

4. SZERVES SAVAK

Citromsav



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

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

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

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

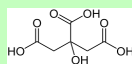
A többi szerves savval ellentétben kizárólag fermentációs úton termelik (régbben: citrusfélék terméséből)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

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, ezéért 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



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

1960 - n-paraffin szénforráson, *Candida lipolytica* (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):

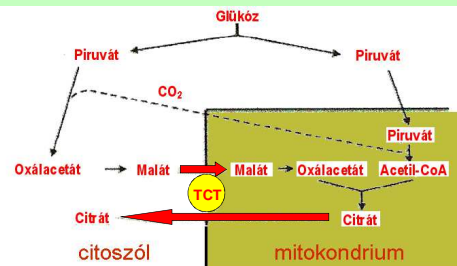
$\text{Piruvát} + \text{CO}_2 + \text{ATP} \rightarrow \text{malát} + \text{P}_i + \text{ADP}$ (piruvát karboxiláz, Mg, Fe és K ionokat igényel)

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

A glikolízis végterméke itt a malát.



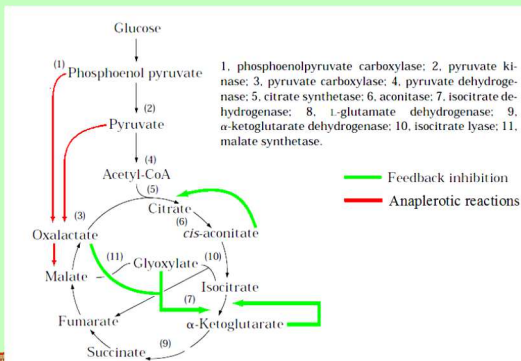
Citromsav bioszintézis



Ellentétes savtranszport, gyorsan kiviszi a citromsavat a mitokondriumból



Anaplerotikus reakciók



Citromsav transzport

A citromsavat ki is kell vinni a sejtből:

- Aktív transzport - kívül 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.



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 akonitáz továbbalakítja.

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

Melléktermékek:

oxálacetsav → oxálsav + ecetsav
glükóz + O₂ → glükonsav



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



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 negatív hat a termelésre – ilyenkor ioncserélő oszlopokon ki kell vonni a fémionokat.

Szénhidrogének 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)



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-menetíteni kell (ioncsere, a Fe eltávolítással együtt).



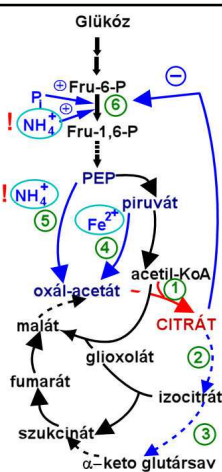
Tápanyag

N-forrás: szervesen sók: 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.



Fermentációs paraméterek

Oldott oxigén koncentráció:

- ha alacsony, csökken a citromsav termelés → intenzív levegőztetés, néha O_2 dúsítás!
- Ha kimarad a levegőztetés: a savtermelés leáll (a sejt-szaporodás újraindul)
- Kulcskérdés a morfológia → pelletképződés →



Tápanyag, Fe

A vasion koncentrációt optimálni 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 akitáz kofaktora is, a citromsav továbbalakulását okozza

A szaporodáshoz ~2000 µg/liter Fe az optimális, a savtermelő szakaszban viszont csak 50-200 µg/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



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



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 átfúvása 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

Szubmerz tenyésztés

Fermentáció: Állandó mikro-szkópos megfigyelés (pellet)

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

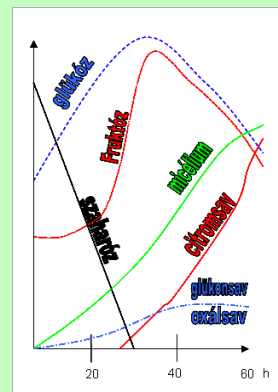
Konverzió: 87-92 %;

Produktivitás:

0,67-0,75 kg citromsav/m³*h;

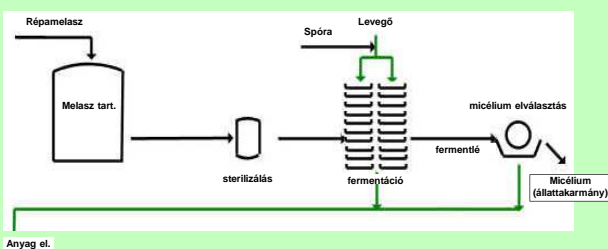
~ 16-18 kg citromsav/m³*nap

Fruktóz: a szacharózból képződik invertálódással. Kezdetben polimerizálódhat.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

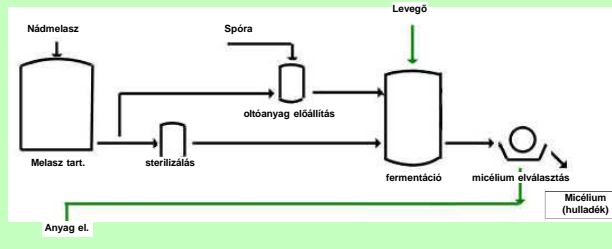
Felületi tenyésztés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

Szubmerz tenyésztés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

Szubmerz tenyésztés

Fermentor: 120-220 m³ keverős reaktor

200-1000 m³ air-lift, merülő-sugaras (pelletképzés)

Tápoldat: melasz → vasmentesítés: ionszere/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

A feldolgozás lépései

IZOLÁLÁS
ANYAG

1. MICÉLIUM ELVÁLASZTÁS

micélium
szűrő
segédanyag

2. OXALÁT FERROCIANID ELTÁVOLÍTÁS

mésztej + FeCl₃
hulladék

3. KÁLCIUM-CITRÁT KICSAPÁS ÉS ELVÁLASZTÁS

mésztej
fermentlé

4. CITROMSAV FELSZABADÍTÁS ÉS GIPSZ ELVÁLASZTÁS

H₂SO₄
gipsz



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

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 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ adagolása → Ca-citrát ne csapódjon ki → csak $\text{Ca}(\text{H}_2\text{citrát})_2$ -ig „titrálják”
Klarifikálás → pl. nyomó szűrő, Funda szűrő,
3. Ca-citrát kicsapás → fontos paraméterei: citromsav koncentráció, hőmérséklet 70-90 °C, pH ~7, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 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

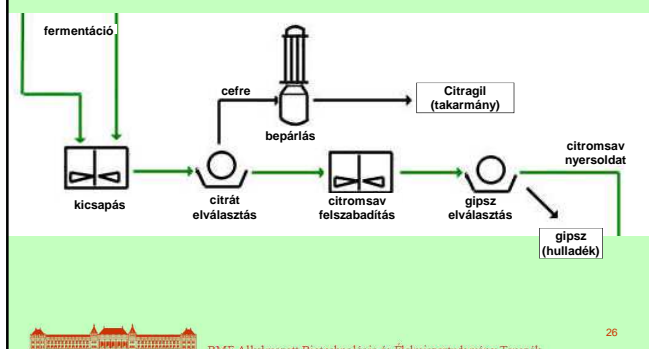
5. Színanyagok eltávolítása → aktív szén oszlopon lonok eltávolítása → kationcserélő, anioncserélő, regenerálás erős savval ill. bázissal
6. Tiszta citromsav oldat koncentrációja: 200-250 g/l → további koncentráls - Többfokozatú vákuum bepárló , kb. 40 °C
7. Kristályosítás vákuumkristályosítóban 36,5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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

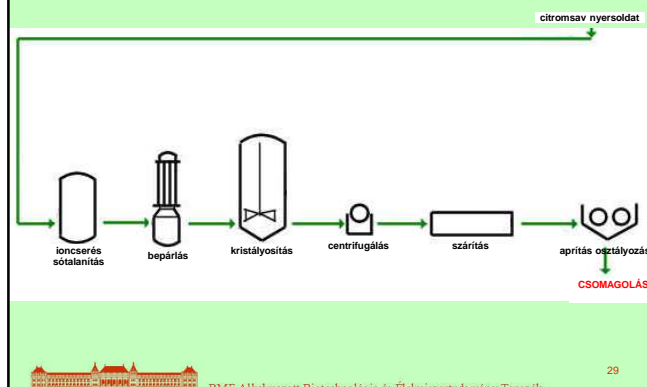
Feldolgozás, izolálás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

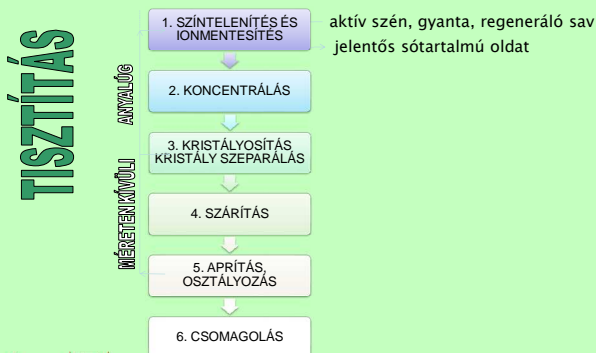
Tisztítás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

A feldolgozás lépései-II



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

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