

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 legősbibb (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 μm hosszúak,
- egyesével, párokban vagy láncokban
- van mozgásra képtelen és mozgásra képes forma is $\rightarrow$ poláris vagy peritrich flagellum
- obligát aerobok



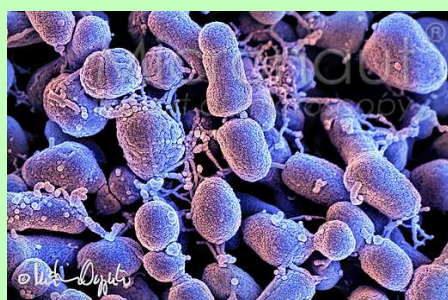
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

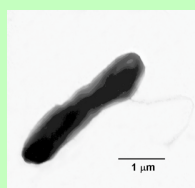
Az ecetsav baktériumok osztályozása

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



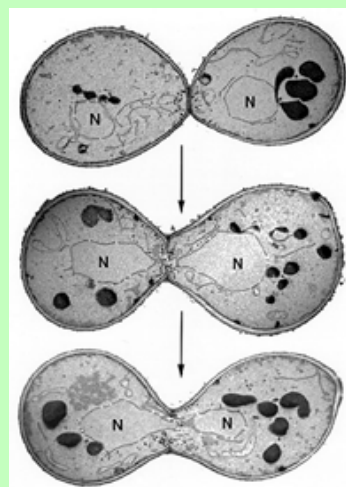
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

Acetobacter törzsek genetikai módosítása

Szferoplaszt(protoplaszt) fúziós technika:

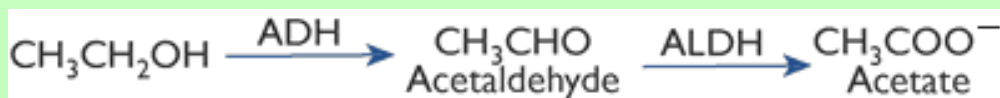
- Szferoplaszt képzés (a sejtfal leemésztése)
- Két különböző tulajdonságú baktériumtörzs szferoplasztjának fúzionáltatása
- Eredmény: a tulajdonságok új kombinációja. (Sok nem stabilizálódik az új törzsben)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Az ecetsav képződés biokémiája



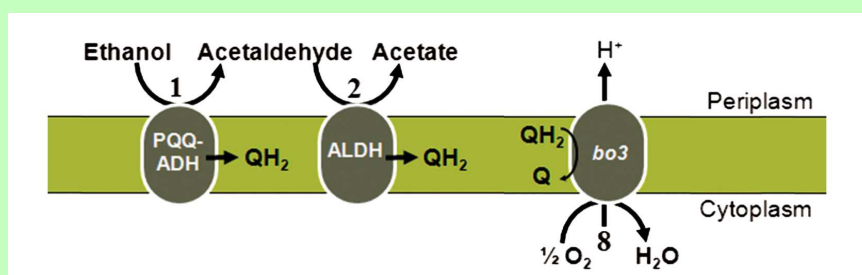
A folyamat két lépésben megy végbe, az etanol előbb acetaldehiddé oxidálódik (alkohol-dehidrogenáz), majd az aldehid oxidálódik ecetsavvá (aldehid dehidrogenáz). Az ADH prosztetikus csoportja PQQ (pirrolo-kinolin-kinon), ez veszi át a hidrogéneket.



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 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 levet 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.

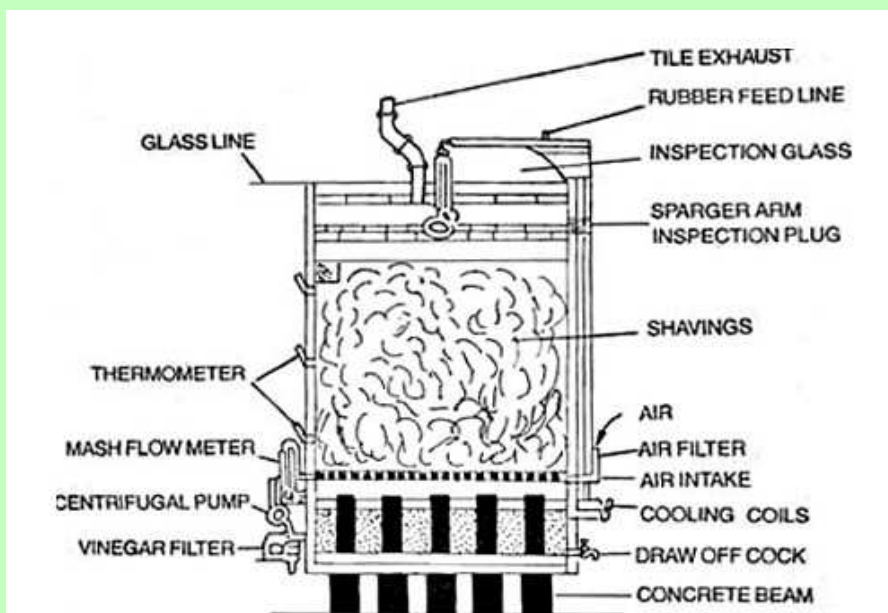


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

18

Felületi technológia



19

19

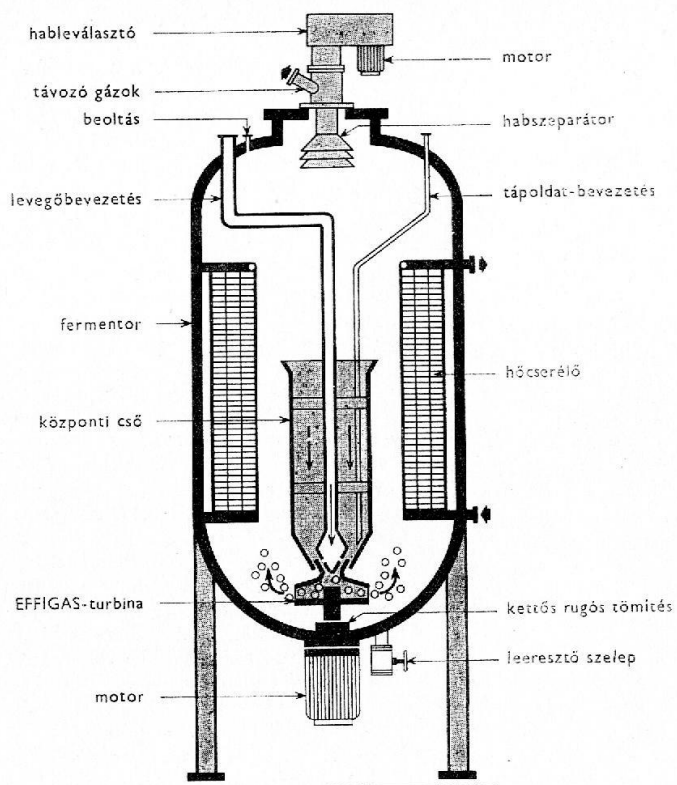
Szubmerz technológiák

Intenzív levegőztetés szükséges, keverős és air lift egyaránt előfordul.

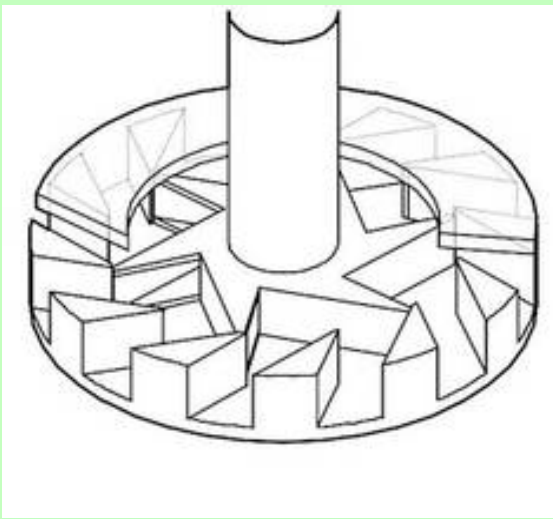
Frings-acetátor:
önbeszívó turbinakeverő, a motor alulról forgatja, és a levegőt felülről, a tengelycsővön át szívja be, és eloszlatja. →



BME Alka



20

Frings acetátor  Egy belső forgó- és egy külső állórészből áll. BME Alkalmazott Biotechnológia	 Frings Acetator turbinája Heinrich Frings GmbH & Co KG Biological and Chemical Technology
--	--

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% összkonzentrációjú.

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.



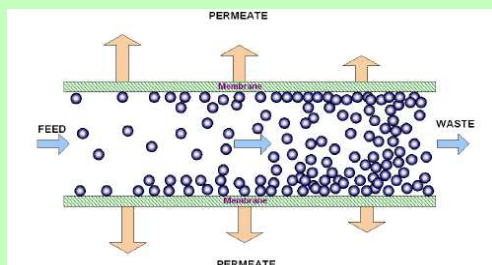
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.



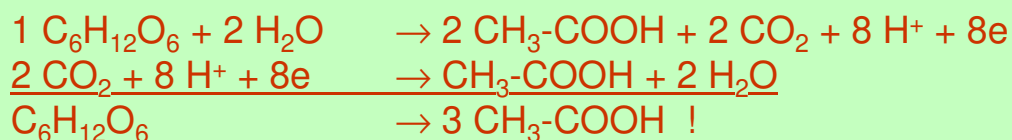
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

24

Új lehetőség: a homoacetogének

Egyes *Clostridium* törzsek képesek CO₂ fixálásra:



A 2 CO₂-ből autotróf CO₂-fixálással egy új acetyl-CoA képződik. Miért?

Sok *Clostridium* kemoautotróf, képes H₂+CO₂ 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 (g*l ⁻¹ *h ⁻¹)	Ecetsav konc. (g*l ⁻¹)
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

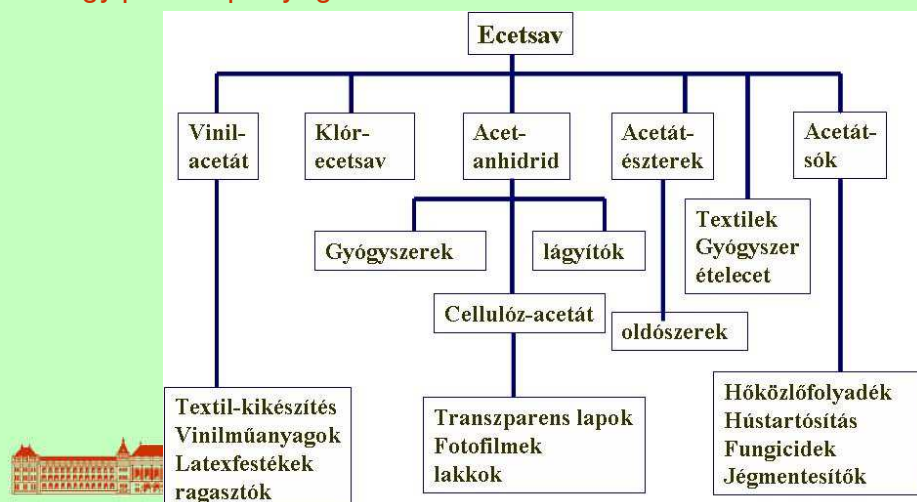
26

26

Az ecetsav felhasználása

Direkt felhasználás: erős savként
vízkőoldás
élelmiszeripar: tartósítás

Vegyipari alapanyagként:



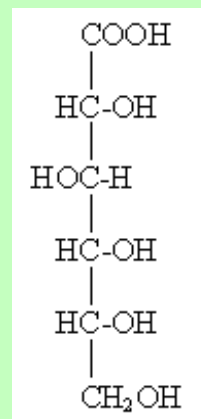
27

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

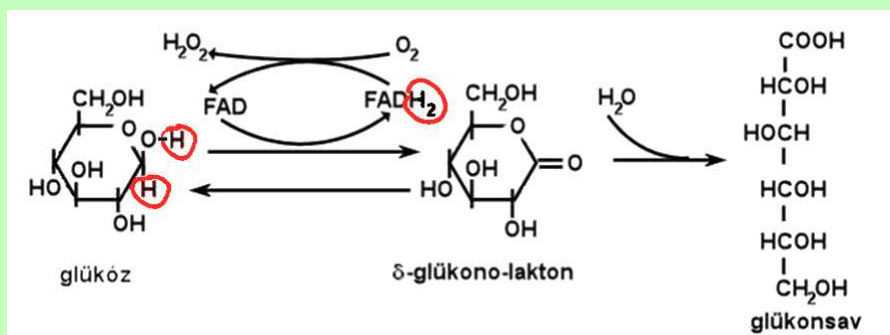


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

28

GLÜKONSAV ELŐÁLLÍTÁSA



A glükóz-oxidáz enzim molekuláris oxigént használ fel és H₂O₂-ot termel. Ezt a kataláz elbontja.
(Kiotási gyűrűt eredményezhet, régen azt hitték, hogy antibiotikumot termel a törzs - blamázs).



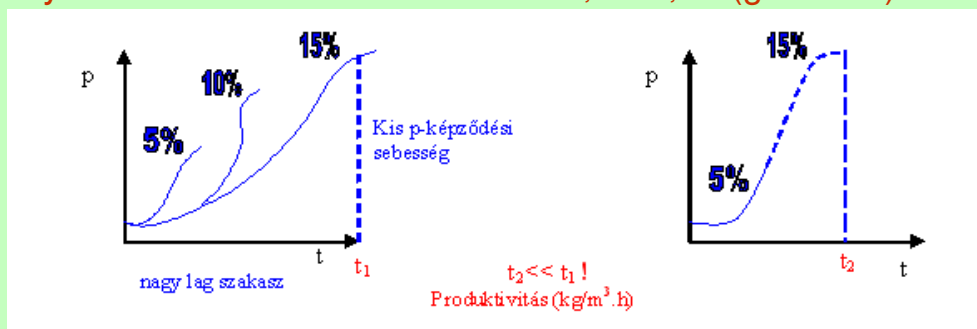
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

29

FERMENTÁCIÓS TECHNOLÓGIA

A két szubsztrátot – glükóz és O₂ – 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: 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 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.

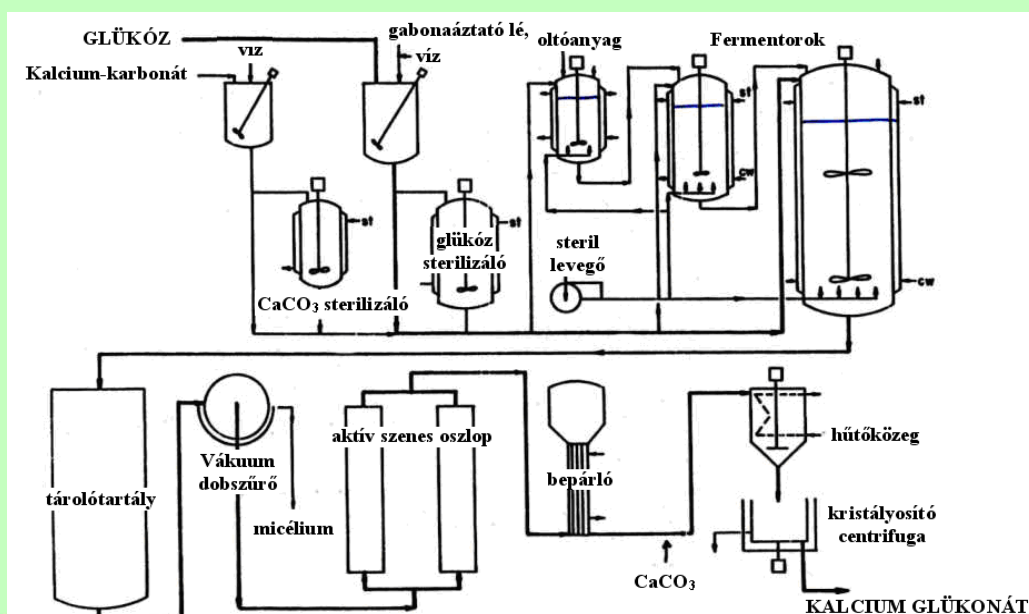


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

31

FERMENTÁCIÓS TECHNOLÓGIA



32

GLÜKONSAV

Felhasználási területek: nem korrozív sav

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

Termelés: ~100.000 t/év

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



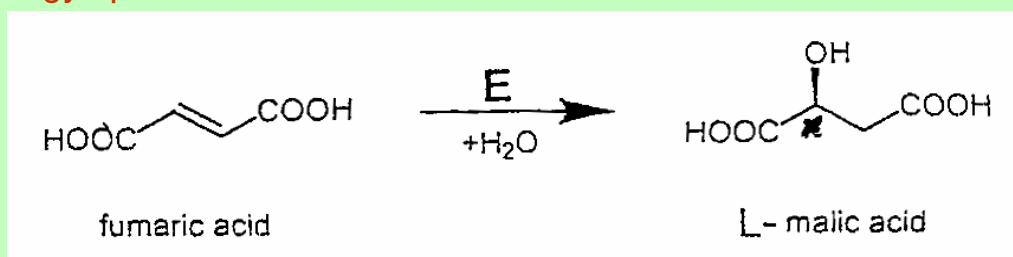
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 arányál (oldatban) →



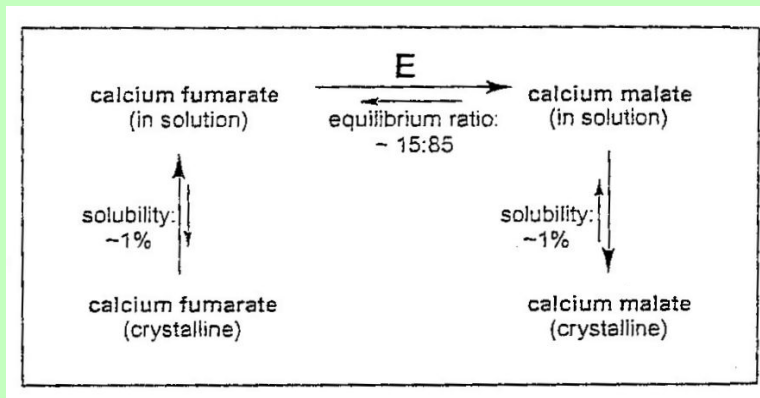
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

34

ALMASAV ELŐÁLLÍTÁSA

A termék kicsapásával az egyensúlyinál jobb konverzió érhető el:



Kristályfermentáció



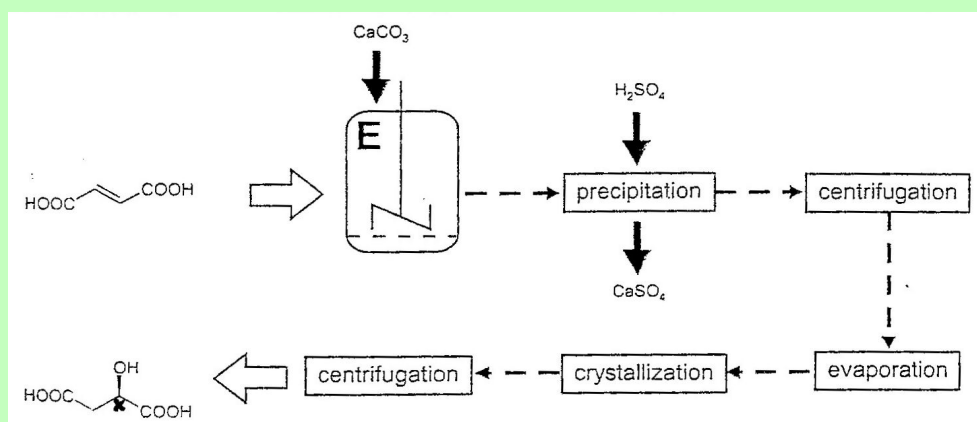
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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