

# 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

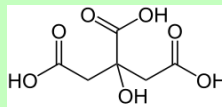
Anaeroboknál: sok NADH keletkezik → redukív közeg → akkor van savtermelés, ha nem redukálódik tovább alkohollá



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 gyümölcslé 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 (régebben: 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):

Piruvát + CO<sub>2</sub> + ATP → malát + P<sub>i</sub> + ADP (piruvát karboxiláz, Mg, Fe és K ionokat igényel)

PEP + CO<sub>2</sub> + ADP → oxál-acetát + ATP (PEP karboxiláz, Mg, K, Mn és ammónium ionokat igényel)

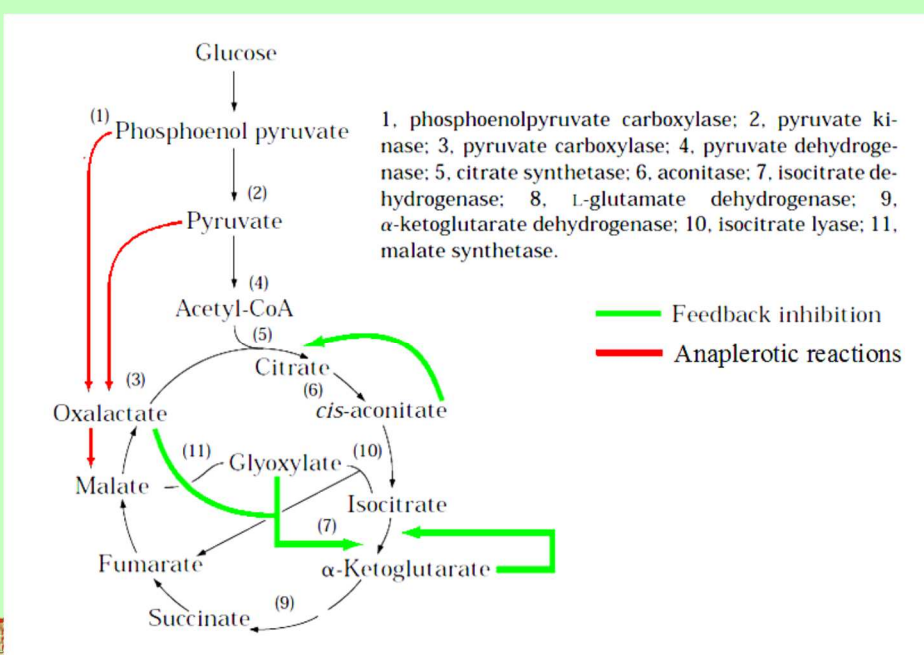
A glikolízis végterméke itt a malát.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

## Anaplerotikus reakciók



8

## 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  $\rightarrow$  oxálsav + ecetsav

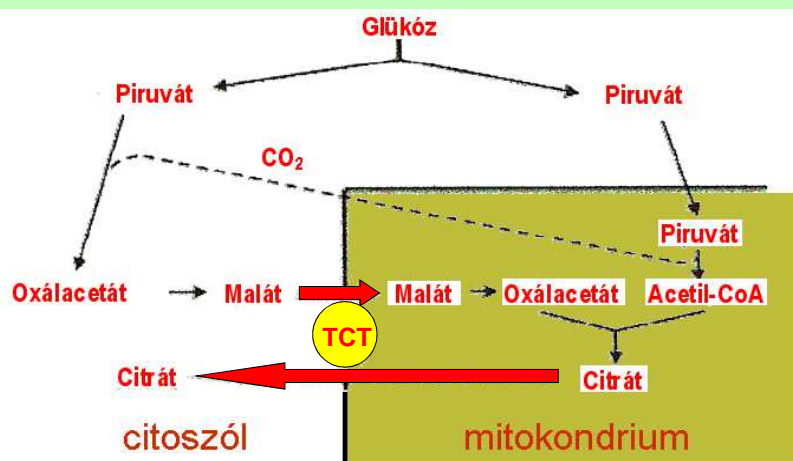
glükóz +  $O_2 \rightarrow$  glükonsav



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

## 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 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 citrát<sup>2-</sup> aniont könnyebb transzportálni, mint az egyértékűt.
- A citrát-permeáz enzimek a citromsavat Mn<sup>2+</sup> komplex formájában importálják → ha nincs Mn<sup>2+</sup> → nincs import, csak export. A mangán ion koncentrációt alacsonyan tartják.



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

Szénhidrogének is lehet fermentálni magas konverzióval *Candida lipolytica* törzsszel, 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 sók: az  $\text{NH}_4^+$  ion rásegít a bioszintézisre.

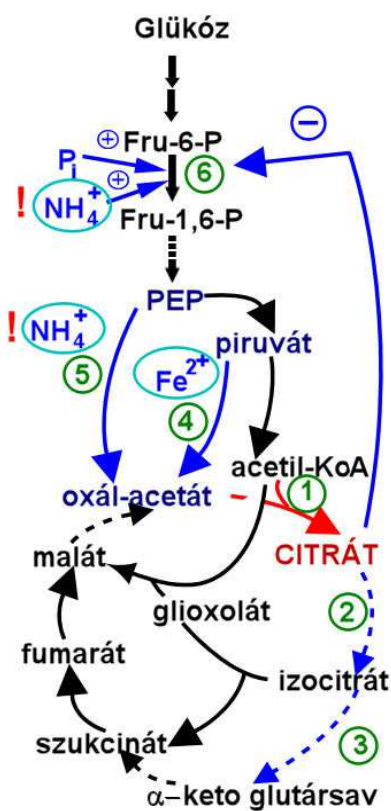
Az ammónia elfogyasztásával savanyodik a közeg: jó hatású.

P felesleg: kedvez a citromsav és oxálsav képződésnek

Nyomelemek: Fe, Mn és Zn limit szükséges.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelm





## 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 akonitáz 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



## 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-kelet 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).





## 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 sejtszaporodás 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 befertőzés 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/m<sup>2</sup>)

Fermentáció: steril levegő átfúvás a tálcák között: nedvesség, hőmérséklettartás, O<sub>2</sub> bevitel, CO<sub>2</sub> eltávolítás

Jelentős a bepárlódás: 30-40 %

Fermentációs idő: 10-15 nap

Hozam: 65-75 %

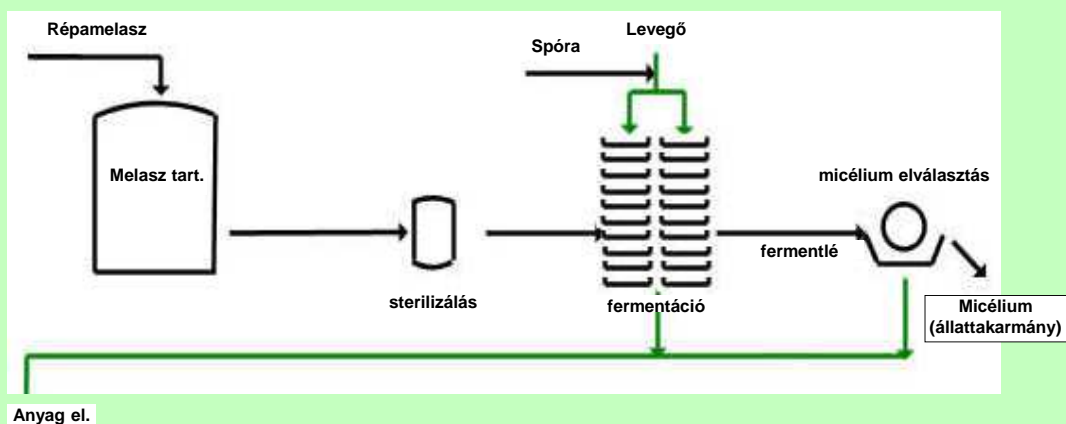
Produktivitás: 7-8 kg citromsav/m<sup>3</sup>/nap. De olcsó.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

## Felületi tenyésztés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

## Szubmerz tenyésztés

- Fermentor:** 120-220 m<sup>3</sup> keverős reaktor  
200-1000 m<sup>3</sup> 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 (O<sub>2</sub> 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

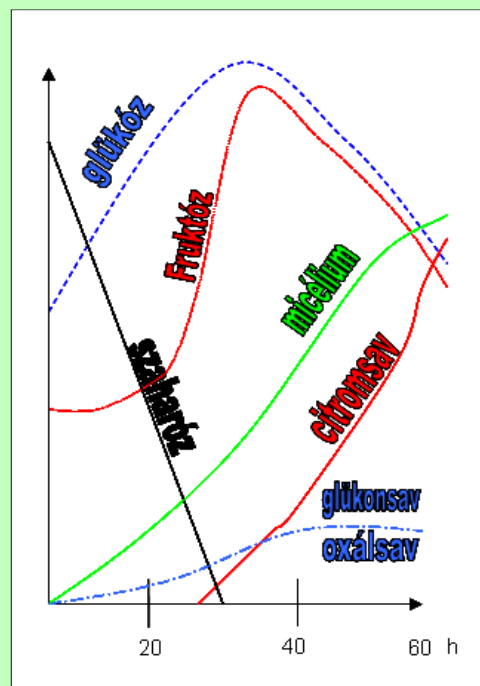
**Fermentáció:** Állandó mikro-szkópos megfigyelés (pellet)

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

**Konverzió:** 87-92 %;

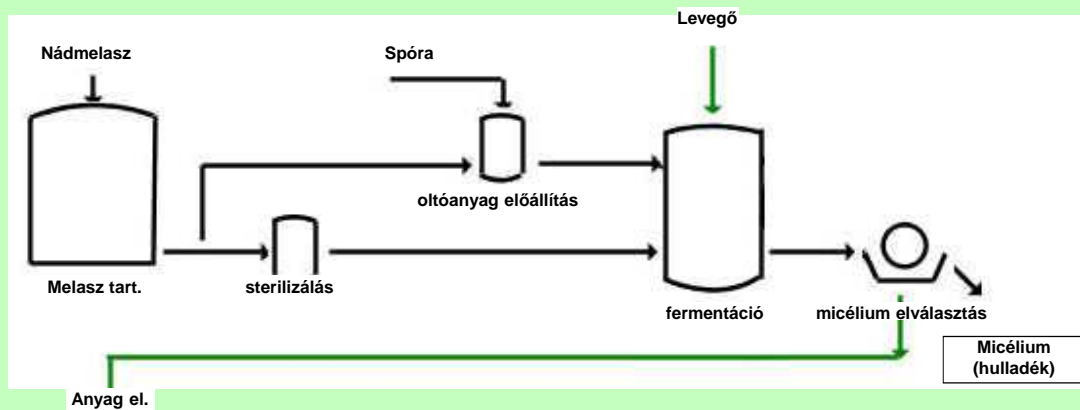
**Produktivitás:**  
0,67-0,75 kg citromsav/m<sup>3</sup>\*h;  
~16-18 kg citromsav/m<sup>3</sup>\*nap

Fruktóz: a szacharózból képződik invertálódással. Kezdetben polimerizálódhat.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Szubmerz tenyésztés



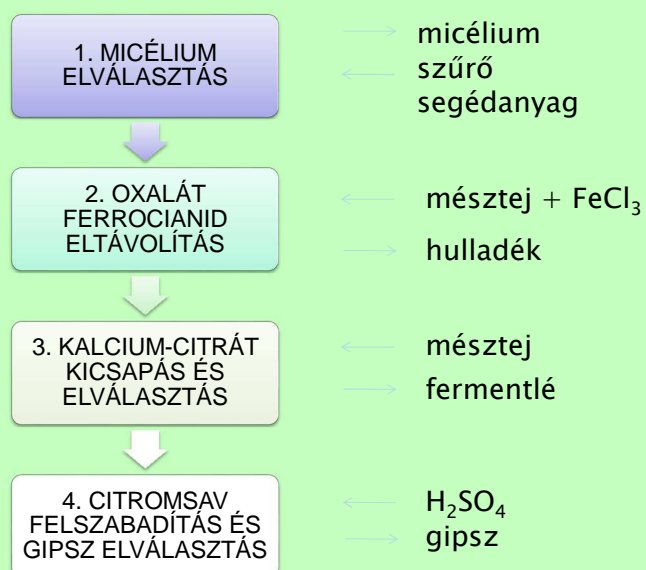
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

## A feldolgozás lépései

IZOLÁLÁS

ANYALÚG



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

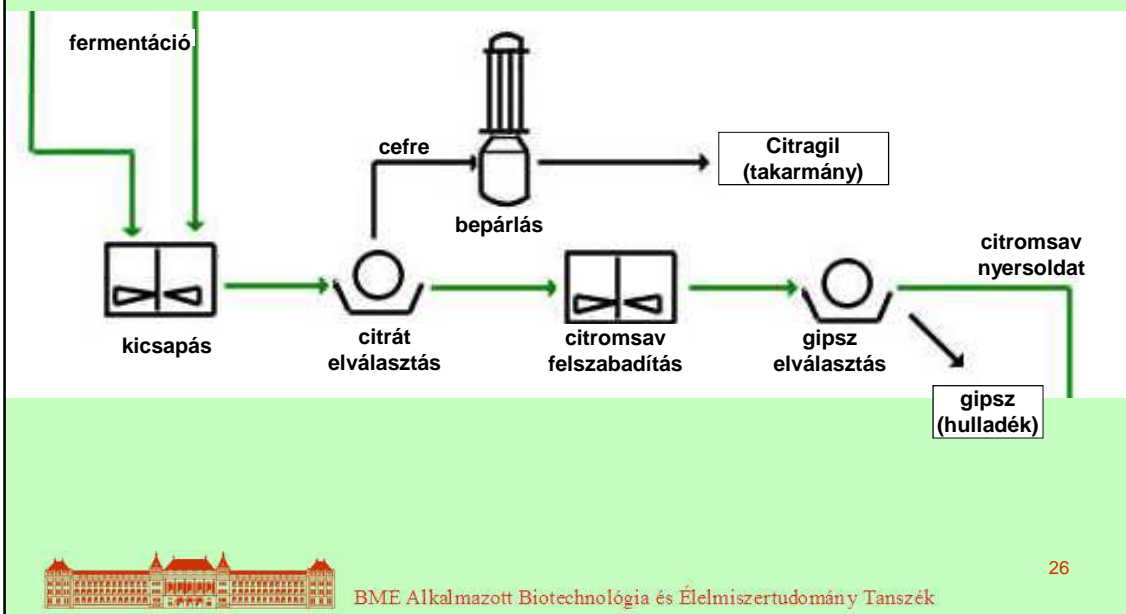
24

## A feldolgozás lépései

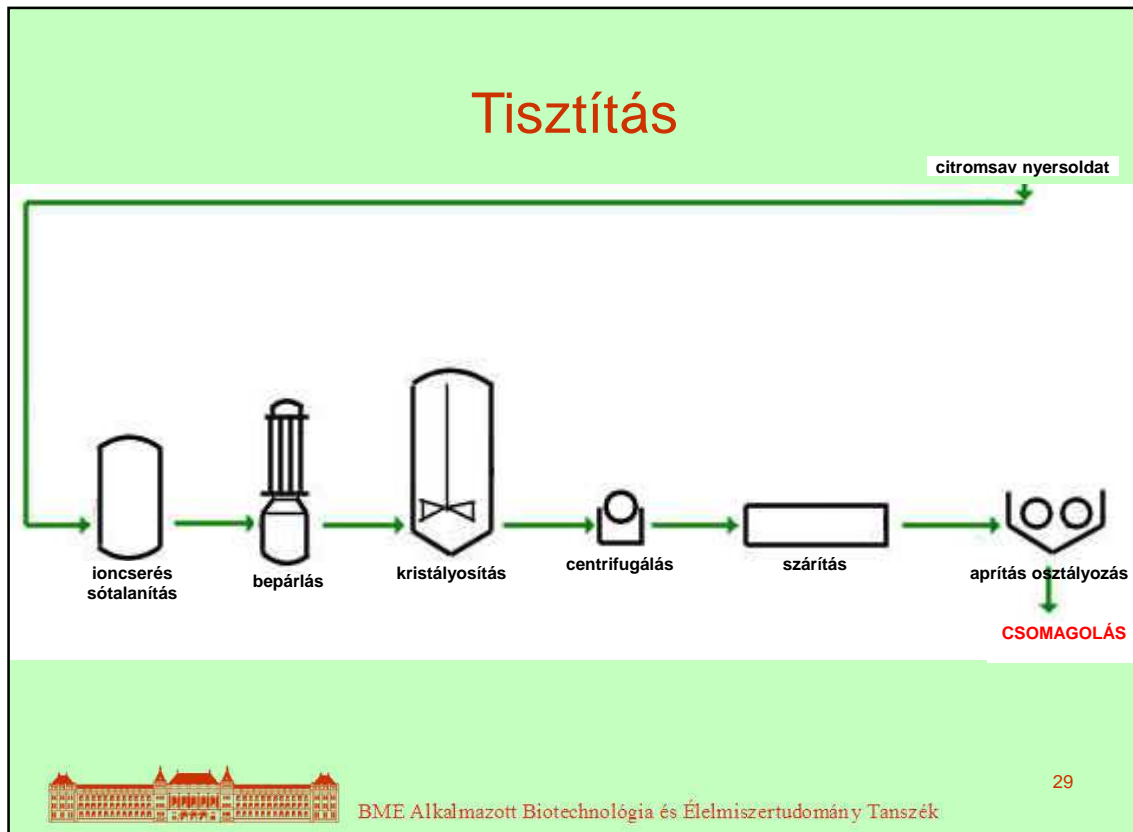
1. Micélium elválasztás → vákuum dobszűrő 0,2 – 1,0 mm átmérőjű pellet a jó → Newtoni szuszpenzió, nyálkaképzés nehezíti a szűrést, szűrősegédanyag → pl. szalmatörek
2. Oxalát mentesítés → kevés  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  adagolása → Ca-citrát ne csapódjon ki → csak  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{citrát})_2$ -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-, trikalcium 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  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -val, (1-2 g/l feleslegben), a képződő gipszet vákuum dobszűrőn szűrik.



## Feldolgozás, izolálás







## 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 m<sup>3</sup>, 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/m<sup>3</sup>
- Biogáz: ANAMAT eljárás. Kilép: CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, víz  
aerob és anaerob eljárás kombinációja


30  
 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék