

# Utjecaj koncentracije izvora ugljika na kinetiku rasta ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum*

---

Brozović, Stella

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:159:257439>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Stella Brozović**

**7364/BT**

**Utjecaj koncentracije izvora ugljika na kinetiku rasta ljubičaste  
nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum***

**ZAVRŠNI RAD**

**Znanstveno-istraživački projekt:** „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih  
lignoceluloznih sirovina" (HRZZ-9717)

**Mentor:** Doc. dr. sc. *Mario Novak*

**Zagreb, 2020.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu znanstveno - istraživačkih projekata „Bioprospecting Jadranskog mora BioProCro“ (KK.01.1.1.01.0002) i „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-9717) pod mentorstvom doc. dr. sc. Maria Novaka te uz pomoć asistenta Nenada Marđetka, mag. ing. bioproc.

*Zahvaljujem se svojem mentoru doc. dr. sc. Mariu Novaku na savjetima, konstruktivnim kritikama te uloženom vremenu i pomoći tijekom izrade završnog rada.*

*Također bih se htjela zahvaliti Nenadu Marđetku, mag. ing. te doc. dr. sc. Antoniji Trontel i svima iz Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na pruženoj pomoći i savjetima prilikom rada u laboratoriju.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na iskazanoj podršci i razumijevanju.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Utjecaj koncentracije izvora ugljika na kinetiku rasta ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum***

***Stella Brozović, 0058210317***

**Sažetak:** Ljubičaste nesumporne bakterije predmet su istraživanja već godinama radi potencijalne primjene u biotehnološkoj proizvodnji različitih komercijalno vrijednih proizvoda kao što su biokemikalije, biopolimeri, vodik kao biogorivo, razni pigmenti i drugi spojevi. Da bi proces proizvodnje bio ekološki i ekonomski održiv potreban je obnovljiv i jeftin izvor sirovina, npr. lignoceluloza. Cilj ovog rada bilo je ispitivanje kinetike rasta ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama s različitim koncentracijama izvora ugljika - glukoze i/ili ksiloze, koje čine većinski udio ugljikohidrata u hidroliziranim lignoceluloznim sirovinama. Tijekom uzgoja bakterije na podlozi s početnom koncentracijom glukoze od 1 g/L, zabilježen je najviši prinos biomase (1,839 g/L) te najveća produktivnost (0,019 g/(Lh)). Najniži prinos biomase (1,176 g/L) te najniža produktivnost (0,012 g/(Lh)) uočeni su prilikom uzgoja na hranjivoj podlozi s 10 g/L glukoze i 10 g/L ksiloze.

**Ključne riječi:** izvor ugljika, lignocelulozne sirovine, ljubičaste nesumporne bakterije, *Rhodovulum adriaticum*

**Rad sadrži:** 40 stranica, 11 slika, 10 tablica, 62 literaturnih navoda, 2 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** Doc. dr. sc. Mario Novak

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

**Datum obrane:**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology, Malting and**  
**Brewing Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

**Effects of carbon source concentration on growth kinetics of the purple non-sulfur bacteria *Rhodovulum adriaticum***

***Stella Brozović, 0058210317***

**Abstract:** Purple non-sulfur bacteria have been the subject of research for years because of their potential use in the biotechnological production of various commercially valuable products such as biochemicals, biopolymers, hydrogen as a biofuel, pigments and other compounds. In order to achieve ecologically and economically sustainable production process, a renewable and cheap source of raw materials, e.g. lignocellulose, is required. The aim of this study was to research the growth kinetics of the purple non-sulfur bacterium *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 on different concentrations of carbon source – glucose and/or xylose, which make up the majority of sugars in hydrolysed lignocellulosic raw materials. The highest biomass yield (1,839 g/L) and the highest productivity (0,019 g/(Lh)) were achieved during the cultivation in the medium with 1 g/L glucose. While, the lowest biomass yield (1,176 g/L) and the lowest productivity (0,012 g/(Lh)) were recorded during the growth with 10 g/L glucose and 10 g/L xylose.

**Keywords:** carbon source, lignocellulosic raw materials, purple non-sulfur bacteria, *Rhodovulum adriaticum*

**Thesis contains:** 40 pages, 11 figures, 10 tables, 62 references, 2 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD Mario Novak, Assistant Professor

**Technical support and assistance:** MA Nenad Marđetko

**Defence date:**

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Ljubičaste bakterije .....	2
2.1.1. Ljubičaste sumporne bakterije .....	2
2.1.2. Ljubičaste nesumporne bakterije .....	3
2.2. Primjena ljubičastih nesumpornih bakterija u biotehnologiji .....	5
2.2.1. Biotehnoška proizvodnja biopolimera .....	6
2.2.2. Biotehnoška proizvodnja biogoriva .....	6
2.2.3. Biotehnoška proizvodnja biokemikalija .....	7
2.2.4. Bioremedijacija tla i obrada otpadnih voda .....	8
2.2.5. Proizvodnja i primjena pigmenata .....	8
2.3. Uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija .....	9
3. MATERIJALI I METODE .....	11
3.1. Materijali .....	11
3.1.1. Radni mikroorganizam .....	11
3.1.2. Hranjive podloge .....	11
3.1.3. Kemikalije .....	12
3.1.4. Uređaji i oprema .....	13
3.1.4.1. Centrifuga .....	13
3.1.4.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC) .....	13
3.1.4.3. Spektrofotometar .....	14
3.1.4.4. Ostala oprema i pribor .....	14
3.2. Metode .....	14
3.2.1. Priprema inokuluma .....	14
3.2.2. Priprema hranjivih podloga za uzgoj bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 na različitim koncentracijama odgovarajućeg izvora ugljika .....	15
3.2.3. Provedba i nadzor uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 .....	15
3.2.4. Analitičke metode .....	16
3.2.4.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka tijekom uzgoja .....	16
3.2.4.2. Ekstrakcija ukupnih pigmenata i spektrofotometrijsko određivanje bakterioklorofila a .....	16
3.2.4.3. Određivanje koncentracije izvora ugljika u podlozi UPLC analizom .....	16
3.2.4.4. Određivanje parametara uspješnosti uzgoja .....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	18

4.1. Utjecaj različitih koncentracija glukoze, kao izvora ugljika, na rast ljubičaste nesumporne bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781.....	19
4.2. Utjecaj različitih koncentracija ksiloze, kao izvora ugljika, na rast ljubičaste nesumporne bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781.....	24
4.3. Utjecaj različitih koncentracija glukoze i ksiloze, kao odabranih izvora ugljika, na rast ljubičaste nesumporne bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781.....	29
5. ZAKLJUČCI.....	34
6. LITERATURA.....	35
7. PRILOZI.....	41



## 1. UVOD

U cilju smanjenja negativnog utjecaja na okoliš i potrebe za fosilnim gorivima kao izvorima energije sve se više istražuje potencijal mikroorganizama kao alternative za proizvodnju biogoriva, biokemikalija i biopolimera. Jednu od zanimljivih skupina mikroorganizama predstavljaju anoksigenične fotosintetske ljubičaste bakterije koje su široko rasprostranjene u prirodi, a dijele se na ljubičaste sumporne i ljubičaste nesumporne bakterije.

Ljubičaste nesumporne bakterije mogu sintetizirati različite vrijedne proizvode kao što su polihidroksialkanoati, biorazgradivi i biokompatibilni polimeri (Higuchi-Takeuchi i sur., 2016), vodik kao biogorivo koje ne zagađuje okoliš (Basak i Das, 2007), aminolevulinska kiselina koja se zbog svojih biokemijskih karakteristika široko primjenjuje u medicini, prehrambenoj industriji i poljoprivredi (Liu i sur., 2014). Biomasa ljubičastih nesumpornih bakterija koristi se za bioremedijaciju tla i vode zagađene teškim metalima, a također je bogata vitaminima, karotenoidima i proteinima sa značajnom količinom esencijalnih aminokiselina pa se može koristiti za ishranu životinja (Prasertsan i sur., 1997). Ljubičaste nesumporne bakterije mogu rasti u različitim uvjetima te koristiti različite supstrate kao izvore ugljika i energije te nitrate i/ili amonijak kao izvore dušika (Kantachote i sur., 2005). Za uzgoj ovih bakterija te proizvodnju određenih biotehnoloških proizvoda koriste se jeftini, obnovljivi i lako dostupni izvori organskog materijala kao što su otpadne vode i lignocelulozne sirovine. Međutim, potreban je proces predobrade lignoceluloznih sirovina da bi dobili fermentabilne šećere koje radni mikroorganizmi mogu koristiti za rast. Lignoceluloza se sastoji od tri polimera - lignina, celuloze i hemiceluloze. Predtretmanom lignoceluloznih sirovina dolazi do hidrolize navedenih polimera čime se dobiva heterogena smjesa različitih spojeva, no uglavnom se dobivaju ugljikohidrati kao što su glukoza i ksiloza (Marđetko i sur., 2018).

U svrhu istraživanja utjecaja koncentracije izvora ugljika na rast ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 proveo se uzgoj ove bakterije na kemijski definiranim hranjivim podlogama sa glukozom i/ili ksilozom kao izvorom ugljika. Uz kinetiku rasta pratila se i potrošnja supstrata te sinteza fotosintetskih pigmenata ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Ljubičaste bakterije

Ljubičaste bakterije su gram-negativni fotosintetski prokarioti koji sadrže peptidoglikan i lipopolisaharidnu vanjsku membranu te imaju sposobnost pretvorbe svjetlosne energije u kemijsku procesom anoksigenične fotosinteze. Ove bakterije sadrže fotosintetske pigmente - bakterioklorofile *a* ili *b* te karotenoide kao što su likopen, sferoiden, okenon, rodopinal te spiriloksantin prema kojima kulture bakterijskih stanica poprimaju određenu boju (Schmidt, 1978). Ljubičaste bakterije mogu rasti na svjetlu, anaerobno, s CO<sub>2</sub> kao jednim izvorom ugljika te reduciranim anorganskim spojevima kao elektron donorima (Novak i sur., 2017). Prilikom autotrofnog rasta Calvinov ciklus služi kao mehanizam fiksacije ugljika (Madigan i Jung, 2009). Ljubičaste bakterije zahtijevaju anoksične uvjete da bi mogle fototrofno rasti jer molekularni kisik potiskuje sintezu pigmenata, stoga najčešće obitavaju u estuarijima, jezerima, barama i drugim vodenim okruženjima (Pfennig, 1989). Podjela ljubičastih bakterija na sumporne i nesumporne se prvobitno temeljila na njihovoj različitoj toleranciji i korištenju sulfida. One vrste koje podnose milimolarne koncentracije sulfida i mogu ga oksidirati te pohraniti u obliku sumpornih globula unutar stanice, smatrane su ljubičastim sumpornim bakterijama, a vrste koje nemaju tu sposobnost klasificirane su kao ljubičaste nesumporne bakterije. Međutim, znanstvenici Hansen i van Gemerden (1972) dokazali su da neke vrste ljubičastih nesumpornih bakterija mogu rasti pri niskim koncentracijama sulfida i oksidirati ga do elementarnog sumpora, tetratioata ili sulfata. Ipak postoji važna razlika u metabolizmu ovih dviju skupina bakterija. Naime, ljubičaste sumporne bakterije skladište elementarni sumpor u obliku granula intracelularno, a kod ljubičastih nesumpornih bakterija ostaje izvan stanice. Ova klasifikacija potvrđena je analizom 16S rDNA sekvence prema kojoj ljubičaste sumporne bakterije pripadaju razredu *Gammaproteobacteria*, a ljubičaste nesumporne bakterije razredima *Alphaproteobacteria* i *Betaproteobacteria* (Imhoff i sur., 2005).

#### 2.1.1. Ljubičaste sumporne bakterije

Fiziologija ljubičastih sumpornih bakterija je usko povezana sa sulfidom stoga ove bakterije rastu u osvijetljenim vodenim ekosustavima u kojima se nalazi sumporovodik, a mogu se pojaviti i u plitkim lagunama zagađenim kanalizacijom (Pfennig, 1989). Prilikom

fotoautotrofnog rasta kao elektron donore koriste sulfide ili tiosulfate pri čemu se sumpor oksidira (Brune, 1995). Ljubičaste sumporne bakterije imaju važnu ulogu jer stvaraju povoljne uvjete za rast drugih organizama (biljaka, životinja, bakterija) oksidacijom toksičnog H<sub>2</sub>S u netoksični elementarni sumpor ili sulfat (Madigan i Jung, 2009). Nadalje, neke vrste ljubičastih sumpornih bakterija koriste Fe<sup>2+</sup> ione kao elektron donore koje oksidiraju u Fe<sup>3+</sup> (Ehrenreich i Widdel, 1994) ili nitrite koje oksidiraju do nitrata. Također, ljubičaste sumporne bakterije mogu fotoasimilirati nekoliko organskih izvora ugljika kao što su organske i masne kiseline, kratkolančani alkoholi te neki ugljikohidrati (Sojka, 1978). Klasificirane su u dvije porodice: *Ectothiorhodospiraceae* i *Chromatiaceae*. Vrste koje pripadaju porodici *Chromatiaceae* skladište granule sumpora unutar stanice, dok ih vrste porodice *Ectothiorhodospiraceae* izlučuju izvan stanice. Mnogo vrsta ljubičastih sumpornih bakterija je ekstremofilno, a pojedine vrste najbolje rastu pri visokom pH i/ili visokoj koncentraciji soli (Madigan i Jung, 2009).

### **2.1.2. Ljubičaste nesumporne bakterije**

Ljubičaste nesumporne bakterije su gram-negativne, nesporogene bakterije i većina se pokreće pomoću bičeva. Vrlo su raznolika i heterogena skupina fotosintetskih prokariota (Imhoff i sur., 2005). Pojedine vrste ljubičastih nesumpornih bakterija razlikuju se u sastavu karotenoida, strukturi unutarnje membrane, korištenju izvora ugljika, elektron donorima te morfologiji. Obično rastu u područjima niske razine sulfida ili gdje sulfidi nisu prisutni. Prisutne su u kanalizaciji i raznim otpadnim vodama jer pružaju povoljne uvjete za rast ovih bakterija (Madigan i Jung, 2009).

U anoksičnim uvjetima uz prisutnost svjetla, ljubičaste nesumporne bakterije mogu rasti fotoautotrofno koristeći H<sub>2</sub> ili niske razine sulfida kao elektron donore, a neke vrste mogu koristiti i S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ili Fe<sup>2+</sup> kao fotosintetske elektron donore (Brune, 1995). Međutim, većina vrsta najbolje raste fotoheterotrofno u mediju koji sadrži malat ili piruvat kao izvor ugljika te amonijak kao izvor dušika. Različite vrste metaboliziraju primarne i sekundarne alkohole, aminokiseline, organske i masne kiseline te C1 jedinice (Sojka, 1978). U medij se često dodaje kvašćev ekstrakt koji je izvor B vitamina potrebnog za rast većine ljubičastih nesumpornih bakterija (Biebl i Pfennig, 1981). Ekstrakt kvasca također sadrži organske spojeve koji mogu potaknuti fotoheterotrofni rast. Potrebni faktori rasta su tiamin, biotin, nikotinska kiselina te *p*-aminobenzojeva kiselina.

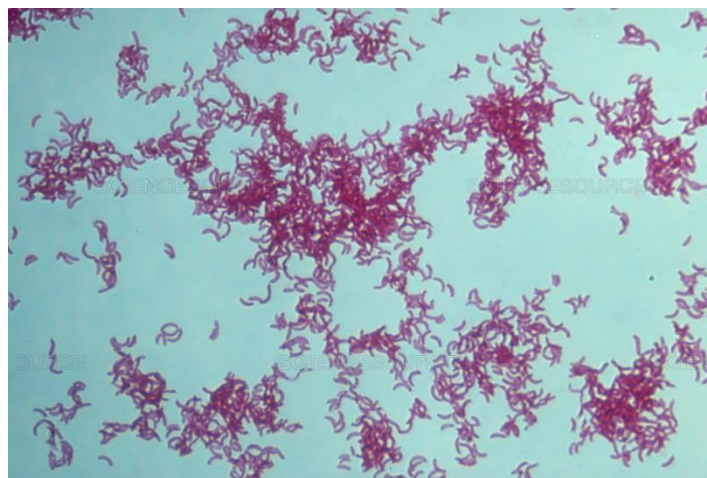
Mnogi organski spojevi se mogu koristiti kao izvori ugljika i elektron donori prilikom aerobnog rasta u mraku. Tolerancija na kisik varira ovisno o vrsti ljubičastih nesumpornih

bakterija, npr. *Rhodobacter* mogu rasti uz snažnu aeraciju (Madigan, 1988). Prilikom rasta u aerobnim uvjetima u tami sinteza fotosintetskih pigmenata je reprimirana, stoga kulture bakterijskih stanica nisu obojane (ili su slabo obojane). Određene vrste mogu rasti u anoksičnim uvjetima u tami, fermentacijom ili anaerobnim disanjem. Kemolitotrofni rast u mraku određenih vrsta omogućen je korištenjem molekularnog vodika ili tiosulfata kao elektron donora (Madigan i Jung, 2009).

Nadalje, ljubičaste nesumporne bakterije imaju sposobnost fiksacije elementarnog dušika ( $N_2 + 8H \rightarrow 2NH_3 + H_2$ ) prilikom kemotrofnog i fototrofnog rasta pomoću enzima nitrogenaze (Madigan i Jung, 2009).

Do sada je poznato 20-ak rodova ljubičastih nesumpornih bakterija raspodijeljenih unutar razreda *Alphaproteobacteria* i *Betaproteobacteria* (Madigan i Jung, 2009). Unutar razreda *Alphaproteobacteria* definirane su tri veće filogenetske skupine kojima pripada većina rodova ovih bakterija (Imhoff, 2006).

Grupa  $\alpha$ -1 sadrži 9 rodova, a glavni predstavnik ove skupine je rod *Rhodospirillum*. Bakterijske stanice koje pripadaju ovom rodu spiralnog su oblika (slika 1.) i pokreću se pomoću polarnog biča, a sadrže unutarцитoplazmatske fotosintetske membrane u obliku vezikula, lamele ili nakupina. Osim roda *Rhodospirillum*, u ovu skupinu spadaju i *Rhodospira*, *Rhodocista*, *Roseospira*, *Roseospirillum*, *Phaeospirillum*, *Rhodopila*, *Rhodovibrio*, *Rhodothalassium* (Imhoff, 2006). Stanice roda *Rhodopila* su sferičnog do jajolikog oblika i pokreću se pomoću bičeva. Mogu rasti pri niskom pH, a kao faktore rasta zahtijevaju *p*-aminobenzojevu kiselinu i biotin. Također su osjetljive na prisutnost kisika (Novak i sur., 2017).



**Slika 1.** Ljubičasta nesumporna bakterija *Rhodospirillum rubrum* (preuzeto sa sciencesource.com)

Tipični predstavnik grupe  $\alpha$ -2 je *Rhodopseudomonas*. Stanice ovog roda su štapićastog oblika, dijele se asimetrično, sadrže unutarcitoplazmatsku fotosintetsku membranu i pokreću se bičevima (Novak i sur., 2017). Ova grupa obuhvaća i rodove *Rhodoblastus*, *Rhodoplanes*, *Rhodobium*, *Blastochloris* te *Rhodomicrobium* (Imhoff, 2006). Bakterijske stanice roda *Rhodomicrobium* jajolikog su oblika, pokreću se peritrihalnim bičevima i razmnožavaju se pupanjem.

U grupu  $\alpha$ -3 pripada rod *Rhodobacter* i *Rhodovulum*. Bakterijske stanice roda *Rhodobacter* su jajolikog do štapićastog oblika, dijele se binarnom diobom te mogu biti pokretne ili nepokretne. Sve vrste ovog roda za rast zahtijevaju tiamin, a većina i biotin. Sadrže bakterioklorofil *a* i karotenoide sferoidne skupine (Novak i sur., 2017).

Razred *Betaproteobacteria* uključuje rodove *Rhodoferax*, *Rubrivivax* i *Rhodocyclus*. Bakterije roda *Rhodocyclus* su tanke i zakrivljene, mogu se pokretati pomoću polarnih bičeva ili mogu biti nepokretne. Sadrže intracitoplazmatske membrane koje tvore male intruzije citoplazmatske membrane u obliku prsta (Madigan i Jung, 2009).

## **2.2. Primjena ljubičastih nesumpornih bakterija u biotehnologiji**

Široka biotehnološka primjena ljubičastih nesumpornih bakterija omogućena je zahvaljujući njihovoj fiziološkoj raznolikosti, sposobnosti rasta na različitim supstratima, u različitim uvjetima te sposobnosti sinteze različitih komercijalno vrijednih proizvoda.

Ljubičaste nesumporne bakterije imaju potencijal za povećanje prinosa i kvalitete jestive biljne biomase te za pospješivanje rasta biljaka, bioremedijaciju teških metala i ublažavanje emisije stakleničkih plinova (Sakarika i sur., 2019). Također, poznato je da ove bakterije sintetiziraju i/ili akumuliraju široku paletu metabolita kao što su polihidroksibutirat (PHB), biopolimer kao alternativa plastici zahvaljujući svojoj biorazgradivosti i biokompatibilnosti (Higuchi-Takeuchi, 2016.); vodik kao alternativno biogorivo za smanjenje upotrebe fosilnih goriva; karotenoidi, vitamini (npr. C, E, D, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>), velike količine proteina (Kobayashi i Kobayashi, 1995); 5-aminolevulinska kiselina korištena u medicini, poljoprivredi i prehrambenoj industriji (Liu i sur., 2014). Nadalje, koriste se za obradu različitih otpadnih voda zbog mogućnosti rasta na različitim supstratima i korištenju sumporovodika kao elektron donora čime se smanjuje toksičnost i neugodni mirisi.

### **2.2.1. Biotehnoška proizvodnja biopolimera**

Polihidroksialkanoati (PHA) su biopoliesteri, proizvode ih različiti mikroorganizmi u svrhu skladištenja energije i ugljika te za povećanje redukcijskog potencijala. Kao što je već spomenuto, PHA se koristi kao alternativa plastici dobivenoj iz fosilnih izvora zbog biokompatibilnosti i biorazgradivosti. Cijena PHA, u usporedbi s komercijalnom plastikom, i dalje je visoka zbog troškova potrebnih izvora ugljika (šećeri ili biljna ulja). Da bi se smanjila cijena PHA, neka istraživanja usredotočena su na izravnu fiksaciju CO<sub>2</sub> za sintezu PHA putem fotosinteze. Poznato je da se akumulacija PHA povećava rastom bakterijskih stanica uz suvišak izvora ugljika te limitacijom izvora dušika, sumpora ili fosfora (Higuchi-Takeuchi, 2016). Proizvodnja PHA istraživana je na nekoliko slatkovodnih sojeva ljubičastih nesumpornih bakterija kao što su *Rhodospirillum rubrum* (Brandl i sur., 1989), *Rhodobacter sphaeroides* (Brandl i sur., 1991) i *Rhodopseudomonas palustris* (Carlozzi i Sacchi, 2001) s naglaskom na uvjete kultivacije, izvor ugljika i prinos PHA. *Rhodospirillum rubrum* najbolje je karakteriziran soj obzirom na proizvodnju PHA, prilikom uzgoja ovog soja (kad se butirat koristi kao jedini izvor ugljika) sadržaj PHA je 50 wt% suhe tvari biomase (Brandl i sur., 1989). Istraživanja *Rhodobacter sphaeroides* pokazala su akumulirane razine PHA 60-70 wt% (Brandl i sur., 1991), a *Rhodopseudomonas palustris* svega 4 wt% (Carlozzi i Sacchi, 2001). Morska ljubičasta nesumporna bakterija *Rhodovulum sulfidophilum* navodno može sintetizirati polihidroksibutirat (PHB) do 50 wt% suhe tvari biomase (Chowdhury i sur., 1996).

Također, uočeno je nakupljanje polifosfata u stanicama ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodopseudomonas palustris* prilikom rasta na svjetlu, nakon postizanja stacionarne faze rasta. Kada se ukloni izvor energije i/ili ugljika bakterije otpuštaju intracelularni polifosfat ili poli-β-hidroksibutirat kako bi osigurale energiju za rast. Tijekom inkubacije u nedovoljnim uvjetima za rast, bakterijske stanice koriste prethodno pohranjeni polifosfat za proizvodnju električne energije. Ovakav koncept bi se, uz optimizaciju, mogao koristiti za istodobnu obradu otpadnih voda i obnavljanje energije (Lai i sur., 2017).

### **2.2.2. Biotehnoška proizvodnja biogoriva**

U cilju smanjenja upotrebe fosilnih goriva i emisije raznih onečišćivača koji se oslobađaju u atmosferu prilikom njihova izgaranja, sve je veća upotreba vodika kao biogoriva zbog mogućnosti reciklacije i niskog ekološkog otiska jer tijekom sagorijevanja kao glavni produkt

nastaje voda. U usporedbi sa drugim plinovitim gorivima kao što je metan, vodik nije štetan za ljude i okoliš (Debabrata i Veziroğlu, 2001). U odnosu na termokemijske i elektrokemijske procese, biološki postupci proizvodnje vodika vode se pri umjerenim temperaturama i atmosferskim tlakovima što znači da su manje energetski intenzivni i ekološki povoljniji. Biovodik se može dobiti fotofermentacijom i fermentacijom u mraku pri čemu glavnu ulogu u proizvodnji biovodika imaju enzimi nitrogenaza i hidrogenaza (Basak i Das, 2007). Fototrofne bakterije pokazale su najveći potencijal za proizvodnju biovodika zbog visokog teorijskog koeficijenta konverzije supstrata u produkt, sposobnosti sinteze biovodika u anaerobnim uvjetima, upotrebe širokog spektra svjetlosne energije te mogućnosti rasta na različitim organskim supstratima iz otpadnih voda (Fascetti i sur., 1998). U ljubičastim nesumpornim bakterijama kisik se tijekom fotosinteze ne stvara (anaerobni uvjeti) stoga su hidrogenaza i nitrogenaza aktivne (prisutnost kisika ih inhibira). Nitrogenaza je odgovorna za dobivanje vodika iz protona uz istovremenu fiksaciju dušika, ova reakcija je ireverzibilna i zahtijeva energiju ATP-a (Basak i Das, 2007). Budući da ljubičaste nesumporne bakterije mogu koristiti razne otpadne materijale kao izvor ugljika, ispitivana je proizvodnja vodika korištenjem raznih vrsta otpada i otpadnih voda s ciljem smanjenja troškova proizvodnje (Wu i sur., 2012). Za proizvodnju biovodika fotofermentacijom mogu se koristiti: *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sulfidophilus* i druge (Basak i Das, 2007).

### **2.2.3. Biotehnološka proizvodnja biokemikalija**

Ljubičaste nesumporne bakterije sintetiziraju 5-aminolevulinsku kiselinu (5-ALA) koja se primjenjuje u medicini za dijagnosticiranje trovanja teškim metalima, fotodinamičkoj dijagnozi i terapiji (Sasaki i sur., 2002), u prehrambenoj industriji te poljoprivredi kao herbicid, insekticid i faktor koji potiče rast biljaka (Sasaki i sur., 1998). Biorazgradiva je i nije štetna za biljke, ljude ni životinje. 5-ALA je međuprodukt u biosintezi tetrapirola koji se nalazi u hemu, porfirinima i vitaminu B<sub>12</sub> (Sasaki i sur., 2002). Može se sintetizirati pomoću dva različita biokemijska puta: C4 put (Sheminov metabolički put) koji se odvija u ljubičastim bakterijama, stanicama sisavaca i kvascima te C5 biokemijski put prisutan u nekim mikroorganizmima i mnogim biljkama (Woodard i Dailey, 1995). Proizvodnja 5-ALA kemijskom sintezom puno je složenija, skuplja i daje manje prinose u odnosu na mikrobnu fermentaciju, stoga se 5-ALA uglavnom proizvodi biotehnološki pomoću fotosintetskih bakterija (Liu i sur., 2014). 5-aminolevulinsku kiselinu proizvode i divlji sojevi bakterija i odgovarajući mutanti (primjereniji su za sintezu 5-ALA). Uočeno je da ljubičasta nesumporna

bakterija *Rhodobacter sphaeroides*, koja sintetizira velike količine tetrapirolnih spojeva, akumulira relativno velike količine ekstracelularne 5-ALA dodatkom levulinske kiseline (LA) – kompetitivnog inhibitora enzima ALA-dehidrataze u anaerobnim uvjetima uz prisutnost svjetla (Sasaki i sur., 1990). Do sada je testiran proizvodni kapacitet 5-ALA mnogih različitih sojeva fotosintetskih bakterija i njihovih mutanata (Xiu-yan i sur., 2005; Liu i sur., 2015; Meng i sur., 2016).

#### **2.2.4. Bioremedijacija tla i obrada otpadnih voda**

Postupci bioremedijacije istražuju upotrebu bioloških mehanizama za pretvorbu, uništavanje ili imobilizaciju onečišćivača okoliša u svrhu zaštite istog. Fotosintetske bakterije imaju sposobnost korištenja metalnih spojeva kao elektron donora čime pretvaraju toksične spojeve u druge, manje toksične. Primjena fotosintetskih bakterija za obradu otpadnih voda ekonomičnija je i ekološki prihvatljivija u odnosu na kemijske i fizikalne metode. Prilikom obrade otpadne vode dolazi do smanjenja BPK (biokemijske potrošnje kisika) i KPK (kemijske potrošnje kisika) te smanjenja koncentracije organskih tvari, sulfata, bikarbonata i klorida (Merugu i sur., 2014). Također, tijekom obrade, ljubičaste nesumporne bakterije proizvode komercijalno važne spojeve kao što su SCP (*single cell protein*), terapijske i antimikrobne tvari te biopolimere. Iz otpadnih voda su izolirane i okarakterizirane različite fototrofne bakterije (Vasavi i sur., 2008; Ramchander i sur., 2007). Nadalje, anoksigenične fototrofne bakterije degradiraju aromatske homocikličke i heterocikličke spojeve te uklanjaju toksične kemikalije prisutne u otpadnim vodama (Merugu i sur., 2014). Ljubičaste nesumporne bakterije koriste se za tretiranje različitih otpadnih voda kao što su otpadne vode iz stočnih uzgajališta (Myung i sur., 2004), otpadne vode s visokom koncentracijom lateksa (Choorit i sur., 2002), kanalizacijske otpadne vode koje sadržavaju ulja (Takeno i sur., 2005), voda iz farmaceutske industrije s visokim udjelom KPK (Madukasi i sur., 2009), a koriste se i za pročišćavanje ribnjaka za uzgoj ribe u Japanu (Sasaki i sur., 1998). Dobivena bakterijska biomasa bogata je proteinima, vitaminima, karotenoidima i drugim sastojcima stoga se koristi kao hrana za životinje i gnojivo u poljoprivredi te može ukloniti neugodne mirise otpadnih materijala (Kobayashi i Kobayashi, 1995).

#### **2.2.5. Proizvodnja i primjena pigmenata**

Ljubičaste nesumporne bakterije obično sintetiziraju bakterioklorofile *a* i *b* te karotenoide u anaerobnim uvjetima na svjetlu, dok u aerobnim uvjetima u mraku sintetiziraju malo ili uopće ne sintetiziraju fotosintetske pigmente (Takaichi i sur., 2001). U aerobnim uvjetima



rastu kemotrofno pri čemu koriste kisik kao elektron akceptor. Smanjenjem koncentracije kisika potiče se sinteza fotosintetskih pigmenta i proteina za njihovo vezanje. Pigment-protein kompleksi ugrađeni su u citoplazmatsku membranu te se kroz proces invaginacije formira specijalizirani membranski sustav koji se naziva intracitoplazmatska membrana (ICM). Formiranje ICM rezultira značajnim morfološkim promjenama u strukturi stanične membrane. U *Rhodobacter sphaeroides* i *R. capsulatus* tri su različita pigment-protein kompleksa uključena u transdukciju svjetlosne energije u kemijsku energiju. Dva tipa jedinica za sakupljanje svjetlosti apsorbiraju svjetlost i prenose energiju ekscitacije do fotokemijskog reakcijskog centra na kojemu se odvija transport elektrona i primarna fotokemija. Iako intenzitet svjetlosti ima ključnu ulogu u regulaciji veličine fotosintetskog aparata, poznato je da je kisik glavni kontrolni faktor tijekom razvoja istog (McEwan, 1994). Karotenoidi su izoprenoidni pigmenti odgovorni za narančastu, crvenu, žutu ili ljubičastu boju u raznim biljkama, mikroorganizmima i životinjama. Imaju važnu ulogu u organizmu kao prekursori vitamina A, antioksidansi i antitumorske tvari stoga imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji, medicini, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji kao bojila i funkcionalne komponente. U prehrambenoj i kozmetičkoj industriji je primjena kemijski sintetiziranih karotenoida ograničena zbog njihove toksičnosti, stoga se u obzir uzima komercijalna proizvodnja karotenoida pomoću mikroorganizama zahvaljujući visokoj učinkovitosti procesa i jednostavnoj manipulaciji (Chen i sur., 2006). Biosinteza karotenoida u ljubičastim bakterijama može se odvijati putem spiriloksantina (obuhvaća normalan i neobičan spiriloksantinski put te sferoidenski i karotenalni put - *Alphaproteobacteria* i *Betaproteobacteria*) i putem okenona pri čemu se kao konačni produkti dobivaju okenon ili drugi ketokarotenoidi (Takaichi, 2009).

### **2.3. Uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija**

Zahvaljujući fiziološkoj raznolikosti ljubičaste nesumporne bakterije mogu se uzgajati na različite načine. Energiju mogu dobiti iz svjetla u anaerobnim uvjetima (fototrofna kultivacija) kao i u aerobnim uvjetima iz kemijskih spojeva (kemotrofna kultivacija) (Sakarika i sur., 2019). Preferirani način rasta je fotoheterotrofni zbog visokog prinosa biomase i proizvodnje komercijalno vrijednih proizvoda kao što su vodik, pigmenti i drugi spojevi povezani sa sintezom fotosintetskog aparata (Kuo i sur., 2012). Prilikom odabira bioreaktora potrebno je obratiti pozornost na prijenos topline, prijenos mase unutar bioreaktora i homogenost sastava podloge tijekom kultivacije (Wang i Zhong, 2007). Također je bitan izvor i intenzitet svjetlosti tijekom fotosintetskog uzgoja radi sinteze

vrijednih proizvoda, a važan parametar je i miješanje koje osigurava održavanje bakterijskih stanica u suspenziji te jednoliku raspodjelu plinova i nutrijenata (Yen i sur., 2019).

Fototrofna kultivacija odvija se u fotobioreaktorima – zatvorenim sustavima koji osiguravaju optimalne uvjete za provođenje biokonverzije uključujući svjetlost određenog intenziteta i odgovarajući medij (Kuo i sur., 2012). Produktivnost fotobioreaktora je ograničena svjetlošću, a visok omjer površine i volumena je nužan preduvjet. Fotokemijska učinkovitost je niska (teorijski maksimalna iznosi 10%) i sklona je smanjenju pri većim intenzitetima svjetla (dolazi do efekta zasićenja svjetlošću jer se ne mogu svi fotoni koristiti za reakcijsku energiju nego se rasipaju kao toplinska energija). Što znači da je za postizanje učinkovitog biološkog procesa potrebno razrijediti svjetlost i distribuirati je kroz volumen bioreaktora i/ili intenzivno miješati medij kako bi stanice bile izložene svjetlu u kratkom vremenskom periodu. Tri najčešća tipa fotobioreaktora su vertikalni kolonski (barbotirajuća kolona ili air-lift), cijevni te fotobioreaktori s ravnim pločama (Akkerman i sur., 2002). Značajni su troškovi umjetne rasvjete, no mogu se smanjiti upotrebom učinkovitijih izvora svjetla. Prednost uzgoja u vanjskim fotobioreaktorima su manji troškovi jer se koristi prirodna sunčeva svjetlost, no javljaju se problemi s kontaminacijom, direktnim izlaganjem UV zračenju te nestabilnošću opskrbe svjetlom (Kuo i sur., 2012).

Kemotrofna kultivacija odvija se u aerobnim uvjetima u mraku (Keppen i sur., 2013). Za aerobni uzgoj može se koristiti bioreaktor s miješalom ili vertikalna air-lift/barbotirajuća kolona (Yen i Shih, 2009). Prednosti upotrebe bioreaktora s miješalom su postizanje zadovoljavajuće homogenizacije, dobra sposobnost prijenosa kisika, jednostavan scale-up, kontrola i praćenje procesa, jednostavnost održavanja i pranja. Međutim, nedostaci ovog tipa bioreaktora su velika potrošnja energije (za miješanje i aeraciju) i hidrodinamički stres za stanice uzrokovan velikim silama smicanja (Zhong, 2010).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

Radni mikroorganizam korišten u ovom istraživanju je ljubičasta nesumporna bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva.

##### 3.1.2. Hranjive podloge

Tijekom ovog istraživanja, za rast ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, korištene su kemijski definirane hranjive podloge. Sadržaj soli, izvora dušika i faktora rasta kemijski definiranih hranjivih podloga prikazan je u Tablici 1. Izvori ugljika za kultivaciju *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 navedeni su u Tablici 2.

**Tablica 1.** Sadržaj soli, izvora dušika i faktora rasta u hranjivim podlogama za uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Kemikalija	Kemijska formula	Masena koncentracija [g/L]
Kvašćev ekstrakt	/	1,5
Natrijev glutamat	$C_5H_8NO_4Na$	3
Diamonijev sulfat heptahidrat	$(NH_4)_2SO_4 \times 7 H_2O$	0,8
Kalijev dihidrogenfosfat	$KH_2PO_4$	0,5
Kalijev hidrogenfosfat	$K_2HPO_4$	0,5
Magnezijev sulfat heptahidrat	$MgSO_4 \times 7 H_2O$	0,2
Kalcijev klorid dihidrat	$CaCl_2 \times 2 H_2O$	0,05
Manganov sulfat heptahidrat	$MnSO_4 \times 7 H_2O$	$1,2 \times 10^{-3}$
Nikotinska kiselina	/	$1,0 \times 10^{-3}$
Tiamin klorid	/	$1,0 \times 10^{-3}$
Cijanokobalamin	/	$1,0 \times 10^{-6}$
Biotin	/	$1,0 \times 10^{-5}$

**Tablica 2.** Izvori ugljika u hranjivim podlogama za uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Kemikalija	Kemijska formula	Masena koncentracija [g/L]
Malat (za inokulum)	$C_4H_4Na_2O_5$	2
Glukoza	$C_6H_{12}O_6$	1; 3; 7; 20
Ksilozna	$C_5H_{10}O_5$	1; 3; 7; 20
Glukoza + ksiloza	/	1+1; 3+10; 3+20; 10+10

### 3.1.3. Kemikalije

Kemikalije korištene u pripremi kemijski definiranih hranjivih podloga prikazane su u Tablici 3. Ostale kemikalije korištene tijekom istraživanja navedene su u Tablici 4.

**Tablica 3.** Kemikalije korištene za pripremu hranjivih podloga za uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
Kvašćev ekstrakt	Za primjenu u biotehnologiji	Kemika, Hrvatska
Malat	≥99%	Kemika, Hrvatska
Natrijev glutamat	≥99%	Kemika, Hrvatska
Glukoza	≥99%	Kemika, Hrvatska
Ksilozna	≥99%	Kemika, Hrvatska
CSL	Za primjenu u biotehnologiji	Kemika, Hrvatska
Diamonijev sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalijev dihidrogenfosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalijev hidrogenfosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Magnezijev sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalcijev klorid dihidrat	p.a.	Merck, Njemačka
Manganov sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Tiamin klorid	≥99%	Sigma – Aldrich, Njemačka
Nikotinska kiselina	≥99%	Sigma – Aldrich, Njemačka
Biotin	≥99%	Sigma – Aldrich, Njemačka
Cijanokobalamin	≥99%	Sigma – Aldrich, Njemačka

**Tablica 4.** Ostale kemikalije korištene u istraživanju

<b>Kemikalija</b>	<b>Čistoća</b>	<b>Proizvođač</b>
Aceton	≥99%	Kemika, Hrvatska
Etanol	≥99%	Kemika, Hrvatska
Natrijev hidroksid	p.a.	Kemika, Hrvatska
Cinkov sulfat heptahidrat	≥99%	Kemika, Hrvatska
Sumporna kiselina	≥99%	Kemika, Hrvatska

### **3.1.4. Uređaji i oprema**

#### **3.1.4.1. Centrifuga**

U svrhu izdvajanja bakterijske biomase iz hranjive podloge korištena je centrifuga Thermo Scientific SL 8R (Thermo Fischer Scientific, SAD) pri 8000 rpm. Tijekom postupka pripreme uzoraka za UPLC analizu korištena je centrifuga CF-10 High-Performance (Njemačka), pri 7500 rpm.

#### **3.1.4.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC)**

UPLC uređaj Agilent Technologies 1290 Infinity II (Santa Clara, SAD) korišten je za određivanje koncentracije supstrata u uzorcima (slika 2.). Uređaj sadrži pumpu (G7104A 1290 Flexible Pump) i otplinjač, injektor (G7167B 1290 Vialsampler), termostatski blok (G7116B), pretkolonu, analitičku kolonu (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija 150x7,8 mm, detektor indeksa loma (G7162A 1260 RID), modul za kontrolu sustava (SCL – 10Avp) te računalni softver za obradu podataka (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline protoka 1 ml/min, a volumen uzorka iznosio je 10 µL.



**Slika 2.** UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II

#### **3.1.4.3. Spektrofotometar**

Za određivanje apsorpcijskog spektra biomase te apsorpcijskih spektara ekstrahiranih pigmenata tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm korišten je spektrofotometar Cary 100, UV-VIS; Agilent Technologies. Za snimanje apsorpcijskih spektara korištene su kvarcne kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka).

#### **3.1.4.4. Ostala oprema i pribor**

Osim navedenih uređaja također je korištena analitička vaga (ALC210.4; Acculab, SAD), tehnička vaga (ET – 1211; Tehnica, Slovenija), pH metar (HI 9125; Hanna Instruments, SAD), autoklav (Sutjeska, Jugoslavija), sušionik (ST-50; Instrumentaria, Hrvatska), vorteks miješalica (LLG – uniTEXTER 1; LLG – Labware, Njemačka) plamenici, stakleno i plastično laboratorijsko posuđe, hladnjaci i zamrzivač u kojem su čuvani uzorci pri -20°C.

### **3.2. Metode**

#### **3.2.1. Priprema inokuluma**

Kemijski definirana hranjiva podloga korištena za uzgoj inokuluma ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 sadržavala je tvari navedene u Tablici 1. te malat kao izvor ugljika, koncentracije 2 g/L. Kao izvor dušika korišten je glutamat početne koncentracije 2 g/L. U odgovarajućem volumenu demineralizirane vode otopljene su prethodno izračunate i izvagane mase potrebnih sastojaka, a pH podloge namješten je između 6,8 i 7 dodatkom krutog natrijeva hidroksida. U staklenu tikvicu sa brušenim čepom dodano je 150 ml hranjive podloge, a zatim je podloga stavljena na sterilizaciju u autoklav pri 121°C / 20 minuta. Nakon sterilizacije i hlađenja podloge, sterilno su dodani termolabilni sastojci (vitamini i elementi u tragovima) preko filtera veličine pora 0,2 µm.

Uzgoj inokuluma provodio se u mikroaerofilnim uvjetima pri 28°C ispod obične žarulje.

### **3.2.2. Priprema hranjivih podloga za uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na različitim koncentracijama odgovarajućeg izvora ugljika**

Pripremljene su kemijski definirane hranjive podloge za ispitivanje utjecaja različite koncentracije izvora ugljika na rast ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781. U određeni volumen demineralizirane vode dodane su izračunate i odvagane mase potrebnih tvari iz Tablice 1. te glukoza i/ili ksiloza kao izvor ugljika. U prvom dijelu eksperimenta pripremljene su 4 tikvice u kojima je početna koncentracija glukoze iznosila 1; 3; 7; 20 g/L. U drugom dijelu eksperimenta pripremljene su 4 tikvice sa ksilozom kao izvorom ugljika čije su početne koncentracije iznosile 1; 3; 7; 20 g/L. A u trećem dijelu eksperimenata u 4 tikvice su kao izvor ugljika dodane glukoza i ksiloza: 1 g/L glukoze i 1 g/L ksiloze, 3 g/L glukoze i 10 g/L ksiloze, 3 g/L glukoze i 20 g/L ksiloze te 10 g/L glukoze i 10 g/L ksiloze. pH hranjivih podloga podešen je između 6,8 i 7 pomoću krutog natrijeva hidroksida uz eventualnu korekciju dodatkom sumporne kiseline. U tikvice sa brušenim čepom stavljeno je po 150 ml hranjive podloge, a zatim su stavljene na sterilizaciju u autoklav pri 121°C tijekom 20 minuta. Nakon sterilizacije i hlađenja u podloge su dodani vitamini i elementi u tragovima preko filtera veličine pora 0,2 µm.

### **3.2.3. Provedba i nadzor uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781**

Uzgoj je proveden u hranjivim podlogama opisanim u poglavlju 3.2.2. (ukupno 12 tikvica u koje je stavljeno po 150 ml hranjive podloge s odgovarajućim koncentracijama izvora ugljika). Podloge su naciepljene sa 15 ml inokuluma čija je priprema opisana u poglavlju 3.2.1. te zatim stavljene na inkubaciju pri 28°C, u mikroaerofilnim uvjetima uz stalno osvjetljenje.

Svaka 24 sata izuzeto je po 5 ml uzroka iz svake tikvice i analizirano na spektrofotometru u svrhu praćenja porasle biomase i određivanja apsorpcijskih maksimuma i minimuma. Nakon analize pomoću spektrofotometra uzorci su centrifugirani pri 8000 rpm, 10 minuta. Dobiveni supernatant je korišten za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC) radi praćenja koncentracije izvora ugljika u analiziranim uzorcima. Također, svakih 48 sati vršila se ekstrakcija pigmenata pomoću smjese otapala (aceton:etanol = 7:2 vol/vol) i spektrofotometrijsko određivanje bakterioklorofila *a*.

### **3.2.4. Analitičke metode**

#### **3.2.4.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka tijekom uzgoja**

U svrhu određivanja apsorpcijskih maksimuma i minimuma tijekom uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, mjerena je optička gustoća uzoraka skeniranjem u području valnih duljina od 300 do 900 nm, pomoću spektrofotometra.

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

Uzorak od 10 ml se najprije centrifugira pri 8000 rpm tijekom 15 minuta. U dobiveni talog bakterijske biomase doda se 5 ml smjese acetona i etanola u omjeru 7:2 (vol/vol) u svrhu ekstrakcije ukupnih pigmenata te 4 g staklenih kuglica za dezintegraciju bakterijskih stanica. Zatim se uzorak tri puta naizmjenično podvrgava intenzivnom miješanju 2 minute i hlađenju u ledu 2 minute. Ovaj postupak ekstrakcije provodi se u mraku zbog osjetljivosti pigmenata na svjetlost da bi se spriječila njihova degradacija. Nakon ekstrakcije uzorak se centrifugira pri 8000 rpm tijekom 10 minuta.

Nakon ekstrakcije provodi se spektrofotometrijsko određivanje bakterioklorofila *a* u dobivenom supernatantu, u kvarcnoj kivetici, skeniranjem u području valnih duljina 300-900 nm. Koncentracija bakterioklorofila *a* računa se prema formuli za ekstrakciju smjesom etanola/acetona (Ritchie, 2018):

$$P = 0.348209 \times (A_{648} - A_{850}) - 0.16583 \times (A_{665} - A_{850}) + 12.11114 \times (A_{775} - A_{850}) \text{ [mg/L]}$$

#### **3.2.4.3. Određivanje koncentracije izvora ugljika u podlozi UPLC analizom**

Uzorci se najprije moraju pripremiti za analizu tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti (UPLC). U 750  $\mu$ L supernatanta uzorka doda se 750  $\mu$ L 10%-tne otopine cinkova sulfata u svrhu taloženja proteina i nečistoća. Nakon homogenizacije i 10 minuta mirovanja, uzorci se centrifugiraju na 10000 rpm, 15 minuta. Dobiveni supernatant se profiltrira kroz mikrobiološki filter promjera pora 0,2  $\mu$ m u staklenu vialu. Tako pripremljeni uzorak koristi se za UPLC analizu.

Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline uz brzinu protoka od 0,6 mL/min. 10  $\mu$ L uzorka je injektirano i propušteno kroz kolonu pri 55°C. Pomoću računalnog programa OpenLAB CDS obrađeni su dobiveni kromatogrami. U prilogima 7.1. i 7.2. prikazani su baždarni dijagrami s odgovarajućim jednadžbama pravaca iz kojih su određene nepoznate koncentracije izvora ugljika u uzorcima.



#### **3.2.4.4. Određivanje parametara uspješnosti uzgoja**

Pokazatelji uspješnosti biotehnološkog procesa su: prinos biomase, potrošnja supstrata, brzina rasta, stupanj konverzije supstrata u biomasu te produktivnost.

Prinos biomase ( $Y_X$ ) računa se prema formuli :  $Y_X = X - X_0$  [g/L]

pri čemu je  $X$  konačna koncentracija biomase, a  $X_0$  početna koncentracija biomase.

Potrošnja supstrata ( $\Delta S$ ) računa se prema izrazu:  $\Delta S = S_0 - S$  [g/L]

s time da je  $S_0$  početna koncentracija supstrata, a  $S$  konačna koncentracija supstrata.

Specifična brzina rasta ( $\mu$ ) računa se prema navedenoj formuli:  $\mu = \frac{1}{\Delta t} \times \ln \frac{X}{X_0}$  [h<sup>-1</sup>]

pri čemu je  $\Delta t$  vremenski interval,  $X$  koncentracija biomase u određenom vremenskom intervalu,  $X_0$  početna koncentracija biomase.

Koeficijent konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{X/S}$ ) računa se prema formuli:  $Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$  [g/g]

Produktivnost sinteze biomase ( $Pr$ ) računa se prema formuli:  $Pr = \frac{X - X_0}{t_{uk}}$  [g/Lh]

pri čemu je  $t_{uk}$  ukupno vrijeme trajanja uzgoja.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu je opisan i prikazan uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima, na svjetlu i kemijski definiranim hranjivim podlogama sa različitim koncentracijama izvora ugljika. Ovaj rad je nastavak istraživanja koja su provedena u sklopu znanstveno – istraživačkih projekata „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ te „Bioprospecting Jadranskog mora BioProCro“. Svrha ovog istraživanja je odrediti kinetiku rasta ljubičaste nesumporne bakterije na glukozu i/ili ksilozi kao izvoru ugljika, potrošnju spomenutih supstrata te istražiti potencijal sinteze pigmenata tijekom rasta bakterije u danim uvjetima.

Poglavlje 4.1. sadrži rezultate uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranim podlogama sa različitim početnim koncentracijama glukoze kao izvora ugljika.

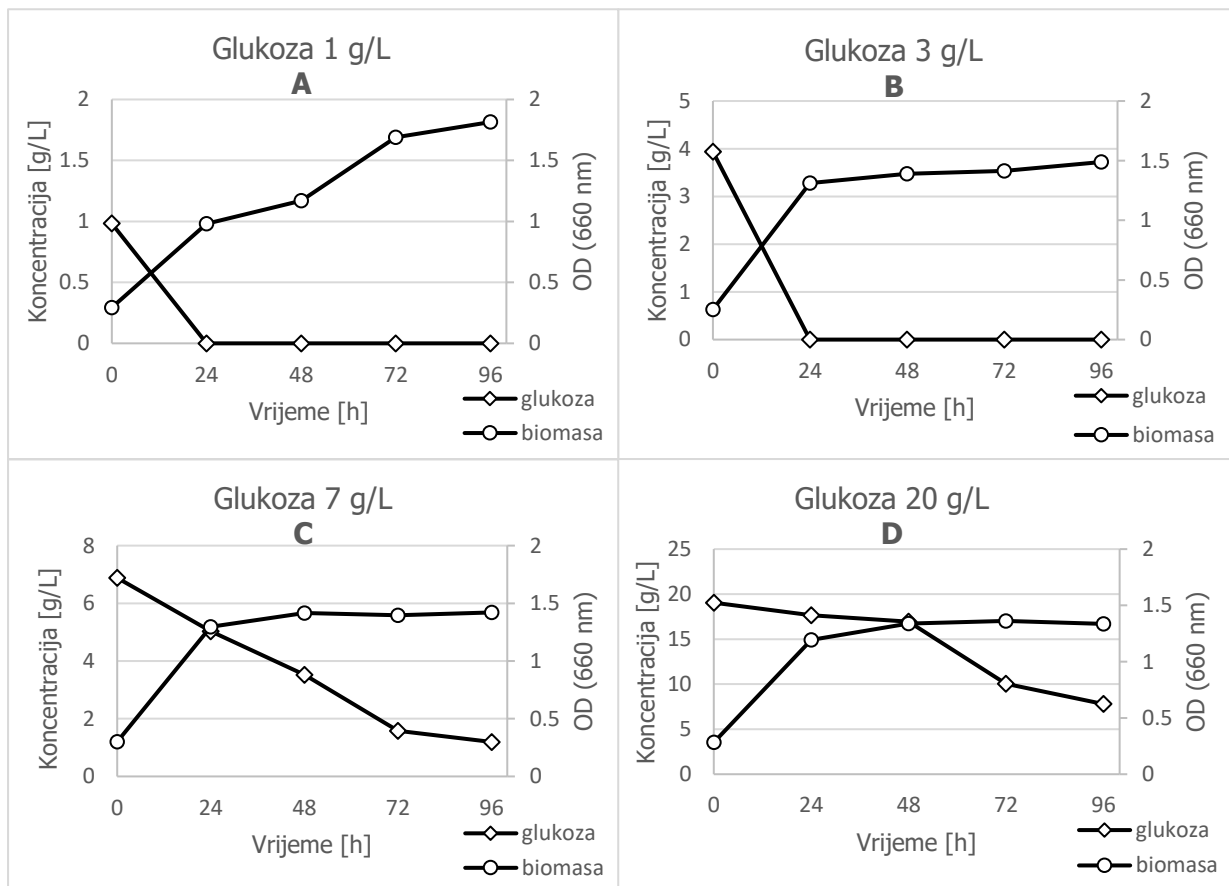
Poglavlje 4.2. sadrži rezultate kultivacije ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranim hranjivim podlogama sa različitim početnim koncentracijama ksiloze kao izvora ugljika.

Poglavlje 4.3. sadrži rezultate uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranim podlogama sa različitim početnim koncentracijama glukoze i ksiloze kao izvora ugljika za rast.

Tijekom svih provedenih uzgoja pratio se porast biomase, potrošnja izvora ugljika te udio fotosintetskog pigmenta bakterioklorofila *a* u porasloj bakterijskoj biomasi. Prikazani grafovi prate tijek uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, a prikazani su i apsorpcijski spektri biomase i ekstrahiranih pigmenata u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm. Također, izračunati su pokazatelji uspješnosti kultivacije i koncentracija bakterioklorofila *a* te su navedeni u tekstu i/ili u tablicama. Nakon prikaza rezultata slijedi rasprava.

#### 4.1. Utjecaj različitih koncentracija glukoze, kao izvora ugljika, na rast ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

U ovom dijelu istraživanja provedeno je ispitivanje rasta i sinteze pigmenata bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na različitim koncentracijama glukoze kao odabranog izvora ugljika. Uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 proveden je na hranjivim podlogama s masenom koncentracijom glukoze: 1 g/L, 3 g/L, 7 g/L, 20 g/L tijekom 96 sati u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu, bez miješanja.



**Slika 3.** Krivulje rasta ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 pri koncentracijama glukoze od: 1 g/L (A), 3 g/L (B), 7 g/L (C), 20 g/L (D)

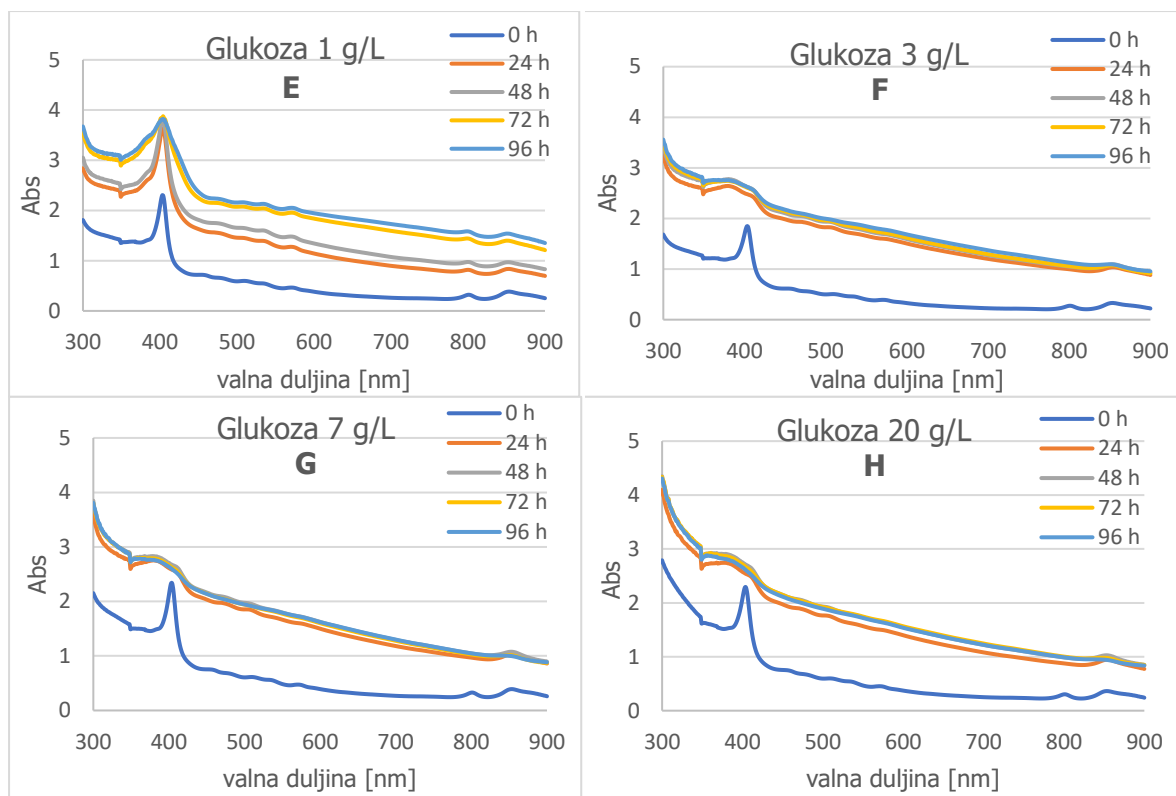
Potrošnja supstrata (glukoze) te porast biomase tijekom kultivacije bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 može se vidjeti na slici 3. Tijekom uzgoja ove bakterije na hranjivoj podlozi s masenom koncentracijom glukoze od 1 g/L, u prvih 24 sata potrošena je sva glukoza. Prinos biomase izračunat je na temelju podataka dobivenih mjerenjem optičke gustoće (OD) pri valnoj duljini od 660 nm te pomoću jednadžbe baždarnog pravca, a iznosio

je 1,839 g/L. Iz dobivenih vrijednosti prinosa biomase te potrošnje supstrata izračunat je koeficijent konverzije supstrata u biomasu koji iznosi 1,872 g/g. Također, važan pokazatelj uspješnosti kultivacije je produktivnost koja je u ovom slučaju iznosila 0,019 g/(Lh). Prilikom uzgoja spomenute bakterije na kemijski definiranoj podlozi sa 3 g/L glukoze došlo je do potrošnje ukupne količine glukoze tijekom prvih 24 sata uzgoja. Prinos bakterijske biomase iznosio je 1,494 g/L, a koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,38 g/g. Produktivnost sinteze biomase tijekom kultivacije iznosila je 0,016 g/(Lh). Nadalje, tijekom kultivacije spomenute bakterije na hranjivoj podlozi sa 7 g/L glukoze, potrošnja supstrata tijekom 96 sati uzgoja iznosila je 5,688 g/L što znači da nije sav supstrat iskorišten za rast, nego dio zaostaje u podlozi. Prinos biomase iznosio je 1,355 g/L, koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,238 g/g, a produktivnost 0,014 g/(Lh). Što se tiče uzgoja bakterije na hranjivoj podlozi s masenom koncentracijom glukoze od 20 g/L, potrošnja supstrata iznosila je 11,256 g/L, što znači da je dosta supstrata ostalo neiskorišteno. Prinos biomase je bio manji nego tijekom ostalih kultivacija, a iznosio je 1,274 g/L. Isto vrijedi i za koeficijent konverzije supstrata u biomasu koji je iznosio 0,113 g/L te produktivnost od 0,013 g/(Lh). Specifične brzine rasta bakterije u navedenim uzgojima su otprilike podjednake te u prosjeku iznose 0,023 h<sup>-1</sup>. U tablici 5. dan je pregled parametara uspješnosti kultivacije ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781.

**Tablica 5.** Pokazatelji uspješnosti kultivacije bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi sa glukozom kao izvorom ugljika

Izvor ugljika	Y <sub>x</sub> [g/L]	ΔS [g/L]	μ [h <sup>-1</sup> ]	Y <sub>x/s</sub> [g/g]	Pr [g/(Lh)]
Glukoza 1 g/L	1,839263	0,982371	0,024092	1,872269	0,019159
Glukoza 3 g/L	1,494288	3,935973	0,024793	0,379649	0,015566
Glukoza 7 g/L	1,354544	5,68802	0,020905	0,23814	0,01411
Glukoza 20 g/L	1,27378	11,25599	0,021338	0,113165	0,013269

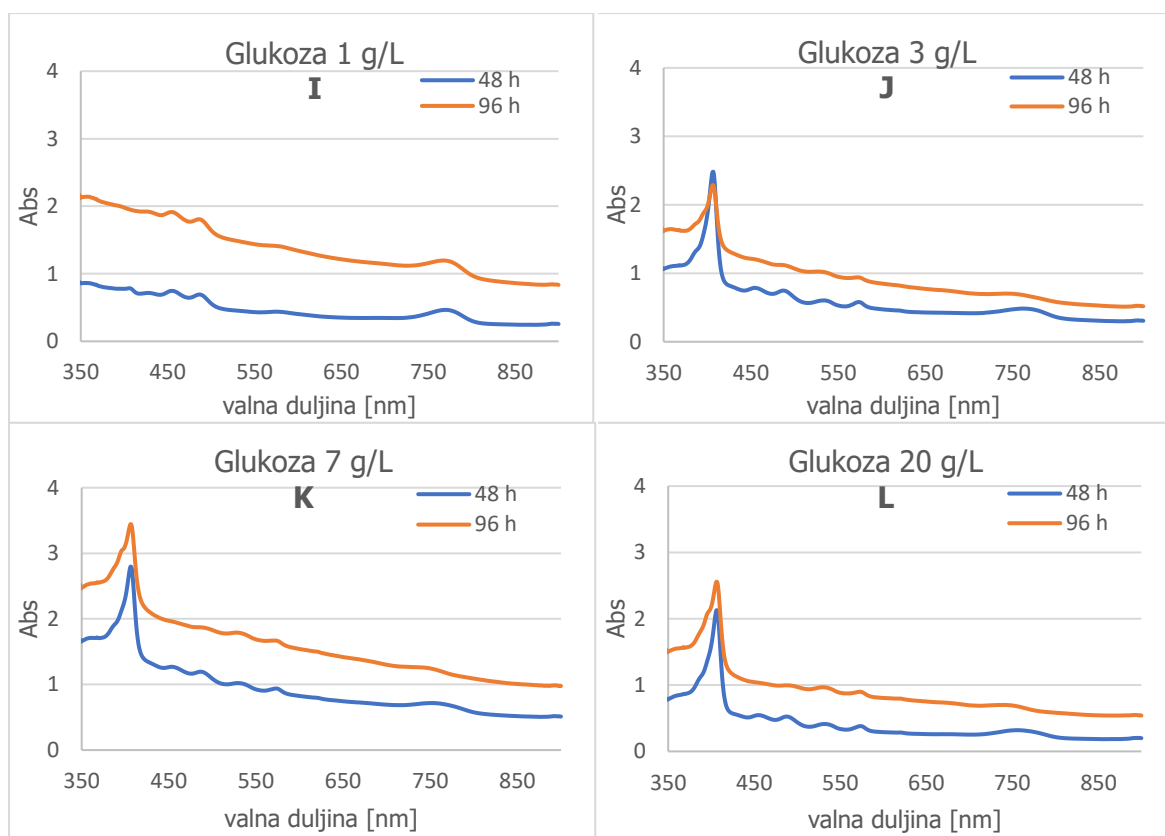
Nadalje, provedeno je spektrofotometrijsko skeniranje uzoraka u području valnih duljina od 300 do 900 nm u svrhu dobivanja apsorpcijskih spektara biomase sa karakterističnim pikovima te određivanja optičke gustoće pri 660 nm potrebne za računanje koncentracije biomase. Apsorpcijski spektri biomase bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja na hranjivoj podlozi sa glukozom prikazani su na slici 4.



**Slika 4.** Apsorpcijski spektri biomase ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja na kemijski definiranim hranjivim podlogama sa početnim koncentracijama glukoze od: 1 g/L (E), 3 g/L (F), 7 g/L (G), 20 g/L (H)

Na apsorpcijskom spektru biomase tijekom rasta na početnoj koncentraciji glukoze od 1 g/L (E) najbolje se vide dva karakteristična apsorpcijska maksimuma bakterioklorofila *a* pri valnim duljinama od 800 i 850 nm. Na ostalim apsorpcijskim spektrima (F, G, H) oba spomenuta karakteristična pika vide se samo na početku kultivacije (0 h), a nakon 24 h, 48 h i 72 h vidljiv je samo apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 850 nm.

Također, radi praćenja promjene koncentracije i udjela bakterioklorofila *a* u bakterijskoj biomasi tijekom kultivacije, provedena je ekstrakcija ukupnih pigmenata te spektrofotometrijsko skeniranje supernatanta, nakon ekstrakcije ukupnih pigmenata, u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm. Na slici 5. prikazani su apsorpcijski spektri pigmenata nakon 48 i 96 sati kultivacije bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na različitim koncentracijama glukoze.



**Slika 5.** Apsorpcijski spektri ekstrahiranih pigmenata tijekom kultivacije ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranim hranjivim podlogama s početnim koncentracijama glukoze od: 1 g/L (I), 3 g/L (J), 7 g/L (K), 20 g/L (L)

Apsorpcijski spektar biomase razlikuje se od apsorpcijskog spektra pigmenata koji su ekstrahirani iz tih stanica. Valne duljine apsorpcijskih maksimuma ovise o kemijskom okruženju pigmenata, ono se prilikom ekstrakcije organskim otapalima mijenja, stoga dolazi do pomaka apsorpcijskih maksimuma bakterioklorofila *a* s 850-910 nm na 775 nm (Oren, 2011). Shodno navedenom, na apsorpcijskom spektru pigmenata (I) vide se apsorpcijski maksimumi pri valnoj duljini od 775 nm, no na ostalim spektrima (J, K, L) ti pikovi su slabije vidljivi zbog dosta niske koncentracije bakterioklorofila *a*.

Nadalje, određivana je koncentracija bakterioklorofila *a* pomoću formule navedene u poglavlju 3.2.4.2., dobiveni rezultati prikazani su u tablici 6. Tijekom uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama s početnim koncentracijama glukoze od 3 g/L, 7 g/L te 20 g/L vidljivo je smanjenje koncentracije bakterioklorofila *a* zbog razgradnje pigmenata tijekom samog uzgoja te smanjenja koncentracije biomase bakterije. Najveći udio bakterioklorofila *a* u biomasi bakterije bio je nakon 48 h tijekom uzgoja na podlozi s početnom koncentracijom glukoze od 1 g/L, a iznosio je 2,05 mg/g biomase. Ovaj rezultat je u skladu s očekivanjima jer u uvjetima kad nema izvora ugljika, bakterija dobiva

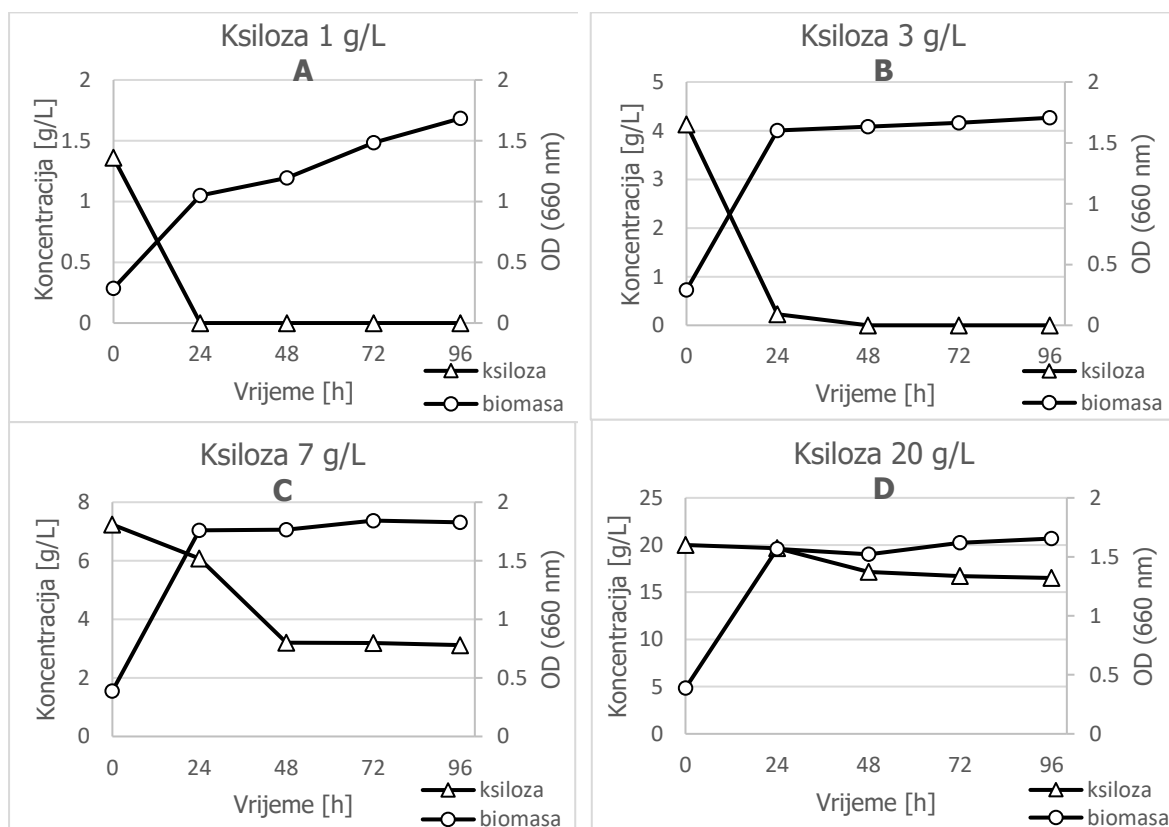
energiju procesom fotosinteze, stoga proizvodi više fotosintetskih pigmenata. Udio bakterioklorofila *a* nakon 48 h uzgoja pri koncentraciji glukoze od 3 g/L iznosio je 1,298 mg/g biomase, a pri koncentraciji glukoze od 7 g/L iznosio je 1,245 mg/g biomase. Najmanji udio bakterioklorofila *a* u bakterijskoj biomasi zabilježen je tijekom uzgoja na podlozi s početnom koncentracijom glukoze od 20 g/L te je nakon 48 h kultivacije iznosio 0,906 mg/g biomase. Ovakav rezultat je također u skladu s očekivanjima jer bakterija, u uvjetima kada ima dovoljno izvora ugljika, energiju dobiva kemotrofno pa nema potrebu za proizvodnjom velike količine pigmenta.

**Tablica 6.** Koncentracija bakterioklorofila *a* nakon 48 h i 96 h kultivacije ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi sa glukozom kao izvorom ugljika

Izvor ugljika	Bchl <i>a</i> (nakon 48 h) [mg/L]	Bchl <i>a</i> (nakon 96 h) [mg/L]
Glukoza 1 g/L	2,588072	3,946309
Glukoza 3 g/L	1,983275	1,531612
Glukoza 7 g/L	1,940649	1,808420
Glukoza 20 g/L	1,326704	0,962248

## 4.2. Utjecaj različitih koncentracija ksiloze, kao izvora ugljika, na rast ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Tijekom procesa predobrade lignoceluloznih sirovina dobivaju se veće koncentracije ksiloze, stoga je u ovom dijelu istraživanja provedeno ispitivanje rasta i sinteze pigmenata bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na ksilozi kao izvoru ugljika. Kultivacija je provedena na kemijski definiranim hranjivim podlogama s različitim početnim koncentracijama ksiloze: 1 g/L, 3 g/L, 7 g/L, 20 g/L tijekom 96 sati, u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu, bez miješanja.



**Slika 6.** Krivulje rasta ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 pri koncentracijama ksiloze od: 1 g/L (A), 3 g/L (B), 7 g/L (C), 20 g/L (D)

Potrošnja supstrata (ksiloze) te porast biomase tijekom kultivacije bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 može se vidjeti na slici 6. Tijekom uzgoja spomenute bakterije na hranjivoj podlozi sa ksilozom masene koncentracije 1 g/L, sva ksiloza potrošena je u prvih 24 sata uzgoja. Prinos biomase iznosio je 1,689 g/L, a izračunat je na temelju podataka

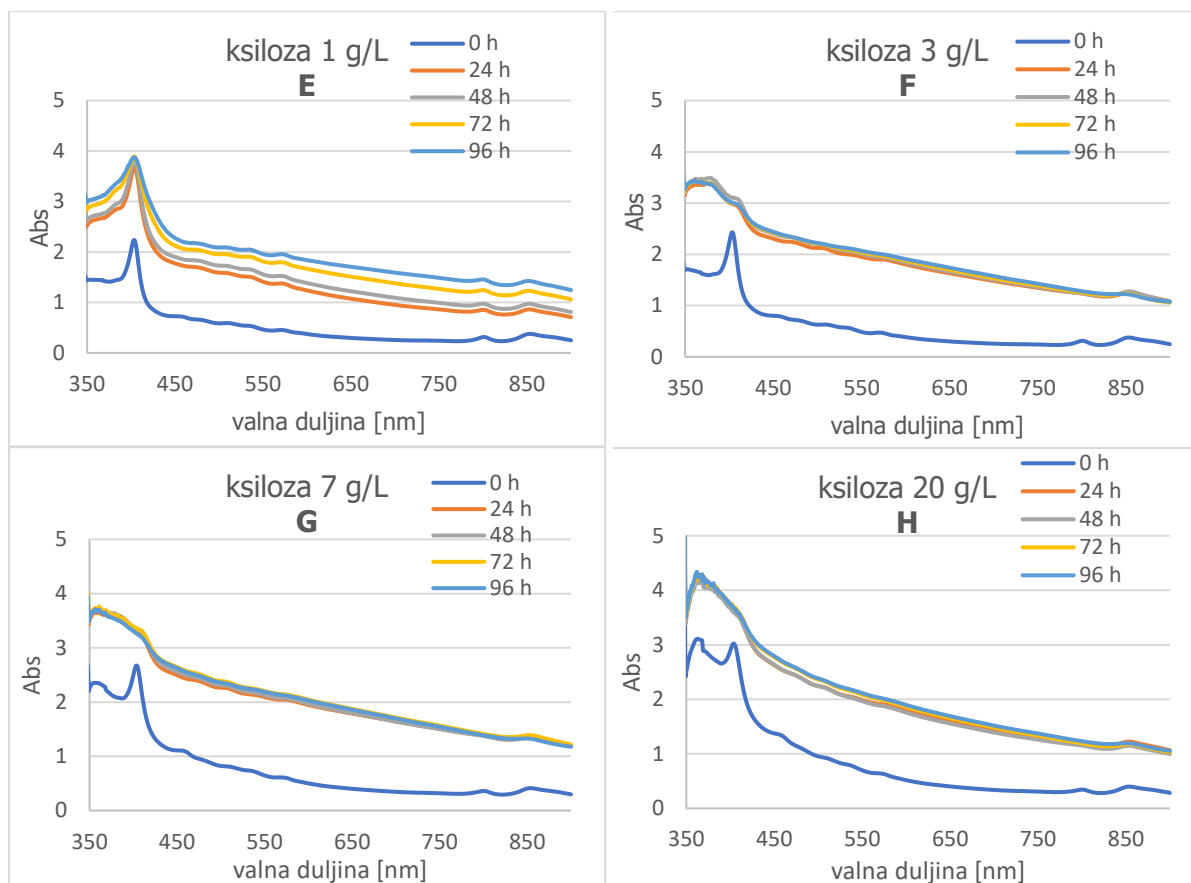


dobivenih određivanjem OD pri valnoj duljini od 660 nm te pomoću jednadžbe baždarnog pravca. Koeficijent konverzije supstrata u biomasu izračunat je iz dobivenih vrijednosti prinosa biomase i potrošnje supstrata, a iznosio je 1,243 g/g. Produktivnost sinteze biomase tijekom uzgoja iznosila je 0,018 g/(Lh). Tijekom kultivacije bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlozi s masenom koncentracijom ksiloze od 3 g/L, nakon 48 sati uzgoja utrošena je ukupna ksiloza u podlozi. Prinos biomase bakterije iznosio je 1,711 g/L, stupanj konverzije supstrata u biomasu 0,414 g/g, a produktivnost 0,018 g/(Lh). Specifična brzina rasta jednaka je za uzgoje s početnim koncentracijama ksiloze od 1 g/L i 3 g/L te iznosi 0,024 h<sup>-1</sup>. Prilikom uzgoja ove bakterije na hranjivoj podlozi s početnom koncentracijom ksiloze od 7 g/L, tijekom 96 h utrošeno je 4,116 g/L ksiloze, prinos biomase bio je 1,74 g/L, a izračunati koeficijent konverzije supstrata u biomasu iznosio je 0,423 g/g. Ukupna produktivnost iznosila je također 0,018 g/(Lh). Nadalje, tijekom kultivacije bakterije na hranjivoj podlozi s masenom koncentracijom ksiloze od 20 g/L, utrošeno je 3,487 g/L ksiloze što znači da je potrošnja supstrata niska. Prinos bakterijske biomase iznosio je 1,533 g/L, stupanj konverzije supstrata u biomasu 0,44 g/g, a ukupna produktivnost 0,016 g/(Lh). Specifična brzina rasta tijekom kultivacije s početnim koncentracijama od 7 g/L i 20 g/L praktički je jednaka i u prosjeku iznosi 0,019 h<sup>-1</sup>. U tablici 7. dan je pregled pokazatelja uspješnosti kultivacije ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781.

**Tablica 7.** Pokazatelji uspješnosti uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi sa ksilozom kao izvorom ugljika

Izvor ugljika	Y <sub>x</sub> [g/L]	ΔS [g/L]	μ [h <sup>-1</sup> ]	Y <sub>x/s</sub> [g/g]	Pr [g/(Lh)]
Ksiloza 1 g/L	1,689065	1,359213	0,023716	1,242679	0,017594
Ksiloza 3 g/L	1,711337	4,131604	0,023596	0,414206	0,017826
Ksiloza 7 g/L	1,740433	4,116195	0,019498	0,422826	0,01813
Ksiloza 20 g/L	1,532937	3,487491	0,018426	0,439553	0,015968

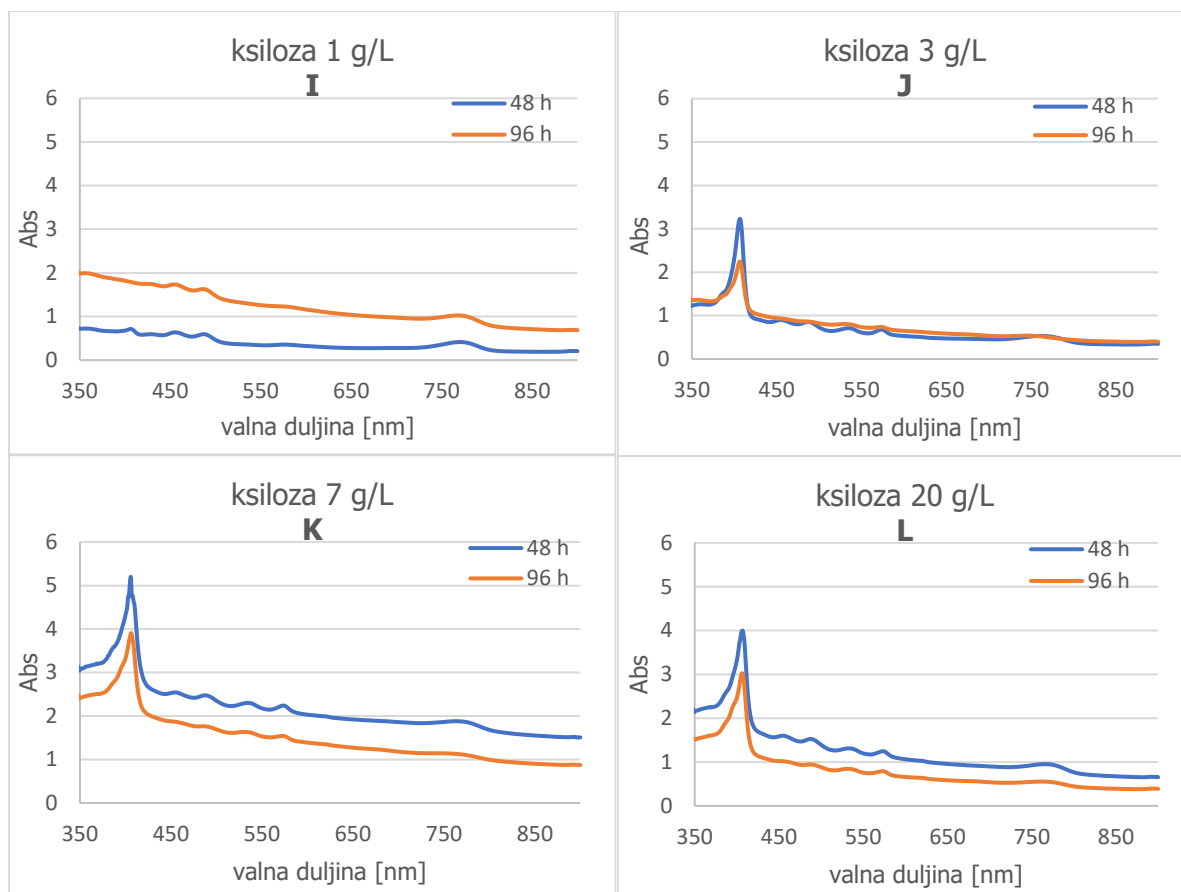
U ovom dijelu istraživanja je također provedeno spektrofotometrijsko skeniranje uzoraka u području valnih duljina od 300 do 900 nm kako bi dobili apsorpcijske spektre biomase s karakterističnim pikovima te da bi odredili OD pri 660 nm. Apsorpcijski spektri biomase bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja na hranjivoj podlozi sa ksilozom prikazani su na slici 7.



**Slika 7.** Apsorpcijski spektri biomase ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja na kemijski definiranim hranjivim podlogama sa početnim koncentracijama ksiloze od: 1 g/L (E), 3 g/L (F), 7 g/L (G), 20 g/L (H)

Kao i prilikom uzgoja na glukozi, na apsorpcijskim spektrima biomase vidljivi su karakteristični apsorpcijski maksimumi bakterioklorofila *a* pri 800 i 850 nm. Spomenuti pikovi najbolje su vidljivi na apsorpcijskom spektru biomase tijekom uzgoja sa početnom koncentracijom od 1 g/L (E). Na ostalim spektrima (F, G, H) specifični apsorpcijski maksimumi vide se slabije zbog relativno niske koncentracije pigmenta.

Također, u svrhu određivanja koncentracije i udjela bakterioklorofila *a* u bakterijskoj biomasi provedeno je spektrofotometrijsko skeniranje ekstrahiranih pigmenta, u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm. Na slici 8. prikazani su apsorpcijski spektri pigmenta nakon 48 i 96 sati kultivacije bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na različitim koncentracijama ksiloze.



**Slika 8.** Apsorpcijski spektri ekstrahiranih pigmenata tijekom kultivacije ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranim hranjivim podlogama sa početnim koncentracijama ksiloze od: 1 g/L (I), 3 g/L (J), 7 g/L (K), 20 g/L (L)

Kao i tijekom uzgoja na glukozi, na apsorpcijskim spektrima ekstrahiranih pigmenata vidi se karakterističan apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 775 nm koji odgovara bakterioklorofilu *a*. Na pojedinim spektrima manje je vidljiv zbog relativno niske koncentracije bakterioklorofila *a*.

Izračunata koncentracija bakterioklorofila *a* tijekom kultivacije bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama sa ksilozom dana je u tablici 8. Tijekom uzgoja na podlozi s početnom koncentracijom ksiloze od 1 g/L uočen je porast koncentracije bakterioklorofila te je nakon 48 sati uzgoja zabilježen udio bakterioklorofila *a* u biomasi bakterije u vrijednosti od 2,037 mg/g biomase. Međutim, tijekom uzgoja spomenute bakterije na podlogama s masenim koncentracijama ksiloze od 3 g/L, 7 g/L te 20 g/L vidljivo je smanjenje koncentracije bakterioklorofila *a* zbog razgradnje pigmenata tijekom uzgoja. Tijekom kultivacije bakterije na podlozi s 3 g/L ksiloze, nakon 48 h uzgoja, udio bakterioklorofila *a* iznosio je 1,184 mg/g biomase. Nakon 48 h uzgoja bakterije na hranjivoj

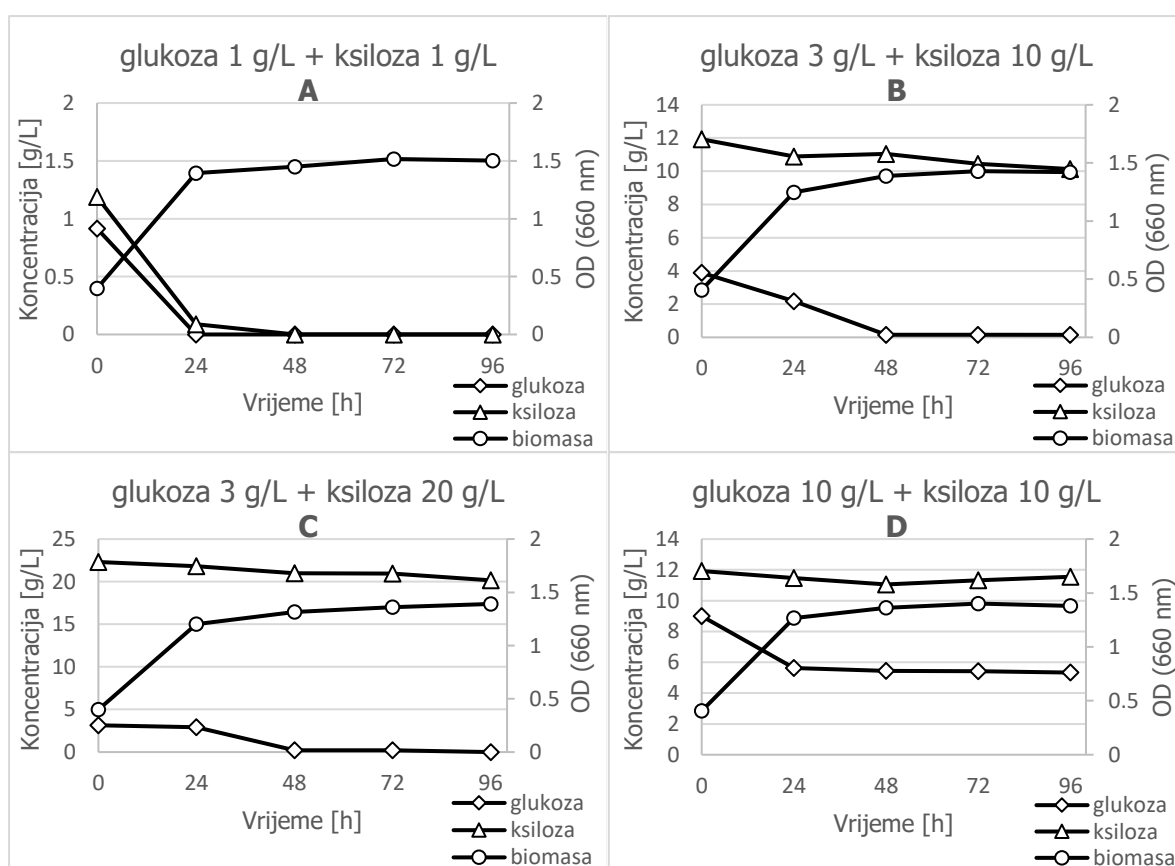
podlozi s početnom koncentracijom ksiloze od 7 g/L udio bakterioklorofila *a* iznosio je 1,914 mg/g biomase, a na podlozi s početnom koncentracijom ksiloze od 20 g/L iznosio je 1,923 mg/g biomase.

**Tablica 8.** Koncentracija bakterioklorofila *a* nakon 48 h i 96 h uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi sa ksilozom kao izvorom ugljika

Izvor ugljika	Bchl <i>a</i> (nakon 48 h) [mg/L]	Bchl <i>a</i> (nakon 96 h) [mg/L]
Ksiloza 1 g/L	2,631481	3,724468
Ksiloza 3 g/L	2,156576	1,108500
Ksiloza 7 g/L	3,792663	2,473492
Ksiloza 20 g/L	3,243689	1,847860

### 4.3. Utjecaj različitih koncentracija glukoze i ksiloze, kao odabranih izvora ugljika, na rast ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Hidrolizirane komponente lignocelulozih sirovina sadrže šećere čiji većinski udio čine glukoza i ksiloza (Marđetko i sur., 2018) stoga je u ovom dijelu istraživanja provedeno ispitivanje rasta i sinteze pigmenata bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na glukozi i ksilozi kao izvorima ugljika. Uzgoj ove bakterije proveden je na hranjivim podlogama s: 1 g/L glukoze i 1 g/L ksiloze, 3 g/L glukoze i 10 g/L ksiloze, 3 g/L glukoze i 20 g/L ksiloze te 10 g/L glukoze i 10 g/L ksiloze tijekom 96 sati, u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu, bez miješanja.



**Slika 9.** Krivulje rasta ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 pri koncentracijama glukoze i ksiloze od: 1 g/L+1 g/L (A), 3 g/L+10 g/L (B), 3 g/L+20 g/L (C), 10 g/L+10 g/L (D)

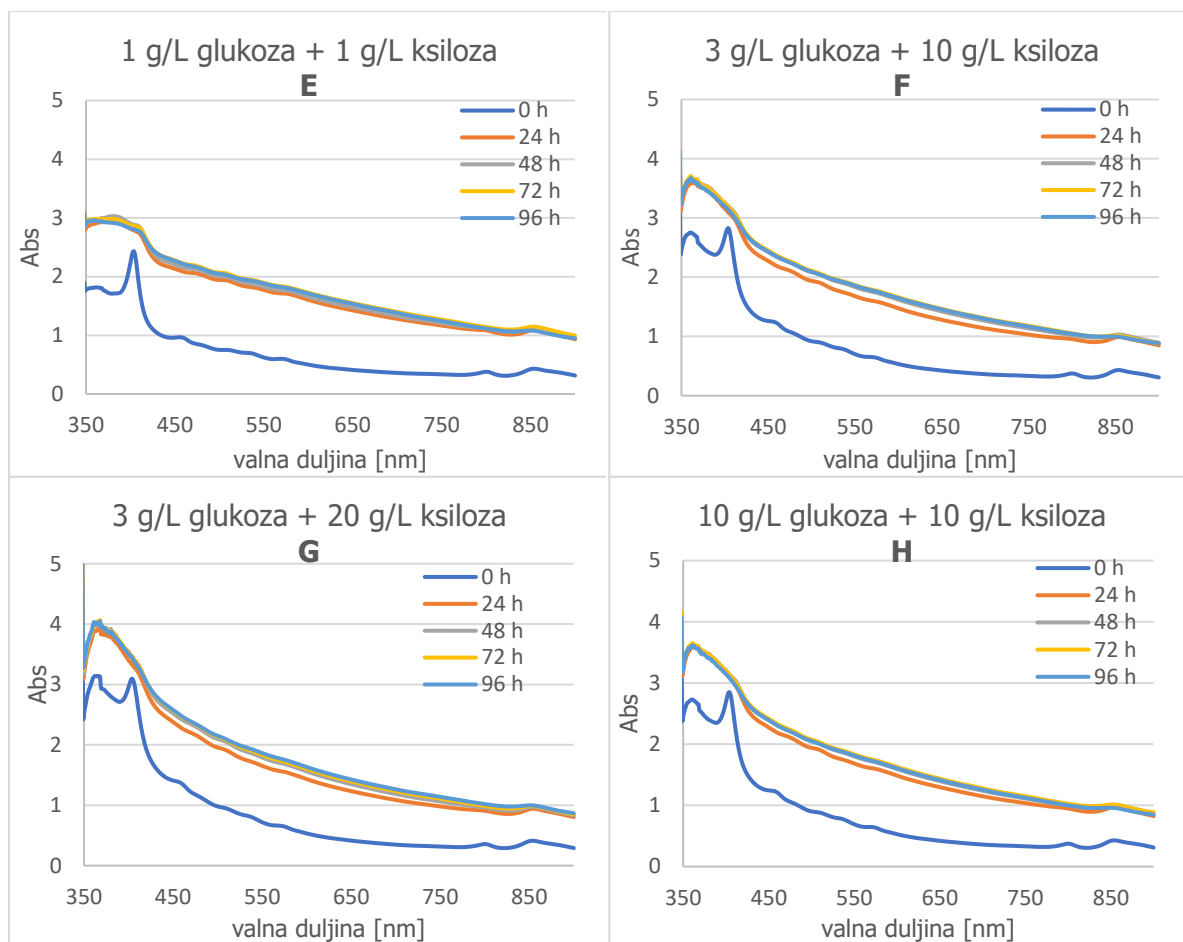
Potrošnja supstrata (glukoze i ksiloze) te porast biomase tijekom kultivacije bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 prikazan je na slici 9. Tijekom uzgoja spomenute bakterije na hranjivoj podlozi s 1 g/L glukoze i 1 g/L ksiloze, tijekom prvih 24 sata utrošena

je sva glukoza, a tijekom 48 sati i ksiloza. Prinos biomase iznosio je 1,336 g/L, koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,634 g/g, a ukupna produktivnost bila je 0,014 g/(Lh). Tijekom kultivacije na podlozi sa 3 g/L glukoze i 10 g/L ksiloze utrošena je glukoza tijekom 48 sati uzgoja dok je potrošnja ksiloze bila samo 1,792 g/L. Prinos biomase bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 iznosio je 1,223 g/L, koeficijent konverzije supstrata u biomasu iznosio je 0,221 g/g, a ukupna produktivnost 0,013 g/(Lh). Na podlozi s 3 g/L glukoze i 20 g/L ksiloze ukupna glukoza utrošena je tijekom 48 sati uzgoja, a potrošnja ksiloze iznosila je 2,153 g/L. Prinos bakterijske biomase iznosio je 1,2 g/L, koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,227 g/g, a ukupna produktivnost bila je 0,012 g/(Lh). Nadalje, na podlozi s 10 g/L glukoze i 10 g/L ksiloze potrošnja glukoze iznosila je 3,664 g/L, a ksiloze 0,379 g/L tijekom 96 sati uzgoja. Prinos biomase bakterije iznosio je 1,176 g/L, koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,291 g/g, a produktivnost sinteze biomase tijekom uzgoja iznosila je 0,012 g/(Lh). Specifična brzina rasta je tijekom svih uzgoja bila otprilike jednaka te u prosjeku iznosila 0,016 h<sup>-1</sup>. Tablica 9. sadrži prikaz svih parametara uspješnosti kultivacije ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781.

**Tablica 9.** Pokazatelji uspješnosti kultivacije bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi sa glukozom i ksilozom kao izvorom ugljika

Izvor ugljika	Y <sub>x</sub> [g/L]	ΔS [g/L]	μ [h <sup>-1</sup> ]	Y <sub>x/s</sub> [g/g]	Pr [g/(Lh)]
Glukoza + ksiloza (1+1) g/L	1,335665	0,916084; 1,189105	0,016924	0,634463	0,013913
Glukoza + ksiloza (3+10) g/L	1,223382	3,733344; 1,79164	0,015857	0,221427	0,012744
Glukoza + ksiloza (3+20) g/L	1,199674	3,14123; 2,15334	0,01601	0,226586	0,012497
Glukoza + ksiloza (10+10) g/L	1,17602	3,663767; 0,37883	0,01561	0,290907	0,01225

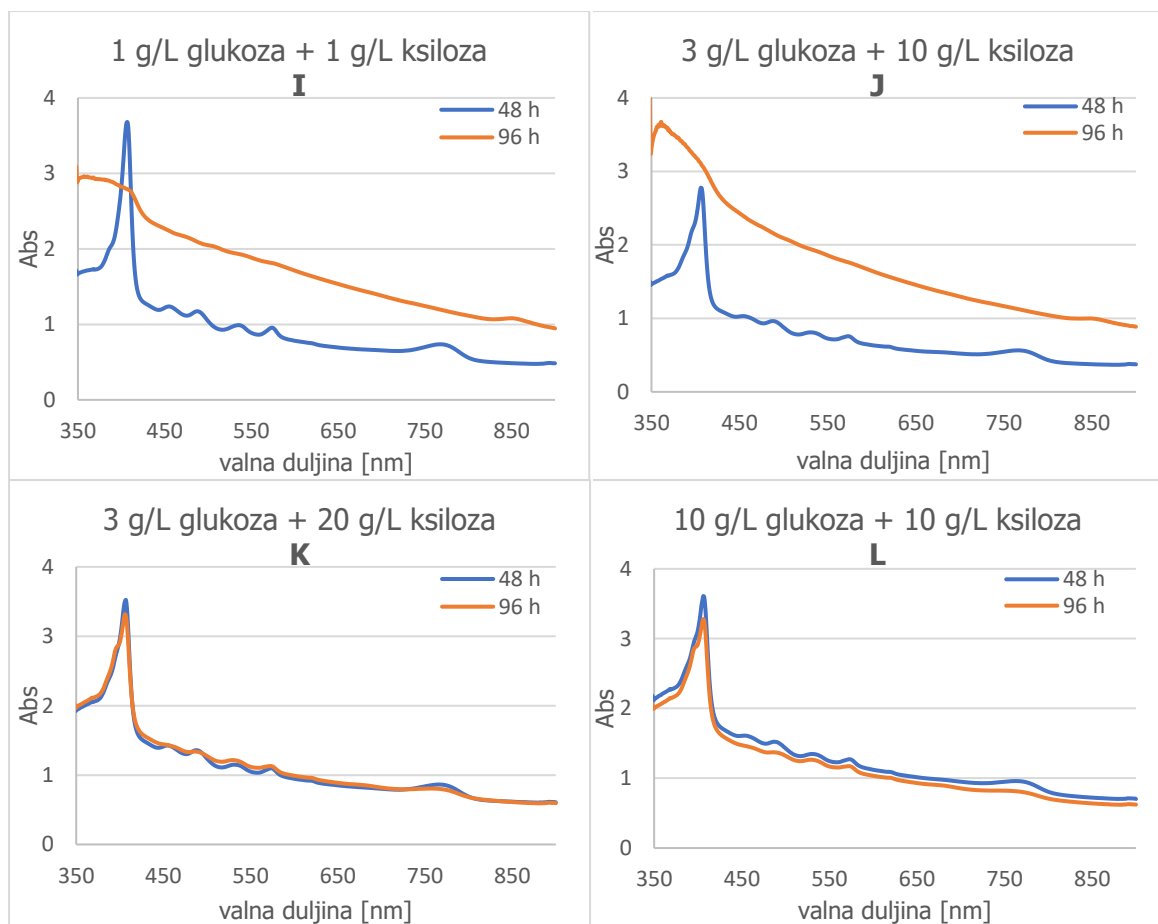
Kao i tijekom prijašnjih uzgoja, provedeno je spektrofotometrijsko skeniranje uzoraka biomase i ekstrahiranih pigmenata u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm. Apsorpcijski spektri biomase bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom kultivacije na podlozi s glukozom i ksilozom prikazani su na slici 10.



**Slika 10.** Apsorpcijski spektri biomase ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom kultivacije na kemijski definiranim hranjivim podlogama sa početnim koncentracijama glukoze i ksiloze od: 1 g/L + 1 g/L (E), 3 g/L + 10 g/L (F), 3 g/L + 20 g/L (G), 10 g/L + 10 g/L (H)

Na apsorpcijskim spektrima bakterijske biomase vide se dva specifična apsorpcijska maksimuma fotosintetskog pigmenta bakterioklorofila *a* na 800 i 850 nm. Nakon 24 h kultivacije vrlo slabo se vide spomenuti maksimumi zbog niske koncentracije pigmenta.

Slika 11. prikazuje apsorpcijske spektre pigmenta ekstrahiranih iz bakterijske biomase nakon 48 i 96 sati uzgoja na hranjivim podlogama s glukozom i ksilozom.



**Slika 11.** Apsorpcijski spektri ekstrahiranih pigmenata tijekom kultivacije ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranim hranjivim podlogama sa početnim koncentracijama glukoze i ksiloze od: 1 g/L + 1 g/L (I), 3 g/L + 10 g/L (J), 3 g/L + 20 g/L (K), 10 g/L + 10 g/L (L)

Kao i tijekom prijašnjih uzgoja, na apsorpcijskim spektrima vidljiv je apsorpcijski maksimum bakterioklorofila *a* pri valnoj duljini od 775 nm. Spomenuti maksimum slabo je vidljiv na pojedinim spektrima, osobito nakon 96 sati uzgoja zbog niske koncentracije bakterioklorofila *a*.

Izračunate koncentracije bakterioklorofila *a* nakon 48 i 96 sati uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 prikazane su u tablici 10. Vidljivo je smanjenje koncentracije fotosintetskog pigmenta bakterioklorofila *a* s vremenom kultivacije zbog razgradnje pigmenata. Najveći udio bakterioklorofila *a* u biomasi bakterije zabilježen je nakon 48 sati kod svih uzgoja.

Nakon 48 h uzgoja na hranjivoj podlozi s 1 g/L glukoze i 1 g/L ksiloze zabilježen je udio u vrijednosti od 1,837 mg/g biomase; na podlozi s 3 g/L glukoze i 10 g/L ksiloze zabilježen je udio od 1,433 mg/g biomase; na hranjivoj podlozi s 3 g/L glukoze i 20 g/L ksiloze udio



bakterioklorofila *a* iznosio je 1,993 mg/g biomase; na podlozi s 10 g/L glukoze i 10 g/L ksiloze udio bakterioklorofila *a* u bakterijskoj biomasi iznosio je 1,818 mg/g biomase.

**Tablica 10.** Koncentracija bakterioklorofila *a* nakon 48 h i 96 h uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi sa glukozom i ksilozom kao izvorom ugljika

Izvor ugljika	Bchl <i>a</i> (nakon 48 h) [mg/L]	Bchl <i>a</i> (nakon 96 h) [mg/L]
1 g/L glukoza + 1 g/L ksiloza	2,936688	0,348209
3 g/L glukoza + 10 g/L ksiloza	2,184923	1,706398
3 g/L glukoza + 20 g/L ksiloza	2,86142	2,153501
10 g/L glukoza + 10 g/L ksiloza	2,716206	1,914494

## 5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata provedenog istraživanja zaključeno je sljedeće:

1. Tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama s glukozom, pri nižim koncentracijama dobiveni su veći prinosi biomase te viši koeficijenti konverzije supstrata u biomasu nego pri višim koncentracijama glukoze zbog inhibicije supstratom. Produktivnost je bila najveća prilikom uzgoja na podlozi sa 1 g/L glukoze i iznosila je 0,019 g/(Lh). Specifična brzina rasta je tijekom svih uzgoja bila otprilike podjednaka.
2. Tijekom kultivacije ljubičaste nesumporne bakterije na hranjivoj podlozi sa ksilozom, najniži prinos biomase i produktivnost zabilježeni su kod početne koncentracije ksiloze od 20 g/L. Potrošnja supstrata bila je u prosjeku 3,912 g/L (izuzev uzgoja pri 1 g/L ksiloze) što znači da je potrošnja ksiloze bila relativno niska.
3. Tijekom uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama s glukozom i ksilozom, najveći prinos biomase i koeficijent konverzije supstrata u biomasu dobiveni su prilikom kultivacije na podlozi s 1 g/L glukoze i 1 g/L ksiloze. Prilikom uzgoja na podlogama sa višim koncentracijama glukoze i ksiloze (3 g/L + 10 g/L; 3 g/L + 20 g/L; 10 g/L + 10 g/L) primijećeno je da se u većoj mjeri troši glukoza u odnosu na ksilozu, što znači da je preferirani supstrat glukoza. Specifična brzina rasta tijekom svih uzgoja iznosila je 0,016 h<sup>-1</sup>.
4. Koncentracija fotosintetskog pigmenta bakterioklorofila *a* tijekom svih uzgoja bila je relativno niska zbog njihovog raspada, no najveći udio bakterioklorofila *a* u biomasu zabilježen je nakon 48 sati tijekom svih kultivacija. Najveći udio dobiven je prilikom uzgoja na 1 g/L glukoze te iznosi 2.05 mg/g biomase. Prilikom uzgoja na glukozu primijećena je inhibicija sinteze pigmenata pri višim koncentracijama supstrata.

## 6. LITERATURA

Akkerman I., Janssen M., Rocha J., Wijffels R. H. (2002) Photobiological Hydrogen Production: Photochemical Efficiency and Bioreactor Design. *Int. J. Hydrogen Energy* 27: 1195 - 1208.

Basak N., Das D. (2007) The prospect of purple non sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 31 - 42.

Biebl H., Pfennig N. (1981) Isolation of members of the family *Rhodospirillaceae*. U: The Prokaryotes — a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria (Starr M. P., Stolp H., Trüper H. G., Balows A. i Schlegel H. G., ured.), Springer-Verlag, New York, USA, str. 267 – 273.

Brandl H., Knee E. J. Jr., Fuller R. C., Gross R. A, Lenz R. W. (1989) Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly (beta-hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters. *Int. J. Biol. Macromol.*11(1): 49 – 55.

Brandl H., Lenz R. W., Lloyd R., Fuller R. C. (1991) The accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter sphaeroides*. *Arch. Microbiol.* 155(4): 337 – 340.

Brune D. C. (1995) Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. U: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, (Blankenship R. E., Madigan M. T., Bauer C. E., ured.), Springer, Netherlands str. 847 – 870.

Carlozzi P., Sacchi A. (2001) Biomass production and studies on *Rhodopseudomonas palustris* grown in an outdoor, temperature controlled, underwater tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.* 88(3): 239 – 249.

Chen D., Han Y., Gu Z (2006) Application of statistical methodology of the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Proc. Biochem.* 41: 1773 – 1778.

Choorit W., Thanahoset P., Thongpradistha J., Sasaki K., Noparatnaraporn N. (2002) Identification and cultivation of photosynthetic bacteria in wastewater from a concentrated latex processing factory. *Biotechnol. Lett.* 24 (13): 1055 - 1058.

- Chowdhury W. Q., Idehara K., Maeda I., Umeda F., Yagi K., Miura Y., i sur. (1996) Factors affecting polyhydroxybutyrate biosynthesis in the marine photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas* sp. strain W-1S. *Appl. Biochem. Biotech.* 57/58: 361 – 366.
- Debabrata D., Veziroğlu T. N. (2001) Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int. J. Hydrogen Energy* 26: 13 – 28.
- Ehrenreich A., Widdel F. (1994) Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4517 – 4526.
- Fascetti E., D'addario E., Todin O., Robertiello A. (1998) Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes. *Int. J. Hydrogen Energy*, 23(9): 753 – 60.
- Fenchel T., King G. M., Blackburn T. H. (2012) Bacterial Metabolism U: Bacterial Biogeochemistry, (Fenchel T., King G. M., Blackburn T. H., ured.), Elsevier Ltd., str. 1 - 34.
- Fiedor J., Ostachowicz B., Baster M., Lankosz M., Burda K. (2016) Quantification of purple non-sulphur phototrophic bacteria and their photosynthetic structures by means of total reflection X-ray fluorescence spectrometry (TXRF). *J. Anal. At. Spectrum.* 31: 2078 - 2088.
- Merugu R., Prashanthi Y., Sarojini T., Badgu N. (2014) Bioremediation of waste waters by the anoxygenic photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* SMR 009. *International Journal of Research in Environmental Science and Technology* 4: 16 - 19.
- Hansen T. A., Van Gemerden H. (1972) Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria. *Arch. Mikrobiol.* 86: 49 - 56.
- Higuchi–Takeuchi M., Numata K. (2019) Marine Purple Photosynthetic Bacteria as Sustainable Microbial Production Hosts. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7: 258.
- Higuchi-Takeuchi M., Morisaki K., Toyooka K., Numata K. (2016) Synthesis of High-Molecular-Weight Polyhydroxyalkanoates by Marine Photosynthetic Purple Bacteria. *PLoS ONE* 11 (8): 1-17.
- 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 K. H., Stackebrandt E., ured.), Springer, New York, str. 41 – 64.

Imhoff J. F., Hiraishi A., Süling J. (2005) Anoxygenic Phototrophic Purple Bacteria. U: *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, (Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T., Garrity G. M., ured.), Springer, Boston, MA, str. 119 – 132.

Kantachote D., Torpee S., Umsakul K. (2005) The potential use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. *Electron. J. Biotechnol.* 8: 314 - 323.

Keppen O. I., Krasil'nikova E. N., Lebedeva N. V., Ivanovskii R. N. (2013) Comparative Study of Metabolism of the Purple Photosynthetic Bacteria Grown in the Light and in the Dark under Anaerobic and Aerobic Conditions. *Microbiology* 82 (5): 547 – 553.

Kobayashi M., Kobayashi M. (1995) Waste Remediation and Treatment Using Anoxygenic Phototrophic Bacteria. U: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration vol 2*, (Blakeship R. E., Madigan M. T., Bauer C. E., ured.) Springer, Dordrecht, str. 1269 – 1282.

Kuo F. H., Chien Y. H., Chen C. J. (2012) Effects of light sources on growth and carotenoid content of photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*. *Bioresour. Technol.* 113: 315 – 318.

Lai Y. C., Liang C. M., Hsu S. C., Hsieh P. H., Hung C. H. (2017) Polyphosphate Metabolism by Purple Non-Sulfur Bacteria and its Possible Application on Photo-Microbial Fuel Cell. *J. Biosci. Bioeng.* 123 (6): 722 – 730.

Lee C. M., Chen P. C., Wang C. C., Tung Y. C. (2002) Photohydrogen production using purple nonsulfur bacteria with hydrogen fermentation reactor effluent. *Int. J. Hydrogen Energy* 27: 1309 - 1313.

Liang C. M., Hung C. H., Hsu S. C., Yeh I. C. (2010) Purple Nonsulfur Bacteria Diversity in Activated Sludge and its Potential Phosphorus-Accumulating Ability Under Different Cultivation conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 709 – 719.

Liu S., Zhang G., Li X., Zhang J. (2014) Microbial production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Appl. Microbiol. Biot.* 98: 7349 – 7357.

Madaras M. (2019) Uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija u bioreaktoru s miješalom bez izvora svjetlosti na različitim izvorima ugljika. Diplomski rad. Zagreb, Prehrambeno – biotehnološki fakultet.

Madigan M. T. (1998) Isolation and characterization of psychrophilic purple bacteria from Antarctica. U: *The Phototrophic Prokaryotes* (Peschek G. A., Löffelhardt W. and Schmetterer G., ured.), Plenum, New York, USA, str. 699 – 706.

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, str. 1 - 15.

Madukasi E. I., Dai X., He C., Zhou J. (2009) Potentials of Phototrophic Bacteria in Treating Pharmaceutical Wastewater. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 7 (1): 165 - 174.

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.

Markov S., Weaver P. F. (2008) Bioreactors for H<sub>2</sub> Production by Purple Nonsulfur Bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 145: 79 - 86.

McEwan A. G. (1994) Photosynthetic electron transport and anaerobic metabolism in purple non- sulphur phototrophic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 66: 151 - 164.

McGarvey J. A., Bullard G. L., Lathrop J. R., Miller W. G., Silva C. J. (2009) Induction of purple sulfur bacterial growth in dairy wastewater lagoons by circulation. *Letters in Applied Microbiology* 49: 427 - 433.

Meng Q., Zhang Y., Ju X., Ma C., Ma H., Chen J., Zheng P., Sun J., Zhu J., Ma Y., Zhao X., Chen T. (2016) Production of 5-aminolevulinic acid by cell free multi-enzyme catalysis. *Journal of Biotechnology*, 226: 8 - 13.

Myung K. K., Choi K. M., Yin C. R., Lee K. Y., Im W. T., Lim J. H., Lee S. T. (2004) Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodopseudomonas palustris*, isolated from eutrophicated ponds. *Biotech Lett.*, 26 (10): 819 - 822.

Novak M., Pavlečić M., Harutyunyan B., Goginyan V., Horvat P., Šantek B. (2017) Characteristic and selection of culture of photosynthetic purple non-sulphur bacteria as a potential 5-aminolevulinic acid producers. *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.* 12 (3-4): 113 - 119.

Oren A. (2011) Characterization of Pigments of Prokaryotes and Their Use in Taxonomy and Classification. *Methods Microbiol.* 28: 261 – 282.

Pfennig N. (1989) Ecology of phototrophic purple and green sulfur bacteria (Schlegel H. G., Bowien B., ured.) *Autotrophic Bacteria*, str. 97 – 116.

Prasertsan P., Jaturapornpipat M., Sirpatana C. (1997) Utilization and treatment of tuna condensate by photosynthetic bacteria. *Pure. Appl. Chem.* 69 (11): 2438 - 2445.

Ramchander M., Prasad M. S. K., Vasavi D. S., Girisham S., Reddy S. M. (2007) Bioremediation of waste water by two Anoxygenic Phototrophic bacteria. *Nat. Acad. Sci. Lett.* 30: 223 - 227.

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.

Sakarika M., Spanoghe J., Sui Y., Wambacq E., Grunert O., Haesaert G., Spiller M., Vlaeminck S. S. (2019) Purple non-sulphur bacteria and plant production: benefits for fertilization, stress resistance and the environment. *Microb. Biotechnol.* 0 (0): 1 – 30.

Sarić M. (2019) Kinetika rasta i sinteza bakterioklorofila tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781. Završni rad. Zagreb, Prehrambeno – biotehnološki fakultet.

Sasaki K., Tanaka T., Nishizawa Y., Hayashi M. (1990) Production of a herbicide, 5-aminolevulinic acid, by *Rhodobacter sphaeroides* using the effluent waste from an anaerobic digester. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 727 – 731.

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*, 2. izd. (Martin A. M. ured.) Blackie Academic and Professional, str. 247 – 291.

Sasaki K., Watanabe M., Tanaka T., Tanaka T. (2002) Biosynthesis, Biotechnological Production and Applications of 5-Aminolevulinic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58 (1): 23 – 29.

Schmidt K. (1978) Biosynthesis of carotenoids. U: *The Photosynthetic Bacteria* (Clayton R. K., Sistrom W. R., ured.) Plenum Press, New York, USA, str. 729 - 750.

Sojka G. A. (1978) Metabolism of nonaromatic organic compounds. U: *The Photosynthetic Bacteria* (Clayton R. K., Sistrom W. R., ured.), Plenum Press, New York, USA, str. 707 - 718.

Takaichi S., Jung D., Madigan M. (2001) Accumulation of unusual carotenoids in the spheroidene pathway, demethylspheroidene and demethylspheroidenone, in an alkaliphilic

purple nonsulfur bacterium *Rhodobaca bogoriensis*. *Photosynthesis Research*, 2001 – Springer, str. 207 - 214.

Takaichi S. (2009) Distribution and Biosynthesis of Carotenoids. U: The Purple Phototrophic Bacteria (Neil Hunter C., Daldal F., Thurnauer M. C., Beatty J. T., ured.), Springer Science +Business Media B.V., str. 97 - 117.

Takeo K., Yamaoka Y., Sasaki K. (2005) Treatment of oil- containing sewage wastewater using immobilized photosynthetic bacteria. *W. J. of Microb. Biotech.*, 21 (8-9): 1385 - 1391.

Vasavi D., Ramchander M., Girisham S., Reddy S. M. (2008) Remediation of waste water using two Anoxicogenic Phototrophic Bacteria. *Ecol. Envi. Con.* 14: 363 - 366.

Wang S. J., Zhong J. J. (2007) Bioreactor Engineering. U: Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, (Yang S. T., ured.), 2.izd, Elsevier B.V., str. 45 - 68.

Woodard S. I., Dailey H. A. (1995) Regulation of heme biosynthesis in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 316: 110–115.

Wu T. Y., Hay J. X. W., Kong L. B., Juan J. C., Jahim J. M. (2012) Recent advances in reuse of waste material as substrate to produce biohydrogen by purple non-sulfur (PNS) bacteria. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16: 3117–3122.

Xiu-yan L., Xiang-yang X., Qing-lan M., Wei-hong W. (2005) Biological formation of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *Journal of environmental sciences*, 7: 152-155.

Yen H. W., Hu I. C., Chen C. Y., Nagarajan D., Chang J. S. (2019) Design of photobioreactors for algal cultivation. U: Biomass, Biofuels and Biochemicals (Pandey A., Venkata Mohan S., Chang J. S., Hallenbeck P., Larroche C., ured.) Elsevier, str. 23 - 45.

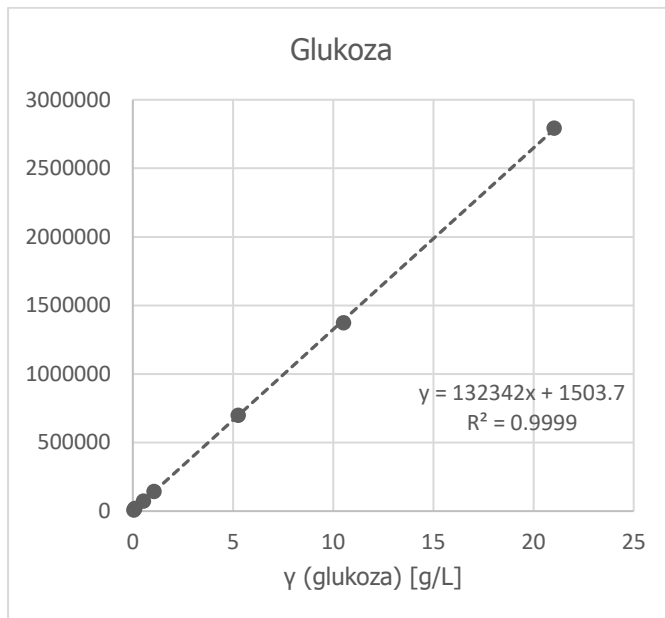
Yen H. W., Shih T. Y. (2009) Coenzyme Q<sub>10</sub> Production by *Rhodobacter sphaeroides* in Stirred Tank and in Airlift Bioreacotr. *Bioprocess and Biosyst. Eng.* 32 (6): 711 – 716.

Zhong J. J. (2010) Recent Advances in Bioreactor Engineering. *Korean J. Chem. Eng.* 27 (4): 1035 – 1041.

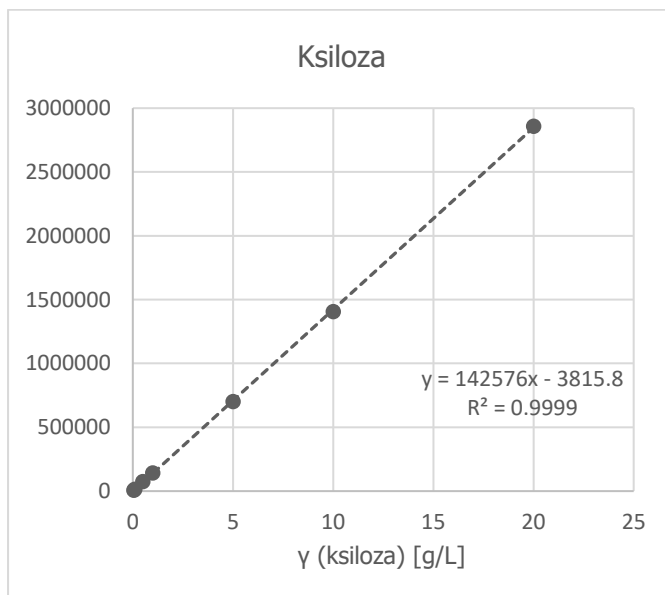


## 7. PRILOZI

Prilog 7.1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze na UPLC-u



Prilog 7.2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ksiloze na UPLC-u



## Izjava o izvornosti

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

*Stella Brozović*

---