

# Παραγωγή προϊόντων από μικροοργανισμούς

# Διάρθρωση της παράδοσης

- Σημαντικά προϊόντα και μεθοδολογία της βιομηχανικής μικροβιολογίας
- Ανιούσα και κατιούσα διεργασία
- Παραδείγματα προϊόντων που παράγονται από μικροοργανισμούς
- Συσκευασία - τυποποίηση προϊόντων

# Σημαντικά προϊόντα μικροβιακών διεργασιών

Προϊόν	Οργανισμός	Χρήση
Αιθανόλη	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Βιομηχανικοί διαλύτες, ποτά
Γλυκερόλη	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Παραγωγή εκρηκτικών
Γαλακτικό οξύ	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Τρόφιμα και φαρμακευτικά
Ακετόνη και Βουτανόλη	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Διαλύτες
α-αμυλάση	<i>Bacillus subtilis</i>	Υδρόλυση αμύλου

# Σημαντικές Βιομηχανίες με μικροβιακά προϊόντα

- Βιομηχανίες τροφίμων και ποτών που περιλαμβάνουν ζύμωση (π.χ. τυρί, ξύδι, γιαούρτι, αλκοολούχα ποτά)
- Βιομηχανίες παραγωγής ενζύμων, αιθυλικής αλκοόλης και άλλων διαλυτών, κιτρικού οξέος, βιταμινών, μονοκυτταρικής πρωτεΐνης για ζωοτροφές, αντιβιοτικών και άλλων φαρμάκων
- Βιομηχανίες παραγωγής ενέργειας από ανακυκλώσιμες ύλες (παραγωγή αιθανόλης ή/και βιοαερίου από κυτταρινούχες πρώτες ύλες)
- Βιολογικοί καθαρισμοί υγρών και στερεών αποβλήτων
- Βιομηχανίες εξόρυξης πετρελαίου και δέσμευσης αζώτου

# ΚΥΡΙΟΙ ΣΤΑΘΜΟΙ

- **αρχαιότητα και μέχρι σήμερα:** χρήση βιοτεχνολογικής παραγωγής τροφίμων, όπως κρασιού, ξυδιού, τυριού, ψωμιού και αργότερα μπύρας και γιαουρτιού.
- **αρχές του 20ού αιώνα:** χρησιμοποιούνται για πρώτη φορά βιοτεχνολογικές μέθοδοι παραγωγής οργανικών οξέων, διαλυτών και βιομάζας κάτω από μη άσηπτες συνθήκες,
- **περίπου 1940:** με την ανάπτυξη των μεθόδων αποστείρωσης παράγονται με βιοχημικές διεργασίες πολλά προϊόντα όπως αντιβιοτικά ( πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη κ.α.), βιταμίνη B12, αλκαλοειδή, γιβερελλίνες, κορτιζόνη, 5'-νουκλεοτίδια, δεξτράνες, ένζυμα κ.λ.π.
- **τα τελευταία 20 χρόνια:** μεγάλη ώθηση λόγω δύο νέων επιτευγμάτων:
  - ο Τεχνολογία **ακινητοποιημένων κυττάρων**
  - ο Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA (**γενετική μηχανική**)

# Εφαρμοζόμενες διεργασίες

- διεργασίες για την **απομάκρυνση** θρεπτικών συστατικών (π.χ. βιολογικός καθαρισμός)
- διεργασίες για την **παραγωγή μεταβολικών προϊόντων** (π.χ. αλκοολική ζύμωση)
- διεργασίες για την **παραγωγή βιομάζας** (φύκη, μονοκυτταρική πρωτεΐνη)
- διεργασίες **βιομετατροπής**, δηλ. χρήσης ως καταλύτη (π.χ. υδροξυλίωση αρωματικών)

# Διεργασία Χώνευσης

Ανιούσα διεργασία

Πρώτες ύλες της χώνευσης

Μικροοργανισμός

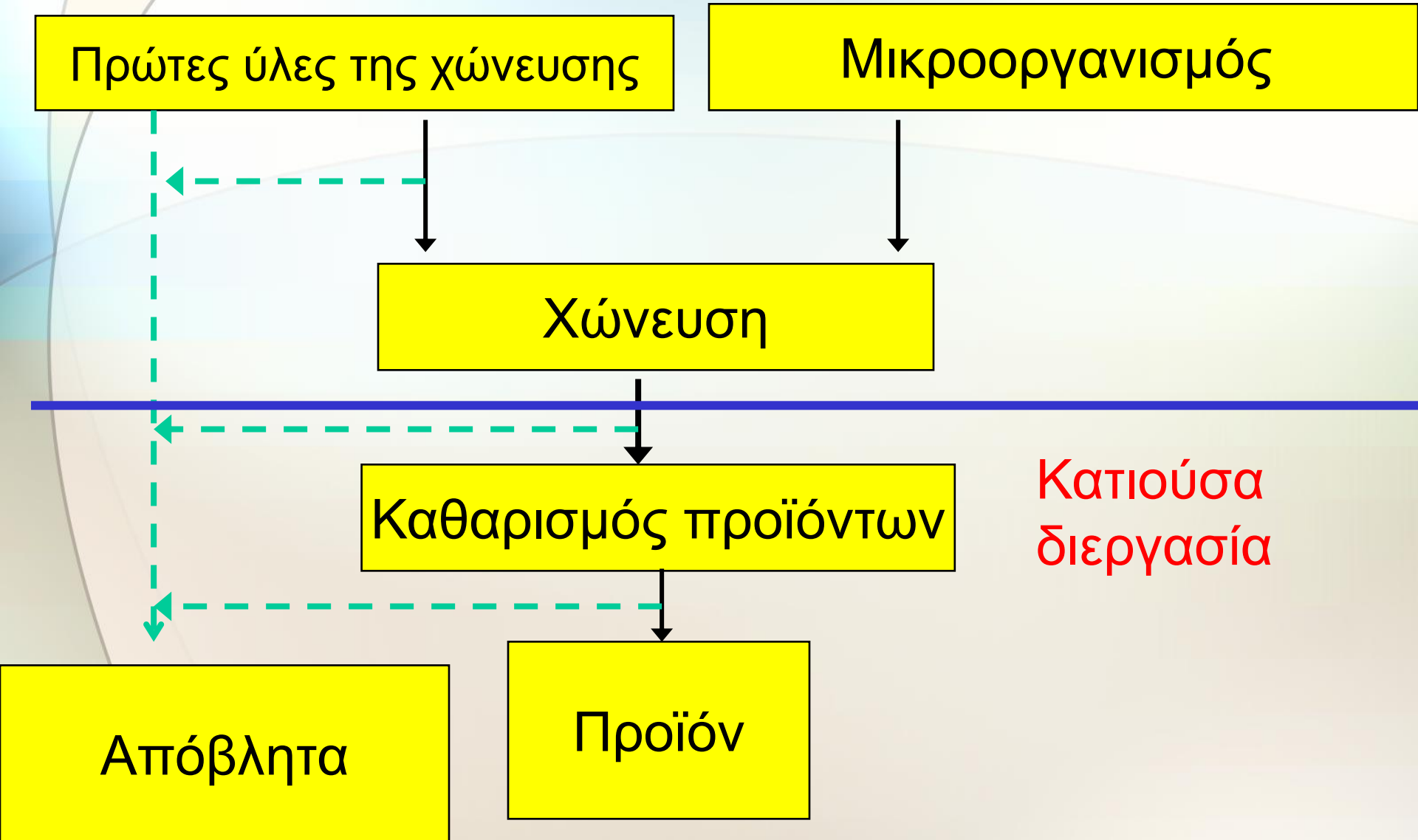
Χώνευση

Καθαρισμός προϊόντων

Απόβλητα

Προϊόν

Κατιούσα διεργασία



# Ανιούσα διεργασία

## Τρία κομβικά σημεία:

### Μικροοργανισμός

#### Οι διεργασίες για

- Παραλαβή του κατάλληλου μικροοργανισμού

- Βελτίωση του στελέχους για την αύξηση της παραγωγικότητας και της απόδοσης

- Διατήρηση καθαρού στελέχους

- Παρασκευή του κατάλληλου εμβολιαστικού υλικού

### Μέσο καλλιέργειας

### Διεργασία Χώνευσης

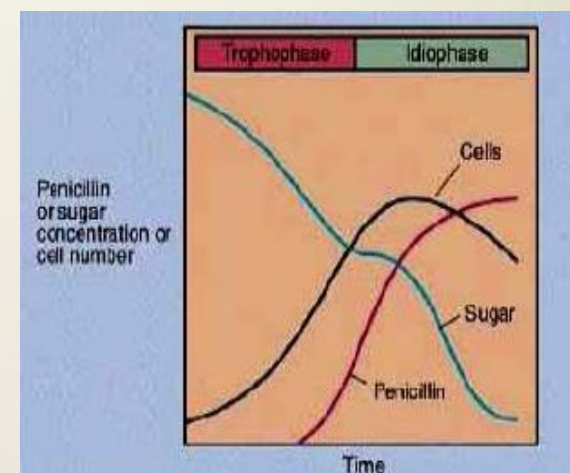
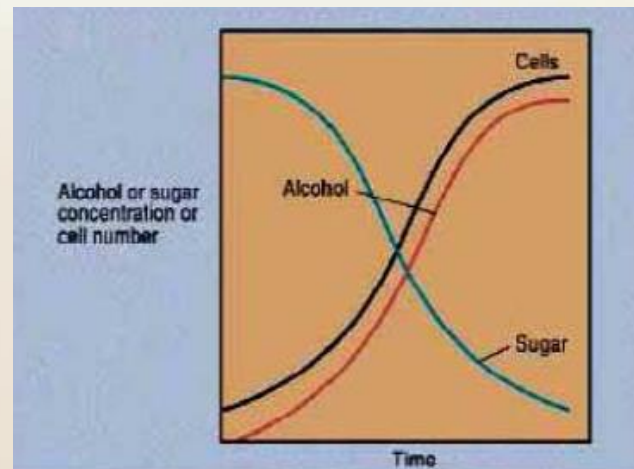
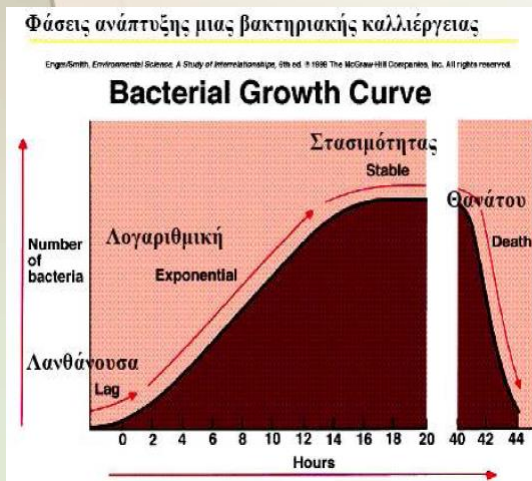


# Παραδείγματα εφαρμογών μικροοργανισμών

- *Bacillus thuringiensis*
  - Μικροβιακά εντομοκτόνα
- *Lactobacillus sp.*
  - Αρχικές καλλιέργειες για τη ζύμωση γαλακτοκομικών προϊόντων
- *Streptococcus cremoris*
  - Βιομηχανοποίηση γαλακτοκομικών προϊόντων
- *Penicillium roqueforti*
  - Εμβολιάσματα για την παραγωγή τυριών
- *Rhizobium sp.*
  - Εμβολιάσματα που προάγουν την καθήλωση του αζώτου
- *Pseudomonas syringae*
  - Δημιουργία τεχνητού χιονιού
- Μεταλλαγμένα στελέχη για προστασία των φυτών από τους παγετούς

# Το είδος των προϊόντων

- Πρωτογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι παράγονται κατά τη φάση ανάπτυξης (λογαριθμική φάση) των μικροοργανισμών
- Δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται κατά τη στατική ή φάση στασιμότητας των μικροοργανισμών



# Δευτερογενείς Μεταβολίτες

- Είναι μόρια που συνθέτονται από μικροοργανισμούς κατά την τελευταία φάση ανάπτυξής τους (φάση στασιμότητας)
- Δεν απαιτούνται για την ανάπτυξη
- Η πραγματική τους λειτουργία δεν είναι πλήρως γνωστή
- Οι πιο γνωστοί είναι τα αντιβιοτικά που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών, προσδίδοντας οικολογικό πλεονέκτημα στους παραγωγούς των
- Σήμερα περισσότερα από 2500 αντιβιοτικές ουσίες παράγονται από βακτήρια γνωστά ως Ακτινομύκητες

# Αντιβιοτικά

- *Penicillium notatum*: Πενικιλίνη
- *Bacillus licheniformis*: Βακιτρακίνη
- *Streptomyces griseus*: Στρεπτομυκίνη
- *Streptomyces erythraeus*: Ερυθρομυκίνη
- *Streptomyces nodosus*: Αμφοτερισίνη Β

# Βιταμίνες

- Βιταμίνη B12
  - *Propionobacterium, Streptomyces griseus*
- Καροτένιο (Βιταμίνη A)
  - *Phycomyces blakesleeanus*
- Βιταμίνη B2
  - *Eremothecium ashbyii, Ashbya gossipyii*

# Αρωματικές Ουσίες

- Πτητικές ενώσεις που απαντώνται στις τροφές και στα αρώματα δίνοντας χαρακτηριστική οσμή
- Είναι φυσικές αν προέρχονται από φυσικά προϊόντα
- Σήμερα 50-100 αρωματικές ουσίες παράγονται από μικροοργανισμούς
- Βανιλίνη:
  - Φυσική, από τον καρπό της βανίλλιας (~ \$4,000/kg)
  - Παρασκευή με ζύμωση φυσικών προϊόντων (π.χ. στιλβένιο, ευγενόλη) (~ \$1,000/kg)
  - Παρόμοια με τη φυσική, παραγόμενη από μικροοργανισμούς (~ \$12/kg)

# Αρωματικές ύλες και παραγωγή τυριών

- Κατά την ωρίμανση τυριών χρησιμοποιούνται καθαρές καλλιέργειες βακτηρίων π.χ. *Brevibacterium*, *Microbacterium* με πλήθος οσμηρών συστατικών, όπως λιπαρά οξέα, αλκοόλες, μεθυλοκετόνες και κυκλικές ενώσεις
- Η εμφάνιση του χρώματος συνδέεται συχνά με τη δράση ενζύμων όπως λιπάσες και πρωτεάσες
- Οι συγκεντρώσεις των προϊόντων αποικοδόμησης των ενζύμων αυτών καθορίζουν το άρωμα της κάθε ποικιλίας τυριού, π.χ. *Penicillium roqueforti*, που προσδίδει χαρακτηριστικό άρωμα τυριού τύπου ροκφόρ



# Παραγωγή κιτρικού οξέος

- Είναι το πλέον σημαντικό οργανικό οξύ
  - Παράγεται σε ποσότητες τόνων (>1.000.000 tn/y)
  - Η χρήση του αυξάνεται κάθε χρόνο κατά 4%
  - Χρησιμοποιείται σε τρόφιμα (60%) και φαρμακευτικά (10%)
- Παράγεται με βυθισμένη χώνευση σακχάρων (μελάσα, διαλυτά προϊόντα αμύλου) από *Aspergillus niger* ή *Candida sp.*
- Έχουν προταθεί και άλλες τεχνικές χώνευσης, π.χ. στερεά χώνευση, ως επίσης και άλλες πηγές σακχάρων, π.χ. αγροτοβιομηχανικά απόβλητα



# Παραγωγή κιτρικού οξέος

- Απομονώθηκε πρώτη φορά από τον Karls Scheels το 1874, στην Αγγλία, από το χυμό λεμονιού, έπειτα από καταβύθιση με  $\text{Ca}(\text{OH})_2$
- Οι Ιταλοί λεμονοπαραγωγοί είχαν για σχεδόν 100 χρόνια το μονοπώλιο στην παραγωγή του, η δε τιμή του ήταν αρκετά υψηλή
- Εξ αιτίας αυτού έγιναν πολλές προσπάθειες για εναλλακτικές μεθόδους παραγωγής, χημικές και μικροβιακές
- Το 1923, ο Wehmer παρατήρησε την παρουσία κιτρικού οξέος, ως παραπροϊόν της παραγωγής οξαλικού από *Penicillium glaucum* και άλλοι ερευνητές απομόνωσαν δύο στελέχη μυκήτων του είδους *Citromyces* (namely *Penicillium*)
- Δυστυχώς, οι βιομηχανικές προσπάθειες δεν υπήρξαν αποδοτικές, λόγω επιμολύνσεων και υψηλής διάρκειας των ζυμώσεων

# Παραγωγή κιτρικού οξέος

- Η Βιομηχανική διεργασία ξεκίνησε από τον Currie, το 1917, ο οποίος ανακάλυψε ότι ο *Aspergillus niger* μπορούσε να συσσωρεύει κιτρικό οξύ κατά τη διάρκεια ζύμωσης σακχάρων
- Ο Currie έδειξε ότι η παραγωγή κιτρικού οξέος ευνοείται από υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων, όπου παρεμποδίζεται η ανάπτυξή του
- Στη δεκαετία του 1930 αναπτύχθηκαν βιομηχανικές μονάδες στην Αγγλία, τη σοβιετική Ένωση και στη Γερμανία για την παραγωγή του
- Το όλο θέμα ξεκαθαρίστηκε από βιοχημικής άποψης πλήρως στη δεκαετία του 1950, με την ανακάλυψη του μονοπατιού της γλυκόλυσης και του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων
- Στη συνέχεια αναπτύχθηκε στις ΗΠΑ η βελτιωμένη πορεία παραγωγής μέσω βυθισμένης χώνευσης, που ακολουθείται έως σήμερα

# Παραγωγή κιτρικού οξέος

- Υπάρχουν πολλές και καλές μέθοδοι χημικής σύνθεσης του κιτρικού οξέος
- Πιο επιτυχημένες μέθοδοι θεωρούνται εκείνες μέσω μικροβιακών ζυμώσεων
  - λόγω των καθαρότερων αποβλήτων
  - λόγω της χαμηλότερης ενεργειακής δαπάνης
- Οι μελέτες συνεχίζονται στο επίπεδο
  - της βελτίωσης των στελεχών
  - της διατήρησης της παραγωγικότητάς τους

# Χρήσεις κιτρικού οξέος

- Κυρίως στις βιομηχανίες τροφίμων ως πρόσθετο, λόγω
  - της ευχάριστης όξινης γεύσης
  - της υψηλής διαλυτότητας στο νερό
- Ανήκει στις ουσίες που χαρακτηρίζονται ως “GRAS” (generally recognized as safe)

Βιομηχανία	Εφαρμογές
Ποτά	Παρέχει τη γεύση και το άρωμα φρούτων. Αυξάνει την αποτελεσματικότητα των μικροβιοστατικών. Ρύθμιση του pH.
Ζελέ, μαρμελάδες και γλυκά του κουταλιού	Παρέχει τη γεύση. Ρύθμιση του pH.
Καραμέλα	Παρέχει τη γεύση. Μειώνει την ιμβερτοποίηση της σουκρόζης. Παρέχει το σκούρο χρώμα στις σκληρές καραμέλες. Δρα ως μέσο οξίνισης.
Κατεψυγμένα φρούτα	Μειώνει το pH για την ανενεργοποίηση οξειδωτικών ενζύμων. Προστατεύει το ασκορβικό οξύ από μεταλλικά ιχνοστοιχεία.
Γαλακτοκομικά	Ως γαλακτωματοποιητής σε παγωτά και μαλακά τυριά. Ως μέσο οξίνισης και αντιοξειδωτικό σε τυριά.
Λίπη και έλαια	Δεσμεύει ελεύθερες ρίζες - αντιοξειδωτικό.
Φαρμακευτικά	Ως αναβράζον σε σκόνες και χάπια σε συνδυασμό με διττανθρακικά. Διευκολύνει την τάχιστη διαλυτοποίηση δραστικών συστατικών. Ως μέσο οξίνισης σε ήπια στυπτικά σκευάσματα. Αντιπηκτικό.

Βιομηχανία	Εφαρμογές
Καλλυντικά και προϊόντα περιποίησης	<p>Ως συστατικό ρυθμιστικών διαλυμάτων και για τη ρύθμιση του pH. Αντιοξειδωτικό. Ως κηλωτής μεταλλικών ιόντων.</p>
Γενικές βιομηχανικές εφαρμογές	<p>Δεσμευτής μεταλλικών ιόντων. Εξουδετερωτής. Συστατικό ρυθμιστικών διαλυμάτων.</p>
Καθαρισμός μετάλλων	<p>Απομακρύνει τα μεταλλικά οξειδία από τις επιφάνειες σιδηρούχων και μη μεταλλικών υλικών. Καθαρισμός (για παραγωγή ή χρήση) των οξειδίων του χαλκού και του σιδήρου.</p>
Άλλες	<p>Ηλεκτροεπιμετάλλωση (χαλκού, κλπ). Καθαρισμός μετάλλων. Μαύρισμα δερμάτινων υφασμάτων. Μελάνια εκτύπωσης. Υλικά καθαρισμού φιαλών. Τσιμέντο δαπέδου. Υφάσματα. Φωτογραφικά αντιδραστήρια. Γύψος σκυροδέματος. Πυρίμαχα υλικά και καλούπια. Συγκολλητικά. Χαρτί. Πολυμερή. Καπνός - καπνικά προϊόντα. Καθαρισμός αποβλήτων.</p>

# Μικροοργανισμοί που παράγουν κιτρικό οξύ

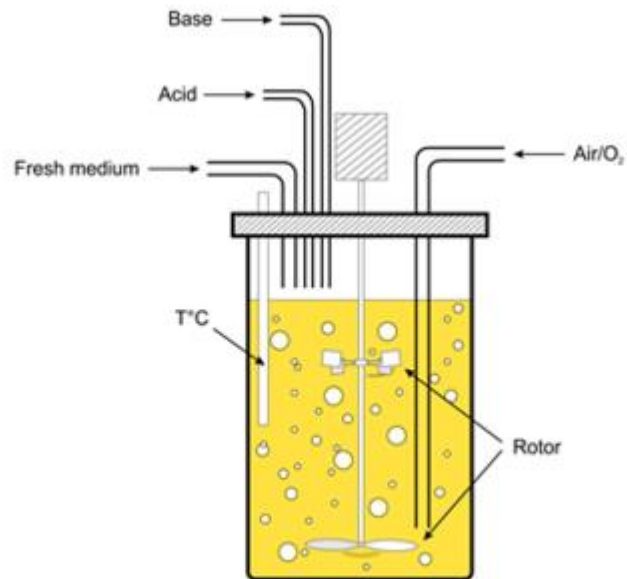
Μικροοργανισμοί	
Μύκητες	<i>Aspergillus niger</i> <i>A. aculeatus</i> <i>A. awamori</i> <i>A. carbonarius</i> <i>A. wentii</i> <i>A. foetidus</i> <i>Penicillium janthinelum</i>
Ζύμες	<i>Saccharomicopsis lipolytica</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>C. oleophila</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. citroformans</i> <i>Hansenula anamola</i>
Βακτήρια	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Arthrobacter paraffinens</i> <i>Corynebacterium sp.</i>

# Υγρή χώνευση: Βυθισμένη χώνευση

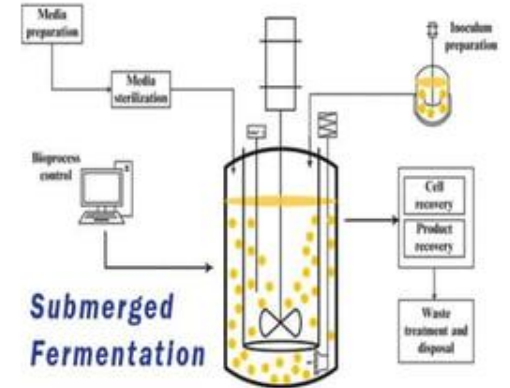
- Πρόκειται για την πλέον συχνά χρησιμοποιούμενη πορεία
- Περίπου 80% της παγκόσμιας παραγωγής
- Πολλά πλεονεκτήματα, κυρίως
  - Υψηλή απόδοση
  - Υψηλή παραγωγικότητα
  - Χαμηλό εργατικό κόστος
- Δύο τύποι χωνευτήρων
  - αναδευόμενοι χωνευτήρες
  - χωνευτήρες πύργου
    - προτιμητέος λόγω τιμής αγοράς, μεγέθους και τρόπου λειτουργίας
- Οι χωνευτήρες
  - κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα
  - απαιτούν καλό αερισμό (πλούσια παροχή οξυγόνου)
  - δεν απαιτούν αντοχή σε υψηλές πιέσεις
    - η αποστείρωση γίνεται με διαβίβαση θερμού ατμού
  - η ψύξη γίνεται με κυκλοφορία ψυχρού ύδατος



# Βυθισμένη χώνευση



**Submerged Fermentation**



**Submerged Fermentation**

# Υγρή χώνευση: Βυθισμένη χώνευση

- Το μέσο καλλιέργειας μπορεί να περιέχει απλούς υδατάνθρακες ή παράγωγα υδρόλυσης του αμύλου
- Η μελάσσα, και άλλα απόβλητα, απαιτούν προκατεργασία, προσθήκη άλλων συστατικών και αποστείρωση
- Ο ενοφθαλμισμός γίνεται εισάγοντας
  - είτε αιώρημα σπόρων
    - προστίθεται απορρυπαντικό για να βοηθήσει τη διασπορά τους
  - είτε προκαλλιεργημένα μικύλλια
    - το ενοφθάμισμα είναι περίπου 10% του όγκου του μέσου καλλιέργειας
- Η βυθισμένη χώνευση ολοκληρώνεται σε 5-10 ημέρες ανάλογα με τις συνθήκες της διεργασίας
- Συνήθως χρησιμοποιείται αντιδραστήρας παρτίδων

# Υγρή χώνευση: Βυθισμένη χώνευση

## Απόδοση προϊόντος

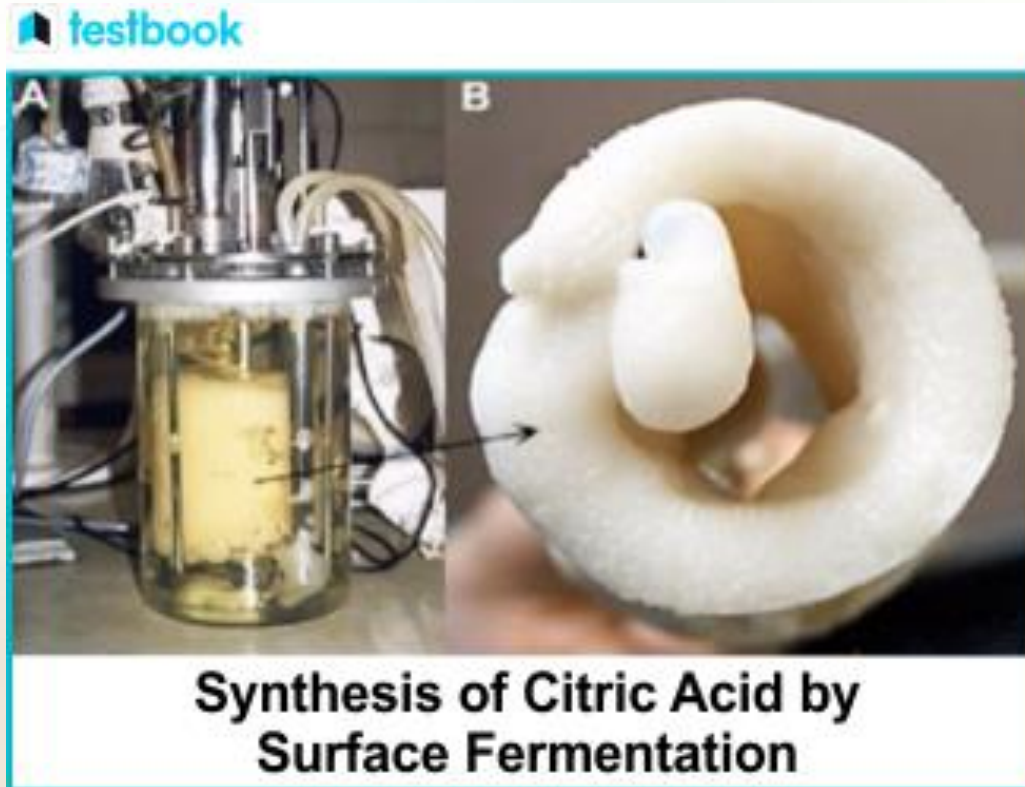
Raw material	Strain	Citric acid	Yield, %
Brewery wastes	<i>A. niger</i> ATTC 9142	19 g/L	78.5
Beet molasses	<i>A. niger</i> ATTC 9142	109 g/L	-
	<i>Yarrow lipolytica</i> A101	54 g/L	68.7 <sup>a</sup>
Cane molasses	<i>A. niger</i> T 55	-	65
Wood Hemicellulose	<i>A. niger</i> IMI- 41874	27 g/L	45 <sup>a</sup>
	<i>S. lipolytica</i> IFO 1658	9 g/L	41
Date syrup	<i>A. niger</i> ATTC 9142	-	50
Corn starch	<i>A. niger</i> IM-155	-	62
Starch hydrolysate	<i>Y. lipolytica</i> DS-1	-	-
	<i>Y. lipolytica</i> A-101	-	75
Rapeseed oil	<i>Y. lipolytica</i> A-101	-	57
Soybean oil	<i>Y. lipolytica</i> A-101	-	63
Coconut oil	<i>C. lipolytica</i> N-5704	-	99.6 <sup>b</sup>
Palm oil	<i>C. lipolytica</i> N-5704	-	155 <sup>b</sup>
Olive oil	<i>C. lipolytica</i> N-5704	-	119 <sup>b</sup>
Soybean oil	<i>C. lipolytica</i> N-5704	-	115 <sup>b</sup>
Glycerol	<i>C. lipolytica</i> N-5704	-	58.8 <sup>b</sup>
n-Paraffin	<i>C. lipolytica</i> N-5704	-	161 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> based on sugar consumed; <sup>b</sup> based on oils and fatty acids

# Υγρή χώνευση: Επιφανειακή χώνευση

- Η πρώτη πορεία που ακολουθήθηκε για την παραγωγή κιτρικού οξέος ήταν η υγρή επιφανειακή καλλιέργεια (1919, Βέλγιο και 1923, ΗΠΑ)
- Η τεχνική είναι σχετικά απλή, εύκολη στην εγκατάσταση και λειτουργία και με λιγότερη δαπάνη ενέργειας
- Η καλλιέργεια διατηρείται σε ρηχούς δίσκους από αλουμίνιο ή ανοξείδωτο ατσάλι των 50-100 L και ο μύκητας αναπτύσσεται ως μυκιλλιακό ταπέτο στην επιφάνειά της
- Οι δίσκοι τοποθετούνται ως ράφια στον αντιδραστήρα, ο οποίος ρυθμίζεται ως προς τη θερμοκρασία, την τροφοδοσία με αέρα και την υγρασία
- Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται καθαρή ή όχι σακχαρόζη, σιρόπι αραβοσίτου ή μελάσσα μετά από οξείδωση με εξακυανοσιδηρικό
- Η αποστείρωση πρέπει να διατηρείται τουλάχιστο τις 2 πρώτες ημέρες, μέχρι να βλαστήσουν τα σπορία
- Οι συνήθεις μολύνσεις προέρχονται από *Penicilia*, *Aspergilli*, ζύμες και γαλακτικά βακτήρια

# Επιφανειακή χώνευση

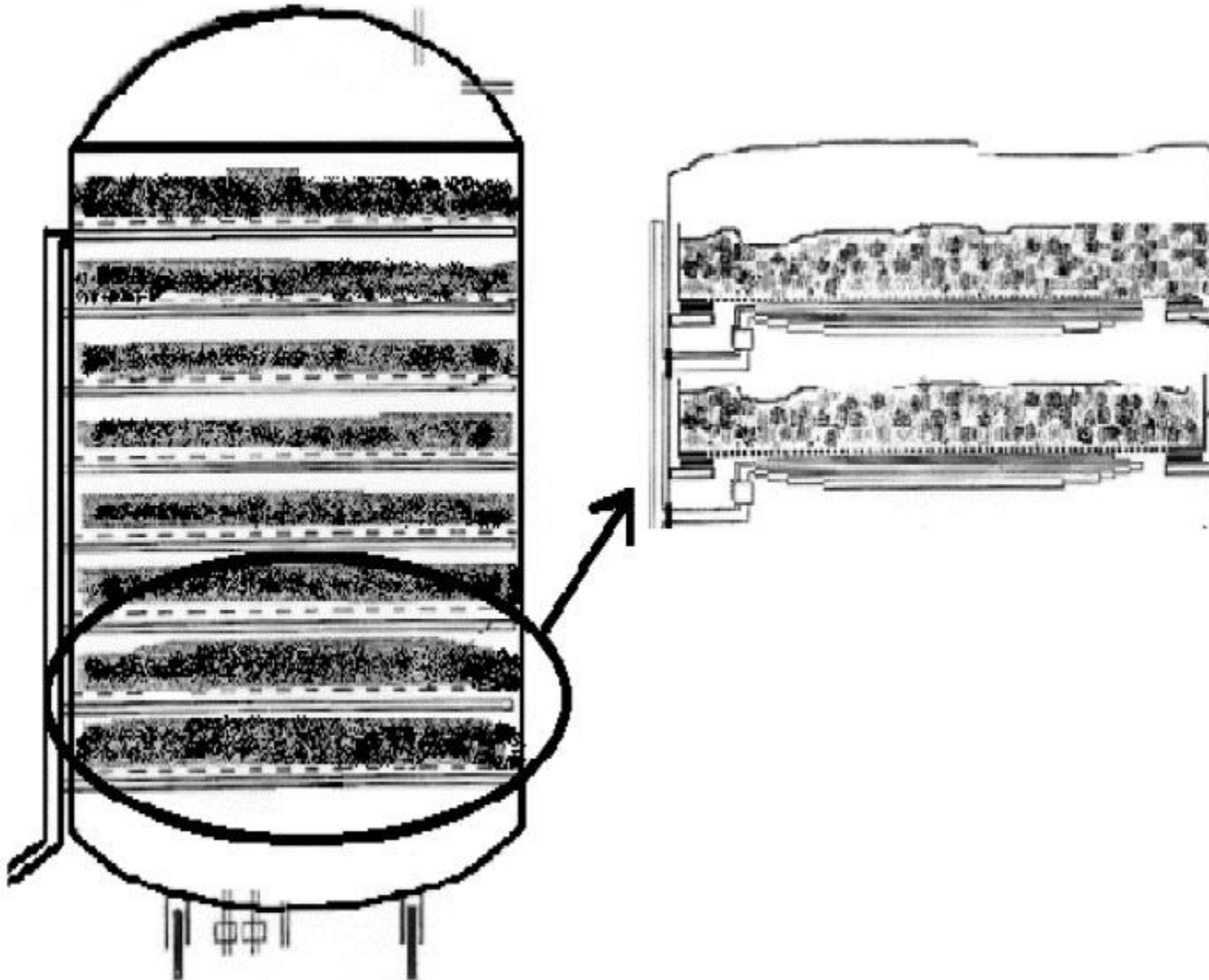


# Χώνευση σε στερεά κατάσταση (Solid-state fermentation)

- Η χώνευση σε στερεά κατάσταση (SSF) προβάλλεται ως εναλλακτική μέθοδος στην παραγωγή κιτρικού οξέος από αγροτοβιομηχανικά απόβλητα
- Η παραγωγή κιτρικού οξέος με SSF (η πορεία κατά Koji) αναπτύχθηκε στην Ιαπωνία και είναι η απλούστερη μέθοδος παραγωγής του
- Η SSF χρησιμοποιεί πολλών ειδών απόβλητα
- Το υπόστρωμα υγραίνεται περίπου μέχρι 70% υγρασία
  - Εξαρτάται από την ικανότητα προσρόφησης του υποστρώματος
- Το αρχικό pH είναι 4.5-6.0 και η T επώασης μεταξύ 28 και 30°C



# Χώνευση σε στερεά κατάσταση



# Χώνευση σε στερεά κατάσταση

Είδη αποβλήτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν

Apple pomace	<i>A.niger</i>	NRRL2001	766 g/kg <sup>a</sup>
		NRRL 2270	816 g/kg <sup>a</sup>
		NRRL 599	771 g/kg <sup>a</sup>
		NRRL 328	798 g/kg <sup>a</sup>
		NRRL 567	883 g/kg <sup>a</sup>
Grape pomace	<i>A.niger</i>	NRRL2001	413 g/kg <sup>a</sup>
		NRRL 2270	511 g/kg <sup>a</sup>
		NRRL 599	498 g/kg <sup>a</sup>
		NRRL 328	523 g/kg <sup>a</sup>
		NRRL 567	600 g/kg <sup>a</sup>
Kiwifruit peel	<i>A.niger</i>	NRRL 567	100 g/kg <sup>a</sup>
Cellulose hydrolysate and Sugar cane	<i>A.niger</i>		29 g/kg
Orange waste	<i>A.niger</i>		46 g/kg
Beet molasses (Ca-alginate gel)	<i>A.niger</i>	ATCC 9142	35 g/L
Saccharose (Sugar cane bagasse)	<i>A.niger</i>	CFTRI 30	174 g/kg <sup>b</sup>
Coffee husk	<i>A.niger</i>	CFTRI 30	150 g/kg <sup>b</sup>
Carrot waste	<i>A.niger</i>	NRRL 2270	29 g/kg <sup>a</sup>
Okara (soy residue)	<i>A.niger</i>		96 g/kg <sup>a</sup>
Pineapple waste	<i>A.niger</i>	ATCC 1015	132 g/kg <sup>b</sup>
		ACM 4942	194 g/kg <sup>b</sup>
Glucose (Sugar cane bagasse)	<i>A.niger</i>	CBS733.88	21.24 g/L
Kumara (starch containing)	<i>A.niger</i>	Yang no 2	103 g/kg <sup>b</sup>
Mussel processing wastes (polyurethane foams)	<i>A.niger</i>		300 g/kg
Cassava bagasse	<i>A.niger</i>	LPB-21	347 g/kg <sup>b</sup>

<sup>a</sup> based on sugar consumed; <sup>b</sup> based on dry matter



# Χώνευση σε στερεά κατάσταση

- Ο πλέον συνήθης οργανισμός είναι ο *A. niger*
  - Χρησιμοποιούνται επίσης ορισμένες ζύμες
- Ένα από τα πλεονεκτήματα της SSF είναι ότι η παρουσία ιχνοστοιχείων συνήθως δεν επηρεάζει την παραγωγή του κιτρικού οξέος, όπως συμβαίνει στην SmF
- Συνεπώς, δεν απαιτείται προκατεργασία του υποστρώματος

# Χώνευση σε στερεά κατάσταση

- Διαφορετικοί τύποι χωνευτήρων έχουν χρησιμοποιηθεί
  - Απλές κωνικές φιάλες
  - Γυάλινοι σωληνοειδείς αντιδραστήρες
  - Αντιδραστήρες δίσκων
- Χωρίς να υπάρχει συσχέτιση με το είδος του υποστρώματος
- Υψηλότερες αποδόσεις έχουν επιτευχθεί σε αντιδραστήρες φιαλών χωρίς αερισμό
  - με ελάχιστη ανάπτυξη σπορίων
- Ανάλογες αποδόσεις έχουν επιτευχθεί σε σωληνοειδείς χωνευτήρες με ελάχιστο αερισμό
- Φαίνεται τελικά προτιμότερη η παραγωγή του κιτρικού οξέος από χωνευτήρες δίσκων

# Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή κιτρικού οξέος

Το μέσο καλλιέργειας και τα συστατικά του

Πηγή Άνθρακα

- Η συσσώρευση κιτρικού οξέος επηρεάζεται πάρα πολύ από τη φύση της πηγής άνθρακα
- **Η παρουσία εύκολα μεταβολιζόμενων υδατανθράκων είναι σημαντική για καλή παραγωγή**
- Σουκρόζη>>γλυκόζη>>φρουκτόζη>>γαλακτόζη
  - Η γαλακτόζη συμβάλλει σε χαμηλή ανάπτυξη του μύκητα και δεν ευνοεί τη συσσώρευση κιτρικού οξέος
- Άλλες πηγές άνθρακα, παράγωγα σακχάρων ή όχι, π.χ. αιθανόλη, κυτταρίνη, μανιτόλη, γαλακτικό, μηλικό, α-κετογλουταρικό, επιτρέπουν περιορισμένη ανάπτυξη και χαμηλή παραγωγή
  - Το άμυλο, οι πεντόζες (ξυλόζη και αραβινόζη), η σορβιτόλη και το πυροσταφυλικό καθυστερούν την ανάπτυξη, κι έτσι ελαχιστοποιούν την παραγωγή

# Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή κιτρικού οξέος

Το μέσο καλλιέργειας και τα συστατικά του

Πηγή Άνθρακα

- Η αρχική συγκέντρωση σε σάκχαρα είναι πολύ κρίσιμη για την παραγωγή κιτρικού και άλλων οργανικών οξέων
  - Ο *A. Niger* χρειάζεται αρχική συγκέντρωση σακχάρων 10-14% (βέλτιστη)
  - Δεν παράγεται κιτρικό οξύ σε συγκέντρωση σακχάρου < 2,5%
    - Τα ακινητοποιημένα κύτταρα *A. niger* χρειάζονται μικρότερη συγκέντρωση σουκρόζης σε σχέση με την απλή καλλιέργεια, για να επιτευχθούν υψηλές αποδόσεις (200 g κιτρικού/L καλλιέργειας, και 120 g/L ακινητοποιημένων κυττάρων)
- Πολλά απόβλητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν
- Κρίσιμοι παράγοντες είναι το κόστος και η προκατεργασία
- Πιο κρίσιμος παράγοντας είναι η παρουσία ιχνοστοιχείων που μπορούν να δρουν ως αναστολείς, αλλά και ως ενεργοποιητές
  - συνεπώς θα πρέπει να ελέγχεται η παρουσία τους και να απομακρύνονται

# Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή κιτρικού οξέος

Το μέσο καλλιέργειας και τα συστατικά του

Πηγή Αζώτου

- Η παραγωγή κιτρικού επηρεάζεται άμεσα από την πηγή αζώτου
- Προτιμώνται αμμωνιακά άλατα
  - Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ουρία, πεπτόνη, μαλτ, κλπ
- Η κατανάλωση του αζώτου οδηγεί σε μείωση του pH, κάτι πολύ σημαντικό στη διεργασία της χώνευσης
- Όμως, είναι απαραίτητη η διατήρηση σταθερής τιμής pH την πρώτη ημέρα της χώνευσης, πριν αναπτυχθεί ικανοποιητικά η καλλιέργεια
  - Η ουρία βοηθά κατά κάποιο τρόπο στη σταθερότητα του pH
- Η συγκέντρωση της πηγής του αζώτου που απαιτείται είναι 0,1 έως 0,4 N
  - Υψηλότερη συγκέντρωση αζώτου αυξάνει την κυτταρική ανάπτυξη και την κατανάλωση σακχάρων, όμως μειώνει την παραγωγή κιτρικού

# Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή κιτρικού οξέος

## Το μέσο καλλιέργειας και τα συστατικά του

### Πηγή Φωσφόρου

- Η παρουσία του φωσφόρου στο μέσο καλλιέργειας έχει θετικότερη επίδραση στην απόδοση σε κιτρικό
  - Το  $\text{KH}_2(\text{PO}_4)$  θεωρείται η πιο κατάλληλη πηγή φωσφόρου
- Ο φωσφόρος απαιτείται σε συγκεντρώσεις 0,5 έως 5,0 g/L στο μέσο καλλιέργειας, ώστε να είναι μέγιστη η παραγωγή κιτρικού
- Τα φωσφορικά είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και το μεταβολισμό του *A. niger*
- Χαμηλά επίπεδα φωσφορικών ευνοούν την παραγωγή κιτρικού
- Υψηλά επίπεδα (περίσσεια) φωσφορικών οδηγούν σε
  - Βιοσύνθεση οξέων-παραγώγων υδατανθράκων
  - Μείωση στην αφομοίωση  $\text{CO}_2$ , και σε μειωμένη ανάπτυξη
    - Τα φωσφορικά δρουν στο επίπεδο της ενζυμικής δραστηριότητας και όχι σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης

# Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή κιτρικού οξέος

## Το μέσο καλλιέργειας και τα συστατικά του

- Αξίζει να σημειωθεί ότι διαφορετικά στελέχη απαιτούν διαφορετικές συγκεντρώσεις N και P στο μέσο καλλιέργειας
- Στην πράξη, ο περιορισμός σε N και P είναι πολύ σημαντικός παράγοντας στην παραγωγή κιτρικού, επειδή υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ τους
- Η γενική εικόνα δείχνει ότι τα περισσότερα στελέχη παράγουν μεγαλύτερα ποσά κιτρικού
  - σε συνθήκες χαμηλών επιπέδων N και P σε βυθισμένη καλλιέργεια
  - σε συνθήκες υψηλών επιπέδων σε καλλιέργεια στερεάς κατάστασης
    - αυτό οφείλεται στη χαμηλή διάχυση των θρεπτικών υλικών στην καλλιέργεια στερεάς κατάστασης
- Συμπερασματικά, στα στελέχη με υψηλές απαιτήσεις σε N και P δεν ευνοείται η παραγωγή κιτρικού, λόγω των περιορισμών που τίθενται σε θρεπτικά υλικά



# Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή κιτρικού οξέος

## Ιχνοστοιχεία

- Η διατροφή σε ιχνοστοιχεία είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση σε κιτρικό
- Πολλά δισθενή μέταλλα, όπως **Zn, Mn, Fe, Cu και Mg** επηρεάζουν άμεσα την παραγωγή κιτρικού από *A. niger*
- Είναι σημαντική επίσης η εξάρτηση της δράσης των ιχνοστοιχείων από το μέσο καλλιέργειας
  - Ο Zn ευνοεί την παραγωγή κιτρικού, όταν προστίθεται παρουσία  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - Η παρουσία Mn και μεγάλες συγκεντρώσεις Fe και Zn οδηγεί σε μείωση της απόδοσης σε κιτρικό μόνο σε μέσο ελεύθερο φωσφορικών
- Λίγες διαφορές εντοπίζονται μεταξύ SSF και SmF, όσον αφορά στην απόκριση του *A. niger* σε ιχνοστοιχεία
- Τα συστήματα SSF μπορούν να υπερπηδήσουν τις ανεπιθύμητες παρενέργειες υψηλών συγκεντρώσεων ιχνοστοιχείων στο μέσο καλλιέργειας
  - Έτσι δεν χρειάζεται η προσθήκη χηλικών παραγόντων (σιδηροκυανικά) για τη δέσμευσή τους



# Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή κιτρικού οξέος

## Ιχνοστοιχεία

- Ο **Cu** συμπληρώνει την ικανότητα του **Fe** (στη βέλτιστη συγκέντρωση) να ευνοεί τη βιοσύνθεση του κιτρικού
  - Η βέλτιστη αρχική συγκέντρωση του  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  είναι 78 mg/L
- Η συσσώρευση κιτρικού μειώνεται με την αύξηση του **Fe**, ο οποίος έχει επίδραση και στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού
- Έλλειψη σε **Mn** καταλήγει σε καταστολή των ενζύμων της γλυκόλυσης και του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων, με εξαίρεση τη **συνθετάση του κιτρικού**
  - Αυτό οδηγεί σε υπερσυσσώρευση του κιτρικού ως τελικού προϊόντος της γλυκόλυσης
- Χαμηλά επίπεδα **Mn** (σε επίπεδο ppm) είναι ικανά να μειώσουν την απόδοση σε κιτρικό κατά 10%
- Το **Mg** είναι απαραίτητο τόσο για την ανάπτυξη, όσο και για την παραγωγή κιτρικού
  - Η βέλτιστη αρχική συγκέντρωση θειικού μαγνησίου βρίσκεται μεταξύ 0,02-0,025%

# Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή κιτρικού οξέος

**Άλλα συστατικά του μέσου: αλκοόλες, εστέρες, λίπη**

- Η προσθήκη αλκοολών μικρού αριθμού ατόμων C ευνοεί την παραγωγή κιτρικού από υποπροϊόντα γλυκόζης ή άλλων υδατανθράκων
  - Καταλληλότερες είναι: μεθανόλη, αιθανόλη, ισοπροπανόλη, αλλά και ο οξικός μεθυλεστέρας
  - Η βέλτιστη συγκέντρωση μεθανόλης ή αιθανόλης εξαρτάται από το στέλεχος και τη σύσταση του μέσου καλλιέργειας
    - Συνήθως είναι μεταξύ 1-3%
- Η μεθανόλη ή αιθανόλη δρα αυξάνοντας την ενεργότητα της κιτρικής συνθετάσης (100%) και της ακονιτάσης (75%)
  - Τα υπόλοιπα ένζυμα του κύκλου των TCA αυξάνονται ελάχιστα
- Το λάδι της καρύδας (3% κ.β. σε μέσο που περιέχει σουκρόζη) ενισχύει την παραγωγή κιτρικού
- Γενικά, οι αλκοόλες δρουν κυρίως στη διαπερατότητα των μεμβρανών, επηρεάζοντας τη φωσφολιπιδική σύστασή τους (κυρίως της κυτταρικής μεμβράνης)
- Παράλληλα, επηρεάζουν την ανάπτυξη και σπορίωση του μικροοργανισμού, δρώντας επί πλέον στη χωροταξική οργάνωση των μεμβρανών και στη λιπιδική σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος

# Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή κιτρικού οξέος

## Διάφορα άλλα συστατικά του μέσου

- Ορισμένες ουσίες ( $\text{CaF}_2$ ,  $\text{NaF}$  και  $\text{KF}$ ) που δρουν αναστέλλοντας τον μεταβολισμό, επιταχύνουν την παραγωγή κιτρικού
- Αντίθετα, άλλες ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) οδηγούν σε μειωμένη απόδοση
- Οι διάφορες ουσίες δρουν με διαφορετικούς τρόπους ευνοώντας την συσσώρευση του κιτρικού
- Ορισμένες από αυτές δρουν αντιδραστικά στην επίδραση μεταλλικών ιόντων και άλλων τοξικών ουσιών
- και ευνοούν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στην αρχική φάση
- Τέτοιες είναι
- 4-Methylumbelliferone, 2-ναφθοϊκό, 3-υδροξυ-2-ναφθοϊκό, βενζοϊκό οξύ,  $\text{Fe}(\text{CN})_2$ , τεταρτοταγείς αμμωνιοβάσεις, οξίμες, άμυλο, EDTA, βερμικουλίτης, κα

# Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή κιτρικού οξέος

## Παράμετροι της διεργασίας

- **pH:** το pH σε μια καλλιέργεια μπορεί να διαφοροποιείται λόγω της μεταβολικής δραστηριότητας του μικροοργανισμού
- Παραγωγή οργανικών οξέων που οδηγούν σε μείωση του pH
  - Κιτρικό, οξικό, γαλακτικό
- Η αλλαγή στην κινητική του pH εξαρτάται πάρα πολύ από το μικροοργανισμό
  - Στα *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* και *Rhizopus sp.*, το pH μειώνεται πολύ γρήγορα μέχρι τιμής κάτω από 3,0.
  - Σε άλλους μύκητες, *Trichoderma*, *Sporotrichum*, *Pleurotus sp.*, το pH είναι πιο σταθερό (μεταξύ 4 και 5)
- Η φύση του υποστρώματος επηρεάζει την κινητική του pH
  - Για τη βέλτιστη παραγωγή κιτρικού απαιτείται τιμή pH κάτω του 2,0
- Οι χαμηλές αρχικές τιμές pH πλεονεκτούν γιατί
  - δεν επιτρέπουν τις επιμολύνσεις
  - αναστέλλουν την παραγωγή οξαλικού
- Τιμή pH = 2,2 είναι η βέλτιστη για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και για την παραγωγή κιτρικού
- Όταν χρησιμοποιείται μελάσσα ως υπόστρωμα, απαιτούνται υψηλότερες τιμές pH (5,4 ως 6,0-6,5) για βέλτιστη παραγωγή κιτρικού

# Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή κιτρικού οξέος

## Παράμετροι της διεργασίας

- **Αερισμός:** Ο αερισμός έχει καθοριστικό ρόλο κατά την παραγωγή κιτρικού μέσω χώνευσης
- Αυξημένος αερισμός οδηγεί σε αυξημένες αποδόσεις και μικρότερο χρόνο διεργασίας
- Είναι σημαντικό να διατηρείται η συγκέντρωση οξυγόνου πάνω από 25% κορεσμό
  - Διακοπή στην τροφοδοσία οξυγόνου έχει βλαβερές συνέπειες
- Οι υψηλές απαιτήσεις σε οξυγόνο επιτυγχάνονται με την κατασκευή κατάλληλων συστημάτων αερισμού, ώστε να υπερπηδάται και το ιξώδες του μέσου καλλιέργειας
- Ο αερισμός πραγματοποιείται σε όλη τη διάρκεια της χώνευσης με την ίδια ένταση και παροχή σε εύρος 0,5 – 1,5 vvm
  - Για λόγους οικονομίας, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται χαμηλός αερισμός (0,1 – 0,4 vvm) στην αρχή της διεργασίας

# Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή κιτρικού οξέος

## Παράμετροι της διεργασίας

- Υψηλή παροχή αέρα καταλήγει σε έντονο αφρισμό, ειδικά στη φάση της ανάπτυξης
- Είναι απαραίτητη η προσθήκη χημικών αντιαφριστικών και η κατασκευή μηχανικών αντιαφριστικών
- Ο τρόπος ανάπτυξης του μικροοργανισμού επηρεάζει τη διάλυση του οξυγόνου
- Προτιμάται, κατά τη διάρκεια της χώνευσης, η δημιουργία μικροβιακών συναθροίσεων (pellets) έναντι νηματίων (λόγω πρόσμιξης μετάλλων), επειδή το διαλυμένο οξυγόνο μειώνεται στο 50% του αρχικού, ακόμα και αν η μικροβιακή ανάπτυξη δεν έχει ξεπεράσει το 5%



# Ανάκτηση του κιτρικού

- Η ανάκτηση του κιτρικού από υγρή χώνευση γίνεται μέσω
  - κατακρήμνισης (με γάλα ασβεστίου)
    - λαμβάνεται τετραϋδρίτης του κιτρικού τρι-ασβεστίου
  - εκχύλισης
    - το προϊόν διηθείται, εκπλένεται και κατεργάζεται με θειικό οξύ
    - το θειικό ασβέστιο απομακρύνεται με διήθηση
  - καθαρισμού με ιονανταλλάκτη
    - το υγρό κατεργάζεται με ενεργό άνθρακα και υποβάλλεται σε κατεργασία με ανιον- και κατιον-ανταλλάκτη
  - κρυστάλλωσης υπό κενό στους 20-25°C στη μορφή του μονοϋδρίτη του κιτρικού οξέος ή σε μεγαλύτερη θερμοκρασία στη μορφή άνυδρου κιτρικού οξέος
- Η πορεία έχει καθοριστεί από το FDA
- Το κιτρικό που λαμβάνεται χρησιμοποιείται ως πρόσθετο σε τρόφιμα και φάρμακα

# Βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης και Βέλτιστες συνθήκες Βιοδιεργασίας

π.χ. ο *Aspergillus Niger*

- παράγει **κιτρικό οξύ** σε σημαντικές ποσότητες όταν το θρεπτικό μέσο παρουσιάζει **έλλειμμα** σε μαγγάνιο
- Η ανάπτυξη του οργανισμού ωστόσο **απαιτεί** μαγγάνιο

Μία διεργασία παραγωγής κιτρικού οξέος που στηρίζεται στην χρήση αυτού του οργανισμού πρέπει να περιλαμβάνει δύο φάσεις:

- ✓ μία για την ανάπτυξη επαρκούς αριθμού κυττάρων
- ✓ μία για την παραγωγή κιτρικού οξέος



# Κατιούσα διεργασία

- Η διεργασία που ακολουθεί τη χώνευση:
  - Συλλογή των κυττάρων
  - Λύσις των κυττάρων
  - Καθαρισμός του προϊόντος από τα κυτταρικά εκχυλίσματα ή το μέσο καλλιέργειας

# Στάδια της κατιούσας διεργασίας

Στάδιο	Unit Operations
1. Διαχωρισμός των αδιάλυτων	διήθηση, εκχύλιση, καταβύθιση, προσρόφηση
2. Απομόνωση του προϊόντος	εκχύλιση, προσρόφηση, υπερδιήθηση, καθίζηση
3. Καθαρισμός	χρωματογραφία, κρυστάλλωση, κλασματική καθίζηση
4. Φινίρισμα	ξήρανση, κρυστάλλωση

# Έκδοχα

- Ουσίες που προστίθενται στο τελικό προϊόν για τη σταθεροποίησή του
- Αλβουμίνη του ορού
  - Αντοχή σε χαμηλό pH ή αυξημένη θερμοκρασία
  - Δεν επιτρέπει στο προϊόν να κολλήσει στα τοιχώματα του δοχείου συσκευασίας
  - Σταθεροποιεί τη φυσική διαμόρφωση της πρωτεΐνης

# Έκδοχα

- Αμινοξέα
  - Γλυκίνη
    - Σταθεροποιεί πρωτεΐνες έναντι θερμοκρασίας
- Αλκοόλες (και άλλες πολυ-όλες)
  - Σταθεροποιούν τις πρωτεΐνες σε διαλύματα
- Απορρυπαντικά
  - Ελαττώνουν την επιφανειακή τάση, παρεμποδίζοντας τη συσσωμάτωση πρωτεϊνών και τη μετουσίωσή τους

# Τελικό προϊόν

- Έλεγχος ποιότητας (QC testing)
- Αποστείρωση με διαβίβαση σε φίλτρο 0.22  $\mu\text{m}$
- Ασηπτική πλήρωση των δοχείων
  - Σε περίπτωση υγρών, χρήση αυτοματοποιημένου συστήματος διανομής

# Τελικό προϊόν

- Λυοφιλοποίηση
  - Το προϊόν λαμβάνεται σε μορφή σκόνης
  - Μειώνεται πιθανή βιολογική ή χημική καταστροφή του προϊόντος
  - Μεγαλύτερη διάρκεια ζωής του προϊόντος
  - Αποθήκευση προϊόντων που λαμβάνονται παρεντερικά

# Τελικό προϊόν

- Απαίτηση για προσθήκη κρυοπροστατευτικών
  - Γλυκόζη ή σουκρόζη
  - Αλβουμίνη του ορού
  - Αμινοξέα
  - Πολυ-όλες

# Παραδείγματα

