

## 4. SZERVES SAVAK



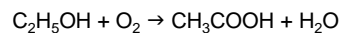
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

### Az ecetsav biológiai előállítása

A bor után legősibb (bio)technológia:  
a bor „megecetesedik” → borecet keletkezik

A folyamat bruttó leírása:



Az **ecetsav baktériumok** az alkoholt ecetsavvá oxidálják molekuláris oxigén felhasználásával.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### SZERVES SAVAK

Mind prokarióták, mind eukarióták termelnek savakat, nincs különbség.

Anyagcserében:

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

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

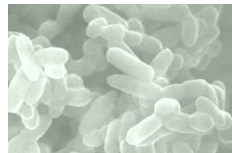


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

### Ecetsav baktériumok

- Gram negatív,
- ellipszoid vagy pálcá alakú sejtek,
- aprók, 0,6-0,8 μm hosszúak,
- egyesével, párokban vagy láncokban
- van mozgásra képtelen és mozgásra képes forma is → poláris vagy peritrich flagellum
- obligát aerobok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### 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

### Az ecetsav baktériumok osztályozása

Az *Acetobacteraceae*-n belül 3 család.

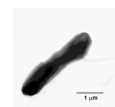
Az *Acetobacter* és *Gluconobacter* közeli rokonok (DNS hibridizáció).



*Gluconobacter*



*Acetobacter*



*Frateuria*



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## 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”

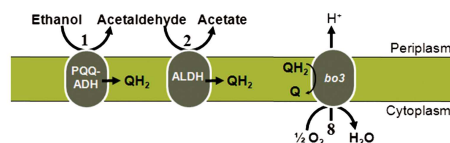
Ipari törzseknel/kultúráknál elvárás, hogy:

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## 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.

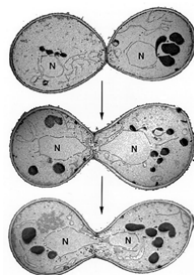


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Acetobacter törzsek genetikai módosítása

Szferoplaszt(protozaszt) 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

## 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

## 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 proszтетikus csoportja PQQ (pirrolo-kinolin-kinon), ez veszi át a hidrogéneket.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Étkezési ecetek

Alapanyagok szerint:

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



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## 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)
- 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

## 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.  
(Az alkohol koncentráció folyamatos mérése és szabályozása.)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## 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<sub>2</sub>-ot, beépítik saját anyagaikba (~0,1% C)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## 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

## Nitrogénvegyületek

N-forrás:

szervetlen N-források (ammónium sók) is megfelelők

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## 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 (= „mozgóceférés” eljárás)

A felületen a sejtekből biofilm alakul ki.

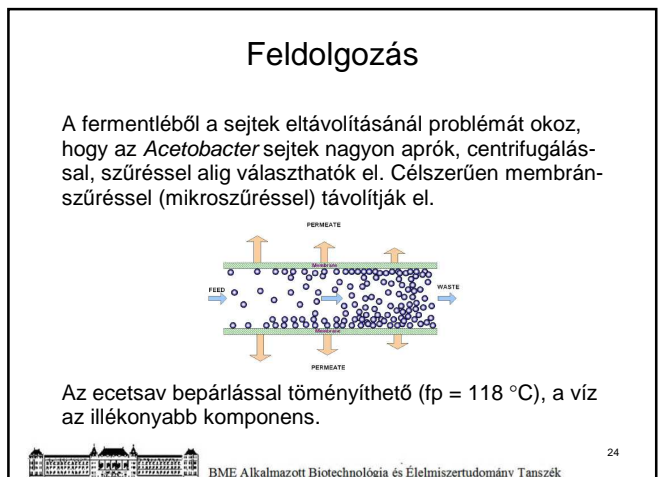
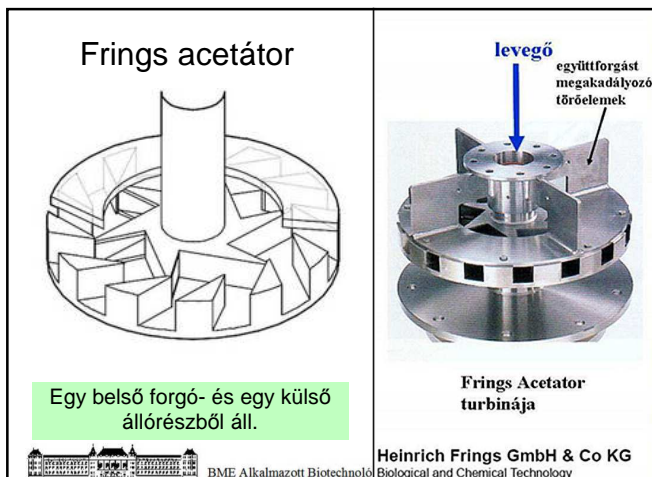
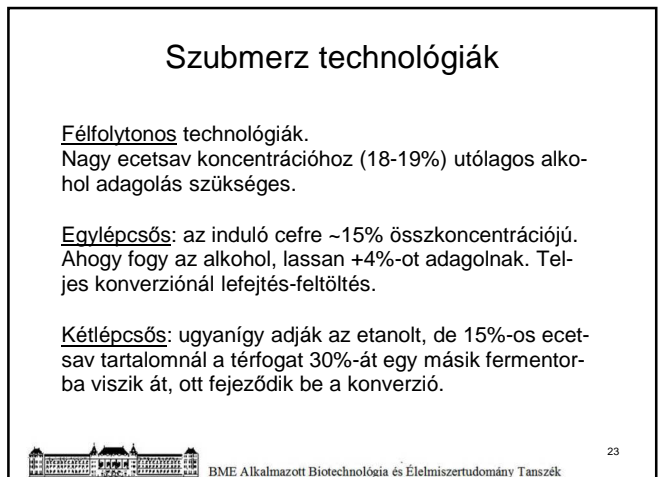
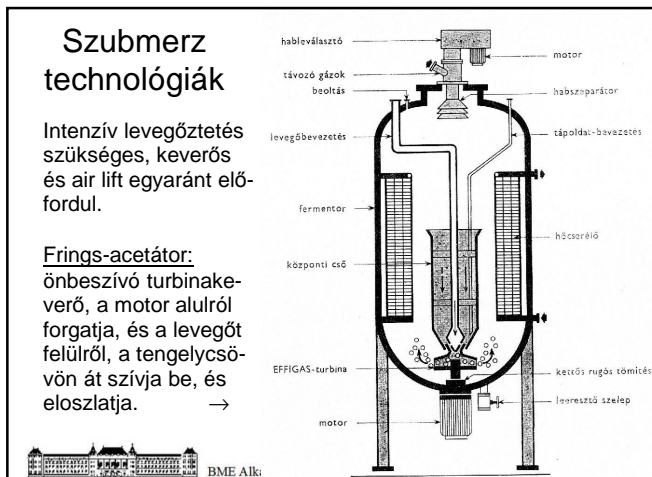
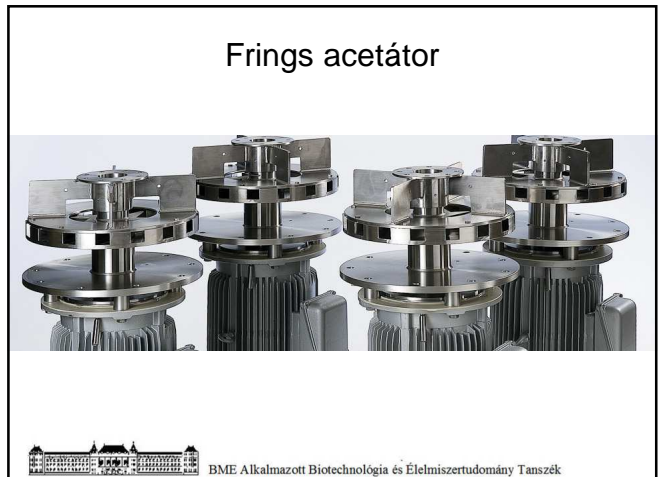
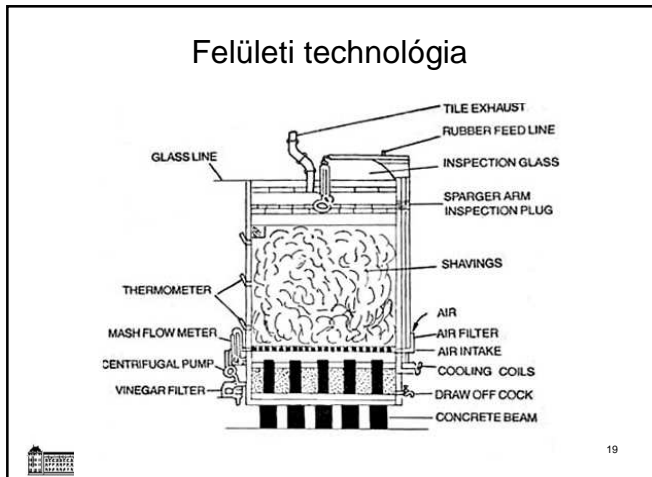
Nem steril, a befertőződéstől védi az alkoholtartalom és a savas pH. (de: „ecetangolna”)

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



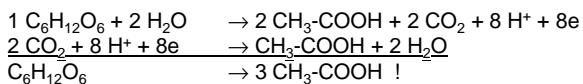
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18



## 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

## GLÜKONSAV ELŐÁLLÍTÁSA

1928 – felületi tenyésztés cukron,

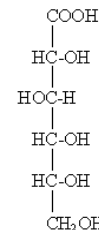
*Penicillium notatum*

80-87% -os konverzió

Ma: főleg *Aspergillus niger*, mellette baktériumok:

*Gluconobacter suboxydans*,

metanolhasználók, 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

## Új lehetőség: a homoacetogének

Fermentáció típusa	Produktivitás (g*l <sup>-1</sup> *h <sup>-1</sup> )	Ecetsav konc. (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

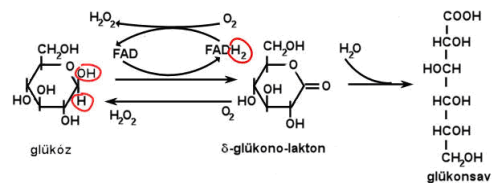
Elméleti konverzió: 1 g/g, a gyakorlatban 90-95%



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

## 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

## Az ecetsav felhasználása

Felhasználása:

Ipar: erős sav, reakciók, alapanyag,

Vízkezelés

Élelmiszeripar: tartósítás

Új: jégmentesítés: só helyett Ca- vagy Mg-acetát



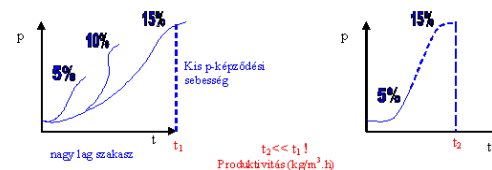
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

## 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 erős levegőztetés, intenzív keverés, nagy fejnymás. DO-t magas értéken kell tartani.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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)

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

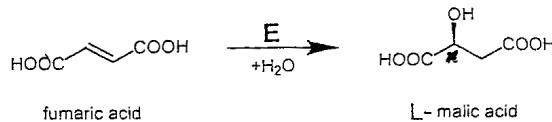


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

## ALMASAV ELŐÁLLÍTÁSA

Egylépéses konverzióval fumarásvából.



Törzs: *Corynebacterium glutamicum*, nyugvósejtes tenyészet

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

Körülmények: pH = 8, t = 25 °C

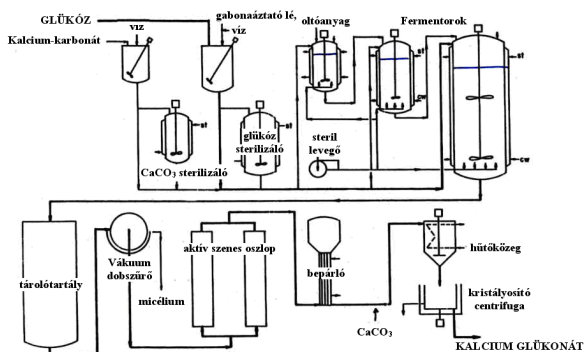
Egyensúly: 15 : 85 arányál (oldatban) →



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

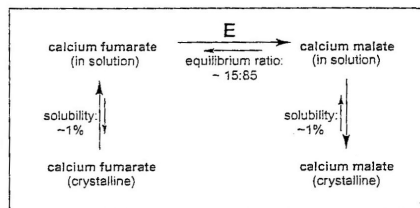
34

## FERMENTÁCIÓS TECHNOLÓGIA



## ALMASAV ELŐÁLLÍTÁSA

A termék kicsapásával az egyensúlyinál jobb konverzió érhető el:



Kristályfermentáció



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

35

## GLÜKONSAV

Felhasználási területek: nem korrozív sav

- Fémipar (tisztítás, rozsdátlanítás)
- Üvegipar
- Detergenszekben (komplekképző)
- Gyógyszeripar (vízoldhatóságot javítja, Ca, Fe)
- Cementadalék

Termelés: ~100.000 t/év

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

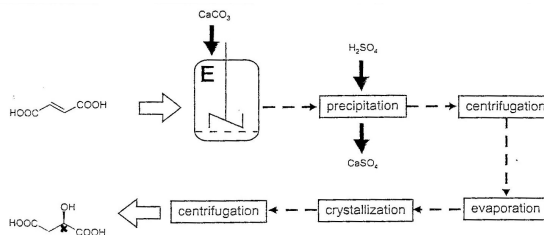


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

## ALMASAV ELŐÁLLÍTÁSA

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

## 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