

# Vývoj výroby kyseliny citronové

ZDENĚK FENCL

547.477.1

O výrobu kyseliny citronové jako suroviny pro různé druhy průmyslu projevovalo a projevuje lidstvo zájem již desítky let. Kyselina citronová se používá hlavně v potravinářství, ať již k přípravě ovocných šťáv, cukrovinek, ke konzervačním účelům, k práškům do pečiva nebo její soli pro výrobu tavených sýrů. Mimo tento hlavní obor spotřeby se užívá i v řadě dalších průmyslových odvětví. Ve farmacii slouží jednak čistá, jednak ve formě sodné soli jako ústojný roztok při transfusi krve k přípravě krevních konserv. Je součástí řady dalších farmaceutických preparátů a dnes se jí používá jako výchozí látka při výrobě hydrazidu kyseliny isonikotinové, preparátu, který je vedle streptomycinu a PASu dosud nejúčinnějším známým lékem proti různým druhům tuberkulózy. V průmyslu umělých hmot se její estery s nižšími alkoholy přidávají do některých plastických látek jako změkčovadla, i když její volná hydroxylová skupina způsobuje určitou rozpustnost esterů ve vodě, čímž dochází k postupnému tvrdnutí plastické hmoty. Možnosti využití kyseliny citronové nebo jejích derivátů jako výchozí látky pro přípravu umělých hmot jsou ještě v počátcích. V jiných oborech (na příklad v koželužství) se již dříve uvažovalo o jejím použití při odvápnování kůží, neboť dobře rozpouští sádro.

Fries [1] odhaduje, že spotřeba kyseliny citronové ve světě se zhruba dělí mezi tyto sektory:

potravinářský průmysl	60 %
umělé hmoty, změkčovadla	15 %
textilní průmysl a kožářství	10 %
farmaceutický průmysl	5 %
zušlechťování kovů	5 %
ostatní	5 %

Přírodním i prvním zdrojem pro výrobu této kyseliny byly citrony, ve kterých byla objevena slavným chemikem Scheelem v roce 1784 a odtud byl také odvozen její název. K výrobě se využívaly většinou méněcenné plody citrovníku, z nichž se lisovala šťáva obsahující 6–8 % kyseliny citronové. Ze 100 kg citronů se vylisuje asi 40 kg šťávy [2]. Vápenným mlékem se ve šťávě vysráží vápenatá sůl kyseliny. Protože teplem klesá rozpustnost citraňů vápenatého, provádí se srážení za varu. Po filtraci se citran rozloží kyselinou sírovou a po vyloučení sádry se roztok kyseliny citronové ještě zbaví nečistot a krystaluje na zrno. Vedle kyseliny citronové se při této

výrobě získávají též eterické oleje a v moderně vedených závodech i pektin.

Původním výrobcem byla Itálie, odkud se vyvážela buď kyselina, nebo citran vápenatý do celého světa. Později se USA snažily osamostatnit ve výrobě kyseliny citronové tím, že vysázely veliké citrovníkové háje v Kalifornii. Anglie opět zakládala háje v koloniích, na příklad v britském Hondurasu i jinde. V kontinentálních zemích se také zakládaly háje citrovníků a výroba citranu vápenatého se zaváděla ve Španělsku, Řecku a na Blízkém Východě v Palestině.

Současně se pro výrobu kyseliny citronové začaly používat i jiné suroviny, jako na příklad v Kalifornii odpady při konservování ovoce, v SSSR odpady při výrobě tabáku. Vypracování této výroby je dílem prof. Šmuka a jeho spolupracovníků [3] z období před druhou světovou válkou. Spočívá na zjištění, že tabák obsahuje v průměru asi 7,5 % kyseliny citronové v sušině. Výroba byla zavedena po roce 1930.

Mohutný rozvoj produkce kyseliny citronové i rozvoj jejího použití nastal teprve až po úspěšném vyřešení výroby této kyseliny kvasnou cestou. Původním teoretickým základem byly práce Wehmera [4], který zjistil, že určité plísňe z rodu *Citromyces* jsou schopny produkovat značná množství kyseliny citronové zkvašováním cukru. Jako citrotvorné uvádí *Citromyces Glaber* a *Citromyces Pfefferianus*. Dokonce se Wehmer pokusil o průmyslovou výrobu v městě Thann v Elsasku způsobem povrchového kvašení. Pokusy však skončily neúspěšně pro řadu obtíží, jako byla na příklad otázka vhodného materiálu pro kvasné misky, silná infekce a pod.

Podstatným přínosem byly práce Currie [5], který začal používat ke kvašení jako mikroorganismu vůči infekcím vysoce odolnou a rychle rostoucí plíseň *Aspergillus niger*. Tuto plíseň Wehmer pokládal za schopnou vytvářet pouze kyselinu štavelovou. Currie tím, že podstatně snížil počáteční pH kvasného media do značně kyselé reakce, nejen že zabránil vzniku infekcí, takže bylo možno zkvašovat i nesterilní substrát, ale zároveň posunul sled reakcí u plísně ve směru tvorby kyseliny citronové.

Po roku 1920 se během krátké doby vytvořilo několik pracovišť, na kterých byla kvasná výroba kyseliny citronové věnována soustavná pozornost. Byly to USA, SSSR, Polsko, Československo, Belgie a Anglie.

Currie vytvořil v USA kolem sebe skupinu spolupracovníků, kteří položili základ kvasné výroby kyseliny citronové ve Spojených státech. Nezávisle na nich byla vybudována výroba v Belgii v Tirlemontu. Oba závody zahájily produkci kolem roku 1930. Na základě prací *Butkeviče*, *Kostyčeva* a jejich škol byl v roce 1935 uveden do chodu první speciální závod na výrobu kyseliny citronové v Leningradě. Rovněž samostatně byl vyřešen problém výroby v Anglii.

Všechny uvedené výroby pracovaly povrchovým způsobem, zkvašovaly syntetický substrát, jehož základem byla sacharosa. Optimální množství sacharosy v mediu se pohybuje od 10–20 %. Ke kvašení se používají uzavřené kvasné komory, v nichž se udržuje teplota obvykle kolem 30 °C, reguluje se množství procházejícího vzduchu a jeho vlhkost. Kvasné misky jsou v těchto místnostech upevněny buď na stabilních konstrukcích, nebo lze celé konstrukce z komory vyvážet do manipulačního prostoru. Výška substrátu v kvasných miskách je různá a pohybuje se obvykle od 4 do 10 cm. Očkuje se různým způsobem: vodní suspensí spór *Aspergilla*, nebo rozprašováním spór do vzduchu. Za dva až tři dny se vytváří v miskách na substrátu souvislý povlak mycelu, který pak během dalších pěti až deseti dnů zkvasí přítomný cukr na kyselinu citronovou. Podle použitého kmene plísně a podle složení media se vytváří někdy značné množství kyseliny glukonové nebo šťavelové. Kyselina šťavelová se izoluje z vykvašených louhů předem, vysrážením jako vápenatá sůl. Kyselina glukonová znamená obvykle ztrátu, neboť jde do odpadu.

Při dávkování ostatních živin (mimo cukr) je třeba do substrátu přidat jen taková množství těchto látek, aby dostačovaly k vytvoření mycelu, ale aby během prvních dvou až tří dnů byly spotřebovány. Tím je plísni zabráněno využít další cukr pro svůj růst a vlastně za nepřírodných podmínek vytváří kyselinu citronovou jako produkt nedokonalé asimilace cukru, která by měla za normálních podmínek probíhat až na tvorbu kyslíčnicku uhličitého.

V SSSR již v roce 1937 [6] přešli na tak zvaný směnný způsob výroby, kdy plíseň vyrůstá na živné půdě, tato půda se během dvou až tří dnů stáhne a pod mycel se podlijí kvasná půda bez stopových prvků a s omezeným množstvím neuhlíkatých živin, po případě bez nich. Tím, že mycel pracuje kolem 18 dnů a po vysrážení kyseliny citronové se neprokvašený cukr vrací ve formě podlivu pod mycel, dosahuje se velmi ekonomického způsobu výroby.

V Československu byla výroba kyseliny citronové vybudována nezávisle na cizině [7]. Zatím co se v zahraničí všude pracovalo s čistou sacharosou, byl u nás již v roce 1929 Dolovými a průmyslovými závody, dříve J. D. Stark — nyní Chemické závody Julia Fučíka v Kaznějově — postaven závod, který ke kvasné výrobě kyseliny citronové používal jako zdroje cukru řepnou melasu, t. j. surovinu daleko levnější než je čistá sacharosa. Byl to tehdy nejpokrokovější způsob výroby. Výzkumné práce byly zahájeny na podkladě patentu *Szucse* [8], který byl zakoupen v roce 1924. Dalším propracováním, hlavně pak zavedením přísady žluté krevní soli do kvasného media, byla výroba pod vedením *Dr. Kanhausera* přivedena k zdárnému konci a tak se Československo stalo jedním z hlavních producentů kyseliny citronové. Levná výchozí surovina umožnila i výhodnou cenu výrobku a proto se z Kaznějova kyselina citronová vyvážela téměř do celého světa. Československo se stalo velmi rychle v produkci kyseliny citronové světovou velmocí, neboť se u nás

vyrábělo přibližně 10 % světové výroby, a tento podíl na světové produkci si dalším rozšiřováním závodu zachovalo až dodnes. Kaznějovský způsob zkvašování levné suroviny se stal časem vzorem pro téměř všechny závody na světě, které postupně přecházely na výrobu na melase. Přídavek ferrokyanidu draselného do kvasného substrátu, který podstatně zlepšuje průběh kvašení na melase, byl dlouho utajován a teprve po patentové přihlášce *Mezzadrolého* [9] vešla tato úprava substrátu ve známost.

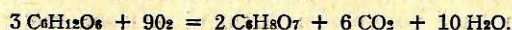
Kvalita melasy (vedle vhodného kmene plísně) je důležitým faktorem úspěšné výroby. Některé melasy jsou pro výrobu nevhodné i při všech dosud známých úpravách. Třtinovou melasu se na příklad velmi dlouho nepodařilo úspěšně zkvašovat a některé závody řešily problém tak, že míchaly v určitém poměru melasu řepnou a třtinovou. *Bernhauero*va škola v Praze se dlouhá léta zabývala hledáním látek v melase, které mají vliv na průběh citronového kvašení, avšak bez velkých úspěchů [10].

Technický rozvoj, který prodělaly od počátku druhé světové války kvasné procesy pracující s plísněmi, projevil se i ve výrobě kyseliny citronové. Snaha dosáhnout co nejekonomičtějšího a neovladatelnějšího způsobu výroby vedla k intenzivním pokusům převést povrchové kvašení na kvašení submersní v kádích. Tyto pokusy se datují téměř od doby, kdy se začalo uvažovat o možnostech výroby kyseliny citronové kvasnou cestou. Tak *Wehmer* v přehledném článku uvádí, že se zkušelo zkvašovat zaočkovaný substrát tím, že se do něho vhněl sterilní vzduch [11]. Pokusy byly bezúspěšné. Naopak se později dokázalo [12], že při pohybu a provětrávání půdy má *Aspergillus* vyšší sklon k tvorbě kyseliny glukonové a později se v Kaznějově s týmiž kmeny, které se používaly povrchové pro citronové kvašení, se stejným úspěchem vyráběla v tancích kyselina glukonová hlubinným způsobem. Úspěchy s aerobní submersní fermentací penicilinu a jiných antibiotik zintensivněly i práci na obdobném způsobu výroby kyseliny citronové. V posledních letech vyšla řada prací i patentů pojednávajících o podmínkách úspěšné hlubinné fermentace [13, 14, 15]. Všechny práce ukazují na to, že hlubinný způsob výroby kyseliny citronové je proti povrchovému daleko citlivější na přítomnost kovových iontů a na ostatní složení půdy. Melasa se musí proto deionisovat na iontoměničích a teprve potom je naděje na úspěšný průběh kvašení. Velkou důležitost má množství procházejícího vzduchu i fyzikální podmínky, za kterých probíhá proces. Nejdůležitější (stejně jako u kvašení povrchového) je najít vhodný, vysoké kyselinotvorný kmen plísně a způsob, jak u tohoto kmene udržet jeho optimální vlastnosti.

Většina publikovaných prací popisuje pouze laboratorní způsob hlubinné fermentace a přenos do provozního měřítka není vždy jednoduchý a úspěšný. Rovněž optimální přísady neucukrných živin uvádějí různí autoři různě, ba mnohdy protichůdně, což se vysvětluje specifitou kmene. Důležité jsou proto poznatky *Zuravského* [16], který ve čtvrtprovozních rozměrech získal 4,4 kg kyseliny citronové ze 110 l půdy, obsahující 15 % cukru. Dá se proto předpokládat, že v SSSR bude brzy uveden do chodu závod vyrábějící kyselinu citronovou hlubinným způsobem. Podle zpráv byla rovněž v USA v posledních letech vybudována výroba kyseliny citronové na hlubinné fermentaci. Přesto se však i nadále budují na

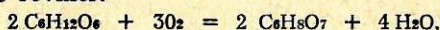
příklad v Jižní i Severní Americe závody, které pracují povrchovým způsobem. To jen dokazuje, že submersní kvašení kyseliny citronové je ještě stále ve stadiu pokusném a že teprve v další budoucnosti lze počítat, že submersní způsob zatlačí povrchovou výrobu do pozadí.

Dosud se při povrchovém kvašení ekonomičtěji využívá cukru (výťažnost se pohybuje mezi 60 až 80 %), úprava melasových roztoků pro kvašení je minimální. Při hlubinném způsobu bývá značný zbytkový cukr a poměrně nákladná je příprava kvasného substrátu. Výhodou však je, že kvašení probíhá rychleji a nepamětně lépe se využije kvasného prostoru. Rovněž manipulace a udržování sterility je při hlubinném způsobu snazší. Reakční pochody, které by přesně osvětlily, jakým způsobem se cukr přítomný v kvasném roztoku oxyduje plísní na kyselinu citronovou, nejsou dodnes přesně známy. Dříve se soudilo [18], že pro kvašení kyseliny citronové platí tato úhrnná rovnice:



Podle ní by teoretický výtěžek kyseliny z hexos činil 71 % a ze sacharosy 74,9 %. Na základě pokusů bylo však stanoveno, že výtěžek kyseliny citronové vztahený na spotřebovaný cukr může dosáhnout až 100 % (17), t. j. více než by odpovídalo teorii.

Žuravský manometrickými pokusy dokázal, že tvorba kyseliny citronové z cukru odpovídá schematické rovnici:



to znamená, že teoretický výtěžek by činil 106,6 % kyseliny citronové z hexos a 112,3 % ze sacharosy. Otázka, zda vytvořená kyselina citronová brzdí další kyselinotvorný proces plísně, není zatím definitivně vyřešena. Bernhauer [18] se domnívá, že vysoce kyselinotvorným kmenům plísně přítomnost kyseliny citronové v substrátu nevaří, naproti tomu Žuravský [19] svými pokusy dokazuje, že kyselina citronová působí na mycel toxicky a snižuje jeho kyselinotvornost. Rozpory patrně spočívají v různých vlastnostech kmenů, se kterými bylo pracováno.

Izolace kyseliny citronové při povrchovém a hlubinném způsobu fermentace je obdobná jako při výrobě kyseliny citronové ze šťávy citronů. Proti citranu připravenému z citronů má citran vápenatý z kvasných louhů tu výhodu, že obsahuje obvykle méně nečistot, takže další zpracování na kyselinu citronovou je jednodušší. Pokusy zachycovat kyselinu citronovou z louhů přímo na iontoměničích, resp. extrahovat ji do organických rozpouštědel, nenašly zatím širšího uplatnění v praxi.

Odpady při výrobě, t. j. mycel, sádra a prokvašené louhy, jsou spíše balastem a zatím se jen v málo případech zhodnocují. Vylouženého mycelu se zčásti používá jako přísady do strojených hnojiv; pokusy využít hodnotu bílkovin obsažených v mycelu pro krmné účely narážejí na potíže, neboť při sporulaci dobytek jej odmítá pro plísnivý pach. Jsou však známy případy, kdy mycel se hydrolysoval a používal pro přípravu polévkového koření.

Odpadající síran vápenatý se dosud většinou již dále nezpracovává.

Melasové odpadní louhy obsahují po vyloučení citranu vápenatého ještě malý zbytek cukru, organických kyselin a řadu jiných organických látek majících původ jednak v melase, jednak v činnosti plísně během citronového kvašení. Pracuje-li se s ferokyanidem draselným, jsou v loužích i jeho

stopy. V Chemických závodech J. Fučíka v Kaznějově se podařilo přizpůsobit kvasinku *Torulopsis* utilis na tyto louhy, takže je lze s úspěchem použít pro biologickou syntezu bílkovin [20].

Stále stoupající spotřeba kyseliny citronové, která zatlačuje do pozadí dražší kyselinu vinnou, vede k silně stoupající produkci kyseliny citronové ve světě. Fries [1] odhaduje její spotřebu přibližně na 35 000 t ročně, z čehož 80 % je kryto kvasnou výrobou a zbytek je rostlinného původu. Je pravděpodobné, že spotřeba je vyšší než odhaduje Fries, neboť v SSSR a v zemích lidové demokratických potávka po této kyselině rychle stoupá. O tom svědčí na příklad rozvoj kvasné výroby kyseliny citronové v SSSR v posledních patnácti letech, jak uvádí Žuravský [6]. Pokládáme-li množství výrobků v SSSR v roce 1938 za rovné stu, potom v roce 1952 stoupla výroba na 800, to znamená, že je osmkrát větší. I u nás v Československu došlo po druhé světové válce k podstatnému zvýšení produkce nejen vlivem vývozu, ale i pro její zvýšenou potřebu v tuzemsku.

#### Literatura

- [1] H. Fries: Schimmelpilzgärungen, Chem. Zeit. 78 (1954), 322.
- [2] Die Entwicklung der Zitronensäureindustrie: Chem. Zeit. 58 (1934), 114.
- [3] A. A. Šmuk, A. I. Mednikov, M. K. Malov: Proizvodstvo nikotina i limonnoj kisloty iz machoročnovo syrja. Piščepromizdat, 1948.
- [4] C. Wehmer: Beiträge z. Kenntnis einheimischer Pilze, Hannover u. Leipzig, H. 1. 1895.
- [5] J. N. Currie: The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*, Journ. Biol. Chem. 31 (1917), 15.
- [6] G. J. Žuravský se společ.: Proizvodstvo piščevych kislot, Piščepromizdat 1953.
- [7] Dolové a průmyslové závody, dříve J. D. Stark: Čs. pat. 24882, přihláš. 1924 a čs. pat. 34924, přihl. 1927.
- [8] J. Szücs: Öster. pat. 101009 z r. 1923.
- [9] G. Mezzadrolí: Ital. pat. 355081 z r. 1937.
- [10] K. Bernhauer, J. Rauch a G. Gross: Über die Säurebildung aus Zucker durch *Aspergillus niger*: Die Zitronensäurebildung aus Zuckerrübenmelasse in der Oberflächenkultur — Biochem. Zeit. 319 (1949), 499.
- [11] C. Wehmer: Über Zitronensäuregärung Chem. Zeit. 36 (1912), 1106.
- [12] R. Schreger: Säuerungsversuche mit dem Pilz *Aspergillus fumaricus*, Biochem. Zeit. 202 (1928), 131.
- [13] J. Szücs: USA pat. 2,438.136 z r. 1948, přihl. 1946.
- [14] P. Schuand, M. Johnson: Citric acid production by Submerged Fermentation with *Aspergillus niger*, Ind. Eng. Chem. 40 (1948), 1202.
- [15] E. Karow, S. Waksman: Production of Citric Acid in Submerged cultur, Ind. Eng. Chem. 39 (1947), 821.
- [16] G. I. Žuravský: Glubinnij sposob polučeniya limonnoj kisloty s pomošču gríbov roda *Aspergillus*, DAN SSSR 80 (1951), 797.
- [17] V. S. Butkevič, M. S. Gajevská: Vychody limonnoj kisloty iz sachara kak osnovanije dlja ocenki schemy jejo obrazovanija iz poslednovo, DAN SSSR 3 (1935), 405.
- [18] K. Bernhauer: Biochemie der oxydativen Gärungen, Ergebnisse der Enzymforschung 3 (1934), 185.
- [19] G. I. Žuravský: Vlijanie svobodnoj limonnoj kisloty na process kislotoobrazovanija u gríba *Aspergillus niger*, Mikrobiologia 19 (1950), 65.
- [20] J. Leopold, Z. Fencl: Čs. pat. 85048 a 85486.