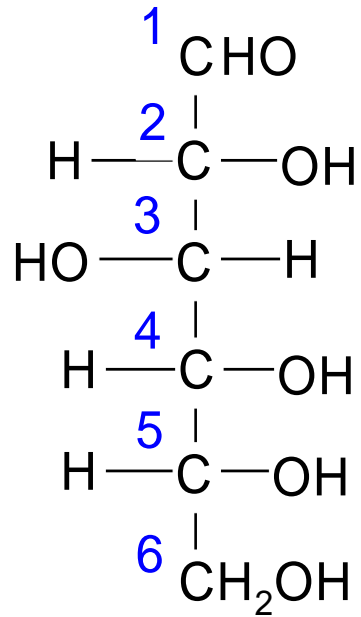


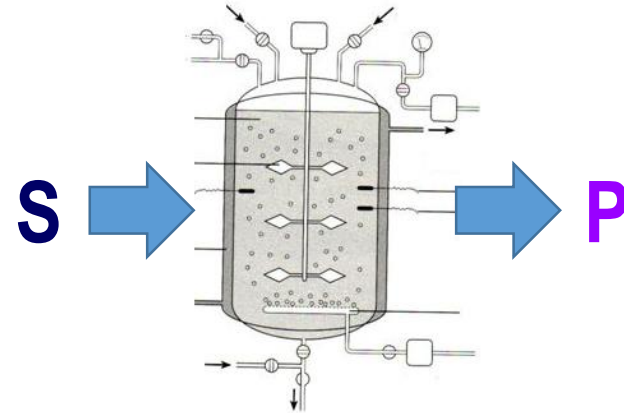
Uvod u biotehnologiju

Prof. dr. sc. Anita Slavica

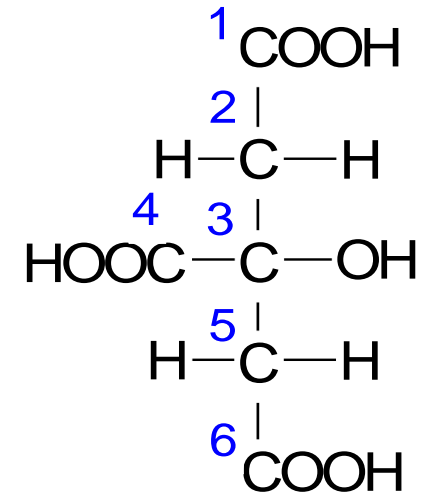
primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (1)



D- glukoza

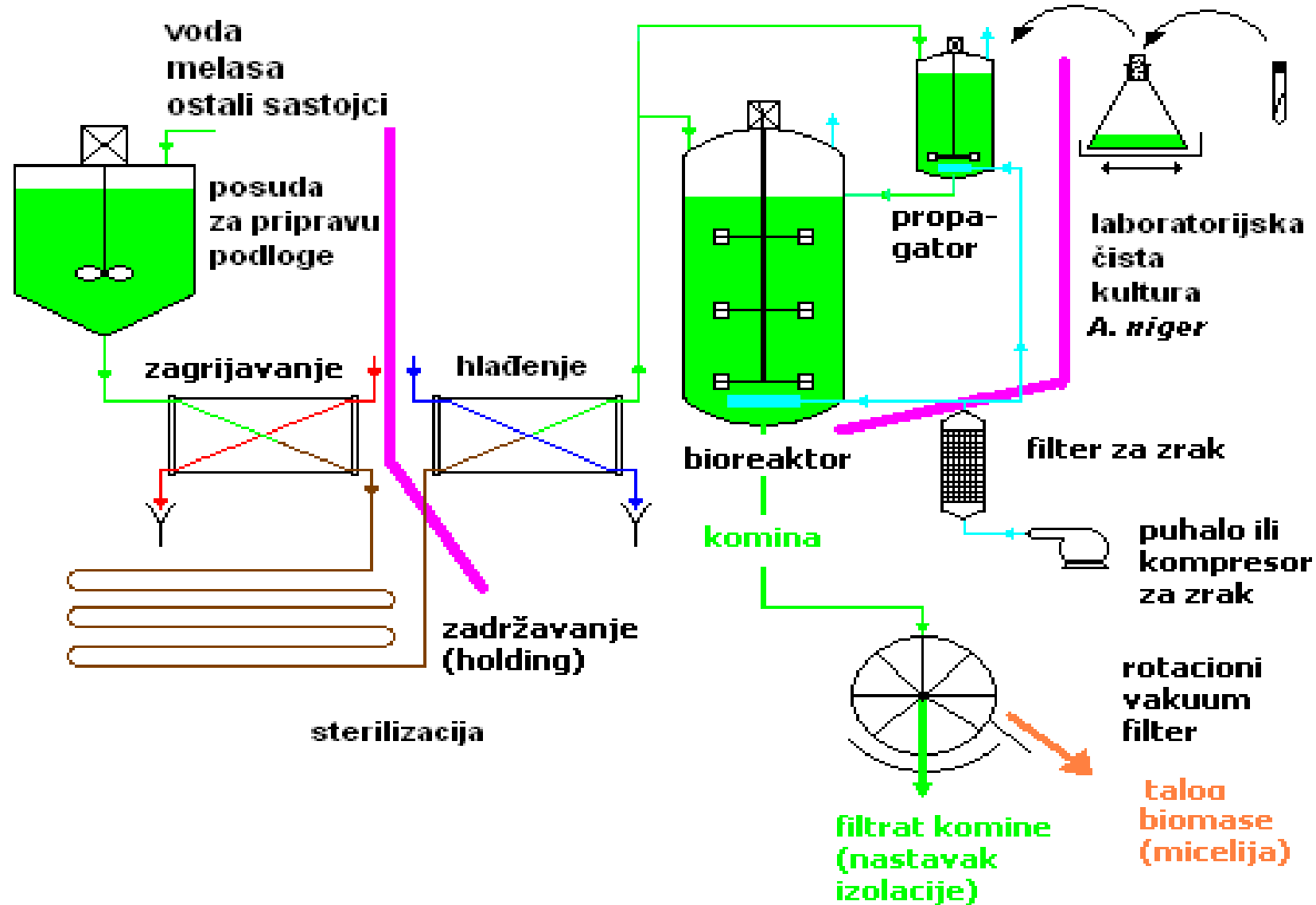


odabrani sojevi (varijeteti) plijesni *Aspergillus niger* u nizu biokemijskih reakcija transformiraju šećere hranjive podloge u **limunsku kiselinu**



limunska kiselina

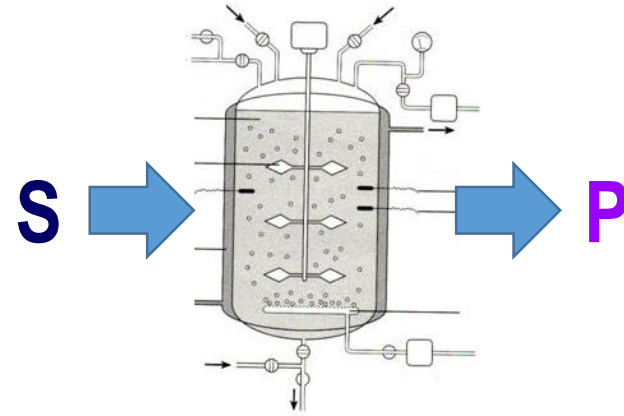
primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (2)



podsjetimo se: procesi prije bioreaktora, bioproces i procesi poslije bioreaktora

upstream processing

downstream processing



bioproces
u
bioreaktoru

priprema hranjive podloge
(engl. medium)

priprema biokatalizatora
enzima
cjepiva (inokuluma)

izdvajanje biokatalizatora

izdvajanje proizvoda

pročišćavanje proizvoda

primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (3)

- **Bioprocес u bioreaktoru**

Sterilna hranjiva podloga u bioreaktoru se nacjepljuje (inokulira) suspenzijom spora (konidija) plijesni *Aspergillus niger* (10^6 spora/L hranjive podloge).

Ovaj bioprocес je AEROBAN (potrebno je dovoditi zrak), pa se vodi uz aeraciju (engl. aeration) i miješanje (engl. mixing) podloge/suspenzije.

AERACIJA je propuhivanje (BARBOTIRANJE, engl. sparging) zraka kroz tekuću hranjivu podlogu/suspenziju. Zrak je STERILAN (filtracija kroz mikrobiloške filtre).

primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (4)

- **Bioprocес u bioreaktoru**

Zbog aeracije i miješanja suspenzije u bioreaktoru dolazi do pjenjenja, pa se tijekom bioprocеса (po potrebi) dodaju sredstva za suzbijanje pjene (PROTUPJENIČI , engl. antifoams).

Ovaj postupak se zove DUBINSKI ili SUBMERZNI postupak (engl. submerged culture).

Zastarjeli način proizvodnje limunske kiseline je POVRŠINSKI ili EMERZNI postupak (engl. surface culture), koji se provodio na površini hranjive podloge u plitkim tavama.

engl. culture, culturing, cultivation - uzgoj

primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (5)

- **Bioprocес u bioreaktoru**

Tijekom prva 2-3 dana bioprocеса u bioreaktoru osiguravaju se uvjeti optimalni za klijanje spora i rast HIFA plijesni (stanice povezane u dugačke niti), koje tvore strukturu klupka, a koje se naziva MICELIJ.

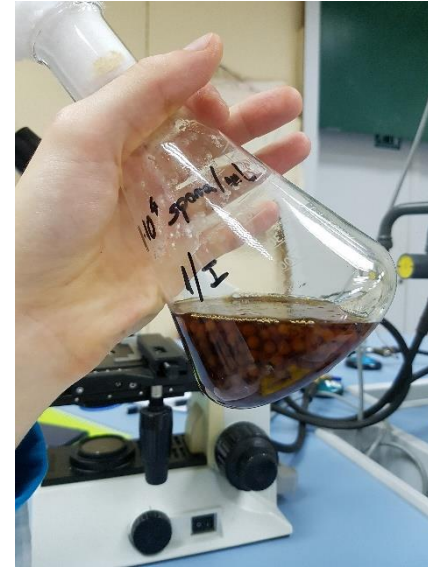
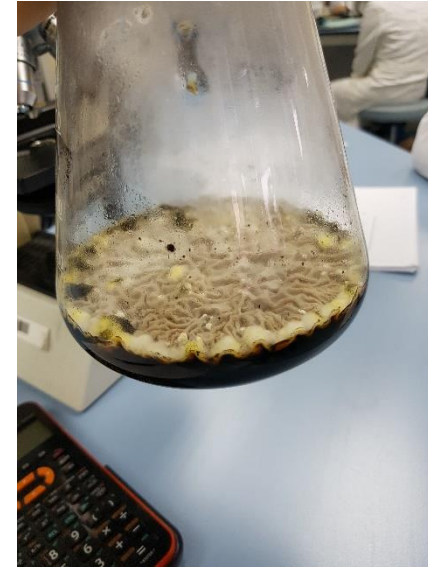
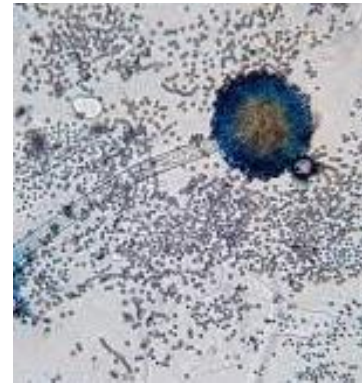
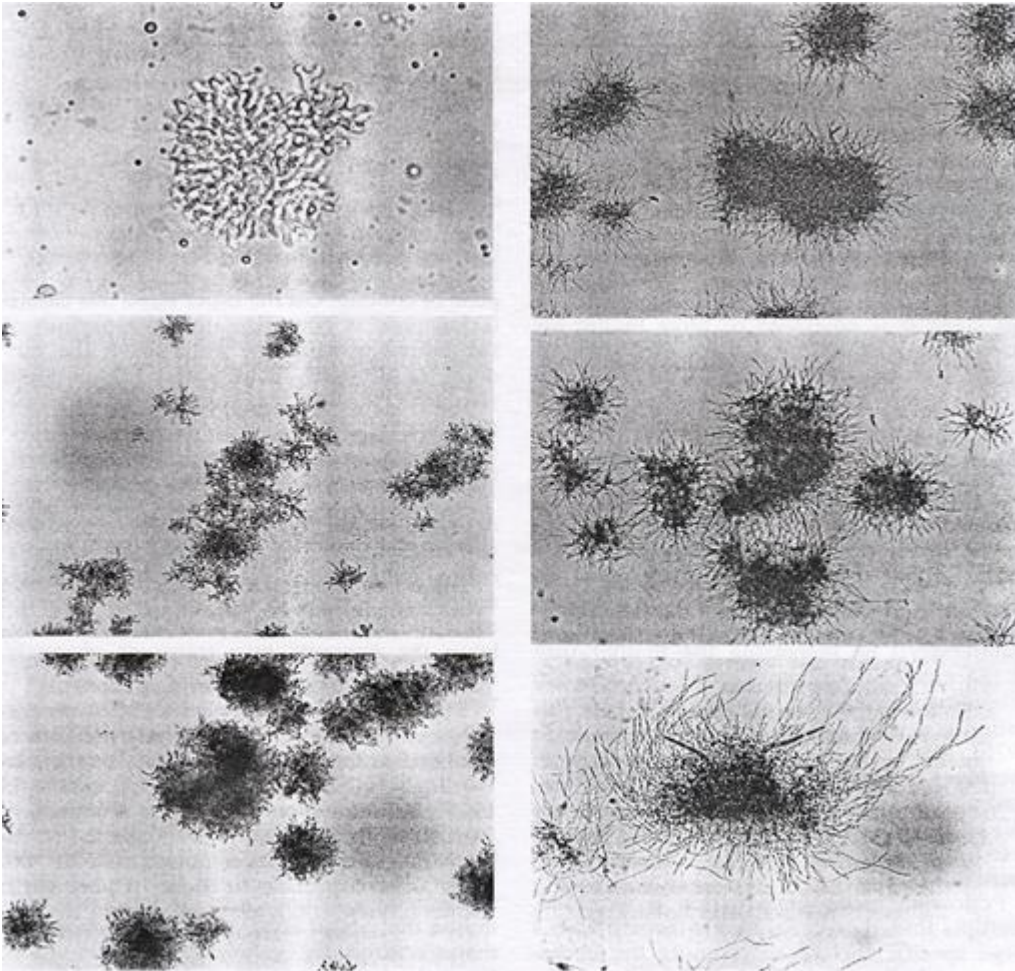
Ova faza mikrobnog procesa koja je optimalna za rast micelija (BIOMASE) naziva se TROFOFAZA.

Zbog intenzivnog miješanja tijekom submerznog postupka iz svake spore formira se specifični kuglasti oblik micelija, koji se naziva MICELIJSKI PELET.

Oblik i struktura micelijskog peleta bitno utječu na prinos i produktivnost bioprocеса proizvodnje limunske kiseline.

primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (6)

- Bioprocес u bioreaktoru**



primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (7)

- **Bioprocес u bioreaktoru**

Nakon 2. ili 3. dana, zbog proizvodnje limunske kiseline, dolazi do sniženja pH vrijednosti podloge/suspenzije.

pH vrijednost podloge/suspenzije opadne do oko 2,0 jedinice, a onda se održava na ovoj vrijednosti i to dodatkom sterilne lužine. Kod ove pH vrijednosti inhibira se rast biomase (peleta *A. niger*), a stimulira proizvodnja limunske kiseline.

Ovo je tzv. proizvodna faza ili IDIOFAZA. Proizvode koji nastaju u IDIOFAZI nazivamo IDIOLITIMA.

primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (8)

- **Bioprocес u bioreaktoru**

Ovo je tzv. proizvodna faza ili IDIOFAZA. Proizvode koji nastaju u IDIOFAZI nazivamo IDIOLITIMA.

U idiofazi postiže se prosječna produktivnost (engl. productivity) bioprocеса proizvodnje limunske kiseline (monohidrat limunske kiseline, $\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CAM od engl. citric acid monohydrate) od oko $1 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

Limunska kiselina pri sobnoj temperaturi ima kristalnu strukturu bilo kao bezvodna ili kao monohidrat limunske kiseline.



primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (9)

- **Bioprocес u bioreaktoru**

Bioprocес proizvodnje limunske kiseline u bioreaktoru traje ukupno 9-12 dana.

Može se voditi ili kao tipični ŠARŽNI (PUNIDBENI) PROCES (sva podloga dodaje se u bioreaktor odjednom na početku procesa, engl. batch process) ili kao

ŠARŽNI PROCES S PRIHRANJIVANJEM

(svježa podloga dodaje se u obrocima tijekom bioprocеса, engl. fed-batch process).

Nastajanje ovog proizvoda djelomično je vezano uz rast biomase (kinetika).

Kinetika tipa I (nastajanje proizvoda izravno povezano s rastom biomase).

Kinetika tipa III (nastajanje proizvoda nije povezano s rastom biomase).

primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (10)

- Bioprocес u bioreaktoru

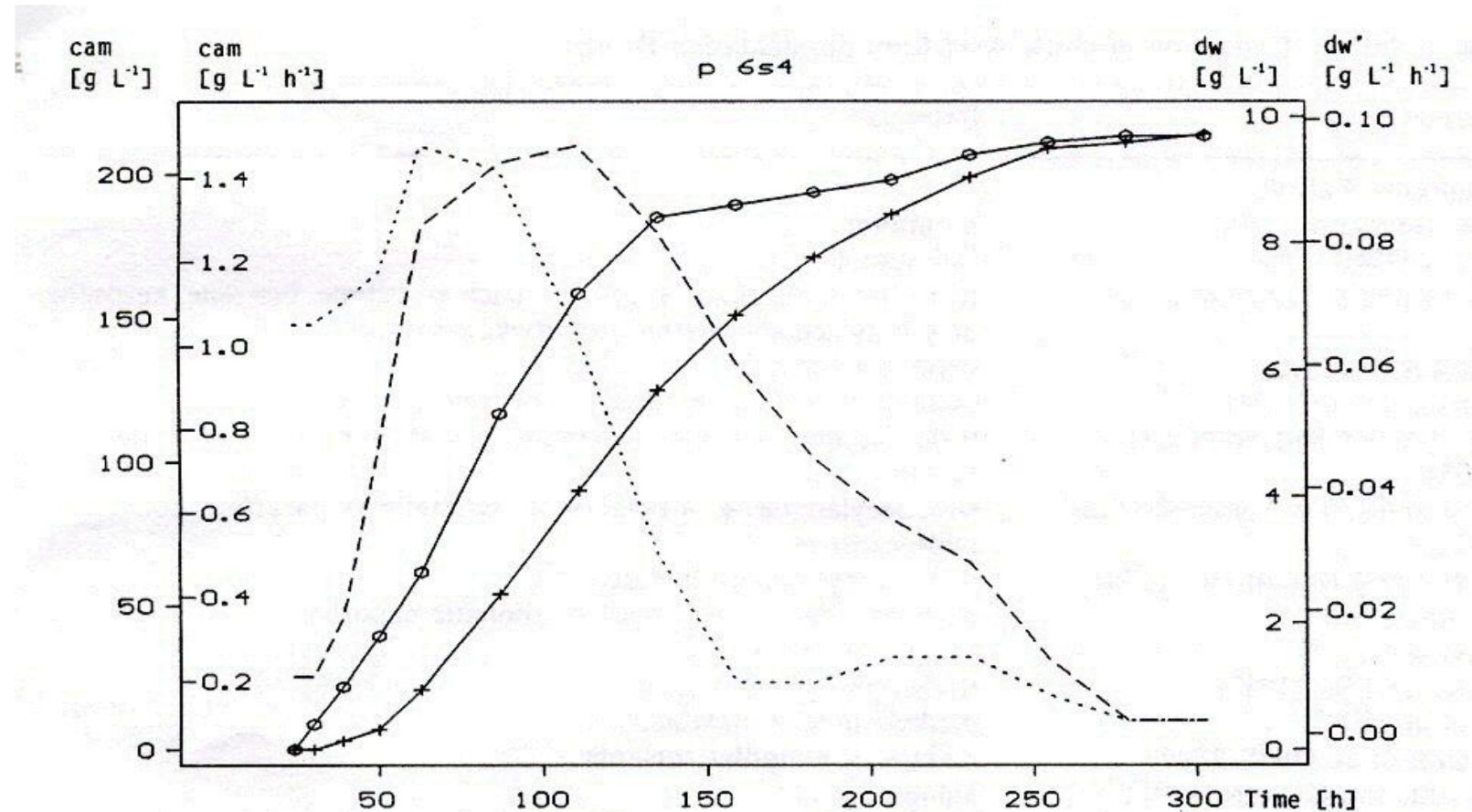


Fig. 4. Time-course of a typical industrial citric acid fermentation showing: + citric acid monohydrate (cam) and O mycelium dry weight (dw) [g L^{-1}]; ——— citric acid volumetric productivity (cam) and ---- specific growth rate (dw') [$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$].

primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (11)

- **Bioprocес u bioreaktoru**

Na kraju bioprocesa postiže se PRINOS (engl. yield, Y_P) od oko 200 kg CAM/m³.

Iskorištenje bioprocesa na utrošeni šećer (engl. substrate to product conversion coefficient, $Y_{P/S}$) iznosi oko 90% ($Y_{P/S} = 0,9$ g/g).

Teorijski $Y_{P/S}$ iznosi 1,12 g/g za bezvodnu limunsku kiselinu tj. 1,23 g/g za CAM.

Izračun – domaća zadaća.

primjer mikrobnog procesa: industrijska proizvodnja limunske kiseline (12)

- **Bioprocес u bioreaktoru**

Dio šećera (supstrata, engl. substrate) troši se za rast biomase *A. niger*, koje u procesu nastaje između 150 i 200 kg SUHE TVARI po toni utrošenog šećera (saharoze).

To je koeficijent konverzije supstrata u biomasu (engl. substrate to biomass conversion coefficient, $Y_{X/S} = 0,15-0,2$ kg/kg).

Biološki materijali sadrže do 90% vode. Udio vode u biološkom materijalu može varirati u širokom rasponu. Zato se količina biološkog materijala iskazuje kao SUHA TVAR (engl. dry matter, dry substance dry solids, cell dry weight).

naučili smo (domaća zadaća)

1. Što je aeracija, a što je barbotiranje?
2. Kako se sterilizira zrak za aerobne mikrobne procese?
3. Što su protupjenici?
4. Što je trofofaza, a što je idiofaza?
5. Što su idioliti?
6. Što je micelijski pelet?
7. Zna li razliku između *batch* i *fed-batch* postupaka?
8. Što označava kratica CAM?
9. Zašto se koncentracija biomase iskazuje kao grami suhe tvari po litri podloge/suspenzije?
10. Objasnite razliku između tipova kinetike mikrobnih procesa I, II i III.