

Eräiden pienimolekyylisten alifaattisten
karboksyylihappojen valmistus

Pro gradu -tutkielma
Jyväskylän yliopisto
Kemian laitos
Soveltavan kemian osasto
11.5.2012
Emmi Laitinen

Tiivistelmä

Tässä pro gradu -tutkielmassa tarkasteltiin pienimolekyylisten alifaattisten karboksyylihapojen valmistusta. Tarkasteltavat yleiset hapot valittiin hiililukumäärän perusteella (C_1 – C_4) käsittäen muurahais-, etikka-, propioni- ja voiapon. Jokaisen hapon kohdalla esiteltiin eri menetelmiä kyseisen hapon valmistamiseksi. Tietyt esitellyistä menetelmistä ovat monimutkaisia ja eivät näytä olevan taloudellisesti kannattavia, eivätkä ne siten sovellu suuren mittakaavan tuotantoon. Ongelmana prosesseissa voivat olla esimerkiksi lähtöaineiden tai käytettävien katalyyttien ympäristövaikutukset sekä vaikeudet lopputuotteen talteenotossa.

Viimeaikainen kehitys bioteknologiassa on mahdollistanut merkittäviä edistysaskelia fermentointiprosesseissa ja siten karboksyylihapojen tuotannossa uusiutuvista energialähteistä. Raaka-aineina voidaan käyttää lukuisia erilaisia orgaanista ainesta sisältäviä materiaaleja, kuten puuta, viljakasveja ja kotitalouksien biojätettä. Fermentointiprosesseissa käytetään hyväksi erilaisia mikro-organismeja, kuten hiivoja ja bakteereita. Kyseiset mikro-organismit hyödyntävät orgaanisen aineksen hiililähteenä käymisprosessissa, jonka lopputuotteena saadaan erilaisia orgaanisia happoja. Perinteisen fermentoinnin ongelmana on kuitenkin usein alhainen saanto, mikä johtuu pääosin talteenoton vaikeudesta ja lopputuotteiden inhibiitiosta. Näihin ongelmiin on yritetty löytää parannusta kehittämällä bakteerikantoja, jotka kestävät entistä paremmin korkeaa happopitoisuutta sekä kehittämällä nykyistä tehokkaampia talteenottomenetelmiä.

Esipuhe

Tämän pro gradu -tutkielman aiheena oli pienimolekyylisten alifaattisten karboksyylihappojen valmistus. Tutkielman aineisto kerättiin pääasiassa käyttämällä Science Direct- ja Google Scholar -tietokantoja. Työn valvojana on toiminut Prof. Raimo Alén.

Haluan kiittää lämpimästi aviopuolisoani Jereä kaikesta tuesta tämän projektin aikana.

Kuusankoskella 11.5.2012

Emmi Laitinen

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	i
Esipuhe	ii
Sisällysluettelo	iii
Käytetyt lyhenteet	v
1 Johdanto	1
2 Muurahaishappo	3
2.1 Metyyliformiaatin hydrolyysi	3
2.2 Hiilidioksidin hydraus	4
2.3 Formamidiin perustuva valmistus	5
3 Etikkahappo	5
3.1 Fermentointi	8
3.2 Metanolin karbonylointi	8
3.3 Metyyliformiaatin isomerisointi	11
3.4 Synteesikaasureitti	11
3.5 Etyleenin kaasufaasihapetus	12
3.6 Muut teknologiat	12
3.6.1 Hydroterminen prosessi	12
3.6.2 Etaanin hapetus	15
3.6.3 Metaanin karbonylointi	15
4 Propionihappo	16
4.1 Fermentointi	16
4.2 Etyleenin karbonylointi	19
4.3 Propionaldehydin hapetus	20
4.4 Glyserolin katalyyttinen dehydraatio	20
5 Voihappo	21
5.1 Fermentointi	21
5.2 Butanaalin hapetus	25
5.3 Alkoolien biotransformaatio	26

6 Yhteenveto	27
7 Kirjallisuusviiteluettelo	30

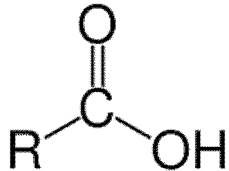
Käytetyt lyhenteet

AAB	Etikkahappobakteerit
ABE	Asetoni-butanoli-etanoli
ack	Asetaattikinaasi-geeni
ADP	Adeniinidifosfaatti
AK	Asetaattikinaasi
ATP	Adeniinitrifosfaatti
BK	Butyraattikinaasi
CMC	Karboksimetyyliselluloosa
CoA	Koentsyymi-A
DME	Dimetyylieetteri
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
DHA	Dihydroksiasetoni
DHAP	Dihydroksiasetonifosfaatti
FBB	Kuitupetibioreaktori
FP	Flavoproteiini
FPH ₂	Pelkistynyt flavoproteiini
Fd	Ferredoksiini
FdH ₂	Pelkistynyt ferredoksiini
GDP	Guanosiinidifosfaatti
GTP	Guanosiinitrifosfaatti
HMF	5-hydroksimetyyli-2-furaldehydi
NAD ⁺	Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi
NADH	Pelkistynyt nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi
PET	Polyetyleenitereftalaatti
PEP	Fosfoenolipyruvaatti
Pi	Epäorgaaninen fosfaatti
PTA	Fosfotransasetylaasi
PTB	Fosfotransbutyrylaasi
TPA	Tereftaalihappo

TBP	Tributyylifosfaatti
TOA	Trioktyyliamiini
WO	Märkähapetus
2-FA	2-furaldehydi

1 Johdanto

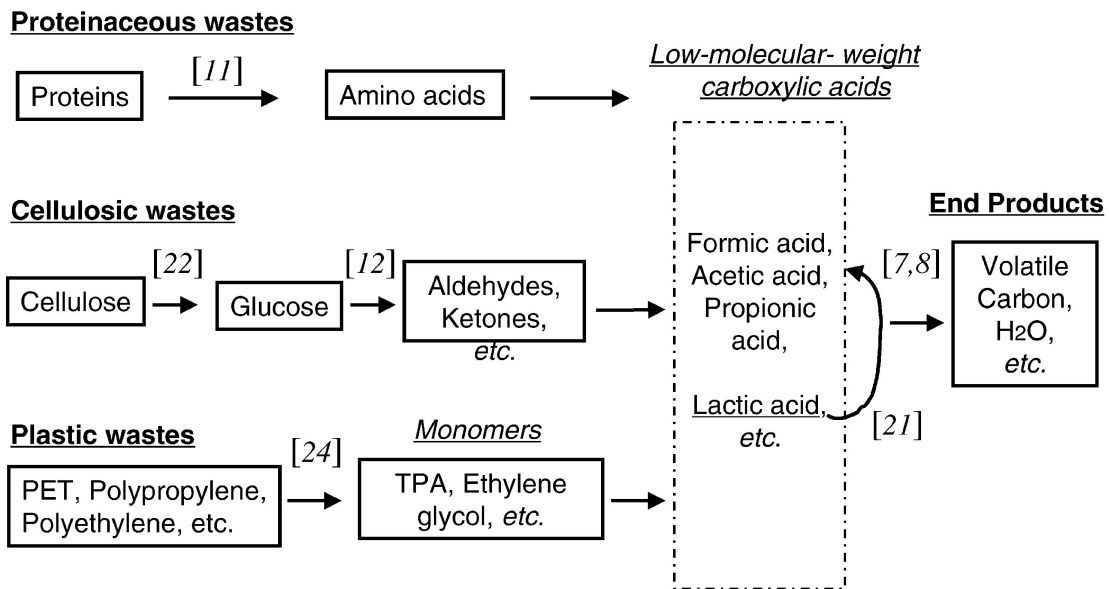
Karboksyylihappo on orgaaninen yhdiste, jossa funktionaalisenä ryhmänä on karboksyyliryhmä -COOH. Karboksyylihapon yleinen rakenne on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Karboksyylihapon kemiallinen yleisrakenne. R voi olla vety tai orgaaninen ryhmä.

Karboksyylihappoja tuotetaan teollisesti useilla eri menetelmillä /1/. Yleisimpiä menetelmiä ovat a) aldehydien hapetus ilmalla, b) hiilivetyjen hapetus ilmalla, c) alkoholien emäskatalysoitu dehydrogenaatio, d) karbonylointi ja e) fermentointi. Laboratoriomittakaavassa happoja voidaan tuottaa mm. hapettamalla primaarisia alkoholeja tai aldehydeja vahvoilla hapettimilla sekä hydrolysoimalla nitrilejä, estereitä tai amideja.

Viimeaikainen kehitys bioteknologiassa on mahdollistanut merkittäviä edistysaskelia fermentointiprosesseissa ja siten karboksyylihappojen tuotannossa uusiutuvista energianlähteistä /2/. Karboksyylihappoja, kuten etikka-, propioni- ja voi-happoa, käytetään laajalti moniin eri käyttötarkoituksiin. Niiden valmistus perustuu pääasiassa petrokemian prosesseihin uusiutumattomista raaka-aineista. Toinen tapa tuottaa kyseisiä happoja on fermentointi. Se on ympäristöystävällinen tapa tuottaa karboksyylihappoja uusiutuvista materiaaleista. Raaka-aineena voidaan käyttää lukuisia eri orgaanista ainesta sisältäviä materiaaleja. Tällaisia ovat esimerkiksi puu, viljakasvit, kotitalouksien biojäte ja eläinten lanta. Pienimolekyylisten karboksyylihappojen yleinen valmistusprosessi orgaanisesta jätteestä hydrotermisellä käsittelyllä on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Yleisiä tapoja valmistaa pienimolekyylisiä karboksyylihappoja orgaanisesta jätteestä hydrotermisellä käsittelyllä [3/].

Prosessissa (kuva 2) happoja muodostuu kolmella tavalla [3/]. Proteiineista muodostuu aminohappoja pilkkoutumalla. Aminohapot hajoavat edelleen muodostaen pienimolekyylisiä orgaanisia happoja. Jos jäte sisältää selluloosaa, selluloosa hydrolysoituu glukoosiksi, josta muodostuu muita tuotteita, kuten aldehydeja ja ketoneja. Näistä muodostuu edelleen orgaanisia happoja. Orgaanisia happoja voi myös muodostua muovijätteen monomeereista hydrolyysillä.

Tässä pro gradu -tutkielmassa tarkastellaan alifaattisten pienimolekyylisten karboksyylihappojen valmistusta. Käsiteltävät yleiset hapot valittiin hiililukumäärän perusteella (C₁–C₄) muurahaishaposta voihappoon. Jokaisen hapon kohdalla on esitelty eri menetelmiä kyseisen hapon valmistamiseksi.

2 Muurahaishappo

Muurahaishappo (metaanihappo HCOOH) on yksinkertaisin karboksyylihappo. Sitä käytetään Suomessa mm. säilörehuliuksen valmistuksessa, paperin ja tekstiilien värjäyksessä, märkälujahartsin valmistuksessa, nahan käsittelyssä ja lääkeainesynteesissä /4/.

Teollisesti muurahaishappoa muodostuu sivutuotteena etaanihapon valmistuksessa hiilivetyjen nestefaasihapetuksessa, mihin sen ensisijainen valmistus nykyisin pohjautuu /5/. Sitä saadaan myös hiilimonoksidin ja metanolin reaktiotuotteesta, metyyylimetanaaatista, joko suoralla hydrolyysillä tai muodostamalla kyseisestä välituotteesta helposti hydrolysoitavaa formamidia. Muurahaishapon suora katalyyttinen valmistus vedestä ja hiilimonoksidista vaatii sen sijaan suhteellisen voimakkaita reaktio-olosuhteita, eikä prosessi ole tämän vuoksi taloudellisesti kannattava. Muurahaishappoa voidaan tuottaa myös hapettamalla metaania selektiivisesti vetyperoksidilla /6/. Katalyytteinä prosessissa käytetään useita yksinkertaisia vanadiumyhdisteitä.

2.1 Metyyliformiaatin hydrolyysi

Muurahaishappoa voidaan tuottaa metyyliformiaatin hydrolyysillä /7/. Prosessi sisältää seuraavat vaiheet: a) Metanoli ja hiilimonoksidi reagoivat keskenään vahvan emäksen läsnä ollessa muodostaen metyyliformiaattia:



b) Metyyliformiaatin hydrolyysi tuottaa muurahaishappoa ja metanolia:



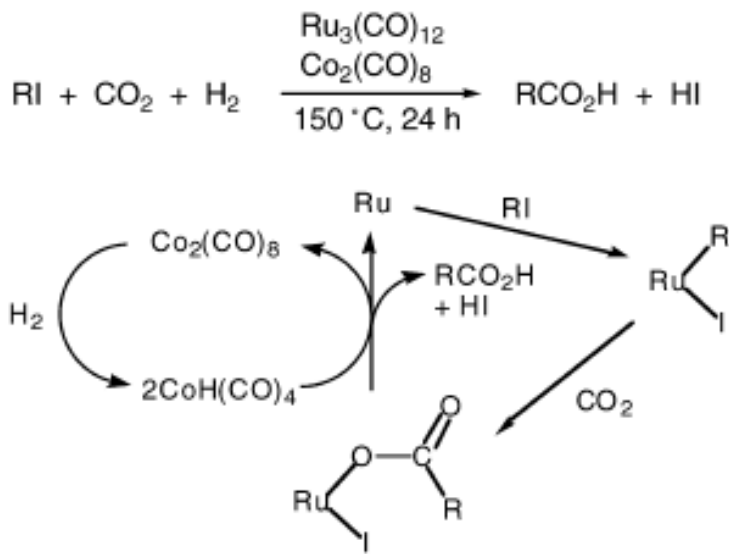
c) Metanoli ja jäljelle jäänyt metyyliformiaatti poistetaan, jolloin jäljelle jää muurahaishapon vesiliuos. d) Tämän jälkeen muurahaishappo uutetaan muurahaishapon esterillä, jolloin saadaan esterin ja hapon seos. e) Lopuksi esteri ja happo erotetaan tislamalla toisistaan.

2.2 Hiilidioksidin hydraus

Etikkahapon tuottamiseen kehitetyt kaupalliset menetelmät, kuten metyyliformaatin hydrolyysi, tarvitsevat paljon energiaa sekä tuottavat jätettä /8/. Hiilidioksidin hydraus on vaihtoehto puhtaammalle tavalle tuottaa etikkahappoa:



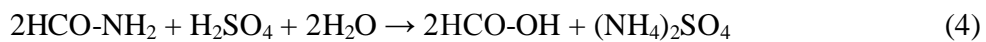
Tämä menetelmä on ollut käytössä jo vuosia /8/. Katalyytteinä reaktiossa on käytetty mm. nikkeliä, rutenium-palladium-kompleksia tai muita toisen ja kolmannen jakson ja siirtymäalkuaineiden ryhmien 8–12 muodostamia komplekseja. Ongelmana on kuitenkin ollut muurahaishapon talteenotto käytettäessä homogeenistä katalyyttiä. Tämän vuoksi on koetettu kehittää heterogeenisiä katalyyttejä, joilla saadaan aikaan korkea saanto ja hyvä erotettavuus. Yleisimmin käytettyjä katalyyttejä ovat erilaiset rutenium- ja rodiumkompleksit /8–10/. Kuvassa 3 on esitetty karboksyylihappojen valmistuksen mahdollinen reaktiomekanismi.



Kuva 3. Karboksyylihapojen valmistuksen mahdollinen reaktiomekanismi /10/.

2.3 Formamidiin perustuva valmistus

Muurahaishappoa voidaan tuottaa antamalla formamidin reagoida rikkihapon ja veden kanssa seuraavan reaktioyhtälön mukaisesti /11/:

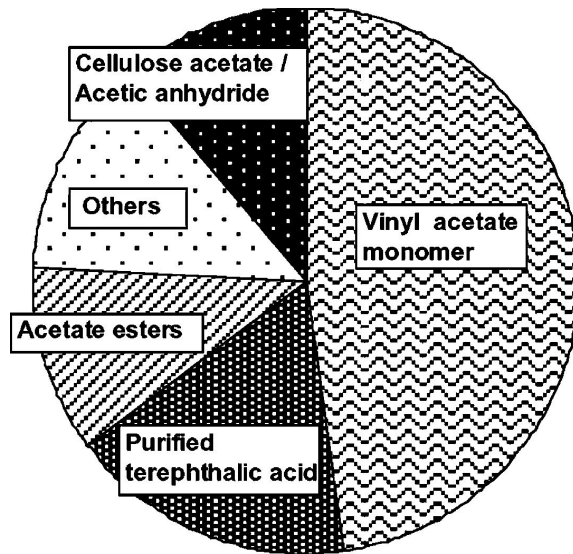


Muodostunut muurahaishappo erotetaan ammoniumsuolasta tislaamalla.

3 Etikkahappo

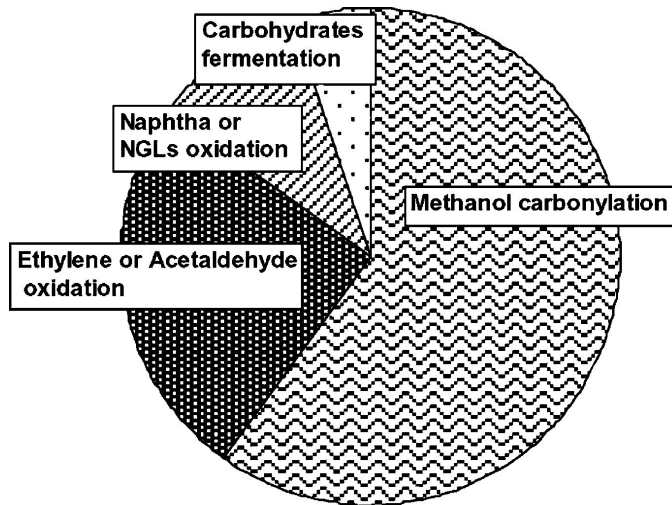
Etikkahappo (etaanihappo CH₃COOH) on tärkeä teollisuuden raaka-aine, jota käytetään mm. etikkahappoanhydridin, asetaattiestereiden, selluloosa-asetaatin, vinyliasetaattimonomeerin, peretikkahapon ja monokloorietikkahapon valmistukseen /5,12/. Sitä käytetään myös muovien, lääkeräaka-aineiden, väriaineiden, hyönteismyrkkyjen, elintarvikelisäaineiden, valokuvauskemikaalien ja lateksin kovettimien

tuotantoprosesseissa ja apuaineena tekstiiliteollisuudessa. Suomessa etikkahappoa käytetään myös monokloorietikkahapon ja edelleen karboksimeetyyliselluloosan (CMC) valmistukseen /12/. Kuvassa 4 on esitetty etikkahapon käyttökohteita.



Kuva 4. Etikkahapon käyttökohteita /13/.

Etikkahappoa tuotetaan lähinnä öljystä ja maakaasusta joko metanolin karbonyloinnilla tai asetaldehydin hapetuksella /13,14/. Kuten kuvasta 5 näkyy, yli 60 % etikkahaposta valmistetaan metanolin karbonyloinnilla.



Kuva 5. Etikkahapon valmistusreitit /13/.

Etikkahappoa voidaan tuottaa myös aerobisesti etanolin käymisreaktiolla /13/. Tällä menetelmällä tuotetaan yhä suurin osa etikasta. Ensimmäinen merkittävä kaupallinen prosessi synteettisesti valmistettavan etikkahapon tuottamiseen perustui asetaldehydin hapetukseen. Vuonna 1916 otettiin käyttöön prosessi asetyleenin muuttamiseksi asetaldehydiksi. Katalyyttinä prosessissa käytettiin organo-elohopeaa. Menetelmää käytettiin Kiinassa aina viime vuosiin asti, jolloin elohopean myrkylliset ympäristövaikutukset pakottivat luopumaan menetelmästä.

Fossiilisten polttoainevarojen ehtyminen on johtanut öljyn hinnan nousuun, mikä puolestaan on johtanut uusiutuviin energialähteisiin pohjautuvan teknologian kehittymiseen /14/. Etikkahapon tuottaminen fermentoimalla on herättänyt tutkijoissa suurta kiinnostusta sen taloudellisten mahdollisuuksien vuoksi. Biomassan hiilihydraattien hyödyntäminen fermentointiprosessissa pilkkomalla hiilihydraatit ensin monosakkarideiksi tapahtuu happohydrolyysin tai entsyymikäsittelyn avulla. Kyseisillä käsittelyillä biomassassa oleva hiilihydraattiaines pilkotaan siten käymiskykyisiksi sokereiksi, joita bakteerit hyödyntävät varsinaisessa käymisprosessissa. Happohydrolyysin huonoina puolina ovat kuitenkin alhainen glukoosin saanto ja laitteistojen korroosio. Entsyymaattisella käsittelyllä voidaan saavuttaa entistä parempi saanto, mutta ongelmana on menetelmän kalleus.

Seuraavaksi esitellään erilaisia menetelmiä etikkahapon tuottamiseen.

3.1 Fermentointi

Monet hiivat ja bakteerit pystyvät tuottamaan etikkahappoa. Esimerkiksi *Candida utilis*-suvun hiivat tuottavat etikkahappoa biomassasta /15/. Lisäksi monet sellulolyttiset, mesofiiliset ja anaerobiset *Clostridium*-suvun bakteerit, kuten *C. lentocellum* SG6, pystyvät tuottamaan etikkahappoa suoraan biomassasta /16/. Myös etikkahappobakteerit (AAB) voivat hapettaa sokereita ja alkoholeja orgaanisiksi hapoiksi /17/. Kyseiset bakteerit voivat tuottaa suuria määriä etikkahappoa etanolista. Etikkahappobakteereita on paljon erilaisia ja ne luokitellaan nykyisin kahteentoista eri sukuun. AAB voivat käyttää erilaisia hiilihydraatteja hiililähteenään. Esimerkiksi *Gluconobacter*-kanta käyttää mieluummin sokeria hiilenlähteenään kuin *Acetobacter*-kanta, mikä johtuu bakteerien erilaisesta metaboliasta.

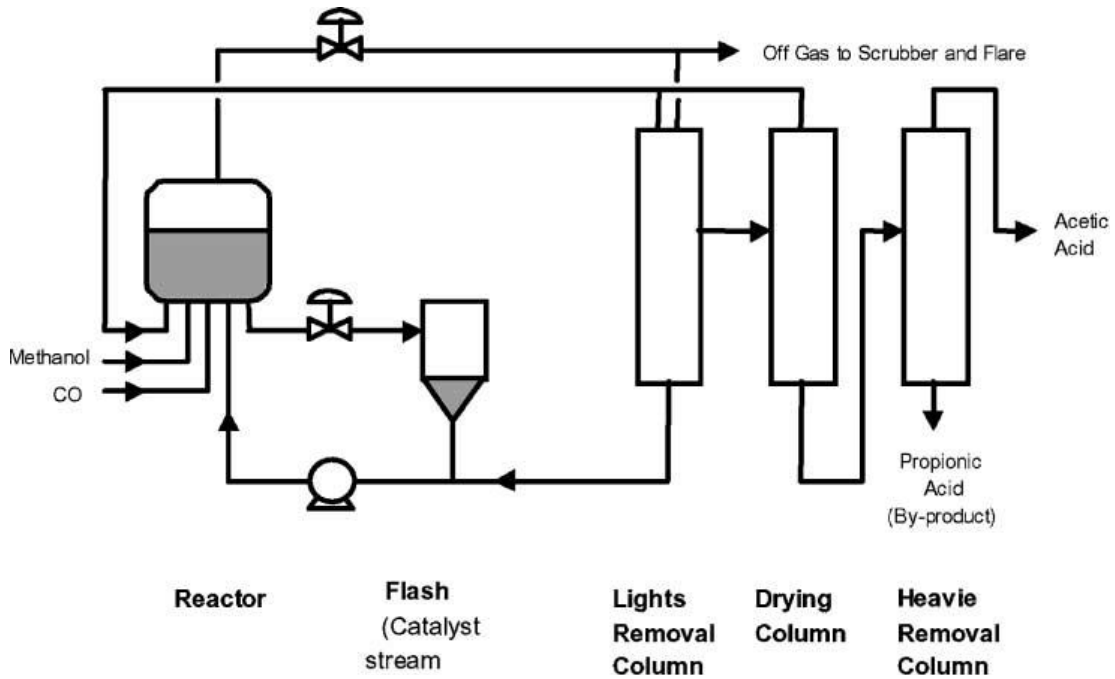
Perinteinen monivaiheinen menetelmä sisältää happo- tai entsyymaattisen hydrolyysin, jota seuraa substraatin fermentointi ja hapetus /16,18/. Tällä menetelmällä saadaan yleensä hyvä saanto, mutta se on kallis ja aiheuttaa laitteiston korroosiota. Tämän vuoksi taloudellisempi vaihtoehto on biomassan suora konversio etikkahapoksi.

Etikkahappofermentoinnissa etanoli hapettuu etikkahappobakteerien avulla etikkahapoksi /19/. Etikkahappo kuitenkin inhiboi bakteereita, joiden kasvu ja fermentointikyky laskevat etikkahappokonsentraation kasvaessa. Tämän vuoksi on kehitetty bakteereja, jotka kestävät entistä paremmin korkeaa etikkahappopitoisuutta.

3.2 Metanolin karbonylointi

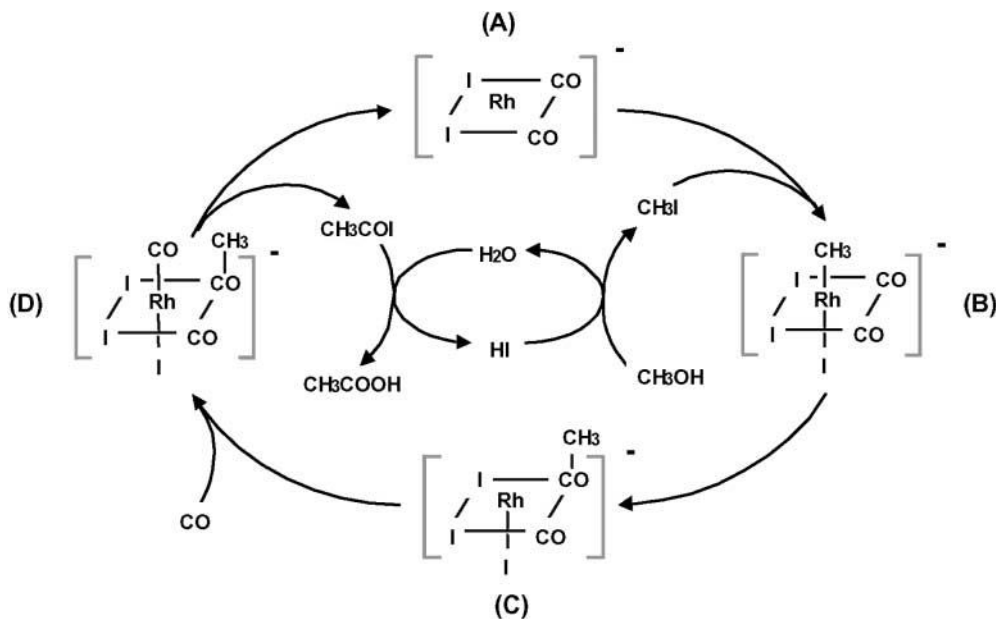
Metanolin karbonyloinnissa eli Monsanto-prosessissa metanoli reagoi hiilimonoksidin kanssa muodostaen etikkahappoa /13,20/. Katalyyttinä reaktiossa käytetään rodium(I)-

tai rodium(III)-komplekseja. Perinteinen metanolin karbonylointilaitos on esitetty kuvassa 6.



Kuva 6. Perinteinen metanolin karbonylointilaitos /13/.

Kuvassa 7 on esitetty rodiumkatalysoidun Monsanto-prosessin karbonylointikierto.



Kuva 7. Rodium-katalysoidun karbonyloinnin kierto /13/.

Prosessissa rodium-dikarbonyyli-dijodidi-kompleksiin (A) lisätään metyylijodidia, jolloin saadaan rodium-metyyli-kompleksi (B) /13/. Tämän jälkeen metyyli-ryhmä siirtyy viereiseen hiiliatomiin muodostaen asetyylimuodon (C) ja reagoi hiilimonoksidin kanssa. Tällöin muodostuu rodium-asetyyli-kompleksi (D), joka asetyyli-jodidin pelkistävällä eliminaatiolla vapauttaa alkuperäisen rodiumkompleksin (A). Prosessin sivutuotteena saadaan propionihappoa.

Monsanto-prosessissa on mahdollista käyttää rodiumkatalyytin lisäksi muita katalyyttejä, kuten nikkeliä ja iridiumia /13/. Vaikka nikkeli on huomattavasti halvempaa kuin rodium, sen kompleksit voivat olla hyvin myrkyllisiä ja haihtuvia yhdisteitä. Tämä rajoittaa sen käyttöä katalyyttinä. Iridiumia puolestaan käytetään rodiumin tilalla ja iridium-katalysoitu prosessi on hyvin samankaltainen kuin rodium-katalysoitu prosessi. Prosessin tekniset vaikeudet liittyvät lähinnä käyttökustannuksiin, joita alentamalla prosessista saadaan taloudellisesti kannattavampi /21/. Prosessista saadaan taloudellisempi mm. säätämällä prosessiolosuhteita, kuten pitämällä vedyn osapaine karbonylointireaktorissa mahdollisimman alhaisena. Tämä vähentää sivutuotteiden, kuten propionihapon ja metaanin muodostumista.

3.3 Metyyliformiaatin isomerisointi

Etikkahappoa voidaan tuottaa myös metyyliformiaatin isomerisoinnilla homogeenisen rodiumkatalyytin läsnä ollessa /13/. Metyyliformiaatti tuotetaan metyylin dehydrogenaatiolla tai metanolin karbonyloinnilla korkeassa paineessa kuparioksidin ja alkalikatalyytin läsnä ollessa. On huomattu, että etikkahapon tuottaminen metanolin dehydrogenaatiolla, jota seuraa metyyliformiaatin isomerisointi, vaatii ainoastaan metanolin, eikä lainkaan hiilimonoksidia:



Etikkahappoa voidaan tuottaa pelkästään metanolista käyttämällä Ru-Sn-katalyyttiä /13/.

3.4 Synteesikaasureitti

Reaktion ensimmäisessä katalyyttisessä vaiheessa tapahtuu metanolin ja dimetyylieetterin (DME) synteesi /13/:



Toisessa vaiheessa metanoli ja DME karbonyloidaan etikkahapoksi. Katalyytteinä käytetään erilaisia katalyytsiseoksia (kupari-sinkki-alumiini-oksidi ja H-ZMS-5) /13/:



DME:n ja metanolin karbonyloinnissa etikkahapoksi käytetään katalyyttinä rodium-karbonyyli-kompleksia /13/.

3.5 Etyleenin kaasufaasihapetus

Etikkahappoa voidaan tuottaa kaksivaiheisella hapetusprosessilla etyleenistä seuraavasti /13/:

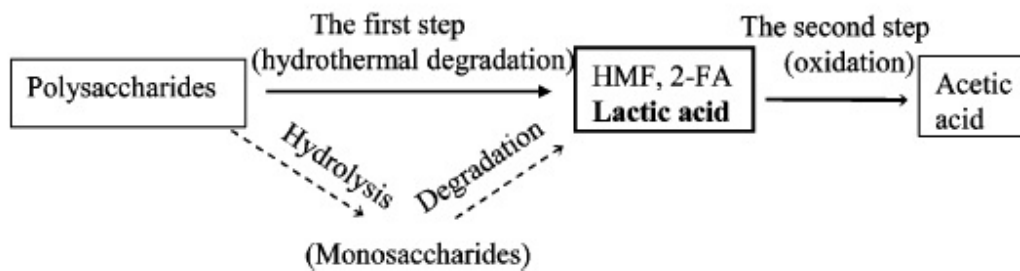


Reitti sisältää asetaldehydin nestefaasihapetuksen, jossa katalyyttinä on mangaani-asetatti /13/. Prosessissa on korkea saanto ja alhaiset kustannukset, mutta ongelmana ovat asetaldehydin korkeat varastointikulut. Sen lisäksi katalyysisysteemi aiheuttaa laitteiston korroosiota.

3.6 Muut teknologiat

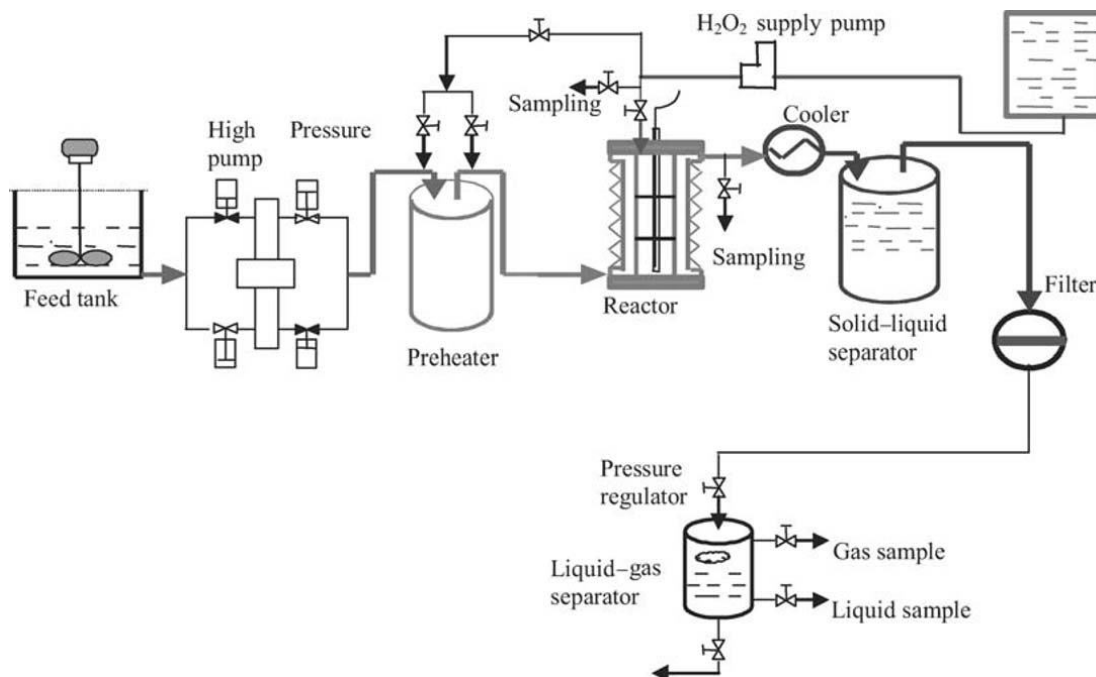
3.6.1 Hydroterminen prosessi

Orgaanisen jätteen määrän lisääntyminen on pakottanut keksimään uusia ja tehokkaita ratkaisuja biojätteen käsittelyyn /22/. Yksi lupaava prosessi etikkahapon tuottamiseksi biomassasta on märkähapetusprosessi (WO) /22,23/. Etikkahapon saanto perinteisessä märkähapetuksessa jää kuitenkin melko alhaiseksi (11–13 %), eikä saantoa pystytä juurikaan parantamaan. Tämän vuoksi on kehitetty kaksivaiheinen prosessi, jossa ensimmäisen vaiheen tarkoitus on nopeuttaa 5-hydroksimetyyli-2-furaldehydin (HMF), 2-furaldehydin (2-FA) ja maitohapon muodostumista (kuva 8). Kyseiset yhdisteet tuottavat etikkahappoa hapettamalla reaktion toisessa vaiheessa.



Kuva 8. Mahdollinen kaksivaiheinen prosessi etikkahapon saannon lisäämiseksi /22/.

Kuvassa 9 on esitetty biomassan hydroterminen konversio etikkahapoksi.

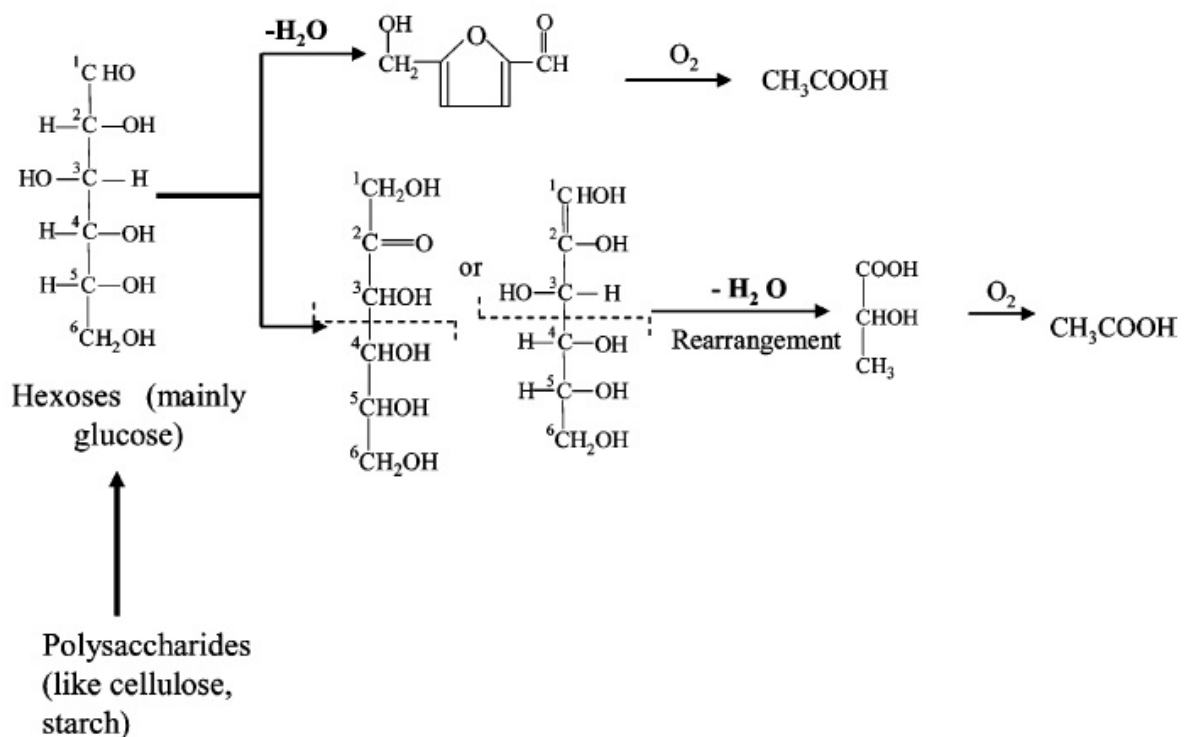


Kuva 9. Biomassan hydroterminen konversio etikkahapoksi /23/.

Aluksi biomassa paineistetaan ja esikuumennetaan /23/. Tavallisessa märkähapetuksessa biomassa ja vetyperoksidi sekoitetaan kuumennuksen yhteydessä ja johdetaan sen jälkeen hapetusreaktioon. Kaksivaiheisessa prosessissa reaktiosäiliö on

jaettu kahteen osaan. Alemmassa osassa biomassa kuumennetaan ilman vetyperoksidia (reaktion ensimmäinen vaihe) ja ylemmässä osassa tapahtuu hapetusreaktio (reaktion toinen vaihe). Tämän jälkeen seos johdetaan jäädytettäväksi, minkä jälkeen kiinteä aines ja neste erotetaan toisistaan. Viimeisenä neste ja kaasu erotetaan toisistaan.

Hiilihydraattien mekanismi kaksivaiheisessa prosessissa on esitetty kuvassa 10. Aluksi heksooseista muodostuu HMF:a dehydrataation avulla tai siten, että heksoosi katkeaa ensin 3. ja 4. hiilen välistä ja tämän jälkeen tapahtuu dehydrataatio muodostaen maitohappoa. HMF:sta ja maitohaposta muodostuu edelleen etikkahappoa.



Kuva 10. Hiilihydraattien kaksivaiheisen prosessin mekanismi /22/.

3.6.2 Etaanin hapetus

Etaanin hapetus on 1980-luvulta peräisin oleva prosessi, jossa etaani hapetetaan etikkahapoksi katalyytin läsnä ollessa /13/:



Reaktio voi toimia kahdella eri tavalla riippuen katalyytista /13/: (1) metyyliiryhmä hapettuu osittain tai (2) etaani hapetetaan etyleeniksi joka edelleen hydrataan etanoliksi, etyleeniksi tai asetaldehydiksi. Katalyytteinä käytetään yleensä molybdeenin, vanadiumin ja jonkun muun metallin seoksia (Z). Katalyytin yleinen muoto on $\text{Mo}_x\text{V}_y\text{Z}_z$.

3.6.3 Metaanin karbonylointi

Etikkahappoa voidaan tuottaa metaanista ja hiilimonoksidista katalyytin $\text{Pd}(\text{OCOCH}_3)_2/\text{Cu}(\text{OCOCH}_3)_2/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{CF}_3\text{COOH}$ läsnä ollessa /13/. Myös metaanin, hiilimonoksidin ja hapen seoksesta voidaan tuottaa etikkahappoa rodiumtrikloridi-katalyytin läsnäollessa seuraavan reaktioyhtälön mukaisesti:



Reaktio tuottaa korkean etikkahapposaannon, mutta hidas reaktionopeus tekee siitä taloudellisesti kannattamattoman /13/.

Etikkahappoa voidaan tuottaa metaanista myös valmistamalla metaanista ensin metanolia, josta edelleen tuotetaan etikkahappoa metanolin karbonylointireaktiolla /24/.

Perinteisesti nämä kaksi vaihetta ovat erillisiä, mikä lisää tuotantokustannuksia. Poistamalla prosessista energiaa vieviä välivaiheita pystytään tuottamaan etikkahappoa suoraan metaanista edullisemmin ja yksinkertaisemmin. Prosessissa metaanikaasu ja happi muodostavat metanolin, hiilimonoksidin ja metaanin seoksen, joka syötetään metanolin karbonyloitireaktoriin. Reaktorissa kaasuseoksesta muodostuu edelleen katalyytin läsnä ollessa etikkahappoa. Etikkahappoa otetaan talteen ja jäljelle jäänyt metanoli kierrätetään uudestaan karbonyloitireaktiossa.

4 Propionihappo

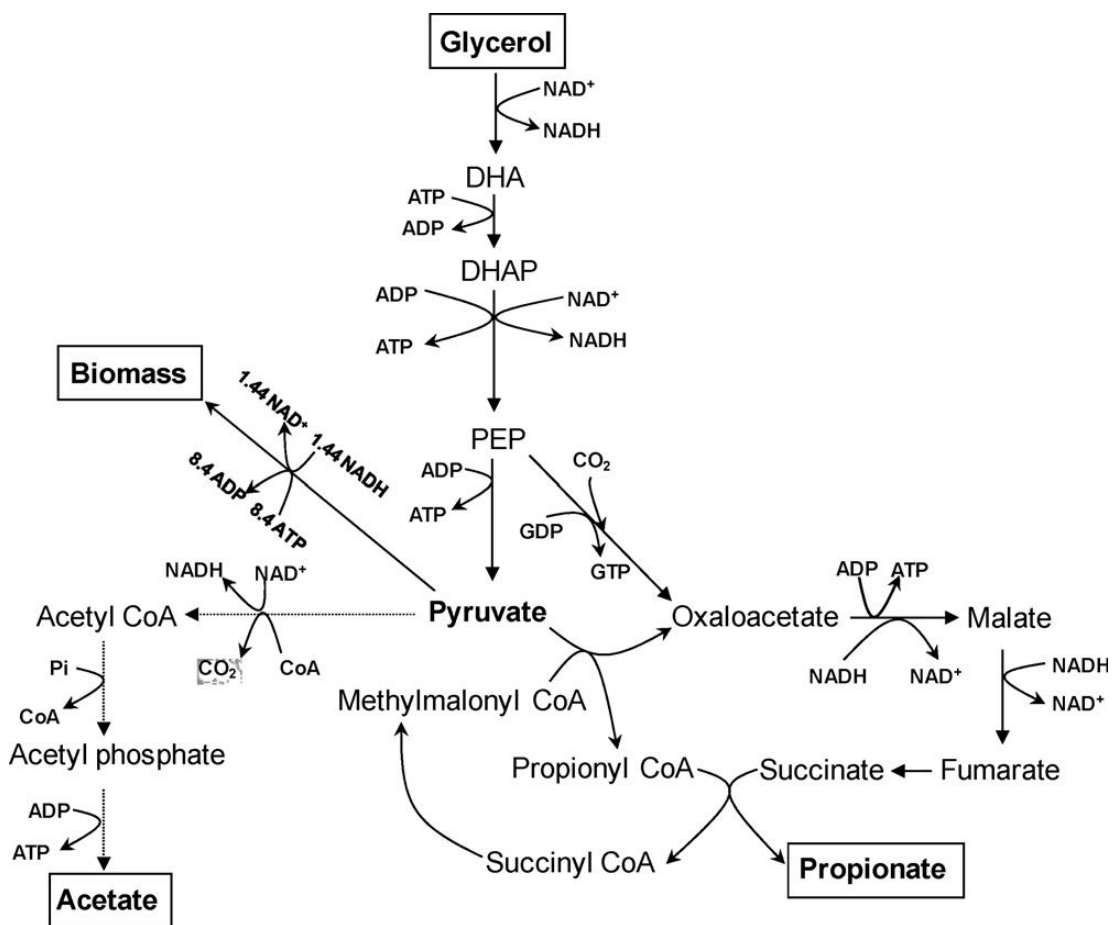
Propionihappo (propanihappo $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) on merkittävä kemikaali esimerkiksi kasvimyrkyissä, parfyymeissä ja lääkealan sovelluksissa /25–27/. Lisäksi sitä käytetään rehuviljan säilöntään /5,28/. Siitä valmistetaan myös farmaseuttisia tuotteita, mm. ihonhoitoaineita sekä hajusteina käytettäviä estereitä /4/. Propionihappoa ja sen suoloja käytetään myös laajalti elintarvikkeissa /25–28/. Propionihappoa valmistetaan lähes yksinomaan petrokemian prosessien kautta /25,27,29/. Kuten etikkahapon kohdalla, öljyn hinnan nousu ja kuluttajien kasvava kiinnostus biopohjaisia tuotteita kohtaan ovat kuitenkin lisänneet teollisuuden kiinnostusta propionihapon valmistukseen uusiutuvista raaka-aineista /25/.

Propionihappoa valmistetaan hapettamalla propanolia tai vaihtoehtoisesti katalyyttisellä reaktiolla, jossa lähtöaineina ovat etanoli ja hiilimonoksidi /5/. Propionihappoa syntyy myös heksooseista bakteerien aiheuttamassa ns. propaanihappokäymisessä, jota esiintyy mm. juuston valmistuksen yhteydessä.

4.1 Fermentointi

Propionihappoa tuottavia bakteerikantoja on useita erilaisia. Esim. bakteerikannat *Propionibacterium acidipropionici*, *P. jensenii*, *P. thoenii*, *P. freudenreichii* ja *P.*

shermanii pystyvät tuottamaan propionihappoa käymisreaktiolla /30/. Lukuunottamatta *P. thoenii*- ja *P. freudenreichii* -kantoja, näiden bakteerien propionihapposaanto anaerobisessa fermentoinnissa on korkea käytettäessä sokerina sakkaroosia. Nämä kannat tuottavat myös vähemmän etikkahappoa. Varsinkin *P. acidipropionici* -kannan etu on alhainen etikkahapon muodostuminen käymisreaktiossa. Käytettäessä glyserolia sokerina fermentoinnissa pystytään saavuttamaan huomattavasti korkeampi saanto verrattuna glukoosiin (kuva 11) /25/.



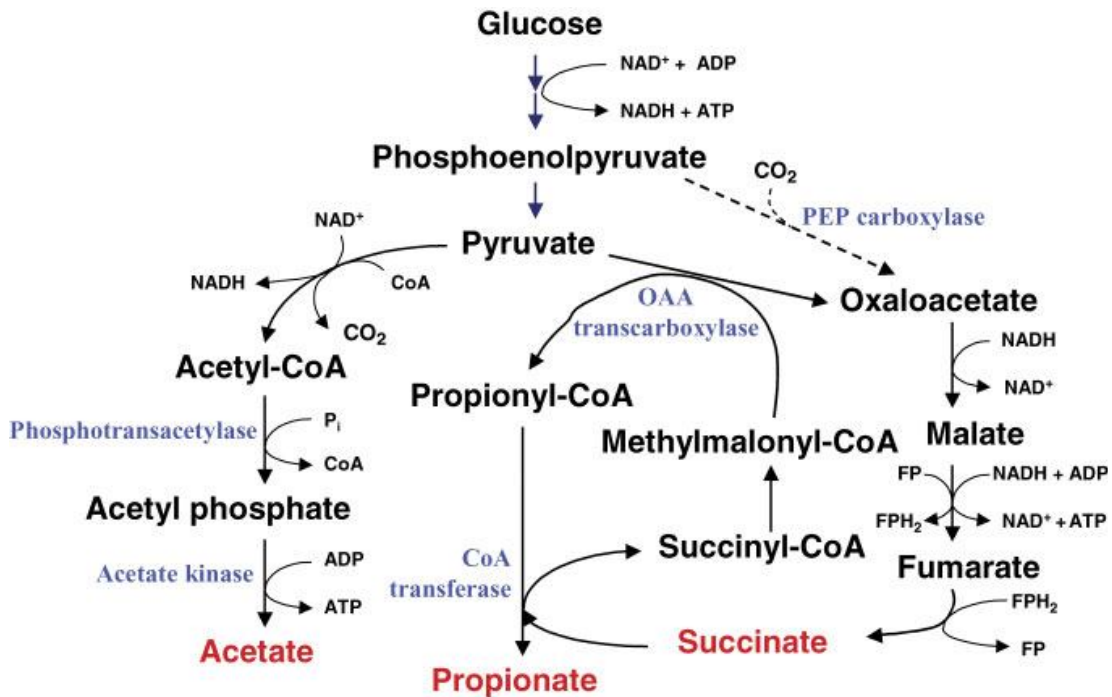
Kuva 11. Propionihappofermentoinnin dikarboksyylihapporeitti glyserolista *P. acidipropionici* -bakteerilla /25/.

Monet propionihappoa tuottavista bakteereista ovat vahvasti riippuvaisia pH-arvosta /30/. Yhden yksikön nosto pH-asteikolla voi kasvattaa saantoa jopa kaksinkertaiseksi. Myös lämpötila vaikuttaa saantoon.

Perinteisen propionihappofermentoinnin ongelmana on usein alhainen saanto ja väkevyys /25,27–29/, mikä johtuu mm. bakteerien hitaasta kasvusta, voimakkaasta lopputuotteiden inhibiitiosta /29,31/ sekä talteenoton vaikeudesta /32/. Fermentoinnin saantoa yritetäänkin nostaa vähentämällä lopputuotteiden inhibiitiota ja parantamalla reaktorin tuottavuutta. Myös bakteerien sietokykyä propionihappoa vastaan on koetettu parantaa /25,32/.

Geenitekniikan kehitys on mahdollistanut valmistaa bakteerimutantteja, jotka parantavat fermentointia /25,28,29/. Yksi käytetty mutanti on *P. acidipropionici* ACK-Tet, jota käyttämällä saadaan tuotettua propionihappoa paremmalla saannolla. Myös *P. acidipropionici* P9-kannasta kehitetty mutanti P200910 pystyy tuottamaan enemmän propionihappoa kuin alkuperäinen kanta /33/. Biomassaa muodostuu prosessissa vähemmän, mikä alentaa biomassan poistosta aiheutuvia kustannuksia.

Propionihappofermentoinnissa muodostuu propionihapon lisäksi etikkahappoa /27/. Etikkahapon muodostuminen reaktiossa ei ole suotavaa, sillä se alentaa propionihapon saantoa. Tämän vuoksi etikkahapon tuotantoa pyritään vähentämään tai estämään kokonaan käyttämällä geenimuunneltuja bakteereita. Yksi käytetty bakteeri on *P. acidipropionici*, jossa asetaattikinaasi-geenin (*ack*) toiminta on estetty joko häiritsemällä geenin toimintaa lisäämällä geeniin vieras DNA-sekvenssi tai estämällä bakteeria muodostamasta etikkahappoa (kuva 12).



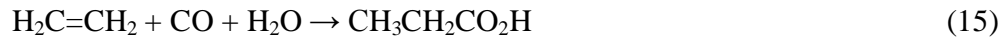
Kuva 12. Propionihappofermentoinnin dikarboksyylihapporeitti glukoosista *P. acidipropionici* -bakteerilla [27].

Öljyn hinnan nousu on herättänyt kiinnostuksen tuottaa propionihappoa vaihtoehtoisilla menetelmillä. Yksi varteenotettava menetelmä on uuttofermentointi [34]. Tällä teknologialla on mahdollista saavuttaa parempi reaktorin tuottavuus ja talteenotto sekä vähentää jälkikäsittelyyn menevää kuormaa ja alentaa tuotantokustannuksia. Perinteisesti propionihappoa on uutettu fermentointiliemestä saostamalla kalsiumsuolalla. Aktiivinen uutto sen sijaan käyttää uuttoaineen ja laimennusaineen yhdistelmää parantaakseen talteenottoa. Uuttoaineina voidaan käyttää esimerkiksi tributyylifosfaattia (TBP) tai trioktyyliamiinia (TOA).

4.2 Etyleenin karbonylointi

Etyleenin karbonylointi on yksivaiheinen konversio etyleenistä ja hiilimonoksidista propionihapoksi [35,36]. Katalyytteinä voidaan käyttää kalliita alkuaineita, kuten

iridiumia ja palladiumia, mutta näiden käyttö on liian kallista käytettäväksi kaupallisiin sovelluksiin. Katalyyttinä voidaan käyttää myös halvempia Cr-ryhmään perustuvia katalyyttejä, jotka kalliiden katalyyttien tavoin voivat toimia matalassa paineessa ja lämpötilassa. Reaktio tapahtuu veden tai alkoholin ja katalyytin läsnäollessa seuraavan reaktioyhtälön mukaisesti:



4.3 Propionialdehydin hapetus

Propionihappoa valmistetaan hapettamalla propionialdehydiä koboltti- tai mangaani-ionikatalyytin läsnäollessa lämpötilassa 40–50 °C /17/.



4.4 Glyserolin katalyyttinen dehydraatio

Glyserolin dehydraatio on yksivaiheinen reaktio, jossa katalyyttinä on ainakin yksi siirtymämetallia sisältävä yhdiste /17/. Reaktio suoritetaan hapen läsnä ollessa vakioaineessa ja -lämpötilassa. Reaktiolämpötila on yleensä 180–300 °C ja paine 5–4000 Pa.

Propionihappoa tuotetaan myös hapettamalla propionialdehydiä koboltti- tai mangaani-ionien läsnäollessa lämpötilassa 40–50 °C /29/.

5 Voihappo

Voihaposta (butaanihappo $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$) valmistetaan hajusteissa käytettäviä hyväntuoksuisia estereitä sekä muita, lukuisiin käyttökohteisiin soveltuvia johdannaisia /5/. Lisäksi sitä käytetään sellaisenaan mm. nahkateollisuudessa parkitukseen ja kalkinpoistoon. Voihappoa käytetään myös ruoanvalmistuksessa antamaan makua /37,38/.

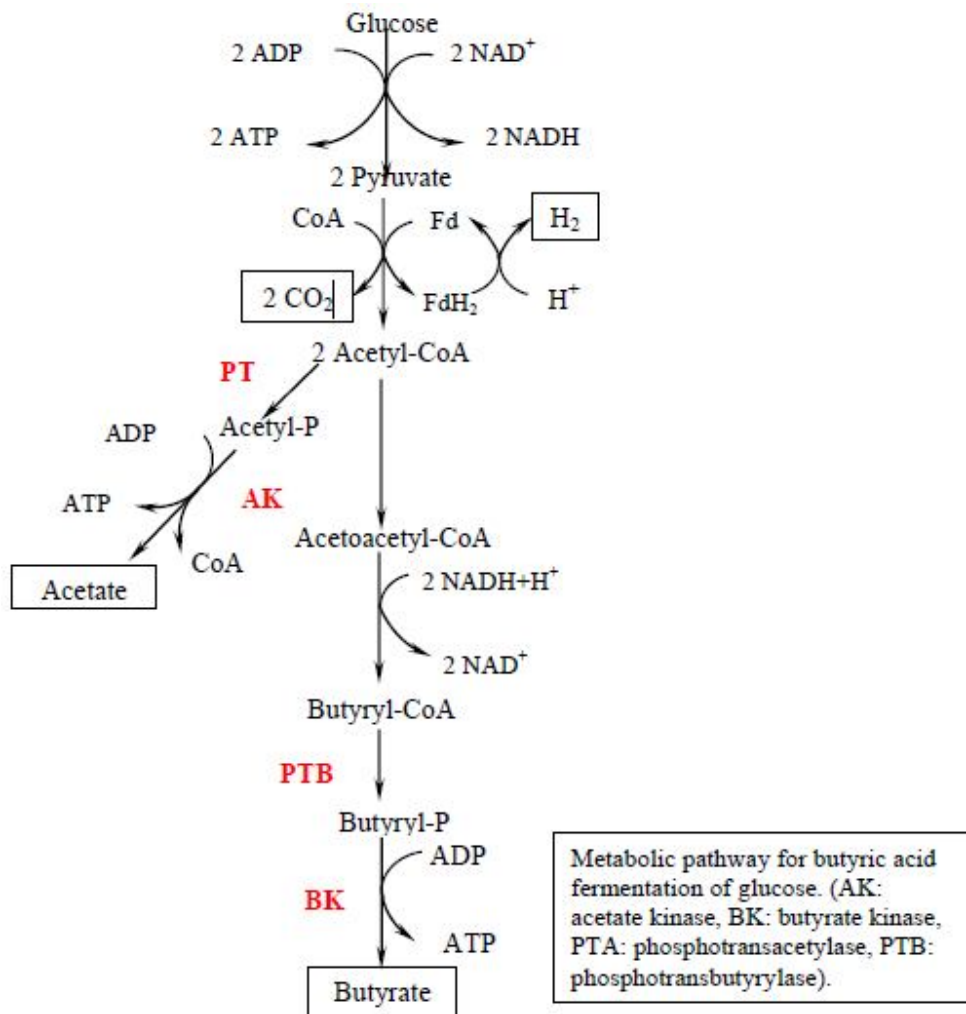
Voihappoa valmistetaan käymisteitse peruna-, maissi- ja riisitärkkelyksestä butaanihappobakteerien avulla /4/. Sitä voidaan valmistaa myös hapettamalla butanaalia /5,39/.

Voihapon tuottaminen uusiutuvista energialähteistä on tullut entistä kiinnostavammaksi vaihtoehtoehdoksi verrattuna öljypohjaisiin kemiallisiin synteeseihin /38,39/. Syynä tähän on yleinen huoli petrokemianteollisuuden ympäristöhaitoista ja kuluttajien kasvava kiinnostus biopohjaisia tuotteita kohtaan. Bioteknologiset voihapon tuotantoprosessit eivät kuitenkaan ole taloudellisesti kannattavia verrattuna kemialliseen tuotantoon /40/. Tämä johtuu alhaisesta saannosta ja lopputuotteen kalliista talteenotto- ja erotusmenetelmistä.

5.1 Fermentointi

Voihappoa tuottavia bakteerikantoja on useita /37,39,41/. Tällaisia ovat esim. *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Butyribacterium*, *Sarcina*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* ja *Megasphaera* -sukuihin kuuluvat anaerobiset mikro-organismit. Hiililähteenä bakteerit voivat käyttää glukoosia, laktoosia, sakkaroosia, tärkkelystä, perunaa, vehnää, selluloosaa tai glukoosia. Kyseiset bakteerit tuottavat voihappoa anaerobisessa prosessissa.

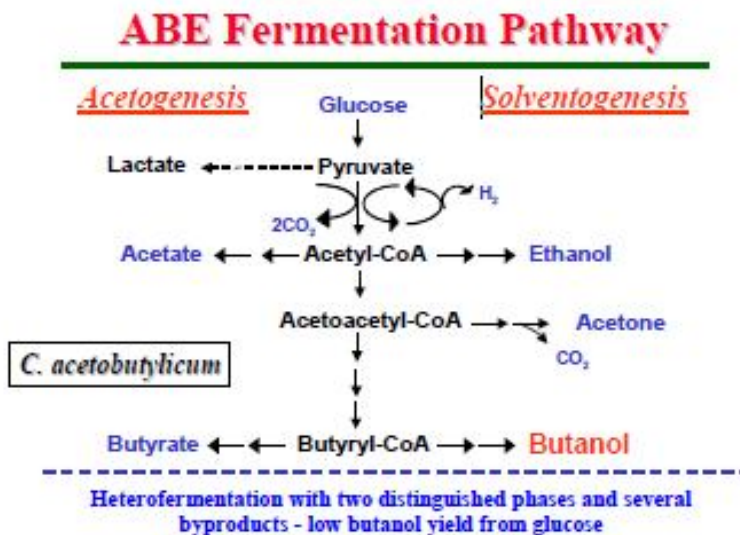
Käytettäessä *Clostridium*-bakteerikantaa glukoosin metaboliareitti tuottaa voihapon lisäksi useita muita yhdisteitä, esim. butyraattia, butanolia, asetaattia ja asetonia (kuva 13) /37,39,42/. Kaksi vastaavaa metaboliareittiä tuottavat asetaattia ja butyraattia asetyyli-CoA:n ja butyryyli-CoA:n toimiessa välituotteina.



Kuva 13. Glukoosin metaboliareitti voihappofermentoinnissa /42/.

Clostridium-kanta on yleisimmin käytetty kanta voihapon tuottamisessa johtuen mm. sen hyvästä tuottavuudesta /39/. Tämä bakteerikanta pystyy hyödyntämään useita sokereita hiilenlähteenään, kuten heksooseja, useita pentooseja sekä oligo- ja polysakkarideja.

Voihappoa voidaan tuottaa biomassasta useilla eri fermentointimenetelmillä /39,41/. Asetoni-butanoli-etanoli(ABE)fermentointi *Clostridium acetobutylicum* -bakteerilla on yksi vanhimmista teollisesti käytetyistä fermentointimenetelmistä /42/. Tyypillisessä ABE-fermentoinnissa tuotetaan ensin etikka-, propioni- ja voihappoa *C. acetobutylicum* -bakteerin avulla, minkä jälkeen hapoista voidaan edelleen tuottaa asetonia, butanolia ja etanolia (kuva 14). *Clostridium*-kannalla on kaksi rinnakkaista metaboliareittiä /39/. Ensimmäinen reitti tuottaa happoja (butyraatti ja asetaatti) ja toinen reitti liuottimia (asetoni ja butanoli). ABE-fermentoinnin saanto on tyypillisesti matala johtuen tuotteiden inhibiitiosta /42/.

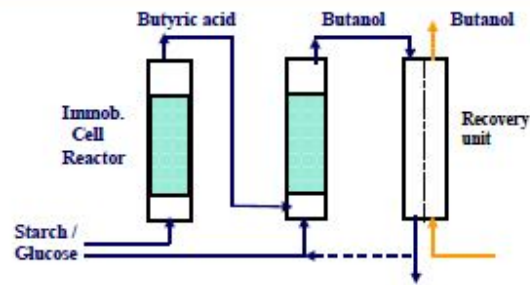


Kuva 14. *C. acetobutylicum* -bakteerin ABE-fermentointireitti /42/.

ABE-fermentoinnin saantoa on yritetty parantaa useilla eri menetelmillä, kuten käyttämällä erilaisia reaktoreita /42/. Myös uuttofermentoinnilla, jossa butanoli poistetaan käymisliemestä paikan päällä, on pystytty parantamaan saantoa jonkin verran. Yksi keino on erottaa hapon (voihappo) ja liuottimen (butanoli) tuotanto, ja käyttää kahta peräkkäistä fermentointia (kuva 15). Ensimmäisessä vaiheessa tuotetaan voihappo käyttämällä *Clostridium tyrobutyricum* -bakteeria. Toisessa fermentointivaiheessa muodostuu butanolia *Clostridium acetobutylicum* -bakteerin

avulla. Tämä kaksivaiheinen prosessi mahdollistaa sen, että molemmat bakteerit voivat toimia omalla optimaalisella lämpötila- ja pH-alueellaan.

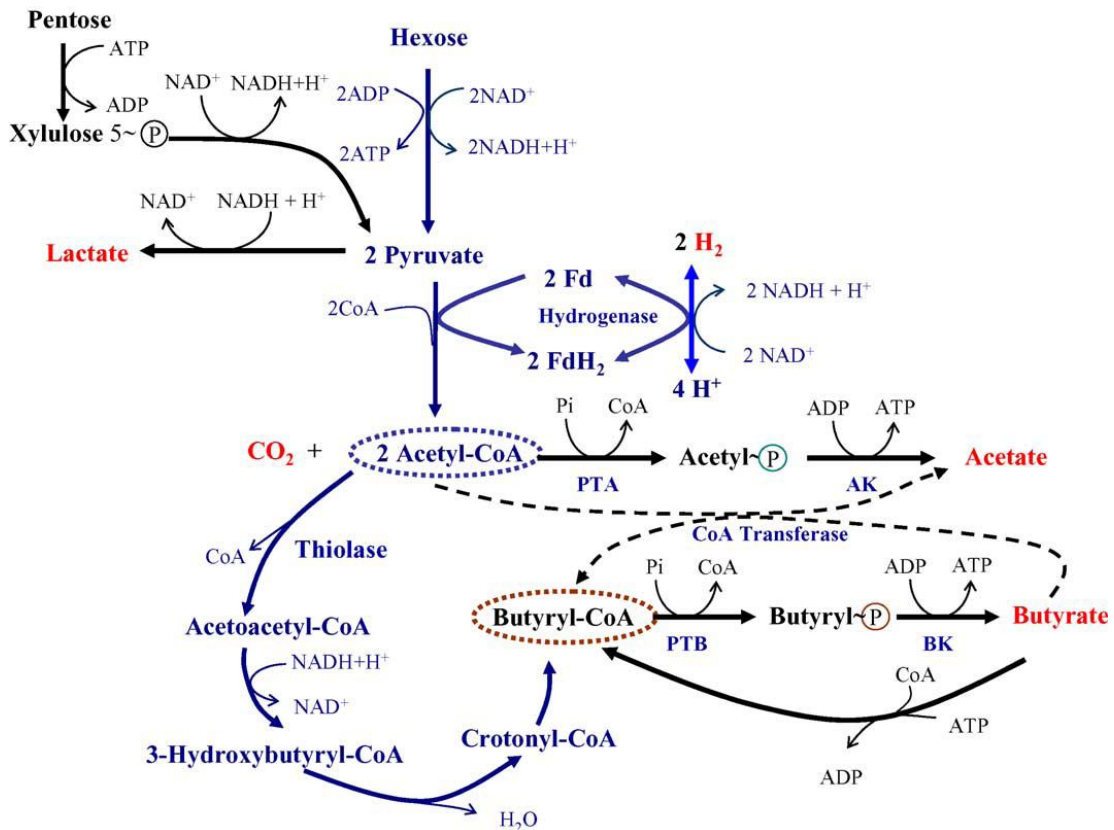
Butanol Production from Starch/Glucose Using a Two-Step Fermentation Process



Kuva 15. Glukoosin kaksivaiheinen fermentointiprosessi butyraatin kautta butanoliksi /42/.

Fermentoinnin ongelmana on usein alhainen saanto, mikä johtuu osaksi voihapon inhibiittoriefektistä /40/. Kyseinen ongelma voidaan ratkaista tehokkaalla erotusmenetelmällä, jossa inhibitiotuote poistetaan sitä mukaa kun sitä muodostuu. Yksi mahdollisesti tehokas erotusmenetelmä on reaktiivinen uutto. Menetelmän tehokkuus riippuu suurelta osin käytettävästä uuttoagentista. Saantoa ja lopputuotteen pitoisuutta voidaan parantaa myös käyttämällä kuitupetireaktoria (FBB) /41/. Lisäksi yksi tapa on käyttää kaikki hiilihydraatit voihapon tuottamiseen ja eliminoida kaikki muut prosessissa syntyvät sivutuotteet /38/.

Kuten etikka- ja propionihapon kohdalla, myös voihapon saantoa voidaan parantaa käyttämällä mutanteja /38,42/. *C. tyrobutyricum* -kannasta on kehitetty kaksi mutanttia, joista toisesta on inaktivoitu asetaattikinaasi-geeni (*ack*) ja toisesta fosfotransasetylaasi-geeni (*pta*). Näiden geenien inaktivointi muuttaa asetaatin muodostumisreaktiota ja johtaa siten parempaan voihapon saantoon. Myös bakteerin sietokyky butyraattia kohtaan on parempi ja näin ollen inhibiitioefekti vähäisempi /42/. Kuvassa 16 on esitetty *Clostridium tyrobutyricum* -kannan metaboliareitti /38/.



Kuva 16. *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 -kannan metaboliareitti /38/.

5.2 Butanaalin hapetus

Butanolin hapetuksessa muodostuu butanaalia, josta edelleen voidaan valmistaa voi happoa syöttämällä ilmaa tai happea butanaalin läpi katalyytin läsnä ollessa seuraavan reaktioyhtälön mukaisesti /43/:

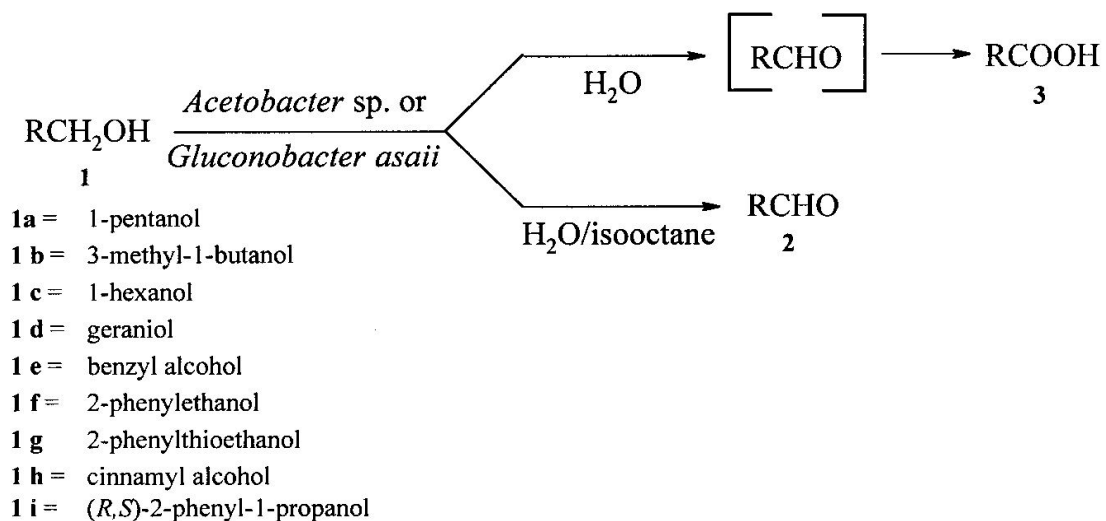


Prosessi on hyvin hidas ja butanaalin häviö on merkittävä. Tämän vuoksi se ei sovellu kaupalliseen tarkoitukseen sellaisenaan /43/.

5.3 Alkoolien biotransformaatio

Alkoolien biotransformaatio muodostaa yhden tavan tuottaa orgaanisia happoja /39/. Eräs ensimmäisistä yrityksistä tuottaa voi happoa tällä menetelmällä oli butanolin hapetus käyttämällä *Gluconobacter*- ja *Acetobacter*-bakteerikantoja. Samoja kantoja käytettiin myös propionihapon tuottamiseen. *Acetobacter aceti* -bakteeria hyödynnettiin myöhemmin useiden primaaristen alkoholien hapetuksessa orgaanisiksi hapoiksi. Lisäksi useilla hiivakannoilla, kuten *Saccharomyces*-, *Hansenula*-, *Pichia*-, *Candida*- ja *Kluyveromyces* -sukujen hiivoilla, on mahdollista tuottaa orgaanisia happoja alkoholeja hapettamalla.

Gandolfi *et al.* /44/ tekemässä tutkimuksessa erilaisia alkoholeja hapetettiin sekä vedellä että veden ja iso-oktaanin seoksella (kuva 17). Bakteerikantoina käytettiin *Acetobacter*-suvun bakteereita ja *Gluconobacter asaii* -bakteeria.



Kuva 17. Alkoolien hapetus vedellä sekä veden ja iso-oktaanin seoksella /44/.

Molemmilla bakteerikannoilla saavutettiin korkea saanto, ja menetelmä vaikuttaakin lupaavalta erilaisten happojen tuottamiseen /44/.

6 Yhteenveto

Karboksyylihappoja voidaan tuottaa lukuisilla eri menetelmillä. Aiemmin niiden valmistus perustui pääosin petrokemian prosesseihin uusiutumattomista raaka-aineista. Viimeaikainen kehitys bioteknologiassa on kuitenkin mahdollistanut uusien entistä tehokkaampien menetelmien kehittämisen, joissa kyseisiä happoja tuotetaan ympäristöystävällisesti uusiutuvista energialähteistä käymisteitse.

Muurahaishappo on yksinkertaisin karboksyylihappo, jota käytetään mm. säilörehuluiuksen valmistuksessa, paperin ja tekstiilien värjäyksessä, märkälujahartsin valmistuksessa, nahan käsittelyssä ja lääkeainesynteesissä. Teollisesti muurahaishappoa muodostuu sivutuotteena etaanihapon valmistuksessa, mihin sen ensisijainen valmistus perustuu. Muurahaishappoa voidaan tuottaa myös esimerkiksi metyyliformiaatin hydrolyysillä, hiilidioksidin hydrogenaatiolla tai antamalla rikkihapon ja veden reagoida formamidin kanssa.

Etikkahappo on tärkeä teollisuuden raaka-aine, jota käytetään mm. etikkahappoanhydridin, asetaattiestereiden, selluloosa-asetaiin, vinyliasetattimonomeerin, peretikkahapon ja monokloorietikkahapon valmistukseen. Sitä käytetään myös muovien, lääkeräaka-aineiden, väriaineiden, hyönteismyrkkyjen, elintarvikelisiäaineiden, valokuvauskemikaalien ja lateksin kovettimien tuotantoprosesseissa ja apuaineena tekstiiliteollisuudessa. Suomessa etikkahappoa käytetään monokloorietikkahapon ja edelleen CMC:n valmistukseen. Etikkahappoa tuotetaan lähinnä öljystä ja maakaasusta joko metanolin karbonyloinnilla tai asetaldehydinin hapetuksella. Etikkahappoa voidaan myös tuottaa aerobisesti etanolin käymisreaktiolla. Etikkahapon tuottaminen fermentoimalla on herättänyt tutkijoissa suurta kiinnostusta sen taloudellisten mahdollisuuksien vuoksi. Fermentointiprosessissa käytetään hyväksi erilaisia mikro-organismeja, kuten hiivoja ja bakteereita. Kyseiset mikro-organismit hyödyntävät orgaanisen aineksen käymisprosessissa, jonka lopputuotteena saadaan erilaisia orgaanisia happoja. Biomassan hiilihydraattien hyödyntäminen fermentointiprosessissa pilkkomalla hiilihydraatit ensin monosakkarideiksi tapahtuu happohydrolyysin tai

entsyymikäsitteilyn avulla. Kyseisillä käsittelyillä biomassassa oleva hiilihydraattiaines pilkotaan siten käymiskykyisiksi sokereiksi, joita bakteerit hyödyntävät varsinaisessa käymisprosessissa. Happohydrolyysin huonoina puolina ovat kuitenkin alhainen glukoosin saanto ja laitteistojen korrosio. Entsymaattisella käsittelyllä voidaan saavuttaa entistä parempi saanto, mutta ongelmana on menetelmän kalleus. Perinteisen fermentoinnin ongelmana on kuitenkin usein alhainen saanto, mikä johtuu pääosin talteenoton vaikeudesta ja lopputuotteiden inhibiitiosta. Myös laitteistojen korrosio aiheuttaa ongelmia. Kyseisiin ongelmiin on yritetty löytää ratkaisua mm. kehittämällä geenimuunneltuja bakteerikantoja, jotka kestävät paremmin korkeaa happopitoisuutta sekä kehittämällä tehokkaampia talteenottomenetelmiä.

Propionihappoa käytetään kasvimyrkyissä, parfyymeissä, lääkealan sovelluksissa sekä rehuviljan säilöntään. Siitä valmistetaan myös farmaseuttisia tuotteita, kuten ihonhoitoaineita. Samoin propionihappoa ja sen suoloja käytetään laajalti elintarviketeollisuudessa. Propionihappoa valmistetaan lähes yksinomaan petrokemian prosessien kautta. Öljyn hinnan nousu on kuitenkin lisännyt teollisuuden kiinnostusta propionihapon valmistukseen uusiutuvista raaka-aineista. Propionihappoa voidaan valmistaa etyleenin karbonyloinnilla, propionaldehydin hapetuksella, glyserolin katalyyttisellä dehydraatiolla sekä fermentoimalla. Propionihappofermentoinnin ongelmana on usein alhainen saanto ja väkevyys. Tämä johtuu mm. bakteerien hitaasta kasvusta, voimakkaasta lopputuotteiden inhibiitiosta sekä talteenoton vaikeuksista. Geenitekniikan kehitys on mahdollistanut geenimuunneltujen bakteerikantojen kehittämisen, mikä parantaa fermentointia.

Voihaposta valmistetaan hajusteissa käytettäviä hyvätuoksuisia estereitä sekä muita eri käyttökohteisiin soveltuvia johdannaisia. Lisäksi sitä käytetään sellaisenaan nahkateollisuudessa, kalkinpoistossa ja ruoanvalmistuksessa. Kuten etikka- ja propionihappoa voihaposta valmistetaan käymisteitse bakteerien avulla. Sitä voidaan valmistaa myös hapettamalla butanaalia. Myös voihaapon valmistus uusiutuvista energialähteistä on tullut kiinnostavammaksi verrattuna öljypohjaisiin synteeseihin. Bioteknologiset tuotantoprosessit eivät kuitenkaan ole vielä taloudellisesti kannattavia

verrattuna kemialliseen tuotantoon. Syinä tähän ovat alhainen saanto ja kallis lopputuotteen talteenotto- ja erotusmenetelmä. Fermentoinnin saantoa on yritetty parantaa mm. käyttämällä kahta peräkkäistä fermentointia, tehostamalla erotusmenetelmiä sekä kehittämällä bakteerimutanteja.

Kirjallisuusviiteluettelo

1. Napari, P., *Orgaaninen kemia*, Oy Edita Ab, Helsinki, 2001.
2. Huang, Y.H., Wu, Z., Zhang, L., Cheung, C.M. ja Yang, S.-T., Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor, *Biores. Technol.*, 82 (2002) 51–59.
3. Quitain, A., Faisal, M., Kang, K., Daimon, H. ja Fujie, K., Low-molecular-weight carboxylic acids produced from hydrothermal treatment of organic wastes, *J. Hazard. Mater. B*, 93 (2002) 209–220.
4. Anon., OVA-ohje: Muurahaishappo, <http://www.ttl.fi/ova/muurhapp.html>, (luettu 7.4.2012).
5. Alén, R., *Kokoelma orgaanisia yhdisteitä – ominaisuudet ja käyttökohteet*, Consalen Consulting, Helsinki, 2009.
6. Wei, X., Ye, L. ja Yuan, Y., Low temperature catalytic conversion of methane to formic acid by simple vanadium compound with use of H₂O₂, *J. Natur. Gas Chem.*, 18 (2009) 295–299.
7. Hladiy, S., Starchevskyy, M., Pazderskyy, Y. ja Lastovyak, Y., Method for production of formic acid, *United States Patent*, US 6,713,649 B1, Mar 30., 2004.
8. Hao, C., Wang, S., Li, M., Kang, L. ja Ma, X., Hydrogenation of CO₂ to formic acid on supported ruthenium catalysts, *Catal. Today*, 160 (2011) 184–190.
9. Lau, C. ja Chen, Y., Hydrogenation of carbon dioxide to formic acid using a 6,6'-dichloro-2,2'-bipyridine complex of ruthenium, *cis*-[Ru(6,6'-Cl₂bpy)₂(H₂O)₂](CF₃SO₃)₂, *J. Mol. Catal. A: Chemical*, 101 (1995) 33–36.
10. Jessop, P., Joó, F. ja Tai, C.-C., Recent advances in the homogenous hydrogenation of carbon dioxide, *Coord. Chem. Rev.*, 248 (2004) 2425–2442.
11. Speer, W. ja Weiss, H., Production of formic acid, *United States Patent Office*, 2,196,156, Apr 2., 1940.
12. Anon., OVA-ohje: etikkahappo, <http://www.ttl.fi/ova/etikkah.html>, (luettu 7.4.2012).

13. Yoneda, N., Kusano, S., Yasui, M., Pujado, P ja Wilcher, S., Recent advances in processes and catalysts for the production of acetic acid, *Appl. Catal. A*, 221 (2001) 253–265.
14. Sim, J.H. ja Kamaruddin, A.H., Optimization of acetic acid production from synthesis gas by chemolithotrophic bacterium – *Clostridium aceticum* using statistical approach, *Biores. Technol.*, 99 (2008) 2724–2735.
15. Christen, P., Domenech, F., Páca, J. ja Revah, S., Evaluation of four *Candida utilis* strains for biomass, acetic acid and ethyl acetate production from ethanol, *Biores. Technol.*, 68 (1999) 193–195.
16. Ravinder, T., Ramesh, B., Seenayya, G. ja Reddy, G., Fermentative production of acetic acid from various pure and natural cellulosic materials by *Clostridium lentocellum* SG6, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16 (2000) 507–512.
17. Sengun, I. ja Karabiyikli, S., Importance of acetic acid bacteria in food industry, *Food Contr.*, 22 (2011) 647–656.
18. Ravinder, T., Swamy, M.V., Seenayya, G. ja Reddy, G., *Clostridium lentocellum* SG6 – a potential organism for fermentation of cellulose to acetic acid, *Biores. Technol.*, 80 (2001) 171–177.
19. Goto, H. ja Nakano, S., Gene participating in acetic acid tolerance, acetic acid bacteria bred using the gene, and process for producing vinegar with the use of the acetic acid bacterium, *United States Patent Application Publication*, US 2006/0154351, Jul 13., 2006.
20. Zhang, S., Guo, C., Qian, Q. ja Yuan, G., Synthesis of acetic acid and acetic acid anhydride from methanol carbonylation with polymer supported rhodium catalyst, *Catal. Commun.*, 9 (2008) 853–858.
21. Williams, B., Iridium-catalyzed carbonylation process for the production of acetic acid, *United States Patent*, 6,140,535, Oct 31., 2000.
22. Jin, F., Zhou, Z., Moriya, T., Kishida, H., Higashijima, H. ja Enomoto, H., Controlling hydrothermal reaction pathways to improve acetic acid production from carbohydrate biomass, *Environ. Sci. Technol.*, 39 (2005) 1893–1902.

23. Jin, F., Zhou, Z., Kishita, A., Enomoto, H., Kishida, H. ja Moriya, T., A new hydrothermal process for producing acetic acid from biomass waste, *Chem. Eng. Res Des.*, 85 (2007) 201–206.
24. McFarlan, A., Production of acetic acid from methane, *United States Patent*, 5,659,077, Aug 19., 1997.
25. Zhang, A. ja Yang, S.-T., Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*, *Process Biochem.*, 44 (2009) 1346–1351.
26. Zhu, Y., Li, J., Tan, M., Liu, L., Jiang, L., Sun, J., Lee, P., Du, G. ja Chen, J., Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source, *Biores. Technol.*, 101 (2010) 8902–8906.
27. Suwannakham, S., Huang, Y. ja Yang, S., Construction and characterization of *ack* knock-out mutants of *Propionibacterium acidipropionici* for enhanced propionic acid fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, 94 (2006) 383–395.
28. Zhang, A. ja Yang, S., Engineering *Propionibacterium acidipropionici* for enhanced propionic acid tolerance and fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, 104 (2009) 766–773.
29. Gu, Z., Glatz, B. ja Glatz, C., Effects of propionic acid on propinobacteria fermentation, *Enzyme Microb. Technol.*, 22 (1998) 13–18.
30. Quesada-Chanto, A., Afschar, A. ja Wagner, F., Optimization of a *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilizing sucrose, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42 (1994) 16–21.
31. Solichien, M., O'Brien, D., Hammond, E. ja Glatz, C., Membrane-based extractive fermentation to produce propionic and acetic acids: toxicity and mass transfer considerations, *Enzyme Microb. Technol.*, 17 (1995) 23–31.
32. Goswami, V. ja Srivastava, A.K., Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*, *Biochem. Eng. J.*, 4 (2000) 121–128.
33. Woskow, S. ja Glatz, B., Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semicontinuous fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (1991) 2821–2828.

34. Keshav, A., Wasewar, K. ja Chand, S., Recovery of propionic acid from an aqueous stream by reactive extraction: effects of diluents, *Desalination*, 244 (2009) 12–23.
35. Zoeller, J., Blakely, E., Moncier, R. ja Dickson, T., Molybdenum catalyzed carbonylation of ethylene to propionic acid and anhydride, *Catal. Today*, 36 (1997) 227–241.
36. Pearson, J. ja Hadden, R., Process for carbonylation of ethylene, *United States Patent*, US 6,284,919 B1, Sep 4., 2001.
37. Zigová, J., Šturdík, E., Vandák, D. ja Schlosser, Š., Butyric acid production by *Clostridium butyrium* with integrated extraction and pertraction, *Process Biochem.*, 34 (1999) 835–843.
38. Liu, X., Zhu, Y. ja Yang, S., Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants, *Enzyme Microb. Technol.*, 38 (2006) 521–528.
39. Zigová, J. ja Šturdík, E., Advances in biotechnological production of butyric acid, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 24 (2000) 153–160.
40. Vandák, D., Zigová, J., Šturdík, E. ja Schlosser S., Evaluation of solvent and pH for extractive fermentation of butyric acid, *Process Biochem.*, 32 (1997) 245–251.
41. Zhu, Y., Wu, Z. ja Yang, S., Butyric acid production from acid hydrolysate of corn fibre by *Clostridium tyrobutyricum* in a fibrous-bed bioreactor, *Process Biochem.*, 38 (2002) 657–666.
42. Ramey, D. ja Yang, S., Production of butyric acid and butanol from biomass, Final report, U.S. Department of Energy, 2004, 103 s.
43. Hancock, C., Manufacture of normal butyric acid from butyl aldehyde, *United States Patent Office*, 1,580,137, Apr. 13, 1926.
44. Gandolfi, R., Ferrara, N. ja Molinari, F., An easy and efficient method for the production of carboxylic acids and aldehydes by microbiological oxidation of primary alcohols, *Tetrahedron Lett.*, 42 (2001) 513–514.