**Zbrani povzetki seminarskih nalog »Uporaba mikroorganizmo v biotehnologiji«**

PROIZVODNJA PIVA

Prvo kot prvo bom najprej povedal nekaj na splošno o samem pivu in varjenju piva, nato bom pa še podrobno predstavil kvasovke.

Pivo se je pojavilo že tam okoli 4 tisočletja pr. n. št. in sicer v okolici takratne Mezopotamije. Prvi načini varjenja piva so bili resda precej drugačni, kakor jih poznamo danes, a velja, da nekateri še zmeraj prakticirajo malo drugačno verzijo varjenja, kot je bila včasih. Res pa je, da se tehnologija hitro razvija in z njo se se spreminja tudi način proizvodnje piva. Obstaja vedno več načinov, kako narediti ta hmeljev zvarek. Pivo spada pod alkoholne pijače, ki ga pridobivajo s fermentacijo s pomočjo gliv kvasovk. Pivo se večino deli na 3 vrste glede na vrenje: pivo z zgornjim vrenjem (po končani fermentaciji se kvasovke dvignejo na gladino), pivo s spodnjim vrenjem (kvasovke se po končani fermentaciji spustijo na dno) in kislo pivo (dodajanje raznih MO, ki so klasičnemu pivu škodljive). Poznamo zelo veliko različnih vrst piv, vse pa delimo na to, katero vrsto kvasovk uporabljajo. Poznamo Lager, Ale, Lambic, Weissbier, ...

Za katerekoli pivo najprej potrebujemo slad. Za pridobivanje sladu uporabljajo žitarice, kot so ječmen, pšenica, rž, ... Glavna naloga sladu je pridobitev sladkorja, ki se lahko meša z vodo ter bo služil kot hrano za glive kvasovke, da bodo lahko proizvedle alkohol. V žitaricah se nahaja škrob, ki ni topen v vodi, zato ga je treba razgraditi v manjše vodotopne sladkorje. To naredijo s pomočjo amilaz, ki se sproščajo med kaljenjem žitaric in razgradijo škrob (npr.: na maltozo). Temu procesu razgrajanja škroba imenujemo drozganje.Ko se škrob razgradi, je potrebno sladico (manjši sladkorji) ločiti od preostalega sladu. To naredijo z odceditvijo. To naredijo s tem, da za filter oziroma cedilo služi kar zrnje žitaric po tem, ko se je škrob iz njih razgradil, lahko pa tudi skozi posebne filtre.Sledi kuhanje sladice. Glavna naloga je sterilizacija sladkorjev in odstranitev stranskih produktov, ki lahko kvarijo okus, vonj in barvo samega piva. Med kuhanjem se dodaja tudi hmelj, ki da pivu značilen okus in vonj. Nekateri dodajajo namesto hmelja tudi druge začimbe in zelišča.Po tem, ko se pripravljena brozga ohladi, sledi dodajanje kvasovk. Te bodo uporabljale sladkor v brozgi in proizvajale alkohol. Poleg alkohola nastaja tudi ogljikov dioksid, zato morajo imeti zaprti bioreaktorji na pokrovu naprave za uravnavanje tlaka.Produkt fermentacije se imenuje mlado pivo, ki se ga ohladi do ledišča. To pospeši usedanje kvasovk na dno in povzroči koagulacijo beljakovin. V tem procesu se izločijo snovi z neprijetnim vonjem, kar izboljša okus piva. Potem nastali proizvod prefiltrirajo in opravijo še pasterizacijo, saj morajo uničiti ostale snovi (bakterije), ki so šle skozi filter. Ponekod pa uporabljajo proces mikrofiltracija, pri čemer pa filtrat ni potrebno pasterizirati. Tako pivo je nepasterizirano. Obstajajo pa tudi nefiltrirana piva, kar pomeni, da mladega piva ne prefiltrirajo, ampak opravijo samo pasterizacijo, da uničijo bakterije in ubijejo kvasovke. Tako je nefiltrirano pivo manj prozorno, saj vsebuje mrtve kvasove.

Tak proces se uporablja pri večini pivovarjev po svetu, ampak se od kraja do kraja rahlo spreminja. Spreminjanjo se viri sladu, vrste kvasovk, čas fermentacije, ... Poleg vsega pa sam postopek varjenja piva ostaja enak.

Kvasovke spadajo pod domeno evkarionti in v kraljestvo gliv. Trenutno je poznanih skoraj 2000 različnih vrst kvasovk, kar predstavlja kakšen odstotek vseh poznanih gliv. Razmnožujejo se z mitozo. Velike so od 3-4 µm, nekatere pa tudi večje. Za varjenje piva se največkrat uporabljajo kvasovke vrst:

* Saccharomyces cerevisiae
* Saccharomyces patorianus
* Brettanomyces
* Torulaspora delbrueckii

Pri varjenju piva kvasovke uporabljajo sladkorje in proizvajajo alkohol in CO2. Kot že samo ime pove, se kvasovke pridobiva iz kvasa. Poznamo različne vrste kvasa, kot so naravni kvas, pivski kvas, industrijski kvas, ... Vsak kvas različno pridobivajo glede na to, za katero stvar ga bodo uporabljali. SACCHAROMYCES CEREVISIAE Pri proizvodnji piva se te kvasovke uporablja za Ale piva. Celice same kot take so več ali manj gladke, okrogle (lahko tudi elipsaste), kolonije so tudi gladke, a njen rob ima izbokline. Ta vrsta kvasovk sicer bolje raste na trdih gojiščih, ampak pri proizvodnji piva nočemo namnožiti kvasovk na veliko število, ampak potrebujemo njihove metabolne produkte (alkohol, CO2). Njihova optimalna temperature se giblje med 30°C in 35°C, minimalna pa okoli 10°C +/- 5°C. SACCHAROMYCES PASTORIANUS Te kvasovke se pri proizvodnji piva uporabljajo za Lager piva. Te kvasovke imajo bolj zapleten genom, kar se pozna pri tem, da še ni dokončno raziskana. Pravijo, da je nekje med S. Cerevisiae in drugimi vrstami kvasovk. Ta vrsta kvasovk je nastala iz dveh čistih vrst kvasovk, ampak še ne vedo iz katerih. Imajo tudi različna imena, ampak glede na taksonomijo je S. Pastorianus še najboljše. BRETTANOMYCES Te kvasovke se pri proizvodnji piva uporabljajo za Lambic pivo. Ta vrsta kvasovk je od drugih drugačna zaradi oblike (je bolj jajčasta in podolgovata) in zaradi tega, ker pod aerobnimi pogoji proizvaja ocetno kislino. Sprva so jo v Britanskih pivovarnah označili, kot kvarljivo za njihov Ale. Potem pa so jo prevzeli Danci in Nemci ter iz nje začeli proizvajati svoje pivo. Zaradi svojih značilnosti, se te kvasovke pogosto obravnava kot nezaželene, ponekod, kjer pa so ljubitelji tradicionalnih piv, so pa cenjene. TORULASPORA DELBRUECKII Te kvasovke se pri proizvodnji piva uporabljajo za pšenična piva. Tudi za te se še ne ve točno v kater rod spadajo. Prej je imela ime Saccharomyces Delbrueckii, zdaj pa Torulaspora Delbrueckii (tudi zaradi teksonomskih značilnosti). Poleg proizvodnje piva, se te kvasovke uporablja tudi pri pekovski industriji, živilskih fermentacijah (silaža, kumare, teqila, jabolčnik, mlečni izdelki…). Klinično gledano se te kvasovke obačasno šteje kot oportunistični patogen (se ne šteje kot človeški patogen). Glede tega, kako te kvasovke živijo, pa še niso raziskali.

Pekovska industrija

»Pekovski izdelek je izdelek, ki je po ustreznem tehnološkem postopku izdelan iz žit, mlevskih izdelkov iz žit in žitom podobnih surovin oziroma poljščin, vode oziroma druge ustrezne tekočine, z ali brez pekovskega kvasa ali drugega sredstva za vzhajanje. Lahko se uporabljajo tudi druge sestavine, ki ustrezajo predpisani minimalni kakovosti, ter dovoljeni aditivi.« - citat iz pravilnika o kakovosti pekovskih izdelkov, 3. člen, 1. odstavek

Pekovske izdelke glede na velikost in način priprave delimo v tri (3) skupine:

-kruh

-pekovsko pecivo (do 250g)

-drugi pekovski izdelki (prepečenec, grisini, preste, mlinci, drobtine)

Za vse tri skupine pa je osnovni postopek izdelave enak. Najprej pripravimo vse surovine, ki jih potrebujemo za peko, osnovne so: moka, voda, kvas in sol. Nato oblikujemo testo v želeno obliko in pustimo da vzhaja, med tem poteka alkoholno vrenje. Potem kruh spečemo, po pečenju pa sledi ohlajanje. Če je do pečenja prišlo do kakršne koli okužbe, s toplotno obdelavo uničimo mikroorganizme, zato se izdelki najpogosteje okužijo prav po peki, med transportom, skladiščenjem in prodajo.

Mikroorganizmi, ki pri peki sodelujejo so kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae.* To so evkarionti, enocelične glive, ki zelo hitro rastejo in se razmnožujejo. Velike so med 5 in 10μm in se lahko povezujejo v psevdomicelije. Obstaja več kot 600 različnih vrst, najdemo pa jih v veliko različnih oblikah. Njihov vir ogljika so različni sladkorji, pirovati in glicerol. V njih potekata dva procesa anaerobni proces je alkoholno vrenje in aerobni je celično dihanje. Alkoholno vrenje je biogen proces, ki se je razvil, ko v atmosferi ni bilo kisika, zato da so organizmi lahko pridobili ATP. Da se je proces lahko razvil pa so morali nastati encimi kot so kinaze in dekarboksilaze.

Formula alkoholnega vrenja je:

**C6H12O6** (Monosaharid - glukoza) **→ C2H5OH** (etanol) **+ CO2** (ogljikov dioksid)

Kvarljivci osnovne sestavine, moke, od začetka do konca proizvodnje.

**Žita** se med rastjo lahko okužijo iz zraka in s tal, med skladiščenjem in predelavo pa tudi iz naprav in opreme s katero so v stiku. Med rastjo se lahko okužijo z rjami, sneti, plesnimi in rženimi rožiči (Claviceps purpurea), ki so strupeni. Med skladiščenjem pa se lahko okužijo z bakterijami (Lactobacillaceae, Bacillaceae, Micrococcaceae) in s plesnimi, ki izločajo toksine (Aspergillus, Penicillium, Fusarium). Število mikroorganizmov na žitih se lahko zmanjša s pranjem le teh, ščetkanjem, luščenjem, z ustreznimi pogoji v skladiščih in v obdobju rasti.

**Moka** je najprej odvisna od žit nato pa se lahko okuži tudi med skladiščenjem s plesnimi (Aspergillus, Penicillium), mlečnokislinskimi bakterijami (kisla fermentacija), kvasovkami (alkoholno vrenje) in ocetno kislinskimi bakterijami (ocetno kislinsko vrenje).

**Kruh** se lahko okuži po peki (med transportom, skladiščenjem in prodajo).

Okužbe kruha so:

Rdeč – krvav kruh

Povzročajo ga lahko bakterije rodu Serratia (rdeč pigment) ali plesni rodu Oidum (rdeče

sredice črnega kruha) in se zelo redko pojavlja.

Kredast kruh

Vzrok so lahko Trichosporon variable ali Endomycopsis fibuliger, ki povzročajo bele kredaste pege na površini.

Plesnivost kruha

Povzročajo ga plesni na primer: Rhizopus nigicans (bel bombažni micelij in črne pike), Penicillium expanzum (čopičasta plesen z modro zelenim micelijem), Aspergillus niger (glavičasta plesen zeleno rjavo črno ali rumeno obarvan micelij), Mucor (siva plesen) in

Cladosporium (temno zelena plesen po navadi z zidov pekarn). Razvijejo se zaradi vlage in neustrezne temperature. Pogosto se okužba zgodi v skladišču, ob transportu …

Okužbe s kvasovkami

Kvasovke Hyphopichia burtonii, povzročajo neprijeten vonj in

okus kruha. Hitro rastejo na površini kruha in spominjajo na plesni.

Nitkavost kruha

Kruh ima sladkast, neprijeten vonj, sredica je mehka, rumeno rjava z madeži in lepljiva povzročitelji so bakterije rodu Bacillus. Vzrok za nitkavost kruha so lahko okužena moka, pribor, noži, počasno ohlajanje, premalo kisel pH, topla in vlažno okolje. Najbolj izpostavljen tej obliki kvarjeja je domač – bel kruh.

Proizvodnja sira

Izdelava sira je stara več tisočletij (sumerski in egipčanski reliefi, zapisi v Bibliji, v Homerjevi Odiseji itd.). Skozi dolgi zgodovinski razvoj je sir dobil velik pomen, saj je v nasprotju z mlekom dlje časa obstoječ. Sire ločimo med seboj glede na vrsto mleka (kozje, ovčje, kravje ali mešano), glede na način, ki smo ga uporabili za usirjenje (s siriščem, kislino, kombinirano), glede na odstotek maščobe v suhi masi (prekomasten do pust) ter glede na odstotek vode v siru (zelo trdi do sirnega namaza).

Osnovni postopek izdelave sira: izbira in priprava mleka, usirjenje mleka, obdelava koaguluma, obdelava sirnega zrna, stiskanje, soljenje, zorenje.
Glavne sestavine mleka so voda, beljakovine, maščobe in mlečni sladkor ter vrsta vitaminov in mineralov.
Osnova za sir je mleko in če hočemo pridelati sir, ki bo ustrezal našim kriterijem, moramo imeti tudi tako mleko, ki bo imelo dobre fizikalno-kemijske lastnosti (delež beljakovin, kalcija, maščobe, laktoze), ustrezno mikrobiološko sliko (naseljenost mleka z mikroorganizmi), primerno kislinsko stopnjo (optimalna pH vrednost surovega mleka je 6,6 do 6,8) in ne sme vsebovati zaviralnih snovi, kot so antibiotiki, kemična sredstva za varstvo rastlin, ostanki čistil, razkužil…
Mleko pri izbiri ocenimo z okušanjem, po videzu in po vonju ter mu določimo kislost. Ko ima mleko ustrezno kislost in je segreto na 32 do 33°C, ga usirimo. Ko je sirjenje končano dobimo koagulum in sirotko. Koagulum nadaljno obdelamo s počasnim mešanjem do velikosti sirnega zrna. Sirotka mora med tem postopkom ostati zelenkastorumena in precej bistra. Nadaljna obdelava sirnega zrna je odvisna od vrste sira, ki ga želimo pridobiti.
Mikroorganizmi imajo v mleku za pridelavo sira več nalog (proizvodnja kisline, razgradnja beljakovin, razgradnja maščob, tvorba plinov in oblikovanje arom ter zaviranje rasti tehnološko škodljivih mikroorganizmov).
Pri izbiri biokulture moramo paziti na to, kateri končen produkt želimo oziroma v kakšni obliki. Vrste mikroorganizmov, ki jih potrebujemo se namreč razlikujejo glede na tip sira. Pri nekaterih tipih sira pa so lahko tudi enake ali pa podobne, ker izhajajo iz istega rodu. Pri izdelavi trdega sira in sicer ementalskega sira ali grojerja ali pa tudi parmezana, je eden izmed mikroorganizmov, ki jih lahko uporabimo *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus.* Je Gram pozitivna bakterija in je fakultativni anaerob. Prav tako je tudi katalaza negativna. Njena optimalna rastna temperatura je med 35 do 42°C. uporabimo lahko tudi *Lactobaccilus delbrückii ssp. lactis* ali pa *Lactobacillus delbrückii ssp. bulgaricus. Lactobacillus delbrückii* so Gram pozitivne bakterije, fakultativno anaerobne ter so paličaste oblike. Razpon velikosti celic je 0,5-0,8 x 2,0-9,0 mikrometrov. *L.delbrückii* so tolerantni na kisline ter imajo strogo fermentacijsko presnovo pri kateri je mlečna kislina glavni metabolični produkt. Pri proizvodnji poltrdih sirov pa po večini sodelujejo bakterije iz rodu *Lactococcus;* in sicer *Lactococcus lactis ssp. lactis, Lactococcus lactis ssp. cremoris, Lactococcus lactis ssp. diacetylactis* in pa bakterija *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris.* Laktokoki so homofermentativni organizmi. *Lactococcus lactis* so Gram pozitivne bakterije, ki so v obliki kokov, ki rastejo v parih ali manjših skupinah. Tipično dolžino imajo 0,5-1,5 mikrometrov.
Pri proizvodnji sira so mlečnokislinske bakterije, ki sodelujejo pri mlečnokislinskem vrenju zelo pomembne. To vrenje poteka v anaerobnih pogojih. Mlečnokislinske bakterije cepijo laktozo, ki jo dobijo v mleku, na glukozo in galaktozo. Nato poteče proces glikolize, pri katerem nastane vmesni produkt piruvat. Iz piruvata nastane mlečna kislina, ki je glavni produkt.
Nastajajoča mlečna kislina onemogoča razvoj nezaželenim mikroorganizmov.
Zaradi povečevanja količine mlečne kisline, se pH spreminja in beljakovine koagulirajo ter zato dobimo koagulum.
Kot stranski produkt dobimo pri proizvodnji sira tudi zelo veliko sirotke. Sirotka je zelo priporočljiv del v naši prehrani. V sirotki se nahajajo beljakovine laktoalbumini, ki so podobni albuminom v krvi ter laktoglobulini, ki so enaki kot globulini v krvnem serumu. Imenujejo jih tudi popolni proteini, ker tudi če so edine beljakovine v naši prehrani, omogočajo normalno rast in razvoj. Ti proteini tudi vsebujejo več različnih aminokislin kot rastlinske beljakovine ter večjo količino aminokislin kot beljakovine jajc in mesa. Potemtakem pri proizvodnji sira ni odpadkov. Vendar nastaneta dva produkta, ki sta zelo koristna in priporočljiv obrok v našem jedilniku.

DOMAČA PRIDELAVA;
Približno 5 litrov domačega kozjega mleka precedimo skozi gosto cedilo in nato še skozi gazo v velik lonec. Lonec nato postavimo na štedilnik in pogrejemo mleko na približno 60°C. Pomagamo si z digitalnim termometrom. Ko mleko segrejemo na 60°C, ga nato postavimo v korito, v katero natočimo mrzlo vodo. Mleko moramo v koritu ohladiti na 32°C, zato je bolje, da v korito natočimo vodo z nižjo temperaturo od 32°C. Potem ko mleko ohladimo, vanj primešamo jogurt v katerem smo predhodno primešali 17 kapljic sirila. Nato mleko pustimo počivati dobre pol ure, da se ustvari koagulum; medtem časom moramo stalno vzdrževati temperaturo mleka na 32°C. Nato koagulum razrežemo in rahlo mešamo približno 15min, da se ustvarijo sirna zrna. Opazili bomo, da se izloča sirotka, ki mora vseskozi ostajati bistra in rumenkastozelena. Vse skupaj precedimo, da dobimo samo sirna zrna, ki jih nato skupaj z gazo postavimo v posodo, katere oblika bo določala obliko sira. Nato pustimo sirna zrna, ki se bodo počasi tvorila v trdno celoto v posodi vsaj čez noč ali pa kar cel dan. Trdna celota se bo naredila, če bomo sirna zrna v posodi obtežili. Po tem, ko smo pustili koagulum počivati se naredi sir, ki ga nato vzamemo iz posode in ga damo za 2-3 dni v solnico. Solnico naredimo po okusu-približno 10% soli in 90% vode. Sir lahko pustimo v solnici tudi dlje časa.

Proizvodnja jogurta

Jogurt je eden izmed najstarejših fermentiranih izdelkov in je v svetu zelo razširjen. Od kod izvira ne moramo natančno določiti. Njegova »domovina« pa so kraji oz. območja z visokimi dnevnimi temperaturami, zaradi katerih so se lahko razvile termofilne bakterije.

Postopek pridelave čvrstega jogurta: Za samo proizvodnjo potrebujemo: mleko, mleko v prahu, kupljen jogurt ali pa liofilizirano mikrobiološko kulturo.

Začnemo s toplotno obdelavo mleka oz. pasterizacijo, na temperaturi od 90-95°C približno tri minute. Mleko ne sme vsebovati prevelikega števila mikroorganizmov, če želimo da fermentacija poteka normalno. Med segrevanjem ves čas mešamo, ampak pazimo, da ne mešamo prehitro. Naslednji korak je povišanje deleža suhe snovi mleka**.** To naredimo, če želimo jogurt s čvrstim koagulumom. Torej, mleku s temperaturo nad 70°C dodamo 2-3% mleka v prahu in nadaljujemo s segrevanjem. Nato mleko ohladimo na temperaturo cepljenja in sicer 42-45°C. Sledi dodajanje in vmešavanje mikrobiološke kulture. Če gre za pridelavo manjših količin jogurta je najbolje, da uporabimo kupljen čvrsti sveži jogurt. Če pa govorimo o pridelavi večjih količin, pa je seveda bolje uporabiti liofilizirane pripravke mlečnokislinskih bakterij. Po dodajanju mikrobiološke kulture moramo mleko mešati še 1-3 minute, da se mikroorganizmi enakomerno razporedijo. Temu sledi polnjenje v lončke ali steklene kozarce, ki jih pokrijemo z aluminijasto folijo ali zapremo s pokrovčki. Naslednja stopnja je zorenje ali inkubacija cepljenega mleka. Napolnjene kozarce/lončke postavimo v »prostor« s stalno temperaturo 42-45°C, zložimo jih skupaj in pokrijemo z nečim, kar bo zadrževalo toploto. Trajanje zorenja je odvisno od aktivnosti mlečnokislinskih bakterij, načeloma tej fazi namenimo 2-3 ure. Zelo pomembno pa je tudi samo ohlajanje in shranjevanje. Sama čvrstost jogurta je posledica koagulacije mlečne beljakovine kazein, ki koagulira zaradi znižanega Ph. Torej, po zorenju moramo jogurt čim hitreje ohladiti na temperaturo med 2-6°C, da s tem zaustavimo delovanje mlečnokislinskih bakterij. Med ohlajanjem in skladiščenjem se dokončno oblikujejo senzorične lastnosti jogurta. Če smo ves postopek izvedli pravilno in higiensko neoporečno, bi moral imeti jogurt rok trajanja 2 tedna.

Poznamo tudi tekoči jogurt, ki ga izdelamo enako kot čvrstega, le da ga zorimo pred točenjem v embalažo. Pred polnjenjem pa ga še premešamo.

Jogurt je živilo, ki nastaja s fermentacijo mleka. Le to povzročijo mlečnokislinske bakterije, ki opravljajo mlečnokislinsko vrenje. Za izdelavo jogurta sta najbolj značilni dve vrsti mlečnokislinskih bakterij: *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* in *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus.* Mikroorganizmi, ki so del delovne kulture za proizvodnjo jogurta imajo v svojem genomu tudi *Lac* operon, saj jim osnoven vir ogljika predstavlja laktoza.

Rod *Streptococcus* je v močni povezavi s človeškim organizmom in veliko bakterij iz tega rodu je patogenih, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* ni*.* So manj odporni na kisline kot laktobacili. Mnogi fermentacije ne preživijo in to zaradi mlečne kisline, ki jo med postopkom sami ustvarijo.

*Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* v mleku opravi začetno kisanje. Je Grampozitivna bakterija (ima celično steno iz debele plasti peptidoglikana) in ne tvori spor. Kar se tiče potrebe po kisiku je fakultativno anaerobna, torej se lahko razmnožuje in živi brez kisika. Streptokoki so homofermentativni, torej lahko proizvajajo le en produkt, in termofilni – njihova optimalna temperatura je od 42-45°C. So okrogle oblike in povezujejo se v »verižice«. Zaradi svojih lastnosti je to ena izmed najbolj komercialno pomembnih mlečnokislinskih bakterij. Poleg jogurta je pomembna starter kultura tudi za druge mlečne izdelke. *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* ima pomembno vlogo kot probiotik, saj blaži simptome intolerance na laktozo in drugih gastrointestinalnih motenj.

Rod *Lactobacillus* najdemo v mleku, mlečnih izdelkih, mesu in mesnih izdelkih, sestavljajo pa tudi mikrofloro človeškega telesa. V splošnem velja, da so predstavniki tega rodu nepatogeni. Pomembno vlogo igrajo tudi pri proizvodnji vina, piva in viskija.

Naloga *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* je, da dokonča kisanje in s proizvajanjem acetaldehida jogurtu da njegovo značilno aromo. Je prav tako Grampozitivna bakterija in ne tvori spor. Ravno tako je fakultativno anaerobna. Laktobacili so fakultativno heterofermentativni in psihrofilni, nekateri viri pravijo, da uspevajo pri višjih temperaturah. Potrebujejo nizek pH (5.4 - 4.6). So paličaste oblike in se prav tako kot *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*  povezujejo v verige.

Mlečnokislinska fermentacija:

Že omenjena mikroorganizma v procesu mlečnokislinskega vrenja in mleka naredita mlečno kislino. Začetna snov za ta proces je disaharid laktoza oz. mlečni sladkor. Laktoza s pomočjo encimov razpade na glukozo in galaktozo. V procesu fermentacije glukoza razpade na 2 molekuli piruvata, ki nato reducirata do mlečne kisline/laktata.

glukoza + 2ADP + 2Pa → 2 mlečna kislina (laktat) + 2ATP

Proizvodnja kefirja

Kefir je tradicionalno fermentirano živilo, ki izvira s Kavkaza. Je najstarejši probiotični mlečni izdelek. To je mlečno živilo, ki poskrbi za boljšo odpornost in okrepitev imunskega sistema. Nastane iz mleka s pomočjo žive kefirjeve kulture oziroma kefirjevih zrn. Uporabimo surovo, neobdelano mleko, ki je lahko katerekoli vrste. Lahko je kravje, ovčje, kozje ali kobilje. Kefirjevo zrno, ali pogovorno kefirjeva gobica, po obliki spominja na cvetačo. Je belo-rumene barve, veliko pa je lahko od 2 mm do 2 cm. Je simbioza kvasovk in dobrih bakterij. Kefirjevo zrno sestavljajo 3 deli: periferni (zunanji) sloj, kjer prevladujejo predvsem paličaste bakterije, medcona, kjer je več kvasovk in središčna cona, kjer je več kvasovk, ki so vgrajene v želatinasto matrico.

Površina zrna je prekrita s kompaktnim slojem paličastih bakterij in ovalnih kvasovk, ki fermentirajo laktozo. V kefirju najdemo več ko 30 vrst kvasovk. Najpogostejše izolirane kvasovke iz kefirjevih zrn so *Candida kefir*, *Kluveromyces marxianus*, *Candida colliculosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus* in neidenficirana kvasovka U, ki vedno dominira. Med fermentacijo se število laktoza fermentativnih kvasovk K. marxianus in C. kefir (ki sta prisotni na zunanjem delu zrna) poviša in po količini doseže kvasovko U. Laktobacili so paličaste bakterije. V kefirju jih je več kot 12 različnih vrst. Najpogostejša sta *Lactobacillus brevis* in *Lactobacillus kefir*. Pomembnejših streptokokov in laktokokov je 7. V kefirju pa najdemo tudi dve vrsti bakterij ocetno kislinskega vrenja (*Acetobacter acetil* in *A. rasens*). Optimalna temperatura delovanja kvasovk in bakterij, ki jih najdemo v kefirjevem zrnu je 20°C do 24°C.

*Lactobacillus brevis* je vrsta mlečnokislinskih bakterij. Spada pod laktobacile, kar pomeni, da je paličasta bakterija. So gram pozitivne bakterije. To pomeni da imajo 90 % celične stene iz peptidoglikana in da se pri barvanju po Gramu pobarvajo modro-vijolično. So katalaza negativne bakterije, kar pomeni da nimajo katalaz, encimov, ki iz celice odstranjujejo vodikov peroksid. Velike so 0,5-1,2 mikrometra krat 1,0-10,0 mikrometra. Optimalna temperatura je 28-30 °C. Delujejo v anaerobnih pogojih (prostor brez kisika). Pri proizvodnji kefirja sodelujejo pri mlečnokislinskem vrenju in za substrat uporabljajo laktozo. Uporablja pa se jih tudi pri proizvodnji vina in piva. So probiotične bakterije, kar pomeni da ugodno vpliva na zdravje človeka ali živali.

Kefir proizvajamo s pomočjo mlečno-kislinske in alkoholne fermentacije. Mlečnokislinske bakterije sodelujejo v mlečnokislinskem vrenju, kvasovke pa v alkoholnem. Proces obeh vrenj teče podobno: Mlečnokislinske bakterije cepijo laktozo, ki jo dobijo v mleku, v glukozo in galaktozo. Poteče glikoliza in nastane vmesni produkt piruvat. Nato pa se proces razdvoji.

* Mlečnokislinsko vrenje poteka v anaerobnih pogojih (pogojih brez kisika) pod vplivom mlečnokislinskih bakterij. Glavni produkt je mlečna kislina (laktat), ki nastane iz piruvata. Nastala mlečna kislina daje izdelku svež kisel okus.

glukoza + 2ADP + 2Pa → 2 mlečna kislina (laktat) + 2ATP

* Alkoholno vrenje poteka v aerobnih pogojih (pogoji ob prisotnosti kisika) pod vplivom kvasovk. Glavna produkta sta etanol in CO2. CO2 ustvarja majhne mehurčke plina, ki so vzrok za nastanek penastega napitka.

glukoza + 2ADP + 2Pa → 2 etanol + 2CO2 + 2ATP

* Piruvat lahko sodeluje tudi v drugih reakcijah. Katera pot bo tekla je odvisno od vrste prisotnih mikroorganizmov. Tako lahko dobimo majhno količino vmesnih produktov, kot so: diacetil, aceton, ocetna, maslena in mravljična kislina in druge, ki prav tako v manjši meri vplivajo na aromo proizvoda.

V zgodovini so kefir proizvajali tako, da so kefirjeva zrna zavezali v vogal usnjene vreče iz ovčje kože, v katero so nalili mleko in pustili nekaj dni na soncu ali ob ognju.

Tradicionalni kefir se proizvaja tako, da v mleko dodamo kefirjeva zrna. Pri postopku izdelave, ki se uporablja v večjih proizvodnjah pa se uporabi liofilizirana oblika cepiva. To so že pripravljena cepiva, ki vsebujejo le najpogostejše mikroorganizme, vendar ne vseh ki jih vsebuje kefirjevo zrno. Prednosti pri tem so enostavna uporaba, konstantna kakovost končnega izdelka, manjša verjetnost kontaminacije in zmanjšanje stroškov za pripravo izdelka. Raziskave pa so pokazale, da s takim načinom proizvodnje kefir zgubi na svoji kakovosti. Cepljenje poteka v mleko s temperaturo 23 °C. Fermentacije je razdeljena v tri faze. Prva je faza acidifikacije, kjer se mikroorganizmi v 12 urah namnožijo in razvijajo, pH pa pade na 4,5. V tej fazi poteka mlečnokislinsko vrenje in nastane mlečna kislina. Naslednja faza je vmesno ohlajanje, kjer maso ohlajamo na 14-16 °C in mešamo, da dosežemo enakomerno ohlajanje. Tretja faza je faza dozorevanja. Ta traja 12 ur, pH pa pade na 4,4. V tej fazi kvasovke omogočajo alkoholno vrenje, tako da nastaja etanol in CO2. Nato izdelek ohladimo na 5-8 °C, da prekinemo nastajanje kisline. Med ohlajanjem moramo ravnati z izdelkom previdno, saj lahko stresanje ali druge mehanske obdelave povzročijo izločanje sirotke, ki je lahko ena od tehničnih napak. Če kefir proizvajamo s pomočjo kefirjevih zrn, na koncu s filtracijo odstranimo le ta. Zrna lahko ponovno uporabimo in ne predstavljajo problema v smislu odpadkov. Edini problem je voda, ki se uporablja za pranje kefirjevih zrn. Vendar se ne pojavlja v večjih količinah, saj pranje poteka le občasno. Zato lahko rečemo, da je kefir okolju prijazen izdelek.

Kvarljivci v mlečni industriji

Mlečni izdelki vsebujejo veliko hranljivih snovi. Zato imajo zelo primerne pogoje za življenje bakterij, plesni in kvasovk. Delovanje mikroorganizmov v mlečnih izdelkih delimo na tri skupine. Prva skupina so koristni mikroorganizmi, ki jih uporabljamo kot starter kulture. Druga skupina so patogeni mikroorganizmi, ki ogrožajo naše zdravje. Potem pa je še skupina v kateri so uvrščeni škodljivi mikroorganizmi, ki povzročajo kvarjenje izdelkov. Najbolj pogosto škodljive bakterije so enterobakterije, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*, stafilokoki, sulfit reducirajoči klostridiji, *Escherichia coli* in *Bacillus cereus.* Listerija (*Listeria monocytogenes*) je bakterija, ki je zelo razširjena v naravnem okolju. Najdemo jo v zemlji, vodi, odplakah in številnih živilih. Listerija je Gram pozitivna bakterija paličaste oblike. Raste in razmnožuje se lahko prav tako v anaerobnih kot v aerobnih pogojih. Razmnožuje se pri temperaturah od 4 do 44°C. Njeno razmnoževanje ne ustavi niti temperatura 0°C ampak ga le upočasni. Odporna je tudi na visoke temperature tako, da spada med najodpornejše nesporogene bakterije. Povzroča okužbo imenovano listeriozo tako pri živalih kot tudi pri ljudeh. Za listeriozo pri človeku je značilno, da se običajno ne pojavlja v epidemični obliki, ampak posamično. Najpogostejši vir okužbe so živila. Listerioza je eden od vodilnih vzrokov smrti v primerjavi z drugimi okužbami in zastrupitvami z živili. Določena živila kot so surovo mleko in mlečni izdelki iz nepasteriziranega mleka predstavljajo večje tveganje za okužbo z listerijo. *Bacilus cereus* je Gram pozitivna, sporogena in gibljiva patogena bakterija. Je paličaste oblike (bacil) in je fakulativno anaerobna in aerobna. Spore so razširjene v okolju. Prisotne pa tudi v ekstremnih pogojih. Bakterijo najdemo v surovi in kuhani hrani. *Bacilus cereus* tvori dva različna enterotoksina. Eden je emetični (bruhanje), drugi pa diarealni (driska). Ukrepi za preprečevanje z okužbo so, da živila shranjujemo pri primernih temperaturah in jih toplotno obdelamo. Najbolj pogosto škodljive plesni pa so rodu *Aspergillus, Geotrichum*, *Penicillium*, *Monilia* in *Mucor.* Rod *Geotrichum* Tvori proteolitične in lipolitične encime, ki razgrajujejo mlečne beljakovine in maščobo. Zaradi tega so mlečni izdelki manj kakovostni in obstojni. *Aspergillus* je gliva katere spore so prisotne v zraku in nam ne povzročajo težav. Težave nastanejo so se živila okužijo s to plesnijo. Ker nekatere plesni rodu *Aspergillus* in *Penicillium* proizvajajo sekundarne metabolite, ki so nam škodljivi. To so aflatoksini, ki so strupene kemijske snovi. Aflatoksini so strupi naravnega izvora, ki so tudi močno rakotvorni.

Mikroorganizmi lahko pridejo v mleko oziroma v mlečne izdelke iz obolelih živali, pri neustrezni higieni oseb in opreme katero uporabljajo. Prav tako pa lahko pridejo iz zraka, vode, pri pridobivanju in predelavi. Izdelki pa se lahko okužijo tudi po predelavi, če jih hranijo v neustreznih temperaturah.

Število mikroorganizmov zmanjšujejo z toplotno obdelavo kot je na primer pasterizacija. Pasterizacija je postopek toplotne obdelave mleka, da uničimo zdravju škodljive mikroorganizme. Poskrbeti morajo, da imajo čim bolj sterilno okolje, da ne bi izdelkov po predelavi kontaminirali.

Proizvodnja suhih mesnin

V zgodovini se je že zgodaj pojavila potreba po sušenju mesa, saj so mu s tem podaljšali obstojnost – hranilno vrednost in okus. Načini, s katerimi so to dosegli, se razlikujejo že med regijami, kaj šele med ljudstvi oz. celinami. Načini so tudi klimatsko pogojeni – to pomeni, da se prilagajajo klimi oz. podnebju regije v katerem so ustvarjali suhomesnate izdelke. Že 900 let pred Kristusom so v Grčiji poznali konzerviranje mesa s sušenjem in konzerviranjem v soli.

Na Slovenskem ima proizvodnja suhomesnatih izdelkov že dolgo tradicijo in je povezana z časom kolin. Koline so potekale v zimskem času, ko se meso lahko konzervira z naravnim hlajenjem ali pa se ga v teh razmerah predela v obstojnejše proizvode. Tradicionalno s konzerviranjem (soljenje ali/in razsoljevanje), dimljenje in sušenje/zorenje mesa.

Proizvodnja suhomesnatih izdelkov se začne s pripravo surovine – mesa. Osredotočil se bom na pripravo svinjine.

Priprava mesa se začne se s transportom živali do klavnice, ki je lahko kamionski ali železniški. Transport more biti prilagojen živalim (ravna, ne gladka tla, zasenčenost, ventilacija, način vožnje, število živali v vozilu..) Žival potem omamijo mehansko, kemično ali električno. Po omamljanju sledi izkrvavitev. Kri odteka v zbirne posode potem pa naprej v predelavo ali pa v uničenje. Sledi garanje – postopek razščetinjenja prašiča. Tu se pojavi že prva nevarnost. Voda, s katero oparijo trupe, lahko vdre skozi vbodno rano v globino trupa in mikrobiološko kontaminira meso. Sledi eksenteracija (odstranitev notranjih organov), razpolavljanje in tehtanje trupov. Potem sledi hlajenje – s tem preprečimo kvarjenje, ki ga povzročajo encimi in mikroorganizmi.

Potem je postopek priprave mesa odvisen od končnega produkta. Meso za salame, klobase in polnjene želodce se zmelje. Surovina za pršut je celo prašičje stegno.

Suhomesnati izdelki so izdelki, narejeni iz celih kosov mesa ali pa razdetega mesa v ovojih. To meso je potrebno soliti ali razsoliti, hladno dimiti ali sploh ne dimiti, sušiti in zoriti do stopnje ko je meso primeren za uživanje brez predhodne toplotne obdelave.

Klobase se proizvaja kot klasično sušene (klobase, salame, želodci) in hitro fermentirane (čajna klobasa) Klobase se izdelujejo iz razdetega (zmletega, sesekljanega) mesa, dodatnih sestavin, aditivov in začimb. Nadev se polni v naravne ali umetne ovitke nato pa se klobase suši oziroma zori v sušilnicah oz. zorilnicah. Klobase so lahko hladno dimljene ali pa nedimljene, prekrite s plemenito plesnijo. Klobasa ima praviloma premer do 3,5 cm, salamina od 3,5 cm do 5 cm in salama nad 5 cm. Aktivnost vode (aw) ne sme presegati 0,93.

Razmerje med mesom in slanino mora biti 4:1, pH med 5,4 in 5,8. Za klobase je boljše hrbtno meso starejših prašičev – Tu slanina vsebuje najmanj nenasičenih maščob, ki bi med sušenjem oksidirale in povzročile žarkost.

V zmleto meso dodamo 3% kuhinjske soli, ki povezuje nadev in zmanjša vodno aktivnost (na proste ione veže vodo). Če ne solimo dovolj, tvegamo mikrobiološko kvarjenje že med zorenjem. Mikroorganizmi imajo tudi različno tolerantnost za NaCl – mlečnokislinske bakterije tolerirajo sol samo do določenega obsega. V industriji dodajajo tudi nitrite, ki vplivajo na razvoj značilne rdeče barve izdelkov, razvoj arome in na rast gram-pozitivnih bakterij. Antibakterijski vpliv nitratov se poveča pri nižji pH (dodajanje stabilizatorjev zorenja znižuje pH v prvih dneh zorenja) in manjši vodni aktivnosti (aw)

Najpogostejši začimbi sta črni poper in česen. Začimbe izboljšajo okus, nekatere pa delujejo tudi kot bakteriostatiki. Na drugi strani so lahko začimbe močno kontaminirane z mikroorganizmi in so vir okužbe živila. To rešujejo tako, da začimbe sterilizirajo s paro vendar to lahko uniči

Fermentacijo spontano sprožijo encimi v mesu, mikroflora ali pa starter kulture, ki jih dodamo mesu (različne bakterije, plesni, kvasovke glej 🗶) Starter kulture po navadi dodajajo nadevu za salame, da pospešijo fermentacijo.

Maso z vsemi dodatki in začimbami polnijo v dobro prečiščeno svinjsko črevo. Masa mora biti dobro povezana, če ne se razvijejo plesni.

Z dimljenjem sušimo površino ovitka in zmanjšamo delež vode v klobasah. Dimimo s hladnim dimom s temperaturo od 16°C - 24°C. Če je temperatura previsoka ovitek odstopa od mase in se razvijejo plesni. Dim bukovih drv ne sme biti pregost saj to kvari aromo in okus. Vse pogosteje se dimi s tekočim dimom, ki vsebuje manj zdravju škodljivih sestavin. Sestavine dima ščitijo klobaso pred mikroorganizmi. Klobas ponekod zaradi naravnih pogojev ne dimijo (na Primorskem), kar pripomore k bolj mesnatemu okusu.

Encimi v mesu ob povišani temperaturi aktivirajo zorenje. Med tem poteka notranja difuzija vode, ki iz notranjosti odteka iz ovitka čez pore. Če je vlaga v zorilnici prenizka se pore zasušijo, voda pa ostane v notranjosti in meso se začne kvarit. Klobase so suhe po 4-5 tednih po izdelavi. Optimalna temperatura je od 16°C - 18°C, vlažnost pa okoli 90% proti koncu sušenja 80%. Če se meso ne suši pravilno se nam lahko zaradi delovanja nekaterih bakterij, ki se razmnožujejo v vlažnem nadevu, skisa.

Med zorenjem, ki je zapleten biotehnološki proces poteka FERMENTACIJA. Ta poteka zaradi že prej omenjenih encimov celic mišičnine in delovanja mikroorganizmov. To je mikroaerofilni proces (poteka ob površini izdelka) in anaerobni proces (poteka v globini izdelka).

Sušene mesnine so proizvedene iz soljenih ali razsoljenih večjih delov mesa. Meso je lahko hladno dimljeno ali nedimljeno. Sušimo in zorimo ga do stopnje, ko ga lahko uživamo brez predhodne toplotne obdelave. Izdelki lahko vsebujejo kosti in kožo živali. Sem spada pršut, sušena šunka, sušeno pleče, sušena vratina, budžola, zašinek, panceta in sušena slanina.

Mikroflora suhomesnatih izdelkov je kontaminirano meso, slanina, dodatki in ovitki. Predstavniki bakterij so mikrokoki, laktobacili in gram negativne enterobakterije ter pseudomone. Slednje so prisotne zgolj v začetku procesa in so zaradi dodatkov (sol, nitrit, delovanje laktobacilov) hitro inhibirane.

Najpomembnejši so mlečnokislinske bakterije. Meso je polno vitamina B zato se te v začetku hitro razmnožujejo, ter s tvorbo organskih kislin (glikoliza) nižajo pH. S tem vplivajo tudi na aromo in strukturo izdelka. Mikrokoki stabilizirajo barvo saj delujejo pri redukciji nitrita v nitrat. Mikrokoki zavirajo žarkost izdelka in proizvajajo encime, ki vplivajo na razvoj vonja in okusa. Plesni se pojavijo že ob začetku zorenja. Najpogosteje se pojavljajo plesni iz rodov Mucor, Oospora, Alternaria. Žlahtna bela plesen poleg izboljšave okusa vpliva tudi na dinamiko sušenja in da izdelku značilen izgled. Paziti moramo, da se ne razvijejo druge plesni (zelena, črna, oranžna…), saj te proizvajajo neželene toksine.

Dejavniki, ki vplivajo na rast mikroorganizmov v suhomesnatih izdelkih:

* Število mikroorganizmov 🡪 Na število vpliva sekundarna kontaminacija, trajanje procesa, higiena opreme, osebja, prostorov…
* Vodna aktivnost 🡪 Minimalna vrednost (aw) za rast večine bakterij je 0,90. Na (aw) pa vpliva pH

🗶Poznamo tri načine uvajanja biokultur v bioproces.

1. Način – Ne dodajamo nobenih mikroorganizmov ali starter kultur. Lastnosti izdelka so odvisne samo od mikroflore, ki je že prisotna v mesu ali pa je vanj prišla čez zrak ali prek opreme. Ta način je zelo variabilen in nam da unikatne izdelke.
2. Način – v novo šaržo prenesejo del že fermentiranega izdelka. V izdelku je mikroflora, ki nam ugaja in jo bomo uporabili še v naslednji šarži.
3. Način – Uporaba čistih inokulumov starter kulture. Uničimo mikrofloro v mesu in jo nadomestimo z starter kulturo. Ta način je najbolj varen. Ponovljivost izdelka je velika. V nadev za hitro fermentirane klobase dodajamo kulture mlečnokislinskih bakterij iz rodov Lactobacillus in Pediococcus. S pretvorbo sladkorjev v mlečno kislino močno pospešijo zorenje klobas. Hitro fermentirane klobase zorijo polovico manj časa kot trajne klobase. Pri izbiranju starter kultur je potrebno poznati njihove fermentativne sposobnosti, halotolerantnost in sposobnosti redukcije nitrata.

Kvarljivci v mesni industriji

Meso je dober medij za rast mikroorganizmov. Na njem in raste ogromno število različnih mikroorganizmov. Meso je izpostavljeno številnim možnim okužbam, ki največkrat pridejo iz okolja s katerim je meso v stiku. Poslabšanje kakovosti mesa in kvar pogojujejo različni dejavniki, predvsem mikrobiološki inkemični ali biokemični, lahko pa tudi biološki in fizikalni. Poslabšanje kakovosti lahko opišemo kot napako v izgledu, vonju ali okusu živil. Kvarjenje mesa in mesnih izdelkov se pokaže kot gnitje, kisanje, sluzavost, plesnivost, obarvanje površin in sprememba barve.Gnitje je posledica razgradnje beljakovin zaradi delovanja mikroorganizmov, ki razgrajujejo beljakovine v mesu in mesnih izdelkih. To so bakterije rodu Pseudomonas, Clostridium, Bacillus, Proteus, Escherichia … ter plesni in kvasovke. Glavni znaki gnitja so sprememba barve, konsistence in vonja. V suhomesnatih izdelkih se zaradi razsoljevanja gnitje redkeje pojavlja. Pri nepropustno zaprtih izdelkih (embaliranih) je kvar viden po deformaciji ovitkov oziroma embalaži. Kislost je posledica vrenja ali fermentacije v mesu ali mesnih izdelkih. Ta oblika kvara se pojavlja v anaerobnih in mikroaerofilnih razmerah. Najpogostejša je v barjenih klobasah, poltrajnih konzervah, vakuumsko pakiranih izdelkih in pakiranem svežem mesu. Površinska sluzavost nastaja na ohlajenem mesu z vlažno površino. Na površini izdelka se pojavi sluzavo lepljivi sloj sivozelenkaste ali svetlorjave barve. Sluzavost se pojavlja na površini barjenih klobas, na klobasah za pečenje, v nadevu za klobase in na mletem mesu. Plesnivost se pogosto pojavi na ovitkih klobas in na površinah trajnih in poltrajnih suhomesnatih izdelkov. Barva je odvisna od vrste plesni. Najpogosteje se pojavljajo plesni iz rodov Mucor, Oospora, Alternaria. Pri nekaterih izdelkih je plesen zaželena (trajne klobase, ki zorijo s plemenito plesnijo na ovitku), večinoma pa je pojav plesni na površini mesnih izdelkov neželen. Zaradi rasti plesni se spremenijo organoleptične lastnosti izdelkov, lahko pa plesni izločajo tudi strupe (aflatoksine – Aspergillus flavus). Rok uporabnosti mesa lahko podaljšamo z različnimi postopki, kot so, hlajenje, sušenje, dodajanje kemikalij…

Psevdomonasi so aerobne, nesporogene, ravne ali lahno ukrivljene, po Gramu negativne paličaste bakterije, ki se gibljejo z enim ali več polarnimi bički. Imajo respiracijski tip presnove s kisikom kot končnim akceptorjem elektronov. So kemoorganotrofni. Nekatere vrste so fakultativno kemolitotrofne, sposobne izkoriščati vodik ali ogljikov monoksid kot edini vir energije.

Enterobakterije so paličaste, po Gramu negativne bakterije, ki so prisotne skoraj povsod – v vodi, zemlji, so del normalne mikrobne flore pri ljudeh in živalih. Veliko vrst enterobakterij se nahaja v črevesju. Od tu jim tudi ime. Vir okužbe je ponavadi človeško in živalsko črevo. Patogene enterobakterije so: salmonele (Salmonella), šigele (Shigella) in jersinije (Yersinia). Oportunistično patogene so: E. Coli, Proteus. »Oportunistično patogen« pomeni, da povzročajo bolezen le v določenih okoliščinah. Ponavadi pri zmanjšani odpornosti, poškodbah. Zdravimo jih z različnimi antibiotiki, odvisno od vrste in seva bakterij.

Proizvodnja sojine omake

Sojina omaka je tekoči proizvod, ki služi kot dodatek k jedem ali kot začimba predvsem v Aziji. Glavna surovina je soja, vendar se pogosto uporabljajo tudi oves, rž in druga žita.Klasična proizvodnja sojine omake traja več mesecev ali celo nekaj let (do treh let). Z novimi postopki pa skušajo proces pospešiti.Proces izdelave sojine omake je dvostopenjski. V prvi stopnji pripravijo tako imenovan koji, ki je polizdelek, ki nastane v aerobnem delu postopka. Za pripravo koji- a je potrebno zmešati približno enaka dela kuhanih sojinih zrn in zmletih praženih pšeničnih zrn. Sledi inokulacija s čisto startersko kulturo *Aspergillus oryzae* ali *Aspergillus soyae*. V industriji se za proizvodnjo sojine omake uporablja pladenjski bioreaktor. Plesen v dveh do treh dneh preraste toplotno obdelana semena soje in nato s pomočjo ekstracelularnih encimov razgradi škrob (encimska hidroliza škroba).V drugi stopnji poteka mlečnokislinska (mlečnokislinske bakterije) in alkoholna (kvasovke) fermentacija v mikroaerofilnih razmerah. Približno 20 % škroba iz pšenice porabijo plesni, preostanek pa mlečnokislinske bakterije, ki ga razgradijo do pentoz in heksoz. Del teh sladkorjev se sčasoma v procesu fermentacije spremeni do mlečne kisline, ocetne kisline in drugih organskih kislin. Posledica tega je sprememba pH. Mlečnokislinski fermentaciji sledi burna alkoholna fermentacija, ki je posledica delovanja inokulirane kulture kvasovk. Po končani fermentaciji filtrirajo in pasterizirajo. Po stiskanju s filtrno stiskalnico in filtraciji dobimo surovo sojino omako, sojino olje in sojino pogačo ( za prehrano živali).

*Aspergillus oryzae* so glavičaste plesni (kraljestvo gliv), ki spadajo v rod *Aspergillus*. Za ta rod je značilno, da plesni tvorijo micelij, ki ga sestavljajo med seboj prepletene dolge niti ali hife. Iz micelija izraščajo konidiofori (hifa, na kateri nastajajo konidiji ali konidiospore) iz katerih zrastejo konidialne glavice, ki so najprej rumeno-zelene, nato pa rjave barve. Konidialno glavico tvorijo sterigme in konidiospore, ki so okrogle z gladko ali rahlo hrapavo površino in v verižicah do 50. Na agarju površine kolonij izgledajo žamenasto. V rodu *Aspergillus* je poznanih okoli 120 vrst. Identificiramo jih na podlagi oblike in barve hif in konidialnih glavic. Če vrsto *Aspergillus oryzae* opazujemo po sedmih dneh kultivacije na agarju, vidimo da pri 25° zrastejo kolonije s premerom od 4 do 5 cm, konidiofori pa so dolgi 4 do 5 mm. Spore imajo najprej elipsasto obliko, ki s starostjo prehaja v okroglo obliko s premerom od 4,5 do 8 mikrometrov. Plesni nasploh so nezahtevni organizmi, saj za rast potrebujejo le vlago in vir hranilnih snovi. *Aspergillus oryzae* zelo dobro uspeva na monsunskih področjih Azije, kjer je klima vlažna in topla. Avtohtona prisotnost spor v zraku omogoča pripravo orientalske fermentirane hrane iz žit in stročnic. V primerjavi z drugimi plesnimi je *Aspergillus oryzae* bolj uporabljena, saj proizvaja veliko ekstracelularnih encimov, ima nezahtevne pogoje rasti in visoko kakovost proteinov. Je aerobni organizem. *Aspergillus oryzae* raste pri minimalnem pH 1,6 do maksimalnega 9,3. Razmnožuje se nespolno (spolno zelo redko ob posebnih pogojih) z mitosporami oziroma konidiji (konidiospore). *Aspergillus oryzae* uvrščamo v skupino plesni *Aspergillus flavus*, ki pa je glede na produkcijo aflatoksina rizičen mikroorganizem. Rezultati raziskav so pokazali, da *Aspergillus oryzae* ne producira aflatoksinov. Ugotovili so da okoli polovico sevov producira koji kislino, ki je toksično delovala na poskusne zajce. Ker pa so kulture plesni, ki jih dobimo iz zbirk testirane na produkcijo koji kisline, za proizvodnjo biomase izberemo seve, ki koji kisline ne sintetizirajo. Plesen *Aspergillus oryzae* namnožena na riževih zrnih, otrobih in v submerzni kultivaciji vsebuje encime: kisla proteinaza, alfa amilaza, kisla karboksipeptidaza, levcinaminopeptidaza in karboksimetilcelulaza. Encim amilaza daje fermentirani hrani sladkast okus. Aktivnost encimov je odvisna od uporabljenega substrata. Najbolj so dejavni med 30 in 40°C. Iz *Aspergillus oryzae* so dobili tudi seve za industrijsko proizvodnjo amilaz, proteaz in laktaz. To plesen se uporablja v pripravi koji-ja, ki je prva stopnja v industrijski proizvodnji nekaterih azijskih jedi. Pri nas sta kot končna izdelka najbolj znana sojina omaka in miso.

Proizvodnja aminokislin

Aminokisline so osnovni gradniki beljakovin. Poleg te osnovne naloge so aminokisline nujno potrebe še ostalih telesnih funkcijah. Sodelujejo pri izgradnji in popravilu celic, raznašajo kisik po telesu, stabilizirajo krvni sladkor, vzdržujejo in popravljajo mišice, kožo, možgane in srce. Kljub temu, da poznamo le 20 različnih aminokislin obstaja ogromno beljakovin v katere se vežejo te aminokisline. Vežejo se v različno dolge verige z različnim številom določenih aminokislin. Vse aminokisline imajo enako zgradbo, vsebujejo amino skupino NH2 in pa karboksilno skupino COOH. Delimo jih na ne esencialne in esencialne. Ne esencialne aminokisline so tiste aminokisline, ki jih telo lahko proizvaja samo, esencialne pa so tiste, ki jih telo ne more proizvesti samo, zato jih vnašamo s hrano.

Prav zaradi ne zmožnosti proizvajanja ali premajhnega proizvajanja aminokislin v telesu je danes proizvodnja aminokislin še bolj v porastu. Letno naj bi proizvedli do več milijonov ton aminokislin vsako leto pa se proizvodnja dvigne še za od 3-5%. Aminokisline se največ uporablja v hrani za živino. Dodane so v krmila, da žival hitreje raste. Ogromno se uporabljajo kot aditivi v predelani hrani, da hrani izboljšajo okus. V porastu je uporaba v športu kot prehranski dodatek za boljšo rast mišic in hitrejšo regeneracijo. Uporabljajo se v medicini kot sestavina za infuzije in tudi zdravila. V kemiji jih uporabljajo za proizvodnjo detergentov. Pomembne so tudi v kozmetiki, saj so pomembne za naše lase in kožo. Aminokisline proizvajajo na tri načine. Z ekstrakcijo, kemijsko sintezo in pa z mikrobno sintezo, ki se deli še na encimatsko sintezo in fermentacijo. Tri najbolj proizvedene aminokisline so lizin, ki je pomemben za rast mišic in se uporablja predvsem kot dodatek krmi za živino je pa tudi pomemben pri dodatkih za nas same, saj se uporablja kot dodatek prehrani predvsem v športu. Nato je metionin, ki se uporablja predvsem za krmo za živino. Aminokislina z največjo proizvodnjo pa je L-glutaminska kislina ali imenovana tudi glutamat.

Leta 2007 je proizvodnja L-glutaminske kisline znašala 2 milijona ton v letu in proizvodnja vsako leto naraste za 3%. L-glutaminsko kislino so prvi izolirali Japonci že leta 1907 po zaslugi profesorja na Tokijski univerzi Kikunaea Ikede. Zadal si je nalogo, da odkrije sestavino v začimbah za japonske juhe, ki je dajala tak edinstven okus. Njegova hipoteza je bila, da je v začimbi eden ali več sestavin, ki niso sladkega, grenkega, kislega ali slanega okusa. Zato je ta peti okus poimenoval umami. Leta 1908 je odkril, da je ta sestavina L-glutaminska kislina. Patentiral jo je in dobil tudi dovoljenje za proizvodnjo nove začimbe. Leta 1909 je začel sodelovati s kemikom Saburousuke Suzukijem. Začimbo sta poimenovala Aji-No-Moto in jo tudi registrirala kot znamko. Sprva sta L-glutaminsko kislino pridobivala z ekstrakcijo pšeničnega glutena, saj je slednji vseboval največ glutamina. Glutamin so najprej hidrolizirali nato pa so ga dali v velike keramične posode kjer so dodali še solno kislino in vse skupaj segrevali 20 ur. Nato so vse skupaj filtrirali in za 24 ur dali nazaj v keramičen lonec da sta L-glutaminska kislina in solna kislina kristalizirala. Do obdobja petdesetih let prejšnjega stoletja postopka niso spreminjali do odkritja dveh novih metod. Kemijske sinteze in fermentacije. Mi se bomo obrnili proti slednji. Pri fermentaciji je seveda pomemben mikroorganizem, ki na posebnem gojišču proizvaja L-glutaminsko kislino. Prvi izmed njih je bil *Micrococcus glutamicus,* ki je bil izoliran leta 1956 s strani znanstvenika Kinoshite. Kasneje so odkrili še druge mikroorganizme *Brevibacterium aminogenes, Bacillus megaterium-cereus, Brevibacterium flavum, Brevibacterium divaricatum, Brevibacterium divaricatum**,* Corynebacterium glutamicum. Prav slednjo najbolj uporabljajo še danes.

Corynebacterium glutamicum je majhna gram pozitivna bakterija, ki se ne premika. Spada v družino Corynebacterium. Je paličaste oblike z ošiljenimi robovi. Ne proizvaja spor in uporablja fermentacijski metabolizem, da razstavi ogljikove hidrate. Ima en krožen kromosom in plazmid. Pomembna je njena celična stena, saj poleg peptidoglikanske plasti vsebuje še lipide, ki niso značilni za celično steno. Odkrita je bila kot izdelovalec L-glutaminske kisline sedaj pa jo uporabljajo še za proizvodnjo aminokislin serin, lizin, levcin in treonin. Pleg tega lahko proizvaja še vitamin B5. Na splošno znanstveniki radi uporabljajo to bakterijo, saj ne tvori spor, ni patogena, ne potrebuje veliko sestavin za rast, raste hitro in ima stabilen genom.

L-glutaminsko kislino s pomočjo bakterije Corynebacterium glutamicum proizvajajo s fermentacijo. Proizvajajo jo tako, da bakterijo dajo v gojišče z veliko vsebnostjo sladkorja, to je po navadi kar melasa, dodajo mu še amonijak za vir dušika, določene minerale in pravo količino vitamina B, ki ga bakterija potrebuje za svoje delovanje. Postopek pustijo teči aerobno 2-3 dni in iz tega nato dobijo do okoli 100 gramov L-glutaminske kisline na liter medija. Kot vir dušika lahko sladkor zamenjajo z ocetno kislino ali pa z etanolom. Za rast bakterije je pomemben vitamin B, za še boljšo aktivnost pa gojišču dodajajo še penicilin ali maščobne kisline.

Proizvodnja ocetne kisline

Ocetna kislina drugače imenovana tudi etanojska kislina (CH3COOH) je pomembna karboksilna kislina, večini poznana tudi kot glavna sestavina kisa. Čisto 100% ocetno kislino lahko imenujemo tudi ledocetna kislina, namreč le ta začne zmrzovati v led že pri kar 16,6°C. Mikroorganizmi, ki omogočajo sam bioproces pridobivanja etanojske kisline, so tako imenovane ocetnokislinske bakterije, katere so po Gram-u negativne, obligatno aerobne bakterije z zmožnostjo oksidacije alkoholov in sladkorjev. Slednje delimo v dva pomembnejša rodova: *Acetobacter* in *Gluconobacter.*

 Začetki uporabe ocetne kisline segajo daleč v preteklost zgodovine človeka, namreč le ta v medicini slovi, kot najverjetneje eden izmed prvih znanih antibiotikov. Najstarejša znana metoda oz. različica bioprocesa pridobivanja etanojske kisline je tako imenovan *orleanski proces*. Slednjega so skozi čas izpopolnjevali, mu dodajali številne izboljšave ter ga razvijali na podlagi novih odkritij vse do danes. Ocetno kislino lahko pridobivamo na več načinov, in sicer s kemično sintezo iz naftnih komponent in kemikalij ali po biološki poti z aerobnim oz. anaerobnim procesom. Sam bioproces proizvodnje poteka v dveh stopnjah. Ocetna kislina je glavni produkt delovanja ocetnokislinskih bakterij, katere oksdirajo etanol, ki ga s svojim metabolizmom iz sladkorja proizvedejo kvasovke. Prva stopnja je torej produkcija etanola iz ogljikovih hidratov s pomočjo kvasovk, v drugi stopnji pa se etanol na katerega delujejo ocetnokislinske bakterije oksidira do ocetne kisline. Proizvodnjo etanojske kisline lahko prvotno razdelimo v dve veliki skupini in sicer na domačo in industrijsko proizvodnjo. V industrijski verziji je zaradi uporabe že prej pridobljenega nenaravnega etanola kot surovega materiala, prva stopnja procesa največkrat izpuščena, v tem primeru torej pretvorba ogljikovih hidratov ob prisotnosti kvasovk, ni potrebna. Industrijsko proizvodnjo lahko nato razdelimo še naprej na več različnih postopkov. In sicer pridobivanje ocetne kisline s pomočjo destilacije suhega lesa , pridobivanje ocetne kisline s katalitično oksidacijo etanola, pridobivanje kisa z uporabo površinske kulture, pridobivanje kisa z uporabo imobilizirane kulture, submerzni postopek pridobivanja kisa in še nekateri drugi specialni postopki. V svoji predstavitvi se bom predvsem osredotočila na submerzni način proizvodnje. Pri samem poteku izbranega postopka ima zelo veliko vlogo tudi pravilna izbira bioreaktorja in pravilna predpriprava izbrane biokulture, kar pa je odvisno predvsem od načina pridobivanja, ki smo ga izbrali.

Ocetna kislina je naravna kemična spojina, s katero smo ljudje tako rekoč vsakodnevno v stiku. Najdemo jo lahko v številnih živilih kot so: jabolka, sir, mleko, pomaranče, peteršilj, kis, borovnice, ipd. Čiste etanojske kisline v prehrambeni industriji skoraj da ne uporabljamo. Slednja je največ v uporabi kot aroma in za zakisovanje proizvodov kot so: konzervirano sadje in zelenjava, majoneze, kečap, razne omake in solatni prelivi. Čista ocetna kislina je bolj pomembna predvsem v drugih industrijah (kemijska, tekstilna, kozmetična,..). Zaradi množične uporabe je proizvodnja izbrane kisline po svetu močno razširjena. Vsako leto jo tako pridelajo več milijonov ton, vendar pa ima le ta tudi številne škodljive učinke, kateri ogrožajo predvsem naše zdravje, zdravje delavcev oz. proizvajalcev in tudi okolja.

Zeleno gnojenje

Stročnice igrajo v človeški prehrani pomembno vlogo. Mednje štejemo grah, fižol, lucerno, sojo in druge. Sploh soja je pomembne ne le v človeški prehrani, pač pa tudi kot beljakovinsko bogata živinska krma. Nobena od teh rastlin pa ne more dobro rasti brez bakterij iz rodu *Rhizobium*. Te bakterije se naravno nahajajo v tleh in imajo zmožnost pretvorbe atmosferskega dušika v amonijak. Večinoma se paličaste oblike, ki pa jo lahko spreminjajo. Lahko imajo enega ali šest bičkov. Idealni pH je od 6-7, idealna temperatura od 25-30 stopinj Celzija. Amonijak lahko sintetizirajo samo v mikroaerofilnih pogojih. Stročnice izločajo različne kemikalije, ki pospešujejo rast bakterij *Rhizobium*. Ko se te dovolj namnožijo, začnejo tudi same oddajati oligosaharide ali tako imenovane Nod faktorje. Te povzročijo, da se koreninski laski začnejo zvijati. To omogoča bakterijam, da vdrejo v lasek in se znotraj njega začnejo pospešeno razmnoževati. Proti celicam glavne korenine napredujejo po infekcijski cevki in stimulirajo rast in delitev nekaterih celic v glavni korenini. Nastanejo t.i. noduli, ki so vidni na zunanji strani korenin. Rhizobiji živijo znotraj rastlinskih celic kot bakterioidi, nepravilno oblikovane celice. S pomočjo ATP, ki ga dobijo od rastline in encimov nitrogenaz atmosferski dušik pretvarjajo v amonijak. Ker pa kisik inhibira nitrogenaze, so v celici prisotne molekule leghemoglobina, ki deluje kot nekakšen pufer za kisik, tj. veže proste molekule. Na 10000 vezanih kisikovih molekul tako pride le ena nevezana. Nod faktorji so odseki DNA, večinoma plazmidi. Kodirajo encime, ki sintetizirajo oligosaharide, ki delujejo kot signalne molekule. Poleg tega, da povzročijo krivljenje koreninskih laskov, so odgovorni tudi za pospešeno deljenje rastlinskih celic in tvorbo nodulov. Nod geni prek signalnih oligosaharidov omogočajo specifičnost podvrst bakterij iz rodu *Rhizobium* in *Bradyrhizobium*. V sodobnem kmetijstvu je mogoče kupiti semena, ki so že prekrita z omenjenimi bakterijami. To močno zmanjša čas inokulacije, saj je bakterij veliko, hkrati pa so blizu kalčku in ga lahko hitro inficirajo. Zato so hektarskih donosi ob setvi kritega semena mnogo večji kot v primeru navadnih semen. Na trgu so tudi substrati s bakterijami, ki jih zmešamo s semenom v sejalnici. Krito seme in substrat se priporoča predvsem pri setvi lucerne ali stročnic na slabša tla oz. na tla, kjer že dolgo niso rastle take rastline.

## Biorudarjenje ( *Acidithiobacillus Ferrooxidans*)

Te bakterije so paličaste oblike (bacil) in so velike od 0,5 – 1,0 ali 4,0 µm. So obligatorni acidofili, kar pomeni, da lahko preživijo le v kislem okolju (optimalen pH: 1,5 do 2,5) in tudi sami proizvajajo kislino (H2SO4) kot stranski produkt metabolizma. So Gram-negativne bakterije in kemolitoautotrofi, kar pomeni, da energijo, ki jim omogoči življenje, pridobivajo iz anorganskih snovi. *A. ferrooxidans* se preživlja z oksidacijo kovin v okolici, ogljik pridobi v obliki CO2, dušik pa tudi lahko veže iz zraka.

### Taksonomija

* **Domena**: Bakterije
* **Deblo**: *Proteobakterije* (Večina Gram-negativnih bakterij)
* **Razred**: *Acidithiobacillia*
* **Red**: *Acidithiobacillales* (Samostojen razred šele od leta 2013. Prej so jih uvrščali med *Gamaproteobakterije*)
* **Družina**: *Acidithiobacillaceae*
* **Rod**: *Acidithiobacillus*
* **Vrsta**: *Acidithiobacillus ferooxidans*, (bazonim (prejšnje poimenovanje): *Thiobacillus ferrooxidans*)

V naravi *A. ferrooxidans* pogosto najdemo skupaj z bakterijami rodu *Acidiphillium* in pravzaprav živita v simbiozi. *Acidiphillium* bakterije pridobivajo energijo iz organskih snovi, od katerih so določene strupene za *A. ferrooxidans* ali pa jih izloča kot nerabne snovi. Obe vrsti ne uspevata dobro na običajnih heterotrofnih hranilnih podlagah, kar je le še en razlog več, da se sta ta dva organizma v naravi pogosto nahajata skupaj, v velikokrat tako imenovano ko-kulturi (ang. *co-culture*). Kako natančno bakterije rodu *Acidiphillium* pripomore k uspešnejši rasti *A. ferrooxidans*, še ni znano.

Biorudarjenje je tehnika ekstrakcije kovin iz njihovih rud s pomočjo prokariontov ali gliv. Za ta proces se uporablja kemolitotrofne bakterije in arheje, ki so poimenovane glede na snov, katero primarno oksidirajo. *A. ferrooxidans* zato spada med železove bakterije, vendar oksidacija železa (Fe2+ 🡪 Fe3+) proizvede malo energije, zato lahko oksidira tudi žveplo (oz. tiosulfat) ali bakrove minerale. Pogosto energijo črpa iz minerala, ki se imenuje pirit (FeS2) ali železov kršec.

Dandanes se biorudarjenje največ uporablja za pridobivanje bakra, lahko pa pridobivamo tudi zlato, nikelj, cink in kobalt. Redko je uporabljena zgolj ena sama biokultura, temveč jih je več, če se le njihovi optimalni pogoji ujemajo. Pri bakrovem biorudarjenju so pomembne naslednje tri reakcije, kjer *A. ferrooxidans* netopen baker pretvori v topno kovino:

Cu2S + 1/2 O2 + 2 H+ → CuS + **Cu2+** + H2O

CuS + 2 O2 → **Cu2+** + SO42−

CuS + 8 Fe3+ + 4 H2O → **Cu2+** + 8 Fe2+ + SO42− + 8 H+

Baker v elementarnem (trdnem) stanju dobimo v reakciji z elementarnim železom, kjer se slednji oksidira, baker pa zreducira:

Fe0 + Cu2+ → **Cu0** + Fe2+

Bakterija *Acidithiobacillus ferooxidans* se lahko uporablja tudi kot bioremediant. Bioremediacija je proces, kjer mikroorganizmi (bakterije, glive ali protisti) razgrajujejo snovi, ki so sicer strupene oziroma jih imamo za onesnaževalce. Bioremediacija se zlasti uporablja pri naftnih razlitjih. Žal se bioremediacija ne more uporabljati povsod, saj so nekatere snovi, ki so strupene nam, strupene tudi ostalim mikroorganizmom.

Mikroorganizmi v čistilnih napravah

Čiščenje odpadne vode je pomemben element pri ohranjanju okolja. Odpadna voda je po uporabi ali kot posledica padavin preveč onesnažena, da bi jo bilo varno izpustiti neposredno v ekosistem, saj bi lahko zaradi visoke koncentracije različnih snovi povzročila spremembe in porušenje ekosistema. Pomembno je, da odpadno vodo pred izpustom v okolje očistimo. Med seboj se odpadne vode razlikujejo po izvoru (komunalne, padavinske in tehnične odpadne vode) ter vrsti in količini snovi, katere vsebujejo. Zaradi tega se med seboj razlikujejo tudi čistilne naprave. Te delujejo na osnovi mehanskih, biotskih in kemičnih procesov, ki so lahko kombinirani ali posamični, kar je odvisno od količine in vrste snovi v odpadni vodi.

Biološko čiščenje je najbolj učinkovit in ekonomičen način za obdelavo vod z veliko vsebnostjo biološko razgradljivih ali vsaj delno biološko razgradljivih snovi. Primer take odpadne vode so komunalne odpadne vode, zato je ta biološko čiščenje nepogrešljiv del komunalnih čistilnih naprav.

Najbolj razširjen postopek biološkega čiščenja je čiščenje z aktivnim blatom. Gre za biomaso, ki nastane med čiščenjem odpadne vode z rastjo mikroorganizmov v aerobnih in anaerobnih pogojih. Sam proces je zelo podoben naravnemu čiščenju voda, le da je v primeru čistilne mikroorganizmi bolj koncentrirani in posledično je proces hitrejši. Biomasa je sestavljena iz številnih vrst mikroorganizmov. Točna vrsta in količina mikroorganizmov je močno odvisna od odpadne vode in se med čistilnimi napravami tudi razlikuje. Proces čiščenja z aktivnim blatom poteka v velikih bazenih s stalnim mešanjem in aeratorji, ki skrbijo za vzdrževanje količine kisika in ohranjajo mikroorganizme v suspenziji.

Za mikroorganizme je v tem procesu je, da se združujejo v kosme ali flokule. Gre za krogličaste strukture, kjer se na površino pripenjajo aerobni mikroorganizmi, v notranjost pa fakultativno anaerobni organizmi, saj znotraj flokulov nastajajo tudi anaerobni pogoji. Tako lahko poteka aerobna in anaerobna razgradnja organskih snovi. Zametke kosmov najpogosteje zaradi svoje izkosmičene oblike tvori bakterija *Zoogloea ramigera.* Nekateri mikroorganizmi pa se ne povezujejo v kosme, ampak so razpršeni v tekočini med kosmi. Mikroorganizmi v sistemu se delijo na razgrajevalce in porabnike. Razgrajevalci razgrajujejo organske snovi za svoje energijske potrebe, porabniki pa so mikroorganizmi, ki se prehranjujejo z ostalimi mikroorganizmi v sistemu in skrbijo za vzdrževanje populacije. Glavni namen mikroorganizmov v procesu čiščenja je razgradnja organsko razgradljivih snovi. Mikroorganizmi z razgradnjo organskih snovi pridobijo energijo za celično rast (z razmnoževanjem narašča biomasa) in kot stranska produkta izločajo vodo in ogljikov dioksid. Razgradnja organskih snovi je najučinkovitejša pri aerobni razgradnji, saj poteka mnogo hitreje kot anaerobna. Poleg tega se pri anaerobni razgradnji pojavljajo v čistilni napravi tudi neželene snovi, kot so vodikov sulfid, amonijak, metan in nizko molekularne maščobne kisline. Vzporedno z razgradnjo organskih snovi pa v procesu z aktivnim blatu poteka tudi nitrifikacija. Gre za večstopenjsko pretvorbo organskega dušika v nitrat. Nitrat se lahko kasneje v anaerobnih pogojih (znotraj flokul) v večstopenjskem procesu pretvori v atmosferski dušik. Ta proces se imenuje denitrifikacija.

Po zaključenem procesu razgradnje v vodi še vedno ostane aktivno blato. Tega iz vode nato odstranijo s sedimentacijo. Del ga porabijo za zagon novega procesa, preostanek pa v nadaljnji predelavi uporabijo za proizvodnjo bioplina in gnojil. Voda je po končanem procesu po potrebi še dodatno obdelana z ostalimi prečiščevalnimi procesi, nato pa izpuščena v okolje.

Čiščenje nafte

Na morju je čedalje več ladij, kar pa predstavlja večja tveganja za razlitje nafte. Vendar so ta razlitja v primerjavi s tistimi do katerih lahko pride ob črpanju nafte izpod gladine morja, veliko manj katastrofalne. Do takega razlitja je prišlo leta 2010 aprila v mehiškem zalivu 1500m pod vodo. Velja za največjega v zgodovini. Sprostilo se je približno 780,000 m3 nafte. Ta dogodek je sprožil številne nove raziskave na področju bioremediacije. Začeli so raziskovati številne bakterije, ki sodelujejo pri čiščenju nafte. Za začetek povejmo, da je nafta sestavljena večina iz ogljikovodikov. Pri tem je 15%-60% alkanov, 30%-60% cikloalkanov, 3%-30% aromatskih OV in ostalo. Te snovi so predvsem nepolarne, zato se v vodi ne topijo. V primeru razlitja tako nastanejo velike lise nafte. Gibanje morja oz. valovanje jih razbije na manjše enote. Pri čiščenju jih najprej z gladine posnamejo in sežgejo. Morje nato z letali poškropijo z disperzantom, ki razbije nafto na kapljice. Zdaj se lažje topi z vodo zaradi česar jo bakterije lažje degradirajo. Pogosto kot disperzant uporabljajo corexit. Sledi postopek imenovan bioremediacija, kar pomeni razkroj ogljikovodikov na manjše molekule s pomočjo bakterij. Te bakterije se ob razlitju močno namnožijo. To delo upravlja ogromno vrst bakterij, zato je umetno gojenje in uporabljanje le teh še zelo neučinkovito. Prav tako bi zaradi »konkurence« domačih bakterij hitro propadle. Če jih v morje ne moremo vnesti, pa lahko dodajamo hranila oz. gnojila, ki bi pospešila razvoj obstoječih bakterij. Dodajati moramo predvsem vire fosfata in dušika. Za proces potrebujejo veliko kisika, zato obstanejo le v nižjih globinah in blizu obale. V bolj globoki vodi se njihova aktivnost zaradi manj kisika in nižje temperature, zmanjša. Kot produkt proizvajajo vodo in CO2, kar se kaže v manjši koncentraciji kisika nad gladino (za 30%). V globini igrajo večjo vlogo anaerobne bakterije, ki namesto kisika uporabljajo H2S, vendar pa je njihova hitrost 35 krat manjša od aerobnih. Kljub vsemu pa traja čiščenje nafte več let. K temu pripomore tudi slab odzivni čas bakterij.

Tako so na hitro odkrili veliko novih bakterij, zmožnih degredacije nafte. Izkazalo se je, da zelo zlahka razgradijo alkane, nekoliko težje pa aromatske spojine. Pri tem so izpostavili *Colwellio, Neptuniibacter,* ki je sposobna razgrajati tudi žveplove molekule. Kar igra pomembno vlogo pri razgradnji disperzanta. Najpomembnejša je vrsta *Alcanivorax borkumensis,* za katero so ugotovili, da je zmožna razgrajati tudi aromatske spojine. Omeniti je potrebno, da so najbolj strupene policiklične aromatske spojine (ali PAHs). Te je zmožna razgraditi vrsta *, Lutibacterium* anuloederans in tudi številne vrste iz rodu *Cycloclasticus.* Pojavlja se tudi *Pseudomonas aeruginos,* ki porablja manj kisika. V globokih in mrzlih oceanih pa je pogosta *Oleispira antarctica*. Vsem je skupno, da tvorijo na kapljicah biofilm ter tako delujejo z največjo površino. Velikokrat pa gre za stopenjsko razgradnjo, kjer je izhodna spojina ene bakterija vhodna za drugo.

Od vseh naštetih je najbolj dominantna vrsta *Alcanivorax borkumensis.* V okolju se pojavlja predvsem v oceanih in v bližini obale. Razmnožijo pa se v morju onesnaženem z nafto, saj je to okolje vir fosforja in dušika. Zaradi potreb po kisiku se nahaja le na gladini morja. Po obliki je paličasta bakterija. Je edina bakterija iz svojega rodu, ki je brez flagele – pomeni, da je negibna. Energijo si pridobi z razgradnjo alkanov. Za svojo rast potrebuje predvsem vire fosfata in dušika. Kot hrane pa ni sposobna razgraditi sladkorjev oz. aminokislin. Je aerobna, kar pomeni, da potrebuje kisik. Je tudi halofil, kar pomeni, da lahko živi le v slanem okolju (morje). Absolutni razpon koncentracije soli, v katerem še lahko živi je med 1% in 12,5%. Za temperaturo pa med 4 °C in 35 °C – je psihrofil oz. mezofil. Je gram negativna bakterija. Ima krožen kromosom, ki vsebuje 3 120 143 baznih parov. Večina nosi zapise za encime, ki razgrajujejo mnoge alkane. Zaradi velikega števila encimov, ki jih tvori za alkane je ta vrsta bakterije zmeraj v presežku – 80% do 90% vseh bakterij, ki razgrajujejo nafto - in nima konkurence. Pomembna lastnost je, da so sposobne tvoriti biosurfaktante. To lastnost ji omogoča sposobnost razgrajevanja alkanov kot vir energije. Molekule, ki nastanejo ob razgradnji alkanov se vežejo na membrano in jo naredijo bolj hidrofobne. V osnovi lahko razgrajujejo n-alkane, maščobne kisline, piruvat in alifatske OV. V celici imajo prostorčke v katerih si nabirajo zalogo. Ko imajo na voljo le n-alkane, začnejo proizvajati biosurfaktante z namenom, da se lahko vežejo na kapljice. Gre za molekule (večina glukolipidi, ki jih bakterija tvori na zunanji strani membrane. Te molekule so hidrofobne. Bistvo teh je, da zmanjšajo površinsko napetost. Tako se lažje mešajo z naftnimi kapljicami. So tudi emulgatorji, kar jim omogoča nastanek emulzije – zmes vode in nafte. Da bi se bakterija lažje zaščitila pred napadalci, kodira obrambne encime. Je zanimiva za raziskovalce, ker je sposobna preživeti v okolju, kjer je velika koncentracija natrijevih ionov in kjer je prisotno močno UV sevanje. Za to vrsto je značilno, da tvorijo biofilm. To pomeni, da se bakterije primejo površine naftne kapljice, kjer s svojim metabolizmom razgrajujejo nafto v vodotopne snovi. Poteklo je veliko raziskav na področju izolacije bakterijskega genoma in umestitvi tega v drugo bakterijo. Tako bi lahko kultiviral velike količine bakterij, ki bi jih vnesli v morje. Vendar pa bi bil tak eksperiment nevaren, saj bi lahko rast bakterije zavrla rast drugih. Je prva bakterija, ki je zmožna razgraditi alkane, kateri so določili genom. Njena GC-vsebnost znaša 54,7%. Genom nosi zapis za dva pomembna encima. In sicer za AlkB1 in LkB2. Oba sta alkanohidroksilazi, kar pomeni, da vežeta hidroksilne skupine v ogljikovodike. To pa predstavlja prvi korak pri razgradnji OV. Razlika med njima je, da AlkB1 razgrajuje linearne oz. razvejane alkane od 5 do 20 C atomov, medtem ko AlkB2 le alkane z 8 do 16 C atomov. Pomembno je omeniti, da je zapis za ta dva encima blizu oriC in sta zato prva gena, ki se podvojita. Ker je izpostavljena UV žarkom se njena dednina stalno spreminja. Zato ima bakterija tudi zapis za proteine, ki vstopajo v popravljalne procese.

Bakterija *Alcanivorax borkumensis* je bila vključena med drugim v raziskavo, kjer so opazovali odpornost bakterije na klorofenol in na 1-oktanol. To so naredili tako, da so najprej nacepili kontrolni vzorec, kjer ni bilo strupa. Nacepili so še več kultur z dodanimi različnimi koncentracijami klorofenola oz. 1-oktanola. Kulture so nato inkubirali za 3 ure in jih očistili ter jih zamrznili pri -20 °C. Točko strupenosti so definirali kot koncentracija topila, pri kateri preživi le polovica kulture – glede na kontrolni vzorec. Ta postopek so izvedli na dveh gojiščih. Eno gojišče je bilo obogateno z heksadekanom, drugo pa s piruvatom. Izkazalo se je, da so bile bakterije na heksadekanu s prisotnostjo 1-oktanola, veliko bolj tolerantne kot tiste na piruvatu. Pri klorofenolu ni bilo bistvene razlike. Razlog za to leži v tem, da bakterije razgradijo alkane, med drugim nastane alkohol, ki pa je za celice strupen. Tako so se bakterije na heksadekanu že adaptirale na alkohol in so bile na strup zato bolj odporne. Naredili so še drug eksperiment, kjer so opazovali rast bakterije glede na število C atomov v alkanu (od 6 do 30). Kot referenco so vključili tudi piruvat. Kulturo so vzgajali v posodah v razmerju 0,5% za 3,5 ure. Izkazalo se je, da se je rast s številom C atomov v alkanu povečevala do 19-C atomov. Izjema so bili le alkani med 8 in 10, kjer je bila rast bistveno upočasnjena. Veliko hitrejša rast je bila pri alkanih med 14 in 19 C atomov – najvišja pri 18. Od 20 naprej se je rast ponovno začela upočasnjevati. Razlog za upočasnjeno rast pri alkanih z manj kot 10 C atomov je, da bakterija razgradi alkane na alkohole, ki pa so za celico strupeni. Alkoholi z več C atomi niso nevarni. Razlog zakaj se hitrost med 14 in 19 močno poveča je, da bakterija maščobne kisline, ki nastanejo kot produkt, akumulira na membrani – da poveča hidrofobnost. Membrana namreč predstavlja 10 % celotne mase celice. Zakaj je to območje le med 14 in 19? Ker tudi dolžina maščobne kisline na membrani ni nikoli večja od 19 C atomov. Povprečna dolžina maščobne kisline je 16.

Proizvodnja inzulina z uporabo *E. Coli*

-Deblo: **Proteobacteria**
-Razred: **Gamma proteobacteria**
-Red: **Enterobacteriales**
-Družina: **Enterobacteriaceae**
-Rod: **Escherichia**-Vrsta: ***Escherichia Coli***

*Escherichia Coli* ali na kratko *E. Coli* je naravni predstavnik naše črevesne flore. Nahaja se v črevesju toplokrvnih organizmov (sesalcev), med drugim tudi v ljudeh, kamor se kot eden prvih simbiontov naseli že v roku 40 dni po porodu in tam ostane do naše smrti. Navadno je nam neškodljiv mikroorganizem (nevirulenten), določeni sevi *E. Coli* pa lahko povzročijo težka obolenja in celo smrt (virulentni). Spada med gramnegativne bakterije, kar pomeni, da tvori celične stene z manj peptidoglikana kot grampozitivne bakterije in ne tvori spor. Je najbolj raziskan mikroorganizem na svetu, saj so se na njej začele razvijati genske raziskave in izolacije genskega koda.

Poleg tega, da je bila *E. Coli* najbolj koristen mikroorganizem za raziskovanje bakterijskih celic in opravljanje genetskih raziskav, je izredno pomemben oz. nepogrešljiv člen v pridobivanju rekombinantnega inzulina.

Inzulin je izredno pomemben peptidni hormon, ki nastaja na posebnih delih trebušne slinavke, skupkih celic, ki se imenujejo beta celice Langerhansovih otočkov. Omogoča prenos molekul glukoze iz krvi v celice skozi celično membrano.

Nekateri ljudje imajo posebno okvaro, pri kateri trebušna slinavka ne izloča inzulina, ali pa ga le ne izloča dovolj. Bolezen imenujemo diabetes in je zelo razširjena. V tem primeru morajo bolniki pridobiti inzulin za pravilno uravnavanje koncentracije glukoze v krvi od zunaj.

Takšne alternativne oblike inzulina so se skozi zgodovino spreminjale. Sprva, preden je bil razvit genski inženiring, so uporabljali inzulin, ki so ga ekstrahirali iz trebušnih slinavk goveda in prašičev, saj ima zelo podobno zgradbo in delovanje, kot človeški inzulin. Rešitev je bila učinkovita, a pri nekaterih ljudeh so se pojavile negativne in alergijske reakcije na tuj, živalski inzulin. Poleg tega pa je pridobivanje takšnega inzulina pomenilo zelo veliko živalskih žrtev. Danes pridobivajo inzulin s pomočjo mikroorganizmov, od katerih se največ uporablja *Escherichia Coli*.

Za pridobivanje inzulina uporabljajo oslabljeno obliko *E. Coli*, ki ne povzroča zapletov v procesu in je tudi stalni prebivalec našega prebavnega trakta. Pred začetkom samega bioprocesa je potrebno bakteriji omogočiti sintezo človeškega inzulina. To dosežejo tako, da umetno sintetizirajo DNK zapis za A in B polipeptidni verigi, ki skupaj tvorita inzulin. Nato ta odsek nukleinske kisline s pomočjo restrikcijskih encimov, ki se že nahajajo v celici in omogočajo »rezanje« dednine, vstavijo v dva plazmida. Restrikcijski encimi razrežejo krožno molekulo plazmida na točno določenem mestu, tja se vstavi zapis za inzulin in encimi ligaze »zlepijo« plazmid zopet skupaj. Celice s tema plazmidoma se nato delijo in reproducirajo tudi plazmida, tako da na koncu vse bakterije v bioreaktorju nosijo zapis za sintezo inzulina. Poleg le bakterij moramo v bioreaktor dodati tudi hranilne snovi in soli, ki so vir biogenih elementov. Dodamo jim tudi rastne faktorje in na koncu, ko se že namnožijo do želene koncentracije, induktor, ki odcepi represor z operona za sintezo inzulina.

Za tem nekaj ur poteka biokonverzija, v času katere bakterije sintetizirajo obe polipeptidni verigi, ki jih po končanem bioprocesu povežejo skupaj, da tvorita inzulin. Ko se proces zaključi, najprej s centrifugiranjem izločijo celice in jih s tem povišanjem tlaka tudi počijo, saj je inzulin ujet v njihovi notranjosti. Nato s postopki kromatografije iz zmesi izločijo obe verigi inzulina in ju povežejo skupaj, da dobijo delujoči človeški inzulin. Stranskih produktov pri tem bioprocesu ni, saj vse razen inzulina zavržejo.

Poleg velike koristi nam *E. Coli* lahko povzroča tudi težave. Ker obstaja veliko različnih sevov te bakterije, so med njimi nekateri tudi virulentni in povzročajo razna obolenja. Okužb je v zgodovini nepregledno število, saj je to zelo pogosta okužba, a nekateri primeri, kot je bil npr. leta 1992 tako imenovani »Jack in the box«, si zaslužijo posebno omembo. Ta specifični primer je povzročil spremembo ameriške zakonodaje, ki je sprejela zakon o naključnih pregledih mesa.