

Permeabilizacija stanica bakterije *Leuconostoc mesenteroides* i njihova primjena u proizvodnji alfa-glukozilglicerola

Vučenović, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:159:382166>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

Ivan Vučenović
893/MB

Permeabilizacija stanica bakterije
Leuconostoc mesenteroides **i njihova**
primjena u proizvodnji
 α -glukozilglicerola

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

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Aniti Slavici, na mogućnosti da izradim ovaj diplomski rad, kao i na korisnim savjetima tijekom planiranja i izvođenja eksperimenata te tijekom pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Mladenu Brnčiću na utrošenom vremenu i ustupanju potrebne aparature za izradu ovog diplomskog rada.

Zahvaljuem se svojim roditeljima i sestri na njihovom strpljenju i pruženoj podršci tijekom studiranja.

Zahvaljujem se Luci jer je uvijek uz mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
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

Permeabilizacija stanica bakterije *Leuconostoc mesenteroides* i njihova primjena u proizvodnji α -glukozilglicerola

Ivan Vučenović, 893/MB

Sažetak: Gram-pozitivna bakterija mliječne kiseline *Leuconostoc mesenteroides* znatno bolje raste u kemijski djelomično definiranoj podlozi pri aerobnim ($\mu = 0,24 \text{ h}^{-1}$) nego mikroaerofilnim uvjetima ($\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$). Pri aerobnim uvjetima ova bakterija doseže polovinu eksponencijalne faze rasta kroz 5,0 h, kada je koncentracija i aktivnost saharoza fosforilaze, citoplazmatskog enzima koji katalizira transglukozilaciju, maksimalna. U reakcijskoj smjesi u kojoj je istraživana transglukozilacijska aktivnost saharoza fosforilaze, saharoza je donor glukozila, dok je glicerol akceptor glukozila. Međutim, saharoza i glicerol su supstrati za centralni metabolizam u stanicama ove heterofermentativne bakterije mliječne kiseline s pomoću koje je proizvedena samo mliječna kiselina, dok ostali krajnji proizvodi razgradnje ovih supstrata nisu identificirani HPLC metodom. Primjena ultrazvuka i površinski aktivne tvari Tween-80 pokazale su se kao dobre metode, kojima je moguće permeabilizirati bakterijske stanice ali i utjecati na aktivnost ove bakterije. Nakon provedenih postupaka permeabilizacije stanice se dalje eksponencijalno umnažaju i zadržavaju svoju metaboličku aktivnost. U reakcijskoj smjesi s pomoću permeabiliziranih stanica bakterije *L. mesenteroides* formira se α -glukozilglicerol, koji se eluira između saharoze i glukoze tijekom HPLC analize uzoraka. Nastavak ovog istraživanja uključuje izolaciju proizvedenog proizvoda i njegovu identifikaciju i kvantifikaciju npr. nuklearnom magnetnom rezonancijom.

Ključne riječi: heterofermentativna bakterija mliječne kiseline, *Leuconostoc mesenteroides*, permeabilizacija, mliječna kiselina, transglukozilacija

Rad sadrži: 55 stranica, 20 slika, 9 tablica, 31 literaturni navod, 9 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Anita Slavica

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. Igor Stuparević
2. Prof.dr.sc. Anita Slavica
3. Prof.dr.sc. Mladen Brnčić
4. Prof.dr.sc. Jasna Mrvčić (zamjena)

Datum obrane: 19. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
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

Permeabilization of cells of bacterium *Leuconostoc mesenteroides* and their application in production of α -glucosylglycerol

Ivan Vučenović, 893/MB

Abstract: Gram-positive lactic acid bacterium *Leuconostoc mesenteroides* grew significantly better in chemically semi-defined medium under aerobic ($\mu = 0.24 \text{ h}^{-1}$) than under microaerophilic conditions ($\mu = 0.02 \text{ h}^{-1}$). Under aerobic conditions this bacterium reached half of the exponential growth phase over 5.0 h when concentration and activity of sucrose phosphorylase, cytoplasmatic enzyme that catalyzes transglucosylation reaction, should be maximal. In reaction mixture for the transglucosylation reaction catalyzed by the sucrose phosphorylase, sucrose serves as glucosyl donor while glycerol is glucosyl acceptor. However, sucrose and glycerol are also substrates in central metabolism of this heterofermentative lactic acid bacterium that produced only lactic acid, while other end-products of the two substrates degradation were not identified by HPLC method. Application of ultrasound and surfactant Tween-80 are methods of choice and both methods can be used for cell permeabilization but also in directing metabolic activity of the bacterium. After permeabilization the cells continued to grow exponentially and they retained their metabolic activity. In reaction mixture formation of α -glucosylglycerol was catalyzed by the permeabilized cells of the bacterium *L. mesenteroides* and formed product eluted between sucrose and glucose during HPLC analysis of withdrawn samples. Next steps in this investigation should include isolation of produced α -glucosylglycerol and its unambiguous identification and quantification by *e.g.* nuclear magnetic resonance.

Keywords: heterofermentative lactic acid bacterium, *Leuconostoc mesenteroides*, permeabilization, lactic acid, transglucosylation

Thesis contains: 55 pages, 20 figures, 9 tables, 31 references, 9 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. *Igor Stuparević*, Assistant Professor
2. PhD. *Anita Slavica*, Full Professor
3. PhD. *Mladen Brnčić*, Full Professor
4. PhD. *Jasna Mrvčić*, Full Professor (substitute)

Thesis defended: 19 July 2018

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Biokatalitički procesi – zamjena za kemijsku sintezu spojeva s dodanom vrijednošću	2
2.1.1. Prednosti i nedostaci primjene cjelovitih mikrobnih stanica kao biokatalizatora	2
2.2. Permeabilizacija stanica	3
2.2.1. Metode permeabilizacije stanica	4
2.3. Bakterija mliječne kiseline <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	6
2.4. Saharozna fosforilaza	7
2.5. Proizvodnja 2-O-(α -D-glukopiranozil)-sn-glicerola	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. Materijali	11
3.1.1. Mikroorganizam	11
3.1.2. Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterijske kulture	11
3.1.3. Kemikalije	11
3.1.4. Uređaji	13
3.2. Metode rada	17
3.2.1. Priprava hranjivih podloga	17
3.2.2. Priprava cjepiva za uzgoj bakterije u laboratorijskom mjerilu	18
3.2.3. Određivanje krivulje rasta bakterije <i>Leuconostoc mesenteroides</i> pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima	18
3.2.4. Uzgoj bakterijske biomase i priprema reakcijske smjese za transglukozilaciju	18
3.2.5. Permeabilizacija stanica bakterije <i>L. mesenteroides</i>	19
3.2.6. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	19
3.2.7. Analitičke metode	20
3.2.8. Analiza eksperimentalnih podataka - izračunavanje specifične brzine rasta bakterije <i>L. Mesenteroides</i>	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. Krivulja rasta bakterije <i>leuconostoc mesenteroides</i> pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima	27
4.2. Uzgoj bakterijske biomase i permeabilizacija stanica <i>L. Mesenteroides</i> u cilju provođenja transglukozilacije	31
4.2.1. Uzgoj bakterijske biomase i permeabilizacija stanica <i>L. Mesenteroides</i> fizikalnom metodom	31
4.2.2. Uzgoj bakterijske biomase i permeabilizacija stanica <i>L. Mesenteroides</i> kemijskom metodom	37
4.3. Procjena uspješnosti formiranja α -glukozilglicerola u reakcijama transglukozilacije provedenim s pomoću permeabiliziranih stanica bakterije <i>Leuconostoc mesenterides</i>	43
5. ZAKLJUČCI	45
6. LITERATURA	47
7. PRILOZI	51

1. UVOD

Bioproceni u kojima se koriste cjelovite mikrobne stanice mogu uspješno zamijeniti procese kemijske sinteze. Glavne prednosti upotrebe cjelovitih mikrobnih stanica u odnosu na kemijsku sintezu spojeva s dodanom vrijednosti su mogućnost provođenja procesa u blagim uvjetima i smanjena ili potpuno izbjegnuta proizvodnja drugih nepoželjnih proizvoda. Primjena cjelovitih mikrobnih stanica ima prednosti i u odnosu na primjenu enzimskih preparata. Primjenom cjelovitih mikrobnih stanica izbjegava se ekonomski zahtjevna i često dugotrajna proizvodnja, izolacija i pročišćavanje enzima. Osim toga, u mikrobnim stanicama odvija se regeneracija kofaktora koji su potrebni za određene enzimske reakcije kojima se dobiva željeni proizvod. Nadalje, u cjelovitim mikrobnim stanicama odvijaju se multienzimske reakcije kojima je moguće proizvesti određeni proizvod. Glavni nedostatak upotrebe cjelovitih mikrobnih stanica je ograničeni transport supstrata u stanicu i transport proizvoda iz stanice, što rezultira niskim prinosima proizvoda u ovako kataliziranim bioprocima. Zbog toga se cjelovite mikrobne stanice permeabiliziraju i na taj se način može olakšati transport molekula u i iz stanice i povećati prinos proizvoda. Bakterije mliječne kiseline tradicionalno se koriste u biotehnološkoj proizvodnji i njihov GRAS (engl. Generally Recognized As Safe) status im osigurava visoku poziciju u industrijskoj proizvodnji. Gram-pozitivna heterofermentativna bakterija mliječne kiseline *Leuconostoc mesenteroides* interesantna je iz nekoliko istraživačkih aspekata, a posebice zato što posjeduje gen koji kodira saharozu fosforilazu (EC 2.4.1.7.). Ovaj citoplazmatski enzim katalizira reakciju transglukozilacije tijekom koje se odvija prijenos glukoza sa molekule donora (npr. saharoze) na akceptorsku molekulu (npr. glicerol).

Cilj ovog rada bio je istražiti rast stanica bakterije *Leuconostoc mesenteroides* pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima i snimiti krivulju rasta pri povoljnijim uvjetima uzgoja šaržnim postupkom s obzirom na koncentraciju otopljenog kisika u suspenziji. Bilo je potrebno utvrditi faze bakterijskog rasta kako bi se odredio vremenski period potreban za sintezu dovoljne koncentracije bakterijske biomase pri kojoj je maksimalna ekspresija i aktivnost saharozu fosforilaze, kako je to istaknuto u literaturi. Kako se pročišćeni oblik ovog enzima koristi u različitim industrijski primijenjenim reakcijama transglukozilacije, cilj ovog rada bio je istražiti primjenu cjelovitih bakterijskih stanica u istovrsnim konverzijama supstrata do industrijski interesantnog glukoziliranog spoja. Zbog toga su u ovom radu istražene metode permeabilizacije Gram-pozitivnih bakterijskih stanica kemijskim i fizikalnim metodama. Permeabilizacija bakterijskih stanica olakšava transport supstrata u stanicu do citoplazmatske saharozu fosforilaze kao i transport, u enzimski kataliziranoj reakciji, formiranog glukoziliranog proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIOKATALITIČKI PROCESI – ZAMJENA ZA KEMIJSKU SINTEZU SPOJEVA S DODANOM VRIJEDNOŠĆU

Biokatalitički procesi sve više zamjenjuju kemijsku sintezu u proizvodnji različitih spojeva dodane vrijednosti. Razlozi tomu su višestruki. U biokatalitičkim procesima koriste se pročišćeni enzimski preparati i/ili cjelovite (mikrobne) stanice kao biokatalizatori i, sukladno tomu, ovi procesi pripadaju tehnologijama koje su u skladu s načelima očuvanja okoliša, a primjenom biokatalitičkih procesa moguće je zadovoljiti potrebe globalnog tržišta. Iako je dugi niz godina poznato da se biokatalizatori mogu koristiti kao alternativa kemijskoj sintezi, tek se u posljednjih nekoliko desetljeća i to zbog razvoja i napretka novih tehnika i tehnologija, kojima se povećava stabilnost i aktivnost biokatalizatora, razvijaju i implementiraju bioprocеси u industrijskom mjerilu. Jedan od kriterija za primjenu takvih primjenjivih bioprocеса je visoka volumetrijska produktivnost (de Carvahlo, 2010). Uvođenje bioprocеса u industrijsku proizvodnju određena je i karakterističnim blagim uvjetima pri proizvodnji određene kemikalije, zatim olakšanom izolacijom dobivenog proizvoda kao i smanjenom proizvodnjom neželjenih drugih proizvoda, od kojih neki mogu biti i toksični (Lin i Tao, 2017).

2.1.1. Prednosti i nedostaci primjene cjelovitih mikrobnih stanica kao biokatalizatora

Primjena cjelovitih mikrobnih stanica kao biokatalizatora ima niz prednosti u odnosu na pročišćene enzimске preparate. Jedna od prednosti primjene cjelovitih mikrobnih stanica u bioprocесima je činjenica da su cjelovite stanice najjeftiniji oblik biokatalizatora. Osim uzgoja mikrobnih stanica, ovdje nisu potrebni postupci izolacije i pročišćavanja, kao što je to slučaj kod primjene pročišćenih enzima kao biokatalizatora. Nadalje, primjenom cjelovitih mikrobnih stanica kao izvora određenog enzima, koji katalizira reakciju kojom se proizvodi ciljani proizvod, postiže se znatno veća stabilnost ovih enzima u stanici nego što je to slučaj sa stabilnošću enzima u njihovom pročišćenom obliku. U ovakvim bioprocесima postiže se veća produktivnost i omogućava provođenje biokatalize u tzv. nekonvencionalnim reakcijskim smjesama, npr. u bezvodnim smjesama (Wachtmeister i Rother, 2016). Nadalje, u cjelovitim mikrobnim stanicama odvija se regeneracija kofaktora, kako je to uobičajeno tijekom staničnog metabolizma.

Regeneracija kofaktora nužan je preduvjet za aktivnost brojnih enzima, koji imaju industrijsku primjenu (Woodley, 2006). Osim navedenog, bitno je naglasiti da primjena cjelovitih mikrobnih stanica omogućava odvijanje tzv. multi-enzimskih reakcija, kojima se proizvodi željeni proizvod, a sam proizvodni proces može uključiti divlji tip određene mikrobne stanice, u kojoj su prisutni svi enzimi potrebni za dobivanje željenog proizvoda, ili mutante, u kojima su eksprimirani različiti enzimi potrebni za dobivanje ciljanog proizvoda (Wachtmeister i Rother, 2016).

Glavni problem pri korištenju cjelovitih mikrobnih stanica u biokatalizi je transport supstrata u stanicu, gdje se odvija jedna ciljana reakcija ili niz reakcija, kao i transport nastalog proizvoda iz stanice. Mikrobne stanice imaju određene sustave za transport nekih supstrata, koji se koriste u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji. Broj transportnih sustava za određene supstrate može se promijeniti i/ili povećati metodama genetičkog inženjerstva. Značajno efikasniji pristup rješavanju ovog problema smatra se permeabilizacija stanične stijenke i citoplazmatske membrane i to primjenom različitih fizikalnih i kemijskih metoda (Lin i Tao, 2017).

2.2. PERMEABILIZACIJA STANICA

Selektivna djelomična propusnost stanične stijenke i citoplazmatske membrane jedan je od glavnih problema pri korištenju cjelovitih mikrobnih stanica u biokatalitičkim procesima. U idealnom ali nerealnom slučaju, transport supstrata u stanicu i transport proizvoda iz stanice bio bi potpuno neometan. U ovom slučaju produktivnost takvog bioprocasa ovisila bi samo o metaboličkoj aktivnosti stanice. U realnim bioprocasima potrebno je provesti proces permeabilizacije stanične stijenke i/ili mebrane kako bi se narušila njihova struktura, pri čemu je moguće zadržati metaboličku aktivnost permeabilizirane mikrobne stanice. Postupkom permeabilizacije mikrobnih stanica olakšava se transport određenog supstrata u stanicu kao i transport proizvoda iz permeabilizirane stanice u izvanstanični prostor, čime se povećava produktivnost bioprocasa (Chen, 2007).

2.2.1. Metode permeabilizacije stanica

2.2.1.1. Permeabilizacija organskim otapalima

Primjena organskih otapala jedna je od najčešće korištenih metoda permeabilizacije stanica. Organska otapala utječu na strukturu lipida u membranama i tako narušavaju strukturu membrane. Glavni razlozi široke primjene organskih otapala su njihova pristupačna cijena i relativno jednostavan postupak permeabilizacije. Glavni nedostatak primjene organskih otapala u postupcima permeabilizacije stanica je njihova toksičnost prema mikrobnim stanicama. Među najučinkovitija organska otapala koja se koriste u postupcima permeabilizacije stanica pripadaju: toluen, kloroform, dietil-eter i dimetil sulfoksid. Organska otapala su djelotvorna u smislu permeabilizacije mikrobnih stanica u relativno niskim koncentracijama, ali zbog svog toksičnog učinka na mikrobnostanice negativno utječu na preživljavanje ovih stanica, posebice ukoliko nije optimirano vrijeme trajanja tretmana i koncentracija permeabilizirajućeg organskog otapala, koji se koristi u postupku (Choi i sur., 2004). Neki uspješni primjeri permeabilizacije stanica su permeabilizacija stanica bakterije *Escherichia coli* acetonom ili etanolom (Cánovas i sur., 2005). Nakon postupka permeabilizacije postignut je povećan prinos L-karnitina i to za 45% u odnosu na bioproces koji je proveden s pomoću nepermeabiliziranih stanica ove bakterije.

2.2.1.2. Permeabilizacija površinski aktivnim tvarima

Uz organska otapala, površinski aktivne tvari se također često primjenjuju u postupcima permeabilizacije stanica. Glavna prednost površinski aktivnih tvari je činjenica da su manje toksične u odnosu na organska otapala. Za optimalnu permeabilizaciju određenog tipa mikrobnostanice važno je odabrati prikladnu vrstu površinski aktivne tvari i odrediti njezinu optimalnu koncentraciju. Površinski aktivne tvari stupaju u interakcije sa proteinima unutar stanične membrane i/ili stanične stjenke i tako formiraju okruženje slično lipidnom dvosloju. Razlikuju se dvije vrste površinski aktivnih tvari - (1) kationske površinske aktivne tvari, koje stupaju u hidrofobne i elektrostatske interakcije s proteinima membrana, i (2) ne-ionske površinski aktivne tvari, koje stupaju u hidrofobne interakcije s membranskim proteinima.

Ne-ionske površinski aktivne tvari kao što su površinski aktivne tvari komercijalnih imena Triton-X, Tween-80 i Tween-20, češće se koriste u postupcima permeabilizacije stanica, jer imaju blaže djelovanje i ometaju lipid-lipid i lipid-protein interakcije u membranama. Za razliku od njih, kationske površinski aktivne tvari, kao što je npr. cetiltrimetilamonij bromid, ometaju i protein-protein interakcije (Vierira Cortez i Conceica, 2012), zbog čega imaju invazivnije djelovanje na stanice. Dobar primjer primjene površinski aktivne tvari je konverzija maleata u D-malatnu kiselinu pomoću enzima maleaze iz stanica *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (van der Werf i sur., 1995). U ovom slučaju permeabilizacija citoplazmatske membrane provedena je pomoću Tritona-X i tako je povećana aktivnost maleaze, čija se aktivnost nije mogla detektirati kod nepermeabiliziranih stanica. Proizvodnja α -arbutina (glikozilirani hidrokinon) u industrijskom mjerilu provodi se pomoću permeabiliziranih stanica *Xanthomonas* BT-112 (Wei i sur., 2016). Kod ovog bioprocesa koristi se ne-ionska površinski aktivna tvar Tween-80 za permeabilizaciju stanica. Ovim se postupkom povećava produktivnost procesa proizvodnja α -arbutina za 124,8% u odnosu na bioprocen u kojem se koriste nepermeabilizirane cjelovite stanice *Xanthomonas* sp.

2.2.1.3. Permeabilizacija ultrazvukom

Posljednjih nekoliko godina ultrazvuk ima sve širu primjenu u fundamentalnim istraživanjima staničnih struktura, ali i u različitim bioprocima kao što su bioproceni bioremedijacije, zatim u biokatalizi, ali i u postupcima ekstrakcije. Glavni razlozi šire primjene ultrazvuka u pobrojanim (bio)procesima su jednostavna izvedba sustava za emitiranje ultrazvučnih valova, jednostavno upravljanje uređajima kao i niski zahtjevi za energijom koja je potrebna za pokretanje uređaja koji proizvode ultrazvučne valove. Kako ultrazvuk uzrokuje mehaničku permeabilizaciju stanične stijenke i/ili citoplazmatske membrane, primjena ultrazvuka visokog inteziteta relativno brzo dovodi do ireverzibilnog oštećenja staničnih struktura. Zato se u bioprocima za permeabilizaciju stanica bakterija, kvasaca, funga i biljaka koristi ultrazvuk niskog inteziteta, pri čemu je ključno odrediti optimalnu frekvenciju, snagu i trajanje ultrazvučnog tretmana za svaku vrstu stanica koja se koristi u određenom bioprocenu (Yao i sur., 2014). Primjerice, izlaganje alge *Anabaena flosaquae* ultrazvuku frekvencije 20 kHz kroz 5,0 minuta svaki dan tijekom uzgoja dovodi do povećanog porasta biomase (Chisti, 2003), dok izlaganje alge *Selenastrum capricornutum* ultrazvuku iste frekvencije kroz

istovjetan vremenski period negativno utječe na rast ove alge (Francko i sur., 1990).

Osim opisanih metoda, stanice je moguće permeabilizirati i pomoću otopine NaCl, EDTA, zatim elektroporacijom, postupkom smrzavanja i sušenja, itd. Nadalje, permeabilnost stijenke i membrane se može povećati metodama genetičkog inženjerstva tako da se uvedu mutacije u gene koji kodiraju proteine koji sudjeluju u sintezi stanične stijenke ili membrane. Struktura i aktivnost ovako modificiranih proteina i enzima imaju za rezultat povećanu permeabilnost stanične stijenke i/ili citoplazmatske membrane (Zhao i sur., 2014)

2.3. BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE *Leuconostoc mesenteroides*

Leuconostoc mesenteroides je mezofilna Gram-pozitivna fakultativno anaerobna heterofermentativna bakterija mliječne kiseline (BMK) čije stanice imaju oblik koka. U industriji se sojevi *L. mesenteroides* koriste u proizvodnji dekstrana iz saharoze (Chun i sur., 2017). *Leuconostoc* vrste fermentiraju ugljikohidrate pri čemu se energija pridobiva djelomičnom oksidacijom supstrata gdje su različiti međuspojevi donori i akceptori elektrona (Hayek i Ibrahim, 2013).

Sojevi *L. mesenteroides* posjeduju gen za saharoza fosforilazu (EC 2.4.1.7.), enzim koji u prisustvu anorganskog fosfata katalizira reverzibilnu konverziju saharoze (α -D-glukopiranozil-1,2- β -D-fruktofuranozid) u α -D-glukopiranozil-fosfat (G1P) i D-fruktozu (Schwarz i sur., 2007). Budući da je *L. mesenteroides* heterofermentativna BMK, G1P se kao supstrat u staničnom metabolizmu može dalje razgraditi do nekoliko krajnjih proizvoda - mliječne kiseline, acetata ili etanola i CO₂. Ova bakterija može i D-fruktozu djelomično konvertirati u manitol i to u reakciji koju katalizira manitol dehidrogenaza (EC 1.1.1.37). Dio raspoložive D-fruktoze može se metabolizirati nakon što se koncentracija saharoze u hranjivoj podlozi smanji do određene kritične vrijednosti (Vandamme i sur., 1987).

Optimalna koncentracija saharoza fosforilaze u stanicama *L. mesenteroides* tijekom uzgoja u hranjivoj podlozi u kojoj je glavni izvor ugljika i energije saharoza, ako se uzgoj vodi bez podešavanja pH vrijednosti suspenzije i pri temperaturi od 30 °C, postiže se na polovini eksponencijalne faze rasta bakterije (Vandamme i sur., 1987). Neki sojevi vrste *Leuconostoc mesenteroides* saharozu iz hranjive podloge ne troše na sintezu dekstrana, nepoželjnog sastojka podloge, koji povećava viskoznost takve suspenzije (Vandamme i sur., 1987).

2.4. SAHAROZA FOSFORILAZA

Saharoza fosforilaza (EC 2.4.1.7.) je endogeni citosolni enzim bakterije *L. mesenteroides* koji joj omogućava metaboliziranje saharoze u reakciji opisanoj u prethodnom poglavlju. Gen(i) koji kodira(ju) saharoza fosforilazu identificiran(i) je (su) kod drugih vrsta bakterija, kao što su *Bifidobacterium adolescentis*, *Pseudomonas saccharophila* i *Streptococcus mutans*. Aktivna forma ovog enzima je funkcionalni monomer ili dimer, a za njegovu aktivnost nije potrebna prisutnost kofaktora i kosupstrata (Goedl i sur., 2010). Saharoza fosforilaza pripada obitelji glikozid hidrolaza, relativno širokoj grupi enzima, koja uključuje i amilaze i α -glukanotransferaze (Mueller i Nidetzky, 2007). Poznato je da saharoza fosforilaza katalizira tri tipa kemijskih reakcija: (1) prijenos glukozila sa anorganskog fosfata i na anorganski fosfat (fosforoliza i sinteza), dok bez prisustva anorganskog fosfata ovaj enzim općenito može katalizirati (2) reakcije hidrolize i (3) transglukozilacije. U reakcijama transglukozilacije, koje katalizira ovaj enzim, kao jedan od najboljih donora glukozila smatra se saharoza, a može se koristiti i G1P. Saharoza fosforilaza katalizira prijenos glukozila sa molekule donora (npr. saharoze) na različite molekule akceptora, kao što su glicerol, zatim fenolni spojevi, askorbinska kiselina i neki alkoholi (Luley-Goedl i sur., 2010).

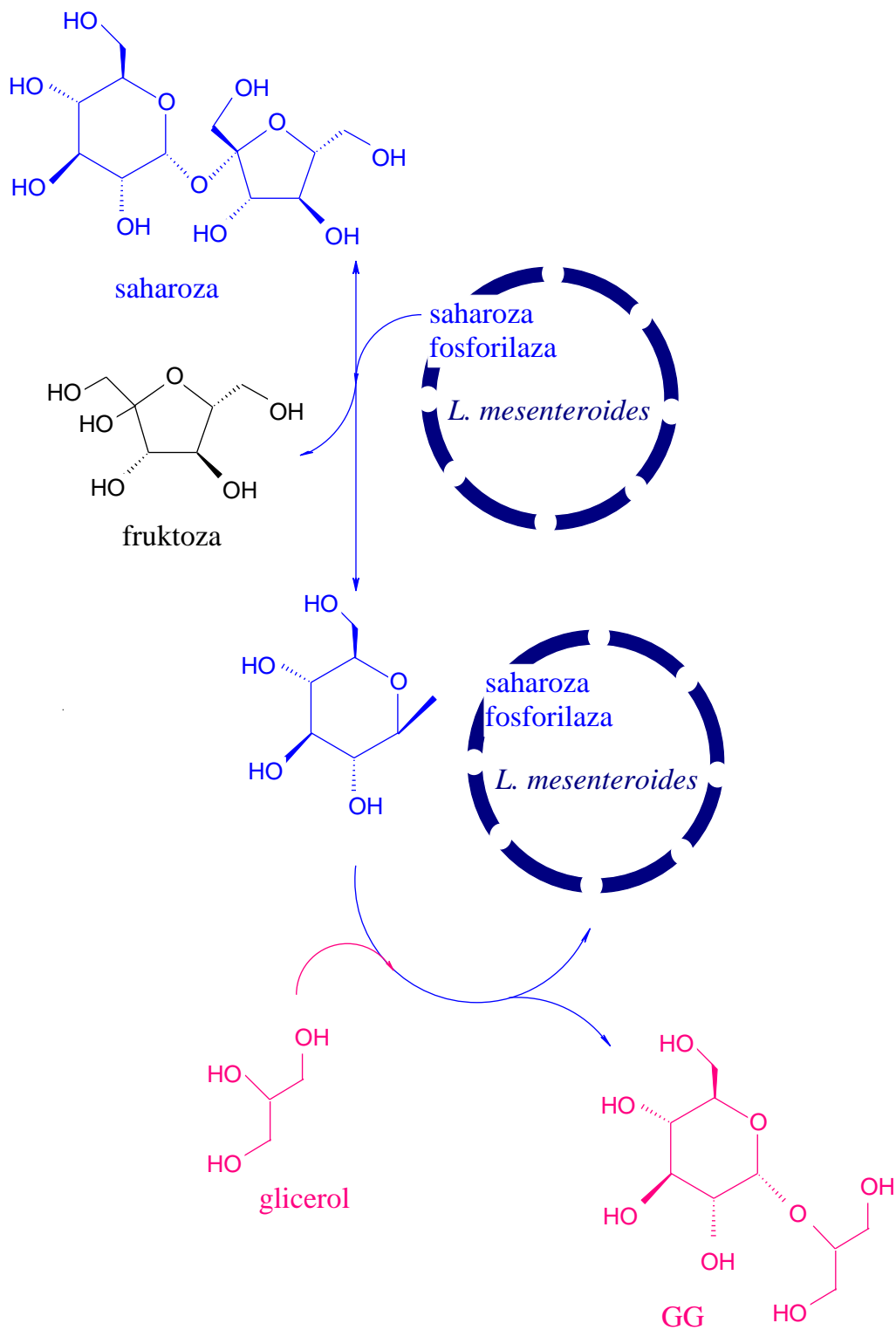
Saharoza fosforilaza je enzim čija primjena ima industrijski značaj. Naime, s pomoću ovog enzima provodi se biosinteza različitih glukoziliranih spojeva. Jedan od takvih primjera je reakcija 2-*O*- α -glukozilacije L-askorbinske kiseline u kojoj je donor glukozila saharoza. U ovoj reakciji nastaje glukozid askorbinske kiseline, izrazito stabilna forma vitamina C, koji se koristi u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Gudimichi i Nidetzky, 2017).

Osim pobrojenih akceptora glukozila, u reakciji transglukozilacije kao akceptor se može koristiti i D-glukoza. U ovoj reakciji u kojoj je donor glukozila saharoza, nastaju maltoza i kojibioza (2- α -D-glukozil-D-glukoza) i to u ekvimolarnim koncentracijama. Ukoliko se u reakciji transglukozilacije, koju regioselektivno katalizira saharoza fosforilaza, saharoza koristi kao donor glukozila, a glicerol kao akceptor glukozila, nastaje 2-*O*-(α -D-glukopiranozil)-sn-glicerol (GG) (Luley-Goedl i Nidetzky, 2010).

2.5. PROIZVODNJA 2-O-(α -D-GLUKOPIRANOZIL)-*sn*-GLICEROLA

Saharoza fosforilaza katalizira regioselektivni prijenos glukozila sa saharoze, koja je donor glukozila, na molekulu akceptora (glicerol), pri čemu nastaje 2-O-(α -D-glukopiranozil)-*sn*-glicerol (GG). Ova reakcija transglukozilacije katalizirana je u dva stupnja (Slika 1.). U prvom stupnju hidrolizom saharoze i prijenosom glukozila na enzim dolazi do formiranja intermedijera β -glukozil-enzima. U narednom (drugom) stupnju reakcije glukozil se iz intermedijera β -glukozil-enzima prenosi na 2-OH skupinu glicerola. Praćenjem kinetike reakcije i detekcijom proizvoda (GG) nuklearnom magnetnom rezonancijom (NMR) dokazano je da u ovoj reakciji, koju katalizira saharoza fosforilaza iz bakterije *Leuconostoc mesenteroides*, nastaje isključivo GG - proizvod u kojem je glukozilni dio vezan na 2-OH skupinu glicerola (Goedl i sur., 2008).

Industrijska proizvodnja GG podrazumijeva upotrebu pročišćene saharoza fosforilaze, koja se izolira iz BMK *L. mesenteroides*. Gen za saharoza fosforilazu je eksprimiran u bakteriji *Escherichia coli*. Nakon uzgoja ove bakterije potrebno je provesti izolaciju i kromatografsko pročišćavanje enzima, kako bi se dobio pročišćeni enzimski preparat, koji se primjenjuje u industrijskoj proizvodnji. Optimalni uvjeti za reakciju transglukozilacije su: 2,0 U/ml pročišćenog enzima, temperatura od 30 °C, pH vrijednost reakcijske smjese od 7,0 jedinica, koncentracija saharoze u reakcijskoj smjesi od 0,8 mol L⁻¹ i koncentracija glicerola od 2,0 mol L⁻¹. Iskorištenje u ovako provedenom bioprocesu je oko 85 %. Postupak izdvajanja GG-a iz reakcijske smjese olakšan je ukoliko se koncentracija glicerola smanji do 1,0 mol L⁻¹, zbog čega se iskorištenje bioprocesa smanjuje do 72 % (Luley-Goedl i sur., 2010).



Slika 1. Shematski prikaz reakcije transglukozilacije, koju katalizira saharoza fosforilaza u dva stupnja, pri čemu saharoza služi kao donor glukozila, a glicerol kao akceptor glukozila.

GG pripada skupini prirodnih osmolita koji su izolirani iz biljaka, cijanobakterija i bakterija. Do povećane sinteze GG i drugih osmolita dolazi pri nepovoljnim okolišnim uvjetima kao što su visoka temperatura i osmotski šok. Iako točan mehanizam njihovog djelovanja nije potpuno razjašnjen, GG povećava stabilnost proteina i staničnih membrana (Hincha i Hagemann, 2004).

Komercijalna važnost GG-a uključuje njegovu primjenu u kozmetičkoj industriji, gdje se koristi kao hidratizirajuće sredstvo za njegu kože (Breitenbach i sur, 2006). Nadalje, GG se može koristiti kao stabilizator proteina, koji se koriste u industrijskoj proizvodnji različitih spojeva dodane vrijednosti. U malim koncentracijama (npr. 0,5 mol L⁻¹), GG povećava stabilnost različitih enzima, primjerice laktat dehidrogenaze, naročito tijekom njihova izlaganja povišenim temperaturama (40°C) (Sawangwan i sur., 2010). U prehrambenoj industriji GG se može koristiti kao zaslađivač umjesto saharoze, jer ima veću relativnu slatkoću od saharoze, a djeluje antikariogeno (Takenaka i Uchiyama, 2000).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizam

U ovom radu korištena je heterofermentativna Gram-pozitivna bakterija mliječne kiseline *Leuconostoc mesenteroides* iz Zbirke 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. Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterijske kulture

Čista kultura bakterijskog soja *Leuconostoc mesenteroides* čuvana je u hranjivoj De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) podlozi (De Man i sur., 1960). Za uzgoj bakterije u laboratorijskom mjerilu u Erlenmeyer tikvicama korištena je kemijski djelomično definirana hranjiva podloga (Tablica 1.) u kojoj je saharoza glavni izvor ugljika i energije za rast bakterije (Vandamme i sur., 1987).

3.1.3. Kemikalije

Tablica 1. Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu djelomično kemijski definirane hranjive podloge za uzgoj bakterije *Leuconostoc mesenteroides* u laboratorijskom mjerilu.

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

Tablica 1. Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu djelomično kemijski definirane hranjive podloge za uzgoj bakterije *Leuconostoc mesenteroides* u laboratorijskom mjerilu (nastavak).

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
manganov sulfat monohidrat	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	p.a.	Merck, Njemačka
željezov sulfat heptahidrat	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	p.a.	Kemika, Hrvatska
tiamin-HCl	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS}$	p.a.	Merck, Njemačka
natrij-L-askorbat	$\text{C}_6\text{H}_2\text{NaO}_6$	p.a.	Merck, Njemačka

Tablica 2. Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu reakcijske smjese za glukozilaciju glicerola, koja je katalizirana permeabiliziranim cjelovitim stanicama *Leuconostoc mesenteroides*.

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
saharoza	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	p.a.	Gram-mol, Hrvatska
glicerol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Kemika, Hrvatska

Tablica 3. Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu uzoraka za analizu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) i provođenje analize uzoraka HPLC metodom.

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
činkov sulfat pentahidrat	$\text{ZnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	p.a.	Merck, Njemačka
fosforna kiselina	H_3PO_4	p.a. za HPLC	Fluka, Njemačka

Tablica 4. Čistoća i porijeklo ostalih kemikalija, koje su korištene u ovom radu.

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
polisorbat (Tween-80)	$C_{64}H_{124}O_{26}$	p.a.	Merck, Njemačka

3.1.4. Uređaji

3.1.4.1. Spektrofotometar

U ovom je radu spektrofotometrijskom metodom praćen rast bakterijske biomase i to određivanjem optičke gustoće suspenzije (OD) pri valnoj duljini svjetlosti (λ) od 608 nm (A_{608}). Kod ove metode korišten je spektrofotometar Helios Epsilon (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) (Slika 2.).



Slika 2. Spektrofotometar (Helios Epsilon, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

3.1.4.2. Centrifuge

Za centrifugiranje uzoraka, koji su izuzeti tijekom rasta bakterijske biomase i tijekom trajanja reakcije transglukozilacije, korištena je centrifuga Centric 150 (Tehtnica, Železniki,

Slovenija). Uzorci koji su pripremani za analizu HPLC metodom centrifugirani su u centrifugi HC-240 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

3.1.4.3. Ultrazvučna kupelj za permeabilizaciju stanica L.mesenteroides

Ultrazvučna kupelj Elmasonic P 300 H (Elma, Singen, Njemačka) (Slika 3.) korištena je pri permeabilizaciji stanica ultrazvukom.



Slika 3. Ultrazvučna kupelj Elmasonic P 300 H (Elma, Singen, Njemačka).

3.1.4.4. Uređaj za filtraciju mobilne faze za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti i ultrazvučna kupelj

Za uspješno provođenje analize uzoraka HPLC metodom, mobilnu fazu je bilo potrebno profiltrirati i degazirati pomoću ultrazvučne kupelji. Kao mobilna faza za analizu uzoraka korištena je otopina H_3PO_4 (0,1 % vol/vol), koja je profiltrirana kroz najlonski filter (0,22 μm , 47 mm; Magna, GE Water & Process Technologies, Trevose, SAD) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, New York, SAD), a potom je profiltrirana mobilna faza degazirana u ultrazvučnoj kupelji USC300T (VWR International, Leuven, Belgija) kroz 20 minuta.

3.1.4.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

HPLC metodom praćen je utrošak dvaju supstrata u reakciji transglukozilacije (saharoze i glicerola), identificiran je dodatni pik, koji bi mogao biti proizvod reakcije

transglukozilacije - α -glukozilglicerol (GG) i određene su koncentracije krajnjeg proizvoda metabolizma saharoze ove bakterije mliječne kiseline - mliječne kiseline. HPLC sustav, koji je prikazan na Slici 4., detaljno je opisan u diplomskom radu Kostelac (2016).



Slika 4. Kromatograf Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} (Shimadzu; Kyoto, Japan). 1- boca za mobilnu fazu; 2 - otplinjač; 3 - podjedinica za formiranje gradijenta; 4 - pumpa; 5 auto-injektor; 6 - pećnica s predkolonom i kolonom; 7- detektor.

3.1.4.6. Ostala oprema

- analitička vaga Shimadzu (Shimatzu, Kyoto, Japan);
- autoklav Sutjeska;
- termostat (ST-05, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska);
- magnetska miješalica (Cimarec i Poly, Multipoint Stirrer, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD);
- mikser EV-100, Tehnica (Železniki d.o.o., Železniki, Slovenija);
- svjetlosni mikroskop Olympus CH20 (Olympus, Tokyo, Japan);
- osobno računalo s operativnim sustavom MS Windows 10 Home i programskim paketom MS Office 2016.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprava hranjivih podloga

Za uzgoj bakterije *Leuconostoc mesenteroides* u staklenim epruvetama ($V_K = 10$ mL) korištena je MRS podloga (priprava cjepiva), dok je za uzgoj bakterijskih stanica u Erlenmeyer tikvicama ($V_K = 50$ mL) korištena hranjiva podloga u kojoj je saharoza glavni izvor ugljika i energije (Vandamme i sur., 1987). Ova hranjiva podloga za uzgoj bakterijskih stanica u Erlenmeyer tikvicama pripremljena je tako da su svi sastojci navedeni u Tablici 5. A, odvagani, otopljeni u 50 mL demineralizirane vode i sterilizirani u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 minuta. U sterilnu otopinu nakon hlađenja do sobne temperature dodano je 0,5 mL prethodno profiltrirane otopine (filteri sa porama 0,20 μm ; LLG-Syringe filters, nylon, 0,2 μm , Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), koja je sadržavala sastojke u koncentracijama prikazanim u Tablici 5. B.

Tablica 5. Sastav kemijski djelomično definirane hranjive podloge (A) i filtracijom sterilizirane otopine (B) (Vandamme i sur., 1987).

A)

sastojak podloge	kemijska formula	γ (g/L)
saharoza	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	100
kvašćev ekstrakt	-	10
kalijev dihidrogen karbonat	KH_2PO_4	10

B)

sastojak podloge	kemijska formula	γ (g/L)
magnezijev sulfat heptahidrat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4
manganov sulfat monohidrat	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2
željezov sulfat heptahidrat	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
tiamin-HCl	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS}$	0,01
natrij-L-askorbat	$\text{C}_6\text{H}_2\text{NaO}_6$	0,05

3.2.2. Priprava cjepiva za uzgoj bakterije u laboratorijskom mjerilu

Čistom kulturom bakterije *Leuconostoc mesenteroides*, koja je porasla u tekućoj hranjivoj MRS podlozi preko noći pri 28°C, nacijepljena je hranjiva podloga (50 mL) za uzgoj bakterijske biomase u Erlenmeyer tikvici tako da je konačni volumni udio cjepiva u suspenziji bio 5,0 %.

3.2.3. Određivanje krivulje rasta bakterije *Leuconostoc mesenteroides* pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima

Uzgoj bakterije *Leuconostoc mesenteroides* proveden je u 50 mL kemijski djelomično definirane hranjive podloge (Vandamme i sur., 1987.). Uzgoj je proveden u Erlenmeyer tikvicama pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima (miješanje s pomoću magnetića i magnetske miješalice, 250 rpm; Cimarec i Poly, Multipoint Stirrer, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Oprema za ove eksperimente smještena je u termostat (ST-05, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska) pri temperaturi od $29,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$. Rast bakterije praćen je određivanjem optičke gustoće (A_{608}) aseptično izuzetih uzoraka suspenzije, a praćenje rasta bakterije je prekinuto kada je na temelju A_{608} vrijednosti utvrđeno da je rast bakterije u stacionarnoj fazi rasta. Promjena pH vrijednosti suspenzije tijekom ovih uzgoja procijenjena je na temelju promjene boje pH papirića (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). Iz dobivenih krivulja rasta procijenjena je specifična brzina rasta ove bakterije kao i vremenski period kroz koji bakterija doseže polovinu eksponencijalne faze rasta. U svim narednim eksperimentima bakterijska biomasa uzgajana je do polovine eksponencijalne faze rasta, nakon čega je uslijedio postupak permeabilizacije bakterijskih stanica.

3.2.4. Uzgoj bakterijske biomase i priprema reakcijske smjese za transglukozilaciju

Bakterijska biomasa uzgajana je pri aerobnim uvjetima, kako je to opisano kod određivanja krivulje rasta bakterije (poglavlje 3.2.3.). Nakon što je bakterija dosegla polovinu eksponencijalne faze rasta ($t = 5,0$ h), izuzet je alikvot bakterijske suspenzije u aseptičnim uvjetima i prebačen u sterilnu Erlenmeyer tikvicu ili sterilnu laboratorijsku čašu od 100 mL.

Bakterijskoj suspenziji dodani su određeni volumeni vodene otopine saharoze i glicerola kako bi se postigla njihova konačna koncentracija od, redom, $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ i $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, a konačni volumen reakcijske smjese $50,0 \text{ mL}$. Ovako priređenoj reakcijskoj smjesi dodano je $0,5 \text{ mL}$ filtracijom sterilizirane otopine vitamina i soli (Tablica 4.B), a pH vrijednost smjese je podešen pomoću otopine $1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ do pH 5,0.

3.2.5. Permeabilizacija stanica bakterije *L. mesenteroides*

Permeabilizacija bakterijskih stanica u priređenoj reakcijskoj smjesi (poglavlje 3.2.4.) je provedena dvjema metodama - kemijskom i fizikalnom metodom. U cilju permeabilizacije stanica kemijskom metodom korištena je ne-ionska površinski aktivna tvar Tween-80 (Merck, Darmstadt, Njemačka), dok je za permeabilizaciju stanica fizikalnom metodom korišten ultrazvuk (ultrazvučna kupelj; Elmasonic P 300 H, Elma, Singen, Njemačka). Tween-80 je dodan u $50,0 \text{ mL}$ reakcijske smjese za transglukozilaciju u koncentracijama od $0,4 \%$ (v/v) i $0,6\%$ (v/v). Parametri za permeabilizaciju ultrazvukom su: frekvencija 37 kHz , snaga 90 W i temperatura $29,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$. Dva su različita tretmana ultrazvukom korištena za permeabilizaciju bakterijskih stanica - jedan tretman pri navedenim uvjetima je trajao kontinuirano kroz $4,0 \text{ h}$, dok je drugi tretman uključivao primjenu ultrazvuka kroz dva ciklusa od 30 minuta sa 30 minuta pauze između ciklusa. Tijekom trajanja reakcije transglukozilacije izuzimani su uzorci suspenzije u pravilnim vremenskim intervalima, raspodijeljeni i korišteni za određivanje optičke gustoće (A_{608}) i pH vrijednosti kao i za pripremu uzorka za analizu HPLC metodom.

3.2.6. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

3.2.6.1. Priprava uzoraka za analizu HPLC metodom

Bakterijska biomasa iz $1,0 \text{ mL}$ izuzete suspenzije je izdvojena centrifugiranjem (Centric 150, Tehtnica, Železniki, Slovenija) kroz $5,0 \text{ minuta}$ pri 13000 g i na ovaj je način izdvojeno više od $600 \mu\text{L}$ bistrog supernatanta. Kako bi se iz izdvojenog supernatanta istaložili proteini, korištena je otopina cinkova sulfata heptahidrata (500 g/L). Metoda taloženja proteina je

detaljno opisana u diplomskom radu Kostelac (2016). Prije same analize priređenog uzorka bez proteina HPLC metodom, uzorci su profiltrirani kroz filter s porama od 0,20 μm (LLG-Syringe filters, nylon, 0,2 μm , Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD).

3.2.6.2. Ion-izmjenjivačka tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Ion-izmjenjivačka kromatografija je jedna od najdjelotvornijih metoda za separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju nabijenih čestica (aniona, kationa). Ovisno o molekulama koje čine stacionarnu fazu kolone koja se koristi pri analizi, razlikuju se kation-izmjenjivačka i anion-izmjenjivačka kromatografija (Hegy i sur., 2013).

U ovom radu, korištena je ion-izmjenjivačka kromatografija za određivanje koncentracije saharoze i glicerola u supernatantima izuzetih uzoraka kao i za određivanje koncentracije krajnjeg produkta metabolizma saharoze - mliječne kiseline. Ovom metodom moguće je predvidjeti i formiranje proizvoda transglukozilacije - α -glukozilglicerola (GG) i to pojavljivanjem dodatnog pika u kromatogramu, koji se eluira pri retencijskom vremenu koje ne odgovara nijednom drugom sastojku reakcijske smjese. Standard za ovaj spoj nije dostupan i identitet proizvoda, koji se formira u reakciji transglukozilacije, može se nakon izolacije utvrditi drugim analitičkim metodama. Ovaj postupak nije dio ovog diplomskog rada.

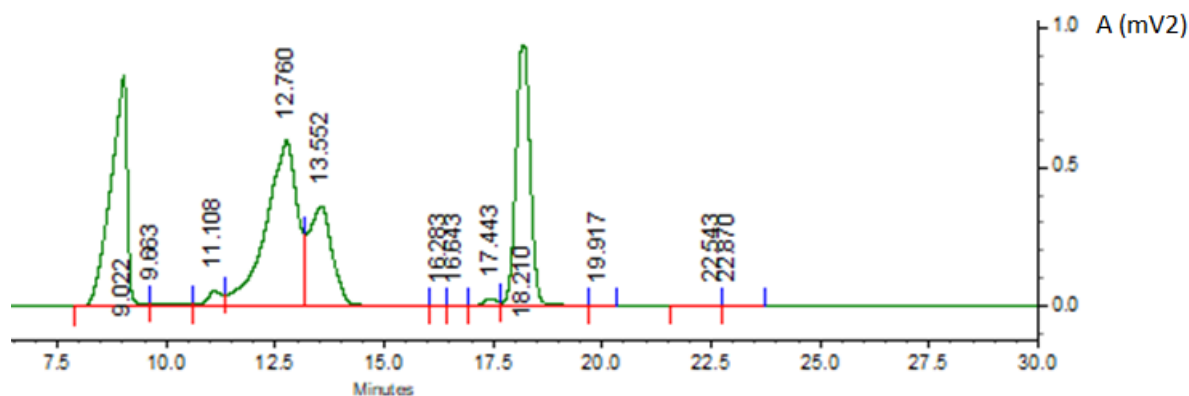
3.2.7. Analitičke metode

3.2.7.1. Praćenje rasta bakterije *L. mesenteroides* određivanjem optičke gustoće

Tijekom uzgoja bakterije *Leuconostoc mesenteroides* u Erlenmeyer tikvicama, izuzimani su uzorci volumena 1,0 mL svakih sat vremena i određena je optička gustoća (A_{608}) spektrofotometrijskom metodom (spektrofotometar Helios Epsilon, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Opadanje pH vrijednosti zbog porasta *L. mesenteroides* i proizvodnje mliječne kiseline procijenjeno iz promjene boje pH papirića. Porast permeabiliziranih bakterijskih stanica i, posredno, njihova aktivnost tijekom reakcije transglukozilacije praćena je na isti način.

3.2.7.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

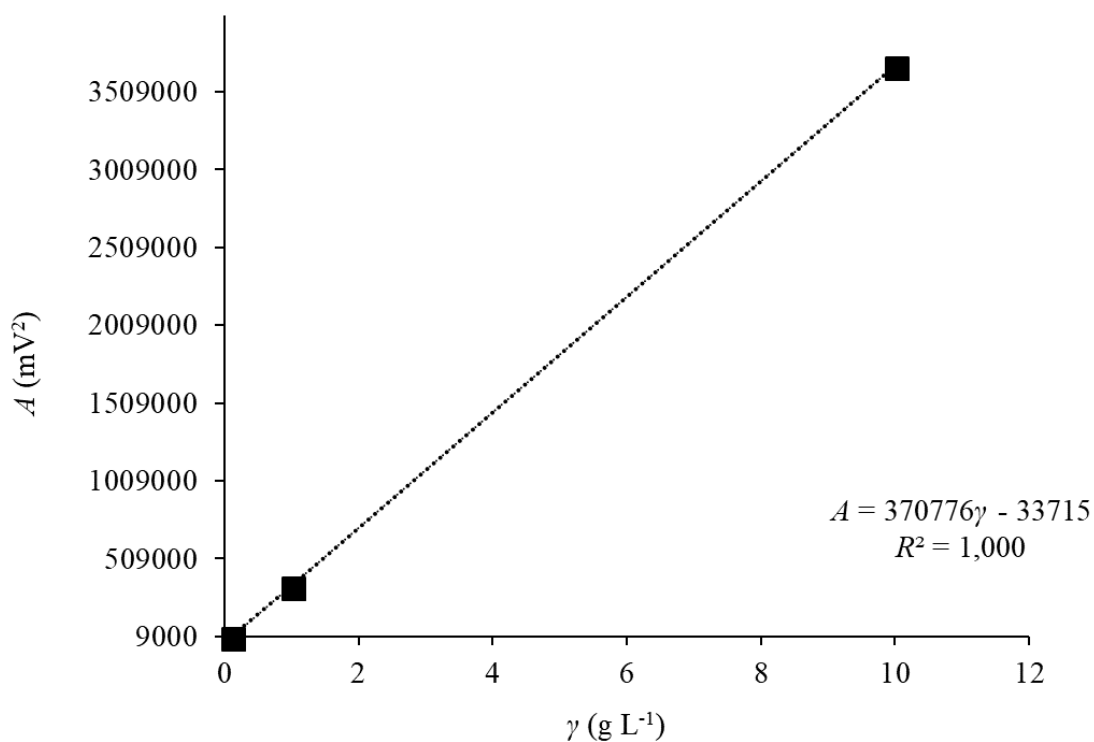
Za određivanje koncentracije saharoze, glicerola, mliječne kiseline i procjenu formiranja proizvoda transglukozilacije (GG) tijekom procesa provedenog u laboratorijskom mjerilu (Slika 5.) korišten je kromatografski sustav Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} (Shimadzu; Kyoto, Japan), koji se sastoji od: crpke (LC-10A_{VP}), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10A_{VP}), uređaja za grijanje kolone (CTO-10A_{VP}), analitičke kolone (Supelcogel™ C-610H, 30 cm x 7,8 mm i.d., 9 μm; Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, SAD) sa predkolumnom (Supercogel™ H; 5 cm x 4.6 mm ID, 9 μm; Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, SAD), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10A_{VP}) i računalnog programa (CLASS-VP v6.10). Pri analizi uzoraka korištena je kromatografska metoda sa sljedećim parametrima: temperatura 55,0 °C; trajanje metode 30,0 minuta, protok mobilne faze 0,5 mL min⁻¹. Računalni program CLASS-VP verzija 6.10 korišten je za procjenu dobivenih rezultata nakon kromatografske analize uz pomoć jednadžbi baždarnih dijagrama pripremljenih neposredno prije analize uzoraka.



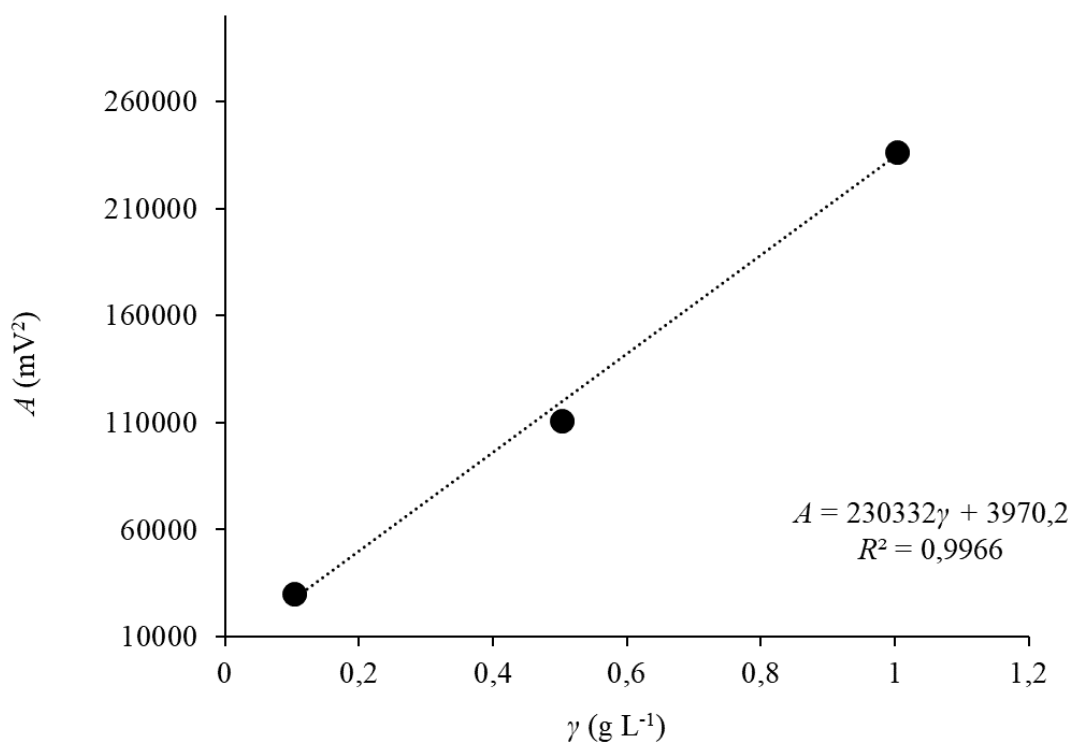
Slika 5. Kromatogram uzorka koji je izuzet iz reakcijske smjese za transglukozilaciju i to nakon 1,0 h kontinuiranog tretmana ultrazvukom i koji je analiziran HPLC metodom. U ovoj analizi HPLC metodom identificirani su i kvantificirani: cinkov sulfat pentahidrat ($t_R = 9,022$ min), saharoza ($t_R = 11,108$ min), glukoza ($t_R = 12,780$ min), fruktoza ($t_R = 13,552$ min), mliječna kiselina ($t_R = 17,443$ min) i glicerol ($t_R = 18,210$ min). Octena kiselina i etanol nisu identificiran kao sastojci niti jednog analiziranog uzorka.

3.2.7.2.1. Priprava baždarnih dijagrama

Priređeni su baždarni dijagrami za sve sastojke hranjivih podloga, koje su korištene u ovom radu, kao i za sastojke reakcijske smjese, koja je priređena za provođenje reakcije transglukozilacije. U ovom radu prikazani su baždarni dijagrami za saharozu i glicerol (Slike 6. i 7.), dok su jednadžbe najvažnijih pravaca za određivanje koncentracije ostalih sastojaka podloge prikazani u Tablici 6. Analizom uzorka sa otopinom kalijeva hidrogen karbonata nije dobiven signal na kromatogramu.



Slika 6. Baždarni dijagram ovisnosti površine pika (A) saharoze ($t_R = 11,100 \pm 0,5$ min) o njezinoj koncentraciji u otopini (γ).



Slika 7. Baždarni dijagram ovisnosti površine pika (A) glicerola ($t_R = 18,127 \text{ min}$) o njegovoj koncentraciji u otopini (γ).

Tablica 6. Jednadžbe baždarnih pravaca dobivenih HPLC analizom ostalih sastojaka podloga korištenih za uzgoj bakterijske biomase i reakciju transglukozilacije i njihova pripadajuća retencijska vremena.

Sastojak podloge	Jednadžba baždarnog pravca	Retencijsko vrijeme (t_R) (min)
kvašćev ekstrakt	$A = 58646\gamma + 2,0 \cdot 10^6$ $R^2 = 0,9023$	$17,079 \pm 0,089$
magnezijev sulfat heptahidrat	$A = 1,0 \cdot 10^8 \gamma - 229886$ $R^2 = 1,000$	$8,463 \pm 0,113$
manganov sulfat monohidrat	$A = 1,0 \cdot 10^8 \gamma - 125736$ $R^2 = 1,000$	$8,419 \pm 0,096$
željezov sulfat heptahidrat	$A = 2,0 \cdot 10^6 \gamma + 57,556$ $R^2 = 1,000$	8,285
tiamin-HCl	$A = 1,0 \cdot 10^9 \gamma - 529578$ $R^2 = 0,9983$	$8,605 \pm 0,113$
natrij-L-askorbat	$A = 2,0 \cdot 10^7 \gamma - 46251$ $R^2 = 1,000$	10,320

3.2.8. Analiza eksperimentalnih podataka – izračunavanje specifične brzine rasta bakterije *L. mesenteroides*

Pomoću dobivenih vrijednosti pri spektrofotometrijskom određivanju optičke gustoće (A_{608}) mikrobne suspenzije, napravljena je linearizacija eksperimentalnih podataka kako bi se odredila specifična brzina rasta (μ) bakterije *L. mesenteroides* prilikom uzgoja u mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima, (Poglavlje 4.1., Tablica 7.). Također, specifična brzina rasta ove bakterije je izračunata prilikom svakog eksperimenta prije i tijekom permeabilizacije stanica kao i za kontrolne uzorke (Tablica 8.)

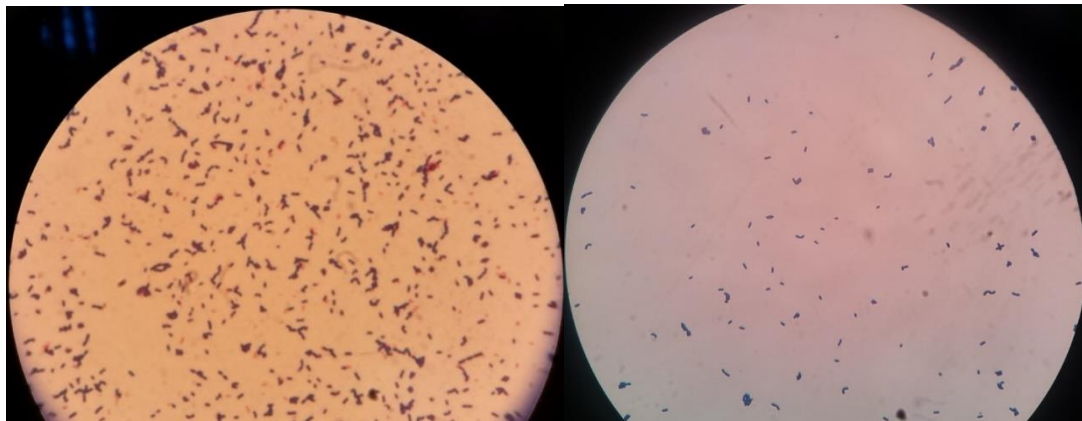
Grafičkim prikazom ovisnosti $\ln A_{608}$ o vremenu bioprocasa (t) dobivene su jednaždbe pravca, a specifična brzina μ odgovara nagibu dobivenih pravaca. Grafički prikazi su u poglavlju 7. Prilozi.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Glavni ciljevi ovog rada su bili: (1) istražiti rast stanica bakterije *Leuconostoc mesenteroides* pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima, (2) provesti permeabilizaciju stanica uzgojenih pri optimalnim uvjetima rasta i (3) provjeriti primjenu permeabiliziranih stanica u proizvodnji GG. Kako bi se navedeni ciljevi ispunili, prvo je ispitan utjecaj otopljenog kisika na rast biomase tako da su provedeni uzgoji *L. mesenteroides* u mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima. Rast biomase je praćen spektrofotometrijski, mjerenjem optičke gustoće (A_{608}) suspenzije, a praćena je i promjena pH vrijednosti. Budući da je rast biomase bio značajno bolji u aerobnim uvjetima, stanice su u ostalim eksperimentima uzgajane aerobno. Iz dobivene krivulje rasta pri aerobnim uvjetima uzgoja, određena je polovina eksponencijalne faze rasta ($t = 5,0$ h). U tom trenutku, u suspenziji je pristupa dovoljna koncentracija stanica za permeabilizaciju, a i ekspresija i aktivnost enzima saharoze fosforilaze je u tom trenutku optimalna (Vandamme i sur., 1987). U sljedećim eksperimentima, stanice su uzgajane do polovine eksponencijalne faze rasta, nakon čega je alikvot mikrobne suspenzije izuzet i prebačen u reakcijsku smjesu koja je sadržavala $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ saharoze i $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ glicerola. Vrijednost pH je sa početne vrijednosti 3,0 podešena pomoću $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH na vrijednost 5,0. Stanice su zatim permeabilizirane primjenom ultrazvuka kontinuirano i ciklički. Osim ultrazvuka, kao kemijsko permeabilizirajuće sredstvo korišten je Tween-80 (0,4 %, 0,6 %). Detaljan postupak permeabilizacije stanica opisan je u Poglavlju 3.2.5.. Tijekom cijelog procesa je praćen rast biomase spektrofotometrijski (A_{608}), kao i promjena pH. Osim toga, tijekom trajanja reakcije transglukozilacije, u pravilnim vremenskim intervalima izuzimani su uzorci za HPLC analizu kojom je praćen utrošak saharoze i glicerola koji su supstrati za reakciju transglukozilacije, koncentracija proizvedene mliječne kiseline kao krajnjeg produkta metabolizma saharoze i konačno, koncentracija produkta reakcije transglukozilacije - GG. Na isti su način analizirani i kontrolni uzorci u kojima stanice nisu tretirane permeabilizirajućim sredstvom. Dobiveni rezultati su prikazani u nastavku ovog poglavlja.

4.1. KRIVULJA RASTA BAKTERIJE *Leuconostoc mesenteroides* PRI MIKROAEROFILNIM I AEROBNIM UVJETIMA

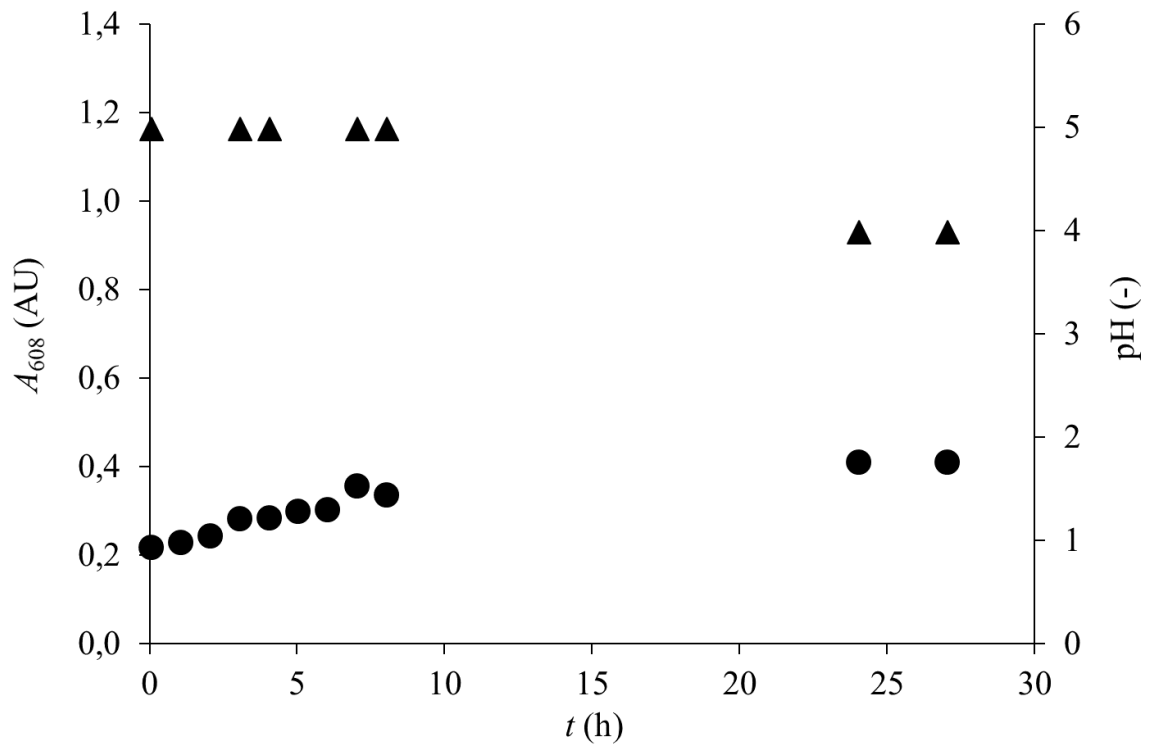
U ovom radu ponajprije je istražen utjecaj koncentracije otopljenog kisika na rast bakterije *Leuconostoc mesenteroides* (Slika 8.). Provedeni su uzgoji ove bakterije u kemijski djelomično definiranoj podlozi (Vandamme i sur., 1987) u Erlenmeyer tikvicama pri mikroaerofilnim uvjetima (statično, bez miješanja) i pri aerobnim uvjetima (miješanje suspenzije pomoću magnetića na magnetskoj mješalici). Na Slici 9. prikazane su promjene optičke gustoće (A_{608}) i pH vrijednosti suspenzije tijekom uzgoja bakterije pri mikroaerofilnim uvjetima, dok su na Slici 10. prikazane iste veličine, koje su dobivene tijekom uzgoja *L. mesenteroides* pri aerobnim uvjetima. Detalji uvjeta ovih uzgoja opisani su u Poglavlju 3.2.3.



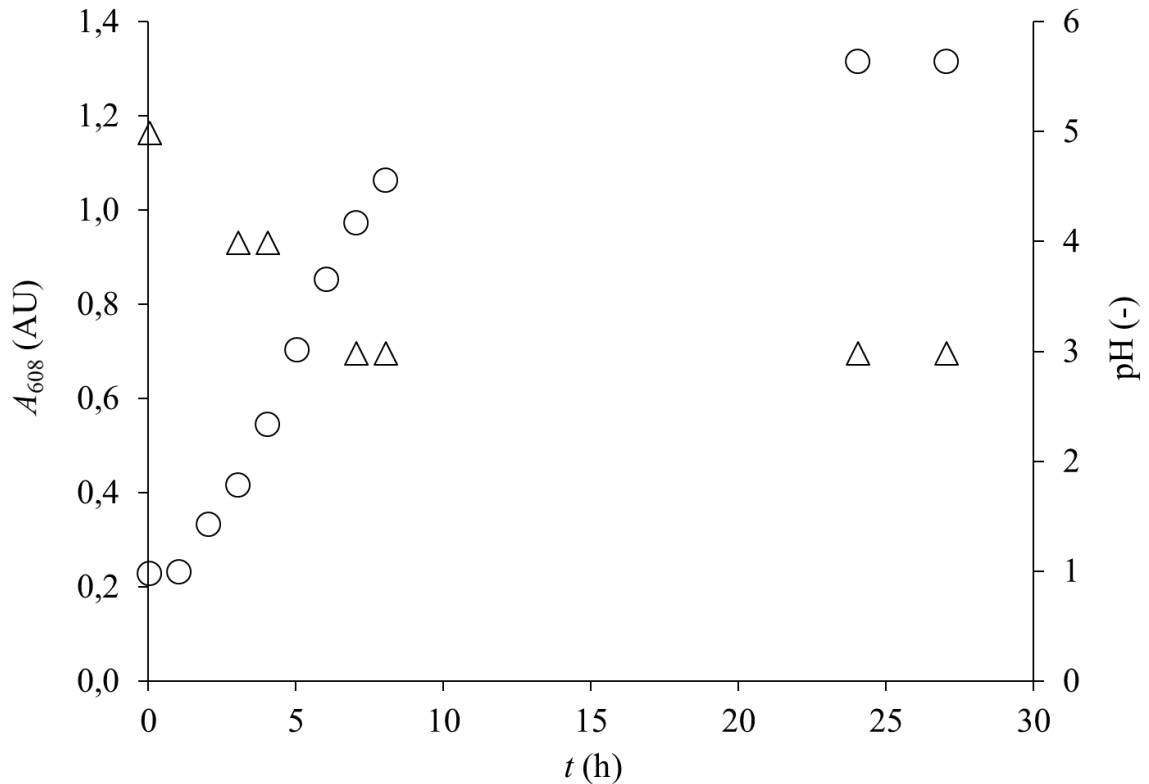
(A)

(B)

Slika 8. Mikroskopska slika bakterije *L. mesenteroides* prije permeabilizacije (A) i nakon permeabilizacije stanica ultrazvukom kontinuirano kroz $t = 4,0$ h (B). Bakterijske stanice su obojane po Gramu, priređeni je preparat promatran pod imerzijskim objektivom svjetlosnog mikroskopa Olympus CH20 (Olympus; Tokyo, Japan) pri povećanju od tisuću puta.



Slika 9. Promjena optičke gustoće (A_{608}) (●) i pH vrijednosti (▲) suspenzije tijekom uzgoja bakterije *L. mesenteroides* pri mikroaerofilnim uvjetima u laboratorijskom mjerilu.



Slika 10. Promjena optičke gustoće (A_{608}) (○) i pH vrijednosti (Δ) suspenzije tijekom uzgoja bakterije *L. mesenteroides* pri aerobnim uvjetima u laboratorijskom mjerilu.

Tablica 7. Specifične brzine rasta *L. mesenteroides* pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima uzgoja.

	mikroaerofilni uzgoj	aerobni uzgoj
Specifična brzina rasta (μ) [h^{-1}]	0,02	0,24

Iz dobivenih rezultata A_{608} jasno se vidi da je rast bakterije *Leuconostoc mesenteroides* znatno bolji pri aerobnim uvjetima ($\mu = 0,24 \text{ h}^{-1}$) nego pri mikroaerofilnim uvjetima ($\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$). Pri aerobnim uvjetima dolazi do značajnijeg opadanja pH vrijednosti suspenzije (Slike 9. i 10.). Dakle, na rast i metaboličku aktivnost bakterije *L. mesenteroides* pozitivno utječe povećana koncentracija otopljenog kisika. Zbog toga su svi naredni eksperimenti provedeni pri aerobnim

uvjetima. Osim toga, iz dobivene krivulje rasta bakterije pri aerobnim uvjetima (Slika 10.) procijenjeno je trajanje eksponencijalne faze rasta ($t = 10,0$ h) i utvrđen je vremenski period potreban da *L. mesenteroides* dosegne polovinu eksponencijalne faze rasta ($t = 5,0$ h). Stoga je ovaj vremenski period ($t = 5,0$ h) odabran kao povoljan za postizanje dovoljne koncentracije aktivnih bakterijskih stanica, koje će nakon permeabilizacije moći katalizirati transglukozilaciju. Zbog toga su svi postupci permeabilizacije stanica provedeni nakon 5,0 h uzgoja bakterije *L. mesenteroides* u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi (Vandamme i sur., 1987). Sukladno podacima iz literature, pri sredini eksponencijalne faze rasta ove bakterije optimalna je ekspresija i aktivnost saharoza fosforilaze, citoplazmatskog enzima koji katalizira reakciju transglukozilacije (Vandamme i sur., 1987).

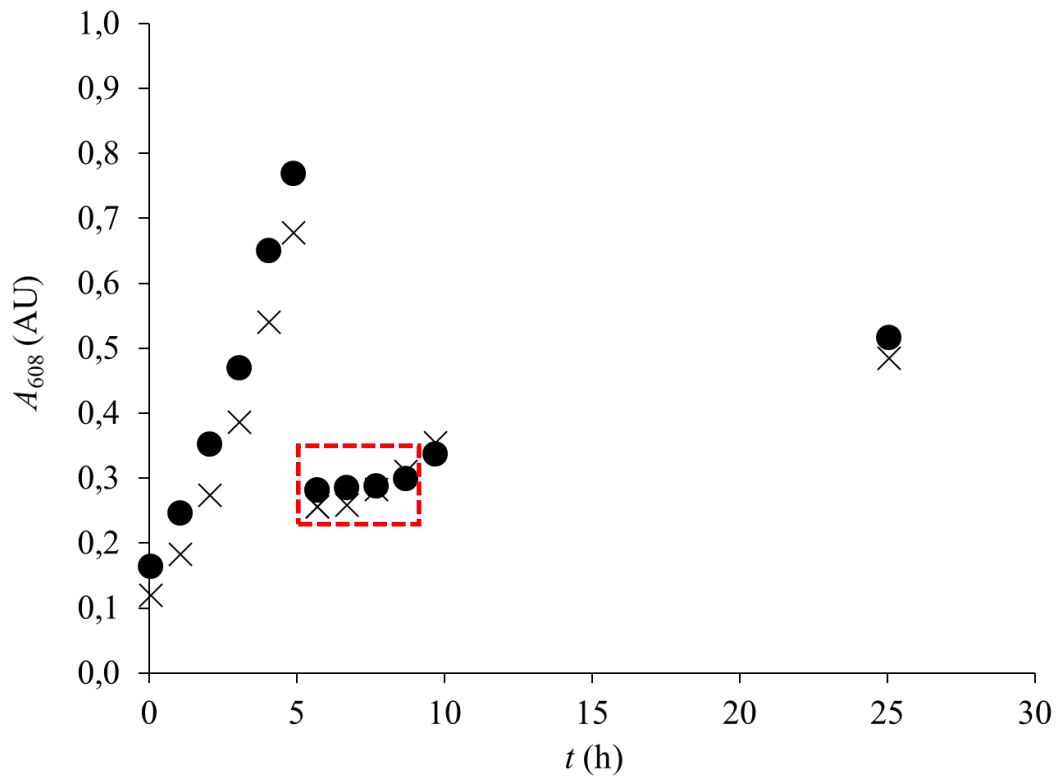
4.2. UZGOJ BAKTERIJSKE BIOMASE I PERMEABILIZACIJA STANICA *L. mesenteroides* U CILJU PROVOĐENJA TRANSGLUKOZILACIJE

Nakon rasta bakterije *L. mesenteroides* u kemijski definiranoj hranjivoj podlozi (Vandamme i sur., 1987) pri aerobnim uvjetima u laboratorijskom mjerilu kroz $t = 5,0$ h, provedena je permeabilizacija ovih bakterijskih stanica fizikalnom i kemijskom metodom. U poglavlju 4.2.1. prikazani su rezultati transglukozilacije s pomoću stanica permeabiliziranih ultrazvukom, dok su u poglavlju 4.2.2. prikazani rezultati transglukozilacije s pomoću stanica permeabiliziranih primjenom Tween-80.

4.2.1. Uzgoj bakterijske biomase i permeabilizacija stanica *L. mesenteroides* fizikalnom metodom

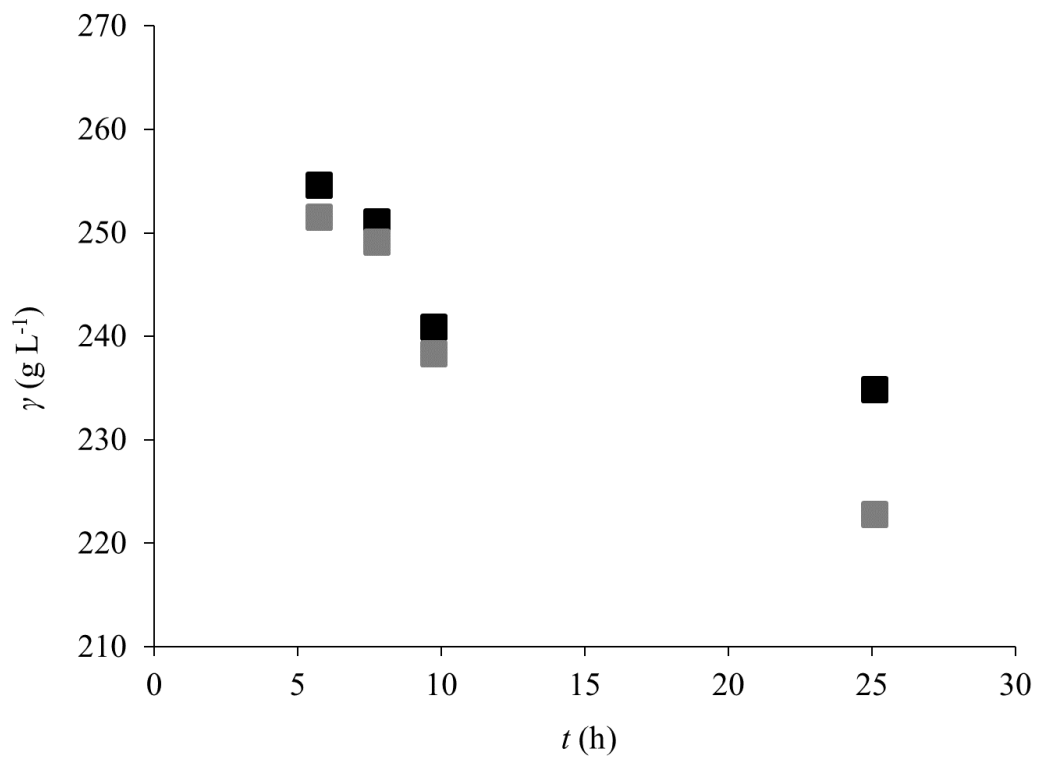
Permeabilizacija bakterijskih stanica provedena je fizikalnom metodom i to primjenom ultrazvuka (frekvencija 37 kHz, snaga 90 W i temperatura $29,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$), kako je to već opisano u poglavlju 3.2.5. Istražen je učinak dvaju različitih tretmana ultrazvukom - jednog kontinuiranog ($t = 4,0$ h) i drugog u ciklusima (dva ponavljanja od 30 minuta sa 30 minuta pauze između ponavljanja tretmana). Kontrolni uzorak sadržavao je bakterijske stanice koje su porasle i prebačene u reakcijsku smjesu, ali nisu tretirane ultrazvukom u cilju permeabilizacije stanica.

Rezultati na Slici 11. prikazuju promjenu A_{608} vrijednosti tijekom uzgoja bakterijske biomase i trajanja reakcije transglukozilacije koju kataliziraju stanice permeabilizirane primjenom ultrazvuka kontinuirano kroz $t = 4,0$ h

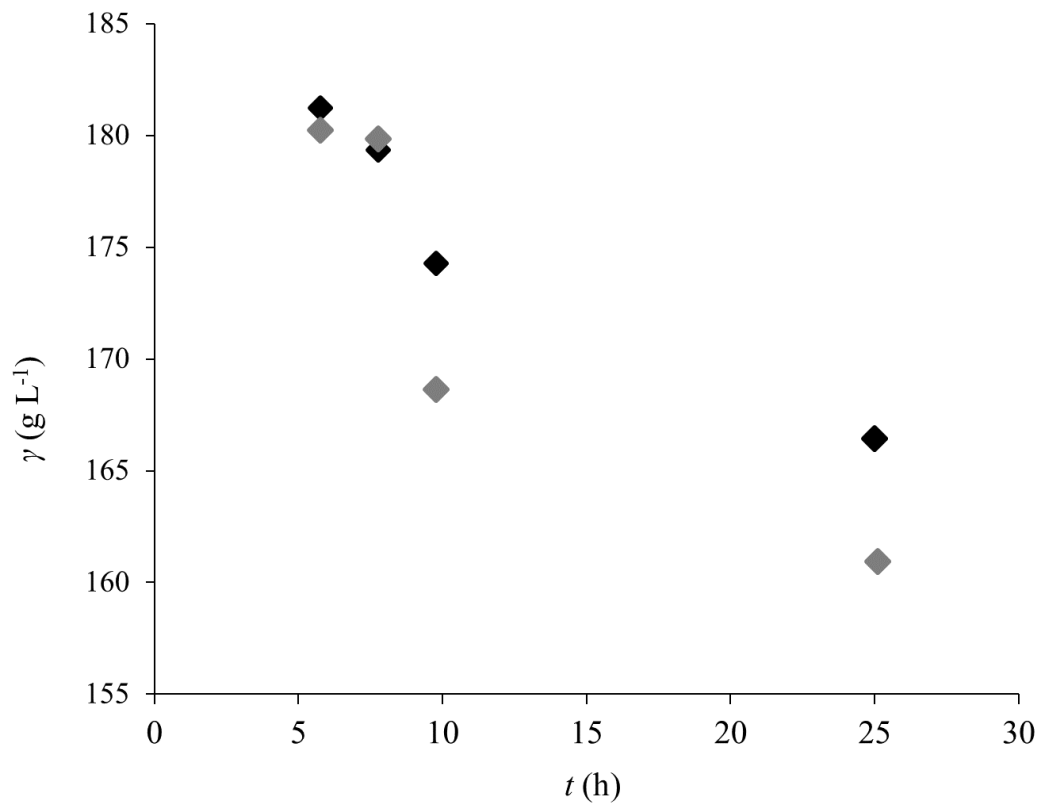


Slika 11. Rast bakterijske biomase (A_{608}) tijekom uzgoja *L. mesenteroides* u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ($t = 0,0 - 5,0$ h), tijekom kontinuiranog tretmana ultrazvukom u reakcijskoj smjesi ($t = 5,0 - 9,0$ h; crveni pravokutnik) i nakon kontinuiranog tretmana ultrazvukom ($t = 10,0$ h i $25,0$ h) (●). Istovrsno određivanje provedeno je i za kontrolni uzorak (x).

Dobiveni rezultati jasno pokazuju da permeabilizacija stanica primjenom ultrazvuka kontinuirano kroz $t = 4,0$ h nema značajnijeg utjecaja na rast bakterijskih stanica (Slika 11.). Zapravo se rast ovako permeabiliziranih stanica može smatrati uspješnijim od rasta stanica u kontrolnom uzorku.



Slika 12. Smanjenje koncentracije saharoze od početnih $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ ($\gamma = 251,76 \text{ g L}^{-1}$) u reakcijskoj smjesi sa stanicama *L. mesenteroides* permeabiliziranim kontinuiranim tretmanom ultrazvukom (■) i kontrolnom uzorku (■).

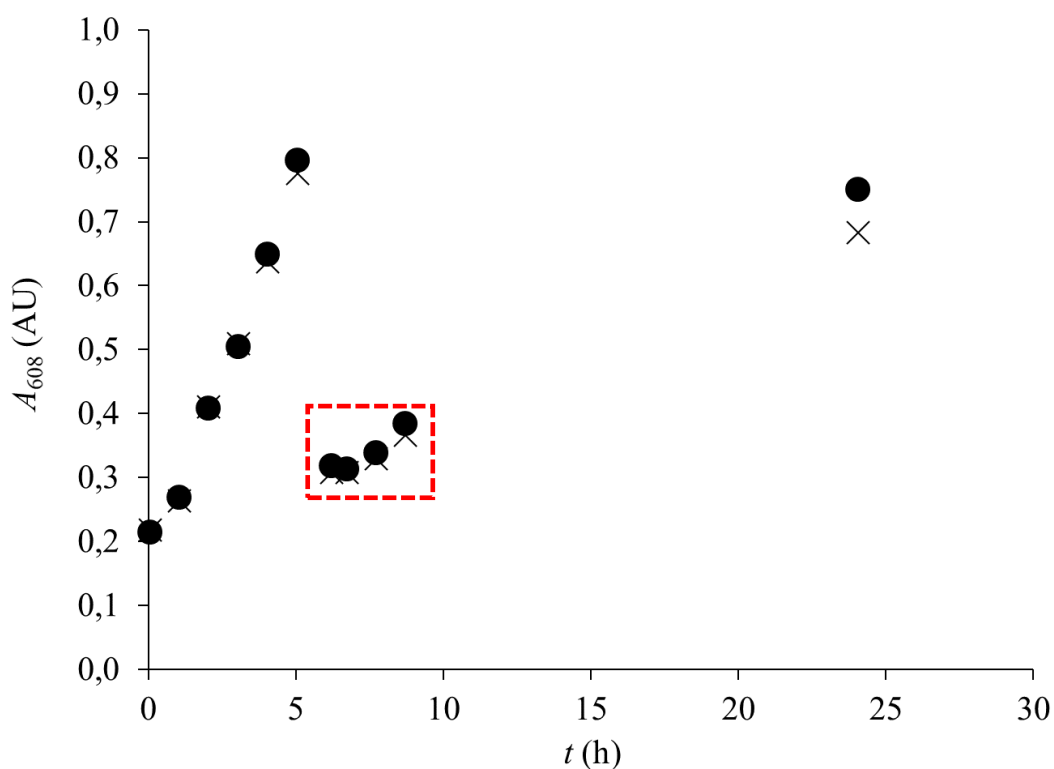


Slika 13. Smanjenje koncentracije glicerola od početnih $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ ($\gamma = 180,39 \text{ g L}^{-1}$) u reakcijskoj smjesi sa stanicama *L. mesenteroides* permeabiliziranim kontinuiranim tretmanom ultrazvukom (◆) i kontrolnom uzorku (◆).

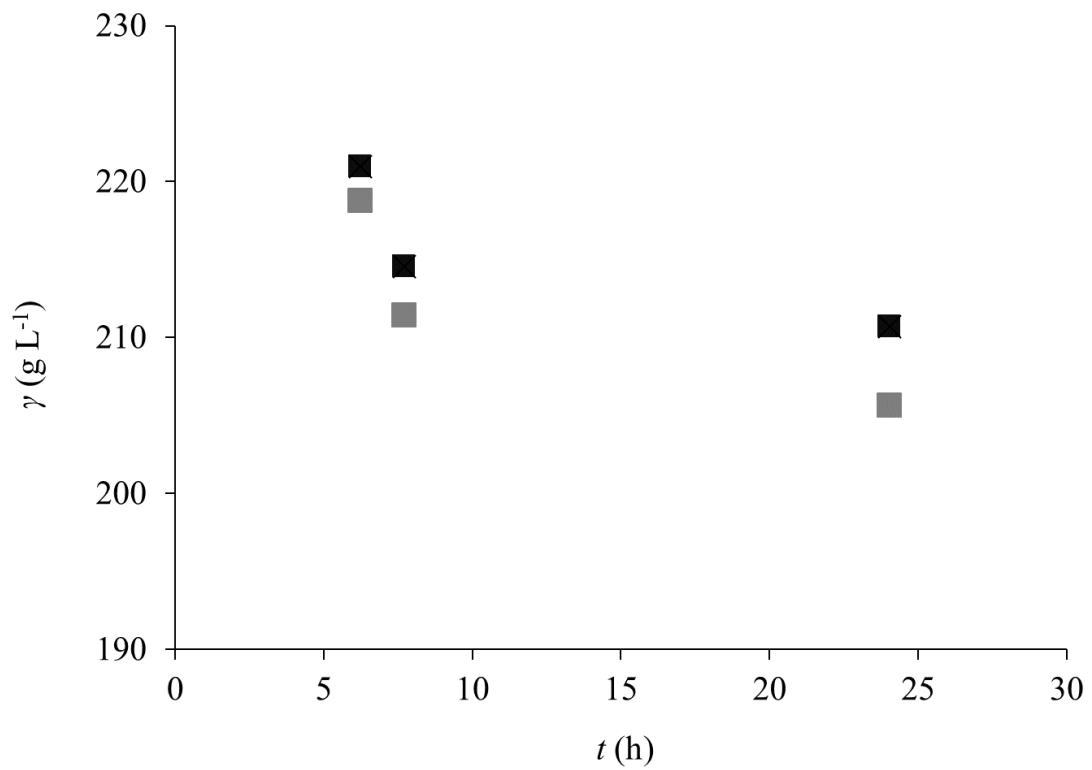
Iz rezultata prikazanih na Slikama 12. i 13. jasno se može zaključiti da je utrošak saharoze i glicerola u reakcijskoj smjesi sa stanicama permeabiliziranim kontinuiranim tretmanom ultrazvukom značajno veći nego u kontrolnom uzorku. Međutim, i saharoza i glicerol mogu biti supstrati u centralnom metabolizmu u stanicama heterofermentativne bakterije mliječne kiseline *Leuconostoc mesenteroides*, što se može utvrditi određivanjem koncentracije mliječne kiseline, octene kiseline i/ili etanola (i CO_2) kao krajnjih proizvoda metabolizma ovih dvaju supstrata. Dakle, permeabilizacija ovih stanica ne mora nužno rezultirati transglukozilacijom, već može biti postupak kojim će se značajno pospješiti fermentacija dvaju supstrata, saharoze i glicerola. Zbog toga je HPLC metodom određena koncentracija pobrojanih krajnjih proizvoda metabolizma dvaju supstrata, koje je ova bakterija

proizvela u odabranim uvjetima. HPLC metodom je utvrđeno da u opisanim uvjetima bakterija *L. mesenteroides* proizvodi isključivo mliječnu kiselinu, kako je to prikazano na Slici 5.

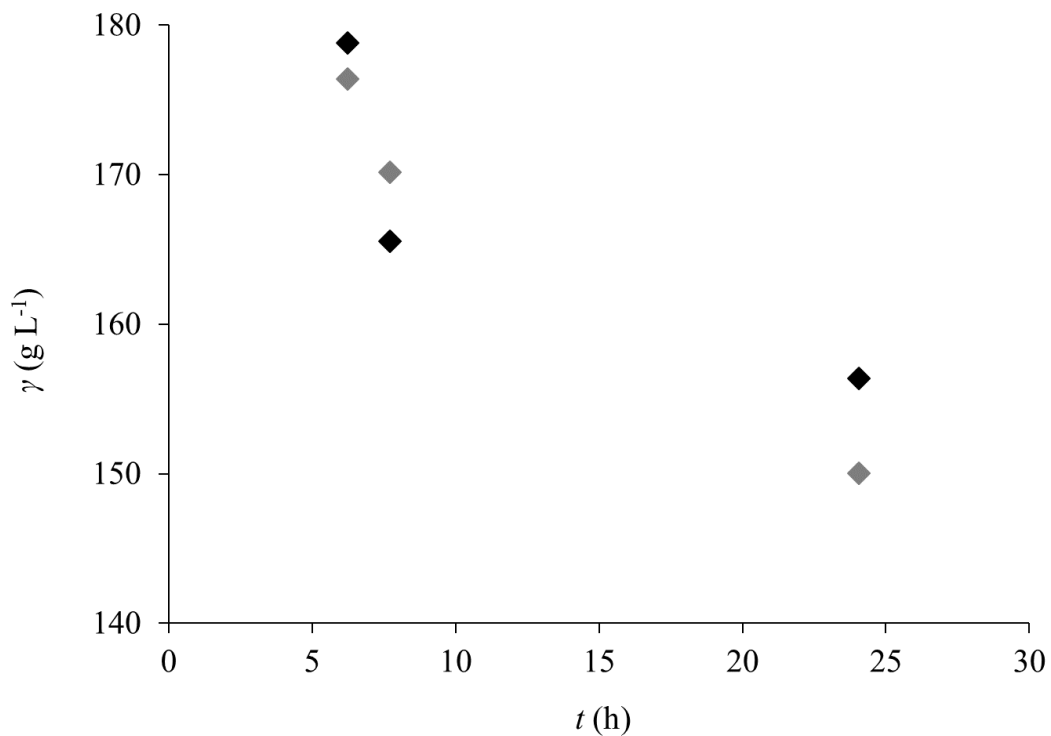
Permeabilizacija stanica ultrazvukom u ciklusima također je dala očekivane rezultate (Slike 14.-16). Iako nema bitnije razlike u rastu permeabiliziranih stanica i stanica koje nisu tretirane ultrazvukom u ciklusima (Slika 14.), sasvim je jasan učinak premeabilizacije na utrošak saharoze (Slika 15.) i glicerola (Slika 16.).



Slika 14. Rast bakterijske biomase (A_{608}) tijekom uzgoja *L. mesenteroides* u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ($t = 0,0 - 5,0$ h), tijekom tretmana ultrazvukom u ciklusima u reakcijskoj smjesi ($t = 5,0 - 9,0$ h; crveni pravokutnik) i nakon tretmana ultrazvukom u ciklusima ($t = 10,0$ h i $25,0$ h) (●). Istovrsno određivanje provedeno je i za kontrolni uzorak (x).



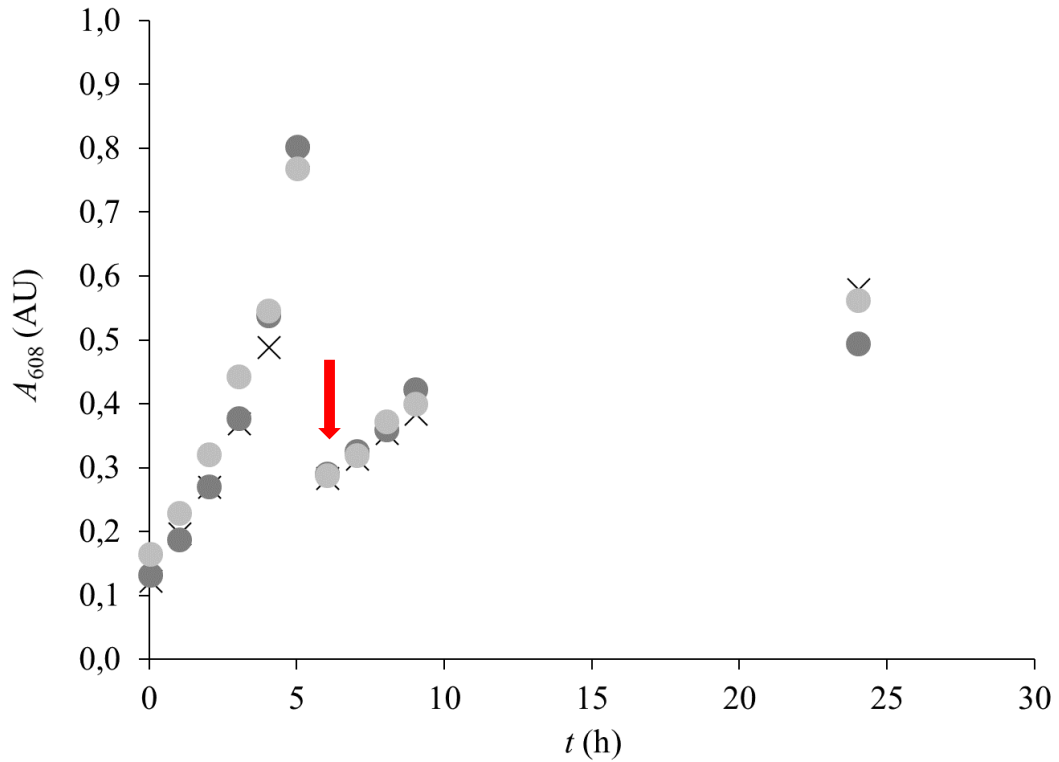
Slika 15. Smanjenje koncentracije saharoze od početnih $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ ($\gamma = 218,89 \text{ g L}^{-1}$) u reakcijskoj smjesi sa stanicama *L. mesenteroides* permeabiliziranim tretmanom ultrazvukom u ciklusima (■) i kontrolnom uzorku (■).



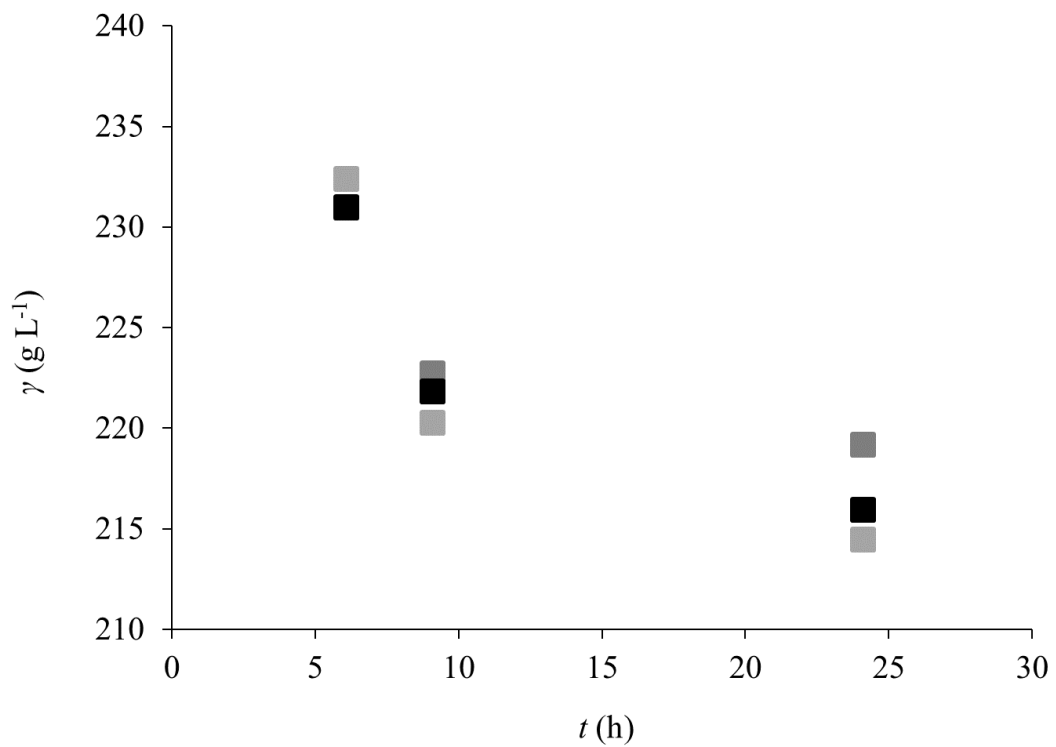
Slika 16. Smanjenje koncentracije glicerola od početnih $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ ($\gamma = 176,50 \text{ g L}^{-1}$) u reakcijskoj smjesi sa stanicama *L. mesenteroides* permeabiliziranim tretmanom ultrazvukom u ciklusima (◆) i kontrolnom uzorku (◆).

4.2.2. Uzgoj bakterijske biomase i permeabilizacija stanica *L. mesenteroides* kemijskom metodom u cilju provođenja transglukozilacije

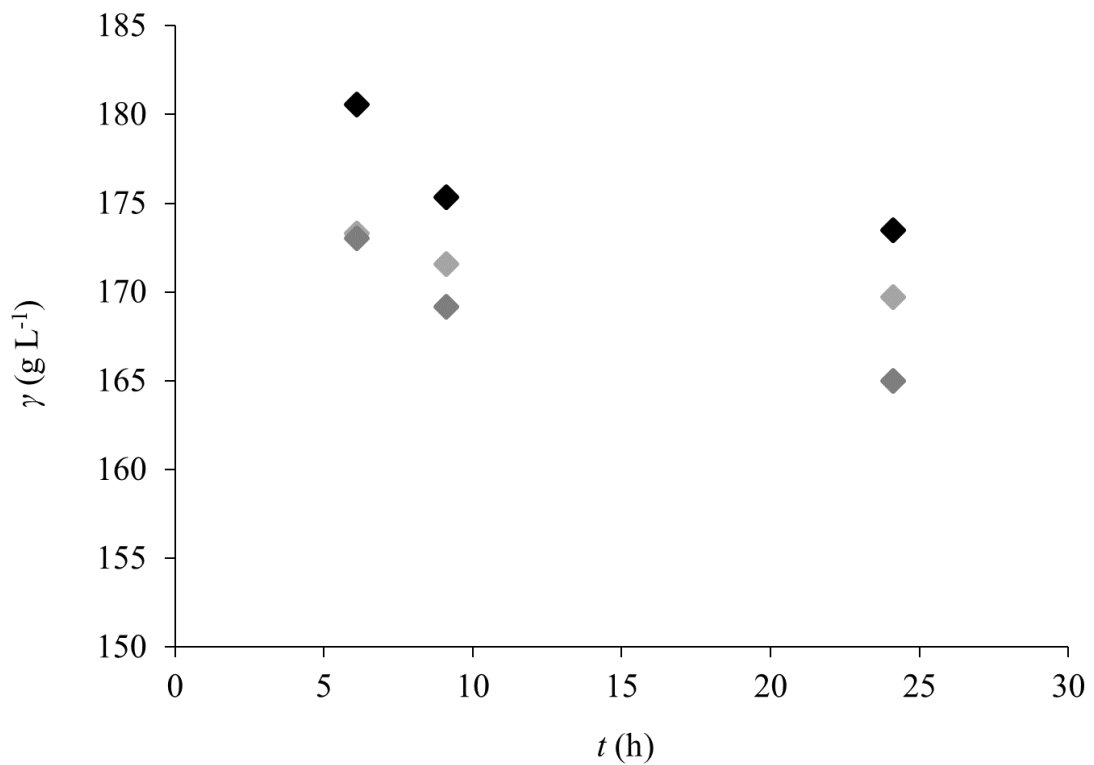
Osim ultrazvuka, istražen je učinak ne-ionske površinski aktivne tvari Tween-80 na permeabilizaciju stanica bakterije *Leuconostoc mesenteroides*. Dva različita udjela Tween-80 (0,4 i 0,6% v/v) dodana su u reakcijsku smjesu, koja je priređena za transglukozilaciju, kako je to opisano u poglavju 3.2.5. Dobiveni rezultati prikazani su na Slikama 17.-19.



Slika 17. Rast bakterijske biomase (A_{608}) tijekom uzgoja *L. mesenteroides* u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ($t = 0,0 - 5,0$ h) i tijekom kemijskog tretmana Tween-om-80 (0,4% v/v; ●, 0,6% v/v ●) u reakcijskoj smjesi ($t = 5,0 - 25,0$ h; crvena strelica). Istovrsno određivanje provedeno je i za kontrolni uzorak (x).

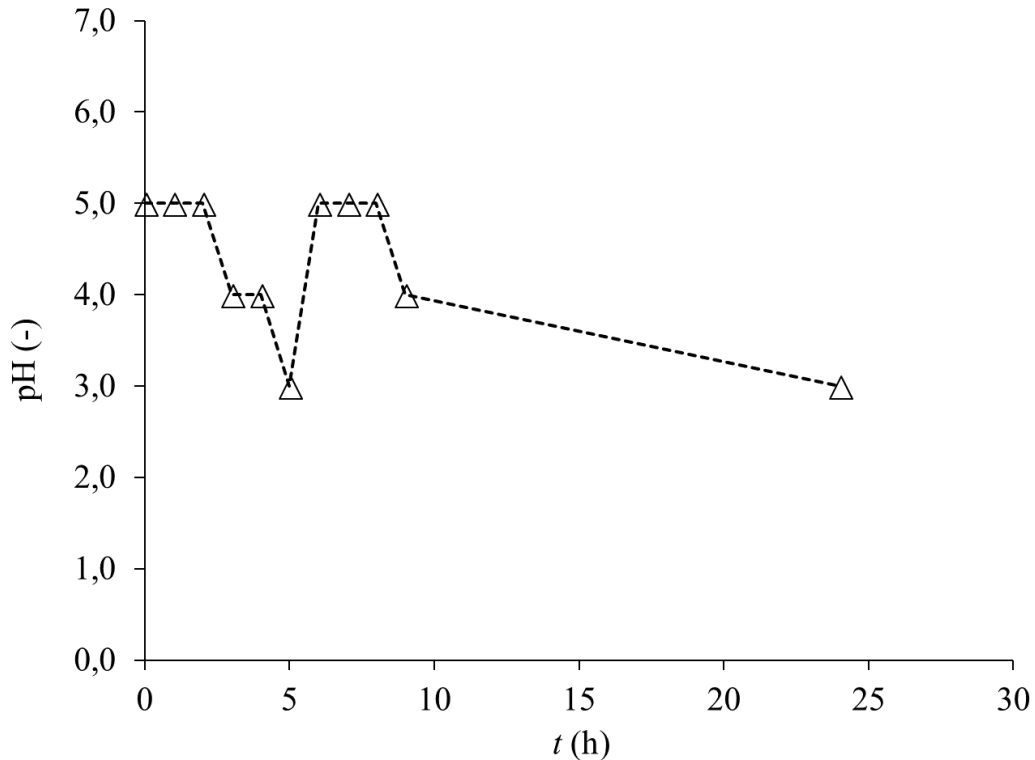


Slika 18. Smanjenje koncentracije saharoze od početnih $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ ($\gamma = 232,51 \text{ g L}^{-1}$) u reakcijskoj smjesi ($t = 5,0 - 25,0$) sa stanicama *L. mesenteroides* permeabiliziranim kemijskim tretmanom Tween-om-80 (0,4% v/v; ■, 0,6% v/v ■). Istovrsno određivanje provedeno je i za kontrolni uzorak (■).



Slika 19. Smanjenje koncentracije glicerola od početnih $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ ($\gamma = 173,48 \text{ g L}^{-1}$) u reakcijskoj smjesi ($t = 5,0 - 25,0 \text{ h}$) sa stanicama *L. mesenteroides* permeabiliziranim kemijskim tretmanom Tween-om-80 (0,4% v/v; ◇, 0,6% v/v; ◆). Istovrsno određivanje provedeno je i za kontrolni uzorak (◆).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je utrošak saharoze u uzorku u kojem su stanice tretirane sa 0,6% v/v Tween-80 niži nego kod kontrolnog uzorka, dok je u slučaju tretiranja stanica sa 0,4% v/v Tween-80 utrošak saharoze viši nego kod kontrolnog uzorka.



Slika 20. Promjena pH vrijednosti (Δ) tijekom uzgoja bakterije *L. mesenteroides* do polovine eksponencijalne faze rasta ($t = 5,0$ h) i tijekom trajanja reakcije transglukozilacije pomoću permeabiliziranih stanica iste bakterije.

Na Slici 20. prikazana je promjena pH vrijednosti tijekom uzgoja bakterijske biomase za permeabilizaciju i nakon permeabilizacije tj. tijekom trajanja reakcije transglukozilacije katalizirane permeabiliziranim stanicama bakterije *L. mesenteroides*. Promjene pH vrijednosti su vrlo slične za sve provedene eksperimente kao i za kontrolne uzorke, pa su ovdje pokazani rezultati dobiveni tijekom jednog eksperimenta. Nakon 5,0 sati uzgoja, pripremljena je reakcijska smjesa za transglukozilaciju, a pH vrijednost je podešena pomoću $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH sa početne vrijednosti 3,0 na 5,0. Opadanje pH vrijednosti upućuje na rast i metaboličku aktivnost permeabiliziranih stanica ove bakterije mliječne kiseline. U Tablici 8. su prikazani rezultati za specifičnu brzinu rasta (μ) *L. mesenteroides* dobiveni linearizacijom eksperimentalnih podataka za promjenu optičke gustoće (A_{608}) prije i nakon postupka permeabilizacije. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da stanice nastavljaju svoj rast tijekom i nakon procesa permeabilizacije. Grafički prikaz linearizacije eksperimentalnih podataka za

izračun specifične brzine rasta (μ) koja odgovara nagibu dobivenih pravaca prikazani su u poglavlju 7. Prilozi.

Tablica 8. Specifične brzine rasta (μ) bakterije *L. mesenteroides* u hranjivoj podlozi prije i nakon tretmana permeabilizirajućim sredstvima.

permeabilizacija	specifična brzina rasta (μ) prije permeabilizacije [h ⁻¹]	specifična brzina rasta (μ) nakon permeabilizacije [h ⁻¹]
ultrazvuk (kontinuirano)	0,32 ± 0,02	0,02 0,09*
ultrazvuk (ciklički)	0,21 ± 0,00	0,09 0,09*
Tween (0,4 %)	0,34 ± 0,01	0,12 0,10*
Tween (0,6 %)	0,33 ± 0,04	0,11 0,10*

Kontrolni uzorci označeni su zvjezdicom (*).

4.3. PROCJENA USPJEŠNOSTI FORMIRANJA α -GLUKOZILGLICEROLA U REAKCIJAMA TRANSGLUKOZILACIJE PROVEDENIM S POMOĆU PERMEABILIZIRANIH STANICA BAKTERIJE *Leuconostoc mesenterides*

Na temelju dobivenih kromatografskih rezultata (HPLC metoda) i to utoška saharoze i glicerola te proizvedene mliječne kiseline, kao jedinog krajnjeg proizvoda fermentacije supstrata, procijenjena je uspješnost formiranja α -glukozilglicerola (GG) u reakcijama transglukozilacije provedenim s pomoću permeabiliziranih stanica bakterije *Leuconostoc mesenterides* (Tablica 9.). Pri procjeni koncentracije formiranog GG uzete su obzir koncentracija proizvedene mliječne kiseline i odgovarajuća koncentracija fermentacijom utrošene saharoze. Iz preostalog dijela saharoze, koji nije fermentiran do mliječne kiseline, i utrošenog glicerola izračunata je koncentracija GG ($C_9H_{18}O_8$) i uspoređena sa površinom ispod pika, koji je eluiran između saharoze ($C_{12}H_{22}O_{11}$; $t_R = 11,108$ min) i glukoze ($C_6H_{12}O_6$; $t_R = 12,780$ min).

Tablica 9. Procjena utroška saharoze i glicerola i proizvodnje mliječne kiseline te formiranja α -glukozilglicerola.

permeabilizacija	utrošak saharoze ($\Delta\gamma$, g/L)	utrošak glicerola ($\Delta\gamma$, g/L)	proizvedena mliječna kiselina ($\Delta\gamma$, g/L)	proizvedeni GG ($\Delta\gamma$, g/L)
ultrazvuk (kontinuirano)	28,707	19,314	5,147	17,706
	19,761*	14,929*	4,770*	11,321*
ultrazvuk (ciklusi)	13,132	11,617	8,650	3,653
	10,245*	10,450*	9,758*	0,725*
Tween-80 (0,4% v/v)	17,904	3,572	7,419	8,069
	15,038*	7,102*	6,789*	6,384*
Tween-80 (0,6% v/v)	11,764	8,035	7,630	3,357
	15,038*	7,102*	6,789*	6,384*

Kontrolni uzorci označeni su zvjezdicom (*).

Iz procijenjenih vrijednosti može se zaključiti da se stanice bakterije *L. mesenteroides* uspješno permeabiliziraju odabranom fizikalnom i kemijskom metodom. Nakon postupaka permeabilizacije stanice zadržavaju svoju metaboličku aktivnost i dalje se eksponencijalno umnažaju i to uspješnije od stanica koje nisu permeabilizirane. Najveća koncentracija saharoze i glicerola utrošena je u reakcijskoj smjesi u kojoj su bakterijske stanice permeabilizirane kontinuiranim tretmanom ultrazvukom. Permeabilizacija stanica pogoduje fermentaciji supstrata (saharoze) i proizvodnji mliječne kiseline. Najveće koncentracija mliječne kiseline dobivena je u reakcijskoj smjesi u kojoj su stanice *L. mesenteroides* permeabilizirane tretmanom ultrazvukom u ciklusima.

Sukladno procijenjenim rezultatima, permeabilizacija stanica bakterije *L. mesenteroides* dovodi do formiranja α -glukozilglicerola (GG). Neidentificirani pik se eluira između saharoze i glukoze tijekom HPLC analize uzoraka i, sukladno literaturnim podacima (Takenaka i sur., 2000), takav spoj bi trebao biti GG. Ukoliko je ova pretpostavka točna, najviše GG-a je proizvedeno u reakcijskoj smjesi u kojoj su stanice *L. mesenteroides* permeabilizirane kontinuiranim tretmanom ultrazvukom.

Nastavak ovog istraživanja je logičan i uključuje izolaciju proizvedenog GG-a i njegovu identifikaciju i kvantifikaciju npr. nuklearnom magnetnom rezonancijom (NMR).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju eksperimenata, koji su osmišljeni kako je to opisano u ovom radu, i rezultata dobivenih u laboratorijskom mjerilu, može se zaključiti slijedeće:

1. Koncentracija kisika, koji je otopljen u hranjivoj podlozi, ima značajan utjecaj na rast heterofermentativne Gram-pozitivne bakterije mliječne kiseline *Leuconostoc mesenteroides*. Pri mikroaerofilnim uvjetima rast ove bakterije slijedi linearan trend bez jasno odijeljenih faza rasta i procijenjena maksimalna specifična brzina rasta ($\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$) znatno je manja od procijenjene specifične brzine rasta ove bakterije pri aerobnim uvjetima ($\mu = 0,24 \text{ h}^{-1}$). Pri aerobnim uvjetima *L. mesenteroides* odmah nakon naciepljivanja kemijski definirane podloge ulazi u eksponencijalnu fazu rasta i nakon 10 h uzgoja pri odabranim uvjetima ulazi u stacionarnu fazu rasta.
2. Polovina eksponencijalne faze rasta ove bakterije pri aerobnim uvjetima ($t = 5,0 \text{ h}$) smatra se optimalnom za postizanje visoke koncentracije i aktivnosti saharoza fosforilaze, citoplazmatskog enzima koji katalizira transglukozilaciju. Stoga su nakon 5,0 h uzgoja primjenjene fizikalna i kemijska metoda za permeabilizaciju stanica bakterije *L. mesenteroides*. Primjena ultrazvuka (frekvencija 37 kHz, snaga 90 W i temperatura $29,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ i to kontinuirano kroz 4,0 h i u dva ponavljanja kroz 30 min s pauzom između ponavljanja od 30 min) i površinski aktivne tvari Tween-80 (0,4 i 0,6 vol/vol) pokazale su se kao dobre metode, kojima je moguće utjecati na aktivnost ove bakterije. Nakon provedenih postupaka permeabilizacije, stanice se dalje eksponencijalno umnažaju i zadržavaju svoju metaboličku aktivnost i to na sličan ili bolji način nego u kontrolnom uzorku.
3. U reakcijskoj smjesi u kojoj je istraživana transglukozilacijska aktivnost saharoza fosforilaze saharoza je donor glukozila, dok je glicerol akceptor glukozila. Oba sastojka reakcijske smjese su supstrati za centralni metabolizam u permeabiliziranim stanicama ove heterofermentativne bakterije mliječne kiseline s pomoću kojih je proizvedena samo mliječna kiselina, dok ostali krajnji proizvodi (octena kiselina i etanol) razgradnje ovih supstrata nisu identificirani HPLC metodom. Dakle, tretman ultrazvukom i Tween-om-80 može se koristiti u usmjeravanju metabolizma supstrata kod potencijanih industrijskih biokatalizatora, npr, u proizvodnji platformske kemikalije - mliječne kiseline s pomoću *L. mesenteroides*.
4. Najveća koncentracija saharoze ($\Delta\gamma = 28,707 \text{ g L}^{-1}$) i glicerola ($\Delta\gamma = 19,314 \text{ g L}^{-1}$) utrošena je u reakcijskoj smjesi u kojoj su bakterijske stanice permeabilizirane kontinuiranim tretmanom ultrazvukom, dok je najveća koncentracija mliječne kiseline ($\gamma = 8,650 \text{ g L}^{-1}$) dobivena u

reakcijskoj smjesi u kojoj su stanice *L. mesenteroides* permeabilizirane tretmanom ultrazvukom s ponavljanjima.

5. Sukladno procijenjenim rezultatima, permeabilizacija stanica bakterije *L. mesenteroides* dovodi do formiranja α -glukozilglicerola. Neidentificirani pik se eluira između saharoze i glukoze tijekom HPLC analize uzoraka i, sukladno literaturnim podacima (Takenaka i sur., 2000), takav spoj bi trebao biti GG. Ukoliko je ova pretpostavka točna, najviše GG-a ($\gamma = 17,706 \text{ g L}^{-1}$) je proizvedeno u reakcijskoj smjesi u kojoj su stanice *L. mesenteroides* permeabilizirane kontinuiranim tretmanom ultrazvukom. Nastavak ovog istraživanja uključuje izolaciju proizvedenog GG-a i njegovu identifikaciju i kvantifikaciju npr. nuklearnom magnetnom rezonancijom (NMR).

6. LITERATURA

Breintenbach, U., Kallmayer, V., Raschke, T., Scherner, C., Siefken, W., Viala, S., (2006) Cosmetic preparations containing glucosyl glycerides and one or more acrylamidomethyl propylsulphonic acid polymers. WO2006122669.

Cánovas, M., Torroglosa, T., Iborra, J., L. (2005) Permeabilization of *Escherichia coli* cells in the biotransformation of trimethylammonium compounds into L-carnitine. *Enzyme Microb. Technol.* **37**, 300-308.

Chen, R. R. (2007) Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 730-738.

Chisti, Y. (2003) Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. *Trends. Biotechnol.* **21**, 89-93.

Choi, K. O., Song, S.H., Yoo, Y.J. (2004) Permeabilization of *Ochrobactrum anthropi* SY509 cells with organic solvents for whole cell biocatalyst. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **9**, 147-150.

Chun, B. H., Kim, K. H., Jeon, H. H., Lee, S. H., Jeon, C. O. (2017). Pan-genomic and transcriptomic analyses of *Leuconostoc mesenteroides* provide insights into its genomic and metabolic features and roles in kimchi fermentation. *Scientific Reports.* **7**, 1-16.

Cortez, D. V., Roberto, I., C. (2012) CTAB, Triton X-100 and freezing-thawing treatments of *Candida guilliermondii*: effects on permeability and accessibility of the glucose-6-phosphate dehydrogenase, xylose reductase and xylitol dehydrogenase enzymes. *N. Biotechnol.* **29**, 192-108.

De Carvahlo, C. C. R. C. (2011) Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. *Biotechnol. Adv.* **29**, 75-83.

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

Francko, D., Taylor, S., Thomas, B., McIntosh, D. (1990) Effect of low-dose ultrasonic treatment on physiological variables in *Anabaena flos-aquae* and *Selenastrum capricornutum*. *Biotechnol. Lett.* **12**, 219–224.

Goedl, C., Sawangwan, T., Mueller, M., Schwarz, A., Nidetzky, B. (2008) A high-yielding biocatalytic process for the production of 2-*O*-(α -D-glucopyranosyl)-*sn*-glycerol, a natural osmolyte and useful moisturizing ingredient. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **47** (52), 10086-10089.

Goedl, C., Sawangwan, T., Wildberger, P., Nidetzky B. (2010) Sucrose phosphorylase: a powerful transglucosylation catalyst for synthesis of α -D-glucosides as industrial fine chemicals. *Biocatal. Biotransformation*, **28** (3), 10-21.

Gudimichi, R. K., Nidetzky, B. (2017) Walking a fine line with sucrose phosphorylase: efficient single-step biocatalytic production of L-ascorbic acid 2-glucoside from sucrose. *ChemBioChem*, **18** (14), 1387-1390.

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

Hincha, D. K., Hagemann, M. (2004) Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochem. J.* **15**, 277-283.

Kostelac, D. (2016) Proizvodnja i karakterizacija α -amilaze bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, srpanj 2016.

Lin, B., Tao Y. (2017) Whole-cell biocatalysis by design. *Microb. Cell Fact.* **16**, 106.

Luley-Goedl, C., Nidetzky B., (2010) Small-molecule glucosylation by sucrose phosphorylase: structure-activity relationships for acceptor substrates revisited. *Carbohydr. Res.* **345** (10), 1492-1496.

Luley-Goedl, C., Sawangwan, T., Mueller, M., Schwarz, A., Nidetzky, B. (2010) Biocatalytic process for production of α -glucosylglycerol using sucrose phosphorylase. *Food Technol. Biotechnol.* **48** (3) 276-283.

Mueller, M., Nidetzky, B., (2007) The role of Asp-295 in the catalytic mechanism of *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase probed with site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* **7**, 1403-1408.

Schwarz, A., Brecker, L., Nidetzky, B. (2007) Acid–base catalysis in *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase probed by site-directed mutagenesis and detailed kinetic comparison of wild-type and Glu237→Gln mutant enzymes. *Biochem. J.* **403**, 441- 449.

Sawangwan, T., Goedl, C., Nidetzky, B. (2010) Glucosylglycerol and glucosylglycerate as enzyme stabilizers. *Biotechnol. J.* **5**, 187-191.

Takenaka, F., Uchiyama, H. (2000) Synthesis of α -D-glucosylglycerol by α -glucosidase and some of its characteristics. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1821-1826.

Takenaka, F., Uchiyama, H., Imamura, T. (2000) Identification of α -D-Glucosylglycerol in *Sake*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64** (2), 378-385

Van der Werf, M. J., Hartmans, S., Van den Tweel, W. J. J. (1995) Permeabilization and lysis of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* cells by Triton X-100 for efficient production of D-malate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 590-594.

Vandamme, E. J., Loo, J V., Simkens, E., De Laporteet, A. (1987) Optimization of sucrose phosphorylase production by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Chem. Tech. Biofechnol.* **39**, 251-262.

Wachtmeister, J., Rother D. (2016) Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. *Curr. Opin. Biotechnol.* **42**, 169-17.

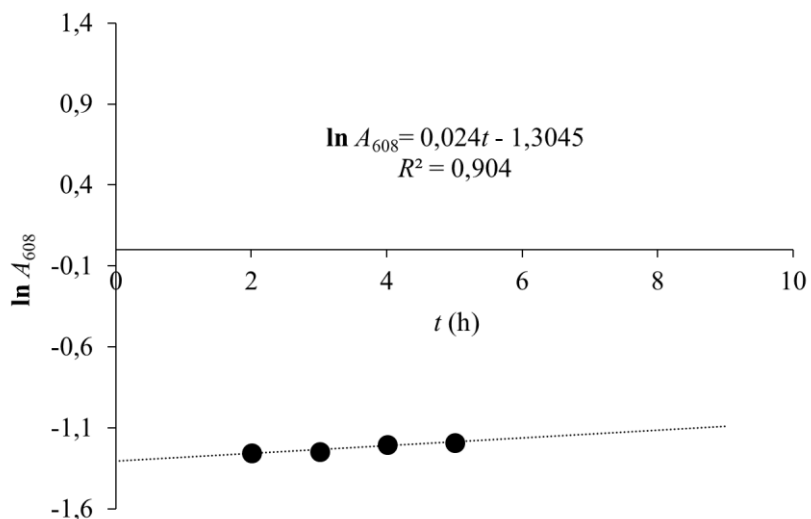
Wei, M., Ren, Y., Liu, C., Liu, R., Zhang, P., Wei, Y., Xu, T., Wang F., Tan T., Liu C. (2016) Fermentation scale up for α -arbutin production by *Xanthomonas* BT-112, *J. Biotechnol.* **233**, 1-5.

Woodley, J., M. (2006) Microbial Biocatalytic Processes and Their Development. *Adv. Appl. Microbiol.* **60**, 1-15.

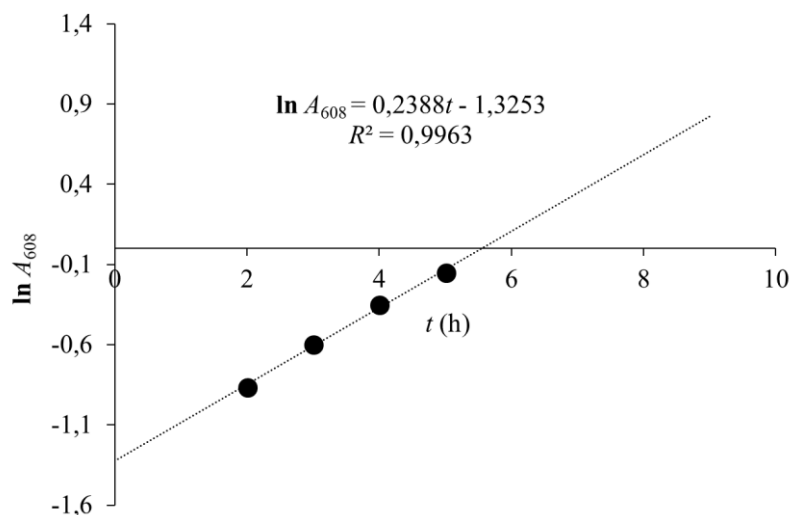
Yao, L.Y., Zhu, Y. X., Jiao, R. H., Lu, Y. H., Tan, R. X. (2014) Enhanced production of fumigaclavine C by ultrasound stimulation in a two-stage culture of *Aspergillus fumigatus* CY018. *Bioresour. Technol.* **159**, 112-117.

Zhao, W. R., Sheng, H. U., Jun H., Mei L. (2014) Improve Microorganism Cell Permeability for Whole-Cell Bioprocess : Methods and Strategies. *China Biotechnology* **34**, 125-131.

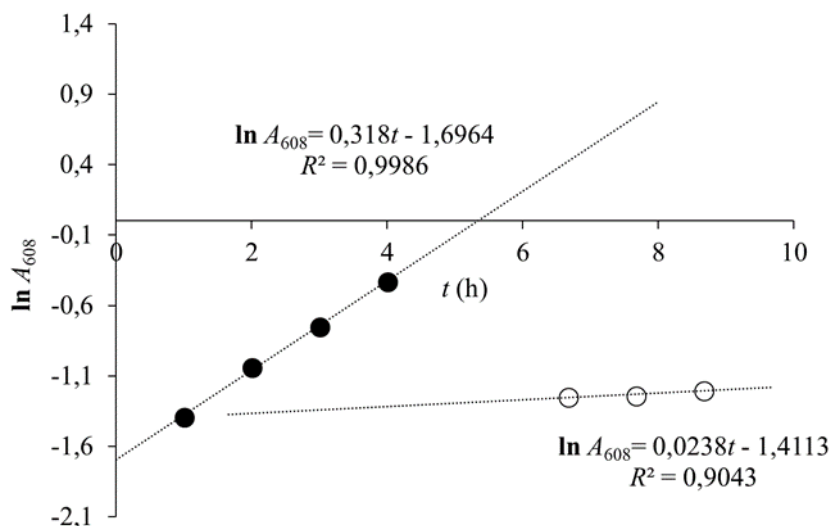
7. PRILOZI



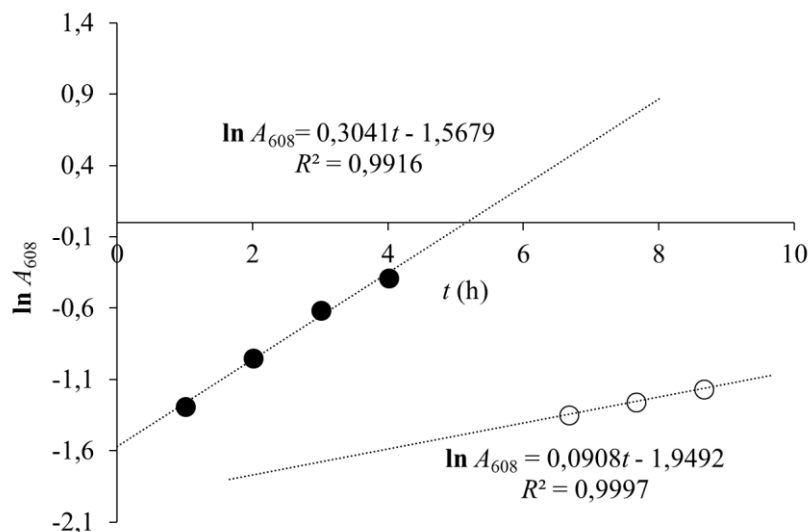
Slika 21. Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu rasta bakterije *L. mesenteroides* ($\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$, ●) tijekom eksponencijalne faze rasta ove bakterije uzgojene pri mikroaerofilnim uvjetima u laboratorijskom mjerilu.



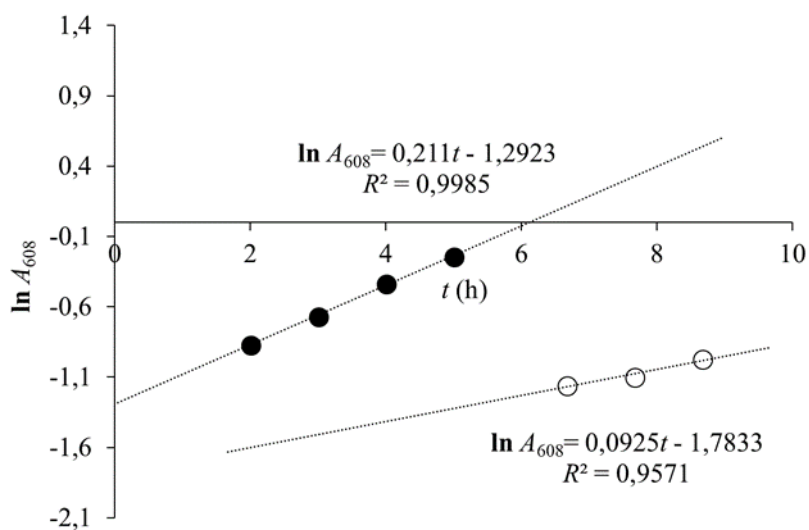
Slika 22. Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu rasta *L. mesenteroides* ($\mu = 0,24 \text{ h}^{-1}$, ●) tijekom eksponencijalne faze raste ove bakterije uzgojene pri aerobnim uvjetima u laboratorijskom mjerilu.



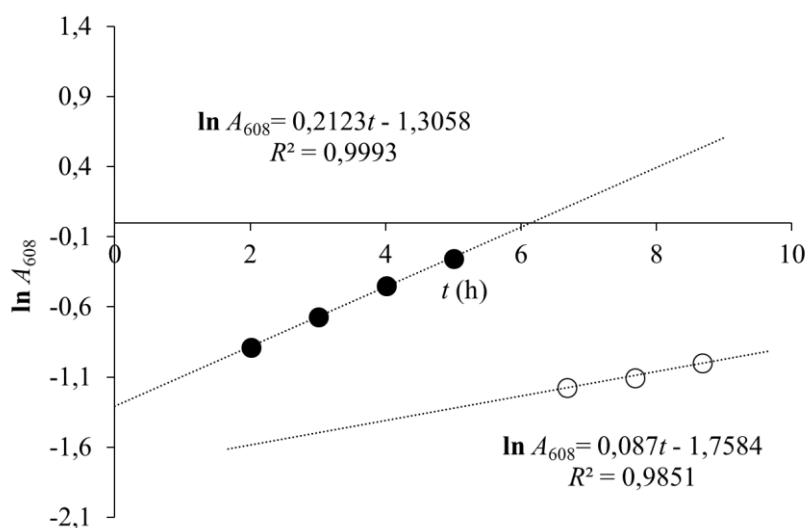
Slika 23. Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu rasta bakterije *L. mesenteroides* prije permeabilizacije ($\mu = 0,32 \text{ h}^{-1}$, ●) i za specifičnu brzinu rasta bakterije tijekom i nakon permeabilizacije ($\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$, ○) ultrazvukom kontinuirano kroz $t = 4,0$ u laboratorijskom mjerilu.



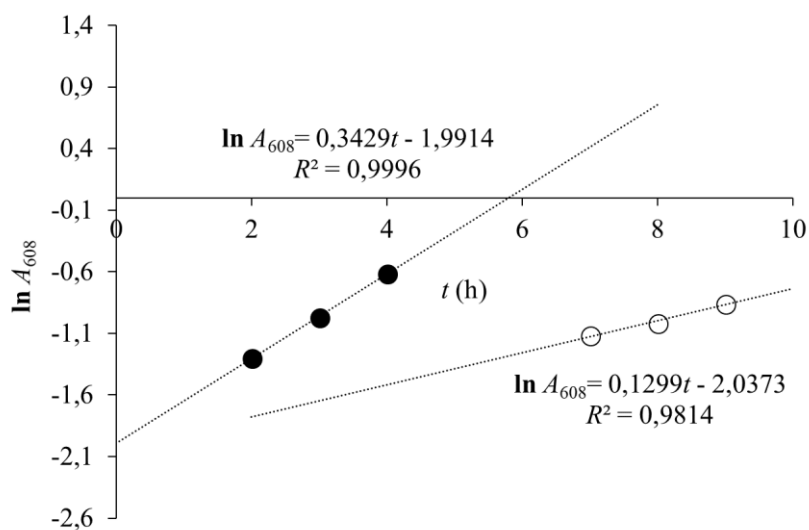
Slika 24. Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu rasta bakterije *L. mesenteroides* u kontrolnom uzorku (kontrola za proces permeabilizacije stanica ultrazvukom kontinuirano) prije ($\mu = 0,30 \text{ h}^{-1}$, ●) i tijekom trajanja reakcije transglukozilacije ($\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$, ○).



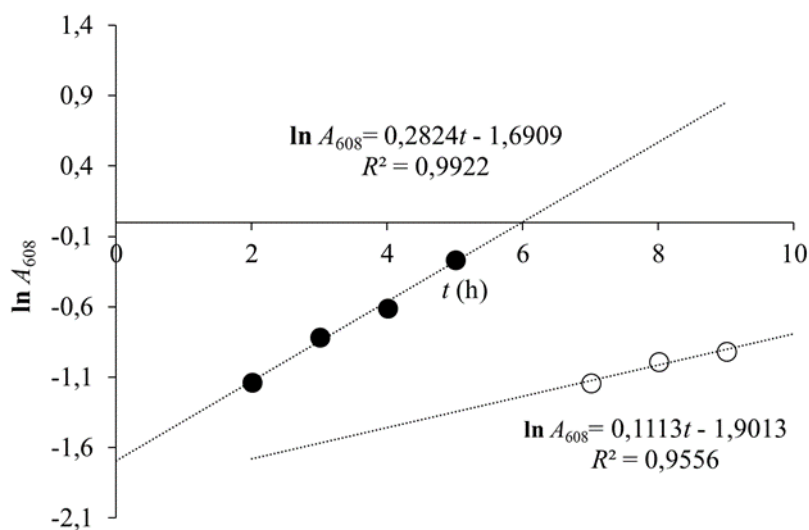
Slika 25. Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu rasta bakterije *L. mesenteroides* prije permeabilizacije ($\mu = 0,21 \text{ h}^{-1}$, ●) i za specifičnu brzinu rasta tijekom i nakon cikličke permeabilizacije ultrazvukom ($\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$, ○).



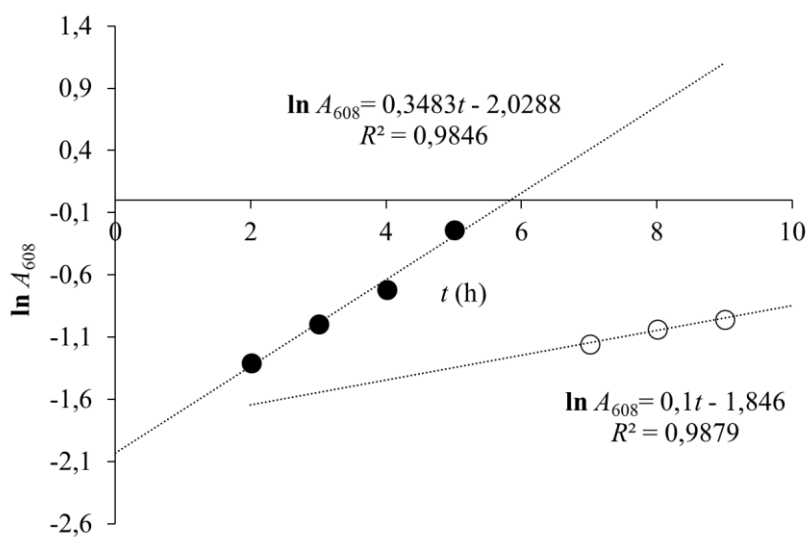
Slika 26. Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu rasta bakterije *L. mesenteroides* u kontrolnom uzorku (kontrola za proces permeabilizacije stanica ultrazvukom ciklički) prije ($\mu = 0,21 \text{ h}^{-1}$, ●) i tijekom trajanja reakcije transglukozilacije ($\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$, ○).



Slika 27. Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu rasta bakterije *L. mesenteroides* prije permeabilizacije ($\mu = 0,34 \text{ h}^{-1}$, ●) i za specifičnu brzinu rasta tijekom i nakon permeabilizacije ($\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$, ○) pomoću Tween-80 (0,4 % v/v).



Slika 28. Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu rasta bakterije *L. mesenteroides* tijekom prije permeabilizacije ($\mu = 0,28 \text{ h}^{-1}$, ●) i za specifičnu brzinu rasta tijekom i nakon permeabilizacije ($\mu = 0,11 \text{ h}^{-1}$, ○) pomoću Tween-80 (0,6 % v/v)



Slika 29. Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu rasta bakterije *L. mesenteroides* u kontrolnom uzorku (kontrola za proces permeabilizacije stanica ultrazvukom pomoću Tween-80 (0,4 % i 0,6%)) prije ($\mu = 0,35 \text{ h}^{-1}$, ●) i tijekom trajanja reakcije transglukozilacije ($\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$, ○).

IZJAVA O IZVORNOSTI

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



Ime i prezime studenta