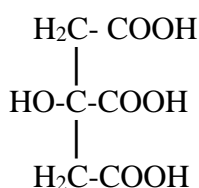


SZERVES SAVAK GYÁRTÁSA

Elsődleges anyagcseretermékek, az energiatermeléshez vagy a növekedéshez kötött bioszintézis. Minden nagy rendszertani egységben (baktériumok, élesztők, fonalas gombák) vannak termelők. Általában hiányos anyagcserét jelez a savtermelés – az oxidáció nem megy végig szén-dioxidig és vízig. Anaeroboknál nem az oxidáció hiányos, hanem speciális, kis energianyereségű reakciók fordulnak elő (homofermentatív tejsavtermelők, homoacetogének).

1. CITROMSAV

A citromsav, a 2-hidroxi-1,2,3,-propántricarboxil 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. Biológiailag 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/mól, 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 szárazanyagának 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 másodperc-re, 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 textúráját, csökkenti ragadóságot az íz befolyásolása nélkül.

Gyógyszeripar: kalcium és vas bevitele citrát komplex formájában, Na-sója véralvadást gátló hatású (megköti a kalciumot a vérből), kozmetikumokban tartósítószerként.

Műanyagipar: citromsav észterek: lágyítók (vinil és cellulózgyantákhoz)

Fémipar: felület tisztítás, rozsdamentesítés, passzíválás (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

1784. A citromsavat először Scheele izolálta citromléből. 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 mintegy 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 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 megvalósítható technológia felületi tenyésztésben 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 Rowntree Ltd. - saját szabadalmát használva - 1927-ben indította meg a citromsavtermelést.

1928-ban melaszt hasznosító eljárásra épült üzem Csehországban, Kaznejevban, német szabadalom alapján. Ez azonban új nehézségeket is okozott a melaszban lévő fémionok zavaró hatása miatt. Erre talált megoldást Leopold, a felesleges vasat 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)

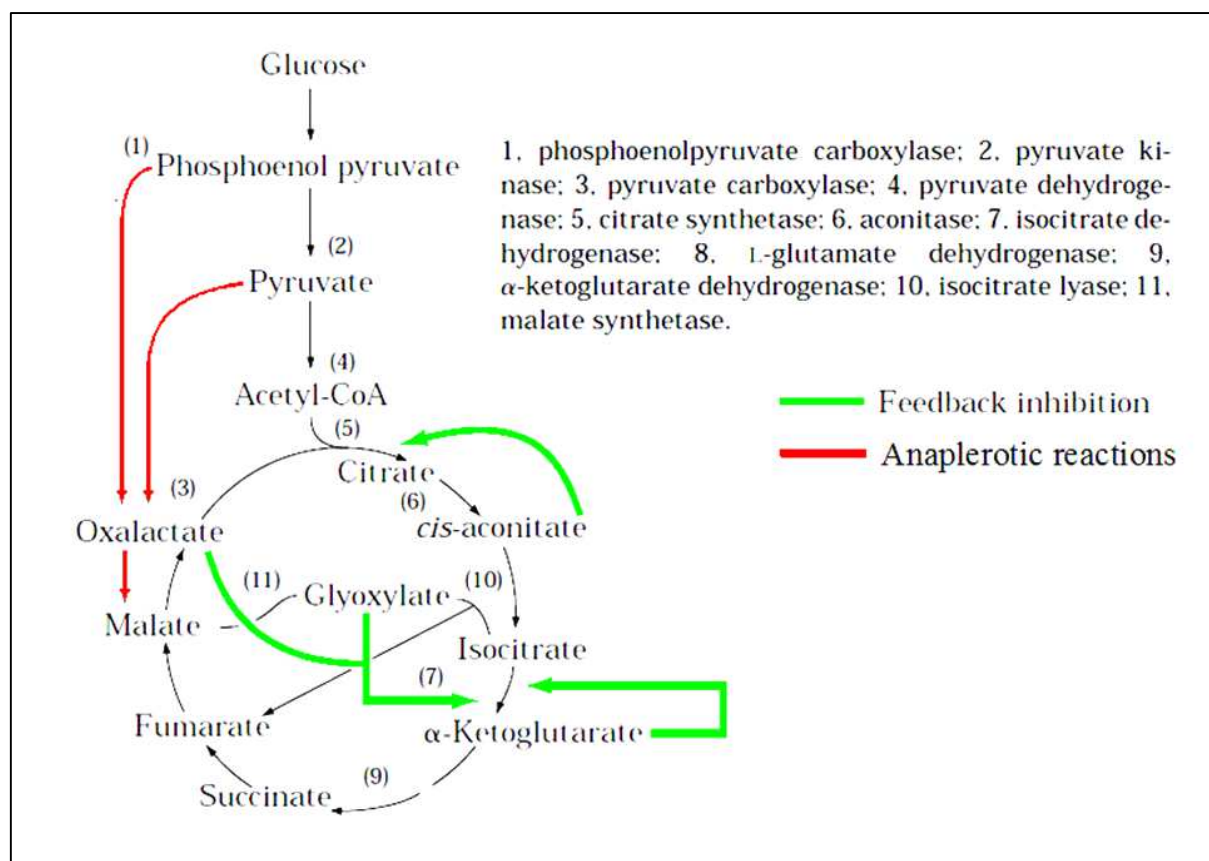
NSZK: Benckiser, Boehringer

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 fermentációban. 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

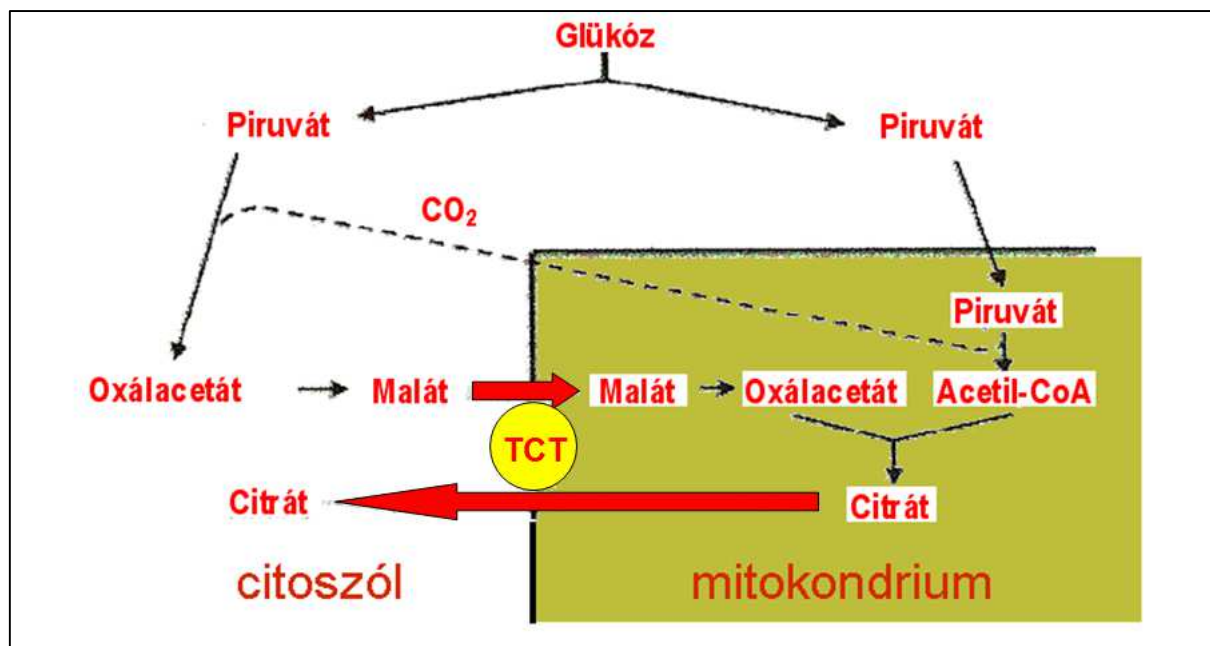
A szén-dioxid anaplerotikus megkötését a piruvát karboxiláz enzim katalizálja. Az enzim eukariótákban jellemzően a mitokondriumban található, de az *A. niger*-ben mitokondriális és citoszolikus formája is létezik. Az utóbbi működése miatt az anaplerotikus szén-dioxid megkötés (vagyis az oxálecetsav kialakulás)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

Az eddig tárgyalt primer metabolitok esetében indukált mutációval állították meg az anyagserefoolyamatokat, hiánymutánsok létrehozásával kényszerítették ki a céltermék felhalmozódását. A citromsav esetében erre nincs szükség, a citromsav-ciklus összes génje és a rólu 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 a glikolízis végtermékeként 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 oxalacetáton keresztül citromsavvá alakul.



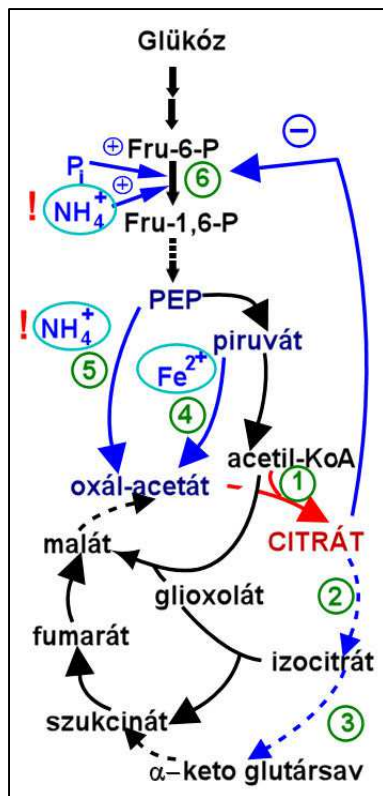
2. ábra A citrát kilépése a mitokondriumból antiporttal

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: glükonsav fermentáció).

A megtermelt és a citoplazmába transzportált citromsavat ki is kell vinni a sejtől, ráadásul úgy, hogy a koncentráció a fermentáléban 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. 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 sejtfa szintézisét, összetételét és morfológiáját is.

1.1.6. Anyagcsere szabályozások

A klasszikus anyagcsere-mérnökség első lépése a reakcióutak, az egymást követő lépések, közttermékek feltérképezése volt. Ennek alapján döntöttek el, hogy mely lépéseket célszerű genetikai beavatkozásokkal lezárni, korlátozni vagy derepresszálni. A vizsgálatok követ-



3. ábra A citromsav bioszintézist befolyásoló anyagok

kező 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.

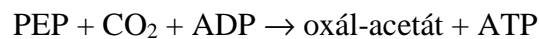
Anaplerotikus reakciók:

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



Az enzim Mg^{2+} , Fe^{2+} és K^+ ionokat igényel, azaz itt a vas ionra 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, nyomelemnyi 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) 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 energia ráfordítás 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, tisztátalan nyersanyagok, mint a répa- és cukornád melasz, a nyers keményítő, keményítő hidrolizátum, nyerscukor előkezelést igényelnek. A melasz kiváló szénforrás, szacharózt tartalma mintegy negyven százalék 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 alacsonyban 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 oldatósági 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 vízdoldhatósága (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 szervetlen 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 képződést, 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 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 szövedéket. 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 aseptikus (az adott folyamatra ártalmas mikrobáktól mentes) működést. A tálcák egymás fölött, egy sterilizált, 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 befújt levegőt nedvesítik, mert különben jelentős mennyiségű párat viz 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 szénhidrát-tartalmú 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, 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 tenyésztet 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

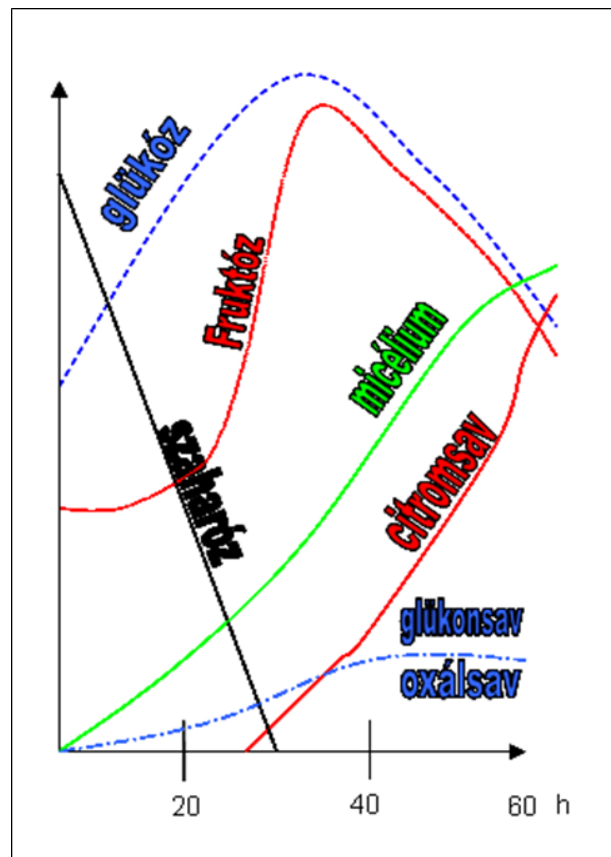
A világ citromsav termelésének túlnyomó részét szubmerz fermentációval állítják elő. Ennek számos előnye van a felületi vagy az SSF tenyésztéshez képest, így kisebb a munkaerő-igény, nagyobb a konverzió és a produktivitás, alacsonyabbak a költségek, kevesebb a befertőződés, stb.

Ipari léptékben az *Aspergillus niger* törzseket használják citromsav termelésre. Szubmerz tenyészetben szigorúan szabályozott környezeti körülmények között, pelletes formában szaporítják. A tápoldat jellemzően 15-20% fémoon-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 Citromsav fermentációelső szakasza

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 fermentálé 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 jelentősen veszít aktivitásából, pH=3-nál teljesen inaktíválódik. Eszerint a pH-t gyorsan három alá kell csökkenteni. A cukoralapú tápoldatoknak alig van pufferhatása, a termelődő sav hatására a

fermentlé gyorsan lesavanyodik. A melaszban lévő szerves anyagoknak viszont jelentős a pufferkapacitása, a pH kevésbé csökken. Melasz alapú tápoldatoknál emiatt kénsavval vizik le a pH-t.

Adalék: minden más szerves sav fermentációs előállításánál a keletkező savat közömbösíteni kell, mert a sejtek nem viselik el a savas közeget. A citromsav az egyetlen kivétel, ahol nem lúggal, hanem savval szabályozzák 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 átmertileg, 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 visszaiüthet, 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 vésztartalékként 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.



5. ábra Pelletes növekedés rázott lombikban

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).

Kontrollált körülmények között a glükóz átalakítása a citromsavvá 87-92%-os konverzióval megy végbe, a törzstől, a szénhidrát alapanyagától valamint a technológiai paramétereiktől

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 fermentleiben a folyamat 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 dob-szűrővel 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 leg gondosabban vezetett fermentációs technológia mellett is mindig képződik kis mennyiségű oxálsav is. A szűrt fermentle 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 „megtitráljuk” a fermentlevet. Kevés Ca(OH)₂ bevitelével az oxalát leválik, míg az egybázisú (mono-)kalcium-citrát (a hárombázisúval elmentésben) elég jól oldódik.

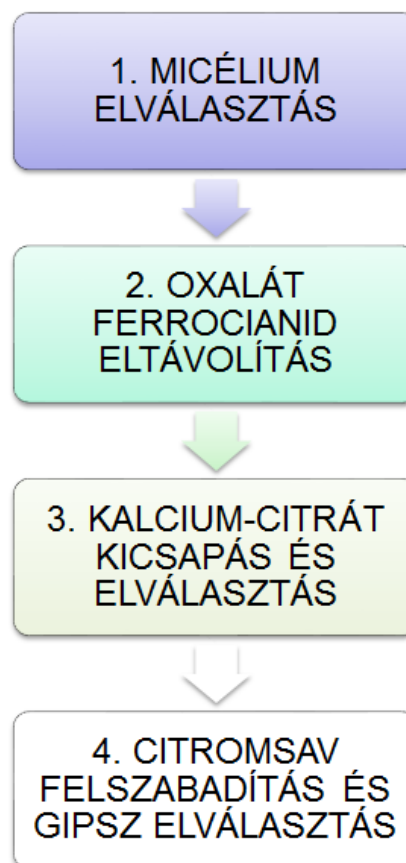
A vasat elvonó hexaciano-ferrátot is ebben a lépésben távolítják el. Feleslegben adott FeCl₃-dal kék színű csapadék képződik. Ez a vegyület a fehér csapadékot kékes színűre festi.

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).

2. táblázat A trikálcium-citrát oldhatósága a hőmérséklet függvényében

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

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 hatásfoka 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 citromsavgyártási 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 szénnel 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 termékénél 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 túltelítetté válik, belőle a citromsav kristályosítható. A művelet kritikus paramétere a hőmérséklet. 36,5 °C alatt ugyanis a sav egy kristályvízzel, e fölött 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.

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 vákuumszárítókat 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 sejtfa anyagot is tartalmaz. 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



7. ábra Kristályos citromsav előállítás

fogyasztják (vö.: silótakarmány). Kevesebb hasznot hoz, ha a biomasszát biotrágyaként szántóföldekre szórják ki, ezzel javítják a talaj szervesanyag-tartalmát. Lúgos előkezeléssel a papír-
ipar is használhatja a cellulózos alapanyagok mellett. Ha nincs más megoldás, biogázosítással
fűtőgázt is elő lehet állítani belőle.

Gipsz: 1,4 tonna

CaSO₄x(1-2 H₂O), 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.

Szennyvíz: 8 m³

Szárazanyagtartalma 5 – 6%, kémiai oxigén igénye igen nagy, KOI ≈ 50 000 mgO₂/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 citromsav takarmányélesz-
tőt 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.

Tartalomjegyzék

SZERVES SAVAK gyártása	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	3
1.1.6. Anyagcsere szabályozások	5
1.1.7. Termelő törzsek	6
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	9
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. Koncentráció bepárlással	13
1.1.10.7. Kristályosítás	14
1.1.10.8. Szárítás	14
1.1.11. Melléktermékek, szennyvíz	14