

# Biotechnológie mikroorganizmov



## **Mikrobiálna produkcia biomasy**

Ing. Lukáš Hleba, PhD.

# Úvod



- Je z biotechnologického hľadiska – všetká organická hmota, ktorá vzniká konverziou solárnej energie
- Slnko, či už priamo alebo nepriamo je primárny zdroj energie na Zemi
- Odpady z agrokultúry sú zdrojom pre produkciu biomasy v biotechnológiách
- Je dôležité vybrať vždy tie správne MO a odpad pre produkciu biomasy
- Dôležité je sledovať aj sekundárne metabolity, ako mykotoxíny, a i.
- Ak potrebujeme biomasu využiť v potravinárstve, ako krmivo

# Mikroorganizmy

- Existujú štyri typy MO používaných v biotechnológiách na výrobu biomasy pre konzum, baktérie, kvasinky, huby a riasy.
- Výber vhodného druhu závisí na:
  - Dostupnom prírodnom substráte
  - Nutričné požiadavky MO (energetická hodnota, proteínový obsah, aminokyselinová bilancia)
  - Technologické požiadavky (typ kultúry, nutričné požiadavky, typ separácie)
  - Toxikologické

# Mikroorganizmy

Ideálny MO by mal spĺňať nasledovné:

- Vysoko špecifický rast a výťažok biomasy
- Vysoká afinita k substrátu
- Nízke nutričné požiadavky
- Schopnosť použiť komplexný substrát
- Schopnosť vytvoriť vysokú denzitu MO
- Stabilitu počas množenia
- Kapacitu pre genetickú modifikáciu
- Dobrá tolerancia voči pH a teplote

# Mikroorganizmy - príklady

Substrát	Organizmus
Baktérie a aktinomycéty	
N- alkány	<i>Actinobacter cerificans</i> , <i>Achromobacter delvacuate</i> , <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>Nocardia</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.
Metán	<i>Corynebacterium hydrocarbonoclastus</i> , <i>Nocardia paraffinica</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Hyphomicrobium</i> sp., <i>Methylomonas methanica</i> , <i>Methylococcus capsulatus</i>
Metanol	<i>Methylomonas methylovora</i> , <i>M. clara</i> , <i>M. methanolica</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Methylophilus methylotrophus</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>Xanthomonas</i> sp.,
Etanol	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Celulóзовý substrát	<i>Thermomonospora fusca</i>
Sulfit. substrát	<i>Pseudomonas denitrificans</i>

# Mikroorganizmy - příklady

Susbrát	Organismus
Kvasinky	
N- alkány	<i>Candida lipolytica</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. maltosa</i>
N-parafíny	<i>C. paraffinica</i> , <i>C. oleophila</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>
Metanol	<i>Candida utilis</i> , <i>Hanseniaspora</i> sp., <i>Pichia pastoris</i> , <i>Hansenula</i> sp., <i>Kloeckera</i> sp.,
Etanol	<i>Candida enthnothermophilus</i> , <i>C. utilis</i> , <i>C. kruzei</i>
Srvátka	<i>Candida intermedia</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i> ,
Trstinová melasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Škrob	<i>Schwanniomyces alluvius</i> , <i>Lipomyces kononenkoe</i>
Lipidy	<i>Candida rugosa</i> , <i>C. utilis</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. blankii</i> , <i>C. curvata</i> , <i>C. deformans</i> , <i>C. parapsilosis</i>
Celulóza	<i>Candida utilis</i>
Tekutý sír. odpad	<i>Candida utilis</i> , <i>C. tropicales</i>

# Mikroorganizmy - příklady

Susbrát	Organismus
Huby	
Glukóza	<i>Agaricus blazei, A. campestris</i>
Sladinová melasa	<i>Agaricus campestris</i>
Škrob	<i>Aspergillus niger, Fusarium graminearum</i>
Tekutý sír. odpad	<i>Paecilomyces variotii</i>
Celulóza	<i>Chaetonium cellulolyticum, Trichoderma viridae</i>
Pivárenský odpad	<i>Calvatica gigantea</i>
Riasy	
CO <sub>2</sub>	<i>Chlorella pyrenoidosa, C. regularis, C. sorokiniana, Oocystis polymorpha, Scenedesmus quadriculata, Spirulina maxima, Spirulina platensis, Dunaliella bardawil</i>

# Baktérie

- Tvorba biomasy je s väčším výťažkom ako u iných organizmov
- Totálny obsah proteínov je zhruba okolo 80 %
- Aminokyselinové zloženie je rovnomerné
- Obsah sírnatých aminokyselín a lyzínu tiež
- Obsah nukleových kyselín je väčší ako u kvasiniek, húb alebo rias – okolo 10 – 16 %
- Je však obmedzený počet baktérií – pretože mnohé sú patogény a malé rozmery robia problémy pri separácii

TABLE 1. Amino acid profiles of SCP from lactobacilli, FAO reference protein, and certain SCP and conventional foods<sup>a</sup>

Protein source <sup>b</sup>	Essential amino acids								Nonessential amino acids								Source	
	ILE	LEU	LYS	MET	PHE	THR	VAL	TYR	ALA	ARG	ASP	Half-CYS	GLU	GLY	HIS	PRO		SER
Cold trichloroacetic acid extraction																		
<i>L. acidophilus</i> 3532	4.3	7.4	10.4	1.9	3.3	4.0	4.9	2.5	9.0	5.1	9.7	0.2	11.1	4.2	2.4	3.5	2.5	
<i>L. bulgaricus</i> 2217	4.5	6.1	9.3	2.2	3.2	4.3	5.8	3.3	6.0	4.5	10.5	0.4	9.1	3.5	2.2	3.6	2.6	
<i>L. bulgaricus</i> 3533	4.2	6.5	7.9	1.9	3.2	3.8	4.9	2.7	7.2	4.0	10.0	0.3	9.8	4.0	1.9	3.0	2.3	
<i>L. casei</i> 14435	5.0	6.8	10.2	2.1	4.0	4.2	5.4	3.2	6.8	5.3	11.0	0.5	12.3	4.4	2.7	2.9	3.1	
<i>L. fermenti</i> 3957	4.4	6.3	7.1	2.0	3.1	3.6	4.9	2.4	8.9	5.1	7.7	0.1	10.3	4.2	2.2	2.6	2.7	
<i>L. plantarum</i> 14431	12.3	5.4	4.5	1.8	2.6	3.4	4.2	2.2	9.3	3.0	7.0	0.0	11.5	3.5	1.4	3.1	2.4	
<i>L. plantarum</i> 3074	13.2	5.7	4.9	1.8	2.9	3.3	4.9	2.5	9.8	3.3	7.8	0.2	11.9	3.4	1.7	2.5	2.5	
<i>L. thermophilus</i> 3863	4.1	6.4	9.0	1.9	3.2	3.7	4.8	2.6	8.4	4.3	10.6	0.2	9.7	4.2	2.2	2.4	2.3	
Hot trichloroacetic acid extraction																		
<i>L. acidophilus</i> 3205	6.4	8.2	10.3	2.1	4.2	4.8	6.4	3.5	8.4	4.9	13.3	0.3	12.4	4.4	2.5	3.4	2.8	
<i>L. delbrueckii</i> B-443	5.5	7.6	9.6	1.9	4.2	4.4	5.9	3.3	7.5	4.6	14.6	0.5	14.6	4.3	2.0	3.3	2.8	
<i>L. fermenti</i> 8954	4.6	8.0	10.2	2.2	4.1	6.2	6.7	4.2	7.6	4.3	13.5	0.4	10.9	4.4	2.4	3.1	3.2	
<i>L. plantarum</i> 8014	4.6	1.5	9.0	1.9	3.6	4.3	5.5	3.0	7.2	4.3	11.8	0.3	10.4	3.6	2.2	3.0	2.5	
FAO reference protein	4.0	7.0	5.5	3.5 <sup>c</sup>	6.0 <sup>d</sup>	4.0	5.0											27
<i>Cellulomonas</i> sp.	4.7	11.2	6.8	1.9	4.4	5.4	10.7	2.7										23
<i>L. plantarum</i> 8014	5.6	5.9	5.2	1.1	2.8	3.8	5.2											5
<i>L. casei</i> 7469	6.2	6.8	7.7	1.1	3.5	4.9	5.8											5
<i>L. fermenti</i> 9338	7.0	7.5	6.9	1.3	4.1	4.9	6.8											11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4.6	7.0	7.7	1.7	4.1	4.8	5.3											9
Beef protein	5.3	8.2	8.6	2.5	4.1	4.4	5.5	3.4										15
Whole egg	5.9	8.8	7.8	3.2	5.5	4.9	7.1											4
Soybean protein	5.8	7.6	6.6	1.1	4.8	3.9	5.2	3.2										23
Wheat flour	4.2	7.0	1.9	1.5	5.5	2.7	4.1											

<sup>a</sup> Amino acid concentrations are expressed as grams of amino acid per 16 g of N.

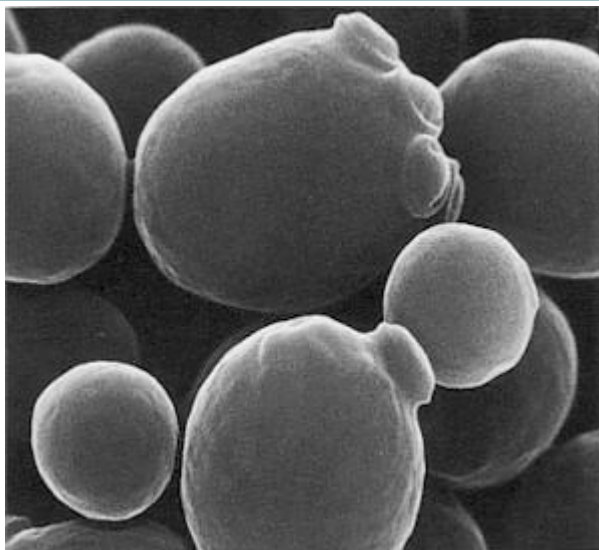
<sup>b</sup> SCP was extracted with 10% (wt/vol) trichloroacetic acid at 25° for organisms under cold trichloroacetic acid. For organisms listed under hot trichloroacetic acid, SCP was extracted with 10% (wt/vol) trichloroacetic acid at 90°C; details are given in Materials and Methods.

<sup>c</sup> Value reported is the sum of values for methionine + cystine.

<sup>d</sup> Value reported is the sum of values for phenylalanine + tyrosine.

# Kvasinky

- Boli ako prvé známe akceptované na konzum
- Sú zriedka kedy toxické
- Obsah proteínov – okolo 60 % - obsah lyzínu, tryptofánu a treonínu je postačujúci
- Obsahujú málo sírnatých aminokyselín ako metionín a cysteín
- Sú bohaté ako zdroj vit. B skupiny, a nukleové kyseliny tvoria 4 – 10 %
- Rast je pomalší ako u baktérií, avšak separácia jednoduchšia



# Huby

- Biotechnológie húb sú síce staré – pri výrobe *tempeh* alebo *miso*, avšak na výrobu biomasy pomerne nové
- Obsah proteínov okolo 50 %, deficitné sú sírnaté aminokyseliny
- Obsah nukleových kyselín iba 3-5 %
- Výhodou je široká paleta substrátov ako celulóza, škrob a vynikajúca filtrácia mycélia
- Dominanta je pestovanie makromycét – hlivy, šampiňóny a pod.



*TEMPEH*



*MISO*

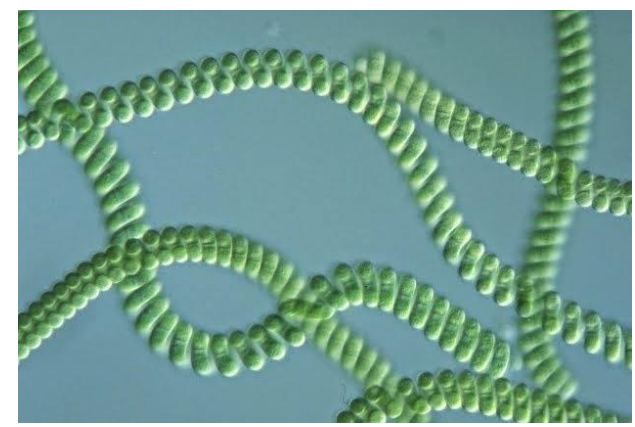


# Riasy a cyanobaktérie

- Výhodou je zdroj uhlíka, ktorým je atmosferický oxid uhličitéy, tiež atmosferický N pre rod *Cyanophyta*
- Potreba vodných plôch
- Tradičné v Mexiku (*Spirulina platensis*) a Afrike-Chad (*Spirulina maxima*)
- Majú nízky obsah sírnatých aminokyselín, vysoký obsah vitamínov, obsah nukleových kyselín je okolo 4 – 6 %,
- Ľahké na množenie, ale trvá dlhšie



*Spirulina platensis*



# Biomasa ako zdroj proteínov

Produkcia mikrobiálnej biomasy sa dá rozdeliť na dve základné kategórie:

1. Likvidácia odpadov (n-alkánov, n-parafínov, sírnych odpadov, celulóзовých odpadov alebo metanolu)
2. Produkcia biomasy ako zdroja bielkovín, najmä pre krmovinarstvo

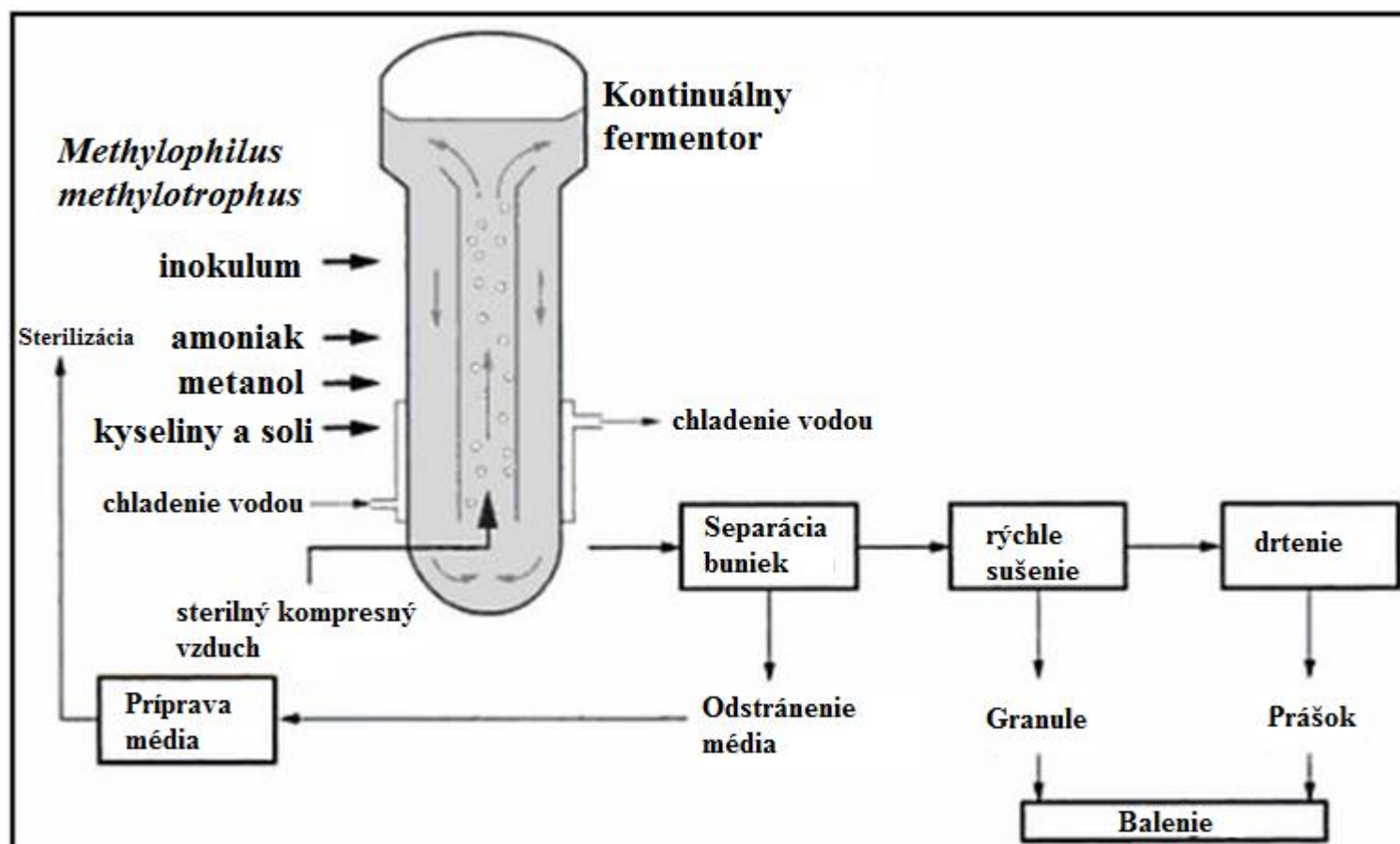
# Pruteen proces - mikrobiálne proteíny

- Ináč nazývaný aj „Single cell protein“ SCP
- Pre tento proces sa používa *Methylophilus methylophilus* – izolovaná z pôdy, je bezpečná, rýchlo rastie, substrátom je metanol.
- Produkuje vysoké množstvo esenciálnych aminokyselín – lyzínu a metionínu
- Sušený obsahuje 73,8 % hrubého proteínu (64 % čistého proteínu) – vysoko energetický prídavok do krmiva

Table 1: Average different compositions of the main groups of microorganisms (% dry weight)

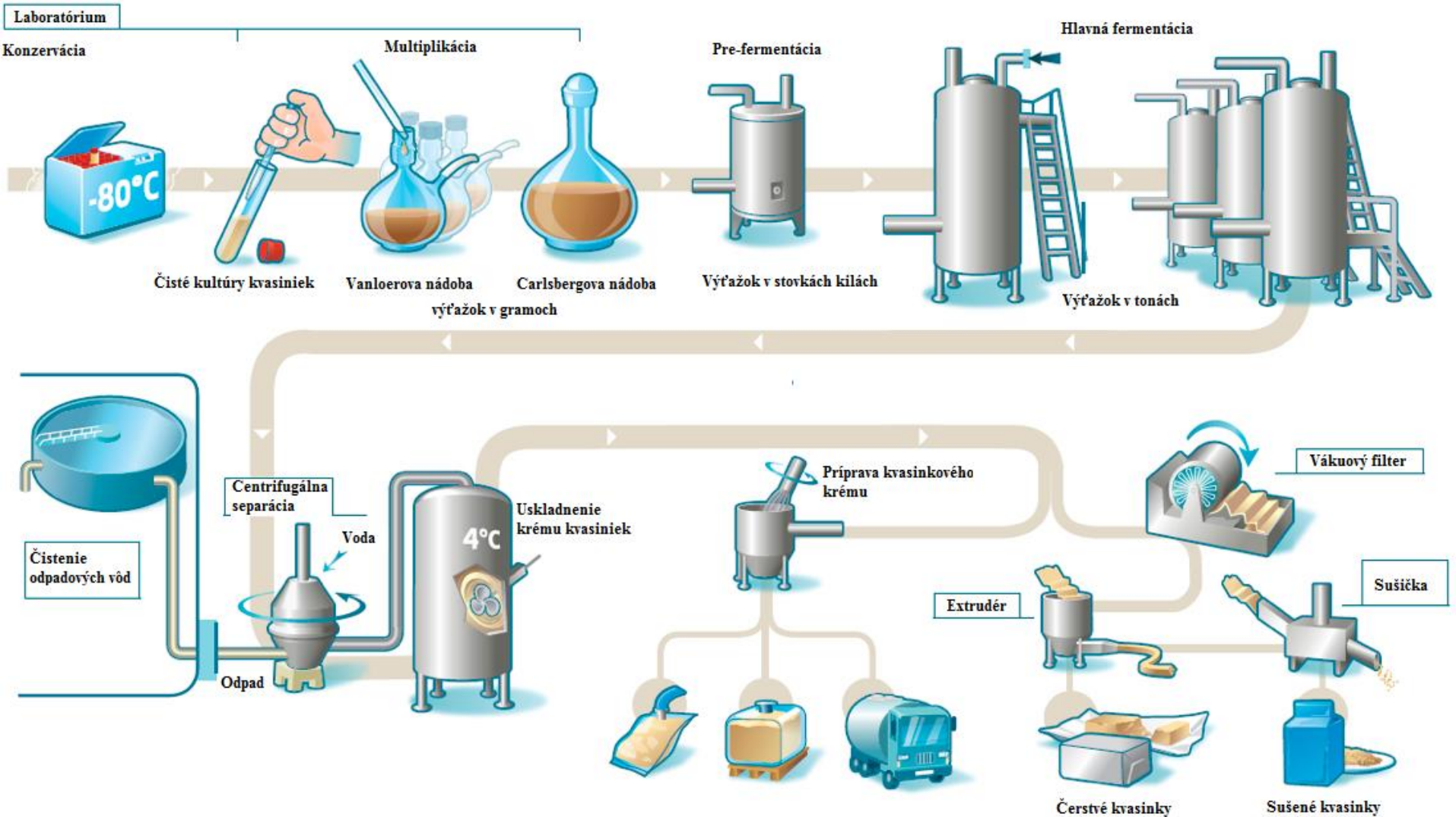
Composition	Fungi	Algae	Yeast	Bacteria
Protein	30-45	40-60	45-55	50-65
Fat	2-8	7-20	2-6	1-3
Ash	9-14	8-10	5-10	3-7
Nucleic acid	7-10	3-8	6-12	8-12

[Miller and Litsky \(1976\)](#)



# Produkcia pekárenských kvasiniek

- Tvorí najväčšiu časť produkcie mikrobiálnej biomasy na svete – *Saccharomyces cerevisiae*
- Ročne sa produkuje asi 2 mil ton/rok
- Používa sa najmä stlačená alebo sušená forma kvasiniek
- Hlavná produkcia je orientovaná na stacionárnu kultiváciu s pridávaním živín
- Cyklus trvá približne 5-7 dní
- Dobre navrhnutý systém produkuje až 48 ton kvasiniek za 16 hodín



# Produkcia kvasiniek ako krmiva

- V r. 1970 bol vyvinutý proces na spracovanie n-parafínov pomocou kvasiniek
- Z 500 kmeňov kvasiniek bola vybratá *Candida lipolytica*
- Výťažok z 1g je 0,95g
- Výťažok proteínov je okolo 60 %, čo je vyhovujúce pre krmovinarstvo

# *Pekilo proces*

- Proces vyvinutý vo Fínsku na produkciu *pekilo* proteínov pomocou *Peacimolycus variotii*
- Proteíny využiteľné v krmovinárstve
- Substrátom je tekutý sírnatý odpad
- Sušený produkt tvorí okolo 55-60 % hrubého proteínu, v ktorom 87 % je stráviteľných
- Rovnako obsahuje vitamíny, minerály používané v krmovinárstve

# Produkcia makromycét

- Vo svete sa produkuje obrovské množstvo rastlinného odpadu, až 3,5 biliónov ton/rok
- Používa sa ako substrát na produkciu húb
- Produkcia húb prebieha na celom svete: Európa, Severná Amerika, Ázia, Austrália – *Agaricus bisporus*
- Najväčší producenti húb sú: Čína a Tajvan



*Lentinus edodes* - Shiitake



*Agaricus bisporus*  
*Agaricus bitorquis*

šampiňóny



***Pleurotus spp.* - Hliva**



*Auricularia* spp.

**Judášovo ucho**



*Pholiota nameko*





*Tremella fuciformis*



*Flammulina velutipes*



*Volvariella volvacea*

# Produkcia makromycét

Produkcia húb má niekoľko výhod:

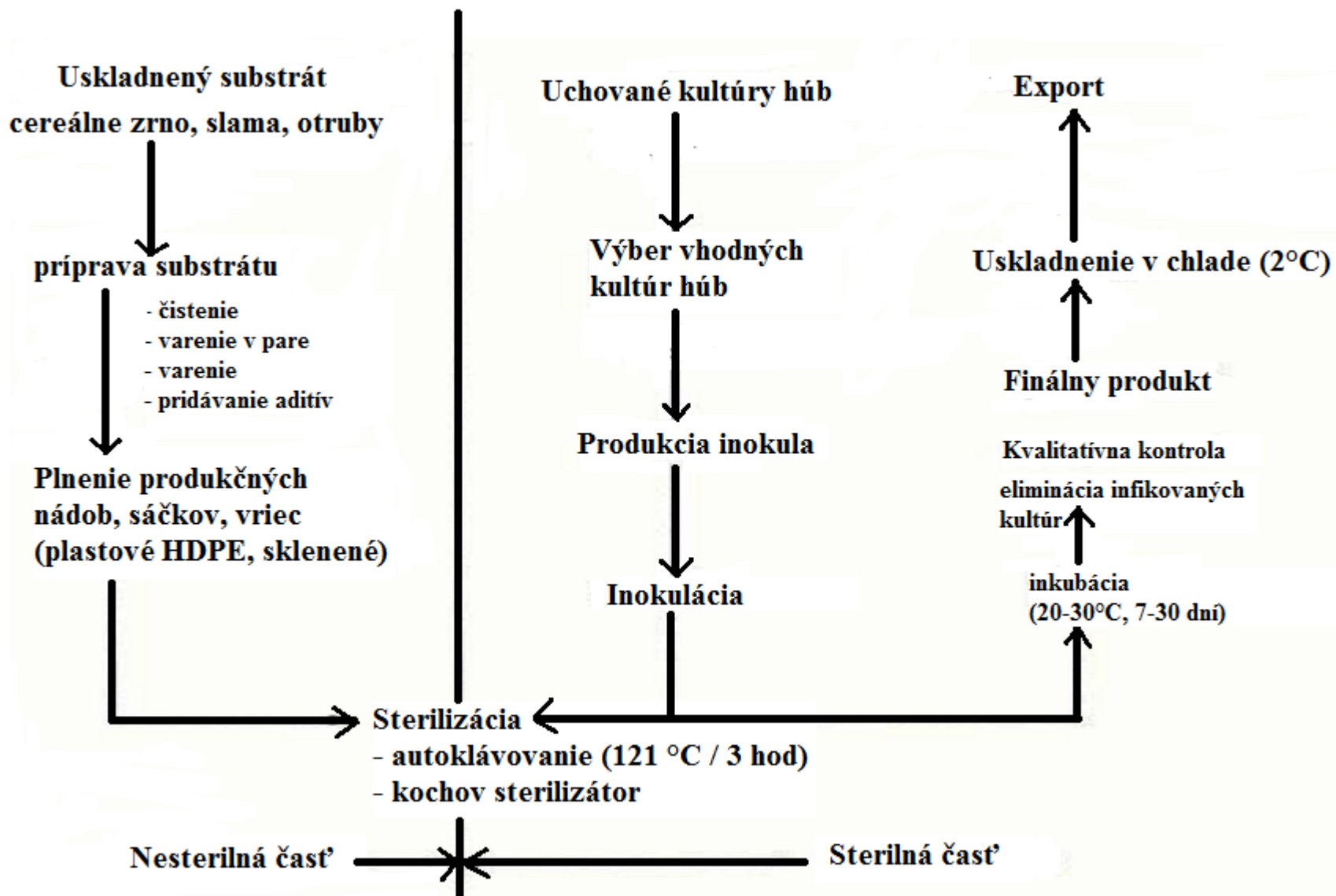
- Odpad z poľnohospodárstva môže byť účinne prekonvertovaný pomocou týchto procesov
- Tuhé a tekuté odpady sú priamo konvertované na substrát pre pestovanie húb
- Lignocelulóзовые zdroje uhlíka, ktoré nemajú využitie môžu byť transformované na biomasu
- Zber húb je nenáročný proces, ktorý nevyžaduje špeciálnu separáciu
- Huby sú akceptované verejnosťou na konzum

# Produkcia makromycét

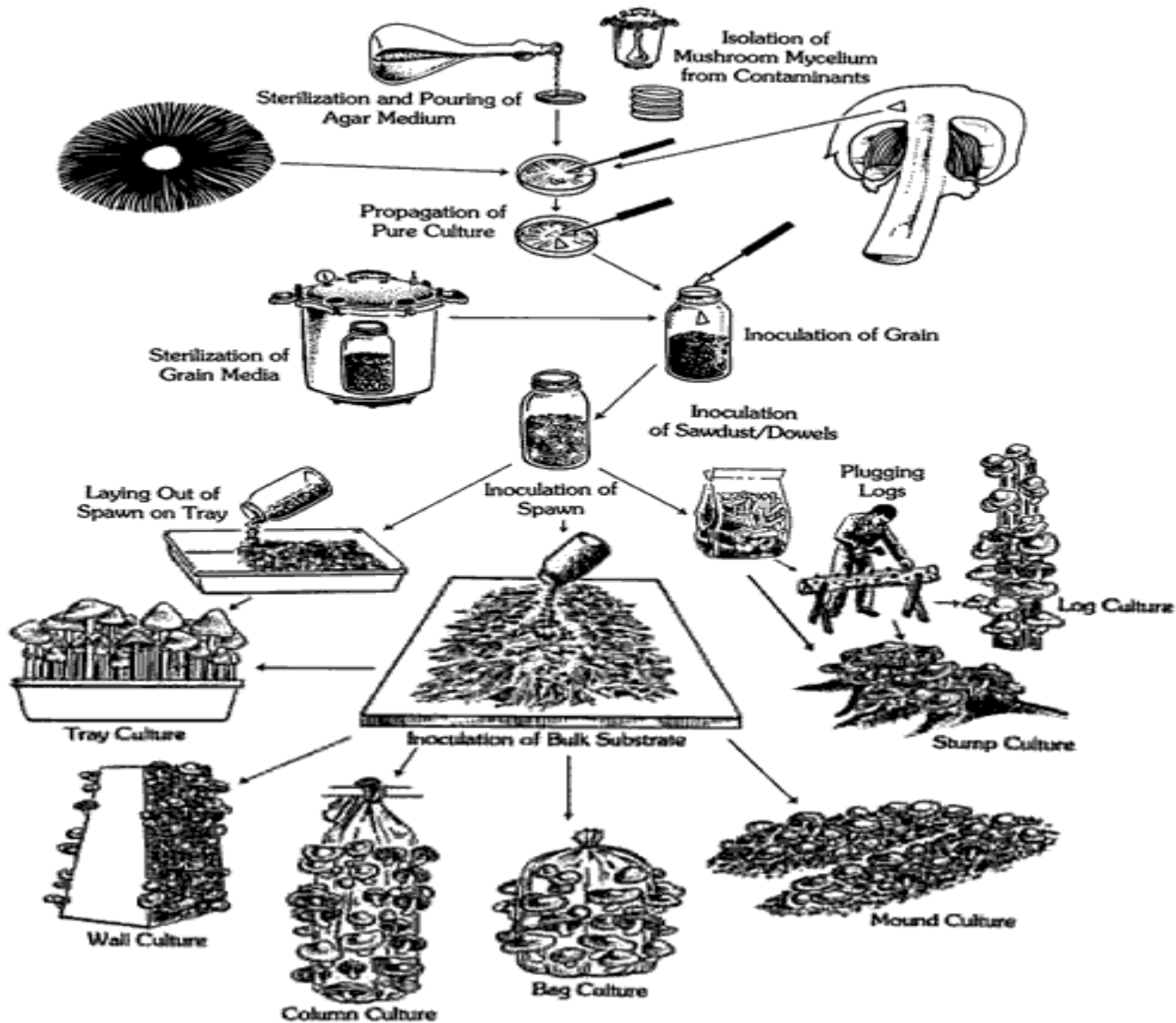
## Najčastejšie pestované huby

Druhy v lat.	Druhy v slov.	Kvantita v tis. ton	%
<i>Agaricus bisporus</i>	Šampiňóny	1227	56,2
<i>Agaricus bitorquis</i>	Pečiarka obyčajná		
<i>Lentinus edodes</i>	Šitake	314	14,4
<i>Volvariella volvacea</i>	Pošvovec čiernovláknitý	178	8,2
<i>Pleurotus</i> spp.	Hliva	169	7,7
<i>Auricularia</i> spp.	Judášovo ucho	119	5,5
<i>Flammulina velutipes</i>	Plamienka zimná	100	4,6
<i>Tremella fuciformis</i>	Rôsolovka	40	1,8
<i>Pholiota nameko</i>	Šupinovka nameko	25	1,1
Other spp.		10	
Total		2182	100

# Produkcia makromycét - schéma



# Kultivačný cyklus húb



# Produkcia biomasy rias

- Používa sa rod *Spirulina* (zeleno-modré riasy, cyanobaktérie) – ako zdroj proteínov v ľudskej výžive – Španielsko, Mexiko, Jazero Chad – Afrika, história – Astékovia – Jazero Texcoco
- *Spirulina* – obsah proteínov 60-70 %, viac ako v rastlinách, absentuje prítomnosť celulózy,
- Komerčná *Spirulina* (60 % proteínov, 20 % karbohydrátov, 5 % tukov, 7 % minerálov, 3-6 % vlhkosti, nízke kalórie, bez cholesterolu, vysoký obsah karoténu, vit B12, tiamínu a riboflavínu, obsah železa a esenciálnych mastných kyselín

# Produkcia biomasy rias

- Iné komerčne zaujímavé rody: *Dunaliella*, *Porphyridium*, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Anabaena*, *Isochrysis* a *Tetraselmis*.
- Štúdie z Izraela ukázali že je možné kultivovať 7kg/m<sup>2</sup>, je však potreba produktívneho podnebia – slnko a teplotu
- Druhý potenciál – *Dunaliella* – riasa vhodná k produkcii glycerolu – tvorí ho v prítomnosti NaCl v osmotickom strese – dá sa purifikovať v 99 % čistote
- *Azolla* – žije v symbióze s *Anabaena azola*, dusík fixujúca zeleno-modrá riasa, v symbióze fixuje dusík viac ako *Rhizobium* s *Fabaceae* rastlinami,
- Táto asociácia produkuje až 540-720 kg proteínov mesačne – krmivo pre prasatá, kačice, dobytok a ryby

# Škrob obohatený proteínmy



- *Cassava* – koreň Maniok jedlý (vysoký obsah škrobu) sa fermentuje s *Aspegillus niger* – iba parciálna fermentácia na uchovanie uhľovodíkov
- Po 30 hodinách – konečný produkt okolo 20 % proteínov
- Experimentálne – v Austrálii použili *Aspergillus oligosporus* – izolovaný z tempeh, zo 65 ton cassava vyprodukovali 3,5 tony proteínov s podobným množstvom enzýmu amyloglukozidáza
- Tento enzým konvertoval 39 ton cassava na monomerickú glukózu a pomocou *Zymomonas mobilis* sa vyprodukovalo 15,6 mil litrov etanolu

# Proteínom obohatená srvátka

- Srvátka – odpad pri výrobe syra, obsahuje 6-7 % sušiny a približne 60 % laktózy, už len malé množstvo proteínov, lipidov, kys. mliečnej, minerálov a vitamíny

Tri cesty produkcie biomasy zo srvátky

1. Priame použitie laktózy pre MO
2. Konverzia laktózy na glukózu a galaktózu enzymaticky a použitie produktov ako substrát pre MO
3. Fermentácia laktózy kyslo-mliečnymi baktériami v kombinácii s kyselinou mliečnou a galaktózou