



BIOTEHNOLOGIJA 2

akademska godina
2016/17.



Hranjive podloge za mikrobnne procese

- **Kompleksne (prirodne)**
 - pripravljene od poljoprivrednih proizvoda i nusproizvoda
 - jeftine, no promjenjivog sastava
 - uporaba za proizvode velikih volumena



- **Kemijski definirane**
 - kao laboratorijske podloge
 - skupe, no točno poznatog sastava koji se ne mijenja
 - uporaba za skupe proizvode malih volumena





Kompleksne podloge

- **Prednosti:**

- jeftine
- faktori rasta su sastavni dio (čak i nepoznati)
- dobar prinos i volumetrijska produktivnost

- **Mane:**

- promjene u sastavu, kakvoći, dostupnosti, cijeni
- neželjeni sastojci: željezo ili bakar mogu biti letalni za stanični rast
- mogući problemi s prethodnom obradom i sterilizacijom
- problemi s izolacijom i pročišćavanjem proizvoda

- **Status:**

- bez obzira na mane, cijena i dobra svojstva čine ih podlogama za proizvodnju velikih volumena proizvoda niže vrijednosti
- češće uporabljane no kemijski definirane podloge



Definirane podloge

- **Prednosti:**
 - ujednačene sastavom i kakvoćom
 - ne izazivaju pjenjenje
 - jednostavna priprava (formulacija, sterilizacija)
 - olakšana izolacija i purifikacija proizvoda
 - **Mane:**
 - skupe
 - nužno je definirati i osigurati faktore rasta jer su prisutne samo mineralne soli
 - **Status:**
 - glavna primjena u proizvodnji s malim volumenima za dobivanje visokovrijednih proizvoda
- * Neke "definirane" podloge mogu sadržavati manje količine "nedefiniranih" sastojaka (npr. kvašćev ekstrakt) kao izvor faktora rasta



Vrste hranjivih podloga i njihova uporaba

Podloga	Uporaba
Selektivna	<ul style="list-style-type: none">- inhibicija rasta neželjenih m.o., rast poželjnih m.o.- kruta podloga za izolaciju pojedinih kolonija
Diferencijalna	<ul style="list-style-type: none">- omogućava rast više m.o. od interesa, kolonije morfološki različite- podloge sa specifičnim supstratima i indikatorima
Obogaćena	<ul style="list-style-type: none">- vrlo slična selektivnoj podlozi, ali pripravljena za povećanje broja željenih m.o.- dodatak faktora rasta
Reducirajuća	<ul style="list-style-type: none">- rast obligatnih anaeroba- sadrži reducirajuće agense (kemikalije) koji vežu molekularni O_2



Sastojci hranjivih podloga

- Hranjiva podloga: brojni sastojci jednostavne ili složene građe, otopljeni, suspendirani ili emulgirani u vodi
- Osnovni sastojci:
 - voda
 - izvori biogenih elemenata
 - mineralne soli (izvori ostalih kemijskih elemenata)
 - faktori rasta (vitamini, aminokiseline, i dr.)
 - prekursori i induktori
 - ostali sastojci (površinski aktivne tvari, emulgatori, regulatori pjene, antiseptici)



TEMELJNI SAS TOJCI HRANJIVIH PODLOGA ZA MKB UZGOJ

1. VODA

- važna za gotovo sve biokemijske reakcije u živoj stanici (90 % vode)
- otopljeni, suspendirani ili emulgirani sastojci lako se prenose do stanica
- metaboliti izlaze u vodu
- aerobni uvjeti - pogodan medij za otapanje kisika iz zraka i njegov prijenos do stanice
- dobar vodič topline - olakšano zagrijavanje ili hlađenje
- vodena aktivnost čiste vode ($a_v = 1,00$) smanjuje se povećanjem koncentracije otopljenih sastojaka
- za rast m.o. $a_v > 0,63$ (osim osmofilnih ili halofilnih m.o.)
- bakterije $a_v = 0,93 - 0,99$
- kvasci $a_v = 0,88 - 0,91$



2. BIOGENI ELEMENTI

- Kemijski elementi nužni za preživljavanje svakog organizma
- 6 glavnih elemenata: C, H, O, N, S i P
- 5 važnih elemenata: Na, K, Mg, Ca, Cl
- el. u tragovima: Mn, Fe, Co, Cu, Zn, I



2. BIOGENI ELEMENTI

- šest kemijskih elemenata (C, O, H, N, P i S)
- glavni sastojci mkb. stanica - proteini, nukleinske kiseline, ugljikohidrati i lipidi
- sastavni dio makromolekula sastavljenih od aminokiselina, šećera, masnih kiselina i fosfata

A. Ugljik

- udjel u s.tv. mkb. stanica najviši (do 50 %)
- najvažniji sastojak hranjivih podloga
- KEMOORGANOTROFI - rast ovisi o oksidaciji ili fermentaciji C-spojeva
-



B. Kisik

- izvori - oksidirani ugljikovi spojevi, voda, izvori drugih biogenih elemenata (N, P, S) s kisikom
- aerobni m.o. - nužan molekulski kisik - akceptor elektrona u respiratornom lancu
- potreba za kisikom - ovisna o m.o. (dužina respiratornog lanca) te vrsti i koncentraciji izvora C u kemijskoj podlozi
- molekulski kisik mora biti otopljen u vodi - aeracija (prozračivanje podloge)



C. Vodik

- u mkb. stanici potječe iz vode te izvora C i N
- važno paziti na koncentraciju vodikovih iona (10^{-8} - 10^{-5})
- veća koncentracija (10^{-2} - 10^{-3}) i preniska (10^{-9}) toksična ili smrtonosna
- inaktivacija enzima
- najčešće oko neutralnog ili blago kiselog pH područja (odstupanje: proizvodnja organskih kiselina)
- regulacija pH: dodatak pufera, nadzor i regulacija pH podloge



D. Dušik

- koncentracija vrlo promjenjiva: ovisno o udjelu proteina, nukleinskih kiselina, slobodnih aminokiselina i nekih vitamina
- u prirodnim spojevima u oksidativnom stanju od $+6$ (NO_3) do -3 (NH_4)
- m.o ne mogu asimilirati NO_3 - toksičan za većinu m.o., asimilacija kod mnogih algi, samo nekih bakterija i plijesni
- samo vrlo mali broj bakterija može vezati N iz zraka - u hranjivim podlogama u obliku amonijevih soli i organskih spojeva s dušikom



E. Fosfor

- u obliku fosfata u nukleotidima i nukleinskim kiselinama (RNA, DNA, ATP)
- važna uloga u metabolizmu - nezaobilazan sastojak svake podloge - puferi!

F. Sumpor

- najvažnije aminokiseline cistein i metionin (sadrže S u obliku tiola -SH skupina)
- vitamini (biotin, tiamin)



3. MINERALNE SOLI

- makrohranjiva - Mg^{2+} , Ca^{2+} - relativno visoke koncentracije (0,1 - 1 mM), u obliku anorganskih soli
- mikrohranjiva ili elementi u tragovima - Zn^{2+} , Mn^{2+} - vrlo male koncentracije (0,1 - 100 μM)
- hranjive soli - ako sadrže i neke od biogenih elemenata

VAŽNO!

- odrediti kritičnu koncentraciju mikrohranjiva - treba odrediti empirijski za svaki proces - učinak je teško predvidjeti
- poznati primjer: inhibicija proizvodnje limunske kiseline ionima Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} i Fe^{2+} prisutnih u melasi - uklanjanje dodatkom kalijevog ferocijanida ili EDTA (BT1, 3. predavanje)



4. FAKTORI RASTA

AUKSOTROFI - gubitak ili nemogućnost biosinteze potrebnog udjela važnih molekula (a.k., nukleotidi, vitamini) za gradnju staničnih sastojaka

- ovise o prisustvu jednog ili više specifičnih sastojaka podloge
- bitan faktor rasta - dodatak sastojka koji m.o uopće ne može sintetizirati
- pomoćni faktor rasta - dodatak sastojka koji m.o. sintetizira u nedovoljnoj količini za metabolizam

PROTOTROFI - mogu sintetizirati faktore rasta

- dodatkom faktora rasta omogućen ubrzani rast m.o. - važno u industrijama (biotin za proizvodnju L-lizina i glutaminske kiseline)



5. PREKURSORI I INDUKTORI

PREKURSORI

- sastojci koje m.o. ne troše za rast nego ih izravno ugrađuju u proizvode sekundarnog metabolizma

INDUKTORI - potiču biosintezu ekstracelularnih enzima

- dodatak samo ako je opravdano (antibiotici, vitamin B₁₂, neki enzimi)

6. OSTALI SASTOJCI

-površinski aktivne tvari, emulgatori, regulatori pjene, antiseptici, toksini



A. Površinski aktivne tvari

- emulgiranje netopljivih hranjivih sastojaka u vodi
- povoljno djeluju u složenim hranjivim podlogama kod proizvodnje antibiotika, enzima i cjepiva
- važno je pokusno odrediti najbolju koncentraciju

B. Čvrste, suspendirane čestice

- kod proizvodnje antibiotika - proces se odvija brže zbog povećanja viskoznosti podloga (dodatak agara)
- proizvodnja limunske kiseline - dodatak škroba ili agara omogućava stvaranje peleta ili kuglica



C. Sredstva protiv pjene

- protupjenila - kemijska sredstva koja suzbijaju pjenjenje izazvano aeracijom
- dodaju se u podlogu naknadno - nisu sastavni dio podloge
- ne smiju biti toksična niti inhibirati mkb. rast
- prema kemijskoj naravi:
 - alkoholi
 - esteri
 - masne kiseline
 - derivati masnih kiselina
 - silikoni
 - sulfiti i sulfonati
 - mješovita sredstva
- komercijalna sredstva - mješavina 1 ili više supstancija



D. Antiseptici

- rijetko se dodaju kemijskim podlogama
- iznimka: proizvodnja vina - dodatak SO_2 (plinoviti ili ukapljeni, sumporasta kiselina, kalijev metabisulfit)



Terminologija (“trofi”) u mikrobnom metabolizmu

Ugljik

Hetero- = organski

Auto- = anorganski

Izvor energije

kemo= kemijski

organo = organski

lito= anorganski

foto= sunčeva

e- akceptor

aerobni = kisik

anaerobni= bez O_2