

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

FIZIOLOGIJA INDUSTRIJSKIH MIKROORGANIZAMA
- PRIRUČNIK ZA VJEŽBE -

prof. dr. sc. Anita Slavica

Hvala Marini Vnućec i Ljiljani Blažević na pomoći pri izradi ovog priručnika.

IZOLACIJA ČISTE KULTURE NEKIH INDUSTRIJSKIH MIKROORGANIZAMA

Mikroorganizmi obitavaju u različitim staništima kao što su tlo, voda, zrak, različita biljna i životinjska tkiva i organi. Mikroorganizme je potrebno izolirati iz njihovih staništa kao čiste kulture kako bi ih mogli istraživati i primijeniti u industrijskim bioprocima. U mikrobiologiji se pod pojmom čiste kulture podrazumijevaju stanice mikroorganizma koje su nastale razmnožavanjem jedne stanice. Bit izolacije čiste kulture određenog mikroorganizama je izdvajanje jedne stanice iz mješovite kulture.

Čiste kulture mikroorganizama kao i drugi biološki materijali [npr. različite (makro)molekule, virusi, stanice divljih tipova i mutanata, stanične linije i hibridoma] sakupljaju se, popisuju, pohranjuju i održavaju u zbirkaama te se iz njih, na zahtjev i uz određene uvjete, raspođjeljuju. Neke od ovih zbirki su: ATCC (eng. American Type Culture Collection, <http://www.lgcpromochem-atcc.com>), DSMZ (njem. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, <http://www.dsmz.de>) i JCM (eng. Japan Collection of Microorganisms, <http://www.jcm.riken.go.jp>).

Mikroorganizmi istog roda i vrste mogu biti dio različitih staništa. Tako se za izolaciju kvasaca *Saccharomyces* sp. odabire stanište u kojem se u najvećem broju najčešće nalaze kvasci iz roda *Saccharomyces*, a to su npr. površine voća i mošt. Tlo je uobičajeno stanište za mikrobne vrste kao što su bakterije iz roda *Streptomyces* i sporogene bakterije (bakterije iz rodova *Bacillus* i *Clostridium*), pa se ove vrste izoliraju iz različitih uzoraka tla.

Uvjeti izolacije određene čiste kulture odabiru se tako da najviše odgovaraju vrsti koju želimo izolirati, a ne pogoduju rastu preostalih vrsta mikroorganizama iz odabrane mješovite kulture tj. iz uzorka staništa. Tako se na samom početku izolacije eliminira dio neželjene mikrobne populacije iz staništa.

Uvjeti uzgoja određene vrste mikroorganizma odabiru se prema njegovim poznatim svojstvima. Tako je vrlo važno znati: pripada li vrsta aerobnim ili anaerobnim mikroorganizmima; može li sporulirati; koje su minimalne, optimalne i maksimalne pH vrijednosti hranjive podloge i temperature pri kojoj se uzgaja vrsta; zatim koje izvore ugljika i dušika vrsta može koristiti; je li vrsta otporna prema antibioticima, bojilima, itd.; kao i druga svojstva. Ovi se kriteriji primjenjuju i u mikrobiološkoj analitici prilikom izolacije i preliminarne karakterizacije pojedinih vrsta u različitim uzorcima. Izolacija industrijski važnih vrsta mikroorganizama kao i izolacija pojedinih vrsta iz različitih materijala obično započinje uzgojem u sterilnoj hranjivoj tekućoj podlozi. Sastav hranjive podloge i ostali odabrani

ekološki parametri uzgoja omogućavaju razmnožavanje mikroorganizma od interesa u toj mjeri da nakon inkubacije odabrana vrsta brojnošću znatno premašuje preostale vrste koje čine mješovitu kulturu. Nakon toga, obično se poraslom kulturom nacjepljuje sterilna čvrsta hranjiva podloga. Prilikom nanošenja suspenzije porasle kulture na površinu čvrste hranjive podloge stanice je potrebno razdijeliti tako da tijekom inkubacije iz svake odijeljene stanice izraste po jedna kolonija. Postupci i metode za izolaciju čiste kulture mikroorganizma mogu se razvrstati, kako slijedi:

1. Kochova metoda: mehaničko razdvajanje jedne stanice od druge stanice mikroorganizma na čvrstoj hranjivoj podlozi.

2. Lindnerova metoda viseće kapi: mikroskopsko traženje samo jedne stanice mikroorganizma u kapljici razrijeđene suspenzije i izdvajanje ove kapljice sa odabranom stanicom u aseptičnim uvjetima u odabranu hranjivu podlogu.

3. Primjena mikromanipulatora: mikromanipulator je uređaj koji se pričvršćuje na mikroskop i pomoću kojeg je moguće, uz korištenje pipete i kapilare, izdvojiti jednu stanicu određenog mikroorganizma iz suspenzije (razrjeđenja).

4. Mijenjanje fizioloških uvjeta koji osiguravaju određenu selektivnost: uzgoj pri različitim temperaturama i pH vrijednostima hranjive podloge, inhibicija nepoželjnih mikroorganizama nakon dodatka npr. bojila ili antibiotika, itd.

5. Uzgoj u ili na obogaćenim selektivnim tekućim ili čvrstim hranjivim podlogama pogodnim za rast određene vrste mikroorganizma koju želimo izolirati.

Čuvanje čistih kultura mikroorganizama

Čiste kulture mikroorganizama mogu se čuvati u tekućim ili na čvrstim hranjivim podlogama kroz relativno kratko vrijeme i to pri temperaturi od 4°C. Tako se čuvaju samo tzv. radne kulture mikroorganizama koje se gotovo svakodnevno koriste u laboratoriju za određena istraživanja ili za pripremu cjepiva u laboratorijskom mjerilu. Mikrobne kulture koje se ovako čuvaju potrebno je često precjepljivati jer se u opisanim uvjetima iscrpljuju određeni sastojci hranjive podloge, nakupljaju toksični proizvodi mikrobnog metabolizma i gubi se voda iz hranjive podloge, zbog čega aktivnost stanica mikroorganizma opada relativno brzo. Ovisno o vrsti mikroorganizma, radne kulture je potrebno precjepljivati svakih 7, 15 ili 30 dana.

Priređivanjem trajne kulture svojstva mikrobne kulture mogu se očuvati kroz duži vremenski period. Trajne kulture mogu se pripremiti na nekoliko načina. Jednostavnije trajne kulture su:

1. Kultura na kosoj hranjivoj podlozi u epruvetama i pod slojem parafinskog ulja: u epruvetu sa poraslom kulturom dolije se sterilno parafinsko ulje tako da površina hranjive podloge s poraslom kulturom bude potpuno prekrivena parafinskim uljem. Ovako priređena kultura čuva se pri temperaturi od 4°C.
2. Kultura na kosoj hranjivoj podlozi u epruveti začepljenoj zaparafiniranim vatenim čepom. Ovako priređena kultura čuva se pri temperaturi od 4°C.
3. Suspenzija kulture nanešena na sterilnu zemlju ili pijesak u epruveti začepljenoj zaparafiniranim vatenim čepom: relativno mali volumen suspenzije kulture uzgojene u tekućoj hranjivoj podlozi (manje od 1 mL) u aseptičnim uvjetima se postupno sterilnom pipetom prenese u epruvetu sa sterilnom zemljom ili sterilnim pijeskom. Zemlja ili pijesak se prethodno tri puta uzastopno steriliziraju pri temperaturi od 121°C kroz 20 minuta. Ovako priređena kultura se čuva pri temperaturi od 4°C.

Trajne kulture pripravljene opisanim postupcima potrebno je jednom godišnje uzgojiti i utvrditi njihova fiziološka svojstva prije ponovnog pripremanja kulture u trajnom obliku.

Za pripremu vrlo trajnih mikrobnih kultura potrebna je složenija oprema i postupci. Vrlo trajna kultura može se prirediti postupkom liofilizacije. Ovaj postupak podrazumijeva sušenje suspenzije kulture koja je prethodno uzgojena u tekućoj hranjivoj podlozi i to u vakuumu ($p = 5-7$ Pa) pri temperaturi od -78°C u liofilizatorima. Nakon provedenog postupka vrh epruvete sa liofiliziranom kulturom se zatali. Ovako pripremljena trajna kultura može se čuvati 10 ili više godina. Obično se zataljena epruveta (ampula) stavlja u još jednu epruvetu koja sadrži silikagel (SiO_2) koji u prisutnosti tragova vode (vlage) mijenja boju. Osim liofilizacije, vrlo trajna kultura može se pripremiti smrzavanjem. Suspenzija kulture koje je prethodno porasla u tekućoj hranjivoj podlozi naglo se smrzne pri temperaturi od -60°C i zatim čuva pri temperaturi od -20°C.

Principi na kojima se zasnivaju izolacije čiste kulture određenih industrijskih mikroorganizama na vježbama

Izolacija čiste kulture kvasca

Čistu kulturu kvasca iz roda *Saccharomyces* možemo izolirati tako da bobicu grožđa prenesemo u epruvetu sa sterilnom sladovinom. Sladovina je vrlo pogodna hranjiva podloga za rast kvasca iz roda *Saccharomyces*. Tijekom inkubacije pri optimalnoj temperaturi od 28°C doći će do intenzivnog rasta kvasca uz nastanak etanola i CO_2 . Razvijanjem CO_2 uspostavljaju

se mikroaerofilni uvjeti u epruveti, a proizvodnjom etanola inhibira se rast većeg broja preostalih mikroorganizama.

Izolacija bakterija iz roda *Lactobacillus*

Izolacija čiste kulture bakterija iz roda *Lactobacillus* olakšana je svojstvom nekih vrsta iz ovog roda koje su termofilne i pokazuju optimalan rast pri temperaturama od 45°C do 50°C. Tijekom rasta ovih bakterija kao krajnji proizvod metabolizma ugljikohidrata proizvodi se mliječna kiselina koja, ovisno o koncentraciji proizvedene mliječne kiseline, može znatno sniziti pH vrijednost podloge. Osim toga, proizvedena mliječna kiselina djeluje toksično na većinu saprofitnih mikroorganizama i to već pri koncentraciji većoj od 10 g L⁻¹ (*w* = 1%). Pri koncentraciji većoj od 20 g L⁻¹ (*w* = 2%) mliječna kiselina inhibira i rast proizvodnih mikroorganizama - bakterija iz roda *Lactobacillus*.

Izolacija bakterija iz roda *Clostridium*

Pri izolaciji čiste kulture bakterija iz roda *Clostridium* potrebno je imati na umu sljedeće:

- a) bakterije iz roda *Clostridium* su obligatni anaerobi,
- b) ove su bakterije sporogene,
- c) bakterije iz roda *Clostridium* imaju amilolitičke enzime pa mogu koristiti škrob kao izvor ugljika,
- d) optimalna temperatura za rast ovih bakterija je 37°C.

S obzirom na pobrojano, stanište bakterija iz roda *Clostridium* (uzorak tla) prenosi se u epruvetu sa sterilnom kukuruznom kominom. U ovoj je hranjivoj podlozi škrob jedini izvor ugljika. Ovako nacijepljena podloga se zagrijava kroz jednu minutu pri temperaturi od 100°C kako bi se uništili vegetativni oblici, a preostali samo sporogeni oblici bakterija iz roda *Clostridium*. Anaerobni uvjeti postižu se dolijevanjem sterilnog parafinskog ulja u epruvetu s nacijepljenom hranjivom podlogom, čime se onemogućava pristup zraku tj. kisiku. Nacijepljena hranjiva podloga inkubira se pri temperaturi od 37°C.

Izolacija bakterija iz roda *Streptomyces*

Metoda diferencijalnog centrifugiranja koristi se pri izolaciji bakterija iz roda *Streptomyces*. Centrifugiranjem kroz 20 minuta pri brzini okretaja od 2000 min⁻¹ odijelit će se stanice kvasaca i plijesni u donji dio kivete, stanice bakterija će ostati pri površini suspenzije, a bakterije iz roda *Streptomyces*, koje su zrakaste bakterije, izdvojit će se pri sredini kivete.

Sterilnom pipetom iz sredine kivete uzimamo uzorak suspenzije koji nacijepljujemo na selektivnu čvrstu hranjivu podlogu za aktinomicete. Bakterije iz roda *Streptomyces* dobro rastu pri temperaturi od 28°C, pa će ova temperatura biti jedan od uvjeta koji će pospješiti izolaciju čiste kulture ove bakterije.

Zadatak: Izolirati čistu kulturu:

- a) kvasca *Saccharomyces* sp.,
- b) bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus* sp.,
- c) bakterije *Clostridium* sp. i
- d) bakterije *Streptomyces* sp.

I. Radni dan

a) Izolacija *Saccharomyces* sp.

U staklenu epruvetu sa sterilnom sladovinom (volumen sladovine je 10 mL, udio suhe tvari u sladovini je 12%) u aseptičnim uvjetima doda se zrno grožđa (ili drugog voća), promućka i ostavi u termostatu pri temperaturi od 28°C kroz 48 h.

Ovdje se koristi sladovina iz pivovare, koja obično ima >20% suhe tvari. Sladovina iz pivovare se razrijedi demineraliziranom vodom do 12% suhe tvari i sterilizira direktno parom u autoklavu (121°C/20 min).

b) Izolacija *Lactobacillus* sp.

U Erlenmeyer tikvicu koja sadrži 50 mL sterilne sladovine (udio suhe tvari 9-12%) u aseptičnim uvjetima prenese se oko 1 g kiselog kupusa (ili zdrobljenog žita ili silaže). Pomoću indikator papirića odredi se početna pH vrijednost nacijepljene sladovine: u aseptičnim uvjetima sterilnom pipetom uzme se kap nacijepljene sladovine i kapne na indikator papirić, koji je položen na staničevinu, te se uspoređivanjem boje vlažnog papirića i pH skale utvrdi početna pH vrijednost nacijepljene sladovine. Zatim se nacijepljena sladovina ostavi u termostatu kroz 24-48 h pri temperaturi od 45°C.

c) Izolacija *Clostridium* sp.

Oko 1 g uzorka tla prenese se u aseptičnim uvjetima u Erlenmeyer tikvicu (500 mL) koja sadrži 99 mL sterilne vode (razrijeđenje 10^{-2}). Tikvica se zatim stavi kroz 10 minuta na laboratorijsku tresilicu kako bi se dobila jednoličnija suspenzija. Sterilnom pipetom se prenese 1 mL suspenzije u epruvetu s 9 mL sterilne vode (razrijeđenje 10^{-3}). Sadržaj epruvete se

homogenizira te se 1 mL ove suspenzije prenese u slijedeću epruvetu s 9 mL sterilne vode (razrijeđenje 10^{-4}). Postupak se ponavlja do razrijeđenja 10^{-6} (uzastopno razrijeđivanje pripravljenog razrijeđenja 10^{-4} u slijedeće dvije epruvete s 9 mL sterilne vode). 1 mL suspenzije ovog razrijeđenja prenese se u epruvetu za uzgoj anaeroba koja sadrži 10 mL sterilne kukuruzne komine [kukuruzne močevine, eng. corn steep liquor (CSL), sa 5% suhe tvari]. Nacijepljena hranjiva podloga prelije se sterilnim parafinskim uljem tako da sloj ulja bude visok oko 1 cm kako bi se postigli anaerobni uvjeti uzgoja u hranjivoj podlozi. Nakon toga, epruveta se uroni u kipuću vodu kroz približno 1 min, a zatim ohladi do sobne temperature i inkubira kroz 48 h pri temperaturi od 37°C .

d) Izolacija *Streptomyces* sp.

Suspenzija uzorka tla (oko 1 g) u sterilnoj vodi (99 mL), koja je već pripremljena za izolaciju *Clostridium* sp. (razrijeđenje 10^{-2}), koristi se kao polazni uzorak za izolaciju *Streptomyces* sp. Sterilnom pipetom se uzme 0,5 mL ovog razrijeđenja i u aseptičnim uvjetima prenese u Erlenmeyer tikvicu sa 100 mL sterilne vode (razrijeđenje $\approx 5 \cdot 10^{-5}$) i dobro promućka. Dio ove suspenzije (oko 30 mL) se prebaci u jednu epruvetu (kivetu) za centrifugiranje (tako da se ispuni $2/3$ volumena kivete), kiveta sa suspenzijom se tarira na vagi sa nasuprotnom kivetom i centrifugira 20 minuta pri brzini okretaja od 2000 min^{-1} . Nakon centrifugiranja sa sredine kivete otpipetira se 0,1 mL suspenzije i nacijepi u Petry-jevu zdjelicu koja sadrži selektivnu čvrstu hranjivu podlogu za aktinomicete. Nacjepljenu suspenziju treba dobro razmazati po čvrstoj hranjivoj podlozi pomoću staklenog štapića po Drigalsky-om. Štapić po Drigalsky-om se prethodno umoči u alkohol i alkohol se zapali provlačenjem kroz plamen laboratorijskog plinskog plamenika. Inkubacija nacijepljene podloge u Petry-jevoj zdjelici traje 8-10 dana pri temperaturi od 28°C .

II. Radni dan

a) Izolacija *Saccharomyces* sp.

Iz sladovine u kojoj je porastao kvasac napravi se nativni mikroskopski preparat (vidi Prilog 1.). Osim mikroskopskog preparata, potrebno je načiniti razrijeđenje suspenzije, kako bi se izolirala čista kultura *Saccharomyces* sp. Sterilnom pipetom uzme se 1 mL suspenzije i u aseptičnim uvjetima prenese u epruvetu sa 9 mL sterilne vode, ovo se razrijeđenje homogenizira mućkanjem ili pomoću laboratorijske mješalice (eng. vortex), a zatim se iz ove epruvete uzme 1 mL suspenzije i prenese u 9 mL sterilne vode u drugoj epruveti. Postupak se ponovi do

razrijeđenja 10^{-6} . Volumen načinjenog razrijeđenja od 1 mL iz (pred)zadnje epruvete (razrijeđenje 10^{-5} ili 10^{-6}) se prenese u aseptičnim uvjetima u sterilnu Petry-jevu zdjelicu i prelije sterilnom podlogom sladovina-agar koja ima temperaturu od oko 45°C . Laganim pomicanjem Petry-jeve zdjelice po radnom stolu sadržaj zdjelice se homogenizira. Kad se hranjiva podloga sa suspenzijom ohladi, zdjelica se ostavi u termostatu kroz 48 h pri temperaturi od 28°C .

b) Izolacija *Lactobacillus* sp.

Iz tikvice sa sladovinom u kojoj su porasle bakterije iz roda *Lactobacillus* odredi se kiselost podloge pomoću indikator papirića, a zatim se napravi mikroskopski preparat i oboji po Gram-u (vidi Prilog 1.). Volumen od 1 mL suspenzije otpipetira se i u aseptičnim uvjetima prenese u epruvetu s 9 mL sterilne vode. Postupak se ponovi do razrijeđenja 10^{-4} . Iz zadnje epruvete prenese se 1 mL suspenzije u aseptičnim uvjetima u sterilnu Petry-jevu zdjelicu i prelije se sterilnom podlogom sladovina-agar koja ima temperaturu od oko 45°C . Zdjelica se poklopi, a sadržaj se pažljivo promiješa kružnim pomicanjem zdjelice u vodoravnom položaju (na stolu). Kada se hranjiva podloga sa suspenzijom ohladi, zdjelica se ostavi u termostatu pri temperaturi od 45°C kroz 48 h.

c) Izolacija *Clostridium* sp.

Iz epruvete za uzgoj anaeroba sa suspenzijom anaerobnih vrsta u kukuruznoj komini sa slojem parafinskog ulja sterilnom pipetom se u aseptičnim uvjetima uzme uzorak iz bistrijeg dijela podloge i priredi mikroskopski preparat koji se oboji po Schaeffer-Fulton-u (vidi Prilog 1.). Pri uzimanju uzorka treba paziti da se pipeta s vanjske strane obriše staničevinom kako se parafinsko ulje ne bi prenijelo na predmetnicu. Nakon mikroskopiranja preparata, načini se razrijeđenje uzorka do 10^{-5} i to u aseptičnim uvjetima. Iz zadnje epruvete prenese se 0,1 mL razrijeđene suspenzije na čvrstu hranjivu podlogu za uzgoj bakterija iz roda *Clostridium* (vidi Prilog 1.). Suspenzija se razmaže pomoću staklenog štapića po Drigalsky-om. Zdjelica se zatvori u plastičnu vrećicu/kontejner u kojoj/kojem su osigurani anaerobni uvjeti. Vrećica sa zdjelicom se ostavi u termostatu kroz 48 h pri temperaturi od 37°C .

d) Izolacija *Streptomyces* sp.

Iz jedne porasle kolonije karakteristične morfologije načini se mikroskopski preparat i oboji po Gram-u (vidi Prilog 1.). Odabere se morfološki slična kolonija i u aseptičnim uvjetima materijal prenese pomoću bakteriološke ušice na čvrstu hranjivu podlogu za sporulaciju (vidi

Prilog 1.) u dvije epruvete. Inkubacija nacijepljene podloge traje oko 7 dana pri temperaturi od 28°C.

III. Radni dan

a) Izolacija *Saccharomyces* sp.

Iz jedne porasle kolonije napravi se nativni mikroskopski preparat i mikroskopira (vidi Prilog 1.). Jedna se kolonija (morfološki slična onoj iz koje smo načinili preparat) prenese u aseptičnim uvjetima u sterilnu tekuću sladovinu i inkubira pri temperaturi od 28°C kroz 48 h.

b) Izolacija *Lactobacillus* sp.

Iz jedne porasle kolonije napravi se mikroskopski preparat, oboji po Gram-u (vidi Prilog 1.) i mikroskopira. Jedna se kolonija (morfološki slična onoj iz koje smo načinili preparat) prenese u aseptičnim uvjetima u tekuću sladovinu sa kalcijevim karbonatom i sladnim klicama, te inkubira kroz 48 h pri temperaturi od 45°C.

c) Izolacija *Clostridium* sp.

Iz jedne od poraslih kolonija načini se mikroskopski preparat, oboji po Schaeffer-Fulton-u (vidi Prilog 1.) i mikroskopira. Jedna se kolonija (morfološki slična onoj iz koje smo načinili preparat) prenese u aseptičnim uvjetima u epruvetu sa kukuruznom kominom (5% suhe tvari), nacijepljena hranjiva podloga se prelije parafinskim uljem i inkubira kroz 48 h pri temperaturi od 37°C.

d) Izolacija *Streptomyces* sp.

Kad su bakterije iz roda *Streptomyces* sporulirale, napravi se mikroskopski preparat, oboji po Gram-u (vidi Prilog 1.) i mikroskopira. Zatim se dio vatenog čepa, koji se nalazi izvan epruvete, postupno umače u rastaljeni parafin i ohladi. Ovako pripremljena kultura može se čuvati kroz 6-12 mjeseci pri temperaturi od 4°C.

IV. Radni dan

a) Izolacija *Saccharomyces* sp.

Iz suspenzije kvasca uzme se kapljica suspenzije mikrobiološkom ušicom i u aseptičnim uvjetima nacijepi na dvije kose sterilne podloge sladovina-agar. Nacijepljene

podloge inkubiraju se kroz 48 h pri temperaturi od 28°C. Napravi se nativni mikroskopski preparat i mikroskopira (vidi Prilog 1.).

b) i c) izolacija čistih kultura bakterija *Lactobacillus* sp. i *Clostridium* sp.

Po 0,5 mL tekuće podloge u kojoj su porasle čiste kulture bakterija iz rodova *Lactobacillus* i *Clostridium* postupno se, jedna po jedna zasebno, prenesu na sterilni pijesak u epruvetama i to u aseptičnim uvjetima. Epruvete sa sterilnim pijeskom i suspenzijom se zatvore vatenim čepom, ostave kroz određeno vrijeme kroz koje će pijesak upiti suspenziju, a zatim se čep umoči u parafin i ostavi da se ohladi. Ovako se pripreve jednostavnije trajne čiste kulture izoliranih bakterija *Lactobacillus* sp. i *Clostridium* sp. Naprave se mikroskopski preparati, oboje po Gram-u tj. Schaeffer-Fulton-u i mikroskopiraju (vidi Prilog 1.).

V. Radni dan

a) Izolacija *Saccharomyces* sp.

Nakon inkubacije čiste kulture kvasca u epruveti sa slavinom, vateni čep se umoči u rastaljeni parafin, zaparfinira i ohladi. Ovako pripremljena kultura može se čuvati kroz duži vremenski period pri temperaturi od 4°C.

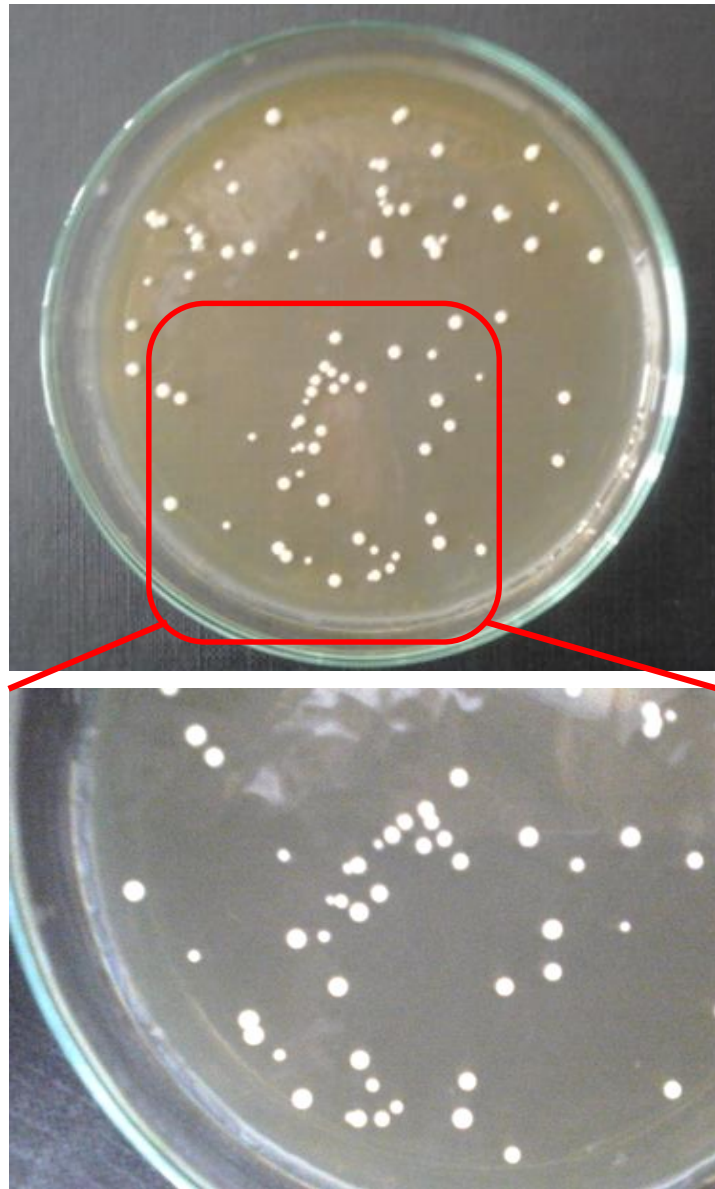
Prilog 1.

Bojenje bakterijskih stanica po Gram-u

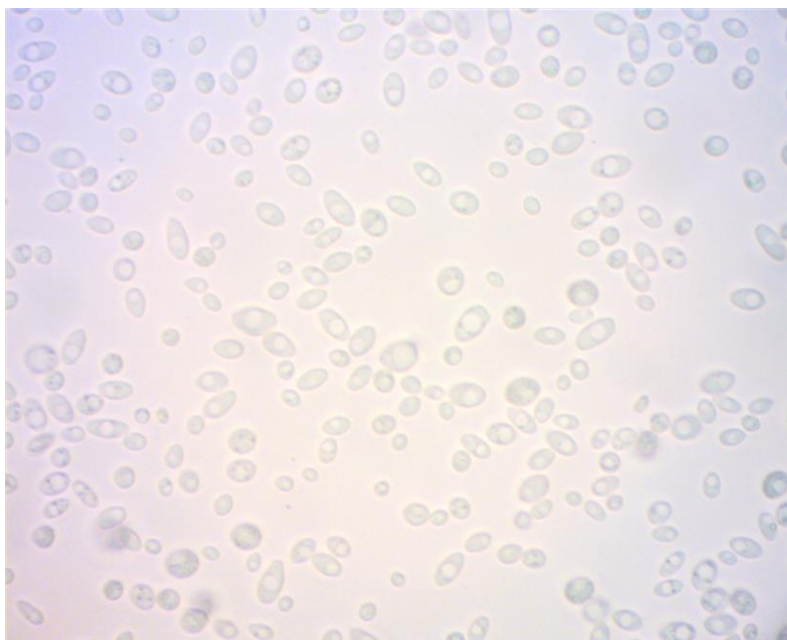
1. Nanijeti jednu-dvije kapi suspenzije na predmetnicu.
 2. Raspodijeliti suspenziju mikrobiološkom ušicom u tankom sloju po površini predmetnice.
 3. Osušiti razmazanu suspenziju na zraku ili kratkim provlačenjem kroz plamen (vidi ovdje ispod).
 4. Fiksirati uzorak provlačenjem predmetnice kroz plamen (najmanje) tri puta.
 5. Nanijeti bojilo **gencijana violet** (kristal violet) i ostaviti kroz **1 minutu**.
 6. Nanijeti **lugolovu otopinu** (otopina I₂ u KI) i ostaviti kroz **1 minutu**.
 7. Odbojati preparat 96%-tnim **etanolom** ili smjesom etanol-aceton, oprezno dodavati **kap po kap** otopine, sve dok se boja ne ispere s fiksiranog uzorka.
 8. Isprati preparat **vodom**.
 9. Bojiti preparat kontrastnim bojilom **safraninom** i ostaviti kroz **5 minuta**.
 10. Isprati preparat **vodom**.
 11. **Sušiti** preparat na zraku ili pomoću papira (staničevine).
 12. Mikroskopirati priređeni preparat koristeći imerzijski objektiv.
- Gram pozitivne bakterijske stanice ostaju obojene grimizno ili tamno plavo, a Gram negativne crveno.

Bojenje bakterijskih vegetativnih stanica i endospora - metoda po Schaeffer-Fulton-u

1. Nanijeti suspenziju na predmetnicu.
 2. Raspodijeliti suspenziju mikrobiološkom ušicom u tankom sloju po površini predmetnice.
 3. Osušiti razmazanu suspenziju na zraku ili provlačenjem kroz plamen (vidi ovdje ispod).
 4. Fiksirati uzorak provlačenjem predmetnice kroz plamen (najmanje) tri puta.
 5. Preko čitave predmetnice nanijeti bojilo **malahitno zelenilo**.
 6. Slijedi **trokratno zagrijavanje**: pridržavajući predmetnicu štipaljkom preparat zagrijati s donje strane na plamenu (**nekoliko sekundi** – do početka isparavanja otapala), a onda odmaknuti u stranu da se ohladi. Nakon otprilike minutu postupak se ponavlja, ukupno tri puta (trokratno zagrijavanje).
 7. Preparat ohladiti i **oprati pod (manjim) mlazom vode**.
 8. Nanijeti kontrastno bojilo **safranin** i ostaviti kroz **5 minuta**.
 9. Isprati **vodom**.
 10. **Sušiti** preparat na zraku ili pomoću papira (staničevine).
 11. Mikroskopirati priređeni preparat koristeći imerzijski objektiv.
- Endospore dobro načinjenog preparata su obojene zeleno, a vegetativne stanice crveno (ili ružičasto).

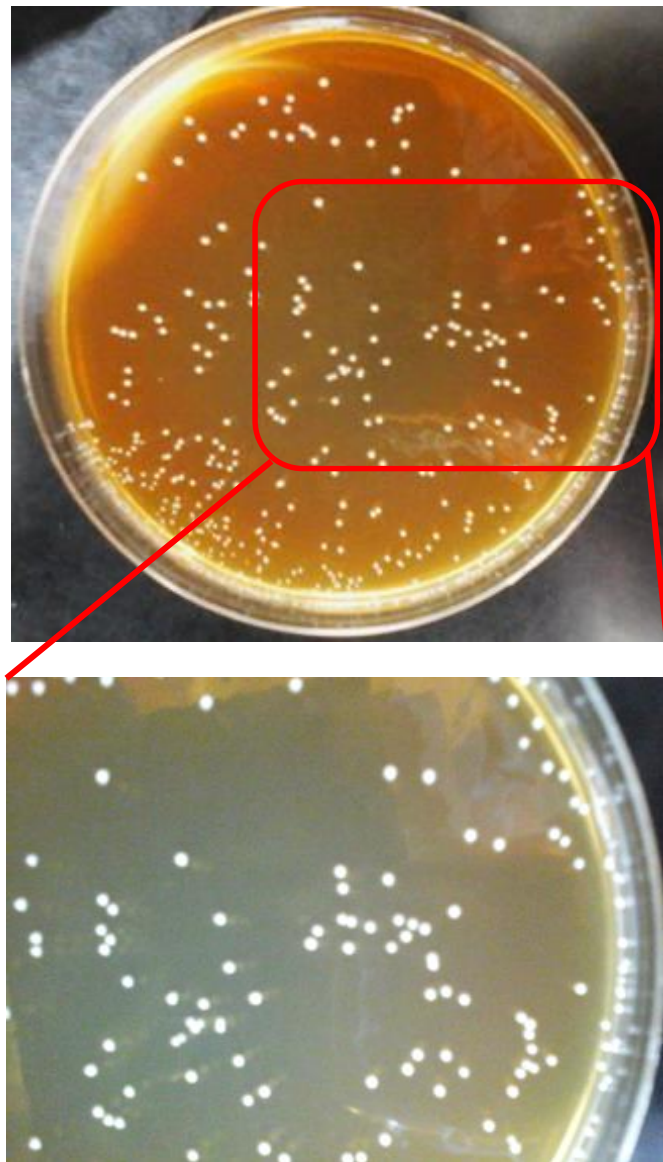


Slika P.1.1. Kolonije kvasca iz roda *Saccharomyces* porasle na čvrstoj hranjivoj podlozi sladovina-agar nakon inkubacije (28°C/24 h).



Slika P.1.2. Mikroskopska slika nativnog preparata kvasca iz roda *Saccharomyces*.

Za izradu ove mikroskopske slike korišteni su: mikroskop Olympus CX21FS1 (Olympus; Tokyo, Japan), Dino-Eye Microscope Eye-Piece kamera (Microscope.com, The Microscope Store, LLC, SAD) sa pripadajućim programom (DinoCapture 2.0). Ova je oprema korištena pri izradi svih mikroskopskih slika koje su prikazane u ovom priručniku za vježbe. Povećanje ove mikroskopske slike je 400x.

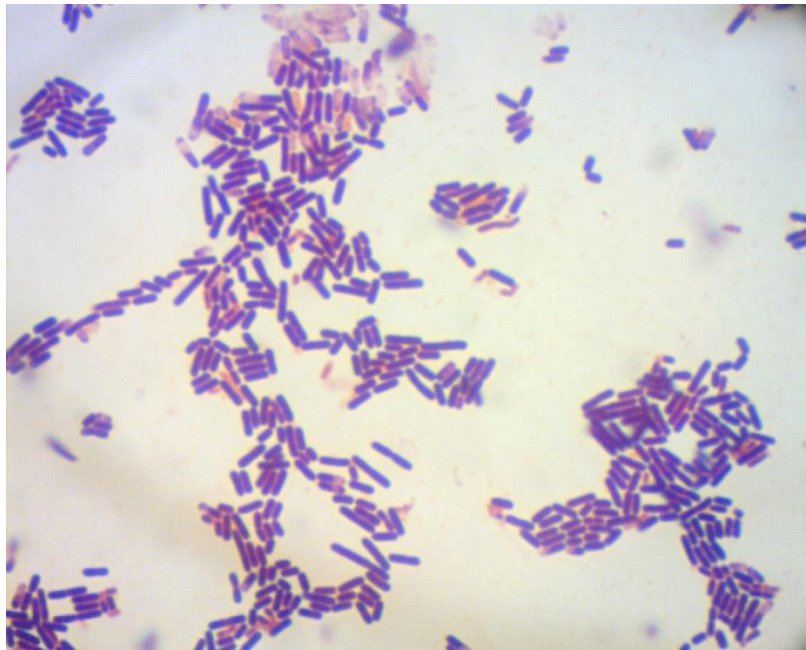


Slika P.1.3. Kolonije bakterije iz roda *Lactobacillus* porasle na čvrstoj hranjivoj De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) podlozi nakon inkubacije (37°C/24 h).

Tablica P.1.1. Sastav čvrste hranjive De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) podloge (pH 6.2±0.4)

(Biolife; Milano, Italija).

sastojak	γ (g L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	2
CH ₃ COONa · 3 H ₂ O	8,3
MgSO ₄	0,2
MnSO ₄ · H ₂ O	0,06
HOC(CO ₂ H)(CH ₂ CO ₂ NH ₄) ₂	2
glukoza	20
pepton	10
mesni ekstrakt	10
kvašćev ekstrakt	5
Tween 80®	1 mL
agar	15



Slika P.1.4. Mikroskopska slika preparata bakterije iz roda *Lactobacillus* koji je obojen po Gram-u. Ukupno povećanje ove mikroskopske slike kao i drugih mikroskopskih slika koje su načinjene uz korištenje imerzijskog objektiv (100x) je 1000x.



Slika P1.5. Mikroskopska slika preparata bakterije iz roda *Clostridium* koji je obojen po Schaeffer-Fulton-u. Ukupno povećanje ove mikroskopske slike je 1000x.

Tablica P.1.2. Sastav hranjive podloge za uzgoj *Clostridium* sp. (pH 7,0).

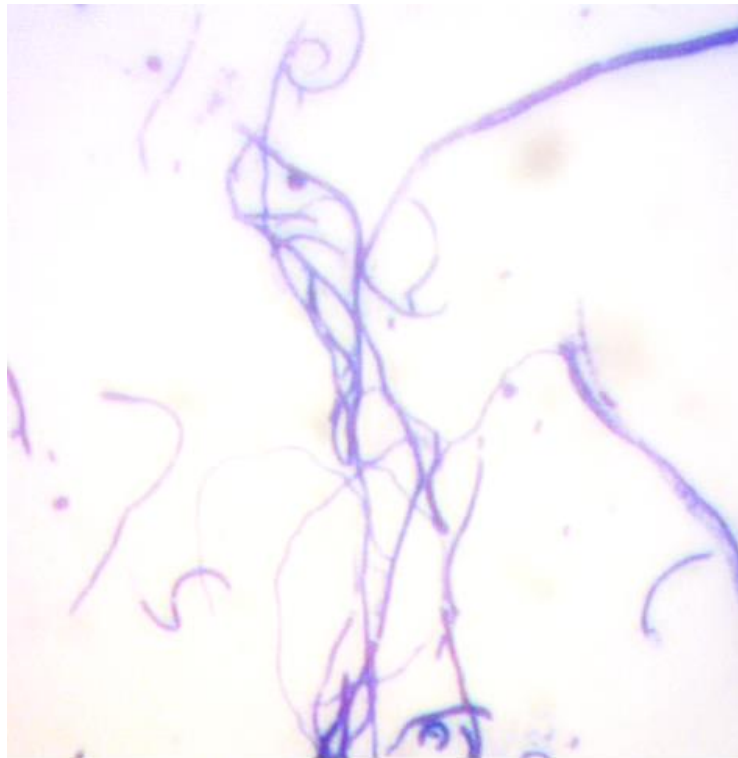
sastojak	γ (g L ⁻¹)
bujon	22
laktoza	20
agar	22



Slika P.1.6. Kolonije bakterije iz roda *Streptomyces* porasle na čvrstoj hranjivoj podlozi (vidi ispod) nakon inkubacije (28°C/72 h).

Tablica P.1.3. Sastav hranjive podloge za uzgoj *Streptomyces* sp. (pH 6,8-7,0).

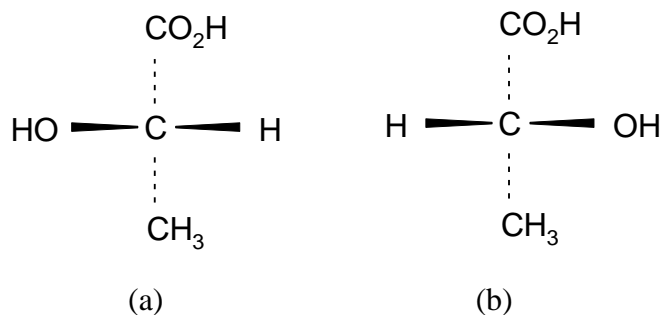
sastojak	γ (g L ⁻¹)
pepton	2,0
kvašćev ekstrakt	2,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5
glukoza	5,0
kazein	2,0
agar	20



Slika P.1.7. Mikroskopska slika preparata bakterije iz roda *Streptomyces* koji je obojen po Gram-u. Ukupno povećanje ove mikroskopske slike je 1000x.

PROIZVODNJA MLIJEČNE KISELINE

Mliječna kiselina ($C_3H_6O_3$; 2-hidroksipropanska kiselina) je važan biotehnološki proizvod koji ima široku primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj, tekstilnoj, kožarskoj i kemijskoj industriji. Ova se organska kiselina do nedavno proizvodila kemijskom sintezom iz petrokemikalija, a danas se proizvodi fermentacijom različitih supstrata uz primjenu određenih vrsta mikroorganizama (John i sur., 2009). Racemična smjesa dvaju optički aktivnih izomera mliječne kiseline može se dobiti kemijskom sintezom. Ova se kiselina može dobiti i drugim kemijskim postupcima kao što su: razgradnja ugljikohidrata lužinom; oksidacija propilenglikola, reakcija acetaldehida, ugljikovog monoksida i vode pri povišenim temperaturama i tlaku; hidroliza kloropropionske kiseline te oksidacija propilena nitratnom kiselinom. Pobrojanim se kemijskim postupcima proizvodi mliječna kiselina na tehnički, ekonomski i ekološki neprihvatljiv način. Biotehnološkom proizvodnjom s pomoću različitih sojeva bakterija mliječne kiseline može se dobiti smjesa stereoizomera mliječne kiseline, ali i stereospecifična, D-(-)- ili L-(+)-mliječna kiselina (Slika 2.1.). U biotehnološkoj proizvodnji mliječne kiseline istražuje se primjena funga iz rodova *Mucor*, *Monilia* i *Rhizopus* (*Rhizopus oryzae*), genetički modificiranih kvasaca (npr. *Saccharomyces cerevisiae* i *Kluyveromyces lactis*), kao i bakterija, koje se najčešće koriste u proizvodnji mliječne kiseline. Ove bakterije najčešće pripadaju rodovima *Lactobacillus* (npr. *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. intermedius*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. amylophilus* i *L. amylovorus*), *Streptococcus*, *Leuconostoc* i *Enterococcus*.



Slika 2.1. L-(+)-mliječna kiselina (a) i D-(-)-mliječna kiselina (b).

Ekonomski povoljna i ekološki prihvatljiva biotehnološka proizvodnja mliječne kiseline podrazumijeva mikrobnu fermentaciju polimernih supstrata iz obnovljivih sirovina kao i sporednih proizvoda i tzv. otpadnih tvari nastalih tijekom različitih bioprocasa. Relativno

jeftine sirovine (npr. melasa, sladovina, sirutka, brašno, mekinje, celuloza, biljna biomasa) koje sadrže glukozu, saharozu, škrob i druge ugljikohidrate, nalaze primjenu u industrijskoj proizvodnji ove kiseline. Obično se konverzija kompleksnih supstrata do mliječne kiseline odvija dvostupanjskim procesom: nakon kiselinske ili enzimske hidrolize polimernih ugljikohidrata provodi se mikrobna fermentacija nastalih oligo-, di- i monosaharida. Jednostupanjski procesi u kojima se hidroliza i fermentacija škroba do mliječne kiseline odvija direktno uz primjenu bakterija mliječne kiseline s amilolitičkom aktivnošću (bakterije iz rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus*) znatno su ekonomski povoljniji.

Bakterije mliječne kiseline čine specifičnu skupinu srodnih bakterija koje proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji proizvod metabolizma. Ovo su Gram-pozitivne bakterije koje su mikroaerofili i ne sporuliraju. Bakterije mliječne kiseline čine grupu bakterija koje su svrstane u oko 20 rodova i najvažniji rodovi su: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella*. Rod *Lactobacillus* s oko 80 vrsta je najbrojniji. Tradicionalno se bakterije mliječne kiseline koriste kao starter kulture u procesima prerade mlijeka, mesa, ribe i povrća. Ovi proizvodi obično imaju relativno nisku pH vrijednost zbog proizvedene mliječne kiseline, čime se usporava ili onemogućava rast različitih nepoželjnih mikroorganizama.

U stanicama bakterija mliječne kiseline ugljikohidrati se mogu fosforilirati tijekom transporta fosfoenolpiruvat-fosfotransferaznim sustavom (PTS-om). Bakterije mliječne kiseline koriste dva puta za razgradnju heksoza, glikolizu ili Embden-Meyerhof-Parnasov put (Slika 2.2.) i 6-fosfoglukonat/fosfoketolazni put (Slika 2.3.). Enzim fosfoketolaza katalizira fosforolizu ugljikohidrata i tako nastaje energijom bogati acetil-fosfat i odgovarajući spoj koji ima dva ugljikova atoma manje od početnog supstrata (Hammes i Hertel, 2009; Hofvendahl i Hahn-Hägerdal, 2000; Neves i sur., 2005).

S obzirom na način kojim fermentiraju heksoze, bakterije mliječne kiseline mogu se podijeliti u tri grupe: obligatno homofermentativne bakterije, obligatno heterofermentativne bakterije i fakultativno heterofermentativne bakterije mliječne kiseline (Hammes i Hertel, 2009).

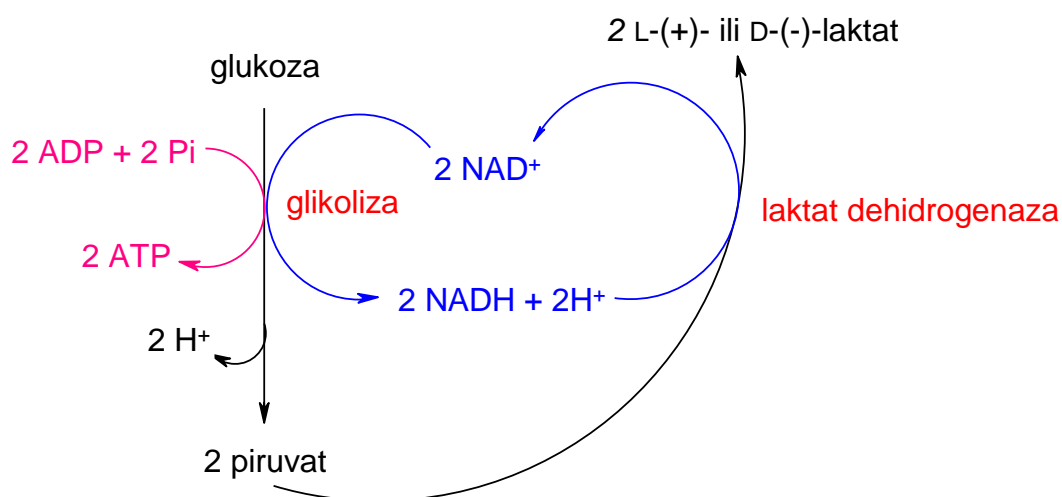
Obligatno homofermentativne bakterije razgrađuju heksoze Embden-Meyerhof-Parnasovim putem do mliječne kiseline, ne mogu koristiti pentoze ili glukonat kao supstrat. U uvjetima kada nema limitacije izvorom ugljika a pristup kisika je ograničen, iz jedne molekule glukoze nastaju dvije molekule mliječne kiseline i dvije molekule ATP-a. Obligatno homofermentativne bakterije podijeljene su u dvije filogenetske podgrupe - *L. delbrueckii*

grupu i *L. casei-Pediococcus* grupu. Neki od predstavnika obligatno homofermentativnih bakterija su: *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* i *L. helveticus*.

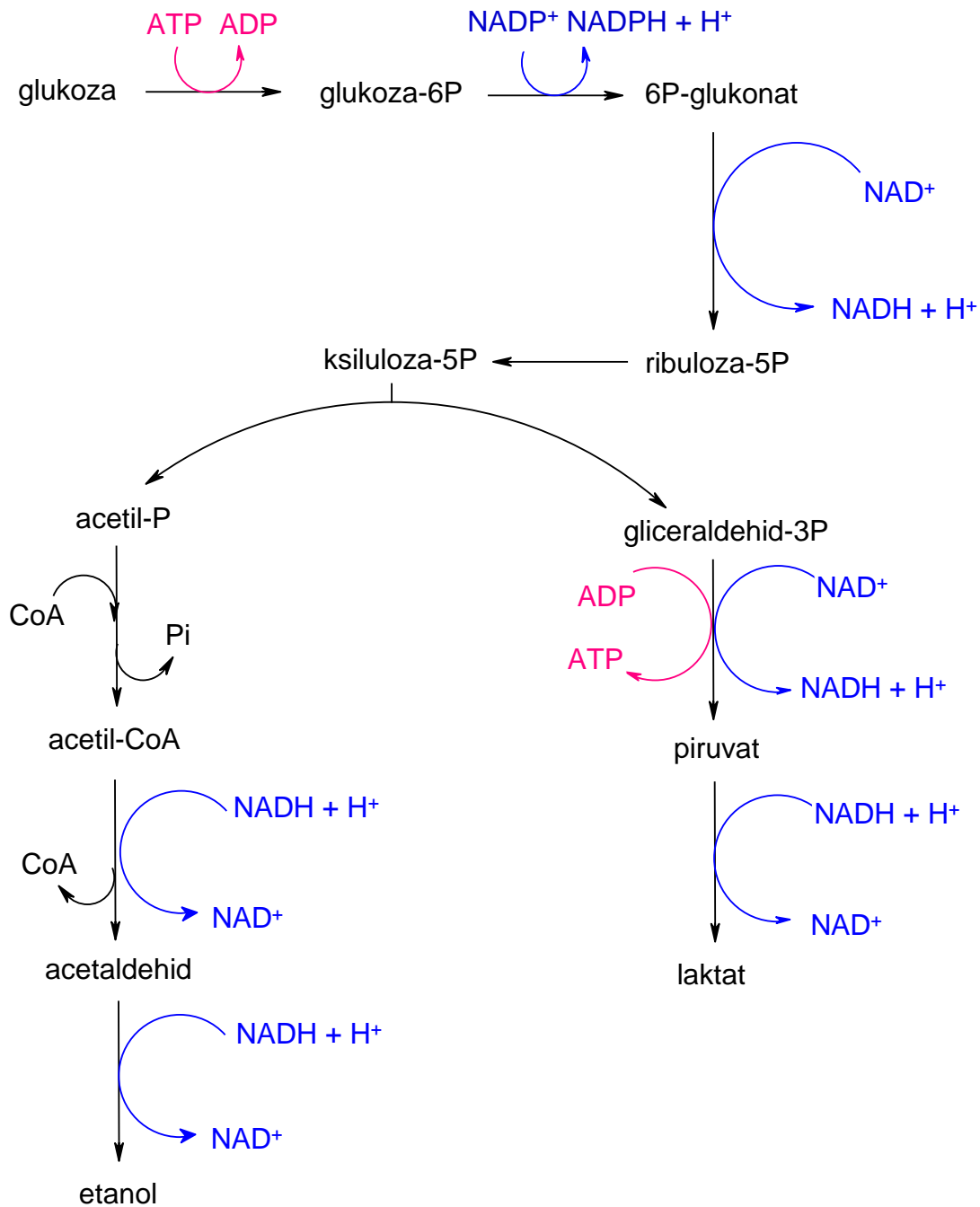
Obligatno heterofermentativne bakterije razgrađuju heksoze fosfoglukonatnim putem do mliječne kiseline, octene kiseline, etanola i CO₂, a pentoze fermentiraju do mliječne i octene kiseline. Enzim pentoza fosfoketolaza sudjeluje u razgradnji supstrata u oba slučaja. Od 22 vrste iz roda *Lactobacillus* iz ove fiziološke grupe, njih 16 pripada *L. casei-Pediococcus* grupi, a šest *Leuconostoc* grupi. Tipični predstavnici obligatno heterofermentativnih bakterija su: *L. casei*, *L. plantarum* i *L. sake*.

Fakultativno heterofermentativne bakterije fermentiraju heksoze Embden-Meyerhof-Parnasovim putem do mliječne kiseline ili, u uvjetima limitacije glukozom, do mliječne kiseline, octene kiseline, etanola i mravlje kiseline. Inducibilnim pentoza-fosfoketolaznim putem razgrađuju pentoze do mliječne i octene kiseline. Ovdje su ubrojene i streptobakterije i neke novookarakterizirane vrste iz roda *Lactobacillus*. Kod fakultativno heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline mogu se razlikovati vrste koje pripadaju *L. delbrueckii* grupi (*L. acetotolerans* i *L. hamsteri*) i vrste koje pripadaju *L. casei-Pediococcus* grupi (15 *Lactobacillus* vrsta).

Različiti mehanizmi koji reguliraju katabolizam ugljikohidrata do D- i/ili L-laktata u stanicama bakterija mliječne kiseline još su uvijek nedovoljno istraženi (Slavica i sur., 2015).



Slika 2.2. Pojednostavljeni prikaz razgradnje glukoze glikolizom i homolaktičke fermentacije.



Slika 2.3. Fosfoketolazni put u stanicama bakterije *Leuconostoc mesenteroides*.

Lactobacillus delbrueckii

Lactobacillus delbrueckii je Gram-pozitivna, mikroaerofilna, nepokretna, nesporogena bakterija s pomoću koje se industrijski proizvodi mliječna kiselina. Duljina štapića ove bakterije, pojedinačnih ili u lancima, obično je 2-9 µm, a debljina 0,5 µm. Porasle kolonije promjera 1-3 mm su hrapave i bez pigmenta. Ova bakterija raste pri temperaturama od 40°C do 52°C, a ne može rasti i pri 15°C. Optimalna pH vrijednost hranjive podloge u ili na kojoj raste kreće se u rasponu od 5,5 do 5,8. Za uzgoj ove bakterije mliječne kiseline u hranjivu je podlogu potrebno dodati vitamine B grupe i različite aminokiseline. *Lactobacillus delbrueckii* treba za svoj rast oko 10-15 različitih aminokiselina, a od vitamina riboflavin, nikotinsku i pantotensku kiselinu. Slobodne aminokiseline mogu se nadomjestiti peptidima i aminokiselinskim amidima. Masne kiseline također potiču rast bakterija mliječne kiseline, ali mehanizam njihova djelovanja još nije poznat. Od mineralnih soli ove bakterije trebaju fosfat. Amonijev ion može biti jedini izvor dušika, a pretpostavlja se da utječe na metabolizam nekih aminokiselina. Osim izvora ugljika, hranjiva podloga za proizvodnju mliječne kiseline mora sadržavati i faktore rasta. Zbog toga se u hranjivu podlogu dodaju sladne klice. Kalcijev karbonat (CaCO₃) dodaje se kod uzgoja bakterija mliječne kiseline za neutralizaciju proizvedene mliječne kiseline. Početnu pH vrijednost podloge potrebno je podesiti na vrijednost od oko 6,5, a tijekom fermentacije se ova vrijednost podloge zbog neutralizacije kalcijevim karbonatom održava u rasponu od 5,8 do 6,0. Sterilna hranjiva podloga se nacjepljuje sa 1-5 % (v/v) cjepiva, a fermentacija provodi pri temperaturama između 45°C i 50°C (*L. delbrueckii* i *L. amylovorus*). Iskorištenje ovog bioprocasa obično je iznad 90% od teoretskog iskorištenja.

L. delbrueckii ne može sintetizirati porfirine, a supstrate isključivo fermentira i proizvodi mliječnu kiselinu kao krajnji proizvod metabolizma i tolerira relativno visoke koncentracije mliječne kiseline. Fermentira glukozu, fruktozu, manozu, maltozu, a neki sojevi i saharozu. *L. delbrueckii* pripada rodu *Lactobacillus* i to obligatno homofermentativnim bakterijama mliječne kiseline koje fermentacijom heksoza proizvode D-(-)-mliječnu kiselinu. Kod ovih vrsta hidroliza arginina je varijabilna, nitrata ne reduciraju u nitrite, ne proizvode indol i H₂S, katalaza i benzidin test su negativni. Stanična stijenka ove bakterije sadrži murein tipa Lys-D-Asp i glicerol teihonske kiseline. Može se izolirati iz materijala biljnog ili životinjskog porijekla kod kojih se odvija fermentacija pri relativno visokim temperaturama (40°C-50°C).

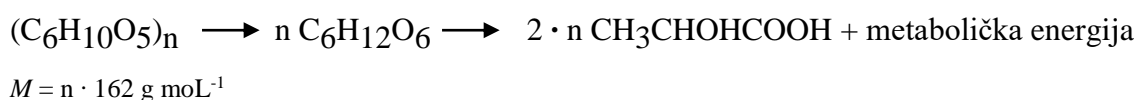
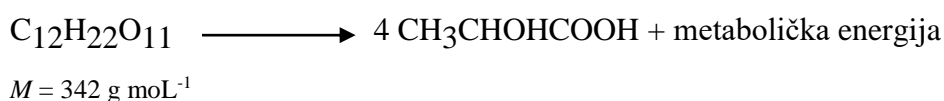
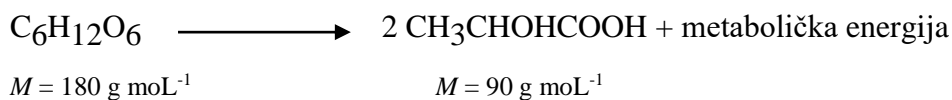
Vrsta *L. delbrueckii* može se podijeliti u tri podvrste: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Filogenetski *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* vrlo je sličan vrstama *L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. acetotolerans*, *L. gasseri*, i *L. amylophilus*. Ova podvrsta ima nešto veći udio GC baza (49-51%) nego druge vrste (34-46%) koje pripadaju ovoj filogenetskoj grupi. Veličina genoma bakterije *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* iznosi 2.3 Mpb.

Lactobacillus amylovorus

Vrsta *Lactobacillus amylovorus* je obligatno homofermentativna bakterija mliječne kiseline koja razgrađuje heksoze Embden-Meyerhof-Parnasovim putem do mliječne kiseline, a ne može koristiti pentoze ili glukonat kao supstrat. Izolirana je iz škrobnih sirovina. Karakteristično je za ovu vrstu da sintetizira amilaze i razgrađuje škrob do maltooligosaharida i maltoze. Zbog ove karakteristike nije potrebno provesti hidrolizu škroba prije fermentacije jednostvnih ugljikohidrata do mliječne kiseline, što je značajno za ekonomičnost ovog bioprocesa kojeg u cjelosti katalizira bakterija *L. amylovorus*. Zbog postupne razgradnje škroba ne dolazi do inhibicije bioprocesa glukozom ni kod relativno visokih koncentracija supstrata - škroba. Ova bakterija može koristiti škrob kukuruza, riže i pšenice, a nešto slabije škrob manioke i krumpira. Amilolitička bakterija mliječne kiseline *L. amylovorus* proizvodi smjesu dvaju stereoizomera mliječne kiseline (D-/L-mliječnu kiselinu). Ova je bakterija izuzetno osjetljiva na varijacije u temperaturi okoline. Optimalna temperatura za rast ove bakterije je između 37°C i 45°C, a maksimalna temperatura za uzgoj između 45°C i 50°C. Raste i pri relativno niskim temperaturama (između 20°C i 25°C). Kao i druge vrste bakterija mliječne kiseline, aktivnost ove vrste je osjetljiva i na pH vrijednost podloge. pH vrijednosti hranjive podloge između 5 i 6 jedinica smatra se optimalnim za proizvodnju mliječne kiseline. Brzina proizvodnje mliječne kiseline značajno opada već pri promjenama ovih pH vrijednosti od oko 0,5 jedinica.

Jednadžbe proizvodnje mliječne kiseline iz nekih ugljikohidrata:



Metode određivanja mliječne kiseline

Mliječna se kiselina može kvantitativno odrediti na nekoliko načina. Enzimska metoda je kolorimetrijska metoda koja se zasniva na praćenju opadanja koncentracije NADH tijekom reakcije koju katalizira laktat dehidrogenaza. Plinska kromatografija iziskuje esterifikaciju mliječne kiseline i može biti neprecizna metoda za kvantifikaciju koncentracije nastalog estera. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) izvrsna je metoda za kvantitativnu analizu ali i za razdvajanje dvaju optičkih izomera mliječne kiseline. Osim kvalitativno-kvantitativne analize, primjenom hibridnih tehnika analize može se definirati enantio-selektivnost enzimske reakcije polimerizacije mliječne kiseline kao i stupanj polimerizacije nastalog polilaktata. Takve su hibridne tehnike npr. kiralne HPLC metode združene s različitim metodama spektrometrije masa (npr. MALDI, eng. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization).

Izdvajanje i pročišćavanje mliječne kiseline

Problemi kod proizvodnje mliječne kiseline nisu u (amilolitičko-)fermentacijskom dijelu bioprocasa, gdje relativno visoka temperatura i blago kiseli pH znatno reduciraju probleme aseptičnosti, već u izdvajanju i pročišćavanju ovog proizvoda. Relativno je komplicirano izdvojiti mliječnu kiselinu u kristaliziranom obliku, a i prinosi takvih procesa su relativno niski, pa se ova organska kiselina obično proizvodi kao bezbojni sirup koji lako apsorbira vodu. Sirup se obično distribuira kao 65%-tna vodena otopina. Jedna od metoda za izdvajanje mliječne kiseline podrazumijeva taloženje kalcijeva laktata, zatim obradu ovog taloga sa H_2SO_4 čime se uklanja višak kalcija, pa ponovno taloženje kiseline kao cinkove soli, i na kraju pročišćavanje mliječne kiseline ekstrakcijom otapalima ili destilacijom estera mliječne kiseline.

Zadatak: proizvesti mliječnu kiselinu fermentacijom supstrata iz melasne podloge sa zadanom koncentracijom saharoze s pomoću bakterije *Lactobacillus delbrueckii* kao i hidrolizom i fermentacijom škroba iz škrobne podloge s pomoću bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T (ATCC 33620, NRRL B-4540) (Tablica 2.1.).

Tablica 2.1. Zadane koncentracije saharoze u melasnoj podlozi za proizvodnju određenih koncentracija mliječne kiseline s pomoću bakterije *Lactobacillus delbrueckii* i koncentracija škroba za proizvodnju mliječne kiseline s pomoću bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T.

<i>Lactobacillus delbrueckii</i>					
	A	B	C	D	E
<i>m</i> (mliječna kiselina) (g)	16	19	21	19	23
γ_0 (saharoz) (g L ⁻¹)	80	90	100	110	120
<i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531 ^T					
γ_0 (škrob) (g L ⁻¹)	10				

Svaka grupa studenata (radni stol) priređuje po jednu melasnu podlogu (*Lactobacillus delbrueckii*) i po jednu škrobnu podlogu (*Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T). Prije pripreme podloge za sterilizaciju potrebno je izračunati potrebne količine sastojaka i prirediti hranjive podloge. Pripravljena podloga se sterilizira (121°C kroz 20 min), a kroz to vrijeme načini se mikroskopski preparat iz priređenih cjepiva dviju bakterija mliječne kiseline. Nakon sterilizacije i hlađenja podloge (do temperature od oko 45°C) potrebno je nacijepiti obje podloge (melasnu podlogu suspenzijom *L. delbrueckii*, a škrobnu podlogu suspenzijom *L. amylovorus* DSM 20531^T) i tikvice ostaviti pri temperaturi inkubacije od 45°C. Nakon završene fermentacije određuje se koncentracija slobodne i vezane mliječne kiseline (*L. delbrueckii*), dok se kod proizvodnje mliječne kiseline s pomoću *L. amylovorus* DSM 20531^T odredi ukupna koncentracija mliječne kiseline kromatografskom metodom (HPLC). Iz dobivenih rezultata potrebno je izračunati koeficijent konverzije supstrata u proizvod ($Y_{P/S}$) i iskorištenje procesa (I).

Priprema melasne podloge

Osim ugljikohidrata iz melase, podloga mora sadržavati i sladne klice (2,5-3% od koncentracije ugljikohidrata u podlozi), CaCO₃ (60% od koncentracije ugljikohidrata u podlozi) i (NH₄)₂SO₄ (2% od koncentracije ugljikohidrata u podlozi). U čašu se odvagane izračunata količina melase s poznatim udjelom ugljikohidrata (obično 45-50%) kako bi se dobila koncentracija ugljikohidrata u podlozi zadana zadatkom. Nakon toga se melasa kvantitativno, uz dodavanje tople vodovodne vode, prenese u graduirani cilindar i nadopuni

vodom do izračunatog volumena. Melasna podloga se prenese u Erlenmeyer tikvicu od 500 mL, doda joj se izračunata količina sladnih klica, CaCO_3 i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ te se podesi pH vrijednost pripremljene podloge na 6,5-7,0. Tikvica se začepi vatenim čepom koji se omota papirom i podloga je spremna za sterilizaciju.

Priprema škrobne podloge

Sastav škrobne podloge za proizvodnju mliječne kiseline s pomoću bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T je dan u tablici 2.2.

Tablica 2.2. Sastav hranjive podloge za proizvodnju mliječne kiseline s pomoću bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T ($V_K = 50$ mL, $V = 100$ mL).

sastojak	γ (g L ⁻¹)
K_2HPO_4	2
$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	8.3
MgSO_4	0.2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.06
$\text{HOC}(\text{CO}_2\text{H})(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4)_2$	2
škrob	10
pepton	10
mesni ekstrakt	10
kvašćev ekstrakt	5
Tween 80®	1 mL

Pripravljene podloge se steriliziraju u autoklavu kroz 20 minuta pri temperaturi od 121°C.

Nacjepljivanje podloge

Sterilne i ohlađene hranjive podloge nacijepe se s 5% (v/v) (melasna podloga; suspenzija *L. delbrueckii*) tj. 2,5% (v/v) (škrobna podloga, suspenzija *L. amylovorus* DSM 20531^T) priređenog cjepiva. Nacijepljene podloge se inkubiraju u termostatu pri temperaturi od 45°C tijekom 24 sata.

Određivanje koncentracije mliječne kiseline – melasna podloga

Nakon završene fermentacije suspenziju treba ohladiti do sobne temperature i profilirati preko naboranog filter papira. Dobiveni filtrat koristi se za određivanje koncentracije slobodne i vezane mliječne kiseline.

Određivanje slobodne mliječne kiseline

10 mL filtrata razrijedi se u odmjernoj tikvici od 100 mL sa 50 mL destilirane vode, u tikvicu se doda aktivni ugljen (na vrhu žlice ili noža) i sadržaj tikvice se prokuha. Nakon kuhanja, otopina se ohladi, nadopuni do oznake (100 mL) destiliranom vodom i profilira (naborani filter papir). 50 mL ovog filtrata (što odgovara 5 mL originalnog filtrata) titrira se otopinom NaOH koncentracije 0,1 mol L⁻¹ uz fenol-ftalein kao indikator (pH raspon od 8,3 - 10,0; promjena boje otopine iz bezbojne do svijetlo roza obojenja). Volumen od 1 mL 0,1 mol L⁻¹ NaOH odgovara 0,009 g CH₃CHOHCOOH, pa se koncentracija slobodne mliječne kiseline (γ_{SMK}) izračuna prema slijedećem izrazu:

$$\gamma_{SMK} = \frac{a \cdot 0,009 \cdot 1000}{5} [g L^{-1}]$$

$$a = V(0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}) \cdot f_{NaOH} \\ [mL] \cdot [-]$$

Određivanje vezane mliječne kiseline

Princip

Vezana mliječna kiselina (kalcijev laktat) može se odrediti kompleksometrijskom (kelatometrijskom) metodom. Metoda se zasniva na nastajanju u vodi topljivih stabilnih kompleksa metalnih iona s polidentatnim ligandima (kelati). Jedan od standarda u kelatometriji je etilen-diamin tetraoctena kiselina (H₄Y, EDTA). Zbog slabe topljivosti EDTA u vodi, kao standard se uzima dinatrijeva sol Na₂H₂Y · 2H₂O (komercijalnog naziva komplekson III). Završetak titracije indicira se metal-indikatorima koji mijenjaju boju pri promjeni koncentracije metalnih iona.

Postupak

U odmjernu tikvicu od 500 mL prenese se trbušastom pipetom 10 mL filtrata suspenzije i nadopuni do oznake destiliranom vodom. 10 mL ovako razrijeđenog uzorka prenese se

trbušastom pipetom u Erlenmeyer tikvicu od 500 mL, doda 90 mL destilirane vode, 5 mL puferske otopine ($\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$; pH 8,0 - 8,5) i, na vrhu žličice, indikator (Eriochrom crno-T). Priređena otopina se titra otopinom kompleksona III ($c = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$; u mikrobireti) do promjene boje otopine iz plave u ljubičastu. Volumen od 1 mL utrošenog kompleksona III koncentracije $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ odgovara 2,004 mg kalcija. Koncentracija vezane mliječne kiseline (γ_{VMK}) izračuna se prema slijedećem izrazu:

$$\gamma_{\text{VMK}} = V_{\text{KOMPLEKSON III}} \cdot f_{\text{KOMPLEKSON III}} \cdot 45 \left[\text{g L}^{-1} \right]$$

Određivanje koncentracije mliječne kiseline (ukupna mliječna kiselina, UMK) kromatografskom metodom - škrobna podloga

Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} sustav (Shimadzu, Kyoto, Japan) koristi se za određivanje koncentracije mliječne kiseline u pripremljenim uzorcima. Kromatografskoj analizi uzoraka izuzetih iz škrobne podloge prethodi hidroliza neutrošenog škroba.

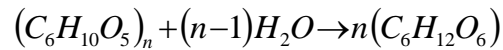
Kiselinska hidroliza neutrošenog škroba

Postupak potpune hidrolize škroba provodi se pomoću otopine klorovodične kiseline na slijedeći način: trbušastom pipetom prenese se 5 mL uzorka iz kojeg je izdvojena bakterijska biomasa centrifugiranjem (4000 min^{-1} kroz 20 min) u odmjernu tikvicu od 50 mL te se doda 7 mL 21%-tne otopine HCl i 10 mL destilirane vode, odmjerna tikvica bez čepa ostavi se u kipućoj vodi kroz 40 minuta, nakon toga se u odmjernu tikvicu doda još 4 mL 21%-tne otopine HCl i ostavi stajati 30 minuta na sobnoj temperaturi, uzorak se zatim neutralizira 20%-tnom otopinom NaOH te se odmjerna tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake. Dio ovako pripremljenog uzorka (2 x 1 mL) profiltrira se pomoću šprice kroz najlonski filter s porama veličine $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ (Roth, Njemačka) i analizira se kromatografskom metodom. Koncentraciji ugljikohidrata u škrobnoj podlozi treba pridodati koncentraciju ugljikohidrata iz kvašćevog ekstrakta, mesnog ekstrakta i peptona (npr. BD BionutrientsTM Technical Manual; http://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/br_3_2547.pdf). Koncentracija ugljikohidrata iz ova tri sastojka škrobne podloge određena je RS metodom i njihova ukupna koncentracija iznosi $0,8 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$. Zbrajanjem ovih dviju početnih koncentracija ugljikohidrata dobije se ukupna koncentracija reducirajućih spojeva u hranjivoj podlozi koja iznosi $11,9 \text{ g L}^{-1}$ (γ_{S_0}). Tijekom hidrolize škroba združeni učinak relativno visoke temperature i otopine klorovodične kiseline dodane u uzorak ima za posljedicu i taloženje proteina iz škrobne podloge, koje je

inače potrebno provesti prije određivanja koncentracije supstrata i proizvoda fermentacije kromatografskom metodom.

Izračun za konverziju škroba do glukoze

Konverzija škroba do glukoze opisana je slijedećim izrazom:



Iz ovog se izraza može izračunati teoretski koeficijent konverzije škroba do glukoze ($Y_{G/S}$):

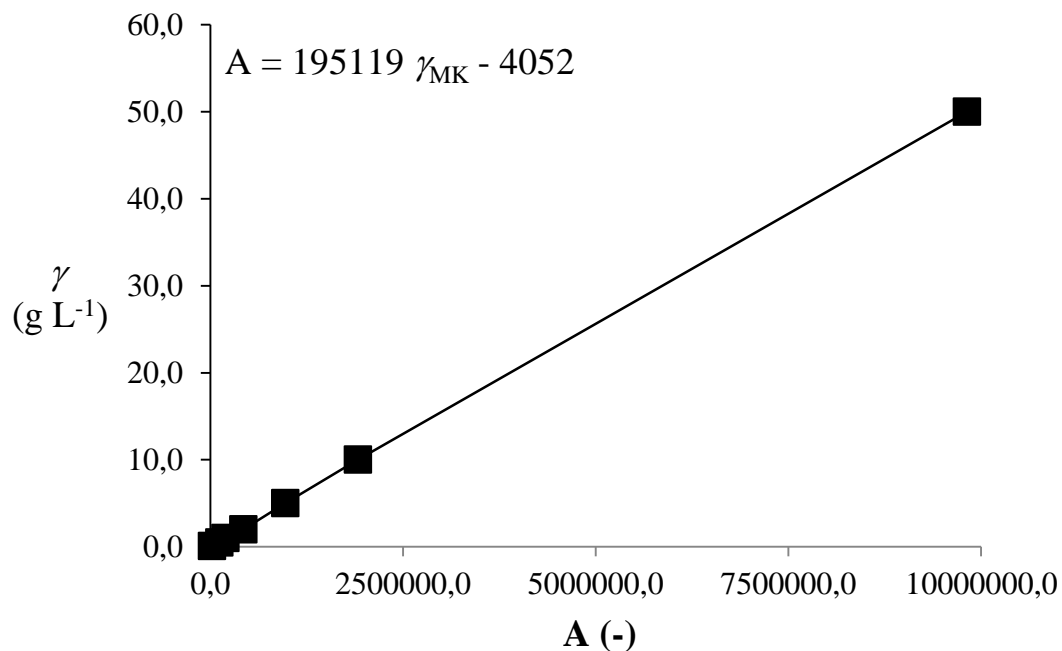
$$Y_{G/S} = \frac{180 \cdot n}{162 \cdot n - (n-1) \cdot 18}$$

ili pojednostavljeno (ako se izostavi voda): $Y_{G/S} \approx \frac{180 \cdot n}{162 \cdot n} = 1,11 g_G g_S^{-1}$

Dakle, potpunom hidrolizom 1 g škroba (S) nastaje 1,11 g glukoze (G).

Kromatografska analiza

Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} kromatografski sustav se sastoji od crpke (LC-10A_{VP}), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10A_{VP}), uređaja za grijanje kolone (CTO-10A_{VP}), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7.8 mm ID, 9 μm) s predkolonom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4.6 mm ID, 9 μm), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10A_{VP}) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10). Za pripravu otopine pokretne faze, otopina standarda i odgovarajućih razrijeđenja pripremljenih uzoraka koristi se redestilirana voda nakon reverzne osmoze vodljivosti manje od 1 μS cm⁻¹. Otopina H₃PO₄ (0,1% vol/vol) u vodi koristi se kao pokretna faza. Otopine standarda mliječne kiseline u vodi u koncentracijama od 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 50,0 i 100,0 mg mL⁻¹ pripravljene su za izradu baždarnog pravca. Po 20 μL od svake otopine injektirano je i propušteno kroz kolonu pri temperaturi od 30°C i brzini protoka pokretne faze od 0,5 mL min⁻¹. Svaka otopina analizirana je tri puta izokratnom analizom. U opisanim uvjetima maksimum detekcije ($U_{\max} = 0,7$ V) postignut je kod analize otopina standarda s koncentracijom od 100,0 mg mL⁻¹, pa ovi rezultati nisu korišteni za izradu baždarnih dijagrama. Nakon kromatografske analize otopina standarda opisanom metodom, procjena rezultata napravljena je pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10 i izrađen je baždarni pravac (Slika 2.4.).



Slika 2.4. Baždarni pravac za određivanje koncentracije mliječne kiseline (γ_{MK}) kromatografskom metodom ($t_R = 20,600$ min). Otopine standarda ($\gamma = 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0$ i $50,0$ mg mL⁻¹) analizirane su Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} sustavom. Slovom A označena je površina pika.

Računanje koeficijenta konverzije supstrata i sirovine u proizvod ($Y_{P/S}$) i iskorištenja (I)

$$Y_{P/S} = \frac{\gamma_P - \gamma_{P_0}}{\gamma_{S_0} - \gamma_S}, \quad Y_{SIROVINSKI} = \frac{m_{MK}}{m_{MELASA}}, \quad I = \frac{Y_{P/S \text{ stvarni}}}{Y_{P/S \text{ teoretski}}}$$

Tablica 2.3. Rezultati fermentacije saharoze iz melasne podloge s različitim početnim koncentracijama supstrata (γ_{S_0}) s pomoću bakterije *Lactobacillus delbrueckii*.

γ_{S_0} (g L ⁻¹)	γ_{SMK} (g L ⁻¹)	γ_{VMK} (g L ⁻¹)	γ_{UMK} (g L ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{SIROVINSKI}$ (g g ⁻¹)	I (%)
80						
90						
100						
110						
120						

Tablica 2.4. Rezultati hidrolize i fermentacije škroba iz podloge s pomoću bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T.

γ_{S_0} (g L ⁻¹)	stol	γ_{UMK} (HPLC) (g L ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	I (%)
10	1			
10	2			
10	3			
10	4			
10	5			

Prilog 2.

P.2.1. Izračun mase sastojaka hranjive melasne podloge za proizvodnju mliječne kiseline s pomoću bakterije *Lactobacillus delbrueckii* (vidi Tablicu 2.1.)



$$n(\text{saharoze}) : n(\text{mliječne kiseline}) = 1 : 4$$

$$n(\text{mliječne kiseline}) = \frac{m(\text{mliječne kiseline})}{M(\text{mliječne kiseline})}$$

$m(\text{mliječne kiseline})$ je zadana u Tablici 2.1.

Primjer A.

$$m(\text{mliječne kiseline}) = 10,0 \text{ g}$$

$$n(\text{mliječne kiseline}) = \frac{10,0 \text{ g}}{90,08 \text{ g/mol}} = 0,1110 \text{ mol}$$

$$n(\text{saharoze}) = \frac{1}{4} \cdot n(\text{mliječne kiseline}) = \frac{1}{4} \cdot 0,1110 \text{ mol} = 0,0278 \text{ mol}$$

$$m(\text{saharoze}) = n(\text{saharoze}) \cdot M(\text{saharoze}) = 0,0278 \text{ mol} \cdot 342,30 \text{ g/mol} = 9,50 \text{ g}$$

$$V(\text{podloge}) = \frac{m(\text{saharoze})}{\gamma(\text{saharoze})}$$

$\gamma(\text{saharoze})$ je zadana u u Tablici 2.1.

Ukoliko je npr. $\gamma = 80 \text{ g/L}$

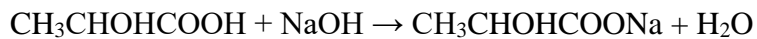
$$V(\text{podloge}) = \frac{9,50 \text{ g}}{80 \text{ g/L}} = 0,1188 \text{ L} = 118,8 \text{ mL} \approx 119 \text{ mL}$$

$$m(\text{melase}_{50}) = m(\text{saharoze}) \cdot \frac{1}{0,50} = 19,0 \text{ g}$$

P.2.2. Izračun koncentracije slobodne mliječne kiseline (γ_{SMK})

$$c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/L} = 0,1 \text{ mmol/mL}$$

$$V(\text{NaOH}) = 1,0 \text{ mL} (\cdot f_{\text{NaOH}})$$



$$n(\text{mliječne kiseline}) : n(\text{NaOH}) = 1 : 1$$

$$n(\text{NaOH}) = c \cdot V = 0,1 \text{ mmol/mL} \cdot 1,0 \text{ mL} (\cdot f_{\text{NaOH}}) = 0,1 \text{ mmol} (\cdot f_{\text{NaOH}})$$

$$n(\text{mliječne kiseline}) = 0,1 \text{ mmol} (\cdot f_{\text{NaOH}})$$

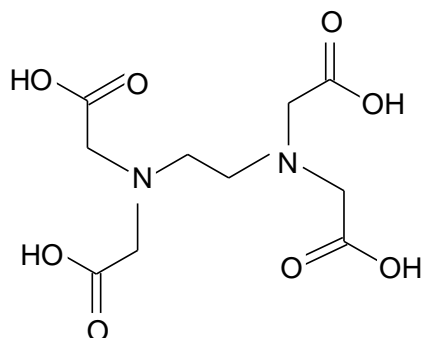
$$m(\text{mliječne kiseline}) = n \cdot M = 0,1 \text{ mmol} (\cdot f_{\text{NaOH}}) \cdot 90 \text{ mg/mmol} = 9 \text{ mg} (\cdot f_{\text{NaOH}})$$

$$m(\text{mliječne kiseline}) = 0,009 \text{ g} (\cdot f_{\text{NaOH}})$$

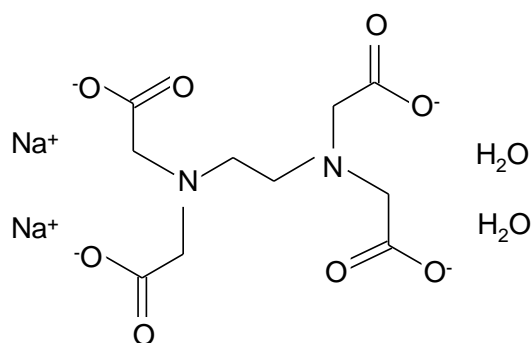
$$V(\text{uzorka fermentirane podloge koji je uzet za titraciju}) = 5 \text{ mL}$$

$$\gamma_{\text{SMK}} = \frac{m}{V} = \frac{0,009 \text{ g} \cdot V_{\text{NaOH}}[\text{mL}] \cdot f_{\text{NaOH}} \cdot 1000 \frac{\text{mL}}{\text{L}}}{5 \text{ mL}} [\text{g/L}]$$

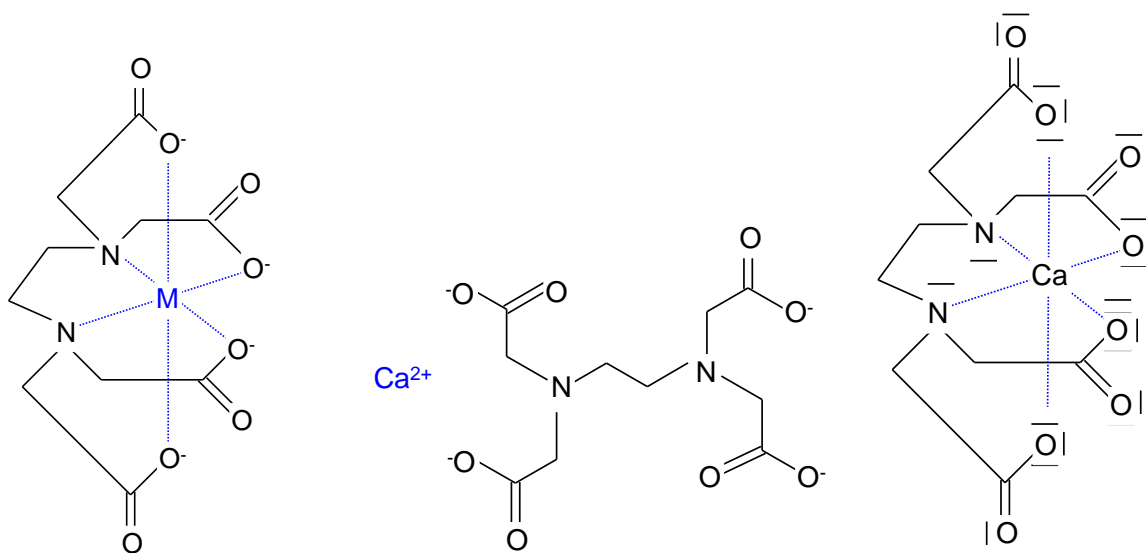
P.2.3. Izračun koncentracije vezane mliječne kiseline (γ_{VMK})



Slika P.2.1. Etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA ili H_4EDTA), kemijska formula $C_{10}H_{16}N_2O_8$, $M = 292,24 \text{ g mol}^{-1}$.



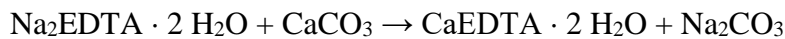
Slika P.2.2. $Na_2EDTA \cdot 2 H_2O$ (komplekson III).



Slika P.2.3. Metal (M)-EDTA kelat i Ca-EDTA kelat.

$$c \text{ (komplekson III)} = 0,05 \text{ mol/L} = 0,05 \text{ mmol/mL}$$

$$V \text{ (komplekson III)} = 1,0 \text{ mL} (\cdot f_{\text{komplekson III}})$$

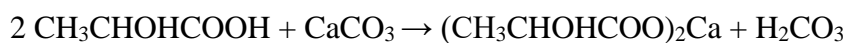


$$n \text{ (komplekson III)} = n \text{ (Ca}^{2+}\text{)}$$

$$n \text{ (komplekson III)} = c \cdot V (\cdot f_{\text{komplekson III}}) = 0,05 \text{ mmol/mL} \cdot 1,0 \text{ mL} (\cdot f_{\text{komplekson III}})$$

$$n \text{ (komplekson III)} = 0,05 \text{ mmol} (\cdot f_{\text{komplekson III}})$$

$$n \text{ (Ca}^{2+}\text{)} = 0,05 \text{ mmol} (\cdot f_{\text{komplekson III}})$$



$$n \text{ (mliječne kiseline)} : n \text{ (Ca}^{2+}\text{)} = 2 : 1$$

$$n \text{ (mliječne kiseline)} = 2 \cdot n \text{ (Ca}^{2+}\text{)} = 2 \cdot 0,05 \text{ mmol} (\cdot f_{\text{komplekson III}}) = 0,10 \text{ mmol} (\cdot f_{\text{komplekson III}})$$

$$m \text{ (mliječne kiseline)} = n \cdot M = 0,10 \text{ mmol} (\cdot f_{\text{komplekson III}}) \cdot 90 \text{ mg/mmol}$$

$$m \text{ (mliječne kiseline)} = 9 \text{ mg} (\cdot f_{\text{komplekson III}}) = 0,009 \text{ g} (\cdot f_{\text{komplekson III}})$$

$$V \text{ (uzorka fermentirane podloge koji je uzet za titraciju)} = \frac{10 \text{ mL}}{500 \text{ mL}} \cdot 10 \text{ mL} = 0,2 \text{ mL}$$

$$\gamma_{\text{VMK}} = \frac{m}{V} = \frac{0,009 \text{ g} \cdot V_{\text{komplekson III}} \cdot f_{\text{komplekson III}} \cdot 1000 \frac{\text{ml}}{\text{L}}}{0,2 \text{ mL}} = V_{\text{komplekson III}} \cdot f_{\text{komplekson III}} \cdot 45 \text{ [g/L]}$$

PASTEUR-OV I CRABTREE-JEV UČINAK

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ubraja se u važnije industrijske mikroorganizme. Tradicionalno se koristi u proizvodnji etanola i alkoholnih pića, a njegova biomasa predstavlja vrijedan proizvod - pekarski kvasac.

S. cerevisiae pripada kvascima reda *Endomycetales*. Ovaj red ima četiri porodice od kojih je najbrojnija porodica *Saccharomycetaceae*. Potporodica *Sacharomycoidae* obuhvaća trinaest rodova, među kojima je i dobro proučen rod askosporogenih kvasaca *Saccharomyces*. Rodu *Saccharomyces* pripada 30 vrsta kvasaca, među njima i *S. cerevisiae*. Prema drugom izdanju taksonomije kvasaca ukupno 17 zasebnih vrsta iz roda *Saccharomyces* objedinjeno je u trećem izdanju taksonomije u jednu vrstu - *Saccharomyces cerevisiae*. Nekadašnje vrste koje su razlikovane prema mogućnosti korištenja određenih ugljikohidrata, smatraju se danas varijetetima jedne vrste i to *S. cerevisiae*.

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je kemoorganotrofni fakultativno aerobni mikroorganizam koji energiju pridobiva oksidativnom razgradnjom prvenstveno glukoze, a zatim i drugih ugljikohidrata te tzv. glukogenih supstrata pri aerobnim uvjetima (octena i mliječna kiselina, piruvat, etanol i glicerol). Varijeteti vrste *S. cerevisiae* mogu fermentirati: glukozu, fruktozu, manozu, galaktozu, saharozu, maltozu, maltotriozu, trehalozu, melibiozu i rafinozu. Sojevi zasebne vrste *S. diastaticus* mogu koristiti dekstrine i topljivi škrob. Nijedan od varijeteta ne može koristiti sve ovdje pobrojane ugljikohidrate. Po definiciji *S. cerevisiae* ne može metabolizirati laktozu, celobiozu, pentoze i monosaharide L-konfiguracije. U uvjetima kad su različiti monosaharidi prisutni u okolini stanice, ovaj kvasac najprije će potrošiti glukozu, zatim fruktozu te, uz indukciju enzima, manozu i galaktozu.

Da bi neki mikroorganizam mogao koristiti određeni ugljikohidrat, mora imati funkcionalni sustav za transport tog ugljikohidrata u stanicu. Kod kvasca *S. cerevisiae* poznata su četiri transportna sustava:

- 1) konstitutivni sustav za transport heksoza (glukoze, fruktoze i manoze);
- 2) inducibilni sustav za transport galaktoze;
- 3) inducibilni sustav za transport maltoze i
- 4) inducibilni sustav za transport α -metil glukozida i sličnih analoga.

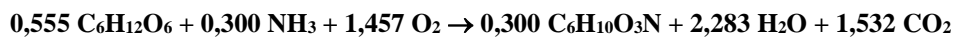
Razgradnja ugljikohidrata odvija se glikolizom i/ili heksoza-monofosfatnim putem (pentozni ciklus) i Krebsovim ciklusom (ciklus limunske kiseline). Poznavanje metabolizma

ugljikohidrata u stanicama kvasca, a osobito mehanizma regulacije metabolizma, osnovni je preduvjet za uspješno vođenja industrijskog bioprocasa.

Jedno od temeljnih svojstava mikrobnih stanica, pa tako i stanica kvasca, jest sposobnost detektiranja promjena u okolini stanice te sposobnost prilagodbe metabolizma novonastalim uvjetima. Brojni se mehanizmi regulacije metabolizma ugljikohidrata kod kvasca odvijaju na različitim razinama, a najčešće se regulira sinteza enzima i aktivnost enzima koji sudjeluju u metabolizmu odgovarajućeg ugljikohidrata. Dvije pojave karakteristične za kvasac *S. cerevisiae* posljedica su globalnog mehanizma regulacije metabolizma ugljikohidrata, a nazivaju se Pasteur-ov i Crabtree-jev efekt (učinak). Oba učinka proizlaze iz činjenice da kvasac *S. cerevisiae* može rasti aerobno i anaerobno.

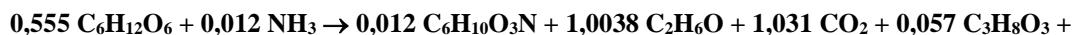
Bilanca za ova dva procesa zasniva se na eksperimentalnim podacima i dana je slijedećim jednadžbama:

1. AEROBNA RAZGRADNJA GLUKOZE



			biomasa		
100,0 g	5,1 g	46,6 g	43,2 g	41,1 g	67,4 g

2. ANAEROBNA RAZGRADNJA GLUKOZE



		biomasa	etanol		glicerol
100,0 g	0,2 g	1,8 g	46,2 g	45,3 g	5,2 g
				+ 0,012 C ₄ H ₆ O ₄	+ 0,00071 C ₄ H ₁₀ O
				sukcinat	butanol
				1,4 g	0,05 g
					0,2 g

Već je Louis Pasteur uočio da pri anaerobnim uvjetima kvasac fermentira ugljikohidrate uglavnom do etanola i CO₂ ($Y_{X/S} = 0,02 \text{ kg kg}^{-1}$; $Y_{P/S} = 0,45 \text{ kg kg}^{-1}$), dok se u aerobnim uvjetima u stanicama kvasca odvija potpuna oksidacija ugljikohidrata do CO₂ i H₂O, pri čemu nastaju znatne količine biomase ($Y_{X/S} = 0,50 \text{ kg kg}^{-1}$; $Y_{P/S} = 0,00 \text{ kg kg}^{-1}$). Pasteur-ov učinak opisuje regulaciju metabolizma ugljikohidrata kada se optimira brzina razgradnje glukoze kako bi stanice kvasca imale dostatno energije i međuspojeva za biosintezu biomase. Kada se stanice

kvasca prenesu iz anaerobnih uvjeta rasta u aerobne, dolazi do smanjenja brzine potrošnje ugljikohidrata. Naime, pri aerobnim uvjetima kvasac proizvodi više ATP-a (metaboličke energije) po molekuli glukoze nego pri anaerobnim uvjetima, što znači da stanični materijal može sintetizirati uz manji utrošak supstrata.

Poznato je da je brzina glikolize primarno regulirana razinom aktivnosti enzima fosfofruktokinaze. Aktivnost ovog alosteričkog enzima stimulirana je relativno visokom koncentracijom ADP-a i AMP-a, a inhibirana relativno visokom koncentracijom ATP-a i citrata. Budući da reakcije oksidativne fosforilacije imaju tendenciju povećanja omjera ATP/ADP, za očekivati je da u aerobnim uvjetima dolazi do usporavanja potrošnje supstrata. Ovaj primjer zajedničke kontrole glikolize i respiracije nazvan je Pasteur-ov učinak.

Pri prelasku s fermentacijskog na oksidacijski metabolizam ugljikohidrata, na nivou enzimske aktivnosti događa se slijedeće:

- a) u prisutnosti kisika povećava se aktivnost enzima ciklusa limunske kiseline;
- b) u aerobnim uvjetima povećava se aktivnost enzima pentoza fosfatnog ciklusa (u aerobnim uvjetima 30-35% supstrata ide u ciklus pentoza-fosfata, a u anaerobnim samo 5-10%);
- c) prelaskom sa anaerobnih na aerobne uvjete ponovno se sintetiziraju mitohondriji koji degeneriraju i gotovo potpuno se izgube tijekom dulje anaerobioze.

Međutim, Herbert Grace Crabtree je utvrdio da kvasac, koji se uzgaja u podlozi sa relativno visokom koncentracijom ugljikohidrata, proizvodi etanol čak i u potpuno aerobnim uvjetima (ugljikohidrat se razgrađuje fermentativnim putem). Ova pojava nazvana je “reverzni Pasteur-ov učinak” ili Crabtree-jev učinak. Kod kvasca *S. cerevisiae* ovaj se efekt očituje u djelovanju na veliki broj enzimskih reakcija, u prvom redu aktivnosti enzima ciklusa limunske kiseline i respiratornog (disajnog) lanca. Kao konačni rezultat dolazi do “prebacivanja” oksidacijske razgradnje glukoze na proizvodnju etanola fermentacijskim putem. Važno je istaknuti da se metabolizam ugljikohidrata ne odvija na ovaj način kod svih kvasaca, što je dovelo do podjele kvasaca na Crabtree-pozitivne i Crabtree-negativne. Točan mehanizam Crabtree-jevog učinka još uvijek nije poznat, ali se pretpostavlja katabolička represija sinteze enzima te katabolička inaktivacija određenih enzima već prisutnih u stanici.

Zadatak: U podlozi s različitim koncentracijama glukoze uzgojiti kvasac *S. cerevisiae* pri aerobnim uvjetima (uzgoj na tresilici) i pri anaerobnim uvjetima (statična kultura u tikvici s vrelnjačom). Nakon uzgoja odrediti koncentraciju biomase, koncentraciju proizvedenog alkohola i koncentraciju supstrata preostalog u podlozi.

Tablica 3.1. Zadane koncentracije glukoze u kemijski definiranoj podlozi za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

	A	B	C	D	E
γ_0 (glukoza) (g L ⁻¹)	5	10	20	40	50

Sastav hranjive podloge (g L⁻¹):

(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01
CaCl ₂	0,1
NaCl	0,1
kvašćev ekstrakt	1,0
glukoza	izračunati prema zadatku (Tablica 3.1.)

pH podloge ($V_K = 150$ mL) podesiti na 5.

Cjepivo za podlogu je suspenzija kvasca *S. cerevisiae* u fiziološkoj otopini. Prije naciepljivanja potrebno je mikroskopirati nativni preparat načinjen iz suspenzije kvasca.

U Erlenmeyer tikvici od 500 mL pripravi se 150 mL hranjive podloge sa zadanom koncentracijom glukoze. Tikvica se zatvori vatenim čepom, čep se omota papirom i sterilizira u autoklavu pri temperaturi od 121°C kroz 20 minuta. Nakon sterilizacije, podloga se ohladi na oko 28°C, naciepi u aseptičnim uvjetima s 5% (v/v) cjevica i dobro homogenizira. Određivanjem optičke gustoće uzorka (OD₅₄₀) naciepljene hranjive podloge odredi se početna koncentracija kvašćeve biomase. Kod anaerobnog uzgoja se vateni čep na Erlenmeyer tikvici zamijeni vrelnjačom.

Nakon inkubacije (28°C/24 sata) potrebno je mikroskopirati podlogu, te odrediti koncentraciju kvašćeve biomase (OD₅₄₀), koncentraciju etanola i koncentraciju glukoze preostale u podlozi nakon uzgoja.

Mikroskopiranje prevrele komine

Mikrobiološkom ušicom ili sterilnom pipetom prenese se jedna kap suspenzije na predmetnicu, pažljivo prekrije pokrovnim stakalcem (ne uklopiti mjehuriće zraka) i mikroskopira pod povećanjem od 400 puta (vidi Prilog 1.).

Određivanje koncentracije biomase

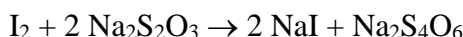
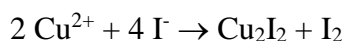
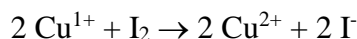
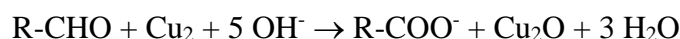
Suspenzija se homogenizira, oko 3-4 mL suspenzije prenese se u kivetu za spektrofotometar i odredi se optička gustoća pri 540 nm (OD_{540}). Iz baždarnog pravca (vidi Prilog 3.) se očita koncentracija kvaščeve biomase ($mg\ mL^{-1}$ ili $g\ L^{-1}$ suhe tvari) za pripadajuću vrijednost OD_{540} . Ako je vrijednost OD_{540} previsoka (izvan raspona baždarnog pravca), potrebno je napraviti razrijeđenje uzorka (npr. 10^{-1}) i ponoviti određivanje OD_{540} .

Određivanje alkohola u prevreloj komini

Pomoću graduiranog cilindra (menzure) odmjeri se 100 mL podloge, doda 100 mL destilirane vode i sve se prebaci u tikvicu za destilaciju s okruglim dnom, te se podesi pH vrijednost podloge na približno 7,0 jedinica pomoću otopine NaOH koncentracije $1\ mol\ L^{-1}$. Tikvica se priključi na aparaturu za destilaciju, a destilat se prikuplja u odmjernu tikvicu od 100 mL. Kada je oko 2/3 volumena odmjerne tikvice ispunjeno destilatom, destilacija se prekida, odmjerna tikvica se nadopuni vodom do 100 mL, te se odredi refraktometrijska vrijednost ove otopine. Iz baždarnog pravca se očita odgovarajući volumni udio etanola i izračuna koncentracija proizvedenog etanola (vidi Prilog 3.).

Određivanje koncentracije reducirajućih spojeva (RS metoda)

Ugljikohidrati svojim slobodnim aldehidnim i karbonilnim skupinama mogu reducirati metale iz alkalnih otopina soli metala. Tipičan reagens za određivanje koncentracije ugljikohidrata metodom koja se zasniva na njihovoj redukcijskoj sposobnosti je alkalna otopina bakrovog sulfata ($CuSO_4$) i kalijevog i natrijevog tartarata ($KNaC_4H_4O_5$) tj. Fehlingova otopina. Slobodne aldehidne i karbonilne skupine ugljikohidrata reduciraju kupri ion (Cu^{2+}) u kupro ion (Cu^{1+}) pri čemu nastaje crveno-smeđi talog netopljivog bakrovog oksida (Cu_2O). Otopina kalijeva jodida (KI) se dodaje ohlađenoj smjesi u suvišku, a smjesa se zakiseli s pomoću otopine sumporne kiseline (H_2SO_4). Jod reagira s kupro ionom, a suvišak joda se titrira otopinom natrijevog tiosulfata ($Na_2S_2O_3$) uz dodatak otopine škroba kao indikatora (smjesa otopine joda i škroba je tamnomodre boje) do prelaza u ružičasto-bež boju. Princip metode prikazan je sljedećim kemijskim jednadžbama:



S Fehlingovom otopinom reagiraju:

- a) direktno: glukoza, fruktoza, maltoza i laktoza;
- b) nakon hidrolize: saharoza, oligo- i polisaharidi.

Postupak

Centrifugirati oko 30 mL suspenzije i uzeti za analizu 10 mL supernatanta (uzorak). U tikvicu sa okruglim dnom od 250 mL doda se 10 mL uzorka i 15 mL destilirane vode (ovisno o koncentraciji reducirajućih spojeva u uzorku za analizu, omjer volumena vode i uzorka može se prilagoditi, ali uvijek tako da ukupni volumen nerazrijeđenog ili razrijeđenog uzorka bude 25 mL), uzorku u tikvici doda se 10 mL otopine A (69,3 g L⁻¹ CuSO₄ · 5 H₂O; Fehling I) i 10 mL otopine B (346 g L⁻¹ KNaC₄H₄O₅; Fehling II), smjesa se zagrijava i kuha točno dvije minute uz povratno hladilo, nakon toga smjesa se ohladi pod mlazom vode te joj se doda 10 mL otopine C (30%-tna otopina KI) i 10 mL otopine D (26%-tna otopina H₂SO₄), zatim se smjesa dobro izmiješa, doda joj se 2 mL otopine škroba (1%-tna otopina škroba u 0,9%-tnom NaCl) te se titrira s otopinom Na₂S₂O₃ (c = 0,1 mol L⁻¹) do prelaza tamnoplave boje u ružičasto-bež boju koja se treba zadržati jednu minutu.

Isti postupak potrebno je provesti i s otopinom glukoze (glukoza test) i vodom (slijepa proba). Za glukoza test (kontrola) potrebno je uzeti 5 mL otopine glukoze (1%-tna otopina) i 20 mL vode, dok se za slijepu probu uzima 25 mL destilirane vode. Koncentracija reducirajućih spojeva izračuna se pomoću sljedećeg izraza:

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

gdje je:

- γ_{RS} – koncentracija reducirajućih spojeva (g L⁻¹),
- a – volumen otopine Na₂S₂O₃ (0,1 mol L⁻¹) utrošen za titraciju slijepa probe (mL),
- b – volumen otopine Na₂S₂O₃ (0,1 mol L⁻¹) utrošen za titraciju uzorka (mL),
- c – volumen otopine Na₂S₂O₃ (0,1 mol L⁻¹) utrošen za titraciju glukoza testa (mL),

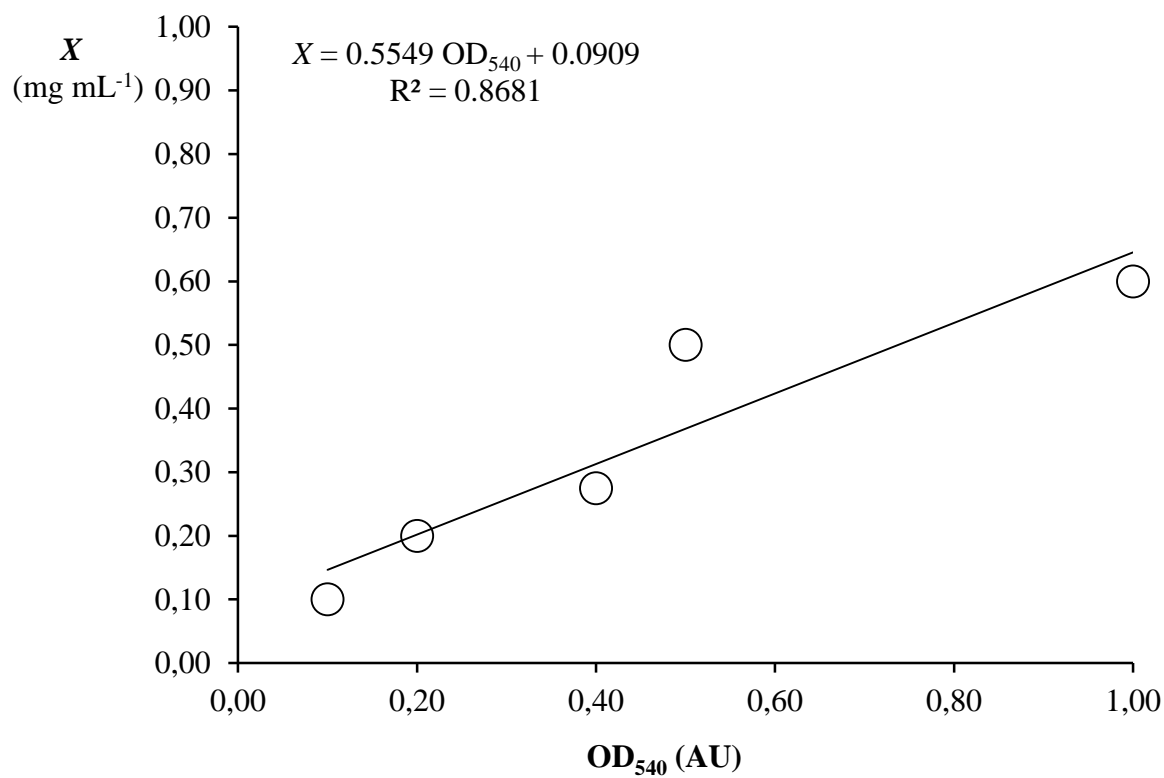
d – volumen uzorka (supernatanta) uzet za analizu npr. $d = \frac{7}{50} \cdot 10 = 1.4 \text{ mL}$.

Nakon završenih analiza izračunati koeficijent konverzije supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$) i koeficijent konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$). Dobivenim rezultatima popuniti tablicu za sve koncentracije glukoze za aeroban i anaeroban uzgoj.

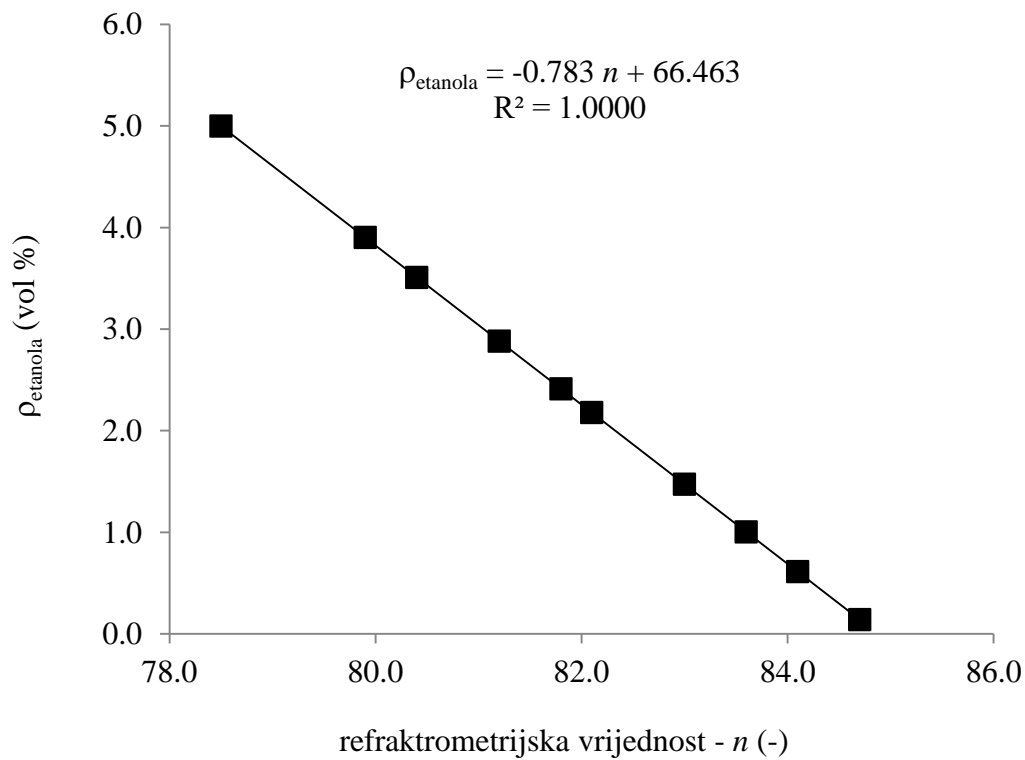
$$\rho(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 0,789 \text{ g cm}^{-3}$$

Tablica 3.2. Rezultati uzgoja kvasca *S. cerevisiae* u podlogama s različitim koncentracija glukoze u aerobnim i anaerobnim uvjetima.

AEROBNO						ANAEROBNO					
γ_{S_0} (g L ⁻¹)	γ_S (g L ⁻¹)	γ_X (g L ⁻¹)	$\gamma_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$ (g L ⁻¹)	$\gamma_{X/S}$ (g g ⁻¹)	$\gamma_{P/S}$ (g g ⁻¹)	γ_{S_0} (g L ⁻¹)	γ_S (g L ⁻¹)	γ_X (g L ⁻¹)	$\gamma_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$ (g L ⁻¹)	$\gamma_{X/S}$ (g g ⁻¹)	$\gamma_{P/S}$ (g g ⁻¹)
5						5					
10						10					
20						20					
40						40					
50						50					



Slika P.3.1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije suhe tvari biomase kvasca iz vrijednosti optičke gustoće pri valnoj duljini (λ) svjetlosti od 540 nm (OD₅₄₀).



Slika P.3.2. Baždarni dijagram za određivanje volumnog postotka etanola (ρ_{etanola}) iz refraktometrijske vrijednosti (n).

Primjer 1.

$$\rho_{\text{etanola}} = 5,0 \text{ vol \%}$$

$$\gamma_{\text{etanola}} = \frac{5,0 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} \cdot 0,789 \text{ g/ml} = 0.0396 \text{ g/ml} \cdot \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} = 39,6 \text{ g/L}$$

NEPOTPUNA BIOOKSIDACIJA - PROIZVODNJA OCTENE KISELINE

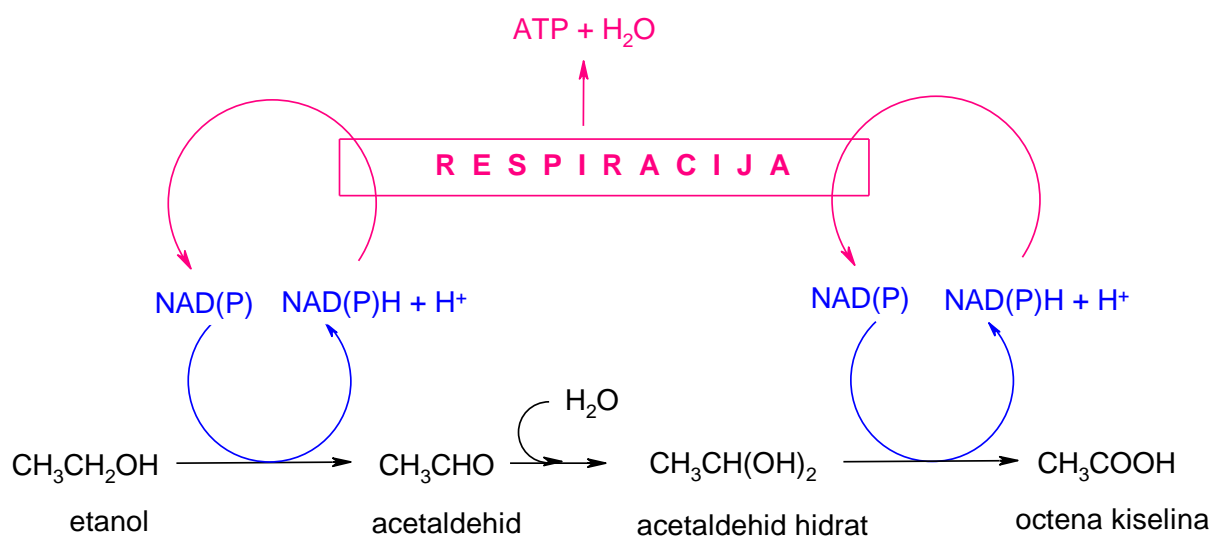
Bakterije octene kiseline pripadaju odjeljku Gram negativnih aerobnih štapića i koka, porodici *Acetobacteraceae*, koja je podijeljena u dva roda - rod *Acetobacter* i rod *Gluconobacter*. Osnovni kriterij za razlikovanje ta dva roda je oksidacija acetata i laktata do CO₂ i H₂O te prisutnost flagela. Bakterije roda *Gluconobacter* ne oksidiraju acetat i laktat do CO₂, imaju polarno smještene flagele ili su nepokretne.

Bakterijske stanice iz roda *Acetobacter* oksidiraju acetat i laktat do CO₂, imaju peritrihno smještene flagele ili su nepokretne. Ovaj rod ima četiri vrste: *A. aceti*, *A. liquefaciens*, *A. pasteurians* i *A. hansenii*. Stanice bakterija iz ovog roda su elipsoidnog i štapićastog oblika, ravne ili blago svinute. Promjer stanica je 0,6-0,8 µm, a njihova dužina 1,0-4,0 µm. Mikroskopiranjem nativnog preparata mogu se uočiti pojedinačne stanice bakterija, stanice u parovima i u lancima. Nepravilni sferični, izduženi, savijeni i filamentozni oblici stanica bakterija su česti. Pojava ovih oblika stanica posljedica je utjecaja pH vrijednosti podloge tj. proizvodnje octene kiseline u podlozi i koncentracije etanola na stanice ovih bakterija. Ove bakterije ne stvaraju endospore, Gram negativne su do Gram promjenjive ("starije" kulture), imaju uvijek oksidativni metabolizam, nikad fermentativni. Većina vrsta iz ovog roda ne sintetizira pigmente, a manji broj sintetizira vodootporne pigmente. Bakterije iz roda *Acetobacter* nemaju oksidazu, ali imaju katalazu, oksidiraju etanol do octene kiseline, a acetat i laktat do CO₂ i H₂O. Najbolje rastu na etanolu, glicerolu i laktatu kao izvoru ugljika. Supstrate D-glukozu, *n*-propanol i *n*-butanol oksidiraju do glukonske, propionske i maslačne kiseline. Ove bakterije ne hidroliziraju laktozu i škrob. Optimalna temperatura za rast ovih bakterija kreće se između 25°C i 30°C, a optimalna pH vrijednost podloge 5,4-6,3. Molarni postotak GC parova u njihovim DNA molekulama iznosi 51-65%.

Metabolizam ugljikohidrata

Vrste iz roda *Acetobacter* metaboliziraju ugljikohidrate heksoza-monofosfatnim putem i ciklusom trikarbonskih kiselina. To su metabolički putevi kojima se pribavljaju ishodišni međuspojevi za sintezu staničnih sastojaka. Glikolitički put razgradnje ugljikohidrata nije detektiran i ključni enzim glikolize fosfofruktokinaza nije izoliran kod ovih bakterija. U uvjetima u kojima bakterije iz roda *Acetobacter* rastu na etanolu kao jedinom izvoru ugljika, međuspojevi potrebni za sintezu staničnih sastojaka (npr. preteče aminokiselina i nukleotida) sintetiziraju se glukoneogenezom.

Enzimi koji sudjeluju u reakcijama oksidacije etanola do octene kiseline su: alkohol dehidrogenaza (ADH) koja katalizira oksidaciju alkohola u aldehid, i aldehid dehidrogenaza (ALDH) koja katalizira oksidaciju nastalog aldehida u kiselinu. Značajno je da su iz stanica ovih bakterija izolirana dva para ADH i ALDH. Jedan je par ADH/ALDH izoliran iz citoplazme, a karakterizira ga optimalna pH vrijednost u neutralnom području. Drugi je par ADH/ALDH vezan na membranu citoplazme i pokazuje optimalnu aktivnost pri nižim pH vrijednostima (pH 3,4-4,5). S obzirom na optimalni pH, pretpostavlja se da par enzima u citoplazmi stanice sudjeluje u reakcijama u kojima se etanol koristi kao izvor ugljika za sintezu staničnih sastojaka, dok drugi par enzima vezanih na membranu citoplazme sudjeluje u oksidaciji etanola do octene kiseline radi pridobivanja energije i odgovoran je za proizvodnju octene kiseline (Slika 4.1.) kod vrsta koje se koriste u industrijskom mjerilu.



Slika 4.1. Biooksidacija etanola do octene kiseline.

Jednadžba nepotpune biooksidacije etanola:



Vrste iz roda *Acetobacter* ne trebaju za rast esencijalne aminokiseline koje ne mogu koristiti kao jedini izvor ugljika i dušika. Bakterije iz ovog roda mogu sintetizirati sve aminokiseline. Neki sojevi iz ovog roda mogu rasti u kemijski definiranoj podlozi s amonijevim ionom kao izvorom dušika i etanolom kao izvorom ugljika. Ovisnost o faktorima

rasta kod bakterija octene kiseline u vezi je s izvorom ugljika u podlozi. Rastu li ove bakterije na glukozi kao jedinom izvoru ugljika, faktori rasta im nisu potrebni. Bakterije iz roda *Acetobacter* ne mogu rasti na kompleksnim hranjivim podlogama (npr. kvasčev ekstrakt i pepton) ukoliko u podlozi nema dodatnih izvora ugljika. Kod uzgoja na D-manitolu kao jedinom izvoru ugljika, može se zamijetiti ovisnost o *p*-aminobenzojevoj kiselini, niacinu, tiaminu i pantotenskoj kiselini. Ove bakterije ne pokazuju nikakvu patogenost prema ljudima i životinjama. Neki sojevi imaju svojstvo nepovoljnog djelovanja prema stanicama određenih vrsta kvasaca. Prilikom izlaganja toplini tkivo plodova voća postaje ružičasto ili smeđe zbog 2,5-diketoglukonske kiseline koja nastaje aktivnošću stanica bakterija octene kiseline koje obitavaju na površini ovih plodova.

Mikrobiološkom oksidacijom etanola u octenu kiselinu dobiva se komercijalni proizvod ocat. Osnovne sirovine za proizvodnju octa su:

- a) rafinirani etanol dobiven iz ugljikohidratnih sirovina;
- b) prevreli voćni sokovi (npr. vino, jabukovača);
- c) prevrela sladovina.

Ovisno o upotrijebljenoj sirovini, mogu se dobiti slijedeći komercijalni produkti:

- a) bijeli ili alkoholni ocat koji ima 80-120 g L⁻¹, a ponekad i 170 g L⁻¹ octene kiseline;
- b) vinski odnosno jabučni ocat koji ima 40-80 g L⁻¹ octene kiseline;
- c) sladni ocat koji se uglavnom proizvodi u krajevima gdje slabo uspijeva šećerna repa odnosno voće.

Postupak za proizvodnju octene kiseline izrazito je aeroban. Nedostatak kisika u podlozi tijekom samo nekoliko sekundi izaziva ireverzibilno oštećenje u stanicama bakterija. Proizvodnja se odvija pri temperaturi od 28°C do 30°C. Karakteristično je da bakterije octene kiseline mogu podnositi relativno niske pH vrijednosti podloge (pH 2,5-3,0) u kojoj rastu i pokazuju aktivnost. Međutim, optimalna pH vrijednost za rast različita je za različite vrste bakterija octene kiseline. Tako npr. za *A. aceti* optimalna pH vrijednost je u rasponu 5,3-5,6. Hranjivoj se podlozi uvijek na početku dodaje relativno mala koncentracija octene kiseline ($w = 1-3\%$) kako bi se već na početku bioprocasa snizila pH vrijednost i tako barem djelomično onemogućio rast kontaminanata. Dodana octena kiselina ujedno je i izvor ugljika.

Zadatak: Potrebno je proizvesti zadanu koncentraciju octene kiseline iz etanola uz zadane sastojke hranjive podloge i to iz rafiniranog etanola i etanola iz vina (Tablica 4.1.).

Postupak:

1. Načiniti preparat cjepiva *A. aceti*, obojiti ga po Gramu i mikroskopirati (vidi Prilog 4.).
2. Proračunati potrebnu količinu svih sastojaka hranjivih podloga, pripremiti i sterilizirati podloge.
3. Nacijepiti sterilne hranjive podloge i odrediti početnu kiselost podloge.
4. Inkubirati naciepljenu podlogu na tresilici pri temperaturi od 28°C.
5. Nakon završene biooksidacije mikroskopirati suspenziju *A. aceti* (vidi Prilog 4.) i odrediti koncentraciju proizvedene octene kiseline kao i preostali etanol.
6. Izračunati koeficijent konverzije supstrata u proizvod i učinkovitost bioprocesa.

Tablica 4.1. Vrijednosti za početnu koncentraciju etanola i masu i koncentraciju octene kiseline za provođenje nepotpune biooksidacije rafiniranog etanola i etanola iz vina s pomoću bakterije *Acetobacter aceti*.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
$m(\text{CH}_3\text{COOH})$ (g)	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0
supstrat/sirovina	rafinirani etanol					vino				
$\gamma(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})$ (g L ⁻¹)	20	25	30	40	50	20	25	30	40	50
$\gamma(\text{CH}_3\text{COOH})$ (g L ⁻¹)	10									

Priprema hranjive podloge s etanolom

Sastav hranjive podloge s etanolom: rafinirani etanol, octena kiselina, kukuruzni ekstrakt, sladovina, kvašćeva juha.

Pomoću vrijednosti iz tablice 4.1. potrebno je izračunati volumen hranjive podloge, volumen 96 %-tnog etanola i volumen octene kiseline, koju je potrebno dodati u podloge na početku bioprocesa (vidi Prilog 4.).

$$V(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})_{100\%} = \frac{m}{\varphi} \quad \varphi = 0,789 \text{ g mL}^{-1}$$

$$V(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})_{96\%} = \frac{V(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})_{100\%}}{0,96} \quad V_{\text{PODL.}} = \frac{m(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})}{\gamma(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})}$$

$$m(\text{CH}_3\text{COOH}) = \gamma \cdot V \quad V(\text{CH}_3\text{COOH}) = \frac{m}{\varphi} \quad \varphi(\text{CH}_3\text{COOH}) = 1,05 \text{ g mL}^{-1}$$

U Erlenmeyer tikvicu od 500 mL otpipetira se sladovina ($w = 10\%$) i to volumen od 4% od ukupnog volumena hranjive podloge, doda kukuruzni ekstrakt (CSL) i to volumen od 0,5% od ukupnog volumena hranjive podloge, kao i kvašćeva juha čiji se volumen izračuna tako da se ukupni volumen hranjive podloge umanjši za volumen sladovine, kukuruznog ekstrakta, etanola i octene kiseline:

$$V(\text{kv. juhe}) = V_{\text{UK.}} - (V_{\text{SLADOVINE}} + V_{\text{CSL}} + V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}} + V_{\text{CH}_3\text{COOH}})$$

Tikvica se začepi vatenim čepom, čep se omota papirom i pripremljena podloga se sterilizira ($121^\circ\text{C}/20 \text{ min}$). Nakon sterilizacije, sterilna podloga se ohladi i sterilno joj se doda izračunati volumen 96 %-tnog etanola i octene kiseline. Nacijepljivanje se provodi na slijedeći način: 5 mL sterilne hranjive podloge prenese se u epruvetu s kulturom *A. aceti* koja je porasla na kosom agaru, mikrobiološkom ušicom se kultura porasla na površini kosog agara suspendira i, u aseptičnim uvjetima, suspenzija prebaci u tikvicu sa sterilnom hranjivom podlogom. Nakon nacijepljivanja, iz Erlenmeyer tikvice treba uzeti 1 mL nacijepljene podloge kako bi odredili početnu koncentraciju octene kiseline. Sve ovdje opisane radnje potrebno je obaviti u aseptičnim uvjetima. Tikvica se ostavi na tresilici kako bi se odvijala biooksidacija etanola s pomoću bakterije *A. aceti* pri temperaturi od 28°C .

Priprema hranjive podloge s vinom

Hranjiva podloga s vinom sastoji se od vina, octene kiseline i vode. U Erlenmeyer tikvicu od 500 mL ulije se izračunati volumen vode, začepi vatenim čepom, čep se omota papirom i pripremljena podloga se sterilizira ($121^\circ\text{C}/20 \text{ min}$). Nakon sterilizacije, voda u tikvici se ohladi i, u aseptičnim uvjetima, joj se doda izračunati volumeni vina i octene kiseline. Ovako pripremljena hranjiva podloga nacijepi se kao i hranjiva podloga s etanolom, na gore opisan način, i na isti način se izuzme uzorak za određivanje početne kiselosti ove podloge.

Određivanje koncentracije octene kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL uzme se 1 mL uzorka, 20 mL vode i doda nekoliko (2-3) kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak se titrira otopinom NaOH koncentracije

0,1 mol L⁻¹ do prve pojave ljubičaste boje. Koncentracija octene kiseline računa se prema izrazu:

$$m_{\text{CH}_3\text{COOH}} = V(\text{NaOH}) \cdot f(\text{NaOH}) \cdot V_{\text{PODL}} \cdot 6 \quad [\text{mg}]$$

Dobivena masa octene kiseline je masa ove kiseline u jednom mililitru ili koncentracija izražena u g L⁻¹ (ili mg mL⁻¹).

Određivanje koncentracije etanola

100 mL podloge nakon biooksidacije prenese se u tikvicu za destilaciju, podloga se neutralizira otopinom NaOH ($c = 1,0 \text{ mol L}^{-1}$), doda joj se 100 mL destilirane vode. Tikvica se priključi na aparaturu za destilaciju i u odmjernu tikvicu predestilira se točno 100 mL destilata. Pomoću piknometra odredi se gustoća destilata i to pri temperaturi od 20°C. Iz donjeg se izraza izračuna gustoća destilata.

$$\rho = \frac{m(\text{piknometras destilatom}) - m(\text{piknometra})}{\text{vodenavrijednost piknometra}}$$

Iz dobivene gustoće destilata očita se volumni postotak etanola iz tablice po Windischu i izračuna koncentracija etanola preostalog nakon provedene biooksidacije.

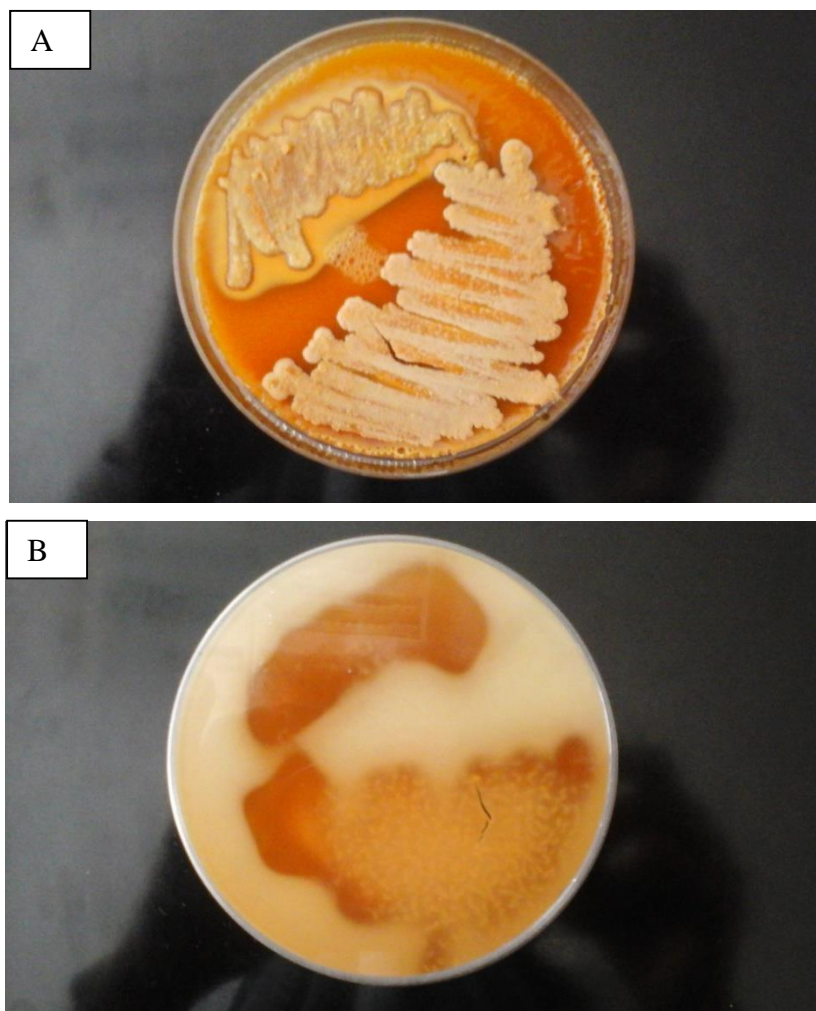
Računanje koeficijenta konverzije supstrata u produkt i učinkovitost bioprocasa

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} = \frac{m_P}{m_S} \quad I = \frac{Y_{P/S \text{ stvarni}}}{Y_{P/S \text{ teoretski}}}$$

Tablica 4.2. Rezultati nepotpune biooksidacije etanola i etanola iz vina s pomoću bakterije *A. aceti*.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
$m(\text{CH}_3\text{COOH})$ [g]	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0
supstrat/sirovina	rafinirani etanol					vino				
$\gamma_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$ [g L ⁻¹]	20	25	30	40	50	20	25	30	40	50
$\gamma_{\text{CH}_3\text{COOH}}$ [g L ⁻¹]	10									
$\gamma_{\text{CH}_3\text{COOH}}$ [g L ⁻¹]										
$\Delta\gamma_{\text{CH}_3\text{COOH}}$ [g L ⁻¹]										
$\gamma_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$ [g L ⁻¹]										
$Y_{P/S}$ [g g ⁻¹]										
I [%]										

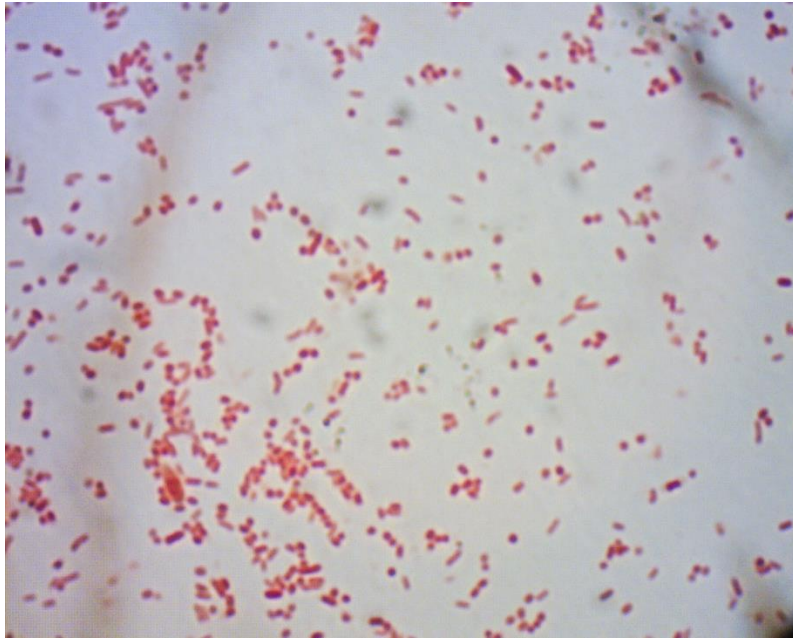
Prilog 4.



Slika P.4.1. Kolonije bakterije iz roda *Acetobacter* porasle na čvrstoj podlozi za uzgoj bakterija octene kiseline (Tablica 4.4.3.) nakon inkubacije (28°C/48 h): slika kolonija s gornje strane Petry-jeve zdjelice (A) i slika kolonija s donje strane Petry-jeve zdjelice s prikazom promjene boje podloge zbog neutralizacije proizvedene octene kiseline kalcijevim karbonatom (B).

Tablica 4.4.3. Sastav hranjive podloge za uzgoj bakterija octene kiseline.

sastojak	koncentracija (g L ⁻¹)
glukoza	100
kvašćev ekstrakt	10
CaCO ₃	30
agar	20



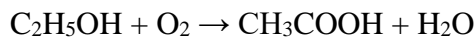
Slika P.4.2. Mikroskopska slika preparata bakterije iz roda *Acetobacter* koji je obojen po Gram-u.

P.4.1. Izračun mase sastojaka hranjive podloge sa etanolom i hranjive podloge sa vinom za proizvodnju octene kiseline s pomoću bakterije *Acetobacter aceti* DSM 3508 (vidi Tablicu 4.1.)

$$m(\text{CH}_3\text{COOH}) = 1,0 \text{ g}$$

$$\gamma_0(\text{CH}_3\text{COOH}) = 5,0 \text{ g/L}$$

$$\gamma(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 10,0 \text{ g/L}$$



$$n(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) : n(\text{CH}_3\text{COOH}) = 1 : 1$$

$$n(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = n(\text{CH}_3\text{COOH})$$

$$n(\text{CH}_3\text{COOH}) = \frac{m}{M} = \frac{1,0 \text{ g}}{60 \text{ g/mol}} = 0,0167 \text{ mol}$$

$$n(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 0,0167 \text{ mol}$$

$$m(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = n \cdot M = 0,0167 \text{ mol} \cdot 46 \text{ g/mol} = 0,77 \text{ g}$$

$$m(\text{podloge}) = \frac{m(\text{etanol})}{\gamma(\text{etanol})} = \frac{0,77 \text{ g}}{10,0 \text{ g/L}} = 0,077 \text{ L} = 77,0 \text{ mL}$$

$$V(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}_{100\%}) = \frac{m}{\rho} = \frac{0,77 \text{ g}}{0,789 \text{ g/mL}} = 0,98 \text{ mL}$$

$$V(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}_{96\%}) = \frac{0,98 \text{ mL}}{0,96 \text{ mL/mL}} = 1,02 \text{ mL}$$

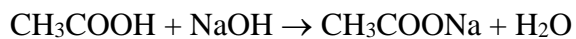
$$V(\text{CH}_3\text{COOH}) = \frac{m}{\rho}$$

$$\rho(\text{CH}_3\text{COOH}) = 1,05 \text{ g/mL}$$

$$m_0(\text{CH}_3\text{COOH}) = 5,0 \text{ g u 1L } [\gamma_0(\text{CH}_3\text{COOH})]$$

$$m_0(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,385 \text{ g u 77,0 mL podloge}$$

$$V(\text{CH}_3\text{COOH}) = \frac{0,385 \text{ g}}{1,05 \text{ g/mL}} = 0,37 \text{ mL}$$

P.4.2. Izračun mase (ili koncentracije) octene kiseline

$$n(\text{CH}_3\text{COOH}) : n(\text{NaOH}) = 1 : 1$$

$$c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol L}^{-1} = 0,1 \text{ mmol mL}^{-1}$$

$$V(\text{NaOH}) = 1,0 \text{ mL}$$

$$n(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mmol} = n(\text{CH}_3\text{COOH})$$

$$m(\text{CH}_3\text{COOH}) = n \cdot M = 0,1 \text{ mmol} \cdot 60 \text{ g mol}^{-1} = 6 \text{ g}$$

Utrošeni volumen od 1 ml NaOH koncentracije $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ili $0,1 \text{ mmol mL}^{-1}$ odgovara 6 g octene kiseline, pa je:

$$m_{\text{CH}_3\text{COOH}} = V(\text{NaOH}) \cdot f(\text{NaOH}) \cdot V_{\text{PODL}} \cdot 6$$

MIKROBNA PROIZVODNJA MEĐUSPOJEVA KREBSOVOG CIKLUSA - PROIZVODNJA LIMUNSKJE KISELINE

Proizvodnja limunske kiseline (2-hidroksipropan-1,2,3-trikarboksilna kiselina) s pomoću plijesni na ugljikohidratnim supstratima provodi se reakcijama Krebsovog ciklusa (ciklus limunske kiseline). Glukoza je glavni izvor ugljika za ovaj bioproces i kod većine mikroorganizama se oko 80% glukoze razgradi Embden-Meyerhof-Parnasovim putem (EMP) do piruvata. Piruvat se dekarboksilira do acetil-CoA koji se dalje može koristiti u reakcijama Krebsova ciklusa (ciklus trikarbonskih kiselina). Završni stupanj u proizvodnji limunske kiseline je kondenzacija C2 (acetil-CoA) i C4 spoja (oksaloacetat) (Slika 5.1.).

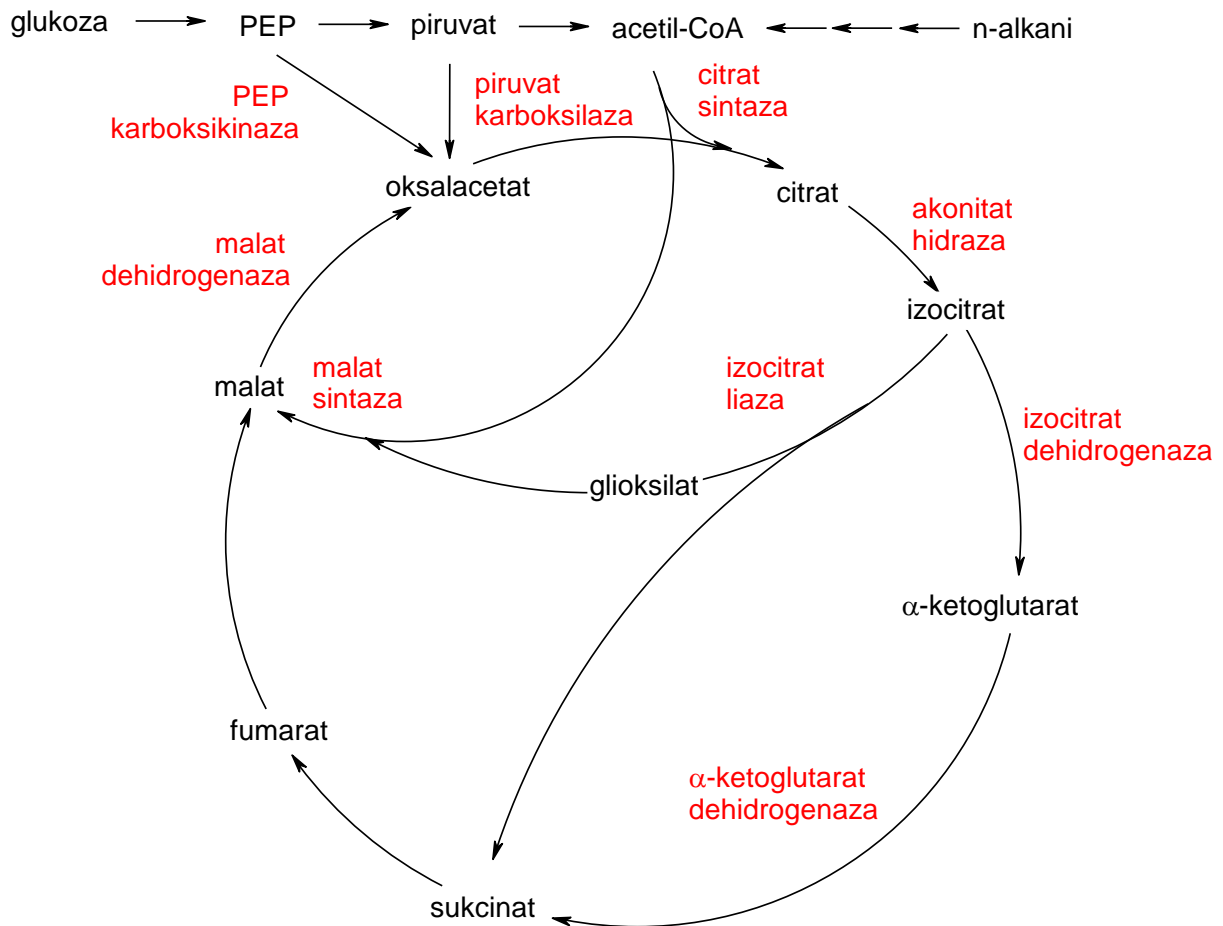
Tijekom idiofaze tj. faze nastajanja limunske kiseline, proizvodni mikroorganizam je u stacionarnoj fazi rasta kada sporo katabolizira izvore ugljika i dušika. Aktivnost citrat sintaze (enzim koji katalizira reakciju kondenzacije oksaloacetata i acetil-CoA) povećava se 10 puta tijekom proizvodnje limunske kiseline. Aktivnost enzima koji kataboliziraju limunsku kiselinu, npr. akonitaze i izocitrat dehidrogenaze, ne može se detektirati ili je relativno niska u usporedbi s aktivnošću ova dva enzima tijekom trofofaze (faza intenzivnog rasta mikroorganizma tijekom koje se brže kataboliziraju izvori ugljika i dušika). Aktivnost NADP-zavisne izocitrat dehidrogenaze kontrolirana je koncentracijom citrata, dok je aktivnost NAD-zavisne izocitrat dehidrogenaze regulirana omjerom $\text{NADH}/(\text{NAD}^+ + \text{NADH} + \text{H}^+)$.

Tijekom šaržnog bioprocasa mikroorganizam je prvo u trofofazi ili fazi rasta, tijekom koje izvor ugljika (glukozu) troši za rast micelija, pri čemu se energija za rast pridobiva u procesu respiracije. Nakon formiranja micelija, mikroorganizam prelazi u idiofazu tijekom koje se proizvodi limunska kiselina tj. preostali dio izvora ugljika prevodi se u organsku kiselinu uz vrlo mali udio izvora ugljika koji se potpuno oksidira.

U uvjetima iscrpljivanja glukoze iz podloge provode se reakcije glioksilatnog ciklusa (glioksilat se pregrađuje do malata, izocitrat liaza se inducira, a malat sintetaza je već prisutna u stanici). Dodatkom glukoze reprimira se glioksilatni ciklus, a izocitrat liaza je još uvijek djelomično aktivna.

Brojni mikroorganizmi mogu proizvoditi limunsku kiselinu kao krajnji proizvod metabolizma kao što su: *Aspergillus niger*, *A. wentii*, *A. clavatus*, *Penicillium luteum*, *P. citrinum*, *Mucos piriformis*, *Paecilomyces divaricatum*, *Citromyces pfefferianus*, *Candida guilliermondii*, *Saccharomycopsis lipolytica*, *Trichoderma viride*, *Arthrobacter paraffineus* i *Corinebacterium* sp. Proizvodnja limunske kiseline provodi se najčešće uz pomoć odabranih

sojeva plijesni *Aspergillus niger* na ugljikohidratnim podlogama. Patentirani su i procesi proizvodnje ove kiseline s pomoću kvasaca (*Candida* sp.) i bakterija (*Corynebacterium* sp.) na ugljikovodičnim sirovinama (Slika 5.1.). U bioprocima koji se provode s pomoću bakterija i kvasaca proizvodnja traje kraće i postiže se veće iskorištenje bioprocisa nego kod bioprocisa koji se provode s pomoću plijesni.



Slika 5.1. Razgradnja piruvata i alkana ciklusom trikarbnskih kiselina i glioksilatnim ciklusom.

Neke karakteristike bioprocisa za proizvodnju limunske kiseline

U industrijskoj proizvodnji limunske kiseline najčešće se koriste podloge koje sadrže melasu šećerne repe ili melasu šećerne trske kao osnovnu sirovinu. Melasa se razrijeđuje vodom tako da udio saharoze bude 10-12%. Za odvijanje enzimskih reakcija u stanicama plijesni potrebne su određene koncentracije (u tragovima) metala (željeza, mangana, cinka i fosfora) koji ulaze u sastav koenzima enzima citratnog ciklusa. U uvjetima kada su

koncentracije potrebnih sastojaka hranjive podloge optimalne, stanice plijesni neće nakupljati limunsku kiselinu, već će potpuno oksidirati ugljikohidrate do CO_2 i H_2O . Podese li se koncentracije metala u tragovima tako da se onemogući aktivnost određenih enzima citratnog ciklusa, nakupljat će se limunska kiselina. Zbog toga se melasa za ovaj bioproces tretira sredstvima za uklanjanje viška metalnih iona [npr. taloženje iona aluminijevim hidroksidom, upotreba ionskih izmjenjivača ili kalijeva ferocijanida ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$)]. Optimalna pH vrijednost za uzgoj plijesni je 6 jedinica, a optimalna temperatura 28°C - 30°C . Aeracija se obično provodi zrakom ili kisikom.

Limunska se kiselina može proizvesti tijekom bioprocasa sa površinskim ili submerznim načinom uzgoja. Pri submerznom uzgoju plijesan *A. niger* diferencira se u micelijska klupka ili zrnca, koja nazivamo peleti. Veličina peleta ima velik utjecaj na difuziju kisika i hranjivih tvari u stanice plijesni koje formiraju pelet, te utječe na konačni prinos limunske kiseline. Kod peleta koji dostignu određenu karakterističnu veličinu, rast se ograničava na perifernu zonu zbog ograničene difuzije supstrata u unutrašnjost čvrstog i kompaktnog peleta. Eksperimentalno je utvrđeno da je za biosintezu limunske kiseline optimalan promjer peleta s malo vlaknastog rasta 1,2 do 2,5 mm. Submerzni uzgoj se provodi u bioreaktorima. Hranjiva se podloga naciepljuje naklijalim konidijama koje formiraju pelete, a konidije se uzgajaju u predreaktoru. Bioproces tijekom kojeg je potrebno aerirati i miješati hranjivu podlogu traje 6-7 dana.

Zadatak: u i na melasnoj podlozi sa različitim koncentracijama saharoze proizvesti limunsku kiselinu s pomoću plijesni *A. niger* i to submerznim i površinskim načinom uzgoja. Submerzni uzgoj plijesni potrebno je provesti s dvije različite početne koncentracije plijesni. Izračunati prinos proizvoda određivanjem ukupne kiselosti podloge nakon provedenog bioprocasa. Usporediti prinose s obzirom na početnu koncentraciju plijesni i morfologiju micelijskih peleta. Početni broj spora u kemijski definiranoj podlozi za uzgoj cjepiva je između 10^4 i 10^8 mL^{-1} .

Tablica 5.1. Zadane koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi za proizvodnju limunske kiseline s pomoću *A. niger*.

	A	B	C	D	E
γ_0 (saharoz) [g L^{-1}]	100	120	140	160	180

Priprema podloge za površinski i submerzni uzgoj plijesni

Odvagati izračunatu masu melase s poznatim udjelom saharoze i razrijediti je vodovodnom vodom do 400 mL. Pripremljena suspenzija melase kvantitativno se prenese u Erlenmeyer-ovu tikvicu od 1000 mL. pH vrijednost suspenzije podesi se pomoću otopine HCl (10%-tna otopina) do pH vrijednosti 5-6. U tikvicu se doda 3,0 mL otopine 5%-tnog $K_4Fe(CN)_6$. Pripremljena se podloga razdijeli u Erlenmeyer tikvice i to tako da se u dvije tikvice od 500 mL prenese po 100 mL pripravljene podloge za submerzni uzgoj, dok preostalih 200 mL pripravljene podloge ostaje u Erlenmeyer tikvici od 1000 mL za površinski uzgoj. Tikvice se zatvore vatenim čepovima i omotaju papirnatim čepom te steriliziraju pri temperaturi od 121°C kroz 20 min.

Priprema cjepiva za submerzni uzgoj

U dvije epruvete s kosom hranjivom podlogom na kojoj je porasla i dobro sporulirala kultura *A. niger* dodati u aseptičnim uvjetima po 9 mL sterilne vode koja sadrži 0,2% Tween 80 (površinski aktivno sredstvo). Pomoću mikrobiološke ušice u obje epruvete u aseptičnim uvjetima prirediti supenzije *A. niger* u vodi i prenijeti ih u jednu praznu sterilnu Erlenmeyer tikvicu od 50 mL. U ovoj je suspenziji potrebno odrediti broj spora plijesni u 1 mL, što se može napraviti brojanjem spora u Thoma-ovoj komorici. Prije brojanja se obično napravi razrijeđenje ove suspenzije i to 10^{-1} (1 mL pripravljene suspenzije iz tikvice otpipetira se u aseptičnim uvjetima u epruvetu sa 9 mL sterilne vode sa površinski aktivnim sredstvom) kako bi se lakše pobrojale spore. Nakon određivanja broja spora u jednom mililitru suspenzije, izračuna se volumen suspenzije *A. niger* ili njezina razrijeđenja (10^{-1}), koji je potrebno dodati u 50 mL kemijski definirane podloge (pripremljene dvije kemijski definirane podloge od 50 mL za uzgoj cjepiva u dvije Erlenmeyer tikvice od 300 mL). Kemijski definiranu podlogu naciepljujemo kako bi uzgojili cjepivo za naciepljivanje melasne podloge za submerzni uzgoj. Naciepljene kemijski definirane podloge se ostave na tresilici kroz 24 sata pri temperaturi od 28°C.

Naciepljivanje melasne podloge za submerzni i površinski uzgoj

Nakon 24 sata uzgoja *A. niger* u kemijski definiranoj podlozi, potrebno je mikroskopirati micelij. Ukupni volumen preostalog poraslog cjepiva iz jedne tikvice u aseptičnim se uvjetima prenese u tikvicu sa 100 mL sterilne melasne podloge za submerzni uzgoj. Dakle, s cjepivom iz dvije tikvice s kemijski definiranom podlogom naciepe se dvije

tikvice sa melasnom podlogom za submerzni uzgoj *A. niger*. Neposredno nakon naciepljivanja melasnih podloga, sterilnom pipetom se izuzme 1 mL naciepljene melasne podloge, razrijedi s 50 mL destilirane vode i titrira otopinom NaOH ($c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) uz fenolftalein kao indikator. Submerzni uzgoj se provodi na tresilici kroz 7 dana pri temperaturi od 28°C.

Podloga za površinski uzgoj (Erlenmeyer tikvica od 1000 mL s 200 mL sterilne melasne podloge) naciepi se konidijama plijesni koje se pomoću aktivnog ugljena i mikrobiološke ušice prenesu s kose podloge (iz treće epruvete). Tikvica se ostavi u termostatu pri temperaturi od 28°C.

Određivanje koncentracije limunske kiseline

Nakon provedenog bioprocesa suspenzija se filtrira preko naboranog filter papira. Otpipetira se 1 mL filtrata, razrijedi se s 50 mL destilirane vode i proizvedena limunska kiselina se titrira s otopinom NaOH ($c = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$) uz fenolftalein kao indikator. Dobiveni utrošak lužine (V , mL) množi se faktorom 6,4 i dobiveni rezultat predstavlja koncentraciju limunske kiseline (g L^{-1}) jer 1 mL 0.1 mol L^{-1} NaOH odgovara 6.4 mg limunske kiseline.

Izračun za prinos limunske kiseline $Y_P = (a - b) \cdot f_{\text{NaOH}} \cdot 6.4$ [g L⁻¹]

Razlika u volumenu utrošene lužine (V , mL) na kraju (a) i na početku (b) uzgoja preračuna se na prinos limunske kiseline tijekom provedenog bioprocesa

Izračun za stupanj konverzije supstrata (saharoze) u proizvod (limunsku kiselinu)

$$Y_{P/S} = \frac{Y_P}{\gamma_{S_0} - \gamma_S} \quad [\text{g g}^{-1}]$$

Nakon izračuna, dobivene rezultate unesite u tablicu 10.

Tablica 5.2. Prinos limunske kiseline i koeficijent konverzije saharoze u limunsku kiselinu tijekom submerznog i površinskog uzgoja *A. niger*.

	Y_P [g L ⁻¹]	$Y_{P/S}$ [g g ⁻¹]
Stol I	μ (saharoza) = 100 g L ⁻¹	
N = 10 spora mL ⁻¹		
10 spora mL ⁻¹		
površinski uzgoj		
Stol II	μ (saharoza) = 120 g L ⁻¹	
N = 10 spora mL ⁻¹		
10 spora mL ⁻¹		
površinski uzgoj		
Stol III	μ (saharoza) = 140 g L ⁻¹	
N = 10 spora mL ⁻¹		
10 spora mL ⁻¹		
površinski uzgoj		
Stol IV	μ (saharoza) = 160 g L ⁻¹	
N = 10 spora mL ⁻¹		
10 spora mL ⁻¹		
površinski uzgoj		
Stol V	μ (saharoza) = 180 g L ⁻¹	
N = 10 spora mL ⁻¹		
10 spora mL ⁻¹		
površinski uzgoj		



Slika 5.2. Mikroskopska slika preparata plijesni *Aspergillus niger*.