

Porast biomase amilolitičke bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T tijekom uzgoja na maltozi šaržnim postupkom pri suboptimalnoj temepraturi

Bis, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:261758>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ana Bis

7057/BT

**PORAST BIOMASE AMIOLITIČKE BAKTERIJE MLIJEČNE
KISELINE *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T TIJEKOM
UZGOJA NA MALTOZI ŠARŽNIM POSTUPKOM PRI
SUBOPTIMALNOJ TEMPERATURI**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija I

Mentor: prof. dr. sc. Anita Slavica

Zagreb, 2017.

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

**Porast biomase amilolitičke bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus*
DSM 20531^T tijekom uzgoja na maltozi šaržnim postupkom pri
suboptimalnoj temepraturi**

Ana Bis, 7057/BT

Sažetak: Amilolitička bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T pri suboptimalnoj temperaturi, konstantnoj pH vrijednosti i bez aeracije tijekom šaržnog uzgoja može koristiti maltozu kao izvor ugljika i energije i rasti u odabranim uvjetima. Porast bakterijske biomase može se pratiti određivanjem optičke gustoće izuzete suspenzije kao i prvog razrjeđenja ove suspenzije. Iz dobivenih rezultata procijenjeno je trajanje faza rasta ovog soja kao i specifična brzina rasta. Optička gustoća u skladu je sa podacima dobivenim za koncentraciju suhe tvari bakterijske biomase kao i rezultatima određivanja broja stanica u određenom volumenu suspenzije. Tradicionalne metode za praćenje porasta bakterijske biomase, određivanje faza rasta i procjenu nekih parametara, kao što je specifična brzina rasta bakterijskog soja, pouzdane su i u međusobnom skladu, naročito tijekom eksponencijalne faze rasta radnog mikroorganizma i to u laboratorijskom mjerilu. Na temelju ovih rezultata može se planirati uzgoj ovog potencijalnog industrijskog soja u većem mjerilu uz primjenu ovih metoda.

Ključne riječi: amilolitička bakterija mliječne kiseline, maltoza, šaržni uzgoj, bakterijska biomasa, analitičke metode

Rad sadrži: 33 stranice, 12 slika, 1 tablicu, 67 literaturnih navoda, 3 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 2017. godine

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

**Increase in biomass of amylolytic lactic acid bacterium *Lactobacillus amylovorus*
DSM 20531^T during batch cultivation on maltose at suboptimal temperature**

Ana Bis, 7057/BT

Abstract: Amylolytic lactic acid bacterium *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T can use maltose as carbon and energy source during batch cultivation that was carried out at suboptimal temperature, constant pH value and without aeration. Increase in bacterial biomass can be followed by determination of optical density of withdrawn suspension or its dilution. Obtained results were used in estimation of duration of growth phases as well as for estimation of specific growth rate of *L. amylovorus* DSM 20531^T. Optical density values are in agreement with data obtained by determination of dry weight biomass concentration and number of bacterial cells in defined volume of the suspension. Traditional methods for monitoring of the bacterial biomass increase, estimation of the growth phases duration and other parameters of relevance, e.g. specific growth rate, are reliable and in agreement between each other, especially during exponentially growth phase of strain when employed at laboratory scale. Based on obtained results it is possible to plan further cultivation experiments of this potential industrial strain at higher scale with implementation of tested methods.

Keywords: amylolytic lactic acid bacterium, maltose, batch cultivation, bacterial biomass, analytical methods

Thesis contains: 33 pages, 12 figures, 1 table, 67 references, 3 supplement

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 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Bakterije mliječne kiseline – rod <i>Lactobacillus</i>	2
2.1.1. Metabolizam maltoze u stanicama bakterija mliječne kiseline	4
2.1.2. Primjena bakterija mliječne kiseline	8
2.2. Amilolitičke bakterije mliječne kiseline	9
2.2.1. Amilolitička bakterija mliječne kiseline <i>Lactobacillus amylovorus</i>	9
2.3. Mliječna kiselina	10
2.3.1. Proizvodnja mliječne kiseline fermentacijom	11
2.4. Amilolitički enzimi	12
2.4.1. α -amilaza	13
2.5. Metode za praćenje rasta bakterija i procjenu koncentracije bakterijske biomase	14
2.5.1. Metode određivanja gustoće bakterijskih stanica	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.2. Materijali	16
3.2.1. Mikroorganizam	16
3.2.2. Sastav hranjive podloge	16
3.2.3. Aparatura i pribor	17
3.2.3.1. Laboratorijski bioreaktor s miješalom	17
3.2.3.2. Spektrofotometar	17
3.2.3.3. Filtri	18
3.2.3.4. Centrifuge	18
3.2.3.5. Mikroskop	18
3.2.3.6. Ostala oprema	18
3.3. Metode rada	19
3.3.1. Priprava hranjivih podloga	19
3.3.2. Priprava cjepiva	19
3.3.3. Uzgoj ABMK <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531 ^T u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom	19
3.3.3.1. Određivanje koncentracije suhe tvari bakterijske biomase	20
3.4.2.2. Određivanje koncentracije suhe tvari bakterijske biomase nakon filtriranja	21
3.4.2.3. Određivanje broja bakterijskih stanica u određenom volumenu suspenzije	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Uzgoj amilolitičke bakterije mliječne kiseline <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531 ^T u hranjivoj MRS-mal ₂₀ podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom	22
5. ZAKLJUČCI	26
6. LITERATURA	27
7. PRILOZI	32

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) pripadaju grupi Gram-pozitivnih bakterija čiji je glavni krajnji proizvod metabolizma mliječna kiselina. Rodovi koji su svrstani u ovu grupu bakterija su: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weisella*, pri čemu se rod *Lactobacillus* smatra najbrojnijim i industrijski najznačajnijim rodom BMK (Hammes i Hertel, 2009). Zasebna grupa bakterija iz roda *Lactobacillus* su amilolitičke bakterije mliječne kiseline (ABMK). Jedna od fiziološki i procesno najinteresantnijih karakteristika ove grupe bakterija je proizvodnja amilaza - enzima koji kataliziraju hidrolizu glikozidnih veza u polimernim ugljikohidratima i proizvodnju jednostavnih ugljikohidrata, kao što su maltoza i glukoza. Proizvodnja amilaza otvara sasvim nove mogućnosti u smislu provođenja simultane hidrolize polimernih ugljikohidrata (npr. škroba) i fermentacije jednostavnih ugljikohidrata, npr. maltoze i glukoze, do mliječne kiseline kao krajnjeg proizvoda metabolizma ABMK. Tako bi se primjenom ABMK tradicionalni bioprocesi proizvodnje mliječne kiseline, koji se sastoje od dva zasebna procesa - hidrolize škroba (enzimski ili kemijski postupak) do glukoze, a zatim fermentacije glukoze do laktata s pomoću BMK, mogli zamijeniti učinkovitijim bioprocenom simultane hidrolize i fermentacije.

Soj *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T pripada grupi ABMK i, sukladno objavljenim rezultatima (Trontel i sur., 2010; Trontel i sur., 2011; Slavica i sur. 2015), izgledan je kandidat za industrijsku proizvodnju mliječne kiseline simultanom hidrolizom i fermentacijom. Fiziologija ovog soja, kao ni drugih ABMK, nije dovoljno istražena i potrebno je provesti obimna istraživanja u laboratorijskom mjerilu kao i primjenu ovih industrijskih mikroorganizama u većem mjerilu, najprije u pilot-postrojenju, a zatim i u poluindustrijskom mjerilu.

Mliječna kiselina (C₃H₆O₃) pripada grupi organskih kiselina koje se u relativno velikim volumenima koriste u kemijskoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Osim kao proizvod biotehnoške industrije, mliječna kiselina tj. oba njezina stereoizomera, D-(–) i L-(+)-mliječna kiselina, su tzv. platformske molekule i imaju široku primjenu u održivoj proizvodnji brojnih proizvoda, koji su se do nedavno proizvodili iz petrokemikalija, ali i sasvim novih proizvoda, koji nalaze primjenu na različitim tržištima farmaceutske i biomedicinske industrije (Dusselier i sur., 2013).

Cilj ovog rada bio je definirati porast bakterijske biomase soja ABMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T tijekom šaržnog uzgoja pri suboptimalnoj temperaturi ($\theta = 40^{\circ}\text{C}$) i optimalnoj pH vrijednosti podloge (pH = 5,5) u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom. Kao glavni izvor ugljika i energije odabrana je maltoza, glavni proizvod hidrolize škroba i škrobnih sirovina s pomoću ovog soja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterije mliječne kiseline – rod *Lactobacillus*

Bakterije mliječne kiseline (BMK) iz roda *Lactobacillus* su Gram-pozitivne, nesporogene, katalaza-negativne, štapićaste ili okruglaste bakterije (Axelsson, 2004). Bakterije iz roda *Lactobacillus* rastu u mikroaerofilnim uvjetima i to u rasponu temperatura uzgoja od 5 do 45°C, a optimalan rast zabilježen je pri mezofilnim do termofilnim uvjetima. Ove bakterije optimalno rastu pri pH vrijednostima podloge od 5,5 do 6,5, premda ima određenih vrsta koje rastu i pri nižim pH vrijednostima, npr. 4,4. Bakterije iz roda *Lactobacillus* rastu u i na kompleksnim organskim supstratima, a osim izvora ugljika (najčešće su to ugljikohidrati), za rast trebaju i određene aminokiseline, peptide, nukleotide, vitamine, minerale i masne kiseline (Reddy i sur., 2008).

U stanicama bakterija iz roda *Lactobacillus* okarakterizirani su različiti metabolički putevi kojima pridobivaju energiju. To je prvenstveno fermentacija ugljikohidrata povezana sa fosforilacijom na nivou supstrata. Osim toga, metabolička energija nastaje tijekom razgradnje arginina do CO₂ i NH₃ i to fosforilacijom na nivou supstrata pri konverziji karbamoil-fosfata u ove krajnje proizvode. Ipak, samo neke vrste bakterija iz ovog roda mogu rasti na argininu kao izvoru energije. Osim fosforilacije na nivou supstrata, ove bakterije pridobivaju energiju tijekom sekundarnog transporta (uniport, simport i antiport; Könings, 2002) pri čemu sva tri tipa transporta pridonose formiranju gradijenta protona. Ovi su sustavi od ključne važnosti za preživljavanje bakterija iz roda *Lactobacillus* u stresnim uvjetima kao što su ograničenje izvorom ugljika, nakupljanje mliječne kiseline i posljedično snižavanje pH vrijednosti u okolini stanica. Ove bakterije ne posjeduju citokrome pa ne mogu provoditi oksidativnu fosforilaciju. Međutim, posjeduju oksidaze s flavinskim koenzimima i peroksidaze te energiju pridobivaju oksidacijom NADH₂, pri čemu je kisik krajnji akceptor elektrona (Hammes i Hertel, 2009).

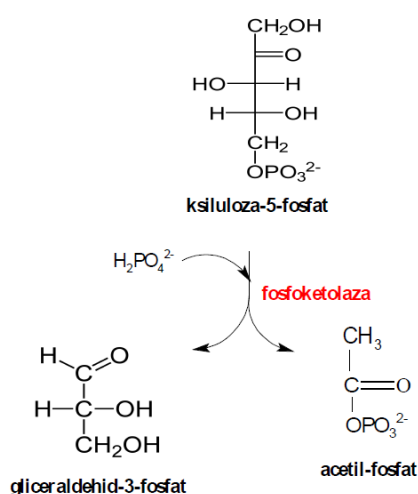
Prema metaboličkim putevima razgradnje ugljikohidrata i proizvodima koji nastaju ovim putevima, BMK se mogu podijeliti na (Hammes i Hertel, 2009; Reddy i sur., 2008):

(1) Obligatno homofermentativne BMK čiji je glavni proizvod metabolizma mliječna kiselina (<85%), a nastaje fermentacijom heksoza glikolizom. Ovim načinom se iz jednog mola glukoze dobiju dva mola laktata i dva mola ATP-a. Ove bakterije mliječne kiseline posjeduju fruktoza-1,6-bisfosfat aldolazu, ali nemaju fosfoketolazu, pa ne mogu koristiti glukonat ili pentoze kao izvore ugljika. U ovu skupinu BMK ubrajaju se rodovi *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* i neke vrste roda *Lactobacillus*. Sojevi vrste *Lactobacillus amylovorus* pripadaju ovoj skupini BMK.

(2) Obligatno heterofermentativne BMK po jednom molu glukoze, koju razgrađuju 6-fosfoketolaznim putem proizvode po jedan mol laktata, etanola i ugljikova dioksida. Pentoze

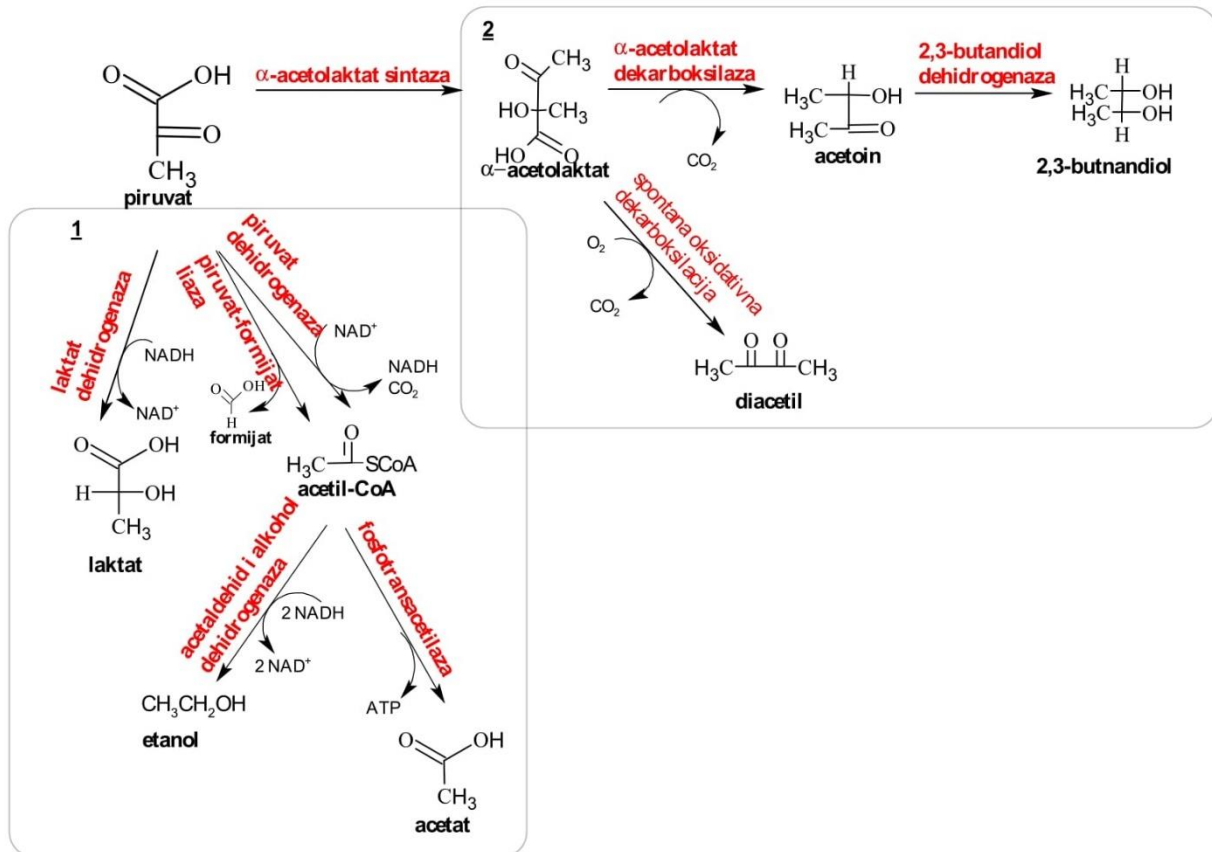
se fermentiraju ovim putem i to zato jer obligatno heterofermentativne BMK posjeduju fosfoketolazu (Slika 1.). Osim navedenih proizvoda, tijekom razgradnje supstrata pridobiva se i jedan mol ATP-a, što rezultira slabijim prirastom bakterijske biomase po molu glukoze.

(3) Fakultativno heterofermentativne BMK posjeduju oba metabolička puta - glikolizu i 6-fosfoketolazni put. U uvjetima suviška supstrata - ugljikohidrata (heksoza), heksoze se prevode u laktat glikolizom. Ova skupina BMK posjeduje i fruktoza-1,6-bisfosfat aldolazu i inducibilnu fosfoketolazu (Slika 1.), što im omogućava korištenje pentozna i glukonata kao supstrata i to 6-fosfoketolaznim putem u uvjetima limitacije glukozom. Sintaza enzima 6-fosfoketolaznog puta u prisutnosti glukoze je reprimirana.



Slika 1. Reakcija koju katalizira inducibilna fosfoketolaza u stanicama obligatno i fakultativno heterofermentativnih BMK.

Piruvat, intermedijer oba metabolička puta razgradnje ugljikohidrata (glikolize i 6-fosfoketolaznog puta), može se razgrađivati do diacetila, octene kiseline i/ili etanola, kao i nekih drugih krajnjih proizvoda metabolizma supstrata (Slika 2.). U uvjetima limitacije supstratom, 6-fosfoketolazni put je dominantan i homolaktična fermentacija prelazi u heterolaktičku fermentaciju kojom se proizvode octena kiselina, etanol i mravlja kiselina (formijat) kao krajnji proizvodi metabolizma (Hammes i Hertel, 2009). Laktat ne mora biti krajnji proizvod metabolizma BMK, već se u definiranim uvjetima može djelomično oksidirati i prevesti u octenu i mravlju kiselinu i CO₂.



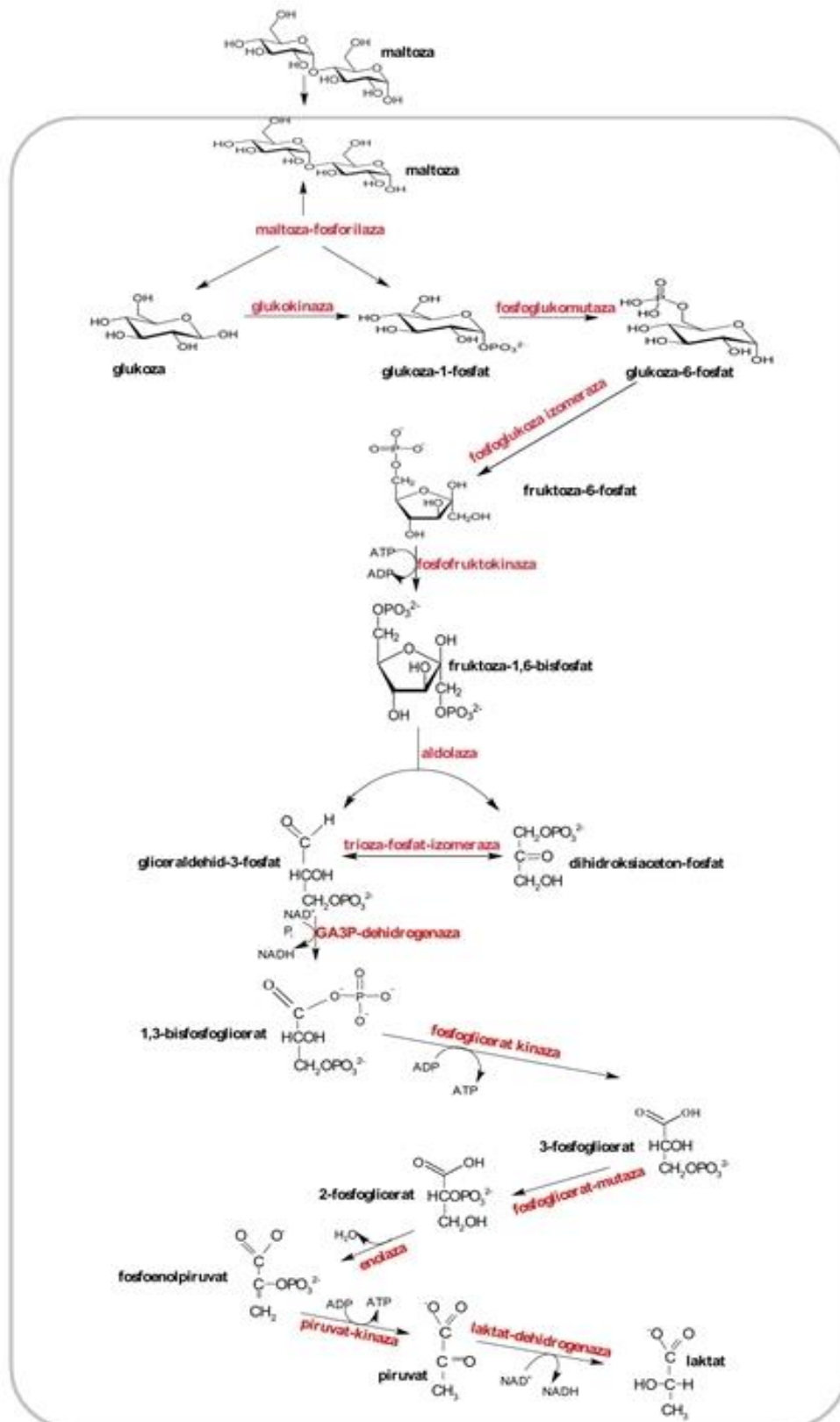
Slika 2. Shematski prikaz razgradnje piruvata do različitih krajnjih proizvoda metabolizma – (1) fermentacija mješovitog tipa i (2) fermentacija do diacetila i 2,3-butandiola.

2.1.1. Metabolizam maltoze u stanicama bakterija mliječne kiseline

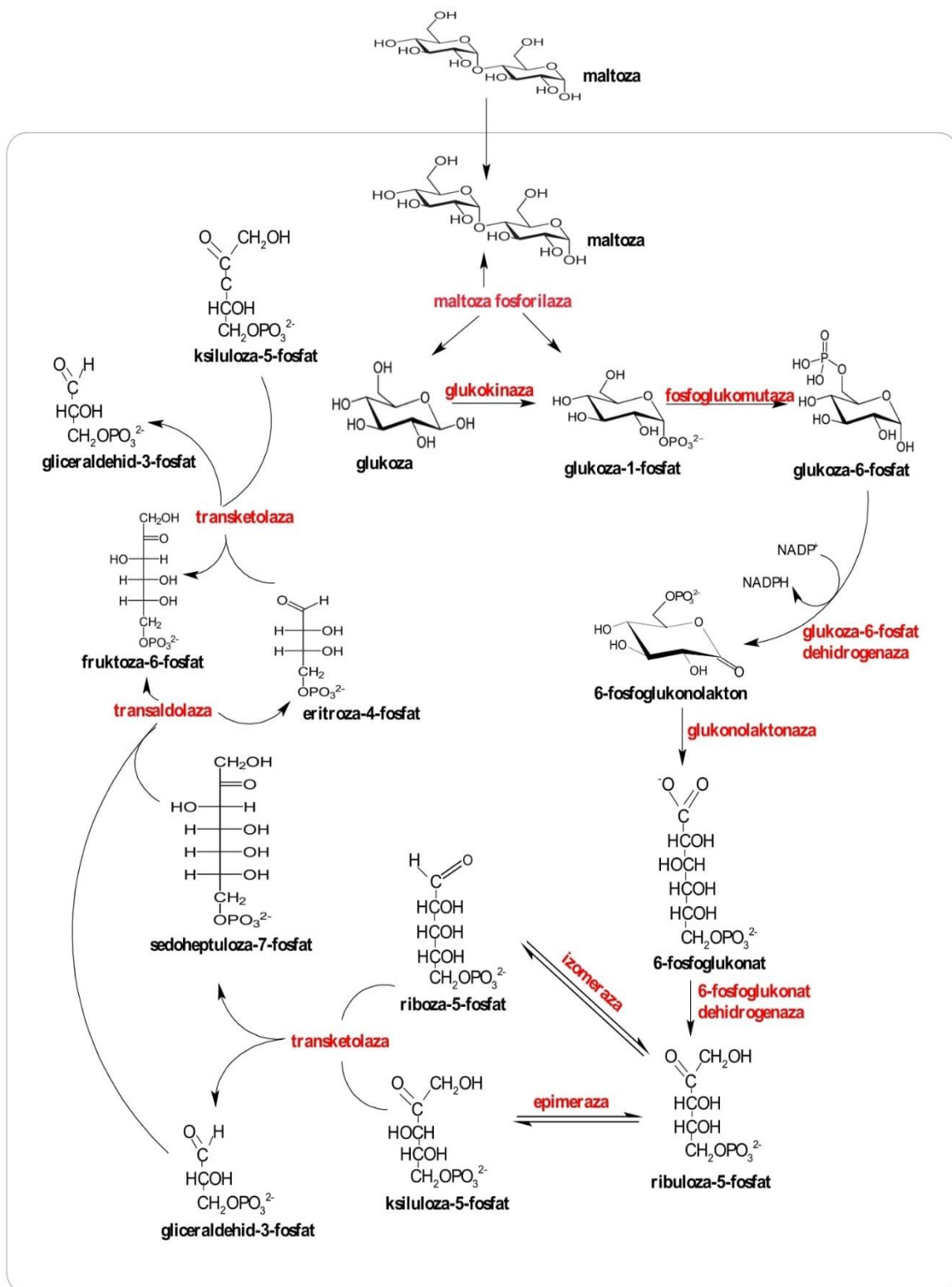
Ugljikohidrati, kao i svi drugi (potencijalni) supstrati, mogu se koristiti kao izvor ugljika i energije ako se mogu transportirati u stanicu. Tri su dominantna mehanizma transporta ugljikohidrata u bakterijsku stanicu: (i) fosfoenolpiruvat fosfotransferazni sustav (PTS) koji uključuje transport i fosforilaciju ugljikohidrata uz utrošak energije konverzije fosfoenolpiruvata u piruvat, što rezultira transportom fosforiliranog oblika ugljikohidrata unutar stanice (Postma i sur., 1993); (ii) sekundarni transportni sustav koji se odvija na račun energije gradijenta protona i to pomoću proteina prijenosnika - specifičnih permeaza (Poolman i sur., 1996); i (iii) ABC transportni sustav, koji je primarni transportni sustav i odvija se na račun hidrolize ATP-a (Fath i Kolter, 1993). Sa energetskog stajališta, PTS sustav je najučinkovitiji zbog toga što se transport i fosforilacija ugljikohidrata odvijaju u jednom koraku i to na račun jedne molekule fosfoenolpiruvata (ekvivalent jednoj molekuli ATP-a, jer se tijekom glikolize dobije jedna

molekula ATP-a u reakciji kataliziranoj piruvat kinazom). Za ugljikohidrate koji se u stanicu ne transportiraju PTS sustavom, potrebno je utrošiti više od jednog ekvivalenta ATP-a. Višekomponentni PTS sustav se sastoji od dva proteina: enzima I (EI) i HPr proteina, uz još nekoliko specifičnih enzima II (EII). Transport ugljikohidrata sustavom permeaza povezan je sa translokacijom iona, a nakon njega slijedi fosforilacija ugljikohidrata posredovana kinazom (Poolman i sur., 1996).

Maltoza se u stanice bakterija iz roda *Lactobacillus* transportira ATP-ovisnom permeazom, a nakon toga, neovisno o tipu fermentacije koji će se provoditi u stanici (homo- ili heterolaktička fermentacija), prvi korak u razgradnji maltoze je fosforilacija i hidroliza maltoze u D-glukozu i β -D-glukozu-1-fosfat u reakciji koju katalizira maltoza fosforilaza. Ovaj je enzim visoko specifičan samo za maltozu i ne katalizira fosforilaciju izomaltoze i maltodekstrina. Kod većine heterofermentativnih bakterija iz roda *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. fermentum*, *L. reuteri*) maltoza fosforilaza je jedini enzim koji može katalizirati razgradnju maltoze. Kod ostalih vrsta maltoza fosforilaza je dio MalEFG/MsmK maltodekstrinskog operona, kojeg čini zajedno sa α -glukozidazama MalL i MalN (Gänzle, 2012). Sljedeću reakciju razgradnje katalizira enzim β -fosfoglukomutaza kojom se β -D-glukoza-1-fosfat prevodi u β -D-glukozu-6-fosfat (Qian i sur., 1994). Daljnja razgradnja D-glukoze i β -D-glukoze-6-fosfata odvija se poznatim reakcijama (Slika 3. i Slika 4.).



Slika 3. Shematski prikaz homolaktičke fermentacije maltoze u stanicama BMK.



Slika 4. Shematski prikaz heterolaktičke fermentacije maltoze u stanicama BMK.

2.1.2. Primjena bakterija mliječne kiseline

U prehrambenoj se industriji BMK koriste za procese proizvodnje hrane i pića te poboljšavanje njihovih organoleptičkih svojstava (Urbach, 1995), zatim biokonzerviranje (Stiles, 1996), proizvodnju bakteriocina (De Vuyst i Leroy, 2007) i egzopolisaharida (Cerning, 1990; Welman i Maddox, 2003). Osim u prehrambenoj industriji, BMK se koriste u industrijskoj proizvodnji tzv. *bulk* kemikalija (kemikalije koje se proizvode u velikim volumenima), kao i za proizvodnju finih kemikalija kao što su mliječna kiselina farmaceutske čistoće (Kwon i sur., 2001), poliololi (Wisselink i sur., 2002) i vitamini B skupine (Burgess i sur., 2004; Taranto i sur., 2003). BMK su vrlo prihvaćene kod potrošača i imaju široku primjenu zahvaljujući svom GRAS (eng. Generally Recognised As Safe) statusu.

Glavne komponente arome, diacetil i acetaldehid, proizvodi su konverzije laktoze do mliječne kiseline pomoću BMK. U dozrelim sirevima starter kulture relativno brzo odumiru te brzina lize stanica i ispuštanja enzima u okolinu ima značajan utjecaj na koncentraciju slobodnih aminokiselina. Ovi krajnji proizvodi zajedno sa krajnjim proizvodima drugih metaboličkih puteva u stanicama BMK određuju organoleptička svojstva proizvoda mliječne industrije.

Pod pojmom biokonzerviranje podrazumijeva se produživanje vijeka trajanja proizvoda kao i poboljšana sigurnost ovih proizvoda koja se postiže uz prisutnost autohtone mikroflore i njihovih proizvoda metabolizma. Prepoznat je i primijenjen potencijal BMK u biokonzerviranju zbog njihova GRAS statusa, a tijekom skladištenja proizvoda dominiraju nad ostalim članovima mješovite kulture. U mliječnim proizvodima, konzerviranom povrću, zatim mesnim proizvodima i proizvodima na bazi žitarica dodatkom ugljikohidrata potiče se rast i aktivnost BMK koje tako daju novu vrijednost proizvodu.

BMK imaju širok raspon antimikrobnih aktivnosti, pri čemu je proizvodnja mliječne i octene kiseline od većeg značaja. Neki sojevi BMK proizvode i druge bioaktivne molekule kao što su etanol, mravlja kiselina, neke masne kiseline, H₂O₂, diacetil, reuterin i reutericiklin. Brojni sojevi BMK također proizvode bakteriocine i njima slične molekule koji pokazuju antibakterijsko djelovanje. Bakteriocini su mali, ribosomski sintetizirani, peptidi ili proteini koji antimikrobno djelovanje pokazuju prema srodnim Gram-pozitivnim bakterijama, dok su stanice proizvođača bakteriocina imune na ove proizvode (De Vuyst i Vandamme, 1994; Cotter i sur., 2005; Klaenhammer, 1988). Bakteriocini BMK mogu se podijeliti u tri skupine: (*i*) lantibiotici; (*ii*) nelantibiotički bakteriocini; (*iii*) bakteriolizini (Klaenhammer, 1988). Osim bakteriocina, neke BMK mogu sintetizirati antimikrobne peptide koji pridonose očuvanju i sigurnosti hrane.

2.2. Amilolitičke bakterije mliječne kiseline

Većina izoliranih amilolitičkih bakterija mliječne kiseline (ABMK) pripada rodu *Lactobacillus*, iako neka istraživanja pokazuju da amilolitičku aktivnost pokazuju i vrste iz roda *Bifidobacterium*, koje su izolirane iz humanog gastrointestinalnog trakta (Ji i sur., 1992; Lee i sur., 1997). Kako sintetiziraju α -amilaze, ove vrste mogu hidrolizirati različite škrobove i škrobne sirovine kao što su kukuruzni škrob (Nakamura, 1981), krumpirov škrob (Chatterjee i sur., 1997) i škrob manioke (Giraud i sur., 1994). ABMK razgrađuju škrob i prevode ga u mliječnu kiselinu u jednom koraku. U industrijskoj proizvodnji najčešće se koriste u fermentaciji prehrambenih sirovina čija su osnova žitarice. Neke se ABMK koriste u proizvodnji mliječne kiseline iz škrobnih sirovina u jednostupanjskom procesu (Reddy i sur., 2008). Time se mijenja tradicionalni način proizvodnje mliječne kiseline koji je uključivao predtretman sirovine u svrhu želatinizacije i hidrolize škroba do glukoze, koja se u sljedećem koraku razgradila do mliječne kiseline (Anuradha i sur., 1999).

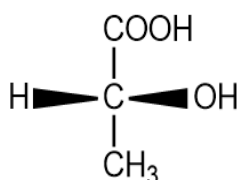
2.2.1. Amilolitička bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus*

Lactobacillus amylovorus DSM 20531^T pripada skupini obligatno homofermentativnih ABMK. Stanice ovog soja su nepokretne, štapićastog oblika, veličine 3-5 μ m, pri čemu obično tvore kratke lance. Dobro rastu pri temperaturi od 45°C. Kao i ostale BMK, ova vrsta je Gram-pozitivna, što znači da je stanična stijenka građena pretežito od peptidoglikana (mureina), u ovom slučaju sačinjenog od Lys-D-Asp podjedinica. Ova vrsta BMK raste na kompleksnim hranjivim podlogama, a kao izvoze ugljika može koristiti: amigdalín, celobiozu, galaktozu, maltozu, manozu, rafinozu, salicin, saharozu i trehalozu. Osim izvora ugljika, za rast ove vrste ABMK su nužni i niacin, pantotenska kiselina, folna kiselina i riboflavin (Hammes i Hertel, 2009). Tijekom fermentacije proizvodi oba stereoizomera mliječne kiseline u različitim omjerima, pri čemu se taj omjer može mijenjati korištenjem različitih izvora ugljika i mijenjanjem temperature uzgoja (Trontel i sur., 2010; Trontel i sur., 2011; Slavica i sur., 2015).

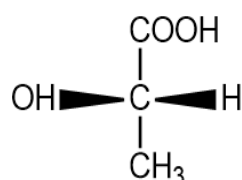
2.3. Mliječna kiselina

Mliječna kiselina (2-hidroksipropionska kiselina; $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) je u vodi topiva visoko higroskopska alifatska kiselina prisutna u ljudskom organizmu, organizmu životinja i mikroorganizmima. To je prva biotehnološki proizvedena organska kiselina sa širokim rasponom primjene pri čemu je ona najraširenija primjena tradicionalno konzerviranje hrane, a koristi se i u farmaceutskoj, tekstilnoj i kemijskoj industriji (Vickroy, 1985). Prvi je put izolirana iz kiselog mlijeka 1780. godine, a njenu je industrijsku proizvodnju 1881. godine pokrenula američka kompanija CE Avery (Vickroy, 1985). Iako mliječna kiselina ima GRAS status, D-(-)- izomer može imati štetan učinak na ljudski organizam i rezultirati acidozom i dekalifikacijom (Datta i sur., 1995). Mliječna se kiselina može proizvesti fermentacijom s pomoću BMK ili sintetizirati hidrolizom laktonitrila uz upotrebu jakih kiselina. Produkt kemijske sinteze je uvijek racemična smjesa D-(-)- i L-(+)-mliječne kiseline. Biotehnološka proizvodnja mliječne kiseline ima nekoliko prednosti u odnosu na kemijsku sintezu, a to su relativno niska cijena supstrata, relativno niska temperatura odvijanja procesa i znatno manji utrošak energije (Rojan i sur., 2007). Za razliku od kemijske sinteze, produkt fermentacije različitih supstrata optički je čista L-(+)- ili D-(-)-mliječna kiselina (Pandey i sur. 2001).

Mliječna kiselina pripada grupi najvažnijih kemikalija, a koristi se u prehrambenoj industriji kao konzervans, regulator kiselosti te za poboljšavanje okusa, u tekstilnoj i farmaceutskoj industriji te kemijskoj industriji kao polazna sirovina za proizvodnju estera mliječne kiseline, propilen-glikola, 2,3-pentadiona, propionske kiseline, acetaldehida i diacetila (Varadarajan i sur., 1999; Åkerberg i Zacchi., 2000). U posljednje je vrijeme potražnja za mliječnom kiselinom značajno porasla jer se ona može koristiti kao monomer za proizvodnju polilaktida (PLA), iz kojih se proizvode biorazgradivi materijali sa višestrukom upotrebom u analitici, farmaciji i medicini.



D-(-)-mliječna kiselina



L-(+)-mliječna kiselina

Slika 5. Shematski prikaz dvaju stereoizomera mliječne kiseline.

2.3.1. Proizvodnja mliječne kiseline fermentacijom

Mikroorganizmi koji se koriste u industrijskoj proizvodnji mliječne kiseline mogu se podijeliti u dvije skupine: bakterije i fungi (Litchfield, 1996). Iako se kao radni mikroorganizmi u većini istraživanja, ali i u industrijskim procesima koriste BMK, treba napomenuti da filamentozni fungi, npr. vrste iz roda *Rhizopus*, mliječnu kiselinu proizvode uz visoku učinkovitost bioprocesa, ali pri aerobnim uvjetima, što znatno poskupljuje takve bioprocese (Zhou i sur., 1999; Tay i Yang, 2002; Kosakai i sur., 1999). Osim toga, *R. oryzae* i *R. arrhizus* pokazuju amlilolitičku aktivnost, što omogućava direktnu konverziju škrobnih sirovina do L-(+)-mliječne kiseline (Yin i sur., 1997; Oda i sur., 2001). Tijekom proizvodnje mliječne kiseline pomoću funga prinosi proizvoda su smanjeni zbog ograničenja prijenosa mase (Park i sur., 1998) i nastanka određenih drugih krajnjih proizvoda metabolizma (fumarne kiseline i etanola) (Tay i Yang, 2002), pa se za industrijsku proizvodnju mliječne kiseline uglavnom koriste BMK. BMK trebaju komplekse hranjive podloge, jer ne mogu sintetizirati faktore rasta kao što su vitamini B skupine i aminokiseline. Kao izvore ugljika i dušika koriste ugljikohidrate, aminokiseline, vitamine i minerale (Axelsson, 2004; van Niel i Hahn-Hägerdal, 1999; Amrane, 2000).

Da bi biotehnoška proizvodnja mliječne kiseline bila ekonomski održiva, potrebno je koristiti relativno jeftine supstrate i/ili sirovine jer tržište zahtijeva velike volumene mliječne kiseline, i to po relativno niskoj cijeni. Sirovine koje se koriste moraju biti jeftine, sadržavati minimalan udio nepoželjnih tvari, osigurati veliku specifičnu brzinu rasta radnog mikroorganizma i visoke prinose mliječne kiseline, ne smiju utjecati na stvaranje drugih krajnjih proizvoda metabolizma, sadržavati iskoristive supstrate i biti dostupne tijekom cijele godine (Vickroy, 1985). Korištenje prerađenih sirovina znatno smanjuje troškove pročišćavanja proizvoda, ali je i dalje ekonomski neisplativo jer su rafinirani ugljikohidrati relativno skupi. Zato se za proizvodnju mliječne kiseline koriste jeftine sirovine poput škrobnih i celuloznih sirovina, kao i melasa (Hofvendahl i Hahn-Hägerdal, 2000). Ako se kao polazna sirovina koristi škrobna sirovina, potrebno je izvršiti hidrolizu škroba do fermentabilnih ugljikohidrata (Richter i Träger, 1994; Hofvendahl i Hahn-Hägerdal, 2000; Oh i sur., 2005). Hidroliza škroba se može provesti simultano sa fermentacijom (Linko i Javanainen, 1996), i to pomoću ABMK, npr. sojem *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T. Da bi se ostvarila brza proizvodnja mliječne kiseline, osim gore navedenih sirovina, u hranjivu podlogu potrebno je dodati i različite dodatke i to u suvišku. Najčešće se koristi kvašćev ekstrakt (Hofvendahl i Hahn-Hägerdal, 2000; Vickroy, 1985), a može se koristiti i kukuruzna močevina (CSL; Oh i sur., 2005).

U proizvodnji mliječne kiseline najčešće se koriste šaržni i kontinuirani postupak. Pri tome se kod šaržnog postupka, kao i kod šaržnog postupka s prihranjivanjem, postižu veće koncentracije proizvedene mliječne kiseline nego kod kontinuiranih postupaka. S druge strane, kod kontinuiranog se postupka postiže veća produktivnost bioprocasa (Vickroy, 1985). Druga prednost kontinuiranog postupka pred šaržnim postupkom je mogućnost vođenja bioprocasa kroz duži vremenski period. Sustav za reciklaciju mikrobnih stanica osigurava povećanu koncentraciju stanica radnog mikroorganizma, a time i produktivnost bioprocasa (Oh i sur., 2003; Kwon i sur., 2001). Eksperimentalno je dokazano da se dodatkom 26% kvašćeva ekstrakta u hranjivu podlogu postiže povećana produktivnost bioprocasa proizvodnje mliječne kiseline (Oh i sur., 2003). Imobilizacija stanica je jedna od glavnih tehnika zadržavanja stanica u bioreaktoru (Senthuran i sur., 1999). Za imobilizaciju stanica BMK koriste se kalcijev alginat, polietilenimin i različiti drugi materijali (Göksungur i Güvenç, 1999; Cotton i sur., 2001; Senthuran i sur., 1999). Proizvodnja mliječne kiseline najčešće je inhibirana mehanizmom povratne sprege jer pri relativno niskim pH vrijednostima nedisocirana mliječna kiselina prolazi kroz stanične membrane i tako se vraća u stanicu gdje disocira i remeti gradijent protona te snižava pH vrijednost citoplazme (Axelsson, 2004; Gonçalves i sur., 1997). Negativan učinak relativno visokih koncentracija proizvedene mliječne kiseline može se ublažiti uklanjanjem mliječne kiseline *in situ* tijekom bioprocasa.

2.4. Amilolitički enzimi

Amilolitički enzimi pripadaju najvažnijim skupinama enzima u biotehnologiji, a prisutni su u većini živih organizama. U industrijskoj biotehnologiji najznačajnije su amilaze mikrobnog, točnije bakterijskog i fungalnog podrijetla. Ovi se enzimi uvelike koriste u industriji jer se njihovom primjenom pri relativno blagim uvjetima zamjenjuju kemijski postupci hidrolize škroba pri znatno nepovoljnijim uvjetima (Pandey i sur., 1991; Reddy i sur., 2008). Amilolitički se enzimi koriste u procesima koji zahtijevaju brzu hidrolizu škroba i/ili smanjenje viskoznosti takvih otopina (Nigam i Singh, 1995).

Razgradnja škroba uobičajeno se provodi pomoću četiri skupine enzima (Gozmán-Maldonado i Paredes-López, 1995): (1) endoamilaze i (2) egzoamilaze, koje razgrađuju α -1,4-glikozidne veze; zatim (3) enzimi koji smanjuju razgranatost supstrata, a razgrađuju α -1,6-veze; i (4) ciklodekstrin glikoziltransferaze, koje kataliziraju razgradnju škroba reakcijama ciklizacije i disproporcioniranja. Endoamilaze cijepaju samo α -1,4-glikozidne veze u unutrašnjosti molekule škroba zaobilazeći α -1,6 mjesta grananja amilopektina (Vihinen i

Mäntsälä, 1989). Slično tomu, egzoamilaze kataliziraju cijepanje α -1,4-glikozidne veze (β -amilaze), ali neke od njih mogu razgraditi i α -1,6-vezu (glukoamilaze). Ovi enzimi djeluju na vanjske veze u supstratu, a kao glavni proizvodi ovih reakcija okarakterizirani su niskomolekularni hidrolizati škroba, kakvi su maltoza i glukoza. U skupinu enzima koji smanjuju razgranatost supstrata pripadaju pululanaza i izoamliaza, koje cijepaju α -1,6-veze amilopektina i sličnih polisaharida. U četvrtu skupinu pripadaju ciklodekstrin glikoziltransferaze, a proizvodi reakcija koje kataliziraju ovi enzimi su ciklodekstrini, prstenaste molekule sačinjene od 6, 7 ili 8 jedinica glukoze povezanih α -1,4-glikozidnom vezom (Horvathova i sur., 2000). Ovi enzimi kataliziraju intra- i intermolekularne reakcije transfera glikozila (Horvathova i sur. 2000).

2.4.1. α -amilaza

α -amilaza (1,4- α -D-glukan glukanohidrolaza; EC 3.2.1.1) katalizira hidrolizu α -1,4-glikozidnih veza u škrobu, glikogenu i sličnim polisaharidima. Ovaj enzim pripada grupi endoamilaza koja odcjepljuje poli- i oligosaharidne lance različitih duljina, što dovodi do naglog opadanja viskoziteta škrobne suspenzije. α -amilaza izolirana je iz bakterija, kvasaca i drugih funga (Henrissat i Bairoch, 1996). Ova grupa enzima može se podijeliti u dvije skupine i to prema stupnju hidrolize supstrata (Fukumoto i Okada, 1963). Saharifirajuće α -amilaze hidroliziraju od 50 do 60% dostupnog škroba, dok likveficirajuće α -amilaze hidroliziraju od 30 do 40% škroba. α -amilaza ne pokazuje uvijek apsolutnu specifičnost prema α -1,4-vezi, pa tako postoje neke α -amilaze koje mogu hidrolizirati α -1,6-glikozidnu vezu (Sakano i sur., 1985), ali znatno manje učestalo nego α -1,4-vezu. α -amilaza je relativno termostabilna, što je čini izvrsnim kandidatom za primjenu u hidrolizi škroba za proizvodnju maltoze i glukoze (Horvathova, 2000). Prednosti korištenja termostabilnih α -amilaza su smanjena mogućnost kontaminacije, skraćivanje vremena reakcije te ušteda energije. Provođenje hidrolize pri višim temperaturama smanjuje polimerizaciju D-glukoze u izomaltozu (Fogarty i Kelly, 1980). Osim toga, α -amilaza ima primjenu u pekarstvu, tekstilnoj industriji, industriji papira, medicinskoj, kliničkoj i analitičkoj kemiji (Ramachandran i sur., 2004).

2.5. Metode za praćenje rasta bakterija i procjenu koncentracije bakterijske biomase

Rast bakterijskih stanica može se pratiti primjenom nekoliko metoda i to direktno ili indirektno. Direktno se porast bakterijskih stanica može pratiti brojanjem obojenih bakterijskih stanica u vidnom polju svjetlosnog mikroskopa. U ovom slučaju potrebno je na predmetnicu nanijeti određeni volumen bakterijske suspenzije i u njemu odrediti broj stanica. Indirektno se porast bakterijskih stanica može procijeniti određivanjem: (1) suhe tvari biomase bakterijskih stanica, (2) koncentracije staničnih sastavnica (DNA ili proteini), zatim (3) potrošnje kisika ili (4) proizvodnjom ugljikova dioksida, (5) turbidimetrijskim određivanjem apsorbancije suspenzije (spektrofotometrijska ili kolorimetrijska analiza). Zajednički nedostatak navedenih metoda je da se njima ne mogu razlikovati žive od odumrlih stanica kao ni stanice u različitim fazama rasta (Aneja, 2003).

Ovdje valja napomenuti razliku između dva pojma, a to su koncentracija i gustoća bakterijskih stanica. Koncentracija se stanica definira kao broj stanica u volumenu suspenzije (Monod, 1949), dok se gustoća izražava kao masa suhe tvari biomase u volumenu suspenzije.

2.5.1. Metode određivanja gustoće bakterijskih stanica

Prema definiciji pojma gustoće bakterijskih stanica, jedna od prikladnijih metoda za određivanje gustoće bakterijskih stanica bila bi određivanje suhe tvari biomase. Zbog nepraktičnosti metode te točnosti samo u slučajevima kada se određuju relativno velike količine poraslih stanica, ova se metoda koristi samo kao provjera drugih metoda. Zbog toga se paralelno koriste različite indirektno kemijske metode za procjenu gustoće bakterijskih stanica. Određivanje količine amonijačnog dušika pokazalo se kao relativno dobra metoda za procjenu suhe tvari biomase. Kada bakterijska kultura raste u podlozi koja sadrži amonijeve soli kao izvor dušika, smanjenje koncentracije slobodnog amonijaka u podlozi dobar je pokazatelj rasta bakterijskih stanica (Fisher i Armstrong, 1947). Osim toga, suha se tvar bakterijske biomase može dovesti u korelaciju sa metaboličkom aktivnošću radnog mikroorganizma i to mjerenjem potrošnje kisika ili proizvodnje kiselina (McIlwain, 1944). Primjena ovih metoda je ograničena. Izdvajanje bakterijske biomase centrifugiranjem i naknadno sušenje taloga također je jedna od metoda koja se može primijeniti u laboratorijskom mjerilu (van Niel, 1947).

Od svih navedenih metoda, do sada su se kao relativno pouzdane pokazale metode koje se zasnivaju na određivanju transmitirane ili apsorbirane svjetlosti, odnosno mjerenju

turbiditeta ili optičke gustoće suspenzije. Zamućenje suspenzije direktno je proporcionalno broju stanica, pa se to svojstvo koristi kao pokazatelj gustoće bakterijskih stanica u uzorku. Zamućenje se kvantificira spektrofotometrom, koji mjeri količinu svjetlosti koja je prošla ili se apsorbirala u uzorku. Stanice suspendirane u podlozi ometaju prolazak svjetlosti određene valne duljine, što dovodi do toga da na detektor dopijeva manja količina svjetlosti od početne. Gustoća suspenzije stanica se izražava kao apsorbancija (logaritamska vrijednost) ili optička gustoća (vrijednost izvedena iz postotka transmisije), a direktno je proporcionalna broju stanica (Aneja, 2003).

Često se iz praktičnih razloga rezultati mjerenja optičke gustoće izražavaju kao koncentracija stanica. U tim se slučajevima korelacija između gustoće i koncentracije stanica može povući samo za eksponencijalnu fazu rasta, a podatci izraženi kao koncentracija stanica moraju se odnositi na standardnu stanicu čija je veličina jednaka kao veličina stanice u eksponencijalnoj fazi rasta (Monod, 1949).

Novija istraživanja uključuju primjenu znatno preciznijih metoda, kao što su različite imunofluorescentne metode i protočna citometrija (Meyers, 2000). Protočna citometrija ima ključnu ulogu kod praćenja broja stanica, ali i različitih fizioloških promjena kod stanica industrijskih mikroorganizama, prvenstveno kvasaca i bakterija. U novije vrijeme ova se metoda koristi i za praćenje fizioloških karakteristika virusa u određenim uvjetima i interakcijama. Razvijena je primjena protočne citometrije do tzv. napredne protočne citometrije (Delvigne i sur., 2000). S pomoću ove metode moguće je popratiti i povezati promjenu fiziologije stanice, heterogenost čiste kulture i događanja u okolini stanice. Osim pobrojenih, za praćenje broja, ali i fizioloških promjena na nivou pojedinačnih stanica, koristi se vrlo osjetljiva metoda koju bi mogli nazvati mikrofluidnost pojedinačne stanice (engl. single cell microfluidics). Na ovaj se način može pouzdano holistički promatrati samo jedna stanica kao dio mikrobne populacije.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.2. Materijali

3.2.1. Mikroorganizam

U ovom završnom radu kao radni mikroorganizam upotrijebljen je ABMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T (ATCC 33620, NRRL B-4540).

3.2.2. Sastav hranjive podloge

Za uzgoj bakterijskog soja korištena je modificirana hranjiva De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) podloga (De Man i sur., 1960) u kojoj je glukoza (20 g/L) zamijenjena maltozom (20 g/L). Sastav modificirane hranjive MRS podloge (MRS-mal₂₀) prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu hranjive MRS-mal₂₀ podloge za uzgoj bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T.

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	K_2HPO_4	tehnički	Biolife, Italija
kvašćev ekstrakt	/	za uporabu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
magnezijev sulfat	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 uporabu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
natrijev acetat trihidrat	$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	p.a.	Merck, Njemačka
pepton	/	za uporabu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
polisorbat 80 (Tween 80 [®])	$\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$	p.a.	Merck, Njemačka

3.2.3. Aparatura i pribor

3.2.3.1. Laboratorijski bioreaktor s miješalom

Uzgoj bakterijskog soja *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T proveden je u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Goettingen, Njemačka) izrađenom od nehrđajućeg čelika. Glavni dijelovi sustava su nosač sustava, reaktorska posuda i mjerno-regulacijska jedinica. Na nosaču su učvršćeni reaktor, osjetilo za mjerenje i regulaciju temperature te sustav za dovod i odvod zraka i drugih plinova. Sustav je u potpunosti automatiziran, a parametri koji se prate su: temperatura (Pt-100); pH vrijednost, koja se može kretati u rasponu od 2 do 12 (pH elektroda); parcijalni tlak kisika (polarografska elektroda, %); razina hranjive podloge i pjene (kontaktne elektrode). Broj okretaja turbinskog miješala se kreće u rasponu od 20 do 1500 min⁻¹. Ukupni volumen bioreaktora iznosi 30,0 L, a omjer visine i promjera reaktora (H:D) je 3:1. Na poklopcu reaktorske posude nalaze se tri ulaza koji se mogu koristiti za: nacjepljivanje podloge, prihranjivanje, dovod kiselina i/ili lužina za regulaciju pH vrijednosti podloge, doziranje sredstava protiv pjene i drugih otopina. Dvostruki plašt oko bioreaktora omogućuje *in-situ* sterilizaciju vodenom parom koja može biti zagrijana na temperaturu do 130°C.

3.2.3.2. Spektrofotometar

Tijekom uzgoja soja *L. amylovorus* DSM 20531^T praćena je optička gustoća suspenzije izuzete iz laboratorijskog bioreaktora s miješalom. Optička gustoća se određivala pomoću spektrofotometra Cary 13E Varian (Varian, Mulgrave, Australija) pri valnoj duljini svjetlosti (λ) od 600 nm. Pri ovoj valnoj duljini sterilna hranjiva MRS-mal₂₀ podloga ne apsorbira svjetlost, pa tako ne interferira pri određivanju optičke gustoće suspenzije, dok je apsorbancija suspenzije ovog bakterijskog soja blizu svog maksimuma. Mjerenje se provodilo u staklenim kivetama promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) u koje je dodana izvorna suspenzija, odnosno njezino prvo ili drugo decimalno razrjeđenje u sterilnoj demineraliziranoj vodi.

3.2.3.3. Filtri

Suspenzija bakterijskih stanica poraslih tijekom uzgoja pri opisanim uvjetima u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom filtrirana je pomoću šprica i filtara (Nalgene[®], Nalge Nunc Internatinal, Rochester, SAD) promjera pora 0,2 µm.

3.2.3.4. Centrifuge

Kod određivanja suhe tvari bakterijske biomase centrifugiranjem je izdvojena mokra bakterijska biomasa od tekućeg dijela suspenzije. U ovom slučaju korištena je centrifuga Harrier 18/80 (Sanyo, Warford, Velika Britanija)

3.2.3.5. Mikroskop

Broj bakterijskih stanica obojenih po Gramu pobrojen je u vidnom polju svjetlosnog mikroskopa Olympus CX21FS1 (Olympus; Tokyo, Japan) pri povećanju od 1000 puta (imerzijski objektiv).

3.2.3.6. 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);
- Peristaltička pumpa H-8604 Chemap AG (Chemap AG; Volketswil, Švicarska);
- 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).

Rezultati dobiveni tijekom istraživanja koja su opisana u ovom završnom radu prikupljeni su i obrađeni pomoću osobnog računala s programskim paketom MS Office 2013.

3.3. Metode rada

3.3.1. Priprava hranjivih podloga

Za čuvanje i održavanje kulture soja *L. amylovorus* DSM 20531^T korištene su tri hranjive MRS podloge: standardna MRS podloga sa glukozom kao glavnim izvorom ugljika i energije (MRS-glc₂₀), modificirana MRS podloga sa maltozom kao glavnim izvorom ugljika i energije (MRS-mal₂₀) i modificirana MRS podloga sa škrobom kao glavnim izvorom ugljika i energije (MRS-škrob₁₀). Ostali sastojci MRS podloge dodani su u istovjetnim koncentracijama kao i kod standardne MRS podloge (Tablica 1.). Ove podloge su pripravljene kao tekuće hranjive sterilne podloge i, uz dodatak agara (15 g/L), kao čvrste hranjive podloge (Trontel i sur., 2010; Trontel i sur., 2011; Slavica i sur.; 2015). Podloge su sterilizirane u autoklavu Sutjeska (Beograd, Jugoslavija) kroz 20 min pri 121°C.

3.3.2. Priprava cjepiva

Soj ABMK uzgajan je i održavan u sve tri tekuće i na sve tri čvrste hranjive MRS podloge. Kultura je precjepljivana svakih 48 h, inkubirana pri 37°C preko noći i spremljena u hladnjaku pri +4°C. Prije provođenja uzgoja u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom, proveden je uzgoj cjepiva najprije u dvije epruvete sa po 8 mL sterilne hranjive MRS-mal₂₀ podloge pri 37°C preko noći, a zatim je svježe uzgojenom kulturom naciepljena sterilna hranjiva MRS-mal₂₀ podloga (po 250 mL u dvije Erlenmeyer tikvice) i uzgojena pri 37°C preko noći. Ovako uzgojenom suspenzijom naciepljena je sterilna hranjiva MRS-mal₂₀ podloga u laboratorijskom reaktoru s miješalom.

3.3.3. Uzgoj ABMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom

U laboratorijskom bioreaktoru s miješalom pripremljena je hranjiva MRS-mal₂₀ podloga (10,0 L) i *in situ* sterilizirana indirektno vodenom parom kroz 20 min pri 121°C. U ohlađenu sterilnu podlogu ($\theta \approx 40^\circ\text{C}$, $n = 400$ rpm) prepumpano je 250 mL uzgojenog cjepiva (2,5% vol/vol) i to pomoću peristaltičke pumpe (CH-8604; Chemap AG, Mannedorf, Švicarska). Procesni su parametri održavani konstantnima, tako da je temperatura (θ) iznosila $40 \pm 0,2^\circ\text{C}$,

broj okretaja miješala (n) 400 min^{-1} , a podloga se nije aerirala. Početna je pH vrijednost podloge iznosila $6,2 \pm 0,2$. Zbog proizvodnje mliječne kiseline, pH vrijednost se tijekom prvih nekoliko sati uzgoja spustila do pH vrijednosti koja je bila niža od 5,5, kada je automatski započeo prtok $5,0 \text{ mol/L NaOH}$ te se tako održavala konstantna pH vrijednost u rasponu $5,5 \pm 0,2$. Uzorci suspenzije iz laboratorijskog bioreaktora ($V \approx 50 \text{ mL}$) izuzimani su svakih sat vremena. Izuzeti uzorci ili njihova razrjeđenja (10^{-1} i 10^{-2}) korišteni su za određivanje optičke gustoće pri valnoj duljini svjetlosti od 600 nm . Za određivanje koncentracije suhe tvari bakterijske biomase korišteno je izdvajanje biomase centrifugiranjem (poglavlje 3.2.4.1.) i filtracijom (poglavlje 3.2.4.2.) te je nakon sušenja određena koncentracija bakterijskih stanica. Osim toga, određen je broj stanica soja *L. amylovorus* DSM 20531T i to brojenjem fiksiranih i obojenih bakterijskih stanica pomoću mikroskopa (poglavlje 3.2.4.3.).

3.3.3.1. Određivanje koncentracije suhe tvari bakterijske biomase

Volumen od $7,0 \text{ mL}$ izuzete bakterijske suspenzije prebačen je u osušene i do sobne temperature ohlađene polipropilenske kivete od $10,0 \text{ mL}$, kojima je prethodno određena masa (analitička vaga Shimadzu AX-200 W/O AC ECTA; Shimadzu, Kyoto, Japan). U zatvorenim kivetama biomasa je centrifugirana u centrifugi Harrier 18/80 pri 6000 rpm i $+4^\circ\text{C}$ i to kroz 20 min . Nakon centrifugiranja supernatant je uklonjen pipetiranjem, a izdvojena mokra bakterijska biomasa u kiveti osušena je u sušioniku Instrumentarija ST-50 (Zagreb, Hrvatska) pri 105°C do konstantne mase. Nakon hlađenja u eksikatoru, određena je masa kiveta sa suhom bakterijskom biomasom i izračunata koncentracija suhe tvari bakterijske biomase (γ_X) prema donjoj jednadžbi:

$$\gamma_X = \frac{m_{K+X} - m_K}{V_S} \quad (\text{g/L}) \quad [1.]$$

gdje je

m_K masa kivete (g),

m_{K+X} masa kivete sa bakterijskom biomasom nakon sušenja (g),

V_S volumen suspenzije ($0,007 \text{ L}$).

3.4.2.2. Određivanje koncentracije suhe tvari bakterijske biomase nakon filtriranja

Volumen od 4,0 mL izuzete suspenzije propušten je kroz filtracijsku membranu s pomoću plastične šprice. Nakon toga, filtri su sušeni u laboratorijskom sušioniku do konstantne mase te je masa suhe tvari biomase određena iz razlike mase filtra i mase filtra sa bakterijskom biomasom nakon sušenja. Koncentracija suhe tvari bakterijske biomase izračunata je prema jednadžbi [1.], u kojoj je V_S iznosio 0,004 L.

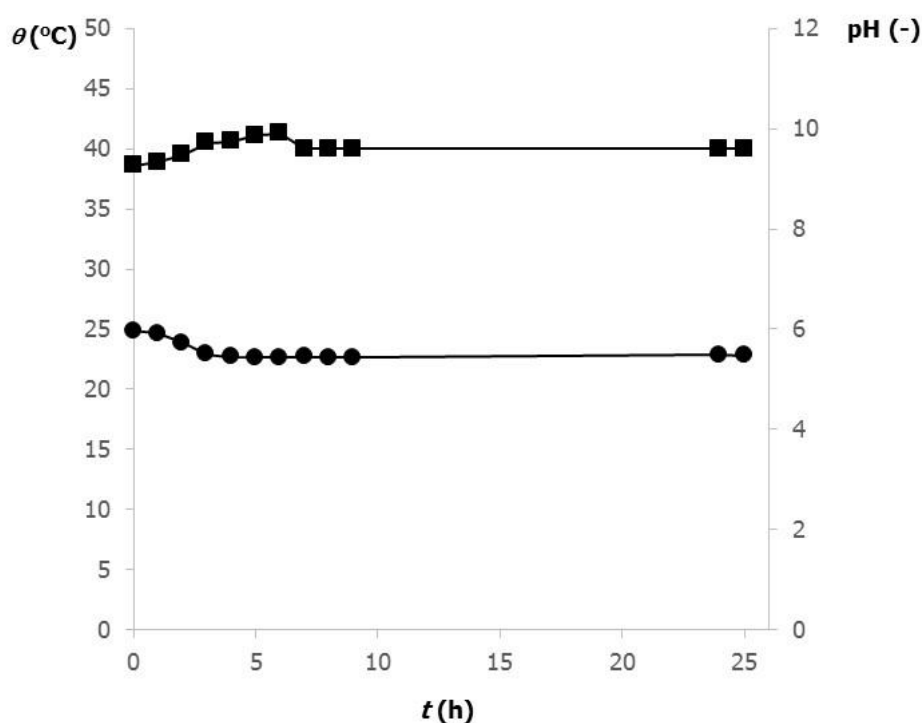
3.4.2.3. Određivanje broja bakterijskih stanica u određenom volumenu suspenzije

Preparat za mikroskopiranje je pripravljen iz 0,1 mL bakterijske suspenzije ili njezinog razrjeđenja (10^{-1}), koji su ravnomjerno raspoređeni na površini od 1 cm². Stanice su fiksirane na površini predmetnice i obojene po Gramu. Priređeni je preparat korišten za određivanje broja stanica u 6 vidnih polja i to s pomoću imerzijskog objektiva mikroskopa uz povećanje od tisuću puta. Nakon toga izračunat je broj bakterijskih stanica u jednom mililitru suspenzije.

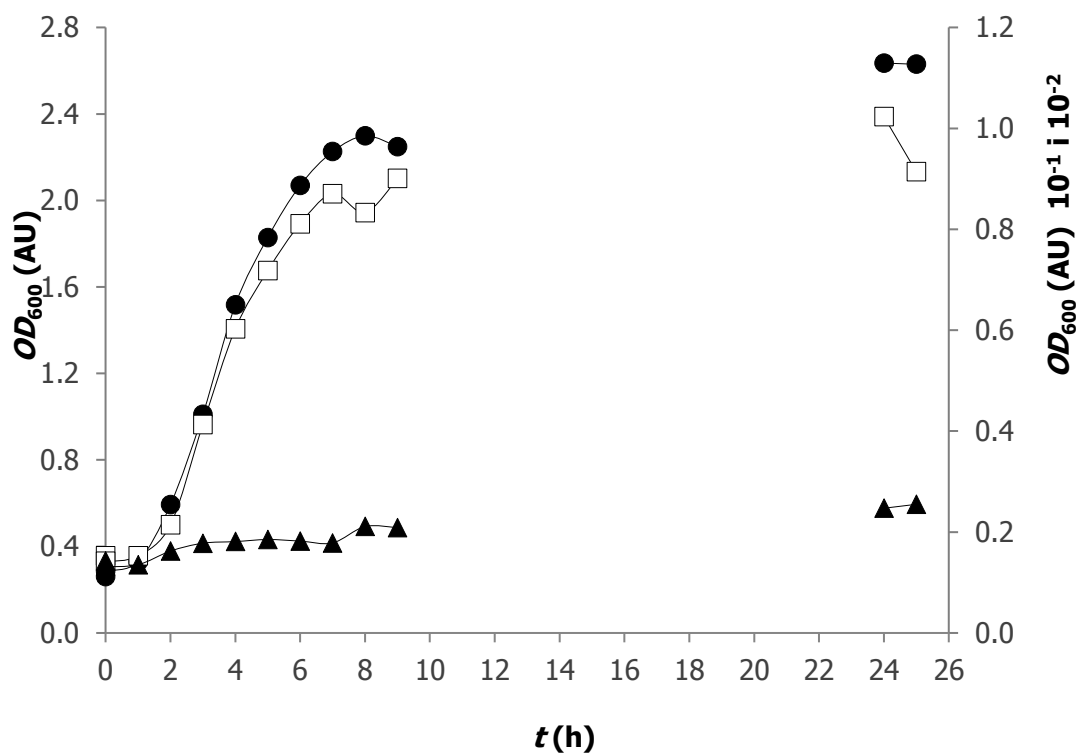
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uzgoj amilolitičke bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T u hranjivoj MRS-mal₂₀ podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom

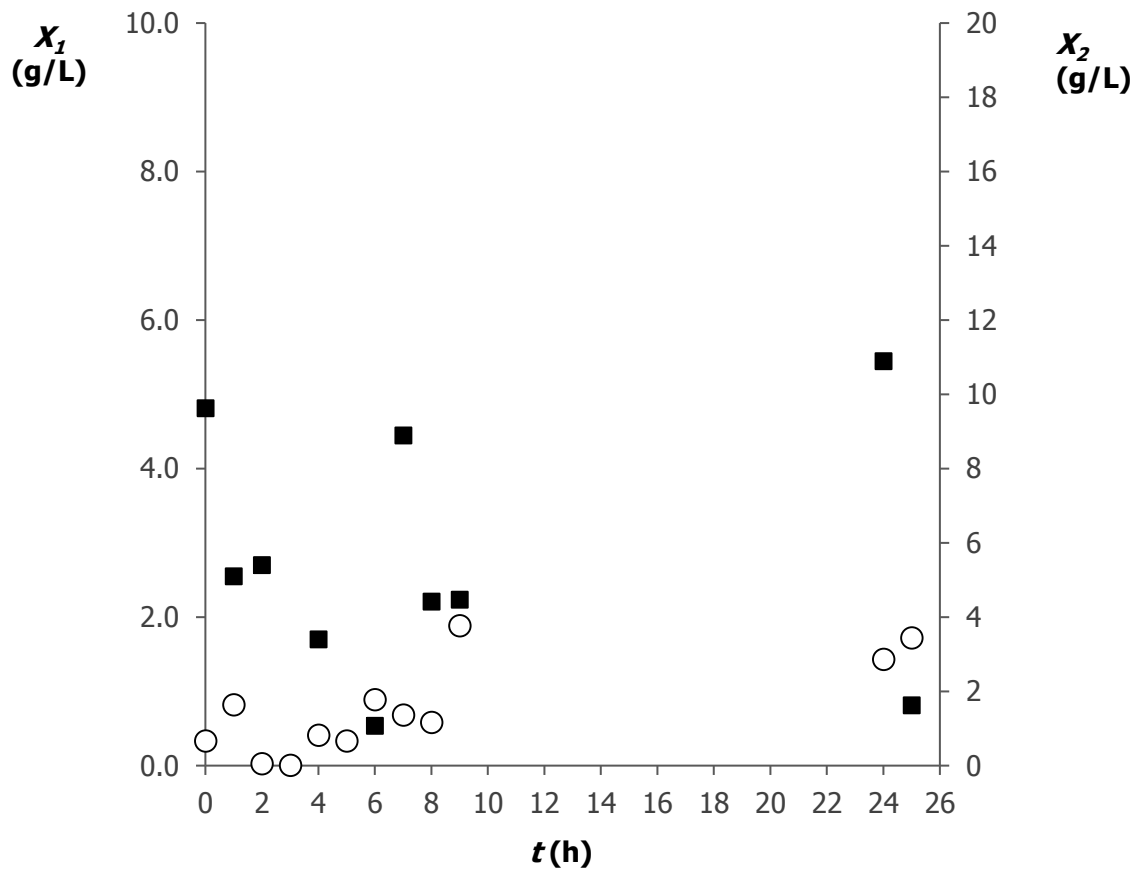
U ovom su poglavlju prikazani rezultati dobiveni tijekom uzgoja ABMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T. Na slici 6. prikazane su promjene temperature (θ) i pH vrijednosti podloge. Na slici koja slijedi u ovom poglavlju prikazane su optičke gustoće bakterijske suspenzije i njezinih razrjeđenja tijekom uzgoja ABMK *L. amylovorus* DSM 20531^T u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom (Slika 7.). Promjena koncentracije suhe tvari bakterijske biomase prikazana je na slici 8., dok je promjena broja stanica u volumenu suspenzije od 1,0 mL tijekom uzgoja ABMK *L. amylovorus* DSM 20531^T u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom prikazana na slici 9.



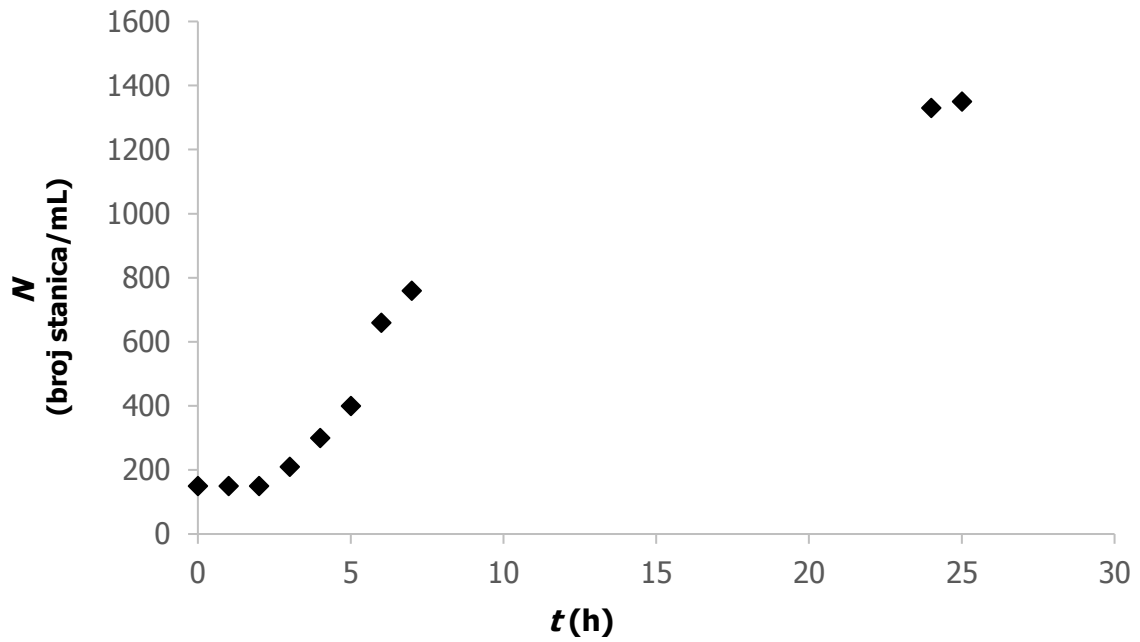
Slika 6. Promjene temperatura uzgoja [θ (■)] i pH vrijednosti podloge (●) tijekom uzgoja ABMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom.



Slika 7. Promjena optičke gustoće (OD_{600}) bakterijske suspenzije (●) i razrjeđenja ove suspenzije u demineraliziranoj vodi [10^{-1} (□) i 10^{-2} (▲)] tijekom uzgoja ABMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom.



Slika 8. Promjena koncentracije suhe tvari bakterijske biomase (X) tijekom uzgoja ABMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom. X_1 (○), koncentracija određena nakon centrifugiranja i sušenja; X_2 (■), koncentracija određena nakon filtriranja i sušenja.



Slika 9. Promjena broja stanica u volumenu suspenzije od 1 mL tijekom uzgoja ABMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Amilolitička bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T uzgojena je u modificiranoj hranjivoj MRS-mal₂₀ podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom uz korisni volumen od 10,0 L. Pri suboptimalnoj temperaturi ($\theta = 40 \pm 0,2^\circ\text{C}$), konstantnoj pH vrijednosti ($\text{pH} = 5,5 \pm 0,2$) i bez aeracije ovaj soj može koristiti maltozu kao izvor ugljika i energije i rasti u odabranim uvjetima.
2. Porast bakterijske biomase praćen je određivanjem optičke gustoće izuzete suspenzije i optičke gustoće dvaju razrjeđenja ove suspenzije u demineraliziranoj vodi pri valnoj duljini svjetlosti od 600 nm. Dobiveni rezultati pokazuju da se porast bakterijske biomase može pratiti određivanjem optičke gustoće izuzete suspenzije kao i prvog razrjeđenja ove suspenzije, dok drugo razrjeđenje suspenzije nije prikladno za praćenje porasta bakterijske biomase ovom metodom.
3. Iz dobivenih podataka za optičku gustoću procijenjeno je trajanje faza rasta soja *L. amylovorus* DSM 20531^T kao i specifična brzina rasta (μ) ovog soja u odabranim uvjetima. Eksponencijalna faza rasta ABMK *L. amylovorus* DSM 20531^T započinje nakon jednog sata lag faze ($t_{lag} = 1,0$ h) i traje sve do osmog sata šaržnog uzgoja ($t_{eksp} = 7,0$ h) nakon čega bakterija ulazi u stacionarnu fazu rasta. Specifična brzina rasta procijenjena iz optičke gustoće suspenzije iznosila je $0,51 \text{ h}^{-1}$, dok je vrlo slična vrijednost ($\mu = 0,48 \text{ h}^{-1}$) procijenjena iz optičke gustoće prvog razrjeđenja suspenzije.
4. Optička gustoća u skladu je sa podacima dobivenim za koncentraciju suhe tvari bakterijske biomase, posebice tijekom ekspanzionalne faze rasta, pa se i ovom metodom može uspješno pratiti porast bakterijske biomase tijekom uzgoja u laboratorijskom mjerilu. Metoda u kojoj se koristi filtriranje bakterijskih stanica nije dala pouzdane rezultate.
5. Praćenjem broja stanica bakterijskog soja *L. amylovorus* DSM 20531^T u određenom volumenu također se može uspješno pratiti porast bakterijske biomase tijekom uzgoja u laboratorijskom mjerilu. I iz ovih podataka određena je specifična brzina rasta soja i to u vrijednosti od $\mu = 0,59 \text{ h}^{-1}$, što je vrijednost bliska prethodno procijenjenim vrijednostima.
6. Tradicionalne metode za praćenje porasta bakterijske biomase, određivanje faza rasta i procjenu nekih parametara kao što je specifična brzina rasta bakterijskog soja pouzdane su i u međusobnom skladu, naročito tijekom ekspanzionalne faze rasta radnog mikroorganizma i to u laboratorijskom mjerilu. Na temelju ovih rezultata može se planirati uzgoj ovog potencijalnog industrijskog soja u većem mjerilu uz primjenu ovih metoda za praćenje promjene koncentracije bakterijske biomase.

6. LITERATURA

- Åkerberg, C., Zacchi, G. (2000) An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. *Bioresource Technol.* **75**(2), 119-126.
- Amrane, A. (2000) Evaluation of lactic acid bacteria autohydrolyzate for the supplementation of lactic acid bacteria fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 207–209.
- Aneja, K.R. (2003) Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology. 4. izd. New Age International, str. 66
- Anuradha, R., Suresh, A. K., Venkatesh, K. V. (1999) Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. *Process. Biochem.* **35**, 367–375.
- Axelsson L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. U: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects, 3. izd., Salminen S., von Wright A., Ouwehand A., ur., Marcel Dekker, Inc. str. 1-66.
- Burgess, C., O'Connell-Motherway, M., Sybesma, W., Hugenholtz, J., van Sinderen, D. (2004) Riboflavin production in *Lactococcus lactis*: potential for in situ production of vitamin-enriched foods. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5769–5777.
- Cerning, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 113–130.
- Chatterjee, M., Chakrabarty, S.L., Chattopadhyay, B.D., Mandal, R.K. (1997) Production of lactic acid by direct fermentation of starchy wastes by an amylase-producing *Lactobacillus*. *Biotechnol. Lett.* **19**, 873-874.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 777–788.
- Cotton, J.C., Pometto III, A. L., Gvozdenovic-Jeremic, J. (2001) Continuous lactic acid fermentation using plastic composite support biofilm reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**,626–630.
- Datta, R., Tsai, S.P., Bonsignor, P., Moon, S., Frank, J. (1995) Technological and economical potential of polylactic acid and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**, 221–31.
- De Man, J.D., Rogosa, M., Sharpe, M.E. (1960) A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bact.* **23**, 130-135.
- Delvigne, F., Baert, J., Sassi, H., Fickers, P., Grünberger, A., Dusny, C. (2017) Taking control over microbial populations: Current approaches for exploiting biological noise in bioprocess. *Biotechnol. J.* **12**, 1-17.
- De Vuyst, L., Leroy, F. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 194–199.
- De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (1994) Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. U: Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, de Vuyst, L., Vandamme E. J., ur., Blackie Academic & Professional. Str. 91-142.

- Fath, M.J., Kolter, R. (1993) ABC transporters: bacterial exporters. *FEMS Microbiol. Rev.* **57**, 995–1017.
- Fogarty, W.M., Kelly, C. T. (1980) Amylases, amyloglucosidases and related glucanases, *Econ. Microbiol.* **5**, 115.
- Fukumoto, J., S. Okada. 1963. Studies on bacterial amylase. Amylase types of *Bacillus subtilis* species. *J. Ferment. Technol.* 41:427-434.
- 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 gramicin ML, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**, 2908-2915.
- Gänzle, M.G., Follador, R. (2012) Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. *Front. Microbiol.* **340**, 1-15.
- Giraud, E., Champailier, A., Raimbault, M. (1994) Degradation of raw starch by a wild amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4319–4323.
- Göksungur, Y., Güvenç, U. (1999) Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74**, 131–136.
- Gonçalves, L.M.D., Ramos, A., Almeida, J.S., Xavier, A.M.R.B., Carrondo, M.J.T. (1997) Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 346–350.
- Gozman-Maldonado, H., Paredes-Lopez, O. (1995) Amyolytic enzymes and products derived from starch: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35**, 373-403.
- Hammes W.P., Hertel, C. (2009) Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck 1901. 212^{AL}. U: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 3. izd., De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., ur., Springer, New York, str. 465-511.
- Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B. (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resource. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 87–107.
- Horvathova, V., Janeček, Š., Štrudik, E. (2000) Amyolytic enzymes: their specificities, origins and properties. *Biologia.* **55**(6), 605-615.
- Ji, G.E., Han, H.K., Yun, S.W., Rhim, S.L. (1992) Isolation of amyolytic *Bifidobacterium* sp. Int57. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 85–91.
- Klaenhammer, T.R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70**, 337–349.
- Konings, W.N. (2002) The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* **82**: 3–27.
- Kwon, S., Yoo, I.K., Lee, W.G., Chang, H.N., Chang, Y.K. (2001) High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **73**, 25–34.

- Lee, S.K., Kim, Y.B., Ji, G.E., (1997) Purification of amylase secreted from *Bifidobacterium adolescentis*. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 267–272.
- Linko, Y.Y., Javanainen, P. (1996) Simultaneous liquefaction, saccharification, and lactic acid fermentation on barley starch. *Enzyme Microb. Technol.* **19**, 118–123.
- Litchfield, J.H. (1996) Microbiological production of lactic acid. *Adv. Appl. Microbiol.* **42** 45–95.
- Meyers, S.P. (2000) Developments in aquatic microbiology. *Int. Microbiol.* **3**(4), 203-211.
- Monod, J. (1949) The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* **3**, 371-394.
- Nakamura, L. K. (1981) *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**, 56–63.
- Nigam, P., Singh, D. (1995) Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enz. Microb. Technol.* **17**, 770-778.
- Oda, Y., Saito, K., Yamauchi, H., Mori, M. (2002) Lactic acid fermentation of potato pulp by the fungus *Rhizopus oryzae*. *Curr. Microbiol.* **45**, 1–4.
- Oh, H., Wee, Y.J., Yun, J.S., Han, S.H., Jung, S., Ryu, H.W. (2005) Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresour. Technol.* **96**, 1492–1498.
- Oh, H., Wee, Y.J., Yun, S., Ryu, H.W. (2003) Lactic acid production through cell-recycle repeated-batch bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **107**, 603–613.
- Pandey, A. (1991) Aspects of design of fermenter in solid-state fermentation. *Proc. Biochem.* **26**, 355–361.
- Park, E.Y., Kosakai Y., Okabe, M. (1998) Efficient production of L(+)-lactic acid using mycelial cotton-like flocs of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor. *Biotechnol. Progr.* **14**, 699–704.
- Poolman, B. (1993) Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 125–147.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **57**, 543–594.
- Qian, N., Stanley, G.A., Hahn-Hagerdal, B., Radstrom, P. (1994) Purification and characterization of two phosphoglucomutases from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and their regulation in maltose- and glucose-utilizing cells. *J. Bacteriol.* **176**, 5304–5311.
- Ramachandran, S., Patel, A.K., Nampoothiri, K.M., Chandran, S., Szakacs, G., Soccol, C.R., Pandey, A. (2004) α -Amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Bra. Arch. Biol. Technol.* **47**, 309–317.
- Reddy, G.R., Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Kumar, E.V. (2008) Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. *Biotechnol. Adv.* **26**, 22-34.

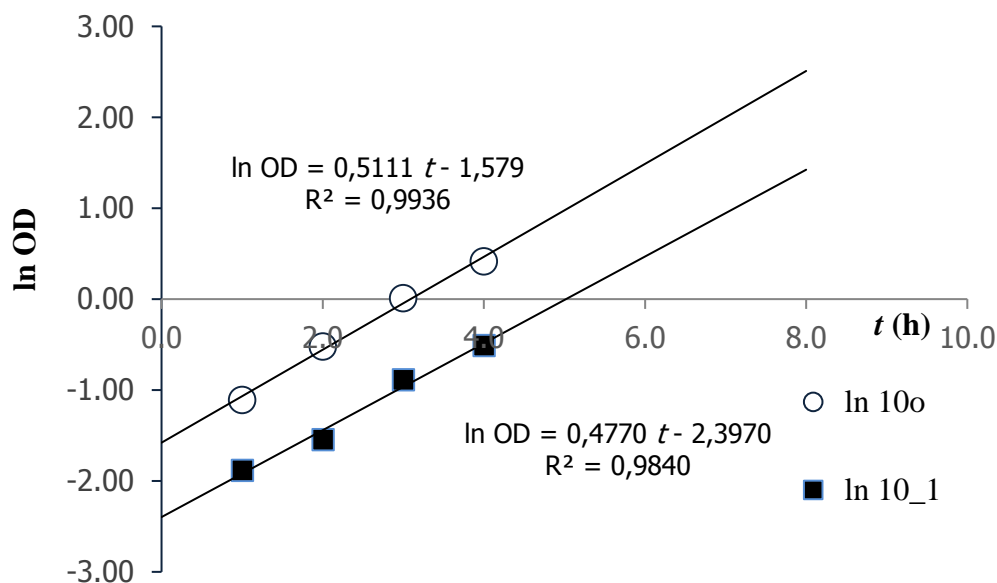
- Richter, K., Träger, A. (1994) L(+)-lactic acid from sweet sorghum by submerged and solid-state fermentations. *Acta Biotechnol.* **14**, 367–378.
- Rojan, P.J., Madhavan Nampoothiri, K. (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 524-534.
- Sakano, Y., Sano, M., Kobayashi, T. (1985) Hydrolysis of α -1,6-glycosidic linkages by α -amylases, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3041.
- Senthuran, A., Senthuran, V., Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B. (1999) Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: A step towards optimization, *J. Biotechnol.* **73**, 61–70.
- Slavica, A., Trontel, A., Jelovac, N., Kosovec, Ž., Šantek, B., Novak, S. (2015) Production of lactate and acetate by *Lactobacillus cornyformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T in comparison with *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T. *J. Biotechnol.* **202**, 50-59.
- Stiles, M.E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 331-345.
- Taranto, M.P., Vera, J.L., Hugenholtz, J., De Valdez, G.F., Sesma, F. (2003) *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. *J. Bacteriol.* **185**, 5643–5647.
- Tay, A., Yang, S.T. (2002) Production of L(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 1–12.
- Trontel, A. Batušić, A., Gusić, I., Šantek, B., Novak, S. (2011) Production of D- and L-lactic acid by mono- and mixed cultures of *Lactobacillus* sp. *Food Technol. Biotechnol.* **49**, 72-82.
- 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^T in batch process. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 352-361.
- Urbach, G. (1995) Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *Int Dairy J.* **5**, 877–903.
- van Niel, E.W.J., Hahn-Hägerdal, B. (1999) Nutrients requirements of lactococci in defined growth media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 617–627.
- Varadarajan, S., Miller, D. J. (1999) Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids. *Biotechnol. Progr.* **15**, 845–854.
- Vickroy T.B. (1985) Lactic acid. U: Comprehensive biotechnology 3. izd., Moo-Young A, ur., Dic Pergamon Press, str. 761–76.
- Vihinen, M., Mantsala, P. (1989) Microbial amylolytic enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **24**(4), 329-418.
- Welman, A.D., Maddox, I.S. (2003) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* **21**, 269–274.

Wisselink, H.W., Weusthuis, R.A., Eggink, G., Hugenholtz, J., Grobben, G. J. (2002) Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *Int. Dairy J.* **12**, 151–161.

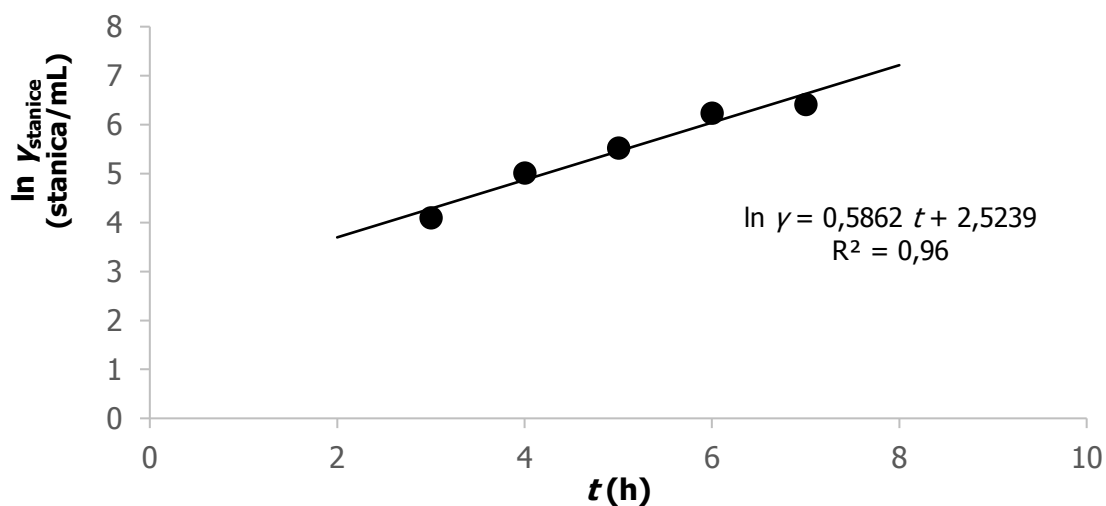
Yin, P., Nishiya, N., Kosakai, Y., Yahira, K., Park, Y.S., Okabe, M. (1997) Enhanced production of L(+)-lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 249–253.

Zhou, Y., Domínguez, J.M., Cao, N., Du, J., Tsao, G.T. (1999) Optimization of L-lactic acid production from glucose by *Rhizopus oryzae* ATCC 52311, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **78** 401–407.

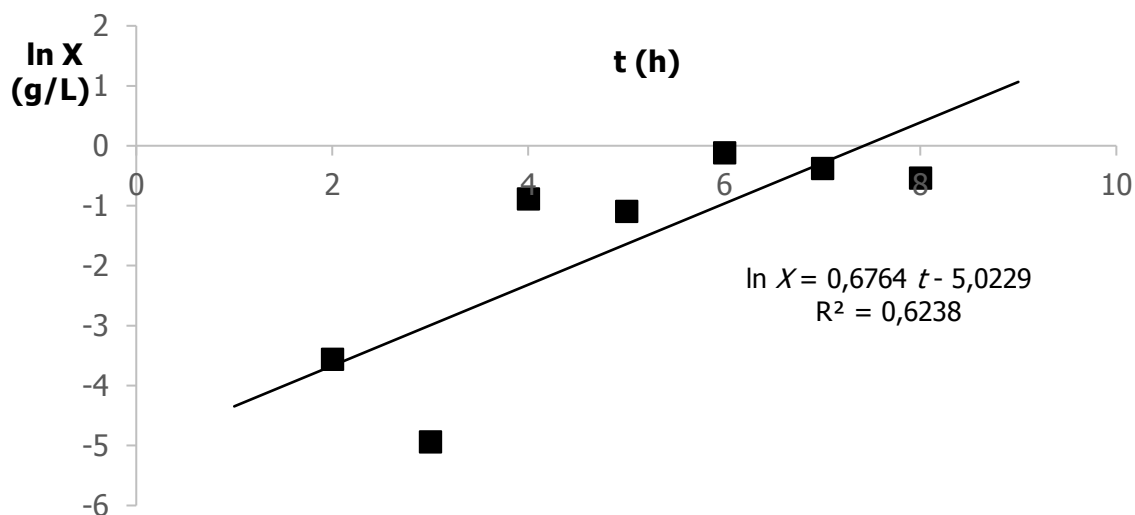
7. PRILOZI



Slika 10. Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu rasta ($\mu = 0,51 \text{ h}^{-1}$, tj. $\mu = 0,48 \text{ h}^{-1}$) ABMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T tijekom uzgoja u hranjivoj MRS-mal₂₀ podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom. Eksperimentalni podaci su dobiveni određivanjem optičke gustoće bakterijske suspenzije i prvog razrjeđenja ove suspenzije u demineraliziranoj vodi pri valnoj duljini svjetlosti od 600 nm.



Slika 11. Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu rasta ($\mu = 0,59 \text{ h}^{-1}$) ABMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T tijekom uzgoja u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom. Eksperimentalni su podaci dobiveni određivanjem broja stanica u 0,1 mL ove suspenzije te preračunavanjem na koncentraciju izraženu kao broj stanica u jednom mililitru.



Slika 12. Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu rasta ($\mu = 0,67 \text{ h}^{-1}$) ABMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T tijekom uzgoja u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom. Eksperimentalni su podaci dobiveni centrifugiranjem 7 mL bakterijske suspenzije, sušenjem dobivenog taloga vaganjem kiveta s biomasom i praznih kiveta. Dobivene su vrijednosti uvrštene u jednadžbu [1.].

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