

Fermentačné procesy

BIOTECHNOLÓGIE MIKROORGANIZMOV

Fermentácia

- ▶ Z latinské slova „fermentum“ – znamená vriieť, kypieť
- ▶ Je metabolický proces pri ktorom sa metabolizujú uhlíkaté zlúčeniny bez prístupu kyslíka (anaeróbna dehydrogenácia organických látok)
- ▶ Rozdeľujeme:
 1. Etanolové kvasenie
 2. Kyslo-mliečne kvasenie
 3. Maslové kvasenie
- ▶ Vznik malého množstva energie, produkt je endogénny akceptor vodíkov a elektrónov, donor vodíkov je samotná fermentovaná organická látka
- ▶ Koncové produkty: etanol, kyselina mliečna, kyselina maslová ... + CO₂

Fermentácia

- ▶ Katabolický proces
- ▶ Striktne anaeróbny proces – fakultatívne anaeróbne a anaeróbne mikroorganizmy, chemoheterotrofné
- ▶ Metabolická dráha rozkladu látok pri fermentácii:
 1. Glykolýza (Embden-Mayerhofova dráha, Horeckerova dráha, Entner-Doudorofova dráha)
 2. Tvorba ATP fosforyláciou na substrátovej úrovni
 3. Redukcia pyruvátu alebo jeho metabolitu

EMP - glykolýza

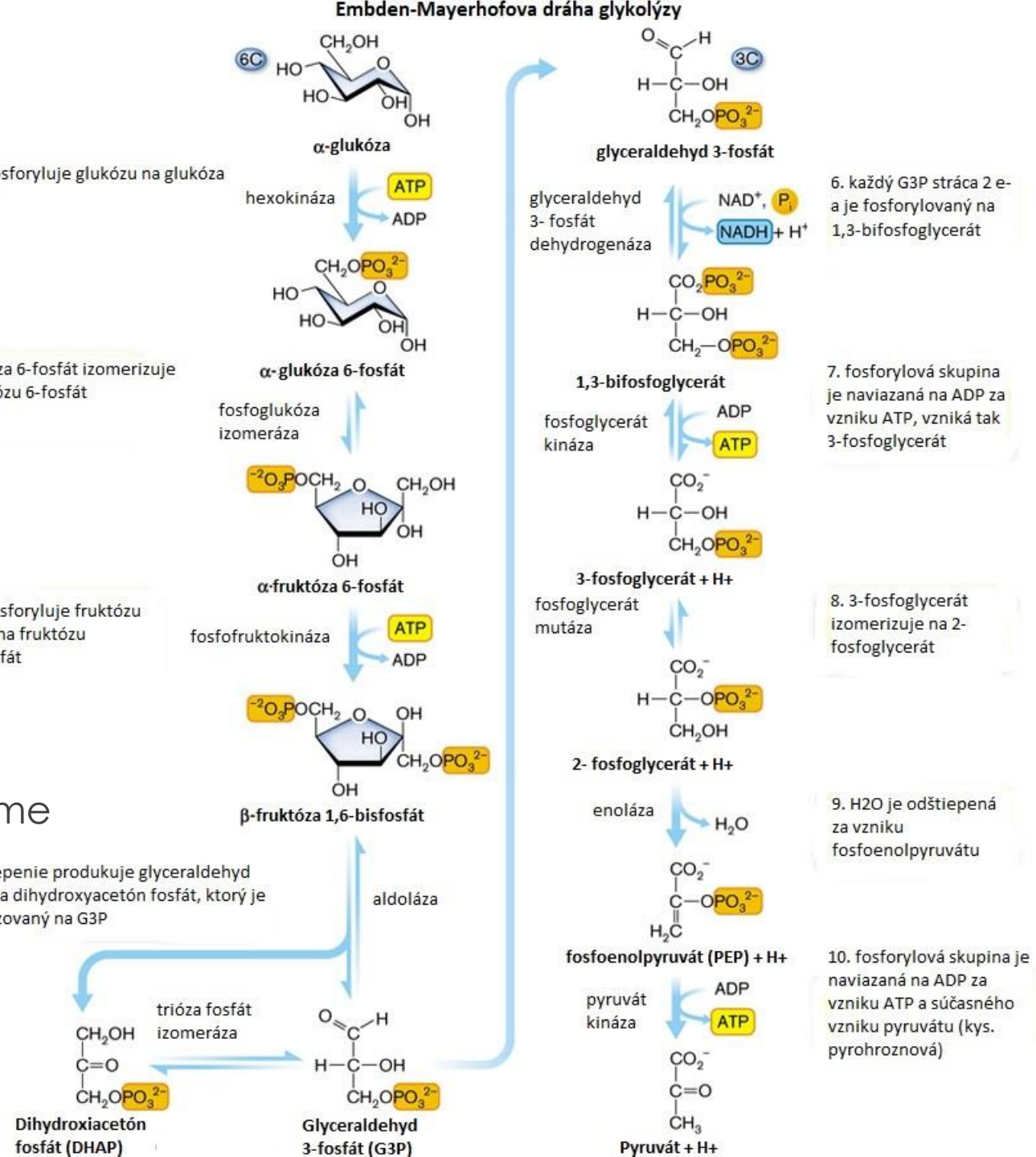
1. Premena glukózy na pyruvát
2. 10 enzýmov
3. - 2 ATP, + 4 ATP, + 2 NADH
4. Vznik 2 pyruvátov
5. Známa u prokaryotov a eukaryotov
6. V anaerobnom a aerobnom metabolizme

1. ATP fosforyluje glukózu na glukóza 6-fosfát

2. Glukóza 6-fosfát izomerizuje na fruktózu 6-fosfát

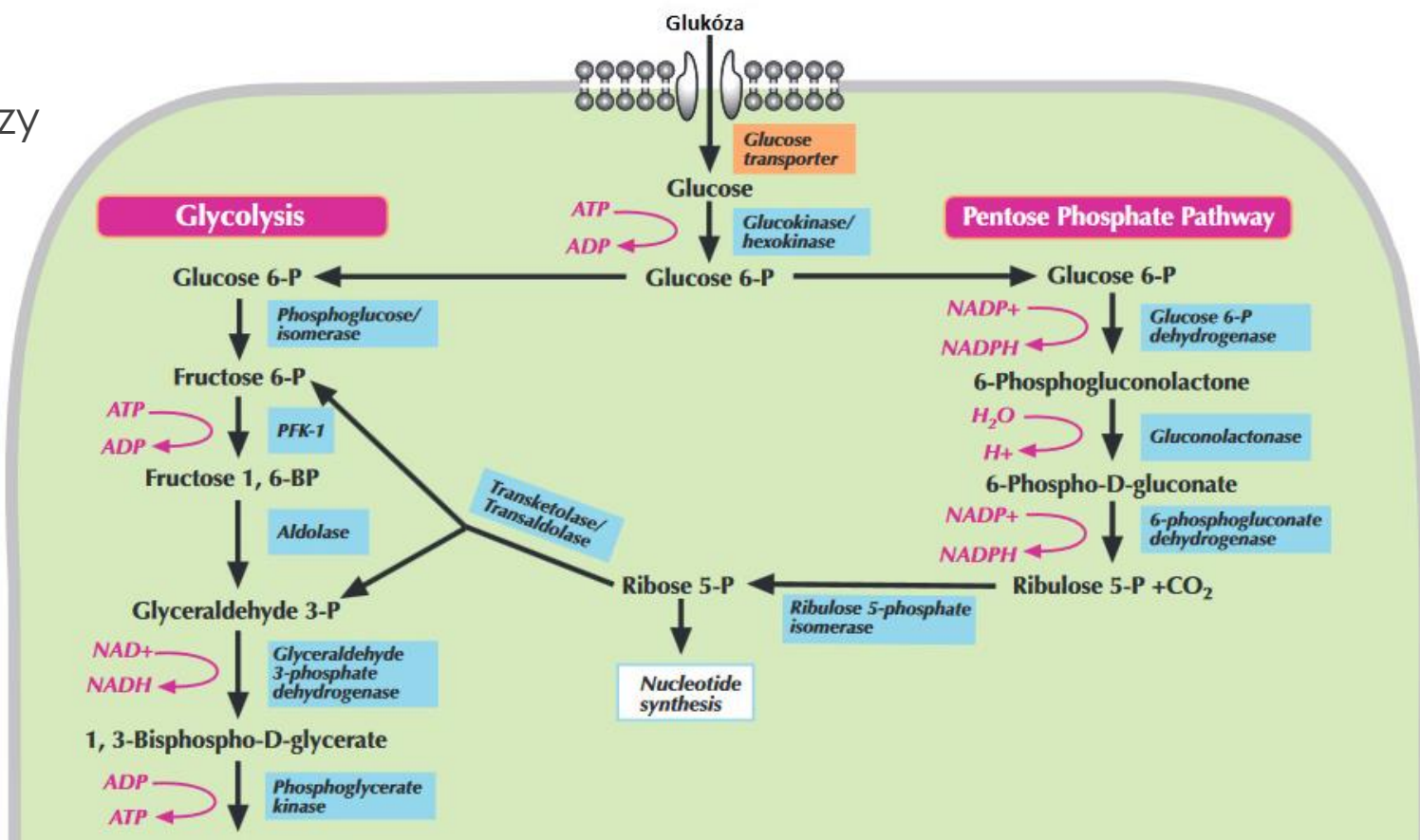
3. ATP fosforyluje fruktózu 6-fosfát na fruktózu 1,6-bisfosfát

4.-5. štiepenie produkuje glyceraldehyd 3-fosfát a dihydroxyacetón fosfát, ktorý je izomerizovaný na G3P



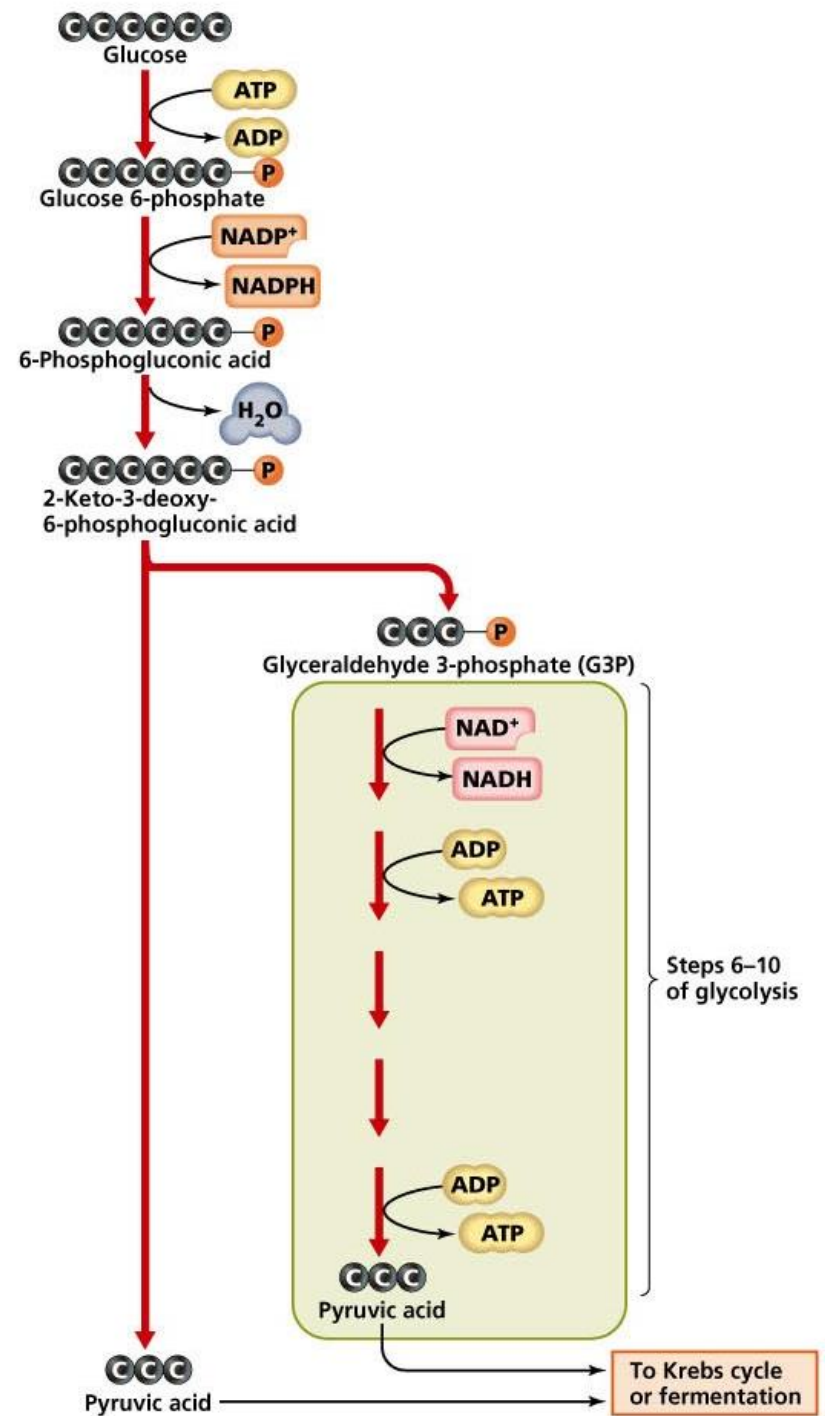
Horeckerova dráha (Pentózofosfátová dráha) (PPP)

- ▶ Oxidácia a dekarboxylácia glukózy
- ▶ vznik pentózy
- ▶ Pentózy potrebné pre syntézu NK
- ▶ 5 enzýmov
- ▶ Vznik CO₂
- ▶ Spotreba ATP, + 2 NADPH, + H⁺



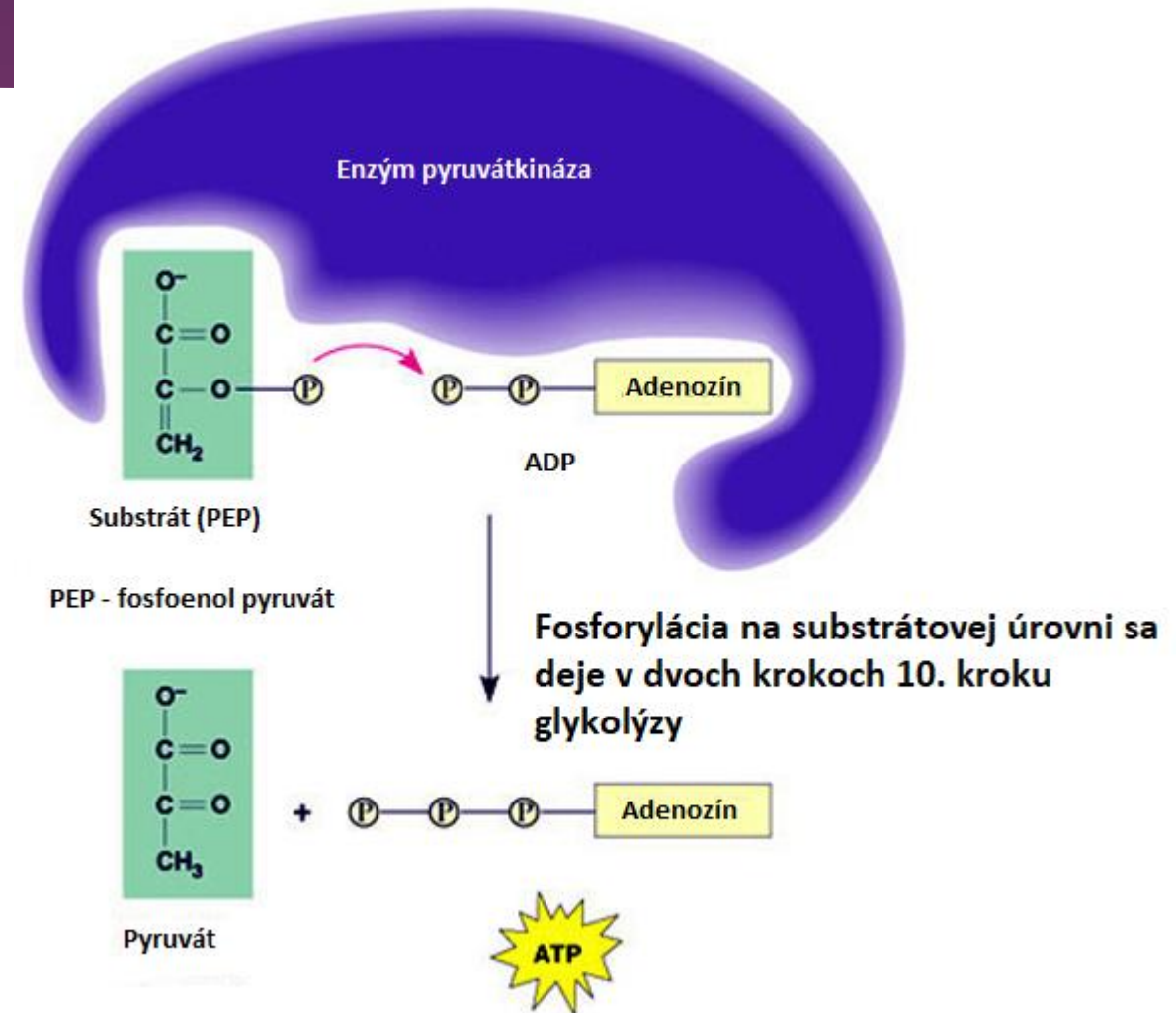
Entner-doudorofova dráha

- ▶ Výťažok je 1 ATP, 1 NADPH a 1 NADH na 1 mol glukózy



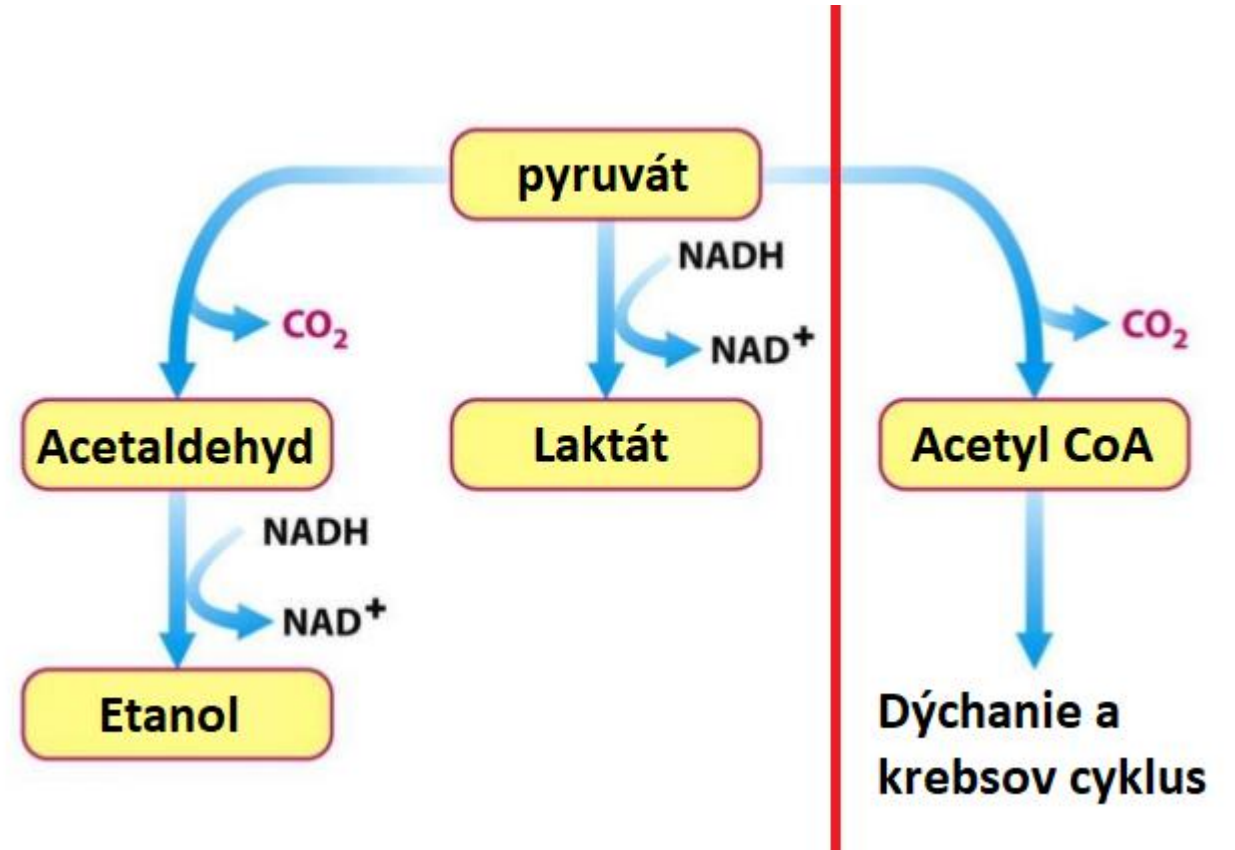
Foforylácia na substrátovej úrovni

- ▶ Je syntéza ATP priamym transférom fosfátovej skupiny zo substrátu (vysokoenergetický medziprodukt) na molekulu ADP
- ▶ Nachádza sa v glykolýze
- ▶ Oproti oxidatívnej fosforylácii sa produkuje iba 10 % ATP
- ▶ Prebieha v cytoplazme alebo v mitochondriách



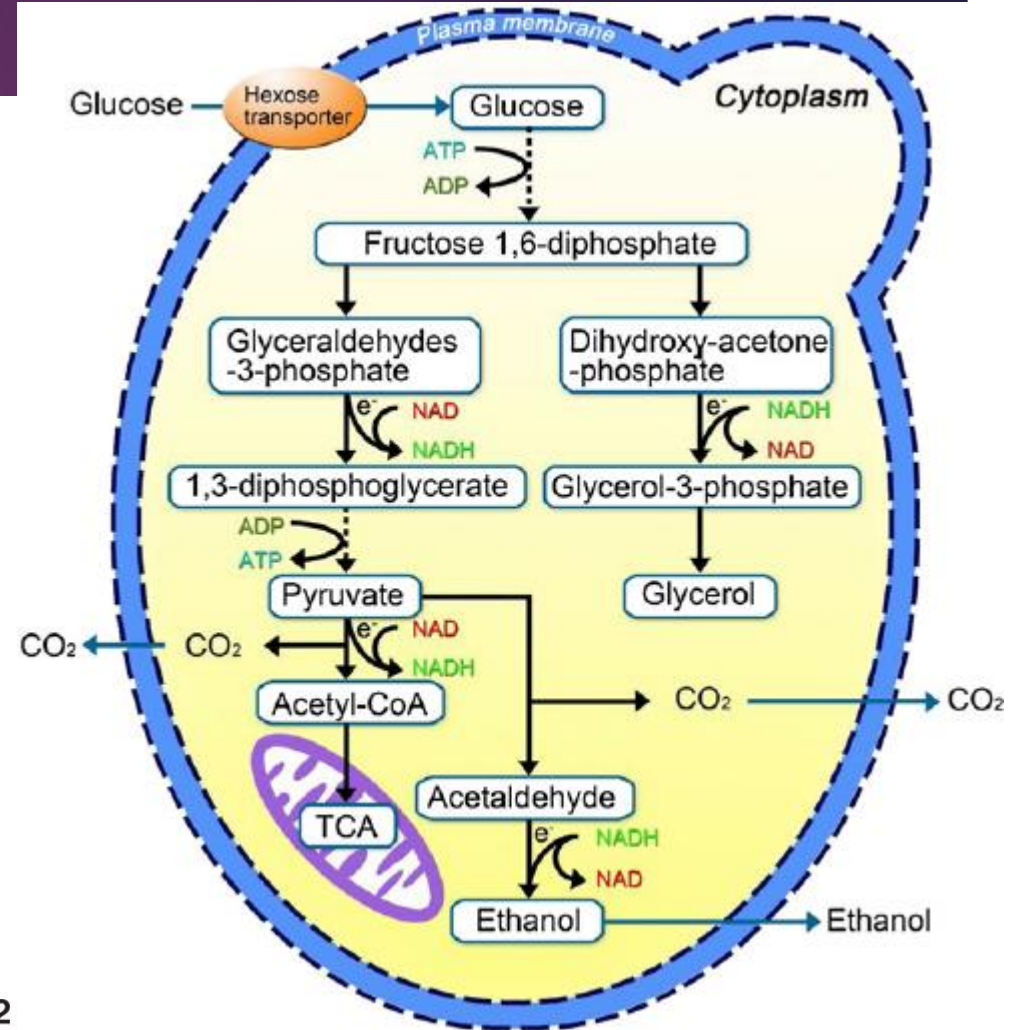
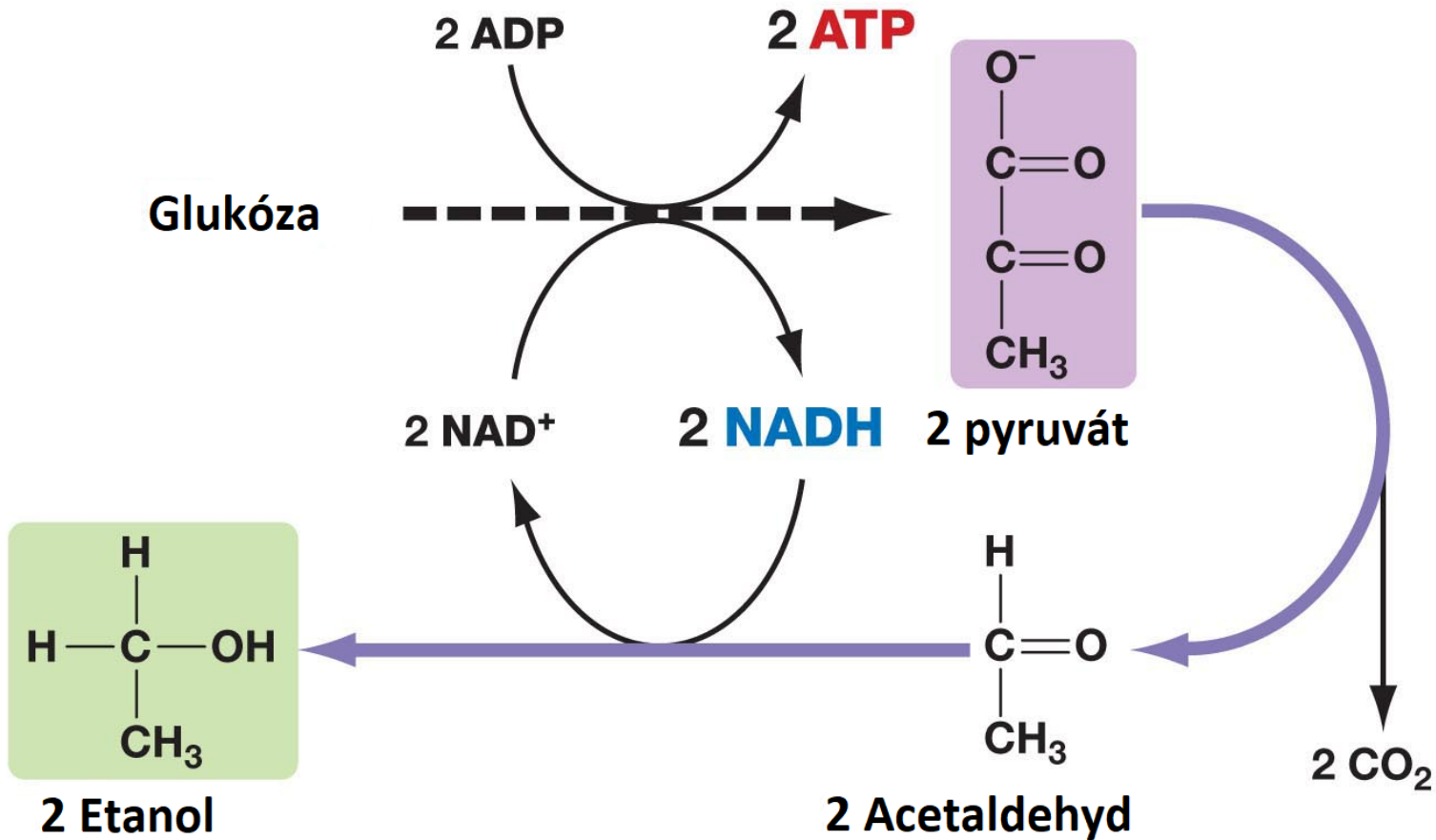
Redukcia pyruvátu alebo jeho metabolitu

- ▶ Pyruvát na etanol: vyžaduje pyruvát dekarboxylázu a alkohol dehydrogenázu + NADH, ktorý redukuje acetaldehyd na etanol pri etanolovom kvasení
- ▶ Pri kyslo-mliečnom kvasení sa redukuje priamo pyruvát na laktát



Etanolové kvasenie – schéma metabolizmu

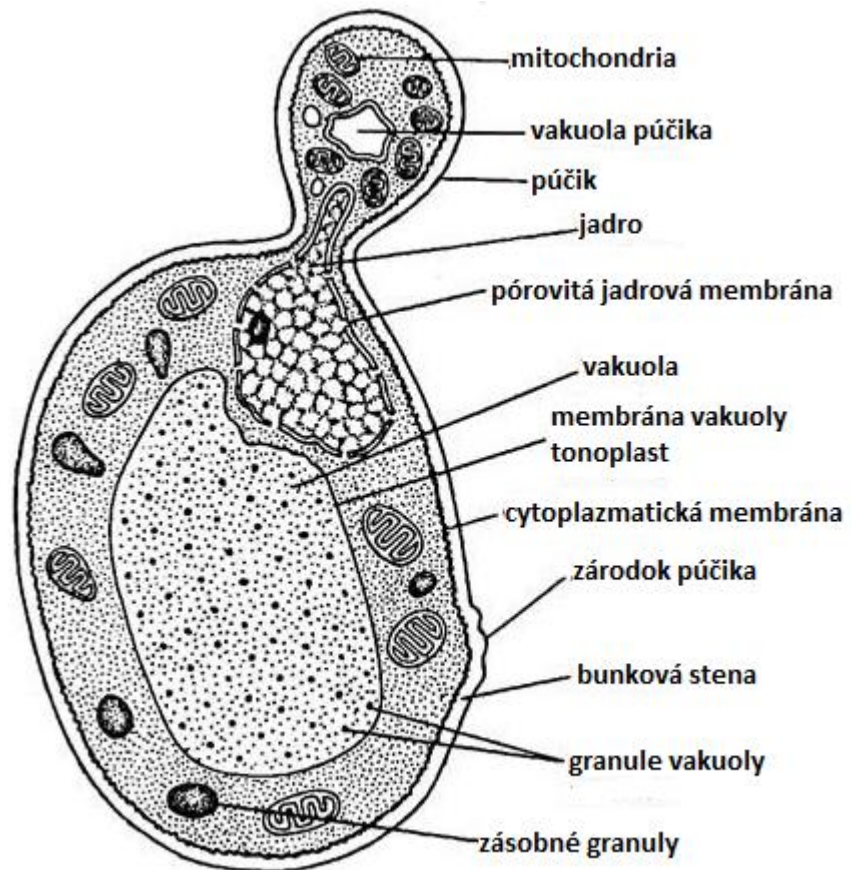
Etanolové kvasenie - metabolizmus



Etanolové kvasenie

- ▶ Sumárna rovnica: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2 \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{OH} + 2 \text{CO}_2 + \text{E (2 ATP)}$
- ▶ Glykolýza prebieha Embden-Mayerhofovou dráhou
- ▶ Etanolové kvasenie používajú kvasinky a baktérie
- ▶ Pôvodcovia: *Saccharomyces cerevisiae* a *S. uvarum*, baktérie: *Zymomonas mobilis*, *Sarcina ventriculi*, *Pseudomonas linderi*

Saccharomyces cerevisiae



Saccharomyces cerevisiae

- ▶ Produkty: pivo, víno, alkohol, saké, cider ...
- ▶ Pekárenské produkty (nefermentované – otázka rozdiel)

Pivo – technológia

- ▶ Klíčenie jačmeňa (7 dní)
- ▶ Sušenie na 4 % vlhkosti + odklíčkovanie ---- vzniká slad
- ▶ Drvenie sladu
- ▶ Rmutovanie – spustenie enzymatických procesov na hydrolýzu škrobu na jednoduché cukry
- ▶ Filtrovanie rmutu – odstránenie plev, získanie extraktu – sladínový extrakt
- ▶ Chmelenie – získanie mladiny
- ▶ Fermentácia – *Saccharomyces cerevisiae* (ALE pivo), *S. pastorianus* (ležiaky), teplota: ALE pri 15-20°C, ležiaky pri 6-13°C, čas závisí na teplote – približne pri 8,5°C trvá 10 dní.
- ▶ Filtrácia – 3 dni v chlade – sedimentáciou
- ▶ Stabilizácia

Víno - technológia

- ▶ Odstopkovanie – kvôli nežiaducim látkam, napr. taníny – ovplyvňujú chuť vína
- ▶ Drvenie – zlepšiť prístupnosť šťavy
- ▶ Lisovanie – odseparovať šťavu a odpad
- ▶ Fermentácia – *Sachcaromyces cerevisiae*, *S. bayanus*, biele vína pri teplote 10-15°C, červené 20-30°C, 20-30 dní
- ▶ Čistenie (čírenie) – najčastejšie bentonitom (odstraňuje bielkoviny), číry víno, vo veľkých prevádzkach sa používa silica gel
- ▶ Filtrácia – mikróby membránovou filtráciou, tiež kvôli pevným rezíduam
- ▶ Stabilizácia – kvôli oxidačnému hnednutiu – siričitanmi (SO₂)

Cíder - technológia

- ▶ Rozomletie – melú sa jablká, ktoré stály niekoľko týždňov, kvôli premene zvyšného škrobu na cukry
- ▶ Prešovanie – odšťavovanie – vo veľkovýrobe sa používajú hydraulické lisy
- ▶ Fermentácia šťavy – *Saccharomyces pastorianus*, *S. bayanus*, teplota od 15-25 °C, 2 týždne, vyskytuje sa tu aj jablčno-mliečna fermentácia, ktorú zapríčiňuje *Leuconostoc oenos* spolu s laktobacilmi
- ▶ Po-fermentačné úpravy – v tradičnej výrobe sa necháva odležať bez kyslíka niekoľko týždňov, vo veľkovýrobe odležanie absentuje
- ▶ Čírenie – bentonitom, chitosanom, želatínou prípadne centrifugáciou
- ▶ Filtrácia – membránové filtre

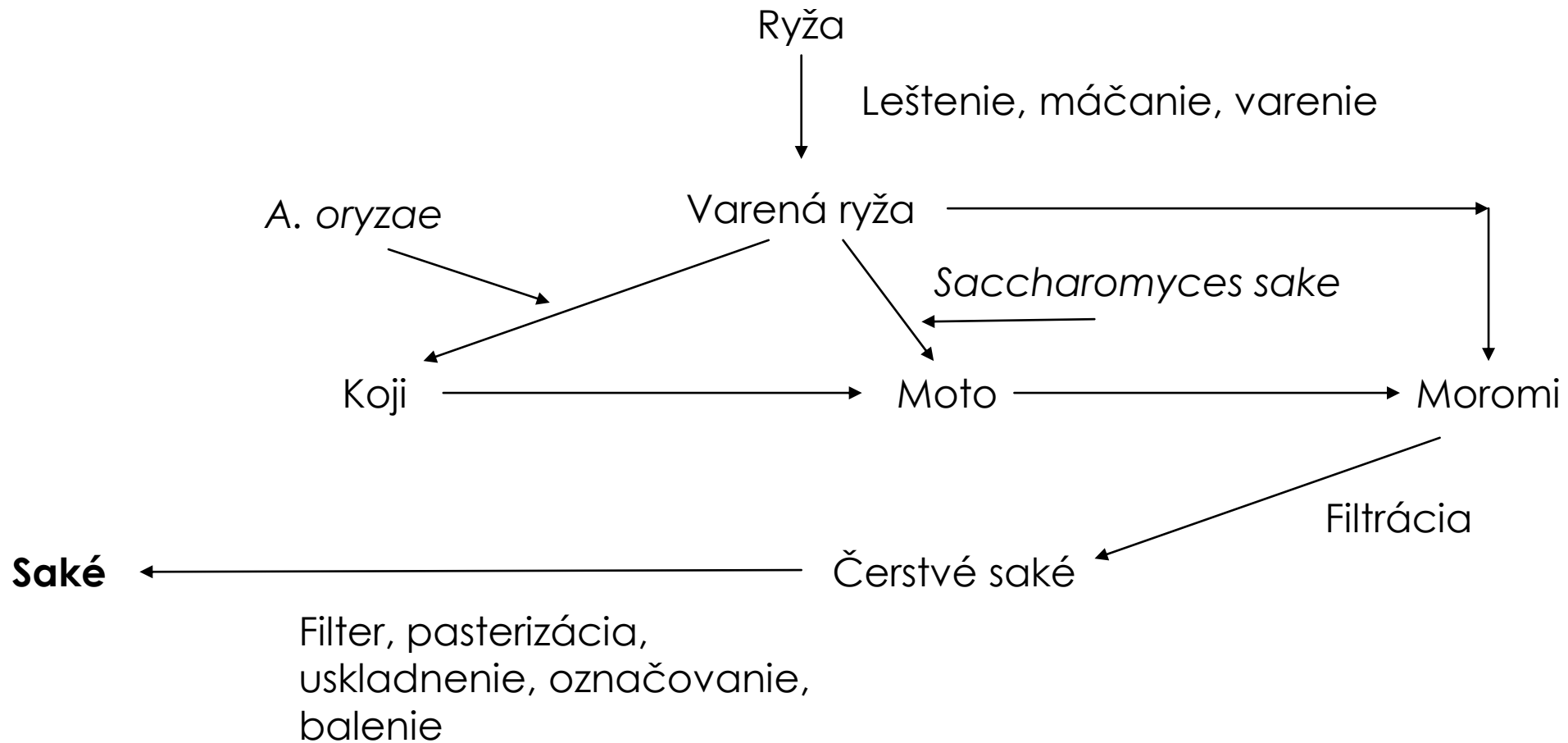
Alkohol - technológia

- ▶ Viacero technológií – z obilovín – napr. Whiskey – podobný proces ako u výroby piva
- ▶ Z ovocia – kvasením rozdrveného ovocia – podobný proces ako pri výrobe vína alebo cíderu
- ▶ Fermentácia – *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus* v prípade divokého kvasenia

Saké – technológia

- ▶ Leštenie ryže – odstránenie vrchných vrstiev, pre lepší kontakt zrna s hubou
- ▶ Umývanie a máčanie ryže – zvýšenie obsahu vody v zrne na zhruba 30 % vlhkosti,
- ▶ Varenie – zhruba 60 minút varenia – čiastočná sterilizácia a želatinovanie škrobu v ryži
- ▶ Chladienie ryže
- ▶ Koji – ochladenú ryžu naočkujeme *Aspergillus oryzae* – úlohou je rozložiť škrob, koji sa premiešava raz za 4 hodiny pri teplote okolo 30°C, *A. oryzae* rastie približne 40-45 hodín až do získania arómy po gaštanoch
- ▶ Nasleduje viacero metód v nasledujúcom fermentačnom procese
- ▶ Často sa využíva kooperácia *A. oryzae* a *S. saccharomyces* var. *sake* pri tzv. viacnásobnej paralelnej fermentácii
- ▶ Koji sa mieša s vodou a 80 % varenej ryže a pridávajú sa kvasinky – vzniká najprv moto, neskôr moromi
- ▶ V aeróbnom prostredí na povrchu *A. oryzae* hydrolyzuje škrob na cukry a v aneróbnej časti pod hladinou kvasinky premieňajú cukry na alkohol
- ▶ Nasleduje filtrácia – vzniká čerstvé saké
- ▶ To sa dodatočne filtruje pasterizuje, balí a označuje, vzniká saké

Saké – technológia - schéma



Mliečne kvasenie

► Všeobecne sa rozdeľuje na:

1. Homofermentatívne mliečne kvasenie:

1 hexóza \longrightarrow 2 kyselina mliečna + 2 ATP

2. Heterofermentatívne mliečne kvasenie:

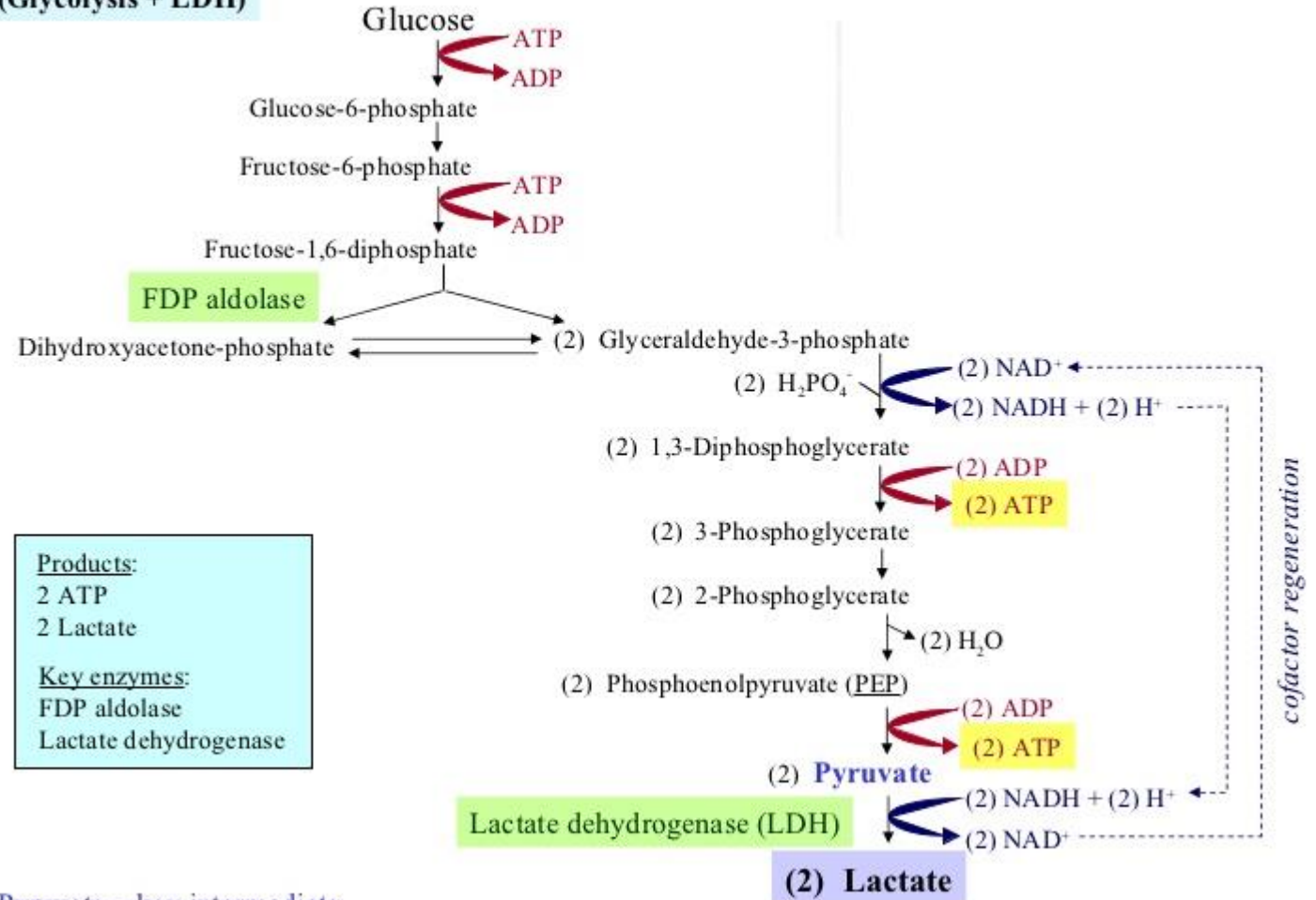
1 monosacharid \longrightarrow 1 kys. mliečna + 1 (etanol alebo kys. octová) + 1 CO₂
+ kys. mravčia + 1 ATP + 1 ATP/kys. octová

Homofermentatívne mliečne kvasenie

- ▶ Produkty:
2 ATP a 2 kyselina mliečna
- ▶ Kľúčové enzýmy:
FDP aldoláza
Laktát dehydrogenáza

Homolactic Fermentation of Glucose (Embden-Meyerhof Pathway)

(Glycolysis + LDH)



Zmiešaná kyslá fermentácia

Mixed Acid Fermentation: Alternative endproducts for pyruvate

► Produkty:

3 ATP

2 prekuzory kyseliny mravčej

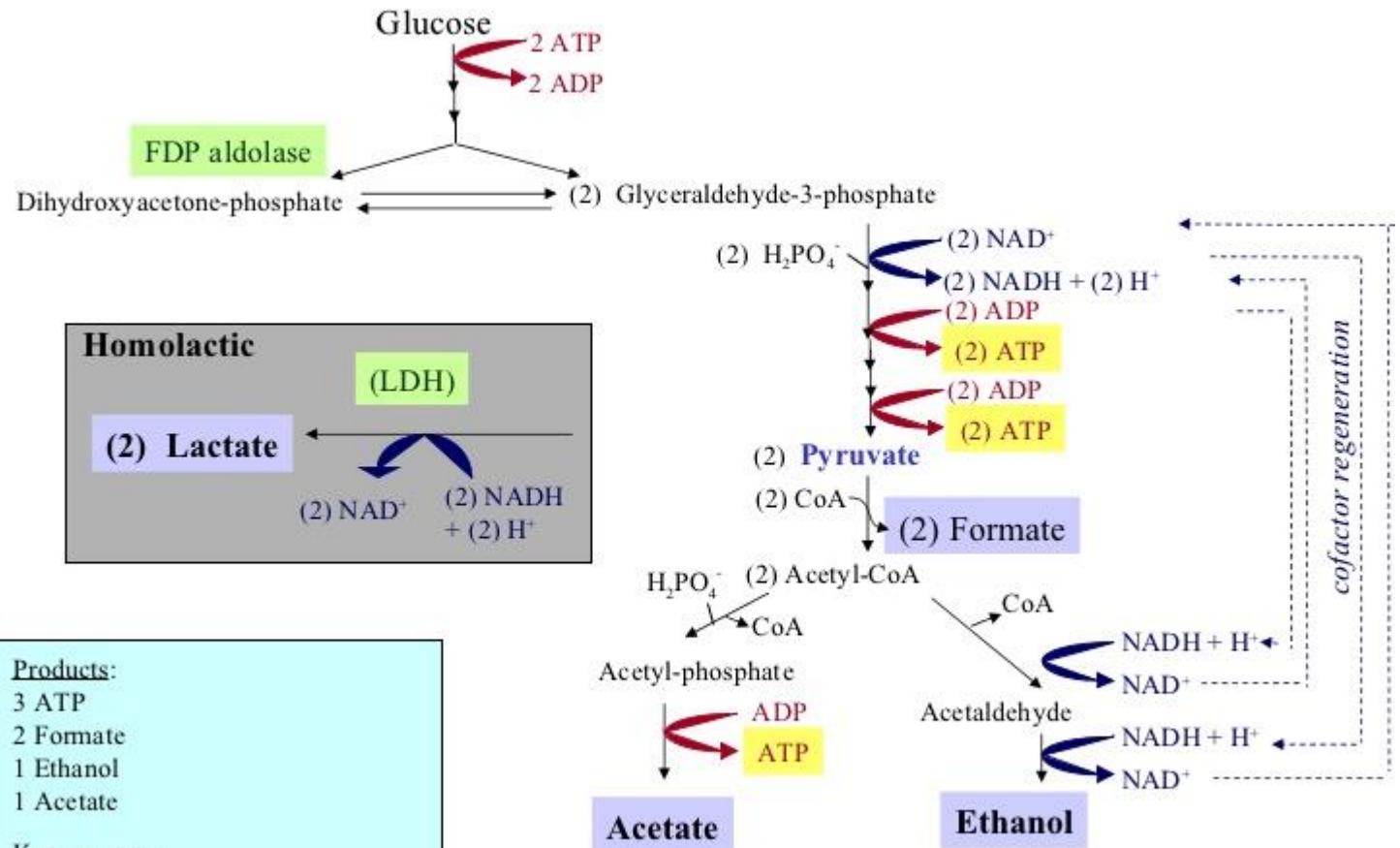
1 etanol

1 acetát

► Kľúčové enzýmy:

FDP aldoláza

Pyruvát formát lyáza



Products:
 3 ATP
 2 Formate
 1 Ethanol
 1 Acetate

Key enzymes:
 FDP aldolase
 Pyruvate formate lyase (PFL)

Heterofermentatívne mliečne kvasenie glukózy (PPP) aeróbne podmienky

Heterolactic Fermentation of Glucose (Pentose Phosphate Pathway) --- Aerobic conditions

► Produkty:

2 ATP

1 CO₂

1 kyselina mliečna

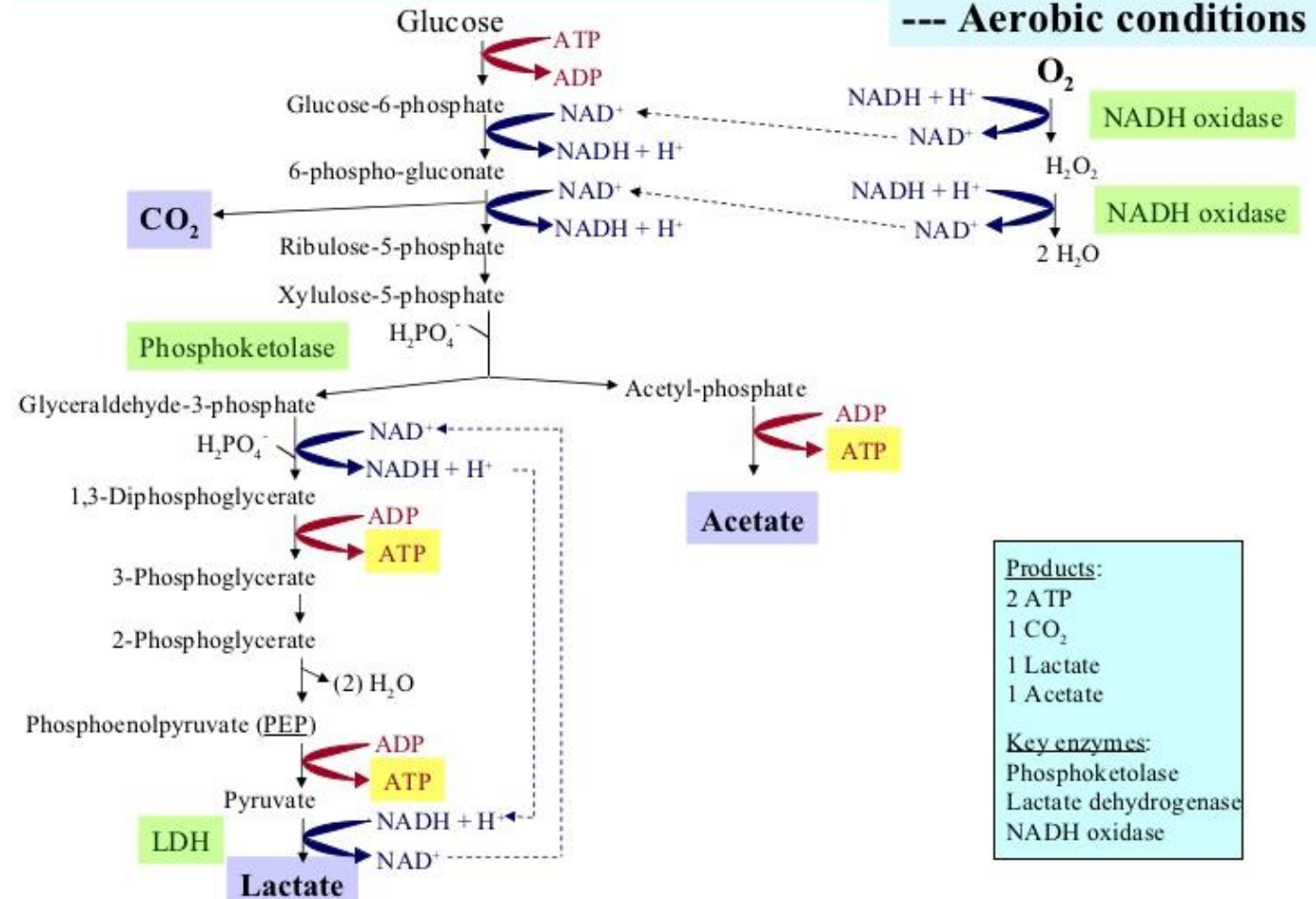
1 acetát

► Kľúčové enzýmy:

Fosfoketoláza

Laktát dehydrogenáza

NADH oxidáza



Heterofermentatívne mliečne kvasenie glukózy – anaeróbne podmienky

Heterolactic Fermentation of Glucose --- Anaerobic conditions

► Produkty:

1 ATP

1 CO₂

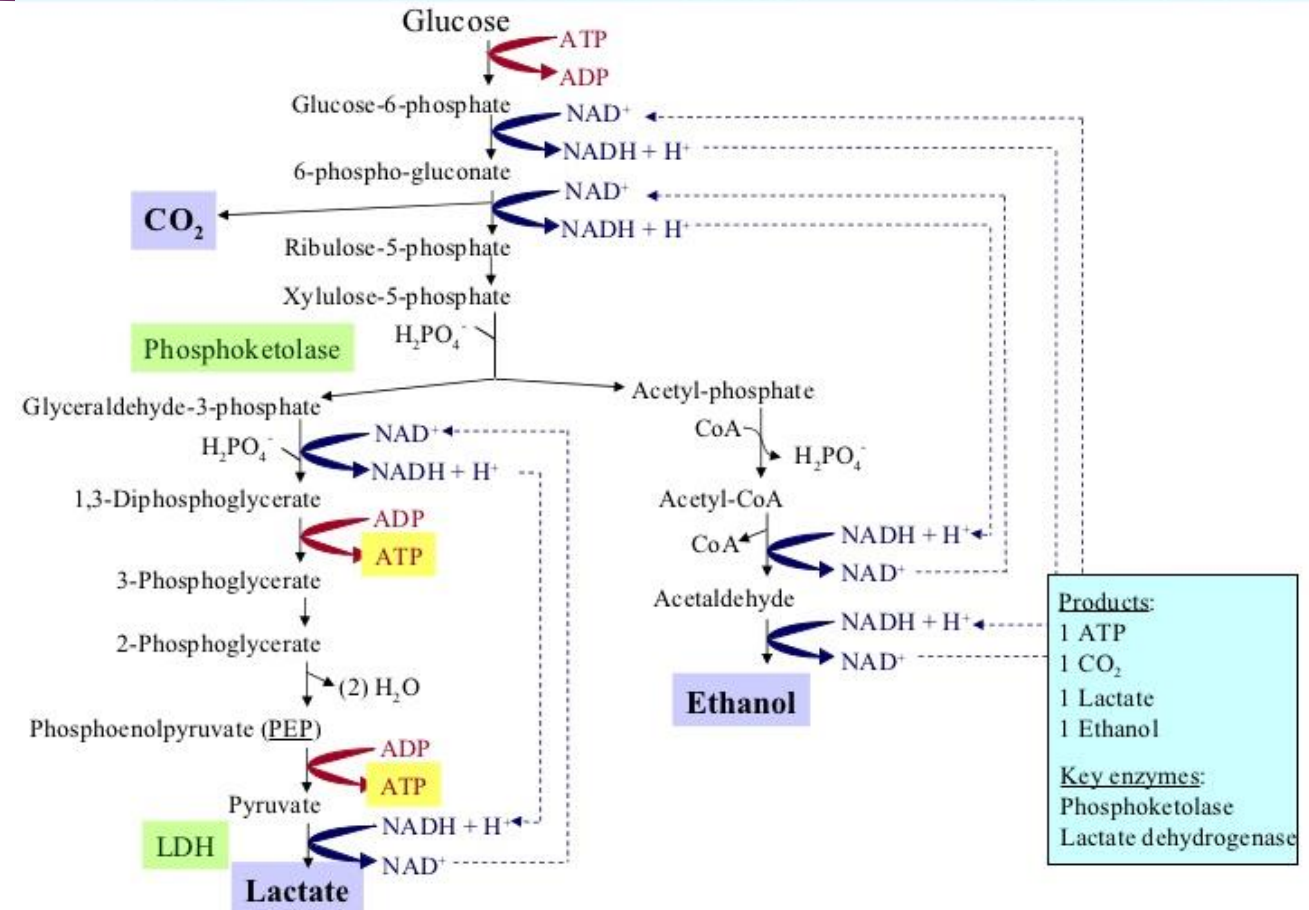
1 kyselina mliečna

1 etanol

► Kľúčové enzýmy:

Fosfoketoláza

Laktát dehydrogenáza



Príklady mikrobiálnych fermentačných procesov

TABLE 26.2. Some common microbial fermentation and the microorganisms involved

<i>Type of fermentation</i>	<i>Overall reaction</i>	<i>Microorganisms involved</i>
1. Alcoholic fermentation	Hexose \longrightarrow 2 Ethanol + 2 CO ₂	Yeasts, <i>Zymomonas</i>
2. Homolactic fermentation	Hexose \longrightarrow 2 Lactate ⁻ + 2H ⁺	<i>Streptococcus</i> , some <i>Lactobacillus</i>
3. Heterolactic fermentation	Hexose \longrightarrow Lactate ⁻ + Ethanol + CO ₂ + H ⁺	<i>Leuconostoc</i> , some <i>Lactobacillus</i>
4. Propionic acid fermentation	Lactate ⁻ \longrightarrow Propionate ⁻ + Acetate ⁻ + CO ₂	<i>Propionibacterium</i> , <i>Clostridium propionicum</i>
5. Mixed acid fermentation	Hexose \longrightarrow Ethanol + 2,3-Butanediol + Succinate ²⁻ + Lactate ⁻ + Acetate ⁻ + Formate ⁻ + H ₂ + CO ₂	Enteric bacteria, e.g., <i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i>
6. Butyric acid fermentation	Hexose \longrightarrow Butyrate ⁻ + Acetate ⁻ + H ₂ + CO ₂	<i>Clostridium butyricum</i>
7. Butanol fermentation	Hexose \longrightarrow Butanol + Acetate ⁻ + Acetone + Ethanol + H ₂ + CO ₂	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
8. Homoacetogenic fermentation	Fructose \longrightarrow 3 Acetate ⁻ + 3H ⁺ + 4H ₂ + 2CO ₂ + H ⁺ \longrightarrow Acetate ⁻ + 2H ₂ O	<i>Clostridium aceticum</i> , <i>Acetobacterium</i>

Mikróby a kvasenie

