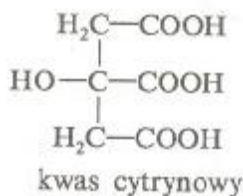


Biosynteza kwasu cytrynowego z wykorzystaniem przemysłowych szczepów *Aspergillus*.

Wprowadzenie.

Kwas cytrynowy jest jednym z najważniejszych produktów w grupie kwasów organicznych otrzymywanych na drodze biotechnologicznej. Stosowany jest głównie w przemyśle spożywczym do poprawy smaku potraw oraz jako środek konserwujący. Jako kwas cytrynowy lub cytrynian sodu związek ten znalazł również zastosowanie w chemii gospodarczej, w produkcji proszków do pieczenia i płynów myjących a także w przemyśle farmaceutycznym i chemicznym.



Kwas cytrynowy występuje w owocach cytrusowych (np. w cytrynach;)). Początkowo te owoce były surowcem z którego otrzymywano ten kwas. Obecnie jedynie niewielka ilość (ok. 1%) tego surowca, wytwarzana jest z tego źródła naturalnego, przytłaczająca większość wytwarzana jest metodami biotechnologicznymi z wykorzystaniem drobnoustrojów. Do produkcji kwasu cytrynowego stosuje się wyselekcjonowane (w drodze mutacji lub selekcji ze szczepów dzikich) wysoko wydajne szczepy grzybów strzępkowych – *Aspergillus niger* lub *Aspergillus wentii*. W europie głównym surowcem do produkcji kwasu cytrynowego za pomocą szczepów *Aspergillus* jest melasa (produkt uboczny przemysłu cukrowniczego), zawierająca do 50% sacharozy lub czysta sacharoza. W USA wykorzystuje się hydrolizowaną skrobię kukurydzianą, a w Japonii pewne frakcje ropy naftowej (z tym że w tym przypadku wykorzystuje się drobnoustroje z rodzaju *Candida*).

Cytrynian jest ważnym metabolitem pośrednim powstającym podczas rozkładu różnych związków, w przemianach mających na celu pozyskiwanie energii przez organizmy rosnące w warunkach tlenowych. W przypadku szczepów *Aspergillus* cząsteczki heksozy asymilowane są w dwóch szlakach metabolicznych – szlaku glikolitycznym i cyklu Krebsa. W czasie wzrostu grzybni funkcjonują obydwie te szlaki z blisko 2-krotną przewagą glikolizy. W drugiej fazie wzrostu – tzw. idiofazie – fazie nagromadzenia kwasu cytrynowego, w wyniku zmian aktywności enzymów cykl Krebsa zostaje praktycznie zablokowany na etapie przemian kwasu cytrynowego. Aby komórki grzyba mogły tworzyć dalsze ilości kwasu

(w wytrząsarce z intensywnym napowietrzaniem). Hodowle prowadzić przez okres 7 dób w temperaturze 30°C.

Koniec I zajęć.

5. **Przeprowadzić obserwacje hodowli** metodą wgłębną i powierzchniową. Spostrzeżenia zanotować (zwrócić uwagę na wygląd grzybni, obecność zarodników itp.). Wykonać dokumentację zdjęciową i/lub rysunkową.
6. Przeprowadzić analizę wszystkich prób fermentacyjnych:
 - **Sprawdzić obecność kwasu szczawiowego** – ubocznego produktu fermentacji kwasu cytrynowego. Do kropli podłoża pobranego z próby fermentacyjnej (pipetą) dodać na szkiełku zegarkowym nasycony roztwór CaCl_2 – obserwować pojawiające się kryształy szczawianu wapnia.
 - **Wyznaczyć zawartość powstałego kwasu cytrynowego.** Pobrać 5 ml płynu z każdej z kolb (bez grzybni) i miareczkować 0,25M NaOH wobec fenoftaleiny (do zmiany koloru). Odmierzać objętość dodanego NaOH. 1 ml 0,25M NaOH odpowiada 0,016g kwasu cytrynowego.
 - **Wyznaczyć suchą masę grzybni** – grzybnię z hodowli powierzchniowej umieścić na lejku Buchnera i przemyć niewielką ilością wody – umieścić na płytce Petriego (szklanej i zważonej!). Grzybnię z hodowli wgłębnej umieścić na bibule filtracyjnej w lejku Buchnera – odsączyć i przemyć wodą, umieścić grzybnię na płytce Petriego (szklanej i zważonej!). Grzybnie suszyć najpierw w 50°C (15-20 min), następnie w temp. 105°C do stałej wagi (30-45 min).

Skład podłoża sacharazowego (na 1000 ml): sacharoza 100g, NH_4NO_3 – 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1g, KH_2PO_4 – 1g, FeSO_4 – ślad, woda do 1000ml. (w ćwiczeniu pracowaliśmy z objętością 100 ml! – do obliczeń istotna jest ilość sacharozy)

Sprawozdanie.

Na podstawie otrzymanych wyników (zawartość kwasu, sucha masa grzybni, ilość sacharozy w pożywce) obliczyć wydajność biosyntezy kwasu cytrynowego i porównać z wartością teoretyczną. Porównać wydajności dla obydwu badanych organizmów i każdej z metod. **Wyniki skomentować.** Załączyć wyniki obserwacji wzrostu organizmów w różnych warunkach i na różnych podłożach, opatrzyć krótkim komentarzem.

Sprawozdanie powstało na podstawie/literatura uzupełniająca:

1. Biotechnologia i chemia antybiotyków, A. Chmiel, S. Grudziński Wydawnictwo Naukowe PWN, 1998
2. Biotechnologia mikrobiologiczna – ćwiczenia i pracownie specjalistyczne, J. Długosinski, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 1997