

# ANAEROB FERMENTÁCIÓK

## = ERJEDÉSI IPAROK



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## ERJEDÉS

Az erjedés a szénhidrátok lebontását jelenti, amelyet mikroorganizmusok (baktériumok, élesztők, penészek) végeznek, abból a célból, hogy saját élettevékenységükhöz energiát termeljenek.

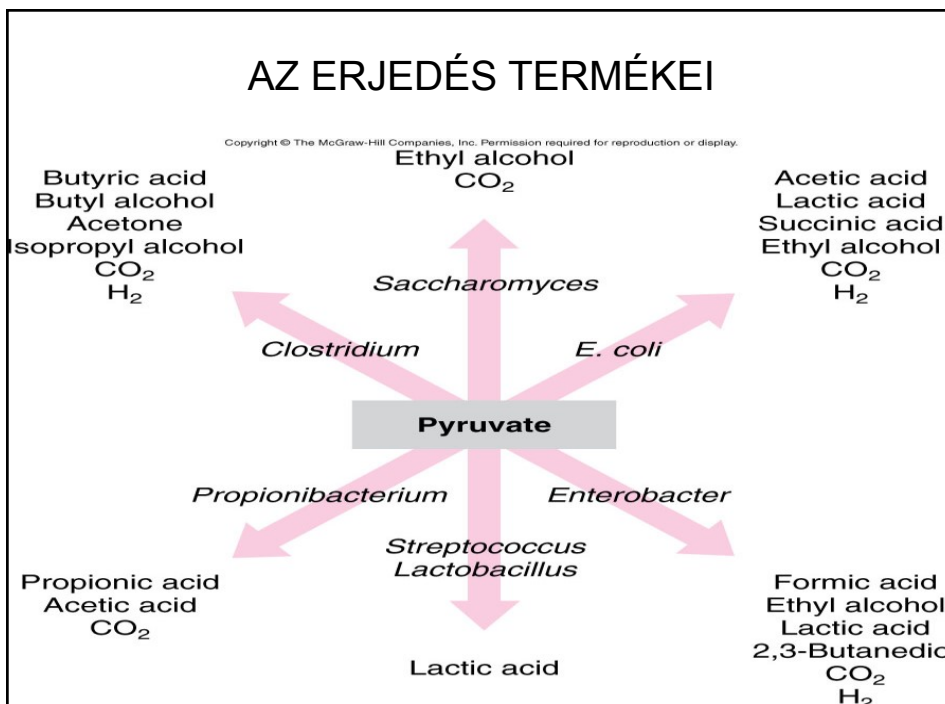
A heterotróf mikroorganizmusok energiatermelése anaerob körülmények között erjedéssel történik.

**Összefoglalva:** az erjedés tehát a heterotróf mikroorganizmusok anaerob energiatermelő folyamata, amely a szénhidrátok ill. egyes származékaik egy vagy több szén-szén kötésének hasításával és az oxigénatomok átrendeződésével jár.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2



## Erjedési iparok

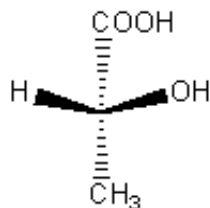
Anaerob technológiákkal nagy léptékben állítanak elő olyan tömegtermékeket, mint az etanol és a biogáz. Ezek gyártásával más tárgyak foglalkoznak, ezért itt nem részletezzük. További tradicionális erjesztési termékek:

- B<sub>12</sub> vitamin (lásd a Vitaminok fejezetben)
- Dextrán (lásd a Mikrobiális poliszaccharidok fejezetben)
- Tejsav
- Aceton-butanol-etanol elegy

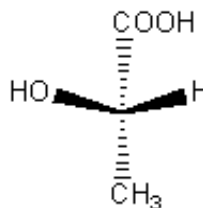


## A tejsav előállítása

Az (L)-tejsav tipikusan az anaerob anyagcsere terméke, a piroszőlősav hidrogénezésével keletkezik.



D-(-)-tejsav



L-(+)-tejsav

A természetben előfordul:

- savanyú káposzta
- kovász
- aludttej, kefir
- kovászos uborka



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

## A tejsav előállítása

Alternatív előállítás:

- Szintetikus: acetaldehid + HCN (racém termék)

Bioszintézis (anaerob):

Heterofermentatív: 1 tejsav/molekula glükóz

Homofermentatív: 2 tejsav/molekula glükóz (nincs CO<sub>2</sub>!)

Törzsek: - *coccusok*, - *bacillusok*, - néhány fonalas gomba

Iparban: *Lactobacillusok*

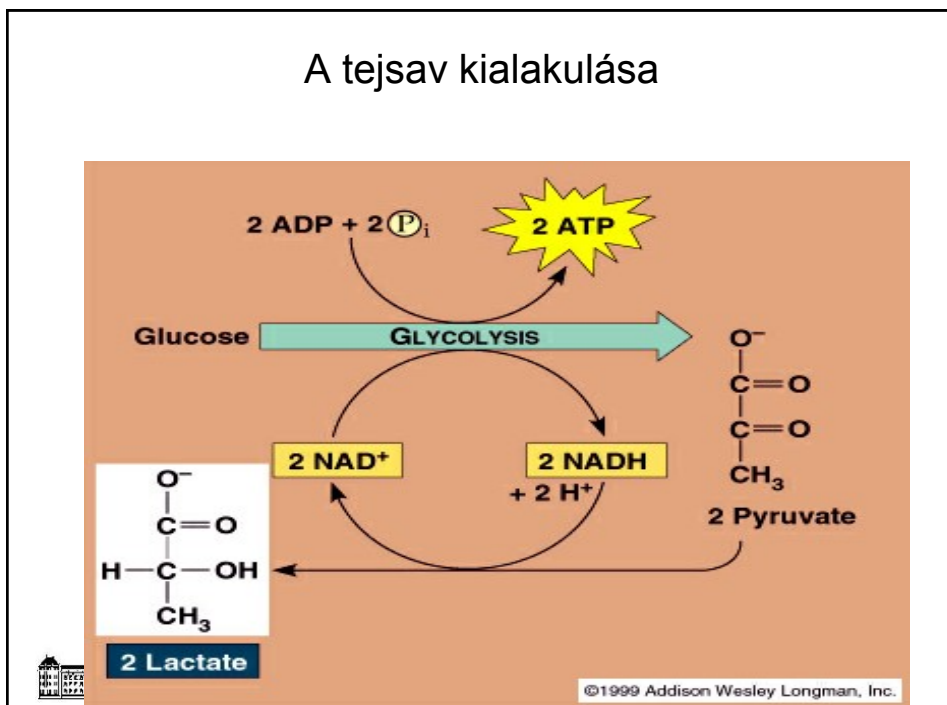
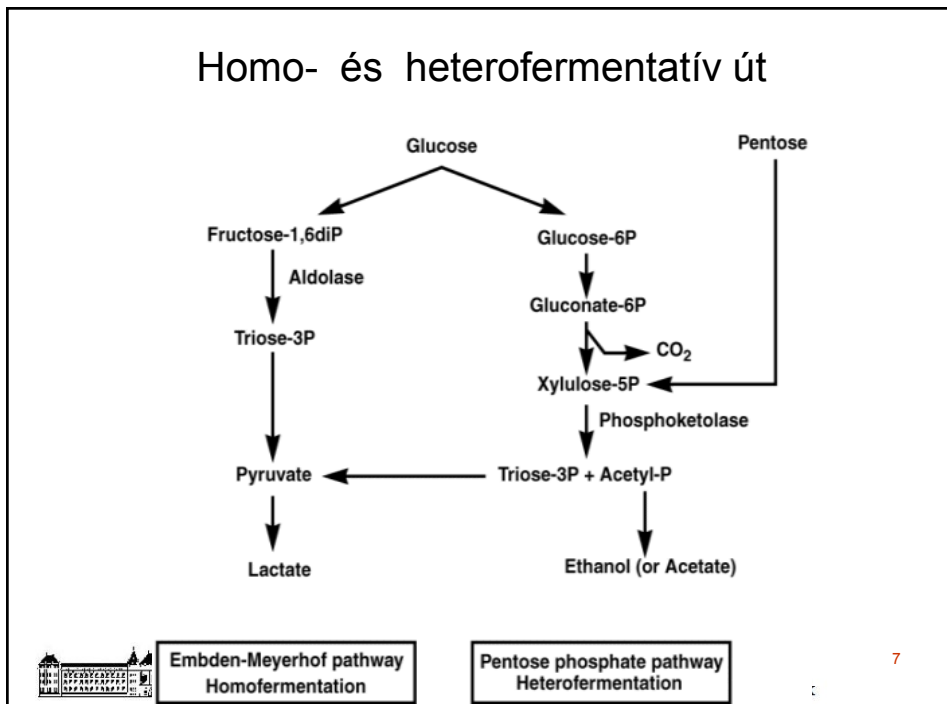
Tápanyagigény: szénforrás: glükóz, laktóz, néha keményítő

N-forrás: komplex, szerves nitrogént igényelnek, fehérje-hidrolizátumokat.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6



## A tejsav termelő törzsek

Baktériumtörzsek	Enantiomer forma	Erjedés típusa
<i>Bacillus coagulans</i>	L (+)	Fakultatív heterofermentatív
<i>Lactobac. casei ssp. casei</i>	L (+)	“ “
<i>Lactobac. rhamnosus</i> korábban <i>L. delbrueckii</i>	L (+)	“ “
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> korábban <i>Streptococcus lactis</i>	L (+)	Homofermentatív
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> korábban <i>Streptococcus cremoris</i>	L (+)	“ “
<i>Streptococcus faecalis</i>	L (+)	“ “
<i>Streptococcus thermophilus</i>	L (+)	“ “
<i>Bacillus laevolacticus</i>	D (-)	Fakultatív heterofermentatív
<i>Lactobac. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	D (-)	Homofermentatív
<i>Sporolactobacillus inulinis</i>	D (-)	“ “



## Tejsavbaktériumok

A tejsavbaktériumok Gram-pozitív, általában nem spóraképző, nem mozgékony pálcikák és coccusok.

Nem képesek a citokróm és a porfirin (légzési lánc részei) létrehozására, a proton-gradiensek segítségével nem tudnak ATP-t létrehozni, azt csak főként erjedéssel, cukrok fermentációjával nyerik.

Korlátozott bioszintetikus képességekkel rendelkeznek → szükségük van:

- aminosavakra
- B-vitaminra
- purin és pirimidin bázisokra
- szénre és cukorra



## A tejsav termelő törzsek tápanyagigénye

Bacteria	Fermentation pathway	Lactic acid enantiomer	Carbon sources substrates and complex
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (formerly <i>L. bulgaricus</i> )	Obligate homolactic	D(-)	Lactose, cheese whey, casein whey, and cheese whey permeate
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (formerly <i>L. delbrueckii</i> )	Homolactic-inducible heterolactic	L(+)	Glucose, sucrose and potatoes
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Obligate homolactic	D, L	Cheese whey permeate and lactose
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	Obligate homolactic	L(+)	Starch
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Obligate homolactic	D, L	Starch
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> and subsp. <i>rhamnosus</i>	Homolactic-inducible heterolactic	L(+)	Lactose and cheese whey
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> and subsp. <i>cremoris</i> (formerly <i>Streptococcus lactis</i> )	Obligate homolactic	L(+)	Lactose and cheese whey permeate
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Obligate homolactic	L(+)	Lactose

## A *Lactobacillus*-ok

Hőmérséklet: 5-45 °C közötti tartományban növekednek.

Savtűrőek → a legtöbb pH = 4.4-es közegben is képes növekedni. Hajlamosak „túlsavanyítani” a közeget, ettől leáll a növekedés → tartósítás (pl. silózás)

A *Lactobacillus* nemzetség tagjai jóval savtűrőbbek, mint a többi tejsav baktérium, ezért olyan fontosak az élelmiszeripari fermentációk végső fázisában.



## A tejsav előállítása

A fermentáció körülményei:

Anaerob, levegőztetés nem kell,  $N_2$  öblítés viszont igen.

Pufferolás: a keletkező tejsavat közömbösíteni kell, mivel az károsítja a sejteket. Lehet:

- $CaCO_3$ -tal (automatikus, de szilárd fázis),
- Alkáli lúgokkal (jelentősen hígítja a fermentlevet)
- $NH_3$  gáz befúvatásával (drágább, de nem hígít)

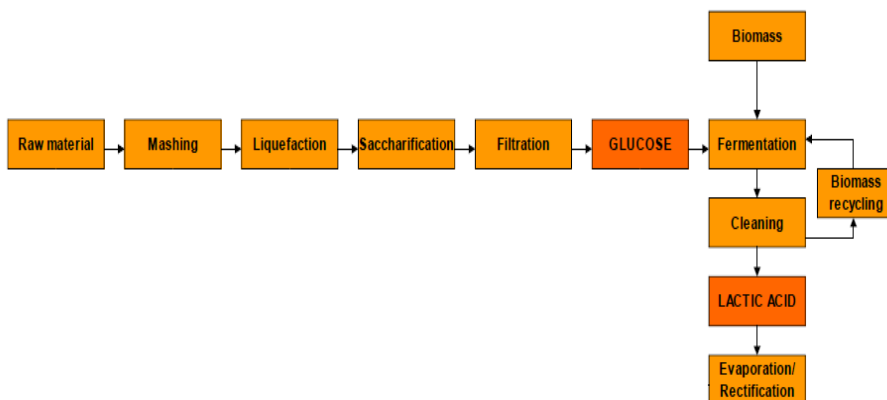
Kidolgoztak szakaszos és folytonos technológiákat, a leg-hatékonyabb a sejtviisszatáplálásos.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

## A tejsav előállítása keményítő alapon



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

## A tejsav előállítása

Feldolgozás:

„klasszikus”, kalcium-laktátos lé:

- a hőmérsékletet 80-90 °C-ra emelik,
- az oldat pH-ját kalcium-hidroxiddal 10-11 közé állítják.
- a kalcium laktát teljes egészében oldatba megy.
- a levet melegen szűrik
- kénsavval felszabadítják a tejsavat, a kalcium gipsz formájában kicsapódik.
- csapadékos oldatot leszűrik,
- a kapott tejsav oldat tetszőlegesen töményíthető, akár 80-90 %-ig, atmoszférikus vagy csökkentett nyomáson.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

## A tejsav előállítása

Alternatív feldolgozási műveletek:

Alkáli, vagy ammónium-laktátos lé:

- a sejtek elválasztása után mindenképpen savval szabadítják fel a tejsavat, rengeteg só képződik
- Koncentráció, tisztítás
- Bepárlás.

Membránműveletek: egyre inkább terjednek

- A sejtek elválasztására mikroszűrés,
- Az oldott molekulák szétválasztására nanoszűrés,
- A laktát só koncentrálására elektrodialízis
- A sav felszabadítására bipoláris elektrodialízis.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16



## A tejsav felhasználása

- Élelmiszeripar (tartósítás, ízesítés, sütőipari adalékok, malolaktikus erjesztés)
- Textil festés, kikészítés, bőrcserzés
- Műgyanták, celofán
- Ragasztók, detergenssek
- Kozmetikai ipar (AHA)
- Gyógyszeripar

Legújabb: „zöld kémia”:

- Lebontható műanyagok (polilakton) gyártása
- Észterei a „zöld” (= környezetkímélő) oldószerek



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

## Aceton-butanol-(etanol) fermentáció

### Bevezetés:

Pasteur figyelte meg először baktériumok butanoltermelését a 19. században.

I. Világháború előtt – a butanolt használták butadién előállítására → szintetikus gumihoz

Chaim Weizmann - *Clostridium acetobutylicum*

I. Világháború idején inkább az acetont tekintették főterméknek – felhasználták a TNT robbanóanyaghoz

I. Világháború után újra a butanol válik fontossá a nitrocellulóz előállításához



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

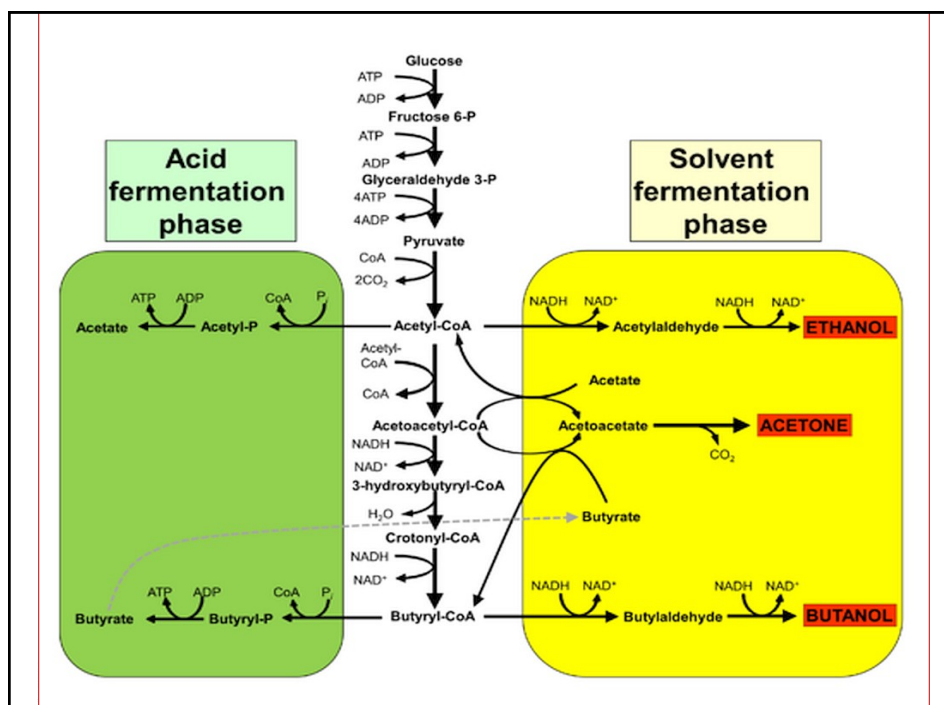
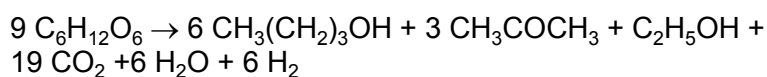
18

## Aceton-butanol-(etanol) fermentáció

A II. Világháború után a petróleum bázisú termékek kiszorították a fermentációs termékeket → a 200 m<sup>3</sup> alatti fermentorok nagy többségét leállították (kivétel: pl. Taiwan és Dél-Afrika)

### Butanolos erjesztések:

A *Clostridium acetobutylicum* keményítőtől, melaszból, pentózokból, szacharózból állít elő n-butanolt, acetont, izopropanolt és nyomokban etanolt állít elő.



## Aceton-butanol fermentáció

A termékek relatív aránya függ:

- baktérium törzstől
- fermentációs körülményektől

Három fermentáció típust különböztetünk meg:

1. Aceton-butanol fermentáció → *Clostridium acetobutylicum*
2. Butanol - izopropanol fermentáció → *Clostridium butylicum*
3. Vajsav - ecetsav fermentáció → *Clostridium butyricum*



## Végtermékgátlás

A 0,5%-nál kisebb koncentrációjú butanolnak nincs hatása a sejtekre, de nagyobb koncentrációban károsítja a sejtmembránt.

1,3 – 1,7%-os butanol koncentráció felett a termelés leáll.



## Termelő törzsek

A *Clostridium* baktériumcsaládba tartozó mikrobák képesek keményítőt (egyesekek cellulózt) közvetlenül, vagy egyszerűbb szénhidrátokat (glükózt, fruktózt, xilózt, szacharózt, laktózt, stb.) anaerob körülmények között erjeszteni. Gram-pozitív spóráképző pálcák, egyik végükön több ostorszerű mozgásszervük van.

Keményítőszerű tartaléktápanyagot tárolnak.

**Elnevezésük:** spórázáskor a nagyméretű endospórák deformálják a sejtfalat, a sejt végén buzogányszerű dudort alkotnak.



BME Alkalmazott Biotechnológia és

## Aceton-butanol fermentáció

Törzseltartás: a spórák nagyon ellenállóak, sokáig eltarthatók. A *Clostridium acetobutylicum* törzskultúrákat spóra formájában, homokban akár 30 évig is tárolják.

A fermentorokat (200-700 m<sup>3</sup>) hővel sterilizik.

Levegőztetni nem kell (anaerob), de beoltás előtt és után a levet CO<sub>2</sub> befúvatásával keverik, egyúttal telítik széndioxid-dal.

A fermentáció szénforrása: melasz vagy kukorica keményítő

Az indulási pH-t 5,8-6 közé állítják, a hőmérséklet 34°C.

A fermentációs idő 36 óra, lefutása: →



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

## A fermentáció lefutása

Az első szakaszban a pH csökken, kb 5,2-re → mert szerves savak (ecetsav és vajsav) keletkeznek.

A következő szakaszban a pH emelkedik → a savakból acetone és butanol képződik. Amikor felesleges  $\text{NADH}_2$  van jelen, akkor a sejtek felveszik a megtermelt vajsavat és butanollá redukálják.

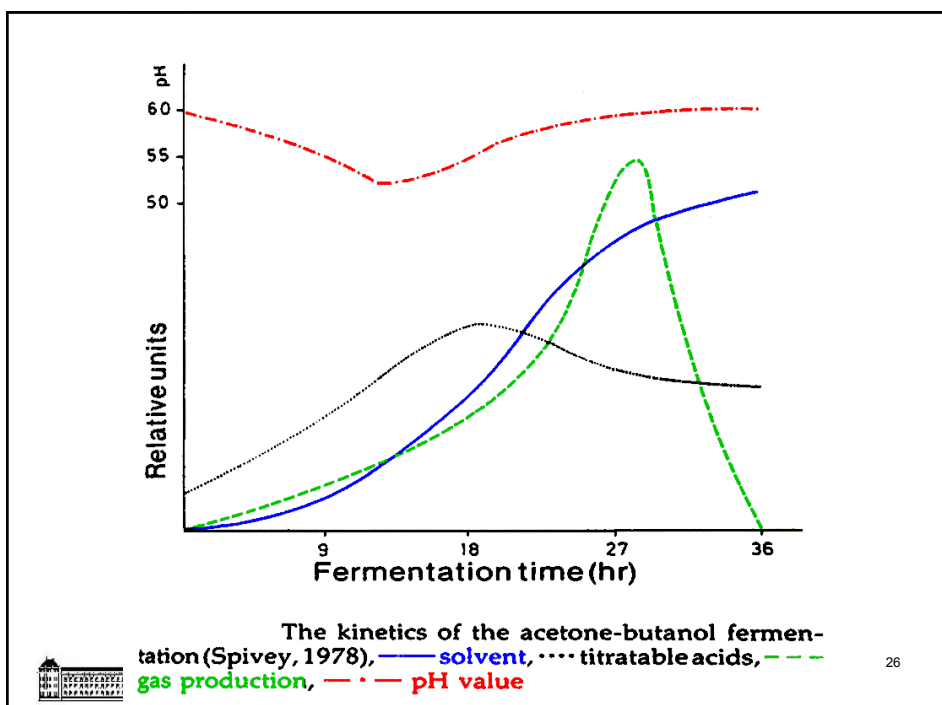
Végül a növekedés és az oldószer termelés leáll. A legnagyobb változás a gáztermelés sebességében mutatkozik. Ez jelzi az anyagcsere leállítását. A pH visszaáll az 5,8 értékre.

A kész levet feldolgozásra továbbítják.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25



26

## Aceton-butanol fermentáció

termék	cukor átalakítás, %	Termelt mennyiség
Butanol	30	1053 kg
Aceton	30	526 kg
Etanol	*	175 kg
CO <sub>2</sub>	50	2900 kg
H <sub>2</sub>	2	117 kg
* arány (6:3:1)		

Hozamok egy 90 m<sup>3</sup>-es fermentorban:

5,85 t fermentálandó cukrot tartalmaz

A CO<sub>2</sub>-ot kinyerik

Az acetont, butanolt, etanolt kidesztillálják

Desztilláció maradékát megszáritják → takarmány



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

## Erjesztési technikák

ABE erjesztésnél is fellép a termékgátlás, 0,7-1,5% butanol koncentrációnál. A szaporodás és a termékképzés egyaránt csökken.

Tehát nagy mennyiséghez:

- vagy nagy fermentációs térfogat kell,
- vagy növelni kell a térfogati produktivitást

Erjesztő mikroorganizmusként kizárólag a *Clostridium acetobutylicum* törzset használják.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

## Szakaszos technológiák

Szénforrásként keményítő-, cellulóz és hemicellulóz-, szacharóz- vagy laktóztartalmú nyersanyagokat alkalmaznak.

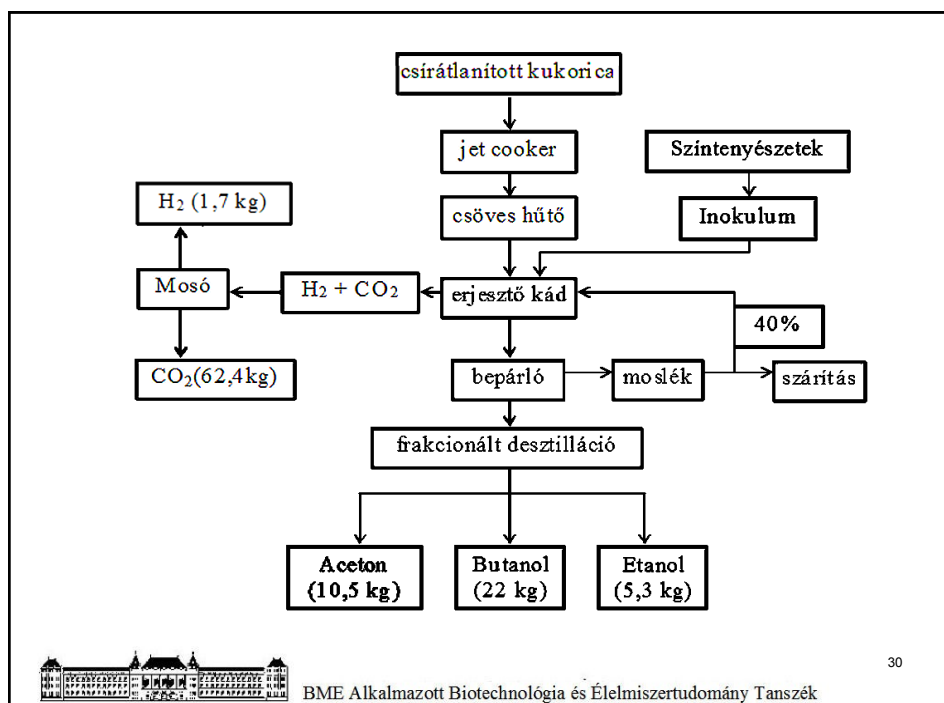
A keményítőtartalmú nyersanyagok közül a kukorica a legfontosabb.

A szemekből a csírárt eltávolítják → őrlék → keményítőtartalmát (folyamatos főzőben) elcsirizesítik → oldatba viszik



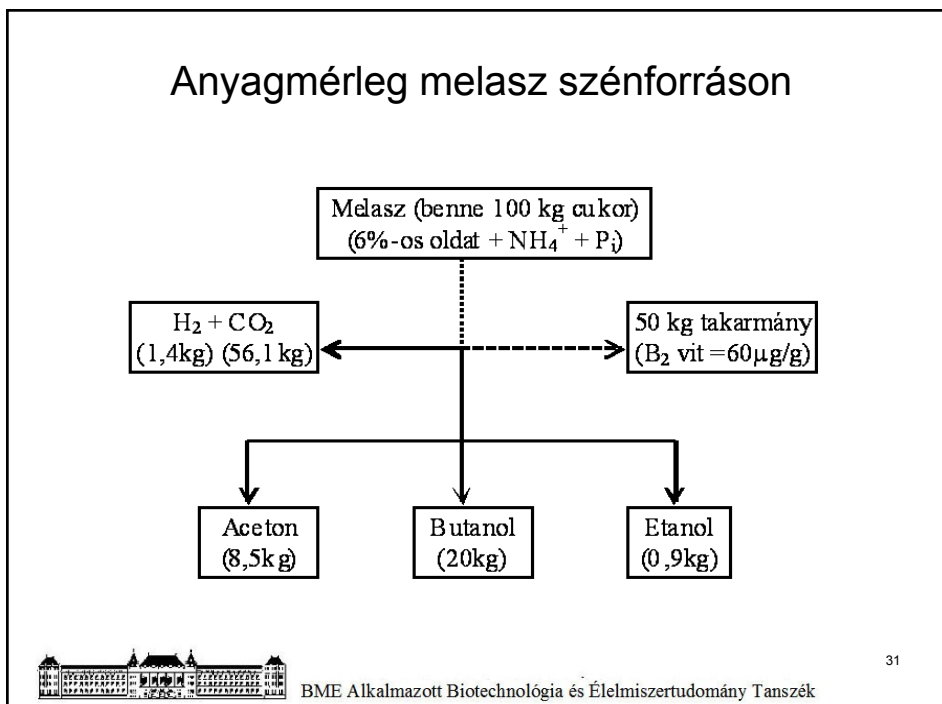
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30



31

## ABE törzsfejlesztés

Rekombináns DNS technológiát, hagyományos mutagenézist és szelekciót alkalmaztak, hogy módosítsák a kívánt metabolikus útvonalakat az oldószertermelő *Clostridiumok*-ban.

Antiszensz blokkolás: a *C. acetobutylicum* 824 törzsben a butanol/aceton arány növelése érdekében az mRNS transzlációt gátló komplementer RNS-t használtak („anti-sense RNA technology”), hogy blokkolják az aceton termelő útvonalat alkotó enzimek és a CoA-transzferáz képződését, így növeljék a butanol részarányát.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



## Továbbfejlesztett technológiák

Régen: szakaszos fermentáció

- 1940-es és 1950-es évek során a butanol ipari léptékben szakaszosan, anaerob fermentorokban termelték.
- A manipulálatlan törzsek igényeinek megfelelően (cukornád) melaszt használtak szénforrásként.
- Fermentáció végére a sejtömeget és más lebegő részeket centrifugálással távolították el és takarmányként hasznosították.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Folytonos technológiák

Elmúlt két évtized alatt folytonos fermentációs technológiákat fejlesztettek ki.

Ezek továbbfejlesztése a sejtviisszatartásos technológia: az elvett léből a sejteket elválasztják és a visszavezetik a fermentorba → ezzel megnövelik a sejtek koncentrációját a reaktorban és emelik a produktivitást.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Downstream fejlesztések

Módszerek az oldószer-kinyerés egyszerűbbé és gazdaságosabbá tételére:

Gáz sztripelés

- a fermentlén gázt (célszerűen a termelődő szén-dioxid) áramoltatnak keresztül
- ahogy a gáz átbuborékol a fermentoron, oldószer gőzöket visz magával (gőznyomás), lehűtve ezek lekondenzálnak és összegyűjthetők
- a gázt recirkuláltatják a fermentorba, további oldószer kinyerésére



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Pervaporáció

A fermentlé egy membránnal érintkezik, amelynek másik oldalán áramló inert gáz vagy vákuum van.

A termelt oldószer molekulák beoldódnak a membrán apoláris anyagába, átdiffundálnak rajta és a másik oldalon gőzként jelennek meg.

Az egyensúly akkor állna be, amikor a gőzök koncentrációja eléri az adott hőmérséklethez tartozó gőznyomást. Ha viszont a gőzöket folyamatosan elvisszük egy kondenzátorba, a termelt oldószerek elvétele is folyamatossá válik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Pervaporáció

A művelet hatékonyságát két paraméterrel jellemezhetjük:

- szelektivitás: az eltérő polaritású illékony anyagok át-eresztésének/visszatartásának mértéke
- fluxus: az egyes komponensek anyagtranszportjának sebessége, egységnyi időre és membránfelületre vonatkoztatva



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Oldószer kinyerési módszerek

A kihazatok összehasonlítása:

**A comparison of novel ABE production systems using glucose as substrate.**

Fermentation process	Culture	Sugar used g/L <sup>a</sup>	Total ABE produced g/L	Yield	ABE productivity (g/L/h)
Batch (control)	<i>C. beijerinckii</i> BA101	<60	<33	0.38–0.40	0.35
<b>Product recovery by gas stripping:</b>					
Batch	<i>C. beijerinckii</i> BA101	161	75.9	0.47 <sup>b</sup>	0.61
Fed-batch	<i>C. beijerinckii</i> BA101	500	233	0.47 <sup>b</sup>	1.16
Continuous	<i>C. beijerinckii</i> BA101	1163	460	0.40	0.91
<b>Product recovery by pervaporation:</b>					
Fed-batch	<i>C. acetobutylicum</i> 824	470 <sup>c</sup>	155	0.31–0.35	0.13–0.26

<sup>a</sup> g per L culture volume.

<sup>b</sup> values are higher than expected.

<sup>c</sup> calculated value.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Extrakció

Vízzel nem elegendő szerves oldószerrel  
A butanol jobban oldódik a szerves fázisban mint a vízben (fermentlé) → megoszlás

A fázisok szétválasztása (ülepítés/centrifugálás)

Probléma: a szerves fázisból ki kell vonni az átoldódott termékeket – pl. desztillációval (nem lehet kikerülni)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Extrakció

Hátrányai:

- Az alkalmazott oldószer a sejtekre nézve toxikus lehet,
- nehezen szétválasztható emulzió kialakulása,
- Az extraháló oldószer vesztesége (egy kevés mindig átoldódik a fermentlébe)
- A sejtek akkumulációja a szerves és a vizes fázis határ felületén
- Megoldás: membrán-extrakció (persztrakció)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Membránextrakció

Fermentlevet és az oldószert egy membránnal választjuk el. A membrán anyagán keresztül érintkezik a két, egymással nem elegyedő folyadék.

Apoláris anyagú membrán esetén a butanol beoldódik a membrán anyagába és átdiffundál rajta, míg más, hidrofíl komponensek illetve fermentációs köztermékek (pl: ecetsav, vajsav) visszamaradnak a vizes fázisban.

Nincs direkt kapcsolat a két fázis között, így az oldószer toxicitása, fázis diszperzió, emulzió és réteg képződés drasztikusan lecsökken vagy megszűnik



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## ABE technológiák összehasonlítása

Technológia	Produktivitás (g/l*h)	Oldószer konc. (g/l)	Maradék szénhidrát (g/l)	Mellék termék (g/l)
Szakaszos (szabad sejtes)	0,2-0,6	10-18	kicsi v. 0	1-3
Szakaszos (rögzített)	0,24	17	-	-
Folytonos (szabad sejtes)	0,75	13,0	1	5
Folytonos (adszorbeált)	1,5-4,1	-	-	-
Folytonos (gélbezárt)	1-1,8	-	-	-
Folytonos (kétlépcsős)	0,6-0,7	18,5	0	-
Sejtrecirkulációs (kétlépcsős)	3,6	13	kicsi	-
Extraktív (sejtrecirk.)	3,1	18	-	-
Termék kiüzéses (szabad sejtes)	0,31	16	-	-
Termék kiüzéses (kétlépcsős rögzített)	2,3+0,6	-	-	-



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

42

## Gazdasági kérdések

Az erjesztéssel gyártott ABE termékeknek erős konkurenciát jelentenek a petrokémiai alapokon gyártott termékek.

Gazdasági hátrány az erjesztéssel nyert ABE termékek alacsony elérhető koncentrációja, az ilyen híg oldatoknál koncentrálsuk és frakcionált kinyerésük a klasszikus rektifikálással nagyon energiaigényes.

A térfogati produktivitás mellett a másik legfontosabb mérőszám gazdasági számításokhoz az erjesztéssel nyert összkoncentráció.



## Gazdasági kérdések

Utóbbi évek gazdasági tanulmányai szerint nem gazdaságos a butanol termelése a petrokémiai útvonalhoz viszonyítva.

További fejlesztésekre van szükség, hogy versenyképes legyen a kémiai előállítással

1. Genetikailag módosított törzsek kifejlesztése
2. olyan új törzseket létrehozni, melyek képesek lignocellulózból származó cukrok felhasználására és rezisztensek e hidrolizátumok a mikrobiális inhibitoraival szemben



## Gazdasági kérdések

Fejlesztési irányok:

3. Minél olcsóbb szénforrások hasznosítása (melléktermékek, hulladékok, például a kukorica rost hidrolizátuma)
4. a szénhidrát alapanyag minél teljesebb elerjesztése és az értéktelen melléktermékek képződésének minimalizálása. Ez a kihozatal javítása mellett a szennyvízbe kerülő szerves anyag mennyiségét is csökkenti.
5. A sejttömeg visszavezetése, nagy sejtsűrűség
6. A fermentációs melléktermékek ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ , biomassza) hasznosítása

