



mezioborová integrace výuky zaměřená na rostlinnou biochemii a fytopatologii

CZ.1.07/2.2.00/28.0171

Biotechnologie

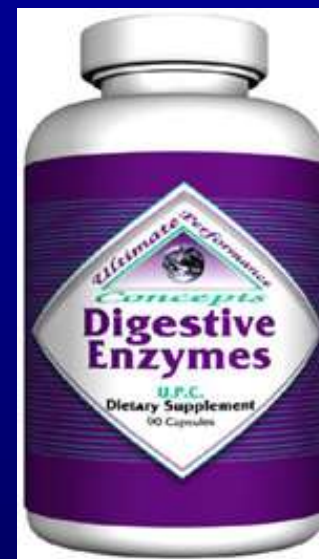
5. Biotechnologické výroby organických látek

Marek Petřivalský

Katedra biochemie PŘF UP



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Biotechnologie:
Organické kyseliny a vitamíny

ORGANICKÉ KYSELINY

OCET

Tradiční biotechnologie – 2 fermentační kroky

- 1) **kvasinky** – cukry na etanol
- 2) **Acetobacter** – etanol na kys. octovou

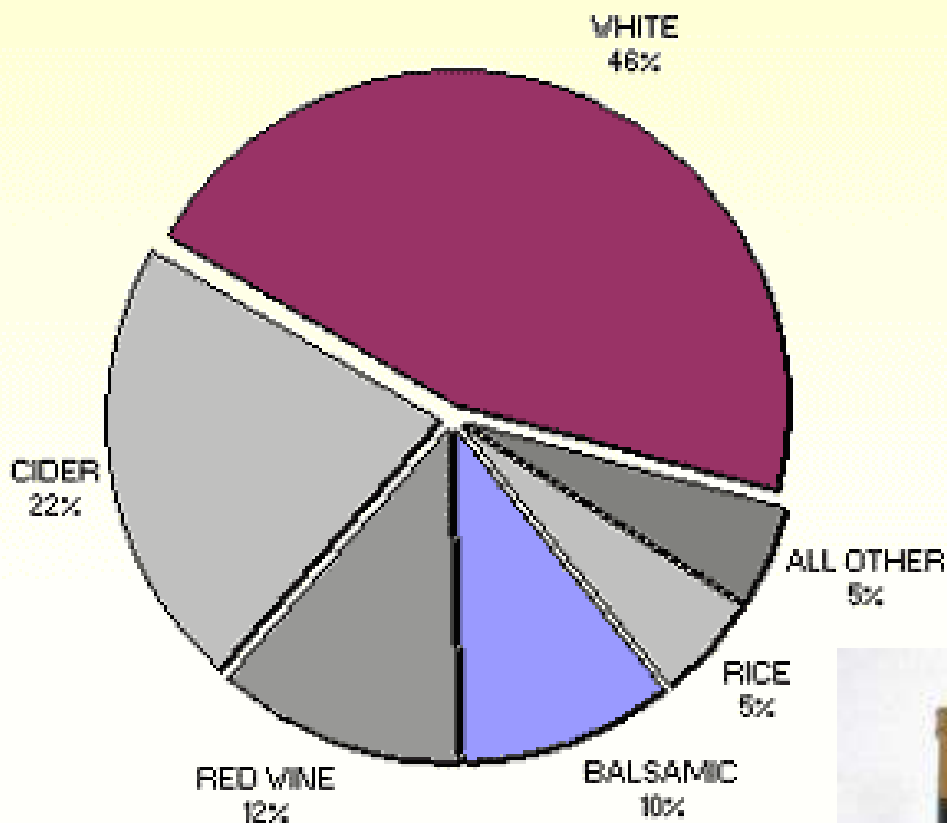
Druhy:

- 1) **ovocný** = dvojnásobná fermentace ovocné šťávy
jablka, hrozny, bobuloviny, rýže ... cider
- 2) **sladový** = z ječmene nebo jiné obiloviny
- 3) **cukrový** = fermentace cukrového sirupu nebo melasy
- 4) **etanolový** = octová fermentace zředěného lihu
baktérie na bukových hoblinách - provzdušňování

Ocet



2002 Unit Shares by Flavor
ACNielsen



Spotřeba octa podle druhu

video:

[výroba rýžového octa v Japonsku](#)



ORGANICKÉ KYSELINY

Balsámový ocet z Modeny:

- speciální odrůdy hroznů (*Trebbiano, Lambrusco, Ancelotta, Sauvignon*)
- extrakce šťávy - zahřívání na otevřeném ohni
- startovací kultura = usazeniny kvasinek a bakterií z octa
Mycoderma aceti
- postupné zrání v **dřevěných sudech** (výrobní tajemství ...)
obvykle: kaštan, akát, třešeň, jalovec, dub

pro kvality DOC - min. doba 12 let !



Balsámový ocet

tradiční výroba v Itálii



Balsámový ocet – 4 kategorie kvality:

A) Tradizionale

tradiční ruční výroba - až 80 let zrání
každá šarže prochází degustací
130 – 190 USD / láhev

B) Artigianale

zrání min. 25 let v jalovcových sudech
50-80 USD/ láhev

C) Condimenti

10-20 USD/ láhev

D) Industriale



KYSELINA CITRONOVÁ

Od r. 1923

první úspěšná komerční aplikace moderní biotechnologie

Roční produkce 1,6 mil. tun

45% nápoje, 20% potraviny (E330)

20% mýdla a detergenty, 10% chemická výroba

Použití:

- * **snížení pH** = slabý antimikrobiální účinek (x mléčná, octová)
kyselá chuť nápojů
- * **zvýraznění chuti** konzervovaného ovoce a zeleniny
- * **chelatace Fe a Cu iontů**
(např. inhibice vzniku dimethylaminu v rybách)
- * **antioxidant** (s kys. askorbovou) – inhibice polyfenoloxidas

KYSELINA CITRONOVÁ

Aspergillus niger

- **obligátní aerob**

x za normálních podmínek neprodukuje zvýšené množství

1) izolace kmenů s nadprodukcí citrátu

2) růstové podmínky

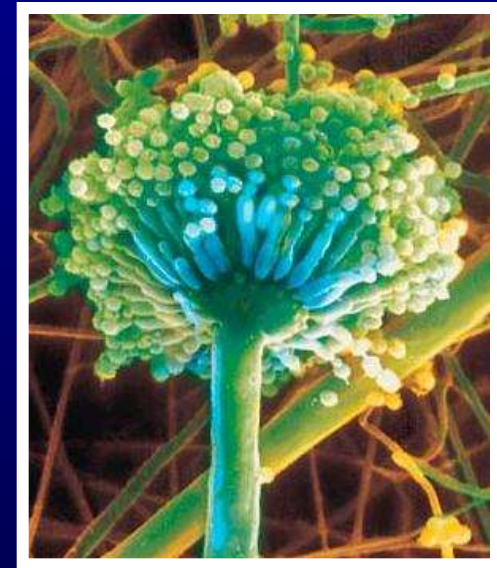
* **dostatek O₂ a glukosy**

* **nepřítomnost Mn**

Produkce kys.citronové v *A.niger* :

- není koncovým produktem metabolismu

- intermediát TCA cyklu



Roční produkce cca 1 600 000 tun (50% Čína)

Kyselina citronová

1) nedostatek Mn

= zrychlený metabolický obrat proteinů

= zvýšená koncentrace NH_4

= odstranění allosterické

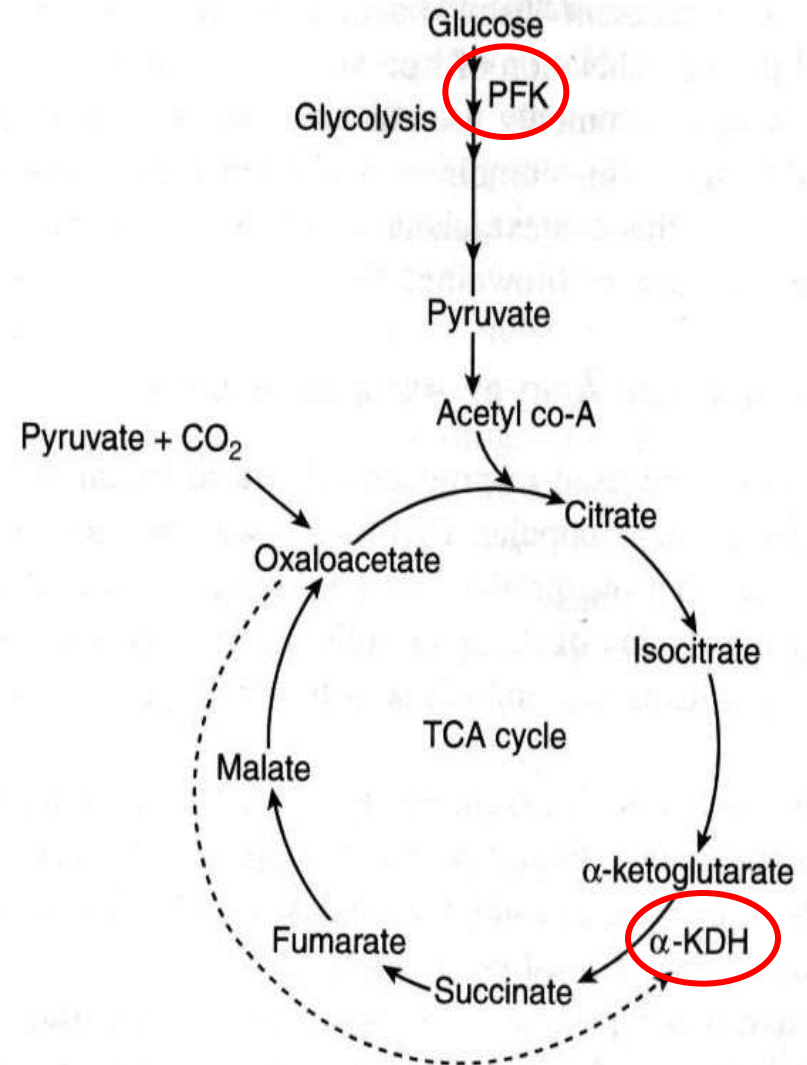
inhibice **fosfofruktokinasy**

2) vysoká konc. glukosy

= produkce oxalacetátu

= inhibice **α -ketoglutaratdehydroge**

také snížení K_m fosfofruktokinasy
x nemožnost oxidace nadbytku citrátu



Kyselina citronová

Použití odpadních organických substrátů
např. „**cassava**“ (yucca, manioc, tapioca)

Manihot esculenta Crantz

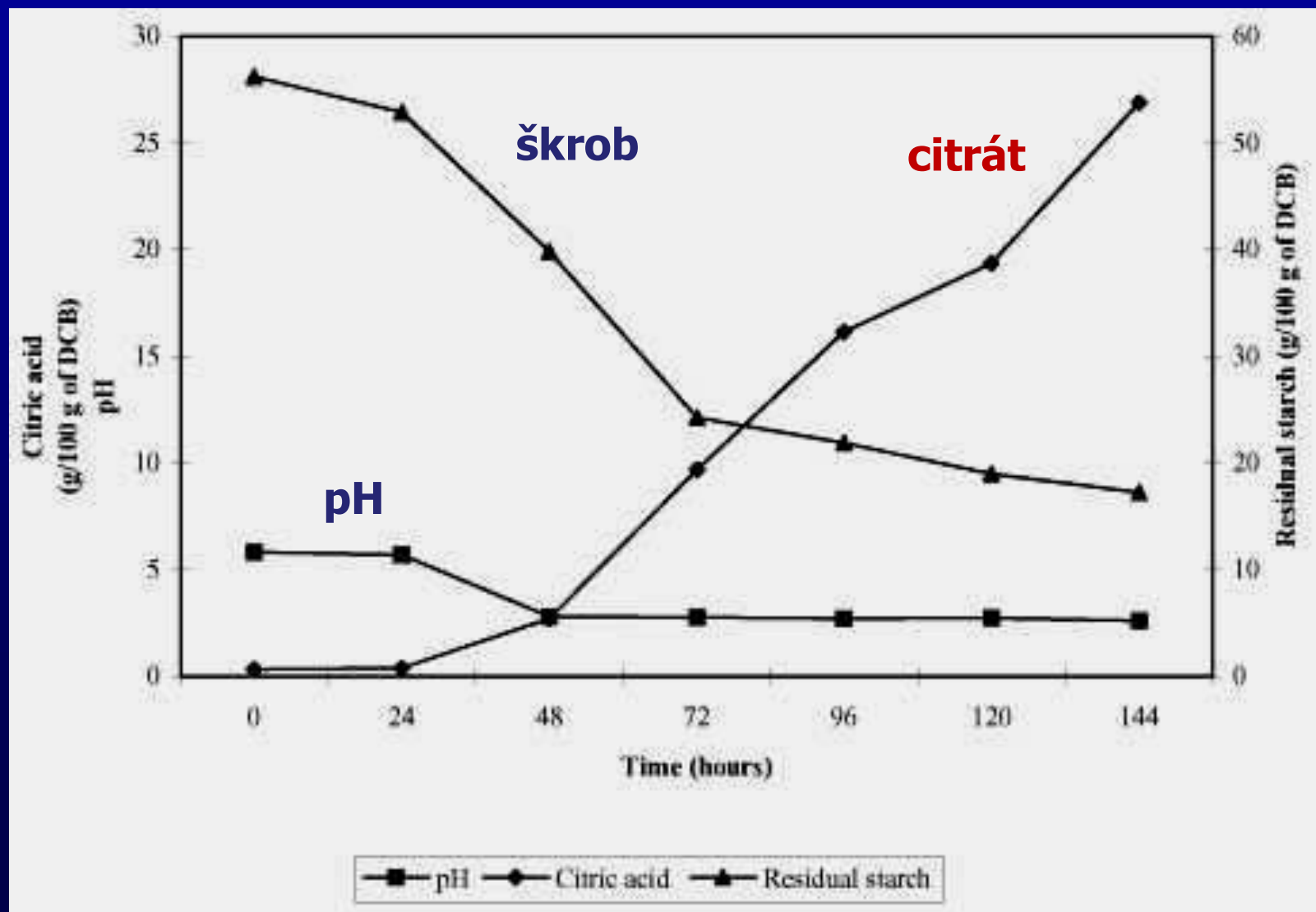
- 30% škrob
- nízký obsah proteinů

Izolace kyseliny z fermentačního média:

- 1) Filtrace houbových částic
- 2) Příklad Ca(OH)₂
- 3) Vysrážení citrátu vápenatého
- 4) Uvolnění kyseliny přidáním kys. sírové



Kinetika produkce kys.citronové z odpadního substrátu po zpracování kasavy



AMINOKYSELINY

Ekonomicky velmi významné

Roční světová produkce: > 2 mil. tun

- 1) **zvýraznění chutě** – glutaman sodný (cca 1,7 mil. tun)
- 2) doplňky **krmiva zvířat** – Met, Lys (800 tis.tun)
potravinové doplňky – Trp, větvené AA
uměla výživa (nitrožilní apod.)
- 3) **sladidla** (aspartam) – Asp, Phe
- 4) **průmyslové použití** (např. Phe – detergenty, chelatace)
- 5) výroba **léků** – Pro, D-Ala

AMINOKYSELINY

Mikroby přirozeně neprodukují zvýšené množství AK

- výjimkou L-Glu, L-Val, L-Ala

Metody:

A) výběr mutantů – defektní kontrola hladiny AK

B) metabolické inženýrství - nutná znalost příslušných drah

Přednosti oproti jiným technologiím:

- **hydrolýza proteinů** x náročná separace směsi AA

- **chemická syntéza** x D,L stereoisomery

AMINOKYSELINY

Výběr mikroorganismu:

hledisko způsobu kontroly příslušné biosyntetické dráhy

př. **E. coli** – složitá 3-stupňová kontrola = obtížné překonání

- zpětná inhibice produktem (E)
- represe transkripce (mRNA)
- atenuace (tRNA)

př. *Serratia marcescens* (*Enterobacteriaceae*)

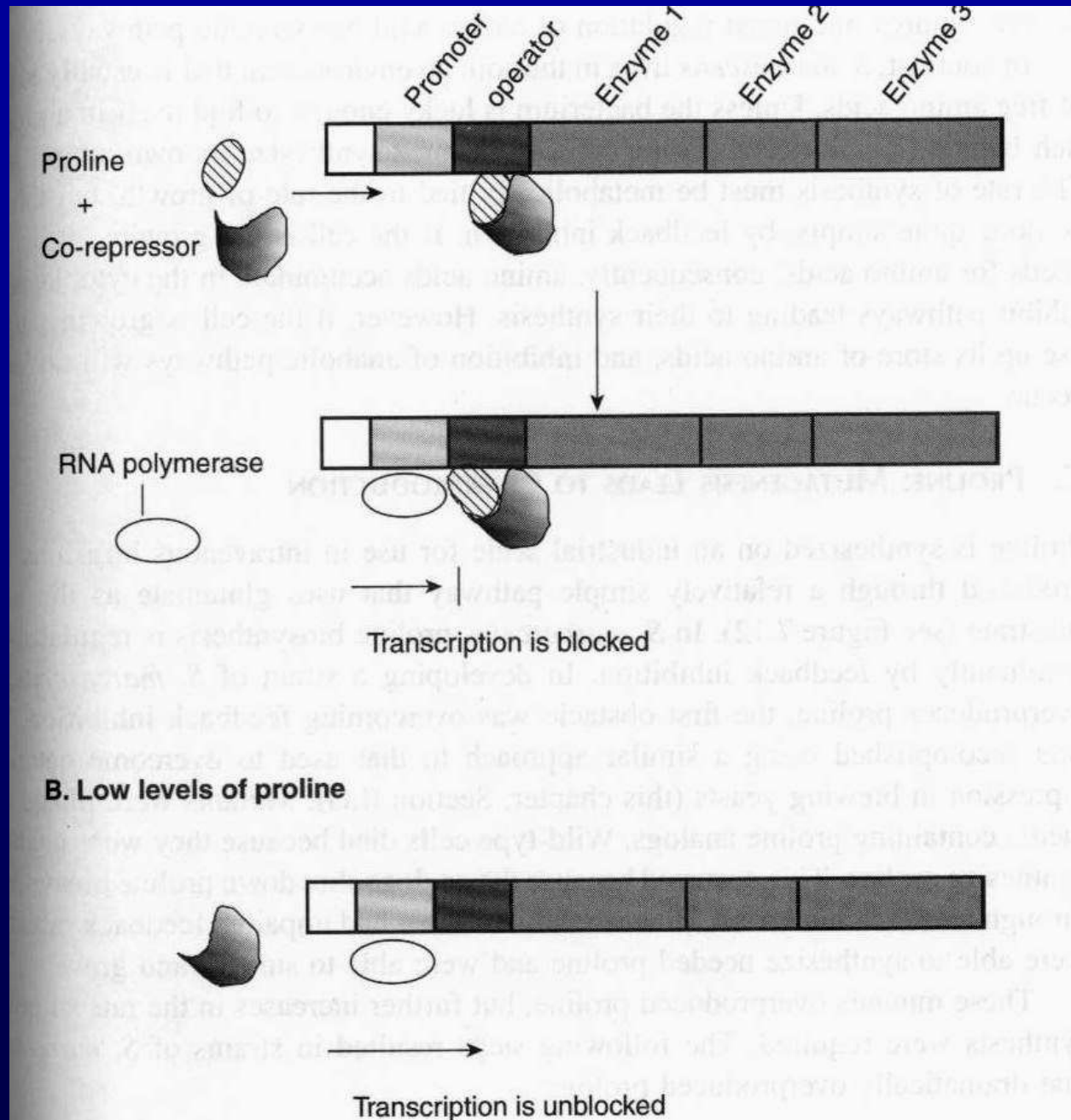
– pouze zpětná inhibice produktem

→ Důvod ... odlišné životní prostředí

E. coli – GT živočichů

S. marcescens – půda

E. coli
represe transkripce



α -ketoglutarate (diverted from the TCA cycle)

transaminase

glutamate

glutamate kinase

glutamic γ -semialdehyde

glutamic γ -semialdehyde dehydrogenase

Δ^1 -pyrroline 5-carboxylate

Δ^1 -pyrroline 5-carboxylate reductase

L-proline

Příklad 1:

Prolin

(Serratia marcescens)

Příklad 1: **Prolin** - *Serratia marcescens*

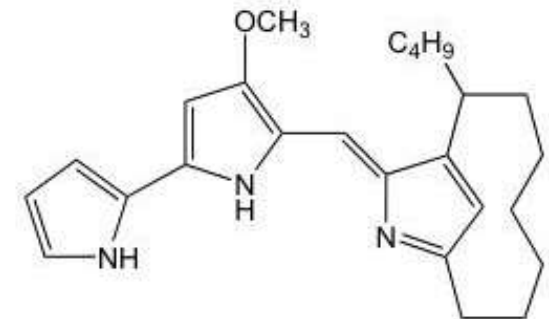
Postupné nalezení maximální produkce AA

Vysoceprodukční kmen – 57 mg Pro/ml média

- 1) výběr mutantu: analoga prolinu
- 2) odstranění genu pro degradaci prolinu
- 3) růst na médiu s vysokým obsahem NaCl
- 4) více kopií genu pro syntézu Pro



x tento postup nelze aplikovat obecně
– větvené metabolické dráhy



Příklad 2: **Glutamát** z *Corynebacterium glutamicum*

- ekonomicky nejvýznamnější
- glutamátový chuťový receptor
- Japonsko – tradiční sušené chaluhy "*konbu*"

50.léta – objev půdních bakterií s nadprodukcí Glu: až 100 g/l
taxon. *Corynebacterium* / *Brevibacterium*

Podmínky:

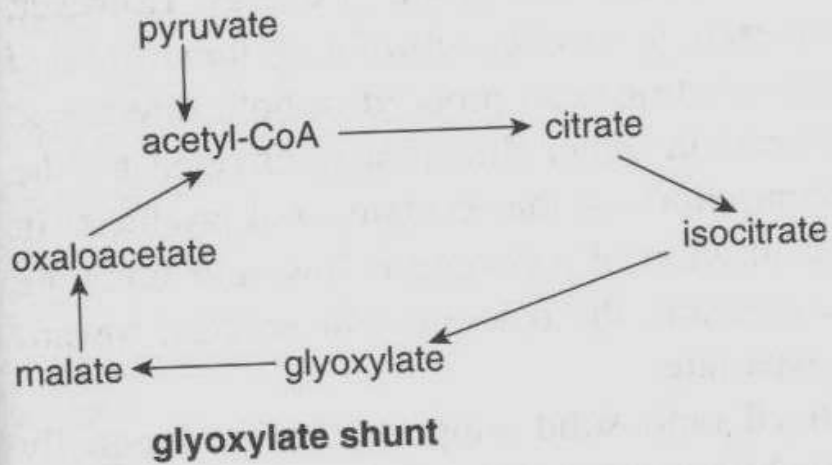
Proč tolik glutamátu ...??

- nedostatek biotinu** – zvýšení propustnosti membrán pro Glu
aktivace specifických transportérů
- nedostatek O₂** – energetický metabolismus končí Glu
nízká aktivita α -ketoglutarátdehydrogenasy

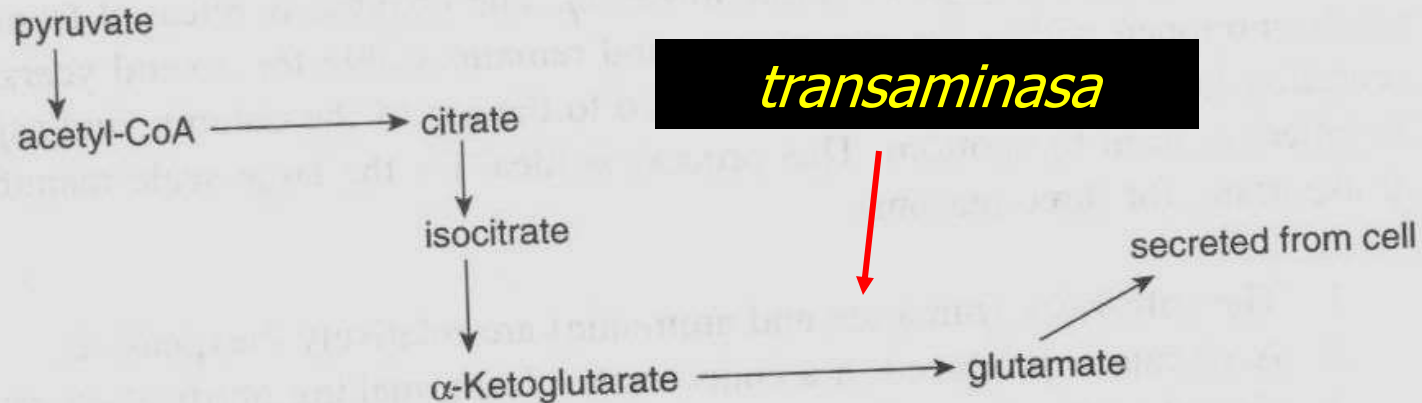
Při použití melasy – rychlé vyčerpání biotinu i O₂

Příklad 2: **Glutamát** (*C. glutamicum*)

A. Catabolism of pyruvate in the presence of oxygen



B. Catabolism of pyruvate under low oxygen availability



AMINOKYSELINY

Příklad 3: **Aspartát** pomocí *E.coli*



L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester

Aspartate

Phenylalanine

Methanol

Umělé sladidlo aspartám:

Phe: obdobné metody výběru mutantů jako u Pro

Asp: **aspartasa z *E.coli***

* za normálních podmínek Asp zdroj energie

* při vysoké konc. kys.fumarové a NH_3 = obrácená reakce

Enzym:

- **imobilizovaný** na pevném sorbentu
- použití **buněk *E.coli* imobilizovaných v bioreaktoru**
po několika dnech dochází k lýzi buněk
x enzym zachycen v koloidu

Nutnost kontroly čistoty produktu:

1988-90 **syndrom eosinofílie-myalgie** – cca 60.000 postižených
v Japonsku zemřelo 25 lidí
v USA 1500 trvale postižených



- původem málo purifikovaný Trp (f. Showa Denko)
- kontaminace toxickým **fosforibosyldifosfátem**
produkt prvního kroku biosyntézy Trp
v *Bacillus amyloliquefaciens*
- obecně vznik možnost toxických látek
reaktivita AK při vysoké koncentraci

VITAMINY

Chemická syntéza:

hlavní podíl produkce x fosilní zdroje

Mikrobiální biotechnologie:

ergosterol (proD), **riboflavin**, **B12**, **B13**

vitamin C – kombinace bio a chemická syntéza

Podmínky

- 1) selekce kmenů přirozeně produkujících vitamín
- 2) optimalizace růstových podmínek v bioreaktoru

př. riboflavin:

vláknité houby *Ermothecium ashbyi*, *Ashbya gossypii*

úspěšná náhrada chem. syntézy – “zelená” technologie,

- obnovitelné zdroje substrátů

VITAMIN C

roční produkce cca 100.000 tun



A) klasická chemická syntéza (Reichstein)

- několikasupňová chemická syntéza + jeden fermentace
Acetobacter suboxydans
- nebezpečné látky

B) 2-stupňová fermentace („čínská cesta“)

Gluconobacter, Erwinia spp.

C) 1-stupňová fermentace – zatím v laboratorních podmínkách
kmeny kvasinek přeměňující D-galaktosu na askorbát

VITAMIN C

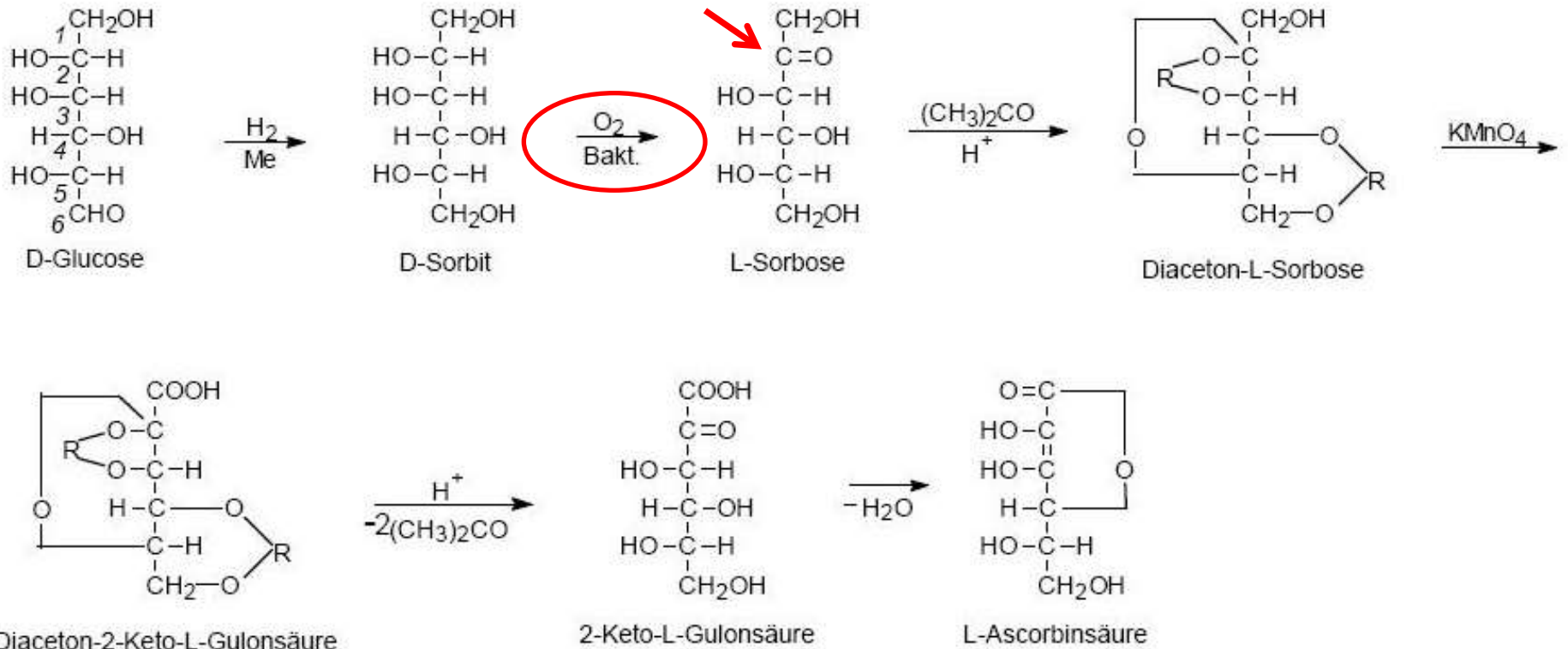
Vitamíny



roční produkce cca 100.000 tun

A) klasická výroba (Reichstein)

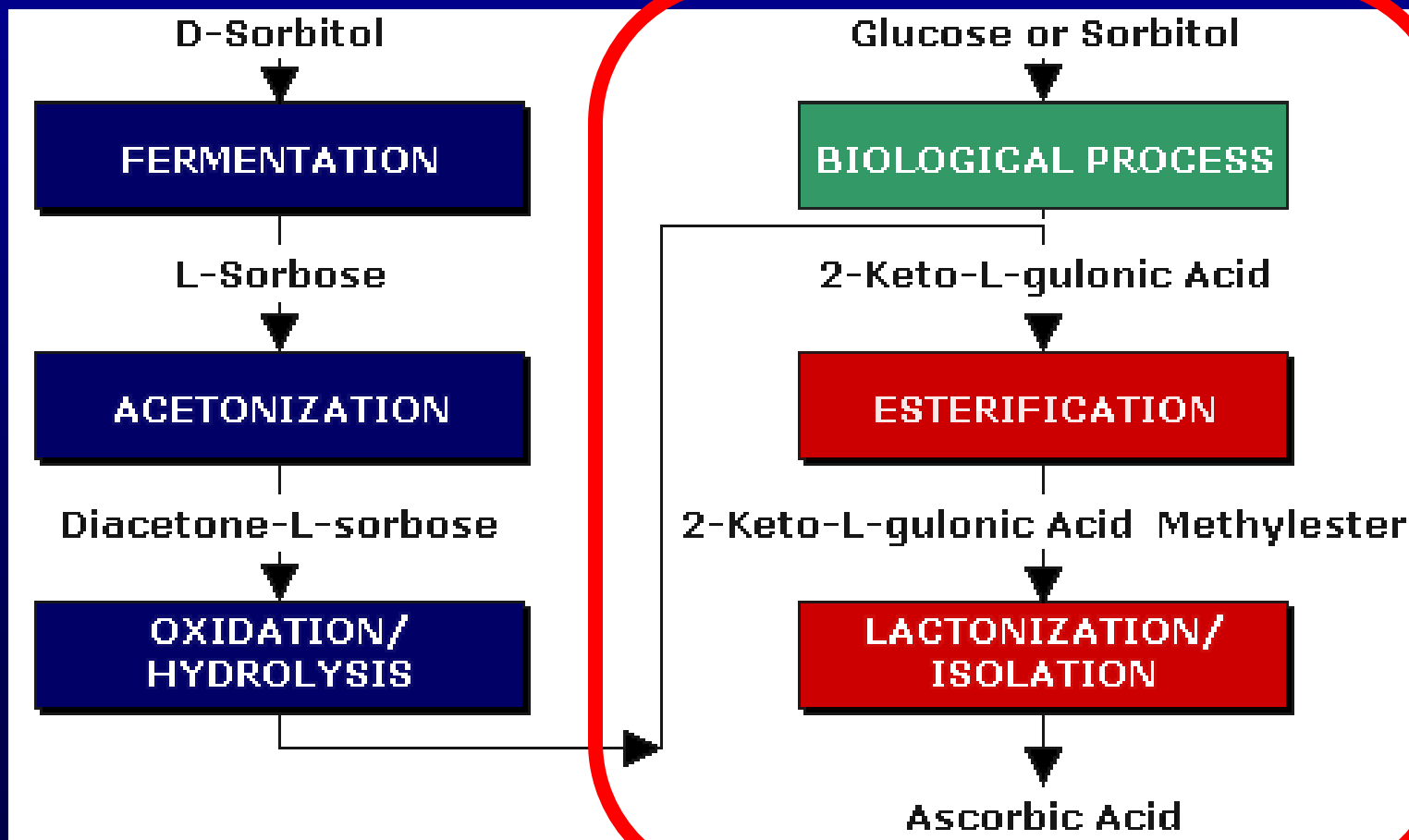
- několikastupňová chemická syntéza + jeden fermentace
- nebezpečné látky



VITAMIN C

Vitamíny

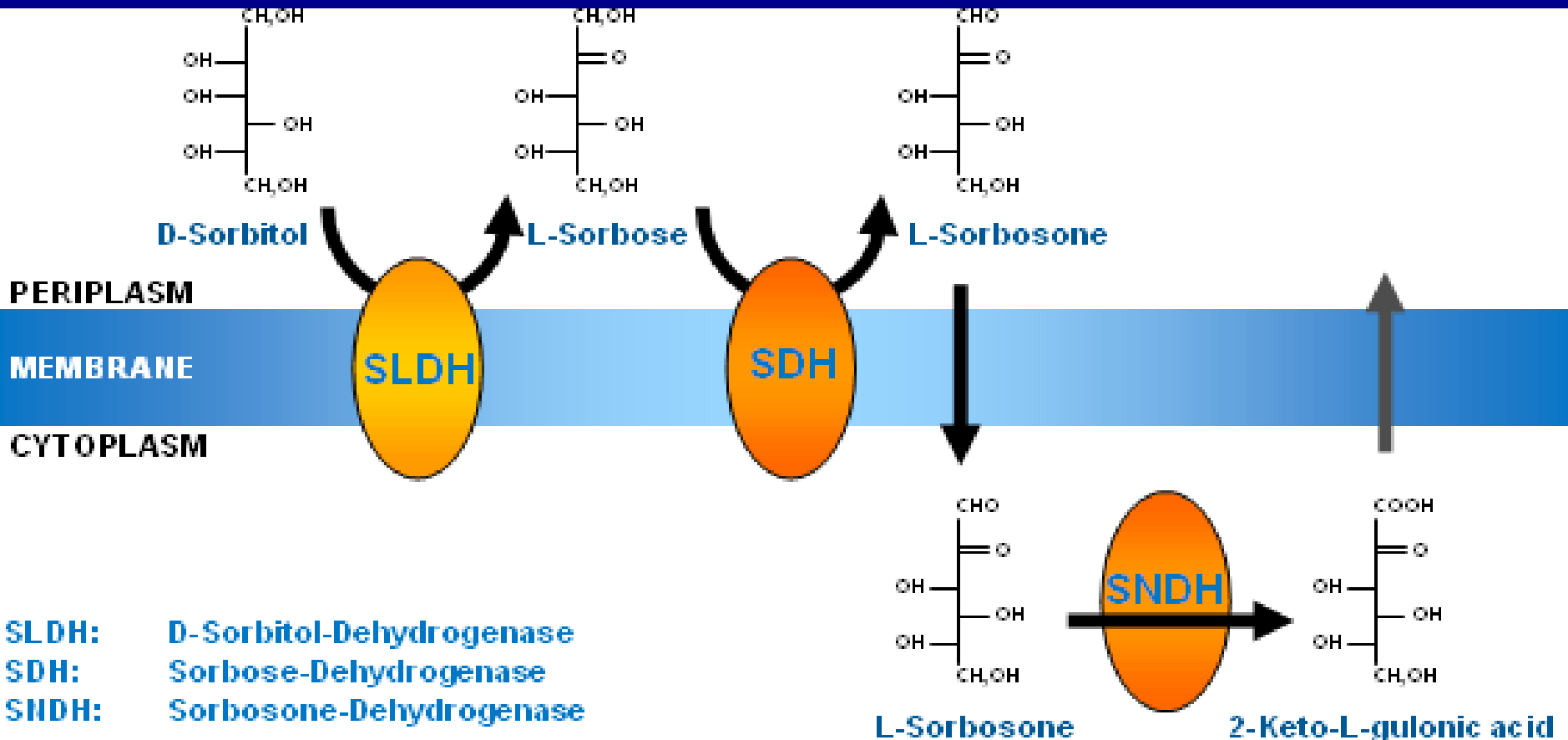
B) 2-stupňová fermentace („čínská cesta“)



VITAMIN C

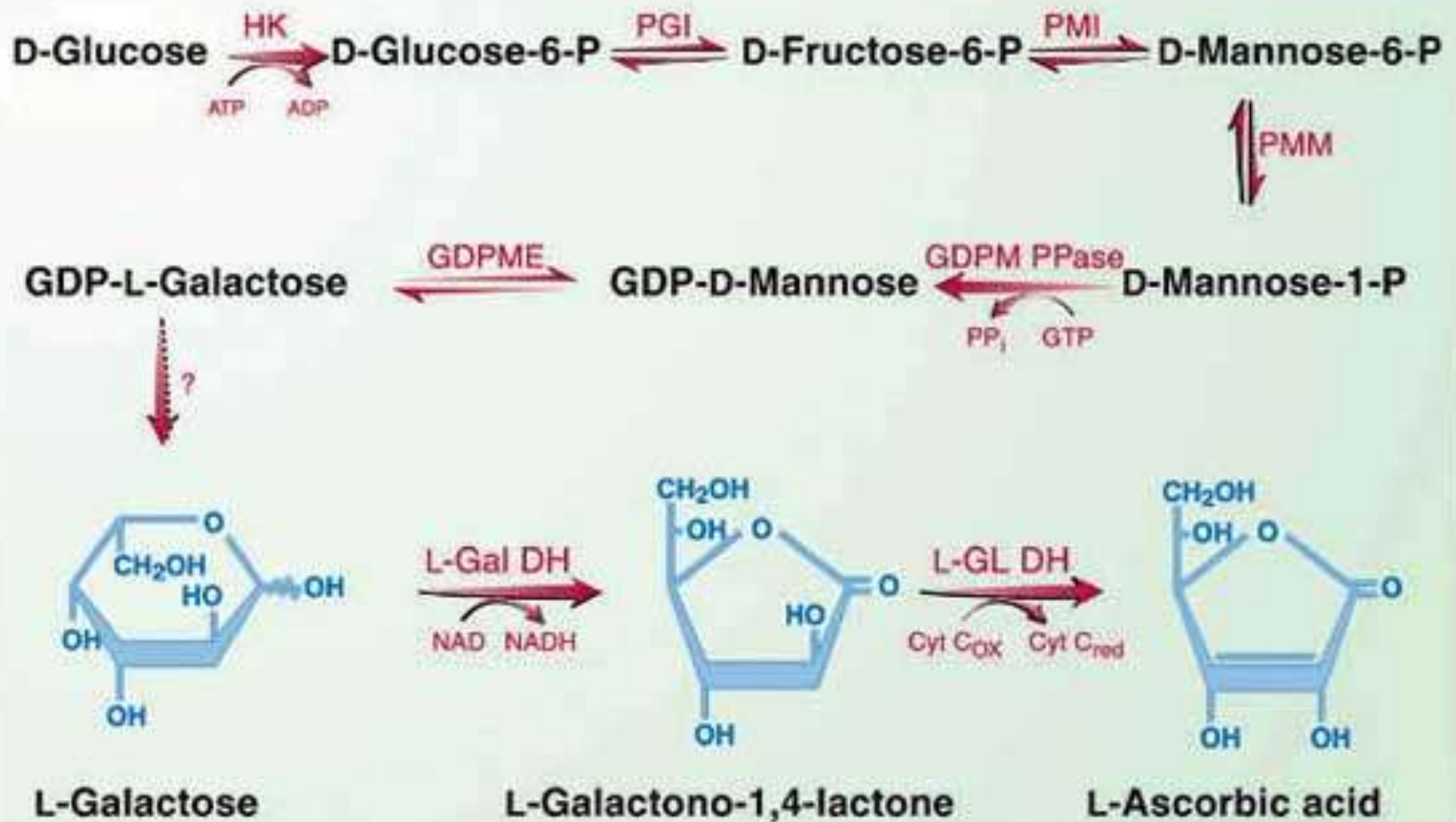
Gluconobacter

- transgenní bakterie se zvýšenou produkcí kys. 2-keto-L-gulonové (výchozí meziprodukt pro syntézu kys. askorbové)



VITAMIN C

C) 1-stupňová fermentace – zatím v laboratorních podmínkách kmeny kvasinek přeměňují galaktosu na askorbát



Příště



Enzymy



OptiPhos[®]
The Advanced Phytase

OptiPhos[®]
is the
advanced
phytase.

