

Uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 pri različitim uvjetima aeracije i iskorištavanje otpadne prevrele podloge nesumpornim ljubičastim bakterijama

Kovač, Ivan

Master's thesis / Diplomski 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:159:033925>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2023.

Ivan Kovač

**UZGOJ PLIJESNI *Mucor indicus*
DSM 2185 PRI RAZLIČITIM
UVJETIMA AERACIJE I
ISKORIŠTAVANJE OTPADNE
PREVRELE PODLOGE
NESUMPORNIM LJUBIČASTIM
BAKTERIJAMA**

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 pod mentorstvom doc. dr. sc. Maria Novaka, te uz pomoć dr. sc. Nenada Marđetka.

Diplomski rad izrađen je u okviru HRZZ projekta pod vodstvom prof. dr. sc. Božidara Šanteka „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (OPB-SLS; šifra projekta 9717).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

UZGOJ PLIJESNI *Mucor indicus* DSM 2185 PRI RAZLIČITIM UVJETIMA AERACIJE I ISKORIŠTAVANJE OTPADNE PREVRELE PODLOGE NESUMPORNIM LJUBIČASTIM BAKTERIJAMA

Ivan Kovač, univ. bacc. ing. biotechn. 0058213324

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj različitih protoka zraka pri uzgoju plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na dva hidrolizata kukuruznih oklasaka u barbotirajućem bioreaktoru te istražiti mogućnost iskorištenja otpadnih prevrelih podloga za uzgoj fototrofnih nesumpornih ljubičastih bakterija. Uzgojem plijesni u 1 L podloge pri protoku zraka od 0,5 L/min na kiselinskom hidrolizatu proizvedeno je 5,07 g/L etanola i 5 g biomase s 8,3 % masnih kiselina, a na enzimskom hidrolizatu proizvedeno je 11,7 g/L etanola i 10,8 g biomase s 13,6 % masnih kiselina. Uzgoji provedeni pri 1 i 1,5 L/min zraka proizveli su više biomase s većim udjelom masnih kiselina s manje etanola u podlozi. U anaerobnim uvjetima proizvedeno je 22,35 g/L etanola. Na iskorištenim podlogama nakon uzgoja plijesni proveo se uzgoj bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2178 i za *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090 te se pratila sinteza bakterioklorofila, te je napravljena analiza masnih kiselina u izoliranoj biomasi.

Ključne riječi: *Mucor indicus* DSM 2185, ljubičaste nesumporne bakterije, hidrolizati lignocelulozne sirovine, biokemikalije, barbotirajući bioreaktor

Rad sadrži: 47 stranica, 7 slika, 6 tablica, 78 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Mario Novak

Pomoć pri izradi: dr. sc. Nenad Marđetko

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Antonija Trontel (predsjednica)
2. doc. dr. sc. Mario Novak (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)
4. doc. dr. sc. Bojan Žunar (zamjenski član)

Datum obrane: 4. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

CULTIVATION OF MOLD *Mucor indicus* DSM 2185 UNDER DIFFERENT AERATION
CONDITIONS AND UTILIZATION OF WASTE SUBSTRATE BY NON-SULFUR PURPLE
BACTERIA

Ivan Kovač, univ. bacc. ing. biotechn. 0058213324

Abstract: The aim of this work was to examine the influence of different air flows during the cultivation of the mold *Mucor indicus* DSM 2185 on corn cob hydrolysates in a bubbling bioreactor and to investigate the use of waste media for the cultivation of phototrophic non-sulfur purple bacteria. Mold grown in 1 L of acid hydrolyzate at an air flow of 0,5 L/min produced 5,07 g/L of ethanol and 5 g of biomass with 8,3% fatty acids whereas 11,7 g/L of ethanol and 10,8 g of biomass with 13,6% fatty acids were produced on the enzymatic hydrolyzate. More biomass and fatty acids were produced with less ethanol at higher airflows. Under anaerobic conditions 22,35 g/L of ethanol was produced. *Rhodovulum adriaticum* DSM 2178 and *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090 were cultivated on the waste media. The synthesis of bacteriochlorophyll was monitored and an analysis of fatty acids was made.

Keywords: *Mucor indicus* DSM 2185, purple non-sulfur bacteria, hydrolysates of lignocellulosic raw materials, biochemicals, bubbling bioreactor

Thesis contains: 47 pages, 7 figures, 6 tables, 78 references, 1 supplement

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Mario Novak, PhD, Assistant professor

Technical support and assistance: Nenad Mardetko, PhD

Reviewers:

1. Antonija Trontel, PhD, Assistant professor (president)
2. Mario Novak, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (member)
4. Bojan Žunar, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: July 4th, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BIORAFINERIJA	2
2.2. LIGNOCELULOZNE SIROVINE	4
2.2.1. Lignoceluloza	4
2.2.2. Celuloza	4
2.2.3. Hemiceluloza	5
2.2.4. Lignin	5
2.3. PREDOBRAĐA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA	5
2.4. ODABRANI MIKROORGANIZMI	6
2.4.1. Plijesan <i>Mucor indicus</i>	7
2.4.2. Ljubičaste nesumporne bakterije	8
2.5. ODABRANI PROIZVODI BIOPROCESA	9
2.5.1. Bioetanol	10
2.5.2. Ksilitol	10
2.5.3. Masne kiseline	11
2.5.4. Hitin i hitozan	12
2.5.5. Pigmenti	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Radni mikroorganizmi	14
3.1.2. Kemikalije	14
3.1.3. Hranjive podloge	16
3.1.4. Uređaji i oprema	17
3.2. METODE	19
3.2.1. Priprema inokuluma plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185	19
3.2.2. Priprema podloga za održavanje ljubičastih nesumpornih bakterija <i>R. adriaticum</i> DSM 2718 i <i>R. capsulatus</i> JCM 21090	19
3.2.3. Priprema hranjivih podloga za uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185	20
3.2.4. Priprema podloge za uzgoj nesumpornih ljubičastih bakterija	20
3.2.5. Provedba i nadzor biotehnoške proizvodnje biokemikalija pomoću plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u bioreaktoru s mješalom i barbotirajućem bioreaktoru	20
3.2.6. Provedba i nadzor uzgoja nesumpornih ljubičastih bakterija u Erlenmeyerovim tikvicama na otpadnoj vodi uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185	21
3.2.7. Analitičke metode	22

4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. UZGOJ PLIJESNI <i>M. indicus</i> DSM 2185 NA PODLOZI DOBIVENOJ KISELINSKOM HIDROLIZOM KUKURUZHNIH OKLASAKA U BARBOTIRAJUĆEM BIOREAKTORU	27
4.2. UZGOJ PLIJESNI <i>M. indicus</i> DSM 2185 NA PODLOZI DOBIVENOJ ENZIMSKOM HIDROLIZOM KISELINSKI PREDOBRAĐENIH KUKURUZHNIH OKLASAKA U BARBOTIRAJUĆEM BIOREAKTORU I BIOREAKTORU S MIJEŠALOM	32
4.3. UZGOJ NESUMPORNIH FOTOTROFNIH LJUBIČASTIH BAKTERIJA <i>R. capsulatus</i> JCM 21090 I <i>R. adriaticum</i> DSM 2178 U ISKORIŠTENOJ PODLOZI NAKON UZGOJA <i>M. indicus</i> DSM 2185	36
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA.....	41
7. PRILOZI	

1. UVOD

Svijet ovisi o fosilnim gorivima ne samo kao izvorima energije nego kao sirovinama za proizvodnju raznih plastika, lijekova i kemijskih sredstava. Fosilna goriva su neobnovljivi izvori energije te njihova ekstrakcija s vremenom postaje sve skuplja i teža. Ekstrakcija i uporaba fosilnih goriva ima ogromni utjecaj na okoliš, klimu i društvo s najvećim utjecajem na najranjivije zajednice u manje razvijenim zemljama. Uz sve navedeno očekuje se daljnji rast populacije te zbog navedenih problema dolazi do potrebe za razvojem industrije koja može koristiti netoksične lokalne resurse s minimalnim ili pozitivnim utjecajem na okoliš i društvo (IPCC, 2022). Cirkularna ekonomija u obliku biorafinerija baziranim na lokalnoj biomasi nudi rješenje za mnoge od navedenih problema s obzirom da ugljik iz biomase potječe iz atmosferskog CO₂, a ne iz fosilnih izvora. Lignocelulozna biomasa uključuje poljoprivredni otpad poput sijena, kukuruzovine, kukuruznih oklasaka i mekinja raznih žitarica, otpadnu celulozu kao što su karton i papir, trave, drveće te brzo rastuće energetske biljke (Kucharska i sur., 2018). Izazov u uporabi lignocelulozne biomase predstavlja prethodna predobrada te je hidroliza lignocelulozne biomase do monomernih šećera neophodna kako bi je mikroorganizmi mogli metabolizirati (Bušić i sur., 2018). Lignocelulozne sirovine bogate su heksozama glukozom, galaktozom i manozom te pentozama arabinozom i ksilitolom. Malobrojni mikroorganizmi mogu metabolizirati pentoze stoga 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 istraživao se biotehnološki proces proizvodnje biokemikalija pomoću plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na dva različita hidrolizata lignocelulozne sirovine u barbotirajućem bioreaktoru pri protocima zraka od 0,5, 1 i 1,5 L/min. Uzgoj se provodio s ciljem sinteze biomase plijesni i proizvodnje etanola i ksilitola. Nakon provedenih uzgoja plijesni *Mucor indicus*, filtrat kulture se dalje iskoristio kao podloga za rast nesumpornih ljubičastih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718 i *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090 te se pratila sinteza fotosintetskih pigmenata i analizirao se sastav masnih kiselina u sojevima bakterija.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIORAFINERIJA

Zanimanje za bioekonomiju zbog brige da se zadovolji povećana potražnja za hranom i materijalima proizvedenim na održivi način raste iz dana u dan sa sve većim brojem dobro informiranih potrošača koji su skloniji kupnji ekološki prihvatljivih proizvoda (Gaffey i sur., 2021). Biorafinerije se smatraju ključnim tehnologijama koje omogućuju široku primjenu u bioekonomijama. Biorafinerije su definirane kao postrojenja koja provode procese konverzije biomase, u kemikalije, biomaterijale i energiju maksimizirajući vrijednost biomase te minimizirajući otpad (Vertès i sur., 2017; Alriols i sur., 2010), tj. kao održiva prerada biomase u spektar proizvoda na biološkoj osnovi (hrana, krmivo, kemikalije, materijali) i bioenergiju (biogoriva, energija i/ili toplina) (IEA Bioenergy, 2020). Unutar biorafinerija obično se odvijaju sljedeći procesi: predobrada i priprema biomase, odvajanje komponenta biomase te naknadni koraci konverzije i pročišćavanja proizvoda (Bušić i sur., 2018). U skladu s cirkularnom ekonomijom te maksimalnim iskorištenjem sirovina, biorafinerije u cilju imaju iskorištavanje procesnih nusproizvoda i tokova otpada poput otpadnih podloga i otpadne biomase pretvarajući ih u nove vrijedne proizvode (Pabbathi i sur., 2022; Usmani i sur., 2022). Korištenje biomase kao sirovine je ekološki prihvatljivo i poželjno, zbog smanjenja emisije stakleničkih i štetnih plinova. Sirovine koje se koriste u biorafinerijama ne pridonose povećanju koncentracije ugljikova dioksida u atmosferi jer su one same dio kruženja ugljika u prirodi, odnosno sav ugljik koji je sastavni dio sirovina za biorafinerije potječe iz atmosfere. Biorafinerije su se razvile radi: proizvodnje biogoriva kao alternativa ugljenu, zemnom plinu i nafti te suzbijanju njihove sve veće potrošnje, kao opskrba novih monomera i kemikalija kao preteče za nove proizvode, otvaranju novih radnih mjesta, valorizacija otpada (poljoprivredni, gradski i industrijski otpad) te radi postizanja smanjenja emisija stakleničkih plinova (Qureshi i sur., 2014). Klasifikacija biorafinerija temelji se na četiri značajke (Cherubini i sur., 2009):

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 uvjetima (povišeni tlak i temperatura, s ili bez katalizatora)

Prema proizvodima biorafinerije se grupiraju kao neenergetske kojima je cilj proizvodnja kemikalija s dodanom vrijednošću te energetske kojima je glavni proizvod električna ili toplinska energija ili biogoriva poput bioetanol, biobutanola, biodizela i bioplina (Vertès i sur., 2017). S obzirom na broj različitih sirovina i krajnjih proizvoda, biorafinerije se mogu podijeliti na biorafinerije prve, druge i treće faze. Biorafinerije prve faze (engl. *phase I biorefinery*) jednim tehnološkim postupkom, jednu sirovinu pretvaraju u jedan glavni proizvod (Vertès i sur., 2017; Cherubini i sur., 2009). Biorafinerije druge faze (engl. *phase II biorefinery*) koje koriste jednu sirovinu, ali su u mogućnosti proizvesti više različitih krajnjih proizvoda. Pokazalo se da ovakve biorafinerije predstavljaju uspješnije investicije koje istovremeno postižu bolje ekonomske i energetske ciljeve (Cherubini i sur., 2009). Biorafinerije treće faze (engl. *phase III biorefinery*) za proizvodnju više različitih proizvoda koriste više vrsta obnovljivih sirovina.

2.2. LIGNOCELULOZNE SIROVINE

2.2.1. Lignoceluloza

Lignoceluloza je osnovna komponenta biljaka koja se sastoji od polimera: celuloze, hemiceluloze i lignina. Ona čini sastavni dio stanične stijenke biljaka, daje stanici oblik, sprječava hlapljenje vode, pruža mehaničku potporu te djeluje kao zaštita od nametnika (Taherzadeh i Jaihanipour, 2012). Lignocelulozne sirovine predstavljaju veliku količinu obnovljivih sirovina za proizvodnju biogoriva, biokemikalija i biopolimera. U lignocelulozne sirovine ubrajaju se trave, drveće, brzo rastuće energetske biljke kao što su slama, kukuruzovina, kukuruzni oklasci, miskantus i dr. (Kucharska i sur., 2018). Takva vrsta sirovine može se koristiti za održivu proizvodnju etanola i biokemikalija (Marđetko i sur., 2018). Lignocelulozni materijal koji se može koristiti za proizvodnju etanola može se podijeliti u šest skupina: ostatci usjeva (različite vrste slame, rižine ljuske, kukuruzni oklasci), tvrdo (kritosjemenjače) i meko drvo (golosjemenjače), celulozni otpad (otpadni papir), zeljasta biomasa (sijeno lucerne, trave) i čvrsti komunalni otpad (Bušić i sur., 2018). Celuloza, hemiceluloza i lignin zajedno čine kompleksnu strukturu u kojoj lignin ima ulogu mehaničke potpore strukture koja ujedno štiti celulozu od razgradnje enzimima, celulozne i hemicelulozne niti međusobno se isprepliću, a visoki udio kristalne strukture i stupanja polimerizacije celuloze čine lignocelulozne sirovine kompleksnim i teško razgradivim supstratima za enzime (Andlar i sur., 2018). Celuloza i hemiceluloza ostvaruju vodikove veze, dok se lignin veže kovalentno na hemicelulozu (Zoghلامي i Paës, 2019).

2.2.2. Celuloza

Celuloza je makromolekularni spoj sastavljen 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 i tvore mikrovlakna, koja su međusobno povezana u vlakna (Sjostrom, 1993). Struktura celuloze sastoji se od kristalnih područja kao posljedica povezivanja hidroksilnih skupina vodikovim vezama unutar istog i okolnih lanaca celuloze te amorfnih područja (Limayem i Ricke, 2012). Amorfna područja u strukturi celuloznih vlakana pružaju mjesto djelovanja enzima celulaza (Jönsson i sur., 2013).

2.2.3. Hemiceluloza

Hemiceluloza je amorfni razgranati heteropolimer koji se sastoji od heksoza (D-glukoze, D-galaktoze, D-manoze) i pentoza (D-ksiloze i L-arabinoze) te može sadržavati D-glukoronsku, D-galaturonsku i metilgalakturonsku kiselinu. Jedinice D-ksiloze međusobno se povezuju β -1,4-glikozidnom vezom i čine okosnicu hemiceluloze (Limayem i Ricke, 2012). Osim toga, hemiceluloza je kovalentnim vezama povezana s ligninom i nekovalentnim vezama s celulozom što povećava stabilnost lignoceluloznih sirovina (Marđetko i sur., 2018). Bočni lanci hemiceluloze koji se pojavljuju u strukturi određuju topljivost, fizičku konformaciju i reaktivnost s drugim komponentama hemiceluloze (Goswami i Rawat, 2015). Sastav šećera koji grade hemicelulozu može varirati te ovisi o vrsti biljke i uvjetima kultivacije (Kucharska i sur., 2018).

2.2.4. Lignin

Lignin je amorfni heteropolimer koji se sastoji od tri monomera fenil propionskog alkohola: kumaril, koniferil i sinapil alkohola međusobno povezanih ugljik-ugljik i esterskim vezama. Njihovom polimerizacijom tvore umreženu trodimenzionalnu strukturu (Marđetko i sur., 2018). Uz celulozu, lignin je najzastupljenija polimerna organska molekula u prirodi. Lignin je odgovoran za mehaničku čvrstoću stanične stijenke biljaka, strukturna je potpora u strukturi lignoceluloze te pruža nepropusnost i otpornost na mikrobni ili oksidativni stres biljne stanice (Hendriks i Zeeman, 2009).

2.3. PREDOBRAĐA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

Da bi se lignocelulozne sirovine mogle koristiti kao supstrat potrebno je provesti prethodnu predobradu lignoceluloznih sirovina čime se mijenja sastav i struktura sirovine. Ovisno o metodi predobrade sirovine dolazi do djelomičnog ili potpunog uklanjanja lignina, djelomične ili potpune hidrolize hemiceluloze te prevođenja dijela celuloze iz kristalnog u amorfni oblik pogodan za enzimsku hidrolizu (Bušić i sur., 2018). Metode predobrade lignoceluloznih sirovina su kemijske, fizikalne, fizikalno-kemijske i biološke metode.

Većina fizikalnih i kemijskih metoda, kao i kombinacija istih uključuje korištenje visokih temperatura i tlakova, kiselina, lužina, eksplozije parom, ionizirajućeg zračenja, eksplozija CO₂ ili kombiniranih procesa što zahtjeva korištenje posebne opreme 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/ili odgovarajućih enzima. Enzimaska hidroliza predstavlja proces razgradnje polimera na pojedinačne monomere uz primjenu komercijalnih enzima ili lignocelulolitičkih mikroorganizama, a kako bi bila uspješna prethodno je potreban učinkovit predtretman sirovine. Optimalna temperatura hidrolize za većinu komercijalnih enzima poput celulaza i hemicelulaza je 50 °C (Bušić i sur., 2018). Određeni šećeri koji nastaju tijekom hidrolize lignoceluloznih sirovina mogu djelovati inhibitorno na celulaze (Pinaki i sur., 2015) što u konačnici dovodi do potrebe za većim koncentracijama enzima kako bi se postigao željeni prinos procesa (Balat, 2011). Celobioza u koncentraciji do 6 g/L može smanjiti celulaznu aktivnost za 60 % (Bušić i sur., 2018). Glavni faktor koji sprječava proizvodnje biokemikalija iz lignoceluloznih sirovina u velikom mjerilu su troškovi predobrade kao i efikasnost enzimske hidrolize (Meinita i sur., 2019).

2.4. ODABRANI MIKROORGANIZMI

Glukoza, ksiloza, manoz, arabinoza i galaktoza su šećeri prisutni u lignoceluloznim sirovinama u različitim omjerima. Budući da hemiceluloza čini veliki udio u lignoceluloznim sirovinama, fokus tehnoloških razmatranja i istraživanja su mikroorganizmi koji kao supstrat mogu koristiti pentoze (Chen i sur., 2014; Balat i sur., 2011). Mikroorganizmi koji fermentiraju ksilozu pronađeni su među mnogim bakterijama, kvascima i filamentoznim gljivama, a osim toga koriste se genetički modificirani mikroorganizmi, među kojima mnogi imaju svojstvo za simultanu saharifikaciju i fermentaciju. Genetički modificirane bakterije koje imaju potencijal u proizvodnji ksilitola su *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Corynebacterium glutamicum* dok su glavni producenti ksilitola kvasci poput *Candida athensensis*, *Candida tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces marxianus* i *Pichia stipitis* (de Albuquerque i sur., 2014), *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* i *Candida mogii* (Silva i sur., 1998). Navedeni mikroorganizmi proizvode ksilitol kao intermedijer u metabolizmu D-ksiloze (de Albuquerque i sur., 2014). Još jedan od mogućih proizvođača ksilitola je i plijesan *Mucor indicus* za koju je utvrđeno da ima nizak prinos u proizvodnji ksilitola, ali proizvodi i druge biokemikalije, što ju čini interesantnim mikroorganizmom u biorafinerijskoj proizvodnji (Dasgupta i sur., 2017).

2.4.1. Plijesan *Mucor indicus*

Sposobnost filamentoznih gljiva da učinkovito koriste ili razgrade brojne supstrate iskorištava se na različite načine poput izolacije novih enzima (Maeda i sur., 2005), biorazgradnju otpadnih proizvoda (Borchert i Libra, 2001; Sumathi i Manju, 2000) ili za potpunu fermentaciju sirovine. Gljive se mogu koristiti za predobradu lignoceluloznih sirovina te se u tu svrhu koriste gljive bijelog, smeđeg i mekog truljenja. Gljive bijelog truljenja razgrađuju samo lignin ili simultano lignin i ostale sastojke lignoceluloznih materijala (Sigoillot i sur., 2012). Neke od ovih gljiva razgrađuju i lignin i celulozu proizvodeći važne ekstracelularne oksidativne i hidrolitičke enzime, dok gljive smeđeg truljenja hidroliziraju celulozu i hemicelulozu, a djelomično modificiraju lignin. Gljive mekog truljenja izlučuju celulaze, enzime koji razgrađuje celulozu, ali ne i lignin, što dovodi do stvaranja mikroskopskih šupljina unutar drva.

Mucor indicus je dimorfna, nepatogena plijesan iz reda *Mucorales*. Plijesni iz ovoga reda tvore bijele, vunaste kolonije sa sporangijima (Sharifia, 2007). *M. indicus* ima mogućnost filamentoznog rasta ili u obliku pojedinih stanica nalik kvascima. Uzgoj u anaerobnim uvjetima s visokom početnom koncentracijom inokuluma rezultira rastom plijesni *M. indicus* u obliku pojedinih stanica, dok niska koncentracija početnog inokuluma bez obzira na prisustvo kisika uvjetuje rast plijesni u filamentoznom obliku (Satari i sur., 2015; Karimi i Zamani, 2013). Stanična stijenka ove plijesni sadrži 65,5 % hitina i hitozana (Karimi i Zamani, 2013). Hitozan predstavlja vrijedan proizvod biomase ove plijesni zbog brojnih potencijalnih primjena koje uključuju njegovo antibakterijsko djelovanje, izrade biokompatibilnih struktura te primjene u farmaceutskoj industriji za kontrolirano doziranje aktivnih supstanci lijekova (Majeti i Kumar, 2000).

M. indicus bez obzira na tip rasta, ima mogućnost iskorištavanja pentozna i heksoza iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina. Inhibitori prisutni u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina kao što su octena i mravlja kiselina, vanillin, furfural i drugi ne utječu na rast plijesni kao na kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (Karimi i sur., 2008). Ksilozu koja se u velikoj mjeri nalazi u većini lignoceluloznih hidrolizata plijesan može koristiti u aerobnim i u mikroaerofilnim uvjetima (Sues i sur., 2005). Prednost plijesni *M. indicus* nad ostalim mikroorganizmima koji rastu na ksilozi je mogućnost metaboliziranja iste do etanola (Karimi i Zamani, 2013). Budući da nema invertaze, nije u mogućnosti rasti na saharozi zbog čega se koristi za selektivno uklanjanje ostalih šećera u svrhu dobivanja kristalizirane saharazoe (Sharifia i sur., 2008). Uz sve navedeno *M. indicus* je crabtree-

pozitivan mikroorganizam te pri visokim koncentracijama glukoze dolazi do aerobne fermentacije gdje se dio glukoze metabolizira totalnom oksidacijom do vode i ugljikova dioksida, a dio do etanola i ugljikova dioksida (Karimi i Zamani, 2013). Svoju primjenu također pronalazi u bioremedijaciji (Sues i sur., 2005). Biotehnološka primjena plijesi *M. indicus* u proizvodnji biokemikalija iz lignoceluloznih sirovina sve je češća, posebice zbog zadovoljavajućih prinosa i manjka negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje (Sues i sur., 2005).

Gledajući s biotehnološkog aspekta, plijesan *M. indicus* je zanimljiva zbog proizvodnje polinezasićenih masnih kiselina, među kojima je najznačajnija γ -linolenska kiselina. To je omega 6 masna 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 Zamani, 2013). Osim navedene γ -linolenske kiseline, stanična stijenka plijesni sadrži i palmitinsku kiselinu (C16:0), oleinsku kiselinu (C18:1-cis-9), 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, sapuna i deterdženata kao i u prehrambenoj industriji (Satari i sur., 2015).

2.4.2. Ljubičaste nesumporne bakterije

Ljubičaste nesumporne bakterije su najraznolikija skupina fototrofnih ljubičastih bakterija (Imhoff i Trüper, 1989). One su Gram-negativne eubakterije koje čine izrazito raznoliku i heterogenu skupinu široko rasprostranjenih fotosintetskih mikroorganizama u prirodi. Prisutne su u raznim staništima, a mogu se naći u jezerima, ribnjacima, otpadnim vodama, kanalizaciji, obalnim lagunama te ostalim vodenim staništima, kao i u sedimentima, vlažnom tlu i neobrađenim poljima (Novak i sur., 2017). Preferirani rast svih vrsta je fotoheterotrofno u anaerobnim uvjetima na različitim organskim supstratima kao što su masne i ostale organske kiseline (sukcinat ili malat), primarni i sekundarni alkoholi, ugljikohidrati i aromatski spojevi. Mnoge vrste sposobne su rasti fotoautotrofno uz prisustvo molekularnog vodika ili sulfida kao izvorima energije te samo s CO₂ kao izvorom ugljika (Hansen i Van Gemerden, 1972). Neke ljubičaste nesumporne bakterije mogu rasti u tami aerobno i anaerobno ili kemolitotrofijom (Madigan i Jung, 2009; Madigan i Gest, 1979).

Danas je poznato više od 20 vrsta ljubičastih nesumpornih bakterija među kojima su najpoznatije one iz rodova *Rhodobacter* i *Rhodopseudomonas*, no predmet znanstvenih

istraživanja sve više su druge vrste koje imaju neobične metaboličke karakteristike poput ekstremofila koji naseljavaju hladna, vruća, slana, alkalna ili kisela staništa (Madigan i Jung, 2009). Prema Madukasi i sur. (2009) nužni faktori rasta su izvori vitamina B, poput tiamina, niacina, p-aminobenzojeve kiseline ili biotina. Moguća je i 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).

Ljubičaste nesumporne bakterije imaju veliki potencijal u biotehnologiji. 5-aminolevulinska kiselina je najpoznatija kemikalija koju proizvode ljubičaste nesumporne bakterije (Liu i sur., 2019). Također se mogu primijeniti za sintezu biopolimera polihidroksialkanoata (PHA) (Higuchi-Takeuchi i sur., 2019). Ljubičaste nesumporne bakterije našle su uporabu i u procesima pročišćavanja tla i otpadnih voda iz raznih industrija uključujući otpadne vode iz farmaceutske industrije (Sakarika i sur., 2020; Madukasi i sur., 2009). Mogu se koristiti i za bioremedijaciju teških metala poput kadmija (Cd), nikala (Ni) i olova (Pb) te metala s radioaktivnim izotopima poput cezija (Cs) i stroncija (Sr). Ljubičaste nesumporne bakterije su dobar izvor proteina. Proteini čine 60-70 % suhe tvari biomase (Kobayashi i Kobayashi, 1995). Bogate su esencijalnim aminokiselinama, karotenoidnim pigmentima i vitaminima što ih čini pogodnima za uzgoj kao stočna hrana za ribu i druge životinje pri čemu mogu poboljšati njihov imunitet i zaštititi ih od bolesti. Osim navedenog, mogu se koristiti za prekomjernu ekspresiju membranskih proteina, fotobiološku proizvodnju H_2 i drugih vrijednih spojeva (Frigaard, 2016).

2.5. ODABRANI PROIZVODI BIOPROCESA

Biokemikalije su karakterizirane, proizvedene ili uključuju kemijske reakcije u živim organizmima. Različitim tipovima bioprocesa može se proizvesti različite biokemikalije: vitamine (riboflavin, cijanokobalamin, askorbinska kiselina), organska otapala (acetone, etanol, butanol), enzime (proteaze, lipaze, celulaze), hormone, aminokiseline, organske kiseline (octena, mliječna, limunska kiselina) antibiotike i različite masne kiseline (Marić, 2000).

2.5.1. Bioetanol

Bioetanol je obnovljivi izvor energije koji se proizvodi mikrobnom fermentacijom šećera (Sun i Cheng, 2001). Danas se bioetanol uglavnom koristi kao gorivo ili dodatak gorivu u pogonskim motorima, ali se može iskoristiti i kao sirovina u kemijskoj industriji (Rass-Hansen i sur., 2007). Za proizvodnju etanola iz lignoceluloznih sirovina potrebno je provesti predtretman sirovine kako bi se sastojci biomase djelomično razgradili i bili lakše dostupni za enzime poput celulaza i hemicelulaza. Dobiveni hidrolizat koristi se za proizvodnju etanola mikrobnom fermentacijom šećera, a za dobivanje etanola u određenom stupnju čistoće potrebna je njegova separacija i pročišćavanje (Bušić i sur., 2018). Iako su kvasci najpoznatiji mikroorganizmi za fermentaciju šećera, sve više se pribjegava korištenju plijesni poput *Mucor indicus*. Primjena plijesni umjesto kvasca proizlazi iz potrebe za postizanje većih iskorištenja procesa uslijed mogućnosti plijesni da metabolizira više vrsta šećera uključujući pentoze poput ksiloze. Plijesan se također primjenjuje zbog prisutnosti inhibitora u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina u čijoj prisutnosti kvasci ne mogu efikasno provoditi proizvodnju etanola. Zadnji korak proizvodnje etanola je pročišćavanje koje se sastoji od destilacije te dehidracije etanola. U prvom koraku dobiva se 92,5 do 94 % etanola, dok se u idućem koraku destilacijom uz promjenu tlaka ili azeotropnom destilacijom dobiva bezvodni etanol (Bušić i sur., 2018).

2.5.2. Ksilitol

Ksilitol 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. Sastavni je dio različitih prehrambenih i konditorskih proizvoda, poput žvakaćih guma bez šećera i pekarskih proizvoda. Lijekovi zaslađeni ksilitolom sigurni su za dijabetičare jer ksilitol uzrokuje vrlo mali porast razine glukoze u krvi (Msomi i sur., 2023).

Biotehnološki postupak proizvodnje ksilitola rezultat je konverzije ksiloze odgovarajućim mikroorganizmom (de Albuquerque i sur., 2014). Supstrati koji se koriste za biotehnološku 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 (Parajo 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 pojedinačne stanice. Potrebno je optimirati i ostale parametre procesa poput pH, temperature, aeracije te sastav hranjive podloge što uključuje izbor odgovarajućih koncentracija izvora ugljika, dušika, makro i mikronutrijenata (Rafiqul i Mimi Sakinah, 2013).

2.5.3. Masne kiseline

Masne kiseline su skupina karboksilnih kiselina s lancima koje čine 4 - 36 atoma ugljika. Među njima se razlikuju zasićene masne kiseline (engl. *Saturated Fatty Acid, SFA*), masne kiseline s jednom nezasićenom vezom u lancu (engl. *Monounsaturated Fatty Acid, MUFA*), masne kiseline s dvije nezasićene veze u lancu (engl. *Di-unsaturated Fatty Acid, DUFA*), masne kiseline s tri nezasićene veze u lancu (engl. *Tri-unsaturated Fatty Acid, TUFA*) i masne kiseline s više od tri nezasićene veze u lancu (engl. *Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA*) (D'Alessandro i Antoniosi Filho, 2016). Masne kiseline predstavljaju izvor energije za organizme te su bitne komponente staničnih struktura, ponajprije staničnih membrana. Industrijska proizvodnja masnih kiselina rezultat je hidrolize triglicerida te naknadnog uklanjanja glicerola, dok je sintetička proizvodnja masnih kiselina rezultat hidrokarboksilacije alkena (Lu i sur., 2011).

Masne kiseline svoju upotrebu pronalaze u proizvodnji sapuna, deterdženata, površinski aktivnih sredstava, maziva, emulgatora, sredstava za vlaženje, sredstava za teksturiranje, 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), a esteri sa složenijim alkoholima se koriste za obradu vode, kao sintetička maziva ili tekućine za obradu metala te se konzumiraju u hrani (Xin i sur., 2015). Esterifikacijom masti metanolom ili etanolom dobiva se glicerol kao nusproizvod te smjesa metilnih estera masnih kiselina (engl. *fatty acid methyl esters, FAME*) ili smjesa etilnih estera masnih kiselina (engl. *fatty acid ethyl esters, FAEE*), poznatiji pod nazivom biodizel. Biodizel je obnovljivo, netoksično gorivo s niskom emisijom plinova potpuno kompatibilno s dizel motorima s unutarnjim izgaranjem (Chen i sur., 2012). Radni mikroorganizmi koji su sposobni proizvesti više od 20 % masenog udjela lipida u suhoj tvari poznati su kao oleaginozni mikroorganizmi među koje se ubrajaju mikroalge, bakterije, filamentozne gljive te kvasci (Patel i sur., 2020). Filamentozne gljive među koje spada plijesan *M. indicus* predstavljaju idealne izvore za proizvodnju masnih kiselina.

2.5.4. Hitin i hitozan

Hitin (β -(1-4)-poli-*N*-acetil-*D*-glukozamin) je široko rasprostranjen polimer u prirodi i drugi je najzastupljeniji polisaharid nakon celuloze (Liu i sur., 2023). Hitin je poluproziran te izrazito netopljiv materijal koji ima slična svojstva kao i celuloza, te se može smatrati polimerom čiju strukturu čini celulozna osnova u kojoj je hidroksilna skupina na položaju C-2 glukoze zamijenjena acetilamino skupinom. Monomerne jedinice 2-acetilamino-2-deoksi- β -*D*-glukoze u strukturi hitina međusobno su povezane β -(1,4) vezom. Dok se strukturalno hitin može usporediti s celulozom, njegova funkcija u organizmima sličnija je keratinu pa organizmi od hitina stvaraju različite strukture poput ljuski i egzoskeleta člankonožaca te ljuštore školjkaša i puževa (Lenardon i sur., 2010). Pojedinačni polimerni lanci mogu se opisati kao spirale, u kojima je svaki pojedini monomer invertiran s obzirom na susjedni monomer. Hitin se u prirodi javlja u obliku uređenih makrofibrila te je glavna strukturna komponenta egzoskeleta člankonožaca i stanične stijenke gljiva. Hitin se javlja u tri različita kristalična alomorfa: α -, β -i γ -oblik, koji se razlikuju u usmjerenju mikrofibrila (Merzendorfer i Zimoch, 2003). Strukturu α -hitina karakteriziraju dva susjedna lanca u antiparalelnom položaju što dovodi do stvaranja brojnih vodikovih veza unutar istog i između lanaca zbog čega dolazi do velike stabilnosti strukture. β -hitin karakteriziraju dva susjedna lanca u paralelnom usmjerenju te zbog toga ne nastaju vodikove veze između susjednih slojeva. γ -hitin je treći alomorf koji u svojoj strukturi ima lance paralelne i antiparalelne orijentacije. Najčešće se javlja u staničnoj stijenci gljiva (Ospina Alvarez i sur., 2014).

Zbog netopivosti hitina u vodi te niske topivosti u otapalima i visoke toksičnosti istih, hitin se obično pretvara u derivat hitozan koji se može koristiti u komercijalnoj biomedicini. Hitozan je deacetilirani oblik hitina te je topiv u razrijeđenim kiselinama s pH vrijednošću nižom od pH 6.0, kao što su octena, mravlja i mliječna kiselina (Baker i sur., 2007). Konverzija hitina u hitozan moguća je upotrebom različitih enzima ili kemijskom hidrolizom pomoću lužina (npr. vrućom koncentriranom otopinom NaOH) (Baker i sur., 2007). Hitin i hitozan su biokompatibilni, biorazgradivi i netoksični biopolimeri, koji imaju antimikrobno djelovanje te se mogu koristiti kao hidratizirajući agensi (Zagrag i sur., 2015). U organizmima kao što su gljive i beskralježnjaci, zabilježeni su različiti stupnjevi deacetilacije, rezultirajući širokim rasponom oblika između hitina (potpuno acetilirani) i hitozana (potpuno deacetilirani) (Yang, 2011).

2.5.5. Pigmenti

Najčešći pigmenti sintetizirani kod ljubičastih nesumpornih bakterija u anaerobnim uvjetima na svjetlu su bakterioklorofili a i b te karotenoidi. Kada rastu pri aerobnim uvjetima u mraku ljubičaste nesumporne bakterije sintetiziraju malo ili gotovo nikakvu količinu fotosintetskih pigmenata (Takaichi i sur., 2001). Smanjenjem koncentracije kisika kod uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija potiče se sinteza fotosintetskih pigmenata i proteina koji služe za njihovo vezanje. Protein-pigment kompleksi ugrađeni su u citoplazmatsku membranu i formiraju specijalizirani membranski intracitoplazmat sustav. U *R. capsulatus* tri su različita pigment-protein kompleksa koji služe u transdukciji svjetlosne energije u kemijsku (McEwan, 1994). Karotenoidi su žuti, narančasti i crveni pigmenti sa širokom primjenom u hrani, hrani za životinje, kozmetičkim i farmaceutskim industrijama zbog svojih živih boja i promicanja zdravlja kao prekursori za sintezu vitamina A. 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 uzrokuje stvaranje reaktivnih vrsta kisika (ROS), a karotenoidi kao antioksidansi služe kao zaštita stanice od ROS-a (Frigaard, 2016). Svi karotenoidi su derivati tetraterpena, što znači da su sintetizirani iz 8 molekula izoprena i sadrže 40 atoma ugljika. 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. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Radni mikroorganizmi

Radni mikroorganizmi korišteni tokom ovog rada su plijesan *Mucor indicus* DSM 2185 čuvana na čvrstoj podlozi opisanoj poglavlju 3.1.3.1. pri 4 °C te ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2718 i *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090 čuvane na tekućim podlogama opisanim u poglavljima 3.1.3.2. i 3.1.3.3. pri sobnoj temperaturi. 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 1. prikazan je popis kemikalija korištenih prilikom izrade ovog rada.

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih prilikom izrade 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
Ksiloz		
Agar-agar		
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	p.a.	Kemika, Hrvatska

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih prilikom izrade ovog rada – *nastavak*

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
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
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
Natrijev hidroksid		
Octena kiselina		
Tween	p.a.	Merck, Njemačka
Klorovodična kiselina	≥99 %	Kemika, Hrvatska
Sumporna kiselina	min. 96 %, p.a.	Kemika, Hrvatska
Etanol	p.a.	Gram-mol, Hrvatska
Metanol		
Kloroform		
Heksan		
Protupjenič	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD
Cellulase enzyme blend	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD
Viscozyme L, enzyme blend	za upotrebu u biotehnologiji	Novozyme, Danska
Hemicellulase from <i>Aspergillus niger</i>	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD

3.1.3. Hranjive podloge

3.1.3.1. *Kemijski sastav krute hranjive podloge za održavanje kulture M. indicus DSM 2185*

Kemijski sastav krute podloge za održavanje kulture plijesni *M. indicus* DSM 2185 je: 20 g/L glukoze, 20 g/L ksiloze, 2 g/L kvašćeva ekstrakta, 5 g/L mesnog ekstrakta, 2 g/L diamonijeva fosfata heptahidrata, 2 g/L diamonijeva sulfata heptahidrata i 10 g/L agar-agara. 250 mL podloge sterilizirano je pri 121 °C kroz 20 min u autoklavu te je još vruća lijevana u sterilne Petrijeve zdjelice u aseptičnim uvjetima nakon čega je poklopljena ostavljena da se ohladi i skruti.

3.1.3.2. *Kemijski sastav hranjive podloge za održavanje kulture bakterija R. adriaticum DSM 2718*

Kemijski sastav tekuće podloge za održavanje kultura bakterija *R. adriaticum* DSM 2718: 0,9 g/L kvašćeva ekstrakta, 1,62 g/L malata, 1,2 g/L glutamata, 0,48 g/L diamonijeva fosfata heptahidrata, 0,3 g/L kalijeva dihidrogen fosfata, 0,3 g/L kalijeva hidrogen fosfata, 0,12 g/L magnezijeva sulfata, 0,0318 g/L kalcijeva klorida i 1,2 g/L manganova sulfata heptahidrata.

3.1.3.3. *Kemijski sastav hranjive podloge za održavanje kulture bakterije R. capsulatus JCM 21090*

Kemijski sastav tekuće podloge za održavanje kulture bakterije *R. capsulatus* JCM 21090 je: 1 g/L kalijevog dihidrogen fosfata, 0,5 g/L magnezijevog klorida heksahidrata, 0,1 g/L kalcijeva klorida dihidrata, 1 g/L amonijeva klorida, 1 g/L natrijeva klorida, 1 g/L natrijeva acetata, 1 g/L natrijeva sukcinata, 0,5 g/L kvašćeva ekstrakta i 0,3 g/L bacto peptona.

3.1.3.4. *Kemijski sastav hranjive podloge za pripremu inokuluma plijesni M. indicus DSM 2185*

Kemijski sastav hranjive podloge za pripremu inokuluma plijesni *M. indicus* DSM 2185 je: 20 g/L glukoze, 5 g/L diamonijeva sulfata heptahidrata, 5 g/L diamonijeva fosfata heptahidrata, 5 g/L mesnog ekstrakta i 2 g/L kvašćeva ekstrakta.

3.1.3.5. *Kemijski sastav kiselinskog hidrolizata upotrijebljenog za uzgoj plijesni M. indicus DSM 2185*

Kao podloga za uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 korištena je podloga dobivena kiselinskom hidrolizom kukuruznih oklasaka napravljena u okviru HRZZ projekta

„Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-9717) čiji je sastav dobiven UPLC analizom. Podloga se sastoji od: 4 g/L glukoze, 24 g/L ksiloze, 2 g/L arabinoze, 1,5 g/L mravlje kiseline i 3 g/L octene kiseline.

3.1.3.6. *Kemijski sastav enzimskog hidrolizata upotrebljenog za uzgoj plijesni M. indicus DSM 2185*

Kao podloga za uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 korištena je podloga dobivena enzimskom hidrolizom krutog ostatka nakon kiselinske hidrolize kukuruznih oklasaka napravljena u okviru HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-9717) čiji je sastav dobiven UPLC analizom. Podloga se sastoji od: 55 g/L glukoze i 5 g/L ksiloze.

3.1.3.7. *Sastav otopine elemenata u tragovima za uzgoj nesumpornih ljubičastih bakterija R. adriaticum DSM 2718 i R. capsulatus JCM 21090*

Otopina elemenata u tragovima za uzgoj nesumpornih ljubičastih bakterija sastoji se od: 1,8 g/L željezova (II) klorida tetrahidrata, 250 mg/L kobaltova klorida heksahidrata, 10 mg/L niklova (II) klorida heksahidrata, 10 mg/L bakrova (II) klorida dihidrata, 70 mg/L manganova (II) klorida tetrahidrata, 100 mg/L cinkova klorida, 500 mg/L borne kiseline, 30 mg/L natrijeva molibdata i 10 mg/L natrijeva selenata. Otopina je sterilizirana mikrofiltracijom radi sprječavanja nastanka netopivog taloga.

3.1.3.8. *Sastav otopine vitamina za uzgoj nesumpornih ljubičastih bakterija R. adriaticum DSM 2718 i R. capsulatus JCM 21090*

Otopina vitamina za uzgoj nesumpornih ljubičastih bakterija sastoji se od: 1 mg/L biotina, 3,5 mg/L niacina, 3 mg/L tiamina, 2 mg/L p-aminobenzoične kiseline, 1 mg/L piridoksina, 1 mg/L kalcijeva pentotenata i 0,5 mg/L vitamina B12. Otopina je sterilizirana mikrofiltracijom radi očuvanja biološke aktivnosti vitamina.

3.1.4. Uređaji i oprema

3.1.4.1. *Bioreaktor s mješalom i barbotirajući bioreaktor*

Za uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 koristio se stakleni reaktor dimenzija 15 x 30 cm, korisnog volumena 2 L. Bioreaktor je povezan s komadnom pločom (Biostat MD, B. Braun Biotech International, Njemačka) preko koje se provodi automatska regulacija temperature. Bioreaktor je opremljen pH elektrodom, sustavom za izuzimanje uzoraka, sustavom za regulaciju pH, sustavom za prepumpavanje podloge i inokulaciju i temperaturnom sondom. Grijanje i hlađenje podloge u reaktoru provodi se cirkuliranjem

vode kroz plašt. U izvedbi reaktora s mješalom miješanje podloge se provodilo turbinskim mješalom. U izvedbi barbotirajućeg reaktora miješanje podloge se provodilo strujom sterilnog zraka iz sapnice na dnu reaktora. Sterilizacija reaktora zajedno s podlogom se provodila u autoklavu pri 121 °C i tijekom 20 min.

3.1.4.2. Sustav za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (engl. Ultra Performance Chromatography, UPLC)

Za praćenje koncentracije izvora ugljika (glukoza, ksiloza, arabinoza) i proizvedenih biokemikalija (etanol, glicerol, ksilitol) 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 150×7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 mol/L otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 µL, a protok mobilne faze 0,6 mL/min.

3.1.4.3. 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.

3.1.4.4. Spektrofotometar

Za određivanje optičke gustoće uzoraka tijekom uzgoja i snimanje apsorpcijskog spektra u rasponu valnih duljina od 200 do 900 nm 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 (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka).

3.1.4.5. Sustav za plinsku kromatografiju (engl. Gass Chromatography, GC)

Sastav i koncentracija masnih kiselina u suhoj biomasi plijesni i nesumpornih bakterija nakon ekstrakcije i transesterifikacije 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).

3.1.4.6. 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 *M. indicus* DSM 2185

Prije provođenja biotehnološkog procesa uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 pripremljeno je 250 mL podloge za inokulum. Podloga je pripremljena prema sastavu navedenom u poglavlju 3.1.3.4. te je sterilizirana pri 121 °C kroz 20 min u autoklavu. Tako pripremljena podloga za inokulum je nacijepljena sporama s čvrste podloge za održavanje kulture i inkubirana 24 h pri 28 °C uz miješanje na tresilici pri 180 rpm.

3.2.2. Priprema podloga za održavanje ljubičastih nesumpornih bakterija *R. adriaticum* DSM 2718 i *R. capsulatus* JCM 21090

Podloga za održavanje bakterije *R. adriaticum* DSM 2718 je pripremljena prema sastavu navedenom u poglavlju 3.1.3.2. Podloga za održavanje bakterije *R. capsulatus* JCM 21090 je pripremljena prema sastavu navedenom u poglavlju 3.1.3.3. Podloge su raspoređene po 250 mL u Erlenmeyerove tikvice od 500 mL i sterilizirane u autoklavu pri 121 °C kroz 20 min. Kada su se podloge ohladile u njih je aseptično dodano po 1 mL otopine vitamina i minerala čiji su sastavi dati u poglavljima 3.1.3.7. i 3.1.3.8. Podloge su nacijepljene s po 50 ml kulture odgovarajućih bakterija i držane 7 dana na svjetlu. Nakon 7 dana mogu se koristiti kao kulture za nacijepeljivanje novih podloga za održavanje te kao inokulum za uzgoj bakterija kao što je navedeno u poglavlju 3.2.6.

3.2.3. Priprema hranjivih podloga za uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185

Za uzgoj plijesni *M. indicus* koristile su se dvije hranjive podloge. Prva podloga koja je korištena bila je tekuća faza nakon kiselinske hidrolize kukuruznih oklasaka u okviru HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-9717). Kukuruzni oklasci tretirani su slabom sumpornom kiselinom (0,5 % vol/vol) u visokotlačnom reaktoru pri 180 °C kroz 10 min čime se dobila kruta i tekuća faza.

Kao druga podloga za uzgoj plijesni korišten je enzimski hidrolizat krute faze nakon provedene kiselinske predobrade dobiven u okviru HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-9717). Kruta faza je usitnjena i korištena u daljnjim procesima enzimske hidrolize pomoću enzima „Cellulase enzyme blend tvrtke Sigma-Aldrich, SAD, Viscozyme L enzyme blend tvrtke, Novozyme, Danska te Hemicellulase from *Aspergillus niger*“ tvrtke Sigma-Aldrich, SAD. Objema podlogama pH je podešen na 5 dodavanjem natrijeve lužine te su prije uzgoja sterilizirane u autoklavu pri 121 °C kroz 20 min.

3.2.4. Priprema podloge za uzgoj nesumpornih ljubičastih bakterija

Za uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija kao hranjiva podloga iskorištena je smjesa supernatanata nakon provedenih uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 kao što je opisano u poglavlju 3.2.5. Budući da je supernatant nakon uzgoja plijesni *M. indicus* otpadna voda procesa te da se u njoj nakon provedenog uzgoja nalaze neiskorišteni izvori ugljika i metabolički proizvodi plijesni *M. indicus*, cjelokupni volumen hranjivih podloga je centrifugiran, podijeljen u Erlenmayerove tikvice te je supernatant u njima steriliziran pri 121 °C kroz 20 min. Nakon sterilizacije tikvice s podlogom su ohlađene, u njih je dodano po 1 mL otopine vitamina (poglavljje 3.1.3.8.) i minerala (poglavljje 3.1.3.7.) u aseptičnim uvjetima. Podloga je kao takva iskorištena za uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija *R. adriaticum* DSM 2718 i *R. capsulatus* JCM 21090 u svrhu obrade otpadnih voda u skladu s biorafinerijskim principima.

3.2.5. Provedba i nadzor biotehnoške proizvodnje biokemikalija pomoću plijesni *M. indicus* DSM 2185 u bioreaktoru s mješalom i barbotirajućem bioreaktoru

Uzgoj plijesni *M. indicus* proveden je u bioreaktoru opisanom u poglavlju 3.1.4.1. Provedeno je ukupno 6 uzgoja na dvjema podlogama, tri aerobna uzgoja na podlozi

opisanoj u poglavlju 3.1.3.5. te dva aerobna i jedan anaerobni uzgoj na podlozi opisanoj u poglavlju 3.1.3.6. 1 L hranjive podloge sterilizirana je u reaktoru nakon čega je dodano 250 ml pripremljenog inokuluma plijesni *M. indicus* opisanog u poglavlju 3.2.1. te je u podlogu dodano sredstvo protiv pjenjenja tvrtke Sigma-Aldrich, SAD. Ukupni volumen u bioreaktoru iznosio je 1250 mL. Proces je vođen pri temperaturi od 30 °C i pH ≈ 5.

Kod aerobnih uzgoja miješanje se provodilo strujanjem zraka iz sapnice pozicionirane na dnu reaktora uz stalni protok zraka od 0,5, 1, i 1,5 L/min. Uzgoj plijesni pri aerobnim uvjetima provodio se kroz 48h uz sterilno uzimanje uzoraka svaka 2 h.

Kod anaerobnog uzgoja miješanje se provodilo pomoću turbinskog miješala čiji je broj okretaja iznosio 150 o/min. Uzgoj plijesni pri anaerobnim uvjetima provodio se kroz 120 h uz sterilno uzimanje uzorka.

Uzeti uzorci su centrifugirani, supernatant uzoraka je pripremljen za UPLC analizu (poglavlje 3.2.7.1.). Po završetku uzgoja podloga je centrifugirana, biomasa je osušena pri 50 °C i pripremljena za GC analizu kako bi se odredio udio masnih kiselina u biomasi (poglavlje 3.2.7.2.) i za ekstrakciju hitina i hitozana (poglavlje 3.2.7.5.), dok su supernatanti od svih uzgoja pomiješani i iskorišten za uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija.

3.2.6. Provedba i nadzor uzgoja nesumpornih ljubičastih bakterija u Erlenmeyerovim tikvicama na otpadnoj vodi uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185

Za svaku vrstu ljubičastih nesumpornih bakterija pripremljena je tikvica s 250 ml sterilizirane prevrele podloge nakon uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185. Tikvice su nacijeppljene sa 150 mL inokuluma opisanog u poglavlju 3.2.4. u aseptičnim uvjetima te im je dodan po 1 ml otopine vitamina i minerala (poglavlja 3.1.3.7. i 3.1.3.8.). Uzgoj se provodio kroz 7 dana pri 28 °C bez miješanja. Kao izvor svjetlost korišteno je LED svjetlo. Jednom dnevno sterilno su uzimani uzorci od 2 ml te su pripremljeni za spektrofotometrijsku analizu (3.2.7.4.) kojom se pratio porast biomase. Na kraju uzgoja biomasa je centrifugirana, osušena i pripremljena za spektrofotometrijsko određivanje bakterioklorofila a (poglavlje 3.2.7.3.) i za GC analizu udjela masnih kiselina u biomasi (poglavlje 3.2.7.2.).

3.2.7 Analitičke metode

3.2.7.1. Određivanje koncentracije izvora ugljika i metabolita UPLC metodom

Određivanje koncentracije hidroliziranih šećera te potrošnje istih i sinteze metabolita plijesni *M. indicus* DSM 2185 postignuto je UPLC metodom pomoću uređaja opisanog u poglavlju 3.1.1.2. Uzorci izuzeti svaka 2 h od uzgoja plijesni *M. indicus* u biorekatoru s mješalom i barbotirajućem biorekatoru pripremljeni su za UPLC analizu. U 750 µL supernatanta uzorka dodano je 750 µL 10 %-tne otopine cinkova sulfata. Nakon toga je dvostruko razrijeđeni uzorak vorteksiran i ostavljen na sobnoj temperaturi 15 min kako bi se provela reakcija između dodanog cinkovog sulfata i proteina te ostalih prisutnih nečistoća. Centrifugiranjem 15 min na 10000 rpm izdvojeni su istaloženi proteini, a dobiveni supernatant je profiltriran kroz mikrobiološki filter promjera pora 0,2 µm u staklenu vialu. Na taj način pripremljeni uzorci su spremi za UPLC analizu.

3.2.7.2. Određivanje udjela masnih kiselina u biomasi provedenih uzgoja

Određivanje udjela masnih kiselina u uzetim uzrocima postignuto je analizom na plinskom kromatogramu opisanom u poglavlju 3.1.1.5. Prije analize uzoraka GC-FID metodom provedena je transesterifikacija masnih kiselina u metilne estere, a potom ekstrakcija u odgovarajuće otapalo, u ovom slučaju je to bio heksan. Transesterifikacija masnih kiselina u metilne estere provodila se prema NREL protokolu (Van Wychen i Laurens, 2013). Uvjeti metode pri kojima je provedena analiza sastava estera masnih kiselina prikazana je u tablici 2. Identifikacija i kvantifikacija estera masnih kiselina provedena je usporedbom s retencijskim vremenima i baždarnim dijagramima određenim za metilne estere standardne smjese 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 - C24, Supelco) prema uvjetima navedenim u tablici 2. Koncentracija masnih kiselina dobivena je određivanjem površine ispod pika primjenom softvera GC Solutions verzija 2.32 i integratora ugrađenog u uređaj. Sastav metilnih estera masnih kiselina izražen je prinosom pojedine masne kiseline po g suhe tvari biomase (mg/g) i masenim udjelom (%) ukupnih masnih kiselina u uzorku.

$$m_{x, \text{norm.}} = \frac{\gamma_x}{\gamma_{C13}} \cdot m_{C13} \quad [1]$$

$$w_x = \frac{m_{x, \text{norm.}}}{m_u} \cdot 100 \quad [2]$$

pri čemu je:

γ_x - koncentracija metilnog estera masne kiseline [mg/L]

γ C13 - koncentracija standarda metil tridekanoata [mg/L]

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

mu - masa suhe biomase [mg]

Tablica 2. Uvjeti rada na uređaju za plinsku kromatografiju

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

3.2.7.3. Ekstrakcija ukupnih pigmenata i spektrofotometrijsko određivanje klorofila a

Ekstrakcija ukupnih pigmenata sintetiziranih tijekom uzgoja provedena je sa smjesom organskih otapala uz mehaničku dezintegraciju stanica pomoću staklenih kuglica. 10 ml uzorka centrifugirano je 15 min pri 8000 rpm. 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 naizmjenično tri puta. Potrebno je sve provoditi u što manje osvjetljenom prostoru kako bi se spriječila degradacija pigmenata. Nakon što smo proveli ekstrakciju, uzorak je potrebno centrifugirati 10 min pri 8000 rpm, nakon čega se supernatant analizira u spektrofotometru opisanom u poglavlju 3.1.1.4 u području valnih duljina od 300-900 nm. Koncentracija klorofila a u biomasi određuje se prema formuli za ekstrakciju smjesom etanol/acetona (Ritchie, 2018):

$$P = 0.348209 \times (A_{648} - A_{850}) - 0.16583 \times (A_{665} - A_{850}) + 12.11114 \times (A_{775} - A_{850})$$

[3]

3.2.7.4. Odeđivanje optičke gustoće

Optička gustoća uzoraka mjerena je skeniranjem uzoraka u području valnih duljina od 300-900 nm u spektrofotometru opisanom u poglavlju 3.1.1.4., s ciljem praćenja porasta biomase i određivanja apsorpcijskog minimuma, odnosno maksimuma ljubičastih nesumpornih bakterija *R. adriaticum* DSM 2718 i *R. capsulatus* JCM 21090.

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

Za izdvajanje hitina i hitozana korišteno je 3 g osušene i usitnjene biomase plijesni *M. indicus* DSM 2185 dobivene nakon uzgoja u različitim reaktorskim sustavima. Biomasa je suspendirana u 90 mL natrijeve lužine ($\gamma = 20$ g/L) i autoklavirana sat vremena pri 121 °C (omjer volumena otopine NaOH i mase suhe tvari biomase iznosi 30:1). Alkalno netopljiva frakcija odvojena je centrifugiranjem (6800 rpm/15 min). Dobiveni supernatant je odekantiran, a netopljivi talog se resuspendira s destiliranom vodom i centrifugira pri istim uvjetima. Postupak ispiranja se provodi dok se ne postigne neutralna pH vrijednost (\approx pH 7) supernatanta. Neutraliziranom talogu dodaje se 120 mL 10 %-tne octene kiseline (omjer volumena otopine HAc i mase suhe tvari biomase iznosi 40:1) te se dobivena suspenzija kuha tijekom 6 sati uz refluks i povremeno miješanje. Hitin se izdvaja centrifugiranjem pri 6800 rpm tijekom 15 min. Zatim se ispire s destiliranom

vodom do neutralne vrijednosti, a hitozan se izdvaja iz supernatanta dodavanjem 4 mol/L natrijeve lužine i podizanjem pH vrijednosti supernatanta na 9 jedinica. Vakuum filtracijom na Büchnerovom lijevku izdvaja se hitozan. Kristali hitina i hitozana se ispiru s destiliranom vodom do neutralne pH vrijednosti, a zatim s etanolom (omjer volumena etanola i mase suhe tvari biomase iznosi 20:1) i acetonom (omjer volumena acetona i mase suhe tvari biomase iznosi 20:1). Dobiveni kristali suše se pri 60 °C do konstantne mase (Pochanavanich i Suntornsuk, 2002).

3.2.7.6. Određivanje pokazatelja uspješnosti procesa

Na temelju prikazanih jednadžbi izračunati su pokazatelji uspješnosti uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185:

1. X [g] konačna biomasa plijesni

2. Potrošnja supstrata (ΔS)

$$\Delta S = S_0 - S \quad [4]$$

S_0 – početna koncentracija supstrata

S – konačna koncentracija supstrata

3. Prinos etanola, glicerola i ksilitola (Y_p)

$$Y_p = \frac{P - P_0}{\Delta S} \quad [5]$$

P_0 – početna koncentracija produkta

P – konačna koncentracija produkta

4. Produktivnost sinteze etanola, glicerola i ksilitola (Pr)

$$Pr = \frac{P - P_0}{t_{uk}} \quad [6]$$

t_{uk} – ukupno vrijeme uzgoja

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu istraživao se proces uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 na hidrolizatima kukuruznih oklasaka pri različitim uvjetima aeracije i u različitim biorektorskim sustavima u svrhu proizvodnje biomase, ksilitola te etanola tijekom uzgoja. Biomasa plijesni je vrijedan proizvod budući da se iz nje mogu izolirati hitin i hitozan te masne kiseline. Otpadna podloga zaostala nakon izdvajanja biomase poslužila je kao supstrat za uzgoj fototrofnih ljubičastih nesumpornih bakterija (*R. adriaticum* DSM 2718 i *R. capsulatus* JCM 21090) s ciljem proizvodnje biomase i pigmenata.

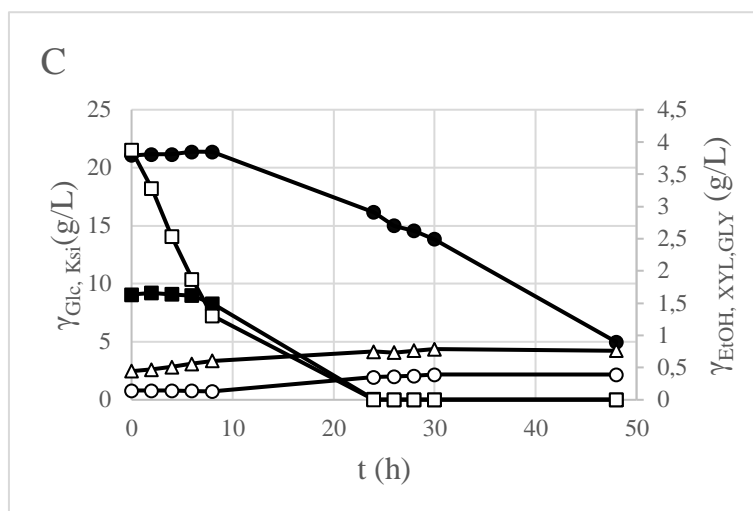
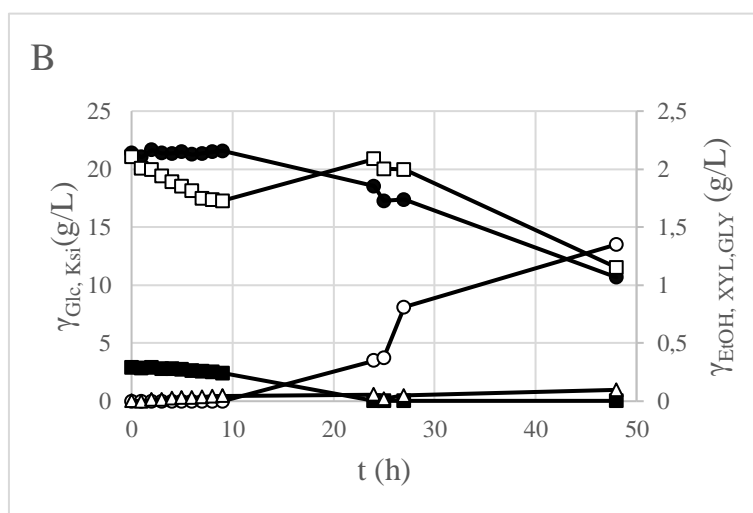
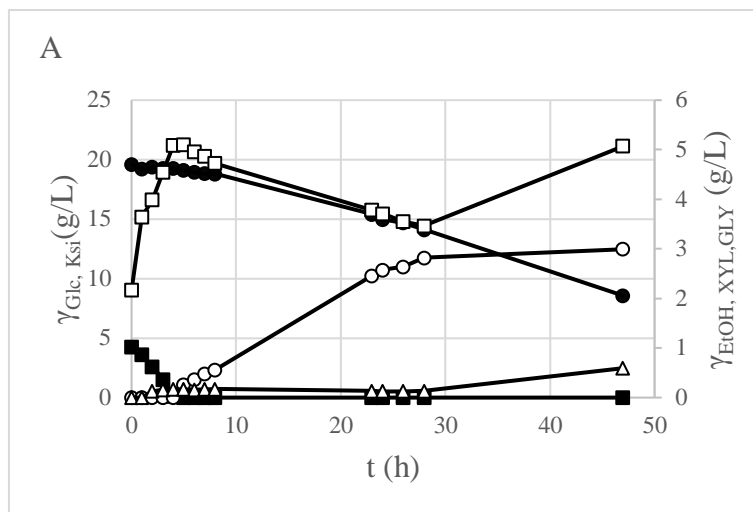
U poglavlju 4.1. prikazani su rezultati uzgoja plijesni na kiselinskom hidrolizatu kukuruznih oklasaka. Rezultati su prikazani na slici 1 te u tablicama 3 i 4.

U poglavlju 4.2. prikazani su rezultati uzgoja plijesni na enzimskom hidrolizatu kukuruznih oklasaka. Rezultati su prikazani na slici 3 te u tablicama 5 i 6.

U poglavlju 4.3. prikazani su rezultati uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija na prevreloj podlozi nakon uzgoja plijesni *M. indicus*.

4.1. UZGOJ PLIJESNI *M. indicus* DSM 2185 NA PODLOZI DOBIVENOJ KISELINSKOM HIDROLIZOM KUKURUZHNIH OKLASAKA U BARBOTIRAJUĆEM BIOREAKTORU

U ovom istraživanju provedena su tri uzgoja plijesni *M. indicus* na kiselinskom hidrolizatu kukuruznih oklasaka pri različitim protocima zraka. Uzgoji su se provodili u barbotirajućem bioreaktoru opisanom u poglavlju 3.1.4.1. Prvi uzgoj proveden je pri protoku zraka od 0,5 L/min, drugi uzgoj s 1 L/min, a treći uzgoj s 1,5 L/min. Tijekom procesa pratila se potrošnja glukoze i ksiloze te sinteza etanola, ksilitola i glicerola. Na kraju procesa određena je suha biomasa te udio hitina i hitozana te sadržaj masnih kiselina u biomasi plijesni pomoću GC-FID metode opisane u poglavlju 3.2.7.2. Rezultati su prikazani na slici 1 te u tablicama 3 i 4. Na slici 2 prikazane su mikroskopske slike uzgoja plijesni u različitim stadijima rasta micelija tokom uzgoja.



Glukoza
 Ksilaza
 Ksilitol
 Glicerol
 Etanol

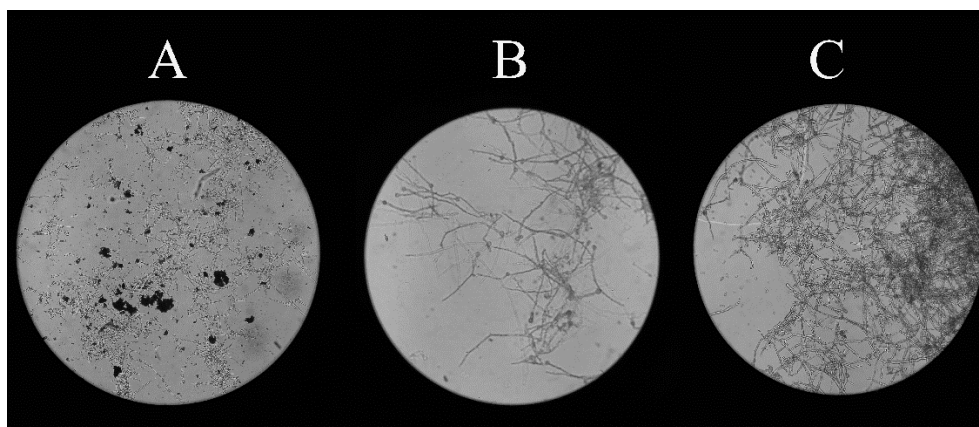
Slika 1. Promjena koncentracije glukoze, ksilaze, ksilitola, glicerola i etanola tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 na kiselinskom hidrolizatu kukuruznih oklasaka u barbotirajućem bioreaktoru pri protocima zraka od 0,5 (A), 1 (B) i 1,5 L/min (C)

Tablica 3. Pokazatelji uspješnosti uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 na kiselinskom hidrolizatu kukuruznih oklasaka u barbotirajućem bioreктору pri različitim protocima zraka

Protok zraka (L/min)	0,5	1	1,5
X (g)	5	8,99	12,26
$\Delta S_{\text{glukoza}}$ (g/L)	4,25	2,89	9,04
$\Delta S_{\text{ksiloza}}$ (g/L)	11,03	10,73	16,08
t_{uk} (h)	47	48	48
P_{EtOH} (g/L)	5,07	1,15	0
Y_{EtOH} (g/g)	0,19	0	0
Pr_{EtOH} (g/Lh)	0,062	0	0
P_{Ksilitol} (g/L)	2,99	1,35	0,39
Y_{Ksilitol} (g/g)	0,27	0,13	0,01
Pr_{Ksilitol} (g/Lh)	0,06	0,02	0,005
P_{Glicerol} (g/L)	0,59	0,098	0,76
Y_{Glicerol} (g/g)	0,039	0,007	0,013
Pr_{Glicerol} (g/Lh)	0,013	0,002	0,007

Iz dobivenih rezultata (slika 1 i tablica 3) može se opaziti da tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* na kiselinskom hidrolizatu kukuruznih oklasaka prvo dolazi do potrošnje glukoze, a nakon što se glukoza iscrpi dolazi do trošenja ksiloze. Takav način rasta naziva se diauksični (Karimi i Zamani, 2013). Tijekom uzgoja pri protoku zraka od 0,5 L/min plijesan je potrošila svu glukozu u podlozi unutar 5 sati dok je tijekom uzgoja pri 1 i 1,5 L/min glukoza potrošena unutar 24 h. 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. Kod uzgoja pri protoku zraka od 0,5 L/min zamjećuje se porast koncentracije etanola u prvih 5 h uzgoja kada je postigao maksimum od 5,1 g/L, nakon čega koncentracija stagnira i kreće padati dok koncentracija ksilitola istovremeno počne rasti prelaskom metabolizma s korištenja glukoze na korištenje ksiloze. Plijesan *M. indicus* može koristiti etanol kao izvor ugljika u prisustvu kisika, no uzrok padu koncentracije etanola moguće je ispuhivanje etanola iz podloge kao posljedica izražene aeracije s obzirom da uz glukozu i ksilozu etanol nije preferirani izvor ugljika. Ta pojava naziva se katabolička represija izvorom ugljika. Koncentracija ksilitola postiže maksimum nakon 30 h (2,99 g/L). U sva tri uzgoja u podlozi na početku uzgoja nalazio se etanol u koncentracijama između 2,1 i 3,87 g/L koji potječe iz inokuluma. Kod uzgoja pri protoku zraka od 1 L/min u početnoj fazi uzgoja, zamjećuje se pad koncentracije

etanola s 2,1 na 1,7 g/L, ali nakon toga koncentracija etanola ponovno počinje rasti do 2,08 g/L. Nakon što je sva glukoza potrošena ponovno se zamjećuje pad koncentracije etanola do konačnih 1,15 g/L. Koncentracija ksilitola raste nakon 9. h uzgoja i postiže konačnu koncentraciju od 1,35 g/L. Tijekom uzgoja pri 1,5 L/min protoka zraka zamijećeno je da je etanol potrošen te je njegova koncentracija na kraju pala na nulu. Koncentracija ksilitola tijekom cijelog uzgoja ostala je niska s konačnom koncentracijom od 0,39 g/L. Tijekom uzgoja pri protoku zraka od 1,5 L/min došlo je do najveće potrošnje ksiloze čija je konačna koncentracija iznosila 23,6% početne koncentracije. Nakon uzgoja pri protoku 1 L/min u podlozi je zaostalo 49,89% početne ksiloze, kod uzgoja pri protoku zraka od 0,5 L/min je zaostalo 43,72% početne ksiloze. Uočava se da se pri višim protocima zraka postiže niža ukupna količina metabolita. Plijesan *Mucor indicus* u aerobnim uvjetima raste u filamentoznom obliku, za koji je utvrđeno da ima nizak prinos u proizvodnji ksilitola (Dasgupta i sur., 2017), a 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). U literaturi postoje primjeri proizvodnje etanola pomoću plijesni *M. indicus* na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina. Satari i sur. (2015) su u aerobnim uvjetima uspješno proizveli etanol na hidrolizatu rižine slame uz prinos etanola od 0,37 g po g asimiliranih šećera, a na hidrolizatima šumskog drvnog otpada koji su velikim dijelom činili otpaci smreke, radili su Sues i sur. (2005) te su postigli prinos etanola od 0,42 g/g. Usporedbom s rezultatima iz ovog rada, jedino se pri protoku zraka od 0,5 L/min proizveo etanol s konačnom koncentracijom višom od početne uz prinos od 0,19 g/g. U sva tri slučaja zabilježena je najveća koncentracija ksilitola na kraju uzgoja: 2,99 g/L pri protoku zraka od 0,5 L/min, 1,35 g/L pri protoku zraka od 1 L/min te 0,39 g/L pri protoku zraka od 1,5 L/min. Iz ovih podataka jasno se očitava smanjenje sinteze biokemikalija s povećanjem protoka zraka te asimilacija izvora ugljika u biomasu. Karimi i sur. (2006) navode da je za proizvodnju etanola iz ksiloze pomoću plijesni *M. indicus* potreban kisik te njihovim pokušajem fermentacije kiselinskog hidrolizata rižine slame u anaerobnim uvjetima nije došlo do proizvodnje etanola.



Slika 2. Mikroskopski preparati uzorka plijesni *M. indicus* DSM 2185 uzgajane na kiselinskom hidrolizatu kukuruznih oklasaka u barbotirajućem bioreaktoru pri protoku zraka od 0,5 L/min na početku uzgoja (A) nakon 24 h (B) i na kraju uzgoja nakon 48 h (C)

Završetkom uzgoja biomasa je centrifugiranjem odvojena te osušena u sušioniku pri 50 °C. Osušena biomasa je usitnjena u tarioniku i izvagana. U konačnici je dobiveno 5 g suhe biomase plijesni na kraju uzgoja pri protoku zraka od 0,5 L/min, 8,99 g na kraju uzgoja pri protoku zraka od 1 L/min te 12,261 g na kraju uzgoja pri protoku zraka od 1,5 L/min. Tako osušena i usitnjena biomasa iskorištena za izolaciju hitina i hitozana i za određivanje masnih kiselina

Tablica 4. Udio hitina, hitozana i masnih kiselina u suhoj biomasi plijesni *M. indicus* DSM 2185 uzgojenoj na kiselinskom hidrolizatu kukuruznih oklasaka u barbotirajućem bioreaktoru

Protok zraka (L/min)	0,5	1	1,5
Hitin (g/g biomase)	0,063	0,107	0,062
Hitozan (g/g biomase)	0,023	0,101	0,034
Masne kis (mg/g biomase)	83,07	260	393,62

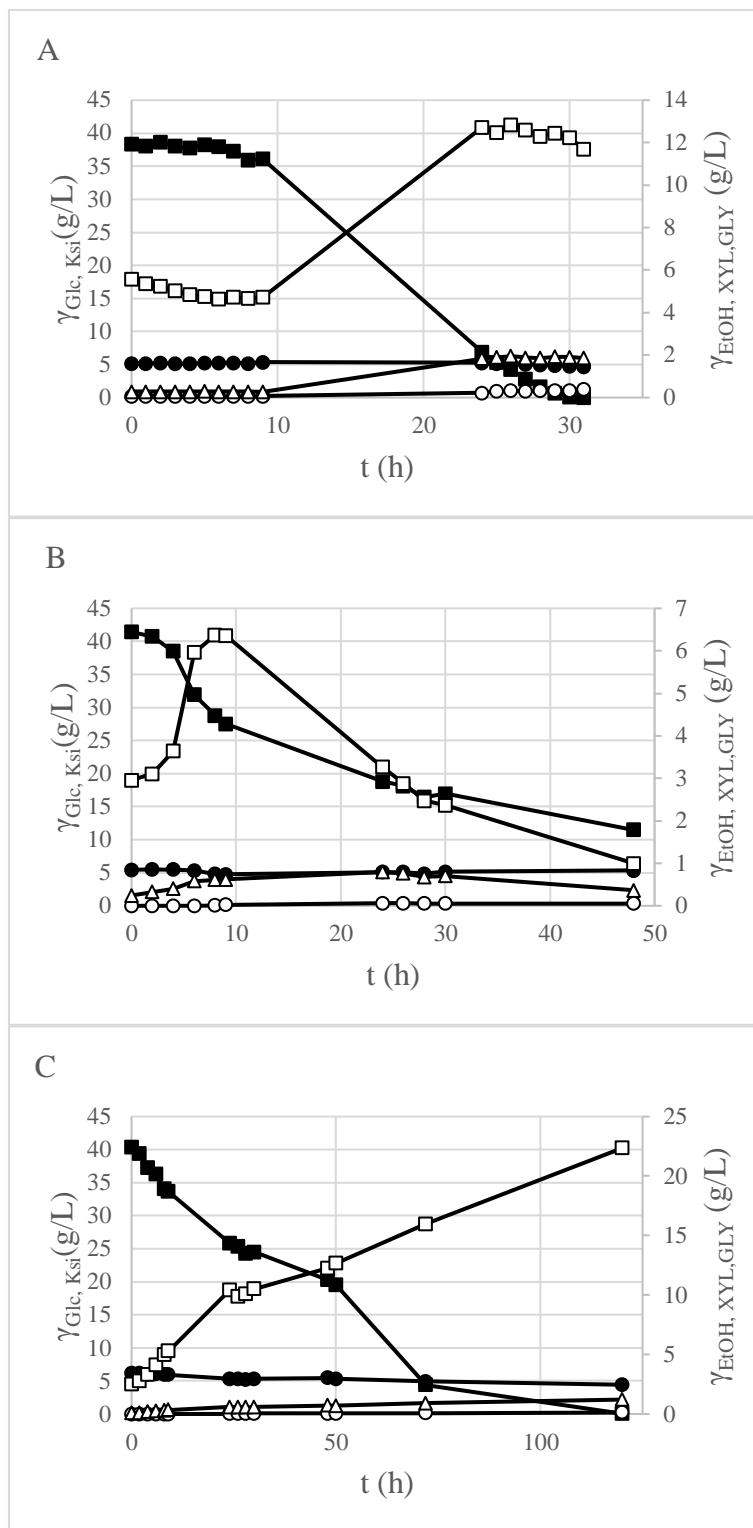
Stanična stijenka plijesni *M. indicus* bogata je hitinom i hitozanom (Satari i sur., 2015). Hitin i hitozan su zanimljivi produkti jer postoje mogućnosti primjene hitina i hitozana u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Sharifyazd i Karimi, 2017). Udio hitozana u biomasi plijesni varira u rasponu od 5 % do 10 % suhe tvari biomase (Sharifyazd i Karimi, 2017), no u ovom istraživanju koncentracija hitozana u biomasi

iznosila je i manje od 5 % biomase kod uzgoja pri protoku zraka od 0,5 L/min (2,33 %) te uzgoja pri protoku zraka od 1,5 L/min (3,46 %). Niže koncentracije hitozana moguće su zbog gubitaka u procesu izolacije. Najveći udio hitina i hitozana zabilježen je kod uzgoja pri protoku zraka od 1 L/min (10,1 %).

Osim hitina i hitozana biomasa plijesni sadrži i masne kiseline. Tijekom ovog istraživanja uzgoja plijesni *M. indicus* na kiselinskom hidrolizatu kukuruznih oklasaka dobiveni su sljedeći rezultati. Biomasa na kraju uzgoja pri protoku zraka od 0,5 L/min sadržavala je 83,0762 mg masnih kiselina po g suhe biomase, biomasa na kraju uzgoja pri protoku zraka od 1 L/min sadržavala je 260 mg/g dok je biomasa na kraju uzgoja pri protoku zraka od 1,5 L/min uzgoja sadržavala 572,6227 mg/g što je u skladu s literaturom (Satari i sur., 2015). Nakon provedene ekstrakcije i transesterifikacije lipida iz biomase provedena je analiza sastava masnih kiselina u biomasi kao što je opisano u poglavlju 3.2.7.2. U biomasi plijesni dobivenoj nakon svih uzgoja najzastupljenije masne kiseline bile su palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0), linolna (C18:2), γ -linolenska kiselina (C18:3), eikozatrenska (C20:3) te oleinska (C18:1) kiselina koja je imala najveći udio u svim uzgojima te je činila preko 30 % ukupnih masnih kiselina.

4.2. UZGOJ PLIJESNI *M. indicus* DSM 2185 NA PODLOZI DOBIVENOJ ENZIMSKOM HIDROLIZOM KISELINSKI PREDOBRAĐENIH KUKURUZNIH OKLASAKA U BARBOTIRAJUĆEM BIOREAKTORU I BIOREAKTORU S MIJEŠALOM

U ovom istraživanju provedena su tri uzgoja plijesni *M. indicus* na enzimskom hidrolizatu kiselinski predtretiranih kukuruznih oklasaka pri različitim protocima zraka s ciljem sinteze biomase i proizvodnje etanola. Uzgoji su se provodili u barbotirajućem bioreaktoru te bioreaktoru s miješalom opisanima u poglavlju 3.1.4.1. Prvi uzgoj vodio se pri protoku zraka od 0,5 L/min, drugi uzgoj pri protoku zraka od 1 L/min, a treći uzgoj provodio se u anaerobnim uvjetima te je miješanje postignuto turbinskim miješalom pri 150 o/min. Pratila se potrošnja glukoze i ksiloze te sinteza etanola, ksilitola i glicerola. Na kraju procesa određena je suha biomasa te udio hitina i hitozana i sadržaj masnih kiselina u biomasi plijesni pomoću GC-FID metode opisane u poglavlju 3.2.7.2. Rezultati su prikazani na slici 3 te u tablicama 5 i 6. Na slici 4 prikazan je mikroskopski preparat uzgoja plijesni pri anaerobnim uvjetima.



Glukoza
 Ksiloza
 Ksilitol
 Glicerol
 Etanol

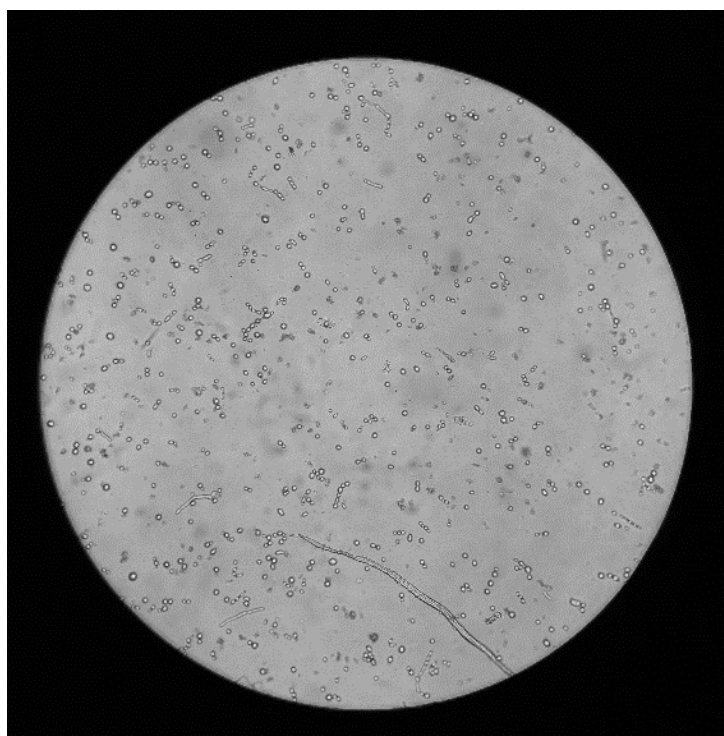
Slika 3. Promjena masene koncentracije glukoze, ksiloze, ksilitola, glicerola i etanola tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 na enzimskom hidrolizatu kukuruznih oklasaka u barbotirajućem bioreaktoru pri protocima zraka od 0,5 L/min (A), 1 L/min (B) te anaerobno uz miješanje miješalom pri 150 o/min (C)

Tablica 5. Pokazatelji uspješnosti uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 na enzimskom hidrolizatu kiselinski predobrađenih kukuruznih oklasaka u barbotirajućem bioreaktoru pri različitim uvjetima aeracije

Protok zraka (L/min)	0,5	1	Anaerobno
X (g)	10,83	9,11	4,06
$\Delta S_{\text{glukoza}}$ (g/L)	38,4	29,95	40,32
$\Delta S_{\text{ksiloza}}$ (g/L)	0,53	0,09	1,72
t_{uk} (h)	31	48	120
P_{EtOH} (g/L)	11,698	0,999	22,35
Y_{EtOH} (g/g)	0,157	0	0,49
Pr_{EtOH} (g/Lh)	0,197	0	0,165
P_{Ksilitol} (g/L)	0,39	0,055	0,124
Y_{Ksilitol} (g/g)	0,62	0,61	0,72
Pr_{Ksilitol} (g/Lh)	0,01	0,001	0,01
P_{Glicerol} (g/L)	1,86	0,37	1,21
Y_{Glicerol} (g/g)	0,04	0,004	0,027
Pr_{Glicerol} (g/Lh)	0,051	0,003	0,009

Iz rezultata dobivenih tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u barbotirajućem bioreaktoru na podlozi dobivenoj enzimskom hidrolizom kukuruznih oklasaka i pri aeraciji od 0,5 L/min koncentracija etanola je rasla do konačnih 11,698 g/L nakon 31 h uzgoja te je produktivnost proizvodnje etanola iznosila 0,197 g/Lh. Maksimalna koncentracija etanola iznosila je 12,84 g/L i postignuta je nakon 26 h uzgoja. Koncentracija ksiloze pala je krajem uzgoja za 0,53 g/L nakon što je sva glukoza u sustavu potrošena. Kod uzgoja pri protoku zraka od 1 L/min specifična brzina potrošnje glukoze iznosila je 1,57 g/Lh unutar prvih 8 sati uzgoja. Istovremeno koncentracija etanola raste do 8. sata uzgoja nakon čega se postiže maksimalna koncentracija etanola od 6,37 g/L te mu se koncentracija počne smanjivati brzinom od 0,14 g/Lh. Istovremeno se smanjila brzina potrošnje glukoze koja je do kraja uzgoja iznosila 0,41 g/Lh. Na kraju uzgoja u prevreloj podlozi je zaostalo 11,47 g/L glukoze te 0,99 g/L etanola. Kod anaerobnog uzgoja određena je koncentracije etanola od 22,35 g/L nakon 120 sati uzgoja. Prinos etanola na kraju uzgoja iznosio je 0,49 g etanola po gramu utrošenih šećera što je usporedivo s kvascem *Saccharomyces cerevisiae* (Sues i sur., 2005). Uzgoj je trajao duže ako se primjerice uspoređi s uzgojima pri aerobnim uvjetima, ponajprije zbog promjene morfologije plijesni iz filamentoznog oblika u oblik pojedinih stanica. Na slici 4 prikazan

je mikroskopski preparat plijesni u obliku pojedinačnih stanica tijekom anaerobnog uzgoja.



Slika 4. Mikroskopski preparat uzorka plijesni *M. indicus* DSM 2158 u obliku pojedinačnih stanica tijekom anaerobnog uzgoja

Usporedbom slike 2 i slike 4 jasno se vidi dimorfizam plijesni *M. indicus*. Završetkom uzgoja biomasa je centrifugiranjem odvojena i iskorištena za izolaciju hitina te hitozina te za određivanje sadržaja masnih kiselina. Iskorištena prevrela podloga se koristila za daljnji uzgoj nesumpornih ljubičastih bakterija. Usporedbom rezultata dobivenih na kraju uzgoja zamjećuje se da se u aeriranim uzgojima postigla veća količina biomase, 10,83 g pri protoku zraka od 0,5 L/min i 9,11 g pri protoku zraka od 1 L/min te manja količina etanola 11,698 g/L pri protoku zraka od 0,5 L/min i 0,99 g/L pri protoku zraka od 1 L/min naspram uzgoja provedenog u anaerobnim uvjetima gdje se postigla koncentracija etanola od 22,35 g/L i konačna biomasa od 4,06 g. Manja količina biomase nakon uzgoja pri protoku zraka od 1 L/min naspram uzgoja pri protoku zraka od 0,5 L/min može se pripisati manjoj potrošnji supstrata. Dok je plijesan pri protoku od 0,5 L/min potrošila 38,4 g/L glukoze i 0,53 g/L ksiloze, plijesan pri protoku od 1 L/min potrošila je 29,95 g/L glukoze i 0,09 g/L ksiloze.

Tablica 6. Udio hitina, hitozana i masnih kiselina u suhoj biomasi plijesni *M. indicus* DSM 2185 uzgojenoj na enzimskom hidrolizatu kiselinski predobrađenih kukuruznih oklasaka u barbotirajućem bioreaktoru

Protok zraka (L/min)	0,5	1	Anaerobno
Hitin (g/g biomase)	0,132	0,165	0,101
Hitozan (g/g biomase)	0,029	0,022	0,096
Masne kiseline (mg/g biomase)	136,1	398,924	70,75

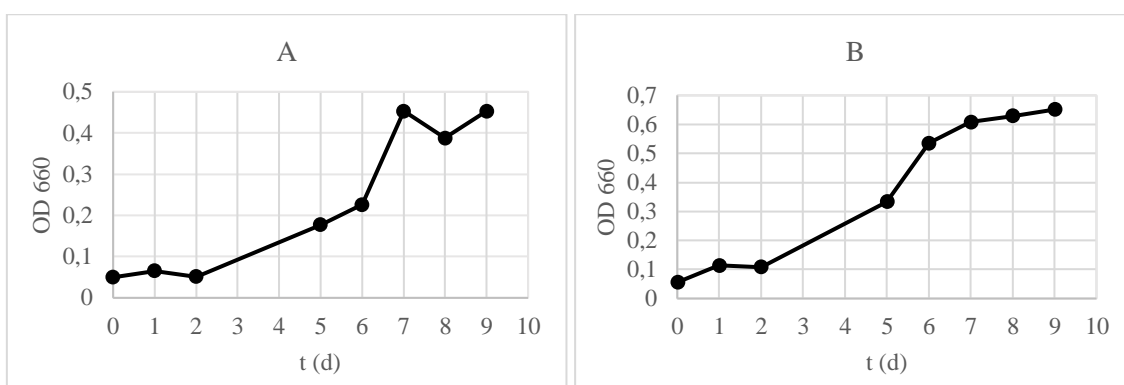
Najveći udio hitina zabilježen je kod uzgoja pri protoku zraka od 1 L/min, a hitozana kod anaerobnog uzgoja. Usporedbom omjera hitina i hitozana vidi se da u anaerobnim uvjetima kada plijesan raste u obliku pojedinačnih stanica dolazi do veće sinteze hitozana naspram aerobnih uvjeta što je u skladu s istraživanjem prema Sharifyazd i Karimi (2017). Osim hitina i hitozana biomasa plijesni sadrži i masne kiseline. Tijekom ovog istraživanja uzgoja plijesni *M. indicus* na enzimskom hidrolizatu kiselinski predobrađenih kukuruznih oklasaka dobiveni su sljedeći rezultati. Biomasa koja je rasla pri protoku zraka od 0,5 L/min sadržavala je 136,1 mg masnih kiselina po g suhe biomase, a biomasa uzgajana pri 1 L/min sadržavala je 398,9209 mg/g. Biomasa koja je uzgojena pri anaerobnim uvjetima sadržavala je 70,7599 mg/g. Nakon provedene ekstrakcije i transesterifikacije lipida iz biomase provedena je analiza sastava masnih kiselina u biomasi kao što je opisano u poglavlju 3.2.7.2. Masne kiseline koje su se u najvećoj mjeri nalaze u sastavu plijesni *M. indicus* DSM 2185 nakon uzgoja na enzimskom hidrolizatu bile su: palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0), linolna (C18:2), γ -linolenska kiselina (C18:3), eikozatrenska (C20:3) te oleinska (C18:1) kiselina koja je imala najveći udio u svim uzgojima te je činila preko 30 % ukupnih masnih kiselina.

4.3. UZGOJ NESUMPORNIH FOTOTROFNIH LJUBIČASTIH BAKTERIJA *R. capsulatus* JCM 21090 I *R. adriaticum* DSM 2178 U ISKORIŠTENOJ PODLOZI NAKON UZGOJA *M. indicus* DSM 2185

Nakon uzgoja određenih mikroorganizama i izolacije metabolita, zaostaje prevrela podloga koja se često baca. Iskorištavanje takvih otpadnih podloga ključni je dio biorafinerijskog principa gdje otpad jedne industrije može biti vrijedna sirovina za neku drugu. Da bi smanjili ekološki utjecaj i otisak bioprocesa, teži se što većem

iskorištavanju svih nusproizvoda iz primjerice kultivacija. Prevreća podloga nakon izolacije biomase plijesni predstavlja dobar supstrat za uzgoj fototrofnih mikroorganizama, koji imaju smanjen zahtjev za nutrijentima, nisu podložni velikom utjecaju raznih inhibitora te mogu rasti uz adekvatan izvor svjetla. Takvi fototrofni mikroorganizmi, poput nesumpornih ljubičastih bakterija jako su zanimljivi u istraživanju posebice u razvoju biorafinerija. Ljubičaste nesumporne bakterije osim vrlo vrijedne biomase proizvode i pigmente koji su visokovrijedni proizvodi (Novak i sur., 2020; Novak i sur., 2017).

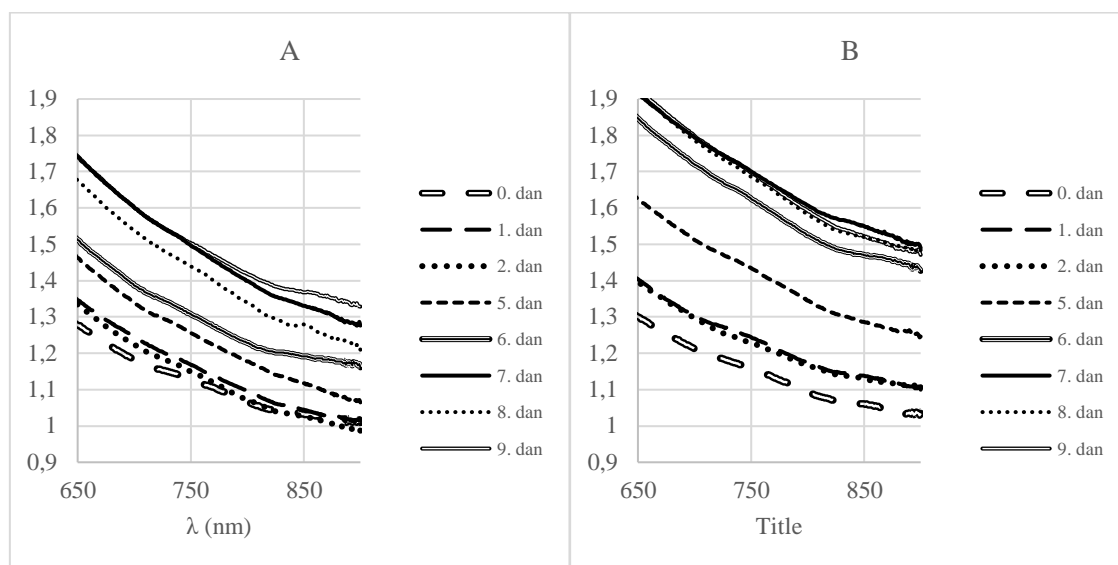
Nakon provedenih uzgoja plijesni *M. indicus* zaostala podloga iskorištena je za uzgoj nesumpornih bakterija *R. capsulatus* i *R. adriaticum* kao što je opisano u poglavlju 3.2.6. Nakon sterilizacije podloge provela se UPLC analiza iste. Dobiveni sastav glasio je: 5,94 g/L glukoze, 11,34 g/L ksiloze, 1,12 g/L ksilitola, 1,15 g/L glicerola i 4,74 g/L etanola. Na slici 5 prikazan je rast bakterija praćen mjerenjem optičke gustoće pri 660 nm. Na slikama 5- 7. prikazani su rezultati uzgoja.



Slika 5. Optička gustoća podloge tokom rasta nesumpornih ljubičastih bakterija *R. capsulatus* (A) i *R. adriaticum* (B) na smjesi prevrelih podloga nakon uzgoja plijesni *M. indicus*

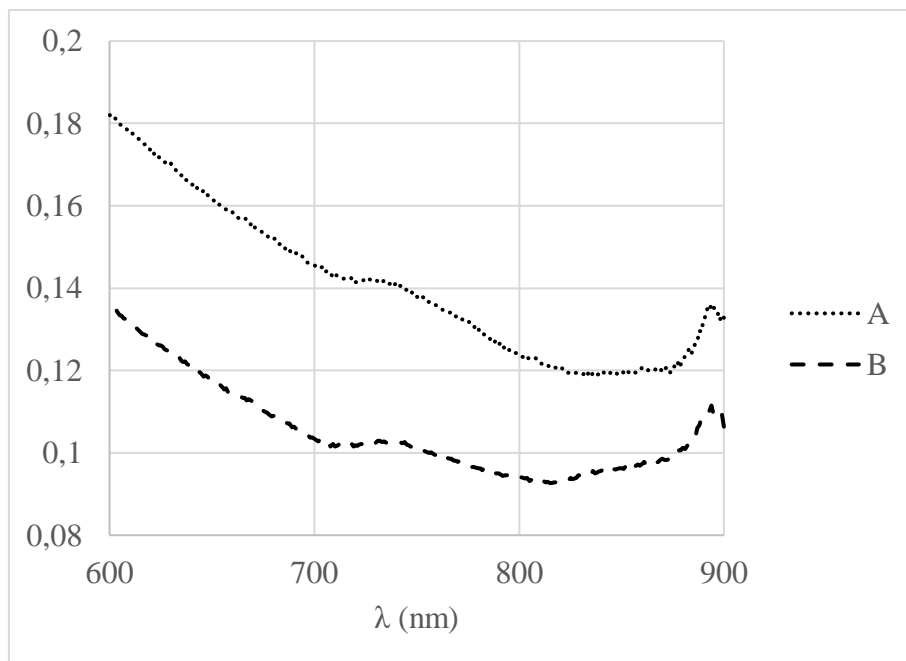
Preostali ugljikohidrati u prevreloj podlozi nakon izolacije biomase plijesni predstavljaju vrijedan izvor ugljika koji se i dalje može iskoristiti. Stoga su oba bakterijska soja uzgajana u zasebnim Erlenmeyerovim tikvicama bez miješanja u mikroaerofilnim uvjetima pod ljubičastim LED svjetlom kroz 9 dana. Bakterija *R. adriaticum* potrošila je 4,24 g/L glukoze od početnih 5,94 g/L dok je bakterija *R. capsulatus* potrošila 2,06 g/L glukoze. *R. capsulatus* potrošila je 0,35 g/L ksiloze, 0,12 g/L ksilitola, 0,34 g/L glicerola te etanol nije trošila. *R. adriaticum* potrošila je 0,19 g/L ksiloze, 0,05 g/L ksilitola, 0,03 g/L glicerola te 0,13 g/L etanola. Centrifugiranjem cjelokupnog volumena podloge (350 mL) nakon uzgoja i sušenjem biomase pri 50 °C dobivena je konačna suha biomasa. *R.*

adriaticum narasla je do konačnih 0,1874 g, a *R. capsulatus* je narasla do konačnih 0,181 g. Nadalje, provedeno je spektrofotometrijsko skeniranje uzoraka kao što je opisano u poglavlju 3.2.7.4. u području valnih duljina od 350 do 900 nm u svrhu dobivanja apsorpcijskih spektara biomase s karakterističnim pikovima. Apсорpcijski spektri biomase bakterije *R. adriaticum* i *R. capsulatus* tijekom uzgoja nisu pokazali očekivani apсорpcijski maksimum pri valnim duljinama od 800 – 850 nm već od 700-750 nm kao što se može vidjeti na slici 6.



Slika 6. Apсорpcijski spektri tijekom uzgoja bakterija *R. capsulatus* (A) i *R. adriaticum* (B) na prevreloj podlozi nakon uzgoja plijesni *M. indicus* bez miješanja uz ljubičasto LED svijetlo

Osim spektrofotometrijskog određivanja biomase napravljena je ekstrakcija ukupnih pigmenta kao što je opisano u poglavlju 3.2.7.3. te je nakon ekstrakcije provedeno spektrofotometrijsko određivanje apсорpcijskih maksimuma u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm te se iz apсорbancija pri valnim duljinama od 648, 665, 775 i 850 nm pomoću jednadžbe [3] može izračunati udio pigmenta u ljubičastim nesumpornim bakterijama. Ljubičaste nesumporne bakterije *R. adriaticum* i *R. capsulatus* sintetiziraju pigmente koji imaju karakteristični apсорpcijski maksimum u području valnih duljina od 800 do 910 nm. Koncentracija bakterioklorofila a ekstrahirane iz bakterije *R. adriaticum* iznosila je 0,04 mg/L podloge kojoj su bakterije rasle te 0,15 mg/L kod bakterije *R. capsulatus*. Apсорpcijski spektri pigmenta prikazani su na slici 7.



Slika 7. Apsorpcijski spektri ekstrahiranih pigmenata bakterija *R. capsulatus* (A) i *R. adriaticum* (B) na prevreloj podlozi nakon uzgoja plijesni *M. indicus* bez miješanja uz ljubičasto LED svjetlo

Uz ekstrakciju pigmenata, bakterijska biomasa sadrži masne kiseline. Uzorci suhih biomasa oba sojeva podvrgnuti su ekstrakciji masnih kiselina kao što je opisano u poglavlju 3.2.7.2. Sastav masnih kiselina nakon uzgoja bakterije *R. adriaticum* DSM 2178 na prevreloj podlozi nakon uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 glasio je: kaprilna kiselina C8:0, undeciklička kiselina C11:0, miristinska kiselina C14:0, palmitinska kiselina C16:0, palmitoleinska C16:1-cis-9, margarinska kiselina C17:0, heptadecenska C17:1-cis-10, stearinska kiselina C18:0, oleinska C18:1-cis-9, linolelaidinska C18:2-trans-9,12, linolna C18:2-cis-9,12, γ -linoleinska C18:3-cis-6,9,12, cervonska C22:6-cis-4,7,10,13,16,19, arahidna C20:0, lignocerinska C24:0 te trikozilna kiselina C23:0. Najveći udio imale su palmitinska C16:0 i oleinska kiselina C18:1-cis-9. Sastav masnih kiselina nakon uzgoja bakterije *R. capsulatus* JCM 21090 na prevreloj podlozi nakon uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 glasio je: kaprilna kiselina C8:0, undeciklička kiselina C11:0, miristinska kiselina C14:0, palmitinska kiselina C16:0, palmitoleinska C16:1-cis-9, margarinska kiselina C17:0, heptadecenska C17:1-cis-10, stearinska kiselina C18:0, oleinska C18:1-cis-9, linolelaidinska C18:2-trans-9,12, linolna C18:2-cis-9,12, γ -linoleinska C18:3-cis-6,9,12, cervonska C22:6-cis-4,7,10,13,16,19, arahidna C20:0 te lignocerinska kiselina C24:0. Najveći udio imale su palmitinska C16:0 i oleinska kiselina C18:1-cis-9.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Plijesan *Mucor indicus* uzgajana na kiselinskom hidrolizatu kukuruznih oklasaka pri protoku zraka od 0,5 L/min sintetizira manje biomase (5 g), ima manji udio masnih kiselina u istoj (8,3 %) te akumulira veće količine etanola (5,07 g/L) i ksilitola (2,99 g/L) u podlozi u usporedbi pri protoku od 1,5 L/min gdje je sintetizirano 12,26 g biomase, udio masnih kiselina je iznosio 39,3 % te nije došlo do akumulacije etanola u podlozi te je postignuta koncentracija od 0,39 g/L ksilitola na kraju uzgoja.
2. Plijesan *M. indicus* uzgajana na enzimskom hidrolizatu predobrađenih kukuruznih oklasaka pri istim protocima zraka ima veći udio masnih kiselina u biomasi (13,6 % pri 0,5 L/min i 39,8 % pri 1 L/min) naspram biomase uzgojene na kiselinskom hidrolizatu (8,3 % pri 0,5 L/min i 26 % pri 1 L/min).
3. U anaerobnim uvjetima na enzimskom hidrolizatu kukuruznih oklasaka kada *M. indicus* raste u obliku pojedinačnih stanica plijesan proizvodi najmanje količine biomase (4,06 g) s najmanjim udjelom masnih kiselina (7,07 %) te sintetizira najveća količina etanola (22,35 g/L) uz prinos od 0,49 g etanola po g utrošenih šećera.
4. Prinos etanola pri aerobnim uvjetima uz protok zraka od 0,5 L/min veći je kod uzgoja plijesni na kiselinskom hidrolizatu gdje je primarni izvor ugljika ksiloza (0,19 g/g) naspram uzgoja na enzimskom hidrolizatu pri istim uvjetima gdje je primarni izvor ugljika glukoza (0,157 g/g).
5. Omjer hitina i hitozana u biomasi plijesni veći je u aerobnim uvjetima na enzimskom hidrolizatu i raste s protokom zraka (4,55 g hitina po g hitozana pri 0,5 L/min i 7,5 g/g pri 1 L/min) naspram biomase uzgajane na kiselinskom hidrolizatu gdje udio hitozana raste s protokom zraka (2,74 g hitina po g hitozana pri 0,5 L/min i 1,06 g/g pri 1 L/min) dok je najmanje hitina naspram hitozana imala biomasa nakon anaerobnog uzgoja (1,05 g hitina po g hitozana).
6. *R. adriaticum* potrošila je više glukoze od *R. capsulatus* (4,24 g/L naspram 2,06 g/L), sintetizirala više biomase (0,1874 g naspram 0,181 g) no proizvela manje bakterioklorofila a (0,04 mg/L naspram 0,15 mg/L).

6. LITERATURA

Abedinifar S, Karimi K, Khanahmadi M, Taherzadeh MJ (2009) Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. *Biomass Bioenerg* **33**, 828-833.

Alriols MG, García A, Llano-ponte R, Labidi J (2010) Combined organosolv and ultrafiltration lignocellulosic biorefinery process. *Chem Eng J* **157**, 113–120.

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.

Baker LG, Specht CA, Donlin MJ, Lodge JK (2007) Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **6**; 855-867.

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

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.

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.

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 LX, Peng XW, Wang K, Chen ZF, Sun RC (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. *Biofuels Bioprod Biorefin* **3**, 534–546.

D'Alessandro EB, Antoniosi Filho NR (2016) Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renew Sust Energ Rev* **58**, 832–841.

Dasgupta D, Bandhu S, Adhikari DK, Ghosh D (2017) Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: a review. *Microbiol Res* **197**, 9-21.

de Albuquerque TL, da Silva Jr IJ, de Macedo GR, Ponte Rocha MV (2014) Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. *Process Biochemistry*

- Frigaard NU (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.
- Gaffey J, McMahon H, Marsh E, Vehmas K, Kymäläinen T, Vos J, (2021) Understanding consumer perspectives of bio-based products—a comparative case study from Ireland and The Netherlands. *Sustainability* **13**, 6062.
- Goswami GK, Rawat S (2015) Microbial Xylanase and their applications - A review. *Int J Curr Res Acad Rev* **3**, 436-450. doi: 10.5455/2319-2003.ijbcp20130602.
- Hansen TA, Van Gernerden H (1972) Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria *Arch Mikrobiol* **86**: str. 49-56.
- Hendriks ATWM, 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**, 118.
- IEA Bioenergy (2020) IEA Bioenergy Annual Report 2020, International Energy Agency, Pariz. <https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2021/04/IEAB-Annual-Report-2020.pdf>. Pristupljeno 19. rujna 2022.
- Imhoff JF, Trüper HG (1989) The purple non sulfur bacteria *Manual of Systematic Bacteriology*, **3**: str. 1658-1661.
- IPCC (2022) *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability*. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.)]. Cambridge University Press. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, 3056 pp., doi:10.1017/9781009325844.
- Johansson I, Svensson M (2001) Surfactants based on fatty acids and other natural hydrophobes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci* **6**, 178-188.
- Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors.
- Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh MJ (2006) Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. *Process Biochem* **41**, 653–658.
- 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**, 383-388. doi: 10.1016/j.bej.2007.10.009.
- 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, (Blakeship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E., ured.) Springer, Dordrecht, str. 1269 – 1282.
- Kucharska K, Rybarczyk P, Hołowacz I, Łukajtis R, Glinka M, Kamiński M (2018) Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. *Molecules*. **23**, 2937. doi: 10.3390/molecules23112937.
- Lenardon M, Munro CA, Gow NAR (2010) Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **13**; 416-423.
- Limayem A, Ricke SC (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog Energ Combust* **38**, 449-469. doi:10.1016/j.pecs.2012.03.002.
- Liu S, Daigger GT, 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**, 122-172.
- Liu Y, Liu R, Shi J, Zhang R, Tang H, Xie C, Wang F, Han J, Jiang L (2023) Chitosan/esterified chitin nanofibers nanocomposite films incorporated with rose essential oil: Structure, physicochemical characterization, antioxidant and antibacterial properties. *Food Chemistry: X*, **18**
- 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**, 4968 – 4973. doi: 10.1016/j.biortech.2011.01.027
- 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.
- Madigan MT, Gest H (1979) Growth of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* chemoautotrophically in darkness with H₂ as the energy source. *Journal of bacteriology*, **137**: 524-530.
- Madigan MT, Jung DO (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 EI, Dai X, He C, Zhou J (2009) Potentials of Phototrophic Bacteria in Treating Pharmaceutical Wastewater. *Int J Environ Sci Tech* **7**, 165 - 174. doi: 10.1007/bf03326128
- Majeti NV, Kumar R (2000) A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* **46**, 1-27.
- Mardetko N, Novak M, Trontel A, Grubišić M, Galić M, Šantek B (2018) Bioethanol Production from Dilute-acid Pre-treated Wheat Straw Liquor Hydrolysate by Genetically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem Biochem Eng Q* **32**, 483–499. doi: 10.15255/CABEQ.2018.1409.

- Marić V (200) *Biotehnologija i sirovine*, 1. izd., Stručna i poslovna knjiga d.o.o., Zagreb.
- Martínez EC, e Silva JBA, Giulietti M, Nápoles Solenzal A I (2007) Downstream proces for xylitol produced from fermented hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 1193-1198.
- McEwan AG (1994) Photosynthetic electron transport and anaerobic metabolism in purple non- sulphur phototrophic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. **66**, 151-164.
- Meinita MDN, 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.
- Merzendorfer H, Zimoch L (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol* **206**, 4393-412.
- Millati R, Karimi K, Edebo L, Niklasson C, Taherzadeh MJ (2008) Ethanol production from xylose and wood hydrolyzate by *Mucor indicus* at different aeration rates. *BioRes* **3**, 1020–1029.
- Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biores Technol* **96**, 673-686.
- Msomi NZ, Erukainure OL, Salau VF, Olofinisan KA, Islam MdS (2023) Comparative effects of xylitol and erythritol on modulating blood glucose; inducing insulin secretion; reducing dyslipidemia and redox imbalance in a type 2 diabetes rat model, *Food Science and Human Wellness* **12**, 2052-20601.
- Novak M, Harutyunyan B, Goginyan V, Horvat P, Šantek B (2017) Characteristics and selection of cultures of photosynthetic purple non-sulphur bacteria as a potential 5-aminolevulinic acid producers. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **12**, 113-119.
- Novak M, Trontel A, Marđetko N, Matoković V, Sarić M, Pavlečić M, Šantek B (2020) Ftoheterotrofni uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* na hranjivim podlogama s različitim izvorima ugljika. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **15**, 115-123.
- Ormerod JG (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.
- Ospina Alvarez SP, Ramirez Cadavid DA, Escobar Sierra DM, Ossa Orozco CP, Rojas Vahos DF, Zapata Ocampo P (2014) Comparison of extraction methods of chitin from *Ganoderma lucidum* mushroom obtained in submerged culture. *BioMed Res Int* 2014; 169071.
- Pabbathi NPP, Velidandi A, Pogula S, Gandam PK, Baadhe RR, Sharma M, Sirohi R, Thakur VK, Gupta VK (2022) Brewer's spent grains-based biorefineries: a critical review. *Fuel* **317**, 123435.

- Parajó JC, Domínguez H, Domínguez JM (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.
- Pinaki D, Lhakpa W, Joginder S (2015) Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF), An Efficient Process for Bio-Ethanol Production: An overview. *Biosci Biotech Res Asia* **12**, 87-100. doi: 10.13005/bbra/1639.
- Pochanavanich P, Suntornsuk W (2002) Fungal chitosan production and its characterization. *Lett Appl Microbiol* **35**, 17-21.
- Qureshi N, Hodge D, Vertès A (2014) Biorefineries. Integrated Biochemical Processes for Liquid Biofuels., 1. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 59.
- Rafiqul IS, Mimi Sakinah AM, (2013) Processes for the Production of Xylitol- A review. *Food Reviews International*, **29**, 127-156.
- Rass-Hansen J, Falsig H, Jorgensen B, Christensen CH (2007) Perspective Bioethanol: fuel or feedstock. *J Chem Technol Biotechnol* **82**, 329-333.
- Ritchie RJ (2018) Measurement of Chlorophylls *a* and *b* and Bacteriochlorophyll *a* in Organisms From Hypereutrophic Auxinic Waters. *J Appl Phycol* **30**, 3075–3087.
- Sakarika M, Spanoghe J, Sui Y, Wambacq E, Grunert O, Haesaert G, Spiller M, Vlaeminck SE (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 (2015) Oil, chitosan, and ethanol production by dimorphic fungus *Mucor indicus* from different lignocelluloses. *J Chem Technol Biotechnol* **91**, 1835-1843.
- Sharifia M (2007) Production of ethanol by different morphology of *Mucor indicus*, MSc Thesis, Department of Chemical Engineering. Isfahan University of Technology, Iran.
- Sharifia M, Karimi K, Taherzadeh MJ (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.
- Sharifyazd S, Karimi K (2017) Effects of fermentation conditions on valuable products of ethanolic fungus *Mucor indicus*. *Electron J Biotechnol* **30**, 77–82.
- Sigoillot JC, Berrin JG, Bey M, Lesage-Meessen L, Levasseur A, Lomascolo A, Record E, Uzan-Boukhris E (2012) Fungal Strategies for Lignin Degradation. U Advances in Botanical Research, (Lapierre, C., Jouanin, L. ured), Elsevier, Amsterdam, 263-308.

- Silva SS, Felipe MGA, Mancilha IM (1998) Factors that Affect the Biosynthesis of Xylitol by Xylose-Fermenting Yeasts. A Review. *Appl Biochem Biotechnol* **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 KL (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 MJ (2005). Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS Yeast Res* **5**, 669–676.
- 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
- Sun Y, Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* **83**, 1-11.
- 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.
- Usmani Z, Sharma M, Gaffey J, Sharma M, Dewhurst RJ, Moreau B, Newbold J, Clark W, Thakur VK, Gupta VK (2022) Valorization of dairy waste and by-products through microbial bioprocesses. *Bioresour Technol* **346**, 126444.
- Van Wychen S, Laurens LML (2013) Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by in situ transesterification. Laboratory Analytical Procedure. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, SAD.
- Vertès AA, Quresji N, Hodge DB (2017). Processes for Liquid Biofuels Biorefineries Integrated Biochemical Processes for Liquid Biofuels. U: Biorefineries (Qureshi, N., Hodge, D. B., Vertes, A. A. ured.). Elsevier, Amsterdam, Nizozemska.
- 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.
- Yang TL (2011) Chitin-based materials in tissue engineering: applications in soft tissue and epithelial organ. *Int J Mol Sci* **12**, 1936-63.

Zagrag V, Asghari M, Dashti A (2015) A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *Chem Bio Eng Rev* **2**, 204-226.

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

7. PRILOZI

Prilog 1. Standardi korišteni za UPLC analizu

Tvar	RT (min)	Jednadžba kalibracijskog pravca	R ²
glukoza	4,766	$y = 143593x - 2189,5$	0,9998
ksiloza	5,134	$y = 126445x - 484,34$	0,9998
ksilitol	6,298	$y = 135564x + 211,35$	0,9995
glicerol	6,993	$y = 105559x - 297,02$	1,0000
etanol	11,143	$y = 53836x - 15864$	0,9969

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ivan Kovač

Vlastoručni potpis