

# Održiva proizvodnja fumarne i itakonske kiseline iz lignoceluloznog otpada nastalog proizvodnjom hrane

---

Bečirović, Karlo

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

*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:159:476651>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-31**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Karlo Bečirović  
0058219013**

**Održiva proizvodnja fumarne i itakonske kiseline iz  
lignoceluloznog otpada nastalog  
proizvodnjom hrane**

**ZAVRŠNI RAD**

**Mentor:** prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac

**Zagreb, 2024.**

Završni rad izrađen je u okviru HRZZ projekta "Biorafinerijski sustav za proizvodnju biogoriva i biokemikalija iz neprehrambenih lignoceluloznih sirovina" (Biorefinery-NFLRM) – trajanje projekta 29. 12. 2023. – 28. 12. 2027. (voditelj projekta prof. dr. sc. Božidar Šantek)

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Održiva proizvodnja fumarne i itakonske kiseline iz lignoceluloznog otpada  
nastalog proizvodnjom hrane  
Karlo Bećirović, 0058219013

## Sažetak:

Organske kiseline su ekonomski važni proizvodi s brojnim primjenama u različitim područjima života. Biotehnološka proizvodnja organskih kiselina je stoga postala brzo rastuće područje. S obzirom na koncept današnjeg kružnog gospodarstva, lignocelulozna biomasa može se koristiti u industrijskoj proizvodnji kao obnovljiva sirovina za razne biotehnološke proizvode. Korištenje takvih sirovina omogućuje ekonomski i ekološki održivo dobivanje proizvoda visoke vrijednosti. Lignocelulozni otpad koji nastaje u prehrambenoj industriji ima ogroman biotehnološki potencijal. Predmet interesa ovog rada je mogućnost korištenja lignoceluloznog otpada, nastalog tijekom proizvodnje hrane, kao sirovine za proizvodnju fumarne i itakonske kiseline biotehnološkim procesima.

**Ključne riječi:** lignocelulozni otpad, prehrambena industrija, fumarna kiselina, itakonska kiselina

**Rad sadrži:** 35 stranica, 7 slika, 6 tablica, 43 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Ana Dobrinčić, viši asistent

**Datum obrane:** 16. rujna 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Food Technology

Department of Biochemical engineering  
Laboratory for Biochemical engineering, industrial microbiology and beer and malt technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

**Sustainable production of fumaric and itaconic acid from lignocellulosic waste  
from food production**

**Karlo Bečirović, 0058219013**

### **Abstract:**

Organic acids are economically important products with numerous applications in different areas of life. Biotechnological production of organic acids has therefore become a rapidly growing field. Considering the concept of today's circular economy, lignocellulosic biomass can be used in industrial production as renewable raw materials for various biotechnological products. The use of such raw materials enable the economically and ecologically sustainable production of high-value products. Lignocellulosic waste, generated in the food industry, has enormous biotechnological potential. The subject of interest in this paper is the possibility of using lignocellulosic waste, created during food production, as a raw material for the production of fumaric and itaconic acid by biotechnological processes.

**Keywords:** lignocellulosic waste, food industry, fumaric acid, itaconic acid

**Thesis contains:** 35 pages, 7 figures, 6 tables, 43 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Vlatka Petravić Tominac, PhD, Full Professor

**Technical support and assistance:** Ana Dobrinčić, PhD, Senior Scientific Assistant

**Thesis defended:** September 16th, 2024

## Sadržaj

1.UVOD .....	1
2.TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. LIGNOCELULOZNI OTPAD IZ PROIZVODNJE HRANE KAO BIOTEHNOLOŠKA SIROVINA .....	2
2.2. BIOTEHNOLOŠKI PRINCIPI KORIŠTENJA LIGNOCELULOZNE BIOMASE .....	3
2.3. POSTUPCI PREDOBRADE LIGNOCELULOZNIH SIROVINA .....	6
2.4. ORGANSKE KISELINE KAO VAŽNI BIOTEHNOLOŠKI PROIZVODI.....	6
2.5. FUMARNA KISELINA.....	11
2.5.1. KEMIJSKA STRUKTURA I SVOJSTVA FUMARNE KISELINE	11
2.5.2. PODRUČJA PRIMJENE FUMARNE KISELINE	13
2.5.3. PROIZVODNJA FUMARNE KISELINE	14
2.5.4. PROČIŠĆAVANJE FUMARNE KISELINE NAKON BIOTEHNOLOŠKE PROIZVODNJE	19
2.6. ITAKONSKA KISELINA .....	20
2.6.1. KEMIJSKA STRUKTURA I SVOJSTVA ITAKONSKE KISELINE	20
2.6.2. PODRUČJA PRIMJENE ITAKONSKE KISELINE	21
2.6.3. PROIZVODNJA ITAKONSKE KISELINE	23
2.6.4. PROČIŠĆAVANJE ITAKONSKE KISELINE NAKON BIOTEHNOLOŠKE PROIZVODNJE	28
3.ZAKLJUČAK.....	29
4.LITERATURA.....	30

## 1. UVOD

Pojam lignoceluloznih materijala ili lignocelulozne biomase (LCB) odnosi se na biljnu biomasu koja može potjecati iz više različitih izvora poput poljoprivrede, prehrambene industrije i šumarstva. Neki od primjera lignoceluloznih ostataka su: 1. poljoprivredni ostaci odnosno žetveni ostaci kao npr. pšenična slama, slama ječma, pljevica pšenice i ječma, kukuruzovina, kukuruzna komušina (perušina) i kukuruzni oklasci; 2. druge biljke i biljni ostaci (listovi, stabljike, djetelina, trava); 3. otpad iz industrijske proizvodnje hrane i pića, pokvareno ili nekvalitetno voće i povrće (Velić i sur., 2019; Petravić-Tominac i sur., 2020, Zheng i sur., 2022). Prednosti lignoceluloznih sirovina su niska cijena, dostupne količine i nekonkurentnost žitaricama koje se koriste kao hrana (Bajpai, 2016; Zoghلامي i Paes, 2019).

S obzirom na konstantan porast svjetske populacije i povećanje potrebe za proizvodnjom hrane, prehrambena industrija, kao jedan od najvećih industrijskih sektora, rezultira konstantnim porastom otpadnih materijala. Upravljanje otpadom od hrane postalo je veliki ekonomski i ekološki izazov. Ovi se materijali mogu uporabiti kao sirovina za raznovrsne održive bioprocese kojima se mogu proizvesti brojni visokovrijedni biotehnološki proizvodi, npr. kemikalije (organske kiseline, organska otapala), lijekovi, tekuća i plinovita biogoriva, enzimi, spojevi arome, pigmenti, mikrobna biomasa, makrofungi i njihovi metaboliti i dr. (Coban, 2020; Petravić-Tominac i sur., 2022).

Stoga su ciljevi ovog završnog rada:

- pojasniti sastav lignoceluloznih sirovina za biotehnološke procese
- objasniti osnovne biotehnološke principe korištenja lignocelulozne biomase
- razmotriti mogućnost primjene lignoceluloznog otpada, nastalog pri proizvodnji hrane, za proizvodnju organskih kiselina
- navesti kemijske karakteristike fumarne i itakonske kiseline, objasniti njihovu gospodarsku važnost i područja primjene
- objasniti konkurentnost biotehnološkog načina proizvodnje fumarne i itakonske kiseline, s naglaskom na lignocelulozne sirovine, u odnosu na postupke kemijske sinteze
- navesti principe izdvajanja i pročišćavanja fumarne i itakonske kiseline po završetku bioprocasa.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. LIGNOCELULOZNI OTPAD IZ PROIZVODNJE HRANE KAO BIOTEHNOLOŠKA SIROVINA

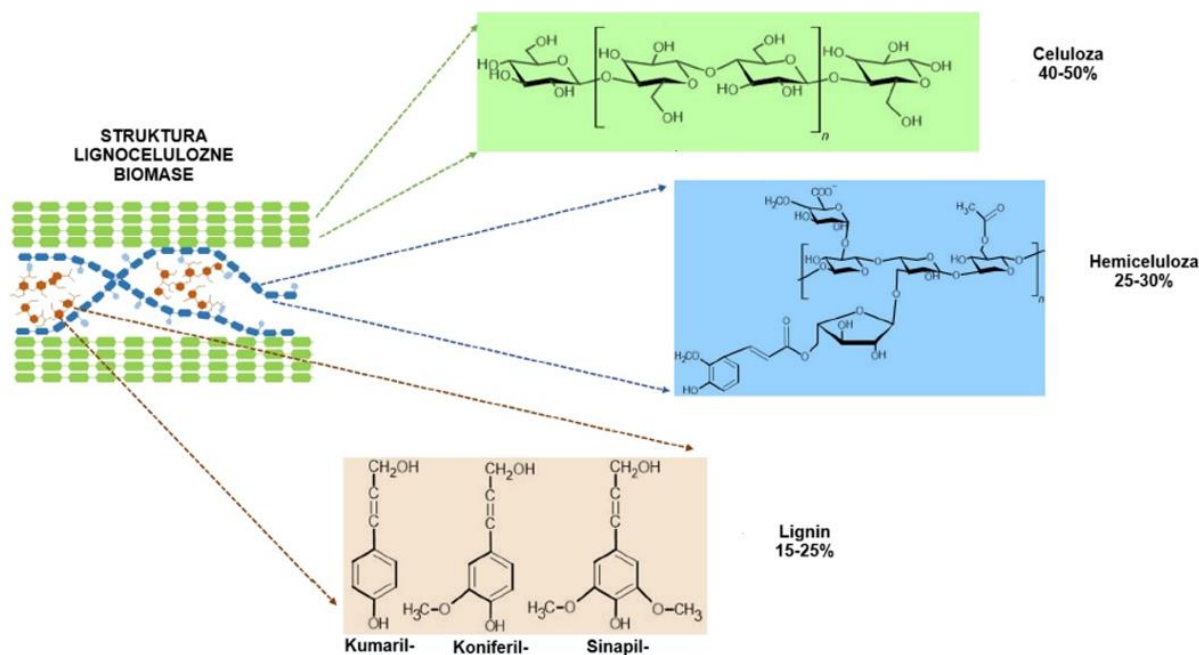
Različite vrste lignoceluloznih ostataka, odnosno lignocelulozne biomase (LCB), ranije su završavale na odlagalištima ili su spaljivane. U današnje vrijeme se lignocelulozni materijal ne bi trebalo tretirati na taj način, obzirom da se može koristiti kao sirovinna baza za različite biotehnološke procese, u skladu s konceptom suvremenog kružnog gospodarstva. Mali je broj mikroorganizama koji mogu razgraditi lignocelulozu, no primjenom odgovarajućih metoda predobrade lignoceluloznih sirovina i odgovarajućih radnih mikroorganizama mogu se uspostaviti raznovrsni održivi bioprocesi čiji su rezultat brojni visokovrijedni biotehnološki proizvodi. Tako se mogu proizvesti različite kemikalije poput organskih kiselina (npr. octena kiselina, limunska kiselina, fumarna kiselina) i organskih otapala (npr. aceton, butanol) ali i mnogobrojni drugi proizvodi kao što su lijekovi (npr. antibiotici), tekuća i plinovita biogoriva (bioetanol, biodizel, bioplín), enzimi za primjenu u prehrambenoj i drugim industrijama, različiti spojevi arome, pigmenti, mikrobna biomasa, proteini jednostaničnih organizama (eng. single cell protein, SCP), makrofungi i njihovi metaboliti te razni drugi proizvodi visoke vrijednosti (npr. vanilin, galna kiselina, ksilitol, furfural) (Coban, 2020; Petravić-Tominac i sur., 2022).

U skladu s time, LCB ima ogroman biotehnološki potencijal s obzirom na dostupnost, budući da značajne količine ne nastaju samo u prehrambenoj industriji već i u poljoprivredi te drvnoj industriji (Petravić-Tominac i sur., 2022). Procjenjuje se da globalno svake godine nastane ogromna količina lignocelulozne biomase, od čega 89% nije u potpunosti iskorišteno te se može koristiti kao jeftina obnovljiva sirovina. Primjeri lignoceluloznih materijala su pšenična slama, slama ječma, pljevica pšenice i ječma, kukuruzovina, kukuruzna komušina (perušina), kukuruzni oklasci, druge biljke i biljni ostaci (lišće, stabljike, djetelina, trava), drvo topole, drveni ostaci poput piljevine, stabljike biljaka te otpad iz industrijske proizvodnje hrane i pića poput ostataka šećerne repe i šećerne trske, pivskoga tropa, pokvarenog ili nekvalitetnog voća i povrća, sačmi uljarica i dr. (Mussatto i Teixeira, 2010; Mussato i sur., 2012; Karimi, 2015; Petravić-Tominac i sur., 2022). Pored male cijene i velike dostupne količine, prednosti lignoceluloznog materijala kao biotehnološke sirovine su nekonkurentnost žitaricama koje se koriste kao hrana (Petravić-Tominac i sur., 2022).

Glavninu kompleksne strukture lignocelulozne biomase čine tri strukturna polimera, a to su celuloza, hemiceluloza i lignin (Slika 1), koji su povezani s drugim manje zastupljenim komponentama kao što su proteini, pektin, ekstraktivne tvari i pepeo. Zbog različitih izvora,



ove sirovine imaju različite udjele strukturnih polimera te sastav LCB ovisi o vrsti i starosti biljke, klimi i uvjetima okoliša. Kako bi se LCB prevela u proizvode biotehnoškim putem, potrebno je osloboditi monosaharide koji tvore ugljikohidrate lignoceluloze (Varriale i sur., 2023).



**Slika 1.** Struktura lignocelulozne biomase sadrži celulozu (40–50 % w/w), hemicelulozu (25–30 % w/w) i lignin (15–25 % w/w) u različitim omjerima. Celuloza je linearni homopolimer koji se sastoji od linearnog lanca jedinica D-glukoze povezanih  $\beta$ -(1,4)-glikozidnim vezama. Hemiceluloze su kratko razgranati, supstituirani heteropolimeri različitih šećera (pentoza i heksoza), povezanih različitim glikozidnim vezama i različitim sastavom bočnih lanaca. Lignin je kompleksni umreženi heteropolimer sastavljen od triju različitih supstituiranih aromatskih jedinica (*p*-kumaril, koniferil i sinapil alkohol) (Varriale i sur., 2023)

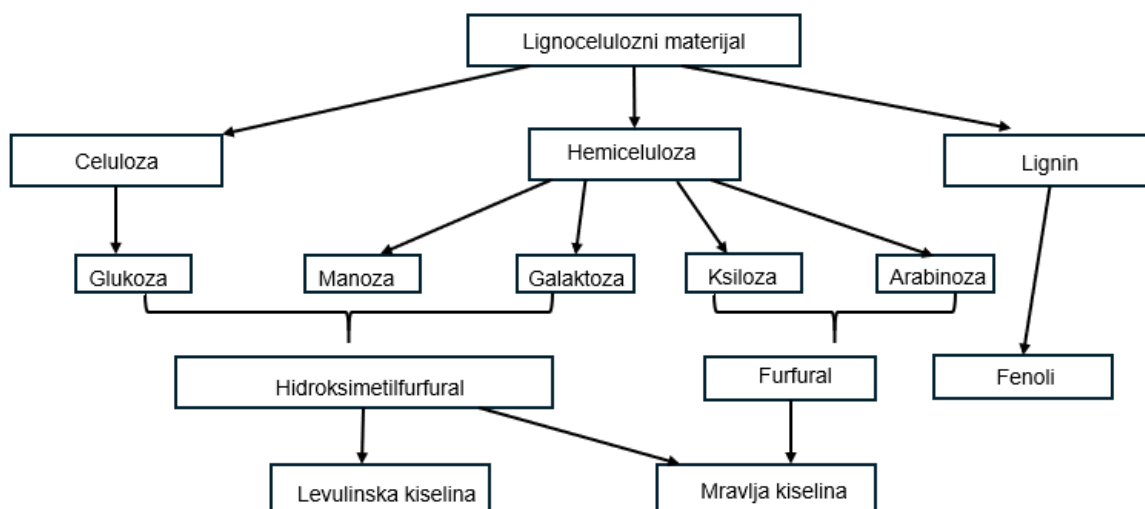
## 2.2. BIOTEHNOLOŠKI PRINCIPI KORIŠTENJA LIGNOCELULOZNE BIOMASE

Europska federacija za biotehnologiju (European Federation of Biotechnology, EFB) je 1989. godine prihvatila definiciju biotehnologije kao združivanje prirodnih i inženjerskih znanosti radi primjene organizama, stanica, njihovih dijelova i molekularnih analoga za produkte i usluge (Ivančić Šantek, 2020). U sklopu biotehnoške primjene mikroorganizama istražuju se mogućnosti proširenja sirovinske baze, što između ostalog uključuje i brojna istraživanja lignoceluloznih materijala (Marić, 2000; Marić i Šantek, 2009), za koje se, obzirom na dostupnu

količinu, smatra da imaju ogroman biotehnološki potencijal kao obnovljive sirovine i stoga se mogu primijeniti u okviru biorafinerijskog koncepta. Za razliku od rafinerije nafte u kojoj se kao sirovina koristi sirova nafta, biorafinerija je postrojenje u kojem se procesima konverzije i prerade biomase dobivaju različiti proizvodi kao što su goriva, energija, toplina, materijali i kemikalije. Ovakvo dobivanje različitih bioproizvoda (bioenergije, biokemikalija, biomaterijala) definirano je kao biogospodarstvo ili bioekonomija (engl. bio-based economy or bioeconomy) (Varriale i sur., 2023).

Mikrobni procesi se uglavnom odvijaju kroz četiri tehnološke faze: priprema hranjive podloge, priprema cjepiva (inokuluma), proizvodna faza te izdvajanje i pročišćavanje proizvoda (Marić i Šantek, 2009). Za vođenje proizvodnih procesa koriste se specifične posude koje se nazivaju bioreaktori (u anaerobnim procesima fermentori), a opremljene su odgovarajućim mjernim i regulacijskim sustavima. Bioreaktori su obično izrađeni od nehrđajućeg čelika i mogu imati različite volumene, oblike, načine miješanja te prozračivanja (aeracije) njihova sadržaja ovisno o mikroorganizmu, trajanju procesa, tipu i tržišnoj vrijednosti proizvoda. Uzgoj mikrobnih stanica može se provesti na tri načina: površinski (emerzno), dubinski (submerzno) te na polučvrstim i čvrstim supstratima (Marić i Šantek, 2009). U industriji se lignocelulozne sirovine koriste u submerznim procesima i u postupcima uzgoja na polučvrstim ili čvrstim supstratima (Mussatto i Teixeira, 2010).

Dubinski ili submerzni postupak uzgoja mikroorganizama (engl. submerged cultivation ili Submerged Fermentation, SF, Smf) podrazumijeva rast industrijskih radnih mikroorganizama u bioreaktoru u tekućoj hranjivoj podlozi koja sadrži 80 - 90% slobodne vode, a miješa se mehaničkim mješalom, pumpom ili zrakom (osim u anaerobnim procesima). Pri industrijskoj proizvodnji većine biotehnoloških proizvoda najčešće se koristi submerzna kultivacija jer ima najveće pokazatelje uspješnosti bioprocasa (prinos proizvoda, stupanj iskorištenja supstrata, učinkovitost i produktivnost) (Marić i Šantek, 2009). U submerznim procesima mogu se koristiti brojni sojevi mikroorganizama, uključujući bakterije, kvasce, funge i alge (Mussatto i Teixeira, 2010). Da bi se mikroorganizmi, koji ne mogu sami razgraditi lignocelulozu, mogli uzgajati submerznim postupkom, lignocelulozna sirovina se prethodno razgrađuje odgovarajućim postupcima predobrade. Time se iz celuloze i hemiceluloze u tekuću hranjivu podlogu oslobađaju šećeri (heksoze i pentoze) koji služe radnom mikroorganizmu kao izvor ugljika i energije (Slika 2). Tako dobivenim lignoceluloznim hidrolizatima dodaju se odgovarajuće količine drugih hranjivih tvari, čijim dodatkom se optimira sastav tekuće hranjive podloge u skladu sa zahtjevima pojedinog bioprocasa (Marić, 2000; Mussatto i Teixeira, 2010; Petravić-Tominac i sur., 2022).



**Slika 2.** Hidroliza lignocelulozne biomase i nastajanje inhibicijskih spojeva (de Cárdenas i de Cárdenas, 2020)

Uzgoj na polučvrstim i uzgoj čvrstim supstratima (engl. Solid-State Fermentation, SSF) obuhvaća uzgoj mikroorganizama na sirovinama koje nisu topljive u vodi. Od njih se pripremaju polučvrste ili čvrste hranjive podloge koje sadržavaju malo slobodne, a puno upijene ili koloidno vezane vode te mikroorganizmi rastu na čvrstom supstratu slično kao što rastu u vlažnoj zemlji (Marić i Šantek, 2009). Mali udio vlage znači da će ove procese moći provesti samo ograničen broj mikroorganizama (Mussatto i Teixeira, 2010). Pritom se lignocelulozne sirovine koriste kao čvrsti nosač i / ili izvor hranjivih tvari, pri čemu se dobiva niz visokovrijednih proizvoda.

Iako je dosadašnji razvoj suvremene biotehnologije usmjeren uglavnom na submerzni uzgoj, koji se pokazao pogodnijim za većinu proizvoda, u određenim slučajevima i za određene proizvode uzgoj na polučvrstim ili čvrstim supstratima je prikladna ili čak bolja opcija obzirom na moguć veći prinos ili bolja svojstva proizvoda. Nadalje, uzgoj na polučvrstim ili čvrstim supstratima omogućuje njihovo korištenje bez zahtjevnih postupaka predobrade. Pregled mogućnosti korištenja poljoprivrednog otpada i otpada prehrambene industrije u bioprocima na polučvrstim i čvrstim supstratima može se naći u literaturi (Mussatto i Teixeira, 2010; Petravić-Tominac i sur., 2022).

### **2.3. POSTUPCI PREDOBRADE LIGNOCELULOZNIH SIROVINA**

Obzirom na kompleksnu kemijsku strukturu, LCB je otporna na mikrobnu i enzimsku razgradnju, što otežava njezinu biotehnološku primjenu. Lignocelulozni materijali su teško razgradivi zbog kristalinične strukture celuloze i kompleksne strukturne organizacije celuloze, hemiceluloze i lignina. Stoga je neophodna odgovarajuća metoda predobrade, što omogućava da celuloza postane pristupačnija za djelovanje enzima i olakšava pretvorbu polisaharida u fermentabilne šećere. Predobrada lignoceluloze je vrlo kompleksno područje opisano u literaturi te nije detaljno pojašnjena u ovom radu. Iako postoje različite metode predobrade, nisu sve u potpunosti prikladne za industrijsko mjerilo. Odabir odgovarajućeg postupka predobrade, koja se provodi prije samog submerznog procesa, ovisi o vrsti lignoceluloznog materijala i željenom proizvodu. Najčešće se provode kemijska i enzimska hidroliza. Pritom se mogu dobiti tekući lignocelulozni hidrolizati koji sadrže oslobođene jednostavne šećere, a preostali čvrsti ostatak može se iskoristiti u drugim postupcima. Lignocelulozni hidrolizati mogu se koristiti u biotehnološkoj proizvodnji kao tekuća hranjiva podloga za submerzni uzgoj jer se radi o složenoj smjesi šećera (heksoza i pentoza) te drugih spojeva (Mussatto i Teixeira, 2010; Petravić-Tominac i sur., 2022).

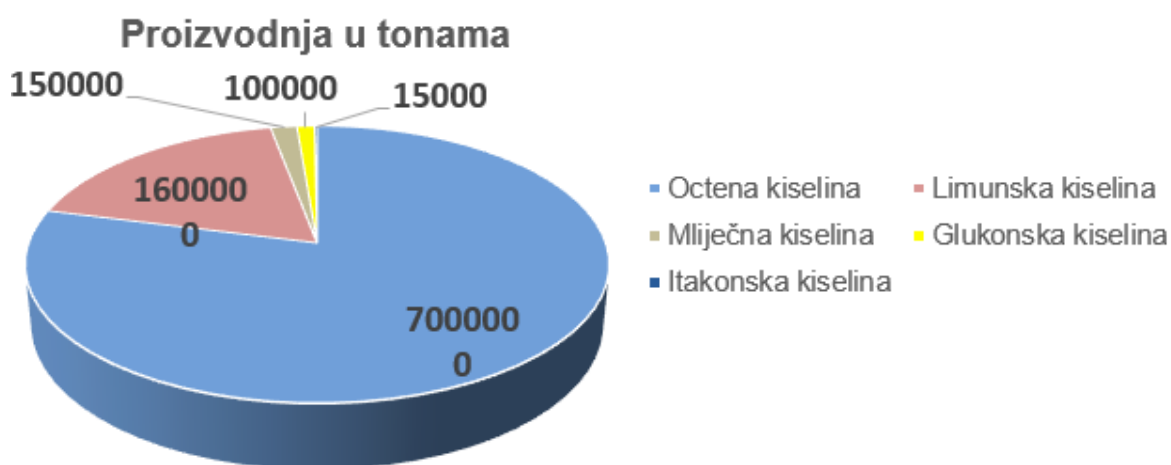
Tijekom nekih postupaka predobrade lignoceluloze, osim šećera oslobađa se i niz spojeva koji su toksični za radni mikroorganizam (slabe kiseline, derivati furana i fenolni spojevi), a potječu iz lignina ili nastaju razgradnjom šećera (Slika 2). Stoga je važno odabrati odgovarajuću metodu predobrade i podesiti njezine uvjete tako da nastane što manje inhibitora. Odgovarajućim metodama detoksikacije ili njihovom kombinacijom može se eventualno ukloniti nastale inhibitore biotehnološkog procesa. Metode detoksikacije dijele se na biološke, fizikalne i kemijske, a djelotvornost pojedine metode detoksikacije ovisi o tipu hidrolizata i o vrsti radnog mikroorganizma (Petravić-Tominac i sur., 2022).

### **2.4. ORGANSKE KISELINE KAO VAŽNI BIOTEHNOLOŠKI PROIZVODI**

Produkti bazne kemijske industrije najvećim dijelom služe za proizvodnju drugih vrsta proizvoda kemijske industrije. Isto tako, bazni biotehnološki proizvodi služe uglavnom kao sirovina za druge proizvode i dobivaju se u velikim količinama te im je zato cijena relativno niska. Obzirom da neke organske kiseline pripadaju u tzv. bazne kemikalije (engl. platform chemicals) te da za njih postoji sve veće globalno tržište, proizvodnja organskih kiselina je područje koje se brzo razvija (Ghai i sur., 2024). Obzirom na potražnju, organske kiseline su na globalnom tržištu po važnosti treća skupina kemikalija proizvedenih biotehnološkim putem,

uz očekivani dodatni porast (de Cárdenas i de Cárdenas, 2020).

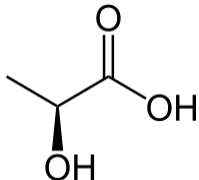
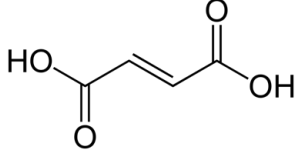
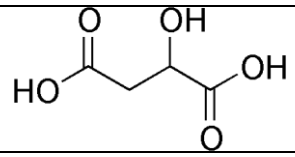
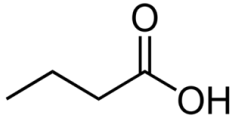
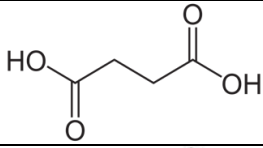
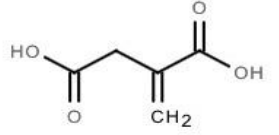
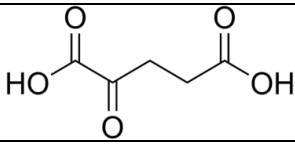
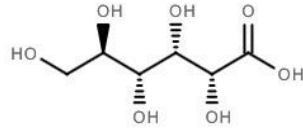
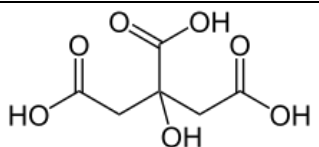
Organske kiseline ključne su za životne funkcije, a u prirodi se pojavljuju u hrani, mikroorganizmima i ostalim živim bićima. Prvi procesi industrijske proizvodnje octene i limunske kiseline potječu još iz 1823. i 1913. godine. Nakon toga je zbog porasta potražnje i novih primjena organskih kiselina povećan broj karboksilnih kiselina koje se industrijski proizvode putem inovativnih biotehnoških procesa, npr. glicerinska, glukarna, jantarna, maslačna, ksilonska, fumarna, jabučna, itakonska, laktobionska, propionska i adipinska kiselina (Alonso i sur., 2015). Globalno tržište organskih kiselina 2015. godine je iznosilo 6,55 milijardi američkih dolara, a procjenjuje se da će do 2026. godine narasti na 12,54 milijarde američkih dolara. Uzme li se u obzir prosječna godišnja proizvodnja industrijski važnih organskih kiselina, uz sve veću potražnju i primjenu, ovakav porast tržišta je očekivan. Tako se primjerice godišnje proizvede oko 7 milijuna tona octene kiseline i 1,6 milijuna tona limunske kiseline (Slika 3). Važno je razviti robusne i učinkovite bioprocese za proizvodnju karboksilnih kiselina iz jeftinih sirovina i stoga se nastoji postići velik prinos proizvoda iz lignoceluloznih materijala te minimizirati troškove (Alonso i sur., 2015; Kumari i sur., 2022; Ghai i sur., 2024).



**Slika 3.** Proizvodnja različitih organskih kiselina (Vishnu i sur., 2020)

Za organske kiseline je karakteristična njihova mala molekulska masa, a obično se mogu klasificirati na temelju četiri karakteristike: (1) prirode lanca ugljikovih atoma (aromatski, alifatski, aliciklički i heterociklički); (2) zasićenosti ili nezasićenosti spoja; (3) supstituiranosti; i (4) broja funkcionalnih skupina (mono, di- ili tri-karboksilne). S obzirom na duljinu lanca, dijele se na kratkolančane (1-6 ugljikovih atoma), srednjelančane (7-10 ugljikovih atoma) i dugolančane kiseline (više od 11 ugljikovih atoma) (Vishnu i sur., 2020). Pregled strukture, broja C-atoma te molekulske težine prikazan je u Tablici 1.

**Tablica 1.** Molekulska formula, molekulska težina i molekulska struktura odabranih ekonomski značajnih organskih kiselina( Ghai i sur., 2024)

Organska kiselina	Broj ugljikovih atoma	Molekulska formula	Molekulska masa	Molekulska struktura
mliječna kiselina	3	$C_3H_6O_3$	90,08	
fumarna kiselina	4	$C_4H_4O_4$	116,07	
jabučna kiselina		$C_4H_6O_5$	134,087	
maslačna kiselina		$C_4H_8O_2$	88,11	
jantarna kiselina		$C_4H_6O_4$	118,09	
itakonska kiselina	5	$C_5H_6O_4$	130,099	
alfa-ketoglutarna kiselina		$C_5H_6O_5$	146,11	
glukonska kiselina	6	$C_6H_{12}O_7$	196,16	
limunska kiselina		$C_6H_8O_7$	192,124	

Različite kiseline mogu naći mnogobrojne primjene u različitim granama industrije poput prehrambene industrije, proizvodnje stočne hrane, farmaceutske industrije, kemijske, naftne i plinske industrije, kozmetičke i tekstilne industrije i dr. Industrijska primjena organskih kiselina proizvedenih mikrobnim procesima uvelike ovisi o njihovoj cijeni, što predstavlja prvu prepreku njihovoj upotrebi. Osim tradicionalne primjene, u novije vrijeme je potaknuta bioproizvodnja organskih kiselina kao bifunkcionalnih monomera pa se tako kiseline s dodatnim keto- ili hidroksilnim grupama koriste kao monomeri za sintezu poliesteru, a dikarboksilne kiseline se mogu primijeniti u proizvodnji poliamida poboljšanih svojstava (Becker i Wittmann, 2015; Becker i sur., 2015).

Tako primjerice limunska kiselina, kao jedna od najpopularnijih i najistraživanijih organskih kiselina, ima brojne primjene. Mores i sur. (2021) objavili su pregled primjene limunske kiseline u industrijskoj proizvodnji hrane i pića, prvenstveno u funkciji acidulanta (tvar za zakiseljavanje) kako bi se spriječio gubitak organoleptičkih svojstava, a također i kao konzervansa s ciljem produženja roka trajanja. Cirimmina i sur. (2017) istaknuli su njezinu antioksidacijsku sposobnost, budući da limunska kiselina može kelirati metalne ione. U farmaceutskoj industriji se koristi kao sastojak šumećih tableta, kao poboljšivač okusa i za proizvodnju filmova, a u kozmetičkoj industriji u losionima za njegu kože, dezodoransima i lakovima za kosu.

Slično kao i limunska, mliječna kiselina je izrazito rasprostranjena u prirodi. Široko se primjenjuje u prehrambenoj industriji kao emulgator, konzervans i poboljšivač okusa (većinom za izradu mliječnih proizvoda), u kozmetičkoj industriji kao sredstvo za vlaženje, farmaciji i kemijskoj industriji za proizvodnju otapala i sintezu biorazgradive plastike i premaza. Također se polimeri mliječne kiseline (polilaktat) koriste za proizvodnju kirurškog konca i medicinskih implantanta (Mussato i sur., 2012; Li i sur., 2015; Alves de Oliveira i sur., 2018).

Organske kiseline mogu se prevesti u različite proizvode veće dodane vrijednosti s mnogobrojnim komercijalnim primjenama te stoga posjeduju velik ekonomski potencijal. Glavne primjene odabranih organskih kiselina prikazane su na Slici 4.

U novije vrijeme sve je veći trend korištenja fermentacije na čvrstoj podlozi umjesto submerzne fermentacije u tekućoj hranjivoj podlozi. S obzirom na mali udio vlage u SSF sustavima, odabir mikroorganizama ima ključnu ulogu za određenu vrstu lignoceluloznog otpada i optimizacija fizikalno-kemijskih parametara (Mussatto i Teixeira, 2010).

Za proizvodnju organskih kiselina koriste se bakterije *Arthrobacter paraffinensis*, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus thermophilus*, plijesni *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* te kvasac *Yarrowia lipolytica* i srodne vrste kvasaca (Panda i sur., 2016). Industrijski radni mikroorganizmi koji se često koriste u biotehnologiji, kao što su bakterije *Escherichia coli* i *Corynebacterium glutamicum* te kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, podvrgnuti su genetičkim

modifikacijama kako bi se mogli koristiti za razvoj procesa biotehnoške proizvodnje organskih kiselina (Becker i sur., 2015).

Limunska kiselina je primjer organske kiseline koja se uglavnom proizvodi biotehnoškim putem na čvrstoj podlozi iz lignoceluloznih otpadaka. Za proizvodnju ove kiseline može se koristiti velik broj radnih mikroorganizama, ali se najviše koristi plijesan *Aspergillus niger* jer postiže velike prinose i može se poboljšati mutagenezom. Važan čimbenik koji treba uzeti u obzir pri proizvodnji limunske kiseline putem SSF-procesa je da na sintezu utječe izvor dušika čije trošenje smanjuje pH vrijednost (Ghai i sur., 2024). Neke od sirovina koje se koriste u proizvodnji limunske kiseline uz pripadajuća iskorištenja prikazane su u Tablici 2.

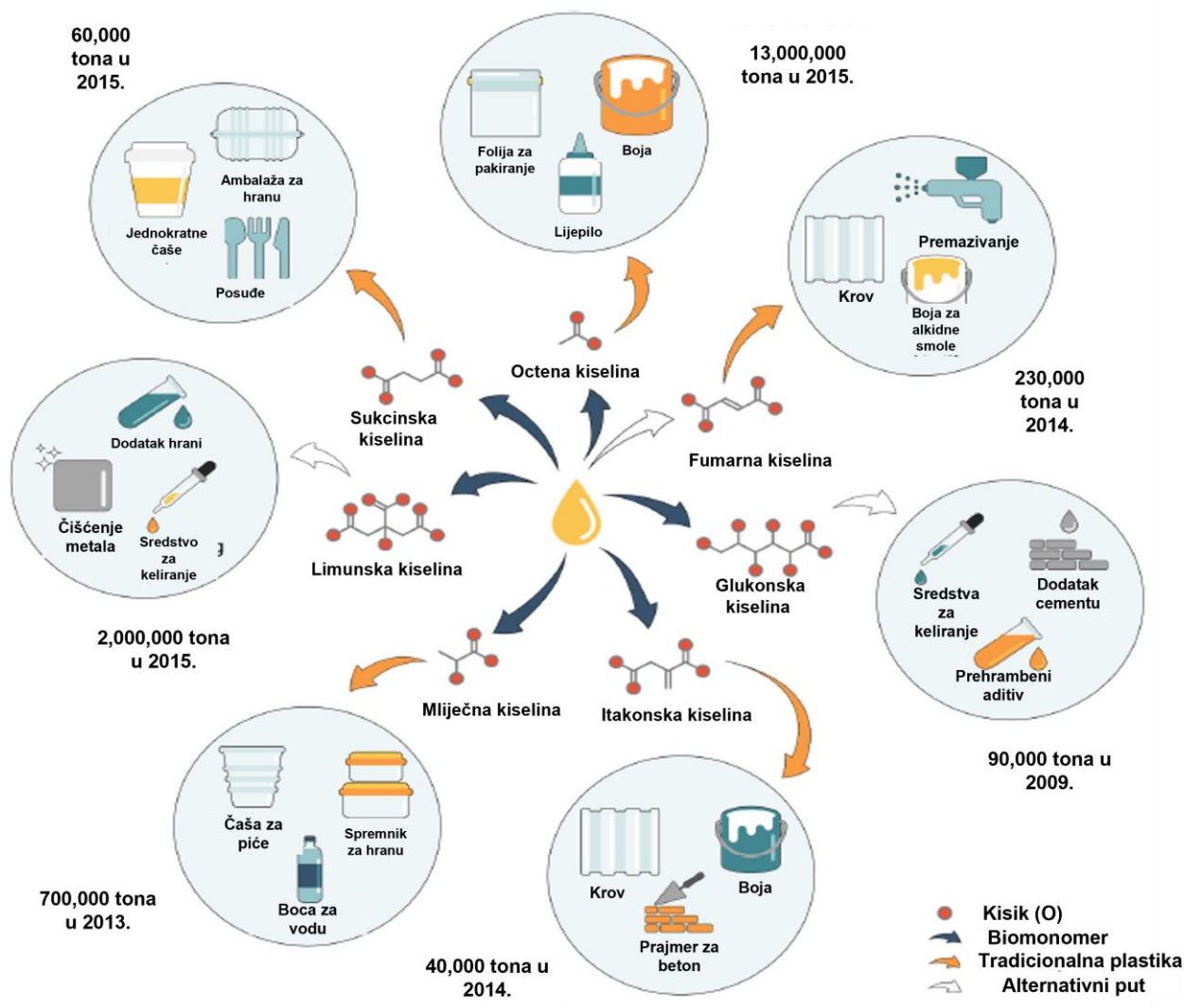
**Tablica 2.** Mikrobna proizvodnja limunske kiseline iz odabranih lignoceluloznih sirovina koje nastaju u prehrambenoj industriji (Ghai i sur., 2024)

Supstrat	Prinos (%)
komina jabuke	88
otpad iz pivovare	78,5
gomolj biljke Yam bean ( <i>Pachyrhizus erosus</i> (L.) Urban)	58 - 74
kora kivija	> 60

Mliječna kiselina može se proizvesti SSF-postupcima koristeći fungalne i bakterijske kulture. Sojevi plijesni roda *Rhizopus* su uobičajeni među fungalnim kulturama, a sojevi roda *Lactobacillus* među bakterijskim kulturama koje se koriste kao radni mikroorganizmi za industrijsku proizvodnju mliječne kiseline. U nastavku teksta prikazan je pregled suvremene biotehnoške proizvodnje fumarne i itakonske kiseline.

Proizvodnja biopolimera iz organskih kiselina dobivenih biotehnoškim putem održiva je alternativa petrokemijskim izvorima. Pritom je ekonomska konkurentnost jedan od glavnih izazova, pa se korištenjem lignocelulozne biomase nastoji postići ekonomski održiv proces. Stoga korištenje hidrolizirane biomase za proizvodnju organskih kiselina, koje potom služe kao biomonomeri, može biti konkurentno standardnoj praksi proizvodnji plastike na bazi petrokemijskih sirovina (Slika 4). U biorafinerijskom konceptu korištenja lignoceluloznih sirovina za proizvodnju biopolimera kao biomonomeri se dobivaju octena, limunska, fumarna, glukonska, mliječna, itakonska i jantarna kiselina (Diep i sur., 2012; Magalhães Júnior i sur., 2021).





**Slika 4.** Glavni načini primjene odabranih organskih kiselina za dobivanje biopolimera i pripadajuće količine proizvedenih biopolimera (Magalhães Júnior i sur., 2021)

## 2.5. FUMARNA KISELINA

### 2.5.1. Kemijska struktura i svojstva fumarne kiseline

Fumarna kiselina (engl. fumaric acid, FA) je dikarboksilna organska kiselina koja sadrži četiri ugljikova atoma. Molekulska formula ove kiseline je  $C_4H_4O_4$ , njezina sažeta strukturna formula je  $COOH-CH=CHCOOH$ , a strukturna formula fumarne kiseline prikazana je u Tablici 1. Fumarna kiselina sadrži dvostruku veze između  $\alpha$ - i  $\beta$ -položaja i dvije karboksilne skupine koje

se međusobno nalaze u trans (*E*) položaju, dok su u maleinskoj kiselini u *cis* (*Z*) položaju (Das i sur., 2016; Mohmad i sur., 2024). FA je bezbojna, bez okusa, a u čistom stanju je bijela kristalna tvar čija su fizikalna i kemijska svojstva navedena u Tablici 3. Slabo je topljiva u vodi (ispod 10 g L<sup>-1</sup>), a kada se FA zagrije na 200 °C dolazi do njezine pretvorbe u malein anhidrid, s obzirom da ne postoji fumarni anhidrid. Soli fumarne kiseline imaju različitu topljivost u vodi.

**Tablica 3.** Fizikalna i kemijska svojstva fumarne kiseline (FA) (Kreuter i sur., 2002, Das i sur., 2015)

SVOJSTVO	VRIJEDNOST
Molekulska formula	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>
Molarna masa	116,07g/mol
Gustoća	1,635 g/cm <sup>3</sup>
Karakteristike kristala	monoklinski, prizmatični, oblik iglica ili listića
Električni dipolni moment	8,17
Talište	560 K (287 °C)
Vrelište	563 K (290 °C)
Topljivost	Etilni alkohol (95%) = 54,5 (302,7 K) Triklormetan = 0,2 g/L (298 K) Tetraklormetan = 0,27 mg/mL (298 K) Dietil eter = 7,1 mg/mL na 298 K Propan-2-on = 17 g/mL (302,7 K) 2-butennitril = 0,34 mg/mL (323 K) Voda = 6,3 mg/mL (298 K)
Toplinski kapacitet	0,1418 kJ/mol
Standardna entalpija katalitičke hidrogenacije	-130,3 kJ/mol
Kalorijska vrijednost	-1334,7 kJ/mol
Toplina sublimacije)	123,6 kJ/mol
Toplina nastajanja (entalpija nastajanja)	-811,03 kJ/mol
Gibbsova energija	-655,633 kJ/mol
pKa vrijednost	3,10 i 4,64

FA je prvi put detektirana u gljivi *Boletus pseudoignarius*, koja pripada u rod vrganja i porodicu vrganjevki. Značajnija količina fumarne kiseline je 1832. izolirana iz biljke *Fumaria officinalis*

(hrv. dimnjača) po kojoj je i dobila ime (Das i sur., 2016; de Cárdenas i de Cárdenas, 2020; Lu i sur., 2020; Ghai i sur., 2024; Mohmad i sur., 2024), a radi se o jednogodišnjoj zeljastoj biljci karakterističnog lijepog ružičastog cvijeta koja pripada porodici makova (*Papaveraceae*) i raste od travnja do listopada na sjevernoj hemisferi te je poznata po svojim ljekovitim svojstvima (Dimnjača, 2024). U svim aerobnim organizmima, biosinteza FA odvija se kroz dva različita metabolička puta: (1) ciklus trikarboksilne kiseline (TCA) ili Krebsov ciklus i (2) put reduktivne karboksilacije. Soli i esteri FA nazivaju se fumarati.

### 2.5.2. Područja primjene fumarne kiseline

Zahvaljujući svojoj kemijskoj strukturi, tj. dvjema karboksilnim skupinama i dvostrukoj vezi, FA je podložna kemijskim modifikacijama (polimerizaciji i esterifikaciji), što je važno za mogućnost njezine primjene kao značajnog intermedijera u raznim područjima kemijske, prehrambene i drugih industrija (Mohmad i sur., 2024).

Budući da je vrlo jeftina, fumarna kiselina se primjenjuje u raznim industrijskim granama. FA se najviše koristi za industrijsku proizvodnju hrane i pića (oko 1/3 svjetske potrošnje) te nosi oznaku E297. Netoksična je i nehigroskopska. Ima baktericidni učinak, čime kontrolira rast mikroorganizama te produžuje trajnost proizvoda. Od 1946. godine koristi se kao acidulant u proizvodnji hrane i pića. Koristi se za podešavanje pH vrijednosti te u odnosu na druge prehrambene kiseline pokazuje bolji puferski kapacitet pri pH 3. Također je vrlo jak pojačivač okusa te daje dugotrajan kiselkast okus. Koristi se u pripremi jestivih sastojaka kao što su L-maleinska kiselina i L-asparaginska kiselina, koje se koriste u proizvodnji umjetnih zaslađivača. Osim što se koristi kao acidulant u hrani i pićima, primjenjuje se kao sastojak kukuruznih i pšeničnih tortilja, ohlađenih tijesta za kekse, raženog kruha te sredstava za želiranje. S gledišta prehrambene industrije, fumarna kiselina poboljšava kvalitetu hrane uz smanjene troškove (Varriale i Ulber, 2023; Ghai i sur., 2024; Mohmad i sur., 2024).

FA se dodaje u stočnu hranu radi povećanja konverzije hrane uz značajno smanjenje emisije metana (do 70%) (Mohmad i sur., 2024). Nadalje, FA djeluje kao međuprodukt u proizvodnji drugih organskih kiselina, kao što su L-jabučna kiselina i L-asparaginska kiselina, korištenih također u prehrambenoj industriji (Das i sur., 2016).

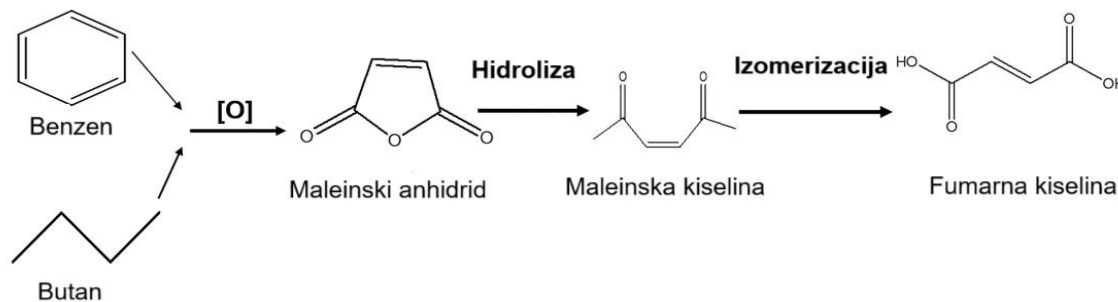
U proizvodnji smola FA je zbog svoje kemijske strukture, pogodna za reakcije polimerizacije i esterifikacije zbog čega se koristi za dobivanje smola različitih kemijskih svojstava. Od ukupne godišnje proizvodnje fumarne kiseline, koja iznosi 90 000 tona, industrija smola koristi 56%, od čega se 35% koristi u industriji papirnih smola, 15% u industriji nezasićenih poliesterskih smola, a 6% u industriji alkidnih smola. Smole sintetizirane iz fumarne kiseline otpornije su na

kemijsku koroziju, dugovječnije su nego smole proizvedene od maleinskog anhidrida. Fumarna se kiselina još koristi za proizvodnju biorazgradivih polimera, plastifikatora i karboksilacijskih sredstava za gumu (Das i sur., 2016).

Esteri fumarne kiseline sve veću pažnju dobivaju u području medicine i farmacije. Uspješno se primjenjuju u liječenju različitih kožnih poremećaja uključujući kožnu sarkoidozu, lipidnu nekrobiozu i dijabetičku dermopatiju, a velik učinak pokazuje i u liječenju psorijaze i skleroze (Varriale i Ulber, 2023).

### 2.5.3. Proizvodnja fumarne kiseline

Još ranih 1940-ih godina, u SAD-u se fumarna kiselina proizvodila uglavnom biotehnološkim putem i to submerznim procesima pomoću plijesni *Rhizopus oryzae* te je kompanija Pfizer na taj način godišnje proizvodila 4000 tona, da bi 1970-ih godina 20. stoljeća takva praksa bila privremeno prekinuta i umjesto toga se FA proizvodila kemijskim putem koji je tada postao ekonomski atraktivniji. Proizvodnja fumarne kiseline kemijskim putem započinje oksidacijom butana ili benzena kataliziranom vanadil-pirofosfatom,  $(VO)_2P_2O_7$ , pri čemu nastaje anhidrid maleinske kiseline, koji se potom hidrolizira u maleinsku kiselinu te na kraju slijedi izomerizacija u fumaranu kiselinu (Slika 5).



**Slika 5.** Kemijski put sinteze fumarne kiseline (Mohmad i sur., 2024)

Porastom cijena nafte, uporaba malein anhidrida kao naftnog derivata postaje neekonomična i neisplativa za proizvodnju FA. Malein anhidrid čini 60-70 % ukupnih troškova proizvodnje FA kemijskom sintezom (Das i sur., 2016). Pored toga su se javili problem stakleničkih plinova kao štetnih nusproizvoda (poput CO i CO<sub>2</sub>) te sve veći interes za sigurnost hrane što je potaklo obnavljanje interesa za razvojem alternativnih jeftinijih i ekološki prikladnijih biotehnoloških procesa proizvodnje FA. FA je identificirana kao jedna od najvažnijih (engl. „top 10“) baznih kemikalija koji se mogu proizvesti iz šećera biotehnološkim putem (Das i sur., 2016). Globalno tržište FA procjenjuje se na 660,9 milijuna američkih dolara, a predviđa se godišnji rast od 5,5

% tijekom razdoblja od 2021. do 2026. godine (Varriale i Ulber, 2023). Pri biotehnološkoj proizvodnji FA, mnogi aspekti koji određuju produktivnost procesa, npr. radni mikroorganizam i njegova morfologija, sredstvo za neutralizaciju i primijenjena sirovina (de Cárdenas i de Cárdenas, 2020; Varriale i Ulber, 2023; Ghai i sur., 2024; Mohmad i sur., 2024).

Plijesni imaju visok potencijal proizvodnje raznih organskih kiselina pa tako i FA. Još 1911. godine, Felix Ehrlich otkrio je da sojevi plijesni *Rhizopus nigricans* proizvode fumarnu kiselinu. Tijekom 90-ih godina 20. stoljeća su Foster i Waksman su 1938 objavili istraživanje u kojem su obuhvatili 41 soj mikroorganizama iz 8 različitih rodova kako bi identificirali koji od njih ima najveću produktivnost. U njihovom istraživanju pokazalo se da FA proizvode plijesni iz rodova *Rhizopus*, *Mucor*, *Cunninghamella* i *Circinella* te da se ovi sojevi međusobno razlikuju po proizvodnji FA. Od navedenih rodova istraženih u njihovom radu, vrste roda *Rhizopus*, (*R. nigricans*, *R. oryzae*, *R. arrhizus* i *R. formosa*) pokazale su se najboljima jer proizvode FA u aerobnim i anaerobnim uvjetima, dok drugi mikroorganizmi, poput kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i nekih sojeva plijesni vrsta *Aspergillus niger* i *Aspergillus flavus*, također mogu izlučivati fumarnu kiselinu, ali u niskim koncentracijama, kao manje zastupljen fermentacijski proizvod (de Cárdenas i de Cárdenas, 2020; Ghai i sur., 2024).

Za suvremenu komercijalnu proizvodnju FA uglavnom se koriste plijesni roda *Rhizopus*, koje mogu proizvoditi FA u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Pritom se preferira submerzna fermentacija i to obično korištenjem glukoze kao izvora ugljika. Proizvodnja se provodi šaržno, iako se spominje i mogućnost korištenja reaktora s imobiliziranim radnim mikroorganizmima (kao nosači istraživane su ljuske jaja, vlakna tikve lufa, plastične ili metalne mreže). U industrijskom mjerilu se najviše koriste reaktori s mješalom (engl. stirred tank reactor) jer omogućuju visok stupanj kontrole i imaju male operativne troškove (Varriale i Ulber, 2023). Kontrola uključuje vođenje procesa na optimalnoj temperaturi i pH vrijednosti, ovisno o vrsti mikroorganizma uz odgovarajuću koncentraciju supstrata i hranjivih soli.

Tijekom 1970-ih i 1980-ih, *R. arrhizus* je bio ključni proizvođač fumarne kiseline s najvećom koncentracijom proizvoda od 121 g L<sup>-1</sup>, međutim navedena je vrsta imala ograničen prinos (0,37 g L<sup>-1</sup>) i nije bila toliko ekonomična s obzirom na zahtjeve za hranjivim tvarima. S druge strane, korištenjem plijesni *R. oryzae*, potrebe za hranjivim tvarima se zadovoljavaju uz niže troškove. Stoga se od 1990-ih nadalje, *R. oryzae* obično koristi za proizvodnju FA, pri čemu je postignuta maksimalna produktivnost od 4,25 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, no treba napomenuti kako nisu svi sojevi *R. oryzae* potentni proizvođači fumarne kiseline (Mohmad i sur., 2024). Novija literatura naglašava da se kao dobri proizvođači FA među raznim vrstama roda *Rhizopus* ističu *R. oryzae* i *R. arrhizus*. Također ističe da dvije vrste roda *Aspergillus* (*A. niger* i *A. flavus*) posjeduju sposobnost proizvodnje malih koncentracija FA kao produkta fermentacije, ali da do sada nisu korištene u komercijalnu proizvodnju (Mohmad i sur., 2024). Genetički modificirane

bakterije proizvode FA iz glukoze uz prinose do 85% w/w (de Cárdenas i de Cárdenas, 2020). Plijesni roda *Rhizopus* uglavnom koriste različite supstrate poput škroba, melase, saharoze i glukoze u procesu fermentacije. Proizvodnja FA iz obnovljivih izvora još uvijek je u fazi laboratorijskih istraživanja, a primjeri su dobivanje FA iz otpada od proizvodnje jabučnog soka i otpadne vode pivovara pomoću plijesni *R. oryzae* 1526 (Varriale i Ulber, 2023). 2015. godine objavljeno je istraživanje u kojem je korišten otpad dobiven pri proizvodnji jabučnog soka. Optimizirani su radni uvjeti za submerzni postupak i postupak uzgoja na čvrstoj hranjivoj podlozi, pri čemu je soj *R. oryzae* NRRL 1526 korišten kao pouzdan radni mikroorganizam. Submerzno (SmF) je u tikvicama na tresilici korišten ultrafiltracijski mulj koji zaostaje nakon bistrenja soka (engl. apple pomace ultrafiltration sludge). Jabučna pogača (engl. apple pomace, AP), koja sadrži 50% vlage te čini 20-35 % izvornog voća, uz dodatak pljevice riže (engl. rice husk) je primijenjena u eksperimentima uzgoja na čvrstim supstratima (engl. solid-state fermentation, SSF) koji su provedeni na tzv. tavama (pliticama s tankim slojem čvrste hranjive podloge) u inkubatoru. Kalcijev karbonat je korišten za neutralizaciju u oba slučaja. Ovo istraživanje potvrdilo je mogućnost proizvodnje FA pomoću plijesni *R. oryzae* 1526 na obje sirovine primjenom oba postupka fermentacije. Pri optimalnim uvjetima submerzne fermentacije (40 g L<sup>-1</sup> ukupne suhe tvari, pH 6, temperatura 30 °C, 200 o/min i 72 h) koncentracija FA dosegla je 25,2 g L<sup>-1</sup> uz produktivnost od 0,35 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, a manji peleti pogodovali su proizvodnji FA. Reducirajući šećer i suha tvar prisutna u ultrafiltracijskom mulju izdvojenom iz jabučnog soka prevedeni su u fumarnu kiselinu tijekom submerzne fermentacije. Fermentacijom na čvrstoj hranjivoj podlozi (SSF) je nakon 14 dana inkubacije dobiveno 52 g fumarne kiseline po kg suhe tvari komine jabuke. 2014. su objavljeni rezultati istraživanja primjene otpadne vode pivovara uz dodatak kalcijeva karbonata (20 g L<sup>-1</sup>) za proizvodnju fumarne kiseline korištenjem soja *R. oryzae* 1526 putem submerzne fermentacije. Istraživani su učinci različitih parametara kao što su ukupna koncentracija suhe tvari u supstratu, pH fermentacije, temperatura inkubacije, brzina miješanja u tikvicama na tresilici te utjecaj veličine inokuluma na morfologiju plijesni. Različiti morfološki oblici (micelijske nakupine, suspendirani micelij i peleti koji se sastoje od središnjeg čvrstog micelijskog klupka i perifernog vlaknastog dijela) *R. oryzae* 1526 dobiveni su pri različitim primijenjenim pH vrijednostima fermentacije, temperaturama inkubacije, brzinama miješanja i veličinama inokuluma. Oblik peleta je najpovoljniji za povećanje proizvodnje FA uz različite istraživane parametre. Uz optimizirane uvjete rasta (pH 6, 25 °C, 200 okretaja u minuti, 5 % (v/v) inokuluma, 25 g L<sup>-1</sup> suhe tvari u hranjivoj podlozi i promjer peleta od 0,465 mm), najveća postignuta koncentracija FA bila je 31,3 g L<sup>-1</sup> (Liu i sur., 2016). Liu i sur. (2016) su istraživali mogućnost primjene otpadne hrane iz restorana, bogate ugljikohidratima i proteinima, za proizvodnju FA u fed-batch SF, pri čemu je hrana podvrgnuta

termičkom predtretmanu (100°C / 120 minuta) te su tako dobivene tekuća, uljna i čvrsta frakcija. Uljna faza je odvojena za proizvodnju biodizela. Za uzgoj plijesni *R. arrhizus* RH7-13 na tresilici, korištene su tekuća faza, odnosno čvrsta faza suspendirana u vodi kojoj je dodana glukoza i pokazalo se da se obje frakcije hrane mogu koristiti te da mogu zamijeniti dio izvora ugljika, dušika i hranjivih tvari. Tekuća frakcija otpadne hrane pokazala se kao najbolji medij za rast radnog mikroorganizma te je proizvodnja FA iznosila 32,68 g L<sup>-1</sup>, uz produktivnost od 0,34 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Čvrsta frakcija FW pomiješana s vodom uz dodatak glukoze omogućila je proizvodnju 31,26 g L<sup>-1</sup> FA.

S povećanjem svijesti mogućnostima primjene jeftinih izvora ugljika za sintezu proizvoda s dodanom vrijednošću, istražen je potencijal sirovina agroindustrijskog podrijetla za industrijsku proizvodnju FA. Pritom su za FA korištene sirovine poput drvene sječke, stajskog gnoja, kukuruzne slame, sirovog glicerola i raznih drugih vrsta lignocelulozne biomase (Das i sur., 2016). Trenutačno je uporaba lignoceluloznih materijala za proizvodnju FA još uvijek u fazi laboratorijskih istraživanja (Varriale i Ulber, 2023). Iako je lignoceluloza bogata ugljikohidratima, probleme još uvijek predstavljaju skup proces predobrade i manja brzina konverzije u proizvod. Međutim, poboljšanjem tehnologije predobrade i poznavanja mikrobnog metabolizma, komercijalna primjena lignoceluloza za dobivanje FA bit će omogućena. Štoviše, smatra se da će zbog mogućnosti uporabe kitozana/hitina kao nusproizvoda, proces proizvodnje FA iz lignoceluloze biti ekonomičniji te se stoga može očekivati da će lignoceluloza postati konkurentnija od škrobnih sirovina (Xu i sur., 2012, citirano u Varriale i Ulber, 2023). Primjeri razvijanja održivih bioprocasa proizvodnje FA utemeljenih na lignoceluloznim sirovinama navedeni su u tekstu koji slijedi. U Tablici 4 prikazani su primjeri različitih sirovina koje su istraživane za proizvodnju FA.

Plijesan *Rhizopus oryzae* ATCC 20344 korištena je na hidrolizatu stajskog gnoja (koji između ostalog sadrži i lignocelulozu) uz dodatak glukoze te je proizvedeno 31 g L<sup>-1</sup> FA uz prinos od 31%. U navedenom istraživanju se zapravo radilo o procesu odvojene hidrolize lignoceluloznog materijala i fermentacije dobivenog lignoceluloznog hidrolizata (engl. separated hydrolysis and fermentation, SHF), što znači da je sirovina prvo podvrgnuta predtretmanu, zatim je enzimski hidrolizirana, a potom je proveden uzgoj plijesni *R. oryzae*. Problemi pri navedenom SHF procesu su inhibicija enzimske hidrolize krajnjim proizvodom, spora hidroliza te mali prinos i koncentracija proizvoda. Stoga je osmišljen proces simultane saharifikacije i fermentacije (engl. simultaneous saccharification and fermentation, SSF) koji u jednom bioreaktoru omogućava istodobnu enzimsku hidrolizu lignoceluloze i fermentaciju oslobođenih šećera kako bi se prevladali problemi SHF-postupka (de Cárdenas i de Cárdenas, 2020).

**Tablica 4.** Mikrobna proizvodnja fumarne kiseline koristeći organski otpad (Ghai i sur., 2024)

SUPSTRATI	MIKROORGANIZMI	PRINOS (g/g)
kukuruzovina	<i>R. oryzae</i> ME-F12	0,35
kukuruzni škrob	<i>R. oryzae</i>	0,60
stajski gnoj	<i>R. oryzae</i>	0,31
melasa	<i>R. nigricans</i>	0,36
ksiloza	<i>R. nigricans</i>	0,23
hidrolizat drvene sječke	<i>R. arrhizus</i>	0,089
sirovi glicerol	<i>R. arrhizus</i> RH-07-13	0,346
otpad iz pivovare	<i>R. oryzae</i> 1526	-

Proizvodnja FA iz alkalno predtretiranih kukuruznih oklasaka (engl. alkali-pretreated corncob, APC) uz visoku početnu koncentraciju suhe tvari sirovine (engl. high solids loading) provedena je u laboratorijskom mjerilu korištenjem kombinacije odvojene enzimске hidrolize i fermentacije (SHF) te simultane saharifikacije i fermentacije s pritokom supstrata (SSF) nakon čega je proveden uzgoj plijesni *R. oryzae*. Ispitana su četiri različita načina fermentacije. Najveća koncentracija od 41,32 g L<sup>-1</sup> FA dobivena je pri koncentraciji suhe tvari APC od 20 % (w/v) pri 38 °C u kombinaciji SHF i šaržnog SSF postupka s pritokom, u usporedbi s 19,13 g L<sup>-1</sup> FA dobivene samo u šaržnom SSF. Rezultati su pokazali da je kombinacija SHF i šaržnog SSF-a značajno poboljšala proizvodnju FA iz lignoceluloze u odnosu na onu postignutu sa šaržnim SSF-om pri velikom udjelu suhe tvari.

Mala iskoristivost ksiloze, iz lignoceluloze je usko grlo za učinkovito korištenje lignoceluloze za proizvodnju FA. Ksiloza je dobar izvor ugljika za rast plijesni, ali ne i za proizvodnju FA. Stoga je profitabilnije koristiti dvostupanjski proces u kojem biomasa raste u prvom stupnju na ksilozi, a u drugom stupnju na glukozu proizvodi FA. Xu i sur. (2010) su istraživali mogućnost dvostupanjskog procesa korištenja kukuruzovine za proizvodnju FA pomoću plijesni *R. oryzae* ME-F12. Kukuruzovina je najprije obrađena razrijeđenom sulfatnom kiselinom (2% w/w, uz omjer tekućine i suhe tvari 10:1) kako bi se dobio tekući kiselinski hidrolizat bogat ksilozom (23,6 g L<sup>-1</sup> ksiloze i 2,3 g L<sup>-1</sup> glukoze) koja se može koristiti kao izvor ugljika za rast biomase plijesni. Čvrsta faza, preostala nakon kiselinske hidrolize, je enzimski hidrolizirana kako bi se dobila tekuća hranjiva podloga bogata glukozom (31,2 g L<sup>-1</sup> glukoze i 1,8 g L<sup>-1</sup> ksiloze) što pogoduje proizvodnji fumarne kiseline. Oba hidrolizata su koncentrirana uparavanjem u vakuumu pri 40 °C i korištena za optimiranje parametara dvostupanjskog procesa tako da su razrijeđeni na odgovarajuće koncentracije monosaharida. Pri optimalnim koncentracijama monosaharida (30 g L<sup>-1</sup> ksiloze u koncentriranom kiselinskom hidrolizatu kukuruzovine za uzgoj



biomase u prvom stupnju i  $80 \text{ g L}^{-1}$  glukoze u koncentriranom enzimskom hidrolizatu za proizvodnju FA u drugom stupnju), proizvodnja FA je iznosila do  $27,79 \text{ g L}^{-1}$ , uz koeficijent konverzije supstrata u produkt od  $0,35 \text{ g g}^{-1}$  i produktivnost  $0,33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

U novije vrijeme je osmišljena fungalna kokultura za proizvodnju FA iz lignocelulozne biomase putem integriranog bioprocasa (engl. consolidated bioprocessing, CBP). Navedena kokultura sastavljena od celulozitičke plijesni *Trichoderma reesei* i plijesni *Rhizopus delemar* koja je producent fumarne kiseline. Plijesan *T. reesei* proizvodi celulaze kako bi se oslobodili šećeri iz celuloze, a potom se ti šećeri u istom reaktoru prevode u fumarnu kiselinu pomoću *R. delemar*. Ključan čimbenik o kojem ovisi proizvodnja FA je količina dušika jer kada se u hranjivoj podlozi iscrpi dušik, *R. delemar* prelazi iz faze rasta u fazu proizvodnje fumarne kiseline. Dok se koncentracija dušika u hranjivoj podlozi održava na 12,5 %, oba mikroorganizma će rasti sve dok koncentracija dušika ne postane limitirajuća. Rast i proizvodnja celulaze u tom trenutku prestaju, a započinje proizvodnja fumarne kiseline, što je dokaz kompatibilnosti plijesni *T. reesei* i *R. delemar* za zajednički rast u proizvodnji fumarne kiseline. Ova kokultura iz  $40 \text{ g L}^{-1}$  mikrokristalinične celuloze proizvodi  $6,87 \text{ g L}^{-1}$  FA uz produktivnost  $31,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , a iz  $20 \text{ g L}^{-1}$  alkalno obrađene kukuruzovine može proizvesti  $0,69 \text{ g L}^{-1}$  FA (Lu i sur., 2020).

#### 2.5.4. Pročišćavanje fumarne kiseline nakon biotehnološke proizvodnje

Uz troškove fermentacije, postupci koji slijede nakon procesa proizvodnje u bioreaktoru (engl. downstream processing) potrebni za izdvajanje i pročišćavanje proizvoda predstavljaju glavne troškove i prepreke za komercijalizaciju procesa biotehnološke proizvodnje fumarne kiseline. U prošlosti su se za izdvajanje i pročišćavanje raznih organskih kiselina proizvedenih biotehnološkim putem koristili različiti postupci separacije, poput ekstrakcije otapalom, ionske izmjene, elektrodijalize i precipitacije. Unatoč tome, ove metode izdvajanja potrebno je unaprijediti.

Od spomenutih metoda izdvajanja, za fumarnu kiselinu najčešće se koristi precipitacija. Mala topljivost u vodi i visoka polarnost fumarne kiseline (Tablica 3) koristi se za njeno odvajanje od drugih kiselina, soli, ugljikohidrata i dušikovih spojeva. Mala topljivost kiseline omogućuje njenu precipitaciju iz prevrele hranjive podloge, uz dodatnu adsorpciju nečistoća pomoću aktivnog ugljena, čime se dobiva FA zadovoljavajuće čistoće za polimerizaciju. Nakon toga, aceton se može koristiti za desorpciju kiseline koja se zatim još ispiri vodom kako bi se povećao prinos na 98 %.

Ionska izmjena se može koristiti za adsorpciju tijekom procesa separacije i pročišćavanja fumarne kiseline. Povremeno uklanjanje kiseline iz hranjive podloge tijekom bioprocasa i

integracija bioprocesa s jedinicom za separaciju povećava prinos fumarne kiseline za 25 %, a produktivnost za 59 %. To se može objasniti činjenicom da dolazi do inhibicije produktom koji inhibira vlastitu proizvodnju u kasnijim fazama fermentacije, tj. fumarna kiselina tijekom proizvodnje pomoću fungalnih sojeva djeluje kao „samoinhibitor“. Stoga, hibridne strategije, koje kombiniraju više od jednog procesa predstavljaju ključan alat za povećanje proizvodnje fumarne kiseline i široko se primjenjuju u industrijskim procesima. Kada je separacija fumarne kiseline otežana zbog prisutnosti nusproizvoda fermentacije poput octene kiseline, za postizanje visoke čistoće i uspješno izdvajanje (99 %) neophodne su vrlo osjetljive kompleksnije kromatografske tehnike (Mohmad i sur., 2024).

## 2.6. ITAKONSKA KISELINA

### 2.6.1. Kemijska struktura i svojstva itakonske kiseline

Itakonska kiselina (engl. itaconic acid, IA) je mononezasićena dikarboksilna kiselina koja sadrži pet ugljikovih atoma. Molekulska formula ove kiseline je  $C_5H_6O_4$ , njezina sažeta strukturna formula je  $COOH-CH_2-C(=CH_2)-COOH$ , a strukturna formula itakonske kiseline prikazana je u Tablici 1. Otkrio ju je S. Baupa 1837. godine kao rezultat termičke razgradnje limunske kiseline. Obzirom da sadrži jednu dvostruku vezu između dva ugljikova atoma, IA je alken (olefin), a spada u masne kiseline te je prisutna u fungima i ljudskom organizmu. Dobro je topljiva u vodi, etanolu i acetonu, a manje u nepolarnim otapalima poput benzenu. Stabilna je u srednje bazičnim, neutralnim i kiselim uvjetima te je higroskopna. Karakterističnog je mirisa, pri sobnoj temperaturi je u obliku bijelog kristalnog praha (Teleky i Vodnar, 2019; Ghai i sur., 2024). Neke od općih karakteristika itakonske kiseline prikazane su u Tablici 5.

**Tablica 5.** Fizikalno-kemijska svojstva itakonske kiseline (Anonimus 1, 2024 [www.chemicalbook.com](http://www.chemicalbook.com))

SVOJSTVO	VRIJEDNOST
Molekulska formula	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
Relativna molekulska masa	130,1
Gustoća	1,573 g cm <sup>-3</sup>
Temperatura vrelišta	268 °C
Temperatura tališta	165 - 168 °C
Topljivost u vodi	7,75 g cm <sup>-3</sup>
pK <sub>a</sub> vrijednosti	3,85 i 5,55

#### 2.6.2. Područja primjene itakonske kiseline

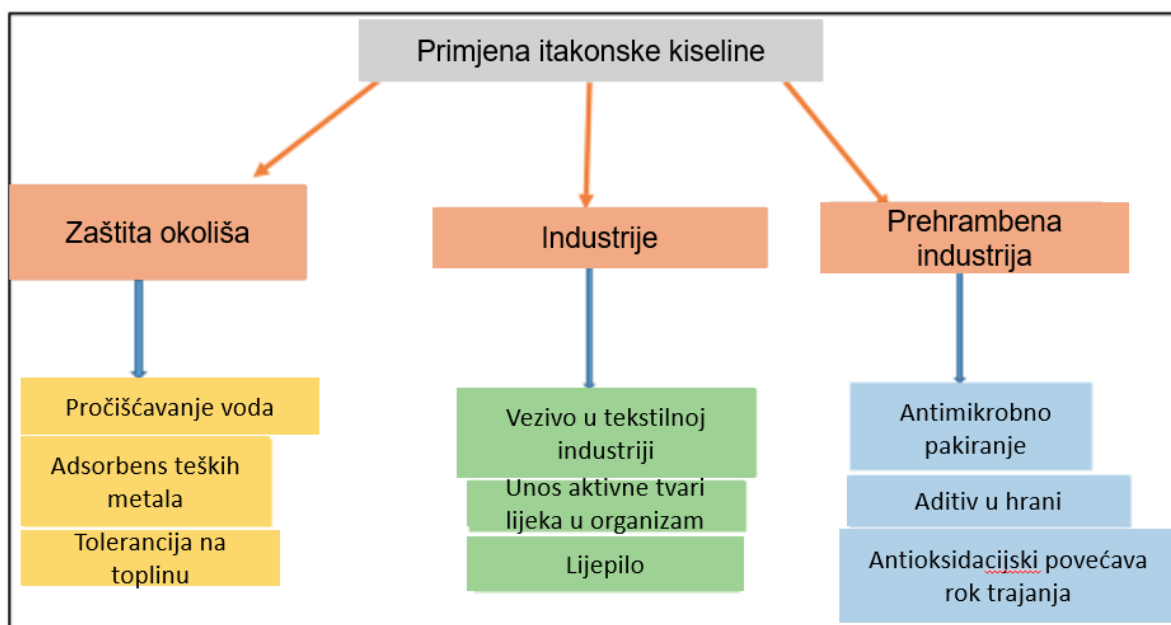
IA je svrstana među 12 biotehnoški proizvedenih kemikalija s najvećim potencijalom (Teleky i Vodnar, 2019; Ghai i sur., 2024). Zanimljiva je zbog svoje kemijske strukture, tj. prisutnosti konjugirane dvostruke veze metilenske skupine odnosno trofunkcionalne strukture s dvije karboksilne skupine i  $\alpha,\beta$ -nezasićenom dvostrukom vezom kojom je vezana metilenska skupina. Struktura molekule IA omogućava kondenzacijsku polimerizaciju i esterifikaciju s karboksilnim skupinama različitih ko-monomera. Stoga se IA smatra perspektivnom baznom kemikalijom koja može služiti kao monomer ili se može koristiti za sintezu monomera te se iz IA može proizvesti širok spektar složenih organskih spojeva ili polimera. Neke od glavnih prednosti proizvoda izrađenih od IA, u odnosu na druge kemikalije iz fosilnih izvora, su biorazgradivost njezinih homopolimera, netoksičnost i raznolikost mogućih derivata (de Cárdenas i de Cárdenas, 2020; Varriale i Ulber, 2023). IA također može tvoriti komplekse s metalnim ionima i esterificirati s alkoholima. Pored proizvodnje polimera, koristi se u obradi otpadnih voda i kromatografiji (Sriariyanun i sur., 2019; Ghai i sur., 2024).

Za razliku od većine drugih organskih kiselina, IA se koristi za neprehrambene svrhe. Važna je kao sirovina za proizvodnju ljepila, nezasićenih poliesterskih smola, sredstava za završnu obradu, deterdženata i sredstava za čišćenje, superupijajućih polimera i sredstava za dispergiranje. Zbog svoje trofunkcionalne strukture, IA omogućuje proizvodnju više novih

biopolimera namijenjenih različitim svrhama kao što su inteligentno pakiranje hrane, isporuka lijekova, elastomeri, hidrogelovi u obradi vode i antibakterijski biofilmovi (Varriale i Ulber, 2023). Atraktivna alternativa monomerima dobivenim iz nafte je konverzija itakonske kiseline u metil-metakrilat (MMA), poznat monomer od kojeg nastaje Plexiglas® (Becker i sur., 2015; de Cárdenas i de Cárdenas, 2020; Varriale i Ulber, 2023).

Primjenjuje se i u pročišćavanju vode tako što se film sastavljen od itakonske kiseline može miješati s raznim polimerima kao što su hitozan, guar-guma i nanomaterijali koje se koriste za pročišćavanje vode. Tako je razvijen nano-hidrogel (engl. Chitin-cl-poly acrylamide-co-itaconic acid) koji se koristi za uklanjanje pesticida atrazina iz vode uz učinkovitost adsorpcije 204,08 mg g<sup>-1</sup>. Neki polimeri itakonske kiseline imaju antimikrobna svojstva te djeluju na Gram pozitivne bakterije, stoga svoju primjenu pronalaze u liječenju bakterijskih infekcija čiji uzročnici su rezistentni na lijekove. Osim toga, pojedini polimeri pokazuju antikancerogenu aktivnost. Itakonska kiselina primjenjuje se i u prehrambenoj industriji prilikom pakiranja hrane. Polimeri itakonske kiseline koji se koriste za pakiranje, a imaju i poboljšanu bioaktivnost pa se mogu koristiti kao konzervansi za hranu (Sindhu i sur., 2024).

S obzirom na mnogobrojne primjene, proizvodnja itakonske kiseline pobuđuje sve veći interes na globalnoj razini. Slika 6 prikazuje široku primjenu itakonske kiseline.

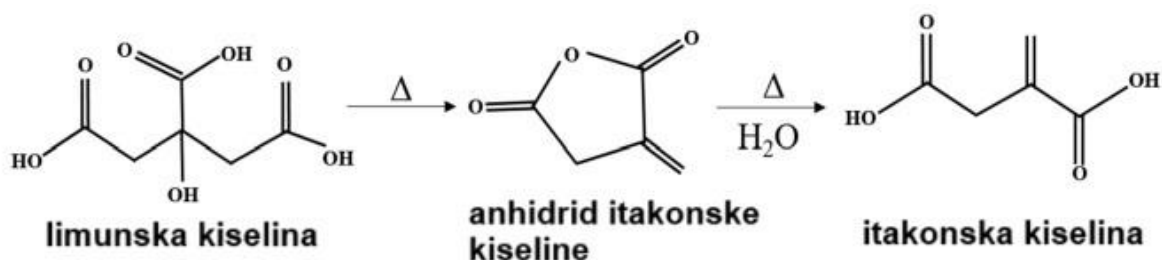


**Slika 6.** Primjena itakonske kiseline (Sindhu i sur., 2024)

### 2.6.3. Proizvodnja itakonske kiseline

Potražnja za itakonskom kiselinom na svjetskom tržištu sve više raste s obzirom na težnju ka održivom razvoju. Zbog niske produktivnosti, nestabilnosti procesa i skupe proizvodnje, itakonska kiselina ima visoku cijenu i za sad ima ograničeno tržište, uglavnom zbog ograničene primjene njenih proizvoda i dostupnih zamjena za te proizvode. Cijena itakonske kiseline tijekom godina se mijenjala, a u posljednje vrijeme je konstantna i kreće se 1,5 – 2,5 USD/kg. Ukoliko bi se mogli smanjiti troškovi proizvodnje, to bi svakako doprinijelo porastu tržišta za IA. Godišnja svjetska proizvodnja itakonske kiseline premašila je 80 000 tona. Poput fumarne kiseline, ministarstvo energetike SAD-a svrstalo je i itakonsku kiselinu kao jednu od dvanaest vodećih baznih kemikalija dobivenih iz obnovljive biomase, s tržišnim potencijalom od 260 milijuna USD do 2025. godine (Varriale i Ulber, 2023; Sindhu i sur., 2024).

Industrijska proizvodnja IA tradicionalno se odvijala korištenjem različitih kemijskih postupaka i to prvenstveno pirolizom limunske kiseline (Slika 7), a ostali kemijski postupci su dekarboksilacijom akonitinske kiseline i oksidacijom izoprena. Limunska kiselina kao polazni spoj pri kemijskom postupku dobivanja IA je nepovoljna zbog visoke cijene, a također je potrebna velika temperatura što iziskuje veliku potrošnju energije. Ključni nedostaci kemijske sinteze u odnosu na biotehnoško dobivanje su dugo trajanje procesa, velik broj koraka, slaba učinkovitost i veliki troškovi proizvodnje iz nafte te stoga sve više pada interes za takav način proizvodnje (Teleky i Vodnar, 2019; Varriale i Ulber, 2023).



**Slika 7.** Kemijska sinteza itakonske kiseline iz limunske kiseline (Teleky i Vodnar, 2019)

Biotehnoška proizvodnja privlači sve više pažnje i dobiva na važnosti zbog većeg prinosa, veće brzine proizvodnje i održivosti (Teleky i Vodnar, 2019; Varriale i Ulber, 2023). Iako je proizvodnja IA biotehnoškim putem industrijski uvriježen proces koji je jeftiniji od kemijskog, proizvodnja još uvijek nije dovoljno velika što još ograničava uporabu IA unatoč ogromnom potencijalu primjene (de Cárdenas, de Cárdenas 2020). Danas se cijela industrijska proizvodnja IA odvija biotehnoškim putem uz proizvodnju 41 400 tona godišnje, a odvija se

pretežno u Kini, SAD-u i Indiji i to primjenom bakterija, funga i aktinomiceta (Varriale i Ulber, 2023). Među parametrima koji utječu na biotehnološku proizvodnju IA navode se: korišteni mikroorganizmi, temperatura, koncentracije nutrijenata, početna pH vrijednost i njezine varijacije tijekom bioprocesa, opskrba kisikom i nastajanje nusproizvoda (Teleky i Vodnar, 2019).

De Cárdenas i de Cárdenas (2020) navode da su od 1940-ih godina plijesni *Aspergillus itaconicus* i *A. terreus* dobro poznati kao izvrsni proizvođači za biotehnološku proizvodnju IA u šaržnom submerznom procesu. Također se spominje još nekoliko mikroorganizama korištenih za proizvodnju IA u laboratorijskom mjerilu i to uglavnom kvasac *Candida* spp., bazidiomicet *Ustilago zea*, plijesni *Rhodotorula* sp., mutanti kvasca roda *Candida*, *A. terreus* TN-484-M1, *A. terreus* SKR10-20, itd. (De Cárdenas i de Cárdenas, 2020).

Za suvremenu proizvodnju IA najčešće se koriste plijesni roda *Aspergillus*, od kojih najčešće plijesan *Aspergillus terreus* (Becker i sur., 2015; de Cárdenas i de Cárdenas, 2020; Ghai i sur., 2024), koji je otporan na nizak pH, ima visoke prinose i daje visoku koncentraciju produkta (Varriale i Ulber, 2023). Plijesan *A. terreus* obitava u tlu te štetno djeluje na zdravlje biljnih kultura i ljudi no zanimljiva je iz biotehnološke perspektive (Park i sur., 2017) zbog otpornosti na niske pH vrijednosti te visokog prinosa i koncentracija proizvoda. Osim plijesni *Aspergillus terreus*, i *Aspergillus itaconicus*, kao mogući producenti IA se spominju i druge vrste istog roda poput *A. japonicus*, *A. niveus*, *A. flavus*, *A. oryzae* (Ramakrishnan i sur., 2020).

Ostali mikroorganizmi koji mogu proizvoditi itakonsku kiselinu u velikom mjerilu su parazitska gljiva *Ustilago maydis*, a pored njega kvasci *Candida* sp., *Pseudozyma antarctica*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, plijesan *A. niger* te bakterije *Corynebacterium glutamicum* i *E. coli*, koji mogu koristiti ugljikohidrate dobivene iz lignocelulozne biomase (Becker i sur., 2015; Ghai i sur., 2024).

U novije vrijeme je bazidiomicet *Ustilago maydis* (hrv. kukuruzna snijet, red *Basidiomycota*, porodica *Ustilaginomycete*) privukao pažnju kao alternativni radni mikroorganizam za proizvodnju u realnom mjerilu (Varriale i Ulber, 2023). Kukuruzna snijet inače uzrokuje bolest kukuruza koja izgleda kao mjehuraste nabrekline (tumori) na dijelovima kukuruza, najčešće na klipu, a širi se sporama pomoću kiše i vjetra. Ovo je uvjetno jestiva gljiva, tj. dobre je kvalitete, ali samo mlada dok ne sazriju spore. Izuzetno je cijenjena u Meksiku gdje je poznata pod imenom huitlacoche (cuitlacoche) i bere se dok je još nezrela i sočna jer zrela je suha i puna spora. Moguće je i otrovanje izazvano sporama kukuruzne snijeti u osoba koje jedu onečišćeno kukuruzno brašno (u kruhu i drugim kukuruznim jelima) (Ustilaginizam, 2024).

De Cárdenas i de Cárdenas (2020) navode da je vrlo malo objavljenih istraživanja usmjereno na poboljšanje proizvodnje IA te da je jedan od najučinkovitijih procesa patentiran još u prošlom stoljeću, fermentacijom šećera iz melase uz prinos od 70 %. Maksimalne objavljene

koncentracije IA u prevreloj podlozi su nešto veće od  $80 \text{ g L}^{-1}$ . Submerzna fermentacija se provodi aerobno pri  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  pri čemu se kao radni mikroorganizam za proizvodnju itakonata preferira plijesan *Aspergillus terreus*.

Danas se cijela industrijska proizvodnja IA odvija biotehnološkim putem uz proizvodnju 41 400 tona godišnje, pri čemu se kao izvori ugljika koriste glukoza, jednostavni šećeri ili škrob. Korištenje glukoze kao izvora ugljika daje teorijski prinos od 72 % uz koncentraciju IA od  $86\text{--}129 \text{ g L}^{-1}$  i s produktivnost od  $0,5\text{--}1,14 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Varriale i Ulber, 2023).

Varriale i Ulber (2023) prikazali su pregled razvoja biotehnoloških procesa proizvodnje IA. Submerzni postupci su rasprostranjeni za proizvodnju IA u laboratorijskim uvjetima ili pilot-postrojenjima uz korištenje reaktora s mješalom (engl. stirred-tank reactors) i plijesni *Aspergillus terreus* kao glavnog radnog mikroorganizma. U literaturi se navodi primjer proizvodnje IA s izoliranim sojem *A. terreus* DSM 23081 u bioreaktoru s mješalom od 15 L i dobili  $86,2 \text{ g L}^{-1}$  IA nakon 7 dana procesa, a koeficijent konverzije dosegao je  $0,62 \text{ g IA po g glukoze}$ , uz ukupnu produktivnost od  $0,51 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , maksimalnom produktivnošću od  $1,2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (de Cárdenas i de Cárdenas, 2020; Varriale i Ulber, 2023). Također se navodi primjena plijesni *A. terreus* u bioreaktoru s mješalom (engl. stirred tank bioreactor) od 1,5 L i dobivena koncentracija  $129 \text{ g L}^{-1}$  IA iz glukoze nakon gotovo 5 dana uzgoja. U jednom istraživanju je proizvedena IA korištenjem reaktora s mješalom ukupnog volumena 9 L s glukozom kao izvorom ugljika pri čemu je proizvedeno  $0,85 \text{ g IA po g glukoze}$ . Također je dokazana mogućnost proizvodnje IA iz ksiloze u šaržnom procesu. Zbog velikog naprezanja smicanja uzrokovanog mehaničkim miješanjem koje dovodi do oštećenja stanica, bioreaktori s mješalom nisu idealni za filamentozne funge. Kako bi se prevladao ovaj problem, tzv. air lift reaktori predstavljaju prikladnu alternativu za proizvodnju IA, budući da omogućuju dobro miješanje i prijenos kisika zahvaljujući recirkulaciji tekućine, npr. primjenom air lift reaktora nakon 7 dana uzgoja na glukozu proizvedeno je  $63,7 \text{ g L}^{-1}$  IA. Ostale strategije fermentacije navedene su u literaturi, npr. uzgoj s pritokom supstrata. Iako glukoza osigurava najveći prinos IA, u tijeku je razvoj procesa usmjerenih na korištenje obnovljivih sirovina (Varriale i Ulber, 2023). Tablica 6 prikazuje primjere jeftinih supstrata korištenih u proizvodnji itakonske kiseline.

Rezultati nedavnih istraživanja sugeriraju da se kontinuiranim uzgojem može poboljšati produktivnost te se kao prednosti takvog načina uzgoja navode mogućnost održavanja optimalnih uvjeta tijekom cijelog procesa fermentacije, kontinuirani tok proizvoda koji pojednostavljuje proces izdvajanja i izbjegavanje problema inhibicije produktom (Varriale i Ulber, 2023).

**Tablica 6.** Primjeri jeftinih sirovina korištenih za proizvodnju itakonske kiseline (Sindhu i sur., 2024)

Podloga/supstrat	Mikroorganizam	Proizvodni prinos (g L <sup>-1</sup> )	Optimalni uvjeti
kukuruzni škrob	<i>Aspergillus niveus</i> MG183809	15,65 ± 1,75	120h inkubacije i pH 7
pogača zaostala nakon prešanja sjemena uljane palme	<i>Aspergillus terreus</i> (ATCC 20542) <i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	105,00 100,33	pH 4, 10g supstrata, 10% inokuluma, 29 ± 1°C (5.dan)
otpad od proizvodnje viskoze (engl. rayon)	<i>Escherichia coli</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Aspergillus niger</i>	14,2 IA, 36,5 mliječne kiseline i 39,2 kitozan	-
kora batata	<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404) <i>Aspergillus terreus</i> (ATCC 20542)	112,67 + 5,20 115,67 + 5,30	-
otpad od krumpira	<i>Aspergillus terreus</i> soj C1	29,69	200 okretaja u minuti; aeracija 0,25 vvm; 35 °C; pH 7,5
pljeva pšenice	<i>Aspergillus terreus</i> DSM 23081	27,7	pH 4,8; 50 °C; 10 FPU/g biomase
pročišćeni glicerol i hidrolizat biomase algi	<i>Aspergillus niveus</i>	31,55 + 1,25	168h; 37 °C; 120 okretaja u minuti
pšenica hidrolizat mekinja	<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 10020	49,65 ± 0,38	-
rižina pljeva	<i>Aspergillus terreus</i> (ATCC 10020)	1,9	30 °C, pH 6,0, inokulum 10 <sup>7</sup> CFU mL, 100 okretaja u minuti
pšenična slama	<i>Aspergillus terreus</i> NRRL 1972	-	pH 3,1, 33 °C, 200 okretaja u minuti
otpad od hrane (krumpir, riža i rezanci)	<i>Aspergillus terreus</i> BD soj	41,1	10% biomase, 5% enzima, pH 5,5; 60 °C



Jedan od ograničavajućih aspekata proizvodnje IA je visoka cijena izvora ugljika. Iako je glukoza najčešće korišteni supstrat za dobivanje IA, ona nije najjeftiniji izvor ugljika. Korištenje melase ili otpada bogatog škrobom (kukuruzni, rižin i krumpirov škrob) kao supstrata može omogućiti poboljšanu proizvodnju IA (Teleky i Vodnar, 2019). Prema istraživanju koje su proveli Klement i Büchs (2013), soj *A. terreus* iz krumpirovog otpada proizvodi itakonsku kiselinu u koncentracijama od 30,8 g L<sup>-1</sup> i 23,4 g L<sup>-1</sup>. Prema istraživanju temeljenom na fermentaciji otpada dobivenog preradom riže, krumpira i kukuruza te bogatog škrobom, najveći prinos postignut je korištenjem krumpirovog škroba dodatnom deionizacijom (Sindhu i sur., 2024). Narisetty i sur. (2021) su istraživali sintezu itakonske kiseline uzgojem novog termotolerantnog soja *A. terreus* BD na enzimskom hidrolizatu modelnog prehrambenog otpada sastavljenog od određenih udjela krumpira, riže i rezanaca. Prinosi iz otpada bogatog škrobom iznosili su 41,1 g L<sup>-1</sup> i 0,27 g L<sup>-1</sup> te se razlikuju od rezultata prinosa na glukozi, tj. 44,7 g L<sup>-1</sup> i koeficijent konverzije 30 g g<sup>-1</sup> (Narisetty i sur., 2021).

Lignocelulozne sirovine su u novije vrijeme privukle pažnju kao potencijalni izvori ugljika za proizvodnju IA. Hidrolizati lignoceluloze (npr. pšeničnih mekinja, rižinih mekinja, bukovine), škrob i melasa, bi mogli biti dobar alternativni izvor glukoze te su objavljena istraživanja u kojima su korišteni hidrolizati rižine pljevice i pšenične pljevice (Teleky i Vodnar, 2019). LCB kao izvor ugljika za itakonsku kiselinu može se koristiti u biotehnološkim procesima na čvrstom supstratu ili submerzno (Sindhu i sur., 2024).

Trenutačno je uporaba lignoceluloznih materijala za proizvodnju IA još uvijek na razini laboratorijskih istraživanja. Jedno od glavnih ograničenja submerznih postupaka na lignoceluloznim hidrolizatima su inhibitori nastali tijekom predobrade, što je općenito jedan od problema koje treba prevladati tijekom osmišljavanja održivih bioprocasa utemeljenih na lignoceluloznoj biomasi (Varriale i Ulber, 2023).

Osim brojnih pozitivnih strana, *A. terreus* ima i neke mane, a to su dugo trajanje bioprocasa i velik broj nusproizvoda što poskupljuje proizvodnju. Osim toga, predtretman lignoceluloznih sirovina može proizvesti neke inhibitore poput octene kiseline, furfurala, fenola, metalnih iona, mravlje kiseline, hidroksimetilfurfurala itd., koji mogu inhibirati rast mikroorganizama te tako utjecati i na samu proizvodnju itakonske kiseline, odnosno smanjiti njezin prinos. Octena kiselina, koja pri tome nastaje može snažno suzbiti rast i metabolizam plijesni roda *Aspergillus* (Sindhu i sur., 2024). Međutim, u današnje vrijeme je proizvodnja itakonske kiseline pomoću plijesni *A. terreus* optimirana do te mjere da joj kemijska proizvodnja više ne može konkurirati. Ograničenja koja djeluju na kapacitet proizvodnje prilikom primjene lignoceluloznih materijala za uzgoj na čvrstim supstratima, su temperatura, prozračivanje i vlažnost koje treba kontrolirati. Ako je vlažnost ispod optimalne, hranjive tvari neće biti dostupne mikroorganizmima, a ako je iznad optimalne, negativno utječe na agregaciju supstrata. Za

uspješno klijanje spora potrebno je održavati odgovarajuću temperaturu. Velika prednost fermentacije na čvrstom supstratu je to što tijekom bioprocesa ne nastaje pjena pa se samim time osigurava bolji prinos, a i šanse za kontaminaciju su vrlo male (Sindhu i sur., 2024). Plijesan *Aspergillus japonicus* korištena je za fermentaciju na čvrstom supstratu pri čemu je kao sirovina poslužila kora lubenice (*Citrullus lanatus*) (Ramakrishnan i sur., 2020).

Pokušalo se osmisliti i integrirani proces proizvodnje IA, pri čemu se u jednom koraku odvijaju tri procesa (proizvodnja celulaze, hidroliza celuloze i prevođenje oslobođenih šećera u IA). Pritom se kao proizvođač celulaze odabrana plijesan *Penicillium verruculosum*, a za proizvodnju IA plijesan *A. terreus* (Teleky i Vodnar, 2019).

#### 2.6.4. Pročišćavanje itakonske kiseline nakon biotehnološke proizvodnje

Procesi koji slijede po završetku mikrobnog procesa, koji uključuju izdvajanje i pročišćavanje proizvoda, odgovorni su za 30 do 40% ukupnih proizvodnih troškova. Iako se biotehnološka proizvodnja itakonske kiseline provodi u industrijskom mjerilu, postoji velika potreba za poboljšanjem ne samo u segmentu fermentacije nego i u izdvajanju proizvoda. Izdvajanje i pročišćavanje itakonske kiseline može se provesti različitim tehnikama te često kombinacijom različitih separacijskih tehnika kako bi se postigle specifikacije čistoće proizvoda koje zahtijeva tržište (Sriariyanun i sur., 2019).

Na kraju mikrobnog procesa, prevrela hranjiva podloga sastoji se od biomase, ostataka fermentacijskog medija i drugih spojeva, uključujući i različite organske kiseline. Prvi korak je ukloniti biomasu nakon čega dolaze koncentriranje i pročišćavanje IA. Kao primarne tehnike odvajanja i pročišćavanja itakonske kiseline koriste se precipitacija, kristalizacija, adsorpcija, filtracija, ekstrakcija tekuće - tekuće, elektrodijaliza, a u novije doba i membranska separacija. Itakonska kiselina dobivena fermentacijom obično se izdvaja kristalizacijom iako ima nizak prinos kiseline, zahtijeva mnoge korake i skupa je. S druge strane, prednosti ove metode su brzina i učinkovitost, odnosno čistoća proizvoda. Taloženje kalcijevih i olovnih soli itakonske kiseline mogu se koristiti pri izdvajanju. Kalcijev hidroksid se primjenjuje pri pročišćavanju jer u ovom procesu nastaje kalcijev itakonat koji je manje topljiv u usporedbi s kiselinom koju taloži. Kalcijev itakonat i sumporna kiselina mogu se koristiti za regeneraciju kiseline, koja se zatim dodatno pročišćava aktivnim ugljenom i kristalizacijom. Nedostatak ove metode je proizvodnja značajne količine otpadnog kalcijevog sulfata tako da je taloženje izvedivo samo kada su kemijski troškovi dovoljno mali ili kada postoji mogućnost recikliranja. Ostale mogućnosti pročišćavanja itakonske kiseline opisane su u literaturi (Teleky i Vodnar, 2019; Sindhu i sur., 2024).

### **3. ZAKLJUČAK**

1. Obzirom na potrebu za racionalnijim iskorištavanjem lignoceluloznog otpada prehrambene industrije, primjena u biotehnološkoj proizvodnji nameće se kao način koji može zadovoljiti ekološke i ekonomske zahtjeve.
2. Organske kiseline su važni spojevi koji se široko primjenjuju u različitim industrijskim granama. Ranije se proizvodnja organskih kiselina temeljila na fosilnim gorivima ili izvorima na bazi nafte, no u novije vrijeme teži se ka prijelazu na obnovljive sirovine u skladu s konceptom suvremenog kružnog gospodarstva.
3. Biotehnološka proizvodnja fumarne i itakonske kiseline su ekonomski i ekološki povoljnije od njihove kemijske sinteze. Navedene kiseline imaju široku potencijalnu primjenu te se stoga za njima očekuje sve veća potražnja.
4. Fumarna i itakonska kiselina se biotehnološkim putem trenutno proizvodi najčešće iz glukoze ili nekih drugih sirovina koje se mogu koristiti kao hrana ili stočna hrana.
5. Proizvodnja fumarne i itakonske kiseline moguća je iz lignoceluloznog otpada nastalog u proizvodnji hrane. Da bi se takvi procesi mogli komercijalizirati, potrebno je prethodno optimirati parametre predobrade sirovina, mikrobnog procesa te izdvajanja i pročišćavanja produkta, odnosno osmisliti održive biotehnološke procese.

#### 4. LITERATURA

Alonso S, Rendueles M, Díaz M (2015) Microbial production of specialty organic acids from renewable and waste materials. *Crit Rev Biotechnol* **35**, 497–513.

<https://doi.org/10.3109/07388551.2014.904269>

Alves de Oliveira R, Komesu A, Vaz Rossell CE, Maciel Filho R (2018) Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design-From economic to production aspects. *Biochem Eng J* **133**, 219–239.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.003>

Becker J, Lange A, Fabarius J, Wittmann C (2015) Top value platform chemicals: bio-based production of organic acids. *Curr Opin Biotechnol* **36**:168–175.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.022>

Becker J, Wittmann C (2015) Advanced biotechnology: metabolically engineered cells for the bio-based production of chemicals and fuels, materials, and health-care products. *Angew Chem Int Edit* **54**, 3328–3350.

<https://doi.org/10.1002/anie.201409033>

Ciriminna R, Meneguzzo F, Delisi R, Pagliaro M (2017) Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. *Chem Cent J* **11**, 22.

<https://doi.org/10.1186/s13065-017-0251-y>

Coban HB (2020) Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions. *Bioprocess Biosyst Eng* **43**, 569–591.

<https://doi.org/10.1007/s00449-019-02256-w>

Das RK, Brar SK (2014) Enhanced fumaric acid production from brewery wastewater and insight into the morphology of *Rhizopus oryzae* 1526. *Appl Biochem Biotechnol* **172**, 2974–2988.

<https://doi.org/10.1007/s12010-014-0739-z>

Das RK, Brar SK, Verma M (2015) A fermentative approach towards optimizing directed biosynthesis of fumaric acid by *Rhizopus oryzae* 1526 utilizing apple industry waste biomass. *Fungal Biol* **119**, 1279–1290.

<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.10.001>

Das RK, Brar SK, Verma M (2016) Fumaric Acid: production and application aspects U: Brar SK, Sarma SJ, Pakshirajan K (ured.) Platform Chemical Biorefinery: Future green industry, Elsevier Science Publishing, Amsterdam str. 133–157.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802980-0.00008-0>

de Cárdenas LZ, de Cárdenas BZ (2020) Production of organic acids via fermentation of sugars generated from lignocellulosic biomass. U: Ingle AP, Chandel AK, da Silva SS (ured.) Lignocellulosic Biorefining Technologies. John Wiley & Sons Ltd, Chichester str. 203–246.

<https://doi.org/10.1002/9781119568858.ch10>

Diep, Nhu & Sakanishi, Kinya & Nakagoshi, Nobukazu & Minowa, Tomoaki & Dang Xuan, Tran. (2012). Biorefinery : concepts, current status, and development trends. *International Journal of Biomass & Renewables*. 1. 1-8.

<https://doi.org/10.61762/ijbrvol1iss2art13818>

Dimnjača, <https://www.plantea.com.hr/dimnjaca>, pristupljeno 1. rujna 2024.

Ghai M, Agnihotri N, Kumar V, Agnihotri R, Kumar A, Sahu K (2024) Global organic acids production and their industrial applications. U: Kumar A, Kumar V (ured.) Microbial Organic Acids Production: Utilizing waste feedstocks, Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, str. 1–19.

<https://doi.org/10.1515/psr-2022-0157>

Itaconic acid,

[https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB8439347\\_EN.htm](https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB8439347_EN.htm), pristupljeno 18. srpnja 2024.

Ivančić Šantek, M. (2020) Biotehnologija, Osvježimo znanje . *Kem Ind*, **69** [5,6], 326-327.

Karimi K (ed) (2015) Lignocellulose-based bioproducts. Springer International Publishing, Cham.

Klement T, Büchs J (2013) Itaconic acid – A biotechnological process in change. *Bioresour Technol* **135**, 422–431.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.141>

Kreuter A, Gambichler T, Altmeyer P, Brockmeyer NH (2002) Treatment of disseminated granuloma annulare with fumaric acid esters. *BMC Dermatol* **2**, 5.

<https://doi.org/10.1186/1471-5945-2-5>

Kumari P, Mehta A, Sehgal R, Ray RC, Gupta R (2022) Microbial enzymes and organic acids production from vegetable and fruit wastes and their applications. U: Ray RC, (ured.) *Fruits and Vegetable Wastes: Valorization to Bioproducts and Platform Chemicals* Springer Nature Singapore, Singapore, str. 237–257.

<https://doi.org/10.1007/978-981-16-9527-8>

Li X, Chen Y, Zhao S, Chen H, Zheng X, Luo J, i sur. (2015) Efficient production of optically pure L-lactic acid from food waste at ambient temperature by regulating key enzyme activity. *Water Res* **70**, 148–157.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.049>

Ling LB, Ng TK (1989) Fermentation process for carboxylic acids. Patent US4877731A

Liu H, Ma J, Wang M, Wang W, Deng L, Nie K, i sur. (2016) Food waste fermentation to fumaric acid by *Rhizopus arrhizus* RH7-13. *Appl Biochem Biotechnol* **180**, 1524–1533.

<https://doi.org/10.1007/s12010-016-2184-7>

Lu J, Lv Y, Qian X, Jiang Y, Wu M, Zhang W, i sur. (2020) Current advances in organic acid production from organic wastes by using microbial co-cultivation systems. *Biofuel Bioprod Bior* **14**, 481–492.

<https://doi.org/10.1002/bbb.2075>

Magalhães Júnior A I, Soccol C R, Candido Camara M, Molina Aulestia D T, Porto de Souza Vandenberghe L, de Carvalho J C (2021) Challenges in the production of second-generation organic acids (potential monomers for application in biopolymers). *Biomass Bioenergy* **149** 106092. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106092>

Marić, V. (2000) *Biotehnologija i sirovine*, sveučilišni udžbenik, Zagreb: Stručna i poslovna knjiga d.o.o.

Marić, V., Šantek B. (2009) Biokemijsko inženjerstvo, Zagreb: Golden marketing – Tehnička knjiga, 37-38.

Mohmad M, Agnihotri N, Kumar V (2024) Fumaric acid: fermentative production, applications and future perspectives. U: Kumar A, Kumar V (ured.) Microbial Organic Acids Production: Utilizing waste feedstocks, Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, str. 69–94.  
<https://doi.org/10.1515/psr-2022-0161>

Mores S, Vandenberghe LP de S, Magalhães Júnior AI, de Carvalho JC, de Mello AFM, Pandey A, i sur. (2021) Citric acid bioproduction and downstream processing: Status, opportunities, and challenges. *Bioresour Technol* **320**, 124426.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124426>

Mussato S.I, Ballesteros L.F, Martins S, Teixeira J (2012) Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. U: Yeow SK, Xinxin G (ured.) Industrial Waste, InTech, Rijeka, str. 121-140.  
<https://doi.org/10.5772/36310>

Mussatto S.I, Teixeira J (2010) Lignocellulose as raw material in fermentation processes. U: Mendez-Vilas A (ured.) Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Formatex Research Center, Bajadoz, str. 897–907.

Narisetty V, Prabhu AA, Al-Jaradah K, Gopaliya D, Hossain AH, Kumar Khare S, i sur. (2021) Microbial itaconic acid production from starchy food waste by newly isolated thermotolerant *Aspergillus terreus* strain. *Bioresour Technol* **337**, 125426.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125426>

Novak M, Šantek B, Buljubašić M, Didak Ljubas B, Grubišić M, Marđetko N, i sur. (2022) Lignocellulosic byproducts from agriculture and the food industry as a driver of biotechnological production progress. *Glasnik zaštite bilja* **45**, 26–37.  
<https://doi.org/10.31727/gzb.45.6.3>

Panda SK, Mishra SS, Kayitesi E, Ray RC (2016) Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. *Environ Res* **146**, 161–172.  
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.035>

Park H-S, Jun S-C, Han K-H, Hong S-B, Yu J-H (2017) Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi. U: Sariaslani S, Gadd GM, (ured.) *Advances in Applied Microbiology*, Elsevier Science Publishing, Oxford, str. 161–202.

<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.03.001>

Petravić Tominac V., Trontel A., Novak M., Marđetko N., Grubišić M., Didak Ljubas B., Buljubašić M., Šantek B. (2022) Lignocelulozni nusprodukti iz poljoprivrede i prehrambene industrije kao pokretač napretka biotehnoške proizvodnje. *Glasnik zaštite bilja* **45**(6): 26-37.

<https://doi.org/10.31727/gzb.45.6.3>

Ramakrishnan G, Dhandapani B, Krishnamoorthy S, Dhithya V, Palaniyappan H (2020) Next-generation itaconic acid production using novel *Aspergillus japonicas* from *Citrullus lanatus* rind through solid-state fermentation. *Bioresour Technol Rep* **11**, 100544.

<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100544>

Sindhu M, Mehta S, Kumar S, Saharan BS, Malik K, Kayasth M, i sur. (2024) Itaconic acid: microbial production using organic wastes as cost-effective substrates. U: Kumar A, Kumar V (ured.) *Microbial Organic Acids Production: Utilizing waste feedstocks*, Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, str. 125–148.

<https://doi.org/10.1515/psr-2022-0164>

Sriariyanun M, Heitz JH, Yasurin P, Asavasanti S, Tantayotai P (2019) Itaconic Acid: A promising and sustainable platform chemical? *Applied Science and Engineering Progress* **12**, 75–82.

<https://doi.org/10.14416/j.asep.2019.05.002>

Teleky B-E, Vodnar D (2019) Biomass-derived production of itaconic acid as a building block in specialty polymers. *Polymers (Basel)* **11**, 1035.

<https://doi.org/10.3390/polym11061035>

Ustilaginizam, <https://www.enciklopedija.hr/clanak/ustilaginizam>, pristupljeno 8.9.2024.

Varriale L, Ulber R (2023) Fungal-based biorefinery: From renewable resources to organic acids. *ChemBioEng Reviews* **10**, 272–292.

<https://doi.org/10.1002/cben.202200059>



Vishnu D, Dhandapani B, Mahadevan S (2020) Recent advances in organic acid production from microbial sources by utilizing agricultural by-products as substrates for industrial applications. U: Jerold M, Arockiasamy S, Sivasubramanian V (ured) Bioprocess Engineering for Bioremediation. The Handbook of Environmental Chemistry, 104. izd., Springer, Cham str. 67–87.

[https://doi.org/10.1007/698\\_2020\\_577](https://doi.org/10.1007/698_2020_577)

Xu Q, Li S, Fu Y, Tai C, Huang H (2010) Two-stage utilization of corn straw by *Rhizopus oryzae* for fumaric acid production. *Bioresour Technol* **101**, 6262–6264.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.086>

### Izjava o izvornosti

Ja Karlo Bečirović izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



---

Vlastoručni potpis