

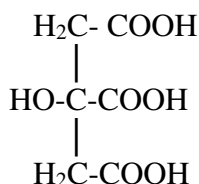
1. Szerves savak gyártása

A szerves savak globális termelését 2007-ben közel 16 millió tonnára becsülték, ebből kb. 2 millió tonna készült fermentációs eljárással. A szerves savak termelése évente kb. 5%-kal növekszik. A szerves savak a harmadik legnagyobb csoportot képviselik a fermentációs termékek között. A megújuló szénforrásokból mikrobiális folyamatokkal előállítható, sokféleképpen továbbalakítható platform molekulák jó példái a szerves savak. Hagyományosan ezeket egyes baktériumcsoportok (például ecetsav és tejsavbaktériumok) és fonalas gombák (például *Aspergillus niger*) felhasználásával termelik.

E savak elsődleges anyagcseretermékek, bioszintézisük az energiatermeléshez vagy a növekedéshez kötött. A savtermelés általában hiányos anyagcserét jelez – a szénforrás oxidációja nem megy végig szén-dioxidig és vízig. Anaerob organizmusoknál nem az oxidáció hiányos, hanem éppen a redukció áll meg karbonsav szinten, a molekula nem hidrogéneződik tovább oxo-vegyületté vagy alkohollá (tejsavas, kevertsavas erjedés).

1.1. CITROMSAV

A citromsav, a 2-hidroxi-1,2,3,-propántrikarboxil sav a második legjelentősebb fermentált ipari termék az etanol után. Fehér, kristályos, kellemesen savanyú ízű anyag. Háromértékű karbonsav, sóinak nagy a pufferkapacitása, a három disszociációs lépcső miatt széles tartományban használható. Komplexképzésre hajlamos, ezáltal fémionok megkötésére alkalmas. Nem korrozív, de elég erős sav. Biológiaiilag bontható, a citrát pufferek bepenészedésre hajlamosak. Vízben jól oldódik; oldata kellemes savanyú ízű.



Összegképlete: $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ molekulatömege: 192 g/mol, 36 fok alatt egy kristályvízzel kristályosodik.

1.1.1. Előfordulása

A trikarbonsav (vagy Szent-Györgyi-Krebs) ciklus része, ezért szinte minden sejtben előfordul. Egyes citrusfélék (lime, citrom) félig érett termésében a szárazanyagnak akár a 8%-át is elérheti a citromsav, a XX század közepéig ebből nyerték ki nagyobb mennyiségben.

1.1.2. Felhasználás

Élelmiszeripar: élelmiszerekben elsősorban savanyúságot szabályozó anyagként, ízesítőszerként alkalmazzák (sav-cukor arány beállítása) E330 kódnéven. A létrehozott savas közeg tartósít, lassítja az élelmiszerek romlását. Emellett antioxidánsként is használják, bár önállóan nincs ilyen hatása, de elősegíti a többi antioxidáns hatását. Gyümölcsök esetében késlelteti az oxigén hatására történő elszíneződést. Napi maximum beviteli mennyisége nincs korlátozva.

Adalék: A citromsavat az élelmiszeriparban széles körben használják, mint sokoldalú, többfunkciós élelmiszeradaléket. Teljesen biztonságos, korlátozás nélkül megkapta a GRAS (generally recognised as safe) minősítést. Ételekben és italokban savanyító, tartósító, pH szabályozó, ízfokozó, kelátképző, stabilizáló és antioxidáns adalékként szolgál. Nagyon jól oldódik, így tömény szirupokban is alkalmazható. A citromsavat és más szerves savakat sok élelmiszer sav-cukor arányának (pontosabban a savanyú és édes íz arányának) beállításához használják. Az ízek arányát optimálják az üdítőitalok, gyümölcs- és zöldséglevelek, lekvárok, szörpök, cukorkák, egyes fagyaltok, bor és a boralapú italok, almabor, és konzerv gyümölcs készítésénél. Mivel a citromsav sok gyümölcs természetes összetevője, jól illeszkedik az ízek közé és hatékonyan hozza ki az aromákat. A nátrium-citrát forma szerepe is hasonló egyes italokban, különösen a citrom és lime alapúakban. Kelátképzőként megköti a fémionokat és ezzel megakadályozza a fémkatalizált barnulási és ízromlási folyamatokat. Lecsökkenti a pH-t, ezzel késlelteti a romlást okozó organizmusok növekedését.

A pH csökkentése megváltoztatja az élelmiszerek tulajdonságait, ezzel a feldolgozási paramétereket, például a főzési időt és hőmérsékletet. Az alacsony pH a legtöbb enzim aktivitását is lecsökkenti, ezzel is lassítja a romlási folyamatokat. 0,1-0,3% citromsav hozzáadása megakadályozza a fagyasztott és konzerv gyümölcsök és zöldségek színének és ízének romlását. Ha friss zöldségeket 1-2%-os citromsav fürdőbe merítenek 30 másodpercre, az 2-4 órával késlelteti barnulást. A lekvárok, zselék és édes töltelékek készítésénél a citromsav tartósítószerként szolgál. Az alacsony pH, 3,0-3,5 alatt a zavarosságot okozó pektineket kicsapja.

A nátrium-citrátot is széleskörűen alkalmazzák, például tejtermékekben. Stabilizálja az emulziókat, megakadályozza a zsír elválását. A sajtoknál javítja és egységesíti textúrát, csökkenti ragadóságot az íz befolyásolása nélkül.

Gyógyszeripar: elősegíti a kalcium és vas bevitelét citrát komplex formájában, Na-sója véralvadásgátló hatású (megköti a kalciumot a vérből), kozmetikumokban tartósítószerként is használják.

Műanyagipar: citromsav észterek: lágyítók (vinil- és cellulózgyantákhoz)

Fémipar: felületek tisztítása, rozsdamentesítés, passziválás (salétromsav helyett, ahol ez nem alkalmazható), galvánizáló fürdők adaléka.

Tisztító- és mosószer: víz lágyítására használják polifoszfátok helyett, mert nem okoz eutrofizációt (a foszfát alapú vízlágyítókat egyes országokban be is tiltották).

1.1.3. Története

A citromsavat először Scheele izolálta citromléből 1784-ben. A következő 100 évben az olaszok a citrom szállításával gyakorlatilag monopolizálták a termelést és ettől a termék drága maradt. Kivonása az éretlen citromból a XX század közepéig gazdaságos technológia volt. Egy tonna citromsavat kalcium-só formájában 40 tonna citrom préslevéből nyertek ki. Wehmer 1893-ban véletlenszerűen észlelte, hogy egyes, a citrus növényeken élő fonális gombák citromsavat termelnek. Egy kalcium-oxalátot előállító törzs tenyésztésében melléktermékként észlelte a citromsav megjelenését. Wehmer felfedezésének gyakorlati jelentőségét felismerve később főtermékként citromsavat termelő gombákat keresett és talált, majd ezeket a mikroszkópos gombákat új genus-ként, a *Citromyces* nemzetség tagjaiként írta le 1903-ban. A részletes rendszertani vizsgálatok később kiderítették, hogy a törzsek valójában a *Penicillium* nemzetségbe sorolandók.

1913-ban Zahorsky jelentette be az első *Aspergillus niger*-rel végzett citromsav termelésre vonatkozó szabadalmat.

1917 A citromsav termelés ipari megvalósíthatóságát biztosító felfedezés Currie nevéhez kapcsolódik. Az *Aspergillus* nemzetség savtermelő képességét vizsgálva megállapították, hogy ezek a gombák savanyú kémhatású táptalajon is növekednek, és ez a savanyú környezet a citromsavképződésnek is kedvez. Ilyen savanyú (pH=1,5-2) körülmények között a baktériumos fertőzés már nem zavarhatja a folyamatot, sőt pH=2 alatt, a növekedés részleges gátlása fokozza is a citromsav képződést. Az optimált és nagyipari méretben is biztonságosan megva-

lósítható technológia felületi tenyészetben viszonylag rövid idő (1-2 hét) alatt a szénhidrát tartalomra számolva 60 % feletti citromsav hozamot eredményezett.

1919-ben készült el az első citromsavat termelő üzem Belgiumban. Ezt követte a Pfizer üzemének a felépítése az USA-ban Currie eredményei alapján (1923). Angliában a Rown-tree Ltd. - saját szabadalmát használva - 1927-ben indította meg a citromsavtermelést.

1928-ban melaszt hasznosító eljárásra épült üzem Csehországban, Kaznejovban, német szabadalom alapján. Ez azonban új nehézségeket is okozott a melaszban lévő fémionok zavaró hatása miatt. Erre talált megoldást Leopold, aki a káros vas ionokat K-ferrocianiddal kötötte meg.

Később nagy kapacitású citromsav üzemek épültek Németországban, a Szovjetunióban és más európai országokban. Ezek az üzemek mind felületi tenyésztéssel termelték a citromsavat, mégpedig olyan olcsón, hogy a citromléből történő citromsav előállítás elsorvadt. Az olcsó ipari termék már nem csak az élelmiszeriparban, de a vegyipar más területén is felhasználásra került.

A második világháború után fokozódott az érdeklődés a citromsav iránt. A piac igényeit csak újabb üzemek építésével lehetett kielégíteni. Ezek az üzemek azonban már új technológiát alkalmaztak, a szubmerz, levegőztetett eljárást (1950-ben Perquin, Kluyver Laboratory)

A foszfát limitáció hatását, illetve annak megszüntetését hazánkfia, Szűcs János írta le, igaz, az Egyesült Államokban (1944-48).

Érdekes kitérő a technológiai fejlesztésben, hogy a cukor helyett n-paraffinon (kőolaj alapon) is megoldották a citromsav gyártást, *Candida lipolytica* törzs alkalmazásával. Termelő üzemet is építettek Szardínia szigetén, de a kőolaj árának növekedésével a gyártás gazdaságtalanná vált.

1.1.4. Termelés

A citromsav termelési volumenének intenzív növekedését mutatja be az alábbi adatsor:

1. táblázat A citromsav termelés növekedése

Évszám	termelés, t/év
1929	5 000
1953	50 000
1976	200 000
1980	350 000
2007	1 600 000
2014	1 850 000

A világon évente mintegy 1,85 millió tonna citromsavat termelnek, ezen belül 1,05 millió tonna származik Kínából. Magyarországon 2014. szeptember 9-én tették le a Szolnokon épülő citromsav gyár alapjait, ahol 60 ezer tonna terméket kívánnak előállítani. A Kazincbarcikán épülő gyárban évi 100 ezer tonna előállítását tervezik. Az üzemek elkészülte esetén a világtermelés 8 %-a származik majd Magyarországról.

A piacvezető Kínán kívül ott vannak a piacon a történeti részben említett országok és cégek:

USA: Pfizer, Miles Lab

Anglia: Sturge Ltd.

Belgium: Citrique Belge (Hoffmann La Roche)

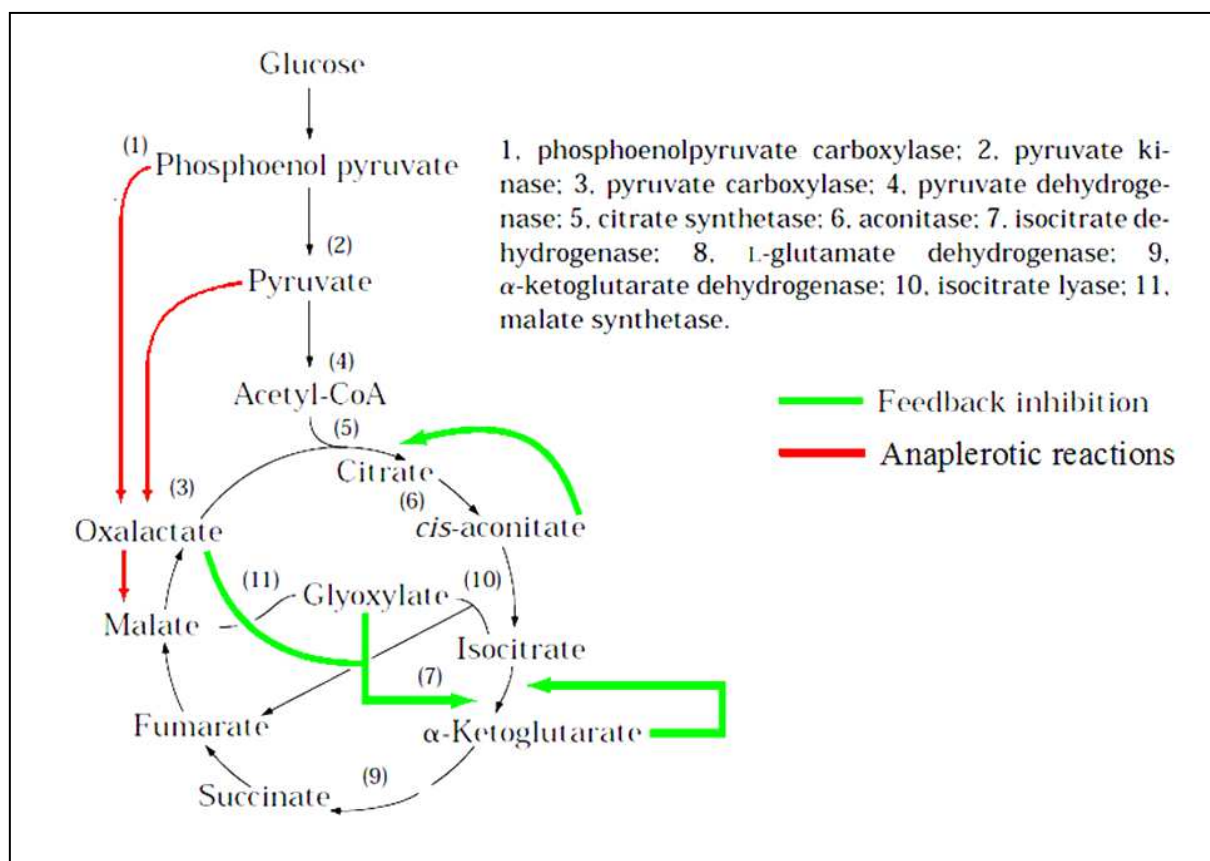
NSZK: Benckiser, Boehringer

Ausztria: Jungbunzlauer

Olaszország, Spanyolország, Törökország, Lengyelország, Jugoszlávia

1.1.5. Bioszintézis

A citromsav a citrátkör indító lépésének terméke: oxálacetátból és acetyl-CoA-ból alakul ki. A körfolyamatban a citrát molekula tovább alakul és az acetyl csoporttal belépett két szénatom szén-dioxidok formájában lép ki a rendszerből. A gyártás célja viszont az, hogy a citrát ne alakuljon tovább, hanem lépjen ki a mitokondriumból és a sejtéből is, és nagy mennyiségben halmozódjon fel a fermentáléban. A citromsav elvonásával viszont a citrátkör nem zárul, nem alakul ki az oxálacetát templát a következő ciklus indításához. Ezeket az intermediereket az anyagcsere más folyamataival kell pótolni a sejtnek, ezeket a folyamatokat nevezzük anaplerotikus, vagy feltöltő anyagcsereutaknak. Ezek foszfo-enolpiruvátból és piruvátból széndioxid fixálással karboxilezve állítanak elő oxálacetátot illetve malátot.

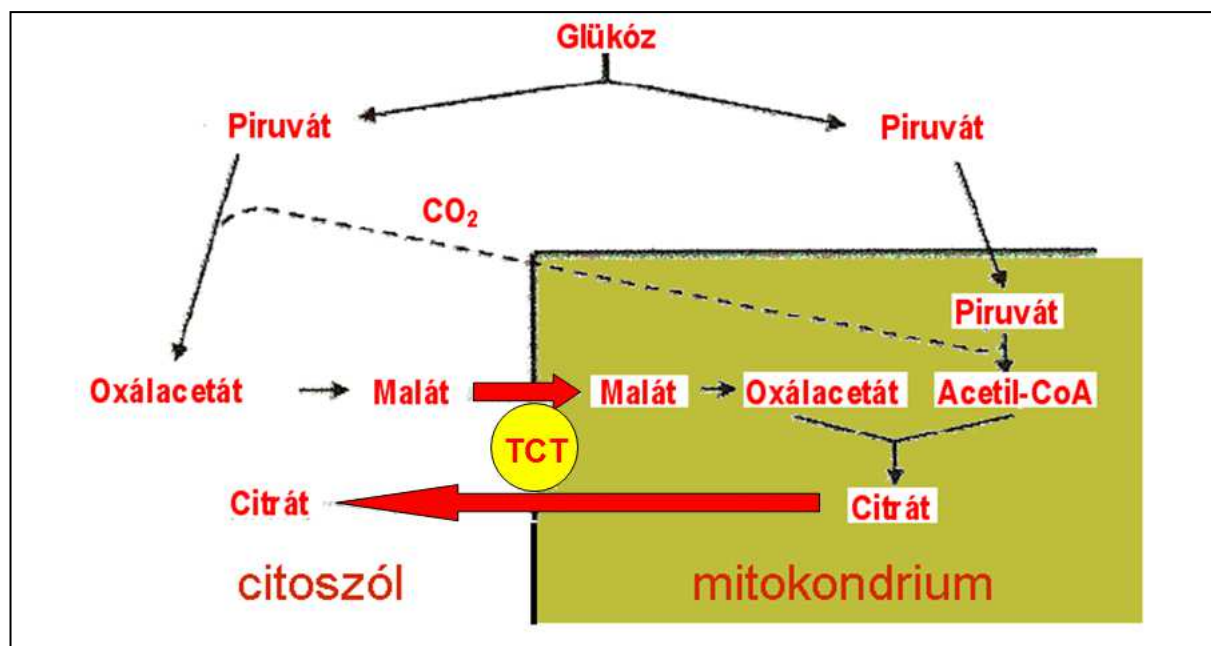


1. ábra A citrátkör az anaplerotikus utakkal

A szén-dioxid anaplerotikus megkötését a piruvát karboxiláz enzim katalizálja. Az enzim eukariótákban jellemzően a mitokondriumban található, de az *A. niger*-ben mitokondriális és citoszolikus formája is létezik. Az utóbbi működése miatt az anaplerotikus szén-dioxid megkötés (vagyis az oxálecetsav kialakulás) nagyrészt a citoszolban megy végbe.

Az egy molekula glükózból képződő két piruvát molekula sorsa a szén-dioxidon keresztül kapcsolódik össze. A dekarboxilezéssel felszabaduló szén-dioxid felhasználódik az oxálacetát képződésénél. Így a kiindulási glükóz molekula mind a hat szén atomja bekerülhet a citromsavba.

A citoszolban található malát dehidrogenáz enzim jóvoltából az oxálecetsav maláttá (almasavvá) alakul. Ez a citrátkör szempontjából visszafelé menő reakció. A reakció NADH-igényét a glikolízis fedezi. Az *A. niger*-ben tehát a glikolízis végterméke a citoplazmában nem piruvát, hanem malát.



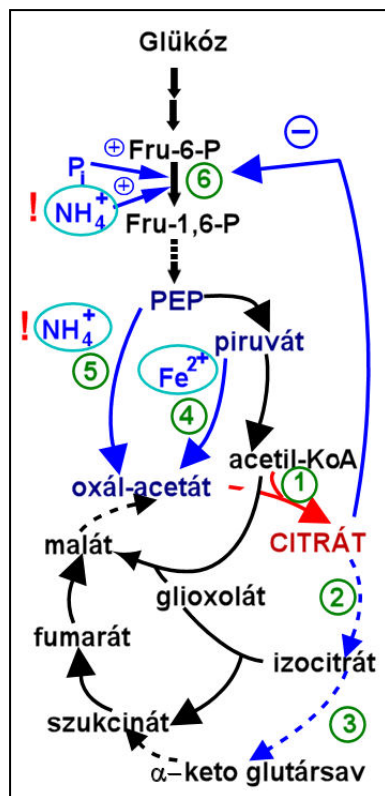
2. ábra A citrát kilépése a mitokondriumból antiporttal

Az eddig tárgyalt primer metabolitok esetében indukált mutációval állították meg az anyagcsere-folyamatokat, hiánymutánsok létrehozásával kényszerítették ki a céltermék felhalmozódását. A citromsav esetében erre nincs szükség, a citromsav-ciklus összes génje és a róla átíródó enzimek is hibátlanul működnek túltermelő körülmények között is.

Az *A. niger*-ben a túltermelést más mechanizmus okozza: a mitokondrium membránjában megtalálható egy trikarbonsav karrier enzim, mely antiporttal szerves savakat cserél ki a mitokondrium és a citoszol között. Működéséhez egy szerves savat igényel viszonylag magas koncentrációban, emiatt általában inaktív. Az *A. niger*-ben azonban cserepartnerként szolgál az a malát, ami az anaplerotikus reakció termékeként feldúsul a citoplazmában. A malát hatására a transzporter aktiválódik és kiviszi a citrátot a mitokondriumból. Összehasonlítva az akonitáz és a transzporter reakciósebességét, ez utóbbi nagyságrenddel gyorsabb, így a citromsav nagy részét kiviszi a mátrixból. A cserébe bevitt malát pedig oxálacetáton keresztül citromsavvá alakul.

A citromsavon kívül melléktermékek is megjelenhetnek. Az oxálecetsav a sejtben elbomolhat oxálsavra és ecetsavra. Emellett az *A. niger* mindig termel glükóz-oxidázt, amely a nagy koncentrációjú glükózból és oxigénből glükonsavat képez (lásd a glükonsav fermentációnál).

A megtermelt és a citoplazmába transzportált citromsavat ki is kell vinni a sejtől, ráadásul úgy, hogy a koncentráció a fermentlemben sokkal nagyobb (10-12%), mint a citoplazmában. Ennek megfelelően a citromsav aktív transzporttal, energia befektetésével lép ki a sejtől. Rásegít a folyamatra a nagy különbség a lé (pH=2) és a citoplazma (pH=6-7) aciditása között. A permeázok a kétértékű citrát²⁻ aniont szállítják megfelelően (ez van túlsúlyban a sejtben), míg a kívül, a savas közegben megjelenő, kevésbé disszociált formákat sokkal lassabban. Emellett a citrát-permeáz enzimek Mn²⁺ iont igényelnek, pontosabban a citromsavat kizárólag Mn²⁺ komplex formájában képesek importálni, így Mn²⁺ ion hiányában a permeáz működése egyirányúvá (export) válik. Ezért az ipari fermentációs technológiákban mindig nagyon alacsonyan tartják a mangánion koncentrációt (<2µg/l). Ugyanakkor a mangánhiány fokozza a fehérjék lebomlását, megváltoztatja a lipid bioszintézist, a sejt fal szintézisét, összetételét és morfológiáját is.



3. ábra A citromsav bioszintézist befolyásoló anyagok

1.1.6. Anyagcsere szabályozások

A klasszikus anyagcsere-mérnökség első lépése a reakcióutak, az egymást követő lépések, köztermékek feltérképezése volt. Ennek alapján döntötték el, hogy mely lépéseket célszerű genetikai beavatkozásokkal lezárni, korlátozni vagy derepresszálni. A vizsgálatok következő foka az egyes enzimek tulajdonságainak felderítése, a befolyásoló anyagok, ionok azonosítása. Ennek ismeretében a tápoldat összetételét úgy állíthatjuk be, hogy az enzimaktivitásokat a termékképzés fokozása érdekében növeljük, vagy csökkentjük. A tápanyagok koncentrációjának beállításával szabályozhatjuk a folyamatot. Az 3. ábrán láthatók az anyagcsere térkép legfontosabb elemei. Az enzimek számozása:

- 1) Citrát szintetáz – ennek aktivitása legyen nagy
- 2) Akonitáz – ez a megtermelt citromsavat tovább alakítja, tehát működését le kell lassítani. Mivel a kofaktora a Fe ion, ennek koncentrációját csökkentve az enzim aktivitása csökken.
- 3) Izocitrát dehidrogenáz – ez is citromsav továbbalakítását katalizálja, így a gyártás szempontjából kedvezőtlen.

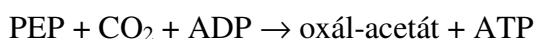
Anaplerotikus reakciók:

- 4) Piruvát karboxiláz: szén-dioxid fixálással a piruvátból malátot hoz létre:



Ez az enzim Mg^{2+} , Fe^{2+} és K^+ ionokat igényel, azaz a vas ionra itt szükség van, nem lehet teljesen elvonni a fermentléből.

5) PEP karboxiláz: analóg módon a C3 egységből szén-dioxid fixálással C4-et hoz létre. Lényeges különbség, hogy míg az előző reakció ATP-t fogyasztott, ez viszont ATP-t termel.



Működéséhez ennek az enzimnek is ionokra (Mg^{2+} , K^+ és Mn^{2+} és ammónium ionra) van szüksége. Így a mangán jelenlétét sem lehet a nullára csökkenteni, parányi, nyomnyi koncentrációban szükség van rá. Az ammóniumion hatása jelentős, ügyelni kell rá, hogy a tenyészet ne kerüljön nitrogén limitbe.

6) Foszfo-fruktokináz

A glikolízis kulcsenzime, a második ATP itt lép be a folyamatba. Evolúciós célszerűség, hogy ha nincs szükség a glikolízis intenzív működésére, akkor a folyamat lefékeződjön. Ne használjon fel a sejt sok ATP-t, ha van elegendő későbbi intermedier. Így a nagy citromsav koncentráció gátolja a foszfo-fruktokinázt (feed back inhibíció). Ugyanakkor a nagy foszfát és ammóniumion koncentráció kompenzálja ezt a gátlást, mégsem fékeződik le a glikolízis, ezzel a citromsav termelés. Azaz e két ion koncentrációját a folyamat során végig magasan kell tartani.

1.1.7. Termelő törzsek

Gyakorlatilag az összes citromsavat az *Aspergillus niger*, és a hozzá nagyon hasonló *A. wentii* törzsszel termelik. Emellett az elmúlt száz évben kidolgoztak *Penicillium citrinum*, *Candida lipolytica* (n-paraffinon), *C. guilliermondii*, *Trichoderma viride* (cellulózon, Kyowa Hakko, J) törzseken alapuló eljárásokat is, de ezek már nem használatosak.

A törzsekkel szemben követelmény, hogy elnyomható legyen az izocitromsav, és glükonsav termelés, valamint működjenek az anaplerotikus reakciók.

A termelő törzsek, változatok screenelésénél a szokásos szelekciós módszerek:

- pH indikátort kevernek az agarba – a színváltozás jelezi a savtermelést;
- a tápoldat pH-ját eleve 1,4–2,0-re állítják be, illetve 20 %-os citromsav oldatot használnak – ilyen extrém körülmények között csak jó termelő törzsek nőnek ki;

1.1.8. Tápoldat

1.1.8.1. Szénforrás

Szénhidrátok: könnyen metabolizálható cukrok, glükóz, fruktóz, szacharóz, vagy az olcsóbb melasz, keményítő hidrolizátum és hulladék szénhidrát tartalmú anyagok.

Az elméleti hozam száz százalék fölötti, glükózra nézve, móltömegekkel: $192/180 = 107\%$, szacharózon 112% ($2 \cdot 192/342$), a valós hozam a sejttömeg képződés és a fenntartási energiaráfordítás miatt csak maximum 92% .

Az önköltség szempontjából kritikus tényező a nyersanyag és az előkezelés költsége. A szacharóz a legalkalmasabb szénforrás, de tesztelték a melaszt, a keményítő- és cellulóz-hidrolizátumot, és trópusi gyümölcsök hulladékait (kakaó, banán, szója és ananász).

Az olyan komplex, tisztítatlan nyersanyagok, mint a répa- és cukornád melasz, a nyers keményítő, keményítő hidrolizátum, nyerscukor előkezelést igényelnek. A melasz kiváló szénforrás, szacharóz tartalma $40\text{--}50\%$ és nitrogén tartalma is elegendő. De problémát jelent, hogy általában jelentős mennyiségű, a répa által a talajból fölvevett fémiont, például a kritikus Fe, Mn és Zn ionokat tartalmaz. Ráadásul a melaszok minősége és összetétele változó.

A fémionokat például ioncserével lehet eltávolítani, de ekkor számolnunk kell azzal, hogy a gyanta kapacitása a gyorsan kimerül más ionok megkötésével.

A fermentáció során a vasionok koncentrációját alacsonyan lehet tartani nátrium- vagy kálium-ferrocianid hozzáadásával. Más hasonló ferro- vagy ferricianid sók is megfelelők, adagolásuk történhet oltás előtt vagy később, a termelő tenyészethez. Ezek a sók összetett anionokat alkotnak a vas ionokkal. A komplexek kicsapódnak, pontosabban oldatossági szorzatuk egy nagyon alacsony vasion koncentrációt állít be.

Szénhidrogénekből ($C_9 - C_{30}$ n-paraffin frakció) *Candida lipolytica* törzsszel jó konverzióval (145% , g citromsav/g paraffin) lehet citromsavat gyártani, de technikai és gazdasági okok miatt az eljárás versenyképtelenné vált. Probléma az alkánok rossz vízzoldhatósága (emulzió képzés) és a nagyobb arányban keletkező izocitromsav. Emellett meg kell szabadulni a szénhidrogén nyomoktól, mert egyesek karcinogének. Az olcsó kőolaj idején, a múlt század hatvanas-hetvenes éveiben gazdaságosan működő gyárat építettek Szardínia szigetén, de az olaj árának ugrásszerű növekedésével az üzemet be kellett zárni.

1.1.8.2. N-forrás

A törzs egyformán jól hasznosítja a szerves és a szerves nitrogén forrásokat: az ammónium és nitrát sókat, karbamidot, a melasz nitrogén tartalmú vegyületeit. A szabályozó mechanizmusoknál már említésre került, hogy az NH_4^+ ionok adagolása növeli a foszfo-fruktokináz aktivitást ezzel serkenti a sejtek növekedését és fokozza a citromsav termelést. Az anyagcsere során az ammónia elfogyasztásával a közeg savanyodik - ez fokozza a citromsav képző-

dést, valamint a pigment és nyálkaképződés is csökken. Ettől tisztább a termék, egyszerűbb a feldolgozás.

P-forrás: az oldható foszfátok deregulálják a foszfo-fruktokinázt, felpörgetik a glikolízist, ezzel elősegítik a citromsav és oxálsav képződést.

1.1.8.3. Nyomelemek:

A Fe, Mn és Zn ionoknak szabályozó hatásuk van a citromsav termelésben kritikus enzimekre. A vasion koncentrációt egy optimális sávban kell tartani, mert egyrészt:

- ha kevés a vas, akkor lassú a növekedés, a cukorfelhasználás és a piruvát-karboxiláz aktivitása csökken;
- másrészt a nagy koncentráció sem jó, mert a vas az akonitáz kofaktora is, a citromsav továbbalakulását fokozza

Az optimális koncentráció a szaporodási szakaszban ~2000 µg Fe/liter, később, a savtermelő szakaszban viszont csak 50-200 µg/l. Melasz szénforrás estében a vastartalmat ioncserével csökkentik. Menet közben a vasionokat K-ferrocianid hozzáadásával lehet megkötni. Ez komplex formában megköti a vasat, és a komplex disszociációs állandója olyan kicsi, hogy a szabad ion koncentráció közelítőleg a kívánt zónába esik. A fémion koncentráció szempontjából fontos a készülékek anyaga is. Ha a fermentor nem jó minőségű rozsdamentes acélból készült, akkor a sav hatására vas és más fémionok oldódnak ki a falából, ami tönkreteszi a fermentációt. A vasionok hatását bizonyos mértékig ellensúlyozni lehet metanol adagolással.

A Mn ion a már tárgyalt módon vesz részt a citromsav importjában, jelenlétében a megtermelt és kiválasztott termék visszaáramlik a sejtbe, ezért is fontos a Mn-szintet 2 µg/l alatt tartani. A melaszt például Mn-mentesíteni kell (ioncserével, a Fe eltávolítással együtt). A mangán káros hatását ellensúlyozni lehet kis mennyiségű rézion adagolásával.

A nyomelemek koncentrációja és aránya befolyásolja a gombafonalak morfológiáját, a pelletképződést is.

1.1.9. Technológiák

Ipari méretekben a citromsavat felületi, szubmerz, és szilárd fázisú fermentációval gyártják. A tápoldat főkomponense valamilyen szénhidrát, kiegészítve szerves vagy szerves nitrogén forrással és megfelelően összeállított ásványi sókkal.

1.1.9.1. Felületi fermentáció

Ez volt az első ipari gyártás, amit 1920 körül dolgoztak ki. Annak ellenére, hogy azóta kifinomultabb és hatékonyabb technológiákat fejlesztettek ki, ezt még mindig alkalmazzák a meglévő üzemekben, mert az energia költségek alacsonyabbak, mint a szubmerz eljárásnál. Ugyanakkor az élőmunka igény viszont magasabb. A jelenlegi gazdasági helyzetben egy új üzem létesítése erre a technológiára nem gazdaságos. Sok technológiai részletet szabadalmaztattak, illetve titokban tartanak. A felületi fermentációnál a micélium sekély tálcákban lévő tápoldat felületén alkot szöveteket. A tálcák felülete 5-8 m², a tápoldat 5-20 cm-es réteget alkot benne. Anyaguk tisztaságú alumínium vagy rozsdamentes acél, mert a savas közeg más fémekből a fermentációra káros fémionokat old ki.

A tálcákat egymás fölött állványokon helyezik el olyan kamrákban, amelyek kialakítása lehetővé teszi a közel aszeptikus (az adott folyamatra ártalmas mikrobáktól mentes) működést. A tálcák egymás fölött, egy sterilen zárt, de állandó levegő befúvatással ellátott kamrában helyezkednek el.

Cukor szénforrásnál a koncentrációt 20-25%-ra állítják és a tálcákba való kitöltés után a citromsav termelő gombatörzsek spóráival beoltják. A kezdeti pH-t általában 3,5-re állítják, mivel ilyen körülmények között a befertőződéstől nem kell tartani és az oxalát képződése minimális.

Melasz szénforrás használata esetén a tápoldatban hígítással 15% erjeszhető cukor koncentrációt állítanak be. A fémionokat eltávolítják és a tápközeget általában forralással sterilizálják. A folyadékot lehűtés után a tálcákba szivattyúzzák.

Az oltás megoldható közvetlenül spóra szuszpenzióval (100-150 mg spóra/m²) vagy a levegővel befúvatott spórákkal. A nagy spórakoncentráció az oltásnál lerövidíti a termékképzés előtti növekedési szakaszt és a morfológiát inkább a fonalas növekedés irányába tolja el a pellet képződés rovására.

Sok törzsnél a sporuláció fellépése csökkenti vagy gátolja a citromsav képződést. Ennél fogva a körülményeket úgy állítjuk be, hogy a micélium hosszabb ideig növekedjen a spórázás megindulása nélkül. Ez az ammónium ion koncentráció növelésével és nemionos detergenssek hozzáadásával érhető el. A folyamat általában 8-12 nap alatt játszódik le. A lé feldolgozásának első lépése a micélium elválasztása a folyadéktól.

Félfolytonos fermentációnál friss tápoldatot adnak a micélium szövetekhez, ezáltal csökkentik a lag szakasz hosszát az egymást követő ciklusokban. A micélium ismételt használata attól függ, hogy a törzs mennyire hajlamos autolízisre az elsődleges növekedési fázisban.

Érdekes változata a felületi technológiának a többlépcsős fermentáció. Ennél a lé az egymás fölötti tálcák között gravitációsan folyik lefelé és a legalsóról elvett levet dolgozzák fel.

A tálcák között folyamatosan steril levegőt fúvatnak át. A levegőztetésnek az oxigénellátáson túl több funkciója is van, így elviszi a termelt széndioxidot és hőt. A befűjt levegőt nedvesítik, mert különben jelentős mennyiségű párat vizs magával, és ezáltal jelentőssé válik a bepárlódás, két hét alatt akár a víz 30-40%-a is elpárologhat.

A konverzió hatásfoka cukorra számolva 65-75 %, a „reaktor” produktivitása 7-8 kg citromsav/m³*nap. Alacsonyabb, mint a szubmerz eljárásnál, de a költségek is kisebbek.

1.1.9.2. Szilárd fázisú fermentáció

A szilárd fázisú fermentáció (solid state fermentation, SSF) a környezet szempontjából előnyös, mert csökkenti a hulladék kibocsátást. A különböző mezőgazdasági és ipari szénhidráttartalmú hulladékok hozzáadott értéket tartalmazó termékekké alakíthatók. Ez egy egyszerű technika, mellyel a szilárd hulladék anyagokat, mint a rostok, szalma, korpa stb. szubsztrátként hasznosítjuk egy vagy több cellulózbontó törzs szaporításához. A megfelelő termelékenységhez meg kell oldani a megfelelő levegőztetést, ezzel a metabolikus hő eltávolítását és a páratartalom szabályozását. Nagyon fontos a szemcseméret a megválasztása. Kisebb részecskeméret növeli a kitermelést és csökkenti fermentációs időt. Az SSF kultúrák nem érzékenyek a fémionokra, ezek nagyobb koncentrációban sem zavarják a citromsav termelést.

Az SSF fermentációkat legtöbbször tálcákon hajtják végre. A szilárd anyagot gőzzel sterilizálják, majd a felületére permetezik a spórákat. A tenyészetet 10-15 napig nevelik a szubsztrát bonthatóságától és a lebontási sebességtől függően. A penészgombák már a spórák csírázásától kezdve extracelluláris enzimeket, például cellulázokat és amilázokat választanak ki. Ezek a szilárd szubsztrát szénhidrát tartalmát monoszacharidokká bontják és ebből alakul ki a citromsav. Különleges szubsztrát a cukornád bagassz, a cukros lé kipréselése után megmaradó növényi szár, ami még szacharózt, azaz könnyen bontható cukrot is tartalmaz, ami könnyen citromsavvá alakítható.

1.1.9.3. Szubmerz fermentáció

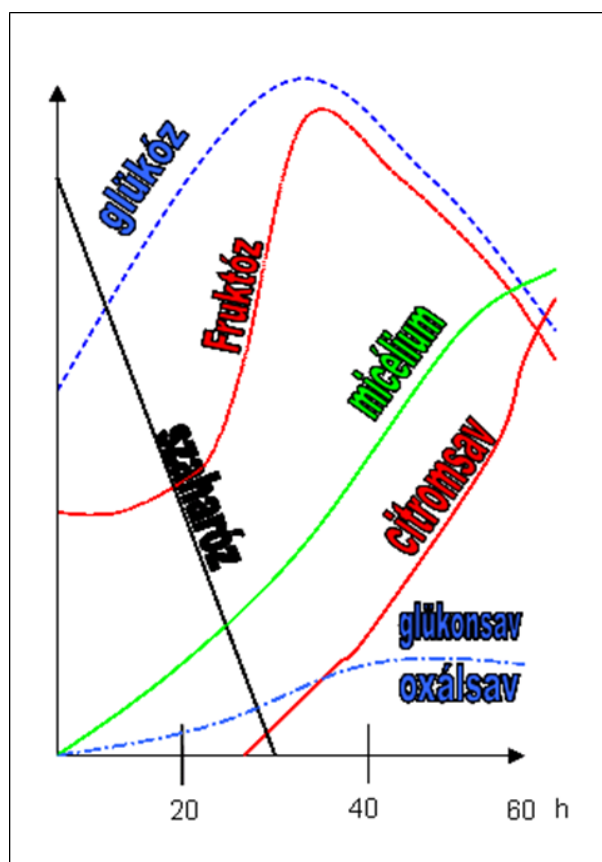
A világ citromsav termelésének túlnyomó részét szubmerz fermentációval állítják elő. Ennek számos előnye van a felületi vagy az SSF tenyésztéshez képest, így kisebb a munkaerőigény, nagyobb a konverzió és a produktivitás, kevesebb a befertőződés, stb.

Ipari léptékben az *Aspergillus niger* törzseket használják citromsav termelésre. Szubmerz tenyésztésben szigorúan szabályozott környezeti körülmények között, pelletes formában szaporítják. A tápoldat jellemzően 15-20% fémion-mentesített cukrot tartalmaz, ami általában melasz, szacharóz, glükóz vagy fruktóz. Nitrogén forrásként ammónium-szulfátot vagy ammónium-nitrátot használnak, és ezek koncentrációját pontosan az optimális értékre állítják. A nyomelemek koncentrációját is pontosan be kell állítani, különösen a vas, cink, réz és mangán ionokét. Kritikus a mangánion koncentrációja, ezt 2 µg/l (2 ppb = 2 parts per billion) alatt kell tartani.

A fermentor beoltása történhet konidiummal (spórákkal) vagy vegetatív sejtekkel (pellet). Ez utóbbi esetben a lag szakasz és az egész fermentáció mintegy 12 órával lerövidül.

A fermentációs idő a szénforrástól függ, lehet 5-8 nap, de elnyúlhat 10-15 napra is. A fermentáció során előbb egy növekedési szakasz figyelhető meg, a cukorhasznosítás a sejtömeg növekedését szolgálja (2-3 nap pelletképződés). Azután a termékképzési fázis (5-8 nap) során az intenzív citromsav termelés mellett csak kis sejtnövekedés észlelhető. Hossza függ a cukor koncentrációtól, adagolástól, a használt törzstől. Az átállásnál K-ferrocianid betáplálással csökkentik le a vasion koncentrációt.

Az ábrán láthatók a citromsav fermentáció egyes paramétereinek időbeli változásai. A szacharóz invertálódása mintegy 30 óra alatt végbemegy. A felszabaduló glükóz koncentrációja eddig a pontig emelkedik, ezután csökken. Az invertálódással képződő fruktóz átmenetileg eltűnik a diagramról, mert polimerizálódik a transz-fruktoziláz enzim hatására, majd visszaalakul és görbéje a glükózéval együtt halad. A micélium és a melléktermékek koncentrációja egy inflexiós S-görbe mentén növekszik. A citromsav csak az első 30 óra után jelenik meg, ezután meredekebben növekszik, mint a sejtömeg.



4. ábra A citromsav fermentáció lefutása

1.1.9.4. Fermentációs paraméterek

Az *Aspergillus niger* citromsav termelését jelentősen befolyásolja a pH. Jelentős mennyiségű citromsav csak pH=2,5 érték alatt halmozódik fel. A külső pH-nak (~2) csak kis hatása van a citoszol pH-jára (~7). A sejtek elviselik, sőt aktív transzporttal létrehozzák ezt a nagy koncentráció különbséget.

A fermentlé pH-ját 1,5 és 2,8 között szabályozzák. Melasz alapú tápoldat esetén inkább a felső határ közelében. Magasabb pH-n melléktermékek, oxálsav és glükonsav képződnek. A pH=3-6 közötti zónában a citromsav mellett oxálsav és glükonsav is keletkezik. Semleges közeli pH-n már az oxálsav dominál. Az extracelluláris glükózoxidáz enzim pH=5 alatt jelentő-

sen veszt aktivitásából, pH=3-nál teljesen inaktiválódik. Eszerint a pH-t gyorsan három alá kell csökkenteni. A cukoralapú tápoldatoknak alig van pufferhatása, a termelő sav hatására a fermentlé gyorsan lesavanyodik. A melaszban lévő szerves anyagoknak viszont jelentős a pufferkapacitása, a pH kevésbé csökken. Melasz alapú tápoldatoknál emiatt kénsavval viszik le a pH-t.

Adalék: minden más szerves sav fermentációs előállításánál a keletkező savat közömbösíteni kell, mert a sejtek nem viselik el a savas közegét. A citromsav az egyetlen kivétel, ahol nem lúggal, hanem savval szabályozák a pH-t.

A hőmérsékletet 28-33 °C tartományban szabályozzák. Efölött megnövekszik az oxálsav képződés, alacsonyabb hőfokon pedig lelassul a folyamat. A citromsav termelése jelentős hőfejlődéssel jár, a fermentlé melegszik. A hő elvonására nagy hűtőfelületeket kell beépíteni a fermentorba.

Levegőztetés, oldott oxigén szint. A tenyészet oxigén igénye nem nagy, de nagyon érzékeny az oldott oxigén szint csökkenésére. Ha csak átmentileg, néhány percre is a DO 20-30 relatív % alá csökken (például üzemzavar esetén), akkor a citromsav termelés megáll. A levegőztetés megnövelése után az anyagcsere, a sejtek növekedése újraindul, de a citromsav termelés nem, vagy csak nagyon kis sebességgel.

A levegőztetésnek az oxigénellátáson túl több funkciója is van, elviszi a termelt széndioxidot és hő egy részét. A túl nagy levegőáram ugyanakkor visszaüthet, mert egyrészt lecsökkenti az anaplerotikus reakciókhoz szükséges a szén-dioxid szintjét, másrészt erős bepárlódást idéz elő. A levegőt a keverős készülékekbe 0,5-1 vvm árammal táplálják be, de vésettartáléként tiszta oxigén befúvatását is lehetővé teszik. Az air lift fermentoroknál extrém nagy, 10 vvm betáplálást is leírtak.

A folyamat elején a csírázási-növekedési szakaszban kevesebb levegő is elegendő, később fokozni kell a levegőztetést.

Az oxigén bevitelét jelentősen befolyásolja a tenyészet morfológiája. Az *Aspergillus*-ok miceliális növekedésűek, a fermentlében gombafonalak tömege jelenik meg. A fonalak elhelyezkedhetnek rendezetlen szövedékben, ami az anyagátadást megnehezíti, illetve alkothatnak pelleteket. A pellet jelentése szemcse, azaz a fonalak kis gömböket alkotnak. Jellemző méretük 1-2 mm, bár laboratóriumban, rázatott tenyészetben akár ~1 cm-es csomók is előfordulnak.

A pelletes morfológia az anyag- és impulzusátadás (oxigénbevitel, keverés) szempontjából sokkal hatékonyabb és a fermentlé szűrése is egyszerűbb. A micélium morfológia alakulása a keverés intenzitásától, nyíróerejétől és a pH-tól egyaránt függ. A fonalak hossza pedig befolyásolja a citromsav termelést is. A rövidebb micéliumok több a citromsavat állítanak elő.

A levegőztetési rendszerek közül mind a keverő nélküli torony fermentorokat (air lift, merülősugaras), mind a kevertős fermentorokat alkalmazzák. A torony fermentorok célszerű magasság/átmérő aránya 4:1 -6:1 közé esik. Szerkezetük egyszerűbb, ezért nagyobb térfogattal építhetők (200-1000 m³).



5. ábra Pelletes növekedés rázott lombikban

Kontrollált körülmények között a glükóz átalakítása a citromsavvá 87-92%-os konverzióval megy végbe, a törzstől, a szénhidrát alapanyagtól, valamint a technológiai paraméterektől függően. Az elérhető citromsav koncentráció 120-130 g/l (melaszon). A technológia produktivitása 0,67-0,75 kg citromsav/m³*h; azaz 16-18 kg citromsav/m³*nap, többszöröse a felületi eljárásnak.

1.1.10. Feldolgozás

A fermentáció végén 10-13% citromsav halmozódik fel. A technológia második szakasza, a feldolgozás (downstream processing) a tisztított céltermék kinyerése. A műveletsorban meg kell szabadulni a szilárd fázistól (sejtek), a termékhez hasonló kis molekulájú szennyezésektől (pl. oxálsav) és nem utolsósorban a víztől.

1.1.10.1. A micélium elválasztása

A szűrhetőség szempontjából a pelletes szerkezet az ideális, a szuszpenzió newtoni folyadékként viselkedik.

A micéliumokat általában vákuum dobszűrővel választják el. Ha szűrősegédanyagra is szükség van, az ásványi anyagok helyett gyakran növényi melléktermékeket (pelyva, szalmatörök) használnak.

1.1.10.2. Oxalátmentesítés

A citromsav-fermentáció során a leggondosabban vezetett fermentációs technológia mellett is mindig képződik kis mennyiségű oxálsav is. A szűrt fermentlé első kezelése ennek elválasztására szolgál. Az elválasztás elve azon alapul, hogy a kalcium-oxalát rosszul oldódik vízben, így az oxálsav mésztejjel reagáltatva lecsapható. A gondot az jelenti, hogy ugyanez igaz a citrátra is, abból is csapadék képződik. A megoldás a kalcium-hidroxid fokozatos hozzáadása, amivel mintegy „megtitráljuk” a fermentlevet. Kevés Ca(OH)₂ bevitelével az oxalát leválik, míg az egybázisú (mono-)kalcium-citrát (a hárombázisúval ellentétben) elég jól oldódik.

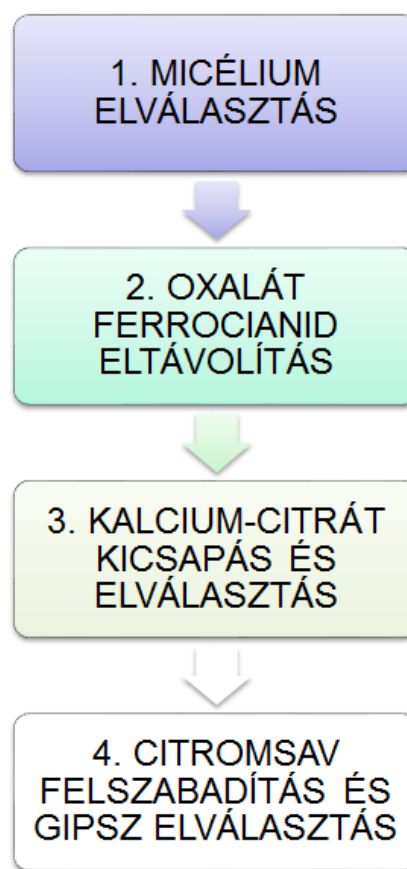
A vasat elvonó ferrocianidot is ebben a lépésben távolítják el. Feleslegben adott FeCl₃-dal kék színű csapadék képződik. Ez a vegyület a fehér csapadékot kékes színűre festi.

A csapadék kiszűrésére dobszűrőt, nyomószűrőt vagy Funda-szűrőt alkalmaznak.

1.1.10.3. A citromsav kicsapása

A citromsav elválasztásának klasszikus módja a kicsapás kalcium-citrát formájában. Ehhez további mésztejet adagolnak az oldatba, ami teljes mértékben semlegesíti a savat, trikalcium-citrát képződik. A kicsapás mentét befolyásoló technológiai paraméterek:

- a citromsav koncentrációja,
- a hőmérséklet,
- a pH, és
- a Ca(OH)₂-adagolás üteme



6. ábra A nyers citromsav kinyerése

A citromsav-koncentráció adott, ezen nem gazdaságos változtatni. A hőmérséklet hatása egyedi. A legtöbb anyag oldhatósága javul magasabb hőmérsékleten. A kalcium-citrát oldhatósága viszont maximumos függvény, magasabb hőmérsékleten újra csökken (2. táblázat).

Hőmérséklet °C	oldhatóság g/100 ml
18	0,085
25	0,096
40	0,085
90	0,058 !

2. táblázat A trikalcium-citrát oldhatósága a hőmérséklet függvényében

A maximális kihozatal érdekében a csapadékos levet forrón, 90 °C-on szűrik. Ezt elősegíti az, hogy a mész beoldásánál, illetve a közömbösítésnél jelentős mennyiségű hő szabadul fel, ami felmelegíti az oldatot. A szűrlet hőtartalmát hőcserélőkkel vissza lehet nyerni, és hasznosítani. A lecsapás határfoka semleges közegben a legjobb, ezért a 7 körüli pH beállítására törekednek, túlzott lúgosítás újra javítja az oldhatóságot. A reakcióhoz CaO-ra nézve 18–25%-os oldatot használnak, lassan beadagolva. Így nagyobb kristályok keletkeznek, amelyek kevesebb szennyezést visznek magukkal. A csapadékot a klasszikus vákuum dobszűrőn választják el.

1.1.10.4. Feltárás kénsavval

Gyengébb savat sójából egy erősebb savval lehet felszabadítani. A citromsav gyártási technológia esetében a kénsav a legmegfelelőbb, mert a melléktermékként keletkező gipsz oldhatatlan, könnyen elválasztható a citromsav oldattól. Sósav vagy salétromsav használata esetén a kalcium-klorid, illetve kalcium-nitrát oldatban maradna, és ez megnehezítené a citromsav kinyerését. A feltárás tömény (60-70%-os) kénsavval történik. Ez a koncentráció még nem oxidálja a szerves anyagokat, és ugyanakkor nem hígítjuk meg vele túlságosan az oldatot. A kénsavat a sztöchiometrikushoz képest kis feleslegben (+1-2 g/l) adagolják. A képződő gipszet ismét csak vákuum dobszűrőn szűrik le. A melléktermékként képződő kristályvizes gipsz mennyisége igen nagy, 1 tonna citromsav előállításával mintegy 1,4 tonna gipsz képződik. Hasznosítása, illetve elhelyezése egyre nagyobb problémát jelent.

1.1.10.5. Tisztítás adszorpcióval

A feltárással kapott citromsav oldat még színanyagokat és ásványi ionokat tartalmaz. Ezekről oszlopokban végrehajtott adszorpcióval szabadulhatunk meg. A színanyagokat aktív szénrel töltött oszlopon lehet megkötni. Az ásványi sók ionjait ioncserélő gyantákkal lehet eltávolítani, „flow through” technikával, azaz nem a főkomponenst kötjük meg a kolonnán, hanem a szennyezéseket. A termék átáramlik az oszlopon, nincs szükség elúcióra. Ipari léptékben nem egy-egy oszlopot telepítenek, hanem több tucat vagy akár száz, egyenként néhány köbméteres kolonnát kapcsolnak össze egy teleppé. Ezek egy része dolgozik, más részét egyidejűleg regenerálják, így lehet biztosítani a folyamatos üzemmenetet.

1.1.10.6. Koncentrálás bepárlással

A tisztított citromsav oldat koncentrációja 200–250 g/l, ez még nem kristályosítható, tovább kell töményíteni. A koncentrálás célszerű művelete ennél a terméknel a bepárlás. A biológiai anyagok esetében ritkán alkalmaznak bepárlást, mert a legtöbb ilyen anyag hőérzékeny.

A citromsav-technológiánál kíméletesen, azaz alacsony hőmérsékleten, rövid tartózkodási idővel történik a bepárlás. Többfokozatú, többtestes vákuumbepárlót használnak, ahol az utolsó fokozatban a tömény oldat hőmérséklete nem haladja meg a 40 °C-ot.

1.1.10.7. Kristályosítás

A betöményített oldat lehűtve már túlélítetté válik, belőle a citromsav kristályosítható. A művelet kritikus paramétere a hőmérséklet. 36,5 °C alatt ugyanis a sav egy kristályvízzel, előlött pedig vízmentesen kristályosodik. A citromsav-monohidrát jobban kezelhető, stabilabb és nem utolsósorban esztétikusabb anyag, ezért ennek létrehozására törekednek. A vákuumbepárlás után a ~40 °C-os oldatot 20-25 °C-ra hűtik, ebből válnak ki a kristályvizes kristályok. A citromsavgyártás olyan nagy léptékben folyik, hogy érdemes folyamatos kristályosítókat alkalmazni. Ezekben az állandósított körülmények hatására állandó tisztaságú és állandó méreteloszlású kristályok jönnek létre. A kristályok elválasztása és mosása általában szűrőcentrifugában történik. Az anyalúg még jelentős mennyiségű terméket tartalmaz, ezt visszavezetik a technológiába, a tisztítási lépések elé, és újra feldolgozzák.



7. ábra Kristályos citromsav előállítás

1.1.10.8. Szárítás

A szűrőből kikerülő mosott kristályok felülete nedves. Ezt a maradék folyadékot szárítással távolítják el. Ez a folyamat is tulajdonképpen bepárlás, pontosabban a felületen lévő folyadék szárazra párolása. Alapvető különbség, hogy a szárításnál a hőközlésre meleg levegőt alkalmaznak. A művelet során újra jelentkezik a kristályvízvesztés veszélye. A száradó anyag hőmérséklete nem haladhatja meg a 36,5 °C-ot. Emiatt vagy vákuumszáritókat használnak, vagy igen nagy mennyiségű, közel szobahőmérsékletű levegővel szárítanak.

1.1.11. Melléktermékek, szennyvíz

A citromsav gyártási technológia sajnos sok járulékos anyag termelődésével jár, ezek hasznosításáról, elbontásáról vagy deponálásáról is gondoskodni kell. Ezek a tételek jelentősen befolyásolják a gyártás gazdaságosságát is. 1 t citromsavra számítva a következő anyagmennyiségekkel kell számolni:

Micélium: ~135 kg

Aspergillus niger biomassza, szűrősegédanyaggal keveredve. A sejtömeg 25-30% fehérjét és 15-20% szénhidrátot tartalmaz. Ugyanakkor jelentős mennyiségű nehezebben bontható sejtfal anyagot is van benne. Értékesíthető, ha takarmányadalékként tápokba keverik. Ennek viszont előfeltétele, hogy a szűrősegédanyag biológiai anyag (korpa, rost, törek) legyen, az ásványi segédanyagokat nem fogyasztják az állatok. A savanyú íz nem okoz gondot, azt szívesen fogyasztják (vö.: silótakarmány). Kevesebb hasznat hoz, ha a biomasszát biotrágya-

ként szántóföldekre szórják ki, ezzel javítják a talaj szervesanyag-tartalmát. Lúgos előkezeléssel a papíripar is használhatja a cellulózos alapanyagok mellett. Ha nincs más megoldás, biogázosítással fűtőgázt is elő lehet állítani belőle.

Gipsz: ~1,4 tonna

$\text{CaSO}_4 \times (1-2 \text{ H}_2\text{O})$, el nem bontható melléktermék. Az építőipar valamennyit felhasznál belőle, de ekkora mennyiséget nem képes felvenni. Ráadásul ez kristályvizes gipsz, ezt ki kell izzítani, hogy kötőképes legyen. Általában lerakóra kerül.

Szennyvíz: ~8 m³

Szárazanyagtartalma 5-6%, kémiai oxigén igénye igen nagy, $\text{KOI} \approx 50\,000 \text{ mgO}_2/\text{l}$. Ezt szennyvíztisztítóban elbontani nagyon költséges. Célszerűbb inkább bepárlással feldolgozni, a szárazanyagtartalmat 65-70%-ra növelni. Ezt a koncentrátumot lehet takarmány kiegészítőként értékesíteni (pl. Citragil néven forgalmazzák). Az árbevétel nem fedezi a bepárlás költségeit, de kisebb a veszteség, mint a szennyvíztisztítás költsége.

Más lehetőség a szerves anyag hasznosításra az egysejt-fehérje előállítása. Erre a célra szelektált *Torula* élesztő szaporításával 14 kg/m³ azaz 112 kg/tonna takarmányélesztőt lehet előállítani.

Erre az anyagra is lehet biogáz gyártást alapozni. ANAMAT néven egy kombinált eljárást fejlesztettek ki, amely aerob és anaerob lépések után teljes mineralizációhoz vezet, gyakorlatilag mindent metánná, vízzé és szén-dioxiddá bont le.

1.2. ECETSAV GYÁRTÁS

A bor ecetesezése történelem előtti időktől ismert folyamat, egyidős a borkészítéssel. Ez a két folyamat a legősibb, spontán is végbemenő biotechnológiai eljárás: a must cukortartalma → borra erjed → a bor „megecetesedik” → borecet keletkezik. Az ecet tudatos gyártása és konyhai hasznosítása szintén ókori eredetű. Élelmezési célra évente 2-3 millió m³ ecet készül, aminek koncentrációja 10-15%, azaz ebben 300-400 ezer tonna tiszta ecetsav található.

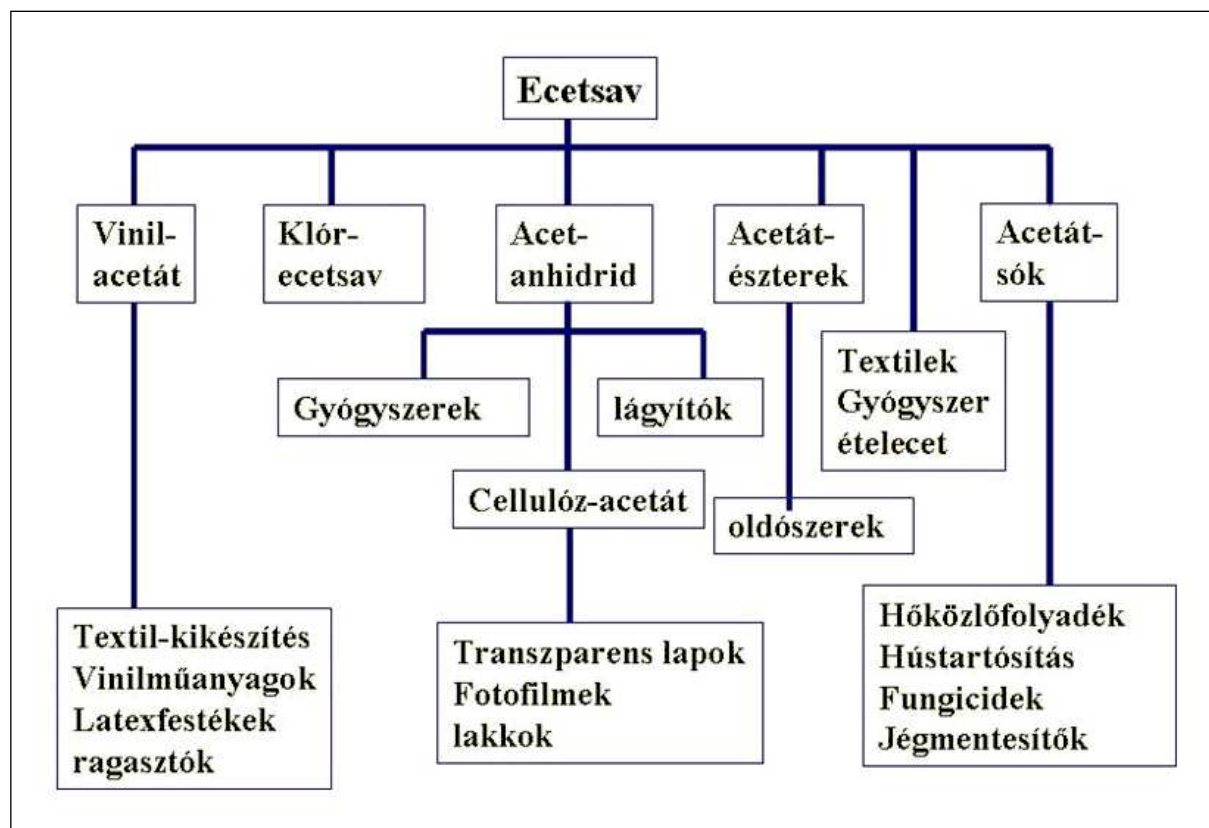
Vegyipari alapanyagként jelentős mennyiségű ecetsavat állítanak elő kémiai szintézissel is, mégis élelmiszeripari célra csak az ecetsav baktériumok által termelt, tehát biológiai úton nyert ecetet használják. A teljesség kedvéért tekintsük át, hogy milyen kémiai reakcióutakon lehet ecetsavat előállítani:

- Metanol karbonilezése
- Acetaldehid oxidációja
- Etilén oxidációja
- Fa száraz lepárlása

A kémiai szintézissel gyártott ecetsavat önmagában, erős savként is számos célra alkalmazzák, így fémfelületek tisztítására (erős, de nem korrozív sav), vízkőoldásra, stb. Kísérleti stádiumban van egy újabb nagy léptékű alkalmazás is, télen az utak jégmentesítésére a környezetszennyező sók helyett Ca- vagy Mg-acetátot szórnak ki.

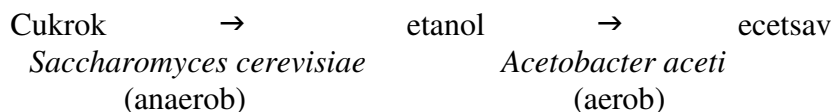
Vegyipari reakciók alapanyagként is nagyon szerteágazó a használata (ábra).

A biológiai úton termelt ecetsavat elsősorban az élelmiszeriparban hasznosítják, a savanyú íz beállítására, illetve tartósításra.

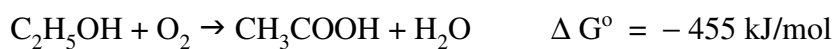


8. ábra Az ecetsav ipari felhasználása

A biotechnológiai úton az alapanyag etilalkohol, tehát tulajdonképpen két fermentációs lépés kapcsolódik össze.



Az ecetsav képződésének bruttó leírása:



Az ecetsav baktériumok az alkoholt molekuláris oxigén felhasználásával ecetsavvá oxidálják.

1.2.1. Az ecetsav-baktériumok

Az alkoholt ecetsavvá oxidáló mikroorganizmusokat általánosan ecetsav-baktériumoknak nevezzük. Polimorf, Gram negatív baktériumok, sejtjeik elipszoid vagy pálca alakúak; melyek egyenesek vagy enyhén hajlítotak; 0,6-0,8 µm hosszúak (=aprók); egyesével, párokban vagy láncokban fordulnak elő. Mozgásra képtelen és mozgásra képes formái is előfordulnak, poláris vagy peritrich flagellummal rendelkeznek. Obligát aerobok, bizonyos fajai pigmentet, míg más fajai cellulózt termelnek.

Az ecetsav baktériumok osztályozása

Az *Acetobacteraceae*-n belül 3 genus különíthető el: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Frateuria*. Ebner és Follman többször is megkísérelték az ecetsav-baktériumok osztályozását. A legfontosabb segítség a pontos taxonómia kialakításában a Gillis és De Ley DNS-rRNS hibridizációs tanulmánya. A legfontosabb következtetés, hogy a korábbi osztályozás alapján elkülönített két csoport, az *Acetobacter* és a *Gluconobacter* igazából közeli rokonságot mutat. Az *Acetobacter*-félék erősen savas közegben az ecetsavat túloxidálják CO₂-dá és vízzé, míg a *Frateuria* és a *Gluconobacter* család nem.



9. ábra Ecetsavbaktériumok



10. ábra *Gluconobacter*

Acetobacter

Frateuria

A törzsek izolálása és azonosítása sok problémával jár. Az ecetgyártásban mindig olyan ecetsav baktériumokkal dolgoznak, amelyek nem tiszta tenyészkultúrákból származnak. A fermentáció során használt baktériumokat nehéz taxonómiai osztályokba besorolni. A termékben (és az ipari félfoltyonos/folytonos eljárásoknál is) vegyes kultúrákat alkotnak, sok, jelentősen eltérő altípussal és spontán hibridekkel. A fenotípusos megkülönböztetés is nehéz, mert egy faj különböző baktérium törzsei nem feltétlenül hasznosítják ugyanazt a szénforrást. Az *Acetobacter* törzs egy új fajt izoláltak Németországban és Svájcban is, erősen savas fermentációkból. Ezt a fajt *Acetobacter europaeus*-nak nevezték el. Az összes vizsgált törzs, amit szubmerz fermentációból izoláltak csak kis mértékben mutatott DNS-DNS hasonlóságot a hagyományos *Acetobacter* törzsekkel. Viszont szignifikánsan meg lehet különböztetni az *Acetobacter europaeus*t az *Acetobacter* nemzetség többi tagjától azért, mert ez a faj erősen toleráns 4-8%-os ecetsavra AE-agarban.

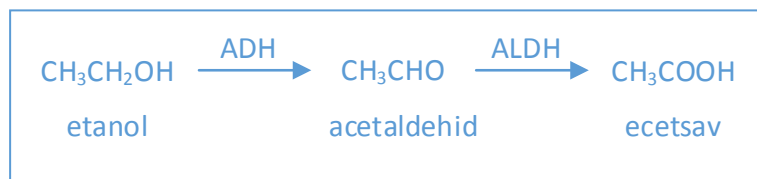
A törzseket szilárd és félszilárd táptalajon nehéz tenyészteni, folyadékban meg nehéz „széleszteni”. Jelentős előrelépést értek el Japánban, ahol speciális dupla rétegű agaron tenyésztették ki a baktériumokat (*Acetobacter polyoxigenes*).

Az iparban használt ecetsav baktérium törzsek

A fermentáció oltóecet beoltásával kezdődik meg, ez egy mikrobiológiailag meghatározatlan maradéka az előző fermentációnak. Ha megfelelő ecetsav toleranciájú és tápanyagigényű baktériumtörzsszel dolgozunk, évekig fenntartható a fermentáció anélkül, hogy félbeszakadna a folyamat vagy csökkenne a hozama, illetve a hatékonysága. Iparban használt törzsektől elvárt tulajdonságok:

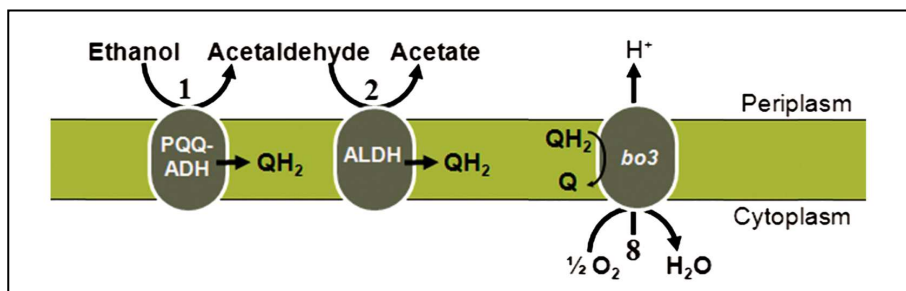
- tolerálja a nagy ecetsav és alkohol koncentrációt
- kis tápanyag szükséglet
- ne lépjen fel túloxidáció
- magas hozamot produkáljon
- fágrezisztens legyen.

1.2.2. Az ecetsav képződés biokémiája



11. ábra Az ecetsav képződése

A folyamat két lépésben megy végbe, az etanol előbb acetaldehiddé oxidálódik (alkohol-dehidrogenáz), majd az aldehid oxidálódik ecetsavvá (aldehid dehidrogenáz).



12. ábra Az ecetsav képződésének enzimeit és koenzimeit

Több ecetsav-baktériumból is sikeresen tisztítottak alkohol-dehidrogenáz enzimet, ilyen irányú kutatásokat főleg *Acetobacter aceti*, *A. rancens*, *G. suboxydans* baktériumokkal végezték. Az ADH prosztetikus csoportja PQQ (pirrolo-kinolin-kinon), ez veszi át a hidrogéneket.

Az enzimek a citoplazmamembránba épülnek be. A hidrogéneket ubikinonnak adják át. Az ubikinol visszaoxidálása során a terminális oxidációhoz hasonlóan molekuláris oxigénnel víz képződik és proton exportálódik a periplazmikus térbe. A protonok visszaáramlásával a sejt ATP-t termel, így nyer energiát a folyamatból.

Tápanyagok, szubsztrátok

A tápoldat fő komponense a tisztított és hígított etilalkohol. A legtöbb országban az ilyen célra szánt alkoholt denaturálják, az USA-ban etil-acetáttal, Európában pedig ecetsavval.

Az alkoholtartalmú tápoldatot cefrének nevezik. Az alkoholtartalmat térfogatszázalékban adják meg. Az oldat általában kis mennyiségben ecetsavat is tartalmaz, ezt vegyes százalékból (gramm ecetsav/100 ml oldat) mértékegységben fejezik ki. A két különböző mértékegységű koncentráció számértékének összegét összkoncentrációnak nevezik, ez közelítőleg megadja a teljes fermentáció alatt kinyerhető maximális ecetsav koncentrációt. Az eltérő mértékegységek látszólag értelmetlen használata azért praktikus, mert figyelembe véve a két anyag móltömegének és sűrűségének különbségeit az anyagok átalakulása során az összkoncentráció nem változik. Egy tf% alkoholból közelítőleg egy m/v% ecetsav keletkezik. A kinyert ecetsav koncentráció és az összkoncentráció hányadosa a hozam.

Az ecetsav fermentáció során az etanol teljes mennyisége ecetsavvá oxidálódik. Általában a kitermelés 95-98% körül szokott lenni, a maradék elveszik a kiáramló gázzal. Közben az esetleges egyéb szénforrás (pl. glükóz) oxidálódik, ennek termékei H_2O és CO_2 .

Az étkezési ecetek gyártásánál a tiszta alkohol helyett különböző természetes, erjesztett, alkoholtartalmú leveket használnak nyersanyagként. A borecetnél bor, az almaecetnél az almabor az alapanyag. A maláta ecet az árpa vagy egyéb gabona forrázatának az alkoholosan erjesztett (sörszerű) levéből készül. A rizsecet pedig elcukrosított rizsből készül alkoholos és ecetsavas fermentációval.

A balzsamecetek az ecet mellett sok cukrot (gyümölcsle, szirup) is tartalmaznak.



13. ábra Ízesítő ecetek

1.2.3. Tápanyagok, szubsztrátok

Szénforrások

Acetát

Az *Acetobacter* törzsek képesek a citromsav-cikluson keresztül hasznosítani az acetátot és a laktátot, de a túloxidáció minimalizálására törekszünk.

Cukrok (glükóz, szacharóz): könnyebben beépülnek a sejt anyagába, mint az acetát. Ezeket az ecetsav baktériumok a pentóz-foszfát úton hasznosítják. A fermentáció indításához kis mennyiségben adagolják.

Szén-dioxid

A sejtek igénylik szén-dioxidot a növekedéshez. A szén-dioxid asszimilálódik a sejt anyagába, a sejt széntartalmának ~0,1%-a ebből származik. Nagyon kis mennyiségű ecetsav is ebből a CO₂-ből származik.

Nitrogén-forrás:

Szerves szénforrás jelenlétében sok ecetsav-baktérium törzs képes ammónium ionokat is nitrogénforrásként felhasználni. Egyes törzseknek viszont aminosavakra is szüksége van.

Növekedési faktorok:

Egyes törzsek növekedési faktorokat/vitaminokat igényelnek (p-aminobenzoészav, niacin, tiamin, pantoténsav), illetve ezek jelenlétében jobban termelnek. Az *A. aceti* törzsnél halmozottan pozitív hatást érhetünk el glutation és Na-glutamát együttes adagolásával. A növekedési faktor szükséglet a szénforrás ellátástól függ.

Szervetlen sók

Természetes nyersanyagoknál általában nincs szükség további tápanyag hozzáadására. Bár az almaborban kevesebb nitrogéntartalmú vegyület van, de ez feljavítható ammónium-foszfát hozzáadásával. Néhány szőlőborhoz is szükséges ammónium-foszfátot adni az optimális fermentációhoz.

Tiszta alkohol alapú ecetsav gyártásnál mindenképp szükség van kálium, nátrium, magnézium, kalcium, ammónium (ammónium-foszfát formájában), szulfát és klorid hozzáadására. Ezen kívül nyomelemekre: vas, mangán, kobalt, réz, molibdén, vanádium és cink is szükség van. Kereskedelmi forgalomban található tápanyag keverékek további adalékokat is tartalmaznak, mint például szárított élesztőt.

Etanol

Az ecetsav-baktériumok károsodhatnak, ha a fermentáció során az összes etanol oxidálódik és az etanol tartalmú friss tápoldat hozzáadása nem történik meg időben. Az etanol hiánya a légzési lánc kiesése miatt az oxigénhiányhoz hasonlóan megzavarja a fermentációt. A kár mértéke a teljes koncentrációtól és az etanol hiány idejétől függ. A túloxidáció az a nem kívánatos reakció, mely során az ecetsav tovább oxidálódik és CO₂ és H₂O keletkezik. Ezt megelőzhetjük, ha az összkoncentrációt magas értéken tartjuk és az etanolt állandóan pótoljuk. Ennek érdekében célszerű az etanol koncentrációt folyamatosan mérni. A Frings cég által kifejlesztett Alcosens időkésés nélkül méri az etanolt a fermentáléban. A szenzor működése membrándiffúzió alapszik, ezért csak állandó hőmérsékleten ad megbízható eredményeket.



14. ábra Frings Alcosens

Oxigén: az *Acetobacter*-ek obligát aerobok, a fermentáció során nagy mennyiségű oxigénre van szükség, ezért nagyon fontos a megfelelő levegőztetés. Kiterjedt kutatások bizonyítják, hogy a levegőztetés megszakítása a fermentációban zavart okozhat, például az ecetsav koncentráció vagy a fermentációs sebesség csökkenését. Az oxigén ellátás zavara is éles esést okoz az oxidációs sebességben, illetve az enzimek aktivitásában. Minél hosszabb időre szakad meg a levegőztetés és minél nagyobb cefre összkoncentrációja, annál erősebb a hatás. Egy 11-12%-os összkoncentrációjú elegynél a 15-60 mp-ig tartó levegőztetés kimaradás ugyanakkora kárt okoz, mint az 5%-os összkoncentrációjú elegynél a 2-8 perces.

Ugyanakkor a levegő nagy térfogatárama sok illékony komponenst (ecetsav és etanol) visz magával, ezzel veszteséget okoz. Ezt úgy szokták csökkenteni, hogy az elmenő levegőt egy tartályban vízen buborékolatják át, és az elnyeli az illó komponenseket. Az így kapott vizes oldattal készítik el azután a következő fermentáció tápoldatát.

1.2.4. Levegőztetési megoldások

Felületi fermentáció, Orleans-i eljárás

Régebben használták borecet készítésére, ilyen módszer az Orleans-i eljárás, ahol álló fahordóba vezették a bort, a hordó felső részében légzőnyílásokat alakítottak ki és szobahőmérsékleten állni hagyták. Az ecetsav-baktériumok a levegővel jutottak a bor felszínére és elkezdték a borban lévő etilalkohol átalakítását ecetsavvá. A keletkező ecetsav sűrűsége kisebb a bor sűrűségénél, ezért lesüllyed és elvezethető a hordó alsó részéből. Kiváló minőségű ecetet lehetett így előállítani.

Újabb típusú felületi fermentációknál egy sekély folyadék réteg felületén baktérium filmet alakítanak ki. A folyadékot (cefre) áramoltatják. A folyadék mélysége ~10 mm, az kifolyó ecetsav koncentrációja 5-6%.

Mozgócefrés fermentáció

A mozgócefrés fermentorok töltött oszlopnak tekinthetők, bennük bükkfa forgácsot, nyírfa gallyakat vagy kukoricacsutkát használtak hordozó anyagként. Az ecetsav baktériumok a töltet felületén telepedtek meg, biofilm alakult ki. Az alkoholtartalmú cefrét felülről locsolták a töltetre, ezzel egyidőben alulról a hézagokban felfelé áramoltatták a levegőt. A lecsorgó folyadékot újra rávezették a töltetre, recirkuláltatták (innen a mozgócefrés elnevezés), mindaddig, amíg az

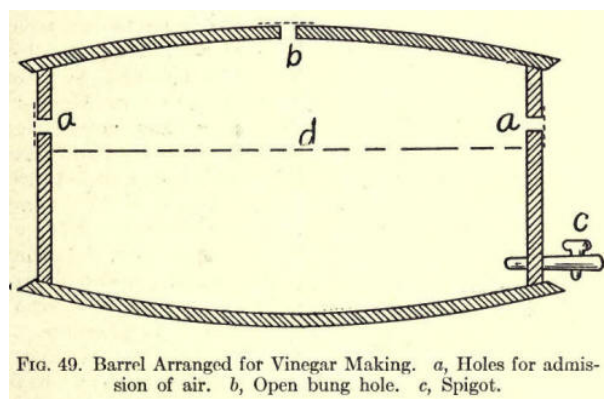
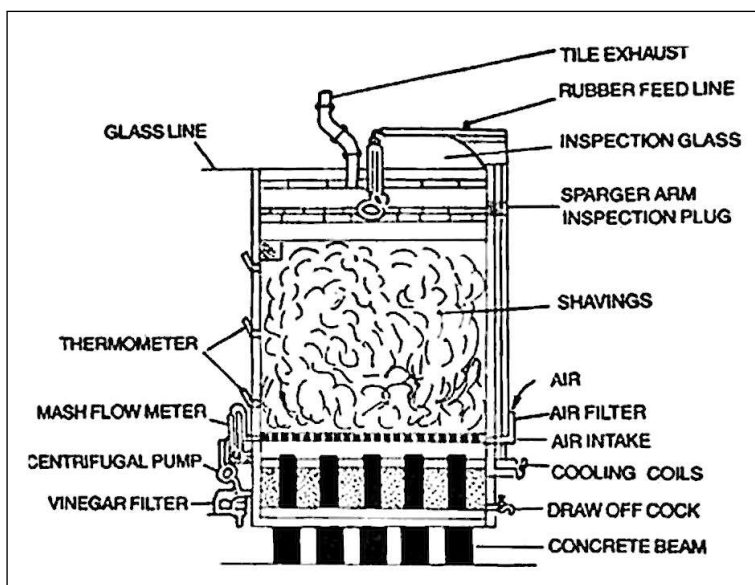


FIG. 49. Barrel Arranged for Vinegar Making. a, Holes for admission of air. b, Open bung hole. c, Spigot.

15. ábra Orleans-i ecetgyártás



16. ábra Mozgócefrés ecetsav generátor

átalakulás teljesen végbe nem ment. Nagy, fából készült tartályokat (akár 100 m³) építettek erre a célra.

A belső tér nem steril, de a befertőződéstől védi az alkoholtartalom és a savas pH. Viszont a biofilmben gyakran megtelepszik egy nagyon specializálódott baktériumfaló fonálféreg, az „ecetangolna” (*Anguillula aceti*).

Szubmerz, levegőztetett fermentáció

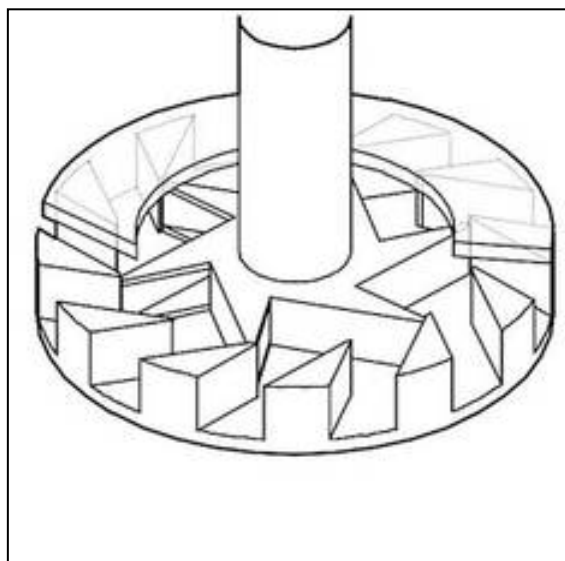
A szubmerz fermentációknál intenzív levegőztetésre van szükség, keverős és air-lift megoldást egyaránt alkalmaznak. Különleges megoldás a Frings-acetátor (önbeszívó turbina-keverő).

Frings acetátor

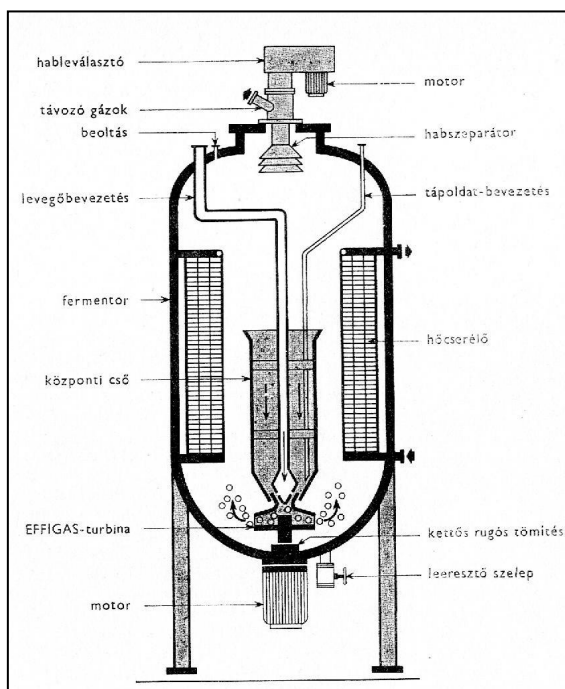
A Frings levegőztető önbeszívó rendszerű, nincs szüksége kompresszorra, a környezetből szívja be a levegőt egy szívócsövön keresztül. A motor alulról forgatja, és a levegőt felülről, a tengelycsövön át szívja be, és eloszlatja. Egy belső forgó- és egy külső állórészből áll. A forgórész voltaképpen egy centrifugál-szivattyú, ami a tengelynél levegőt és fermentlevet szív be, a kerületén kilépő keverék átpréselődik a sztátor csatornáin, és erős vízszintes áramlás jön létre. A levegőztetés sebességét úgy kell megválasztani, hogy az a levegő egyenletes eloszlását biztosítsa a fermentor teljes keresztmetszetén. Mivel nem lehet teljesen kiküszöbölni a habképződést, az acetátor egy mechanikai habtörővel van felszerelve. A gyorsan forgó habtörő leválasztja a habból a folyadékot és

visszaengedi a fermentorba. Az elpusztult baktériumok lízise során fehérjék szabadulnak ki, amelyek fokozzák a habzást. Mivel az intenzív levegőztetés okozza a habzást, ezért a habtörőnek a ciklus nagy részében működnie kell.

A Frings Acetátor a legelterjedtebb eszköz ecet gyártására. 1996 végére 642 Acetátor működött a világ minden részén, teljesen automatizáltan, teljes termelése 1,5 * 10⁶ m³/év ecet volt, 10%-os ecetsavra átszámítva. Energia fogyasztása 400 Wath/liter etanol, kitermelése 98% feletti.



17. ábra A Frings turbina és turbinaház (forgó- és állórész) kialakítása



18. ábra A Frings acetátor hosszmetsete



19. ábra Frings turbinák, motorral szerelve (katalógus fotó)

1.2.5. Technológiák

A szubmerz gyártásoknál félfolytonos és folytonos fermentációs technológiákat egyaránt alkalmaznak.

A 12-15%-os ecet gyártását félfolyamatos módszerrel végzik. Itt minden fermentációs ciklusnak azonos hosszúságúnak kell lennie. Amikor az alkohol koncentráció 0,05-0,3% közé csökken, a fermentlé egy részét eltávolítják a fermentorból, majd újratöltik 0-2% ecetsav tartalmú és 12-15% alkohol tartalmú cefrével. Az újratöltést lassan, erőteljes kevertetés és állandó hőmérséklet mellett kell végezni. A fermentor töltése során ugyanolyan összkoncentrációjú cefrét kell betölteni, mint az előző ciklusban, és közben kevertetni kell, mert a helyileg kialakuló nagy koncentráció károsíthatja a baktériumokat. A következő ciklus lag fázis nélkül indul el. Az állandó hőmérséklet érdekében a beadagolt cefrét elő kell melegíteni.

Egylépcsős félfolytonos

1994 óta lehetséges töményebb, 19%-os ecetsav gyártása módosított fermentációval. A cefrét és a többletalkoholt külön program szerint adagolják. Az előzőhöz hasonló kiindulási cefrével indítják a folyamatot, majd lassan adagolják a többlet alkoholt. Az alkohol adagolást addig folytatják, amíg el nem érik a kívánt (19%) összkoncentrációt. Az oxidáció végbemegy, és amikor az alkohol koncentráció lemegy nullára, a fermentlé egy részét lefejtik és a helyébe a hígabb cefrét táplálják be. Később újból alkohol adagolásával növelik az összkoncentrációt.

Kétlépcsős félfolytonos

A konzerviparban magas ecetsav tartalmú ecetre van szükség. A kétlépcsős folyamat során 15%-os és ennél nagyobb ecetsav tartalmú ecetet lehet gyártani. Amikor az első fermentorban az ecetsav koncentráció eléri a 15%-ot, a fermentlé 30%-át áttöltik a második fermentorba és az első fermentort újratöltik alacsonyabb összkoncentrációjú eleggyel. A második fermentorban folytatódik a fermentáció, az alkoholt lassan adagolják hozzá, amíg el nem érik a 18,5%-os összkoncentrációt és a konverzió majdnem teljes nem lesz, ekkor a levét lefejtik.

Folyamatos fermentáció

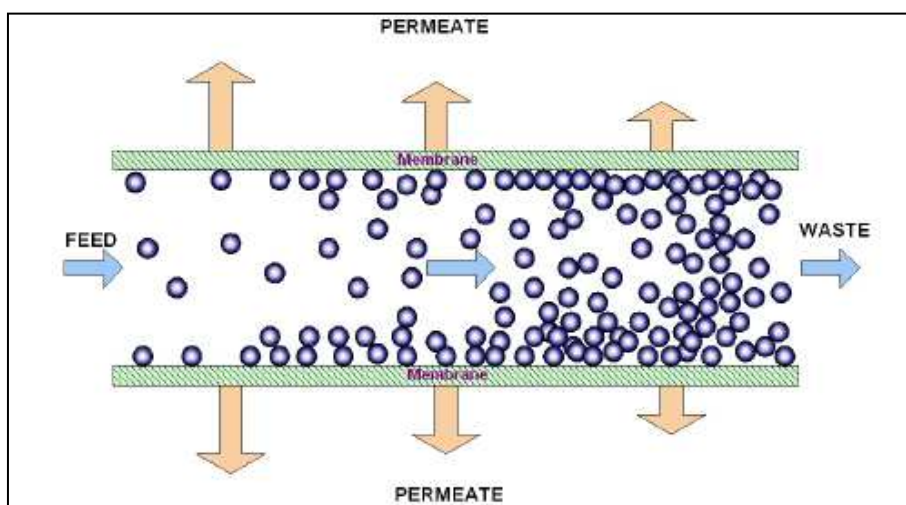
Az elérhető ecetsav koncentráció csak 9-10%, mivel meg kell találni a kompromisszumot a növekedés, a termékképzés, a sejt és a szubsztrát koncentráció között. Az állandósult állapotban a nagy ecetsav és kis maradék alkohol koncentrációra törekszünk, de az alacsony állandósult etilalkohol koncentráció viszont lecsökkenti a baktériumok fajlagos növekedési sebességét, ezzel a hígítási sebességet, azaz a kilépő termékáramot.

Kísérletek immobilizált ecetsav baktériumokkal

A mozgócefrés eljárás biofilmje is tulajdonképpen immobilizálásnak tekinthető, de pl. Japánban sok kísérlet folyik rizsecet vagy gyümölcsacet gyártására immobilizált ecetsav baktériumokkal. A rögzített sejteket félfolytonos fermentációban, airlift bioreaktorokban alkalmazták. Karragénan gél gyöngyökön immobilizált ecetsav baktériumokkal nagy fajlagos növekedési sebességet és respirációs aktivitást értek el. Más hordozó anyagoknál, mint a polipropilén rostoknál a 3%-os, míg méhsejt szerkezetű kerámia monolitnál maximum 4%-os ecetsav koncentráció érhető el. Kalcium-alginát gél gyöngyökkel fluidizált reaktorban pedig 3,5%-os ecetsav koncentráció nyerhető ki.

Feldolgozás

A fermentléből a sejtek eltávolításánál problémát okoz, hogy az *Acetobacter* sejtek nagyon aprók, centrifugálással, szűréssel alig választhatók el. Célszerűen membránszűréssel (mikroszűréssel) távolítják el, ehhez nem szükséges szűrési segédanyag.



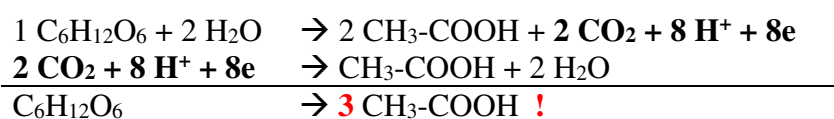
20. ábra Keresztáramú (cross flow) szűrés üregesszál (hollow fiber) modulban

Az ecetsav bepárlással töményíthető, de nem tisztítható, mivel a víz az illékonyabb komponens, elpárologtatásával az ecetsav és a nem-illó szennyezések koncentrációja nő (az ecetsav forrpontja = 118 °C).

1.2.6. Homoacetogének

Új lehetőséget jelentett az ecetsav gyártásban a homoacetogének alkalmazása. A *Clostridium*ok között sok faj autotróf módon H_2/CO_2 vagy CO gázkeveréken is tud szaporodni. Egyes kemoautotróf reakciókra képes fajok a glükóz szénforrás mellett 2 CO_2 –ből autotróf CO_2 fixálással egy új acetyl-CoA-t hoznak létre (termofil homoacetogének: *Clostridium thermoaceticum*, *Cl. thermoautotrophicum*). Ezek egy glükóz molekula felhasználásával három ecetsavat termelnek, ezért kapták a homoacetogén gyűjtőnevet.

A bruttó reakcióegyenlet:



A folyamat nyilvánvaló előnye a +50% hozam (100 g cukorból az elméleti hozam: 100 g ecetsav, ebből gyakorlatilag 90-95 g érhető el). A fermentort nem kell levegőztetni, viszont a szén-dioxid betáplálás lehetőségét meg kell oldani.

Hátránya viszont, hogy a törzsek növekedése, anyagcseréje lassú. Összehasonlító kísérleteket végeztek különböző fermentációs technikákkal.

A szakaszos fermentációnál a keletkező savat dolomittal (fő komponense: MgCO_3): semlegesítették. A nagyobb termékkoncentráció érdekében glükóz rátáplálást alkalmaztak, így 12%-os termékkoncentrációt is elértek.

Az aerob eljárásokhoz hasonlóan félfolytonos technikát is kidolgoztak, 50% lefejtési aránnyal.

A folyamatos fermentáció nagyobb produktivitást, de jóval kisebb termékkoncentrációt eredményezett.

Forgódobos fermentáció: immobilizálás, a baktérium a forgó tányérokhoz tapad

A legnagyobb produktivitást egyfajta rögzített sejtes módszerrel érték el. Egy forgó dob felületén biofilmet alakítottak ki, amely csak periodikusan merült a fermentlébe.

Fermentáció típusa	Produktivitás ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Ecetsav konc. ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)
Szakaszos, rátáplálással	0,9	120
Folyamatos	2,5	7
Folyamatos sejtvisszatáplálással	4	22
Forgódobos (biofilm) eljárás	10	37

3. táblázat Homoacetogén technológiák összehasonlítása

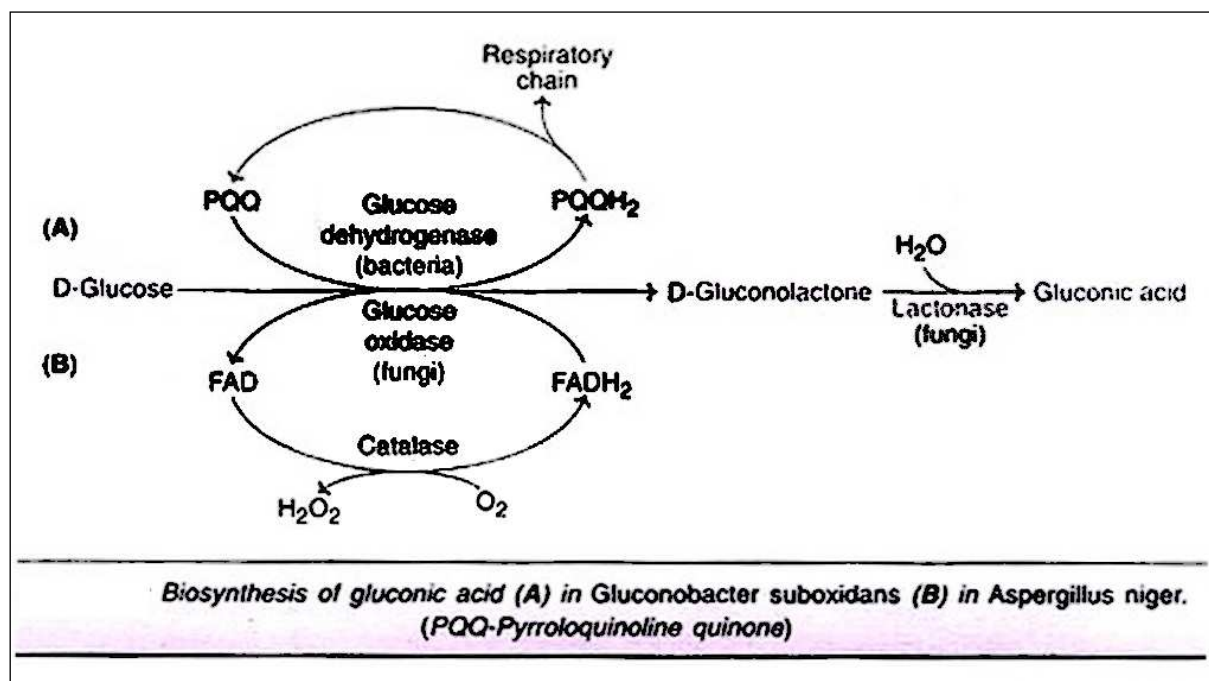
1.3. GLÜKONSAV GYÁRTÁS

A glükonsav egy gyenge szerves sav, piaca mintegy 100 000 tonna/év. Ebbe beleértendő a savon kívül a δ -lakton-, és a sók formájában eladott mennyiség is.

A glükonsavat glükózból gyártják, az aldehid csoport oxidációjával karboxilcsoport képződik. Bár ezt kémiai oxidációval is meg lehet oldani, a hozamok, és a szelektivitás miatt előnyösebb a biotechnológiai átalakítás. A folyamat inkább hasonlít **enzimes** átalakításra, mint egy de novo fermentációs folyamatra.

1.3.1. A glükonsav képződés biokémiája

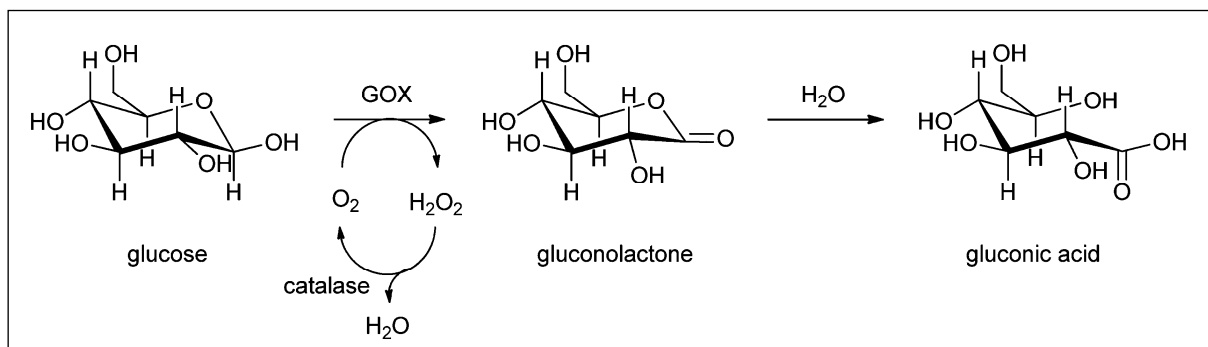
Sokféle organizmus képes glükonsavat felhalmozni: egyes gombafajok, mint az *Aspergillus niger* vagy a *Penicillium luteum* vagy a baktériumok között a *Gluconobacter*, *Pseudomonas* vagy *Acetobacter* törzsek. A folyamat biokémiája eltérő a prokariótáknál és az eukariótáknál.



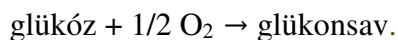
A baktériumokban az oxidáció az ecetsavnál bemutatott módon, a citoplazmamembránban kötött D-glükóz-dehidrogenáz enzim által megy végbe. A hidrogén akceptor a PQQ, illetve a NAD^+ vagy NADP^+ , amely a légzési láncnak adja át a hidrogéneket. A reakció terméke a D-glükono- δ -lakton, ami a fermentlébe kikerülve spontán hidrolizál glükonsavvá. A hidrolízis sebessége a pH-tól és a hőmérséklettől függ.

A megtermelt glükonsavat a sejt képes szénforrásként hasznosítani. Ez a pentóz-foszfát útvonalon történik, de ezt az utat a katabolit represszió (magas glükóz koncentráció, >0,5%) elnyomja. Tehát ha a technológiában nagy glükóz koncentrációt állítanak be, akkor glükonsav túltermelést lehet elérni. A folyamat hatékonyságát rontja, hogy a képződött glükonsav – a Bertrand-szabálynak megfelelően – tovább oxidálódik 5-keto-glükonsavvá. Ezt a második lépést a reakció körülményeinek szabályozásával vissza lehet szorítani (semleges pH, 37 °C), ill. elő lehet segíteni (savanyú pH, 25–30 °C), vagy CaCO_3 -adagolással, mert az 5-keto-Ca-glükonát csaknem oldhatatlan, így az egyensúly erősen jobbra tolódik.

A fonalas gombákban a glükonsav kialakulása során két enzim működik. A D-glükózt a glükóz-oxidáz alakítja D-glükono- δ -laktonná, amit a laktonáz hidrolizál glükonsavvá. A glükonsav- δ -lakton ugyan spontán is hidrolizál glükonáttá, de az *Aspergillus*-okban egy specifikus lakton-hidrolizáló enzim működése is észlelhető.



A penészgombák glükóz-oxidáza egy homodimer flavoprotein. Az enzim kb. 10% szénhidrátot tartalmazó 186.000 moltömegű glükoprotein. Prosztetikus csoportként két kötött FAD-ot tartalmaz. A kofaktor visszaoxidálása hidrogén-peroxid képződése közben egy oxigén molekulát fogyaszt. Ezt a toxikus terméket a mikroorganizmusban működő kataláz elbontja. Így a nettó reakció:



Adalék: Több szerző a negyvenes évek elején ezt az enzimet. antibiotikumként írta le (notatin, penicillin B), mert megtévesztette őket a felszabaduló hidrogénperoxid dezinficiáló hatása, ami kioltási gyűrűket eredményezett.

A FAD regenerálása során keletkező hidrogén-peroxid a glükóz-oxidáz erős inhibitora. Ezért a megfelelő kataláz-aktivitás is fontos a hatékony folyamat szempontjából.

Az *Aspergillus niger* glükóz-oxidázáról megállapították, hogy a D-glükóz β -anomerjét 150-szer gyorsabban képes oxidálni, mint az α -D-glükózt. Lehet, hogy a rendszer egy mutarotáz aktivitással rendelkező fehérjét is tartalmaz.

A glükóz-oxidáz másik szubsztrátja az oldott oxigén, ennek koncentrációja is befolyásolja a reakciósebességet. Az enzim Michaelis állandója (K_{mO_2}) néhány mg/liter, így atmoszférikus nyomáson az oxigén oldhatóságának tartományában van, tehát a reakciósebesség meg sem közelíti a v_{max} -ot. Emiatt a fermentorokban túlnyomást (pl. 3 bar) szoktak alkalmazni.

Az enzim meglehetősen hőérzékeny, 50 °C felett elveszti az aktivitását. Az optimális pH=5,5, alacsonyabb pH-n gyorsan inaktiválódik. Ezért a fermentlé pH-ját 4,5 és 6,5 között kell tartani.

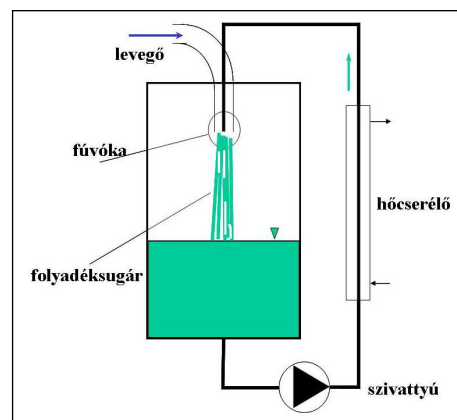
Az enzimet általában intracellulárisként írják le, egyes szerzők szerint a sejtek felületén, mások szerint a peroxiszómákban található, de kimutatták a szűrt fermentlében is.

A glükonsav termelés képessége minden bizonnyal evolúciós előnyt jelent. Egyrészt a pH gyors csökkentése akadályozza a kompetitív mikroorganizmusok szaporodását, másrészt a termelt glükonsav rosszul hasznosítható szénforrás a versengő mikroorganizmusok számára, de jó tápanyag az *A. niger*-nek.

1.3.2. Glükonsav fermentációs technológiák

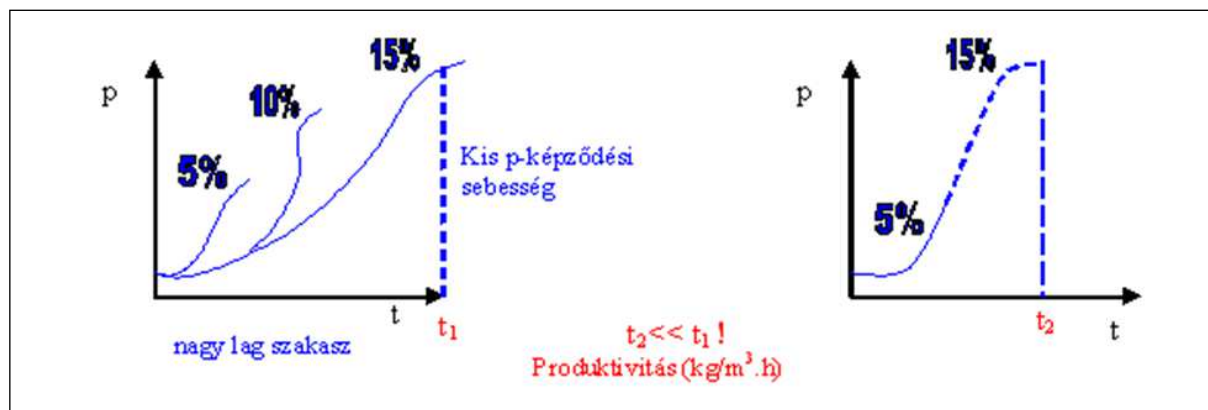
A folyamat biokémiájának megfelelően a gyártási folyamat is kétféle: bakteriális és fungális lehet. Az *A. niger* alapú technológiák jóval elterjedtebbek.

Érdekes technológiai változatot dolgozott ki az osztrák Vogelbush cég. *Acetobacter methanolicus* baktériumot használnak a glükonsav-fermentációhoz, egy speciális levegőztető rendszerrel. Első lépésként metanol szén/energia-forráson kemosztát folytonos fermentációval elszaporítják a mikroorganizmust, majd az összegyűjtött sejtömeggel egy külön bioreaktorban nagy glükózkoncentrációt fenntartva végzik a glükóz-glükonsav konverziót. A nagy glükózkoncentráció és a nagy sejtömeg (mint katalizátor) igen intenzív oxigébevitelt (levegőztetést) igényel, amit az ún. becsapódó-sugaras (Vb-IZ) reaktorral oldottak meg.



Glükonsav termelés fonalas gombákkal

Az ipari fermentációt szubmerz körülmények között végzik, rendszerint *Aspergillus niger* törzsszel. A termelési paramétereket a glükóz-oxidáz enzim tulajdonságai határozzák meg. A folyamat tipikusan 5% glükóz – praktikusán keményítő hidrolizátum – koncentrációval indul. 15-20 órás kortól az átalakuló glükózt pótolva steril tömény glükóz oldatot adagolnak. Erre azért van szükség, mert a nagyobb cukor koncentráció esetén lassabban, hosszabb lag-szakasszal indul el fermentáció.



Kalcium-karbonátos közömbösítéssel így kb. 15% glükóz átalakítását lehet elérni 20 óra alatt. Nátrium hidroxid oldat adagolással, automatikus pH szabályozással viszont az átalakított glükóz összmenyisége elérheti a 35 %-ot is.

A konverzió felpörgetése érdekében a sejtnövekedést célszerű korlátozni nitrogén- (20-30 mM) és foszfát-limit (80-90 mM) beállításával. A nyomelemek közül a mangán ionok jelenléte (1-10 mM) szükséges.

A reakció oxigénigénye igen nagy. Az oxigén koncentrációt intenzív levegőztetéssel (1 vvm) magasan kell tartani az egész folyamat során, amit gyakran a fermentor jelentős (2-4 bar) túlnyomás alá helyezésével biztosítanak.

Az oxidáció közben felszabaduló hő elvonása hatásos hűtést (nagy hűtőfelület, sok hűtővíz) igényel.

Az oxidáció során képződő glükonsavat semlegesíteni kell, mert $\text{pH}=4,5$ alatt leáll a savtermelés. A közömbösítés módja szerint többféle technológiát dolgoztak ki.

Kalcium-glükonát gyártás: a szükséges $\text{pH}=5-6$ tartományt kalcium-karbonát adagolásával biztosítják. A tápoldat 2,5% kalcium-karbonátot (mészkőlisztet) tartalmaz. Ezt külön, vizes szuszpenzióban sterilizve adják oltás előtt a táptalajhoz. A Ca-glükonát korlátozott oldhatósága miatt ezzel az eljárással csak kb 15% cukrot lehetett átalakítani. Nagy előrelépést jelentett az a felismerés, hogy bórax jelenlétében az átalakítandó glükóz koncentrációja tovább növelhető akár 350 g/liter értékig. A bór ugyanis akadályozza a kalcium-glükonát kiválását, a termék oldatban marad. Viszont élelmiszeripari hasznosításra készülő termék esetében a bórsav-észter toxicitása miatt bórax nem használható.

A nátrium-glükonát gyártás: a pH szabályozást NaOH oldattal tartják $\text{pH}=6,5$ értéken.

A nátriumsó sokkal jobban oldódik vízben, bórax nélkül is el lehet érni a 35 %-os koncentrációt.

A fermentáció mindkét esetben 90% feletti hozammal működik, előfordul 98% is. A fermentációs idők is rövidek, 24 és 60 óra közé esnek. Ezért nem meglepő, hogy a törzs fejlesztésével eddig nem sokan foglalkoztak.

Egyes gyártók *félfolytonos fermentációs* eljárással dolgoznak, azaz a szakaszos fermentációs ciklus befejezése után a tenyészet 1/4-1/5-ét a fermentorban hagyják, és friss tápoldattal töltik fel, így kezdenek egy újabb tenyésztési ciklust. (A folyamat 3-4-szer ismétlődhet.)

A szakaszos átalakítás végén is kiszűrt micélium tömeg ismételten felhasználható a folyamat katalizálására aktivitásvesztés nélkül. (Ebben az esetben valódi transzformációról, és nem növekedéssel kapcsolatos fermentációról van szó.)

1.3.3. A glükonsav izolálása fermentléből

A feldolgozás első lépése a sejttömeg elválasztása. A micélium jól szűrhető, pl. vákuum dobszűrőn elválasztható. Egyúttal az esetleg megmaradó mészkőliszt szemcséktől is megszabadulnak. A szűrletet aktív szénnel lehet deríteni, színteleníteni. A további lépések már függenek a közömbösítésre használt bázistól.

Kalcium-hidroxidos technológia esetén mésztej hozzáadásával a pH -t 7,0-ra emelik, majd a levét kb. 20%-os koncentrációra bepárolják. Az oldatot $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtve a Ca-glükonát kikristályosodik. A kiválás hatásfokát javítani lehet vízzel elegyedő szerves oldószer, pl. alkohol hozzáadásával. A kristályokat elválasztják, majd szűrőn hideg vízzel mossák. Az anyalúg és a mosóvíz egy újabb aktív szénes tisztítás után visszavihető a bepárlóba. A kristályokat $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten szárítják.

A kalcium-glükonát maga is egy értékesíthető termék, de a piac nagyobb tömegben a nátriumsót és a szabad savat igényli. A Ca-glükonát kristályok tömény vizes szuszpenziójához számított mennyiségű kénsavat adva a glükonsav felszabadítható. Melléktermékként gipsz keletkezik, ami szűréssel elválasztható. A szabad sav vízben jól oldódik, akár 50 %-os oldat is készíthető belőle. Ebben a vizes oldatban a hőmérséklettől függő arányban egyidejűleg jelen van a szabad sav mellett a δ -illetve a γ -lakton is. A tútelített oldatból $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatt a szabad sav kristályosodik, $30-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ között a δ -lakton kristályosítható, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ felett pedig a γ -lakton válik ki. A termék tisztítása ismételt kalcium-glükonát képzéssel, majd aktív szénes derítést követő kristályosítással történik.

A nátrium-hidroxidos pH szabályozás esetén a sejttömeg kiszűrése után a pH -t NaOH-dal 7,5-re emelik, az oldatot aktív szénnel derítik, majd 45%-os koncentrációra párolják be. Ez a tömény oldat egyből dobszárítóra vihető, de így szennyezettebb marad a termék. Hűtéssel kikristályosítva tisztább anyagot kapunk. A nátriumsóból szabad savat ioncserével állíthatunk elő.

A kiszűrt biomassza nem csak takarmányozásra, biogázosításra használható, hanem az enzimek forrása is, belőle melléktermékként glükóz-oxidáz és kataláz enzim nyerhető ki.

Érdekesség: a glükóz-oxidáz enzim felhasználható a szubsztátjainak eltávolítására élelmiszeripari termékekből.

A tojáslé porlasztva szárításánál problémát okoz a készítményben levő néhány ezreléknyi glükóz, amely melegen a fehérjével Maillard reakcióba lép, és ettől barna lesz a termék. A folyadékba glükóz-oxidázt, katalázt és egy kevés hidrogén peroxidot adva a glükóz eloxidálódik glükonsavvá, és elmarad a barnulás.

Más termékeknél a csomagolásba zárt oxigén jelenthet problémát (enzimes barnulás, pl. katecholak oxidációja kinonnná). A zárt csomagolásba adagolt glükóz-oxidáz + kataláz felhasználja az oxigént és ezzel megakadályozza az elszíneződést. Gyümölcsök esetében nincs szükség glükóz hozzáadására, mivel ezekben mindig van kis mennyiségű szőlőcukor.

Az enzim specifikus működése miatt a glükóz kvantitatív mérésére is használható. Gyorsasága, megbízhatósága miatt ez a tapasztalat analitikai módszerre fejlesztve bevonult a klinikai gyakorlatba.

A technológia fejlesztésének egyik jövőbeni iránya a konverzió megvalósítása tisztított enzimekkel. Viszont az enzim intracelluláris, illetve sejtfalhoz kötött, ezért a kinyeréshez sejtfeltárás szükséges, ami a jelentősen megdrágítja a preparálást. Ma már nagyipari glükonsav technológiát is üzemeltetnek tisztított enzimes biokonverzióval (Argonne, USA), amelynek során rögzített glükóz-oxidáz enzimet használnak. A keletkezett savat nem semlegesítik klasszikus módszerekkel, hanem az enzimes reaktorba integrált elektrodialízissel folyamatosan távolítják el a rendszerből.

1.3.4. A glükonsav felhasználása

A glükonsav nem-korrozív (nem-oxidáló) középerős sav. Két- és háromértékű fémionokkal vízdoldható komplexeket képez, aminek révén a fémfelszínek tisztítására, rozsdamentesítésére használható. Vizes (50 %-os) oldatát a tejipar használja a tároló edények, alumínium eszközök és a csőrendszerek tisztítására.

Fémkomplexei (Ca, Fe, Mg), jól felszívódnak, ezért ezeket állati takarmányba keverve is használják. A humán gyógyászatban a vas- és kalcium bevitel során is glükonsavat használnak ellen-anionként. Ezeket a vízdoldható komplexeket használja az építési-, textil-, detergens-, illetve gyógyszeripar is.

Az élelmiszerekben enyhe savanyú íze miatt használják. Kedvező toxicitási jellemzői miatt élelmiszerekben és üdítő italokban is alkalmazzák kiegészítőként. A mikrobiális glükonsav termelési eljárásokat az FDA is jóváhagyta. A δ -lakton savanyú ízhatása lassan alakul ki a hidrolízis során.

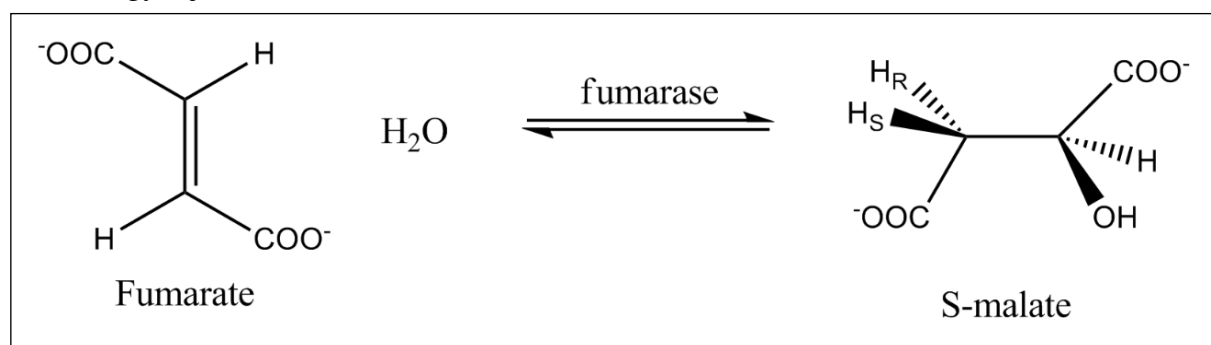
Japánban évente 3000 tonna laktont használnak fel csak a szójafehérje kicsapására.

1.4. Almasav gyártás

Az almasavat először éretlen almából izolálták, innen ered a neve is. A természetben az L-izomer fordul elő. Kémiai szintézissel, maleinsav vagy fumársav kémiai hidratálásával viszont racém keverék, DL-almasav keletkezik. Élelmiszeripari szempontból mindkét forma felhasználható, ízük azonos és egyformán biztonságosak. Az összes termelés kb. 65.000 tonna/év.

Az élelmiszerekben gyümölcslevek, szénsavas üdítőitalok és cukorkák ízestésénél fanyar savanyú íze miatt az édes íz ellensúlyozására alkalmazzák. A kozmetikai iparban, a krémek és más készítmények pH-jának beállítására, alfa-hidroxi-karbonsavként hámlékeztetésre használják. Ezen kívül más iparágakban fémfelületek valamint textilszálak kezelésére is alkalmas. Az almasav igény megugrásával számolhatunk, ha ipari léptékben is megoldódik a biológiailag bontható poli-almasav műanyag gyártása és alkalmazása.

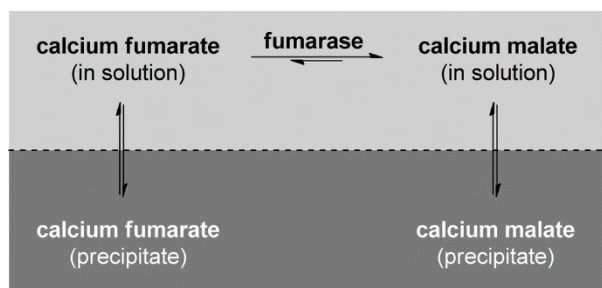
Az említett szintetikus gyártások mellett a fumársavból enzimmel katalizált konverzióval is gyártják.



Eredetileg a *Brevibacterium ammoniagenes*, később a *B. flavus* által termelt fumaráz enzimet kinyerés, tisztítás nélkül κ -carrageenan gélben rögzített sejtes formában használva 70%-os kihozatalt értek el. Az optimális pH = 8, a hőmérséklet: 25 °C (Tanabe Co., J).

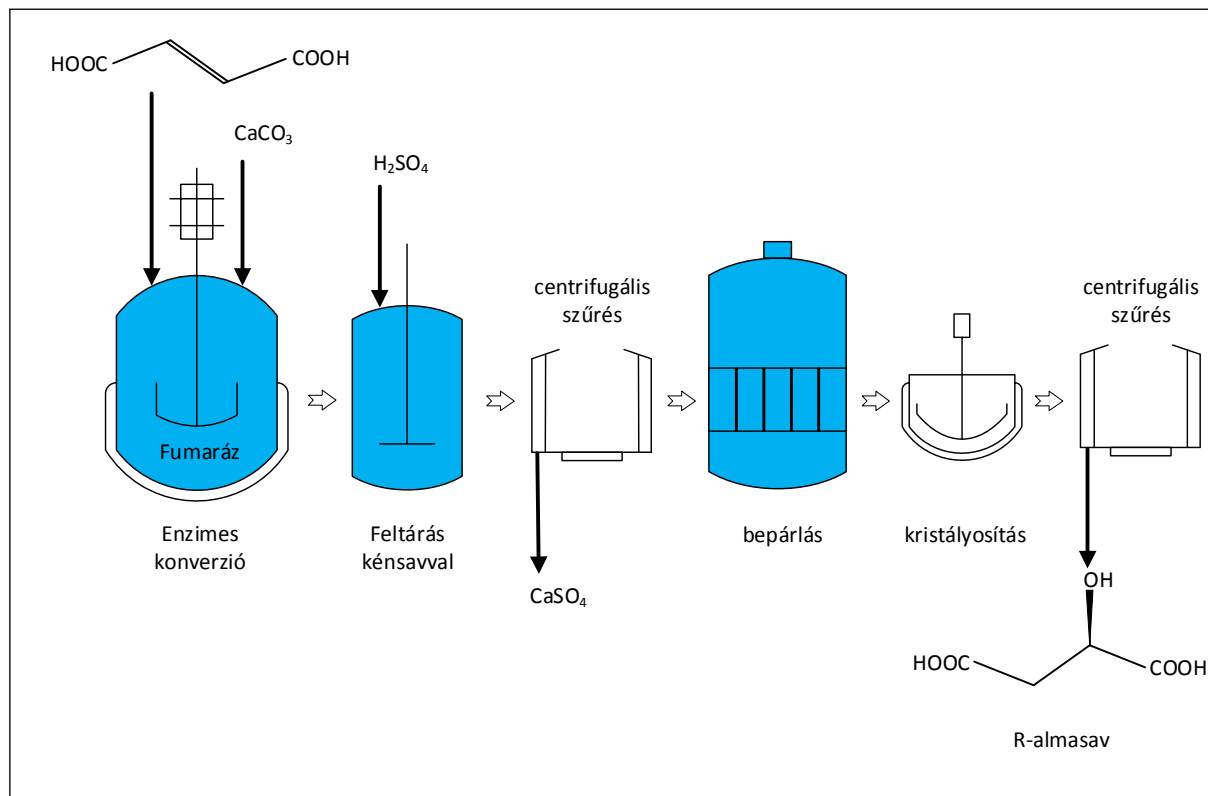
Genetikailag módosított *Saccharomyces cerevisiae* sejtjeiben túltermeltették a fumarázt, és ezzel a konverzió elérte az egyensúlyi 85%-ot.

Ennél nagyobb, közel 100%-os kitermelés csak akkor érhető el, ha a terméket eltávolítjuk a rendszerből. Ez történhet membrános bioreaktorban, illetve csapadékképzéssel. A csapadékos eljárás (*Corynebacterium glutamicum* sejtuszuspenzió, Amino GmbH, D) azon alapul, hogy mind a szubsztrát, mind a termék kalcium sója rosszul oldódik vízben, az oldhatóságuk kb. 1%. Ha a szilárd kalcium fumarátot viszünk be a rendszerbe, akkor az egyensúlyban lesz saját telített, kb. 1%-os oldatával. Ahogy az enzim átalakítja a fumarátot,



az folyamatosan pótlódik a kristályok feloldódásával. A keletkező malát viszont, amikor koncentrációja eléri az egy százalékot, kicsapódik. Így a folyamat egészen addig megy, amíg a szilárd szubsztrát el nem fogy. Az almasavat sójából kénsavval szabadítják fel, a kicsapódó gipszet leszűrik. A szűrletet bepárlással töményítik, lehűtve a kikristályosodik az almasav. A nyersterméket szűréssel elválasztják, a szűrőn mossák és szárítják. Ha további tisztításra van

szükség, akkor az anyagot újraoldják, ioncserével és/vagy aktív szénnel tisztítják, és újra kristályosítják.



Foglalkoztak az L-almasav de novo fermentációs előállításával is. Az *Aspergillus flavus* jó termelőnek bizonyult, csak az a probléma, hogy mind a három négy-szénatomos dikarbonsavat (fumársav, maleinsav, almasav) túltermeli.

TARTALOMJEGYZÉK

1. Szerves savak gyártása	1
1.1. CITROMSAV	1
1.1.1. Előfordulása.....	1
1.1.2. Felhasználás.....	1
1.1.3. Története.....	2
1.1.4. Termelés	3
1.1.5. Bioszintézis	4
1.1.6. Anyagcsere szabályozások	6
1.1.7. Termelő törzsek	7
1.1.8. Tápoldat.....	7
1.1.8.1. Szénforrás	7
1.1.8.2. N-forrás	7
1.1.8.3. Nyomelemek:	8
1.1.9. Technológiák	8
1.1.9.1. Felületi fermentáció	8
1.1.9.2. Szilárd fázisú fermentáció	9
1.1.9.3. Szubmerz fermentáció	10
1.1.9.4. Fermentációs paraméterek	10
1.1.10. Feldolgozás.....	12
1.1.10.1. A micélium elválasztása	12
1.1.10.2. Oxalátmentesítés	12
1.1.10.3. A citromsav kicsapása	12
1.1.10.4. Feltárás kénsavval	13
1.1.10.5. Tisztítás adszorpcióval	13
1.1.10.6. Koncentrálnak bepárlással	13
1.1.10.7. Kristályosítás	14
1.1.10.8. Szárítás	14
1.1.11. Melléktermékek, szennyvíz	14
1.2. ECETSAV GYÁRTÁS	16
1.2.1. Az ecetsav-baktériumok	17
1.2.2. Az ecetsav képződés biokémiája	18
1.2.3. Tápanyagok, szubsztrátok	19
1.2.4. Levegőztetési megoldások	21
1.2.5. Technológiák	23
1.2.6. Homoacetogének	24

1.3.	GLÜKONSAV GYÁRTÁS	26
1.3.1.	A glükonsav képződés biokémiája	26
1.3.2.	Glükonsav fermentációs technológiák	28
1.3.3.	A glükonsav izolálása fermentléből	29
1.3.4.	A glükonsav felhasználása	30
1.4.	Almasav gyártás	31