

Rast bakterije *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 pri različitim uvjetima šaržnog uzgoja

Blašković, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:159:659762>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Iva Blašković

7343/BT

RAST BAKTERIJE *Leuconsotoc mesenteroides* LMG 7954
PRI RAZLIČITIM UVJETIMA ŠARŽNOG UZGOJA

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 1

Mentor: prof. dr. sc. Anita Slavica

Zagreb, srpanj 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

**Rast bakterije *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 pri različitim uvjetima
šaržnog uzgoja**

Iva Blašković, 7343/BT

Sažetak: Fiziološki potencijal bakterija mliječne kiseline nedovoljno je istražen i primijenjen u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji različitih proizvoda. Neka najnovija istraživanja ukazuju na robusnost ovih bakterija i njihovu potencijanu primjenu u proizvodnji vrlo vrijednih biokemikalija kao i drugih proizvoda, koji su inače izvanredno prihvaćeni na tržištu. U ovom radu istraživana je mogućnost soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 da osim glukoze koristi i saharozu kao izvor ugljika i energije. Kreirani su mikroaerofilni i aerobni uvjeti šaržnog uzgoja ovog soja u laboratorijskom mjerilu i praćena je krivulja rasta ove heterofermentativne bakterije mliječne kiseline. Osim toga, preživljavanje *L. mesenteroides* LMG 7954 okarakterizirano je u reakcijskoj smjesi s visokim koncentracijama glicerola ($c = 2,0$ mol/L), još jednog potencijalnog izvora ugljika za ovaj soj, i saharoze ($c = 0,8$ mol/L). U ovoj reakcijskoj smjesi visokog osmotskog tlaka bakterijske stanice iz polovice eksponencijalne faze rasta tretirane su ultrazvukom. Na temelju eksperimentalnih rezultata procijenjeni su trajanje faza rasta i specifična brzina rasta soja *L. mesenteroides* LMG 7954 pri odabranim uvjetima šaržnog uzgoja, koji predstavljaju izvrsnu polaznu točku za daljnja istraživanja fiziologije ovog soja i njezinu primjenu u održivoj biotehnološkoj proizvodnji proizvoda i usluga visoke dodane vrijednosti.

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954, šaržni uzgoj, tretman ultrazvukom

Rad sadrži: 28 stranica, 10 slika, 4 tablice, 17 literaturnih navoda, 4 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Anita Slavica

Datum obrane: srpanj 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor Thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

**Growth of bacterium *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 during batch
cultivation under different conditions**

Iva Blašković, 7343/BT

Abstract: Physiological potential of lactic acid bacteria has been insufficiently investigated and implemented in biotechnological industrial production of different products. Few latest investigations indicate robustness of those bacteria as well as their potential applications in manufacturing of value added biochemicals and other products that are remarkably accepted in a market. In this work a capacity of a strain *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 to use sucrose, besides glucose, as a source of carbon and energy was explored. Microaerophilic and aerobic conditions of laboratory scale batch cultivations were created and a growth curve of those heterofermentative lactic acid bacterium was followed. Besides, survival of *L. mesenteroides* LMG 7954 in a reaction mixture containing high concentration of glycerol ($c = 2,0$ mol/L), another potential source of a carbon for the strain, and sucrose ($c = 0,8$ mol/L) was characterized. In this reaction mixture with high osmotic pressure bacterial culture with the cells from the middle of exponential growth phase were treated by ultrasound. Duration of growth phases and specific growth rate of the strain *L. mesenteroides* LMG 7954 were estimated based on the experimental results obtained under selected conditions of batch cultivations. Obtained values represents excellent starting point for further investigations of physiology of the strain and its implementation in sustainable biotechnological production of different products and high added value utilities.

Keywords: lactic acid bacteria, *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954, batch cultivation, ultrasound treatment

Thesis contains: 28 pages, 10 figures, 4 table, 17 references, 4 supplements

Original in: Croatian

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

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

Defence date: July 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Heterofermentativne bakterije mliječne kiseline – rod <i>Leuconostoc</i>	2
2.1.1. Vrsta <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	5
3. EKSPERIMENTALNI DIO	6
3.1. Materijali	6
3.1.1. Mikroorganizam.....	6
3.1.2. Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterijske kulture	6
3.1.3. Aparatura i pribor.....	7
3.1.3.1. Spektrofotometar	7
3.1.3.2. Mikroskop.....	7
3.1.3.3. Ultrazvučna kupelj.....	8
3.1.3.4. Ostala oprema	8
3.2. Metode rada	8
3.2.1. Priprava hranjivih podloga	8
3.2.2. Priprava cjepiva	9
3.2.3. Uzgoj soja <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954 šaržnim postupkom.....	100
3.2.4. Praćenje krivulje rasta u hranjivoj podlozi i reakcijskoj smjesi	100
4. REZULTATI I RASPRAVA	121
4.1. Uzgoj heterofermentativne bakterije mliječne kiseline <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954 u hranjivoj kemijski djelomično definiranoj podlozi šaržnim postupkom pri različitim uvjetima.....	11
5. ZAKLJUČCI	232
6. LITERATURA	243
7. PRILOZI	265

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline tradicionalno se koriste u industrijskoj proizvodnji različitih proizvoda i ove su bakterije izvanredno pozitivno prihvaćene kod krajnjih potrošača kao uobičajeni sastojak takvih proizvoda, ali i kao bakterije koje povoljno utječu na kvalitetu i održivost proizvoda kao i po zdravlje potrošača. Kod ovih bakterija prvenstveno se podrazumijeva poželjna proizvodnja mliječne kiseline, kao krajnjeg proizvoda fermentacije ugljikohidrata i još nekih izvora ugljika, kao i još samo nekoliko krajnjih proizvoda u znatno manjim koncentracijama, npr. acetoina i diacetila, koji doprinose kvaliteti proizvoda. Nažalost, regulacija metabolizma ugljikohidrata u stanicama ovih bakterija slabo je istražena, tako da nam do danas nisu poznati precizniji mehanizmi na temelju kojih bi se ova grupa bakterija mogla raspodijeliti u nekoliko karakterističnih grupa, kao što je to uvriježena podjela na obligatno homofermentativne bakterije mliječne kiseline, zatim fakultativno heterofermentativne i obligatno fermentativne bakterije mliječne kiseline. Osim metabolizma ugljikohidrata, za ove auksotrofne industrijske biokatalizatore se pretpostavlja da imaju relativno visoke zahtjeve glede potrebitih sastojaka hranjivih podloga u kojima bi mogle optimalno rasti. Metabolizam aminokiselina, vitamina i drugih sastojaka hranjivih podloga u kojima rastu bakterije mliječne kiseline sasvim je podzastupljen u dosadašnjim istraživanjima i tek nedavno prepoznat od nekoliko istraživačkih grupa, koji su dotakle potencijalnu robusnost ovih industrijskih biokatalizatora. U skladu s tim je dostupno samo nekoliko znanstvenih radova koji opisuju hidrolitičku aktivnost ove grupe bakterija, kao i njihovo preživljavanje i specifične aktivnosti u tzv. ekstremnim uvjetima (npr. niska temperatura, sastav hranjive podloge i dr.).

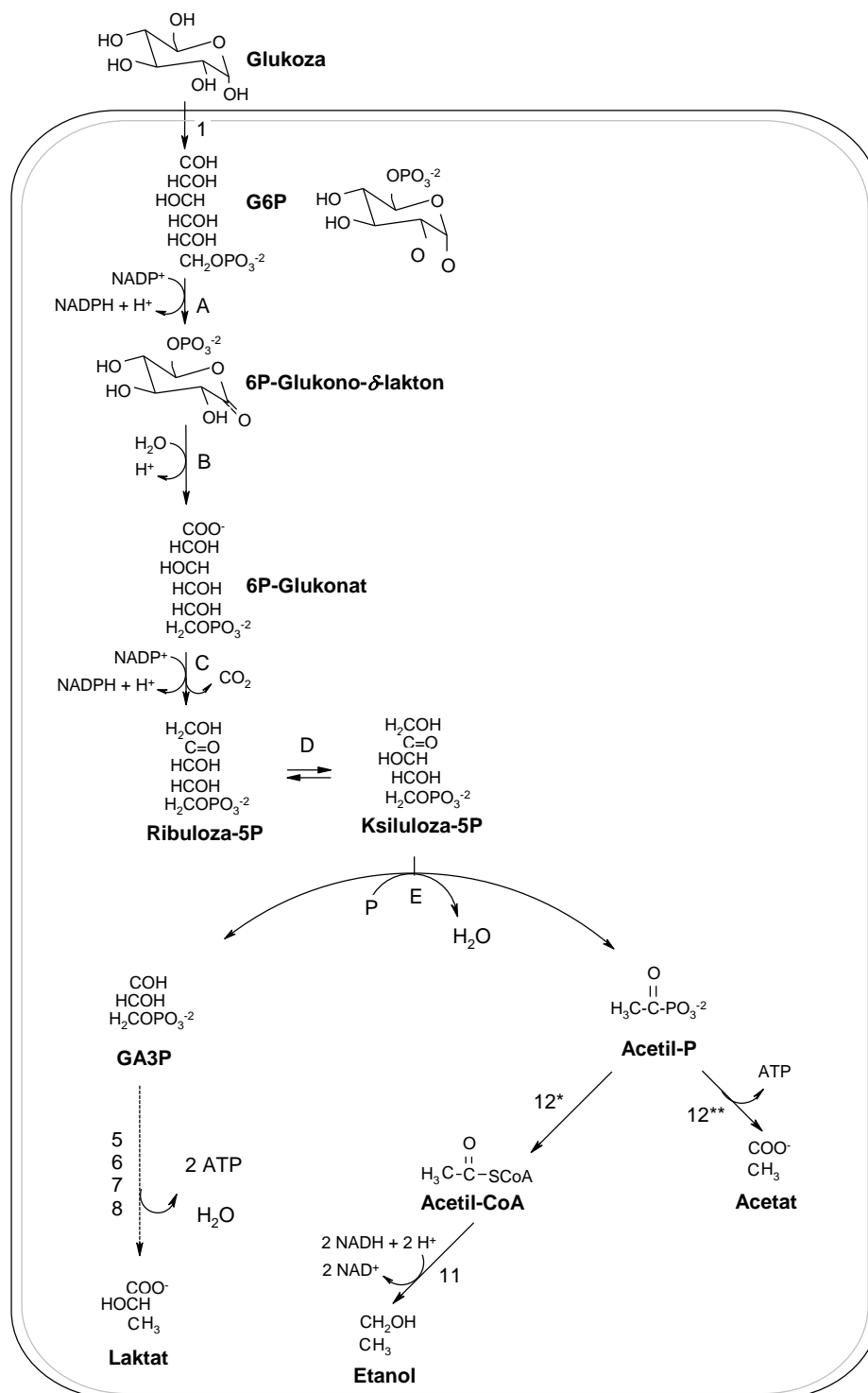
Cilj ovog rada bio je uzgojiti soj *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 šaržnim postupkom u laboratorijskom mjerilu. Fiziologija ove (navodno) heterofermentativne bakterije mliječne kiseline slabo je istražena, pa je bilo potrebno koristiti nekoliko izvora ugljika tj. hranjivih podloga različitog sastava, kako bi se utvrdilo može li ovaj soj koristiti dva različita ugljikohidrata - glukozu i saharozu, kao izvore ugljika i energije. Kako je djelomično opisan utjecaj otopljenog kisika u suspenziji na metabolizam ugljikohidrata u stanicama bakterija iz roda *Leuconostoc*, nadalje je bilo potrebno istražiti utjecaj mikroaerofilnih i aerobnih uvjeta uzgoja šaržnim postupkom na rast ovog soja. Visoka koncentracija saharoze i glicerola, kao potencijanih supstrata koji mogu utjecati na regulaciju metabolizma i rast ovog soja, također je parametar koji je istražen u cilju primjene ovog soja u industrijskim uvjetima. Permeabilizacija stanica *L. mesenteroides* LMG 7954 ultrazvukom može biti neinvazivna metoda značajna za industrijsku primjenu ovog soja, pa je utjecaj ultrazvuka u tzv. ekstremnim uvjetima (visoke početne koncentracije saharoze i glicerola) također istražen i opisan u ovom završnom radu. Ova pionirska istraživanja svakako će baciti novo svjetlo na fiziologiju i, sukladno tomu, moguću primjenu ovog soja u proizvodnji visokovrijednih kemikalija.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Heterofermentativne bakterije mliječne kiseline – rod *Leuconostoc*

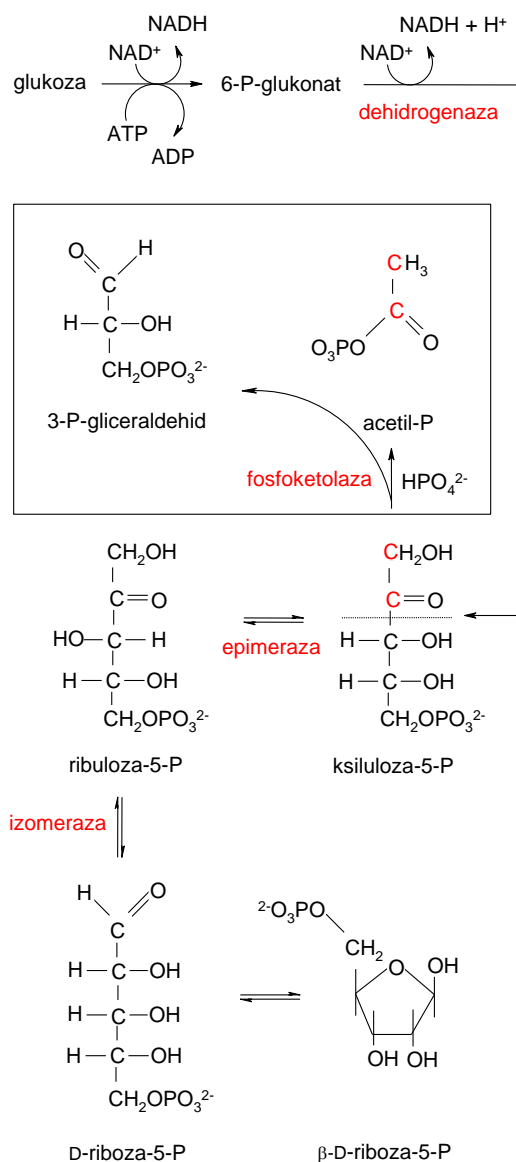
U porodicu *Leuconostocaceae* ubrajaju se Gram-pozitivne, nepokretne i nesporogene bakterije. Stanice ovih bakterija mogu imati elipsoidan ili, vrlo često, izduženi kuglasti oblik (Hucker i Pederson, 1930). Tri roda pripadaju porodici *Leuconostocaceae*: *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Weissella*. U rod *Leuconostoc* svrstano je 10 vrsta s tri *Leuconostoc mesenteroides* podvrste (Garvie, 1986). Pri tome je *Leuconostoc paramesenteroides* reklasificiran kao *Weissella paramesenteroides* (Collins i sur., 1993), dok je *Leuconostoc oenos* pridružen rodu *Oenococcus oeni* sp. nov., (Dicks i sur., 1995).

Bakterije iz roda *Leuconostoc* nepatogene su za čovjeka, životinje i biljke. Ove su bakterije fakultativno anaerobni kemoorganotrofi, koji ne iskazuju katalaznu aktivnost i ne posjeduju citokrome. U stanicama bakterija iz ovog roda nije identificirana aktivnost aldolaze fruktoza 1,6-difosfata, dok je okarakterizirana aktivnost glukoza 6-fosfat dehidrogenaze. Glukožu fermentiraju kombinacijom pentozna-fosfatnog puta (Slika 1.) i fosfoketolaznog puta (Slika 2.). Na ovaj način proizvode ugljikov dioksid i ribulozu 5-fosfat (Slika 1.) i dalje, zbog aktivnosti ksiluloza 5-fosfat fosfoketolaze i enzima koji slijede u ovom metaboličkom putu, proizvedu jednak broj molova mliječne kiseline i etanola (acetata) (Cogan, 1987; De Moss i sur., 1951; Garvie, 1986; Schmitt i sur., 1992). Pri mikroaerofilnim uvjetima reducirani koenzim NADH regenerira se u NAD⁺ u reakcijama koje kataliziraju laktat dehidrogenaza, acetaldehid dehidrogenaza i alkohol dehidrogenaza (Condon, 1987). Pri aerobnim uvjetima vrste *Leuconostoc mesenteroides* reducirani NADH mogu reoksidirati u reakcijama koje kataliziraju NADH oksidaze i NADH peroksidaze (Condon, 1987). Proizvodnja acetata prevladava nad proizvodnjom etanola tijekom uzgoja pri aerobnim uvjetima. Pri tome stanica pridobije dvostruko više molova metaboličke energije (ATP) nego pri mikroaerofilnim uvjetima (Condon 1987; Ito i sur., 1983; Johnson i McCleskey, 1957; Keenan, 1968). Važno je napomenuti da do danas nije poznato metabolizira li se galaktoza Leloir-ovim putem u stanicama ovog roda (De Vos i sur., 2009). Kako je ksiluloza 5-fosfat fosfoketolaza ključni enzim u metabolizmu ugljikohidrata u stanicama iz roda *Leuconostoc* (Kandler i sur., 1983), pretpostavlja se da bi ove bakterije iz roda *Leuconostoc* mogle uspješno fermentirati i pentoze.



Slika 1. Razgradnja heksoza pentozna-fosfatnim putem u stanicama bakterija mliječne kiseline iz roda *Leuconostoc*. Prikazane reakcije kataliziraju enzimi pobrojani na sljedećoj stranici.

Enzimi: A, glukoza 6-fosfat dehidrogenaza (EC 1.1.1.49); B, 6-fosfoglukonolaktonaza (EC 3.1.1.31); C, 6-fosfoglukonat dehidrogenaza (EC 1.1.1.44); D, ribuloza-5P epimeraza (EC 5.1.3.1); E, fosfoketolaza (EC 4.1.2.9); 5, gliceraldehid 3-fosfat 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); 11, acetaldehid dehidrogenaza (EC 1.2.1.3) i alkohol dehidrogenaza (EC 1.1.1.1); 12*, fosfotransacetilaza (EC 2.3.1.8); 12**, acetat kinaza (EC 2.7.2.1).



Slika 2. Fosfoketolazni put u stanicama bakterija mliječne kiseline iz roda *Leuconostoc*.

2.1.1. Vrsta *Leuconostoc mesenteroides*

Soj *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (LMG 7954; Knudsen i Sørensen, 1929) još se označava i ovim brojevima iz različitih zbirki mikroorganizama: Hucker P2615, LMG 18973, NCFB 801, NCFB 1589, NCIMB 3356, NCTC 3356, NRRL B-1146, ATCC 19254, CCUG 21965, CIP 103009, DSM 20346, LMG 6909, NCIMB 12008, NRRL B-3252, VKM B-1420 (Anonymous 1, 2019). Tijekom rasta stanice ovog soja mogu formirati dugačke lance. Većina vrsta ne može fermentirati saharozu (Whittenbury, 1966), međutim ukoliko im je glavni izvor ugljika i energije saharoza, stanice ovog soja ne proizvode dekstran. Piruvat im obično služi kao elektron-akceptor u reakciji regeneracije NADH i pri tome se proizvodi D-(-)-laktat, a ne proizvode se acetoin i diacetil. Ovaj auksotrofni soj treba brojne vitamine i aminokiseline za optimalan rast pri temperaturi između 18°C i 25°C.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizam

Soj heterofermentativne bakterije mliječne kiseline *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 je korišten kao radni mikroorganizam u ovom završnom radu. Soj se održava i čuva u zbirci mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterijske kulture

Čista kultura ovog bakterijskog soja se čuva u hranjivoj De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) podlozi (De Man i sur., 1960). Za uzgoj bakterijskog soja u laboratorijskom mjerilu u Erlenmeyer tikvicama korištena je kemijski djelomično definirana hranjiva podloga u kojoj je saharoza glavni izvor ugljika i energije za rast ove bakterije (Vandamme i sur., 1987; Tablice 1. i 2.).

Tablica 1. Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu hranjive kemijski djelomično definirane podloge (Vandamme i sur., 1987) za uzgoj soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954.

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
saharoza	$C_{12}H_{22}O_{11}$	p.a.	Gram-mol, Hrvatska
kvašćev ekstrakt	-	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
kalijev dihidrogen fosfat	KH_2PO_4	tehnički	Kemika, Hrvatska
magnezijev sulfat heptahidrat	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	p.a.	Kemika, Hrvatska
manganov sulfat monohidrat	$MnSO_4 \cdot H_2O$	p.a.	Merck, Njemačka

Tablica 1. Čistoća i porijeklo kemikalija za pripravu hranjive kemijski djelomično definirane podloge (Vandamme i sur., 1987) za uzgoj soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 (nastavak).

željezov sulfat heptahidrat	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	p.a.	Kemika, Hrvatska
tiamin-HCl	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS}$	p.a.	Merck, Njemačka
natrij-L-askorbat	$\text{C}_6\text{H}_2\text{NaO}_6$	p.a.	Merck, Njemačka
glicerol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Kemika, Hrvatska

3.1.3. Aparatura i pribor

3.1.3.1. Spektrofotometar

Tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 praćena je optička gustoća suspenzije izuzete iz Erlenmeyer tikvice. Optička gustoća se određivala pomoću spektrofotometra Helios Epsilon (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) pri valnoj duljini svjetlosti (λ) od 608 nm. Određivanje se provodilo u staklenim kivetama promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) u koje je dodana izvorna suspenzija, odnosno njezino prvo i/ili drugo decimalno razrjeđenje u sterilnoj demineraliziranoj vodi.

3.1.3.2. Mikroskop

Bakterijske stanice obojene po Gramu vizualizirane su svjetlosnim mikroskopom Olympus CX21 (Olympus; Hamburg, Njemačka) pri povećanju od 1000 puta (imerzijski objektiv).

3.1.3.3. Ultrazvučna kupelj

Nakon uzgoja bakterijskog soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 pri aerobnim uvjetima na magnetskoj miješalici, bakterijska suspenzija je prebačena u laboratorijsku čašu ukupnog volumena 100 mL u kojoj je priređena reakcijska smjesa, koja je sadržavala glicerol ($c = 2,0$ mol/L) i saharozu ($c = 0,8$ mol/L). Ovako priređena reakcijska smjesa tretirana je u ultrazvučnoj kupelji Elmasonic P 300 H (Elma, Singen, Njemačka) pri 37 kHz, 90 W i $34,0 \pm 1,5^\circ\text{C}$.

3.1.3.4. Ostala oprema

- Analitička vaga Shimadzu AX-200 W/O AC ECTA (Shimadzu; Kyoto, Japan);
- Tehnička vaga Tehtnica ET-1211 (Tehtnica; Železniki, Slovenija);
- Autoklav Sutjeska (Beograd, Jugoslavija);
- Sušionik Instrumentarija ST-50 (Zagreb, Hrvatska);
- pH-metar 744, Metrohm (metrohm AG; Zofingen, Švicarska);
- bakteriološki elektronski termostat BTE-S (Termomedicinski aparati, Zagreb, Hrvatska);
- hladnjak Gorenje (Gorenje gospodinjski aparati d.d.; Velenje Slovenija)
- magnetska mješalica (Thermo Scientific; Cimarec i Poly; Waltham, Massachusetts, SAD).

Rezultati dobiveni tijekom istraživanja, koja su opisana u ovom završnom radu, su prikupljeni i obrađeni pomoću osobnog računala s programskim paketom MS Office 2007.

3.2. Metode rada

3.2.1 Priprava hranjivih podloga

Za čuvanje i održavanje kulture soja *L. mesenteroides* LMG 7954 korištena je hranjiva MRS podloga (De Man i sur., 1960). Za uzgoj soja u staklenim epruvetama ($V_k \approx 10$ mL) korištena je MRS podloga (za pripravu cjepiva), dok je za uzgoj bakterijskih stanica u Erlenmeyer tikvicama ($V_k = 100$ mL) korištena hranjiva podloga u kojoj je saharoza glavni izvor ugljika i energije (Vandamme i sur., 1987; Tablice 1. i 2.). Ova hranjiva podloga za uzgoj stanica

bakterijskog soja u Erlenmeyer tikvicama pripremljena je tako da su svi sastojci navedeni u Tablici 2. A, odvagani, otopljeni u 100 mL demineralizirane vode i sterilizirani u autoklavu pri 121°C tijekom 20 minuta. U ovu sterilnu otopinu nakon hlađenja do sobne temperature dodano je 1,0 mL prethodno profiltrirane otopine (filteri sa porama 0,20 µm; LLG-Syringe filters, nylon, 0,2 µm, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), koja je sadržavala sastojke u koncentracijama prikazanim u Tablici 2. B.

Tablica 2. Sastav kemijski djelomično definirane hranjive podloge (A) i filtracijom sterilizirane otopine (B) (Vandamme i sur., 1987).

A)

kemikalija	kemijska formula	γ (g/L)
saharoza	$C_{12}H_{22}O_{11}$	100
kvašćev ekstrakt	-	10
kalijev dihidrogen karbonat	KH_2PO_4	10

B)

kemikalija	kemijska formula	γ (g/L)
magnezijev sulfat heptahidrat	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,4
manganov sulfat monohidrat	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,2
željezov sulfat heptahidrat	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01
tiamin-HCl	$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$	0,01
natrij-L-askorbat	$C_6H_2NaO_6$	0,05

3.2.2. Priprava cjepiva

Bakterijski soj je uzgajan i održavan u hranjivoj MRS podlozi (De Man i sur., 1960). Kultura je precjepljivana svakih 48 h, inkubirana pri 37°C preko noći i nakon toga spremljena u hladnjaku pri +4°C. Prije provođenja uzgoja u Erlenmeyer tikvici, proveden je uzgoj cjepiva najprije u dvije epruvete sa po 8-10 mL sterilne hranjive MRS podloge pri 37°C preko noći, a

zatim je ovako uzgojenom suspenzijom naciepljena sterilna hranjiva kemijski djelomično definirana podloga (Vandamme i sur., 1987) u Erlenemeyer tikvici.

3.2.3. Uzgoj soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 šaržnim postupkom

Šaržni uzgoj započet je naciepljivanjem sterilne hranjive kemijski djelomično definirane podloge (Vandamme i sur., 1987) u Erlenemeyer tikvici ($V_K = 100$ mL, $V = 300$ mL) s magnetičem. Volumni udio cjepiva iznosio je 5%. Šaržni uzgoj proveden je statično (bez miješanja) i uz miješanje na magnetskoj miješalici pri 250 rpm. Sukladno tomu, šaržni uzgoj proveden bez miješanja smatra se mikroaerofilnim, dok se šaržni uzgoj uz miješanje s pomoću magnetića na magnetskoj miješalici smatra aerobnim uzgojem. Uzgoji su provedeni pri temperaturi od $28 \pm 0,05$ °C.

3.2.4. Praćenje krivulje rasta u hranjivoj podlozi i reakcijskoj smjesi

Krivulja rasta ove heterofermentativne bakterije mliječne kiseline je praćena pri mikroaerofilnim (statično, bez miješanja) i aerobnim (uz miješanje) uvjetima. Optička gustoća (OD_{608}) aseptično izuzete suspenzije određivana je svakih sat vremena tijekom prvih dviju faza rasta bakterije u Erlenmeyerovim tikvicama, a nakon ulaska u stacionarnu fazu rasta, izuzimanje uzoraka i određivanje OD_{608} načinjeno je kroz samo nekoliko puta. Na ovaj je način procijenjeno trajanje eksponencijalne faze rasta ovog bakterijskog soja. Nakon toga, uzgoj je ponovljen, ali samo do polovine eksponencijalne faze rasta, nakon čega je suspenzija prebačena u reakcijsku smjesu, koja je sadržavala glicerol ($c = 2,0$ mol/L) i saharozu ($c = 0,8$ mol/L), i tretirana u ultrazvučnoj kupelji (37 kHz; 90 W i $34,0 \pm 1,5$ °C). I u ovim relativno nepovoljnim uvjetima je praćeno preživljavanje i rast stanica bakterijskog soja *L. mesenteroides* LMG 7954.

4. REZULTATI I RASPRAVA

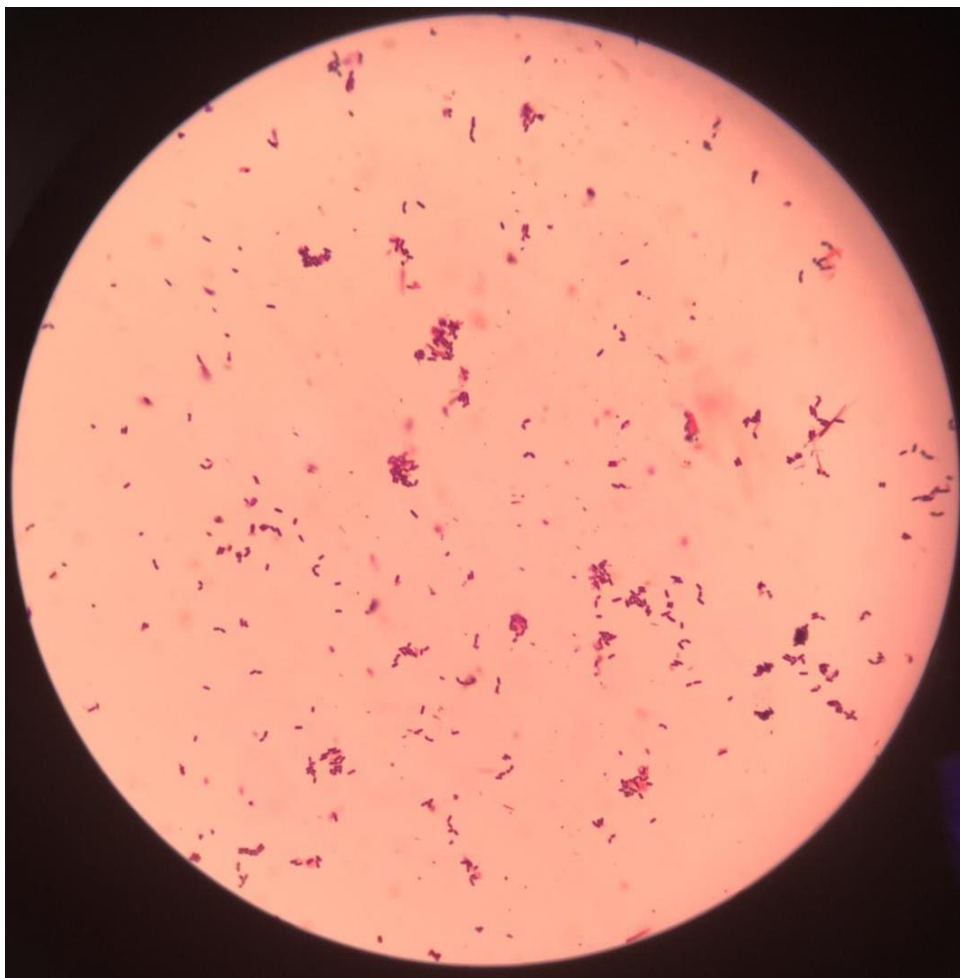
4.1. **Uzgoj heterofermentativne bakterije mliječne kiseline *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u hranjivoj kemijski djelomično definiranoj podlozi šaržnim postupkom pri različitim uvjetima**

U ovom su poglavlju prikazani rezultati dobiveni tijekom uzgoja heterofermentativne bakterije mliječne kiseline *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 (Slika 3.) u hranjivoj kemijski djelomično definiranoj podlozi šaržnim postupkom pri različitim uvjetima. Na Slici 4. prikazana je promjena temperature (θ), a na Slici 5. promjena pH vrijednosti suspenzija tijekom uzgoja ovoga soja šaržnim postupkom pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima. Na slici koja slijedi nakon ove dvije slike u ovom poglavlju prikazane su promjene optičke gustoće bakterijske suspenzije (OD_{608}) i njezinog decimalnog razrijeđenja (10^{-1}) tijekom uzgoja soja *L. mesenteroides* LMG 7954 u Erlenmeyer tikvici pri mikroaerofilnim uvjetima (Slika 6.). Slično tomu, prikazani su rezultati za uzgoj ovoga soja pri aerobnim uvjetima (Slika 7.).

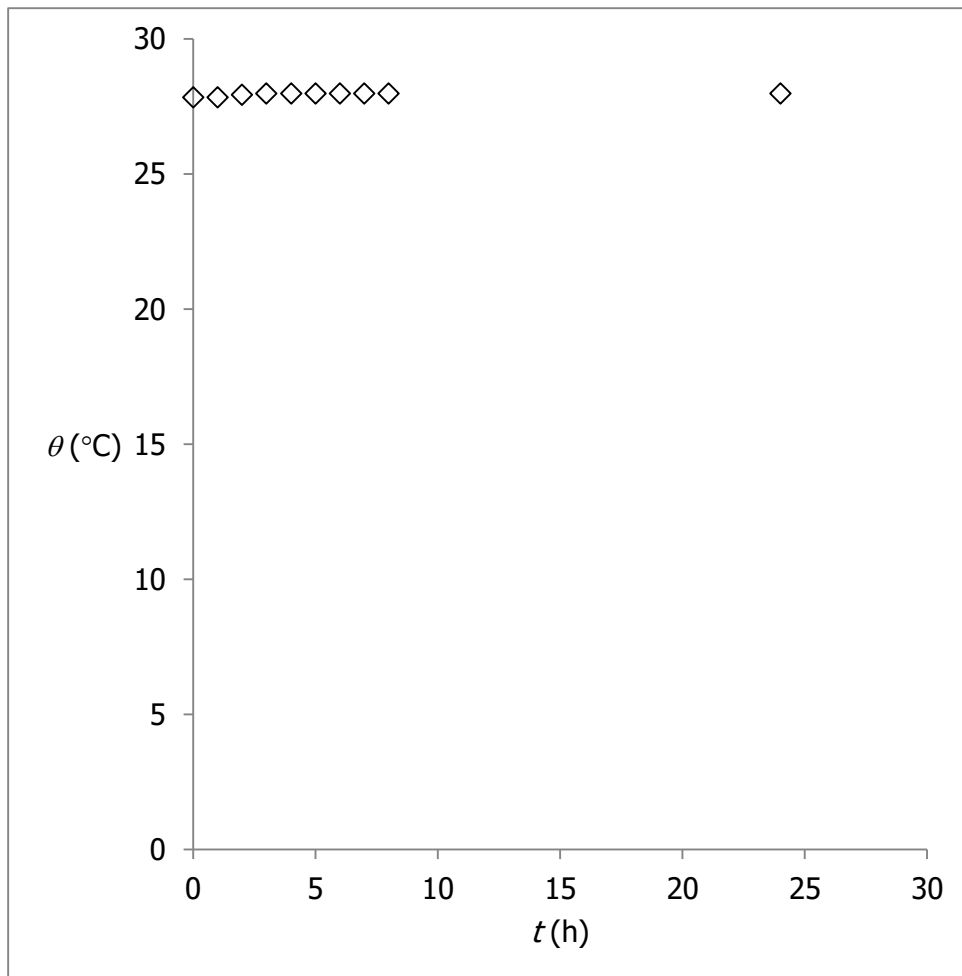
U Tablici 3. prikazane su procijenjene vrijednosti za trajanje pojedinih faza rasta kao i izračunate specifične brzine rasta (vidi Prilog 1. i Prilog 2.) ovog bakterijskog soja tijekom šaržnog uzgoja pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima.

Promjena OD_{608} tijekom uzgoja bakterijskog soja u hranjivoj MRS podlozi do polovine eksponencijalne faze raste i, nakon toga, u reakcijskoj smjesi uz tretman ultrazvukom (37 kHz; 90 W i $34,0 \pm 1,5$ °C) prikazana je na Slici 10., dok su pripadajuće vrijednosti za temperaturu i pH vrijednost suspenzije odnosno reakcijske smjese prikazane na Slikama 8. i 9.

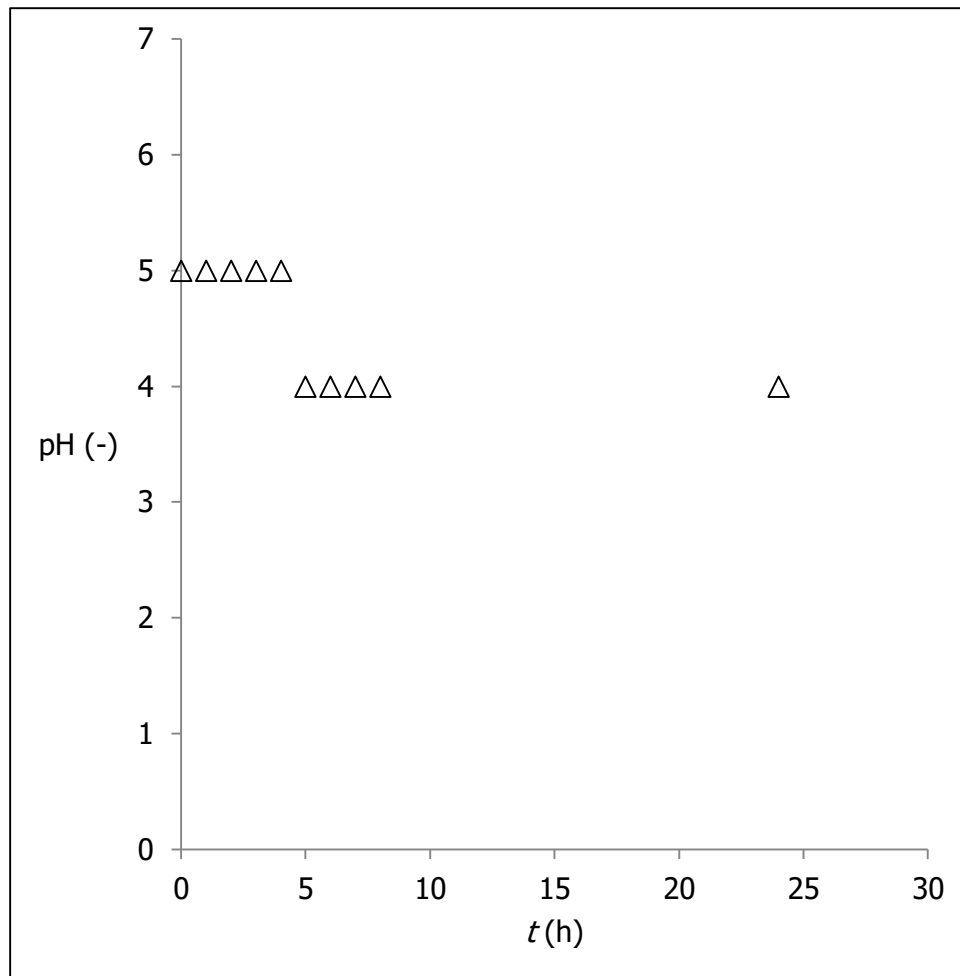
U Tablici 4. prikazane su vrijednosti za trajanje faza rasta i procijenjene vrijednosti za specifične brzine rasta soja *L. mesenteroides* LMG 7954 u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi, kao i u reakcijskoj smjesi visokog osmotskog tlaka pri aerobnim uvjetima šaržnog uzgoja.



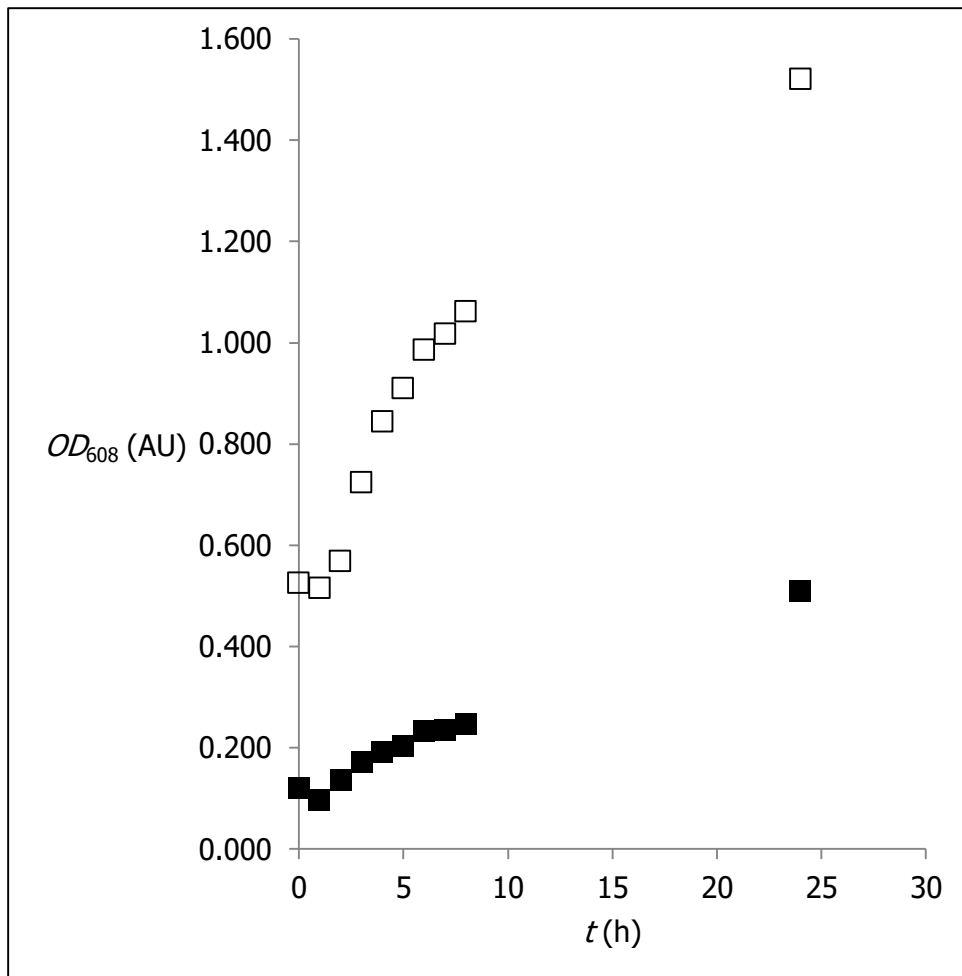
Slika 3. Mikroskopska slika *L. mesenteroides* LMG 7954, koji je obojan po Gramu i promatran pod imerzijskim objektivom (povećanje 1000 puta) mikroskopa Olympus CX21 (Olympus; Hamburg, Njemačka).



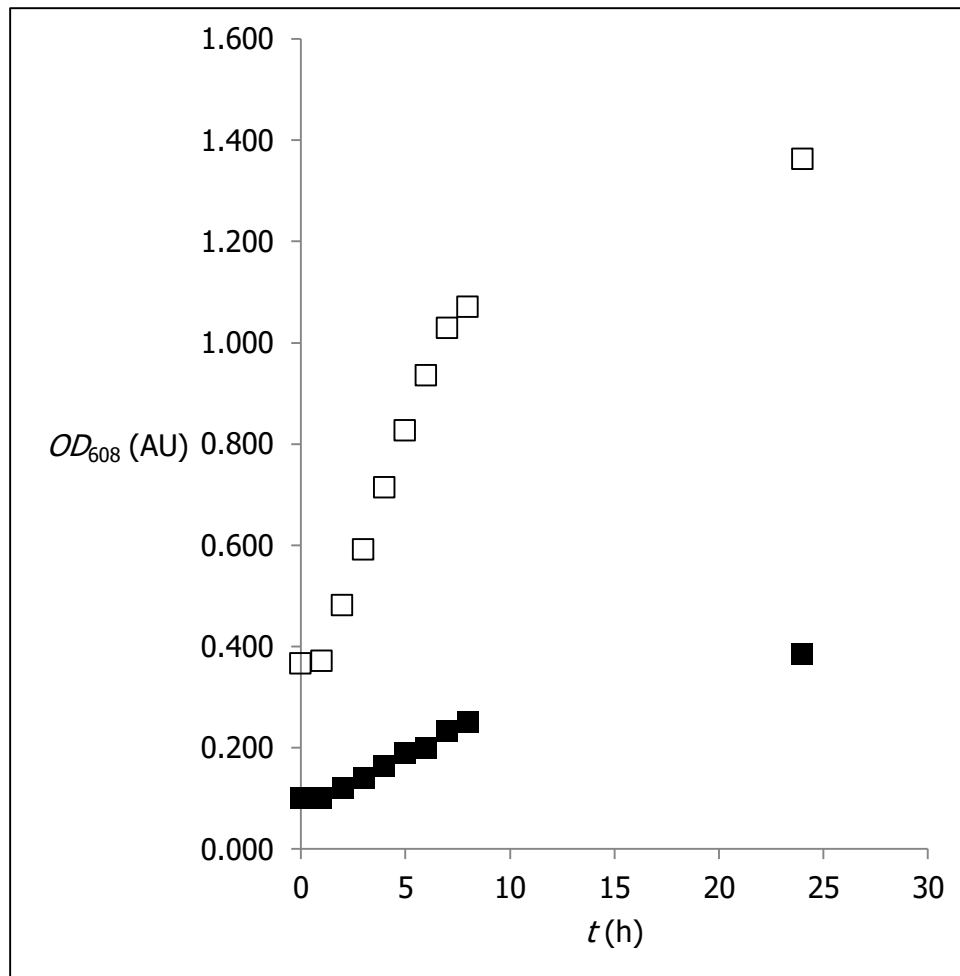
Slika 4. Promjena temperature (θ ; \diamond) tijekom šaržnog uzgoja soja *L. mesenteroides* LMG 7954 pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima. Na slici su prikazane srednje vrijednosti temperature u termostatu tijekom svih uzgoja koji su opisani u ovom završnom radu.



Slika 5. Promjena pH vrijednosti suspenzije (srednja vrijednost, Δ) tijekom šaržnog uzgoja soja *L. mesenteroides* LMG 7954 pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima



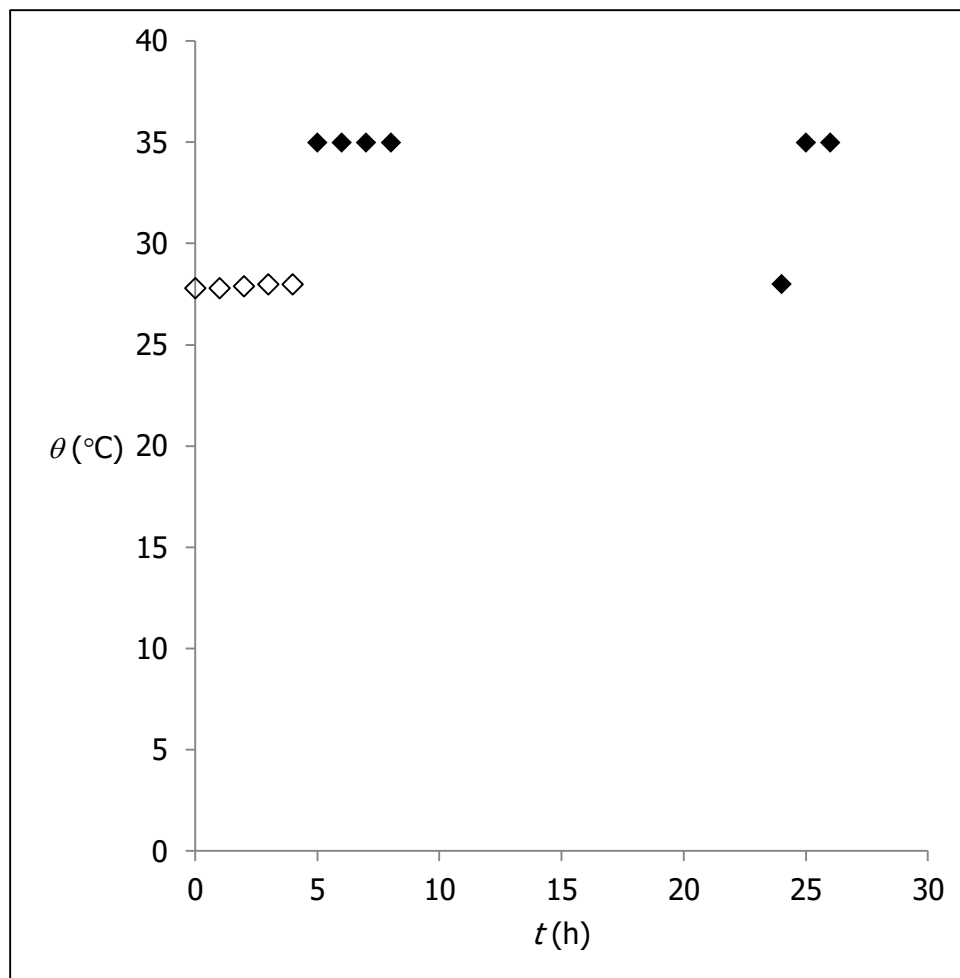
Slika 6. Promjena optičke gustoće suspenzije bakterijske biomase (OD_{608} ; \square) i njenog prvog razrjeđenja (OD_{608} ; \blacksquare) tijekom šaržnog uzgoja soja *L. mesenteroides* LMG 7954 pri mikroaerofilnim uvjetima.



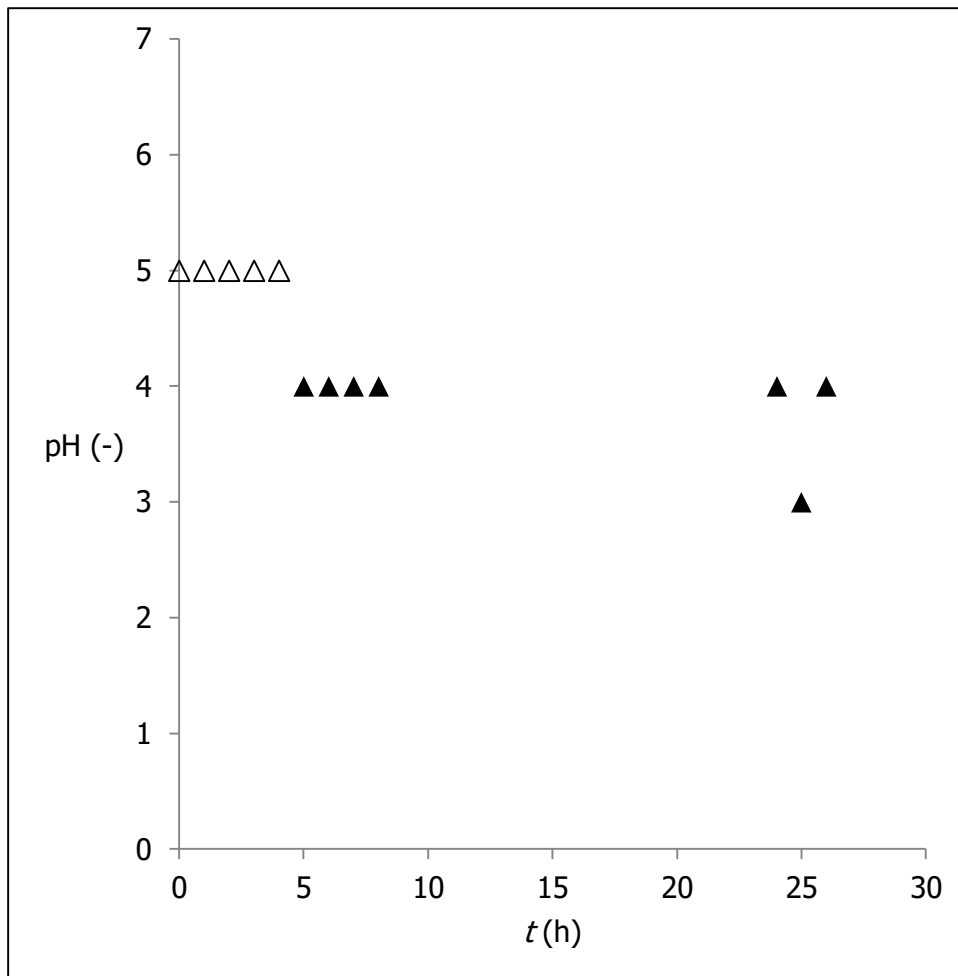
Slika 7. Promjena optičke gustoće suspenzije bakterijske biomase (OD_{608} ; □) i njenog prvog razrjeđenja (OD_{608} ; ■) tijekom šaržnog uzgoja soja *L. mesenteroides* LMG 7954 pri aerobnim uvjetima.

Tablica 3. Trajanje faza rasta i procijenjene specifične brzine rasta (μ , vidi Prilog 1. i Prilog 2.) soja *L. mesenteroides* LMG 7954 tijekom šaržnog uzgoja pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima.

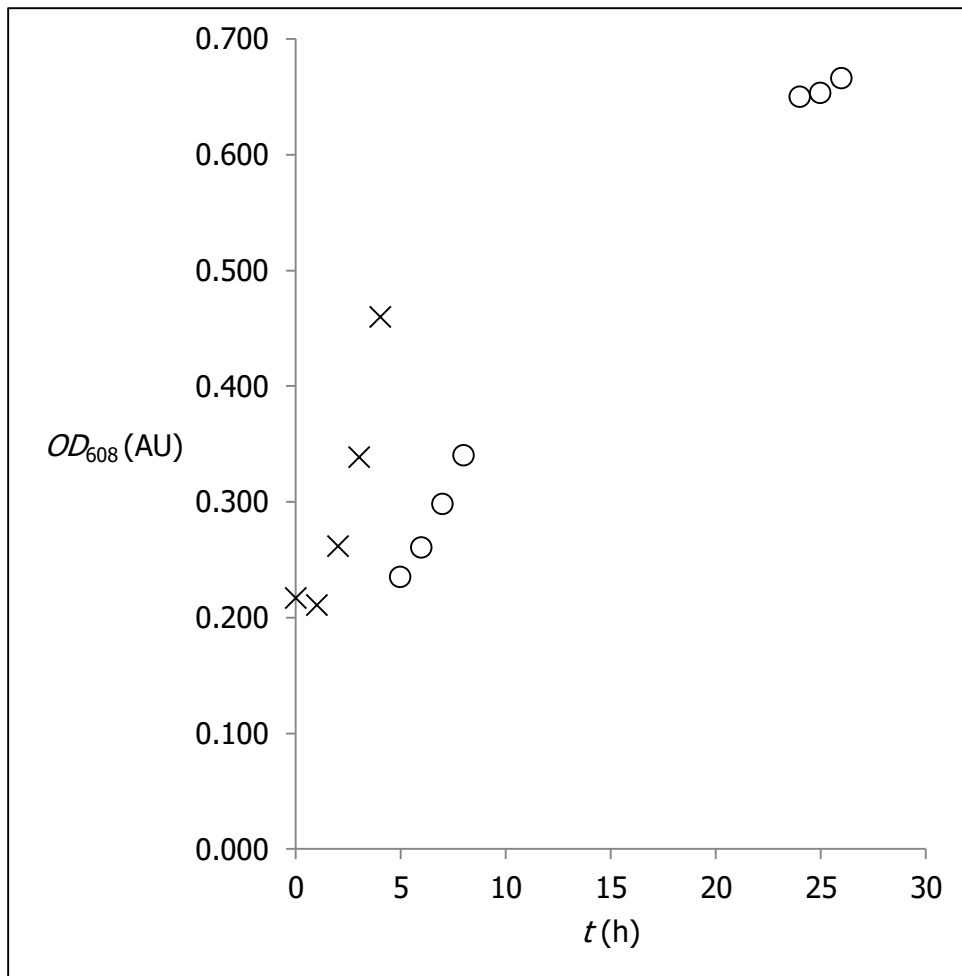
		suspenzija		prvo razrjeđenje suspenzije u destiliranoj vodi (10^{-1})	
		mikroaerofilno	aerobno	mikroaerofilno	aerobno
trajanje	lag	2	1	2	1
faza					
rasta	eksponencijalna	4	6	4	6
(h)					
specifična brzina rasta					
	μ (h^{-1})	0,13	0,17	0,13	0,14



Slika 8. Promjena temperature (srednja vrijednost, θ) tijekom šaržnog uzgoja soja *L. mesenteroides* LMG 7954 u hranjivoj kemijski djelomično definiranoj podlozi do polovine eksponencijalne faze rasta soja *L. mesenteroides* LMG 7954 ($t = 0,0-4,0$ h; \diamond) i zatim u reakcijskoj smjesi ($t = 5,0-8,0$ h i $25,0-26,0$ h; \blacklozenge) uz tretman ultrazvukom (Slika 10.).



Slika 9. Promjena pH vrijednosti suspenzije (srednja vrijednost) tijekom šaržnog uzgoja soja *L. mesenteroides* LMG 7954 u hranjivoj kemijski djelomično definiranoj podlozi do polovine eksponencijalne faze rasta ($t = 0,0 - 4,0$ h; Δ) i zatim u reakcijskoj smjesi ($t = 5,0 - 8,0$ h i $25,0 - 26,0$ h; \blacktriangle) uz tretman ultrazvukom (Slika 10.).



Slika 10. Promjena optičke gustoće (OD_{608}) suspenzije bakterijske biomase tijekom šaržnog uzgoja soja *L. mesenteroides* LMG 7954 u hranjivoj kemijski djelomično definiranoj podlozi do polovine eksponencijalne faze rasta ($t = 0,0-4,0$ h; x) i zatim u reakcijskoj smjesi ($t = 5,0-8,0$ h i 25,0-26,0 h; o) uz tretman ultrazvukom.

Tablica 4. Trajanje faza rasta i procjena specifične brzine rasta (μ , vidi Prilog 3. i Prilog 4.) soja *L. mesenteroides* LMG 7954 u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi kao i u reakcijskoj smjesi visokog osmotskog tlaka uz permeabilizaciju bakterijskih stanica ultrazvukom.

		rast <i>L. mesenteroides</i> LMG 7954 u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi		rast <i>L. mesenteroides</i> LMG 7954 u reakcijskoj smjesi glicerol – saharoza uz tretman ultrazvukom	
		suspenzija	prvo razrjeđenje suspenzije u destiliranoj vodi (10^{-1})	suspenzija	prvo razrjeđenje suspenzije u destiliranoj vodi (10^{-1})
trajanje faza	lag	1	1	/	/
rasta	eksponencijalna	3	3	3	3
	t (h)				
	specifična brzina rasta μ (h^{-1})	0,26	0,09	0,12	0,06

5. ZAKLJUČCI

Na temelju eksperimenata opisanih u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Soj *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 raste u hranjivim podlogama u kojima su glukoza i saharoza glavni izvori ugljika i energije. Korištenje saharoze kvalificira ovaj soj neškodljiv za čovjeka, životinje i biljke za njegovu primjenu u brojnim biotehnološkim industrijskim procesima.
2. Tijekom rasta *L. mesenteroides* LMG 7954 u hranjivoj kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi sa saharozom pri temperaturi od $28 \pm 0,05^\circ\text{C}$ snižava se pH vrijednost suspenzije od početnih 5 do 4 pH jedinice nakon 24 h uzgoja šaržnim postupkom. Dakle, fermentacijom saharoze proizvode se krajnji proizvodi metabolizma koji se transportiraju iz bakterijskih stanica i disociraju u vanstaničnom prostoru, čime povećavaju koncentraciju H^+ iona.
3. Koncentracija kisika u suspenziji utječe na izgled krivulje rasta ove heterofermentativne bakterije mliječne kiseline. Pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima trajanje faza rasta (lag faze i eksponencijalne faze rasta) se razlikuje kao i specifična brzina rasta (μ) stanica ovog soja. Tako je na temelju eksperimentalnih podataka procijenjena specifična brzina rasta *L. mesenteroides* LMG 7954 pri mikroaerofilnim uvjetima od $0,13 \text{ h}^{-1}$, a pri aerobnim uvjetima od $0,17 \text{ h}^{-1}$.
4. Soj *L. mesenteroides* LMG 7954 preživljava i u tzv. ekstremnim uvjetima tj. uvjetima visokog osmotskog tlaka. Ovakvi uvjeti su uobičajeni kod nekih proizvodnih procesa, a u laboratorijskom mjerilu su kreirani prebacivanjem suspenzije bakterijskih stanica, koje su porasle do polovine eksponencijalne faze rasta ($t = 4,0 \text{ h}$), u reakcijsku smjesu koja sadrži visoke koncentracije glicerola ($c = 2,0 \text{ mol/L}$) i saharoze ($c = 0,8 \text{ mol/L}$).
5. Nadalje, ovaj soj preživljava i neinvazivan tretman ultrazvukom u uvjetima visokog osmotskog tlaka i nastavlja eksponencijalno rasti u opisanim uvjetima uzgoja šaržnog postupka kroz narednih 4 h pri čemu je vrijednost za μ procijenjena na $0,12 \text{ h}^{-1}$.

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2019) BCCM - Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, <<http://bccm.belspo.be/>> Pristupljeno 25. lipnja 2019.

Cogan T.M. (1987) Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp.: effects on growth, substrates and products. *J. Appl. Bacteriol.* **63**, 551–558.

Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J., Wallbanks S. (1993) Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 595–603.

Condon, S. (1987) Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 269–280.

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

De Moss R.D., Bard R.C., Gunsalus I.C. (1951) The mechanism of the hetero-lactic fermentation: a new route of ethanol formation. *J. Bacteriol.* **62**, 499–511.

De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.-H., Whitman W.B. (2009) Bergey's manual of systematic bacteriology, 2. izd., Springer. str. 627.

Dicks L.M.T., Dellaglio F., Collins M.D. (1995) Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* corrig. gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 395–397.

Garvie E.I. (1986) Genus *Leuconostoc* van Tieghem 1878, 198^{AL} emended mut. char. Hucker and Pederson 1930, 66^{AL}. U: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2. izd., Holt J.G., Mair N.S., Sharpe H.E., Sneath P.H.A., ur., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, str. 1071–1075.

Hucker G.J., Pederson C.S. (1930) Studies on the Coccoceae XVI. The genus *Leuconostoc*. *N.Y. Agric. Exp. Sta. Bull.* **167**, 3–80.

Ito S., Kobayashi T., Ohta Y., Akiyama Y. (1983) Inhibition of glucose catabolism by aeration in *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Ferm. Technol.* **61**, 353–358.

Johnson M.K., McCleskey C.S. (1957) Studies on the aerobic carbohydrate metabolism of *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* **74**, 22–25.

Kandler O., Schillinger U., Weiss N. (1983) *Lactobacillus halotolerans* sp. nov., nom. rev. and *Lactobacillus minor* sp. nov., nom. rev. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 280–285.

Keenan T.W. (1968) Production of acetic acid and other volatile compounds by *Leuconostoc citrovorum* and *Leuconostoc dextranicum*. *Appl. Microbiol.* **16**, 1881–1885.

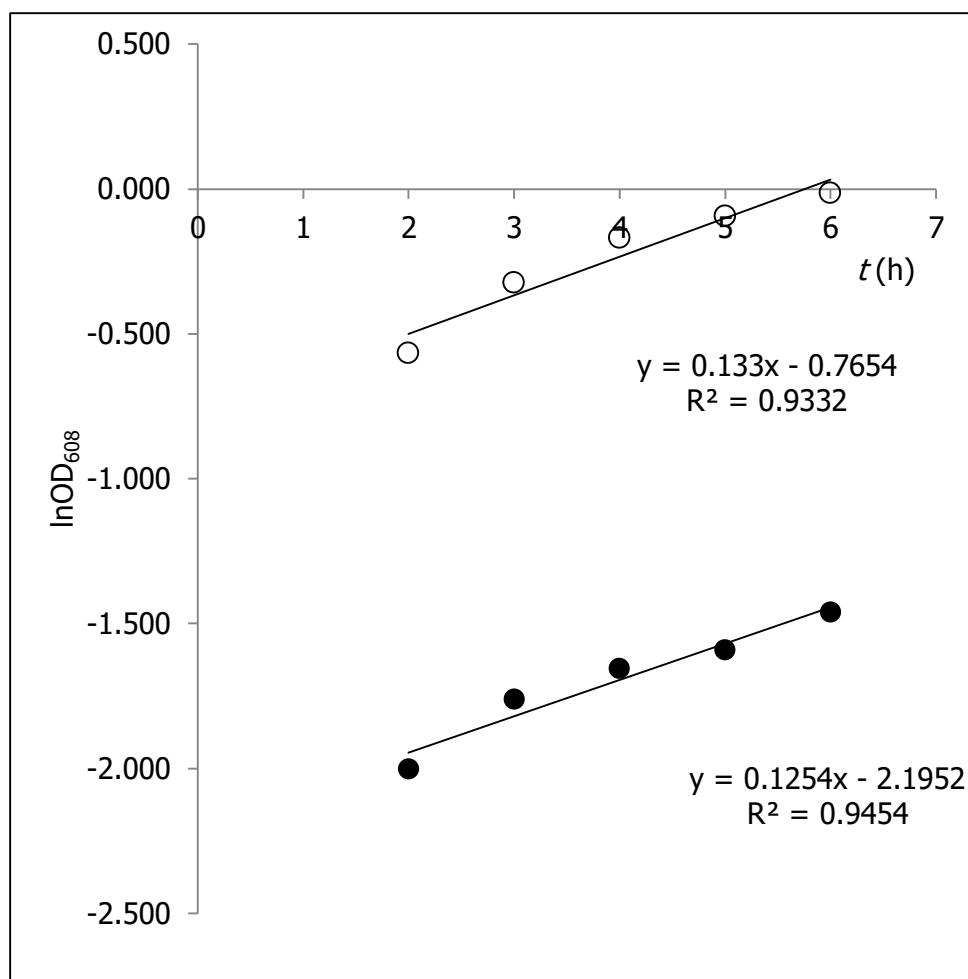
Knudsen S., Sørensen A. (1929) Contributions to the bacteriology of starters. *Aarsskrift K. Veterinagr-Og Landbohøjskole Copenhagen* 131–138.

Vandamme E., Van Loo J., Simkens E., De Laporte A. (1987) Optimization of Sucrose Phosphorylase Production by *Leuconostoc mesenteroides*. *J.Chem.Tech.Biotechnol.* **39**, 251-262.

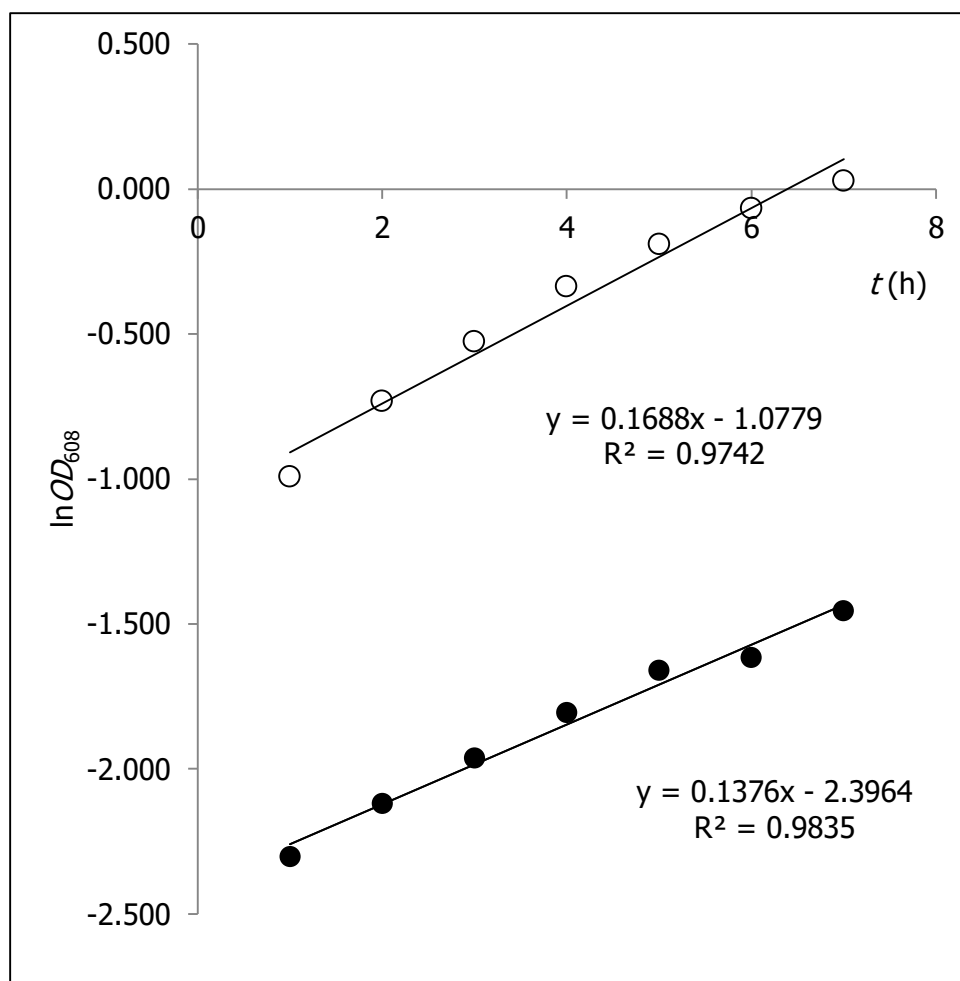
Schmitt P., Davies C., Cardona A. (1992) Origin of end-products from the co-metabolism of glucose and citrate by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 679–683.

Whittenbury R. (1966) A study of the genus *Leuconostoc*. *Arch. Mikrobiol.* **53**, 317–327.

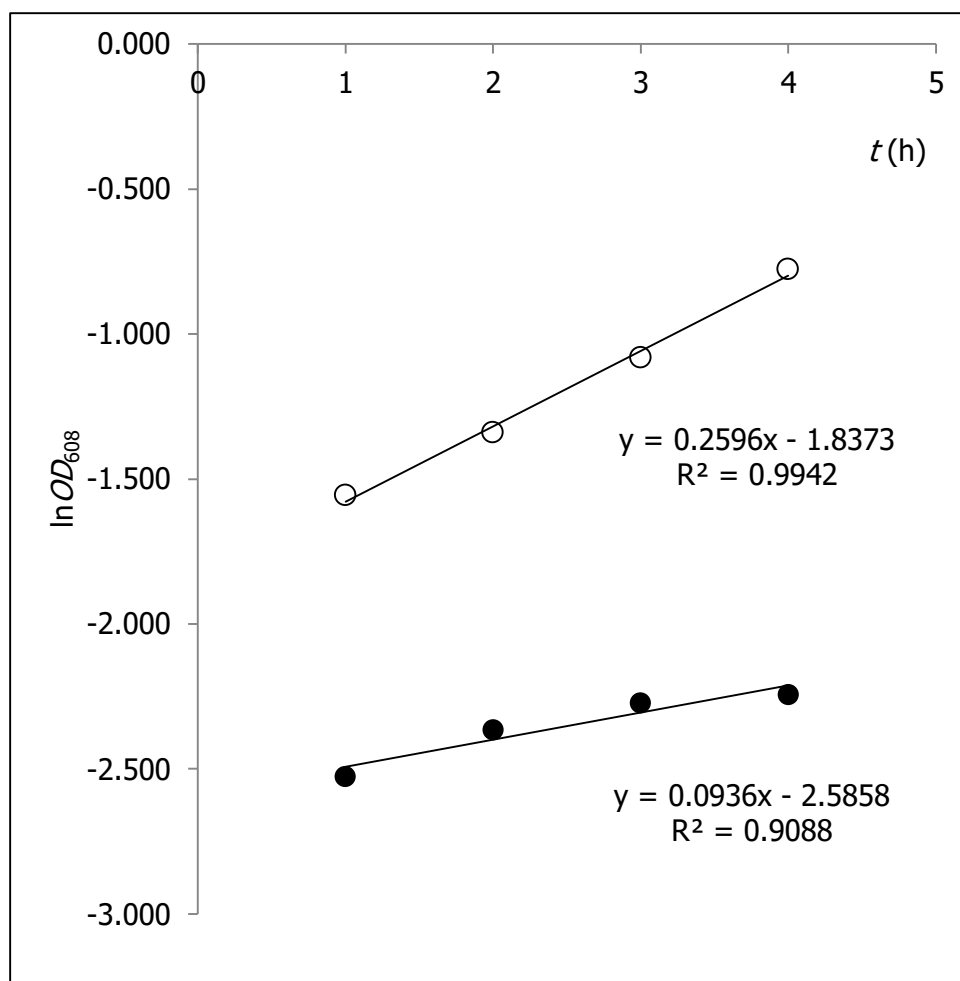
7. PRILOZI



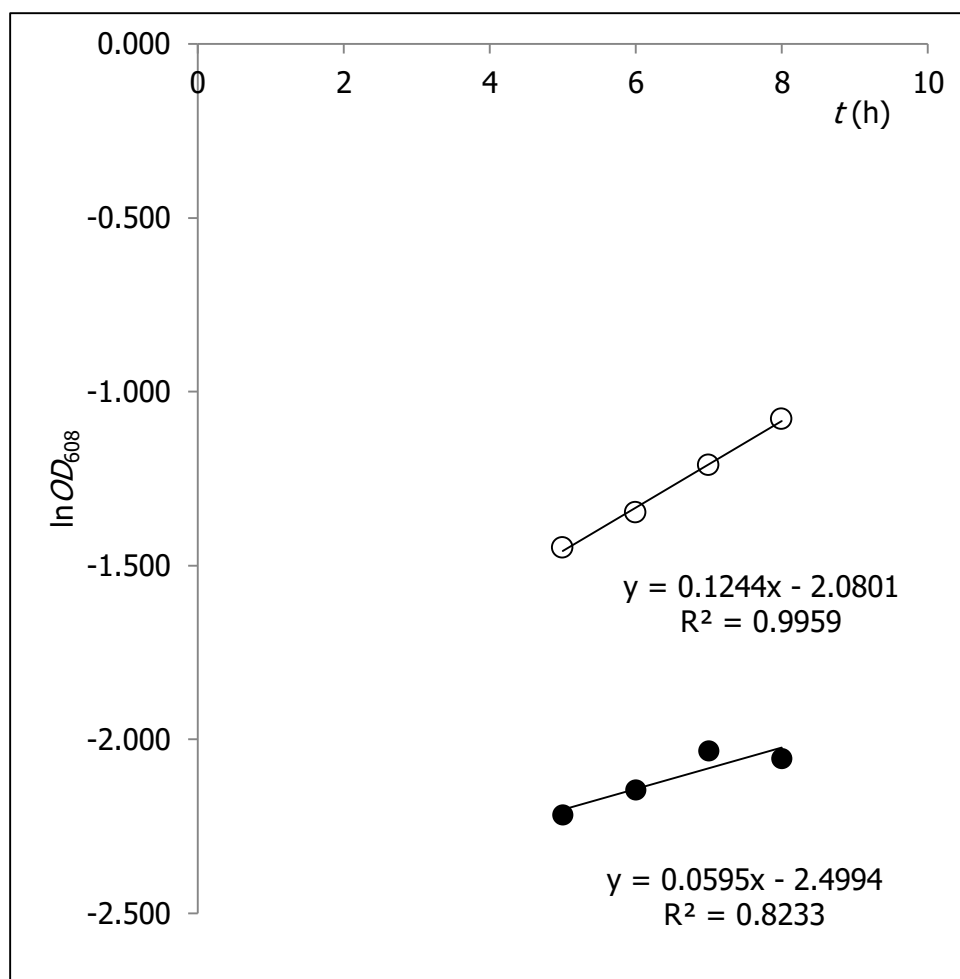
Slika 11. Prikaz procjene vrijednosti za specifičnu brzinu rasta ($\mu = 0,13 \text{ h}^{-1}$; $\mu = 0,13 \text{ h}^{-1}$) i to kao nagiba pravca funkcije ovisnosti \ln vrijednosti optičke gustoće (OD_{608} , o) i njezina prvog razrjeđenja (OD_{608} , •) o vremenu trajanja eksponencijalne faze rasta ($t = 4 \text{ h}$) tijekom mikroaerofilnog uzgoja soja *L. mesenteroides* LMG 7954.



Slika 12. Prikaz procjene vrijednosti za specifičnu brzinu rasta ($\mu = 0,17 \text{ h}^{-1}$; $\mu = 0,14 \text{ h}^{-1}$) i to kao nagiba pravca funkcije ovisnosti \ln vrijednosti optičke gustoće (OD_{608} , o) i njezina prvog razrjeđenja (OD_{608} , •) o vremenu trajanja eksponencijalne faze rasta ($t = 6 \text{ h}$) tijekom aerobnog uzgoja soja *L. mesenteroides* LMG 7954.



Slika 13. Prikaz procjene vrijednosti za specifičnu brzinu rasta ($\mu = 0,26 \text{ h}^{-1}$; $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$) i to kao nagiba pravca funkcije ovisnosti \ln vrijednosti optičke gustoće (OD_{608} , ○) i njezina prvog razrjeđenja (OD_{608} , ●) o vremenu trajanja eksponencijalne faze rasta (t) tijekom aerobnog uzgoja u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi soja *L. mesenteroides* LMG 7954.



Slika 14. Prikaz procjene vrijednosti za specifičnu brzinu rasta ($\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$; $\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$) i to kao nagiba pravca funkcije ovisnosti \ln vrijednosti optičke gustoće ($OD_{608, \circ}$) i njezina prvog razrjeđenja ($OD_{608, \bullet}$) o vremenu trajanja eksponencijalne faze rasta ($t = 5-8 \text{ h}$) tijekom izlaganja ultrazvuku reakcijske smjese soja *L. mesenteroides* LMG 7954.

Izjava o izvornosti

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

ime i prezime studenta