

FIZIOLOGIJA INDUSTRIJSKIH MIKROORGANIZAMA - Izvedbeni plan nastave AK. GOD. 2024./2025.

1. OPĆE INFORMACIJE			
1.1. Nositelj(i) i suradnici predmeta	Prof. dr.sc. Anita Slavica Prof. dr. sc. Vesna Zechner-Krpan	1.8. Semestar	zimski
1.2. Naziv predmeta	Fiziologija industrijskih mikroorganizama	1.9. Bodovna vrijednost (broj bodova po ECTS sustavu)	6
1.3. Šifra predmeta	53222	1.10. Broj sati u semestru (P+V+S+e-učenje)	40+30+0+0
1.4. Studijski program	Diplomski sveučilišni studij Bioproceno inženjerstvo	1.11. Očekivani broj studenata na predmetu	20
1.5. Status (vrsta) predmeta	obvezan	1.12. Razina primjene e-učenja (1, 2, 3 razina), postotak izvođenja predmeta <i>on line</i> (maks. 20%)	1. 0%
1.6. Mjesto izvođenja	Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu	1.13. Jezik izvođenja	Hrvatski
1.7. Godina studija u kojoj se predmet izvodi	prva	1.14. Mogućnost izvođenja na engleskom jeziku	DA
2. OPIS PREDMETA			
2.1. Ciljevi predmeta	Cilj predmeta je upoznati studenta sa holističkim pristupom u primjeni, analizi i evaluaciji metoda, postupaka i bioprocasa koji se provode pomoću tradicionalnih i potencijalnih biokatalizatora te formiranjem novih ideja i rješenja u biotehnologiji, bioekonomiji i kružnom gospodarstvu.		
2.2. Uvjeti za upis predmeta i / ili ulazne kompetencije potrebne za predmet (ako postoje)	Poželjna su predznanja iz biotehnologije, mikrobiologije, (bio)kemije, instrumentalne analize, biokemijskog inženjerstva i genetičkog inženjerstva, koja se mogu steći i nakon upisa ovog predmeta.		
2.3. Ishodi učenja na razini programa kojima predmet pridonosi	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prepoznavanje proizvodnih problema, donošenje korektivnih odluka</li> <li>• Unaprjeđivanje postojećih biotehnoloških proizvodnji</li> <li>• Razvoj novih industrijskih biotehnoloških procesa i opreme</li> <li>• Prevođenje biotehnoloških procesa u veće (industrijsko) mjerilo (scale up) i testiranje istih u manjem mjerilu (scale down)</li> <li>• Tehnološki nadzor nad projektiranjem, izvedbom i testiranjem biotehnoloških postrojenja</li> <li>• Identificiranje izvora onečišćenja okoliša u proizvodnim linijama i detekcija onečišćenja u okolišu, osmišljavanje način zbrinjavanja, te vođenje pogona za biotehnološku obradu otpadnih voda i drugog otpada</li> </ul>		

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Planiranje i izvedba eksperimenata (u malom i velikom mjerilu) u različitim područjima biotehnologije, prikaz i kritička interpretacija rezultata, donošenje meritornih zaključaka</li> <li>• Izvođenje stručnih poslova odgovarajućega stupnja složenosti u mikrobiološkim i biokemijskim laboratorijima.</li> <li>• Interpretacija rezultata laboratorijskih analiza</li> <li>• Prezentacija pogonskih, istraživačkih, laboratorijskih i poslovnih rezultata usmenim i pismenim putem uz korištenje stručne terminologije</li> <li>• Korištenje i valorizacija znanstvene i stručne literature u svrhu cjeloživotnog učenja i unapređenja struke</li> </ul>
<p>2.4. Očekivani ishodi učenja na razini predmeta (3-10 ishoda učenja)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Samostalno interpretirati i prezentirati dostupne informacije o biokemijskim reakcijama i metaboličkim putevima te</li> <li>• Uspješno komunicirati problematiku mikrobne fiziologije stručnjacima i laicima.</li> <li>• Objasniti primjenu određene (makro)molekule, odjeljka stanice ili cjelovite stanice mikroorganizma u bioprocima za proizvodnju biotehnoških proizvoda (npr. alkohola, kiselina, biomase, itd.).</li> <li>• Objasniti formiranje elektrokemijskog gradijenta (kemiosmotski mehanizam) i načine pridobivanja metaboličke energije kao i mehanizme regulacije transporta kroz biomembrane (kemiosmotski prijenosnici, PTS, egzo- i endocitoza).</li> <li>• Objasniti evoluciju i mehanizme regulacije različitih metaboličkih (kataboličkih i anaboličkih) puteva, posebno kod tradicionalnih industrijskih mikroorganizama (bakterija mliječne kiseline, bakterija octene kiseline, plijesni i kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>).</li> <li>• Objasniti mehanizme prijenosa signala (globalne regulacijske mreže), posebno mehanizme regulacije ekspresije gena (represija glukozom, <i>lac</i> operon bakterije <i>Escherichia coli</i>, sinteza alarmona i funkcioniranje <i>relA/spoT</i> modulona, sporulacija bakterija).</li> <li>• Objasniti primjenu analitičkih metoda kojima se može pratiti ciljani događaj na nivou enzima, odjeljka stanice, cjelovite stanice ili biomase u bioreктору i primijeniti ih.</li> <li>• Primijeniti selektivne uvjete i regulaciju metabolizma (neoksidativni metabolizam, nepotpune biooksidacije, Pasteur-ov i Crabtree-jev učinak kod kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, formiranje peleta) pri uzgoju i održavanju mikroorganizma kao i proizvodnji različitih proizvoda.</li> </ul>
<p>2.5. Opis sadržaja predmeta</p>	<p><b>Predavanja</b>  <b>Metode u fiziologiji industrijskih mikroorganizama</b>          Ključne karakteristike prokariotskih i eukariotskih industrijskih mikroorganizama, primjena ovih mikroorganizama, biljnih i životinjskih stanica i viših organizama u tradicionalnim te u bioprocima "nove biotehnologije". Izvori čistih kultura industrijskih mikroorganizama (divljih tipova i mutanata) i drugog biološkog materijala; metode i tehnike izolacije ovih mikroorganizama iz različitih staništa. Primjena selektivnih uvjeta uzgoja industrijskih</p>

mikroorganizama i postupaka vođenja bioprocasa u laboratorijskom, polu-industrijskom i industrijskom mjerilu. Primjena različitih jednostavnih i hibridnih metoda i tehnika (kemostat, svjetlosna i elektronska mikroskopija, SEM, TEM; difrakcija X-zraka; UV-Vis spektrofotometrija; 1D i 2D kromatografske i elektroforetske metode; kapilarna elektrokromatografija; luminiscencija; protočna citometrija; ionizacija i spektrometrija masa; NMR; ELISA; mikrosenzori, te primjena PCR, tag-ova, mutacija i drugih tehnika genetičkog inženjerstva) za proučavanje fiziologije industrijskih mikroorganizama. Primjena *in silico* analize (Metabolic Control Analysis fluksa glukoze „kroz“ glikolizu kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, formiranje 3D modela bioloških molekula na primjeru oksidaze D-aminokiselina). Iščitavanje fizioloških karakteristika iz podataka sekvencioniranja nukleinskih kiselina i proteina industrijskih mikroorganizama. Holistički i "omički" pristup u proučavanju fiziologije (potencijalnog) industrijskog mikroorganizma (primjenom genomike, transkriptomike, proteomike, lipidomike, metabolomike, fluksomike, bibliomike).

#### **Biomembrane, transport, bioenergetika, struktura stanice industrijskog mikroorganizma**

Hipoteza o procesu formiranja biomembrane prokariotske i eukariotske stanice te membrana organela eukariotske stanice. Višestruka uloga membrana prokariotskih i eukariotskih industrijskih mikroorganizama. Izvori kemijske energije i korištenje energije svjetlosti u biomembranama (potencijalnih) industrijskih mikroorganizama. Kemiosmotski mehanizam i formiranje transmembranskog elektrokemijskog gradijenta te usporedba oksidativne fosforilacije i fotofosforilacije (necikličke i cikličke). Primjeri aerobne i anaerobne respiracije kod industrijskih mikroorganizama. Pasivni i aktivni transport otopljenih tvari (molekula i iona) kroz fosfolipidni dvosloj kod prokariotskih i eukariotskih industrijskih mikroorganizama s naglaskom na fosfoenolpiruvat fosfotransferazni sustav (PTS) te spregu respiratornog lanca i laktoza permeaze kod bakterije *Escherichia coli*. Endocitoza/egzocitoza kod viših organizama. Važnost stukture stanice mikroorganizma za njegovu industrijsku primjenu.

#### **Katabolizam i anabolizam u stanicama industrijskih mikroorganizama. Sekundarni metabolizam kod nekih industrijskih mikroorganizama**

Primjena autotrofa i heterotrofa u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji. Korištenje različitih supstrata (ugljikohidrata, lipida, ugljikovodika, spojeva s dva ugljikova atoma, spojeva s jednim ugljikovim atomom, spojeva s dušikom, rezervnih tvari) i proizvodnja industrijskih proizvoda različitim metaboličkim putevima i specifičnim reakcijama (glikoliza, fosfoketolazni put kod bakterije *Bifidobacterium bifidum*, Entner-Doudoroff-ov put, pentozafosfatni put, ciklus limunske kiseline i ciklus dikarbonskih kiselina, oksidacija ugljikovodika i beta-oksidacija, transaminacija, oksidativna i reduktivna deaminacija, nitrifikacija/denitrifikacija, anaplerotske reakcije, glioksilatni put, Calvin-Benson-Bassham-ov put, serinski put, alulozni put). Primjena sekundarnog metabolizma u industrijskoj proizvodnji (ribosomska i ne-ribosomska sinteza polipeptidnih antibiotika i polimerizacijske reakcije sinteze poliketida na multienzimskom kompleksu).

#### **Regulacija metabolizma u stanicama industrijskih mikroorganizama**

Opći načini prijenosa signala/pobuda i prilagodba industrijskih mikroorganizama na pobude iz okoline (sustav:

kemijski signal/senzor-receptor/prijenosnik signala/receptor-primatelj signala/regulator/odziv/adaptacija). Razine regulacije metabolizma industrijskih mikroorganizama (reguliranje transkripcije, translacije, post-translacijske kovalentne modifikacije, kompartmentacija i specifična rekombinacija). Organizacija genetičkog materijala kod industrijskih mikroorganizama (operon, regulon, modulon) i pripadajući regulatorni mehanizmi na razini interakcije protein-DNA. Primjeri regulacije nekih operona kod divljih sojeva i mutanata (auksotrofnih i regulacijskih) industrijskih mikroorganizama. Globalne regulacijske mreže i prijenos signala - stalna i prijelazna katabolička represija glukozom kod Gram-pozitivnih (ccpA modulon) i Gram-negativnih bakterija (crp modulon) i diauksijski rast (uloga cAMP). Shift-up i shift-down eksperimenti; kontrola anabolizma relA/spoT modulonom [„zakočeni“ ribosom, uloga acyl carrier proteina, sinteza ppGpp].

**Stanični ciklus prokariotskih i eukariotskih industrijskih mikroorganizama. Biokemijsko-morfološka diferencijacija stanica industrijskih mikroorganizama (sporulacija *Bacillus* sp.)**

Ključni događaji tijekom mitoze (simetrične diobe) eukariotskih mikroorganizama te diobe bakterijskih stanica. Prijenos pobude („glad“, quorum sensing, sinteza DNA), prijenos signala SpoO-phospho-relay putem, (auto)regulacija ekspresije određenih gena (npr. gena koji kodiraju AbrB protein i  $\sigma$  faktore), biokemijsko-morfološka diferencijacija vrsta iz roda *Bacillus* (asimetrična dioba) i formiranje spore. Specifična rekombinacija dvaju dijelova gena koji kodira sigmaK faktor i njegova post-translacijska modifikacija. Aktivacija i germinacija (klijanja) spore. Važnost poznavanja prijenosa pobude i biokemijska (sekundarni metabolizam kod nekih industrijskih mikroorganizama) i biokemijsko-morfološka (sporulacija vrsta iz roda *Bacillus*) diferencijacija stanice.

**Fermentacije i nepotpune oksidacije izvora ugljika kod tradicionalnih industrijskih mikroorganizama: proizvodnja mliječne kiseline, octene kiseline i limunske kiseline**

Potpune i nepotpune biooksidacije supstrata s pomoću industrijskih mikroorganizama i proizvodnja važnih industrijskih proizvoda [npr. alkohola, ketona, (amino)kiselina, antibiotika] nepotpunim biooksidacijama. Transport glukoze i drugih izvora ugljika i energije u stanice bakterija mliječne kiseline i regulacija njihova metabolizma (homolaktička fermentacija, heterolaktička fermentacija, fosfoketolazni put kod bakterije *Leuconostoc mesenteroides*, mixed-acid fermentacija). Raspodjela energije reakcije defosforilacije fosfoenolpiruvata između aktivnog transporta supstrata PTS-om i supstratne fosforilacije (pridobivanje ATP) tijekom ustaljenog stanja (obilje šećera), zaustavljanja glikolize (gladovanje) i ponovnog pokretanja glikolize (ponovno obilje). Difuzija nedisocirane mliječne kiseline kroz citoplazminu membranu, proton/laktat simport i citrat/laktat antiport kod bakterija mliječne kiseline. Mehanizmi rezistencije bakterija octene kiseline na relativno visoke koncentracije etanola i octene kiseline u okolini. Pregled fizioloških karakteristika bakterija octene kiseline u tradicionalnim i novim bioprocima. Regulacija metabolizma acetata – "acetatni prekidač" (acetate switch). Proizvodnja acetata (acetogeneza) u reakcijama redukcije različitih supstrata (npr. Wood-Ljungdahl-ovim putem) s pomoću različitih industrijskih mikroorganizama (*Clostridium* sp., *Acetobacterium* sp. i dr.).

**Regulacija metabolizma različitih ugljikohidrata u stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae***

Sustavi za transport različitih ugljikohidrata (glukoza, fruktoza, manoz, maltoza, galaktoza, saharoza) u stanice kvasca *S. cerevisiae*. Korištenje različitih ugljikohidrata i drugih supstrata pri aerobnim i anaerobnim uvjetima uzgoja kvasca *S. cerevisiae*. Koordinacija glikolize i glukoneogeneze u stanicama kvasca *S. cerevisiae* s naglaskom na inaktivaciju fruktoza-1,6-bisfosfat 1-fosfataze nakon dodatka glukoze. Organizacija genetičkog materijala kod kvasca [elementi UAS, OP (URS), TATA i I]. Primjena ne-represibilnih mutanata i ne-derepresibilnih mutanata kvasca *S. cerevisiae* u istraživanju i industrijskoj proizvodnji. Leloir-ov metabolički put i gal operon. Prijenos signala o dostupnosti glukoze fosforilacijskom kaskadom (od vanstaničnog prostora do gena koji kodiraju proteine/enzime za transport i metabolizam drugih ugljikohidrata i represija metabolizma drugih ugljikohidrata glukozom). Oksidativni i oksidativno-fermentativni metabolizam ugljikohidrata tijekom uzgoja kvasca *S. cerevisiae* šaržnim i kontinuiranim postupkom. Pasteur-ov i Crabtree-jev učinak kod Pasteur-pozitivnih kvasaca i Crabtree-pozitivnih kvasaca. Drugi poznati učinci kod kvasca (Custer-ov i Kluver-ov učinak). Primjena kemostata: ustaljeno stanje te tranzijentni eksperimenti pulsne i stupnjevite pobude; metode i tehnike za eksperimentalno utvrđivanje kratkotrajnog i dugotrajnog Crabtree-jevog učinka.

#### **Vježbe**

##### **Metode u fiziologiji industrijskih mikroorganizama**

Odabir ključnih fizioloških karakteristika određenih industrijskih mikroorganizama (*Lactobacillus* sp., *Clostridium* sp., *Streptomyces* sp., *Saccharomyces* sp.) i izolacija čiste kulture ovih mikroorganizama iz njihovih staništa pripremom uzorka staništa, uzastopnim naciepljivanjem na sterilne selektivne tekuće i čvrste hranjive podloge u odabranim selektivnim uvjetima za svaki mikroorganizam. Odabir poraslih kolonija prema karakterističnim morfološkim značajkama, njihovo mikroskopiranje i naciepljivanje za uzgoj u cilju pripreme trajnih kultura i njihovo pohranjivanje u laboratorijskoj zbirci.

##### **Stanični ciklus prokariotskih i eukariotskih industrijskih mikroorganizama. Biokemijsko-morfološka diferencijacija stanica industrijskih mikroorganizama (sporulacija *Bacillus* sp.)**

Primjena termičkog stresa kao pobude za inicijaciju diferencijacije vegetativnih stanica vrsta iz roda *Clostridium* i uzgoj spora u hranjivoj podlozi sa škrobom. Razlikovanje vegetativnih stanica i spora vrsta iz roda *Clostridium*. Prepoznavanje pupova kod *Saccharomyces* sp.

##### **Fermentacije i nepotpune oksidacije izvora ugljika kod tradicionalnih industrijskih mikroorganizama: proizvodnja mliječne kiseline, octene kiseline i limunske kiseline**

Priprema hranjivih podloga, inokulacija i vođenje mikrobnih procesa: (i) proizvodnje L-mliječne kiseline fermentacijom ugljikohidrata u melasnoj podlozi s pomoću Gram-pozitivne bakterije *Lactobacillus rhamnosus* DSM 20021<sup>T</sup>, (ii) proizvodnje ekvimolarnie otopine D- i L-mliječne kiseline simultanom saharifikacijom i fermentacijom škroba s pomoću amilolitičke Gram-pozitivne bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>, (iii) proizvodnje octene kiseline u hranjivoj podlozi sa etanolom i hranjivoj podlozi sa vinom s pomoću Gram-negativne bakterije *Acetobacter aceti* DSM 3508, (iv) proizvodnje limunske kiseline u melasnoj podlozi površinskim i submerznim

FIZIOLOGIJA INDUSTRIJSKIH MIKROORGANIZAMA - Izvedbeni plan nastave AK. GOD. 2024./2025.

	<p>uzgojem spora, micelija i peleta plijesni <i>Aspergillus niger</i>. Procjena uspješnosti primjene odabranih sojeva bakterija i plijesni, koji imaju različiti metabolički potencijal (proizvodnja octene i limunske kiseline, proizvodnju L-mliječne kiseline i D-/L-mliječne kiseline) na temelju eksperimentalno određenih koncentracija i izračunatih biokinetičkih parametara (<math>Y_{X/S}</math>, <math>Y_{P/S}</math>, <math>E</math>).</p> <p><b>Regulacija metabolizma različitih ugljikohidrata u stanicama kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b></p> <p>Priprema hranjivih podloga, inokulacija i uzgoj kvasca <i>S. cerevisiae</i> pri aerobnim i anaerobnim uvjetima. Procjena uspješnosti primjene odabranih uvjeta uzgoja kvasca <i>S. cerevisiae</i> na temelju eksperimentalno određenih koncentracija i izračunatih biokinetičkih parametara (<math>Y_{X/S}</math>, <math>Y_{P/S}</math>, <math>E</math>) te utvrđivanje Pasteur-ovog i Crabtree-jev učinka.</p>								
2.6. Vrste izvođenja nastave:	<input checked="" type="checkbox"/> predavanja <input type="checkbox"/> seminari i radionice <input checked="" type="checkbox"/> vježbe <input type="checkbox"/> <i>on line</i> u cijelosti <input type="checkbox"/> mješovito e-učenje <input type="checkbox"/> terenska nastava			<input type="checkbox"/> samostalni zadaci <input type="checkbox"/> multimedija i mreža <input type="checkbox"/> laboratorij <input type="checkbox"/> mentorski rad <input type="checkbox"/> (ostalo upisati)			2.7. Komentari:		
2.8. Praćenje rada studenata	Pohađanje nastave	DA		Istraživanje			Usmeni ispit	NE	
	Eksperimentalni rad	DA		Referat			(ostalo upisati)		
	Esej			Seminarski rad			(ostalo upisati)		
	Kolokvij			Praktični rad			(ostalo upisati)		
	Projekt			Pismeni ispit	DA		Broj bodova po ECTS sustavu (ukupno)	6	
2.9. Metode i kriteriji vrednovanja	<p>Način provjere znanja je pisani ispit [parcijalni pisani ispiti (2) ili pisani ispit ukupnog gradiva]. Kriteriji vrednovanja znanja u skladu su sa ciljevima i ishodima predmeta Fiziologija industrijskih mikroorganizama. Pohađanje nastave (predavanja i vježbe) ne sudjeluje u konačnoj ocjeni, ali je osnovni i jedini preduvjet za dodjelu potpisa studentu. Prolazna ocjena na (parcijalnom) pisanom ispitu postiže se kod 60% postignutih bodova.</p>								
2.10. Obveze studenata	<p>Da položi predmet, student/studentica mora:</p> <p>uredno pohađati nastavu, aktivno sudjelovati u nastavi (P+V) i zatim položiti pisani ispit.</p>								

FIZIOLOGIJA INDUSTRIJSKIH MIKROORGANIZAMA - Izvedbeni plan nastave AK. GOD. 2024./2025.

	Naslov	Dostupnost u knjižnici	Dostupnost putem ostalih medija
2.11. Obvezna literatura (dostupna u knjižnici i / ili na drugi način)	Cooper, G. M., Hausmann, R. E., Stanica: molekularni pristup, 2010, copublished by ASM Press and Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA, (G. Lauc, ur.), Medicinska naklada d.o.o., Zagreb.	ne	da, kod nastavnika
	Alberts, B. i sur., The Cell, 1983, Garland Publishing, Inc., New York & London.	ne	da, kod nastavnika
	Lengeler, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G., Biology of the Prokaryotes, 1999, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York	ne	da, kod nastavnika
	Moat, A.G., Microbial Physiology, 1979, John Wiley & Sons, New York.	ne	da, kod nastavnika
	Industrial Microbiology and Biotechnology, 1999 (A.L. Demain, J.E. Davies, ur.) ASM Press, Washington.	ne	da, kod nastavnika
	Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, 1999, 2nd edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.	ne	da, kod nastavnika
2.12. Dopunska literatura	Svi znanstveni radovi (lista znanstvenih i preglednih radova, čiji popis se obnavlja svake ak. god) koji se navode u nastavnim materijalima (P i V) dostupni su kod nastavnika.		
2.13. Ispitni rokovi	Rokovi ispita objavljuju se na Studomatu i ovoj mrežnoj stranici: <a href="http://www.pbf.unizg.hr/studiji/ispitni_rokovi">http://www.pbf.unizg.hr/studiji/ispitni_rokovi</a>		
2.14. Ostalo			