

# Sirovine i izvori kemijskih elemenata korišteni za hranjive podloge u industrijskoj proizvodnji

---

**Tomić, Sara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:313704>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-14**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Sara Tomić**

7496/BT

**SIROVINE I IZVORI KEMIJSKIH ELEMENATA KORIŠTENI ZA**  
**HRANJIVE PODLOGE U INDUSTRIJSKOJ PROIZVODNJI**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 2

**Mentor:** Prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

**Zagreb, 2021.**

*Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Sunčice Beluhan.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**  
**Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,**  
**industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

## **SIROVINE I IZVORI KEMIJSKIH ELEMENATA KORIŠTENI ZA HRANJIVE PODLOGE U INDUSTRIJSKOJ PROIZVODNJI**

**Sara Tomić, 7496/BT**

**Sažetak:** Sirovine i izvori kemijskih elemenata koji se koriste za hranjive podloge u industrijskoj proizvodnji dijelimo u četiri skupine: izvori ugljika, izvori dušika, minerali i sirovine korištene za posebne namjene. Kao izvori ugljika koriste se ugljikohidrati i biljna ulja. Izvori dušika su poljoprivredni te mesnih i riblji nusproizvodi ili anorganski spojevi koji sadrže dušik. Mineralne soli služe kao izvori nutrijenata, prekursori, puferi ili za kontrolu pH vrijednosti. U sirovine za posebne namjene ubrajamo sredstva protiv pjenjenja, emulgatore i kelatne agense. Sirovine biramo prema vrsti procesa i karakteristikama radnog mikroorganizma. Sve se češće kao sirovina koristi poljoprivredno-industrijski otpad zbog jeftinije cijene, a takav pristup rješava i problem odlaganja otpada. Poljoprivredno-industrijski otpad uključuje i lignocelulozne sirovine za koje je potreban dodatan predtretman kako bi se mogle koristiti u hranjivim podlogama za različite biotehnološke procese.

**Ključne riječi:** sirovine, hranjiva podloga, fermentacija, poljoprivredno-industrijski otpad

**Rad sadrži:** 29 stranica, 8 slika, 8 tablica, 55 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

**Datum obrane:** rujan 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical engineering  
Laboratory for Biochemical Engineering,  
Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

### RAW MATERIALS AND SOURCES OF CHEMICAL ELEMENTS USED FOR MEDIUM IN INDUSTRIAL PRODUCTION

Sara Tomić, 7496/BT

**Abstract:** Raw materials and sources of chemical elements used for nutrient media in industrial production are divided into four groups: carbon sources, nitrogen sources, minerals and raw materials used for special purposes. Carbohydrates and vegetable oils serve as carbon sources. Sources of nitrogen are derived from agricultural, meat and fish products or inorganic nitrogen-containing salts. Minerals are used as sources of nutrients, precursors, buffers or pH control. Raw materials for special purposes include anti-foaming agents, emulsifiers and chelating agents. Raw materials are selected according to the type of process, and characteristics of the working microorganism. Agro-industrial waste is increasingly used as a raw material because of the cheaper price and this approach also solves the problem of its accumulation. This type of waste also includes lignocellulosic raw materials that require additional pretreatment to be used in nutrient media in various biotechnological processes.

**Keywords:** raw materials, nutrient medium, fermentation, agro-industrial waste

**Thesis contains:** 29 pages, 8 figures, 8 tables, 55 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Sunčica Beluhan, PhD, Full Professor

**Defence date:** September, 2021

<b>Sadržaj</b>	
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 Fermentacija i biokataliza</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2 Obnovljive sirovine koje se trenutno koriste za biotehnošku proizvodnju</b> .....	<b>3</b>
<b>2.3 Izvori ugljika</b> .....	<b>4</b>
2.3.1 Ugljikohidrati kao izvor ugljika.....	4
2.3.2 Biljna ulja kao izvor ugljika.....	8
<b>2.4 Izvori dušika</b> .....	<b>9</b>
2.4.1 Izvori dušika dobiveni iz poljoprivrednih proizvoda .....	10
2.4.2 Izvori dušika dobiveni iz nusproizvoda pivarske industrije .....	11
2.4.3 Izvori dušika dobiveni iz mesa i ribljih nusproizvoda.....	11
<b>2.5 Minerali</b> .....	<b>12</b>
<b>2.6 Kemikalije za posebne namjene</b> .....	<b>13</b>
<b>2.7 Kriteriji za izbor nutrijenata</b> .....	<b>14</b>
<b>2.8 Lignocelulozne sirovine kao izvor nutrijenata</b> .....	<b>16</b>
2.8.1 Sastav lignoceluloznih sirovina.....	16
2.8.2. Tehnologija korištenja poljoprivredno – industrijskih ostataka u industrijskoj biotehnologiji .....	19
2.8.2.1. Otpad iz poljoprivrede i proizvodnje hrane .....	19
2.8.2.2. Kemijski sastav poljoprivredno – prehrambenih industrijskih ostataka .....	20
2.8.2.3. Proizvodnja mikrobnih pigmenata iz poljoprivredno-industrijskog otpada .....	20
2.8.3 Pivski trop.....	20
<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>24</b>
<b>4. LITERATURA</b> .....	<b>25</b>

## 1. UVOD

Biomasa se može definirati kao sav organski materijal biljnog ili životinjskog podrijetla koji se proizvodi u prirodnim ili kontroliranim ekosustavima (poljoprivreda, akvakultura, šumarstvo). Očekuje se da će bioenergija, dobivena iz biomase, znatno pridonijeti obnovljivim izvorima energije u dugoročnom razdoblju. Prema Međunarodnoj agenciji za energiju (engl. IEA), bioenergija nudi potencijal za zadovoljavanje 50 posto potreba za energijom u 21. stoljeću. Isto vrijedi i za sintezu finih i baznih kemikalija, materijala i polimera koji se sada uglavnom temelje na fosilnim resursima: nafti, plinu i ugljenu. Za razliku od tih fosilnih resursa, većina poljoprivrednih sirovina kao što su pšenica, riža i kukuruz unazad nekoliko godina imali su niske cijene (čak i tendenciju pada cijena) zbog rastućih poljoprivrednih prinosa. To se drastično promijenilo zbog kompeticije korištenja biomase za hranu ili za kemikalije i biogoriva.

Poljoprivredni usjevi, npr. kukuruz, pšenica, riža i ostale žitarice, šećerna trska i repa te krumpir, već su prerađeni u rafinerijama škroba i šećera u relativno čiste sirovine ugljikohidrata (škrob, šećeri) kao primarni supstrati za prehrambenu industriju, ali i za većinu industrijskih procesa fermentacije i za neke kemijske procese (Dahod, 1999; Kamm i Kamm, 2004). Postupci fermentacije mogu prevesti te poljoprivredne sirovine u širok raspon vrijednih kemijskih proizvoda kao što su biogoriva i otapala. Uljarice kao što su soja, uljana repica i sjemenke uljane palme (ali i otpadna biljna ulja i životinjske masti) prerađuju se u ulja koja se kasnije prevode u sastojke hrane te sve više u biodizel (Canakci i Sanli, 2008; Vasudevan i Briggs, 2008).

Poljoprivredno – industrijski ostaci kao što su slama, mekinje, pulpa šećerne repe i otpaci drveta bogati su lignoceluloznim sirovinama koje su često podcijenjene ili prepuštene truljenju (Sarath i sur., 2008; Zhang, 2008). Ti otpadni materijali učinkovito se pretvaraju u bioplin i koriste za proizvodnju topline, pare ili električne energije te sve više privlače pažnju kao obilno dostupne i jeftine obnovljive sirovine za proizvodnju kemikalija, materijala i biogoriva. Potrebno je puno više pažnje usmjeriti na biotehnoški potencijal uporabe i modernizacije ostataka iz obnovljivih izvora energije, posebno poljoprivredno-industrijskog otpada (koji je nedovoljno iskorišten). Naglasak treba staviti na načela i procese fermentacije i biokatalize kao vrlo prikladne tehnologije za poboljšanje korištenja tih poljoprivredno-industrijskih ostataka na održiv način.

Cilj ovog rada je navesti izvore sirovina, kemijskih elemenata i kemikalija te načine njihove prerade tijekom pripreme hranjivih podloga kojima se omogućuje njihovo korištenje u biotehnoškoj industrijskoj proizvodnji.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 Fermentacija i biokataliza

Tek je u novije vrijeme prihvaćeno da su mikroorganizmi (bakterije, fungi i mikroalge) neiscrpan izvor širokog spektra kemijskih spojeva. Sve veći broj finih i baznih kemikalija, otapala, aditiva za hranu, enzima i farmaceutskih proizvoda proizvodi se pomoću mikroorganizama primjenom biotehnoloških principa u industrijskom mjerilu ili pomoću procesa biokatalize (Demain, 2007; Vandamme, 2007). Često osim fermentacije ne postoji alternativni put za njihovu sintezu. Također, reakcije biotransformacije koje se temelje na uporabi imobiliziranih biokatalizatora (stanica ili enzima), daju korisne regio- i enantioselektivne molekule u blagim uvjetima reakcije u kojoj se često koriste racemični prekursori (Vandamme i sur, 2005, 2006). Nadalje, svi ti mikrobn procesi imaju pozitivan utjecaj na okoliš (tablica 1). Mikrobn proizvodi pokazuju željenu kiralnost, biorazgradivi su i proizvode se od obnovljivih izvora (poljoprivrednih supstrata), ali i od škroba i šećera. Naime, hranjivi supstrati kao glavni sastojci u industrijskim postupcima fermentacije širom svijeta, uglavnom su dobiveni iz poljoprivrednih kultura prilikom njihove prerade u rafinerijama škroba i šećera. Poljoprivredna praksa i industrijska prerada kao sekundarne proizvode daju poljoprivredno-industrijske ostatke koje bi trebalo smatrati hranjivim nutrijentima, a ne otpadom.

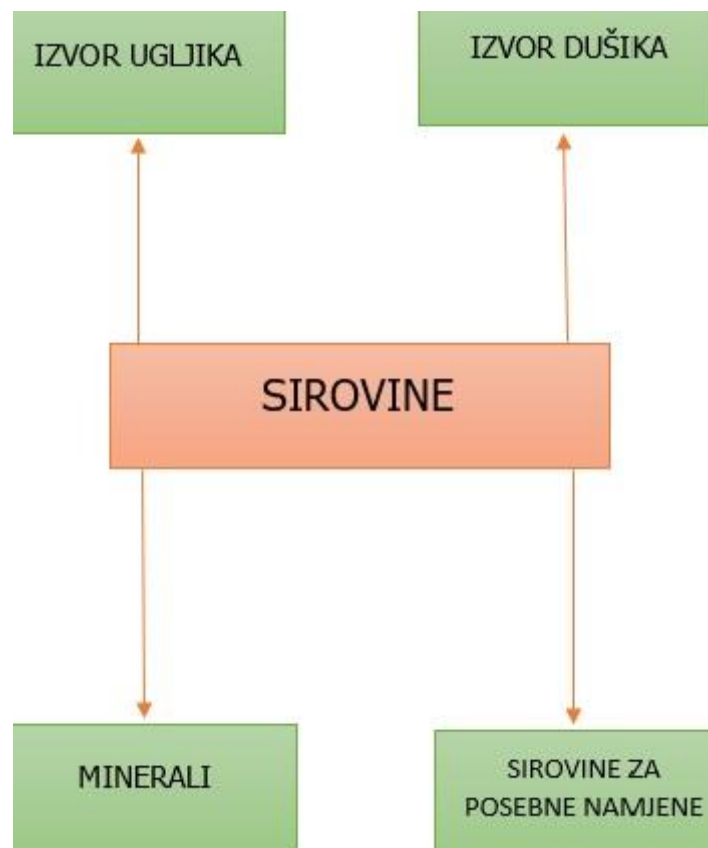
**Tablica 1.** Svojstva važna za održivost kemikalija dobivenih fermentacijom i biokonverzijom (Vandamme, 2009).

proizvedeno iz obnovljivih poljoprivrednih supstrata i poljoprivredno-industrijskih ostataka
blagi uvjeti reakcije – „zelena kemija“
biološki razgradiv
željena kiralnost



## 2.2 Obnovljive sirovine koje se trenutno koriste za biotehnošku proizvodnju

Diljem svijeta su sirovine za postupke fermentacije (slika 1), izravno ili neizravno, povezane s poljoprivrednom proizvodnjom. Zrna žitarica, gomolji biljaka, biljna ulja, ostaci usjeva, poljoprivredno-industrijski proizvodi i dobiveni otpad glavni su izvori biotehnoških sirovina. Većina sirovina korištenih u industrijskom mjerilu složenog su sastava koji nije potpuno kemijski definiran. Ti sastojci uglavnom sadrže više hranjivih tvari koji služe za rast i razvoj mikroorganizama. Međutim, za potrebe razvoja hranjive podloge promatra se određeni sastojak kao izvor jedne hranjive tvari. Na primjer, sojino brašno se koristi za opskrbu dušikom ili proteinima za rast mikroorganizama. Međutim, sojino brašno sadrži i znatne količine ugljikohidrata i minerala. Sastojci hranjive podloge se dijele u skladu s njihovom primarnom ulogom u postupku fermentacije. Na temelju toga možemo razvrstati sirovine korištene za fermentaciju u četiri kategorije hranjivih tvari: sirovine koje su prvenstveno korištene kao izvori ugljika, dušika i minerala te sirovine korištene u posebne svrhe (Vandamme, 2009) (slika 1).



**Slika 1.** Izvori sirovina (vlastita slika prema Vandamme, 2009).

S obzirom na izvore ugljika i dušika većina je biljnog podrijetla, ali određene mikrobne hranjive tvari su životinjskog podrijetla ili su dobivene iz kvasca (Dahod, 1999) (tablica 2).

**Tablica 2.** Česti izvori ugljika u industrijskim fermentacijskim procesima (Vandamme, 2009).

<b>ugljikohidrati</b>	<b>ulja i alkoholi</b>
kukuruzno brašno	sojino ulje
škrob iz različitih biljaka	glicerol
organske kiseline	metil-oleat
glukoza	kukuruzno ulje
glukozni sirup	ulje od sjemenki pamuka
maltoza	ulje od kikirikija
sirutka	palmino ulje
poljoprivredno-industrijski otpad	riblje ulje
laktoza	polioli
melasa šećerne trske	ugljikovodici
melasa šećerne repe	metanol
saharoza	etanol
hidrolizat drva	

## 2.3 Izvori ugljika

### 2.3.1 Ugljikohidrati kao izvor ugljika

Ugljikohidrati (slika 2) imaju značajnu ulogu u različitim procesima. Ugljikohidrati kao bazna kemikalija su izvor ugljika za uzgoj mikroorganizama u industrijskom mjerilu (tablica 3). Jeftini ugljikohidrati, kao što su melasa šećerne repe i trske, saharoza, škrob ili njihovi hidrolizati i glukozni sirup, gotovo se univerzalno koriste kao obnovljivi izvori ugljika u procesima fermentacije.



**Slika 2.** Neki primjeri škrobnih sirovina kao izvora ugljika; kukuruz, pšenica i ječam (Anonymus 1, 2021).

**Tablica 3.** Važne funkcije ugljikohidrata (Vandamme, 2009).

Uobičajeno korištenje	Posebne namjene	Potrošnja
izvor energije	receptori	saharoza: > $10^8$ tona godišnje
spojevi za skladištenje	kiralni međuproducti	glukoza: > $10^7$ tona godišnje
biološki „građevinski“ materijal	imunostimulatori	ugljikohidratne sirovine za fermentaciju: $4 \cdot 10^7$ tona godišnje
služe za prehranu živih organizama	biopolimeri	
	bioplastika	

Ukupna uporaba ugljikohidrata kao sirovina za industrijski proces fermentacije procjenjuje se na  $4 \cdot 10^7$  tona godišnje. Melasa se proizvodi od šećerne repe i trske, nastaje kao ostatak nakon izdvajanja saharoze, a sadrži ukupni fermentabilni šećer u rasponu od 50-55% (w/w) i često

se upotrebljava za dobivanje proizvoda koji se industrijski dobivaju u velikim količinama (engl. *bulk products*) kao što su kvasac, limunska kiselina, etanol, industrijski enzimi i mnogi drugi. Melasa je također izvor dušika, minerala, vitamina i faktora rasta. Njezin promjenjiv sastav je često nedostatak te je potrebna standardizacija, prethodna obrada i dodavanje drugih hranjivih tvari, ovisno o predviđenom postupku fermentacije. Zbog niske cijene melasa je jedna od glavnih sirovina korištena u industriji kao izvor ugljika unatoč promjenjivoj kvaliteti, visokim troškovima za pročišćavanje konačnih proizvoda, potrebi za zbrinjavanjem nusproizvoda kao što je gips i potrebi za obradom otpadnih voda koje su onečišćene melanoidinima, sulfatima itd. Povećanje ekološke svijesti i nužnost smanjenja troškova ulaganja doveli su do toga da industrija sve više koristi tehnologije temeljene na čistim sirovinama za fermentaciju poput škroba i škrobnih hidrolizata. Industrija škroba nudi širok raspon izvora ugljika: škrob, maltodekstrini, glukoza, glukozni i maltozni sirupi maksimalne čistoće i prilagođenog sastava (Róper, 1996). Škrob se obično ne može koristiti u svom izvornom obliku s obzirom na to da dolazi do želatinizacije prilikom sterilizacije što dovodi do povećanja viskoznosti. Za smanjenje viskoznosti potrebno je izvršiti likvefakciju  $\alpha$ -amilazama te se potom može koristiti kao izvor ugljika za mikroorganizme koji proizvode glukoamilazu (Vandamme, 2009). Glukoza je najčešće korišten ugljikohidrat u industrijskim procesima fermentacije. U uporabi su dvije vrste proizvoda: glukoza monohidrat i hidrolizirani kukuruzni sirup koji sadrži glukozu (DE 95). DE ili dekstroza ekvivalent prikazuje količinu reducirajućih šećera izraženih kao invertni šećer (Narodne novine, 2009). Glukoza monohidrat dolazi u kristaličnom obliku koji je lakši za rukovanje, ali je i skuplji. Uglavnom se koristi u procesima koji se provode u manjem mjerilu i kad je ponovljivost procesa iznimno važna. Za procese u većem mjerilu i prihranjivanje tijekom procesa koristi se hidrolizirani kukuruzni sirup kao ekonomičniji materijal. Ukoliko radni mikroorganizam može hidrolizirati niskomolekularne saharide, mogu se koristiti i jeftiniji kukuruzni sirupi koji imaju niže DE vrijednosti. Na primjer, za industrijske procese fermentacije poput proizvodnje penicilina, mogu se koristiti hidrolizati s DE 20. Često se događa da visokomolekularni saharidi daju veće prinose nego čista glukoza. Dekstrini, kukuruzni škrob, ostale vrste škroba (kao što je krumpirov škrob) i kruti supstrati rijetko se koriste za prihranjivanje tijekom procesa. Uglavnom se koriste kao izvori ugljika za početni rast mikroorganizama ili kao izvori ugljika koje mikroorganizam postupno asimilira tijekom sinteze proizvoda. U SAD-u je kukuruzni škrob najrašireniji i najjeftiniji izvor kompleksnih ugljikohidrata. Ovaj proizvod prvenstveno sadrži škrob, ali ima i 5% proteina. Strategija za smanjenje troškova prilikom fermentacije je korištenje sirovog škroba ili kukuruznog brašna zajedno sa komercijalno dostupnim enzimima amilazama. Amilaze razgrađuju molekule škroba te se dobivaju lakše iskoristive molekule ugljikohidrata. Maltodekstrini su rezultat hidrolize

škroba (enzimska ili pomoću kiseline) i kao takvi se mogu koristiti za proizvodnju antibiotika poput penicilina, cefalosporina i streptomocina. Glukoza sirup dobiva se djelovanjem amilaza na škrob. Takvi sirupi (85-90% glukoze) poznati i kao hidrolizati škroba najčešće se primjenjuju u fermentaciji tj. za proizvodnju: limunske kiseline, glukonske kiseline, L-amino kiselina i nekih antibiotika. Za proizvodnju mliječne kiseline i nekih drugih kemikalija često se koristi čista glukoza (dekstroza). Maltozni sirup, dobiven djelovanjem  $\beta$ -amilaze na škrob, prikladan je pri fermentaciji u kojoj je aktivan učinak represije glukozom, kao što je slučaj u fermentacijama za dobivanje nekih antibiotika (Vandamme, 2009). U mnogim fermentacijskim procesima primarni izvor ugljika (koji se najčešće koristi, kao što je glukoza) brzo se metabolizira tijekom faze rasta, a sekundarni izvor ugljika (kao što su ulja) koristi se tijekom proizvodnje. Saharoza se često koristi u postupcima fermentacije. U kristaličnom obliku koristi se kao konzumni šećer, a bijela kristalna saharoza koristi se u procesima u manjem mjerilu. U nekim fermentacijskim procesima može se koristiti i kao izvor ugljika koji se postepeno dodaje ukoliko radni mikroorganizam ima ograničenu sposobnost metaboliziranja saharoze. Uporaba disaharida često se koristi kao alternativni izvor ugljika umjesto monosaharida ukoliko dolazi do kataboličke represije. Saharoza dolazi i u obliku melase koja sadrži od 3-10% proteina pa se u nekim procesima (npr. proizvodnja glutaminske kiseline) melasa koristi kao kombinirani izvor ugljika i dušika. U počecima proizvodnje penicilina laktoza je korištena kao izvor ugljika. Radni mikroorganizam postupno metabolizira laktozu pa se ona odmah na početku procesa može asimilirati u hranjivu podlogu. Međutim, nakon pojave kontrolirane prihrane glukozom, važnost laktoze u fermentacijskim procesima je smanjena. Za procese u manjem mjerilu laktoza je dostupna u granuliranom obliku, ali se još uvijek koristi i u fermentacijskim procesima, posebno u Europi gdje je lakše dostupna od glukoze i kukuruznog sirupa. Najekonomičniji izvor laktoze je sirutka koja je nusproizvod u industriji sira. Sirutka je dostupna u obliku praha osušenog raspršivanjem i osim što je izvor laktoze, izvrstan je izvor proteina i minerala. Biološke metode pročišćavanja otpadnih voda mogu pomoći u sigurnom odlaganju sirutke u skladu sa zaštitom okoliša, ali one su skupe. Umjesto toga, sirutka se može koristiti kao atraktivan i jeftin supstrat za mikrobiološku proizvodnju karotenoida (Venil i sur., 2017).

Od ostalih šećera koji su rijetko korišteni u industrijskim fermentacijskim procesima koriste se maltoza, manitol, sorbitol i ksiloza. Svi oni se koriste u svojim pročišćenim oblicima. Još jedan srodni izvor ugljika u fermentacijskim procesima je glicerol. Osim toga, neke organske kiseline, kao što je octena kiselina, u rijetkim slučajevima mogu istodobno biti korištene za kontrolu pH vrijednosti i kao izvori ugljika (Dahod i sur., 2010). Minoda (Minoda, 1986) govori o mogućnostima uporaba drugih manje uobičajenih izvora ugljika za proizvodnju aminokiselina.

Sulfitni otpadni alkohol, nusproizvod u postupku proizvodnje papirne mase, bogat je pentozom i zato ga kao izvor ugljika mogu koristiti kvasci iz roda *Candida*. Dobro definirani i čisti izvori ugljika preferiraju se u industrijskim procesima fermentacije zbog ograničenja koja imaju radni mikroorganizmi, a također i zbog jednostavnog procesa izdvajanja željenog proizvoda. Patentiran je proces za proizvodnju butanola iz sulfitnog otpada (Hilderbrandt, 2006). Grondal i Berger (Grondal i Berger, 1945) su još krajem prve polovine 20. stoljeća objavili mogućnost prerade otpadnog sulfitnog alkohola kojim se može proizvesti butanol u samo jednom koraku.

### 2.3.2 Biljna ulja kao izvor ugljika

Još jedan zanimljiv supstrat za postupke fermentacije su biljni lipidi i ulja. Obično se koriste u proizvodnji antibiotika poput  $\beta$ -laktamskih antibiotika (penicilini i cefalosporini), tetraciklina, makrolidnih antibiotika i fungalnih poliena (Vandamme, 2009).

U procesima proizvodnje antibiotika, gdje se jezgra antibiotika sintetizira iz masnih kiselina manjih molekularnih masa, ulja su vrlo dobar izvor ugljika zato što osiguravaju masne kiseline prilikom fermentacije. Iako se ugljikohidrati relativno lako obrađuju u usporedbi s biljnim uljima, melasa i izvori škroba zahtijevaju skupi predtretman odnosno hidrolizu. Kalorijski sastav i količina energije po jedinici volumena je znatno veća kod ulja nego što je kod ugljikohidrata. Veća količina raspoložive energije omogućava korištenje manje količine izvora ugljika i manje volumene bioreaktora. Nadalje, pri razgradnji ulja nastaje puno manje vode nego razgradnjom šećera. Ulja također mogu djelovati kao sredstva za suzbijanje pjene te se mogu koristiti kao prekursor za površinski aktivne tvari ili pri proizvodnji antibiotika. Prije nego što su se počela proizvoditi sintetska sredstva protiv pjenjenja, ulja su bila korištena u svrhu kontrole pjene čak i u procesima gdje su ugljikohidrati bili glavni izvor ugljika. Međutim, problem je bio što radni mikroorganizam metabolizira dodano ulje koje je potrebno za suzbijanje pjene. Sintetička sredstva za suzbijanje pjene bolja su zato što ih radni mikroorganizam ne može metabolizirati pa su i potrebna u manjoj količini što je onda i ekonomičnije. U posebnim slučajevima, kad prisustvo sredstava za suzbijanje pjene interferira s izdvajanjem proizvoda, i danas se koriste ulja. S druge strane, korištenje biljnih ulja zahtijeva postupak fermentacije dviju faza uz veću dobavu kisika i mikrobne sojeve koji posjeduju lipaznu aktivnost (Vandamme, 2009)

Ulja mogu opskrbiti mikroorganizam ugljikom koji mu je potreban za energiju, rast i razvoj. Ona se mogu koristiti kao izvor ugljika u šaržnim i kontinuiranim procesima. U nekim fermentacijskim procesima ulja imaju važnu ulogu iako ih radni mikroorganizam ne metabolizira aktivno. Ulje omogućava i zaštitu stanica od sila smicanja i uzrokuje lakšu dostupnost ključnih mikronutrijenata iz hranjive podloge za radni mikroorganizam. Najvažnije ulje korišteno u SAD-u je sojino ulje koje je izdašno i relativno jeftino. Ostala ulja koja se

koriste su: ulje od svinjske masti, riblje ulje i ulja od biljaka poput kukuruza, kikirikija i suncokreta. Poseban uljni proizvod koji je proizveden sintetičkim putem, a našao je svoje mjesto u industrijskim fermentacijskim procesima je metil-oleat. Metil-oleat često se koristi kao hranjivi dodatak u kombinaciji s nekim drugim uljima. Ovisno o izvoru ulja varira udio masnih kiselina koje su u njemu zastupljene (Dahod i sur., 2010). Oplemenjivanjem biljaka može se kvalitativno i kvantitativno povećati produktivnost uljarica. Željene fenotipe biljaka dobivamo mutacijama, selekcijom i rekombinacijom. U jednogodišnjim i višegodišnjim biljkama povećanjem žetvenog indeksa (engl. *harvest index*) i proizvodnjom hibridnih sorti uspješno su povećani prinosi (Baumann i sur., 1988).

#### **2.4 Izvori dušika**

Proizvodi nastali od biljaka, životinja i kvasaca obično se koriste kao složeni izvori dušika u fermentacijskim procesima, a osim dušika i ugljika sadrže: vitamine, faktore rasta i mineralne tvari nužne za rast mikroorganizama (tablica 4). Proizvodi dobiveni iz kvasca obično se proizvode iz pekarskog ili pivskog kvasca koji se uzgaja na melasi, sladovini ili na drugim podlogama sastavljenim od poljoprivrednog otpada. Ekstrakte, autolizate i hidrolizate kvasca je potrebno ispitati s obzirom na njihovu prikladnost za određeni radni mikroorganizam. Peptoni se dobivaju djelomičnom enzimskom hidrolizom proteina životinjskog i biljnog podrijetla ili iz mlijeka (meso, želatina, kazein, proteini sirutke itd.). U novije vrijeme je pojava prionskih bolesti među životinjama s farmi dovela do veće potražnje za hidrolizatima proteina iz drugih izvora kao što su ribe i biljke. Kukuruzna močevina je nusproizvod dobiven u postupku vlažnog mljevenja, a bogata je mineralima, aminokiselinama, vitaminima i faktorima rasta. Koristi se kao izvor hranjivih tvari u mnogim industrijskim procesima fermentacije, primjerice za proizvodnju penicilina G, aminokiselina, enzima i biopesticida. Svi navedeni izvori dušika su dobiveni izravno iz poljoprivrednih proizvoda ili njihovom industrijskom preradom (Vandamme, 2009).

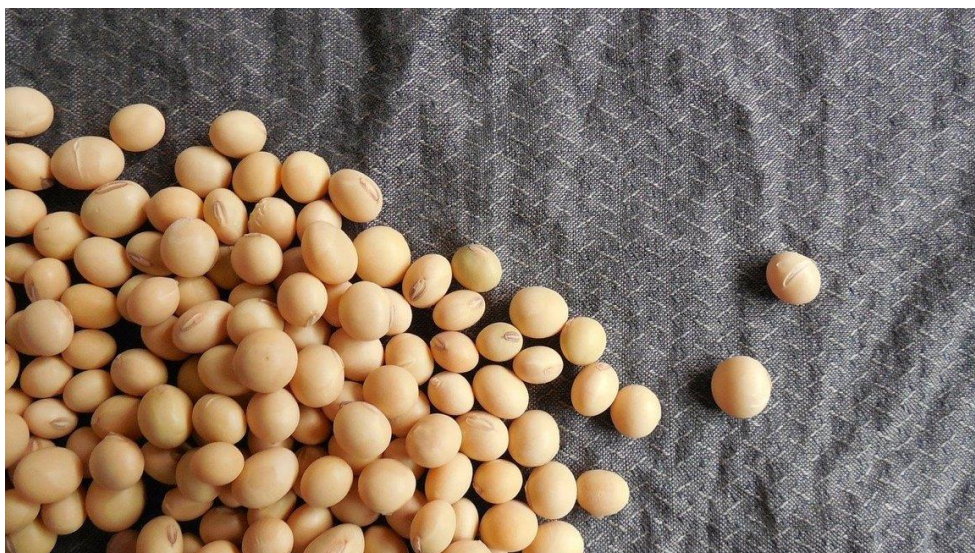
**Tablica 4.** Tipični izvori dušika u procesu fermentacije (Vandamme, 2009).

<b>biljnog podrijetla</b>	<b>dobiveni iz kvasca</b>	<b>ostali izvori</b>
kukuruzna močevina	ekstrakt kvasca	$\text{NH}_4^+$ , $\text{NO}_3^-$ , $\text{N}_2$
brašno od sjemenki pamuka	autolizat kvasca	mliječni proteini (kazein)
brašno od kikirikija i lana	hidrolizat kvasca	peptoni životinjskog
pšenično, sojino i rižino	ostaci od destilacije	podrijetla
brašno		svinjska mast
hrana na bazi kukuruznog		urea
glutena		

#### 2.4.1 Izvori dušika dobiveni iz poljoprivrednih proizvoda

Izvori dušika dobiveni iz poljoprivrednih proizvoda važni su za industrijske procese fermentacije. Neki od poljoprivrednih proizvoda koji se koriste kao izvori dušika su različite žitarice i soja (slika 3). Sojino brašno, sojine pahuljice i sojina krupica se najčešće koriste u proizvodnji antibiotika. Popularnost sojinih proizvoda bazira se na činjenici da se sojino ulje ekstrahira iz soje, a ostatak od ekstrakcije se sastoji od 50% proteina koje stanice mogu koristiti za rast. Osim toga, navedene sojine prerađevine sastoje se od 30% iskoristivih ugljikohidrata. Većina minerala koji su potrebni za fermentacijske procese također se nalaze u proizvodima na bazi soje. Ukoliko se umnožava inokulum radnog mikroorganizma te je primarna zadaća rast radnog mikroorganizma sve što je potrebno u hranjivoj podlozi je sojino brašno zajedno sa solima poput magnezijevog sulfata i kalijevog fosfata. Brašno od sjemenki pamuka je proizvod koji se obrađuje vrlo slično kao sojino brašno. Proteini u tom brašnu su manje dostupni i zbog toga je dobar izvor dušika koji se polako asimilira. Kukuruzno glutensko brašno je također lako dostupan izvor dušika koji se polako asimilira. U počecima proizvodnje antibiotika često je bila korištena kukuruzna močevina kao nusproizvod industrije za mljevenje kukuruza. Međutim, posljednjih godina zbog varijabilnosti u kvaliteti kukuruzne močevine ona se prestala koristiti. Umjesto nje sada se koristi kukuruzna močevina osušena raspršivanjem zbog svoje ujednačenije i stalne kvalitete. Ostali poljoprivredni proizvodi koji se koriste kao izvori dušika u industrijskim biotehnološkim procesima uključuju brašna od kikirikija, sjemenki lana, pšenice, riže i ječama. Hidrolizati biljnog i životinjskog porijekla dobiveni su djelovanjem enzima, uglavnom proteaza te imaju široku primjenu (Dahod i sur., 2010). Kemijske analize mnogih biljnih kultura pokazuju da se postotak dušika smanjuje s godinama pa shodno tome starije biljke sadrže manje dušika nego mlađe biljke (Erdman, 1929).





**Slika 3.** Izvor dušika iz poljoprivrednih proizvoda: soja (Anonymus 2, 2020).

#### 2.4.2 Izvori dušika dobiveni iz nusproizvoda pivarske industrije

Pivarska industrija važan je izvor biotehnoloških sirovina. Glavni proizvod je otpadni pivski kvasac koji zaostaje nakon proizvodnje piva. O metodi sušenja ovisi hoće li kvasac biti pogodan za određen postupak fermentacije. Kvasac može biti osušen u bubnju ili se može sušiti raspršivanjem. Također se prodaje kao pasta koja nastaje isparavanjem vode u industrijskom isparivaču. Svi ovi proizvodi su pronašli svoje mjesto u industrijskim fermentacijskim procesima kao izvor dušika. Međutim, kvasac se nikad ne koristi kao primarni izvor dušika nego kao dodatak koji sadrži hranjive tvari koje nedostaju u izvorima dušika koji potječu iz žitarica. Te dodatne hranjive tvari su organski fosfor i nepoznati mikronutrijenti. Pivski kvasac se također prerađuje u ekstrakte kvasca koji su različito topivi u vodi i zbog veće cijene koriste se u manjim količinama. Ekstrakt kvasca je komponenta koja nema potpuno definiran sastav pa se zato koristi u procesima s polusintetskim hranjivim podlogama kao izvor mikronutrijenata. Dušik je prisutan i u pivskom tropu, koji je opisan u poglavlju broj 2.8. vezanom uz lignocelulozne sirovine.

#### 2.4.3 Izvori dušika dobiveni iz mesa i ribljih nusproizvoda

Meso i riblji proizvodi te nusproizvodi njihovih prerađivačkih industrija bogati su proteinima. Primarni proizvod na bazi mesa je poznat kao suspendirane masne čestice nastale pri preradi. Životinjske kosti i tkiva kuhaju se u vodi u prisutnosti proteaza kako bi se uklonila masnoća. Dobivena tekućina separira se na vodeni i masni sloj. Vodeni sloj je bogat proteinima i peptidima te se suši raspršivanjem i dobije se proizvod koji sadrži 80% proteina. Hidrolizirani proizvod prodaje se pod imenom raznih robnih marki kao pepton. Riblje brašno i riblji hidrolizati

mogu se dobiti enzimskom ili toplinskom hidrolizom ribljeg otpada te uglavnom sadrže oko 70% (w/w) proteina (Dahod i sur., 2010).

## 2.5 Minerali

Minerali su anorganske tvari koje se pojavljuju u jednostavnim oblicima kao što je natrijev klorid ili u kombinaciji s organskim spojevima kao što je željezo u hemoglobinu. Imaju ulogu u sintezi i razgradnji tkiva te regulaciji metabolizma (Silverman i Brauer, 2008). Minerali u hranjivim podlogama tijekom procesa fermentacije služe kao izvori glavnih nutrijenata, mikronutrijenata, prekursori za sintezu sekundarnih metabolita, puferi, za regulaciju pH vrijednosti i kao reaktanti za uklanjanje određenih inhibitora iz hranjive podloge. Soli koje sadrže dušik (npr. amonijev sulfat, amonijev nitrat, natrijev nitrat i kalijev nitrat) u kombinaciji s organskim dušikom zadovoljavaju potrebe za opskrbu stanice dušikom. Korištenjem soli kao izvora dušika u hranjivim podlogama uvijek dolazi do promjena pH vrijednosti. Na primjer, kad organizam koristi amonijev sulfat, pH će se smanjiti, a kad koristi natrijev nitrat pH se povećava. Stoga je vrlo važno osigurati odgovarajuću kontrolu pH vrijednosti i koristiti pufer kako bi se navedeni učinci smanjili.

Još jedna važna hranjiva tvar koja se dobiva u obliku anorganskih soli je fosfor. Fosfor koji se dobiva iz topivih anorganskih soli fosfata lakše je dostupan organizmu od fosfora dobivenog iz organskih hranjivih tvari kao što je kvasac. Stoga je moguće kontrolirati brzinu rasta ravnotežom između fosfora dobivenog iz organskih i anorganskih izvora.

Iako većina izvora dušika, kao što su žitarice i ekstrakt kvasca, sadrže mnoge minerale potrebne za rast, hranjivoj podlozi se često dodaju soli koje sadrže potrebne makroelemente tj. kemijske elemente u količinama većim od onih u tragovima. Na primjer, magnezijeve, kalijeve i sulfatne soli su uglavnom uključene kao sastojci hranjive podloge ukoliko se već ne koriste za neke druge svrhe. Elementi u tragovima kao što su željezo, cink, mangan, bakar, kobalt i molibden uglavnom nisu uključeni u sastojke hranjive podloge koje sadrže visoke koncentracije kompleksnih sastojaka, osim ako nemaju neku posebnu ulogu u metabolizmu. Na primjer, ako sintezu određenog proizvoda provodi enzimski kompleks koji sadrži kobalt, onda će određena koncentracija kobalta biti dodana u hranjivu podlogu kako bi se osigurao kontinuirani rad tog enzimskog kompleksa. Ukoliko hranjiva podloga sadrži male koncentracije kompleksnih sastojaka potrebno je dodati mješavinu elemenata u tragovima u tu hranjivu podlogu.

U procesima u kojima je potrebna velika ionska jakost u podlogu se dodaju soli poput natrijevog klorida ili natrijevog sulfata. Relativno netopiv kalcijev karbonat dodaje se u medij kako bi se spriječilo da pH vrijednost procesa padne ispod 6. Ako pH vrijednost padne ispod 6 kalcijev karbonat će se otopiti i time povećati pH podloge. Topive kalcijeve soli, kao što su kalcijev klorid i kalcijev acetat koriste se kako bi istaložile fosfate u obliku kalcijevog fosfata iz hranjive podloge u kojoj fosfati snažno inhibiraju sintezu proizvoda. Minerali služe i kao prekursori u proizvodnji antibiotika. Prilikom proizvodnje penicilina i cefalosporina potrebno je osigurati u hranjivoj podlozi dovoljno sulfata koji hranjivu podlogu opskrbljuju sumporom koji je potreban za sintezu navedenih antibiotika (Dahod i sur., 2010).

## **2.6 Kemikalije za posebne namjene**

U hranjive podloge koje se koriste za proizvodnju u velikom mjerilu dodaje se više vrsta kemikalija za posebne namjene, a najvažnija su sredstva protiv pjenjenja (SPP). Sredstva protiv pjenjenja smanjuju napetost površine između vode i zraka kako bi se olakšalo sjedinjenje mjehurića. Biljna ulja, koja su ranije korištena kao sredstva za suzbijanje pjene u biotehnološkim procesima, uvelike su zamijenjena sredstvima protiv pjenjenja na bazi poliola i silikona. Prednost sintetskih sredstava protiv pjenjenja je njihova cijena, a pored toga se sporo metaboliziraju. Dva najpopularnija sredstva protiv pjenjenja u industriji su polipropilen glikol (PPG) i silikonska emulzija. SPP se obično stavljaju zajedno s podlogom na samom početku bioprocasa. Međutim, u nekim bioprocasima tijekom procesa je potrebno dodavati SPP kako bi se kontrolirala pjena i zadržavanje zraka. Moderna sredstva protiv pjenjenja sadrže brojne sastojke koji zadovoljavaju različite zahtjeve konačnog proizvoda te uključuju niz sastojaka u krutim i tekućim stanjima, sredstva za zgrušavanje, konzervanse, ulja i otapala (Owen, 2001).

Emulgatori koji se dodaju tijekom fermentacije imaju ulogu suprotnu sredstvima protiv pjenjenja. Dodaju se kako bi se stabilizirale male kapljice uljnih hranjivih tvari povećanjem površinske napetosti između ulja i vode. Male kapljice imaju znatno veću površinu te su stoga lakše dostupna radnom mikroorganizmu. Reagensi za keliranje metala, poput EDTA, često su komponente hranjivih podloga. Kelatni agensi imaju dva dijametralno suprotna efekta. S jedne strane, mogu povezati metalne ione koji su toksični za mikroorganizam, a s druge strane, mogu spriječiti taloženje željenog metala prisutnog u tragovima tako što stvaraju topljivi kompleks. Dostupnost metala radnom mikroorganizmu ovisi o tome može li se on učinkovito natjecati s kompleksirajućim agensom za njega.

Važna pomoćna sredstva koja se koriste u biotehnološkoj proizvodnji sastoje se od različitih enzimskih pripravaka. Koriste se sirovi enzimski pripravci enzima poput amilaze, proteaze i

celulaze. Ti se enzimi uvijek koriste u fazi miješanja sastojaka podloge prije sterilizacije hranjive podloge. Djelomično cijepanje škroba iz kukuruznog brašna se u hranjivoj podlozi postiže amilazama. Celulaze se koriste kako bi se smanjila viskoznost medija koji sadrži velike koncentracije sojinog brašna ili brašna od sjemenki pamuka. Proteaze mogu razgraditi proteine iz hranjive podloge prije sterilizacije. Trenutačno se ulažu veliki napori kako bi se omogućio predtretman jeftinijih sirovina koje bi služile za ekonomičniju proizvodnju bioetanola i drugih biogoriva (Dahod i sur., 2010).

## **2.7 Kriteriji za izbor nutrijenata**

Konačan izbor vrste izvora hranjivih tvari za određeni proces fermentacije složena je odluka koja se temelji na potrebama korištenog mikrobnog soja ili karakteristikama krajnjeg proizvoda (tablica 5) uzevši u obzir tehničke i ekonomske čimbenike (tablica 6). U procesu proizvodnje pojedinog antibiotika koristi se deset različitih izvora ugljika ovisno o ekonomičnosti i geografskoj lokaciji proizvodnog postrojenja.

**Tablica 5.** Odabir sirovina koje sadrže škrob, maltozu i glukozu za biotehnološki proces (Vandamme, 2009).

proizvod fermentacije	škrob	maltoza	glukoza	razlog željene uporabe
polioli: eritritol	+			veći prinos i manji broj koraka prilikom pročišćavanja u odnosu na primjenu melase
organske kiseline: glukonska, itakonska	+			molekularna struktura
aminokiseline: lizin	+			veći prinos i manji broj koraka prilikom pročišćavanja
polisaharidi: ksantan i ciklodekstrini	+			molekularna struktura
enzimi	+			katabolička represija
antibiotici	+			čistoća proizvoda
makrolidi	+			molekularna struktura
tetraciklini	+			katabolička represija
penicilin G	+			čistoća proizvoda
vitamin B <sub>12</sub>	+			čistoća proizvoda

**Tablica 6.** Ekonomski i tehnički čimbenici važni pri izboru hranjivih tvari za mikrobn proces (Vandamme, 2009).

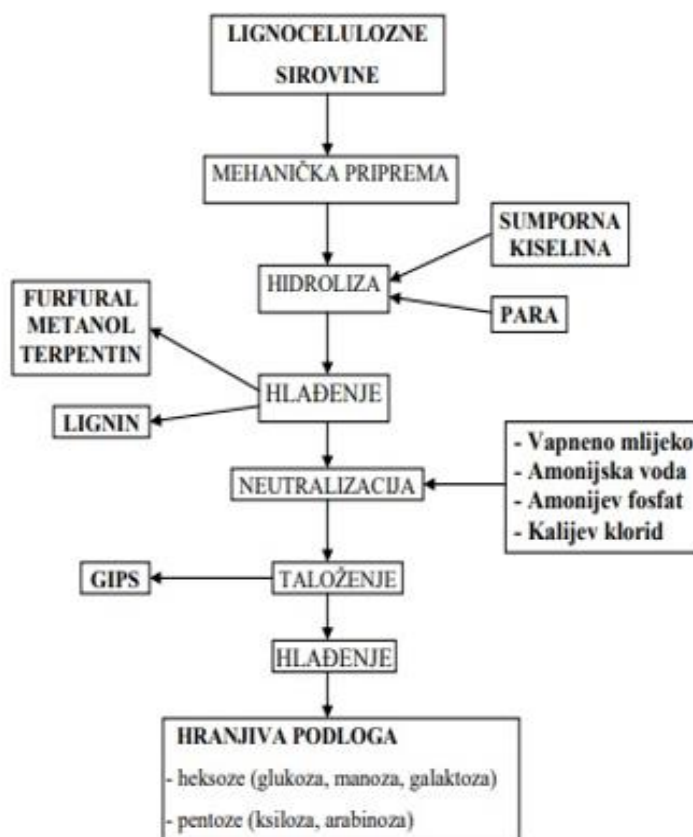
dostupnost	ujednačenost kemijskog sastava
cijena sirovine po jedinici nutrijenta	jednostavna primjena
troškovi transporta	reološka svojstva
stabilnost cijene	površinska napetost
troškovi predtretmana	utjecaj na izdvajanje proizvoda
troškovi stabilizacije	prinos
troškovi skladištenja	tip i koncentracija proizvoda
sigurnosni čimbenici	produktivnost

U tablici 6 istaknuti su neki od važnih čimbenika koji mogu biti prednosti i nedostaci korištenja sirovih i rafiniranih ugljikohidrata ili ulja kao izvora ugljika u fermentacijskim procesima. Ključno je da mikroorganizmi mogu prevesti te lako dostupne i obnovljive izvore hranjivih tvari u široki spektar vrlo složenih bioproizvoda koji često imaju širok potencijal za primjenu (Demain, 2000). Kemijska svojstva supstrata te odabir mono-, di- ili polisaharida za proces fermentacije ovisi o genetičkim svojstvima radnog mikroorganizma. Većina organizama raste na glukozi, a mnogi sojevi mogu hidrolizirati saharozu. Korištenje laktoze ovisi o transportnom sustavu za laktozu kroz staničnu membranu. Mnogi važni fermentacijski organizmi ne mogu rasti na škrobu jer nemaju amilaze koje služe za saharifikaciju škroba (Wilke, 1996).

## 2.8 Lignocelulozne sirovine kao izvor nutrijenata

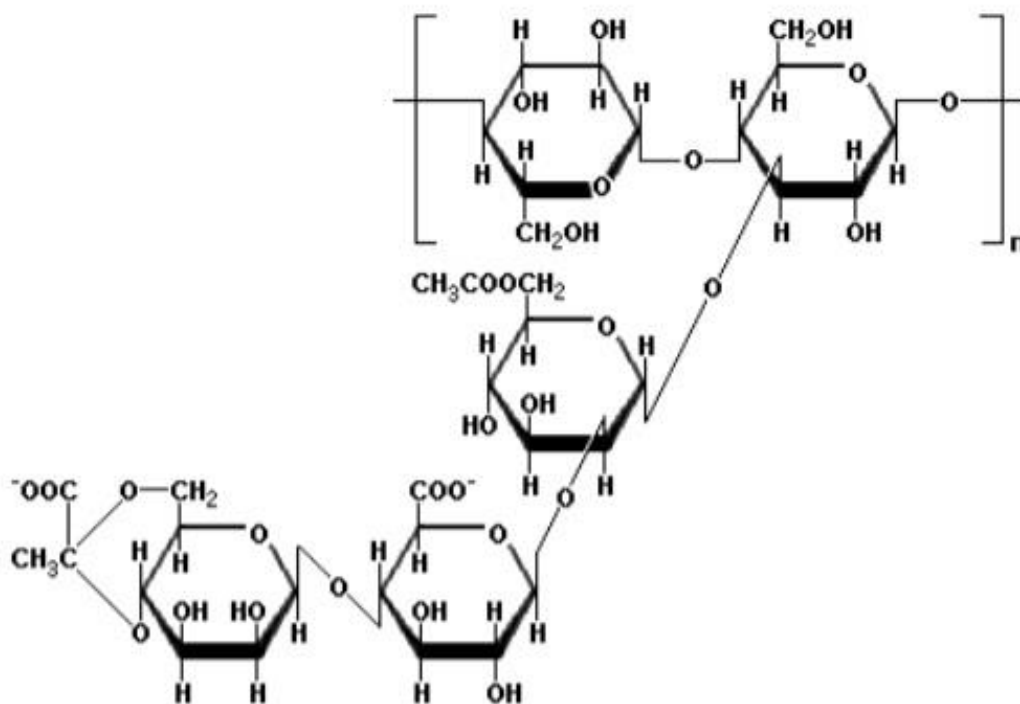
### 2.8.1 Sastav lignoceluloznih sirovina

Lignocelulozne sirovine moguće je hidrolizom prevesti u jednostavne šećere koji dalje služe kao izvori nutrijenata za biotehnoške procese (Chatterjee i Saito, 2015) (slika 4). Ova skupina sirovina u svom sastavu sadrži tri polimera: celuloza (35-50%), hemiceluloza (15-35%) i lignin (10-35%) (Karimi, 2015).

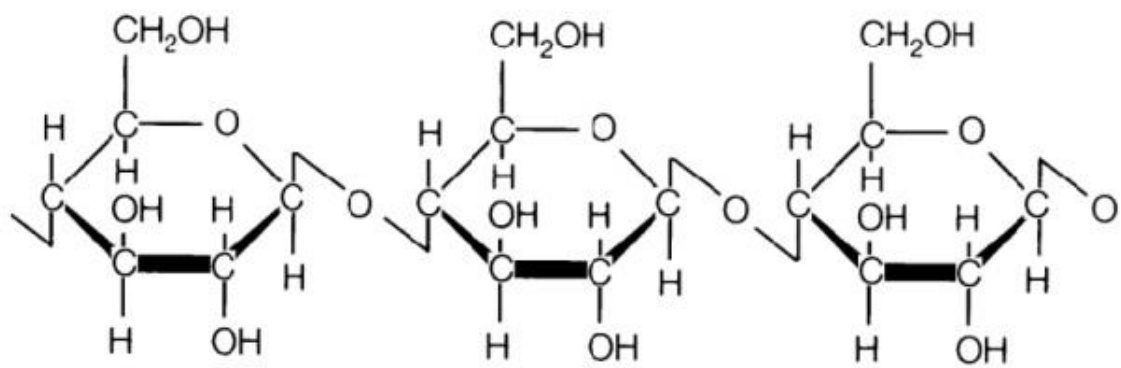


**Slika 4.** Obrada lignoceluloznih sirovina do jednostavnih šećera korištenih za hranjive podloge (Marić, 2000).

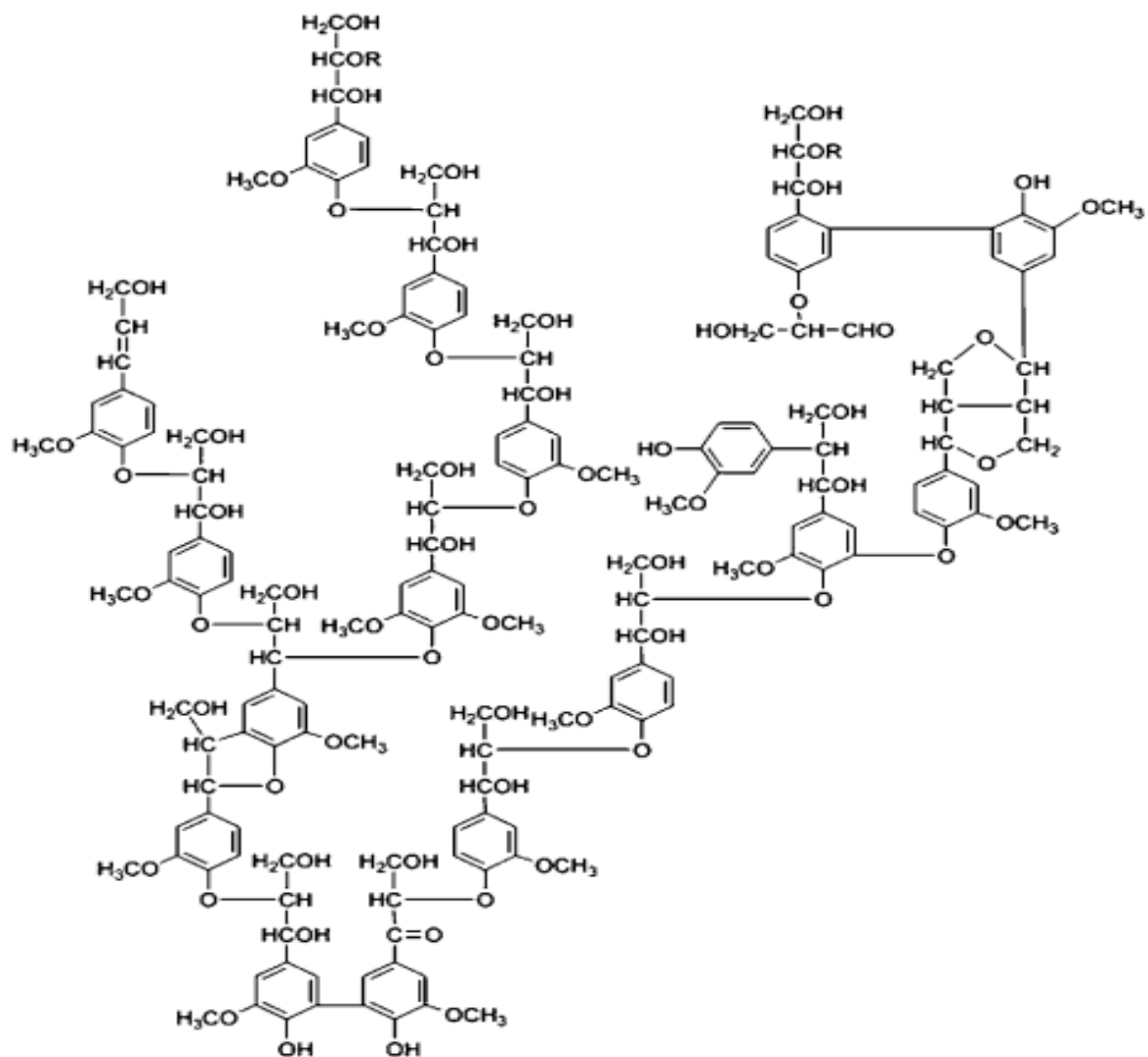
Hemiceluloza (slika 5) je heteropolimer u čijem se sastavu nalaze heksoze (glukoza, galaktoza, manoz) i pentoze (ksiloza, arabinoza i ramnoza). Najzastupljeniji polisaharid u hemicelulozi je ksilan na kojeg su vezane glukuronska kiselina i arabinoza (Harmsen i sur., 2010). Hemicelulozu čine kratki lanci povezani u razgranatu i amorfnu strukturu. Zbog svoje strukture hemiceluloza se jednostavno razgrađuje kiselinom hidrolizom. Celuloza (slika 6) je ravnolančani polisaharid sastavljen od D-glukoznih jedinica međusobno povezanih  $\beta$ -1,4 glikozidnim vezama (Pine, 1984). Zbog prisutstva hidroksilnih skupina na svakoj jedinici glukoze dolazi do stvaranja vodikovih veza između lanaca glukoze, ali i sa drugim molekulama. Celuloza se pojavljuje u kristaličnom i amorfnom obliku, međutim, amorfni oblik pogodniji je za postupke enzimske i kemijske hidrolize (Kumar i sur., 2009). Lignin (slika 7) je složeni amorfni biopolimer koji ima heterogenu aromatsku strukturu. Molekularna masa i sastav bilo koje vrste lignina uglavnom ovise o biljkama koje koristimo kao izvor lignina te okolišnim i razvojnim čimbenicima. Na svojstva lignina utječe postupak ekstrakcije koji se koristi prilikom obrade. Lignini iz biljaka mogu se podijeliti u tri skupine: lignini iz mekanog drva, lignini iz tvrdog drva i lignini iz trava. Mekano drvo sadrži veće količine lignina od tvrdog drva, a najmanje količine lignina nalazimo u travama (Chatterjee, 2015).



**Slika 5.** Kemijska struktura hemiceluloze (Kulkarni Vishakha i sur., 2012).



**Slika 6.** Kemijska struktura celuloze (Acharya i sur., 2012)



**Slika 7.** Kemijska struktura lignina (Calvo-Flores i Dobado, 2010)



## 2.8.2. Tehnologija korištenja poljoprivredno – industrijskih ostataka u industrijskoj biotehnologiji

Kad govorimo o poljoprivredno-industrijskim ostacima ili poljoprivredno-otpadnim tokovima također je potrebno osloboditi fermentabilne šećere iz lignoceluloze koja čini strukturu tih ostataka. Poseban predtretman tih otpadnih materijala je preduvjet za daljnji proces. Prije nego što započne proces mikrobne fermentacije ili biokatalize potreban je mehanički, kemijski, fizikalni ili enzimski predtretman sirovine. Iznimka je provođenje fermentacije na čvrstim supstratima u kojoj se lignocelulozne sirovine izravano koriste za mikrobnu proizvodnju. Pomak ka većem korištenju poljoprivredno- industrijskih ostataka u biotehnološkoj proizvodnji također će staviti veći naglasak na predtretman i na povećanje troškova naknadne obrade (izdvajanja i pročišćavanja proizvoda) u ekonomskoj analizi cijelog procesa proizvodnje. Poljoprivredno-industrijski ostaci imaju širok potencijal kao izvor hranjivih tvari u industrijskim biotehnološkim procesima. Također, mogu se koristiti za proizvodnju finih i baznih kemikalija te goriva. Unaprjeđenje utemeljeno na tim sirovinama drastično će smanjiti socijalne tenzije vezane uz odluku o tome hoće li se biomasa i usjevi koristiti za hranu ili za proizvodnju kemikalija i biogoriva (Robinson i sur., 2001).

### 2.8.2.1. Otpad iz poljoprivrede i proizvodnje hrane

Porast poljoprivredno–industrijskih djelatnosti posljednjih desetljeća doveo je do gomilanja velikih količina lignoceluloznih ostataka (otpad ili nusproizvodi) diljem svijeta koji se ne zbrinjavaju i tako doprinose klimatskim promjenama kao i onečišćenju vode, tla i zraka. Iako se neki od tih ostataka koriste kao hrana za životinje, velike količine se odlažu na odlagalištima ili spaljuju (Šelo i sur., 2021). Primjeri nekih poljoprivredno–prehrambenih industrijskih ostataka prikazani su u tablici 7. Ovi se materijali mogu koristiti u raznovrsnim biotehnološkim procesima koji se provode dubinski (submerzno) ili se mikroorganizmi uzgajaju na čvrstim supstratima.

**Tablica 7.** Podjela poljoprivredno–prehrambenih ostataka (Šelo i sur., 2021).

Poljoprivredni ostaci (nakon berbe usjeva)	ostaci prehrambene industrije (nakon prerade žitarica, voća i povrća i proizvodnje škroba, šećera i jestivih ulja)
plodovi korijenje stabljike sjeme lišće	mekinje komina kora pulpa ulje komine

### 2.8.2.2. Kemijski sastav poljoprivredno – prehrambenih industrijskih ostataka

Na temelju izvora ugljika Mitchell i suradnici (Mitchell i sur., 2002) razvrstavaju podloge za fermentaciju na čvrstim supstratima u tri skupine: škrobni supstrati (sadrže škrob kao glavni izvor ugljika), lignocelulozni supstrati (sadrže celulozu i lignocelulozu kao glavni izvor ugljika) i supstrati koji sadrže uglavnom topive šećere. Poljoprivredno-prehrambeni industrijski ostaci su heterogenog i veoma složenog sastava. Čimbenici koji utječu na njihov sastav su: vremenske prilike, sorte, metode žetve, uvjeti skladištenja i analitičke metode korištene za mjerenje pojedinih sastojaka. Lignocelulozna struktura poljoprivredno–prehrambenih industrijskih ostataka mijenja se biokatalitičkim aktivnostima različitih mikroorganizama. Kako bi se odabrala najbolja metoda za primjenu ovih obnovljivih sirovina (mikroorganizam, uvjeti prerade i vrsta uzgoja) takvi se ostaci prvo moraju kemijski definirati. Kao primjer primjene lignoceluloze porijeklom iz poljoprivrede i prehrambene industrije bit će objašnjena proizvodnja mikrobnih pigmenata.

### 2.8.2.3. Proizvodnja mikrobnih pigmenata iz poljoprivredno-industrijskog otpada

Industrijska proizvodnja pigmenata nije ekonomična s obzirom na korištenje skupe tehnologije. Istraživanja su stoga usmjerena na pronalazak jeftinih supstrata kako bi se smanjili troškovi proizvodnje (Venil i sur., 2017). Posljednjih se godina poljoprivredno-industrijski otpad istražuje kao supstrat ili aditiv u proizvodnji pigmenata s ciljem ostvarivanja dodatne vrijednosti i zadovoljavanjem sve veće potražnje za očuvanjem energije. U navedenim istraživanjima korištene su rižine i pšenične mekinje, kolač zaostao nakon prešanja sezamovog i kokosovog ulja te pivski trop kao sirovine koje sadrže ugljik, škrob, vitamine i minerale za proizvodnju pigmenata. Postoje mnogi drugi čimbenici koji utječu na proizvodnju pigmenata pomoću bakterija, a temeljito razumijevanje tih čimbenika i učinka reguliranja biosintetskih putova na proizvodnju pigmenata pomoći će u razvoju isplativijih bioprocesa (Bhat i sur., 2013). Mikroorganizmi mogu sintetizirati karotenoide pri rastu na hranjivoj podlozi koja sadrži razne rafinirane izvore ugljika, poput glukoze, ksiloze, celobioze, saharoze, glicerola i sorbitola. Međutim, takvi tipovi hranjivih podloga zahtijevaju visoke troškove. Istraživanje karotenogeneze fokusira se na jeftine sirovine kako bi se smanjili troškovi proizvodnje.

### 2.8.3 Pivski trop

Pivski trop (slika 8) je količinski najzastupljeniji nusproizvod pivarske industrije. Procjenjuje se da na 10 000 hektolitara proizvedenog piva nastaje oko 200 tona pivskog tropa koji sadrži 70-80% vode (Kunze, 1996).



**Slika 8.** Izgled pivskog tropa golim okom i mikroskopom (Mussatto i sur., 2006b).

Pivski trop u pravilu se sastoji od pljevice ječma, ali može sadržavati i zaostale dijelove endosperma koji sadrži škrob ovisno o procesu proizvodnje piva. Također može sadržavati ostatke nekih drugih žitarica koje se pored ječma koriste u pivarstvu kao što su pšenica, riža i kukuruz (Mussatto, 2009). Pljevica ječma sastavljena je od lignoceluloznog materijala pa celuloza i hemiceluloza čine 50% (w/w) sastava pivskog tropa. Aminokiseline prisutne u pivskom tropu su leucin, valin, alanin, serin, glicin, a u najvećim količinama prisutna je glutaminska kiselina. Također mogu biti prisutne cistein, histidin, izoleucin i metionin (Huige, 2006; Mariani, 1953). Pivski trop uz to sadrži i određeni udio minerala, lipida, škroba, smola, tanina i eteričnih ulja. Lipidi uključuju triacilglicerole, diacilglicerole, masne kiseline (palmitinska, linolna i oleinska) i sterole. Sadrži i vitamine kao što su: biotin, niacin, pantotenska kiselina, riboflavin i tiamin. Ipak, kemijski sastav pivskog tropa uvelike ovisi o sorti ječma, vremenu žetve, uvjetima mljevenja i miješanja te kvaliteti ostalih žitarica koje su dodane (Huige, 2006). Prikaz kemijske analize sastava pivskog tropa nalazi se u tablici 8.

**Tablica 8.** Kemijski sastav pivskog tropa (Mussatto i Roberto i sur., 2006; Kanauchi i sur., 2001; Carvalheiro i sur., 2004; Silva i sur., 2004).

<b>masa suhe tvari (%) komponentata</b>	<b>Mussatto i Roberto i sur., 2006</b>	<b>Kanauchi i sur., 2001</b>	<b>Carvalheiro i sur., 2004</b>	<b>Silva i sur., 2004</b>
celuloza	16.8	25.4	21.9	25.3
hemiceluloza	28.4	21.8	29.6	41.9
ksilan	19.9	nn	20.6	nn
arabinoksilan	8.5	nn	9.0	nn
lignin	27.8	11.9	21.7	16.9
Acetilne skupine	1.3	nn	1.1	nn
proteini	15.3	24.0	24.6	nn
pepeo	4.6	2.4	1.2	4.6
ekstrakti	5.8	nn	nn	9.5
<b>Masa suhe tvari (mg/kg) minerala</b>				
kalcij	3515.0	nn	nn	nn
natrij	309.3	nn	nn	nn
kalij	258.1	nn	nn	nn
magnezij	1958.0	nn	nn	nn
aluminij	36.0	nn	nn	nn
željezo	193.4	nn	nn	nn
barij	13.6	nn	nn	nn
stroncij	12.7	nn	nn	nn
mangan	51.4	nn	nn	nn
bakar	18.0	nn	nn	nn
cink	178.0	nn	nn	nn
fosfor	5186.0	nn	nn	nn
sumpor	1980.0	nn	nn	nn
krom	5.9	nn	nn	nn
silicij	10740.0	nn	nn	nn

nn= nije navedeno

Pivski trop može se koristiti kao supstrat za kultivaciju mikroorganizama i za proizvodnju enzima. Neke vrste funga poput rodova: *Pleurotus*, *Agrocybe*, *Lentinus*, *Aspergillus*, *Trichoderma* i bakterije rodova *Bacillus* i *Streptomyces* su neki od mikroorganizama uspješno kultivirani na pivskom tropu (Wang i sur., 2001; Sponzar i sur., 2003; Bartolomé i sur. 2003; Bogar i sur., 2002; Sim i Oh, 1990). Uzgojem mikroorganizama u pivskom tropu potvrđena je i proizvodnja enzima. Na primjer, ksilanaza proizvedena pomoću *Aspergillus awamori* (Bhumibhamon, 1978) i *Streptomyces avermitilis* (Bartolomé i sur., 2003),  $\alpha$ -amilaza proizvedena pomoću *Bacillus subtilis* (Duvnjak i sur., 1983), *Bacillus licheniformis* (Okita i sur., 1985) i *Aspergillus oryzae* (Bogar i sur., 2002; Francis i sur., 2003) i celulaza proizvedena pomoću *Trichoderma reesei* (Sim i Oh, 1990).

S obzirom na niske troškove, pivski trop je privlačna sirovina za industrijske procese. Zbog sastava bogatog šećerima hidrolizati pivskog tropa koriste se u procesima fermentacije za proizvodnju spojeva od industrijske važnosti. Neki od primjera korištenja šećera dobivenih hidrolizom za hranjive podloge su proizvodnja: etanola pomoću *Saccharomyces cerevisiae*, ksilitola pomoću *Candida guilliermondii* (Mussatto i sur., 2008), ksilitola, etanola i glicerola pomoću *Debaryomyces hansenii* (Carvalho i sur., 2005; Duarte i sur., 2004) i mliječne kiseline pomoću *Lactobacillus delbrueckii* (Mussatto i sur., 2007b), *Lactobacillus pentosus* ili *Lactobacillus rhamnosus* (Cruz i sur., 2007).

### 3. ZAKLJUČAK

Na temelju činjenica navedenih u teorijskom dijelu doneseni su slijedeći zaključci:

1. Svaki biotehnološki proces zahtijeva odgovarajuću hranjivu podlogu čiji sastav je potrebno prethodno optimirati u skladu s potrebama radnog mikroorganizma, dostupnom sirovinskom osnovom i željenim proizvodom. Postoje različiti tipovi biotehnoloških proizvoda pa su i sirovine za biotehnološku proizvodnju raznolike.
2. Priprava hranjivih podloga prethodi bioprocesu, što u nekim slučajevima uključuje posebnu mehaničku pripremu prirodnih sirovina i njihovu enzimsku razgradnju.
3. Prilikom proizvodnje finih kemikalija, koje na tržištu postižu veću cijenu, mogu se koristiti i skuplje sirovine. Proizvodnja baznih kemikalija zahtijeva jeftinije sirovine.
4. Umjetne hranjive podloge sastoje se od različitih sirovina biljnog i životinjskog podrijetla. Kao sirovine se ponekad mogu koristiti primarni poljoprivredni proizvodi, a češće se koriste njihove prerade ili nusproizvodi dobiveni industrijskom preradom tih sirovina.
5. U biotehnološkoj proizvodnji se najčešće koriste složene hranjive podloge, čiji kemijski sastav nije sasvim definiran. Kod sastavljanja hranjivih podloga različite složene sirovine se međusobno kombiniraju te im se dodaju odgovarajuće anorganske soli i po potrebi faktori rasta (aminokiseline, vitamini, hormoni).
6. Lignocelulozni materijali su biljna biomasa koja uključuje ostatke iz drvne i prehrambene industrije, različite poljoprivredne ostatke te komunalni otpad. U današnje vrijeme nastoji se unaprijediti biotehnološke procese koji se temelje na ovim obnovljivim sirovinama no treba uzeti u obzir da one zahtijevaju odgovarajući predtretman (fizikalni, fizikalno-kemijski, kemijski ili biološki).

#### 4. LITERATURA

- Acharya S., Chaudhary A. (2012) Bioprospecting thermophiles for cellulase production: A review. *Brazilian journal of microbiology*. 43, 844-856.
- Bartolomé B., Gómez-Cordovés C., Sancho A.I. i sur. (2003) Growth and release of hydroxycinnamic acids from brewer's spent grain by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339. *Enzyme and Microbial Technology* **32**:140–14
- Baumann H., Bühler M., Fochem H., Hirsinger F., Zoebelin H., Falbe J. (1988). Natural fats and oils—renewable raw materials for the Chemical Industry. *Angewandte Chemie International Edition in English* **27**(1): 41–62
- Bhat S.V., Khan S.S., Amin T. (2013) Isolation and characterization of pigment producing bacteria from various foods for their possible use as biocolours. *International Journal of Recent Scientific Research* **4**:1605–1609
- Bhumibhamon O. (1978) Production of acid protease and carbohydrate degrading enzyme by *Aspergillus awamori*. *Thailand Journal of Agricultural Science* **11**:209
- Bogar B., Szakacs G., Tengerdy R.P. i sur. (2002) Production of  $\alpha$ -amylase with *Aspergillus oryzae* on spent brewing grain by solid substrate fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **102–103**: 453–461
- Calvo-Flores F. G., Dobado J. A. (2010) Lignin as renewable raw material. *ChemSusChem* **3**(11): 1227–1235.
- Carvalho F., Duarte L.C., Lopes S. i sur. (2005) Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Process Biochemistry* **40**:1215–1223
- Chatterjee S., Saito T. (2015) Lignin-derived advanced carbon materials. *ChemSusChem*, **8**(23): 3941-3958
- Cruz J.M., Moldes A.B., Bustos G. i sur. (2007) Integral utilisation of barley husk for the production of food additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**:1000–1008
- Dahod K.S., Greasham R., Kennedy M. (2010) Raw materials selection and medium development for industrial fermentation processes. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 3.izd., str. 659-668

- Duarte L.C., Carvalheiro F., Lopes S. i sur. (2004) Comparison of two posthydrolysis processes of brewery's spent grain autohydrolysis liquor to produce a pentose-containing culture medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **113–116**:1041–1058
- Duvnjak Z., Budimir A., Suskovic J. (1983) Effect of spent grains from beer production on production of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus subtilis*. *Food Technology Review* **21**:97–1
- Erdman L. W. (1929) The Percentage of Nitrogen in Different Parts of Soybean Plants at Different Stages of Growth. *Agronomy Journal* **21**(3): 361.
- Francis F., Sabu A., Nampoothiri K.M. i sur. (2003) Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal* **15**:107–115
- Grondal R. L., Berger H. W. (1945) *Chemical and Metallurgical Engineering* **52**: 101
- Harmsen P. F. H., Huijgen W., Bermudez L., Bakker R. (2010). Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. Report number: ECN- E-10-013. Wageningen UR-Food & Biobased Research, 27-28.
- Hilderbrandt F. M. (2006). Recent Progress in Industrial Fermentation. U: *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 7.izd., Inc.str. 557–615
- Huige N.J. (2006) Brewery by-products and effluents. U: Priest F.G., Stewart G.G., 2.izd. Handbook of Brewing, CRCPress, Boca Raton
- Kamm, B. and Kamm, M. (2004) Principles of biorefineries. *Applied Microbiology Biotechnology* **64**: 137–145
- Kanauchi O., Mitsuyama K., Araki Y. (2001). Development of a functional germinated barley foodstuff from brewers' spent grain for the treatment of ulcerative colitis. *Journal of American Society of Brewing Chemists* **59**:59–62
- Karimi K. (2015) Lignocellulose-Based Bioproducts. 1st ed. Switzerland: Springer International Publishing, 1-37, 85-155.
- Kulkarni Vishakha S., Butte Kishor D., Rathod Sudha S. (2012). Natural polymers – A comprehensive review. *International journal of research in pharmaceutical and biomedical sciences*, **3**(4): 1597-1613.



- Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M., Stroeve P. (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **48** (8), 3713-3729
- Kunze W. (1996) *Technology Brewing and Malting*. VLB, Berlin
- Mariani E. (1953). Chromatographic examination of the amino acids of beer and spent grains. *Brass Malt Belg* **3**:50–53
- Marić V. (2000) *Biotehnologija i sirovine, Stručna i poslovna knjiga*, Zagreb. str. 216.
- Minoda, Y. (1986) Raw materials for amino acid fermentation-culture medium C-source development. *Programme for Industrial Microbiology* **24**:51–66.
- Mitchell D.A., Berovic M., Krieger N.(2002) Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Review* **8**:183–225
- Mussatto S.I., Roberto I.C. (2006) Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of chemical Technology and Biotechnology* **81**:268-274
- Mussatto S.I., Dragone G., Rocha G.J.M. i sur. (2006b) Optimum operating conditions for brewer's spent grain soda pulping. *Carbohydrate Polymers* **64**:22–28
- Mussatto S.I., Fernandes M., Dragone G. i sur. (2007b) Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnology Letters* **29**:1973–1976
- Mussatto S.I., Rocha G.J.M., Roberto I.C. (2008) Hydrogen peroxide bleaching of cellulose pulps obtained from brewer's spent grain. *Cellulose* **15**:641–649
- Mussatto S.I. (2009) Biotechnological potential of brewing industry by-products. U: *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation*. Nigam P.S., Pandey A., Springer. str. 314.-319.
- Okita H., Yamashita H., Yabuuchi S. (1985) Production of microbial enzymes using brewers' spent grain. *Hakko Kogaku Kaishi – Journal of Fermentation Technology* **63**:55–60
- Owen M. J. (2001). Defoamers. U: *Encyclopedia of Chemical Technology*, Kirk-Othmer, str. 236-254.
- Pine S. H., Hendrickson J. B., Cram D. J., Hammond G. S. (1984) *Organska kemija*, 2. prom. izd., Školska knjiga. str. 767.

Pravilnik o šećerima i metodama analiza šećera namijenjenih za konzumaciju (2009) Narodne novine **39** (NN 39/2009)

Robinson, T., Singh, D., and Nigam, P. (2001) Solid state fermentation: A promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology Biotechnology* **55**: 284–289

Róper H. (1996) Starch: present use and future utilization. U: Carbohydrates as organic raw materials III. Van Bekkum H., Róper H., Voragen F., VCH Publishers Inc., str. 32-33.

Sarath, G., Mitchel, R.B., Satler, S.E., Funnell, D., Pedersen, J.F., Graybosch, R.A., and Vogel, K.P. (2008) Opportunities and roadblocks in utilizing oranges and small grains for liquid fuels. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **35**: 343–354

Silva J.P., Sousa S., Rodrigues J. i sur. (2004) Adsorption of acid orange 7 dye in aqueous solutions by spent brewery grains. *Separation and Purification Technology* **40**:309–315

Silverman R., Brauer J. (2008) Minerals. U: The Complete Guide to Nutrition in Primary Care, Deen D., Hark L., str. 249–274

Sim T.S., Oh J.C.S. (1990) Spent brewery grains as substrate for the production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM9414. *Journal of Industrial Microbiology* **5**:153–158

Šelo G., Planinić M., Tišma M., Tomas S., Koceva Komlenić D., Bucić-Kojić A. (2021) A comprehensive review on valorization of agro-food industrial residues by solid-state fermentation. *Foods* 2021, **10**:927.

Vandamme, E.J., Cerdobbel, A., and Soetaert, W. (2005) Biocatalysis on the rise: Part 1 Principles. *Chemistry Today* **23(6)**: 47–51

Vandamme, E.J., Cerdobbel, A., and Soetaer, W. (2006) Biocatalysis on the rise: Part 2 Applications. *Chemistry Today* **24(1)**: 57–61

Vandamme, E.J. (2007) Microbial gems: Microorganisms without frontiers. *SIM-News* **57(3)**: 81–91

Vandamme, E.J. (2009) Agro-Industrial Residue Utilization for Industrial Biotechnology Products. U: Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation. Nigam P.S., Pandey A., Springer. str. 3-10

Vasudevan, P.T. and Briggs, M. (2008) Biodiesel production: Current state of art and challenges. *Journal of Industrial Biotechnology* **35**: 421–430

Venil C.K., Yusof N.Z.B., Aruldass C.A., Ahmad W.A. (2017) Microbial pigment production utilizing agro-industrial waste and its applications. *Biopigmentation and Biotechnological Implementations*, str. 215-239

Wang D., Sakoda A., Suzuki M. (2001) Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology* **78**:293–300

Wilke D. (1996) Raw materials for fermentation. U: Carbohydrates as Organic Raw Materials III. Van Bekkum H., Róper H., Voragen F., VCH Publishers Inc., str. 122.

Anonymus 1 (2021) kukuruz, pšenica i ječam <<https://www.hippopx.com/hr/corn-wheat-barley-413528>> pristupljeno 8. rujna 2021.

Anonymus 2 (2020) soja <<https://www.krenizdravo.hr/prehrana/soja-i-njen-utjecaj-na-zdravlje>> pristupljeno 9. rujna 2021.

## Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mogeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

*Stević*

ime i prezime studenta