



M. Ivančić Šantek*

Prehrambeno-biotehnoški fakultet
Sveučilište u Zagrebu
Pierrotijeva 6, 10 000 Zagreb

Mikroorganizmi u biotehnoškoj proizvodnji

Mikroorganizmi se primjenjuju u industrijskoj proizvodnji širokog spektra proizvoda, od prehrambenih proizvoda, biogoriva, organskih kiselina, aminokiselina, enzima, proteina jednostaničnih mikroorganizama (SCP), biopesticida pa sve do lijekova, dodataka hrani i nutraceutika. Također se upotrebljavaju u bioremedijaciji onečišćenja tla, vode i zraka, obradi otpadnih voda i izluživanju metala iz ruda.

Uzgoj mikroorganizama

Mikroorganizmi se uzgajaju submerzno u tekućoj hranjivoj podlozi ili površinski na čvrstom supstratu (npr. poljoprivredni ostaci, škrobne sirovine). Na rast mikroorganizma utječu:

- fizikalni čimbenici – temperatura, pH, aktivitet vode i osmotski tlak podloge, svjetlost (izvor energije), miješanje,
- kemijski čimbenici – nutrijenti potrebni za rast mikroorganizma (hranjiva podloga).

Za brz rast mikroorganizma i visoku produktivnost procesa potrebno je osigurati optimalne uvjete uzgoja (temperatura, pH, aktivitet vode, osmotski tlak itd.) i sastav hranjive podloge.

Izvor ugljika i energije za rast i razmnožavanje

Stanici mikroorganizma potrebna je energija za aktivan transport molekula i iona, sintezu makromolekula i drugih biomolekula, pokretanje i endogeni metabolizam. Energiju dobiva iz okoliša (svjetlost) ili kemijskim reakcijama u stanici. Metabolizam je skup svih kemijskih reakcija koje se provode u nekom organizmu u svrhu održavanja života, a dijeli se na katabolizam i anabolizam. Katabolizam obuhvaća metaboličke reakcije u kojima se razgrađuju organske molekule uz oslobađanje energije (npr. aerobna razgradnja glukoze do CO_2 i vode). Oslobođena energija pohranjuje se kovalentnim vezama adenozin trifosfata (ATP), a troši se u anaboličkim reakcijama. Anabolizam obuhvaća sve metaboličke procese u kojima se sintetiziraju makromolekule i druge biomolekule uz trošenje energije, tj. ATP-a.

Prema izvoru ugljika koji se upotrebljava za izgradnju staničnih struktura mikroorganizmi se dijele na autotrofe i heterotrofe (tablica 1). Autotrofni mikroorganizmi upotrebljavaju CO_2 kao jedini izvor ugljika, dok heterotrofni mikroorganizmi za rast upotrebljavaju različite organske tvari kao što su ugljikohidrati, proteini, lipidi, organske kiseline itd. Metabolizam autotrofnih mikroorganizama pokreće energija svjetlosti (fotoautotrofni) ili energija dobivena oksidacijom anorganskih tvari (kemoautotrofi). Heterotrofni mikroorganizmi mogu koristiti svjetlosnu energiju (fotoheterotrofi) ili energiju dobivenu oksidacijom organskih tvari (kemoheterotrofi). Međutim neki se mikroorganizmi ne mogu svrstati ni u jednu od navedenih skupina te pojednostavljene podjele mikroorganizama (tablica 1). Tako npr. miksotrofi čine

zasebnu skupinu mikroorganizama koji mogu izmjenjivati heterotrofan i autotrofan način rasta ovisno o uvjetima u okolini stanice i fiziološkim uvjetima (npr. zelene mikroalge roda *Chlorella*).

Tablica 1 – Pojednostavljena podjela mikroorganizama prema izvoru ugljika i energije

	Fotoautotrof	Kemoautotrof	Fotoheterotrof	Kemoheterotrof
Izvor ugljika	CO_2	CO_2	organske tvari	organske tvari
Izvor energije	svjetlost	oksidacija anorganskih tvari (H_2S , NH_4^+ , Fe^{2+})	svjetlost	oksidacija organskih tvari
Mikroorganizmi	fotosintetski prokarioti (cijanobakterija), neki protisti (mikroalge)	neki prokarioti (npr. <i>Sulfolobus</i>)	neki prokarioti (<i>Rhodobacter</i> , <i>Chloroflexus</i>)	mnogi prokarioti (<i>Clostridium</i>) i protisti

Većina industrijskih mikroorganizama spada u skupinu kemoheterotrofa koji dobivaju energiju jednim od sljedećih procesa:

- aerobnom respiracijom (aerobno) – oksidacija organskih tvari do CO_2 i H_2O uz O_2 kao akceptor elektrona,
- fermentacijom (anaerobno) – anaerobna razgradnja glukoze i drugih organskih molekula (npr. razgradnjom glukoze s kvascem *Saccharomyces cerevisiae* nastaje etanol i CO_2),
- anaerobna respiracija (anaerobno) – oksidacija organskih tvari do CO_2 uz anorganske tvari kao akceptor elektrona (npr. NO_3^- , SO_4^{2-}).

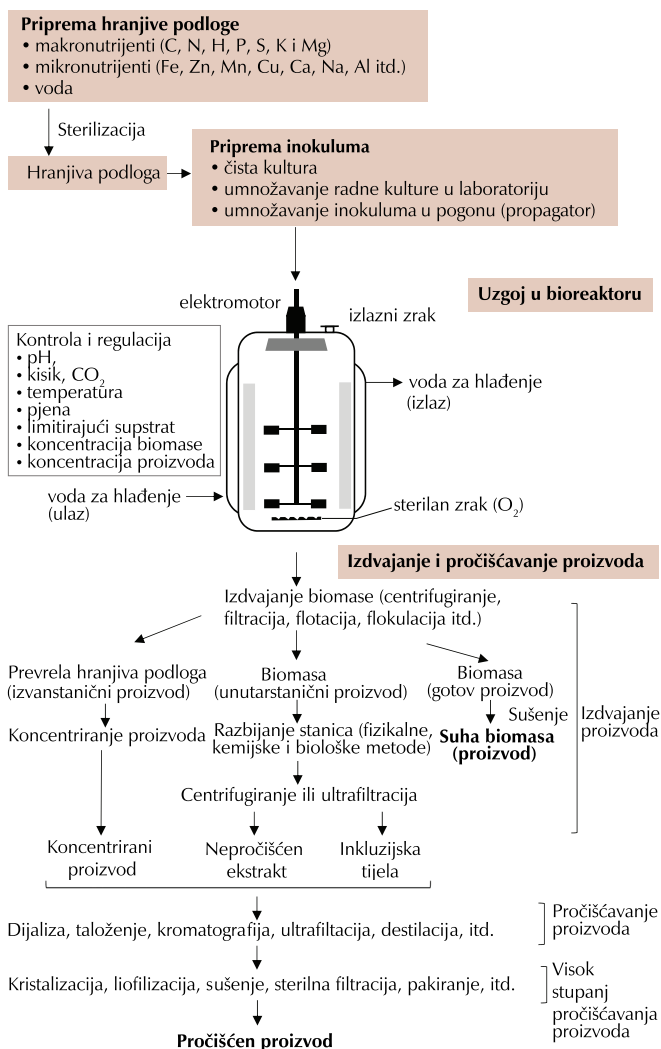
Hranjiva podloga

Hranjiva podloga za uzgoj mikroorganizma sadržava sve nutrijente potrebne za sintezu staničnog materijala i energije te za sintezu proizvoda metabolizma. Ovisno o koncentraciji u hranjivoj podlozi, nutrijenti se dijele na:

- makronutrijente ($> 10^{-4}$ M) – ugljik, dušik, vodik, kisik, sumpor, fosfor, Mg^{2+} i K^+ ,
- mikronutrijente ($< 10^{-4}$ M) – Mo^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , vitamini, metabolički prekursori itd.

Izvor ugljika može biti anorganska (CO_2) ili organska tvar, što ovisi o vrsti mikroorganizma, odnosno metabolizmu stanice. Za industrijski uzgoj heterotrofnih mikroorganizama najčešće se upotrebljavaju obnovljive sirovine kao što je melasa, škrob, kukuruzni sirup, sirutka, lignocelulozni hidrolizati itd. Organski izvori ugljika su i primarni izvori vodika. Dušik se dodaje u podlogu u obliku anorganskih soli (npr. amonijak, amonijeve soli) i/ili kompleksnih

* Prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek
e-pošta: mivancicsantek@pbf.hr



Slika 1 – Prikaz biotehnološkog procesa

organskih tvari (npr. kvašćev ekstrakt, pepton). U aerobnim procesima kisik potreban za rast mikroorganizma se dobiva uvođenjem zraka u hranjivu podlogu. Zbog niske topljivosti kisika zrak se mora kontinuirano uvoditi u hranjivu podlogu. Preostali makro i mikronutrijenti dodaju se u podlogu u obliku anorganskih soli.

Biotehnološki procesi

Biotehnološki procesi se odvijaju u nekoliko faza koje obuhvaćaju: (1) pripremu i sterilizaciju hranjive podloge i procesne opreme, (2) pripremu inokuluma (mikrobna kultura za nacjepljivanje bioreaktora), (3) uzgoj u bioreaktoru te (4) izdvajanje i pročišćavanje proizvoda (slika 1). Priprema inokuluma ključna je za uspješno provođenje uzgoja i provodi se u nekoliko koraka počevši od laboratorijske kulture mikroorganizma. Mikroorganizam se precjepljuje u sterilnu hranjivu podlogu uz postupno povećanje volumena dok se ne dobije potreban volumen inokuluma za nacjepljivanje pogonskog propagatora. Glavni uzgoj započinje nacjepljivanjem hranjive podloge u bioreaktoru. Konstrukcija bioreaktora omogućuje aseptičan rad i osigurava optimalne uvjete

uzgoja radnog mikroorganizma. Nakon završenog uzgoja provodi se izdvajanje i pročišćavanje proizvoda, a sam postupak ovisi o vrsti proizvoda. Proizvod biotehnološkog procesa može biti:

- prevrela hranjiva podloga s mikroorganizmom (npr. mliječni fermentirani proizvodi),
- tekući dio prevrele hranjive podloge dobiven nakon izdvajanja mikrobne biomase (pivo, vino, ocat),
- biomasa mikroorganizma (npr. pekarski kvasac),
- izvanstanični proizvodi metabolizma koji su otopljeni u prevreloj hranjivoj podlozi (npr. etanol, otapala, antibiotici, enzimi, vitamini, aminokiseline, organske kiseline),
- unutarstanični proizvodi metabolizma (antibiotici, enzimi, nukleinske kiseline, hormon rasta, inzulin, interferon itd.).

Izdvajanje biomase najčešće se provodi filtracijom i centrifugiranjem te mikrofiltracijom, sedimentacijom, flokulacijom ili flotacijom. Koncentracija izvanstaničnih proizvoda u prevreloj hranjivoj podlozi često je vrlo niska, pa je potrebno provesti koncentriranje proizvoda kako bi se smanjili troškovi pročišćavanja (npr. taloženjem, adsorpcijom, ekstrakcijom, ultrafiltracijom itd.). Osim koncentriranja primjenom nekih od navedenih postupaka povećava se čistoća izdvojenog proizvoda. Za razliku od izvanstaničnih, postupak pročišćavanja unutarstaničnih proizvoda je složeniji i skuplji. Prije izdvajanja unutarstaničnog proizvoda potrebno je razbiti stanični zid mikroorganizma primjenom neke od sljedećih metoda:

- mehaničke metode (visokotlačni homogenizatori, kuglični mlinovi, ultrazvuk, preše),
- fizikalne metode (osmotski stres, termoliza, zaleđivanje/otapanje),
- kemijske metode (kiseline, lužine, otapala, detergentsi, kelirajući agensi),
- biološke metode (djelovanjem faga, enzima, inhibicija sinteze staničnog zida s antibiotikom).

Izbor metode ovisi o vrsti mikroorganizma i fizikalno-kemijskim karakteristikama proizvoda.

Pročišćavanje proizvoda kromatografskim i membranskim postupcima provodi se nakon uklanjanja stanica, staničnih dijelova i micela koje mogu uzrokovati začepljenje opreme. Također se primjenjuju i drugi postupci pročišćavanja kao što je taloženje, destilacija i kristalizacija, itd.

Literatura

- J. B. Reece, N. Meyers, L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky, Campbell Biology, Diverse nutritional and metabolic adaptations have evolved in prokaryotes u Australian and New Zealand Edition (Vol. 10), Pearson Higher Education AU, 2015., str. 587–589.
- N. J. Claassens, D. Z., Sousa, V. A. M. dos Santos, W. M. de Vos, J. van der Oost, Harnessing the power of microbial autotrophy, Nat. Rev. Microbiol. 14 (11) (2016) 692–706, doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.130>.
- M. L. Shuler, F. Kargi, Bioprocess Engineering: Basic Concepts, Englewood Cliffs, New Jersey, Prentice Hall, 1992., str. 10–147.
- R. S. Singh, Industrial biotechnology: an overview. Advances in Industrial Biotechnology, IK International Publishing House Pvt. Ltd, India, 2014., str. 1–35.