

# Biotechnologické aspekty výroby organických kyselín

R. J. KARKLIŇŠ, Ústav mikrobiológie Augusta Kirchenštejna Akadémie vied Lotyšskej SSR, Riga

**Kľúčové slová:** organické kyseliny, biotechnologické aspekty, kvasinky

Moderná úroveň rozvoja biotechnológie umožňuje v širokej miere využívať mikroorganizmy na syntézu rôznych fyziologicky aktívnych látok, včítane aj radu organických kyselín.

Je známych asi 60 organických kyselín, ktoré sa môžu získavať pomocou mikrobiologickej syntézy. V tabuľke 1 sa uvádzajú najdôležitejšie z nich, na ktoré bola v rade krajín vyvinutá priemyselná technológia. Všetky tieto kyseliny možno syntetizovať chemickými metódami, avšak mikrobiologická syntéza je hospodárnejšia, čo je dokázané širokou výrobou kyselín, ako je kyselina citrónová, itakónová a mliečna.

S najširším využitím spomedzi organických kyselín sa stretáva kyselina citrónová, čím sa aj vysvetľuje rast úrovne jej výroby. Svetová potreba kyseliny citrónovej každoročne rastie: ak to v roku 1953 bolo 50 000 t na rok, v súčasnosti je to už 10 krát viac.

Hlavným spotrebiteľom kyseliny citrónovej je potravinársky priemysel: pripadá naň až 90 % vyrobenej kyseliny citrónovej. Okrem toho sa kyselina citrónová používa v chemickom priemysle, v medicíne, v textilnom priemysle, v hutníctve, v elektronickom priemysle a v ďalších odvetviach.

V poslednom čase sa kyselina citrónová široko uplatnila vo výrobe povrchovo aktívnych látok a syntetických čistiacich prostriedkov. V súvislosti s tým vzniká potreba znižovať náklady na výrobu kyseliny citrónovej a jej solí zdokonaľovaním technológie, ako aj na základe šľachtenia vysoko aktívnych producentov.

Medzi ostatnými organickými kyselinami se veľká pozornosť venuje potravinárskym kyselinám (mliečna, vínná, jablčná) a kyselinám, ktoré majú prvoradý význam pre chemický priemysel pri výrobe nových materiálov (kyselina itakónová, fumárová, gallová, oxálová, kójová apod.).

V 60. rokoch bola v Sovietskom zväze vyvinutá a zavedená technológia mikrobiologickej výroby kyseliny itakónovej. Kyselina itakónová, čiže metylénjantárová, je nenasýtená dvojsýtna kyselina, preto je schopná ľahko polymerizovať a tvoriť početné syntetické materiály, ktoré majú cenné vlastnosti a v širokej miere sa uplatňujú. Kyselina itakónová sa používa aj vo výrobe vysokokvalitných syntetických živíc, povrchovo-aktívnych látok a pri syntéze radu zložitých organických zlúčenín.

Kyselina mliečna sa používa v potravinárskom priemysle a aj v technike — pri spracovaní kože, pri výrobe farbív a pri získavaní umelých materiálov. Kyselina vínná sa používa na dokysľovanie vín, a aj v medicíne. Kyselina jablčná sa používa v rovnakých odvetviach, ako kyselina citrónová a vínná. Kyselina gallová (trihydroxybenzoová) sa v širokej miere používa pri výrobe farbiva galloxyanidu, hnedého alizarínu, ako aj pri liečení kožných ochorení. Kyselina glukónová (v podobe vápenatých a železnatých solí) sa používa predovšetkým ako liečebný preparát a takisto aj na výrobu čistiacich prostriedkov pre hutníctvo a garbiarsky priemysel, ako aj pri výrobe farbív. Kyselina propiónová sa používa vo výrobe kozmetických prostriedkov, ako konzervačná prísada v potravinárskom priemysle a pod.

Rad organických kyselín je produktom metabolizmu plesní rodu *Aspergillus*. Avšak často neúspechy v realizácii priemyselnej výroby produktov mikrobiálnej syntézy sú podmienené málo aktívnym produkčným mikroorganizmom.

V roku 1891 nemecký vedec *Wehmer* prvýkrát zistil schopnosť plesní produkovať organické kyseliny. Pri kultivácii *Aspergillus niger* na sacharózovej pôde získal kyselinu oxálovú a pri kultivácii plesne z rodu *Citromyces* kyselinu citrónovú.

V roku 1917 Američan *Kerry* získal kyselinu oxálovú a kyselinu citrónovú pomocou kmeňa *Aspergillus niger*. Práce *Wehmera* a *Kerryho* vyvolali značný záujem. V tejto oblasti sa rozvinul široký výskum v rôznych krajinách, včítane Anglicka, Čiech, USA, Japonska a ZSSR. Do roku 1930 bolo Taliansko hlavným dodávateľom citráru vápenatého, získavaného z citrónovej šťavy.

V ZSSR na základe prác V. S. *Butkeviča* (1922—24) a *Kostyčeva* (1932) bol v Leningrade v roku 1935 uvedený do prevádzky prvý závod na výrobu kyseliny citrónovej z kryštálového cukru.

V ďalšom výskume biosyntézy kyseliny citrónovej sa v ZSSR pokračovalo a v roku 1948 sa v Rige začala namiesto cukru používať repná melasa, čo umožnilo značne zvýšiť produktivitu a znížiť vlastné náklady na výrobok.

Kyselinu itakónovú mikrobiologickou cestou získali prvýkrát japonskí vedci v roku 1929, keď na tento účel využili plesň *Aspergillus itaconica*. Výťažok produktu bol však nízky.

V priebehu ďalšieho výskumu sa zistilo, že schopnosť tvoriť kyselinu itakónovú je najvýraznejšia u plesní, patriacich ku skupine *Aspergillus terreus*.

Tabuľka 1. Organické kyseliny získavané mikrobiálnou syntézou

Kyselina	Surovina	Produkčný mikroorganizmus	Výťažok
Araboaskorbová Vínná	glukóza	<i>Penicillium notatum</i>	45 %
	glukóza	<i>Gluconobacterium suboxydans</i>	27 %
Gallová Glukónová Izocitrónová	tanín	<i>Aspergillus niger</i>	100 %
	glukóza	<i>Aspergillus niger</i>	95 %
	glukóza	<i>Candida brumptii</i>	28 %
	n-alkány	<i>Candida lipolytica</i>	115 %
Itakónová Ketoglutarová	glukóza	<i>Aspergillus terreus</i>	60 %
	glukóza	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	48 %
	n-alkány	<i>Candida lipolytica</i>	80 %
	glukóza	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	90 %
2-ketoglukónová 5-ketoglukónová	glukóza	<i>Gluconobacterium suboxydans</i>	90 %
	glukóza	<i>Aspergillus oryzae</i>	50 %
Kójová Citrónová	sacharóza	<i>Aspergillus niger</i>	90 %
	n-alkány	<i>Candida lipolytica</i>	140 %
Mliečna Pyrohroznová	glukóza	<i>Lactobacillus delbrückii</i>	90 %
	glukóza	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50 %
	glycerín	<i>Candida lipolytica</i>	50 %
Propiónová	glukóza	<i>Propionibacterium shermanii</i>	60 %
	glukóza	<i>Acetobacter acetic</i>	95 %
Octová Fumárová	glukóza	<i>Rhizopus delemar</i>	58 %
	n-alkány	<i>Candida hydrocarbofumarica</i>	84 %
Oxálová Jantárová	sacharóza	<i>Aspergillus niger</i>	60 %
	k. jablčná	<i>Bacterium succinicum</i>	57 %
	n-alkány	<i>Candida brumptii</i>	67 %
	glukóza	<i>Lactobacillus brevis</i>	100 %
Jablčná	k. fumárová, kvasinky		
	etanol	<i>Kvasinky Schizophyllum commune</i>	70 % 60 %

Plesne rodu *Aspergillus* sú schopné produkovať také organické kyseliny, ako je kyselina oxálová, glukónová, jablčná, malónová, fumárová, akonitová, jantarová, vínna, kójová a mnohé iné, v závislosti od podmienok kultivácie. Prípady, že plesень produkuje iba jednu organickú kyselinu sa stretávajú zriedka, ale obvykle jedna z kyselín sa vylučuje v množstve značne väčšom, ako ostatné.

Ešte nedávno sa kultúry mikroorganizmov pre výrobné účely nachádzali v prírode. Avšak prax ukázala, že iba nemnohé z nich sa vyznačujú vysokou produktivitou. V posledných rokoch sa nahromadili faktografické údaje, svedčiacie o tom, že využitie mutagénov fyzikálnej a chemickej povahy, ako samostatne, tak aj v kombinácii, pre účely šľachtenia mikroorganizmov so zadanými vlastnosťami umožňuje získať mutantné kmene so zvýšenou aktivitou.

Voľba kvalitného produkčného kmeňa je jedným z hlavných faktorov získania vysokých hospodárskych výsledkov pri fermentácii. Kritériá pre voľbu produkčného mikroorganizmu príslušnej kyseliny sú: úroveň výťažku produktu, rýchlosť fermentácie, prírastok biomasy, syntéza vedľajších látok. Okrem toho treba zlepšiť fyziologické a biochemické vlastnosti kmeňa. Za tým účelom sa pravidelne robí selekčný výber najlepších kultúr mikroorganizmov izoláciou čistých líní a výberom nasledovných generácií podľa najlepších znakov. S použitím tejto metódy mohli mikrobiológovia zachovať morfológické a fyziologické vlastnosti produkčných mikroorganizmov *Aspergillus niger* počas 20 rokov.

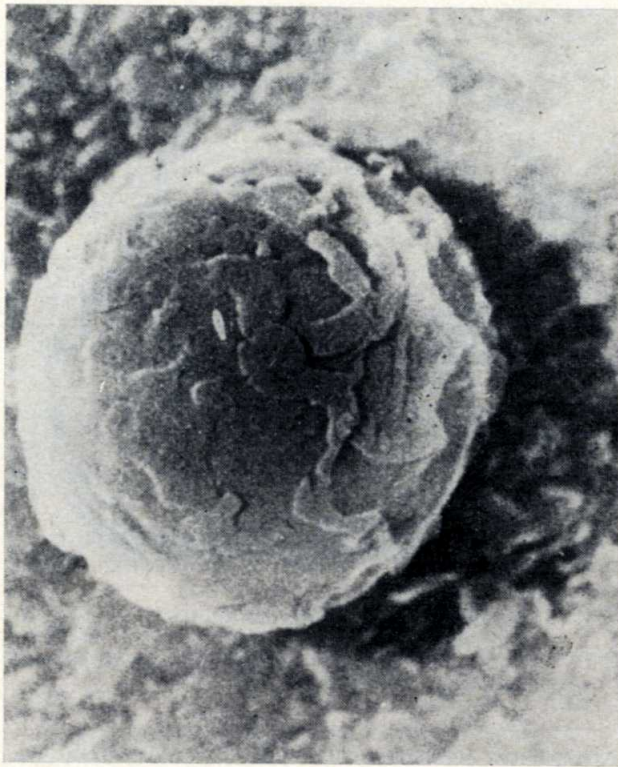
Do roku 1962 sa v Sovietskom zväze používali prírodné kmene č. 82 a č. 90 plesne *Aspergillus niger* na biosyntézu kyseliny citrónovej a do roku 1966 kmeň 718/9 *Aspergillus terreus* na biosyntézu kyseliny itakónovej.

V našich prácach ohľadne selekcie plesní rodu *Aspergillus*, produkujúcich organické kyseliny, sa používali rôzne chemické mutagény a takisto ultrafialové a gama lúče. Chemické mutagény sú skupina biologicky aktívnych zlúčenín, indukujúcich jemné zmeny vo výstavbe genetického materiálu. V závislosti od mechanizmu účinku na jadrovú hmotu sa chemické mutagény delia na nasledovné skupiny: 1. inhibitory prekursorov nukleových kyselín, 2. analógy dusíkatých báz, 3. alkylačné zlúčeniny, 4. oxidanty, 5. supermutagény. Najefektívnejšou kombináciou je ožarovanie konidií východzieho kmeňa UV-lúčmi a spracovanie etylénimínom a N-nitrózometylmočovinou (NMM).

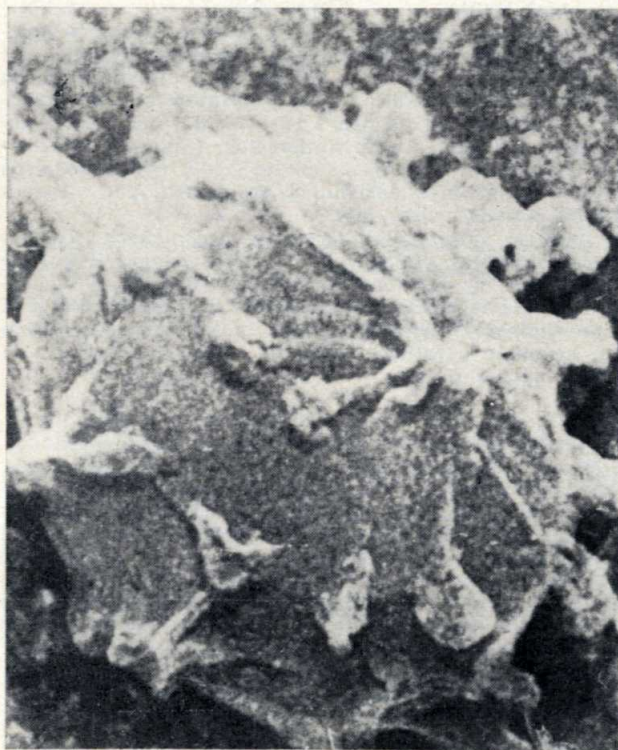
Boli vyšľachtené nové aktívnejšie kmene, ktoré sa čo do morfológických a fyziologických príznakov líšia od východzích. Výsledky šľachtenia kmeňov *Aspergillus niger*, produkujúcich kyselinu citrónovú, sa uvádzajú v tabuľke 2.

Kmene R-1 a R-3 poskytujú zvýšenie výťažku kyseliny citrónovej v porovnaní s prírodným kmeňom 1,6krát a vytvárajú na melasových pôdach 96–99 % kyseliny citrónovej z obsahu všetkých syntetizovaných kyselín. V prevádzkových podmienkach predstavuje výťažok hlavného produktu 75 až 85 % obsahu cukru v melase. Tieto kmene dobre fermentujú melasy zníženej kvality a takisto sú menej citlivé na antagonistické mikroorganizmy, ktoré sa vyskytujú vo výrobe.

Pomocou elektrónovej mikroskopie sa vykonalo porovnávacie štúdium morfológických zmien v bunkách *Aspergillus niger* po ošetrovaní chemickými mutagénami a



Obr. 1. Konidia prírodného kmeňa *Aspergillus niger* 14 000krát zväčšené

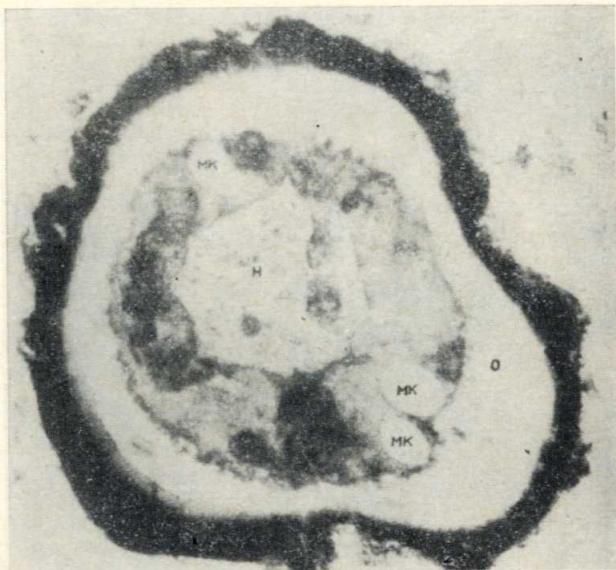


Obr. 2. Konidia mutantného kmeňa R-3 *Aspergillus niger* 14 000krát zväčšené

Tabuľka 2. Aktivita biosyntézy kyseliny citrónovej rôznymi kmeňmi *Aspergillus niger*

Kmeň	Koeficient transformácie sacharidu na kyselinu citrónovú za podmienok		Obsah kyseliny citrónovej v pomere k celkovému obsahu kyselín [%]
	laboratórnych (max.)	prevádzkových	
90-prírodný produkčný	0,70	0,50–0,55	90–95
EU-119 — mutantný	0,85	0,65–0,70	93–97
R-1 — mutantný	0,95	0,70–0,80	96–99
R-3 — mutantný	0,99	0,75–0,85	96–99,9

UV lúčmi. Ukázalo sa, že po preočkovaní na príslušné pôdy sa v nasledovnom pokolení konidiá líšia od pôvodných takmer dvojnásobne väčšími rozmermi (obr. 1 a 2) a takisto spevnenými štruktúrnymi prvkami, men-



Obr. 3. Priečný rez konídium mutantného kmeňa R-1 *Aspergillus niger*; O — blana, N — nukleotid, M — mitochondrium, MK — mikrokapsula; Zväčšené 50 000krát.

ším počtom nukleotidov v bunkách a dvakrát väčším obsahom kyseliny dezoxyrbonukleovej — DNK (obr. 3).

Na základe selekčného kmeňa *Aspergillus terreus* G-232 bol vyvinutý submerzný proces fermentácie kyseliny itakónovej, poskytujúci výťažok produktu až 65 % na obsah uhlíka.

Na základe výskumu rôznych zdrojov uhlíka a minerálnej výživy boli vypracované receptúry živných pôd pre biosyntézu kyseliny citrónovej a itakónovej. Na ukážku sa v tabuľke 3 uvádzajú výťažky kyseliny itakónovej, získané na pôdach s rôznymi zdrojmi uhlíka povrchovou a submerznou kultiváciou. Najlepšie výsledky sa získali pri použití melasovej pôdy, avšak pomerne vysoký výťažok sa dosiahol aj pri použití pôd, obsahujúcich drevné hydrolyzáty.

Rozmery mikrobiálnej syntézy organických kyselín, najmä kyseliny citrónovej, boli donedávna limitované množstvom a cenou sacharidických surovín. Ekonomické kalkulácie, vykonané za účelom hodnotenia všetkých potenciálnych surovín, ukázali, že najperspektívnejšími sú kvapalné parafíny (normálne alkány) a hydrolyzáty rastlinných surovín.

Tabuľka 3. Maximálne výťažky kyseliny itakónovej

Zdroj uhlíka	Povrchová metóda		Submerzná metóda		Obsah kyseliny itakónovej v pomere k celkovému obsahu kyselín [%]
	Výťažok na cukor [%]	Výťažok z plochy [g·m <sup>-2</sup> ·deň <sup>-1</sup> ]	Výťažok na cukor [%]	Výťažok [kg·m <sup>-3</sup> ·deň <sup>-1</sup> ]	
Sacharóza (kryštalický cukor)	57,0	260	62,2	16,4	96,8
Surový cukor (trstinový)	59,4	320	64,5	16,2	95,2
Melasa	62,0	467	42,0	10,1	99,2
Kryštalická glukóza (drevná)	46,5	200	52,7	13,4	93,5
Podvojná zlúčenina glukózy (produkt hydrolyzy dreva)	45,8	195	56,6	13,7	92,8
Drevný hydrolyzáť (rafinovaný)	36,0	155	—	—	89,5
Sirup z kukuričného škrobu	38,2	195	28,9	6,4	87,0
Sirup zo zemiakového škrobu	34,0	177	25,6	5,6	84,5

Začiatkom 60. rokov, potom ako výskumníci zdôvodnili možnosť praktického použitia mikroorganizmov, asimilujúcich uhľovodíky, záujem o problém sa rozšíril. Prác venovaných štúdiu biosyntézy organických kyselín z uhľovodíkov nie je veľa. V našej krajine sa týmto problémom začali zaoberať pracovníci Ústavu biokémie a fyziológie mikroorganizmov Akadémie vied ZSSR. Spoločným úsilím sme vyvinuli technológie získavania kyseliny citrónovej, izocitrónovej a ketoglutárovej a ich solí z kvapalných parafínov. Biosyntéza týchto kyselín sa realizuje pomocou kvasiniek *Candida lipolytica*.

Výťažok kyseliny citrónovej v závislosti od koncentrácie parafínov predstavuje 110 až 140 %, jej podiel na celkovom obsahu kyselín 92—97 %. Výťažok kyseliny izocitrónovej 115 %, kyseliny ketoglutárovej 80 %.

Základom pre urýchlený rozvoj mikrobiologickej výroby organických kyselín je:

- šľachtenie a zavádzanie nových aktívnych producentov, ktoré sú menej citlivé na výkyvy chemického zloženia rôznych živných pôd a sú viac odolné voči antagonistickým mikroorganizmom;
- použitie nových, lacnejších nepotravinárskych druhov surovín;
- vyvinutie bezodpadovej technológie výroby a uzavretého procesu, vylučujúceho znečistenie životného prostredia;
- zdokonalenie procesov izolácie metabolitov.

Karkliňš, R. J.: Biotechnologické aspekty výroby organických kyselín. Kvas. prům., 32, 1986, č. 11, s. 262—265.

Popisujú sa organické karboxylové kyseliny, produkty mikrobiologickej syntézy. Pomocou chemických a fyzikálnych mutagénov boli vyšľachtené aktívne kmene plesní rodu *Aspergillus* — producenti kyseliny citrónovej a itakónovej. Na základe výskumu rôznych zdrojov uhlíka bola dokázaná efektívnosť použitia živných pôd na báze melasy a perspektívnosť použitia kvapalných parafínov a hydrolyzáto rastlinných surovín. Boli vypracované spôsoby výroby kyseliny izocitrónovej a ketoglutárovej a ich solí z kvapalných parafínov pomocou kvasiniek *Candida lipolytica*.

Карклиньш, Р. И.: Биотехнологические аспекты производства органических кислот. Квас. прум. 32, 1986, № 11, стр. 262—265.

Описываются органические карбоксильные кислоты, продукты микробиологического синтеза. При помощи химических и физических мутагенов селективировались активные штаммы плесней рода *Aspergillus* — продуценты лимонной кислоты и итаконовой кислоты. На основе исследования разных источников углерода была доказана эффективность применения питательных сред на базе мелассы и перспективность применения жидких парафинов и гидролизатов растительного сырья. Были разработаны способы производства изолимонной кислоты и кетоглутаровой кислоты и их солей из жидких парафинов при помощи дрожжей *Candida lipolytica*.

Karkliňš, R. J.: Biotechnology Aspects of Organic Acids Production. Kvas. prům. 32, 1986, No. 11, pp. 262—265.

Organic carboxylic acids as products of the microbial synthesis are described. Using chemical and physical mutagens active strains from the genus *Aspergillus* for a production of citric and itaconic acids were selected. Testing various carbon sources the results proved a possibility to use molasses, liquid alkanes and hydrolysates of plant materials for acid productions. The procedures for isocitric and ketoglutaric acid as well as for their salts productions from liquid alkanes using the yeast *Candida lipolytica* were elaborated.

Karkliňš, R. J.: Biotechnologische Aspekte der Erzeugung organischer Säuren. Kvas. prům. 32, 1986, Nr. 11, S. 262—265.

Es werden die organischen Karboxylsäuren, Produkte mikrobiologischer Synthese, beschrieben. Mittels chemischer und physikalischer Mutagene wurden aktive

Schimmelpilzstämme der Gattung *Aspergillus* ausgezüchtet — Produzenten der Zitronen- und Itakonsäure. Aufgrund der Erforschung verschiedener Kohlenstoffquellen wurde die Effektivität der Anwendung von Nährmedien auf Melassebasis und die perspektive An-

wendbarkeit flüssiger Parafine und Hydrolysate pflanzlicher Rohstoffe bestätigt. Es wurden die Verfahren zur Herstellung der Isozitronen- und Ketoglutar-säure und ihrer Salze aus flüssigen Paraffinen mittels der Hefen *Candida lipolytica* ausgearbeitet.