

# Proizvodnja i karakterizacija alfa-amilaze bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T

---

**Kostelac, Deni**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

*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:159:290022>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

Deni Kostelac, 612/MB

**Proizvodnja i karakterizacija**

**$\alpha$ -amilaze bakterije**

***Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>**

Ovaj je diplomski rad izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Anite Slavica.

Diplomski rad je izrađen u okviru projekta "Proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina na principima ekološke i ekonomske održivosti (SPECH-LRM, 9158)" voditelja prof. dr. sc. Božidara Šanteka. Provedbu ovog programa i projekta podupire Hrvatska zaklada za znanost.

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Božidaru Šanteku, voditelju projekta "Proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina na principima ekološke i ekonomske održivosti (SPECH-LRM, 9158)" i prof. dr. sc. Srđanu Novaku na mogućnosti da izradim svoj diplomski rad na ovom projektu.*

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Aniti Slavica, na predloženoj temi, savjetima, pomoći i razumijevanju tijekom izvođenja eksperimenata te pisanja diplomskog rada.*

*Veliko hvala svim članovima ovog Laboratorija na susretljivosti i pomoći.*

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Renati Teparić na sugestijama i pomoći tijekom izvođenja kromatografije i elektroforeze.*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima na podršci koju su mi pružali tijekom studiranja.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### Proizvodnja i karakterizacija $\alpha$ -amilaze bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>

Deni Kostelac, 612/MB

**Sažetak:** Amilolitička bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> uzgojena je modificiranoj MRS podlozi, u koju je umjesto glukoze dodana maltoza (20,0 g L<sup>-1</sup>). Uzgoj u MRS podlozi s maltozom (MRS-mal<sub>20</sub>) proveden je u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom ( $V_K = 6,0$  L) pri konstantnoj temperaturi (40±0,2°C) i uz održavanje pH vrijednosti suspenzije u bioreaktoru (pH 5,5±0,2). *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> odmah nakon nacjepljivanja počinje transportirati maltozu, hidrolizira je i razgrađuje isključivo do mliječne kiseline. Istovremeno s razgradnjom maltoze i homofermentativnom proizvodnjom mliječne kiseline odvija se sinteza biomase (eksponencijalni rast) i to sve do  $t = 6,0$  h bioprocesa, kada bakterija ulazi u stacionarnu fazu rasta. Nakon toga se uspoređuju potrošnja maltoze, sinteza bakterijske biomase i proizvodnja mliječne kiseline. Do kraja bioprocesa ( $t = 24,0$  h) koncentracija maltoze je opala do 6,95 g L<sup>-1</sup> i proizvedeno je 11,34 g L<sup>-1</sup> mliječne kiseline tako da je koeficijent konverzije maltoze u mliječnu kiselinu ( $Y_{P/S}$ ) iznosio samo 0,87 g g<sup>-1</sup>. Soj *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> sintetizira  $\alpha$ -amilazu i transportira je izvan stanice. Izolacija  $\alpha$ -amilaze provedena je afinitetnom kromatografijom i to iz supernatanta uzoraka izuzetih pri kraju eksponencijalne i stacionarne faze rasta. Propuštanjem otopine  $\alpha$ -ciklodekstrina kroz kolonu eluirane su i separirane na baznoj liniji različite frakcije  $\alpha$ -amilaze. SDS-PAGE metodom utvrđeno je da se frakcija 1 (F1) sastoji od nekoliko proteinskih vrpca koje imaju molekulsku masu <30,0 kDa.

**Glavne riječi:** maltoza, *Lactobacillus amylovorus*,  $\alpha$ -amilaza, afinitetna kromatografija, SDS-PAGE.

**Rad sadrži:** 61 stranicu, 19 slika, 9 tablica, 43 literaturne reference, 3 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Anita Slavica,

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Renata Teparić
2. Izv. prof. dr. sc. Anita Slavica
3. Prof. dr. sc. Srđan Novak
4. Prof. dr. sc. Božidar Šantek (zamjena)

**Datum obrane:** 14. srpanj 2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Graduate Thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

### Production and characterization of $\alpha$ -amylase produced by bacterium

*Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>

Deni Kostelac, 612/MB

**Abstract:** Cultivation of amylolytic lactic acid bacterium *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> was conducted in modified MRS medium in which maltose (20.0 g L<sup>-1</sup>) was added instead of glucose. The cultivation of the bacterium in MRS medium with maltose (MRS-mal<sub>20</sub>) was carried out in a laboratory scale stirred tank bioreactor (working volume of 6.0 L) at constant temperature (40±0.2°C) and maintained pH value (pH of 5.5±0.2). Transport of maltose into bacterial cells started immediately after inoculation, transported maltose was hydrolysed and further degraded to lactic acid exclusively. Simultaneously with maltose utilization and lactic acid production bacterial biomass was synthesised (exponential growth) until  $t = 6.0$  h of bioprocess, when bacterium entered stationary growth phase. After this time point utilization of maltose, bacterial biomass synthesis and lactic acid production were slowed down. Until the end of the bioprocess ( $t = 24.0$  h) concentration of maltose decreased to 6.95 g L<sup>-1</sup> and 11.34 g L<sup>-1</sup> of lactic acid was produced. Resulting substrate to product conversion coefficient ( $Y_{P/S}$ ) was only 0.87 g g<sup>-1</sup>. Strain *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> can synthesise  $\alpha$ -amylase and transport it to extracellular space. Isolation of the  $\alpha$ -amylase was done by affinity chromatography. Supernatants of samples withdrawn at the end of exponentially and stationary growth phases were used in the isolation. Different  $\alpha$ -amylase fractions were eluted and base-line separated by  $\alpha$ -cyclodextrin solution. Fraction 1 (F1) consisted of several protein bands with molecular weight <30.0 kDa, as determined by SDS-PAGE.

**Key words:** maltose, *Lactobacillus amylovorus*,  $\alpha$ -amylase, affinity chromatography, SDS-PAGE.

**Thesis contains:** 61 pages, 19 figures, 9 tables, 43 references, 3 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD Anita Slavica, Associate Professor

#### Reviewers:

1. PhD Renata Teparić, Associate Professor
2. PhD Anita Slavica, Associate Professor
3. PhD Srđan Novak, Full Professor
4. PhD Božidar Šantek, Full Professor (substitute)

**Paper defended:** 14 July 2016

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	2
2.1. Fiziologija bakterija mliječne kiseline	2
2.1.1. Amilolitičke bakterije mliječne kiseline	7
2.1.1.1. Amilolitička bakterija mliječne kiseline <i>Lactobacillus amylovorus</i>	8
2.2. Amilaze	8
2.2.1. $\alpha$ -amilaze	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	11
3.1. MATERIJAL	11
3.1.1. Mikroorganizam	11
3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge	11
3.1.2.1. Kemikalije za pripremu hranjive podloge MRS-mal <sub>20</sub> za uzgoj bakterije i proizvodnju $\alpha$ -amilaze	11
3.1.2.2. Kemikalije za pripremu otopina za biospecifičnu (afinitetnu) kromatografiju	12
3.1.2.3. Kemikalije za pripremu otopina za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata i detekciju proteina u gelu	13
3.1.2.4. Kemikalije za pripremu otopina za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti i određivanje koncentracije proteina	14
3.1.2.5. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterijske kulture	15
3.1.3. Aparatura i pribor	15
3.1.3.1. Laboratorijski bioreaktor s miješalom	15
3.1.3.2. Centrifuge	16
3.1.3.3. Spektrofotometri	17
3.1.3.4. Sustav za biospecifičnu (afinitetnu) kromatografiju	18
3.1.3.5. Sustav za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)	19
3.1.3.6. Oprema za filtraciju pokretne faze za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti i ultrazvučna kupelj	20
3.1.3.7. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti	20
3.1.3.8. Ostala oprema	21
3.2. METODE RADA	22
3.2.1. Priprava hranjivih podloga	22
3.2.2. Priprava cjepiva za uzgoj bakterije u tikvici i laboratorijskom bioreaktoru s miješalom	22
3.2.3. Uzgoj bakterije i indukcija sinteze $\alpha$ -amilaze u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom	23
3.2.4. Izdvajanje $\alpha$ -amilaze	24



3.2.4.1. Priprema uzoraka za izdvajanje $\alpha$ -amilaze	24
3.2.4.2. Biospecifična (afinitetna) kromatografija	24
3.2.5. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)	28
3.2.6. Analitičke metode	34
3.2.6.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka izuzetih tijekom šaržnog uzgoja bakterije	34
3.2.6.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	35
3.2.6.2.1. Taloženje proteina cinkovim sulfatom	35
3.2.6.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	35
3.2.6.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradford-ici	36
3.2.7. Analiza eksperimentalnih podataka - izračunavanje nekih pokazatelja uspješnosti rasta i proizvodnje mliječne kiseline s pomoću amilolitičke bakterije <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531 <sup>T</sup>	38
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	40
4.1. Uzgoj amilolitičke bakterije <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531 <sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal <sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom	41
4.2. Izdvajanje $\alpha$ -amilaze afinitetnom kromatografijom i njezina djelomična karakterizacija	48
<b>5. ZAKLJUČCI</b>	54
<b>6. LITERATURA</b>	55
<b>7. PRILOZI</b>	60

**UVOD**

Amilaze su grupa enzima koje mogu katalizirati hidrolizu  $\alpha$ -1,4- i  $\alpha$ -1,6-glikozidnih veza u škrobu i u polimerima slične strukture. Primjena amilaza u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji je široka, a najviše se koriste mikrobne amilaze zbog mogućnosti proizvodnje amilaza točno definiranih poželjnih karakteristika i to u vrlo velikim količinama. Različiti sojevi funga, kvasaca i bakterija uzgajaju se s ciljem proizvodnje amilaza. Zasebna grupa amilaza su  $\alpha$ -amilaze koje kataliziraju hidrolizu  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze u molekulama škroba i drugih polimera glukoze. Hidrolizom škroba iz kukuruza, manioke, krumpira i pšenice pomoću  $\alpha$ -amilaza dobivaju se različiti hidrolizati škroba, glukozni i fruktozni sirupi te derivati maltodekstrina i ciklodekstrina, koji se koriste prvenstveno u prehrambenoj industriji. Osim toga, pročišćene  $\alpha$ -amilaze se koriste u farmaceutskoj, prehrambenoj i fermentacijskoj industriji, kao i u proizvodnji tekstila, papira, detergenata i finih kemikalija. U medicini i analitičkoj kemiji našle su primjenu  $\alpha$ -amilaze visoke čistoće. Termostabilnost i aktivnost u širokom rasponu pH vrijednosti dvije su najpoželjnije karakteristike ove grupe amilaza. U industrijskoj proizvodnji  $\alpha$ -amilaza najviše se koriste vrste iz roda *Bacillus*, npr. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* i *Bacillus amyloliquefaciens*.

Neke amilolitičke bakterije mliječne kiseline kao npr. soj *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>, mogu proizvoditi  $\alpha$ -amilazu. Osim komercijalne proizvodnje ovog enzima, proizvodnja  $\alpha$ -amilaze kod soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> je od interesa u industrijskoj proizvodnji mliječne kiseline. Naime, ovaj soj posjeduje hidrolitička i fermentativna svojstva i zbog toga je kandidat za primjenu u bioprocusu simultane saharifikacije (hidrolize) i fermentacije škroba do mliječne kiseline. Relativno malo podataka je dostupno o  $\alpha$ -amilazi soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> i primjeni ovog soja u proizvodnji mliječne kiseline simultanom saharifikacijom i fermentacijom škroba.

Cilj ovog rada bio je proizvesti  $\alpha$ -amilazu soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u laboratorijskom mjerilu. Maltoza je dodana u hranjivu podlogu kao jedini izvor ugljika i energije i kako bi se inducirala sinteza i sekrecija ovog hidrolitičkog enzima tijekom uzgoja amilolitičkog soja. Kako je fiziologija ovog soja relativno slabo istražena, praćena je dinamika potrošnje sporo fermentirajuće maltoze, sinteza bakterijske biomase i proizvodnja mliječne kiseline pri odabranim uvjetima ( $\theta = 40^{\circ}\text{C}$ , pH 5,5). Supernatanti uzoraka izuzetih pri kraju eksponencijalne faze rasta *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> i na kraju bioprocusa provedenog u biorektoru s miješalom korišteni su za izdvajanje  $\alpha$ -amilaze afinitetnom kromatografijom. Izdvojene su različite frakcije  $\alpha$ -amilaze i djelomično karakterizirane SDS-PAGE metodom.

**TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Fiziologija bakterija mliječne kiseline

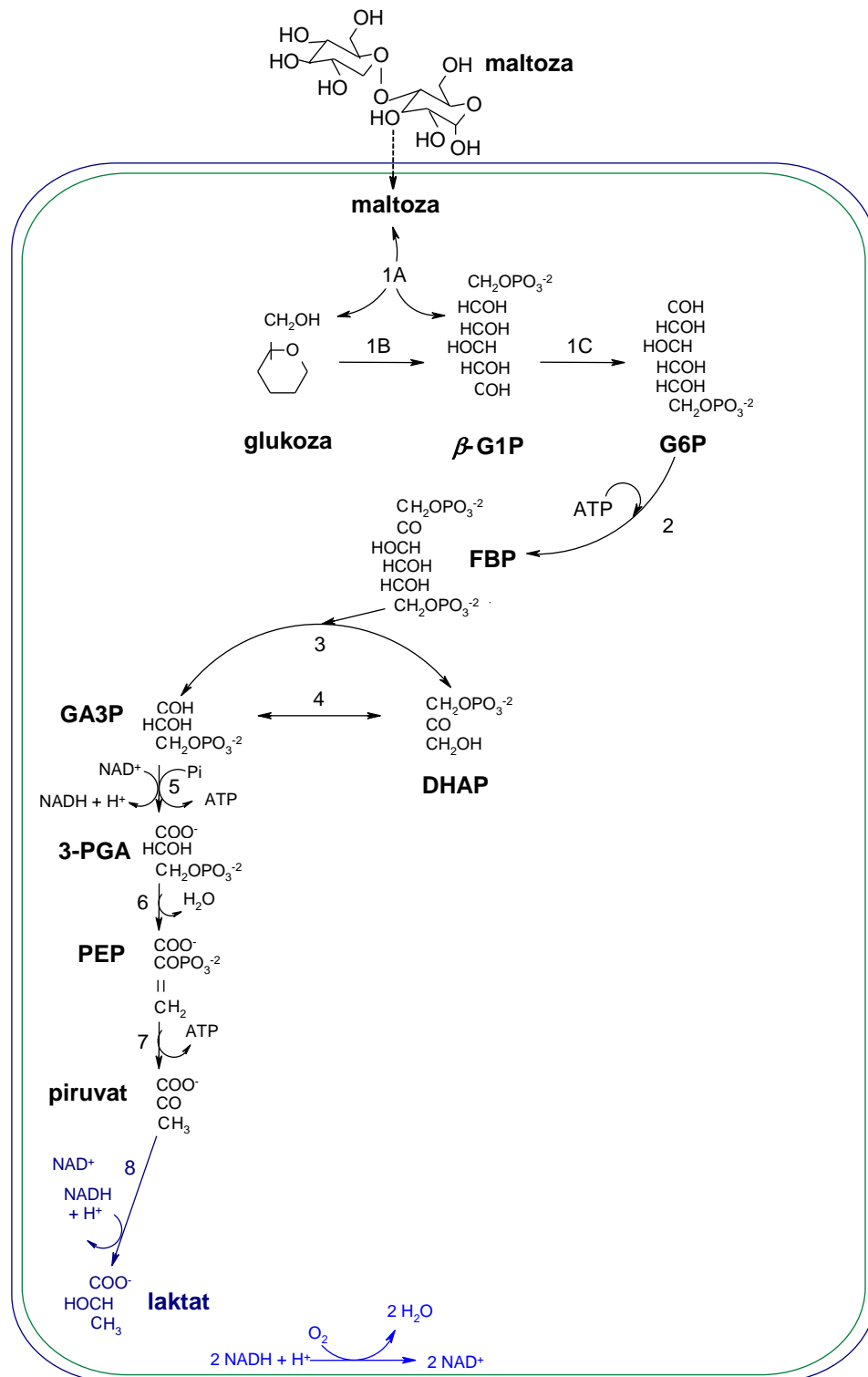
Bakterije mliječne kiseline (BMK) su nesporogene, Gram-pozitivne, mikroaerofilne bakterije. Ova skupina bakterija kao krajnji proizvod metabolizma proizvodi mliječnu kiselinu (Carr i sur., 2002). Osim nekoliko vrsta, ove su bakterije nepatogeni mikroorganizmi koji imaju GRAS (eng. Generally Recognised As Safe) status. BMK su okarakterizirane kao termofili, ali mogu rasti pri temperaturama u rasponu od 5°C do 45°C. Optimalne pH vrijednosti za rast BMK kreću se u rasponu od 5,5 do 6,5, dok neki sojevi mogu rasti i pri nižim pH vrijednostima.

BMK su razvrstane u oko 20 rodova od kojih se većinom istražuju: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weisella*. Među pobrojanim rodovima nabrojnijim se smatra rod *Lactobacillus* (Vandamme i sur., 1996).

Različiti mehanizmi koji reguliraju katabolizam ugljikohidrata do krajnjih proizvoda, D- i/ili L-mliječne kiseline i drugih, nisu istraženi u detalje (Hammes i Hertel, 2009; Hofvendahland i Hahn-Hägerdal, 2000; Neves i sur., 2005). Regulacija konverzije različitih ugljikohidrata glikolizom do piruvata i, nakon toga, do laktata (homolaktička fermentacija) u stanicama BMK intenzivno je istraživana i relativno dobro opisana u literaturi. S obzirom na broj i vrstu spojeva koji nastaju tijekom razgradnje ugljikohidrata i metaboličke puteve kojima se ova razgradnja odvija, BMK možemo podijeliti u tri grupe (Hammes i Hertel, 2009; Reddy i sur., 2008):

(1) obligatno homofermentative bakterije (vrste iz rodova *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* i neke vrste iz roda *Lactobacillus*), kod kojih je glavni metabolički put glikoliza, proizvode mliječnu kiselinu homolaktičkom fermentacijom (Slika 1.). Ova grupa BMK može razgrađivati heksoze i 6-fosfoglukonatnim putem (Slika 2.) i tako proizvoditi više krajnjih proizvoda: laktat, ugljikov dioksid, etanol (ili acetat). Ovaj drugi metabolički put naziva se i heterolaktična fermentacija.

(2) Fakultativno heterofermentativne BMK posjeduju oba metabolička puta, glikolizu i 6-fosfoglukonatni put, i mogu razgrađivati heksoze glikolizom do piruvata te zatim do laktata i, u uvjetima limitacije ugljikohidratom (glukozom), 6-fosfoglukonatnim putem. Ova grupa BMK može razgrađivati i pentoze jer posjeduju inducibilnu fosfoketolazu (EC 4.1.2.9; Slika 3.) i na taj način proizvode laktat i acetat kao krajnje proizvode metabolizma.



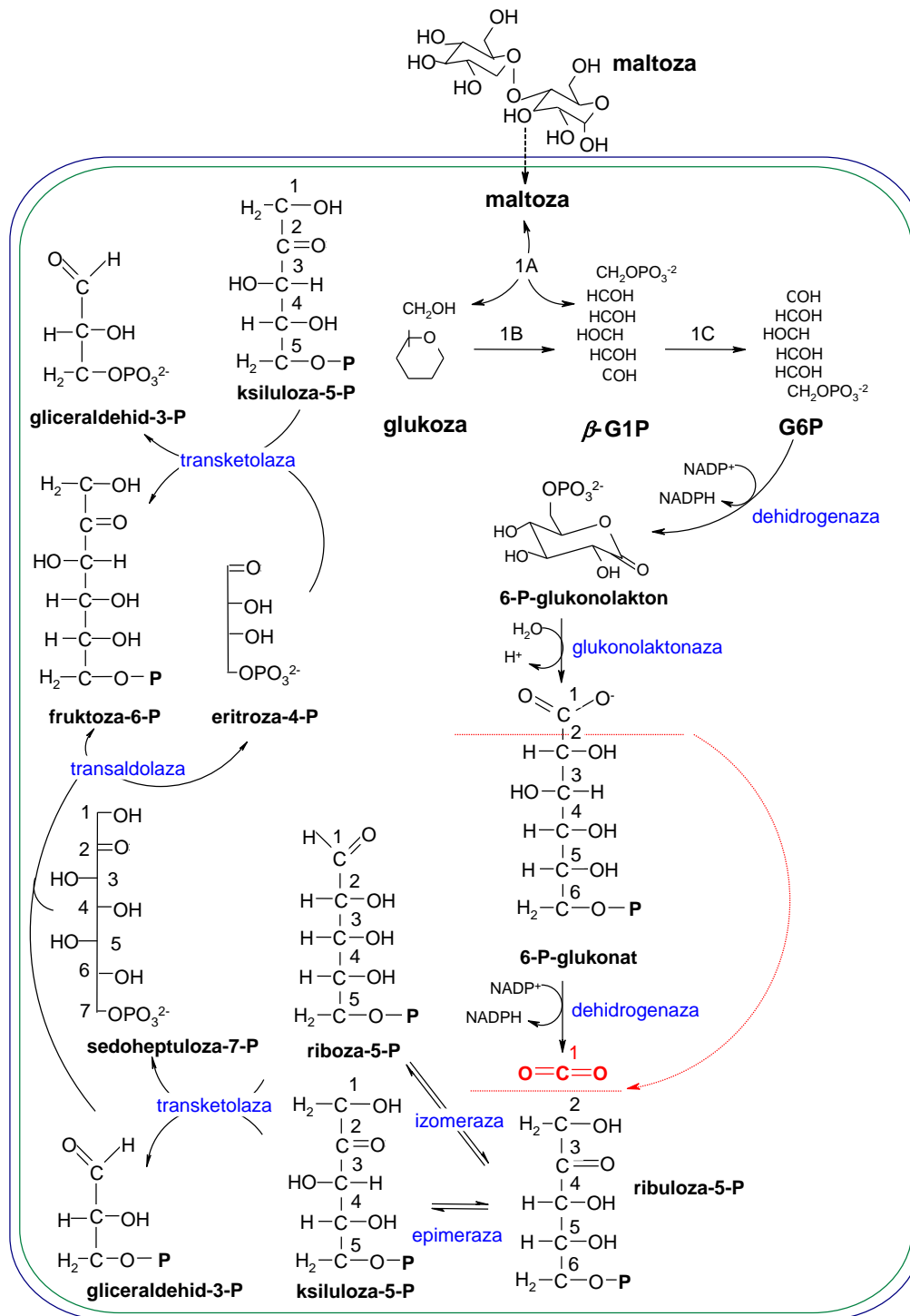
**Slika 1.** Shematski prikaz razgradnje maltoze glikolizom i konverzije piruvata do mliječne kiseline (homolaktička fermentacija). Prikazane reakcije kataliziraju enzimi pobrojani na sljedećoj stranici.

Kratice: G6P, glukoza 6-fosfat; FBP, fruktoza 1,6-bisfosfat; GA3P, gliceraldehid 3-fosfat; DHAP, dihidroksiaceton fosfat; 3-PGA, 3-fosfogliceraldehid; PEP, fosfoenol piruvat. Enzimi: 1A, maltoza fosforilaza (EC 2.4.1.8); 1B, glukokinaza (EC 2.7.1.2); 1C,  $\beta$ -fosfoglukomutaza (EC 5.4.2.6); 2, fosfoglukoza izomeraza (EC 5.3.1.9) i 6-fosfofrukto-1-kinaza (PFK, EC 2.7.1.11); 3, fruktoza 1,6-bisfosfat aldolaza (EC 4.1.2.13); 4, triozafosfat izomeraza (EC 5.3.1.1); 5, GA3P dehidrogenaza (EC 1.2.1.9) i fosfoglicerat kinaza (EC 1.1.1.95); 6, fosfogliceromutaza (EC 2.7.5.3) i enolaza (EC 4.2.1.11); 7, piruvat kinaza (EC 2.7.1.40); 8, laktat dehidrogenaza (D-LDH, EC 1.1.1.28 i/ili L-LDH, EC 1.1.1.27).

(3) Obligatno heterofermentativne BMK mogu metabolizirati ugljikohidrate samo 6-fosfoglukonatnim putem (Slika 2.) i tako razgrađuju heksoze do laktata, ugljikovog dioksida, etanola ili acetata, a pentoze do laktata i acetata.

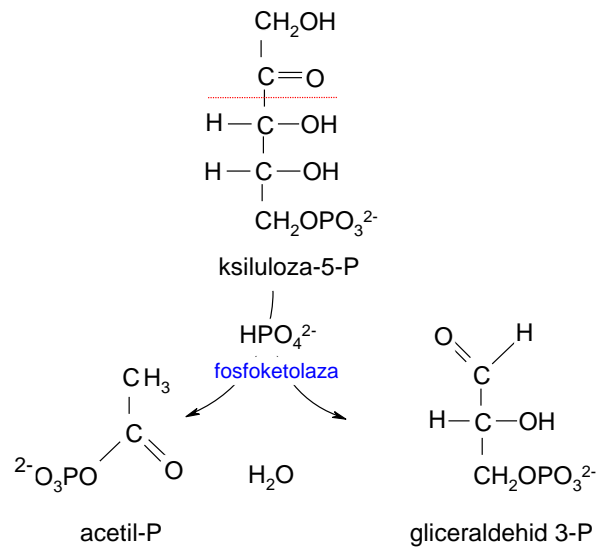
Tradicionalno se aktivnost fosfoketolaze smatra valjanim kriterijem pomoću kojega je moguće razlikovati dvije grupe heterofermentativnih (fakultativno i obligatno heterofermentativne) BMK od obligatno homofermentativnih BMK. Ipak, metabolički putevi razgradnje ugljikohidrata i aktivnost fosfoketolaze (Slika 3.) ne mogu se koristiti u klasifikaciji određenih vrsta BMK. Naime, kod nekih obligatno homofermentativnih BMK koji homolaktičkom fermentacijom razgrađuju heksoze, fosfoketolaza je inducirana u prisutnosti pentoza i razgradnjom pentoza proizvode se laktat i acetat. Nadalje, neki ne baš dobro okarakterizirani sojevi BMK mogu razgrađivati pentoze i to za sada nepoznatim metaboličkim putevima. U ove puteve ubraja se i glikoliza, a ovi sojevi proizvode isključivo laktat (Hammes i Hertel, 2009).

Osim ovih nedovoljno okarakteriziranih metaboličkih reakcija, smatra se da neke vrste BMK provode specifične reakcije koje uključuju međuspojeve - poveznice između različitih do sada okarakteriziranih puteva razgradnje ugljikohidrata. Jedna takva poveznica je piruvat, međuspoj koji se formira tijekom odvijanja glikolize i 6-fosfoglukonatnog puta u stanicama BMK. Pri određenim uvjetima konverzija piruvata može rezultirati proizvodnjom 2,3-butandiola i diacetila (Slika 4.; Neves i sur., 2005). Osim toga, okarakteriziran je tzv. metabolički pomak (eng. metabolic shift) od homolaktičke fermentacije do fermentacije mješovitog tipa (eng. mixed acid fermentation), koja je definirana kao konverzija piruvata do više krajnjih proizvoda: laktata, ugljikovog dioksida, mravlje kiseline, etanola i acetata (Slika 4.; Hofvendahl i Hahn-Hägerdal, 2000; Neves i sur., 2005).

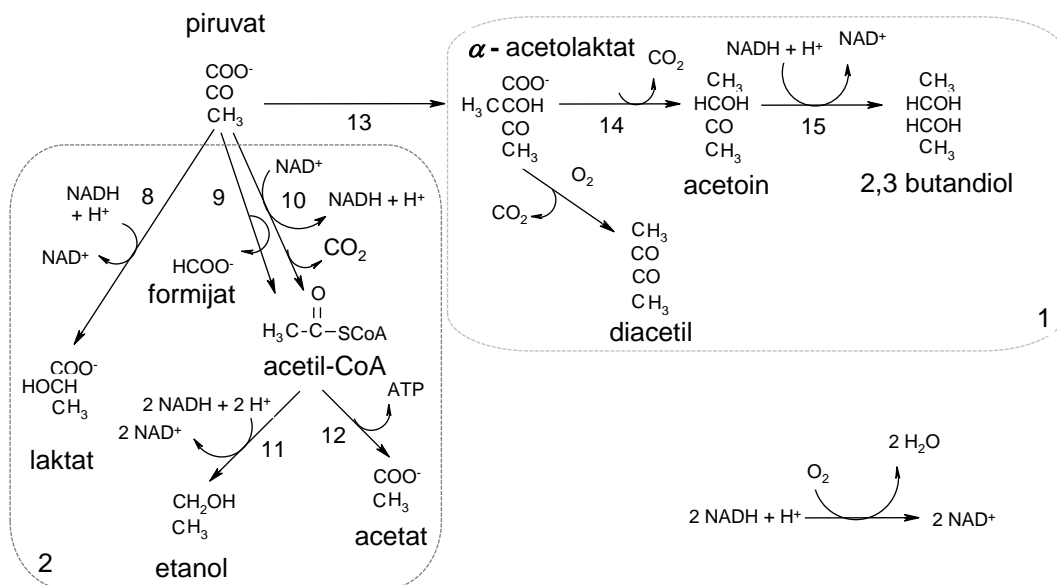


**Slika 2.** Shematski prikaz razgradnje maltoze 6-fosfoglukonatnim putem do tetraoza fosfata i pentoza fosfata, koji se koriste u anaboličkim reakcijama (biosintezi nukleinskih kiselina, nukleotida, aminokiselina i masnih kiselina) i međuspojeva glikolize (gliceralehid 3-fosfata i fruktoza 6-fosfata). Daljnjom razgradnjom međuspojeva glikolize (vidi Sliku 1.) proizvode se laktat, ugljikov dioksid, etanol ili acetat (heterolaktička fermentacija, vidi Sliku 4.).





**Slika 3.** Reakcija koju katalizira fosfoketolaza.



**Slika 4.** Razgradnja piruvata do različitih krajnjih proizvoda - (1) diacetila i 2,3-butandiola, i (2) tzv. fermentacija mješovitog tipa (proizvodnja laktata, ugljikovog dioksida, formijata, etanola i acetata). Enzimi: 8, laktat dehidrogenaza (D-LDH, EC 1.1.1.28 i/ili L-LDH, EC 1.1.1.27); 9, piruvat-formijat liaza (EC 2.3.1.54); 10, kompleks piruvat dehidrogenaza (EC 1.2.4.1); 11, acetaldehid dehidrogenaza (EC 1.2.1.3) i alkohol dehidrogenaza (EC 1.1.1.1); 12, fosfotransacetilaza (EC 2.3.1.8) i acetat kinaza (EC 2.7.2.1); 13,  $\alpha$ -acetolaktat sintaza (EC 2.2.1.6); 14,  $\alpha$ -acetolaktat dekarboksilaza (EC

4.1.1.5); 15, 2,3-butandiol dehidrogenaza (EC 1.1.1.4); 16, diacetil reduktaza (EC 1.1.1.4).

Osim toga, neke dekarboksilaze aminokiselina, npr. histidin dekarboksilaza, trebaju kovalentno vezan piruvat kao prostetsku skupinu (Fernández i Zúniga, 2006).

Osim piruvata, laktat, koji se obično smatra krajnjim proizvodom razgradnje ugljikohidrata kod BMK, može se prevesti u acetat. Ova se konverzija opravdava pridobivanjem metaboličke energije - ATP (Goffin i sur., 2006).

Limitacija i iscrpljivanje ugljikohidrata kao izvora ugljika i energije i smanjivanje pH vrijednosti zbog proizvodnje krajnjih proizvoda metabolizma ugljikohidrata kreiraju nepovoljne uvjete za BMK, koje se prilagođavaju novonastalim uvjetima. Zbog toga je regulacija metaboličkih puteva razgradnje ugljikohidrata i pridobivanje metaboličke energije pri takvim uvjetima od velike važnosti (Konings, 2006).

BMK generiraju metaboličku energiju fosforilacijom na razini supstrata koja je povezana sa razgradnjom ugljikohidrata i, kod nekih vrsta, sa metabolizmom arginina i histidina (konverzijom karbamoil fosfata u CO<sub>2</sub> i NH<sub>3</sub> u arginin deiminaza putu, i dekarboksilacijom histidina do histamina i histidin/histamina antiportom uz formiranje elektrokemijskog gradijenta) (Fernández i Zúniga, 2006). Metabolička energija se u BMK pridobiva i sekundarnim transportom.

Smatra se da povezanost različitih metaboličkih puteva (puteva za razgradnju ugljikohidrata i metabolizma aminokiselina), pridobivanja metaboličke energije i održavanja pH vrijednosti mora biti u vezi sa preusmjeravanjem centralnog metabolizma ugljika pri određenim uvjetima u kojima preživljavaju BMK.

### **2.1.1. Amilolitičke bakterije mliječne kiseline**

Amilolitičke bakterije mliječne kiseline (ABMK) su grupa BMK koja može sintetizirati enzime amilaze, hidrolizirati škrob i koristiti ga kao jedini izvor ugljika i energije (Trontel i sur., 2010; Trontel i sur., 2011). Ovaj polimerni ugljikohidrat se hidrolizira s pomoću amilolitičkih enzima koje proizvode ABMK do jednostavnih fermentabilnih ugljikohidrata, npr. maltoze, koja se transportira u stanice ABMK te se u citoplazmi hidrolizira i fermentacijom prevodi do mliječne kiseline. Smatra se da je fermentacija ugljikohidrata i

proizvodnja mliječne kiseline glavni način kojim se pridobiva metabolička energiju u stanicama ABMK (Duedahl-Olesen i sur., 2000). Samo neke vrste ABMK mogu koristiti škrob iz sirovina kao jedini izvor ugljika i energije, pa su ove vrste, kao što su sojevi vrste *Lactobacillus amylovorus*, od interesa u industrijskoj proizvodnji mliječne kiseline iz škrobnih sirovina.

#### 2.1.1.1. Amilolitička bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus*

ABMK *Lactobacillus amylovorus* pripada skupini obligatno homofermentativnih bakterija mliječne kiseline (Hammes i Hertel, 2009). Ova industrijski primjenjiva bakterija može proizvoditi oba stereoizomera mliječne kiseline, D- i L-laktat, i to u različitim omjerima. Omjer proizvedenih stereoizomera može se podešavati korištenjem različitih izvora ugljika i održavanjem različitih temperatura bioprocesa (Trontel i sur., 2010; Trontel i sur., 2011). Pri određenim uvjetima ova obligatno homofermentativna bakterija uz laktat proizvodi i acetat kao drugi krajnji proizvod razgradnje ugljikohidrata (Slavica i sur., 2015). Fiziologija ove ABMK nije dovoljno istražena.

Baza podataka BRENDA (Anonymous 1, 2016) sadrži podatke o devet enzima soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>: 3-fitaza (EC3.1.3.8), 4-fitaza (EC 3.1.3.26),  $\alpha$ -amilaza (EC 3.2.1.1), gluklan 1,4- $\alpha$ -glukozidaza (EC 3.2.1.3), beta-galaktozidaza (EC3.2.1.23), 6-fosfo-beta-galaktozidaza (EC 3.2.1.85), 6-fosfo-beta-glukozidaza (EC 3.2.1.86) i fenilalanin-tRNA ligaza (EC 6.1.1.20).

## 2.2. Amilaze

Amilaze su grupa enzima koji mogu katalizirati hidrolizu škroba i drugih sličnih homopolimera glukoze. Nekoliko je različitih klasifikacija ovih enzima.

Jedan od kriterija za klasifikaciju amilaza može biti mjesto na kojem dolazi do hidrolize škroba i škrobu sličnih polimera i, na temelju ove karakteristike hidrolitičke reakcije, amilaze se mogu razvrstati u endoamilaze i egzoamilaze. Endoamilaze su enzimi koji hidroliziraju škrob tako što cijepaju glikozidne veze unutar molekule amiloze odnosno amilopektina i tijekom ove reakcije nastaju linearni odnosno razgranati oligosaharidi različite duljine tj. poliglukozni lanci s različitim brojem podjedinica. Egzoamilaze cijepaju glikozidne veze s

reducirajućih krajeva ovih polimera i u ovako kataliziranim reakcijama nastaju relativno kratki, linearni poliglukozni lanci (Reddy i sur., 2008).

Prema vrsti kemijskih reakcija koje kataliziraju, amilaze su razdijeljene u tri različite klase (eng. Enzyme Class, EC) i pridruženi su im odgovarajući brojevi. Po ovoj klasifikaciji amilaze mogu pripadati klasi transferaza (EC 2.), hidrolaza (EC 3.) ili izomeraza (EC 5.).

Klasa enzima koji imaju oznaku - hidrolaze (EC 3.) obuhvaća najveći broj dosad izoliranih i okarakteriziranih amilaza (Taniguchi i Honnda, 2009). Amilaze s tri početna broja EC 3.2.1. pripadaju klasi hidrolaza (3), podklasi glikozilaza (3.2) i skupini glikozidaza (3.2.1). U enzime s tri početna broja EC 3.2.1. ubrajaju se  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -amilaze. Ukoliko se nakon hidrolize škroba i škrobu sličnih polimera zadržava anomerna konfiguracija proizvoda (glukoze) koji su dobiveni tijekom hidrolize, onda ovu reakciju kataliziraju  $\alpha$ -amilaze. U reakcijama koje kataliziraju  $\beta$ -amilaze i glukoamilaze ( $\gamma$ -amilaze) dolazi do promjene anomerne konfiguracije proizvoda (Duedahl-Olesen i sur., 2000).

Kako je cilj ovog rada proizvodnja i karakterizacija  $\alpha$ -amilaza, u slijedećem potpoglavlju su opisane samo  $\alpha$ -amilaze.

### 2.2.1. $\alpha$ -amilaze

$\alpha$ -amilaze (EC 3.2.1.1.) pripadaju grupi endo-enzima koji kataliziraju hidrolizu  $\alpha$ -D-1,4-glikozidne veze u molekulama škroba i molekulama drugih polimera glukoze koji imaju najmanje tri glukozne podjedinice. U ovoj reakciji mogu nastati oligosaharidi s različitim stupnjem polimerizacije. Kao proizvodi hidrolize polimera amiloze najprije nastaju dekstrini, s relativno velikom molekulskom masom, koji se dalje hidroliziraju djelovanjem  $\alpha$ -amilaza do maltotrioze (G3) i maltoze (G2). Razgradnjom amiloze i dekstrina smanjuje se viskoznost suspenzije u kojoj je suspendiran škrob ili škrobna sirovina.  $\alpha$ -amilaze mogu dalje hidrolizirati  $\alpha$ -D-1,4-glikozidne veze u maltotriozi, koja je nastala hidrolizom dekstrina, i u ovoj reakciji nastaje maltoza (G2) i glukoza (G1). Brzina reakcije hidrolize polimera, dekstrina i trioza, smanjuje se sa smanjenjem stupnja polimerizacije supstrata (Synowiecki, 2007). Budući da  $\alpha$ -amilaze ne kataliziraju hidrolizu  $\alpha$ -D-1,6-glikozidnih veza, osim maltoze, hidrolizom amilopektina nastaju i tzv. granični dekstrini. Ovi produkti hidrolize su zapravo kraći razgranati polimeri koji imaju glukozne podjedinice povezane  $\alpha$ -D-1,4- i  $\alpha$ -D-1,6-vezom. Svi proizvodi koji nastaju tijekom hidrolize  $\alpha$ -glukoznih polimera  $\alpha$ -amilazama zadržavaju  $\alpha$ -konfiguraciju.

Iako većina  $\alpha$ -amilaza pokazuje optimalnu aktivnost pri temperaturama u rasponu od 30°C do 37°C i pri pH vrijednostima u neutralnom području, izolirane su i  $\alpha$ -amilaze koje pokazuju aktivnost u jako kiselim (pH 3,0) ili lužnatim uvjetima (pH 10,0) i pri temperaturama višim od 100°C (Taniguchi i Honnda, 2009). Ovi enzimi se vrlo često primjenjuju u postupcima razgradnje škroba u industrijskoj proizvodnji različitih proizvoda. Mogu se izolirati iz stanica različitih mikroorganizama te iz biljnih i životinjskih stanica.

**EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. MATERIJAL

#### 3.1.1. Mikroorganizam

U ovom diplomskom radu kao radni mikroorganizam korištena je amilolitička bakterija mliječne kiseline (ABMK) *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> (ATCC 33620, NRRL B-4540). Ovaj bakterijski soj nabavljen je iz zbirke mikroorganizama Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Njemačka).

#### 3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge

##### 3.1.2.1. Kemikalije za pripremu hranjive MRS-mal<sub>20</sub> podloge za uzgoj bakterije i proizvodnju $\alpha$ -amilaze

**Tablica 1.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu hranjive MRS-mal<sub>20</sub> podloge za uzgoj bakterije i proizvodnju  $\alpha$ -amilaze.

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
diamonijev citrat	$\text{HOC}(\text{CO}_2\text{H})(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4)_2$	p.a.	Merck, Njemačka
dikalijev fosfat	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	tehnički	Biolife, Italija
kvašćev ekstrakt	-	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
magnezijev sulfat	$\text{MgSO}_4$	p.a.	Merck, Njemačka
maltoza monohidrat	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$	p.a.	Kemika, Hrvatska
manganov sulfat monohidrat	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	p.a.	Merck, Njemačka
mesni ekstrakt	-	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
natrijev acetat trihidrat	$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	p.a.	Merck, Njemačka

**Tablica 1.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu hranjive MRS-mal<sub>20</sub> podloge za uzgoj bakterije i proizvodnju  $\alpha$ -amilaze (nastavak).

pepton	-	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
polisorbat 80 (Tween 80 <sup>®</sup> )	C <sub>64</sub> H <sub>124</sub> O <sub>26</sub>	p.a.	Merck, Njemačka

### 3.1.2.2. Kemikalije za pripremu otopina za biospecifičnu (afinitetnu) kromatografiju

**Tablica 2.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu otopina za biospecifičnu (afinitetnu) kromatografiju.

kemikalije	kemijska formula	čistoća	proizvođač
etanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	ACS, (eng. American Chemical Society)	Carlo Erba Reagents, Italija
glukoza	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	p.a.	Kemika, Hrvatska
klorovodična kiselina	HCl	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev acetat	CH <sub>3</sub> COONa	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev klorid	NaCl	p.a.	Kemika, Hrvatska
octena kiselina	CH <sub>3</sub> COOH	p.a.	Kemika, Hrvatska
tris(hidroksimetil)aminometan (Tris)	(HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	p.a.	Kemika, Hrvatska
$\alpha$ -ciklodekstrin	C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>30</sub>	98 % (HPLC)	Sigma-Aldrich, SAD



**3.1.2.3. Kemikalije za pripremu otopina za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (eng. Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) i detekciju proteina u gelu**

**Tablica 3.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu otopina za SDS-PAGE i detekciju proteina u gelu.

kemikalije	kemijska formula	čistoća	proizvođač
boja brom-fenol plavo	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	za elektroforezu	Sigma-Aldrich, SAD
akrilamid	$CH_2=CHCONH_2$	$\geq 99\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich, SAD
amonijev persulfat (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	min. 99 %	SERVA, Njemačka
boja Coomassie Brilliant Blue R-250, za elektroforezu	$C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$	(udio boje oko 90%)	Sigma-Aldrich, SAD
etanol	$CH_3CH_2OH$	96 %	Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)	$(HO_2CCH_2)_2NCH_2CH_2N(CH_2CO_2H)_2$	p.a.	Kemika, Hrvatska
formaldehid	HCOH	p.a.	Kemika, Hrvatska
glicerol	$HOCH_2CH(OH)CH_2OH$	p.a.	Kemika, Hrvatska
glicin	$NH_2CH_2COOH$	p.a.	Kemika, Hrvatska
izopropanol	$(CH_3)_2CHOH$	p.a.	CLARO-PROM d.o.o., Hrvatska
klorovodična kiselina	HCl	p.a.	Kemika, Hrvatska
metanol	$CH_3OH$	p.a.	Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamin (TEMED)	$(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$	98 %	LKB Produkter AB, Bromma, Švedska
natrijev dodecilsulfat (SDS)	$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	$\geq 98.5\%$ (GC)	Sigma-Aldrich, SAD
natrijev karbonat	$Na_2CO_3$	p.a.	Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
natrijev tiosulfat pentahidrat	$Na_2S_2O_3 \cdot 5 H_2O$	p.a.	Kemika, Hrvatska

**Tablica 4.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu otopina za SDS-PAGE i detekciju proteina u gelu (nastavak).

kemikalije	kemijska formula	čistoća	proizvođač
obilježavači masa za denaturirajuću elektroforezu (niskomolekulski proteinski standard ili LMW standard)	-	-	Amersham, Biosciences, SAD
octena kiselina	CH <sub>3</sub> COOH	99 - 100 %	Kemika, Hrvatska
srebrov nitrat	AgNO <sub>3</sub>	p.a.	Kemika, Hrvatska
tris(hidroksimetil)aminometan (Tris)	(HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	p.a.	Kemika, Hrvatska
2-merkptoetanol	HSCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	za elektroforezu	Sigma-Aldrich, SAD

### 3.1.2.4. Kemikalije za pripremu otopina za tekućinsku kromatografije visoke djelotvornosti i određivanje koncentracije proteina

**Tablica 5.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu otopina za: tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti i određivanje koncentracije proteina.

kemikalije	kemijska formula	čistoća	proizvođač
činkov sulfat pentahidrat	ZnSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	p.a.	Merck, Njemačka
fosforna kiselina	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	p.a. za HPLC	Fluka, Njemačka
Bradford-ov reagens (kataloški broj B6916)	-	-	Sigma-Aldrich, Njemačka

### 3.1.2.5. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterijske kulture

ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> čuvana je i održavana u tekućim i na čvrstim hranjivim De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) (De Man i sur., 1960) podlogama, kako je to već prije opisano (Trontel i sur., 2010; Trontel i sur., 2011; Slavica i sur., 2015). Za uzgoj bakterijske kulture u Erlenmeyer tikvicama i u bioreaktoru s miješalom kao i indukciju sinteze amilaza korištena je MRS hranjiva podloga u kojoj je glukoza ( $\gamma_{S_0} = 20,0 \text{ g L}^{-1}$ ) zamijenjena disaharidom maltozom ( $\gamma_{S_0} = 20,0 \text{ g L}^{-1}$ ) (MRS-mal<sub>20</sub>) dok koncentracija preostalih sastojaka ove podloge nije mijenjana.

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### 3.1.3.1. Laboratorijski bioreaktor s miješalom

Uzgoj kulture *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi i indukcija sinteze  $\alpha$ -amilaze provedeni su u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Germany) (Slika 5.). Ovaj laboratorijski sustav sastoji se od nosača, reaktora i mjerno-kontrolne digitalne jedinice. Nosač sustava podupire reaktor, osjetilo za mjerenje i regulaciju temperature (Pt-100) kao i sustav za dovod (prstenasti raspršivač) i odvod zraka (ili drugih plinova). Ulazni i izlazni mebranski filteri za plin nalaze se na poklopcu reaktora. Tri se ulaza na poklopcu reaktora mogu koristiti za naciepljivanje hranjive podloge i dodavanje različitih otopina ili suspenzija. Reaktor ima maksimalni korisni volumen ( $V_K$ ) od 30 L, a izrađen je od nehrđajućeg čelika. Odnos visine i promjera ovog automatski *in situ* sterilizabilnog reaktora je 3:1. Sterilizaciju vodenom parom preko plašta moguće je provesti pri temperaturama od 100 do 130°C kroz vremenski period od najmanje jednu minutu. Mjerno-kontrolnom jedinicom može se regulirati: brzina okretaja miješala ( $n$ ), pH vrijednost hranjive podloge (pH elektroda), parcijalni tlak kisika u reaktoru (polarografska pO<sub>2</sub> elektroda, %), dovod drugog plina, razina hranjive podloge (kontaktna elektroda) te razina pjene u reaktoru (kontaktna elektroda). Miješalo se sastoji od tri turbine koje se mogu postaviti na različite udaljenosti od podnice reaktora. Svaka turbina ima po 6 ravnih lopatica, a promjer turbine iznosi 0,4 od

unutrašnjeg promjera reaktorske posude. Miješalo pokreće motor snage 900 W. Broj okretaja miješala može se podesiti u rasponu od 20 do 1500 min<sup>-1</sup>. Vrijednosti izmjerene tijekom bioprocasa mogu se spremati ili ispisati pomoću RS 422 sučelja. Bioreaktor ima izlaz za izuzimanje uzoraka koji se može sterilizirati parom, kao i *in situ* sterilizabilan izlaz za pražnjenje reaktora.



**Slika 5.** Laboratorijski bioreaktor s miješalom i mjerno-kontrolnom digitalnom jedinicom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Goettingen, Germany).

### 3.1.3.2. Centrifuge

Iz uzoraka izuzetih tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u bioreaktoru s miješalom supernatant je izdvojen centrifugiranjem u polipropilenskim kivetama od 50 mL i 500 mL (Nalgene, Nalge Nunc International, USA). Korištene su dvije centrifuge - jedna za manji

volumen uzoraka (3500 g, +4°C, 20 min; centrifuga Harrier 18/80; Sanyo, Warford, Velika Britanija) i druga za veći volumen uzoraka (6400 g, +4°C, 30 min; Beckman J-21B, Beckman Coulter, Krefeld, Njemačka).

Centrifuga HC-240 Tehtnica (tehtnica Železniki d.o.o., Železniki, Slovenija) korištena je za izdvajanje istaloženih proteina (9500 g, 15 min) iz supernatanta tijekom postupka pripreme supernatanta za analizu HPLC metodom (poglavlje 3.2.6.2.1.).

Pomoću centrifuge Thermo Scientific SL8R Centrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc., Roskilde, Danska) koncentrirani su supernatanti uzoraka, koji su na taj način pripremljeni za izdvajanje  $\alpha$ -amilaze biospecifičnom (afinitetnom) kromatografijom. Ovi su uzorci centrifugirani (6000 rpm, +4°C, 20 min) u polipropilenskim kivetama s membranom (Amicon® Ultra-15; Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, SAD). Pomoću ove membrane odijeljene su molekule s molekulskom masom većom od 10,000  $\pm$  5,000 Da (koncentrat) od molekula s molekulskom masom manjom od 10,000  $\pm$  5,000 Da (permeat) (eng. Molecular Weight Cut Off, MWCO, 10 kDa).

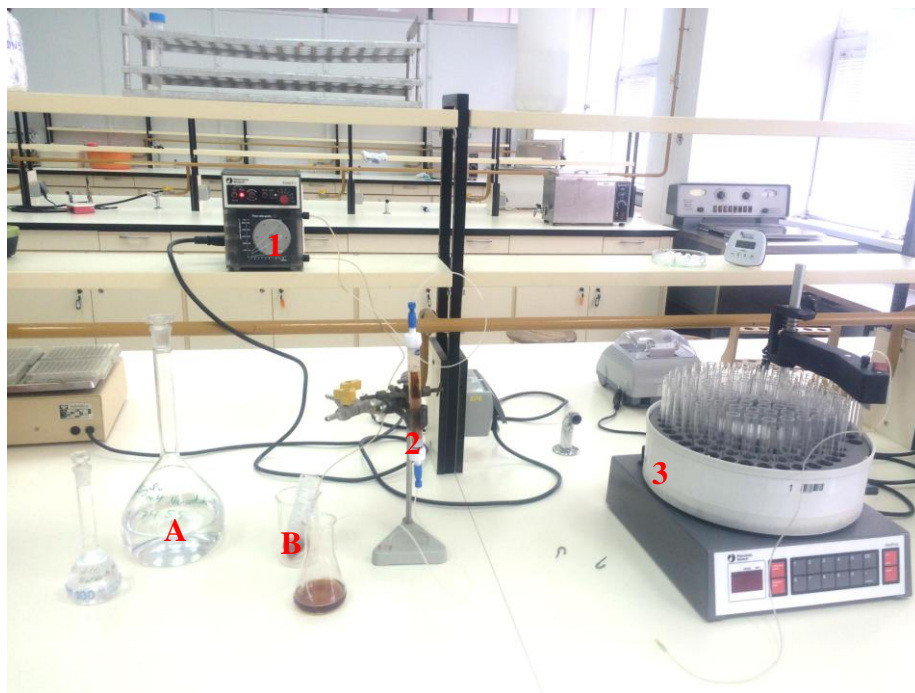
### **3.1.3.3. Spektrofotometri**

Optička gustoća uzoraka izdvojenih tijekom šaržnog uzgoja bakterije u laboratorijskom bioreaktoru i njihovih decimalnih razrjeđenja ( $10^{-1}$  i  $10^{-2}$ ) određena je pomoću spektrofotometra Cary 13E Varian (Varian, Mulgrave, Australija). Izuzete suspenzije su homogenizirane i prebačene u staklene kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka). Njihova optička gustoća određena je pri valnoj duljini ( $\lambda$ ) od 600 nm ( $A_{600}$ ).

Apsorbancija frakcija prikupljenih tijekom afinitetne kromatografije (poglavlje 3.2.4.2.), određena je pomoću spektrofotometra UviLine 9400 (SCHOTT Instruments, Mainz, Njemačka).

### 3.1.3.4. Sustav za biospecifičnu (afinitetnu) kromatografiju

Sustav se za biospecifičnu (afinitetnu) kromatografiju prikazan je na Slici 6.



**Slika 6.** Sustav za afinitetnu kromatografiju. Peristaltička pumpa (LKB Pump P-1; Pharmacia, Uppsala, Švedska) (1) za prepumpavanje pufera (A) i uzorka (B), cilindar s nastavcima (Omnifit<sup>®</sup> Column Kit, duljina cilindra 150 mm, unutarnji promjer cilindra 10 mm, ukupni volumen cilindra 9,5 mL; Sigma-Aldrich, Stockholm, Švedska) i aktiviranom sefarozum (Sephacrose<sup>®</sup> 6B; Sigma-Aldrich, Stockholm, Švedska) (2), sakupljač frakcija (RediFrac; Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska) (3).

### **3.1.3.5. Sustav za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)**

Sustav za SDS-PAGE sastoji se od izvora električne energije (Electrophoresis Power Supply EPS; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Švedska) i sustava za vertikalnu gel elektroforezu (SIGMA ALDRICH CVS10CBS omniPAGE mini dual; Sigma Aldrich, Milwaukee, SAD; Slika 7.). Priređeni uzorci i proteinski standardi za elektroforezu u denaturirajućim uvjetima (eng. Low Molecular Weight standard, LMW standard; Amersham Biosciences, Uppsala, Švedska) nanoseni su u jažice gela pomoću mikropipete volumena 15  $\mu$ L (Scientific Glass Engineering Pty Ltd., Melbourne, Australija).



**Slika 7.** Sustav za vertikalnu gel elektroforezu SIGMA ALDRICH CVS10CBS omniPAGE mini dual (Sigma Aldrich, Milwaukee, SAD)

### **3.1.3.6. Oprema za filtraciju pokretne faze za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti i ultrazvučna kupelj**

Kao pokretna faza za analizu uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) korištena je otopina  $H_3PO_4$  (0,1 % vol/vol). Pripravljena otopina je profiltrirana kroz najlonski filter (0,22  $\mu m$ , 47 mm; Magna, GE Water & Process Technologies, Trevose, SAD) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, New York, SAD) i nakon toga degazirana u ultrazvučnoj kupelji USC300T (VWR International, Leuven, Belgija) kroz 20 minuta.

### **3.1.3.7. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti**

Koncentracija supstrata - maltoze i produkta - mliječne kiseline u supernatantima izuzetih uzoraka određena je pomoću kromatografa Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu; Kyoto, Japan) (Slika 8.).





**Slika 8.** Kromatograf Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu; Kyoto, Japan). 1 - boca za pokretnu fazu; 2 - otplinjač; 3 - podjedinica za formiranje gradijenta; 4 - pumpa; 5 - auto-injektor; 6 - pećnica s predkolonom i kolonom; 7- detektor.

### 3.1.3.8. Ostala oprema

- analitička vaga Shimadzu (Shimatzu, Kyoto, Japan);
- tehnička vaga Tehtnica (Železniki d.o.o., Železniki, Slovenija);
- autoklav Sutjeska;
- mikser EV-100, Tehtnica (Železniki d.o.o., Železniki, Slovenija);
- sušionik Instrumentarija ST-50 (Instrumentarija, Zagreb, Hrvatska);
- bakteriološki elektronski termostad BTE-S (Termomedicinski aparati, Zagreb, Hrvatska);
- staklena sisaljka na vodeni mlaz s gumenim vakuum crijevom (Hospitalija; Zagreb,

Hrvatska);

- osobno računalo s operativnim sustavom MS Windows Vista Professional i programskim paketom MS Office 2010.

## **3.2. METODE RADA**

### **3.2.1. Priprava hranjivih podloga**

Tekuće i čvrste hranjive MRS podloge (Trontel i sur., 2010; Trontel i sur., 2011; Slavica i sur., 2015) korištene su za čuvanje, održavanje i uzgoj bakterijske kulture *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u staklenim epruvetama. MRS-mal<sub>20</sub> podloga korištena je za uzgoj bakterije u Erlenmeyer tikvicama ( $V_K = 400$  mL;  $V = 500$  mL) i u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom. MRS-mal<sub>20</sub> podloga pripravljena je tako što su svi sastojci (poglavlje 3.1.2.1., Tablica 1.), osim polisorbata 80, odvagani i otopljeni u demineraliziranoj vodi. Podloga sa otopljenim sastojcima je zatim zagrijana te je uz miješanje dodan odgovarajući volumen polisorbata 80 (Tween 80<sup>®</sup>; Merck, Darmstadt, Njemačka). Ovako pripravljena hranjiva MRS-mal<sub>20</sub> podloga sterilizirana je u Erlenmeyer tikvici u autoklavu pri 121°C tijekom 20 minuta ili u bioreaktoru pri 121°C kroz najmanje 20 minuta.

### **3.2.2. Priprava cjepiva za uzgoj bakterije u tikvici i laboratorijskom bioreaktoru s miješalom**

Kultura bakterije *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> (0,1 mL suspenzije) nacijepljena je iz tekuće MRS-mal<sub>20</sub> podloge u po dvije staklene epruvete s 10 mL ove podloge. Uzgoj je proveden pri 40°C preko noći. S ovako uzgojenom kulturom (8 mL) nacijepljena je MRS-mal<sub>20</sub> podloga (400 mL) u Erlenmeyer tikvici (500 mL) koja je zatim inkubirana bez stresanja pri 40°C preko noći. Nakon uzgoja u MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u Erlenmeyer tikvici (400 mL), oko 250 mL (2,5 %  $V_K$  vol/vol) bakterijske suspenzije prepumpano je pomoću peristaltičke pumpe (CH-8604; Chemap

AG, Mannedorf, Švicarska) u laboratorijski bioreaktor sa sterilnom i ohlađenom ( $\approx 40^{\circ}\text{C}$ ) MRS-mal<sub>20</sub> podlogom ( $V_K = 6,0\text{ L}$ ).

### 3.2.3. Uzgoj bakterije i indukcija sinteze $\alpha$ -amilaze u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom

Za šaržni uzgoj bakterije *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Goettingen, Germany) korištena je hranjiva MRS-mal<sub>20</sub> podloga ( $V_K = 6,0\text{ L}$ ). Nakon sterilizacije vodenom parom ( $121^{\circ}\text{C}/20\text{ min}$  uz miješanje,  $n = 400\text{ min}^{-1}$ ) i nakon hlađenja (do  $\approx 40^{\circ}\text{C}$ ), sterilna hranjiva podloga je nacijepljena s 2,5 % (vol/vol) prekonoćne bakterijske kulture (250 mL) s pomoću peristaltičke pumpe (CH-8604; Chemap AG, Mannedorf, Švicarska). Tijekom uzgoja hranjiva podloga nije aerirana, a njezina homogenost je održavana miješanjem ( $n = 400\text{ min}^{-1}$ ). Temperatura hranjive podloge automatski je regulirana i održavana pri  $40\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ . Početna pH vrijednost hranjive podloge bila je  $6,2\pm 0,2$ . Kada se pH vrijednost podloge, zbog proizvodnje mliječne kiseline, smanjila do  $5,5\pm 0,2$ , započelo je automatsko doziranje otopine NaOH ( $c = 5,0\text{ mol L}^{-1}$ ). Na ovaj se je način pH vrijednost podloge tijekom uzgoja u bioreaktoru održavala pri vrijednosti  $5,5\pm 0,2$ . Tijekom prvih 8,0 sati uzgoja šaržnim postupkom uzorci su izuzimani svaki sat, a nakon toga, u većim vremenskim razmacima. Dinamika bioprocesa praćena je mjerenjem optičke gustoće ( $A_{600}$ ) izuzetih uzoraka, a uzgoj je zaustavljen kada je na temelju  $A_{600}$  vrijednosti utvrđeno da je rast bakterije dosegao stacionarnu fazu rasta. Nakon  $t = 6,0$  i  $24,0\text{ h}$  uzgoja izuzeto je, redom, oko 1,0 L i 4,0 L bakterijske suspenzije. Centrifugiranjem ovih uzoraka izdvojen je supernatant i spremljen pri  $-20^{\circ}\text{C}$  za izdvajanje amilaza afinitetnom kromatografijom.

### **3.2.4. Izdvajanje $\alpha$ -amilaze**

#### **3.2.4.1. Priprema uzoraka za izdvajanje $\alpha$ -amilaze**

Supernatant je prebačen u polipropilenske kivete s membranom (MWCO 10±5 kDa) (Amicon<sup>®</sup> Ultra-15; Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, SAD, SAD) i centrifugiranjem koncentriran (centrifuga Thermo Scientific SL8R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., Roskilde, Danska), kako je to opisano u poglavlju 3.1.3.2. U koncentratu i permeatu određena je koncentracija proteina metodom po Bradford-ici (poglavlje 3.2.6.3). Koncentrat je korišten za izdvajanje  $\alpha$ -amilaze afinitetnom kromatografijom, a jedan dio je čuvan za analizu SDS-PAGE metodom (poglavlje 3.2.5.).

#### **3.2.4.2. Biospecifična (afinitetna) kromatografija**

##### Princip

Biospecifična (afinitetna) kromatografija je metoda pomoću koje je moguće izdvojiti jedan ili više proteina iz smjese ukoliko se ovi proteini mogu (reverzibilno) vezati na specifični ligand. Pod pojmom ligand ovdje se podrazumijeva specifična molekula koja je kovalentno vezana na adsorpcijski matriks kroz koji se propušta smjesa proteina. Adsorpcijski matriks je inertan i porozan nosač tj. nepokretna kromatografska faza specifične kemijske strukture na koju se kovalentno veže određeni ligand (Cuatrecasas i sur., 1986). U većini slučajeva ligand se ne veže direktno na adsorpcijski matriks, već se matriks najprije kemijski modificira. Kemijska modifikacija matriksa podrazumijeva aktivaciju matriksa i to dodavanjem određenog hidrofilnog spoja tzv. razmaknice (Vretblad, 1974). Tijekom propuštanja smjese proteina kroz cilindar, koji je napunjen određenim volumenom aktiviranog adsorpcijskog matriksa sa razmaknicom i odgovarajućim ligandom, dolazi do specifičnog vezivanja određenih proteina na ligand. Ovi proteini imaju visoki afinitet za vezanje na ligand, vežu se i “ostaju” u koloni, dok preostali proteini iz smjese prolaze kroz matriks i “izlaze” iz kolone otopljeni u puferu. Elucija vezanih proteina odvija se ukoliko se promijene uvjeti u kojima je došlo do vezanja proteina na ligand u

koloni. Promjena uvjeta podrazumijeva promjenu: pH vrijednosti otopine tj. pufera, ionske jakosti pufera za eluiranje proteina ili polarnosti ovog pufera. Vezani protein može se eluirati i ukoliko se kroz kolonu propušta pufer u kojem je otopljen konkurentni spoj - molekula koja ima veći afinitet za vezanje na ligand od prije vezanog proteina. Eluirani protein obično zadržava svoju aktivnost.

U ovom je radu kao adsorpcijski matriks korišten specifično umreženi (eng. cross-linked) polimer agarosa, komercijalnog naziva Sepharose® 6B (Sigma-Aldrich, Uppsala, Švedska). Agarosa je linearni polisaharid kojeg sačinjavaju naizmjenično povezane podjedinice D-galaktoze i 3,6-anhidro-L-galaktoze. Specifično umrežena agarosa, kod koje polisaharidi nemaju naboj, naziva se sefaroza. U ovom radu korištena je epoksi aktivirana sefaroza (Vretblad, 1974). Epoksi aktivirana sefaroza je specifičan adsorpcijski matriks koji je kemijski modificiran vezanjem razmaknice - hidrofilnog spoja 1,4-bis(2,3-epoksi-propoksi)-butana. Kao ligand korišten je  $\alpha$ -ciklodekstrin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka). Ciklodekstrini (CD), posebice  $\alpha$ - i  $\beta$ -CD imaju visoki afinitet za vezanje s amilazama i mogu biti kompetitivni inhibitori ovih enzima (Hamilton i sur., 2000). Ovi se spojevi često koriste kao ligandi za izdvajanje amilaza afinitetnom kromatografijom.

## Postupak

Postupak izdvajanja amilaza afinitetnom kromatografijom proveden je kroz nekoliko koraka, kako slijedi: (1) priprema i aktivacija matriksa - epoksi-aktivirane sefaroze, (2) priprema uzorka - supernatanta uzoraka izuzetih nakon  $t = 6,0$  h i  $24,0$  h uzgoja bakterije u MRS-mal<sub>20</sub> hranjivoj podlozi u bioreaktoru, za izdvajanje amilaza afinitetnom kromatografijom, (3) izdvajanje amilaza iz priređenog uzorka afinitetnom kromatografijom i (4) regeneracija matriksa.

### **(1) Priprema i aktivacija epoksi-aktivirane sefaroze**

Na analitičkoj vagi (Shimadzu; Kyoto, Japan) odvagano je 2,5 g liofilizirane epoksi-aktivirane sefaroze (Sepharose® 6B; Sigma-Aldrich, Uppsala, Švedska), koja je zatim prebačena u lijevak sa staklenim sinter filterom (veličina pora 40-100  $\mu\text{m}$ ; Boral, Pula, Hrvatska), gdje je ispirana demineraliziranom vodom tijekom jednog sata. Ukupni volumen demineralizirane vode koja je postupno dodavana u filter iznosio je 500 mL. Ispiranjem epoksi-aktivirane sefaroze

demineraliziranom vodom uklonjeni su nepoželjni sastojci npr. aditivi (laktoza i dekstran) i krioprotektor, koji je dodan prije liofilizacije sefaroze. Preporuka je da se 1 g liofilizata ispere s oko 200 mL demineralizirane vode. Tijekom ispiranja praškasta epoksi-aktivirana sefaroza veže dio vode i bubri, tako da se iz 1,0 g praškaste sefaroze može dobiti oko 3,5 mL matriksa u gel obliku (Anonymous 2, 2011). Nakon toga, dobiveni gel ispiran je puferom za vezanje liganda tj. otopinom NaOH ( $c = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 13,0) uz lagano miješanje. Višak otopine uklonjen je pomoću staklene sisaljke na vodeni mlaz s gumenim vakuum crijevom (Hospitalija; Zagreb, Hrvatska). Nakon toga, gel je iz lijevka prebačen u Erlenmeyer tikvicu (25,0 mL) u koju je prethodno dodana otopina  $\alpha$ -ciklodekstrina ( $\alpha$ -CD) ( $\gamma = 25,0 \text{ g L}^{-1}$ ) u otopini NaOH (300,0 mg  $\alpha$ -CD otopljeno je u 12,0 mL  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH). Dobivena suspenzija je lagano miješana na laboratorijskoj mješalici (CERTOMAT<sup>®</sup> RM; B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Melsungen, Njemačka) tijekom 16,0 sati pri 45°C. Nakon inkubacije, suspenzija je prebačena iz Erlenmeyer tikvice u lijevak sa staklenim sinter filterom, gdje je višak  $\alpha$ -CD, koji se nije vezao na epoksi-aktiviranu sefarozu, ispran uz dodatak demineralizirane vode ( $V = 450,0 \text{ mL}$ ) tijekom 30,0 minuta. Aktivne grupe  $\alpha$ -CD, koji se vezao na epoksi-aktiviranu sefarozu, blokirane su tako što je suspenziji postupno dodavana otopina glukoze ( $\gamma = 25,0 \text{ g L}^{-1}$ ,  $V = 370,0 \text{ mL}$ ) i to kroz slijedećih 30 minuta. Nakon toga, epoksi-aktivirana sefaroza s vezanim i blokiranim ligandom  $\alpha$ -CD ispirana je najprije demineraliziranom vodom ( $V = 500,0 \text{ mL}$ ) kroz 30,0 minuta, a onda  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  natrij-acetatnim puferom, pH 5,5. Ovaj pufer je prethodno pripremljen tako da je u 6,545 mL  $1 \text{ mol L}^{-1}$  octene kiseline u odmjernoj tikvici od 1 L dodano 43,45 mL  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  natrijevog acetata. Tikvica je nadopunjena do oznake demineraliziranom vodom. Dobivena je suspenzija aktivirane sefaroze s  $\alpha$ -CD ligandom (~6 mL) u kojoj je odnos volumena epoksi-aktiviranog sefaroznog gela s ligandom ( $\alpha$ -CD) i volumena natrij-acetatnog pufera ( $c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 5,5) bio 3:1. Dobiveni gel prebačen je u stakleni cilindar (Omnifit<sup>®</sup> Column Kit; Sigma-Aldrich, Milwaukee, SAD) pomoću staklenog štapića. Kolona je dopunjena natrij-acetatnim puferom ( $c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 5,5) do vrha i pripojena na crijevo peristaltičke pumpe (Pharmacia LKB Pump P-1, Uppsala, Švedska). Kroz ovako priređeni kromatografski sustav najprije je propušten natrij-acetatni pufer ( $c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 5,5) ( $V = 30,0 \text{ mL}$ ) pomoću pumpe uz konstantan protok ( $F = 0,7 \text{ mL min}^{-1}$ ). Nakon toga, propušten je koncentrat supernatanta pripremljen za afinitetnu kromatografiju, kako je to opisano ovdje ispod.

## (2) Priprema uzorka za izdvajanje $\alpha$ -amilaze afinitetnom kromatografijom

Supernatant, koji je dobiven koncentriranjem uzoraka izuzetih nakon  $t = 6,0$  h i 24,0 h uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u laboratorijskom biorekatoru s miješalom, korišten je za izdvajanje  $\alpha$ -amilaze afinitetnom kromatografijom.

## (3) Afinitetna kromatografija

U odjeljku (1) ovog poglavlja već su opisani postupak pripreme i aktivacije matriksa te postupak pripreme sustava za afinitetnu kromatografiju. Kroz kolonu je protocima ( $F$ ) od 0,6 mL min<sup>-1</sup> (postupak 3) i 0,7 mL min<sup>-1</sup> (postupak 1 i postupak 2) najprije prepumpano 30 mL natrij-acetatnog pufera ( $c = 50$  mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5), a nakon toga su uz iste protoke propušteni priređeni uzorci. Provedena su tri postupka izdvajanja amilaza iz priređenih uzoraka: postupak 1,  $V = 3,0$  ml,  $F = 0,7$  ml min<sup>-1</sup>,  $\gamma_{\text{prot}} \approx 0,1$  mg ml<sup>-1</sup>; postupak 2,  $V = 30,0$  ml,  $F = 0,7$  ml min<sup>-1</sup>,  $\gamma_{\text{prot}} = 0,84$  mg ml<sup>-1</sup>; postupak 3,  $V = 30,0$  ml,  $F = 0,6$  ml min<sup>-1</sup>,  $\gamma_{\text{prot}} = 2,52$  mg ml<sup>-1</sup>. U postupku 1 uzorak je propuštan kroz kolonu tijekom 58 minuta, u postupku 2 uzorak je propuštan kroz kolonu tijekom 100 minuta, dok je u postupku 3 uzorak propuštan kroz kolonu 115 minuta. Nakon toga, kroz kolonu je propušten natrij-acetani pufer ( $c = 50$  mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5;  $V = 50,0$  mL), kako bi se isprali svi nevezani spojevi. Elucija amilaza provedena je dodavanjem otopine konkurentnog liganda - otopine  $\alpha$ -CD ( $\gamma = 10,0$  g L<sup>-1</sup>) u natrij-acetatnom puferu ( $c = 50$  mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5). Ova je otopina propušтана kroz kolonu uz protoke ( $F$ ) jednake kao i kod nanošenja uzoraka. Otopina eluirana s kolone prikupljena je pomoću sakupljača fracija (RediFrac; Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska). Volumen fracija bio je 0,7 mL. Svakoj fraciji određena je koncentracija proteina mjerenjem apsorbancije pri 280 nm ( $A_{280}$ ), izrađen je graf s kromatografskim profilima za sva tri postupka izdvajanja (Slika 13., Slika 14. i Slika 15. u poglavlju Rezultati) i na temelju ovih grafova određene fracije su spojene u zajedničku otopinu.

## (4) Regeneracija matriksa

Nakon afinitetne kromatografije, gel iz cilindra prebačen je u lijevak sa staklenim sinter filterom (Boral; Pula, Hrvatska) te je ispran demineraliziranom vodom, kako je već prije opisano

u ovom poglavlju u odjeljku (1). Nakon toga, gel je ispran 20 %-tnom (vol/vol) otopinom etanola i potom ponovno demineraliziranom vodom ( $V = 200,0$  mL) tijekom 15 minuta. Ispiranjem demineraliziranom vodom uklonjeni su proteini i drugi spojevi koji su se još uvijek nalazili u gelu. Nakon toga, uklonjen je vezani ligand -  $\alpha$ -CD tj. oslobođene su epoksi-grupe aktivirane sefaroze.  $\alpha$ -CD je uklonjen ispiranjem gela Tris-HCl puferom ( $c = 0,1$  mol L<sup>-1</sup>; pH 8,5) u koji je dodan NaCl (29,22 g NaCl otopljeno je u 1,0 L TRIS-HCl pufera). Ovaj je pufer ( $V = 150,0$  mL) dodavan gelu u nekoliko obroka. Nakon toga, gel je ispran natrij-acetatnim puferom ( $c = 0,1$  mol L<sup>-1</sup>, pH 4,3) u koji je dodan NaCl (14,61 g NaCl otopljeno je u 500 mL natrij-acetatnog pufera). Opisani postupak ispiranja gela, naizmjenično Tris-HCl puferom ( $c = 0,1$  mol L<sup>-1</sup>, pH 8,5) i natrij-acetatnim puferom ( $c = 0,1$  mol L<sup>-1</sup>, pH 4,3), ponavljan je tri puta, tako da je trajanje svakog pojedinačnog ispiranja iznosilo oko 15 minuta. Nakon toga, gel je ispran dodavanjem natrij-acetatnog pufera ( $c = 50$  mol L<sup>-1</sup>, pH 5,5) u nekoliko navrata (po  $V = 50,0$  mL) u ukupnom trajanju od 15 minuta. Nadalje, priprema i aktivacija matriksa - epoksi aktivirane sefaroze za kromatografsko izdvajanje proteina, koja započinje ispiranjem gela otopinom NaOH ( $c = 0,1$  mol L<sup>-1</sup>, pH 13,0), provodi se prema prije opisanom postupku [ovo poglavlje, odjeljak (1)].

### **3.2.5. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)**

Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE) je metoda pomoću koje se u električnom polju mogu razdvojiti proteini s različitom molekulskom masom. Prije elektroforeze, otopini proteina dodaje se anionski detergent natrijev dodecilsulfat (SDS) i u ovoj smjesi nativni proteini se denaturiraju i dobivaju negativan naboj. SDS se veže na proteine u omjeru 1,4 g SDS : 1 g proteina. Nastali protein-SDS kompleks ima negativan naboj, a količina naboja je proporcionalna molekulskoj masi proteina. Gustoća naboja u kompleksu protein-SDS jednaka je za sve proteine iz uzorka i ovi se proteini - molekule s nabojem pokreću prema pozitivnoj elektrodi u električnom polju određenog napona. Brzina kretanja SDS-om denaturiranih proteina zavisi o njihovoj molekulskoj masi (Laemmli, 1970). Različiti proteini koji su razdvojeni u električnom polju na temelju opisanog principa nisu obojeni, pa su prema tome nevidljivi prostim okom. Zbog toga se elektroforetski razdvojeni



proteini bojaju tj. vizualiziraju kako bi se mogli detektirati, odnosno odrediti molekulska masa denaturiranog proteina. Proteini u gelu bojaju se aromatskim aminosulfonskim bojama ili pomoću srebra, što ovisi o koncentraciji proteina u uzorcima nanesenim u jažice poliakrilamidnog gela. Nakon vizualizacije, određuju se molekulska masa razdvojenih proteina. Zbog toga se u gelu, osim proteina iz uzoraka, razdvaja i smjesa proteina poznatih molekulskih masa (smjesa kalibracijskih proteinskih standarda). Omjer udaljenosti koju tijekom elektroforeze u gelu prijeđe pojedini protein i udaljenosti koju postigne određena boja u definiranim uvjetima električnog polja, naziva se referentna vrijednosti ( $R_f$ ).  $R_f$  dobivene za proteine poznate molekulske mase prikazuju se u ovisnosti o logaritamskim vrijednostima pripadajućih molekulskih masa ( $\log M_r$ ) i tako se dobije baždarni pravac iz kojeg se mogu očitati vrijednosti za  $\log M_r$  za proteine s nepoznatom molekulskom masom.

U ovom radu kao standard korišteni su obilježavači masa za denaturirajuću elektroforezu (Low Molecular Weight standard, LMW standard; Amersham Biosciences, Uppsala, Švedska). Ovaj LMW standard sastoji se od šest proteina: (1)  $\alpha$ -laktalbumina (14 400 Da), (2) inhibitora tripsina (20 100 Da), (3) anhidraze (30 000 Da), (4) ovalbumina (43 000 Da), (5) albumina (67 000 Da) i (6) fosforilaze b (94000 Da).

## Postupak

Razdvajanje proteina iz smjese elektroforetskom metodom provedeno je u nekoliko koraka, kako slijedi: (1) priprava gela za SDS-PAGE, (2) priprava uzoraka za elektroforezu, (3) elektroforetsko razdvajanje proteina (SDS-PAGE), (4) vizualizacija razdvojenih proteina i određivanje molekulske mase amilaza.

### **(1) Priprava gela za SDS-PAGE**

Poliakrilamidni gel za SDS-PAGE sastoji se od donjeg gela ili gela za razdvajanje (eng. separating gel) i gornjeg gela ili gela za sabijanje (eng. stacking gel). Najprije je pripravljen 10 %-tni gel za razdvajanje, čiji je sastav naveden u Tablici 6. Sve otopine dodane su u staklenu čašu i dobro promiješane, nakon čega je dobivena smjesa izlivena u kalup za pripravu gela (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri SAD). Na izliveni gel za razdvajanje dodan je sloj izopropanola kako bi se onemogućio pristup zraku, koji bi spriječio polimerizaciju ovog gela.

Polimerizacija gela za razdvajanje odvijala se na sobnoj temperaturi kroz 40 minuta. Nakon toga, uklonjen je izopropanol te je na donji gel u kalupu za pripremu gela dodan gel za sabijanje. Gel za sabijanje ili gornji gel pripremljen je miješanjem određenih volumena otopina, kako je navedeno u Tablici 6. U gel za sabijanje umetnut je češljic za formiranje jažica, od kojih je svaka imala volumen od 25  $\mu\text{L}$ . Polimerizacija gela za sabijanje trajala je 20 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga, iz gornjeg gela je izvučen češljic za formiranje jažica.

**Tablica 6.** Kemijski sastav 10%-tnog gela za razdvajanje i 4,5%-tnog gela za sabijanje.

	10 %-tni gel za razdvajanje	4,5 %-tni gel za sabijanje
Tris-HCl puffer (1,13 mol L <sup>-1</sup> , pH 8,8)	2,5 mL	-
Tris-HCl puffer (0,14 mol L <sup>-1</sup> , pH 6,8)	-	2,13 mL
otopina akrilamida (30%)	3 mL	0,3 mL
TEMED	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
otopina APS-a (10%)	38 $\mu\text{L}$	22,5 $\mu\text{L}$
demineralizirana H <sub>2</sub> O	2 mL	-

## (2) Priprava uzoraka za elektroforezu

U ovom radu kao pufer za uzorke za SDS-PAGE pripremljen je 0,25 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl puffer, pH 6,8 (pufer 1 za SDS-PAGE). Sastav ovog pufera dan je u Tablici 7. SDS je anionski detergent koji se veže na proteine i denaturira ih. U sastavu pufera 1 za SDS-PAGE je i glicerol, koji zbog svoje guste konzistencije do početka elektroforeze održava proteine u jažicama poliakrilamidnog gela. Boja brom-fenol plavo se koristi kao marker za praćenje kretanja proteina tijekom elektroforeze. Naime, ova mala molekula pri pH vrijednostima većim od 4,6 ima negativan naboj i u električnom polju putuje prema anodi. U sastavu ovog pufera je i 2-merkaptetanol koji je reducirajući spoj i u njegovoj prisutnosti dolazi do cijepanja disulfidnih veza. Na ovaj se način lineariziraju proteini i spriječava se formiranje njihovih agregata.

Kao pufer za SDS-PAGE korišten je 0,25 mol L<sup>-1</sup> Tris-glicin puffer, pH 8,3 (pufer 2 za SDS-PAGE). Sastav koncentrirane otopine, iz koje se razrjeđivanjem s demineraliziranom vodom pripremlja pufer 2 za SDS-PAGE, dan je u Tablici 7. Ovaj puferski sustav koristi se radi

moćnosti koncentriranja proteina u jažici u vrlo usku startnu zonu, zbog čega dolazi do boljeg razdvajanja proteina iz jednog uzorka u zasebne vrpce (Garfin, 2003). Naime, pri pH vrijednosti od 6,8 (pH vrijednost pufera 1 za SDS-PAGE i Tris-HCl pufera koji je dio gela za sabijanje) glicin (iz pufera 2 za SDS-PAGE) je slabo ioniziran, zbog čega ima relativno malu pokretljivost u električnom polju. Klor iz Tris-HCl pufera je pri ovoj pH vrijednosti potpuno ioniziran i puno veće je pokretljivosti od glicina. Pri pH 6,8 pokretljivost proteina u električnom polju je veća od glicina i manja od iona klora. Tijekom elektroforeze između iona koji brzo putuju (Cl<sup>-</sup>) i iona koji sporo putuju (glicin) nalaze se ioni srednje pokretljivosti - proteini. Pri prelasku molekula iz gela za sabijanje u gel za razdvajanje, koji ima pH vrijednost 8,8, glicin potpuno disocira i njegova pokretljivost doseže pokretljivost iona klora, zbog čega na granici između dva gela dolazi do dodatnog sabijanja proteina u usku startnu zonu. Smanjenje veličine pora u gelu za razdvajanje dovodi do razdvajanja proteinskih vrpca, što zavisi isključivo o njihovoj molekularnoj masi.

**Tablica 7.** Sastav pufera za uzorke za SDS-PAGE (pufer 1 za SDS-PAGE) i koncentrirane otopine (10x) za pripravu Tris-glicin pufera za SDS-PAGE (pufer 2 za SDS-PAGE).

	pufer 1	koncentrirana otopina za pripravu pufera 2	
Tris	0,78 g	Tris	30 g
EDTA	0,0095 g	glicin	144 g
SDS	2,5 g	SDS	10 g
glicerol	10 mL	demineralizirana H <sub>2</sub> O	do 1000 mL
brom-fenol plavo	0,005 %		
2-merkaptoetanol	6,25 mL		
demineralizirana H <sub>2</sub> O	do 25 mL		
HCl	za podešavanje pH		

U po 20 µL svakog uzorka dodano je po 5 µL pufera 1 za SDS-PAGE (Tablica 7.), nakon čega je pripravljena smjesa ostavljena na sobnoj temperaturi kroz 20 minuta. Uzorak sa

proteinskim standardom pripremljen je otapanjem 575 ng liofiliziranog praha ovog LMW standarda u 0,2 mL pufera 1 za SDS-PAGE. Pomoću mikropipete priređeni uzorci (25  $\mu$ L) prenešeni su, svaki zasebno, u po jednu jažicu gela. Volumen otopine proteinskog standarda u jažici bio je 1  $\mu$ L.

### **(3) SDS-PAGE**

Pripremljeni poliakrilamidni gel za SDS-PAGE, koji se nalazio u kalupu za pripremu gela, postavljen je u sustav za SDS-PAGE (Slika 7.; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), pričvršćen je pomoću štipaljki te je samo u donjem dijelu bio uronjen u pufer 2 za SDS-PAGE. Dio prostora iznad jažica također je ispunjen puferom 2 za SDS-PAGE. Pufer 2 za SDS-PAGE pripremljen je razrjeđivanjem 25 mL koncentrirane otopine za pripremu ovog pufera (Tablica 7.) dodatkom 225 mL demineralizirane vode. Zatim su priređeni uzorci i LMW standard dodani u jažice gela. Aparatura je priključena na izvor električne energije (Electrophoresis Power Supply EPS; Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Uppsala, Švedska). Proces razdjeljivanja proteina u poliakrilamidnom gelu u električnom polju proveden je pri naponu od 180 V i to tijekom 45 minuta. Nakon toga, sustav za SDS-PAGE odspojen je od izvora električne energije i sustava za hlađenje. Gel je pažljivo izvađen iz sustava za SDS-PAGE i iz kalupa u kojem je pripremljen i u kojem se nalazio tijekom elektroforeze. Nakon toga, razdvojene vrpce proteina vizualizirane su bojanjem gela.

### **(4) Vizualizacija razdvojenih proteina i određivanje molekulske mase amilaza**

Prvi gel najprije je obojan otopinom aromatske aminosulfonske boje (Coomassie Brilliant Blue R-250, CBB; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). Nakon ovog bojanja vrpce proteina nisu bile dovoljno vidljive, pa je naknadno obojan i pomoću srebra. Drugi gel je bojan samo pomoću srebra. Nakon bojanja srebrom određene su molekulske mase ( $M_r$ ) izdvojenih proteina. U poglavlju Rezultati prikazana je slika gela obojenog pomoću srebra (Slika 16.).

#### **(4.1.) Bojanje gela otopinom aromatske aminosulfonske CBB boje**

Otopina boje dobivena je otapanjem 0,1 g praha komercijalne Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) boje u 100 mL otopine koja je prethodno priređena iz: 50 mL metanola (99 % vol/vol), 7,0 mL octene kiseline (99,8 % vol/vol) i 43,0 mL demineralizirane vode. Poliakrilamidni gel je nakon elektroforeze pažljivo prebačen u posudu sa otopinom CBB boje u kojoj je ostavljen kroz 45 min. Nakon toga, gel je prebačen u staklenu čašu sa 50,0 mL 7 %-tne (vol/vol) octene kiseline i postupno je zagrijavan. Otopina octene kiseline je u nekoliko navrata odlijevana iz čaše s gelom i zamijenjena svježom otopinom, sve dok nije postignuto zadovoljavajuće obezbojenje gela.

#### **(4.2.) Bojanje gela pomoću srebra**

Prije bojanja gela pomoću srebra, fiksirani su proteini u gelu. Otopina za fiksiranje pripravljena je miješanjem 19,0 mL demineralizirane vode, 25,0 mL 50 %-tnog (vol/vol) metanola, 6,0 mL 12 %-tne (vol/vol) octene kiseline i 25  $\mu$ L 37 %-tnog (vol/vol) formaldehida. Fiksiranje proteina u gelu provedeno je tijekom jednog sata uz lagano miješanje.

Nakon fiksiranja proteina u gelu, gel je tri puta ispran u 50 %-tnoj (vol/vol) otopini etanola ( $V = 50$  mL) kroz 20 minuta. Na ovaj su se način uklonili tragovi TRIS-a, SDS-a i glicina, spojeva koji ulaze u sastav pufera 2 za SDS-PAGE (Tablica 7.). Ovi spojevi su uklonjeni jer tijekom bojenja mogu vezati ione srebra i na ovaj način se može pojačati tzv. pozadinsko bojanje.

Otopina za predtretman gela pripravljena je otapanjem 0,01 g natrijevog tiosulfata pentahidrata u 50,0 mL demineralizirane vode. 1,0 mL ove otopine sačuvan je za pripravu otopine za vizualiziranje proteinskih vrpca na gelu. Predtretmanom gela povećava se osjetljivost bojanja jer se ubrzava redukcija srebra koje se veže na proteine. Gel je ostavljen u otopini natrijevog tiosulfata pentahidrata kroz jednu minutu te je ispran (tri puta po 20-tak sekundi) u demineraliziranoj vodi ( $V = 50,0$  mL).

Otopina za impregnaciju gela pripravljena je dodavanjem 0,1 g srebrovog nitrata i 37,5  $\mu$ L 37 %-tnog (vol/vol) formaldehida u demineraliziranu vodu do ukupnog volumena od 50,0 mL. Impregnacija gela, pri kojoj se u prisutnosti formaldehida reducira srebro, provedena je tijekom 20 minuta. Gel je zatim ispran dva puta po 20-tak sekundi u demineraliziranoj vodi ( $V =$

50,0 mL). Vizualizacija proteinskih vrpca u gelu inducirana je stavljanjem gela u otopinu za razvijanje. Otopina za razvijanje pripravljena je dodavanjem 3,0 g natrijevog karbonata, 25  $\mu$ L 37 %-tnog (vol/vol) formaldehida i 1,0 mL otopine za predtretman gela (vidi gore u ovom poglavlju) u demineraliziranu vodu do ukupnog volumena od 50,0 mL. Nakon otprilike 10 minuta proteinske vrpce su bile jasno vidljive te je gel ispran u demineraliziranoj vodi ( $V = 50,0$  mL) i to dva puta po 2 min. Vizualizacija proteinskih vrpca u gelu zaustavljeno je prebacivanjem gela u 50,0 mL otopine pripravljene miješanjem 25,0 mL 50 %-tnog (vol/vol) metanola, 6,0 mL 12 %-tne (vol/vol) octene kiseline i 19,0 mL demineralizirane vode.

### **3.2.6. Analitičke metode**

Tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DMS 20531<sup>T</sup> u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom izuzimani su uzorci kako bi nakon njihove analize definirali dinamiku potrošnje maltoze, dinamiku rasta bakterijske kulture i dinamiku proizvodnje mliječne kiseline te kako bi dobili supernatant za izdvajanje  $\alpha$ -amilaze afinitetnom kromatografijom. U izuzetim uzorcima određene su: optička gustoća ( $A_{600}$ ; poglavlje 3.2.6.1.), zatim koncentracija maltoze ( $\gamma_S$ ) i mliječne kiseline ( $\gamma_P$ ) (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti; poglavlje 3.2.6.2.). Metodom po Bradford-ici (poglavlje 3.2.6.3.) određena je koncentracija proteina ( $\gamma_{prot}$ ) u koncentratu supernatanata koji su korišteni za izdvajanje  $\alpha$ -amilaze.

#### **3.2.6.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka izuzetih tijekom šaržnog uzgoja bakterije**

U epruvetu sa 9,0 mL sterilne vode otpipetira se 1,0 mL izuzete suspenzije i homogenizira. Prema potrebi, iz ovog razrijeđenja ( $10^{-1}$ ) pripremaju se daljnja razrijeđenja (npr.  $10^{-2}$ ) opisanim postupkom. Oko 3,5 do 4,0 mL odgovarajućeg razrijeđenja prenese se u kivetu i očita apsorbancija razrijeđenog uzorka pri valnoj duljini svjetlosti ( $\lambda$ ) od 600 nm ( $A_{600}$ ). Dobivena vrijednost se množi s 10 ili 100, zavisno o tome koje je razrijeđenje korišteno za određivanje  $A_{600}$ , prvo ( $10^{-1}$ ) ili drugo ( $10^{-2}$ ).

### 3.2.6.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

#### 3.2.6.2.1. Taloženje proteina cinkovim sulfatom

Iz uzoraka izuzetih tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DMS 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom Biostat CPlus (Sartorius BBI Systems GmbH, Goettingen, Njemačka) šaržnim postupkom centrifugiranjem je izdvojena biomasa ove amilolitičke bakterije. U ovako dobiven supernatant (2 x 500,0 µL) dodana je otopina cinkovog sulfata heptahidrata ( $\gamma = 500,0 \text{ g L}^{-1}$ ) u omjeru volumena supernatanta i otopine soli od 1:1 (Polson i sur., 2003). Ovako pripremljena otopina snažno je izmiješana kroz 20-tak sekundi (mikser EV-100, Tehnica; Železniki, Slovenija) i, nakon toga, ostavljena na sobnoj temperaturi kroz slijedećih 20 minuta. Istaloženi proteini izdvojeni su centrifugiranjem (10 000 g, 15 min; HC-240 Tehnica; Železniki, Slovenija), a supernatant je profiltriran pomoću šprice kroz najlonski filter s porama veličine 0,2 µm (Roth, Roth, Njemačka). Ovako pripremljeni uzorci analizirani su kromatografom Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu; Kyoto, Japan).

#### 3.2.6.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

U ovom radu kromatografski sustav Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu; Kyoto, Japan) korišten je za određivanje koncentracije maltoze i mliječne kiseline u uzorcima izuzetim tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom.

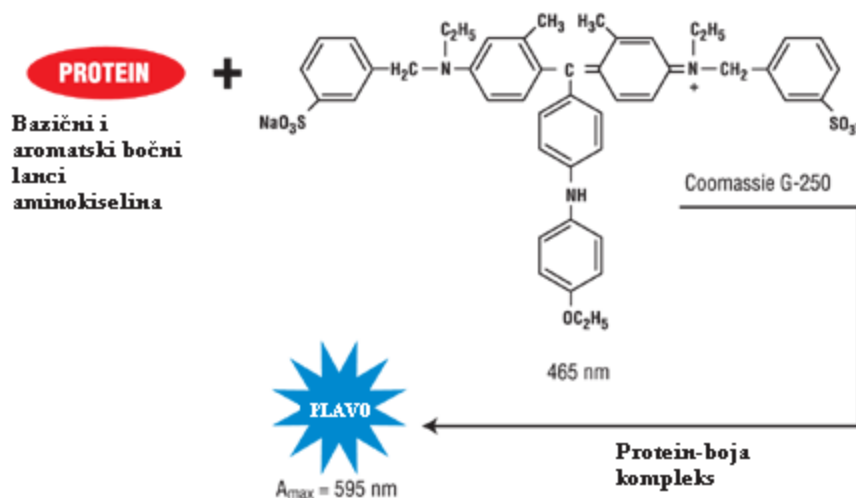
Kromatografski sustav sastojao se od: crpke (LC-10AD<sub>VP</sub>), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10AD<sub>VP</sub>), uređaja za grijanje kolone (CTO-10A<sub>VP</sub>), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Supelcogel<sup>TM</sup> C-610H; 30 cm x 7.8 mm ID, 9 µm) sa predkolonom (Supercogel<sup>TM</sup> H; 5 cm X 4.6 mm ID, 9 µm), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10A<sub>VP</sub>) i računalnog programa (CLASS-VP v6.10). Za analizu uzoraka ovim sustavom korištena je optimirana kromatografska metoda (Slavica i sur., 2015) pomoću koje je praćena dinamika potrošnje maltoze iz MRS-mal<sub>20</sub> podloge i dinamika proizvodnje

mlječne kiseline. Procjena rezultata kromatografske analize napravljena je pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10 i pripadajućih vrijednosti očitanih iz baždarnih pravaca (Batušić, 2008; Gusić, 2008).

### 3.2.6.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradford-ici

#### Princip

Ova kolorimetrijska metoda koristi interakcije proteina s bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 u kiselom mediju. Vezanjem boje na protein dolazi do promjene boje njihove zajedničke otopine iz crveno-smeđe (apsorpcijski maksimum pri  $\lambda = 465$  nm) u plavu (apsorpcijski maksimum pri  $\lambda = 595-610$  nm; Slika 9.). Mehanizam vezanja boje i proteina podrazumijeva prvenstveno aminokiseline arginin, lizin i histidin, ali se smatra da druge aminokiseline mogu vezati ovu boju i to van der Waalsovima i hidrofobnim interakcijama. Broj vezanih molekula boje na molekulu proteina uglavnom je proporcionalan broju pozitivnih naboja na površini proteina. Slobodne aminokiseline i peptidi ne vežu boju Coomassie Brilliant Blue G-250, pa se u njihovoj interakciji ne razvija karakteristična plava boja otopine.



**Slika 9.** Shematski prikaz reakcije proteina i boje Coomassie Brilliant Blue G-250 uz apsorpcijski pomak od  $\lambda = 465$  nm do  $\lambda = 595-610$  nm.

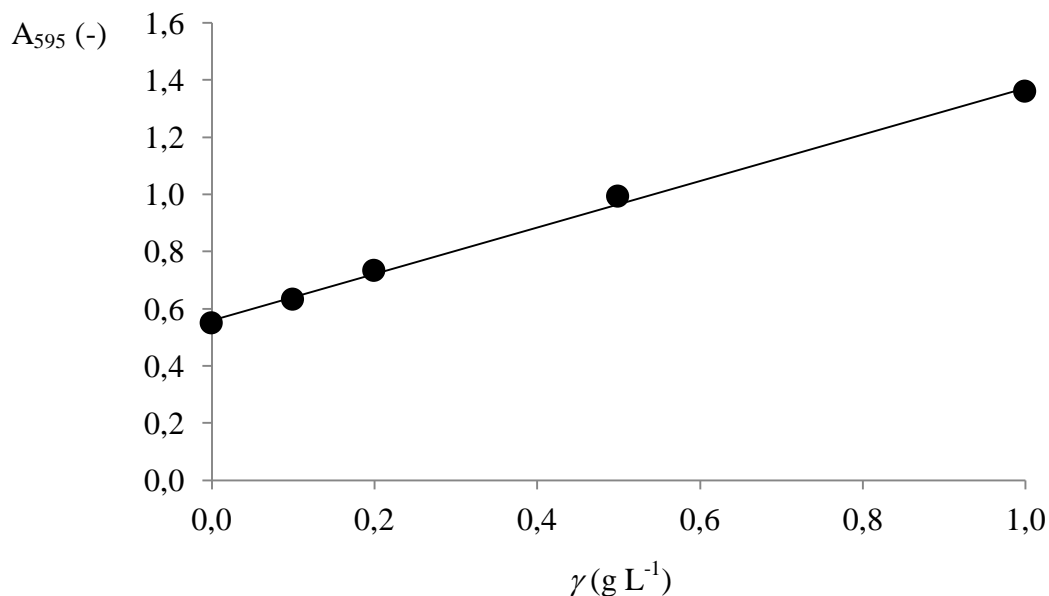


Postupak

Bio-Rad 600-0005 reagens (koncentrat) sadrži 450 mL otopine boje Coomassie Brilliant Blue G-250, fosforu kiselinu i metanol. Ovaj koncentrat je razrijeđen i to tako da se jedan (1) volumen koncentrata razrijedio dodatkom četiri (4) volumena destilirane vode. Dobivena otopina je filtrirana kroz filter-papir i spremljena u staklenu bocu pri sobnoj temperaturi (razrijeđena otopina Coomassie Brilliant Blue G-250).

U kivetu za mjerenje otpipetirano je 1000  $\mu\text{L}$  razrijeđene otopine Coomassie Brilliant Blue G-250 i dodano je 20  $\mu\text{L}$  uzorka. Kiveta sa sadržajem se inkubira kroz 15 min pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija se odredi pri  $\lambda = 595 \text{ nm}$ .

Jednadžba dobivenog baždarnog pravca (Slika 10.):  $A_{595} = 0,8130 y + 0,5592$  ( $R^2 = 0,9973$ ).



**Slika 10.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradford-ici.

### 3.2.7. Analiza eksperimentalnih podataka - izračunavanje nekih pokazatelja uspješnosti rasta i proizvodnje mliječne kiseline s pomoću amilolitičke bakterije

*Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>

Pomoću nelinearnog modela i linearizacije eksperimentalnih vrijednosti za suhu tvar biomase ( $\gamma_X$ ), koncentraciju supstrata ( $\gamma_S$ ) i koncentraciju proizvedene mliječne kiseline ( $\gamma_P$ ) izračunate su maksimalna specifična brzina rasta ( $\mu$ ), brzina potrošnje supstrata ( $q_S$ ) i brzina proizvodnje mliječne kiseline ( $q_P$ ) u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi.

$$\ln \gamma_{X(\max)} = \ln \gamma_{X0} + \mu_{(m)} \cdot t \quad [1.]$$

$$\ln \gamma_S = \ln \gamma_{S0} + q_S \cdot t \quad [2.]$$

$$\ln \gamma_P = \ln \gamma_{P0} + q_P \cdot t \quad [3.]$$

gdje je :

$\gamma_{X(\max)}$  (maksimalna) koncentracija suhe tvari biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$\gamma_{X0}$  koncentracija suhe tvari biomase na početku uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$\mu_{(m)}$  (maksimalna) specifična brzina rasta bakterije [ $\text{h}^{-1}$ ],

$t$  vrijeme proteklo od početka uzgoja [h],

$\gamma_S$  koncentracija supstrata u vremenu  $t$  [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$\gamma_{S0}$  koncentracija supstrata na početku uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$q_S$  brzina potrošnje supstrata [ $\text{h}^{-1}$ ],

$\gamma_P$  koncentracija proizvedene mliječne kiseline u vremenu  $t$  [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$\gamma_{P0}$  koncentracija mliječne kiseline na početku uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$q_P$  brzina proizvodnje mliječne kiseline [ $\text{h}^{-1}$ ],

Koeficijent  $Y_{X/S}$  predstavlja masu prirasle biomase po jedinici mase utošenog supstrata, a izračunava se prema slijedećoj jednadžbi:

$$Y_{X/S} = \frac{\gamma_X - \gamma_{X_0}}{\gamma_{S_0} - \gamma_S} \text{ [g g}^{-1}\text{]} \quad [4.]$$

Koeficijent  $Y_{P/S}$  predstavlja masu proizvedene mliječne kiseline po jedinici mase utrošenog supstrata, a izračunava se prema slijedećoj jednadžbi:

$$Y_{P/S} = \frac{\gamma_P - \gamma_{P_0}}{\gamma_{S_0} - \gamma_S} \text{ [g g}^{-1}\text{]} \quad [5.]$$

Produktivnost uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> ( $Pr_X$ ) te produktivnost proizvodnje mliječne kiseline ( $Pr_P$ ) tijekom rasta amilolitičke bakterije izračunate su prema ovim jednadžbama:

$$Pr_X = \frac{\gamma_X - \gamma_{X_0}}{t} \text{ [g L}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{]} \quad [6.]$$

$$Pr_P = \frac{\gamma_P - \gamma_{P_0}}{t} \text{ [g L}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{]} \quad [7.]$$

## **REZULTATI I RASPRAVA**

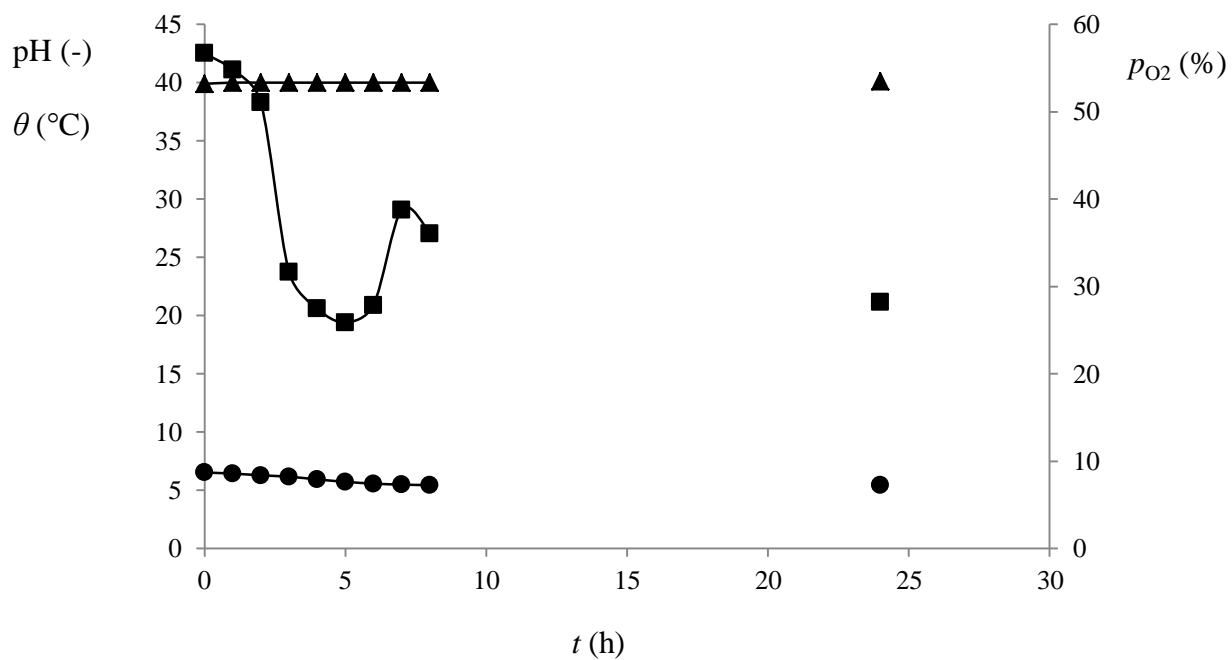
U ovom radu je kao proizvodni mikroorganizam korištena amilolitička bakterija mliječne kiseline (ABMK) *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>. Prethodna istraživanja, koja su provedena u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, potvrdila su da ovaj bakterijski soj može provoditi visoko učinkovitu hidrolizu pročišćenog škroba kao i škroba iz sirovine (Slavica i sur., 2015; Trontel i sur., 2011; 2010). Ova istraživanja provedena su u laboratorijskom (Slavica i sur, rad u pripremi) i poluindustrijskom mjerilu (neobjavljeni rezultati) pri uvjetima održivog bioprocasa, čija primjena je interesantna i u industrijskom mjerilu. Naime, ovaj soj sintetizira  $\alpha$ -amilazu koja iskazuje aktivnost pri relativno: visokim početnim koncentracijama supstrata odnosno sirovine ( $100,0 \text{ g L}^{-1}$ ), niskim temperaturama ( $<40^\circ\text{C}$ ) i pH vrijednostima ( $<4,0$ ).

U ovom radu ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> je uzgojena u modificiranoj MRS podlozi koja se od standardne MRS podloge (MRS-glc<sub>20</sub>) razlikuje samo po jednom sastojku - glavnom izvoru ugljika i energije. Tako je u modificiranoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi umjesto glukoze ( $20,0 \text{ g L}^{-1}$ ) dodana maltoza ( $20,0 \text{ g L}^{-1}$ ) i to kao induktor sinteze i sekrecije amilaza (Welker i Campbell, 1963; Morkeberg i sur., 1995). Uzgoj soja proveden je u laboratorijskom mjerilu u bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom uz korisni volumen od  $V_K = 6,0 \text{ L}$ , održavanje pH vrijednosti suspenzije pri  $5,5 \pm 0,2$  i temperature pri  $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

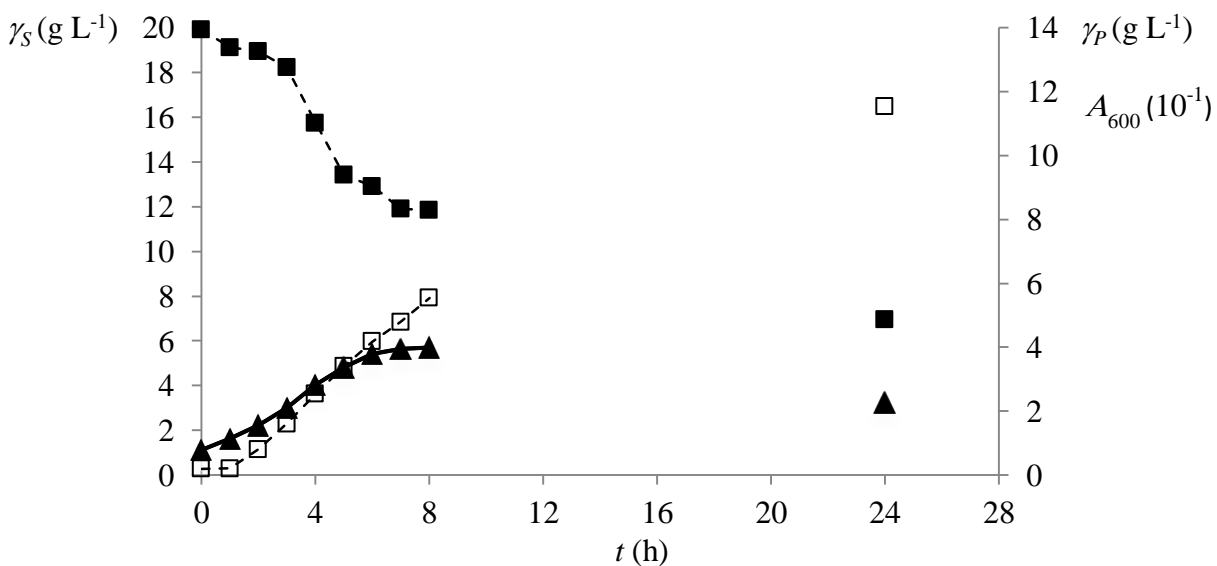
Nakon  $t = 6,0 \text{ h}$  i  $24,0 \text{ h}$  uzgoja izuzeti su određeni volumeni suspenzije ( $V = 1,0 \text{ L}$  i  $4,0 \text{ L}$ ) iz bioreaktora i centrifugiranjem su izdvojeni supernatanti. Oba supernatanta, supernatant 1 (koji je dobiven iz suspenzije koja je izdvojena nakon  $t = 6,0 \text{ h}$  uzgoja) i supernatant 2 (koji je dobiven iz suspenzije koja je izdvojena nakon  $t = 24,0 \text{ h}$  uzgoja) zasebno su spremljeni pri  $-20^\circ\text{C}$  prije izdvajanja  $\alpha$ -amilaze. Nakon odmrzavanja i koncentriranja supernatanta, provedeno je izdvajanje amilolitičkog enzima i to metodom biospecifične (afinitetne) kromatografije. Iz supernatanta 1 izdvojene su tri frakcije (F1, F2 i F3), dok je iz supernatanta 2 izdvojena samo jedna frakcija (F1) koja je sadržavala  $\alpha$ -amilazu. Frakcija 1 (F1), koja je izdvojena iz supernatanta 1 i 2, analizirana je SDS-PAGE metodom.

#### **4.1. Uzgoj amilolitičke bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom**

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> i homofermentativne proizvodnje mliječne kiseline u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom. Promjene pH vrijednosti hranjive podloge, temperature i udjela otopljenog kisika tijekom uzgoja prikazane su na Slici 11. Promjene koncentracije maltoze ( $\gamma_S$ ), optičke gustoće suspenzije ( $A_{600}$ ) te proizvedene mliječne kiseline ( $\gamma_P$ ), prikazane su na Slici 12. Izračunati su i biokinetički parametri rasta bakterijskog soja (Tablica 8.) i homofermentativne razgradnje maltoze (Tablica 8. i Tablica 9.). Izračun ovih biokinetičkih parametara da je u poglavlju Prilozi.



**Slika 11.** Promjene uvjeta okoline [pH (●),  $p\text{O}_2$  (■),  $T$  (▲)] tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom.



**Slika 12.** Promjena koncentracije maltoze ( $\gamma_s$ , ■), bakterijske biomase [ $A_{600}(10^{-1})$ , ▲], koncentracije mliječne kiseline ( $\gamma_p$ , □) tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom.



**Tablica 8.** Trajanje faza rasta ( $t_{\text{FAZE RASTA}}$ ; lag faza, lag; eksponencijalna faza, eksp) i vrijednosti za specifičnu brzinu rasta bakterije ( $\mu$ ), maksimalnu koncentraciju biomase ( $\gamma_{X_{\text{max}}}$ ), brzinu konverzije supstrata ( $q_s$ ), koeficijent konverzije supstrata u bakterijsku biomasu ( $Y_{X/S}$ ) i produktivnost sinteze bakterijske biomase ( $Pr_X$ ) procijenjene na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom.

rast amilolitičke bakterije						
$t_{\text{FAZE RASTA}}$ (h)		$\mu$	$\gamma_{X_{\text{max}}}$	$q_s$	$Y_{X/S}$	$Pr_X$
lag	eksp	(h <sup>-1</sup> )	(g <sub>X</sub> L <sup>-1</sup> )	(h <sup>-1</sup> )	(g <sub>X</sub> g <sub>S</sub> <sup>-1</sup> )	(g <sub>X</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
0,0	6,0	0,27	4,00	0,08	0,40	0,40

**Tablica 9.** Vrijednosti za brzinu proizvodnje mliječne kiseline ( $q_P$ ), maksimalnu koncentraciju ove kiseline ( $\gamma_{P_{max}}$ ), koeficijent konverzije maltoze u mliječnu kiselinu ( $Y_{P/S}$ ), odnos mase proizvedene mliječne kiseline i mase prirasle biomase ( $Y_{P/X}$ ) i produktivnost proizvodnje mliječne kiseline ( $Pr_P$ ) procijenjene na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom.

proizvodnja mliječne kiseline				
$q_P$	$\gamma_{P_{max}}$	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	$Pr_P$
(h <sup>-1</sup> )	(g <sub>P</sub> L <sup>-1</sup> )	(g <sub>P</sub> g <sub>S</sub> <sup>-1</sup> )	(g <sub>P</sub> g <sub>X</sub> <sup>-1</sup> )	(g <sub>P</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
0,57	11,53	0,87	1,67	0,47

Ovaj bakterijski soj, koji je prethodno uzgojen u hranjivoj MRS-glc<sub>20</sub> podlozi, odmah nakon nacjepljivanja u sterilnu hranjivu MRS-mal<sub>20</sub> podlogu počinje metabolizirati maltozu, kako je to određeno HPLC metodom (Slika 12.). Ovaj rezultat zabilježen je i tijekom uzgoja ovog soja u hranjivoj MRS-mal<sub>10</sub> podlozi pri istim uvjetima bioprocasa (Peklić, 2011; Trontel, 2013). Glukoza, kao razgradni proizvod maltoze, nije identificirana HPLC metodom u supernatantu uzoraka tijekom uzgoja ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> pri odabranim uvjetima u MRS-mal<sub>10</sub> i MRS-mal<sub>20</sub> podlozi. Dakle, u vanstaničnom prostoru ne dolazi do hidrolize maltoze, već se ovaj disaharid transportira u stanice *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> kao jedini izvor ugljika i energije (Slika 1.).

Ovi su rezultati u skladu sa hipotezom o metabolizmu maltoze u stanicama bakterije mliječne kiseline *Lactococcus lactis*, koju su predložili Neves i sur. (2005). Prema ovim autorima maltoza se transportira u stanice *L. lactis* pomoću proteina koji veže maltozu (eng. maltose binding protein) i maltoza permeaze (ABC transporter).

U bazi podataka BRENDA dostupni su podaci za dva enzima koji mogu vezati maltozu - EC 2.7.11.11 i EC 3.2.2.19 (Anonimus 1, 2016). Ova oba proteina nisu izolirana iz bakterija mliječne kiseline. Enzim s EC 2.7.11.11, izoliran iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, okarakteriziran je kao cAMP-zavisna protein kinaza, a enzim EC 3.2.2.19 (proteinska ADP-ribozilarginin hidrolaza), izoliran iz Gram-negativne bakterije *Rhodospirillum rubrum*, regulira aktivnost enzima dinitrogenaze reduktaze, ključnog enzima u fiksiranju dušika.

Maltoza permeaza (EC 3.6.3.19) je ATP-zavisna fosfohidrolaza izolirana iz bakterije mliječne kiseline *Lactococcus lactis* pomoću koje se mogu transportirati maltoza i oligosaharidi maltoze. Poznato je da je aktivnost ovog enzima regulirana kataboličkom represijom glukoze, a drugi detalji regulacije i mehanizma ove enzimske reakcije još nisu okarakterizirani (Gabrielsen i sur., 2012).

Kod druge Gram-pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* maltoza i oligosaharidi maltoze se transportiraju pomoću fosfoenolpiruvat fosfotransferaznog sustava uz posredovanje specifičnog IICB proteina, ABC transportera i proteina koji veže oligosaharide maltoze (Nakai i sur., 2009).

Iz dostupnih literaturnih podataka i rezultata ovog rada može se zaključiti da se maltoza transportira u stanice Gram-pozitivnih bakterija, npr. soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>, i nakon toga u citoplazmi hidrolizira i dalje metabolizira.

U citoplazmi maltoza fosforilaza (EC 2.4.1.8), izolirana iz nekoliko vrsta iz roda *Lactobacillus* (npr. iz *L. acidophilus*; Nakai i sur., 2009), katalizira fosforolizu maltoze pri čemu dolazi do fosforilacije i inverzije C1 atoma jedne glukoze, dok druga glukoza ostaje nepromijenjena. Tako u ovoj reakciji nastaju  $\beta$ -glukoza 1-fosfat i glukoza (Neves i sur., 2005). Ova se reakcija smatra povratnom i, pri određenim uvjetima, maltoza fosforilaza može katalizirati proizvodnju maltoze.

Zatim  $\beta$ -fosfoglukomutaza (EC 5.4.2.6) prevodi  $\beta$ -glukoza 1-fosfat u glukoza 6-fosfat. Ovaj je enzim okarakteriziran kod *Lactobacillus brevis*, *L. delbrueckii* i *Lactococcus lactis* (Anonimus 1, 2016). Pretpostavlja se da glukokinaza (EC 2.7.1.2) fosforilira glukozu u glukoza 6-fosfat. Međutim, ovaj enzim nije izoliran niti okarakteriziran kod bakterija mliječne kiseline. Ovako dobivene dvije glukoze 6-fosfat dalje se mogu razgrađivati glikolizom (Neves i sur., 2005).

Pri odabranim uvjetima istovremeno sa razgradnjom maltoze, jedinim izvorom ugljika i energije u MRS-mal<sub>20</sub> podlozi, odvija se sinteza bakterijske biomase (Slika 12.) i to sve do  $t =$

6,0 h bioprocesa (eksponencijalni rast,  $\mu = 0,27 \text{ h}^{-1}$ , Tablica 8.). U ovoj vremenskoj točki bioprocesa ( $t = 6,0 \text{ h}$ ) koncentracija maltoze i proizvedene mliječne kiseline iznosila je, redom,  $12,91 \text{ g L}^{-1}$  i  $4,19 \text{ g L}^{-1}$ , dok proteine nije bilo moguće detektirati metodom po Bradford-ici. Nakon toga, *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> ulazi u stacionarnu fazu rasta i značajno se usporava potrošnja maltoze. Do  $t = 24,0 \text{ h}$  koncentracija maltoze je opala do  $6,95 \text{ g L}^{-1}$  i proizvedeno je  $11,34 \text{ g L}^{-1}$  mliječne kiseline tako da je koeficijent konverzije maltoze u mliječnu kiselinu ( $Y_{P/S}$ ) iznosio samo  $0,87 \text{ g g}^{-1}$ . Pri tome je iskorištenje bioprocesa bilo 82,9%.

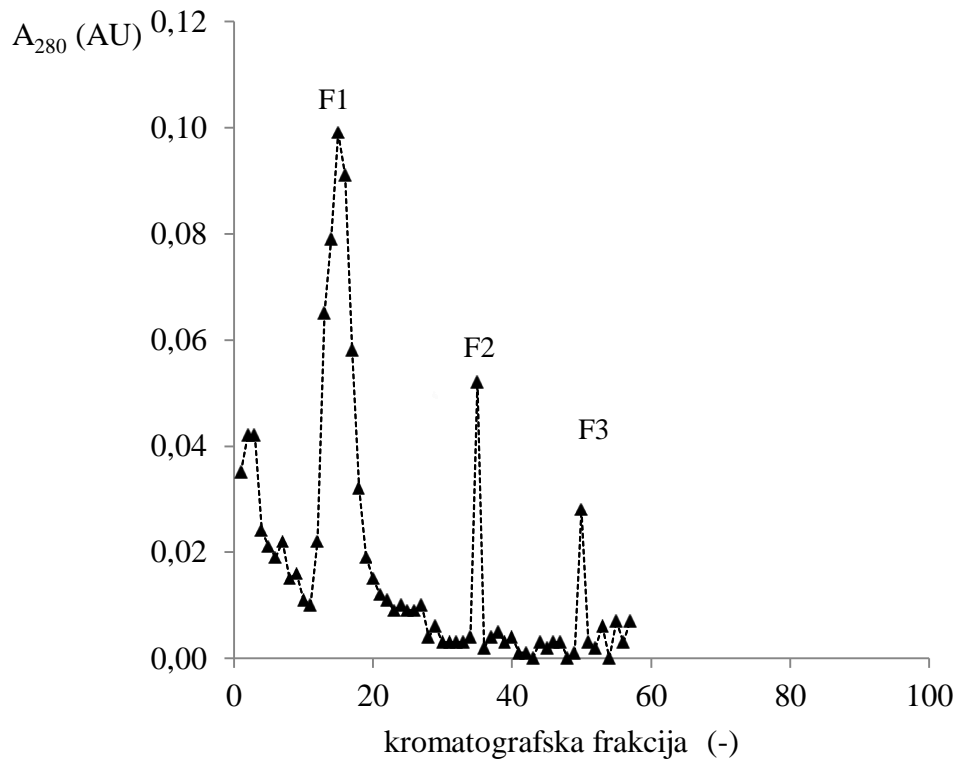
Maltoza je okarakterizirana kao tzv. sporo metabolizirajući izvor ugljika i energije i proizvodnja više od jednog krajnjeg proizvoda metabolizma se može očekivati kod bioprocesa koje provode bakterije mliječne kiseline (Solem i sur., 2007). Tijekom uzgoja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> maltoza se razgradila isključivo do mliječne kiseline, kako je određeno HPLC metodom.

ABMK *L. amylovorus* svrstana je u grupu obligatno homofermentativnih bakterija mliječne kiseline (Hammes i Hertel, 2009). Ipak, ove vrste u definiranim uvjetima uz ekvimolarnu koncentraciju D- i L-mliječne kiseline mogu proizvesti i acetat, kako je to opisano u radu Slavice i sur. (2015). U eksperimentima kod kojih je uzgoj ovog amilolitičkog soja proveden u MRS-mal<sub>10</sub> podlozi u laboratorijskom reaktoru pri istovjetnoj temperaturi ( $40 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ) i pH vrijednosti ( $5,5 \pm 0,2$ ) soj je brže rastao ( $\mu = 0,41 \text{ h}^{-1}$ ) i iscrpio svu maltozu iz podloge (Peklić, 2011). Uz visoko učinkovitu proizvodnju D-/L-mliječne kiseline ( $Y_{P/S} = 0,92 \text{ g g}^{-1}$ ,  $Pr = 0,96 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), soj je proizveo je i octenu kiselinu ( $\gamma = 1,90 \text{ g L}^{-1}$ ). U uvjetima uzgoja koji su opisani u ovom radu, a to je početna koncentracija maltoze od  $20 \text{ g L}^{-1}$  (hranjiva MRS-mal<sub>20</sub> podloga), temperature od  $40 \pm 0,2^\circ\text{C}$  i pH vrijednost od  $5,5 \pm 0,2$ , nije zamijećeno iscrpljivanje maltoze kao ni proizvodnja drugog krajnjeg proizvoda metabolizma maltoze (npr. acetata).

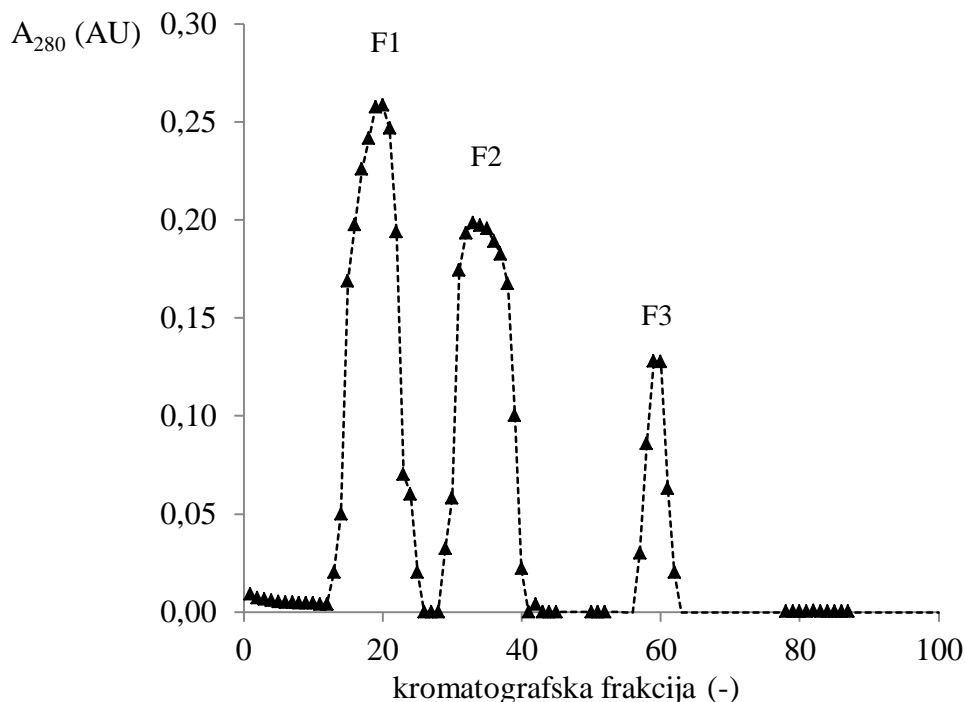
## 4.2. Izdvajanje $\alpha$ -amilaze afinitetnom kromatografijom i njezina karakterizacija

U ovom poglavlju prikazani su rezultati izdvajanja  $\alpha$ -amilaze biospecifičnom (afinitetnom) kromatografijom iz supernatanta 1 (koji je dobiven iz uzorka izuzetog nakon  $t = 6,0$  h uzgoja) i supernatanta 2 (koji je dobiven iz uzorka izuzetog nakon  $t = 24,0$  h uzgoja). Provedena su tri različita postupka izdvajanja amilaza afinitetnom kromatografijom koja su se razlikovala po: vremenu uzorkovanja tijekom uzgoja ( $t = 6,0$  h i  $t = 24, 0$  h), volumenu supernatanta koji je korišten u afinitetnoj kromatografiji, koncentraciji proteina u supernatantima i protoku kroz kolonu.

Za prvi postupak (supernatant 1) uzeto je 3,0 mL koncentriranog supernatanta s  $\gamma_{\text{prot}} \approx 0,1$  mg mL<sup>-1</sup> i eluiranje amilaza je provedeno pri  $F = 0,7$  mL min<sup>-1</sup> (Slika 13.). Budući da je koncentracija proteina u eluiranim sa kolone bila vrlo niska (pogotovo u frakcijama F2 i F3) supernatant 1 je zatim dodatno koncentriran te je ponovljena kromatografija sa većim volumenom (30 ml) i koncentracijom proteina ( $\gamma_{\text{prot}} = 0,84$  mg mL<sup>-1</sup>) u uzorku, uz jednak protok ( $F = 0,7$  ml min<sup>-1</sup>) (Slika 14), kako bi se potvrdilo da pojava proteinskih “peakova” nije posljedica greške u mjerenju.



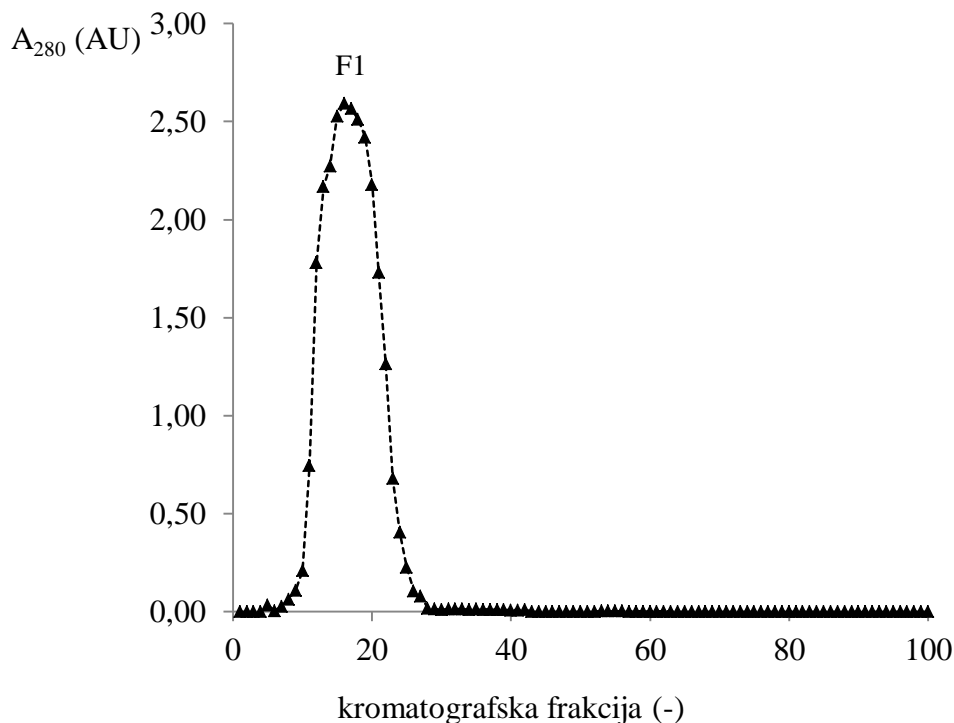
**Slika 13.** Kromatogram dobiven tijekom izdvajanja  $\alpha$ -amilaze iz koncentrata supernatanta ( $V = 3,0 \text{ mL}$ ,  $\gamma_{\text{prot}} \approx 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) afinitetnom kromatografijom (Sepharose<sup>®</sup> 6B). Frakcije 1 (F1), 2 (F2) i 3 (F3) eluirane su pri  $F = 0,7 \text{ mL min}^{-1}$ .



**Slika 14.** Kromatogram dobiven tijekom izdvajanja  $\alpha$ -amilaze iz koncentrata supernatanta ( $V = 30,0 \text{ mL}$ ,  $\gamma_{\text{prot}} = 0,84 \text{ mg mL}^{-1}$ ) afinitetnom kromatografijom (Sepharose<sup>®</sup> 6B). Frakcije 1 (F1), 2 (F2) i 3 (F3) eluirane su pri  $F = 0,7 \text{ mL min}^{-1}$ .

Povećanje volumena uzorka i koncentracije proteina u uzorku je rezultiralo širenjem “peak”-ova u dobivenom kromatogramu, ali su i dalje vidljiva tri odvojena proteinska “peaka” (frakcije F1, F2 i F3) što znači da su u zorku prisutne tri forme  $\alpha$ -amilaze sa različitim afinitetom za vezanje na kolonu. Kod trećeg postupka (supernatant 2) uzeto je  $30,0 \text{ mL}$  koncentriranog supernatanta s  $\gamma_{\text{prot}} = 2,52 \text{ mg mL}^{-1}$  i eluiranje amilaza je provedeno pri  $F = 0,6 \text{ mL min}^{-1}$  (Slika 15.).

Nakon 24 h uzgoja se na kromatogramu (Slika 15.) vidi samo jedan “peak” koji odgovara F1 frakciji iz supernatanta 1. Ovakav rezultat bi mogao biti posljedica razgradnje formi amilaze iz frakcija F2 i F3 (detektiranih u uzorku izuzetom nakon prvih 6 h uzgoja) tijekom daljnjeg uzgoja do 24 h što bi upućivalo da se forme  $\alpha$ -amilaze u F2 i F3 frakciji osim po afinitetu za vezanje na kolonu razlikuju i po stabilnosti.



**Slika 15.** Kromatogram dobiven tijekom izdvajanja  $\alpha$ -amilaze iz koncentrata supernatanta 2 ( $V = 30,0$  mL,  $\gamma_{\text{prot}} = 2,52$  mg mL<sup>-1</sup>) afinitetnom kromatografijom (Sepharose<sup>®</sup> 6B). Frakcija 1 (F1) je eluirana pri  $F = 0,6$  mL min<sup>-1</sup>.

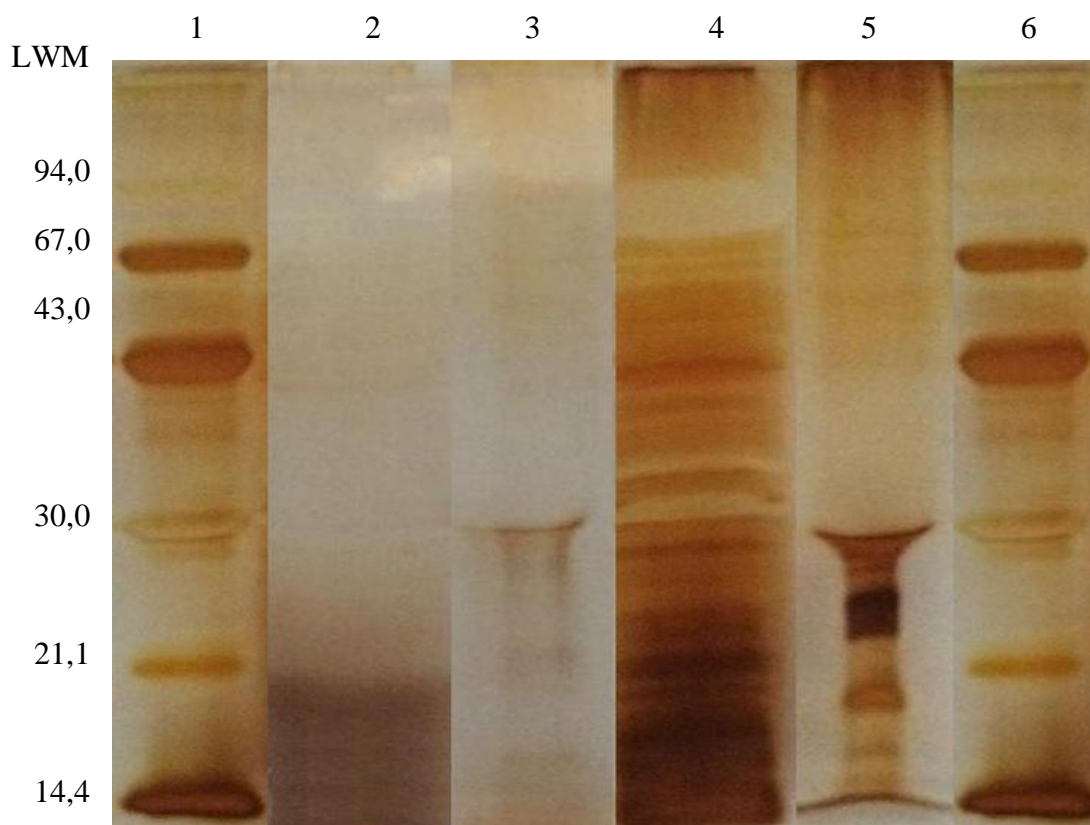
Pri planiranju ovog rada pretpostavljeno je da ABMK *L. amylovorus* 20531<sup>T</sup> sintetizira  $\alpha$ -amilazu i transportira je u vanstanični prostor. Ova pretpostavka temelji se na literaturnim podacima (Eom i sur., 2009) kao i prethodno provedenim eksperimentima u našem Laboratoriju kod kojih je uzgoj ovog amilolitičkog soja proveden u MRS-mal<sub>10</sub> podlozi u laboratorijskom reaktoru pri istovjetnoj temepraturi ( $40 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ) i pH vrijednosti ( $5,5 \pm 0,2$ ). Suspenzija tj. supernatant za izdvajanje  $\alpha$ -amilaze u prethodnim eksperimentima dobiven je nakon  $t = 8,0$  h uzgoja ABMK (pri kraju eksponencijalne faze rasta ove ABMK). Tijekom afinitetne kromatografije identificirane su dvije frakcije  $\alpha$ -amilaze, koje nisu bile sasvim odijeljene (Peklić,



2011; Trontel, 2013). Obje frakcije posjedovale su aktivnost prema škrobu i tijekom hidrolize škroba proizvele maltozu i maltooligosaharide.

U ovom radu povećana je početna koncentracija maltoze u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi i to od prethodnih 10,0 g L<sup>-1</sup> do 20,0 g L<sup>-1</sup>, kako bi se pospješila indukcija i sekrecija  $\alpha$ -amilaze (Welker i Campbell, 1963; Morkeberg i sur., 1995). Povećanje koncentracije maltoze rezultiralo je promjenama u rastu ovog soja kao i u potrošnji maltoze, kako je to već opisano u prethodnom poglavlju. Zbog toga su u ovom radu supernatanti izuzeti nakon  $t = 6,0$  h (pri kraju eksponencijalne faze rasta, supernatant 1) i pri kraju uzgoja amilolitičkog soja ( $t = 24,0$  h, supernatant 2).

Iz supernatanta 1 izdvojene su tri frakcije koje su sadržavale vanstanične  $\alpha$ -amilaze: F1, F2 i F3 (Slike 13. i 14), dok je iz supernatanta 2 (Slika 15.) izdvojena samo jedna frakcija (F1). Ovo je prvi takav rezultat koji potvrđuje postojanje više formi  $\alpha$ -amilaze koju proizvode vrste *L. amylovorus*. Slični rezultati kao i detaljnija karakterizacija  $\alpha$ -amilaza vrsta *L. amylovorus* nije dostupna u bazama podataka niti objavljenim znanstvenim radovima (Rodriguez Sanoja i sur., 2000; 2005; Castillo Pompeyo i sur., 1993; Burgess-Cassler i Imam, 1991; Giraud i sur., 1993; 1994; Hamilton i sur. 1998). Možda bi se kromatogrami prikazani u ovom radu mogli usporediti sa kromatogramima kod izdvajanja  $\alpha$ -amilaza biljke arak (*Salvadora persica*), kod koje je izdvojeno pet  $\alpha$ -amilaza (Mohamed i sur., 2014). Osim kromatograma, sličnost ovih amilaza s formama  $\alpha$ -amilaze soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> je i u molekulskoj masi, koja je manja od 30,0 kDa. SDS-PAGE gel s odgovarajućim uzorcima nakon bojanja srebrom prikazan je na Slici 16. Koncentracija proteina u F1 frakciji uzorka supernatanta 1 (izuzetog nakon 6 h uzgoja) je značajno manja od one u F1 frakciji supernatanta 2 (izuzetog nakon 24 h uzgoja), što otežava elektroforetsku analizu proteina budući da su i nakon bojanja srebrom proteinske vrpce dosta slabo vidljive. Međutim, može se uočiti da su veličina i broj proteinskih vrpce u F1 frakcijama supernatanta 1 i supernatanta 2 podjednake. Naime, kako je to pokazano na Slici 16., frakcija 1 (F1) sastoji se od nekoliko proteinskih vrpce koje sve imaju molekulsku masu manju od 30,0 kDa.



**Slika 16.** SDS-PAGE gel nakon bojanja srebrom s frakcijama 1 (F1)  $\alpha$ -amilaze dobivenim tijekom afinitetne kromatografije uzorka supernatanta nakon 6 h (supernatant 1) odnosno 24 h uzgoja (supernatant 2): LMW standard (1 i 6); koncentrat supernatanta 1 ( $\gamma_{\text{prot}} = 0,84 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (2); frakcija 1 (F1) izdvojena afinitetnom kromatografijom tijekom postupka 2 (3); koncentrat supernatanta 2 ( $\gamma_{\text{prot}} = 2,52 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (4); frakcija 1 (F2) izdvojena afinitetnom kromatografijom tijekom postupka 3 (5).

**ZAKLJUČCI**

Na temelju rezultata eksperimenta koji su opisani u ovom radu može se zaključiti slijedeće:

1. Amilolitička bakterija mliječne kiseline (ABMK) *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> uzgojena je u modificiranoj MRS podlozi, u koju je umjesto glukoze dodana maltoza (20,0 g L<sup>-1</sup>). Maltoza je dodana kao induktor  $\alpha$ -amilaze. Uzgoj u MRS podlozi sa maltozom (MRS-mal<sub>20</sub>) proveden je u laboratorijskom mjerilu u bioreaktoru s miješalom ( $V_K = 6,0$  L) pri konstantnoj temperaturi (40±0,2°C) i uz održavanje pH vrijednosti suspenzije (pH 5,5±0,2).
2. ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>, koja je prethodno uzgojena u MRS podlozi (MRS-glc<sub>20</sub>), odmah nakon naciepljivanja počinje transportirati maltozu, hidrolizira je i zatim razgrađuje isključivo do mliječne kiseline, kako je određeno HPLC metodom. Ovom metodom nisu identificirani drugi krajnji proizvodi razgradnje maltoze s pomoću ovog soja.
3. Istovremeno sa razgradnjom maltoze i homofermentativnom proizvodnjom mliječne kiseline odvija se sinteza biomase (eksponencijalni rast) i to sve do  $t = 6,0$  h bioprocasa, kada *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> ulazi u stacionarnu fazu rasta i nakon čega se usporavaju potrošnja maltoze, sinteza bakterijske biomase i proizvodnja mliječne kiseline. U ovoj vremenskoj točki bioprocasa ( $t = 6,0$  h) koncentracija maltoze i proizvedene mliječne kiseline iznosila je, redom, 12,91 g L<sup>-1</sup> i 4,19 g L<sup>-1</sup>, dok proteine nije bilo moguće detektirati metodom po Bradford-ici.
4. Do vremena bioprocasa  $t = 24,0$  h koncentracija maltoze je opala do 6,95 g L<sup>-1</sup> i proizvedeno je 11,34 g L<sup>-1</sup> mliječne kiseline tako da je koeficijent konverzije maltoze u mliječnu kiselinu ( $Y_{P/S}$ ) iznosio samo 0,87 g g<sup>-1</sup>. Pri tome je iskorištenje bioprocasa bilo 82,9%.
5. Maltoza inducira proizvodnju i sekreciju  $\alpha$ -amilaze. Soj *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> sintetizira ovaj enzim i transportira ga u vanstanični prostor. Izolacija  $\alpha$ -amilaze provedena je afinitetnom kromatografijom i to iz supernatanta uzoraka izuzetih pri kraju eksponencijalne faze rasta ( $t = 6,0$  h) i na kraju bioprocasa (stacionarna faza rasta,  $t = 24,0$  h).
6. Propuštanjem otopine  $\alpha$ -ciklodekstrina kroz kolonu eluirane su, separirane na baznoj liniji i detektirane tri frakcije koje su sadržavale  $\alpha$ -amilaze (F1, F2 i F3) i to iz supernatanta koji je izuzet nakon  $t = 6,0$  h bioprocasa. Kromatogrami sa samo jednom frakcijom (F1) koja je sadržavala dobiveni su iz supernatanta koji je izuzet u nakon  $t = 24,0$  h bioprocasa.
7. SDS-PAGE metodom utvrđeno je da se frakcija 1 (F1) sastoji od nekoliko proteinskih vrpca koje imaju molekulsku masu <30,0 kDa.

## **LITERATURA**

Anonymous 1 (2016) BRENDA - The Comprehensive Enzyme Information System, <<http://www.brenda-enzymes.org>. Pristupljeno 20. lipnja 2016.

Anonymous 2 (2016) (<[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/0E9DAB3298C9C74AC1257628001CCDD6/\\$file/18102229AE.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/0E9DAB3298C9C74AC1257628001CCDD6/$file/18102229AE.pdf)>). Pristupljeno 01. ožujka 2016.

Batušić, A. (2008) Utjecaj izvora ugljika na proizvodnju mliječne kiseline s pomoću bakterija *Lactobacillus delbrueckii* i *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, svibanj 2008.

Burgess-Cassler, A., Imam, S. (1991) Partial purification and comparative characterization of  $\alpha$ -amylase secreted by *Lactobacillus amylovorus*. *Curr. Microbiol.* **23**, 207-213.

Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. (2002) The lactic acid bacteria: A Literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**(4), 281-370.

Castillo Pompeyo, C., Suarez Gomez, M., Gasparian, S., Morlon-Guyot, J. (1993) Comparison of amylolytic properties of *Lactobacillus amylovorus* and of *Lactobacillus amylophilus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 266-269.

Cuatrecasas, P., Wilchek, M., Anfinsen, C. B. (1968) Selective enzyme purification by affinity chromatography. *PNAS USA* **61**(2), 636-643.

De Man, J. D., Rogosa, M., Sharpe, M. E. (1960) A medium for cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bact.* **23**, 130-135.

Duedahl-Olesen, L., Haastrup Pedersen, L., Lambertsen Larsen, K. (2000) Suitability and limitations of methods for characterisation of activity of malto-oligosaccharide-forming amylases. *Carbohydr. Res.* **329**, 109-119.

Eom, H., Moon, J., Seo, E., Han, N.S. (2009) Heterologous expression and secretion of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase in *Leuconostoc citreum*. *Biotechnol. Lett.* **31**(11), 1783-1788.

Fernández, M., Zúniga, M., 2006. Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **32**, 155–183.

Gabrielsen, C., Brede, D. A., Hernández, P.E., Nes, I. F., Diepa, D. B. (2012) The maltose ABC transporter in *Lactococcus lactis* facilitates high-level sensitivity to the circular bacteriocin garvicin ML, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 2908-2915.

Garfin, D.E. (2003) Cell structure, A Practical Approach. U: Essential Cell Biology, (Davey, J. I Lord, M.; ured.), Oxford University Press, Oxford UK, str. 197-268.

Giraud, E., Champailler, A., Raimbault, M. (1994) Degradation of raw starch by a wild amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(12), 4319-4323.

Giraud, E., Gosselin, L., Marin, B., Parada, J.L., Raimbault, M. (1993) Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 276-282.

Goffin, P., Muscariello, L., Lorquet, F., Stukkens, A., Prozzi, D., Sacco, M., Kleerebezem, M., Hols, P., 2006. Involvement of pyruvate oxidase activity and acetate production in the survival of *Lactobacillus plantarum* during the stationary phase of aerobic growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (12), 7933–7940.

Gusić, I. (2008) Proizvodnja mliječne kiseline s pomoću bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T šaržnim postupkom, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, svibanj 2008.

Hamilton, L. M., Kelly, C. T., Fogarty, W.M. (1998) Raw starch degradation by the non-raw-starch-adsorbing bacterial alpha amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. *Carbohydr. Res.* **314**, 251-257.

Hamilton, L. M.; Kelly, C. T.; Fogarty, W.M. (2000) Review: cyclodextrins and their interaction with amyolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 561-567.

Hammes, W.P., Hertel, C., 2009. Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck 1901. 212AL. In: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3: The Firmicutes, 2<sup>nd</sup> edition. Springer, New York, pp. 465–511.

Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 87-107.

Konings, W.N., 2006. Microbial transport. Adaptations in natural environments. *Antonie van Leeuwenhoek* **90**, 325–342.

Laemmli (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Mohamed, S. A., Almulaiky, Y. Q., Ahmed, Y. M., Al-Bar, O. A. M., Ibrahim, I. H. (2014) Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from miswak *Salvadora persica*, *Complement. Altern. Med.*, **14**, 1-10.

Morkeberg, R., Carlsen, M., Nielsen, J. (1995) Induction and repression of  $\alpha$ -amylase production in batch and continuous cultures of *Aspergillus oryzae*. *Microbiol.* **141**, 2449-2454.

Nakai, H., Baumann, M.J., Petersen, B.O., Westphal, Y., Schols, H., Dilokpimol, A., Hachem, M.A.; Lahtinen, S.J., Duus, J.Ø., Svensson B., (2009) The maltodextrin transport system and metabolism in *Lactobacillus acidophilus* NCFM and production of novel glucosides through reverse phosphorylation by maltose phosphorylase, *FEBS J.*, **276**, 7353-7365.



Neves, A. R., Pool, W. A., Kok, J., Kuipers, O. P., Santos, H. (2005) Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* - The input from in vivo NMR. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 531-554.

Peklić, M., Karakterizacija amilolitičke aktivnosti bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, rujan 2011.

Polson, C., Sarkar, P., Incledon, B., Raguvanan, V., Grant, R. (2003) Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **785**, 263-275.

Prakash, O., Jaiswal, N. (2010)  $\alpha$ -Amylase: An ideal representative of thermostable enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**, 2401-2414.

Reddy, G. R., Altaf, M., Naveena, B. J., Venkateshwar, M., Kumar, E. V. (2008) Amyolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. *Biotechnol. Adv.* **26**, 22-34.

Rodríguez-Sanoja, R., Morlon-Guyot, J., Jore, J., Pintado, J., Juge, N., Guyot, J. P. (2000) Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(8), 3350-3356.

Rodríguez-Sanoja, R., Ruiz, B., Guyot, J. P., Sanchez, S. (2005) Starch-binding domain affects catalysis in two *Lactobacillus*  $\alpha$ -amylases. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(1), 297-302. *Solem i sur.*, 2007

Slavica, A., Trontel, A., Jelovac, N., Kosovec, Ž., Šantek, B., Novak, S. (2015) Production of lactate and acetate by *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004<sup>T</sup> in comparison with *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>, *J. Biotechnol.* **202**, 50-59.

Solem, C., Koebmann, B., Yang, F., Jensen, P. R. (2007) The las enzymes control pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis* during growth on maltose. *J. Bacteriol.* **189**(18), 6727-6730.

Synowiecki, J. (2007) The use of starch processing enzymes in food industry. In: Poliana J. MacCabe, A.P. (Eds.). *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Springer, New York, NY, str. 19-34.

Taniguchi, H., Honnda Y. (2009) Amylases. U: *Encyclopedia of Microbiology, Applied Microbiology: Industrial amylases*, (Schaechter, M., Baldauf, S. L., Baross, J. A., Baulcombe, D. C., Haselkorn, R., Hopwood, D. A., Ingraham, J. L., Laskin, A. I., Levin, B. R., Schmidt, T. M., Summers, W. C., White, J. F. Jr., ured.), Elsevier Inc. New York, str.159-173.

Trontel, A. (2013) Razvoj novoga bioprocasa proizvodnje mliječne kiseline, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, lipanj 2013.

Trontel, A., Baršić, V., Slavica, A., Šantek, B., Novak, S. (2010) Modeling the effect of different substrates and temperature on the growth and lactic acid production by *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> in batch process. *Food Technol. Biotechnol.* **48**(3), 352-361.

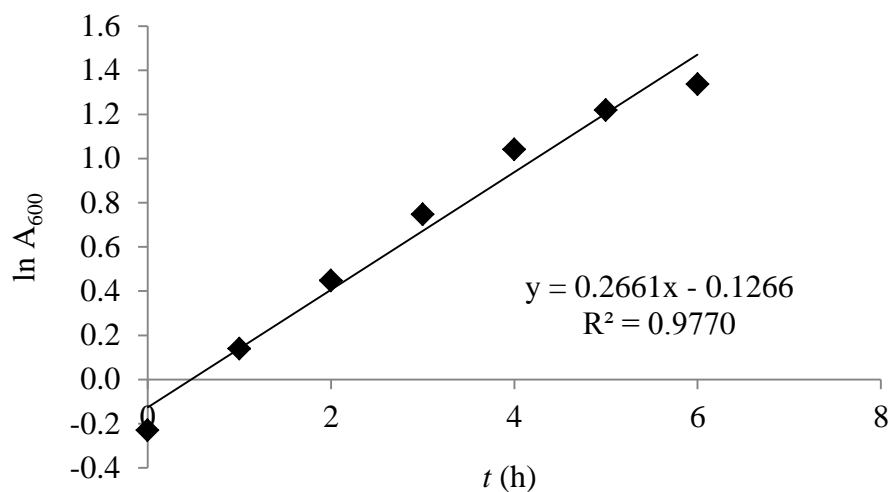
Trontel, A.; Batušić, A., Gusić, I., Slavica, A., Šantek, B., Novak, S. (2011) Production of D- and L-lactic acid by mono- and mixed cultures of *Lactobacillus* sp. *Food Technol. Biotechnol.* **49**(1), 75-82.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**(2), 407-438

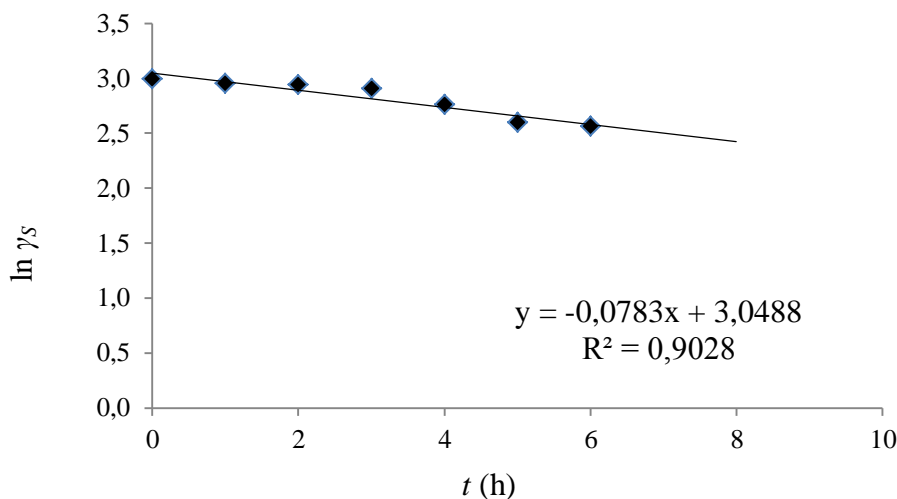
Vretblad, P. (1974) Immobilization of ligands for biospecific affinity chromatography via their hydroxyl groups. The cyclohexaamylose -  $\alpha$ -amylase system. *FEBS Lett.* **47**(1), 86-89.

Welker, N. E. i Campbell, L. L. (1963) Induced biosynthesis of  $\alpha$ -amylase by growing cultures of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* **86**, 1196-1201.

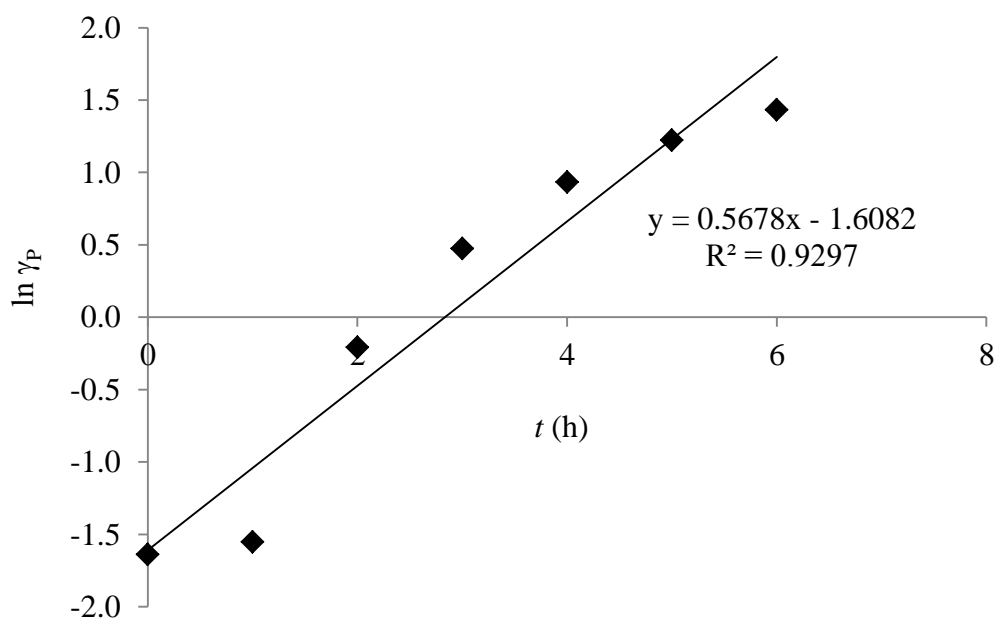
**PRILOZI**



**Slika 17.** Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu rasta ( $\mu = 0,27 \text{ h}^{-1}$ ) ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> tijekom uzgoja u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom pri  $\theta = 40 \pm 0,2^\circ\text{C}$  i pH  $5,5 \pm 0,2$ .



**Slika 18.** Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu potrošnje maltoze ( $q_S = 0,08 \text{ h}^{-1}$ ) pomoću ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> tijekom uzgoja u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom pri  $\theta = 40 \pm 0,2^\circ\text{C}$  i pH  $5,5 \pm 0,2$ .



**Slika 19.** Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu proizvodnje mliječne kiseline ( $q_p = 0,57$   $\text{h}^{-1}$ ) pomoću ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> tijekom uzgoja u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom pri  $\theta = 40 \pm 0,2^\circ\text{C}$  i pH  $5,5 \pm 0,2$ .