Imobilizacija pekarskog kvasca u alginatnoj i umreženoj želatinskoj matrici

Kostešić, Ema

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:777468

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

IMOBILIZACIJA PEKARSKOG KVASCA U ALGINATNOJ I UMREŽENOJ ŽELATINSKOJ MATRICI

ZAVRŠNI RAD

EMA KOSTEŠIĆ

Matični broj: 1060

Split, srpanj 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE

SMJER: ZAŠTITA OKOLIŠA

IMOBILIZACIJA PEKARSKOG KVASCA U ALGINATNOJ I UMREŽENOJ ŽELATINSKOJ MATRICI

ZAVRŠNI RAD

EMA KOSTEŠIĆ

Matični broj: 1060

Split, srpanj 2017.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

ENVIRONMENTAL PROTECTION

IMMOBILIZATION OF BAKER'S YEAST IN ALGINATE AND CROSSLINKED GELATINE MATRIX

BACHELOR THESIS

EMA KOSTEŠIĆ

Parent number: 1060

Split, July 2017

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko–tehnološki fakultet u Splitu

Studij: Preddiplomski studij Kemijske tehnologije, smjer Zaštita okoliša

Znanstveno područje: Tehničke znanosti

Znanstveno polje: Kemijsko inženjerstvo

Tema rada prihvaćena je 30.11. 2016. na 21. sjednici Fakultetskog vijeća

Mentor: prof. dr. sc. Branka Andričić

IMOBILIZACIJA PEKARSKOG KVASCA U ALGINATNOJ I UMREŽENOJ ŽELATINSKOJ MATRICI

Ema Kostešić

1060

Sažetak: Suhi pekarski kvasac suspendiran je u otopini Na-alginata i imobiliziran dokapavanjem u otopinu $CaCl_2$. Na taj način kvasac je ostao zarobljen u netopljivom Ca-alginatu. Također, provedena je imobilizacija stanica kvasca u otopini želatine uz dodatak glutaraldehida kao sredstva za umrežavanje. Uspješnost procesa imobilizacije na pojedinoj matrici praćena je određivanjem količine etanola dobivenog fermentacijom glukoznog supstrata. Zaključeno je da je proces imobilizacije stanica kvasca uspješniji na alginatu.

Ključne riječi: pekarski kvasac, imobilizacija, alginat, želatina

Rad sadrži: 35 stranica, 18 slika, 9 tablica, 11 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Ani Radonić - predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Sandra Svilović - član
3. prof. dr. sc. Branka Andričić - mentor

Datum obrane: 18.07.2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf formatu) obliku pohranjen u knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology

Study: Undergraduate study of Chemical Technology, orientation Environmental protection

Scientific area: Technical Sciences

Scientific field: Chemical engineering

The subject was approved on October 30, 2016 on Faculty Council session no. 21

Mentor: Branka Andričić, PhD, Full proffesor

IMMOBILIZATION OF BAKER'S YEAST IN ALGINATE AND CROSSLINKED GELATINE MATRIX

Ema Kostešić

1060

Abstract: Dry baker's yeast was suspended in Na-alginate solution and immobilized by dropping in $CaCl_2$ solution. In this way, the yeast remained trapped in the insoluble Ca-alginate. Immobilization of the yeast cells in gelatin solution was also carried out with addition of glutaraldehyde as the crosslinking agent of the matrix. The success of the immobilization process on individual matrices was monitored by the amount of ethanol obtained by fermentation of the glucose substrate. It was concluded that the process of immobilization of yeast cells is more efficient on alginate.

Keywords: baker's yeast, immobilization, alginate, gelatine

Thesis contains : 35 pages, 18 images, 9 tables, 11 references

Original language: Croatian

Defence committee:

1. Ani Radonić- PhD, associate prof. chair person
2. Sandra Svilović- PhD, associate prof. member
3. Branka Andričić - PhD, full prof. supervisor

Printed and eletronic (pdf format) version of thesis is deposited in library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad izrađen je u Zavodu za organsku tehnologiju pod nadzorom prof.dr.sc. Branke Andričić u razdoblju od ožujka do srpnja 2017. godine.

Zadatak završnog rada

1. Imobilizirati pekarski kvasac pomoću alginata i otopine $CaCl_2$
2. Imobilizirati pekarski kvasac pomoću želatine i glutaraldehida
3. Provesti fermentaciju glukoznog supstrata imobiliziranim stanicama pekarskog kvasca
4. Usporediti procese fermentacije imobiliziranih stanica na polisaharidnoj i proteinskoj matrici

Sažetak

Suhi pekarski kvasac suspendiran je u otopini Na-alginata i imobiliziran dokapavanjem u otopinu $CaCl_2$. Na taj način kvasac je ostao zarobljen u netopljivom Ca-alginatu. Također, provedena je imobilizacija stanica kvasca u otopini želatine uz dodatak glutaraldehida kao sredstva za umrežavanje. Uspješnost procesa imobilizacije na pojedinoj matrici praćena je određivanjem količine etanola dobivenog fermentacijom glukoznog supstrata. Zaključeno je da je proces imobilizacije stanica kvasca uspješniji na alginatu.

Ključne riječi: pekarski kvasac, imobilizacija, alginat, želatina

Summary

Dry baker’s yeast was suspended in Na-alginate solution and immobilized by dropping in $CaCl_2$ solution. In this way, the yeast remained trapped in the insoluble Ca-alginate. Immobilization of the yeast cells in gelatin solution was also carried out with addition of glutaraldehyde as the crosslinking agent of the matrix. The success of the immobilization process on individual matrices was monitored by the amount of ethanol obtained by fermentation of the glucose substrate. It was concluded that the process of immobilization of yeast cells is more efficient on alginate.

Keywords: baker's yeast, immobilization, alginate, gelatine

Sadržaj

UVOD 1
1. TEORIJSKI DIO 3
1.1. Alkoholna fermentacija 3
1.2. Kvasci 6
1.2.1. Saccharomyces cerevisiae 7
1.3. Imobilizacija stanica 9
1.3.1. Metode imobilizacije stanica i enzima 13
1.4. Alginati 15
1.5. Želatina 16
2. EKSPERIMENTALNI DIO 18
2.1. Materijal 18
2.2. Postupak imobilizacije suhog pekarskog kvasca 19
2.2.1. Imobilizacija pekarskog kvasca na alginatu 20
2.2.2. Imobilizacija pekarskog kvasca na želatini 21
2.3. Fermentacija uz imobilizirani kvasac 23
3. REZULTATI 25
4. RASPRAVA 31
5. ZAKLJUČAK 33
6. LITERATURA 34

UVOD

Etanol, strukturne formule CH_3-CH_2-OH i temperature vrelišta 78 °C, primarni je alkohol dobiven alkoholnom fermentacijom uz prisustvo kvasaca. Ovisno o raspoloživosti, dobiva se iz niza sirovina kao što su šećerna trska i repa, melasa, celuloza, kukuruz, žitarice i druge škrobne sirovine.

Alkoholna fermentacija ima široku primjenu u proizvodnji piva, vina i drugih alkoholnih pića kao i samog etanola koji služi kao pogonsko gorivo.
Iako kao gorivo pokazuje određene prednosti u odnosu na primjerice benzin, da bi etanol postao i ekonomski prihvatljiv nužno je usmjeriti istraživanja k poticanju mikroorganizama na proizvodnju veće količine alkohola i unaprijeđenju samih postupaka proizvodnje. Jedan od načina kojim se to ostvaruje je imobilizacija stanica kvasca u umreženu polimernu matricu. Takav način provođenja alkoholnog vrenja omogućava lakšu kontrolu procesa, jednostavnije odvajanje stanica od mikrobno izmijenjene podloge te jednostavnije odvajanje produkata. Također, pozitivna značajka ove metode je mogućnost korištenja čitavog niza materijala pogodnih za hvatanje stanica unutar strukture. Tu spadaju prirodni polisaharidi (agar, alginat, karagenan, pektin), proteini (kolagen, keratin) ili sintetski polimeri (poliakrilamid).

Tehnike imobilizacije biokatalizatora znatno su napredovale od svojih početaka do danas. Važno je naglasiti da ne postoji univerzalna metoda imobilizacije niti univerzalan nosioc.[1] Njihov odabir ovisi o čitavom nizu čimbenika te je nemoguće predvidjeti kakav će učinak imati odabrana metoda.

U ovom radu stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* suspendirane su uotopini Na-alginata, a zatim je sustav precipitiran u otopini $CaCl_2$ pri čemu je nastao u vodi netopljiv Ca-alginat. Osim na alginatu, napravljena je suspenzija kvasca u želatini gdje se umreženje i otvrdnjavanje proteina odvijalo dodatkom glutaraldehida. Provedena je usporedba uspješnosti imobilizacije stanica kvasca imobiliziranog na alginatu i želatini određivanjem količine etanola dobivenog alkoholnom fermentacijom.

1. TEORIJSKI DIO

1.1. Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija ili alkoholno vrenje je biokemijski proces transformacije monosaharida u alkohol i ugljikov dioksid, uz prisustvo kvasaca sudjelovanjem niza enzima. Čini osnovnu fazu u procesu proizvodnje vina. Prvu formulu kemijskog procesa alkoholne fermentacije postavio je Gay-Lussac 1815. godine:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CO_2 + 2\ C_2H_5OH + \Delta H \quad (1)$$

Danas se zna da se alkoholna fermentacija odvija u kvaščevoj stanici, sudjelovanjem skupine enzima zajedničkog naziva – zimaza.

Alkoholna fermentacija predstavlja biokemijski proces razgradnje šećera u anaerobnim uvjetima odnosno bez prisustva kisika te se u prirodi odvija spontano. Transformacija ide do formiranja krajnjih anaerobnih produkata - etanola i ugljikovog dioksida uz oslobađanje male količine energije.

U odnosu na aeroban proces - stanično disanje, gdje kvasac ima dovoljno energije za rast, razvoj i razmnožavanje, alkoholna fermentacija nije dovoljno energetski ekonomičan proces. Stoga je potrebno osigurati dovoljnu količinu šećera kao izvora ugljika kojeg će kvasac fermentirati. Stanično disanje prikazano je jednadžbom (2):

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 6CO_2 + 6\ H_2O + \Delta H \quad (2)$$

To se u prvom redu odnosi na monosaharide sa 6 atoma ugljika kao što su glukoza ili fruktoza. Kvasci (*S.cerevisiae*) fermentiraju disaharide (saharoza) i trisaharide (rafinoza) samo u slučaju kada mogu sintetizirati hidrolitičke enzime. Pentoze nije u stanju fermentirati niti jedan kvasac.

Važno je napomenuti da je alkoholna fermentacija prirodno zaštićen proces, jer alkohol koji nastaje djeluje kao inhibitor za većinu bakterijskih vrsta, pa one postupno nestaju kako napreduje alkoholno vrenje.

Postupno se uspostavljaju i anaerobni uvjeti, jer se na površini komine nakuplja plin CO_2 pa se konačno prestaju razmnožavati i oni mikroorganizmi koji su obligatni aerobi (plijesni i aerobne bakterije). Tako na kraju vrenja zaostanu samo kvasci.[2]

Složeni proces alkoholnog vrenja može se podijeliti u dvije faze: prvo se odvija glikoliza, tj. razgradnja glukoze do pirogrožđane kiseline i energije u obliku ATP molekula, a nakon što se stvore dovoljne količine piruvata slijedi „prava“ alkoholna fermentacija pri čemu se dobivaju alkohol i CO_2.

Na tijek alkoholne fermentacije utječe više čimbenika i to:

1) izbor mikroorganizama: ovisi o zahtjevima za željenim produktom, oni su nositelji alkoholnog vrenja
2) temperatura: ima velik utjecaj na početak,intenzitet i završetak alkoholne fermentacije – pri višoj temperaturi fermentacija će početi ranije, biti intenzivnija i trajati kraće. Također, količina alkohola koja će nastati,odnosno sama aktivnost kvasaca, ovisi o temperaturi. Kvasci su otporni prema niskim, ali vrlo osjetljivi na visoke temperature zbog čega može doći do prekida fermentacije i/ili stvaranja neželjenih tvari. Optimalna temperatura je izmedu 30 i 35°C, a iznad 40°C započinje deaktivacija stanica kvasca
3) pH: optimalan pH je 4 - 5
4) kisik: potreban za pravilan razvoj kvasaca te održavanje životnih funkcija stanice. Kisik je uključen i u reakcije sinteze u staničnoj membrani kvasca koja osigurava otpornost na alkohol, pa se i sami kvasci razlikuju po potrebi za kisikom. Alkoholna fermentacija je anaeroban proces no puno se brže i intenzivnije odvija u prisustvu kisika
5) alkohol: ovisi o otpornosti kvasaca na alkohol, neki su osjetljivi već na minimalne postotke, a neke vrste mogu prevriti šećer do 19% alkohola
6) svjetlost: dokazano je da se kvasci brže razmnožavaju u tami
7) CO_2 : prisustvo CO_2 već od 0,25% inhibira razmnožavanje kvasaca

Osim kvasaca za dobivanje alkohola mogu se koristiti i neke bakterije:

-*Zymomonas mobilis (*koristi se za fermentaciju soka agave u proizvodnji pića pulquè*)*

-*Thermoanaerobacter ethanolicus* (uzgaja se na škrobu i šećerima, termofilna bakterija)

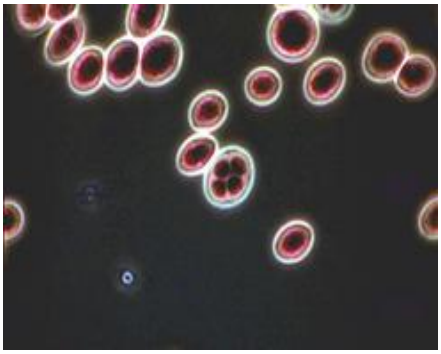
-*Clostridium thermocellum* (hrani se celulozom, termofilna bakterija).[2]

1.2. Kvasci

Kvasci spadaju u jednostanične organizme – gljivice. Mogu se razmnožavati vegetativno- pupanjem ili cijepanjem- binarnim dijeljenjem, sa ili bez stvaranja hifa ili pseudohifa. Kod askomiceta, industrijski najinteresantnijih kvasaca, stvaraju se askospore (endogene spore) u posebnoj stanici, askus, koje su otpornije na nepovoljne uvijete u okolišu od vegetativnih stanica. Presjek stanice kvasca prikazan je na slici 1, a dijeljenje kvasca na slici 2.



Slika 1. Presjek stanice kvasca[3]



Slika 2. Dijeljenje kvasca[4]

Kvasci se razlikuju od ostalih eukariota po tipu talusa. Kvasce odlikuje celularno (jednostanično) tijelo te na površini stanica imaju staničnu stijenku sa zaštitnom funkcijom, dok ostatak gljivica raste u obliku razgranatih filamenata stvarajući micelij.

Dijele se na rodove, sojeve i vrste, a za biotehnološke procese i samu industriju najznačajniji su oni iz roda *Saccharomyces* (po latinskoj nomenklaturi *Saccharomyces* - gljive koje koriste šećere). Ti kvasci imaju sposobnost savladavanja teških uvjeta fermentacije, mogu podnositi i niske pa i visoke temperature (od 5 do 37 ˚C), niske pH vrijednosti, visoke koncentracije alkohola i sl. U većini slučajeva ne mogu razgrađivati škrob i celulozu. Kvasci iz ovog roda su vjerojatno najstariji komercijalno upotrebljavani mikroorganizmi. Najpoznatiji kvasac iz roda *Saccharomyces* je vrsta *S. cerevisiae* čiji se sojevi danas upotrebljavaju u proizvodnji vina, piva, kruha i jakih alkoholnih pića.[3]

1.2.1. Saccharomyces cerevisiae

Pekarski kvasac (*Saccharomyces cerevisiae)* je bijela, aktivna kvaščeva biomasa koja se razmnožava pupanjem. Uloga u pekarstvu mu je proizvodnja plina CO_2 koji diže tijesto. Osim toga, ima povoljan utjecaj na reološka svojstva tijesta (elastičnost)i razvoj ugodnog okusa i mirisa u tijestu. Na tržište dospijeva kao svježi ili osušeni.

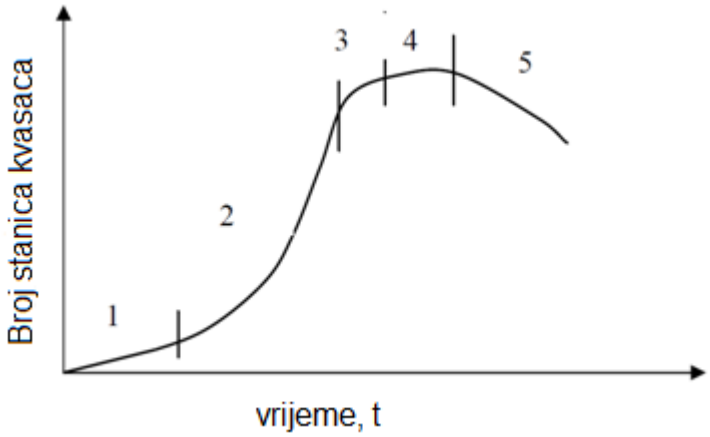
U elementarnom sastavu pekarskog kvasca prevladavaju ugljik (48 %), kisik (31%), dušik (8 %) i vodik (7 %). Biomasa se također sastoji od kalija, fosfora, magnezija, kalcija, sumpora i ostalih elemenata u tragovima. Osim pekarskog postoje pivski i vinski kvasac koji su bogatiji nutrijentima(vitamini B kompleksa).

Vrste iz roda *Saccharomyces* vrše enzimsku konverziju šećera u odsustvu kisika, kako bi proizvele etanol i ugljikov dioksid. To svojstvo im omogućava da se prilagode na supstrate bogate šećerom i izvrše alkoholnu fermentaciju. Osim toga, supstrat mora biti bogat vlagom, hranjivim tvarima i aminokiselinama.

U prirodi se nalaze na različitom lišću, korijenju i plodovima biljaka. Veće količine kvasca uz industrijsku primjenu, priređuju se kultiviranjem na odgovarajućim hranjivim podlogama.[2] Proces selekcije kvasaca ove grupe star je koliko i civilizacija.

Rast kvasaca na nekom supstratu odvija se u 5 faza,kao što je prikazano na slici 3:

1. faza prilagodbe
2. eksponencijalna faza(log faza)
3. post log faza
4. stacionarna faza
5. faza ugibanja.



Slika 3. Krivulja rasta kvaščeve biomase[2]

U fazi prilagodbe kvasac se prilagođava novonastalim uvjetima, broj stanica ne raste, ali je prisutna metabolička akivnost.

U eksponencijalnoj fazi stanice dostižu maksimalnu brzinu rasta, a njihov kemijski sastav se ne mijenja.

U post log fazi broj stanica jos uvijek raste eksponencijalno s vremenom, ali manjom brzinom sve do stacionarne faze.

U stacionarnoj fazi stanice kvasca su dostigle maksimalnu veličinu i volumen populacije. Ova faza nastupa kada je koncentracija limitirajućeg nutrijenta takva da više ne može podržati maksimalnu brzinu rasta. Broj stanica više se ne mijenja, no one su i dalje metabolički aktivne.

Slijedi faza ugibanja, ugibanje postaje očito, odnosno brzina ugibanja stanica veća je nego brzina razmnožavanja.

Podloge za proizvodnju alkohola potrebno je sterilizirati ili dezinficirati.Uvjete okoline za alkoholno vrenje treba podesiti tako da najviše odgovaraju kvascima: temperatura oko 30 °C, a pH vrijednost od 4 do 5. Koncentracija šećera u podlogama može biti 15 -20 %, ali je poželjna nešto niža koncentracija, do 5%, kako nebi došlo do inhibicije rasta kvaščevih gljivica supstratom.

Poboljšavanje industrijskih sojeva kvasca provodi se zbog što boljeg iskorištenja sirovine, odnosno što potpunije i brže potrošnje nutrijenata iz podloge, ubrzanja, pojednostavljenja i pojeftinjenja proizvodnog procesa, održavanja ili podizanja kvalitete gotovog proizvoda te proširenja asortimana odnosno razvoja novih proizvoda.[3]

1.3. Imobilizacija stanica

U biotehnološkim procesima se koriste stanice mikroorganizama, životinja, biljaka i njihovih aktivnih dijelova, enzima, za proizvodnju novih proizvoda, kao primjerice u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji ili za uklanjanje štetnih sastojaka iz otpadnih tokova. Neki procesi primjenjivali su se već u staroj antici za proizvodnju fermentirane hrane i pića, a do danas je razvijen niz bioprocesa u kojima se iz relativno jeftinog supstrata proizvode skupe kemikalije te antibiotici, cjepiva, hormoni i slično.

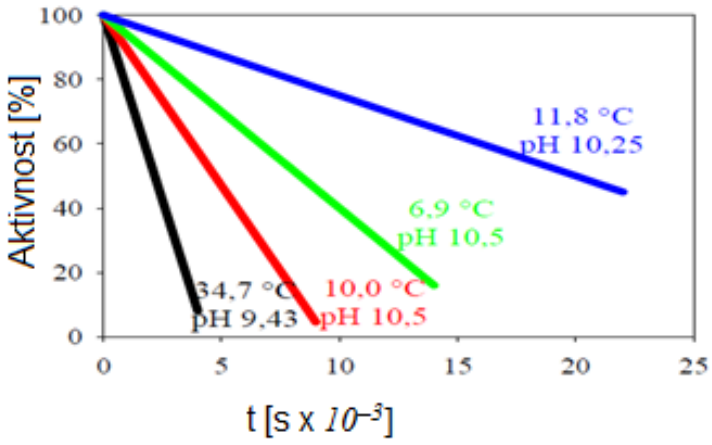
Enzimi su biološki katalizatori izolirani iz stanice. Posjeduju visoku selektivnost i specifičnost, ubrzavaju reakcije u živim organizmima, kemijski se ne mijenjaju, te im se reakcije odvijaju u vodenom mediju. Mogu biti aktivni i izvan stanice, no nužno je održavati uvjete što sličnije onima u stanici (pH, temperatura).

U uvjetima niske koncentracije supstrata moguće je postići samo nisku produktivnost. Također, većina kemijskih procesa zahtijeva visoke tlakove i temperature što kod bioprocesa nije moguće, jer biološki materijal uglavnom nije otporan na takve uvjete. Stoga je potrebna stroga i stalna kontrola uvjeta zbog uskog područja stabilnosti i aktivnosti biomaterijala.

Tokom biotransformacija želi se postići što veća koncentracija produkta, volumna produktivnost i što bolje iskorištenje biokatalizatora. Iz toga razloga sebiokatalizator izlaže uvjetima različitim od onih u stanici, što dovodi do pada aktivnosti njegovom produljenom upotrebom.

Ta promjena može biti uzrokovana miješanjem, većom koncentracijom supstrata, promjenom pH vrijednosti ili prisustvom stranih molekula.

Utjecaj pH i temperature na inaktivaciju enzima adenozin trifosfata (ATP) prikazan je na slici 4.



Slika 4. Utjecaj pH i temperature na inaktivaciju enzima ATP-aze[1]

Stoga, da bi se biokatalizator mogao koristiti u industrijskom procesu potrebno ga je prevesti u stabilan oblik, a jedan od načina da se to postigne je postupak imobilizacije.

Imobilizacija stanica ili enzima mikroorganizama se definira kao vezivanje ili lokalizacija biološki aktivnih stanica ili molekula u jednu fazu, koja iz druge faze uzima otopljene tvari i u nju izlučuje proizvode metabolizma. Također, zadržava katalitička svojstva i mogućnost ponovne i kontinuirane uporabe.

Imoblizacija stanica ponekad je povoljnija od imobilizacije samih enzima jer predstavlja multienzimski sustav.

Primjena imobiliziranih biokatalizatora (enzima ili pak čitavih stanica) u biotehnološkim procesima provodi se u svrhu:

1. dobivanja spojeva stereospecifičnim reakcijama
2. proizvodnje energije biološkim reakcijama
3. selektivnog djelovanja na onečišćenja u svrhu rješavanja problema u okolišu
4. analize različitih spojeva s visokom osjetljivošću i specifičnošću
5. proizvodnje novih lijekova, umjetnih organa itd.[5]

Imobilizirati se mogu:

- žive stanice koje rastu- za proizvode koje nastaju u fazi rasta. Supstrat treba sadržavati nužne elemente za rast i razvoj te nesmije spriječavati isti.
- žive stanice koje ne rastu- za proizvode koji nastaju u stacionarnoj fazi, supstrat se troši samo na produkciju željenog proizvoda. Omogućenaje samo metabolitička aktivnost.
- mrtve stanice -za proizvode koje nastaju enzimskom sintezom ii razgradnjom, pri čemu uvjeti (pH,sastav supstrata) moraju odgovarati enzimskoj reakciji neovisno o metabolizmu.

Prednosti i nedostaci uporabe imobiliziranih živih stanicaprikazani su u tablici 1, a prednosti i nedostaci uporabe enzima u odnosu na čitave stanice u tablici 2.

Tablica 1. Prednosti i nedostaci uporabe imobiliziranih živih stanica[1,5]

PREDNOSTI	NEDOSTACI
Šaržni bioproces može postati kontinuirani	Mali udio produkta zbog velikog postotka slobodne vode u supstratu i trošenja supstrata na rast razvoj i nusproizvode metabolizma
Veća gustoća stanica-intenzivniji proces	Uvjeti za rast i razvoj nisu uvijek isti kao za stvaranje produkta
Većina enzima/metabolita je aktivna samo u stacionarnoj fazi stanice	Po završetku mikrobna masa u većini slučajeva otpad, a izolacija i pročišćavanje produkta skupo zbog nastajanja više nusprodukata

Tablica 2. Prednosti i nedostaci uporabe enzima u odnosu na cijele stanice[1,5]

PREDNOSTI	NEDOSTACI
Jednostavnost postupka	Većina enzima nestabilna
Mogu se kombinirati enzimi iz različitih izvora te po završetku reakcije ostaju nepromijenjeni	Ograničeno vrijeme aktivnosti
Nema sporednih reakcija, otpadne biomase,čistiji produkt i moguća veća koncentracija biokatalizatora	Teže izdvajanje zato jer su topivi u vodi, skuplje

Imobilizacija mikroorganizama i njihovo samoorganiziranje prirodna je pojava. Osim u biokatalizi, imobilizirani biokatalizatori upotrebljavaju se i kao aktivni dijelovi uređaja za medicinske i analitičke svrhe (biosenzori),kao selektivni adsorbensi za pročišćavanje proteina i enzima,učinkoviti mikrouređaji za kontrolirano otpuštanje lijekova te važno oruđe u proteinskoj kemiji u čvrstom stanju.[1]

1.3.1. Metode imobilizacije stanica i enzima

Metode imobilizacije dijele se na fizikalne i kemijske.

- Fizikalne metode:
    1. Hvatanje u umreženoj 3D matrici polimera
    2. Adsorpcija
    3. Mikrokapsuliranje
    4. Flokulacija
- Kemijske metode:
    1. Kovalentno vezanje na površinu nosača
    2. Kovalentno umreženje s difunkcionalnim spojevima

Za imobilizaciju stanica koriste se metode vezanja na površinu nosača fizikalnim i kemijskim vezama i hvatanje unutar polimerne 3D matrice.

Naime, 50-ih godina prošlog stoljeća je otkriveno da se enzimi mogu fizički uklopiti u strukturu gela i pri tome zadržavati biološku aktivnost.[1] Takva metoda imobilizacije razlikuje se od ostalih metoda jer se ne stvara niti kemijska niti fizikalna veza izmedu biokatalizatora i nosača, već se biokatalizator uklapa u strukturu gela. Pore gela onemogućavaju mu kretanje te služe kao matrica. Poroznost gela mora biti takva da se spriječi „curenje“ biokatalizatora iz gela, a istovremeno da je omogućeno kretanje supstrata i produkata kroz strukturu gela.

Inkorporiranje unutar gela može se provesti na nekoliko načina:

- miješanje sa poliionskim polimernim materijalom: slijedi umrežavanje polimera sa Ca^{2+} ili drugim multivalentnim kationima pri čemu nastaje struktura gela koja zadržava čitave stanice i enzime unutar sebe (npr. alginat).
- Toplinom izazivano želiranje: gel se može dobiti korištenjem 1-4 % otopine agaroze ili želatine promjenom temperature. Takvi gelovi su mekani i nestabilni.
- polimerizacija: kemijskom ili fotokemijskom reakcijom (npr.poliakrilamid)

- miješanje biokatalizatora sa monomerima: nakon čega slijedi polimerizacija i formiranje mreže u koju se enzim uklopi.

Dobiveni gel može biti u obliku kuglica, membrana, vlakana, filmova i slično.

Najčešći materijali koji se koriste za imobilizaciju hvatanjem u umreženu 3D matricu jesu: alginat (80% procesa), agar, kolagen,želatina i sl.

Prednosti i nedostaci ove metode prikazani su u tablici 3.

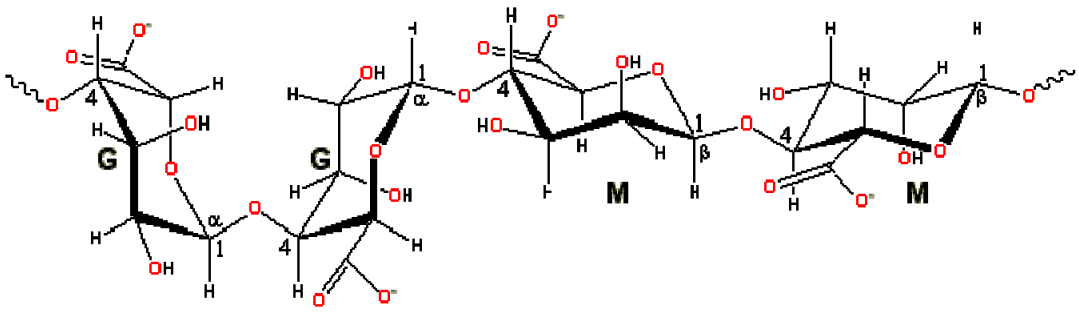
Tablica 3. Prednosti i nedostaci metode imobilizacije uklapanjem u gel[1,5]

PREDNOSTI	NEDOSTACI
jednostavnost	otpor prijenosu tvari difuzijom
velika brzina	gel nije stabilan u organskim otapalima
niska cijena	pogodnija za čitave stanice nego enzime zbog mogućnosti „curenja“ i relativno velikih dimenzija pora

1.4. Alginati

Alginska kiselina je hidrofilni polisaharid koji se dobiva ekstrakcijom iz velikih, morskih smeđih algi (*Laminaria hyperborea, Laminaria stipe*) u obliku svojih soli - alginata. Sastavni je dio stanične membrane algi gdje putem vezivanja vode formira viskoznu tvar. U ekstrahiranom obliku ima sposobnost brze apsorpcije i nekoliko stotina puta veće količine vode od vlastite mase. Boja joj varira od bijele do smeđo žute, a prodaje se u praškastom obliku i granulama.

Alginati su linearni, nerazgranati kopolimeri sastavljeni od D-manuronske kiseline vezaneβ -1,4 vezama(M-jedinica) i L-guluronske kiseline vezane α -1,4 vezama(G-jedinica), slika 5 - ponavljajuća jedinica alginata.



Slika 5. Kemijska struktura ponavljajućih jedinica u makromolekuli alginata[2]

Ponavljajuće jedinice su, kao rezultat postojanja više slobodnih karboksilnih skupina u makromolekuli, složene u homopolimerne blokove bogate GG i MM jedinicama kao i GM jedinicama koje ih povezuju. Udio ponavljajućih jedinica nastalih iz jednog monomera ovisi o vrsti alge.

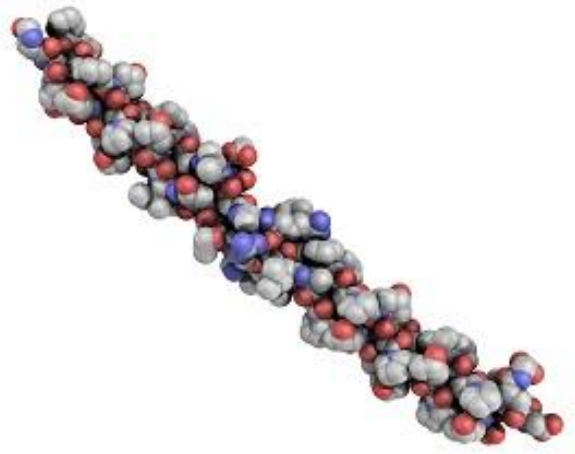
Amonijeve ili metalne soli jednovalentnih kationa kao što je Na-alginat, otapaju se u vodi i daju viskoznu kapljevinu. Soli dvovalentnih kationa stvaraju netopljive komplekse u vodi, kao što je slučaj sa Ca-alginatom. Ioni Ca^{2+} stvaraju koordinativnu vezu sa karboksilnom skupinom, pri čemu nastaje trodimenzijska mreža dugih lanaca M jedinica i čvorišta između kalcija i G jedinica alginske kiseline.

Alginati se primjenjuju kao zgušnjavala u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, u proizvodnji krema i kozmetici, tekstilnoj industriji (Na-alginat). Također, upotrebljavaju se kod trovanja olovom zbog afiniteta prema vezivanju teških metala, u odnosu na primjerice kalij i slične metale.

Ca-alginat koristi se za proizvodnju zavoja za velike rane i opekline gdje jeuobičajeni zavoj vrlo teško (i bolno) odstraniti. Ispod mreže alginatnog zavoja stavljenog naranu stvara se krasta, a zavoj se odstrani otopinom natrijevog klorida, jer netopljivi Ca-alginatprelazi u topljivi Na-alginat. Na istom principu temelji se i imobilizacija mikroorganizama (npr. kvasca) ili enzima na alginatu u biotehnologiji.[6]

1.5. Želatina

Želatina je derivat dobiven hidrolizom kolagena, vlaknastog proteina koji se nalazi u svim višestaničnim životinjama. U ljudskom tijelu sadržan je u kostima, koži i vezivnim tkivima. Sastoji se od 3 aminokiseline: prolina, hidroksiprolina i glicina koji su važni za formaciju trostruke zavojnice (slika 6.).



Slika 6. Prikaz trostruke zavojnice kolagena[7]

Prolin stabilizira strukturu svakoga lanca, glicin omogućava da se lanci kompaktno slože, a hidroksiprolin je odgovoran za stabilnost tako stvorenog polipeptidnog lanca.

Životinjski kolagen, najčešće goveđi ili svinjski, upotrebljava se u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

Do danas je poznato 19 vrsta kolagena, a razlikuju se samo po krajevima molekula koje omogućavaju izrazito čvrsto povezivanje. Struktura kolagena je takva da je ne oštećuju različiti enzimi koji cirkuliraju tijelom, osim *kolagenaze*, koja ga može cijepati u manje fragmente. Osim vezivne uloge, kolagenkontrolira oblik stanica te migraciju i sintezu brojnih proteina. Zagrijavanjem kolagena uništava se njegova struktura; trostruki heliks se odvaja i lanci serazdvajaju. Kada se ta denaturirana masa ohladi, upije svu vodu u okolini, poput spužve testvara želatinu.[6]

Želatina je bezbojan nutritivni sastojak, kao aditiv ima oznaku E411. Osim u mliječnim,mesnim i ostalim prehrambenim proizvodima, prije razvoja digitalnih fotoaparata primjenjivala se za izradu fotografija .

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijal

Tablica 4. Materijal potreban za imobilizaciju stanica kvasca na alginatu

	Naziv	Proizvođač
1.	Suhi pekarski kvasac „Digo“	Kvasac d.o.o. Hrvatska
2.	Natrijev alginat	Fluka, Njemačka
3.	$CaCl_2$	Kemika, Hrvatska

Tablica 5. Materijal potreban za imobilizaciju stanica kvasca na želatini

	Naziv	Proizvođač
1.	Želatina u listićima	Dr. Oetker , Njemačka
2.	Glutaraldehid	Amresco, Kanada

Tablica 6. Materijal potreban za pripremu supstrata za fermentaciju

	Naziv	Sadržaj u supstratu/ gL^{-1}	Proizvođač
1.	Glukoza	80,0	Merck, Njemačka
2.	$(NH_4)_2SO_4$	4,0	Kemika, Hrvatska
3.	$MgSO_4 \times 7H_2O$	1,0	Kemika, Hrvatska
4.	KH_2PO_4	2,0	Kemika, Hrvatska

2.2. Postupak imobilizacije suhog pekarskog kvasca

Pripremljena je 1,5%-tna vodena otopina Na-alginata u kojem je suspendiran suhi pekarski kvasac. Takva suspenzija dokapavana je u otopinu $CaCl_2$ koncentracije 0,1 $molL^{-1}$

- Priprava 1,5%-tne otopine alginata

  U 200 mL destilirane vode, prethodno zagrijane na 60 °C, otopi se 3,0 g Na-alginata uz konstantno miješanje. Nakon što se alginat potpuno otopi, napravi se suspenzija dodavajući 7,5 g suhog pekarskog kvasca.

- Priprava otopine $CaCl_2$

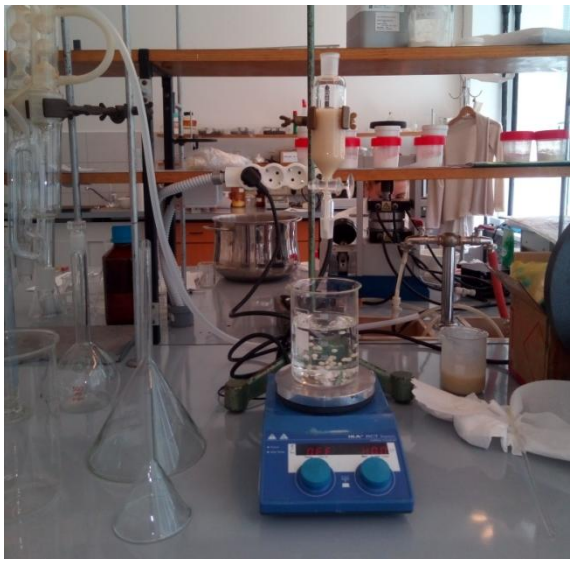
  Za pripravu 0,1 M otopine $CaCl_2$ otopi se 11 g $CaCl_2$ (M=110,99 g/mol) u 1 L destilirane vode.

- Priprava supstrata

  Potrebni sastojci, navedeni u tablici 6, izvažu se na analitičkoj vagi, prenesu u odmjernu tikvicu od 1 L koja se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

2.2.1. Imobilizacija pekarskog kvasca na alginatu

Suspenzija kvasca u otopini alginata ulije se u lijevak za dokapavanje. Dokapava se sa visine od 15 cm u čašu postavljenu na magnetsku miješalicu pri 400 o/min. Čaša sadrži 400 mL otopine kalcijeva klorida. Aparatura za provedbu imobilizacije prikazana je na slici 7.



Slika 7. Aparatura za provedbu imobilizacije

U otopini $CaCl_2$ stvaraju se kuglice približno jednakog volumena i mase koje sadrže stanice kvasca zarobljene u alginatnom gelu. Nakon što su se formirale sve kuglice, one ostaju u otopini kalcijeva klorida kako bi se završio proces nastajanja kompleksa. Sljedeći korak je odvajanje kuglica od kapljevine dekantacijom i filtracijom te ispiranje kuglica destiliranom vodom (4 x) kako bi se uklonio višak kalcijevih iona. Na slici 8 prikazane su kuglice nakon dekantacije, filtracije i ispiranja.



Slika 8. Kuglice nakon dekantacije, filtracije i ispiranja

Kuglice se zatim prenesu na filter papir kako bi se osušile i do trenutka upotrebe čuvaju se u destiliranoj vodi u hladnjaku.

2.2.2. Imobilizacija pekarskog kvasca na želatini

U 200 mL destilirane vode sobne temperature,stavi se 4 g želatine u listićima. Nakon što nabubri, zagrije se na 60 °C kako bi se želatina otopila i dobila 2%-tna otopina. Zatim se pripremi 5%-tna otopina glutaraldehida kojeg se dodaje zbog umreženja proteina. Masa od 7,5 g suhog pekarskog kvasca pomiješa se sa otopinom želatine i glutaraldehida i dokapava sa visine od približno 5 cm u Petrijevu zdjelicu, kako je prikazano na slici 9.



Slika 9. Dokapavanje suspenzije stanica kvasca u želatini

Poželjno je da debljina sloja u Petrijevoj zdjelici ne bude veća od 5 mm. Potrebno je ostaviti suspenziju u zamrzivaču preko noći. Prije upotrebe, Petrijeve zdjelice sa sadržajem potrebno je ostaviti minimalno 30 min na sobnoj temperaturi. Ukoliko je došlo do zamrzavanja, potrebno je ukloniti zaleđeni dio te izrezati želatinu na kockice približno jednake veličine, slika 10.



Slika 10. Kockice želatine s imobiliziranim pekarskim kvascem

2.3. Fermentacija uz imobilizirani kvasac

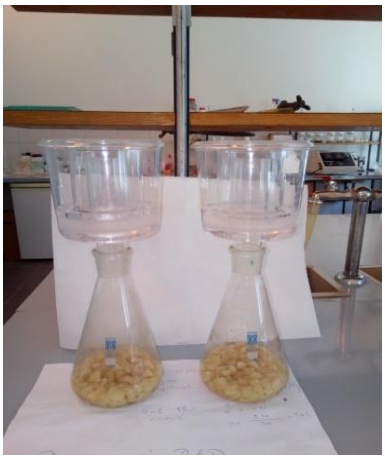
Pripremljene imobilizirane kuglice odnosno kockice kvasca stave se u Erlenmeyerovu tikvicu i doda 100 mL supstrata. Na otvor tikvice stavi se vrenjača koja spriječava ulaz kisika, a omogućava izlaz nastalog ugljikovog dioksida. U vrenjaču se do oznake ulije voda i stavi indikator metilensko crvenilo kako bi se promjenom boje uočilo nastajanje CO_2 koji se otapa u vodi dajući ugljičnu kiselinu.

Tikvice zajedno sa sadržajem se na početku izvažu i zabilježi se početna masa. Ugljikov dioksid odlazi u vrenjaču, a kada ga nastane dovoljno da se promijeni pH, dolazi i do promjene boje indikatora.

Promjena mase nastala izlučivanjem CO_2 prati se svakih sat vremena, a zatim nakon 24 i 48 h. Razlika u masi ekvivalentna je masi nastalog plina, a količina etanola dobivenog fermentacijom jednaka je količini nastalog CO_2. Početak fermentacije imobiliziranih stanica na Na-alginatu prikazan je na slici11, a završetak fermentacije sustava imobiliziranog na želatini na slici12.



Slika 11. Početak fermentacije imobiliziranih stanica na Na-alginatu



Slika 12. Završetak fermentacije sustava imobiliziranog na želatini

Kao što se vidi na slikama, proces fermentacije se pratio paralelno u dvije tikvice za svaki sustav kvasac-sredstvo za imobilizaciju.

Eksperimentalno dobivena masa etanola računa se prema izrazu (3):

$m_{e} = \{(m_0 - m_t)/M_{CO2}\} \times M_{EtOH}$(3)

Gdje je :

m_o – masa tikvice sa sadržajem na početku /g
m_t – masa tikvice sa sadržajem u vremenu t/g
M_{CO2} – molekulska masa CO_2/gmol^{-1}
M_{EtOH}- molekulska masa etanola /gmol^{-1}

Primjer proračuna za masu nastalog etanola za tikvicu 1 sustava kvasac - alginat nakon 48 h prema izrazu (3) :

((153,414-150,304) / 44,01) x 46,068 = 3,255 g

3. REZULTATI

Eksperimentalni podaci promjene mase tikvica u kojima se odvijala fermentacija prikazani su u tablicama 7 i 8.

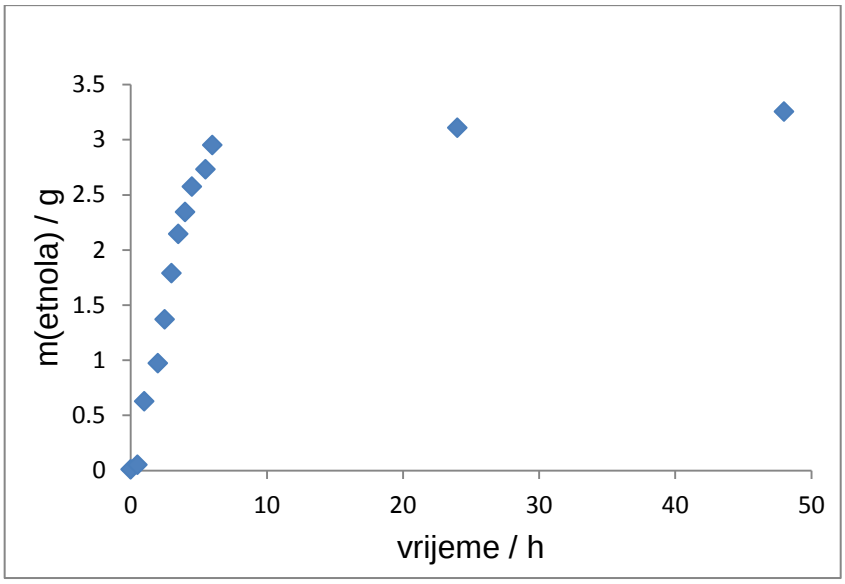
Tablica 7. Eksperimentalni podaci promjene mase tikvica sa alginatom

t/h	m1/g	m2/g	m (etanol)$_1$	m (etanol)$_2$
	153,414	164,454		
0	153,404	164,434	0,010	0,021
0,5	153,364	164,404	0,052	0,052
1	152,814	163,854	0,628	0,628
2	152,484	163,534	0,973	0,963
2,5	152,104	163,134	1,371	1,382
3	151,704	162,694	1,790	1,842
3,5	151,364	162,404	2,146	2,146
4	151,174	162,204	2,345	2,355
4,5	150,954	161,984	2,575	2,586
5,5	150,804	161,814	2,732	2,763
6	150,594	161,634	2,952	2,952
24	150,444	161,464	3,109	3,130
48	150,304	161,304	3,255	3,297

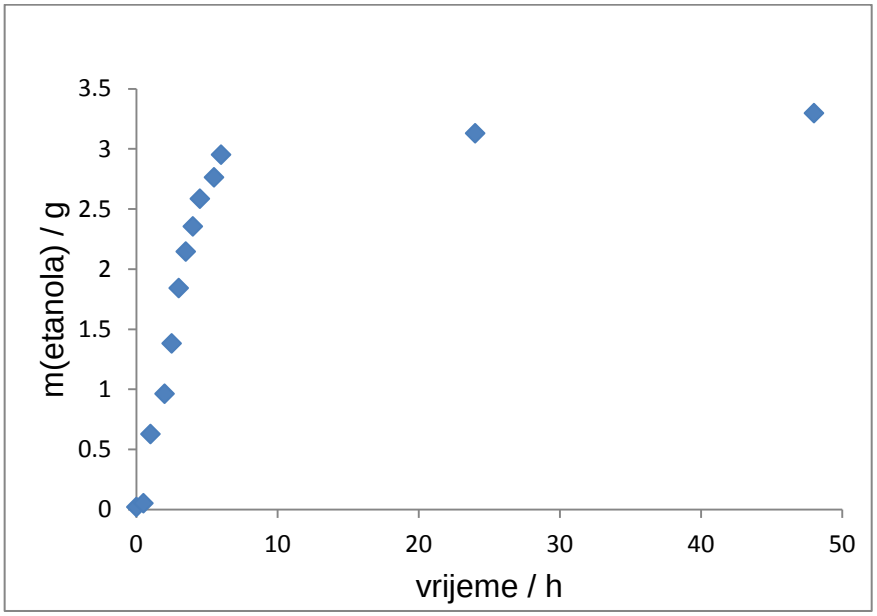
Tablica 8. Eksperimentalni podaci promjene mase tikvica sa želatinom

t/h	m1/g	m2/g	m (etanola)$_1$	m (etanola)$_2$
0	148,694	150,664		
0,5	148,684	150,654	0,010	0,010
1	148,684	150,654	0,011	0,011
1,5	148,684	150,654	0,011	0,011
2	147,914	149,954	0,817	0,743
19	147,904	149,904	0,827	0,796
19,5	147,864	149,874	0,869	0,827
21	147,844	149,834	0,890	0,869
22	147,804	149,804	0,932	0,900
22,5	147,754	149,774	0,984	0,932
23	147,714	149,754	1,026	0,953
23,5	146,854	148,914	1,926	1,832
42,5	146,774	148,834	2,010	1,916
44	146,734	148,814	2,052	1,937
45,5	146,694	148,774	2,094	1,978
46	145,554	147,534	3,287	3,276

Ovisnost mase nastalog etanola o vremenu potrebnom za fermentaciju s imobiliziranim stanicama kvasca na Na-alginatu prikazana je na slikama od 13 do 16, a na želatini na slikama 17 i 18.

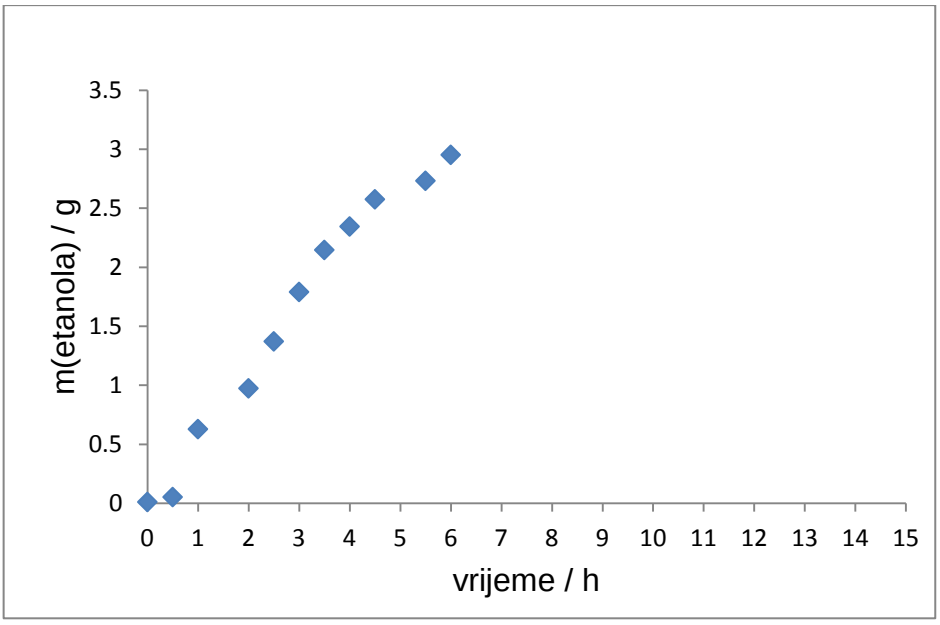


Slika 13. Ovisnost mase nastalog etanola o vremenu fermentacije uz imobilizirane stanice kvasca,$w_{alginat}$ =1,5 %, c_{CaCl2} =0,1 M (tikvica 1)

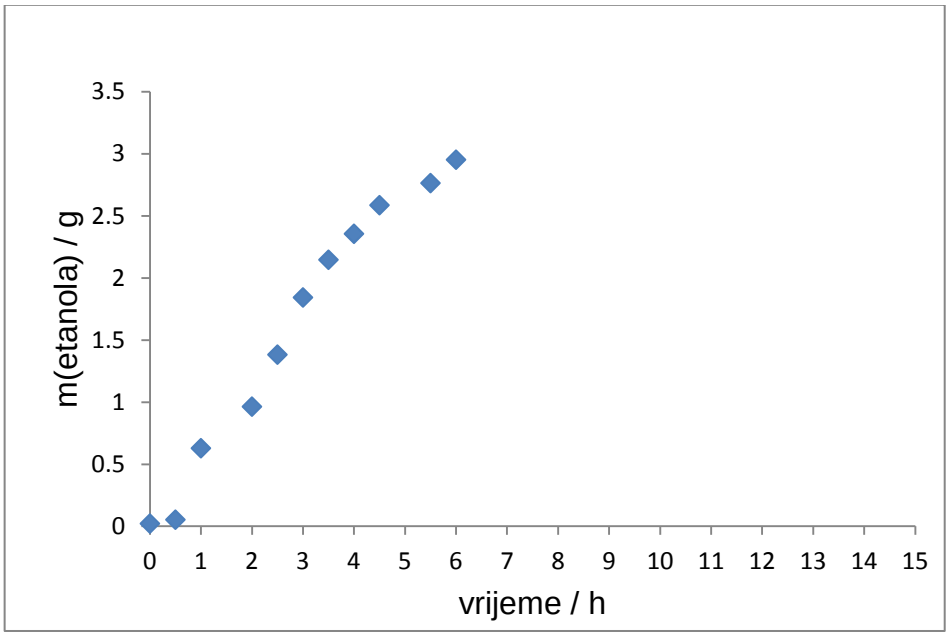


Slika 14. Ovisnost mase nastalog etanola o vremenu fermentacije uz imobilizirane stanice kvasca, $w_{alginat}$=1,5 %, c_{CaCl2} =0,1 M (tikvica 2)

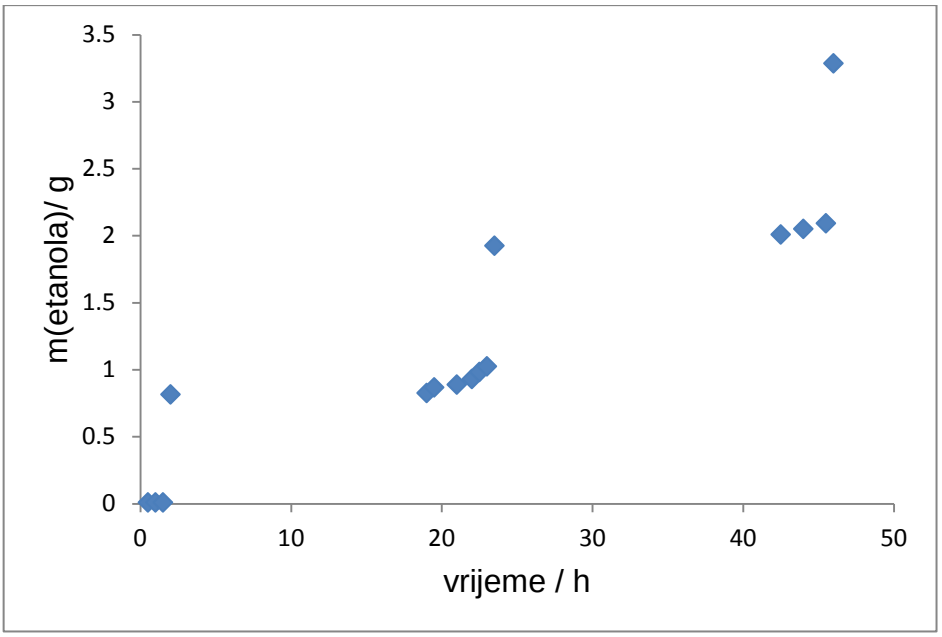
Slike 15 i 16 također prikazuju masu nastalog etanola u ovisnosti o vremenu fermentacije uz imobilizirane stanice kvasca na alginatu, no radi boljeg uočavanja faza na krivulji os apcisa je skraćena do 15 h.



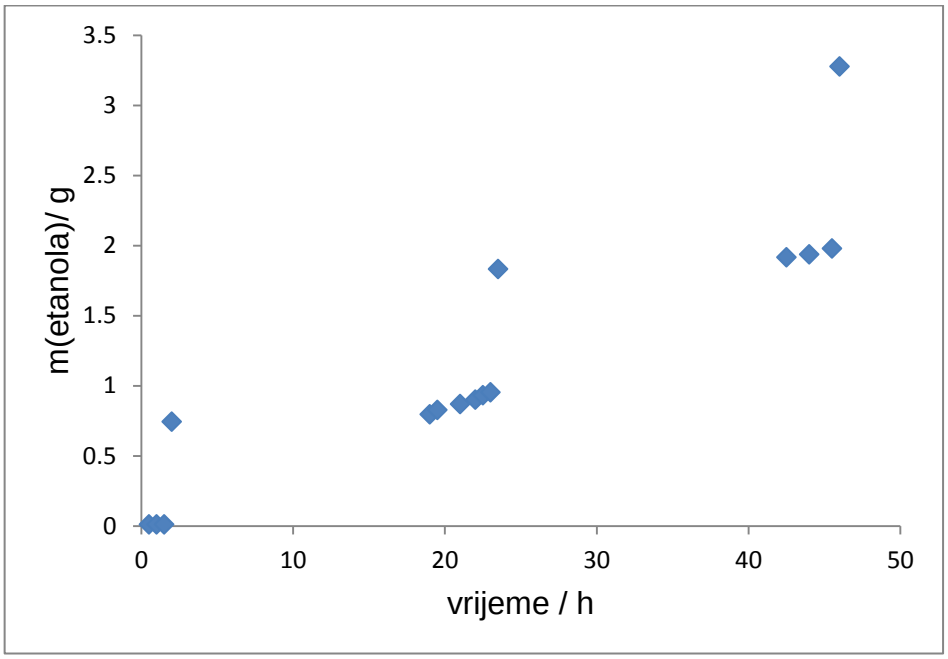
Slika 15. Ovisnost mase nastalog etanola o vremenu fermentacije uz imobilizirane stanice kvasca, $w_{alginat}$=1,5 %, c_{CaCl2} =0,1 M (tikvica 1) tijekom 15 h



Slika 16. Ovisnost mase nastalog etanola o vremenu fermentacije uz imobilizirane stanice kvasca, $w_{alginat}$=1,5 %, c_{CaCl2} =0,1 M (tikvica 2) tijekom 15 h



Slika 17. Ovisnost mase nastalog etanolao vremenu fermentacije uz imobilizirane stanice kvasca, $w_{želatina}$=2 % (tikvica 1)



Slika 18. Ovisnost mase nastalog etanola o vremenu fermentacije uz imobilizirane stanice kvasca, $w_{želatina}$ = 2% (tikvica 2)

Nakon 48 h fermentacije izračunata je masa nastalog etanola, prema izrazu (3) i prikazana u tablici 9.

Tablica 9. Masa etanola nastala fermentacijom glukoznog supstrata uz imobilizirani pekarski kvasac

	IMOBILIZACIJA NA ALGINATU	IMOBILIZACIJA NA ŽELATINI
TIKVICA	m (etanola) / g	m (etanola) / g
1	3,255 g	3,287 g
2	3,297 g	3,276 g

4. RASPRAVA

Stanice kvasca imobilizirane su unutar trodimenzionalne strukture alginata umreženog kalcijevim ionima te unutar želatine umrežene glutaraldehidom.

Dokapavanjem suspenzije suhog aktivnog kvasca i Na-alginata u otopinu $CaCl_2$, formirane su kuglice pravilnog oblika i približno jednakog volumena. Kako bi se sačuvala aktivnost kuglica s kvascem do početka fermentacije, čuvane su u hladnjaku.

Fermentacija glukoze u prisustvu imobiliziranih stanica kvasca praćena je tijekom 48 h. Bilježena je promjene mase zbog nastalog CO_2 koji se apsorbira u vrenjači, što se vidi iz promjene boje indikatorau ružičastu.

Na slikama 15 i 16 vidiljivo je da je masa etanola u korelaciji sa razmnožavanjem kvasaca, jer su CO_2 i etanol produkti primarnog metabolizma kvasaca. Stoga se posredno može pratiti i objasniti krivulja rasta biomase. Prvih 30 minuta imobilizirane stanice prilagođavale su se na novonastale uvjete. Nakon 30 minuta započinje eksponencijalna faza koja traje do 6 h. U tom razdoblju broj stanica rastao je maksimalnom brzinom i srednja vrijednost mase nastalog etanola je 2,95 grama. U vremenu od 6 do 15 h, nakon što je sav supstrat razgrađen, slijedi stacionarna faza prilikom čega je nastalo još 0,32 g etanola. Oblik kuglice je povoljan jer u odnosu na volumen ima veliku površinu pa je supstrat odmah dostupan raspoređenim kvascima unutar kuglice. Ukupna masa nastalog etanola iznosi 3,27 g.

Slike 17 i 18 prikazuju imobilizaciju stanica na želatini. Faza prilagodbe u ovom slučaju trajala je nešto duže, točnije 90 min. Tijekom 48 h praćenja procesa uočena su 3 skoka tijekom fermentacije. Prvi skok javlja se između 2 i 3 h, nakon čega slijedi prividna neaktivnost kvasaca i nastajanje 0,78 g etanola. Drugi skok počinje nakon 21 h i traje približno 2 h nakon čega ponovno slijedi neaktivnost kvasca, a masa nastalog etanola sada iznosi 1,88 g. Treći skok odvija se u intervalu od 42 do 45 h, a ukupna masa nastalog etanola iznosi 3,28 grama.

Konačna masa nastalog etanola približno je ista kao i za prvi način imobilizacije, što znači da je razgrađena jednaka količina supstrata i kod stanica imobiliziranih na alginatu i na želatini. U slučaju želatine razgradnja se odvijala u više faza, kao da sve stanice kvasca nisu istovremeno aktivne, odnosno nije im svima dostupan supstrat.

Prilikom pripreme želatine bilo je potrebno zamrznuti nosač kako bi se što bolje stvrdnuo. Dio vode koji se zaledio bilo je potrebno ukloniti, što znači da su kvasci ostali zgusnuti i neravnomjerno raspoređeni u želatini. Kockice želatine bile su znatno veće od kuglica alginata (slika 9), pa je i supstratu bilo potrebno dulje vrijeme da dođe do zarobljenih kvasaca.

Prvi skok rezultat je množenja kvasaca na površini, a sljedeća dva rezultat su aktivacije dubljih slojeva kvasaca i dolaska potrebnog supstrata i vode do istih.

Drugo, manje vjerojatno obašnjenje je da je prilikom zamrzavanja dio kvasaca stradao i da se u želatini sada nalazi manja količina stanica kvasca. One stanice koje su preostale, razgradile su dio supstrata što se manifestira kao prvi skok. Mikroorganizmi se u idealnim uvjetima dijele svakih 20 – 30 min, tako da nakon prve diobe miruju, pa se opet dijele i tako dok ne ponestane supstrata. Za potvrdu ove teze trebalo bi provjeriti sadrži li želatina manje stanica nego alginat.

5. ZAKLJUČAK

- Imobilizaciju stanica suhog pekarskog kvasca moguće je provesti pri koncentraciji Na-alginata 1,5% i 4%tne otopine želatine. Koncentracija kompleksirajućeg agensa koji sadrži Ca^{2+} ione bila je 0,1 M, a koncentracija otopine glutaraldehida 5%.

- Iako je alkoholnom fermentacijom dobivena približno jednaka masa etanola, faza prilagodbe kod stanica kvasca imobiliziranih u želatini trajala je trostruko duže i razgradnja supstrata odvijala se u trifaze. Također, prilikom priprave matrica, želatina je bila osjetljivija na promjene temperature te je dobiven mekši i nestabilniji gel što je rezultiralo debljim i manje povoljnim oblikom kockice. Posljedica toga je otežana dostupnost supstrata stanicama kvasca u unutrašnjosti čime se objašnjava prethodno opisana specifična pojava.

- Fermentacijom glukoznog supstrata s 80 g/L glukoze uz kvasac imobiliziran na alginatu nastaje oko 3,276 g etanola, a fermentacijom supstrata istog sastava uz kvasac imobiliziran na umreženoj želatini nastaje oko 3,282 g etanola.

- Imobilizacija na alginatu uspješnije je provedena radi jednostavnijeg izvođenja samog postupka i formiranja optimalnijeg oblika kuglice.

6. LITERATURA

1. Z. Findrik Blažević, Bioreakcijska tehnika I (interna skripta), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013. (str. 1-29)
2. B. Andričić, Vježbe iz biotehnoloških procesa (interna skripta), Kemijsko tehnološki fakultet, Split, 2006.
3. https://www.scribd.com/doc/246403788/Alkohol-i-kvasci-knjiga-Grba-pdf (str. 8-21, 206-238) (28.04.2017.)
4. http//:e-skola.biol.pmf.unizg.hr (28.04.2017)
5. L. Žmire, Alkoholna fermentacija glukoze uz imobilizirani pekarski kvasac, Diplomski rad, Kemijsko - tehnološki fakultet, Split, 2007.
6. B. Andričić, Prirodni polimerni materijali, Priručnik, Kemijsko - tehnološki fakultet, Split, 2009. (str. 3-38)
7. http://www.tehnologijahrane.com (13.05.2017)
8. A.Vrsalović Presečki, Studij procesa pridobivanja enzima u rastućim stanicama pekarskog kvasca, Magistarski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2003. (str. 1-10)
9. M. Krušelj, Alkoholna fermentacija, Završni rad, Prehrambeno – tehnološki fakultet, Osijek, 2014., (str. 2-9)
10. http://www.bionet-skola.com/w/Gljive (29.04.2017.)
11. D. Pelc, S. Marion, S. Petrović, Dinamika sol – gel prijelaza želatine, rad-kandidat za Rektorovu nagradu, Prirodoslovno matematički fakultet, Zageb, 2010.

12. V. Stehlik – Tomas, D. Stanzer, J. Mrvčić, S. Križanović, Proizvodnja etanola i prehrambenog kvasca, Prehrambenobiotehnološki fakultet, Zagreb, 2012.

13. H. Scragg, Biotehnology for Engineers, Biological Systems in Tehnological processes, Ellis Horwood Ltd, Chichester, 1998, (str. 235-250)

14. S. Prentis, Biotehnologija – nova industrijska revolucija, Školska knjiga, Zagreb, 1991. (str. 136-143, 210-245)

15. R. Kumar, R. Vats, Protease production by *Bacillus subtilis* immobilized on different matrices, Dolphin PG College of life science, Punjab, India, New York science journal 2010. (str. 20-23)

16. M. Divatar, G. Sandhya, S. Ahemad, K. Lingappa, Immobilization of Pseudomonas sp. klm9 in sodium alginte: a promising technique for L – glutaminase production, University Gulbarga, Karnataka, India, SciPress Ltd. Swizerland, 2015. (str. 28-34)

17. N.S. Wang, Cell immobilization with calcium alginate, University of Maryland, USA, 2016.