

Fermentačná príprava kyseliny kójovej

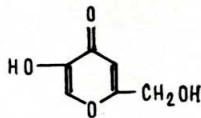
663 579

Ing. PETER MICHALÍK, Ing. ROBERT HORENITZKÝ, Výskumný ústav liehovarov a konzervární, Bratislava

Kľúčové slová: kyselina kójová, submerzná kultivácia, optimalizácia, *Aspergillus tamarii*

1. ÚVOD

Kyselina kójová, 5-hydroxy-2-(hydroxymetyl)-4H-pyran-4-on, je produkovaná v procese aeróbnej fermentácie z rôznych uhlíkatých zdrojov rôznymi mikroorganizmami.



Štruktúrny vzorec kyseliny kójovej

Kyselina kójová (KK) bola objavená v roku 1907, jej štruktúra bola stanovená v roku 1924 a chemická syn-

téza sa úspešne zavŕšila v roku 1930 [1]. Z média fermentovaného v povrchových alebo submerzných podmienkach sa kyselina kójová izoluje po oddelení mycélia a zahutnení ultrafiltrovaných lúhov kryštalizáciou alebo zrážaním vo forme komplexov.

V prirodzenej forme sa KK vyskytuje v orientálnych fermentovaných pokrmoch (miso, saké, sójová omáčka a pod.), ktorým dodáva charakteristickú chuť a vôňu [2].

Tieto vlastnosti sa využívajú aj v derivátoch KK, akými sú maltol, resp. etylmaltol, ktoré slúžia ako potravinárske aditíva. Vďaka chelatačným, antioxidačným a antibakteriálnym vlastnostiam sa skúma uplatnenie kyseliny kójovej a jej derivátov v kozmetike, humánnej medicíne a pri vývoji biodegradabilných pesticídov.

2. MATERIÁL A METÓDY

2.1 Mikroorganizmy

V experimentoch sa použil kmeň *Aspergillus tamarii*, mutant VIII (CCM-781) šľachtený γ -žiarením [8].

2.2 Média a spôsob kultivácie

Pre screeningové testy bola použitá metóda difúzie na agarových platniach [3] so Sabourdou pevnou pôdou a prídavkom FeCl_3 .

Pre prípravu vegetatívneho inokula slúžila Czapek-Doxova tekutá pôda očkovaná vodnou suspenziou spór, pre produkčnú fázu definované minerálne glukózové médium. Kultivovalo sa počas 7 dní na závesných rotačných trepačkách (výrobca CHTF SVŠT, frekvencia otáčok 210 min^{-1}) v 500 ml varných bankách s vpichmi s 80 ml fermentačného média. Optimalizačné pokusy sa uskutočnili pomocou metódy grécko-latinských štvorcov s rozpisom 3×3 [4], viď obr. 1.

Obr. 1. Všeobecný rozpis experimentu pre optimalizáciu metódou grécko-latinských štvorcov.

a_1-3 , b_1-3 , c_1-3 — zvolené hladiny faktorov A, B, C.

	b_1	b_2	b_3
a_1	pokus A podmienky a_1, b_1, c_1	pokus B podmienky a_1, b_2, c_2	pokus C podmienky a_1, b_3, c_3
a_2	pokus D podmienky a_2, b_1, c_3	pokus E podmienky a_2, b_2, c_1	pokus F podmienky a_2, b_3, c_2
a_3	pokus G podmienky a_3, b_1, c_2	pokus H podmienky a_3, b_2, c_3	pokus I podmienky a_3, b_3, c_1

2.3 Analytické metódy

Sušina sa stanovila gravimetricky, redukujúce sacharidy modifikovanou metódou podľa Lane-Eynona [5] a kyselina kójová spektrofotometricky s $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ [3].

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V prvej sérii pokusov boli zvolené hodnoty optimalizovaných faktorov na nasledovných hladinách:

100, 150 a 200 g.l^{-1} — koncentrácia glukózy
0,1; 0,3; 0,4 g.l^{-1} — vstupná sušina inokula
2,0; 3,5; 5,0 — pH média

Rozpis a výsledky tejto varianty pokusu sú zhrnuté v tab. 1. Pri štatistickom spracovaní, kde sa za objektívnu funkciu zvolila celková akumulácia kyseliny v médiu, zistil sa interval optimálnych hodnôt — pre glukózu 150–200 g.l^{-1} , sušina inokula 0,3–0,4 g.l^{-1} a pH 3,5–5,0. V najlepšej kombinácii H je však z hľadiska izolácie nevýhodou vysoký obsah zbytkového cukru, ktorý kryštalizuje spolu s kyselinou kójovou. Pre priebeh fermentácie je nárast sušiny (23 g.l^{-1}) vysoký, čo však môže súvisieť s typom dusíkatého zdroja a neoptimálnou koncentráciou stopových prvkov. Je známe, že mikroelementy tvoria aj prostetickú skupinu enzýmov (napr. Fe, Cu, Zn) alebo slúžia ako aktivátory enzýmov (napr. Mn, Zn, Co, Ca, Fe) [6]. V ďalšej optimalizácii boli preto ako jednotlivé faktory zvolené prvky Fe, Mn, Zn pri hladinách:

— Fe — 1, 2, 3 $\cdot 10^{-3} \text{ g.l}^{-1}$
— Mn — 2, 4, 6 $\cdot 10^{-3} \text{ g.l}^{-1}$
— Zn — 1, 2, 3 $\cdot 10^{-3} \text{ g.l}^{-1}$

Do média sa pridávali vo forme síranov. Rozpis a výsledky pokusu sú zhrnuté v tab. 2. Najlepšie výsledky sa dosiahli v kombinácii E, kde produkcia stúpala na 35 g.l^{-1} kyseliny kójovej, zlepšila sa utilizácia sacharidov a znížil sa aj nárast biomasy, čím sa zvýšila konverzia zdroja uhlíka v prospech produktu.

Tabuľka 2. Rozpis a výsledky fermentácií pri optimalizácii stopových prvkov. Počiatočná koncentrácia glukózy 15%, pH = 4,0

Kombinácia	(g.l ⁻¹)			pH	(g.l ⁻¹)		
	MnSO ₄	ZnSO ₄	FeSO ₄		sušina biomasy	RC	KK
A	0,01	0,005	0,005	1,86	13,2	56,3	20,4
B	0,01	0,01	0,01	1,80	12,3	70,3	15,6
C	0,01	0,015	0,015	2,01	16,7	65,6	24,0
D	0,02	0,005	0,015	1,80	16,9	72,4	25,8
E	0,02	0,01	0,005	1,81	12,4	72,4	35,8
F	0,02	0,015	0,01	1,77	13,6	92,9	22,1
G	0,03	0,005	0,01	1,81	13,8	63,9	18,1
H	0,03	0,01	0,015	1,79	14,0	79,4	25,4
I	0,03	0,015	0,005	1,74	12,2	76,9	22,1

V biosyntéze sekundárnych metabolitov produkovaných vláknitými hubami hrá dôležitú úlohu príprava biomasy s vysokou aktivitou enzýmov potrebných pre syntézu, čo závisí ve veľkej miere aj od použitého typu a koncentrácie zdroja dusíka [7]. Pre vylúčenie možnosti interakcie nebola použitá štatistická metóda. Rozpis a výsledky sú zhrnuté v tab. 3. Najlepší výsledok sa dosiahol s kombinovaným zdrojom dusíka — NH_4Cl a močovina. Zaujímavé sú aj výsledky 5. a 7. paralelky, v ktorých sa dosiahla nižšia akumulácia produktu, ale vyšší výťažkový koeficient $y_{P/S}$ ako v najlepšej 1. paralelke.

Tabuľka 3. Rozpis a výsledky optimalizácie dusíkatého zdroja. Počiatočná koncentrácia glukózy 15 %

Pokus č.	Zdroj dusíka	N (%)	pH poč.	pH kon.	B (g.l ⁻¹)	RC (g.l ⁻¹)	KK (g.l ⁻¹)
1	NH_4Cl + močovina	0,07	4,40	1,81	14,4	58,3	35,9
2	NH_4NO_3	0,07	4,33	3,04	16,2	64,8	15,2
3	NH_4NO_3	0,035	4,30	3,61	13,8	98,1	18,6
4	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,07	4,45	1,32	11,8	107,1	16,6
5	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,035	4,36	1,54	10,9	117,9	21,4
6	NH_4Cl	0,07	4,23	1,15	12,1	124,4	stopy
7	NH_4Cl + močovina	0,035	4,26	2,07	9,1	97,2	27,4

N — množstvo dusíka
B — sušina biomasy
RC — redukujúce sacharidy
KK — kyselina kójová

Tabuľka 1. Rozpis a výsledky optimalizácie poč. pH, koncentrácie glukózy a vstupnej sušiny inokula

Kombinácia	Počiatok fermentácie			Koniec fermentácie			
	pH	sušina biomasy (g.l ⁻¹)	konc. glukózy (g.l ⁻¹)	pH	sušina biomasy (g.l ⁻¹)	RC (g.l ⁻¹)	KK (g.l ⁻¹)
A	2,0	0,1	100	1,58	21,8	84,1	6,0
B	3,5	0,1	150	2,06	22,9	95,6	7,7
C	5,0	0,1	200	1,95	25,9	140,2	18,5
D	2,0	0,3	200	1,63	19,9	182,8	6,3
E	3,5	0,3	100	1,90	22,9	53,9	17,4
F	5,0	0,3	150	1,88	26,5	87,6	17,0
G	2,0	0,4	150	1,61	27,9	95,6	7,4
H	3,5	0,4	200	1,84	23,5	155,8	22,4
I	5,0	0,4	100	2,0	23,4	70,1	11,1

Optimalizáciou sa podarilo zvýšiť produkciu kyseliny kójovej submerznou fermentáciou z 22 g.l^{-1} na 35 g.l^{-1} prekvaseného média s 15% počiatočnou koncentráciou glukózy, dosiahol sa aj optimálny nárast biomasy. Pri štatistickom spracovaní bola za objektívnu funkciu zvolená celková produkcia KK v g.l^{-1} , čo však malo pri vysokej počiatočnej koncentrácii glukózy, ktorá je aktivátorom syntézy KK, za následok vysokú hladinu zbytkových sacharidov v médiu. Tá nepriaznivo ovplyvňuje čistotu a výťažnosť izolácie produktu. V ďalšom sa preto bude

venovať pozornosť hlbšiemu prekvaseniu a optimalizáciou vedenia procesu vo fermentore bude potrebné zvýšiť konverziu glukózy na kyselinu kójovú.

Vysvetlivky

KK — kyselina kójová

RC — redukujúce sacharidy v médiu po fermentácii

Literatura

- [1] BEĚLIK, A.: Adv. Carbohydr. Chem., **11**, 1956, s. 145.
- [2] YANG, S. S. - WEI, C. B. - CHOU, C. C.: Mem. Coll. Agr. Natl. Taiwan, **20**, 1980, s. 25.
- [3] DOBIAS, J. - BRŤKO, J. - NEMEC, P.: Kvas. prům., **31**, 1985, s. 260.
- [4] MEDONOS, V.: Statistické zpracování experimentálních výsledků analýzou rozptylu. SNTL, 1. vydání, Praha 1961.
- [5] DAVÍDEK, J. et al.: Laboratorní příručka analýzy potravin, SNTL, 1. vydání, Praha 1977, s. 245.
- [6] BERRY, D. R.: Filamentous Fungi, Vol. 1: Industrial Mycology, Edward Arnold Publ. London, 1976, s. 25.
- [7] SCHROEPPEL, E. - MÜLLER, H. M.: Landwirtsch. Forsch., 35 Sdh., Kongressband 1978, s. 570.
- [8] Pat. ČSSR. AQ 251 533.

Lektoroval dr. Jiří Plachý

Michalík, P. — Horenitzký, R.: Fermentačná produkcia kyseliny kójovej. Kvas. prům., **34**, 1988, č. 5, s. 140—142.

Použitím mikroorganizmu *Aspergillus tamaritii* sa opti-

malizáciou média zvýšila produkcia kyseliny kójovej z 22 g.l⁻¹ na 35 g.l⁻¹ v 7-dňovej submerznej kultivácii.

Михалик, П. — Горенитзкий, Р.: Ферментативное получение коевой кислоты с помощью субмерзной культивации. Квас. прум., **34**, 1988, № 5, стр. 140—142.

После оптимализации медиа с *Aspergillus tamaritii* как продуцентом повысилась продукция коевой кислоты из 22 г.л⁻¹ на 35 г.л⁻¹ с помощью субмерзной культивации в течение 7 дней.

Michalík, P. — Horenitzký, R.: Fermentation Production of Kojic Acid. Kvas. prům., **34**, 1988, No. 5, pp. 140—142.

After optimization of fermentation medium — using *Aspergillus tamaritii* as producing strain — raised the production of kojic acid from 22 g.l⁻¹ to 35 g.l⁻¹ in submerged culture during 7 days.

Michalík, P. — Horenitzký, R.: Produktion der Kojisäure durch Submerskultivation. Kvas. prům., **34**, 1988, Nr. 5, S. 140—142.

Nach der Optimalization des Mediums *Aspergillus tamaritii* als Produzent hat die Kojisäure Produktion vom 22 g.l⁻¹ bis 35 g.l⁻¹ gestiegen durch Submerskultivierung in 7 Tagen.