

4. SZERVES SAVAK

Citromsav



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

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

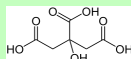
Anaeroboknál: sok NADH keletkezik → redukív közeg → akkor van savtermelés, ha nem redukálódik tovább alkohollá



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Citromsav



Összegképlete: $C_6H_8O_7$ Molekulatömeg: 192 g/mól

Tulajdonságai:

Fehér, kristályos, kellemesen savanyú ízű anyag
Háromértékű gyenge sav, így savasításra illetve pufferek készítésére fel lehet használni

Előfordulása:

A TCA (vagy Szent-Györgyi-Krebs) ciklus része, ezért szinte minden sejtben előfordul
Bizonyos citrusféléknek a termésében (lime, citrom) a szárazanyagának akár a 8%-át is elérheti a citromsav, ennek a kinyerésére is vannak eljárások



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Felhasználása



~60%-ban az élelmiszer ipar használja fel pl. gyümölcslevek és gyümölcsle sűrítvények, lekvárok ízesítésére, konzerválására – a száma: E330

A gyógyszeriparban is felhasználják pl: vas-citrátot a vas bevitelére, a nátrium sóját véralvadás gátlásra, kalcium bevitelre az angolkór megelőzésére, és kozmetikumok tartósítására

Pufferolásra használják a háztartási tisztítószerekben

Felhasználják a fémiparban felületek tisztítására, passziválására (salétromsav helyett – ahol ez nem alkalmazható)

Mosószerekben is felhasználják a víz lágyítására a foszfátok helyett mert nem okoz eutrofizációt, ami miatt a foszfát alapú lágyítók bizonyos országokban be vannak tiltva.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Termelés

1929	5 000 t/év
1953	50 000 t/év
1976	200 000 t/év
1980	350 000 t/év
2007	1 600 000 t/év

Több mint egy milliárd dolláros piac

A többi szerves savval ellentétben kizárólag fermentációs úton termelik (régbben: citrusfélék terméséből)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Történet

1784 - SCHELE citromból izolálja

a XX sz közepéig éretlen citromból vonják ki

1913 - ZAHORSKY citromsav termelő törzset szabadalmaztat

1923 - CURRIE: felületi eljárás, cukor, pH=2, Hozam: ~60 %

Citromsav üzemek Belgiumban, Pfizer (USA), Sturge (Anglia)

1928 - Kaznejov, melasz szénforrás. Leopold: a felesleges vas megkötése K-ferrocianiddal + 20% növekedés

1950 - Perquin, Kluver Lab., SZUBMERZ fermentációs technológia, Szűcs (P-limitáció feloldása) + 80% növekedés

1960 - n-paraffin szénforráson, *Candida lipolitica* (Szardínia)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Citromsav bioszintézis

Primer anyagcsere: glikolízis → citrátkör

A citromsav felhalmozódása miatt nem zárul a citrátkör, nincs oxálacetát képződés, ez az anaplerotikus utakon át pótlódik (mint a treoninnál):

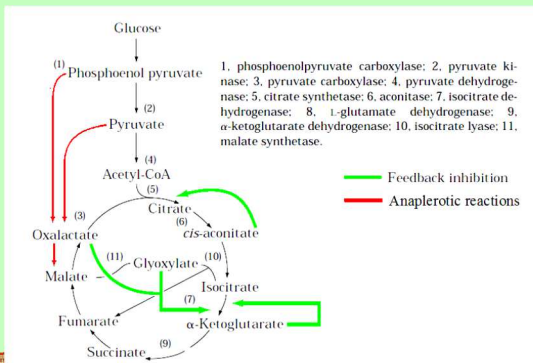
$\text{Piruvát} + \text{CO}_2 + \text{ATP} \rightarrow \text{malát} + \text{P}_i + \text{ADP}$ (piruvát karboxiláz, Mg, Fe és K ionokat igényel)

$\text{PEP} + \text{CO}_2 + \text{ADP} \rightarrow \text{oxál-acetát} + \text{ATP}$ (PEP karboxiláz, Mg, K, Mn és ammónium ionokat igényel)

A glikolízis végterméke itt a malát.



Anaplerotikus reakciók



Citromsav bioszintézis

A szokásos anyagcsere mérnöki beavatkozás nem szükséges, nem kell hiánymutáns a továbbalakulás megakadályozására.

A keletkező citromsavat egy antiport transzporter viszi ki a mitokondriumból – sokkal gyorsabban, mint ahogy az aconitáz továbbalakítja.

Ellenirányban malátot visz be a mátrixtérbe, ami két lépésben citromsavvá alakul.

Melléktermékek:

oxálecetsav → oxálsav + ecetsav
 glükóz + O₂ → glükonsav



Citromsav bioszintézis

Ellentétes savtranszport, gyorsan kiviszi a citromsavat a mitokondriumból

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 10

Citromsav transzport

A citromsavat ki is kell vinni a sejtől:

- Aktív transzport - kint a koncentráció sokkal nagyobb (10-12%), mint a citoplazmában, ATP szükséges.
- Nagy a pH különbség a lé (pH=2) és a citoplazma (pH=6-7) között. A kétértékű citrát²⁻ aniont könnyebb transzportálni, mint az egyértékűt.
- A citrát-permeáz enzimek a citromsavat Mn²⁺ komplex formájában importálják → ha nincs Mn²⁺ → nincs import, csak export. A mangán ion koncentrációt alacsonyan tartják.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 11

Törzsek

Általában *Aspergillus niger* vagy *A. wentii* törzseket használnak, mert:

- bírják a savas pH-t (~2)
- elnyomható az izocitromsav, és glükonsav termelés
- működnek az anaplerotikus reakciók
- nagy hozam

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 12

Szubsztrátok

Szénforrás: melaszt, keményítő hidrolizátumot és hulladék szénhidrátot használnak (szacharóz, glükóz)

A melasszal a probléma, hogy ha szennyezett, például a Fe, Mn vagy Zn ionok mennyisége túl magas, akkor negatívan hat a termelésre – ilyenkor ioncserélő oszlopokon ki kell vonni a fémionokat.

Szénhidrogéneken is lehet fermentálni magas konverzióval *Candida lipolytica* törzssel, de a probléma az alkánok rossz vízoldhatósága és nagyobb arányban keletkezik izocitromsav. Másrészt meg kell szabadulni a szénhidrogén nyomoktól, mert egyesek karcinogének. (+ a kőolaj ára)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Tápanyag

N-forrás: szervesen: az NH_4^+ ion ráségít a bioszintézisre.

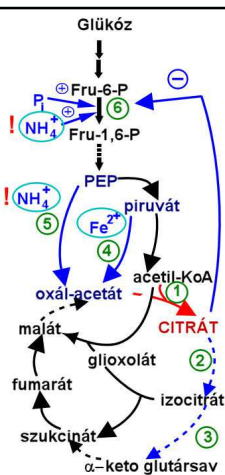
Az ammónia elfogyasztásával savanyodik a közeg: jó hatású.

P felesleg: kedvez a citromsav és oxálsav képződésnek

Nyomelemek: Fe, Mn és Zn limit szükséges.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



Tápanyag, Fe

A vasion koncentrációt optimalni kell, mert:

- ha kevés a vas, akkor lassú a növekedés, a cukorfelhasználás és a piruvát-karboxiláz lelassul
- viszont a nagy koncentráció sem jó, mert a vas az akonitáz kofaktora is, a citromsav továbbalakulását okozza

A szaporodáshoz ~2000 $\mu\text{g}/\text{liter}$ Fe az optimális, a savtermelő szakaszban viszont csak 50-200 $\mu\text{g}/\text{l}$.

A vastartalom csökkentésére a melaszt ioncserélni kell, vagy K-ferrocianidot adnak.

A vas kioldódása miatt a fermentáció csak rozsdamentes készülékekben működik.

- A vas hatását ellensúlyozza:
- MeOH
 - Cu adagolása
 - alacsonyabb hőmérséklet



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

Tápanyag, Mn

20 µg/l Mn felett a citromsavképződés csökken, mert:

A citromsav ki- és belépése a sejtbe eltérő mechanizmussal történik:

Kifelé aktív transzporttal megy, a sejt „meg akar szabadulni” a fölös citromsavtól.

Befelé viszont Mn-kelát formájában tud belépni, ezért is fontos a Mn-szintet 20 µg/l alatt tartani. A melaszt pl. Mn-mentesíteni kell (ioncsere, a Fe eltávolítással együtt).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

Fermentációs paraméterek

Oldott oxigén koncentráció:

- ha alacsony, csökken a citromsav termelés → intenzív levegőztetés, néha O₂ dúsítás!
- Ha kimarad a levegőztetés: a savtermelés leáll (a sejt-szaporodás újraindul)
- Kulcskérdés a morfológia → pelletképződés →



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

Fermentációs paraméterek

pH: a melléktermékek képződését – fertőzési kockázatot befolyásolja

Optimális pH=1.5 – 2.8

- pH < 3 csak citromsav-képződés (az extracelluláris glükóz-oxidáz inaktiválódik)
- pH = 6 felett oxálsav képződés
- pH = 3-6 oxál- és glükonsav képződés is
- ha nincs pufferolva a közeg, a pH gyorsan 3 alá megy – de a melasz erősen pufferol → savanyítás kénsavval
- ilyen savas közegben kicsi a befertőződés veszélye.

Hőmérséklet: Optimális = 28 – 33°C

- Ha <28 °C a citromsav képződési sebesség csökken
- Ha >33 °C → oxálsav képződés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

Felületi tenyésztés

Zárt kamrák: állványokon mosható, dezinficiálható (HCHO, gőz ...) tálcák (alumínium, rozsdamentes), (~4 x 2,5 x 0,25 m) kb: 400-1200 l tápoldat.

Tápoldat: hígított melasz (cukor: 15-20%) + tápanyagok, pH=6-6,5, K-ferrocianid c=10-100 mg/l – a melasz minősége szerint: A Fe, Mn, Zn ionokat komplexben megköti, a szabad fémion koncentrációt kb. az optimálisra csökkenti.

Inokulum: konídium szuszpenzióval (100-150 mg/m²)

Fermentáció: steril levegő átfűvés a tálcák között: nedvesség, hőmérséklettartás, O₂ bevitel, CO₂ eltávolítás

Jelentős a bepárlódás: 30-40 %

Fermentációs idő: 10-15 nap

Hozam: 65-75 %

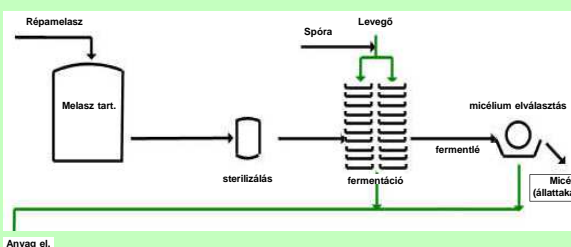
Produktivitás: 7-8 kg citromsav/m³/nap. De olcsó.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

Felületi tenyésztés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

Szubmerz tenyésztés

Fermentor: 120-220 m³ keverős reaktor
200-1000 m³ air-lift, merülő-sugaras (pelletképzés)

Tápoldat: melasz → vasmentesítés: ioncsere/K-ferrocianid
kukorica hidrolizátum (elfolyósítás - elcukrosítás)

Inokulálás: konídium vagy vegetatív (pellet) inokulum: 12 órával rövidebb!

Fermentáció: Általában fed batch: 5% cukorral indul. Majd cukor és K-ferrocianid rátáplálás
levegőztetés: 0,2-1 vvm (O₂ dúsítás!)
hőmérséklet: 28-33 °C
pH szabályozás: 2-2,6 (savval!)
2-3 nap pelletképződés, 5-8 nap citromsav képződés (függ a cukor koncentrációtól, és a használt törzstől)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

Szubmerz tenyésztés

Fermentáció: Állandó mikro-szkópos megfigyelés (pellet)

citromsav konc.: 130 g/l melaszon; 200-250 g/l cukorból

Konverzió: 87-92 %;

Produktivitás:
0,67-0,75 kg citromsav/m³*h;
~16-18 kg citromsav/m³*nap

Fruktóz: a szacharózból képződik invertálódással. Kezdetben polimerizálódhat.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Szubmerz tenyésztés

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A feldolgozás lépései

IZOLÁLÁS

1. MICÉLIUM ELVÁLASZTÁS

 - micélium
 - szűrő
 - segédanyag
2. OXALÁT FERROCIANID ELTÁVOLÍTÁS

 - mésztej + FeCl₃
 - hulladék
3. KALCIUM-CITRÁT KICSAPÁS ÉS ELVÁLASZTÁS

 - mésztej
 - fermenté
4. CITROMSAV FELSZABADÍTÁS ÉS GIPSZ ELVÁLASZTÁS

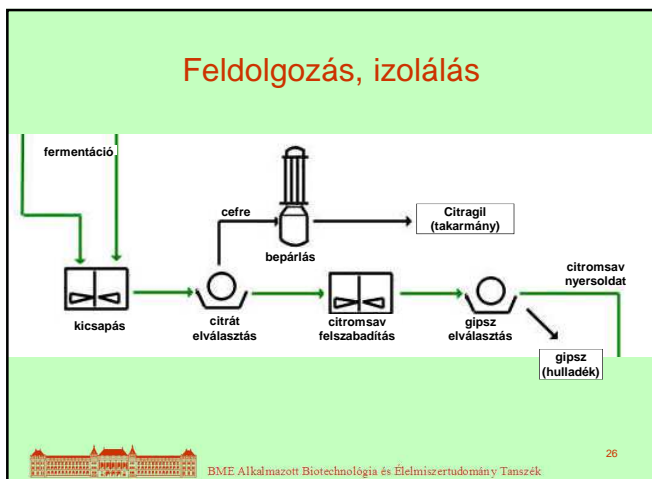
 - H₂SO₄
 - gipsz

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A feldolgozás lépései

1. Micélium elválasztás → vákuum dobszűrő 0,2 – 1,0 mm átmérőjű pellet a jó → Newtoni szuszpenzió, nyálkaképzés nehezíti a szűrést, szűrősegédanyag → pl. szalmatörök
2. Oxalát mentesítés → kevés Ca(OH)_2 adagolása → Ca-citrát ne csapódjon ki → csak $\text{Ca(H}_2\text{citrát)}_2$ -ig „titrálják”
Klarifikálás → pl. nyomó szűrő, Funda szűrő,
3. Ca-citrát kicsapás → fontos paraméterei: citromsav koncentráció, hőmérséklet 70-90 °C, pH ~7, Ca(OH)_2 adagolás üteme, mono-, di-, trikálcium citrát egyensúly → oldhatóság forrón kisebb! nagy kristályok képződése előnyös → szennyezések pH=7, 18-25%-os CaO, nagy mennyiségű hő szabadul fel → hasznosítás, szűrés → vákuum dobszűrőn
4. citromsav felszabadítása 60-70 %-os H_2SO_4 -val, (1-2 g/l feleslegben), a képződő gipszet vákuum dobszűrőn szűrik.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
25





A feldolgozás lépései - 2

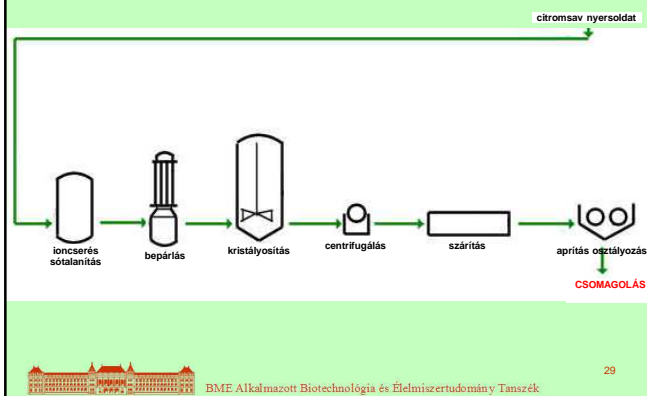
5. Színanyagok eltávolítása → aktív szén oszlopon
lonok eltávolítása → kationcserélő, anioncserélő,
regenerálás erős savval ill. bázissal
6. Tiszta citromsav oldat koncentrációja: 200-250 g/l →
további koncentráció - Többfokozatú vákuum bepárló ,
kb. 40 °C
7. Kristályosítás vákuumkristályosítóban
36,5 °C alatt → képződő termék citromsav-monohidrát
40 °C felett → vízmentes termék
szűrőcentrifuga → az anyalúg visszavezetése a folya-
matba
8. Szárítás 36,5 °C alatti hőmérsékleten (kristályvízvesztés
veszélye)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

Tisztítás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

Melléktermékek, szennyvíz

1 tonna citromsavra számítva:

Micélium: ~135 kg (25 - 30% fehérje, 15 - 20% szénhidrát)
Takarmány – trágya – papíripar

Gipsz: 1,4 t – építőipar

Szennyvíz: 8 m³; 5 - 6 % szárazanyag; KOI ≈ 50 000 mg/l

Feldolgozása:

- Bepárlás (szárazanyag: 65 – 70 %) takarmány-kiegészítő (Citragil) (Az ár nem fedezi a költségeket)
- Élesztősítés: *Torula* 14 kg/m³
- Biogáz: ANAMAT eljárás. Kilép: CH₄, CO₂, víz
aerob és anaerob eljárás kombinációja



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30
