

Mikrobiálna biotechnológia kyseliny citrónovej

Ing. Lukáš Hleba, PhD.

Organické kyseliny vyrábané mikrobiálnymi biotechnológiami

- ▶ Hlavné organické kyseliny: kyselina citrónová, kyselina mliečna, L-askorbová kyselina, glukónová kyselina
- ▶ Vyrábané za pomoci:
 - a., anaeróbných mikroorganizmov - formovanie je naviazané na ich rast (s rastom asociovaná produkcia)
 - b., aeróbných baktérií a húb - akumulácia organických kyselín je výsledkom nekompletne oxidovaného substrátu a často je vyvolaná nevyrovnanosťou niektorých esenciálnych živín, napr. minerálnych iónov
- ▶ Z toho vyplýva: že tu existujú veľké rozdiely vo fyziologických predpokladoch formovania týchto organických kyselín

Príklady biotechnologických procesov pri výrobe niektorých org. kyselín

Organické kyseliny	Organizmus	Komerčná produkcia	Substrát	Proces	Výt'azok	použitie
Kyselina fumárová	<i>Rhizopus sp.</i> , <i>Candida</i>	Áno	Glukóza	3 dni pri 33 °C	65 %	Živice
			n-alkány	7 dní pri 30 °C	84 %	
Kys. propiónová	<i>Propionibacterium</i>	Áno	Laktóza, glukóza, škrob	8-12 dní pri 30 °C	60 %	Parfémy a fungicíd
Kys. Malová	<i>Leuconostoc brevis</i> , <i>Candida</i>	Nie	Fumárová kyselina a n-alkány	24 hodín	99 %	Potraviny
					72 %	
α -ketoglutárová kyselina	<i>Candida</i> , <i>Aerobacter</i>	Nie	N-alkány a glutámová kyselina	40 hodín	67 % 46 %	
5-ketoglukónová kyselina	<i>Acetobacter suboxydans</i>	Áno	Glukóza	5-6 dní	85 %	L-tartariková kyselina
2-keto glukónová	<i>Serratia marcescens</i>	Áno	Glukóza	16 hodín	95-100 %	Izoaskorbová kyselina

Kyselina citrónová

- ▶ Komerčne vyrábaná pomocou submerznej fermentácie zo sacharózy alebo melasy
- ▶ Používa sa *Aspergillus niger*
- ▶ Alebo sa vyrába synteticky z acetónu alebo glycerolu
- ▶ Syntetická metóda je nevýhodná - drahšia a hazardná - hazard predstavujú vstupné látky a nadmerné množstvo reakčných krokov vedúcich k malému výťažku

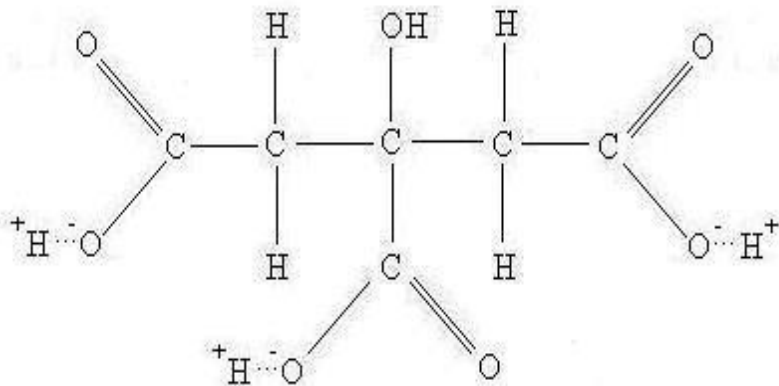
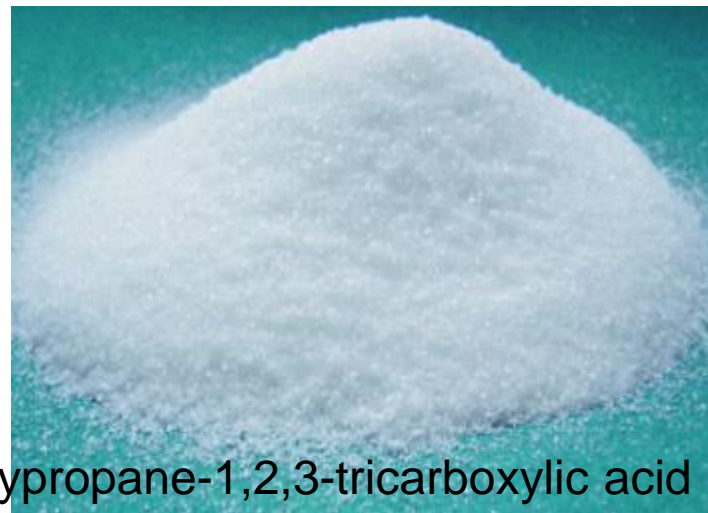


Fig - Citric Acid (C₆H₈O₇) - a two



2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid

Aplikácia kyseliny citrónovej

- ▶ Je produkovaná v bezvodnej forme (kryštalizáciou z horúceho vodného roztoku) alebo ako monohydrát (kryštalizáciou pri teplote nižšej ako 36,6 °C)
- ▶ V potravinárstve:
 - a., dominantné použitie má ako ochucovadlo a ako konzervačná látka v potravinárstve a nápojoch
 - b., soli kyseliny citrónovej sa používajú ako nosič minerálov v biologicky dostupnej forme v mnohých prídavných látkach
- ▶ Vo farmaceutike:
 - a., v použití so sódou bikarbónou (bikarbonát sodný) v šumivých tabletách a práškoch, ako príklad v antacide alebo rozpustnom aspiríne

Aplikácia kyseliny citrónovej

- ▶ Čistenie a ako chelačné činidlo

a., je excelentné chelačné činidlo viažuce kovy. Používa sa na odstraňovanie vodného kameňa z bojlerov evaporátorov

b., zmäkčovač vody, ktorý sa plne používa v mydlách a pracích prostriedkoch. Prostredníctvom chelatačných kovov v tvrdej vode umožňuje čistiacim prostriedkom produkovať penu a lepšie pracovať aj bez zmäkčovania vody

c., aktívna ingrediencia v niektorých čistiacich prostriedkoch

- ▶ Plasty

a., estery kyseliny citrónovej, najmä trietyl, tributyl a acetyltributyl estery sa používajú ako netoxické zmäkčovadlá plastov na ochranu potravín.

Aeróbna respirácia glukózy

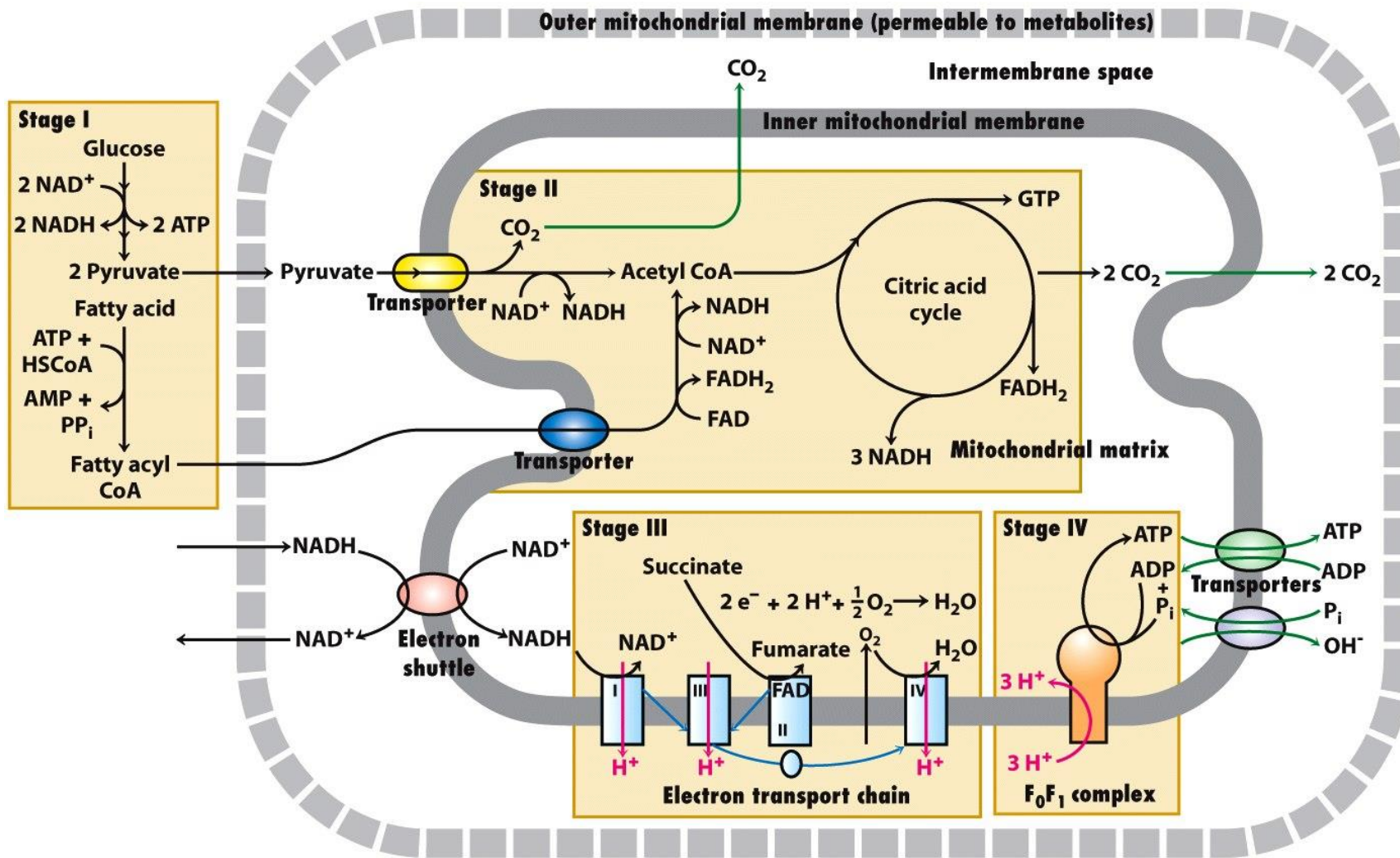
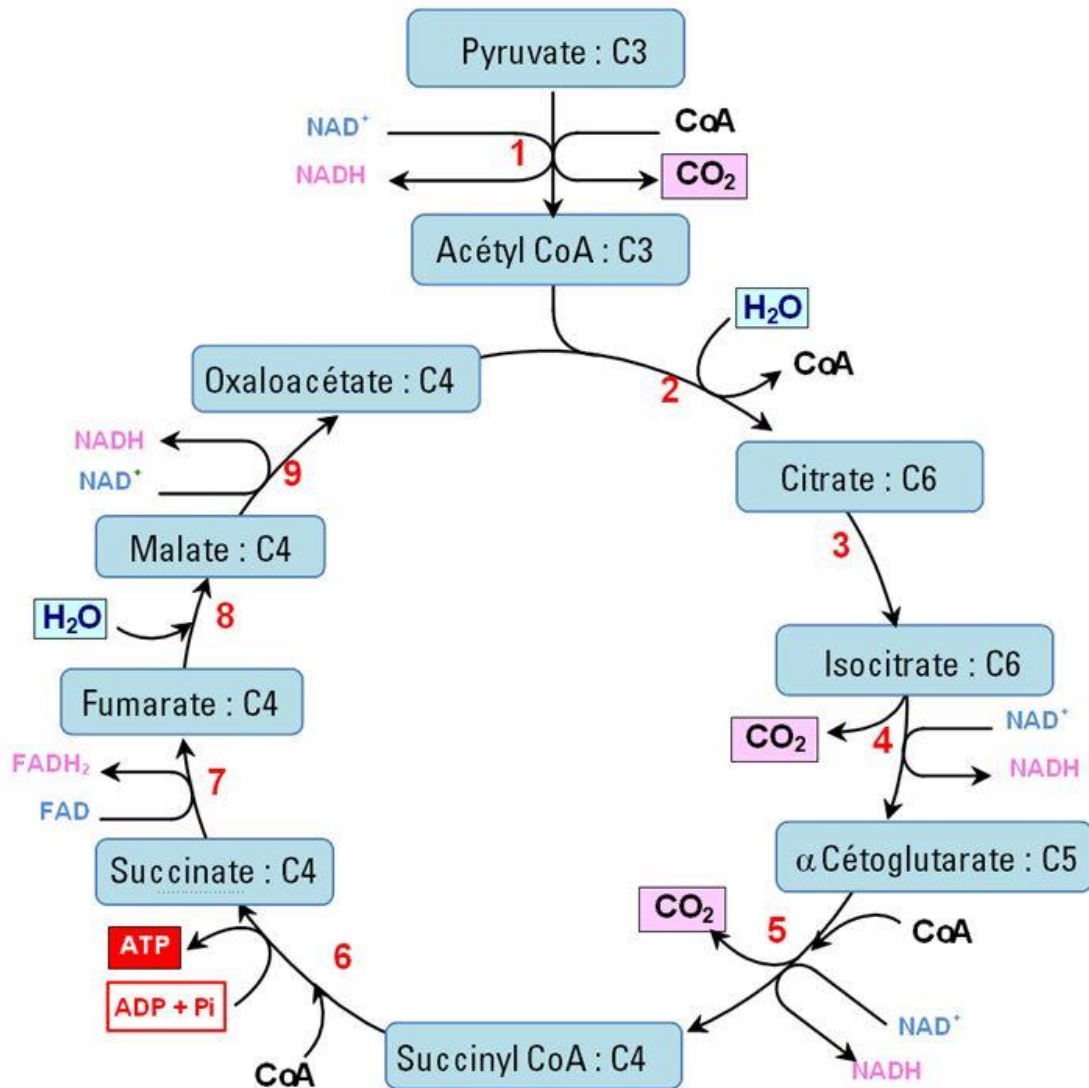


Figure 12-8
 Molecular Cell Biology, Sixth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

Krebsov cyklus = cyklus kys.citrónovej



1. Pyruvát dehydrogenáza
2. Citrát syntetáza
3. Akonitáza
4. Isocitrát dehydrogenáza
5. Alfa-ketoglutarát dehydrogenáza
6. Sukcinyl-CoA syntetáza
7. Sukcinát dehydrogenáza
8. Fumaráza
9. Malát dehydrogenáza

NAD^+ : nikotín adenín dinekluotid
 FAD : flavín adenín dinukleotid
 GDP : guanozín 5' -difosfát
 GTP : guanozín 5' -trifosfát
 HS-CoA : koenzým A

Microorganizmy

- ▶ Mnohé mikroorganizmy sú producentami kyseliny citrónovej

Baktérie: *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *Corynebacterium* sp.,

Huby: *Aspergillus niger*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *Penicillium restrictum*

Kvasinky: *Candida lipolytica*, *C. intermedia*, *Saccharomyces cerevisiae*

Na komerčnú produkciu bol zvolený *A. niger* ako zástupca mikroskopických húb pre jeho jednoduchú manipuláciu, schopnosť fermentovať rôzne lacné substráty s vysokým výťažkom kyseliny citrónovej

Médiá

- ▶ Ako zdroj C,H,O môže byť škrob, škrobový hydrolyzát, trstinová šťava, glukóza, sacharóza alebo melasa ---- sacharóza je najčastejšie používaný zdroj uhlíka, za ňou nasledujú glukóza, fruktóza a galaktóza
- ▶ Ako zdroj dusíka: amónne soli ako preferované zdroje, rovnako močovina, síran amónny, chlorid amónny, peptón, sladinový extrakt a iné
- ▶ Ako zdroj minerálov: zinok, mangán, železo, meď a horčík podporujú tvorbu kyseliny citrónovej. Dihydrogén fosforečnan draselný je najvhodnejší zdroj fosforu.
- ▶ Rast *Aspergillus niger* vo vysokých koncentráciách cukrov a nízkej koncentrácii Fe^{3+} a Mn^{2+} dáva vysoké výtťažky kyseliny citrónovej

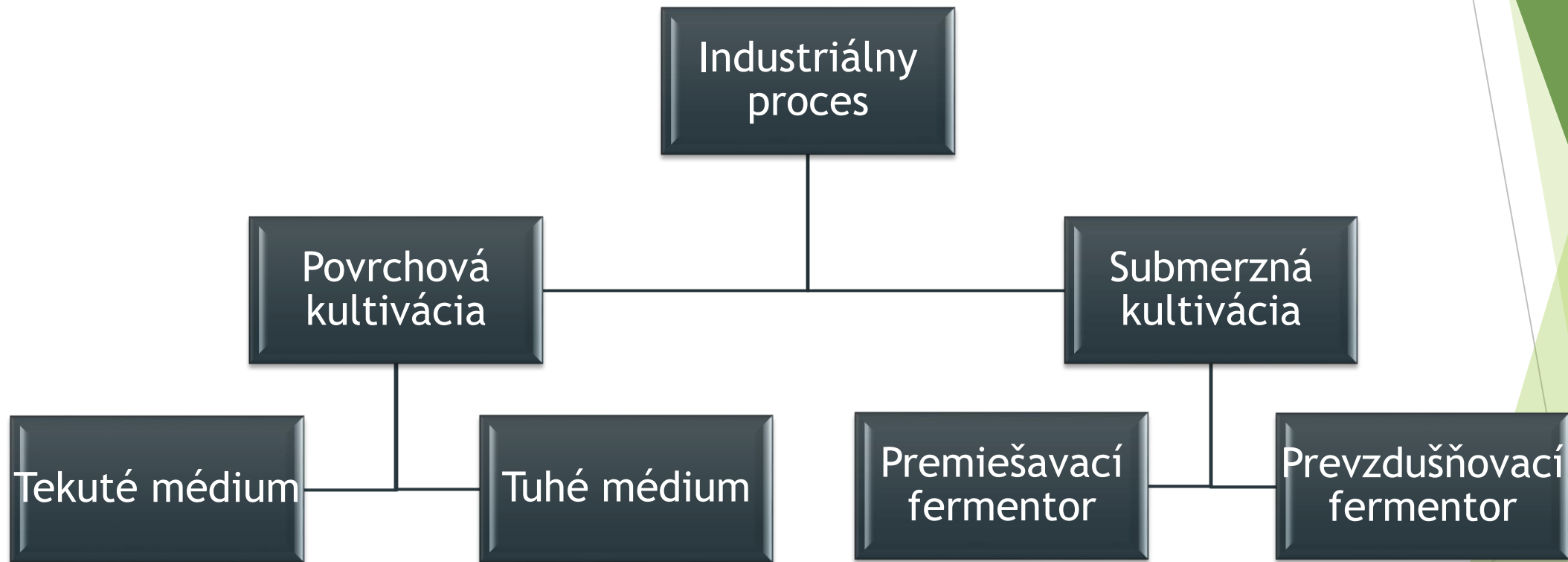
pH

- ▶ Nízke počiatkové pH má výhodu v kontrole kontaminácie a inhibuje tvorbu kyseliny šťaveľovej
- ▶ pH 2,2 je optimálne pre rast *A. niger* a výrobu kyseliny citrónovej
- ▶ pH okolo 5,4 a 6,0-6,5 bolo zistené ako najvhodnejšie pre produkciu kyseliny citrónovej vyrábanej z melasy

Prevzdušňovanie - aerácia

- ▶ Vytváraní aerácie média - zvyšujeme výťažok a redukujeme fermentačný čas
- ▶ Je dôležité udržiavať hladinu kyslíku na koncentrácii 25 % nasýtenia
- ▶ Jeho prerušenie je škodlivé - niekedy s veľkými stratami
- ▶ Aerácia prebieha počas celej fermentácie rovnakou intenzitou

Industriálna výroba



Fermentácia v tekutom médiu (Submerzná fermentácia = SmF)

- ▶ Najviac používaná technika na výrobu kyseliny citrónovej
- ▶ Je dobre preštudovaná a vyrába sa pomocou nej viac ako 80 % kys. citrónovej na svete

Výhody:

- Vysoký výťažok a produktivita, nízke laboratórne náklady sú hlavné dôvody
- ▶ Existujú dva typy fermentorov:
 1. Fermentor s premiešavaním
 2. Vežový fermentor

Média využívané na submerznú kultiváciu

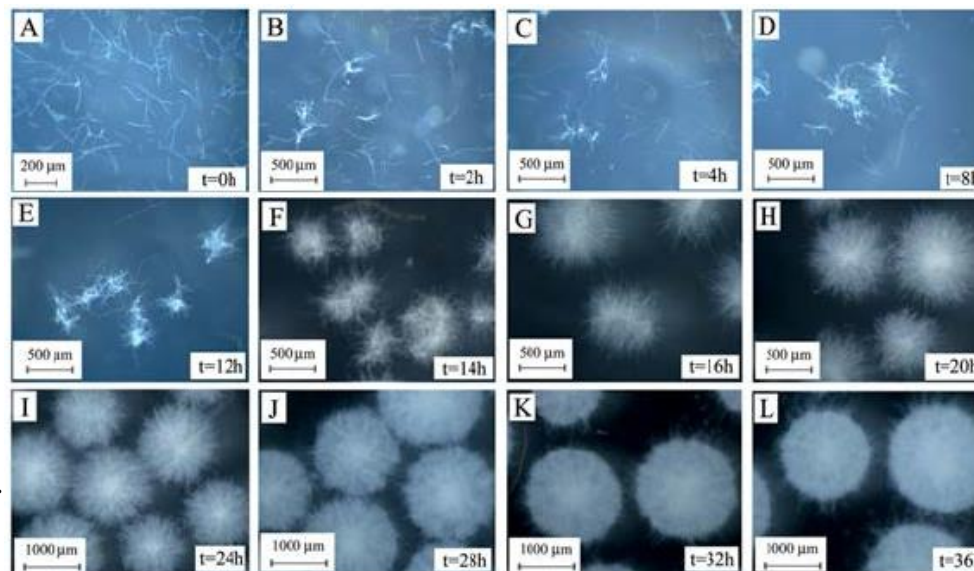
Surový materiál	Druh MO	Množstvo kys. citrónovej	Výt'azok v %
Odbad pri výrobe piva	<i>A. Niger</i> ATTC 9142	19g/L	78,5
Repná melasa	<i>A. Niger</i> ATTC 9142	109g/L	-
Trstinová melasa	<i>A. Niger</i> T 55	-	65
Hemicelulóza z dreva	<i>A niger</i> IMI-41874	27g/L	45
Datľový sirup	<i>A. Niger</i> ATTC 9142	-	41
Kukuričný škrob	<i>A. Niger</i> IM-155	-	62
Škrobový hydrolyzát	<i>Y. Lipolytica</i> DS-1	-	-
Repkový olej	<i>Y. Lipolytica</i> A-101	-	75
Sojový olej	<i>Y. Lipolytica</i> A-101	-	57
Kokosový olej	<i>C. Lipolytica</i> N-5704	-	63
Palmový olej	<i>C. Lipolytica</i> N-5704	-	99,6
Olivový olej	<i>C. Lipolytica</i> N-5704	-	155
Sojový olej	<i>C. Lipolytica</i> N-5704	-	115
Glycerol	<i>C. Lipolytica</i> N-5704	-	58,8
N-Parafín	<i>C. Lipolytica</i> N-5704	-	161

Inokulum

- ▶ Ako inokulum slúži suspenzia spór alebo pred kultivované mycélium
- ▶ Spóry sú produkované počas 10-14 dní pri 25 °C v sklenených fľašiach na tuhých živných pôdach
- ▶ Ak ako inokulum používame spóry, je potrebné použitie povrchovo aktívnych látok na rovnomernú disperziu spór v médiu
- ▶ Pri použití predkultivovaného mycélia je potrebné dodržať pravidlo, aspoň 10 % inokula musí byť na čerstvé médium
- ▶ Submerzná fermentácia za normálnych okolností končí po 5 - 10 dňoch, závisí od podmienok

Morfológia mycélia pri submerznej kultivácii

- ▶ Rast *A. niger* pri submerznej kultivácii je rozhodujúci, správny tvar mycélia sú agregáty v tvare malých sférických peliet - vločiek.
- ▶ Myceliarne pelety by mali byť okolo 0,2 - 0,5 mm veľké v tvrdom povrchom
- ▶ Tento stav je spôsobený nedostatkom mangánu v médiu alebo zjavným prírastkom feroxyanidových iónov.

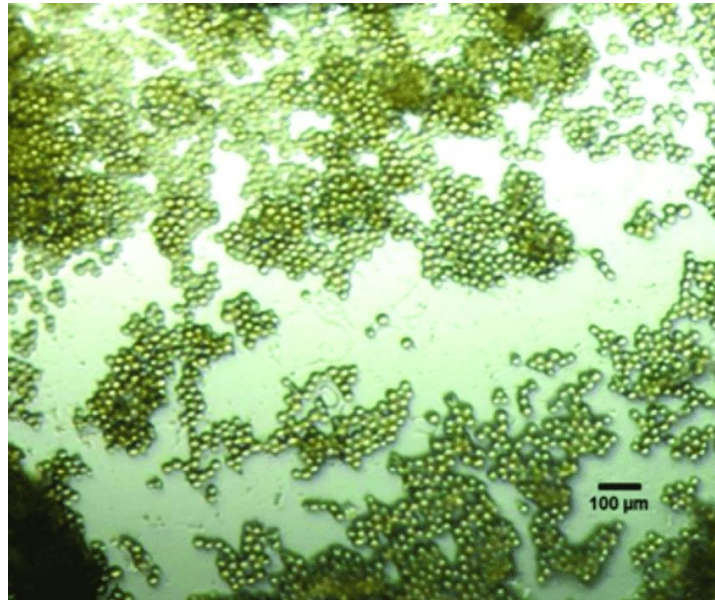


Mycelial pellet formation of marine-derived fungus: new formation pathway directly from hyphae. 2015. Tao Lu, Qi-Lei Zhang, Shan-Jing Yao. Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology

Použitie suspenzie spór ako inokula

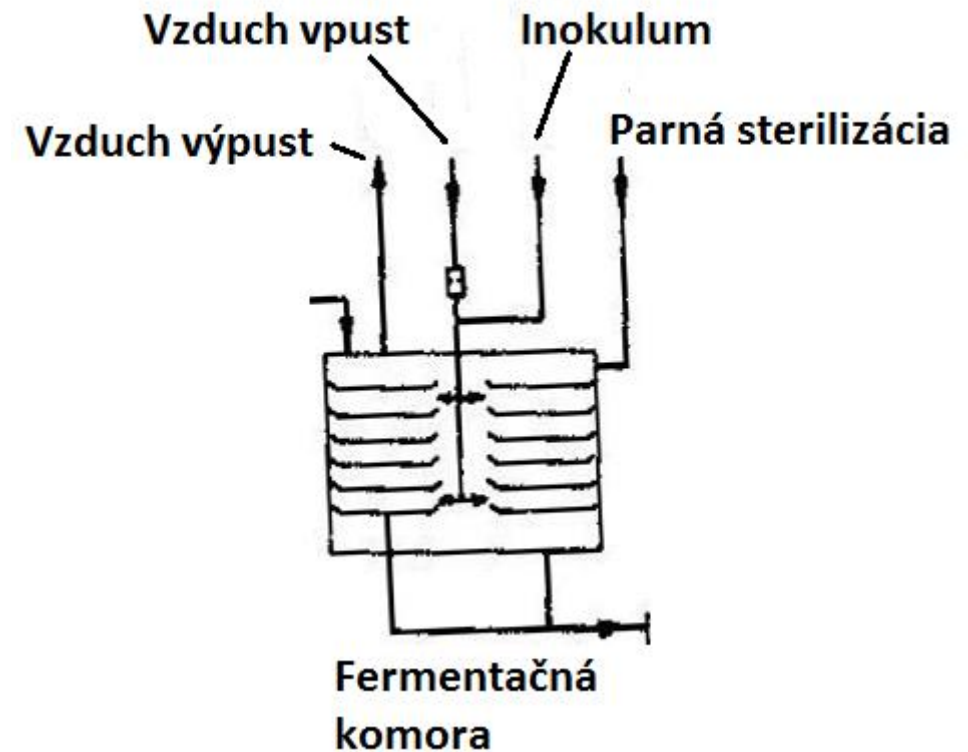
- ▶ Ak sa použije spórová suspenzia, ktorá je obvykle kultivovaná na tuhom médiu je nutné ju aplikovať do sterilného substrátu vo fermentore
- ▶ Médium sa prevzdušňuje, v niektorých procesoch sa premiešava
- ▶ Huby sa nechávajú rásť pri teplote 30 °C počas 18-30 hodín, kedy sa dosiahne optimálne pH

Suspenzia spór v mikroskope



Povrchová fermentácia v tekutom médiu s *A. niger* (*liquid surface culture* = LCF)

- ▶ Používa sa rovnako tekuté živné médium
- ▶ Médium:
 - Repná melasa ako surový materiál je stále intenzívne využívaná
 - Príprava samotného substrátu je o čosi náročnejšia
 - No požiadavky na fermentáciu sú pomerne nižšie ako u submerznej fermentácii
 - Je nutný prídavok živín a alkalického ferokyanidu
- ▶ Po sterilizácii a ochladení média sa toto médium plní do plytkých misiek uložených v regáloch vo vetranej komore. Misky sa plnia od 0,05 do 0,20 m

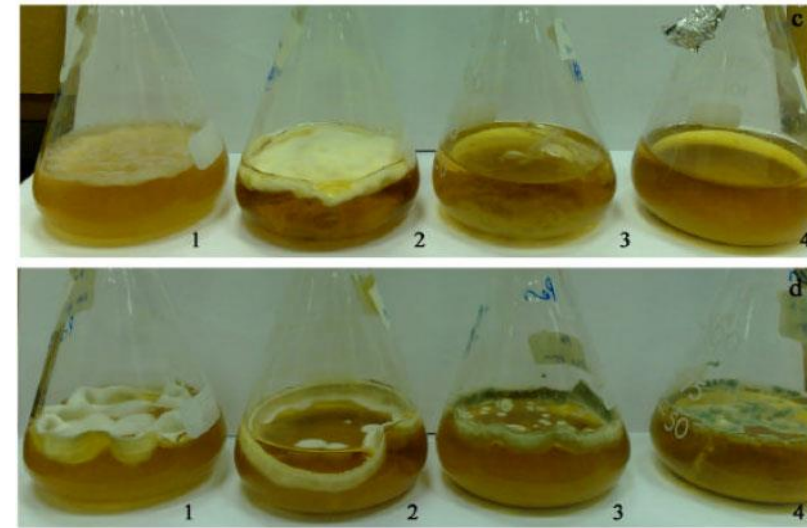


Inokulum pri povrchovej kultivácii

- ▶ Používajú sa spóry *A. niger* získané rastom selektovaných druhov na sporulačnom médiu
- ▶ Spóry sú zozbierané a distribuované na povrch média v miskách

Fyzikálne podmienky:

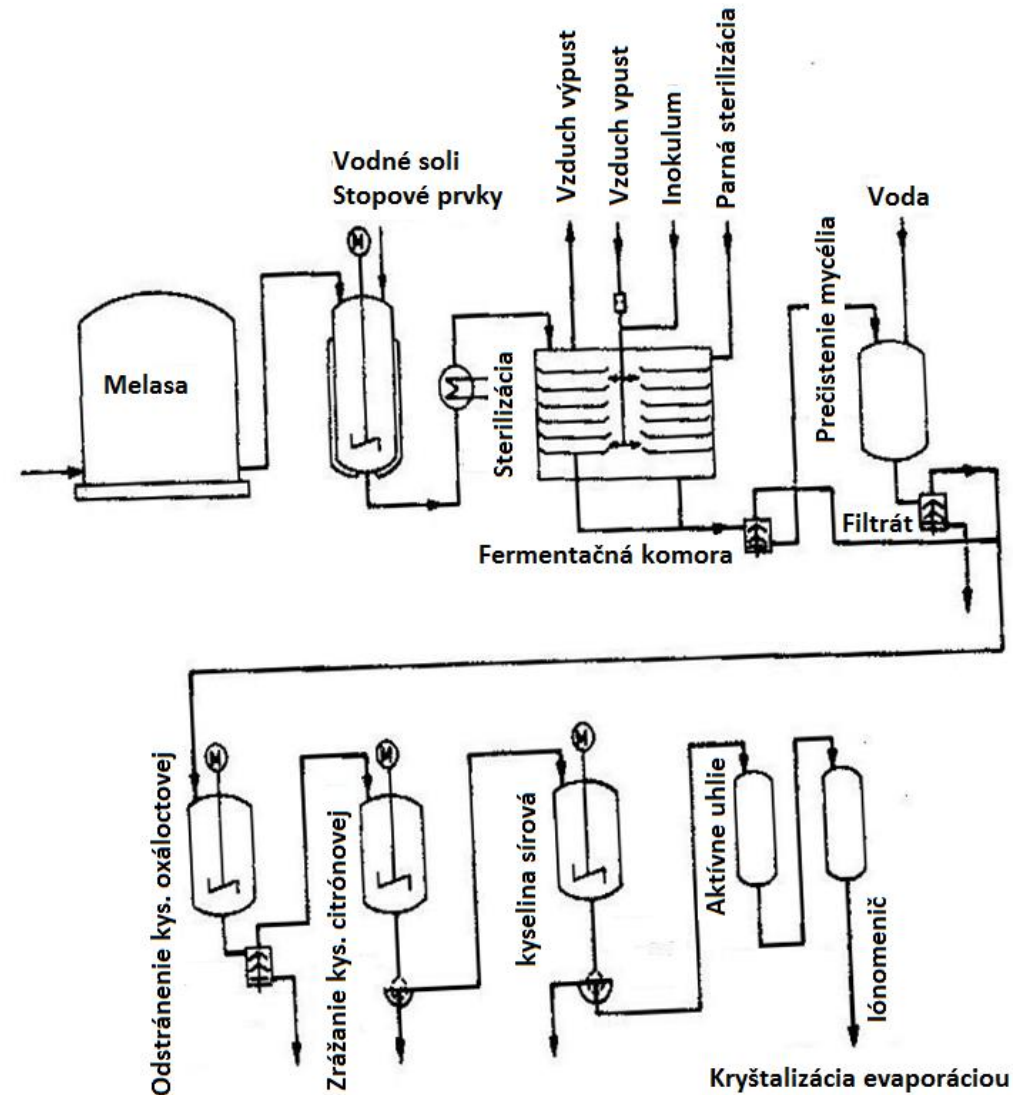
- Sterilný vzduch je podmienkov pri fermentácii v komore
- Privádzaný vzduch má dvojitú funkciu:
 1. Dodáva kyslík pre aeróbnu respiráciu - ako konečný akceptor vodíkov
 2. Odvádza vyrobené teplo mimo fermentovaný substrát



- ▶ Na povrchu sa tvorí koherentný film a substrát sa postupne vyčerpáva
- ▶ Odstránenie ťažkých kovov ferokyanidom výrazne obmedzuje sporuláciu
- ▶ Po 7 až 15 dňoch sa platne vyprázdnia a mycélium sa oddelí od fermentovaného substrátu
- ▶ Tekutý substrát sa prečerpáva do regeneračnej sekcie
- ▶ Nežiaduce látky ako kyselina glukónová alebo šťaveľová sú častokrát prítomné
- ▶ Zamedzeniu ich vzniku sa predchádza opatrnou selekciou kmeňov

Schéma produkcia kys. Citrónovej s použitím povrchovej kultivácie

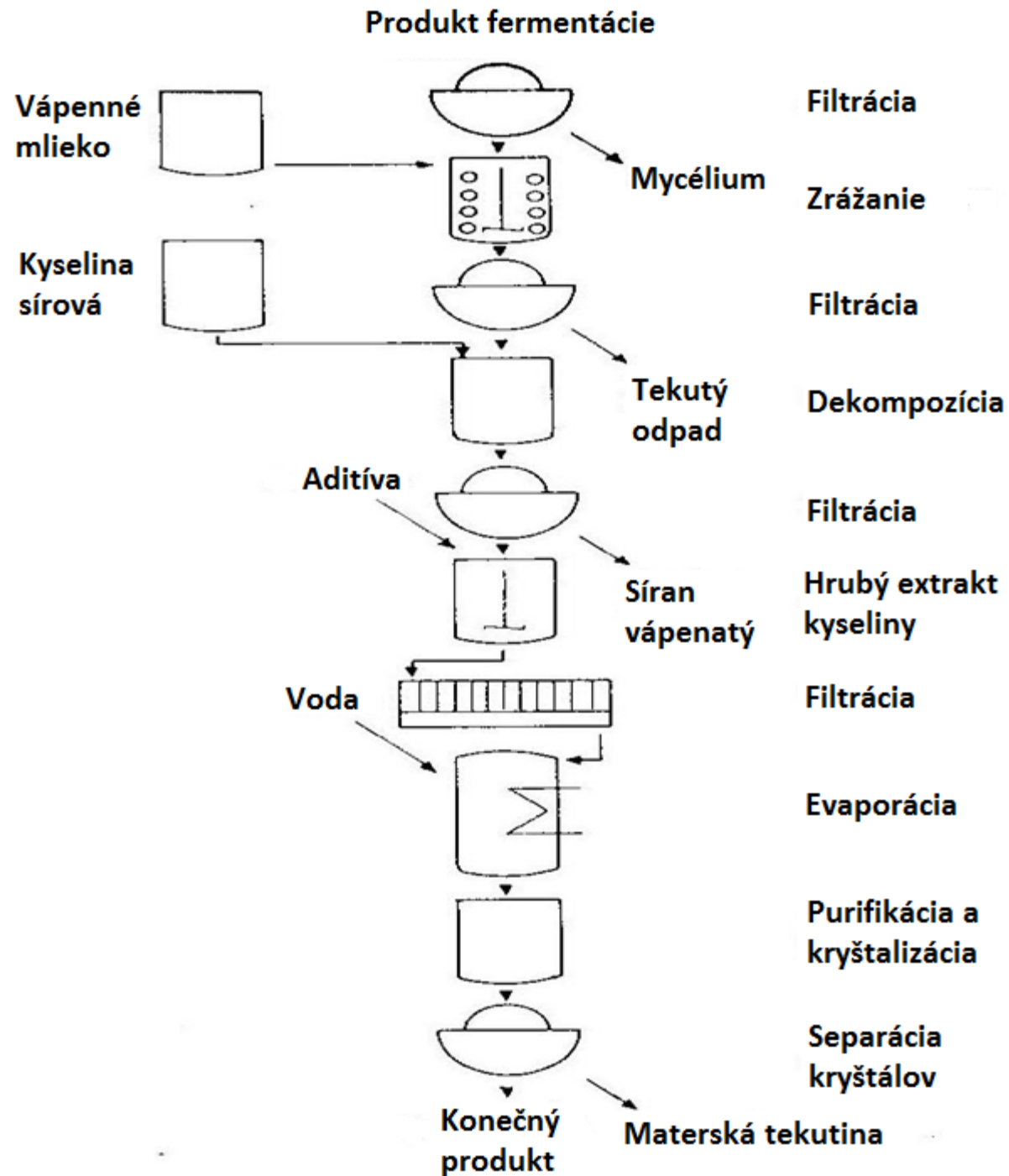
- ▶ Industriálna výroba kyseliny citrónovej mikrobiálnou konverziou z cukru repnej melasy fermentáciou



Získavanie produktu

- ▶ Získavanie kyseliny citrónovej z fermentovanej tekutiny sa obvykle získava tromi cestami:
 1. Zrážaním - najčastejšie využívaná metóda
 2. Extrakciou
 3. Adsorpciou a absorpciou - na to slúžia hlavne iónomeničové živice
- ▶ Separácia kys. citrónovej z tekutiny:
 - Pridaním hydroxidu vápenatého sa získa tetrahydrát citrátu vápenatého
 - Nasleduje premývanie zrazeniny - jej oddelenia od tekutiny
 - Pridá sa riedená kyselina sírová za vzniku kys. citrónovej a zrazenina síranu vápenatého
 - Prida sa bielidlo a nasleduje kryštalizácia
 - Vzniká bezvodá a monohdrát kyseliny citrónovej

Proces získavania kyseliny citrónovej



Fermentácia tuhých substrátov (solid-state fermentation - SSF)

- ▶ Prvýkrát vyvinutá v Japonsku, kde sa vyrába Koji - najjednoduchšia metóda fermentácie
- ▶ Pomocou SSF je možné fermentovať rôzne materiály
- ▶ Všeobecne je substrát navlhčený na 70 % vlhkosť, závisí však na substráte, koľko vody dokáže prijať
- ▶ Počiatočné pH je normálne pozmenené na 4,5 - 6 pH a teplota fermentácie od 28 - 30 °C
- ▶ Najčastejšie využívaným organizmus: *Aspergillus niger*
- ▶ Najdôležitejšia výhoda SSF: prítomnosť stopových prvkov neoplyvňuje produkciu kyseliny citrónovej ako u SmF
- ▶ Taktiež, ošetrovanie substrátu nie je potrebné

Závery a perspektívy

- ▶ Využitie alternatívnych surových materiálov na výrobu kyseliny citrónovej pomocou SmF, LSC a SSF sa javia ako vhodná možnosť
- ▶ Je však potrebné zvolit' správny typ fermentačného procesu a prispôbiť ho k danej surovine
- ▶ Predošetrenie suroviny, prídavkom látok, sterilizácia substrátu a pod. môže zvýšiť konečnú produkciu
- ▶ Ďalšou oblasťou pre zlepšenie je možnosť izolácie nových kmeňov, s lepšou využiteľnosťou substrátov, menšou produkciou nežiaducich látok, prípadne genetické manipulácie.