

Biotechnologické a metabolické produkty hub

Metabolické produkty hub a biotechnologie

Produkty fungálních biotechnologií

- Enzymy
- Produkty alkoholového kvašení
- Proteiny
- Kvasnice
- Fermentované potraviny
- Sýry
- Industriální alkohol
- Kyselina citronová
- Vitamíny (riboflavin)
- Antibiotika (penicilin, cephalosporiny)
- Farmaceutické produkty (sekundární metabolity, steroidy)
- Agrochemikálie (fungicidy a regulátory růstu)
- Buněčné proteiny

Některé otřepané pravdy o houbách...

- Heterotrofní absorptivní organismy
- Extracelulární enzymy
- Formy: kvasinkovité a/nebo vláknité formy (hyfa a mycelium)
- Hyfa je charakteristická apikálním růstem, **buněčnou stěnou** s fosfolipidovou dvouvrstvou s globulárními proteiny, základním komponentem je chitin (chitosan) a hlavním sterolem ergosterol.
- Periplasmatický prostor – prostor mezi vnitřní buněčnou stěnou a a vnější periplasmatickou membránou je u vláknitých forem těsně spojen u kvasinek obsahuje mannoproteiny a enzymy (invertázy)
- Cytoplasma – jádro, mitochondrie, proteozómy, endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát a komplex vesikulů, vakuoly peroxizómy

Výživa hub

- **Hlavní živina** – sacharidy (glukóza), N ve formě NH₄, aminokyseliny
- Většina hub jsou **aerobní formy**, *S.cerevisiae* fakultativní anaerob
- O₂/CO₂ je pro aerobní formy limitujícím faktorem pro růst a vývoj
- S – sulfátové formy, thiosulfáty, methionin, glutation
- P – nezbytný pro syntézu nukleových kyselin, fosfolipidů, ATP, glykofosfátů (vakuola – polyfosfáty)
- **Makroelementy** – **Mg** (dělení buněk, enzymatická aktivita)
- **K** (osmoregulace, enzymatická aktivita)
- **Mikroelementy** – **Mn** –enzymatický co-faktor,
- **Ca** –přenos a výměna iontů,
- **Cu** (redoxní pigmenty),
- **Fe** (cytochromy),
- **Zn** (enzymatická aktivita, struktura proteinů), **Ni** (metabolismus močoviny)
- **Mo** (nitrátový metabolismus, B12) **Co** (kobalamin, koenzym)

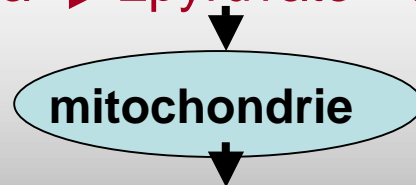
Transport živin

- Aktivní a pasivní absorpce živin přes plasmatickou membránu: **volná difúze** (lipidové molekuly, lipofilické metabolity, mastné kyseliny), **usnadněná difúze** (translokace látek na základě transmembránového koncentračního gradientu pomocí enzymů (proteázy) (*S.cerevisiae* – glukóza), **difúzní kanály** (na základě odlišného elektropotenciálu – ionty K)
- **Aktivní transport** (cukry, aminokyseliny,...) aktivní symport – iontové a proteinové přenašeče – membránový elektrochemický potenciál pomocí membránové H⁺ATPázy (cukry, aminokyseliny, ionty)

Metabolismus

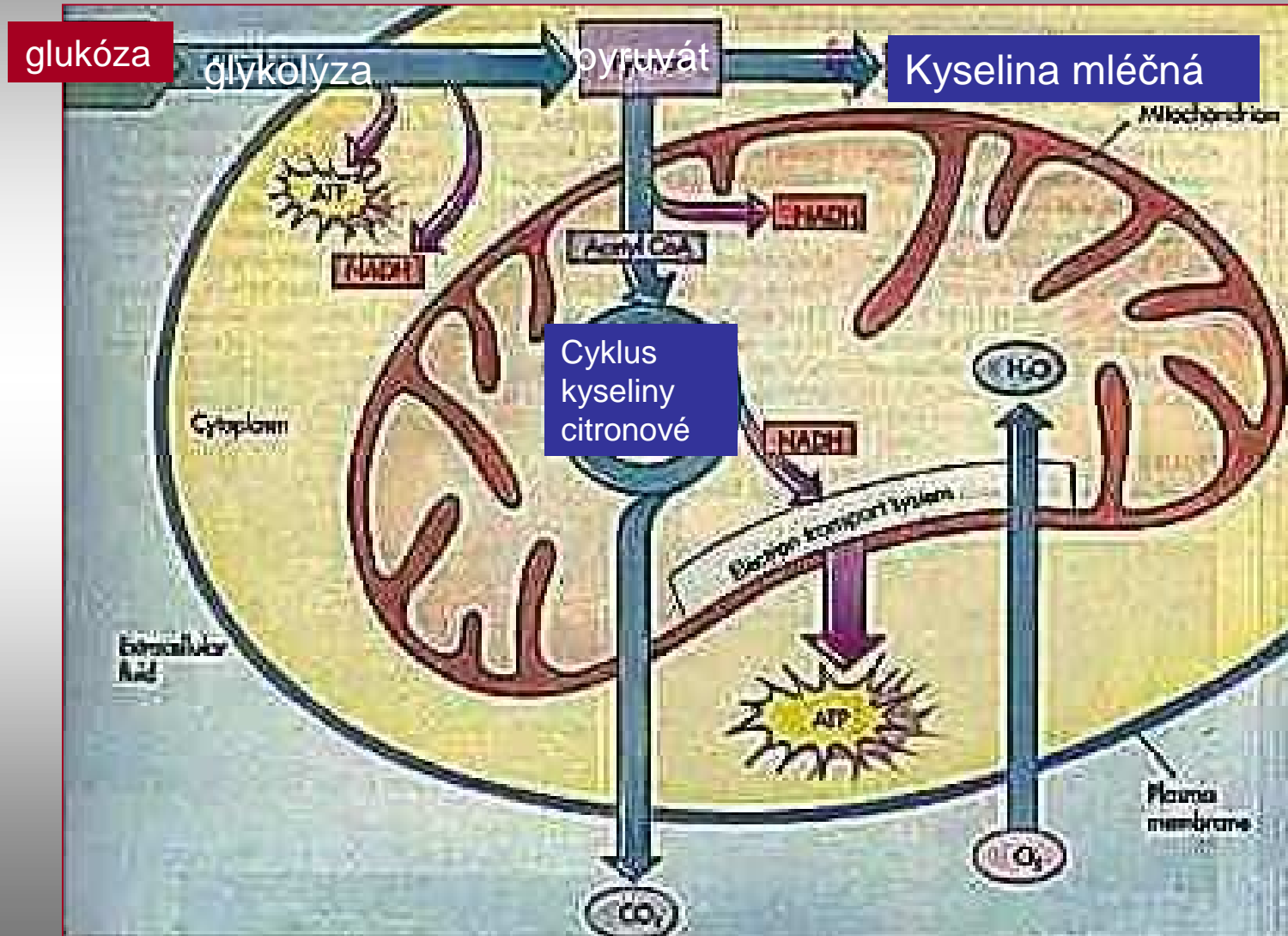
- Chemo-organotrofní organismy
- Enzymatický rozklad substrátu (amylázy, glukoamylázy, celulózy, inulázy, lipázy, hemicelulózy, proteinázy, chitinázy, etc.)
- Př. lipázy – *Yarrowia lipolytica* a *Candida rugosa* – štěpí lipázami triaglycerol na mastné kyseliny a glycerol
- Celulózy, hemicelulózy – dřevokazné druhy hub, výsledkem štěpení celulozy je **glykolytická reakce.**

Glukoza ➔ 2pyruvate + 2ATP + 2NADH + H⁺



- 4CO₂, 6NADH, 2FADH₂, 8H⁺ and 2GTP.

- Cyklus kyseliny citronové

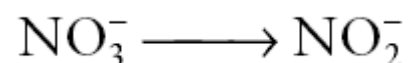


Metabolismus N – biosyntéza aminokyselin a proteinů

Houby přijímají N ve formě NH_4^+ a NO_3^- iontů

NH_4^+ využívají k tvorbě aminokyselin – glutamat a glutamin (základ pro metabolické pochody – glutamat dehydrogenaza, glutamat syntetasa etc.)

NO_3^- ionty jsou redukovány nitrát reduktázou na NO_2^- a dále nitrid reduktázou na NH_4^+



Obdobným způsobem je degradována i **močovina**



Růst kultury

- Každá kultura hub (kvasinky i vláknité) v omezeném prostoru (P-miska s médiem, fermentor, pytel..etc.) vykazuje tzv. **růstové fáze**, které se liší morfologicky i fyziologicky.
- ***lag-fáze***
- **exponenciální fáze růstu**
- **stacionární fáze růstu**

- **Lag fáze** – zahrnuje nulový růst populace na počátku, včetně adaptačních reakcí na nové medium (začíná produkce ribosomů a enzymů) start primárního metabolismu
- **Fáze exponenciálního růstu** – je perioda, kdy kvasinky se logaritmicky množí, myceliární masa u vláknitých hub narůstá až do konstantní hodnoty, maximální růstový poměr (μ_{\max}) v determinovaném časovém úseku (1h). Tato fáze je typická intenzivním primárním metabolismem, nezbytným pro nárůst bioamasy (kvasinky – dělení, vláknité – růst mycelia). V řízených kulturách, kde jsou získávány právě primární metabolity, lze tuto fázi prodloužit tzv. „fed-batch fermentace“ kontinuálním přísunem živin do kultury (viz. dále)

- **Stacionární fáze růstu** – nastává pokud kultura dosáhla maximálního růstu a živiny byly odčerpány. Kultura již neroste, biomasa je konstantní. Kultura je schopná v této fázi přežít i měsíce bez přísunu živin. Změnou fyziologických podmínek může v kultuře docházet k hromadění různých metabolitů – ethanol, pokles pH, změna v poměru O₂ a CO₂. Kultura je charakteristická produkcí sekundárních metabolitů (př. Penicilin, cyklosporin, ergotaminové alkaloidy).
- **Autolytická fáze** – apoptóza a smrt buňky, programovaná smrt houbové buňky (endogenní enzymy (vakuoly), proteázy a karbohydrázy rozpouští cytoplasmatické proteiny a polysacharidy buněčné stěny(viroidní RNA „killer“ úseky). Autolytickou fázi lze navodit i exogenními faktory – soli, změna teploty, pH etc.

Fungální fermentace a produkty

- Fermentace – jeden z nejstarších biotechnologických procesů (5000 bc) Egypt – víno jako dar bohyně Osiris
- Kvasinky byly poprvé mikroskopovány 1680 – Van Leuwenhoek a popsány jako *Saccharomyces cerevisiae* – 1838
- Kvasný proces byl objasněn až L.Pasteurem (1863)
- Penicilin (1928) Sir A. Fleming

Industriální aplikace hub

Biomasa	Potravinářské kvasnice mykoprotein
Buněčné komponenty	Nativní a rekombinantní proteiny
Produkty sekundárního metabolismu	Antibiotika, vitamíny
Katabolické produkty	alkohol

Typ fermentace	Příklad	Produkt
Fermentace na pevném substrátu	<i>Agaricus bisporus</i>	plodnice
Batch -hromadná	Pivovarnictví vinařství	Pivo víno
Fed- batch fermentace	Kultivace <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	kvasnice
Recyklovaná batch fermentace	Produkce vína (Itálie)	Letní vína
Kontinuální fermentace	Kultivace <i>Penicilium graminarium</i>	mykoprotein

Fermentace na pevném substrátu

- Fermentace na pevném substrátu
- Produkce jedlých hub
- Vlákňité houby – produkce enzymů a antibiotik
- Sojové boby a *Rhizopus* sp. – sojová omáčka
- Srážení mléka při výrobě sýrů – *Penicillium* sp.

Batch fermentace (šaržovitá fermentace)

- Kvasné nápoje
- Technická rozpouštědla – alkohol a aceton
- Medium je inokulováno malou dávkou živých buněk
- Lag fáze je krátká – minuty nebo hodiny)
- Exponenciální fáze – maximální využití živin
- Po vyčerpání živin se růst populace zpomalí dokud zcela neustane
- Stacionární fáze
- Produkce ethanolu je maximální na rozhraní konce exponenciální a stacionární fáze (přechod)

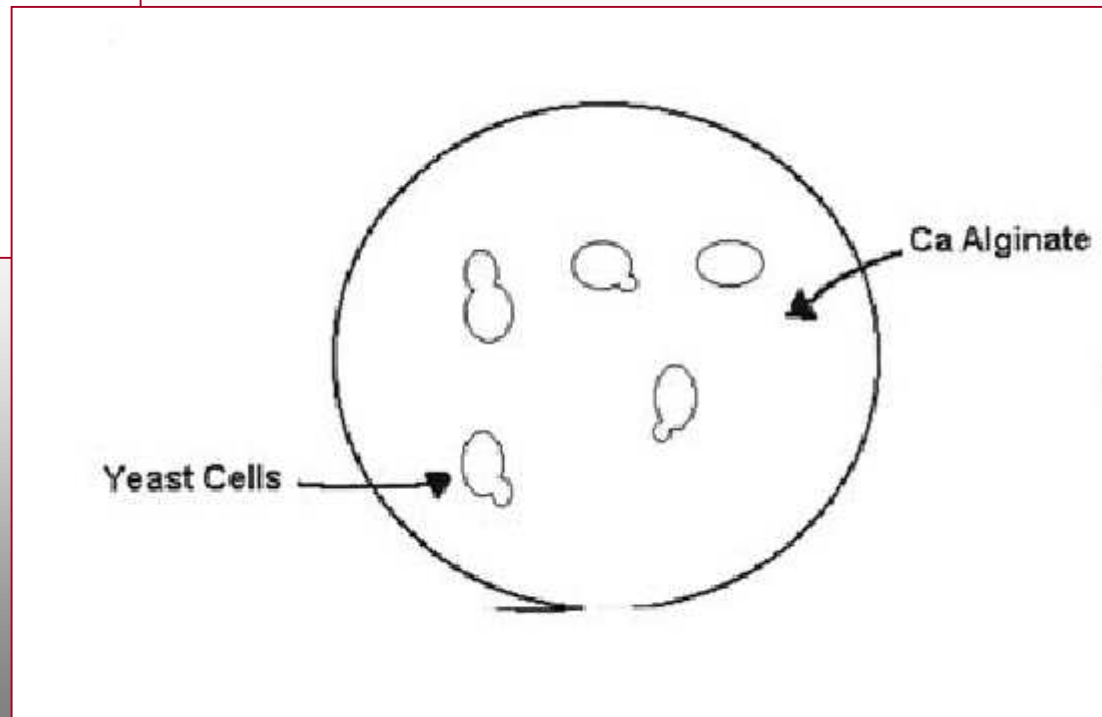
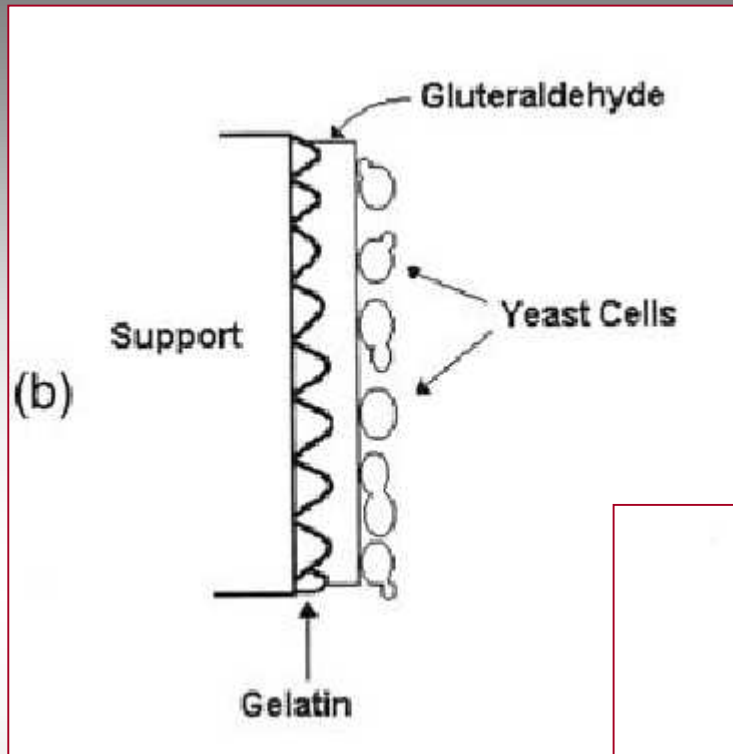
Fed batch fermentace

- Fermentace podobná předchozímu typu, ale během procesu se kontinuálně doplňují živiny
- Umožňuje tak nárůst maximální biomasy
- Používá se především k výrobě potravinářských kvasnic
- **Melle-Boinot proces** –recyklační batch fermentace – podstatou je, že část produktu získaného fermentací se použije k opakované inokulaci dalšího fermentačního cyklu – zajistí se tak vysoká dávka inokula s vyšší odolností proti zbytkovému ethanolu
- Využívá se v některých oblastech Itálie k výrobě vín a k výrobě ethanolu z xylózy (5C) kvasinkou *Pachysolen tannophilus*

Kontinuální cyklická fermentace

- Celý systém probíhá v přesně definovaných podmínkách, tak aby se živé buňky udržely v požadované vývojové fázi
- Živiny jsou přidávány v konstantních dávkách
- Zároveň je odpouštěno strávené medium
- Využívá se zejména k produkci antibiotik a mykoproteinu
- K optimalizaci výroby se využívá technologie fixace živých buněk (imobilizace) – nejsou pak vypouštěny a vymývány z reaktoru
- **Imobilizace buněk**
 1. dialyzační membrány, mikrofiltry, mokrporézní materiály – nevýhodou je ucpávání pórů
 2. Elektrostatická či kovalentní fixace na pevné povrchy
 3. Alginátové pelety (zvyšují obsah ethanolu, ale nevýhodou je zvýšená produkce CO₂)

Imobilizace buněk



- Na konci fermentačního procesu může docházet k tvorbě vloček a shluků – oddělují se centrifugací
 - Nejefektivnější jsou membránové systémy – zvyšuje se obsah ethanolu a udržují se ředící poměry
 - Musí propustit metabolit a efektivně oddělit houbové buňky
 - U produktů předpokládáme určitý výnos jehož koncentrace je předem známá
1. Antibiotika a lipidy – 10 -30g/l
 2. buněčný protein – 30-50g/l
 3. Ethanol -70-120g/l

Faktory ovlivňující fermentaci

- Kvalita izolátu používaného jako inokulum
- Míchání media s inokulem (může měnit poměry O_2 a CO_2)
- Kvalita růstového media
- teplota

Výroba ethanolu

- Semi-anaerobní fermentace
- Kvasinky *Sacharomyces cerevisiae* během kvasného procesu konvertují glukózu na alkohol během biochemického procesu (glykolýza)



Genetický upravované kvasinky pro pivovarnictví – snížení obsahu diacetylu (nepříjemný zápach piva –acetolaktát se odbourává na acetoin)

Genetická manipulace pro zvýšený obsah enzymů, vločkování, urychlení fermentačního procesu.

....zatím se v praxi nepoužívají

Vaření piva

Kvasinky nejsou schopné rozložit škroby ze sladu (ječmen) nemají amylázy, takže se ječmen nechává naklíčit a během sladování se pak škroby lyzují na cukry, které kvasinky během fermentace konvertují na alkohol. Škroby se rozpadají na maltózu a dextriny (endogenní amylázy)–

sladování

Po sladování se ječmen **suší** – dlouhodobě chladem (světlý slad s vysokou enzymatickou aktivitou) – krátkodobým teplem (tmavý slad s nízkou enzymatickou aktivitou)

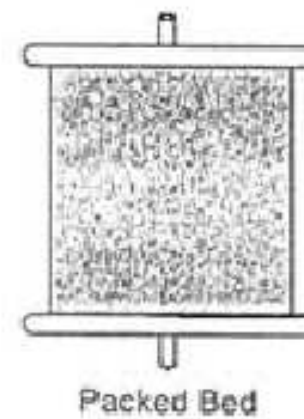
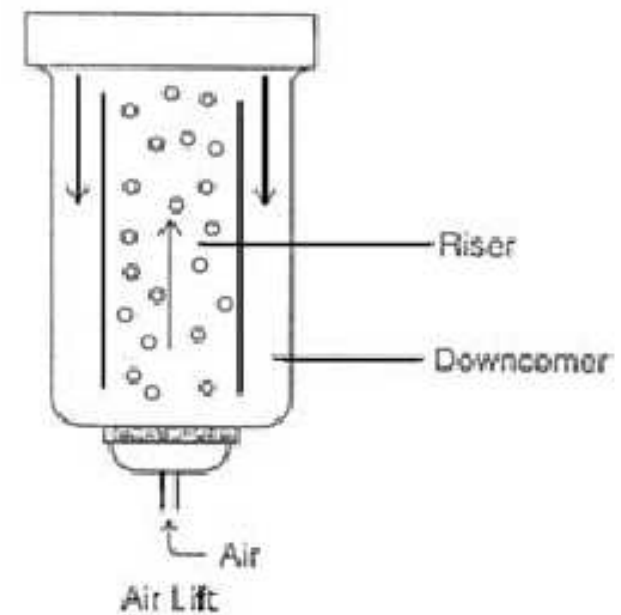
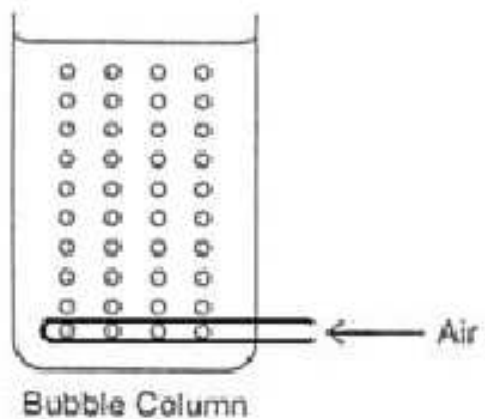
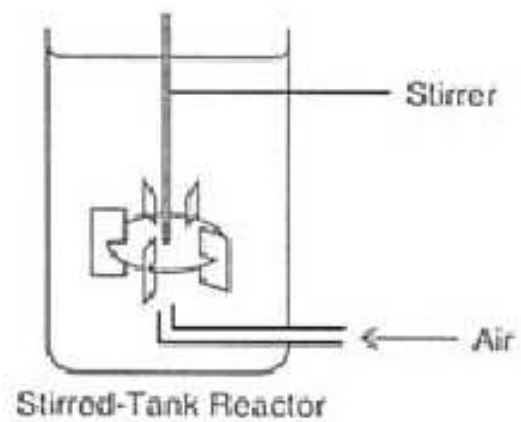
Mletí –sladová moučka (šrot) - **výluh horkou vodou** – extrakt cukrů a enzymů (během 2-3hodin výluh obsahuje velké množství fermentovatelných cukrů (fruktózu,glukózu, sacharózu, maltotriózu).

Sladová mladina (pivovarská sladina) se **vaří**, upravuje se pH a přidává chmel.

Do zchlazené sladiny se přidávají kvasinky (inokulace) a fermentace probíhá při optimální teplotě 15-22°C. Fermentace končí vyvločkováním kvasinek na spodu fermentoru.

Reguluje se míchání, teplota a doba fermentace, zchlazování apod.

Způsoby provzdušňování (aerace) fermentačního procesu



Produkce potravinářských kvasnic

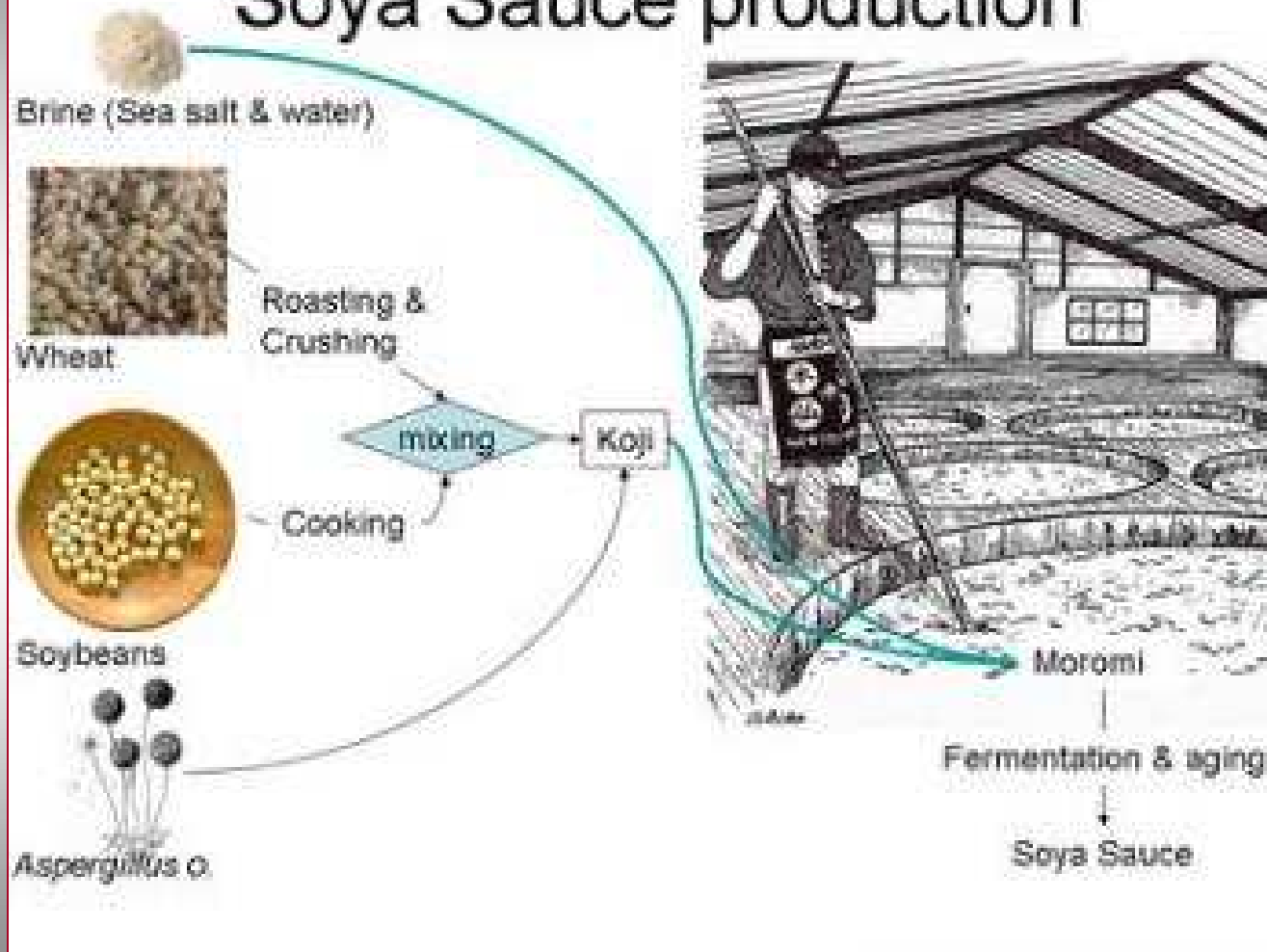
- *Saccharomyces cerevisiae*
- Aerobní fermentace
- Fed-batch kultivace (zdrojem cukru je většinou melasa)
- Kvasinky se sklízí vakuovou filtrací a upravují podle poptávky
- Jiné druhy potravinářských kvasinek: *S.exiguus*, *Candida krusei*, *Pichia satoi* (rýžová mouka)

Ostatní potravinářské produkty

Sojová omáčka (Čína, Japonsko, Indonesie, Thajsko...)

- Sojové boby se nachají 16 hodin nabobtnat a vaří se.
- aerobní fermentace pevného substrátu
- ***Aspergillus oryzae, A.sojae, A. tamarii*** ...
- Inokulace spórami
- Směs substrátu a inokula – **koji**
- Aspergillus produkuje celou řadu hydrolytických enzymů (amylázy, hydrolázy...)
- **Koji fermentace** - může trvat i několik měsíců
- Koji stádium končí, když je znatelný myceliární růst a enzymatická aktivita (ale houba ještě nesporuluje) a je cítit plesnivina
- Takový substrát je smíchán se solným roztokem (20%) a následuje tzv. **moromi fáze** (slaná kaše)
- Následuje anaerobní fermentace v hlubokých kádích – slanomilné kvasinky (*Zygosaccharomyces rouxii*) a bakterie mléčného kvašení (*Pediococcus sp.*)
- Moromi fáze může trvat od 3 měsíců po 3 roky
- Na konci procesu se slije roztok, klarifikuje, pasterizuje a dávákuje do nádob
- Obdobným způsobem se připravuje sojová pasta Miso

Soya Sauce production



SUFU a TOFU

- Sojové mléko
- Zahřátím se zvyšuje vůně, odstraňuje trypsin
- Srážením se získává Tofu
- Tofu se naseká na kostky, nechá se nasáknout 1% slaným roztokem 2.5% kys. citronovou a takto se pasterizuje
- Po vychladnutí se povrch tofu inokuluje a inkubuje 2-10 dní -SUFU
- *Mucor racemosus*, *Rhizopus chinensis*, *Actinomucor elegans*



Sýry

- Sýry s plísní na povrchu – Brie a Camembert
- Tvarohovitá hmota se formuje do disků
- Postřík spórami *P.camembertii*
- Proteolytické enzymy z penicilia difundují do tvarohu, rozkládají proteiny na aminokyseliny a peptidy a změkčují a ztekucují tvaroh.
- *Geotrichum candidum* se používá k deaminaci (amonium se uvolňuje při zrání)

Roquefort, Gorgonzola, Stilton a Danish Blue

- Tvaroh se napřed inokuluje bakteriema – produkce CO₂ – oka a otvory v sýru
- *Penicilium roqueforti* – spóry, proteolytické a lipolytické enzymy

Buněčné proteiny (SCP) (jedlá biomasa z kvasinek a mikromycet)

materiál	houby
celulóza	<i>Trichoderma viridae</i>
ethanol	<i>Candida utilis</i> (Kuba – melasa, UK čokoládovny)
Banánové slupky	<i>Pichia spp.</i>
Hovězí lůj	<i>Candida utilis</i>
petrolej	<i>Candida lipolytica, C.utilis</i>
škroby	<i>Saccharomyces fibuliger</i>
syrovátka	<i>Klyuveromyces fragilis</i> (laktóza)
cukry	Různé druhy kvasinek (Kuba – melasa, UK čokoládovny)



Mykoprotein

- ***Fusarium graminearum*** – UK, analog masa, bohatý na proteiny a aminokyseliny (reakce na BSE)
- Quorn®Mycoprotein
- Fermentor 155m³ je inokulován 5l inokula. Zbytek tvoří živné medium (30°C). Základním problémem bylo množství RNA (9%), takže se mycelium vystavuje teplotě 68°C po dobu 20 min (obsah se snižuje na přípustné 1% a mycelium ztrácí vláknitou strukturu. Mycelium se získává centrifugací.
- Mycoprotein je adsorptivní, zadržuje vůně a zbarvuje se během varu.

Výroba mykoproteinu

Spádovou trubicou je přidáván kyslík a odváděn CO₂, kultura se tím zahušťuje a sedá na dno

Odvod CO₂

Stoupací potrubí s bublinami vhněného stlačeného vzduchu zabezpečuje promíchávání kultury

Redukce RNA - kontainer

Glukóza, minerální soli a biotin jsou dodávány v konstantním ředícím poměru

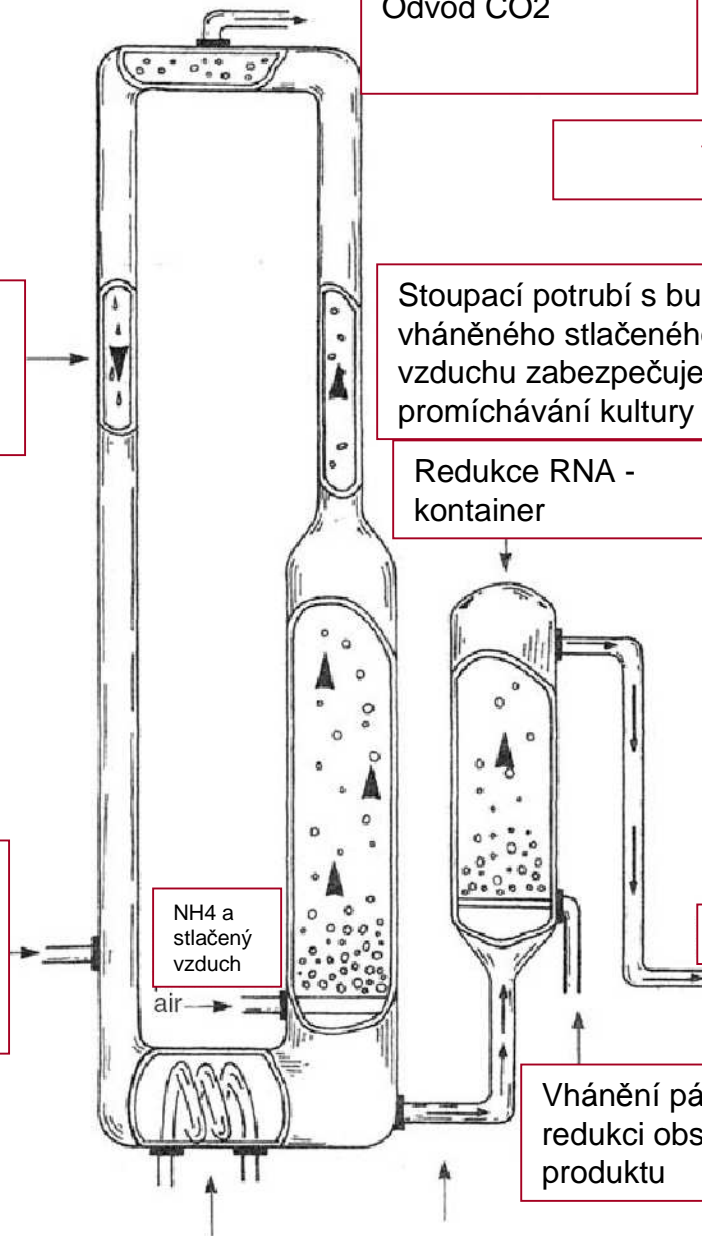
NH₄ a stlačený vzduch

Konečný produkt

Vhánění páry 64°C na redukcí obsahu RNA v produktu

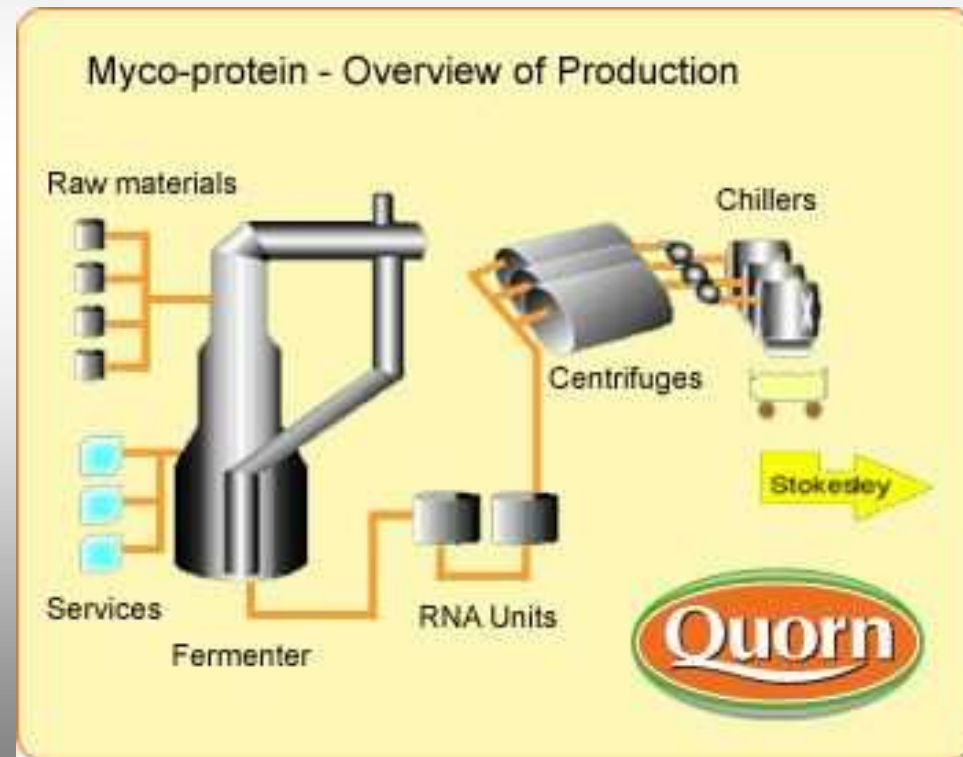
Výměník tepla – kultura svým metabolismem indukuje teplo a zvyšuje se tak celková teplota reaktoru. Zde je redukována na 30°C

Produkt je odváděn ve stejném poměru v jaké, jsou dodávány živiny



Problémy mykoproteínu

- Čistota a obsah RNA, karcinogenních látek (z ropných odpadů)
- Obsah mykotoxinů (*Fusarium graminearum*)
- Poptávka trhu



Antibiotika, enzymy a chemické produkty hub

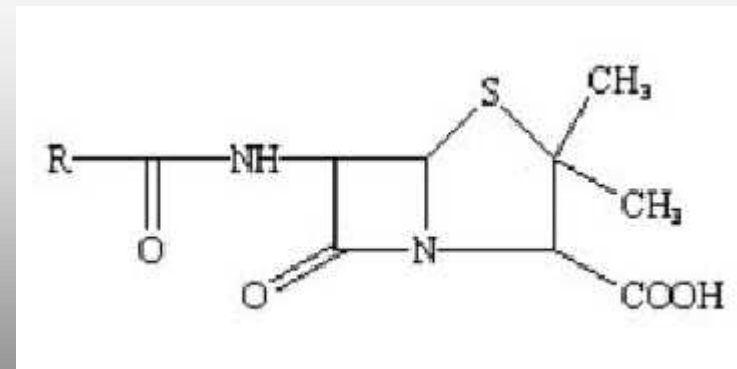
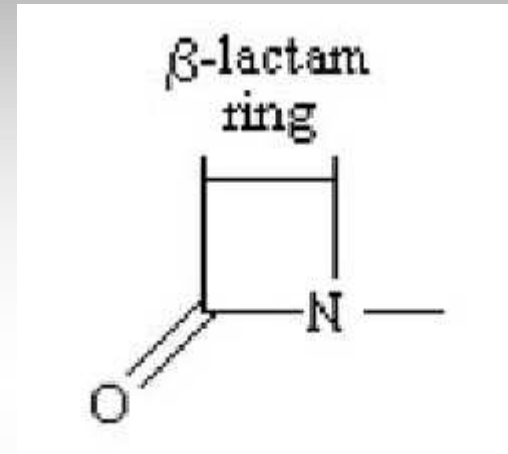
- Antibiotika, enzymy a chemické produkty jsou výsledkem primárního nebo sekundárního metabolismu
- Primární metabolity jsou nezbytné pro růst kultur, maximální produkce primárních metabolitů se dosahuje v exponenciální (růstové) fázi kultury
- Primární metabolity jsou snadno získatelné (kys.citrónová, fumarová etc.)
- Jejich produkce může být kvalitativně i kvantitativně ovlivněná genetickou manipulací hub
- Sekundární metabolity – nehrají primární roli, vznikají až když organismus přejde do stacionární fáze a začne trávit své vlastní metabolity, tento jev bývá spojen se sporulací a diferenciací pletiv,
- Příklad: antibiotika, cyklosporiny, statiny, ergotaminové alkaloidy

Table 5.2 Example of primary and secondary metabolites

	Example	Production organism
Primary metabolites	Enzymes	<i>Aspergillus</i> sp.
	Industrial alcohol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Organic acids	<i>Aspergillus/Candida</i>
	Fats	<i>Candida</i>
	Polymers	<i>Yarrowia</i>
Secondary metabolites	<i>Antibiotics:</i>	
	penicillin	<i>Penicillium</i>
	fusidic acid	<i>Fusidium coccineum</i>
	<i>Cholesterol lowering agents:</i>	
	lovastatin	<i>Monascus ruber</i>
	mevastatin	<i>Penecillium citrinum</i>
	<i>Immunosuppressing drugs:</i>	
	cyclosporin A	<i>Tolytocladium inflatum</i>
<i>Plant hormones:</i>		
giberellic acid	<i>Gibberella fujikuroi</i>	

Antibiotika

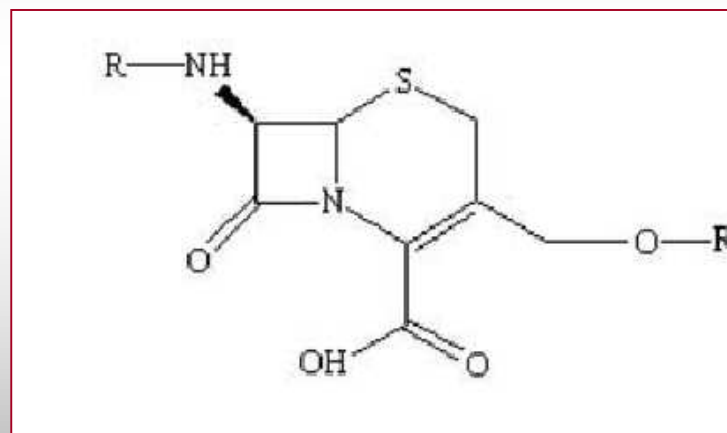
- 1928 Sir Alexander Fleming – *Penicillium notatum* – účinnost proti G+ bakteriím
- **β -laktam** – základní funkční molekula penicilinu s **nepolárními** postraními řetězci fenylacetátu a fenoxyacetátu jsou přirozeně hydrofobní a tvoří penicilin G a penicilin V
- Existuje celá řada semi-syntetických produktů, ale pouze výše uvedená struktura je produkována vláknitými mikromycetami
- Peniciliny s hydrofilními postraními řetězci mohou být produkovány bakteriemi, aktinomycety a houbami



- Laktamová vazba je nestabilní – kyselina peniciliová a její degradace v nízkém pH
- Některé bakterie produkují peniciliázy, čímž kys. peniciliovou inaktivují (rezistence k antibiotikům)

Cefalosporiny

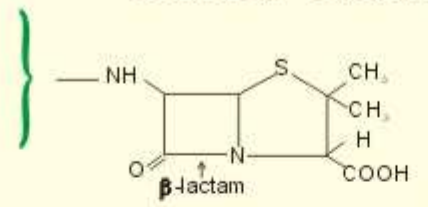
- Mají obdobnou strukturu jako peniciliny
- Laktamový prstenec je stabilnější než u penicilinů, díky sekundárním a terciálním strukturám
- Širší spektrum použití
- Řada vedlejších účinků



Side chain:

- Ampicillin
- Benzyl-
- Cloxacillin
- Phenoxymethyl-
- Ticarcillin

General Structure Of Penicillin



- β -lactamase (penicillinase)
- Peptido-glycan matrix
- Penicillin-binding protein

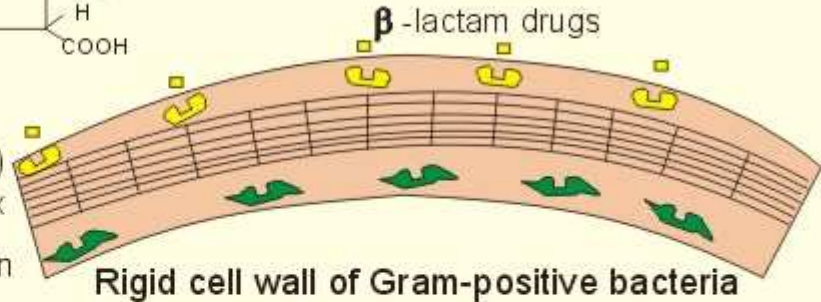
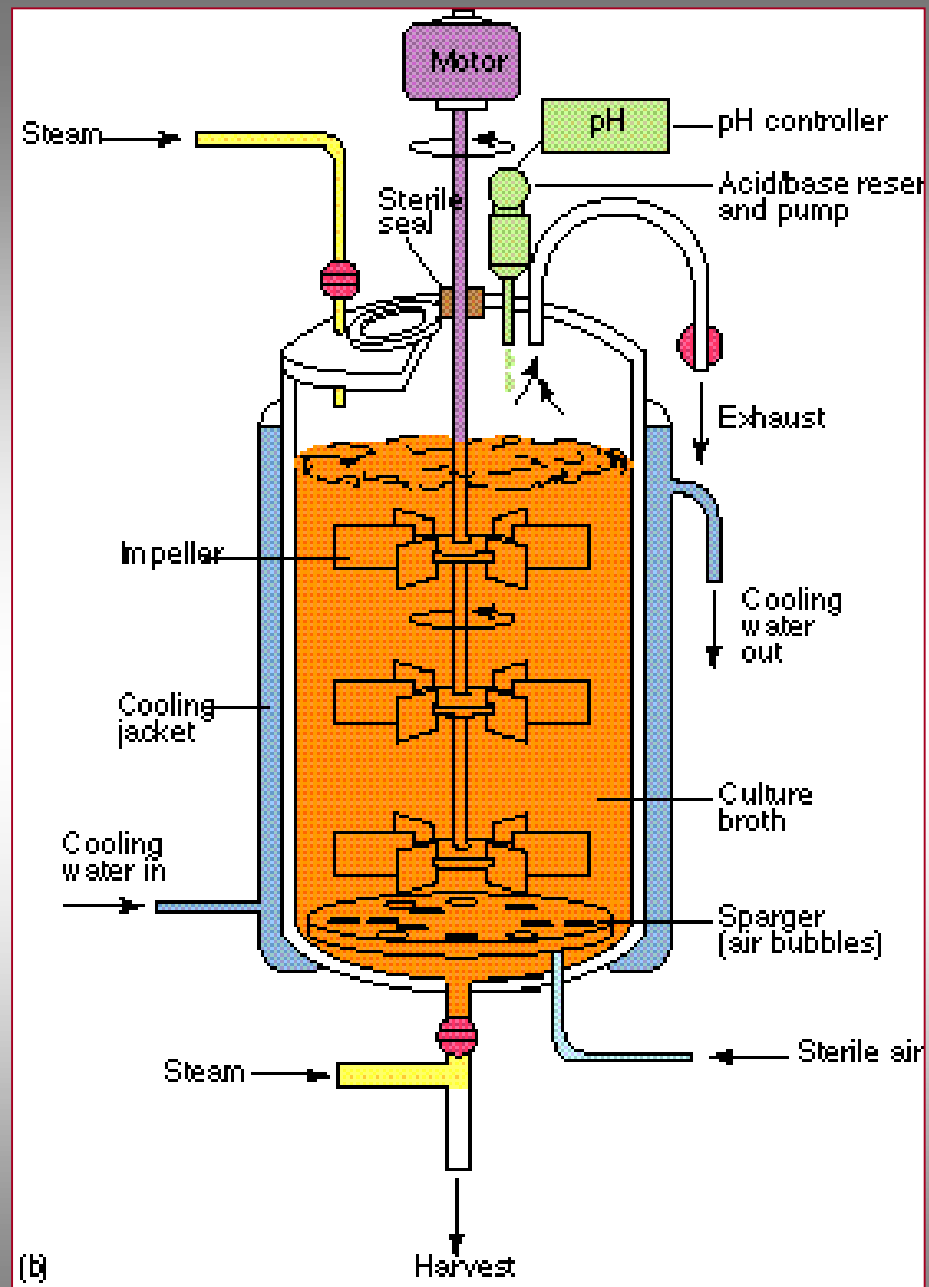


Fig 33-1

KMc

Produkce antibiotik

- Technologicky není produkce penicilinu příliš efektivní – pouze 10% výtěžnosti z celkového množství vloženého C
- Každá farmaceutická firma má vlastní patentovaný systém
- Základní princip:
 1. Inokulum kultivace ze sbírkové kultury – produkce matečné kultury a dceřiných kultur s dostatečným množstvím spór (10L – 20000L - 300000L)
 2. Kultivace – rychlá růstová exponenciální fáze (regulace glukózy)
 3. Stacionární fáze
 4. Separace antibiotik od mycelia a ostatních metabolitů (downstream process) – centrifugace, filtrace
 5. Extrakce rozpouštědel, ultrafiltrace, chromatografie a sušení
 6. Ročně se vyprodukuje asi 100000T penicilinu G



Ostatní antibiotika

- **Griseofulvin** – *Penicillium griseum* (inhibuje růst plísní)
- Kyselina fusidová (steroidní struktura) – *Fusidium coccineum* – účinné jak na G+ bakterie tak i proti bakteriím rezistentním vůči laktamovým antibiotikům



Farmakologicky aktivní produkty hub

Cyklosporin A

- Immunosupresivum (*Inhibuje produkci interleukinu T lymfocytů*)
- *Tolypocladium inflantum*
- *Cyklický peptid*

Statiny

- Inhibitory 3-HMG-CoA reductázy – klíčového enzymu při syntéze cholesterolu
- Kyselina mevinová – **lovastatin** (*Monascus ruber*) a **mevastatin** (*Penicillium citrinum*)
- Produkce je možná jak cestou kapalně fermentace tak i fermentací pevného substrátu

Strobiluriny

Mucidin a **strobilurin A**, jsou antifungální antibiotika na přírodní bázi produkovaná a izolovaná z basidiomycet *Oudemansiella mucida* a *Strobilurus tenacellus*.

Obě látky inhibují přenos elektronů v Krebsově cyklu (mitochondrie)



Fungicidy strobilurinového typu

Alkaloidy

- Ergolinové alkaloidy –ergometrin a metyl ergometrin, kyselina lysergová
 - Tvoří se ve stromatu
 - *Claviceps paspali* (LSD)
 - *Claviceps purpurea*
- 1. Pěstování parazitických kultur na rostlinách žita**
- První technologie pro pěstování námele – patent – 1934 Bekesy
 - V současné době se používá hybridní žito (CMS linie, zvýšená citlivost k infekci)
 - Rostliny se stříkají konidiální suspenzí (Sfaceliové stádium)
 - Výnos 1,000 –2,000kg sklerocií na ha
 - **Nevýhoda:** produkce závisí na podmínkách prostředí (počasí), omezený prostor pro pěstování, ochrana izolátu (proti rekombinacím apod.) je nemožná a následná purifikace je drahá



2. Saprofytické kultury

- Submerzní kultury
- Erginin a ergometrin, kyselina lysergová – produkováno pouze myceliem parazitické fáze nikdy ne sfaceliovou fází
- Buňky sfaceliové fáze a parazitické fáze mají v submerzní kultuře odlišnou strukturu
- Media pro submerzní kultivaci mají specifické složení, vysoký obsah cukrů (manitol, sorbitol a sacharóza) a vysoký osmotický tlak (podporuje tvorbu sklerocií a zabraňuje konidiogenezi)
- Syntéza alkaloidů startuje po odčerpání P z media
- **Izolát musí mít schopnost produkovat alkaloidy v maximálním množství, produkovat sklerociální buňky a pigmentace.**

Gibereliny

- Diterpenoidní látky, v biosyntetickém cyklu kyseliny mevalonové
- Ovlivňují metabolické a růstové pochody v rostlinách
- *Gibberella fujikuroi*

Enzymy

Enzymy jsou primární metabolity s jasně definovanou rolí v životním cyklu houbového organismu

Aplikace:

1. **proteázy** –

- srážení mléka (*Rhizomucor miehie*)
- Pivovarnictví (odstranění kalu)
- Soyové proteiny stc.

2. **Amylázy** (amylóza a amylopectin) (*Trichoderma reesei*)

- Pekárenství

3. **Celulózy** (*Trichoderma reesei*)

Papírenství, živočišná výroba, textilní průmysl

4. **Xylanázy** (arabinoxylany v rostlinných pletivech)

Strategie při produkci enzymů

- Submerzní fermentace (extracelulární)
- Povrchová fermentace
- Koji fermentace
- Fermentace pevných substrátů



Batch fermentace

Intracelulární produkce

Extracelulární produkce

Separace biomasy

Rozbití buněk

Separace pevné a tekuté složky

pevná

tekutá

odpad

Odstranění
nukleových kyselin

purifikace

Koncentrace

Stabilizace

PRODUKT

Výroba organických kyselin

Kyselina citronová (*Aspergillus niger*)

Glukonová

Itakonová (*Aspergillus terreus*)

Mléčná (*Rhizopus oryzae*)



Komerční produkce fungální technologie

Kyselina oxalová

Fumarová



Menší poptávka na trhu

Fungální technologie se nevyplatí, i když je známá a vypracovaná

Kyselina citronová

Intracelulární produkt (citrátového cyklu) *Aspergillus niger*

(nebo případně se používají kvasinky jako např. Saccharomyces lipolytica, Candida tropicalis aj. - odlišný technologický proces od Aspergilu)

Pro farmaceutický průmysl, čištění kovů, výroba detergentů

Produkuje se v suché krystalické podobě (anhydrid nebo monohydrát)

- **Povrchová fermentace** (jednoduchá a operativní, nižší náklady)
- **Submerzní fermentace** (velkoprodukční, nižší nároky na manuální obsluhu a zabírá méně prostoru)



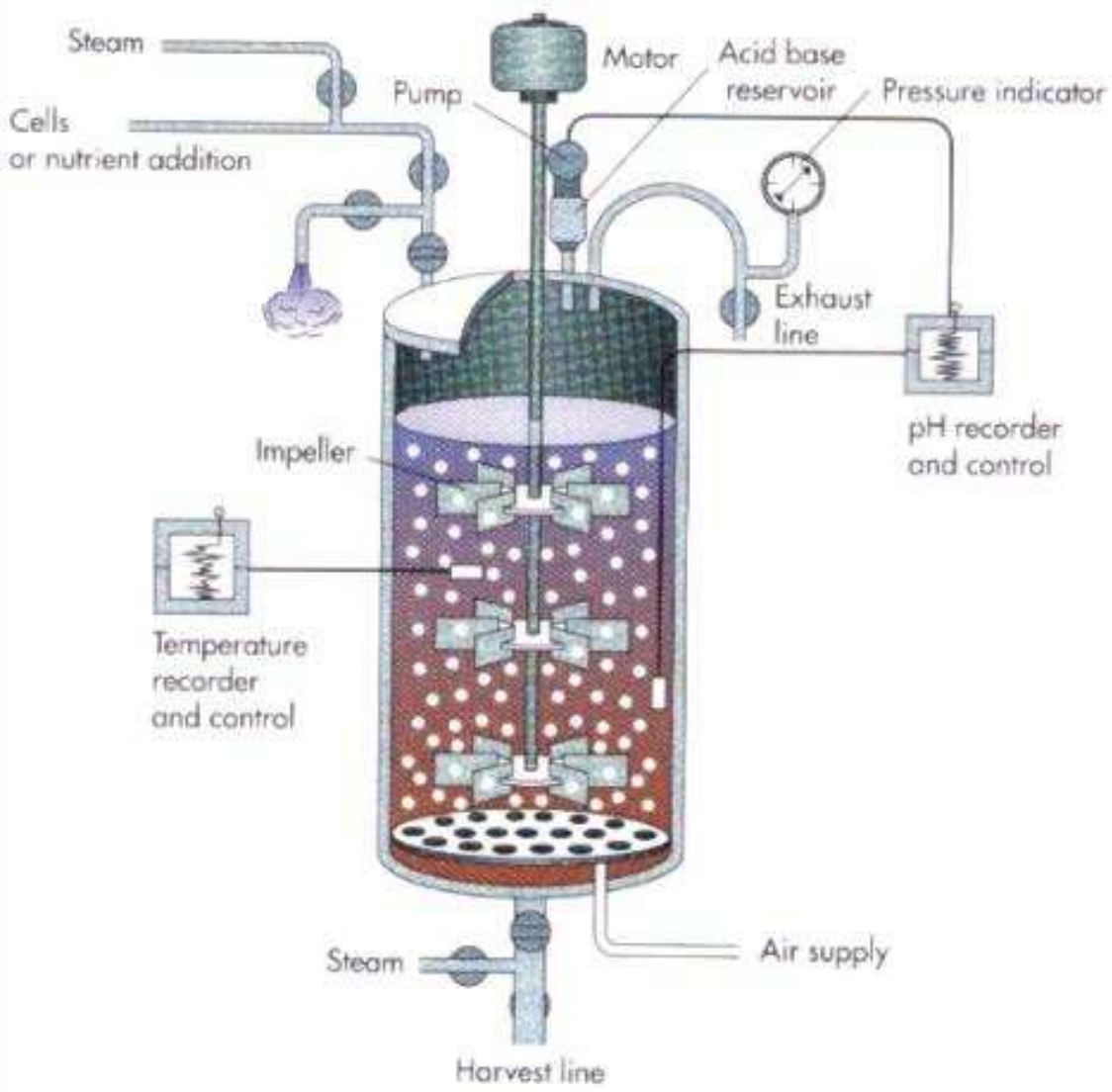
Povrchová fermentace

Mycelium roste na povrchu 50-100 l aseptických nerezových nádob (vany s vnitřním nátěrem odolným proti nízkému pH) s živným médiem (melasa)

1. Medium se naředí, aby obsah cukrů byl 15% , pH je upraveno na 6-7
2. Po úpravě živin se živné medium steriluje, chladí a napumpuje do kultivačních nádob
3. Inokulace – spóry v suspenzním roztoku nebo samotné spory v proudu vzduchu
4. Kultivace myceliárního povlaku – 25-30°C, vlhkost 40-60%
5. provzdušňování vháněním O₂
6. Během kultivace pH klesá až pod 2. Při pH 3 může být izolována i kyselina fumarová a oxaloctová
7. Fermentace trvá 8-12 dní, pak se oddělí mycelium z fermentátu se separují organické kyseliny

Submerzní kultivace

- věžové reaktory nebo tankové reaktory s míchadly
reaktor musí být rezistentní vůči kyselině (chelaticky váže kovy) a nízkému pH (inertní nátěry)
- Medium se ředí a připravuje obdobným způsobem jako pro povrchovou fermentaci buď ve zvláštním autoklávu připojeném na reaktor (vhání se potrubím) nebo přímo v reaktoru
- Inokulace – sporiemi nebo předkultivovaným myceliem
- množství inokulačního mycelia tvoří 10% celkového objemu biomasy
biomasa je okysličována (probublávání)
- Fermentační proces trvá 5-10 dní



Koji fermentace

- Nejjednodušší proces výroby kyseliny citrónové (Japonsko)
- Fermentace pevného substrátu (sláma, bramborové slupky, nať...) se nasytí vodou (70%) a sterilují se a následně schladí
- Inokulace spórami, startovní pH 5,5
- Škrob je hydrolyzován amylázami a cukry konvertovány na kyselinu citrónovou
- Proces trvá 4-5dní

1. Separace fermentačního roztoku od biomasy filtrací nebo centrifugací

2. V procesu $\text{Ca}/\text{H}_2\text{SO}_4$ je fermentační produkt ošetřen $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a produkt precipituje jako citrát vápenatý
3. Filtruje se a vymývají nečistoty a rozpouští se v kyselině sírové (vzniká nerozpustný CaSO_4 který se oddělí.
4. Kyselina citrónová se následně dejonizuje a suší (krystalická forma)

Modernější způsob výroby tekutá extrakce směsí lauraminu, oktanolu a dekanu z fermentačního roztoku s následující extrakcí vodou za vyšší teploty, následuje vymytí roztoku, filtrace přes aktivní uhlí a zakoncentrování odparem a krystalizace.

Kyselina glukonová

Extracelulární produkt *Aspergillus niger*

- Glukóza v mediu je oxidována ve dvou krocích na kyselinu glukonovou
- Používá se do cementu (tvrdnutí)

Kyselina itakonová

Intracelulární produkt *Aspergillus terreus*, *Aspergillus itaconicus*

- Stejná technologie výroby jako u kyseliny citrónové, startovací pH 2, fermentační medium je nejčastěji řepná melasa
- Používá se při výrobě polymerů – syntetická vlákna, adhesiva,

Kyselina mléčná

Rhizopus oryzae

- Přijímá glukózu a produkuje laktát v aerobních podmínkách
- Nesnáší pokles pH pod 4,5
- Má tendence k vláknitému růstu – ve fermentoru musí být míchadlo a musí se provzdušňovat
- používá se jako acidulant a konzervační látka

Produkce vitamínů

Přehled vitamínů na jejichž biosyntéze se podílí houby

vitamín	<i>organismus</i>	Roční světová produkce (tuna/rok)
Vitamín B2 (riboflavin)	<i>Candida sp.</i>	2000
B12 (cyanokobalamin)	<i>Ashbya gosypii</i> <i>Eremothecium ashbyi</i>	10
Provitamín D2 (ergosterol)	<i>S.cerevisiae</i>	-
Vitamín E (tokoferol)	<i>S.cerevisiae</i>	6800
Vitamín F	<i>S.cerevisiae</i>	1000

B2 – riboflavin

- se v mediu tvoří ke konci exponenciální fáze, kdy glukóza je víceméně spotřebována
- Základ media tvoří sojová moučka
- Do media se přidává glycin a ribitol (prekurzory riboflavinu)

Vitamíny se sterolovou strukturou

- S.cerevisiae*
- Fed batch fermentace – dvoufázová
- Základem je substrát bohatý na glukózu, štěpení na alkohol i ten se nechá zpracovat kvasinkami – pak přechází do fáze vláknitého růstu = **produkce sterolů**

Obohacené kvasinky

- Obohacené kvasinky (*S.cerevisiae*) o minerály
- Se - **Selplex®** a Chr- **Cofactor III™**
- Kvasinky jsou schopné metabolizovat selen a navázat ho na organickou aktivní síru v molekulách – selenometathion, selenocystein etc.
- Organicky vázaný Selen je méně toxický oproti anorganickému, veterinární výživa – ve fekáliích zůstává v organické formě – nedochází k hromadění v prostředí

Zdroje informáci:

The mycota (1997) (Esser k. and Lemke P.A. eds.) IV. Environmental and Microbial relationships (Wicklów D.T. and Soderstrom B.E. eds.)

Fungi: biology and application (2005) (Kavanah K. ed.)

Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine (2004) (Lenge J and L. eds.)

Heusler K, and Pletscher A. (2001) The controversial history of cyclosporin
Swiss Med WKLY 131:299-302

Webster J. and Weber R.W.S (2005) Introduction to mycology