

Proizvodnja biokemikalije s pomoću plijesni *Mucor indicus* u različitim tipovima bioreaktora i obrada otpadne prevrele podloge nesumpornim ljubičastim bakterijama

Kaselj, Mija

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:859851>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Mija Kaselj

7644/BT

Proizvodnja biokemikalija s pomoću plijesni *Mucor indicus* u različitim tipovima bioreaktora i obrada otpadne prevrele podloge nesumpornim ljubičastim bakterijama

ZAVRŠNI RAD

Znanstveno-istraživački projekt: „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (OPB – SLS; šifra projekta 971)

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

Zagreb, 2021.

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 HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (OPB – SLS; šifra projekta 971) pod mentorstvom doc. dr. sc. Maria Novaka te uz pomoć asistentice Marine Grubišić, mag. ing. bioproc.

Posebno se zahvaljujem svom mentoru, doc. dr. sc. Mariu Novaku, na pruženoj prilici za izradu ovog završnog rada, na uloženom vremenu i pomoći tijekom izrade, te na znanju i korisnim savjetima koje je prenio na mene.

Također se zahvaljujem svim ostalim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na pruženoj pomoći, suradnji i ugodnom iskustvu. Za kraj, posebne zahvale mojoj obitelji, prijateljima i mojoj zvijezdi vodilji.

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 biokemikalije s pomoću plijesni *Mucor indicus* u različitim tipovima bioreaktora i obrada otpadne prevrele podloge nesumpornim ljubičastim bakterijama

Mija Kaselj, 0058213179

Sažetak: Sve veće potrebe za ekološki i ekonomski održivim proizvodnjama dovele su do razvoja biorafinerija i iskorištavanja obnovljivih izvora energije. Biorafinerija je integrativni i višenamjenski koncept koji koristi lignoceluloznu biomasu za održivu proizvodnju, a uključuje selektivnu transformaciju različitih molekula biomase u biokemikalije, biopolimere, biogoriva i druge spojeve. Cilj ovog rada je ispitati utjecaj različitih tipova bioreaktora na rast plijesni *Mucor indicus* čija biomasa je bogata masnim kiselinama, dok je proizvod asimilacije šećera iz hranjive podloge ksilitol. Uzgojem plijesni *Mucor indicus* u biorektoru s mješalom proizvelo se 6,634393 g/L ksilitola, 3,5414 g/L suhe tvari biomase koja je sadržavala 72,5 % nezasićenih masnih kiselina s najvećim udjelom cis-9 oktadekanoična kiseline u postotku od 50,5 %. Kad se plijesan *Mucor indicus* uzgajala u baborirajućem biorektoru dobilo se 0,750836 g/L ksilitola, 4,624 g/L biomase koja je sadržavala 82,4 % nezasićenih masnih kiselina s najvećim udjelom cis-9-oktadekanoične kiseline u postotku od 47,11 %. Kako bi se dodatno smanjila količina otpada, na iskorištenim podlogama iz uzgoja plijesni proveo se uzgoj fototrofnih ljubičastih nesumpornih bakterija u svrhu iscrpljivanja izvora ugljika i dušika iz navedenih podloga. Tijekom uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija pratio se utjecaj različitih izvora svjetlosti, na rast i sintezu bakterioklorofila *a*.

Ključne riječi: lignocelulozne sirovine, *Mucor indicus*, biorafinerija, biokemikalije, ljubičaste nesumporne bakterije, *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340, *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090, izvor svjetlosti

Rad sadrži: 40 stranica, 3 slike, 13 tablica, 83 literaturna navoda, 4 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: Marina Grubišić, 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**

**Biochemicals production with *Mucor indicus* in different bioreactors and treatment
of the fermented media with purple non-sulfur bacteria**

Mija Kaselj, 0058213179

Abstract: The growing need for both ecologically and economically sustainable production systems has brought to the development of biorefineries and the use of renewable raw materials. A biorefinery is an integrative and multipurpose concept that uses lignocellulosic biomass for sustainable production which includes a selective transformation of different biomass molecules into biochemicals, biopolymers, biofuel, and other components. The purpose of this thesis is to examine the influence of different bioreactor types on *Mucor indicus* growth, whose biomass is rich with fatty acids whereas the product of sugar assimilation is xylitol. Cultivating *Mucor indicus* in a stirred-tank bioreactor resulted in the production of 6,634393 g/L of xylitol and 3,5414 g/L of dry biomass that consisted of 72,5 % non-saturated fatty acids with cis-9 octadecanoic acid having the largest ratio of 50,5 %. When the *Mucor indicus* was cultivated in a sparged tank bioreactor, the amount of xylitol and biomass produced was 0,750836 g/L and 4,624 g/L respectively, whereas the dry biomass consisted of 82,4 % of non-saturated fatty acids with the largest ratio of cis-9-octadecanoic acid of 47,11 %. To reduce the total amount of waste from the cultivations and to use the carbon and nitrogen left-overs, the fermented broth was used for the cultivation of phototrophic purple non-sulfur bacteria, during which the influence of different light sources on the growth and bacteriochlorophyll a synthesis was examined.

Keywords: lignocellulosic raw materials, *Mucor indicus*, biorefinery, biochemicals, purple non-sulfur bacteria, *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340, *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090, light source

Thesis contains: 40 pages, 3 figures, 13 tables, 83 references, 4 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 Marina Grubišić

Defence date:

SADRŽAJ:

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO	2
2.1. Biorafinerija	2
2.2. Lignocelulozne sirovine	3
2.2.1 Lignoceluloza	3
2.2.2. Celuloza	3
2.2.3. Hemiceluloza	4
2.2.4 Lignin	4
2.3. Predobrada lignocelulozних sirovina	4
2.4. Odabrani mikroorganizmi za biorafinerijski pristup	5
2.4.1. Plijesan	5
2.4.1.1. <i>Mucor indicus</i>	6
2.4.2. Ljubičaste nesumporne bakterije	7
2.4.2.1. Biotehnološka primjena ljubičastih nesumpornih bakterija	8
2.5. Odabrani proizvodi bioprocasa	9
2.5.1 Biokemikalije	9
2.5.1.1. Ksilitol	9
2.5.1.2. Masne kiseline	10
2.5.1.3. Pigmenti	11
3.MATERIJALI I METODE	12
3.1 Materijali	12
3.1.1 Radni mikroorganizmi	12
3.1.2. Kemikalije	12
3.1.3. Hranjive podloge	13
3.1.4. Uređaji i oprema	15
3.1.1.1. Bioreaktor s mješalom i barbotirajući bioreaktor	15
3.1.1.2. Sustav za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (eng. Ultra Performance Chromatography, UPLC)	15
3.1.1.3. Centrifuga	16
3.1.1.4. Spektrofotometar	16
3.1.1.5. Sustav za plinsku kromatografiju (eng. Gass Chromatography, GC)	16
3.1.1.6. Ostala oprema i pribor	16
3.2. Metode	16
3.2.1 Priprema inokuluma plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2185	16
3.2.2. Priprema hranjive podloge za uzgoj plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2185	17

3.2.3. Priprema inokuluma ljubičastih nesumpornih bakterija <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2718, <i>Rhodobacter azotoformans</i> JCM 9340 i <i>Rhodovulum capsulatus</i> JCM 21090.....	17
3.2.4. Priprema filtrata kulture plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2185 za uzgoj <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2718, <i>Rhodobacter azotoformans</i> JCM 9340 i <i>Rhodovulum capsulatus</i> JCM 21090 na različitim tipovima svjetla	17
3.2.5. Provedba i nadzor biotehnoške proizvodnje biokemikalija u bioreaktoru s mješalom pomoću plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2185	17
3.2.6. Provedba i nadzor biotehnoške proizvodnje biokemikalija u barbotirajućem bioreaktoru pomoću plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2185.....	18
3.2.7. Provedba i nadzor uzgoja nesumpornih ljubičastih bakterija	18
3.2.6 Analitičke metode	18
3.2.6.1. Određivanje koncentracije hidroliziranih šećera UPLC metodom	18
3.2.6.2. Određivanje udjela masnih kiselina u biomasi provedenih uzgoja	19
3.2.6.3. Ekstrakcija ukupnih pigmenata i spektrofotometrijsko određivanje klorofila a	20
3.2.6.4. Odeđivanje optičke gustoće	21
3.2.6.5. Odeđivanje pokazatelja uspješnosti procesa	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Uzgoj plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2185 u dva različita tipa bioreaktora na podlogama s izvorima ugljika koji su zastupljeni u hidrolizatima dobivenim pretretmanima lignoceluloznih sirovina	22
4.2. Utjecaj različitih tipova svjetlosti na rast ljubičastih nesumpornih bakterija <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2718, <i>Rhodobacter azotoformans</i> JCM 9340 i <i>Rhodovulum capsulatus</i> JCM 21090 u filtratu kulture uzgoja plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2185.....	26
5.ZAKLJUČAK	32
6.LITERATURA	33
7.PRILOZI	41

1. UVOD

Zbog značajne potrošnje obnovljivih izvora energije i sirovina potrebnih za opstanak i razvoj čovjeka u današnje vrijeme sve više istraživanja se usmjeravaju prema razvoju tehnologija za iskorištavanju obnovljivih izvora. Obnovljivi izvori se kategoriziraju u dvije skupine – oni koji se mogu reciklirati poput energije sunčeve svjetlosti i topline, zraka, vjetra i vode, energije plime i oseke, te oni koji su biološke prirode, uključujući različite biljke, životinje, mikroorganizme i njihovu okolinu, koja je sačinjena od ekosustava (Zhou 2013).

Biomasa, kao obnovljivi izvor energije, sve više privlači svjetska tržišta zbog svoje svestranosti u recikliranju i konverziji. Osim što je obnovljivi izvor energije, biomasa se može upotrijebiti u proizvodnji biokemikalija. Ugljikohidrati su glavna komponenta biomase koja se konvertira i čijom asimilacijom ne dolazi do onečišćenja okoliša i negativnog utjecaja na cijeli ekosustav. Biomasa uključuje poljoprivredni i šumarski otpad, dio je poljoprivredne proizvodnje, te uključuje potencijalne onečišćivače okoliša, ostatak usjeva, stajskog gnojiva, šumskog i organskog otpada. Energija očuvana u biljnim i materijalnim izvorima se sve više iskorištava i reciklira a recikliranje biomase učinkovito je rješenje za rješavanje problema opskrbe energijom i ublažavanje onečišćenja okoliša (Chen 2015). Izazov u uporabi lignocelulozne biomase predstavlja prethodna predobrada. Hidroliza lignocelulozne biomase do monomernih šećera nepohodna je kako bi je mikroorganizmi mogli metabolizirati (Bušić i sur., 2018). Lignocelulozne sirovine su bogate s pentozama, točnije ksilozom, zbog čega se istraživanja usmjeravaju prema upotrebi radnih mikroorganizama koji mogu iskorištavati pentoze kao supstrat za svoj rast a primjer je plijesan *Mucor indicus* (Karimi i Zimani., 2013).

U ovom radu istražio se biotehnološki proces proizvodnje biokemikalija pomoću plijesni *Mucor indicus* u dva različita tipa bioreaktora, u bioreaktoru s mješalom te u barbotirajućem bioreaktoru. Nakon provedenih uzgoja plijesni *Mucor indicus*, filtrat kulture se dalje iskoristio kao podloga za rast nesumpornih ljubičastih bakterija na različitim tipovima svjetlosti. Uz praćenje rasta nesumpornih ljubičastih bakterija, pratila se i potrošnja izvora ugljika te sinteza fotosintetskih pigmenata ljubičaste nesumprone bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 te *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Biorafinerija

Integrirani i višenamjenski koncept biorafinerija podrazumijeva korištenje lignocelulozne biomase za održivu proizvodnju različitih biokemikalija iskorištavajući gotovo sve komponente sirovine i nusprodukata (npr. otpadna podloga, otpadna biomasa). Biotehnološka proizvodnja bazirana na iskorištenju lignoceluloznih sirovina daje mogućnost stvaranja visokokvalitetnih nusprodukata uz glavni proizvod (Balat 2008).

Koncept biorafinerije uključuje selektivnu transformaciju različitih molekula dostupnih u biomasi u bazne biokemikalije i biogoriva, ali i u farmaceutske proizvode, zatim papir, različite polimere, te hranu ili stočnu hranu. Općenito, postupak biorafinerije obično obuhvaća sljedeće faze: predobrada i priprema biomase, odvajanje komponenta biomase i naknadne korake konverzije i pročišćavanja proizvoda (Bušić i sur., 2018).

Korištenje biomase kao sirovine je ekološki prihvatljivo i poželjno, zbog smanjenja emisije štetnih plinova. Koncept biorafinerije se razvija u svrhu ispunjavanja sljedećih ciljeva: nadopuna trenutnoj proizvodnji goriva i kemijskih građevnih jedinica proizvedenih iz neobnovljivih izvora energije, zbog njihove sve veće potrošnje, opskrba novim jedinicama za proizvodnju novih materijala, širenje industrije te otvaranje novih radnih mjesta, uključujući ruralna područja, valorizacija otpada (poljoprivredni, gradski i industrijski otpad) te naposljetku, postizanje smanjenja emisija stakleničkih plinova (Qureshi i sur., 2014). Današnja klasifikacija biorafinerija temelji se na sljedeće četiri značajke:

1. Platforme – odnose se na ključne međuprodukte između sirovina i konačnih proizvoda. Najvažniji međuprodukti su: bioplin iz anaerobne digestije, sintetski plin iz uplinjavanja, vodik iz reformiranja pare, elektrolize vode i fermentacije, C6 šećeri iz hidrolize saharoze, škroba, celuloze i hemiceluloze, C5 šećeri iz hidrolize hemiceluloze i hrane, lignin iz prerade lignocelulozne biomase.
2. Proizvodi – odnosi se na podjelu proizvoda biomase na energetske ili neenergetske proizvode. U ovoj klasifikaciji ključno je prepoznati glavno tržište:
 - biorafinerije vođene energijom: energija predstavlja konačni proizvod, npr. biogoriva, struja i toplina.
 - biorafinerije vođene materijalom: proizvod baziran na biološkoj osnovi je glavni proizvod.

3. Sirovine – namjenske sirovine (usjevi šećera, lignocelulozni usjevi, usjevi na bazi ulja, morske biomase i trave te škrobni usjevi) i otpaci (otpaci na bazi ulja, lignocelulozni otpaci, organski otpaci)
4. Proces – mehanizam pretvorbe biomase u konačni proizvod:
 - mehanički/fizički: kemijska struktura komponenata biomase je očuvana, uključuje operacije prešanja, mljevenja, odvajanja, dekantacije itd.
 - biokemijski: procesi koje provode enzimi ili mikroorganizmi pri optimalnoj temperaturi i tlaku.
 - kemijski procesi: kemijske modifikacije supstrata djelovanjem kemikalija (npr. hidroliza, transesterifikacija, hidrogeniranje, transaminacija, karboksilacija, oksidacija)
 - termokemijski: sirovina izložena ekstremnim uvjetim (povišeni tlak i temperatura, sa ili bez katalizatora) (Cherubini i sur., 2009).

2.2. Lignocelulozne sirovine

2.2.1 Lignoceluloza

Biotehnologija lignoceluloznih sirovina usredotočena je na biotehnošku upotrebu prirodne lignocelulozne biomase koja nije u potpunosti iskorištena radi teže razgradivih komponenti u satavu – celuloze, hemiceluloze i lignina (Chen 2014). Lignocelulozne sirovine predstavljaju velike količine obnovljivih izvora energije za proizvodnju biogoriva, biokemikalija i biopolimera. Lignoceluloznu biomasu čine ostatci iz poljoprivrede i šumarstva, energetskih usjeva i ostatci iz biorafinerija (Jonsson i sur., 2013). Lignoceluloza čini sastavni dio stanične stijenke biljaka, daje stanici oblik, sprječava hlapljenje vode, pruža mehaničku potporu te djeluje kao zaštita od nametnika (Taherzadeh i Jeahanipour, 2012). Polimeri koji su sastavni dio lignoceluloznih sirovina čine kompleksnu strukturu zbog čega predstavljaju kompleksan supstrat za enzime. Razlog tomu su molekule lignina koje štete celulozu, te ispreplitanje celuloze i hemiceluloze, stupanj polimerizacije celuloze, visoka kristaliničnost te nepristupačne površine sirovina (Andlar i sur., 2018). Celuloza i hemiceluloza ostvaruju vodikove veze, dok se lignin veže kovalentno na hemicelulozu (Zoghiami i Paës, 2019). Međusobo ostvarene interakcijske lignoceluloznih komponenti ključan su faktor u razgradnji lignocelulozne biomase (Bušić i sur., 2018; Jonsson i sur., 2013)

2.2.2. Celuloza

Celuloza je makromolekularni spoj formule $(C_6H_{10}O_5)_n$ od nekoliko stotina do preko 10.000 monomernih jedinica D - glukoze povezanih β -1,4-glikozidnom vezom. U staničnoj stijenci biljaka, molekule celuloze međusobno su povezane vodikovim vezama i tvore mikrovlakna,

koja su povezana u vlakna (Sjostrom 1993). Građa celuloze obično uključuje kristalno i amorfno područje koje je dostupno djelovanju celulitičkih enzima, dok je pomlerizacijski stupanj prirodnih celuloznih molekula veći od 1000 (Jonsson i sur., 2013).

2.2.3. Hemiceluloza

Hemiceluloze su razgranati heteropolisaharidi s kratkim bočnim lancem koji se sastoji od dva ili više monosaharida. Grupe šećera koje su u sastavu hemiceluloza uglavnom su ksiloza, glukoza, manoz, arabinoza i galaktoza te njihovi različiti derivati. Općenito gledano, hemiceluloza je najslabija komponenta u staničnoj stijenci lignoceluloze budući da tvori kovalentne veze s ligninom i esterske veze s acetilnim jedinicama i fenilpropanskom kiselinom (Chan 2014). Za razliku od celuloze i visokog stupnja polimerizacije, stupanj polimerizacije hemiceluloze iznosi oko 100-200, uglavnom u razgranatoj strukturi (Rowell i sur., 2015). Zbog velikog udjela amornog područja građenog od različitih šećere, veća je i topivost hemiceluloze u odnosu na celulozu u vodi, te je lakše razgradiva. U lignoceluloznim materijalima, hemiceluloza predstavlja „ljepilo“ između celuloze i lignina (Fengel i Wegener, 1984).

2.2.4 Lignin

Uz celuloze, lignin je najzastupljenija polimerna organska molekula u prirodi. Uloga lignina u biljci je višestruka, npr., lignin je odgovoran za mehaničku čvrstoću stanične stijenke, nepropusnost, izgrađuje sekundarnu staničnu stijenku koja se formira kada je biljka upotpunosti razvijena, te služi kao zaštita od patogenih organizama i oksidativnog stresa (Hendriks i Zeeman, 2009). Po svojoj strukturi, lignin je složeni amorfni heteropolimer s trodimenzionalnom strukturom koja se sastoji od fenilpropanskih alkohola povezani međusobnom ugljik-ugljik i ugljik-kisik vezama. Tri fenilpropanska alkohola koja ulaze u strukturu lignina su kumaril alkohol, koniferil alkohol i sinapil alkohol. Razgradnja bilo kojeg od tri glavna sastojka lignoceluloze bit će ograničena drugim zbog isprepletene strukture celuloze, hemiceluloze i lignina (Marđetko i sur., 2018).

2.3. Predobrada lignoceluloznih sirovina

Da bi radni mikroorganizam mogao efikasno koristiti lignocelulozne sirovine kao supstrate potrebno je provesti prethodnu predobradu lignoceluloznih sirovina čime se mijenja sastav i struktura sirovina. Ovisno o vrsti predobrade lignocelulozne sirovine dolazi do djelomičnog ili potpunog uklanjanja lignina, djelomične ili potpune hidrolize hemicelulze te prevođenja dijela celuloze iz kristalnog u amorfni oblik pogodan za enzimsku hidrolizu (Shi i sur., 2019; Ivančić Šantek i sur., 2018; Rezić 2012). Metode koje čine prethodnu obradu lignoceluloznih sirovina su kemijske, fizikalne, fizikalno-kemijske i biološke metode. Većina fizikalnih i kemijskih metoda, kao i kombinacija istih uključuje korištenje kiselina, lužina, mikrovalnih pećnica,

eksplozije parom, ionizirajućeg zračenja, eksplozija CO₂ ili kombiniranih procesa što zahtjeva korištenje posebnih instrumenta prilikom čijeg rada se troše velike količine energije i generiraju se mogući inhibitori koji utječu na enzimatsku hidrolizu i samu fermentaciju (Mosier i sur., 2005). Biološka predobrada lignoceluloznih sirovina podrazumijeva korištenje različitih mikroorganizama i odgovarajućih enzima. Enzimatska hidroliza predstavlja proces razgradnje polimera ugljikohidrata na pojedinačne šećere uz primjenu enzima, a kako bi bila uspješna prethodno je potreban učinkovit predtretman sirovine. Glavni ograničavajući faktori komercijalizacije proizvodnje biokemikalija iz lignoceluloznih sirovina su troškovi predobrade kao i efikasnost enzimatske hidrolize (Meinita i sur., 2019; Biond i sur., 2005). Osim lignocelulolitičkih enzima, neke gljive, bakterije i insekti proizvode enzime lignin peroksidazu i lakazu koje mogu hidrolizirati lignin. Lakaze su enzimi koji sadrže bakar te uz zajedničko djelovanje s enzimima lignolitičkog sustava dovode do potpune hidrolize lignina (Saloheimo i sur., 2002).

2.4. Odabrani mikroorganizmi za biorafinerijski pristup

Glukoza, ksiloza, manoza, arabinoza i galaktoza su šećeri prisutni u lignoceluloznim sirovinama u različitim omjerima, stoga se, za uspješnu industrijsku proizvodnju biokemikalija koriste mikroorganizmi koji učinkovito fermentiraju iste. Budući da je hemiceluloza velikim udjelom sadržana u lignoceluloznim sirovinama, fokus tehnoloških razmatranja i istraživanja su mikroorganizmi koji kao supstrat mogu koristiti pentoze (Chen 2014.; Balat i sur., 2008). Mikroorganizmi koji fermentiraju ksilozu pronađeni su među mnogim bakterijama, kvascima i nitastim gljivama, a osim toga koriste se genetički konstruirani mikroorganizmi, među kojima mnogi imaju svojstvo za istodobnu saharifikaciju i fermentaciju. Među prirodnim bakterijama sposobnim za fermentaciju ksiloze su sojevi bakterija *Bacillus macerans* DMS 1574, *Bacteroides polypragmatus* NRCC 2288 i *Erwinia chrysanthemi* B374. Najznačajnije prirodne vrste kvasca koje fermentiraju ksilozu su *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* i *Pachysolen tannophilus*. Određeni sojevi iz roda *Candida* i *Pichia* pokazuju veću toleranciju na inhibitore od kvasca *S. cerevisiae*. Specifične gljivične i bakterijske vrste mogu metabolizirati ksilozu u ksilulozu putem različitih enzima kao što su oksidoreduktaze, ksiloza reduktaza (XR) i ksilitol dehidrogenaze (XDH) ili izomeraze kao što je ksiloza izomeraza (Toivola i sur., 1984).

2.4.1. Plijesan

Plijesni su velika skupina filamentoznih gljiva. To su eukarioti, nefotosintetski organizmi čije su stanice obavijene staničnom stijenkama koja je najčešće, sastavljena od polisaharida hitina (Duraković, 1996). Procesi uzgoja koji uključuju plijesan koja raste filamentozno su desetljećima optimizirani za dobivanje visokog prinosa proizvoda (Grimm i sur., 2005).

Sposobnost filamentoznih plijesni za učinkovitu razgradnju supstrata iskorištava se na brojne načine, za izolaciju novih enzima (Maeda i sur., 2005), biorogradnju otpadnih proizvoda (Borchert i Vaga, 2001; Kanaly i sur., 2005; Sumathi i Manju, 2000) ili za potpunu fermentaciju sirovine (Han i sur., 2005). Plijesan koja pripada koljenu Basidiomiceta sposobna je u velikoj mjeri razgraditi i polisaharide i lignin, dok plijesni, pripadnici koljena Askomiceta i Zigomiceta uspješno razgrađuju celulozu i hemicelulozu. Pojedine plijesni iz koljena Zigomiceta, zahvaljujući prisutnim enzimima mogu djelomično razgraditi lignin, što je potvrđeno kemijskim analizama. Askomicete su najmanje proučavane s obzirom na njihove enzimске profile koji razgrađuju lignocelulozu (Hyde i sur., 2000; Jones 1993).

Biotehnološka primjena biomase plijesni zbog sve veće potrebe za ekološki osvještenom proizvodnjom pronalazi sve češće svoju primjenu. Na primjer, zeleni biokompozitivi dobiveni iz materijala na biološkoj osnovi mogu ponuditi održivu alternativu plastičnoj ambalaži na bazi nafte u širokom rasponu primjene (Cottet i sur., 2020). Ambalažni materijal na bazi micelija koristeći lignocelulozne sirovine predstavljaju proizvode koji su biorazgradivi i imaju malu težinu, a osim toga njihovom proizvodnjom se dopirnosi reciklaciji poljoprivrednih proizvoda i nusproizvoda, te zamjeni postojećih ambalaža, smanjujući se na taj način negativan utjecaj na okoliš (Girometta i sur., 2019; Haneef i sur., 2017). Također, kompozitni materijala na bazi gljivičnog micelija pronalazi svoju primjenu u zamjeni proizvoda na bazi nafte te u automobilskoj industriji. Zamjene za kožu na bazi gljiva nastajuća su klasa etički i ekološki odgovornih tkanina koje sve više udovoljavaju estetskim i funkcionalnim očekivanjima potrošača i stječu naklonost kao alternativa goveđoj i sintetičkoj koži (Jones i sur., 2021).

2.4.1.1. *Mucor indicus*

Mucor indicus jedan je od najvažnijih pripadnika koljena zigomiceta. Prema taksonomskoj klasifikaciji plijesan *Mucor indicus* pripada koljenu Zygomycota, razredu Zygomycetes, redu Mucorales, porodici Mucoraceae, rodu *Mucor* i vrsti *indicus* (Karimi i sur., 2013; Majudar i sur., 2008; Chatterjee i sur., 2005). *M. indicus* ima mogućnost filamentoznog rasta ili u obliku stanica kvasca. Uzgoj u anaerobnim uvjetima s visokom početnom koncentracijom inokuluma rezultira rastom plijesni *M. indicus* u obliku kvasca, dok niska koncentracija početog inokuluma bez obzira na prisustvo kisika uvjetuje rast plijesni u filamentoznom obliku (Satari i sur., 2016; Karimi i Zamani, 2013). Stanični zidovi ove plijesni sadrže značajne količine hitozana, hitina i različitih polisaharida, koje je potrebno izolirati iz biomase plijesni kako bi pronašli uporabu u farmaceutskoj, prehrambenoj i poljoprivrednoj industriji zbog svojih antimikrobnih i biorazgradivih svojstava (Lewandowaska i sur., 2016). *M. indicus* bez obzira na tip rasta, ima mogućnost iskorištavanja pentozna, heksoza, lignoceluloznih hidrolizata. Inhibitori prisutni u

lignoceluloznim hidrolizatima kao što su octena kiselina, vanillin, furfural i drugi ne ometaju rast plijesni (Karimi i sur., 2008). Ksilozu kao najzastupljeniji šećer u većini lignoceluloznih hidrolizata plijesan koristi efikasno u aerobnim, kao i u mikroaerofilnim uvjetima (Millati i sur., 2005). Prednost plijesni *Mucor indicus* nad ostalim mikroorganizmima koji rastu na ksilozu je mogućnost fermentacije iste do etanola (Karimi i Zamani, 2013). Budući da nema invertaze, nije u mogućnosti rasti na saharozu zbog čega se koristi za selektivno uklanjanje ostalih šećera u svrhu dobivanja kristalizirane saharoze (Sharifia i sur., 2008). Svoju primjenu pronalazi i u uklanjanju i uporabi različitog otpadnog materijala kao što su teški metali, lako hlapljivi organski spojevi ili za razgradnju polietilena (Chatterjee i sur., 2005; Sues i sur., 2005). Zbog isključenih mogućnosti štetnog utjecaja na ljude, biotehnološka primjena plijesi *Mucor indicus* u proizvodnji biokemikalija iz lignoceluloznih sirovina sve je češća, posebice zbog zadovoljavajućih prinosa, a osim toga plijesan *Mucor indicus* ima sposobnost asimilacije kisloza uz prisustvo kisika (Millati i sur., 2005).

Gledajući s biotehnološkog aspekta, plijesan *Mucor indicus* je zanimljiva zbog proizvodnje polinezasićenih masnih kiselina, među kojima je najznačajnija γ -linolenska kiselina čija se uloga u ljudskom organizmu očituje u regulaciji bioloških funkcija. Geni koji kodiraju za enzim δ -6-desaturazu, koja provodi konverziju linolenske u γ -linolensku kiselinu, uobičajeno se eksprimiraju tijekom faze klijanja spora plijesni *M. indicus* (Karimi i sur., 2013). Osim navedene γ -linolenske kiseline, stanična stjenka plijesni sadrži i palmitinsku kiselinu (C16:0), oleinsku kiselinu (C18:1), trans-6-trans-9-linolnu kiselinu (C18:2 trans 6,9) te linolensku kiselinu (C18:3 cis 6,9,12). Spomenute polinezasićene masne kiseline pronalaze primjenu u proizvodnji biodizela kao i u prehrambenoj industriji (Satari i sur., 2016).

2.4.2. Ljubičaste nesumporne bakterije

Ljubičaste nesumporne bakterije su gram-negativni fotosintetski prokarioti koji sve više pronalaze primjenu u biotehnologiji. Danas je poznato više od 20 vrsta ljubičastih nesumpornih bakterija među kojima su najpoznatije *Rhodobacter* i *Rhodopseudomonas*. Međutim, predmet znanstvenih istraživanja sve više su druge vrste koje imaju jednu ili više neobičnih metaboličkih karakteristika poput ekstremofilnih vrsta koje naseljavaju hladno, vruće, slano, alkalno stanište ili su izolirane iz kiselih sredina (Madigan 2009). Sve ljubičaste nesumporne bakterije su proteobakterije (Imhoff i sur., 2005). Budući da su pigmenti i fotokompleksi u različitim vrsta nesumpornih bakterija vrlo slični, to upućuje na činjenicu da se stjecanje fototrofnih sposobnosti u ljubičastih nesumpornih bakterija dogodilo bočnim prijenosom gena (Nagashima i sur., 1997). Ljubičaste nesumporne bakterije imaju jednaku sposobnost rasta u tami i fototrofno. Rast nekih ljubičastih bakterija moguć je u fotoautotrofnim uvjetima s CO₂ ili nekim organskim

izvorom, te vodikom i manjim koncentracijama reduciranih sumpornih spojeva ili željezovih (II) kationa kao donorima elektrona, dok je u tami omgućen aerobno, fermentacijom ili kemolitotrofijom (Madigan 2009; Madigan i Gest, 1979.,). Prema Madukasi i sur., (2009) i Imhoffu (1995) nužni faktori rasta su izvori vitamina B, poput tiamina, niacina, p – aminobenzojeve kiseline ili biotina, a pored toga moguća je upotreba kvašćevog ekstrakta koji sadrži visoki udjel vitamina B te potiče rast pri manjim koncentracijama. Prema Lu i sur., (2011) tijekom fototrofnog rasta, pridobivanje energije se odvija putem fotosintetske fosforilacije. Pokretačka sila za sintezu ATP-a ili redukciju NADP^+ u $\text{NADPH} + \text{H}^+$ je gradijent proton na membrane kao posljedice apsorpcije fotona u molekulama pigmenta prilikom fotosintetkse fosforilacije (Ormerod 1992).

2.4.2.1. Biotehnoška primjena ljubičastih nesumpornih bakterija

Najpoznatija primjena ljubičastih bakterija je proizvodnja 5-aminolevulinske kiseline (Liu i sur., 2019) te proizvodnja bioplastike, točnije polihidroksialkanoata (Higuchi-Takeuchi i sur., 2019) posljednjih godina se istražuje primjena biomase ljubičastih nesumpornih bakterija u procesima pročišćavanja tla i otpadnih voda iz raznih industrija (Matoković 2020; Sakarika i sur., 2020). Pomoću biomase ljubičastih bakterija postignuto je i efikasno pročišćavanje voda s visokim udjelom kemijske potrošnje kisika iz farmaceutske industrije (Madukasi i sur., 2009), stočarske industrije (Myung i sur., 2004) te vode s povišenom koncentracijom ulja (Takeno i sur., 2005). Osim spomenutih primjena, ljubičaste nesumporne bakterije su dobar izvor proteina s obzirom na to da sirovi proteini čine 60-70 % suhe tvari biomase (Kobayashi i Kobayashi, 1995). Bogate su esencijalnim aminokiselinama, karotenoidnim pigmentima i vitaminima što ih čini pogodnima za upotrebu kao hrane za ribe i druge životinje pri čemu mogu poboljšati njihov imunitet i zaštititi ih od bolesti. Neke do njih mogu oksidirati anorganske spjeve sumpora za fiksiranje CO_2 ovisno o svjetlu. Također, neke anoksigene bakterije mogu provoditi bioremedijaciju boja, pesticida i teških metala u anaerobnim uvjetima. Osim navedenog, mogu se koristiti za prekomjernu ekspresiju membranskih proteina, fotobiološku proizvodnju H_2 i drugih vrijednih spojeva (Frigaard 2016). Ljubičaste nesumporne bakterije nude ekološki prihvatljiv biološki pristup uklanjanju sumporovodika iz otpadnih voda oksidirajući ga djelomično do elementarnog sumpora, umjesto potpune oksidacije do sulfata, što je poželjno jer je elementarni sumpor lako istaložiti u obliku granula. Mnoge ljubičaste nesumporne bakterije imaju mogućnost razgradnje azo-boja pri čemu ta razgradnja ovisi o enzimu azoreduktazi. Azo-boje su najvažnija skupina sintetičkih bojila i uglavnom nisu školne biorazgradnji zbog svoje ksenobiotske prirode. Različiti sojevi ljubičastih nesumpornih bakterija izolirani iz različitih izvora vode (*Rhodobacter adriaticus*, *Rhodobacter blasticus*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodovulum strictum* i *R. palustris*) u mogućnosti su razgraditi do 96% testiranih

azo – boja nakon samo dva dana osvjetljnja i aerobnih inkubacija. Ljubičaste nesumporne bakterije također se upotrebljavaju za bioremedijaciju tj. za uklanjanje teških metala poput kadmija (Cd), nikala (Ni) i olova (Pb) te metala s radioaktivnim izotopima poput cezija (Cs) i stroncija (Sr). Osim za proizvodnju biokemikalija, biopolimera i za bioremedijaciju, ljubičaste nesumporne bakterije zanimljive su za proizvodnju biogoriva vodika (Frigaard 2016).

2.5. Odabrani proizvodi bioprocasa

2.5.1 Biokemikalije

Biokemikalije su proizvodi dobiveni izolacijom iz biomase, odnosno biorazgradivog dijela proizvoda, otpada ili ostataka iz poljoprivrede, šumskog otpada te biorazgradivog dijela industrijskog otpada, dobiveni različitim biotehnološkim procesima s pomoću različitih mikroorganizama. Različitim tipovima bioprocasa možemo proizvesti različite biokemikalije: vitamine (riboflavin, askorbinska kiselina, cijanokobalamin), organska otapala (etanol, butanol, aceton), enzime (proteaze, lipaze, celulaze), hormone, aminokiseline (lizin, glutaminska kiselina, teonin, asparagin), organske kiseline (octena, mliječna, limunska kiselina) antibiotike i različite masne kiseline (Marić 2000).

2.5.1.1. Ksilitol

Ksilitol ($C_5H_{12}O_5$) je prirodni pentahidroksi šećerni alkohol koji ima širok primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Dasgupta i sur., 2017). Ksilitol slatkoćom, okusom i izgledom podsjeća na saharozu, a koristi se kao niskoenergetski zaslađivač, ulazi u sastav različitih prehrambenih i konditorskih proizvoda, poput žvakaćih guma bez šećera i pekarskih proizvoda. Uz to, ksilitol se koristi kao zaslađivač u mnogim farmaceutskim pripravcima kao zamjena za sukrozu (Jia i sur., 2016). Lijekovi zaslađeni ksilitolom ne utječu na nastanak zubnog karijesa jer ksilitol uzrokuje vrlo mali porast razine glukoze i inzulina u krvi (Cardoso i sur., 2016). Trenutno biorafinerije koje iskorištavaju lignoceluloznu biomasu proizvode različite proizvode s dodatnom vrijednošću među kojima je i ksilitol (Ghaffar i sur., 2017).

Biotehnološki postupak proizvodnje ksilitola rezultat je konverzije ksiloze odgovarajućim mikroorganizmom (Lima i sur., 2014). Supstrati koji se koriste za proizvodnju ksilitola najčešće su lignocelulozne sirovine zbog svoje niske cijene (Martinez i sur., 2007). Biotehnološka predobrada lignoceluloznih sirovina nužna je za proizvodnju ksilitola, u uvjetima koji osiguravaju visoku koncentraciju ksiloze, nisku koncentraciju inhibitora koji djeluju na radni mikroorganizam te visoku selektivnost prema razgradnji celuloze. Optimalni uvjeti ostvareni su odgovarajućom koncentracijom supstrata i inhibitora (Parajo i sur., 1998). Radni mikroorganizmi su većinom bakterije i plijesni. Genetički konstruirani sojevi bakterija *Escherichie coli*, *Bacillus subtilisa* i *Corynebacterium glutamicum* se koriste u proizvodnji ksilitola dok u izboru radnog

mikroorganizma prednjače kvasci uzgojeni na hidrolizatu lignoceluloznih sirovina među kojima su *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia stipites*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *Candida mogii*, *Candida athensensis*, *Candida tropicalis* (Albuquerque i sur., 2014; Silva i sur., 1998). Prilikom odabira plijesni *Mucor indicus* kao radnog mikroorganizma, najveća produktivnost ksilitola ostvaruje se u aerobnim uvjetima s limitiranom količinom kisika jer tada plijesan raste i filamentozno i kao kvasac. Potrebno je optimirati i ostale parametre procesa poput pH, temperature, aeracije te imbolizacije stanica i koncentracije inokuluma, sastav hranjive podloge što uključuje izbor odgovarajućih koncentracija izvora ugljika, dušika, makro i mikronutrijenata (Rafiqul i Mimi Sakinah, 2013).

2.5.1.2. Masne kiseline

Masne kiseline su skupina karboksilne kiseline s lancima duljine 4 - 36 atoma ugljika. Među njima razlikujemo zasićene masne kiseline (eng. Saturated Fatty Acid, SFA), masne kiseline s jednom nezasićenom vezom u lancu (eng. Monounsaturated Fatty Acid, MUFA), masne kiseline s dvije nezasićene veze u lancu (eng. Di-unsaturated Fatty Acid, DUFA), masne kiseline s tri nezasićene veze u lancu (eng. Tri-unsaturated Fatty Acid, TUFA) i masne kiseline s više od tri nezasićene veze u lancu (eng. Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA) (D'Alessandro i Antoniosi Filho, 2016). Prema Chen-u i sur., (2012) masne kiseline kod nekih vrsta mikroalgi čine 70 % masenog udjela lipida, ali i kod drugih organizama pronađene su u sastavu tri estera – fosfolipidi, kolesterilni esteri te trigliceridi. U bilo kojem od spomenutih estera, masne kiseline predstavljaju prehrambeni izvor energije za životinje te su bitne komponente gradivne strukture stanice. Industrijska proizvodnja masnih kiselina rezultat je hidrolize triglicerida te naknadnog uklanjanja glicerola, dok je sintetička proizvodnja masnih kiselina rezultat hidrokarboksilacije alkena (Zhang i sur., 2011).

Masne kiseline svoju upotrebu pronalaze u proizvodnji sapuna, površinski aktivnih sredstava, detrdženata i maziva. Nadalje, određene masne kiseline svoju primjenu pronalaze u proizvodnji emulgatora, sredstava za vlaženje, sredstava za teksutriranje, sredstava protiv pjenjenja te kao stabilizatori (Johansson i Svensson, 2001). Esteri masnih kiselina s jednostavnijim alkoholima koriste se kao omekšivači u kozmetici i drugim proizvodima za osobnu njegu (Sturms i sur., 2017). Estri masnih kiselina sa složenijim alkoholima konzumiraju se u hrani ili se koriste za osobnu njegu i obradu vode ili se koriste kao sintetička maziva ili tekućine za obradu metala (Xin i sur., 2015). Još jedna primjena masnih kiselina je u proizvodnji biodizela, alternativnog goriva za dizel motore. Biodizel je obnovljivo, netoksično gorivo s niskom emisijom plinova (Sandrolhosseini i sur., 2011).

Radni mikroorganizmi koji su sposobni proizvesti više od 20 % masenog udjela lipida u suhoj tvari poznati su kao oleaginozni mikroorganizmi. Određene vrste mikroalgi, bakterija i kvasaca mogu sintetizirati i do 70 % masenog udjela lipida u suhoj tvari, ovisno o uvjetima vođenja uzgoja. Većina sintetiziranih lipida su ugljikovodični nerazgranati lanci dužine 4 – 28 ugljikovih atoma. Najpoznatiji primjeri radnih mikroorganizama su mikroalge *Chlorella vulgaris* i *Chlamydomonas reinhardtii*, kvasci *Cryptococcus curvatus* i *Rhodospiridium toruloides* te plijesni *Fusarium oxysporum* i *Fusarium equiseti* (Patel i sur., 2020).

2.5.1.3. Pigmenti

Rezultat sinteze ljubičastih nesumpornih bakterija su najčešće bakterioklorofili *a* i *b* te karotenoidi u anaerobnim uvjetim na svjetlu, dok aerobni uvjeti u mraku rezultiraju s malom ili gotovo nikakvom sintezom fotosintetskih pigmenata (Takaichi i sur., 2001). Ljubičaste nesumporne bakterije u prisustvu kisika rastu kemotrofno pri čemu im kisik služi kao elektron akceptor, dok se smanjenjem koncentracije kisika potiče sinteza fotosintetskih pigmenata i proteina koji služe za njihovo vezanje. Kompleksi protein – pigment su ugrađeni u citoplazmatsku membranu i formiraju specijalizirani membranski intracitoplazmat sustav. U *Rhodobacter sphaeroides* i *R. capsulatus* tri su različita pigment-protein kompleksa koji služe u transdukciji svjetlosne energije u kemijsku. Nakon prikupljanja svjetlosti energija se prenosi do fotokemijskog reakcijskog centra gdje se odvija transport elektorna i primarna fotokemija (McEwan 1994). Karotenoidi su žuti, narančasti i crveni pigmenti sa širokom primjenom u hrani, hrani za životinje, nutritivnim, kozmetičkim i farmaceutskim industrijama zbog svojih živih boja i promicanja zdravlja. Najvažnija uloga karotenoida u fototrofnim organizmima je u zaštiti od svjetlosti. Štetni učinci svjetlosti puno su ozbiljniji pod aerobnim uvjetima nego u anaerobnim uvjetima jer pobuđivanje bakterijskog klorofila u aerobnim uvjetima uzrokuju stvaranje reaktivnih vrsta kisika (ROS). Kod fototrofnih aerobnih bakterija karotenoidi se ne smiju u potpunosti ukloniti iz njihovog organizma, dok u aerobnim uvjetim fototrofne bakterije nemaju takav zahtjev jer karotenoidi nisu toliko bitni za njihovu zaštitu od svjetlosti zbog čega se mogu koristiti za biotehnološki proizvodnju genetičkim inženjeringom. Genetičkim modifikacijama postiže se sinteza komercijalno vrijednog karotenoida u ljubičastoj nesumpornoj bakteriji *R. Rubrum* (Frigaard 2016). Karotenoidi se mogu podjeliti na one koji sadrže kisik – ksantofili i na karotene koji ne sadrže kisik. Svi su derivati tetraterpena, što znači da su sintetizirani iz 8 molekula izoprena i sadrže 40 atoma ugljika (Wang 2014). Biosinteza karotenoida u ljubičastim bakterijama može se odvijati putem okenona pri čemu su rezultat biosinteze okein ili drugi ketokarotenoidi, te putem spiriloksantina koji obuhvaća normalan i neobičan spiriloksantinski put te sferoidenski i karotenalni put - *Alphaproteobacteria* i *Betaproteobacteria* (Takaichi 2009).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Radni mikroorganizmi

Tijekom izrade ovog rada, kao radni mikroorganizmi korištena je plijesan *Mucor indicus* DSM 2185 te ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340, *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva.

3.1.2. Kemikalije

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih za izradu ovog rada

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
Kvašćev ekstrakt	Za upotrebu u biotehnologiji	Kemika, Hrvatska
Mesni ekstrakt	Za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
Bacto pepton	Za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
D-(+)-glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
Malat	≥99%	Kemika, Hrvatska
Natrijev glutamat	≥99%	Kemika, Hrvatska
Diamonijev fosfat heptahidrat	p.a.	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.	Kemika, Hrvatska
Manganov sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Tiamin - HCl	≥99%	Sigma – Aldrich, Njemačka
Nikotinska kiselina	≥99%	Sigma – Aldrich, Njemačka

Tablica 1. Nastavak

Kemikalije	Čistoća	Proizvođač
Biotin	≥99%	Sigma – Aldrich, Njemačka
Magnezijev diklorid heksahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Amonijev klorid	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev klorid	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev acetat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev sukcinat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Tween	p.a.	Merck, Njemačka
Klorovodična kiselina	≥99%	Kemika, Hrvatska
Sumporna kiselina	min. 96%, p.a.	Kemika, Hrvatska
Etanol	p.a.	Gram-mol, Hrvatska

3.1.3. Hranjive podloge

Hranjiva podloga korištena za pripremu inokuluma plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 je kemijski definirana hranjiva podloga s točnim sastavom navedenim u Tablici 2., dok su hranjive podloge korištene za uzgoj plijesni u biorektoru s točnim sastavom navedenim u Tablici 3. Točan kemijski sastav podloga za inokulum ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 je naveden u Tablici 4., a za *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090 u Tablici 5. Hranjive podloge korištene za uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija su filtrati s preostalim šećerom dobiveni nakon provedenog biotehnološkog procesa uzgoja plijesni *Mucor indicus*.

Tablica 2. Kemijski sastav hranjive podloge za pripremu inokuluma plijesni *Mucor idnicus* DSM 2185

Kemikalija	Kemijski sastav	Masena koncentracija
Glukoza	$C_6H_{12}O_6$	20 g/L
Diamonijev sulfat heptahidrat	$(NH_4)_2SO_4 \times 7 H_2O$	5 g/L
Diamonijev fosfat heptahidrat	$(NH_4)_2HPO_4 \times 7 H_2O$	5 g/L
Mesni ekstrakt	/	5 g/L
Demineralizirana voda	/	/

Tablica 3. Kemijski sastav hranjive podloge za uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185

Kemikalija	Kemijski sastav	Masena koncentracija
Glukoza	$C_6H_{12}O_6$	2 g/L
Ksilaza	$C_5H_{10}O_5$	20 g/L
Arabinoza	$C_5H_{10}O_5$	1 g/L
Mravlja kiselina	CH_2O_2	0.15 g/L
Octena kiselina	CH_3COOH	2 g/L
Kvašćev ekstrakt	/	5 g/L
Diamonijev fosfat heptahidrat	$(NH_4)_2HPO_4 \times 7 H_2O$	5 g/L
Diamonijev sulfat heptahidrat	$(NH_4)_2SO_4 \times 7 H_2O$	5 g/L

Tablica 4. Kemijski sastav hranjive podloge za inkulum ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340

Kemikalija	Kemijski sastav	Masena koncentracija
Kvašćev ekstrakt	/	0,9 g/L
Malat	/	1,62 g/L
Glutamat	/	1,2 g/L
Diamonijev fosfat heptahidrat	$(NH_4)_2HPO_4 \times 7 H_2O$	0,48 g/L
Kalijev dihidrogen fosfat	KH_2PO_4	0,3 g/L
Kalijev hidrogen fosfat	K_2HPO_4	0,3 g/L
Magnezijev sulfat heptahidrat	$MgSO_4 \times 7 H_2O$	0,12 g/L
Kalcijev klorid dihidrat	$CaCl_2 \times 2 H_2O$	0,0318 g/L
Manganov sulfat heptahidrat	$MnSO_4 \times 7 H_2O$	$1,2 \times 10^{-3}$ g/L
Tiamin - HCl	/	$1,0 \times 10^{-3}$ g/L
Nikotinska kiselina	/	$1,0 \times 10^{-3}$ g/L
Biotin	/	$1,0 \times 10^{-3}$ g/L
Destilirana voda	/	/

Tablica 5. Kemijski sastav hranjive podloge za inokulum ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090

Kemikalija	Kemijska formula	Masa, Volumen
Otopina s elementima u tragovima	SLA	0,3 ml
Otopina s vitaminima	VA	0,3 ml
Kalijev dihidrogen fosfat	KH_2PO_4	0,3 g
Magnezijev diklorid heksahidrat	$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,15 g
Kalcijev klorid dihidrat	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,03 g
Amonijev klorid	NH_4Cl	0,3 g
Natrijev klorid	NaCl	0,3 g
Natrijev acetat	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$	0,3 g
Natrijev sukcinat	$\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4$	0,3 g
Kvašćev ekstrakt	/	0,15 g
Bacto pepton	/	0,09 g
Destilirana voda	/	300 ml

3.1.4. Uređaji i oprema

3.1.1.1. Bioreaktor s mješalom i barbotirajući bioreaktor

Bioreaktor s mješalom u kojem se provodio uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 je stakleni reaktor dimenzija 15 x 30 cm, korisnog volumena 2L. Bioreaktor je povezan s komadnom pločom (Biostat MD, B. Braun Biotech International, Njemačka) preko koje se provodi automatska regulacija temperature te pH vrijednosti, 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. Barbotirajući bioreaktor je isti bioreaktor u kojem je umjesto mješala hranjiva pologa miješana strujom zrak preko prstenaste sapnice promjera 5 cm koja je udaljena 2 cm od dna bioreaktora. Protok kroz prstenastu sapnicu kontrolira se preko aerometra.

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

Za praćenje koncentracije ksilitola, glukoze, ksiloze i arabinoze korišten je uređaj tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti, (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD), a sastoji se od crpke (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex)

dimenzija 150 x 7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS).

3.1.1.3. Centrifuga

U svrhu izdvajanja biomase iz hranjive podloge korištena je centrifuga Thermo Scientific SL 8R (Thermo Fischer Scientific, SAD) pri 6000 - 8000 rpm. U svrhu analitike korištena je centrifuga CF-10 High-Performance (Njemačka), pri 7500 rpm.

3.1.1.4. Spektrofotometar

Za potrebe analitike tijekom uzgoja korišten je spektrofotometar Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). U staklenim kivetama promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) određena je optička gustoća uzoraka, a za određivanje apsorpcijskog spektra ekstrahiranih pigmenata korištena je kvarcna kiveta promjera 10 mm istog proizvođača.

3.1.1.5. Sustav za plinsku kromatografiju (eng. Gass Chromatography, GC)

Sastav masnih kiselina u biomasi određen je pomoću uređaja za plinsku kromatografiju GC 2010 Plus AF (Shimadzu, Japan). Sustav se sastoji od automatskog uzorkivača (AOC-20s), injektora (AOC-20i), termostatisane kapilarne kolone (Zebron ZBFAME Phenomenex, SAD), plameno - ionizacijskog detektora (FID-2010 Plus) i računalnog programa za obradu podataka (GC Solutions v2.32).

3.1.1.6. Ostala oprema i pribor

Tijekom izrade eksperimentalnog dijela pored spomenutih uređaja korištena je i 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, LED izvor svjetla, stakleno i plastično laboratorijsko posuđe, hladnjaci i zamrzivač u kojem su čuvani uzorci pri -20°C.

3.2. Metode

3.2.1 Priprema inokuluma plijesni *Mucor indicus* DSM 2185

Prije provođenja biotehnološkog procesa uzgoja plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 pripremljeno je 250 mL podloge za inokulum. Podloga je pripremljena dodatkom kemikalija navedenih u Tablici 2. u 1000 ml demineralizirane vode. Tako pripremljena podloga za inokulum je inkubirana 24 h pri 28 °C uz miješanje na tresilici.

3.2.2. Priprema hranjive podloge za uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185

Za uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 pripremljen je 1L hranjive podloge tako da su izvori ugljika, dušika i faktora rasta (Tablica 3.) otopili u demineraliziranoj vodi. Tako pripremljena podloga sterilizirala se u autoklavu kroz 20 minuta na 121 °C. Vruća podloga se tada sterilno prepumpala u prethodno pripremljen sterilni bioreaktor (Poglavlje 3.1.1.1.).

3.2.3. Priprema inokuluma ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090

Nakon provedenih uzgoja plijesni *Mucor indicus*, pripremljeno je 600ml inokuluma svake ljubičaste nesumporne bakterije. Podloga je pripremljena dodatkom kemikalija navedenih u Tablici 4. za bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340, a za bakteriju *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090 prema točnom sastavu navedenom u Tablici 5.

3.2.4. Priprema filtrata kulture plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 za uzgoj *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090 na različitim tipovima svjetla

Za uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija kao hranjiva podloga iskorišten je filtrat kulture uzgoja plijesni *Mucor indicus* DSM 2185. Budući da je u podlozi nakon provedenog uzgoja još uvijek postojalo neiskorištenih šećera te proizvoda plijesni *Mucor indicus*, cijelokupni volumen hranjivih podloga (od uzgoja u bioreaktoru s mješalom i barbotirajućem bioreaktoru) je centrifugiran te je supernatant iskorišten za uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090. U supernatan su dodani otopina vitamina i elementi u tragovima.

3.2.5. Provedba i nadzor biotehnološke proizvodnje biokemikalija u bioreaktoru s mješalom pomoću plijesni *Mucor indicus* DSM 2185

Uzgoj plijesni *Mucor indicus* proveden je u bioreaktoru dimenzija 15 x 30 cm uz miješalo. 1L pripremljene, sterilizirane, hranjive podloge prepumpan je u aseptičnim uvjetima u prethodno sterilizirani bioreaktor, nakon čega je dodano 250 ml pripremljenog inokuluma plijesni *Mucor*. Ukupni volumen u bioreaktoru iznosio je 1250mL. Proces je vođen pri temperaturi od 28,1 °C, pH ≈ 5, i uz stalno miješanje. Početni broj okretaja iznosio je 350 o/min, a nakon 2h smanjen je na 200 o/min i zadržan do kraja vođenja procesa. U podlogu su dodana sredstva protiv pjenjenja. Uzgoj plijesni provodio se kroz 48h uz sterilno uzimanje uzorka svaka 2h. Uzeti uzorci su centrifugirani, supernatan uzoraka je pripremljen za UPLC analizu (poglavlje 3.2.6.1.), dok je biomasa osušena i pripremljena za GC analizu kako bi se odredio udio masnih kiselina u biomasi (poglavlje 3.2.6.2.).

3.2.6. Provedba i nadzor biotehnoške proizvodnje biokemikalija u barbotirajućem bioreктору pomoću plijesni *Mucor indicus* DSM 2185

Uzgoj plijesni *Mucor indicus* proveden je u barbotirajućem bioreктору dimenzija 15 x 30 cm uz miješanje podloge ostvareno preko prstenaste sapnice strujom zraka. 1L pripremljene, sterilizirane, hranjive podloge prepumpam je u aseptičnim uvjetima u prethodno sterilizirani bioreaktor, nakon čega je dodano 250 ml pripremljenog inokuluma plijesni *Mucor indicus* DSM 2185. Ukupni volumen u bioreктору iznosio je 1250mL. Temperatura vođenja procesa je 28.1°C, pH \approx 5, uz stalnu aeraciju. U podlogu su dodana sredstva protiv pjenjenja. Uzgoj plijesni provodio se kroz 48h uz sterilno uzimanje uzoraka svaka 2h. Uzeti uzorci su centrifugirani, supernatan uzoraka je pripremljen za UPLC analizu (poglavlje 3.2.6.1.), dok je biomasa osušena i pripremljena za GC analizu kako bi se odredio udio masnih kiselina u biomasi (poglavlje 3.2.6.2.).

3.2.7. Provedba i nadzor uzgoja nesumpornih ljubičastih bakterija

Tri različite ljubičaste nesumporne bakterije uzgajane su na različitim izvorima svjetlosti (crveno, plavo, kombinacija crvenog i plavog svjetla). Za svaku vrstu ljubičastih nesumpornih bakterija pripremljena je tikvica s 250ml sterilizirane hranjive podloge u koju je nacijepljeno 150ml pripremljenog inokuluma (poglavlje 3.2.3.) u aseptičnim uvjetima. Uzgoj se provodio tri tjedna pri 28°C bez miješanja. Kao izvor svjetlost korišteno je LED svjetlo, a proces je trajao 144h. Svaka 24h su sterilno uzimani uzorci od 5ml te su pripremljeni za spektrofotometriju kojom se pratio porast biomase te apsorpcijski maksimum i minimum, dok su nakon svakih 96 i 144h sterilno uzeti uzorci za ekstrakciju ukupnih pigmenata i spektrofotometrijsko određivanje bakterioklorofila *a* (poglavlje 3.2.6.3.).

3.2.6 Analitičke metode

3.2.6.1. Određivanje koncentracije hidroliziranih šećera UPLC metodom

Određivanje koncentracije hidroliziranih šećera postignuto je UPLC metodom. Uzorci izuzeti svaka 2h od uzgoja plijesni *Mucor indicus* u bioreктору s mješalom i barbotirajućem bioreктору pripremljeni su za UPLC analizu. U 750 μ L supernatanta uzorka dodano je 750 μ L 10%-tne otopine cinkova sulfata. Nakon toga je dvostruko razrijeđeni uzorak vorteksiran i ostavljen na sobnoj temperaturi 15 minuta kako bi se provela reakcija između dodanog cinkovog sulfata i proteina te ostalih prisutnih nečistoća. Centrifugiranjem 15 minuta na 10000rpm izdvojeni su istaloženi proteini, a dobiveni supernatant je profiltriran kroz mikrobiološki filter promjera pora 0,2 μ m u staklenu vialu. Na taj način pripremljeni uzorci su spremi za UPLC analizu.

Korištena mobilna faza je 0,0025M otopina sulfatne kiseline pripremljena na način da je u 1L destilirane vode otpipetirano 139 μ L spomenute sulfatne kiseline. Dobivena otopina je filtrirana i dekarbonizirana djelovanjem Ultrazvučne kupelji. 10 μ L pripremljenog uzorka propušteno je kroz kolonu pri 55°C. Dobiveni kromatogrami obrađeni su pomoću računalnog programa Open LAB.

3.2.6.2. Određivanje udjela masnih kiselina u biomasi provedenih uzgoja

Određivanje udjela masnih kiselina u uzetim uzrocima postignuto je analizom na plinskom kromatogramu GC – 2010 Plus (Shimadzu, Japan) opremljenom masnim detektorom (FID). Prije provođenja analize potrebno je pripremiti uzorke. U staklene viala izvagano je 5-10 mg biomase koja je prethodno osušena na 50°C. Odvazi je dodano 20 μ L surogat standarda metil tridekanoata (C13:0 ME, $\gamma = 10 \text{ mg mL}^{-1}$), 200 μ L otopine kloroform:metanol (2:1, v/v) i 300 μ L 0,6 M otopine HCl u metanolu. Reakcijska smjesa je homogenizirana, a potom inkubirana u vodenoj kupelji na 85 °C kroz sat vremena. Nakon završene reakcije, uzorak je kroz 15min ohlađen na sobnoj temperaturi, a potom je dodan 1mL heksana i smjesa je ostavljena na sobnoj temperaturi 60 minuta kako bi došlo do razdvajanja faza. Gornja heksanska faza je otpipetirana u čistu vialu radi daljne pripreme za GC analizu, dok je donja vodena faza bačena. Organskoj fazi dodan je određeni volumen internog standarda pentadekana koncentracije 1 mg mL⁻¹ (5 μ L na 200 μ L uzorka). Na ovaj način pripremljen uzorak propušten je kroz kolonu za plinsku kromatografiju. Identifikacija masnih kiselina u uzorcima određena je usporedbom vremena zadržavanja njihovih metilnih estera s vremenima zadržavanja metilnih estera standardne smjese 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 - C24) analiziranih u istim uvjetima. Dobivene koncentracije metilnih estera masnih kiselina normalizirane su prema količini standarda C13:0 ME i izražene masenim udjelom u suhoj tvari biomase [%]:

$$m_{x, \text{norm.}} = \frac{yx}{\gamma C13} \cdot m_{C13}$$

$$w_x = \frac{m_{x, \text{norm.}}}{m_u} \cdot 100$$

pri čemu je:

yx - koncentracija metilnog estera masne kiseline [mg L⁻¹]

γ C13 - koncentracija standarda metil tridekanoata [mg L⁻¹]

mC13 – masa standarda metil tridekanoata dodanog u reakcijsku smjesu [mg]

m_u - masa suhe biomase [mg].

Tablica 6. Uvjeti rada na uređaju za plinsku kromatografiju

Kolona	Kapilarna kolona ZB-FAME (Zebron), 30 m x 0,25 mm debljina filma 0,20 µm, stacionarna faza: cijanopropil-silikon
Detektor	FID
Temperatura injektora	250 °C
Temperaturni program	100 °C uz zadržavanje 2 min; 10 °C min ⁻¹ do 140 °C; 3 °C min ⁻¹ do 190°C ; 30 °C min ⁻¹ do 260 °C uz zadržavanje 2 min
Plin nosač i protok	Helij, 1,2 mL min ⁻¹
Parametri FID	Helij (30 mL min ⁻¹), dušik (40 mL min ⁻¹), kisik (400 mL min ⁻¹)
Omjer razdijeljenja	1:15
Temperatura detektora	260 °C
Količina injektiranog uzorka	2 µL

3.2.6.3. Ekstrakcija ukupnih pigmenata i spektrofotometrijsko određivanje klorofila *a*

Spektrofotometrijskom određivanju bakterioklorofila *a* prethodi postupak ekstrakcije pigmenata iz vlažne biomase. 10 ml uzorka centrifugirano je 15 minuta pri 8000rpm. Izdvojenom talogu biomase dodan je 4 g staklenih kuglica u cilju mehaničkog razbijanja stanica bakterija i 5 ml smjese acetona i etanola u omjeru 7:2 (vol/vol) u svrhu ekstrakcije pigmenata. Uzorak je potom vorteksiran 2 minute, a nakon toga hlađen 2 minute, a navedeni postupci ponovljeni su naizmjerno tri puta. Potrebno je sve provoditi u što manje osvijetljenom prostoru kako bi se spriječila degradacija pigmenata. Nakon što smo proveli ekstrakciju, uzorak je potrebno centrifugirati 10 minuta pri 8000rpm, nakon čega supernatant se spektrofotometrijski analizira, u kvarcnoj kivetici, skeniranjem u području valnih duljina od 300-900nm. Koncentracija klorofila *a* u biomasi određuje se prema formuli za ekstrakciju smjesom etanol/acetona (Ritchie 2018):

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

3.2.6.4. Odeđivanje optičke gustoće

Optička gustoća uzoraka mjerena je skeniranjem uzoraka u području valnih duljina od 300-900nm na spektrofotometru, u cilju praćenja porasta biomase i određivanja apsorpcijskog minimuma, odnosno maksimuma ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090.

3.2.6.5. Odeđivanje pokazatelja uspješnosti procesa

Pokazatelji uspješnosti bioprocesa:

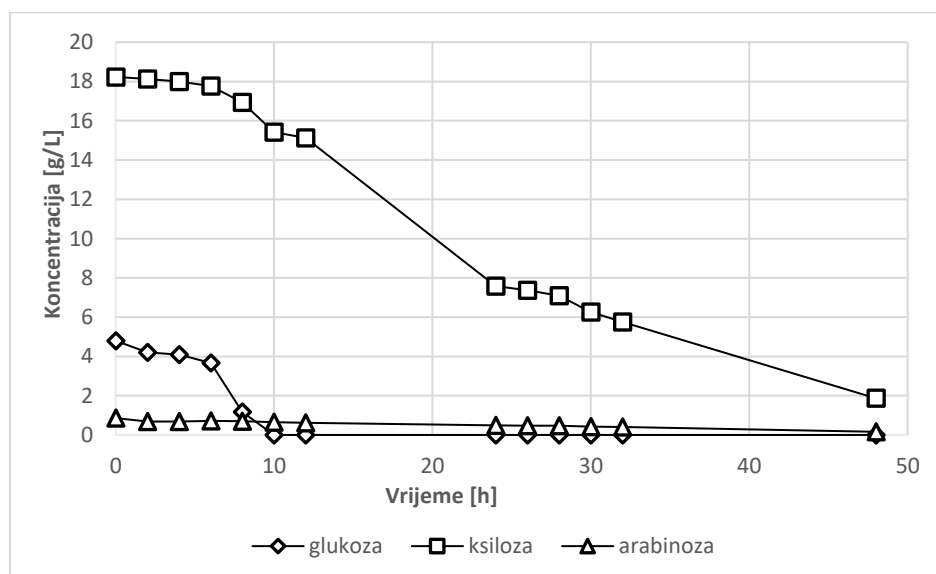
1. Prinos biomase (Y_x) $\rightarrow Y_x = X - X_0$ [g/L], pri čemu je X_0 početna koncentracija biomase, a X konačna koncentracija biomase.
2. Potrošnja supstrata (ΔS) $\rightarrow \Delta S = S_0 - S$ [g/L], gdje je S_0 početna koncentracija supstrata, a S konačna koncentracija supstrata.
3. Koeficijent konverzija supstrata u biomasu ($Y_{x/s}$) $\rightarrow Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$ [g/g]
4. Specifična brzina rasta (μ) $\rightarrow \mu = \frac{1}{\Delta t} \times \ln \frac{X}{X_0}$ [h⁻¹], pri čemu je Δt vremenski interval, X je koncentracija biomase u određenom vremenskom intervalu, a X_0 početna koncentracija biomase.
5. Produktivnost sinteze biomase (Pr) $\rightarrow Pr = \frac{X - X_0}{t_{uk}}$ [g/Lh], gdje t_{uk} predstavlja ukupno vrijeme trajanja uzgoja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

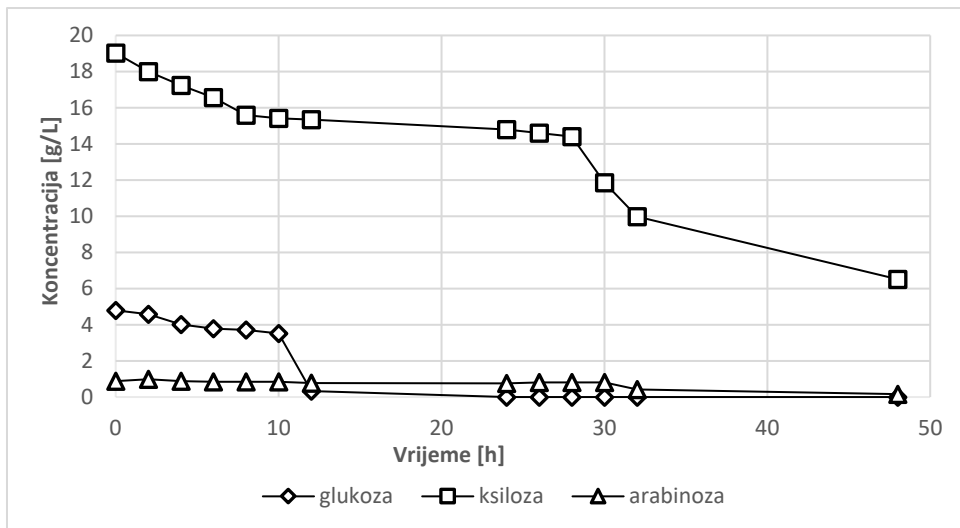
U ovom radu prikazan je uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 u dva različita tipa bioreaktora na podlogama s izvorima ugljika zastupljenim u hidrolizatu predobrađenih lignoceluloznih sirovina. Tijekom uzgoja pratio se utjecaj različitih tipova bioreaktora na prinos proizvoda procesa te potrošnju šećera u hranjivoj podlozi i prinos biomase i udio masnih kiselina u istoj (poglavlje 4.1.). Nakon uzgoja plijesni, otpadna hranjiva podloga iskorištena je za uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090, gdje se ispitaio utjecaj različitih izvora svjetlosti na proizvodnju bakteriofila *a* (poglavlje 4.2.).

4.1. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 u dva različita tipa bioreaktora na podlogama s izvorima ugljika koji su zastupljeni u hidrolizatima dobivenim pretretmanima lignoceluloznih sirovina

Uzgoj plijesni *Mucor indicus* vodio se u bioreaktoru s mješalom (poglavlje 3.2.5.) te u barbotirajućem bioreaktoru (poglavlje 3.2.6.). Za uzgoj plijesni *Mucor indicus* pripremljena je hranjiva podloga s točnim sastavom navedenim u Tablici 3. Inokulum plijesni pripremljen je 24 sata prije uzgoja u bioreaktoru (poglavlje 3.2.1.). Plijesan *Mucor indicus* može koristiti glukozu i ksilozu kao supstrate za svoj rast, a spomenuti šećeri su u najvećoj količini prisutni u hidrolizatu lignoceluloznih sirovina. Tijekom oba uzgoja pratila se koncentracija glukoze, ksiloze, arabinoze, te se odredila koncentracija ksilitola. Na kraju procesa pomoću GC-FID metode odredio se sadržaj masnih kiselina u biomasi plijesni *Mucor indicus*. Rezultati su prikazani na Slikama 1. i 2. te u Tablicama 7.,8. i 9.



Slika 1. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze i arabinoze tijekom uzgoja plijesni *Mucor indicus* u bioreaktoru s miješalom na hidrolizatu lignoceluloznih sirovina. Uvjeti uzgoja: broj okretaja 200 min^{-1} , vrijeme uzgoja 48h, ukupni volume 1200mL.



Slika 2. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze i arabinoze tijekom uzgoja plijesni *Mucor indicus* u barbotirajućem bioreaktoru na hidrolizatu lignoceluloznih sirovina. Uvjeti uzgoja: vrijeme uzgoja 48h, ukupni volumen 1200mL.

Na početku uzgoja u bioreaktoru s mješalom koncentracija glukoze u podlozi iznosila je 4,8 g/L, ksiloze 18,23 g/L, a arabinoze 0,86 g/L. U prvih 8h uzgoja iskorištena je cijelokupna glukoza koja se nalazila u hranjivoj podlozi, dok su ksiloza i arabinoza korištene tijekom cijelog uzgoja (48h). Potrošnja supstrata na kraju uzgoja iznosila je 4,8 g/L za glukožu, 16,36 g/L za ksiložu te za arabinozu 0,7 g/L. Prinos proizvoda iznosi 6,634393 g/L ksilitola. Koeficijent konverzije supstrata u proizvod iznosi 0,405 g/g. Prinos biomase iznosi 3,5414 g/L, a koeficijent konverzije supstrata u biomasu iznosi 0,486 g/g. Određena specifična brzina rasta bila je 0,279 h⁻¹, dok produktivnost sinteze biomase u bioreaktoru s mješalom iznosila 0,138 g/Lh.

Kod uzgoja u barbotirajućem bioreaktoru sva glukoza iz podloge potrošena je tijekom prvih 15h uzgoja, skoro duplo duže nego u bioreaktoru s mješalom. Rezultati dobiveni u istraživanju Abedinifar i sur., (2009) pokazuju da je u njihovom procesu uzgoja plijesni *M. indicus*, bilo potrebno čak 25 sati za potpunu asimilaciju glukoze. Značajniju promjenu u potrošnji ksiloze uočavamo između 25 i 35 sata uzgoja (Slika 2.). Potrošnja supstrata na kraju uzgoja iznosila je 4,8 g/L za glukožu, 12,5 g/L za ksiložu, te za arabinozu 0,72 g/L. Prinos ksilitola iznosi 0,750836 g/L. Koeficijent konverzije supstrata u proizvod iznosi 0,06 g/g. Prinos biomase iznosi 4,624 g/L, a koeficijent konverzije supstrata u biomasu iznosi 0,7698 g/g specifična brzina rasta 0,234 h⁻¹, dok produktivnost sinteze u barbotirajućem bioreaktoru iznosi 0,0156 g/Lh. Usporedbom dobivenih rezultata možemo zaključiti da je potrošnja šećera u hranjivoj podlozi manja u barbotirajućoj koloni u odnosu na bioreaktor s mješalom, zbog čega je i manja produktivnost procesa te naposljetku i prinos ksilitola, dok je prinos biomase u barbotirajućoj koloni veći. Prema literaturi, povećanjem aeracije ne potiče se veća proizvodnja ksilitola iz

ksiloze i njegovo oslobađanje iz stanice, jer se veliki dio ksiloze konvertira u ksilulozu, a potom u etanol (Millati i sur., 2008) Zbog izrazito aerobnih uvjeta u barbotirajućoj koloni, došlo je do proizvodnje značajno manje količine ksilitola. U usporedbi s radom Karimi i sur., (2006) gdje je prinos ksilitola po gramu ugljikohidrata prisutnih u hidrolizatu rižine slame iznosio 0,18 g/g možemo zaključiti da je prinos ksilitola u ovom eksperimentu gotovo 2 puta veći za uzgoj u bioreaktoru s mješalom kao i uzgoj u barbotirajućoj koloni. Biomasa plijesni predstavlja vrijedan izvor masnih kiselina. Vodeći se biorafinerijskim principom željelo se dobiti više proizvoda iz jedne biotehnoške proizvodnje. Iz dobivene biomase plijesni izolirale su se masne kiseline prema postupku opisanom u poglavlju 4.2.6.2.

Tablica 7. Prikaz parametara uspješnosti proizvodnje etanola u HRCB-u i barbotirajućem bioreaktoru.

	Bioreaktor s mješalom	Barbotirajući bioreaktor
$\Delta S_{\text{glukoza}}$ [g/L]	4,8	4,8
$\Delta S_{\text{ksiloza}}$ [g/L]	16,36	12,5
$\Delta S_{\text{arabinoza}}$ [g/L]	0,7	0,72
Y_x [g/L]	3,5414	4,624
Y_P [g/L]	6,634393	0,750836
$Y_{P/S}$ [g/g]	0,405	0,06
$Y_{X/S}$ [g/g]	0,486	0,7698
μ [g/L]	0,279	0,234
Pr [g/Lh]	0,138	0,0156

Tablica 8. Profil masnih kiselina izražen kao udjel u ukupnim staničnim lipidima plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 uzgojenoj na hidrolizatu lignoceluloznih sirovina u bioreaktoru s mješalom na kraju uzgoja

Oznaka	Naziv masne kiseline	Y [mg/L]	W_{MK} ukupno [%]
C8:0	Dekadska kiselina (kaprinska kiselina)	2,985	4,1239
C11:0	Undekanska kiselina	2,401	3,3171
C14:0	Tetradekanska kiselina (miristinska kiselina)	0,944	1,3042
C16:0	Hekسادekanska kiselina (palmitinska kiselina)	13,585	18,7682

Tablica 8. Nastavak

C16:1 cis 9	cis-9-heksadekanoična kiselina (palmitoleinska kiselina)	1,571	2,1704
C18:1 cis 9	Cis-9-oktadekanoična kiselina (oleinska kiselina)	36,51	50,4400
C18:2 trans 9,12	Trans-9, trans-12- oktadekanoična kiselina (linolna kiselina)	9,039	12,4877
C18:2 cis 9,12	Cis-9, cis-12-oktadekanoična kiselina (linolna kiselina)	5,348	7,3885
W ukupne masne kiseline, biomasa [%]	1,0698207		

Tablica 9. Profil masnih kiselina izražen kao udjel u ukupnim staničnim lipidima plijesni *Mucor indicus* uzgojenoj na hidrolizatu lignoceluloznih sirovina u barbotirajućem bioreaktoru na kraju uzgoja

Oznaka	Naziv masne kiseline	Y [mg/L]	W_{MK} ukupno [%]
C14:0	Tetradekanska kiselina (miristinska kiselina)	1,846	1,3547
C16:0	Heksadekanska kiselina (palmtinska kiselina)	22,222	16,3079
C16:1 cis 9	Cis-9-heksadekanoična kiselina (palmitoleinska kiselina)	4,79	3,51521
C18:1 cis 9	Cis-9-oktadekanoična kiselina (oleinska kiselina)	64,203	47,1163
C18:2 trans 9,12	Trans-9, trans-12- oktadekanoična kiselina (oleinska kiselina)	31,589	23,182

Tablica 9. Nastavak

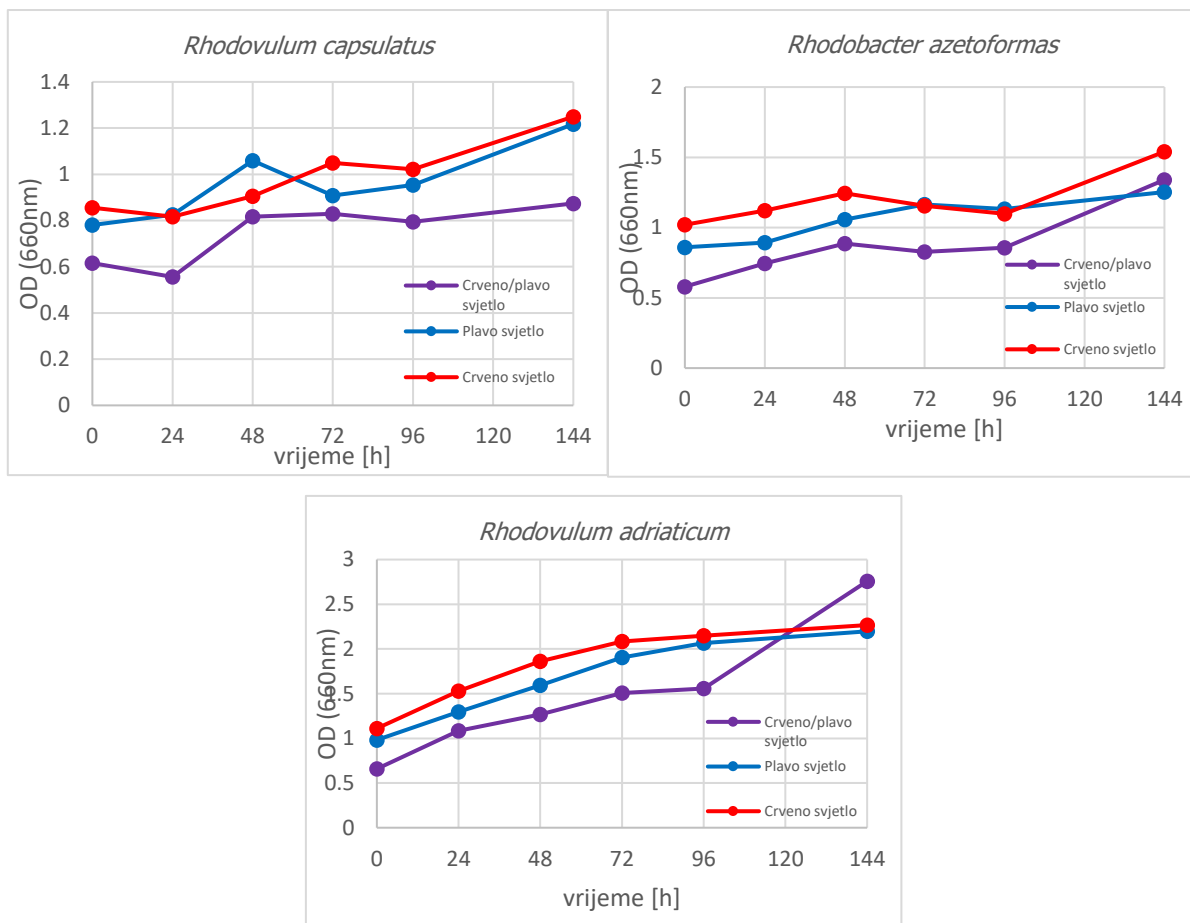
C18:2 cis 9,12	Cis-9, cis-12- oktadekanoična kiselina (oleinska kiselina)	11,615	8,52383
C18:3 cis 6,9,12	Cis-6, cis-9, cis-12- oktadekanoična kiselina (oleinska kiselina)	2,772	23,3766
W ukupne masne kiseline, biomasa [%]		4,87841	

Rezultati određivanja masnih kiselina u ukupnim staničnim lipidima plijesni *Mucor indicus* pokazuju da za 48h uzgoja vođenog u biorekatoru s mješalom najveći udjel čine nezasićene među kojima najviše jednostruko nezasićene masne kiseline (MUFA), gdje je prisutan najveći udjel cis-9-oktadekanoična kiselina s 50,5 %. Postotak zasićenih masnih kiselina iznosi 27,5 % s najvećim udjelom palmitinske kiseline u postotku od 18,8 % (Tablica 8.)

Rezultati određivanja masnih kiselina u ukupnim staničnim lipidima plijesni *Mucor indicus* pokazuju da za 48h uzgoja u barbotirajućem biorekatoru također je prisutan veći postotak nezasićenih masnih kiselina u odnosu na zasićene masne kiseline. Najzastupljenija je cis-9-oktadekanoična kiselina u postotku od 47,2 %. Od zasićenih masnih kiselina prisutne su miristinska i palmitinska kiselina s ukupnim udjelom od 17,6 % (Tablica 9.).

4.2. Utjecaj različitih tipova svjetlosti na rast ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090 u filtratu kulture uzgoja plijesni *Mucor indicus* DSM 2185

U svrhu ispitivanja utjecaja različitog izvora svjetlosti na rast i sintezu pigmenta bakterioklorofila *a* bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090, vođen je uzgoj spomenutih ljubičastih nesumpornih bakterija na prevreloj hranjivoj podlozi zaostaloj od uzgoja plijesni *Mucor indicus* DSM 2185. Kao svjetlost korištena su tri različita izvora svjetlosti, crveno, plavo te kombinacija crvenog i plavog svjetla. Uzgoj na svakom izvoru svjetlosti vođen je kroz 144h.



Slika 3. Krivulje rasta ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090 na crvenom, plavom i kombinaciji crvenog i plavog svjetla

Preostali ugljikohidrati u otpadnoj podlozi nakon izolacije biomase plijesni predstavljaju vrijedan izvor ugljika koji se nebi trebao baciti. Stoga je u ovom istraživanju otpadna podloga iz uzgoja plijesni *Mucor indicus* iskorištena za uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija. Rezultati istraživanja pokazuju da sve tri vrste ljubičastih nesumpornih bakterija utroše glukozu potpuno, a nakon što iskoriste glukozu prelaze na previranje preostalih šećera u hranjivoj podlozi. Ksilozu kao izvor ugljika bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 iskorištava najefikasnije pri crvenom izvoru svjetlosti, nešto slabije pri plavom te najslabije u kombinaciji crvenog i plavog svjetla. Kod *Rhodovulum adriaticum* DSM 2178 uočavamo najveće iskorištenje ksiloze u odnosu na druga dva soja, pri čemu je najveća potrošena koncentracija glukoze na crvenom svjetlu, zatim na plavom svjetlu i najmanja pri kombinaciji plavog i crvenog svjetla. *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090 najslabije koristi ksilozu, te je pri svakom izvoru svjetlosti niska promjena u koncentraciji ksiloze u hranjivoj podlozi. *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 arabinozu kao izvor ugljiva gotovo da ne troši, a uočena je mala potrošnja arabinoze pri plavom izvoru svjetlosti. *Rhodovulum adriaticum* DSM 2178 arabinozu podjednako troši pri sva tri

izvora svjetlosti, te je prosječna promjena koncentracije arabinoze 0,0782 g/L. *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090 arabinozu troši u malim koncentracijama, dok je nešto značajnija potrošnja uočena pri uzgoju na plavom svjetlu (Tablica 9-11.). Prinos biomase izračunat je na temelju dobivenih podataka mjerenjem optičke gustoće pri valnoj duljini od 660nm te pomoću jednadžbe baždarnog pravca dobivenog iz gravimetrijski određenog prinosa biomase. Koeficijent konverzije supstrata u biomasu određen je iz prinosa biomase i srednje vrijednosti potrošnje dostupnih koncentracija šećera u hranjivoj podlozi. Najveći prinos biomase uočavamo kod bakterije *Rhodovulum adriaticum* na crvenom izvoru svjetlosti 2,044 g/L gdje je i produktivnost procesa najveća i iznosi 0,014 g/L, kao i specifična brzina rasta 0,0209 h⁻¹. Prinos biomase *Rhodobacter azetiformans* na crvenom svjetlu iznosi 1,007 g/L, a od *Rhodovulum capsulatus* 0,83 g/L. Koeficijent konverzije supstrata u biomasu najveći je kod bakterije *Rhodovulum capsulatus* i iznosi 6,80 g/g. Na plavom izvoru svjetlosti sve tri ljubičaste bakterije rastu slabije u odnosu na crveno svjetlo, dok je najslabiji rast zabilježen na kombinaciji crvenog i plavog izvora svjetlosti (Tablice 12).

Tablica 9. Potrošnja glukoze, ksiloze, arabinoze i xylitola tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718 na različitim tipovima svjetlosti

<i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2718	$\Delta S_{\text{ksiloza}}$ [g/L]	$\Delta S_{\text{arabinoza}}$ [g/L]	$\Delta S_{\text{glukoza}}$ [g/L]	$\Delta S_{\text{xylitol}}$ [g/L]
crveno svjetlo	2,713778	0,079319	0,272491	0,371172
plavo svjetlo	2,382066	0,062549	0,271929	0,282188
kombinacija	0,863995	0,082403	0,210529	0,113405

Tablica 10. Potrošnja glukoze, ksiloze, arabinoze i xylitola tijekom uzgoja *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 na različitim tipovima svjetlosti

<i>Rhodobacter azotoformans</i> JCM 9340	$\Delta S_{\text{ksiloza}}$ [g/L]	$\Delta S_{\text{arabinoza}}$ [g/L]	$\Delta S_{\text{glukoza}}$ [g/L]	$\Delta S_{\text{xylitol}}$ [g/L]
crveno svjetlo	0,763609	0,11345	0,399503	0,00011
plavo svjetlo	0,638784	0,0023	0,399592	0,279376
kombinacija	0,149026	0,0016	0,131887	0,058523

Tablica 11. Potrošnja glukoze, ksiloze, arabinoze i xylitola tijekom uzgoja *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090 na različitim tipovima svjetlosti

<i>Rhodobacter capsulatus</i> JCM 21090	$\Delta S_{\text{ksiloza}}$ [g/L]	$\Delta S_{\text{arabinoza}}$ [g/L]	$\Delta S_{\text{glukoza}}$ [g/L]	$\Delta S_{\text{xylitol}}$ [g/L]
crveno svjetlo	0,301914	0,013454	0,289862	0,092888
plavo svjetlo	0,136405	0,057894	0,271145	0,00012
kombinacija	0,03112	0,001853	0,289862	1,816534

Tablica 12. Pokazatelji uspješnosti vođenja procesa uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090 na različitim tipovima svjetlosti

Izvor svjetlosti:	Y_x [g/L]	μ [h ⁻¹]	$Y_{x/s}$ [g/g]	Pr [g/Lh]
Crveno svjetlo:				
<i>R. adriaticum</i> DSM 2718	2,044157	0,020955	2,8250601	0,014195
<i>R. azotoformans</i> JCM 9340	1,0075258	0,014548	3,156725	0,0069967
<i>R. capsulatus</i> JCM 21090	0,836159	0,0131221	4,790945	0,005807
Plavo svjetlo:				
<i>R. adriaticum</i> DSM 2718	1,932596	0,018528	2,57788425	0,0134208
<i>R. azotoformans</i> JCM 9340	0,862022	0,0131638	2,6115924	0,0059863
<i>R. capsulatus</i> JCM 21090	0,792173	0,0143722	6,806136	0,0055012
Kombinacija crvenog i plavog svjetla:				
<i>R. adriaticum</i> DSM 2718	0,021347	0,0069915	0,67217	0,000148
<i>R. azotoformans</i> JCM 9340	0,898974	0,0114804	1,073286	0,006249
<i>R. capsulatus</i> JCM 21090	0,5188654	0,0215188	0,970118	0,00360322

Nadalje, provedeno je spektrofotometrijsko skeniranje uzoraka u području valnih duljina od 350 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 2718, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090 tijekom uzgoja na svakom od izvora svjetlosti nisu pokazali očekivajući apsorpcijski maksimum pri valnim duljinama od 800 – 850nm.

Osim spektrofotometrijskog određivanja biomase napravljena je ekstrakcija ukupnih pigmenata te je nakon ekstrakcije provedeno spektrofotometrijsko skeniranje supernatanta u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm radi praćenja promjene koncentracije i udjela bakterioklorofila *a* u bakterijskoj biomasi. Ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum*, *Rhodobacter azotoformans* i *Rhodovulum capsulatus* sintetiziraju pigmente koji imaju karakteristični apsorpcijski maksimum u području valnih duljina od 800 do 910nm. Zbog ekstrakcije pigmenata organskim otapalima dolazi do pomaka apsorpcijskih maksimuma bakterioklorofila *a* sa spomenutog područja na 775nm, budući da valne duljine apsorpcijskih maksimuma ovise o kemijskom okruženju pigmenta (Oren 2011). Pomak apsorpcijskog maksimuma ekstrahiranih pigmenata slabo je uočljiv prilikom uzgoja na sva tri izvora svjetlosti zbog čega rezultati nisu prikazani. Koncentracije bakterioklorofila *a* tijekom uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodovulum adriaticum*, *Rhodobacter azotoformans* i *Rhodovulum capsulatus* prikazane su u Tablici 13. Vrijednosti koncentracija bakterioklorofila *a* se kreću od 0,04 mg/L do 1,23 mg/L. Tijekom uzgoja na kombinaciji crvenog i plavog svjetla razvile su se najmanje količine bakterioklorofila *a* kod sve tri bakterije čije vrijednosti nisu prelazile koncentraciju od 0,52 g/L. Tijekom uzgoja na plavom svjetlu kod bakterije *Rhodovulum adriaticum* koncentracija bakterioklorofila *a* se smanjila nakon 96h uzgoja, te na kraju kultivacije iznosi 0,82 mg/L. Tijekom kultivacije *Rhodobacter azotoformans* uočavamo značajni pad koncentracije na kraju uzgoja u odnosu na 96h vođenja procesa, gdje promjena koncentracije iznosi $\approx 0,5$ mg/L. Za razliku od prethodno spomenutih bakterija, kod bakterije *Rhodovulum capsulatus* se uočava porast koncentracije na kraju uzgoja za $\approx 0,2$ mg/L. Crveno svjetlo se pokazalo kao najuspješniji izvor svjetlosti za sintezu bakterioklorofila *a* kod sve tri bakterije, a kod *Rhodovulum adriaticum* uočavamo najveću vrijednost koncentracije od 1,234883 mg/L nakon 96h uzgoja.

Tablica 13. Koncentracija bakterioklorofila *a* nakon 96h i 144h kultivacije ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090 na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi sa glukozom kao izvorom ugljika

<i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781		
Izvor svjetlosti:	Bchl <i>a</i> (nakon 96h) [mg/L]	Bchl <i>a</i> (nakon 144h) [mg/L]
Crveno/plavo svjetlo	0,527066	0,520493
Plavo svjetlo	0,884952	0,822111
Crveno svjetlo	1,234883	0,578826
<i>Rhodobacter azotoformans</i> JCM 9340		
Crveno/plavo svjetlo	0,153736	0,205047
Plavo svjetlo	0,835417	0,354127
Crveno svjetlo	1,226745	1,082968
<i>Rhodovulum capsulatus</i> JCM 2109		
Crveno/plavo svjetlo	0,053398	0,037615
Plavo svjetlo	0,758326	0,931561
Crveno svjetlo	0,824623	1,099952

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata provedenog istraživanja zaključeno je sljedeće:

1. Plijesan *Mucor indicus* u mikroaerofilnim uvjetima tijekom uzgoja u bioreaktoru s mješalom raste ostvaruje prinos ksilitola od 6,634393 g/L, a produktivnost procesa iznosi 0,138 g/Lh. U barbotirajućoj koloni u aerobnim uvjetima plijesan *Mucor indicus* ostvaruje manji prinos ksilitola od 0,750836 g/L, a analogno tome, produktivnost procesa je manja i iznosi 0,0156 g/Lh.
2. Određivanjem masnih kiselina u ukupnim staničnim lipidima plijesni *Mucor indicus* nakon završenog procesa vođenog u bioreaktoru s mješalom detektirano je 8 masnih kiselina, među kojima je veći postotak nezasićenih masnih kiselina 78,6%, a najprisutnija je cis-9 oktadekanoična kiselina u postotku od 55,38 %. U barbotirajućem bioreaktoru detektirano je 7 masnih kiselina, najzastupljenija je cis-9-oktadekanoična kiselina s postotkom od 47,11 %. Od zasićenih masnih kiselina prisutne su miristinska i palmitinska kiselina s ukupnim udjelom od 17,6 %.
3. Tijekom uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090 najveći prinos biomase i koeficijent konverzije supstrata u biomasu za sve tri ljubičaste nesumporne bakterije dobiveni su prilikom kultivacije na crvenom izvoru svjetlosti. Na plavom izvoru svjetlosti koeficijent konverzije supstrata u biomasu i prinos su nešto manji, dok se kombinacija crvenog i plavog svjetla pokazala neodgovarajućom
4. Koncentracija fotosintetskog pigmenta bakterioklorofila *a* tijekom svih uzgoja bila je relativno niska. Najveći udio bakterioklorofila *a* u biomasi zabilježen je tijekom uzgoja na crvenom izvoru svjetlosti, nakon 96 sati kod *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 te *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340, dok je kod *Rhodovulum capsulatus* JCM 21090 najveći udio zabilježen nakon 144h.

6.LITERATURA

Alvira P., Tomas-Pejo E., Ballesteros M., Negro M.J., (2009) Preatreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, *Bioresour Technol* 101, 4851-61

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. doi: 10.1002/elsc.201800039.

Balat, M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energ. Convers. Manage.* 52, 858-875. doi: 10.1016/j.enconman.2010.08.013

Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., Komes, D., Novak, S., Šantek, B. (2018) Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technol. Biotech.* 56, 289-311. doi:10.17113/ftb.56.03.18.5546.

Borchert M, Libra JA (2001) Decolorization of reactive dyes by the white and rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing bath reactors. *Biotechnol Bioeng* 57, 313–321

Castillo Martinez, F. A., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti A., Oliveira, R. P. S. (2013) Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci. Tech.* **30**, 70-83.

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

Chen, L., Liu, T., Zhang, W., Chen, X., Wang, J. (2012) Biodiesel production from algae oil in free acids by two-step catalytic conversion. *Bioresource technology* **111**, 208-214.

Chen, W., Zhong, L. X., Peng, X. W., Wang, K., Chen, Z. F., & Sun, R. C., (2014). Xylan-type hemicellulose supported palladium nanoparticles: a highly efficient and reusable catalyst for the carbon–carbon coupling reactions, *Catal Sci Technol*, 4, 1426- 1435.

Cherubini, F., Jungmeier, G., Wellisch, M., Willke, T., Skiadas, I., Van Ree, R., de Jong, E. (2009) Toward a common classification approach for biorefinery systems. *Model. Anal.* **3**, 534–546.

Cottet, C., Ramirez-Tapias, Y., Delgado, J., de la Osa, O., Salvay, A., Peltzer, M. (2020) Biobased Materials from Microbial Biomass and Its Derivatives. *Materials* **13**, 1263.

- D'Alessandro, E. B., Antoniosi Filho, N. R. (2016) Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 58, 832–841.
- 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*
- Eriksson, K.-E., R.A. Blanchette and P. Ander. 1990). *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 407
- Fengel D. i Wegener G., (1984) *Wood –chemistry, ultrastructure, reactions* (Belgacem M. N., Gandini A., ured.), Elsevier , Amsterdam, str. 289-300
- Frigaard, N. U. (2016) *Biotechnology of Anoxygenic Phototrophic Bacteria*. U: *Anaerobes in Biotechnology*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 156, (Hatti-Kaul R., Mamo G., Mattiasson B., ured.), Springer, Cham, str. 139 – 154.
- Girometta, C., Picco, A.M., Baiguera, R.M., Dondi, D., Babbini, S., Cartabia, M., Savino, E. (2019) Physico-mechanical and thermodynamic properties of mycelium-based biocomposites: A review. *Sustainability* **11**, 281.
- Grimm, L. H., Kelly, S., Krull, R., & Hempel, D. C. (2005). *Morphology and productivity of filamentous fungi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(4), str. 375–384. doi:10.1007/s00253-005-0213-5
- Haneef, M., Ceseracciu, L., Canale, C., Bayer, I.S., Heredia-Guerrero, J.A., Athanassiou, A. (2017) Advanced materials from fungal mycelium: Fabrication and tuning of physical properties. *Sci. Rep.* **7**, 41292.
- Hendriks A. T. W .M. , Zeeman G., (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresour Technol* 100, 10–18.
- Higuchi-Takeuchi M., Numata K. (2019) Acetate-inducing metabolic states enhance polyhydroxyalkanoate production in marine purple non-sulfur bacteria under aerobic conditions. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7: str 118.
- Hyde, K.D., V.V. Sarma and E.B.G. Jones. (2000.) *Morphology and taxonomy of higher marine fungi*. In: (K.D. Hyde and S.B. Pointing, eds) *Marine mycology: a practical approach*. Fungal diversity research series 1. Fungal Diversity Press, Hong Kong. str. 171–204.
- Imhoff, J. F. (1995) *Taxonomy and Physiology of Phototrophic Purple Bacteria and Green Sulfur Bacteria*. U: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, (Blankenship, R. E., Madigan, Michael T., Bauer, C. E., ured.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, str. 6 – 8.

- Imhoff, J. F. (2006) The Phototrophic Alpha – Proteobacteria. U: *The Prokaryotes* (Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., 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.
- Johansson, I., Svensson, M. (2001) Surfactants based on fatty acids and other natural hydrophobes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **6**, str. 178-188.
- Johnson, E.A. (2013) Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts - the ascomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, str. 503–517.
- Jones, E.B.G. (1993.) Tropical marine fungi. In: (S. Issac, J.C. Fankland, R. Watling and A.J.S. Whalley, eds) *Aspects of tropical mycology*. Cambridge University Press, Cambridge. str. 73–90.
- Jones, M., Gandia, A., John, S. (2021) Leather-like material biofabrication using fungi. *Nat. Sustain.* **4**, str. 9–16.
- Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.O. (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors
- Karimi K., Edebo L., Taherzadeh M. J. (2008) *Mucor indicus* as a biofilter and fermenting organism in continuous ethanol production from lignocellulosic hydrolysate. *Biochem. Eng. J.* **39**, str. 383-388. doi: 10.1016/j.bej.2007.10.009.
- Karimi, K., Emtiazi, G., Taherzadeh, M. J. (2006) Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. *Process Biochem.* **41**, 653 – 658.
- Karimi, K., Zamani, A. (2013) *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review. *Biotechnol. Adv.* **31**, 466 – 481.
- Kobayashi, M., Kobayashi, M. (1995) Waste Remediation and Treatment Using Anoxygenic Phototrophic Bacteria. U: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration vol 2*, (Blakenship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E., ured.) Springer, Dordrecht, str. 1269 – 1282.
- Koku, H., Eroğlu, I., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L. (2002) Aspects of the Metabolism of Hydrogen Production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int. J. Hydrogen Energy* **27**: 1315 – 1329.

- 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*.
- Liu S., Daigger G. T., Kang J., Zhang G. (2019) Effects of light intensity and photoperiod on pigments production and corresponding key gene expression of *Rhodospseudomonas palustris* in a photobioreactor system. *Bioresource technology*, 294: str. 122-172.
- Lu, H., Zhang, G., Dong, S. (2011) Quantitative Study of PNSB Energy Metabolism in Degrading Pollutants Under Weak Light-Micro Oxygen Condition. *Bioresour. Technol.* 102 (8): 4968 – 4973. doi: 10.1016/j.biortech.2011.01.027
- Lewandowska, M., Szymańska, K., Kordala, N., Dąbrowska, A., Bednarski, W., Juszcuk, 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*.
- Madigan M. T., Gest H. (1979) Growth of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* chemoautotrophically in darkness with H₂ as the energy source. *Journal of bacteriology*, 137(1): str. 524-530
- Sumathi S, Manju BS (2000) Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus*. *Enzyme Microb Technol* 27:347–355 Taylor JW (1995) Making the Deuteromycota redundant: a practical integration of mitosporic and meiosporic fungi. *Can J Bot* 73, 754–759
- Madigan M.T. (1998) Isolation and characterization of psychrophilic purple bacteria from Antarctica. U: *The Phototrophic Prokaryotes* (Pescek 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, Dordrecht, 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. doi: 10.1007/bf03326128
- 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

- Maeda H, Yamagata Y, Abe K, Hasegawa F, Machida M, Ishioka R, Gomi K, Nakajima T (2005) Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 778–788
- 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.
- Masuda, S., Nagashima, K. V. P., Shimada, K., Matsuura, K. (2000) Transcriptional Control of Expression of Genes for Photosynthetic Reaction Center and Light-Harvesting Proteins in the Purple Bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *J. Bacteriol.* 182 (10): 2778 – 2786. doi: 10.1128/JB.182.10.2778-2786.2000
- McEwan, A. G. (1994) Photosynthetic electron transport and anaerobic metabolism in purple non- sulphur phototrophic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 66, 151-164.
- McKinlay, J. B., Harwood, C. S. (2010) Photobiological Production of Hydrogen Gas as a Biofuel. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21 (3): 244 – 251. doi: 10.1016/j.copbio.2010.02.012
- Meinita, M. D. N., Marhaeni, B., Jeong, G., Hong, Y. (2019) Sequential acid and enzymatic hydrolysis of carrageenan solid waste for bioethanol production: A biorefinery approach. *J. Appl. Phycol.* 31, 2507 – 2515.
- Mosier N. i sur. (2005) Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover, *Bioresour Technol* 96, 1986- 1993.
- Myung, K. K., Choi, K. M., Yin, C. R., Lee, K. Y., Im, W. T., Ju, H. L., Lee, S. T. (2004) Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodopseudomonas palustris*, isolated from eutrophicated ponds. *Biotechnol. Lett.* **26**, 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.
- Novak, M., Šantek, B., Pavlečić, M., Sarić, M., Matoković, V., Marđetko, N., Trontel, A., (2020) Ftoheterotrofni uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* na hranjivim podlogama s različitim izvorima ugljika. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **15**, 115-123.
- Olsson L, Hahn-Hägerdal B. (1996) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microb Technol*, pp 31-312.

Ormerod, J. G. (1992) Physiology of the Photosynthetic Prokaryotes. U: Photosynthetic Prokaryotes. Biotechnology Handbooks vol 6, (Mann, N. H., Carr, N. G., ured.), Springer, Boston, MA, 93 - 120.

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.

Patel, A., Karageorgou, D., Rova, E., Katapodis, P., Rova, U., Christakopoulos, P., Matsakas, L. (2020) An Overview of Potential Oleaginous Microorganisms and Their Role in Biodiesel and Omega-3 Fatty Acid-Based Industries. *Microorganisms* **8**, 434.

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

Qureshi, N., Hodge, D., Vertès, A. (2014) *Biorefineries. Integrated Biochemical Processes for Liquid Biofuels.*, 1. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 59.

Rafiqul, I. S., Mimi Sakinah, A. M., (2013) Processes for the Production of Xylitol- A review. Food Reviews International, 29:127-156.

Rezić, T., (2012) Interna skripta iz kolegija Biotehnologija III, Prehrambeno biotehnološki fakultet, Zagreb

Rowell R. M., Pettersen R., Tshabalala M.A., (2005) Cell wall chemistry. U: Handbook of wood chemistry and wood composites, drugo izdanje, Taylor & Francis Group , London, New York, str. 35-74

Safaei, Z., Karimi, K., Golkar, P., Zamani, A. (2015) Effects of plant growth hormones on *Mucor indicus* growth and chitosan and ethanol production. Int. J. Mol. Sci. 16, 16683 – 16694.

Sakarika, M., Spanoghe, J., Sui, Y., Wambacq, E., Grunert, O., Haesaert, G., Spiller, M., Vlaeminck, S.E. (2020) Purple non-sulphur bacteria and plant production: benefits for fertilization, stress resistance and the environment. *Microb Biotechnol.* **13**, 1336-1365.

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.

Sharifia, M., Karimi, K., Taherzadeh, M. J. (2008) Production of ethanol by filamentous and yeast-like forms of *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 1253 – 1259

- Sharifia, M., Karimi, K., Taherzadeh, M. J. (2008) Production of ethanol by filamentous and yeast-like forms of *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1253 – 1259.
- 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
- Sjostrom E., (1993) Wood polysaccharides. U: *Wood chemistry: Fundamentals and applications*, drugo izdanje, Elsevier, Amsterdam, str. 54-70
- Sturms, R., White, D., Vickerman, K.L. (2017) Lubricant Properties of $\omega - 1$ Hydroxy Branched Fatty Acid-Containing Natural and Synthetic Lipids. *Tribol Lett* **65**, 99.
- Sues, A., Millati, R., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2005) Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS Yeast Res.* 5, 669 – 676.
- Sun, S., Sun, S., Cao, X., Sun, R. (2016) The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology* **199**, 49-58.
- Taherzadeh, M., Jeihanipour, A. (2012) Recalcitrance of Lignocellulosic Biomass to Anaerobic Digestion. *Biogas Prod.* 27-54.
- 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, 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., 97-117.
- Takeno, K., Yamaoka, Y., Sasaki, K. (2005) Treatment of Oil-Containing Sewage Wastewater Using Immobilized Photosynthetic Bacteria. *World J. Microb. Biot.* 21: 1385 – 1391.
- Toivola A, Yarrow D, van Den Bosch E, van Dijken P, Scheffers WA. (1984) Alcoholic fermentation of d-xylose by yeasts. *Appl Environ Microbiol. Adv.* 47 pp. 3-1221
- 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.

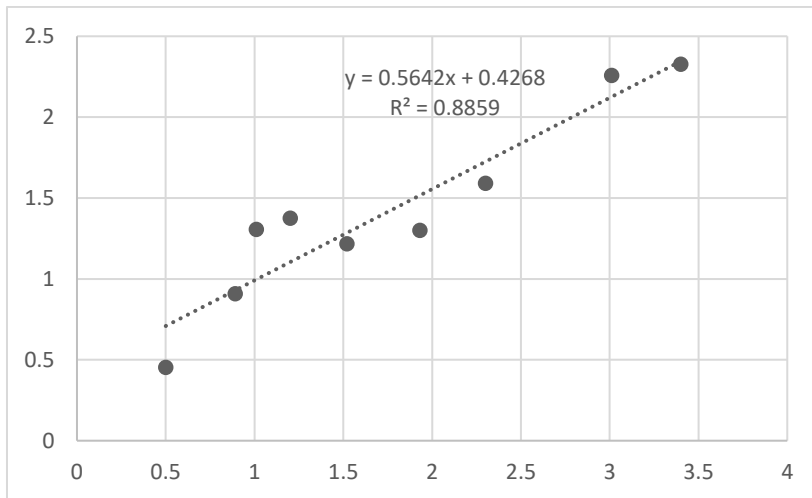
Xin, Z., Kaili, N., Yongli, Z., Fang, W., Li, D., Tianwei T. (2015) Enzymatic production and functional characterization of d-sorbitol monoesters with various fatty acids. *Catalysis Communications*, **72**, 138-141.

Zhou, Q. X. (2013) *Introduction of Resource Recycling Science and Engineering*. Chemical Industry Press, Beijing, str. 17.

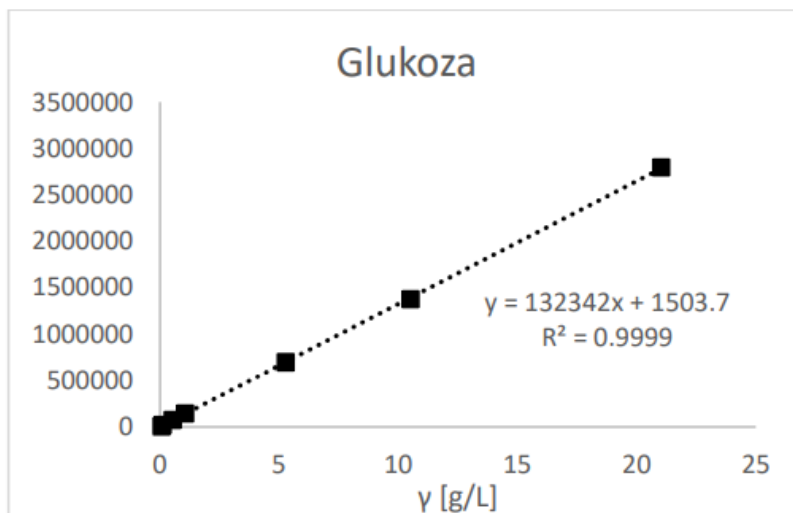
Zoghiami, A., Paës, G. (2019) Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Front. Chem.* **7**, 874.

7.PRILOZI

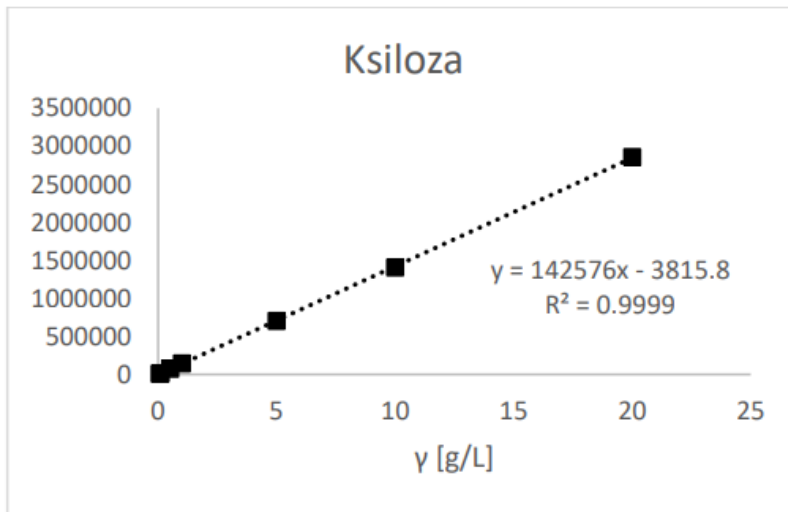
Prilog 7.1. Baždarni dijagram za određivanje prinosa biomase ljubičastih nesumpornih bakterija



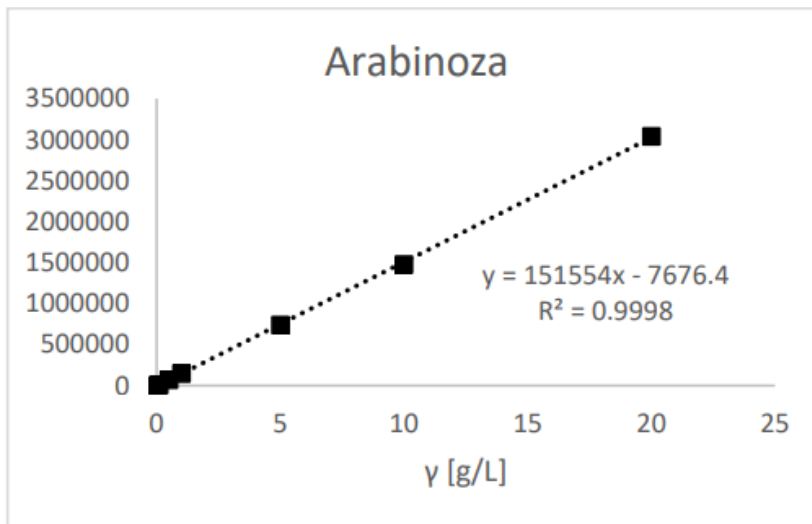
Prilog 7.2. Baždarni dijagram za određivanje glukoze na UPLC-u



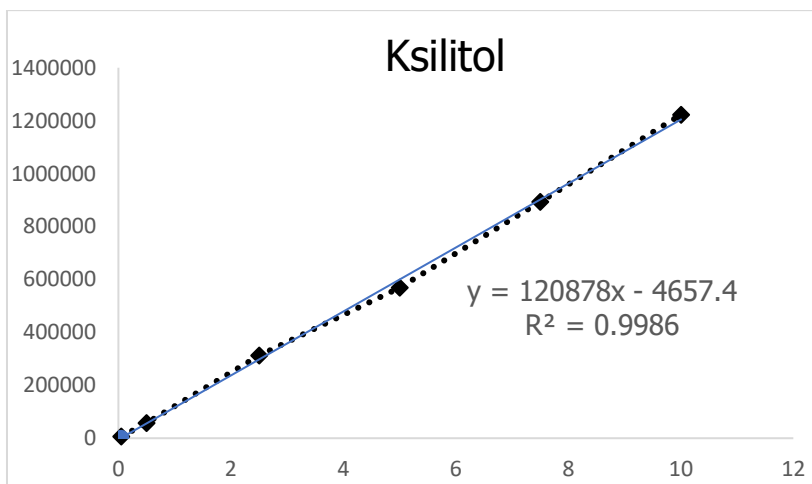
Prilog 7.3. Baždarni dijagram za određivanje ksiloze na UPLC-u



Prilog 7.4. Baždarni dijagram za određivanje arabinoze na UPLC-u



Prilog 7.5. Baždarni dijagram za određivanje ksilitola na UPLC-u



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.

Mija Kaselj
ime i prezime studenta