

# Biorafinerijski pristup korištenju otpadne trave za proizvodnju biokemikalija

---

**Kolakušić, Antonio**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:408959>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-12**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2021.

Antonio Kolakušić

1275/BPI

**BIORAFINERIJSKI PRISTUP  
KORIŠTENJU OTPADNE TRAVE  
ZA PROIZVODNJU  
BIOKEMIKALIJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Antonije Trontel, te uz pomoć asistenta Nenada Marđetka, mag. ing. bioproc.

Diplomski rad je izrađen u okviru projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (šifra projekta: IP-2018-01-9717) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).

*Veliko hvala roditeljima, Mirjani i Tomi, te braći, Luki i Hrvoju, za podršku tijekom studiranja jer bez njih ovo ne bi bilo moguće.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,  
industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

## BIORAFINERIJSKI PRISTUP KORIŠTENJU OTPADNE TRAVE ZA PROIZVODNJU BIOKEMIKALIJA

*Antonio Kolakušić, 1275/BPI*

**Sažetak:** Korištenje različitih biomasa kao sirovina u biorafinerijama predstavlja dobru alternativu proizvodnji transportnih goriva i drugih vrijednih kemikalija iz fosilnih izvora. U ovom radu je istražena mogućnost rasta plijesni *Mucor indicus* DSM 2158 na podlogama koje se sastoje od hidrolizata lignocelulozne sirovine - otpadne trave i različitih izvora dušika, te proizvodnja vrijednih metabolita poput etanola i masnih kiselina. Najveća produktivnost procesa obzirom na proizvodnju etanola je ostvarena tijekom uzgoja sa  $10 \text{ g L}^{-1}$  kvašćevog ekstrakta kao izvora dušika, a iznosila je  $0,04 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Određen je i lipidni sastav biomase ove plijesni, te je detektirano 24 masne kiseline GC-FID metodom od kojih najveći udio čine oleinska ( $\approx 50 \%$ ) te palmitinska ( $\approx 15 \%$ ) kiselina. Udjel lipida izražen na suhu tvar biomase plijesni iznosi  $16,9 \%$  (w/w). Otpadne podloge nakon uzgoja *M. indicus* DSM 2158 su korištene za uzgoj nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, čija se biomasa može koristiti kao gnojivo, za bioremedijaciju tla ili kao izvor različitih pigmenata. Uzgojem bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 na otpadnoj podlozi u bioreaktoru s miješalom ostvarena je prinos biomase od  $2,3 \text{ g L}^{-1}$  te je postupkom ekstrakcije iz biomase izdvojeno  $60 \text{ mg g}^{-1}$  ukupnih pigmenata izraženo na suhu tvar biomase.

**Ključne riječi:** *Mucor indicus*, *Rhodovulum adriaticum*, otpadna trava, masne kiseline, etanol

**Rad sadrži:** 70 stranica, 16 slika, 11 tablica, 67 literaturnih navoda, 8 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** doc. dr. sc. Antonija Trontel

**Pomoć pri izradi:** Nenad Marđetko, mag. ing. bioproc.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. doc. dr. sc. Mario Novak
2. doc. dr. sc. Antonija Trontel
3. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
4. prof. dr. sc. Jasna Novak (zamjena)

**Datum obrane:** 14. srpanj, 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemistry engineering  
Laboratory for Biochemistry engineering,  
industrial microbiology and beer and malt technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

### BIOREFINERY APPROACH FOR BIOCHEMICAL PRODUCTION FROM WASTE GRASS

*Antonio Kolakušić, 1275/BPI*

**Abstract:** Using biomass as feedstock in biorefineries represents a good alternative to production of fuels and other value-added chemicals from fossil sources. Cultivations of fungi *Mucor indicus* DSM 2158 on lignocellulosic feedstock - wheat grass hydrolysate with different nitrogen sources, and production of valuable metabolites such as ethanol and fatty acids was investigated in this research. Highest ethanol productivity ( $0.04 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) was achieved while cultivating the fungus in a medium with  $10 \text{ g L}^{-1}$  of yeast extract. Fatty acid composition in *M. indicus* biomass was determined using GC-FID method. Total of 24 fatty acids were detected, while oleic and palmitic acid represented about 50 % and 15 % of total fatty acids, respectively. Lipid fraction in biomass accounts up to 16.9 % (w/w) of the biomass dry weight. After cultivations of *Mucor indicus* DSM 2158, waste liquid media were used for cultivations of non-sulphur purple bacteria *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781. The biomass of *R. adriaticum* DSM 2781 can be used as a fertilizer, for soil bioremediation or as a source of pigments. Cultivation of *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 in a stirred-tank bioreactor yields  $2.3 \text{ g L}^{-1}$  of biomass. From obtained biomass using extraction method  $60 \text{ mg g}^{-1}$  total pigments were produced.

**Keywords:** *Mucor indicus*, *Rhodovulum adriaticum*, wheat grass, fatty acid, ethanol

**Thesis contains:** 70 pages, 16 figures, 11 tables, 67 references, 8 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD, Antonija Trontel, Assistant professor

**Technical support and assistance:** M. Sc. Nenad Marđetko

#### Reviewers:

1. PhD, Mario Novak, Assistant professor
2. PhD, Antonija Trontel, Assistant professor
3. PhD, Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor
4. PhD, Jasna Novak, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 14<sup>th</sup>, July, 2021



Sadržaj	stranica
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. BIORAFINERIJE.....	2
2.1.1. Sirovine .....	2
2.1.2. Proizvodi biorafinerija.....	6
2.2. PLIJESAN <i>Mucor indicus</i> .....	8
2.2.1. Morfologija.....	8
2.2.2. Stanična stijenka.....	9
2.2.3. Proizvodnja etanola s pomoću plijesni <i>Mucor indicus</i> .....	9
2.2.4. Proizvodnja masnih kiselina s pomoću plijesni <i>Mucor indicus</i> .....	10
2.2.5. Obrada otpadnih voda s pomoću plijesni <i>Mucor indicus</i> .....	11
2.3. LJUBIČASTE NESUMPORNE BAKTERIJE .....	11
2.3.1. Biotehnoška primjena ljubičastih nesumpornih bakterija .....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>14</b>
3.1. MATERIJALI .....	14
3.1.1. Sirovina .....	14
3.1.2. Kemikalije .....	14
3.1.3. Radni mikroorganizmi.....	15
3.1.4. Hranjive podloge za održavanje i uzgoj mikroorganizama.....	15
3.2. UREĐAJI I OPREMA .....	18
3.2.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC) .....	18
3.2.2. Uređaj za plinsku kromatografiju (GC).....	18
3.2.3. Spektrofotometar .....	18
3.2.4. Centrifuge.....	18
3.2.5. Bioreaktor s miješalom.....	19
3.2.6. Ostali uređaji .....	19
3.3. METODE .....	20
3.3.1. Uzgoj čiste kulture plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2158.....	20
3.3.2. Uzgoj inokuluma plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2158 .....	20
3.3.3. Preliminarni uzgoji <i>Mucor indicus</i> na definiranoj podlozi s glukozom i različitim izvorima dušika .....	20
3.3.4. Uzgoji <i>Mucor indicus</i> DSM 2158 na hidrolizatu otpadne trave dobivenom kiselinom predobradom u visokotlačnom bioreaktoru .....	21
3.3.5. Uzgoji <i>Mucor indicus</i> DSM 2158 na hidrolizatu otpadne trave prethodno tretiranom aktivnim ugljenom.....	21
3.3.6. Uzgoj <i>Mucor indicus</i> DSM 2158 u bioreaktoru s miješalom.....	21
3.3.7. Uzgoj inokuluma <i>Rhodovulum adriaticum</i> .....	22

3.3.8. Uzgoj <i>Rhodovulum adriaticum</i> na otpadnim podlogama nakon uzgoja <i>M. indicus</i> .....	22
3.3.9. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti (UPLC).....	22
3.3.10. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase plijesni na kraju uzgoja .....	23
3.3.11. Određivanje koncentracije i sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom s plameno-ionizacijskom detekcijom.....	23
3.3.12. Određivanje optičke gustoće hranjive podloge tijekom uzgoja <i>Rhodovulum adriaticum</i> .....	25
3.3.13. Ekstrakcija ukupnih pigmenata i spektrofotometrijsko određivanje bakterioklorofila a .....	26
3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI UZGOJA .....	27
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>28</b>
4.1. ODREĐIVANJE UTJECAJA RAZLIČITIH IZVORA DUŠIKA NA RAST I PROIZVODNJU METABOLITA S POMOĆU PLIJESNI <i>Mucor indicus</i> U PODLOZI S GLUKOZOM .....	29
4.2. UZGOJ PLIJESNI <i>Mucor indicus</i> DSM 2185 NA HIDROLIZATU OTPADNE TRAVE DOBIVENOM KISELINSKOM PREDOBRADOM U VISOKOTLAČNOM BIOREAKTORU .....	37
4.2.1. Uzgoj plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2185 na hidrolizatu otpadne trave.....	37
4.2.2. Uzgoj plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2185 na hidrolizatu otpadne trave tretiranog aktivnim ugljenom.....	42
4.2.3. Uzgoj plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2185 u reaktoru s miješalom na detoksificiranom hidrolizatu otpadne trave .....	45
4.3. ANALIZA SASTAVA MASNIH KISELINA U BIOMASI PLIJESNI <i>Mucor indicus</i> DSM 2185 NAKON UZGOJA NA RAZLIČITIM HRANJIVIM PODLOGAMA .....	47
4.4. UZGOJ BAKTERIJE <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 NA RAZLIČITIM OTPADNIM PODLOGAMA .....	51
4.4.1. Uzgoj na otpadnoj podlozi bez dodatka izvora dušika.....	51
4.4.2. Uzgoj na otpadnoj podlozi s dodatkom CSL-a .....	52
4.4.3. Uzgoj na otpadnoj podlozi s dodatkom kvasčevog ekstrakta .....	54
4.4.4. Uzgoj na otpadnoj podlozi uz dodatak CSL-a u reaktoru s miješalom .....	56
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>59</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>60</b>
<b>7. PRILOZI.....</b>	<b>67</b>



# 1. UVOD

Veliki dio svjetskih energetske potrebe dobiva se preradom fosilnih goriva u rafinerijama. Zbog nesigurnosti dostupnih količina fosilnih sirovina poput nafte, njihovog negativnog ekološkog utjecaja i rasta cijena fosilnih goriva, potrebno je povećati udio drugih izvora energije kojima bi se izbjegli negativni aspekti upotrebe fosilnih goriva, te smanjila ovisnost čovječanstva o istima. Uz sunčevu energiju, energiju vjetra te energiju vode, biljna biomasa predstavlja još jedan zanimljiv potencijalan izvor energije. Zamjena nafte biljnom biomasom kao sirovinom za proizvodnju biogoriva i biokemikalija je pokretačka snaga za razvoj koncepta biorafinerija (Cherubini, 2010).

U biorafinerijama se gotovo sve vrste sirovina biološkog podrijetla mogu pretvoriti u biogoriva različitih klasa i druge vrijedne biokemikalije. Biomasa koja se koristi u biorafinerijama može se podijeliti u četiri veće skupine, a to su „energetski usjevi“ (uglavnom su to travaste biljke poput miskantusa, divljeg prosa, bambusa, sirka i dr.), brzorastuće drveće, poljoprivredni usjevi (uljarice i žitarice) te biomasa algi (Maity, 2015).

Posebno su zanimljive sirovine lignoceluloznog sastava zbog velike dostupnosti istih, jer nerijetko takve sirovine predstavljaju otpad drugih industrija, npr. stabljike žitarica nakon žetve iz poljoprivredne industrije ili otpad šumske industrije. Lignocelulozne sirovine nije moguće mikroorganizmima prevesti u vrijedne proizvode bez prethodne obrade sirovine s ciljem oslobađanja jednostavnih šećera iz kristalične strukture tih sirovina.

U ovom radu istražit će se utjecaj različitih izvora dušika poput soli, peptona, kvašćevog ekstrakta i kukuruzne močevine (dalje u tekstu CSL) na rast i proizvodnju različitih metabolita i masnih kiselina s pomoću plijesni *M. indicus* DSM 2185. Zatim će se odabrani izvori dušika koristiti u kombinaciji s lignoceluloznom sirovinom - hidrolizatom otpadne trave za uzgoj ove plijesni. Usporedit će se uspješnost procesa provedenom na nedetoksificiranom i detoksificiranom hidrolizatu otpadne trave (tretiran aktivnim ugljenom kako bi se uklonili inhibitori). Nakon toga, provest će se uzgoji u većem mjerilu - bioreктору s miješalom u podlozi s odabranim izvorom dušika na detoksificiranom hidrolizatu otpadne trave. Dobivena otpadna podloga nakon uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 bit će korištena za uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 za proizvodnju biomase bakterije koja se može koristiti kao bio gnojivo, za bioremedijaciju tla, te za proizvodnju pigmenta.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BIORAFINERIJE

Biorafinerije su postrojenja koja provode procese konverzije biomase, uključujući otpad, u kemikalije, biomaterijale i energiju maksimizirajući vrijednost biomase te minimizirajući otpad (Clark i Deswarte, 2015b). Budući da biorafinerije koriste biomasu kao sirovinu za proizvodnju sličnih proizvoda, one predstavljaju alternativu naftnim rafinerijama kojom bi se moglo postići održivu i ekološki prihvatljiviju proizvodnju. Obzirom na broj različitih sirovina, proizvodnih procesa i krajnjih proizvoda, biorafinerije se mogu podijeliti na biorafinerije prve, druge i treće faze. Biorafinerije prve faze (eng. *Phase I biorefinery*) jednim tehnološkim postupkom, jednu sirovinu pretvaraju u jedan glavni proizvod. Na primjer, to su biorafinerije koje za sirovinu koriste biljno ulje od kojega transesterifikacijom proizvode biodizel i glicerol kao nusproizvod (Wellisch i sur., 2010). Slično biorafinerijama prve faze, biorafinerije druge faze (eng. *Phase II biorefinery*) koriste jednu sirovinu, ali su u mogućnosti proizvesti više različitih krajnjih produkata. Pokazalo se da ovakve biorafinerije koje mogu reagirati na promjene cijena, tržišne potražnje i svojih proizvodnih limita odnosno biorafinerije koje imaju integrirane proizvodnju i biogoriva i kemikalija, predstavljaju uspješnije investicije koje istovremeno postižu ekonomske i energetske ciljeve (Bozell i Petersen, 2010). Nadalje, ovakvim pristupom proizvodnji biogoriva bi se mogle smanjiti cijene biogoriva i do 30 % (IEA Bioenergy, 2012). Biorafinerije treće faze (eng. *Phase III biorefinery*) su najnaprednije jer za proizvodnju više različitih proizvoda mogu koristiti više vrsta sirovina.

#### 2.1.1. Sirovine

##### 2.1.1.1. Lignocelulozne sirovine

Lignocelulozne sirovine čine veliku skupinu sirovina biljne biomase i predstavljaju najobilniji izvor obnovljivog organskog materijala na Zemlji. Lignoceluloza nastaje procesom fotosinteze i rezultat je rasta biljaka koje koriste vodu i CO<sub>2</sub> za stvaranje jednostavnih šećera koje dalje mogu ugraditi u strukturu lignoceluloze. Glavne komponente strukture lignoceluloze su celuloza, hemiceluloza i lignin, a u manjem dijelu su prisutni pigmenti, proteini stanične stijenke, mineralne tvari i pektin (Chen, 2014).

Celuloza je linearni homopolimer molekula D-glukoze povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama te čini 35 – 50 % suhe tvari stanične stijenke biljaka ovisno o vrsti, a kod nekih vrsta (pamuk) stanična stijenka stanica je gotovo u potpunosti sastavljena od celuloze (Chen, 2014). Dugački lanci međusobno su povezani vodikovim vezama, na taj način tvore vlakna celuloze. Zbog takve kompaktne strukture različiti reagensi teško dolaze do aktivnih hidroksilnih skupina glukoznih jedinica i zato je potrebno na neki način otvoriti strukturu lignoceluloze i razbiti ju do jednostavnijih polisaharida te do monosaharida koje mikroorganizmi mogu koristiti za rast i biosintezu proizvoda.

Za razliku od celuloze, hemiceluloza je heteropolimer monosaharida povezanih različitim glikozidnim vezama koji tvore razgranate lance hemiceluloze. Također, sadržaj i struktura hemiceluloze se razlikuje ovisno o vrsti biljke. Hemiceluloze drvenastih biljaka obično se sastoje od D-ksiloze, D-manoze, D-galaktoze, D-glukoze, L-arabinoze, D-glukuronske kiseline i D-galakturonske kiseline, a hemiceluloze trava i žitarica najčešće su velikim dijelom sastavljene od D-ksiloze, D-galaktoze, D-glukoze i L-arabinoze, no u ovim polimerima postoji veća raznolikost strukture (Puls, 1997).

Lignin je treća velika komponenta biljnog materijala. To je obično drugi najzastupljeniji organski polimer biljaka koji čini 20 - 40 % drvenastih biljaka ili 15 - 20 % strukture travastih biljaka (Chen, 2014). Kao što je slučaj s hemicelulozom, lignin je heteropolimer. Monomeri lignina su nelinearno i nasumično povezani, a tri najčešća monomera su kumaril alkohol, sinapil alkohol i koniferil alkohol. Tijekom separacije lignina, zbog mehaničkih, kemijskih i enzimskih metoda koje se koriste, dolazi do djelomične degradacije lignina pa još nije određena njegova prava molekulska masa (Chen, 2014). Cjeloviti lignin je netopiv u bilo kojem otapalu zbog brojnih intramolekulskih i intermolekulskih vodikovih veza koje su posljedica hidroksilnih i drugih polarnih skupina u strukturi lignina (Chen, 2014). Lignin utječe na čvrstoću staničnih stijenki biljnih stanica, poboljšava hidrofobna svojstva stjenke, sudjeluje u transportu mineralnih tvari te štiti od patogena (Liu, 2018).

#### 2.1.1.1.1. Obrada lignoceluloznih sirovina

Predobrada lignoceluloznih sirovina je nužan korak u procesu proizvodnje jer mikroorganizmi ne mogu koristiti lignocelulozne materijale u njihovom prvotnom obliku nego samo jednostavnije gradivne jedinice celuloze, hemiceluloze i lignina. Predtretman je zbog toga vrlo bitan korak jer količina dostupnog supstrata, a samim time i rast mikroorganizma i

proizvodnja vrijednih metabolita, ovisi o učinkovitosti predtretmana. Postoje više načina na koje se može provesti predtretman lignocelulozних sirovina, a mogu se podijeliti na fizikalne, kemijske i biološke metode.

Fizikalne metode uključuju mljevenje odnosno usitnjavanje, radijaciju, eksploziju parom, pirolizu i slično, a cilj je promijeniti strukturu sirovine omogućavajući pristup enzima celulozi (Chen, 2014). Za mehaničko usitnjavanje najčešće se koriste razne vrste mlinova od kojih su se najboljima pokazali kuglični mlinovi. Njima se može učinkovito razbiti intermolekulske vodikove veze te posljedično olakšati razdvajanje biljnih vlakana, a time se poboljšavaju učinkovitost kasnije hidrolize i saharifikacije sirovine (Chen, 2014). Tijekom procesa ultrafinog usitnjavanja osim fizikalne strukture mijenja se i kemijski sastav sirovine, postižu se jako male čestice sirovine čime se postiže velika specifična površina, a time i veća topivost te veća kemijska i biološka aktivnost materijala (Ding i sur., 2002). Ovakve metode usitnjavanja raznim mlinovima su jako učinkovite, ali su relativno skupe zbog potrebne energije. Njihova cijena može činiti i do 60 % cijene ukupne potrošnje energije tijekom predtretmana (Chen, 2014). Eksplozija parom je metoda kojom se lignocelulozna sirovina tretira parom visoke temperature pod visokim tlakom neko određeno vrijeme, zatim se provede trenutna dekompresija sustava što uzrokuje promjene strukture sirovine i razdvajanje komponenti. Pri takvim uvjetima dolazi do stvaranja organskih kiselina iz hemiceluloze koje sudjeluju u hidrolizi hemiceluloze i lignina (Chen, 2014). Ova se metoda pokazala vrlo uspješnom, naime Schultz i sur. (1984) su pokazali visoke prinose nakon enzimske hidrolize sirovine koja je bila tretirana parom temperature 240-250 °C kroz 1 minutu. Uspješnost enzimske hidrolize nakon tretmana parom temperature 230 °C tijekom 1-2 minute iznosi i do 90 % (Martinez i sur., 1990). Prednosti ove metode su mogućnost optimizacije procesa za različite sirovine, učinkovito razdvajanje celuloze, hemiceluloze i lignina, učinkovita naknadna enzimska hidroliza celuloze s gotovo teoretskom uspješnosti. Nadalje, nastale šećere hemiceluloze moguće je gotovo u potpunosti pretvoriti u tekuća goriva, a optimiziranjem procesa moguće je smanjiti stvaranje inhibitora fermentacije i cijena procesa je niska (Chen, 2014).

Kemijske metode odnose se na upotrebu anorganskih kiselina, lužina ili organskih otapala za tretiranje lignocelulozne sirovine čime se postiže degradacija i otapanje lignina i hemiceluloze i dekrizlizacija i otapanje celuloze. Produkti ovih tretmana mogu biti dekstrin, celobioza, glukoza, dekstran i slično (Chen, 2014). Tretiranjem lignocelulozne sirovine lužinom postiže se slabljenje vodikovih veza između celuloze i hemiceluloze i saponificiranje esterskih veza između hemiceluloze i lignina. Na taj način dolazi do povećanja poroznosti lignoceluloze. Zbog egzotermnosti ovih reakcija, povećanjem temperature se smanjuje

bubrenje sirovine čime se smanjuje i reaktivnost celuloze i zato bi tretmane lignoceluloze lužinama trebalo provoditi pri nižim temperaturama, oko 20 °C (Tang i Liang, 1999). Lu i sur. (2004) su pokazali da se tretmanom otopinom NaOH smanjuje stupanj kristalčnosti celuloze i poboljšava buduća enzimaska hidroliza sirovine. Nadalje, za predtretman lužinom mogu se koristiti i Ca(OH)<sub>2</sub> i amonijak što se pokazalo kao uspješna metoda za uklanjanje lignina (Kim i Holtzaple, 2005; Kim i sur., 2003). Predtretmani lužinama mogu se provoditi šaržno, polukontinuirano ili kontinuirano (Zhang, 1990). Postoji i metoda predtretmana otapalima tijekom koje dolazi do otapanja i raspadanja celuloze. Nakon taloženja celuloze, enzimaska hidroliza je olakšana. U ovu svrhu se koriste otapala kao što su H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, cadoxen (oksid ili hidroksid kadmija otopljen u etilendiaminu). Upotreba ovakvih otapala može biti korozivna za procesnu opremu, toksična i otapala su skupa. Ako bi se moglo postići recikliranje otapala za ponovnu upotrebu i smanjenje toksičnosti, ove bi metode mogle postati održive (Chen, 2014). Organska otapala poput alkohola, fenola, ketona, dimetil-sulfoksida i amina mogu se koristiti za odvajanje lignina od celuloznog materijala. Ove se metode provode jedan do dva sata na visokim temperaturama (160 – 200 °C) uz izdvajanje oko 80 % lignina i potpuno otapanje hemiceluloze (Chen, 2014). Poteškoće ovih metoda su ekonomski neisplativ postupak reciklacije nekih otapala, potreban je sustav recikliranja lužina jer se metode provode u lužnatim medijima i skupa oprema. Za tretiranje lignoceluloznih sirovina mogu se koristiti i kiseline, koncentrirane ili razrijeđene. Koncentrirane kiseline su toksične, korozivne za opremu, prije saharifikacije i fermentacije je potrebno neutralizirati kiselinu te ukloniti nastale soli što sve povećava cijenu procesa. Korištenje kiselina nižih koncentracija (0,3 – 3 %) je zato poželjnija metoda. Tijekom tretmana kiselinama sirovina postaje poroznija te se povećava kontaktna površina celuloze za celulaze, dolazi do otapanja hemiceluloze i degradacije do šećera kao što je ksiloza (Chen, 2014).

#### 2.1.1.2. Ostale sirovine

Uz navedene lignocelulozne sirovine, za proizvodnju u biorafinerijama mogu služiti još i žitarice, uljarice, životinjski i biljni otpad te alge (Clark i Deswarte, 2015a). Budući da biorafinerije mogu koristiti različite sirovine čije količine nisu neograničene, njihova ekonomska održivost ovisi o dostupnosti, kvaliteti i cijenama sirovina (BSI, 2013). Što se tiče triglicerida, kao sirovina za biorafinerije mogu se koristiti biljna ulja ili životinjske masti. Trenutno se 95 % ukupne količine biodizela proizvodi od jestivih biljnih ulja (Stamenković i sur., 2011; Leung i sur., 2010). Nekontrolirano korištenje jestivih ulja za proizvodnju biogoriva



može dovesti do ekonomske neravnoteže i krize prehrambene industrije zbog čega bi za proizvodnju biogoriva trebalo koristiti nejestiva ulja, otpadna ulja i životinjske masti (Banković i sur., 2012; Borugadda i Goud, 2012). Sirovina za biorafinerije mogu biti i biljni izvori bogati šećerom (šećerna trska, šećerna repa) ili škrobom (žitarice). Različiti organski otpad može biti sirovina također. U tu skupinu pripadaju javni komunalni otpad, životinjske gnojnice te otpadi industrije voća i povrća. Iako neke navedene sirovine poput životinjskih gnojnica mogu poslužiti kao sirovina u biorafinerijama, zbog visokog sadržaja vlage (>70 %) su prikladnije za proizvodnju bioplina anaerobnom digestijom (Cherubini, 2010).

### 2.1.2. Proizvodi biorafinerija

Kao rezultat velikog broja potencijalnih sirovina i mikroorganizama koji se koriste u biorafinerijskim procesima, postoji jako široki spektar proizvoda biorafinerija. Te se proizvode ugrubo može podijeliti na dvije velike skupine proizvoda, a to su energetske proizvodi i materijalni proizvodi.

Energetski proizvodi su oni koji se koriste zbog svog energetske sadržaja kojim se može proizvesti električna energija, toplina ili mogu služiti kao transportna goriva. To su plinovita goriva (bioplin, sintetski plin, vodik, metan), čvrsta goriva (lignin, ugljen, drveni peleti) i tekuća goriva (bioetanol, biodizel, bioulja). Biogoriva proizvedena u biorafinerijama imaju veliku prednost nad tradicionalnim gorivima iz fosilnih izvora u vidu dostupnosti i obnovljivosti sirovina za proizvodnju, ali i ekološkog otiska jer se izgaranjem biogoriva oslobađa znatno manje stakleničkih plinova koji pridonose globalnom zatopljenju. Bioplin se dobiva anaerobnom digestijom ili fermentacijom organskih sirovina poput životinjskih gnojnica, s pomoću mješovitih kultura mikroorganizama. Obično krajnji proizvod sadrži 45 – 65 % metana, 30 – 40 % ugljikova dioksida te druge plinove samo u tragovima. Bioplin može poslužiti kao zamjena za prirodni plin, no zbog visokog sadržaja CO<sub>2</sub> u usporedbi s prirodnim plinom (do 5 %), bioplin ima znatno manju energetske vrijednost. Unatoč tome bioplin predstavlja zanimljivu alternativu prirodnome plinu zbog toga što se za proizvodnju koristi obnovljivi izvor prirodne biomase, zbog smanjene emisije stakleničkih plinova, zbog mogućnosti lokalne proizvodnje te potencijalne neovisnosti o svjetskom tržištu nafte i plina i slično (Ruan i sur., 2019). Biovodik je čisti vodik koji se iz biomase može dobiti postupcima biofotolize, fermentacije u mraku ili na svjetlu te mikrobnom elektrolizom. Sve navedene metode dobivanja vodika iz biomase imaju karakteristične poteškoće tijekom proizvodnih procesa, a fermentacija u mraku se pokazala kao za sada najbolji izbor zbog tehničke

jednostavnosti, relativno niske potrošnje energije, umjerenih procesnih uvjeta i stabilnosti procesa. Bioetanol je etanol dobiven fermentacijom raznih sirovina s pomoću odgovarajućih mikroorganizama. Koristi se kao transportno gorivo ili kao aditiv gorivima koja se koriste u motorima s unutarnjim izgaranjem. Fokus bi trebao biti na proizvodnji bioetanola kao biogoriva druge generacije odnosno za njegovu proizvodnju trebalo bi koristiti sirovine poput lignoceluloznih sirovina i raznih otpada kako bi se uklonio faktor kompeticije za sirovinu s prehrambenom industrijom. Naime, još uvijek se za proizvodnju većine bioetanola koriste sirovine iz prehrambene industrije poput šećerne trske, kukuruza i pšenice (Karimi i Chisti, 2015). Drugo transportno gorivo koje se može supstituirati biološkom alternativom je dizel kojega može zamijeniti biodizel. Biodizel je bezbojna ili blago-žuta tekuća smjesa koju čine metil-esteri dugolančanih masnih kiselina porijeklom iz biljnih ulja, životinjskih masti, otpadnih ulja ili lipida iz biomase algi. Dobiva se transesterifikacijom pomoću alkohola i lužnatog katalizatora. Iako biodizel, u usporedbi s dizelom fosilnog porijekla, ima nižu kaloričnu vrijednost zbog prisutnosti kisika i manje količine ugljika u svom sastavu, on predstavlja bolje gorivo jer se za proizvodnju koriste obnovljivi izvori sirovine, izgara potpunije od fosilnog dizela, sigurniji je za rukovanje zbog niže točke paljenja i njegovim se izgaranjem emitiraju manje količine ispušnih plinova te je biorazgradiv (Ruan i sur., 2019).

U materijalne proizvode spadaju razne kemikalije bile to fine kemikalije visoke vrijednosti ili tzv. „bulk“ kemikalije niže vrijednosti koje se proizvode u velikim količinama ili prekursori za proizvodnju kemikalija visoke vrijednosti. Druge potencijalne proizvode biorafinerija predstavljaju organske kiseline (glukarinska kiselina, levulonska kiselina, 2,5-furan dikarboksilna kiselina, akrilna kiselina), polimeri (PHA, PHB, poliuretani, poliamidi i dr.) i smole, biomaterijali (linoleum), razni derivati glicerola iz proizvodnje biodizela (propilen glikol, epiklorohidrin, propilen, metanol), životinjska hrana, gnojiva i slično. Nadalje, u stanicama algi nakon proizvodnje biodizela, može se naći vrijednih proizvoda poput funkcionalnih lipida, antioksidansa, pigmenata, vitamina, fungicida i sterola (IEA Bioenergy, 2012).

Cilj biorafinerija bi trebao biti postizanje tzv. „zero waste“ proizvodnje odnosno proizvodnje bez otpada na kraju procesa. Treba težiti inovacijama i unaprjeđivanju postojećih tehnologija kako bi se omogućila integrirana proizvodnja što više vrijednih proizvoda uz maksimalno iskorištavanje sirovina koje ulaze u proces proizvodnje s ciljem ostvarivanja održive te ekonomski i društveno prihvatljivije proizvodnje.

## 2.2. PLIJESAN *Mucor indicus*

### 2.2.1. Morfologija

*Mucor indicus* je dimorfna, nepatogena plijesan iz reda *Mucorales*. Plijesni iz ovoga reda tvore bijele, vunaste kolonije s malim točkama – sporangijima (Sharifia, 2007). Vunasta struktura kolonija ove plijesni posljedica je karakterističnog filamentoznog rasta hifa, ali *M. indicus* može rasti i u obliku kvasca formirajući individualne sferne stanice. Ovisno o uvjetima uzgoja, ova plijesan može prijeći s jednog načina rasta na drugi za što je odgovorna aktivnost citokrom oksidaze, a moguća je i istovremena prisutnost oba načina rasta (Haidle i Storck, 1966). Uvjeti koji utječu na rast i morfologiju rasta su koncentracija spora plijesni u inokulumu, početna koncentracija šećera u podlozi za uzgoj, te atmosferski faktori poput prisutnosti kisika i ugljikova dioksida. Iako još nije poznat točan mehanizam utjecaja koncentracije spora na oblik rasta plijesni, eksperimentalno je dokazano da se korištenjem viših koncentracija spora u inokulumu ( $6 \times 10^6$  spora  $\text{mL}^{-1}$ ) inducira rast plijesni u obliku kvasca. Suprotno tome, korištenjem nižih koncentracija spora u inokulumu,  $3 (\pm 1) \times 10^4$  spora  $\text{mL}^{-1}$ , inducira se filamentozni rast plijesni (Sharifia i sur., 2008). U anaerobnim uvjetima, morfologija plijesni ovisi i o vrsti i koncentraciji prisutnih šećera. Za induciranje rasta u obliku kvasca koristi se glukoza, zatim fruktoza i manozna te galaktoza kao najlošiji izvor energije za rast plijesni *M. indicus* u obliku kvasca. Tijekom uzgoja ove plijesni u podlozi s glukozom uočeno je da filamentozni rast, odnosno formiranje hifa, ovisi o početnoj koncentraciji glukoze u podlozi. Naime, za postizanje rasta u obliku kvasca potrebno je uzgoj provoditi u podlogama s minimalno  $80 \text{ g L}^{-1}$  glukoze kada dolazi do represije morfogeneze hifa plijesni (Karimi i Zamani, 2013). Utjecaj atmosferskih faktora, točnije prisutnost  $\text{O}_2$  i  $\text{CO}_2$ , na morfologiju plijesni, karakteristika je soja. Obično dolazi do rasta u obliku kvasca kada se uzgoj provodi pod atmosferom od barem 30 %  $\text{CO}_2$  sa 70 %  $\text{N}_2$ . Prisutnost  $\text{O}_2$  poništava utjecaj  $\text{CO}_2$ , tako da već pri uzgoju pod atmosferom s 50 %  $\text{CO}_2$  i 50 % zraka, plijesan raste isključivo u filamentoznom obliku (Karimi i Zamani, 2013). Utvrđeno je da se tijekom rasta u filamentozni obliku u stanicama nalazi 50 puta veća koncentracija citokrom oksidaze u odnosu na slučaj kada plijesan raste u obliku kvasca (Haidle i Storck, 1966). Zato se rast u obliku kvasca može postići i dodatkom određenih kemikalija u podlogu koje inhibiraju sintezu ili aktivnost citokrom oksidaze. Nadalje, tijekom filamentoznog rasta moguće je, dodatkom 2-fenil etanola ili etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), potaknuti proces pupanja plijesni i rast u obliku kvasca. Na oblik rasta plijesni *M. indicus* utječe i pH vrijednost podloge. Ako plijesan raste u

podlozi koja sadrži aminokiseline, smanjenje pH vrijednosti podloge rezultira filamentoznim rastom plijesni (Karimi i Zamani, 2013).

### 2.2.2. Stanična stijenka

Staničnu stijenkku *M. indicus* najvećim dijelom čine hitin i hitozan. Ostale komponente su anionski polimeri (polifostati, glukuronan), proteini, lipidi i neki minerali ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ). Hitin i hitozan su polimeri glukozamina i *N*-acetilglukozamina te čine 65,5 % stanične stijenske *M. indicus* (Karimi i Zamani, 2013; Zamani i sur., 2008). No postoje razlike u količinama glukozamina i *N*-acetilglukozamina prisutnih u staničnoj stijenci obzirom na morfologiju plijesni. Pokazano je da stijenske filamentoznih micelija imaju najviši udio glukozamina i *N*-acetilglukozamina (Mohmmadi i sur., 2012). Hitozan predstavlja vrijedan proizvod biomase ove plijesni zbog brojnih potencijalnih primjena koje uključuju njegovo antibakterijsko djelovanje, u medicini se može koristiti za izradu umjetne kože ili oftalmoloških leća, ima pogodna svojstva za izradu mikrokapsula, membrana i gelova u farmaceutskoj industriji pa se može primjenjivati kada je potrebno kontrolirano doziranje aktivne supstance (Majeti i Kumar, 2000).

### 2.2.3. Proizvodnja etanola s pomoću plijesni *Mucor indicus*

Plijesan *Mucor indicus* može fermentirati različite šećere do etanola, uključujući glukozu, manozu, fruktozu i galaktozu, s prinosima koji su usporedivi s prinosima najviše korištenoga mikroorganizma za proizvodnju etanola, *Saccharomyces cerevisiae*. Uz mogućnost fermentiranja navedenih šećera, *M. indicus* može rasti na ksilozi te kao glavni produkt metabolizma proizvodi etanol. Ksiloza je šećer prisutan u lignoceluloznim sirovinama, kao sastavni dio hemiceluloze, što plijesni *M. indicus* daje prednost pred kvascem *S. cerevisiae* za proizvodnju etanola iz lignoceluloznih sirovina. Morfologija plijesni neznatno utječe na proizvodnju etanola kako se vidi u tablici 1. U proizvodnji etanola s pomoću plijesni u reaktorima industrijskog mjerila dolazi do operativnih poteškoća zbog filamentoznog rasta plijesni, koji može otežati miješanje, praćenje procesa zbog ometanja mjernih uređaja i, ukoliko se radi s peletima, prijenos mase do i od središta peleta. *M. indicus* je Crabtree pozitivan mikroorganizam, što znači da uz anaerobnu proizvodnju etanola, etanol može proizvesti i u aerobnim uvjetima kada su u podlozi prisutne visoke koncentracije šećera (Karimi i Zamani, 2013).

**Tablica 1.** Proizvodnja etanola različitim morfologijama *Mucor indicus* (Lennartsson i sur., 2009)

Uvjeti uzgoja biomase	Uvjeti fermentacije	Morfologija	Koeficijent konverzije glukoze u etanol (g g <sup>-1</sup> )
aerobno	aerobno	Filamentozna	0,40
aerobno	anaerobno	Filamentozna	0,42
aerobno	aerobno	Uglavnom filamentozna	0,40
aerobno	anaerobno	Uglavnom filamentozna	0,41
aerobno	aerobno	Uglavnom kao kvasac	0,41
aerobno	anaerobno	Uglavnom kao kvasac	0,42
anaerobno	aerobno	Kao kvasac	0,39
anaerobno	anaerobno	Kao kvasac	0,40

*M. indicus* nema enzime potrebne za razgradnju komponenata lignoceluloznih sirovina do monomera koje može fermentirati do etanola. Zato je prije same fermentacije potrebno provesti predobradu sirovine. Jedan način je kemijska obrada sirovina koja se može provesti kiselinama ili lužinama. Tijekom tretiranja lignocelulozne sirovine kemijskim reagensima, osim oslobađanja šećera za proizvodnju, nastaju i razni inhibitori rasta mikroorganizama, npr. octena kiselina, furani, fenolni spojevi. Ali ova plijesan uspješno proizvodi etanol, unatoč prisutnosti inhibitora (Karimi i sur., 2005). Drugi način predobrade je tretiranje sirovine ili predobrađene sirovine hidrolitičkim enzimima. Na ovaj način uz oslobađanje šećera ne dolazi do formiranja spojeva toksičnih za rast mikroorganizama. U ovu se svrhu koriste hidrolitički enzimi čija optimalna temperatura za aktivnost iznosi 40 – 50 °C. Optimalna temperatura za rast plijesni *M. indicus* je 28 °C, a pokazalo se da plijesan može rasti i proizvoditi etanol i pri 38 °C što je blizu optimalne temperature za aktivnost hidrolitičkih enzima, pa je moguće provođenje procesa simultane saharifikacije i fermentacije sirovine do etanola čime se smanjuju troškovi proizvodnog procesa (Millati i sur., 2005).

#### 2.2.4. Proizvodnja masnih kiselina s pomoću plijesni *Mucor indicus*

Osim proizvodnje etanola, tijekom uzgoja *M. indicus* dolazi i do nakupljanja znatnih količina lipida u stanicama ove plijesni. Glavninu tih lipida čine polinezasićene masne kiseline koje imaju potencijalnu primjenu u prehrambenoj industriji te u proizvodnji biodizela (Satari i sur., 2015). Jedna od najvažnijih polinezasićenih masnih kiselina je  $\gamma$ -linolna kiselina. U više

istraživanja je pokazano da *M. indicus* može proizvesti, među ostalima, upravo  $\gamma$ -linolnu kiselinu (Jangbua i sur., 2009; Jeennor i sur., 2008; Jeennor i sur., 2006). Kod plijesni koje imaju sposobnost nakupljanja lipida u stanicama, taj proces se inicira iscrpljivanjem izvora dušika iz podloge uz istovremeni suvišak izvora ugljika. Zbog nedostatka dušika, spriječena je proliferacija stanica, a postojeće stanice pretvaraju dostupni supstrat u lipide (Somashekar i sur., 2003).

#### 2.2.5. Obrada otpadnih voda s pomoću plijesni *Mucor indicus*

Uloga *M. indicus* u obradi otpadnih voda je uklanjanje teških metala koji predstavljaju problem zbog svoje toksičnosti i nakupljanja u hranidbenom lancu. Teške metale moguće je ukloniti kemijskim, fizikalnim ili biološkim metodama. Biološke metode nisu skupe, a efikasnije su od ostalih. Temelje se na primjeni mikroorganizama koji mogu tvoriti komplekse metalne ione pomoću liganda ili funkcionalnih skupina na njihovoj vanjskoj površini (Yan i Viraraghavan, 2003). U tu se svrhu mogu koristiti žive ili mrtve stanice, ali i dijelovi stanica. Poteškoću vođenja procesa sa živim stanicama predstavlja održavanje stanica na životu jer je potrebno konstantno dovoditi hranjive tvari u proces. Takav se problem može izbjeći primjenom „mrtve“ biomase koja tada djeluje kao ionski izmjenjivač na koji se adsorbiraju i koncentriraju ioni teških metala. Još jedna prednost mrtve biomase je to što se nakon adsorpcije, ione metala može eluirati s biomase koja se na taj način regenerira i može opet koristiti.

### 2.3. LJUBIČASTE NESUMPORNE BAKTERIJE

Ljubičaste bakterije se mogu podijeliti na sumporne i nesumporne obzirom na način skladištenja elementarnog sumpora kojega sumporne ljubičaste bakterije skladište unutar stanice, a nesumporne ga skladište izvan stanice (Hansen i van Gemerden, 1972). Za ljubičaste nesumporne bakterije je karakterističan fotoautotrofni rast u prisutnosti CO<sub>2</sub> kao izvora ugljika i reduciranih anorganskih spojeva koji služe kao donori elektrona uz odgovarajući izvor svjetlosti (Madigan i Jung, 2009). Tijekom fototrofnog rasta, dobivanje energije se odvija putem fotosintetske fosforilacije (Lu i sur., 2011). Za ovaj proces, stanici je potreban sustav kojim bi se pobuđivanjem elektrona na viši energetski nivo, stvorio transmembranski gradijent protona kako bi potom moglo doći do sinteze ATP-a. U biljkama, algama i cijanobakterijama postoje fotosustav I i fotosustav II. Ljubičaste bakterije nemaju niti jedan od ta dva sustava, ali

imaju sustav sličan fotosustavu II, kod kojega voda ne može služiti kao donor elektrona nego su potrebni donori elektrona s nižim redoks potencijalom. U slučaju ljubičastih nesumpornih bakterija to su reducirani sumporni spojevi ili željezovi (II) kationi (Madigan i Jung, 2009). Budući da ne mogu koristiti vodu kao elektron donora u procesu fotosintetske fosforilacije, ove bakterije ne proizvode kisik i zato su anoksigenični fotosintetski mikroorganizmi. Optimalna temperatura rasta im je 25 – 35 °C, a optimalna pH vrijednost u rasponu 6,5 – 7 jedinica. Uz već spomenuti fotoautotrofni način rasta, nesumporne ljubičaste bakterije mogu rasti i fotoheterotrofno na lako razgradivim organskim spojevima kao izvornima ugljika i elektrona (Novak i sur., 2017; Madigan i Jung, 2009). U tom slučaju kao izvor ugljika mogu koristiti aminokiseline, alkohole, organske kiseline, ugljikohidrate, acetat, piruvat, malat, sukcinat (Tabita, 1995), a najprikladniji izvori dušika su amonijak, elementarni dušik, kvašćev ekstrakt te aspartat i glutamat (Imhoff, 2006).

*Rhodovulum adriaticum* je gram-negativna, fotosintetska bakterija iz skupine ljubičastih nesumpornih bakterija. Bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, jedan od mikroorganizama korištenih u ovom radu, izolirana je iz uzoraka blata i vode iz jezera „Malo Jezero“ na otoku Mljetu (Neutzling i sur., 1984), a za rast i proizvodnju metabolita može koristiti glukozu, ksilozu i arabinozu kao izvor ugljika što je značajno jer su ovi šećeri prisutni u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina koji se koriste u biorafinerijama (Hiraishi i Ueda, 1995; Hiraishi i Ueda, 1994).

### 2.3.1. Biotehnološka primjena ljubičastih nesumpornih bakterija

Biotehnološka primjena ljubičastih nesumpornih bakterija temelji se na njihovoj sposobnosti rasta na različitim izvorima ugljika i energije pri različitim uvjetima, s istovremenom proizvodnjom komercijalno vrijednih spojeva kao što su biovodik, biopolimeri, pigmenti, vitamini i ostali biološki aktivni spojevi. Vodik koji proizvode ove bakterije nastaje u procesu fotosintetske fosforilacije, što znači da ljubičaste bakterije nisu jedini mikroorganizmi koji mogu proizvoditi biovodik na ovaj način. Prednost nesumpornih ljubičastih bakterija leži u njihovom anoksigeničnom svojstvu. Naime, enzimi koji sudjeluju u proizvodnji vodika su inhibirani u prisutnosti kisika, te kako ljubičaste nesumporne bakterije ne proizvode kisik, one imaju izraženo veći potencijal za proizvodnju biovodika (Higuchi – Takeuchi i Numata, 2019).

Pigmenti koje proizvode ove bakterije su bakterioklorofili i karotenoidi. Mogu se koristiti u prehrambenoj industriji kao prirodna bojila ili u farmaceutskoj industriji (Numan i

sur., 2018). Osim samih pigmenata, postoje i određeni međuprodukti njihovih biosintetski puteva koji su također vrijedni proizvodi. To su 5-aminolevulinska kiselina, vitamin B12, koenzim Q<sub>10</sub> i profirin (Sasaki i sur., 1998).

Ljubičaste nesumporne bakterije su sposobne nakupljati polihidroksialkanoate u uvjetima ograničene sinteze proteina u svrhu skladištenja viška ugljika i energije (Imhoff, 2006). Lorrungruang i sur. (2006) su u istraživanju fotosintetskih bakterija za proizvodnju polihidroksialkanoata koristili sedam različitih ljubičastih nesumpornih bakterija te su pokazali da neke vrste mogu proizvesti polihidroksialkanoate s produktivnošću većom i do tri puta u usporedbi s drugim fotosintetskim bakterijama. Polihidroksialkanoati predstavljaju potencijalnu alternativu polimerima iz fosilnih izvora zbog svoje biorazgradivosti.

Obrada otpadnih voda je još jedno područje u kojemu se mogu koristiti ljubičaste nesumporne bakterije. Obradom voda ovim bakterijama osim smanjenja KPK i BPK vrijednosti, dolazi i do proizvodnje različitih spojeva poput jednostaničnih proteina, biopolimera, antimikrobnih i terapijskih tvari (Madukasi i sur., 2010). Ljubičaste nesumporne bakterije mogu se koristiti za obradu farmaceutske otpadne vode (Madukasi i sur., 2010), za obradu vode iz stočarske industrije (Sepúlveda-Muñoz i sur., 2020), za obradu voda s visokim salinitetom (Hülßen i sur., 2019) i slično.



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Sirovina

Za pripremu hranjivih podloga za uzgoj *M. indicus* u ovom radu je korišten hidrolizat otpadne trave dobiven kiselinskom predobradom u visokotlačnom bioreaktoru s 0,5 %-tnom otopinom H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kroz 10 minuta. Sastav hidrolizata otpadne trave prikazan je u tablici 2.

**Tablica 2.** Sastav hidrolizata otpadne trave

	glukoza	ksiloza	glicerol	octena kiselina	etanol
$\gamma$ [g L <sup>-1</sup> ]	1,62 ± 0,64	6,76 ± 0,57	0,43 ± 0,26	1,91 ± 2,05	0,77 ± 0,75

##### 3.1.2. Kemikalije

Kemikalije korištene tijekom izrade ovog rada navedene su u tablici 3.

**Tablica 3.** Kemikalije, stupanj čistoće i podrijetlo kemikalija korištenih u ovom radu.

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
Glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
Sladni agar	p.a.	Difco, SAD
Kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Roth, Australija
Diamonijev fosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Diamonijev sulfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
Tween 80	p.a.	Merck, Njemačka
Etanol	p.a.	Gram-mol, Hrvatska
Natrijev hidroksid	p.a.	Merck, Njemačka
Klorovodična kiselina	p.a.	Merck, Njemačka
Mesni ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
Pepton	p.a.	Merck, Njemačka
Heksan	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kloroform	p.a.	Macron Fine Chemicals, SAD
Metanol	p.a.	J.T. Baker, SAD

### 3.1.3. Radni mikroorganizmi

Mikroorganizmi korišteni u ovom radu su:

- 1) *Mucor indicus* DSM 2158
- 2) *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Oba mikroorganizma su dio zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

### 3.1.4. Hranjive podloge za održavanje i uzgoj mikroorganizama

Čista kultura plijesni *Mucor indicus* DSM 2158 održavana je na čvrstim podlogama sljedećeg sastava: 25 g L<sup>-1</sup> glukoze, 5 g L<sup>-1</sup> mesnog ekstrakta, 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog sulfata (DAS), 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog fosfata (DAP) i 20 g L<sup>-1</sup> agara. Za uzgoj inokuluma korištena je podloga opisana u poglavlju 3.3.2.

Čista kultura bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 održavana je u tekućoj podlozi sljedećeg sastava: 2,7 g L<sup>-1</sup> malata, 2 g L<sup>-1</sup> natrijevog glutamatata, 1,5 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta, 0,8 g L<sup>-1</sup> diamonijevog sulfat heptahidrata, 0,5 g L<sup>-1</sup> kalijevog dihidrogenfosfata, 0,5 g L<sup>-1</sup> dikalijevog fosfata, 0,2 g L<sup>-1</sup> magnezij sulfat heptahidrata, 0,053 g L<sup>-1</sup> kalcij klorid dihidrata, 0,0012 g L<sup>-1</sup> mangan sulfat heptahidrata te po 1 x 10<sup>-3</sup> g L<sup>-1</sup> nikotinske kiseline i tiamin klorida te 1 x 10<sup>-5</sup> biotina. pH vrijednost podloge podešena je na 7 pH jedinica dodatkom natrijevog hidroksida. Za uzgoj inokuluma ove bakterije za fermentacije u većem mjerilu korištena je podloga istog sastava.

**Tablica 4.** Sastav definiranih podloga s glukozom za uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2158

podloga	V <sub>k</sub> [ml]	γ [g L <sup>-1</sup> ]					
		glukoza	DAP	DAS	pepton	CSL	kv. ekstrakt
podloga <sub>Glc-DAP1</sub>	230	20	1	-	-	-	-
podloga <sub>Glc-DAP5</sub>		20	5	-	-	-	-
podloga <sub>Glc-DAP10</sub>		20	10	-	-	-	-
podloga <sub>Glc-DAS1</sub>		20	-	1	-	-	-
podloga <sub>GLC-DAS5</sub>		20	-	5	-	-	-
podloga <sub>Glc-DAS10</sub>		20	-	10	-	-	-
podloga <sub>Glc-pepton1</sub>		20	-	-	1	-	-
podloga <sub>Glc-pepton5</sub>		20	-	-	5	-	-
podloga <sub>Glc-pepton10</sub>		20	-	-	10	-	-
podloga <sub>Glc-CSL1</sub>		20	-	-	-	1	-
podloga <sub>Glc-CSL5</sub>		20	-	-	-	5	-
podloga <sub>Glc-CSL10</sub>		20	-	-	-	10	-
podloga <sub>Glc-kve1</sub>		20	-	-	-	-	1
podloga <sub>Glc-kve5</sub>		20	-	-	-	-	5
podloga <sub>Glc-kve10</sub>		20	-	-	-	-	10

U tablici 4 je prikazan sastav hranjivih podloga koje su se koristile za uzgoje plijesni *Mucor indicus* DSM 2158 s ciljem ispitivanja optimalnog izvora dušika obzirom na proizvodnju biomase i etanola čiji su rezultati opisani u poglavlju 4.1.

**Tablica 5.** Sastav podloga koje su korištene za određivanje utjecaja izvora dušika na prinos biomase i produkata fermentacije s pomoću *M. indicus* DSM 2158 na hidrolizatu otpadne trave

podloga	V <sub>k</sub> [ml]	γ [g L <sup>-1</sup> ]			
		Hidrolizat otpadne trave		Izvor N	
		glukoza	ksiloza	CSL	kv. ekstrakt
hidrolizat	230	2,11	6,98	-	-
hidrolizat <sub>CSL1</sub>		2,24	7,18	1	-
hidrolizat <sub>CSL5</sub>		2,15	7,05	5	-
hidrolizat <sub>CSL10</sub>		1,78	7,21	10	-
hidrolizat <sub>kve1</sub>		2,16	7,08	-	1
hidrolizat <sub>kve5</sub>		2,2	7,00	-	5
hidrolizat <sub>kve10</sub>		2,25	6,85	-	10
d-hidrolizat	230	0,7	5,5	-	-
d-hidrolizat <sub>CSL1</sub>		0,82	5,96	1	-
d-hidrolizat <sub>CSL10</sub>		0,55	7,32	10	-
d-hidrolizat <sub>kve1</sub>		1,56	7,09	-	1
d-hidrolizat <sub>kve5</sub>		1,12	6,05	-	5
d-hidrolizat <sub>kve10</sub>		1,46	6,63	-	10

\*d, hidrolizat tretiran aktivnim ugljenom kako bi se uklonili inhibitorni spojevi

Nakon odabira izvora dušika provedeni su uzgoji plijesni *M. indicus* na hidrolizatu otpadne trave dobiven kiselinom predobradom u visokotlačnom bioreaktoru (poglavlje 3.1.4.) s dodatkom 1, 5 ili 10 g L<sup>-1</sup> CSL-a ili kvašćevog ekstrakta (tablica 5). Zatim su uzgoji provedeni na hidrolizatu koji je prethodno tretiran aktivnim ugljenom kako je opisano u poglavlju 3.3.5. uz 1, 5 ili 10 g L<sup>-1</sup> CSL-a ili kvašćevog ekstrakta (tablica 5). Hranjiva podloga za uzgoj u bioreaktoru s miješalom je pripravljena s 5 g L<sup>-1</sup> CSL-a u 1,5 L hidrolizata tretiranog aktivnim ugljenom. pH vrijednost svih podloga je podešena na 5,5 jedinica s natrijevom lužinom ( $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$ ).

## 3.2. UREĐAJI I OPREMA

### 3.2.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) sastoji od: crpke (G7104A 1290 Flexible Pump), injektora (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija 150×7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS).

### 3.2.2. Uređaj za plinsku kromatografiju (GC)

Koncentracije i sastav estera masnih kiselina u biomasi plijesni *M. indicus* DSM 2185 određene su pomoću Shimadzu GC-2010Plus AF sustava (Shimadzu, Kyoto, Japan). Ovaj uređaj se sastojao od automatskog uzorkivača i injektora (AOC-20i), peći s kapilarnom kolonom i plameno-ionizacijskog detektora (FID) i računala s GC Solutions programom za prikupljanje i obradu podataka.

### 3.2.3. Spektrofotometar

Za određivanje optičke gustoće uzoraka tijekom uzgoja i snimanje apsorpcijskog spektra u rasponu valnih duljina od 200 do 900 nm korišten je spektrofotometar Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Optička gustoća uzoraka određena je u staklenim kivetama promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka). Za određivanje apsorpcijskog spektra ekstrahiranih pigmenata tijekom uzgoja korištena je kvarcna kiveta promjera 10 mm istog proizvođača.

### 3.2.4. Centrifuge

Za izdvajanje biomase plijesni korištena je centrifuga Beckmann J-21B, a za izdvajanje bakterijske biomase iz suspenzije korištena je centrifuga Thermo Scientific SL 8R (Thermo Fischer Scientific, SAD; 6500 min<sup>-1</sup>/4°C/ 10 min).

### 3.2.5. Bioreaktor s miješalom

Za uzgoj plijesni *Mucor indicus* korišten je bioreaktor s miješalom korisnog volumena 1,5 L. Hranjiva podloga i bioreaktor sterilizirani su zajedno indirektno pomoću vodene pare. Bioreaktor je staklena posuda dimenzija 15 x 30 cm gdje se miješanje podloge provodi sa zrakom preko prstenaste sapnice promjera 5 cm koja je udaljena 2 cm od dna bioreaktora. Protok kroz prstenastu sapnicu kontrolira se preko aerometra i iznosio je 4 L min<sup>-1</sup>. Bioreaktor je povezan s komandnom pločom (Biostat MD, B. Braun Biotech International, Njemačka) za automatsku regulaciju temperature te pH vrijednosti. Otvori preko kojih se provela inokulacija te iz kojih su se periodično uzimali uzorci za analizu nalaze se na gornjoj podnici bioreaktora zajedno s filterom za aeraciju podloge.

### 3.2.6. Ostali uređaji

Uz potrošnu laboratorijsku opremu, za izradu ovog rada korištena je još i oprema navedena u tablici 6.

**Tablica 6.** Popis uređaja korištenih pri izradi rada

Uređaj	Proizvođač
Tresilica	RM 71 B. Braun Biotech. International, Satorius Group, Njemačka
Sušionik	Instrumenaria ST-50, Hrvatska
Tehnička vaga	Tehnica ET - 1111, Slovenija
Analitička vaga	Shimadzu, AX-200 W/O AC ECTA, Japan
Oprema za filtraciju otopina	Najlonski filteri (0,20 μm, 47 mm; Magna, GE Water & Process Technologies, Michigan, SAD
Magnetska miješalica	Tehnica ET - 1111, Slovenija
Autoklav	Sutjeska, Beograd, Jugoslavija
Hladnjak i zamrzivač	Bosch, Njemačka
pH metar 744	Metrohm, Švicarska

### 3.3. METODE

#### 3.3.1. Uzgoj čiste kulture plijesni *Mucor indicus* DSM 2158

Kultura plijesni *Mucor indicus* uzgojena je na čvrstoj podlozi s agarom. Podloge su pripravljene u Erlenmeyer tikvici volumena 500 mL otapanjem sljedećih spojeva u destiliranoj vodi ( $\text{g L}^{-1}$ ): glukoza, 25; agar, 20; diamonijev fosfat, 2; mesni ekstrakt, 5; diamonijev sulfat, 2. Nakon formiranja spora (3 – 4 dana) kultura je čuvana na 4 °C. Suspenzija spora plijesni dobivena je dodavanjem prethodno pripravljene otopine Tween-a (0,5 – 1 mL Tween-a i 0,9 % NaCl u Erlenmayer tikvici od 250 mL). Nakon dodatka otopine Tween-a 80, spore su ostrugane štapićem po Drigalskom te su precijepljene na novu podlogu.

#### 3.3.2. Uzgoj inokuluma plijesni *Mucor indicus* DSM 2158

S čvrste podloge na kojoj je uzgojena kultura plijesni spore su ostrugane štapićem po Drigalskom nakon dodatka otopine Tween 80. Pipetmanom je dio podloge zajedno sa sporama u aseptičnim uvjetima prenešen u tikvicu s pripravljenom podlogom za uzgoj inokuluma. Podloga za uzgoj inokuluma bila je sljedećeg sastava ( $\text{g L}^{-1}$ ): glukoza, 40; mesni ekstrakt, 5; diamonijev sulfat, 2; diamonijev fosfat, 2. Inokulum je uzgajan na tresilici pri 140 okretaja po minuti, pri temperaturi od 30 °C kroz 2 do 3 dana.

#### 3.3.3. Preliminarni uzgoji *Mucor indicus* na definiranoj podlozi s glukozom i različitim izvorima dušika

Ovi su uzgoji provedeni tako da je 230 mL sterilne definirane podloge s glukozom, pripravljeno na način opisan u poglavlju 3.1.4. naciijepljeno s 20 mL inokuluma plijesni *M. indicus*. Uzgoji su provedeni u Erlenmeyer tikvicama volumena 500 mL. Kao izvor dušika su korišteni diamonijev sulfat, diamonijev fosfat, pepton, CSL i kvašćev ekstrakt. Za svaki izvor dušika su provedeni uzgoji s tri koncentracije izvora dušika, 1, 5 i 10  $\text{g L}^{-1}$  (tablica 4). Ovi su uzgoji provedeni na tresilici uz 140 o  $\text{min}^{-1}$ , na temperaturi 30 °C. Uzgoji su trajali 48 h te je periodično izuziman uzorak iz svake tikvice za analizu UPLC-om.

### 3.3.4. Uzgoji *Mucor indicus* DSM 2158 na hidrolizatu otpadne trave dobivenom kiselinskom predobradom u visokotlačnom bioreaktoru

Uzgoji plijesni *Mucor indicus* DSM 2158 su provedeni u Erlenmeyer tikvicama volumena 500 mL, dok su volumeni podloga bili 230 mL. Za hranjive podloge je u ovom poglavlju korišten hidrolizat otpadne trave čiji je sastav naveden u tablici 1. pH vrijednost podloga je podešena na 5,5 jedinica te su podloge nacijepljene sa po 20 mL inokuluma plijesni pripremljenog na način opisan u poglavlju 3.3.2. Uzgoji su provedeni na tresilici pri brzini okretaja  $140 \text{ o min}^{-1}$  na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ukupno vrijeme trajanja ovih uzgoja je 48 h, a uzorci za analizu UPLC-om su uzeti na samom početku uzgoja te nakon 2, 4, 6, 8, 24 i 48 h uzgoja.

### 3.3.5. Uzgoji *Mucor indicus* DSM 2158 na hidrolizatu otpadne trave prethodno tretiranom aktivnim ugljenom

Hidrolizat otpadne trave je ovaj put prije sterilizacije tretiran aktivnim ugljenom s ciljem detoksifikacije odnosno uklanjanja inhibitornih spojeva. Hidrolizatu iz poglavlja 3.1.1. je dodano  $20 \text{ g L}^{-1}$  aktivnog ugljena te je zatim ostavljen na tresilici pri  $200 \text{ o min}^{-1}$ , na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  kroz 1 h. Hidrolizat s aktivnim ugljenom je potom filtriran pomoću Büchnerovog lijevka te zatim steriliziran, ohlađen i korišten za uzgoj *M. indicus* na način opisan u poglavlju 3.3.4.

### 3.3.6. Uzgoj *Mucor indicus* DSM 2158 u bioreaktoru s miješalom

Za uzgoj plijesni *Mucor indicus* u većem mjerilu korišten je bioreaktor s miješalom iz poglavlja 3.2.5. Kao hranjiva podloga je korišten hidrolizat otpadne trave tretiran aktivnim ugljenom, s ciljem uklanjanja inhibitornih spojeva, uz dodatak  $5 \text{ g L}^{-1}$  CSL-a kao pomoćnim izvorom dušika. Ukupni volumen hranjive podloge bio je 1,5 L, a volumen inokuluma iznosio je 10 % (vol/vol). Uzgoj se provodio 48 h pri  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , u aerobnim uvjetima uz protok zraka od  $2 \text{ L h}^{-1}$  i broj okretaja miješala  $50 \text{ o min}^{-1}$ . Uzorci podloge za analizu UPLC-om su uzimani na početku uzgoja, te nakon 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 26, 28, 30 i 48 h uzgoja.



### 3.3.7. Uzgoj inokuluma *Rhodovulum adriaticum*

Sastav hranjive podloge za inokulum je prethodno opisan u poglavlju 3.1.4. Izvagane mase sastojaka otopljene su u demineraliziranoj vodi, a pH je podešen na između 6,8 i 7,0 dodatkom natrijeva hidroksida. Podloga je sterilizirana u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 minuta, a termosenzibilni sastojci dodani su nakon sterilizacije i hlađenja preko filtera promjera pora 0,2 µm. Uzgoj inokuluma je proveden u mikroaerofilnim uvjetima tijekom 2 do 3 dana pri temperaturi od 30 °C, 2000 luxa ispod obične žarulje, u tikvicama s brušenim čepom.

### 3.3.8. Uzgoj *Rhodovulum adriaticum* na otpadnim podlogama nakon uzgoja *M. indicus*

Kao hranjiva podloga za uzgoj bakterije *R. adriaticum* su korištene otpadne podloge dobivene centrifugiranjem hranjivih podloga nakon uzgoja *M. indicus* DSM 2158. Nakon centrifugiranja, supernatant je odvojen od taloga dekantiranjem te je steriliziran u autoklavu. Nakon hlađenja, podlogama je u aseptičnim uvjetima dodano 10 mL prethodno pripremljene otopine soli i vitamina te 15 mL inokuluma bakterije *Rhodovulum adriaticum* pripremljenog na način opisan u poglavlju 3.3.7. Uzgoji su provedeni na svjetlu jakosti 2000 luxa, na 30 °C u mikroaerofilnim uvjetima u Erlenmeyer tikvicama volumena 500 mL. Uzgoji su trajali 168 h, a svakih 24 h uziman je uzorak za analize.

Uzgoj u većem mjerilu je proveden u bioreaktoru s miješalom iz poglavlja 3.2.5. Nakon uzgoja plijesni *M. indicus* i odvajanja biomase plijesni centrifugiranjem, preostala je otpadna podloga volumena 1 L. Hranjivoj podlozi je dodano 15 mL otopine vitamina, 15 mL otopine elemenata u tragovima, 270 mL destilirane vode te je podloga nacijepljena inokulumom bakterije *Rhodovulum adriaticum* (3.3.7.). Uzgoj je trajao 168 h, a proveden je pri 30 °C, s miješanjem brzine 40 o min<sup>-1</sup>, bez aeracije te sa svjetlošću tri obične žarulje. Uzorci za analiziranje su uzimani u razmacima od 24 h.

### 3.3.9. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti (UPLC)

UPLC metodom analizirani su uzorci izuzimani tijekom procesa uzgoja plijesni *Mucor indicus* DSM 2158 i bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u Erlenmayer tikvicama i u bioreaktoru s miješalom. Prije same analize, uzorci su centrifugirani kako bi se izdvojio supernatant. Nakon toga, supernatant je u omjeru 1:1 (v/v) pomiješan s 10 % - tnom otopinom

ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O kako bi se istaložili proteini. Taloženje se provodilo 10 minuta, a zatim su se istaloženi proteini uklonili ponovnim centrifugiranjem (4000 o min<sup>-1</sup>, 10 min). Naposljetku, supernatant je filtriran u vijalice kroz najlonski filter za šprice promjera pora 0,2 μm (Magna, GE Water & Process Technologies; Michigan, SAD). Ovako pripremljeni uzorci analizirani su tekućinskom kromatografijom (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD; poglavlje 3.2.1.). Za analize je korištena analitička kolona Rezex ROA-Organic Acid H+ (15 cm x 7,2 mm, Phenomenex, SAD), a kao mobilna faza tijekom analize korištena je otopina sumporne kiseline u vodi (0,0025 M), temperatura pećnice iznosila je 60 °C, temperatura RID detektora 40 °C, a injektirano je po 10 μL uzorka uz brzinu protoka mobilne faze od 0,6 mL min<sup>-1</sup>.

### 3.3.10. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase plijesni na kraju uzgoja

Nakon provedenih uzgoja, centrifugiranjem je odvojena biomasa plijesni od prevrele hranjive podloge. Dekantiranjem je odvojena hranjiva podloga (supernatant) od biomase (talog). Supernatant je čuvan u tikvicama za kasniji uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum*, a biomasa je osušena u sušioniku na 50 °C do konačne mase te je koncentracija biomase plijesni na kraju uzgoja izračunata sljedećom formulom:

$$X = \frac{m_1 - m_2}{V} \quad [1]$$

gdje je X koncentracija biomase plijesni na kraju uzgoja, m<sub>1</sub> je masa biomase prije sušenja, m<sub>2</sub> je masa biomase nakon sušenja, a V je volumen hranjive podloge.

### 3.3.11. Određivanje koncentracije i sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom s plameno-ionizacijskom detekcijom

Nakon odvajanja biomase plijesni od hranjivih podloga centrifugiranjem, biomase plijesni su osušene u sušioniku do konstantne mase. Zatim su sastav i koncentracija masnih kiselina u biomasi plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 određeni metodom plinske kromatografije s plameno-ionizacijskom detekcijom (GC-FID). Prije analize uzoraka GC-FID metodom provedena je transesterifikacija masnih kiselina u metilne estere i zatim ekstrakcija u odgovarajuće otapalo, u ovom slučaju je to bio heksan.

Transesterifikacija masnih kiselina u metilne estere provodila se prema NREL protokolu (Van Wychen i Laurens, 2013). Izvagano je 10 mg biomase plijesni *M. indicus* DSM 2185 koja

se potom premješta u staklene kivete volumena 10 mL osušene u eksikatoru preko noći. U kivetu je zatim dodano 20  $\mu\text{L}$  metil tridekanoata ( $\text{C}_{13}:\text{OME} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ; interni standard 1), 200  $\mu\text{L}$  otopine kloroform:metanol (2:1, v/v) i 300  $\mu\text{L}$  0,6 M otopine HCl:metanola. Sadržaj kivete izmiješan je na vibro-mješaču, a nakon toga stavljen u vodenu kupelj na 85 °C kroz 1 sat kako bi se provela transesterifikacija masnih kiselina prisutnih u uzorku biomase. Nakon termostatiranja u vodenoj kupelji kivete su ohlađene na sobnu temperaturu nakon čega je u ohlađeni uzorak dodan 1 mL heksana. Zatim je sadržaj kivete izmiješan na vibro-mješaču kako bi se provela ekstrakcija nastalih estera u heksansku fazu i ostavljen 1 sat na sobnoj temperaturi da se razdvoje faze. Gornji heksanski sloj nakon izdvajanja se prema potrebi može razrijediti dodatkom heksana, u ovom slučaju heksanski je sloj razrijeđen tri puta dodavanjem 200  $\mu\text{L}$  heksanske faze u 400  $\mu\text{L}$  heksana. Volumen od 200  $\mu\text{L}$  razrijeđenja heksanske faze otpipetiran je u vialu za plinsku kromatografiju u koju je dodano 5  $\mu\text{L}$  pentadekana ( $\gamma = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ; interni standard 2) i viala je zatvorena s PTFE/silikonskim čepom. Ovako pripremljeni uzorak korišten je za analizu estera masnih kiselina na plinskom kromatografu s plameno-ionizacijskim detektorom.

GC-FID analiza provedena je na plinskom kromatografu GC-2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan; Poglavlje 3.2.2.). Uvjeti/parametri metode pri kojima je provedena analiza sastava estera masnih kiselina prikazana je u tablici 7. Identifikacija i kvantifikacija estera masnih kiselina provedena je usporedbom s retencijskim vremenima i baždarnim dijagramima određenim za metilne estere standardne smjese 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 - C24, Supelco) prema uvjetima navedenim u tablici 7. Sastav metilnih estera masnih kiselina izražen je masenim udjelom (%) pojedine masne kiseline u uzorku.

**Tablica 7.** Parametri GC-FID metode za određivanje sastava i koncentracije estera masnih kiselina

Parametar	Uvjeti
Kolona	ZB-FAME (Zebron), 30 m x 0,25 mm, d <sub>f</sub> 0,20 μm
Detektor	FID
Plin nosač/ protok	Helij / 1,2 mL min <sup>-1</sup>
Temperaturni program	100 °C, 4 min 10 °C / min → 140 °C 3 °C / min → 190 °C 30 °C / min do 260 °C 260 °C, 2 min
Temperatura injektora	250 °C
Temperatura detektora	260 °C
Koeficijent razdjeljenja	1:15
Volumen injektiranja	2 μL

Izračun ukupnih masnih kiselina provodi se prema formuli:

$$\text{Ukupni lipidi}_{c13 \text{ normal}} = \sum_{C4-C24} \frac{FAME \text{ } ci}{FAME \text{ } c13} \times c \text{ dodanog FAME c13} \quad [2]$$

Izračun ukupnih masnih kiselina kao postotka na suhu tvar biomase uzetog za transesterifikaciju:

$$\% \text{ ukupni FAME} = \frac{\text{ukupni FAME c13 normal}}{\text{masa suhe tvari uzorka}} \times 100 \quad [3]$$

### 3.3.12. Određivanje optičke gustoće hranjive podloge tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum*

Tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, mjerena je apsorbancija svjetlosti uzoraka hranjivih podloga u području valnih duljina (λ) od 350 do 900 nm spektrofotometrom iz Poglavlja 3.2.3. Prirast biomase bakterije praćen je pri valnoj duljini od 660 nm. Uzorci su prije analize dobro homogenizirani, a za mjerenja su korištene kvarcne kivete promjera 10 mm.

### 3.3.13. Ekstrakcija ukupnih pigmenata i spektrofotometrijsko određivanje bakterioklorofila *a*

Ekstrakcija ukupnih pigmenata sintetiziranih tijekom uzgoja provedena je sa smjesom organskih otapala uz mehaničku dezintergaciju stanica pomoću staklenih kuglica. Volumen uzorka za ekstrakciju pigmenata tijekom mikroaerofilnih uzgoja na svjetlu bio je 5 mL, odnosno 20 mL kod uzgoja u bioreaktoru s miješalom u aerobnim uvjetima. Uzorak je centrifugiran 10 minuta pri 8000 rpm. Supernatant je dekantiran, a preostala biomasa se koristila za ekstrakciju i određivanje ukupnih pigmenata. Biomasi je dodano 4 g staklenih kuglica i 4 mL smjese acetona i etanola u omjeru 7:2 (v/v). Biomasa s kuglicama za dezintergaciju stanica se zatim tri puta naizmjenično podvrgavala intenzivnom miješanju u trajanju od 2 minute te hlađenju u ledu, također 2 minute. U svrhu sprječavanja raspada fotosenzibilnih pigmenata uslijed izlaganja svjetlosti, postupak ekstrakcije je proveden u mraku, a kivete su bile zaštićene aluminijskom folijom. Nakon provedene ekstrakcije, uzorak je centrifugiran 10 minuta pri 8000 rpm. Spektrofotometrijsko određivanje bakterioklorofila *a* u supernatantu nakon ekstrakcije odrađeno je u kvarcnoj kiveti skeniranjem u području valnih duljina od 350 do 900 nm. Koncentracija ukupnih pigmenata izračunata je prema izrazu za ekstrakciju primjenom smjese otapala etanol/acetone (Ritchie, 2018):

$$P=0,348209(A_{648}-A_{850})-0,16583(A_{665}-A_{850})+12,11114(A_{775}-A_{850}) [mg L^{-1}] [4]$$

### 3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI UZGOJA

Za izračunavanje pokazatelja uspješnosti biotehnološkog procesa korištene su sljedeće jednadžbe:

Potrošnja supstrata ( $\Delta S$ )

$$\Delta S = S_0 - S \quad [\text{gL}^{-1}] \quad [5]$$

$S_0$  - koncentracija supstrata na početku uzgoja

$S$  - koncentracija supstrata na kraju uzgoja

Prinos etanola ( $Y_{Et}$ )

$$Y_{Et} = Et - Et_0 \quad [\text{gL}^{-1}] \quad [6]$$

$Et_0$  - koncentracija etanola na početku uzgoja

$Et$  - koncentracija etanola na kraju uzgoja

Koeficijent konverzije supstrata u etanol ( $Y_{Et/S}$ )

$$Y_{Et/S} = \frac{Et - Et_0}{S_0 - S} \quad [\text{gg}^{-1}] \quad [7]$$

Produktivnost proizvodnje etanola ( $Pr_{Et}$ )

$$Pr_{Et} = \frac{Y_{Et}}{t_u} \quad [\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}] \quad [8]$$

$t_u$  - ukupno vrijeme trajanja uzgoja

Specifična brzina potrošnje supstrata ( $r_S$ ;  $\text{h}^{-1}$ ), specifična brzina rasta ( $\mu$ ;  $\text{h}^{-1}$ ) i specifična brzina sinteze produkta ( $r_P$ ;  $\text{h}^{-1}$ ), određene su kao reakcije prvog reda (Marđetko i sur., 2018) iz eksperimentalnih podataka. Dobiveni podaci su linearizirani prema jednadžbama:

$$\ln S = \ln S_0 + r_S \cdot t \quad [9]$$

$$\ln P = \ln P_0 + r_P \cdot t \quad [10]$$

te su  $r_S$  i  $r_P$  određene kao koeficijent smjera pravca linearizirane regresijske funkcije.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Biorafinerijski pristup omogućava proizvodnju više različitih proizvoda iz jedne vrste sirovine kombinirajući kemijske i biološke metode u relativno kratkom vremenu s pomoću jednog ili više vrsta mikroorganizama (Rajak i sur., 2020). U ovom radu upotrijebljen je biorafinerijski pristup obradi otpadne lignocelulozne sirovine – otpadne trave s ciljem dobivanja više različitih proizvoda (etanola, masnih kiselina i pigmenata). U preliminarnim eksperimentima proveden je uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 u podlozi s glukozom i različitim izvorima dušika (anorganske soli i CSL) s ciljem odabira najpogodnijeg izvora dušika te kako bi se pronašla zadovoljavajuća alternativa za relativno skup izvor dušika – kvašćev ekstrakt. Zatim su provedeni uzgoji na kiselinski predobrađenom hidrolizatu otpadne trave sa i bez dodatka izvora dušika s ciljem dobivanja proizvoda poput etanola i masnih kiselina. Podloge dobivene nakon uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 (u daljnjem tekstu otpadne podloge) korištena su kao hranjiva podloga za proizvodnju biomase i pigmenata bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781. Naime, bakterije iz roda *Rhodovulum* mogu se koristiti za obradu otpadnih voda, te za proizvodnju nekih industrijskih važnih kemikalija i pigmenata (Numan i sur., 2018).

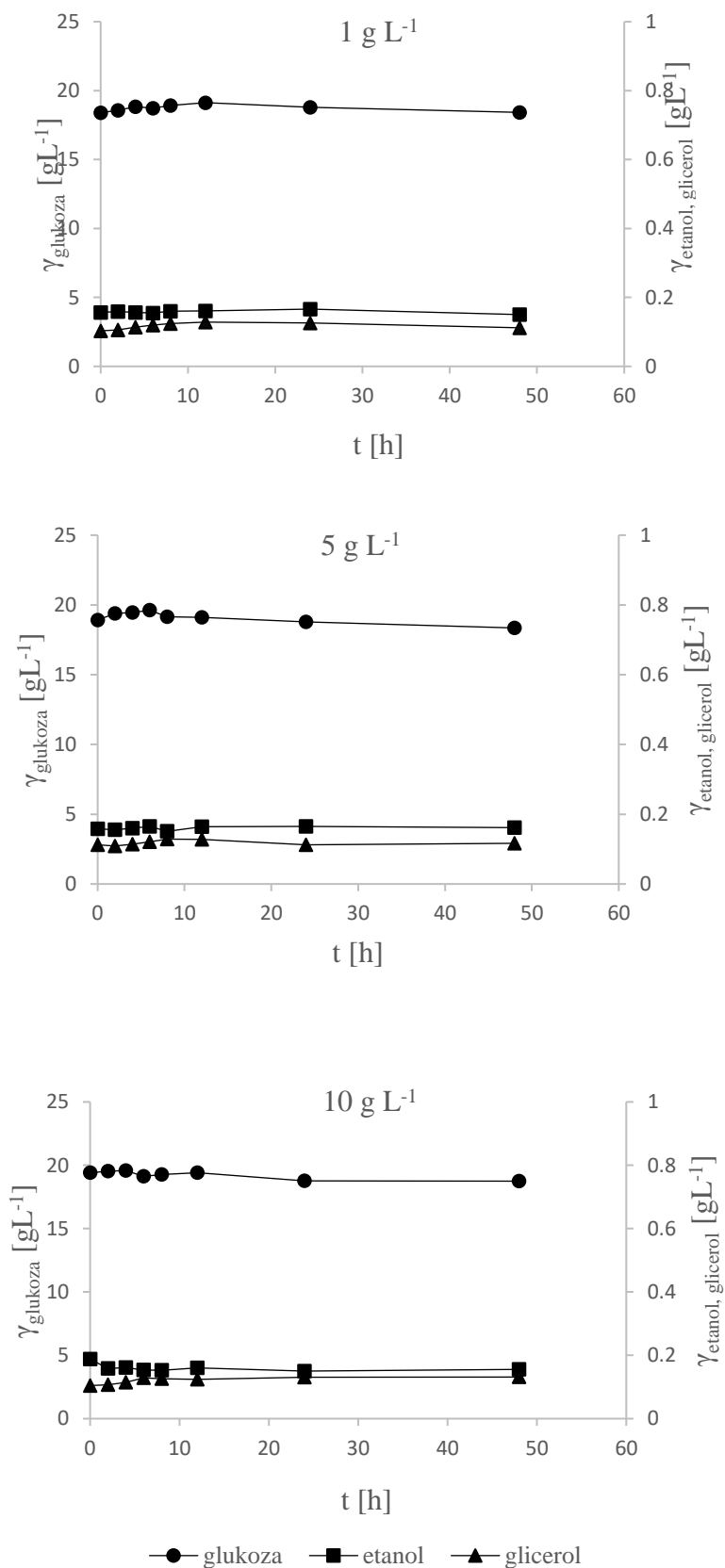
Rezultati ovog rada podijeljeni su u sljedeća poglavlja:

- 4.1. Određivanje utjecaja različitih izvora dušika na rast i proizvodnju metabolita s pomoću plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 u podlozi s glukozom
- 4.2. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na hidrolizatu otpadne trave dobivenom kiselinskom predobrađom u visokotlačnom bioreaktoru
  - 4.2.1. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na hidrolizatu otpadne trave
  - 4.2.2. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na detoksificiranom hidrolizatu otpadne trave
  - 4.2.3. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 u reaktoru s miješalom na detoksificiranom hidrolizatu otpadne trave
- 4.3. Analiza sastava masnih kiselina u biomasi plijesni *Mucor indicus* DSM 2185
- 4.4. Uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na različitim otpadnim podlogama
  - 4.4.1. Uzgoj na otpadnoj podlozi bez dodatka izvora dušika
  - 4.4.2. Uzgoj na otpadnoj podlozi s dodatkom CSL-a
  - 4.4.3. Uzgoj na otpadnoj podlozi s dodatkom kvašćevog ekstrakta
  - 4.4.4. Uzgoj na otpadnoj podlozi s CSL-om u bioreaktoru s miješalom

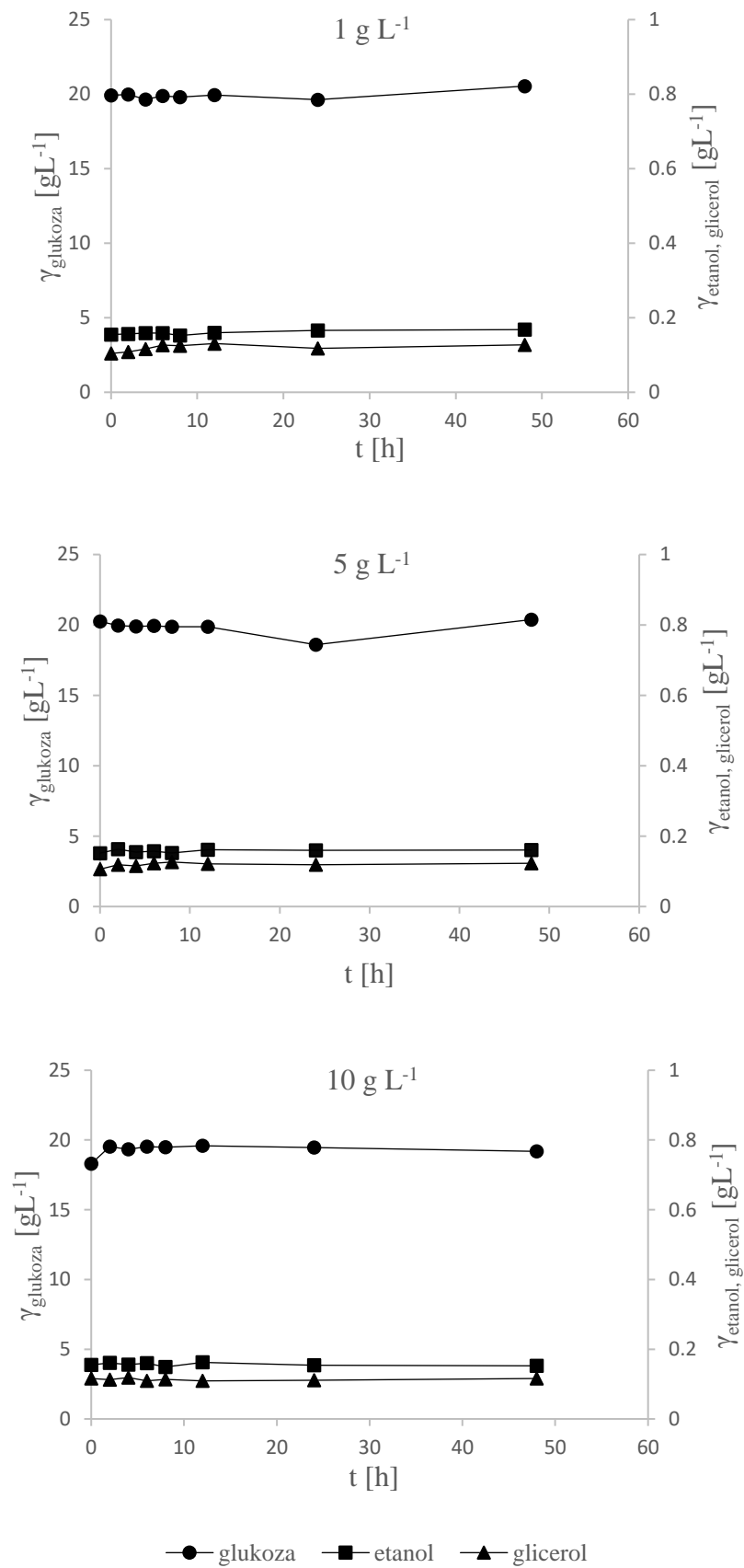
#### 4.1. ODREĐIVANJE UTJECAJA RAZLIČITIH IZVORA DUŠIKA NA RAST I PROIZVODNJU METABOLITA S POMOĆU PLIJESNI *Mucor indicus* U PODLOZI S GLUKOZOM

Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 proveden je u podlozi s glukozom i različitim izvorima dušika. Ispitani su utjecaji diamonijevog fosfata ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), diamonijevog sulfata ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), CSL-a, peptona i kvašćevog ekstrakta na rast biomase plijesni *M. indicus* DSM 2158 i proizvodnju etanola. Koncentracija izvora dušika u korištenim podlogama iznosila je 1, 5 ili 10 g L<sup>-1</sup> (tablica 4). Uzgoji su provedeni u Erlenmayer tikvicama volumena 500 mL, na tresilici pri 140 o min<sup>-1</sup> te temperaturi uzgoja od 30 °C. Rezultati provedenih uzgoja su prikazani na slikama 1 – 5, a izračunati procesni parametri u tablici 8.

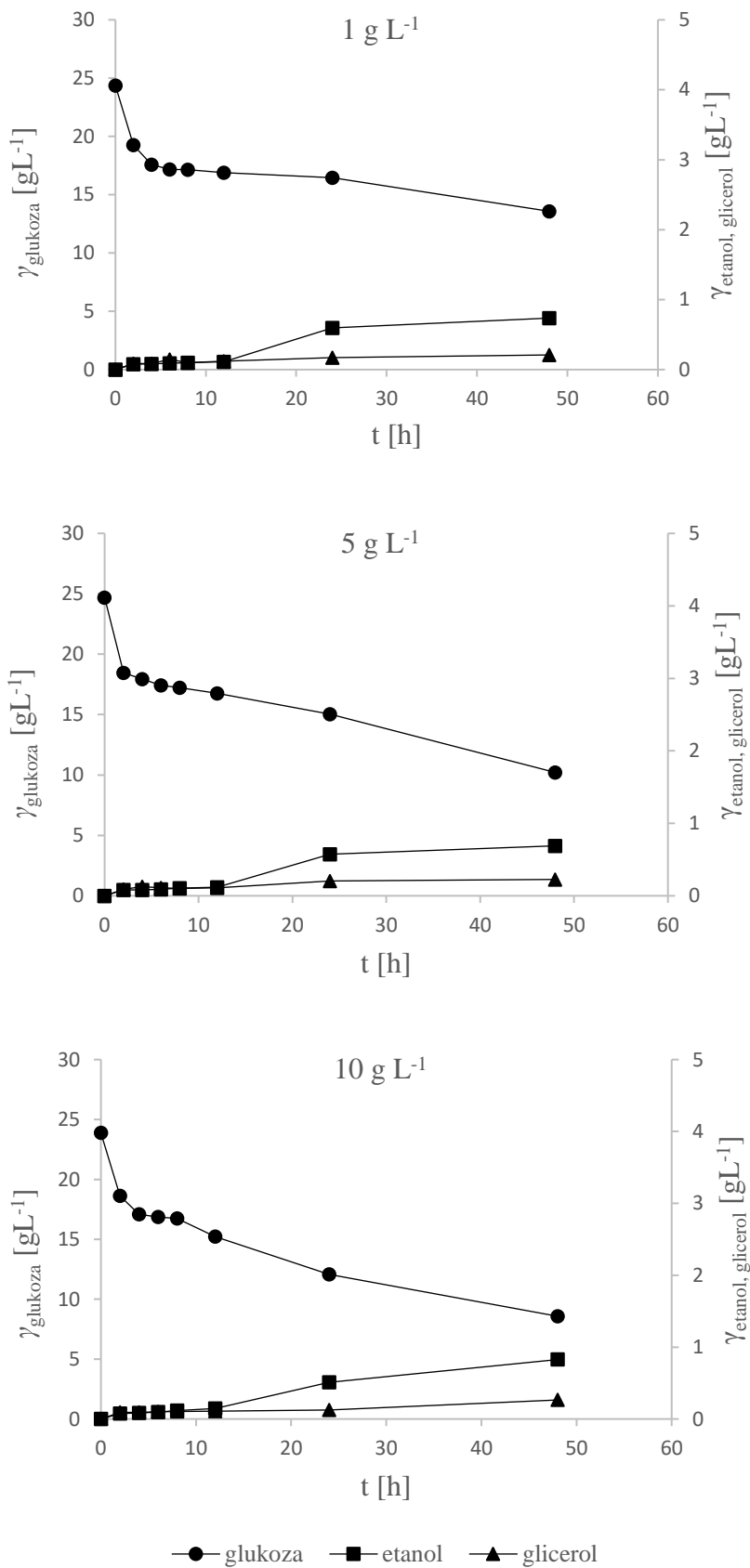




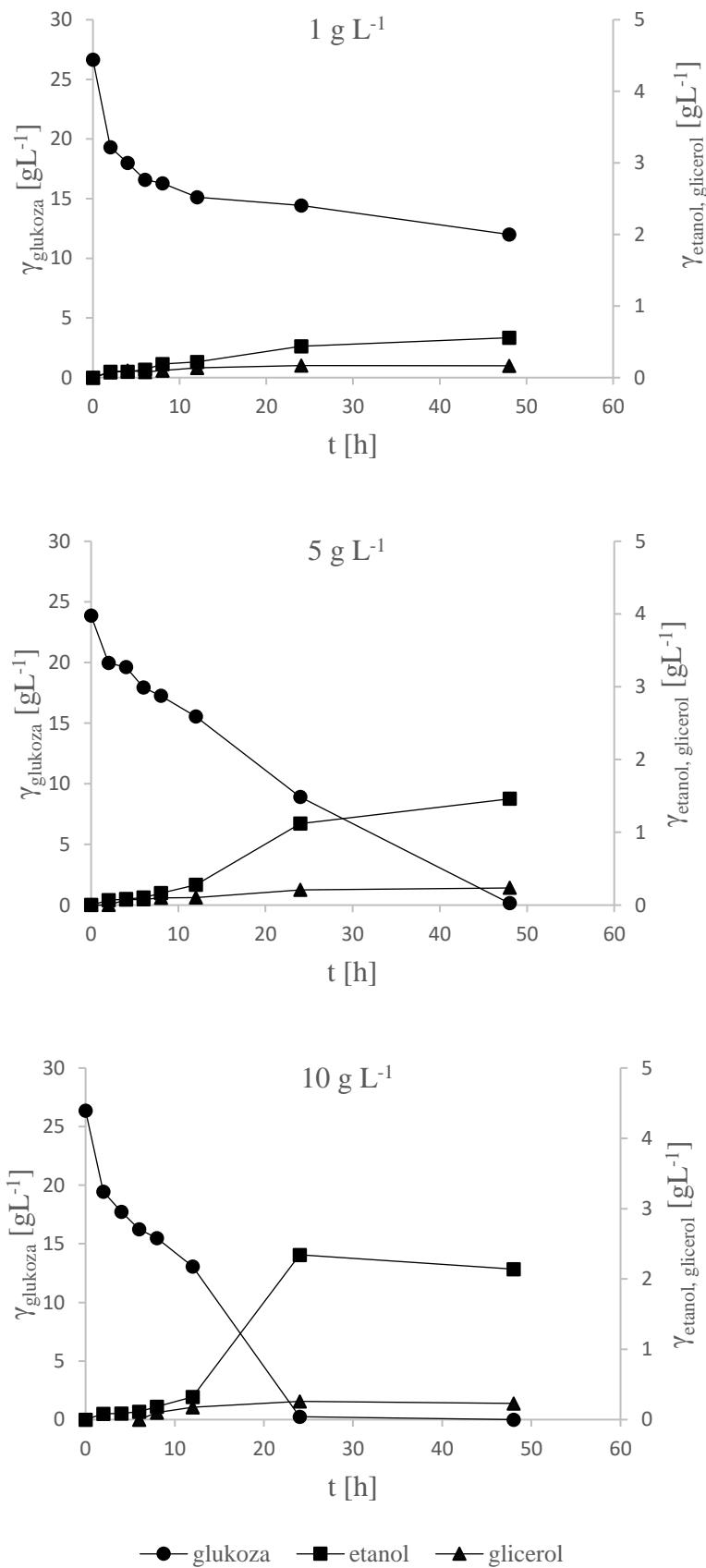
**Slika 1.** Promjena koncentracija glukoze, etanola i glicerola tijekom uzgoja *M. indicus* u podlozi s diamonijevim sulfatom (koncentracije DAS-a: 1, 5 i 10 g L<sup>-1</sup>)



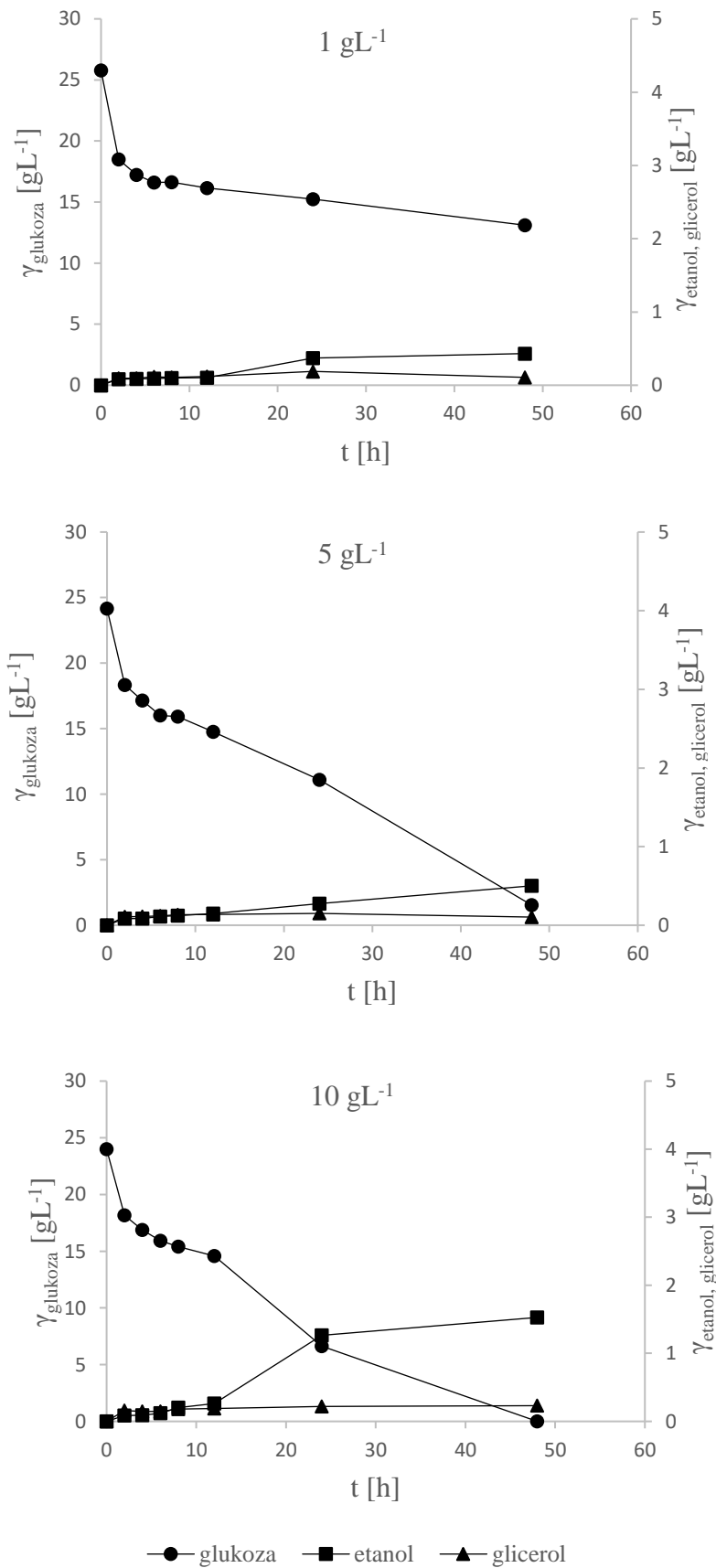
**Slika 2.** Promjena koncentracija glukoze, etanola i glicerola tijekom uzgoja *M. indicus* u podlozi s diamonijevim fosfatom (koncentracije DAP-a: 1, 5 i 10 g L<sup>-1</sup>)



**Slika 3.** Promjena koncentracija glukoze, etanola i glicerola tijekom uzgoja *M. indicus* u podlozi s peptonom (koncentracije 1, 5 i 10 g L<sup>-1</sup>)



**Slika 4.** Promjena koncentracija glukoze, etanola i glicerola tijekom uzgoja *M. indicus* u podlozi s CSL-om (koncentracije 1, 5 i 10 g L<sup>-1</sup>)



**Slika 5.** Promjena koncentracija glukoze, etanola i glicerola tijekom uzgoja *M. indicus* u podlozi s kvašćevim ekstraktom (koncentracije 1, 5 i 10 g L<sup>-1</sup>)

U podlogama s amonijevim solima kao jedinim izvorom dušika nije zamijećen rast plijesni *M. indicus* DSM 2185 niti proizvodnja etanola (slike 1 i 2), te se može zaključiti kako ove soli u koncentracijama od 1 do 10 g L<sup>-1</sup> nisu dobar izvor dušika za rast *M. indicus*. Ovakvi rezultati nisu u skladu s dostupnom literaturom. Naime, Sharifyazad i Karimi (2017) proveli su uzgoj *M. indicus* u podlozi s amonijevim sulfatom kao jedinim izvorom dušika, te je proizveden etanol s koeficijentom konverzije glukoze u etanol od 0,2 – 0,4 g g<sup>-1</sup> već pri koncentraciji amonijevog sulfata od 1 g L<sup>-1</sup>. Navedene podloge su osim glukoze i amonijeva sulfata sadržavale i druge soli poput kalcijevog klorida, magnezijevog sulfata heptahidrata i kalij dihidrogen fosfata. Ostale soli koje se dodaju u podlogu kao izvor fosfata i minerala utječu na aktivnost stanica ove plijesni.

Kada se kao izvor dušika koristi kompleksni izvori kao što je hidrolizat kazeina – pepton (slika 3) ovisno o koncentraciji peptona u podlozi dolazi do djelomičnog utroška glukoze i proizvodnje etanola i glicerola. Povećanje koncentracije peptona u podlozi rezultiralo je i višim prinosima etanola, točnije, za uzgoj s 1 g L<sup>-1</sup> prinos etanola je 0,736 g L<sup>-1</sup> a produktivnost 0,015 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, a za uzgoj s 10 g L<sup>-1</sup> prinos etanola je 0,827 g L<sup>-1</sup> a produktivnost 0,017 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (tablica 8).

Nadalje, uzgoji plijesni *M. indicus* DSM 2185 provedeni su u podlogama s CSL-om i kvašćevim ekstraktom. Kvašćev ekstrakt i CSL predstavljaju izvor dušika i ostalih hranjivih tvari, te je stoga u ovim podlogama utrošena gotovo sva glukoza iz podloge, te su postignuti veći prinosi etanola. Najveći prinos etanola kod uzgoja s kvašćevim ekstraktom postignut je s koncentracijom kvašćevog ekstrakta od 10 g L<sup>-1</sup>, a iznosio je 1,527 g L<sup>-1</sup> s produktivnosti procesa od 0,031 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Tijekom ovog uzgoja, utrošena je gotovo sva glukoza iz podloge, te je njezina vrijednost nakon 24 h iznosila 0,25 g L<sup>-1</sup>, a istovremeno je izmjerena i najviša koncentracija etanola od 2,34 g L<sup>-1</sup>. U podlogama u koje je dodan svega 1 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta ili CSL-a nije utrošena sva glukoza iz podloge niti nakon 48 sati uzgoja, dok je u podlogama s 5 ili 10 g L<sup>-1</sup> dodanog izvora dušika gotovo potpuno iscrpljena glukoza iz podloge.

U radu Alavijeh i sur. (2019) autori izvještavaju o sličnim rezultatima uzgoja na definiranoj podlozi s glukozom te kvašćevim ekstraktom i amonijevim sulfatom kao izvorima dušika. Naime, uspješno je proizvedeno 0,46 g etanola po gramu glukoze uz slične uvjete uzgoja (temperatura, miješanje) koji su korišteni u ovom radu. Mogući uzrok neuspješnih uzgoja u ovom radu je nedostatak pomoćnih tvari poput KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O te CaCl<sub>2</sub> koje su korištene tijekom uzgoja u oba navedena rada.

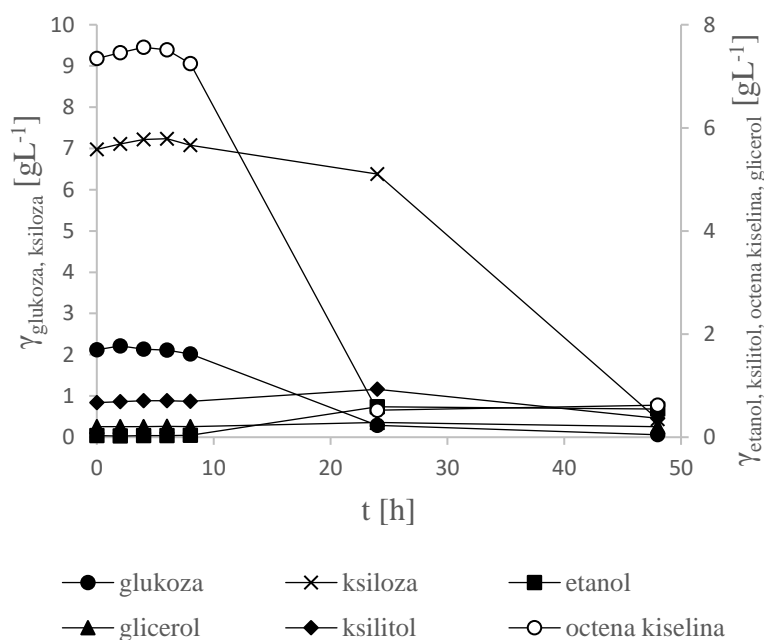
**Tablica 8.** Parametri uspješnosti procesa određeni tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2158 u podlozi s glukozom i različitim izvorima dušika

	$\gamma_{\text{izvor N}}$ [g L <sup>-1</sup> ]	$\gamma_X$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_{\text{etanol}}$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_{\text{Et/S}}$ [gg <sup>-1</sup> ]	$Pr$ [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$q_s$ [h <sup>-1</sup> ]	$q_P$ [h <sup>-1</sup> ]
DAS	1	0,21	0	0	0	0	0
	5	0,28	0	0	0	0	0
	10	0,26	0	0	0	0	0
DAP	1	0,24	0	0	0	0	0
	5	0,23	0	0	0	0	0
	10	0,22	0	0	0	0	0
Pepton	1	0,90	0,736	0,068	0,015	0,008	0,056
	5	2,00	0,69	0,048	0,014	0,014	0,053
	10	3,03	0,827	0,054	0,017	0,018	0,056
CSL	1	1,60	0,558	0,038	0,012	0,012	0,042
	5	2,64	1,46	0,061	0,030	0,100	0,070
	10	3,79	2,139	0,081	0,044	0,186	0,078
Kv. ekstrakt	1	1,02	0,432	0,034	0,009	0,009	0,040
	5	2,40	0,501	0,022	0,01	0,052	0,039
	10	3,82	1,527	0,064	0,031	0,048	0,067

## 4.2. UZGOJ PLIJESNI *Mucor indicus* DSM 2185 NA HIDROLIZATU OTPADNE TRAVE DOBIVENOM KISELINSKOM PREDOBRAĐOM U VISOKOTLAČNOM BIOREAKTORU

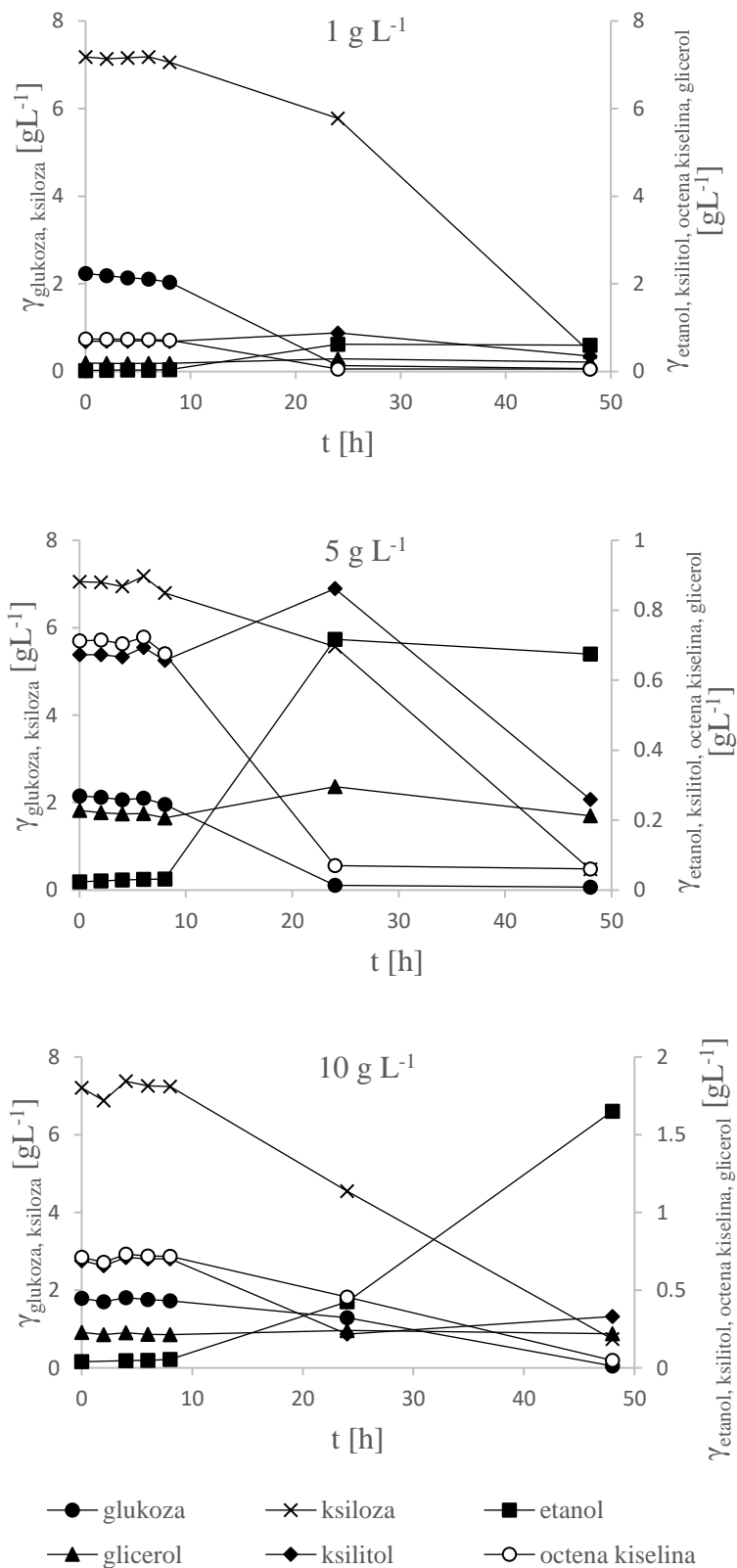
### 4.2.1. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na hidrolizatu otpadne trave

Nakon uzgoja *M. indicus* na podlogama s glukozom i različitim izvorima dušika, provedeni su uzgoji na hidrolizatu otpadne trave dobivenom kiselinskom predobrađom u visokotlačnom bioreaktoru (180°C/10 min/0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Sastav hidrolizata prikazan je u tablici 2, a sastav podloga u tablici 5. Glavni izvor ugljika u ovoj podlozi bila je ksiloza čija je početna koncentracija u hidrolizatu iznosila oko 7 g L<sup>-1</sup>. Uzgoji su provedeni u Erlenmayer tikvicama volumena 500 mL, na tresilici pri 140 o min<sup>-1</sup> te temperaturi uzgoja od 30 °C. Uzgoji su provedeni na hidrolizatu bez dodanog izvora dušika (slika 6), zatim s CSL-om (slika 7) i kvašćevim ekstraktom (slika 8), a izračunati procesni parametri prikazani su u tablici 9.

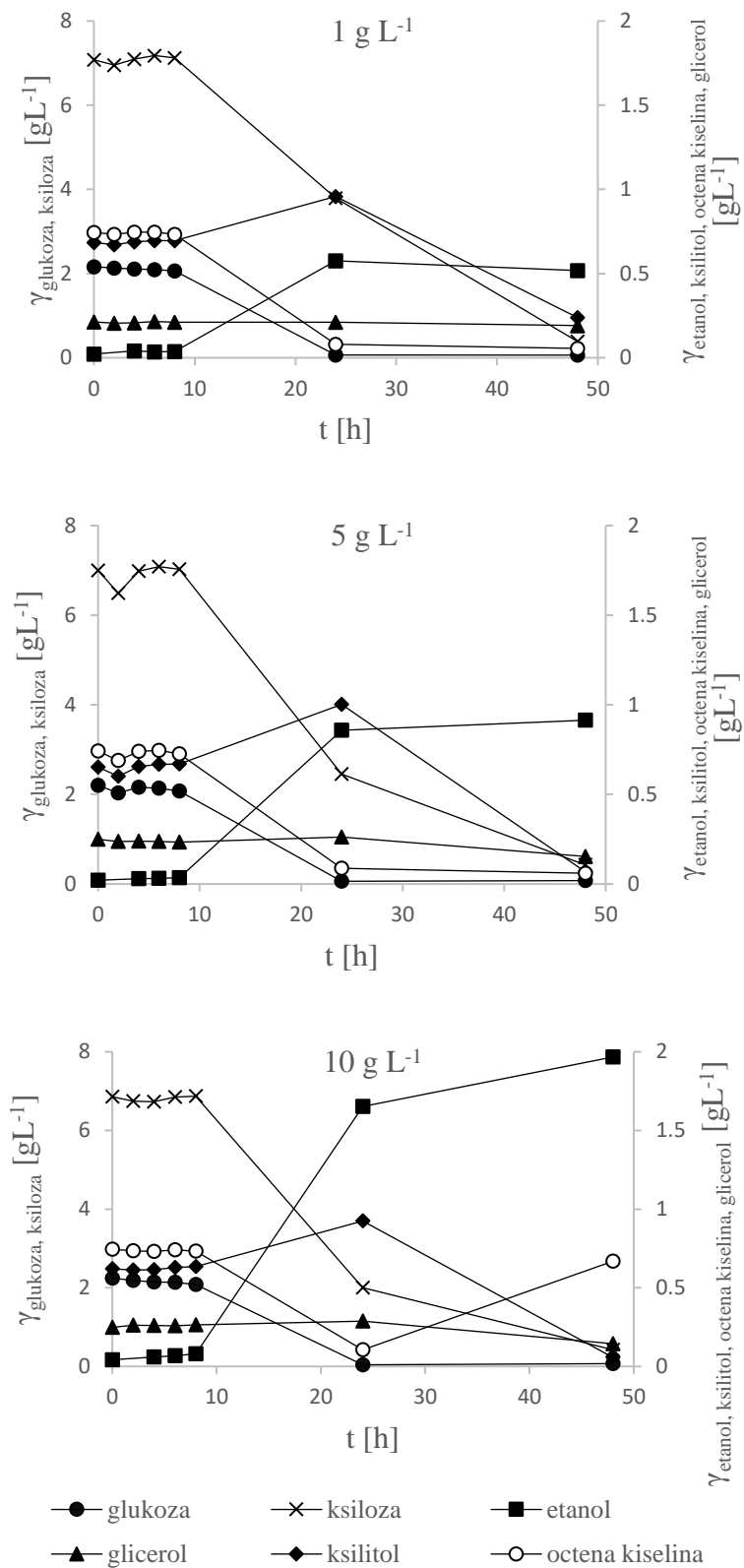


**Slika 6.** Promjena koncentracija glukoze, ksiloze, etanola, glicerola, ksilitola i octene kiseline tijekom uzgoja *M. indicus* na hidrolizatu otpadne trave bez dodanog izvora dušika





**Slika 7.** Promjena koncentracija glukoze, etanola, glicerola, ksilitola, octene kiseline i ksiloze tijekom uzgoja *M. indicus* na hidrolizatu otpadne trave uz dodatak CSL-a



**Slika 8.** Promjena koncentracija glukoze, etanola, glicerola, ksilitola, octene kiseline i ksiloze tijekom uzgoja *M. indicus* na hidrolizatu otpadne trave uz dodatak kvašćevog ekstrakta

**Tablica 9.** Parametri uspješnosti uzgoja plijesni *M. indicus* na hidrolizatu otpadne trave, dobivenom kiselinskom predobradom u visokotlačnom bioreaktoru, s dodanim izvorom dušika

	$\gamma$ [g L <sup>-1</sup> ]	$\gamma_x$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_{\text{etanol}}$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_{\text{Et/S}}$ [g g <sup>-1</sup> ]	$Pr$ [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$q_s$ [h <sup>-1</sup> ]	$q_p$ [h <sup>-1</sup> ]
Bez izvora N	0	3,50	0,52	0,061	0,011	0,0589	0,0756
CSL	1	3,28	0,581	0,065	0,012	0,0592	0,0766
	5	4,05	0,651	0,075	0,014	0,0579	0,0824
	10	3,48	1,612	0,196	0,034	0,0498	0,0843
Kv. ekstrakt	1	3,58	0,496	0,056	0,010	0,0641	0,0723
	5	3,84	0,893	0,103	0,019	0,0641	0,0891
	10	3,89	1,925	0,224	0,040	0,0654	0,0896

Plijesan *M. indicus* DSM 2158 može rasti na kompleksnoj sirovini - hidrolizatu otpadne trave bez dodatka izvora dušika. Ova plijesan prvo iscrpljuje glukozu iz podloge, a zatim i ksilozu. Nakon 24 sata glukoza je u gotovo u potpunosti iscrpljena iz podloge ( $\approx 0,29$  g L<sup>-1</sup>), a nakon 48 h bioprocasa i ksiloza je gotovo utrošena iz podloge. Tijekom provedenih uzgoja koncentracije biomase je određena samo na kraju procesa zbog načina rasta mikroorganizma u obliku micelija i nemogućnosti uzimanja homogenog uzorka biomase tijekom uzgoja. Na kraju ovog procesa određena je koncentracija biomase od 3,50 g L<sup>-1</sup> (tablica 9), dok je koncentracija proizvedenog etanola bila vrlo niska i iznosila je 0,52 g L<sup>-1</sup>.

Kao što je slučaj kod uzgoja ove plijesni na definiranim podlogama s glukozom i određenim izvorom dušika iz poglavlja 4.1., povećanje koncentracije izvora dušika (CSL-a ili kvašćevog ekstrakta) rezultiralo je većim prinosom etanola, a samim time i većom produktivnosti procesa proizvodnje etanola. Tako su najviši prinosi etanola ostvareni prilikom uzgoja s koncentracijom izvora dušika od 10 g L<sup>-1</sup>, za uzgoj proveden s CSL-om prinos iznosi 1,612 g L<sup>-1</sup> s produktivnošću uzgoja od 0,034 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, a za uzgoj s kvašćevim ekstraktom prinos je 1,925 g L<sup>-1</sup> s produktivnošću od 0,040 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Ako se ovi rezultati usporede s rezultatima rada Alavijeh i sur. (2019), može se zaključiti da je moguća bolja optimizacija uvjeta uzgoja korištenih u ovom radu, jer su u radu iz 2019. pokazani prinosi etanola i do 0,38 g po gramu utrošenog šećera što je gotovo 10 puta više proizvedenog etanola nego tijekom uzgoja u ovom radu, a kao sirovina je korištena isto lignocelulozna sirovina (kukuruzovina) obrađena kiselinskom i enzimskom predobradom. Razlog ove velike razlike u količinama

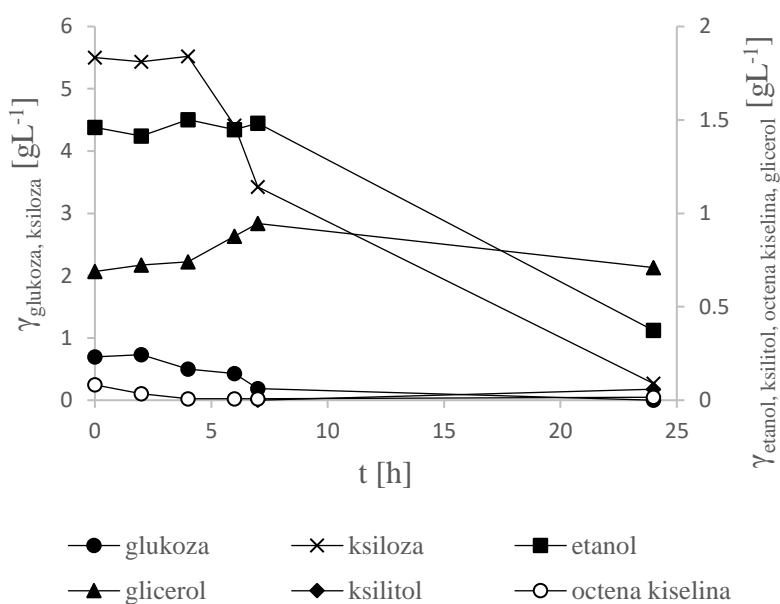
proizvedenog etanola može biti sastav početne sirovine, ali i uspješnost hidrolize početne lignocelulozne sirovine. Naime, hidrolizati otpadne trave korišteni u ovom radu su imali početne koncentracije šećera od 1,8 – 2,2 g L<sup>-1</sup> glukoze, odnosno 6,8 – 7,2 g L<sup>-1</sup> ksiloze, dok je koncentracija glukoze u hidrolizatima kukuruzovine iz rada Alavijeh i sur. (2019) iznosila 49,5 g L<sup>-1</sup>. Proizvodnja etanola u tom radu je provedena u anaerobnim uvjetima, u tikvicama s gumenim i aluminijskim čepovima, a u ovom su radu korišteni pamučni čepovi odnosno uzgoji su provedeni u aerobnim uvjetima. U aerobnim uvjetima je kisik zadnji akceptor elektrona u metabolizmu šećera što znači da stanice proizvode manje etanola, a više se izvora ugljika troši na izgradnju staničnih sastojaka, pa je to još jedan mogući razlog slabije proizvodnje etanola. U literaturi postoji još primjera uspješnije proizvodnje etanola s pomoću plijesni *Mucor indicus* na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina poput rada Satari i sur. (2015) koji su u aerobnim uvjetima uspješno proizveli etanol na hidrolizatima rižine slame (0,37 g g<sup>-1</sup>), brjestovine (0,33 g g<sup>-1</sup>) te borovine (0,25 g g<sup>-1</sup>) ili poput uzgoja Sues i sur. (2005) koji su plijesan *M. indicus* uzgajali na hidrolizatima šumskog drvnog otpada koji su velikim dijelom činili otpaci smreke te su proizveli 0,42 g etanola po gramu asimiliranog šećera iz hranjive podloge.

Usporedbom ovih rezultata, s rezultatima uzgoja iz poglavlja 4.1., vidi se da je uzgoj s CSL-om bio nešto bolji na definiranoj podlozi s glukozom jer se uzgojem u podlozi s glukozom uz dodatak 10 g L<sup>-1</sup> CSL-a, dobije 0,5 g L<sup>-1</sup> više etanola. Kod uzgoja s kvašćevim ekstraktom nije takav slučaj, jer uzgojem s kvašćevim ekstraktom dobiveno je 0,4 g L<sup>-1</sup> više etanola kada je uzgoj proveden na hidrolizatu otpadne trave nakon kiselinske predobrade.

Plijesan tijekom svih ovih uzgoja primarno koristi glukozu za rast i proizvodnju etanola i drugih metabolita. Tijekom prvih 24 sata uzgoja, koncentracija glukoze padne na minimalnu koncentraciju i postigne se maksimalna koncentracija etanola osim kod uzgoja gdje je korišteno 10 g L<sup>-1</sup> CSL-a ili kvašćevog ekstrakta gdje je najveća koncentracija etanola postignuta nakon 48 sati uzgoja odnosno nakon što je potrošena i ksiloza iz podloge.

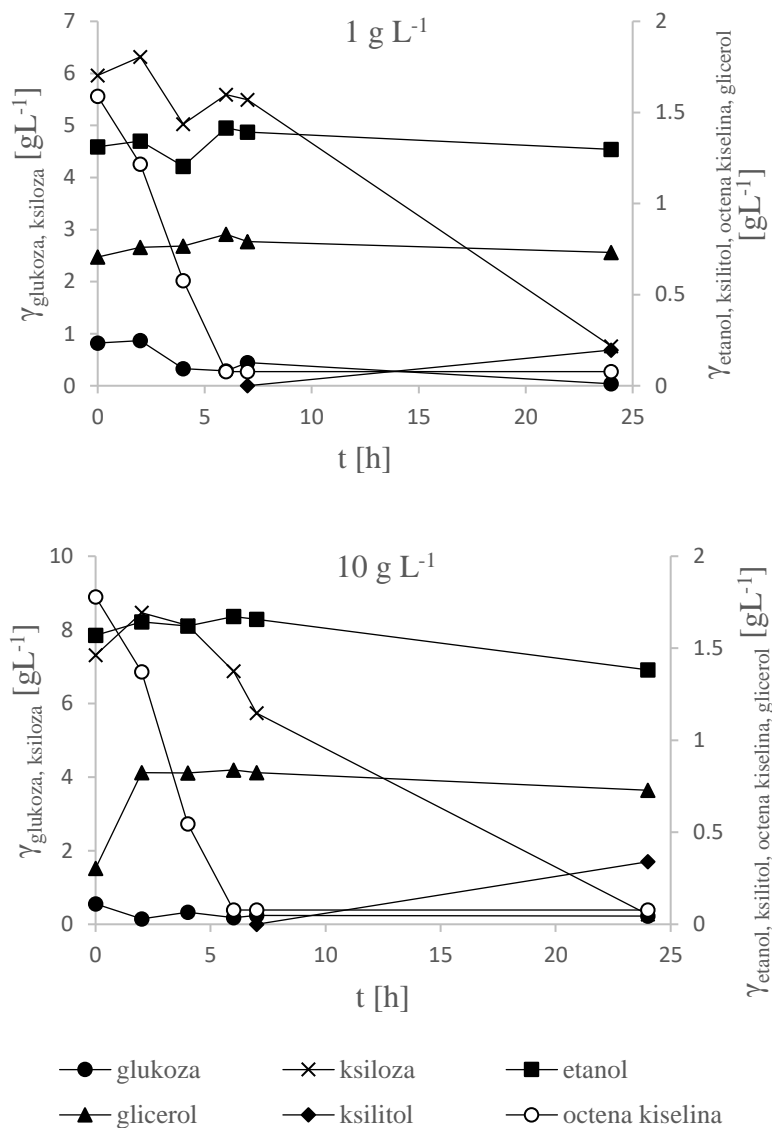
#### 4.2.2. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na hidrolizatu otpadne trave tretiranog aktivnim ugljenom

Uzgoji opisani u ovom poglavlju provedeni su na hidrolizatu otpadne trave dobivenom kiselinom predobradom u visokotlačnom reaktoru koji je prethodno bio tretiran aktivnim ugljenom kako bi se uklonili inhibitorni spojevi. Nakon toga suspenzija je profiltrirana preko Büchnerovog lijevka. Na tako detoksificiranom hidrolizatu proveden je uzgoj plijesni u podlozi bez dodatnog izvora dušika (slika 9), te uzgoji s različitim koncentracijama CSL-a (slika 10) odnosno kvašćevog ekstrakta (slika 11.)

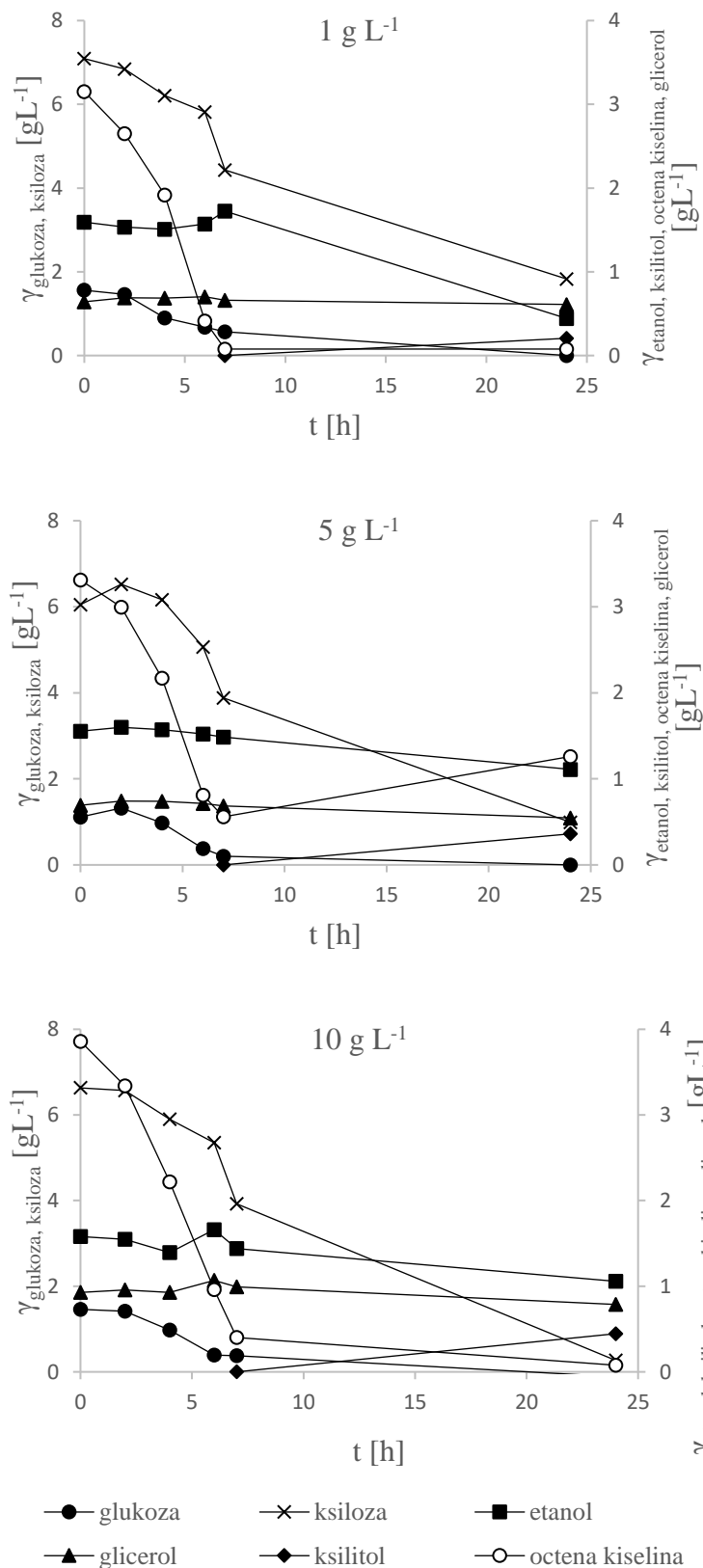


**Slika 9.** Promjena koncentracija glukoze, etanola, glicerola, ksilitola, octene kiseline i ksiloze tijekom uzgoja *M. indicus* na detoksificiranom hidrolizatu otpadne trave bez dodatnog izvora dušika

U podlogama je na početku uzgoja bilo prisutno 0,5 – 1,5 g L<sup>-1</sup> glukoze te oko 6 – 7 g L<sup>-1</sup> ksiloze koje je plijesan relativno brzo asimilirala tako da su uzgoji trajali upola kraće (24 h) nego raniji uzgoji na hidrolizatima na kojima nije provedena detoksifikacija aktivnim ugljenom. Može se pretpostaviti da je plijesan u nekom trenutku uzgoja asimilirala dostupne količine glukoze i ksiloze iz podloge, a zatim koristila etanol za rast. Budući da uzorci nisu uzimani iz podloga između 8. i 24. sata uzgoja, za potvrdu ranije pretpostavke je potrebno provesti nove eksperimente tijekom kojih bi se redovno analizirao sastav hranjive podloge.



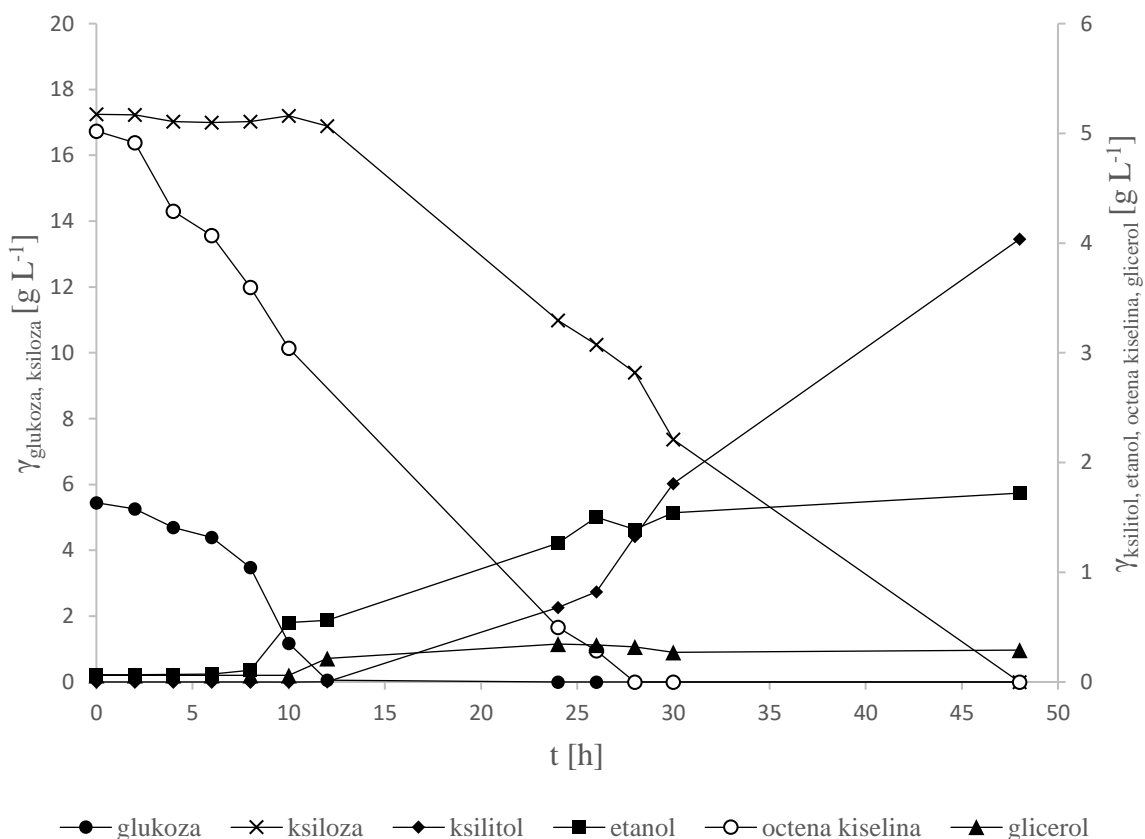
**Slika 10.** Promjena koncentracija glukoze, etanola, glicerola, ksilitola, octene kiseline i ksiloze tijekom uzgoja *M. indicus* na detoksificiranom hidrolizatu otpadne trave uz dodatak CSL-a



**Slika 11.** Promjena koncentracija glukoze, etanola, glicerola, ksilitola, octene kiseline i ksiloze tijekom uzgoja *M. indicus* na detoksificiranom hidrolizatu otpadne trave uz dodatak kvašćevog ekstrakta

#### 4.2.3. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 u reaktoru s miješalom na detoksificiranom hidrolizatu otpadne trave

Uzgoj plijesni *M. indicus* u bioreaktoru s miješalom korisnog volumena 1,5 L je proveden aerobno uz protok zraka  $2 \text{ L h}^{-1}$  i brzinom miješanja  $50 \text{ o min}^{-1}$ . Korištena je podloga sastava opisanog u poglavlju 3.3.6., a temperatura uzgoja je održavana na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Uzgoj je trajao 48 h i redovno su uzimani uzorci za analizu UPLC-om. Rezultati analiza su prikazani na slici 12.



**Slika 12.** Promjena koncentracija glukoze, etanola, glicerola, ksilitola, octene kiseline i ksiloze tijekom uzgoja *M. indicus* u reaktoru s miješalom na detoksificiranom hidrolizatu otpadne trave sa  $5 \text{ g L}^{-1}$  CSL-a

Vrijeme potrebno plijesni da potroši sav izvor ugljika iz podloge, i glukoze i ksiloze, iznosi 48 h pri ranije navedenim uvjetima uzgoja. Prvih 12 sati uzgoja se vidi pad koncentracije glukoze s početnih  $5,45 \text{ g L}^{-1}$  na  $0,06 \text{ g L}^{-1}$  nakon dvanaestog sata uzgoja (nakon 24 h uzgoja, glukoza nije detektirana u podlozi), dok se koncentracija ksiloze neznatno mijenja što znači da



je glukoza preferirani izvor ugljika i energije za *M. indicus* što je u skladu s očekivanjima. Koncentracija etanola u prvih 12 sati uzgoja naraste s  $0,07 \text{ g L}^{-1}$  na  $0,56 \text{ g L}^{-1}$  nakon dvanaestog sata uzgoja što daje produktivnost od  $0,041 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  tijekom prvih dvanaest sati uzgoja. Nakon dvanaestog sata se vidi kontinuirani pad koncentracije ksiloze sve do potpunog iscrpljenja ksiloze iz podloge nakon 48 h uzgoja. Tijekom drugih 36 sati uzgoja koncentracija etanola naraste s  $0,56 \text{ g L}^{-1}$  na konačnih  $1,72 \text{ g L}^{-1}$  što produktivnost uzgoja kada plijesan raste pretežno na ksilozi čini nešto manjom u usporedbi s rastom na glukozi, a iznosi  $0,032 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Glicerol je u podlozi detektiran tek nakon 12 sati uzgoja, a maksimalna koncentracija je postignuta nakon 24 h te iznosi  $0,35 \text{ g L}^{-1}$ . Koncentracija ksilitola se slaže s potrošnjom ksiloze iz podloge jer je ksilitol detektiran tek nakon desetog sata uzgoja i njegova koncentracija kontinuirano raste do konačnih i maksimalnih  $4,04 \text{ g L}^{-1}$  na kraju uzgoja.

Sues i sur. (2005) su proveli uzgoj *M. indicus* u bioreaktoru jednakog volumena (1,5 L) na hidrolizatu šumskog otpada smreke. Njihov je hidrolizat sadržavao višestruko više šećera, točnije  $52,5 \text{ g L}^{-1}$ , od hidrolizata korištenog za uzgoj *M. indicus* u reaktoru u ovom radu koji je sadržavao  $22,7 \text{ g L}^{-1}$  šećera. Samim time, i prinos etanola koji je postignut tijekom njihovog uzgoja ove plijesni je veći. On iznosi  $0,18 \text{ g g}^{-1}$  dok je prinos etanola na kraju bioreaktorskog uzgoja plijesni u ovom radu iznosio svega  $0,11 \text{ g g}^{-1}$ .

**Tablica 10.** Parametri uspješnosti uzgoja plijesni *M. indicus* u reaktoru s miješalom na detoksificiranom hidrolizatu otpadne trave s  $5 \text{ g L}^{-1}$  CSL-a

$\gamma_x [\text{g L}^{-1}]$	$Y_{\text{etanol}} [\text{g L}^{-1}]$	$Y_{\text{Et/S}} [\text{gg}^{-1}]$	$\text{Pr} [\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}]$	$q_s [\text{h}^{-1}]$	$q_p [\text{h}^{-1}]$
3,40	1,66	0,108	0,034	0,0364	0,0868

#### 4.3. ANALIZA SASTAVA MASNIH KISELINA U BIOMASI PLIJESNI *Mucor indicus* DSM 2185 NAKON UZGOJA NA RAZLIČITIM HRANJIVIM PODLOGAMA

Cilj uzgoja plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 u tikvicama i reaktoru s miješalom bila je simultana proizvodnja više vrijednih proizvoda poput etanola i masnih kiselina na hidrolizatima otpadne trave dobivenih kiselinskom predobradom u visokotlačnom bioreaktoru. Nakon takve predobrade lignocelulozne sirovine, u hidrolizatu se osim šećera nalaze i inhibitori mikrobnog rasta poput furfurala i octene kiseline, no unatoč tome *M. indicus* se pokazao kao dobar odabir radnog mikroorganizma za proizvodnju na podlogama od kiselinski predobrađenih lignoceluloznih sirovina budući da je otporan na prisutne inhibitore rasta te može asimilirati pentoze (Sues i sur., 2005). Nakon provedenih uzgoja plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na hranjivim podlogama različitog sastava, biomasa plijesni je centrifugiranjem izdvojena iz hranjivih podloga, zatim je osušena u sušioniku te je provedena ekstrakcija i analiza sastava masnih kiselina u biomasi metodom opisanom u poglavlju 3.3.11. Eukariotski mikroorganizmi, pa tako i plijesan *Mucor indicus*, u stanicama pohranjuju energiju uglavnom u obliku triacilglicerola, a lipidi su još i sastavni dio membrana u obliku fosfolipida. *Mucor indicus* sintetizira masne kiseline koristeći acetyl-CoA, a dihidroksiaceton fosfat koristi za sintezu triacilglicerola i fosfolipida (Karimi i Zamani, 2013).

Analizom uzoraka biomase plijesni je detektirano 24 različite masne kiseline: heksanska kiselina (C6:0), oktanska kiselina (C8:0), dekanska kiselina (C10:0), undekanska kiselina (C11:0), dodekanska kiselina (C12:0), miristinska kiselina (C14:0), pentadekanska kiselina (C15:0), palmitinska kiselina (C16:0), palmitoleinska kiselina (C16:1 cis 9), margarinska kiselina (C17:0), heptadekanoična kiselina (C17:1 cis 10), stearinska kiselina (C18:0), oleinska kiselina (C18:1 cis 9), linoelaidna kiselina (C18:2 trans 9,12), linolna kiselina (C18:2 cis 9,12),  $\gamma$ -linolenska kiselina (C18:3 cis 6,9,12),  $\alpha$ -linolenska kiselina (C18:3 cis 9,12,15), gondoična kiselina (C20:1 cis 11), eikozatrenska kiselina (C20:3 cis 11,14,17), eikozatetraenojska kiselina (C20:4 cis 5,8,11,14), eikozapentaenska kiselina (C20:5 cis 5,8,11,14,17), dokosaheksaenska kiselina (C22:6 cis 4,7,10,13,16,19), lignocerična kiselina (C24:0) i nervonska kiselina (C24:1 cis 15). Najviše zastupljene masne kiseline bile su palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1), linolna (C18:2) i  $\gamma$ -linolenska kiselina ili GLA (C18:3). Najviše zastupljene masne kiseline bile su palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1), linolna (C18:2) i  $\gamma$ -linoleinska kiselina ili GLA (C18:3). Rezultati analiza sastava biomasa plijesni plinskom kromatografijom su prikazani u tablici 11. Uspoređujući rezultate uzgoja provedenih na definiranim podlogama s glukozom, može se vidjeti da su tijekom uzgoja s 1 i 10 g L<sup>-1</sup> CSL-

a ili kvašćevog ekstrakta proizvedene slične količine masnih kiselina obzirom na udio masnih kiselina u biomasi plijesni. Točnije, kod uzgoja s CSL-om udio masnih kiselina u biomasi iznosi 32,2 % za uzgoj s 1 g L<sup>-1</sup> CSL-a te 13,3 % za uzgoj s 10 g L<sup>-1</sup> CSL-a, dok ti udjeli masnih kiselina kod uzgoja s kvašćevim ekstraktom iznose 32,3 % odnosno 14,8 %.

**Tablica 11.** Sastav masnih kiselina u biomasi plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na kraju uzgoja na različitim podlogama

Hranjiva podloga	Izvor dušika	Koncentracija izvora N [g L <sup>-1</sup> ]	Masa masne kiseline u biomasi plijesni [g]					Ukupne MK u biomasi	
			C16:0 (palmitinska)	C18:0 (stearinska)	C18:1 (oleinska)	C18:2 (linolna)	C18:3 (γ-linolenska)	m [g]	% (w/w)
Definirana podloga s glukozom	Pepton	1	0,19	0,19	0,26	0,12	0,16	2,02	26,1
		5	0,2	0,14	0,27	0,17	0,22	4,1	<b>48,4</b>
		10	0,17	0,11	0,27	0,12	0,14	0,88	12,8
	CSL	1	0,24	0,12	0,41	0,19	0,13	1,59	32,2
		5	0,25	0,19	0,42	0,22	0,15	1,31	20,1
		10	0,19	0,14	0,33	0,17	0,14	1,02	13,3
	Kvašćev ekstrakt	1	0,12	0,07	0,17	0,11	0,18	1,74	<b>32,3</b>
		5	0,13	0,12	0,25	0,08	0,11	0,81	10,2
		10	0,13	0,09	0,21	0,09	0,14	0,7	14,8
Hidrolizat otpadne trave	-	-	0,18	0,09	0,49	0,06	0,02	0,97	16,9
	CSL	1	0,27	0,14	0,72	0,1	0,06	1,5	16,9
		5	0,24	0,13	0,71	0,12	0,07	1,55	13,8
		10	0,11	0,04	0,31	0,07	0,06	0,74	7,9
	Kvašćev ekstrakt	1	0,2	0,09	0,49	0,08	0,04	1,07	14,9
		5	0,05	0,01	0,19	0,04	0,03	0,41	5,8
10		0,03	n.d.	0,12	0,03	0,03	0,28	4,7	
Detoksificirani hidrolizat otpadne trave	-	-	0,05	n.d.	0,16	0,02	0,05	0,36	6,1
	CSL	1	0,07	n.d.	0,18	0,04	0,07	0,45	7,2
		10	0,06	n.d.	0,15	0,03	0,19	1	15,2
	Kvašćev ekstrakt	1	0,04	n.d.	0,14	0,03	0,06	0,33	5,7
		5	0,06	n.d.	0,18	0,06	0,08	0,51	4,2
		10	0,03	n.d.	0,21	0,08	0,09	0,66	5
CSL*	5	0,06	0,01	0,15	0,05	0,06	0,41	6,3	

CSL\* se odnosi na uzgoj u bioreaktoru s miješalom, n.d. = nije detektirano

Nakon uzgoja na definiranim podlogama s glukozom i pomoćnim izvorima dušika, provedeni su uzgoji na hidrolizatu otpadne trave iz poglavlja 3.1.1. Proveden je uzgoj bez pomoćnog izvora dušika te uzgoji s 1, 5 i 10 g L<sup>-1</sup> CSL-a odnosno kvašćevog ekstrakta. Uzgoji provedeni s CSL-om su se pokazali nešto uspješnijima obzirom na ukupnu masu masnih kiselina, ali i udjele masnih kiselina u biomasi, bez obzira na koncentraciju izvora dušika. Također, uzgojima s CSL-om su proizvedene višestruko veće količine palmitinske kiseline. Najzastupljenija masna kiselina bila je oleinska koja je tijekom svih ovih uzgoja na hidrolizatu otpadne trave činila gotovo 50 % svih masnih kiselina prisutnih u biomasi na kraju uzgoja. Tijekom nekih uzgoja (uzgoji s 1 g L<sup>-1</sup> CSL-a odnosno kvašćevog ekstrakta, uzgoj s 5 g L<sup>-1</sup> CSL-a) su postignuti dvostruko veći ili gotovo dvostruko veći prinosi oleinske kiseline u usporedbi s rezultatima uzgoja s istim pomoćnim izvorom dušika na definiranim podlogama s glukozom. Usporedbom ukupnih proizvedenih masnih kiselina, može se vidjeti da je tijekom uzgoja na definiranim podlogama proizvedeno više masnih kiselina što se može pripisati višim početnim koncentracijama izvora ugljika, osim u slučaju uzgoja s 5 g L<sup>-1</sup> CSL-a. Naime, uzgojem na hidrolizatu je proizvedeno 1,55 g masnih kiselina, što je 18,3 % više od 1,31 g masnih kiselina proizvedenih tijekom uzgoja na definiranoj podlozi s glukozom. U radu Alavijeh i sur. (2019) autori su proveli eksperimente kojima su koristeći plijesan *Mucor indicus*, uzgojem na hidrolizatu kukuruzovine s kvašćevim ekstraktom i amonijevim sulfatom kao izvorom dušika, proizveli 147,4 ± 2 mg lipida po gramu asimiliranog šećera iz podloge što je činilo 19,3 % suhe tvari biomase plijesni. Ovi se rezultati mogu usporediti s rezultatima uzgoja iste plijesni iz ovog rada, na nedetoksificiranom hidrolizatu s po 1 g L<sup>-1</sup> CSL-a i kvašćevog ekstrakta na kraju kojih je dobiveno 168,3 mg g<sup>-1</sup> za uzgoj s CSL-om (16,9 % suhe tvari biomase), odnosno 121,6 mg g<sup>-1</sup> na kraju uzgoja s kvašćevim ekstraktom (14,9 % suhe tvari biomase). Profil masnih kiselina u biomasi plijesni iz rada Alavijeh i sur. (2019) nešto se razlikuje od sastava masnih kiselina iz ovog rada. Dok su u ovom radu najzastupljenije masne kiseline u biomasi bile oleinska kiselina i  $\gamma$ -linolenska kiselina, u radu Alavijeh i sur. najviše je proizvedeno stearinske, čak 53,5 %, te palmitoleinske (22,7 %) i palmitinske kiseline (13,7 %).

Uzgoji provedeni na hidrolizatu otpadne trave prethodno tretiranim aktivnim ugljenom su bili relativno uspješniji u odnosu na količine proizvedenih masnih kiselina tijekom uzgoja na nedetoksificiranom hidrolizatu. Usporedbom s rezultatima uzgoja na hidrolizatu koji nije tretiran aktivnim ugljenom uspješniji su bili uzgoji s 10 g L<sup>-1</sup> CSL-a odnosno kvašćevog ekstrakta kojima je proizvedeno 0,26 g odnosno 0,38 g više masnih kiselina te uzgoj s 5 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta kojim je proizvedeno 0,10 g više masnih kiselina od uzgoja na nedetoksificiranom hidrolizatu s istim koncentracijama pomoćnog izvora dušika. Najbolji od

ovih uzgoja bio je uzgoj s  $10 \text{ g L}^{-1}$  CSL-a tijekom kojega je proizvedeno 1 g masnih kiselina što je 35 % više od količine masnih kiselina dobivenih uzgojem na netretiranom hidrolizatu s jednakom količinom CSL-a, te samo 0,02 g masnih kiselina manje nego što je proizvedeno tijekom uzgoja na definiranoj podlozi s glukozom.

Uzgoj u bioreaktoru s miješalom je proveden na hidrolizatu otpadne trave prethodno tretiranim aktivnim ugljenom s CSL-om kao pomoćnim izvorom dušika u koncentraciji  $5 \text{ g L}^{-1}$ . Obzirom na količinu proizvedenih masnih kiselina ovaj uzgoj se pokazao manje uspješnim u usporedbi sa sličnim uzgojima provedenim u Erlenmeyer tikvicama jer je tijekom 48 h uzgoja proizvedeno 0,41 g masnih kiselina koje su činile 6,3 % biomase. Mogući uzrok ovakvog rezultata je činjenica da je uzgoj u bioreaktoru s miješalom vođen uz aeraciju podloge, dakle u aerobnim uvjetima. Satari i sur. (2015) navode kako tijekom anaerobnog uzgoja dolazi do djelomičnog nakupljanja ugljikova dioksida koji je potreban za sintezu masnih kiselina. Iako uzgoji u Erlenmeyer tikvicama nisu vođeni u anaerobnim uvjetima nego mikroaerofilnim, pretpostavka je da je tijekom tih uzgoja u tikvicama bilo prisutno više  $\text{CO}_2$  pa su zato proizvedene i veće količine masnih kiselina.

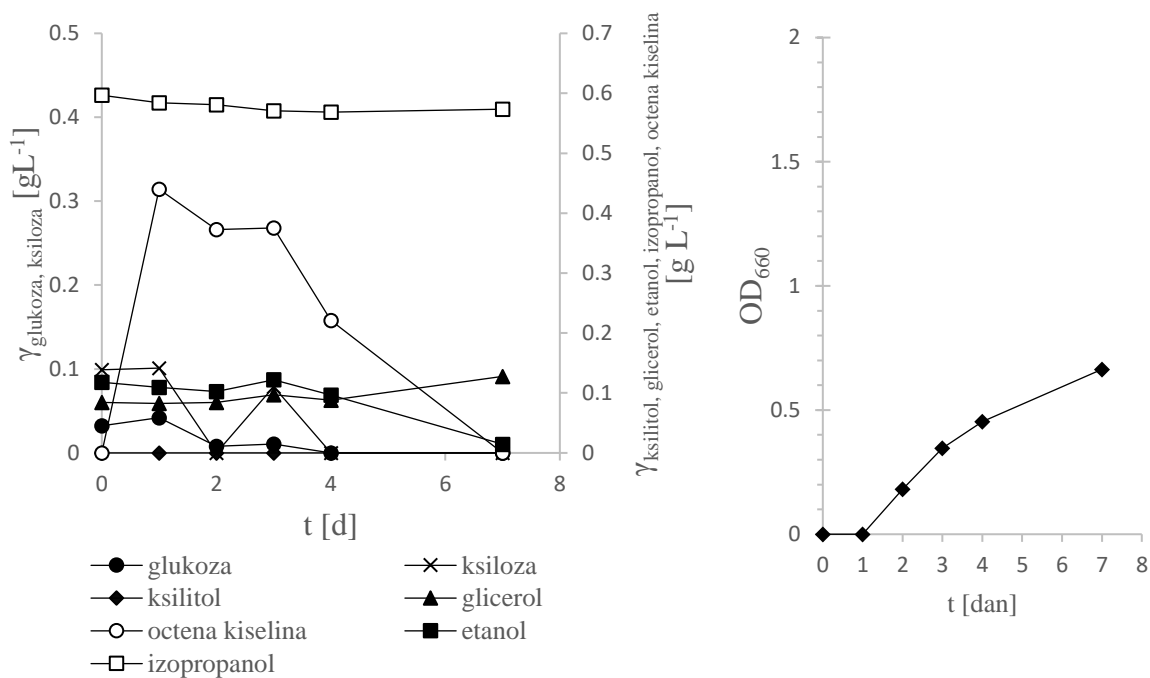
Utjecaj koncentracije izvora dušika na proizvodnju lipida, osim u nekoliko slučajeva, odgovara podacima dostupnim u literaturi. Sharifyazd i Karimi (2017) navode kako niža koncentracija dušika rezultira višim prinosima lipida. Limitacija izvora dušika je zapravo jedna strategija kojom se inducira sinteza intracelularnih lipida, jer mikroorganizam u uvjetima limitacije izvora dušika brzo asimilira sav dostupan dušik te nastavlja asimilirati dostupan izvor ugljika te ga nakupljati u stanicama u obliku lipida (Ratledge, 2004).

#### 4.4. UZGOJ BAKTERIJE *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 NA RAZLIČITIM OTPADNIM PODLOGAMA

Nakon provedenih uzgoja plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na hranjivim podlogama od hidrolizata otpadne trave s različitim koncentracijama CSL-a i kvašćevog ekstrakta kao izvorima dušika, biomasa plijesni je izdvojena centrifugiranjem, a otpadne podloge su korištene za uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781. Već je pokazano da nesumporne ljubičaste bakterije mogu rasti na alkoholima, organskim kiselinama i sličnim proizvodima metabolizma drugih mikroorganizama (Tabita, 1995). U ovom radu je istražena mogućnost rasta bakterije *R. adriaticum* i proizvodnje vrijednih proizvoda poput pigmenata na ostacima hranjivih tvari koji su bili prisutni u podlozi nakon provedenog uzgoja plijesni *M. indicus*. Iskorištavanjem otpadnih podloga uzgojem bakterijske biomase i proizvodnjom vrijednih proizvoda bi se ostvario još veći stupanj iskorištavanja lignocelulozne sirovine. Time bi se povećala i ekonomska isplativost biorafinerijskog procesa proizvodnje biogoriva iz lignoceluloznih sirovina, što trenutno predstavlja jedan veliki faktor visoke cijene biogoriva u odnosu na goriva dobivena iz fosilnih izvora.

##### 4.4.1. Uzgoj na otpadnoj podlozi bez dodatka izvora dušika

Podloga za uzgoj *R. adriaticum* tijekom ovog uzgoja je bila otpadna podloga uzgoja *M. indicus* DSM 2158 na detoksificiranom hidrolizatu otpadne trave bez dodatnog izvora dušika. Bakterija je u prva dva dana uzgoja potrošila glukozu koja je preostala nakon uzgoja *M. indicus*, a ksiloza nije detektirana u podlozi nakon četvrtog dana uzgoja. Nakon četvrtog dana bakterija je asimilirala etanol, što se očituje padom koncentracije etanola kako se može vidjeti na slici 13. Rast bakterije je praćen spektrofotometrijski na 660 nm, a rezultati su prikazani također na slici 13. Konačna koncentracija bakterije je određena gravimetrijski, a u ovom slučaju je iznosila 0,57 g L<sup>-1</sup>. Postignuta koncentracija je niža od rezultata dostupnih u literaturi što je i očekivano zbog niskih početnih koncentracija izvora ugljika u podlozi. Početna koncentracija glukoze iznosila je 0,03 g L<sup>-1</sup>, a ksiloze 0,09 g L<sup>-1</sup>. U podlozi je na kraju uzgoja bilo prisutno i 1,02 g L<sup>-1</sup> izopropanola koji može biti vrijedan proizvod uz pigmente ili samu biomasu bakterije. Koncentracija bakterioklorofila a je određena metodom opisanom u poglavlju 3.3.13. te je na kraju uzgoja iznosila 6,84 mg L<sup>-1</sup>.



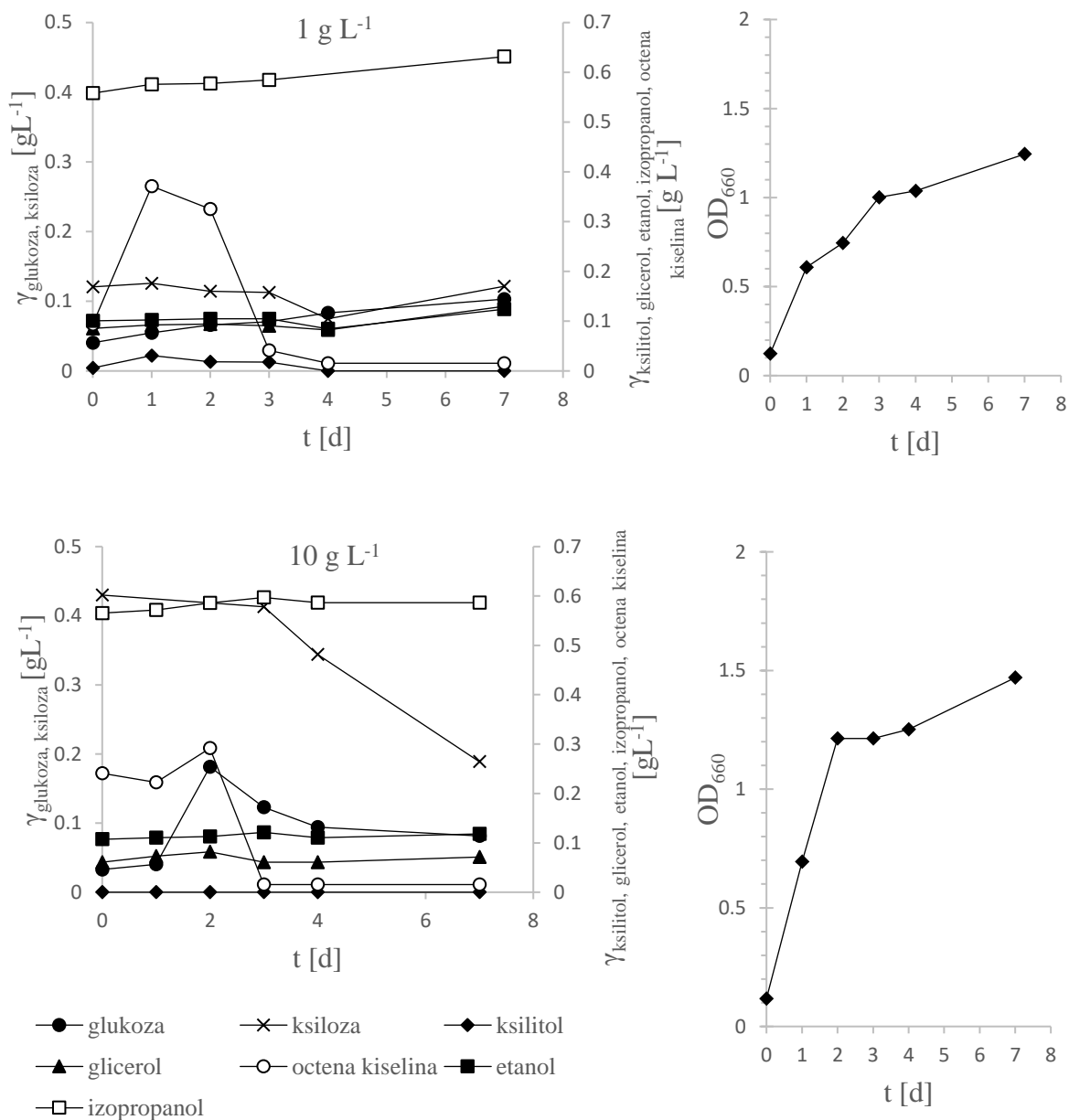
**Slika 13.** Promjena koncentracija glukoze, ksilitola, glicerola, etanola, ksiloze, octene kiseline i izopropanola te optičke gustoće tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum*

#### 4.4.2. Uzgoj na otpadnoj podlozi s dodatkom CSL-a

Bakterija *R. adriaticum* je uzgajana na otpadnim podlogama nakon uzgoja *M. indicus* na detoksificiranim hidrolizatima otpadne trave uz 1 odnosno 10 g L<sup>-1</sup> CSL-a kao izvorom dušika. Svakih 24 h su iz podloga uzimani uzorci za analizu UPLC-om i spektrofotometrom. Rezultati tih analiza su prikazani na slici 14.

U slučaju uzgoja na otpadnoj podlozi koja je na početku uzgoja *M. indicus* sadržavala 1 g L<sup>-1</sup> CSL-a, koncentracija bakterije *R. adriaticum* na kraju uzgoja je iznosila 0,46 g L<sup>-1</sup> što je manje u usporedbi s koncentracijom iste bakterije na kraju uzgoja na otpadnoj podlozi koja nije sadržavala dodatan izvor dušika iz poglavlja 4.4.1. Mogući uzrok tome je to što bakterija nije asimilirala niti male količine glukoze (0,04 g L<sup>-1</sup>), ksiloze (0,12 g L<sup>-1</sup>) i etanola (0,1 g L<sup>-1</sup>) koje su bile prisutne u podlozi na početku uzgoja bakterije. No iako je na ovoj podlozi proizvedeno manje biomase bakterije, ta je biomasa u ovom slučaju sadržavala 3 puta više bakterioklorofila a, točnije 18,19 mg L<sup>-1</sup>. Tijekom uzgoja na otpadnoj podlozi koja je na početku uzgoja *M. indicus* sadržavala 10 g L<sup>-1</sup> CSL-a, došlo je do nešto većeg porasta biomase nakon sedam dana uzgoja. Ona je iznosila 0,8 g L<sup>-1</sup>. Na slici 14 se može vidjeti da se koncentracije glukoze s početka i kraja uzgoja neznatno razlikuju, a došlo je do pada koncentracije ksiloze s 0,43 g L<sup>-1</sup>

na  $0,18 \text{ g L}^{-1}$ . Nadalje, niža inicijalna koncentracija CSL-a ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ), se pokazala pogodnijom i za proizvodnju bakterioklorofila a jer je na kraju ovoga uzgoja detektirano  $18,19 \text{ mg L}^{-1}$  bakterioklorofila a, što je 25 % više u usporedbi s uzgojem na otpadnoj podlozi koja je sadržavala  $10 \text{ g L}^{-1}$  CSL-a.



**Slika 14.** Promjena koncentracija glukoze, ksilitola, glicerola, etanola, ksiloze, octene kiseline i izopropanola te optičke gustoće tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum* na otpadnim podlogama s CSL-om



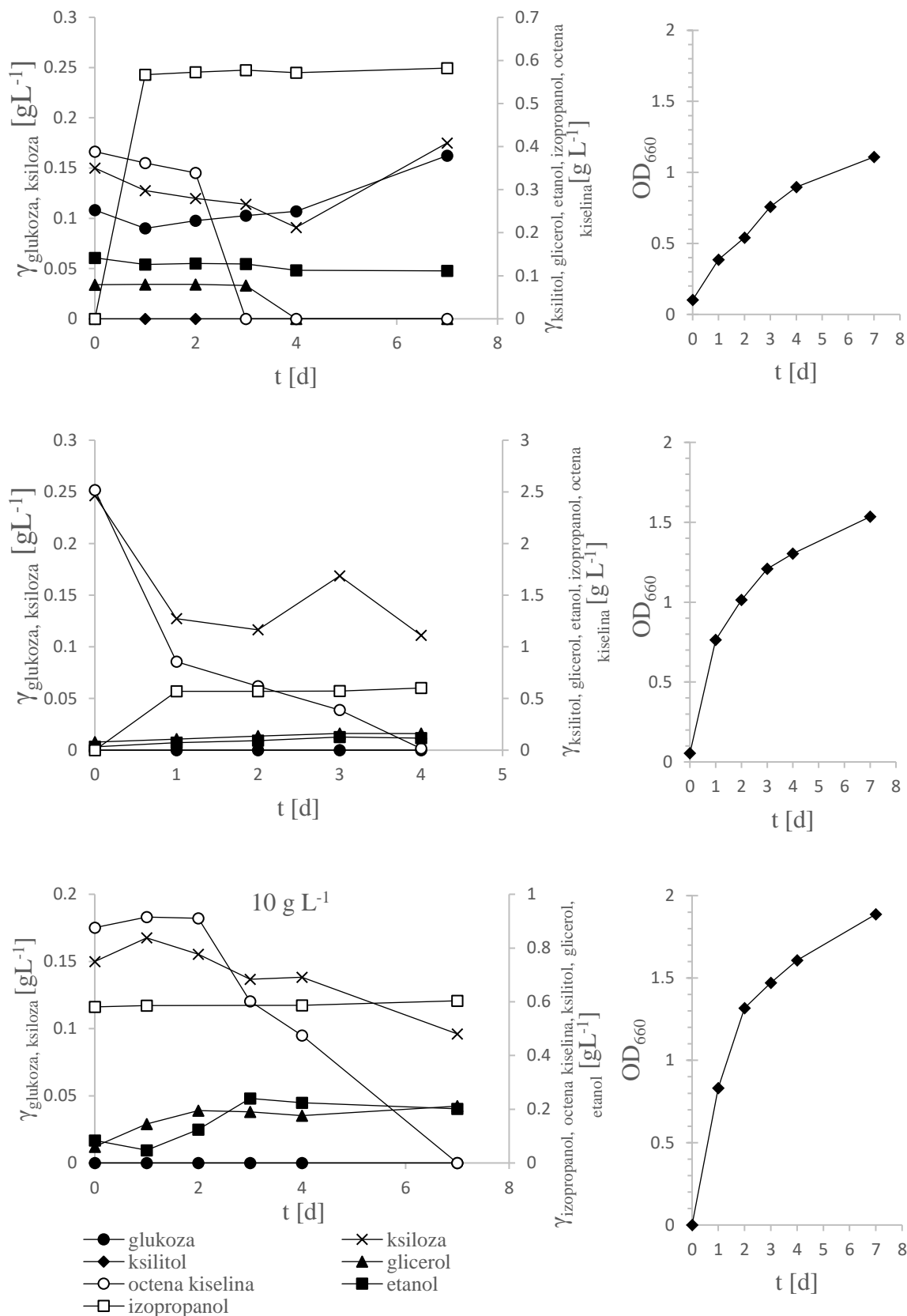
#### 4.4.3. Uzgoj na otpadnoj podlozi s dodatkom kvašćevog ekstrakta

Uzgoji bakterije *R. adriaticum* u ovom poglavlju su provedeni na otpadnim podlogama dobivenim nakon uzgoja plijesni *M. indicus* na detoksificiranim hidrolizatima otpadne trave s početnim koncentracijama kvašćevog ekstrakta od 1, 5 i 10 g L<sup>-1</sup>. Rezultati uzgoja prikazani su na slici 15.

Kroz 7 dana uzgoja bakterije na hidrolizatu koji je sadržavao 1 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta, došlo je do vrlo malih promjena koncentracija etanola te šećera glukoze i ksiloze. Nakon drugog i trećeg dana uzgoja, na slici 11 se vidi nagli pad koncentracija octene kiseline odnosno glicerola. Moguće je da je bakterija za rast koristila upravo octenu kiselinu i etanol jer na kraju uzgoja je gravimetrijski određena koncentracija bakterije od 0,72 g L<sup>-1</sup> što je povećanje od 56 % u odnosu na porast biomase na otpadnoj podlozi uzgoja *M. indicus* s istom koncentracijom CSL-a. Na kraju ovog uzgoja na podlozi s 1 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta je izmjereno 33,04 mg L<sup>-1</sup> bakterioklorofila a.

Obzirom na proizvodnju pigmenta bakterioklorofila a, najbolji se pokazao uzgoj na otpadnoj podlozi s početnom koncentracijom kvašćevog ekstrakta od 5 g L<sup>-1</sup>. Izmjereno je 48,1 mg L<sup>-1</sup> bakterioklorofila a nakon ekstrakcije. Na početku uzgoja u ovoj podlozi nije detektirana glukoza. Moguće je da su bakterije za rast koristile ksilozu i octenu kiselinu jer na slici 15 se vidi nagli pad njihovih koncentracija već nakon prvog dana uzgoja, a na istoj slici se vidi i porast koncentracije biomase bakterija te je na kraju uzgoja određena koncentracija bakterija od 7,98 g L<sup>-1</sup>.

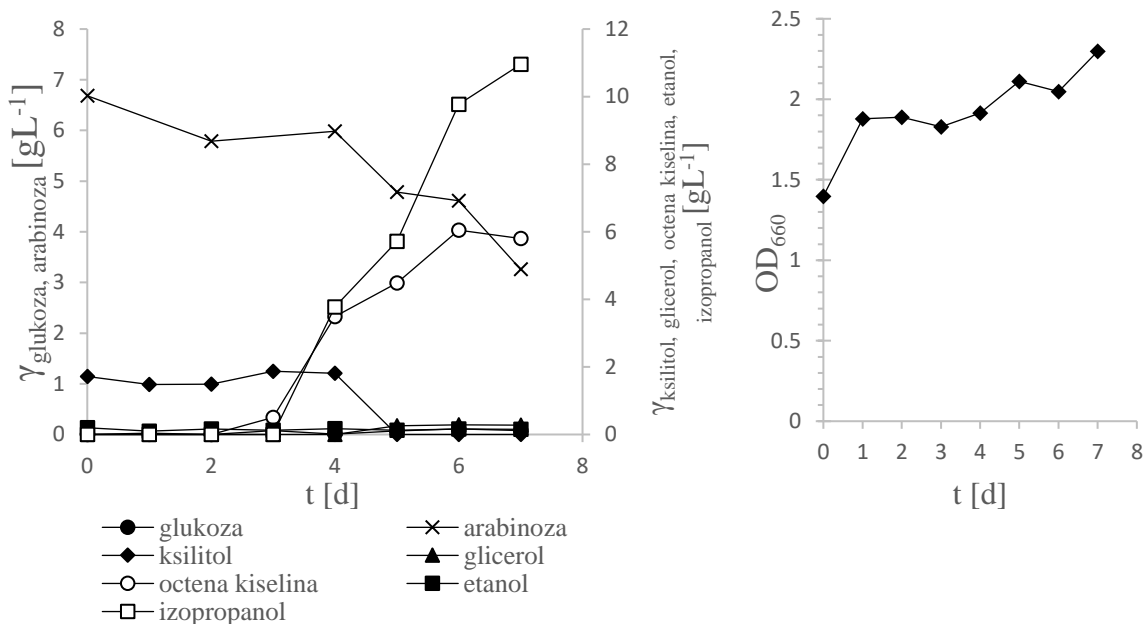
Uzgoj *R. adriaticum* na otpadnoj podlozi uzgoja *M. indicus* s početnom koncentracijom kvašćevog ekstrakta 10 g L<sup>-1</sup> se pokazao kao najbolji obzirom na količinu proizvedene biomase bakterije. Naime, na kraju uzgoja je gravimetrijski određena koncentracija bakterija od 1,85 g L<sup>-1</sup> što je za 132 % bolji prinos biomase bakterije *R. adriaticum* od sljedećeg najboljeg uzgoja provedenog u ovom radu obzirom na proizvodnju biomase bakterija, a to je uzgoj na otpadnoj podlozi s početnom koncentracijom 10 g L<sup>-1</sup> CSL-a, na kraju kojega je određeno 0,8 g L<sup>-1</sup> biomase *R. adriaticum*. Što se tiče proizvodnje bakterioklorofila a, ovaj se uzgoj pokazao boljim od uzgoja provedenih na podlogama s CSL-om, ali kod uzgoja s kvašćevim ekstraktom, ovaj koji je proveden na podlozi s 10 g L<sup>-1</sup> je najlošiji obzirom na proizvodnju pigmenta. Nakon ekstrakcije je spektrofotometrijski određeno 20,8 mg L<sup>-1</sup> bakterioklorofila a na kraju uzgoja.



**Slika 15.** Promjena koncentracija glukoze, ksilitola, glicerola, etanola, ksiloze, octene kiseline i izopropanola te optičke gustoće tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum* na otpadnim podlogama s kvašćevim ekstraktom

#### 4.4.4. Uzgoj na otpadnoj podlozi uz dodatak CSL-a u reaktoru s miješalom

Uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 je proveden kako je opisano u poglavlju 3.3.8., dakle na otpadnoj podlozi dobivenoj izdvajanjem biomase plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 nakon uzgoja na detoksificiranom hidrolizatu otpadne trave s  $5 \text{ g L}^{-1}$  CSL-a kao izvorom dušika. Uzgoj je proveden pri temperaturi  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , a trajao je 168 sati. Svakih 24 h su uzimani uzorci za analizu UPLC-om i spektrofotometrom te je gravimetrijski određena koncentracija biomase bakterija na kraju uzgoja. Tijekom uzgoja su detektirane zanemarive koncentracije glukoze u podlozi koja je preostala nakon uzgoja plijesni *M. indicus*, a ksiloza nije detektirana tijekom uzgoja. U podlozi je na početku uzgoja detektirano  $6,68 \text{ g L}^{-1}$  arabinoze. Koncentracija arabinoze je periodično padala, tako da je na kraju uzgoja detektirano  $3,26 \text{ g L}^{-1}$  arabinoze, pa se može pretpostaviti da su u ovom slučaju bakterije za rast koristile arabinozu. Uz arabinozu, može se pretpostaviti da su bakterije asimilirale i ksilitol čiji se pad koncentracije s  $1,81 \text{ g L}^{-1}$  može vidjeti nakon četvrtog dana uzgoja u reaktoru. Nakon trećeg dana uzgoja na slici 16 se vidi izraziti porast koncentracije octene kiseline, a posebice koncentracije izopropanola čija koncentracija na kraju uzgoja iznosi  $10,95 \text{ g L}^{-1}$ . *Rhodovulum adriaticum* može proizvoditi polihidriksibutirat kondenzacijom acetil-CoA u acetoacetyl-CoA te njegovom daljnjom polimerizacijom u uvjetima nedostatka dušika u hranjivoj podlozi. No budući da je moguće da su nakon centrifugiranja u podlozi nakon uzgoja *M. indicus* zaostale neke stanice plijesni, one su mogle biti dovoljan izvor dušika bakterijama *R. adriaticum* koje u takvim uvjetima mogu umjesto polihidroksibutirata proizvoditi izopropanol. Reakcijom CoA-transferaze od acetoacetyl-CoA nastaje acetoacetat od kojega reakcijom acetoacetat-dekarboksilaze nastaje aceton i  $\text{CO}_2$ . Reakcijom s enzimom alkohol-dehidrogenaza od nastaloga acetona može se proizvesti izopropanol. Ovakav način proizvodnje izopropanola bakterijom *R. adriaticum* je samo pretpostavka budući da ova bakterija može i asimilirati izopropanol kao izvor ugljika i energije. Na kraju uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u reaktoru, gravimetrijski je određena koncentracija biomase, i iznosila je  $2,26 \text{ g L}^{-1}$ . To je najviša koncentracija biomase bakterije u ovom radu. S druge strane, koncentracija bakterioklorofila a određena nakon provedene ekstrakcije pigmenta iz biomase bakterije, je iznosila samo  $1,78 \text{ mg L}^{-1}$ . Na slici 16 su prikazani rezultati UPLC analiza uzoraka na kojoj se vide promjene koncentracija više tvari te porast koncentracije biomase bakterije u obliku promjene vrijednosti optičke gustoće izmjerene na valnoj duljini od  $660 \text{ nm}$ .



**Slika 16.** Promjena koncentracija glukoze, ksilitola, glicerola, etanola, arabinoze, octene kiseline i izopropanola te optičke gustoće tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum* u reaktoru s miješalom na otpadnoj podlozi s 5 g L<sup>-1</sup> CSL-a

U radu Novak i sur. (2020), autori izvještavaju o uspješnim uzgojima i proizvodnji biomase bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 te pigmentata na podlogama s različitim koncentracijama izvora ugljika u vidu glukoze i ksiloze. Naime, uzgojem ove bakterije na podlozi sa po 3 g L<sup>-1</sup> glukoze i ksiloze postignuta je produktivnost od 0,017 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> s ukupnim prinomom biomase bakterije od 1,507 g L<sup>-1</sup>. Budući da glukoza i ksiloza obično čine najveći dio šećera u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (Marđetko i sur., 2018), ranije navedeni rezultati se mogu usporediti s rezultatima uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 iz ovog rada. Naime, najveća koncentracija biomase bakterije je određena na kraju uzgoja na otpadnoj podlozi koja je sadržavala 10 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta, a iznosila je 1,85 g L<sup>-1</sup> s produktivnošću od 0,011 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> obzirom na proizvodnju biomase. Na kraju ostalih uzgoja su određene gotovo upola manje koncentracije biomase bakterije. Razlog manjih prinosa biomase u usporedbi s radom Novak i sur. (2020) mogu biti dosta niže koncentracije glukoze i ksiloze koje su bile preostale u podlogama nakon uzgoja plijesni *Mucor indicus* DSM 2158. Koncentracije glukoze i ksiloze u ovim podlogama su bile 0,1 g L<sup>-1</sup> ili manje glukoze, odnosno do 0,43 g L<sup>-1</sup> ksiloze. Najsličniji rezultat, usporedbom s radom Novak i sur. (2020), postignut je uzgojem u bioreaktoru s miješalom. Naime, tim je uzgojem ostvarena produktivnost od 0,0134 g L<sup>-1</sup> što je za 23,5 % manje od uzgoja Novak i sur. s po 3 g L<sup>-1</sup> glukoze i ksiloze. Razlog višeg prinosa biomase bakterije u bioreaktoru je vjerojatno prisutnost arabinoze u podlozi čija je

koncentracija na početku uzgoja iznosila  $6,69 \text{ g L}^{-1}$ , a tijekom 168 sati uzgoja je utrošeno  $3,43 \text{ g L}^{-1}$  tog šećera. Što se tiče proizvodnje pigmenata, rezultati uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u ovom radu su obećavajući jer su postignute višestruko veće koncentracije tijekom gotovo svih uzgoja u usporedbi s uzgojima Novak i sur. od kojih se najviše ističe uzgoj na otpadnoj podlozi koja je sadržavala  $5 \text{ g L}^{-1}$  kvašćevog ekstrakta na kraju kojega je određeno  $60,12 \text{ mg}$  bakterioklorofila a po gramu biomase bakterije.

**Tablica 12.** Parametri uspješnosti uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na otpadnim podlogama uzgoja *M. indicus*

Otpadna podloga za uzgoj	$\gamma_X$ [ $\text{g L}^{-1}$ ]	$Pr_X$ [ $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]	$\gamma_{\text{ukupni pigmenti}}$ [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	w (pigmenti, X) [ $\text{mg g}^{-1}$ ]
d-hidrolizat	0,57	0,003	6,84	12,22
d-hidrolizat <sub>CSL1</sub>	0,46	0,003	18,19	39,53
d-hidrolizat <sub>CSL10</sub>	0,8	0,005	14,51	18,14
d-hidrolizat <sub>kve1</sub>	0,72	0,004	33,04	45,89
d-hidrolizat <sub>kve5</sub>	0,8	0,005	48,1	60,12
d-hidrolizat <sub>kve10</sub>	1,85	0,011	20,8	11,24
R-d-hidrolizat <sub>CSL5</sub>	2,26	0,013	1,78	0,786

\*R predstavlja uzgoj u reaktoru s miješalom

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog rada može se zaključiti slijedeće:

1. Plijesan *M. indicus* ne može rasti u podlozi s glukozom u koju je kao izvor dušika dodana sol, diamonijev sulfat ili diamonijev fosfat u koncentracije od 1 – 10 g L<sup>-1</sup>.
2. Plijesan *M. indicus* može rasti u podlozi s glukozom u koju je kao izvor dušika dodan pepton, kvašćev ekstrakt ili kukuruzna močevina u koncentracijama od 1 – 10 g L<sup>-1</sup>. Najviši prinosi postignuti su na podlozi u koju je kao izvor dušika dodan CSL u koncentraciji od 10 g L<sup>-1</sup> te je proizveden etanol ( $\approx 2,14$  g L<sup>-1</sup>), glicerol i dr.
3. Prinosi etanola i glicerola na podlozi u koju je kao izvor ugljika dodan kvašćev ekstrakt (10 g L<sup>-1</sup>) postiže zadovoljavajuće prinose koji su oko 25 % manji od prinosa određenih na glukozu i CSL-u kao izvoru dušika.
4. Osim glukoze, ova plijesan uzgajana je na nedetoksificiranom i detoksificiranom hidrolizatu otpadne trave u koju su kao izvor dušika dodani kvašćev ekstrakt i kukuruzna močevina. U podlozi s detoksificiranim hidrolizatom otpadne trave nije postignuta proizvodnja etanola za razliku od uzgoja na nedetoksificiranom hidrolizatu. Najviši prinosi postignuti su na podlozi u koju je kao izvor dušika dodan kvašćev ekstrakt, te je proizveden etanol ( $\approx 1,93$  g L<sup>-1</sup>), ksilitol i dr. Može se zaključiti da postoji određeni inhibitorski efekt spojeva prisutnih u hidrolizatu otpadne trave.
5. Tijekom uzgoja u bioreaktoru s miješalom u kojem je moguće provoditi regulacije pH vrijednosti podloge postignuti su prinosi etanola od 1,65 g L<sup>-1</sup> uz produktivnost 0,03 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, te 4,04 g L<sup>-1</sup> ksilitola i 0,29 g L<sup>-1</sup> glicerola.
6. Određen je udio masnih kiselina u biomasi ove plijesni koji iznosi do 16,9 % kao i profil masnih kiselina koje proizvodi ova plijesan u podlozi s hidrolizatom otpadne trave. Ukupno je određeno 24 masne kiseline, od kojih je najzastupljenija oleinska (48 %) i palmitinska (18 %) kiselina.
7. Na otpadnoj podlozi korištenoj za uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2158 uspješno je proveden uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *R. adriaticum* DSM 2781, te je proizvedeno 2,26 g L<sup>-1</sup> biomase i 60 mg g<sup>-1</sup> ukupnih pigmenata.

## 6. LITERATURA

Alavijeh, R. S., Karimi, K., van den Berg, C. (2019) An integrated and optimized process for cleaner production of ethanol and biodiesel from corn stover by *Mucor indicus*. *J. Clean. Prod.* **249**, 119321.

Banković-Ilić, I., Stamenković, O., Veljković, V. B. (2012) Biodiesel production from non-edible plant oils. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **16**, 3621-3647.

Borugadda, V. B., Goud, V. V. (2012) Biodiesel production from renewable feedstock: Status and opportunities. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **16**, 4763-4784.

Bozell, J. J., Petersen, G. R. (2010) Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates – the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. *Green Chem.* **12**, 539–548.

BSI (2013) Bio-based products: Guide to standards and claims. Bio-based and Renewable Industries for Development and Growth in Europe, Strategic Innovation and Research Agenda.

Chen, H. (2014) *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. Springer Dordrecht Heidelberg New York London, 1-185.

Cherubini, F. (2010) The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers. Manag.* **51**, 1412-1421.

Clark, J., Deswarte, F. (2015a) *Biomass as a Feedstock. U: Introduction to Chemicals from Biomass*, 2. izdanje (Clark, J., Deswarte, F., ured.), John Wiley and Sons Ltd., The Atrium, Southern Gate, Chichester PO19 8SQ, Ujedinjeno Kraljevstvo.

Clark, J., Deswarte, F. (2015b) *The Biorefinery Concept: An Integrated Approach. U: Introduction to Chemicals from Biomass*, 2. izdanje (Clark, J., Deswarte, F., ured.), John Wiley and Sons Ltd., The Atrium, Southern Gate, Chichester PO19 8SQ, Ujedinjeno Kraljevstvo.

Ding, J., Sun, Y., Lu, D. (2002) Application of ultrafine comminution technology in biomaterial. *Sci. Technol. Food Ind.* **23**, 84–6.

- Haidle, C. W., Storck, R. (1966) Control of Dimorphism in *Mucor rouxii*. *J. Bacteriol.* **92**, 1236–1244.
- Hansen, T. A., van Gemerden, H. (1972) Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria. *Archiv. Mikrobiol.* **86**, 49-56.
- Higuchi – Takeuchi, M., Numata, K. (2019) Marine Purple Photosynthetic Bacteria as Sustainable Microbial Production Hosts. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, 258.
- Hiraishi A., Ueda Y. (1994) Intrageneric Structure of the Genus *Rhodobacter*: Transfer of *Rhodobacter sulfidophilus* and related marine species to the genus *Rhodovulum* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44** (1) 15 – 23.
- Hiraishi A., Ueda Y. (1995) Isolation and characterization of *Rhodovulum strictum* sp. nov. and some other purple nonsulfur bacteria from colored blooms in tidal and seawater pools. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45** (2) 319 – 326.
- Hülßen, T., Hsieh, K., Batstone, D. J. (2019) Saline wastewater treatment with purple phototrophic bacteria. *Water Res.* **160**, 259-267.
- IEA Bioenergy (2012) IEA Bioenergy Task 42 Biorefinery, International Energy Agency, Pariz.
- Imhoff, J. F. (2006) The Phototrophic Alpha – Proteobacteria. U: The Prokaryotes, vol. 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses, (Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E., ured.), Springer, New York, 41-64.
- Jangbua, P., Laoteng, K., Kitsubun, P., Nopharatana, M., Tongta, A. (2009) Gamma-linoleic acid production of *Mucor Rouxii* by solid-state fermentation using agricultural by-products. *Lett. Appl. Microbiol.* **49**, 91-97.
- Jeennor, S., Laoteng, K., Tanticharoen, M., Cheevadhanarak, S. (2006) Comparative fatty acid profiling of *Mucor rouxii* under different stress conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **259**, 60-66.
- Jeennor, S., Laoteng, K., Tanticharoen, M., Cheevadhanarak, S. (2008) Evaluation of inoculum performance for enhancing gamma-linolenic acid production from *Mucor rouxii*. *Lett. Appl. Microbiol.* **46**(4), 421-427.



- Karimi, K., Brandberg, T., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2005) Fed-batch cultivation of *Mucor indicus* in dilute-acid lignocellulosic hydrolyzate for ethanol production. *Biotechnol. Lett.* **27**, 1395-1400.
- Karimi, K., Chisti, Y. (2015) Future of Bioethanol. *Biofuel Res. J.* **5**, 147.
- Karimi, K., Zamani, A. (2013) *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review. *Biotechnol. Adv.* **31**, 466-481.
- Kim, S., Holtzaple, M. T. (2005) Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour. Technol.* **96**, 1994-2006.
- Kim, T. H., Kim, J. S., Sunwoo, C., Lee, Y. (2003) Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresour. Technol.* **90**, 39-47.
- Lennartsson P. R., Karimi, K., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2009) Effects of different growth forms of *Mucor indicus* on cultivation on dilute-acid lignocellulosic hydrolyzate, inhibitor tolerance, and cell wall composition., *J. Biotechnol.* **143**, 255-261.
- Leung, D. Y. C., Wu, X., Leung, M. K. H. (2010) review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Appl. Energy* **87**, 1083-1095.
- Liu, Q., Luo, L., Zheng, L. (2018) Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* **19**(2): 335.
- Lorrungruang, C., Martthong, J., Sasaki, K., Noparatnaraporn, N. (2006) Selection of Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 14F for Polyhydroxyalkanoate Production with Two-Stage Aerobic Dark Cultivation. *J. Biosci. Bioeng.* **102**(2), 128-131.
- Lu, H., Zhang, G., Dong, S. (2011) Quantitative study of PNSB energy metabolism in degrading pollutants under weak light-micro oxygen condition. *Bioresour. Technol.* **102**, 4968-4973.
- Lu, J., Shi, S. L., Xing, X. G., Yang, R. N. (2004) Pretreatment of lignocellulose by sodium hydrolysis. *J. Cell Sci. Technol.* **12**(1), 1-6.
- Madigan, M. T., Jung, D. O. (2009) An overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats. U: The Purple Phototrophic Bacteria, (Neil Hunter, C., Daldal, F., Thurnauer, M. C., Beatty, J. T., ured.), Springer, The Netherlands, 1-15.

Madukasi, E. I., Dai, X., He, C., Zhou, J. (2010) Potential of phototrophic bacteria in treating pharmaceutical wastewater. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* **7** (1), 165-174.

Maity, S. K. (2015) Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **43**, 1427-1455.

Majeti, N. V., Kumar, R. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* **46**, 1-27.

Mardetko, N., Novak, M., Trontel, A., Grubišić, M., Galić, M., Šantek, B. (2018) Bioethanol Production from Dilute-acid Pre-treated Wheat Straw Liquor Hydrolysate by Genetically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **32** (4), 483–499.

Martinez, J., Negro, M., Saez, F., Manero, J., Saez, R., Martin, C. (1990) Effect of acid steam explosion on enzymatic hydrolysis of *O. nervosum* and *C. cardunculus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24**(1), 127–134.

Millati, R., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2005) Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor* and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose and wood hydrolyzates. *Enzyme Microb. Technol.* **36**, 294-300.

Mohammadi, M., Zamani, A., Karimi, K. (2012) Determination of glucosamine in fungal cell wall by high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Agr. Food Chem.* **60**, 10511-10515.

Neutzling O., Imhoff J. F., Trüper H. G. (1984) *Rhodopseudomonas adriatica* sp. nov., a new species of the Rhodospirillaceae, dependent on reduced sulfur compounds. *Archives of Microbiology*, **137**, 256 – 261.

Novak, M., Pavlečić, M., Harutyunyan, B., Goginyan, V., Horvat, P., Šantek, B. (2017) Characteristics and Selection of Cultures of Photosynthetic Purple Non-Sulphur Bacteria as a Potential 5-Aminolevulinic Acid Producers. *Cro. J. Food Technol. Biotechnol. Nutrit.* **12** (3-4): 113 – 119.

Novak, M., Trontel, A., Mardetko, N., Matoković, V., Sarić, M., Pavlečić, M., Šantek, M. (2020) Photoheterotrophic cultivation of purple non-sulphur bacterium *Rhodovulum*

adriaticum on the media with different carbon sources. *Cro. J. Food Technol. Biotechnol. Nutrit.* **15**, 115-123.

Numan, M., Bashir, S., Mumtaz, R., Tayyab, S., Rehman, N. U., Khan, A. L., Shinwari, Z. K., Al-Harrasi, A. (2018) Therapeutic Applications of Bacterial Pigments: a Review of Current Status and Future Opportunities. *3 Biotech.* **8**, 207.

Puls, J. (1997) Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *Macromol. Symp.* **120**, 183-196.

Rajak, R. C., Jacob, S., Kim, B. S. (2020) A holistic zero waste biorefinery approach for macroalgal biomass utilization: A review. *Sci. Total Environ.* **716**, 137067.

Ratledge, C. (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* **86**, 807-815.

Ritchie, R. J. (2018) Measurement of Chlorophylls *a* and *b* and Bacteriochlorophyll *a* in Organisms From Hypereutrophic Auxinic Waters. *J. Appl. Phycol.* **30**(6), 3075 – 3087.

Ruan, R., Zhang, Y., Chen, P., Liu, S., Fan, L., Zhou, N., Ding, K., Peng, P., Addy, M., Cheng, Y., Anderson, E., Wang, Y., Liu, Y., Lei, H., Li, B. (2019) Biofules: Introduction. U: *Biofules: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofules*. 2. izdanje (Pandey, A., Larroche, C., Dussap, C.G., Gnansounou, E., Khanal, S. K., Ricke, S.) Elsevier Inc., Amsterdam, 3 – 43.

Sasaki, K., Tanaka, T., Nagai, S. (1998) Use of Photosynthetic Bacteria for the Production of SCP and Chemicals from Organic Wastes. U: *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*, (Martin, A. M., ured.), Springer, Boston, MA, 247 – 292.

Satari, B., Karimi, K., Zamani, A. (2015) Oil, chitosan, and ethanol production by dimorphic fungus *Mucor indicus* from different lignocelluloses. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **91**(6), 1835-1843.

Schultz, T. P., Templeton, M. C., Biermann, C. J., McGinnis, G. D. (1984) Steam explosion of mixed hardwood chips, rice hulls, corn stalks, and sugar cane bagasse. *J. Agric. Food Chem.* **32**(5):1166–72.

- Sepúlveda-Muñoz, C. A., de Godos, I., Puyol, D., Muñoz, R. (2020) A systematic optimization of piggery wastewater treatment with purple phototrophic bacteria. *Chemosphere* **253**, 126621.
- Sharifia, M. (2007) Production of ethanol by different morphology of *Mucor indicus*, MSc Thesis, Department of Chemical Engineering. Isfahan University of Technology.
- Sharifia, M., Karimi, K., Taherzadeh, M. J. (2008) Production of ethanol by Filamentous and yeast-like forms of *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 1253-1259.
- Sharifyazd, S., Karimi, K. (2017) Effects of fermentation conditions on valuable products of ethanolic fungus *Mucor indicus*. *J. Biotechnol.* **30**, 77-82.
- Somashekar, D., Venkateshwaran, G., Sambaiah, K., Lokesh, B. R. (2003) Effect of culture conditions on lipid and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi. *Process Biochem.* **38**, 1719-1724.
- Stamenković, O. S., Veličković, A. V., Veljković, V. B. (2011) The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. *Fuel* **90**(11), 3141–3155.
- Sues, A., Millati, R., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2005) Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS Yeast Res.* **5**, 669 – 676.
- Tabita, F. R. (1995) The Biochemistry and Metabolic Regulation of Carbon Metabolism and Fixation in Purple Bacteria Redox Balance and Carbon Metabolism Central Pathways for Organic Carbon Metabolism. U: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, (Blankenship, R. E., Madigan, Michael T., Bauer, C. E., ured.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 885-914.
- Tang, A. M., Liang, W. Z. (1999) The development of cellulose pretreatment techniques. *Chem. Ind. For. Prod.* **19**, 81–88.
- Van Wycken, S., Laurens, L. M. L. (2013) Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by in situ transesterification. Laboratory Analytical Procedure. *National Renewable Energy Laboratory*, Golden, CO, SAD.
- Wellisch, G., Jungmeier, A., Karbowski, M. K. P., Rogulska, M. (2010) Biorefinery Systems – potential contributors to sustainable innovation. *Biofpr.* **4**, 275–286.

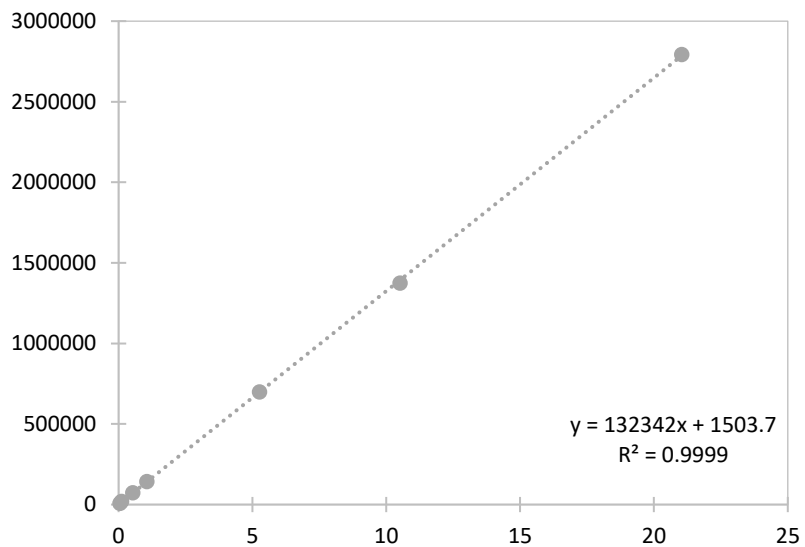
Yan, G., Viraraghavan, T. (2003) Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Res.* **37**(18), 4486–4496.

Zamani, A., Jeyhanipour, A., Edebo, L., Niklasson, C., Taherzadeh, M. J. (2008) Determination of glucosamine and N-acetyl glucosamine in fungal cell walls. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 8314-8318.

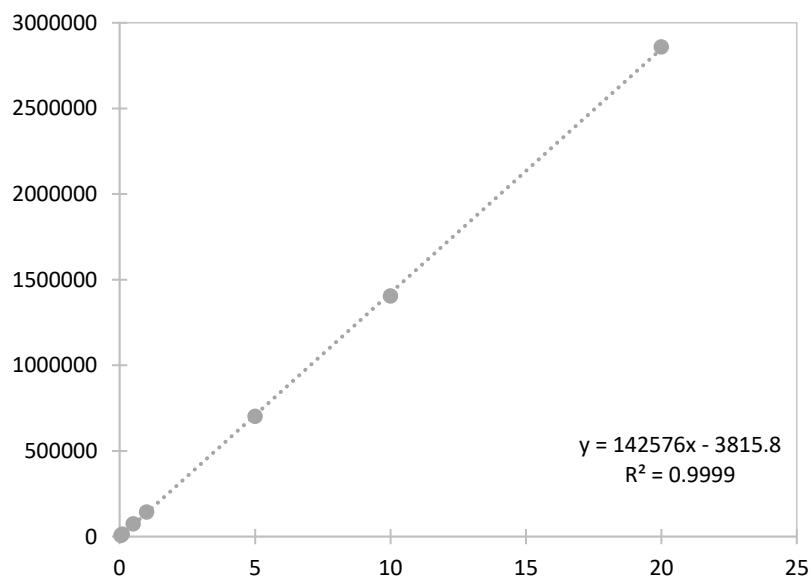
Zhang, Q. X. (1990) Research advancement on bioconversion of cellulose to ethanol. *Prog. Biotechnol.* **10**(4), 1–7.

## 7. PRILOZI

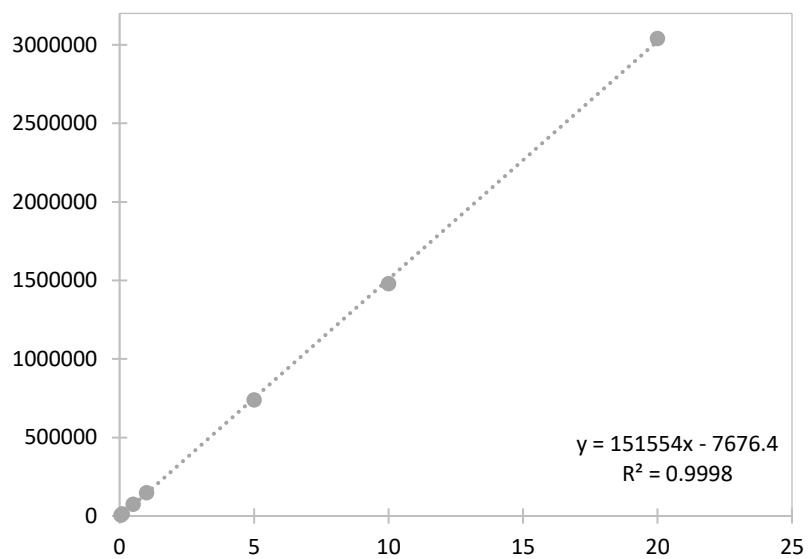
Prilog 7.1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze UPLC-om



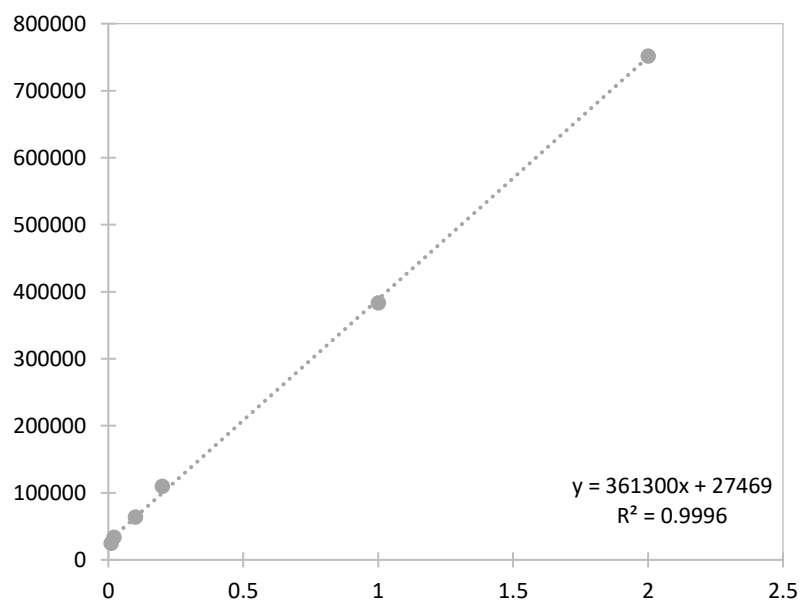
Prilog 7.2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ksiloze UPLC-om



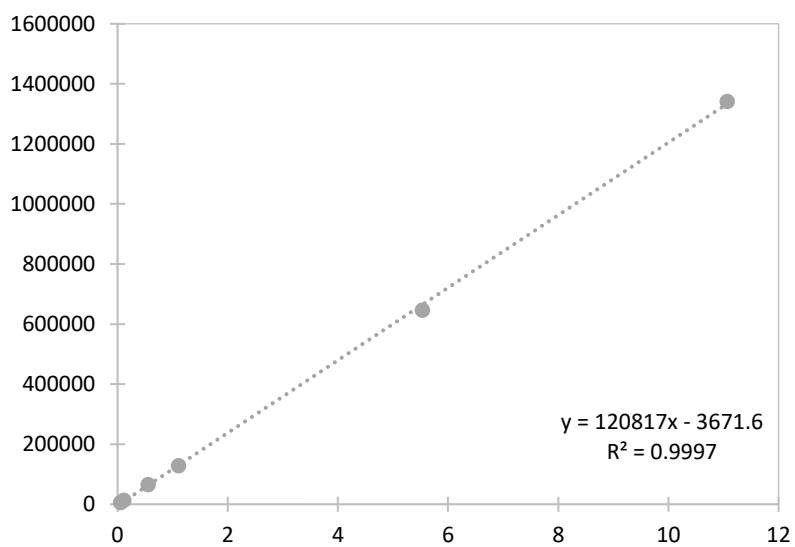
Prilog 7.3. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije arabinoze UPLC-om



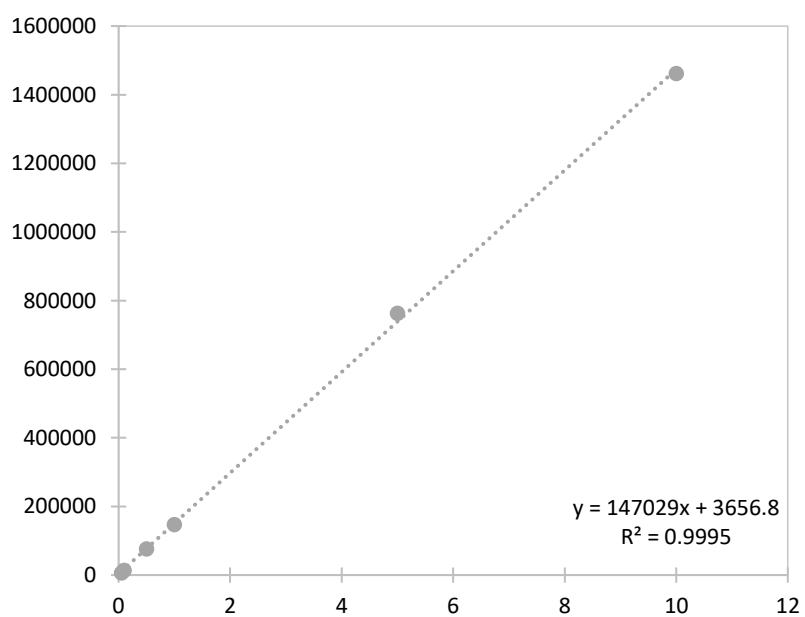
Prilog 7.4. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije etanola UPLC-om



Prilog 7.5. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glicerola UPLC-om

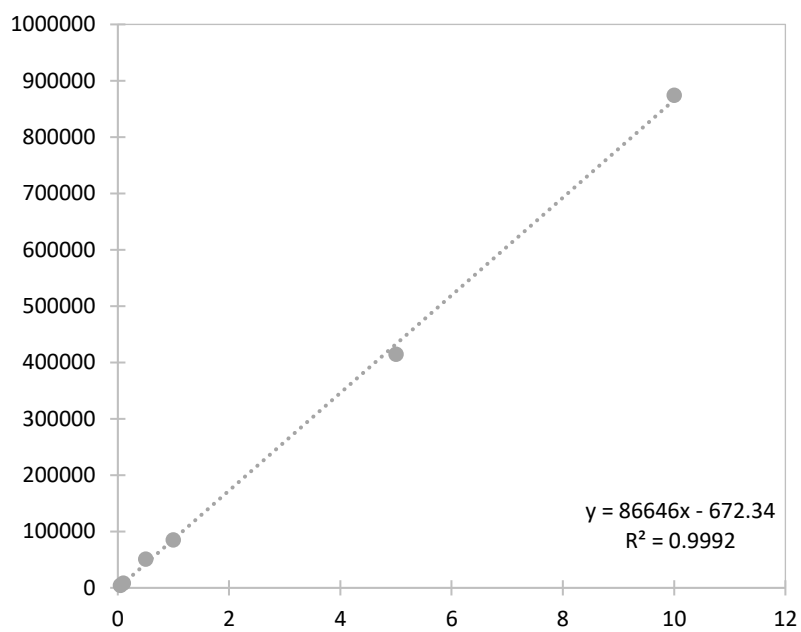


Prilog 7.6. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ksilitola UPLC-om

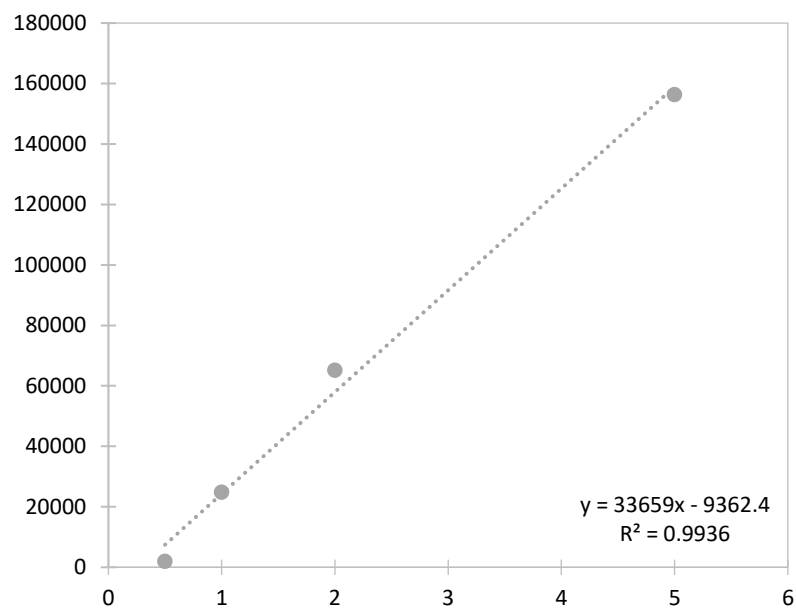




Prilog 7.7. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije octene kiseline UPLC-om



Prilog 7.8. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije izopropanola UPLC-om



## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Ime i prezime