

Biotehnološka proizvodnja bikaverina i karotenoida pomoću plijesni iz roda *Fusarium*

Svilović, Stela

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:811604>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Stela Svilović
0058217937

**BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA BIKAVERINA I
KAROTENOIDA POMOĆU PLIJESNI IZ RODA
*FUSARIUM***

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemijsko inženjerstvo

Mentor: dr. sc. Nenad Marđetko

Zagreb, godina. 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Biotehnološka proizvodnja bikaverina i karotenoida pomoću plijesni iz roda *Fusarium*

Stela Svilović, 00587937

Sažetak:

U ovom radu provedeni su uzgoji plijesni *Fusarium oxysporum* JCM 9293 i *Fusarium verticillioides* JCM 23107 s ciljem određivanja koncentracije pigmenata bikaverina i karotenoida koji nastaju kao sekundarni metaboliti uzgoja. Uzgoji su provedeni u hranjivim podlogama sa dva različita izvora ugljika: glukozom i ksilozom te na 3 različite pH-vrijednosti: 8, 6 i 4; u aerobnim uvjetima (250o./min) tijekom 7 dana. Najveća koncentracija bikaverina (0,5827 mol/L) zabilježena je 6. dan uzgoja na podlozi koja je sadržavala glukozu i ksilozu i čija je pH-vrijednost iznosila 6, a radni mikroorganizam je bio *Fusarium oxysporum* JCM 9293. Najveća koncentracija karotenoida (1,3950 g/L) je izmjerena u uzorcima izoliranim iz biomase nakon 7.-og dana uzgoja na podlozi koja je sadržavala glukozu i ksilozu i čija je pH-vrijednost iznosila 6, a radni mikroorganizam je također bio *Fusarium oxysporum* JCM 9293.

Ključne riječi: *Fusarium oxysporum* JCM 9293, *Fusarium verticillioides* JCM 23107, bikaverin, karotenoidi, pigmenti

Rad sadrži: 31 stranica, 12 slika, 2 tablice, 30 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: dr. sc. Nenad Marđetko

Komentor: doc.dr.sc Mario Novak

Datum obrane: 14.09.2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Biotechnological production of bikaverine and carotenoids using molds from the genus

Fusarium

Stela Svilović, 00587937

Abstract:

In this work, molds *Fusarium oxysporum* JCM 9293 and *Fusarium verticillioides* JCM 23107 were cultivated with the aim of determining the concentration of bikaverine pigments and carotenoids that are produced as secondary metabolites of cultivation. Cultivations were carried out in media with two different carbon sources: glucose and xylose and at three different pH values: 8, 6 and 4; in aerobic conditions (250 o./min) for 7 days. The highest concentration of bikaverine (0,5827 mol/L) was recorded on the 6th day of cultivation on a medium containing glucose and xylose with pH value of 6 and the working microorganism - *Fusarium oxysporum* JCM 9293. The highest concentration of carotenoids (1,3950 g/L) was measured in samples isolated from biomass after the 7th day of cultivation on a medium containing glucose and xylose and whose pH value was 6, with working microorganism *Fusarium oxysporum* JCM 9293.

Keywords: *Fusarium oxysporum* JCM 9293, *Fusarium verticillioides* JCM 23107, bikaverine, carotenoids, molds

Thesis contains: 31 pages, 12 figures, 2 tables, 30 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Nenad, Marđetko, PhD

Technical support and assistance: Mario, Novak, Assistant professor

Thesis defended: 14.09.2023.

Sadržaj

1. UVOD.....	3
2. TEORIJSKI DIO	4
2.1. PIGMENTI NASTALI IZ PRIRODNIH IZVORA	4
2.1.1. BIKAVERIN.....	5
2.1.2. KAROTENOIDI.....	6
2.2. PLIJESNI RODA <i>FUSARIUM</i>	7
2.2.1. <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>	7
2.2.2. <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	10
3.1. MATERIJALI.....	10
3.1.1. RADNI MIKROORGANIZMI.....	10
3.1.2. KEMIKALIJE.....	10
3.1.3. HRANJIVE PODLOGE	11
3.1.3.1. KEMIJSKI SASTAV KRUTE HRANJIVE PODLOGE ZA ODRŽAVANJE KULTURA RADNIH MIKROORGANIZAMA	11
3.1.3.2. KEMIJSKI SASTAV HRANJIVE PODLOGE ZA PRIPREMU INOKULUMA ZA UZGOJ U ERLENMEYEROVIM TIKVICAMA	11
3.1.3.3. KEMIJSKI SASTAV HRANJIVE PODLOGE ZA UZGOJ U ERLENMEYEROVIM TIKVICAMA	11
3.1.3.4. SASTAV OTOPINE ELEMENATA U TRAGOVIMA.....	11
3.1.4. APARATURA I PRIBOR.....	12
3.1.4.1. UREĐAJ ZA TEKUĆINSKU KROMATOGRAFIJU ULTRA VISOKE DJELOTVORNOSTI.....	12
3.1.4.2. SPEKTROFOTOMETAR	12
3.1.4.3. CENTRIFUGE	12
3.1.4.4. OSTALA APARATURA I PRIBOR.....	12
3.2. METODE.....	13
3.2.1. PRIPREMA HRANJIVIH PODLOGA.....	13
3.2.1.1. PRIPREMA HRANJIVE PODLOGE ZA ODRŽAVANJE KULTURA RADNIH MIKROORGANIZAMA	13
3.2.1.2. PRIPREMA INOKULUMA PLIJESNI	13
3.2.1.3. PRIPREMA HRANJIVE PODLOGE ZA INOKULUM ZA UZGOJ U ERLENMEYEROVIM TIKVICAMA ..	13
3.2.1.4. PRIPREMA HRANJIVE PODLOGE ZA UZGOJ U ERLENMEYEROVIM TIKVICAMA.....	13
3.2.1.5. UZGOJ PLIJESNI U HRANJIVIM PODLOGAMA	14
3.2.1.6. IZOLACIJA UKUPNIH PIGMENATA	14
3.2.2. ANALITIČKE METODE	14

3.2.2.1. SNIMANJE APSORPCIJSKOG SPEKTRA UZORAKA	14
3.2.2.2. ANALIZA UZORAKA UREĐAJEM ZA TEKUĆINSKU KROMATOGRAFIJU ULTRA VISOKE DJELOTVORNOSTI (UPLC)	15
3.2.2.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PIGMENATA	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. PROIZVODNJA BIKAVERINA I KAROTENOIDA NA HRANJIVOJ PODLOZI POČETNE PH VRIJEDNOSTI 8	16
4.2. PROIZVODNJA BIKAVERINA I KAROTENOIDA NA HRANJIVOJ PODLOZI POČETNE PH VRIJEDNOSTI 6	19
4.3. PROIZVODNJA BIKAVERINA I KAROTENOIDA NA HRANJIVOJ PODLOZI POČETNE PH VRIJEDNOSTI 4	24
5. ZAKLJUČCI.....	28
6. POPIS LITERATURE	29

1. UVOD

Od prapovijesti pa sve do 19.-og stoljeća korištene su boje prirodnog podrijetla. No sa sve većom potražnjom, čovječanstvo je te boje zamijenilo sintetičkim bojama. Nakon više desetljeća korištenja sintetičkih boja u prehrani, različite studije su dokazale da one imaju značajne toksikološke učinke. Uzrokuju sve od alergija, psihičkih smetnji, imunosupresivnosti do kancerogenosti. Imajući ta saznanja, danas se radi na povratku boja nastalih iz prirodnih izvora. Utvrđeno je da su prirodne boje za hranu sigurnije za ljude te posjeduju i niz farmakoloških svojstava. Djeluju kao antioksidansi i antimutageni te imaju i protuupalne, antineoplastične i antiarteritičke učinke. (Okafor i sur., 2016)

Kukci i biljke bili su prvi izvori prirodnih boja, no zbog raznih čimbenika koji su ograničavali njihovo korištenje istraživanja su se okrenula prema mikroorganizmima, točnije, plijesnima. One imaju veliku prednost u proizvodnji zahvaljujući brzom rastu, lakoj obradi i neovisnosti o vremenskim uvjetima. Plijesni poput *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Monascus*, *Trichoderma* proizvode kinone, antrakinone, ankaflavin, β – karoten i mnoge druge pigmente. Njihovi pigmenti daju sljedeće boje: crvenu, ljubičastu, žutu, smeđu, narančastu i zelenu. Plijesni ih proizvode fermentacijom i na njihovu produktivnost utječu temperatura, pH, izvor ugljika i koncentracija kisika u podlozi. (Murkherjee i sur., 2017.)

Cilj ovog rada bio je provesti uzgoj plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 s ciljem dobivanja pigmenata bikaverina i karotenoida. Uzgoji su provedeni u mraku u aerobnim uvjetima na tresilici sa 250 okretaja u minuti na 12 različitih hranjivih podloga. Podloge su se razlikovale po njihovoj početnoj pH vrijednosti, izvoru ugljika i radnom mikroorganizmu.

2. TEORIJSKI DIO

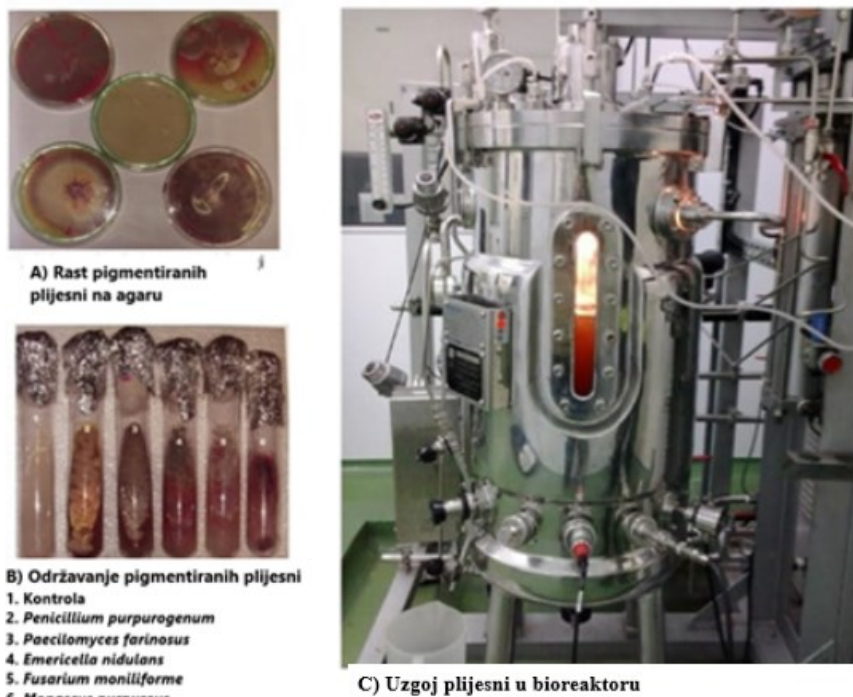
2.1. Pigmenti nastali iz prirodnih izvora

Pigmenti su tvari koje daju boju materijalima putem apsorpcije i refleksije svjetla. Netopljivi su u vodi i većini drugih otapala. Veličine su od 1 do 2 mikrometra. Da bi bili korišteni u industrijama moraju biti stabilni u čvrstom stanju pri sobnoj temperaturi i imati posebna svojstva koja ih čine idealnima za bojanje određenih materijala. Glavna podjela pigmenata je po izvoru nastajanja, a dijele se na prirodne i sintetičke pigmente. (Shindy, 2016.)

Većina prirodnih pigmenata je ekstrahirana iz biljaka i životinja. Neki od izvora su grožđe, repa, paprika, anato, ženke insekata i razni mikroorganizmi (*Monascus*, *Rhodotorula*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Yarrowia*, *Phaffia* itd.). Pigmenti poput karotenoida, antokinona i klorofila se proizvode iz kvasaca, plijesni, bakterija i algi. Mikrobn pigmenti su stekli svoju popularnost u industrijskoj primjeni jer su sigurni za upotrebu, proizvode se neovisno o sezonskim i geografskim uvjetima te stvaraju prinos koji se može kontrolirati i optimizirati u bioprocesu. Neki od mikrobnih pigmenata se mogu proizvesti iz otpadnih materijala (ostaci industrije škroba i sokova), čime se smanjuje onečišćenje vode i okoliša. No pigmenti nastali kao sekundarni metaboliti uzgoja mikroorganizama imaju i svoje nedostatke. Osjetljivi su na toplinu, svjetlost, kiseli medij, stoga su nestabilni i lako razgradivi. Mikroorganizmi koji se koriste u proizvodnji pigmenata moraju ispuniti sljedeće uvjete: sposobnost korištenja velikog broja različitih izvora ugljika i dušika, visoka tolerancija na pH, temperaturu i koncentraciju minerala, moraju stvarati zadovoljavajući prinos pigmenata te ne smiju biti toksični i patogeni. Određeni faktori utječu na produktivnost proizvodnje mikrobnih pigmenata poput temperature, vrijednosti pH, izvora ugljika i dušika, prisutnosti minerala i tipa fermentacije. (Joshi, 2003.)

Pigmenti koji se često nazivaju i mikotoksinima formiraju se kao sekundarni metaboliti u uzgoju plijesni tj. nastaju kao nusproizvodi u metaboličkim putevima i nisu esencijalni za rast i razvoj istih. Plijesni su dobar i lako dostupan alternativni izvor prirodnih pigmenata.

Poznato je da miceliji plijesni proizvode veliki raspon pigmenata kao što su karotenoidi, melanini, flavini, fenazini, kinoni, indigo, violacein i monascini. (Lagashetti i sur., 2019.) Proizvode pigmente koji se lako ekstrahiraju bez organskih otapala te budući da ih je jednostavno prenijeti sa laboratorijske kulture na proizvodnju u bioreaktoru, idealni su za industrijsku proizvodnju (slika 1). (Venil i sur., 2020.)



Slika 1. Prikaz uzgoja plijesni od Petrijeve zdjelice do fermentora. (A) Rast pigmentiranih plijesni u agaru; (B) Održavanje pigmentiranih plijesni; (C) 'Scale-up' uzgoja plijesni koje proizvode pigmente u fermentor. (prilagođeno iz Venil i sur., 2020.)

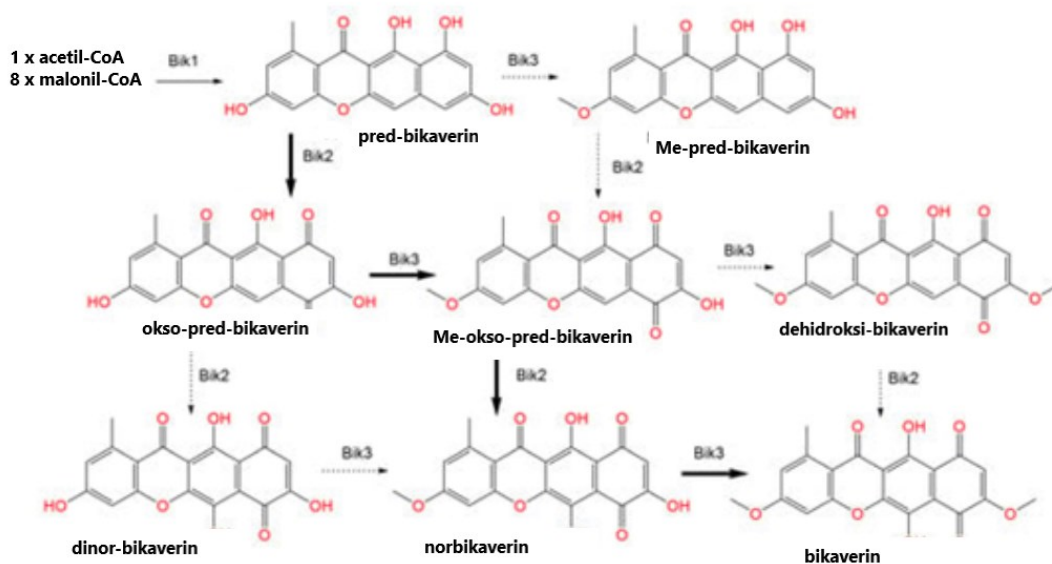
2.1.1. Bikaverin

Bikaverin je crvenkasti pigment kojeg proizvode različite vrste plijesni, većina njih iz roda *Fusarium*. Sadrže antibiotska svojstva protiv određenih protozoa i gljivica. Kemijski, bikaverin je poliketid sa strukturom tetracikličkog benzoksantona. Kemijska struktura bikaverina (6,11-dihidroksi-3,8-dimetoksi-1-metil-benzo-ksantein-7,10,12-trion) određena je rendgenskom kristalografijom. Ovaj pigment je naftokinon biosintetiziran prema poliketidnom putu u nekoliko vrsta iz roda *Fusarium* (Dos Santos i Bicas, 2021).

Proizvodnja ovih metabolita od strane različitih vrsta plijesni ovisi o optimalnim uvjetima uzgoja pojedine kulture, ali na nju uglavnom utječu dostupnost dušika i pH (Limon i sur., 2010).

Biološka svojstva bikaverina uključuju antitumorsko djelovanje protiv različitih staničnih linija raka. Različite biološke aktivnosti i sve veći broj informacija o biokemijskim i genetskim osnovama njegove proizvodnje čine bikaverin metabolitom od sve većeg biotehnološkog interesa (Limon i sur., 2010). Također, ova molekula ima potencijal da se koristi kao bojilo,

zbog svoje jarke crvene boje dobivene tijekom procesa fermentacije plijesni. Istraživanje upotrebe bikaverina kao bojila potaknuto je njegovom prirodnom pojavom u plijesnima koje se mogu lako i brzo uzgajati, proizvodeći velike količine micelija. Iako su uvjeti proizvodnje bikaverina i njegov metabolički put relativno dobro poznati, primjene ove molekule su još uvijek vrlo ograničene. Jedna od takvih mogućnosti uključuje njegovu moguću upotrebu kao bojila za hranu; ali toksikološki podaci su još uvijek nedostadni da bi ju podržali (Dos Santos i Bicas, 2021).



Slika 2. Prikaz biosintetskog puta bikaverina i njegovih intermedijera. Podebljane linije predstavljaju željeni put, a isprekidane linije predstavljaju druge moguće puteve. (prilagođeno iz Sabrin i sur., 2021.)

2.1.2. Karotenoidi

Karotenoidi su bitna komponenta svih fotosintetskih organizama zbog svojih istaknutih fotoprotektivnih i antioksidacijskih svojstava. Međutim, njihova pojava nije ograničena na biljke, alge i cijanobakterije, budući da ih i neke plijesni i nefotosintetske bakterije također mogu sintetizirati. (Lohr, 2009).

Karotenoidi su pigmenti topljivi u lipidima i mogu se pronaći u mnogim vrstama voća, povrća, gljiva, cvijeća i nekih vrsta životinja. Iz prirodnih izvora je do sada izolirano više od 750 različitih struktura karotenoida, dok je oko njih 500 potpuno karakterizirano. Na temelju strukture, karoteni i ksantofili su dvije glavne podklase karotenoida. Karoteni su čisti

ugljikovodici, a ksantofili njihovi derivati. Različite strukture karotenoida prirodno posjeduju drugačija fizikalna, kemijska i funkcionalna svojstva te nisu svi jednako stabilni (Ngamwonglumlert i Devahastin, 2019).

Karotenoidi su komercijalno važni kao prehrabene boje, hrana za životinje i suplementi u prehrani. Nadalje, dokazano je da imaju važnu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih bolesti i raka. Osim kemijski sintetiziranih karotenoida, karotenoidi iz prirodnih izvora dobivaju sve veću važnost i to ne samo oni ekstrahirani iz biljaka, voća i cvijeća već i karotenoidi proizvedeni biotehnoškim postupkom, uzgojem mikroorganizama. (Echavarri-Erasun i Johnson, 2002.) Sa napredovanjem biotehnoških metoda i tehnologije, poboljšala se i proizvodnja karotenoida uz smanjenje ukupnih troškova. Zbog njihove lipofilne prirode, većina ih je prisutna u stanicama. Prije su se za ekstrakciju karotenoida koristila organska otapala no posljednjih godina raste broj studija o korištenju zelenih i održivih metoda. (Chang i sur., 2021.)

2.2. Plijesni roda *Fusarium*

2.2.1. *Fusarium oxysporum*

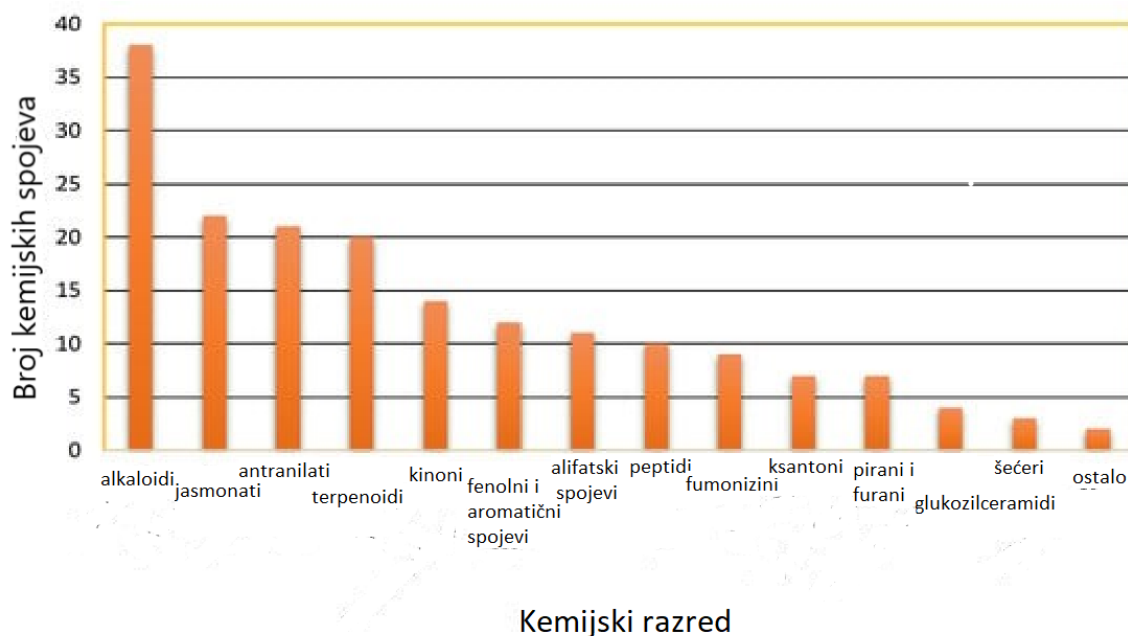
Fusarium oxysporum je anamorfnu vrsta plijesni koja uključuje patogene i nepatogene sojeve. Patogeni oblici uzrokuju venuće biljaka. Aseksualno razmnožavanje ima dominantan utjecaj na populacije *F. oxysporum*-a te odsutnost spolnog razmnožavanja ne sprječava ovaj patogen da nanese značajnu štetu osjetljivim usjevima (Gordon i Martyn, 1997). *F. oxysporum* uspijeva na temperaturama tla iznad 24 °C u kojemu može živjeti neograničeno dugo bez pristupa živim biljkama. Zaražene biljke obično zaostaju u rastu. Lišće im postaje blijedo zeleno do zlatnožuto i na kraju uvene. Nekoliko stotina biljnih vrsta je podložno zarazi, uključujući neke ekonomski važne prehrabene usjeve kao što su slatki krumpir, rajčice, mahunarke, dinje i banane (Encyclopedia Britannica, 2017).

Budući da su telomorfnu stadiji većine *Fusaria* nepoznati, taksonomija *Fusariuma* temelji se na morfološkim karakteristikama anamorfa, uključujući veličinu i oblik makrokonidija, prisutnost ili odsutnost mikrokonidija i klamidospora, boju kolonije i strukturu konidiofora. Na temelju morfoloških kriterija ponekad je teško razlikovati *F. oxysporum* od nekoliko drugih vrsta koje pripadaju sekcijama *Elegans* i *Liseola*. (Fravel i sur., 2003).

Proces infekcije *F. oxysporum* proučavan je pomoću svjetlosne, fluorescentne i elektronske mikroskopije, a može se podijeliti u nekoliko koraka: prepoznavanje korijena, pričvršćivanje na površinu korijena i kolonizacija, prodiranje i kolonizacija kore korijena i u slučaju posebne

forme koja izaziva venuće; proliferacija hifa unutar ksilemskih žila (Michielse i Rep, 2009).

F. oxysporum je izvor brojnih enzima, kao što su pektinaze i celulaze, koji imaju različite industrijske i biotehnoške primjene. Posjeduje iznimnu sposobnost proizvodnje širokog spektra metabolita (slika 3) različitih bioaktivnosti. Neki od njih su alkaloidi, jasmonati, antranilati, ciklički peptidi, kinoni, terpenoidi i mnogi drugi. Nadalje, koristi se za sintezu metalnih nanočestica koje imaju različite biotehnoške, agronomske, farmaceutske i medicinske primjene. Otkriveno je da posjeduju povoljan antimikrobni potencijal te u kombinaciji sa antibioticima predstavljaju novu strategiju u borbi protiv rezistentnih sojeva bakterija. (Sabrin i sur., 2021.)



Slika 3. Prikaz različitih razreda metabolita sintetiziranih pomoću plijesni *F. oxysporum* (prilagođeno iz Sabrin i sur., 2021.)

2.2.2. *Fusarium verticillioides*

Fusarium verticillioides je vrlo važan mikroorganizam s aspekta bolesti biljaka, proizvodnje žitarica i sigurnosti hrane (Bacon i sur., 2008). Najdominantniji je gljivični fitopatogen žitarica i predstavlja veliku opasnost iz globalne perspektive. Plijesan se uglavnom povezuje s kukuruzom, rižom, sirkom, pšenicom, šećernom trskom, bananom i šparogama i uzrokuje trulež klipa, stabljike, korijena, krošnje i vrha (Deepa i sur., 2021). *F. verticillioides* je neizravno opasna za ljude i životinje jer se mikotoksini mogu unijeti u organizam hranom

koja je napadnuta s plijesni. (Bacon i sur., 2008). Među njegovim sekundarnim metabolitima su mikotoksini fumonizina, koji uzrokuju teške bolesti životinja i ljudi (Blacutt i sur., 2018). Gljive iz rodova *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium* proizvode mikotoksine od najveće važnosti za zdravlje životinja i ljudi. Posebno se ističu aflatoksini, fumonizini, ohratoksin A, trihoteceni i zearalenon. Proizvodnja toksina je regulirana sa pH vrijednosti i dostupnosti hranjivih tvari. (Blacutt i sur., 2018)

Iz biotehnoške perspektive, enzimi koji pridonose patogenosti *F. verticillioides* imaju i potencijalnu ekonomsku vrijednost jer se mogu iskoristiti u proizvodnji biogoriva (Blacutt i sur., 2018). Nadalje, *F. verticillioides* proizvodi i razne korisne metabolite kao što su pigmenti naftokinon, monoterpeni i seskviterpeni. Usmjeravanjem bioprocasa kontroliranjem izvora ugljika u hranjivoj podlozi, može se potaknuti proizvodnja korisnih metabolita uz isključenje proizvodnje štetnih mikotoksina. (Achimón i sur., 2021.)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Radni mikroorganizmi

Radni mikroorganizmi korišteni u ovom radu su plijesni *Fusarium oxysporum* f.sp. *langenariae* JCM 9293 i *Fusarium verticillioides* JCM 23107. Kulture su čuvane na čvrstoj podlozi opisanoj u podpoglavlju 3.2.1.1.. Svi korišteni mikroorganizmi uzeti su iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

3.1.2. Kemikalije

U tablici je prikazan popis kemikalija korištenih u ovom radu te njihova čistoća i proizvođač. Kemikalije su korištene za pripremu otopina i hranjivih podloga.

Tablica 1. Popis kemikalija

Kemikalija	Stupanj čistoće	Proizvođač
glukoza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
agar	tehnički	Biolife, Italija
cinkov sulfat	p.a.	Merck KgaA, Njemačka
sumporna kiselina	za UPLC, 96%	Merck KgaA, Njemačka
natrijev hidroksid	≥ 98 %	Merck KgaA, Njemačka
sumporna kiselina	96%, p.a.	Merck KgaA, Njemačka
PDB	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
ksiloza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
kvašćev ekstrakt	p.a.	Oxoid, UK
mesni ekstrakt	p.a.	Biolab, Mađarska
diamonijev hidrogenfosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
diamonijev sulfat	p.a.	Gram-mol, Hrvatska
arabinoza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
kalijev dihidrogenfosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
magnezijev sulfat heptahidrat	≥ 99 %	LACH NER d.o.o., Češka

manganov(II)sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
bakrov sulfat pentahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
željezov(II)sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
etanol	>99%	Gram-mol, Hrvatska
aceton	>99%	Gram-mol, Hrvatska

3.1.3. Hranjive podloge

3.1.3.1. Kemijski sastav krute hranjive podloge za održavanje kultura radnih mikroorganizama

Za održavanje kultura radnih mikroorganizama (*F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107) korištena je čvrsta podloga sljedećeg sastava (u g/L): 20 glukoze, 20 agara, 2,5 kvašćevog ekstrakta, 1 diamonijevog hidroksifosfata, 1 diamonijevog sulfata te 0,3 manganovog(II)sulfat monohidrata, 0,3 kalijevog hidrogenfosfata, 0,3 magnezijev sulfat heptahidrata, 0,3 bakrovog sulfat pentahidrata i 0,3 željezovog(II)sulfat septahidrata.

3.1.3.2. Kemijski sastav hranjive podloge za pripremu inokuluma za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama

Hranjiva podloga za inokulum sastojala se od (u g/L): 20 glukoze, 2,5 kvašćevog ekstrakta, 1 diamonijevog hidroksifosfata, 1 diamonijevog sulfata te 0,3 manganovog(II)sulfat monohidrata, 0,3 kalijevog hidrogenfosfata, 0,3 magnezijev sulfat heptahidrata, 0,3 bakrovog sulfat pentahidrata i 0,3 željezovog (II) sulfat septahidrata.

3.1.3.3. Kemijski sastav hranjive podloge za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama

Za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama korištene su 2 različite hranjive podloge. Prva podloga sadrži (u g/L) 25 dekstrozne otopine krumpira (eng. Potato dextrose broth, PDB) i 2,5 kvašćevog ekstrakta te je i baza druge podloge. Druga podloga još sadrži (u g/L) 20 ksiloze. Hranjivim podlogama za uzgoj željena pH vrijednost je namještena koristeći sumpornu kiselinu ili natrijevu lužinu.

3.1.3.4. Sastav otopine elemenata u tragovima

Otopina elemenata u tragovima se dobila otapanjem sljedećih kemikalija (u g/L): 20 manganovog (II) sulfat monohidrata, 20 kalijevog hidrogenfosfata, 20 magnezijevog sulfat heptahidrata, 20 bakrovog sulfat pentahidrata i 20 željezovog (II) sulfat septahidrata u 50 mL

demineraliziranje vode. Otopina se dalje sterilizirala filtriranjem kroz filter promjera pora 0,22 μm te je čuvana u zamrzivaču na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do upotrebe.

3.1.4. Aparatura i pribor

3.1.4.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti

Za praćenje koncentracije izvora ugljika i proizvedenih biokemikalija korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD). Uređaj se sastoji od crpke (G7104A 1290 Flexible Pump), injektora (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H⁺, Phenomenex) dimenzija $150 \times 7,8\text{ mm}$ s odgovarajućim pretkOLONAMA, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 μL , a protok mobilne faze 0,6 mL min^{-1} .

3.1.4.2. Spektrofotometar

Za snimanje apsorpcijskog spektra, u svrhu određivanja koncentracije pigmentata, korišten je spektrofotometar „Cary 100 UV-VIS“ (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm u staklenim kivetama promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) u programu Scan.

3.1.4.3. Centrifuge

Za izdvajanje biomase plijesni iz suspenzije tijekom uzgoja u tikvicama korištena je centrifuga Thermo Scientific SL 8R (Thermo Fischer Scientific, SAD), a centrifugiranje je izvršeno pri 9500 o/min i temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 7 minuta. Za pripremu uzoraka za analizu na UPLC korištena je centrifuga CF-10 (Witeg, Wertheim, Njemačka).

3.1.4.4. Ostala aparatura i pribor

Ostala aparatura i pribor korišteni u radu su: autoklav (Sutjeska, Jugoslavija), tresilica (RM 71 B. Braun Biotech. International, Satorius Group, Njemačka), zamrzivač (Gorenje, Slovenija), hladnjak (Bosh, Njemačka), tehnička vaga (Technica ET-1111, Slovenija), analitička vaga (Shimadzu, AX-200 W/O AC ECTA, Japan), pH-metar, stakleno i plastično laboratorijsko posuđe i jednokratni plastični pribor.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema hranjivih podloga

3.2.1.1. Priprema hranjive podloge za održavanje kultura radnih mikroorganizama

Hranjiva podloga za održavanje kultura radnih mikroorganizama čiji je sastav opisan u podpoglavlju 3.1.3.1. se pripremala u 300 mL demineralizirane vode. Hranjiva podloga je sterilizirana u autoklavu na 121 °C 20 minuta. Nakon sterilizacije u autoklavu u podlogu je u aseptičkim uvjetima dodan 1 mL prethodno pripremljene otopine elemenata u tragovima čiji je sastav opisan u podpoglavlju 3.1.3.4. te je izlivena u sterilne Petrijeve zdjelice i ostavljena na sobnoj temperaturi da se ohladi.

3.2.1.2. Priprema inokuluma plijesni

S čvrste podloge na kojoj je uzgojena kultura plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107, dijelovi podloge izrezani su metalnim štapićem koji su potom u aseptičkim uvjetima preneseni u tikvicu koja je sadržavala 300 mL hranjive podloge za uzgoj inokuluma (podpoglavlje 3.1.3.2.). Inokulum je uzgajan na tresilici pri 200 okretaja po minuti, pri temperaturi 30°C tijekom 48 h.

3.2.1.3. Priprema hranjive podloge za inokulum za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama

Prije provođenja biotehnološkog procesa uzgoja plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 pripremljena je hranjiva podloga za inokulum za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama u 300 mL demineralizirane vode čiji je sastav opisan u podpoglavlju 3.1.3.2 te je u nju dodan 1 mL otopine elemenata u tragovima prethodno navedenog sastava u podpoglavlju 3.1.3.4.. Hranjiva podloga je sterilizirana u autoklavu u trajanju od 20 minuta na 121 °C.

3.2.1.4. Priprema hranjive podloge za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama

Za uzgoj plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 korištene su podloge sa dva različita izvora ugljika za uzgoj, na tri različita pH. U tikvice za uzgoj je dodano 250 mL demineralizirane vode i kemikalije kako je opisano u podpoglavlju 3.1.3.3. Prije sterilizacije se pH vrijednost hranjive podloge, koristeći pH-metar, namjestila na pH=4, pH=6 ili pH=8. Tikvice su zatim stavljene u autoklav na sterilizaciju na 20 minuta pri 121 °C.

Tablica 2. Hranjive podloge za uzgoj sa različitim izvorima ugljika i njihove skraćenice korištene u ovom radu.

Hranjiva podloga koja sadrži PDB	PDB
Hranjiva podloga koja sadrži PDB i ksilozu	PDBK

3.2.1.5. Uzgoj plijesni u hranjivim podlogama

Tikvice koje su prethodno pripremljene i sterilizirane kako je opisano u podpoglavlju 3.2.1.4., naciepljene su sa 10 mL inokuluma jedne plijesni čija je priprema opisana u podpoglavlju 3.2.1.2. te im je dodan 1 mL otopine elemenata u tragovima čiji je sastav naveden u podpoglavlju 3.1.3.4.. Erlenmeyerove tikvice su potom stavljene na tresilice (250 o./min) i time je započeo uzgoj koji se vodio u mraku. Uzorci su periodično izuzimani svaka 24 sata i centrifugirani. Dalje su uzorci spektrofotometrijski analizirani i pripremljeni za analizu UPLC- om.

Uzgoji na svim pH vrijednostima su se provodili na podlogama PDB i PDBK i bili su naciepljeni sa oba radna mikroorganizma: *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107.

3.2.1.6. Izolacija ukupnih pigmenata

Nakon završetka uzgoja, 10 mL uzorka je izuzeto u plastične falkonice od 50 mL i centrifugirano 15 minuta pri 9 000 o/min. Supernatant je odvojen, a u istaloženu biomasu se dodalo 5 mL smjese acetona i etanola (7:2 vol/vol) za ekstrakciju ukupnih pigmenata. Potom je dodano 4 g staklenih kuglica te je uzorak podvrgnut intenzivnom miješanju tijekom 2 min. Nakon toga je uzorak ohlađen u ledu 2 minute te je postupak intenzivnog miješanja i hlađenja ponovljen 3 puta. Cijeli postupak je proveden u mraku.

3.2.2. Analitičke metode

3.2.2.1. Snimanje apsorpcijskog spektra uzoraka

Uzorci jednakih volumena pipetom su preneseni u kivete od 15 mL i stavljeni u centrifugu (9000 o/min). Izuzet je supernatant kojem je spektrofotometrom pri valnim duljinama od 300 nm do 900 nm izmjeren apsorpcijski spektar. Nakon izolacije ukupnih pigmenata kako je opisano u podpoglavlju 3.2.1.6. uzorak je centrifugiran 10 minuta pri 9 000 o/min i izuzet je supernatant kojemu je spektrofotometrom pri valnim duljinama od 300 nm do 900 nm izmjeren apsorpcijski spektar.

3.2.2.2. Analiza uzoraka uređajem za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Za određivanje koncentracije supstrata i metabolita, korišten je UPLC sustav opisan u poglavlju 3.1.4.1.. Uzorci izuzeti tijekom uzgoja plijesni pripremljeni su za UPLC analizu; otpipetiran je 1,5 mL supernatanta kojeg smo izuzeli u kivetu od 2 mL i stavljen u centrifugu 5 minuta pri 10 000 o/min. Zatim je u novu kivetu otpipetirano 750 μ L supernatanta i 750 μ L 10%-tne otopine cinkovog sulfata. Nakon toga je uzorak vorteksiran i ostavljen na sobnoj temperaturi 15 minuta. Centrifugiranjem 15 minuta na 10000 o/min 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.

3.2.2.3. Određivanje koncentracije pigmenata

Za određivanje koncentracije pigmenata nastalih tijekom uzgoja plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 korištene su sljedeće jednadžbe:

1. Određivanje koncentracije bikaverina

Za određivanje koncentracije bikaverina korištena je sljedeća jednadžba:

$$A = \sum L \text{concn} \quad [1]$$

gdje je A apsorbancija pri 500 nm, ϵ je prosječna molarna apsorbnošć naftokinona (6,456 L/molcm²), L je duljina stanice (1cm) i *concn* je koncentracija (mol/L) pigmenta.

2. Određivanje koncentracije karotenoida

Za određivanje koncentracije karotenoida korištena je sljedeća jednadžba:

$$\gamma_{\text{g/L}} = 0,348209 \times (A_{648} - A_{850}) - 0,16583 \times (A_{665} - A_{850}) + 12,11114 \times (A_{775} - A_{850}) \quad [2]$$

gdje je γ koncentracija (g/L) pigmenta i A su apsorbancije pri zadanoj valnoj duljini.

4. REZULTATI I RASPRAVA

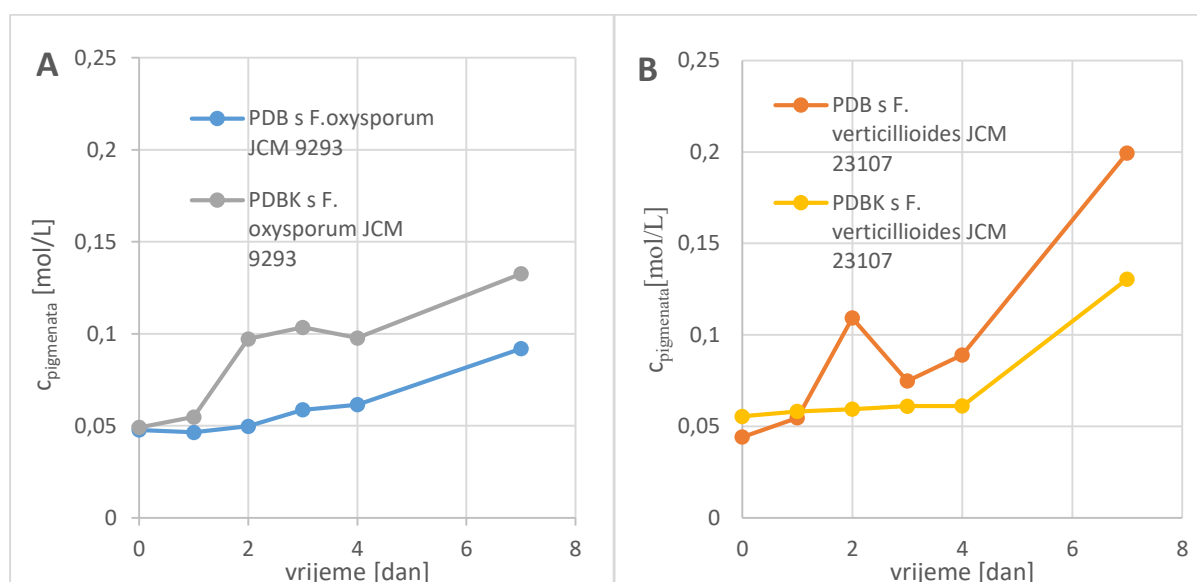
U ovom radu vodio se uzgoj plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 pri tri različite pH vrijednosti i dvije podloge različitog kemijskog sastava navedene u podpoglavlju 3.1.3.3. s ciljem što veće proizvodnje pigmenta bikaverina i karotenoida. Uzgoj se provodio u aerobnim uvjetima ($n = 250$ o/min) u mraku.

Napravljeni su preliminarni uzgoji na različitim izvorima ugljika (tablica 2) među kojima su se kao najbolji pokazali PDB (dekstrozna otopina krumpira) i ksiloza te su se u daljnjim uzgojima samo oni korišteni.

4.1. Proizvodnja bikaverina i karotenoida na hranjivoj podlozi početne pH vrijednosti 8

U ovom poglavlju opisani su rezultati uzgoja dobiveni nakon procesa opisanog u poglavlju 3.2.1.4. i 3.2.1.5. pri početnoj pH vrijednosti 8. Uzgoji su se vodili na hranjivim podlogama sa PDB i PDBK i radnim mikroorganizmima *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107.

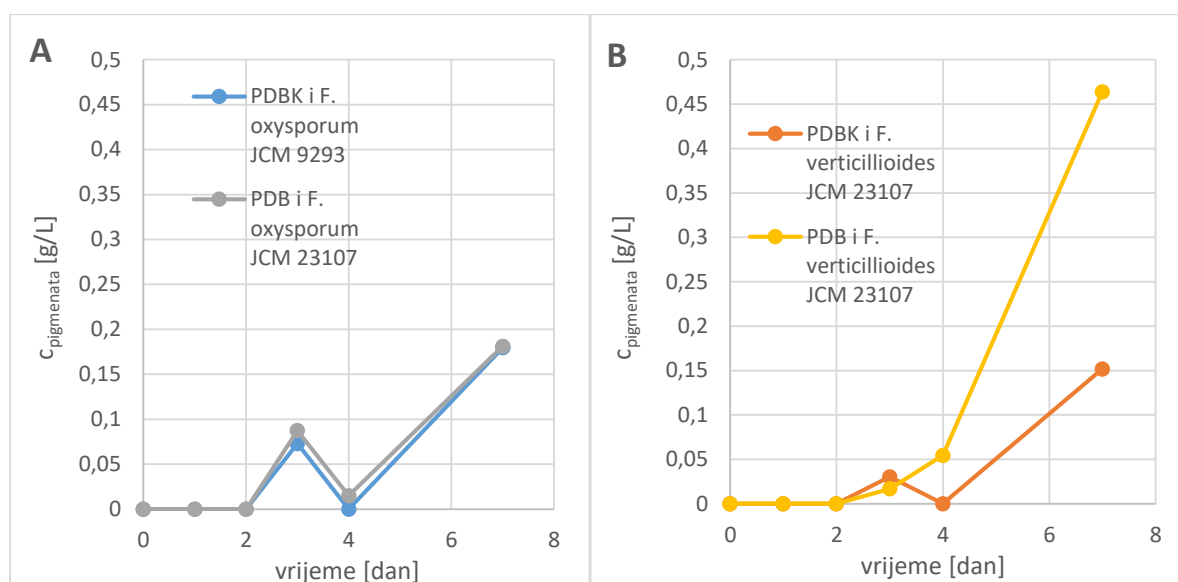
Nakon 48 sati uzgoja okumetrijskim zapažanjem primjećena je promjena boja kod tikvica koje su sadržavale podloge PDBK i radni mikroorganizam *F. oxysporum* JCM 9293 te PDB i *F. verticillioides* JCM 23107. Tikvica sa podlogom PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 je bila roza i bistra, dok je tikvica sa PDB i *F. verticillioides* JCM 23107 bila tamnija, ružičasta i mutna radi jačeg rasta biomase. Svaki sljedeći dan navedene tikvice su bile tamnije i boja im je bila izraženija.



Slika 4. Koncentracije bikaverina ($c_{\text{pigmenata}}$) na hranjivim podlogama PDB i PDBK početne pH vrijednosti 8 i sa radnim mikroorganizmima *F. oxysporum* JCM 9293 (A) i *F. verticillioides* JCM 23107 (B).

Sa grafa možemo očitati da početna vijednost nakon inokulacije iznosi približno 0,05 mol bikaverina po L podloge te se u tikvicama sa hranjivom podlogom koja sadrži PDB i *F. oxysporum* JCM 9293 te PDBK i *F. verticillioides* JCM 23107, koncentracija nije značajno mijenjala prva 4 dana uzgoja. Hranjive podloge sa PDB i *F. verticillioides* JCM 23107 te PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 su već 2. dan uzgoja doživjele skok u koncentraciji bikaverina i to na 0,1 mol/L što je za 2 puta veće od prethodnog dana. Koncentracija kod podloge sa PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 se narednih dana nije značajno mijenjala i 7. dan uzgoja je iznosila 0,13 mol/L pigmenta. Koncentracija bikaverina kod hranjive podloge koja sadrži PDB i radni mikroorganizam *F. verticillioides* JCM 23107 je 3. dan naglo pala i nakon toga nastavila ravnomjerno rasti. 7. dan uzgoja je koncentracija bikaverina u podlozi sa PDB i *F. verticillioides* JCM 23107 iznosila 0,2 mol/L, što je maksimalna koncentracija u svih 7 dana na svim podlogama na pH vrijednosti 8. Koncentracije bikaverina izoliranog iz biomase nakon 7. dana uzgoja su iznosile sljedeće vrijednosti; na podlozi sa PDB i *F. verticillioides* JCM 23107 koncentracija bikaverina iznosila je 0,0598 mol/L, na podlozi sa PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 iznosila je 0,0642 mol/L, nadalje na podlozi sa PDBK i *F. verticillioides* JCM 23107 koncentracija bikaverina je iznosila 0,0547 mol/L i na podlozi sa PDB i *F. oxysporum* JCM 23107, 0,0614 mol/L. Na podlozi sa PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 izrasla je najveća količina biomase te je i za očekivat da će takva podloga dati i najveću koncentraciju samog produkta te biomase tj. pigmenta bikaverina. Veću produktivnost u ovom uzgoju je dala plijesan *F. verticillioides* JCM 23107. Na obje podloge je stvorila veću količinu micelija od *F. oxysporum* JCM 9293 i u konačnici skoro 2 puta veću proizvodnju pigmenata. Možemo zaključiti da na ovoj pH vrijednosti *F. verticillioides* JCM 23107 bolje uspijeva u blago bazičnom mediju sa PDB kao glavnim izvorom ugljika od *F. oxysporum* JCM 9293. U istraživanjima je navedeno da plijesni roda *Fusarium* slabije rastu u blago lužnatom mediju u usporedbi sa neutralnim i blago kiselim medijem. S ciljem povećanja proizvodnje bikaverina znanstvenici su obavili deleciju transkripcijskog faktora PacC. Naime, njegovom delecijom u uzgoju pH vrijednosti 8 došlo je do ozbiljno ograničenog rasta mutanta. Zaključujemo da je PacC potreban za rast u medijima alkalnih pH vrijednosti. Stvoreni su i PacC246 mutanti za povećanje funkcija deletiranog PacC gena komplementiranjem. Ispitivanim transformantima je obnovljena sposobnost rasta na alkalnim medijima sa povećanom proizvodnjom bikaverina.

(Wiemann i sur., 2009.)



Slika 5. Koncentracije karotenoida ($C_{\text{pigmenata}}$) na hranjivim podlogama PDB i PDBK početne pH vrijednosti 4 i sa radnim mikroorganizmima *F. oxysporum* JCM 9293 (A) i *F. verticillioides* JCM 23107 (B).

Osim koncentracije bikaverina, izračunata je i koncentracija karotenoida. Sa slike 5 možemo očitati da podloge sa *F. verticillioides* JCM 23107 su prva 3 dana uzgoja imale najmanji porast u koncentraciji karotenoida dok su podloge sa *F. oxysporum* JCM 9293 3. dan uzgoja skočile na 0,1 g pigmenta po L podloge što je povećanje od 2 puta u odnosu na prethodni dan. 4. dan uzgoja, pada koncentracija u svim podlogama osim u podlozi koja sadrži PDB i *F. verticillioides* JCM 23107 u kojoj raste. Sljedeći dan koji se mjerila koncentracija karotenoida je 7. dan uzgoja i tada je došlo do velikih promjena. Podloge sa radnim mikroorganizmom *F. oxysporum* JCM 9293 i podloga sa PDBK i *F. verticillioides* JCM 23107 sadrže približno sličnu koncentraciju karotenoida od oko 0,18 g/L dok je izmjerena koncentracija za podlogu sa PDB-om i *F. verticillioides* JCM 23107 iznosila čak 0,46 g/L što je 2,5 puta više od ostalih podloga. Na toj je podlozi izraslo najviše biomase i kao što je gore navedeno također i najviše bikaverina. U cijelom uzgoju na ovoj pH vrijednosti ta je podloga pokazala najveću produktivnost. Nadalje *F. verticillioides* JCM 23107 se pokazao kao najbolji radni mikroorganizam u navedenim uvjetima. U jednom radu u šaržnom sustavu istražen je učinak pH vrijednosti, temperature, brzine prozračivanja i ostalih parametara na svojstva rasta i proizvodnje karotenoida kod kvasca *Rhodotorula mucilaginosa*. Optimalna pH vrijednost i temperatura za ukupnu proizvodnju karotenoida su pH vrijednost 7,0 i temperatura 30 °C. (Aksu i Eren, 2005.) Drugo istraživanje je pokazalo da različite pH vrijednosti od 4,0 do 10,0 imaju značajan učinak na

stabilnost karotenoida. Ukupni karotenoidi su pokazali trend pada pri kiseloj pH vrijednosti skladištenja. Gubitak karotenoida je bio najveći u kiselom mediju, ispod 4,0, dok su koncentracije karotenoida ostale stabilne pod neutralnim pH vrijednostima (7,0). Apsorpcija karotenoida se povećava u alkalnim uvjetima, što može biti zbog svojstava esterifikacije sustava konjugiranih veza u njima. Znajući to, karotenoidi bi se trebali održavati u neutralnim do alkalnim uvjetima. (Liu i sur., 2022.)

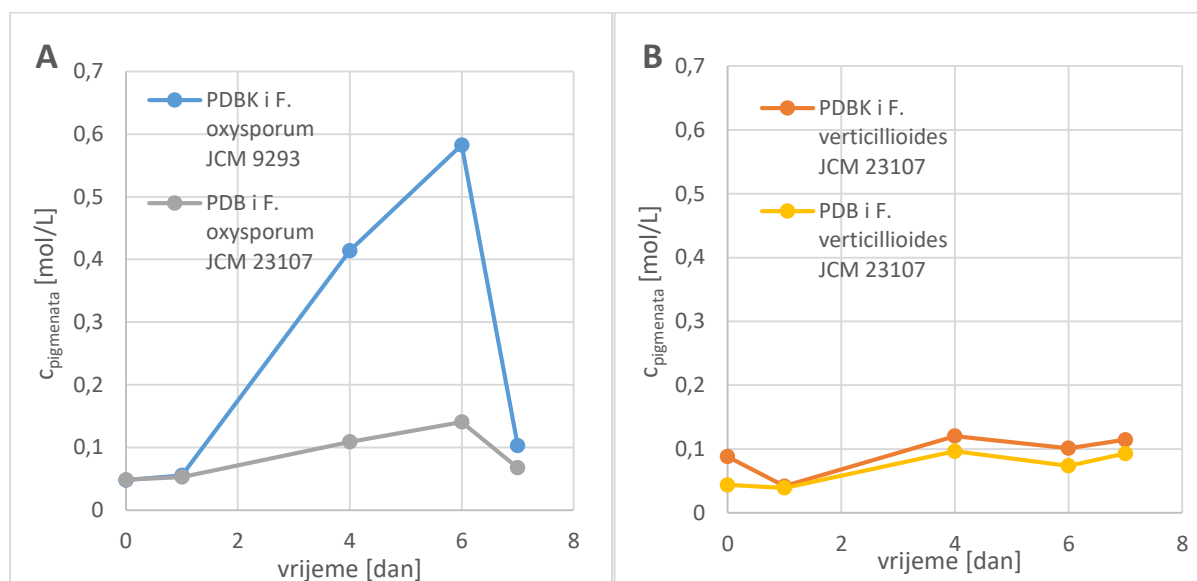
4.2. Proizvodnja bikaverina i karotenoida na hranjivoj podlozi početne pH vrijednosti 6



Slika 6. Slike uzgoja na početnoj pH vrijednosti 6 s lijeva na desno: podloga sa PDB i *F. verticillioides* JCM 23107, podloga sa PDBK i *F. verticillioides* JCM 23107, podloga sa PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 i podloga sa PDB i *F. oxysporum* JCM 23107.

Već nakon 24 sata okumetrijskim zapažanjem primjećena je promjena boja kod podloge koja sadrži PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 kao radni mikroorganizam te podloge sa PDB i *F. oxysporum* JCM 23107 (slika 6). Podloga sa PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 je bila svijetlo ružičasto obojena, a podloga sa PDB i *F. oxysporum* JCM 23107 blago narančasto. 4. dan uzgoja podloga sa PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 je bila obojena žarko ružičastom bojom dok je podloga sa PDB i radnim mikroorganizmom *F. oxysporum* JCM 23107 poprimila

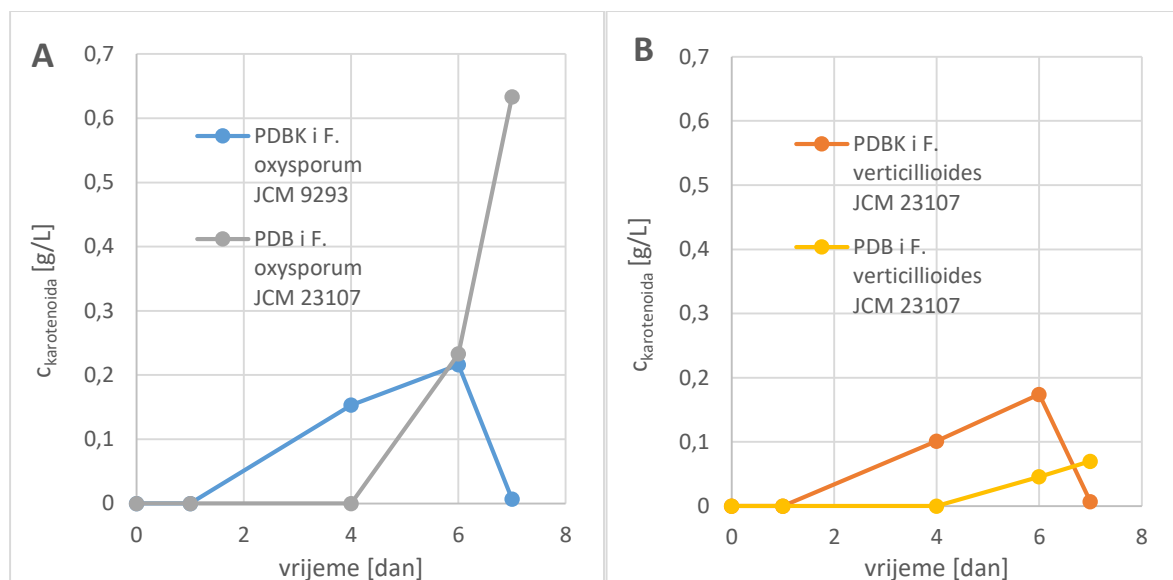
zagasitu sivu boju. Taj dan je primijećena promjena boje tikvice koja sadrži hranjivu podlogu sa PDBK i *F. verticillioides* JCM 23107, ona je poprimala narančastu boju i tikvice sa podlogom sa PDB i *F. verticillioides* JCM 23107 koja je bila smeđe obojena.



Slika 7. Koncentracije bikaverina ($c_{\text{pigmenata}}$) na hranjivim podlogama PDB i PDBK početne pH vrijednosti 6 i sa radnim mikroorganizmima *F. oxysporum* JCM 9293 (A) i *F. verticillioides* JCM 23107 (B).

Uzgoj na pH vrijednosti 6 je započeo kao uzgoj na pH vrijednosti 8, 1. dan uzgoja sve podloge su sadržavale sličnu koncentraciju bikaverina od približno 0,05 mol/L. Sljedeći dan tijekom kojeg se izmjerila koncentracija je 4. dan uzgoja. U podlogama koje sadrže *F. verticillioides* JCM 23107 kao i u podlozi sa PDB i *F. oxysporum* JCM 23107 izračunata je 2 puta veća koncentracija bikaverina u odnosu na 1. dan uzgoja te je iznosila približno 0,1 mol/L. Njihova koncentracija se nije značajno mijenjala tijekom sljedećih dana uzgoja. Koncentracija bikaverina 4. dan uzgoja u hranjivoj podlozi sa PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 iznosila je 0,41 mol/L što je povećanje veće od 8 puta u usporedbi s 1. danom uzgoja. No sinteza bikaverina nije stala te je 6. dan uzgoja njegova koncentracija dotakla maksimum i iznosila je 0,58 mol/L. 7. dan uzgoja koncentracija bikaverina u podlozi sa PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 je pala na 0,1 mol/L radi odumiranja biomase plijesni *F. oxysporum* JCM 9293. Koncentracije bikaverina izoliranog iz biomase nakon 7. dana uzgoja su iznosile sljedeće vrijednosti; na podlozi sa PDB i *F. verticillioides* JCM 23107 koncentracija bikaverina iznosila je 0,058 mol/L, na podlozi sa PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 iznosila je 0,3776 mol/L, nadalje na podlozi sa PDBK i *F. verticillioides* JCM 23107 koncentracija bikaverina je iznosila 0,1017 mol/L i na podlozi sa PDB i *F. oxysporum* JCM 23107, 0,06781 mol/L. Vidimo da su

koncentracije bikaverina izolirane iz biomase ostale visoke i 7. dan uzgoja te je za podlogu koja sadrži PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 iznosila 0,38 mol/L, a za podlogu sa PDBK i *F. verticillioides* JCM 23107, 0,1 mol/L. *F. oxysporum* JCM 9293 je u blago kiselim uvjetima pokazala znatno veću produktivnost pigmentata, a i same biomase u odnosu na *F. verticillioides* JCM 23107 te je biomasa plijesni počela umirati i uništavati pigmente tek 7. dan uzgoja dok je kod *F. verticillioides* JCM 23107 to očitano 6. dan uzgoja.

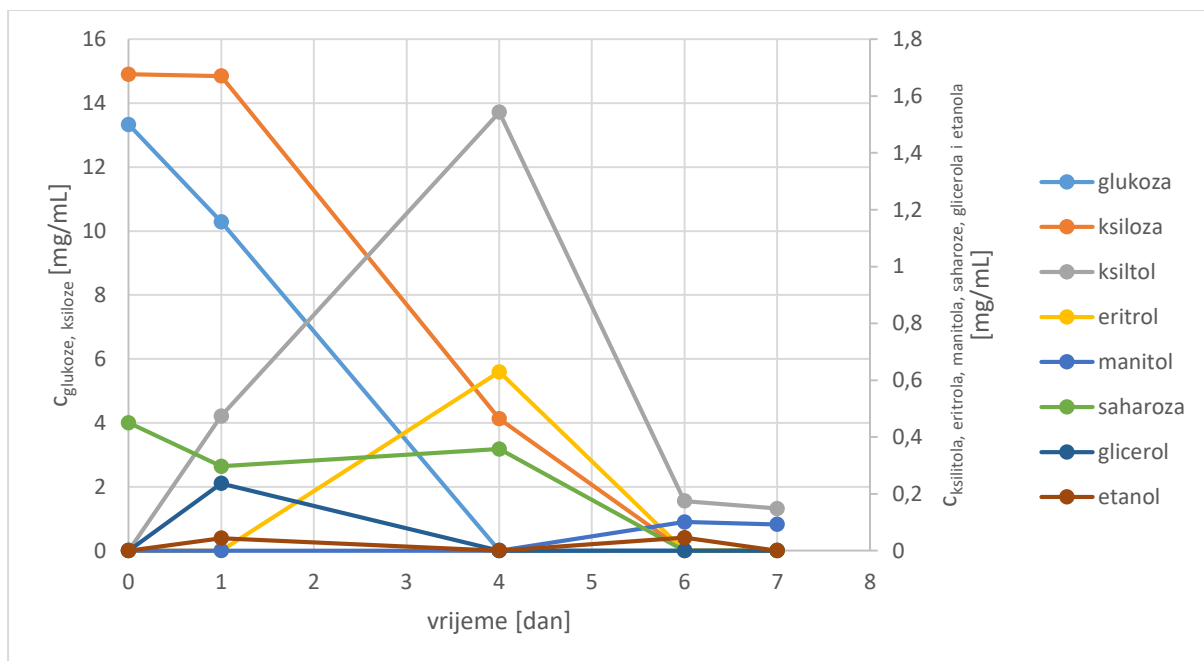


Slika 8. Koncentracije karotenoida ($C_{\text{pigmenata}}$) na hranjivim podlogama PDB i PDBK početne pH vrijednosti 6 i sa radnim mikroorganizmima *F. oxysporum* JCM 9293 (A) i *F. verticillioides* JCM 23107 (B).

Iz slike 8 pratimo proizvodnju karotenoida na hranjivoj podlozi čija pH vrijednost iznosi 6. 4. dan uzgoja je izračunata koncentracija u podlozi sa PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 koja je iznosila 0,15 g/L i u podlozi sa PDBK i *F. verticillioides* JCM 23107 koja je iznosila 0,1 g/L. 6. dan uzgoja su se sve koncentracije povećale te je koncentracija u podlozi sa PDB-om i *F. oxysporum* JCM 23107 skočila na 0,23 g/L, a 6. dan uzgoja još na 0,63 g/L. Izračunate koncentracije na ostalim podlogama su 7. dan uzgoja pale ispod 0,1 g/L. Koncentracije karotenoida izoliranih iz biomase nakon 7. dana uzgoja su iznosile sljedeće vrijednosti; na podlozi sa PDB i *F. verticillioides* JCM 23107 koncentracija karotenoida iznosila je 0 g/L, na podlozi sa PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 iznosila je 1,395 g/L, nadalje na podlozi sa PDBK i *F. verticillioides* JCM 23107 koncentracija karotenoida je iznosila 0,25164 g/L i na podlozi sa PDB i *F. oxysporum* JCM 23107, 0,12271 g/L.

U jednom od znanstvenih članaka navedeno je da su idealni uvjeti za uzgoj *F. oxysporum* CCT7620 uzgoj u mediju riže (20 g rižinog brašna po litri vode), uz inkubaciju 96 h na 28 °C

i 250 okretaja u minuti, bez kontrole pH vrijednosti, što je rezultiralo proizvodnjom bikaverina od 320,5 mg/L. Početna pH vrijednost podloge je iznosila približno 6,0 te je nakon 48 sati uzgoja pala na 3,5 i ta pH vrijednost se zadržala do kraja uzgoja. Najveća proizvodnja pigmenta je zabilježena od 48 do 72 sata uzgoja. Ovi podaci vrijede za uzgoj u bioreaktoru sa barbotirajućom kolonom ali je navedeno da su uzgoji u tikvicama dali slične rezultate. (Santos, 2020.) U ovom radu je potvrđeno da je početna pH vrijednost koja rezultira najvećom proizvodnjom pigmenta pH vrijednost 6 i to bez kasnijeg namiještanja iste. No podloga koja je bila najuspješnija nije bila podloga sa PDB i *F. oxysporum* JCM 23107 već podloga sa PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 tj. podloga koja je sadržavala više izvora ugljika: glukozu i ksilozu. Također tijekom biosinteze karotenoida u procesima fermentacije dolazi do prirodne promjene pH vrijednosti u mediju za uzgoj u skladu sa rastom radnog mikroorganizma. Vrijednost pH se smanjuje tijekom prvih 72 sata, nakon čega slijede povišene pH vrijednosti zbog intenzivne faze karotenogeneze. U istraživanjima u kojima su proučavani idealni uvjeti za proizvodnju karotenoida pomoću kvasaca najveći ukupni sadržaj karotenoida (3,48 mg/L) postignut je pri optimalnoj pH vrijednosti od 5,91-6,2. (Igreja i sur., 2021.)



Slika 9. Promjena koncentracije (c) supstrata i produkata tijekom aerobnog uzgoja *F. oxysporum* u Erlenmeyerovim tikvicama.

S obzirom da se uzgoj u hranjivoj podlozi sa PDBK i radnim mikroorganizmom *F. oxysporum* na ovoj pH vrijednosti pokazao kao najuspješniji, uzorci su podvrgnuti UPLC analizi. Svaka hranjiva podloga je kao osnovni supstrat sadržavala glukozu iz dekstrozne

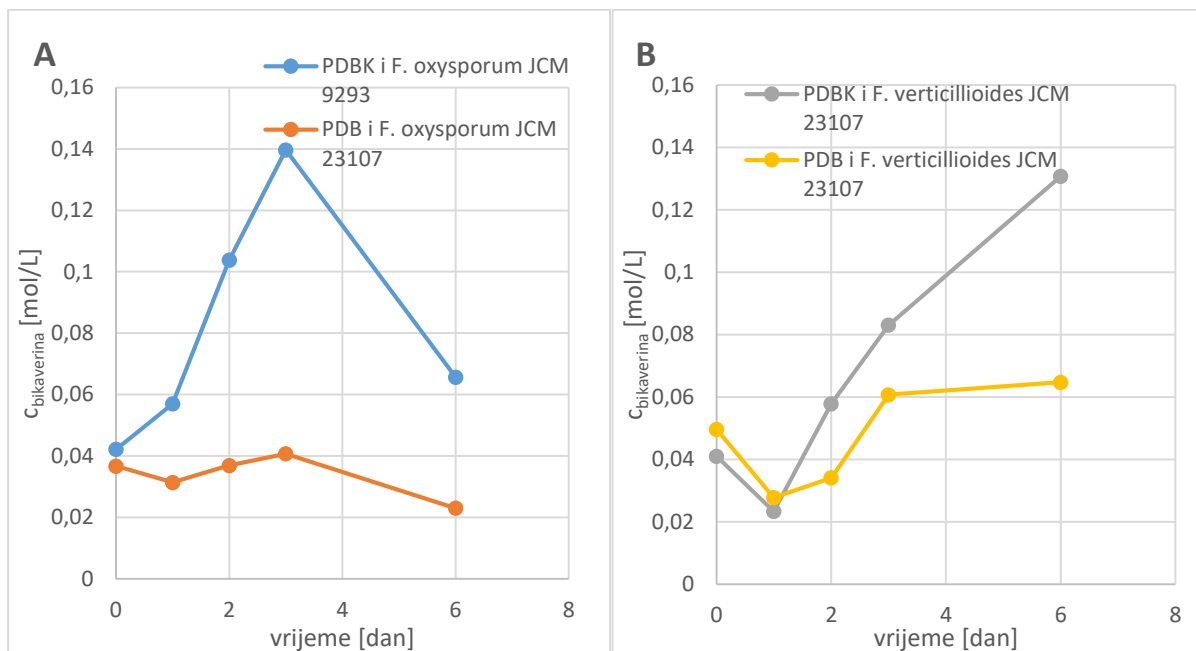
otopine krumpira. Podloge PDBK su imale i glukozu i ksilozu kao supstrate. Rezultati UPLC analize su pokazali da se u početnoj otopini nalazila i saharoza ali u jako maloj koncentraciji. Saharoza je u literaturi navedena kao jedan od čimbenika koji potiču povećanu proizvodnju sekundarnih metabolita, samim time i pigmenata, tijekom uzgoja plijesni *Fusarium*. (Santos, 2020.) U podlogama koje su sadržavale i glukozu i ksilozu, prvo se trošila glukozu, a nakon nje ksiloza te kod skoro svih podloga 4. dan uzgoja više nije bilo izvora ugljika. Jedina podloga kod koje je još 4. dan bila prisutna ksiloza je podloga koja je sadržavala PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293. Ovaj podatak nam je od velike važnosti jer proizvodnju pigmenata potiče restrikcija izvorima ugljika. Produkti koje smo mogli očitati nakon provedene analize su šećerni alkoholi: ksilitol, eritrol i manitol te alkoholi: glicerol i etanol. Najvišu koncentraciju među produktima je pokazao ksilitol i to 4. dan uzgoja (1,54 mg/mL), zatim eritrol isto 4. dan uzgoja (0,66 mg/mL), glicerol 1. dan (0,24 mg/mL) i manitol 6. dan (0,101 mg/mL), dok je najmanju koncentraciju od svih produkata imao etanol (0,045 mg/mL). U istraživanju je navedeno kako je povećani prinos etanola popraćen smanjenjem prinosa nusprodukta ksilitola od 28%. (Panagiotou, 2005.) Iz toga zaključujemo da prisutnost jednog spoja inhibira sintezu drugoga, što potvrđuju rezultati u ovom radu. Za hranjivu podlogu koja sadrži PDB i *F. oxysporum* JCM 23107, koncentracija etanola je 1. dan uzgoja iznosila 0,503 mg/mL dok je koncentracija ksilitola bila 0 mg/mL. 4. dan uzgoja na istoj podlozi koncentracija ksilitola je iznosila 0,1278 mg/mL, a koncentracija etanola je pala na 0,053 mg/mL. Ksilitol, eritrol i glicerol su se počeli proizvoditi već prvi dan, dok je manitol bio očit na četvrti dan uzgoja. U literaturi je u anaerobnim uvjetima glavni produkt bio ksilitol s maksimalnim prinosom od 0,34 mola ksilitola po molu ksiloze, dok je maksimalni prinos etanola (1,02 mola etanola po molu ksiloze) dobiven u aerobnim uvjetima. (Panagiotou, 2005.) Za glicerol je u istraživanjima navedeno da se povećava razina transkripta gena za glicerol-3-fosfat fosfatazu u divljem tipu plijesni *Fusarium* pod stresom fludioksonila, što ukazuje na povećanu proizvodnju glicerola. Pretpostavlja se da fludioksonil izaziva abnormalno nakupljanje glicerola putem deregulacije osmoregulacijskog puta u metabolizmu plijesni. (Van Nguyen, Schäfer i Bormann, 2012.)

4.3. Proizvodnja bikaverina i karotenoida na hranjivoj podlozi početne pH vrijednosti 4



Slika 10. Slike uzgoja na početnoj pH vrijednosti 4 s lijeva na desno: podloga sa PDB i *F. verticillioides* JCM 23107, podloga sa PDBK i *F. verticillioides* JCM 23107, podloga sa PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 i podloga sa PDB i *F. oxysporum* JCM 23107.

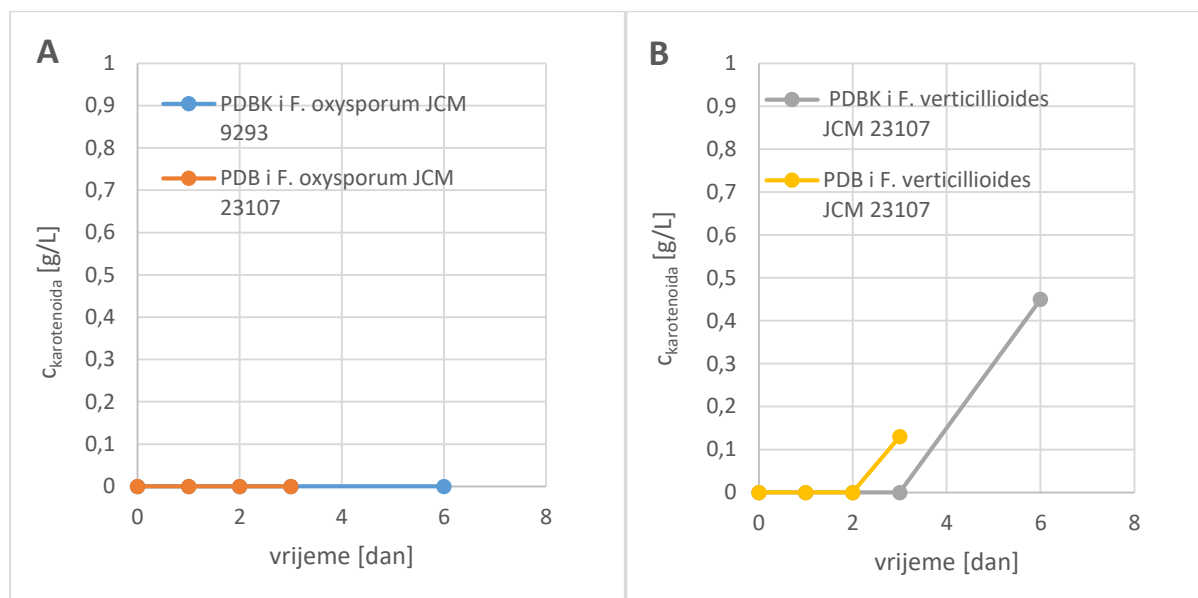
Nakon 24 sata uzgoja okumetrijskim zapažanjem (slika 10) primjećuje se promjena boje u tikvici čija hranjiva podloga sadrži PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293, koja je poprimila blago narančastu boju te u tikvicama čije podloge sadrže PDB i *F. verticillioides* JCM 23107 i PDB i *F. oxysporum* JCM 23107 koje su obojene zagasitom sivom bojom. Nakon 48 sati uzgoja hranjiva podloga sa PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293 je obojena tamnom crvenom bojom. Taj dan se obojila i tikvica sa PDBK i *F. verticillioides* JCM 23107 i to smeđom bojom sa crvenim tonovima. Podloge koje sadrže PDBK do kraja uzgoja nisu promijenile boju te već iz okumetrijskog zapažanja možemo zaključiti da proizvodnja pigmenta nije bila uspješna. Nadalje, nakon 72 sata uzgoja boje u tikvicama se nisu značajno promijenile no 6. dan uzgoja je došlo do velikih promjena. Niti u jednoj tikvici više nisu uočljivi crveni ili narančasti pigmenti, te prevladavaju sive i modre boje. Tijekom uzgoja na ovoj pH vrijednosti, dalo se primijetiti da su suspenzije značajno manje viskozne od onih u prijašnjim uzgojima te nakon centrifugiranja uzoraka, količina istaložene biomase plijesni u kivetama je bila izrazito mala.



Slika 11. Koncentracije bikaverina ($C_{\text{pigmenata}}$) na hranjivim podlogama PDB i PDBK početne pH vrijednosti 4 i sa radnim mikroorganizmima *F. oxysporum* JCM 9293 (A) i *F. verticillioides* JCM 23107 (B).

Na slici 11 možemo primijetiti kako su već 1. dan uzgoja koncentracije bikaverina 2 puta manje nego što su bile tijekom uzgoja na drugim pH vrijednostima. Jedina podloga koja se ističe je ona sa PDBK i *F. oxysporum* JCM 9293, čija koncentracija bikaverina 1. dan iznosi približno 0,06 mol/L. 2. dan uzgoja njena koncentracija raste na 0,1 mol/L što je povećanje od 2 puta u odnosu na prethodni dan. Proizvodnja bikaverina se nastavlja i 3. dan te njegova koncentracija iznosi 0,14 mol/L, što je i maksimum uzgoja na pH vrijednosti 4. 6. dan uzgoja koncentracija bikaverina u istoj podlozi spustila se na 0,065 mol/L. Na razgradnju pigmenata utječu: promjena pH vrijednosti podloge, aktivnost određenih enzima plijesni, negativno djelovanje nekih nusproizvoda metabolizma itd. Podloga sa PDBK i *F. verticillioides* JCM 23107 je pokazala rast koncentracije bikaverina do kraja uzgoja no i njena maksimalna koncentracija je dosta manja od maksimalne koncentracije uzgoja na idealnoj pH vrijednosti za uzgoj plijesni roda *Fusarium* – pH vrijednosti 6. Podloge sa PDB-om su tijekom cijelog uzgoja imale malu produktivnost pigmenata i rast biomase. U kiselim uvjetima su se kao bolje opcije pokazale podloge sa ksilozom tj. podloge koje sadrže više od jednog izvora ugljika. U članku u kojem se ispitivala poboljšana proizvodnja bikaverina delecijom ili dodatnom ekspresijom određenih gena, navedeno je da u plijesnima roda *Fusarium* delecijom transkripcijskog faktora PacC, koji regulira virulentnost plijesni i biosintezu i izlučivanje

sekundarnih metabolita (Barda i sur., 2020.), se znatno povećava sinteza bikaverina u mediju pH vrijednosti 4 u usporedbi sa sojem divljeg tipa. (Wiemann i sur., 2009.).



Slika 12. Koncentracije karotenoida ($C_{\text{pigmenata}}$) na hranjivim podlogama PDB i PDBK početne pH vrijednosti 4 i sa radnim mikroorganizmima *F. oxysporum* JCM 9293 (A) i *F. verticillioides* JCM 23107 (B).

Karotenoidi su se tijekom ovog uzgoja (slika 12) počeli proizvoditi tek 3. dan uzgoja i to samo na podlozi koja je sadržavala PDB i radni mikroorganizam *F. verticillioides* JCM 23107 (0,13 g/L). Kod podloge sa PDBK i *F. verticillioides* JCM 23107 je koncentracija karotenoida izračunata 6. dan uzgoja i iznosila je 0,45 g/L. Na ovoj pH vrijednosti je nisku koncentraciju pigmenata pratio i mali rast biomase iako je u prethodnim istraživanjima navedeno kako je smanjenje pH vrijednosti medija primijećeno pri ekstenzivnom razvoju micelija i kako je promjena pH vrijednosti tijekom uzgoja obrnuto proporcionalna rastu plijesni. To je dokazano i u ovom radu no početna pH vrijednost u njihovom istraživanju je iznosila oko 3,8 i spustila se sve do 3 te na pH vrijednosti 6 nije bio zabilježen nikakav rast biomase iako su rezultati u ovom radu pokazali najbolji rast biomase baš na toj pH vrijednosti. (Srivastava i sur., 2011.) U jednom od istraživanja je navedeno da je u jako kiselom mediju (pH vrijednosti 3) utvrđen porast biosinteze torulena, dok je količina torularhodina značajno smanjena. Sadržaj β -karotena je bio sličan vrijednosti utvrđenih u ostalim medijima čije su pH vrijednosti iznosile od 4,0-7,0. U mediju početne pH vrijednosti 4,0 sadržaj torularhina je iznosila 20,1% dok je u mediju s pH vrijednošću 7,0 porastao na 36,0%. Ukupan sadržaj karotenoida je bio najmanji nakon uzgoja u mediju pH vrijednosti 3,0 (115,8 $\mu\text{g/gd.w.}$), dok

je u ostalim medijima (pH 4,0–7,0) količina karotenoida bila gotovo dvostruko veća (191,7–202,9 µg/gd.w.). (M. Kot i sur., 2017.) Istraživanja tvrde da se u kiselim medijima karotenoidi disociraju u karotenoidne katione koji se lakše disociraju od karotenoida, što može biti jedan od razloga pada njihove koncentracije sa padom pH vrijednosti. (Liu i sur., 2022.)

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Plijesan *F. oxysporum* JCM 9293 najveću koncentraciju pigmenta bikaverina ostvaruje 6. dan uzgoja na hranjivoj podlozi čija je vrijednost pH jednaka 6 i koja sadrži 2 izvora ugljika (glukozu i ksilozu). Molarna koncentracija bikaverina je iznosila 0,5827 mol/L. Uzgoj se vodio u aerobnim uvjetima (250 o./min) u mraku.
2. Plijesan *F. verticillioides* JCM 23107 najveću koncentraciju pigmenta bikaverina i karotenoida ostvaruje 7. dan uzgoja na hranjivoj podlozi čija je vrijednost pH jednaka 8 i koja sadrži 1 izvor ugljika (glukozu). Molarna koncentracija bikaverina je iznosila 0,1994 mol/L, a masena koncentracija karotenoida 0,4638 g/L. Uzgoj se vodio u aerobnim uvjetima (250 o./min) u mraku.
3. Za plijesan *F. oxysporum* JCM 9293, najveća koncentracija karotenoida je izmjerena u uzorcima izoliranim iz biomase nakon 7.-og dana uzgoja i iznosila je 1,3950 g/L. Hranjiva podloga je sadržavala 2 izvora ugljika (glukozu i ksilozu) i iznosila početnu pH vrijednost 6. Uzgoj se vodio u aerobnim uvjetima (250 o./min) u mraku.
4. Utvrđeno je da plijesni rastu diauksijski, odnosno u prisutnosti 2 izvora ugljika, prvo troše glukozu, a tek onda ksilozu. Proizvodnja pigmenata je proces inhibiran supstratom te do najvećeg skoka u proizvodnji pigmenata dolazi tek nakon što su svi izvori ugljika potrošeni. Plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 tijekom uzgoja kao produkte stvaraju ksilitol, eritrol, manitol, glicerol i etanol.
5. *F. oxysporum* JCM 9293 se pokazala kao bolja plijesan sa većom proizvodnjom bikaverina i karotenoida. Uzgoj s *F. oxysporum* JCM 9293 se treba prenijeti u bioreaktor ali je potrebna prethodna dodatna optimizacija procesa.

6. POPIS LITERATURE

- Achimón Fernanda, Pizzolitto CR Krapacher, AG Jacquat, RP, JA Zygodlo(2021) "Carbon sources to enhance the biosynthesis of useful secondary metabolites in *Fusarium verticillioides* submerged cultures." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37.5 : 78. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108470>
- Aksu, Zümriye, and A. Tuğba Eren. (2005) "Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source." *Process Biochemistry* 40.9: str.2985-2991. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.011>
- Alex A. Blacutt, Scott E. Gold, Kenneth A. Voss, Minglu Gao i Anthony E. Glenn (2018) *Fusarium verticillioides*: Advancements in Understanding the Toxicity, Virulence, and Niche Adaptations of a Model Mycotoxigenic Pathogen of Maize, *Phytopathology*, 108, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-17-0203-RVW>
- AM Kot, S Błażej, A Kurcz, J Bryś, I Gientka, Anna Bzducha-Wrobel (2017) "Effect of initial pH of medium with potato wastewater and glycerol on protein, lipid and carotenoid biosynthesis by *Rhodotorula glutinis*." *Electronic Journal of Biotechnology* 27, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.01.007>
- Barda, Maor, Sadhasivam, Bi, Zakin, Prusky, et.al. (2020), The Ph-Responsive Transcription Factor PacC Governs Pathogenicity and Ochratoxin A Biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*, *Frontiers in Microbiology*, 11 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00210>
- The Editors of Encyclopaedia Britannica (2017), *Fusarium wilt*, Encyclopaedia Britannica
- C Liu, B Hu, Y Cheng, Y Guo, W Yao, H Qian.(2021) "Carotenoids from fungi and microalgae: A review on their recent production, extraction, and developments." *Bioresource Technology* 337 : 125398. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125398>
- C. W. Bacon, A. E. Glenn i I. E. Yates (2008) *Fusarium verticillioides*: Managing the endophytic association with maize for reduced fumonisins accumulation, *Toxin Reviews*, 27:3-4, str. 411-446. <https://doi.org/10.1080/15569540802497889>
- Echavarri-Erasun, Carlos, and Eric A. Johnson.(2002) "Fungal carotenoids." *Applied mycology and biotechnology*. Vol. 2. Elsevier, 45-85. [https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(02\)80006-5](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(02)80006-5)
- Fravel, D., Olivain, C. i Alabouvette, C. (2003) *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157: str. 493-502 <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00700.x>

- Gordon, T. R., i Martyn, R. D. (1997) The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. Annual review of phytopathology, Vol.35, str. 111–128. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.111>
- Ibrahim Sabrin RM, A Sirwi, BG Eid, SGA Mohamed, GA Mohamed (2021) "Bright side of *Fusarium oxysporum*: secondary metabolites bioactivities and industrial relevance in biotechnology and nanotechnology." *Journal of Fungi* 7.11: 943. <https://doi.org/10.3390/jof7110943>
- J Liu, L Xiao, Y Xie, F Guan, J Cai, (2022) "The stability of carotenoids from a marine photosynthetic bacterium *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* P2." *Journal of Food Processing and Preservation* 46.7: e16724. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16724>
- Joshi, V. K., Devender Attri, Anju Bala, Shashi Bhushan (2003). "Microbial pigments." 362-369. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/11334>
- Lagashetti, A. C., Dufossé, L., Singh, S. K., and Singh, P.N. (2019). Fungal pigments and their prospects in different industries. *Microorganisms*, 7(12), 604., 01-29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120604>
- Limón, M.C., Rodríguez-Ortiz, R. & Avalos, J. (2010) Bikaverin production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, str. 21–29 <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2551-1>
- Luxsika Ngamwonglumlert i Sakamon Devahastin (2019) Carotenoids, *Encyclopedia of Food Chemistry*, Academic Press, str. 40-52 <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21608-9>
- Mukherjee, Gunjan, Tulika Mishra, and Sunil K. Deshmukh.(2017) "Fungal pigments: an overview." *Developments in fungal biology and applied mycology*: 525-541 https://doi.org/10.1007/978-981-10-4768-8_26
- Marcela Colombo dos Santos, Juliano Lemos Bicas, (2021) Natural blue pigments and bikaverin, *Microbiological Research*, 244 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126653>
- Martin Lohr (2009) Chapter 21 - Carotenoids, *The Chlamydomonas Sourcebook* (Second Edition), Academic Press, str. 799-817 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370873-1.00029-0>
- Michielse, C. B., i Rep, M. (2009) Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*, 10(3), str. 311–324. <https://doi.org/10.1111%2Fj.1364-3703.2009.00538.x>
- N. Deepa.; Achar, P.N. i Sreenivasa, M.Y. (2021) Current Perspectives of Biocontrol Agents for Management of *Fusarium verticillioides* and Its Fumonisin in Cereals—A Review , *Journal of Fungi* , 7, 776 <https://doi.org/10.3390/jof7090776>

Nguyen Thuat Van, Wilhelm Schäfer, and Jörg Bormann (2012) "The stress-activated protein kinase FgOS-2 is a key regulator in the life cycle of the cereal pathogen *Fusarium graminearum*." *Molecular plant-microbe interactions* 25.9 : str.1142-1156

<https://doi.org/10.1094/MPMI-02-12-0047-R>

Panagiotou, Gianni, Paul Christakopoulos, and Lisbeth Olsson. (2005) "The influence of different cultivation conditions on the metabolome of *Fusarium oxysporum*." *Journal of biotechnology* 118.3: 304-315. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.05.004>

P Wiemann, A Willmann, M Straeten, K Kleigrewe, M Beyer, HU Humpfet et.al. (2009) "Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation." *Molecular microbiology* 72.4: str.931-946.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06695.x>

Santos, M.C., Mendonça, M.d. and Bicas, J.L. (2020). Modeling bikaverin production by *Fusarium oxysporum* CCT7620 in shake flask cultures. *Bioresour. Bioprocess.* 7, 1-8.

<https://doi.org/10.1186/s40643-020-0301-5>

Izjava o izvornosti

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

S. Suklović

Vlastoručni potpis