




# **БИОТЕХНОЛОГИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ**

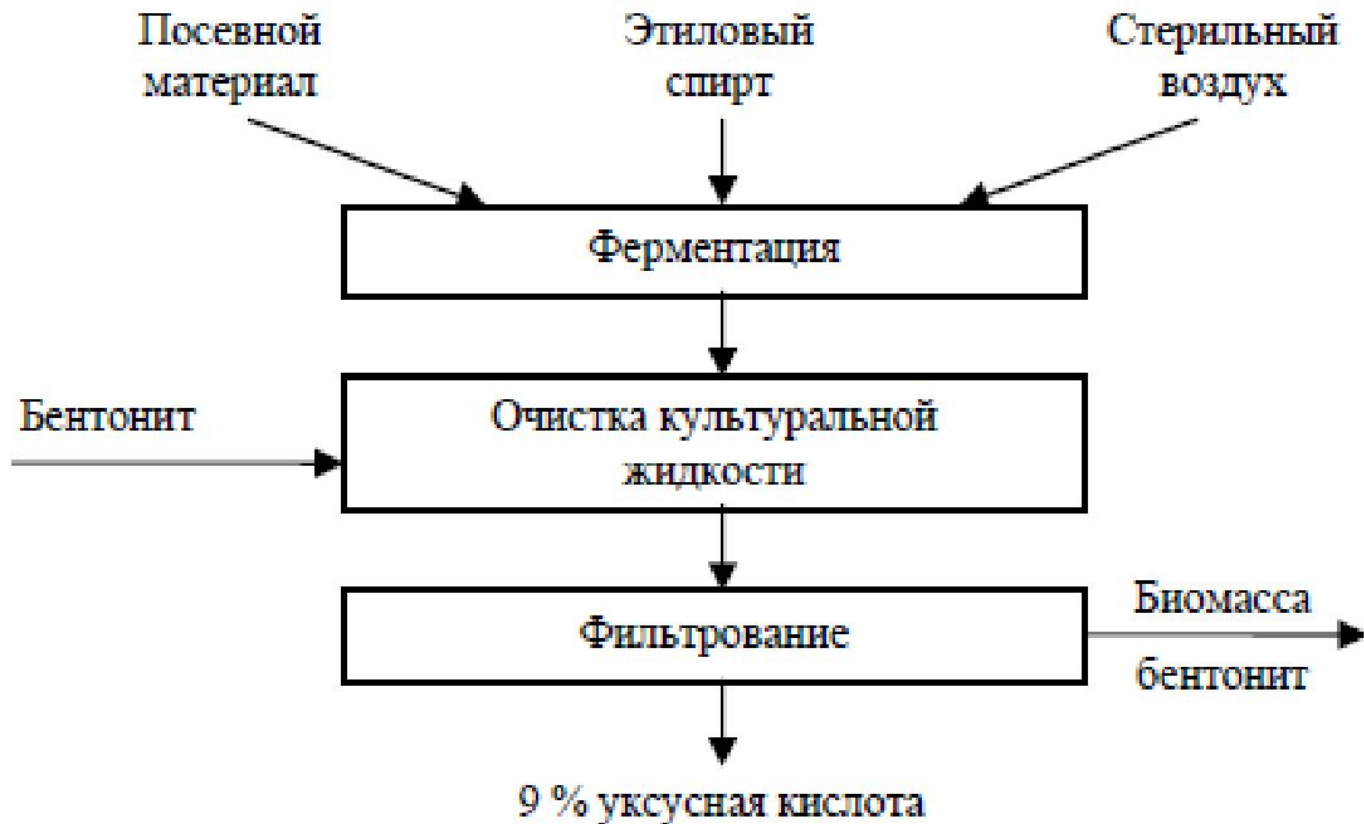


Многие кислоты (лимонная, молочная, уксусная и др.) получают в настоящее время микробиологическим синтезом. Пищевая промышленность традиционно является основным потребителем лимонной, уксусной и молочной кислот, так как продукты естественного брожения более предпочтительны, чем синтетические кислоты в связи с безвредностью для организма человека.

Для получения пищевой **уксусной кислоты** используется способность уксуснокислых бактерий окислять этиловый спирт до уксусной кислоты. Реакцию образования уксусной кислоты катализирует окислительный фермент алкогольоксидаза. Этот сложный многоступенчатый процесс выражается суммарным уравнением



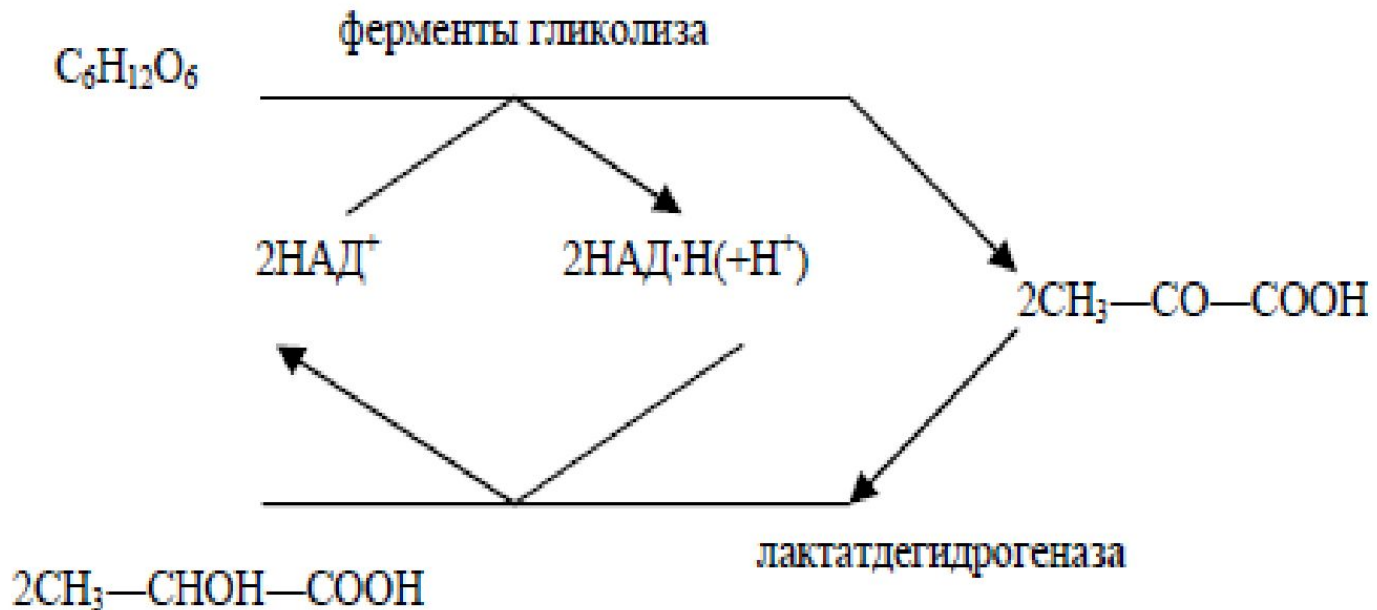
## Схема производства уксусной кислоты



## Основные характеристики биотехнологической стадии производства уксусной кислоты

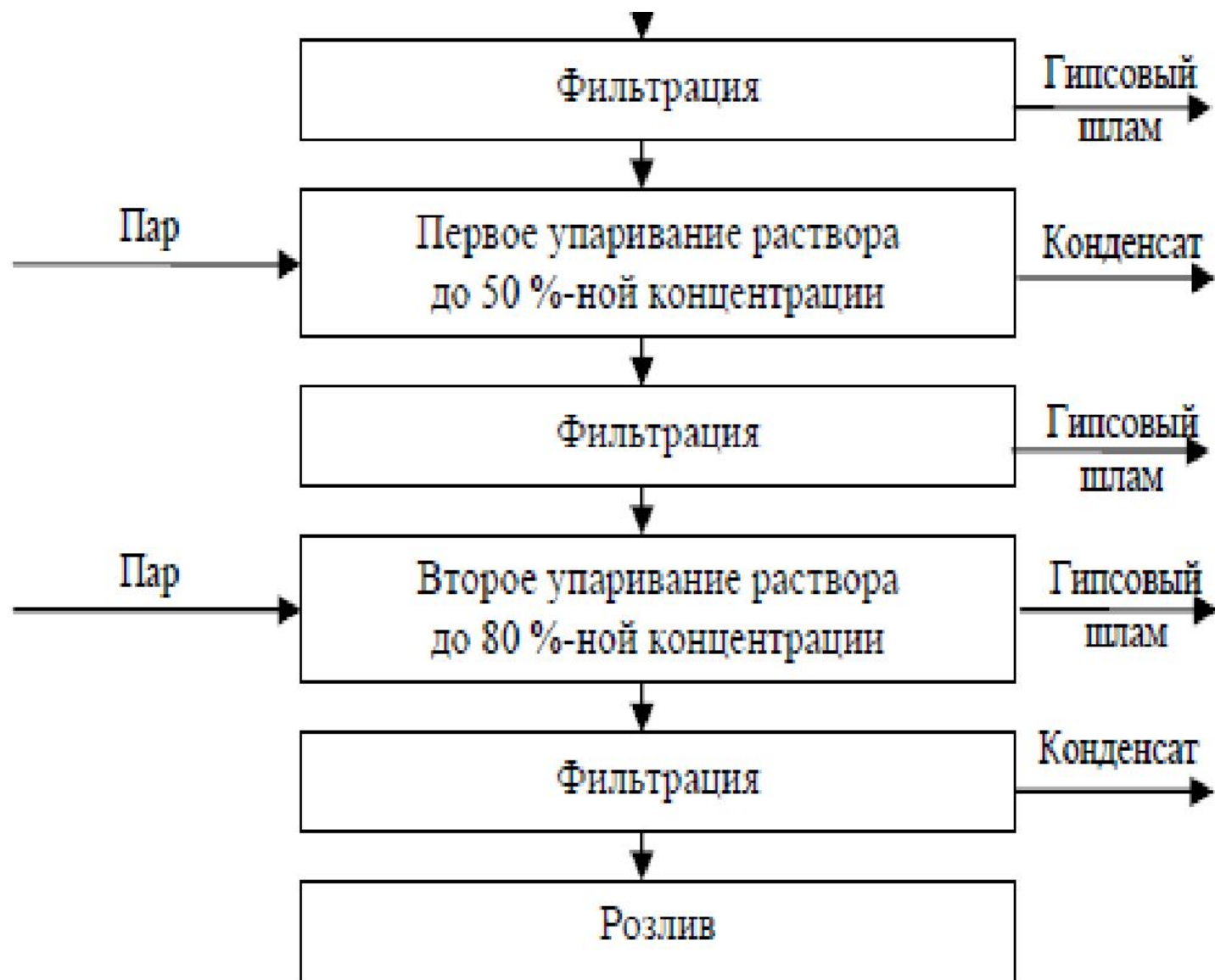
Параметры стадии	Значения параметров
Продуценты	<i>Bacterium Schutzenbachii</i> , <i>Bacterium Curvum</i>
Компоненты питательной среды	Этиловый спирт, хлорид аммония, сульфат магния, монофосфат калия
pH питательной среды	3,0...3,2
Температура культивирования	28 → 25 °C
Режим аэрации	0,35...0,4 → 0,1...0,15 м <sup>3</sup> / м <sup>3</sup> ·мин
Продолжительность культивирования	7...10 суток
Содержание уксусной кислоты в культуральной жидкости	От 6...7 % до 9...14 %

Молочная кислота  $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$  образуется в результате анаэробного превращения углеводов молочнокислыми бактериями. Схема биосинтеза молочной кислоты



В промышленных условиях пищевую молочную кислоту получают методом глубинного культивирования с помощью гомоферментативных термофильных бактерий.







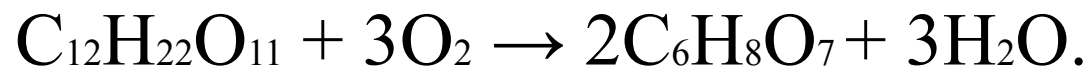
## Основные характеристики биотехнологической стадии производства молочной кислоты


Параметры стадии	Значения параметров
Продуценты	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacterium delbrückii</i>
Компоненты питательной среды	Меласса, гидролизаты крахмала, биологически активные вещества
рН питательной среды	6,3...6,5
Температура культивирования	50 °С
Продолжительность культивирования	7...10 суток
Содержание молочной кислоты в культуральной жидкости	18...20 %

**Лимонная кислота** широко распространена в плодах и ягодах. Она находит применение в пищевой, химической и текстильной промышленности, медицине.

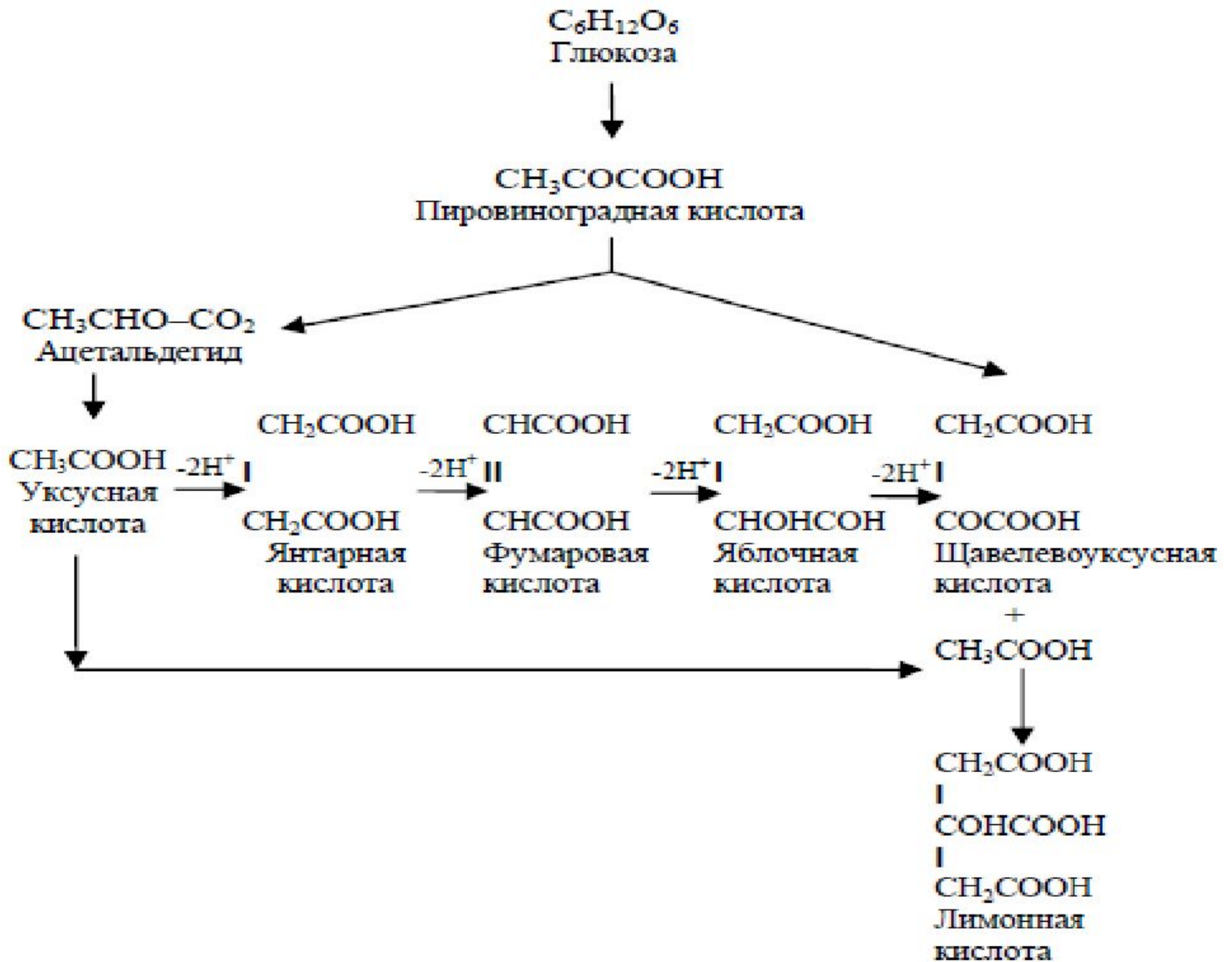
Производство лимонной кислоты основано на культивировании микроскопических грибов **Aspergillus niger**, которые сбраживают сахара питательной среды, образуя лимонную кислоту.

Этот процесс может быть выражен суммарным уравнением



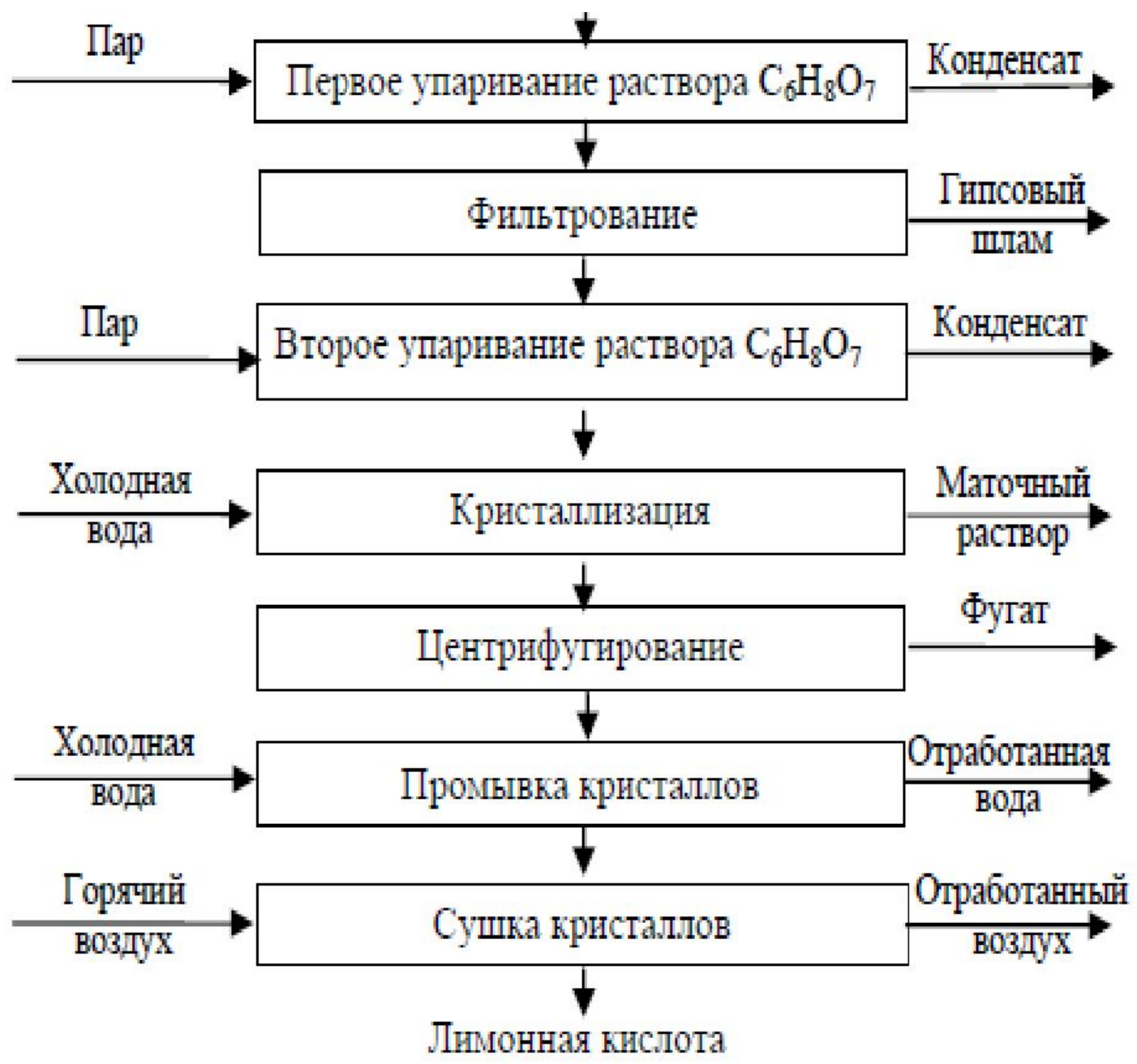


В результате гликолиза глюкозы образуется **пировиноградная кислота**. На следующем этапе происходит ферментативное связывание пировиноградной кислоты с диоксидом углерода. Образовавшаяся щавелевоуксусная кислота вступает далее в реакцию с уксусной кислотой и образуется лимонная кислота. Таким образом, химизм образования лимонной кислоты включает реакции гликолиза и ряд реакций, замкнутых в цикл Кребса. При каждом обороте этого цикла молекула щавелевоуксусной кислоты вступает во взаимодействие с молекулой уксусной кислоты, образуя лимонную кислоту.



**Лимонную кислоту** получают из мелассы микробиологическим синтезом, применяя главным образом микроскопические грибы **Aspergillus niger**, выращиваемые поверхностным или глубинным способом. Производство лимонной кислоты включает следующие основные технологические стадии: получение посевного материала, подготовку мелассы к сбраживанию, сбраживание растворов мелассы в лимонную кислоту с последующим отделением мицелия, выделение из сброженных растворов лимонной кислоты, концентрирование лимонной кислоты и получение ее в кристаллическом виде.






# Основные характеристики биотехнологической стадии производства лимонной кислоты

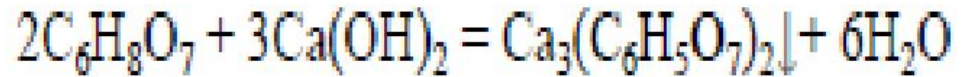
Параметры стадии	Значения параметров
Продуценты	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Varrowia lipolytica</i>
Компоненты питательной среды	Меласса, хлорид аммония, сульфат магния, дифосфат калия
pH питательной среды	7,0...7,2
Температура культивирования	34...36 °C → 32...34 °C
Режим аэрации	15 → 30 м <sup>3</sup> / м <sup>3</sup> ·ч
Продолжительность культивирования	5...7 суток
Содержание лимонной кислоты в культуральной жидкости	5...12 %





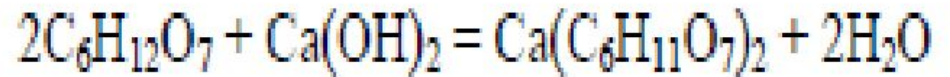
Сброженные растворы представляют собой смесь лимонной, глюконовой и щавелевой кислот, несброженного сахара и минеральных примесей. Содержание лимонной кислоты составляет 80...98 % от суммы всех кислот. Ее выделяют из раствора путем связывания катионами кальция с образованием слаборастворимой соли цитрата кальция.

ЛИМОННАЯ  
КИСЛОТА



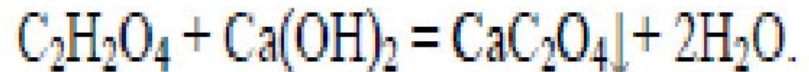
цитрат  
кальция

ГЛЮКОНОВАЯ  
КИСЛОТА



глюконат  
кальция

щавелевая  
КИСЛОТА




оксалат  
кальция

**При нейтрализации  
сброженного раствора образуются кальциевые соли лимонной,  
глюконовой и щавелевой кислот:**

Перевод лимонной кислоты в свободное состояние и отделение ее от оксалата кальция достигается обработкой осадка серной кислотой с последующим фильтрованием и промывкой осадка. Отфильтрованный раствор подают на двухстадийное упаривание с промежуточным освобождением от осадка гипса и кристаллизацию. В товарном продукте должно содержаться не менее 99,5 % лимонной кислоты в пересчете на моногидрат.




# БИОТЕХНОЛОГИЯ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ



К группе белковых препаратов, получаемых биотехнологическим способом, относятся ферментные препараты, аминокислоты, белковые концентраты и белковые изоляты. Из перечисленных групп белковых препаратов в пищевой промышленности в настоящее время наиболее широко используются **ферментные препараты.**

# Классификация ферментов

Название класса ферментов	Тип катализируемой реакции
Гидролазы	Гидролитическое расщепление сложных органических соединений
Изомеразы	Изомеризация
Лиазы	Негидролитическое расщепление
Лигазы (синтетазы)	Синтез сложных органических соединений
Оксидоредуктазы	Окисление и восстановление
Трансферазы	Перенос атомных группировок от одного соединения к другому



Для крупномасштабного получения ферментов пригодны только некоторые растительные организмы на определенной фазе их развития (проросшее зерно различных злаков и бобовых, сок зеленой массы растений), а также отдельные ткани и органы животных (поджелудочная железа, сычуг крупного рогатого скота). Практически неограниченный источник ферментов – микроорганизмы, содержащие набор большинства известных в настоящее время энзимов, количество которых можно повысить в десятки и сотни раз методами мутагенеза, селекции и индукции биосинтеза.

Из более чем **2000 известных** в настоящее время ферментов в промышленности используется около 30. Основная часть ферментов, поступающих на мировой рынок, приходится на долю **гидролаз**. Главное место среди ферментов для пищевой промышленности занимают **глюкоизомераза и глюкоамилаза**, применяющиеся для получения обогащенных фруктозой сиропов и составляющие около 50 % рынка пищевых энзиматических препаратов. Все большее развитие в пищевой промышленности получают технологические процессы с участием **сложных энзиматических систем, включающих коферменты**.




# Применение ферментов в пищевой промышленности

Ферменты	Продуценты ферментов	Назначение
Амилазы	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus mesentericus</i>	Снижение вязкости теста, осахаривание заторов
Протеазы Липазы	<i>Aspergillus terricola</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Тендеризация мяса, получение рыбных гидролизатов
Пектиназы	<i>Aspergillus awamori</i> , <i>Aspergillus foetidus</i> , <i>Clostridium pectinifermentans</i>	Осветление вин, соков
Глюко- изомеразы	<i>Aspergillus awamori</i>	Получение глюкозофруктозных сиропов из крахмала
Целлюлазы	<i>Trichoderma viride</i>	Биодеградация отходов пищевых производств

Производство ферментных препаратов микробного происхождения может осуществляться поверхностным и глубинным методами. **Поверхностный метод** заключается в культивировании микроорганизмов на поверхности увлажненной стерилизованной сыпучей питательной среды, размещенной в кюветах. Инкубацию микроорганизмов ведут в специальном термостатируемом цехе при постоянном контроле в нем температуры, влажности и расхода воздуха.

# Основные параметры поверхностного способа получения ферментов

Параметры стадии	Значения параметров
Продуценты	Микроскопические грибы родов <i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Mucor</i> , <i>Fusarium</i>
Компоненты питательной среды	Пшеничные отруби, солодовые ростки, свекловичный жом, пивная дробина, опилки ( $W = 58...60\%$ )
Температура культивирования	$30...32 \rightarrow 28...30\text{ }^{\circ}\text{C}$
Режим аэрации	Кондиционированный воздух $W$ от $98...99$ до $92...94\%$ и температурой от $30...32\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $28...30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , расход $0,1...0,2\text{ м}^3 / \text{кг}\cdot\text{ч}$
Продолжительность культивирования	От 36 до 52 ч в зависимости от продуцента
Содержание ферментов	$0,006...0,007\%$ от массы сухих веществ



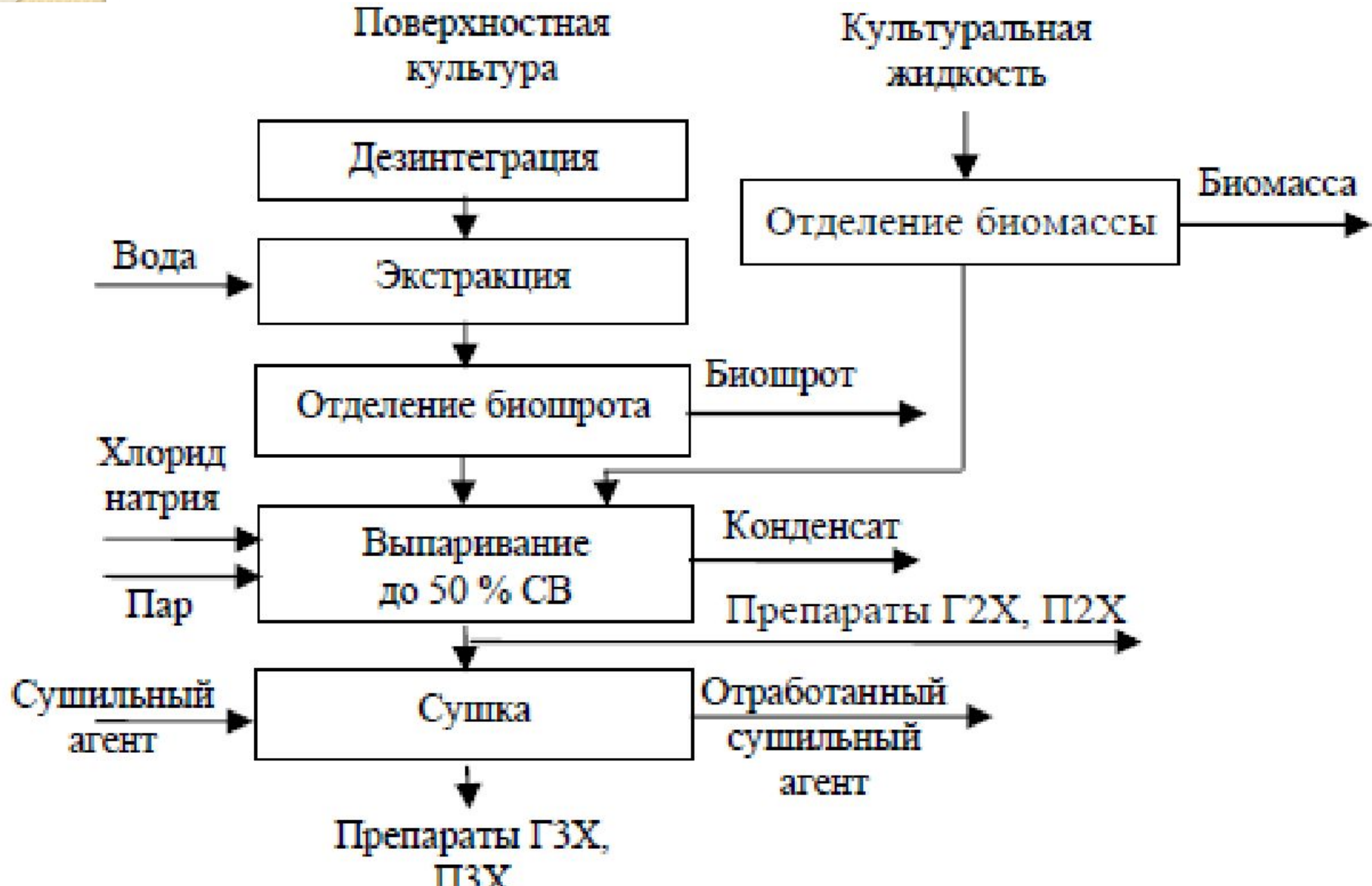
Для выращивания продуцентов ферментов **глубинным методом** в промышленных условиях используют ферментаторы, снабженные устройствами для перемешивания и подачи в жидкую питательную среду стерильного воздуха. Сначала ферментатор заполняют питательной средой, стерилизуют ее, затем засевают чистой культурой, подаваемой из специального генератора. Для предотвращения инфицирования в ферментере поддерживают повышенное давление наряду с оптимальными значениями рН, температуры, окислительно-восстановительного потенциала и другими условиями культивирования.

# Основные параметры глубинного способа производства

Параметры стадии	Значения параметров
Продуценты	Микроскопические грибы родов <i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Mucor</i> , <i>Fusarium</i> , бактерии родов <i>Baccillus</i> и <i>Clostridium</i>
Компоненты питательной среды	Кукурузная мука, крахмал, патока, гидролизаты казеина, дрожжей, древесины, минеральные соли (содержание СВ от 1,5 до 15,5, рН от 3,5 до 8,5)
Температура культивирования	26...32 °С для грибов 32...37 для бактерий
Режим аэрации	50...60 м <sup>3</sup> / ч·м <sup>3</sup>
Продолжительность культивирования	От 24 до 54 ч

**Выделение и очистка ферментов** – весьма трудоемкая и дорогостоящая процедура, поэтому если фермент можно использовать в виде неочищенного препарата, его не очищают. *Например,* в пивоваренной промышленности применяются ферментные препараты, представляющие собой высушенную биомассу плесневых грибов. В большинстве отраслей пищевой промышленности используют очищенные ферментные препараты, частично или полностью освобожденные от балластных веществ. **Исходным материалом** для получения препаратов ферментов служат: биомасса продуцента, фильтрат культуральной жидкости, экстракт из культуры микроорганизмов. Неочищенные ферментные препараты получают путем высушивания в мягком режиме культуры микроорганизмов вместе с остатками питательной среды.

# Схема получения препаратов с индексами П2Х, Г2Х, ПЗХ, ГЗХ



**АМИЛОРИЗИН**    **Г**    **10X**  
I    II    III    IV    V

**В названии препарата указывается также способ культивирования и степень концентрирования и очистки.**

I – название основного фермента;

II – название микроорганизма-продуцента;

III – окончание;

IV – способ культивирования:

"П" – поверхностный, "Г" – глубинный;

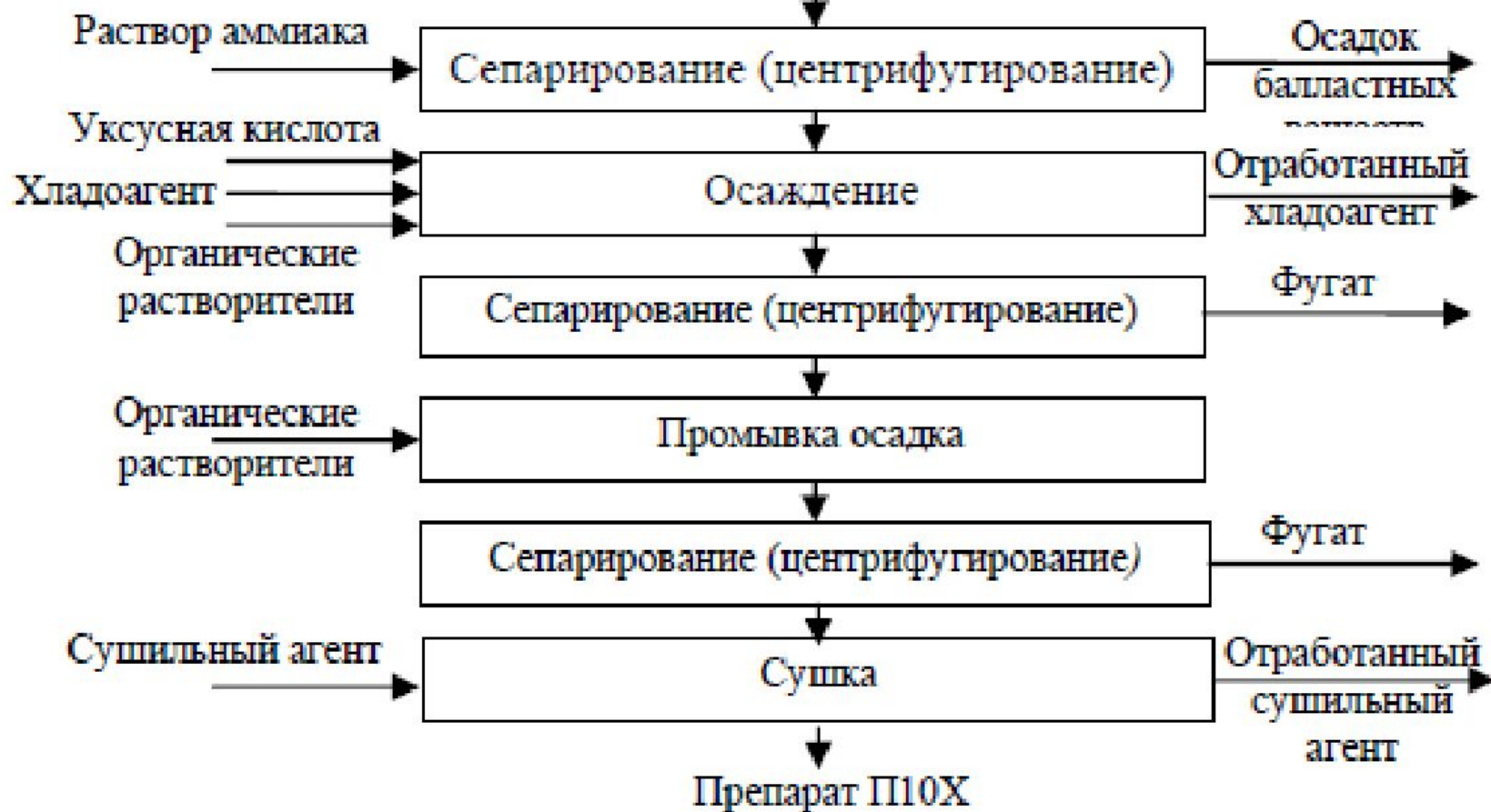
V – степень очистки (концентрирования):

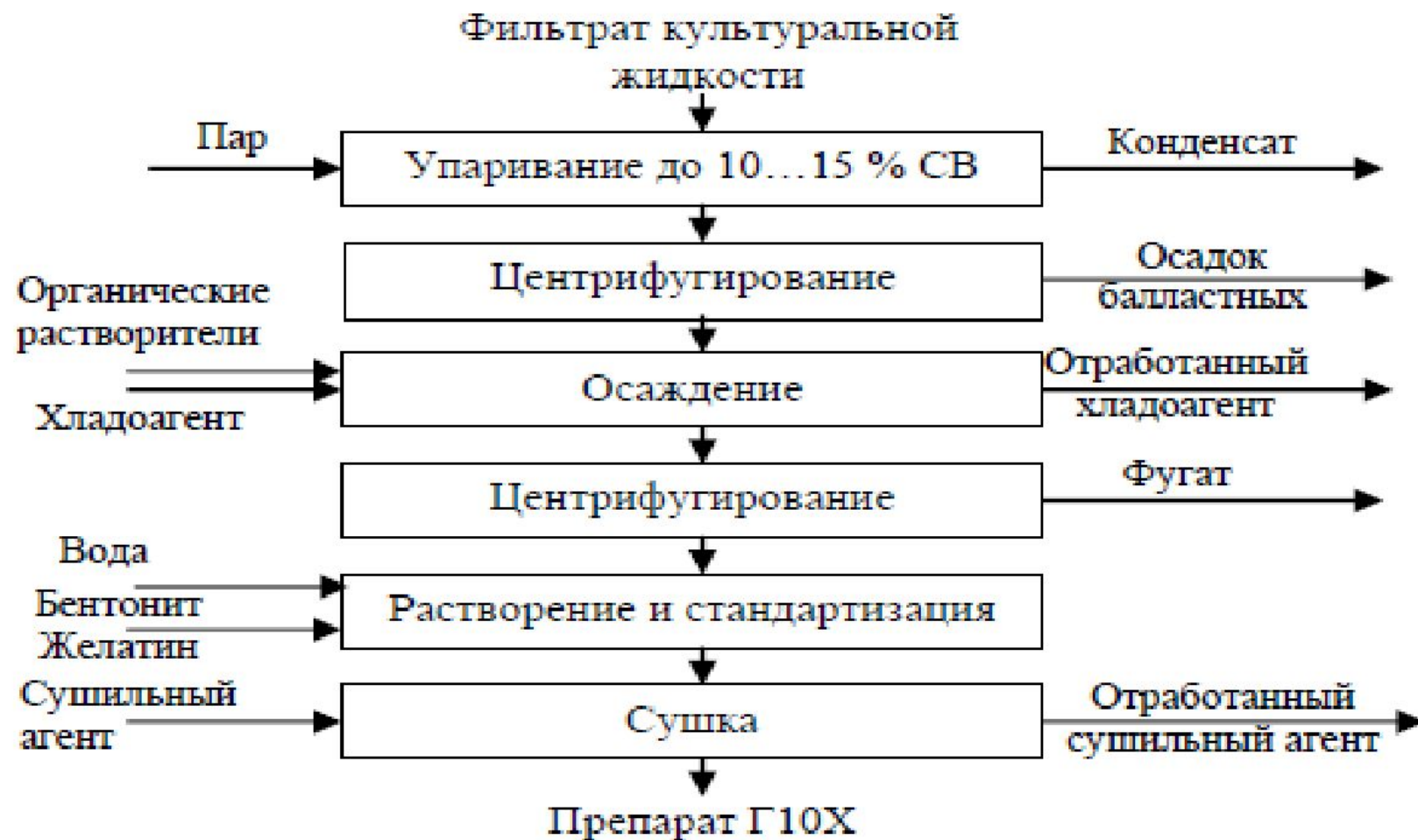
"X" – поверхностная культура или культуральная жидкость; "2X" – концентрированные растворы ферментов, освобожденные от биомассы; "3X" – высушенные препараты "2X"; "10X" – осажденные органическими растворителями и солями; "15X" – "30X" – очищенные от балластных веществ и других ферментов с использованием различных методов очистки и фракционирования.



Для выделения ферментов из клетки необходимо очень тонкое измельчение исходного материала вплоть до разрушения субклеточных структур. Используют специальные мельницы и гомогенизаторы, а также ультразвук, метод попеременного замораживания и оттаивания биомассы. Для высвобождения ферментов из мембранных структур клетки к гомогенатам добавляют небольшое количество детергентов или обрабатывают их энзимами — лизоцимом, целлюлазой, лецитиназой. Особое внимание при выделении ферментов уделяют проведению всех операций в условиях, **исключающих денатурацию белка** (нейтральные значения рН, стабилизирующие добавки в виде защитных белков, солей и др.).

Диффузионная  
вытяжка фермента





Биоконверсия (биотрансформация) – это раздел биотехнологии, наука по изучению превращения одних органических соединений биологического сырья в другие под действием ферментных систем растительного, микробного и животного происхождения.

