

# Extrakció-fermentáció hibrid (Extraktív fermentáció)

Biotermékek izolálása

**Készítette:** Jahola Dóra

Lékai Ildikó

Matuscsák Anett

Török Nikoletta Erika

## Bevezetés

Fermentáció során különböző mikroorganizmusokkal (ritkábban állati vagy növényi sejtekkel) termeltetünk különböző anyagokat. Ezek lehetnek valamilyen intra-, illetve extracelluláris, primer, vagy szekunder anyagcseretermékek, vagy akár maguk a sejtek is. Fermentáció után vagy közben ezeket a termékeket valamilyen módon el kell választanunk a fermentlétől. Erre kétféle módszer létezik: „End of Pipe” („csővégi”) vagy „Slip-stream” technológia. Az előző esetben a terméket a fermentáció leállása után izolálják, úgy, hogy az egész fermentlevet tovább küldik feldolgozásra (pl.: etanol gyártás). A második esetében a termék kinyerése már a fermentáció közben, a bioreaktorban megtörténik és a terméktől megszabadított fermentlé visszakerül vagy soha nem is hagyja el a bioreaktort. Ezt a folyamatot nevezzük másképpen **extraktív fermentációnak**, vagy integrált módszernek, mivel az elválasztási technológia integrálva van magába a fermentációba és a termék így *in situ* kinyerhető. Ez a technikát még leginkább csak laboratóriumi szinten alkalmazzák, mivel ipari szinten az „end of pipe” módszer sokkal könnyebben kivitelezhető. Azonban a slip-stream előnyei közé tartozik, hogy csökkentheti a termék-inhibíciót, illetve növelheti a produktivitást és a szubsztrát konverziót. Azzal, hogy mire is jó ez az új technológia és miért is van szükség, hogy beépüljön az ipari szintű fermentációs eljárásokba, a *Separation and Purification Technologies in Biorefineries* című könyvben megjelent, *Shang-Tian Yang* és *Congcong Lu* által írt fejezet foglalkozik<sup>[1]</sup>.

## A technikáról

Az extraktív fermentáció különböző kivitelezési módjait konkrét fermentációs problémák példáján keresztül mutatjuk be.

### Tejsav termeltetése tejsav baktériumokkal<sup>[2]</sup>

---

A tejsavbaktériumok sok fontos élelmiszeripari ágban játszanak szerepet, mint a tejipar, húsipar vagy az alkoholipar. Azonban sokszor probléma a fermentáció során fellépő végtermék-inhibíció. Ez annak „köszönhető”, hogy a baktériumok szénhidrát-metabolizmusa által termelt tejsav disszociálatlan állapotban oldódik a sejtek membránjában és egyszerű diffúziós folyamatok során bejut az intracelluláris térbe, ahol disszociál és az így keletkező laktát már nem oldódik. Emiatt megváltozik a pH és az eredetileg a sejtnövekedésre felhasznált energiát a sejt a transzmembrán pH-gradiens fenntartására fordítja. Miután már ez sem lehetséges, más sejtfunciók is leállnak, a sejtek megállnak a növekedésben és elpusztulnak. Több próbálkozás is volt e probléma kiküszöbölésére, mint például a fed-batch vagy pH-kontrollált fermentáció, viszont ezek nem bizonyultak túl hatékonyak. A legjobb megoldás a tejsav szelektív *in situ* eltávolítása a fermentlétből. Ennek megvalósítására alkalmas az extraktív fermentáció, azon belül is több lehetőség áll rendelkezésre.

## 1.: Oldószeres extrakció

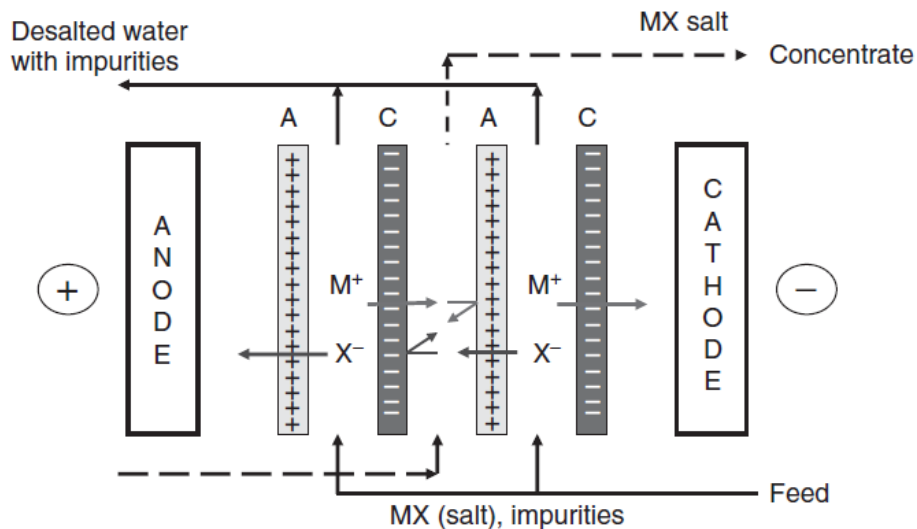
Ez az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a tejsav eltávolítására. A módszer lényege, hogy a tejsavat először kiextrahálják a fermentléből egy extrahálószerrel, majd ezt követi egy újabb extrakció egy másik extrahálószerrel, amely eredményeként elválasztjuk a terméket az oldószertől. A tejsav folyamatos eltávolítását teszi lehetővé tehát a két-zónás fermentációs-extrakciós rendszer (Iyer and Lee, 1999).

Azonban a módszernek több hátlütője is lehet. Az extrakció megvalósítása valójában egy nehéz művelet, a tejsav hidrofób természete miatt. Továbbá eléggé költséges, mivel sok oldószert kell felhasználni. És ami a legnagyobb gond, hogy sok oldószert a mikrobákra nézve toxikus lehet, és ugyanúgy gátolhatja növekedésüket.

## 2.: Elektrodialízis

A módszer lényege, hogy elektromos térerő hatására, egy ioncserélő membrán segítségével koncentrálik az ionos anyagokat és eltávolítják a sókat a fermentléből. Több fajtája is létezik. A kétlépcsős elektrodialízis során először a tejsavat 2,5-szeresre koncentrálik egy ioncserélő membránnal, majd a második lépésben tovább koncentrálik egy vízbontásra alkalmas bipoláris membránnal (Habova et al. (2001). Egylépcsős elektrodialízis során pedig egy háromrészes vízbontó készüléket alkalmaznak (Kim and Moon (2001).

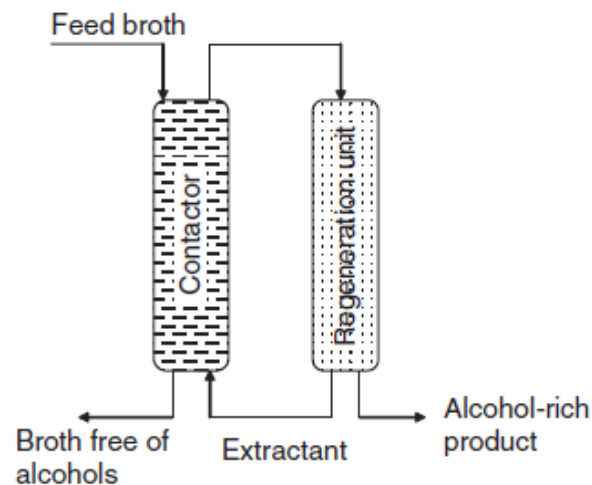
Ennek a módszernek is vannak hátrányai, például, hogy meglehetősen drága kivitelezni, az alkalmazott membrán hamar beszennyeződik, illetve, hogy nem annyira szelektív és más fontos ionokat is eltávolíthat a fermentléből (deionizáció).



### 3.: Vizes kétfázisú rendszer (ATPS)

Ez a technika egyre nagyobb figyelmet kap a biotechnológia különböző területein. Alapja a biomolekulák eltérő megoszlása a két fázis között. A kétfázisú rendszert általában polimer- és sóoldat, vagy két polimeroldat és víz összekeverésével hozzák létre. Tejsav elválasztás során ez a két oldat leggyakrabban: egy polielektrolit, a PEI (polietilénimin) és egy neutrális polimer, a HEC (hidroxietilcellulóz). A termelődött laktát a PEI gazdag alsó fázisban fog akumulálódni, mivel a polimer pozitív töltésű. A sejtek pedig a HEC gazdag fázisban vagy a határfelületen gyűlnek össze. Ezen kívül van példa másféle oldatok alkalmazására is: etilén-oxid-propilén-oxid/ hidroxipropil keményítő polimer-100 (Planas et al. (1996), alkohol/só (Aydogan et al. (2011), etanol/di-kálium-hidrogén-foszfát.

Habár ez a módszer alkalmas lenne a tejsav extrakciós-fermentációjára, mégis korlátozza, hogy sok esetben a tejsav egyenlően oszlik meg a két fázis között, illetve a polimerek magas ára is gazdasági szempontból kedvezőtlené teszi.



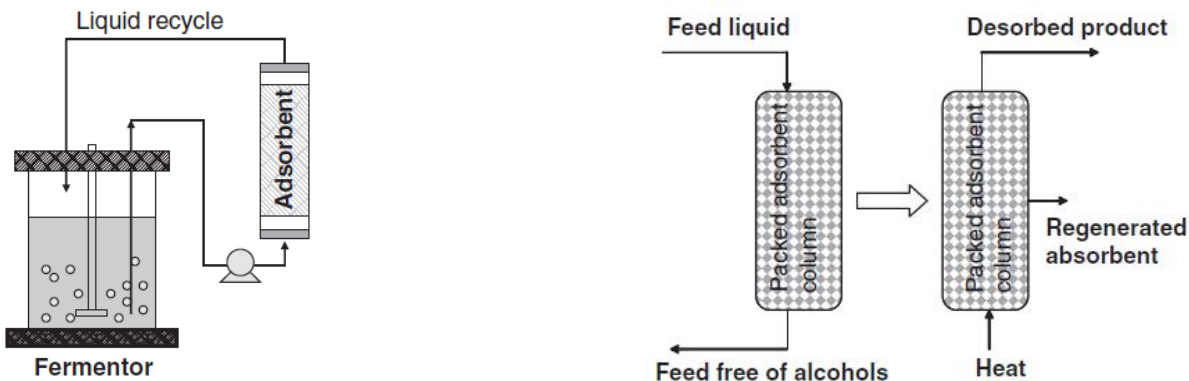
(Az ábra egy másik példát (ABE) szemléltet)

### 4.: Adszorpció

Ebben az esetben a betöltés során a fermentációs termék (alkohol vagy szerves sav) híg oldatban egy töltött oszlopban lévő szelektív adszorbens felületén adszorbeálódik, majd a regeneráció során deszorbeálódik, ami egy koncentrált, termékben gazdag oldatot eredményez. A deszorpció illékony anyagok esetében általában hővel, nem-illékony anyagok esetén pedig oldószeresen történik. A vizes kétfázisú extrakciónál alkalmazott extrahálószerhez hasonlóan az adszorbensnek is szüksége van a regenerálásra, ahhoz, hogy folyamatosan használható legyen. Annak érdekében, hogy elkerüljük az adszorbens szennyeződését (sejtek és egyéb fermentációs komponensek által) jó megoldást jelenthet a sejtcirkuláció során membrán alkalmazása, vagy a sejtek eltávolítása centrifugálás segítségével. (Nielsen et al., 1988; Yang and Tsao, 1995)

Gyakran alkalmazott adszorbensek: anioncserélő gyanta, hidrofób zeolitok, aktív szén, csontszén

Egy tanulmányban aktív szenet használtak adszorbensként a tejsav megkötésére (Gao et al. (2011). Eredményképpen az aktív szén sikeresen csökkentette a termékinhibíciót és mindemellett növelte a produktivitást és a hozamot. Ezen kívül a szilikát (Aljundi et al., 2005), illetve az ioncserélő gyanta (Garret et al., 2015) alkalmazása is effektívnek bizonyult. Adszorbensek alkalmazása talán a legjobb és legköltséghatékonyabb módja a tejsav inhibíció csökkentésének.



(Az ábra egy másik példát (ABE) szemléltet)

#### Butanol elválasztás ABE fermentáció során

##### 5.: Gáz elválasztás (Gas stripping)

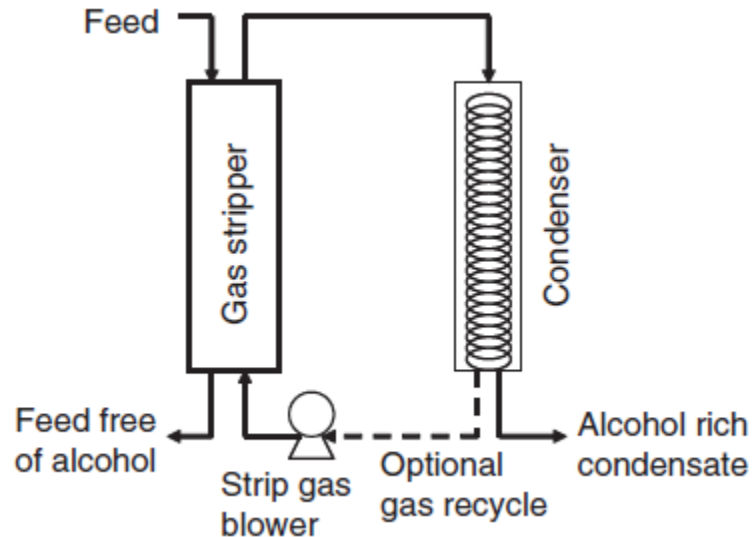
A gáz elválasztásos technika egy könnyű módszer a butanol visszanyerésére a fermentléből. A gázeltávolítás megvalósítható egyszerre a fermentációval a bioreaktorban, vagy különálló elvezető kolonnán. Az ABE (Acetone–butanol–ethanol) fermentációja során nitrogént vagy egyéb fermentációs gázokat (H<sub>2</sub> és CO<sub>2</sub>) használnak ún. sztripper gázként, ezzel biztosítják az anaerob állapotot (Ezeji *et al.*, 2004a).

Működési elve: a bioreaktorban levő fermentlébe bevezetik a gázt, ami felfogja az illékony oldószereket, majd ezt az oldószerekomponenseket tartalmazó gázt átvezetik egy kondenzátoron, ahol az oldószerek lekondenzálódnak és ezáltal dúsul a kondenzátumáram. A különálló gázelszívó kolonna esetén a tápáramot kell az oszlophoz vinni, ahol az oldószereket befogják a sztripperelő gázok és az oldószerszegény táplé visszavezethető a bioreaktorba.

A gázáramlás egylépeses vagy újrahaznosított üzemmódban is működtethető. Egylépeses üzemmódban, ha a gáz áthalad a kondenzátoron, utána szabad levegőre bocsátják ki, ami a kondenzátor hatékonyságától függően oldószeres veszteséget okozhat. Újrahaznosítás esetén a kondenzáció után az oldószerekben szegény gázt visszavezetik a sztripperbe / bioreaktorba, hogy több oldószert vihessen magával, és az eljárás ezzel zárul, így nincs oldószerek veszteség.

Előnye más termék-visszanyerési technológiával szemben, hogy a fermentációs gázok felhasználhatók sztripperelő gázokként, a fermentáció hőmérsékletén működtethető, és könnyű a szilárd anyagok eltávolítása a fermentléből.

Jelenleg azonban a gázválasztás kereskedelmi forgalomban nem alkalmazható etanol vagy butanol visszanyerésére, mivel az alkoholban gazdag kondenzátum legalább egy további lépést igényel az alkohol víztelenítése szempontjából, hogy megfeleljen az előírásoknak.



### 6.: Pervaporáció (átpárologtatás)

A pervaporáció egy membrán-alapú szelektív elválasztási technika. Az illékony komponenseket tartalmazó folyadék a membrán egyik oldalán áramlik, míg a membrán másik oldala vákuum alatt van. A folyadékáram illékony összetevői áthatolnak és átdiffundálnak a membránon, ha (fizikai, kémiai) tulajdonságaik hasonlóak a membránéhoz, majd elpárolognak a vákuum alatt, ezáltal a permeátum oldali részben gazdagodnak. A permeátum-gőzt ezután lekondenzáltatják egy hűtőcsapdában, ez a permeátum. A modulból kilépő retentátum a kiválasztott komponensek koncentrációjára nézve alacsony lesz, ez az elválasztási folyamat befejezése. Az anyagáramlás hajtóereje a koncentráció gradiens, és a fluxus fordítottan arányos a teljes ellenállással.

Ha a membrán hidrofób, a permeátum oldala szerves vegyületekben gazdag lesz a vízhez képest. Ha a membrán hidrofil, a betáplált folyadék kiszárad, ahogy a víz átdiffundál a membránon keresztül. (Jonquieres et al., 2002).

Jelenleg a polidimetil-sziloxán membrán (PDMS vagy szilikongumi-membrán) az általánosan alkalmazott hidrofób membrán alkohol / víz elegy szétválasztására (Vane, 2005, 2008). De polimer membránokon kívül a szerveszelektív zeolit anyagok, például a szilicalit és a Ge-ZSM-5 is használatos. (Sano és munkatársai, 1994; Li és munkatársai, 2003). A fent említett membránokon kívül - amelyek szilárd membránok - tanulmányozták a hordozós folyékony membránokat is, hogy híg vizes oldatokból alkoholt nyerjenek ki (Matsumura és Kataoka, 1987; Thongsukmak és Sirkar, 2007; Izak és munkatársai, 2008 )

A membrán alkalmazása nagyon hatékony és szelektív elválasztást tesz lehetővé a pervaporációban. Még a táplálékban lévő alacsony koncentrációjú komponensek is jelentősen dúsíthatók ezzel az eljárással, ha a megfelelő membránt használják.

Azonban a membrán alkalmazása magában hordozza az eltömődés lehetőségét, általában ez a módszer legfőbb hátránya, a magas költségek mellett.

## **Két konkrét példa a technológia alkalmazására biofinomítóknban**

### *Extraktív ABE (Acetone–butanol–ethanol) fermentáció a fokozott butanol termelés érdekében*

---

A butanol a legkívánatosabb terméke az ABE fermentációnak, mégis a kultúra számára az egyik legtoxikusabb is. Az ABE fermentáció során erős butanol gátlás áll fenn, ami alacsony végső butanol koncentrációt, alacsony hozamot és alacsony produktivitást okoz (Qureshi and Ezeji, 2008). Ezek a korlátozások akadályozzák a biobutanol ezen módszerrel történő előállításának gazdasági alkalmazását.

Egy tipikus ABE fermentáció során csak 12-15 g/L butanol állítható elő 40-60 óra alatt, amíg a fermentáció le nem áll az inhibíció miatt. (Woods, 1995). A butanol in situ kinyerése ezért alapvető fontosságú a reaktor teljesítményének fokozása érdekében. Az egyidejű butanol kinyerés enyhítheti a termék inhibíciót és jobb szénforrás konverzióhoz vezethet. Ez lehetővé teszi a koncentráltabb fermentlé alkalmazását és kiterjeszti a fermentáció idejét. Ezentúl az online butanol kinyerés tovább egyszerűsíti a downstream elválasztás műveletét, ez csökkenti a folyamat energia szükségletét és a teljes folyamat költségeit. Régebben desztillációt alkalmaztak a butanol kinyerésére, de ez drágának bizonyult a butanol alacsony koncentrációja miatt a leerjedt fermentlében. Az utóbbi években előrelépést jelentettek a butanol kinyerés új technikái, mint az adszorpció, a folyadék-folyadék extrakció, a pervaporáció és a gas stripping. Ezek az integrált fermentációs folyamatok a cukor fogyasztás, az ABE végső koncentrációjából és a produktivitás szempontjából elsődlegesek.

Mivel a butanol folyamatosan eltávolításra kerül a rendszerből, így sosem éri el a gátló szintet, így nagyobb a cukor felhasználási aránya. A hagyományos fermentációhoz hasonlóan, az online butanol kinyerés lehetővé teszi, hogy koncentrált fermentlével dolgozzunk hosszabb ideig a fed-batch és a folyamatos fermentációk során, ami így tovább növeli az ABE produktivitását. Néhány integrált folyamat lehetőséget mutat az ABE fermentáció ipari szintű alkalmazására: Ezeji et al. (2005b) bemutatta, hogy a gas stripping integrálva folyamatos fermentációval 1163 g/L glükózt használt és 460 g/L ABE-t produkált. Újabban Lu et al. (2011) tanulmányozta a fed-batch fermentációt folyamatos gas strippinggel butanol előállítására préselt tápióka hidrolizátumból, *Clostridium acetobutylicum* törzs JB200 használatával, szálas ágyú bioreaktorban. A fed-batch fermentáció 263 óráig zajlott és a végén 108,5 g/L ABE (butanol: 76.4 g/L, aceton: 27 g/L, etanol: 5.1 g/L) termék keletkezett, átlagosan  $0.47 \pm 0.06$  g/L·h ABE produktivitással. A gas stripping a butanol koncentrációt 8 és 12 g/L között tartotta a rendszerben a folyamat során és 10-16% (w/v) butanol, ~4% (w/v) aceton és kis mennyiségű etanol (<0.8%) tartalmú kondenzátumot generált. Fázis szeparáció után a nagy butanol tartalmú oldat (~64% (w/v)) a felső szerves fázisban helyezkedett el, ami így egyszerűen tisztítható tovább desztillációval. Ez a tanulmány

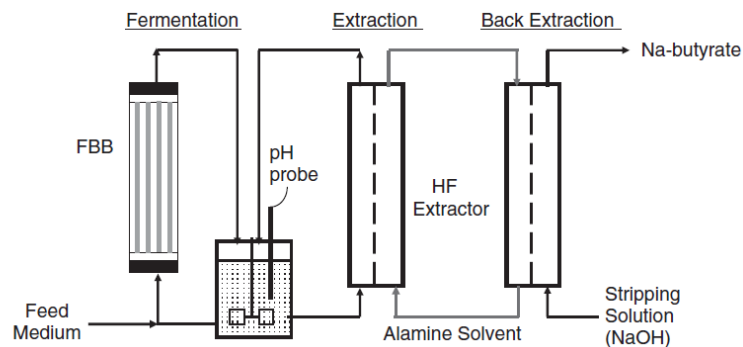
bebizonyította, hogy gas stripping integrálásával az ABE fermentáció hatékonysága nagyban megnövelhető, és a végső termék feldolgozása is gazdaságosabb lesz.

### Extraktív fermentáció szerves sav termelésre

Az integrált fermentációs elválasztási technikákat már alaposan tanulmányozták különböző karbonsavak termelésére is cukrokból. A fermentációs folyamatokat összehasonlítva az online termék szeparáció nagyban megnövelte a termék koncentrációt és a reaktor produktivitását. A szelektív termék elvétel megnöveli a hozamot is, a csökkent melléktermék keletkezésnek köszönhetően. Az oldószer toxicitása és a tápanyag eltávolítás szignifikánsan csökkentheti a produktivitást. Karboxilsavak extrakciója általában hatékonyabb savas pH-n, viszont nagyrészen ezen fermentációk pH optimuma semleges körül van. Következésképpen ezeket a fermentációkat optimális pH-n kívül kell működtetni, így viszont csökken a produktivitás.

Wu and Yang (2003) kifejlesztett egy folyamatot vajsav előállítására glükózból, ahol az extrahálószer 10% (v/v) Alamine 336 oleil-alkoholban volt üreges szálú membrán extrahálóban. A membrán alapú extrakció szelektíven eltávolította a vajsavat a fermentációs rendszerből. A sejteket rögzíteni kellett, mert az oldószer toxikus volt számukra, ha direkt kontaktba kerültek. A fermentáció során a pH önszabályozó volt, a folyamat nagy termék koncentrációt eredményezett (300 g/L), magas vajsav hozammal (0,45 g/g) és 91%-os termék tisztasággal. Azt a konklúziót vonhatták le, hogy az extraktív fermentáció csökkentette a termék inhibíciót a vajsav szelektív eltávolítása által, így javítva a produktivitást.

## Egy extrakciós fermentáció folyamatábárja



A folyamatos termék-elválasztást, az üreges szálú (HF) membrán extraktorban történő extrakció biztosítja. A fermentációs termék - ebben az esetben a vajsav - először kiextrahálódik az első HF egységben, majd „visszaextrahálódik” a második HF egységben. A végtermék ebben az esetben a koncentrált nátrium-butirát oldat és NaOH (mint sztripper oldat).



## **Gazdasági szempontok és ipari kihívás**

A fermentációs termék kinyerése és tisztítása általában a végső termék árának 20-50%-át adja. A kinyerés ára a termék koncentrációjától függ a fermentáléban, ezért fontos, hogy a tisztítás és kinyerés előtt minél nagyobb termékkoncentrációt tudjunk elérni. Az extraktív fermentáció megnöveli a fermentáció produktivitását és magasabb termék koncentrációt tud biztosítani tisztítás előtt. Például a hagyományos ABE fermentáció csak 5-8%, az integrált pertraction fermentáció több mint 30% vajsavat eredményez. A végső termék tisztítási ára ebben az esetben 75%-kal csökkenthető.

Az energiafelhasználáson kívül a használt víz mennyisége is fontos szempont. Az extraktív fermentáció során nagy szubsztrát koncentrációkat tudunk használni, így csökkentve a vízszükségletet. A magasabb koncentrációjú termék szintén csökkenti a keletkezett szennyvíz mennyiségét. Például a gas strippinges ABE fermentáció során a vízhasználat akár 90%-kal is csökkenhet. Hasonló előnyök figyelhetők meg egyéb extraktív fermentációs folyamatok során. Bár ez a technológia energia-gazdaságos és környezetbarát megoldást kínál sok termék előállítására, ami gazdaságilag versenyezhet az olaj-alapú társaikkal, az iparágak még el kell fogadnia. Ebben az jelenthet gondot, hogy nagy méretekben nincs elég ipari tapasztalat ezen technológiák működtetésére. A fermentációs ipar pedig e szempontból konzervatív az új, eddig ismeretlen technológiákkal szemben. Az olajárak emelkedésével az olaj-alapú gyártási technológiák drágulnak, ezért a zöld technológiák egyre inkább előtérbe kerülnek. Az újabb elválasztási technikák között a gas stripping a legígéretesebb az ABE fermentáció során, míg az oldószeres extrakció és a pertrakció a legenergiatakarékosabb módszer karbonsavak előállítására. A membrános technológiák potenciálja is igen nagy, de ezek egyelőre túl drágák ipari felhasználáshoz.

## **Felhasznált irodalom**

[1] *Shang-Tian Yang* and *Congcong Lu*, *William G. Lowrie* Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Ohio State University, USA Dow Chemical Company, Midland, MI, USA, *Separation and Purification Technologies in Biofineries*,

[2] *Majdiah Othman*, *Arbakariya B. Ariff*, *Leonardo Rios-Solis* and *Murni Halim*, Department of Bioprocess Technology, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, Universiti Putra Malaysia, Seri Kembangan, Malaysia, *Bioprocessing and Biomanufacturing Research Center*, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, Universiti Putra Malaysia, Seri Kembangan, Malaysia, *School of Engineering*, *Institute for Bioengineering*, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom, *Extractive Fermentation of Lactic Acid in Lactic Acid Bacteria Cultivation: A Review*, 20 November 2017

Ábrák: *Shang-Tian Yang* and *Congcong Lu*, *William G. Lowrie* Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Ohio State University, USA Dow Chemical Company, Midland, MI, USA, *Separation and Purification Technologies in Biofineries*