

# Fiziologija heterofermentativnog soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 pri različitim uvjetima uzgoja šaržnim postupkom u laboratorijskom mjerilu

---

Gručić, Ana-Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:615416>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Ana-Marija Gruičić

1157/BPI

**Fiziologija heterofermentativnog soja**  
***Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954**  
**pri različitim uvjetima uzgoja**  
**šaržnim postupkom u**  
**laboratorijskom mjerilu**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada u Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Anite Slavice.

*Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Aniti Slavici, na danoj prilici i njenoj bezrezervnoj pomoći, podršci i vrijednim savjetima tijekom planiranja i izvođenja eksperimenata te pisanja ovoga rada.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Mladenu Brnčiću, na iskazanom povjerenju prilikom ustupanja opreme bez koje ne bi bilo moguće izraditi ovaj rad.*

*Veliku zahvalu dugujem dr. sc. Mariji Duvnjak i doc. dr. sc. Kristini Kljak, Zavod za hranidbu životinja, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, za ustupanje HPLC uređaja i veliku pomoć tijekom razvoja HPLC metode, čiji su rezultati od iznimne važnosti za ovaj rad.*

*Zahvala ide i članovima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada, Marini Vnućec i Ljiljani Blažević, a posebice članovima Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Ivi Čanak, Željku Jakopoviću i Deniju Kostelcu, za ustupanje opreme i pomoć pri izvedbi eksperimenata.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima, što su 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

### Fiziologija heterofermentativnog soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 pri različitim uvjetima uzgoja šaržnim postupkom u laboratorijskom mjerilu

Ana-Marija Gručić, 1157/BPI

**Sažetak:** U istraživanjima u ovom radu utvrđen je utjecaj koncentracije otopljenog kisika na rast soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u kemijski djelomično definiranoj podlozi (Vandamme i sur., 1987.) pri  $28 \pm 1,0^\circ\text{C}$  i opadajućoj pH vrijednosti suspenzije tijekom uzgoja šaržnim postupkom u laboratorijskom mjerilu. Razvijena je i optimirana ionsko-izmjenjivačka HPLC metoda, kojom je popraćena aktivnost ovog soja u različitim uvjetima uzgoja šaržnim postupkom. *L. mesenteroides* LMG 7954 uspješno raste u hranjivoj MRS podlozi, kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi kao i u smjesi visokog osmotskog tlaka saharoza:glicerol. Ovaj soj može transportirati i metabolizirati glukozu, saharozu (glukozu i fruktozu) i glicerol. Glavni proizvodi metabolizma ovih ugljikohidrata i alkohola su bakterijska biomasa i laktat te znatno manje koncentracije acetata i etanola. U smjesi saharoza:glicerol ova Gram-pozitivna bakterija raste slijedeći eksponencijalni trend, a zatim linearni trend. Ova važna fiziološka karakteristika kvalificira ovaj soj za industrijsku primjenu u podlogama s visokim početnim koncentracijama supstrata. Primjenom ultrazvuka i dodatkom Tween-a-80 permeabilizirane su stanice ovog soja i to tijekom njihova rasta u smjesi saharoza:glicerol. Obje metode utječu na metabolizam supstrata u stanicama ove (navodno) mikroaerofilne heterofermentativne bakterije mliječne kiseline, kako je to utvrđeno HPLC metodom. Nadalje, identificiran je dodatni pik u kromatogramima, koji ukazuje na mogućnost proizvodnje  $\alpha$ -glukozilglicerola s pomoću ovog soja.

**Ključne riječi:** fiziologija,  $\alpha$ -glukozilglicerol, HPLC, *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954, permeabilizacija stanica

**Rad sadrži:** 71 stranicu, 25 slika, 20 tablica, 47 literaturnih navoda, 13 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. Prof. dr. sc. Renata Teparić
2. Prof. dr. sc. Anita Slavica
3. Prof. dr. sc. Mladen Brnčić
4. Prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjena)

**Datum obrane:** 30. rujna 2019.

## 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 Malting and Brewing Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### **Physiology of heterofermentative strain *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 under different conditions of batch cultivation in the laboratory scale**

*Ana-Marija Gručić, 1157/BPI*

**Abstract:** In investigation described in this work effect of dissolved oxygen on the growth of strain *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 in chemically semi-defined broth (Vandamme et al., 1987) was determined at  $28\pm 1.0^\circ\text{C}$  and decreasing pH value of suspension during batch cultivation in the laboratory scale. Ion-exchange HPLC method was developed and optimized in order to follow activity of the strain under different conditions of the batch cultivation. *L. mesenteroides* LMG 7954 grew in MRS broth, the chemically semi-defined broth and sucrose:glycerol mixture with high osmotic pressure. The strain is able to transport and metabolize glucose, sucrose (glucose and fructose) and glycerol. The main end-products of metabolism of those carbohydrates and alcohol are bacterial biomass and lactate, while significantly lower concentration of acetate and ethanol were detected. In the sucrose:glycerol mixture this Gram-positive bacterium grew first exponentially and then followed linear trend. This physiological characteristic can be very useful in industrial application of the strain, especially in the cultivations with high initial concentration of substrate(s). Cells of this strain were permeabilized when growing in the sucrose:glycerol mixture by using ultrasound treatment and addition of Tween-80. Metabolism of the substrates in the cells of these (apparently) microaerophilic heterofermentative lactic acid bacterium was affected by both methods, as determined by HPLC method. Furthermore, additional peak was identified within HPLC chromatograms which indicates possibility for production of  $\alpha$ -glucosylglycerol by the strain.

**Keywords:** cell permeabilization,  $\alpha$ -glucosylglycerol, HPLC, *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954, physiology

**Thesis contains:** 71 pages, 25 figures, 20 tables, 47 references, 13 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, Full Professor
2. PhD Anita Slavica, Full Professor
3. PhD Mladen Brnčić, Full Professor
4. PhD Blaženka Kos, Full Professor (substitute)

**Thesis defended:** 30<sup>th</sup> September 2019

<b>Sadržaj</b>	<b>stranica</b>
<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	3
2.1. FIZIOLOGIJA VRSTA <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3
2.2. PROIZVODNJA $\alpha$ -GLUKOZILGLICEROLA	4
2.3. SAHAROZA FOSFORILAZA	5
2.4. PERMEABILIZACIJA STANICA BAKTERIJA I NJIHOVA POTENCIJALNA UPOTREBA U INDUSTRIJSKOJ PROIZVODNJI	7
2.4.1. Permeabilizacija bakterijskih stanica ultrazvukom	8
2.4.2. Permeabilizacija bakterijskih stanica kemijskim metodama	8
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	11
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1. Radni mikroorganizam	11
3.1.2. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterijske kulture	12
3.1.3. Kemikalije	12
3.1.4. Uređaji	14
3.1.4.1. Magnetska miješalica	14
3.1.4.2. Centrifuga	14
3.1.4.3. Spektrofotometar	15
3.1.4.4. Ultrazvučna kupelj	15
3.1.4.5. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC)	16
3.1.4.6. Ostala oprema	16
3.2. METODE	17
3.2.1. Priprema inokuluma za uzgoj bakterijskog soja u laboratorijskom mjerilu	17
3.2.2. Priprema kemijski djelomično definirane hranjive podloge za uzgoj bakterijskog soja u laboratorijskom mjerilu	18
3.2.3. Karakterizacija krivulje rasta i procjena specifične brzine rasta bakterijskog soja <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954 pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima uzgoja šaržnim postupkom u laboratorijskom mjerilu	19
3.2.4. Uzgoj bakterijskog soja <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954 pri aerobnim uvjetima, permeabilizacija uzgojenih stanica i njihova fiziologija u smjesi saharoza:glicerol	19
3.2.5. Permeabilizacija stanica bakterijskog soja <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954	20
3.2.5.1. Permeabilizacija stanica ultrazvučnom metodom	20
3.2.5.2. Permeabilizacija stanica površinski aktivnim sredstvom - Tween-om-80	21



3.2.6. Razvoj metode za analizu izuzetih uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC)	21
3.2.6.1. Ionsko-izmjenjivačka tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti	22
3.2.7. Analitičke metode	22
3.2.7.1. Praćenje rasta bakterijske biomase	22
3.2.7.2. Ionsko-izmjenjivačka tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC)	23
3.2.7.2.1. Priprema uzoraka za analizu	23
3.2.7.2.2. Analiza priređenih uzoraka HPLC metodom	23
3.2.7.2.3. Izrada baždarnih dijagrama	24
3.2.8. Analiza eksperimentalno dobivenih podataka	26
3.2.8.1. Procjena specifične brzine rasta bakterije <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	<b>27</b>
4.1. KARAKTERIZACIJA KRIVULJE RASTA I PROCJENA SPECIFIČNE BRZINE RASTA BAKTERIJSKOG SOJA <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954 PRI MIKROAEROFILNIM I AEROBNIM UVJETIMA UZGOJA ŠARŽNIM POSTUPKOM U LABORATORIJSKOM MJERILU	29
4.2. UZGOJ BAKTERIJSKOG SOJA <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954 PRI AEROBNIM UVJETIMA, PERMEABILIZACIJA UZGOJENIH STANICA I NJIHOVA FIZIOLOGIJA U SMJESI SAHAROZA:GLICEROL	35
4.2.1. Permeabilizacija stanica ultrazvučnom metodom	36
4.2.1.1. Fiziologija soja <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954 pri odabranim uvjetima	42
4.2.2. Permeabilizacija stanica površinski aktivnim sredstvom - Tween-om-80	48
4.2.2.1. Permeabilizacija stanica s 0,3 % (vol/vol) Tween-a-80	48
4.2.2.1.1. Fiziologija soja <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954 pri odabranim uvjetima	53
4.2.2.2. Permeabilizacija stanica s 0,5 % (vol/vol) Tween-a-80	58
4.2.2.2.1. Fiziologija soja <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954 pri odabranim uvjetima	62
<b>5. ZAKLJUČCI</b>	<b>66</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>68</b>
<b>7. PRILOZI</b>	<b>73</b>
7.1. PROCJENA VRIJEDNOSTI ZA SPECIFIČNU BRZINU RASTA ( $\mu$ ) BAKTERIJSKOG SOJA <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954 TIJEKOM UZGOJA U KEMIJSKI DJELOMIČNO DEFINIRANOJ PODLOZI PRI RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA OTOPLJENOG KISIKA (MIKROAEROFILNI I AEROBNI UVJETI UZGOJA ŠARŽNIM POSTUPKOM)	73
7.2. PROCJENA SPECIFIČNE BRZINA RASTA ( $\mu$ ) BAKTERIJSKOG SOJA <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954 TIJEKOM UZGOJA U: (1) KEMIJSKI DJELOMIČNO DEFINIRANOJ HRANJIVOJ PODLOZI I (2) REAKCIJSKOJ SMJESI SAHAROZA:GLICEROL – KONTROLNI UZORAK	75

7.3. PROCJENA VRIJEDNOSTI ZA SPECIFIČNU BRZINU RASTA ( $\mu$ ) BAKTERIJSKOG SOJA <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954 TIJEKOM UZGOJA U: (1) U KEMIJSKI DJELOMIČNO DEFINIRANOJ HRANJIVOJ PODLOZI I (2) REAKCIJSKOJ SMJESI SAHAROZA:GLICEROL TIJEKOM TRETMANA ULTRAZVUKOM	76
7.3. PROCJENA SPECIFIČNE BRZINA RASTA ( $\mu$ ) BAKTERIJSKOG SOJA <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954 TIJEKOM UZGOJA U: (1) U KEMIJSKI DJELOMIČNO DEFINIRANOJ HRANJIVOJ PODLOZI I (2) REAKCIJSKOJ SMJESI SAHAROZA:GLICEROL TIJEKOM TRETMANA TWEEN-OM-80 (0,3 % VOL/VOL)	77
7.4. PROCJENJENA SPECIFIČNE BRZINA RASTA ( $\mu$ ) BAKTERIJSKOG SOJA <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954 TIJEKOM UZGOJA U: (1) U KEMIJSKI DJELOMIČNO DEFINIRANOJ HRANJIVOJ PODLOZI I (2) REAKCIJSKOJ SMJESI SAHAROZA:GLICEROL TIJEKOM TRETMANA TWEEN-OM-80 (0,5 % VOL/VOL)	78
7.5. BAŽDARNI DIJAGRAMI	79

## 1. UVOD

Fiziologija soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 samo je u nekoliko detalja opisana u literaturi (Holzapfel i sur., 2009). S obzirom na dostupne podatke, ovaj navodno mikroaerofilni heterofermentativni soj bakterije mliječne kiseline iskazuje aktivnost saharoza fosforilaze (EC 2.4.1.7., Goedl i sur., 2007; Goedl i sur., 2008; Goedl i sur., 2010a; Goedl i sur., 2010b). Njegova primjena, i to u obliku cjelovitih permeabiliziranih stanica, također je nepoznata u znanstvenoj literaturi. Nedostaci, ali i prednosti primjene permeabiliziranih stanica *L. mesenteroides* LMG 7954 mogu se samo predvidjeti (Vučenović, 2018), ali ih je potrebno eksperimentalno utvrditi, najprije u laboratorijskom, a zatim i u većem mjerilu. Stoga je ovaj diplomski rad imao nekoliko ciljeva.

Ponajprije je bilo potrebno okarakterizirati krivulju rasta i procijeniti specifičnu brzinu rasta ( $\mu$ ) soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 i to pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima šaržnog uzgoja u prikladnoj hranjivoj podlozi u laboratorijskom mjerilu. Na ovaj se način utvrdilo postojanje i trajanje različitih faza rasta, posebice eksponencijalne faze, za koju je karakterističan omjer ukupnih kataboličkih i anaboličkih reakcija. Nadalje, bilo je potrebno utvrditi koje supstrate ovaj soj može transportirati i metabolizirati kao i krajnje proizvode metabolizma transportiranih supstrata u odabranim uvjetima. Ukratko, bilo je potrebno dati glavne fiziološke odrednice za ovaj bakterijski soj. Karakterizacija utjecaja smjese saharoze i glicerola pri njihovim visokim početnim koncentracijama (redom  $c = 0,8 \text{ mol L}^{-1}$  i  $c = 2,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) na rast i aktivnost *L. mesenteroides* LMG 7954 također je važan cilj ovog rada. Na ovaj bi se način utvrdila prikladnost ovog soja za primjenu u industrijskoj proizvodnji, kada se obično podrazumijeva primjena relativno visokih početnih koncentracija jednog ili više (tzv. jeftinih) izvora ugljika i energije. Osim toga, cilj ovog rada bio je permeabilizirati stanice *L. mesenteroides* LMG 7954 i to tako da ove stanice ostanu žive i zadrže svoju aktivnost, ali i da rastu u smjesi saharoze i glicerola, koja ima relativno visoki osmotski tlak. Zbog toga je bilo potrebno testirati jednu relativno blagu fizikalnu metodu permeabilizacije bakterijskih stanica kao i jednu relativno grubu kemijsku metodu za permeabilizaciju stanica ovog soja. Predviđen je tretman za permeabilizaciju stanica poraslih do sredine eksponencijalne faze rasta i to ultrazvukom i površinski aktivnom tvari Tween-80. Za ostvarivanje svih opisanih ciljeva najvažnije je bilo primijeniti brzu, jednostavnu i učinkovitu metodu za analizu uzoraka. Zbog toga je kao jedan od najvažnijih ciljeva ovog rada bio razviti i optimirati HPLC metodu

kojom će se moći analizirati uzorci vrlo kompleksnog sastava i kojom će se kroz samo jednu analizu utvrditi identitet i koncentracija supstrata i krajnjih proizvoda metabolizma.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. FIZIOLOGIJA VRSTA *Leuconostoc mesenteroides*

Prema putevima metabolizma ugljikohidrata kao glavnih izvora ugljika i energije, bakterije mliječne kiseline mogu se razvrstati u dvije glavne grupe - homofermentativne i heterofermentativne bakterije mliječne kiseline. Homofermentativni metabolizam podrazumijeva konverziju jednog mola glukoze (heksoze) do dva mola mliječne kiseline i dva mola ATP-a (Axelsson, 2004). Kod heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline ovaj je molarni odnos supstrata i krajnjih proizvoda metabolizma drukčiji, jer se iz jednog mola glukoze pridobiva: jedan mol mliječne kiseline, jedan mol etanola ili acetata, jedan mol CO<sub>2</sub> i jedan mol ATP-a. Omjer proizvedenog etanola i acetata varira i ovisi o redukcijskom potencijalu stanice bakterije mliječne kiseline, koja je aktivna u određenim uvjetima (John i sur., 2007).

Vrste *Leuconostoc mesenteroides* smatraju se fakultativno anaerobnim bakterijama mliječne kiseline, za koje je karakterističan heterofermentativni metabolizam ugljikohidrata (Hayek i Ibrahim, 2013). U usporedbi s velikom većinom preostalih rodova iz skupine bakterija mliječne kiseline, bakterije iz roda *Leuconostoc* postižu veću specifičnu brzinu rasta i potrošnju glukoze tijekom uzgoja pri aerobnim uvjetima, nego pri anaerobnim ili mikroaerofilnim uvjetima uzgoj (Condon, 1983). Smatra se da je razlog tomu što je pri aerobnim uvjetima kisik dostupan u relativno visokim koncentracijama i tada se koristi kao glavni krajnji akceptor elektrona. Pri tome se pridobiva više metaboličke energije (ATP-a) i u opisanim uvjetima pridobiva se dva mola (a ne uobičajenih jedan mol) ATP-a, što je jedan od najvažnijih preduvjeta za anaboličke reakcije tj. za veći prirast biomase u opisanim uvjetima (Adams i Moss, 2000). Pri aerobnim uvjetima uzgoja, bakterije iz roda *Leuconostoc* proizvode veće koncentracije acetata nego etanola, jer je u ovim uvjetima okarakterizirana veća aktivnosti specifične NADH-zavisne oksidaze kao i acetat kinaze, nego pri smanjenim koncentracijama kisika. Nasuprot tomu, pri aerobnim uvjetima aktivnost fosfat-acetiltransferaze i alkohol dehidrogenaze manje su nego pri mikroaerofilnim uvjetima (Cogan i Jordan, 1993). Kao i pripadnici drugih rodova koji se svrstavaju u grupu bakterija mliječne kiseline, smatra se da bakterije iz roda *Leuconostoc* ne mogu provoditi reakcije citratnog ciklusa i nemaju sustav citokroma. Dakle, ove bakterije ne mogu regenerirati reducirane

koenzime u reakcijama oksidativne fosforilacije, u kojima se također pridobiva metabolička energija. Zbog toga bakterije iz ove grupe, pa tako i bakterije iz roda *Leuconostoc* metaboličku energiju pridobivaju fosforilacijom na nivou supstrata i to tijekom fermentacije ugljikohidrata i proizvodnje krajnjih proizvoda metabolizma ugljikohidrata - laktata, etanola i/ili acetata i CO<sub>2</sub>.

Nadalje, smatra se da bakterije iz roda *Leuconostoc* ne mogu sintetizirati aldolazu, pa sukladno tomu ne mogu provoditi sve reakcije glikolize. Zbog toga se u stanicama bakterija iz ovog roda glukoza razgrađuje drugim metaboličkim putevima. Tako obično razgradnja glukoze započinje oksidacijom i dekarboksilacijom ove heksoze do ksiluloza-5-fosfata. Nastali međuspoj se u reakciji koju katalizira fosfoketolaza, prevodi u gliceraldehid-3-fosfat i acetil-fosfat. Iz nastalog trioza-fosfata (gliceraldehid-3-fosfat) može se reakcijama glikolize proizvesti laktat, dok se acetil-fosfat može razgraditi do acetata i/ili etanola. Ukoliko bakterija iz roda *Leuconostoc* kao supstrat koristi pentoze, najprije se ovi supstrati izomeriziraju i fosforiliraju u ksilulozu-5-fosfat, nakon čega slijedi niz reakcija koji je istovjetan reakcijama razgradnje heksoza (Gaspar i sur., 2013) tj. pentoze se razgrađuju do laktata, etanola i/ili acetata i ugljikovog dioksida, kako je već prije ovdje gore opisano.

## 2.2. PROIZVODNJA $\alpha$ -GLUKOZILGLICEROLA

Vrste iz roda *Leuconostoc* mogu sintetizirati saharoza fosforilazu (EC 2.4.1.7.). Ovaj enzim katalizira pregradnju saharoze u četverostranoj reakciji u kojoj, između ostalih krajnjih proizvoda, može nastati i  $\alpha$ -glukozilglicerol. Ovaj visokovrijedni spoj pribraja se u skupinu osmolita, koji su zasebna skupina organskih spojeva glukozidne strukture, a njihovom proizvodnjom ili transportom izvana, stanice se štite od visokog osmotskog tlaka, ekstremnih temperatura i drugih oblika stresnih uvjeta (Goedl i sur., 2008). Razlog njihove zaštitne uloge je u njihovoj fiziološkoj učinkovitosti: reguliraju ravnotežu vode u stanici, štite proteine od denaturacije i stabiliziraju supramolekularne biološke strukture kao što su lipidne membrane (Lentzen i sur., 2006; Santos i sur., 2007; Goedl i sur., 2008).

Dodavanjem osmolita, kao vanjskih stabilizatora proteinima u otopini, smanjuje se potreba za modifikacijom samih proteina i to u smislu povećanja raspona ključnih parametara u okviru kojih zadržavaju svoju poželjnu enzimsku aktivnost i nativni oblik (Polizzi i sur., 2007). Izuzetno je veliki potencijal stabilizirajućeg djelovanja  $\alpha$ -glukozilglicerola na proteine

u (koloidnim) otopinama, kao što je to stanica, ali i na membrane stanice. Osim toga, istražene su i mogućnosti primjene ovog spoja u terapijske svrhe (Colombo i sur., 2000; Nitta i sur., 2007).

Glikozilirani šećerni alkoholi i njihovi derivati, koji se upotrebljavaju kao niskokalorijski zaslađivači, dokazani su inhibitori nastanka zubnog plaka (Havukkala 1991). Također, glukozilirani oligosaharidi iskazuju inhibitorno djelovanje prema aktivnosti  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze, što zapravo upućuje na moguću primjenu ovih spojeva u terapijske svrhe pri regulaciji koncentracije glukoze u krvi (Yoon i Robyt, 2003).

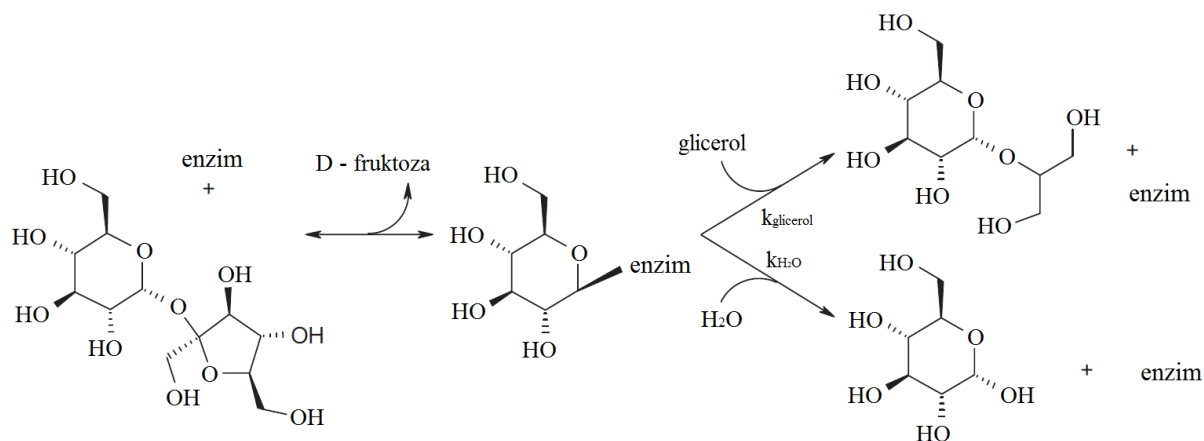
Primjena  $\alpha$ -glukozilglicerola već je uvriježena u kozmetičkoj industriji, u kojoj se primjenjuje prvenstveno kao visokoučinkoviti hidratizirajući spoj. Smatra se da ovaj spoj pospješuje hidrataciju tretirane kože u većoj mjeri od tradicionalno primjenjivanog i prihvaćenog glicerola (Goedl i sur., 2010a; Schrader i sur., 2012). Zbog opisane primjene, enzimski katalizirana proizvodnja  $\alpha$ -glukozilglicerola dobro je okarakteriziran i industrijski primijenjen postupak tvrtke „bitop AG“. Ovako proizveden  $\alpha$ -glukozilglicerol prepoznat je pod komercijalnim imenom Glycoin® i opisan kao jedan od aktivnih sastojka kozmetičkih preparata dostupnih na tržištu (Jan Dekker International, 2009).

### 2.3. SAHAROZA FOSFORILAZA

Saharoza fosforilaza (EC 2.4.1.7.) izolirana je i okarakterizirana iz relativno malog broja bakterija kao što su: *Bifidobacterium adolescentis* (van den Broek i sur., 2004), *Leuconostoc mesenteroides* (Goedl i sur., 2007; Kawasaki i sur., 1996; Koga i sur., 1991; Lee i sur., 2006), *Pseudomonas saccharophila* (Silverstein i sur., 1967; Weimberg i Doudoroff, 1954; Tsai i sur., 1980) i *Streptococcus mutans* (Russell i sur., 1988; Robeson i sur., 1983; Ferretti i sur., 1988). Primarnu strukturu ovog enzima čini 500 aminokiselina. Njegova kvarтерна struktura, kako je to opisano u znanstvenoj literaturi, može ali i ne mora biti formirana. Ovisno o vrsti mikroorganizma iz kojeg se ovaj enzim izolira, saharoza fosforilaza može biti funkcionalni monomer ili dimer. Eksperimentalno je utvrđeno da aktivnost ovoga enzima nije ovisna o određenom kofaktoru ili ko-supstratu te da iskazuje visoku regiospecifičnost (Goedl i sur., 2007). Prema podacima iz literature najveća koncentracija

saharoza fosforilaze u stanicama vrsta *Leuconostoc mesenteroides* postiže se oko polovice eksponencijalne faze rasta (Vandamme i sur.,1987).

Tri su moguće reakcije koje katalizira ovaj enzim: (i) prijenos glukozila s donora (npr. saharoze) na fosfat u reakcijama sinteze ili fosforolize, koja se odvija u prisutnosti anorganskog fosfata, zatim (ii) hidroliza donora glukozila (npr. saharoze na glukozu i fruktozu) i (iii) transglukozilacija, u kojoj se glukozna od donora prenosi na akceptor, npr. glicerol (Goedl i sur, 2010b). Eksperimentalno je utvrđeno da su u reakcijama transglukozilacije ponajbolji donori supstrata (glukozila): saharoza, glukozna-1-fosfat i D-glukopiranozil-1-fluorid, dok je spektar mogućih akceptora glukozila vrlo širok (Mieyal i sur., 1972, Goedl i sur., 2008). Glicerol, D-ksilitol i L-arabitol ističu se kao akceptori glukozila s visokim glukozilacijskim potencijalom, dok se u akceptore sa zadovoljavajućim glukozilacijskim potencijalom mogu pribrojiti: L-sorboza, D-ksiluloza i L-ribuloza. Reakcija glukozilacije glicerola (ili nekog drugog akceptora glukozila), koju katalizira saharoza fosforilaza, odvija se kroz dva koraka (Slika 1.).



**Slika 1.** Shematski prikaz reakcije koju katalizira saharoza fosforilaza u kojoj je saharoza donor glukozila, a glicerol akceptor glukozila (prilagođeno iz Goedl i sur., 2010).

U prvom koraku dolazi do hidrolize donora glukozilne skupine (npr. saharoze) i formira se kompleks  $\beta$ -glukozil-enzim. Ovaj prijelazni kompleks se raspada, jer nakon toga slijedi prijenos glukozilne grupe iz kompleksa  $\beta$ -glukozil-enzim na akceptor, što je u ovom slučaju 2-OH skupina glicerola (Slika 1.) Kompetitivna reakcija opisanom prijenosu glukozilne skupine s kompleksa  $\beta$ -glukozil-enzim na akceptor jest hidroliza donora glikozila (saharoze) na glukozu (i fruktozu) i slobodan enzim. Ova kompetitivna reakcija može bitno



umanjiti uspješnost reakcije transglukozilacije - reakcije koju se želi provesti ukoliko se želi proizvesti industrijski interesantan  $\alpha$ -glukozilglicerol (Goedl i sur., 2010).

Literaturni podaci ukazuju na mogućnost učinkovite proizvodnje  $\alpha$ -glukozilglicerola u opisanoj reakciji s visokim prinosima (85%) ukoliko se u reakcijskoj smjesi u kojoj reakciju katalizira saharoza fosforilaza koriste relativno visoke koncentracije donora i akceptora glikozila - saharoze od  $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ , a glicerola od  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Međutim, kod integriranih postupaka proizvodnje  $\alpha$ -glukozilglicerola, u kojima se biokataliza integrira s postupcima izolacije i pročišćavanja ovog proizvoda (tzv. down stream procesi), uputno je smanjiti krajnji prinos proizvoda s 85% do 72% radi smanjenja koncentracije glicerola, koji pri kraju reakcije koju katalizira saharoza fosforilaza ostaje neglikoliziran. U tom slučaju preporuča se provođenje ove enzimski katalizirane transglukozilacije uz početnu koncentraciju glicerola od  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , dok bi koncentracija saharoze u ovoj reakcijskoj smjesi trebala ostati  $0,8 \text{ mol L}^{-1}$  (Goedl i sur., 2010).

#### **2.4. PERMEABILIZACIJA STANICA BAKTERIJA I NJIHOVA POTENCIJALNA UPOTREBA U INDUSTRIJSKOJ PROIZVODNJI**

Upotreba cjelovitih stanica kao biokatalizatora ima niz prednosti pred upotrebom različitih enzimskih pripravaka i to iz ovih razloga: (1) izolacija i pročišćavanje enzima saharoza fosforilaze, kao i drugih enzima koji se koriste u biotehnološkoj industriji, skup je i dugotrajan niz postupaka; (2) nema potrebe za regeneracijom kofaktora, koja se odvija u stanici tijekom odvijanja metabolizma, kao u slučaju saharoza fosforilaze; i (3) stabilnost enzima u stanici veća je od stabilnosti pročišćenog enzima u otopini. Unatoč pobrojenim i ekonomski važnim prednostima, primjena permeabiliziranih stanica bakterija uglavnom izostaje u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji zbog niza ograničavajućih čimbenika. Kod enzimski kataliziranih reakcija koje se odvijaju u citoplazmi permeabiliziranih bakterijskih stanica, otežan je prijenos mase (supstrata u citoplazmu i proizvoda iz citoplazme u vanstanični prostor) zbog barijera - stanične stijenke i membrane. Primjenom prikladnih metoda za permeabilizaciju stanica, kojima se neće bitnije narušiti struktura stanice bakterije i tako uzrokovati gubitak staničnog integriteta, moguće je povećati učinkovitost procesa u kojima se kao biokatalizatori koriste permeabilizirane stanice bakterija. Na raspolaganju su

različite metode za permeabilizaciju stanica - fizikalne i kemijske metode kao i metode genetičkog inženjerstva (Zhao i sur., 2014).

#### 2.4.1. Permeabilizacija bakterijskih stanica ultrazvukom

Primjena ultrazvuka prvotno je okarakterizirana kao metoda dezintegracije stanica Gram-negativnih bakterija. Međutim, daljnja istraživanja ove fizikalne metode ukazala su na mogućnost primjene ultrazvuka kao načina permeabilizacije bakterijskih stanica, ali i način poboljšanja rasta Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Konvekcijski prijenos tvari otopljenih u okolini stanice (supstrata) u tzv. stagnantnom sloju tekućine i pojava tzv. mikrostrujanja tekućine (pa tako i tvari otopljenih u tekućini) uslijed pojave kavitacijskih mjehurića (Nyborg, 2001), mehanizam je kojim se pojašnjava pozitivan učinak ultrazvuka na aktivnost stanica. Mikrostrujanje je posljedica koja se javlja pri naizmjeničnim ciklusima niskog i visokog tlaka, kada dolazi do naizmjenične ekspanzije i smanjenja mjehurića plina u otopini.

Bitno je naglasiti da je za potrebe permeabilizacije stanica bakterija važno postići uvjete stabilne kavitacije, kada se mjehurići plina u otopini tj. suspenziji neće smanjiti do veličine koja vodi ka njihovoj imploziji (Pitt i Ross, 2003). Dakle, potrebno je primijeniti ultrazvuk niskog intenziteta, kako su to u svom radu opisali Runyan i suradnici, koji su 2006. proveli istraživanje o povećanju permeabilnosti vanjske membrane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* uz podešavanje temperature i frekvencije ultrazvuka, redom, pri 37°C i 70 kHz. Dostupna su i istraživanja provedena s Gram-negativnom bakterijom *Escherichia coli* i Gram-pozitivnoj bakteriji *Lactobacillus rhamnosus*. Dobiveni rezultati upućuju na formiranje prijelaznih proširenja u membrani bakterijskih stanica, a koji su reverzibilno uzrokovani primjenom ultrazvuka niskog intenziteta (Ananta i sur, 2005).

#### 2.4.2. Permeabilizacija bakterijskih stanica kemijskim metodama

Upotreba organskih otapala kao permeabilizacijskog sredstva nosi epitet jedne od najučinkovitijih metoda za permeabilizaciju bakterijskih stanica. Glavni razlog tomu su jednostavnost izvedbe postupka i relativno niski troškovi koje iziskuje ova metoda (Choi i

sur., 2004). Mehanizam povećanja permeabilnosti vanjske stanične membrane objašnjava se promjenama u njezinoj strukturi uslijed dolaska u kontakt s molekulama organskog otapala. Kao posljedica opisanog mehanizma dolazi do preraspodjele („ispadanja“) fosfolipida iz membrane (engl. falling out lipids; Felix, 1982; Richard i sur., 2000). Od organskih se otapala najčešće za permeabilizaciju stanica koriste: toluen, kloroform, etanol, dietil-eter i dimetil-sulfoksid (Flores i sur., 1994; Drishnan i sur., 2000). Iako se ova metoda permeabilizacije smatra jednom od najučinkovitijih metoda, ima bitan nedostatak, a to je gubitak vijabilnosti stanica (Choi i sur., 2004). Ova se metoda smatra učinkovitom kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.

Krishnan i suradnici su 2000. uspješno permeabilizirali stanice bakterije *Lactobacillus plantarum* i to dodatkom 1% (vol/vol) dietil-etera, a u istom su se istraživanju po ovaj mikroorganizam učinkovitima pokazali primjene toluena i etanola. Permeabilizacijom stanica bakterije *Ochrobactrum anthropi* bavili su se Choi i suradnici 2004. i na temelju rezultata provedenih istraživanja zaključili da primjena kloroforma (0,5 % vol/vol) i toluena (2,0 % vol/vol) pripada među učinkovitije metode permeabilizacije stanica biokatalizatora.

Dosutupna su i istraživanja koja ističu primjenu mliječne kiseline kao sasvim zadovoljavajućeg permeabilizacijskog sredstva kod stanica Gram-negativnih bakterija. Time su se 2000. pozabavili Alakomi i suradnici i dokazali da se primjenom mliječne kiseline u koncentraciji od 5,0 mmol L<sup>-1</sup> mogu uspješno permeabilizirati stanice bakterija *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella enterica*.

Još jedna učinkovita i primijenjena metoda permeabilizacije bakterijskih stanica jest upotreba površinski aktivnih tvari odnosno surfaktanata. Slično kao i organska otapala, površinski aktivne tvari permeabiliziraju membranu bakterijskih stanica tako da ostvaruju interakcije s molekulama membrane. Površinski aktivna sredstva jednostavnija su i sigurnija za upotrebu od organskih otapala (Cortez i Roberto, 2012). Tip surfaktanta koji treba upotrijebiti i njegova koncentracija ovise o sastavu stanične membrane. Primjerice, saponin ostvaruje interakcije s kolesterolom membrane i neće biti učinkovito sredstvo za permeabilizaciju membrana koje imaju nizak udio kolesterola (Jamur i Oliver, 2009). Surfaktanti stupaju u reakciju s proteinima stanične membrane, imitirajući okolinu fosfolipidnog dvosloja. Kationski surfaktanti mogu s proteinima ostvariti elektrostatske i hidrofobne interakcije, dok su neionske površinski aktivne tvari, kao što su Triton X-100, Tween-20 i Tween-80, ograničeni samo na primjenu kod hidrofobnih membrana. U većinskoj su upotrebi upravo neionski surfaktanti, budući da u zadovoljavajućoj mjeri ometaju

interakcije lipid-lipid i lipid-protein, a ne konkuriraju interakcijama protein-protein, kako je to slučaj kod kationskih surfaktanata (Cortez i Roberto, 2012).

Brojna istraživanja pokazala su da je upotreba površinski aktivnih sredstava učinkovita za permeabilizaciju membrana Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Van den Werf i suradnici još su 1994. dokazali da se proizvodnja D-malata pomoću bakterije *Pseudomonas pseudoalcaligenes* odvija uz značajno bolji prinos u prisustvu 0,5% (vol/vol) Tritona X-100. Canovas i suradnici posvetili su 2005. pažnju proučavanju utjecaja Tritona X-100, Tweena-20 i Tweena-80 na proizvodnju L-karnitina s pomoću Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* i došli do zaključka o zamjetnom povećanju prinosa nakon dodatka 2,0 % (vol/vol) bilo koja od tri navedena surfaktanta.

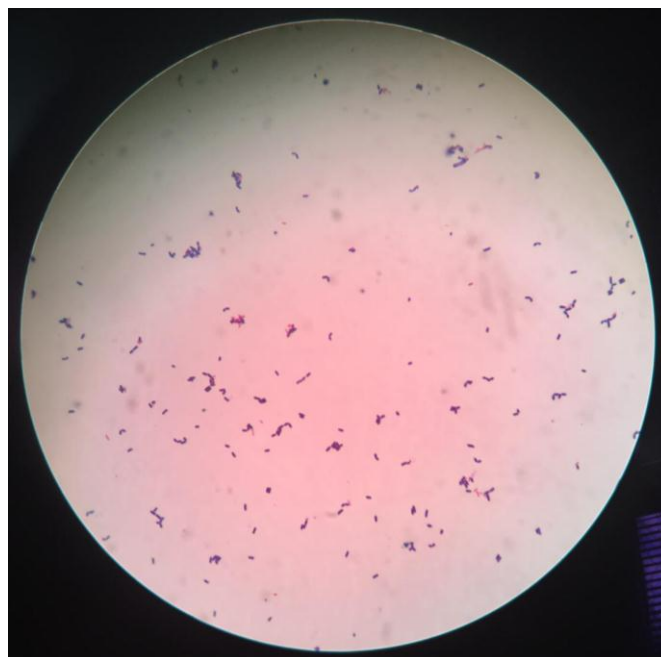
Tween-80 sadrži oleinsku kiselinu, koja potiče rast stanica i metaboličku aktivnost bakterija mliječne kiseline. Tako dodana oleinska kiselina može se ugraditi u staničnu membranu i konvertirati u ciklopropansku masnu kiselinu, za koju se smatra da povećava fluidnost membrane. Ovo je mehanizam na kojem se zasniva permeabilizacijski učinak Tweena-80 i pozitivan učinak na rast bakterija mliječne kiseline kod primjene ovog površinski aktivnog sredstva (Hayek i Ibrahim, 2013).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. MATERIJALI**

##### **3.1.1. Radni mikroorganizam**

U eksperimentima opisanim u ovom radu korištena je bakterija *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



**Slika 2.** Mikroskopska slika bakterije *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 obojene po Gramu. Preparat je promatran pod imerzijskim objektivom svjetlosnog mikroskopa Olympus CH20 (Olympus; Tokyo, Japan) pri povećanju od tisuću puta.

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

Čista kultura bakterijskog soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 održava se, čuva i uzgaja u hranjivoj De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) podlozi (De Man i sur., 1960). Sastav hranjive MRS podloge je prikazan u Tablici 5. Za uzgoj ovoga soja u laboratorijskom mjerilu, korištena je kemijski djelomično definirana hranjiva podloga u kojoj je saharoza glavni izvor ugljika i energije (Vandamme i sur., 1987). Sastav ove hranjive podloge prikazan je u Tablici 6.

### 3.1.3. Kemikalije

**Tablica 1.** Porijeklo i čistoća kemikalija potrebnih za pripremu kemijski djelomično definirane podloge za uzgoj bakterijskog soja.

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
saharoza	$C_{12}H_{22}O_{11}$	p.a.	Gram-mol, Hrvatska
kvašćev ekstrakt	-	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
kalijev dihidrogen fosfat	$KH_2PO_4$	tehnički	Kemika, Hrvatska
magnezijev sulfat heptahidrat	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	p.a.	Kemika, Hrvatska
manganov sulfat monohidrat	$MnSO_4 \cdot H_2O$	p.a.	Merck, Njemačka
željezov sulfat heptahidrat	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	p.a.	Kemika, Hrvatska
tiamin-hidroklorid	$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$	p.a.	Merck, Njemačka
natrijev L-askorbat	$C_6H_2NaO_6$	p.a.	Merck, Njemačka

**Tablica 2.** Porijeklo i čistoća kemikalija potrebnih za pripremu reakcijske smjese za sintezu  $\alpha$ -glukozi-glicerola.

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
saharoza	$C_{12}H_{22}O_{11}$	p.a.	Gram-mol, Hrvatska
glicerol	$C_3H_8O_3$	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Kemika, Hrvatska

**Tablica 3.** Porijeklo i čistoća kemikalija potrebnih za pripremu uzoraka i za analizu pripremljenih uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (engl. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC).

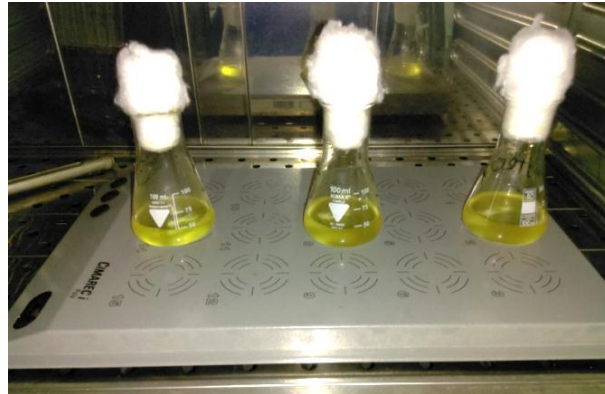
kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
cinkov sulfat heptahidrat	$ZnSO_4 \cdot 5 H_2O$	p.a.	Merck, Njemačka
sumporna kiselina	$H_2SO_4$	p.a. za HPLC	Fluka, Njemačka

**Tablica 4.** Porijeklo i čistoća preostale kemikalije koja je korištena u eksperimentima.

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

### 3.1.4. Uređaji

#### 3.1.4.1. Magnetska miješalica



**Slika 3.** Magnetska miješalica Cimarec and Poly (Multipoint Stirrer, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) na kojoj je uzgajan bakterijski soj u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi u Erlenmeyerovim tikvicama od 100 mL pri brzini okretaja magnetića od 250 rpm.

#### 3.1.4.2. Centrifuga



**Slika 4.** Centrifuga Centric 150 (Tehtnica, Železniki, Slovenija) za izdvajanje supernatanta od biomase bakterijskog soja iz uzoraka izdvojenih tijekom uzgoja *L. mesenteroides* LMG 7954 kao i za izdvajanje supernatanta od taloga tijekom pripreme uzoraka za analizu HPLC metodom. Izuzeti uzorci centrifugirani su kroz 5 min pri  $13\,000 \cdot g$ . Izdvojeni supernatant spremljen je pri  $-20^{\circ}\text{C}$  do analize HPLC metodom.



*3.1.4.3. Spektrofotometar*



**Slika 5.** Spektrofotometar Helios Epsilon (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), koji je korišten za određivanje optičke gustoće suspenzije (*OD*) pri valnoj duljini svjetlosti ( $\lambda$ ) od 608 nm.

*3.1.4.4. Ultrazvučna kupelj*



**Slika 6.** Ultrazvučna kupelj Elmasonic P 300 H (Elma, Singen, Njemačka). Ova je ultrazvučna kupelj korištena u eksperimentima onako kako je to opisano u poglavlju 3.2.5.1.

### 3.1.4.5. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC)



**Slika 7.** Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC).

HPLC sustav SpectraSystem (Thermo Separation Products, Inc., Waltham, SAD) sastoji se od kvaterne gradijentne pumpe (P4000), sustava za otplinjavanje (SCM 1000), automatskog sustava za injektiranje uzoraka i grijača kolone (AS3000) te UV/Vis (UV2000), fluorescencijskog (FL3000) i refraktometrijskog (RI-150) detektora. Podaci se prikupljaju i obrađuju ChromQuest 5.0 softwareom (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD).

### 3.1.4.6. Ostala oprema

- termostat (ST-05, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska);
- ultrazvučna kupelj za pripremu (degaziranje) mobilne faze Sonorex TK 52 (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Njemačka; vrijeme otplinjavanja dva puta kroz 15 min pri frekvenciji od 35KHz);
- analitička vaga Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japan);
- autoklav Sutjeska (Jugoslavija);
- svjetlosni mikroskop Olympus CH20 (Olympus, Tokyo, Japan);
- filteri veličine pora 0,20  $\mu\text{m}$  (LLG-Syringe filters, nylon, 0,2  $\mu\text{m}$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD);
- standardni laboratorijski pribor;
- osobno računalo (operativni sustav MS Windows 7 Home, MS Office 2010).

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Priprema inokuluma za uzgoj bakterijskog soja u laboratorijskom mjerilu

Čista kultura soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 naciijepljena je u epruvetu sa sterilnom ohlađenom hranjivom MRS podlogom ( $V = 8,0-10,0$  mL; sastav podloge je prikazan u Tablici 5.) i ovako priređena suspenzija je inkubirana kroz narednih 12 sati u termostatu pri temperaturi od  $28^{\circ}\text{C}$ .

**Tablica 5.** Sastav MRS podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterijskog soja.

sastojak	$\gamma$ (g L <sup>-1</sup> ) ili *(mL L <sup>-1</sup> )
pepton	10,0
mesni ekstrakt	10,0
kvašćev ekstrakt	5,0
D-glukoza	20,0
Tween 80*	1,0
kalijev hidrogenfosfat	2,0
natrijev acetat trihidrat	0,50
triamonijev citrat	2,0
magnezijev sulfat heptahidrat	0,2
manganov sulfat monohidrat	0,050

3.2.2. Priprema kemijski djelomično definirane hranjive podloge za uzgoj bakterijskog soja u laboratorijskom mjerilu

Sastojci prikazani u Tablici 6. u odjeljku A odvagani su i otopljeni u odgovarajućem volumenu demineralizirane vode, kako bi njihova konačna koncentracija odgovarala koncentraciji prikazanoj u Tablici 6. Ovako priređena otopina sterilizirana je u autoklavu kroz 20 minuta pri 121°C.

Svježa otopina pripravljena je od sastojaka iz odjeljka B u Tablici 6. i sterilizirana filtracijom (filteri veličine pora 0,20 µm; LLG-Syringe filters, nylon, 0,2 µm, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD).

Nakon hlađenja sterilne otopine A, otopine A i B su pomiješane, kako bi se postigle koncentracije svih sastojaka kako je to opisano u radu Vandamme i sur. (1987).

**Tablica 6.** Sastav kemijski djelomično definirane podloge za uzgoj bakterijskog soja.

sastojak	$\gamma$ (g L <sup>-1</sup> )
odjeljak A	
saharoza	100,0
kvašćev ekstrakt	10,0
kalijev dihidrogenfosfat	10,0
odjeljak B	
magnezijev sulfat heptahidrat	0,4
manganov sulfat monohidrat	0,2
željezov sulfat heptahidrat	0,01
tiamin-hidroklorid	0,01
natrijev L-askorbat	0,05

3.2.3. Karakterizacija krivulje rasta i procjena specifične brzine rasta bakterijskog soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima uzgoja šaržnim postupkom u laboratorijskom mjerilu

U 100 mL kemijski djelomično definirane hranjive podloge u Erlenmeyerovim tikvicama (300 mL) nacijepljen je svježe uzgojen inokulum (5,0 mL inokuluma, udjel inokuluma 5 % vol/vol). Uzgoji su provedeni pri mikroaerofilnim uvjetima (bez miješanja) i aerobnim uvjetima (na magnetskoj mješalici pri brzini okretaja magnetića od 250 rpm) u termostatu pri temperaturi od  $28,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ . Porast bakterijske biomase praćen je izdvajanjem uzoraka u aseptičnim uvjetima u pravilnim vremenskim intervalima i određivanjem optičke gustoće ( $OD_{608}$ ) ovako izuzetih uzoraka, kako je to prikazano u poglavlju Rezultati. U izuzetim uzorcima praćena je i promjena pH vrijednosti suspenzije, koja je prema potrebi podešavana dodatkom otopine NaOH ( $c = 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) i održavana u rasponu vrijednosti između 4,0 i 5,0 pH jedinica.

3.2.4. Uzgoj bakterijskog soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 pri aerobnim uvjetima, permeabilizacija uzgojenih stanica i njihova fiziologija u smjesi saharoza:glicerol

Bakterijski soj *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 najprije je uzgojen u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi, kako je to opisano u poglavlju 3.2.3., i to do  $t = 4,0$  h uzgoja pri istovjetnim uvjetima, kako je to učinjeno prilikom karakterizacije krivulje rasta i procjene specifične brzine rasta ovog soja. Nakon toga, uzgojena suspenzija u aseptičnim uvjetima je prebačena u smjesu saharoza:glicerol. Ova smjesa sadržavala je sastojke u koncentracijama prikazanim u Tablici 7.

**Tablica 7.** Koncentracija saharoze i glicerola u reakcijskoj smjesi.

sastojak	$\gamma$ (g L <sup>-1</sup> )	$c$ (mol L <sup>-1</sup> )
saharoza	273,84	0,8
glicerol	184,19	2,0

Reakcijska smjesa ukupnog volumena 50 mL pripremljena je izuzimanjem alikvota bakterijske suspenzije i dodavanjam odgovarajućih volumena sterilnih i ohlađenih otopina saharoze i glicerola. U ovako priređenoj reakcijskoj smjesi praćen je daljnji rast bakterijskog soja u odabranim uvjetima (nakon  $t = 4,0$  h), kako je to prikazano u poglavlju Rezultati. Ovako provedeni uzgoji nanovo su priređeni kao kontrolni uzorci za eksperimente u kojima su stanice bakterijskog soja permeabilizirane dvjema odabranim metodama (poglavlja 3.2.5.1. i 3.2.5.2.).

### 3.2.5. Permeabilizacija stanica bakterijskog soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954

#### 3.2.5.1. Permeabilizacija stanica ultrazvučnom metodom

Reakcijska smjesa, koja je priređena u aseptičnim uvjetima od: (i) svježe uzgojene suspenzije stanica ovog bakterijskog soja u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,0$  h), (ii) otopine saharoze i (iii) otopine glicerola, kako je to opisano u poglavlju 3.2.4., povrgnuta je tretmanu ultrazvukom u ultrazvučnoj kupelji (poglavlje 3.1.4.4.). Priređena reakcijska smjesa tretirana je konstantno kroz 4,0 h pri temperaturi vode u kupelji 35°C, frekvenciji valova od 37 kHz i snazi ultrazvuka od 90 W. Nakon ukupno 4,0 h tretmana ultrazvukom, reakcijska smjesa je preko noći vraćena na magnetsku miješalicu (pH 4,0-5,0, 28,0±1,0°C, 250 rpm), a naredno jutro opet tretirana u ultrazvučnoj kupelji (35°C, 37 kHz, 90 W) kroz ukupno 2,5 h. Eksperiment je ukupno trajao 25,8 h.

### 3.2.5.2. Permeabilizacija stanica površinski aktivnim sredstvom - Tween-om-80

Osim fizikalne metode permeabilizacije stanica ove Gram-pozitivne bakterije (poglavlje 3.2.5.1.), eksperimentalno je utvrđen utjecaj kemijske metode - dodatka površinski aktivne tvari (Tween-80) na stanice bakterijskog soja *L. mesenteroides* LMG 7954.

Nakon uzgoja bakterijskog soja i priređivanja smjese saharoza:glicerol, priređena je reakcijska smjesa koja se sastojala od: (i) suspenzije bakterijskih stanica, (ii) saharoze, (iii) glicerola (vidi poglavlje 3.2.5.1.) i (iv) Tween-a-80. Odabrane su dvije koncentracije Tween-a-80 - 0,3% (vol/vol) i 0,5% (vol/vol). Utjecaj Tween-a-80 praćen je kroz narednih 20,0 h uzgoja bakterijskog soja na magnetskoj miješalici (pH 4,0-5,0,  $28,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ , 250 rpm). Reakcijska smjesa je preko noći ostavljena na magnetskoj miješalici te je kroz naredni dan nastavljeno praćenje utjecaja površinski aktivne tvari na fiziologiju stanica ovog soja u odabranim uvjetima. Eksperiment je ukupno trajao 24,0 h, od čega su bakterijske stanice bile izložene Tweenu-80 konstantno kroz ukupno 20,0 h (nakon  $t = 4,0$  h).

### 3.2.6. Razvoj metode za analizu izuzetih uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC)

U okviru ovog istraživanja optimirana je HPLC metoda kojom se kroz samo jednu analizu postigla identifikacija i određivanje koncentracije svih sastojaka supernatanata izuzetih i priređenih uzoraka. Ovdje je prije svega bilo potrebno: (a) odrediti koncentraciju saharoze tj. glukoze i fruktoze u vanstaničnom prostoru, zatim (b) potrošnju ovih triju izvora ugljika i energije (saharoze, glukoze i fruktoze), ali i fruktoze kao potencijalnog akceptora elektrona tijekom rasta *L. mesenteroides* LMG 7954 u odabranim uvjetima kao i (c) koncentraciju krajnjih proizvoda metabolizma (laktata, acetata i etanola) u vanstaničnom prostoru ovog heterofermentativnog soja. Osim toga, predviđena je aktivnost saharoza fosforilaze, pa smo ovom HPLC metodom planirali identificirati dodatni pik u kromatogramima uzoraka, kod kojih je eventualno došlo do reakcije sinteze  $\alpha$ -glukozilglicerola. Kako standard za ovaj spoj nije komercijalno dostupan, u ovom radu smo se oslonili na vrijeme zadržavanja (ili retencijsko vrijeme,  $t_R$ , min) ovog spoja s ukupno devet ugljikovih atoma, koji bi se trebao eluirati s ionsko-izmjenjivačke kolone nakon saharoze

(spoj sa dvanaest ugljikovih atoma) i prije glukoze (spoj sa šest ugljikovih atoma). U svim kontrolnim uzorcima istražena je mogućnost pojave ovog pika i sličan pik sa istovjetnim vremenom zadržavanja i bilo kakvog intenziteta većeg od bazne linije nije zamijećen.

Tijekom razvoja HPLC metode istražen je utjecaj brzine protoka mobilne faze ( $F = 0,1-0,6 \text{ mL min}^{-1}$ ), temperature grijača kolone ( $35^{\circ}-50^{\circ}\text{C}$ ) i tlaka u analitičkoj koloni, koji je održavan ispod 70,0 bar. Glavni kriterij pri odabiru kombinacije protoka mobilne faze, temperature grijača kolone i tlaka u analitičkoj koloni je bio odvajanje pikova na baznoj liniji i simetričan oblik pikova, od kojih se svaki eluirao unutar vremena od maksimalno 1,0 min.

### *3.2.6.1. Ionsko-izmjenjivačka tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti*

U ovom istraživanju korištena je ionsko-izmjenjivačka kolona MetaCarb 87H (Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD) dimenzija  $0,78 \cdot 30 \text{ cm}$  s kationskim punilom sa  $\text{H}^+$  ionima. Mobilna faza je bila  $0,01 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  uz protok od  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ , a prije analize je degazirana u ultrazvučnoj kupelji, kako je to već prije opisano (poglavlje 3.1.4.6.). Razdvajanje sastojaka priređenih uzoraka odvijalo se pri temperaturi grijača kolone od  $40^{\circ}\text{C}$ , a eluirani spojevi detektirani su fluorescencijskim i refraktometrijskim detektorom.

### 3.2.7. Analitičke metode

#### *3.2.7.1. Praćenje rasta bakterijske biomase*

Porast biomase bakterijskog soja *L. mesenteroides* LMG 7954, u svim odabranim uvjetima opisanim u ovom radu, praćen je određivanjem optičke gustoće ( $OD_{608}$ ) izuzete suspenzije pomoću spektrofotometra Helios Epsilon (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Mjerenje je provedeno tako da se je u pravilnim vremenskim intervalima u aseptičnim uvjetima izuzeo alikvot suspenzije ( $V \approx 3 \text{ mL}$ ). Uzorak i njegovo prvo decimalno razrjeđenje u sterilnoj demineraliziranoj vodi ( $10^{-1}$ ) preneseni su u staklene



kivete (promjer kiveta 10 mm; Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) i određena je njihova optička gustoća ( $OD_{608}$ ), upravo onako kako je to prikazano u poglavlju Rezultati.

Kao pokazatelj porasta stanica ove Gram-pozitivne bakterije i njezine fiziologije u odabranoj hranjivoj podlozi kao i u reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol visokog osmotskog tlaka, praćena je i pH vrijednost suspenzije. pH papirići su se koristili i to zbog očuvanja aseptičnih uvjeta (Macherey-Nagel, mjerno područje 1-14, rezolucija 1; (Anonymous,2018)). Nakon određivanja  $OD_{608}$ , nekoliko kapi suspenzije nanešeno je na pH papirić položen na staničevinu i, usporedbom nijansi na priloženoj pH skali, procijenjena je promjena boje papirića tj, pH vrijednost izuzete suspenzije.

### *3.2.7.2. Ionsko-izmjenjivačka tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC)*

#### *3.2.7.2.1. Priprema uzoraka za analizu*

Supernatant izuzetih uzoraka izdvojen je od bakterijske biomase centrifugiranjem (poglavlje 3.1.4.2.). Alikvotu supernatanta volumena 500,0  $\mu\text{L}$  dodano je 500,0  $\mu\text{L}$  otopine cinkovog sulfata heptahidrata ( $\gamma = 100,0 \text{ g L}^{-1}$ ) kako bi se istaložili proteini iz priređenog supernatanta. Dobivena smjesa je centrifugirana kroz 20 min pri  $13\,000 \cdot g$  (centrifuga Centric 150; Tehnica, Železniki, Slovenija). Izdvojeni je supernatant otpipetiran i tako odvojen od istaloženih sastojaka i neotopljenog cinkovog sulfata heptahidrata, koji je dodan u suvišku. Nakon toga, supernatant je profiltriran kroz filter veličine pora 0,20  $\mu\text{m}$  (LLG-Syringe filters, nylon, 0,2  $\mu\text{m}$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Dobiveni filtrat je razrijeđen demineraliziranom vodom i analiziran HPLC metodom.

#### *3.2.7.2.2. Analiza priređenih uzoraka HPLC metodom*

Prije analize priređenih uzoraka priređene su otopine standarda i analizirane optimiranom HPLC metodom, kako je to opisano u Tablici 8. u poglavlju 3.2.7.2.3. Nakon toga svi priređeni uzorci su razrijeđeni demineraliziranom vodom, preneseni u vijale i postavljeni u automatski sustav za injektiranje uzorka. Načinjena je sekvenca s prikladnim brojem uzorkovanja. Kod uzoraka kod koji su dobiveni neodgovarajući kromatogrami s previsokim intenzitetom pikova, ovi su uzorci još razrijeđeni i HPLC analiza je ponovljena.

### 3.2.7.2.3. Izrada baždarnih dijagrama

Određeno je retencijsko vrijeme (vrijeme zadržavanja,  $t_R$ , min) i izrađeni su baždarni dijagrami za: saharozu, glukozu, fruktozu, oba stereoizomera (D- i L-) mliječne kiseline, glicerola, octene kiseline i etanola. Pripremljene su otopine ovih spojeva u pet različitih koncentracija (Tablica 8.) i analizirane HPLC metodom. Baždarni dijagrami za svaki spoj izrađeni su na temelju vremena zadržavanja svakog spoja ( $t_R$ , min), koncentracije injektirane otopine ( $\gamma$ , g L<sup>-1</sup>) i površine ispod eluiranog pika ( $A$ , mV<sup>2</sup>). Dobivene jednadžbe pravaca korištene su pri procjeni koncentracije sastojaka uzoraka koji su analizirani optimiranom HPLC metodom (Tablica 9.). Vrijednosti za koncentraciju svakog sastojka priređenog uzorka korigirane su s obzirom na razrjeđenje analiziranih uzoraka.

**Tablica 8.** Koncentracije spojeva u otopinama za izradu baždarnih dijagrama.

R. br.	koncentracija (g L <sup>-1</sup> )						
	Saharoza	glukoza	Fruktoza	mliječna kiselina	glicerol	octena kiselina	etanol
1.	0,10	0,13	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13
2.	0,20	0,27**	0,60	0,61	0,60	0,33	0,33
3.	0,50	0,27**	1,20	1,23	1,20	0,63	0,63
4.	1,00	2,00	4,00	4,00	4,00	0,95	0,95
5.	5,00	4,00	5,71	5,71	5,71	6,67	6,67

\*\*dvije otopine s istovjetnom koncentracijom glukoze zasebno su analizirane kako bi se utvrdila ponovljivost HPLC metode.

**Tablica 9.** Vrijeme zadržavanja i jednadžbe baždarnih pravaca za određene sastojke hranjivih podloga i reakcijskih smjesa.

sastojak	$t_R$ (min)	jednadžba baždarnog pravca	$R^2$ (-)
saharoza	4,61	$A = 543\,181 \cdot \gamma + 49\,437$	0,9993
glukoza	5,29	$A = 1\,000\,000 \cdot \gamma - 52\,735$	0,9997
fruktoza	5,69	$A = 1\,000\,000 \cdot \gamma - 52\,266$	0,9981
L-mliječna kiselina	6,81	$A = 157\,769 \cdot \gamma - 16\,836$	0,9984
D-mliječna kiselina	7,20	$A = 411\,185 \cdot \gamma - 55\,517$	0,9977
ukupna mliječna kiselina	-	$A = 568\,953 \cdot \gamma - 72\,353$	0,9979
glicerol	7,37	$A = 1\,000\,000 \cdot \gamma - 119\,014$	0,9985
octena kiselina	8,47	$A = 499\,532 \cdot \gamma + 105\,410$	0,9968
etanol	11,26	$A = 379\,046 \cdot \gamma + 31\,856$	0,9964

Osim ovdje opisanih  $t_R$ , određena su i vremena zadržavanja svih preostalih sastojaka hranjivih podloga, kako bi se utvrdila moguća interferencija sa drugim sastojcima i krajnjim proizvodima metabolizma bakterijskog soja *L. mesenteroides* LMG 7954 u odabranim uvjetima. Tako su HPLC metodom analizirane otopine: peptona, mesnog ekstrakta, kvašćevog ekstrakta, Tween-a-80 i različitih soli ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $CH_3COONa \cdot 3 H_2O$ , triamonijeva citrata,  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , tiamin-HCl, natrijev L-askorbat). Analitički je utvrđeno da pobrojani sastojci ne interferiraju sa sastojcima hranjive podloge ili suspenzije, koji su prikazani u gornjoj tablici, kao ni krajnjim proizvodima metabolizma ovog bakterijskog soja. Zbog toga podaci za ovdje pobrojene sastojke nisu prikazani u ovom radu.

### 3.2.8. Analiza eksperimentalno dobivenih podataka

#### 3.2.8.1. Procjena specifične brzine rasta bakterije *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954

Vrijednosti spektrofotometrijski određene optičke gustoće suspenzije stanica ( $OD_{608}$ ) i to samo tijekom eksponencijalne faze rasta su linearizirane i grafički prikazane u ovisnosti o vremenu uzgoja ( $t$ ). Specifična brzina rasta ( $\mu$ ) bakterijskog soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 odgovara koeficijentu smjera pravca.

Nelinearizirani matematički izraz ovisnosti  $OD_{608}$  ( $X$ ) o vremenu ( $t$ ) opisan je jednadžbom [1], koja nakon linearizacije poprima oblik jednadžbe [2] (Doran, 1995).

$$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad [1]$$

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu \cdot t \quad [2]$$

gdje je:

$X$  - optička gustoća uzorka ( $OD_{608}$ ) u vremenu  $t$ ;

$X_0$  - optička gustoća uzorka ( $OD_{608}$ ) u vremenu  $t = 0,0$  h;

$\mu$  - nagib pravca tj. specifična brzina rasta [ $\text{h}^{-1}$ ] soja u odabranim uvjetima;

$t$  - vrijeme proteklo od početka uzgoja do vremena izuzimanja uzorka [h].

Grafički prikazi procjene specifične brzine rasta ( $\mu$ ) ovog soja pri različitim eksperimentalnim uvjetima dani su u poglavlju 7. Prilozi.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Jedan od primarnih ciljeva ovog diplomskog rada je bio okarakterizirati krivulju rasta i procijeniti specifičnu brzinu rasta ( $\mu$ ) bakterijskog soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima šaržnog uzgoja u laboratorijskom mjerilu (poglavlje 4.1.). Fiziologija ovog (navodno) heterofermentativnog soja bakterija mliječne kiseline (Holzapfel i sur., 2009) nije istražena i ovi osnovni podaci, kao što je utjecaj koncentracije otopljenog kisika na rast i aktivnost bakterijskih stanica, nisu dostupni u znanstvenoj literaturi. Dobiveni podaci i biokinetički parametri bili su polazište za daljnje eksperimente, kako je to opisano nadalje u ovom radu. Tako je jedan od narednih ciljeva ovog istraživanja bio utvrditi utjecaj smjese saharoze i glicerola pri njihovim relativno visokim početnim koncentracijama (redom  $c = 0,8 \text{ mol L}^{-1}$  i  $c = 2,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) na rast i aktivnost ovog bakterijskog soja. Nadalje, bilo je potrebo utvrditi utjecaj permeabilizacije stanica *L. mesenteroides* LMG 7954 u smjesi saharoze i glicerola na preživljavanje i aktivnost ovog soja u odabranim fiziološkim uvjetima. U tu svrhu odabrana je jedna fizikalna metoda permeabilizacije bakterijskih stanica poraslih do sredine eksponencijalne faze rasta - tretman ultrazvukom (poglavlje 4.2.1.), kao i jedna kemijska metoda za permeabilizaciju bakterijskih stanica poraslih do sredine eksponencijalne faze rasta - tretman površinski aktivnom tvari Tween-80 (poglavlje 4.2.2.).

Fiziološke karakteristike ovog bakterijskog soja također su slabo istražene i opisane u literaturi. Stoga je jedan od ciljeva ovog rada bio okarakterizirati metabolizam ugljikohidrata (glukoze iz hranjive MRS podloge, zatim saharoze iz kemijski djelomično definirane podloge i smjese saharoza:glicerol), ali i glicerola iz ove smjese (poglavlja 4.2.1.1. i 4.2.2.1.). Tako bi se dobio uvid o mogućnostima eventualne industrijske primjene soja *L. mesenteroides* LMG 7954.

Sukladno literaturnim podacima (Goedl i sur., 2007; Kawasaki i sur., 1996; Koga i sur., 1991; Lee i sur., 2006), određene *L. mesenteroides* vrste iskazuju aktivnost saharoza fosforilaze (EC 2.4.1.7.). Ovaj citoplazmatski enzim se u svom pročišćenom obliku industrijski primjenjuje u proizvodnji  $\alpha$ -glukozi-glicerola. U ovim istraživanjima planiralo se utvrditi mogućnost primjene permeabiliziranih stanica soja *L. mesenteroides* LMG 7954 u proizvodnji ovog visokovrijednog spoja, koji se primarno koristi u kozmetičkoj industriji. Zbog toga samo razvili i optimirali novu HPLC metodu kojom smo, tijekom samo jedne

analize, identificirali i odredili sve sastojke priređenih uzoraka (supstrate i krajnje proizvode metabolizma bakterijskog soja) i utvrdili mogućnost proizvodnje  $\alpha$ -glukozilglicerola u odabranim uvjetima. Kako standard za ovaj spoj nije komercijalno dostupan, tijekom razvoja i optimiranja ove HPLC metode odredili smo vremena zadržavanja svih spojeva i drugih sastojaka hranjivih podloga i reakcijskih smjesa (smjesa saharoza:glicerol i smjesa saharoza:glicerol:Tween-80), koje smo koristili u istraživanjima. S obzirom na sve provedene eksperimente i postavke HPLC metode, sa velikom sigurnošću možemo tvrditi da ova bakterija posjeduje aktivnost saharoza fosforilaze, kako je to pokazano u poglavlju Rezultati i rasprava. Međutim, samo se nakon izolacije, pročišćavanja i detekcije proizvedenog spoja ( $\alpha$ -glukozilglicerola) može tvrditi da je proizvedeni spoj upravo  $\alpha$ -glukozilglicerol.

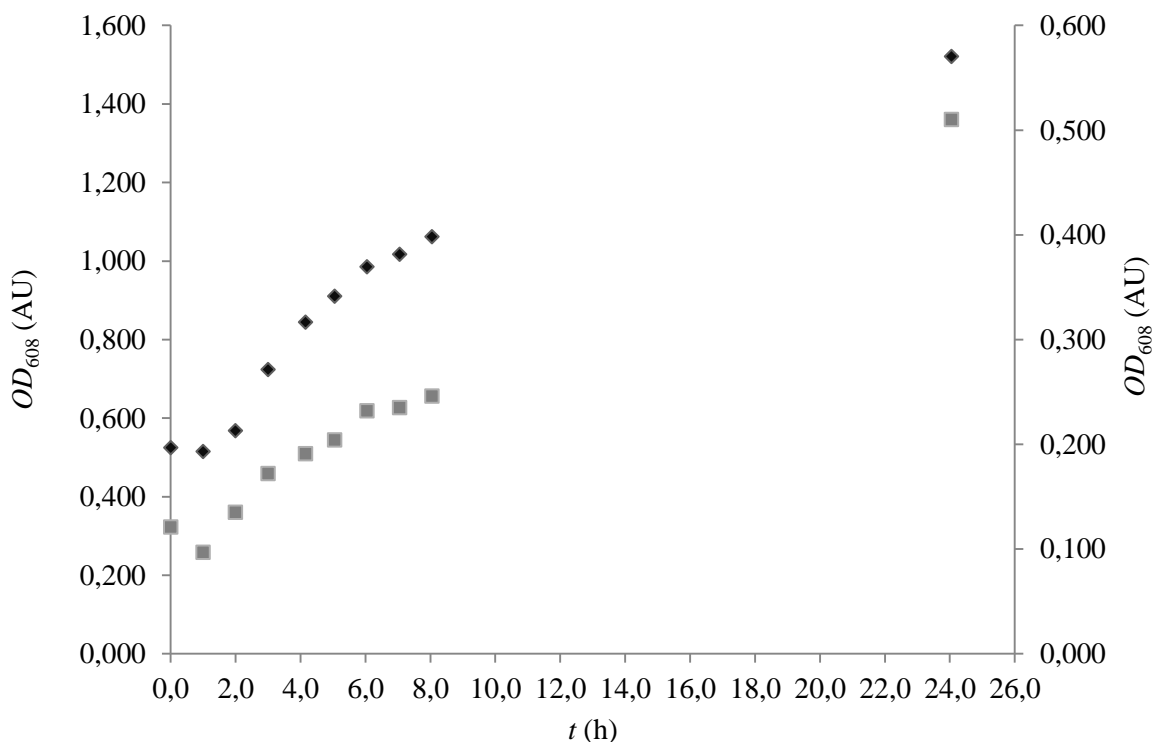
Ovo je istraživanje značajna nadogradnja prethodnom istraživanju (Vučenović, 2018), ali i izvrstan temelj za daljnja istraživanja u ovoj istraživačkoj grupi.

#### **4.1. KARAKTERIZACIJA KRIVULJE RASTA I PROCJENA SPECIFIČNE BRZINE RASTA BAKTERIJSKOG SOJA *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 PRI MIKROAEROFILNIM I AEROBNIM UVJETIMA UZGOJA ŠARŽNIM POSTUPKOM U LABORATORIJSKOM MJERILU**

U ovom poglavlju prikazana je krivulja rasta bakterijskog soja *L. mesenteroides* LMG 7954 pri mikroaerofilnim (Slika 8.) i aerobnim uvjetima (Slika 9.) uzgoja šaržnim postupkom u laboratorijskom mjerilu pri konstantnoj temperaturi i uz opadanje pH vrijednosti suspenzije (Slika 10.).

U Tablici 10. procijenjeno je vrijeme trajanja lag faze rasta (faza prilagodbe) i eksponencijalne faze rasta bakterijskog soja pri odabranim uvjetima. Iz eksperimentalnih podataka procijenjene su vrijednosti za specifičnu brzinu rasta ( $\mu$ ) *L. mesenteroides* LMG 7954 pri opisanim uvjetima.

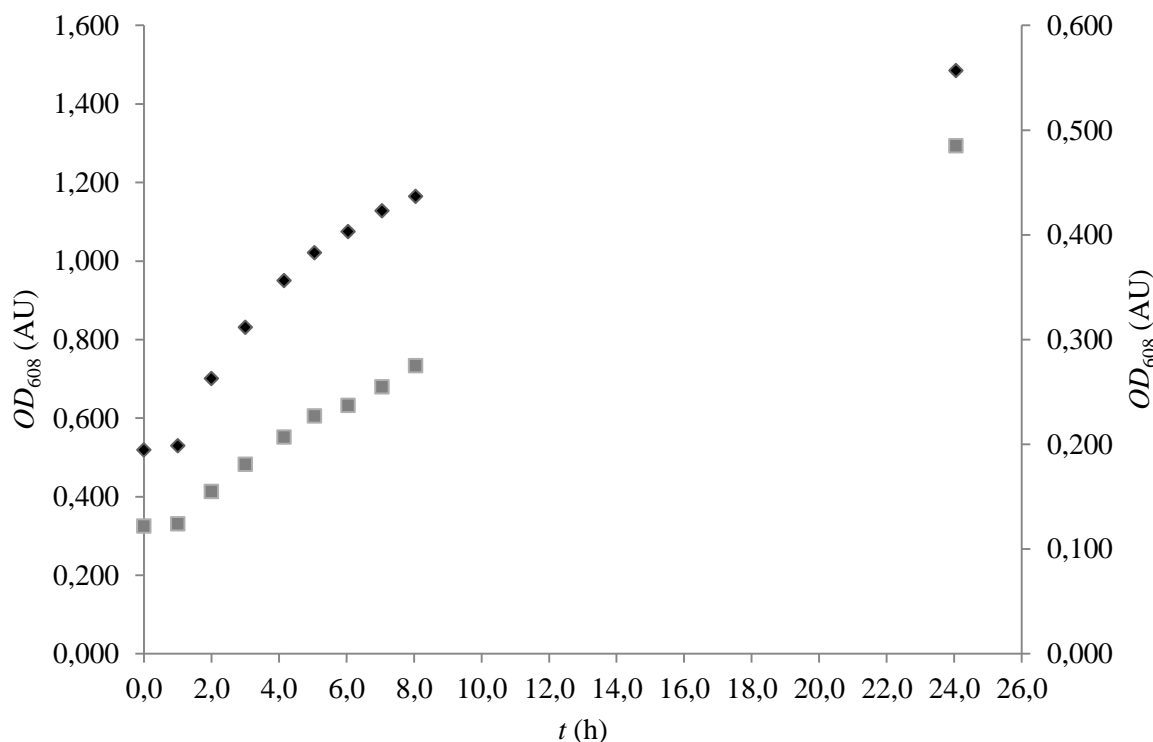
Ovdje opisane eksperimentalne vrijednosti bile su temelj za planiranje eksperimenata permeabilizacije stanica (poglavlje 4.2.).



**Slika 8.** Promjena optičke gustoće ( $OD_{608}$ ) suspenzije (◆, lijeva y-os) tijekom uzgoja bakterijskog soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi pri mikroaerofilnim uvjetima i prvog razrjeđenja ove suspenzije ( $10^{-1}$ , ■, desna y-os).

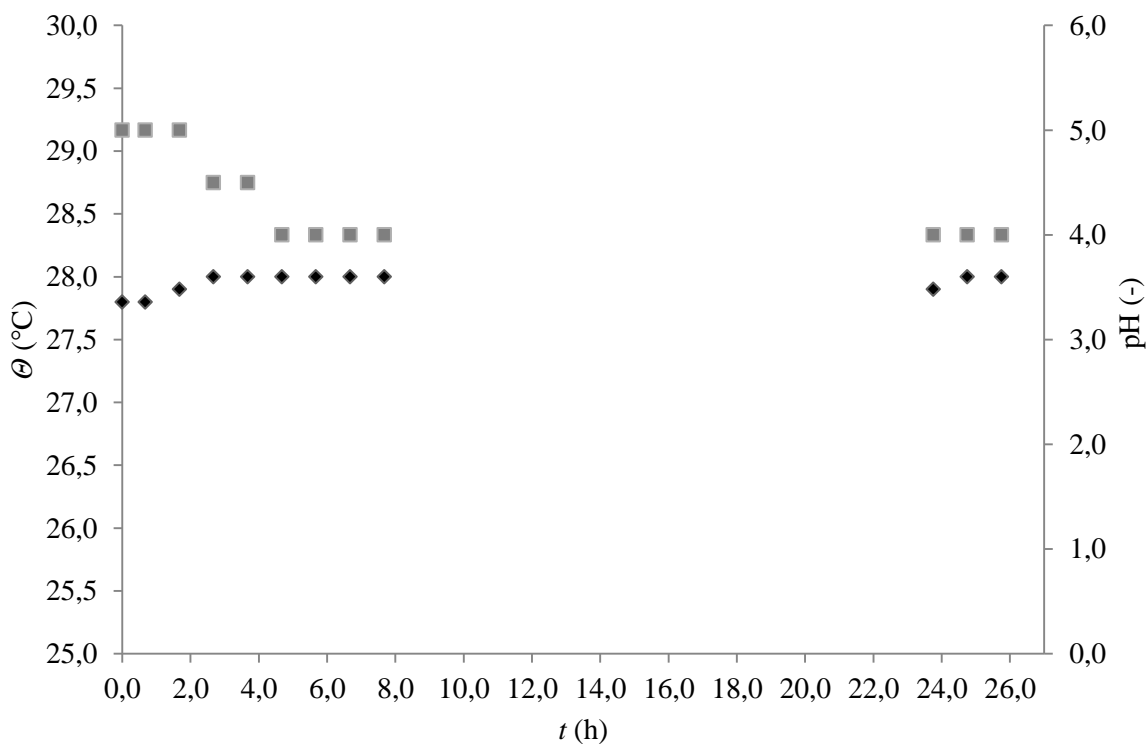
Na temelju eksperimentalnih podataka (Slika 8.) može se zaključiti da vrijednosti za  $OD_{608}$  za suspenziju i njezino prvo decimalno razrjeđenje ( $10^{-1}$ ) ne pokazuju linearnu međuovisnost, kao što je i očekivano s obzirom da se radi o bakteriji mliječne kiseline i njezinom karakterističnom rastu u nakupinama. Ovo je bio glavni razlog zašto ovo istraživanje nije dodatno prošireno eksperimentima s određivanjem suhe tvari bakterijske biomase i brojem poraslih kolonija bakterijskog soja na odgovarajućoj čvrstoj hranjivoj (MRS) podlozi.





**Slika 9.** Promjena optičke gustoće ( $OD_{608}$ ) suspenzije (♦, lijeva y-os) tijekom uzgoja bakterijskog soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi pri aerobnim uvjetima i prvog razrjeđenja ove suspenzije ( $10^{-1}$ , ■, desna y-os).

Usporede li se prve dvije slike u ovom poglavlju (Slika 8. i 9.), može se zaključiti da ovaj bakterijski soj raste slično pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima. Dakle, kisik nema negativan utjecaj na porast biomase tj. energetski metabolizam u stanicama *L. mesenteroides* LMG 7954, kako se u određenom broju znanstvenih radova opisuje. Novija istraživanja, npr. ona Nevesa i sur. (2005), ukazuju na važnu ulogu kisika kao krajnjeg akceptora elektrona u reakcijama reoksidacije reduciranih kofaktora. Reoksidacija kofaktora uz kisik kao krajnji akceptor elektrona smatra se učinkovitijom od drugih redukcijско-oksidacijskih reakcija u kojima se odvija reoksidacija kofaktora, kako je to opisano u Teorijskom dijelu ovog rada.



**Slika 10.** Promjena temperature ( $\theta$ ;  $\blacklozen$ ) i pH vrijednosti suspenzije (pH,  $\blacksquare$ ) tijekom aerobnog uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi pri aerobnim uvjetima.

Vrlo slične vrijednosti za temperaturu i pH vrijednost suspenzije određene su i kod uzgoja ovog soja pri mikroaerofilnim uvjetima, pa stoga nisu nanovo prikazane.

**Tablica 10.** Trajanje faza rasta bakterijskog soja *L. mesenteroides* LMG 7954 tijekom uzgoja u kemijski djelomično definiranoj podlozi (Vandamme i sur., 1987) pri temperaturi od  $28,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ , pH vrijednosti između 4,0 i 5,0 pH jedinica i različitim koncentracijama otopljenog kisika (mikroaerofilni i aerobni uvjeti uzgoja šaržnim postupkom).

uvjeti uzgoja		
	mikroaerofilni	aerobni
faza rasta	<i>t</i> (h)	
lag (faza prilagodbe)	2,0	1,0
eksponecijalna	3,0	3,0

Procjena trajanja dviju faza rasta načinjene su na temelju eksperimentalnih podataka  $OD_{608}$  za izuzetu suspenziju (Slike 8. i 9.). Eksperimentalni podaci dobiveni za  $OD_{608}$  za prvo razrjeđenje suspenzije ( $10^{-1}$ ) nisu uzeti u obzir, jer je iz dobivenih podataka teško razlučiti trajanje faza rasta ovog soja (Slike 8. i 9.).

Iz vrijednosti koje su prikazane u Tablici 10. može se zaključiti da kisik povoljno utječe na rast tj. na prelazak iz lag faze rasta (faze prilagodbe na drugu hranjivu podlogu, suspenzija je precijepljena iz hranjive MRS podloge u kemijski djelomično definiranu hranjivu podlogu) u ekspancijalnu fazu rasta soja *L. mesenteroides* LMG 7954. Pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima ekspancijalna faza rasta ovog soja traje relativno kratko (3,0 h) i vrlo brzo (samo nakon 5,0 h odnosno 4,0 h od prebacivanja iz hranjive MRS podloge u kemijski djelomično definiranu hranjivu podlogu) stanice ulaze u stacionarnu fazu rasta. Zanimljivo je da je u oba slučaja značajni pad pH vrijednosti suspenzije zabilježen već nakon 2,0 h uzgoja, dakle, odmah na početku ekspancijalne faze rasta (Slika 10.). Pri tome je važno napomenuti da je najniža pH vrijednost suspenzije pri kraju obaju uzgoja šaržnim postupkom ( $t > 24,0$  h) iznosila 4,0 pH jedinice. Dakle, proizvodnja visokih koncentracija mliječne i/ili octene kiseline s pomoću ovog soja u odabranim uvjetima ne može se očekivati.

**Tablica 11.** Procijenjena vrijednosti za specifičnu brzinu rasta ( $\mu$ ) bakterijskog soja *L. mesenteroides* LMG 7954 tijekom uzgoja u kemijski djelomično definiranoj podlozi (Vandamme i sur., 1987) pri temperaturi od  $28,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ , pH vrijednosti između 4,0 i 5,0 pH jedinica i različitim koncentracijama otopljenog kisika (mikroaerofilni i aerobni uvjeti uzgoja šaržnim postupkom).

uzorak	uvjeti uzgoja	
	mikroaerofilni	aerobni
	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	
suspenzija ( $10^0$ )	0,113	0,141
prvo decimalno razrjeđenje suspenzije ( $10^{-1}$ )	0,103	0,134

Procijenjena specifične brzine rasta ( $\mu$ ) načinjena je na temelju eksperimentalnih podataka  $OD_{608}$  za izuzetu suspenziju ( $10^0$ ) kao i za prvo razrjeđenje izuzete suspenzije ( $10^{-1}$ ) kako bi se pobliže okarakterizirao ovaj biokinetički parametar i to iz što više eksperimentalnih podataka. Grafički prikazi za procjenu specifične brzina rasta ( $\mu$ ) prikazani su u poglavlju 7. Prilozi (Slike 26. i 27.).

Šaržni uzgoji bakterijskog soja *L. mesenteroides* LMG 7954 pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima ponovljeni su tri puta. Rezultati prikazani u ovom radu predstavljaju srednje vrijednosti eksperimentalnih podataka, koji su dobiveni tijekom ova tri uzgoja, a koja su provedeni u istovjetnim i ponovljivim uvjetima, kako je to opisano u poglavlju Eksperimentalni dio.

Na temelju vrijednosti koje su procijenjene za ovaj biokinetički parametar može se zaključiti o povoljnom utjecaju kisika na rast bakterijske biomase ovog soja. Specifična brzina rasta *L. mesenteroides* LMG 7954 pri aerobnim uvjetima je za oko 30 % veća od vrijednosti procijenjene pri mikroaerofilnim uvjetima (Tablica 11.). Važno je napomenuti da se ove vrijednosti ( $\mu$ ) procijenjene za suspenziju ( $10^0$ ) kao i za prvo razrjeđenje izuzete suspenzije ( $10^{-1}$ ) pri istovjetnim uvjetima (mikroaerofilnim ili aerobnim) šaržnog uzgoja razlikuju za manje od oko 5 %, što je izvanredan rezultat s obzirom na karakterističan rast ove bakterije mliječne kiseline.

## 4.2. UZGOJ BAKTERIJSKOG SOJA *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 PRI AEROBNIM UVJETIMA, PERMEABILIZACIJA UZGOJENIH STANICA I NJIHOVA FIZIOLOGIJA U SMJESI SAHAROZA:GLICEROL

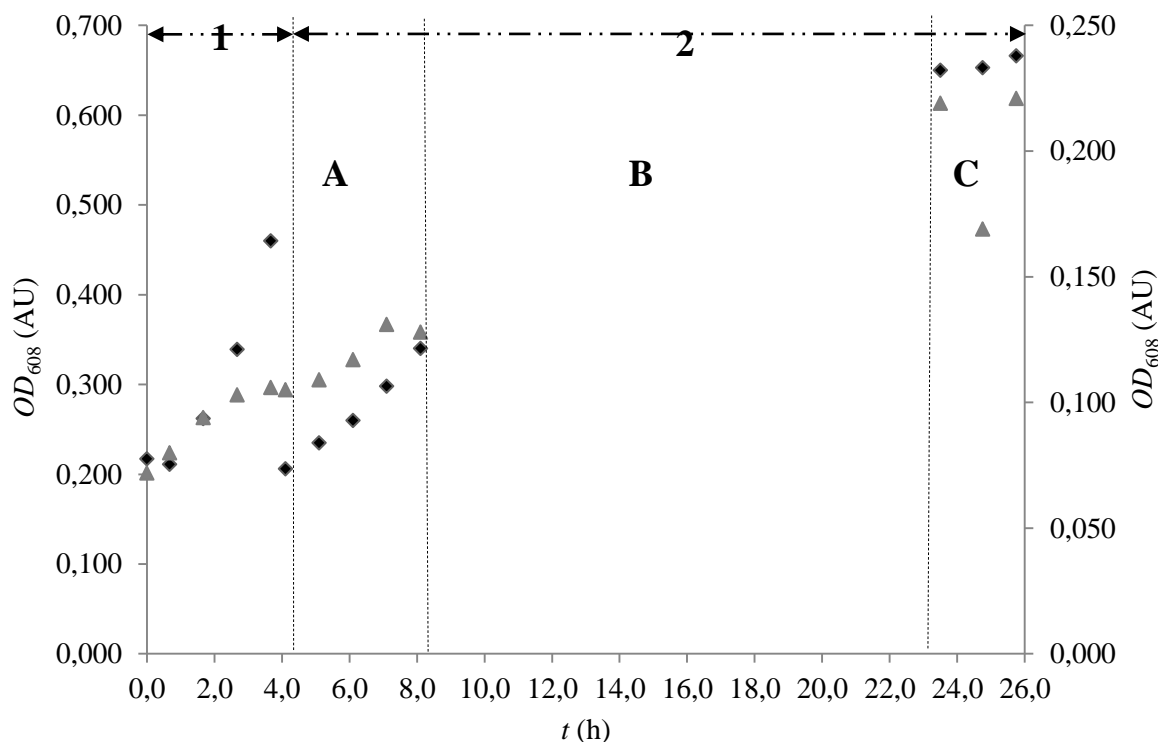
Nakon što je utvrđen povoljan utjecaj kisika na rast *L. mesenteroides* LMG 7954 u odabranim uvjetima (poglavlje 4.1.), planirani su daljnji eksperimenti, koji su svi redom provedeni pri aerobnim uvjetima.

Velika većina podataka o permeabilizaciji bakterijskih stanica iz znanstvene literaure opisuje postupke peremabilizacije stanica optimirane za Gram-negativne bakterije (Runyan i sur., 2006; Ananta i sur, 2005, Choi i sur., 2004). Kako nismo pronašli prikladne optimirane postupke permeabilizacije stanica Gram-pozitivnih bakterija, isplanirali smo primjenu dviju metoda za permeabilizaciju stanica *L. mesenteroides* LMG 7954, koje su prethodno porasle do sredine eksponencijalne faze rasta - fizikalnu i kemijsku metodu. Za fizikalnu metodu odabrana je blaga metoda tretmana ultrazvukom (35°C, 37 kHz, 90 W; poglavlje 4.2.1.), dok je za kemijsku metodu odabran tretman površinski aktivnom tvari - Tween-om-80 (0,3 i 0,5 % vol/vol; poglavlje 4.2.2.). U ovim poglavljima prikazani su rezultati HPLC analize odgovarajućih uzoraka, čime je zapravo opisan metabolizam supstrata tj. fiziologija ovog soja pri odabranim uvjetima kao i mogućnost proizvodnje  $\alpha$ -glukožilglicerola (poglavlja 4.2.1.1., i 4.2.2.1.1. i 4.2.2.2.1.).

#### 4.2.1. Permeabilizacija stanica ultrazvučnom metodom

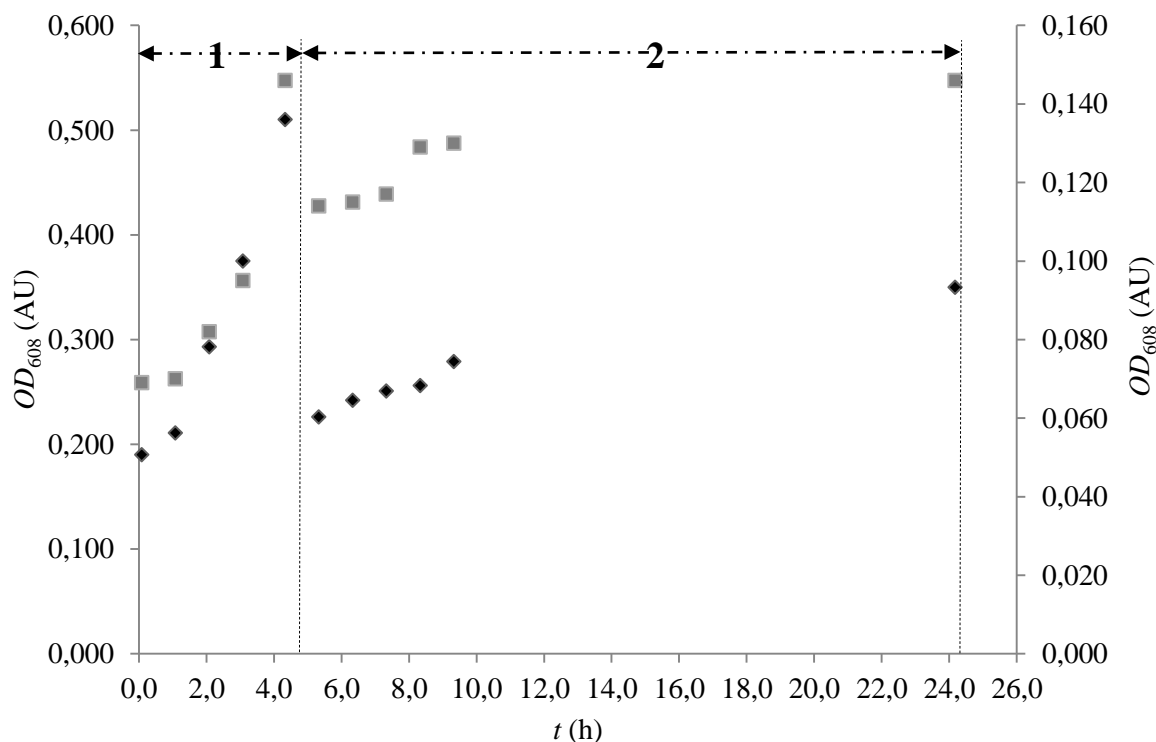
Nakon karakterizacije krivulje rasta i procjene specifične brzine rasta ( $\mu$ ) soja *L. mesenteroides* LMG 7954, provedeni su eksperimenti permeabilizacije stanica bakterijskog soja *L. mesenteroides* LMG 7954 najprije ultrazvučnom metodom (ovo poglavlje), a zatim kemijskom metodom (poglavlje 4.2.2.).

Suspenzija stanica bakterijskog soja je svježe uzgojena u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi do sredine eksponencijalne faze rasta ( $t = 4,0$  h), kako je već prije opisano (poglavlje 4.1.), a zatim je suspenzija prebačena u smjesu saharoza:glicerol ( $0,8 \text{ mol L}^{-1} : 2,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) i uzorci su tretirani u ultrazvučnoj kupelji (Elmasonic P 300 H; Elma, Singen, Njemačka) pri  $35^{\circ}\text{C}$ , frekvenciji ultrazvučnih valova od 37 kHz i snazi ultrazvuka od 90 W. Preko noći suspenzija stanica u smjesi saharoza:glicerol nije ostavljena u ultrazvučnoj kupelji zbog zagrijavanja uzorka, ali je naknadno tretirana naredno jutro kroz još 2,3 h, kako je to prikazano na Slici 11. Na ovoj slici prikazan je rast stanica bakterijskog soja, koje su tretirane ultrazvukom, dok je na Slici 12. prikazan porast bakterijske biomase u kontrolnom uzorku (bez tretmana ultrazvukom). Ovdje je zanimljivo da je došlo do jačeg zakiseljavanja suspenzije nakon tretmana ultrazvukom ( $\text{pH} \approx 3,0$ ; Slika 13.) nego u kontrolnom uzorku ( $\text{pH} \approx 3,-4,0$ ; eksperimentalni podaci nisu prikazani). U Tablici 12. prikazane su vrijednosti procijenjene za specifičnu brzinu rasta ( $\mu$ ) za stanice tretirane ultrazvukom i za kontrolni uzorak. Zbog karakterističnog rasta stanica soja *L. mesenteroides* LMG 7954 najprije u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi (eksponencijalna faza rasta 1), a zatim i u smjesi saharoza:glicerol (eksponencijalna faza rasta 2), procijenili smo dvije vrijednosti za  $\mu$ .



**Slika 11.** Rast bakterijske biomase ( $OD_{608}$ ; ◆, lijeva y-os) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-3,7$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol: tijekom tretmana ultrazvukom ( $t = 4,1-8,1$  h; 2A); zatim tijekom uzgoja na magnetskoj miješalici bez tretmana ultrazvukom ( $t = 8,1-23,5$  h; 2B) i tijekom ponovnog tretmana ultrazvukom ( $t = 23,5-25,8$  h, 2C). Vrijednosti za  $OD_{608}$  za prvo decimalno razrjeđenje ( $10^{-1}$ , ▲, desna y-os) prikazane su po istom principu.

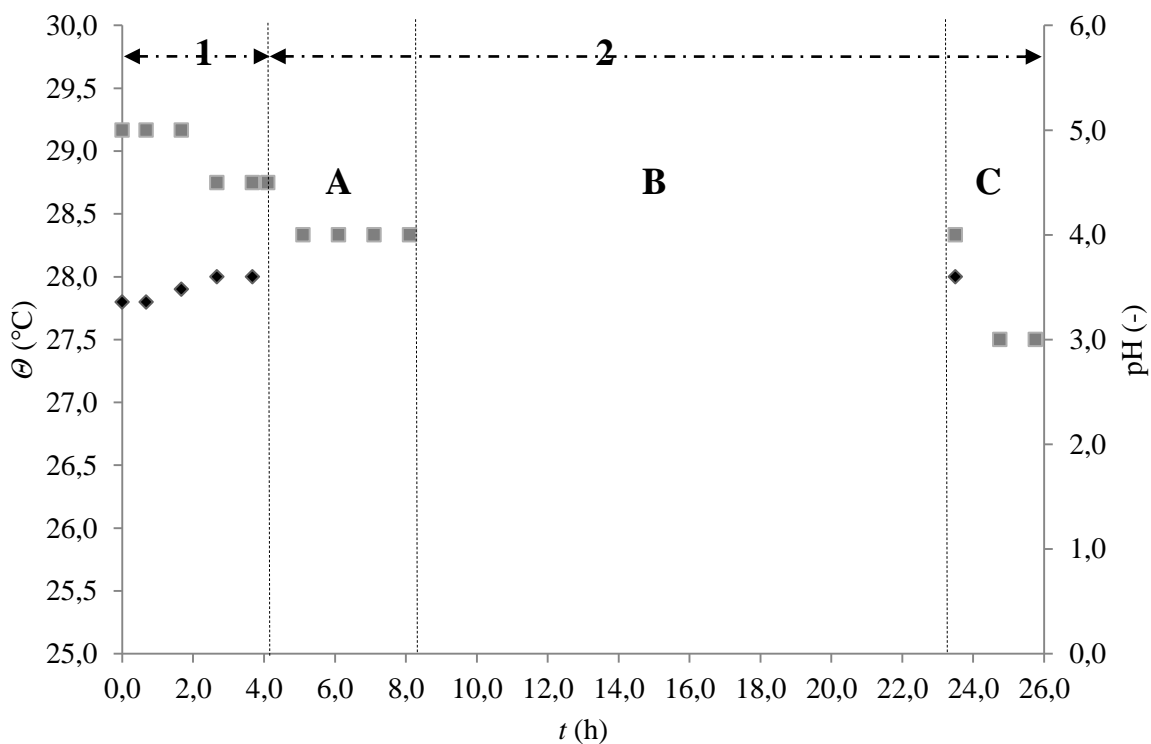
Nakon kratke lag faze ( $t = 1,0$  h) i eksponencijalnog rasta u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi (eksponencijalna faza rasta 1;  $t = 1,0-4,0$  h,  $\Delta t = 3,0$  h), ovaj soj se odmah prilagođava na uvjete u smjesi saharoza:glicerol bez lag faze rasta i opet počinje rasti eksponencijalnim trendom (eksponencijalna faza rasta 2;  $t = 4,1-8,1$  h,  $\Delta t = 4,0$  h). Opisani trend porasta biomase ukazuje na robusnost ovog bakterijskog soja u uvjetima visokog osmotskog tlaka. Zanimljivo je da u smjesi saharoza:glicerol nema karakteristične stacionarne faze rasta, kako je to opisano u preliminarnim eksperimentima karakterizacije krivulje rasta soja *L. mesenteroides* LMG 7954 (poglavlje 4.1.), već u ovim uvjetima, nakon tzv. eksponencijalne faze rasta 2 ( $t = 4,1-8,1$  h,  $\Delta t = 4,0$  h), soj nastavlja rasti linearnim trendom ( $t = 23,5-25,8$  h, 2C).



**Slika 12.** Rast bakterijske biomase ( $OD_{608}$ ; ◆, lijeva y-os) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u kontrolnom uzorku u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,3$  h) i (2) reakcijskoj smjesi sahara: glicerol bez tretmana ultrazvukom ( $t = 4,3-24,2$  h). Vrijednosti za  $OD_{608}$  za prvo decimalno razrjeđenje ( $10^{-1}$ , ■, desna y-os) prikazane su po istom principu.

Za razliku od stanica tretiranih ultrazvukom (Slika 11.), stanice u kontrolnom uzorku nakon prebacivanja u smjesu sahara: glicerol ne rastu eksponencijalno, već bi se ovaj trend mogao opisati linearnim porastom bakterijske biomase (Slika 12.). Dakle, tretman ultrazvukom ima pozitivan učinak na porast bakterijske biomase soja *L. mesenteroides* LMG 7954.





**Slika 13.** Promjena temperature ( $\theta$ ;  $\blacklozenge$ ) i pH vrijednosti suspenzije (pH,  $\blacksquare$ ) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u: (1) u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-3,7$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol tijekom tretmana ultrazvukom ( $t = 4,1-8,1$  h; 2A); tijekom rasta na magnetskoj miješalici ( $t = 8,1-23,5$  h; 2B) i tijekom ponovnog tretmana ultrazvukom ( $t = 23,5-25,8$  h, 2C).

Zbog vrlo sličnih vrijednosti za temperaturu i pH vrijednost suspenzije, koje su eksperimentalno određene u uzorku tretiranom ultrazvukom i u kontrolnom uzorku (bez tretmana ultrazvukom), ove vrijednosti nisu zasebno (nanovo) prikazane.

**Tablica 12.** Procijenjene vrijednosti za specifičnu brzinu rasta ( $\mu$ ) bakterijskog soja *L. mesenteroides* LMG 7954 tijekom uzgoja u: (1) u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi (eksponencijalna faza 1;  $t = 1,7-3,7$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol tijekom tretmana ultrazvukom (eksponencijalna faza 2;  $t = 4,1-8,1$  h). Grafički prikaz procjene za specifične brzina rasta ( $\mu$ ) dan je u poglavlju 7. Prilozi (Slike 28. i 29.).

Smjesa		
	kemijski djelomično definirana hranjiva podloga (eksponencijalna faza 1)	saharoz:glicerol (eksponencijalna faza 2)
uzorak	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	
suspencija (10 <sup>0</sup> )	0,281	0,124
prvo decimalno razrjeđenje suspencije (10 <sup>-1</sup> )	0,181	0,074
kontrolni uzorak	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	
suspencija (10 <sup>0</sup> )	0,246	0,048
prvo decimalno razrjeđenje suspencije (10 <sup>-1</sup> )	0,222	0,047

Vrijednosti u Tablici 12. zorno prikazuju da se ovaj soj izvanredno prilagođava uvjetima u smjesi saharoza:glicerol i procijenjena  $\mu$  u ovoj smjesi visokog osmotskog tlaka ( $\mu = 0,124 \text{ h}^{-1}$ ) je vrlo slična vrijednosti procijenjenoj za kemijski djelomično definiranu hranjivu podlogu ( $\mu = 0,134\text{-}0,141 \text{ h}^{-1}$ , Tablica 11.) u kojoj je soj uzgajan bez tretmana ultrazvukom.

#### 4.2.1.1. Fiziologija soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 pri odabranim uvjetima

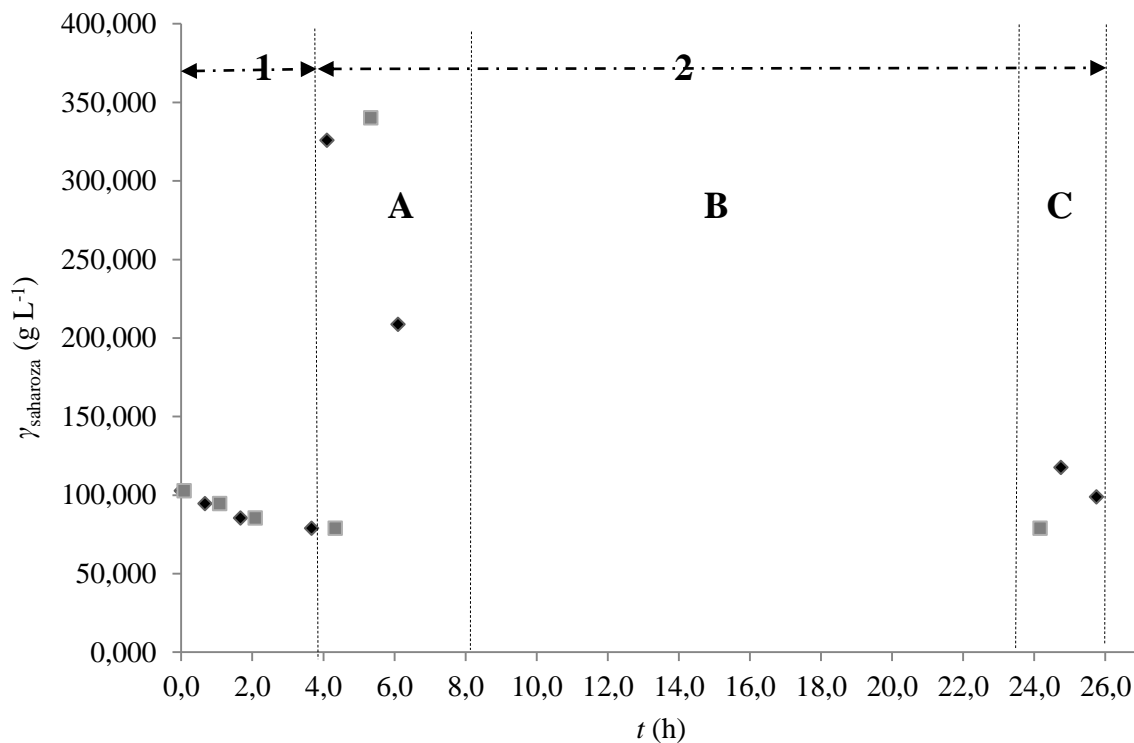
Razvijena je i optimirana HPLC metoda pomoću koje je određena koncentracija određenih relevantnih sastojaka nekih uzoraka i to kako bi se djelomično popratila fiziologija stanica ovog soja u odabranim uvjetima. Svi rezultati HPLC analize nisu prikazani u ovom radu.

U ovom poglavlju prikazana je promjena koncentracije saharoze (Slika 14.), kao izvora ugljika i energije za rast i održavanje stanica ovog bakterijskog soja, ali i kao donora glukoze u reakciji koju katalizira saharoza fosforilaza (transglukozilacija).

Promjena koncentracije glicerola prikazana je na Slici 15. Glicerol također može biti izvor ugljika i energije bakterijskim stanicama, a u smjesu je dodan prvenstveno kao akceptor glukoze u reakciji koju katalizira saharoza fosforilaza.

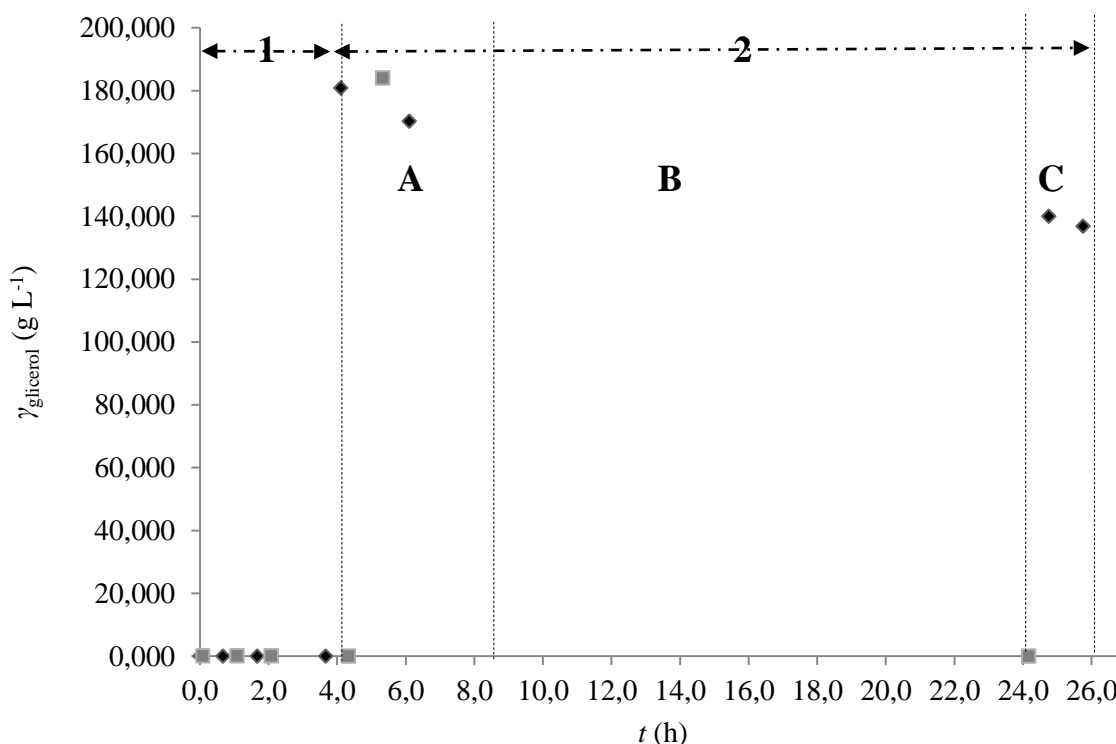
U Tablici 13. prikazane su promjene koncentracije: glukoze, fruktoze, D- i L-laktata kao i ukupnog laktata, zatim acetata i etanola. Promjena koncentracije glukoze ukazuje na hidrolizu saharoze i to u smislu potrošnje saharoze kao izvora ugljika i energije za rast i održavanje bakterijskog soja, ali i kao jednog od supstrata u reakciji transglukozilacije. Fruktoza nastala hidrolizom saharoze može biti izvor ugljika i energije, ali i akceptor elektrona u određenim metaboličkim reakcijama koje, sukladno literaturi, mogu provoditi bakterije mliječne kiseline. Mliječna kiselina, acetat i etanol, trebali bi biti krajnji proizvodi metabolizma ugljikohidrata (saharoze, glukoze i fruktoze) i eventualno glicerola (kao izvora ugljika) u stanicama *L. mesenteroides* LMG 7954.

Praćenjem svih pobrojanih koncentracija u izvjesnoj mjeri može se opisati fiziologija *L. mesenteroides* LMG 7954 u odabranim uvjetima.



**Slika 14.** Promjena koncentracije saharoze ( $\gamma_{\text{saharoza}}$ , ♦) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-3,7$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol: tijekom tretmana ultrazvukom ( $t = 4,1-8,1$  h; 2A); tijekom uzgoja na magnetskoj miješalici bez tretmana ultrazvukom ( $t = 8,1-23,5$  h; 2B) i tijekom ponovnog tretmana ultrazvukom ( $t = 23,5-25,8$  h, 2C). Vrijednosti za promjenu koncentracije saharoze u kontrolnom uzorku (bez tretmana ultrazvukom;  $\gamma_{\text{saharoza}}$ , ■) prikazane su po istom principu radi lakše usporedbe ovih vrijednosti.

Koncentracija saharoze opada u kemijski djelomično definiranoj podlozi (Slika 14., 1) od početnih  $102,736 \text{ g L}^{-1}$  ( $t = 0,0$  h) do  $78,876 \text{ g L}^{-1}$  ( $t = 4,1$  h). Nakon prebacivanja suspenzije u smjesu saharoza:glicerol =  $0,8 \text{ mol L}^{-1} : 2,0 \text{ mol L}^{-1}$  (Slika 14., 2) koncentracija saharoze također opada i to od visoke početne koncentracije od  $325,710 \text{ g L}^{-1}$  do  $98,788 \text{ g L}^{-1}$  do kraja uzgoja. Slične promjene zabilježene su kod kontrolnog uzorka. U ovom potonjem slučaju koncentracija saharoze smanjila se od početnih  $340,000 \text{ g L}^{-1}$  do  $78,876 \text{ g L}^{-1}$  na kraju uzgoja.



**Slika 15.** Promjena koncentracije glicerola ( $\gamma_{\text{glicerol}}$ , ◆) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-3,7$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol tijekom tretmana ultrazvukom ( $t = 4,1-8,1$  h; 2A); tijekom uzgoja na magnetskoj miješalici bez tretmana ultrazvukom ( $t = 8,1-23,5$  h; 2B) i tijekom ponovnog tretmana ultrazvukom ( $t = 23,5-25,8$  h, 2C). Vrijednosti za promjenu koncentracije glicerola u kontrolnom uzorku (bez tretmana ultrazvukom;  $\gamma_{\text{glicerol}}$ , ■) prikazane su po istom principu radi lakše usporedbe ovih vrijednosti.

Heterofermentativni soj *L. mesenteroides* LMG 7954 ne proizvodi glicerol u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi pri aerobnim uvjetima (1), kako je to utvrđeno HPLC analizom izuzetih uzoraka. Dakle, ovaj soj ne provodi heterofermentaciju, već se tijekom razgradnje saharoze iz kemijski djelomično definirane podloge proizvodi samo laktat. U smjesi saharoza: glicerol (2) koncentracija glicerola opada od početne  $180,859 \text{ g L}^{-1}$  do  $136,865 \text{ g L}^{-1}$  na kraju uzgoja. Dakle, glicerol se iz ove smjese s visokom početnom koncentracijom saharoze i glicerola troši, a za pretpostaviti je da se radi o reakciji transglukozilacije. Iznenađuje da koncentracija glicerola u kontrolnom uzorku pada od početnih  $184,000 \text{ g L}^{-1}$  do  $0,000 \text{ g L}^{-1}$ . Dakle, ovaj bakterijski soj može transportirati i metabolizirati glicerol kao izvor ugljika i energije.

**Tablica 13.** Promjena koncentracije glukoze, fruktoze, D- i L-laktata kao i ukupnog laktata, zatim acetata i etanola tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-3,7$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol: tijekom tretmana ultrazvukom ( $t = 4,1-8,1$  h); tijekom uzgoja na magnetskoj miješalici bez tretmana ultrazvukom ( $t = 8,1-23,5$  h) i tijekom ponovnog tretmana ultrazvukom ( $t = 23,5-25,8$  h). Vrijednosti za promjenu koncentracije saharoze u kontrolnom uzorku (bez tretmana ultrazvukom) prikazane su po istom principu radi lakše usporedbe ovih vrijednosti.

## A. Uzorak

$t$ (h)	$\gamma$ (g L <sup>-1</sup> )						
	glukoza	fruktoza	laktat			acetat	Etanol
			D-laktat	L-laktat	ukupni laktat		
0,0	2,478	2,211	0,107	0,095	0,201	0,000	0,000
0,7	3,459	3,334	0,107	1,265	1,372	0,000	0,000
1,7	2,957	2,984	0,107	1,210	1,317	0,000	0,000
3,7	6,964	6,818	0,107	6,207	6,314	0,215	0,000
4,1	15,374	13,770	0,107	0,135	0,242	11,715	0,000
6,1	7,387	6,456	0,107	0,135	0,242	0,000	0,000
24,8	11,870	12,909	0,107	0,135	0,242	9,516	1,453
25,8	14,600	13,107	0,107	0,135	0,242	12,078	5,583

## B. Kontrolni uzorak

$t$ (h)	$\gamma$ (g L <sup>-1</sup> )						
	glukoza	fruktoza	laktat			acetat	Etanol
			D-laktat	L-laktat	ukupni laktat		
0,0	6,478	6,211	0,107	1,895	0,201	0,000	0,672
1,1	3,459	3,334	0,107	1,265	1,372	0,000	0,000
2,1	2,957	2,984	0,107	1,210	1,317	0,000	0,000
4,3	6,964	6,818	0,107	6,207	6,314	0,215	0,000
24,2	6,964	6,818	0,107	6,207	6,314	0,215	0,000

Glukoza je detektirana u uzorku i kontrolnom uzorku tijekom cijelog uzgoja, ali u različitim koncentracijama od kojih su veće one kod stanica permeabiliziranih ultrazvukom (Tablica 13. A i B). Dakle soj *L. mesenteroides* LMG 7954 iskazuje aktivnost invertaze (EC 2.4.1.7.). Slično je i sa fruktozom kao proizvodom hidrolize saharoze (Tablica 13. A i B).

Ovaj soj proizvodi D- i L-laktat, međutim koncentracija proizvedenog laktata puno je veća u kontrolnom uzorku nego kod ultrazvukom permeabiliziranih stanica. Iz ovog bi se moglo zaključiti da ultrazvuk može utjecati na regulaciju metabolizma u stanicama ovog soja.

Acetat i etanol se kod uzgoja ultrazvukom permeabiliziranih stanica javljaju tek u linearnoj fazi rasta ( $t > 3,7$  h; Tablica 13. A i B). Tada je koncentracija saharoze u reakcijskoj smjesi vrlo visoka i permeabilizirane stanice, osim laktata, počinju proizvoditi acetat, a nešto kasnije i etanol. Proizvodnja acetata može se povezati s povećanim prinosom metaboličke energije (ATP), a etanol s reoksidacijom kofaktora.

U kontrolnom uzorku koncentracija proizvedenog acetata je značajno manja, dok etanol nije detektiran (Tablica 13. B).



Odmah na početku uzgoja *L. mesenteroides* LMG 7954 u smjesi saharoza:glicerol uz tretman ultrazvukom ( $t = 4,1$  h), analitički (HPLC metodom) je utvrđena pojava dodatnog pika (engl. shoulder) i to nakon eluiranja saharoze (spoj sa dvanaest ugljikovih atoma,  $t_R = 4,61$  min). Vrijeme zadržavanja ovog dodatnog pika ( $t_R = 4,83$  min) ne odgovara niti jednom sastojku hranjivih podloga, koje su korištene u ovom radu, kao ni krajnjim proizvodima metabolizma supstrata u stanicama soja *L. mesenteroides* LMG 7954. Kako se ovaj dodatni pik eluira između pika saharoze i pika glukoze (spoj sa šest ugljikovih atoma,  $t_R = 5,29$  min), prepostavili smo da bi to trebao biti spoj sa devet ugljikovih atoma, kao što je  $\alpha$ -glukozilglicerol ( $C_9H_{18}O_8$ ). Standard za  $\alpha$ -glukozilglicerol nije komercijalno dostupan i vrlo teško ga je pripremiti sintezom i to čistoće potrebne za HPLC analizu. Zbog svega pobrojanog nije bilo moguće HPLC metodom odrediti vrijeme zadržavanja ovog spoja tj. njegova standarda.

Osim toga, s obzirom na reakcije prikazane na Slici 1. u ovom diplomskom radu, teško je tumačiti promjenu koncentracije tj. površinu ispod ovog dodatnog pika ( $\alpha$ -glukozilglicerol). Dakle, povećanje ali i sniženje koncentracije ovog spoja rezultat je nekoliko reakcija (Slika 1.), a teže ih je popratiti u suspenziji permeabiliziranih stanica, gdje su supstrati za rast stanica soja *L. mesenteroides* LMG 7954 i supstrati i mogući proizvodi (povratnih) enzimskih reakcija.

**Tablica 14.** Promjena površine ( $A$ ,  $mV^2$ ) dodatnog pika ( $t_R = 4,83$  min) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-3,7$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol: tijekom tretmana ultrazvukom ( $t = 4,1-8,1$  h; 2A); tijekom uzgoja na magnetskoj miješalici bez tretmana ultrazvukom ( $t = 8,1-23,5$  h; 2B) i tijekom ponovnog tretmana ultrazvukom ( $t = 23,5-25,8$  h, 2C).

$t_{uzgoja}$ (h)	$A$ ( $mV^2$ )
4,1	1209053
6,1	410359
24,8	890013
25,8	786518

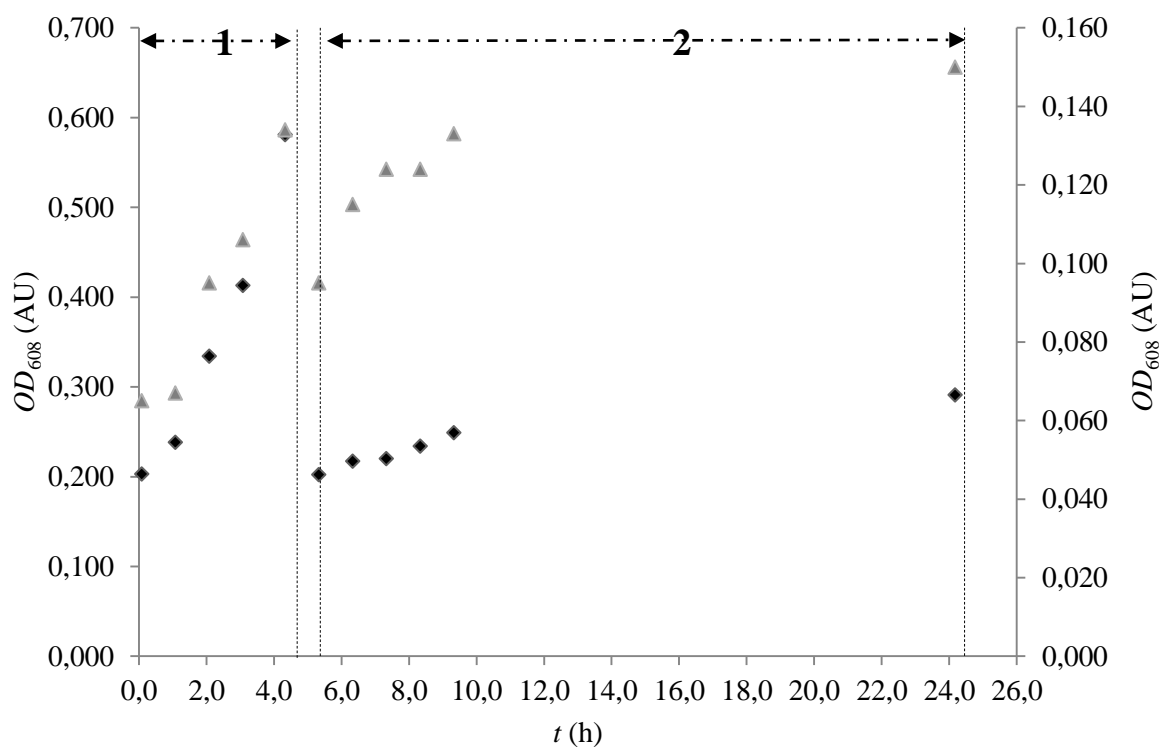
#### 4.2.2. Permeabilizacija stanica površinski aktivnim sredstvom - Tween-om-80

Osim fizikalnom metodom, istražena je mogućnost permeabilizacije stanica kemijskom metodom i to Tween-om-80. Odabrane su dvije koncentracije Tween-a-80 -0,3% (poglavlje 4.2.2.1.) i 0,5 % vol/vol (poglavlje 4.2.2.2.).

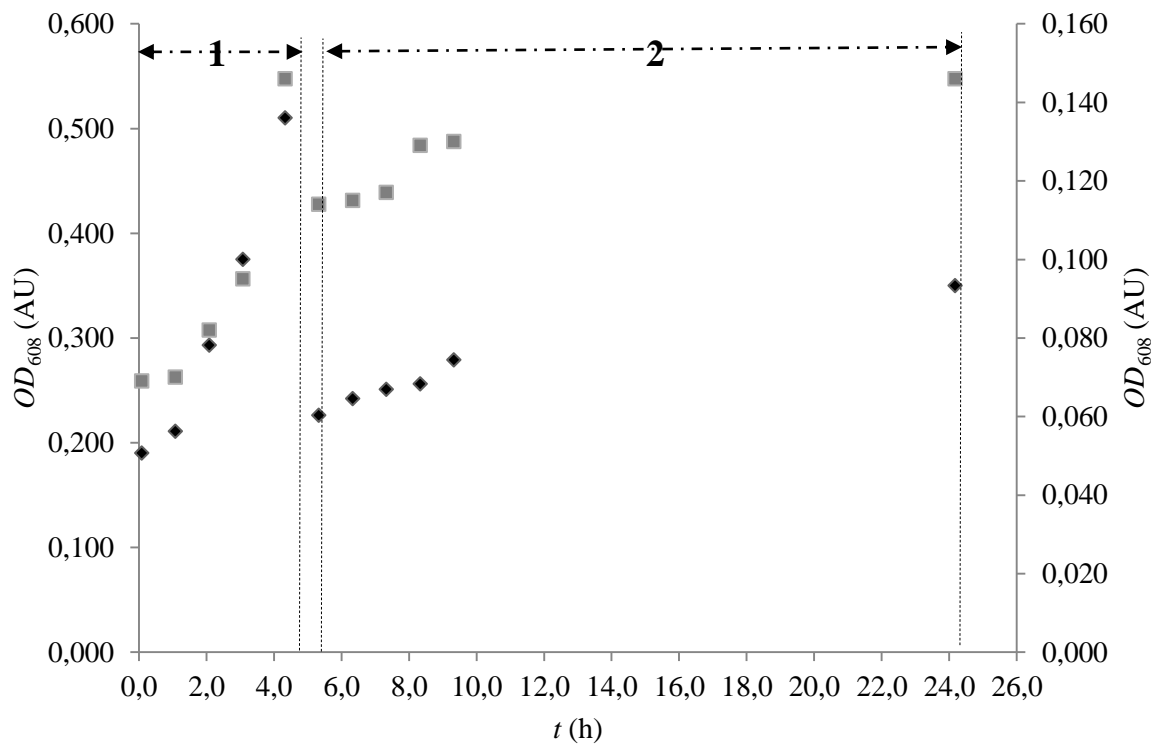
##### 4.2.2.1. Permeabilizacija stanica s 0,3 % (vol/vol) Tween-a-80

Promjena koncentracije biomase ( $OD_{608}$ ) soja *L. mesenteroides* LMG 7954 tijekom uzgoja u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi i nakon prebacivanja u smjesu saharoza:glicerol:Tween-80 prikazana je na Slici 16. Istovjetni podaci za kontrolu (bez Tween-a-80) prikazani su na Slici 17. Promjena temperature i pH vrijednosti obaju uzoraka, uzorka tretiranog Tween-om-80 i kontrolnog uzorka, prikazane su na Slici 18.

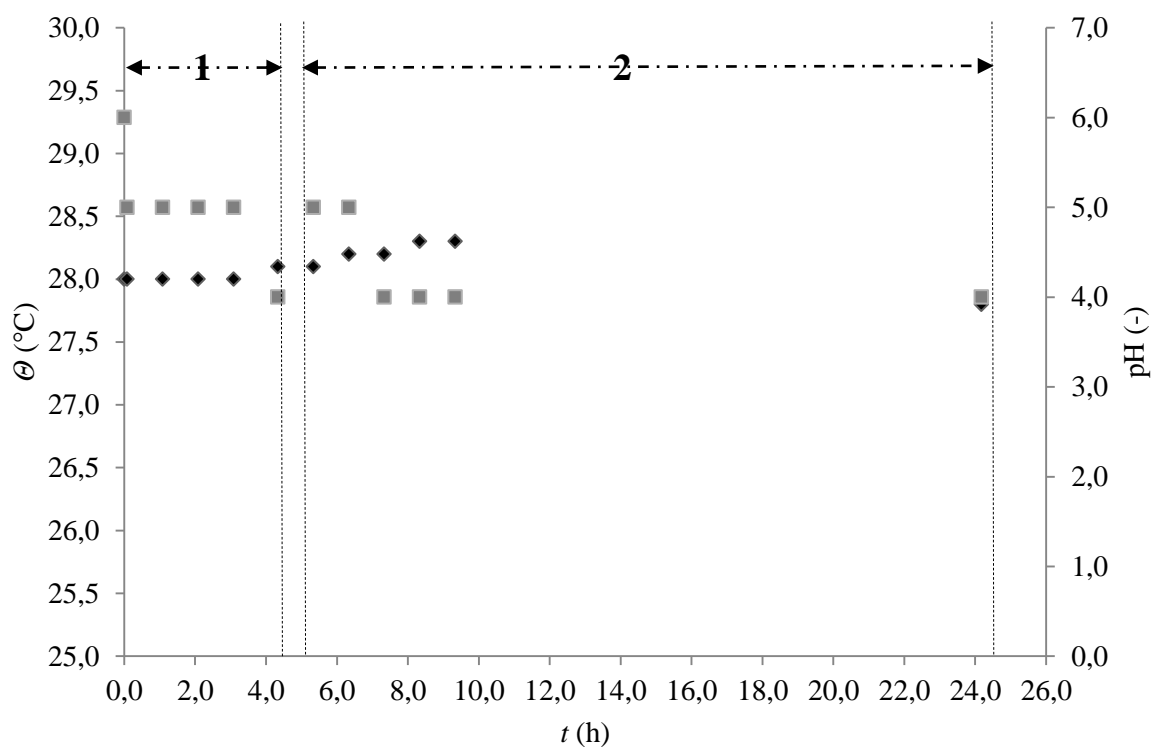
U Tablici 15. uspoređene su vrijednosti procijenjene za specifičnu brzinu rasta ( $\mu$ ) bakterijskog soja u uzorku i kontrolnom uzorku.



**Slika 16.** Rast bakterijske biomase ( $OD_{608}$ ,  $\blacklozenge$ ) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,3$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol:Tween-80 (0,3 % vol/vol;  $t = 5,3-24,2$  h). Vrijednosti za  $OD_{608}$  za prvo decimalno razrjeđenje ( $10^{-1}$ ,  $\blacktriangle$ ) prikazane su po istom principu.



**Slika 17.** Rast bakterijske biomase ( $OD_{608}$ , ◆) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u kontrolnom uzorku u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,3$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol (bez tretmana s 0,3 % vol/vol Tween-a-80;  $t = 5,3-24,2$  h). Vrijednosti za  $OD_{608}$  za prvo decimalno razrjeđenje ( $10^{-1}$ , ■) prikazane su po istom principu.



**Slika 18.** Promjena temperature ( $\theta$ ; ◆) i pH vrijednosti suspenzije (pH, ■) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,3$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol:Tween-80 (0,3 % vol/vol;  $t = 5,3-24,2$  h).

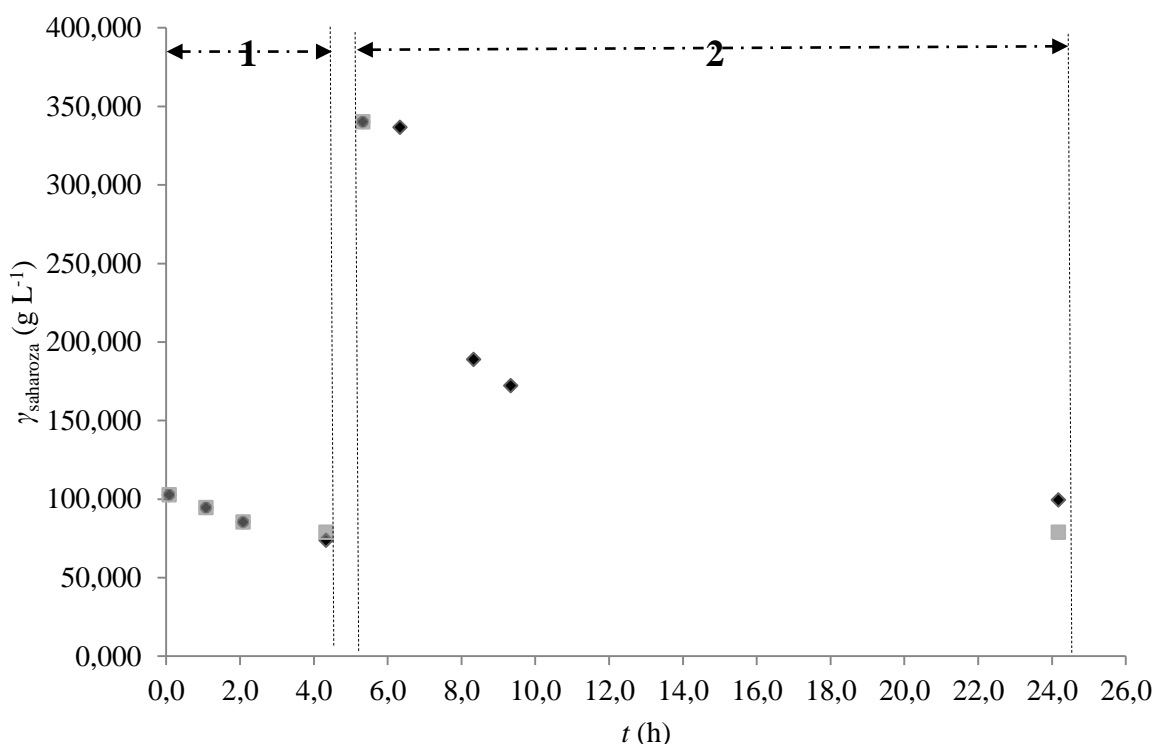
I u ovom setu eksperimenata određene su vrlo slične vrijednosti za temperaturu i pH vrijednost suspenzije u kontrolnom uzorku (bez tretmana s 0,3 % vol/vol Tween-a-80), pa ove eksperimentalne vrijednosti nisu nanovo prikazane.

**Tablica 15.** Procijenjena specifične brzina rasta ( $\mu$ ) bakterijskog soja *L. mesenteroides* LMG 7954 tijekom uzgoja u: (1) u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi (eksponencijalna faza 1;  $t = 2,1-4,3$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol; Tween-80 (0,3 % vol/vol) (eksponencijalna faza 2;  $t = 6,3-9,3$  h). Grafički prikaz procjene za specifične brzina rasta ( $\mu$ ) dan je u poglavlju Prilozi (Slike 28. i 30.).

Smjesa		
	kemijski djelomično definirana hranjiva podloga (eksponencijalna faza 1)	saharoza:glicerol:Tween-80 (eksponencijalna faza 2)
uzorak	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	
suspenzija (10 <sup>0</sup> )	0,247	0,047
prvo decimalno razrjeđenje suspenzije (10 <sup>-1</sup> )	0,154	0,044
kontrola	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	
suspenzija (10 <sup>0</sup> )	0,246	0,048
prvo decimalno razrjeđenje suspenzije (10 <sup>-1</sup> )	0,222	0,047

*4.2.2.1.1. Fiziologija soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 pri odabranim uvjetima*

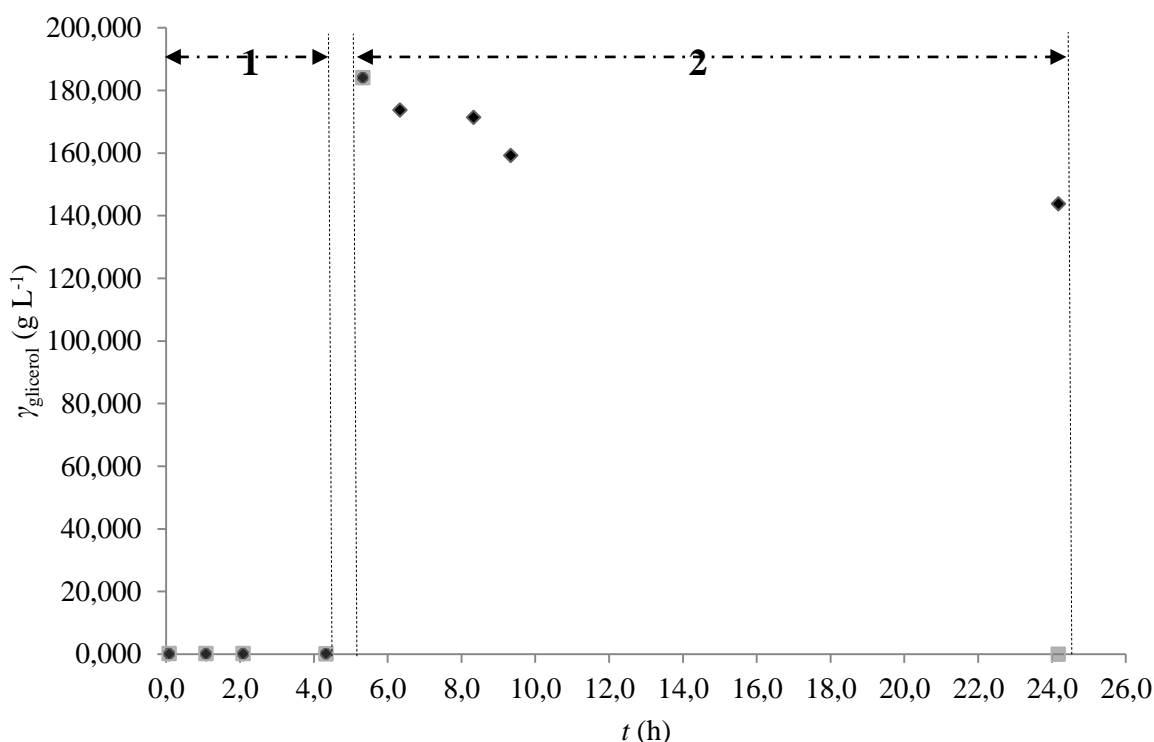
Kao i kod tretmana bakterijskih stanica ultrazvukom, i ovdje kod tretmana bakterijskih stanica Tween-om-80 (0,3 % vol/vol) praćena je koncentracija saharoze (Slika 19.) i glicerola (Slika 20.), dok su u Tablici 16. prikazane promjene koncentracije glukoze, fruktoze, laktata, acetata i etanola.



**Slika 19.** Promjena koncentracije saharoze ( $\gamma_{\text{saharozna}}$ , ◆) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,33$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharozna:glicerol:Tween-80 (0,3 % vol/vol;  $t = 5,3-24,2$  h). Vrijednosti za promjenu koncentracije saharoze u kontrolnom uzorku (bez tretmana Tweenom-80;  $\gamma_{\text{saharozna}}$ , ■) prikazane su po istom principu radi lakše usporedbe ovih vrijednosti.

Promjena koncentracije saharoze u uzorku i kontrolnom uzorku vrlo je slična. Tako je u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi koncentracija saharoze opala od  $102,736 \text{ g L}^{-1}$  do  $73,830 \text{ g L}^{-1}$  (u kontrolnom uzorku od  $102,736 \text{ g L}^{-1}$  do  $78,876 \text{ g L}^{-1}$ ), dok je u smjesi ova promjena bila od početnih od  $340,000 \text{ g L}^{-1}$  do  $99,465 \text{ g L}^{-1}$  pri kraju uzgoja (u kontrolnom uzorku od  $340,000 \text{ g L}^{-1}$  do  $78,876 \text{ g L}^{-1}$ ).





**Slika 20.** Promjena koncentracije glicerola ( $\gamma_{\text{glicerol}}$ ,  $\blacklozenge$ ) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,3$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol:Tween-80 (0,3 % vol/vol;  $t = 5,3-24,2$  h). Vrijednosti za promjenu koncentracije glicerola u kontrolnom uzorku (bez tretmana Tween-om-80;  $\gamma_{\text{glicerol}}$ ,  $\blacksquare$ ) prikazane su po istom principu radi lakše usporedbe ovih vrijednosti.

Kao i u prethodnom eksperimentu, glicerol se ne proizvodi u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi, dok u smjesi saharoza:glicerol:Tween-80 opada od početnih  $184,000 \text{ g L}^{-1}$  do  $143,725 \text{ g L}^{-1}$  na kraju uzgoja. Za razliku od uzorka tretiranog Tween-om-80, u kontrolnom uzorku je sav glicerol utrošen. Dakle, u prisutnosti površinski aktivne tvari u smjesi s visokim početnim koncentracijama saharoze i glicerola potrošnja glicerola je reducirana. Slična istraživanja nisu dostupna u znanstvenoj literaturi, pa se ne može pretpostaviti uzrok opisanoj pojavi.

**Tablica 16.** Promjena koncentracije glukoze, fruktoze, D- i L-laktata kao i ukupnog laktata, zatim acetata i etanola tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,3$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol:Tween-80 (0,3 % vol/vol;  $t = 5,3-24,2$  h).

$\gamma(\text{g L}^{-1})$							
$t$ (h)	glukoza	fruktoza	laktat		ukupni laktat	acetat	Etanol
			D-laktat	L-laktat			
0,1	2,478	2,211	0,107	0,095	0,201	0,000	0,000
1,1	3,459	3,334	0,107	1,265	1,372	0,000	0,000
2,1	2,957	2,984	0,107	1,210	1,317	0,000	0,000
4,3	6,699	4,759	0,107	4,763	4,869	0,101	0,578
6,3	8,674	9,524	0,107	0,135	0,242	0,000	0,000
8,3	22,745	19,255	0,107	0,135	0,242	0,000	0,606
9,3	11,322	11,666	0,107	0,135	0,242	0,384	0,579
24,2	22,745	19,255	0,107	0,135	0,242	0,000	0,606

Osim nakon ukupno 9,3 h uzgoja, koncentracija glukoze i fruktoze stalno raste u vanstaničnom prostoru. Koncentracija laktata varira tijekom uzgoja, dok su koncentracije acetata i etanola minimane i to nakon 4,3 h, (8,3 h) i 9,3 h uzgoja i manje su od  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ . Dakle utjecaj Tween-a-80 drugačiji je od utjecaja ultrazvuka na fiziologiju stanica soja *L. mesenteroides* LMG 7954.

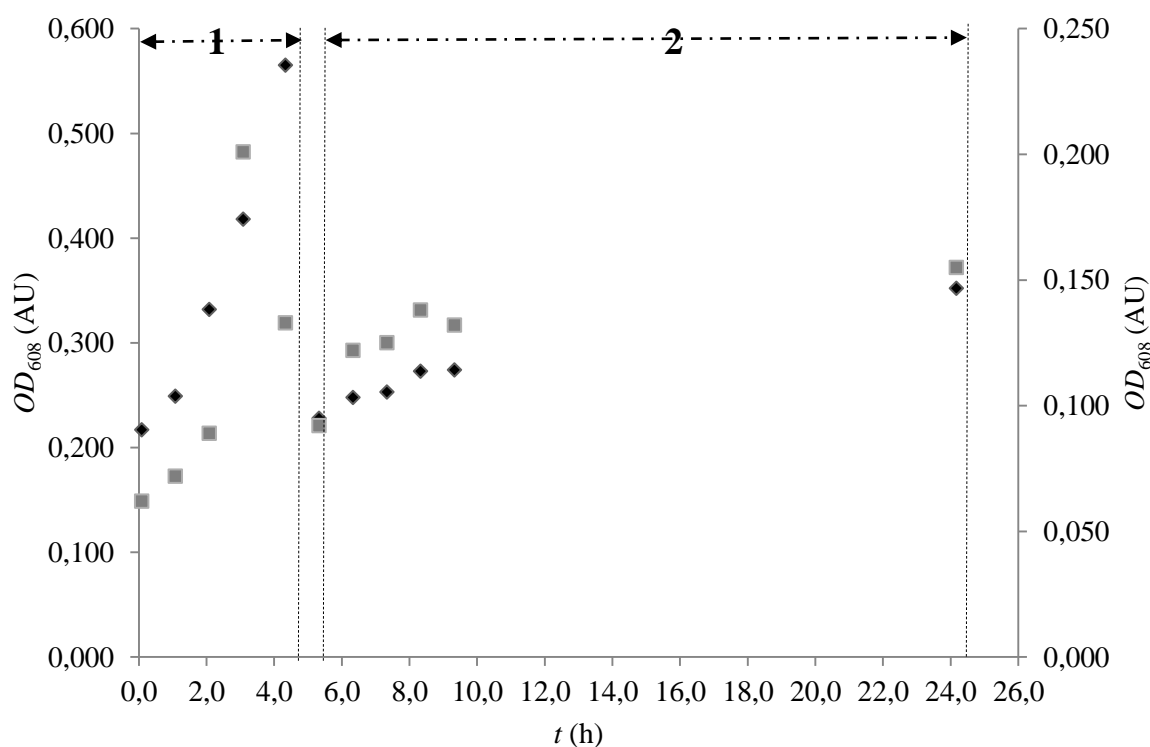
Nakon  $t = 4,3$  h uzgoja bakterijskog soja *L. mesenteroides* LMG 7954 u smjesi saharoza:glicerol:Tween-80 (0,3 % vol/vol), analitički (HPLC metodom) je utvrđena pojava dodatnog pika ( $\alpha$ -glukozilglicerol).

**Tablica 17.** Promjena površine ( $A$ ,  $\text{mV}^2$ ) dodatnog pika ( $t_R = 4,83$  min) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,3$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol:Tween-80 (0,3 % vol/vol;  $t = 5,3-24,2$  h).

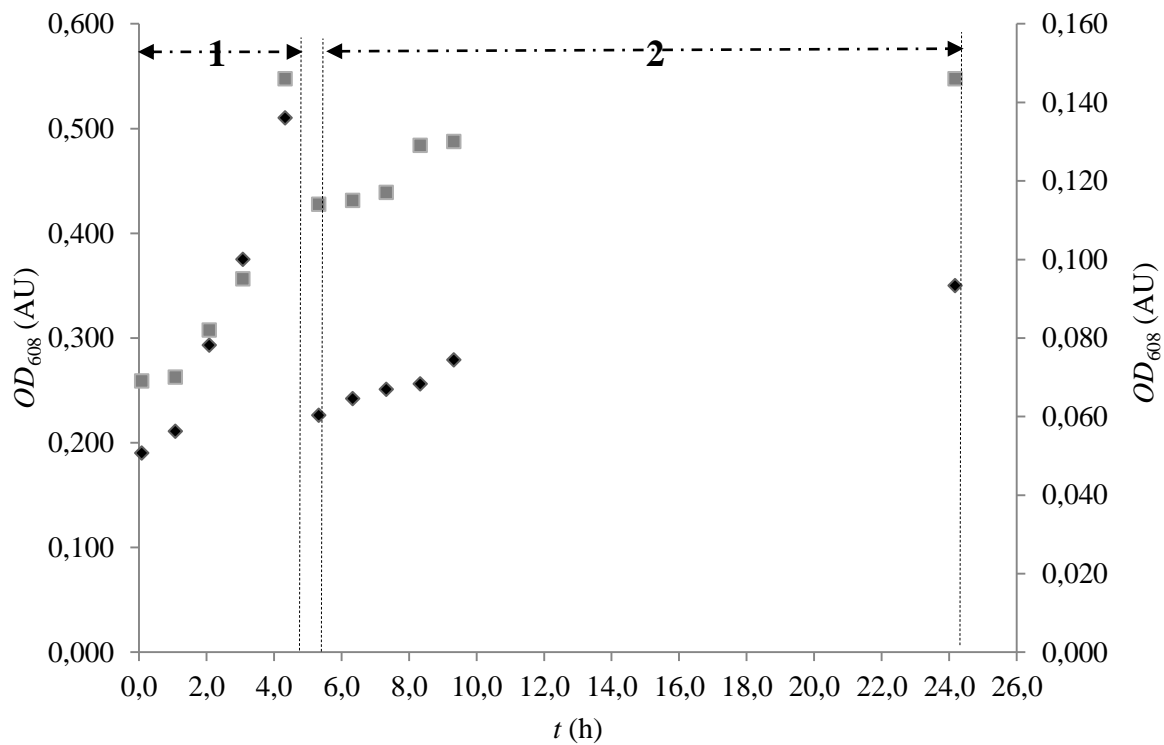
$t_{\text{uzgoja}}$ (h)	$A$ ( $\text{mV}^2$ )
4,3	630321
6,3	16660690
8,3	564503
9,3	979095
24,2	936261

## 4.2.2.2. Permeabilizacija stanica s 0,5 % (vol/vol) Tween-a-80

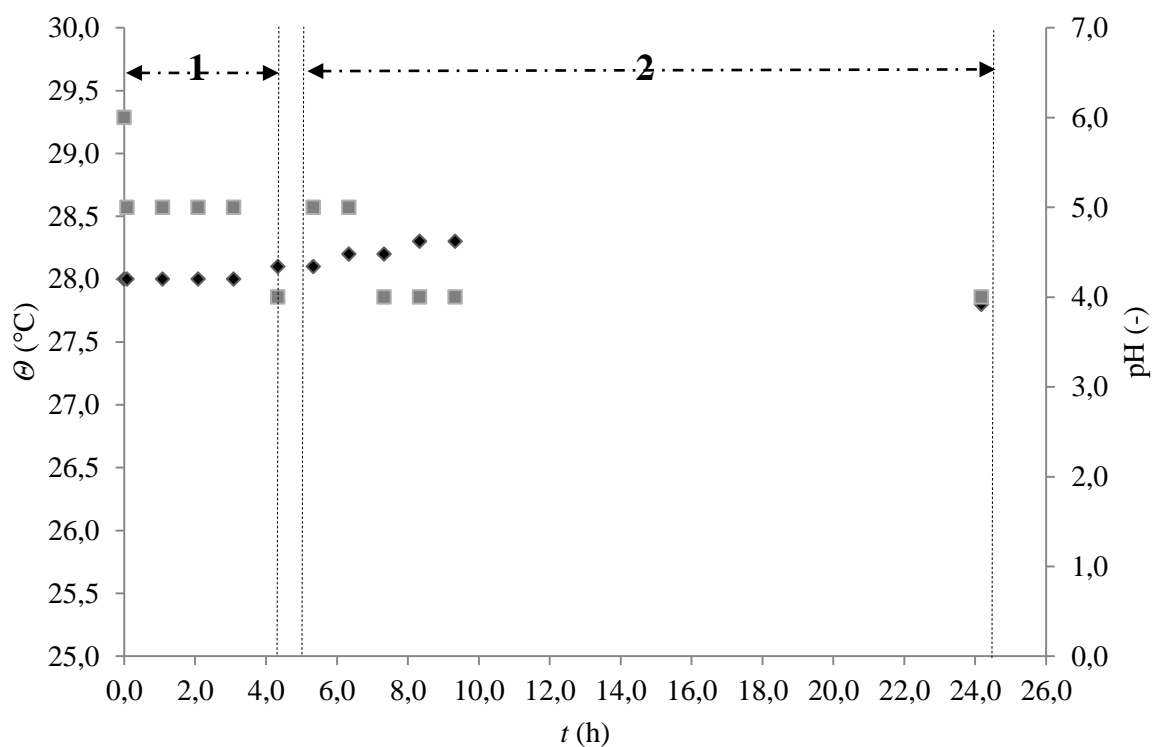
U ovom poglavlju istražen je utjecaj većeg udjela (0,5 % vol/vol) Tween-a-80 na aktivnost soja *L. mesenteroides* LMG 7954. Primjena koncentracije biomase prikazana je na Slikama 21. (uzorak) i 22. (kontrola), promjena temperature i pH vrijednosti suspenzije na Slici 23., dok su procijenjene vrijednosti za specifičnu brzinu rasta prikazane u Tablici 18.



**Slika 21.** Rast bakterijske biomase ( $OD_{608}$ ; ◆) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,3$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol:Tween-80 (0,5 % vol/vol;  $t = 5,3-24,2$  h). Vrijednosti za  $OD_{608}$  za prvo decimalno razrjeđenje ( $10^{-1}$ , ■) prikazane su po istom principu.



**Slika 22.** Rast bakterijske biomase ( $OD_{608}$ , ◆) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u kontrolnom uzorku u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,3$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol (bez tretmana s 0,5 % vol/vol Tween-a-80;  $t = 5,3-24,2$  h). Vrijednosti za  $OD_{608}$  za prvo decimalno razrjeđenje ( $10^{-1}$ , ■) prikazane su po istom principu.



**Slika 23.** Promjena temperature ( $\theta$ ;  $\blacklozenge$ ) i pH vrijednosti suspenzije (pH,  $\blacksquare$ ) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,3$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol:Tween-80 (0,5 % vol/vol;  $t = 5,3-24,2$  h).

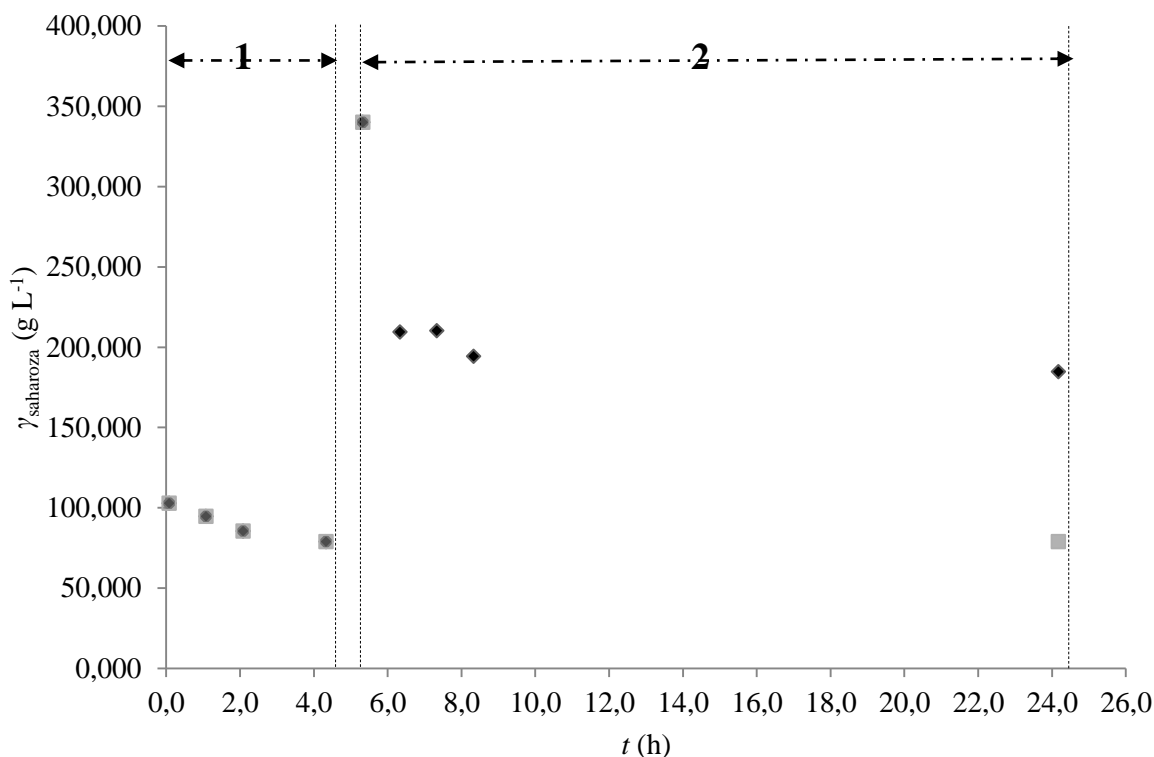
I u ovom setu eksperimenata određene su vrlo slične vrijednosti za temperaturu i pH vrijednost suspenzije u kontrolnom uzorku (bez tretmana s 0,5 % vol/vol Tween-a-80), pa ove eksperimentalne vrijednosti nisu prikazane.

**Tablica 18.** Procijenjena specifične brzina rasta ( $\mu$ ) bakterijskog soja *L. mesenteroides* LMG 7954 tijekom uzgoja u: (1) u kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi (eksponencijalna faza 1;  $t = 2,08-4,33$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol:Tween-80 (0,5 % vol/vol) (eksponencijalna faza 2;  $t = 5,33-9,33$  h). Grafički prikaz procjene za specifične brzina rasta ( $\mu$ ) dan je u poglavlju Prilozi (Slike 28. i 31.).

uzorak	Smjesa	
	kemijski djelomično definirana hranjiva podloga (eksponencijalna faza 1)	saharoza:glicerol:Tween-80 (eksponencijalna faza 2)
	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	
suspenzija (10 <sup>0</sup> )	0,237	0,046
prvo decimalno razrjeđenje suspenzije (10 <sup>-1</sup> )	0,179	0,062
	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	
kontrola suspenzija (10 <sup>0</sup> )	0,246	0,048
prvo decimalno razrjeđenje suspenzije (10 <sup>-1</sup> )	0,222	0,047

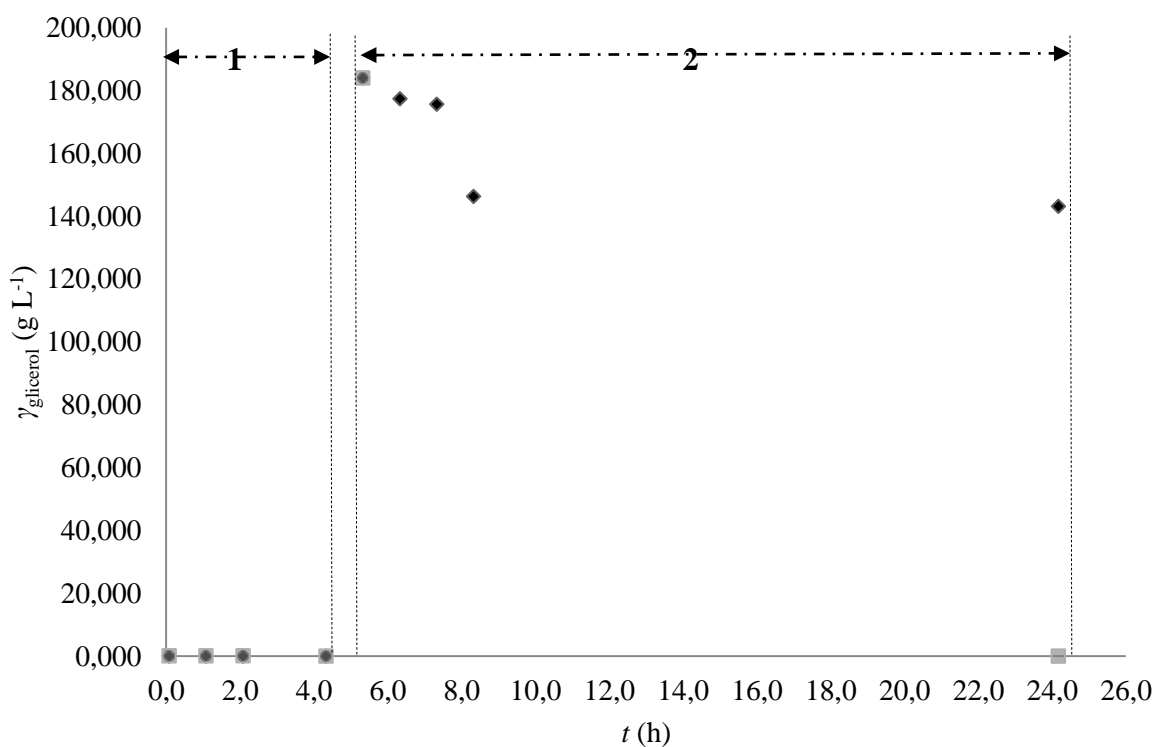
4.2.2.2.1. Fiziologija soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 pri odabranim uvjetima

Fiziologija ovog bakterijskog soja u odabranim uvjetima može se djelom opisati na temelju rezultata prikazanih na slikama u ovom poglavlju (Slike 24. i 25.) kao i u Tablicama 19.-20. Dobiveni rezultati u skladu su s već opisanim rezultatima u poglavlju 4.2.2.1., gdje je opisan utjecaj nešto niže koncentracije Tween-80 (0,3 % vol/vol) na aktivnost *L. mesenteroides* LMG 7954 u smjesi saharoza:glicerol:Tween-80.



**Slika 24.** Promjena koncentracije saharoze ( $\gamma_{\text{saharozna}}$ , ◆) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,3$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol:Tween-80 (0,5 % vol/vol;  $t = 5,3-24,2$  h). Vrijednosti za promjenu koncentracije saharoze u kontrolnom uzorku (bez tretmana Tween-om-80;  $\gamma_{\text{saharozna}}$ , ■) prikazane su po istom principu radi lakše usporedbe ovih vrijednosti.





**Slika 25.** Promjena koncentracije glicerola ( $\gamma_{\text{glicerol}}$ , ◆) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,3$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol:Tween-80 (0,5 % vol/vol;  $t = 5,3-24,2$  h). Vrijednosti za promjenu koncentracije glicerola u kontrolnom uzorku (bez tretmana Tweenom-80;  $\gamma_{\text{glicerol}}$ , ■) prikazane su po istom principu radi lakše usporedbe ovih vrijednosti.

**Tablica 19.** Promjena koncentracije glukoze, fruktoze, D- i L-laktata kao i ukupnog laktata, zatim acetata i etanola tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,3$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol:Tween-80 (0,5 % vol/vol;  $t = 5,3-24,2$  h).

$t$ (h)	$\gamma$ (g L <sup>-1</sup> )						
	glukoza	fruktoza	laktat			acetat	Etanol
			D-laktat	L-laktat	ukupni laktat		
0,08	2,478	2,211	0,107	0,095	0,201	0,000	0,000
1,08	3,459	3,334	0,107	1,265	1,372	0,000	0,000
2,08	2,957	2,984	0,107	1,210	1,317	0,000	0,000
4,33	6,964	6,818	0,107	6,207	6,314	0,215	0,000
6,33	6,436	3,697	0,107	0,135	0,242	0,000	0,000
7,33	5,773	3,506	0,107	0,135	0,242	0,000	0,000
8,33	10,282	6,307	0,107	0,135	0,242	0,000	0,000
24,17	11,346	10,840	0,107	0,135	0,242	0,000	0,591

Nakon  $t = 4,3$  h uzgoja bakterijskog soja *L. mesenteroides* LMG 7954 u smjesi saharoza:glicerol:Tween-80 (0,5 % vol/vol), analitički (HPLC metodom) je utvrđena pojava dodatnog pika ( $\alpha$ -glukozilglicerol).

**Tablica 20.** Promjena površine ( $A$ ,  $\text{mV}^2$ ) dodatnog pika ( $t_R = 4,83$  min) tijekom uzgoja soja *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 u (1) kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi ( $t = 0,0-4,3$  h) i (2) reakcijskoj smjesi saharoza:glicerol:Tween-80 (0,5 % vol/vol;  $t = 5,3-24,2$  h).

$t_{\text{uzgoja}}$ (h)	$A$ ( $\text{mV}^2$ )
4,3	723799
6,3	445707
7,3	398401
8,3	809805
24,2	859478

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata koji su opisani u ovom radu, može se zaključiti kako slijedi:

1. Koncentracija otopljenog kisika pozitivno utječe na rast *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 i specifična brzina rasta ( $\mu$ ) ovog soja u kemijski djelomično definiranoj podlozi (Vandamme i sur., 1987.) pri  $28\pm 1,0^\circ\text{C}$  i opadajućoj pH vrijednosti suspenzije (6,0-3,0) pri aerobnim uvjetima uzgoja šaržnim postupkom u laboratorijskom mjerilu veća je za oko 30 % od  $\mu$ , koja je procijenjena pri mikroaerofilnim uvjetima rasta ovog soja u istovjetnim uvjetima.
2. Okarakterizirana je krivulja rasta *L. mesenteroides* LMG 7954 i utvrđeno je trajanje faze prilagodbe ( $t_{\text{lag}} = 1,0\text{-}2,0$  h) i eksponencijalne faze rasta ( $t_{\text{eksp}} = 3,0\text{-}4,0$  h) u opisanim uvjetima, nakon čega stanice ovog soja ulaze u stacionarnu fazu rasta ( $t_{\text{stac}}$ ).
3. Razvijena je i optimirana ionsko-izmjenjivačka HPLC metoda, kojom je popraćena aktivnost *L. mesenteroides* LMG 7954 u različitim uvjetima uzgoja šaržnim postupkom. Ovom metodom tijekom samo jedne analize moguće je odrediti koncentracije različitih supstrata i krajnjih proizvoda metabolizma ove heterofermentativne bakterije mliječne kiseline.
4. Soj *L. mesenteroides* LMG 7954 uspješno raste u hranjivoj MRS podlozi, kemijski djelomično definiranoj hranjivoj podlozi kao i u smjesi visokog osmotskog tlaka saharoza:glicerol. Dakle, ovaj soj može transportirati i metabolizirati glukozu, saharozu i glicerol. Prije transporta, saharoza se hidrolizira na glukozu i fruktozu, kako je to eksperimentalno utvrđeno. Glavni proizvodi metabolizma ovih ugljikohidrata (glukoze i saharoza) i alkohola (glicerol) su bakterijska biomasa i D- i L-laktat te, ovisno o uvjetima u kojima se stanice uzgajaju, znatno manje koncentracije acetata i etanola. Nakon precjepljivanja svježe uzgojenih stanica ove Gram-pozitivne bakterije u smjesu saharoza:glicerol, stanice nanovo rastu slijedeći eksponencijalni trend, a zatim linearni trend, bez stacionarne faze rasta. Ova fiziološka karakteristika kvalificira ovaj soj za industrijsku primjenu u podlogama s visokim početnim koncentracijama supstrata.
5. U istraživanjima opisanim u ovom radu stanice soja *L. mesenteroides* LMG 7954 permeabilizirane su dvjema metodama - primjenom ultrazvuka i dodatkom Tween-a-

80 (0,3 i 0,5 % vol/vol). Ultrazvuk znatno blaže djeluje na rast stanica ovog soja od Tween-a-80 Tako je specifična brzina rasta stanica tijekom tretmana ultrazvukom ( $\mu = 0,124 \text{ h}^{-1}$ ) slična specifičnoj brzini rasta u kontrolnom uzorku (bez tretmana permeabilizacije,  $\mu = 0,141 \text{ h}^{-1}$ ), dok stanice znatno slabije rastu u smjesi u prisutnosti Tween-a-80 ( $\mu = 0,047 \text{ h}^{-1}$ ). Obje metode permeabilizacije primijenjene su tijekom rasta soja u smjesi saharoza:glicerol i HPLC metodom okarakteriziran je utjecaj ovih metoda na utrošak supstrata (saharoze i glicerola) kao i proizvodnju krajnjih proizvoda metabolizma (laktata, acetat i etanola) s pomoću stanica ove (navodno) mikroaerofilne heterofermentativne bakterije mliječne kiseline. Osim toga, identificiran je dodatni pik u kromatogramima, koji ukazuje na mogućnost proizvodnje  $\alpha$ -glukozilglicerola pomoću ovog soja.

## 6. LITERATURA

Adams, M. R., Moss, M. O. (2000) Food Microbiology, 2.izd., The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Ananta, E., Voigt, D., Zenker, M., Heinz, V., Knorr, D. (2005) Cellular injuries upon exposure of *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* to high-intensity ultrasound. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 271-278.

Anonymous (2018) Indikator papir pH, <<https://agrologistika.hr/hr/HR/mjerni-instrumenti/testeri/indikator-papir-ph>>. Pristupljeno 26. kolovoza 2019.

BRENDA (2018) - The Comprehensive Enzyme Information System, <<https://www.brenda-enzymes.org>>. Pristupljeno 6. rujna 2019.

Canovas, 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.

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.

Cogan, T. M., Jordan, K. N. (1993) Metabolism of *Leuconostoc* Bacteria. *J. Dairy Sci.* **77**, 2704-2717.

Colombo, D., Compostella F., Ronchetti, F., Scala, A., Toma, L., Tokuda, H., Nishino, H.(2000) Glycoglycerolipid analogues active as anti-tumor-promoters: the influence of the anomeric configuration. *Eur. J. Med. Chem.* **35**, 1109-1113.

Condon, S. (1983) Aerobic metabolism of lactic acid bacteria. *Irish. J. Food. Sci. Technol.* **7**, 15-25.

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

Doran, P. M. (1995) *Bioprocess Engineering Principles*, 2.izd., Academic Press, San Diego.

Felix, H., (1982) Permeabilized cells. *Anal. Biochem.* **120**, 211-234.

Ferretti, J.J., Huang, T.T., Russell, R.R.B. (1988) Sequence analysis of the glucosyltransferase A gene (gtfA) from *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Infect. Immun.* **56**, 1585-1588.

Flores, M. V., Voget, C. E., Ertola, R. J. J. (1994) Permeabilization of yeast-cells *Kluyveromyces* with organic-solvents. *Enzyme Microb Technol* **16**, 340-346.

Gaspar, P., Carvalho A. L., Vinga S., Santos H., Neves A. R. (2013,) From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnol. Adv.* **6**, 764-788.

Goedl, C., Schwarz, A., Minani, A., Nidetzky, B. (2007) Recombinant sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*: Characterization, kinetic studies of transglucosylation, and application of immobilised enzyme for production of  $\alpha$ -D-glucose 1-phosphate. *J. Biotechnol.* **129**, 77-86.

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

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

Goedl, C., Sawangwan, T., Mueller, M., Schwarz A., Nidetzky, B. (2010b) Biocatalytic Production of  $\alpha$ -Glucosylglycerol, *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 276-283.

Havukkala, I. (1991) Trends in xylitology. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **3**, 372-374.

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

Holzappel, W. H., Bjorkroth, J. A., Dicks, L. M. T. (2009) Genus I. *Leuconostoc*. U: Bergey's manual of sistematic bacteriology, (De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., ured.), Springer, New York, str. 624-634.

Huijbregts, R. P., de Kroon, A. I. P., de Kruijff, B. (2000). Topology and transport of membrane lipids in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**, 43-61.

Jamur, M. C., Oliver, C. (2009). Permeabilization of Cell Membranes. *Methods Mol. Biol.* **588**, 63-66.

John, R. P., Nampoothiri, K. M., Pandey, A. (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* **74**, 524-534.

Kawasaki, H., Nakamura, N., Ohmori, M., Amari, K., Sakai, T. (1996) Screening for bacteria producing sucrose phosphorylase and characterization of the enzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 319-21.

Koga, T., Nakamura, K., Shirokane, Y., Mizusawa, K., Kitao, S., Kikuchi, M. (1991) Purification and some properties of sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1805-1810.

Krishnan, S., Gowda, L., Karanth, N.G., (2000) Studies on lactate dehydrogenase of *Lactobacillus plantarum* spp. involved in lactic acid biosynthesis using permeabilized cells. *Proc. Biochem.* **35**, 1191-1198.

Lee, J.H., Yoon, S.H., Nam, S.H., Moon, Y.H., Moon, Y.Y., Kim, D. (2006) Molecular cloning of a gene encoding sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1149 and the expression in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 612-620.



Lentzen, G., Schwarz, T. (2006) Orally used compatible solute containing agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 623-34.

Mieyal, J.J., Abeles, R.H. (1972) Disaccharides Phosphorylases. U: The Enzymes, (Boyer, P.D., ured), Academic Press, New York, str. 515-532.

Nitta, T., Takenaka, A., Iki, M., Matsumura, E., Sakaguchi, M. (2007) Antitumor agents containing  $\alpha$ -D-glucopyranosylglycerols and food and cosmetics containing them. *JP patent 2007262023*.

Nyborg, W. L. (2001) Biological effects of ultrasound: development of safety guidelines. Part II: General Review. *Ultrasound Med. Biol.* **27**, 301-333.

Pitt, W. G., Ross, S. A. (2003) Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. *Biotechnol. Prog.* **19**, 1038–1044.

Polizzi, K.M., Bommarius, A.S., Broering, J.M., Chaparro-Riggers, J.F. (2007) Stability of biocatalysts, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 220-225.

Robeson, J.P., Barletta, R.G., Curtiss, R.R. (1983) Expression of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **153**, 211-221.

Russell, R.R., Mukasa, H., Shimamura, A., Ferretti, J.J. (1988) *Streptococcus mutans* *gtfA* gene specifies sucrose phosphorylase. *Infect. Immun.* **56**, 2763–2765.

Santos, H., Lamosa, P., Faria, T. Q., Borges, N., Neves C. (2007) Physiology and biochemistry of extremophiles, ASM Press, Washington, str. 86-103.

Schrader, A., Siefken, W., Kueper, T., Breitenbach, U., Gatermann, C., Sperling, G., Biernoth, T., Scherner, C., Stäb, F., Wenck, H., Wittern, K. P., Blatt, T. (2012) Effects of glyceryl glucoside on AQP3 expression, barrier function and hydration of human skin. *Skin Pharmacol. Physiol.* **25**, 192-199.

Silverstein, R., Voet, J., Reed, D., Abeles, R.H. (1967) Purification and mechanism of action of sucrose phosphorylase, *J. Biol.Chem.* **242**, 1338-1346.

Tsai, L.B., Gong, G.S., Tsao, G.T. (1980) Sucrose phosphorylase from *Clostridium pasteurianum*, Abstracts of the Annual Meeting of the American Society of Microbiology, Miami Beach, FL, USA.

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.

van den Broek, L.A., van Boxtel, E.L., Kievit, R.P., Verhoef, R., Beldman, G., Voragen, A.G. (2004) Physico-chemical and transglucosylation properties of recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 219-227.

Vučenović, I. (2018) Permeabilizacija stanica bakterije *Leuconostoc mesenteroides* i njihova primjena u proizvodnji  $\alpha$ -glukoziilglicerola, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu, srpanj 2018.

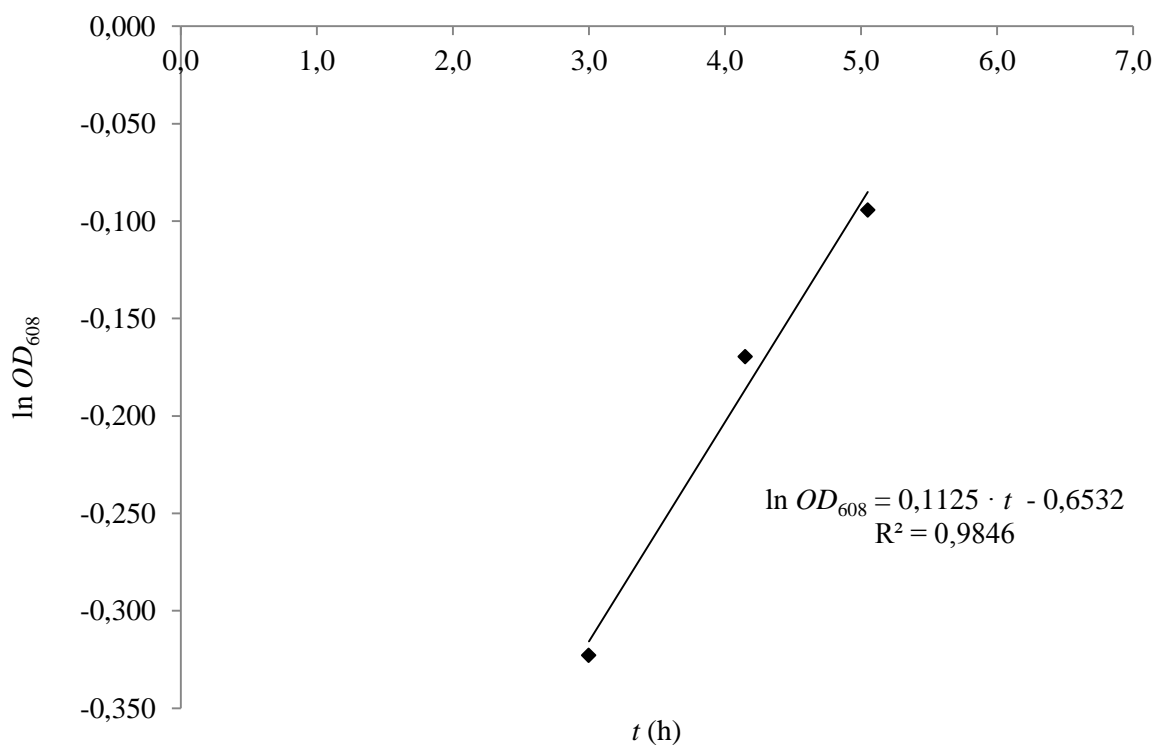
Weimberg, R., Doudoroff, M. (1954) Studies with three bacterial sucrose phosphorylases. *J. Bacteriol.* **68**, 381-388.

Yoon, S.H., Robyt, J.F. (2003) Study of the inhibition of four  $\alpha$ -amylase by acarbose and its 4IV- $\alpha$ -maltohexaosyl and 4IV- $\alpha$ -maltododecaosyl analogues. *Carbohydr. Res.* **338**, 1969-1980.

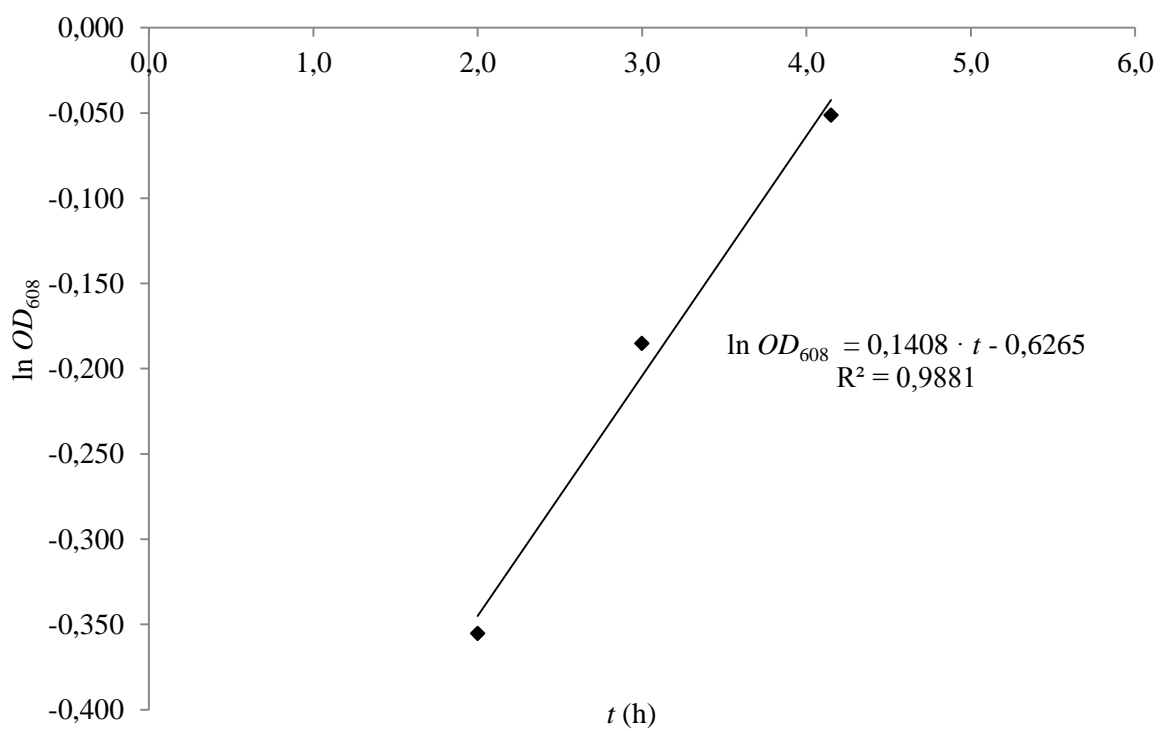
Zhao, W. R., Sheng, H. U., Jun, H., Mei, L. (2014) Improve microorganism cell permeability for whole-cell bioprocess: methods and strategies. *Chin. J. Biotechnol.* **34**, 125-131.

## 7. PRILOZI

### 7.1. PROCJENA VRIJEDNOSTI ZA SPECIFIČNU BRZINU RASTA ( $\mu$ ) BAKTERIJSKOG SOJA *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 TIJEKOM UZGOJA U KEMIJSKI DJELOMIČNO DEFINIRANOJ PODLOZI PRI RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA OTOPLJENOG KISIKA (MIKROAEROFILNI I AEROBNI UVJETI UZGOJA ŠARŽNIM POSTUPKOM)

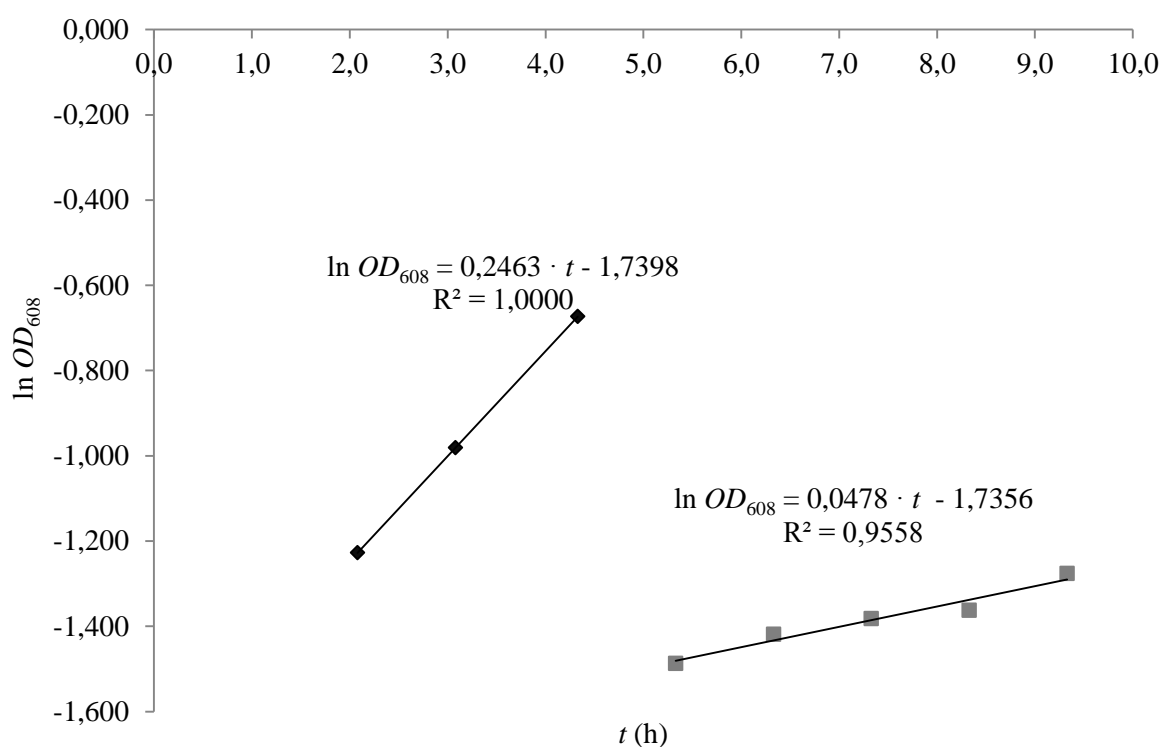


**Slika 26.** Grafički prikaz procjene specifične brzine rasta ( $\mu = 0,113 \text{ h}^{-1}$ ) tijekom eksponencijalne faze rasta ovog soja ( $t = 2,0\text{-}5,0 \text{ h}$ ) pri mikroaerofilnim uvjetima.



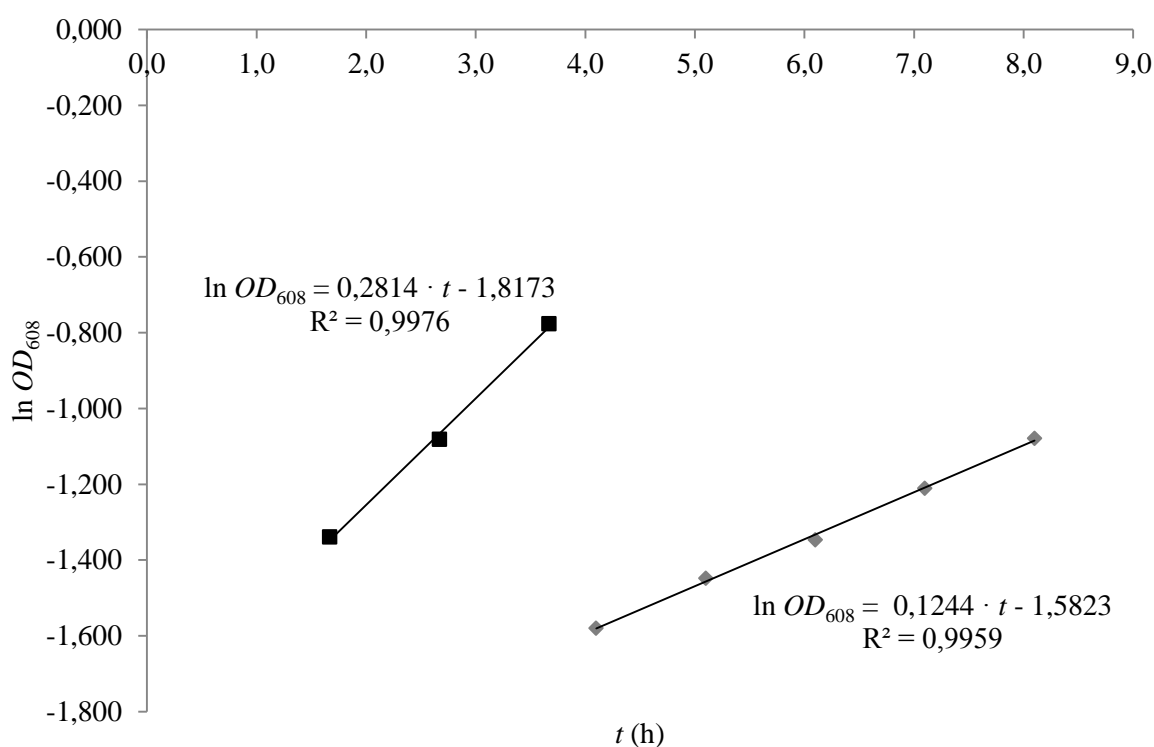
**Slika 27.** Grafički prikaz procjene specifične brzine rasta ( $\mu = 0,141 \text{ h}^{-1}$ ) tijekom eksponencijalne faze rasta ovog soja ( $t = 3,0\text{-}6,0 \text{ h}$ ) pri aerobnim uvjetima.

**7.2. PROCJENA SPECIFIČNE BRZINA RASTA ( $\mu$ ) BAKTERIJSKOG SOJA *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 TIJEKOM UZGOJA U: (1) KEMIJSKI DJELOMIČNO DEFINIRANOJ HRANJIVOJ PODLOZI I (2) REAKCIJSKOJ SMJESI SAHAROZA:GLICEROL – KONTROLNI UZORAK**



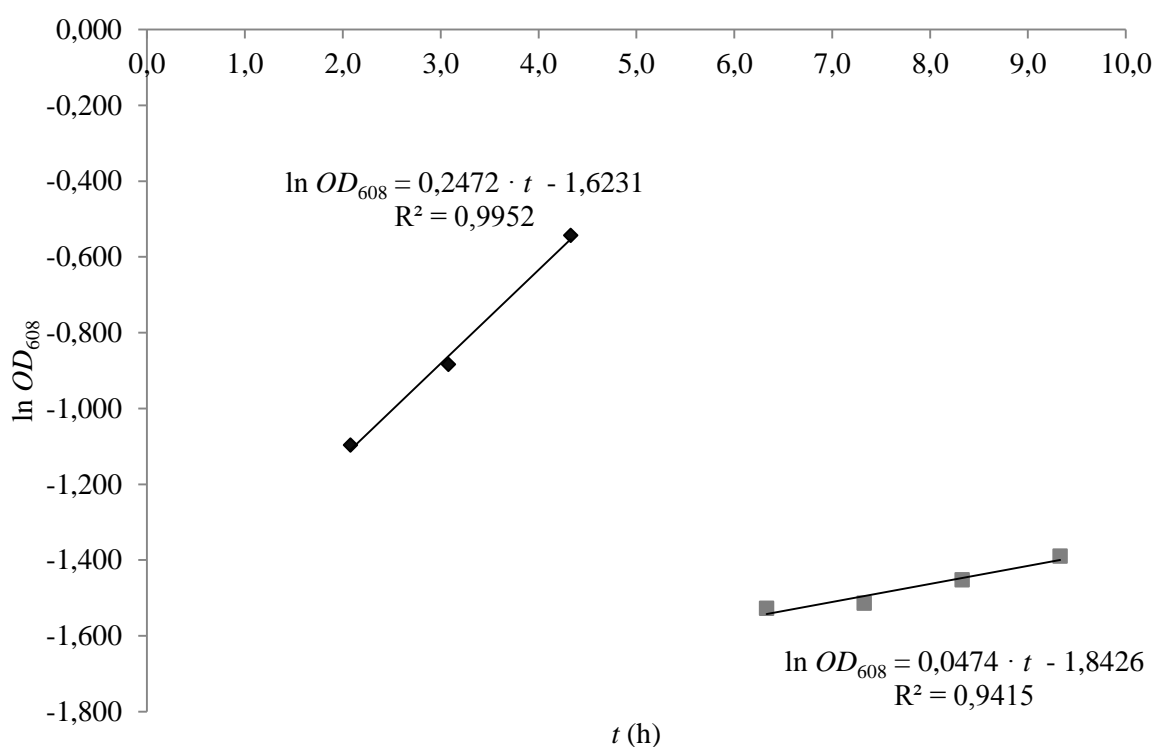
**Slika 28.** Grafički prikaz procjene specifične brzine rasta ( $\mu$ ,  $h^{-1}$ ) bakterije *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 pri aerobnim uvjetima tijekom: eksponencijalne faze rasta u kemijski djelomično definiranoj podlozi (eksponencijalna faza 1;  $t = 2,1-4,3$  h;  $\mu = 0,246$   $h^{-1}$ ; ♦) te u smjesi saharoza:glicerol (eksponencijalna faza 2;  $t = 5,3-9,3$  h;  $\mu = 0,048$   $h^{-1}$ ; ■) - kontrolni uzorak.

**7.3. PROCJENA VRIJEDNOSTI ZA SPECIFIČNU BRZINU RASTA ( $\mu$ ) BAKTERIJSKOG SOJA *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 TIJEKOM UZGOJA U: (1) U KEMIJSKI DJELOMIČNO DEFINIRANOJ HRANJIVOJ PODLOZI I (2) REAKCIJSKOJ SMJESI SAHAROZA:GLICEROL TIJEKOM TRETMANA ULTRAZVUKOM**



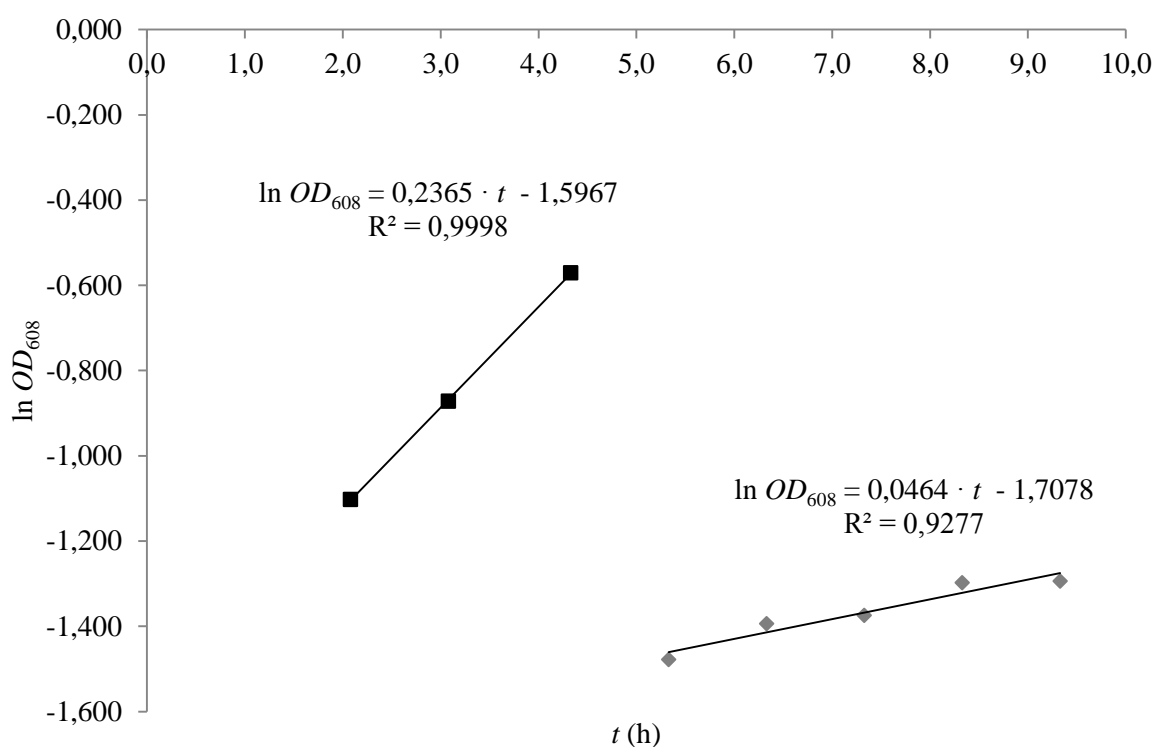
**Slika 29.** Grafički prikaz procjene specifične brzine rasta ( $\mu$ ,  $h^{-1}$ ) bakterije *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 pri aerobnim uvjetima tijekom: eksponencijalne faze rasta u kemijski djelomično definiranoj podlozi (eksponencijalna faza 1;  $t = 1,7-3,7$  h;  $\mu = 0,281$   $h^{-1}$ ; ■) te u smjesi saharoza:glicerol (eksponencijalna faza 2;  $t = 4,1-8,1$  h;  $\mu = 0,124$   $h^{-1}$ ; ◆) uz tretman ultrazvukom.

**7.3. PROCJENA SPECIFIČNE BRZINA RASTA ( $\mu$ ) BAKTERIJSKOG SOJA *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 TIJEKOM UZGOJA U: (1) U KEMIJSKI DJELOMIČNO DEFINIRANOJ HRANJIVOJ PODLOZI I (2) REAKCIJSKOJ SMJESI SAHAROZA:GLICEROL TIJEKOM TRETMANA TWEEN-OM-80 (0,3 % VOL/VOL)**



**Slika 30.** Grafički prikaz izračuna specifične brzine rasta ( $\mu$ ,  $h^{-1}$ ) bakterije *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 pri aerobnim uvjetima tijekom: eksponencijalne faze rasta u kemijski djelomično definiranoj podlozi (eksponencijalna faza 1;  $t = 2,1-4,3$  h;  $\mu = 0,247$   $h^{-1}$ ;  $\blacklozenge$ ) te u smjesi saharoza:glicerol (eksponencijalna faza 2;  $t = 6,3-9,3$  h;  $\mu = 0,047$   $h^{-1}$ ;  $\blacksquare$ ) uz tretman 0,3% (vol/vol) Tween-80.

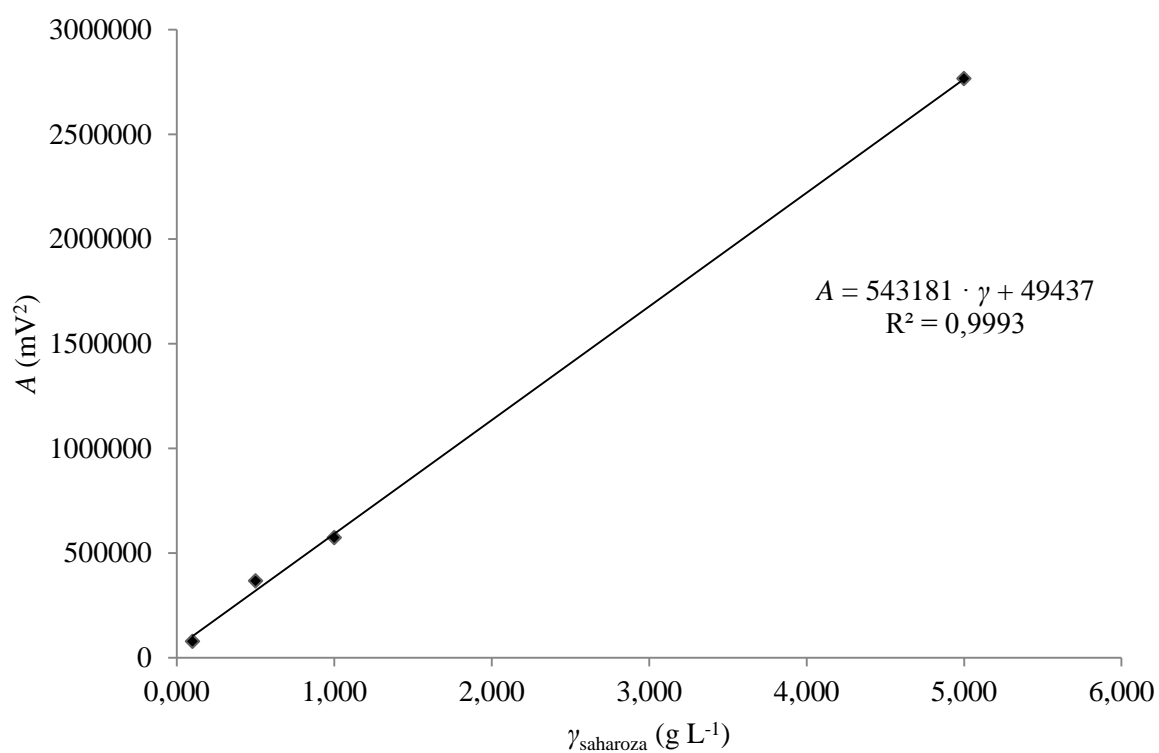
**7.4. PROCJENJENA SPECIFIČNE BRZINA RASTA ( $\mu$ ) BAKTERIJSKOG SOJA *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 TIJEKOM UZGOJA U: (1) U KEMIJSKI DJELOMIČNO DEFINIRANOJ HRANJIVOJ PODLOZI I (2) REAKCIJSKOJ SMJESI SAHAROZA:GLICEROL TIJEKOM TRETMANA TWEEN-OM-80 (0,5 % VOL/VOL)**



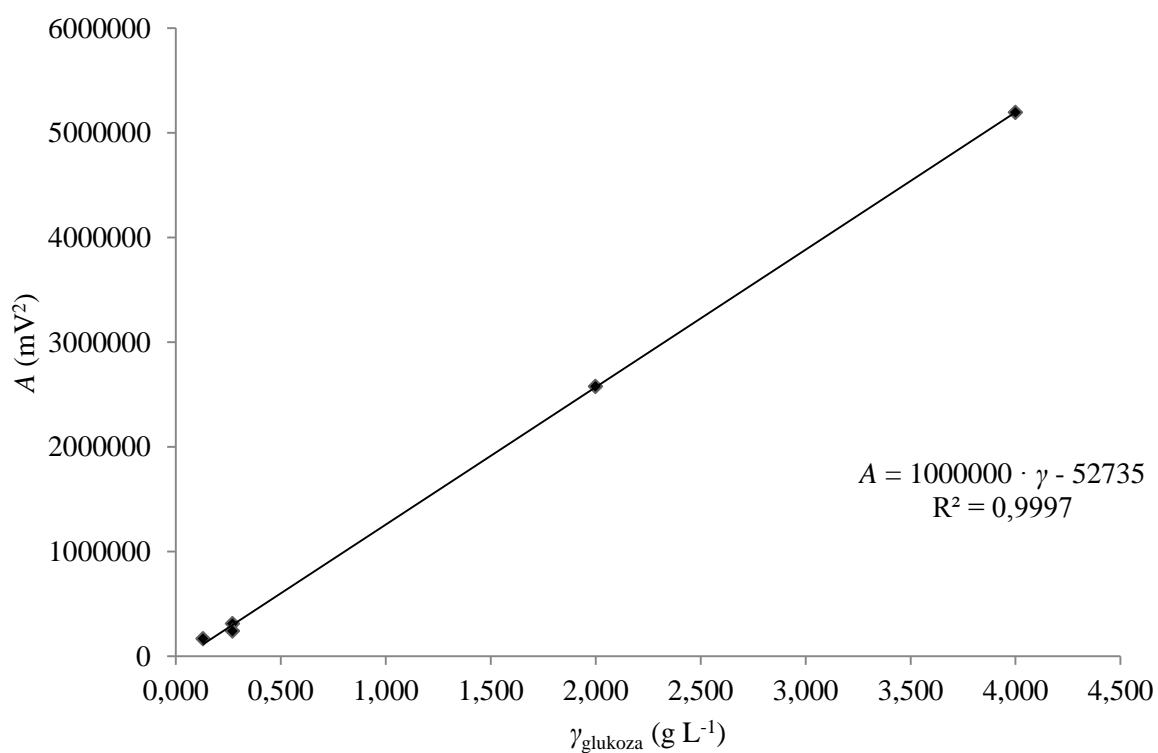
**Slika 31.** Grafički prikaz izračuna specifične brzine rasta ( $\mu$ ,  $h^{-1}$ ) bakterije *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 pri aerobnim uvjetima tijekom: eksponencijalne faze rasta u kemijski djelomično definiranoj podlozi (eksponencijalna faza 1;  $t = 2,1-4,3$  h;  $\mu = 0,237 h^{-1}$ , ■) te u smjesi saharoza:glicerol uz tretman 0,5% (vol/vol) Tween-80 (eksponencijalna faza 2;  $t = 5,3-9,3$  h;  $\mu = 0,046 h^{-1}$ ; ♦).



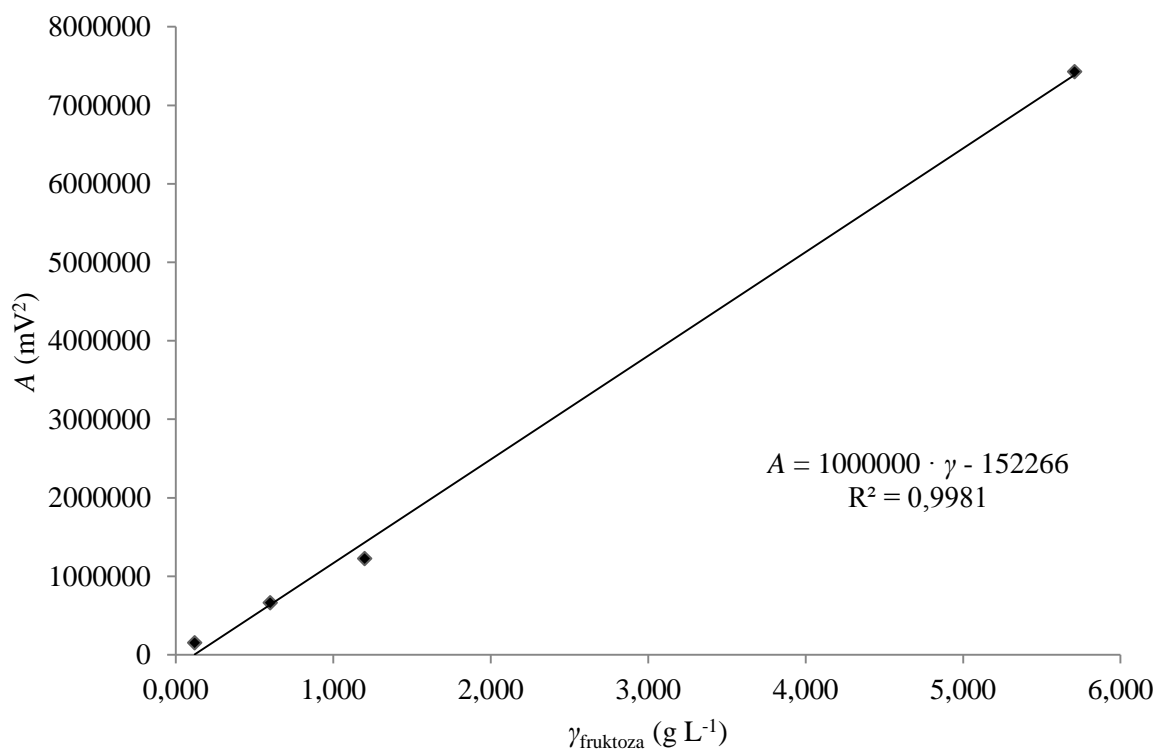
## 7.5. BAŽDARNI DIJAGRAMI



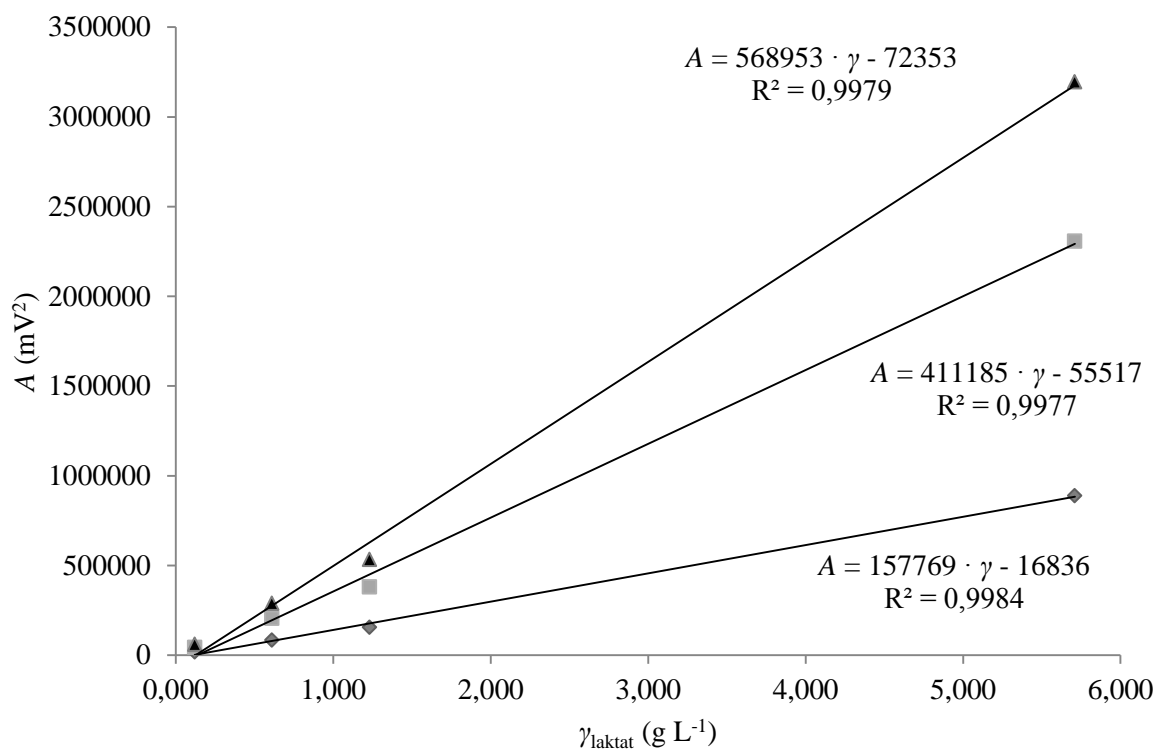
**Slika 32.** Baždarni dijagram ovisnosti površine pika ( $A$ ,  $\text{mV}^2$ ) saharoze ( $t_R = 4,61$  min) o njenoj koncentraciji ( $\gamma_{\text{saharoza}}$ ,  $\text{g L}^{-1}$ ) u otopini.



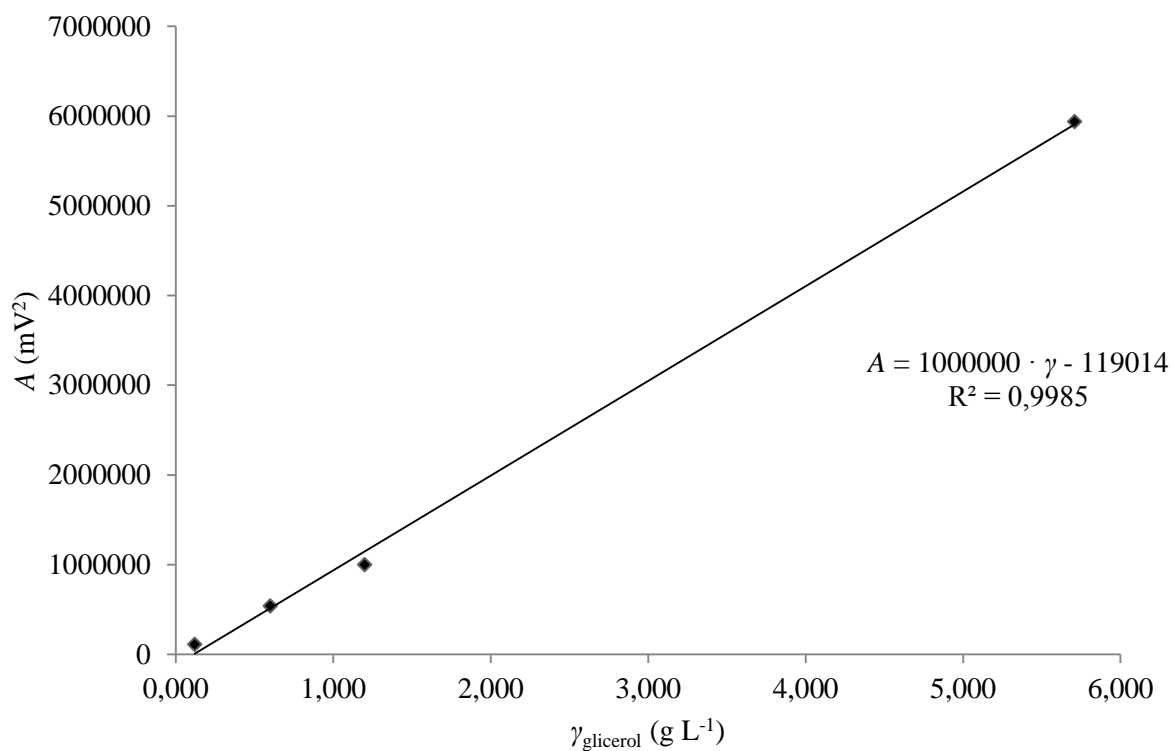
**Slika 33.** Baždarni dijagram ovisnosti površine pika ( $A$ ,  $\text{mV}^2$ ) glukoze ( $t_R = 5,29$  min) o njenoj koncentraciji ( $\gamma_{\text{glukoza}}$ ,  $\text{g L}^{-1}$ ) u otopini.



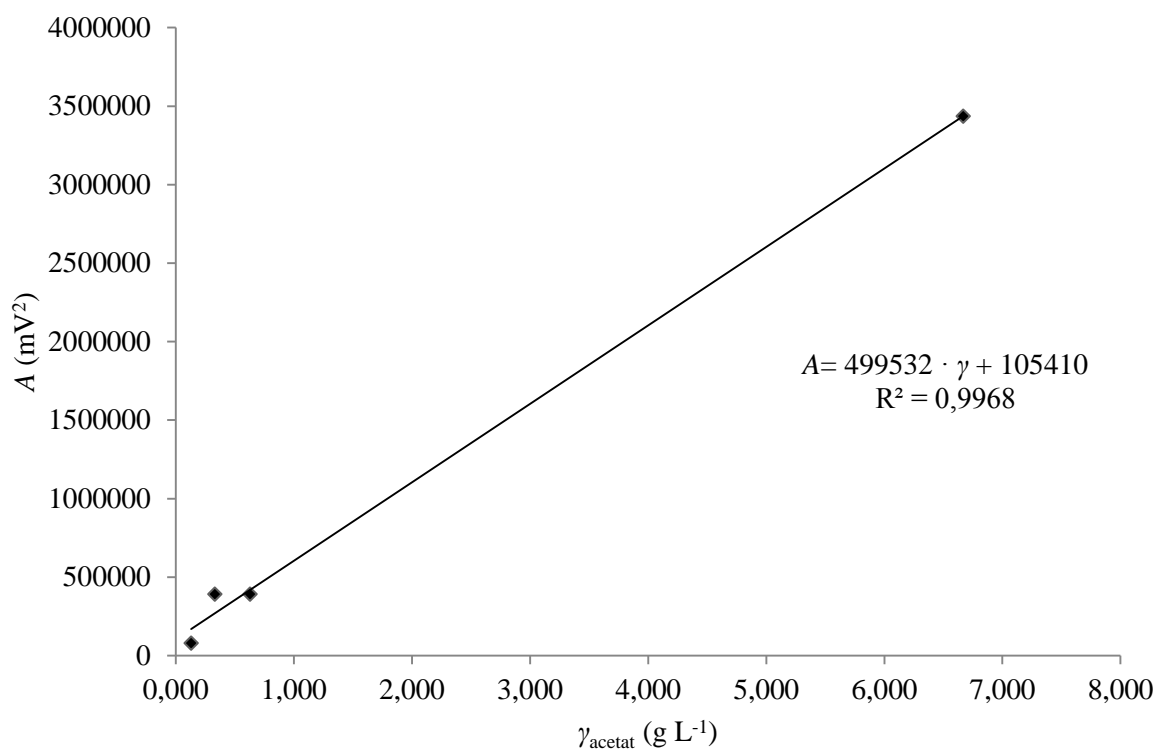
**Slika 34.** Baždarni dijagram ovisnosti površine pika ( $A$ ,  $\text{mV}^2$ ) fruktoze ( $t_R = 5,69$  min) o njenoj koncentraciji ( $\gamma_{\text{fruktoza}}$ ,  $\text{g L}^{-1}$ ) u otopini.



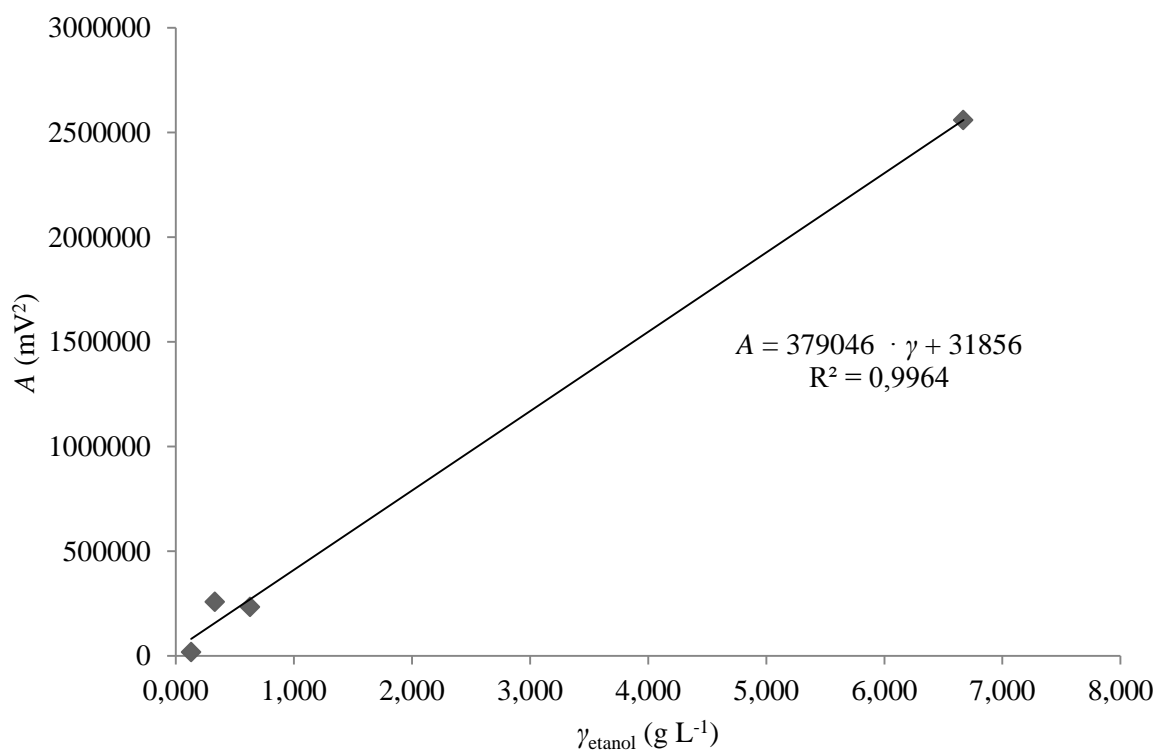
**Slika 35.** Baždarni dijagram ovisnosti površine pika ( $A$ ,  $\text{mV}^2$ ) laktata (L-enantiomer,  $t_R = 5,69$  min, ◆; D-enantiomer,  $t_R = 7,20$  min, ■; ukupni laktat, ▲) o njegovoj koncentraciji ( $\gamma_{\text{laktat}}$ ,  $\text{g L}^{-1}$ ) u otopini.



**Slika 36.** Baždarni dijagram ovisnosti površine pika ( $A$ , mV<sup>2</sup>) glicerola ( $t_R = 7,37$  min) o njegovoj koncentraciji ( $\gamma_{\text{glycerol}}$ , g L<sup>-1</sup>) u otopini.



**Slika 37.** Baždarni dijagram ovisnosti površine pika ( $A$ ,  $\text{mV}^2$ ) acetata ( $t_R = 8,47$  min) o njegovoj koncentraciji ( $\gamma_{\text{acetat}}$ ,  $\text{g L}^{-1}$ ) u otopini.



**Slika 38.** Baždarni dijagram ovisnosti površine pika ( $A$ , mV<sup>2</sup>) etanola ( $t_R = 11,26$  min) o njegovoj koncentraciji ( $\gamma_{\text{etanol}}$ , g L<sup>-1</sup>) u otopini.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Ana-Marija Gruičić