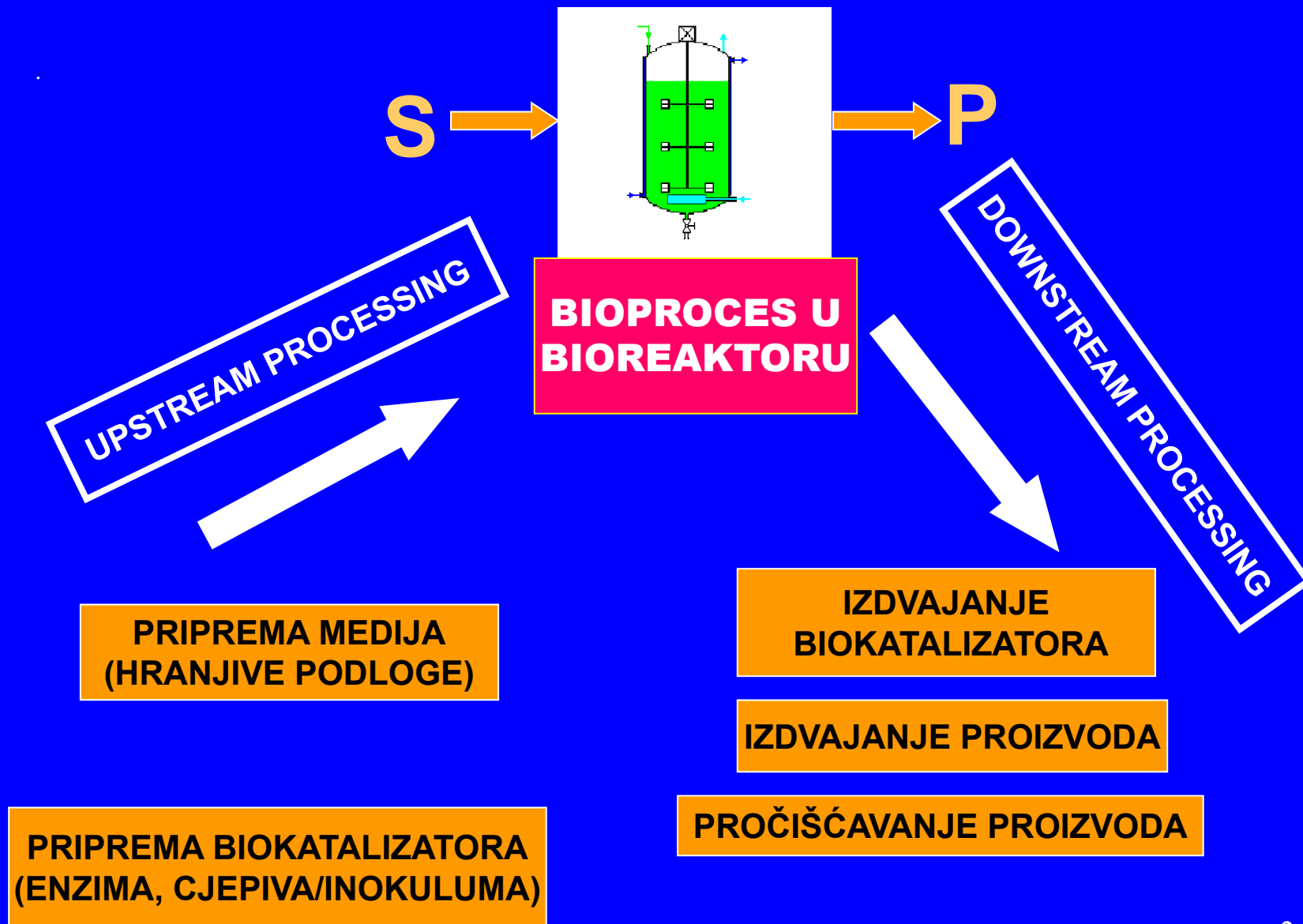


# **Biotehnologija 1**

## **3. i 4. predavanje**

# Što je bioproces?



# Što je bioproces?

(Nekoliko terminoloških napomena)

**BIOPROCESE KOJE KORISTE ENZIME KAO BOKATALIZATOR NAZIVAMO ENZIMSKIM PROCESIMA (eng. *enzyme processes*).**

**BIOPROCESE KOJE KORISTE MIKROORGANIZME KAO BOKATALIZATOR NAZIVAMO MIKROBNIM PROCESIMA (eng. *microbial processes*).**

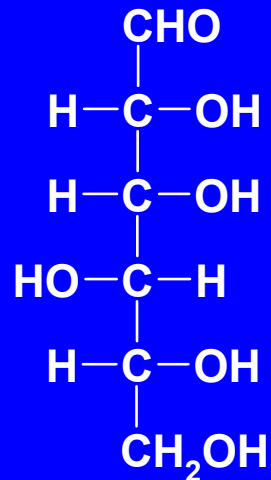
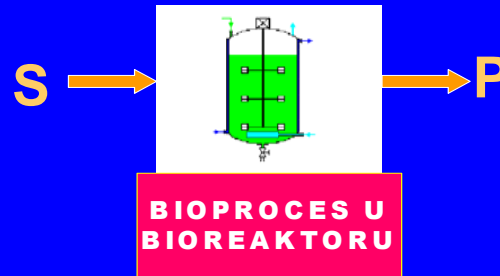
**BIOPROCESE KOJE KORISTE BILJNE ILI ŽIVOTINJSKE STANICE KAO BOKATALIZATOR NAZIVAMO PROCESIMA U KULTURI STANICA (eng. *cell culture processes*).**

Primjer mikrobnog bioprocasa:  
**Industrijska proizvodnja limunske kiseline**

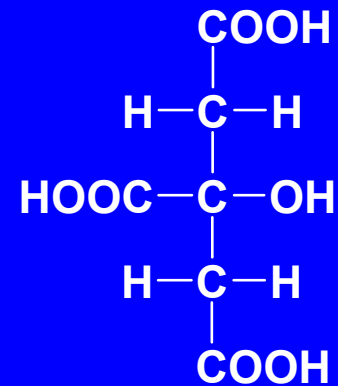
Princip:

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

Što je bioprocas?

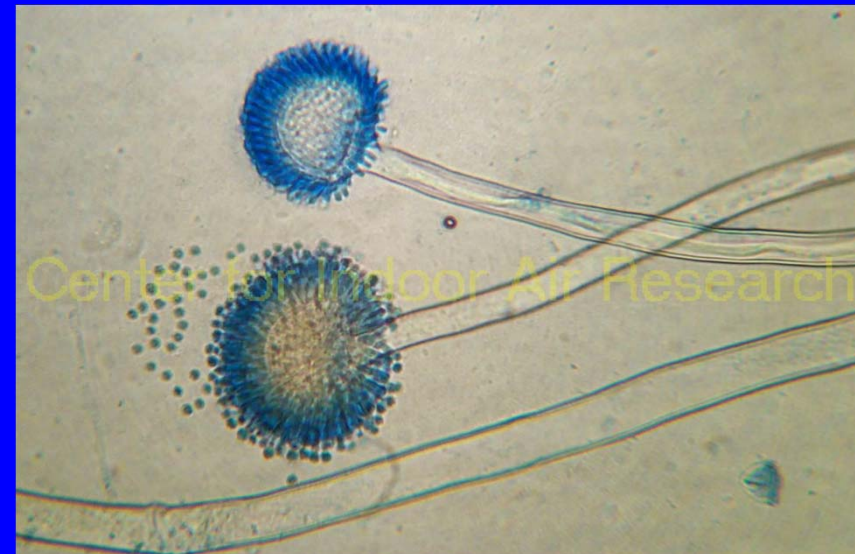


D-glukoza

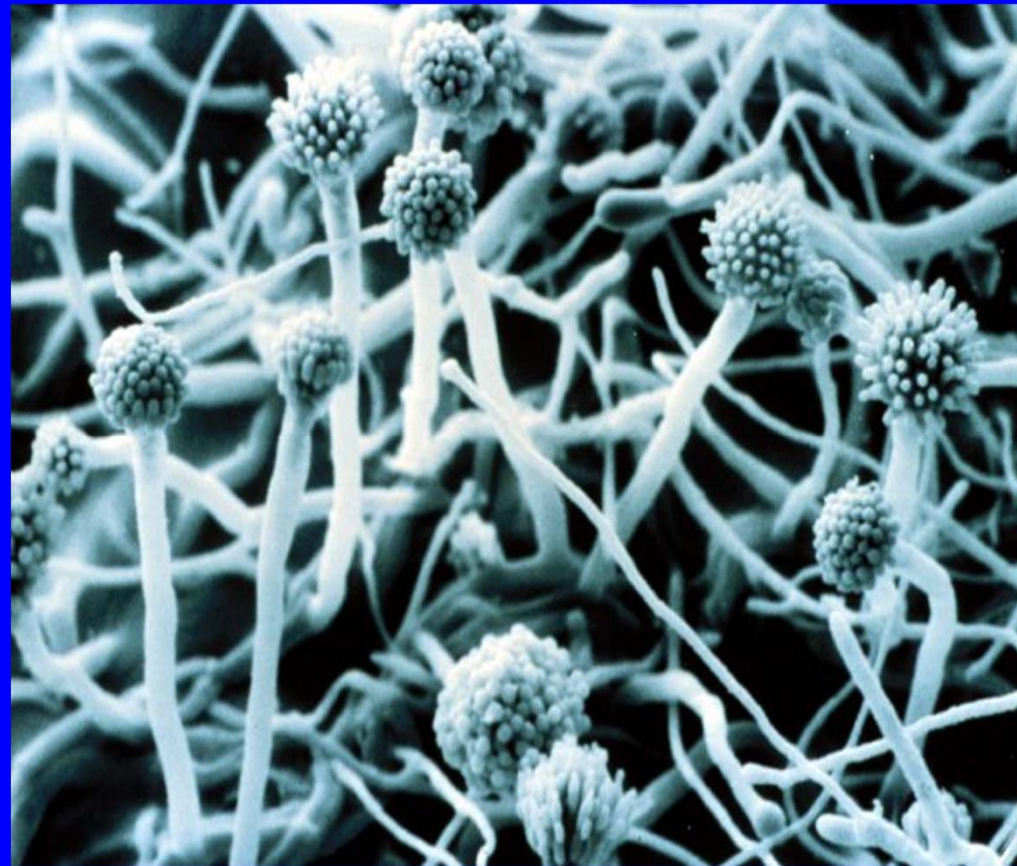
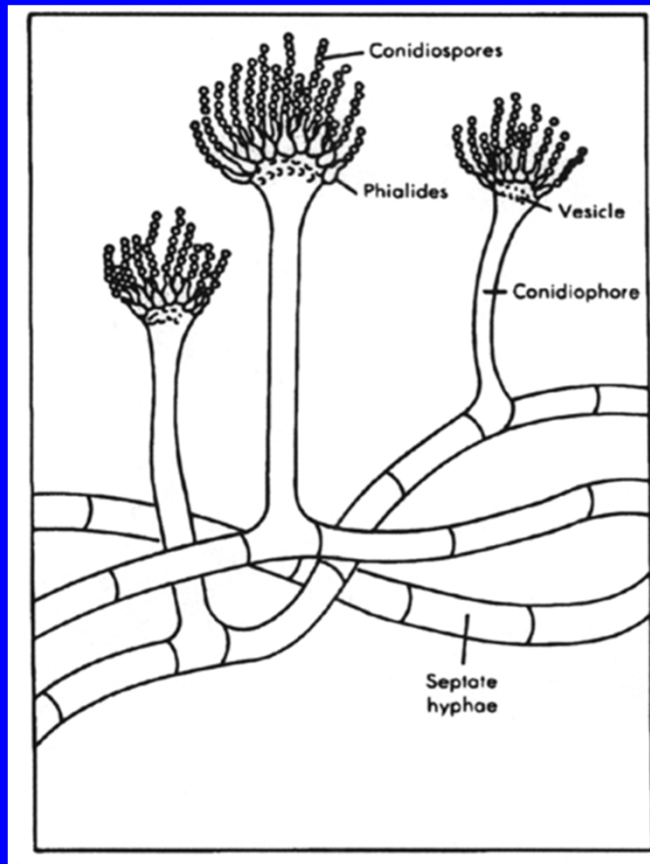


limunska  
kiselina

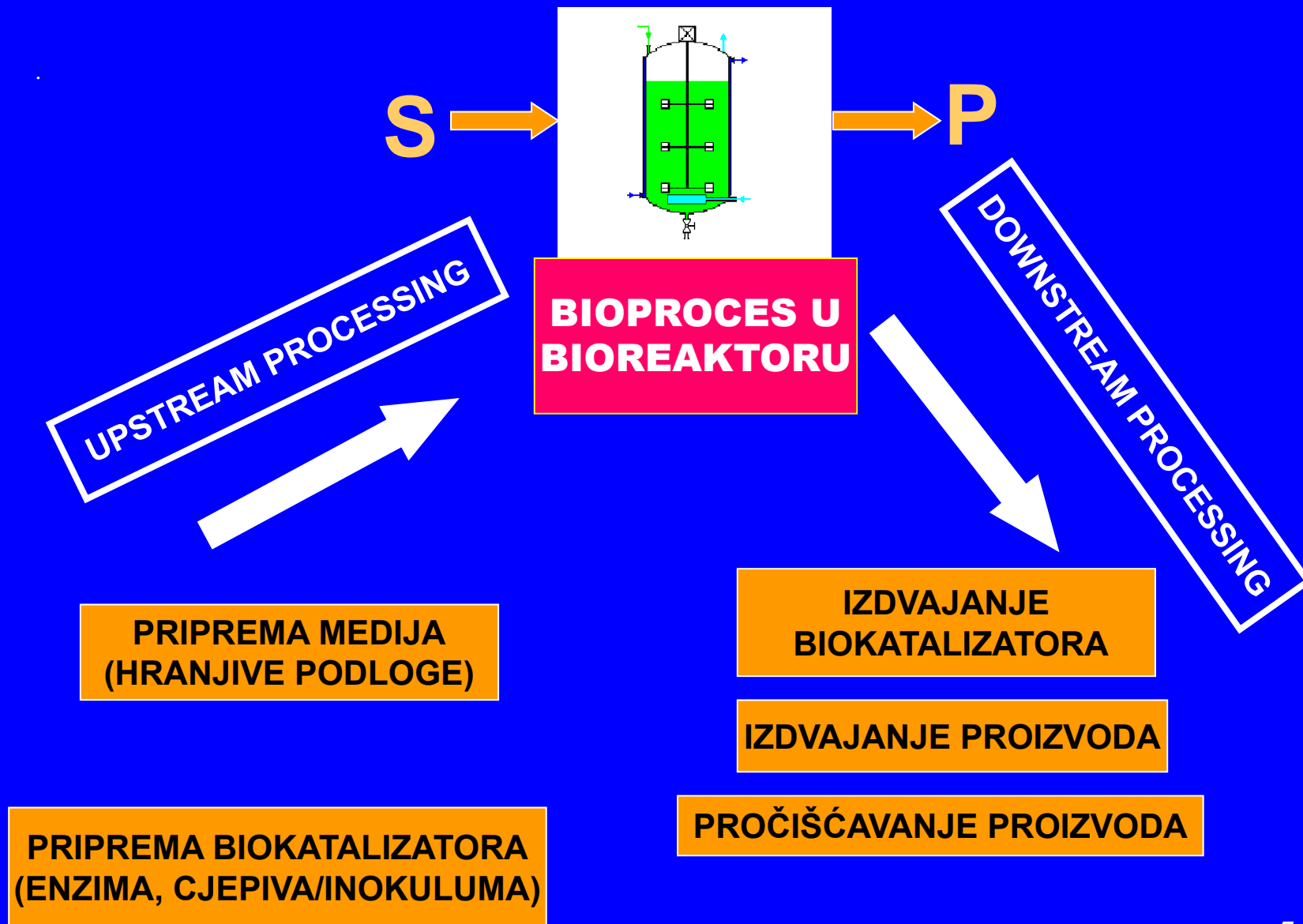
Bioproces: proizvodnja limunske kiseline  
*Aspergillus niger*  
(lat. *aspergillum* – škropilo, *niger* – crn)



Bioproces: proizvodnja limunske kiseline  
*Aspergillus niger*



# Što je bioproces?



Primjer bioprocesa:  
Industrijska proizvodnja limunske kiseline

Hranjiva podloga (engl. *nutrient medium*):

Voda	100 tona (m <sup>3</sup> )
(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> x 7 H <sub>2</sub> O	25 kg
Kalij hekscijanoferrat	ovisno o kvaliteti sirovina
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	



Primjer bioprocesa:  
Industrijska proizvodnja limunske kiseline  
Nešto o hranjivoj podlozi

- **Hranjiva podloga (eng. *nutrient medium*) je u pravilu tekućina koja sadrži sve hranjive tvari potrebne za rast i razmnožavanje radnog mikroorganizma, te za biokemijsku sintezu proizvoda mikrobnog procesa. Osim tekućih postoje i čvrste hranjive podloge ali se one rijetko koriste u industrijskom mjerilu.**
- **Hranjive tvari moraju opskrbiti radni mikroorganizam svim biogenim elementima. To su: C, H, O, N, P, S, Mg, K te drugi metali u ionskom obliku koji su potrebni u malim količinama pa se nazivaju MIKROELEMENTIMA.**

## Primjer bioprocesa:

Industrijska proizvodnja limunske kiseline

Nešto o hranjivoj podlozi

- **Saharoza u ovom bioprocesu služi kao:**
  - **izvor (metaboličke) energije,**
  - **izvor ugljika za sintezu biomase,**
  - **izvor ugljika za sintezu proizvoda.**
- Umjesto saharoze u proizvodnji limunske kiseline često se koristi **melasa šećerne repe** (*sugar beet molasses*) ili **melasa šećerne trske** (*sugar cane molasses*) ili **glukozni sirup** (*glucose syrup*).

## Primjer bioprocesa:

### Industrijska proizvodnja limunske kiseline

#### Nešto o hranjivoj podlozi

- **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 alfa-amilaze i glukoamilaze.)**

Primjer bioprocesa:  
Industrijska proizvodnja limunske kiseline  
Nešto o hranjivoj podlozi

- $\text{NH}_4\text{NO}_3$  se u ovom bioprocesu koristi kao izvor dušika.
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  je izvor fosfora i kalija.
- $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  je izvor magnezija.
- Izvor sumpora je sulfatna kiselina koja se dodaje 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 bioprocesa:

Industrijska proizvodnja limunske kiseline

Nešto o kalij heksacijanoferatu

- **Proizvodnja limunske kiseline izrazito je osjetljiva na ione teških metala, naročito  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$ .**
- **Zato se tradicionalno koristi kalij heksacijanoferat za uklanjanje navedenih iona iz hranjive podloge.**
- **Pored toga kalij heksacijanoferat još nedovoljno objašnjenim mehanizmom inhibira rast plijesni a stimulira proizvodnju limunske kiseline.**
- **Zato se kalij heksacijanoferat dodaje u optimalnoj količini koju je potrebno eksperimentalno odrediti.**
- **Alternativa je da se podloga obradi u jakom *kationskom izmjenjivaču* (kolona sa smolom koja veže katione i oslobađa protone).**

Primjer bioprocasa: proizvodnja limunske kiseline (upstream)

Procesi prije bioreaktora (*upstream processing*)

Prihvata i kontrola kvalitete sirovina

Priprema i obrada hranjive podloge

Sterilizacija (pasterizacija) hranjive podloge

Hlađenje i inokulacija hranjive podloge u bioreaktoru

Priprema  
cjepiva  
(inokuluma)

**BIOPROCES U BIOREAKTORU**

Bioproces: proizvodnja limunske kiseline (upstream)

- Sve sirovine se kemijski i mikrobiološki analiziraju i uspoređuju sa zadanim kriterijima kvalitete sirovina.
- Saharoza se otopi u vodi temperature 40 °C.
- Otopina saharoze se zakiseli sa sulfatnom kiselinom do pH 1,6 – 1,8 i obradi prolazom kroz jaki kationski izmjenjivač da se uklone nepoželjni ioni metala.
- Koncentracija **Fe<sup>3+</sup>** mora biti manja od 200 mg/m<sup>3</sup>, a **Mn<sup>2+</sup>** mora biti manja od 5 mg/m<sup>3</sup>.

Bioproces: proizvodnja limunske kiseline (upstream)

### **Temeljni princip mikrobnog procesa:**

- **Biokatalizator je mikrobnii soj koji je specijaliziran 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 KONTAMINANTI-ma.**
- **Pojava kontaminanata u bioprocesu naziva se KONTAMINACIJA.**



## Bioproces: proizvodnja limunske kiseline (upstream)

- **Protiv kontaminacije borimo se skupom aktivnosti, postupaka i procedura koje nazivamo ASEPTIČNE TEHNIKE RADA.**
- **Vođenje industrijskog procesa u sterilnim (aseptičnim) uvjetima je temeljna razlika u stručnosti kemijskog tehnologa i biotehnologa odn. procesnog (kemijskog) i bioprocenog (biokemijskog) inženjera.**
- **ASEPTIČNE TEHNIKE RADA obuhvaćaju: sterilizaciju ili pasterizaciju hranjive podloge i drugih otopina koje ulaze u bioproces, sterilizaciju i hermetizaciju bioreaktora i svih posuda i cjevovoda povezanih s bioreaktorom, sterilizaciju zraka, te sterilne (aseptične) manipulacije tijekom bioprocena (prebacivanje podloge, inokulacija, doziranje, uzimanje uzoraka, prepumpavanje itd.)**

Bioproces: proizvodnja limunske kiseline (upstream)

- **STERILIZACIJA** – POTPUNO UKLANJANJE SVIH OBLIKA ŽIVOTA U ODREĐENOJ SREDINI
- **PASTERIZACIJA** – DJELOMIČNO UKLANJANJE NEPOŽELJNIH MIKROORGANIZAMA.
- **HERMETIZACIJA** – POSTUPAK KOJIM SE ODREĐENI PROSTOR ILI POSUDA UČINI NEPROPUSNIM.

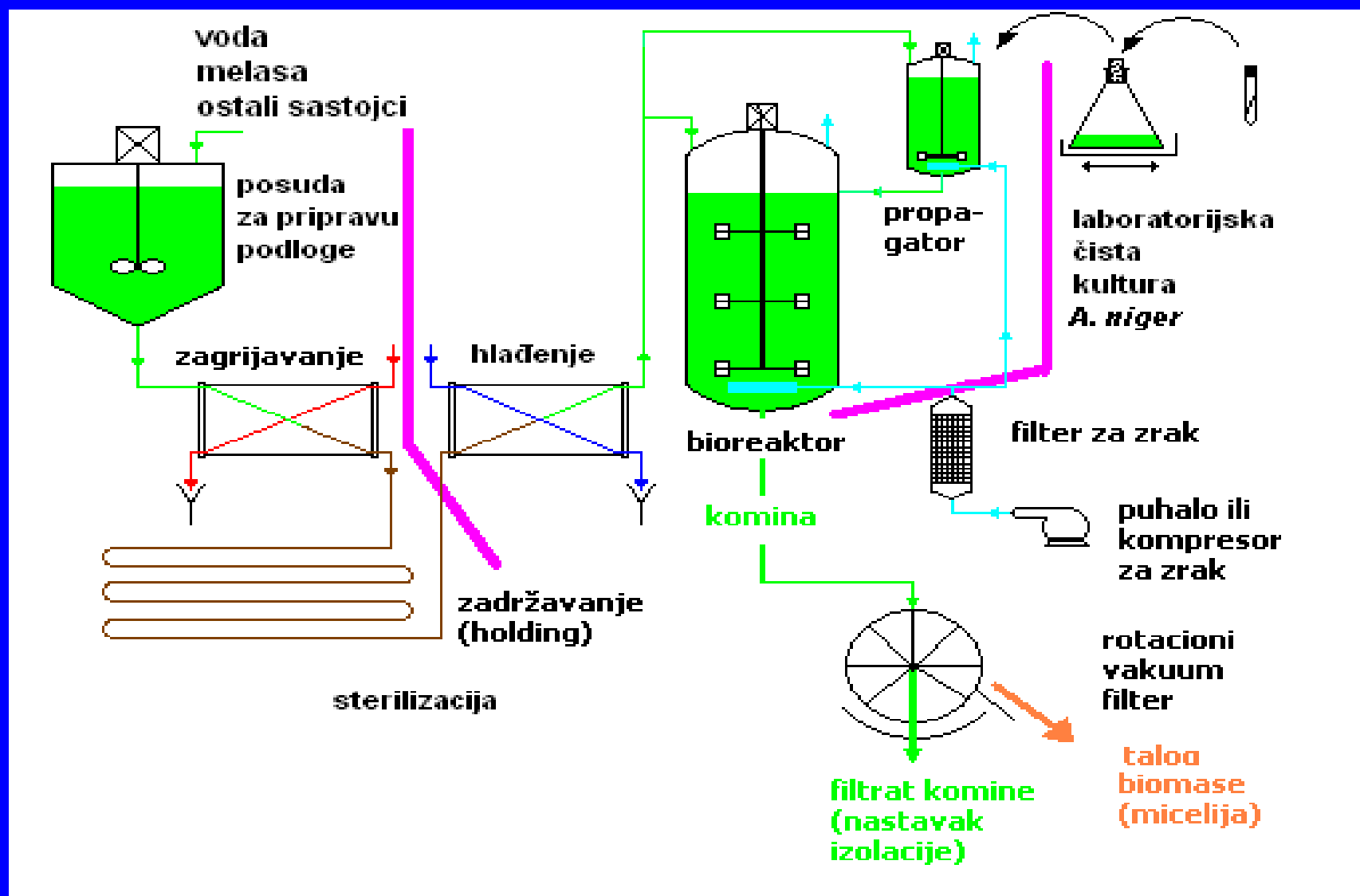
Bioproces: proizvodnja limunske kiseline (upstream)

- Sterilizacija/pasterizacija hranjive podloge mogu se obaviti u samom bioreaktoru (tzv. **šaržna sterilizacija**) ili u **kontinuiranom sterilizatoru** po principu **HTST** (High Temperature Short Time).
- **Šaržna sterilizacija** provodi se kuhanjem pod tlakom, obično pri **121 °C (1 bar pretlaka vodene pare)** kroz **20 - 40 minuta**, a pasterizacija na temperaturama u rasponu **60 - 100 °C** (pri atmosferskom tlaku).
- **Kontinuirana sterilizacija** po HTST principu obično se provodi na temperaturi **143 °C (3 bara pretlaka vodene pare)** kroz **1-3 minute**.
- Kontinuirani sterilizatori i pasterizatori najčešće se strojarski izvode kao sustav pločastih ili spiralnih izmjenjivača topline.

## Bioproces: proizvodnja limunske kiseline (upstream)

- Bioreaktor se pere a zatim **sterilizira** provođenjem vodene pare.
- Otopina saharoze se **pasterizira** zbog visoke koncentracije šećera što pogoduje termičkoj razgradnji šećera i nastajanju toksičnih spojeva koji nepovoljno (toksično) utječu na bioproces.
- Pasterizacija podloge je dovoljna jer je proizvodnja limunske kiseline zbog niske pH vrijednosti podloge ***prirodno zaštićeni bioproces (što znači da je manje podložan kontaminaciji).***
- Odvojeno se otope ostali sastojci podloge kao koncentrirane otopine a zatim se pasteriziraju ili steriliziraju.
- Sve otopine se se sterilnom manipulacijom prebacuju u prethodno sterilizirani bioreaktor.
- Temperatura se podešava na 30 °C, a pH na 3 - 5 (ovo su optimalni uvjeti za rast plijesni).

# Bioproces: proizvodnja limunske kiseline



# Što je bioproces?

