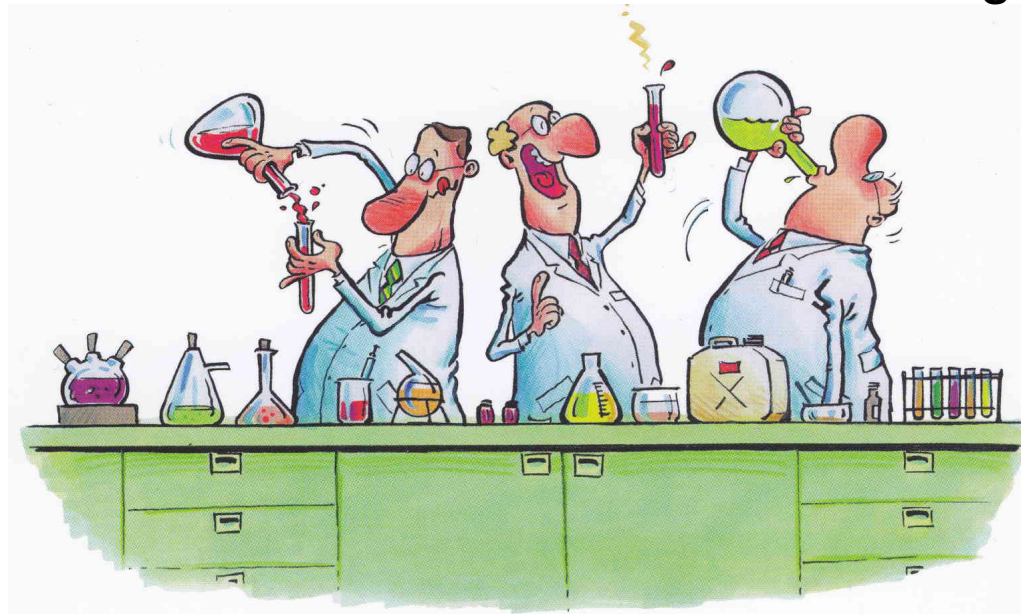


BIOTEHNOLOGIJA 2
akademska godina 2014/15.



ČUVANJE, NADZOR I OBRAĐA SIROVINA

Izv. prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac
vpetrav@pbf.hr

Sastav i kakvoća sirovina - jedan od najznačajnijih uzroka promjenjivosti produktivnosti i smanjenja prinosa biomase i metabolita.

Kako stabilizirati prinos proizvoda ?

- upotrebom homogeniziranih sirovina standardne kakvoće

Zamjena sirovina standardne kakvoće sa sirovinom nepoznate kakvoće može:

- izazvati ozbiljne poteškoće u mikrobnom procesu

- značajno smanjiti ekonomičnost postupka





1. PRIHVAT I ČUVANJE

Za svaku proizvodnu šaržu potrebna je **velika količina sirovina!**

PRIMJER:

korisni volumen biokemijskog reaktora $V_K = 100 \text{ m}^3$

→ za svaku proizvodnu šaržu treba pripremiti 100 m^3 hranjive podloge

- ako podloga sadrži samo **10 % glukoze** (izvora ugljika) → treba **10 t glukoze**

- ako glukozu zamijenimo **melasom** s prosječno 50 % šećera → treba **20 t melase**

rukovanje
skladištenje



pojavljuju se poteškoće s tako velikim količinama sirovina

Sirovine sezonskog karaktera - moraju se čuvati i do godinu dana (CSL, melasa, krupice, brašna, itd.).

Druge sirovine su **na raspolaganju tijekom čitave godine** → skladište se kraće vrijeme.

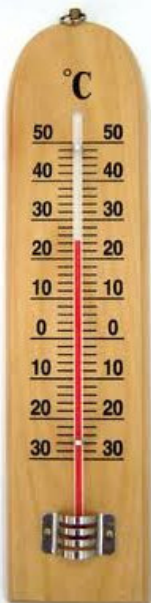
Tijekom skladištenja treba sačuvati **nepromijenjena svojstva sirovina**.

Prirodne sirovine su podložne promjenama uslijed:

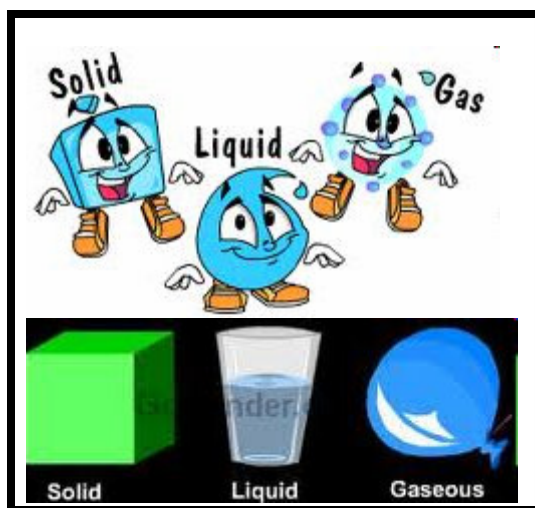
- djelovanja svjetla
- neodgovarajuće temperature
- prisutnih mikroorganizama



Sirovine treba čuvati pri **stalnoj temperaturi**, najčešće **sobnoj ili nižoj** (ovisno o vrsti sirovine).



Ne smiju se zajedno čuvati sirovine koje mogu međusobno reagirati.



Podjela sirovina obzirom na agregatno stanje

praškaste

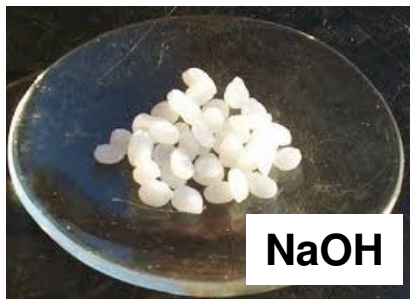
tekuće

plinovite



ČUVANJE PRAŠKASTIH MATERIJALA

- u **suhim silosima** ili **podnim skladištima**
- u uvjetima koji sprječavaju nastajanje grudica
- **higroskopne sirovine** (škrob, šećer, natrijev i kalijev hidroksid, natrijev nitrat) - u **polietilenskim vrećama** na **paletama**, u **mraku** pri **10 do 15 °C**
- **jako higroskopni materijali** (autolizat kvasca i CSL), osušeni tehnikom raspršivanja čuvaju se na sličan način



- **natrijev i kalijev hidroksid** (u obliku pahuljica ili zrnaca, higroskopni) - čuvaju se u polietilenskim vrećama i bačvama
- **enzimski pripravci za hidrolizu sirovina** - pri **4 do 10 °C**



SIROVINE U OBLIKU PASTE ILI SIRUPA

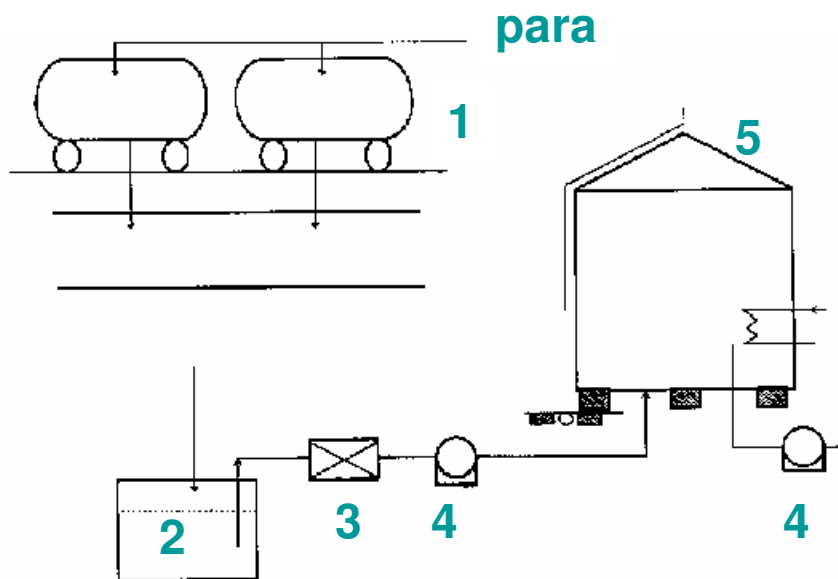
- npr. kvašćev ekstrakt, glukozni i drugi sirupi
- treba ih što brže potrošiti nakon otvaranja originalnog pakovanja

Melasa i slične sirupaste sirovine (npr. **glukozni i visokofruktozni sirupi, kvaščevev ekstrakt** itd.)



- iako imaju visok udjel suhe tvari tijekom skladištenja su podložne mikrobnom kvarenju (često tijekom ljeta) **plijesnima, kvascima i nekim bakterijama**
- zbog visokog udjela suhe tvari i velike viskoznosti, moraju se često zagrijavati i miješati tijekom čuvanja
- za čuvanje su najbolji **spremnici glatkih unutarnjih stijenki** (lako se čiste, a mogu se zagrijavati **vodenom parom**)
- visoka kakvoća uskladištenih sirovina osigurava se redovitim čišćenjem i dezinfekcijom spremnika **hlapljivim dezinficijensima** (**perkloroctena kiselina** i **vodena para**)

Ugušćeni CSL - čuva se u mraku i u hladnom (obično u velikim spremnicima da bi se homogenizirale različite pošiljke i tako postigla ujednačena kvaliteta)



- 1 – prihvati melase
- 2 – prihvatni rezervoar
- 3 – filter
- 4 – pužne pumpe
- 5 – rezervoar za melasu

MELASA

- vrlo viskozna tekućina
- transport iz šećerana u cisternama
- prepumpavanje u nadzemne spremnike za čuvanje
- zbog viskoznosti se teško istače iz transportnih cisterni → prije ili tijekom istakanja treba ih zagrijavati vodenom parom (do 80 °C) ali se ne smije razrijeđivati vodom u rezervoarima za čuvanje

Svježa melasa

- nepogodna je za izravnu primjenu
- čuva se 2 do 3 mjeseca prije upotrebe
- tijekom čuvanja dolazi do taloženja nepoželjnih sastojaka (suspendirane čestice, koloidi, inhibitori) → posebno važno za proizvodnju pekarskog kvasca



ULJA I SREDSTVA PROTIV PJENE

- transport u **bačvama** ili **cisternama**
- potom prepumpavanje u **skladišne spremnike**
- čuvanje u uvjetima ustaljene temperature radi lakšeg rukovanja (doziranja)

VODENA OTOPINA AMONIJAKA

- transport u **cisternama**
- čuvanje u odgovarajućim **spremnima**



ALKOHOLI (ETANOL, METANOL)

- zapaljivi i toksični !!!
- oprez tijekom transporta i čuvanja!



ORGANSKA OTAPALA

- za izdvajanje nekih biotehnoloških proizvoda iz mikrobne kulture
- oprez tijekom transporta i čuvanja!

2. HOMOGENIZACIJA

U proizvodnji treba koristiti sirovine iz iste dobavljačke pošiljke tako dugo dok je to moguće - moguće samo u malim pogonima, ako raspolažu s velikim skladišnim prostorom.

Veliki pogoni (→ velika dnevna potrošnja sirovina) → sirovine treba homogenizirati, a još je bolje ako sam dobavljač obavlja homogenizaciju.

TEKUĆE SIROVINE U TANKOVIMA - homogenizacija miješanjem

PRAŠKASTE ILI RASUTE SIROVINE

- mogu se miješati u spremnicima
- tip i vrsta homogenizatora za rasute sirovine ovisi o kapacitetu uređaja, potrebnom stupnju homogenizacije, asepticnosti, itd.
- **kontinuirani homogenizatori** → homogenizacija sipkog materijala

3. KEMIJSKE I BIOLOŠKE METODE NADZORA



Proizvodni mikroorganizmi su osjetljivi na vrlo male koncentracije **stimulativnih i otrovnih tvari** → zato kemijska kontrola sirovina može ponekad zakazati pri procjeni upotrebljivosti neke sirovine (posebno kod prirodnih supstrata s velikim brojem različitih sastojaka).

Potpuna kvantitativna analiza bila bi preskupa i komplicirana.

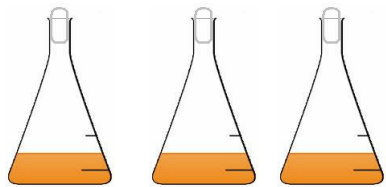


KEMIJSKOM ANALIZOM SIROVINE TREBA ODREDITI:

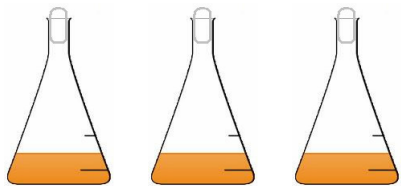
- **sastojke koji najviše utječu na odvijanje procesa** (npr. reduktivne tvari, dušik, pepeo, teški metali i kiseline)
- **parametre koji dopunjavaju kemijsku analizu** (suha tvar, gustoća, boja, bistroća i aroma)

BIOLOŠKI TEST

- procjena primjenjivosti neke sirovine za mikrobnii proces
- **laboratorijski uzgojni test** provodi se za svaku pošiljku sirovine:



uzgoj u 3 tikvice
(**standardna sirovina
poznate kakvoće**)



uzgoj u druge 3
tikvice (**sirovina koja
se testira**)

usporediti prinos proizvoda
(testirana sirovina mora dati
otprilike isti rezultat kao
standardna ili **najmanje 90%**
tog rezultata)

Treba u pričuvi imati dovoljne količine standardne sirovine.

Ograničenje laboratorijskog uzgojnog testa: uvjeti uzgoja u tikvicama i u reaktorima međusobno se razlikuju → neki supstrat prividno pogodan za uzgoj u tikvicama ne mora dati isti rezultat u bioreaktoru.

Različite pošiljke iste sirovine mogu različito utjecati na proizvodnju mikrobnih metabolita.

PRIPREMA HRANJIVIH PODLOGA



PRIPREMA HRANJIVIH PODLOGA

mjerenje mase ili
volumena sirovina

Voda:

- iz bunara
- iz vodovoda
- posebno obrađena za neke mikrobne procese

otapanje,
suspendiranje
ili
emulgiranje
u vodi



MIJEŠANJE S VODOM SE OBAVLJA



U REAKTORIMA - ako nije potrebna prethodna obrada sirovina

- samo kad su sve sirovine topljive u vodi ili će postati barem djelomično topljive nakon sterilizacije
- u manjim pogonima

U POSEBNIM POSUDAMA ZA PRIPREMU PODLOGA

- puno češće jer većina sirovina za industrijske mikrobne procese zahtijeva **barem minimalnu prethodnu obradu**

PRETHODNA OBRADA SIROVINA UKLJUČUJE OVE POSTUPKE:

- **taloženje** (npr. čišćenje melase od nepoželjnih sastojaka)
- **muljanje ili sjeckanje** - ponekad u kombinaciji s enzimskom hidrolizom i prešanjem (groždane i voćne komine)
- **usitnjavanje, ukomljavanje s vodom i hidroliza** do građevnih jedinica topljivih u vodi

POSTUPCI PRETHODNE OBRADE

- OBRADA VODE**
- bistrenje / uklanjanje suspendiranih sastojaka
 - smanjenje tvrdoće
 - djelomična ili potpuna demineralizacija
 - dezinfekcija

Uklanjanje suspendiranih sastojaka vode u dva stupnja:

taloženje u bistroćima → **filtracija** kroz sloj čistog žarenog pijeska ujednačene granulacije

Vodovodna voda obično ne sadrži suspendirane čestice, jer se bistri prije isporuke potrošačima.



Tvrdoća vode smanjuje se postupcima **dekarbonizacije** i **demineralizacije**



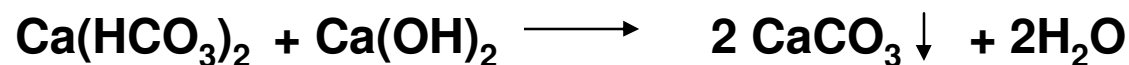
DEKARBONIZACIJA VODE - uklanjanje uzročnika **karbonatne tvrdoće** pomoću ovih postupaka:



- **zagrijavanje:**



- **dodatak kalcijeva hidroksida:**



- **ionska izmjena**

DEMINERALIZACIJA - potpuno uklanjanje **svih kationa i aniona** iz vode.

Za **jako tvrde vode:** **dekarbonizacija** \longrightarrow **anionski izmjenjivači**
(s vapnom ili pomoću kationskih izmjenjivača) uklone se **anioni mineralnih kiselina**

Također se primjenjuje postupak demineralizacija **reverznom osmozom**.

UKLANJANJE NEPOŽELJNIH MIKROORGANIZAMA IZ VODE

Mogu se primijeniti ove metode:

- mikrobiološka filtracija (EK filteri)
- dezinfekcija pripravcima klora i joda
- ozonizacija (O_3)
- zračenje (UV-zrake)
- propuštanje vode između srebrnih elektroda (ioni srebra)



www.shutterstock.com · 61648525

Najčešće i najjeftinije je

kloriranje pomoću:

- **plinovitog klora**

ili

- **natrijeva klorita** ($NaClO_2$)



www.shutterstock.com · 78121420

OBRADA MELASE

- melasa je vrlo dobar i relativno jeftin izvor ugljika za industrijske hranjive podloge
- prije upotrebe treba ukloniti nepoželjne sastojke koji bi štetno utjecali na rast proizvodnih mikroorganizama, proizvodna svojstva ili kvalitetu proizvoda

Nepoželjni sastojci melase

- sumporov(IV) oksid (SO_2)
- hlapljive kiseline
- nitriti
- obojeni sastojci
- koloidi
- suspendirane čestice
- prevelik broj mikroorganizama



- SO_2 se primjenjuje u procesu ekstrakcije šećera, pa ga u tragovima sadrži svaka melasa (0,01 - 0,05 %)
- ako se iz bilo kojeg razloga u pročišćeni šećerni sok naknadno dodaje SO_2 moguće su znatno više njegove koncentracije
- preko 0,02 % SO_2 u podlozi → nepovoljno za rast i kvalitetu pekarskog kvasca

Ako melasa nije kontaminirana nepoželjnim mikroorganizmima →

mali udjel hlapljivih organskih kiselina:

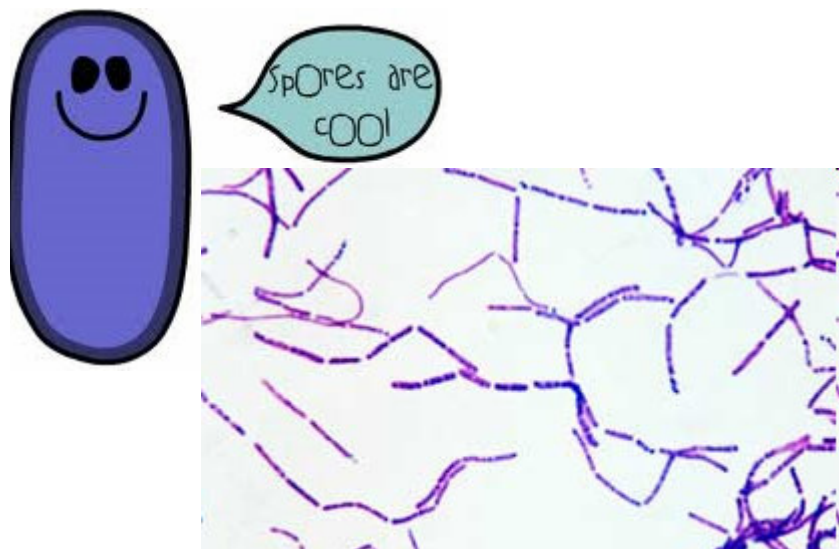
- octena (0,5 - 1,0 %)
- maslačna (do 0,6 %)
- mravlja (do 0,4 %)
- propionska
- valerijanska

- ako udjel hlapljivih kiselina ne prelazi

1/6 do 1/5 od ukupne kiselosti

- ako je udjel maslačne kiseline do **0,60 %**

ne treba očekivati poteškoće u
proizvodnji pekarskog kvasca



bakterija *Bacillus subtilis*

- u melasi je prisutan mali udio **nitrata**
(0,013 - 0,170 %)

- onečišćenje određenim **bakterijama**
(*Bacillus subtilis*) → redukcija nitrata
u nitrite (usporeni rast i pupanje
kvasaca)

- koncentracija **nitrita** u melasi ovisi o
broju i aktivnosti prisutnih **bakterija**



Koncentracija prisutnih mikroorganizama u melasi - može varirati od 5000 do nekoliko desetaka tisuća / mL melase.

Važno: **broj i vrsta** onih mikroorganizama koji se mogu razmnožavati u melasi **tijekom skladištenja** → izazivaju:

- gubitak **šećera**
- gubitak **organskih dušikovih spojeva**
- nakupljanje **štetnih metabolita** (npr. **organske kiseline, nitriti**)

To mogu biti mikroorganizmi koji mogu rasti u medijima sa samo 20 % vode: **sporogene bakterije, osmofilni kvasci** i neke **plijesni**.

bakterije iz roda *Leuconostoc* - izazivaju tzv. dekstransko vrenje



Zato se melasa sa smanjenim udjelom suhe tvari (ispod 80 %) mora stalno mikrobiološki kontrolirati.

Boja melase

- promjenjiva tijekom kampanje prerade šećerne repe
- potječe od: **melanoidina**, **karamelnih tvari** i **željeznih polifenolnih spojeva**
- visok udjel SO_2 → **svjetlije nijanse boje** (u takvoj melasi treba uvijek nadzirati SO_2)

puno karamela (preko 2 %) } → odražava se na sposobnost bistrenja
puno koloidnih sastojaka } melase, prinos i čistoću proizvoda
(npr. **pekarskog kvasca**)
→ **intenzivno obojena melasa**

SUSPENDIRANE ČESTICE U MELASI

- udjel 0,3 - 0,5 %
- mehaničke nečistoće koje se mogu izdvojiti taloženjem i filtracijom
- ima ih u svakoj melasi
- obično ih se uklanja zajedno s otopljenim koloidima tijekom postupka obrade melase

KOLOIDI U MELASI

- udjel može biti različit (od 0,20 - 0,44 %)
- adsorpcijskim silama su vezani za pektine, gumi slične tvari i šećere
- mogu biti pozitivno ili negativno nabijeni

Negativno nabijeni koloidi - u kiseloj sredini se neutraliziraju s H^+ -ionima i talože

Pozitivno nabijeni koloidi mogu se vezati s OH^- -ionima (taloženje u alkalnoj sredini)

Koloidi topljivi u vodi (tzv. reverzibilni)

- većina koloida iz melase)
- **svjetlije boje**
- sadržavaju manje **dušika** od netopljivih koloida (oko 4 %)

Netopljivi koloidi (tzv. ireverzibilni)

- kiselog su karaktera
- **intenzivne crne boje** jer sadrže oko 85 % **obojenih sastojaka** i puno **dušika** (7,5 - 8,5 %)

POSTUPAK OBRADJE MELASE

uzimanje određene količine melase iz tanka za čuvanje



razrijeđivanje

vodom na 20 - 40% suhe tvari



neutralizacija,

zakiseljavanje, kloriranje, zagrijavanje ili kuhanje u kiselom ili lužnatom mediju



bistrenje taloženjem odnosno drugim separacijskim postupcima

Broj i vrsta ovih postupaka ovisi o udjelu nepoželjnih sastojaka u melasi ili o specifičnim potrebama mikrobnog procesa za koji se melasa koristi.

Prethodna obrada melase često podrazumijeva **uklanjanje ili smanjivanje udjela štetnih sastojaka do neke prihvatljive vrijednosti** (ovisno o vrsti mikroorganizma i tipu mikrobnog proizvoda).



PRETHODNA OBRADA GROŽĐA I VOĆNIH SIROVINA



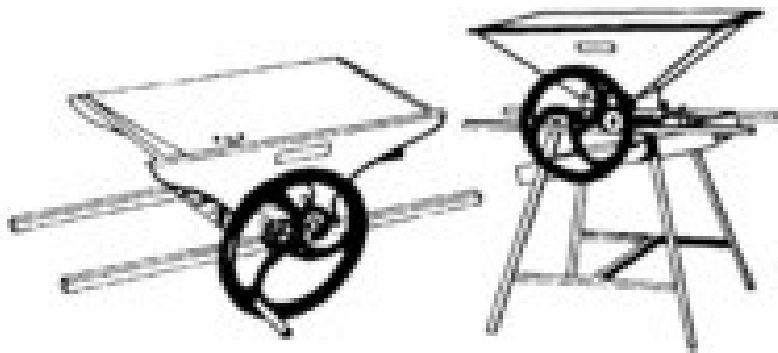
- započinje **muljanjem**, **mljevenjem** ili **sjeckanjem** sirovina → dobiju se **groždane** ili **voćne komine**, odnosno **voćne pulpe** koje mogu biti:
 - **izravni supstrati** za mikrobni proces (alkoholno vrenje),
 - **međuproizvodi** iz kojih se tiještenjem dobiva mošt ili sok za različite namjene (voćni sokovi, bijela vina, voćne rakije)

Postupak muljanja ili mljevenja treba prilagoditi vrsti sirovine tako da:

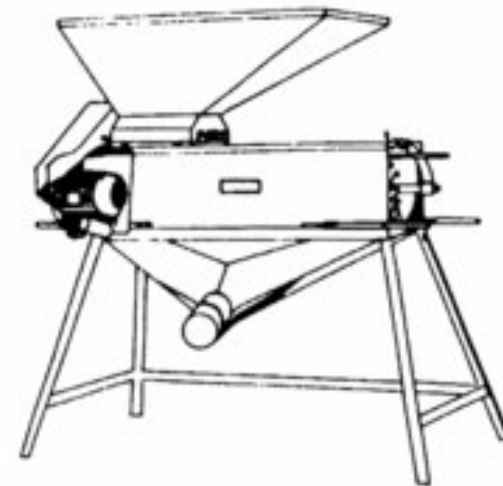
- sirovina pusti **što više soka**,
- ostanu neoštećeni oni dijelovi sirovine koji mogu utjecati na organoleptička svojstva proizvoda (npr. pokožice, sjemenke i koštice)
- olakša naknadno **izdvajanje nepoželjnih dijelova sirovine** (npr. peteljkovina, pokožice, sjemenke, koštice)

Radi povećanja iscrpka mošta ili soka, u kominu se mogu dodati odgovarajući enzimski pripravci (pektinolitički enzimi) i / ili primijeniti djelotvorni postupci tiještenja.





Muljača na ručni pogon s valjcima



Motorna runjača - muljača

PRETHODNA OBRADA ŠKROBNIH I CELULOZNIH SIROVINA

Kada je izvor ugljika polisaharid (škrob, inulin, celuloza) prethodna obrada može biti dosta složena i dugotrajna

- npr. proizvodnja slada iz pivarskog ječma za proizvodnju piva ili whisky-a

slad → mljevenje → ukomljavaње s vodom → razgradnja topljivog škroba enzimskom hidrolizom do šećera i dekstrina

Slično se postupa s ostalim škrobnim, inulinskim i celuloznim sirovinama:

usitnjavanje mljevenjem ili sjeckanjem → miješanje s vodom (10 - 30 % polisaharida u komini) → **prevođenje polisaharida u vodotopljivi oblik:**

- termička obrada komine (zagrijavanje, tj. kuhanje)
- kemijska ili enzimaska hidroliza

ovisno o:

- vrsti sirovine
- daljnjoj namjeni ošećerene komine

Hidroliza slada, ostalih škrobnih te celuloznih sirovina opisana je u narednim predavanjima.

PRIPREMA PROTEINSKIH HIDROLIZATA

- brojni preparati proteinskih hidrolizata na tržištu

Primjena: izvori organskih spojeva dušika (posebno **aminokiselina, peptida, purina, pirimidina i vitamina B-skupine**)

- radi cijene često se zamjenjuju tzv. **sirovim hidrolizatima** iz kojih nisu izdvojeni **netopljivi sastojci** (npr. stanične ovojnice)

Mogu se pripremiti u vlastitom laboratoriju ili pogonu, a sirovine mogu biti:

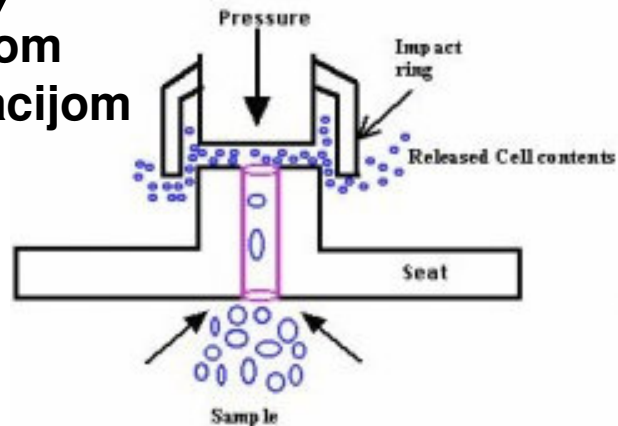
- **mikrobna biomasa** (primjenom autolize, plazmolize, kemijske i enzimske hidrolize)
- **biljne, odnosno životinjske (animalne) sirovine** (primjenom enzimske hidrolize).

Kad je riječ o mikrobnim biomasama prvo treba razoriti stanične ovojnice (stanična stijenka i citoplazmina membrana) i osloboditi proteine nakupljene u stanicama.

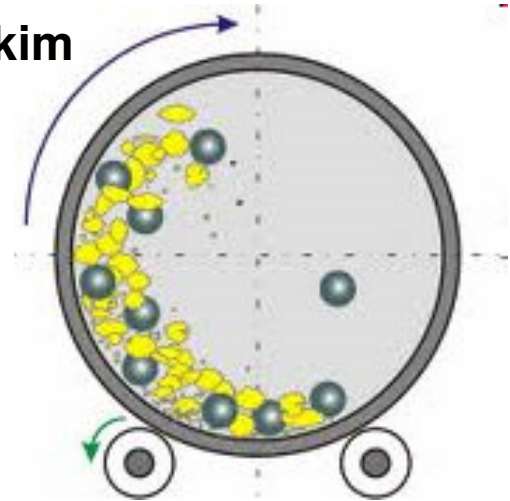
RAZARANJE STANIČNIH OVOJNICA MOŽE SE IZVESTI:

- mehanički

visokotlačnom
homogenizacijom



visokobrzinskim
kugličnim
mlinovima



- **kemijski** (hidrolizom kiselinama ili lužinama)

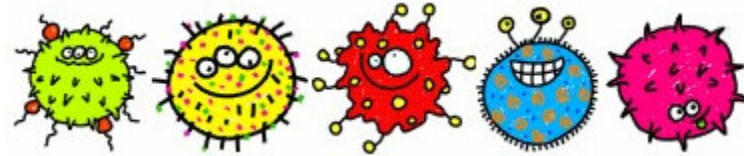
- **enzimski** (hidrolizom sa staničnim enzimima ili enzimskim pripravcima)

Stanične stijenke različitih mikroorganizama su različite građe i mehaničke čvrstoće → primjenjuju se različite metode razaranja staničnih stijenki.

- za pripremu sirovih hidrolizata iz biomase **bakterija, kvasaca i plijesni**, preporučuju se kemijske i enzimске metode, odnosno njihova kombinacija → istovremena razgradnja stanične ovojnice i proteina

Izbor postupka razaranja stanica ovisi o:

- rodu i vrsti mikroorganizma
- kemijskom sastavu staničnih ovojnica



Uvjeti procesa:

- koncentracija biomase
- koncentracija kemijskog sredstva odnosno enzima
- pH-vrijednost
- temperatura
- vrijeme

treba ih prilagoditi
specifičnostima
mikrobne biomase

biljne i

životinjske

sirovine



usitnjavanje i

ukomljavanje s

vodom



termičko ili enzimsko

razaranje ovojnice

staničnog tkiva



hidrolizira oslobođenih

proteina pomoću

odgovarajućih enzimskih

prepravaka

AUTOLIZA

- prirodni proces samorazgradnje staničnih ovojnica pomoću samoprobavnih **endo-enzima** mikrobnih stanica ili staničnih tkiva, koji obično započinje nakon njihove smrti
- zahtijeva pogodnu temperaturu i pH-vrijednost
- npr. stanice pivskog kvasca pri **pH = 5,5** i **55 °C** autoliziraju vrlo brzo pa za nekoliko sati oko 90 % staničnih proteina prelazi u otopinu



Na postupku autolize temelji se proizvodnja najboljih kvašćevih ekstrakata.

PLAZMOLIZA

- gubitak vode iz mikrobne stanice u **hipertoničnoj otopini**
- jednostavna i brza metoda za razaranje staničnih stijenki mikroorganizama
- pritom stanice ugibaju, ali njihovi **enzimi** ostaju aktivni i nastavljaju hidrolizu staničnih sastojaka
- **plazmolitička sredstva**: **natrijev klorid** i **organska otapala** (**etil-acetat** ili **propan-1-ol**).
- **uvjeti**: **50 - 60 °C / 5 - 8 sati** (ovisno o mikrobnoj biomasi te omjeru suhe tvari stanica i plazmolitičkog sredstava)
- ubrzavanje postupka i povećanje učinkovitosti hidrolize dodatkom specifičnih litičkih enzima

ENZIMSKA HIDROLIZA MIKROBNIH, BILJNIH I ŽIVOTINJSKIH SIROVINA

Na principima autolitičke razgradnje razvila se primjena enzimskih pripravaka u proizvodnji proteinskih hidrolizata.

Učinkovitost autolize se povećava **kombiniranim djelovanjem autolitičkih enzima i proteolitičkih enzimskih pripravaka** npr.:

- **papain** (enzim biljnog porijekla)
- **neutralna proteinaza** (enzim mikrobnog porijekla)

Autoliza i proteoliza

(pri 40 - 50 °C / 5 - 15 sati;
pri 55 - 65 °C / 1 - 5 sati)

→ **pasterizacija, odnosno inaktivacija enzima (90 °C)**

Ovaj se postupak primjenjuje za hidrolizu mikrobnih biomasa, biljnih i animalnih sirovina (npr. pšenični i kukuruzni gluten, slad, ječmena prekrupa, sojino brašno, pšenične mekinje, proteini sirutke, mesni otpatci itd.).



KEMIJSKA HIDROLIZA

mikrobna biomasa



suspendiranje u
zakiseljenoj vodi (pH = 2 - 6)

ili

zaluženoj vodi (pH = 8)



zagrijavanje (100-121 °C / 1 - 2 h)



proteinski hidrolizati
(izvori organskog dušika u hranjivim podlogama)



PRIPREMA ZRAKA

atmosferski zrak iz
okoliša uzima se
pomoću kompresora



gruba filtracija na
usisnoj strani
kompresora
(uklanjanje prašine)



komprimiranje



mikrobiološki
filteri
(prije ulaska u
bioreaktor)



ulaz u bioreaktor
pod tlakom



