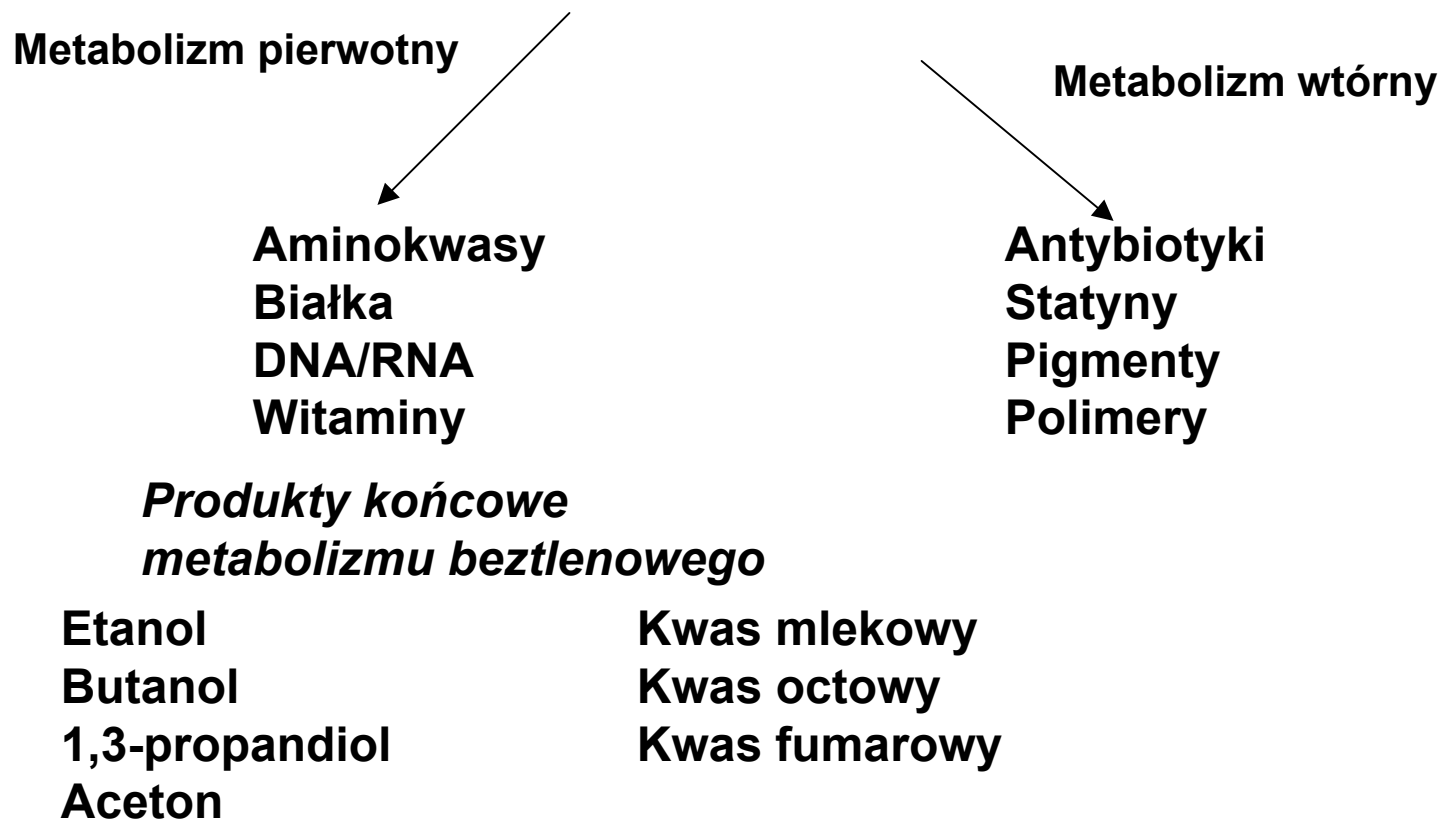


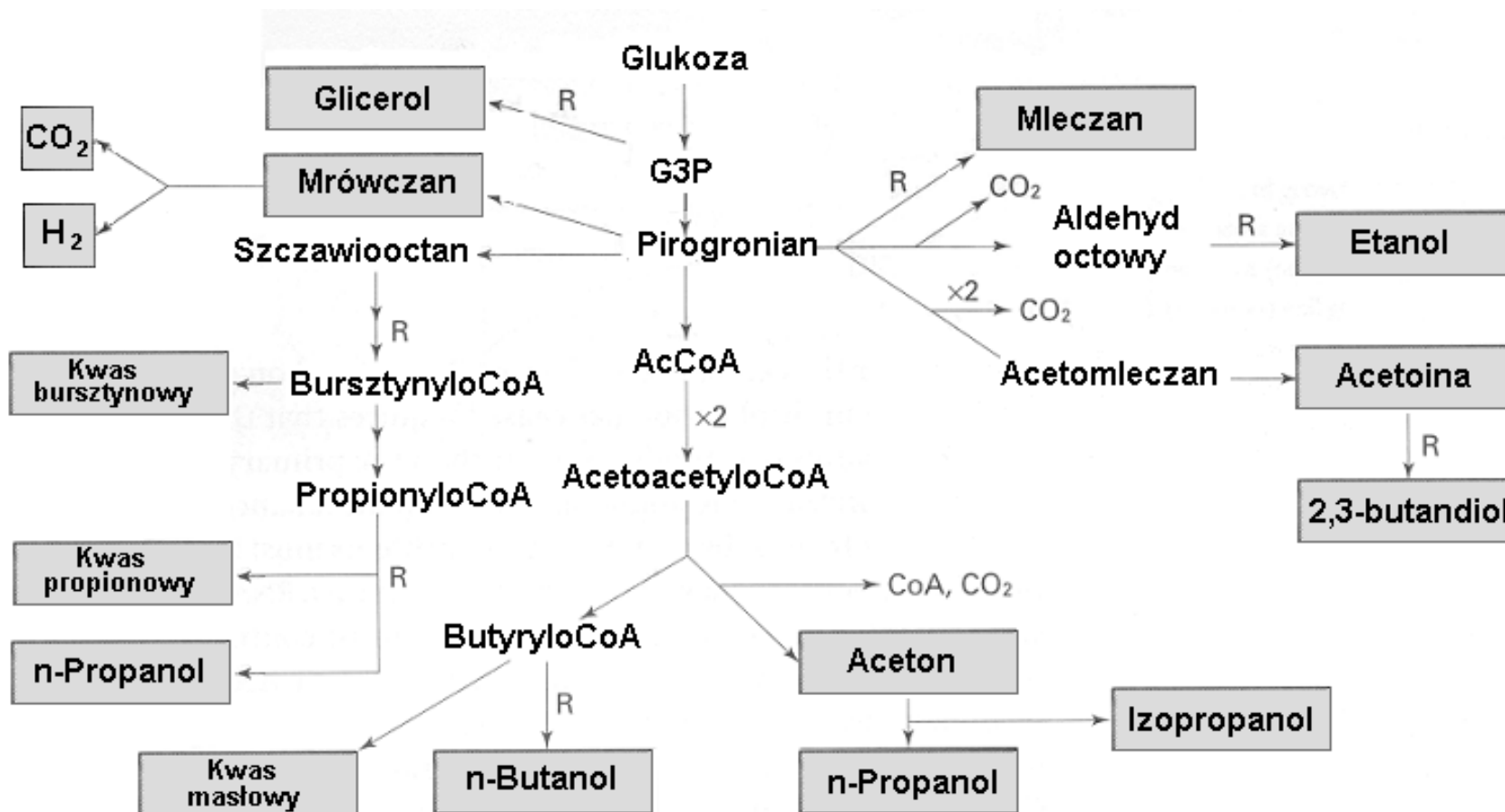


# Produkty metabolizmu drobnoustrojów

## Substraty pokarmowe



## Produkty metabolizmu beztlenowego różnych drobnoustrojów



**R – reakcje prowadzące do regeneracji NADH.**



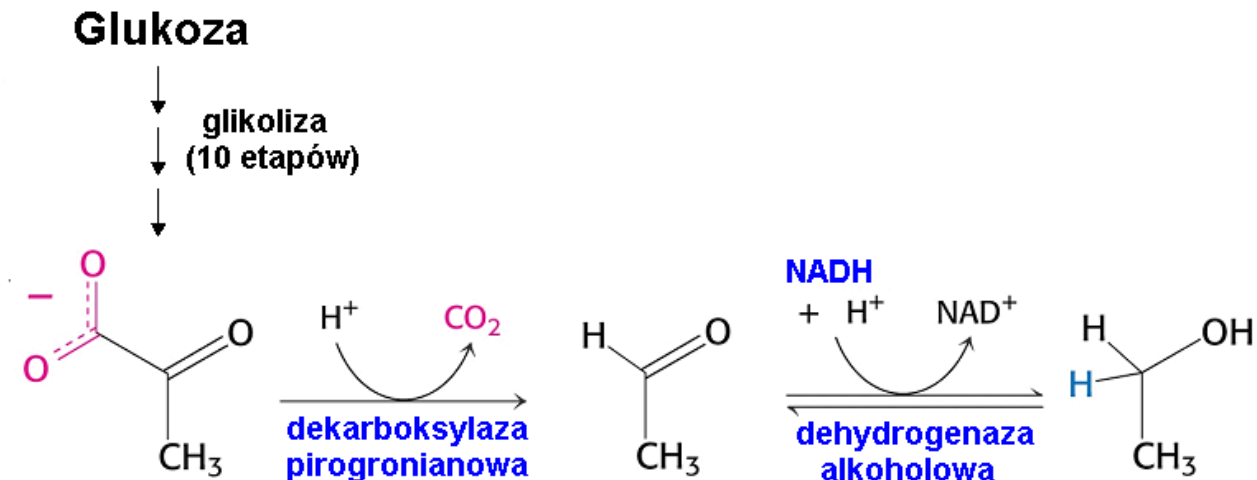
## Przykłady prostych związków organicznych otrzymywanych metodami fermentacyjnymi

Substancja	Drobnoustrój	Zastosowanie
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Zymomonas mobilis</i>	artykuły spożywcze, rozpuszczalnik paliwo
Kwas octowy	<i>Acetobacter</i> spp.	artykuły spożywcze, rozpuszczalnik, odczynnik
Aceton	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	rozpuszczalnik, odczynnik
Butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	rozpuszczalnik, odczynnik
Glicerol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	rozpuszczalnik, plastyfikator, kosmetyki, płyny niezamarzające
Izopropanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	rozpuszczalnik, tusze drukarskie, płyny niezamarzające
1,3-propandiol	<i>Clostridium butyricum</i>	tworzywa sztuczne, rozpuszczalnik, smary
Kwas fumarowy	<i>Rhizopus oryzae</i>	żywice poliestrowe
Kwas mlekowy	<i>Lactobacillus</i> spp.	tekstylija
Kwas cytrynowy	<i>Aspergillus niger</i>	artykuły spożywcze, galwanizacja

## Drobnoustroje wytwarzające etanol

Drobnoustrój	Wykorzystywane substraty
<b>Drożdże</b> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>  <i>Kluyveromyces fragilis</i>  <i>Candida tropicalis</i>	glukoza, fruktoza, galaktoza, maltoza, maltotrioza, ksyluloza glukoza, fruktoza, galaktoza, maltoza, maltotrioza, ksyluloza glukoza, galaktoza, laktoza
<b>Bakterie</b> <i>Zymomonas mobilis</i>  <i>Clostridium thermocellum</i>	glukoza, fruktoza, sacharoza  glukoza, celobioza, celuloza

## Wytwarzanie etanolu na drodze fermentacyjnej przez drobnoustroje Podstawa metaboliczna: proces fermentacji etanolowej.



**Niezbędny substrat – glukoza**

**Możliwe źródła glukozy z surowców odpadowych: skrobia, celuloza, laktoza, sacharoza**

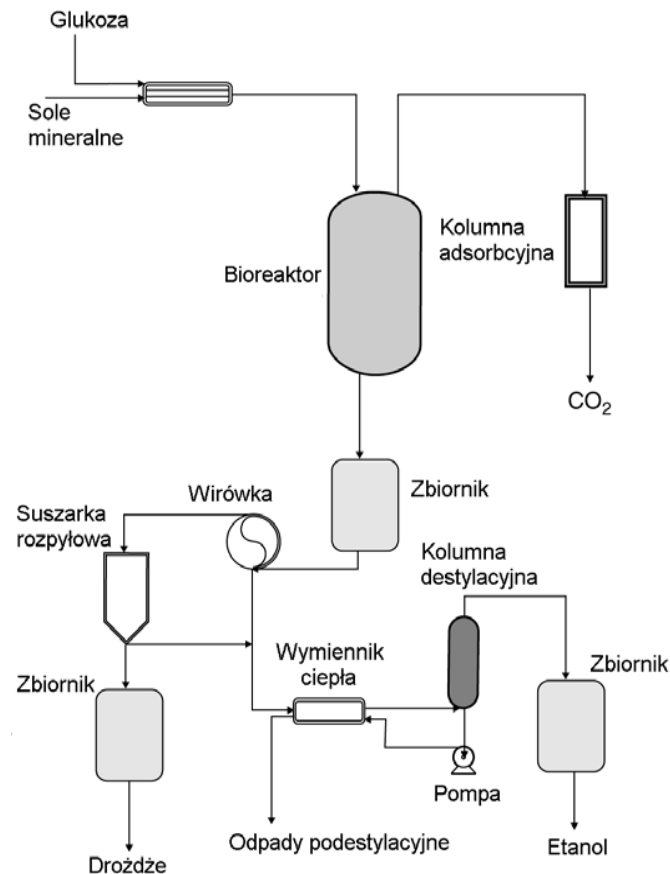
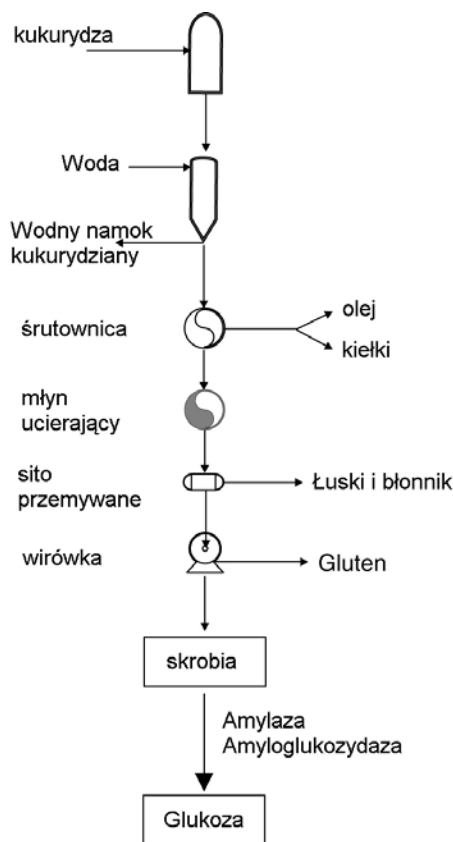
**Skrobia – polimer reszt glukozy połączonych wiązaniami  $\alpha$ -1,4-glikozydowymi**

**Celuloza – polimer reszt glukozy połączonych wiązaniami  $\beta$ -1,4-glikozydowymi**

**Laktoza – dwucukier zbudowany z galaktozy i glukozy połączonych wiązaniem  $\beta$ -1,4**

**Sacharoza – dwucukier zbudowany z glukozy i fruktozy**

## Otrzymywanie etanolu ze skrobi kukurydzianej

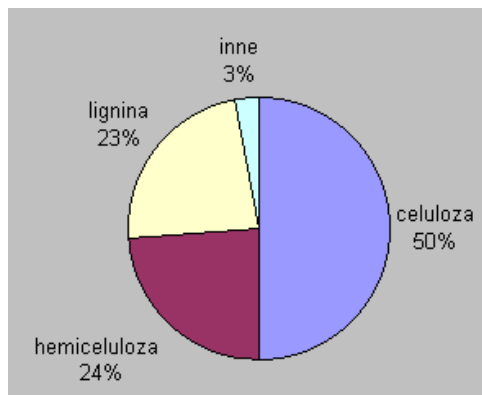


**Uzyskiwanie skrobi z kukurydzy i glukozy ze skrobi**

**Wytwarzanie etanolu z glukozy**

## Wytwarzanie etanolu z celulozy i ligninocelulozy

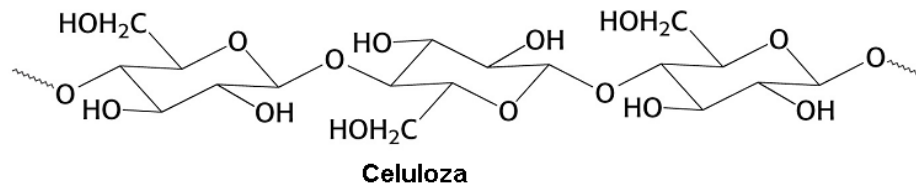
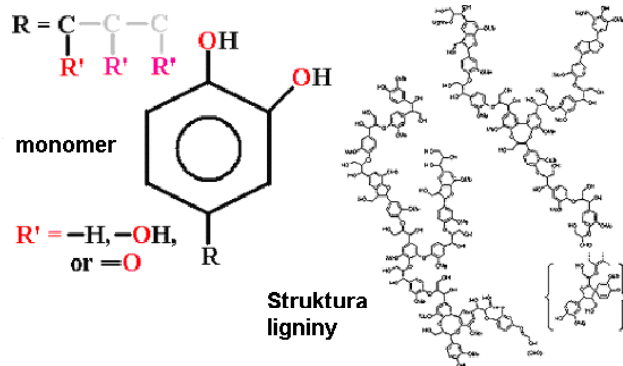
**Źródła celulozy i ligninocelulozy:** wysłodki, słoma, odpady przemysłu papierniczego, trociny, komunalne odpady stałe, makulatura



**Degradacja celulozy do glukozy przez drobnoustroje wymaga działania dwóch enzymów:**

**celulaza hydrolizuje celulozę do celobiozy (dwucukier)  
β-glukozydaza hydrolizuje celobiozę do glukozy**

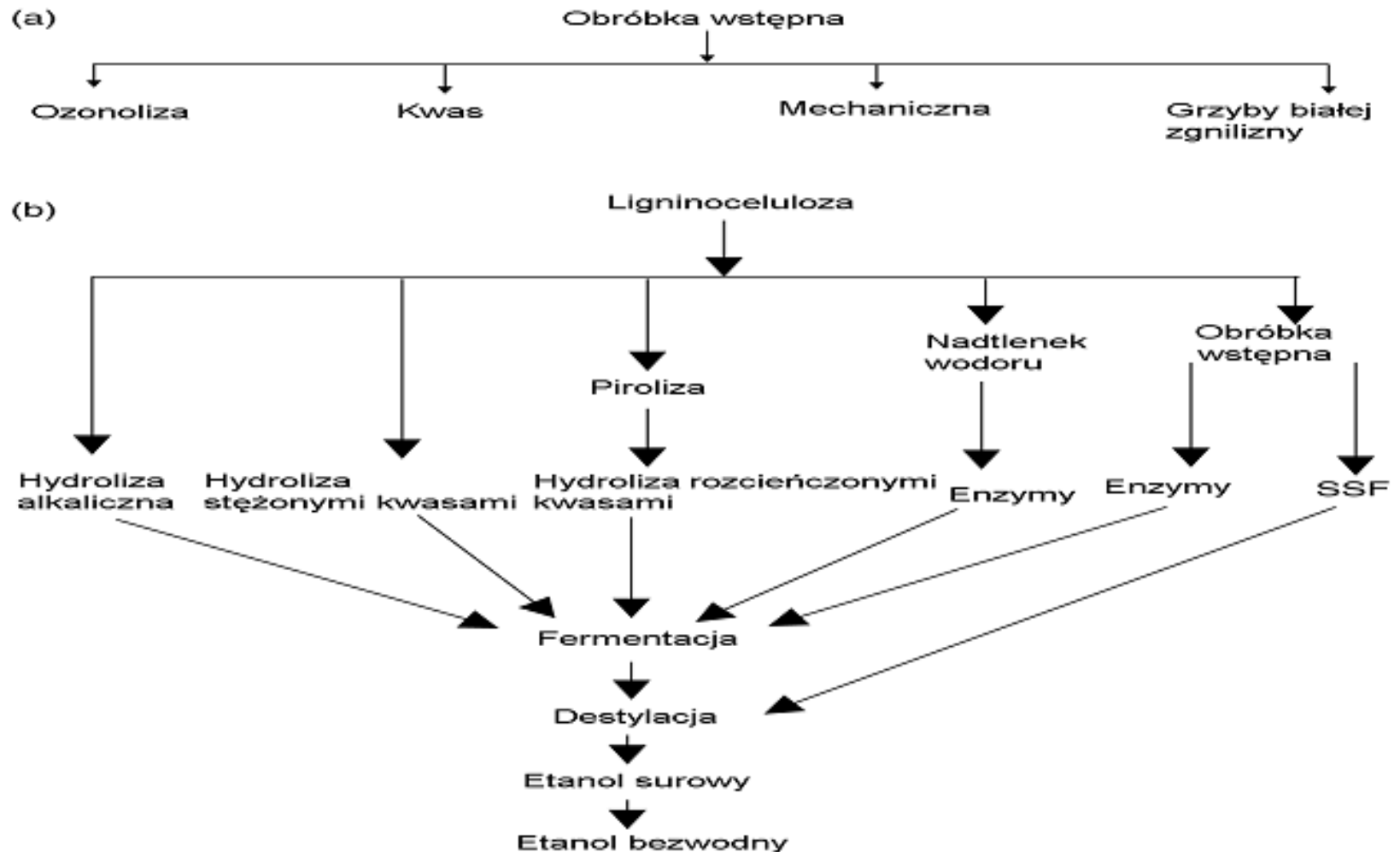
## Skład chemiczny drewna



Podjednostki glukozytowe połączone wiązaniami β-1,4-glikozydowymi



## Etapy i metody chemo/biokonwersji ligninocelulozy i celulozy w etanol





## Grzyby białej zgnilizny (*white rot fungi*)



### *Phanerochaete chrysosporium*

Grzyby te produkują i wydzielają poza błonę cytoplazmatyczną enzymy, które degradują ligniny obecne w drewnie. Do enzymów tych należą: peroksydaza ligninowa, lakkaza (enzym przekształcający związki fenolowe w chinony i Mn-zależna peroksydaza).



### *Phanerochaete crassa*



### *Phanerochaete rhizon*



## Pierwsza instalacja do przemysłowego wytwarzania etanolu z celulozy została uruchomiona w 2004 roku przez kanadyjską firmę IOGEN



**Widok ogólny fabryki**



**Rozdrabnianie słomy**



**Prasy filtracyjne do oddzielania lignin**



**Biofermentor (obj. 250 m<sup>3</sup>)**



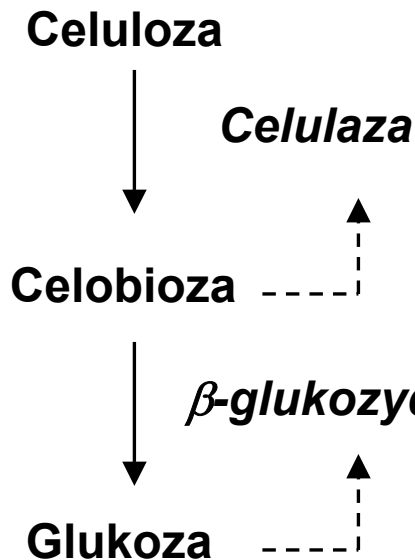
**Zbiorniki do etanolu**



## Technologia SSF

**Problem:** glukoza powstająca w wyniku dwuetapowej hydrolizy celulozy jest inhibitorem  $\beta$ -glukozydazy.

**Rozwiązanie problemu:** połączenie procesu scukrzania celulozy i fermentacji alkoholowej w technologii SSF.



- a) konsorcjum *T. reesei* i *S. cerevisiae*, temp. 38 °C
- b) konsorcjum *T. reesei* i *Kluyveromyces fragilis*, temp. 42 °C

**Inne kierunki badań:**

- a) zastosowanie *Clostridium thermocellum*
- b) genetycznie modyfikowane drożdże zawierające geny kodujące celulazę i  $\beta$ -glukozydazę lub alternatywnie amylazę (możliwość metabolizowania skrobi)

**Enzymatyczna hydroliza celulozy:**  
preparat enzymów celulolitycznych z *Trichoderma reesei*.

**Warunki:** pH 4,8,  
temperatura 45 – 50 °C



## Wytwarzanie etanolu z serwatki

**Serwatka** - prawie klarowna ciecz powstała po ścięciu zawartej w mleku kazeiny:

**laktoza 4,5 - 5,0%**, białka 0,6 - 0,8%, lipidy 0,4 - 0,5%, sole mineralne, kwas mlekowy, kwas cytrynowy, mocznik, kwas moczowy; pH ~5. Światowa produkcja serwatki – około 150 mln ton/rok; w Polsce – około 3 mln ton/rok. Uciążliwy odpad poprodukcyjny przemysłu mleczarskiego –  $BZT_5 = 40\ 000 - 50\ 000\ \text{mg/dm}^3$ .

**Drożdże *Sacharomyces cerevisiae* nie fermentują laktozy**

**Możliwości wytwarzania etanolu z serwatki:**

-wykorzystanie drożdży *Klyveromyces fragilis*. Technologie Anchor Ethanol Company (Nowa Zelandia), Golden Cheese Company (USA).

Problem – wydajność nie przekraczająca 4% v/v.

-zastosowanie rekombinowanych szczepów *S. cerevisiae*:

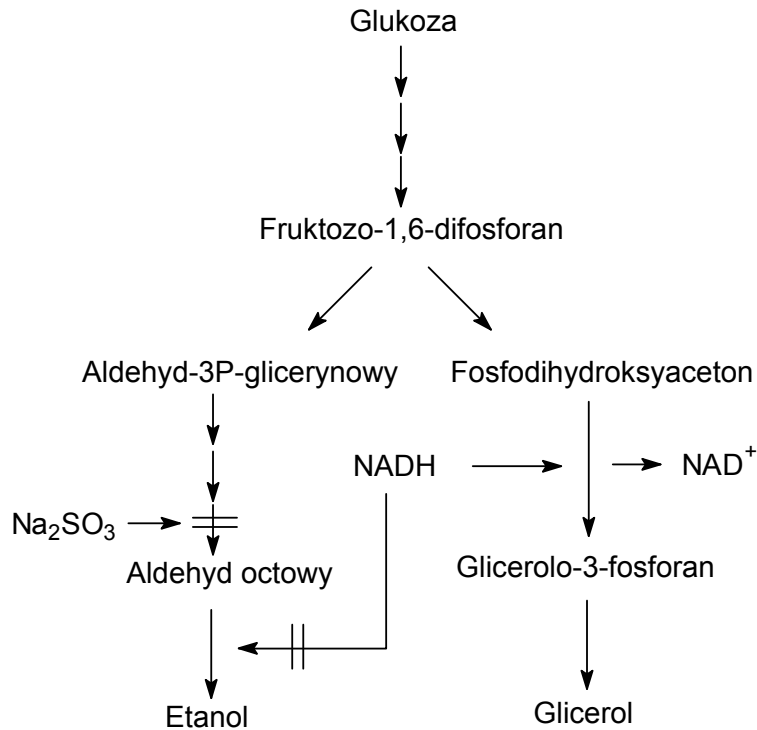
wklonowanie genów  $\beta$ -galaktozydazy i permeazy laktozowej  
wklonowanie genu zewnątrzkomórkowej  $\beta$ -galaktozydazy

## Wytwarzanie glicerolu

**Synteza chemiczna: substrat - chlorek allilu; odpadowe produkty chlorowane**

**Produkt hydrolizy triacyloglicerydów**

**Biosynteza: *S. cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Dunaliella tertiolecta* (halofilne glony)**



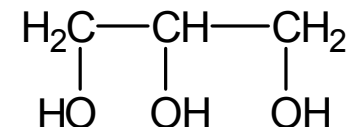
**Metaboliczne warunki „przekierowania” fermentacji etanolowej w stronę wytwarzania glicerolu z wykorzystaniem siarczanu(IV) sodu**

**Strategie nadprodukcji glicerolu:**

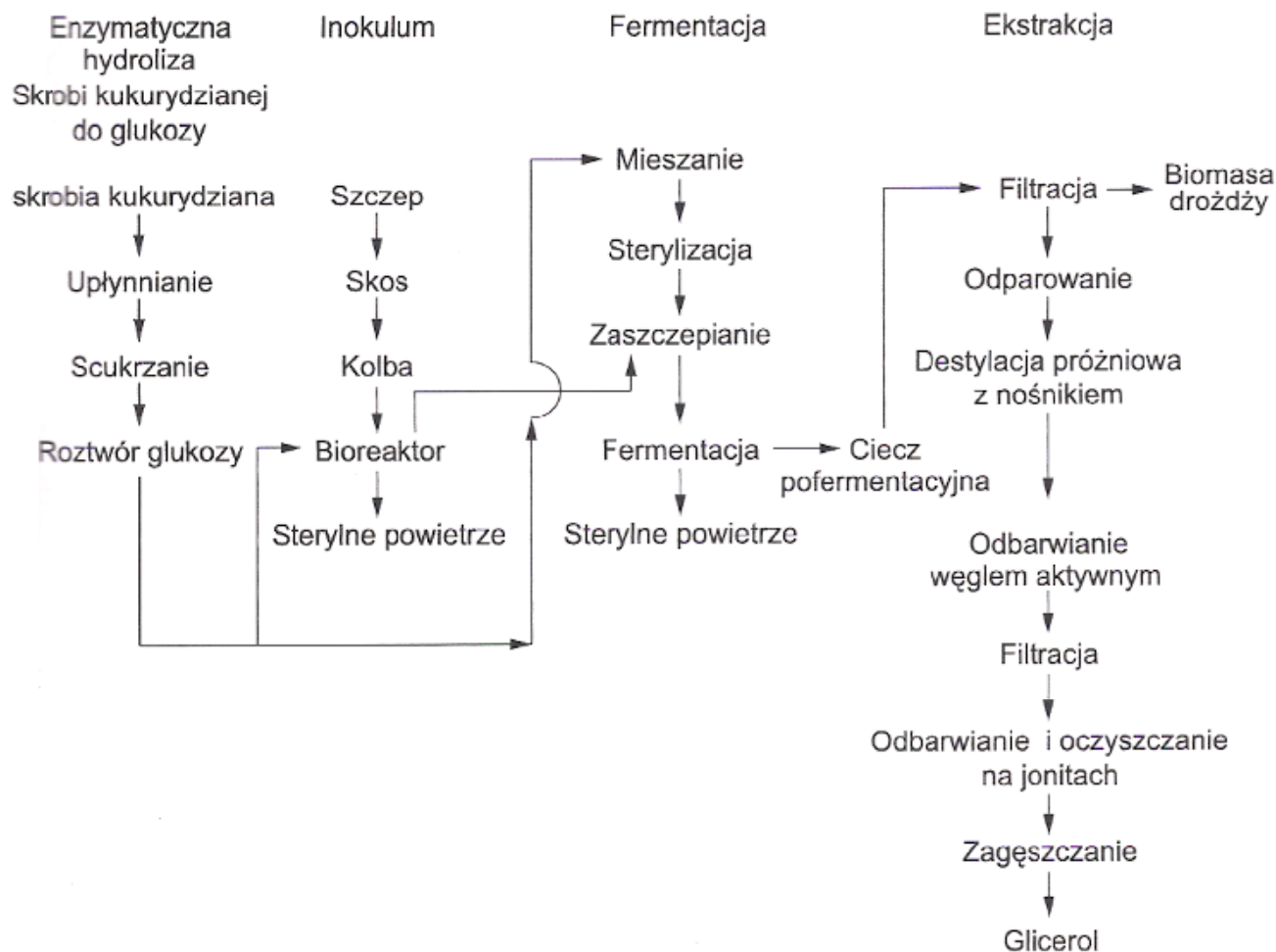
- dodatek siarczanu(IV)
- pH 7 – 8
- stres osmotyczny

**W przypadku hodowli *S. cerevisiae* w obecności siarczanu(IV) osiąga się stężenia 3% glicerolu, 2% etanolu i 1% aldehydu octowego.**

**W chwili obecnej ponad 90% glicerolu otrzymuje się fermentacyjnie.**



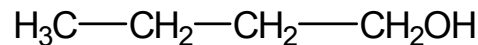
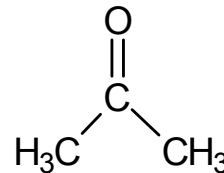
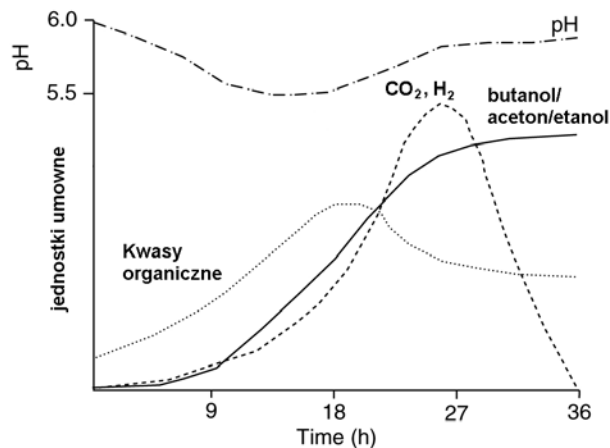
## Wytwarzanie glicerolu



Ideowy schemat produkcji glicerolu przez *Candida glycerinogenes* w warunkach tlenowych

## Wytwarzanie acetonu i butanolu

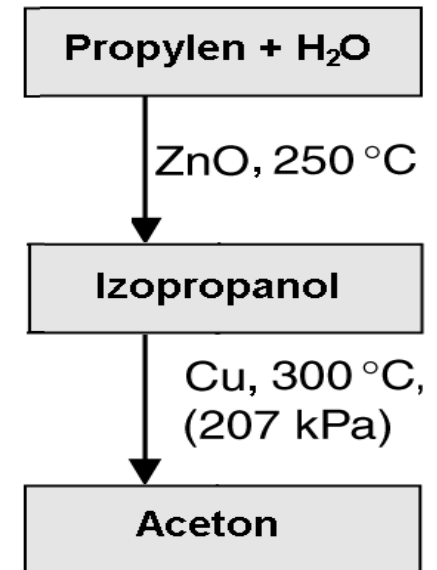
Aceton i butanol były jednymi z pierwszych produktów biotechnologicznych, dla wytwarzania których opracowano przemysłową technologię. Chaim Weizman opracował w 1914 warunki procesu z wykorzystaniem bakterii *Clostridium acetobutylicum*, ze skrobią lub melasą jako źródłem węgla. W 1930 Zastosowano *Clostridium saccharobutylicum*, które wykorzystując sacharozę wytwarzają jedynie aceton i butanol



Kinetyka zmian pH i wytwarzania produktów metabolizmu podczas hodowli *Clostridium acetobutylicum*.

Wydajność procesu: 30% substratu zostaje przekształcone w produkty. Stosunek molowy butanol: aceton: etanol – 6:3:1

## Chemiczna metoda wytwarzania acetonu





## Wytwarzanie acetonu i butanolu

### Powody zarzucenia oryginalnej metody biotechnologicznej:

- niezadowalająca wydajność; niemożliwość przekroczenia granicznych stężeń etanolu i butanolu, toksycznych dla producenta
- fagowrażliwość szczepów produkcyjnych
- autoliza komórek w fazie stacjonarnej
- wysoki koszt substratu i destylacji
- petrochemiczna metoda wytwarzania acetonu okazała się tańsza

### Nowe perspektywy:

- konstrukcja szczepów mogących wykorzystywać surowce odpadowe, w tym celulozę
- wprowadzenie anaerobowej fermentacji odpadów z wytwarzaniem biogazu
- prowadzenie fermentacji w 60 °C z jednoczesnym usuwaniem produktów przez odparowanie
- usuwanie produktów przez odwróconą osmozę, ekstrakcje membranową, odparowywanie membranowe



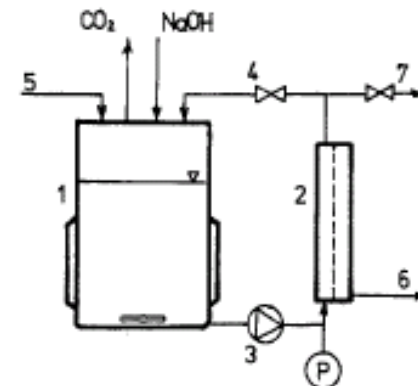
## Kwas mlekowy

Producenci: bakterie kwasu mlekowego – np. *Lactobacillus delbrueckii*, var. *bulgaricus* wymagają do wzrostu mieszaniny aminokwasów *Streptobacterium*, *Lactococcus*

Pożywki: źródło węgla - scukrzona skrobia, sacharoza, glukoza, melasa, serwatka, ługi posulfitowe związki azotowe, autolizaty drożdżowe, mikroelementy

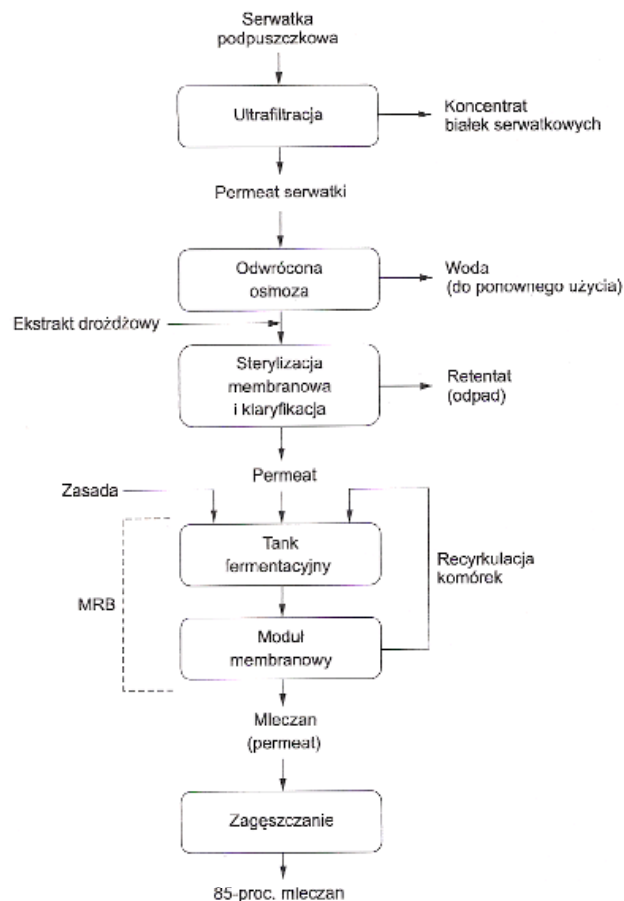
Produkty końcowe: kwas mlekowy techniczny (20-80% kwasu mlekowego, jasnobrązowy. Stosowany do odwapniania skór i w przemyśle włókienniczym; kwas mlekowy spożywczy > 80%, bezbarwny. Dodatek do żywności; kwas farmakopealny >90%. Leczenie schorzeń jelit, preparaty higieniczne; Do produkcji polimerów – bezbarwny <0.01% popiołu. Do produkcji lakierów, pokostów i polimerów biodegradowalnych; mleczan wapnia

Proces wytwórczy z serwatki. Producent – *Lactobacillus lactis*. Usuwanie produktu z cieczy pofermentacyjnej w membranowym reaktorze recykulacyjnym





## Kwas mlekowy



Ideowy schemat produkcji kwasu mlekowego z serwatki podpuszczkowej w recykulacyjnym bioreaktorze membranowym

## Kwas cytrynowy

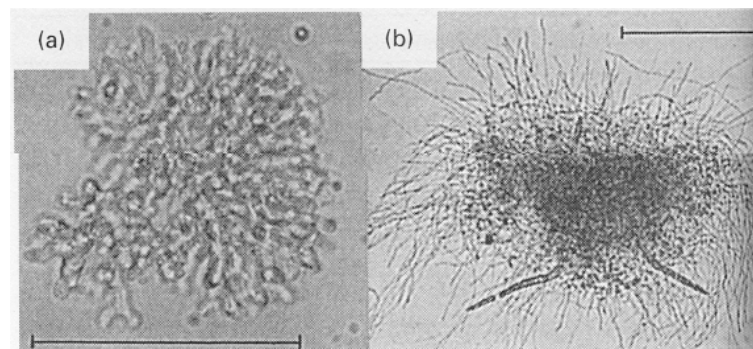
**Zastosowanie – przemysł spożywczy (głównie), przemysł farmaceutyczny**  
**Pierwotnie izolowany z soku cytrynowego. Obecnie 99% z fermentacji *Aspergillus* spp.**

Producenci: grzyby strzępkowe ( w tym m.in. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, drożdże, w tym: *Candida*, *Rhodotorula*, bakterie, w tym: *Bacillus licheniformis* i *Arthrobacter terregens*

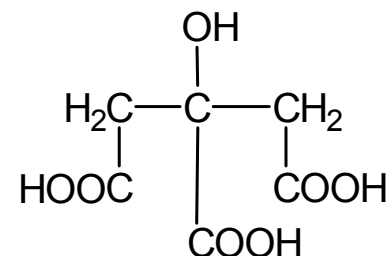
Substraty: melasa buraczana i trzcinowa, hydrolizaty skrobi ziemniaczanej i kukurydzianej, glukoza techniczna, cukier biały i surowy.

Metody biosyntezy:

- 1) Metoda powierzchniowa w pożywce ciekłej w komorach fermentacyjnych z tacami lub w stałym podłożu w perforowanych fermentorach tacowych (bioreaktory Koji), bębnowych, komorowych lub wieżowych
- 2) Metoda wgłębna w klasycznych fermentorach o poj. 50 – 500 m<sup>3</sup> z mieszaniem i napowietrzaniem lub w reaktorach typu air-lift, jako proces ciągły lub półciągły



**Kolonie *Aspergillus niger***





## Kwas cytrynowy

Jakie warunki należy spełnić, aby możliwa była wysoko wydajna produkcja kwasu cytrynowego?

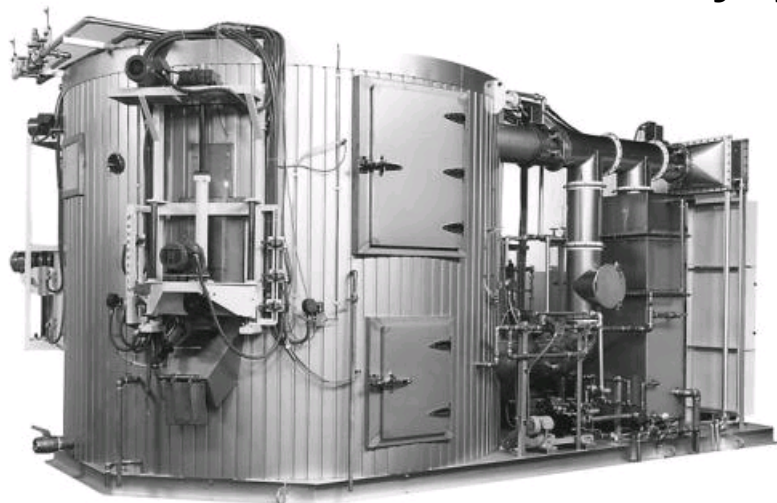
### 1. Wysoko wydajny szczep *Aspergillus niger*

- obecność alternatywnego łańcucha oddechowego
- mutant regulatorowy – PFK-I niewrażliwa na hamowanie przez cytrynian

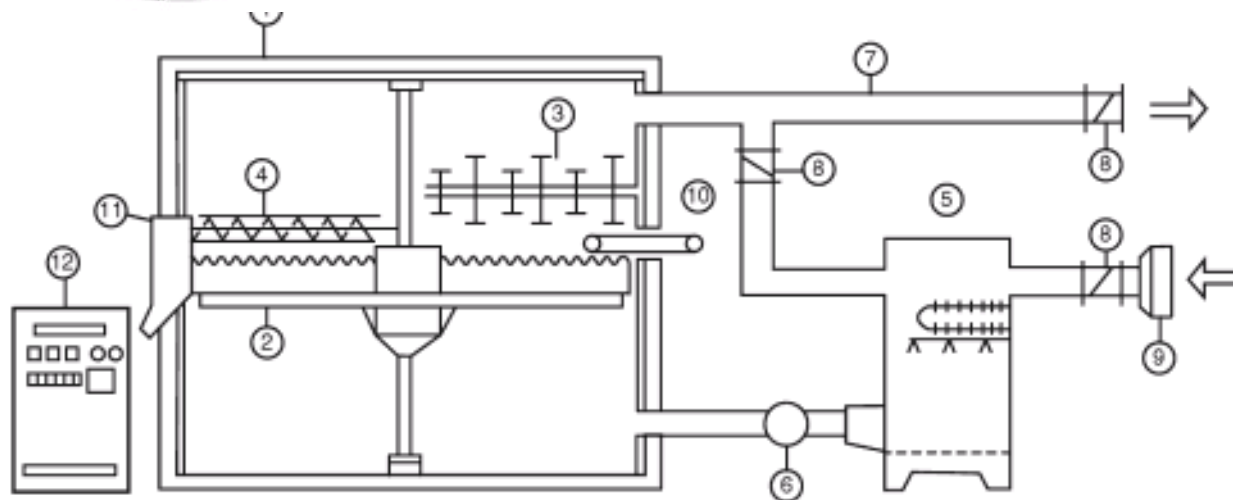
### 2. Odpowiednie warunki hodowli

- skład pożywki: wysokie stężenie cukru; niskie stężenie jonów Fe(II) i Mn(II); niskie pH, około 2);  
niskie stężenie fosforanów
- bardzo intensywne napowietrzanie

## Kwas cytrynowy



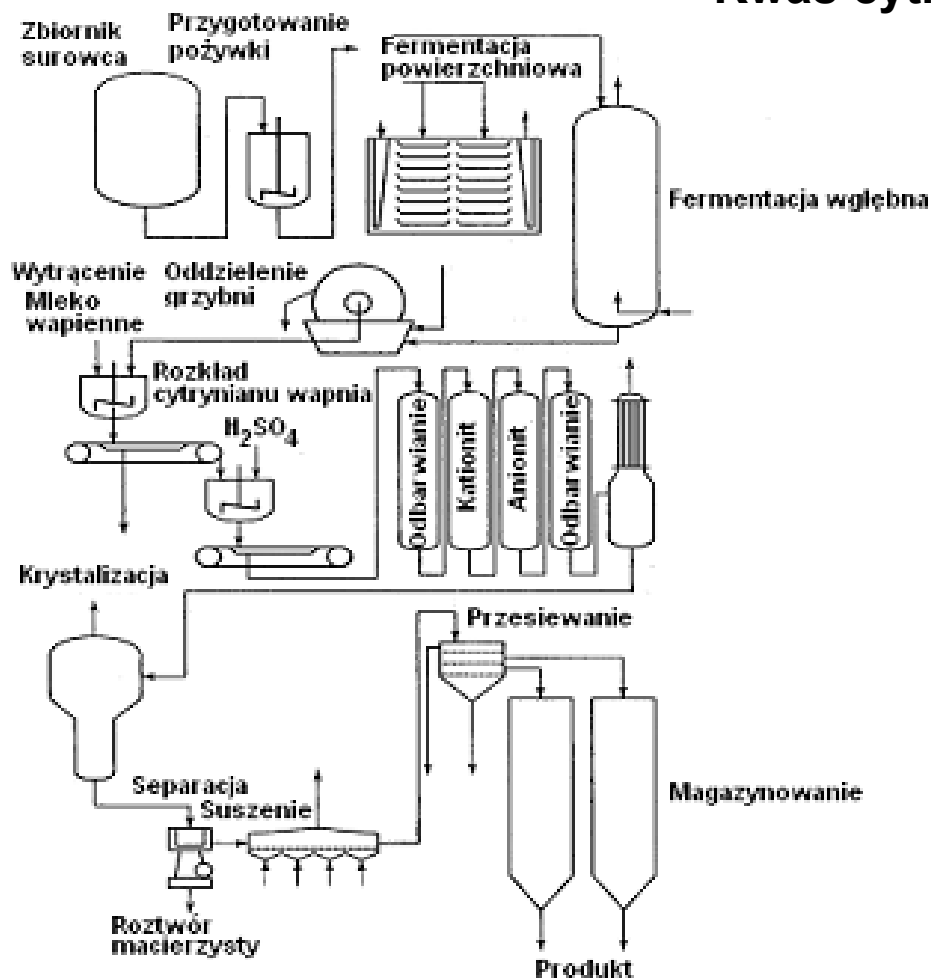
1. Komora bioreaktora; 2. Taca dla hodowli;
3. Mechanizm obracający; 4. Mechanizm przesypujący;
5. Klimatyzator; 6. Dmuchała;
7. Kanał powietrzny; 8. Kłapa powietrzna;
9. Podgrzewacz; 10. Dopływ;
11. Odpływ;
12. Panel sterujący



Wygląd zewnętrzny i schemat bioreaktora Koji

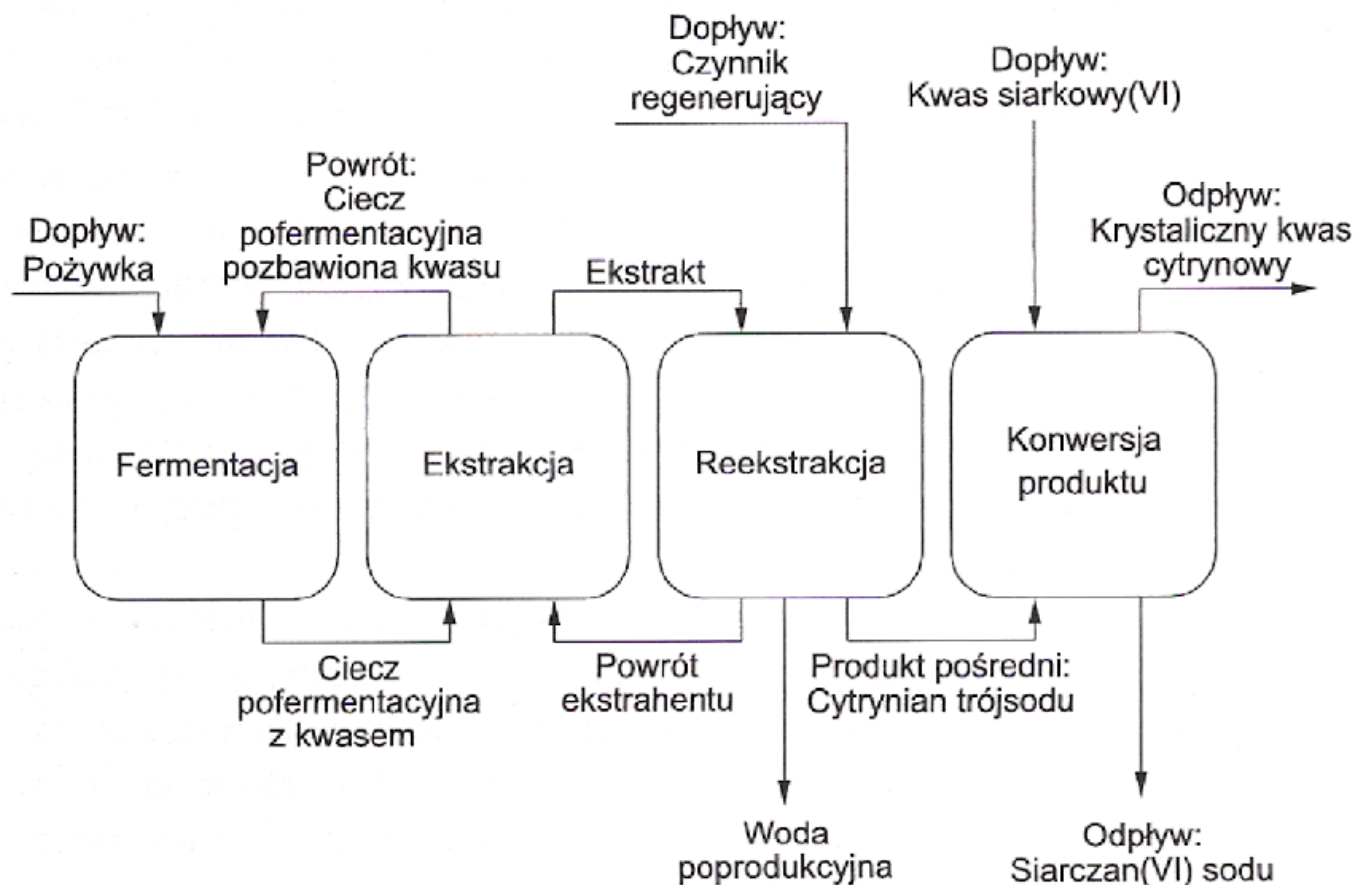
## Kwas cytrynowy

### Metoda klasyczna



W metodzie klasycznej, ciecz po odfiltrowaniu grzybni jest ogrzewana do 70-75 °C i doprowadzana do pH 2,7-2,9 w celu wytrącenia szczawianu wapnia (usuwany przez filtrację). W tych warunkach monocytrynian wapnia pozostaje w roztworze. Dalszy dodatek mleka wapiennego do pH 7,0 - wytrącenie cytrynianu triwapnia. Dodanie kwasu siarkowego – kwas cytrynowy (roztwór) + gips (osad). Odbarwienie – węgiel aktywny; jonity dla usunięcia jonów metali i anionów nieorganicznych. Potem wyparki próżniowe (zagęszczenie), krystalizacja, suszenie

## Kwas cytrynowy

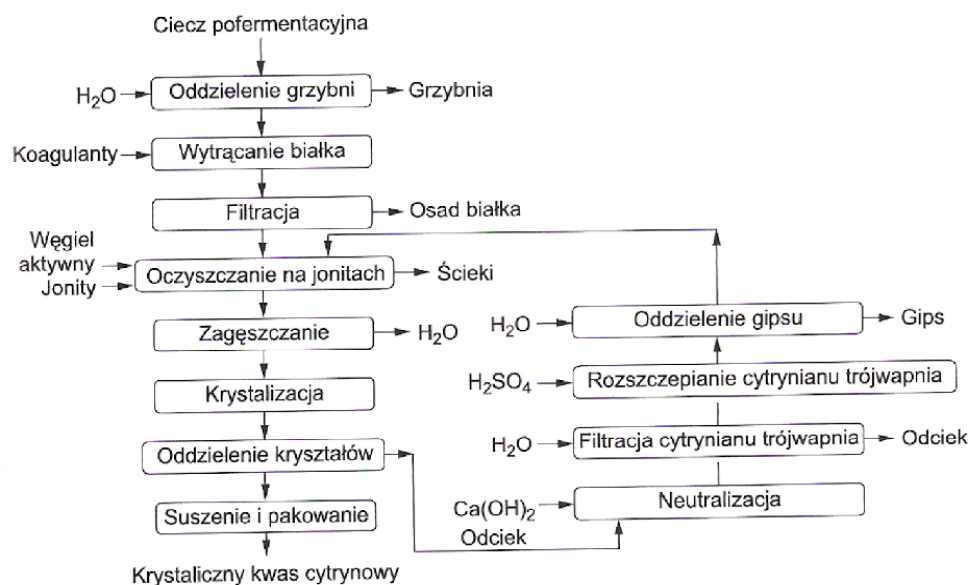
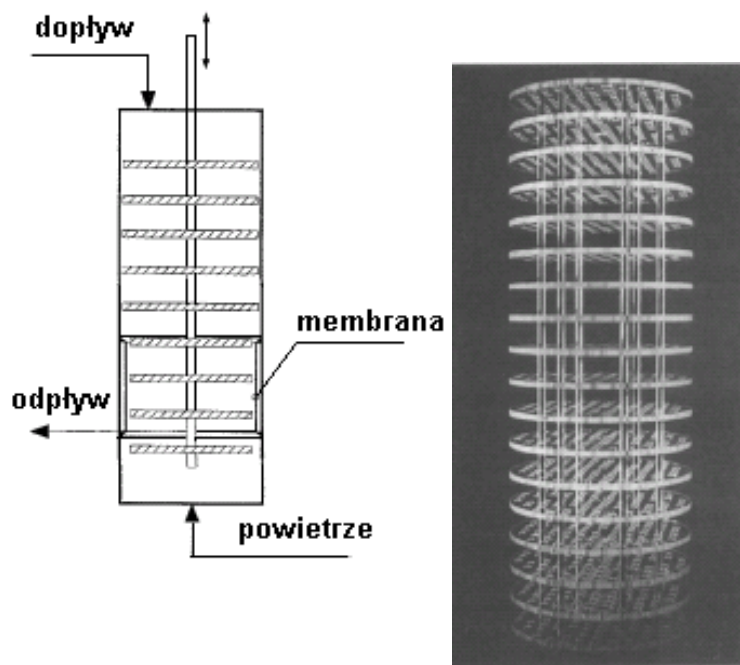


Ideowy schemat czteroetapowej ciągłej produkcji kwasu cytrynowego

## Kwas cytrynowy

### Metoda „bezcytrynianowa”

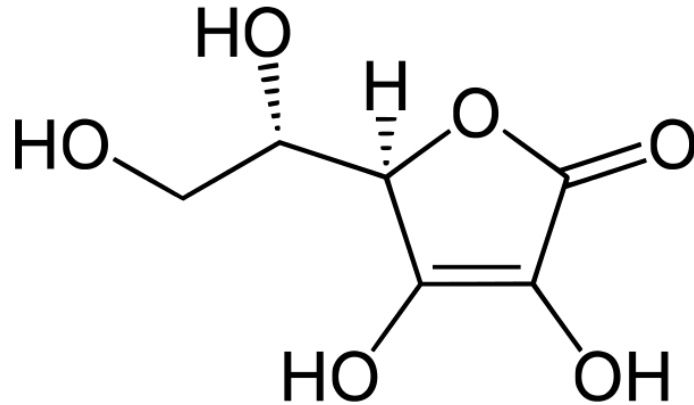
Proces ciągły. Reaktor strumieniowy (*reciprocating-jet-bioreactor*) z modułem mikrofiltracji  
Kwas cytrynowy w permeacie jest ekstrahowany w układzie ciecz-ciecz w kolumnie rozpryskowej mieszającą amina trzeciorzędowa/2-oktanol/cerozyna



Wytwarzanie krystalicznego kwasu cytrynowego metodą „bezcytrynianową”

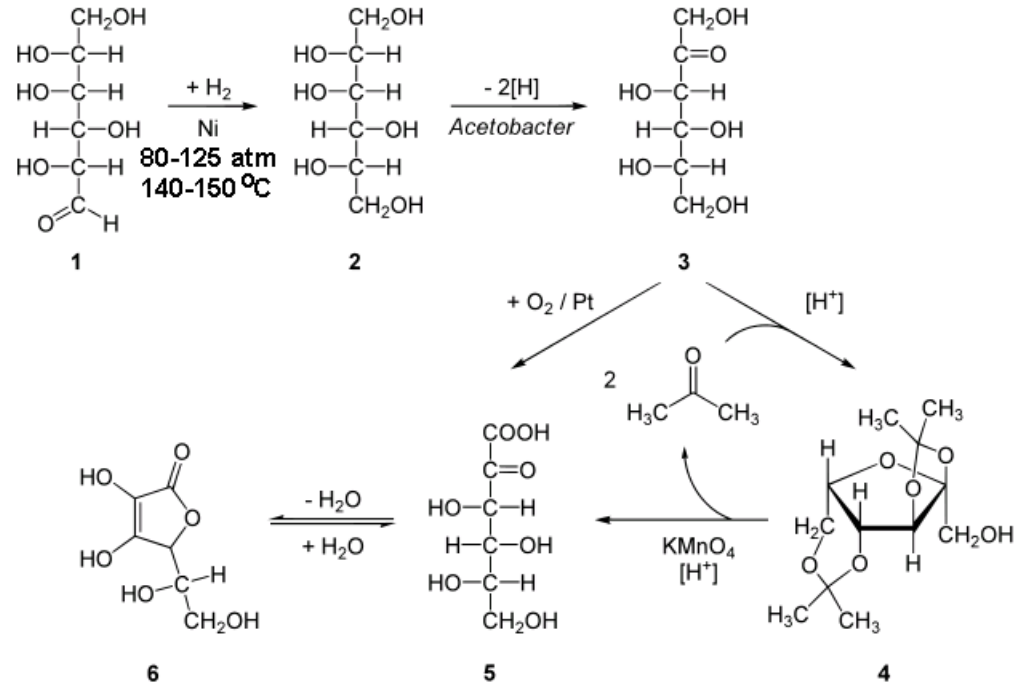


## Kwas askorbinowy



Metoda przemysłowa – kombinacja pięciu etapów chemicznych i jednej biotransformacji

Substrat początkowy – D-glukoza



Biotransformacja

Biokatalizator: *Acetobacter xylinum*

Warunki: 30-35 °C, pH 4-6

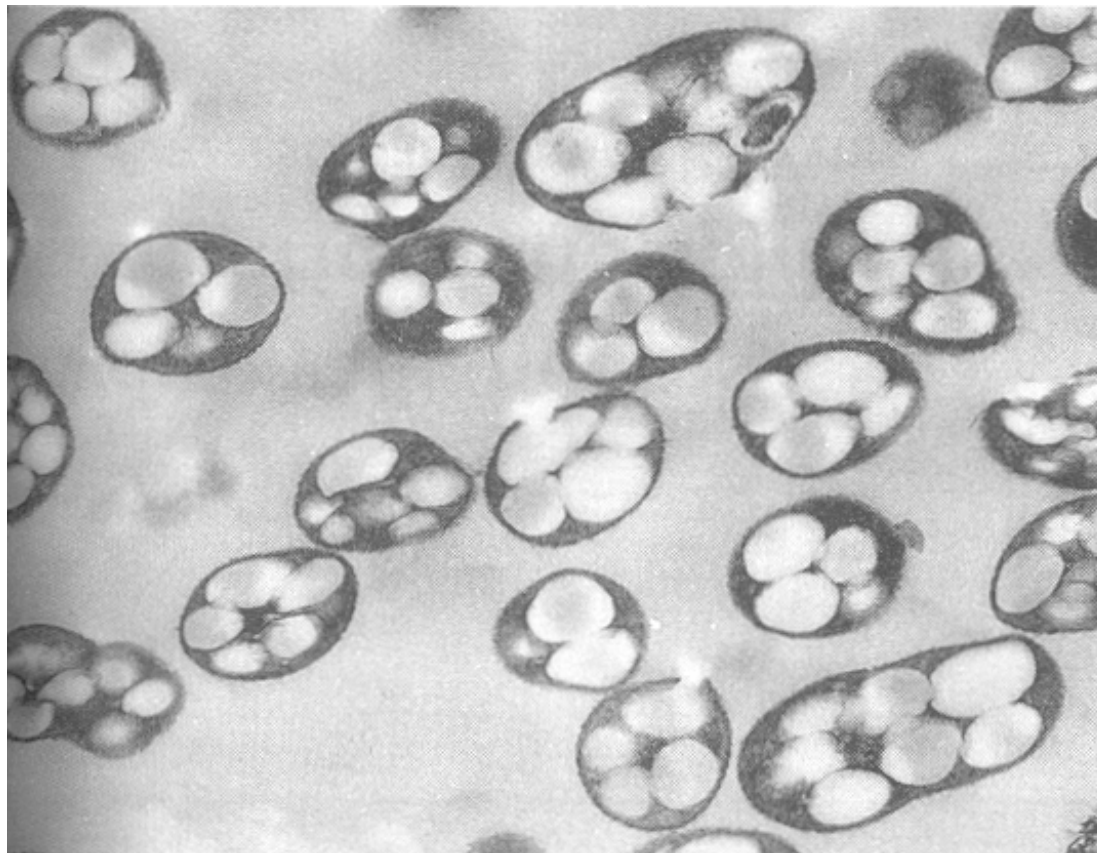
Wydajność sumaryczna około 60%



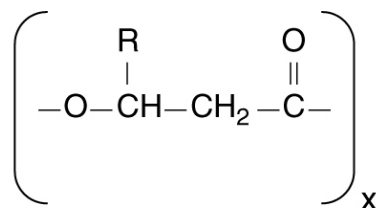
## Inne proste substancje organiczne

- 1. Kwas octowy. Zastosowanie – przemysł spożywczy, przemysł chemiczny.**  
**Metoda chemiczna – utlenienie etanolu.**  
**Metoda fermentacyjna – *Gluconobacter*, *Acetobacter* – otrzymywanie octu winnego lub octu spirytusowego**
- 2. Kwas fumarowy. Zastosowanie – przemysł spożywczy, otrzymywanie poliestrów.**  
**Metoda chemiczna – z benzenu.**  
**Metoda fermentacyjna – *Rhizopus* spp., *Candida* spp. ze skrobi.**
- 3. Akrylamid. Zastosowanie – polimery.**  
**Metoda chemiczna – uwodnienie acetonitrylu na katalizatorze miedziowym.**  
**Metoda biologiczna – biotransformacja akrylonitrylu przez *Pseudomonas* spp. (zawierają hydratazę nitrylową).**

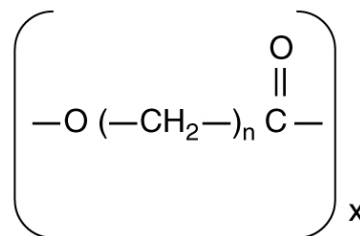
## Tworzywa plastyczne wytwarzane przez drobnoustroje



Granule kwasu polihydroksymasłowego w komórkach *Ralstonia eutropha*



R	Nazwa	Skrót
H	3-hydroksypropionian	3HP
Metyl	3-hydroksymaślan	3HB
Etyl	3-hydroksywalerian	3HV
Propyl	3-hydroksykapronian	3HC
Butyl	3-hydroksyheptanonian	3HH
Pentyl	3-hydroksyoktanonian	3HO
Heksyl	3-hydroksynonanonian	3HN
Heptyl	3-hydroksydekanonian	3HD
Oktyl	3-hydroksyundekanonian	3HUD
Nonyl	3-hydroksydodekanonian	3HDD



n = 3,4-hydroksymaślan  
n = 4,5-hydroksywalerian

**Wzory strukturalne polihydroksyw kwasów wytwarzanych przez drobnoustroje**

## Tworzywa plastyczne wytwarzane przez drobnoustroje

Drobnoustrój	Źródło węgla	Skład PHA													
		Monomery 3-hydroksykwasów										Inne monomery			
		C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>				
<i>Ralstonia eutropha</i>	glukoza	●													
<i>R. eutropha</i>	glukoza + kwas propionowy	●	○												
<i>R. eutropha</i>	glukoza + 4HB	●											○ (4HB)		
<i>Comamonas acidovorans</i>	glukoza + 4HB	○												● (4HB)	
<i>Alcaligenes latus</i>	glukoza + kwas 3-hydroksypropionowy	○	●												
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	kwas oktanowy						○	●		○					
<i>P. oleovorans</i>	kwas nonanowy						○	○	○	○	○				
<i>P. aeruginosa</i>	kwas glukonowy					○	○		○	●				○	
<i>Rhodococcus ruber</i>	glukoza	○	●												

- główny monomer obecny w PHA
- inne monomery; 4HB - 4-hydroksymaślan

**Skład polimerów polihydroksykwasów (PHA) wytwarzanych przez różne gatunki bakterii z różnych źródeł węgla**



## Właściwości fizyczne polihydroksykwasów w porównaniu ze sztucznymi polimerami

Polimer	Temperatura topnienia (°C)	Wytrzymałość na rozciąganie (MPa)	Rozciągliwość (%)
Poli(3-hydroksymaślan)	175 – 179	40	6
Kopolimer P3HB + P3HV (20%)	145	32	-
Kopolimer P3HB + P4HB (10%)	159	24	242
Poli(4-hydroksymaślan)	53	104	1 000
Kopolimer P3HH + P3HO	61	10	300
Polipropylen	170 – 176	34 – 38	400
Polistyren	110	50	-



## Wytwarzanie PHB przez różne drobnoustroje

Drobnoustrój	Źródło węgla	Zawartość PHB (%)	Produktywność (g/l/h)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Glukoza	76	2,42
<i>Ralstonia eutropha</i>	CO <sub>2</sub>	68	1,55
<i>Alcaligenes latus</i>	Sacharoza	50	3,97
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Skrobia	74	0,01
<i>Protomonas extorquens</i>	Metanol	64	0,88
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Laktoza	56	0,02
Rekombinantowe <i>E. coli</i>	Glukoza	80	2,08
Rekombinantowa <i>Klebsiella aerogenes</i>	Melasa	65	0,75



**Znanych jest co najmniej 300 gatunków bakterii wytwarzających PHA.**

**Fizjologiczna rola PHA – „magazyn” energetyczny w warunkach ograniczenia składników odżywczych.**

**Niektóre gatunki bakterii wymagają wyraźnego sygnału w postaci braku składnika odżywczego dla zainicjowania biosyntezy PHA; Inne akumulują PHA w trakcie wzrostu.**

**I grupa – np. *Ralstonia eutropha*. Hodowla 60 h w podłożu glukoza/sole w warunkach ograniczenia fosforanu. Osiąga się 45 – 80 % zawartości PHA w suchej masie. Dodając kwas propionowy do pożywki otrzymuje się kopolimer P(3HB + 3HV).**

**Kopolimer P(3HB + 3HV) jest wytwarzany na skalę przemysłową przez firmę Zeneca i sprzedawany pod nazwą Biopol. Cena 3 \$/kg.**

**Możliwości obniżenia kosztów – tańsze źródła węgla.**

**Inne możliwości: a/ rekombinowane komórki *E. coli*; b/ transgeniczne rośliny – *Arabidopsis thaliana* (akumulacja PHA w plastydach); rośliny oleiste – *Brassica napus*, bawełna, kukurydza.**