

## 4. SZERVES SAVAK



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

1

## SZERVES SAVAK

Mind prokarióták, mind eukarióták termelnek savakat, nincs különbség.

Anyagcserében:

Az aeroboknál: a szénforrások szerves savakon keresztül oxidálódnak. Ha nem megy végig szén-dioxidig (hiányos anyagcsereutak) → savtermelés

Anaeroboknál: sok NADH keletkezik → redukzív közeg → akkor van savtermelés, ha nem redukálódik tovább alkohollá (tejsav, vajsav).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

2

## ECETSAV

Ipari előállítások:

Kémiai úton:

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

Biotechnológiai úton:

Cukrok → etanol → ecetsav  
*Saccharomyces cerevisiae*      *Acetobacter aceti*



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

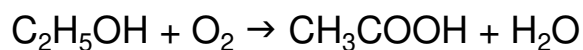
3

## Az ecetsav biológiai előállítása

A bor után legőszibb (bio)technológia:

a bor „megecetesedik” → borecet keletkezik

A folyamat nettó leírása:



Az ecetsav baktériumok az alkoholt ecetsavvá oxidálják molekuláris oxigén felhasználásával.

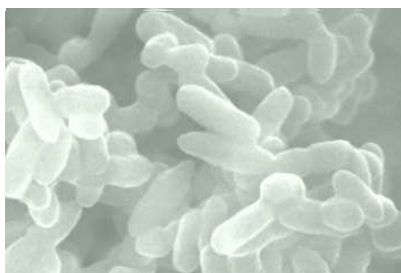


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

## Ecetsav baktériumok

- Gram negatív,
- ellipszoid vagy pálca alakú sejtek,
- aprók, 0,6-0,8  $\mu\text{m}$  hosszúak,
- egyesével, párokban vagy láncokban
- van mozgásra képtelen és mozgásra képes forma is  $\rightarrow$  poláris vagy peritrich flagellum
- obligát aerobok



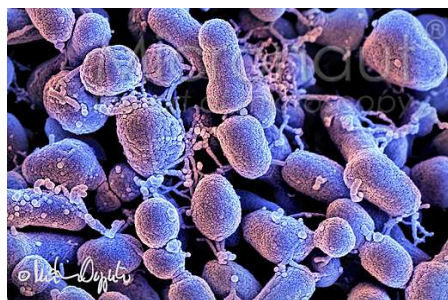
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

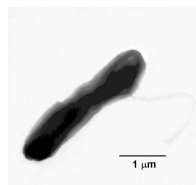
## Az ecetsav baktériumok osztályozása

Az *Acetobacteraceae*-n belül 3 család.

Az *Acetobacter* és *Gluconobacter* közeli rokonok (DNS hibridizáció).



*Gluconobacter*



*Frateuria*

*Acetobacter*



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

## Ecetsav baktériumok

Izolálásuk nehéz, mert:

- a természetben (és az ipari félfolytonos/folytonos eljárásoknál is) vegyes kultúrákat alkotnak, sok, jelentősen eltérő altípussal és spontán hibridekkel.
- szilárd és félszilárd táptalajon nehéz tenyészteni, folyadékban meg nehéz „széleszteni”

Ipari törzseknél/kultúráknál elvárás, hogy:

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



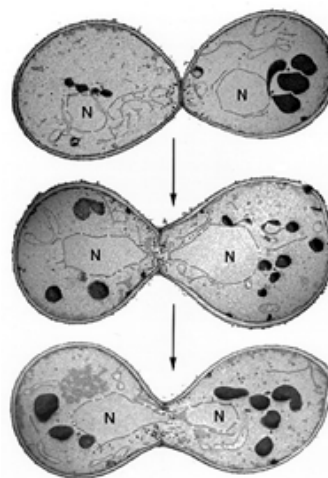
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

## *Acetobacter* törzsek genetikai módosítása

Szferoplaszt(protoplaszt) fúziós technika:

- Szferoplaszt képzés (a sejtfal leemésztése)
- Két különböző tulajdonságú baktériumtörzs szferoplasztjának fúzionáltatása
- Eredmény: a tulajdonságok új kombinációja. (Sok nem stabilizálódik az új törzsben)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

## Az ecetsav képződés biokémiája



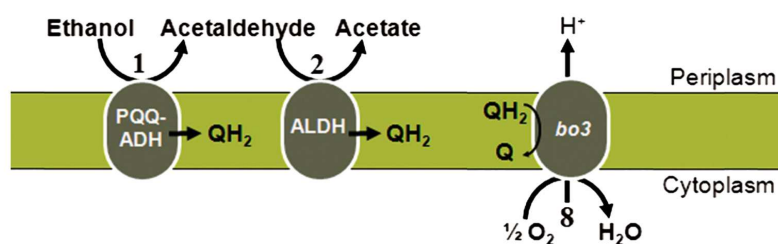
A folyamat két lépésben megy végbe, az etanol előbb acetaldehiddé oxidálódik (alkohol-dehidrogenáz), majd az aldehid oxidálódik ecetsavvá (aldehid dehidrogenáz). Az ADH prosztetikus csoportja PQQ (pirrolo-kinolin-kinon), ez veszi át a hidrogéneket.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

## Az ecetsav képződés biokémiája



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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

## Tápanyagok, szubsztrátok

Fő komponens: etil-alkohol, lehet:

- tiszta, ipari alkohol, ezt denaturálják (USA: etil-acetáttal, EU: ecetsavval)
- valamilyen erjesztett lé, ld. étkezési ecetek

Cefre: a betáplált alkoholtartalmú oldat, töménysége az:

összkoncentráció = alkohol tartalom (V/V%) + ecetsav tartalom (g/100ml)

Hozam = kinyert ecetsav konc./teljes konc.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

## Étkezési ecetek

Alapanyagok szerint:

|               |   |            |
|---------------|---|------------|
| Bor           | → | borecet    |
| Almabor       | → | almaecet   |
| Árpa forrázat | → | malátaecet |
| Rizs          | → | rizsecet   |



Balzsamecetek: az ecet mellett sok cukrot (gyümölcsle, szirup) is tartalmaznak.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

## Tápanyagok, szubsztrátok

Természetes nyersanyagoknál általában nincs szükség további tápanyag hozzáadására.

kivétel: almabor, bor, ehhez ammónium-foszfát (N és P bevitel)

Tiszta alkohol alapú fermentációnál kell a tápoldatba:

- glükóz (kevés, az indításhoz)
- makroelemek: kálium, nátrium, magnézium, kalcium, ammónium (ammónium-foszfát formájában), szulfát és klorid
- nyomelemek: vas, mangán, kobalt, réz, molibdén, vanádium és cink



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

## Szénforrások

A cukor (glükóz, szacharóz) könnyebben beépül a sejt anyagába, mint az acetát. Az ecetsav baktériumok a pentóz-foszfát úton hasznosítják.

### Acetát

A törzsek képesek a citromsav-cikluson keresztül hasznosítani az acetátot és a laktátot, de a túloxidáció csökkentésére törekszünk.

### Szén-dioxid

A sejtek igénylik az oldott  $\text{CO}_2$ -ot, beépítik saját anyagaikba ( $\sim 0,1\%$  C)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

## Nitrogénvegyületek

N-forrás:

szervetlen N-források (ammónium sók) is megfelelők

Egyes törzsek növekedési faktorokat igényelnek, illetve ezek jelenlétében jobban termelnek:

- vitaminok (p-aminobenzoészav, niacin, tiamin, pantoténsav)
- aminosavak
- purin vegyületek
- glutation + Na-glutamát együtt



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

## Etanol

Az etanol hiány (pl. elfogy, és nem pótolják időben) megzavarja a fermentációt, az enzimaktivitások maradandóan lecsökkennek. A kár mértéke az etanol hiány idejétől és az összkoncentrációtól függ.

Túloxidáció: az ecetsav tovább oxidálódik szén-dioxiddá és vízzé. Megelőzésére az összkoncentrációt magas értéken kell tartani az etanol pótlásával.

(Szükséges az alkohol koncentráció folyamatos mérése és szabályozása.)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

## Oxigén

Oxigén: az *Acetobacter*-ek obligát aerobok, igénylik az oxigént.

Ha megszakad az oxigénellátás (1-5 percre), akkor hosszasan megmaradó káros változások alakulnak ki az enzimek működésében. A káros hatás mértéke itt is az oxigén hiány hosszától és az összkoncentrációtól függ.

A nagy levegőáram ugyanakkor sok illó komponenst (etanol, ecetsav) visz magával (= veszteség). Ezért az elmenő levegőt mossák, és a mosóvízzel készítik a következő cefrét.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

## Levegőztetés

Felületi kultúra: töltött oszlopban (klasszikus: bükkfa forgács töltet) a felületen csorog lefelé a kezdetben ~10%-os alkohol, a hézagokban felfelé áramlik a levegő. A levegőt recirkuláltatják (= „mozgócefrés” eljárás)

A felületen a sejtekből biofilm alakul ki.

Nem steril, a befertőződéstől védi az alkoholtartalom és a savas közeg (de: „ecetangolna”).

Konverzió ~100%, kihozatal: 95-98%, a többi elpárolog.

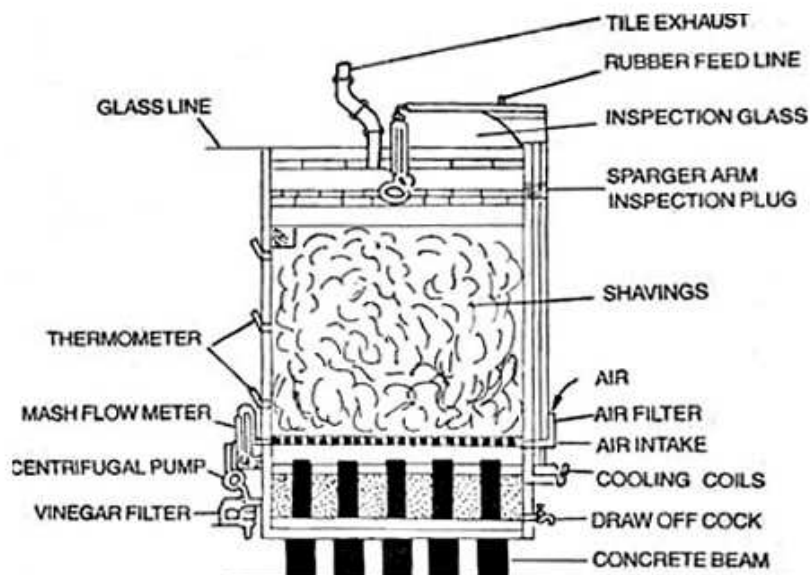


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

18

## Felületi technológia



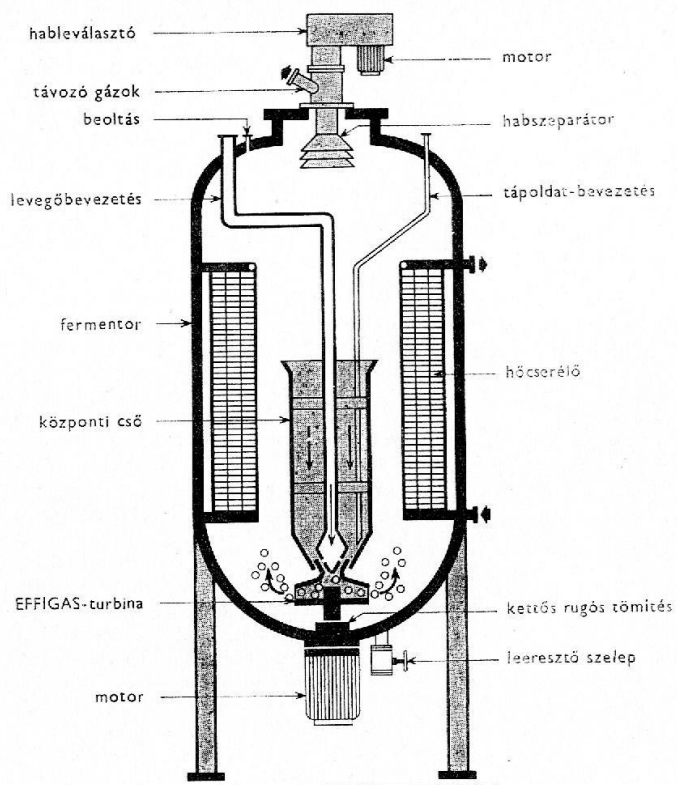
19

19

## Szubmerz technológiák

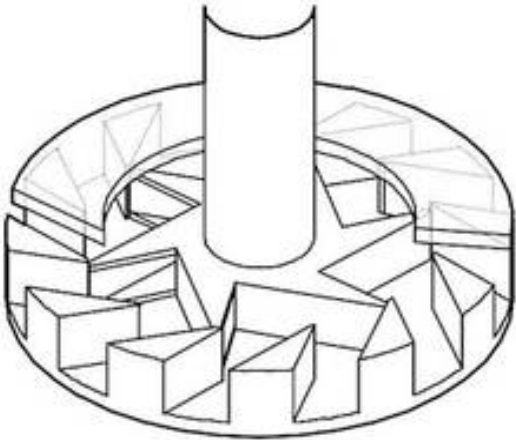
Intenzív levegőztetés szükséges, keverős és air lift egyaránt előfordul.

Frings-acetátor:  
önbeszívó turbinakeverő, a motor alulról forgatja, és a levegőt felülről, a tengelycsövön át szívja be, és eloszlatja. →



BME Alk

20

|                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <h2>Frings acetátor</h2>  <p>Egy belső forgó- és egy külső állórészből áll.</p>  <p>BME Alkalmazott Biotechnológia</p> |  <p><b>Frings Acetator turbinája</b></p> <p><b>Heinrich Frings GmbH &amp; Co KG</b><br/>Biological and Chemical Technology</p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

21

## Frings acetátor



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

## Szubmerz technológiák

Félfolytonos technológiák.

Nagy ecetsav koncentrációhoz (18-19%) utólagos alkohol adagolás szükséges.

Egylépcsős: az induló cefre ~15% összkoncentrációjú. Ahogy fogy az alkohol, lassan +4%-ot adagolnak. Teljes konverziónál lefejtés-feltöltés.

Kétlépcsős: ugyanígy adják az etanolt, de 15%-os ecetsav tartalomnál a térfogat 30%-át egy másik fermentorba viszik át, ott fejeződik be a konverzió.



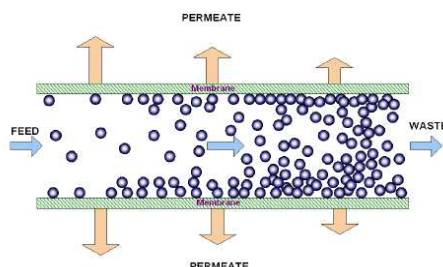
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

23

## Feldolgozás

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



Az ecetsav bepárlással töményíthető ( $f_p = 118\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a víz az illékonyabb komponens.



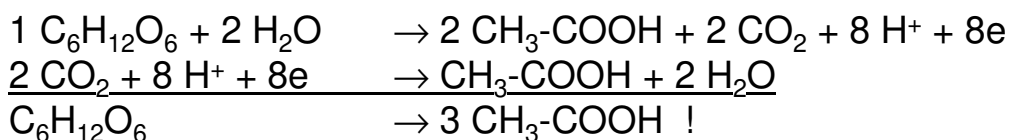
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

24

## Új lehetőség: a homoacetogének

Egyes *Clostridium* törzsek képesek CO<sub>2</sub> fixálásra:



A 2 CO<sub>2</sub>-ből autotróf CO<sub>2</sub>-fixálással egy új acetyl-CoA képződik. Miért?

Sok *Clostridium* kemoautotróf, képes H<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub> vagy CO gázkeveréken növekedni, mint egyedüli szénforráson.

Előny: +50% hozam, Hátrány: lassú folyamat



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

25

## Új lehetőség: a homoacetogének

| Fermentáció típusa                     | Produktivitás<br>(g*l <sup>-1</sup> *h <sup>-1</sup> ) | Ecetsav konc.<br>(g*l <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Szakaszos                              | 0,9                                                    | 120                                   |
| Folyamatos, sejtviisszatáplálással     | 4                                                      | 22                                    |
| Folyamatos, sejtviisszatáplálás nélkül | 2,5                                                    | 7                                     |
| Forgódobos fermentor                   | 10                                                     | 37                                    |

Szakaszos: glükóz rátáplálás, semlegesítés dolomittal

Félfolytonos: lefejtés 50%-ig

Forgótányéros: egyfajta immobilizálás, a tányér felületére biofilm tapad

Elméleti konverzió: 1 g/g, a gyakorlatban 90-95%



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

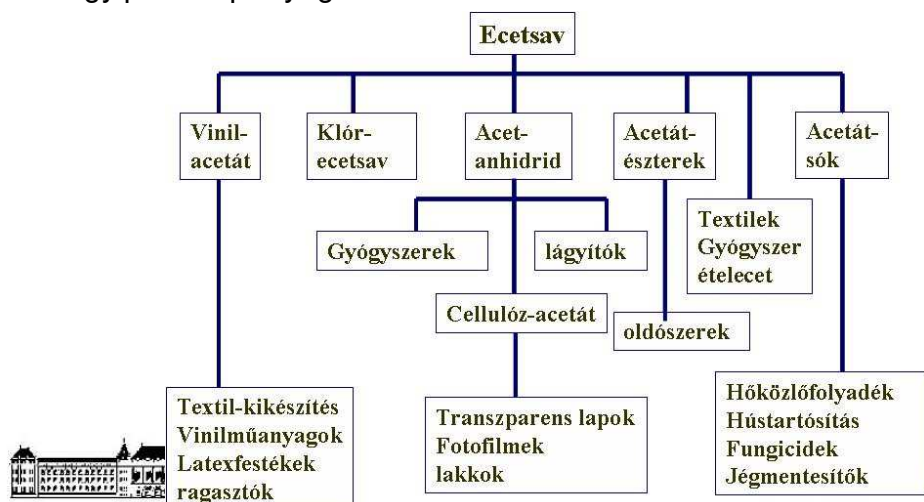
26

26

## Az ecetsav felhasználása

Direkt felhasználás: erős savként  
vízkezelés  
élelmiszeripar: tartósítás

Vegyipari alapanyagként:



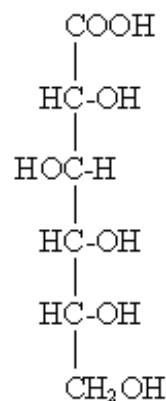
27

## GLÜKONSAV ELŐÁLLÍTÁSA

1928 – felületi tenyésztés cukron,  
*Penicillium notatum*  
80-87% -os konverzió

Ma: főleg *Aspergillus niger*, mellette baktériumok:  
*Gluconobacter suboxydans*,  
metanolhasznosítók, pl. *Ps. ovalis*

Bioszintézis:  
baktériumoknál: egy lépés, membránhoz kötött dehidrogenáz  
gombáknál: két lépésben, a második a sejten kívül megy

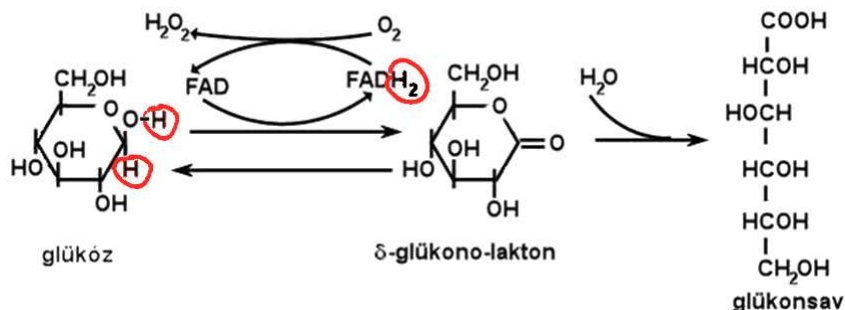


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

28

## GLÜKONSAV ELŐÁLLÍTÁSA



A glükóz-oxidáz enzim molekuláris oxigént használ fel és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot termel. Ezt a kataláz elbontja.  
(Kiotási gyűrűt eredményezhet, régen azt hitték, hogy antibiotikumot termel a törzs - blamázs).



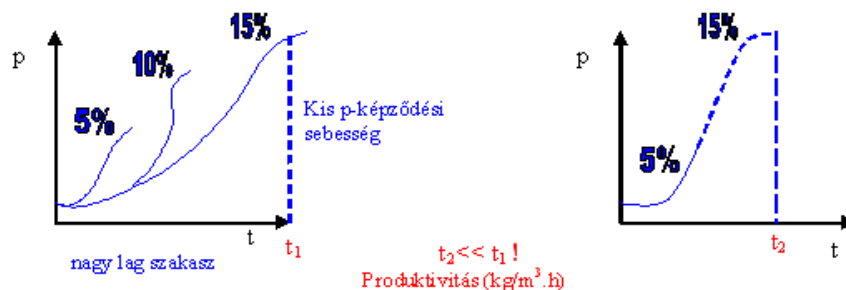
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

29

## FERMENTÁCIÓS TECHNOLÓGIA

A két szubsztrátot – glükóz és O<sub>2</sub> – bőségesen kell bevinni.  
Glükóz: rátáplálás, mert az egyszeri adagolás lelassítja a folyamatot.  
Kihozatal: 0,90-0,95 (glükózra)



Oxigén: igen erőteljes levegőztetés, intenzív keverés, nagy fejnyomás. DO-t magas értéken kell tartani.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

30

## FERMENTÁCIÓS TECHNOLÓGIA

pH: 5,5 alá nem szabad engedni, mert az enzimszisztéma inaktiválódik. Szabályozása:  $\text{CaCO}_3$ -tal automatikus, ill.  $+\text{NaOH}$ -dal, mert a Na só jobban oldódik.

N és P: a termelési szakaszban limitáló koncentrációban, inkább nyugvósejtes tenyészet.

Feldolgozás: - a micélium szűrése, - bepárlás, - kicsapás  $\text{CaCO}_3$ -tal, - elválasztás

Micélium hasznosítása: - újrafelhasználás fermentációhoz, - enzim-kinyerés (glükóz-oxidáz, kataláz)

Törzsfelkészítés: az enzimet a *goxB* gén kódolja. Génmanipulációval: derepresszált mutáns, 36 óra alatt lefut a ferm.

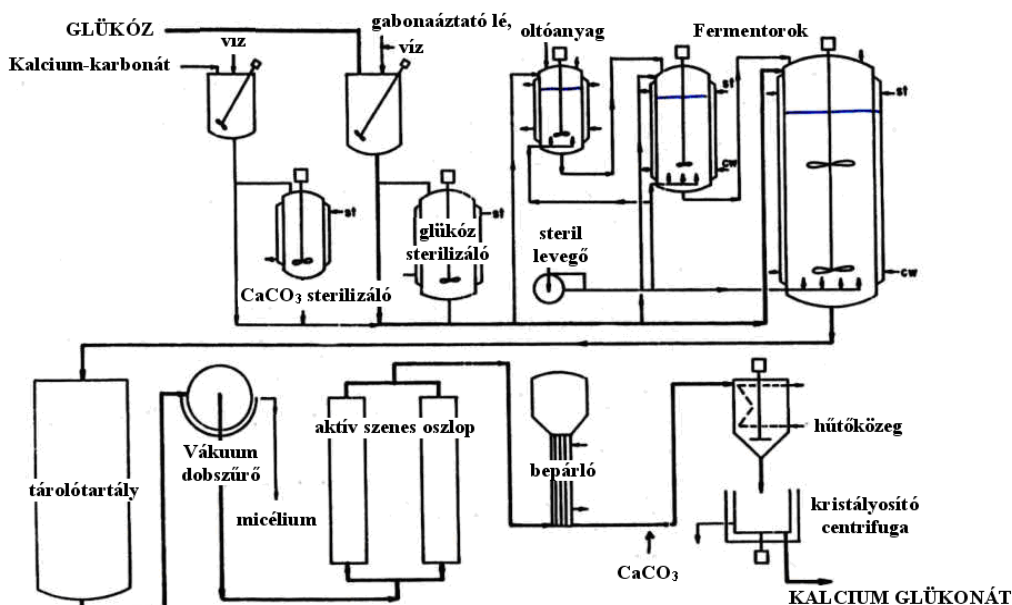


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

31

## FERMENTÁCIÓS TECHNOLÓGIA



32

## GLÜKONSAV

Felhasználási területek: nem korrozív sav

- Fémipar (tisztítás, rozsdátlanítás)
- Üvegipar
- Detergensekben (komplexbéplő)
- Gyógyszer (vízoldhatóságot javítja, Ca, Fe)
- Cementadalék

Termelés: ~100.000 t/év

Cégek: AKZO (NL), Carlo Erba (I), Merck (D), Mallinkrodt (USA)



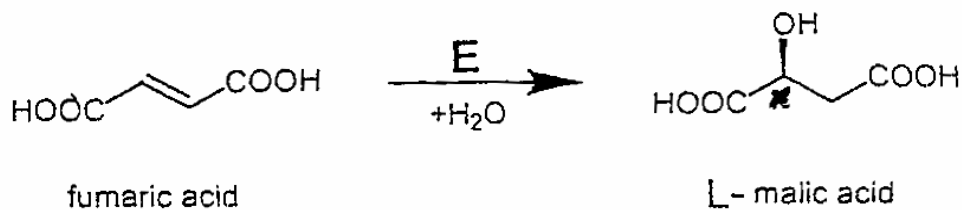
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

33

## ALMASAV ELŐÁLLÍTÁSA

Egylépéses konverzióval fumársavból.



Törzs: *Corynebacterium glutamicum*, nyugvósejtes tenyészet

Enzim: fumaráz, sztereoszelektív, csak L-malátot termel.

Körülmények: pH = 8, t = 25 °C

Egyensúly: 15 : 85 aránynál (oldatban) →



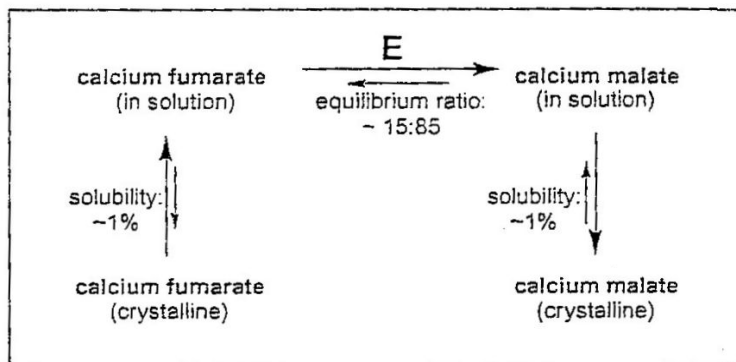
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

34

## ALMASAV ELŐÁLLÍTÁSA

A termék kicsapásával az egyensúlyinál jobb konverzió érhető el:



Kristályfermentáció



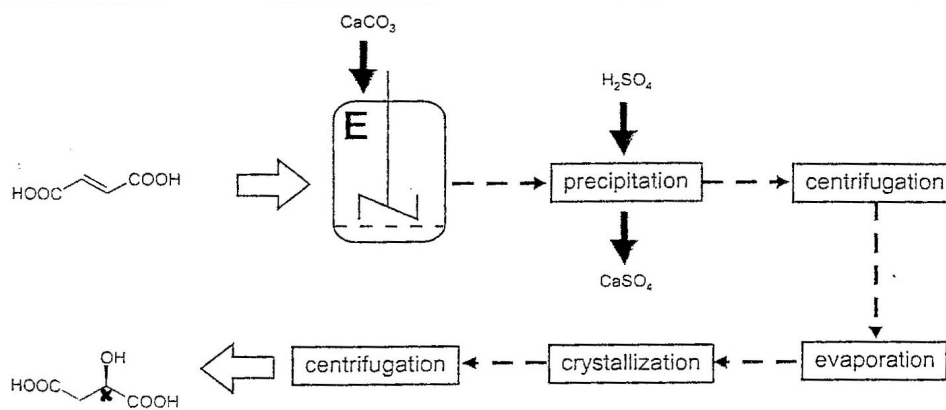
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

35

35

## ALMASAV ELŐÁLLÍTÁSA

Feldolgozás: a Ca-malátot kénsavval bontják, a gipszet leszűrik, ioncserével tisztítják, bepárolják, kristályosítják.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

36

36

## ALMASAV ELŐÁLLÍTÁSA

### Amino GmbH eljárása:

*Corynebacterium glutamicum*, szakaszos üzem,  
nem steril, p-OH-benzoésav észterek  
Imidazol és idegen fehérje adagolás javítja az enzimaktivitást  
2000 t/év, kihozatal: 85 %, 150 g/l Tisztaság: >99 %

### Tanabe eljárás: (eltérések)

*Brevibacterium flavum*, immobilizált sejtek (carragenan gél)  
1000 literes csőreaktor, pH = 6,5-8 , t = 37 °C  
Konverzió: 80% (~egyensúlyi), kihozatal: 70 %



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

37

## ALMASAV ELŐÁLLÍTÁSA

Éves igény: ~ 40.000 t

Felhasználás:

Élelmiszeripar (sav – cukor arány)  
gyümölcs és zöldség készítmények,  
üdítők,  
lekvárok, édességek

Kozmetikai ipar

Gyógyszeripar



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

38

38