

# Fiziologija bakterijskog soja *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T uzgojenog na maltozi u laboratorijskom mjerilu

---

Inkret, Ines

Master's thesis / Diplomski 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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:102139>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Ines Inkret, 866/BPI

**Fiziologija bakterijskog soja**  
***Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>**  
**uzgojenog na maltozi u**  
**laboratorijskom mjerilu**

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

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

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Aniti Slavica, na mogućnosti da izradim ovaj diplomski rad te na mnogobrojnim savjetima i pomoći tijekom izvođenja eksperimenata i prilikom pisanja diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Božidaru Šanteku, voditelju projekta "Proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina na principima ekološke i ekonomske održivosti (SPECH-LRM, 9158)".*

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Renati Teparić na savjetima tijekom određivanja koncentracije i aktivnosti proteina te pomoći tijekom izvođenja ionsko-izmjenjivačke kromatografije.*

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

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### Fiziologija bakterijskog soja *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> uzgojenog na maltozi u laboratorijskom mjerilu

*Ines Inkret, 866/BPI*

**Sažetak:** Amilolitička bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> uzgojena je u laboratorijskom mjerilu u modificiranoj MRS podlozi sa maltozom kao izvorom ugljika i energije i induktorom sinteze amilaze. Ovaj soj je uzastopnim precjepljivanjem i uzgojem u podlozi sa maltozom prilagođen na korištenje disaharida i, nakon toga, u laboratorijskom mjerilu raste brže i sintetizira znatno manje biomase nego kada nije prilagođen na ovaj supstrat. Homofermentativnom razgradnjom maltoze *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> proizvodi mliječnu kiselinu kao jedini krajnji proizvod metabolizma i to znatno učinkovitije nakon prilagodbe. Proizvedena amilaza je izdvojena kroz dva postupka - najprije taloženjem amonijevim sulfatom i, nakon toga, ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom. Tri kromatografski izdvojena proteinska pika pokazuju aktivnost prema škrobu u natrijevom acetatnom puferu (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5 pri 55°C). Ovi su rezultati u skladu sa rezultatima biospecifične kromatografije pomoću koje su izdvojena tri proteinska pika, koja također pokazuju aktivnost prema škrobu. Najveću specifičnu aktivnost od 300 U mg<sup>-1</sup> imaju proteini eluirani tijekom ionsko-izmjenjivačke kromatografije pri 0,6 mol L<sup>-1</sup> NaCl u puferu. Sva tri izdvojena pika sadrže više proteinskih vrpca, kako je to detektirano SDS-PAGE metodom, i mase ovih proteina su između 50 i 94 kDa.

**Ključne riječi:** fiziologija amilolitičke bakterije mliječne kiseline, maltoza, *Lactobacillus amylovorus*, laboratorijsko mjerilo, amilaza, kromatografija.

**Rad sadrži:** 53 stranice, 13 slika, 7 tablica, 34 literaturne reference, 4 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** Prof. dr. sc. Anita Slavica,

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Renata Teparić
2. Prof. dr. sc. Anita Slavica
3. Izv. prof. dr. sc. Tonči Rezić
4. Prof. dr. sc. Blaženka Kos

**Datum obrane:** 21. srpanj 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Graduate Thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

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

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

### Physiology of strain *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> cultivated on maltose at laboratory scale

*Ines Inkret, 866/BPI*

**Abstract:** Cultivation of an amylolytic lactic acid bacterium *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> was carried out in laboratory scale in a modified MRS medium with maltose as a main carbon and energy source and as an inductor of amylase synthesis. The strain was adapted to use disaccharide by iterative cultivation in the medium with maltose and, afterwards, it grew faster and considerably lower concentration of a biomass was synthesized compared to unadapted conditions. The maltose was homofermentatively degraded by *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> and lactic acid was produced more efficiently as a single final product of metabolism after the adaptation. Produced amylase was separated in a two-step procedure which consisted of precipitation by ammonium sulfate and ion-exchange chromatography. Three protein peaks were chromatographically separated and all of them showed activity toward starch in a sodium acetate buffer (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5 at 55°C). Obtained results are in agreement with results of biospecific chromatography when three protein peaks with activity toward the starch were separated as well. The proteins that were eluted during the ion-exchange chromatography at 0.6 mol L<sup>-1</sup> NaCl in the buffer had the highest specific activity of 300 U mg<sup>-1</sup>. All three separated peaks contained more protein bands, as revealed by SDS-PAGE, and their molecular masses were estimated to be between 50 and 94 kDa.

**Key words:** physiology of amylolytic lactic acid bacterium, maltose, *Lactobacillus amylovorus*, laboratory scale, amylase, chromatography.

**Thesis contains:** 53 pages, 13 figures, 7 tables, 34 references, 4 supplements.

**Original in:** Croatian

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

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

**Reviewers:**

1. PhD *Renata Teparić*, Associate Professor
2. PhD *Anita Slavica*, Full Professor
3. PhD *Tonči Rezić*, Associate Professor
4. PhD *Blaženka Kos*, Full Professor

**Paper defended:** 21 July 2017

## SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>TEORIJSKI DIO</b>	<b>2</b>
2.1.	Bakterije mliječne kiseline	2
2.2.	Amilolitička bakterija mliječne kiseline <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531 <sup>T</sup>	2
2.3.	Metabolizam ugljikohidrata u stanicama bakterija mliječne kiseline	3
2.3.1.	Homolaktička fermentacija	4
2.3.2.	Metabolizam maltoze u stanicama bakterija mliječne kiseline iz roda <i>Lactobacillus</i>	5
2.4.	Amilaze	7
2.4.1.	$\alpha$ -amilaza	7
2.4.1.1.	<i>Strukturne i funkcionalne karakteristike <math>\alpha</math>-amilaze</i>	8
2.4.1.2.	<i>Proizvodnja <math>\alpha</math>-amilaze</i>	9
2.4.1.3.	<i>Pročišćavanje <math>\alpha</math>-amilaze</i>	10
2.4.1.4.	<i>Određivanje aktivnosti <math>\alpha</math>-amilaze</i>	11
<b>3.</b>	<b>EKSPERIMENTALNI DIO</b>	<b>12</b>
3.1.	MATERIJAL	12
3.1.1.	Mikroorganizam	12
3.1.2.	Hranjiva podloga za održavanje i uzgoj bakterijske kulture	12
3.1.3.	Kemikalije	13
3.1.4.	Uređaji i aparatura	17
3.1.4.1.	<i>Laboratorijski bioreaktor s miješalom</i>	17
3.1.4.2.	<i>Centrifuge</i>	18
3.1.4.3.	<i>Spektrofotometri</i>	18
3.1.4.4.	<i>Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti</i>	18
3.1.4.5.	<i>Uređaj za filtraciju mobilne faze za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti i ultrazvučna kupelj</i>	19
3.1.4.6.	<i>Sustav za ionsko-izmjenjivačku kromatografiju</i>	20
3.1.4.7.	<i>Sustav za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)</i>	20
3.1.4.8.	<i>Ostala oprema</i>	21
3.2.	METODE RADA	22
3.2.1.	Priprava hranjivih podloga	22
3.2.2.	Priprava cjepiva za uzgoj bakterije u tikvici i laboratorijskom bioreaktoru s miješalom	22
3.2.3.	Šaržni uzgoj bakterije i indukcija sinteze $\alpha$ -amilaze u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom	23
3.2.4.	Izdvajanje $\alpha$ -amilaze	24
3.2.4.1.	<i>Priprema uzoraka za izdvajanje <math>\alpha</math>-amilaze</i>	24
3.2.4.2.	<i>Taloženje <math>\alpha</math>-amilaze amonijevim sulfatom</i>	24
3.2.4.3.	<i>Ionsko-izmjenjivačka kromatografija</i>	25



3.2.5.	Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)	26
3.2.6.	Analitičke metode	27
3.2.6.1.	Određivanje optičke gustoće uzoraka izuzetih tijekom šaržnog uzgoja bakterije	27
3.2.6.2.	Određivanje ugljikohidrata RS metodom	27
3.2.6.3.	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	29
3.2.6.3.1.	Određivanje koncentracije $\alpha$ -amilaze pri valnoj duljini ( $\lambda$ ) od 610 nm ( $A_{610}$ )	29
3.2.6.3.2.	Određivanje aktivnosti $\alpha$ -amilaze pri valnoj duljini ( $\lambda$ ) od 610 nm ( $A_{610}$ )	29
3.2.6.4.	Određivanje koncentracije proteina spektrofotometrijskom metodom	30
3.2.6.5.	Određivanje aktivnosti enzima	31
3.2.7.	Analiza eksperimentalnih podataka - izračunavanje nekih pokazatelja uspješnosti rasta i proizvodnje mliječne kiseline s pomoću amilolitičke bakterije <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531 <sup>T</sup>	32
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA</b>	34
4.1.	Šaržni uzgoj soja <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531 <sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal <sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom	34
4.2.	Izdvajanje $\alpha$ -amilaze ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom i njezina karakterizacija	40
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	44
<b>6.</b>	<b>LITERATURA</b>	45
<b>7.</b>	<b>PRILOZI</b>	50

## **1. UVOD**

Bakterije mliječne kiseline (BMK) imaju GRAS (Generally Recognized As Safe) status i tradicionalno se, između ostalog, primjenjuju u industrijskoj proizvodnji mliječne kiseline. Iako je tradicija primjene BMK jako duga, a ova je kiselina jedini ili glavni proizvod metabolizma ugljikohidrata u stanicama BMK, njihova je fiziologija relativno slabo istražena i opisana i zbog toga često revidirana. Zasebnu skupinu BMK, čija fiziologija je gotovo nepoznata, čine vrste koje proizvode hidrolitičke enzime. Industrijsku primjenu bi mogle naći vrste BMK koje sintetiziraju proteaze i amilaze, a ove potonje - amilolitičke BMK (ABMK), od posebnog su interesa, jer mogu vanstanično hidrolizirati škrob i unutarstanično fermentirati transportirane proizvode hidrolize škroba, maltozu i/ili glukozu. Ove fiziološke karakteristike ima soj *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> (Slavica i sur., 2015), zbog čega može koristiti različite supstrate - osim monosaharida i disaharide (npr. maltozu), oligosaharide i polisaharide. Zbog svojih fizioloških svojstva ovaj soj je izvrstan kandidat za primjenu u bioprocusu simultane saharifikacije (hidrolize) i fermentacije škroba i škrobnih sirovina do mliječne kiseline. Međutim, vrlo malo je podataka dostupno o osnovnim fiziološkim karakteristikama ovog soja koje bi se mogle koristiti u takvom bioprocusu, a naročito je slabo istražena njegova amilolitička aktivnost. Dakle, osim u industrijskoj proizvodnji mliječne kiseline, ovaj bi se soj mogao primijeniti i u proizvodnji amilaza. Amilaze su grupa enzima koje mogu katalizirati hidrolizu  $\alpha$ -1,4- i  $\alpha$ -1,6- glikozidnih veza u škrobu i u polimerima slične strukture, pa je njihova primjena u industriji evidentna. Ove enzime proizvode različiti (mikro)organizmi, pa se prema porijeklu mogu podijeliti na biljne, životinjske i mikrobne amilaze. Mikrobne amilaze su stabilnije od drugih vrsta amilaza i zbog toga su našle primjenu u industriji papira, tekstilnoj i prehrambenoj industriji, u farmaceutskoj industriji, analitici, itd.

Cilj ovog rada bio je pratiti kinetiku potrošnje tzv. sporo fermentirajućeg disaharida - maltoze, koja je razgradni proizvod hidrolize škroba i škrobnih sirovina, ali i induktor sinteze amilaza. Prije bioprocusa, ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> je prilagođena na korištenje ovog disaharida uzastopnim uzgojima u podlozi sa maltozom kao jedinim izvorom ugljika i energije. Bioprocus u laboratorijskom mjerilu provest će se pri suboptimalnoj temperaturi (40°C) i optimalnoj pH vrijednost (5,5) za rast ovog soja i proizvodnju mliječne kiseline. Izdvajanje vanstanične amilaze iz supernatanta dobivenog izuzimanjem uzorka nakon ekspanzionalne faze rasta *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> provest će se taloženjem i kromatografijom. Dobiveni rezultati mogu se usporediti sa prethodnim istraživanjima provedenim u ovoj istraživačkoj grupi, jer slični podaci nisu još objavljeni u relevantnim znanstvenim časopisima i nisu dostupni u bazama podataka.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su skupina Gram-pozitivnih, nesporogenih, katalaza-negativnih, acetotolerantnih, anaerobnih ili fakultativno aerobnih koka ili bacila koji proizvode mliječnu kiselinu kao jedan od glavnih proizvoda razgradnje ugljikohidrata. Osim nekoliko vrsta, BMK su većinom nepatogeni mikroorganizmi i imaju GRAS (Generally Recognized As Safe) status. Tipične vrste BMK pripadaju rodovima *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus* i *Leuconostoc*. BMK obuhvaćaju homofermentativne vrste (koje proizvode uglavnom mliječnu kiselinu) i heterofermentativne vrste (koje osim mliječne kiseline proizvode i octenu kiselinu, etanol, ugljični dioksid i mravlju kiselinu) (Mayo i sur. 2010). Korištenjem molekularnih metoda za klasifikaciju broj rodova uključenih u ove skupine se povećao, dok trenutna taksonomska klasifikacija uključuje BMK u koljeno *Firmicutes*, razred *Bacilli* i red *Lactobacillales* (Quinto i sur., 2014).

Metaboličke aktivnosti BMK potrebno je optimizirati za maksimalnu produktivnost proizvodnje biotehnoški važnih spojeva. Fizikalni i kemijski parametri poput temperature, pH, koncentracije kisika i ostalih nutrijenata utječu na rast i metaboličke aktivnosti BMK. Ovisno o specifičnim potrebama za nutrijentima pojedinih vrsta BMK, razvio se velik broj raznolikih hranjivih podloga za uzgoj s različitim namjenama i uporabom (Hayek i Ibrahim, 2013). Podloga koja se koristi za uzgoj svih vrsta iz roda *Lactobacillus* je De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) podloga (De Man i sur., 1960), koja se ovisno o fiziologiji određene vrste BMK i zahtjevima biotehnoške proizvodnje može modificirati.

## 2.2. Amilolitička bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>

*Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> pripada skupini obligatno homofermentativnih bakterija mliječne kiseline, iako pri određenim uvjetima uz laktat proizvodi i acetat kao drugi krajnji proizvod razgradnje ugljikohidrata (Slavica i sur., 2015). Baza podataka BRENDA (Anonymous 1, 2017) sadrži podatke o samo osam enzima soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>: 3-fitaza (EC 3.1.3.8), 4-fitaza (EC 3.1.3.26),  $\alpha$ -amilaza (EC 3.2.1.1), glukan 1,4- $\alpha$ -glukozidaza (EC 3.2.1.3),  $\beta$ -galaktozidaza (EC 3.2.1.23), 6-fosfo- $\beta$ -galaktozidaza (EC 3.2.1.85), 6-fosfo- $\beta$ -glukozidaza (EC 3.2.1.86) i fenilalanin-tRNA ligaza (EC 6.1.1.20).

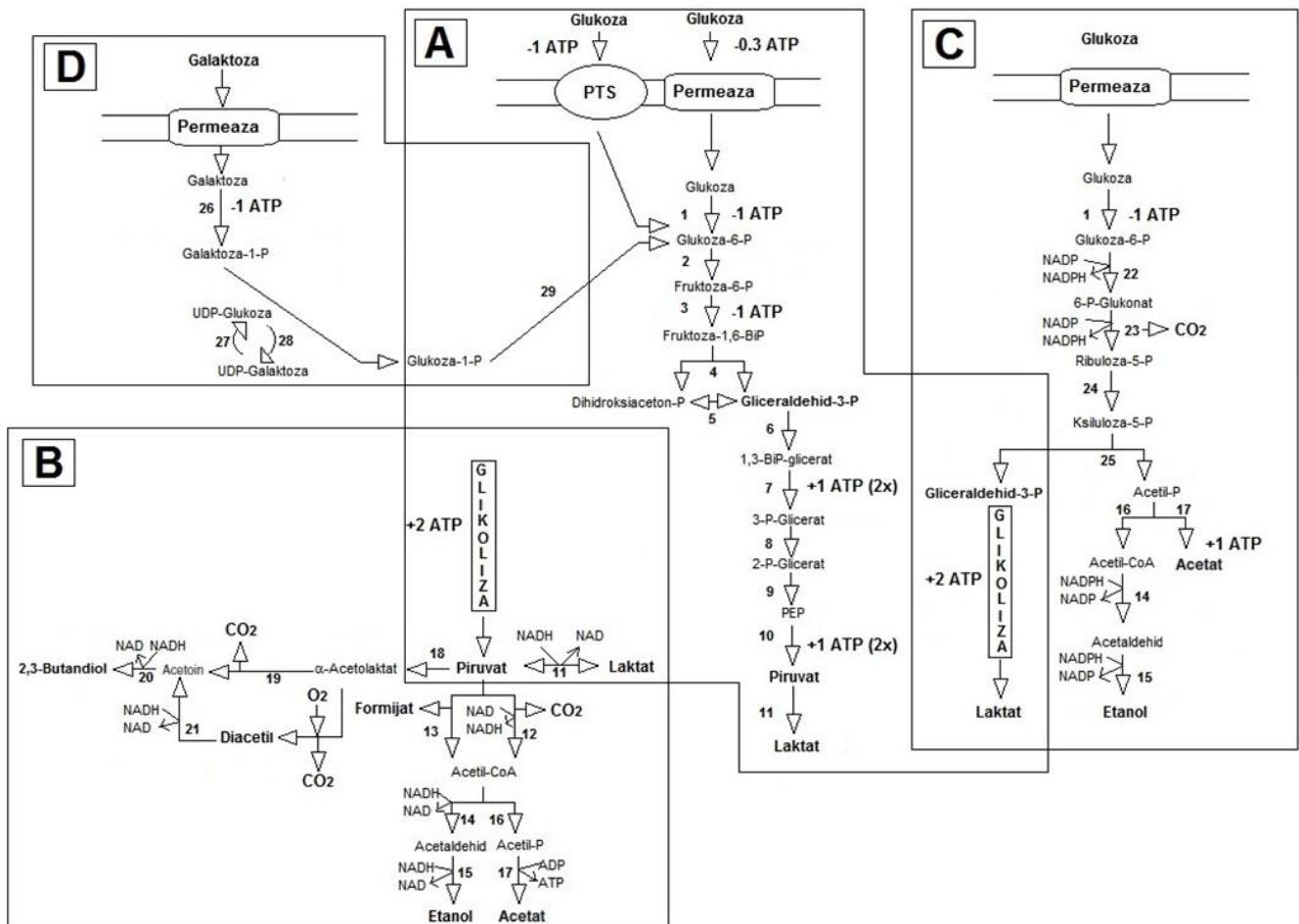
Futoshi Nakamura, znanstvenik koji je prvi izolirao soj *Lactobacillus amylovorus* iz ostataka fermentacije kukuruznih otpadaka, je zaključio da ova vrsta ima enzim pomoću kojeg može hidrolizirati škrob (Imam i sur., 1991). Proizvodi ekstracelularnu  $\alpha$ -amilazu (1,4- $\alpha$ -D-glukanohidrolaza, EC 3.2.1.1.), čime je omogućena uporaba škroba kao izvora ugljika za proizvodnju mliječne kiseline (Burgess-Cassler i Imam, 1991). Iako *L. amylovorus* može rasti na raznim disaharidima (npr. maltozi) i oligosaharidima te na polisaharidima, najpogodniji izvor ugljika za njegov rast i proizvodnju ovog enzima je jednostavan ugljikohidrat, a to je kao i kod svih drugih stanica - glukoza (Guerra, 2012). Kod vrste *L. amylovorus* okarakterizirana je smanjena proizvodnja amilaze u odsustvu glukoze u usporedbi s proizvodnjom amilaze kad je u podlozi prisutna glukoza. To bi moglo značiti da stanica u nedostatku preferiranog izvora ugljika i energije ima na raspolaganju manje energije i zbog toga sintetizira manje amilaze, koju u opisanim uvjetima nije ni potrebno sintetizirati (Fitzsimons i sur., 1994). Eksperimentalno je utvrđeno da je  $\alpha$ -amilaza vrste *L. amylovorus* oko 10 puta učinkovitiji enzim u reakcijama hidrolize škroba od  $\alpha$ -amilaze bakterije *L. plantarum* (Rodríguez-Sanoja i sur., 2005).

### 2.3. Metabolizam ugljikohidrata u stanicama bakterija mliječne kiseline

BMK metaboliziraju ugljikohidrate u biokemijskom procesu poznatom kao fermentacija, prilikom kojeg nastaju različiti korisni spojevi, ali uglavnom mliječna kiselina. Fermentacija je metabolički put razgradnje ugljikohidrata u kojem se energija dobiva iz djelomične oksidacije organskog spoja pomoću organskih međuproizvoda kao donora i akceptora elektrona (Hayek i Ibrahim, 2013). BMK rastu pri mikroaerofilnim uvjetima i uglavnom nisu osjetljive na kisik, a energiju pridobivaju fermentacijom ugljikohidrata.

Ugljikohidrati su primarni izvori ugljika i energije za BMK koji se uzgajaju u laboratorijskom mjerilu. Oligosaharidi i polisaharidi se prije biokemijske razgradnje trebaju hidrolizirati na heksoze ili pentoze. Heksoze se mogu previrati homofermentativno ili heterofermentativno, dok se pentoze isključivo metaboliziraju heterofermentativno (Von Wright i Axelsson, 2011). Različiti transportni sustavi uključeni su u transport ugljikohidrata u stanicu BMK: fosfoenolpiruvat fosfotransferazni sustav (engl. Phosphoenolpyruvate phosphoTransferase System, PTS), ABC transportni sustav i H<sup>+</sup>-simport (Mayo i sur., 2010).

Biokemijski putevi razgradnje glukoze okarakterizirani u stanicama BMK sumarno su prikazani na Slici 1.



**Slika 1.** Biokemijski putevi razgradnje glukoze. A. Homolaktička fermentacija; B. Fermentacija mješovitog tipa; C. Heterolaktička fermentacija; D. Leloir-ov put. Enzimi označeni brojevima 1 – 11 pobrojani su u tekstu ispod.

### 2.3.1. Homolaktička fermentacija

Homofermentativne vrste BMK (sve vrste rodova *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* i neke vrste roda *Lactobacillus*) fermentiraju ugljikohidrate Embden-Meyerhoff-Parnasovim (EMP) metaboličkim putem do piruvata, a piruvat se zatim konvertira u mliječnu kiselinu pomoću enzima laktat dehidrogenaze (Mayo i sur., 2010). Teoretski, homolaktičkom fermentacijom proizvede se 2 mol ATP-a po jednom molu

metabolizirane glukoze (Von Wright i Axelsson, 2011). Homofermentativne BMK razgrađuju jednu molekulu heksoznih šećera (kao što je glukoza) na dvije molekule mliječne kiseline i pridobiju dvije molekule ATP-a (Hayek i Ibrahim, 2013).

Reakcije prikazane na Slici 1.A. kataliziraju sljedeći enzimi: 1, heksokinaza (2.7.1.1); 2, fosfoglukozna izomeraza (EC 5.3.1.9); 3, 6-fosfofrukto-1-kinaza (EC 2.7.1.11); 4, fruktoza 1,6-bisfosfat aldolaza (EC 4.1.2.13); 5, trioza fosfat izomeraza (EC 5.3.1.1); 6, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (EC 1.2.1.9); 7, fosfoglicerat kinaza (EC 1.1.1.95); 8, fosfogliceromutaza (EC 2.7.5.3); 9, enolaza (EC 4.2.1.11); 10, piruvat kinaza (EC 2.7.1.40); 11, laktat dehidrogenaza (D-LDH, EC 1.1.1.28 i/ili L-LDH, EC 1.1.1.27).

### 2.3.2. Metabolizam maltoze u stanicama bakterija mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus*

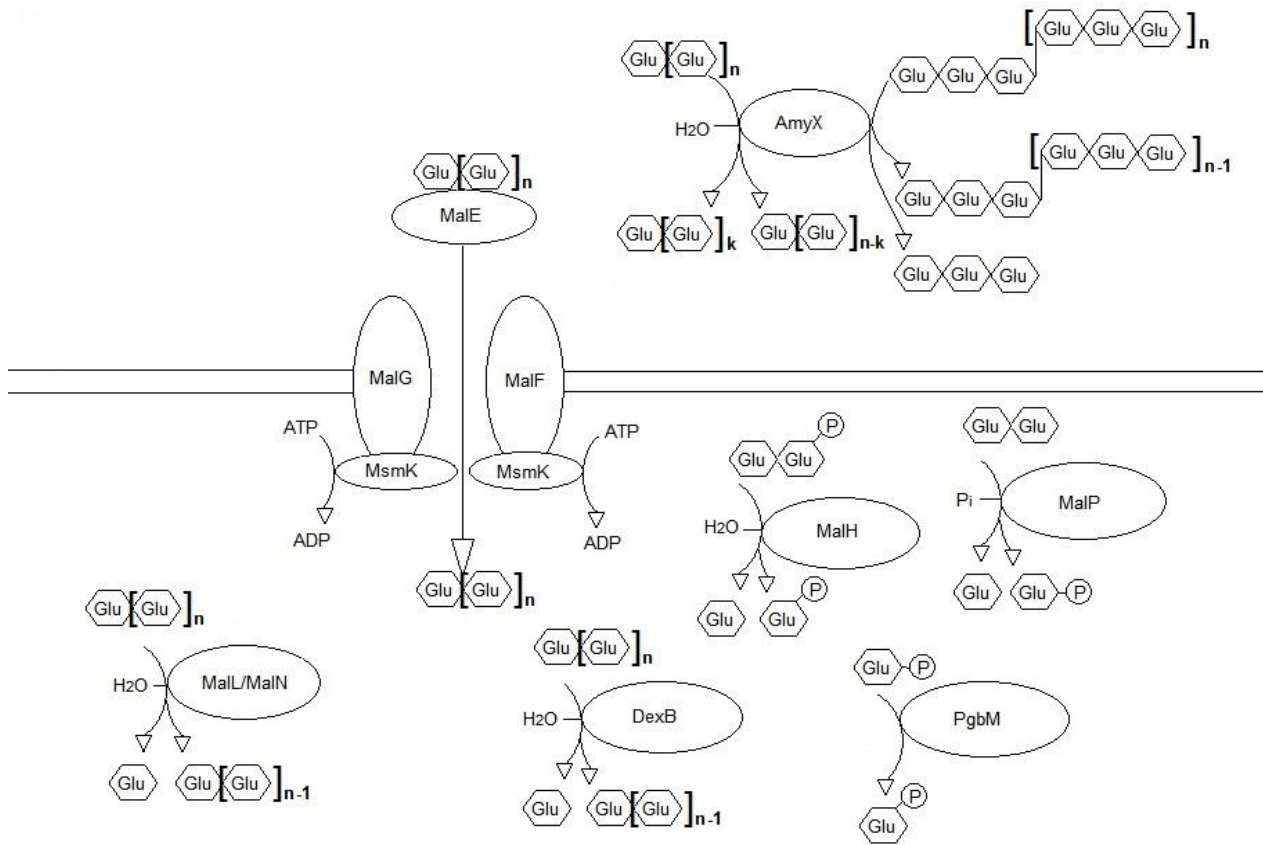
Gotovo sve vrste iz roda *Lactobacillus* mogu razgrađivati  $\alpha$ -glukane, a maltozu ne koriste dok se preferirani izvor ugljika - glukoza ne potroši (Welker i Campbell, 1963).

Postoje dva sustava za transport maltoze u stanice vrsta iz roda *Lactobacillus*: (i) ABC-transporter MalEFG/MsmK, koji je prikazan na Slici 2., i (ii) maltoza- $H^+$  simportni sustav. PTS za maltozu nije okarakteriziran kod *Lactobacillus* vrsta. Transport maltoze ABC-transporterom MalEFG-MsmK okarakteriziran je u stanicama *L. casei* i *L. acidophilus*. Ovaj ABC-transporter je homologan transportnim proteinima za maltodekstrine kod bakterijske vrste *Bacillus subtilis* i ima nizak afinitet za transport maltoze. Nekoliko intracelularnih glukanaza se prepisuje u suprotnom smjeru sa MalEFG-MsmK lokusa, što ukazuje da ovaj transportni sustav funkcionira i kao oligosaharidni transporter (Nakai i sur., 2009).

MalE, MalF, MalG i MsmK su četiri proteinske komponente ABC transportnog sustava koji transportira maltodekstrine u citosol. MalP fosforolizira maltozu na D-glukoza i  $\beta$ -D-glukoza-1-fosfat (Nakai i sur., 2009). PgmB konvertira  $\beta$ -D-glukoza-1-fosfat u  $\beta$ -D-glukoza-6-fosfat. MalH hidrolizira maltoza-6-fosfat i trehaloza-6-fosfat u D-glukoza i D-glukoza-6-fosfat. AmyX, MalN i MalL hidroliziraju  $\alpha$ -1,6- glukozydne veze u pululanu i amilopektinu i  $\alpha$ -1,4- glukozydne veze u škrobu. AmyX je vanstanični enzim, a MalL i MalN su unutarstanični enzimi. DexB hidrolizira  $\alpha$ -1,6- glukozydne veze izomalto-oligosaharida i panoze, ali ne i kod maltoze. Transportni sustav MalEFG/MsmK široko je rasprostranjen u *Lactobacillus* vrstama, ali se često ne može identificirati kod vrsta koje mogu brzo rasti na maltozi kao jednim



izvorom ugljika i energije. PTS za maltozu je okarakteriziran kod drugih rodova BMK (Gänzle i Follador, 2012).



**Slika 2.** Enzimi koji sudjeluju u metabolizmu maltoze, izomaltoze, maltodekstrina, izomalto-oligosaharida i škroba te njihova lokacija u stanicama vrsta iz roda *Lactobacillus*.

Unutarstaničnu konverziju  $\alpha$ -glukozida kataliziraju amilopululanaza MalL i MalN, dekstranaza Dex B i/ili maltoza-fosforilaza MalP. Važno je napomenuti da su unutarstanična amilopululanaza MalL i vanstanična amilopululanaza AmyX homologne te se razlikuju samo po odjeljku stanice u kojem se nalaze i iskazuju aktivnost. Aktivnost vanstanične amilaze djelomično je okarakterizirana kod nekoliko *Lactobacillus* vrsta, pa i kod *L. amylovorus*. U usporedbi s amilolitičkim enzimima kod vrsta iz roda *Bifidobacterium*, koje su egzoamilaze, amilaze *Lactobacillus* vrsta smatraju se endoamilazama koje mogu hidrolizirati amilozu, amilopektin i pululan. Vanstanična amilaza identificirana je samo kod *L. acidophilus* i *L. amylovorus* (Gänzle i Follador, 2012).

Maltoza se unutarstanično fosforolizom prevodi u glukozu i glukozu 6-fosfat pomoću NAD(H) ovisne 6-fosfo- $\alpha$ -glukozidaze (EC 3.2.1.122) (Nakai i sur., 2009). Daljnja razgradnja ovih međuspojeva odvija se glikolizom.

## 2.4. Amilaze

Amilaze su grupa enzima koje mogu katalizirati hidrolizu  $\alpha$ -1,4- i/ili  $\alpha$ -1,6- glikozidnih veza u škrobu i u polimerima slične strukture. Od velikog su značaja za biotehnološku industrijsku proizvodnju i pripadaju u skupinu industrijskih enzima koji čine oko 25% svjetskog tržišta enzima. Enzimi koji hidroliziraju škrob koriste se u proizvodnji maltodekstrina, modificiranih škrobova i glukoznih i fruktoznih sirupa. Ovi enzimi hidroliziraju molekule škroba u polimere sastavljene od jedinica glukoze - dekstrane. Amilaze proizvode različiti (mikro)organizmi, pa se prema porijeklu mogu podijeliti na biljne, životinjske i mikrobne amilaze. Mikrobne amilaze imaju širok spektar industrijske primjene jer su stabilnije od biljnih i životinjskih amilaza. Glavne prednosti korištenja mikroorganizama za proizvodnju amilaza su ekonomičnost mikrobne proizvodnje velike količine enzima i činjenica da se fiziologija mikroorganizama relativno lako usmjerava u cilju dobivanja enzima željenih svojstava (Monteiro de Souza i Oliveira e Magalhães, 2010).

Druga podjela amilaza je na endoamilaze i egzoamilaze. Endoamilaze kataliziraju hidrolizu veza u unutrašnjosti molekule škroba, što uzrokuje formiranje linearnih i razgranatih oligosaharida različitih duljina. Egzoamilaze hidroliziraju veze nedaleko od nereducirajućeg kraja polimernog lanca i u ovoj reakciji mogu nastati kraće poliglukoze kao proizvod hidrolize polimernog ugljikohidrata (Gupta i sur., 2003).

### 2.4.1. $\alpha$ -amilaza

$\alpha$ -amilaza pripada grupi najpoznatijih industrijski primijenjenih termostabilnih enzima. Sve dosad okarakterizirane  $\alpha$ -amilaze imaju kalcijev ion kao stabilizator strukture proteina/enzima. Ukoliko se ovaj ion ukloni, enzimi izgube katalitička svojstva, dok ponovno vezanje kalcijeva iona vodi ka potpunom povratku aktivnosti enzima. Stoga je predloženo da se  $\alpha$ -amilaze svrstaju u klasu metaloenzima s karakterističnom prostetskom skupinom, koja ima prvenstveno strukturnu ulogu, poput disulfidnih mostova (Prakash i Jaiswal, 2010). Uklanjanje

kalcijskih iona ili iona klora rezultira reverzibilnom inaktivacijom  $\alpha$ -amilaze (Feller i sur., 1994).

#### 2.4.1.1. Strukturne i funkcionalne karakteristike $\alpha$ -amilaze

$\alpha$ -amilaza (EC 3.2.1.1) pripada skupini endoamilaza koje kataliziraju početnu hidrolizu  $\alpha$ -D-1,4-glikozidnih veza škroba i kao proizvodi ove reakcije nastaju kraći oligosaharidi - maltotrioza i maltoza, ali i glukoza. Puno ime ovog enzima je  $\alpha$ -1,4-glukan-4-glukanohidrolaza. Glukoze na krajevima polimernih lanaca kao i glukoze povezane  $\alpha$ -1,6 vezom ne mogu se odcijepiti pomoću  $\alpha$ -amilaze. Krajnji proizvodi reakcija koje katalizira  $\alpha$ -amilaza su oligosaharidi s  $\alpha$ -konfiguracijom te smjesa dekstrina obično načinjena od maltoze, maltotrioze i razgranatih oligosaharida od 6-8 glukoznih podjedinica, koje su povezane  $\alpha$ -1,4 i  $\alpha$ -1,6 vezama (Monteiro de Souza i Oliveria e Magalhães, 2010).

Dugo vremena se smatralo da  $\alpha$ -amilaza ima dvije domene tj. da je to enzimski molekula u kojoj je N-kraj katalitička domena (domena A), a C-kraj je domena za vezanje škrobnih sirovina (domena B) (Ifuji i sur., 1996). Istraživanja su pokazala da katalitička domena obuhvaća aminokiseline 1 do 474, a domena za vezanje škrobnih sirovina obuhvaća aminokiseline 475 do 953 (Rodríguez-Sanoja i sur., 2000; Rodríguez-Sanoja i sur., 2005). Prema novijim istraživanjima okarakterizirana je i treća domena (domena C) čija je funkcija još uvijek nepoznata (Monteiro de Souza i Oliveria e Magalhães, 2010). Predložen model proteina s tri domene - A, B i C, prikazan je na Slici 3.



**Slika 3.** Struktura  $\alpha$ -amilaze. Domena A prikazana je u crvenoj, domena B u žutoj i domena C u ljubičastoj boji. Kalcijev ion u katalitičkom centru je prikazan kao plava kugla, dok je kloridni ion u katalitičkom centru prikazan kao žuta kugla. Molekule prikazane zelenom bojom su ligandi u aktivnom mjestu (preuzeto iz Monteiro de Souza i Oliveria e Magalhães, 2010).

Većina eksprimiranih  $\alpha$ -amilaza se transportira iz stanica u okolinu stanice (Eom i sur., 1991). Smatra se da vanstanična  $\alpha$ -amilaza koju proizvodi *L. amylovorus* ima relativno visoku molekulsku masu (Burgess-Cassler i Imam, 1991) i ona može varirati u širokom rasponu od oko 10 do 210 kDa (Gupta i sur., 2003). Optimalna temperatura za aktivnost ovog enzima je od 40°C do 60°C, a optimalna pH vrijednost od 6 do 8 jedinica. Dok kalcijevi ioni podržavaju aktivnost  $\alpha$ -amilaze, kelatori metala (EDTA) te natrijev citrat i natrijev oksalat inhibiraju aktivnost  $\alpha$ -amilaze (Mohamed i sur., 2014). Izoelektrična točka ovog enzima varira među različitim istraživanjima i objavljena je vrijednost  $pI$  od 4,7 (Eom i sur., 1991) kao i od 5,0 (Burgess-Cassler i Imam, 1991).

#### 2.4.1.2. Proizvodnja $\alpha$ -amilaze

$\alpha$ -amilaza se tipično proizvodi submerznim bioprosesom, ali se može proizvoditi i uzgojem na čvrstim supstratima. Plijesni i kvasci su prikladni radni (mikro)organizmi za uzgoj

na čvrstim supstratima (prema teoretskom konceptu aktiviteta vode), dok se bakterije smatraju neprikladnim za takav uzgoj. Međutim, iskustvo je pokazalo da se bakterijske kulture mogu prilagoditi i bioprocima uzgoja na čvrstom supstratu. Postoje i druge prednosti uzgoja na čvrstom supstratu u odnosu na submerzni uzgoj, a to su: visoka produktivnost, jednostavnost izvedbe, manji trošak bioprocisa, manji utrošak energije i vode, jednostavniji postupci izolacije i pročišćavanja proizvoda i odsutnost pjene. Osim toga, uzgoj na čvrstom supstratu smatra se primjerenim za zemlje u razvoju i ima veliki potencijal za porast u skoroj budućnosti (Monteiro de Souza i Oliveria e Magalhães, 2010).

Poput proizvodnje većine inducibilnih enzima i sinteza  $\alpha$ -amilaze regulirana je kataboličkom represijom glukoze i drugim ugljikohidratima. Izvori ugljika, kao što su glukoza i maltoza ali i dekstrani relativno niske molekulske mase u kombinaciji sa Tween 80 (koji povećava aktivnost  $\alpha$ -amilaze i do 27 puta), koriste se u proizvodnji  $\alpha$ -amilaze (Gupta i sur., 2003).  $\alpha$ -Amilaza se inducira u prisutnosti škroba ili proizvoda hidrolize ovog polimernog ugljikohidrata. Maltoza inducira proizvodnju i transport  $\alpha$ -amilaze (Mørkenberg i sur., 1995). Osim maltoze, kod nekih vrsta iz roda *Lactobacillus* i drugi izvori ugljika također djeluju kao induktori  $\alpha$ -amilaze, a to mogu biti laktoza, trehaloza i  $\alpha$ -metil-D-glikozid (aMG). aMG, sintetički analog maltoze, može povećati proizvodnju  $\alpha$ -amilaza i do tri puta u odnosu na proizvodnju  $\alpha$ -amilaza bez dodatka ovog analoga. Osim toga aMG je učinkovitiji induktor  $\alpha$ -amilaza i od maltoze i od škroba (Moreira i sur., 2001).

Za proizvodnju  $\alpha$ -amilaza na maltozi potrebna je tekuća hranjiva modificirana MRS podloga bez glukoze (Okano i sur., 2008). Prije samog početka sinteze  $\alpha$ -amilaze maltoza izomerizira u izomaltozu u reakciji koju katalizira  $\alpha$ -glukozidaza. Bilo koja (nespecifična)  $\alpha$ -glukozidaza koja u ovako kataliziranoj reakciji proizvodi izomaltozu može sudjelovati u indukciji  $\alpha$ -amilaze na ovaj način (Kato i sur., 2002).

#### 2.4.1.3. Pročišćavanje $\alpha$ -amilaze

Industrijski enzimi proizvode se u velikom mjerilu i općenito ih ne treba pročišćavati do visoke čistoće, kao što je to slučaj sa enzimima koji nalaze primjenu u prehrambenoj industriji, farmaceutskoj industriji, analitici ili za terapijske svrhe. Široka komercijalna upotreba  $\alpha$ -amilaze uglavno ne zahtijeva visoki stupanj pročišćavanja ovog enzima. Međutim, visoki stupanj čistoće enzima potreban je u istraživanjima odnosa strukture i funkcije enzima te

biokemijskih svojstava ove aktivne molekule. Različite strategije za pročišćavanje enzima su predložene i sve imaju fokus na primjeni specifičnih karakteristika ciljane biomolekule. Pročišćavanje  $\alpha$ -amilaze u laboratorijskom mjerilu obuhvaća različite kombinacije ionske izmjene, gel filtracije i kromatografije obrnutih faza. Drugi postupci pročišćavanja  $\alpha$ -amilaze uključuju korištenje organskih otapala kao što su etanol i aceton za taloženje ovog proteina, kao i primjenu amonijevog sulfata (Monteiro de Souza i Oliveria e Magalhães, 2010).

Pročišćavanje mikrobnih  $\alpha$ -amilaza u većini slučajeva uključuje klasične postupke pročišćavanja. Prvi postupak u nizu je izdvajanje biomase mikroorganizma od supernatanta i selektivno koncentriranje  $\alpha$ -amilaze taloženjem pomoću amonijevog sulfata ili organskih otapala, kao što je hladni aceton (Burgess-Cassler i Imam, 1991). Ovako istaložen i resuspendiran nepročišćeni protein može se dalje pročišćavati kromatografski. Obično se koristi afinitetna kromatografija, ionska izmjena i/ili gel filtracija (Gupta i sur., 2003). Anionska izmjena je često posljednji postupak u proceduri pročišćavanja  $\alpha$ -amilaza (Sahnouna i sur., 2012).

#### *2.4.1.4. Određivanje aktivnosti $\alpha$ -amilaze*

Aktivnost  $\alpha$ -amilaze može se odrediti upotrebom različitih supstrata od kojih se najzanimljivijim čini topljivi škrob. Različite su metode za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze prema topljivom škrobu. One se mogu temeljiti na određivanju: smanjenja intenziteta obojenja otopine koja sadrži kompleks škrob (amiloza) - jod; povećanja koncentracije jednostavnih i/ili reducirajućih šećera, koji nastaju kao proizvod hidrolize škroba pomoću  $\alpha$ -amilaze; smanjenja intenziteta obojenja otopine kompleksnih supstrata zbog njihove razgradnje; kao i smanjenju viskoznosti suspenzije škroba usljed njegove hidrolize ovim aktivnim enzimom. Škrob (amiloza) formira kompleks s jodom i otopina ovog kompleksa ima plavo obojenje. Hidrolizom škroba smanjuje se koncentracija formiranog kompleksa i time intenzitet plave boje otopine koja postupno prelazi u crveno-smeđe obojenje. U literaturi je opisano nekoliko postupaka za kvantitativno određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze na temelju ovdje pobrojanih svojstava (Gupta i sur., 2003). Amilolitička aktivnost ovog enzima može se odrediti i metodom u kojoj se škrob koristi kao supstrat i tijekom reakcije u odgovarajućem puferu prati se smanjenje obojenja otopine koja sadrži dinitrosalicilnu kiselinu (Feller i sur., 1994).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. MATERIJAL

#### 3.1.1. Mikroorganizam

U ovom radu kao radni mikroorganizam odabrana je bakterija *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> (ATCC 33620, NRRL B-4540), koja je svrstana u skupinu bakterija mliječne kiseline. Korišteni soj potječe iz zbirke mikroorganizama Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Njemačka) te je čuvan u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada u Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### 3.1.2. Hranjiva podloga za održavanje i uzgoj bakterijske kulture

Bakterijski soj *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> čuvan je u tekućoj hranjivoj De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) podlozi (De Man i sur., 1960). Prilikom uzastopnog precjepljivanja bakterijskog soja korištena je MRS hranjiva podloga u kojoj je glukoza ( $\gamma_{S_0} = 20,0 \text{ g L}^{-1}$ ) zamijenjena maltozom ( $\gamma_{S_0} = 20,0 \text{ g L}^{-1}$ ) (MRS-mal<sub>20</sub>), koncentracija preostalih sastojaka u ovoj podlozi nije mijenjana. Hranjiva podloga MRS-mal<sub>20</sub> korištena je i prilikom uzgoja bakterijske kulture u Erlenmeyer tikvicama i u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom.

**Tablica 1.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu hranjive MRS-mal<sub>20</sub> podloge za uzgoj bakterijskog soja i proizvodnju amilaze.

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
diamonijev citrat	$\text{HOC}(\text{CO}_2\text{H})(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4)_2$	p.a.	Merck, Njemačka
dikalijev fosfat	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	tehnički	Biolife, Italija
kvašćev ekstrakt	-	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka



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

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
magnezijev sulfat	MgSO <sub>4</sub>	p.a.	Merck, Njemačka
maltoza monohidrat	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> · H <sub>2</sub> O	p.a.	Kemika, Hrvatska
manganov sulfat monohidrat	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	p.a.	Merck, Njemačka
mesni ekstrakt	-	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
natrijev acetat trihidrat	CH <sub>3</sub> COONa · 3 H <sub>2</sub> O	p.a.	Merck, Njemačka
pepton	-	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
polisorbit 80 (Tween 80 <sup>®</sup> )	C <sub>64</sub> H <sub>124</sub> O <sub>26</sub>	p.a.	Merck, Njemačka

### 3.1.3. Kemikalije

**Tablica 2.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu otopina za pripremu uzoraka i tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti.

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
cinkov sulfat pentahidrat	ZnSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	p.a.	Merck, Njemačka
fosforna kiselina	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	p.a. za HPLC	Fluka, Njemačka

**Tablica 3.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu otopina za ionsko-izmjenjivačku kromatografiju.

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
natrijev acetat	CH <sub>3</sub> COONa	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev klorid	NaCl	p.a.	Kemika, Hrvatska
octena kiselina	CH <sub>3</sub> COOH	p.a.	Kemika, Hrvatska

**Tablica 4.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu otopina za SDS-PAGE (eng. Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) i detekciju proteina u gelu.

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
boja brom-fenol plavo	C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S	za elektroforezu	Sigma-Aldrich, SAD
akrilamid	CH <sub>2</sub> =CHCONH <sub>2</sub>	≥ 99 % (HPLC)	Sigma-Aldrich, SAD
amonijev persulfat (APS)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	min. 99 %	SERVA, Njemačka
boja Coomassie Brilliant Blue R-250, za elektroforezu	C <sub>45</sub> H <sub>44</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	(udio boje oko 90%)	Sigma-Aldrich, SAD

**Tablica 4.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripravu otopina za SDS-PAGE (eng. Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) i detekciju proteina u gelu (nastavak).

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
etanol	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	96 %	Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)	$(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$	p.a.	Kemika, Hrvatska
formaldehid	$\text{HCOH}$	p.a.	Kemika, Hrvatska
glicerol	$\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$	p.a.	Kemika, Hrvatska
glicin	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	p.a.	Kemika, Hrvatska
izopropanol	$(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$	p.a.	CLARO-PROM d.o.o., Hrvatska
klorovodična kiselina	$\text{HCl}$	p.a.	Kemika, Hrvatska
metanol	$\text{CH}_3\text{OH}$	p.a.	Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamin (TEMED)	$(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	98 %	LKB Produkter AB, Bromma, Švedska
natrijev dodecilsulfat (SDS)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$	$\geq 98.5\%$ (GC)	Sigma-Aldrich, SAD
natrijev karbonat	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	p.a.	Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
natrijev tiosulfat pentahidrat	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	p.a.	Kemika, Hrvatska

**Tablica 4.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripravu otopina za SDS-PAGE (eng. Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) i detekciju proteina u gelu (nastavak).

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
obilježivači masa za denaturirajuću elektroforezu (niskomolekulski proteinski standard ili LMW standard)	-	-	Amersham, Biosciences, SAD
octena kiselina	$\text{CH}_3\text{COOH}$	99 - 100 %	Kemika, Hrvatska
srebrov nitrat	$\text{AgNO}_3$	p.a.	Kemika, Hrvatska
tris(hidroksimetil)aminometan(Tris)	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$	p.a.	Kemika, Hrvatska
2-merkptoetanol	$\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	za elektroforezu	Sigma-Aldrich, SAD

### 3.1.4. Uređaji i aparatura

#### 3.1.2.1. Laboratorijski bioreaktor s miješalom

Šaržni uzgoj soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi (Slavica i sur., 2015) i sinteza amilaze provedeni su u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Njemačka; Slika 4.). Karakteristike ovog bioreaktora detaljno su opisane u diplomskom radu Kostelac (2016).



**Slika 4.** Laboratorijski bioreaktor s miješalom i mjerno-kontrolnom digitalnom jedinicom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Goettingen, Njemačka).

#### *3.1.4.2. Centrifuge*

U izradi eksperimentalnog dijela ovog rada korištene su tri centrifuge: centrifuga Harrier 18/80 (Sanyo, Warford, Velika Britanija), centrifuga Thermo Scientific SL8R (Thermo Fisher Scientific Inc., Roskilde, Danska) i centrifuga Beckman J-21B (Beckman Coulter, Krefeld, Njemačka). Centrifuga Harrier 18/80 korištena je za izdvajanje bakterijske biomase i određivanje suhe tvari bakterijske biomase, a centrifuga Beckman J-21B i polipropilenske kivete od 500 mL za izdvajanje supernatanta za izolaciju amilaze. Centrifuga Thermo Scientific SL8R za odvajanje komponenti supernatanta pomoću Amicon<sup>®</sup> kiveta (Ultra-15; Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, SAD). Pomoću ove membrane odijeljene su molekule s molekulskom masom većom od  $10,000 \pm 5,000$  Da (koncentrat) od molekula s molekulskom masom manjom od  $10,000 \pm 5,000$  Da (permeat) (eng. Molecular Weight Cut Off, MWCO, 10 kDa).

#### *3.1.4.3. Spektrofotometri*

Porast bakterijske biomase tijekom uzgoja soja u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom praćen je određivanjem optičke gustoće izdvojene suspenzije kao i njezinih decimalnih razrjeđenja i to pri valnoj duljini svjetlosti ( $\lambda$ ) od 600 nm. Ovdje su korištene staklene kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) i spektrofotometar Cary 13E Varian (Varian, Mulgrave, Australija).

Apsorbancija frakcija prikupljenih tijekom ionsko-izmjenjivačke kromatografije uz korištenje kvarcne kivete pri 280 nm ( $A_{280}$ ) i enzimska aktivnost uzoraka u polipropilenskim kivetima pri 610 nm ( $A_{610}$ ) određene su pomoću spektrofotometra UviLine 9400 (SCHOTT Instruments, Mainz, Njemačka).

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

Koncentracije supstrata - maltoze i krajnjeg produkta metabolizma maltoze - mliječne kiseline u supernatantima uzoraka izuzetih tijekom šaržnog uzgoja bakterijskog soja u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom određene su pomoću kromatografa Shimadzu CLASS-

VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu; Kyoto, Japan). Postupak za određivanje koncentracije i opis sustava prikazanog na Slici 5. detaljno su opisani u diplomskom radu Kostelac (2016).



**Slika 5.** Kromatograf Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu; Kyoto, Japan).

1- boce za pokretnu fazu; 2 - otplinjač; 3 - podjedinica za formiranje gradijenta; 4 - pumpa; 5 auto-injektor; 6 - pećnica s predkolumnom i kolonom; 7- detektor.

#### *3.1.4.5. Uređaj za filtraciju mobilne faze za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti i ultrazvučna kupelj*

Mobilnu fazu za analizu uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) potrebno je profiltrirati i degazirati u ultrazvučnoj kupelji. Kao mobilna faza za analizu uzoraka korištena je otopina H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,1 %

vol/vol). Ova otopina je profiltrirana kroz najlonski filter (0,22  $\mu\text{m}$ , 47 mm; Magna, GE Water & Process Technologies, Trevose, SAD) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, New York, SAD) i nakon toga je degazirana u ultrazvučnoj kupelji USC300T (VWR International, Leuven, Belgija) kroz 20 minuta.

#### *3.1.4.6. Sustav za ionsko-izmjenjivačku kromatografiju*

Kromatografski sustav Pharmacia Biotech P-900 (RediFrac Pharmacia, Uppsala, Švedska) i ionsko-izmjenjivačka kolona (Mono Q<sup>TM</sup> 4.6/100 PE, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska) korišteni su za izdvajanje amilaze. Sustav se sastoji od boca za pokretne faze, injektora, pumpi, kolone, UV-Vis detektora i sakupljača frakcija.

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

Sustav za SDS-PAGE čine izvor električne energije (Electrophoresis Power Supply EPS; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Švedska) i sustav za gel elektroforezu (SIGMA ALDRICH CVS10CBS omniPAGE mini dual; Sigma Aldrich, Milwaukee, SAD; Slika 6.). Priređeni uzorci i proteinski standardi (eng. Low Molecular Weight standard, LMW standard; Amersham Biosciences, Uppsala, Švedska) za elektroforezu u denaturirajućim uvjetima nanoseni su u jažice gela pomoću mikropipete volumena 15  $\mu\text{L}$  (Scientific Glass Engineering Pty Ltd., Melbourne, Australija).





**Slika 6.** Sustav za vertikalnu gel elektroforezu SIGMA ALDRICH CVS10CBS omniPAGE mini dual (Sigma Aldrich, Milwaukee, SAD).

#### *3.1.4.8. Ostala oprema*

- analitička vaga Shimadzu (Shimatzu, Kyoto, Japan);
- tehnička vaga Tehtnica (Železniki d.o.o., Železniki, Slovenija);
- autoklav Sutjeska;
- mikser EV-100, Tehtnica (Železniki d.o.o., Železniki, Slovenija);
- sušionik Instrumentarija ST-50 (Instrumentarija, Zagreb, Hrvatska);
- bakteriološki elektronski termostat BTE-S (Termomedicinski aparati, Zagreb, Hrvatska);
- staklena sisaljka na vodeni mlaz s gumenim vakuum crijevom (Hospitalija; Zagreb, Hrvatska);
- osobno računalo s operativnim sustavom MS Windows Vista Professional i programskim paketom MS Office 2010.

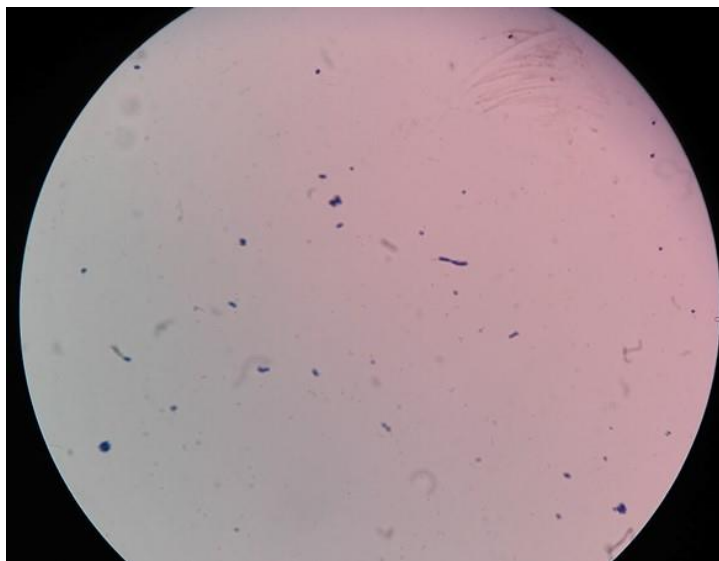
## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Priprava hranjivih podloga

Za uzgoj bakterijskog soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u staklenim epruvatama ( $V_K = 10$  mL), Erlenmeyer tikvicama ( $V_K = 250$  mL) i laboratorijskom bioreaktoru s miješalom ( $V_K = 10,0$  L) korištena je hranjiva MRS- mal<sub>20</sub> podloga (Slavica i sur., 2015). Ova podloga pripremljena je tako što su svi sastojci (Tablica 1.) odvagani i otopljeni u demineraliziranoj vodi te je nakon toga hranjiva MRS-mal<sub>20</sub> podloga sterilizirana u epruvetala i Erlenmeyer tikvicama u autoklavu pri 121°C tijekom 20 minuta, ili prije uzgoja *in situ* u bioreaktoru pri 121°C kroz 20 minuta.

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

Kultura bakterije *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> (Slika 7.) naciepljena je iz tekuće MRS-mal<sub>20</sub> podloge u staklenu epruvetu s 10 mL ove podloge, tako da udio inokuluma u hranjivoj podlozi bude 2,5 % v/v. Nakon 48 sati inkubacije pri 37°C s ovako uzgojenom kulturom (6-7 mL) naciepljena je MRS-mal<sub>20</sub> podloga (250 mL) u Erlenmeyer tikvici koja je zatim inkubirana 48 h pri 37°C. Cijeli volumen suspenzije iz Erlenmeyerove tikvice prepumpnan je pomoću peristaltičke pumpe (CH-8604; Chemap AG, Mannedorf, Švicarska) u laboratorijski bioreaktor sa sterilnom i ohlađenom ( $\approx 40^\circ\text{C}$ ) MRS-mal<sub>20</sub> podlogom ( $V_K = 10,0$  L).



**Slika 7.** Mikroskopska slika bakterijskog soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>. Stanice su fiksirane na površini predmetnice i obojene po Gramu. Priređeni je preparat promatran pod imerzijskim objektivom svjetlosnog mikroskopa Olympus CX21FS1 (Olympus; Tokyo, Japan) pri povećanju od tisuću puta.

### 3.2.3. Šaržni uzgoj bakterijskog soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> i indukcija sinteze amilaze u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom

Šaržni uzgoj bakterije *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Goettingen, Germany) proveden je u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podloga ( $V_K = 10,0$  L). Prvo je bilo potrebno sterilizirati hranjivu podlogu u bioreaktoru indirektno vodenom parom ( $121^\circ\text{C}/20$  min uz miješanje,  $n = 400$  min<sup>-1</sup>) i nakon hlađenja (do  $\approx 40^\circ\text{C}$ ) je sterilna hranjiva podloga naciepljena s 2,5 % (vol/vol) bakterijske kulture porasle u Erlenmeyer tikvici (250 mL) s pomoću peristaltičke pumpe (CH-8604; Chemap AG, Mannedorf, Švicarska). Hranjiva podloga se za vrijeme uzgoja nije aerirala, a homogenost suspenzije se održavala miješanjem pri brzini rotacije turbinskog miješala od 400 min<sup>-1</sup>. Temperatura hranjive podloge je održavana pri  $40 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . Početna pH vrijednost hranjive podloge bila je  $6,2 \pm 0,4$ . Nakon smanjivanja pH vrijednosti podloge do  $5,5 \pm 0,2$  zbog proizvodnje mliječne kiseline, započelo je automatsko doziranje otopine NaOH ( $c = 5,0$  mol L<sup>-1</sup>) radi održavanja konstantne pH vrijednosti suspenzije. Tijekom prvih 8,0 sati uzgoja šaržnim

postupkom uzorci su izuzimani svaki sat. Rast biomase praćen je mjerenjem optičke gustoće ( $A_{600}$ ) izuzetih uzoraka, a uzgoj je zaustavljen kada je na temelju  $A_{600}$  vrijednosti utvrđeno da je rast bakterijskog soja dosegao stacionarnu fazu rasta. Nakon  $t = 8,0$  i  $25,0$  h uzgoja izuzeto je, redom, 3,0 L i 4,5 L bakterijske suspenzije. Centrifugiranjem izuzete suspenzije izdvojen je supernatant i spremljen pri  $-20^{\circ}\text{C}$  za izdvajanje amilaza ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom.

### **3.2.4. Izdvajanje amilaze**

#### *3.2.4.1. Priprema uzoraka za izdvajanje amilaze*

Supernatant je prebačen u polipropilenske kivete s membranom (MWCO  $10 \pm 5$  kDa) (Amicon<sup>®</sup> Ultra-15; Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, SAD, SAD) i koncentriran centrifugiranjem ( $4^{\circ}\text{C}$ , 9500 rpm, 20 min; centrifuga Thermo Scientific SL8R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., Roskilde, Danska). U retentatu i permeatu određena je koncentracija proteina UV/VIS spektrofotometrijskom metodom ( $A_{280}$ ). Retentat je korišten za izdvajanje amilaze ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom i za analizu SDS-PAGE metodom.

#### *3.2.4.2. Taloženje amilaze amonijevim sulfatom*

##### Princip

Taloženje je tehnika odjeljivanja kojom se neke kemijske vrste uklanjaju iz otopine prevođenjem u teško topljiv talog. Ovaj proces karakterizira stvaranje taloga u otopini, koji može nastati kemijskom reakcijom i promjenom pH vrijednosti otopine. Postupak se naziva i precipitacijom. Najčešće se talog stvara kemijskom reakcijom u otopini, u kojoj od dviju ili više otopljenih tvari nastaje barem jedna koja je u otapalu netopljiva, pa se iz njega istaloži na dnu reakcijske posude. Amonijev sulfat  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  se vrlo često koristi sol za taloženje proteina, jer ova sol ima visoku topivost (zasićenje otopine kod koncentracije od  $\sim 3,9$  mol  $\text{L}^{-1}$ ), malu

toplinu otapanja, djeluje stabilizirajuće na strukturu proteina, otopine nisu jako viskozne niti kod visokih koncentracija i taloži većinu proteina kod 75% zasićenja pri 4°C (Burgess i Deutscher, 2009). Taloženja treba provoditi u puferiranim otopinama jer su otopine amonijevog sulfata kisele, najbolje pri pH vrijednosti koja je identična *pI* vrijednosti za protein od interesa (najmanja topivost proteina), pri niskim temperaturama (smanjuje mogućnost denaturacije) i uz blago, ali kontinuirano miješanje. Nakon provedenog taloženja talog proteina se izdvaja centrifugiranjem i otapa u što manjem volumenu odgovarajućeg pufera.

#### Postupak

Postupak taloženja pomoću  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  opisan je u radu Dey i Banerjee (2014).

#### *3.2.4.3. Ionsko - izmjenjivačka kromatografija*

#### Princip

Ionsko-izmjenjivačka kromatografija omogućuje kvalitativno i kvantitativno određivanje i odjeljivanje aniona, kationa i polarnih molekula. Primjenom različitih ionsko-izmjenjivačkih smola i elucijskih otopina ioni se različito raspoređuju na ionsko izmjenjivačkoj smoli, a odjeljivačkom elucijom dolazi do postupnog eluiranja različitih iona (Burgess i Deutscher, 2009).

#### Postupak

Prilikom izdvajanja amilaza u ovom radu korištena je metoda stepenaste elucije, što zahtijeva promjenu sastava eluensa tijekom kromatografske analize. Otopina za eluciju bio je 1 M NaCl u Na-acetatnom puferu, 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5. Proteini su eluirani pri 0.1 – 0.6 mol 1 M NaCl u Na-acetatnom puferu, 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5.

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

#### Princip

Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE) je metoda pomoću koje se u električnom polju mogu razdvojiti proteini s različitim molekulskom masom. Dodatkom anionskog detergenta natrijeva dodecilsulfata (SDS) nativni proteini se denaturiraju i dobivaju negativan naboj. SDS se veže na proteine u omjeru 1,4 g SDS : 1 g proteina. Nastali protein-SDS kompleks ima negativan naboj, a količina naboja je proporcionalna molekulskoj masi proteina. Gustoća naboja u kompleksu protein-SDS jednaka je za sve proteine iz uzorka i ovi se proteini - molekule s nabojem pokreću prema pozitivnoj elektrodi u električnom polju određenog napona. Brzina kretanja denaturiranih proteina zavisi o njihovoj molekulskoj masi (Laemmli, 1970). Proteini koji su razdvojeni u električnom polju na temelju opisanog principa nisu obojeni, pa su prema tome nevidljivi prostim okom. Zbog toga se elektroforetski razdvojeni proteini bojaju tj. vizualiziraju kako bi se mogli detektirati, odnosno odrediti molekulsku masu denaturiranog proteina. Proteini u gelu bojaju se aromatskim aminosulfonskim bojama ili pomoću srebra, što ovisi o koncentraciji proteina u uzorcima nanesenim u jažice poliakrilamidnog gela. Nakon vizualizacije, određuju se molekulsku masu razdvojenih proteina. Zbog toga se u gelu, osim proteina iz uzoraka, razdvaja i smjesa proteina poznatih molekulskih masa (smjesa kalibracijskih proteinskih standarda). Omjer udaljenosti koju tijekom elektroforeze u gelu prijeđe pojedini protein i udaljenosti koju postigne određena boja u definiranim uvjetima električnog polja, naziva se referentna vrijednost ( $R_f$ ).  $R_f$  dobiveni za proteine poznate molekulske mase prikazuju se u ovisnosti o logaritamskim vrijednostima pripadajućih molekulskih masa ( $\log M_r$ ) i tako se dobije baždarni pravac iz kojeg se mogu očitati vrijednosti za  $\log M_r$  za proteine s nepoznatom molekulskom masom. U ovom radu kao standard korišteni su obilježavači masa za denaturirajuću elektroforezu (Low Molecular Weight standard, LMW standard; Amersham Biosciences, Uppsala, Švedska). Ovaj LMW standard sastoji se od šest proteina: (1)  $\alpha$ -laktalbumina (14 400 Da), (2) inhibitora tripsina (20 100 Da), (3) anhidraze (30 000 Da), (4) ovalbumina (43 000 Da), (5) albumina (67 000 Da) i (6) fosforilaze b (94000 Da).

## Postupak

Postupak razdvajanje proteina iz smjese elektroforetskom metodom opisan je u diplomskom radu Kostelac (2016).

### **3.2.6. Analitičke metode**

Tijekom šaržnog uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom izuzimani su uzorci svakih sat vremena, s ciljem praćenja: potrošnje maltoze, rasta bakterijskog soja i proizvodnje mliječne kiseline te kako bi dobili supernatant za izdvajanje amilaze ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom. U izuzetim uzorcima određene su optička gustoća ( $A_{600}$ ), kao i koncentracija maltoze ( $\gamma_S$ ) i mliječne kiseline ( $\gamma_P$ ) tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (Slavica i sur., 2015). Koncentracija proteina određene su spektrofotometrijskom metodom ( $\gamma_{prot}$ ) u uzorcima supernatanata i drugim uzorcima koji su sadržavali izdvojenu amilazu, a određena je i aktivnost ovog enzima.

#### *3.2.6.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka izuzetih tijekom šaržnog uzgoja bakterijskog soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>*

U epruvetu sa 9,0 mL sterilne vode otpipetira se 1,0 mL izuzete suspenzije i homogenizira. Iz ovog razrjeđenja ( $10^{-1}$ ) na isti se način pripravi drugo razrjeđenje ( $10^{-2}$ ). 4,0 mL izuzete suspenzije i odgovarajućeg razrjeđenja prenese se u kivetu i očita apsorbancija razrijeđenog uzorka pri valnoj duljini svjetlosti ( $\lambda$ ) od 600 nm ( $A_{600}$ ). Dobivena vrijednost se preračuna s obzirom na razrjeđenje.

#### *3.2.6.2. Određivanje koncentracije ugljikohidrata RS metodom*

## Princip

Reagens za određivanje koncentracije ugljikohidrata metodom koja se zasniva na njihovoj redukcijskoj sposobnosti je alkalna otopina bakrovog sulfata ( $\text{CuSO}_4$ ) i kalijevog i

natrijevog tartarata ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_5$ ) tj. Fehlingova otopina. Slobodne aldehidne i karbonilne skupine ugljikohidrata reduciraju kupri ion ( $\text{Cu}^{2+}$ ) do kupro iona ( $\text{Cu}^{1+}$ ) pri čemu nastaje crveno-smeđi talog netopljivog bakrovog oksida ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ). Otopina kalijeva jodida (KI) se dodaje ohlađenoj smjesi u suvišku, a smjesa se zakiseli s pomoću otopine sumporne kiseline ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Jod reagira s kupro ionom, a suvišak joda se titrira otopinom natrijevog tiosulfata ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) uz dodatak otopine škroba kao indikatora (smjesa otopine joda i škroba daje tamnomodro obojenje) do prelaza u ružičasto-bež boju. Maltoza reagira direktno s Fehlingovom otopinom.

### Postupak

Centrifugirano je oko 30 mL suspenzije i za analizu je uzeto 10 mL supernatanta (uzorak). U tikvicu sa okruglim dnom od 250 mL dodano je 10 mL uzorka i 15 mL destilirane vode, razrijeđenom uzorku u tikvici doda se 10 mL otopine A ( $69.3 \text{ g L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ ; Fehling I) i 10 mL otopine B ( $346 \text{ g L}^{-1} \text{ KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_5$ ; Fehling II), smjesa se zagrijava i kuha točno dvije minute uz povratno hladilo, nakon toga smjesa se ohladi pod mlazom vode te joj se doda 10 mL otopine C (30%-tna otopina KI) i 10 mL otopine D (26%-tna otopina  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), zatim se smjesa dobro izmiješa, doda joj se 2 mL otopine škroba (1%-tna otopina škroba u 0,9%-tnom NaCl) te se titrira s otopinom  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ( $c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) do prelaza tamnoplave boje u ružičasto-bež boju koja se treba zadržati jednu minutu. Isti postupak potrebno je provesti i s otopinom glukoze (glukoza test) i vodom (slijepa proba). Za glukoza test (kontrola) potrebno je uzeti 5 mL otopine glukoze (1%-tna otopina) i 20 mL vode, dok se za slijepu probu uzima 25 mL destilirane vode. Koncentracija reducirajućih spojeva izračuna se pomoću donjeg izraza (1):

$$\gamma_{\text{RS}} = (50(a-b))/((a-c)d) \quad [\text{g L}^{-1}] \quad (1)$$

gdje je:

$\gamma_{\text{RS}}$  – koncentracija reducirajućih spojeva [ $\text{g L}^{-1}$ ],

a – volumen otopine  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) utrošen za titraciju slijepa probe [mL],

b – volumen otopine  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) utrošen za titraciju uzorka [mL],

c – volumen otopine  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) utrošen za titraciju glukoza testa [mL],

d – volumen uzorka (supernatanta) uzet za analizu



### 3.2.6.3. *Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti*

#### 3.2.6.4.

##### 3.2.6.3.1. *Taloženje proteina cinkovim sulfatom*

#### Princip

Princip metode taloženja opisan je u poglavlju 3.2.4.2. ovog rada. Taloženjem proteina cinkovim sulfatom uklanjaju se proteini iz supernatanta i tako sprječava opterećenje kolone za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti.

#### Postupak

Taloženje proteina cinkovim sulfatom provedeno je kako je to detaljno opisano u diplomskom radu Kostelac (2016).

##### 3.2.6.3.2. *Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti*

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

Kromatografski sustav sastojao se od: crpke (LC-10AD<sub>VP</sub>), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10AD<sub>VP</sub>), uređaja za grijanje kolone (CTO-10A<sub>VP</sub>), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Supelcogel<sup>TM</sup> C-610H; 30 cm x 7.8 mm ID, 9 µm) sa predkolonom (Supercogel<sup>TM</sup> H; 5 cm X 4.6 mm ID, 9 µm), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10A<sub>VP</sub>) i računalnog programa (CLASS-VP v6.10). Za analizu uzoraka ovim sustavom korištena je optimirana kromatografska metoda (Slavica i sur., 2015) pomoću koje je praćena dinamika potrošnje maltoze iz MRS-mal<sub>20</sub> podloge i dinamika proizvodnje mliječne kiseline. Procjena rezultata kromatografske analize napravljena je pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10 i pripadajućih vrijednosti izračunatih pomoću jednadžbe pripadajućih baždarnih pravaca (Batušić, 2008).

#### 3.2.6.4. Određivanje koncentracije proteina spektrofotometrijskom metodom

##### Princip

Određene molekule (poput proteina) apsorbiraju dio elektromagnetskog zračenja određene valne duljine, a dio zračenja prolazi kroz kivetu sa otopinom ovih molekula i biva detektiran na detektoru. Količina zračenja kojeg molekule apsorbiraju ovisna je o debljini sloja molekula (duljina puta kroz kivetu) te o koncentraciji molekula u otopini; što su ove vrijednosti veće to je i veća količina apsorbiranog zračenja. Ovisnost količine apsorbiranog zračenja definirana je Lambert-Beerovim zakonom (2):

$$\log \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon * c * l \quad (2)$$

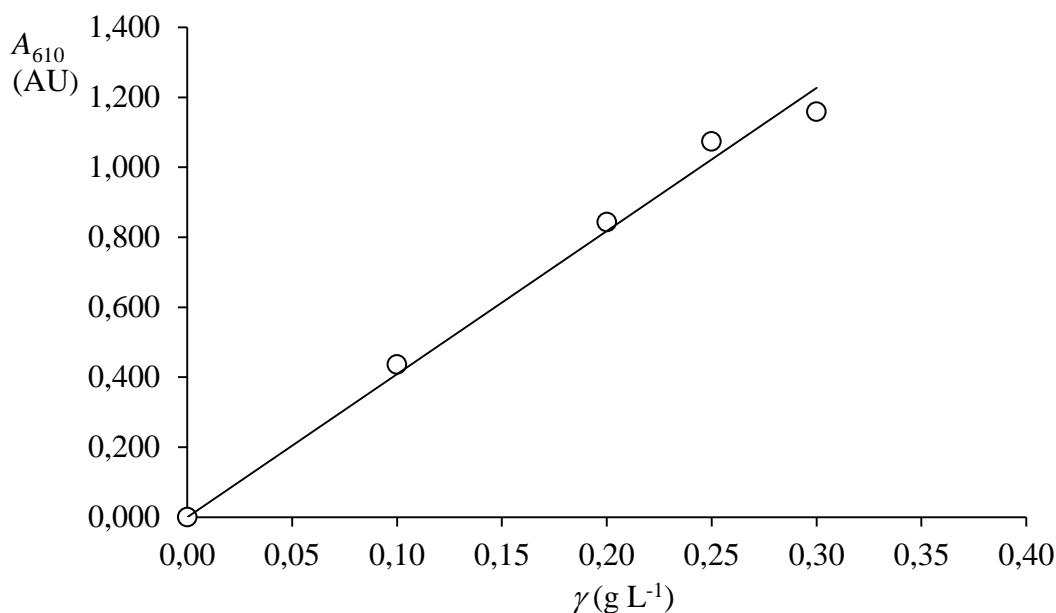
gdje je  $I_0$  intenzitet ulaznog elektromagnetskog zračenja,  $I$  intenzitet propuštenog elektromagnetskog zračenja, logaritam njihova omjera jednak je apsorbanciji ( $A$ ) pri određenoj valnoj duljini. Ova je apsorbancija jednaka umnošku molarnog apsorpcijskog koeficijenta ( $\varepsilon$ , L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), koncentracije molekula u uzorku ( $c$ , mol L<sup>-1</sup>) i duljine puta svjetlosti kroz kivetu ( $l$ , cm) (Burgess i Deutscher, 2009). Ukoliko se mjerenje apsorbancije provodi pri konstantnoj duljini puta, tada je apsorbancija proporcionalna koncentraciji molekula u otopini, te se uz poznavanje molarnog apsorpcijskog koeficijenta može odrediti koncentracija molekula. Slično tomu, ukoliko je poznata koncentracija molekula u otopini, tada se može odrediti molarni apsorpcijski koeficijent za određenu vrstu otopljenih molekula.

##### Postupak

U kvarcnu kivetu za mjerenje otpipetirano je 700  $\mu$ L uzorka. Apsorbancija uzorka se određuje pri  $\lambda = 280$  nm te se iz nje računa koncentracija proteina preko Lambert-Beerovog zakona, uz poznatu vrijednost molarnog apsorpcijskog koeficijenta.

#### 3.2.6.5. Određivanje aktivnosti enzima

Prije određivanja aktivnosti enzima, napravljen je baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri valnoj duljini svjetlosti ( $\lambda$ ) od 610 nm o koncentraciji škroba u natrijevom acetatnom puferu, 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5 (Slika 8.).



**Slika 8.** Baždarni pravac ovisnosti apsorbancije ( $\lambda = 610$  nm) o koncentraciji škroba u natrijevom acetatnom puferu, 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5.

Nakon toga, određena je aktivnost enzima u različitim uzorcima u otopini pufera i škroba pri 55°C nakon dodatka enzimske otopine. Iz linearnog nagiba pravca određena je aktivnost enzima u određenom vremenskom periodu pri odabranim uvjetima.

### 3.2.7. Analiza eksperimentalnih podataka - izračunavanje nekih pokazatelja uspješnosti rast i proizvodnje mliječne kiseline s pomoću bakterijskog soja *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>

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

$$\ln \gamma_{X(\max)} = \ln \gamma_{X0} + \mu_{(m)} \cdot t \quad (3)$$

$$\ln \gamma_S = \ln \gamma_{S0} + q_S \cdot t \quad (4)$$

$$\ln \gamma_P = \ln \gamma_{P0} + q_P \cdot t \quad (5)$$

gdje je :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$$Y_{X/S} = \frac{\gamma_X - \gamma_{X_0}}{\gamma_{S_0} - \gamma_S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad (6)$$

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

$$Y_{P/S} = \frac{\gamma_P - \gamma_{P_0}}{\gamma_{S_0} - \gamma_S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad (7)$$

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

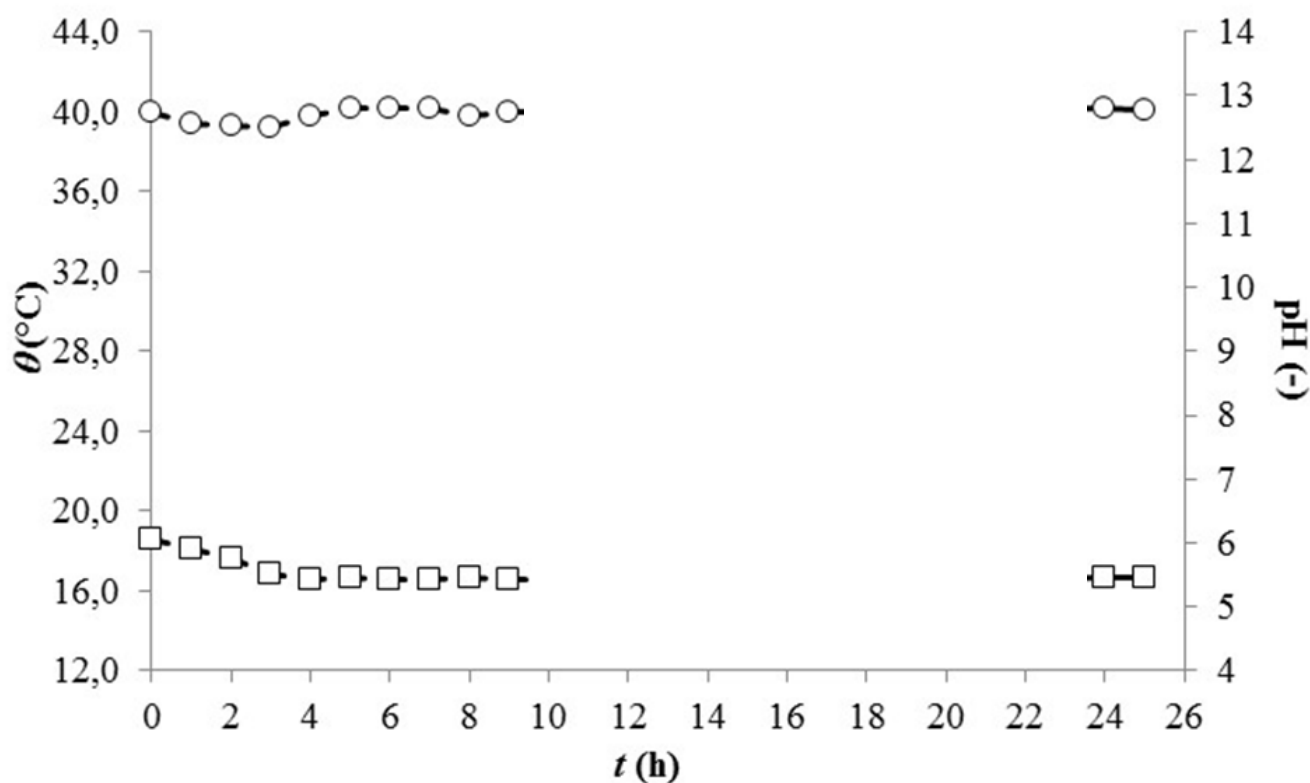
$$Pr_x = \frac{\gamma_x - \gamma_{x_0}}{t} \text{ [g L}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (8)$$

$$Pr_p = \frac{\gamma_p - \gamma_{p_0}}{t} \text{ [g L}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (9)$$

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

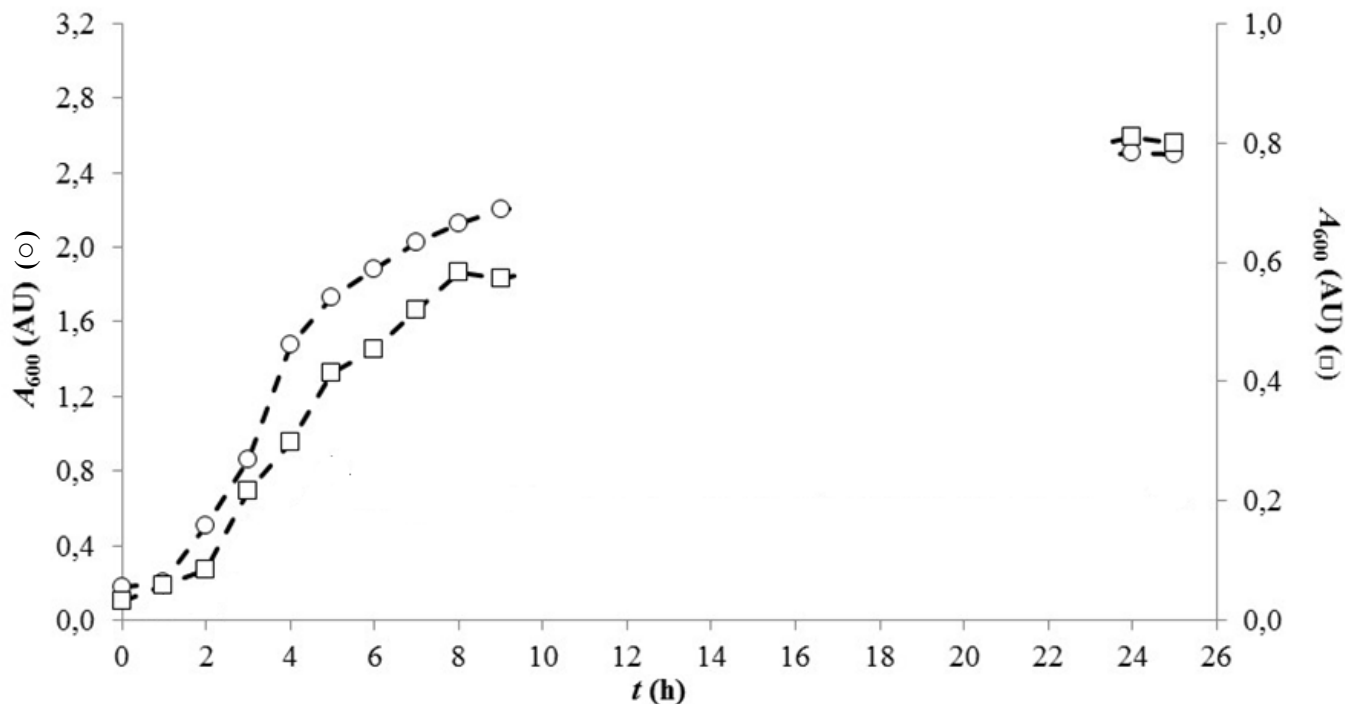
#### 4.1. Šaržni uzgoj bakterijskog soja *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom

U ovom poglavlju prikazani su rezultati šaržnog uzgoja bakterijskog soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom. Promjene temperature i pH vrijednosti hranjive podloge tijekom uzgoja prikazane su na Slici 9. Promjene optičke gustoće suspenzije ( $A_{600}$ ) prikazane su na Slici 10, a promjene koncentracije maltoze ( $\gamma_S$ ) i proizvedene mliječne kiseline ( $\gamma_P$ ) tijekom ovog uzgoja prikazane su na Slici 11. Izračunati su i biokinetički parametri rasta bakterijskog soja (Tablica 5.) kao i biokinetički parametri homofermentativne razgradnje maltoze (Tablica 5. i Tablica 6.). Izračun ovih biokinetičkih parametara prikazan je u poglavlju Prilozi.



**Slika 9.** Promjena temperature ( $\theta$ ,  $^{\circ}\text{C}$ ) i pH vrijednosti suspenzije ( $\square$ ) tijekom šaržnog uzgoja soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom.

Iz rezultata prikazanih na Slici 9. jasno je da je izbor bioreaktora dobar za uzgoj bakterijskog soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u modificiranoj hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi. Optimalna pH vrijednost kao i temperatura održavani su u odabranom rasponu tijekom cijelog uzgoja šaržnim postupkom. Suspenzija je održavana homogenom, a nije bilo potrebe za dodatkom sredstava protiv pjenjenja (rezultati nisu prikazani).

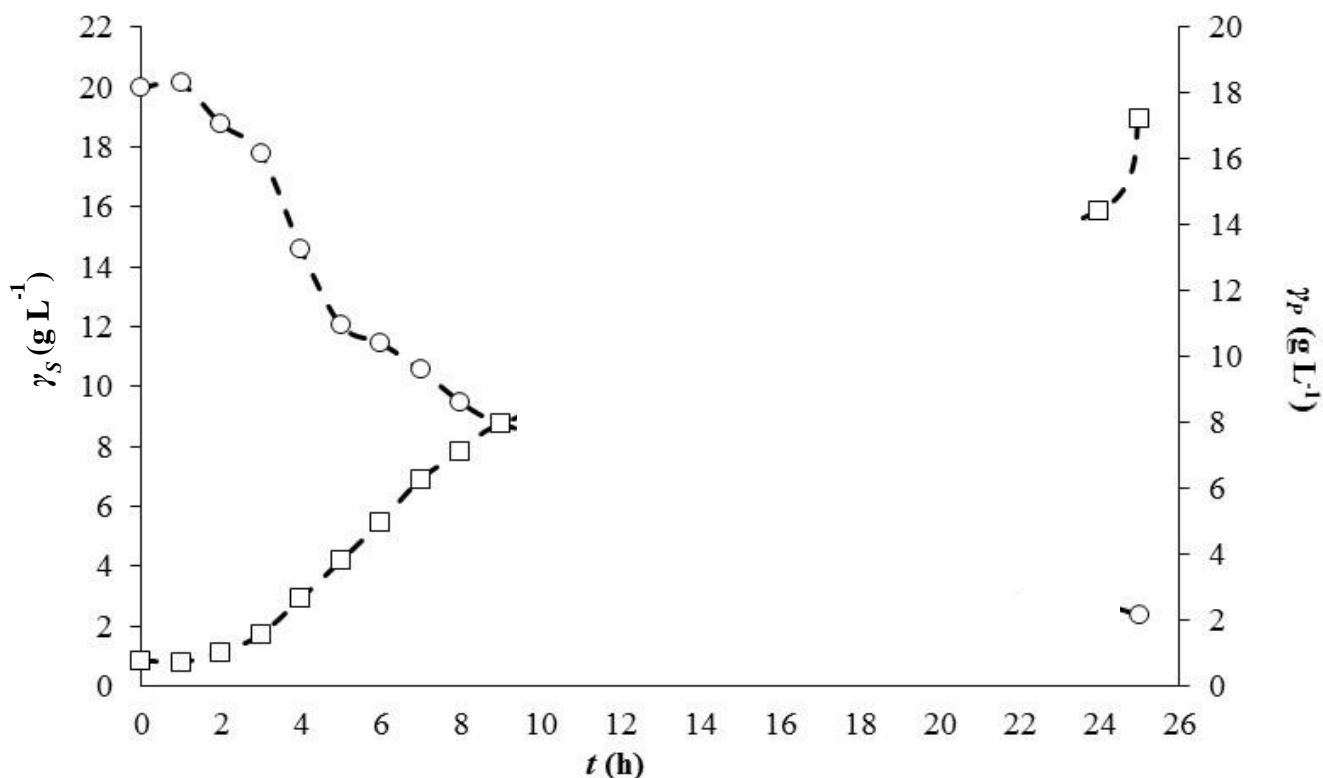


**Slika 10.** Promjena optičke gustoće ( $A_{600}$ ) suspenzije (○) i njezina prvog razrijeđenja (□) u demineraliziranoj vodi tijekom šaržnog uzgoja soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom.

Praćenje optičke gustoće suspenzije i njezinog prvog razrijeđenja izvrstan je pokazatelj porasta bakterijske biomase i može se koristiti u laboratorijskom mjerilu. Iz ovako dobivenih krivulja rasta, koje su očekivano slične kod oba uzorka, može se procijeniti trajanje faza rasta kao i drugi biokinetički parametri, kako je to istaknuto u Tablici 5. Drugo razrijeđenja uzoraka suspenzije izuzete tijekom ovog uzgoja nije dobar odabir i ovi se rezultati ne mogu koristiti za



analizu porasta biomase ovog soja jer pripadajuće vrijednosti znatno osciliraju i nalaze se izvan područja osjetljivosti mjernog instrumenta.



**Slika 11.** Promjena koncentracije maltoze ( $\gamma_S$ ,  $\circ$ ) i mliječne kiseline ( $\gamma_P$ ,  $\square$ ) tijekom šaržnog uzgoja soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom.

Potrošnja maltoze i proizvodnja mliječne kiseline s pomoću ove ABMK praćena je pomoću RS metode (rezultatati nisu prikazani) i HPLC metode, kako je to opisano u poglavlju Eksperimentalni dio. Rezultatati dobiveni RS metodom podudaraju se sa rezultatima dobivenim HPLC analizom uz odstupanja do 10%. Soj *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> može koristiti maltozu kao jedini izvor ugljika i energije i proizvoditi mliječnu kiselinu fermentacijom ovog disaharida pri odabranim uvjetima. Metabolizam maltoze u stanicama ABMK nije okarakteriziran u detalje kod BMK (Neves i sur., 2005), a naročito kod AMBK i ovaj će rad bitno doprinijeti razumijevanju metabolizma ovog ugljikohidrata kod ABMK. Kako glukoza nije identificirana HPLC metodom u supernatantu svih analiziranih uzoraka, može se zaključiti da se maltoza

transportira u stanice soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> i u stanicama hidrolizira i metabolizira. Jedini krajnji proizvod metabolizma maltoze s pomoću ovog potencijalnog industrijskog mikroorganizma je mliječna kiselina. Ovi su rezultati u skladu sa prethodnim istraživanjima u ovoj istraživačkoj grupi (Kostelac, 2016, i drugi neobjavljeni rezultati).

**Tablica 5.** Trajanje faza rasta ( $t_{\text{FAZE RASTA}}$ ; lag faza, lag; eksponencijalna faza, eksp) i vrijednosti za specifičnu brzinu rasta bakterije ( $\mu$ ), maksimalnu koncentraciju biomase ( $\gamma_{X_{\text{max}}}$ ), brzinu konverzije supstrata ( $q_s$ ), koeficijent konverzije supstrata u bakterijsku biomasu ( $Y_{X/S}$ ) i produktivnost sinteze bakterijske biomase ( $Pr_X$ ) procijenjene na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih tijekom uzgoja bakterijskog soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom.

rast amilolitičke bakterije						
$t_{\text{FAZE RASTA}}$ (h)		$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\gamma_{X_{\text{max}}}$ (g <sub>X</sub> L <sup>-1</sup> )	$q_s$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$ (g <sub>X</sub> g <sub>S</sub> <sup>-1</sup> )	$Pr_X$ (g <sub>X</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
lag	eksp					
1,0	7,0	0,35	2,64	0,10	0,10	0,07

Prije uzgoja u laboratorijskom bioreaktoru ovaj je bakterijski soj precjepljivan i uzgajan u tekućoj hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi kroz ukupno 15 uzastopnih uzgoja. Na taj način se želio popratiti utjecaj maltoze na fiziologiju ove ABMK. Usporede li se rezultati iz Tablice 5. (ovdje iznad) sa rezultatima prethodnih istraživanja u kojima je *L. amylovorus* 20531<sup>T</sup> bio održavan u standardnoj MRS podlozi (MRS-glc<sub>20</sub>) (Kostelac, 2016), može se zaključiti da maltoza utječe na biokinetičke parametre rasta ovog soja. Nakon 15 uzastopnih uzgoja u MRS-mal<sub>20</sub> podlozi javlja se lag faza, dok se eksponencijalna faza rasta produžila od 6,0 h (Kostelac, 2016) do 7,0 h (ovaj rad). Međutim, nakon uzastopnih precjepljivanja soj raste brže na maltozi i procijenjena

specifična brzina rasta ove ABMK je veća ( $\mu = 0,35 \text{ h}^{-1}$ ) od specifične brzine rasta soja precijepljenog iz MRS-glc<sub>20</sub> podloge u MRS-mal<sub>20</sub> podlogu ( $\mu = 0,27 \text{ h}^{-1}$ ; Kostelac, 2016). Dakle, tijekom scale-up procedure ovaj soj bi trebalo održavati i propagirati u MRS-mal<sub>20</sub> podlozi, a ne na MRS-glc<sub>20</sub> podlozi.

Osim toga, tijekom uzgoja opisanog u ovom radu proizvedeno je znatno manje biomase ( $\gamma_{X_{\max}} = 2,64 \text{ g L}^{-1}$ ) nego kod prethodnog istraživanja ( $\gamma_{X_{\max}} = 4,00 \text{ g L}^{-1}$ ; Kostelac, 2016) što dodatno ističe ovaj soj kao izvanrednog kandidata za industrijsku proizvodnju mliječne kiseline.

**Tablica 6.** Vrijednosti za brzinu proizvodnje mliječne kiseline ( $q_P$ ), maksimalnu koncentraciju ove kiseline ( $\gamma_{P_{\max}}$ ), koeficijent konverzije maltoze u mliječnu kiselinu ( $Y_{P/S}$ ), odnos mase proizvedene mliječne kiseline i mase prirasle biomase ( $Y_{P/X}$ ) i produktivnost proizvodnje mliječne kiseline ( $Pr_P$ ) procijenjene na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih tijekom uzgoja bakterijskog soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom.

proizvodnja mliječne kiseline				
$q_P$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$\gamma_{P_{\max}}$ ( $\text{g}_P \text{ L}^{-1}$ )	$Y_{P/S}$ ( $\text{g}_P \text{ g}_S^{-1}$ )	$Y_{P/X}$ ( $\text{g}_P \text{ g}_X^{-1}$ )	$Pr_P$ ( $\text{g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )
0,33	17,21	0,93	9,56	0,66

U odabranim uvjetima *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> je proizveo znatno više mliječne kiseline ( $\gamma_{P_{\max}} = 17,21 \text{ g L}^{-1}$ ) nego u prethodno istraživanim uvjetima ( $\gamma_{P_{\max}} = 11,53 \text{ g L}^{-1}$ ; Kostelac, 2016), čime se bitno povećao koeficijent konverzije maltoze u mliječnu kiselinu i to od  $Y_{P/S} = 0,87 \text{ g g}^{-1}$  (Kostelac, 2016) do  $0,93 \text{ g g}^{-1}$ , zbog čega se povećala i produktivnost ovog bioprocasa (od  $Pr_P = 0,47 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  do  $0,66 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

Rezultati u ovom radu uspoređeni su sa prethodnim istraživanjima u ovoj istraživačkoj grupi, jer slični rezultati pogodni za usporedbu nisu pronađeni u literaturi, pa čak ni kod dobro istražene vrste BMK *Lactococcus lactis* (Neves i sur, 2005).

## 4.2. Izdvajanje amilaze ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom

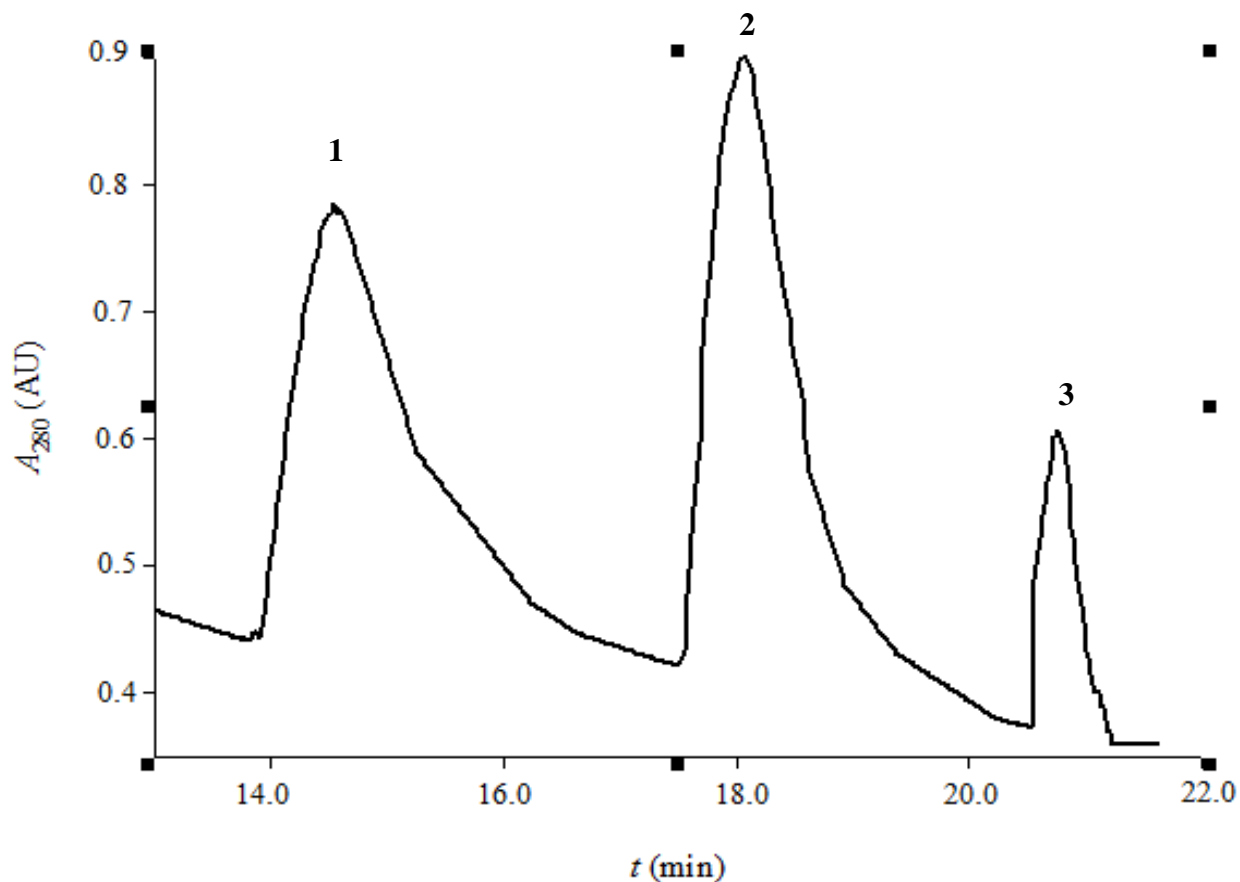
U ovom poglavlju prikazani su rezultati izdvajanja amilaze ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom i to iz supernatanta koji je dobiven iz uzorka izuzetog nakon  $t = 8,0$  h uzgoja soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom. U ovom radu maltoza je izabrana kao jedini izvor ugljika i energije u ovoj modificiranoj hranjivoj podlozi iz dva razloga: (1) maltoza je proizvod hidrolize škroba i škrobnih sirovina s pomoću ovog soja (neobjavljeni rezultati ove istraživačke grupe) i (2) maltoza može biti induktor sinteze amilolitičkih enzima kod određenih sojeva ABMK.

Na Slici 12. prikazani su rezultati izdvajanja amilaze ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom. U Tablici 7. prikazani su rezultati pročišćavanja amilaze soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>, a Slika 13. prikazuje rezultate karakterizacije određenih uzoraka pomoću elektroforeze u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE).

U ovom radu proteini su istaloženi pomoću amonijeva sulfata pri zasićenju otopine od 75%, jer je u prethodnom istraživanju (Jakša, 2017) utvrđeno da je to optimalno zasićenje soli za taloženje enzima koji posjeduju amilolitičku aktivnost. Nakon taloženja, proteini su resuspendirani u Na-acetatnom puferu, 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5 i ova je otopina nanesena na ionsko-izmjenjivačku kolonu.

Pomoću ionsko-izmjenjivačke kromatografije izdvojena su tri proteinska pika (Slika 12.), koji određenom brzinom hidroliziraju škrob u Na-acetatnom puferu, 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5 i temperaturi od 55°C (Tablica 7.). Ovi su rezultati sasvim u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja (Kostelac, 2016) u kojima su biospecifičnom kromatografijom također izdvojena tri proteinska pika. Sva tri proteinska pika koja su se specifično vezala na  $\alpha$ -ciklodekstrin posjeduju aktivnost prema škrobu, ali se njihove specifične aktivnosti značajno razlikuju (Kostelac, 2016). U ovom radu najveću aktivnost prema škrobu pokazuje protein eluiran pri 0,6 mol L<sup>-1</sup> NaCl u Na-acetatnom puferu i ona iznosi 300 U mg<sup>-1</sup> (Tablica 7.).

Molekulska masa proteina u izdvojenim frakcijama kreće se u rasponu od oko 50 do 94 kDa (Slika 13.) i svaka frakcija sadrži nekoliko proteina različite mase. Precizniji zaključci mogu se izvesti nakon daljnje karakterizacije izdvojenih proteina. Ovi se rezultati ne mogu usporediti sa objavljenim vrijednostima, jer takva ili slična istraživanja nisu dostupna u relevantnim znanstvenim časopisima ili bazama podataka.

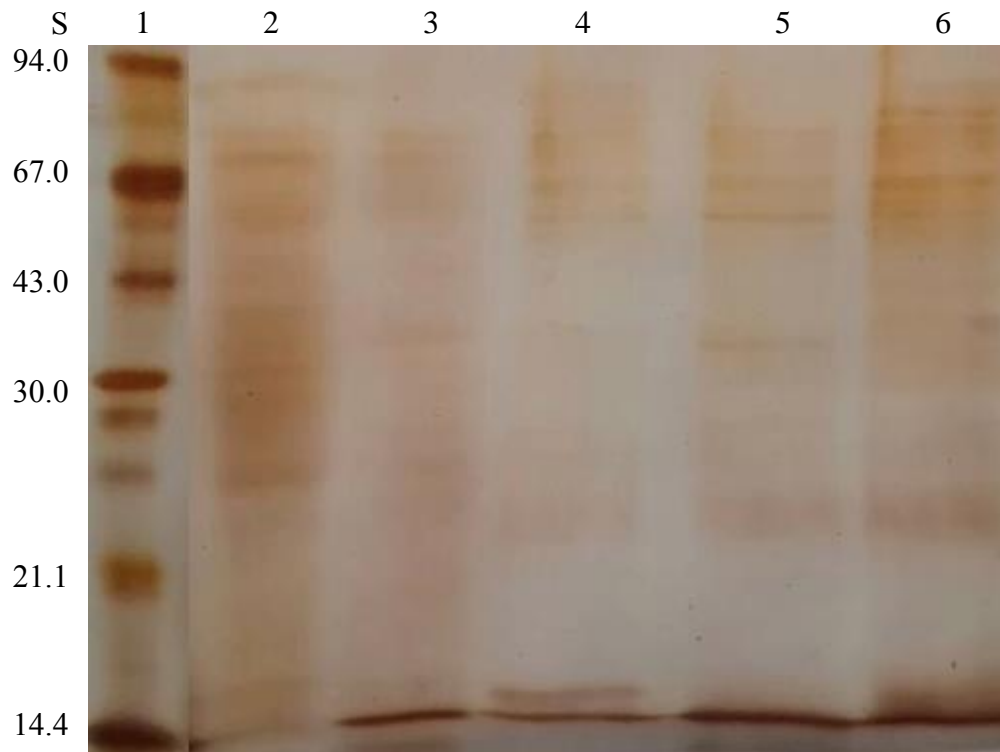


**Slika 12.** Kromatogram amilaze izdvojene iz supernatanta uzorka izuzetog nakon  $t = 8,0$  h uzgoja soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom. Brojevi 1, 2 i 3 označavaju tri izdvojena proteinska pika od kojih je (s lijeva na desno) prvi eluiran pri  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl, a preostala dva, redom, pri  $0,5$  i  $0,6 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl u Na-acetatnom puferu,  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 5,5.

**Tablica 7.** Pročišćavanje amilaze soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>.

uzorak	ukupni proteini (mg)	ukupna aktivnost (U)	specifična aktivnost (U mg <sup>-1</sup> )
supernatant	6,10	660	108
frakcija dobivena taloženjem AS	2,20	620	282
frakcija eluirana s 0,4 mol L <sup>-1</sup> NaCl	0,70	61	87
frakcija eluirana s 0,5 mol L <sup>-1</sup> NaCl	0,80	55	69
frakcija eluirana s 0,6 mol L <sup>-1</sup> NaCl	0,70	210	300

AS, amonijev sulfat



**Slika 13.** SDS-PAGE: standardi (S, 1), supernatant (2), frakcija dobivena taloženjem amonijevim sulfatom (3), frakcija eluirana s  $0,4 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (4), frakcija eluirana s  $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (5), frakcija eluirana s  $0,6 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (6).



## **5. ZAKLJUČCI**

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

1. Amilolitička bakterija mliječne kiseline (ABMK) *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> uzgojena je u modificiranoj MRS podlozi, u koju je umjesto glukoze ( $20,0 \text{ g L}^{-1}$  u MRS-glc<sub>20</sub> podlozi) dodana maltoza ( $20,0 \text{ g L}^{-1}$  u MRS-mal<sub>20</sub> podlozi). Uzgoj je proveden u laboratorijskom bioreaktoru s turbinskim miješalom ( $V_K = 10,0 \text{ L}$ ) pri konstantnoj temperaturi ( $40 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ), pH vrijednosti suspenzije ( $\text{pH } 5,5 \pm 0,2$ ) i broju okretaja miješala ( $n = 400 \text{ rpm}$ ). U odabranim uvjetima ovaj soj koristi maltozu kao jedini izvor ugljika i energije i, uz indukciju ovim disaharidom, sintetizira amilazu.
2. Ovaj soj ABMK, koji je prethodno uzgojen i uzastopnim precjepljivanjem adaptiran na maltozu (MRS-mal<sub>20</sub> podloga), najprije ima fazu prilagodbe ( $t_{\text{lag}} = 1,0 \text{ h}$ ), a zatim eksponencijalno raste kroz slijedećih  $7,0 \text{ h}$  ( $t_{\text{eksp}}$ ), nakon čega ulazi u stacionarnu fazu rasta. U opisanim uvjetima soj sintetizira znatno manje biomase ( $2,64 \text{ g L}^{-1}$ ) nego kada je prethodno uzgojen na glukozi ( $4,00 \text{ g L}^{-1}$ ) i to pri istim odabranim uvjetima uzgoja ( $V_K$ ,  $\theta$ , pH i  $n$ ) u laboratorijskom mjerilu. Adaptirani soj raste brže na maltozi ( $\mu = 0,35 \text{ h}^{-1}$ ) od soja koji nije bio adaptiran na maltozu ( $\mu = 0,27 \text{ h}^{-1}$ ).
3. Homofermentativnom razgradnjom maltoze *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> proizvodi mliječnu kiselinu kao jedini krajnji proizvod metabolizma i to znatno učinkovitije nakon adaptacije na ovaj supstrat ( $Y_{P/S} = 0,93 \text{ g g}^{-1}$ ,  $Pr_P = 0,66 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) nego nakon precjepljivanja sa glukoze ( $Y_{P/S} = 0,87 \text{ g g}^{-1}$ ,  $Pr_P = 0,47 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).
4. Supernatant uzorka, koji je izuzet nakon završetka eksponencijalne faze rasta ovog bakterijskog soja i proizvodnje mliječne kiseline ( $t_{\text{uzgoja}} = 8,0 \text{ h}$ ), korišten je za izdvajanje sintetizirane amilaze i to taloženjem amonijevim sulfatom (75% zasićenja) i, zatim, ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom. Tri kromatografski izdvojene proteinske frakcije pokazuju aktivnost prema škrobu u Na-acetatnom puferu,  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 5,5 pri  $55^\circ\text{C}$ . Ovi su rezultati u skladu sa rezultatima biospecifične kromatografije pomoću koje su također izdvojene tri proteinske frakcije koje su pokazivale aktivnost prema škrobu. Najveću specifičnu aktivnost od  $300 \text{ U mg}^{-1}$  pokazuje proteinska frakcija eluirana tijekom ionsko-izmjenjivačke kromatografije pri  $0,6 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  u puferu.
5. Sva tri izdvojena pika imaju više proteinskih vrpca, kao što je to detektirano SDS-PAGE metodom i njihove mase procijenjene su između  $50$  i  $94 \text{ kDa}$ .

## **6. LITERATURA**

Anonymous 1 (2017) BRENDA - The Comprehensive Enzyme Information System, <<http://www.brenda-enzymes.org>> Pristupljeno 17. lipnja 2017.

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

Burgess, R. R., Deutscher, M. P. (2009) Guide to protein purification, 2. izd., Elsevier Inc., San Diego.

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

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

Dey, T. B., Banerjee, R. (2014) Purification, biochemical characterization and application of  $\alpha$ -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **4** (1), 83-90.

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

Feller, G., Payan, F., Theys, F., Qian, M., Haser, R., Gerday, C. (1994) Stability and structural analysis of  $\alpha$ -amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas Haloplanctis* A23. *Eur. J. Biochem.* **222**, 441-447.

Fitzsimons, A., Hols, P., Jore, J., Leer, R. J., O'Connell, M., Delcour J. (1994) Development of an amylolytic *Lactobacillus plantarum* silage strain expressing the *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (10), 3529-3535.

Gänzle, M. G., Follador, R. (2012) Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. *Front Microbiol.* **3** (340). doi: 10.3389/fmicb.2012.00340.

Guerra, N. P. (2012) A Review on some chemical engineering and microbiological aspects considered in the production of highly concentrated probiotic cultures and bacteriocins by *Lactococci* and *Lactobacilli*. *ISRN Chem.Eng.* **2012**. doi:10.5402/2012/836381.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B. (2003) Microbial  $\alpha$ -amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* **38**, 1599-1616.

Hayek, S. A., Ibrahim, S.A. (2013) Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food Nutr. Sci.* **4**, 73-87.

Ifuji, H., Chino, M., Kato, M., Iimura, Y. (1996) Raw-starch-digesting and thermostable alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. *Biochem J.* **318** (3), 989-996.

Jakša, I. (2017) Izolacija amilaze amilolitičke bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> ion-izmjenjivačkom kromatografijom, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu, srpanj 2017.

Kato, N., Murakoshi, Y., Kato, M., Kobayashi, T., Tsukagoshi, N. (2002) Isomaltose formed by  $\alpha$ -glucosidases triggers amylase induction in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **42**, 43-50.

Kostelac, D. (2016) Proizvodnja i karakterizacija  $\alpha$ -amilaze bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu, srpanj 2016.

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

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

Monteiro de Souza, P., de Oliveira e Magalhães, P. (2010) Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry – a review. *Braz. J. Microbiol.* **41** (4), 850–861.

Moreira, F. G., Lenartovicz, V., de Souza, C. G. M., Ramos, E. P., Peralta, R. M. (2001) The use of  $\alpha$ -methyl-D-glucoside, a synthetic analogue of maltose, as inducer of amylase by *Aspergillus* sp. in solid-state and submerged fermentations. *Braz. J. Microbiol.* **32**, 15-19.

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

Mayo, B., Aleksandrak - Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez Martín, P., Bardowski, J. (2010) Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. U: *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications* (Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M., ured.), Wiley-Blackwell, Hoboken, str. 3-33.

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

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

Okano, K., Zhang, Q., Shinkawa, S., Yoshida, S., Tanaka, T., Fukuda, H., Kondo, A. (2008) Efficient production of optically pure D-lactic acid from raw corn starch by using a genetically modified L-lactate dehydrogenase gene-deficient and  $\alpha$ -amylase-secreting *Lactobacillus plantarum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **75** (2), 462-467.

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

Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., Girbés, T. (2014) Probiotic lactic acid bacteria: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **5**, 1765-1775.

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

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

Sahnouna, M., Bejara, S., Sayaria, A., Ali Trikib, M., Kriaa, M., Kammouna, R. (2012) Production, purification and characterization of two  $\alpha$ -amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus Oryzae* strain S2. *Process Biochem.* **47** (1), 18-25.

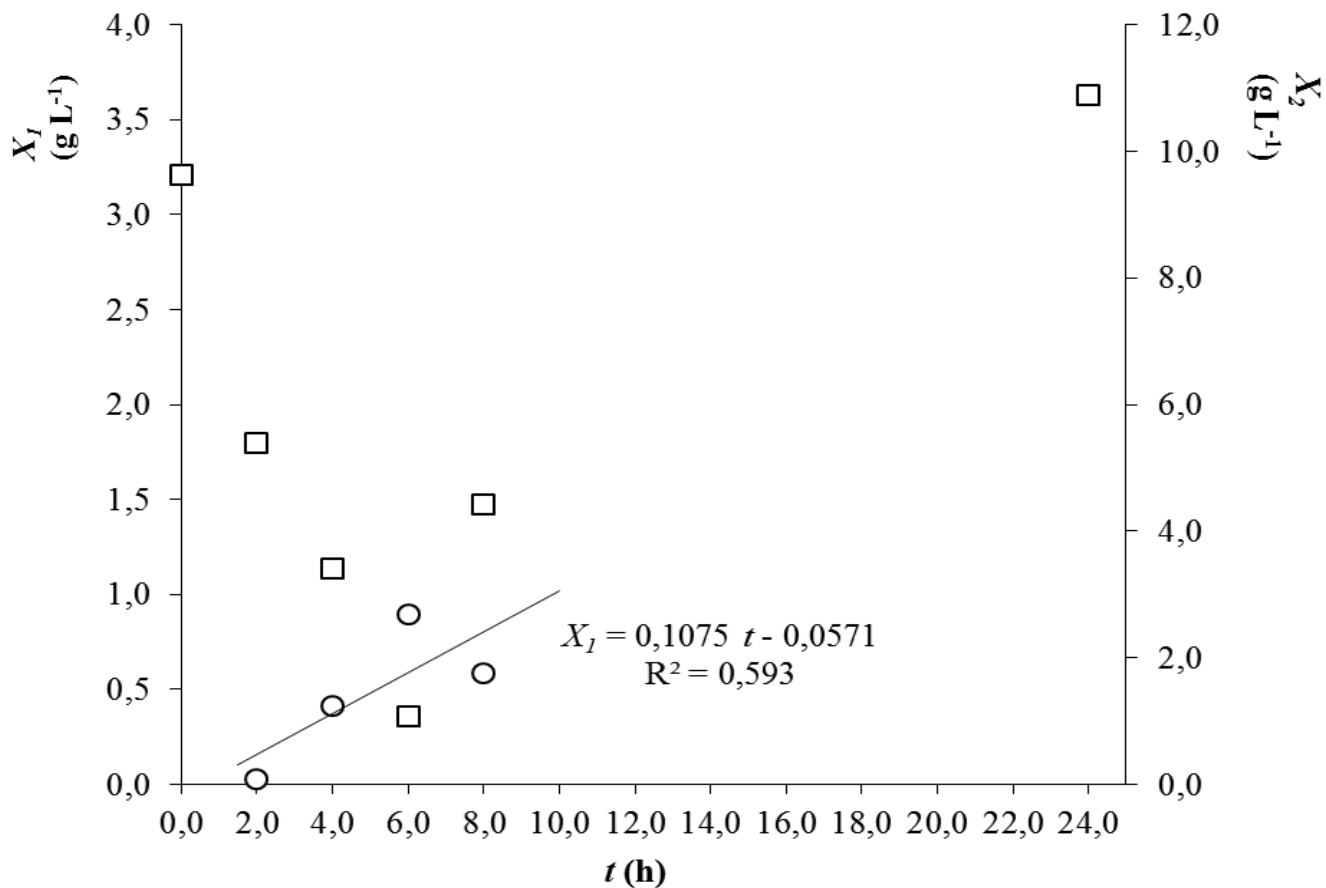
Slavica, A., Trontel, A., Jelovac, N., Kosovec, Ž., Šantek, B., Novak, S. (2015) Production of lactate and acetate by *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004<sup>T</sup> in comparison with *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>, *J. Biotechnol.* **202**, 50-59.

Von Wright, A., Axelsson, L. (2011) Lactic acid bacteria: an introduction. U: *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, 4. izd. (Lahtinen, S., Ouwehand A.C., Salminen, S., von Wright, A., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 2-14.

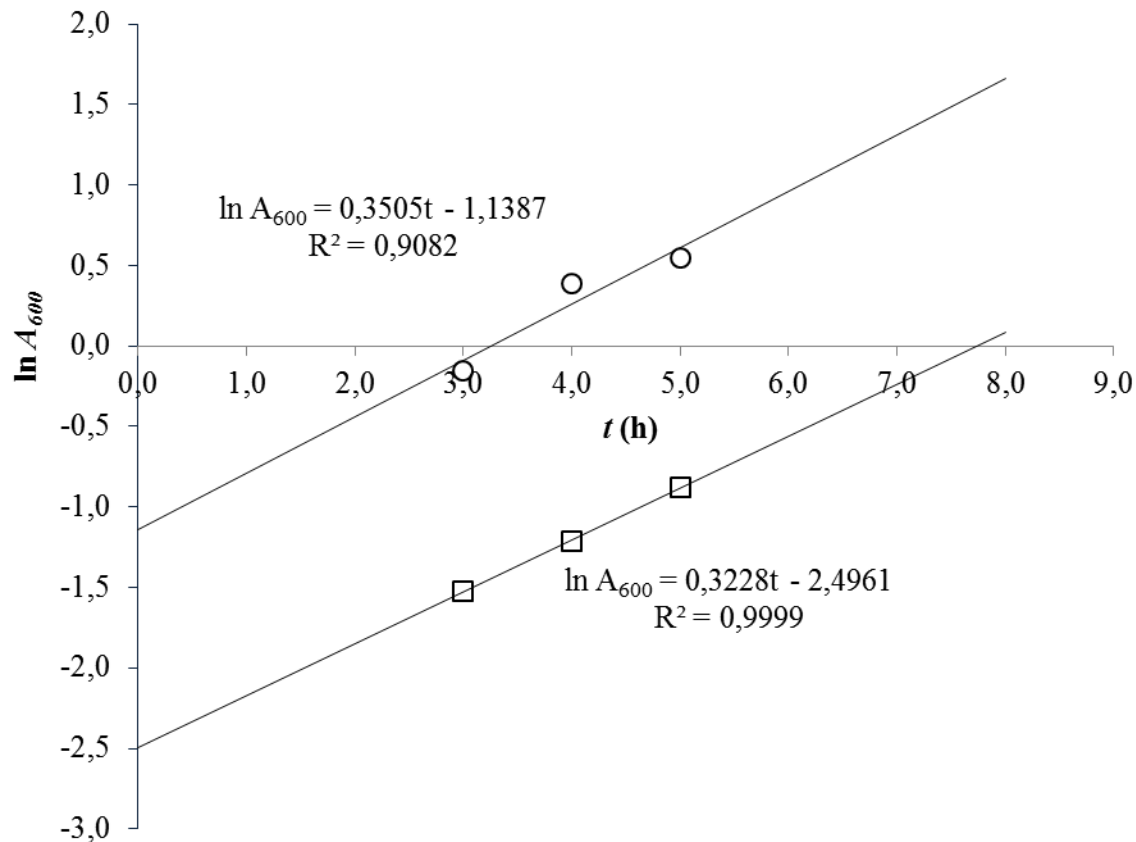
Welker, N. E., Campbell, L. L. (1963) Induced biosynthesis of  $\alpha$ -amylase by growing cultures of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* **86**, 1196-1201.



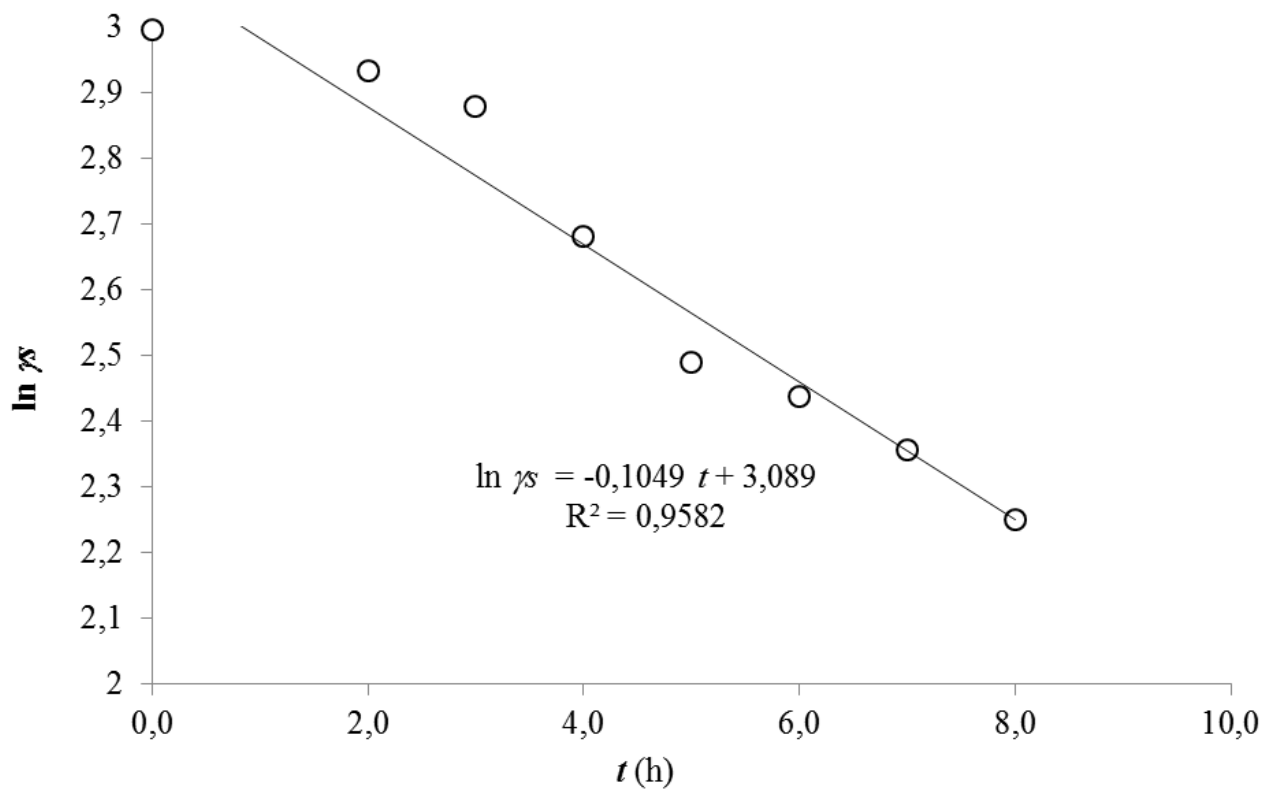
## **7. PRILOZI**



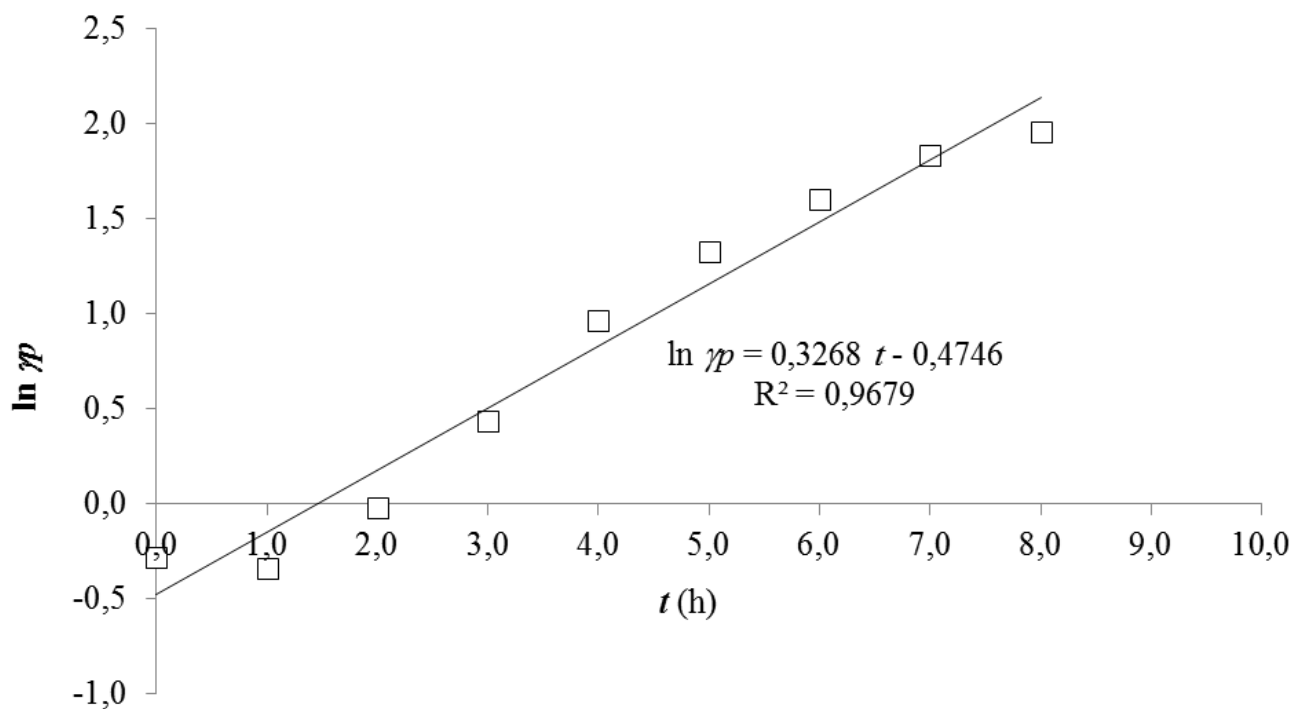
**Slika 14.** Promjena koncentracije suhe tvari bakterijske biomase soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> tijekom šaržnog uzgoja u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom i to nakon sušenja biomase u kivetama (X<sub>1</sub>, ○) i nakon filtriranja (X<sub>2</sub>, □).



**Slika 15.** Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu rasta ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> i to suspenzije ( $\mu = 0,35 \text{ h}^{-1}$ , ○) i njezinog prvog razrijeđenja ( $\mu = 0,32 \text{ h}^{-1}$ , □) tijekom eksponencijalne faze raste ovog soja uzgojenog šaržnim postupkom u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom.



**Slika 16.** Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu potrošnje maltoze ( $q_s = 0,10 \text{ h}^{-1}$ ,  $\circ$ ) s pomoću ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> tijekom eksponencijalne faze rasta ovog soja uzgojenog šaržnim postupkom u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom.



**Slika 17.** Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu proizvodnje mliječne kiseline ( $q_p = 0,33 \text{ h}^{-1}$ , □) pomoću ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> tijekom šaržnog uzgoja u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom.