

rijali, cementi s malom koncentracijom defekata, betoni ojačani staklenim vlaknima.

Znanstveno zanimanje koje prati razvoj tih materijala, a očituje se u znanstvenim radovima objavljenim u 1980-im godinama, u prvom redu se odnosilo na površinske pojave i granice faza, tanke filmove, fiziku submikronskih struktura, vodljivost amorfnih materijala i supravodljivost, fraktalne oblike materijala, deformacije keramika, ponašanje materijala u jednoj i dvije dimenzije, epitaksiju i heteroepitaksiju, interakcije živog tkiva i implantiranog materijala, optoelektroničke pojave, te prognoziranje svojstava na osnovi faznih dijagrama. Stoga se pretpostavlja da će u skoroj budućnosti biti posebno zanimljivi materijali vrlo specijaliziranih funkcija, poboljšani masovni materijali, dizajn svojstava materijala kontrolom mikrostrukture i mikrokemije, neravnotežni materijali i tzv. dvodimenzijski materijali.

LIT.: J. Wulff et al., Structure and Properties of Materials. MIT Press and Wiley, Cambridge-New York 1963–1965. – И. И. Сидорин, Основы материаловедения. Машиностроение, Москва 1976. – R. A. Flinn, P. K. Trojan, Engineering Materials and Their Applications. Houghton Mifflin Co., Boston 1986. – M. F. Ashby, D. R. H. Jones, Engineering Materials, Vol. 1 i 2. Pergamon Press, Oxford 1986. – Encyclopedia of Materials Science and Engineering. MIT Press, Cambridge 1986. – P. A. Psaras, H. D. Langford, (Eds.), Advancing Materials Research. National Academy Press, Washington 1987.

K. Adamić

## TEHNOLOGIJA, MIKROBNA (BIOTEHNOLOGIJA),

znanstvena djelatnost koja se bavi industrijskom primjenom mikroorganizama, dakle vrlo sitnih organizama u koje se ubrajaju virusi, bakterije, alge, mikrofungi i protozoe. Njih proučava mikrobiologija, koja se, s obzirom na specifične srodne skupine mikroorganizama i njihovo djelovanje u prirodi, razvila u više smjerova. U posljednjih 120 godina, otkada je L. Pasteur postavio mikrobiologiju na znanstvene osnove, brzo su se razvile medicinska, tehnološka i zemljišna mikrobiologija jer su prirodne znanosti omogućile proučavanje mikroorganizama specifičnim tehnikama.

Mikrobna tehnologija postala je vrlo važna za razvoj moderne *biotehnologije* koja obuhvaća postupke tehničke primjene mikroorganizama, biljnih i životinjskih stanica i njihovih sastavnih dijelova. Osnovicu biotehnologije čini

integriranje biokemijskih i bioloških procesa i operacija za industrijsku primjenu živih stanica, osobito mikroorganizama. Specifične mikrobiološke, kemijske, biokemijske i inženjerske spoznaje ujedinjene su u *biokemijskom inženjerstvu* koje biološke fenomene prenosi u industrijsko mjerilo (sl. 1). Metodama *genetičkog inženjerstva* prenose se informacijske molekule iz različitih stanica viših organizama u pogodne mikroorganizme, pa tako transformirani mikroorganizmi omogućuju industrijsku proizvodnju humanih proteina, hormona i drugih biološki aktivnih spojeva.

Primjena automatiziranih bioreaktora novih konstrukcija omogućuje masovni uzgoj mikroorganizama. U tim se reaktorima osjetljive biokemijske reakcije vode tako da se nakupljaju različiti stanični metaboliti, koji se ne mogu uspješno i ekonomično proizvesti kemijskom sintezom (antibiotici, vitamini, neki proteini, hormoni i enzimi).

Mikroorganizmi se primjenjuju u proizvodnji lijekova, specifičnih kemikalija, ali i kemikalija za široku potrošnju. Zbog nestašice nafte kemijska se industrija okreće prema onim sirovinama koje biljke fotosintezom obnavljaju svake godine. Te obnovljive biljne sirovine, kao što su celuloza, škrob i šećeri, mikroorganizmi mogu konvertirati u mnoštvo različitih kemijskih spojeva. Proizvodnja etanola, koji se kao gorivo dodaje benzinu (gasohol), primjer je važnosti mikrobne proizvodnje u rješavanju nestašice goriva. Biokonverzija poljoprivrednih otpadaka fermentacijom u metan može ublažiti sve veću nestašicu energije na seoskim gospodarstvima. Proteini za ishranu mogu se proizvesti biosintezom s pomoću mikroorganizama iz različitih sirovina u velikim bioreaktorima kontinuiranim mikrobnim procesima.

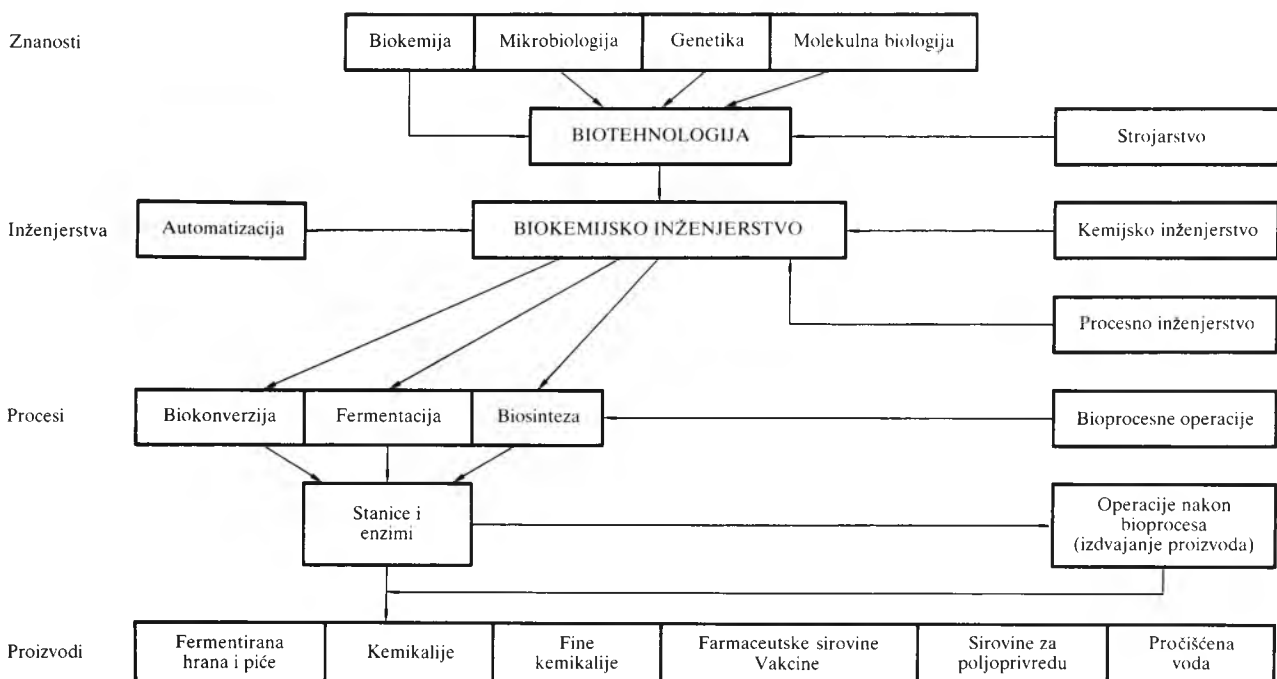
Metode biokemijskog inženjerstva i mikrobne tehnologije primjenjuju se u pročišćivanju komunalnih i otpadnih industrijskih voda, jer mikroorganizmi mogu vrlo djelotvorno oksidirati mnoštvo nepoželjnih otpadnih tvari.

Novе tehnike u genetičkom i biokemijskom inženjerstvu omogućile su razvoj niza novih procesa koji se prije iz tehničkih razloga nisu mogli ostvariti.

U dugom razvojnom putu tehnološka je primjena mikroorganizama prošla više bitnih razdoblja da bi danas nova biotehnologija postala jednim od važnih razvojnih smjerova suvremene industrije (tabl. 1).

Čovjek je bio svjestan fermentacija mnogo prije no što im je mogao utvrditi uzrok. Pećinski je čovjek otkrio da je meso koje je stajalo nekoliko dana bilo mnogo ukusnije od svježeg mesa. Znao je, također, da se opojna pića mogu dobiti od voća i žita.

Proces zrenja mesa i proizvodnja alkoholnih pića bile su prve primjene fermentacije koje su ljudi upoznali.



Sl. 1. Odnosi biokemijskog inženjerstva i osnovnih znanosti, inženjerskih disciplina te skupina osnovnih bioloških procesa i proizvoda

Tablica 1  
RAZDOBLJA I PROIZVODI TEHNOLOŠKE PRIMJENE  
MIKROORGANIZAMA

<i>Prije Pasteura (do 1865)</i>
Fermentirana pića, kiselo mlijeko, fermentirana hrana, kvasac
<i>Poslije Pasteura (1865–1940)</i>
Organska otapala
Organske kiseline
Obradba otpadnih voda
<i>Razdoblje antibiotika (1940–1960)</i>
Penicilin
Antibiotici širokog spektra
Kulture animalnih stanica; virusne vakcine
<i>Razdoblje poslije antibiotika (1960–1974)</i>
Aminokiseline
Mikrobni proteini
Industrijska primjena enzima
Imobilizirani enzimi i mikrobnostanice
Metan iz otpadnih tvari
Etanol kao gorivo (gasohol)
<i>Razdoblje nove biotehnologije (od 1974)</i>
Genetičko inženjerstvo (1974)
Tehnologija hibridoma i monoklonska antitijela (1975)
Monoklonski dijagnostički testovi (1980)
Humani inzulin (1982)
Interferoni (1983)
Interleukini
Nekrozni faktor raka
Faktori rasta za pojedina tkiva
Plazminogeni aktivator tkiva (t-PA)

Pripremanje kruha poznato je skoro isto toliko dugo koliko i poljoprivreda, a zasniva se na fermentaciji uzrokovanoj kvascem. Hljebovi kruha nađeni su u egipatskim piramidama građenim prije šest tisuća godina. Fermentiranje voća, osobito grožđa, poznato je od davnine i svi su primitivni narodi imali neka iskustva u pripremanju pića alkoholnim vrenjem. Pivo je nešto manje drevno od vina jer ga je teže proizvesti. Mezopotamijski zapisi oko 4500. god. govore da je pivarstvo kao profesija bilo poznato još 1500 godina prije. Egipatski podaci iz doba IV. dinastije, oko 2500. godine, opisuju proizvodnju slada od ječma i fermentaciju piva. Kui, kinesko pivo od riže, pripremao se još oko 2300. god. Kolumbo je u Americi otkrio da Indijanci piju pivo od kukuruza. Prije više od 3000 godina Kinezi su upotrebljavali pljesnive pogače od soje za liječenje kožnih infekcija, a Indijanci su Srednje Amerike upotrebljavali gljive za liječenje gnojnih rana.

Tijekom srednjeg vijeka ljudi su naučili kako da poboljšaju okus vina, kruha, piva i sira, ali i poslije više tisuća godina iskustva nisu bili svjesni da u procesu fermentacije djeluju živi organizmi.

Nizozemac A. van Leeuwenhoek (1632–1723), koji se bavio brušenjem leća i konstrukcijom mikroskopa, otkrio je svojim jednostavnim mikroskopom mikroorganizme u vodi, gnoju i hrani, dobro ih nacrtao i opisao. Svoja je opažanja Leeuwenhoek redovito objavljivao u pismima Kraljevskom društvu u Londonu od 1674. do 1684. godine, a mikroorganizme je nazvao vrlo sitnim životinjicama.

Francuski učenjak J. Thénard objavio je 1803. da su kvasci što ih primjenjuju vinari živi i da su baš oni uzročnici vrenja i nastajanja alkohola. Te su Thénardove nalaze odbacile pristalice tada uobičajene kemijske teorije po kojoj se vrenje smatralo kemijskim procesom raspada šećera bez sudjelovanja živih organizama. Tek je kemičar L. Pasteur (1822–1895) dokazao da su Thénard i drugi istraživači bili u pravu. Pasteur je 1857. potvrdio da su kvasci uzročnici alkoholnog vrenja, a da mnoge zarazne bolesti uzrokuju mikroorganizmi. To je otkriće bilo prekretnica u medicini, ali i početak mikrobiologije kao znanstvene discipline. Pasteur je pažljivo proučavao djelovanje mikroorganizama kao uzročnika proizvodnih vrenja i zaraznih bolesti, a 1861. konačno je opovrgao teoriju spontane generacije mikroorganizama. Vrlo dobro smišljenim pokusima dokazao je porijeklo mikrobnih kontaminacija i mogućnost njihova sprečavanja. Pokazao je da jednostavni čep od vate može spriječiti ulaz mikroorganizama u posude sa sterilnim hranjivim tekućinama i sačuvati ih od kvarenja.

Pasteur je kao uspješan kemičar eksperimentator unio u biološka istraživanja preciznost te omogućio znanstveni pristup mikrobiologiji. U svojim daljnim istraživanjima dokazao je da dobivanje pojedinih proizvoda vrenja (etanola i drugi alkoholi, octena, mliječna i druge karboksilne kiseline) ovisi o djelovanju specifičnih mikroorganizama, a da se vino i pivo kvare zbog kontaminacije nepoželjnim mikroorganizmima.

Mikroorganizmi su mnogo poznatiji kao uzročnici mnogih zaraznih bolesti nego kao proizvodni mikroorganizmi u korisnim fermentacijskim procesima. Zato je medicinska mikrobiologija, koja se bavi patogenim mikroorganizmima, vrlo razvijena. L. Pasteur i R. Koch (1843–1910), kao osnivači moderne mikrobiologije, dali su bitan doprinos razvoju medicinske mikrobiologije. Premda su I. Semmelweis i J. Lister već ranije tvrdili da su mikroorganizmi uzročnici zaraznih bolesti te uveli asepsu u bolnice, tek je R. Koch 1876. eksperimentalno potvrdio da bedrenicu (antraks) u životinja i ljudi uzrokuje bakterija *Bacillus anthracis*. Izolacijom u čistoj kulturi bakterija od zaraženih bolesnika Koch je uspio nepobitno dokazati da je *Mycobacterium tuberculosis* uzročnik tuberkuloze. Pasteur je dokazao da se patogeni mikroorganizmi unijeti u zemlju održe živi samo nekoliko sati, pa je zaključio da neki mikrobi u zemljištu ubijaju druge mikrobe. Njegovo je također otkriće da je rast uzročnika bedrenice u tkivu govoda inhibiran ako su prisutni neki aerobni mikrobi, pa se već tada nadao da će ljudske bolesti jednom biti liječene primjenom borbe jedne vrste mikroba protiv drugih. Pripremom cjepiva protiv

bedrenice i protiv bjesnoće Pasteur je mnogo pridonio razvoju imunologije u suzbijanju zaraznih bolesti.

Da bi izbjegli rizik liječenja jedne bolesti s pomoću druge, liječnici su nastojali da iz nepatogenog mikroorganizma izdvoje kemijsku tvar koja bi bila sposobna da inhibira ili razori patogene mikroorganizme. R. Emmerich i O. Loew izdvojili su 1901. godine pijocijanazu iz bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Nekoliko stotina bolesnika bilo je sasvim uspješno liječeno tim prvim antibiotikom pijocijanazom. Međutim, pijocijanaza je ubrzo napuštena zbog nepouzdanosti, jer tada još nije postojao proizvodni postupak koji bi garantirao uvijek jednaku aktivnost antibiotika.

Novi mikrobiološke tehnike omogućile su razvoj mikrobiologije u različitim smjerovima. S. N. Winogradsky i N. Beijerinck su u razdoblju od 1888. do 1900. specifičnim metodama otkrili značenje različitih mikroorganizama za plodnost zemljišta. Ti su istraživači osnivači eksperimentalne ekologije mikroorganizama. Pasteurovi sljedbenici s osobitim uspjehom u industriju uveli kontroliranu proizvodnju s pomoću mikroorganizama. Ch. Hansen je 1882. prvi uveo čiste kulture kvasca u pivarstvo i time omogućio dobru kontrolu industrijskih fermentacija. Potkraj XIX. i početkom XX. st. razvijena je submerzna (dubinska) proizvodnja u aeriranim fermentorima i velika industrijska proizvodnja etanola. Za vrijeme prvoga svjetskog rata, H. Weizmann je s pomoću anaerobne bakterije *Clostridium acetobutylicum* od kukuruzne komine proizveo aceton, koji je tada bio bitan za proizvodnju eksploziva kordita. Tvrtka Pfizer je 1923. otvorila prvu tvornicu u svijetu za fermentaciju limunske kiseline s pomoću pljesni *Aspergillus niger* koja obični šećer prevodi u limunsku kiselinu. Ostale industrijske kemikalije (otapala, karboksilne kiseline) koje se dobivaju fermentacijom otkrivene su postupno, a pripadni se proizvodni procesi obilno primjenjuju u industriji.

Sve do 1928. praktično nije bilo napretka na polju antibiotika. Te je godine A. Fleming, proučavajući bakterije *Staphylococcus aureus*, koje uzrokuju gnojne upale, opazio neobičnu pojavu. Naime, jednog su dana neke kulture na Petrijevim zdjelicama bile kontaminirane zelenoplavom pljesni, ali se u blizini izraslih kolonija pljesni vidjela prozirna svijetla zona bez stafilokoka. Fleming je tada počeo uzgajati tu pljesan iz roda *Penicillium* i pronašao da filtrat kulture djeluje baktericidno i bakteriostatski na mnoge grampozitivne bakterije, ali nije toksičan za ljude. Aktivnu tvar u filtratu kulture nazvao je penicilinom. Flemingovu otkriću bilo je poklonjeno malo pažnje, bar s obzirom na njegovu primjenu, sve dok skupina istraživača s Oxfordskog sveučilišta pred početak drugoga svjetskog rata nije uspjela izolirati tu vrlo aktivnu antibakterijsku tvar, penicilin. Ti su istraživači, kojima su se na čelu nalazili H. Florey i E. Chain, uzeli ponovno *Penicillium notatum*, pljesan sačuvanu iz vremena Flemingova otkrića, u svoj program istraživanja. Nakon višegodišnjeg rada, 27. I. 1941. prvi put je dan penicilin čovjeku, i to s iznenađujućim uspjehom. Prvi su klinički rezultati nagovještavali dolazak nove ere u kemoterapiji, a zbog ratnih prilika u Engleskoj proizvodnja je penicilina nastavljena u SAD. Američka farmaceutska poduzeća uz pomoć vladinih istraživačkih laboratorija već su 1944. znatno usavršila postupak i otvorila veliku industrijsku proizvodnju penicilina, a uskoro i niza novih, još aktivnijih antibiotika. Uspješno uvođenje proizvodnje antibiotika omogućilo je i donijelo najveće tehnološke promjene u industrijskoj primjeni mikroorganizama. Submerzna kultivacija pljesni, vrlo strogi uvjeti aseptične proizvodnje u svim fazama proizvodnje i uvođenje genetičkih metoda, da bi se povećala sposobnost mikroorganizama za što veće prinose metabolita, primjeri su tih novih prodora koji su omogućili razvoj moderne biotehnologije.

Genetika koja se razvila početkom XX. st. proučavajući nasljedna svojstva životinja i biljaka tek se od 1941. više bavi mikroorganizmima. G. W. Beadle i E. L. Tatum su tada uspjeli izolirati niz biokemijskih mutanata gljive *Neurospora crassa*. To je omogućilo analizu putova metabolizma i izvanredno pogodan pristup proučavanju funkcije gena. Uskoro su S. E. Luria i M. Delbrück izolirali bakterijske mutante i omogućili primjenu mikroorganizama u proučavanju gena i osnovnih kemijskih mehanizama u biološkim procesima. Povezivanjem mikrobiologije, genetike i biokemije razvila se u posljednjih 50 godina molekularna biologija, koja je omogućila razvoj genetičkog inženjerstva i primjenu novih tehnika u manipuliranju mikroorganizmima. Golemo proširenje industrijske primjene mikroorganizama posljedica je baš tih novih otkrića i svladavanja barijera među vrstama različitih živih organizama; to je otvorilo nova područja u biotehnologiji. Ti su prodori realizirani potpuno novim biološkim i kemijskim metodama. Fuzija staničnih protoplasta nakon što se enzimima ukloni stanična stijenka, a osobito tehnike rekombinacije DNA (dezoksiribonukleinska kiselina) dopuštaju transfer dijelova DNA iz jedne vrste organizama u drugu specifičnim vektorima (S. Cohen i H. W. Boyer, 1973). Donedavno se proizvodni mikroorganizam izdvajao iz prirodnih staništa selekcijom, a kasnije umjetno mijenjao indukcijom mutacija (nasljednih promjena), dok se danas tehnikama rekombinantne DNA (rDNA) mogu genetske informacije iz ljudskih stanica unositi u bakterijske ili fungalne stanice te proizvoditi vrlo različiti kemijski spojevi, npr. specifični proteini, tehnikama mikrobnih tehnologije. Ti specifični, vrlo aktivni proteini i peptidi nisu se do sada mogli proizvoditi u većem opsegu, pa su ovi novi prodori osigurali biotehnologiji i mikrobiologiji važno mjesto u modernom tehnološkom razvoju.

## MIKROORGANIZMI

Mikroorganizmi (mikrobi) jednostavni su organizmi mikroskopskih dimenzija. Za mikroorganizme je karakteristično da se brzo razmnožavaju, vrlo su prošireni u prirodnom okolišu, a u biosferi omogućuju kruženje tvari. Dimenzije bakterija i funga izražavaju se u mikrometrima ( $10^{-6}$  m), a virusa u nanometrima ( $10^{-9}$  m). Međutim, naziv mikroorganizmi ne definira dobro tu skupinu organizama jer je zasnovan samo na njihovim dimenzijama. Mikrofungi se, npr., ubrajaju u mikroorganizme, ali su mnoge alge i fungi makroskopski

organizmi. Nema, dakle, strogih granica koje odvajaju mikrobiologiju od botanike i zoologije, ali postoje znatne razlike u metodologiji istraživanja mikroorganizama, pa je specifična metodika promatranja i kultiviranja mikroorganizama izdvojila mikrobiologiju u samostalnu znanstvenu disciplinu koja proučava morfologiju, strukturu, genetiku, organizaciju i fiziologiju mikroorganizama.

Omjer površine mikroorganizama prema obujmu vrlo je velik, pa im to omogućuje vrlo brzu razmjenu tvari. Vrlo aktivan metabolizam mikroorganizama uzrok je vrlo brze sinteze proteina, oko 1000 puta brže nego u biljaka i životinja. Veliku aktivnost mikroorganizama pokazuje brzina njihova rasta i reprodukcije, koja za neke bakterije može iznositi i manje od 10 minuta.

Mikroorganizmi se pojavljuju u velikom mnoštvu u prirodi na svim onim mjestima na kojima nalaze hranu i vodu. Uz povoljnu temperaturu razmnožavaju se velikom brzinom u mnoštvo odvojenih ili povezanih jedinki, biomasu, koja se može opaziti golim okom kao zamućenje ili talog u tekućinama, odnosno kao niti ili različito obojene prevlake na čvrstim podlogama. Većina mikroorganizama raste u jednakim uvjetima kao i čovjek, pa se u prirodnoj sredini nalazi mnoštvo mikroorganizama u zraku, vodi, zemlji, hrani, na površini biljaka, životinja i ljudi. Mikroorganizmi se obično ne nalaze unutar zdravih i neoštećenih stanica biljnih i životinjskih tkiva, npr. u plodovima, sjemenkama, krvi, mišićima i pojedinim organima, ali ih ima na sluzokožama. Neke bakterije, rikecije, svi virusi i plazmidi žive parazitski u mikrobnim, biljnim ili životinjskim stanicama.

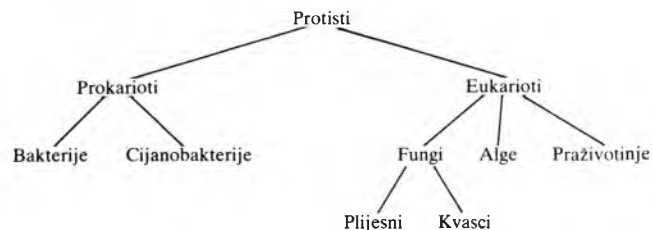
S obzirom na neživa ili živa staništa mikroorganizmi se svrstavaju u saprofitne i parazite. Saprofiti rastu na anorganskim i organskim tvarima uzimajući potrebnu hranu iz uginulih biljaka i životinja te različitih otpadaka. Paraziti uzimaju hranu sa živih organizama ili iz njih. Mnoštvo parazitnih mikroorganizama čini uobičajenu mikrofloru živih organizama ne oštećujući svoje domaćine. Manji broj vrsta parazita (patogeni mikroorganizmi) oštećuju svog domaćina uzrokujući bolesti, a ponekad i smrt.

Saprofiti su mnogobrojniji od parazita i čine izvanredno važnu kariku u biološkim ciklusima Zemljine biosfere. Neki od njih, neke bakterije, kvasci i plijesni, važni su za industriju.

Svi su se mikroorganizmi, osim protozoa, ranije smatrali najjednostavnijim pripadnicima biljnog carstva, tj. najnižim biljkama. Međutim, mnogi mikroorganizmi imaju svojstva zajednička i biljkama i životinjama. Već je 1866. njemački biolog E. Haeckel izdvojio sve mikroorganizme građene od stanica u veliku skupinu protista, koja obuhvaća bakterije, mikrofunge, alge i protozoe. *Protisti* su građeni jednostavnije od višestaničnih biljnih i životinjskih organizama koji su se razvili od protista evolucijom u dalekoj prošlosti. Za razliku od protista, acelularne i supcelularne strukture mogu se reproducirati samo u drugim stanicama. To su virusi, rikecije i plazmidi.

**Klasifikacija mikroorganizama.** Klasifikacija nije važna samo za poznavanje srodnosti i evolucije mikroorganizama, nego i za patentnu zaštitu proizvodnih procesa. Pri opisu biotehnoških procesa moraju se, osim tehnologije, detaljno opisati i morfološka, genetička, fiziološka i biokemijska svojstva proizvodnog mikroorganizma. Identifikacija omogućuje smještanje nepoznatog mikroorganizma u određenu, međunarodno prihvaćenu klasifikaciju, od carstva, kola, razreda, redova, porodica i rodova do vrste. Ime pojedine mikrobne vrste binominalna je kombinacija, a sastoji se od naziva roda i samo jednog specifičnog epiteta, npr. *Bacillus subtilis*. Osim naziva roda, prva riječ može označavati neko svojstvo mikroorganizma, npr. *Bacillus*, štapić, ili može biti izvedena od imena autora koji je taj mikroorganizam prvi opisao, npr. *Escherichia* (prema autoru T. Escherichu). Druga je riječ specifični dio imena, a opisuje neko njeno svojstvo, npr. boju kolonije u imenu *Sarcina lutea* (žuta sarcina). Ime roda uvijek se piše velikim, a specifično ime malim slovom, čak i ako je izvedeno od imena. Znanstveno ime mikroorganizma tiska se kurzivom.

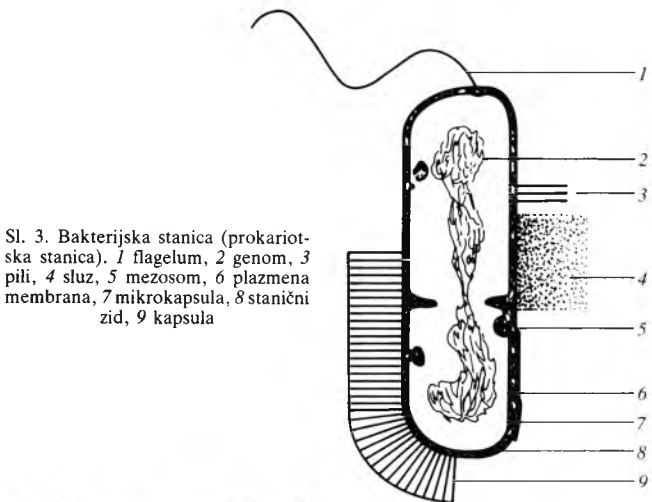
**Značajke mikrobne stanice.** Svi su organizmi građeni od stanica i njihovih proizvoda, pa stanice čine osnovni modul svih organizama. S obzirom na svoju građu i način reprodukcije sve se stanice mogu svrstati u dva tipa: *prokariotske stanice*, koje nemaju membranom omeđenu jezgru, i *eukariotske stanice*, u kojih je jezgra omeđena membranom. Organizmi s prokariotskim stanicama nazivaju se *prokariotima*, a oni s eukariotskim stanicama *eukariotima*, pa se tako mogu razvrstati i mikroorganizmi koji se ubrajaju u protiste (sl. 2).



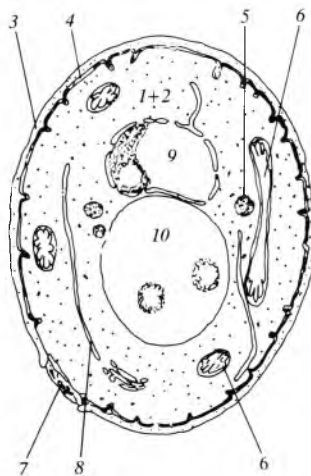
Sl. 2. Vrste mikroorganizama koji se ubrajaju u protiste

Tipične su odlike prokariota kratko vrijeme udvostručenja, brze metaboličke reakcije i velika raznolikost metabolizma, pa prokarioti daju velik doprinos kruženju biogenih elemenata u prirodi. Prokariotske su stanice građene jednostavnije od eukariotskih, a mnoge funkcije u metabolizmu i reprodukciji preuzimaju membranske strukture (sl. 3). Prokariotski se mikroorganizmi dijele običnom diobom nakon što stanični sadržaj naraste, dezoksiribonukleinska kiselina (DNA) se udvostruči, a njena uzvojnica podijeli na dvije stanice. Proces udvajanja i podjela DNA te nastajanje novoga staničnog zida koordiniran je proces koji se događa umjesto mitoze (vegetativne diobe).

Eukariotski mikroorganizmi te biljne i životinjske stanice po svojoj su unutrašnjoj organizaciji mnogo složeniji od



Sl. 3. Bakterijska stanica (prokariotska stanica). 1 flagelum, 2 genom, 3 pili, 4 sluz, 5 mezosom, 6 plazmena membrana, 7 mikrookapsula, 8 stanični zid, 9 kapsula



Sl. 4. Kvašičeva stanica (eukariotska stanica). 1 citoplazma, 2 ribosomi, 3 stanični zid, 4 citoplazmena membrana, 5 uklopine masti, 6 mitohondrije, 7 ožiljak pupa, 8 endoplazmeni retikulum, 9 jezgra, 10 jezgrica

prokariota. Eukariotske su stanice (sl. 4) građene od protoplazma okruženoj staničnim zidom (stijenkom). Protoplast obuhvaća citoplazmu s različitim organelama, a okružen je citoplazmenom membranom. U citoplazmi se nalazi sustav membrana koji dijeli pojedine stanične odjeljke. Nuklearne su tvari odvojene od citoplazme nuklearnom membranom. U citoplazmi se nalaze mitohondriji (aparati disanja) i kloroplasti (aparati fotosinteze); te su organele odvojene membranama. Vakuole, Golgijev aparat i endoplazmeni retikulum također su membranske strukture. U citoplazmi se nalaze ribosomi (sinteza proteina) i različite granule (rezervne tvari). Za eukariotske je organizme poznata vegetativna (mitoza) i seksualna reprodukcija. U eukariotskim stanicama mitoza ima više faza; genski se materijal identično udvaja, pa se kromosomi uzdužno cijepaju i jednako raspoređuju u svaku nastalu stanicu.

Mikroorganizmi su jednostanični, ali mogu rasti i u relativno nespecializiranim višestaničnim kolonijama. Vrijeme udvostručenja (generacijsko vrijeme) može za bakterije iznositi samo 7 minuta, ali i više sati, za kvasce 1 sat i više, dok biljne i životinjske stanice rastu mnogo sporije, pa generacijsko vrijeme može iznositi 20...60 sati. Zato je proizvodnja proteina u bakterija i kvasaca za nekoliko redova veličina brža nego u biljaka kao što je npr. soja, a biljne stanice proizvode proteine mnogo brže od životinjskih. Stanice sisavaca razlikuju se od mikrobnih i biljnih stanica po tome što nemaju čvrsti zid; njihova je citoplazma okružena samo plazmenom membranom. Te su stanice raspoređene u trodimenzijskim strukturama kao što su organi i mišići, a u kulturi tkiva rastu na površini nosača kao jednostanični sloj. Stanice viših organizama mogu rasti i u suspenziji, ali se tada nakupljaju u različite oblike, a u bioreaktoru rastu nediferencirano, često na različitim nosačima.

**Fiziologija i metabolizam mikroorganizama.** Mikrobnost stanica može zamisliti kao izvanredno konstruiranu proizvodnu napravu: proizvodi različite metabolite, a brzo se prilagođava različitim sredinama. Pojedina bakterijska stanica može proizvesti vrlo mnogo kemijskih spojeva, npr. oko 3000 različitih proteina, a može sadržavati oko milijun proteinskih molekula. Otvoreni biološki sustav kakav je živa stanica može se sam reproducirati na osnovi enzima kataliziranih kemijskih reakcija.

U mikrobnosti su proizvodnja mogu brzo sintetizirati kemijski spojevi od jednostavnih sirovina u toku integriranih biokemijskih procesa kojima upravljaju enzimi (v. *Enzimi*, TE 5, str. 334). Sintezu tih enzima reguliraju specifični mehanizmi prema uputama koje su kodirane u molekulama nukleinskih kiselina (DNA i RNA).

S obzirom na više organizme, mikroorganizmi se odlikuju izvanredno raznolikim metabolizmom. To se svojstvo mikroorganizama primjenjuje u biotehnologiji, jer je njen cilj proizvodnja mikrobnosti biomase ili različitih metabolita. Osobito brzo rastu prokariotski mikroorganizmi, i to na vrlo različitim hranjivim podlogama (supstratima), a mogu razgrađivati mnoštvo anorganskih i organskih spojeva.

Položaj je mikroorganizama u prirodi specifičan jer oni sudjeluju u razgradnji i biosintezi mnogih prirodnih spojeva. Biljke su proizvođači biomase jer s pomoću sunčane energije vežu fotosintezom ugljik-dioksid i tvore niz prirodnih spojeva. Životinje su potrošači biomase jer je troše kao hranu. Mikroorganizmi su razgrađivači (destruenti) jer mogu mineralizirati biljne i životinjske otpatke. Tako mikroorganizmi omogućuju stalno biokemijsko kruženje ugljika, dušika, fosfora, sumpora, magnezija, željeza i nekih teških metala u biosferi. U tom je kruženju aktivnost mikroorganizama golema. Svojom brojnošću i raznolikim putovima metabolizma mikroorganizmi djeluju u vodi, zemlji i atmosferi pod različitim okolnostima, kao što su vrlo visoka ili vrlo niska temperatura, visok tlak i drugi uvjeti u kojima viši organizmi ne mogu živjeti.

Konverzija različitih spojeva u staničnu biomasu dio je kemijskih procesa obuhvaćenih *metabolizmom*. Mikrobnosti stanice uvijek sadrže bar četiri vrste makromolekula: proteine,

nukleinske kiseline, polisaharide i lipide. Mikroorganizmi su sposobni da te makromolekule u toku svog rasta izgrade od jednostavnog izvora ugljika, a kasnije ih mogu pregraditi u različite spojeve. Sve su to metabolički procesi: *katabolizam* obuhvaća procese razgradnje organskih molekula, *anabolizam* procese izgradnje makromolekula od malih molekula, a *intermedijarni metabolizam* posreduje u pretvaranju razgradnih produkata u produkte anabolizma.

Proces anabolizma počinje transportom različitih spojeva u mikrobnosti stanicu. Poznavanje mehanizma transporta bitno je za proučavanje metabolizma. Mikrobnosti stanica je otvoreni sustav, što znači da s okolinom razmjenjuje tvari i energiju. Stanica tu energiju iz okoline pretvara u kemijsku koju iskorišćuje za različite potrebe, u prvom redu za sintezu svih kemijskih sastojaka stanice. To omogućuje mikrobnosti stanici održavanje visokoorganizirane strukture, rast i razmnožavanje.

U kataboličkim putovima metabolizma organske se tvari oksidiraju, a u anaboličkim putovima prevladavaju reduktivni procesi.

Mikrobnosti stanice izgrađene od mnoštva različitih spojeva, koje one mogu sintetizirati od relativno malo jednostavnih spojeva. Zato su anabolički putovi, u usporedbi s kataboličkim, brojniji i raznovrsniji. Spojeve iz okoline mikroorganizmi transformiraju katabolizmom u male molekule (organske kiseline, ketone, aldehide, alkohole), a to su polazne sirovine za biosintezu. Nukleotidi se polimeriziraju u nukleinske kiseline, aminokiseline u proteine, šećeri u polisaharide, a masne kiseline i glicerol u lipide.

Primarni je metabolizam srodan u svim organizmima, a njegovi su metaboliti bitni za život i reprodukciju organizma. Pojedini sekundarni ili specifični metaboliti (antibiotici, toksini i drugi) nastaju u manje vrste organizama, a čini se da nisu bitni za rast i reprodukciju.

Nastajanje metabolita vrlo je ovisno o uvjetima uzgoja. Mikroorganizmi mogu sintetizirati čitave skupine srodnih sekundarnih metabolita. Tako, npr., jedan soj iz roda *Streptomyces* može sintetizirati trideset i dva različita antraciklina. Neki mikroorganizmi mogu sintetizirati potpuno različite skupine kemijskih spojeva. Regulacija biosinteze sekundarnog metabolizma razlikuje se od regulacije primarnog metabolizma.

Prema izvoru energije potrebne za rast i razmnožavanje organizmi se mogu svrstati u *fototrofe*, koji rabe svjetlosnu sunčanu energiju, i *kemotrofe*, koji rabe kemijsku energiju. Obje se navedene vrste mogu dalje raščlaniti na mikroorganizme kojima rast ovisi o redoks-reakcijama s anorganskim spojevima iz okoline (fotolitotrofi, kemolitotrofi), odnosno s organskim spojevima iz okoline (fotoorganotrofi, kemoorganotrofi).

U fotolitotrofe ubraja se veoma mnogo evolucijski vrlo udaljenih vrsta: zelene biljke, alge, fitoflagelati, cijanobakterije i fotosintetske sumporne bakterije. Osim sumpornih bakterija, svi ti organizmi uzimaju iz vode elektrone, proizvođači kisik u reakciji fotolize vode. Sumporne bakterije uzimaju sumporovodik kao davaoca elektrona i stvaraju sumporne spojeve različitog stupnja oksidacije.

Fototrofni organizmi izuzetno su važni jer čine osnovnu kariku u procesu prijenosa sunčane energije u živi svijet, te kruženja biogenih elemenata, osobito ugljika, kisika i dušika, u prirodi. Sva slobodna energija za živi svijet potječe izravno ili neizravno od Sunca, a sav kisik u zraku nastao je djelovanjem fototrofnih organizama (fotolizom vode). Pojava prvih fotosintetskih organizama prije više od dvije milijarde godina potpuno je promijenila sastav atmosfere na Zemlji i pokrenula evoluciju u smjeru aerobnih oblika života koji danas prevladavaju. Važnost tih organizama u biokemijskom inženjerstvu zasad nije znatna.

U kemolitotrofe ubraja se relativno malo mikrobnosti vrsta koje su, međutim, vrlo proširene u prirodi, osobito u tlu. Svi su kemolitotrofi prokarioti (bakterije), a njihov osnovni mehanizam dobivanja energije u obliku adenozin-trifosfata (ATP) jest oksidativna fosforilacija. U biokemijskom se

inženjerstvu upotrebljavaju pri mikrobnom izluživanju metala iz siromašnih sulfidnih ruda, a očekuje se da će taj proces biti u budućnosti sve važniji.

U *kemoorganotrofe* ubrajaju se sve životinje i više gljive te mnoge mikrobnе vrste: kvasci, plijesni, mnoge protozoe i većina bakterija. I oni imaju važnu ulogu u kruženju biogenih elemenata u prirodi, jer razgrađuju i mineraliziraju organske tvari pretvarajući ih u anorganske potrebne za rast fotolito-trofa i kemolitotrofa.

Katabolizmom i oksidacijom organskih spojeva u stanicama kemoorganotrofa nastaju organski spojevi male molekularne mase koji služe kao polazne sirovine za sintezu svih kompleksnih staničnih sastojaka prijeko potrebnih za rast i razmnožavanje. Mehanizmi dobivanja energije za kemoorganotrofe obuhvaćaju aerobnu i anaerobnu respiraciju, te fermentaciju. Pod fermentacijom se razumijeva skup procesa za dobivanje energije u kojima organske tvari daju i primaju elektrone. U tehnologiji se, međutim, pojam fermentacije često proširuje na sve mikrobnе metaboličke procese, što s biokemijskog gledišta nije ispravno.

Iako mikroorganizmi upotrebljavaju mnogo organskih spojeva kao izvor energije, metabolički putovi razgradnje različitih spojeva često su zajednički. Zbog toga se organski spojevi mogu svrstati prema metaboličkim putovima kojima se razgrađuju: ugljikohidrati, trigliceridi i masne kiseline, dušični spojevi, ugljikovodici, te različiti spojevi s jednim (CO, CO<sub>2</sub>, metanol, formaldehid) i s dva ugljikova atoma.

Mikrobnе stanice u svom razvoju, osim izvora ugljika, trebaju i druge elemente (dušik, fosfor, sumpor), više mineralnih soli (magnezija, željeza), te čitav niz elemenata u tragovima, osobito teških metala. Zato je sastav hranjive podloge vrlo važan za rast i razvoj mikroorganizama, a osobito treba paziti na pH podloge. Većina bakterija raste u neutralnoj, ali mogu rasti i u kiseloj ili lužnatoj sredini. Kvasci i plijesni bolje rastu u slabo kiseloj sredini.

Metaboličke procese u živim stanicama kataliziraju enzimi, proteini specifičnih svojstava. Mnogi enzimi trebaju za svoju aktivnost kofaktore (koenzime). Struktura enzima i koenzima, njihova funkcija, kinetika i inhibicija već su opširno prikazani (v. *Enzimi*, TE 5, str. 334).

Metabolizam se sastoji od oksidacijskih i redukcijskih reakcija, a mnogi metaboliti u stanici mogu vezati vodikove atome. Te su reakcije izvanredno važne jer nastaju spojevi bogati energijom koju kasnije mogu opet osloboditi. Adenozin-trifosfat je univerzalan spoj u energetskom toku bioloških sustava (v. *Enzimi*, TE 5, str. 338).

Metabolizam aerobnih mikroorganizama usmjeren je u biokemijsku kaskadu reakcija koje se zovu disanje, a konačno nastaju voda i ugljik-dioksid.

U metabolizmu anaerobnih mikroorganizama ne nastaje potpuna oksidacija, a metaboliti mogu, npr., biti etanol i drugi alkoholi, organske kiseline te plinovi poput ugljik-dioksida, vodika i metana.

U životnim je procesima važna koordinacija metaboličkih reakcija. Tako, npr., mikrobnа stanica pri rastu na podlozi koja sadrži šećere, amonijak i mineralne soli mora razgraditi šećer te proizvesti intermedijare i dovoljno energije za sintezu makromolekula. To je niz od nekoliko desetaka enzimskih reakcija. Proizvedeni se intermedijari prevode u 20 aminokiselina, potrebne ribonukleotide, više vitamina i koenzima, masnih kiselina i drugih spojeva. Iz tih spojeva nastaju makromolekule, polimeri kao što su proteini, ribonukleinske i dezoksiribonukleinske kiseline, mukopeptidi, polisaharidi i lipidi, što se također obavlja nizom enzimskih reakcija.

Očigledno je da je za te sinteze potrebno više stotina enzima koji moraju integrirano djelovati tako da nastaju u potrebnim količinama i da se hranjive tvari ne troše uzalud. Samo vrlo dobra koordinacija omogućuje pravilnu reprodukciju bakterijskih stanica za samo 10–30 minuta. Genski je potencijal bakterijske stanice takav da je moguća sinteza više tisuća enzima, ali će dobrom koordinacijom nastati samo oni enzimi koji su u danom razdoblju rasta potrebni u određenoj količini; zato je njihova aktivnost regulirana mehanizmima

aktivacije i inhibicije. Regulacijom metabolizma organizam osigurava sintezu enzima u potrebnim količinama i njihovu aktivnost. Pri industrijskoj sintezi mikrobnih metabolita treba regulaciju metabolizma poremetiti tako da se prekomjerno sintetizira metabolit koji se želi proizvesti. Ta se deregulacija metabolizma može postići promjenom okoline (uvjeta uzgoja) ili genetičkim modifikacijama proizvodnog mikroorganizma. Genetičke su modifikacije opisane u poglavlju o genetički mikroorganizama. Kao primjer kako se pri promjeni uvjeta uzgoja bitno mijenja mikrobnі metabolizam može poslužiti kvasac, koji može živjeti aerobno i anaerobno, rastući u šećernim otopinama. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* u aerobnim uvjetima diše i brzo reproducira svoju biomasu, a glukozu oksidira u ugljik-dioksid i vodu. U anaerobnim uvjetima kvasac raste sporo, a glukozu fermentira gotovo kvantitativno u etanol i ugljik-dioksid. S obzirom na različite putove metabolizma, količina biomase i količina metabolita bitno se razlikuju (tabl. 2).

Tablica 2  
KVAŠČEVI METABOLITI  
(od 100 g glukoze)

Uvjeti uzgoja	Biomasa g	Ugljik-dioksid g	Etanol g	Voda g
Aerobni rast (disanje)	43	67	–	41
Anaerobni rast (fermentacija)	2	45	46	–

Tu je inhibiciju fermentacije kisikom opisao već Pasteur, pa je taj efekt nazvan njegovim imenom. Kvasac potpuno oksidira glukozu samo pri niskim koncentracijama šećera. Pri visokim koncentracijama šećera nastaje fermentacija, dakle represija disanja izvorom ugljika. To uključivanje različitih putova metabolizma posljedica je alosteričke regulacije enzima pri glikolizi.

Velike mogućnosti mikrobnog metabolizma sve se više iskorištavaju ne samo u biosintezi različitih spojeva nego i u selektivnoj primjeni pri transformaciji kemijskih spojeva. Te transformacije obuhvaćaju samo jednu ili nekoliko enzimskih reakcija. Najviše se primjenjuju mikrobnе transformacije u proizvodnji različitih steroidnih hormona, kortizona, testosterona i estrogena. Mikrobnе stanice mogu na steroidnoj molekuli izvesti mnoge reakcije, i to vrlo specifično, pa je proizvodni proces postao mnogo ekonomičniji. Te kemijske transformacije obuhvaćaju hidrosiliranje steroida, hidrogenaciju, dehidrogenaciju, otečepeljivanje bočnog lanca, epoksidaciju, oksidativno otvaranje prstena, a mikroorganizmi ih mogu izvršiti na različitim položajima steroidne molekule. Za transformaciju se obično upotrebljavaju mikrobnе stanice koje ne rastu ili su vezane na nosače, a provode samo jednu ili dvije vrlo specifične reakcije. Taj je postupak znatno proširio primjenu mikroorganizama u farmaceutskoj industriji.

**Genetika mikroorganizama.** Poznavanje nasljednih svojstava mikroorganizama potrebno je za njihovu uspješnu primjenu u industrijskoj proizvodnji. Strukture nasljednih informacijskih molekula, koje se nalaze u svakoj stanici DNA ili RNA, važne su za sve stanične procese. Sadržaj informacije određen je redoslijedom i brojem jedinica u tim molekulama. *Gen* je dio DNA na kromosomu koji nosi informaciju za sintezu jednog polipeptidnog lanca proteina. *Genom* kao skup gena prisutnih u stanici određuje njen *genotip*, dok *fenotip* izražava samo vidljiva svojstva stanice koja su posljedica djelovanja okoline na genotip.

Industrijska proizvodnja mikrobnih metabolita može se poboljšati bilo promjenom uvjeta proizvodnje, odnosno uzgoja proizvodnog mikroorganizma, dakle optimiranjem okoline, bilo promjenom nasljednih svojstava, dakle optimiranjem genotipa proizvodnog mikroorganizma. Oba se ta činitelja održavaju u fenotipu odabranog organizma; sposobnost proizvodnje nekog metabolita u znatnim količinama jedno je od tih svojstava. Poboljšanje promjenom okoline podrazumijeva pronalaženje uvjeta (sastav hranjive podloge,

količina mikrobnog cjepiva, inokuluma), aeracija, miješanje, temperatura itd.) optimalnih za proizvodnju nekog metabolita.

Optimiranje proizvodnje koje se postiže promjenom genotipa mikroorganizma često se naziva genetičkim oplemenjivanjem, a sastoji se u prepoznavanju i izolaciji onih jedinki u populaciji proizvodnog soja koje zbog drukčijih svojstava, tj. genotipa, imaju povoljnija fenotipna svojstva.

Genetička raznolikost među jedinkama u mikrobnjoj populaciji posljedica je spontanosti genetičkih promjena, koje su vrlo rijedak događaj, a može biti inducirana činiteljima koji povećavaju raznolikost u populaciji (zračenje, kemijski mutageni). Takve promjene genoma zovu se inducirane mutacije.

Većina se industrijskih mikrobnih procesa provodi sa sojevima mikroorganizama koji se genetički razlikuju od izvornih (tzv. divljih) sojeva izoliranih neposredno iz prirode. Za proizvodnju antibiotika, enzima, aminokiselina i drugih metabolita primjenjuju se obično inducirani mutanti prilagođeni potrebama proizvodnog procesa. Ako se proizvode biomasa ili primarni metaboliti, mikrobnji sojevi izolirani iz prirode mogu dati vrlo visoke prinose (etanol, organske kiseline).

Prinos specifičnih ili sekundarnih metabolita koji se može postići divljim sojevima najčešće je prenizak da bi ekonomski opravdao vođenje industrijske proizvodnje. Zato optimiranje sojeva industrijskih mikroorganizama najčešće obuhvaća postupke koji vode do visokoproduktivnih sojeva. Cilj poboljšanja može također biti i izolacija sojeva s boljim tehnološkim svojstvima, npr. skraćeno vrijeme biosinteze, izostanak nepoželjnog pigmenta, smanjenje potrebe za kisikom, slabije pjenjenje, upotreba jeftinijih supstrata, veća otpornost prema izlučenom metabolitu, proizvodnja samo jedne komponente umjesto više kemijski srodnih komponenata itd. Rezultat promjene genotipa mikroorganizama može biti i biosinteza novih ili modificiranih metabolita.

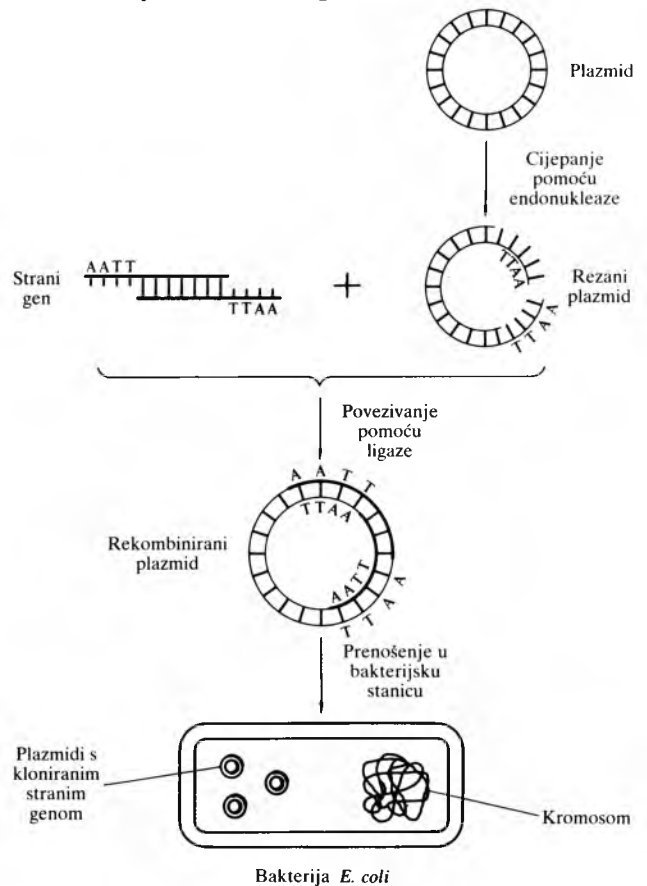
Metode za poboljšanje industrijskih sojeva obuhvaćaju mijenjanje genotipa indukcijom mutacija, križanjem dvaju genetički različitih sojeva (procesom genetičkih rekombinacija) i unošenjem gena iz različitih organizama u pogodan mikroorganizam metodama genetičkog inženjerstva.

Indukcija mutacija i križanje sojeva bili su vrlo uspješni za neke procese, pa je, npr., proizvodnja penicilina porasla od 1 mg/L iz izvornog soja *Penicillium notatum*, izoliranog iz prirode, na više od 60 g/L današnjih proizvodnih sojeva. Međutim, te tehnike često ne zadovoljavaju jer su ograničene na pripadnike iste vrste. Taj je nedostatak izbjegnuto uvođenjem metoda rekombinacije genskog materijala različitih mikroorganizama. Rekombinacije se mogu postići seksualnim procesima, paraseksualnim procesima i transformacijama. U prva dva procesa rekombiniraju se nuklearni kromosomi, što je moguće samo u eukariota, dok se transformacije razvijene genetičkim inženjerstvom, koje obuhvaćaju i ekstrakromosomne elemente, mogu primijeniti za eukariote i prokariote.

Suvremene biokemijske metode zahvaćaju u nasljedne strukture stanica i omogućavaju svladavanje prirodnih barijera među vrstama, te rekombiniranje najrazličitijih molekula DNA laboratorijskim postupcima *in vitro*. Naime, razvojem bakterijske genetike, a osobito genetike bakterije *Escherichia coli*, otkrivene su ekstrakromosomne kružne dezoksiribonukleinske kiseline nazvane *plazmidi*. Mogućnost da se ti genetički elementi upotrijebe i njima manipulira vrlo je proširila primjenu genetike i potakla razvoj nove biotehnologije, jer je omogućila da se pojedini fragmenti jedne DNA ugrade u drugu, a zatim u tom obliku dalje repliciraju (kloniraju). Skup takvih suvremenih postupaka ima različite nazive: genetičko inženjerstvo, tehnologija rekombinantne DNA (rDNA), manipuliranje genima i kloniranje gena.

Tim se postupcima poželjni geni iz humanih, životinjskih ili biljnih stanica (tzv. strani geni) ugrađuju u genetički materijal bakterijskih ili eukariotskih stanica. Dezoksiribonukleinska kiselina iz po želji odabranog organizma cijepa se enzimskim putem na točno određenim mjestima, pa se iz tako

dobivenih fragmenata izolira jedan dio koji se zatim spoji s vektorom (sl. 5). *Vektor* je prijenosnik genetičkih informacija iz jedne stanice u drugu. Za bakterije i kvasce vektori su plazmidi ili dezoksiribonukleinske kiseline odabranih virusa (virusne DNA ili tzv. vektorske DNA). Pomoću vektora fragment strane DNA unosi se u odabranu stanicu da bi se u njoj replicirao zajedno s vektorom (*kloniranje*). Tako se dobiva *klon* identičnih primjeraka rekombinirane DNA, dakle populacija genetički identičnih stanica ili organizama nastalih od jedne stanice ili gena.



Sl. 5. Postupak kloniranja rekombinantne DNA u bakterijskoj stanici

Tako klonirani fragmenti uneseni u mikrobnje stanice mogu se primijeniti u proizvodnji vrlo različitih spojeva koje inače mogu proizvoditi samo humane, životinjske i biljne stanice, što je omogućilo proširenje mikrobnje proizvodnje na nova područja. Potencijal je tih rekombinacija golem, jer se može manipulirati vrlo različitim genetičkim materijalom. Tako su prevladane granice među vrstama, čak i među vrstama viših taksonomskih skupina.

Genetičko je inženjerstvo već ušlo u gotovo sva područja bioloških istraživanja i proizvodnju zasnovanu na biološkim sustavima. U prvoj su se fazi novom tehnologijom rekombinantne DNA (rDNA) mogle jeftinije proizvoditi već poznate tvari (hormoni rasta, inzulin) u mnogo većim količinama. U drugoj se fazi tehnologija rDNA primjenjuje u proizvodnji različitih proteina i drugih spojeva koje je bilo gotovo nemoguće izolirati u dovoljnim količinama iz prirodnih izvora, a važni su u liječenju mnogih bolesti, npr. hormoni rasta, interferoni, različiti sastojci krvi, aktivator plazminogena.

Sadašnji razvoj omogućuje da znanje stečeno u genetičkom inženjerstvu bude osnovica za zamjenu nekih bioloških proizvoda sintetskim proizvodima. Već su razvijene tehnike koje omogućuju kemijsku sintezu genskog materijala (DNA, RNA), brzu identifikaciju patogenih uzročnika bolesti te prenatalnu dijagnostiku nasljednih bolesti. Te su tehnike omogućile i proizvodnju specifičnih metabolita koji se zatim mogu usavršiti kemijskim transformacijama. Kontrola ekspre-

sije gena specifičnim spojevima važna je u medicini, jer omogućuje regulaciju i isključivanje gena odgovornih za neka patološka stanja organizma, osobito za razvoj tumora.

Danas još nije moguće procijeniti rezultate koji će biti posljedica primjene rekombinantne DNA u biotehnologiji. Međutim, istodobni skokoviti napredak mnogih prirodnih i tehničkih disciplina omogućio je znatne prodore ne samo u novoj biotehnologiji nego i u mnogim već dobro uvedenim biotehnoškim procesima. Razvoj tehnologije rekombinantne DNA vidi se iz kratkog pregleda uspjeha u toku prvih godina primjene: rekombinacije DNA *in vitro* (1973), kvašćeva DNA replicirana i izražena u bakterijama (1976), proizveden somastatin (1977), kloniran gen štakorova inzulina (1977), proizveden humani inzulin pomoću bakterija (1978), proizveden hormon rasta (1978), bakterijska DNA uklopljena u kvašćev kromosom (1978), transformacija kvašćevih protoplasta hibridnim plazmidom iz *E. coli* i kvasca (1978), proizveden humani interferon (1980).

Proizvodni mikroorganizam za procese nove biotehnologije najčešće je *Escherichia coli*. Ta se bakterija primjenjuje zbog toga što se vrlo lako uzgaja, što ima najbolje poznatu mapu gena, najviše podataka o putovima metabolizma i regulaciji gena, a plazmidi i fagi dobro su poznati, pa mogu služiti kao vektori za kloniranje i ekspresiju.

### BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA

Mikrobna se proizvodnja zasniva na životnim aktivnostima mikroorganizama, a uzgojem mikroorganizama pod kontroliranim uvjetima ostvaruje se proizvodni proces.

Racionalna shema za modeliranje mikrobnih procesa oslanja se na različite razine sustava kao što su molekularna, celularna, populacijska, bioreaktorska i tehnološka razina.

Modeliranje na razini metabolizma obuhvaća katabolizam i anabolizam, procese autolize te regulacijske i kontrolne mehanizme.

Na razini mikrobne stanice razmatraju se zbivanja u pojedinoj stanici te posebnim staničnim organelama, dakle odjeljcima stanice. Razmatraju se mehanizmi transporta, kompleksne biokemijske mreže, morfološka diferencijacija i stanični ciklusi.

Pri modeliranju populacija treba voditi računa o njihovom diferenciranju. U monokulturama (čiste kulture) to je oblik, građa i starost stanica, a u mješovitim kulturama još i odnosi među pojedinim populacijama stanica u toku procesa.

Dobro kontrolirani laboratorijski bioreaktori omogućuju pouzdanu procjenu niza važnih procesnih parametara.

Modeliranju tehnoloških linija pristupa se na osnovi povezivanja svih opisanih razina. Pri modeliranju je važno kvantificirati proces tako da obuhvaća količine tvari, ravnoteže i kinetiku procesa. Ono što se zbiva u metabolizmu svake pojedine mikrobne stanice, koja je sama po sebi minijaturni bioreaktor, zajednički djeluje kao posljedica rasta mikrobne populacije.

Treba razlikovati mikrokinetiku enzimskih procesa na razini stanica od makrokinetike populacije u bioreaktoru. Modeliranje omogućuje redukciju kompleksnosti bioloških procesa do potrebnih signifikantnih podataka.

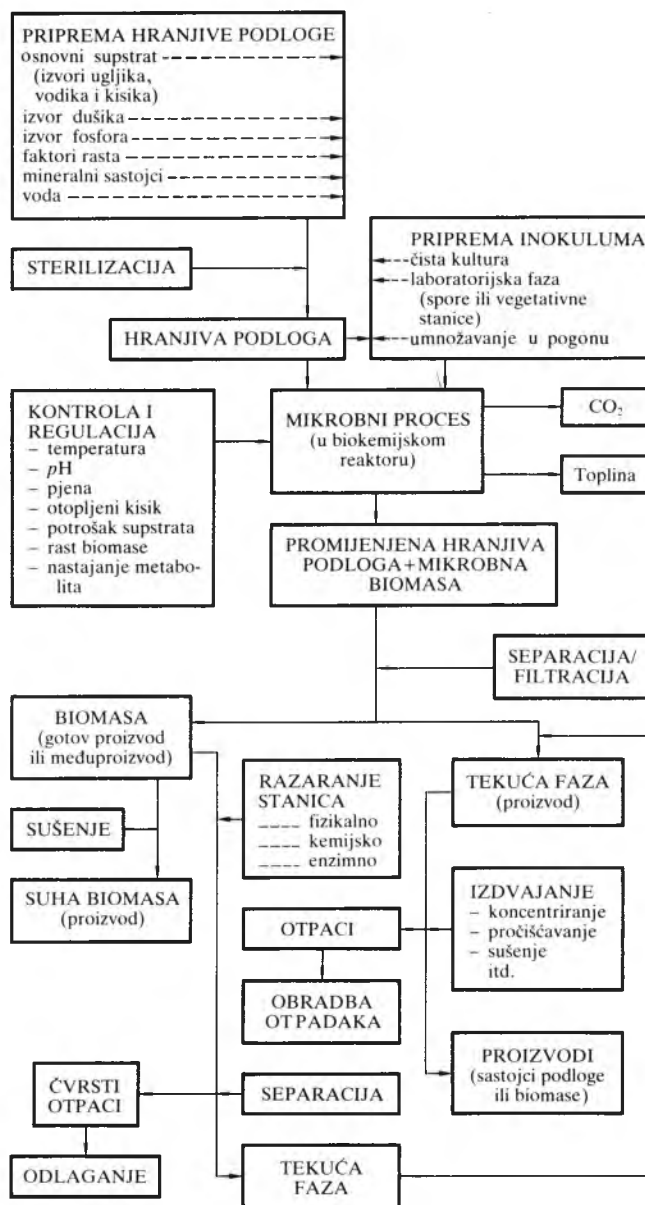
Biotehnoškim procesom obuhvaća kultiviranje mikroorganizama koji biokonverzijom podloge umnožavaju svoju biomasu i proizvode različite metabolite. Prednost je mikroorganizama što mogu sintetizirati i razgraditi mnoštvo različitih kemijskih spojeva. Za razliku od većine reakcija u kemijskoj procesnoj tehnici, gdje se često primjenjuje visoka temperatura i tlak, mnogobrojne kemijske reakcije koje kataliziraju enzimi u živim stanicama zbivaju se u vodenim otopinama pri umjerenim uvjetima reakcije.

Biotehnoška je proizvodnja u posljednje vrijeme znatno usavršena u područjima koja zajednički omogućuju uspješnu i ekonomičnu proizvodnju. To su genetičko optimiranje mikroorganizama (selekcija, mutageneza, fuzija staničnih protoplasta i genska tehnologija rekombinantne DNA) i biokemijsko inženjersko optimiranje (oblik bioreaktora, usa-

vršena oprema, novi mjerni instrumenti, podrška računalom, vrlo selektivne metode izolacije proizvoda).

Zbog kompleksnosti rasta mikroorganizama biokemijsko reakcijsko inženjerstvo teže kvantificira međusobne odnose transportnih fenomena i kinetike da bi obuhvatilo djelotvornost reaktora s obzirom na uvjete rada i ulaznih varijabla. Pritom je potrebno povezati fenomene mehanike fluida, termodinamiku i kinetiku s kemijom i biokemijom procesa. Prinos i selektivnost procesa te brzina biosinteze mjerilo su uspješnosti bioreaktora.

Biotehnoški se procesi mogu raščlaniti u više faza (sl. 6): priprema i sterilizacija sirovina kao podloge za rast mikroorganizama, razmnožavanje mikrobnog cjepiva (inokuluma) u nekoliko stupnjeva za pogonski bioreaktor, proizvodni proces u bioreaktoru s kontrolnom opremom, izolacija proizvoda (mikrobne biomase ili nekog metabolita) iz podloge fizikalnim ili kemijskim postupcima, obradba i oprema gotovog proizvoda, obradba otpadnih voda i otpadnih tvari.



Sl. 6. Opća shema mikrobno procesa

**Sterilna tehnika rada.** U mikrobnoj se tehnologiji gotovo uvijek primjenjuje sterilna tehnika rada, a iznimke su samo neke tradicionalne fermentacije (vino, kisela mlijeka). Sterilnom tehnikom rada moraju se isključiti nepoželjni mikroorganizmi u svim fazama proizvodnje. Početnu proizvodnu fazu

čine priprema, prethodna obradba i sterilizacija podloge. Kako se za biokonverziju često upotrebljavaju različite polisaharidne, saharidne i proteinske sirovine kompleksna sastava uz dodatak anorganskih spojeva, sterilizacija se mora provesti tako da spojevi potrebni za rast mikroorganizama i proizvodni proces ne pretrpe nepoželjne promjene.

Metode sterilizacije (v. *Konzerviranje hrane*, TE 7, str. 269, 278; v. *Radijacijska tehnologija*, TE 11, str. 386) obuhvaćaju razaranje, inaktivaciju ili uklanjanje mikroorganizama iz različitih sredina. Od mnogih tehnika inaktivacije mikroorganizama (toplinom, radijacijom, ultrazvukom) najveću primjenu ima toplinska sterilizacija.

Sterilizacija filtracijom primjenjuje se iznimno za vrlo osjetljive podloge. Razvijene su specijalne tehnike filtriranja kroz slojeve (od keramike, sinteriranog stakla, dijatomejske zemlje, plastike) s porama koje ne propuštaju mikroorganizme i njihove spore. Najteže je ukloniti viruse. Filtracija se najviše primjenjuje za sterilizaciju zraka koji se uvodi u bioreaktore. Toplinska se sterilizacija provodi u bioreaktoru ako su mu kapaciteti relativno maleni. Za procese u bioreaktorima velikih kapaciteta podloga se sterilizira izvan reaktora.

**Bioreaktor.** Mikrobnog procesa počinje razmnožavanjem mikrobnog cjevica (inokuluma). Taj se proces vodi od laboratorijske kulture proizvodnog mikroorganizma u nekoliko faza u bioreaktorima različita kapaciteta da bi se dobila potrebna količina mikroorganizama za glavni proizvodni reaktor.

Bioreaktor čini ključni dio opreme biotehnološkog procesa. Pri oblikovanju bioreaktora treba paziti na fiziologiju mikrobnog procesa, jer je mikroorganizam i sam miniaturni reaktor u kojem teku procesi biosinteze (rast biomase) ili razgradnje (nastajanje metabolita). U bioreaktoru, dakle, raste vrlo mnogo suspendiranih mikroorganizama ( $10^8 \dots 10^{12}$  u litri podloge) pod kontroliranim uvjetima. Pri vođenju mikrobnog procesa treba održavati optimalnim temperaturu, pH i koncentraciju hranjiva, te suzbijati pjenu koja nastaje pri miješanju i uvođenju zraka u bioreaktor. Bioreaktor mora biti tako konstruiran da omogućuje sterilan rad. Bitan je dobar prijenos tvari i razmjena energije, a to znači dobro miješanje, adekvatan prijenos kisika u aerobnim procesima te odvođenje nastale topline pri uzgoju mikroorganizama.

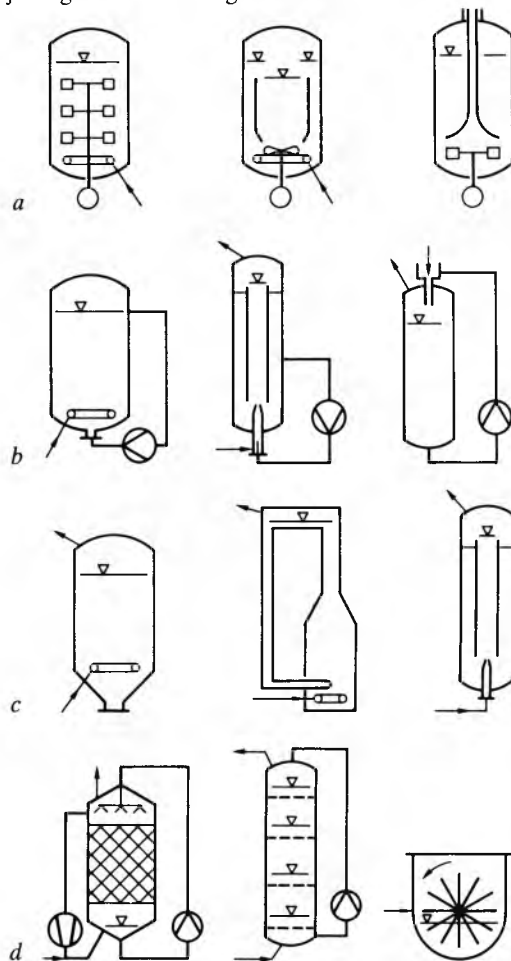
U mikrobnog tehnologiji, osobito u klasičnim anaerobnim fermentacijama, primjenjivali su se vrlo jednostavni reaktori, obično otvoreni vrionici u obliku kaca. Kasnije su uvedeni zatvoreni cilindrični reaktori. Raznoliki oblici bioreaktora razvijeni su u toku porasta proizvodnje aerobnih procesa, osobito pekarskog kvasca i proteinske mikrobnog biomase. Za uspješnost tih procesa bitno je djelotvorno miješanje i aeracija. Za proizvodnju antibiotika konstruiran je cilindrični bioreaktor s različitim oblicima miješalica. Taj je reaktor bio prilično svestran, pa je mogao dugo služiti i za proizvodnju ostalih mikrobnog metabolita uz umjerenu aeraciju.

Bioreaktori vrlo velikih kapaciteta razvijeni su za proizvodnju mikrobnog biomase ( $5000 \text{ m}^3$ ), a najveći bioreaktori ( $25000 \text{ m}^3$ ) grade se u postrojenjima za biološku obradbu komunalnih i industrijskih otpadnih voda. Primjenom tehnologije rekombinantne DNA omogućena je proizvodnja malih količina vrlo skupih biološki aktivnih proizvoda u malim bioreaktorima. S obzirom na osjetljivost tih proizvoda potrebna je mnogo preciznija kontrola svih procesnih parametara. Razvijeni su i novi tipovi bioreaktora, kao što su bioreaktori s biomasom u fluidiziranoj sloju te membranski bioreaktori. Specifično su konstruirani i bioreaktori za kulturu biljnih i životinjskih stanica ili tkiva, jer je često potreban rast na nosačima ili suspendiranim česticama.

S obzirom na miješanje razlikuju se tri glavne skupine bioreaktora: s mehaničkim sustavom miješanja, s recirkulacijskom pumpom i s ulaznim mlazom zraka ili kisika (sl. 7).

Pri anaerobnim je procesima miješanje manje važno. Često, naime, pri fermentacijama kao metaboliti nastaju plinovi koji tijekom procesa miješaju podlogu (ugljik-dioksid, vodik, metan). Oblik, obujam i ostale karakteristike bioreak-

tora odabiru se tako da se uzima u obzir vrsta procesa (aeroban, anaeroban), oblik i svojstva mikroorganizama, sastav i viskoznost podloge, nastajanje pjene i druge specifičnosti procesa. Pjenjenje podloge može u nekim procesima biti uzrok mnogih ograničenja, a ovisi o sastavu podloge i nastalim mikrobnim metabolitima. Oblik i diferencijacija mikroorganizama, osobito micelijskih, mogu znatno utjecati na prijenos tvari. Tako, npr., plijesni rastu u obliku kuglastih micelijskih zrnaca (peleta) ili kao duge difuzne hife, pa je i prijenos kisika ovisan o tim različitim oblicima. Pri mehaničkom miješanju treba paziti da se ne ošteti micelijska struktura mikroorganizama. Mnogo je lakše uzgajati bakterije i kvasce jer rastu kao pojedinačne stanice. Biljne i životinjske stanice pokazuju mnoge specifičnosti: u bioreaktoru rastu potpuno drukčije nego u tkivima organizama.



Sl. 7. Osnovni konstrukcijski tipovi bioreaktora. a s mehaničkim miješanjem, b s recirkulacijskom pumpom, c s ulaznim mlazom zraka, d s pregradama i kontinuiranom plinovitim fazom (strelice označuju ulaz i izlaz zraka, a trokuti razinu tekućine u reaktoru)

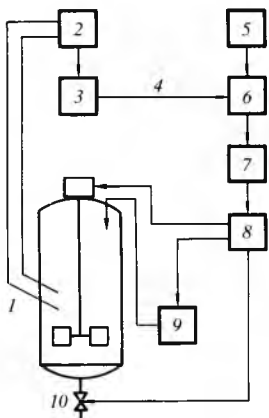
Bioreaktori su nešto složeniji od običnih kemijskih reaktora, posebno zbog potrebne aeracije fermentacijskog supstrata. Pri ocjeni ekonomičnosti pojedinog bioreaktora bitan je njegov aeracijski kapacitet, tj. brzina prijenosa kisika s obzirom na obujam reaktora.

Praćenje procesa u bioreaktoru zahtijeva specifičnu instrumentaciju, koja se donekle razlikuje od one u kemijskih reaktora. Osim uobičajenog mjerenja temperature, tlaka, protoka, vrijednosti pH itd., posebnim se senzorima mjeri razina kapljevine i pjene, koncentracija otopljenog kisika te utrošak sastojaka podloge. Upotrebljavaju se i senzori adaptirani specifičnom biokemijskom procesu, dakle određivanju nekog enzima ili metabolita. Razvijeno je više enzimskih elektroda: penicilinazna elektroda određuje količinu nastalog penicilina, a glukozna elektroda može pratiti utrošak glukoze



u bioreaktoru. Senzori moraju biti tako konstruirani da se mogu sterilizirati.

Biotehnoški se proces može voditi potpuno automatski upravljanjem pomoću elektroničkog računala (sl. 8). Kompjutorski su programi opisani za mnoge poznate fermentacijske procese, a na tržištu se nalaze bioreaktori opremljeni mikroprocesorom.



Sl. 8. Povezivanje bioreaktora s elektroničkim računalom. 1 senzori, 2 pojačalo signala iz senzora, 3 digitalni pisač, 4 prevođenje podataka u oblik prikladan za elektroničko računalo, 5 elektroničko računalo, 6 program, 7 operator za pojedinačno davanje naloga, 8 vremenski automatski uređaj, 9 pumpa, 10 ventil

**Izdvajanje proizvoda iz podloge.** Mikrobnja tehnologija daje po sastavu vrlo različite proizvode. To mogu biti mikrobnja biomasa (npr. pekarski kvasac), fermentirane podloge (vino, pivo, ocat), ali to može biti jedan ili više metabolita koje treba izolirati iz podloge. Proizvode koji se ne izlučuju iz mikroorganizama treba izolirati iz mikrobnje biomase nakon što se razori stanični zid mikroorganizama, što se postiže fizikalnim metodama (prešanjem, mljevenjem, djelovanjem ultrazvuka), kemijskim metodama (djelovanjem kiselina, otapala, detergenata) i biološkim metodama (djelovanjem faga, enzima, inhibicijom sinteze staničnog zida). Postupci izdvajanja često se kombiniraju jer se nastoji iskoristiti mikrobnja biomasa ili filtrat kulture dobivanjem što više korisnih proizvoda. Separacija proizvoda zasniva se na različitim principima, pa se proizvodi izdvajaju na temelju različite veličine čestica (filtracija, ultrafiltracija, membranska filtracija), difuzije (osmoza, dijaliza, elektrodijaliza), naboja (elektroforeza, ionska izmjena), napona para (destilacija, sušenje), topljivosti (ekstrakcija, kristalizacija), površinskog napona (flotacija), mase (centrifugiranje, ultracentrifugiranje, sedimentacija), a primjenjuju se i metode visokog stupnja razdvajanja kakva je, npr., kromatografija.

Primjena različitih postupaka ovisi o njihovoj ekonomičnosti. Glutaminska se kiselina, npr., može izdvojiti na više načina, ali se prinosi znatno razlikuju: kristalizacijom se postiže prinos od 57%, anionskom izmjenom 70%, a kationskom izmjenom 78%.

#### Kinetika mikrobnih procesa pri šaržnom uzgoju

Uzgoj mikroorganizama započinje *inokulacijom* (naciepljivanjem) hranjive podloge odabranom mikrobnom kulturom. *Cjepivo* (*inokulum*) inicijalna je količina aktivnih mikrobnih stanica koja se u hranjivom supstratu relativno brzo umnožava, da bi mikroorganizmi tijekom rasta transformirali osnovni supstrat (obično izvor ugljika) u željeni proizvod (vlastitu biomasu ili neki proizvod metabolizma), te da u stacionarnoj fazi rasta daju željeni proizvod kao rezultat biosinteze (konverzije) nekog sastojka hranjive podloge. U oba je slučaja brzina nastajanja proizvoda funkcija koncentracije i kemijske aktivnosti biokatalizatora u mikrobnjoj stanici.

Mikroorganizmi se u toku rasta nalaze u različitim fazama životnog ciklusa. Pritom se stanična građa diferencira i nastaju morfološke promjene, koje su vrlo izrazite kod plijesni, a manje izrazite kod kvasaca, bakterija i virusa. U proizvodnim uvjetima treba paziti na morfologiju stanice, jer je ona povezana s određenom fazom životnog ciklusa i sposobnošću mikroorganizma da izvrši neku biokemijsku reakciju. Obično se mikroorganizmi primjenjuju u vegetativnoj fazi rasta jer

su tada najaktivniji. Rijetko je cilj uzgoja mikroorganizama proizvodnja sporogenih oblika stanice, iako ima i takvih primjera (sporogeni oblici bakterije *Bacillus thuringiensis* – biološki insekticid; spore plijesni *Aspergillus sp.* – katalizator u biološkoj transformaciji steroidnih hormona). Neki od važnijih proizvoda mikrobnje proizvodnje nastaju tek u fazi prije sporulacije stanice (*Bacillus subtilis* – amilolitički i ostali hidrolitički enzimi).

Mikrobnja proizvodnja osniva se, dakle, na primjeni biokatalizatora mikrobnih stanica u sasvim određenim fazama životnog ciklusa. Prema tome, uspješno vođenje mikrobnih procesa podrazumijeva poznavanje uvjeta diferencijacije proizvodnog mikroorganizma, a to je nastajanje pojedinih tipova i oblika stanica, npr. primarni i sekundarni micelij ili površinski i dubinski rast plijesni. Zato je potrebno znati kako se odabrani mikroorganizam uzgaja, kako se od laboratorijske čiste kulture namnoži potreban broj stanica (ili biomase) potrebnog tipa ili oblika i u pogodnom fiziološkom stanju za neku biokemijsku reakciju u velikom industrijskom bioreaktoru.

**Kinetika rasta.** Umnožavanje jednostaničnih organizama (bakterija i kvasaca) koji ne rastu u micelijском obliku jednostavnije je od umnožavanja plijesni. Nakon što se ti mikroorganizmi nacijepu u hranjivu podlogu, obično se ne počnu odmah razmnožavati, jer je potrebno neko vrijeme da se stanice priviknu na novu okolinu ili podlogu. Pritom stanice povećavaju svoj obujam, sintetiziraju enzime i intermedijare potrebne za rast i razmnožavanje. To se prividno mirovanje naziva *fazom suzdržanog rasta* (lag-faza), a traje tako dugo dok ne nastane dovoljna količina spomenutih tvari (sl. 9). Ako su stanice mlade i okolina vrlo povoljna, ta će faza biti vrlo kratka, a za starije stanice u nepovoljnoj okolini bit će duža.

Cjepivo sadrži mnoštvo stanica, pa je očito da one ne mogu biti jednako stare jer nisu počele istodobno rasti. Budući da je njihova fiziološka aktivnost različita, sve se stanice neće početi ni istodobno umnožavati. Potrebno je neko vrijeme da se sve stanice počnu dijeliti; taj se vremenski interval naziva *fazom ubrzanog rasta*. Ta se faza eksperimentalno teško određuje, pa se čini da se na fazu suzdržanog rasta odmah nadovezuje *faza eksponencijalnog rasta* (log-faza). To je faza najbržeg razmnožavanja mikroorganizama i proizvodnje metabolita koji su vezani uz rast, a nastaju kao rezultat kompleksnih redoks-reakcija, tj. disanja i fermentacije (npr. etanol, octena i mliječna kiselina, ugljik-dioksid). Dok postoji dovoljno hrane, broj se stanica udvostručava stalnom brzinom, sve dok se koncentracija nastalih proizvoda metabolizma ne poveća do vrijednosti koje usporavaju ili onemogućavaju rast. Promjene koje se u nekom vremenu zbivaju u hranjivoj podlozi (umnožavanje stanica, potrošak supstrata i nastajanje proizvoda metabolizma) opisuje kinetika mikrobnih procesa.

Rast, tj. povećavanje koncentracije mikroorganizama s vremenom, može se opisati izrazima

$$\frac{dx}{dt} = \mu x, \quad (1)$$

$$\frac{dC}{dt} = \mu C, \quad (2)$$

gdje je  $x$  masena koncentracija mikrobnih stanica,  $C$  brojna koncentracija stanica,  $t$  vrijeme, a  $\mu$  specifična brzina rasta.

Do specifične brzine rasta dolazi se na osnovi razmatranja diobe stanica i eksponencijalnog povećavanja broja stanica ( $N$ ):

$$N \rightarrow 2N \rightarrow 4N \rightarrow 8N \rightarrow 16N \rightarrow 32N \dots \quad (3)$$

$$2^0 N \rightarrow 2^1 N \rightarrow 2^2 N \rightarrow 2^3 N \rightarrow 2^4 N \rightarrow 2^5 N \dots 2^n N, \quad (4)$$

gdje je  $n$  broj dioba stanica koji je definiran izrazom

$$n = \frac{t}{t_d}, \quad (5)$$

gdje je  $t_d$  vrijeme udvostručenja broja stanica (generacijsko vrijeme). Broj stanica u bilo kojem trenutku eksponencijalne faze rasta dobiva se iz izraza

$$N_t = N_0 2^n, \quad (6)$$

gdje je  $N_t$  broj stanica u vremenu  $t$ , a  $N_0$  početni broj stanica. Ovisnost broja stanica o vremenu

$$\ln N_t = \mu t + \ln N_0 \quad (7)$$

ima oblik jednadžbe pravca, a specifična brzina rasta ( $\mu$ ) koeficijent je smjera toga pravca. Specifična je brzina rasta konstantan parametar rasta svakog mikroorganizma u podlozi stalnog sastava i uz stalne ekološke uvjete. Njena brojčana vrijednost ovisi o nasljednim svojstvima mikroorganizma, vrsti i koncentraciji izvora ugljika, dušika, fosfora i kisika, tvarima rasta i početnoj koncentraciji mikroorganizma u hranjivoj podlozi.

Specifična je brzina rasta  $\mu$ , poput konstante brzine kemijske reakcije, funkcija koncentracije kemijskih reaktanata, a to su bitni sastojci hranjive podloge ili supstrati za rast. Obično je to samo jedan supstrat (najčešće izvor ugljika), jer se hranjiva podloga sastavlja tako da ostali sastojci budu u suvišku. Zato se takav sastojak naziva *graničnim (ograničavajućim) supstratom*. Kad se on iscrpi, eksponencijalna faza rasta prestaje. Ovisnost brzine rasta o koncentraciji graničnog supstrata za rast opisao je J. Monod (1942) izrazom

$$\mu_s = \mu_{m,s} \frac{c_s}{K_s + c_s}, \quad (8)$$

gdje je  $\mu_{m,s}$  maksimalna specifična brzina rasta,  $c_s$  masena koncentracija graničnog supstrata,  $K_s$  konstanta zasićenosti koja je jednaka koncentraciji graničnog supstrata kada je  $\mu = 0,5 \mu_{m,s}$ , što proizlazi iz grafičkog prikaza Monodova modela mikrobnog rasta. Tipične su vrijednosti  $K_s$  niske. Za izvor ugljika te su vrijednosti 1...120 mg/L, a ovise o specifičnosti mikroorganizma.

Praktički je  $\mu \approx \mu_{m,s}$  kad je  $c_s > 10 K_s$ . Specifična brzina rasta postaje ovisna o  $c_s$  kad je  $c_s < 10 K_s$ . Zbog niske vrijednosti  $K_s$  specifična je brzina rasta konstantna u eksponencijalnoj fazi rasta.

Brzina rasta ovisi i o koncentraciji proizvoda metabolizma koji može inhibirati rast (npr. etanol, octena kiselina, mliječna kiselina). Ovisnost specifične brzine rasta o koncentraciji proizvoda koji ograničava rast opazio je N. D. Jerusalimski i opisao ga izrazom

$$\mu_p = \mu_{m,p} \frac{K_p}{K_p + c_p}, \quad (9)$$

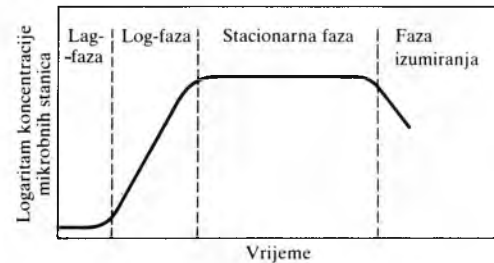
gdje je  $K_p$  konstanta zasićenosti supstrata proizvodom koji ograničava rast,  $c_p$  masena koncentracija tog proizvoda, a  $K_p = c_p$  kad je  $\mu = 0,5 \mu_{m,p}$ . To znači da se ovisnost specifične brzine rasta o koncentraciji supstrata i proizvoda može opisati izrazom

$$\mu_{s,p} = \mu_m \frac{c_s}{K_s + c_s} \cdot \frac{K_p}{K_p + c_p}. \quad (10)$$

Na kinetiku rasta mikroorganizma utječu i drugi faktori okoline (koncentracija kisika, temperatura).

Za eksponencijalne faze rasta mijenja se kemijski sastav hranjive podloge zbog potroška hranjivih sastojaka i izlučivanja proizvoda metabolizma. Sastav supstrata nije u ustaljenom stanju, pa se zbog potroška nekog sastojka hranjive podloge ili povećanja koncentracije nekog metabolita brzina rasta, prije ili kasnije, počinje smanjivati. Mikrobnost kultura ulazi tada u *stacionarnu fazu* (sl. 9). Prijelaz od eksponencijalne do stacionarne faze obično je vrlo brz, jer mnoštvo mikrobnih stanica u kulturi brzo troši supstrat. Zato je teško odrediti vrijednost  $K_s$  u neustaljenom stanju, tj. u šaržnom uzgoju. Mikrobnost je kultura u stacionarnoj fazi kad se stanice prestanu umnožavati, odnosno kad se brzina rasta izjednači s brzinom izumiranja. To, međutim, nema utjecaja na proizvodnju metabolita koji nisu vezani uz rast. Ako se

inkubacija nastavlja nakon ulaska kulture u stacionarnu fazu, mogu se dogoditi tri različite pojave: ukupna masa stanica može ostati nepromijenjena kroz duže razdoblje, broj živih stanica može se smanjivati, broj živih stanica i ukupna masa stanica može se zbog autolize smanjiti, a zatim se nastavlja sekundarni (kriptični) rast.



Sl. 9. Krivulja rasta jednostaničnih organizama (bakterija i kvasaca) u šaržnom uzgoju

Molekulni je sastav mikrobnih stanica (osobito nukleinske kiseline) konstantan u eksponencijalnoj fazi, a počinje se mijenjati u stacionarnoj, jer je metabolizam stanica promijenjen. Smanjuje se koncentracija nukleinskih kiselina, a nagomilavaju se rezervne tvari. Sporogeni mikroorganizmi počinju sporulirati.

Kada stanice izumiru brže nego što nastaju nove, kultura ulazi u fazu izumiranja. Brzina izumiranja ovisi o vrsti mikroorganizama i uvjetima okoline.

**Kinetika potroška supstrata.** Mikrobnost se stanice ne mogu umnožavati bez potroška hranjivih sastojaka podloge. Iako svaki od sastojaka može utjecati na brzinu rasta, tehnološki i ekonomski je obično zanimljiv samo jedan od njih, najčešće izvor ugljika, kojim se stanice služe za biosintezu sastojaka vlastite biomase, za proizvodnju energije i održavanje fiziološke aktivnosti stanica, te za sintezu proizvoda (metabolita nakupljenih u stanicama ili izlučenih u okolinu). Prema tome, promjena koncentracije izvora ugljika (supstrata) posljedica je potroška tog supstrata za te tri navedene svrhe i može se matematički opisati izrazom

$$- \frac{dc_s}{dt} = - \frac{\mu x}{Y_{X/S}} - m_E x - \frac{q_P x}{Y_{P/S}}, \quad (11)$$

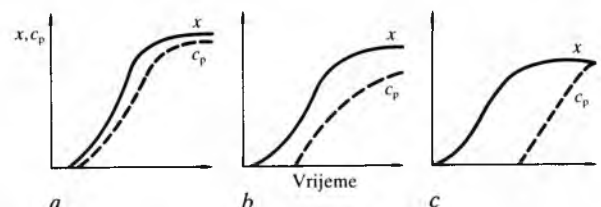
gdje je  $m_E$  specifična brzina potroška supstrata za energiju održavanja mikrobnost stanice,  $q_P$  specifična brzina nastajanja proizvoda (omjer mase proizvoda prema masi mikrobnih stanica i vremenu),  $Y_{X/S}$  prinos mase mikrobnih stanica po masi supstrata (stupanj konverzije supstrata u biomasu), a  $Y_{P/S}$  prinos mase proizvoda po masi supstrata (stupanj konverzije supstrata u proizvod). Negativni predznaci znače smanjivanje koncentracije. Ako se izraz (11) podijeli sa  $x$ , a specifična brzina potroška supstrata  $q_S$  (omjer mase supstrata prema masi mikrobnih stanica i vremenu) definira izrazom

$$q_S = \frac{1}{x} \cdot \frac{dc_s}{dt}, \quad (12)$$

onda je

$$- q_S = - \frac{\mu}{Y_{X/S}} - m_E - \frac{q_P}{Y_{P/S}}. \quad (13)$$

**Kinetika nastajanja proizvoda.** Kinetički odnosi između rasta mikroorganizama i nastajanja proizvoda mikrobnog metabolizma ovise o ulozi tih proizvoda u metabolizmu



Sl. 10. Odnos rasta i nastajanja proizvoda ovisnog o rastu (a), djelomično ovisnog o rastu (b) i neovisnog o rastu (c);  $x$  masena koncentracija mikrobnih stanica,  $c_p$  masena koncentracija proizvoda

stanice. Već prema regulacijskoj kontroli mikrobnog metabolizma, nastajanje proizvoda (sl. 10) može biti: *a*) ovisno o rastu (promjena koncentracije proizvoda prati promjenu koncentracije stanica); *b*) djelomično ovisno o rastu (promjena koncentracije proizvoda prati promjene koncentracije stanica, ali zaostaje u fazi; sinteza proizvoda započinje tek u logaritamskoj fazi rasta, tj. kad se postigne neka potrebna koncentracija stanica); *c*) neovisno o rastu (sinteza proizvoda započinje u stacionarnoj fazi rasta i ovisi o aktivnosti i koncentraciji određenih enzima u stanicama, dakle ovisi o koncentraciji stanica u stacionarnoj fazi rasta).

Proizvodi koji nastaju u toku rasta mikrobnih stanica nazivaju se primarnim metabolitima i obično su stanici potrebni za rast. Ako stanica u toku rasta proizvodi neki metabolit koji nije potreban za rast, takav se proizvod naziva sekundarnim metabolitom biosinteze, a to je naziv i za proizvode koji nastaju u stacionarnoj fazi rasta, dakle sekundarno s obzirom na rast.

Obično se brzina nastajanja primarnih proizvoda metabolizma koji prate rast može izračunati iz izraza

$$\frac{dc_p}{dt} = \frac{\mu x}{Y_{p/x}}, \quad (14)$$

gdje je  $Y_{p/x}$  prinos mase proizvoda po masi mikrobnih stanica. Ako je  $q_p$  specifična brzina nastajanja proizvoda

$$q_p = \frac{1}{x} \cdot \frac{dc_p}{dt}, \quad (15)$$

onda za proizvode vezane uz rast vrijedi izraz

$$q_p = \frac{\mu}{Y_{p/x}}. \quad (16)$$

Kad nastajanje proizvoda samo djelomično ovisi o rastu, kao što je to npr. prilikom proizvodnje mliječne kiseline, onda se brzina nastajanja proizvoda može opisati izrazom

$$\frac{dc_p}{dt} = a \frac{dx}{dt} + bx, \quad (17)$$

koji sadrži konstantu ovisnosti o rastu (*a*) i konstantu neovisnosti o rastu (*b*). Prema tome je

$$q_p = a\mu + b. \quad (18)$$

Kad nastajanje spojeva ne ovisi o rastu mikrobnih stanica, onda brzina sinteze tih spojeva iznosi

$$\frac{dc_p}{dt} = cx, \quad (19)$$

gdje je *c* konstanta proporcionalnosti koja obuhvaća aktivnost enzima. Konačni izraz

$$q_p = c \quad (20)$$

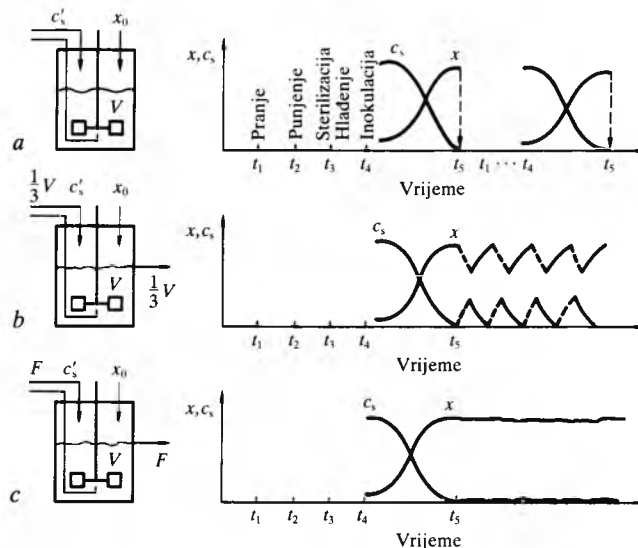
pokazuje da biosinteza proizvoda neovisnih o rastu ovisi izravno o aktivnosti enzima.

### Kinetika mikrobnih procesa pri kontinuiranom uzgoju

Zbog promjena okoline, kao što je potrošak hranjivih sastojaka iz podloge i nakupljanje proizvoda metabolizma, rast mikroorganizama u šaržnom uzgoju nije stabilan i prestaje nakon relativno kratkog vremena. Da bi se to spriječilo, treba šaržni proces, koji je s gledišta bilance materijala i energije zatvoren, pretvoriti u otvoren. To znači da u dobro miješanu mikrobnu kulturu treba dovoditi svježju hranjivu podlogu uz istodobno odvajanje jednakog dijela iskorištene podloge koja sadrži narasle stanice i proizvode njihova metabolizma. Slični su otvoreni prirodni sustavi gdje mikroorganizmi rastu u vodotocima te, npr., u probavnom traktu ljudi i životinja. Osim šaržnog i kontinuiranog uzgoja mikroorganizama, kultiviranje se može voditi i polukontinuirano (sl. 11).

Tipični sustav za kontinuiranu kultivaciju sastoji se od reaktora s konstantnim obujmom hranjive podloge, pumpe

za dovodjenje svježe i odvođenje iskorištene podloge, te od spremnika za svježju sterilnu podlogu.

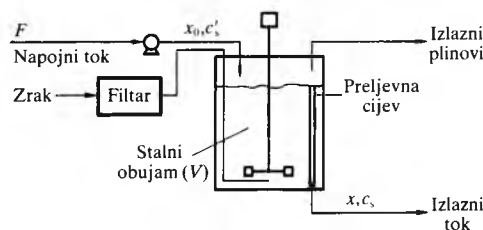


Sl. 11. Usporedni prikaz šaržnog (*a*), polukontinuiranog (*b*) i kontinuiranog (*c*) uzgoja; *x* masena koncentracija mikrobnih stanica, *c<sub>s</sub>* masena koncentracija graničnog supstrata, *V* korisni obujam reaktora, *F* obujamni protok svježe hranjive podloge

U kontinuiranom uzgoju mikroorganizam se stalno održava u eksponencijalnoj fazi rasta. Pritom se održava fiziološko stanje u kojemu se obujam tekućine u reaktoru održava konstantnim uz kontinuirani prtok supstrata i odvod proizvoda, a naziva se *ustaljenim stanjem*. Ustaljeno se stanje održava i kontrolira dvojako: turbidostatski i kemostatski.

U turbidostatu se ukupna mikroba populacija održava stalnom pomoću fotoćelije koja mjeri optičku gustoću kulture i regulira prtok svježeg supstrata. Kad se optička gustoća poveća iznad određene razine, automatski se uključuje pumpa koja dovodi svježju podlogu u bioreaktor. Kako se sadržaj reaktora dobro miješa, a obujam hranjive podloge održava stalnim pomoću prelivne cijevi, kultura se razrjeđuje uz istodobno izdvajanje dijela iskorištene podloge i prirasta stanica iz reaktora. Taj sustav nema veću primjenu ni u laboratorijskom ni u industrijskom mjerilu zbog teškoća mjerenja koncentracije stanica u reaktorima.

U kemostatskom načinu kontrole i održavanja ustaljenog stanja (sl. 12) hranjiva je podloga tako sastavljena da su svi hranjivi sastojci osim jednoga bitnog u suvišku, što proizlazi iz materijalne bilance biomase određenog sastava. Taj bitni hranjivi sastojak ograničava rast i time kontrolira koncentraciju stanica u kulturi. Pojam kemostat označuje stalnost kemijskih svojstava hranjive podloge u ustaljenom stanju. Kao ograničavajući faktor rasta (granični supstrat) može se odabrati bilo koji sastojak hranjive podloge, a najčešće je to izvor ugljika. Pritom se svježja hranjiva podloga dovodi u reaktor odabranim protokom (brzinom protjecanja), toliko malim, da brzina razrjeđivanja kulture bude manja od maksimalne specifične brzine rasta. Zato se koncentracija stanica ubrzo ustali na vrijednosti koja odgovara koncentraciji odabranoga graničnog supstrata.



Sl. 12. Shema kemostata za kontinuirani uzgoj; *x* masena koncentracija mikrobnih stanica, *c<sub>s</sub>* masena koncentracija graničnog supstrata, *V* korisni obujam reaktora, *F* obujamni protok svježe hranjive podloge

**Jednostupanjski kemostat.** Kontinuirani postupak uzgoja mikroorganizama najbolje je razmotriti u jednostupanjskom kemostatu. Pod jednostupanjskim se kemostatom razumijeva kontinuirani sustav s biokemijskim reaktorom s idealnim miješanjem u kojemu je sastav mikrobne kulture jednak u čitavom obujmu supstrata. Zbog toga je sastav izlaznog toka iz reaktora jednak sastavu cjelokupnog sadržaja reaktora.

U kemostatu vlada ustaljeno stanje, a zbivanja u njemu opisuju jednadžbe koje povezuju koncentraciju mikrobnih stanica i graničnog supstrata s neovisnom varijablom, protokom svježe hranjive podloge.

Materijalna se bilanca biomase može opisati izrazom u kojem se za procjenu promjene njene koncentracije uzima u obzir biomasa koja ulazi i koja izlazi iz kemostata, te prirast biomase i njen gubitak zbog izumiranja mikrobnih stanica:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{F}{V}x_0 - \frac{F}{V}x + \mu x - \alpha x, \quad (21)$$

gdje je  $F$  obujamni protok svježe hranjive podloge,  $V$  korisni obujam kemostata,  $x_0$  i  $x$  masena koncentracija biomase koja ulazi odnosno koja se nalazi u kemostatu, a  $\alpha$  specifična brzina izumiranja. Ako je  $x_0 = 0$  (u sterilnim uvjetima), a  $\mu \gg \alpha$ , izraz (21) za ustaljeno stanje ( $dx/dt = 0$ ) može se pojednostavniti, pa izlazi

$$\mu = \frac{F}{V} = D. \quad (22)$$

Specifična brzina rasta određena je, dakle, kvocijentom protoka i obujma hranjive podloge koji se definira kao *brzina razrjeđivanja*  $D$ . Uvjet je za uspješan kontinuirani proces uzgoja mikroorganizama da brzina razrjeđivanja bude jednaka specifičnoj brzini rasta, što znači da stabilnost kontinuiranog sustava ovisi o jednom specifičnom parametru odabranog mikroorganizma. To omogućuje da se za kontinuirani uzgoj izračuna protok svježeg supstrata iz specifične brzine rasta mikroorganizma u šaržnoj kulturi.

Za materijalnu bilancu graničnog supstrata uzima se u obzir ulazni i izlazni supstrat, zatim supstrat utrošen za rast i održavanje te za nastajanje proizvoda metabolizma:

$$\frac{dc_s}{dt} = \frac{F}{V}c'_s - \frac{F}{V}c_s - \frac{\mu x}{Y_{X/S}} - m_E - \frac{q_P x}{Y_{P/S}}, \quad (23)$$

gdje su  $c'_s$  i  $c_s$  masena koncentracija graničnog supstrata koji ulazi i onoga koji se nalazi u kemostatu, a značenja su ostalih simbola kao u izrazu (11) i (21). Ako je  $m_E \ll \mu x/Y_{X/S}$ ,  $q_P \approx 0$  i  $F/V = D = \mu$ , izlazi da u ustaljenom stanju ( $dc_s/dt = 0$ ) mora biti

$$\mu(c'_s - c_s) = \frac{\mu x}{Y_{X/S}}, \quad (24)$$

$$x = Y_{X/S}(c'_s - c_s). \quad (25)$$

Ovisnost između koncentracije mikrobnih stanica i koncentracije graničnog supstrata pokazuje da je prinos mikrobne biomase neovisan o brzini rasta ili razrjeđivanja ako su svi ostali sastojci hranjive podloge u suvišku, a faktori okoline ( $pH$ , temperatura, koncentracija otopljenog kisika) konstantni.

Koncentracija biomase i graničnog supstrata mogu se povezati s brzinom razrjeđivanja s pomoću Monodova modela prema izrazu (8). Taj izraz, primijenjen na kontinuirani uzgoj, poprima oblik

$$D = D_C \frac{c_s}{K_s + c_s}, \quad (26)$$

gdje je  $D_C$  kritična brzina razrjeđivanja, tj. maksimalna brzina s kojom kemostat još može raditi, a približno je jednaka maksimalnoj specifičnoj brzini rasta mikroorganizma u šaržnoj kulturi.

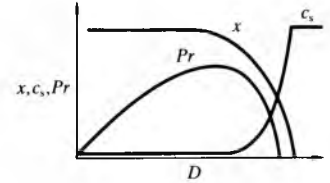
Ako se  $c_s$  izrazi kao funkcija od  $D$ , dobiva se izraz za koncentraciju graničnog supstrata u ustaljenom stanju:

$$c_s = \frac{DK_s}{D_C - D}. \quad (27)$$

Uvrsti li se  $c_s$  u izraz (25), dobiva se ovisnost koncentracije mikrobnih stanica u ustaljenom stanju o brzini razrjeđivanja:

$$x = Y_{X/S} \left( c'_s - \frac{DK_s}{D_C - D} \right). \quad (28)$$

Primjenom izraza (27) i (28) može se ponašanje kemostata prikazati grafički (sl. 13). Vidi se da se s porastom brzine razrjeđivanja koncentracija stanica ne mijenja dok brzina razrjeđivanja ne dostigne neku kritičnu vrijednost ( $D_C \approx \mu_m$ ). Tada započinje ispiranje mikrobnih stanica iz bioreaktora, a koncentracija graničnog supstrata na izlazu iz bioreaktora ( $c_s$ ) približava se koncentraciji na ulazu ( $c'_s$ ).



Sl. 13. Ovisnost masene koncentracije mikrobnih stanica ( $x$ ), masene koncentracije graničnog supstrata ( $c_s$ ) i produktivnosti ( $Pr$ ) o brzini razrjeđivanja ( $D$ ) u jednostupanjskom kemostatu

Kemostat može raditi uz brzine razrjeđivanja veće od kritičnih ( $D > \mu_m$ ) samo ako se dio biomase izdvaja na izlazu iz bioreaktora i vraća u napojni tok (kemostat s reciklacijom stanica). Materijalna bilanca biomase i graničnog supstrata tada izgleda drugačije. Materijalna bilanca višestupanjskih kontinuiranih sustava također se razlikuje od stupnja do stupnja, već prema tome da li se i koliko se u više stupnjeve uvodi svježi supstrat.

Kontinuirani uzgoj mikroorganizama primjenjuje se u prvom redu u proizvodnji primarnih metabolita kojima je nastajanje bar djelomično povezano s rastom. Međutim, mnogi sekundarni metaboliti nastaju u kontinuiranoj kulturi usporedno s rastom, i to često s jednakom ili većom produktivnošću nego u šaržnoj kulturi. To se može protumačiti tako da je u kontinuiranoj kulturi rast ograničen jednim sastojkom hranjive podloge, a u uvjetima ograničenja rasta može stanica aktivirati enzimske sustave potrebne za proizvodnju sekundarnih metabolita.

Iako se kontinuiranim uzgojem mogu dobiti mnogi poznati metaboliti, njegova je primjena za sada ograničena samo na procese kojima se, s obzirom na šaržni uzgoj, postižu očite tehnološke i ekonomske prednosti. Takvi su procesi proizvodnja etanola, krmnog kvasca, obradba otpadnih voda i sl.

**Sustavna analiza mikrobnih proizvodnih procesa.** Mikrobni su procesi kompleksni, pa je teško analizirati dinamička svojstva mikrobnih sustava. Međutim, sve boljim analitičkim metodama sustav se može raščlaniti i pratiti na različitim razinama. Sustavnom analizom najbolje se može pristupiti tom poslu, a moderne mjerne tehnike omogućuju snimanje mnogih parametara koji daju podatke o stabilnosti i poremećajima nekog procesa. Kontinuirane kulture mikroorganizama pomogle su da se bolje upoznaju mnogi aspekti metabolizma i različitih međuovisnosti, pa to ostaje najpouzdanija metoda istraživanja.

Utvrđivanje ustaljenih stanja, njihovih oscilacija i poremećaja osnova je razvoja mikrobnih procesa, bez obzira da li će se tehnološki proces voditi kontinuirano, s djelomičnom reciklacijom biomase ili diskontinuirano.

## PROIZVODI MIKROBNE TEHNOLOGIJE

Proizvodi mikrobne tehnologije mnogobrojni su i raznoliki. Po količini su najvažniji proizvodi alkoholnog vrenja pivo i vino, alkoholna pića, pekarski kvasac i proteinski kvasac kao krma. U velikim se količinama proizvode etanol (kao bazna kemikalija, otapalo i energent, gorivo), aminokiseline (glutaminska kiselina, lizin), organske kiseline (octena, mliječna i limunska), hidrolitički enzimi (proteinaze i amilaze), antibiotici, vakcine, steroidni i drugi hormoni, specifični peptidi, te različite nove biološke aktivne tvari za proizvodnju lijekova i dijagnostičkih sredstava. Antibiotici, vakcine, hormoni i proizvodi nove biotehnologije svrstavaju se u skupe lijekove.

Glavni proizvodi mikrobne tehnologije rezultat su bioke-mijske katalize koju provode mikroorganizmi. Oni mogu od iste polazne sirovine proizvesti različite proizvode, a vrsta i tip proizvoda ovisi o sposobnosti mikroorganizma, tj. njegova enzimmog sustava, da provede različite biokatalitičke reakcije. To mogu biti:

jednostavne oksidoredukcije:

glukoza  $\xrightarrow{\textit{Aspergillus niger}}$  glukonska kiselina,

složene oksidoredukcije:

glukoza  $\xrightarrow{\textit{Saccharomyces cerevisiae}}$  etanol,

polimerizacija:

glukoza  $\xrightarrow{\textit{Leuconostoc mesenteroides}}$  dekstran,

biosinteze:

glukoza +  $\left( \begin{array}{l} \text{kisik} \\ \text{fosfor} \\ \text{dušik} \end{array} \right) \begin{array}{l} \xrightarrow{\textit{S. cerevisiae}} \text{pekarski kvasac} \\ \xrightarrow{\textit{Bacillus subtilis}} \text{amilolitički enzim} \end{array}$

Mikrobna proizvodnja započinje pripremom hranjive podloge i njenom sterilizacijom. Ohlađena se podloga inokulira mikrobnom kulturom i tada započinje mikrobiološka faza procesa, koja može biti anaerobna ili aerobna. Proizvodnja konačno završava izolacijom proizvoda (sl. 6).

U mikrobnoj se proizvodnji kao biokatalizatori mogu upotrebljavati stanice koje rastu ili su imobilizirane na nekom nosaču, a u nekim se reakcijama, npr. u jednostavnim oksidoredukcijama ili polimerizaciji, stanice mogu zamijeniti topljivim ili imobiliziranim enzimima izoliranim iz mikrobnih stanica (v. *Enzimi*, TE 5, str. 334).

Proizvod mikrobne tehnologije najčešće je metabolit izlučen u okolinu (hranjivu podlogu), mikrobna biomasa ili metabolit koncentriran u mikrobnoj stanici. Biološki transformirana hranjiva podloga, prema tome, osim proizvoda, mikrobnog metabolita, sadrži i druge sastojke. To su: proizvod (primarni ili sekundarni metabolit izlučen u hranjivu podlogu; do 20%), sporedni proizvodi (ostali metaboliti izlučeni u podlogu; do 10%), nepromijenjeni ostaci hranjive podloge i aditivi (1...5%), mikrobna biomasa (glavni proizvod, odnosno sadrži glavni ili sporedni proizvod; do 7%) i voda (80...95%).

Ponekad se biološki transformirana hranjiva podloga zajedno s mikrobnim stanicama, bez izdvajanja i pročišćavanja, upotrebljava kao proizvod (jogurt, kiselo mlijeko, sirovi). Često se iz transformirane (prevrele) podloge jednostavnim metodama izdvaja samo biomasa i ostale suspendirane čestice, a transformirana se podloga upotrebljava kao proizvod (npr. vino i pivo). Međutim, najčešće, izdvajanje, koncentriranje i pročišćavanje proizvoda zahtijeva složenu opremu i mnogo različitih tehnoloških operacija, osobito kad je proizvod sastojak mikrobne stanice.

U ovom se članku opisuje proizvodnja samo nekih najvažnijih predstavnika mikrobnih proizvoda koji se međusobno razlikuju po tipu biokatalitičke reakcije u kojoj nastaju i po regulaciji metabolizma potrebnog za njihovo nastajanje, nakupljanje ili izlučivanje u hranjivu podlogu. Neki od ostalih proizvoda mikrobne proizvodnje opisani su u drugim člancima (v. *Antibiotici*, TE 1, str. 305...308; v. *Enzimi*, TE 5, str. 341...345).

### Proizvodnja mikrobne biomase

Industrijski se proizvode biomase kvasaca, bakterija, plijesni i jednostaničnih algi. Mikroorganizmi se uzgajaju na različitim tekućim supstratima koji moraju sadržavati sve sastojke potrebne za rast biomase (biogene elemente: ugljik, dušik, vodik, fosfor i kisik, zatim mineralne soli i faktore rasta).

**Biomasa kvasaca.** Najduže je poznata i najbolje uvedena proizvodnja biomase kvasaca, jer ona služi u proizvodnji alkoholnih pića (pivo, vino, voćna vina, rakije), industrijskog

alkohola (etanol), proizvoda za pekarstvo (svježi, suhi aktivni i instantni kvasac), industrijski prerađene hrane (prehrambeni kvasac) i krmiva (krmni kvasac).

Hranjiva podloga za uzgoj kvasaca mora sadržavati lako razgradljive ugljikohidrate (glukoza, fruktoza, saharoza, maltoza, laktoza, pentozni šećeri), izvore dušika, fosfora, sumpora i svih drugih elemenata od kojih je izgrađena kvašćeva stanica.

Rast se ubrzava ako hranjivi supstrat sadrži aminokiseline i stimulator rasta poput biotina, inozitola, tiamina, pantotenske kiseline, riboflavina i *p*-aminobenzojeve kiseline.

Prirodni supstrati poput mošta, voćnih sokova i pivske sladovine sadrže sve osnovne sastojke i faktore rasta potrebne za uzgoj kvasca, pa se upotrebljavaju za proizvodnju biomase kvasca i za proizvodnju alkoholnih pića.

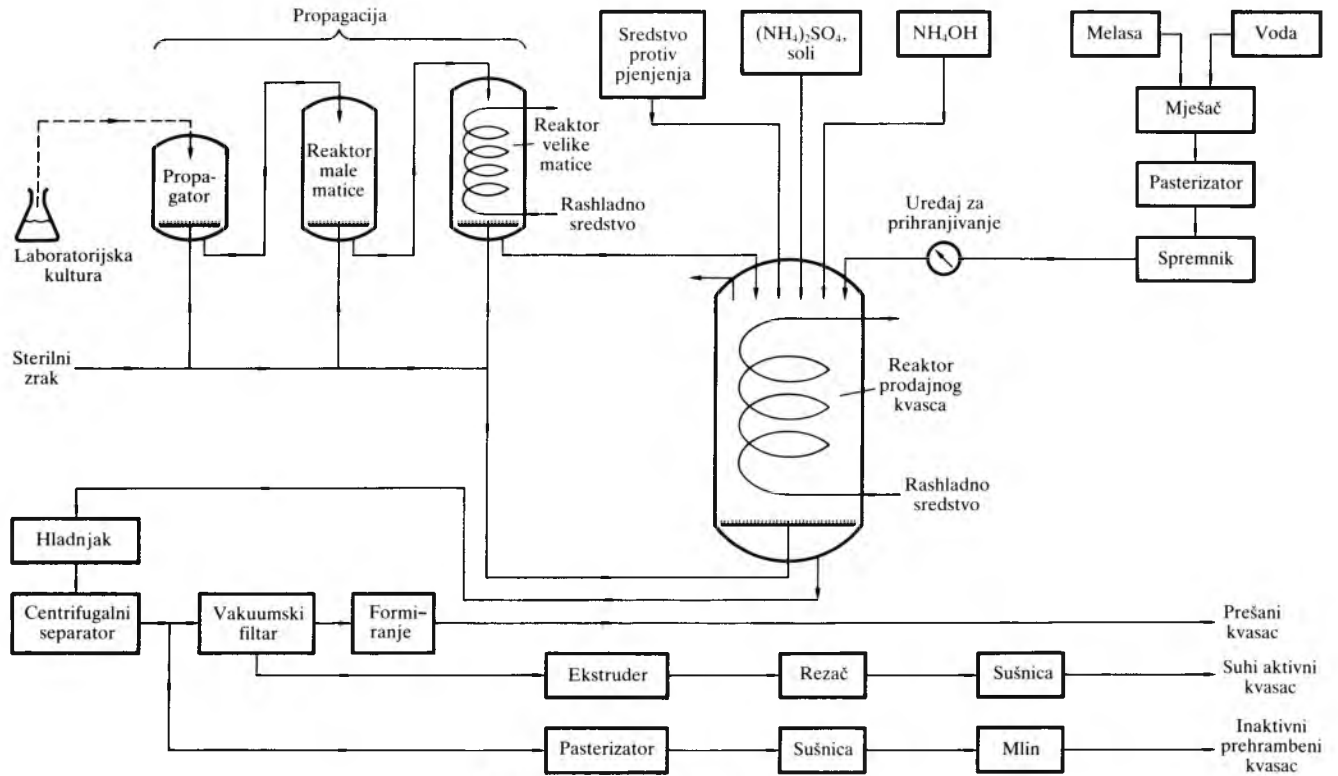
Za proizvodnju pekarskog, prehrambenog i krmnog kvasca upotrebljavaju se različite jeftinije sirovine, kao melasa, sirutka, sulfatna lužina i frakcije nafte (npr. ravnolančani alkani). Takvi supstrati zahtijevaju dodatke (amonijeve i druge mineralne soli, kvašćev ekstrakt, hidrolizate škroba itd.), jer ne zadovoljavaju sve potrebe za rast kvasaca.

Pekarski, prehrambeni i krmni kvasci uzgajaju se aerobno, pretežno šaržnim procesom. Uzgoj započinje u laboratoriju umnožavanjem čiste kulture odabranih kvasaca. Čiste kulture, najčešće nabavljene iz zbirki kvasaca (npr. NCYC, Engleska), čuvaju se na kosom agaru pri +4 °C, te postupno precjepljuju u 5...10 puta veći obujam sterilnog supstrata, sve dok se ne dobije potreban obujam inokuluma za naciepljivanje pogonskog propagatora.

Oprema za proizvodnju (reaktori i cjevovodi) sterilizira se vodenom parom ili kemijskim sredstvima. Hranjivi se supstrati mogu toplinski sterilizirati, ali se češće primjenjuju postupci za smanjenje moguće kontaminacije poput pasterizacije, kuhanja, dodatka kemijskih sredstava (sumpor-dioksid, klor) ili zakiseljavanja (pH 4,5).

**Svježi pekarski kvasac.** To je kvasac vrste *Saccharomyces cerevisiae* što se proizvodi na melasi šećerne repe ili trske (sl. 14). Melasa se razrjeđuje vodom do 40% suhe tvari, bistri se i pasterizira. Posebno se priprema vodena otopina amonijaka, amonij-hidrogenfosfata ili drugih amonijjskih soli, magnezij-sulfata, biotina, a često i tiamina. Mala količina tako pripremljene melase i soli (pH = 4...4,5) uvodi se aseptično u sterilni bioreaktor, razrjeđuje vodom do 5% suhe tvari i inokulira kvascem iz propagatora. Prva se kvašćeva generacija proizvedena u pogonu naziva malom maticom, a druga velikom maticom. Maticni se kvasac u obliku kvašćeva mlijeka (20% suhe tvari) čuva u posudama s dvostrukim stijenkama (duplikatorima) na +4 °C i upotrebljava se kao inokulum za generaciju prodajnog kvasca. Kako je proces uzgoja kvasca aeroban, nakon inokulacije se u bioreaktor preko perforiranih cijevi ili specifičnih raspršivača uvodi sterilan zrak. Kvašćeve stanice brzo troše raspoložive hranjive sastojke, pa se bioreaktor prihranjuje svježom hranjivom podlogom. Postepeno dodavanje supstrata ili prihranjivanje potrebno je zato što visoke koncentracije šećera (saharoze, glukoze ili fruktoze) djeluju represivno na enzime disanja, pa bi šećer, kad bi se u bioreaktor odjednom dodala sva melasa, umjesto konverzije u biomasu, fermentirao u etanol. Rast je kvasca eksponencijalan, pa se količina hranjivih sastojaka i zraka u toku uzgoja mora eksponencijalno povećavati. To se postiže uređajem za doziranje i automatsko vođenje procesa. Zbog intenzivne aeracije i brzog rasta supstrat se pjenuje i oslobađa se toplina. Pjenjenje se suzbija različitim kemijskim sredstvima (poli(propilen-glikoli) i silikoni), a višak topline odvodi se rashladnim sredstvom koje cirkulira kroz rashladni plašt bioreaktora. Temperatura se održava na 30 °C, a pH na 4...4,5 dodatkom potrebnih količina amonijjskih soli, odnosno sulfatne kiseline.

Pri kraju uzgoja zaustavlja se prihranjivanje bioreaktora, ali se nastavlja aeracija. Ta faza traje 1...2 sata da bi se potrošili svi hranjivi sastojci i sintetizirale rezervne tvari koje omogućuju održavanje kvašćevih stanica na životu tijekom skladištenja.



Sl. 14. Shema proizvodnje pekarskog kvasca

Konačna koncentracija suhe tvari kvasca u hranjivom supstratu iznosi na kraju procesa 50...70 g/L. Separacijom se kvasac ugušćuje, pere vodom i ponovno ugušćuje na 200 g suhe tvari po litri poluproizvoda, koji se naziva kvašćevim mlijekom. Ono se oslobađa ekstracelularne vode na okvirnoj filtarskoj preši ili rotacijskom vakuuromskom filtru. Tako se dobiva svjež prešani pekarski kvasac s 27...30% suhe tvari (ovisno o dodatku natrij-klorida). Kvasac se oblikuje u manje ili veće blokove koji se moraju do upotrebe čuvati u hladnjaku. Za proizvodnju 100 kg suhe kvašćeve tvari treba 200 kg saharaže, 10,32 kg amonijaka, 100,44 kg kisika i 7,7 kg mineralnih soli, a osim kvasca nastaje 140,14 kg ugljik-dioksida i 78,12 kg vode, a oslobađa se i toplina od 1600 kJ.

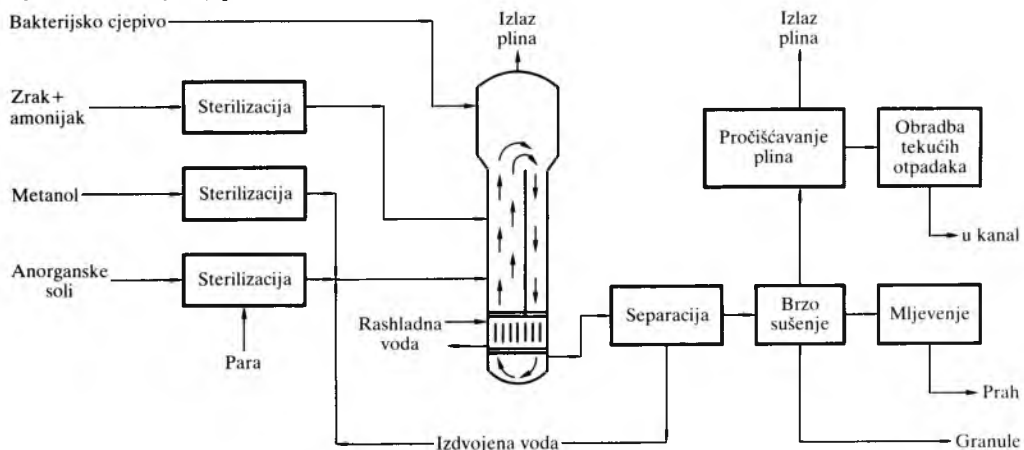
Suhi aktivni pekarski kvasac proizvodi se poput svježega pekarskog kvasca (sl. 14). Za njegovu se proizvodnju upotrebljavaju specijalno odabrani sojevi kvasaca koji mogu sačuvati sposobnost vrenja i nakon sušenja. Prihranjivanje svježom podlogom pri kraju uzgoja prestaje nešto ranije. Separacija i filtracija se provode tako da se dobije svjež kvasac s približno 35% suhe tvari. To se postiže dodatkom od 0,2...0,6% natrij-klorida. Često se dodaju i sredstva koja štite kvasac tijekom sušenja (npr. stearati u količini od

0,5...1%). Kvasac se zatim ekstruzijom oblikuje u sitne kuglice ili štapiće promjera 1...3 mm i suši u fluidiziranom sloju kondicioniranim zrakom, tako da temperatura ne bude viša od 35 °C. Pakira se u atmosferi inertnog plina (dušik) u nepropusnu ambalažu, pa se može skladištiti duže vrijeme na sobnoj temperaturi. Aktivnost je suhog kvasca za 25...35% niža od aktivnosti svježeg kvasca; prije upotrebe treba ga rehidrirati i aktivirati u otopini šećera.

Instantni pekarski kvasac razlikuje se od suhog aktivnog kvasca po tome što se može izravno dodati u brašno bez prethodne rehidratacije i aktivacije.

Prehrambeni kvasac sastoji se od inaktiviranih stanica, najčešće pekarskog kvasca, koje se u prehrambenoj industriji upotrebljavaju kao aditiv da bi se povećao udio proteina, aminokiselina i vitamina u industrijski prerađenoj hrani. Proizvodi se kao svjež kvasac koji se nakon separacije termolizira a zatim suši.

Krmni kvasac. To je biomasa inaktivnih stanica različitih vrsta kvasaca (*Kluyveromyces fragilis*, *Candida utilis*, *C. tropicalis*, *C. intermedia*, *C. pseudotropicalis*, *C. lipolytica*), proizvedena na sirutki, sulfatnom lugu, džibri ili ravnolančanim alkanima, koja se zbog visokog udjela proteina (do 50%)



Sl. 15. Proizvodnja bakterijske biomase (komercijalni naziv proizvoda: Pruteen, tvrtka ICI)

i vitamina upotrebljava kao dodatak krmivu. Ti su proizvodi nazvani proteinima jednostaničnih mikroorganizama, a proizvode se slično kao i prehrambeni kvasac, često kontinuiranim postupkom. Po količinama je najzanimljivija proizvodnja kvašćeve biomase na ravnolančanim alkanima iz nafte, a posebno je bila razvijena u SSSR. Tu proizvodnju karakterizira visoka potreba za kisikom, što se vidi iz materijalne bilance biomase: da bi se proizvelo 100 kg suhe kvašćeve tvari, treba 100 kg heksadekana, 10,32 kg amonijaka, 7,5 kg mineralnih soli i 241,06 kg kisika. Osim kvasca dobiva se 140,14 kg ugljik-dioksida i 118,74 kg vode, a oslobađa se toplina od 1600 kJ. U tom je postupku, dakle, potrebno 2,5 puta više kisika nego pri uzgoju na ugljikohidratima, a pritom treba odvesti i mnogo više oslobođene topline.

**Bakterijska biomasa.** Iako se proizvodi biološki aktivna biomasa različitih bakterija koja se upotrebljava kao polazna mikroba kultura (tzv. starter-kultura) za različite svrhe (različiti mliječni, mesni i drugi fermentirani proizvodi, terapeutici, bioinsekticidi, biološka gnojiva itd.), po količini je najvažnija proizvodnja inaktivne biomase bakterije *Methylophilus methylotrophus* na metanolu (*Pruteen*, proizvod tvrtke ICI). Ta se biomasa proizvodi u golemim bioreaktorima u kontinuiranom procesu (sl. 15), bogata je proteinima (do 80%), a služi kao dodatak krmivu ili emulgirana u vodi kao zamjena za mlijeko u tovu teladi.

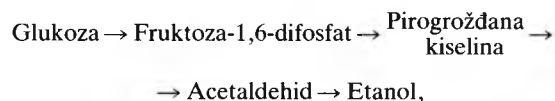
**Biomasa plijesni.** Različite se plijesni uzgajaju na otpadnim vodama radi dobivanja biomase bogate lipidima i proteinima. Najzanimljivija je proizvodnja biomase plijesni *Fusarium graminearum*, koja se nakon djelomičnog uklanjanja ribonukleinskih kiselina preraduje u strukturirani proizvod pod imenom *Myco-Protein* i upotrebljava kao zamjena za meso.

**Biomasa jednostaničnih algi.** Neke vrste jednostaničnih algi (*Chlorella*, *Scenedesmus*) mogu u umjetnom uzgoju dati biomasu bogatu proteinima (do 75% suhe tvari), pa se industrijski proizvode u staklenim bioreaktorima ili otvorenim bazenima izloženim umjetnoj ili sunčanoj svjetlosti. Osim strogog održavanja režima svjetla i tame, treba održavati

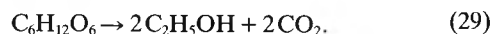
optimalnu temperaturu rasta 25...30 °C, te primjerenu koncentraciju ugljik-dioksida i kisika u zraku za provjetravanje hranjivog supstrata. Proces je obično mnogo duži (7...21 dan) nego pri uzgoju kvasaca, bakterija i plijesni. Pri optimalnim uvjetima postiže se dnevni prinos od 20 g suhe tvari biomase po četvornom metru osvijetljene površine reaktora (bazena).

### Alkoholna fermentacija

Razgradnjom šećera kvasci iz roda *Saccharomyces* u anaerobnim uvjetima proizvode glikolitičkim putem etanol:

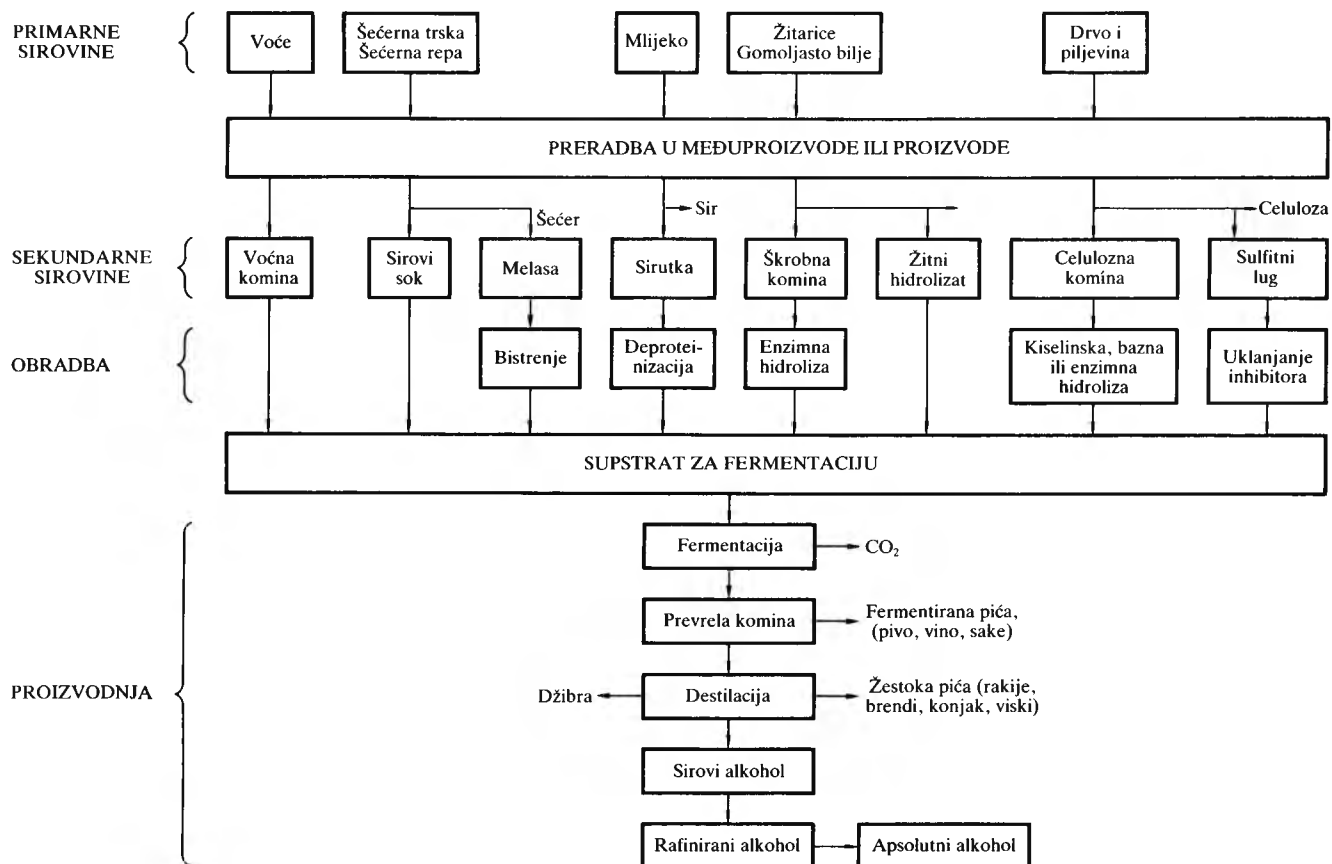


prema jednadžbi



Od 100 kg glukoze može nastati 51,11 kg etanola i 48,89 kg ugljik-dioksida, a oslobađa se toplina od 60,47 kJ. Praktične vrijednosti za proizvedenu masu etanola nešto su niže, jer alkoholnu fermentaciju prati nastajanje sporednih proizvoda vrenja poput glicerola i nekih viših alkohola, jantarne i drugih organskih kiselina, te kvašćeve biomase. Količina sporednog proizvoda ovisi o uvjetima vrenja i supstratu koji se fermentira, pa to utječe i na cijenu proizvoda. Već prema vrsti osnovnog supstrata (šećerne sirovine: voće, grožđe, sirutka i melasa; škrobne sirovine: žitarice i gomoljaste biljke; celulozne sirovine: drvo i slama) dobivaju se različiti fermentirani proizvodi (sl. 16) koji se mogu upotrijebiti izravno (voćna vina, vino, pivo, sake itd.) ili se prvo destiliraju (voćne rakije: šljivovica, kruškovača i konjak; žitne rakije: viski i džin; šećerne rakije: rum i brendi, te sirovi, rafinirani i apsolutni alkohol).

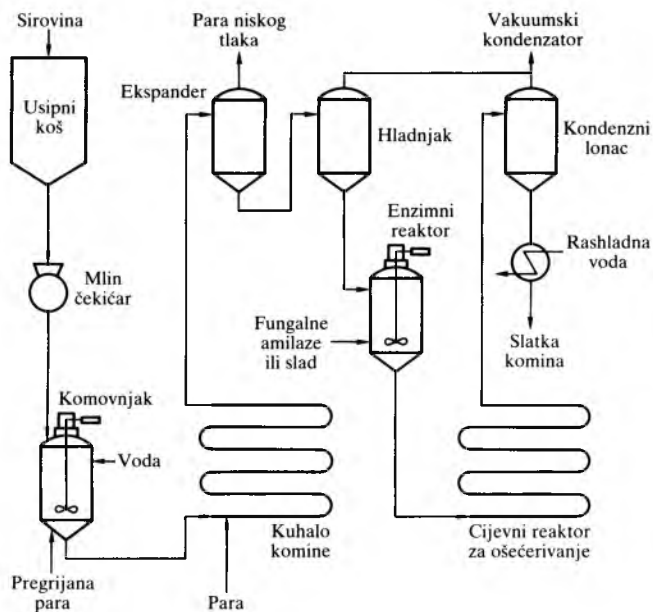
**Proizvodnja etanola.** Etanol se danas proizvodi od petroke-mikalija i fermentacijom. Visoka cijena i ograničene rezerve



Sl. 16. Proizvodnja pića i etanola od različitih sirovina

nafte povećavaju mikrobnu proizvodnju etanola u mnogim zemljama, osobito onim koje nemaju nafte, a raspolažu obnovljivim sirovinama kao što su šećerne, škrobne i celulozne poljoprivredne kulture. Jugoslavenska godišnja proizvodnja industrijskog etanola, pretežno iz melase i kukuruza, premašivala je 50000 tona.

Sirovine za industrijsku proizvodnju etanola fermentacijom svrstavaju se u polisaharidne i šećerne. Polisaharidne su sirovine žita, gomoljaste biljke i drvo, a šećerne su šećerni sok, melasa i sirutka. Polisaharidne sirovine moraju se prije fermentacije ošećeriti enzimnom ili kiselinom hidrolizom. Samljevene se sirovine prethodno ukome s vodom i podvrgnu toplinskoj obradbi pri povišenom tlaku, kako bi se razorile stanične strukture te polisaharidi doveli u oblik pogodan za enzimnu ili kiselinu hidrolizu (sl. 17). Škrobni supstrati uglavnom se hidroliziraju hidrolitičkim enzimima kojima je optimalno djelovanje pri pH 5,5-6,5 u temperaturnom rasponu od 60-90 °C (termostabilne  $\alpha$ -amilaze). U hidrolizi celuloznih supstrata još uvijek prevladavaju postupci s kiselinama ili lužinama.

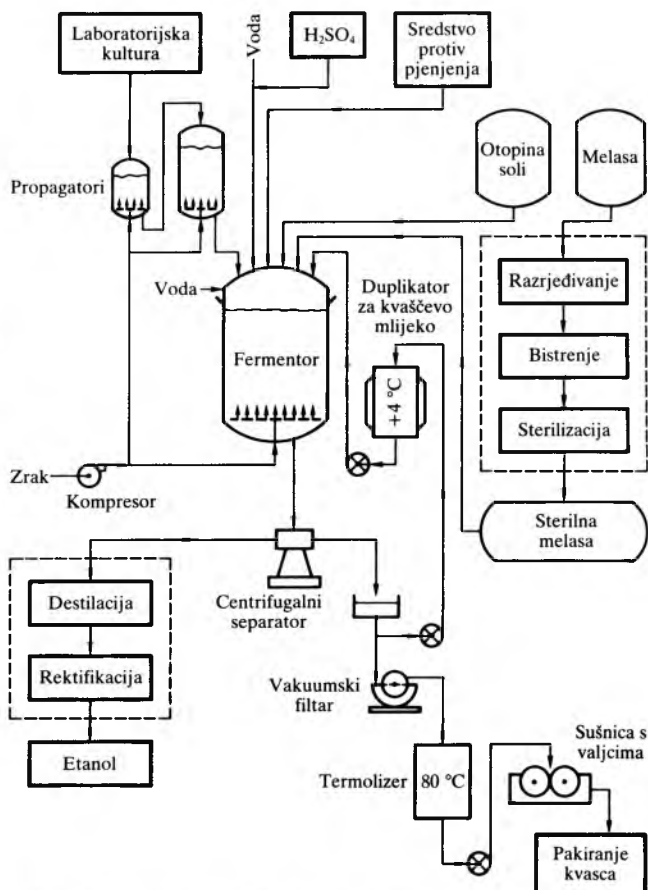


Sl. 17. Shema kontinuiranog kuhanja i ošećerivanja škrobnih sirovina

Koncentracija fermentabilnih šećera u kominama ovisi o načinu vođenja vrenja. Pritom se u diskontinuiranom procesu razlikuju postupci: klasični doljevni, modificirani semiaerobni doljevni i Melle-Boinotov. Proces se može voditi i kontinuirano. Šećerne i ošećerene polisaharidne komine treba prije fermentacije obogatiti izvorima dušika i fosfora (amonij-sulfat i amonij-fosfat). Komina se inokulira potrebnom masom odabrane kulture kvasca i fermentira u fermentoru. Toplina oslobođena fermentacijom odvodi se rashladnim sredstvom, a nastali se ugljik-dioksid odvodi u stanicu za prikupljanje, gdje se pere, komprimira i puni u čelične boce.

Nakon završene fermentacije iz prevrele se komine izdvaja kvašćeva biomasa, a tekući se dio komine odvodi na izdvajanje etanola. Iako su danas poznate mnoge metode izdvajanja (destilacija, ekstrakcija otapalima, membranska separacija itd.), u industriji još uvijek prevladava destilacija i rektifikacija uz potrošak od 1,5-4,5 kg pare za 1 kg etanola, što ovisi o primijenjenom sustavu destilacije (dvije, tri ili četiri kolone, destilacija prema Barbetu, destilacija prema Othmeru i vakuumska destilacija). Pritom se dobiva vrlo kvalitetan, neutralan i rafiniran alkohol s 94-96% etanola. Rafinirani je alkohol sirovina za proizvodnju bezvodnog (apsolutnog) alkohola. Za izdvajanje vode iz rafiniranog etanola postoji također mnogo postupaka, npr. dehidracija benzenom, pentanom ili eterom i drugi.

Etanol se iz melase proizvodi *modificiranim semiaerobnim doljevnim postupkom*. U industriji je najrašireniji šaržni postupak, a karakterizira ga istodobna proizvodnja etanola i suhog, neaktivnog (prehrambenog ili krmnog) kvasca (sl. 18). U početku vrenja u fermentor se uvodi zrak, što ubrzava rast kvasca. Prisutnost kisika ne utječe na nastajanje alkohola dok je koncentracija šećera u bioreaktoru dovoljno visoka (4-6%) da izazove represiju enzima disanja. Proces se zatim do kraja fermentacije vodi anaerobno. Kvasac se iz prevrele komine izdvaja separacijom, a kad je potrebno, reciklira u fermentor. Višak se kvasca termolizira, suši i prodaje kao prehrambeni ili krmni kvasac.



Sl. 18. Proizvodnja etanola i prehrambenog ili krmnog kvasca iz melase

Taj je tip procesa osnova kontinuirane proizvodnje etanola, koja se izvodi višestupanjski u 3-5 fermentora. Pritom se u prvi fermentor kontinuirano dovodi svjež supstrat i reciklira dio biomase iz prevrele komine koja izlazi iz posljednjeg fermentora u nizu.

#### Proizvodnja limunske kiseline

Proizvodnja limunske kiseline stalno raste zbog široke primjene u prehrambenoj, kemijskoj i farmaceutskoj industriji. Svjetska proizvodnja iznosi više od 300000 t godišnje.

Limunska je kiselina hidroksitrikarboksilna kiselina koja nastaje od glukoze u nizu oksidoredukcijskih reakcija. Pojednostavnjeno se njena mikrobnna proizvodnja može prikazati jednadžbom:



Proizvodi se od šećernih ili ugljikovodičnih sirovina (tabl. 3) u izrazito aerobnom procesu, pa se hranjiva podloga tijekom procesa snažno aerira ili oksigenira. U industrijskoj se proizvodnji pretežno upotrebljavaju šećerne sirovine, a mikrobnni proces može biti površinski ili submerzni. Limunska



Tablica 3

USPOREDBA TEHNOLOŠKIH POKAZATELJA PROIZVODNJE LIMUNSKE KISELINE NA UGLJIKOHIDRATNIM I UGLJIKOVODIČNIM SUPSTRATIMA

Pokazatelj	Osnovni supstrat	
	ugljikohidrati	ugljikovodici
Proizvodni mikro-organizam	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida lipolytica</i> <i>Candida oleophila</i> <i>Corynebacterium</i> sp. <i>n</i> -alkani (C <sub>9</sub> ...C <sub>20</sub> ) izvori dušika mineralne soli
Osnovni sastojci hranjive podloge	šećeri 12...20% (melasa/saharoz, glukoza, maltoza) mineralne soli	30 °C
Temperatura	30 °C	3,5...5,0
pH	2,2 (za podlogu na bazi šećera)	vegetativne stanice
Inokulum	5...6 (za melasnu podl.) konidiospore ili micelij u obliku peleta	aeroban submerzno (od 1975)
Tip procesa	aeroban površinski (od 1923) submerzno (od 1952)	3...4 dana ili kontinuirano
Način izvođenja	površinski: 8...11 dana submerzno: 6...7 dana	
Trajanje procesa	0,7...0,8 g/g	1,0 g/g
Koncentracija limunske kiseline na kraju procesa		
Stupanj konverzije osnovnog supstrata u limunsku kiselinu		

se kiselina nagomilava u toku oksidacije šećera u ciklusu trikarbonskih kiselina samo kad je spriječen njezin dalji metabolizam. To se postiže regulacijom pH i udjela teških metala, osobito željeza, mangana i cinka. Zato uspješna proizvodnja limunske kiseline ovisi o vrlo preciznoj kontroli proizvodnih parametara.

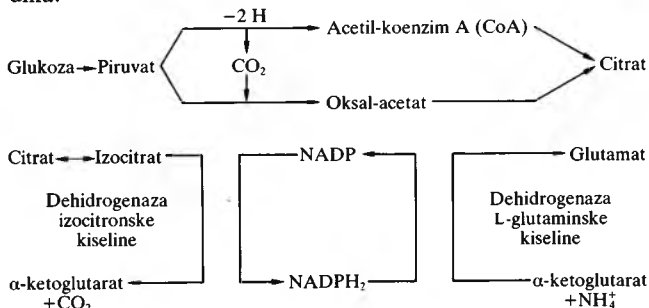
Ako je osnovna sirovina melasa, ona se najprije podvrgava bistenju i smanjenju koncentracije teških metala (željezo, mangan, cink), zatim se razrjeđuje vodom i sterilizira (sl. 19). Tako pripremljenoj hranjivoj podlozi dodaju se anorganske soli i inokulum plijesni *Aspergillus niger* u obliku spora ili kao vegetativni micelij (pelet). Radi smanjenja rasta micelija i povećanja prinosa kiseline podlozi se može dodati metanol (2...3%), etanol, metil-acetat ili škrob.

Nakon 6...11 dana mikrobnog procesa, što ovisi o tehnici kultivacije, izdvaja se limunska kiselina. Izdvajanje i pročišćavanje limunske kiseline za prehrambene svrhe složenije je od mikrobiološke faze procesa. Zato se melasa u suvremenoj proizvodnji zamjenjuje čistim šećerima, npr. saharozom. Iako to poskupljuje hranjivu podlogu, postupak je izdvajanja mnogo jednostavniji.

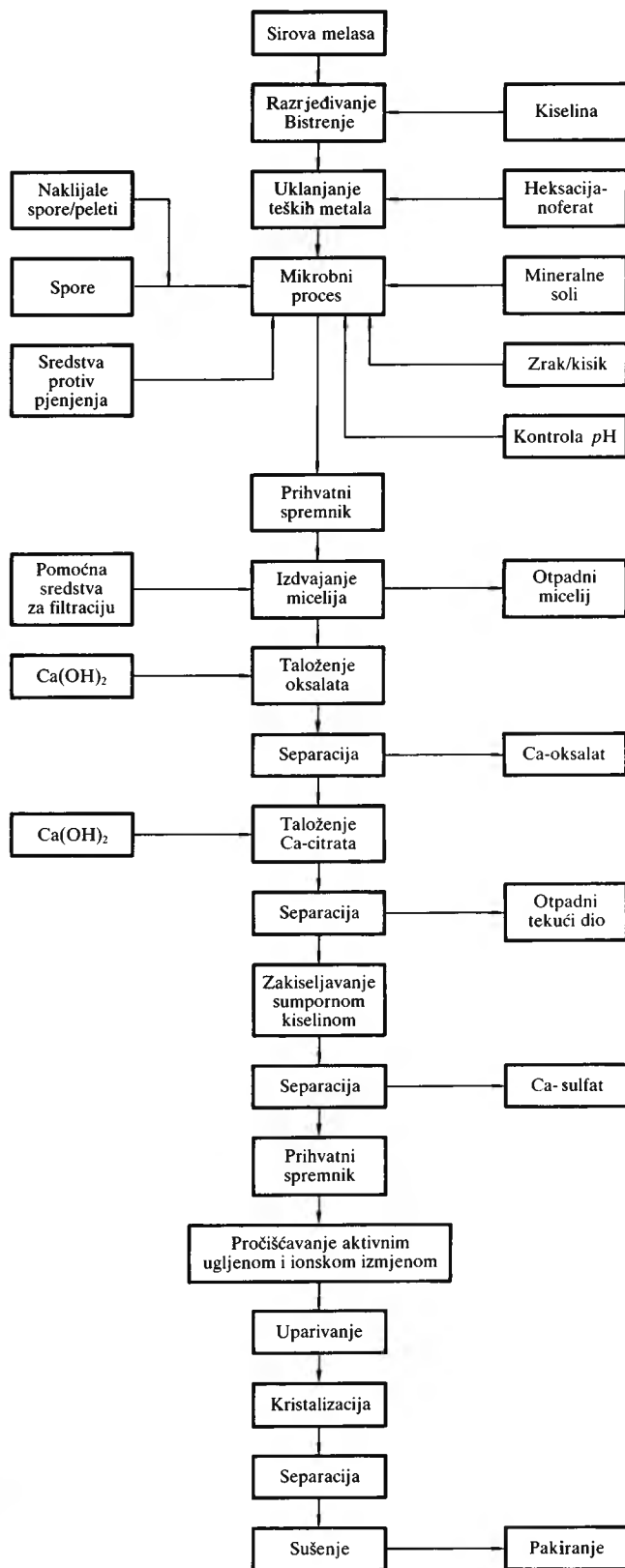
**Proizvodnja glutaminske kiseline**

Natrijska sol glutaminske kiseline upotrebljava se kao aditiv (pojačivač okusa) u prehrambenoj industriji. Zahvaljujući tome, te primjeni u farmaceutici, godišnja mikroba proizvodnja glutaminske kiseline u svijetu (400000 t) premašuje proizvodnju svih ostalih aminokiselina. Najveći je proizvođač Japan. U Jugoslaviji se ta kiselina ne proizvodi.

Glutaminska kiselina nastaje od α-ketoglutarne kiseline dobivene aerobnim metabolizmom šećera (sl. 20) ili ugljikovodika.



Sl. 20. Dobivanje glutaminske kiseline od glukoze (koenzim NADP = nikotinamidadeninukleotid-fosfat, koenzim NADPH<sub>2</sub> = reducirani oblik NADP)



Sl. 19. Proizvodnja i izolacija limunske kiseline iz melase

L-glutaminsku kiselinu izlučuju odabrani sojevi bakterija *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* i *Brevibacterium divaricatum* (tabl. 4). Za visoke prinose glutaminske kiseline (oko 60 g/L) treba omogućiti njeno izlučivanje iz bakterijske stanice, a to znači spriječiti regulaciju sinteze povratnom vezom. To se postiže tako da se poveća propusnost membrane za bakterije dodatkom faktora rasta biotina u pogodnoj koncentraciji (oko 2,5 μg/L podloge). Propusnost

Tablica 4  
TEHNOLOŠKI POKAZATELJI PROIZVODNJE  
L-GLUTAMINSKE KISELINE

Proizvodni mikroorganizam	<i>Micrococcus glutamicus</i> ( <i>Corynebacterium glutamicum</i> ), <i>Brevibacterium flavum</i> , <i>Brevibacterium divaricatum</i> (šećerni supstrati) ili <i>Nocardia erythropolis</i> ( <i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i> ) (alkanski supstrati)
Osnovni sastojci hranjive podloge	glukoza, saharoza (hidrolizirani škrob, melasa) octena kiselina, etanol (5...10%), mineralne soli (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> , FeSO <sub>4</sub> , CaCO <sub>3</sub> ), biotin (do 5 µg/L)
Temperatura	30...35 °C
pH	7...8
Tip procesa	aeroban
Trajanje procesa	2...3 dana
Koncentracija glutaminske kiseline na kraju procesa	do 50 g/L
Stupanj konverzije osnovnog supstrata u glutaminsku kiselinu	0,6 g/g

membrana i staničnog zida također se može promijeniti djelovanjem oleinske kiseline, nekih detergenata i penicilina.

### EKONOMSKA VAŽNOST BIOTEHNOLOŠKE PROIZVODNJE

Godišnji porast biotehnoške proizvodnje procjenjuje se na 12%. U skladu s tim, predviđa se da će krajem XX. st. vrijednost farmaceutskih proizvoda dobivenih biotehnoški premašiti dvadeset i tri milijarde dolara (tabl. 5).

Tablica 5  
PROGNOZA VRIJEDNOSTI BIOTEHNOLOŠKE PROIZVODNJE FARMACEUTSKIH PROIZVODA U SVIJETU POTKRAJ XX. STOLJEĆA

Proizvod	Godišnja vrijednost (milijarde dolara)
Proteini	15,00
Aminokiseline	2,40
Peptidi	2,00
Antibiotici	2,00
Peptidni hormoni	1,26
Enzimi	0,50
Vitamini	0,43
Antivirusni agensi	0,20
Nukleotidi	0,07
<b>Ukupno</b>	<b>23,86</b>

Tablica 6  
PROIZVODNJA GLAVNIH BIOTEHNOLOŠKIH PROIZVODA MIKROBNE TEHNOLOGIJE U JUGOSLAVIJI (1986)

Proizvod	Količina
Vino	6000000 hL
Pivo	12000000 hL
Ocat (10% octene kiseline)	600000 hL
Svježi pekarski kvasac (27% suhe tvari)	37000 t
Suhi aktivni pekarski kvasac (92% suhe tvari)	4000 t
Prehrambeni kvasac (92% suhe tvari)	3000 t
Krmni kvasac (92% suhe tvari)	3500 t
Rafinirani alkohol	52000 t
Tehnički alkohol	5500 t
Limunska kiselina	3500 t
Tehnička mliječna kiselina	800 t
Penicilin	60 t
Tetraciklini	500 t
Bacitracin	400 t
Dekstran	15 t
Askorbinska kiselina	1200 t
Enzimi	50 t

Smatra se da će se vrijednost biotehnoške proizvodnje sasvim približiti vrijednosti kemijskih proizvoda koji se dobivaju sintezom iz nafte i prirodnog plina.

Biotehnoški proizvodi vrlo se razlikuju po cijeni. Udio fermentiranih alkoholnih pića (vino, pivo) te destiliranih alkoholnih pića golem je i teško je procijeniti vrijednosti opsega svjetske proizvodnje. Po važnosti slijedi pet glavnih biotehnoških proizvoda: antibiotici su 1985. god. činili 63% ukupne vrijednosti, etanol kao otapalo 21%, organske kiseline 8%, aminokiseline 5%, te industrijski enzimi 3%. Kad se te kemijske i farmaceutske sirovine pretvore u tržne proizvode i gotove lijekove, njihova vrijednost iznosi više od pedeset milijardi dolara, a procjenjuje se da će početkom sljedećeg desetljeća ta vrijednost biti mnogo veća.

Jugoslavenska biotehnoška proizvodnja (tabl. 6) pokazuje da prevladava tradicionalna biotehnologija, a uvode se proizvodi na osnovi genetičkog inženjerstva.

LIT.: A. Fiechter (ed.), *Advances in Biochemical Engineering*, Vols. 1-16. Springer-Verlag, New York 1971-1987. - J. Mandelstam, K. McQuillen (Eds.), *Biochemistry of Bacterial Growth*. Blackwell Science Ed., London 1973. - T. D. Brock, *Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall, Inc., New Jersey 1974. - A. H. Rose, *Chemical Microbiology*. Butterworth, London 1976. - R. Campbell, *Microbial Ecology*. Blackwell Sc. Publ., Oxford 1977. - D. Perlman, G. T. Tsao, *Annual Reports on Fermentation Processes*, Vols. 1-10. Academic Press, New York 1978-1988. - W. Fritsche, *Biochemische Grundlagen der industriellen Mikrobiologie*. Fischer Verlag, Jena 1978. - S. Aiba, A. E. Humphrey, N. F. Millis, *Biochemical Engineering*. Academic Press, New York 1978. - D. I. C. Wang et al., *Fermentation and Enzyme Technology*. John Wiley, New York 1979. - H. J. Rehm, G. Reed, *Biotechnology*, Vols. 1-8. Verlag Chemie, Weinheim 1981-1989. - B. Mihajlović, *Mikrobiologija I*, Opšta mikrobiologija sa osnovama imunologije. Veterinarski fakultet, Beograd 1983. - W. Crueger, *Biotechnology*, Textbook of Industrial Microbiology. Science Tech. Inc., Madison 1984. - A. Sasson, *Biotechnologies: Challenges and Promises*. Unesco, Paris 1984. - S. Prentis, *Biotechnology, A New Industrial Revolution*. Orbis Publ., London 1984. - *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. I-II. Williams & Wilkins, Baltimore 1984, 1986. - J. E. Smith, *Biotechnology Principles*. ASM, Washington D. C. 1985. - M. Todorović, D. Simić, M. Stojanović, *Mikrobiologija sa praktikumom*. Naučna knjiga, Beograd 1985. - J. E. Bailey, D. F. Ollis, *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill, New York 1986. - S. Silver, *Biotechnology: Potentials and Limitations*. Springer-Verlag, Berlin 1986. - H. Schlegel, K. Schmidt, *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart 1986. - M. Mutanóla-Cvetković, *Opšta mikologija*. Književne novine, Beograd 1987. - S. B. Primrose, *Modern Biotechnology*. Blackwell Sc. Publ., Oxford 1987. - D. Simić, *Mikrobiologija*. Naučna knjiga, Beograd 1988.

V. Johanides V. Marić

**TEKSTIL**, uopćeni naziv za vlakna i sve proizvode načinjene od njih bilo kojom preradiivačkom tehnologijom, tj. pređenjem, tkanjem, pletenjem, pustanjem, iglanjem, lijepljenjem i sl. To znači da pojam uključuje sve linearne i plošne tekstilne tvorevine te iz njih konfekcionirane proizvode. U posljednje se vrijeme za takve tvorevine i proizvode uvodi i naziv *tekstilije*. Prema nekim shvaćanjima u tu skupinu treba uvrstiti i proizvode koji nisu izrađeni od vlakana, a imaju izrazit tekstilni izgled, karakter i namjenu.

Riječ tekstil izvorno označuje tkane proizvode (lat. *texere* tkati, *textilis* tkan).

Kako je prva primjena tekstila bila uvjetovana u prvom redu primarnim čovjekovim potrebama (zaštita od hladnoće), to početke izradbe tekstila treba tražiti u prethistoriji. Najraniji dokazni materijal potječe iz neolitske kulture (oko ← 5000. godina), a radi se o izratku načinjenu tehnikom tzv. *basket-tkanja*. Gotovo je sigurno da je tkanju morala prethoditi izradba prede. Pamuk, vuna, lan i svila upotrebljavali su se još u drevnom Egiptu. Postoje materijalni dokazi o primjeni pamuka u Indiji otprilike ← 3000. godine, a prema kineskim kroničarima u to se razdoblje datira i proizvodnja svile u Kini. Posebno je zanimljivo da se mnogi proizvodi načinjeni u tom ranom razdoblju drevnih civilizacija odlikuju profinjenošću i ljepotom kojoj se može zavidjeti, što znači da se već tada, osim funkcionalnosti, važnost davala obliku i dizajnu.

Izradba tekstila na američkom tlu također datira iz prethistorijskog doba. Zanimljivo je da su peruanske tkanine nalikovale na drevne egipatske, premda nije vjerojatno da je među njima postojao ikakav kontakt. Inke i Navaho Indijanci izradivali su tkanine posebne teksture i ornamentike, obojene izrazito živim i briljantnim tonovima.

Na europsko tlo proizvodnja tekstila dolazi s Istoka preko Male Azije, a kad su Arapi 827. zauzeli Siciliju, Palermo postaje središte proizvodnje prekrasnih vunanih, a kasnije i svilanih tkanina ukrašenih zlatnim nitima. Iz Italije se proizvodnja tekstila prenosi u Francusku (XV. st.). Posebno postaju cijenjeni flamanski tkalci koji su to umijeće prenijeli i u druge europske zemlje, u prvom redu u Englesku, koja nakon poznatog Nanteskog edikta postaje vodeća europska zemlja u proizvodnji tekstila. Taj primat izgubila je tek u nedavnoj prošlosti.