

# Proizvodnja i izdvajanje ksilitola iz hidrolizata otpadne trave

---

Lilek, Stela

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:159:143665>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-10**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Stela Lilek**

**7529/BT**

**Proizvodnja i izdvajanje ksilitola iz hidrolizata otpadne trave**

**ZAVRŠNI RAD**

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

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

**Zagreb, 2020.**

## 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

### Proizvodnja i izdvajanje ksilitola iz hidrolizata otpadne trave

Stela Lilek, 0058211793

#### Sažetak:

Ksilitol je industrijski važan poliol koji se zbog svojih svojstava koristi kao zamjena za šećer te se dodaje u različite proizvode. U ovom radu proveden je šaržni uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na hidrolizatu otpadne trave s ciljem proizvodnje ksilitola. Nakon provedenog procesa proizvodnje ksilitola centrifugiranjem su izdvojeni biomasa i supernatant. Efikasnost procesa proizvodnje ksilitola iznosila je 42,16 % uz prinos ksilitola od 14,57 g L<sup>-1</sup>. Supernatant je korišten za izdvajanje ksilitola kristalizacijom. Maksimalni prinos procesa kristalizacije iznosio je oko 30%. Biomasa ove plijesni predstavlja važan nusproizvod, te je korištena za izolaciju hitina i hitozana. Nakon provedenog postupka izolacije hitina i hitozana, iz biomase plijesni dobiveno je 20,56% hitina te 9,90% hitozana određeno na suhu tvar. Dodatno, određen je i sastav masnih kiselina ove oleaginozne plijesni. Ukupni udio lipida u biomasi plijesni iznosi svega 5,90 % izraženo na suhu tvar, te je plinskom kromatografijom identificirano i kvantificirano 13 estera masnih kiselina, od kojih najveći udio imaju oleinska (C18:1 cis9), linolenska (C18:2 cis 9,12) i  $\gamma$ -linolenska kiselina (C18:3 cis 6,9,12).

**Ključne riječi:** kristalizacija, ksilitol, lignocelulozne sirovine, *Mucor indicus*

**Rad sadrži:** 35 stranica, 7 slika, 8 tablica, 40 literaturnih navoda, 0 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. Antonija Trontel

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

**Datum obrane:** 1.9.2020.

## 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 and Brewing**  
**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

**Proizvodnja i izdvajanje ksilitola iz hidrolizata otpadne trave**

**Stela Lilek, 0058211793**

### **Abstract:**

Xylitol is an industrially important polyol which, due to its properties, is used as a substitute for sucrose and is added to various products. In this paper, batch cultivation of mold *Mucor indicus* DSM 2185, with the aim of xylitol production, on waste grass hydrolyzate was performed. After the xylitol production process, biomass and supernatant were separated by centrifugation. The efficiency of the xylitol production process was 42,16% with a xylitol yield of 14,57 g L<sup>-1</sup>. The supernatant was used to separate the xylitol by crystallization. The maximum yield of the crystallization process was about 30%. The biomass of this mold is an important by-product, and, therefore, has been used to isolate chitin and chitosan. After the isolation procedure of chitin and chitosan, 20.56% of chitin and 9.90% of chitosan was isolated from biomass. Additionally, the fatty acid composition of this oleaginous mold was determined. The total lipid content in biomass was only 5.90%. Gas chromatographic method was used for identification and quantification of 13 fatty acid esters, from which oleic (C18: 1 cis9), linolenic (C18: 2 cis 9, 12) and  $\gamma$ -linolenic acid (C18: 3 cis 6,9,12) have highest concentration.

**Keywords:** crystallisation, xylitol, lignocellulose materials, *Mucor indicus*

**Thesis contains:** 35 pages, 7 figures, 8 tables, 40 references, 0 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**

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

**Technical support and assistance:** Nenad Marđetko, mag. ing. bioproc.

**Defence date:** September 1<sup>st</sup>,2020

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE .....	2
2.2. PREDOBRAĐA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA .....	3
2.3. DETOKSIFIKACIJA.....	4
2.4. KSILITOL .....	5
2.4.1. PROIZVODNJA KSILITOLA .....	6
2.4.2. IZDVAJANJE KSILITOLA .....	7
2.5. PLIJESAN <i>Mucor indicus</i> .....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	11
3.1. MATERIJALI .....	11
3.1.1. Sirovine.....	11
3.1.2. Mikroorganizam.....	11
3.1.3. Kemikalije.....	11
3.2. APARATURA I PRIBOR .....	12
3.2.1. Bioreaktor s mješalom .....	12
3.2.2. Sustav za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (eng. Ultra Performance Chromatography,UPLC) .....	13
3.2.3. Sustav za plinsku kromatografiju .....	13
3.2.4. Ostala oprema .....	14
3.3. METODE .....	15
3.3.1. Priprema podloge .....	15
3.3.2. Priprema inokuluma plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2185 .....	15
3.3.3. Uzgoj plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2185 i proizvodnja ksilitola u bioreктору s mješalom .....	16
3.3.4. Određivanje suhe tvari biomase .....	16
3.3.5. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC).....	17
3.3.6. Priprema uzoraka i taloženje proteina .....	17
3.3.7. Izdvajanje ksilitola kristalizacijom.....	18
3.3.8. Određivanje hitina i hitozana u biomasi plijesni .....	19
3.3.9. Određivanje koncentracije i sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom s plameno-ionizacijskom detekcijom.....	20
3.4. Izračun parametara uspješnosti procesa.....	22

4. REZULTATI I RASPRAVA.....	23
4.1. Uzgoj plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2185 na hidrolizatu otpadne trave .....	24
4.2. Izdvajanje ksilitola .....	27
4.3. Izdvajanje hitina i hitozana iz biomase plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 .....	29
4.4. Određivanje sastava lipida u biomasi plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 .....	30
5. ZAKLJUČCI .....	32
6. LITERATURA .....	33

## 1. UVOD

Ksilitol ili brezin šećer prirodni je zaslađivač kemijske strukture pentoznog alkohola (poliola) čija je slatkoća slična saharozi (De Faveri i sur., 2003). Široko je rasprostranjen u prirodi te se može pronaći u biljkama i voću (Ylikahri, 1979). Primjenjuje se kao preparat u tretmanu bolesti poput dijabetesa, hemolitičke anemije, bolestima debelog crijeva, u prevenciji respiratornih infekcija te osteoporoze (López-Linares i sur., 2017), kao i u pastama za zube, kao dio vitaminskih tableta, u gumama za žvakanje, vodicama za ispiranje usne šupljine, a dodaje se i u različite napitke te u pekarske proizvode (Rafiqul i Mimi Sakinah, 2012). Industrijska proizvodnja ksilitola temelji se na katalitičkom hidrogeniranju čiste D-ksiloze pri visokim temperaturama i tlaku (Dasgupta i sur., 2016).

Ipak, sve se više istražuje biotehnološka proizvodnja ksilitola iz ksiloze dobivene enzimskom hidrolizom lignoceluloze. U lignoceluloznom hidrolizatu se nalaze različite heksoze (glukoza, manoza i galaktoza) te pentoze (ksiloza i arabinoza; Marđetko i sur., 2018). Za navedene procese koriste se jeftine otpadne lignocelulozne sirovine, a uvjeti u kojima se provodi proces su, u odnosu na kemijski postupak proizvodnje, relativno blagi (atmosferski tlak, temperatura oko 30°C; Dasgupta i sur., 2016). Tijekom biotehnološkog procesa dobivanja ksilitola koriste se mikroorganizmi koji imaju metabolički put konverzije ksiloze u ksilitol poput plijesni *Mucor indicus*, ne-*Saccharomyces* kvasaca *Debaryomyces hansenii* i *Candida guilliermondii* (López-Linares i sur., 2017). Osim toga, biomasa nekih mikroorganizama kao npr. plijesni *M. indicus* može biti važan nusproizvod bioprocesa zbog visokog sadržaja hitina i hitozana, te nakupljanja masnih kiselina. Navedeni spojevi se određenim postupcima mogu izdvojiti i pročistiti, te povećati isplativost samog procesa (Melaja i sur., 1978).

U ovom radu bit će proveden šaržni proces proizvodnje ksilitola iz hidrolizata otpadne trave s pomoću plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 u bioreaktoru s mješalom. Nakon završenog procesa proizvodnje ksilitola provest će se izdvajanje ksilitola iz supernatanta kristalizacijom. Biomasa plijesni *Mucor indicus* poslužit će za izolaciju hitina i hitozana, kao i za određivanje sastava i udjela lipida u biomasi tijekom navedenog procesa.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE

Lignoceluloza čini oko 64% biomase poraslih biljaka na Zemlji. Otpadne lignocelulozne sirovine imaju izniman potencijal u biotehnološkoj proizvodnji (Kumar Das i sur., 2020). Lignocelulozne sirovine su trave, cvijeće, slama, kukuruzovina, kukuruzni oklasci, krumpirove stabljike brzo rastuće energetske biljke poput miskantusa i ostalo (Kucharska i sur., 2018). Iskorištavanje lignoceluloznog otpada kao obnovljivog izvora je ekološki prihvatljivo. S razvojem biotehnologije lignocelulozni materijal koristi se za proizvodnju baznih kemikalija kao što je bioetanol i mliječna kselina, zatim u proizvodnji bioplina i enzima te visokovrijednih spojeva kao što su antibiotici i biopesticidi (Marđetko i sur., 2018; Chen, 2015).

Lignoceluloza je glavna građevna jedinica biljaka te se sastoji od tri komponente: linearnog polisaharida celuloze, razgranatog heteropolisaharida hemiceluloze i razgranatog heteropolimera lignina (Slika 1.), a karakterizira ju kompaktna djelomično kristalizirana struktura (Isikgor i Becer, 2015). Udio navedenih polisaharida u strukturi ovisi o sirovini. Između polisaharida koji grade lignocelulozne sirovine prisutne su jake kovalentne te slabe nekovalentne veze. Ovaj način vezanja uzrokuje formiranje mikrofibrila koji međusobnim interakcijama tvore makrofibrile.



**Slika 1.** Sastav lignocelulozne sirovine (Kuthi i sur., 2016)

Celuloza je nerazgranati linearni polimer koji je građen od monomernih podjedinica glukoze koje su međusobno povezane  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama (Kucharska i sur., 2018) dok su susjedni lanci povezani vodikovim i Van der Waals-ovim vezama koje su zaslužne za stvaranje kristalične strukture (Marđetko i sur., 2018). Jaka i kristalična struktura nastaje povezivanjem hidroksilnih skupina vodikovim vezama unutar istog ili susjednih lanaca



celuloze (Limayem i Ricke, 2012). Razgradnja celuloze provodi se enzimskom hidrolizom pomoću endoglukanaza (EC 3.2.1.4), egzoglukanaza (EC 3.2.1.91) i  $\beta$ -glukozidaza (Kucharska i sur.,2018).

Hemiceluloza je razgranati heteropolimer koji je građen od heksoza (galaktoze, fruktoze, manoze) i pentoza (ksiloza, ramnoza, arabinoza) te glukuronske kiseline i acetiliranih šećera (Kucharska i sur.,2018). Glavni lanac građen je od ksilana povezanog  $\beta$ -1,4-glikozidnom veznom s arabinozom. Zbog raznolikosti vezanih šećera koristi se širok spektar enzima kako bi se hemiceluloza u potpunosti hidrolizirala do monomera (Limayem i Ricke, 2012). Stabilnosti lignoceluloze doprinosi hemiceluloza koja je kovalentno vezana na lignin kao i nekovalentno vezana na celulozu (Marđetko i sur., 2018).

Lignin je amorfni netopljiv heteropolimer sastavljen od monomera kumaril, koniferil i sinapil alkohola (Kucharska i sur., 2018) povezanih esterskim vezama (Marđetko i sur.,2018). Sastavna je komponenta stanične stjenke s ulogom zaštite od mikroba (Kucharska i sur., 2018). Lignin ima potpurnu funkciju, a osim toga osigurava nepropusnost i rezistenciju na mikrobe te sudjeluje u oksidativnom stresu kod biljaka (Andlar i sur., 2018).

## **2.2. PREDOBRAĐA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA**

Predobrada lignoceluloznih sirovina obuhvaća razgradnju kompleksne lignocelulozne strukture do osnovnih komponenti celuloze, hemiceluloze i lignina. Svrha predobrade je uklanjanje lignina i hemiceluloze, smanjenje kristaličnosti celuloze kao i povećanje poroznosti materijala. Metode kojima se provodi predtretman moraju biti ekonomski isplative te ne smiju uzrokovati formiranje toksičnih spojeva (Kucharska i sur., 2018), ne smiju uzrokovati razgradnju ugljikohidrata do inhibitornih spojeva te moraju rezultirati formiranjem fermentabilnih šećera (Marđetko i sur., 2018). Razlikuju se fizikalne, kemijske, fizikalno-kemijske i biološke metode. Fizikalne metode predobrade karakterizirane su smanjenjem veličine polimera fragmentiranjem, mljevenjem, sjeckanjem, ali i primjenom mikrovalnog zračenja, sušenja raspršivanjem, gama zračenja i ostalo (Kucharska i sur., 2018). Razgradnja lignoceluloznih sirovina primjenom kemijskih metoda moguća je zbog odvijanja kemijskih reakcija u vodenim otopinama koje obuhvaćaju kiselu i alkalnu predobradu, oksidaciju i ozonolizu te otapanje u organskim otapalima ili ionskim tekućinama. Primjenom fizikalno-kemijskih metoda predtretmana dolazi do razgradnje složene strukture lignoceluloznih sirovina djelovanjem oksidacijskih reakcija u kombinaciji s tretmanom

toplinom, a obuhvaćaju djelovanje ugljikovim dioksidom, eksploziju parom i drugo. Metode biološke predobrade temelje se na primjeni gljiva i bakterija ili enzima koje razgrađuju celulozu, hemicelulozu i lignin. Nakon predobrade slijedi enzimska hidroliza, oslobađanje jednostavnih šećera iz hemiceluloze i celuloze. Razgradnja celuloze i hemiceluloze moguća je primjenom celulaza i hemicelulaza. Hidroliza celuloze vrši se primjenom endoglukanaza koje kataliziraju hidrolizu  $\beta$ -1,4-glikozidne veze, egzoglukanaza koje kataliziraju reakciju uklanjanja monomera i dimera s kraja glukoznog lanca te glikozilaza koje hidroliziraju glukozne dimere. Na taj način celulaze kataliziraju razgradnju celuloze do fermentabilnih šećera, a to je kompleksan proces zbog postojanja celuloznih mikrofibrila koje su stabilizirane unutrašnjim i vanjskim vodikovim vezama iz hemiceluloznih polisaharida poput manana i ksilana. Sposobnost razgradnje celuloze i hemiceluloze ovisi o enzimu, pH, temperaturi, duljini trajanja procesa, poroznosti, stupnju kristaličnosti te o sadržaju celuloze (Kucharska i sur., 2018). Od svih navedenih metoda predobrade, najčešće se primjenjuje metoda kiselinske predobrade lignocelulozne sirovine. Lignocelulozna sirovina izlaže se djelovanju različitih koncentracija kiseline pri određenoj temperaturi i različitim vremenima zadržavanja. Najčešće su korištene sumporna i fosforna kiselina. Tijekom kiselinske preobrade dolazi do hidrolize hemiceluloze na mono- i oligosaharide zbog kidanja glikozidnih veza između podjedinica ksiloze te do razgradnje celuloze. Proces se provodi pri temperaturi između 140 i 215 °C u vremenu trajanja od nekoliko sekundi do nekoliko minuta (Mardetko i sur., 2018).

### **2.3. DETOKSIFIKACIJA LIGNOCELULOZNOG HIDROLIZATA**

Tijekom kiselinske hidrolize dolazi do formiranja inhibitornih i toksičnih spojeva poput furana, alifatskih kiselina i fenola (Mustapa Kamal i sur., 2011). Oni su dobiveni razgradnjom heksoza i pentoza, acetilnih grupa te lignina. Postupci detoksifikacije provode se kako bi se smanjio inhibitorni učinak nastalog hidrolizata. Učinkovitost detoksifikacije ovisi o primijenjenoj metodi hidrolize i tipu biomase te o korištenom mikroorganizmu. Metode detoksifikacije dijele se na fizikalne i kemijske. Primjer fizikalne metode detoksifikacije je vakuum uparavanje kojom se smanjuje količina octene kiseline, furfurala, hidroksimetilfurfurala i vanilina. Kemijske metode obuhvaćaju ekstrakciju organskim otapalom, ionsko-izmjenjivački tretman smolom i adsorpciju ugljika, a primjenjuju se s ciljem uklanjanja toksičnih spojeva nakon hidrolize lignoceluloznih sirovina. Iako su neke toksične komponente hidrolizata u malim koncentracijama korisne tijekom proizvodnje ksilitola (Mohamad i sur., 2015).

## 2.4. KSILITOL

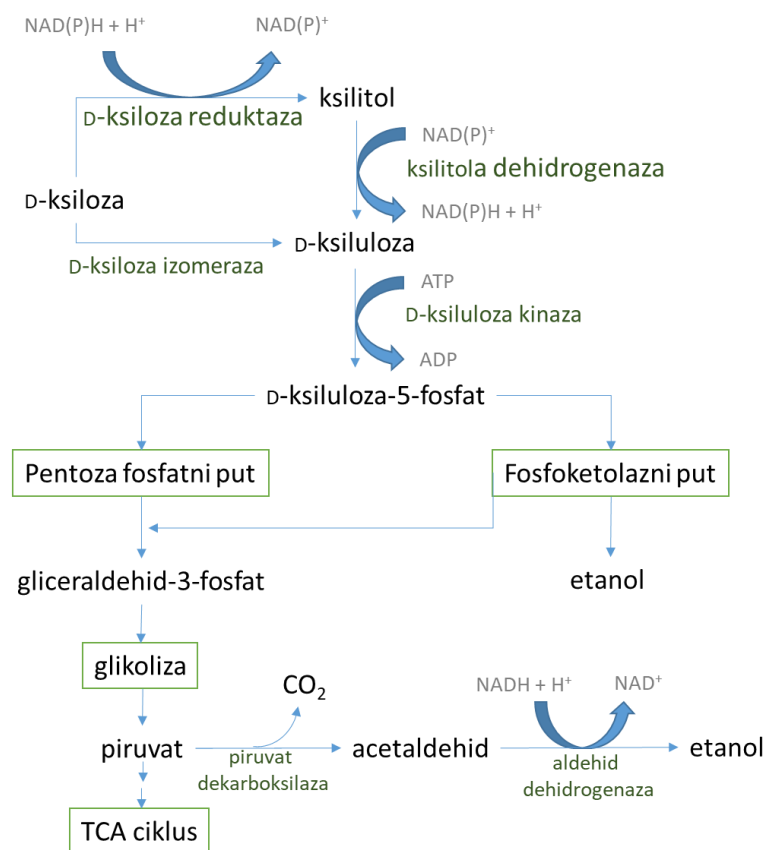
Ksilitol ( $C_5H_{12}O_5$ ) je šećerni alkohol koji na svakom ugljikovom atomu ima vezanu hidroksilnu skupinu te se može usporediti sa saharozom po okusu, slatkoći i izgledu, a formira se prirodno u kori breze. Karakterizira ga visok stupanj slatkoće zbog čega ima 40 % manju kalorijsku vrijednost u odnosu na saharozu (Albuquerque i sur., 2014). Posjeduje iznimna organoleptička svojstva kao što su dobra topljivost, niski glikemijski indeks i antikancerogena svojstva. Primjenjuje se u prevenciji oralnog zdravlja na način da sprečava formiranje oralnog biofilma kojeg proizvodi bakterija *Streptococcus mutans*. Navedena svojstva pružaju mogućnost primjene ksilitola u liječenju bolesti poput dijabetesa, anemije, osteoporoze i akutnog otitisa (Albuquerque i sur., 2014). Važne tehnološke značajke ksilitola poput akariogenosti, negativne topline otapanja, niske kalorijske vrijednosti čine ga poželjnom sirovinom i u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Silva i sur., 1998). Osim toga, primjenjuje se u proizvodnji slatkiša, karamela, sladoleda, čokolada, marmelada i napitaka zbog toga što ne sudjeluje u Maillard-ovim reakcijama koje uzrokuju smeđu boju namirnica i ne uzrokuju redukciju nutritivne vrijednosti proteina (Albuquerque i sur., 2014).

### 2.4.1. PROIZVODNJA KSILITOLA

Ksilitol se može dobiti kemijskim putem u reakciji hidrogeniranja ksiloze ili biotehnološkim postupkom primjenom odgovarajućeg mikroorganizma koji provodi konverziju ksiloze u ksilitol (Lima i sur., 2014). Proizvodnja ksilitola biotehnološkim postupkom može se provesti na poljoprivrednim i agroindustrijskim otpadcima zbog njihove niske cijene. Biotehnološki postupak ima nekoliko prednosti u odnosu na kemijsku proizvodnju ksilitola, a odnosi se na optimiranje i praćenje procesnih parametara kao što su temperatura, pH, tlak, visoku selektivnost i biorazgradivost proizvoda (Martínez i sur., 2007; Mosier i sur., 2005). Biotehnološka proizvodnja ksilitola iz lignoceluloznih sirovina započinje predobradom lignocelulozne sirovine s ciljem dobivanja fermentabilnih ugljikohidrata, D-ksiloze iz hemiceluloze i glukoze, u hidrolizat koji će se koristiti kao izvor ugljika za mikroorganizme (Lima de Albuquerque i sur., 2014). Kiselinska hidroliza, kojom nastaje lignocelulozni hidrolizat, mora biti provedena pri uvjetima koji osiguravaju visoku koncentraciju ksiloze, relativno nisku koncentraciju inhibitornih spojeva prihvatljivu za odabrani radni mikroorganizam te visoku selektivnost prema razgradnji celuloze. Optimalni uvjeti za proizvodnju ksilitola definirani su koncentracijom supstrata i inhibitora (Parajó i sur., 1998).

U biotehnološkoj proizvodnji ksilitola kao radni mikroorganizam primjenjuju se većinom bakterije i plijesni. Genetički modificirane bakterije koje imaju potencijal u proizvodnji ksilitola su *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Corynebacterium glutamicum* dok su glavni producenti ksilitola i dalje kvasci uzgojeni na hidrolizatu hemiceluloze poput *Candida athensensis*, *Candida tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces marxianus* i *Pichia stipitis* (Albuquerque i sur., 2014), *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* i *Candida mogii* (Silva i sur., 1998). Navedeni mikroorganizmi proizvode ksilitol kao intermedijer u metabolizmu D-ksiloze (Albuquerque i sur., 2014). *Mucor indicus* u aerobnim uvjetima raste u filamentoznom obliku, za koji je utvrđeno da ima nizak prinos u proizvodnji ksilitola (Dasgupta i sur., 2016). Najveća produktivnost ksilitola postiže se uzgojem *M. indicus* u aerobnim uvjetima s limitiranom količinom kisika jer u takvim uvjetima navedena plijesan raste u mješovitom obliku (filamentozni oblik i oblik kvasca). Metabolički put pregradnje ksiloze do ksilitola prikazan je na slici 2.

U biotehnološkoj proizvodnji ksilitola s pomoću kvasaca posebno je optimirati parametre poput pH, temperature, aeracije, imobilizacije stanica te koncentracije inokuluma, zatim sastav podloge, odnosno odabrati izvore ugljika, dušika i mikronutrijenata te njihove koncentracije (Rafiqul i Mimi Sakinah, 2013).



**Slika 2.** Put proizvodnje ksilitola (prilagođeno iz Rafiqul i Mimi Sakinah, 2013).

## 2.4.2. IZDVAJANJE KSILITOLA

Pročišćavanje i izolacija ksilitola iz prevrele podloge posljednji je i najzahtjevniji korak u cijelom proizvodnom postupku zbog relativno niske koncentracije ksilitola u prevreloj podlozi, složenog sastava prevrele podloge te prisutnosti drugih proizvoda fermentacije (Rafiqul i Mimi Sakinah, 2013). Izdvajanje ksilitola provodi se (**Slika 3**) kromatografskim metodama, membranskim metodama ili kristalizacijom.

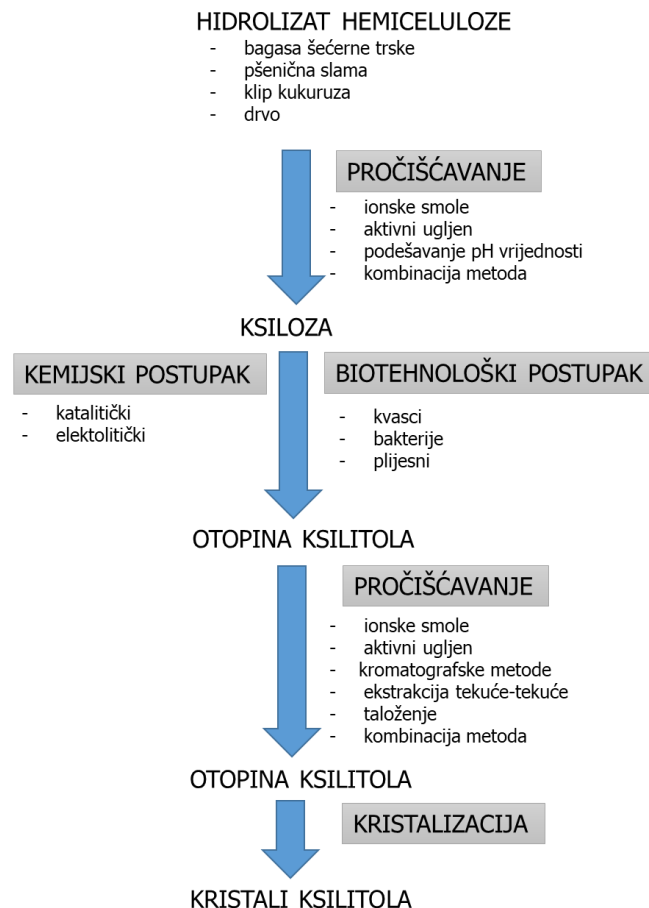
Kromatografska metoda temelji se na razdvajanju komponenata smjese zbog interakcije komponenata smjese s mobilnom odnosno stacionarnom fazom što uzrokuje razdvajanje komponenata smjese (Jaworska i sur., 2020).

Membranskim metodama koje se koriste za izdvajanje ksilitola iz fermentirane podloge može se postići visoka čistoća proizvoda uz relativno mali utrošak energije.

Kristalizacija je metoda izolacije ksilitola koja obuhvaća sljedeće korake: pripremu prezasićene otopine, nukleaciju odnosno stvaranje jezgre kristala, rast kristala, agregaciju te ostale sekundarne procese (Aliakbarian i sur., 2012). Kontrolirano formiranje i rast kristala

provodi se praćenjem ravnoteže i procesnih parametara poput miješanja, temperature, čistoće otopine te brzine hlađenja. Kod biotehnoške proizvodnje ksilitola metode izdvajanja ovise o kvaliteti željenog proizvoda te o sastavu fermentirane hranjive podloge koja sadrži radni mikroorganizam, dijelove stanica kao i druge kontaminante. Prevrela podloga se centrifugira s ciljem uklanjanja biomase te se koncentrira kako bi se povećala koncentracija ksilitola. Izbor metode izolacije ksilitola ovisi o karakteristikama ksilitola poput veličine molekula i prisutnih nečistoća u prevreloj podlozi (Martínez i sur., 2015).

Ksilitol je izoliran primjenom 60%-tne i 90%-tne (vol vol<sup>-1</sup>) vodene otopine etanola pri 5, 25 i 40 °C (Vyglazov, 2004). Osim navedenog, provedena su ispitivanja u kojima je kristalizacija bila potaknuta dodatkom organskih otapala kao što su aceton, metanol i etanol. Također provedena je i kristalizacija u sintetskom mediju s koncentracijom ksilitola od 728 g L<sup>-1</sup> pri čemu se kristalizacija provodila na -6°C (Martínez i sur., 2015).



**Slika 3.** Prikaz izolacije ksilitola (prilagođeno iz Martínez i sur., 2015).

## 2.5. PLIJESAN *Mucor indicus*

Plijesan *Mucor indicus* pripadnik je koljena *Zygomycota*, razreda *Zygomycetes*, reda *Mucorales* te porodice *Mucoraceae*. Ovu vrstu plijesni karakterizira dimorfizam, ima mogućnost rasta u filamentoznom obliku i u obliku kvasca ovisno o uvjetima poput koncentracije šećera, početnoj koncentraciji spora te o prisutnosti kisika u podlozi. Visoka koncentracija početnog inokuluma u anaerobnim uvjetima rezultira rastom *Mucor indicus* u obliku kvasca, dok niska koncentracija početnog inokuluma i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima uzrokuje rast plijesni u filamentoznom obliku (Karimi i Zamani, 2013; Satari i sur., 2016). *M. indicus* ovisno o morfologiji, filamentozni oblik ili oblik kvasca, koristi različite heksoze u proizvodnji etanola. Poznat je kao Crabtree pozitivan mikroorganizam jer osim što proizvodi etanol iz heksoza u anaerobnim uvjetima, ima mogućnost produkcije etanola i u aerobnim uvjetima. U anaerobnim uvjetima fermentira heksoze, kao što su glukoza, fruktoza, manoza i galaktoza, do etanola kao jednog od produkata metabolizma (Sues i sur., 2005). Osim navedenog posjeduje sposobnost konverzije ksiloze do etanola u aerobnim i mikroaerofilnim uvjetima, kao i mogućnost konverzije ksiloze do ksilitola isključivo u aerobnim uvjetima (Karimi i Zamani, 2013). Etanol i ksilitol sporedni su metaboliti prilikom aerobne kultivacije pomoću *Mucor indicus*, dok je glavni produkt sama biomasa plijesni (Millati i sur., 2005). Uz navedeno posjeduje otpornost na inhibitore prisutne u lignoceluloznim hidrolizatima poput octene kiseline, furfurala i hidroksimetilfurfurala. *M. indicus* proizvodi polinezasićene masne kiseline ( $C_{15} - C_{18}$ ) koje omogućavaju fleksibilnost i permeabilnost stanične membrane pri čemu je najvažnija  $\gamma$ -linolenska kiselina. Stanična stjenka odgovorna je za oblik stanice, a osim toga omogućava zaštitu i interakciju stanice i okoline. Staničnu stjenku *M. indicus* čine hitozan u većoj mjeri i hitin u manjoj pri čemu hitozan štiti hitin od razgradnje s enzimima hitinazama (EC 3.2.1.14). Osim toga sadržaj stanične stjenke čine i anionski polimeri, lipidi, proteini i minerali. Izniman značaj mikroorganizama iz koljena *Zygomycota* javlja se s razvojem biotehnološke proizvodnje biogoriva, antibiotika, enzima, hrane i kemikalija. Plijesan *M. indicus* koristi se u proizvodnji fermentirane hrane kao tampe (fermentirana soja) i raga te raga starter kultura. (Karimi i Zamani, 2013; Sues i sur., 2005).

Stanična stijenka plijesni *M. indicus* kao što je već spomenuto sadrži hitin i hitozan. Radi se o polimerima *N*-acetil glukoamina i njegovim deacetiliranim derivatima koji se određuju mjerenjem količine *N*-acetil glukoamina i glukoamina (Karimi i Zamani, 2013; Zamani i sur., 2008). Hitozan, kemijske formule  $\beta$ -1,4-glukozamin, se dobiva kemijskom ili spontanom deacetilacijom  $\beta$ -1,4-*N*-acetil-D-glukoamina odnosno hitina. Stabilna fizikalno-

kemijska svojstva *Zygomyceta* osiguravaju dostatan izvor hitozana, što je postignuto manipulacijom parametara rasta kao što su pH i sastav hranjive podloge tijekom fermentacije (Nadarajah i sur., 2001). Hitin i hitozan potrebno je izolirati iz biomase plijesni kako bi se mogli koristiti u farmaceutskoj, prehrambenoj i poljoprivrednoj industriji zbog antimikrobnih i biorazgradivih svojstava (Lewandowska i sur., 2016).

Navedena plijesan ima mogućnost produkcije polinezasićenih masnih kiselina koje utječu na fleksibilnost i permeabilnost stanične membrane. Jedna od najvažnijih polinezasićenih masnih kiselina je  $\gamma$ -linolenska kiselina čija se uloga u ljudskom organizmu očituje u regulaciji bioloških funkcija. Geni koji kodiraju za delta-6-desaturazu, koja provodi konverziju linolenske u  $\gamma$ -linolensku kiselinu, najčešće je eksprimirana tijekom faze klijanja spora plijesni *M. indicus* (Karimi i Zamani, 2013). Osim navedene  $\gamma$ -linolenske kiseline, stanična stjenka plijesni sadrži i palmitinsku kiselinu (C16:0), oleinsku kiselinu (C18:1), C18:2 trans 6,9, linolnu kiselinu (C18:2 cis 9,12) te linolensku kiselinu (C18:3 cis 6,9,12). Spomenute polinezasićene masne kiseline mogu se primijeniti u proizvodnji biodizela kao i u prehrambenoj industriji (Satari i sur., 2015).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Sirovine

Kao sastavni dio hranjive podloge za uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 korišten je hidrolizat otpadne trave (tekući dio) dobiven kiselinom predobradom u visokotlačnom reaktoru pri slijedećim uvjetima:  $w(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,5\%$  (w/w),  $t = 200^\circ\text{C}$ ,  $t_{\text{zadržavanja}} = 5$  minuta.

##### 3.1.2. Mikroorganizam

Kao radni mikroorganizam koristila se plijesan *Mucor indicus* DSM 2185 iz zbirke mikroorganizama „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ (DSMZ, Braunschweig, Njemačka).

##### 3.1.3. Kemikalije

**Tablica 1.** Popis kemikalija korištenih za pripremu podloga i pripremu uzoraka.

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
D-(+)-glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
D-(+)-ksiloza	p.a.	
kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	
Diamonijev sulfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Diamonijev fosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Tween 80®	p.a.	Merck, Njemačka
Natrijev klorid	p.a.	Kemika, Hrvatska
Aktivni ugljen	-	Merck, Njemačka
Natrijev hidroksid	p.a.	Kemika, Hrvatska
Cinkov sulfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Sumporna kiselina	min 96%, p.a.	Merck, Njemačka

**Tablica 1.** Popis kemikalija korištenih za pripremu podloga i pripremu uzoraka (nastavak).

<b>Kemikalija</b>	<b>Čistoća</b>	<b>Proizvođač</b>
Octena kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
C13:OME	p.a.	Supelco, SAD
Kloroform	p.a.	Macron Fine Chemicals, SAD
Metanol	p.a.	J. T. Baker, SAD
Klorovodična kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
Heksan	p.a.	Kemika, Hrvatska
Etanol	p.a.	Gram Mol, Hrvatska
Aceton	p.a.	Gram Mol, Hrvatska
Izopropanol	p.a.	J. T. Baker, SAD

## **3.2. APARATURA I PRIBOR**

### **3.2.1. Bioreaktor s mješalom**

U ovom radu korišten je bioreaktor s mješalom (B. Braun Biotech International, Berlin, Njemačka) korisnog volumena 2 L (*Slika 4*). Bioreaktor je opremljen pH elektrodom, sustavom za izuzimanje uzoraka, sustavom za regulaciju pH, sustavom za prepumpavanje podloge i inokulaciju i temperaturnom sondom. Grijanje i hlađenje podloge u reaktoru provodi se cirkuliranjem vode kroz plašt. Sterilizacija se provodi u autoklavu pri 120°C i tijekom 20 min.



**Slika 4.** Bioreaktor s mješalom (B. Braun Biotech International, Berlin, Njemačka).

### **3.2.2. Sustav za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (eng. Ultra Performance Chromatography, UPLC)**

UPLC (Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) uređaj tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti sastoji se od crpke (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Viasampler), pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) s pretkolonom, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS).

### **3.2.3. Sustav za plinsku kromatografiju**

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

### **3.2.4. Ostala oprema**

- tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- analitička vaga Shimadzu (Kyoto, Japan);
- autoklav Sutjeska;
- sušionik Instrumentarija ST-50 (Zagreb, Hrvatska);
- pH metar 744, Metrohm (Herisau, Švicarska);
- Eppendorf kivete
- Büchner lijevak
- Erlenmeyer tikvice
- tikvice s okruglim dnom
- Petrijeve zdjelice
- filter papir
- bočica za plinsku kromatografiju

### **3.3. METODE**

#### **3.3.1. Priprema podloge**

Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma sastoji se od 50 g L<sup>-1</sup> glukoze, 5 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta, 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog sulfata, 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog fosfata otopljenog u demineraliziranoj vodi.

Hranjiva podloga za uzgoj u bioreaktoru s mješalom sastoji se od detoksificiranog hidrolizata otpadne trave dobivenog nakon kiseline predobrade otpadne trave u visokotlačnom reaktoru (200°C/ 5 minuta / 0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) u koji je dodano 5 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta, 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog sulfata i 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog fosfata kao izvora dušika i ostalih hranjiva.

Sve podloge su sterilizirane u autoklavu pri 121°C tijekom 20 minuta.

##### *3.3.1.1. Detoksifikacija hidrolizata otpadne trave*

Hidrolizatu volumena 1,25 L pH-vrijednost je podešena na pH vrijednost od 6 jedinica dodatkom natrijeve lužine koncentracije 4 mol L<sup>-1</sup> te je u hidrolizat dodano 25 g aktivnog ugljena. Dobivena suspenzija inkubirala se 1 sat pri 28 °C uz miješanje ( $n = 200 \text{ min}^{-1}$ ) na tresilici. Suspenzija je zatim profiltrirana kroz Büchner-ov lijevak, a dobiveni filtrat (detoksificiran hidrolizat otpadne trave) je korišten za pripravu hranjive podloge za uzgoj u bioreaktoru.

#### **3.3.2. Priprema inokuluma plijesni *Mucor indicus* DSM 2185**

Podloga za uzgoj inokuluma ( $V = 250 \text{ mL}$ ) je nacijepljena sa suspenzijom spora plijesni *M. indicus* nakon čega je inkubirana na tresilici pri 28°C kroz 48 sata. Za pripravu suspenzija spora korištena je sterilna otopina Tween 80® (koncentracija Tween80=0,04%) u 0,09% natrijevom kloridu.

### 3.3.3. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 i proizvodnja ksilitola u bioreaktoru s mješalom

Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 proveden je u bioreaktoru B. Braun Biotech (Berlin, Njemačka). Podloga korisnog volumena 1,25 L (ukupni volumen 1,5 L) nacijepljena je sa poraslom kulturom plijesni *M. indicus* (2,5% vol/vol) u aseptičnim uvjetima. Uzgoj je proveden u aerobnim uvjetima uz aeraciju od 0,4 vol vol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> i brojem okretaja mješala od 200 min<sup>-1</sup> pri temperaturi od 28°C. Tijekom uzgoja pH vrijednost podloge nije korigirana, a na početku uzgoja iznosila je 6 jedinica. Pjenjenje je kontrolirano dodatkom Antifoam 204. Uzorci su izuzimani kroz 6 dana u pravilnim vremenskim intervalima, te su analizirani UPLC metodom. Rast plijesni praćen je mikroskopiranjem.

Nakon završenog bioprocesa biomasa i prevrela podloga razdvojeni su centrifugiranjem. Supernatant je korišten za izdvajanje ksilitola (poglavlje 3.3.7.), a biomasa plijesni stavljena je na sušenje kako bi se odredila ukupna masa proizvedene biomase na kraju procesa (poglavlje 3.3.4.), te kako bi se koristila za izdvajanje hitina, hitozana (poglavlje 3.3.8.) i određivanje ukupnih lipida i sastava masnih kiselina (poglavlje 3.3.9.).

### 3.3.4. Određivanje suhe tvari biomase

Tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u bioreaktoru s mješalom zbog filamentoznog oblika rasta micelija nije bilo moguće izuzeti reprezentativan uzorak biomase iz bioreaktora, te je određivanje suhe tvari biomase provedeno na početku i na kraju bioprocesa filtracijom na Büchnerovom lijevku. Za filtraciju je korišten prethodno osušen i odvagani filter papir.

Nakon filtracije biomasa je stavljena na sušenje u sušionik Instrumetaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska) pri 60°C do konstantne mase. Nakon toga biomasa je ohlađena u eksikatoru te im je izvagana masa.

Prinos biomase plijesni tijekom cijelog bioprocesa izračunat je prema slijedećoj formuli:

$$\Delta m = m_p - m_k \quad [3-1]$$

gdje je

$m_p$ , početna koncentracija biomase [g]

$m_k$ , konačna koncentracija biomase [g]

### 3.3.5. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) korištena je za praćenje koncentracije ksilitola, etanola, octene kiseline, glicerola, ksiloze i glukoze u izuzetim uzorcima. Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M sumporna kiselina s protokom 0,6 mL min<sup>-1</sup>. Volumen uzorka za injektiranje je iznosio 10  $\mu$ L. Za razdvajanje komponenti uzorka korištena je analitička kolona Rezex ROA-Organic Acid H+, (dimenzija 150 $\times$ 7.8 mm, Phenomenex, SAD) s odgovarajućom predkolonom pri 55°C. Detektor indeksa loma (G7162A 1260 RID) primijenjen je za detekciju, a OpenLAB CDS računalni program za obradu podataka. Priprema uzorka za UPLC analizi provedena je kako je to opisano u poglavlju 3.3.6.

**Tablica 2.** Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracije spojeva tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti (UPLC)

Spoj	Retencijsko vrijeme, $t_R$ (min)	Jednadžba baždarnog pravca	$R^2(-)$
Arabinoza	5,6080 $\pm$ 0,0000	$A = 151554 \gamma_{\text{Arabinoza}} - 7676,4$	0,9998
Etanol	11,1000 $\pm$ 0,0000	$A = 361299,75 \gamma_{\text{Etanol}} + 27468,6$	1,0000
Galaktoza	5,1080 $\pm$ 0,0000	$A = 146529 \gamma_{\text{Galaktoza}} + 4914,5$	0,9999
Glicerol	7,0067 $\pm$ 0,0007	$A = 120817 \gamma_{\text{Glicerol}} - 3671,6$	0,9997
Glukoza	4,7000 $\pm$ 0,0000	$A = 132342 \gamma_{\text{Glukoza}} + 1503,7$	0,9999
Ksilitol	5,8000 $\pm$ 0,0000	$A = 147029 \gamma_{\text{Ksilitol}} + 3656,8$	1,0000
Ksiloza	5,1910 $\pm$ 0,1707	$A = 142576 \gamma_{\text{Ksiloza}} - 3815,8$	0,9999
Octena kiselina	7,7924 $\pm$ 0,0045	$A = 8664,6 \gamma_{\text{Octena kiselina}} - 67,234$	0,9992

A= površina

### 3.3.6. Priprema uzoraka i taloženje proteina

Supernatant dobiven nakon centrifugiranja (5 minuta/ 6000 okretaja/min; centrifuga SL 8R ThermoScientific; Waltham, Massachusetts, SAD) korišten je za pripremu uzoraka za UPLC analizu. Po 750  $\mu$ L supernatanta uzorka dodano je u 750  $\mu$ L otopine cinkovog sulfata

heptahidrata koncentracije  $100 \text{ g L}^{-1}$ . Dobivena otopina zatim je intenzivno izmiješana 20 sekundi i ostavljena na sobnoj temperaturi kroz 10 minuta. Nakon toga uzorci su centrifugirani 10 minuta na 10000 o/min. Centrifugiranjem su istaloženi proteini i nečistoće. Tako dobiven supernatant se profiltrira kroz najlonski filter veličine pora  $0,22 \mu\text{m}$  (LLG-Syringe filters Spheros Nylon, 0.22 um promjer 25 mm, Meckenheim, Njemačka) u vialu volumena 2 mL.

### 3.3.7. Izdvajanje ksilitola kristalizacijom

Za izdvajanje ksilitola iz modelnih otopina primijenjena je metoda kristalizacije. Korištene modelne otopine za izdvajanje ksilitola su:

- (1) otopina ksilitola u destiliranoj vodi koncentracije  $700 \text{ g L}^{-1}$ ;
- (2) supernatant podloge dobivene nakon provedenog uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u koju je dodan ksilitol tako da konačna koncentracija ksilitola iznosi  $700 \text{ g L}^{-1}$  (u ovoj podlozi osim ksilitola nalaze se i drugi spojevi poput etanola, glicerola, neprevrelih šećera i razgradnih produkata lignoceluloze koji nastaju nakon kiselinske predobrade).

**Tablica 3.** Volumeni i koncentracije otapala korištenih za kristalizaciju ksilitola iz modelnih otopina.

modelna otopina		otapalo			
		acetone w = 100%	etanol $\varphi=60\%$	etanol $\varphi=99,6\%$	isopropanol w=100%
V [mL]		V [mL]	V [mL]	V [mL]	V [mL]
(1)	20	20	20	20	80
(2)	20	20	20	20	80

Po 20 mL modelne otopine izmiješano je sa 20 mL otapala navedenim u Tablici 3. Tako pripremljeni uzorci hlade se na  $4^{\circ}\text{C}$  tjedan dana, nakon čega su uzorci centrifugirani 15 minuta pri 6800 rpm. Supernatant je odekantiran, a istaloženi ksilitol je osušen do konstantne mase i izvagan na analitičkoj vagi.

Iskorištenje procesa računa se prema formuli:



$$Y = \frac{m(\text{istaloženi ksilitol})}{m(\text{ukupni ksilitol})} * 100 \quad [\%] \quad [3-2]$$

### 3.3.8. Određivanje hitina i hitozana u biomasi plijesni

Za izdvajanje hitina i hitozana korišteno je 3 g osušene i usitnjene biomase plijesni *M. indicus* DSM 2185. Biomasa je suspendirana u 90 mL natrijeve lužine ( $\gamma = 20 \text{ g L}^{-1}$ ) i kuhana dva sata pri 90°C (omjer volumena otopine NaOH i mase suhe tvari biomase iznosi 30:1). Alkalno netopljiva frakcija odvojena je centrifugiranjem (6800 rpm/15 min). Dobiveni supernatant je odekantiran, a netopljivi talog se resuspendira s destiliranom vodom i centrifugira pri istim uvjetima. Postupak ispiranja se provodi dok se ne postigne neutralna pH (pH 7) vrijednost supernatanta. Neutraliziranom talogu dodaje se 120 mL 10%-tne octene kiseline (omjer volumena otopine HAc i mase suhe tvari biomase iznosi 40:1) te se dobivena suspenzija kuha tijekom 6 sati uz refluks i povremeno miješanje. Hitin se izdvaja centrifugiranjem pri 6800 rpm tijekom 15 minuta. Zatim se ispire s destiliranom vodom do neutralne vrijednosti, a hitozan se izdvaja iz supernatanta dodavanjem 4 M natrijeve lužine i podizanjem pH vrijednosti supernatanta na 9 jedinica. Vakuum filtracijom na Büchnerovom lijevku izdvaja se hitozan. Kristali hitina i hitozana se ispiru s destiliranom vodom do neutralne pH vrijednosti, a zatim sa etanolom (omjer volumena etanola i mase suhe tvari biomase iznosi 20:1) i acetonom (omjer volumena acetona i mase suhe tvari biomase iznosi 20:1). Dobiveni kristali suše se pri 60°C do konstantne mase (Pochanavanich i Suntornsuk, 2002).

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

Sastav i koncentracija masnih kiselina u biomasi plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 određeni su metodom plinske kromatografije s plameno-ionizacijskom detekcijom (GC-FID). Prije analize uzoraka GC-FID metodom potrebno je provesti transesterifikaciju masnih kiselina u metilne estere i zatim ekstrakciju u odgovarajuće otapalo (npr. heksan).

#### 3.3.9.1. Priprema uzorka za GC-FID analizu

Transesterifikacija masnih kiselina u metilne estere provodila se prema NREL protokolu (Wychem i Laurens, 2013).

Izvagano je 10 mg biomase plijesni *M. indicus* DSM 2185 koja se potom premješta u staklene kivete volumena 10 mL osušenih u eksikatoru preko noći. U kivetu je zatim potrebno dodati 20  $\mu\text{L}$  metil tridekanoata ( $\gamma_{\text{C13:0ME}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ; interni standard 1), 200  $\mu\text{L}$  otopine kloroform:metanol (2:1, v/v) i 300  $\mu\text{L}$  0.6 M otopine HCl:metanola. Sadržaj kivete izmiješan je na vibro-mješaču, a nakon toga stavljen u vodenu kupelj na 85°C kroz 1 sat kako bi se provela transesterifikacija masnih kiselina prisutnih u uzorku biomase. Nakon termostatiranja u vodenoj kupelji kivete su ohlađene na sobnu temperaturu nakon čega je u ohlađeni uzorak dodan 1 mL heksana. Zatim je sadržaj bočice izmiješan na vibro-mješaču kako bi se provela ekstrakcija nastalih estera u heksansku fazu i ostavljen 1 sat na sobnoj temperaturi da se razdvoje faze. Gornji heksanski sloj nakon izdvajanja se prema potrebi može razrijediti dodatkom heksana. Volumen od 200  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg razrijeđenja ili originala heksanske faze otpipetira se u vialu za plinsku kromatografiju u koju je dodano 5  $\mu\text{L}$  pentadekana ( $\gamma = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ; interni standard 2) i zatvori sa PTFE/silikonskim čepom. Ovako pripremljeni uzorak koristi se za analizu estera masnih kiselina na GC-FID-u.

#### 3.3.9.2. GC-FID analiza

GC-FID analiza provedena je na GC- 2010 Plus uređaju (Shimadzu, Kyoto, Japan; poglavlje 3.3.9.). Uvjeti/parametri metode pri kojima je provedena analiza sastava estera masnih kiselina prikazana je u Tablici 4. Identifikacija i kvantifikacija estera masnih kiselina provedena je usporedbom sa retencijskim vremenima i baždarnim dijagramima određenim za metilne estere standardne smjese 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 - C24, Supelco) prema uvjetima navedenim u Tablici 4. Sastav metilnih estera masnih kiselina izražen je masenim udjelom (%) pojedine masne kiseline u uzorku.

**Tablica 4.** Parametri GC-FID metode za određivanje sastava i koncentracije estera masnih kiselina.

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

$d_f$ , debljina filma

Izračun ukupnih masnih kiselina provodi se prema formuli:

$$\text{Ukupni lipidi}_{c13 \text{ normal}} = \sum_{C4-C24} \frac{FAME \text{ ci}}{FAME \text{ c13}} \times c \text{ dodanog FAME c13} \quad [3-3]$$

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

$$\% \text{ ukupni FAME} = \frac{\text{ukupni FAME c13 normal}}{\text{masa suhe tvari uzorka}} \times 100 \quad [3-4]$$

### 3.4. Izračun parametara uspješnosti procesa

Za izračun parametara uspješnosti procesa korištene su sljedeće formule (Marić i Šantek, 2009):

1) koeficijent konverzije supstrata u produkt ( $Y_{P/UH}$ )

$$Y_{P/UH} = \frac{(P-P_0)}{(UH-S)} = \frac{\Delta P}{\Delta UH} = \frac{Y_P}{\Delta UH} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [3 - 5]$$

$UH_0, P_0$  – početna koncentracija ukupnih ugljikohidrata ili produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$UH, P$  – konačna koncentracija supstrata ili produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$Y_P$  – prinos produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ]

2) produktivnost ( $Pr$ )

$$Pr = \frac{Y_X \text{ ili } Y_{\text{ksilitol}}}{t_U} \quad [\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}] \quad [3 - 6]$$

$Y_X$  – prinos biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$Y_{\text{ksilitol}}$  – prinos ksilitola [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$t_U$  – ukupno vrijeme bioprocesa [h]

3) efikasnost

$$E = \frac{Y_{P/S}}{Y_{P/S}(\text{teor})} \quad [3 - 7]$$

$Y_{P/S}$  – koeficijent konverzije supstrata u produkt [ $\text{g g}^{-1}$ ]

$Y_{P/S}(\text{teor.})$  – teorijski koeficijent konverzije supstrata u produkt [ $\text{g g}^{-1}$ ]

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

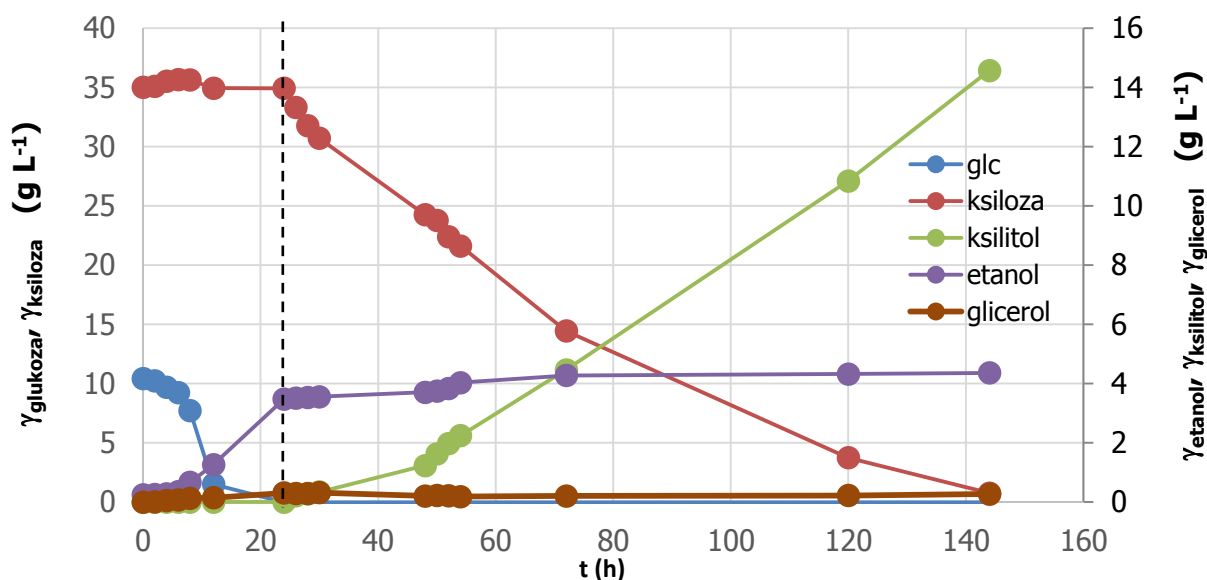
U ovom radu provedena je proizvodnja ksilitola s pomoću plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 u bioreaktoru s mješalom šaržnim postupkom. Uzgoj je proveden na podlozi u kojoj je kao glavni izvor ugljika korišten hidrolizat otpadne trave. Hidrolizat otpadne trave dobiven je kiselinskom predobradom u viskotlačnom reaktoru, te od fermentabilnih ugljikohidrata sadrži glukozu, ksilozu i arabiozu. Nakon provedenog uzgoja biomasa je izdvojena filtracijom. Biomasa i supernatant su korišteni za izdavanje određenih proizvoda. Iz supernatanta kristalizacijom pri različitim uvjetima provedeno je izdavanje ksilitola, a biomasa plijesni *M. indicus* korištena je, zbog specifičnog sastava stanične stjenke, za izolaciju hitina i hitozana. Hitozan je iznimno koristan linearni polisaharid koji ima primjenu u biomedicini (Satari i sur., 2016). Plijesan *M. indicus*, osim navedenog, pripada skupini oleiginoznih plijesani, te se ovaj mikroorganizam potencijalno može koristiti i u proizvodnji biodizela ili u prehrambenoj industriji (Satari i sur., 2016). Stoga je u ovom radu određen sastav masnih kiselina koje, u određenim uvjetima, nakuplja ova plijesan.

Rezultati ovog rada podijeljeni su u sljedeća poglavlja:

- 4.1. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na hidrolizatu otpadne trave
- 4.2. Izdavanje ksilitola
- 4.3. Izdavanje hitina i hitozana iz biomase plijesni *Mucor indicus* DSM 2185
- 4.4. Određivanje sastava lipida iz biomase plijesni *Mucor indicus* DSM 2185

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

Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 proveden je u bioreaktoru s mješalom ( $V_k = 1,25$  L) šaržnim postupkom na detoksificiranom hidrolizatu otpadne trave (poglavlje 3.3.1.1.) u koji je kao izvor dušika i faktora rasta dodano  $5 \text{ g L}^{-1}$  kvašćevog ekstrakta,  $2 \text{ g L}^{-1}$  diamonijevog sulfata i  $2 \text{ g L}^{-1}$  diamonijevog fosfata. Uzgoj je proveden pri broju okretaja mješala od  $200 \text{ min}^{-1}$ , pH vrijednosti od 6 jedinica, temperaturi uzgoja od  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , te uz aeraciju od  $0,4 \text{ vol vol min}^{-1}$ . Na slici 5. prikazana je promjena koncentracije supstrata i glavnih produkata tijekom uzgoja na hidrolizatu otpadne trave.



**Slika 5.** Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, ksilitola i etanola tijekom uzgoja plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 u bioreaktoru s mješalom na hidrolizatu otpadne trave.

**Tablica 5.** Određeni kinetički i procesni parametri proizvodnje ksilitola s pomoću plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na hidrolizatu otpadne trave.

Parametar	Vrijednost
$Y_X$	8,38 g L <sup>-1</sup>
$Y_{X/UH}$	0,18 g g <sup>-1</sup>
$Y_{\text{etanol}}$	4,46 g L <sup>-1</sup>
$Y_{\text{ksilitol}}$	14,57 g L <sup>-1</sup>
$Y_{\text{glicerol}}$	0,27 g L <sup>-1</sup>
$Y_{\text{ksilitol/UH}}$	0,32 g g <sup>-1</sup>
$Y_{\text{etanol/UH}}$	0,10 g g <sup>-1</sup>
$Y_{\text{glicerol/UH}}$	0,01 g g <sup>-1</sup>
$Y_{\text{ksilitol/ksiloza}}$	0,42 g g <sup>-1</sup>
$Pr_X$	0,06 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
$Pr_{\text{ksilitol}}$	0,11 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

\*UH, ukupni ugljikohidrati

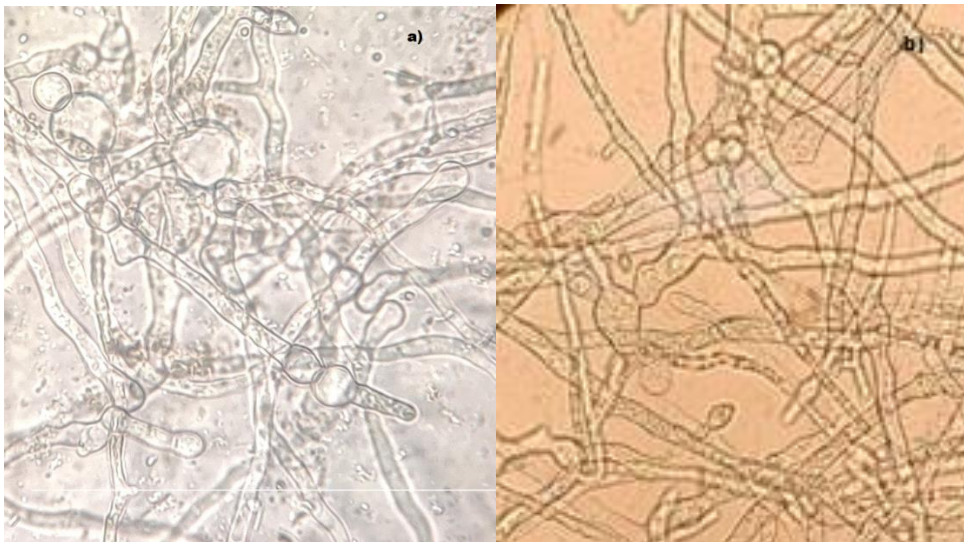
Tijekom uzgoja plijesan *Mucor indicus* DSM 2185 pokazuje tipičan diauksični rast, tj. prvo iz podloge iscrpljuje glukozu, a zatim nakon 24 h uzgoja, započinje potrošnja ksiloze (Slika 5.). U prvih 24 sata uzgoja ne proizvodi se ksilitol, nego se sva glukozu iz podloge prevodi u etanol ( $\gamma_{\text{EtOH}, 24 \text{ h}} = 3,48 \text{ g L}^{-1}$ ), iako se proces vodi u aerobnim uvjetima. Nakon 24 h uzgoja značajno se smanjuje proizvodnja etanola, te do kraja procesa u podlozi je detektirano samo 4,46 g L<sup>-1</sup> etanola. Koeficijent konverzije ukupnih ugljikohidrata, prisutnih u hidrolizatu otpadne trave u etanol iznosi 0,10 g g<sup>-1</sup>, te je značajno manji od koeficijenta konverzije ukupnih ugljikohidrata prisutnih u hidrolizatu rižine slame u etanol (0,24 g g<sup>-1</sup>) određenog tijekom uzgoja *M. indicus* na detoksificiranom hidrolizatu rižine slame u radu Karimi i sur. (2006).

Ova plijesan iz ksiloze proizvodi gotovo isključivo ksilitol (količina proizvedenog etanola od 24 h uzgoja do 144 h uzgoja iznosi svega 0,98 g L<sup>-1</sup>). Ksilitol je ekstracelularni metabolit, a na njegovu proizvodnju utječu faktori poput sastava hranjive podloge, stanja primijenjene kulture, gustoće stanica te brzina rasta (Mohamad i sur., 2015). Tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 na hidrolizatu otpadne trave proizvedeno je 14,57 g L<sup>-1</sup> ksilitola uz ostvareni koeficijent konverzije ukupnih ugljikohidrata u ksilitol (Tablica 5.) od 0,32 g g<sup>-1</sup>.

U radu Karimi i sur. (2006) koeficijent konverzije bio je skoro dva puta manji i iznosio je samo 0,18 g ksilitola po gramu ugljikohidrata prisutnih u hidrolizatu rižine slame. Tijekom uzgoja dolazi do stvaranja vrlo malih koncentracija glicerola ( $\Delta Y_{\text{glicerol}} = 0,27 \text{ g L}^{-1}$ ;  $Y_{\text{glicerol/UH}} = 0,01 \text{ g g}^{-1}$ ) te je značajno manji od istih ( $Y_{\text{glicerol/UH}} = 0,08 \text{ g g}^{-1}$ ) određenih u radu Karimi i sur. (2006). Autori Sues i sur. (2005) proveli su uzgoj plijesni *M. indicus* na hidrolizatu drva u aerobnim uvjetima te je postignut prinos etanola i glicerola od 10 i 1.8 g L<sup>-1</sup> što odgovara koeficijentima konverzije od 0,42 i 0,07 g g<sup>-1</sup> za etanol i glicerol. Tijekom navedenog bioprocasa ksilitol nije proizveden iako je ksiloza bila prisutna u podlozi.

Koncentracija biomase nije mogla biti određivana tijekom ovog uzgoja zbog rasta plijesni u obliku micelija (Slika 6.), te se zbog toga nije mogao izuzeti reprezentativan uzorak biomase. Tijekom uzgoja mikroskopiranjem je praćena morfologija plijesni *M. indicus* (Slika 6.). Koncentracija biomase je određena na početku i na kraju bioprocasa te je određeno da prinos biomase iznosi 8,38 g L<sup>-1</sup>, a koeficijent konverzije ukupnih ugljikohidrata u biomasu iznosi 0.18 g g<sup>-1</sup> (Tablica 5.), što je 25% manje od  $Y_{X/UH}$  određenog u radu Sues i sur. (2005) odnosno 50% manje od  $Y_{X/UH}$  određenog u radu Karimi i sur. (2006).

Biomasa ovog mikroorganizma predstavlja vrijedan nusproizvod zbog visokog udjela hitina i hitozana u biomasu (poglavlje 4.3., Sharifyazd i Karimi, 2017; Karimi i Zamani, 2013), te zbog sposobnosti nakupljanja lipida (Karimi i Zamani, 2013, poglavlje 4.4.) čime ga se može svrstati u mikroorganizme s potencijalnom primjenom u razvoju biorafinerijskog koncepta.



**Slika 6.** Plijesan *Mucor indicus* nakon 24. (slika lijevo) i nakon 72. sata (slika desno) uzgoja slikano optičkim mikroskopom pri ukupnom povećanju od 400 x.



## 4.2. Izdvajanje ksilitola

Provedeni su preliminarni eksperimenti kako bi se odredilo najpovoljnije antiotapalo (otapalo koje ima malu topljivost ksilitola) koje smanjuje topljivost ksilitola u sustavu voda-otapalao u zasićenoj otopini ( $\gamma_{ksilitol} = 700 \text{ g L}^{-1}$ ). Izolacija ksilitola iz modelne otopine ksilitola u vodi (1) i modelne otopine ksilitola u hidrolizatu otpadne trave nakon provedenog bioprocesa (2) provedena je prema prethodno opisanom postupku u Poglavlju 3.3.7. Dobiveni rezultati procesa izdvajanja ksilitola kristalizacijom uz dodatak antiotapala prikazani su u Tablici 6., a izgled kristala ksilitola izoliranih iz dvaju modelnih otopina prikazani su na slici 7.

**Tablica 6.** Iskorištenje procesa izdvajanja ksilitola iz modelnih otopina.

Modelna otopina (MO)	Omjer otapalo / modelna otopina				
	acetan <sub>100%</sub> :MO = 1:1	etanol <sub><math>\varphi=60\%</math></sub> :MO = 1:1	etanol <sub><math>\varphi=99,8\%</math></sub> :MO = 1:1	isopropanol <sub>100%</sub> :MO = 1:1	isopropanol <sub>100%</sub> :MO = 1:4
	Iskorištenje procesa (%)				
(1)	30,95	9,89	14,92	0	10,99
(2)	9,95	9,97	17,87	0	11,74

(1) Vodena otopina ksilitola

(2) Otopina ksilitola u hidrolizatu otpadne trave

Izdvajanje ksilitola najzahtjevniji je dio proizvodnje ksilitola zbog niske koncentracije proizvoda kao i zbog kompleksnog sastava hranjive podloge (De Faveri i sur., 2004). Iz modelnih otopina sa  $700 \text{ g L}^{-1}$  ksilitola provedena je izolacija kristalizacijom uz dodatak antiotapla kao što su aceton, etanol i izopropanol. Omjeri otapala i modelnih otopina korišteni za izdvajanje ksilitola prikazani su u Tablici 6. Topljevost ksilitola u ovim otapalima je vrlo mala, iako se dodatkom ovih otapala razrijeđuje koncentracija ksilitola, postiže se taloženje kristala ksilitola (Wang i sur., 2007).

Iskrištenje postupaka kristalizacije iz modelnih otopina uz dodatak antiotapala kretalo se u rasponu od 0 do 30,95 %. Povećanjem udjela etanola u otopini pridonosi većem iskorištenju procesa izdvajanja ksilitola i u vodenoj otopini ksilitola i u otopini ksilitola u hidrolizatu otpadne trave (Tablica 6). Izopropanol se pokazao kao najnepogodnije otapalo za izdvajanje ksilitola, te je tek pri omjeru modelne otopine i izopropanola od 1:4 uzrokovao taloženje ksilitola.

Najveće iskorištenje postupka kristalizacije ksilitola iz vodene otopine postignuto je uz upotrebu acetona i iznosi 30,95 %, a iz hidrolizata otpadne trave uz upotrebu etanola i iznosi samo 17,87 %. U usporedbi s kristalizacijom koja je potaknuta dodatkom otopine etanola (1:1) koju su proveli Wei i sur. (2010), pratio se prinos ksilitola nakon 24 i 48 sati pri čemu su ostvareni prinosi od 52,67 % odnosno 56,67 % nakon 48 satne kristalizacije.

Izgled kristala ksilitola istaloženih iz vodene otopine ksilitola bili su bijele boje, dok su kristali ksilitola izolirani iz hidrolizata otpadne trave smeđe obojeni (Slika 7.). Obojenost kristala ksilitola je posljedica interferencije ksilitola s drugim komponentama hidrolizata lignocelulozne sirovine kao što su zaostali šećeri, ksiloza i arabinoza, različite anorganske soli, a to utječe na kristalizaciju, prinos, čistoću i oblik kristala (Wei i sur., 2010).



**Slika 7.** Ksilitol izoliran iz hidrolizata otpadne trave (lijevo) i otopine ksilitola u vodi (desno).

### 4.3. Izdvajanje hitina i hitozana iz biomase plijesni *M. indicus* DSM 2185

Izdvajanje hitina i hitozana iz biomase plijesni *M. indicus* DSM 2185 provedena je kao što je prethodno opisano u Poglavlju 3.3.8. Prinosi procesa izolacije hitina i hitozana nakon procesa proizvodnje kislitola na hidrolizatu otapadne trave, u kojem je ova plijesan rasla pretežno u obliku micelija (Slika 6.), aerobnim postupkom prikazani su u Tablici 7.

**Tablica 7.** Prinos postupka izolacije hitina i hitozana iz biomase plijesni *M. indicus* DSM 2185

polimer	prinos (g g <sup>-1</sup> )
hitin	0,2056
hitozan	0,0990

Stanična stijenka plijesni *Mucor indicus* bogata je hitinom i hitozanom (Satari i sur., 2016), a udio hitozana u biomasi plijesni *M. indicus* varira u rasponu od 5 do 10 % računajući na suhu tvar biomase ili 30 do 40 % ako se računa samo na staničnu stijenku ove plijesni (Karimi i sur., 2006). Značajnije količine biomase formiraju se tijekom aerobnog uzgoja (Karimi i sur., 2006), a dokazano je da se udio hitina i hitozana mijenja s promjenom morfologije plijesni *M. indicus*, tj. udio hitina i hitozana povećava se s promjenom morfologije plijesni iz oblika kvasca u filamentozni oblik (Sharifyazd i Karimi, 2017).

Svojstva hitozana omogućuju primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, a osim toga primjenjuje se u pročišćavanju vode i uklanjanju teških metala te se koristi kao flokulacijsko sredstvo (Karimi i sur., 2006). Iz tog razloga provedena je izolacija hitina i hitozana iz biomase plijesni.

Prinos hitina iznosi 0,21 g g<sup>-1</sup> dok je prinos hitozana dvastruko manji i iznosi 0,10 g g<sup>-1</sup> računajući na suhu tvar biomase. U radu autora Sharifyazd i Karimi (2017) određen je prinos hitina i hitozana u biomasi u iznosu od 0.21 odnosno 0.16 g g<sup>-1</sup>. Prinos hitina određen u ovom radu je isti kao u radu Sharifyazd i Karimi (2017) dok je prinos hitozana oko 40% manji što može biti posljedica korištenja različitih metoda za izolaciju hitozana.

Osim toga, udio hitina i hitozana u biomasi plijesni *M. indicus* ovisi i o temperaturi pri čemu je udio hitina najveći pri 28°C te se smanjuje s povišenjem temperature, za razliku od hitozana čiji je udio najmanji pri 28°C te se povećava s porastom temperature (Sharifyazd i Karimi, 2017).

#### 4.4. Određivanje sastava lipida u biomasi plijesni *M. indicus* DSM 2185

Za određivanje sastava lipida u biomasi plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 potrebno je provesti ekstrakciju lipida iz biomase transesterifikacijom i ekstrakciju nastalih metil estera u organsko otapalo prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.9. Sastav lipida koje proizvodi ova plijesan kao i koncentracija pojedinih masnih kiselina određeni su upotrebom GC-FID metode (Tablica 3., poglavlje 3.3.9.2.; Wychen i sur., 2013).

Ova plijesan pripada u skupinu oleaginoznih plijesni koje mogu akumulirati značajne količine lipida, posebice polinezasićenih masnih kiselina (eng. PUFAs), koji mogu imati primjenu u proizvodnji biodizela ili u prehrambenoj industriji (Satari i sur., 2016). Za industrijski značajnu proizvodnju lipida s pomoću ove plijesni potrebno je optimirati procesne parametre poput morfologije, vremena uzgoja, temperature, osigurati određenu dobavu kisika, te odabrati odgovarajuću vrstu izvora ugljika kao i koncentraciju dušika (Sharifyazd i Karimi, 2017).

Biomasa plijesni *M. indicus* DSM 2185 nakon uzgoja provedenog na hidrolizatu otpadne trave, s ciljem proizvodnje ksilitola, sadrži svega 5,90 % ukupnih masnih kiselina u suhoj tvari. U radu autora Satari i sur. (2016) proveden je uzgoj plijesni *M. indicus* u filamentoznom obliku na hidrolizatu rižine slame za proizvodnju etanola, te je određeno da u navedenim uvjetima biomasa ove plijesni sadrži čak 26,93 % ukupnih masnih kiselina. Navedeni udio masnih kiselina je oko 4,5 puta veći od udjela određenog u ovom radu (Tablica 8.).

Od 13 detektiranih masnih kiselina (Tablica 8.), najveći udio ima oleinska kiselina (C18:1 cis 9) od 29,62 %, zatim 19,33 % čini C18:3 cis 6,9,12 ( $\gamma$ -linolenska kiselina), i C18:2 cis 9,12 (linolna kiselina) s 17,81% udjela te C16:0 (palmitinska kiselina) s udjelom od 15,13% dok su ostale masne kiseline (C6:0, heksadekanoična kiselina; C8:0, oktadekanoična kiselina; C10:0 dekanoična kiselina; C11:0, undekanska kiselina; C12:0, laurinska kiselina; C14:0, miristinska kiselina; C16:1 cis 9, palmitoleinska kiselina; C18:2 trans 9,12; C18:0, stearinska kiselina) zastupljene u manjem postotku (Tablica 8.).

Iz literature je poznato da postoji značajna razlika u udjelu masnih kiselina ovisno o morfologiji plijesni pri čemu plijesan u obliku kvasca sadrži veći udio masnih kiselina u odnosu na filamentozni oblik. Polinezasićene omega-6 masne kiseline, linolenska i oleinska kiselina najzastupljenije su u biomasi plijesni *M. indicus* i u filamentoznom obliku i u obliku kvasca pri čemu je udio navedenih masnih kiselina 13,78 %; linolenska kiselina, i 6,73 % oleinska kiselina (Satari i sur., 2016). Ostale određene masne kiseline bile su prisutne u

manjem udjelu: 4,34% C16:0 (palmitinska kiselina), 6,73% C18:1 (oleinska kiselina), 1,31% C18:2 cis 6,9; linolenska kiselina (C18:2 cis 9,12) s udjelom od 13,78% te 0,77% C18:3 cis 6,9,12 (Satari i sur., 2016).

Plijesan *M. indicus* proizvela je značajnije količine linolenske, oleinske i linolne kiseline, dok su ostale masne kiseline prisutne u manjoj količini (Tablica 8.).

**Tablica 8.** Sastav i udio masnih kiselina koje proizvodi plijesan *M. indicus* tijekom uzgoja na hidrolizatu otpadne trave šaržnim postupkom.

masna kiselina		$\gamma_{FAME}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$W_{FAME}$ , FAME ukupno (%)
oznaka	ime		
C6:0	heksanoična kiselina (kaproična kiselina)	7,209	1,41
C8:0	oktanoična kiselina (kaprilna kiselina)	6,18	1,21
C10:0	dekanoična kiselina (kaprinska kiselina)	3,189	0,62
C11:0	undekanska kiselina	4,788	0,94
C12:0	dodekanoična kiselina (laurinska kiselina)	1,878	0,37
C14:0,	tetradekanoična kiselina (miristinska kiselina)	5,58	1,09
C16:0	heksadekanoična kiselina (palmitinska kiselina)	77,265	15,13
C16:1 cis 9	cis-9-heksadekanoična kiselina (palmitoleinska kiselina)	8,826	1,73
C18:0	oktadekanoična kiselina (stearinska kiselina)	16,833	3,30
C18:1 cis 9	cis-9-oktadekanoična kiselina (oleinska kiselina)	151,335	29,62
C18:2 trans 9,12	trans-9,trans-12-oktadekanoična kiselina Linoelaidic acid	38,004	7,44
C18:2 cis 9,12	cis-,cis-,9,12, oktadekanoična kiselina (Linolenska kiselina)	90,996	17,81
C18:3 cis 6,9,12	cis-, cis-, cis-, 6,9,12-oktadekanoična kiselina ( $\gamma$ -linolenska kiselina)	98,754	19,33
$W_{\text{ukupne masne kiseline, biomasa}}$ (%)	5,90		

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Tijekom aerobnog bioprocesa proizvodnje ksilitola na kiselinskom hidrolizatu otpadne trave s pomoću plijesni *M. indicus* DSM 2185 proizvedeno je 14,57 g L<sup>-1</sup> ksilitola uz koeficijent konverzije ksiloze u ksitol od 0,42 g g<sup>-1</sup>. Od ostalih produkata detektirani su etanol i glicerol.
2. Za izdvajanje ksilitola kristalizacijom iz vodene otopine i iz hidrolizata otpadne trave korišteni su etanol, aceton i izopropanol. Najveće iskorištenje postupka kristalizacije ksilitola iz vodene otopine postignuto je uz upotrebu acetona i iznosi 30,95 %, a iz hidrolizata otpadne trave uz upotrebu etanola i iznosi 17,87 %.
3. Plijesan *M. indicus* DSM 2185 u aerobnim uvjetima procesa raste u micelijском obliku uz prinos biomase od 8,38 g L<sup>-1</sup>. Zbog značajnije količine proizvedene biomase ova plijesan može poslužiti kao dobar izvor za izolaciju sporednih proizvoda kao što su hitin i hitozan. Udio izoliranog hitina i hitozana iz plijesni *M. indicus* iznosi 20,56 % i 9,90 % izraženo na suhu tvar biomase.
4. Plijesan *M. indicus* DSM 2185 sadrži i oko 6 % ukupnih lipida u suhoj tvari biomase. Od 13 određenih masnih kiselina najveću udio ima oleinska kiselina (C18:1 cis 9) 29,62 %, zatim  $\gamma$ -linolenska kiselina (C18:3 cis 6,9,12) 19,33 % i linolna kiselina (C18:2 cis 9,12) 17,81%. Navedene masne kiseline se mogu koristiti za proizvodnju biodizela i kao dodatak prehrani.

## 6. LITERATURA

1. Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., Šantek, B., (2018) Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng. Life Sci.*, 18, 768-778.
2. Chen, H. (2015) Lignocellulose Biorefinery Engineering. Lignocellulose biorefinery conversion engineering.
3. Dasgupta, D., Bandhu, S., Adhikari, D. K., Ghosh, D. (2016) Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. *Microbiological Research*.
4. De Faveri, D., Torre, P., Converti, A. (2004) Optimization of xylitol recovery by crystallization from synthetic solutions using response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 61, 407-412.
5. European Biofuels technology platform- Fatty Acid Methyl Esters (FAME), <<https://www.etipbioenergy.eu/images/fame-fact-sheet.pdf>> Pristupljeno 12.6.2020.
6. Isikgor, F. i Becer, R. (2015) Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. *Polymer Chemistry*.
7. Jaworska, M. M., Antos, D., Górak, A. (2020) Rewiew on the application of chitin and chitosan in chromatography. *Reactive and Functional Polymers* 152: 104606.
8. Karimi, K., Emtiazi, G., Taherzadeh, M. J. (2006) Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. *Process Biochemistry* 41, 653-658.
9. Karimi, K., Zamani, A. (2013) *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspective: A review. *Biotechnology Advances* 31, 466-481.
10. Kucharska, K., Rybaczyk, P., Hołowacz, I., Łukajtis, R., Glinka, M., Kamiński, M. (2018) Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. *Molecules*, 23, 2937.
11. Kumar Das, P., Prava Das, B., Dash, P. (2020) Refining Biomass Residues for sustainable Energy and Bioproducts: 13 – Potentials of post harvest rice crop residues as a source of biofuel. *Technology, Advances, Life Cycle Assessment, and Economics*; 275-301.
12. Kuthi, F. A. A., Rabbi, N., Norzali, A., Haji Badri, K. (2016) Thermal Characteristics of microcrystalline cellulose from oil palm biomass. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, Vol 20 No 5: 1112-1122.
13. Lewandowska, M., Szymańska, K., Kordala, N., Dąbrowska, A., Bednarski, W., Juszczyk, A. (2016) Evaluation of *Mucor indicus* and *Saccharomyces cerevisiae* capability to ferment hydrolysates of rape straw and *Miscanthus giganteus* as affected by the pretreatment method, *Bioresource Technology*.
14. Lima de Albuquerque, T., Jose da Silva Jr, I., Ribeiro de Macedo, G., Valderez Ponte Rocha, M. (2014) Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. *Process Biochemistry*.
15. Limayem, A., Ricke, S. C., (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science* 38, 449-467.

16. López-Linares, J. C., Romero, I., Cara, C., Castro, E., Mussatto, S. I. (2017) Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. *Bioresource Technology*.
17. Marđetko, 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.
18. Martínez, E. A., Canettieri, E. V., Bispo, J. A., Giulietti, M., de Almeida e Silva, J. B., Converti, A. (2015) Strategies for xylitol purification and crystallization: A Review. *Separation Science and Technology*.
19. Martínez, E. C., e Silva, J. B. de A., Giulietti, M., Nápoles Solenzal, A. I. (2007) Downstream proces for xylitol produced from fermented hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1193-1198.
20. Melaja, A. J., Virtanen, J. J., Heikkila, H. O., Kantvin (1978) Method for recovering xylitol. United States Patent.
21. Millati, R., Edebo, L., Taherzadeh, M.J. ( 2005) Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose and wood hydrolyzates. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 294-300.
22. Mohamad, N. L., Mustapa Kamal, S. M., Mokhtar, M. N., (2015) Xylitol Biological Production: A Review of Recent Studies. *Food Reviews International*, 31:74-89.
23. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96, 673-686.
24. Mustapa Kamal<sup>a</sup>, S. M., Mohamad, N. L., Liew Abdullah, A. G., Abdullah<sup>b</sup> (2011) Detoxification of sago trunk hydrolysate using activated charcoal for xylitol production. *Procedia Food Science* 1,908-913.
25. Nadarajah, K., Kader, J., Marmira, M., Paul, D. C. (2001) Production of Chitosan by Fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 4(3):263-265.
26. Parajó, J.C., Domínguez, H., Domínguez, J.M. (1998) Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology* 66, 25-40.
27. Pochanavanich, P., Suntornsuk, W. (2002) Fungal chitosan production and its characterization. *Letters in Applied Microbiology* 35, 17-21.
28. Rafiqul, I. S. M., Mimi Sakinah, A. M. (2012) A perspective: Bioproduction of xylitol by enzyme technology and future prospects. *International Food Research Journal* 19(2):405-408.
29. Rafiqul, I. S., Mimi Sakinah, A. M., (2013) Processes for the Production of Xylitol- A review. *Food Reviews International*, 29:127-156.
30. S. S. da Silva i A. K. Chandel (eds.), *D-Xylitol, An Assessment on Xylitol Recovery Methods*,10, B. Aliakbarian, D. de Faveri, P. Perego, A. Converti., ur., Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012.
31. Satari, B., Karimi, K., Zamani, A. (2016) Oil, chitosan, and ethanol production by dimorphic fungus *Mucor indicus* from different lignocelluloses. *J Chem Technol Biotechnol*; 91:1835-1843.



32. Sharifyazd, S., Karimi, K. (2017) Effects of fermentation conditions on valuable products of ethanolic fungus *Mucor indicus*. *Electronic Journal of Biotechnology* 30, 77-82.
33. Silva, S. S., Felipe, M. G. A., Mancilha, I. M. (1998) Factors that Affect the Biosynthesis of Xylitol by Xylose-Fermenting Yeasts. A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 70-72, 331-339.
34. Sues, A., Millati, R., Edebo, L., Taherzadeh, M.J. (2005) Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS Yeast Research* 5, 669-676.
35. Van Wychen, S., Ramirez, K., Laurens, L.M.L. (2013) Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by *in situ* Transesterification. NREL.
36. Vyglazov, V. V. (2004) Kinetics characteristics of xylitol crystallization from aqueous-ethanolic solutions. *Russian J. Appl. Chem.* 77: 26.
37. Wang, S., Sheng Li, Q., Li, Z., Gao Su, M. (2007) Solubility of Xylitol in Ethanol, Acetone, N,N-Dimethylformamide, 1-Butanol, 1-Pentanol, Toluene, 2-Propanol, and Water. *Journal of Chemical and Engineering Dana* 52(1):186-188.
38. Wei, J., Yuan, Q., Wang, T., Wang, L. (2010) Purification and crystallization of xylitol from fermentation broth of corncob hydrolysates. *Front. Chem. Eng. China*, 4(1): 57-64.
39. Ylikahri, R. (1979) Metabolic and nutritional aspects of xylitol. *Advances in Food Research*, vol.25.
40. Zamani, A., Jeyhanipour, A., Edebo, L., Niklasson, C., Taherzadeh, M. J. (2008) Determination of glucosamine and N-acetyl glucosamine in fungal cell wall. *J Agric Food Chem*;56:8314-8.

## Izjava o izvornosti

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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Mika Stela".

---

ime i prezime studenta