

# Uvod u biotehnologiju

Prof. dr. sc. Anita Slavica

što je **bioproces**, biokatalizator i bioreaktor?

Bioprocese koje koriste enzime kao biokatalizatore nazivamo enzimskim procesima (engl. *enzyme processes*).

Bioprocese koje koriste mikrobne stanice kao biokatalizatore nazivamo mikrobnim procesima (engl. *microbial processes*).

Bioprocese koje koriste biljne ili životinjske stanice kao biokatalizatore nazivamo procesima u kulturi stanica (engl. *cell culture processes*).

## što je bioproces, **biokatalizator** i bioreaktor?



engl. *substrate*

sirovina, engl. *raw material*

engl. *product*

**biokatalizatori** (engl. *biocatalysts*) mogu biti:

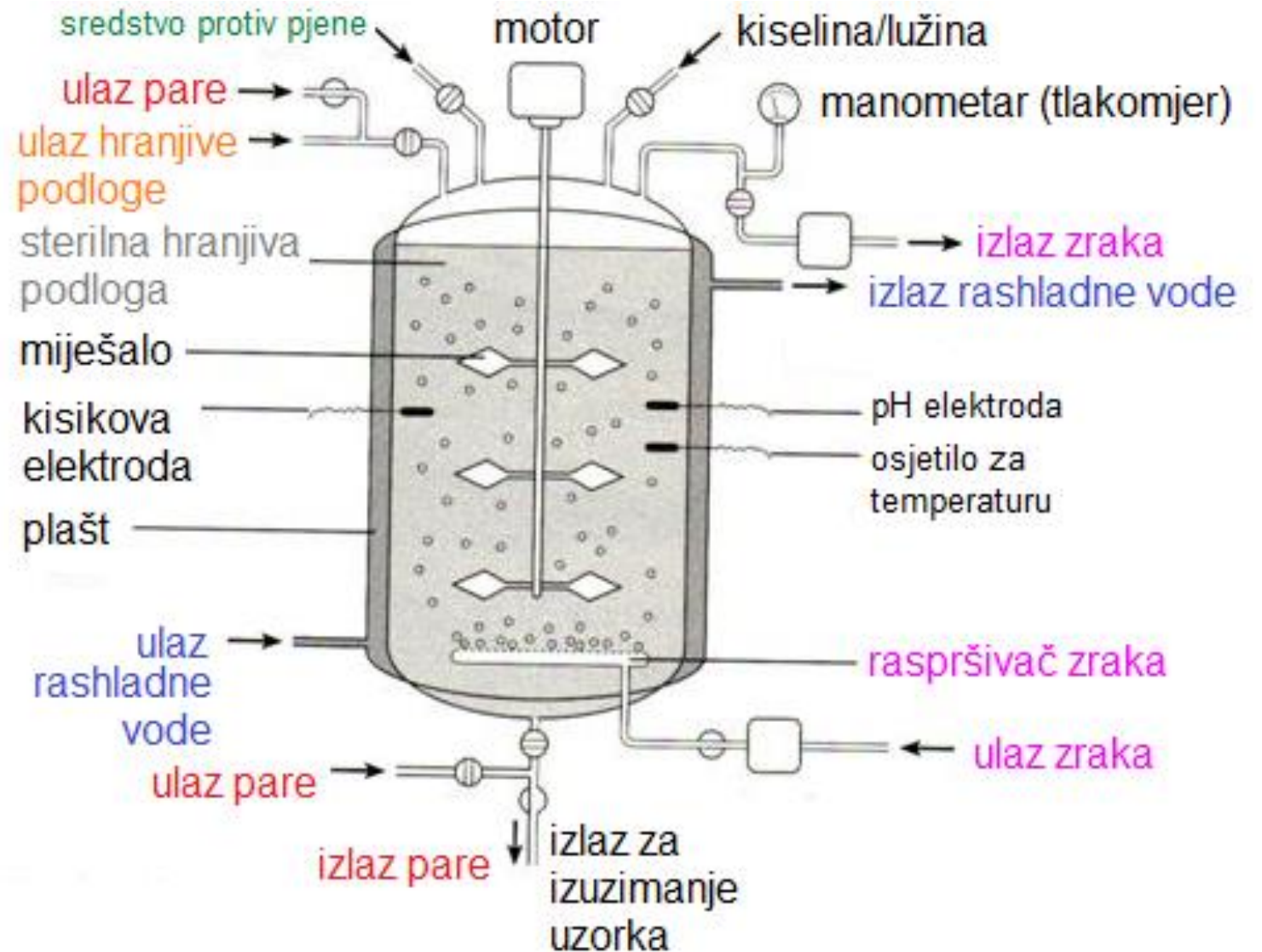
- (mikro)organizmi (mikrobne stanice: bakterije, kvasci, plijesni, alge)
- biljne i životinjske stanice, tkiva
- enzimi, organele, membrane
- „umjetni enzimi, organele i (mikro)organizmi”

# što je bioproces, biokatalizator i **bioreaktor**?

## bioreaktor s miješalom

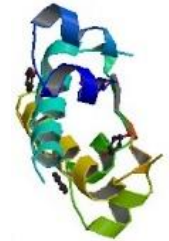
engl. *stirred tank bioreactor*

- shematski prikaz

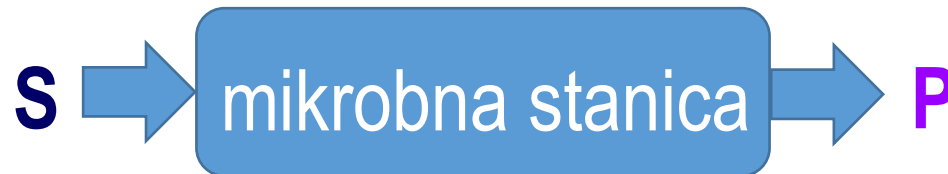


## tri mjerila bioprocesa - bioreaktor - domaća zadaća (1)

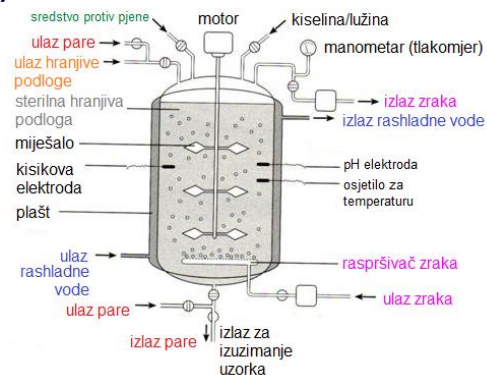
enzim (red veličine: nm, jedna enzimaska reakcija) - enzimski bioproces



mikrobna stanica (red veličine:  $\mu\text{m}$ , tisuće enzimskih reakcija) - mikrobnii proces



bioreaktor (red veličine: mikroreaktori - tisuće  $\text{m}^3$ , do  $10^{11}$  stanica u jednom mililitru)



## tri mjerila bioprocesa - bioreaktor - domaća zadaća (2)

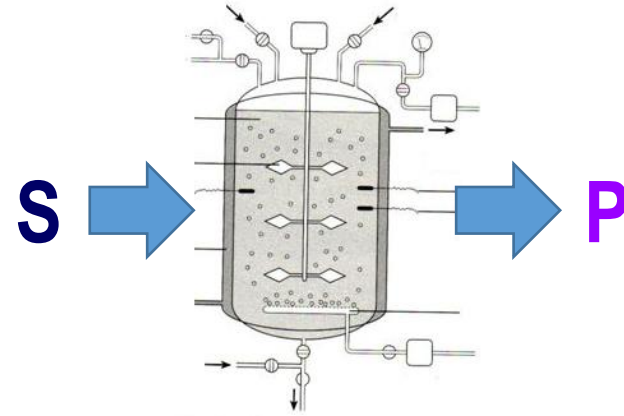
volumen bioreaktora -  $V = 100 \text{ m}^3$

volumen hranjive podloge -  $V_K = 70 \text{ m}^3$

koncentracija stanica -  $N = 1 \cdot 10^{11} \text{ stanica/mL}$

broj stanica u  $V_K = ?$

## procesi prije bioreaktora, bioproces i procesi poslije bioreaktora (1)



Bioprocesu prethode  
**procesi pripreme**,  
tzv.  
**procesi prije bioreaktora**  
(engl. *upstream processing*).

bioproces  
u  
bioreaktoru

Nakon bioprocesa slijede  
**procesi izdvajanja (izolacije) i**  
**pročišćavanja (purifikacije) proizvoda**,  
tzv. **procesi nakon bioreaktora**  
(engl. *downstream processing*).

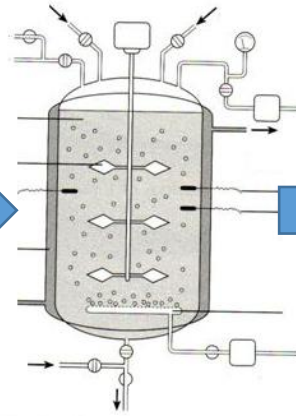
## procesi prije bioreaktora, bioproces i procesi poslije bioreaktora (2)

### *upstream processing*

priprema hranjive podloge  
(engl. medium)

priprema biokatalizatora  
enzima  
cjepiva (inokuluma)

**S**



bioproces  
u  
bioreaktoru

**P**

### *downstream processing*

izdvajanje biokatalizatora

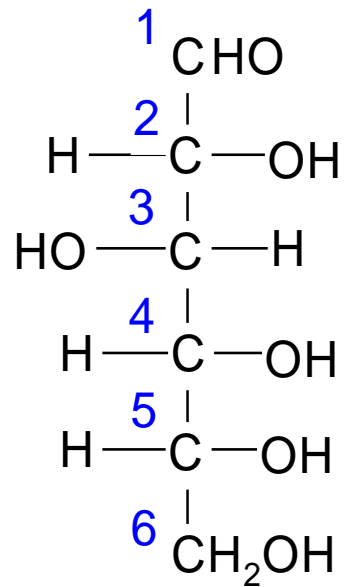
izdvajanje proizvoda  
pročišćavanje proizvoda



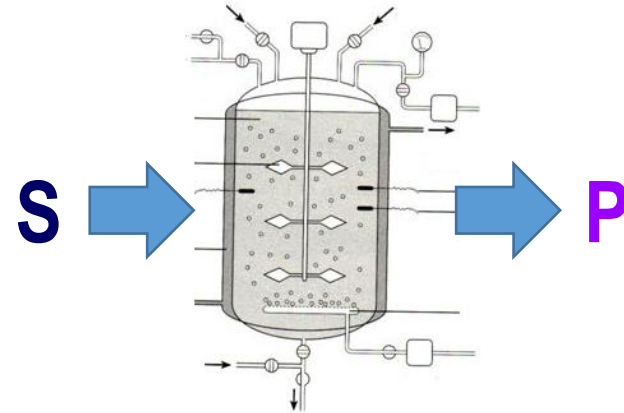
## domaća zadaća (3)

1. Definirajte pojam biotehnologija.
2. Koja su četiri glavna područja primjene biotehnologije?
3. Čime se bavi crvena/zelena/bijela/plava biotehnologija?
4. Definirajte pojam bioproces.
5. Definirajte pojam biokatalizator.
6. Što je to enzimski proces/mikrobni proces/proces u kulturi stanica.
7. Definirajte pojam bioreaktor.
8. Shematski prikažite bioreaktor s miješalom i pobrojite njegove glavne dijelove.
9. Objasnite razliku između bioprocasa i fermentacije.
10. Pobrojite različite grupe biokatalizatora.
11. Shematski prikažite i opišite tri mjerila bioprocasa.
12. Definirajte pojam *upstream processing/downstream processing*.
13. Pobrojite postupke koji pripadaju u *upstream processing/downstream processing*.

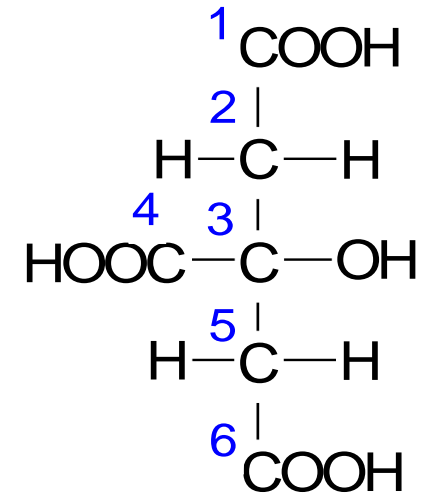
# primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (1)



D- glukoza



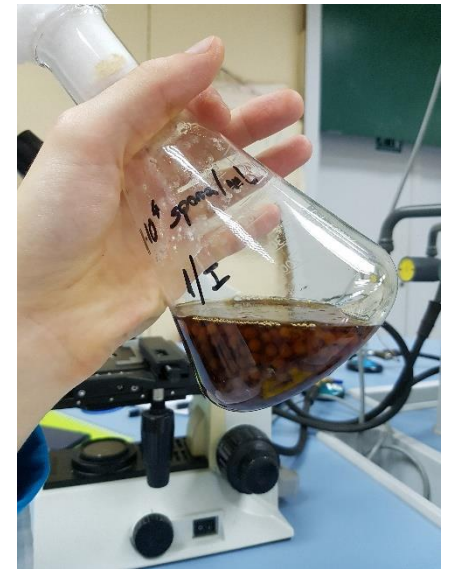
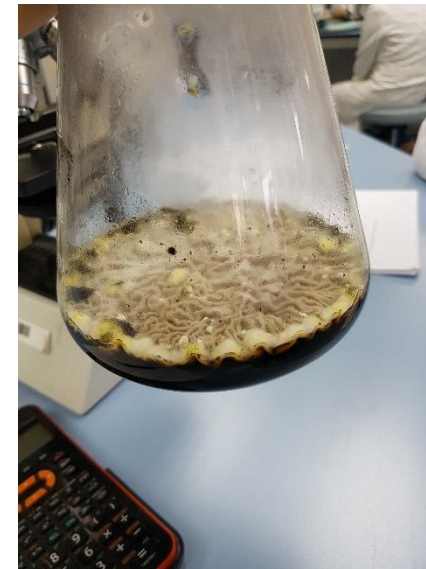
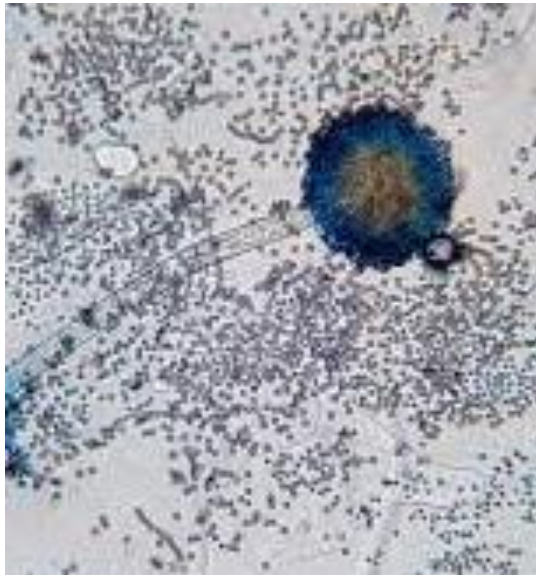
odabrani sojevi (varijeteti) plijesni *Aspergillus niger* u nizu biokemijskih reakcija transformiraju šećere hranjive podloge u **limunsku kiselinu**



limunska kiselina

## primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (2)

**biokatalizator** - plijesan *Aspergillus niger*  
(lat. *aspergillum* - škropilo, *niger* - crn)



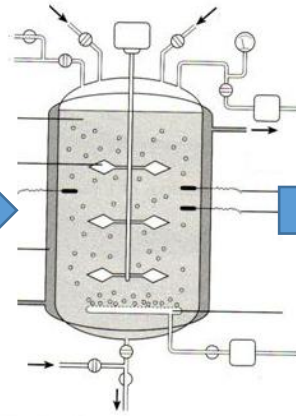
# procesi prije bioreaktora, bioproces i procesi poslije bioreaktora

## upstream processing

priprema hranjive podloge  
(engl. medium)

priprema biokatalizatora  
enzima  
cjepiva (inokuluma)

S



P

bioproces  
u  
bioreaktoru

## downstream processing

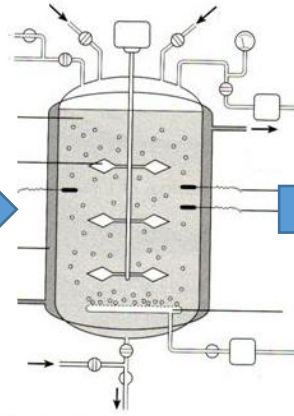
izdvajanje biokatalizatora

izdvajanje proizvoda  
pročišćavanje proizvoda

# procesi prije bioreaktora, bioproces i procesi poslije bioreaktora

priprema hranjive podloge  
(engl. medium)

**S** → **P**



bioproces  
u  
bioreaktoru

## primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (3)

hranjiva podloga (engl. *nutrient medium*)

je u pravilu tekućina koja sadrži sve hranjive tvari potrebne za rast i razmnožavanje biokatalizatora (radnog mikroorganizma), te za biokemijsku sintezu proizvoda mikrobnog procesa.

Osim tekućih postoje i čvrste hranjive podloge (rjeđe se koriste u industrijskom mjerilu).

Hranjive tvari moraju opskrbiti radni mikroorganizam (biokatalizator) svim biogenim elementima.

Biogeni elementi su: C, H, O, N, P, S, Mg, K te drugi metali u ionskom obliku koji su potrebni u malim količinama pa se nazivaju MIKROELEMENTI-ma.

## primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (4)

### Sastav hranjive podloge:

|  |  |
|--|--|
| voda   | do 100 tona (m <sup>3</sup> )<br>(1 tona vode = 1000 kg = 1000 L = 1000 dm <sup>3</sup> = 1 m <sup>3</sup> ) |
| saharoza   | 20 tona  |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                                | 250 kg   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                | 100 kg   |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                         | 25 kg  |
| K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> (kalijev hekascijanoferrat) | (ovisno o kvaliteti sirovina)  |

## primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (5)

hranjiva podloga (engl. *nutrient medium*)

Saharoza u ovom bioprocusu služi kao:

izvor (metaboličke) energije,

izvor ugljika za sintezu biomase,

izvor ugljika za sintezu proizvoda.

Umjesto saharoze u proizvodnji limunske kiseline često se koriste različite SIROVINE, kao što su melase šećerne repe (*sugar beet molasses*), melase šećerne trske (*sugar cane molasses*) ili glukozni sirup (*glucose syrup*).



## primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (6)

hranjiva podloga (engl. *nutrient medium*)

Melasa je šećerni sirup (50% šećera) tamne boje dobiven ugušćivanjem šećernog soka iz kojeg više nije moguće dobiti kristalni šećer.

Melasa šećerne repe sadrži pretežno saharozu.

Melasa šećerne trske sadrži pretežno invertni šećer (smjesu glukoze i fruktoze).

Glukozni sirup dobiva se hidrolizom škroba - nekad kiselinskom, a danas enzimskom hidrolizom pomoću termostabilne  $\alpha$ -amilaze i glukoamilaze.



## primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (7)

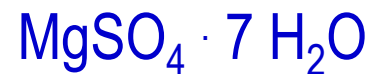
hranjiva podloga (engl. *nutrient medium*)



izvor dušika;



izvor fosfora i kalija;



izvor magnezija;

sulfatna kiselina

izvor sumpora, dodaje se u suvišku jer se koristi za zakiseljavanje na početku pripreme podloge;

ostali metalni ioni i mikroelementi

prisutni su u dovoljnoj količini kao onečišćenja u vodi i drugim sirovinama.

## primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (8)

hranjiva podloga (engl. *nutrient medium*) -  $K_4Fe(CN)_6$  (kalijev hekscijanoferrat)

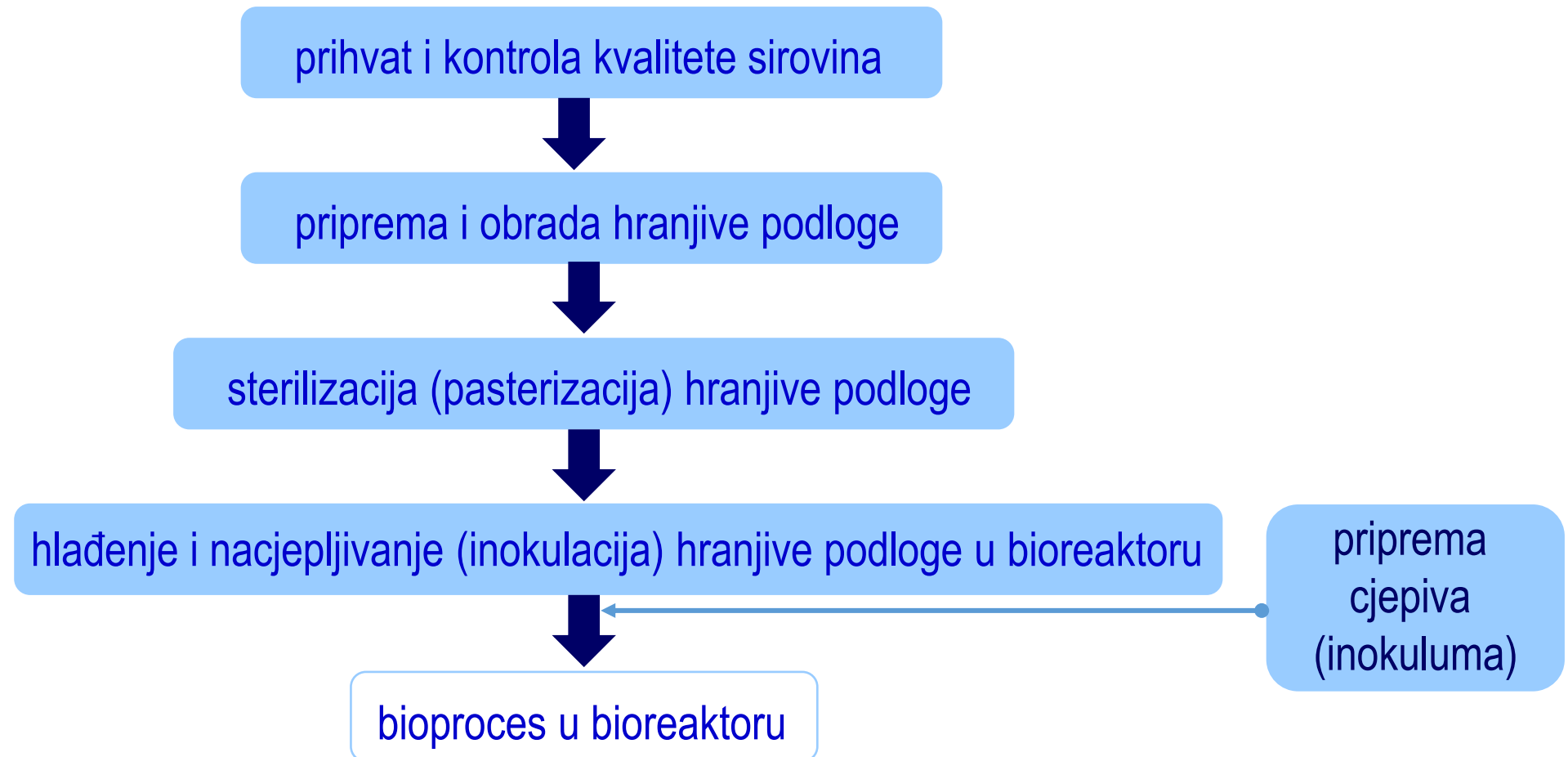
Proizvodnja limunske kiseline izrazito je osjetljiva na ione teških metala, naročito  $Fe^{3+}$  i  $Mn^{2+}$ .

Kalijev heksacijanoferrat (III) koristi se za uklanjanje ovih iona iz hranjive podloge i zato se dodaje u hranjivu podlogu u optimalnoj količini, koju je potrebno eksperimentalno odrediti.

Alternativa dodatku kalijeva heksacijanoferata je da se podloga obradi u jakom kationskom izmjenjivaču (kolona sa smolom koja veže katione i oslobađa protone).

## primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (9)

procesi prije bioreaktora (*upstream processing*):



## primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (10)

procesi prije bioreaktora (*upstream processing*):

Sve sirovine se kemijski i mikrobiološki analiziraju i uspoređuju sa zadanim kriterijima kvalitete sirovina.

Saharoza se otopi u vodi temperature 40°C. Ovako dobivena otopina saharoze se zakiseli sulfatnom kiselinom do pH 1,6-1,8 i obradi prolazom kroz jaki kationski izmjenjivač da se uklone nepoželjni ioni metala ( $\text{Fe}^{3+} < 200 \text{ mg/m}^3$ ,  $\text{Mn}^{2+} < 5 \text{ mg/m}^3$ ).

## primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (11)

### Temeljni principi mikrobnih procesa

Biokatalizator je mikrobnii soj koji je specifičan za određeni bioproces - tzv. RADNI MIKROORGANIZAM.

Da bi radni mikroorganizam mogao nesmetano obaviti svoj posao, potrebno je ukloniti i spriječiti rast drugih nepoželjnih mikroorganizama. Ove nepoželjne organizme nazivamo KONTAMINANTIMA.

Pojava kontaminanata u bioprocusu naziva se KONTAMINACIJA.