

ANAEROB FERMENTÁCIÓK = ERJEDÉSI IPAROK



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Erjedési iparok

Anaerob technológiákkal nagy léptékben állítanak elő olyan tömegtermékeket, mint az etanol és a biogáz. Ezek gyártásával más tárgyak foglalkoznak, ezért itt nem részletezzük. További tradicionális erjesztési termékek:

- B₁₂ vitamin (lásd a Vitaminok fejezetben)
- Dextrán (lásd a Mikrobiális poliszaccharidok fejezetben)
- Tejsav
- Aceton-butanol-etanol elegy



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

ERJEDÉS

Az erjedés a szénhidrátok lebontását jelenti, amelyet mikroorganizmusok (baktériumok, élesztők, penészek) végeznek, abból a célból, hogy saját élettevékenységükhöz energiát termeljenek.

A heterotróf mikroorganizmusok energiatermelése anaerob körülmények között erjedéssel történik.

Összefoglalva: az erjedés tehát a heterotróf mikroorganizmusok anaerob energiatermelő folyamata, amely a szénhidrátok ill. egyes származékaik egy vagy több szén-szén kötésének hasításával és az oxigénatomok átrendeződésével jár.

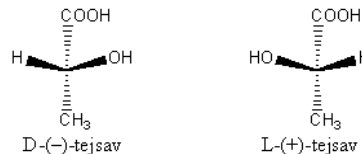


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

A tejsav előállítása

Az (L)-tejsav tipikusan az anaerob anyagcsere terméke, a piroszőlősav hidrogénezésével keletkezik.



A természetben előfordul:

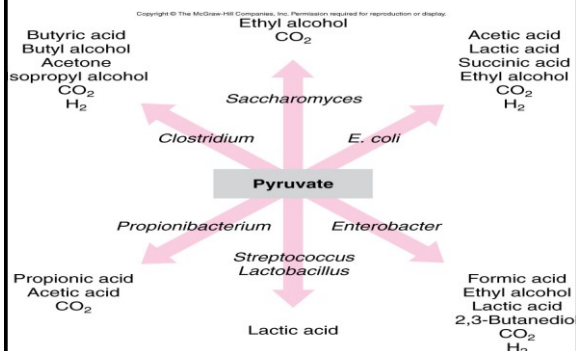
- savanyú káposzta
- kovász
- aludttej, kefir
- kovászos uborka



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

AZ ERJEDÉS TERMÉKEI



A tejsav előállítása

Alternatív előállítás:

- Szintetikus: acetaldehid + HCN (racém termék)

Bioszintézis (anaerob):

Heterofermentatív: 1 tejsav/molekula glükóz

Homofermentatív: 2 tejsav/molekula glükóz (nincs CO₂!)

Törzsek: - *coccusok*, - *bacillusok*, - néhány fonalas gomba

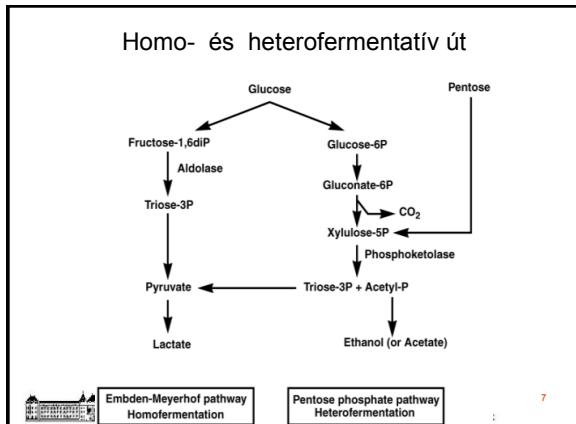
Iparban: *Lactobacillusok*

Tápanyagigény: szénforrás: glükóz, laktóz, néha keményítő
N-forrás: komplex, szerves nitrogént igényelnek, fehérje-hidrolizátumokat.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6



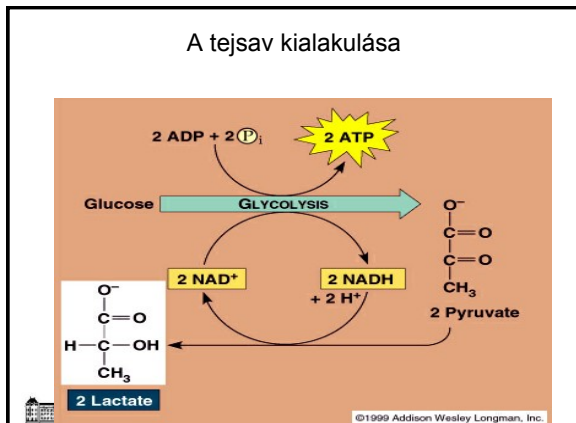
Tejsavbaktériumok

A tejsavbaktériumok Gram-pozitív, általában nem spóráképző, nem mozgékony pálcikák és coccusok.

Nem képesek a citokrom és a porfirin (légzési lánc részei) létrehozására, a proton-gradiensek segítségével nem tudnak ATP-t létrehozni, azt csak főként erjedéssel, cukrok fermentációjával nyerik.

Korlátozott bioszintetikus képességekkel rendelkeznek → szükségük van:

- aminosavakra
- B-vitaminra
- purin és pirimidin bázisokra
- szénre és cukorra



A tejsav termelő törzsek tápanyagigénye

Bacteria	Fermentation pathway	Lactic acid enantiomer	Carbon sources substrates and complex
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (formerly <i>L. bulgaricus</i>)	Obligate homolactic	D(-)	Lactose, cheese whey, casein whey, and cheese whey permeate
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (formerly <i>L. delbrueckii</i>)	Homolactic-inducible heterolactic	L(+)	Glucose, sucrose and potatoes
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Obligate homolactic	D, L	Cheese whey permeate and lactose
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	Obligate homolactic	L(+)	Starch
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Obligate homolactic	D, L	Starch
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> and subsp. <i>rhamnosus</i>	Homolactic-inducible heterolactic	L(+)	Lactose and cheese whey
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> and subsp. <i>cremoris</i> (formerly <i>Streptococcus lactis</i>)	Obligate homolactic	L(+)	Lactose and cheese whey permeate
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Obligate homolactic	L(+)	Lactose

A tejsav termelő törzsek

Baktériumtörzsek	Enantiomer forma	Erjedés típusa
<i>Bacillus coagulans</i>	L (+)	Fakultatív heterofermentatív
<i>Lactobac. casei</i> ssp. <i>casei</i>	L (+)	" "
<i>Lactobac. rhamnosus</i> korábban <i>delbrueckii</i>	L (+)	" "
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> korábban <i>Streptococcus lactis</i>	L (+)	Homofermentatív
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> korábban <i>Streptococcus cremoris</i>	L (+)	" "
<i>Streptococcus faecalis</i>	L (+)	" "
<i>Streptococcus thermophilus</i>	L (+)	" "
<i>Bacillus laevolacticus</i>	D (-)	Fakultatív heterofermentatív
<i>Lactobac. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	D (-)	Homofermentatív
<i>Sporolactobacillus inulinis</i>	D (-)	" "

A Lactobacillus-ok

Hőmérséklet: 5-45 °C közötti tartományban növekednek.

Savtűrőek → a legtöbb pH = 4.4-es közegben is képes növekedni. Hajlamosak „túlsavanyítani” a közeget, ettől leáll a növekedés → tartósítás (pl. silózás)

A *Lactobacillus* nemzetség tagjai jóval savtűrőbbek, mint a többi tejsav baktérium, ezért olyan fontosak az élelmiszeripari fermentációk végső fázisában.

A tejsav előállítása

A fermentáció körülményei:

Anaerob, levegőztetés nem kell, N_2 öblítés viszont igen.
Pufferolás: a keletkező tejsavat közömbösíteni kell, mivel az károsítja a sejteket. Lehet:

- $CaCO_3$ -tal (automatikus, de szilárd fázis),
- Alkáli lúgokkal (jelentősen hígítja a fermentlevet)
- NH_3 gáz befúvatásával (drágább, de nem hígít)

Kidolgoztak szakaszos és folytonos technológiákat, a leg-hatékonyabb a sejtviasszatplálásos.



A tejsav előállítása

Alternatív feldolgozási műveletek:

Alkáli, vagy ammónium-laktátos lé:

- a sejtek elválasztása után mindenképpen savval szabadjítják fel a tejsavat, rengeteg só képződik
- Koncentráció, tisztítás
- Bepárlás.

Membránműveletek: egyre inkább terjednek

- A sejtek elválasztására mikroszűrés,
- Az oldott molekulák szétválasztására nanoszűrés,
- A laktát só koncentrállására elektrodialízis
- A sav felszabadítására bipolaris elektrodialízis.



A tejsav előállítása keményítő alapon



A tejsav felhasználása

- Élelmiszeripar (tartósítás, ízesítés, sütőipari adalékok, malolaktikus erjesztés)
- Textil festés, kikészítés, bőrcserzés
- Műgyanták, celofán
- Ragasztók, detergenssek
- Kozmetikai ipar (AHA)
- Gyógyszeripar

Legújabban: „zöld kémia”:

- Lebontható műanyagok (polilakton) gyártása
- Észterei a „zöld” (= környezetkímélő) oldószerek



A tejsav előállítása

Feldolgozás:

„klasszikus”, kalcium-laktátos lé:

- a hőmérsékletet 80-90 °C-ra emelik,
- az oldat pH-ját kalcium-hidroxiddal 10-11 közé állítják.
- a kalcium laktát teljes egészében oldatba megy.
- a levét melegen szűrik
- kénsavval felszabadítják a tejsavat, a kalcium gipsz formájában kicsapódik.
- csapadékos oldatot leszűrik,
- a kapott tejsav oldat tetszőlegesen töményíthető, akár 80-90 %-ig, atmoszférikus vagy csökkentett nyomáson.



Aceton-butanol-(etanol) fermentáció

Bevezetés:

Pasteur figyelte meg először baktériumok butanoltermelését a 19. században.

I. Világháború előtt – a butanolt használták butadién előállítására → szintetikus gumihoz

Chaim Weizmann - *Clostridium acetobutylicum*

I. Világháború idején inkább az acetont tekintették főterméknek – felhasználták a TNT robbanóanyaghoz

I. Világháború után újra a butanol válik fontossá a nitrocellulóz előállításához

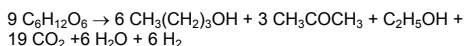


Aceton-butanol-(etanol) fermentáció

A II. Világháború után a petróleum bázisú termékek ki-szorították a fermentációs termékeket → a 200 m³ alatti fermentorok nagy többségét leállították (kivéve: pl. Taiwan és Dél-Afrika)

Butanos erjesztések:

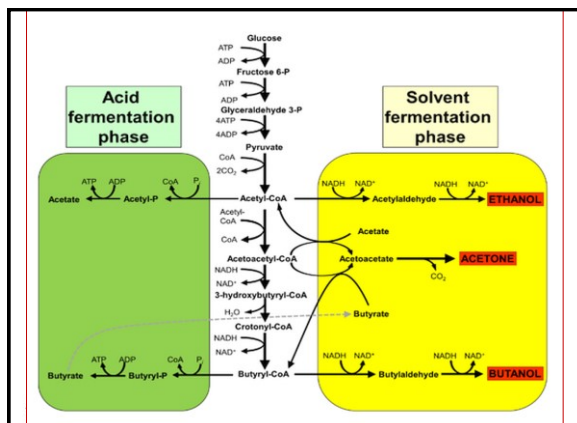
A *Clostridium acetobutylicum* keményítőtől, melaszból, pentózokból, szacharózból állít elő n-butanolt, acetont, izopropanolt és nyomokban etanolt állít elő.



Végtermékgátlás

A 0,5%-nál kisebb koncentrációjú butanolnak nincs hatása a sejtekre, de nagyobb koncentrációban károsítja a sejtmembránt.

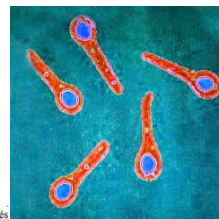
1,3 – 1,7%-os butanol koncentráció felett a termelés leáll.



Termelő törzsek

A *Clostridium* baktériumcsaládba tartozó mikrobák képesek keményítőt (egyesek cellulózt) közvetlenül, vagy egyszerűbb szénhidrátokat (glükózt, fruktózt, xilózt, szacharózt, laktózt, stb.) anaerob körülmények között erjeszteni. Gram-pozitív spóráképző pálcák, egyik végükön több ostorszerű mozgásszervük van. Keményítőszűrő tartaléktápanyagot tárolnak.

Elnevezésük: spórázaskor a nagyméretű endospórák deformálják a sejtfalat, a sejt végén buzogányszerű dudort alkotnak.



Aceton-butanol fermentáció

A termékek relatív aránya függ:

- baktérium törzstől
- fermentációs körülményektől

Három fermentáció típust különböztetünk meg:

1. Aceton-butanol fermentáció → *Clostridium acetobutylicum*
2. Butanol - izopropanol fermentáció → *Clostridium butylicum*
3. Vajsav - ecetsav fermentáció → *Clostridium butyricum*



Aceton-butanol fermentáció

Törzselválasztás: a spórák nagyon ellenállóak, sokáig eltarthatók. A *Clostridium acetobutylicum* törzskultúrákat spóra formájában, homokban akár 30 évig is tárolják.

A fermentorokat (200-700 m³) hővel sterilizelik.

Levegőtteni nem kell (anaerob), de beoltás előtt és után a levét CO₂ befúvatásával keverik, egyúttal feltöltik széndioxid-dal.

A fermentáció szénforrása: melasz vagy kukorica keményítő

Az indulási pH-t 5,8-6 közé állítják, a hőmérséklet 34°C.

A fermentációs idő 36 óra, lefutása: →



A fermentáció lefutása

Az első szakaszban a pH csökken, kb 5,2-re → mert szerves savak (ecetsav ésajsav) keletkeznek.

A következő szakaszban a pH emelkedik → a savakból acetone és butanol képződik. Amikor felesleges NADH_2 van jelen, akkor a sejtek felveszik a megtermelt ajsavat és butanolá redukálják.

Végül a növekedés és az oldószer termelés leáll. A legnagyobb változás a gáztermelés sebességében mutatkozik. Ez jelzi az anyagcsere leállítását. A pH visszaáll az 5,8 értékre.

A kész levet feldolgozásra továbbítják.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

Erjesztési technikák

ABE erjesztésnél is fellép a termékgtátlás, 0,7-1,5% butanol koncentrációnál. A szaporodás és a terméképzés egyaránt csökken.

Tehát nagy mennyiséghez:

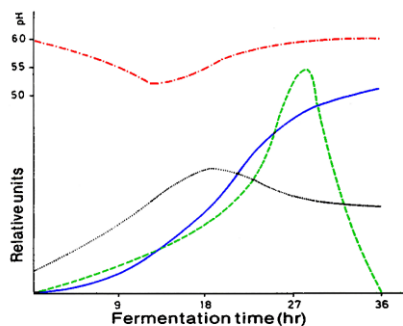
- vagy nagy fermentációs térfogat kell,
- vagy növelni kell a térfogati produktivitást

Erjesztő mikroorganizmusként kizárólag a *Clostridium acetobutylicum* törzset használják.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26



The kinetics of the acetone-butanol fermentation (Spivey, 1978), — solvent, — gas production, - - - titratable acids, - - - pH value

26

Szakaszos technológiák

Szénforrásként keményítő-, cellulóz és hemicellulóz-, szacharóz- vagy laktóztartalmú nyersanyagokat alkalmaznak.

A keményítőtartalmú nyersanyagok közül a kukorica a legfontosabb.

A szemekből a csírárt eltávolítják → őrlék → keményítőtartalmát (folyamatos főzésben) elcsirizesítik → oldatba viszik



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

Aceton-butanol fermentáció

termék	cukor átalakítás, %	Termelt mennyiség
Butanol	30	1053 kg
Aceton	30	526 kg
Etanol	30	175 kg
CO_2	50	2900 kg
H_2	2	117 kg
* arány (6:3:1)		

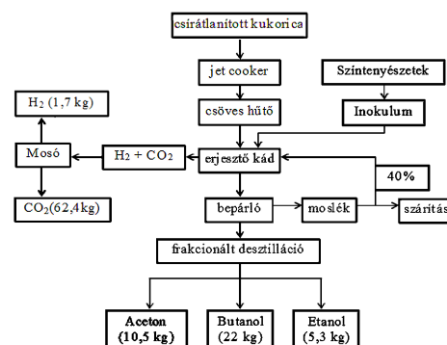
Hozamok egy 90 m³-es fermentorban:

5,85 t fermentálandó cukrot tartalmaz
A CO_2 -ot kinyerik
Az acetont, butanol, etanol kidesztillálják
Desztilláció maradékát megszáritják → takarmány



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

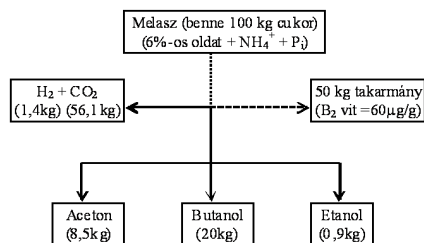
27



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

Anyagmérleg melasz szénforráson



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

Folytonos technológiák

Elmúlt két évtized alatt folytonos fermentációs technológiákat fejlesztettek ki.

Ezek továbbfejlesztése a sejtvisszatartásos technológia: az elvett léből a sejteket elválasztják és a visszavezetik a fermentorba → ezzel megnövelik a sejtek koncentrációját a reaktorban és emelik a produktivitást.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

ABE törzsfeljesztés

Rekombináns DNS technológiát, hagyományos mutagenizist és szelektíót alkalmazták, hogy módosítsák a kívánt metabolikus útvonalakat az oldószertermelő *Clostridium*-ban.

Antiszensz blokkolás: a *C. acetobutylicum* 824 törzsből a butanol/aceton arány növelése érdekében az mRNS transzlációt gátló komplementer RNS-t használtak („anti-sense RNA technology”), hogy blokkolják az aceton termelő útvonalat alkotó enzimek és a CoA-transzferáz képződését, így növelik a butanol részarányát.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Downstream fejlesztések

Módszerek az oldószer-kinyerés egyszerűbbé és gazdaságosabbá tételére:

Gáz sztripelés

- a fermentált gázt (célszerűen a termelő szén-dioxid) áramlatnak keresztül
- ahogy a gáz átbuborékol a fermentorban, oldószer gőzöket visz magával (gőznyomás), lehűtve ezek leköndezálnak és összegyűjthetők
- a gázt recirkuláltatják a fermentorba, további oldószer kinyerésére



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Továbbfejlesztett technológiák

Régen: szakaszos fermentáció

- 1940-es és 1950-es évek során a butanol ipari léptékben szakaszosan, anaerob fermentorokban termelték.
- A manipulálatlan törzsek igényeinek megfelelően (cukornád) melaszt használtak szénforrásként.
- Fermentáció végére a sejttömeget és más lebegő részeket centrifugálással távolították el és takarmánnyként hasznosították.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Pervaporáció

A fermentáló egy membránnal érintkezik, amelynek másik oldalán áramló inert gáz vagy vákuum van.

A termelt oldószer molekulák beoldódnak a membrán apoláris anyagába, átdiffundálnak rajta és a másik oldalra gőzként jelennek meg.

Az egyensúly akkor áll be, amikor a gőzök koncentrációja eléri az adott hőmérséklethez tartozó gőznyomást. Ha viszont a gőzöket folyamatosan elvisszük egy kondenzátorba, a termelt oldószer elvétele is folyamatosává válik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Pervaporáció

A művelet hatékonyságát két paraméterrel jellemezhetjük:

- szelektivitás: az eltérő polaritású illékony anyagok átérésztésének/visszatartásának mértéke
- fluxus: az egyes komponensek anyagtranszportjának sebessége, egységnyi időre és membránfelületre vonatkoztatva



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Extrakció

Hátrányai:

- Az alkalmazott oldószer a sejtekre nézve toxikus lehet,
- nehezen szétválasztható emulzió kialakulása,
- Az extraháló oldószer vesztesége (egy kevés mindig átoldódik a fermentáléba)
- A sejtek akkumulációja a szerves és a vizes fázis határ felületén
- Megoldás: membrán-extrakció (persztrakció)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Oldószer kinyerési módszerek

A kihozatalok összehasonlítása:

A comparison of novel ABE production systems using glucose as substrate.					
Fermentation process	Culture	Sugar used g/L ^a	Total ABE produced g/L	Yield	ABE productivity (g/L/h)
Batch (control)	<i>C. beijerinckii</i> BA101	<60	<33	0.38-0.40	0.35
Product recovery by gas stripping:					
Batch	<i>C. beijerinckii</i> BA101	161	75.9	0.47 ^b	0.61
Fed-batch	<i>C. beijerinckii</i> BA101	500	233	0.47 ^b	1.16
Continuous	<i>C. beijerinckii</i> BA101	1163	460	0.40	0.91
Product recovery by pervaporation:					
Fed-batch	<i>C. acetobutylicum</i> 824	470 ^c	155	0.31-0.35	0.13-0.26

^a g per L culture volume.

^b values are higher than expected.

^c calculated value.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Membránextrakció

Fermentlevet és az oldószert egy membránnal választjuk el. A membrán anyagán keresztül érintkezik a két, egymással nem elegyedő folyadék.

Apoláris anyagú membrán esetén a butanol beoldódik a membrán anyagába és átdiffundál rajta, míg más, hidrofil komponensek illetve fermentációs közltermékek (pl: ecetsav, vajsav) visszamaradnak a vizes fázisban.

Nincs direkt kapcsolat a két fázis között, így az oldószer toxicitása, fázis diszperzió, emulzió és réteg képződés drasztikusan lecsökken vagy megszűnik



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Extrakció

Vízzel nem elegyedő szerves oldószerral

A butanol jobban oldódik a szerves fázisban mint a vizesben (fermentlé) → megoszlás

A fázisok szétválasztása (ülepítés/centrifugálás)

Probléma: a szerves fázisból ki kell vonni az átoldódott termékeket – pl. desztillációval (nem lehet kikerülni)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

ABE technológiák összehasonlítása

Technológia	Produktivitás (g/L ² h)	Oldószer konc. (g/l)	Maradék szénhidrát (g/l)	Mellék termék (g/l)
Szakaszos (szabad sejtes)	0,2-0,6	10-18	kicsi v. 0	1-3
Szakaszos (rögített)	0,24	17	-	-
Folytonos (szabad sejtes)	0,75	13,0	1	5
Folytonos (adszorbeált)	1,5-4,1	-	-	-
Folytonos (gélbezárt)	1-1,8	-	-	-
Folytonos (kétlépcsős)	0,6-0,7	18,5	0	-
Sejtrecirkulációs (kétlépcsős)	3,6	13	kicsi	-
Extraktós (sejtrecirk.)	3,1	18	-	-
Termék kiűzéses (szabad sejtes)	0,31	16	-	-
Termék kiűzéses (kétlépcsős rögített)	2,3+0,6	-	-	-



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

42

Gazdasági kérdések

Az erjesztéssel gyártott ABE termékeknek erős konkurenciát jelentenek a petrokémiai alapokon gyártott termékek.

Gazdasági hátrány az erjesztéssel nyert ABE termékek alacsony elérhető koncentrációja, az ilyen híg oldatoknál koncentráálásuk és frakcionált kinyerésük a klasszikus rektifikálással nagyon energiaigényes.

A térfogati produktivitás mellett a másik legfontosabb mérőszám gazdasági számításokhoz az erjesztéssel nyert összkoncentráció.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

43

Gazdasági kérdések

Utóbbi évek gazdasági tanulmányai szerint nem gazdaságos a butanol termelése a petrokémiai útvonalhoz viszonyítva.

További fejlesztésekre van szükség, hogy versenyképes legyen a kémiai előállítással

1. Genetikailag módosított törzsek kifejlesztése
2. olyan új törzseket létrehozni, melyek képesek lignocellulózból származó cukrok felhasználására és rezsztensek e hidrolizátumok a mikrobiális inhibitoraival szemben



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Gazdasági kérdések

Fejlesztési irányok:

3. Minél olcsóbb szénforrások hasznosítása (melléktermékek, hulladékok, például a kukorica rost hidrolizátuma)
4. a szénhidrát alapanyag minél teljesebb elerjesztése és az értéktelen melléktermékek képződésének minimalizálása. Ez a kihozatal javítása mellett a szennyvízbe kerülő szerves anyag mennyiségét is csökkenti.
5. A sejtömeg visszavezetése, nagy sejtsűrűség
6. A fermentációs melléktermékek (CO_2 , H_2 , biomassa) hasznosítása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

45