

# Laboratorium – biotechnologia ogólna – dla studentów kierunku biotechnologia od 2014\_2015

## PRODUKCJA KWASU CYTRYNOWEGO

### Kwas cytrynowy

Kwas cytrynowy (2-hydroksy-1,2,3-propanotrikarboksylowy) o  $M_{cz}=192$  i temperaturze topnienia  $153^{\circ}\text{C}$  po raz pierwszy został wyizolowany z soku cytryn. W formie krystalicznej kwas ten występuje w postaci bezwodnej lub jednowodnej. Jednowodna forma jest otrzymywana przez krystalizację w temperaturze poniżej  $36,6^{\circ}\text{C}$ , powyżej tej temperatury powstaje forma bezwodna. Kwas cytrynowy otrzymywany jest wyłącznie na drodze biologicznej z substratów naturalnych (pochodzenia roślinnego).

Kwas cytrynowy występuje w przyrodzie w owocach cytrusowych i ananasach. Owoce te do niedawna były głównym źródłem tego kwasu. Światowa produkcja kwasu cytrynowego przekracza 300 000 ton rocznie, co jest podyktowane bardzo dużym zapotrzebowaniem na ten kwas ze strony przemysłu spożywczego, farmaceutycznego, chemicznego oraz metalurgicznego. Jego wykorzystanie wynika m.in. z działania konserwującego na skutek obniżania wartości pH środowiska. Jednocześnie jest związkami nietoksycznym, o dobrych walorach smakowych i zapachowych.

### Zastosowanie kwasu cytrynowego i jego pochodnych

- w produkcji i przetwórstwie żywności jest stosowany (za zgodą FAO/WHO) jako inhibitor enzymów, głównie oksydaz powodujących utlenianie polifenoli, co objawia się ciemnieniem owoców i warzyw,
- wykorzystywany jest do produkcji napojów, słodczy, owoców kandyzowanych i win, jako środek zakwaszający i stabilizujący,
- tworzenie połączeń kompleksowych z jonami metali (Fe, Cu, Zn) zadecydowało o zastosowaniu jako stabilizatora olejów; wiążąc metale katalizujące proces jełczenia tłuszczów, kwas cytrynowy przerywa reakcję tworzenia nadtlenków i innych produktów powstałych w wyniku utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych w procesie autooksydacji olejów,
- zdolność do wiązania metali ciężkich umożliwiła wykorzystanie kwasu cytrynowego do oczyszczania powierzchni metali przed spawaniem lub pokrywaniem powłokami ochronnymi,
- w mleczarstwie, wodne roztwory kwasu cytrynowego są stosowane do usuwania z aparatury kamienia mlecznego (osad z białka, tłuszczu i soli mineralnych mleka),
- w przemyśle farmaceutycznym stosowany jest jako środek dodawany do tabletek powodujący efekt musujący,
- w stacjach krwiodawstwa pochodne kwasu cytrynowego są stosowane jako środki zapobiegające krzepnięciu krwi,
- w chemii gospodarczej sole kwasu cytrynowego wypierają trudno biodegradowane fosforany ze składu detergentów,
- estry kwasu cytrynowego znalazły zastosowanie jako nietoksyczne plastyfikatory w cienkich powłokach ochraniających żywność.

### Producenci kwasu cytrynowego

W 1893 roku Wehmer po raz pierwszy wykrył kwas cytrynowy w kulturach pędzłaków i nazwał je *Citromyces pfefferianus*, a Curie w 1917 roku stworzył przemysłowe podstawy produkcji tego kwasu dzięki odkryciu, że *Aspergillus niger* rośnie dobrze i wydziela duże ilości kwasu cytrynowego w pożywkach płynnych o pH 2,5-3,5. Wzrost pH powoduje przestawienie produkcji na kwas glukonowy, a dalej na szczawiowy. Niska wartość pH chroni pożywkę przed zakażeniami, głównie bakteryjnymi.

Producentami kwasu cytrynowego są wyselekcjonowane szczepy *Aspergillus niger*, *A. wentii*, *A. clavatus* oraz liczne drożdże z rodzaju *Candida* (*C. lipolytica*, *C. tropicalis*, *C. intermedia*, *C. guilliermondii*), które syntezują kwas cytrynowy w środowisku zawierającym n-alkany. Wśród szczepów z gatunku *C. lipolytica* został wyselekcjonowany szczep, u którego stwierdzono cykl płciowy (został nazwany na cześć odkrywcy *Yarrowia lipolytica*) i który może wytwarzać kwas cytrynowy z n-parafin, dzięki czemu znalazł szybko zastosowanie w przemyśle. Jednym z podstawowych aspektów przemawiających za stosowaniem drożdży jest ich zdolność do wykorzystywania w charakterze źródła węgla szerokiej gamy surowców, zwłaszcza niekonwencjonalnych. Jak wiadomo, używanie w procesach biotechnologicznych tanich odnawialnych surowców pozwala na znaczne obniżenie kosztów produkcji. W ostatnich latach, wraz z rozwojem produkcji biopaliw (biodiesla), atrakcyjnym i tanim surowcem stosowanym w procesach biotechnologicznych jest gliceryna. Szacuje się, że pod koniec 2010 r. na rynku europejskim będzie dostępnych około 1 mln ton gliceryny, którą zagospodaruje się różnymi metodami, w tym także metodami biotechnologicznymi. Jednak przetwarzanie glicerolu w użyteczne produkty w procesach biotechnologicznych znajduje się dopiero w fazie badań laboratoryjnych. Odpadowa gliceryna została wykorzystana szczególnie w procesach beztlenowych, m.in. do produkcji: 1,3 propanodiolu, dihydroksyacetonu, kwasu bursztynowego i wodoru. Wstępne badania, wskazują, że odpadowy glicerol zapewnia otrzymanie, w hodowlach z udziałem mutantów octanowych *Y. lipolytica*, wysokich ilości kwasu cytrynowego, dochodzących do 200 g/l. Ponadto wydajność kwasu cytrynowego z tego surowca była wyższa w porównaniu do hodowli prowadzonych w podłożach glukozowych. Interesujący jest również fakt, iż obok kwasu cytrynowego, w podłożach zawierających glicerol, szczep drożdży *Y. lipolytica* produkuje także duże ilości alkoholi cukrowych, takich jak erytrytol i mannitol. Kwas cytrynowy wytwarzają także *Penicillium citrinum*, *Mucor piriformis*. Jednak w praktyce przemysłowej największe znaczenie mają szczepy *Aspergillus niger*.

W syntezie kwasu cytrynowego (oraz innych kwasów organicznych) przez grzyby kluczową rolę odgrywają enzymy cyklu kwasów trójkarboksylowych (cyklu Krebsa). Substratem bezpośrednim jest glukoza. Fumaran, jabłczan, bursztynian i cytrynian

## PRODUKCJA KWASU CYTRYNOWEGO

są wydzielane do podłoża jako produkty pośrednie cyklu Krebsa. Wydajność „fermentacji” zależy w dużym stopniu od składu pożywki. Tworzeniu się kwasu sprzyja mała ilość związków azotu (limitacja procesów wzrostu grzybni) i jednocześnie duża zawartość cukru w podłożu (10% na podłożu sacharozowym i 16% na podłożu melasowym). Wytwarzanie kwasu cytrynowego jest związane z okresem głodowania grzyba. Wysoką wydajność produkcji kwasu cytrynowego warunkują  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  (jeżeli są w stężeniach limitujących aktywność hydratazy akonitanowej – poniżej 0,1 mg/100 ml pożywki).

### Proces produkcyjny

Produkcję kwasu cytrynowego prowadzi kilkoma metodami. Na początku najczęściej stosowano metodę powierzchniową, potem wglębną, a ostatnio – szczególnie w Japonii – stosuje się hodowlę na pożywkach stałych.

#### Metoda powierzchniowa (wydajność procesu 70-80%)

W metodzie powierzchniowej w warunkach statycznych grzybnia *Aspergillus niger* rozwija się na powierzchni pożywki, tworząc zwarta plechę złożoną z mocno rozgałęzionych strzępek. W metodzie tej najczęściej stosowanym surowcem jest melasa buraczana. Oczyszczony melas rozcieńcza się wodą do zawartości 15 – 17% cukru, zakwasza kwasem siarkowym do pH 6,3, dodaje pewną ilość żelazocyjanku potasowego, sterylizuje, ochładza do temp. 40°C i przetłacza do komór fermentacyjnych, odkażonych dwutlenkiem siarki lub formaliną. Dokładna ilość żelazocyjanku potasowego musi być eksperymentalnie określona dla każdej odmiany melasy buraczanej, ponieważ żelazocyjanek potasu wytrąca ze środowiska metale ciężkie - Fe, Zn, Pb, których pewne ilości są niezbędne dla procesu biosyntezy kwasu cytrynowego.

Sterylną pożywkę melasową w objętości 500-600 dm<sup>3</sup> rozlewa się za pomocą odpowiednich urządzeń do tac, o wymiarach 2 m długości, 2,5 m szerokości i 0,16 m głębokości. Tace są sporządzone ze stali kwasoodpornej i są zamontowane na specjalnych stelażach, umieszczanych w komorach z regulacją temperatury i napowietrzania. Kiedy temperatura pożywki obniży się do wartości 40°C, szczepi ją konidiami pleśni zmieszanyymi z węglem aktywnym jako nośnikiem. Po 24 godzinnej inkubacji pojawia się widoczna cienka grzybnia, której intensywny wzrost trwa do 48-72 godzin, po czym słabnie na korzyść produkcji kwasu cytrynowego. Dojrzała grzybnia osiąga grubość 2-3 cm, jej warstwa dolna stykająca się z podłożem jest odpowiedzialna za syntezę kwasu cytrynowego. Czas trwania procesu wynosi 168-216 godz. w temp. 30°C, zapewniając wydajność kwasu cytrynowego na poziomie 70-80% w stosunku do początkowej ilości cukru w pożywce. W tym procesie obok kwasu cytrynowego, stanowiącego około 80% zawartości wszystkich kwasów, do podłoża wydzielany jest kwas szczawiowy i kwas glukonowy oraz w śladowych ilościach kwas z cyklu Krebsa.

Źródłem zanieczyszczeń mikrobiologicznych w powierzchniowej metodzie otrzymywania kwasu cytrynowego jest przede wszystkim melasa buraczana. W surowcu tym występują głównie bakterie z rodzaju *Bacillus*, *Pseudomonas*, a także *Escherichia coli* i *Enterobacter aerogenes*. Źródłem tych ostatnich bakterii oprócz melasy może być także woda stosowana w procesie technologicznym, jeśli nie spełnia wymagań określonych normą. Wszystkie drobnoustroje występujące jako zanieczyszczenia są zdolne do redukcji azotanów (V) do azotanów (III), które działają hamująco na rozwój grzybni. Badania wykazały, że w podłożu melasowym, po niewłaściwie przeprowadzonej sterylizacji, mogą pozostać żywe bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Leuconostoc*, wywierające antagoniczny wpływ na rozwój grzybni *Aspergillus niger*. Spośród pleśni najczęstszym zanieczyszczeniem jest *Penicillium purpurogenum* i *Penicillium rubrum*. W procesie technologicznym konidia tych pleśni dostają się z powietrzem stosowanym do przewietrzania komór, a także wraz ze szczepionką konidiów *Aspergillus niger* podczas jej rozpylania na powierzchnie pożywki. Pleśnie te są bogate w enzymy hydrolityczne, dzięki którym rozwijają się na grzybni *Aspergillus niger*, powodując jej lizę. Aby uniknąć skutków zanieczyszczeń mikrobiologicznych, należy stosować aktywną szczepionkę grzybni *Aspergillus niger*, szybko opanowująca środowisko i obniżającą wartość pH do poziomu hamującego rozwój mikroflory bakteryjnej. Podobnie jak w każdym procesie biotechnologicznym musi być zapewniona wysoka czystość aparatury i komór fermentacyjnych oraz powietrza do ich przewietrzania, ponieważ w przeciwnym razie te środowiska stać się mogą źródłem zanieczyszczenia różną mikroflora, zakłócająca proces produkcji kwasu cytrynowego.

#### Metoda wglębna (wydajność procesu 80-90%)

Wglębna metoda biosyntezy kwasu cytrynowego w skali przemysłowej prowadzona jest w bioreaktorach o pojemności od 50 do 100 m<sup>3</sup> z użyciem surowców o wyższym stopniu czystości niż w metodzie powierzchniowej, tj. cukru handlowego (sacharoza), soków cukrowych, maczek cukrowych, hydrolizatów skrobiowych. Rzadziej do tego celu wykorzystywana jest melasa buraczana, ponieważ proces wglębny z jej użyciem nie zapewnia odpowiedniej wydajności kwasu cytrynowego. W przypadku stosowania pożywki mineralnej, w której źródłem węgla jest handlowa sacharoza, wydajność biosyntezy kwasu cytrynowego wynosi ponad 80%. W zależności od specyfiki szczepu *Aspergillus niger* pożywkę w bioreaktorze szczepi się zawieszoną konidiami, po ich wcześniejszej 6-8 godzinnej inkubacji lub zawieszoną grzybnia inokulacyjnej otrzymanej po 24-36 godzinach hodowli, stosując 10% w stosunku do objętości pożywki w bioreaktorze. W metodzie hodowli wglębnej, w wyniku ciągłego mieszania, grzybnia rozwija się w całej objętości podłoża. Po 48 godzinach rozpoczyna się faza produkcji kwasu cytrynowego. Czas trwania procesu biosyntezy, do momentu wyczerpania źródła węgla, wynosi od 120 do 168 godzin w temperaturze 30-32°C i przy napowietrzaniu jałowym powietrzem. Zaletą tej metody w porównaniu z metodą powierzchniową z użyciem melasy, jest krótszy czas trwania procesu, mniejsze zagrożenie rozwojem obcej mikroflory z uwagi

na niską wartość pH i zamknięte bioreaktory oraz możliwość wydzielania kwasu cytrynowego z pożywki na drodze krystalizacji, a także na mniejsze obciążenie ściekami. Otrzymywanie kwasu cytrynowego metodą hodowli wglębnej stwarza jednak wiele trudności natury bioinżynierskiej, które wynikają ze specyficznej morfologii grzybni w tych warunkach. Ciągły ruch cieczy

## PRODUKCJA KWASU CYTRYNOWEGO

wywołany mieszaniem i napowietrzaniem powoduje, że grzybnia w bioreaktorze występuje w postaci kłębków (pellets) o średnicy 0,2-3,0 mm bądź strzępek grzybni o różnym stopniu rozgałęzienia lub też jako mieszanina obu form morfologicznych. Taki wzrost grzybni, a także gęstość zawiesiny wynosząca do 50 kg s.m./m<sup>3</sup> powodują, że środowisko hodowlane osiąga wysoka lepkość. W tak niekorzystnych reologicznie warunkach utrudniona staje się wymiana masy, a także dyfuzja tlenu do podłoża oraz do komórek grzybni.

### Metoda na pożywkach stałych (wydajność procesu 20%)

Metoda ta najpowszechniej rozwinęła się w Japonii. Surowcem w tej metodzie mogą być odpady przemysłu ziemniaczanego i młynarskiego np. otręby, a także wycieki z trzciny cukrowej, wadliwa melasa buraczana czy trzcinowa, która z uwagi na niewłaściwy skład, nie mogła być wykorzystana w pozostałych metodach. Proces fermentacji prowadzi się w fermentorach tacowych (wilgotność podłoża 65-70%) w napowietrzonych komorach przez ok. 90 godz. Kwas wydziela się z podłoża poprzez ekstrakcję wodą. Metoda ta ma znaczenie marginalne, chociaż budzi też duże nadzieje ze względu na znacznie niższe obciążenie produkcji ściekami oraz wyższą tolerancję *A. niger* na obecność jonów metali i mikroelementów.

### **Wydzielanie kwasu cytrynowego z podłoża hodowlanego**

Wydzielanie kwasu cytrynowego odbywa się tzw. metodą cytrynianową. Polega ona na wytrącaniu na gorąco cytrynianu wapnia, traktując roztwór pofermentacyjny wodorotlenkiem wapnia. Wytworzony osad cytrynianu wapnia [Ca<sub>3</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>] po oddzieleniu od masy reakcyjnej zadaje się roztworem H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, w celu otrzymania kwasu cytrynowego w postaci wolnej. Wytracony gips oddziela się przez filtrację, roztwór zaś zagęszcza i wydziela czysty produkt przez krystalizację. Handlowy kwas cytrynowy wyodrębniony tą metodą jest związany z jedną cząsteczką wody (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·xH<sub>2</sub>O). Metoda cytrynianowa jest bardzo uciążliwa dla przemysłowej produkcji kwasu cytrynowego, z uwagi na duże zużycie kwasu siarkowego, wodorotlenku wapnia, a także wytwarzanie w tym procesie nadmiernych ilości gipsu.

W Instytucie Technologii Przemysłu Chemicznego i Spożywczego Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu została opracowana metoda wydzielania i oczyszczania kwasu cytrynowego tzw. metoda bezcitrynianowa. Może być ona wykorzystana tylko w tych przypadkach, w których do biosyntezy kwasu cytrynowego stosowane są substraty o wysokiej czystości, tj.: glukoza, skrobia, mączki cukrowe, a więc głównie we

wgłębnej hodowli *Aspergillus niger*. Metoda bezcitrynianowa polega na:

- dezaktywacji grzybni w temp. 70°C i oddzieleniu od roztworu hodowlanego,
- oczyszczeniu filtratu garbnikami i ziemią okrzemkową,
- odbarwieniu na kolumnie węglowej,
- zateżeniu w wyparce próżniowej do 72% zawartości kwasu cytrynowego,
- krystalizacji kwasu cytrynowego w temp. 7°C.

Wydajność krystalizacji kwasu cytrynowego wynosi około 50%. Odciek międzykrystaliczny po odbarwieniu węglem aktywnym oczyszcza się na jonitach (kationit i anionit). Proces oczyszczania jest tak prowadzony, aby oczyszczony odciek odpowiadał wymaganiom stawianym przez normę na spożywczy kwas cytrynowy w płynie. Poważnym problemem ekologicznym jest gips wytwarzany w procesie oczyszczania kwasu cytrynowego. Zagospodarowanie gipsu jako materiału budowlanego jest możliwe dopiero po odpowiednim oczyszczeniu. Roztwór hodowlany po oddzieleniu grzybni zawiera obok głównego metabolitu, jakim jest kwas cytrynowy, wiele cennych enzymów, głównie enzymy pektynolityczne, proteolityczne, a także glukanazy, co stwarza możliwość ich przemysłowego pozyskiwania. Ponadto źródłem wielu enzymów (proteinyazy, amylazy, pektynazy, oksydaza glukozy), które mogą być wydzielane dla celów handlowych, jest grzybnia *Aspergillus niger*. Wytwarzana w dużych ilościach w procesach biosyntezy kwasu cytrynowego może być także wykorzystana na cele paszowe, ponieważ zawiera ponad 40% białka w suchej masie, z czego połowa to białko dobrze przyswajalne. Ponadto zawiera liczne mikroelementy.

### **Biochemiczne uwarunkowania nadprodukcji kwasu cytrynowego u *Aspergillus niger***

Zarówno dzięki szczepu *A. niger*, jak i przede wszystkim mutagenizowane szczepy przemysłowe mają zdolność do nadprodukcji kwasu cytrynowego. Wynika to z:

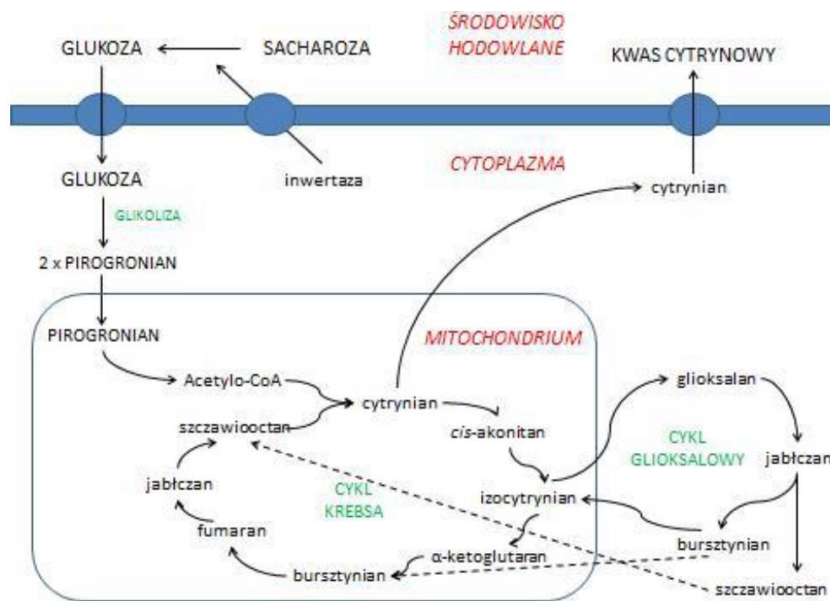
- naturalnej bądź indukowanej sztucznie niskiej aktywności określonych enzymów cyklu Krebsa,
- cyklu glioksalowego
- oraz tzw. alternatywnego szlaku oddechowego.

Łącznie nadprodukcja kwasu cytrynowego u *A. niger* jest więc uwarunkowana trzema mechanizmami biochemicznymi. Głównym substratem w nadprodukcji cytrynianu jest sacharoza, stąd pierwszym etapem biosyntezy jest jej hydroliza warunkowana wysoką aktywnością inwertazy. Enzym ten jest w większości wydzielany do podłoża produkcyjnego (ponad 60%). Produkty hydrolizy sacharozy – glukoza i fruktoza – są włączane następnie w szlak glikolityczny będący podstawowym źródłem prekursorów biosyntezy kwasu cytrynowego. Powstający pirogronian jest włączany do cyklu Krebsa. Kwas cytrynowy powstaje w wyniku kondensacji acetylo-CoA ze szczawiooctanem, jednak dalsze jego przekształcenia w cyklu Krebsa są hamowane w wyniku bardzo niskiej aktywności hydratazy akonitanowej (głównie poprzez regulację składu pożywki – odpowiednio niskie stężenie jonów Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>) katalizującej przekształcenie cytrynianu w izocytrynian. Powstający w tych warunkach nadmiar cytrynianu jest usuwany poza komórki do środowiska hodowlanego, dzięki czemu nie występuje sprzężenie zwrotne hamujące tempo glikolizy. Kolejne dwa enzymy cyklu Krebsa również mają obniżoną aktywność. Są to dehydrogenaza izocytrynianowa (hamowana przez niskie pH środowiska oraz gromadzący się w mitochondriach cytrynian) i dehydrogenaza α-ketoglutaranu.

**PRODUKCJA KWASU CYTRYNOWEGO**

Drugim mechanizmem warunkującym nadprodukcję jest współwystępujący cykl glioksalowy, w którym izocytrynian jest przekształcany w szczawiooctan wzbogacający pulę tego związku w pierwszej, kluczowej reakcji cyklu Krebsa i jednocześnie biosyntezy kwasu cytrynowego. Kluczowym enzymem szlaku glioksalowego, o wysokiej aktywności u *A. niger*, jest liaza izocytrynianowa.

Ostatnim mechanizmem warunkującym nadprodukcję kwasu cytrynowego u *A. niger* jest występowanie alternatywnego łańcucha oddechowego w mitochondrium. Kluczowym jego elementem jest tzw. alternatywna oksydaza AOX (*alternative oxidase*). Jej działanie umożliwia transport elektronów na tlen w sposób bezpośredni, czyli bez udziału układu cytochromów w błonie mitochondrialnej. Znaczenie alternatywnej oksydacji polega na zużyciu gromadzącego się NADH z glikolizy (restytucja NAD<sup>+</sup>), dzięki czemu nie dochodzi do hamowania zwrotnego tego szlaku – jest to główny czynnik aktywujący AOX. Alternatywna oksydacja jest szlakiem mniej wydajnym energetycznie (mniejsza produkcja ATP o około 60%); znaczna część energii jest uwalniana w postaci ciepła. Podobny mechanizm alternatywnego oddychania opisano u innych grzybów (np. u *Neurospora crassa*) – występuje on zwykle w czasie przechodzenia hodowli w etap stacjonarny po fazie logarytmicznego wzrostu. Warunkiem aktywacji AOX jest intensywne natlenianie środowiska. Nawet krótkotrwały niedobór tlenu w środowisku może zahamować aktywność AOX i pobudzić procesy proliferacji grzybni przy jednoczesnym zahamowaniu biosyntezy kwasu cytrynowego. Dodatkowym czynnikiem aktywującym AOX jest niedobór jonów Cu<sup>2+</sup> niezbędnych do prawidłowej aktywności oksydazy cytochromowej – spadek jej aktywności prowadzi do aktywacji AOX.

**Wykonanie ćwiczenia (cz. 1)****1. Przygotowanie podłoża****1.1. Podłoże inokulacyjne**

W kolbie o pojemności 250-300 cm<sup>3</sup> przygotować 50 cm<sup>3</sup> podłoża inokulacyjnego zawierającego:

- glicerol - 2,5 g
- glukoza – 2,5 g
- ekstrakt drożdżowy – 0,15 g
- ekstrakt słodowy – 0,15 g
- bactopecton - 0,25 g

Doprowadzić pH do wartości 5,5. Podłoże przygotować do sterylizacji w autoklawie.

**1.2. Podłoże produkcyjne**

W kolbie 250-300 cm<sup>3</sup> przygotować 100 cm<sup>3</sup> podłoża produkcyjnego o składzie:

- glicerol – 10,0 g
- NH<sub>4</sub>Cl – 0,3 g
- MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,1 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,2 g
- ekstrakt drożdżowy – 0,1 g

Doprowadzić pH do wartości 5,5. Podłoże przygotować do sterylizacji w autoklawie.

**2. Posiew *Candida lipolytica***

Wyjałowione podłoże inokulacyjne zaszczerpić hodowlą drożdży *C. lipolytica*. Hodowle prowadzić na wytrząsarce rotacyjnej, w warunkach tlenowych w temperaturze 30°C.

Wyjałowione podłoże produkcyjne zaszczerpić 5 ml zawiesiny komórek drożdży namnożonych w hodowli inokulacyjnej. Hodowle prowadzić na wytrząsarce rotacyjnej, w warunkach tlenowych w temperaturze 30°C.

## PRODUKCJA KWASU CYTRYNOWEGO

### Wykonanie ćwiczenia (cz. 2)

#### 3. Oznaczanie kwasowości ogólnej

Kwasowość ogólna jest to suma wszystkich kwasów organicznych, jakie tworzą się podczas fermentacji cytrynowej, wśród których najwięcej powstaje kwasu cytrynowego (ponad 90%), reszta to głównie kwas szczawiowy i glukonowy.

##### Wykonanie:

Pobrać 20ml płynu pochodzącego z hodowli produkcyjnej i przefiltrować w zestawie do filtracji próżniowej używając sączków celulozowych o rozmiarach porów 0,45  $\mu\text{m}$ . Następnie 2ml filtratu przenieść do kolby stożkowej o pojemności 50  $\text{cm}^3$ . Dodać 20ml wody destylowanej i miareczkować 0,1 N NaOH wobec fenoloftaleiny (3-4 krople) do pierwszego trwałego różowego zabarwienia.

Wynik podać w  $\text{cm}^3$  0,1 N NaOH/100  $\text{cm}^3$  pożywki.

Aktywna kultura powinna wykazywać kwasowość ogólną odpowiadającą 30 – 40  $\text{cm}^3$  0,1 N NaOH na 2ml roztworu (wymagania normatywne mieszczą się w granicach 20 – 25  $\text{cm}^3$  0,1 N NaOH na 2  $\text{cm}^3$  roztworu).

Wyliczyć ilość wytworzonego kwasu cytrynowego wiedząc, że 1  $\text{cm}^3$  0,1 N NaOH odpowiada 7 mg kwasu cytrynowego jednowodnego lub 6,4 mg bezwodnego.

#### 4. Opracowanie wyników

Wyniki pomiarów przestawić w formie sprawozdania Wyciągnąć wnioski z uzyskanych wyników.

#### 5. Literatura

- Kowal K., Libudzisz Z.; Mikrobiologia techniczna; Wyd. Politechniki Łódzkiej; 2000
- Kunicki-Goldfinger W.; Życie bakterii; Wyd. PWN; Warszawa; 1998
- Schlegel H.; Mikrobiologia ogólna; Wyd. PWN; Warszawa; 2000