

Biotechnologická výroba kyseliny octovej

JURAJ ŠVITEL - ERNEST ŠTURDÍK

Súhrn. Článok sa zaoberá súčasným stavom biotechnologickej výroby kyseliny octovej a dokumentuje trendy a možnosti jej vývoja.

Kyselina octová, resp. ocot sú známe v ľudskej civilizácii tak dlho ako víno, najstarší publikovaný údaj o existencii octu je pravdepodobne v Starom zákone a vzťahuje sa k obdobiu minimálne 10 000 rokov p.n.l. Ocot sa definuje ako produkt s obsahom 5 až 10 % (hmot.) kyseliny octovej [1], ktorý je vyrobený octovým kvasením, rozpustením čistej kyseliny octovej vo vode, alebo zmiešaním kvasného octu s čistou kyselinou octovou. V európskych krajinách je zväčša termín "ocot" vžitý iba pre produkt vyrobený octovým kvasením. Surovinou pre výrobu octu je etanol vyrobený z rôznych druhov ovocia a obilnín, ktoré sú tiež zdroje senzorických látok v octe. V Taliansku a Španielsku sa pojmom ocot označuje iba vínný ocot. Pojmy kyselina octová a ocot teda rozlišujú produkty z hľadiska obsahu senzorických látok, ktoré sú dané predovšetkým použitou surovinou. Kyselina octová vyrobená biotechnologicky je významnou surovinou pre potravinársky priemysel, kde sa využívajú jej konzervačné a senzorické vlastnosti. Svetová produkcia je asi 160 000 ton čistej kyseliny za rok a patrí medzi najtonážnejšie produkty vyrobené primárnym metabolizmom mikroorganizmov [2]. Okrem toho sa kyselina octová vyrába aj chemickou syntézou, množstvo je 15-násobne vyššie, ale pre potravinárstvo je všeobecne akceptovaný

Ing. Juraj Švitel, Doc. Ing. Ernest Šturdík, CSc., Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

iba produkt vyrobený biotechnologicky alkoholovou a následne octovou fermentáciou.

Historický prehľad

Prapôvodom technológie výroby kyseliny octovej je zrejme empirická skúsenosť založená na poznatku o zoctovaní vína v otvorenej nádobe. Neskôr bolo zistené, že pridanie octu do vína urýchlí jeho zoctovenie. Tento princíp bol využívaný na výrobu octu v 16. storočí v Orleánskej oblasti Francúzska a neskôr známy ako "Francúzska metóda". Ocot sa vyrábal v otvorených drevených nádobách, do ktorých sa v pravidelných intervaloch pridávalo víno a odoberal ocot. Octové baktérie rástli na povrchu kvapaliny vo forme želatinóznej "kožky". Neskôr bola táto metóda modifikovaná tak, že na povrchu plávala drevená mriežka, na ktorú sa uchytili baktérie. Z dnešného pohľadu išlo o semikontinuálnu fermentáciu s použitím imobilizovaného biokatalyzátora. Výroba octu trvala pomerne dlho (asi 5 týždňov) kvôli pomalej difúzii kyslíka cez povrch. Okrem octových baktérií sa na povrchu rozmnožovali aj iné mikroorganizmy, ktoré dávali octu výborné senzorické vlastnosti. Metódy výroby octu boli neskôr modifikované zintenzívnením prevzdušňovania tak, že kvapalina stekala po nosiči (napr. pemza, drevo rôznych tvarov). Najrozšírenejšie a najdokonalejšie zariadenie tohto druhu bolo tzv. "Fringsova ocotnica" z roku 1929. Je to drevená nádoba naplnená hoblinami z tvrdého dreva, po ktorých steká kvapalina. Toto usporiadanie umožňuje nútený obeh vzduchu, reguláciu teploty, zariadenie je relatívne jednoduché a prevádzkové náklady sú malé [3]. Ďalším technickým pokrokom bolo zavedenie submerznej fermentácie [4]. Výhodami submerznej kultivácie oproti Fringsovej ocotnici sú až tridsaťnásobne vyššia rýchlosť oxidácie etanolu, menšia veľkosť zariadenia potrebného na vyprodukovanie rovnakého množstva produktu, vyššie výťažky, priaznivejší podiel investícií a produktivity. Úspešnosť kultivácie závisí predovšetkým na aerácii, najmä jej spoľahlivosti. Bolo zistené, že pri nedostatku kyslíka dochádza k rýchlej inaktivácii octových baktérií [5], čo predstavuje hlavnú obťaž pri submerznej kultivácii. Po vynájdení submerzného procesu boli postupne vyvíjané jeho varianty z hľadiska použitých zariadení i pracovného postupu s regionálnym rozšírením

(i špeciálnymi názvami), avšak žiadna z nich sa nestala univerzálne rozšírenou.

Mikrobiológia a taxonómia octových baktérií

Výroba kyselina octovej bola vo svojich prvopočiatkoch založená na empirickej skúsenosti. Mikrobiologickú podstatu objasnil Louis Pasteur v roku 1868 [6], ktorý objavil baktériu oxidujúcu etanol na kyselinu octovú a dal jej názov "*Mycoderma aceti*". V súčasnej taxonómii sú octové baktérie zaradené v Bergey's Manual of Systematic Bacteriology v sekcii 4: Gram-negatívne aeróbne tyčinky a koky v čeľadi Pseudomonadaceae [7]. Rody *Acetobacter* a *Gluconobacter* sú svojimi vlastnosťami (aj metabolickými anomáliami) veľmi podobné. Jednotlivé druhy bývali medzi nimi preradované podľa práve akceptovaných klasifikačných kritérií [8]. Štúdie DNA/rRNA hybridizácie ukázali takú vysokú príbuznosť medzi týmito rodmi, aká nebola pozorovaná medzi žiadnymi inými rodmi baktérií [9]. Staršie klasifikačné kritéria boli obvykle založené na detekcii rôznych enzýmových reakcií, ktoré sú ľahko detegovateľné, napr. ketogenéza a rast na rôznych substrátoch, tvorba pigmentu, prítomnosť katalázovej reakcie [8]. Podľa poslednej 9.edície Bergey's Manual sú rody *Acetobacter* a *Gluconobacter* klasifikované podľa kritéria tepelnej závislosti väzby rRNA pri DNA/rRNA hybridizácii [9]. S uvedenými klasifikačnými kritériami dobre korešponduje i pohyb buniek a prítomnosť oxidačných reakcií s rôznymi substrátmi. Ako pomerne spoľahlivé kritérium vhodné najmä z praktických dôvodov je akceptovaný i tvar bičiek a degradácia laktátu a acetátu. Oxidovanie etanolu potrebné pre produkciu kyseliny octovej bolo pozorované iba pre rod *Acetobacter* [7]. Rod *Acetobacter* má peritrichálne bičiky, alebo je bez pohybu a oxiduje laktát a acetát za vzniku CO₂. Rod *Gluconobacter* má polárne bičiky a uvedené substráty neoxiduje. Počas našich prác s octovými baktériami sme však získali i ojedinelú skúsenosť, že aj u kmeňa z rodu *Gluconobacter* sme pozorovali intenzívnu oxidáciu etanolu. Napokon u octových baktérií dochádza pravidelne k pomerne radikálnym reklasifikáciám jednotlivých druhov [10].

V priemyselnej praxi sa využíva predovšetkým rod *Acetobacter*. Bunky majú elipsoidálny, alebo tyčinkovito pretiahnutý tvar, dĺžku 1,0-4,0 µm, šírku 0,6-0,8 µm. Rastú jednotlivo, v pároch, alebo v retiazkach.

Časté sú involučné formy sférického, alebo filamentózneho tvaru, endospóry netvorí. Ojedinele produkujú porfyrínový pigment, sú katalázovo pozitívne, oxidázovo negatívne. Najlepšie uhlíkaté zdroje pre rast sú etanol, glycerol, laktát, kyseliny sa tvoria z n-propanolu, n-butanolu a D-glukózy. Optimálna teplota pre rast je 25-30 °C, optimálne pH v rozmedzí 5,4-6,3. Involučné formy bývajú až 200 mikrometrov dlhé a dosiaľ nebolo preukázané, či sú štádiom bunecného cyklu. Pri kultiváciách sa často objavujú dve i viac bunkových foriem. U niektorých kmeňov bola pozorovaná extracelulárna tvorba celulózy, pričom cez bunkovú stenu sa transportuje polyglukozán a extracelulárne sa asociuje do mikrofibríl. Špecifickou vlastnosťou octových baktérií sú vysoké nároky na komplexné kultivačné médium, relatívne pomalý rast a nízka výsledná koncentrácia buniek. Pri nízkej koncentrácii organického dusíkatého zdroja sa kultúry vyznačujú vysokou dehydrogenázovou aktivitou. Svojimi vlastnosťami pripomínajú auxotrofné mutanty [11], boli publikované aj úvahy o možných spontánnych transformáciách octových baktérií [12, 13].

Biochemizmus tvorby kyseliny octovej

Oxidácia etanolu na kyselinu octovú je aeróbny proces, pri ktorom sa na oxidáciu etanolu spotrebuje jedna molekula kyslíka za vzniku kyseliny octovej a jednej molekuly vody. Pri reakcii sa vyvíja veľké množstvo tepla, ako tomu napovedá i zmena Gibbsovej energie tejto reakcie $G^{\circ} = -907 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ [14]. Medziproduktom pri oxidácii etanolu na kyselinu octovú je acetaldehyd, ktorý sa vo fermentačnom médiu vyskytuje iba v stopových koncentráciách. Jeho prítomnosť bola dokázaná prídavkom siričitanu, ktorý ho pevne viaže [15].

Všetky enzýmy, ktoré sa zúčastňujú na produkcii kyseliny octovej sú lokalizované na povrchu bunky. Prvý krok pri tvorbe kyseliny octovej je dehydrogenácia etanolu na acetaldehyd enzýmom alkoholdehydrogenáza. Acetaldehyd sa následne dehydrogenuje acetaldehyddehydrogenázou na kyselinu octovú. Obe dehydrogenázy sa nachádzajú na cytoplazmovej membráne a ich prostetickú skupinu tvorí pyrrolochinolínchinón [16, 17]. Akceptorom elektrónov z dehydrogenáz je respiračný reťazec, počet a typy cytochrómov sú dosť diskutované [11], ale

väčšinou sa uvádza, že respiračný reťazec sa skladá z cytochrómov a, c, a cytochromoxidázy [18].

Acetaldehyd, ktorý je medziproduktom pri tvorbe kyseliny octovej, pôsobí na mikroorganizmus toxicky. Jeho aktuálne koncentrácie sú veľmi nízke, pretože je ihneď oxidovaný na kyselinu octovú. V prípade nedostatku kyslíka dochádza k jeho kumulácii a inaktivácii produkčného mikroorganizmu. Toto je aj príčinou spomalenia, alebo až zastavenia produkcie kyseliny octovej pri prerušení vzdušenia vo fermentore. Inhibícia pri prerušení vzdušenia predstavuje vážny problém pri výrobe kyseliny octovej a bola preto pomerne rozsiahlo študovaná [19, 20, 21, 22]. Inhibičný vplyv závisí značne aj od koncentrácie kyseliny octovej v médiu, napr. pri celkovej koncentrácii 5 % prerušenie aerácie na 2 až 8 minút vedie k takej istej inhibícii ako prerušenie na 15 až 60 sekúnd pri celkovej koncentrácii 11 až 12 %.

Selekcia a manipulácia produkčných kmeňov

Výroba kyseliny octovej má dlhú tradíciu, metódy zlepšovania jej parametrov klasickým spôsobom napr. selekciou, adaptáciou produkčných kmeňov sú už na hranici svojich možností. Výroba kyseliny octovej má najdlhšiu tradíciu v Európe, kde sa nachádzajú prevádzky, ktoré sú v chode nepretržite desiatky rokov a produkčné kmene sa postupne adaptovali na koncentráciu i viac než 10 % kyseliny octovej [23]. Octové baktérie sú počas fermentácie vystavené extrémnym vplyvom prostredia (nízke pH, vysoká koncentrácia kyseliny octovej), pri ktorých iné baktérie nie sú schopné rásť. Analýzou produkčných kmeňov z oblasti strednej Európy technikou DNA-DNA hybridizácie bolo zistené, že tieto kmene už nezodpovedajú typovým kmeňom [24]. Je zaujímavé, že vysoko produkčné izoláty z rôznych lokalít pritom vykazujú vysoký stupeň podobnosti DNA. Počas dlhodobej selekcie dochádza k potenčovaniu enzýmových aktivít zúčastňujúcich sa na oxidácii etanolu a k strate genetickej informácie enzýmov metabolizmu monosacharidov. Napr. pre mikrobiologickú prácu s izolátmi octových baktérií z prevádzok sa nedajú využiť bežné živné pôdy, ale bol vyvinutý špeciálny dvojvrstvový agar, kde je zdrojom uhlíka kyselina octová [25]. Pre potreby uchovávania produkčných kmeňov pre výrobu kyseliny

octovej v mikrobiologických zbierkach bolo i navrhnuté pomenovanie druhu "*Acetobacter europeaens*".

V súčasnom období sa upriamila pozornosť na využitie techník rekombinantnej DNA, ktorými možno ovplyvniť enzýmové aktivity účinnejšie než dlhodobou selekciou. Cieľom použitia týchto techník je zvýšiť obsah alkoholdehydrogenázy a acetaldehyddehydrogenázy, čo by umožnilo výrazne zvýšiť produktivitu. Bolo ďalej zistené, že aj rezistencia voči kyseline octovej, ktorá determinuje dosiahnutie vyšších výsledných koncentrácií je geneticky podmienená, i keď nie je presne známy jej mechanizmus [26]. Ako recipientné kmene je najvýhodnejšie použiť izoláty *Acetobacter aceti* z výrobní kyseliny octovej. Použitím multikópiového plazmidu s génmi kódujúcimi alkoholdehydrogenázu a acetaldehyddehydrogenázu bolo dosiahnuté dvojnásobné zvýšenie enzýmových aktivít oproti rodičovskému kmeňu [27]. Na šľachtenie produkčných kmeňov sa dá využiť taktiež fúzia protoplastov. Napríklad fúziou protoplastov termotolerantného kmeňa *Acetobacter aceti* a kmeňa s rezistenciou k vysokým koncentráciám kyseliny octovej bol získaný fuzant s oboma vlastnosťami mimoriadne vhodný na kontinuálnu fermentáciu [28].

Technológia výroby kyseliny octovej

V súčasnosti je výroba octu vo Fringsových ocotniciach [29] ešte stále pomerne rozšírená, hlavne preto, že zariadenia vybudované v minulosti majú dlhú životnosť a prevádzkové náklady sú nízke. Ocotnice pracujú v semikontinuálnom režime, dĺžka cyklu je asi 7 dní. Nový cyklus sa začína vypustením časti vykvaseného octu a doplnením novým médiom s etanolom (do 10 %) a kyselinou octovou (do 4 %). Pomer etanolu a kyseliny octovej býva obvykle optimalizovaný na miestne pomery, je volený tak, aby bola minimálna lag-fáza v produkcii kyseliny, je prispôsobený i účinnosti chladenia a zvykne sa podriaďovať i ročnému obdobiu. Počas cyklu sa náplň ocotnice skrúpa zvrchu a protiprúdne sa vháňa vzduch. Teplota sa udržiava v rozmedzí 30 až 35 °C, médium sa chladí prečerpávaním cez výmenník tepla. Cyklus sa končí dosiahnutím obsahu zvyškového etanolu 0,3 až 0,5 % a výslednej koncentrácie kyseliny octovej 10 až 12 %.

Pri zvyšovaní kapacity výroby octu, alebo výstavbe nových závodov sa volí submerzné zariadenie, ktoré poskytuje priaznivejší pomer nákladov a produktivity. Pre submerznú výrobu boli vyvinuté špeciálne kultivačné zariadenia, ktoré umožňujú využiť až 80 % kyslíka obsiahnutého vo vzduchu. Acetátor podľa vzoru firmy Frings [30] využíva na aeráciu vysokootáčkové turbínové miešadlo, kde sa vzduch dodáva samonasávaním. Vysoký stupeň využitia vzduchu i za cenu vyšších energetických nákladov je žiadúci najmä preto, že sa spotrebuje menšie množstvo vzduchu a tak sa minimalizujú straty produktu odparením. Ďalšia minimalizácia sa dosahuje i obmedzovaním prísunu vzduchu v počiatočnej fáze, keď je malá spotreba kyslíka, prípadne recirkuláciou vzduchu. Účinná aerácia spôsobuje penenie a pretože chemické odpeňovacie prípravky nemožno akceptovať pre potravinárske aplikácie, je potrebné účinné mechanické odpeňovanie. Pre tento účel bolo vyvinuté i špeciálne mechanické zariadenie s prispôbovaním otáčok intenzite penenia [31]. Celková doba fermentácie je 1 až 3 dni [1]. Po skončení fermentácie sa časť kultúry nechá v acetátore ako inokulum a doplní sa čerstvým médiom na pôvodný objem. Podľa množstva ponechaného inokula (býva to až 50 %) sa mení dĺžka fermentácie. Kultivácia prebieha pri 28 °C a etanol sa pridáva postupne, aby sa zabránilo jeho inhibičnému pôsobeniu na kultúru. Submerznou kultiváciou možno dosiahnuť výslednú koncentráciu kyseliny octovej viac ako 12 % [32, 33], pri optimálnom režime až 15 % [34] so zvyškovým etanolom asi 0,2 %.

Po spotrebovaní etanolu (pri koncentrácii menej ako 0,05 %) nastáva tzv. preoxidácia, kyselina octová sa oxiduje na oxid uhličitý a vodu, čo spôsobuje pokles výťažku. Na sledovanie koncentrácie alkoholu pre potreby jeho kontinuálneho dávkovania a určenia konca fermentácie sa využíva kontinuálny analyzátor etanolu. Jednoduché a spoľahlivé sú analyzátory podľa vzoru prístroja "Frings Alkograph" [35]. Malé množstvo fermentačného média sa kontinuálne odoberá do analyzátora, kde sa z neho oddestilováva etanol. Z merania bodu varu pred a po oddestilovaní etanolu sa určí jeho koncentrácia.

Pre výrobu kyseliny octovej sa využívajú zariadenia so špecifickými konštrukčnými prvkami. Vyplýva to z vysokých požiadaviek na aeračné rýchlosti, spoľahlivosť aerácie, účinné chladenie, minimalizáciu strát vo výstupnom vzduchu. Použitie univerzálnych kultivačných zariadení pre aeróbnu kultiváciu preto nie je optimálne. Okrem submerzných zariadení podľa vzoru firmy Frings, pôvodne nazývaných "Acetator" [32,

36] a ich variácií, ktoré sú všeobecne rozšírené, boli vyvinuté podobné zariadenia a technológie, napr. Yeomans Cavitator [37], Bourgeois Process a zariadenia firiem Vogelbush GmbH [39], Process Engineering Co. [40] a Fardons Vinegar Co. [41]. Predmetom inovácií bol hlavne spôsob aerácie, avšak žiadne z týchto zariadení sa všeobecne nerozšírilo.

Obsah pridávaných nutričných komponentov pre rast baktérií pridávaných do fermentačného média je veľmi variabilný a závisí od lokálnych podmienok. Pri výrobe octu z alkoholu sa ako zdroj dusíka používa kvasničný extrakt, prípadne kukuričný výluh. Ďalej sa pridávajú rôzne kationy a anióny ako draslík, horčík, vápnik, amoniak (iba vo forme fosfátu), síran, chlorid. Suma všetkých pridaných solí sa pohybuje do $0,3 \text{ g.l}^{-1}$. Potrebné stopové prvky tj. železo, mangán, kobalt, meď, molybdén, vanád, zinok sú obvykle v dostatočnom množstve prítomné v použitej vode. Pri výrobe viac ako 12 % octu je potrebný i prídavok $0,5$ až $1,0 \text{ g.l}^{-1}$ glukózy. Väčšina prírodných surovín nevyžaduje prídavky živín, iba jablčné víno a niektoré hroznové vína je vhodné dožiť malým množstvom fosforečnanu amónneho.

Teoretická výťažnosť kyseliny octovej z etanolu daná biochemickým mechanizmom môže byť až 98 %, avšak v praxi sú straty hlavne odparom, prípadne preoxidáciou také, že vo Fringsovej ocotnici sú výťažky 85 až 90 %, v submerzných acetátoroch približne o 5 % vyššie [1]. Výsledné koncentrácie kyseliny octovej v ocotniciach sú 10 až 12 %, v submerzných zariadeniach až do 15 %. Produktivita náplňových ocotníc môže dosiahnuť $0,17 \text{ g}$ zoxidovaného etanolu na 1 liter náplne za hodinu [42]. V submerzných zariadeniach je produktivita veľmi variabilná, závisí v hlavnej miere od stupňa automatizácie, použitom kmeni a môže dosiahnuť 2 až $3 \text{ g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$. [43].

Nové smery vo vývoji výroby kyseliny octovej

Použitie geneticky manipulovaných kmeňov poskytuje v súčasnosti možnosti veľmi intenzívneho zvýšenia produkcie. Táto metóda je iba v začiatkoch, je technicky i finančne náročná a pre potravinárske aplikácie i legislatívne problémová. Aktuálne je využitie vysokoprodukčných izolátov, ktoré je možné vyberať podľa lokálnych požiadaviek, akými sú typ spracovávanej suroviny, technologické zariadenie atď. Pre optimalizáciu technologického postupu majú značný význam i po-

znatky o metabolizme octových baktérií. Baktérie rastú najmä pri nižších koncentráciách kyseliny octovej do 4 až 6 %, po dosiahnutí tejto koncentrácie prebieha iba konverzia etanolu na kyselinu octovú. Inhibičné vplyvy etanolu a kyseliny octovej boli podrobne študované [44, 45, 46] i s cieľmi pomocou matematického modelu optimalizovať výrobu na prevádzkovej úrovni [47] reguláciou koncentrácie kyslíka, režimom prítokovania etanolu atď. Štúdiom rastu buniek a jeho modelovaním bolo zistené, že doživenie média na začiatku fázy odumierania vedie k obnove príslušných enzýmových aktivít a k rýchlejšej konverzii etanolu [48].

Kultivačné médium zo submerznej výroby obsahuje vysokú koncentráciu buniek, ktoré sú schopné ďalej produkovať kyselinu octovú. I mŕtve bunky majú zachované enzýmové aktivity a môžu tiež oxidovať etanol [49]. Ich opätovné použitie umožňuje zvýšiť koncentráciu buniek v reaktore a tým i zvýšiť rýchlosť produkcie pri minimalizácii spotreby živín [50]. Recyklos biomasy, tj. separácia buniek a ich opätovné vrátenie do fermentačného média je v súčasnosti intenzívne študovaná problematika, súvisí to aj s rozvojom techník na separáciu buniek ako sú mikrofiltrácia a ultrafiltrácia. Využívajú sa komerčne dostupné filtre konštruované z polysulfonátu, alebo z polyolefínu, najčastejšie v tubulárnom usporiadaní [26, 49, 51, 52]. Na tieto účely bolo napríklad využité filtračné zariadenie s dutými vláknami a priemerom pórov 0,1 μm [49], čím bolo dosiahnuté trojnásobné zvýšenie rýchlosti produkcie. Náročnejšie technické riešenie predstavuje zachytenie buniek do matrixu membrány, produkcia kyseliny octovej potom prebieha priamo vo filtračnom module, cez ktorý sa perkuluje zmes fermentačného média a vzduchu [53]. Usporiadanie bioreaktora s recyklom biomasy umožňuje dosiahnuť vysoké produkčné rýchlosti, kde sa limitujúcim krokom stáva pôsobenie kyseliny octovej. Tento problém bol úspešne riešený jej kontinuálnym odstraňovaním elektrodialýzou, čo predstavuje zrejme najvyšší stupeň kontinualizácie [54]. Tieto technické riešenia vedúce k vyšším objemovým produktivitám sú spojené s aplikáciou náročnejších meracích a regulačných prvkov, hlavne reguláciou koncentrácie rozpusteného kyslíka.

Aplikácia imobilizovaných buniek v klasickej forme na drevených hoblinách bola postupne vytláčaná submerznou výrobou. V súčasnosti je imobilizácia octových baktérií opäť predmetom záujmu, umožňuje to predovšetkým pokrok v imobilizačných technikách a nové materiály

nosičov. Podobne ako recyklovanie biomasy i imobilizácia umožňuje minimalizovať spotrebu živín vo fermentačnom médiu. Na imobilizáciu sa využívajú rôzne princípy, napríklad imobilizácia do prírodných gélov ako sú karagénan [55], alginát [56], nedostatkom gélov sú však ich nepriaznivé difúzne vlastnosti. Z tohto hľadiska je výhodnejšie využitie nosičov, kde sú bunky upútané na povrchu nosiča adhéziou buniek, alebo viazané chemickým činidlom. Na tento účel boli testované napríklad hydratovaný oxid titánu [57], minerál cordierit [58], polypropylén [59]. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté s keramickými nosičmi v tvaroch, ktoré umožňujú rýchlu cirkuláciu kvapalnej a plynnej fázy [60]. Dosahované objemové produktivity bioreaktorov sú nižšie než s použitím techniky recyklu biomasy, ale vzhľadom k vysokej trvanlivosti a dobrým mechanickým vlastnostiam je použitie keramických nosičov veľmi perspektívne i pre prevádzkové použitie [60].

Potravinársky ocot

Surová kyselina octová, resp. ocot obsahuje rôzne nežiadúce sprievodné látky v závislosti od použitej suroviny a v prípade produktu submerznej výroby i značné množstvo buniek octových baktérií. Vyfermentované médium má nízku hodnotu pH, pri ktorom sú rozpustné látky náchylné k precipitácii, najmä v octoch z ovocných surovín. Napríklad v 5 % jablčnom octe sa usadeniny tvoria až počas 4 mesiacov zrenia, pri vyššej koncentrácii sa tento čas skracuje [2]. Vo vínnom octe sa tvorí sediment precipitáciou kyseliny vínnej, pri výrobe octu z čistého etanolu sa sediment netvorí. Zákaly z octu sa odstraňujú filtráciou, alebo čistením bentonitom podľa stupňa zákalu sa dávkuje v množstve 0,5 až 3 kg na 1 m³ octu. Na filtráciu octu sú zaužívané naplavovacie filtre s kremelinou ako filtračnou vrstvou, ale i rôzne typy ultrafiltrov [61]. Ultrafiltračné zariadenia vyžadujú pravidelné čistenie membrán. Vhodným režimom filtrácie možno dosiahnuť i niekoľkotýždňové intervaly čistenia prevádzkových ultrafiltrov [62, 63]. Octy z prírodných vín sa konzervujú pasterizáciou pri teplote 75 až 80 °C počas 30 až 40 sekúnd [61]. Tradičná konzervačná metóda je i sírenie v množstve 50 až 100 mg oxidu siričitého na liter. Sírenie podlieha potravinárskym normám. Doporučená dávka podľa potravinárskej komisie Svetovej zdravotníckej organizácie FAO-WHO je 70 mg.kg⁻¹ [64]. V mnohých krajinách sa ocot

dodáva úplne bezfarebný, čo sa dosahuje odfarbením aktívnym uhlím. V niektorých krajinách sú zaužívané farebné octy dofarbované karamelom, alebo iným potravinárskym farbivom. Octy z červených vín sa tak tiež dofarbujú, pretože počas acetifikácie sa stráca ich červená farba.

Okrem kyseliny octovej a etanolu obsahuje ocot sekundárne zložky, ktoré tvoria jeho vôňu, chuť a konzervačné vlastnosti. Tieto komponenty pochádzajú zo suroviny, nutričných látok pridaných do fermentačného média, použitej vody i z metabolickej činnosti octových baktérií. Na výrobu octu sa používa etanol vyrobený z rôznych surovín, ktoré v prevažnej miere určujú senzorické vlastnosti: víno, jablká, slad, srvátka, ryža. V prípade použitia rektifikovaného etanolu rôznej čistoty produkt obsahuje minimálne množstvo senzorických látok, arómu tvorí hlavne etylacetát. Zrenie, t.j. esterifikácia zvyškového etanolu je veľmi krátka. Buket vznikajúci počas viactýždňového zrenia prírodných octov tvoria étery rôznych alkoholov, estery z alkoholu a kyselín a acetály z aldehydov a alkoholov [2]. V rôznych octoch boli identifikované desiatky látok. Na kvantitatívne stanovenie charakteristických skupín látok napr. celkové kyseliny, neprchavé a prchavé kyseliny, estery, sacharidy, aminokyseliny bolo vypracované množstvo štandardných metodík [64].

Literatúra

1. EBNER, H.-FOLLMAN, H.: In: *Biotechnology Vol.3*. Rehm, H.J.- Reed, G.(Eds). Weinheim, Verlag Chemie 1983, s. 387.
2. EBNER, H.- FOLLMAN, H.: In: *Biotechnology Vol.5.*, Rehm, H.J.- Reed, G.(Eds). Weinheim, Verlag Chemie 1983, s. 425.
3. PRESCOTT, S.C. - DUNN, C.G.: In: *Industrial Microbiology.*, Tokyo, McGraw-Hill, 1959, s. 428.
4. HROMATKA, O. - EBNER, H.: *Enzymologia*, 13, 1949, s. 369.
5. HROMATKA, O. - EBNER, H.: *Enzymologia*, 14, 1950, s. 96.
6. PASTEUR, L.: *Etudes Sur le Vinaigre*, Paris, 1868.
7. DeLEY, J.- GILLIS, M.- SWINGS, J.: In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1, Krieg, N.R.- Holt, J.G. (Eds). Baltimore, Williams and Wilkins 1984.
8. ASAI, T.: *Acetic Acid Bacteria*, Tokyo, University of Tokyo Press, 1968.
9. GILLIS, M.- DeLEY, J.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30, 1980, s. 7.
10. SWINGS, J. - GILLIS, M. - KERSTERS, K. - DeVOS, P. - GOSSELE, F. - DeLEY, J.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30, 1980, s. 547.
11. KULHÁNEK, M.: *Adv. Appl. Microbiol.*, 34, 1989, s. 141.
12. DeLEY, J. - DOCHY, R.: *Biochim. Biophys. Acta*, 40, 1960, s.227.
13. DeLEY, J. - DOCHY, R.: *Biochim. Biophys. Acta*, 42, 1962, s. 538.
14. PERRY, R.H. - CHILTON, C.H.: *Chemical Engineer's Handbook*, Tokyo, 1973.
15. NEUBERG, C. - NORD, F.F.: *Biochem. Z.*, 96, 1919, s. 158.

16. ADACH, O. - TAYAMA, K. - SHINAGAWA, E. - MATSUSHITA, K. - AMEYAMA, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1980, s. 503.
17. ADACH, O. - TAYAMA, K. - SHINAGAWA, E. - MATSUSHITA, K. - AMEYAMA, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1978, s. 2045.
18. AMEYAMA, M. - MATSUSHITA, K. - SHINAGAWA, E. - ADACHI, O.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1987, s. 2943.
19. HROMATKA, O. - EBNER, H.: *Enzymologia*, **15**, 1951, s. 57.
20. HROMATKA, O. - EBNER, H.: *Enzymologia*, **25**, 1962, s. 37.
21. MURAOKA, H. - WATABE, Y. - OGASAWARA, N.: *J. Ferment. Technol.*, **60**, 1982, s. 171.
22. MURAOKA, H. - WATABE, Y. - OGASAWARA, N. - TAKASHI, H.: *J. Ferment. Technol.*, **61**, 1983, s. 89.
23. CONNER, H.A. - ALLGEIER, R.J.: In: *Adv. Appl. Microbiol.* Perlmann, New York, 1976, s. 81.
24. SIEVERS, M. - SELLMER, S. - TEUBER, M.: *System. Appl. Microbiol.*, **15**, 1992, s. 386.
25. ENTANI, E. - OHMORI, S. - MASAI, H. - SUZUKI, K.I.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **31**, 1985, s. 475.
26. FUKAYA, M. - PARK, Y.S. - TODA, K.: *J. Appl. Bacteriol.*, **73**, 1992, s. 447.
27. FUKAYA, M. - TAYAMA, K. - OKUMURA, H. - MASAI, H. - UOZUMI, T. - BEPPU, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1985, s. 2083.
28. FUKAYA, M. - TAYAMA, K. - OKUMURA, H. - MASAI, H. - UOZUMI, T. - BEPPU, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1985, s. 2091.
29. SHIMWELL, J.L.: British Patent 781584, 1952.
30. ENENKEL, A. - MAURER, R.: British Patent 724791, 1955.
31. EBNER, H.: U.S. Patent 3262252, 1966.
32. FRINGS, H.: U.S. Patent 1880381, 1932.
33. FRINGS, H.: German Patent 1517898, 1974.
34. EBNER, H. - ENENKEL, A.: U.S. Patent 4076844, 1978.
35. EBNER, H. - ENENKEL, A.: *GIT Fachz. Lab.*, **13**, 1969, s. 651.
36. MEYNEN, H.L.K.: U.S. Patent 2022970, 1935.
37. BEAMAN, R.G.: Meet. Am. Chem. Soc., New York, 1963.
38. BOURGEOIS FRERES : France Patent 1132093, 1956.
39. VOGELBUSH GmbH: Austrian Patent 335954, 1977.
40. PROCESS ENGINEERING Co.: German Patent Appl. 2755528, 1977.
41. FARDONS VINEGAR Co. - WHITE, J.: British Patent 963481, 1964.
42. GREENSHIELDS, R.N.: In: *Economic Microbiology*, **2**, London, Academic Press 1978, s. 121.
43. GHOSE, T.K. - BHADRA, A.: In: *Comprehensive Biotechnology*, **3**, 1985, s. 701.
44. NANBA, A. - TAMURA, A. - NAGAI, S.: *J. Ferment. Technol.*, **62**, 1984, s. 501.
45. BAR, R. - GAINER, J.L. - KIRWAN, D.J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1987, s. 796.
46. SUN, Y. - FURUSAKI, S.: *J. Ferm. Bioeng.*, **70**, 1990, s. 196.
47. HEKMAT, D. - VORTMEYER, D.: *J. Ferm. Bioeng.*, **73**, 1992, s. 26.
48. ITO, T. - SOTA, H. - HONDA, H. - SHIMIZU, K. - KOBAYASHI, T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 1991, s. 295.
49. PARK, S. - TODA, K. - FUKAYA, M. - OKUMURA, H. - KAWAMURA, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 1991, s. 149.
50. MORI, H. - YAMANE, T. - KOBAYASHI, T. - SHIMIZU, S.: *J. Ferment. Technol.*, **61**, 1983, s. 391.
51. PARK, S. - OHTAKE, H. - FUKAYA, M. - OKUMURA, H. - KAWAMURA, Y. - TODA, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 1989, s. 918.
52. PARK, S. - OHTAKE, H. - FUKAYA, M. - OKUMURA, H. - KAWAMURA, Y. - TODA, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 1989, s. 315.

53. MARINGETTI, N. - FUMI, M.D. - SILVA, A. - BATTISTOTTI, G.: *Biotechnol. Techniques*, 7, 1993, s. 205.
54. NOMURA, Y. - IWAHARA, M. - HONGO, M.: *J. Biotechnol.*, 12, 1989, s. 317.
55. OSUGA, J. - MORI, A. - KATO, J.: *J. Ferment. Technol.*, 62, 1984, s. 139.
56. FUMI, M.D. - SILVA, A. - BATTISTOTTI, G. - COLAGRANDE, O.: *Biotechnol. Letters*, 14, 1992, s. 605.
57. KENEDY, H.: *Austrian Patent Appl.* A6274/80, 1980.
58. GHOMMIDH, C. - NAVARRO, J.M. - DURAND, G.: *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 1982, s. 605.
59. OKUHARA, A.: *J. Ferment. Technol.*, 63, 1985, s. 57.
60. SUEKI, M. - KOBAYASHI, M. - SUZUKI, A.: *Biotechnol. Lett.*, 13, 1991, s. 185.
61. MECCA, F. - ANDREOTTI, R. - VERONELLI, L.: In: *The Vinegar*, Brescia, AEBS.p.A.S. Polo, 1979.
62. EBNER, H.: *U.S. Patent* 4227999, 1980.
63. EBNER, H.: *Chem. Ing. Tech.*, 53, 1981, s. 25.
64. FAO-WHO: In: *Draft European Regional Standard for Vinegar*, Alinorm 83/19, Appendix 2, 1982.

Do redakcie došlo 3.2.1994.

Biotechnological production of acetic acid

Summary

A paper deals with the current status of biotechnological production of acetic acid and reflects some trends and possibilities for its development.