

Proizvodnja biokemikalija s pomoću različitih vrsta plijesni

Bingula, Paulina Sara

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:159:733408>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2023.

Paulina Sara Bingula

**PROIZVODNJA BIOKEMIKALIJA
S POMOĆU RAZLIČITIH VRSTA
PLIJESNI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Antonije Trontel, te uz pomoć dr. sc. Nenada Marđetka, viši asistent, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Antoniji Trontel i dr. sc. Nenadu Marđetku na pomoći i svim stručnim savjetima pri izradi diplomskog rada te vremenu i strpljenju za sva moja pitanja i nedoumice. Također se želim zahvaliti izv. prof. dr. sc. Mariu Novaku i Igoru Livadi na susretljivosti i pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, sestri i ostaloj obitelji na podršci, strpljenju i pomoći tijekom mog studentskog puta.

Veliko hvala i svim mojim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene, bodrili me i nasmijavali na svakom koraku studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,
industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

PROIZVODNJA BIOKEMIKALIJA S POMOĆU RAZLIČITIH VRSTA PLIJESNI

Paulina Sara Bingula, univ. bacc. ing. biotechn. 0053211481

Sažetak:

Biotehnološka proizvodnja biokemikalija i goriva iz obnovljivih supstrata i sirovina s pomoću plijesni predstavljaju zanimljivu alternativu kemijskim procesima proizvodnje biokemikalija i goriva. U ovom radu je istražena mogućnost rasta plijesni *T. terrestris* CBS 45675, *B. dothidea* JCM 2738, *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 na podlogama s različitim izvorima ugljika (glukoza, fruktoza, saharoza (melasa), ksiloza, celobioza i arabinoza) i izvorima dušika (kvasčev i mesni ekstrakt, pepton i kukuruzna močevina) za proizvodnju različitih biokemikalija. Nakon preliminarnih eksperimenata kao radni mikroorganizam odabran je *F. oxysporum* JCM 9293. Ova plijesan u testiranim podlogama proizvela je etanol, octenu kiselinu, manitol, eritrol i ksilitol pri različitim brojevima okretaja (50, 100 i 200 o/min). Uzgojem u bioreaktoru plijesan *F. oxysporum* JCM 9293 proizvela je ksilitol (0,8 g/L), glicerol (1,01 g/L) i etanol (0,28 g/L). Ujedno je proizvedeno 5,12 g/L biomase, a udio masnih kiselina u biomasi plijesni iznosio je 9,51 %.

Ključne riječi: plijesan, *Fusarium oxysporum*, različiti izvori ugljika, biokemikalije, bioreaktor s miješalom

Rad sadrži: 65 stranica, 13 slika, 11 tablica, 65 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Antonija Trontel

Pomoć pri izradi: dr. sc. Nenad Marđetko, znanstveni suradnik

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Mario Novak (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Antonija Trontel (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjenski član)

Datum obrane: 21. prosinca 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemistry engineering
Laboratory for Biochemistry engineering,
industrial microbiology and beer and malt technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

BIOCHEMICALS PRODUCTION BY DIFFERENT FUNGAL SPECIES

Paulina Sara Bingula, univ. bacc. ing. biotechn. 0053211481

Abstract: Biotechnological production of biochemicals and fuels from renewable substrates and raw materials by molds represents an attractive alternative to chemical processes for the production of biochemicals and fuels. This paper explores the possibility of growing molds *T. terrestris* CBS 45675, *B. dothidea* JCM 2738, *F. oxysporum* JCM 9293, and *F. verticillioides* JCM 23107 in media with different carbon sources (glucose, fructose, sucrose (molasses), xylose, cellobiose, and arabinose) and nitrogen sources (yeast and meat extract, peptone, and corn steep liquor) for the production of various biochemicals. After preliminary experiments, *F. oxysporum* JCM 9293 was selected as the working microorganism. This mold produced ethanol, acetic acid, mannitol, erythritol, and xylitol in the tested media at different rotation rates (50, 100, and 200 rpm). By cultivation in a bioreactor, the mold *F. oxysporum* JCM 9293 produced xylitol (0.8 g/L), glycerol (1.01 g/L) and ethanol (0.28 g/L). In addition, 5.12 g/L of biomass was produced, and the fatty acid content of the mold biomass was 9.51 %.

Keywords: mold, *Fusarium oxysporum*, different carbon sources, biochemicals, stirred tank bioreactor

Thesis contains: 65 pages, 13 figures, 11 tables, 65 references

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: Antonija Trontel, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Nenad Marđetko; PhD, *Research Associate*

Reviewers:

1. Mario Novak, PhD, Associate professor (president)
2. Antonija Trontel, PhD, Associate professor (mentor)
3. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (member)
4. Blaženka Kos, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: december 21st, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. BIORAFINERIJA	2
2.1.1. Sirovine.....	3
2.1.1.1. Lignoceluloza.....	3
2.2. FUNGI.....	5
2.2.1. PLIJESAN <i>Botryosphaeria dothidea</i>	6
2.2.2. PLIJESAN <i>Fusarium oxysporum</i>	7
2.2.3. PLIJESAN <i>Fusarium verticillioides</i>	8
2.2.4. PLIJESAN <i>Thielavia terrestris</i>	8
2.3. BIOTEHNOLOŠKI PROCESI PROIZVODNJE BIOKEMIKALIJA S POMOĆU PLIJESNI.....	9
2.3.1. Produkti primarnog i sekundarnog metabolizma	9
2.3.2. Etanol	10
2.3.3. Pigmenti	10
2.3.4. Organske kiseline	11
2.3.5. Šećerni alkoholi	12
2.3.6. Masne kiseline	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. Kemikalije.....	15
3.1.2. Radni mikroorganizmi	16
3.1.3. Hranjive podloge za održavanje mikroorganizama i pripremu inokuluma.....	16
3.1.4. Hranjive podloge za preliminarni uzgoj plijesni.....	17
3.1.5. Hranjive podloge za uzgoj plijesni <i>Fusarium oxysporum</i> JCM 9293 u tikvicama i u bioreктору	18
3.2. UREĐAJI I OPREMA.....	20
3.2.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC).....	20
3.2.2. Uređaj za plinsku kromatografiju (GC)	20
3.2.4. Centrifuge	20
3.2.5. Bioreaktor s miješalom	20
3.2.6. Ostali uređaji.....	21
3.3. METODE.....	22

3.3.1. Uzgoj čiste kulture plijesni	22
3.3.2. Uzgoj inokuluma plijesni za preliminarnu uzgoje	22
3.3.3. Preliminarni uzgoj plijesni	22
3.3.4. Uzgoj inokuluma plijesni <i>Fusarium oxysporum</i> JCM 9293	23
3.3.5. Uzgoj plijesni <i>Fusarium oxysporum</i> JCM 9293	23
3.3.6. Uzgoj plijesni <i>Fusarium oxysporum</i> JCM 9293 u većem mjerilu	23
3.3.7. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti (UPLC).....	23
3.3.8. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase plijesni na kraju uzgoja	24
3.3.9. Određivanje koncentracije i sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom s plameno-ionizacijskom detekcijom	24
3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI UZGOJA	27
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	28
4.1. ODREĐIVANJE UTJECAJA RAZLIČITIH IZVORA UGLJIKA I DUŠIKA NA, PROIZVODNJU BIOKEMIKALIJA S POMOĆU PLIJESNI <i>T. terrestris</i> CBS 45675, <i>B.</i> <i>dothidea</i> JCM 2738, <i>F. oxysporum</i> JCM 9293 i <i>F. verticillioides</i> JCM 23107	29
4.2. UZGOJ PLIJESNI <i>F. oxysporum</i> JCM 9293 NA TRESILICI PRI RAZLIČITIM BROJEVIMA OKRETAJA	38
4.3. UZGOJ PLIJESNI <i>F. oxysporum</i> JCM 9293 U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM	52
4.4. ANALIZA SASTAVA MASNIH KISELINA U BIOMASI PLIJESNI <i>F. oxysporum</i> JCM 9293	56
5. ZAKLJUČCI	59
6. LITERATURA.....	60

1. UVOD

Svjetska ovisnost o fosilnim gorivima proizlazi iz intenzivnog korištenja i potrošnje naftnih derivata, koji su ograničen resurs i pridonose emisiji stakleničkih plinova. S obzirom na potrebu smanjenja ovisnosti o nafti i ublažavanja utjecaja na klimatske promjene, potrebno je istražiti alternativne proizvodne lance. Uz sunčevu energiju, energiju vode te energiju vjetra, biljna biomasa predstavlja još jedan zanimljiv potencijalan izvor energije. Zamjena nafte biljnom biomasom kao sirovinom za proizvodnju biogoriva i biokemikalija je pokretačka snaga za razvoj koncepta biorafinerija. Koncept analogan današnjim rafinerijama nafte, gdje se proizvode različita goriva i kemikalije, je biorafinerija. Biorafinerija je postrojenje ili mreža postrojenja koje integrira procese pretvorbe biomase i opremu za proizvodnju transportnih biogoriva, energije i kemikalija iz biomase. Biomasa, koja može potjecati iz poljoprivrednog, šumarskog, industrijskog ili akvakulturnog sektora, igra ključnu ulogu kao obnovljivi resurs u ovom sve važnijem kontekstu (Cherubini, 2010).

Melasa je jedan od nusproizvoda koji nastaje u industriji prerade šećerne trske i šećerne repe ponavljanom kristalizacijom tijekom proizvodnje šećera. Zbog svog sastava i niske cijene, predstavlja dobar izvor ugljikohidrata za industriju hrane, stočne hrane i fermentaciju. Fermentacijom melase proizvodi se etilni alkohol, liker, suhi kvasac, aceton, butanol, neke organske kiseline i različiti drugi proizvodi (Jamir i sur., 2021).

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj različitih izvora ugljika (glukoza, fruktoza, melasa (saharoza), ksiloza, celobioza i arabinoza) i različitih izvora dušika (kvašćev ekstrakt, mesni ekstrakt, pepton i kukuruzna močevina (dalje u tekstu CSL)) na rast i proizvodnju različitih biokemikalija s pomoću plijesni *Thielavia terrestris* CBS 45675, *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, *Fusarium oxysporum* JCM 9293 i *Fusarium verticillioides* JCM 23107. Zatim je provedena optimizacija procesa proizvodnje biokemikalija uzgojem odabrane plijesni na tresilici pri različitim brojevima okretaja (50, 100 i 200 o/min), te različitim izvorima ugljika i dušika. Prema parametrima odabranim u ovim eksperimentima proveden je uzgoj u većem mjerilu (bioreaktor s miješalom).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIORAFINERIJA

Biorafinerija je postrojenje ili mreža postrojenja koje pretvara biomasu, kao što je na primjer otpad, u različite proizvode uključujući kemikalije, biomaterijale i energiju, povećavajući pritom vrijednost biomase i minimizirajući otpad. Ovaj integrirani pristup privlači sve veću komercijalnu i akademsku pozornost u mnogim dijelovima svijeta (Vertes i sur., 2017).

Biorafinerije predstavljaju alternativu naftnim rafinerijama, istražujući održivije pristupe proizvodnje. Ova postrojenja koriste biomasu kao ključnu sirovinu za dobivanje različitih proizvoda, što ih čini ekološki prihvatljivijima u usporedbi s konvencionalnim rafinerijama. Ti proizvodi uključuju velike količine proizvoda niske vrijednosti kao što su goriva za prijevoz (npr. biodizel i bioetanol), različite kemikalije i materijali te manje količine visokovrijednih proizvoda u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Kroz upotrebu biomase, biorafinerije doprinose smanjenju štetnih utjecaja na okoliš, posebno kroz ograničavanje emisija štetnih plinova (Badgular i Bhanage, 2018; Cherubini, 2010).

U literaturi biorafinerije se dijele u tri skupine; biorafinerije prve faze, biorafinerije druge faze i biorafinerije treće faze. Biorafinerije prve faze koriste jednu sirovinu i jedan proces kako bi proizvele jedan glavni proizvod, kao što su na primjer postrojenja za proizvodnju etanola iz kukuruza. Biorafinerije druge faze također koriste jednu sirovinu, ali pomoću više procesa proizvode i više glavnih proizvoda te se tako iz kukuruznog škroba proizvodi niz kemijskih proizvoda. Biorafinerije treće faze koriste više od jedne sirovine za višestruke procese kojima se dobivaju različiti proizvodi pri čemu se iz lignocelulozne sirovine mogu proizvesti biogoriva, C2 kemikalije (octena kiselina, etil acetat, etanol, etilen) i C3 kemikalije (propionska kiselina, propanol i propilen; Clark i Deswarte, 2015; Fernando i sur., 2006; Kamm i Kamm, 2004).

2.1.1. Sirovine

Biomasa koja se koristi u biorafinerijama može se podijeliti u četiri veće skupine, a to su energetske usjevi (uglavnom su to travaste biljke poput miskantusa, slatkog sirka, pšenične trave, bambusa i dr.), brzorastuće drveće, poljoprivredni usjevi (uljarice i žitarice) te biomasa algi (Maity, 2015).

2.1.1.1. Lignoceluloza

Lignocelulozne sirovine predstavljaju najobilniji izvor obnovljivog organskog materijala na Zemlji. Lignocelulozna sirovina podrazumijeva drveni materijal, slamu, kukuruzovinu, poljoprivredne ostatke (stabljika, lišće i korijenje), energetske usjeve i komunalni lignocelulozni otpad. Glavne komponente lignoceluloze su celuloza, hemiceluloza i lignin, a u manjem dijelu su prisutni pigmenti, proteini stanične stijenke, mineralne tvari i pektin. Celuloza je linearni homopolimer molekula D-glukoze povezanih β -1,4-glikozidnim vezama (Chen, 2014). Hemiceluloze drvenastih biljaka obično se sastoje od D-ksiloze, D-manoze, D-galaktoze, D-glukoze, L-arabinoze, D-glukuronske kiseline i D-galakturonske kiseline, a hemiceluloze trava i žitarica najčešće su velikim dijelom sastavljene od D-ksiloze, D-galaktoze, D-glukoze i L-arabinoze, no u ovim polimerima postoji veća raznolikost strukture (Bušić i sur., 2018). Lignin je heteropolimer u kojem su monomerne jedinice nelinearno i nasumično povezane. Tri najčešća monomera su kumaril alkohol, sinapil alkohol i koniferil alkohol. Tijekom separacije lignina, zbog mehaničkih, kemijskih i enzimskih metoda koje se koriste, dolazi do djelomične degradacije lignina pa još nije određena njegova prava molekulska masa. Predobrada lignoceluloznih sirovina je nužan korak u procesu proizvodnje jer mikroorganizmi ne mogu koristiti lignocelulozne materijale u njihovom prvotnom obliku nego samo jednostavnije gradivne jedinice celuloze, hemiceluloze i lignina. Postoje više načina na koje se može provesti predtretman lignoceluloznih sirovina, a mogu se podijeliti na fizikalne, kemijske i biološke metode (Chen, 2014).

2.1.1.2. Trigliceridi

Trigliceridi obuhvaćaju biljna ulja, životinjske masti, otpadna jestiva ulja te ulja mikroalgi. Biljna ulja dijele se na jestiva (npr. repica, kokos i suncokret) i nejestiva (npr. jatrofa). Struktura triglicerida uključuje jednu molekulu glicerola povezanu esterskim vezama s tri molekule masnih kiselina, koje mogu biti jednake ili različite. Sastav masnih kiselina triglicerida značajno varira ovisno o izvoru i geografskom podrijetlu. Općenito, biljna ulja se sastoje od C8-C24 masnih kiselina, ali većinom prevladavaju C16 i C18 masne kiseline. Sastav ulja mikroalgi ipak je nešto širi u usporedbi s biljnim uljima. Za neke od sojeva, ulja mikroalgi su bogata višestruko nezasićenim masnim kiselinama s četiri ili više dvostruke veze. Životinjske masti obično imaju visok sadržaj zasićenih masnih kiselina velikih molekularnih masa. Također, u ovim sirovinama često se nalazi velike količine slobodnih masnih kiselina, posebno u nejestivim uljima, životinjskoj masti i ulju mikroalgi (Maity, 2015).

2.1.1.3. Šećerne i škrobne sirovine

Sirovine za biorafinerije mogu biti biljni izvori bogati šećerom (šećerna trska, šećerna repa, melasa) ili škrobom (žitarice). Saharoza je disaharid koji se sastoji od dva različiti C6 monosaharidi, α -glukoza i β -fruktoza, međusobno povezana α -1 glukoziidnom- β -2 fruktoziidnom vezom. Škrob je polimer α -glukoze povezane α -1,4- glukoziidnom vezom (kao u amilozi) i α -1,6 glukoziidnom vezom (kao u amilopektinu). Škrob se obično sastoji od 20-25 % amiloze i 75-80 % amilopektina, ovisno o izvoru (Maity, 2015).

2.1.1.3.1. Melasa

Tijekom prerade šećerne trske ili repe, iz njihovog soka se kristalizira šećer, a gusti sirup koji ostaje kao otpad naziva se melasa. Važnost melase leži u činjenici da je to tekućina bogata hranjivim tvarima, faktorima rasta, mineralima i šećerima što ju čini dobrom sirovinom za različite mikrobne procese. Glavne komponente melase uključuju 45-55 % ukupnih fermentirajućih šećera kao što su saharoza, fruktoza i glukoza te ostale spojeve. Zbog svojih iznimnih svojstava, melasa se kao sastojak široko koristi u pekarstvu, kao sirovina za fermentaciju ili kao dodatak stočnoj hrani. Od sto tona šećerne trske može se dobiti sedam tona melase koja se može koristiti kao supstrat za dobivanje biološki vrijednih proizvoda kao što su bioetanol, jantarna, fumarna, mliječna i limunska kiselina, karotenoidi, lipidi, bioplin, enzimi,

izoamil acetat i druge biokemikalije (Bispo i sur., 2023; Britannica, 2023b; Deeba i sur., 2022; Jamir i sur., 2021).

2.2. FUNGI

Gljive (fungi) su eukariotski organizmi koji konstituiraju zasebno carstvo u biološkoj klasifikaciji, odvojeno od carstava biljaka, životinja i protista. Povijesno gledano, gljive su bile klasificirane unutar carstva biljaka zbog određenih morfoloških sličnosti, poput nepokretnosti i prisutnosti stanične stijenke. Gljive ne posjeduju klorofil, pigment ključan za fotosintezu, što ih čini nesposobnima za samostalnu proizvodnju hranjivih tvari. Umjesto toga, gljive su heterotrofni organizmi koji koriste složene organske spojeve kao izvor energije i ugljika. Suvremena taksonomija jasno ih klasificira u vlastito carstvo, reflektirajući njihovu jedinstvenost i značajnu ulogu u biološkoj raznolikosti. Zajedno s bakterijama, gljive su odgovorne za razgradnju organske tvari i otpuštanje ugljika, kisika, dušika i fosfora u tlo i/ili atmosferu.

Tipična gljiva sastoji se od razgranatih, cjevastih niti okruženih krutom staničnom stijenkama. Niti, zvane hife, više puta se granaju u kompliciranu, radijalno šireću mrežu zvanu micelij, koja čini talus ili nediferencirano tijelo tipične gljive. Micelij raste na hranjivim tvarima iz okoliša i nakon dostizanja određenog stupnja zrelosti, oblikuje reproduktivne stanice koje se nazivaju spore. Spore se oslobađaju i raspršuju širokim spektrom pasivnih ili aktivnih mehanizama. Nakon što dospiju na odgovarajući supstrat, spore klijaju i razvijaju hife koje rastu, više puta se granaju i postaju micelij nove jedinice. Gljivični rast uglavnom je ograničen na vrhove hifa, pa su stoga sve gljivične strukture sastavljene od hifa ili dijelova hifa. Hife nekih gljiva podijeljene su u zasebne stanice koje su međusobno odijeljene krajnjim stijenkama, septama, koje mogu biti perforirane što omogućuje brzi protok hranjivih tvari i malih molekula između stanica hifa. U drugim slučajevima hife su nesegmentirane tj. sastoje se od velikih stanica s puno jezgri, a takav raspored naziva se koenocitnim hifama. Vegetativno tijelo gljive može biti jednostanično ili višestanično (Moore i sur., 2023; McGinnis i Tying, 1996).

Kvasci ne tvore micelij nego rastu kao pojedinačne stanice koje se razmnožavaju pupanjem ili, kod nekih vrsta, cijepanjem. Dimorfne gljive mogu prijeći iz jednostaničnog u višestanično stanje ovisno o okolišnim uvjetima. Jednostanične gljive općenito se nazivaju kvasci, a u višestanične pripadaju plijesni (Moore i sur., 2023).

Plijesni su višestanične mikroskopske gljivice koje rastu u obliku hifa. Hifomicete predstavljaju znanstvenu klasifikaciju plijesni, a procjenjuje se da obuhvaćaju oko 400.000 vrsta. Plijesni se mogu klasificirati u dva odjela: zigomicete i askomicete. Razlika između ova dva odjela uglavnom se odnosi na njihovo spolno razmnožavanje i proizvodnju spora. Zigomicete (konjugirane gljive) stvaraju neseegmentirane hife s nekoliko jezgri, a njihove se hife stapaju tijekom spolnog razmnožavanja i proizvode zigospore. Askomicete (vrećaste gljive) imaju hife koje su podijeljene staničnom stijenkom, a svaka stanica sadrži jednu jezgru. Tijekom spolnog razmnožavanja stvaraju spore u vrećicama koje se nazivaju askusi (Britannica, 2023a; White i sur., 2006; Barr, 1983).

2.2.1. PLIJESAN *Botryosphaeria dothidea*

Botryosphaeria dothidea je biljni patogen (askomicet) koji uzrokuje stvaranje rana na različitim vrstama drveća i grmlja. *B. dothidea* je identificirana na nekoliko stotina biljaka domaćina uključujući grožđe, mango, maslinu, eukaliptus, javor i hrast te je otkrivena na svima kontinentima osim na Antartici. Iako je najpoznatija kao patogen, vrsta je identificirana i kao endofit, koji postoji u vezi s biljnim tkivima na kojima nisu uočeni simptomi bolesti. Osim drvenastih tkiva, ova plijesan može kolonizirati i neke plodove (Phillips i sur., 2013; Crous i sur., 2006).

Sekundarni metaboliti biljnog podrijetla već stoljećima imaju važnu ulogu u medicini i poljoprivredi. Međutim, zbog ograničenja biljne raznolikosti, produktivnosti i održivosti, mikroorganizmi, posebno endofiti i simbionti, smatrani su lako obnovljivim i neiscrpnim izvorom novih bioaktivnih sekundarnih metabolita. Iako endofiti asimptomatski napadaju biljna tkiva, njihovi sekundarni metaboliti mogu stimulirati rast biljke ili osigurati obranu od napada biljnih patogena. Ovi mikroorganizmi su stoga prepoznati kao potencijalni izvori novih bioaktivnih spojeva od mogućeg poljoprivrednog, farmaceutskog te industrijskog značaja. Iz kulture *B. dothidea* izolirana su i identificirana tri nova prirodna proizvoda (jedan derivat piridona i dva kongenera ceramida) i 15 poznatih spojeva te se pokazalo da ti spojevi posjeduju neke antimikrobna i antioksidativna svojstva (Xiao i sur., 2014).

2.2.2. PLIJESAN *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum je askomicetna gljiva, najčešća i ekonomski važna vrsta roda *Fusarium*. Sojevi *F. oxysporum* su sveprisutni stanovnici tla koji mogu biti saprofiti te razgrađuju lignin i složene ugljikohidrate. Ova vrsta uključuje patogene (biljne, ljudske i životinjske) i nepatogene sojeve. *F. oxysporum* je patogen koji se prenosi tlo i uzrokuje vaskularno venuće na mnogim biljkama, koje je karakterizirano različitim simptomima, uključujući epinastiju lišća, vaskularno posmeđivanje, defolijaciju, zaostajanje u rastu i smrt biljke (Gordon i sur., 1989; Sutherland i Pometto, 1983).

Kolektivno, biljni patogeni sojevi *F. oxysporum* imaju širok raspon domaćina, međutim pojedinačni izolati obično uzrokuju bolest samo u uskom rasponu biljnih vrsta. Ovo zapažanje dovelo je do ideje o „posebnom obliku“ ili forma *specialis* (f. sp.) kod *F. oxysporum*. Forma *specialis* definirane su kao „neformalni rang u klasifikaciji koji se koristi za parazitske gljive karakterizirane s fiziološkog stajališta (npr. sposobnošću izazivanja bolesti kod određenih domaćina), ali jedva ili uopće ne s morfološkog stajališta“. Njegov kompleks vrsta sastoji se od nekoliko forma *specialis* koje zajedno zaraze više od sto domaćina, što dovodi do ozbiljnih gubitaka u usjevima kao što su rajčica, dinja, banana i pamuk. Kod ljudi, *F. oxysporum* uzrokuje invazivne infekcije kod pacijenata s oslabljenim imunitetom (Ibrahim i sur., 2021).

S druge strane, mnoga su istraživanja otkrila da *F. oxysporum* može sintetizirati različite klase sekundarnih metabolita kao što su alkaloidi, jasmonati, antranilati, ciklički peptidi, ciklički depsi-peptidi, ksantoni, kinoni i terpenoidi koje mogu pokazivati fitotoksične, antimikrobne i citotoksične učinke, te insekticidno, antioksidativno i antiangiogeno djelovanje. Osim toga, vrste *F. oxysporum* imaju potencijal za industrijsku i biotehnološku primjenu kao bogat izvor različitih enzima sa širokom primjenom kao što su kutinaze, nitrilaze, glikozidne, hidrolaze, lakaze, lipoksigenaze, dušikov oksid reduktaze, dekarboksilaze, keratinaze, fosfolipaze B i triosefosfat izomeraze. Nadalje, *F. oxysporum* se može koristiti za sintezu različitih vrsta metalnih nanočestica koje mogu imati različite biotehnološke, farmaceutske, industrijske i medicinske primjene (Ibrahim i sur., 2021).

2.2.3. PLIJESAN *Fusarium verticillioides*

Fusarium verticillioides, prema prijašnjoj klasifikaciji *Fusarium moniliforme*, najčešća je plijesan koja inficira kukuruz. Osim kukuruza, inficira i druge žitarice poput pšenice i riže te sirka. U kukuruzu raste kao endofit u vegetativnom i reproduktivnom tkivu, normalno ne uzrokujući simptome bolesti. Međutim, tijekom vremenskih uvjeta pogodnih za ovu plijesan (visoka vlažnost i temperatura) može uzrokovati trulež stabljike ili klipa u kukuruzu. Osim što smanjuje kvalitetu usjeva i prinos, *F. verticillioides* također proizvodi toksine iz skupine fumonizina koji su štetni za ljude i životinje ako dođe do konzumiranja kontaminiranih žitarica (Moo-Young, 2019).

F. verticillioides poznata je kao učinkoviti proizvođači celulaza i hemicelulaza. Pokazuje visoke prinose etanola prilikom rasta na glukozi i ksilozi. Ova plijesan proizvodi etanol iz bagaze šećerne trske, što ukazuje da je mikroorganizam koji proizvodi različite lignocelulolitičke enzime (Almeida i sur., 2013). Ova askomicetna gljiva raste na temperaturama od približno 3-37 °C, s optimumom oko 25 °C. Također, može rasti pri uvjetima limitacije kisika, ali ne i pri njegovoj potpunoj odsutnosti (Dickman i Grollman, 2010).

2.2.4. PLIJESAN *Thielavia terrestris*

Thielavia terrestris je askomicetna gljiva koja je zanimljiva iz nekoliko razloga. Ova plijesan je klasificirana kao termofil te posjeduje maksimalnu temperaturu rasta na ili iznad 50 °C i nemogućnost rasta ispod 20 °C. Pokazalo se da celulaze i hemicelulaze iz *T. terrestris* posjeduju vrhunske katalitičke karakteristike i karakteristike stabilnosti koje ih čine privlačnim kandidatima za industrijske primjene koje uključuju hidrolizu lignocelulozne biomase. *T. terrestris* je ujedno filogenetski povezana s dobro okarakteriziranim modelnim organizmom *Neurospora crassa* i patogenom gljivom *Chaetomium globosum*. Sekvencioniranje genoma *T. terrestris* može omogućiti identificiranje i definiranje sekvence termofilnih enzima te, njihovo korištenje za hidrolizu lignocelulozne biomase, ali i povećati vrijednost sekvenci genoma drugih blisko povezanih organizama kroz komparativne studije evolucije, regulatornih i biokemijskih putova i patogeneze (Rosgaar i sur., 2006; Breuil i sur., 1986).

2.3. BIOTEHNOLOŠKI PROCESI PROIZVODNJE BIOKEMIKALIJA S POMOĆU PLIJESNI

Proizvodi koji se mogu dobiti pomoću mikroorganizama imaju širok raspon terapijskih primjena, a zahvaljujući novim i boljim tehnikama te tehnologiji, broj otkrivenih spojeva premašuje milijun. Od svih prijavljenih bioloških proizvoda, 20-25 % pokazuje biološku aktivnost, a od toga 10 % je dobiveno od mikroba. Pomoću mikroorganizama je do sada dobiveno oko 22 500 biološki aktivnih spojeva od čega 40 % proizvode fungi. Za nastajanje proizvoda kod mikroba najčešće su odgovorni primarni ili sekundarni metabolizam (Brakhage i Schroekh, 2011; Berdy, 2005;).

2.3.1. Produkti primarnog i sekundarnog metabolizma

Produkti primarnog metabolizma su tvari koje su nužne za rast, razvoj, energiju i održavanje organizma. Primjeri primarnih metabolita uključuju alkohole (npr. etanol), organske kiseline, određene aminokiseline i vitamine. Etanol je jedan od najčešćih primarnih metabolita koji se koristi za proizvodnju u velikom mjerilu te se koristi u proizvodnji alkoholnih pića (Rabha i Jha, 2018). Osim alkohola, u primarne metabolite pripadaju i aminokiseline, uključujući L-glutamat i L-lizin koje se mogu koristiti kao dodaci prehrani, te limunska kiselina koju proizvodi plijesan *Aspergillus niger*, koja se koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Show i sur., 2015).

Sekundarni metaboliti su organski spojevi niske molekulske mase koje proizvode organizmi kao rezultat sekundarnog metabolizma. Oni ne igraju ulogu u rastu, razvoju i reprodukciji kao primarni metaboliti i obično se stvaraju na kraju ili blizu stacionarne faze rasta (idiofaza). Sekundarni metaboliti imaju veliki učinak na zdravlje, prehranu i ekonomiju našeg društva. Najpoznatiji su antibiotici. Ova izvanredna skupina spojeva tvori heterogenu skupinu biološki aktivnih molekula s različitim strukturama i načinima djelovanja. Osim antibiotika, u sekundarne metabolite pripadaju pesticidi, pigmenti, toksini, feromoni, antitumorski spojevi, imunosupresivi i mnogi drugi (Sanchez i Demain, 2011).

2.3.2. Etanol

Almeida i suradnici (2013) ispitivali su proizvodnju etanola pomoću plijesni *Fusarium verticillioides* i *Acremonium zeae*. Nakon 8 dana uzgoja u podlogama koje su sadržavale glukozu kao izvor ugljika, *F. verticillioides* proizvela je 9,44 g/L etanola, a *Acremonium zeae* 7,47 g/L etanola. Esmaili i Keikhosro (2018) u svome su istraživanju pomoću plijesni *Mucor hiemalis* proizveli 0,45 g/g etanola nakon 36 sati uzgoja, na podlozi koja je sadržavala 140 g/L glukoze.

2.3.3. Pigmenti

Pigmenti obično imaju posebna svojstva koja ih čine idealnima za bojanje materijala, a moraju biti stabilni u čvrstom stanju pri sobnoj temperaturi (Shindy, 2016). Većina prirodnih pigmenata se ekstrahira iz biljaka i životinja. Neki od izvora su grožđe, repa, kurkuma, paprika, anato, ženke insekata te razni mikroorganizmi poput rodova *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Dunaliella* i *Phaffia*. Mikrobni pigmenti postaju sve popularniji u industrijskim primjenama jer su sigurni za upotrebu, neovisni su o sezonskim i geografskim uvjetima jer se proces proizvodnje može kontrolirati i optimizirati (Joshi, 2003).

2.3.3.1. Bikaverin

Bikaverin je crveni poliketid koji proizvode plijesni, posebno *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* i *Fusarium oxysporum*. Izvorno crvena biomasa koja sadrži bikaverin može postati plava nakon toplinske obrade, što je važna značajka za proširenje mogućnosti korištenja prirodnih plavih boja za industrijske primjene. Biološke aktivnosti prijavljene za bikaverin uključuju antibiotsku aktivnost protiv protozoe *Leishmania braziliensis*, oomicete *Phytophthora infestans* i nematoida *Bursaphelenchus xylophilus*. Ova molekula također može inhibirati tumorske stanične linije, kao što su ljudski adenokarcinom dojke, ljudski karcinom pluća i ljudski epidermoidni karcinom. Nedavno je bikaverin prijavljen kao obećavajući kandidat protiv koronavirusne bolesti (COVID-19) (Mendonca i sur., 2021).

2.3.3.2. Karotenoidi

Karotenoidi, potporodica terpenoida, su pigmenti žute do crvene boje koji spadaju u antioksidanse. Koriste se kao hranjive tvari, dodaci prehrani, dodaci stočnoj hrani, antioksidansi, sredstva protiv raka, imunološki modulatori i kozmetički proizvodi. Glavini proizvođač karotenoida je plijesan *Blakeslea trispora* koja proizvodi β -karoten u količini od 9 g/L (Sanchez i sur., 2013).

2.3.4. Organske kiseline

2.3.4.1. Octena kiselina

Proizvodnja octene kiseline fermentacijom većinom se povezuje s bakterijama octene kiseline, s naglaskom na rodove poput *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter* i *Gluconobacter*. Unatoč širokoj literaturi koja prati ove bakterijske rodove, primjećuje se značajan manjak informacija o plijesnima koje mogu proizvoditi octenu kiselinu, prema analizi dostupnih istraživanja do 2021. godine (Merli i sur., 2021). Kumar i sur. (1991) su ispitivali proizvodnju octene kiseline s četiri različita soja plijesni *Fusarium oxysporum*, a kao izvor ugljika koristili su celulozu. *Fusarium oxysporum* 841 je pokazao najveći potencijal za proizvodnjom octene kiseline iz celuloze te ju je proizveo u koncentraciji od 2,5 g/L. Ostali sojevi su proizveli octenu kiselinu u puno manjim koncentracijama.

2.3.4.2. Ostale organske kiseline

Aspergillus terreus proizvodi itakonsku kiselinu koja se koristi za pripremu polimera, premaza, ljepila i tekstila. Jedan takav polimer je poli-itakonska kiselina koja se koristi u obradi vode, deterdžentima, kao sredstvo za zgušnjavanje, vezivanje i oblikovanje veličine, kao emulgator, u oralnoj isporuci lijekova te u zubnim cementima (Karaffa, 2015). *Aspergillus niger* poznat je po proizvodnji limunske kiseline, međutim proizvodi i glukonsku kiselinu na različitim supstratima kao što je glukoza, saharoza te nusproizvodi procesa rafiniranja soka šećerne trske ili obrade šećera kiselinom. Ova plijesan proizvodi glukonsku kiselinu s produktivnošću od 1,94 g/Lh, a istražena je i metoda imobiliziranja *A. niger* na celuloznim vlaknima pri čemu je produktivnost bila 0,238 g/Lh (Purane i sur., 2012; Sankpal i Kulkarni, 2002). Metabolički modificirana plijesan *Aspergillus oryzae* koristi se za prekomjernu proizvodnju jabučne

kiseline, koja se koristi u industriji hrane i pića. Produktivnost proizvodnje jabučne kiseline u ovom radu iznosila je 0,94 g/Lh, a prinos na glukozi iznosio je 1,38 mol/mol (Brown i sur., 2013).

2.3.5. Šećerni alkoholi

Šećerni alkoholi su spojevi koji se dobivaju kada se aldo ili keto skupina šećera reducira u odgovarajuću hidroksi skupinu. Neki od primjera šećernih alkohola su ksilitol, eritrol, sorbitol, manitol, arabinitol i galactitol (Bilal i sur., 2020).

2.3.5.1. Ksilitol

Malo je dostupnih istraživanja o proizvodnji ksilitola s pomoću plijesni, a njegov prinos ovisi o plijesnima koje se koriste te uvjetima uzgoja. Filamentozne gljive kao što su *Byssoschlamys sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Gliocladium sp.*, *Myrothecium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Neurospora sp.* i *Mucor*. proizvode male količine ksilitola kada rastu na mediju koji sadrži ksilozu (Chiang i Knight, 1960). Suihko i sur. (1983) su istraživanjem pokazali da plijesan *Fusarium oxysporum* proizvodi 1g/L ksilitola iz 50 g/L ksiloze kada se uzgaja dva dana u aerobnim uvjetima. Fonseca-Peralta i suradnici (2022) su u svome istraživanju pomoću plijesni *Mucor circinelloides* MN128960 proizveli 0,35 g ksilitola po gramu ksiloze, nakon 60 sati trajanja uzgoja.

2.3.5.2. Manitol

Nekoliko vrsta plijesni iz roda *Penicillium* proučavano je za proizvodnju manitola prilikom rasta na podlogama sa saharozom kao izvorom ugljika. Sve vrste su proizvele manitol, a *Penicillium scabrosum* je proizveo čak 43 g/L manitola prilikom rasta na podlozi koja je sadržavala 15 % saharoze i 2 % kvašćevog ekstrakta (Hendriksen i sur., 2007). U nekim istraživanjima manitol su iz glukoze proizveli različiti rodova plijesni među kojima su *Aspergillus*, *Eurotium* i *Fennellia* te plijesan *Fusarium pallidoroseum* (Saha i Racine, 2011).

2.3.5.3. Eritrol

Proučavanjem nekoliko vrsta plijesni koje pripadaju rodu *Penicillium*, uočena je proizvodnja eritrola u malim koncentracijama kod nekih vrsta. Najveći koncentraciju od 3 g/L proizveli su *Penicillium vulpinum* i *Penicillium solitum* prilikom rasta na saharozi kao izvoru ugljika (Hendriksen i sur., 2007). U istraživanju koje su proveli Jovanović i suradnici (2014), uzgajana je filamentozna gljiva *Trichoderma reesei* na lignoceluloznoj sirovini te je proizvela oko 65 µg eritrola po gramu micelija.

2.3.5.4. Glicerol

Hendriksen i suradnici (2007) su proučavali proizvodnju glicerola na nekoliko *Penicillium* vrsta prilikom rasta na saharozi kao izvoru ugljika. Svi sojevi su proizveli glicerol, a *Penicillium maclellaniae* je proizveo najviše glicerola u koncentraciji od 35 g/L. *Rhizopus javanicus* je plijesan koja je uzgojem na podlozi koja sadrži 24 % ksiloze proizvela glicerol u koncentracije od 55 g/L (Lu i sur., 1995).

2.3.6. Masne kiseline

Određene vrste plijesni imaju sposobnost nakupljanja do 85 % (tež/tež) lipida u svojoj biomasi. Nakupljanje lipida je potaknuto iscrpljivanjem hranjivih tvari, osim ugljika, čime se sprječava proliferacija stanica, ali se još uvijek omogućuje pretvaranje supstrata u lipid. Takve plijesni, koje proizvode polinezasićene masne kiseline kao što su omega-3 i omega-6, mogu biti ekonomski isplativ izvor polinezasićenih masnih kiselina pod uvjetom da se većina njih nalazi u obliku triacilglicerola jer se tada mogu ekstrahirati kao biljno ulje. U istraživanju koje su proveli Kendrick i Ratledge (1992) proučavana je proizvodnja masnih kiselina na 7 različitih plijesni. *Mortierella alpina-peyron* proizvela je najviše masnih kiselina koje su činile 37,7 % njene biomase. Iz svih plijesni korištenih u ovom radu ukupno je ekstrahirano 24 masne kiseline od kojih je 14 bilo polinezasićeno. *Thraustochytrium aureum* je proizvela samo 10 % lipida, ali dokozaheksaenska kiselina (DHA) i eieosapentaenska kiselina (EPA) koje su bitne omega-3 masne kiseline su činile 29,9 % odnosno 8,8 % od ukupnih masnih kiselina (Kendrick i Ratledge, 1992). Alavijeh i suradnici (2020) istraživali su plijesan *Mucor indicus* i njegovu sposobnost proizvodnje masnih kiselina na različitim izvorima ugljika i dušika. Kada su kao izvor ugljika korištene glukoza i ksiloza, a kao izvor dušika kvašćev ekstrakt i anorganske soli, postignut je najveći prinos masnih kiselina od 156 mg po gramu izvora ugljika. Pri tom prinosu,

udio masnih kiselina iznosio je 19,3 % biomase plijesni. Sastav masnih kiselina bio je sljedeći: 13,7 % palmitinske kiseline (C16:0), 22,7 % palmitoleinske kiseline (C16:1), 53,5 % stearinske kiseline (C18:0), 6,1 % linolne kiseline (C18:2) i 4,0 % nonadekanska kiselina (C18:3).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Kemikalije korištene tijekom izrade ovog rad navedene su u tablici 1.

Tablica 1. Kemikalije, stupanj čistoće i podrijetlo kemikalija korištenih u ovom radu

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
Glukoza	≥ 99 %	Kemika, Hrvatska
Fruktoza	≥ 99 %	Kemika, Hrvatska
Melasa	-	Sladorana Županja, Hrvatska
Ksilozna	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
Celobioza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
Arabinoza	≥ 99 %	Molekula Group, UK
Sladni agar	p.a.	Difco, SAD
Kvašičev ekstrakt	Za upotrebu u biotehnologiji	Roth, Australija
Mesni ekstrakt	Za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
Diamonijev fosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Diamonijev sulfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Mangan (II) sulfat monohidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalijev hidrogen fosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Magnezijev sulfat heptahidrat	≥ 99 %	LACHNER d.o.o., Češka
Bakrov (II) sulfat pentahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Željezov (II) sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Pepton	p.a.	Merck, Njemačka
Cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
Sumporna kiselina	96 %	Merck KGaA, Njemačka

Tablica 1. Kemikalije, stupanj čistoće i podrijetlo kemikalija korištenih u ovom radu-
nastavak

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
Etanol	p.a.	Gram-mol, Hrvatska
CSL (kukuruzna močevina)	za upotrebu u biotehnologiji	Dynamite Baits, UK
Klorovodična kiselina	p.a.	Merck, Njemačka
Kloroform	p.a.	Macron Fine Chemicals, SAD
Metanol	p.a.	J.T. Baker, SAD
Metil tridecanoat	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
Heksan	p.a.	Kemika, Hrvatska
Pentadekan	98	Sigma-Aldrich, SAD

3.1.2. Radni mikroorganizmi

Mikroorganizmi korišteni u ovom radu su:

- 1) *Thielavia terrestris* CBS 45675
- 2) *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738
- 3) *Fusarium oxysporum* f.sp. *langenariae* JCM 9293
- 4) *Fusarium verticillioides* JCM 23107

Svi mikroorganizmi su dio zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

3.1.3. Hranjive podloge za održavanje mikroorganizama i pripremu inokuluma

Čiste kulture plijesni *T. terrestris* CBS 45675, *B. dothidea* JCM 2738, *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 održavane su na čvrstim podlogama čiji sastav je prikazan u tablici 2.

Za uzgoj inokuluma plijesni *T. terrestris* CBS 45675, *B. dothidea* JCM 2738, *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 prilikom preliminarnih uzgoja te za uzgoj inokuluma plijesni *F. oxysporum* prilikom uzgoja u tikvicama korištene su podloge čiji je sastav prikazan u tablici 2.

Tablica 2. Sastav hranjivih podloga korištenih za održavanje kultura i pripremu inokuluma plijesni *T. terrestris* CBS 45675, *B. dothidea* JCM 2738, *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107

Podloga	Izvor C (g/L)		Izvor N					agar (g/L)
			kvašćev ekstrakt	mesni ekstrakt	pepton	(NH ₄) ₂ HPO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	
KPM _{agar} *	glukoza	20	2,5	2,5	-	1,0	1,0	20
KPM _{glc}	glukoza	10	5	0,5	2,5	1,0	1,0	-
KMP _{glc} **	glukoza	40	5	0,5	2,5	1,0	1,0	-

*podloga korištena za održavanje kultura plijesni

**podloga korištena samo za uzgoj inokuluma plijesni *Fusarium oxysporum* JCM 9293

3.1.4. Hranjive podloge za preliminarni uzgoj plijesni

Za preliminarne uzgoje plijesni *T. terrestris* CBS 45675, *B. dothidea* JCM 2738, *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 korištene su dvije različite grupe podloga. KMP podloge kao izvor dušika sadrže kvašćev ekstrakt, mesni ekstrakt te pepton, i CSL podloge koje kao izvor dušika sadrže CSL, uz dodatak različitih izvora ugljika. Detaljan sastav hranjivih podloga korištenih za preliminarne uzgoje prikazan je u tablici 3.




Tablica 3. Sastav hranjivih podloga korištenih u preliminarnim eksperimentima uzgoja plijesni *T. terrestris* CBS 45675, *B. dothidea* JCM 2738, *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 na različitim izvorima C i N

Podloga		Izvor C (g/L)		Izvor N (g/L)					
				kvašćev ekstrakt	mesni ekstrakt	pepton	(NH ₄) ₂ HPO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	CSL
KPM PODLOGE	KPM _{glc}	Glu	20	5	0,5	2,5	1,0	1,0	/
	KPM _{fru}	Fru	20	5	0,5	2,5	1,0	1,0	/
	KPM _{sah}	Sah	20	5	0,5	2,5	1,0	1,0	/
	KPM _{ksi}	Ksi	20	5	0,5	2,5	1,0	1,0	/
	KPM _{cel}	Cel	20	5	0,5	2,5	1,0	1,0	/
	KPM _{ara}	Ara	20	5	0,5	2,5	1,0	1,0	/
CSL PODLOGE	CSL _{glc}	Glu	20	/	/	/	1,0	1,0	8
	CSL _{fru}	Fru	20	/	/	/	1,0	1,0	8
	CSL _{sah}	Sah	20	/	/	/	1,0	1,0	8
	CSL _{ksi}	Ksi	20	/	/	/	1,0	1,0	8
	CSL _{cel}	Cel	20	/	/	/	1,0	1,0	8
	CSL _{ara}	Ara	20	/	/	/	1,0	1,0	8

3.1.5. Hranjive podloge za uzgoj plijesni *Fusarium oxysporum* JCM 9293 u tikvicama i u bioreaktoru

Za uzgoj plijesni *Fusarium oxysporum* JCM 9293 u tikvicama korištene su dvije različite grupe podloga; KMP i CSL podloga s različitim izvorima ugljika. Za uzgoj plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 u bioreaktoru korištena je KMP podloga uz dodatak saharozom (melasa₅₀). Detaljan sastav hranjivih podloga korištenih za uzgoje u tikvicama i u bioreaktoru prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Sastav hranjivih podloga za uzgoj plijesni *Fusarium oxysporum* JCM 2738 u tikvicama i u bioreaktoru

Podloga		Izvor C (g/L)		Izvor N (g/L)						
				kvašćev ekstrakt	mesni ekstrakt	pepton	(NH ₄) ₂ HPO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	CSL	
CSL PODLOGE		CSL _{glc}	Glu	20	-	-	-	1	1	8
		CSL _{fru}	Fru	20	-	-	-	1	1	8
		CSL _{sah}	Sah	20	-	-	-	1	1	8
KPM PODLOGE		KPM _{glc}	Glu	20	5	0,5	2,5	1	1	-
		KPM _{fru}	Fru	20	5	0,5	2,5	1	1	-
		KPM _{sah}	Sah	20	5	0,5	2,5	1	1	-
		KPM _{sah}	Sah	20	5	0,5	2,5	1	1	-

U sve podloge korištene tijekom izvođenja eksperimenata dodan je određeni volumen prethodno sterilizirane otopine soli sljedećeg sastava:

MnSO₄ · H₂O; K₂HPO₄; MgSO₄ · 7H₂O; CuSO₄ · H₂O; FeSO₄ · 7H₂O. Konačna koncentracija navedenih soli u svim podlogama iznosila je 0,1 g/L.

3.2. UREĐAJI I OPREMA

3.2.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) sastoji se 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 M otopina sumporne kiseline. Volumen injektiranog uzorka je 10 µL, a protok mobilne faze je 0,6 mL/min.

3.2.2. Uređaj za plinsku kromatografiju (GC)

Koncentracije i sastav estera masnih kiselina u biomasi plijesni *Fusarium oxysporum* JCM 9293 određene su pomoću Shimadzu GC-2010Plus AF sustava (Shimadzu, Kyoto, Japan). Ovaj uređaj se sastoji od automatskog uzorkivača i injektora (AOC-20i), peći s kapilarnom kolonom, plameno-ionizacijskog detektora (FID) i računala s GC Solutions programom za prikupljanje i obradu podataka.

3.2.4. Centrifuge

Za izdvajanje biomase plijesni korištena je centrifuga Beckmann J-21B, a za izdvajanje taloga iz suspenzije pri pripremi uzoraka za UPLC metodu korištena je centrifuga Thermo Scientific SL 8R (Thermo Fischer Scientific, SAD). Witeg CF 10 (Witeg Lagor, Njemačka).

3.2.5. Bioreaktor s miješalom

Za uzgoj plijesni *Fusarium oxysporum* JCM 9293 korišten je bioreaktor s miješalom korisnog volumena 1,5 L. Hranjiva podloga i bioreaktor sterilizirani su zajedno indirektno pomoću vodene pare. Bioreaktor je staklena posuda dimenzija 15 · 30 cm gdje se miješanje podloge provodi sa zrakom preko prstenaste sapnice promjera 5 cm koja je udaljena 2 cm od dna bioreaktora. Protok kroz prstenastu sapnicu kontrolira se preko aerometra i iznosio je 2 L/min. Bioreaktor je povezan s komandnom pločom (Biostat MD, B. Braun Biotech International, Njemačka) za automatsku regulaciju temperature te pH vrijednosti. Otvori preko kojih se

provela inokulacija te iz kojih su se periodično uzimali uzorci za analizu nalaze se na gornjoj podnici bioreaktora zajedno s filterom za aeraciju podloge.

3.2.6. Ostali uređaji

Uz potrošnu laboratorijsku opremu, za izradu ovog rada korištena je i oprema navedena u tablici 5.

Tablica 5. Popis uređaja korištenih tijekom izrade ovog rada

Uređaj	Proizvođač
Tresilica	RM 71 B. Braun Biotech. International, Satorius Group, Njemačka
Sušionik	Instrumenaria ST-50, Hrvatska
Tehnička vaga	Tehnica ET – 1111, Slovenija
Analitička vaga	Shimadzu, AX-200 W/O AC ECTA, Japan
Oprema za filtraciju otopina	Najlonski filteri (0,2 μm , 47 mm; Magna, GE Water & Process Technologies, Michigan, SAD
Autoklav	Sutjeska, Beograd, Jugoslavija
Hladnjak i zamrzivač	Bosch, Njemačka
pH metar 744	Metrohm, Švicarska
Mikroskop	Olympus CX21, Japan

3.3. METODE

3.3.1. Uzgoj čiste kulture plijesni

Čiste kulture plijesni *T. terrestris* CBS 456.75, *B. dothidea* JCM 2738, *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 održavane su na čvrstim podlogama, čiji sastav je naveden u tablici 2. Podloge su prije izlijevanja u Petrijeve zdjelice, sterilizirane u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 minuta. Kulture su nakon naciepljivanja uzgajane u termostatu pri temperaturi od 30 °C tijekom 3-4 dana.

3.3.2. Uzgoj inokuluma plijesni za preliminarne uzgoje

Tekuće podloge za uzgoj inokuluma pripremljene su u 4 tikvice volumena 500 mL otapanjem sastojaka, koji su navedeni u tablici 2, u 250 mL destilirane vode. Podloge su sterilizirane u autoklavu pri temperaturi od 121 °C tijekom 20 minuta. Nakon hlađenja podloga, u aseptičnim uvjetima su u svaku podlogu precijepljene čiste kulture plijesni. Inokulumi su uzgajani na tresilici pri 200 o/min i temperaturi od 30 °C tijekom 24 sata.

3.3.3. Preliminarni uzgoj plijesni

Prilikom preliminarnog uzgoja korištene su dvije različite grupe podloga (KMP i CSL podloga) opisane u poglavlju 3.1.4. Podloge su pripremljene u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL. U 48 plastičnih kiveta s konusnim dnom volumena 50 mL prebačeno je po 20 mL odgovarajuće podloge. Tako pripremljene kivete s konusnim dnom zatvorene su vatenim čepovima i prekrivene aluminijskom folijom te stavljene u autoklav na sterilizaciju pri 121 °C tijekom 20 minuta.

Uzgoj je proveden tako da je u aseptičnim uvjetima svaka kiveta s konusnim dnom naciepljena s po 5 mL inokuluma odgovarajuće plijesni. Nakon naciepljivanja iz svake je kivete uzet uzorak od 1,5 mL za UPLC analizu, te su kivete prebačene na tresilicu gdje se uzgoj provodio na 200 o/min pri 30 °C. Uzgoj je trajao 72h, a uzorci za UPLC analizu uzimani su svaka 24h.

3.3.4. Uzgoj inokuluma plijesni *Fusarium oxysporum* JCM 9293

Tekuća podloga korištena za uzgoj inokuluma *Fusarium oxysporum* JCM 9293 opisana je u tablici 2. Podloga volumena 250 mL pripremljena je u Erlenmeyer tikvici od 500 mL te je sterilizirana u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 min. Nakon hlađenja, u podlogu je u aseptičnim uvjetima precijepljena čista kultura plijesni *F. oxysporum* JCM 9293. Nacijepljena Erlenmeyer tikvica postavljena je na tresilicu s 200 o/min pri 30 °C tijekom 24h.

3.3.5. Uzgoj plijesni *Fusarium oxysporum* JCM 9293

Sastav 300 mL podloge za uzgoj plijesni *Fusarium oxysporum* JCM 9293 opisan je u poglavlju 3.1.5. Za uzgoje su korištene tikvice s odbijačima vrtloga od 500 mL. Podloge su sterilizirane u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 min. Nakon hlađenja, podloge su nacijepljene s po 20 mL inokuluma opisanog u poglavlju 3.3.4. Nakon nacjepljivanja, iz svake tikvice u aseptičnim uvjetima uzet je uzorak od 5 mL za UPLC analizu. Uzgoj je proveden pri 50 o/min i temperaturi 30 °C. Ukupno vrijeme trajanja uzgoja je 50 h, a uzorci za UPLC analizu uzimani su u periodičnim intervalima.

Uzgoji u tikvicama s odbijačima vrtloga ponovljeni su pri 100 o/min tijekom 48 h i 200 o/min tijekom 72 h. Uzorci su za UPLC analizu uzimani su u periodičnim intervalima.

3.3.6. Uzgoj plijesni *Fusarium oxysporum* JCM 9293 u većem mjerilu

Uzgoj u većem mjerilu provede je u bioreaktoru s miješalom koji je opisan u poglavlju 3.2.5. Pripremljeno je 1,2 L podloge koja je opisana u tablici 4 te je prebačena u bioreaktor. Bioreaktor je steriliziran indirektno u autoklavu pri 120 °C tijekom 20 min. Nakon hlađenja podloge, podloga je inokulirana s 300 mL inokuluma. Temperatura uzgoja bila je 30 °C, brzina miješanja 200 o/min, a reaktor je aeriran s protokom zraka od 2 L/min. Uzgoj je trajao 26 h, a uzorci su uzimani u periodičnim intervalima.

3.3.7. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti (UPLC)

UPLC metodom analizirani su uzorci izuzimani tijekom procesa uzgoja *T. terrestris* CBS 45675, *B. dothidea* JCM 2738, *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 u tikvicama s odbijačima vrtloga i u bioreaktoru s miješalom. Prije same analize, uzorci su

centrifugirani kako bi se izdvojila biomasa. Nakon toga, supernatant je u omjeru 1:1 (v/v) pomiješan s 10 % - tnom otopinom $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ kako bi se istaložili proteini. Taloženje se provodilo 10 minuta, a istaloženi su se proteini uklonili ponovnim centrifugiranjem (10 000 o/min, 5 min). Naposljetku, supernatant je filtriran u vijale za UPLC kroz najlonski filter za šprice promjera pora 0,2 μm (Magna, GE Water & Process Technologies; Michigan, SAD). Ovako pripremljeni uzorci analizirani su tekućinskom kromatografijom (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD; poglavlje 3.2.1.). Za analize je korištena analitička kolona Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (15 cm x 7,2 mm, Phenomenex, SAD), a kao mobilna faza tijekom analize korištena je otopina sumporne kiseline u vodi (0,0025 M), temperatura pećnice iznosila je 60 °C (osim kod uzoraka koji su sadržavali saharozu gdje je temperatura iznosila 30 °C), temperatura RID detektora 40 °C, a injektirano je po 10 μL uzorka uz brzinu protoka mobilne faze od 0,6 mL/min.

3.3.8. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase plijesni na kraju uzgoja

Nakon provedenih uzgoja, centrifugiranjem je odvojena biomasa plijesni od prevrele hranjive podloge. Dekantiranjem je odvojena hranjiva podloga (supernatant) od biomase (talog). Biomasa je osušena u sušioniku na 50 °C do konačne mase te je koncentracija biomase plijesni na kraju uzgoja izračunata sljedećom formulom:

$$X = \frac{m_1 - m_2}{V} \quad [1]$$

gdje je X koncentracija biomase plijesni na kraju uzgoja, m_1 je masa biomase prije sušenja, m_2 je masa biomase nakon sušenja, a V je volumen hranjive podloge.

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

Sastav i koncentracija masnih kiselina u biomasi plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 određeni su metodom plinske kromatografije s plameno-ionizacijskom detekcijom (GC-FID). Prije analize uzoraka provedena je transesterifikacija masnih kiselina u metilne estere i zatim 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). Izvagano je između 5 do 10 mg biomase plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 te je izvagana biomasa prebačena u staklene kivete volumena 10 mL. U kivetu je zatim dodano 25 μL metil tridekanoata

(C13:0ME = 10 mg mL⁻¹; interni standard 1), 200 μ L otopine kloroform:metanol (2:1, v/v) i 300 μ L 0,6 M otopine HCl:metanola. Sadržaj kivete izmiješan je na vibro-mješaču, a nakon toga stavljen u vodenu kupelj na 85 °C kroz 1 sat kako bi se provela transesterifikacija masnih kiselina prisutnih u uzorku biomase. Nakon jednog sata u vodenoj kupelji kivete su ohlađene na sobnu temperaturu nakon čega je u ohlađeni uzorak dodan 1 mL heksana. Zatim je sadržaj kivete izmiješan na vibro-mješaču kako bi se provela ekstrakcija nastalih estera u heksansku fazu i ostavljen 1 sat na sobnoj temperaturi da se razdvoje faze. Uzorak od 400 μ L gornjeg sloja heksana otpipetiran je u vialu za plinsku kromatografiju te mu je dodano 5 μ L pentadekana (γ = 1 mg/mL ; interni standard 2), a viala je potom zatvorena s PTFE/silikonskim čepom. Ovako pripremljeni uzorak korišten je za analizu estera masnih kiselina na plinskom kromatografu s plameno-ionizacijskim detektorom. GC-FID analiza provedena je na plinskom kromatografu GC-2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan; Poglavlje 3.2.2.). 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 6.

Tablica 6. Parametri GC-FID metode za određivanje sastava i koncentracije estera masnih kiselina

Parametar	Uvjeti
Kolona	ZB-FAME (Zebron), 30 m · 0,25 mm, d _r 0,2 μ m
Detektor	FID
Plinski nosač/ protok	Helij / 1,2 mL/min
Temperaturni program	100 °C, 4 min 10 °C / min → 140 °C 3 °C / min → 190 °C 30 °C / min do 260 °C 260 °C, 2 min
Temperatura injektora	250 °C
Temperatura detektora	260 °C
Koeficijent razdjeljenja	1:15
Volumen injektiranja	2 μ L

Izračun ukupnih masnih kiselina provodi se prema formuli:

$$\text{Ukupni lipidi } C_{13 \text{ normal}} = \sum_{c4-c24} \frac{FAME \text{ } c_i}{FAME \text{ } c_{13}} \times c \text{ dodanog FAME } C_{13} \quad [2]$$

Izračun ukupnih masih kiselina kao postotak na suhu tvar biomase uzetog za esterifikaciju:

$$\% \text{ ukupni FAME} = \frac{\text{ukupni FAME } c_{13 \text{ normal}}}{\text{masa suhe tvari uzorka}} \times 100 \quad [3]$$

3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI UZGOJA

Za izračunavanje pokazatelja uspješnosti biotehnološkog procesa korištene su sljedeće jednadžbe:

Potrošnja supstrata (ΔS)

$$\Delta S = S_0 - S \quad [\text{g/L}] \quad [4]$$

S_0 - koncentracija supstrata na početku uzgoja

S - koncentracija supstrata na kraju uzgoja

Prinos produkta (Y_P)

$$Y_P = P_t - E_{t0} \quad [\text{g/L}] \quad [5]$$

P_{t0} - koncentracija produkta na početku uzgoja

P_t - koncentracija produkta na kraju uzgoja

Koeficijent konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$)

$$Y_{P/S} = \frac{P_t - P_{t0}}{S_0 - S} \quad [\text{g/g}] \quad [6]$$

Produktivnost proizvodnje produkta (Pr_P)

$$Pr_P = \frac{Y_P}{t_u} \quad [\text{g/Lh}] \quad [7]$$

t_u - ukupno vrijeme trajanja uzgoja

Efikasnost proizvodnje produkta (E_P)

$$E_P = \frac{Y_P (\text{eksperimentalni})}{Y_P (\text{teorijski})} \quad [\%] \quad [8]$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

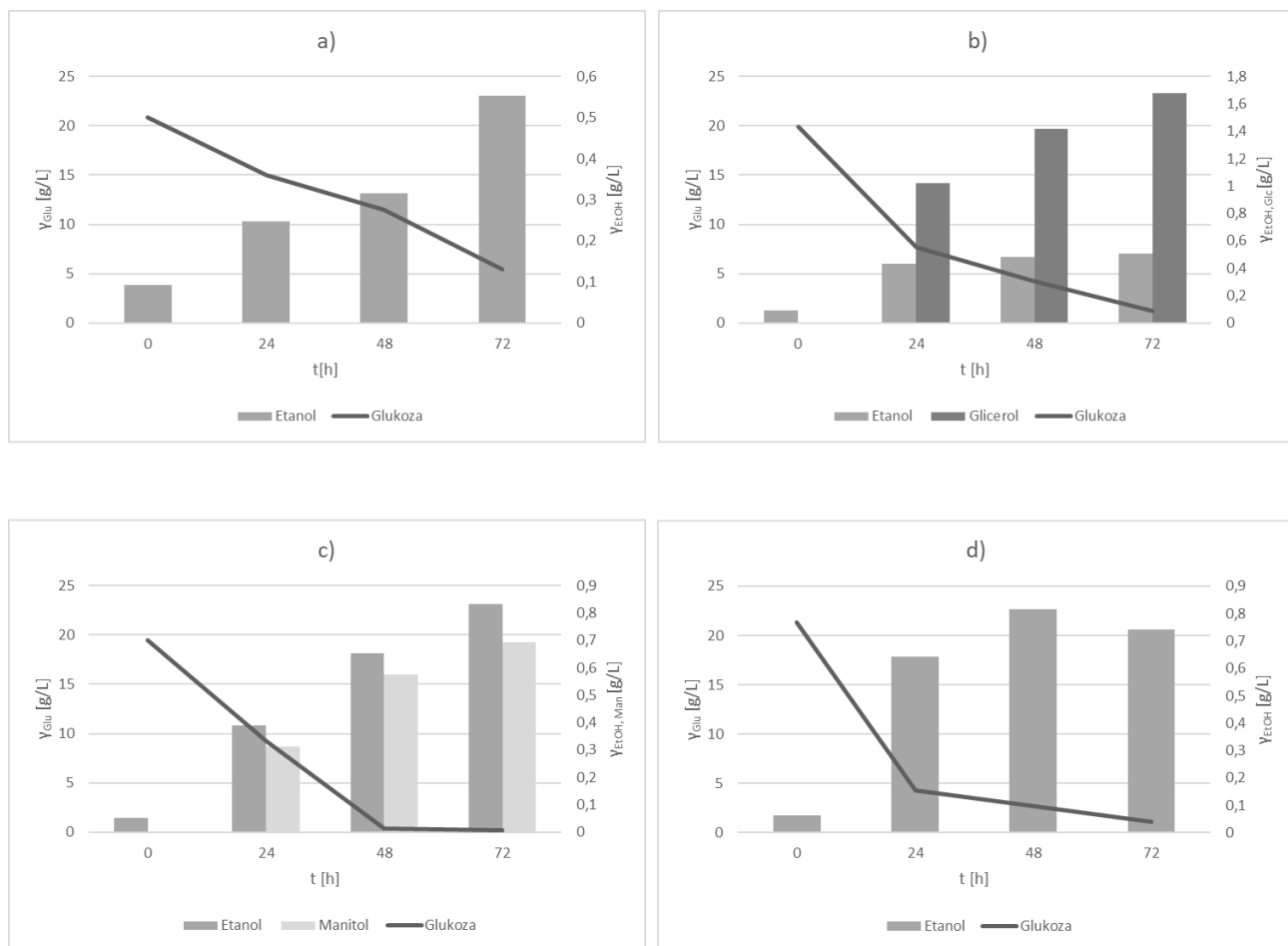
U ovom radu proveden je uzgoj plijesni *T. terrestris* CBS 45675, *B. dothidea* JCM 2738, *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107. U preliminarnim eksperimentima provedeni su uzgoji plijesni *T. terrestris* CBS 45675, *B. dothidea* JCM 2738, *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 u podlogama s različitim izvorima ugljika (glukoza, fruktoza, saharoza, ksiloza, celobioza i arabinoza) i dušika (KMP i CSL) s ciljem odabira plijesni s najboljom sposobnosti proizvodnje biokemikalija te kako bi se optimiranjem sastava podloge maksimizirao prinos biokemikalija. Nakon preliminarnog eksperimenta, kao radni mikroorganizam odabrana je plijesan *F. oxysporum* JCM 9293, kao izvor ugljika odabrane su glukoza, fruktoza i melasa, a kao izvor dušika kvašćev i mesni ekstrakt, pepton (KMP podloga) te kukuruzna močevina (CSL). Proveden je uzgoj plijesni *F. oxysporum* JCM 9293, na odabranim izvorima ugljika i dušika, na tresilici pri različitim brojevima okretaja (50, 100 i 200 o/min), kako bi se dodatno optimirao proces proizvodnje biokemikalija. Na kraju je proveden uzgoj *F. oxysporum* JCM 9293 u bioreaktoru s miješalom.

Rezultati ovog rada podijeljeni su u sljedeća poglavlja:

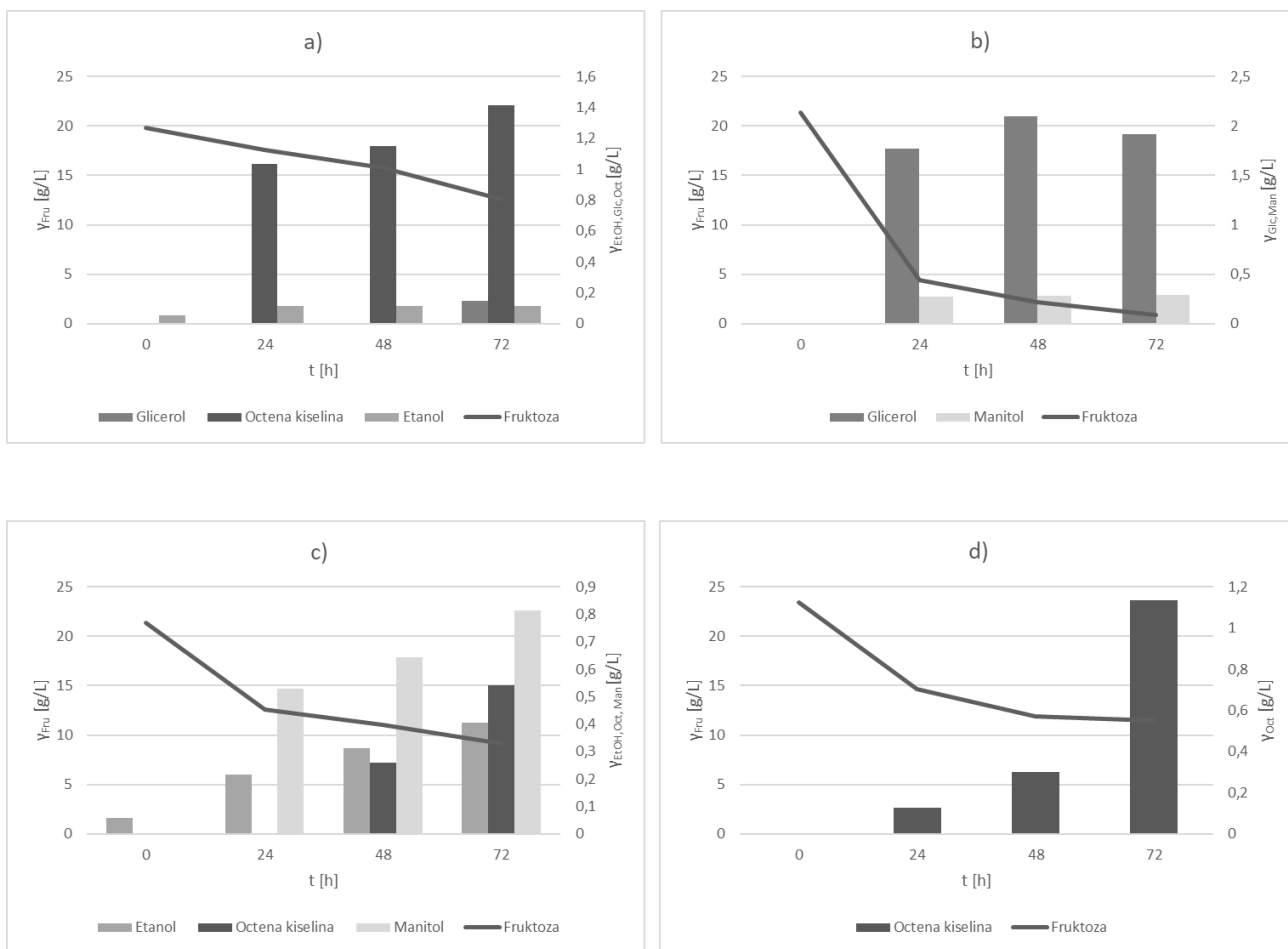
- 4.1. Određivanje utjecaja različitih izvora ugljika i dušika na proizvodnju biokemikalija s pomoću plijesni *T. terrestris* CBS 45675, *B. dothidea* JCM 2738, *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107
- 4.2. Uzgoj plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 na tresilici pri različitim brojevima okretaja
- 4.3. Uzgoj plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 u bioreaktoru s miješalom
- 4.4. Analiza sastava masnih kiselina u biomasi plijesni *F. oxysporum* JCM 9293

4.1. ODREĐIVANJE UTJECAJA RAZLIČITIH IZVORA UGLJIKA I DUŠIKA NA, PROIZVODNJU BIOKEMIKALIJA S POMOĆU PLIJESNI *T. terrestris* CBS 45675, *B. dothidea* JCM 2738, *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107

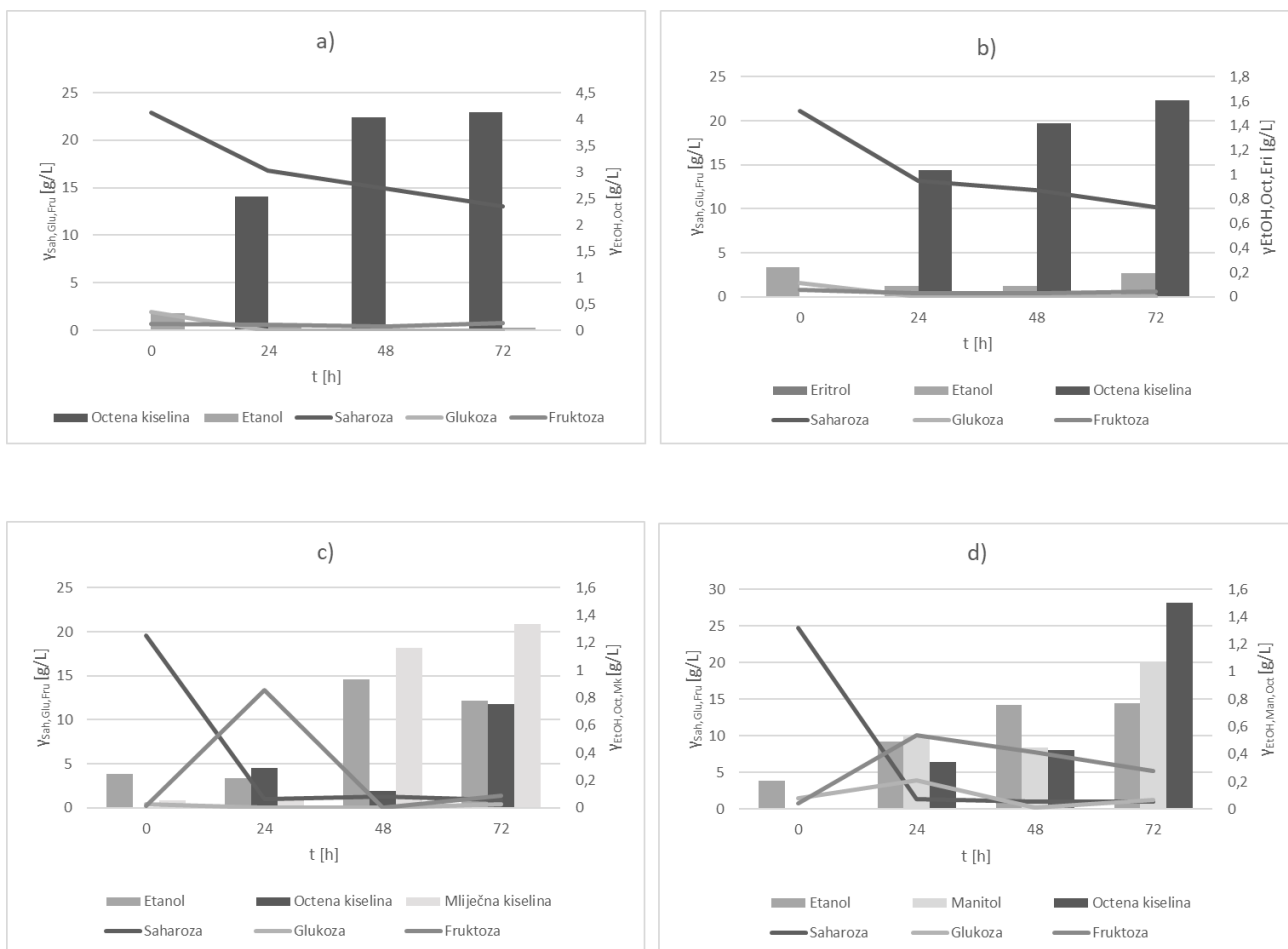
Uzgoj plijesni *T. terrestris* CBS 45675, *B. dothidea* JCM 2738, *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 proveden je u podlogama s različitim izvorima ugljika i dušika. Ispitani su utjecaji glukoze, fruktoze, saharoze, ksiloze, celobioze i arabinoze kao izvori ugljika te CSL i KMP kao izvori dušika, na proizvodnju različitih biokemikalija. Sastav podloga opisan je u poglavlju 3.1.4. Uzgoji su provedeni u kivetama s konusnim dnom volumena 50 mL, na tresilici pri 200 o/min i temperaturi uzgoja od 30 °C. Rezultati provedenog uzgoja prikazani su na slikama 1-5. Prikazani su rezultati uzgoja u kojima je proizvedena značajnija koncentracija biokemikalija (> 0,5 g/L).



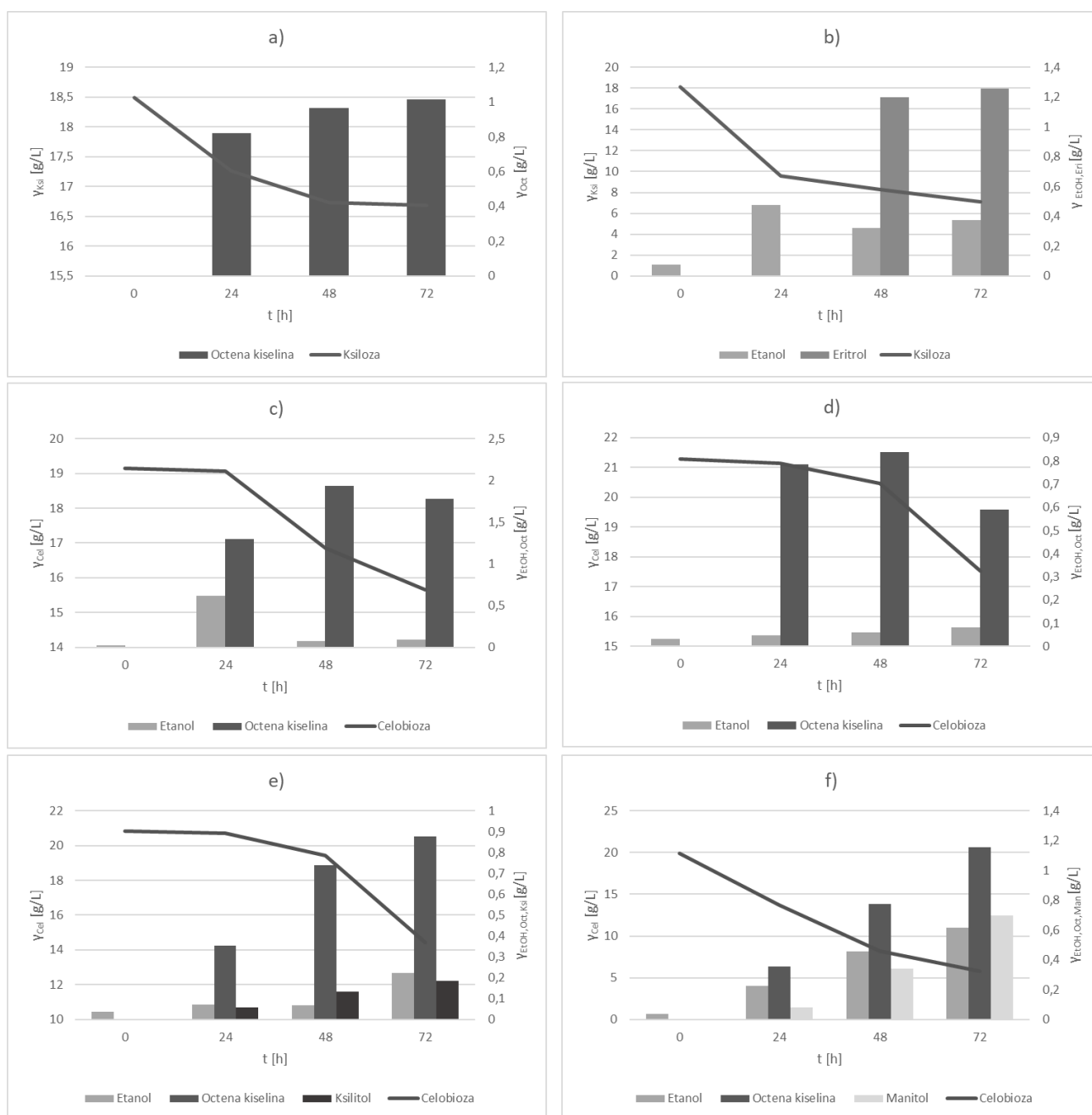
Slika 1. Promjena koncentracije supstrata i produkata tijekom uzgoja a) *T. terrestris* CBS 45675, b) *B. dothidea* JCM 2738, c) *F. oxysporum* JCM 9293 i d) *F. verticillioides* JCM 23107 u KMP podlogama s glukozom kao izvorom ugljika



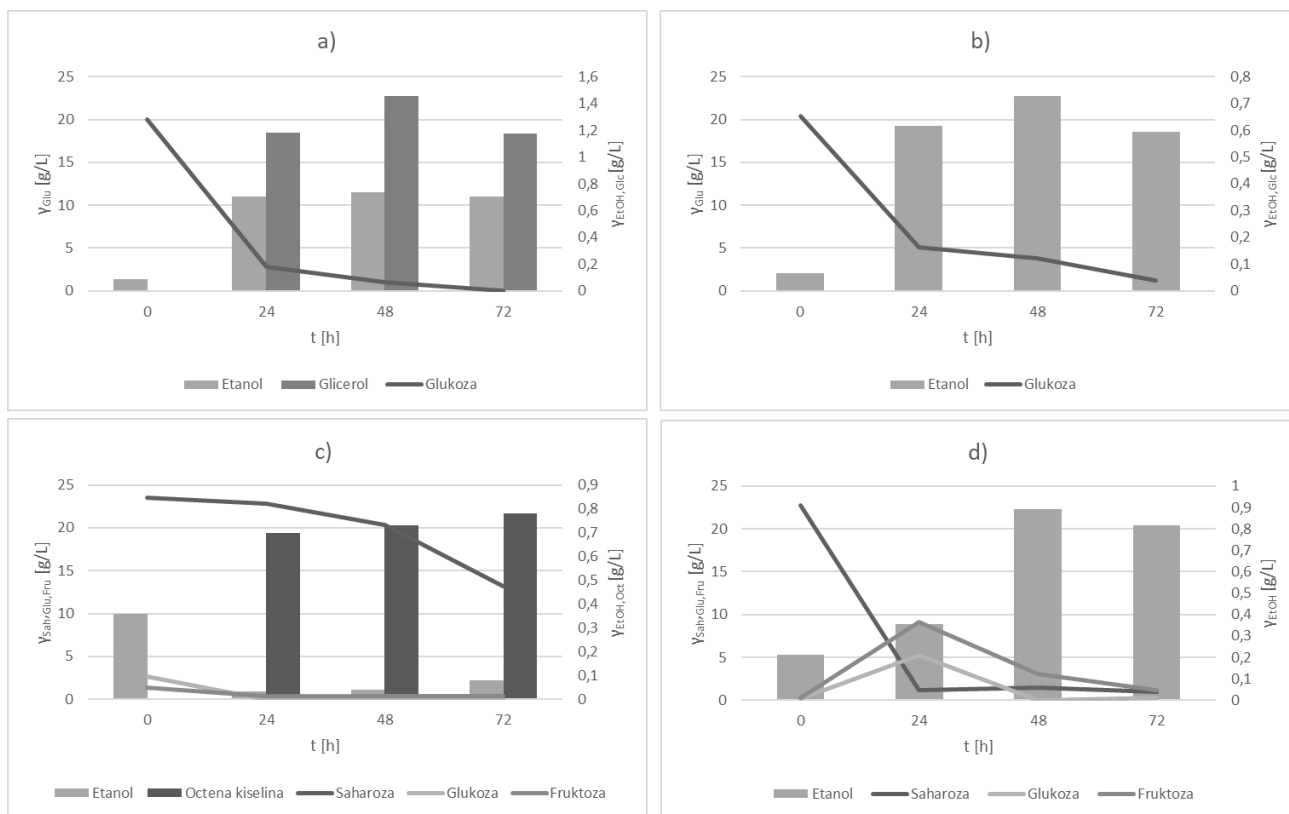
Slika 2. Promjena koncentracije supstrata i produkata tijekom uzgoja a) *T. terrestris* CBS 45675, b) *B. dothidea* JCM 2738, c) *F. oxysporum* JCM 9293 i d) *F. verticillioides* JCM 23107 u KMP podlogama s fruktozom kao izvorom ugljika



Slika 3. Promjena koncentracije supstrata i produkata tijekom uzgoja a) *T. terrestris* CBS 45675, b) *B. dothidea* JCM 2738, c) *F. oxysporum* JCM 9293 i d) *F. verticillioides* JCM 23107 u KMP podlogama sa saharozom kao izvorom ugljika



Slika 4. Promjena koncentracije supstrata i produkata tijekom uzgoja a) *T. terrestris* CBS 45675, b) *F. oxysporum* JCM 9293, c) *T. terrestris* CBS 45675, d) *B. dothidea* JCM 2738, e) *F. oxysporum* JCM 9293 i f) *F. verticillioides* JCM 23107 u KMP podlogama s ksilozom ili celobiozom kao izvorom ugljika



Slika 5. Promjena koncentracije supstrata i produkata tijekom uzgoja a) *B. dothidea* JCM 2738, b) *F. verticillioides* JCM 23107, c) *B. dothidea* JCM 2738 i d) *F. oxysporum* JCM 9293 u CSL podlogama s glukozom i saharozom kao izvorom ugljika

Usporedbom dobivenih rezultata može se vidjeti da su u KMP podlogama proizvedene biokemikalije (etanol, glicerol, octena i mliječna kiselina, manitol, ksilitol i eritrol) u većim koncentracijama nego u CSL podlogama (slike 1-5). U KMP podlogama *T. terrestris* CBS 45675 proizvela je etanol, glicerol i octenu kiselinu. Najveću koncentraciju etanola od 0,55 g/L proizvela je na glukozu kao izvoru ugljika, a najveću koncentraciju octene kiseline od 4,12 g/L proizvela je na saharozu kao izvoru ugljika. *T. terrestris* CBS 45675 proizvela je glicerol samo na podlozi s fruktozom kao izvorom ugljika u iznosu od 0,15 g/L. *B. dothidea* JCM 2738 je u KMP podlogama proizvela također etanol, glicerol i octenu kiselinu. Najveću koncentraciju etanola od 0,51 g/L proizvela je na glukozu kao izvoru ugljika, a najveću koncentraciju octene kiseline od 1,6 g/L proizvela je na saharozu kao izvoru ugljika. Najveću koncentraciju glicerola *B. dothidea* JCM 2738 proizvela je na fruktozi kao izvoru ugljika, što je ujedno i jedina biokemikalija koju je ova plijesan proizvela na podlozi s fruktozom. Plijesan *F. oxysporum* JCM 9293 je u KMP podlogama proizvela etanol, octenu kiselinu, mliječnu kiselinu, manitol, eritrol i ksilitol. Najveću koncentraciju etanola od 0,83 g/L proizvodi na glukozu kao izvoru ugljika,

najveću koncentraciju octene kiseline od 0,88 g/L proizvodi na celobiozi kao izvoru ugljika, a najveću koncentraciju manitola od 0,81 g/L na fruktozi kao izvoru ugljika. *F. oxysporum* JCM 9293 proizveo je mliječnu kiselinu, eritrol i ksilitol samo na jednom od izvora ugljika. Mliječnu kiselinu (1,33 g/L) proizveo je na saharozi, eritrol (1,26 g/L) na ksilozi, a ksilitol (0,18 g/L) na celobiozi kao izvoru ugljika. *F. verticillioides* JCM 23107 je u KMP podlogama proizveo etanol, octenu kiselinu i manitol. Najveće koncentracije svih navedenih biokemikalija proizvedene su na saharozi kao izvoru ugljika u iznosu od 0,77 g/L za etanol, 1,5 g/L za octenu kiselinu te 1,07 g/L za manitol. *F. verticillioides* JCM 23107 je uzgojem na ksilozi kao izvoru ugljika proizveo jedino etanol (0,27 g/L) jednako kao i na glukozi gdje ga je proizveo u malo većoj koncentraciji od 0,74 g/L. U radu Almeida i sur. (2013) autori izvještavaju o drugačijim rezultatima uzgoja ove plijesni na ksilozi i glukozi kao izvorima ugljika. Iako su koristili slične uvjete s jednakim količinama šećera (20 g/L), bilježili su veću proizvodnju etanola prilikom uzgoja na ksilozi (5,68 g/L), uz stvaranje malih količina octene kiseline i ksilitola. Također, primijetili su veću koncentraciju etanola prilikom uzgoja na glukozi (9,44 g/L). Ove razlike u rezultatima mogu proizaći iz različitih postavki eksperimenta ili ukazivati na prirodne varijacije u načinu na koji *F. verticillioides* metabolizira različite izvore ugljika. Plijesni proizvode biokemikalije u KMP podlogama na gotovo svim korištenim izvorima ugljika, osim na arabinozi, gdje plijesni nisu uopće metabolizirale ovaj šećer, te na ksilozi, gdje *B. dothidea* JCM 2738 nije proizvela niti jednu biokemikaliju. Panagiotou i sur. (2005) su istraživali različite uvjete uzgoja i njihov utjecaj na metabolizam plijesan *F. oxysporum* F3. U svom istraživanju su naveli kako *F. oxysporum* F3 nije proizvela niti jednu biokemikaliju prilikom rasta na arabinozi, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu. U svom radu McMillan i Boynton (1994) istraživali su metabolizam arabinoze kod različitih mikroorganizama, uključujući *Aspergillus oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Paecilomyces sp.*, *Rhizopus oryzae* i *Rhizopus formosaencii*. Kao izvor ugljika korištena je kombinacija arabinoze i ksiloze. Rezultati su pokazali da *R. oryzae*, *R. formosaencii* i *P. chrysogenum* nisu metabolizirale arabinozu. S druge strane, ostale plijesni su metabolizirale ksilozu brže od arabinoze, neovisno o tome je li došlo do istodobne ili redosljedne potrošnje ovih ugljikohidrata. Značajno je napomenuti da je jedino *A. oryzae* potpuno iscrpio arabinozu iz podloge, nakon što je potrošio ksilozu. Plijesni koje su koristile arabinozu proizvele su isključivo biomasu.

U CSL podlogama korištene plijesni su proizvele biokemikalije (etanol, glicerol, octena i mliječna kiselina, manitol, ksilitol i eritrol) u znatno manjim koncentracijama (slika 5). *T. terrestris* CBS 45675 proizvela je etanol, glicerol, octenu kiselinu, eritrol i mliječnu kiselinu.

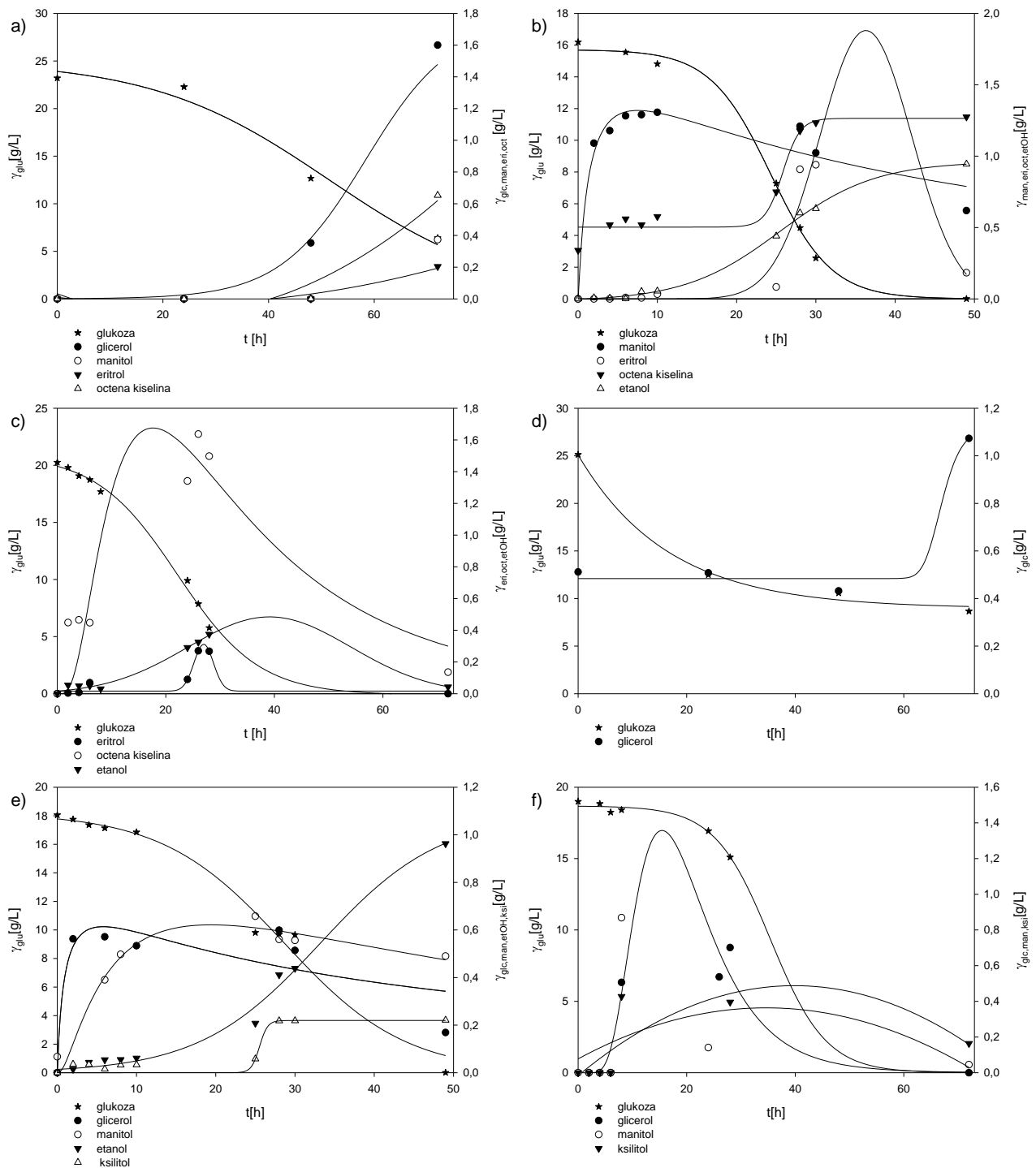
Najveće koncentracije etanola (0,16 g/L) i glicerola (0,25 g/L) proizvela je na glukozi kao izvoru ugljika. *T. terrestris* CBS 45675 proizvela je eritrol u iznosu od 0,12 g/L samo na saharozi kao izvoru ugljika, a mliječnu kiselinu koncentracije 0,44 g/L samo na arabinozi kao izvoru ugljika. Ova plijesan proizvela je octenu kiselinu najveće koncentracije od 0,34 g/L na celobiozi kao izvoru ugljika, a na podlogama sa fruktozom i ksilozom nije došlo do nastajanja biokemikalija. *B. dothidea* JCM 2738 je u CSL podlogama proizvela etanol, glicerol i octenu kiselinu. Najveće koncentracije etanola (0,71 g/L) i glicerola (1,17 g/L) proizvela je na glukozi kao izvoru ugljika. Octenu kiselinu koncentracije 0,78 g/L proizvela je samo na saharozi kao izvoru ugljika, dok na ksilozi, celobiozi i arabinozi nije proizvela biokemikalije. Uzgojem u CSL podlogama *F. oxysporum* JCM 9293 proizveo je etanol i manitol. Najveću koncentraciju etanola od 0,82 g/L ova plijesan proizvela je na saharozi kao izvoru ugljika, a najveću koncentraciju manitola u iznosu od 0,38 g/L na fruktozi kao izvoru ugljika. *F. oxysporum* JCM 9293 nije pokazao proizvodnju biokemikalija na podlozi s arabinozom kao izvorom ugljika. Plijesan *F. verticillioides* JCM 23107 je u CSL podlogama također proizvela etanol i manitol. Najveću koncentraciju etanola (0,59 g/L) proizvela je na glukozi kao izvoru ugljika, a najveću koncentraciju manitol (0,41 g/L) na celobiozi kao izvoru ugljika. Ova plijesan nije pokazala proizvodnju biokemikalija na podlozi s arabinozom kao izvorom ugljika. Korištenjem CSL-a kao izvor dušika dobivene su manje koncentracije biokemikalija u usporedbi s KMP podlogama te su glukoza i saharoza (slika 5) jedini izvori ugljika na kojima je došlo do proizvodnje biokemikalija u koncentracijama većim od 0,5 g/L.

Lu i sur. (2011) proveli su istraživanje o fermentacijskim karakteristikama plijesni *Mortierella alpina* na različitim izvorima dušika. U njihov istraživanju pokazalo se da je najveća stopa asimilacije dušika (75,2 %) postignuta kada se kao jedini izvor dušika koristio CSL. Međutim, iako je potrošnja dušika bila najveća, potrošnja glukoze bila je najmanja te je iznosila 37,3 %. S druge strane, kada je kvašćev ekstrakt korišten kao izvor dušika, glukoza je u potpunosti bila utrošena iz podloge tijekom fermentacije. Ako ove rezultate usporedimo s rezultatima dobivenim u ovome radu, može se uočiti da u podlogama sa CSL-om kao izvorom dušika, glukoza i ostali ugljikohidrati nisu u potpunosti utrošeni iz podloge te je postignuti manji prinos biokemikalija.

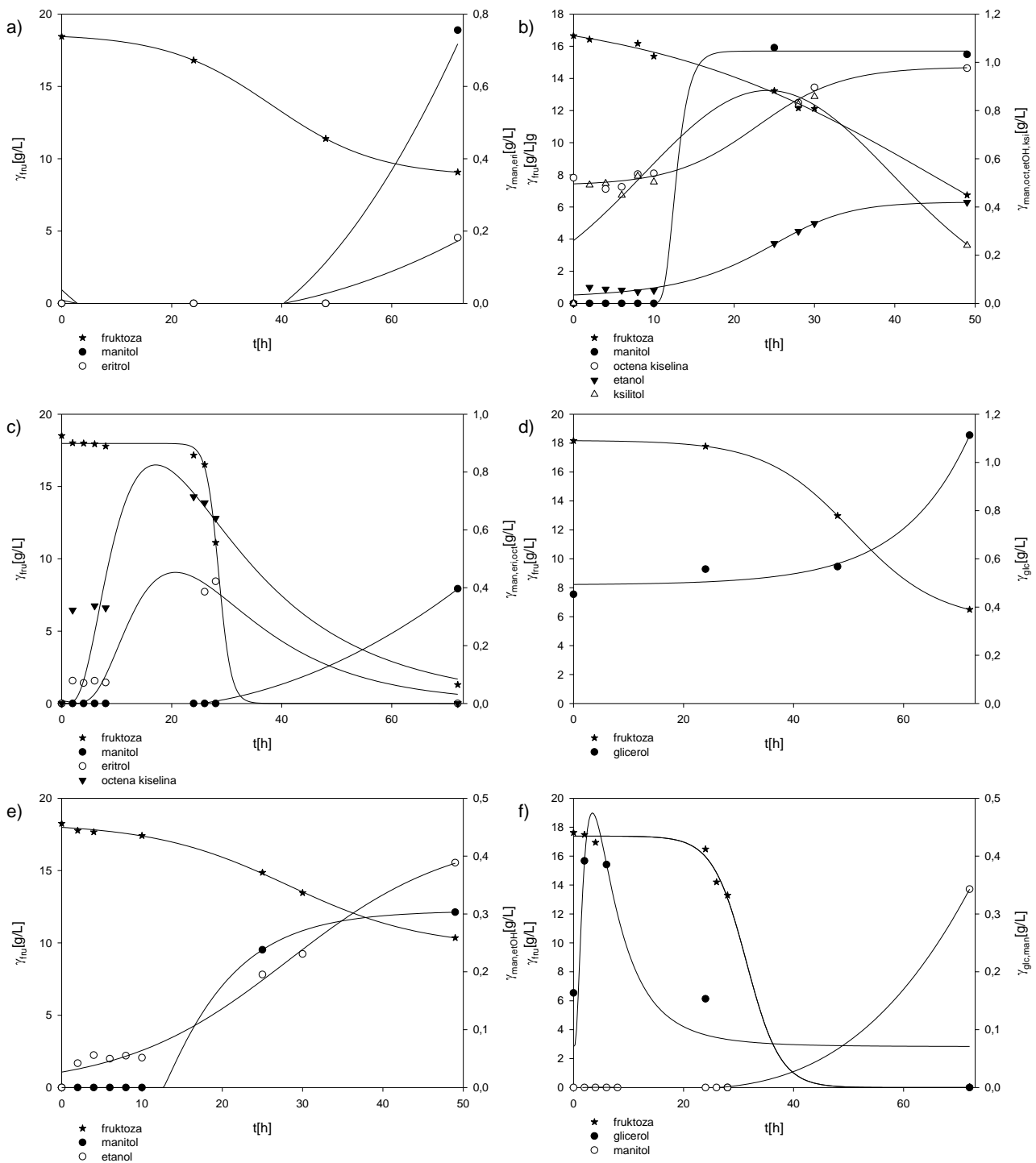
Za daljnje istaživanje kao radni mikroorganizam odabrana je plijesan *F. oxysporum* JCM 9293 jer je proizvela etanol, organske kiseline (mliječna i octena kiselina) te šećerne alkohole (manitol, eritrol i ksilitol). S obzirom da je jedan od ciljeva istraživanja bio ispitati proizvodnju biokemikalija na različitim ugljikohidratima, kao supstrati odabrani su jednostavni ugljikohidrati glukoza i fruktoza te sirovina melasa (saharoza) kao izvor ugljika. Za sljedeću fazu istraživanja korištene su i KMP i CSL podloge (tablica 4) kao bi se dalje pratio utjecaj različitih izvora dušika.

4.2. UZGOJ PLIJESNI *F. oxysporum* JCM 9293 NA TRESILICI PRI RAZLIČITIM BROJEVIMA OKRETAJA

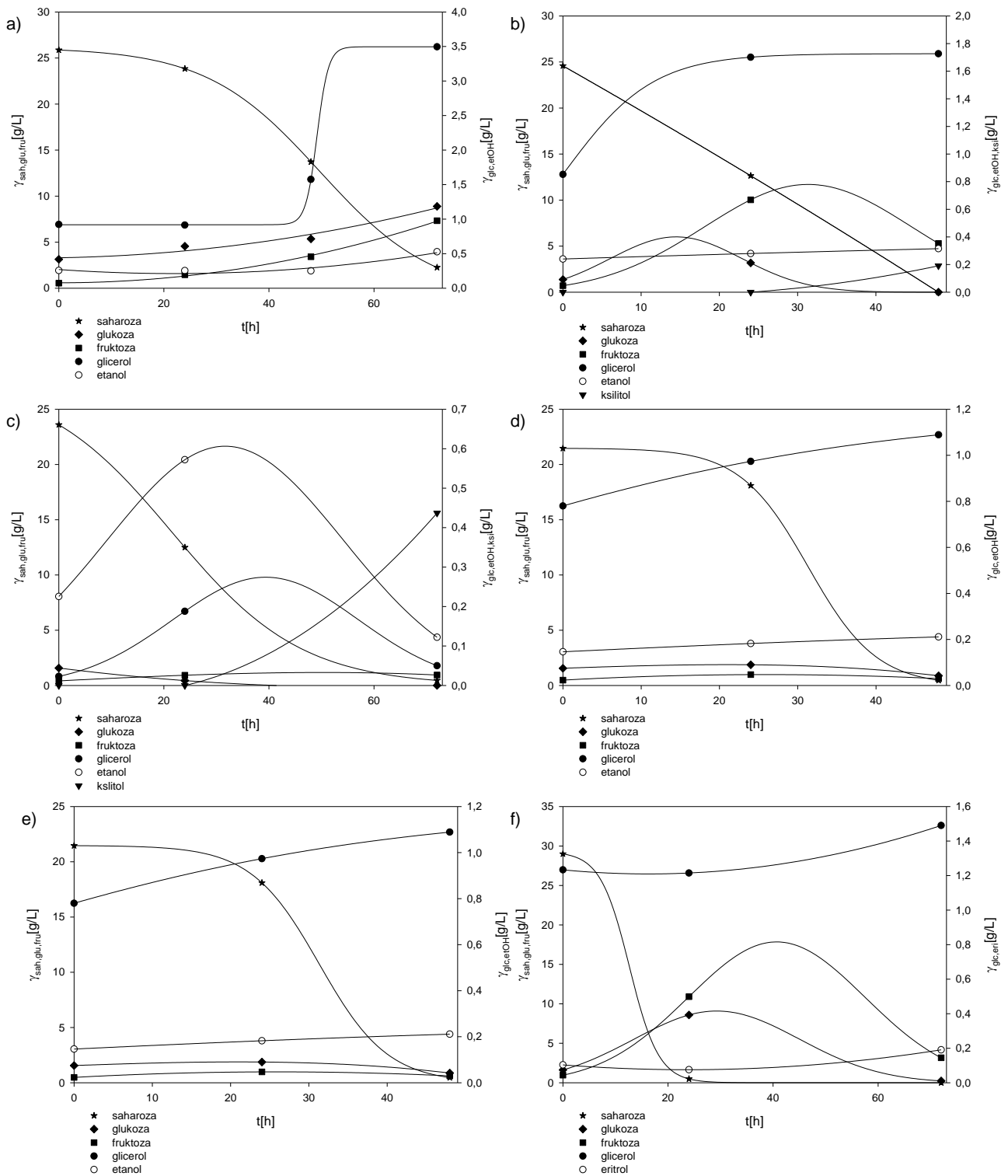
Na temelju rezultata preliminarnih uzgoja kao radni mikroorganizam za proizvodnju biokemikalija odabrana je plijesan *F. oxysporum* JCM 9293. Uzgoji ove plijesni provedeni su u KPM i CSL podlogama, dok su kao izvor ugljika u podloge dodane glukoza, fruktoza i melasa (saharoza). Uzgoji su provedeni na tresilici pri različitim brojevima okretaja (50, 100 i 200 o/min). Sastav podloga te koncentracije izvor ugljika opisane su u poglavlju 3.1.5. Uzgoji su provedeni u Erlenmeyer tikvicama s odbijačima vrtloga na temperaturi uzgoja od 30 °C. Rezultati provedenog uzgoja prikazani su na slikama 6-8, a izračunati parametri uspješnosti prikazani su u tablicama 8 i 9.



Slika 6. Promjena koncentracije supstrata i produkata tijekom uzgoja *F. oxysporum* JCM 9293 u KMP podlogama na tresilici pri a) 50 o/min, b) 100 o/min i c) 200 o/min te u CSL podlogama na tresilici pri d) 50 o/min, e) 100 o/min i f) 200 o/min sa glukozom kao izvorom ugljika



Slika 7. Promjena koncentracije supstrata i produkata tijekom uzgoja *F. oxysporum* JCM 9293 u KMP podlogama na tresilici pri a) 50 o/min, b) 100 o/min i c) 200 o/min te u CSL podlogama na tresilici pri d) 50 o/min, e) 100 o/min i f) 200 o/min sa fruktozom kao izvorom ugljika



Slika 8. Promjena koncentracije supstrata i produkata tijekom uzgoja *F. oxysporum* JCM 9293 u KMP podlogama na tresilici pri a) 50 o/min, b) 100 o/min i c) 200 o/min te u CSL podlogama na tresilici pri d) 50 o/min, e) 100 o/min i f) 200 o/min sa saharozom kao izvorom ugljika

Usporedbom rezultata uzgoja na KMP i CSL podlogama (slike 6-8) vidljivo je da *F. oxysporum* JCM 9293 uzgojem na KMP podlogama proizvodi više različitih biokemikalija (etanol, glicerol, manitol, eritrol, ksilitol i octenu kiselinu). Pri 50 o/min i glukozi kao izvoru ugljika *F. oxysporum* JCM 9293 u KMP podlozi u najvećoj koncentraciji proizvodi glicerol (1,6 g/L), dok u nižim koncentracijama proizvodi manitol, eritrol i octenu kiselinu (slika 6). Pri istom broju okretaja i fruktozi kao izvoru ugljika u KMP podlozi nastaju manitol (0,756 g/L) i eritrol (0,181 g/L; slika 7). Također, pri saharozi kao izvoru ugljika, u najvećoj koncentracije nastaje glicerol (3,50 g/L), uz male koncentracije etanola. S povećanjem broja okretaja na 100 u minuti u KPM podlozi s glukozom kao glavnom izvoru ugljika *F. oxysporum* JCM 9293 proizvodi etanol, manitol, eritrol te u najvećoj koncentraciji octenu kiselinu (1,275 g/L). Metaboliziranjem fruktoze pri istom brojem okretaja ova plijesan proizvodi iste biokemikalije kao i na glukozi, uz maksimalne određene koncentracije manitola i octene kiseline od 1,05 g/L i 0,98 g/L. U istim uvjetima, ali sa saharozom kao izvorom ugljika u KPM podlozi, u najvećoj koncentraciji nastaje glicerol (1,726 g/L) uz etanol i ksilitol. U uzgojima provedenim pri 200 o/min većina biokemikalija na kraju uzgoja nastaje u manjim koncentracijama. Niski prinos biokemikalija vjerojatno je posljedica intenzivne aeracije, značajnijeg rasta biomase (tablica 7) i potrošnje nastalih produkata nakon iscrpljivanja supstrata (glukoza, fruktoza, saharoza) iz podloge. Smanjenje koncentracije na kraju uzgoja može se pripisati sposobnosti *F. oxysporum* JCM 9293 da koristi biokemikalije kao izvor ugljika kada se iz podloge iscrpi primarni izvor ugljika, kako je pokazano u radu Suihko (1983), u kojem je ta sposobnost potvrđena za ksilitol i manitol. Naime, Suihko (1983) je ispitivao rast i proizvodnju etanola plijesni *Fusarium oxysporum* VTT-D-80134 na 20 različitih izvora ugljika uključujući ksilitol i manitol. Rezultati njegovog istraživanja pokazuju da ova plijesan može metabolizirati navedene šećerne alkohole te iz njih proizvesti etanol. Prema rezultatima na slikama 6-8 može se uočiti da se koncentracija dobivenih biokemikalija u većini slučajeva smanjuje povećanjem broja okretaja tresilice. Povećanjem broja okretaja tresilice povećava se i dobava kisika stanicama te takvi uvjeti odgovaraju rastu biomase, dok uvjeti limitacije kisikom odgovaraju proizvodnji biokemikalija (Panagiotou i sur., 2005). Pri 200 o/min uzgojem u KMP podlozi s glukozom kao izvorom ugljika, *F. oxysporum* JCM 9293 proizvodi eritrol, octenu kiselinu i etanol. Na kraju uzgoja eritrol nije detektiran u podlozi, a koncentracije octene kiseline i etanola su iznosile 0,14 g/L i 0,04 g/L. Uzgojem plijesni na fruktozi primjećuje se da koncentracije octene kiseline i eritrola, nakon postignutih maksimalnih koncentracija od 0,71 g/L odnosno 0,42 g/L, počinju padati, dok koncentracija manitola do kraja uzgoja raste na 0,4 g/L. Pri istom broju okretaja i saharozi

kao izvoru ugljika, nastaju glicerol i etanol, koji su do kraja uzgoja gotovo u potpunosti potrošeni, te ksilitol čija koncentracija na kraju uzgoja iznosi 0,45 g/L.

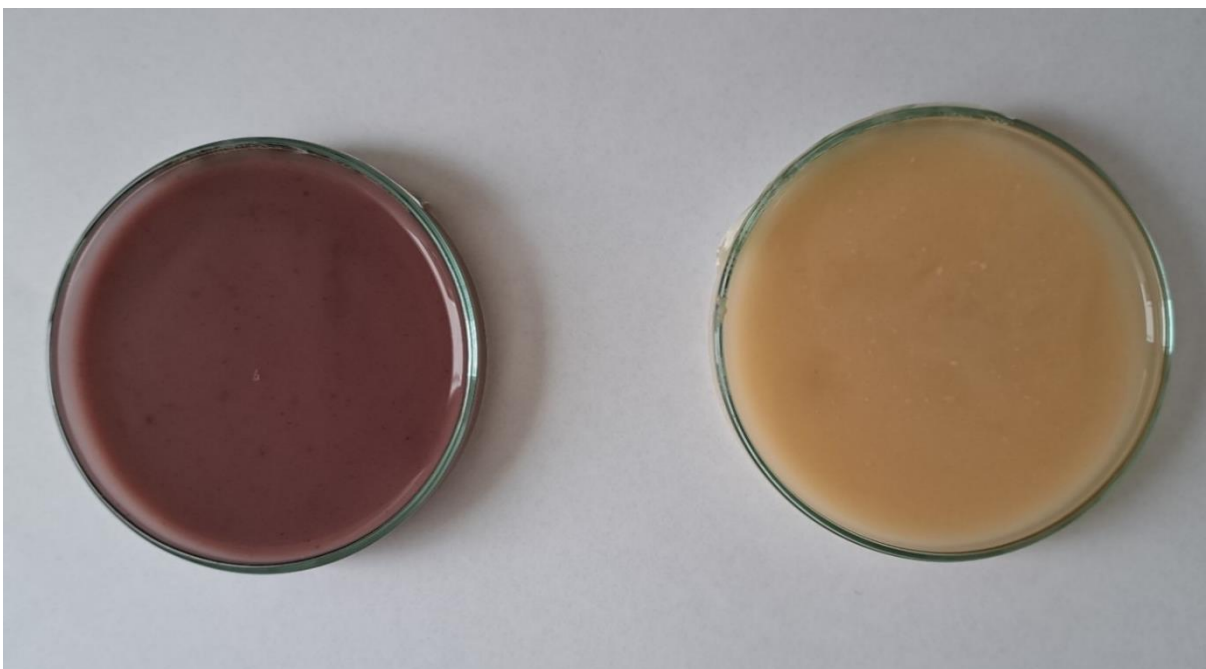
Pri 50 o/min i glukozi kao izvoru ugljika *F. oxysporum* JCM 9293 u CSL podlozi proizvodi isključivo glicerol u koncentraciji od 1,07 g/L (slika 6). Pri istom broju okretaja i fruktozi kao izvoru ugljika u CSL podlozi također nastaje samo glicerol u iznosu od 1,11 g/L. Nadalje, kada se kao izvor ugljika koristila saharoza, *F. oxysporum* JCM 9293 u najvećoj koncentraciji proizvodi glicerol (2,54 g/L), dok u nižim koncentracijama proizvodi eritrol i etanol. S povećanjem broja okretaja na 100 u minuti u CSL podlozi s glukozom kao glavnom izvoru ugljika *F. oxysporum* JCM 9293 proizvodi manitol, ksilitol i glicerol te u najvećoj koncentraciji etanol (0,96 g/L). Metaboliziranjem fruktoze pri istom brojem okretaja ova plijesan proizvodi manitol i etanol, pri čemu je etanol proizveden u većoj koncentraciji (0,39 g/L). U istim uvjetima, ali sa saharozom kao izvorom ugljika u CSL podlozi, u najvećoj koncentraciji nastaje glicerol (1,09 g/L) uz manje koncentracije manitola. U uzgojima provedenim pri 200 o/min kod većine biokemikalija na kraju uzgoja dolazi do smanjenja koncentracija, što se može pripisati sposobnosti *F. oxysporum* JCM 9293 da koristi biokemikalije kao izvor ugljika kada se iz podloge iscrpi primarni izvor ugljika, kako je pokazano u radu Suihko (1983), u kojem je ta sposobnost potvrđena za ksilitol i manitol. Pri 200 o/min uzgojem u CSL podlozi s glukozom kao izvorom ugljika, *F. oxysporum* JCM 9293 proizvodi manitol, ksilitol i glicerol, čije koncentracije na kraju uzgoja iznose 0,05 g/L i 0,16 g/L, dok glicerol nije detektiran. Uzgojem plijesni na fruktozi primjećuje se da koncentracija glicerola, nakon postignutih 6 sati uzgoja i 0,39 g/L koncentracije, počinje padati, dok koncentracija manitola do kraja uzgoja raste na 0,34 g/L. Pri istom broju okretaja i saharozi kao izvoru ugljika, nastaju eritrol i glicerol u koncentracijama od 0,19 g/L odnosno 1,49 g/L.

Suihko i sur. (1983) u svome radu izvještavaju o proizvodnji etanola na različitim supstratima pomoću plijesni *F. oxysporum* VTT-D-80134. Uzgoj je proveden u Erlenmeyer tikvicama pri 200 o/min i s kvašćevim ekstraktom kao izvorom dušika. Rezultati njihovog eksperimenta pokazuju proizvodnju etanola od 0,23 g/L prilikom korištenja saharoze kao izvora ugljika. Vrlo slični rezultati dobiveni su i u ovom istraživanju, gdje je korišten isti supstrat i broj okretaja tresilice, rezultirajući u proizvodnji od 0,12 g/L etanola na kraju proizvodnje, odnosno maksimalnom iznosu od 0,57 g/L etanola u 24. satu uzgoja, koji se smanjivao uslijed potrošnje supstrata i konzumacije etanola kao izvora ugljika od strane *F. oxysporum* JCM 9293.

Tijekom uzgoja plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 u podlogama s fruktozom na KMP i CSL-u kao izvoru dušika te glukozom na CSL-u kao izvoru dušika pri 200 o/min, uočeno je nastajanje ljubičaste boje (slike 9-10). Podloga je ujedno poprimila i miris po jagodama, ali hlapive organske komponente supernatanta nisu određene. Santos i sur. (2020) istraživali su različite uvjete uzgoja *F. oxysporum* CCT7620 i njihov utjecaj na proizvodnju bikaverina. Njihovo istraživanje pokazalo je da je broj okretaja izravno povezan s koncentracijom bikaverina, točnije da se povećanjem broja okretaja povećava koncentracija bikaverina. Najveću koncentraciju bikaverina od 0,293 g/L dobili su uzgojem *F. oxysporum* CCT7620 na 289 o/min. Također, prilikom uzgoja pri brzinama okretaja manjim od 100 o/min, nisu uočili nastajanje bikaverina.



Slika 9. CSL podloge sa fruktozom (lijevo) i glukozom (desno) u kojima je uočeno nastajanje pigmenta nakon uzgoja plijesni *F. oxysporum* JCM 9293



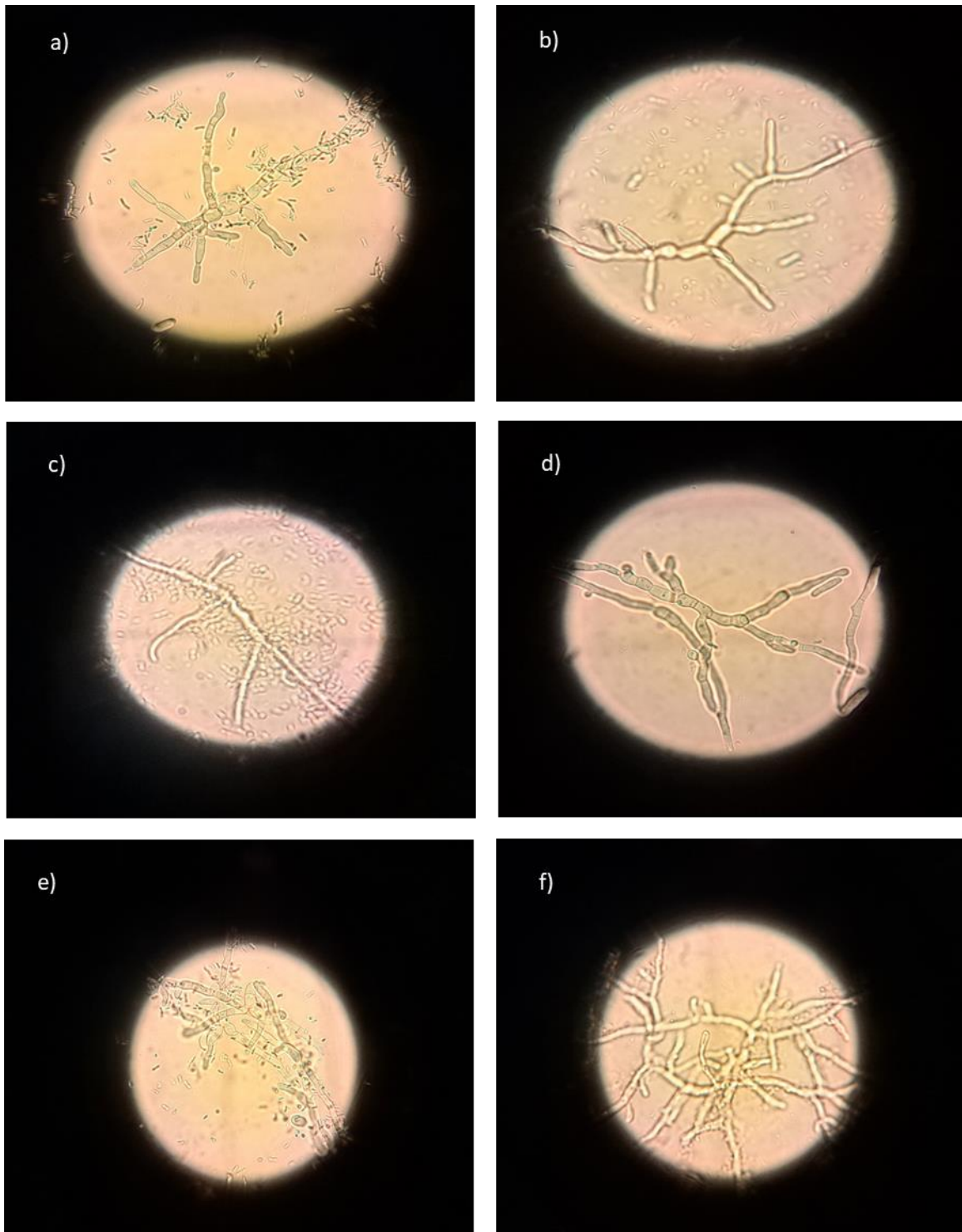
Slika 10. KMP podloge sa fruktozom (lijevo) u kojoj je uočeno nastajanje pigmenta i KMP podloga sa glukozom (desno) nakon uzgoja plijesni *F. oxysporum* JCM 9293

Na kraju uzgoja u tikvicama s odbijačima vrtloga, iz prevrelih podloga centrifugiranjem je izolirana biomasa plijesni *F. oxysporum* JCM 9293. Uvidom u tablicu 7 može se primijetiti da s povećanjem broja okretaja dolazi do povećanja mase nastale biomase. Uzgojem u KMP podlozi pri 50 o/min s glukozom nastaje 1,284 g/L biomase, pri 100 o/min 1,343 g/L biomase te pri 200 o/min nastaje 3,491 g/L biomase. Povećanje nastale biomase s povećanjem broja okretaja primjećuje se u svim KMP podlogama na svim izvorima ugljika, a najveća koncentracija biomase (5,660 g/L) nastala je u podlozi sa saharozom pri 200 o/min. Količina nastale biomase povećava se s većim brojevima okretaja i u CSL podlogama na svim izvorima ugljika. Na primjer, na saharozu je pri 50 o/min nastalo 2,733 g/L biomase, pri 100 o/min 3,092 g/L biomase te pri 200 o/min 3,887 g/L biomase. Najveća koncentracija biomase dobivena u ovom eksperimentu nastala je pri 200 o/min u CSL podlozi s glukozom kao izvorom ugljika i iznosila je 5,72 g/L. Da Silva i suradnici (2001) istraživali su proizvodnju biomase *F. oxysporum* na različitim izvorima dušika. U podlozi koja je kao izvor dušika sadržavala 10 g/L peptona, a kao izvor ugljika 20 g/L glukoze, pri 200 o/min nastalo je 11 g/L biomase. Koncentracija biomase dobivena u radu (2001) gotovo je tri puta veća od koncentracije biomase dobivene u ovome radu (3,491 g/L) na KMP podlozi, ali je manja od maksimalne dobivene koncentracije na CSL podlozi.

Tablica 7. Masa nastale biomase plijesni *Fusarium oxysporum* JCM 9293 nakon uzgoja u tikvicama s odbijačima i u bioreaktoru

HRANJIVA PODLOGA	Broj okretaja (o/min)	Izvor ugljika	Masa biomase (g)	Koncentracija biomase (g/L)
KMP PODLOGA	50	Glukoza	0,3852	1,284
		Fruktoza	0,6916	2,305
		Saharoza	0,7198	2,399
	100	Glukoza	0,4028	1,343
		Fruktoza	0,8363	2,788
		Saharoza	0,8230	2,743
	200	Glukoza	1,0473	3,491
		Fruktoza	1,1415	3,805
		Saharoza	1,6981	5,660
		Saharoza (Bioreaktor)	7,6852	5,123
CSL PODLOGA	50	Glukoza	0,2402	0,801
		Fruktoza	0,0200	0,067
		Saharoza	0,8200	2,733
	100	Glukoza	0,4179	1,393
		Fruktoza	0,3746	1,249
		Saharoza	0,9277	3,092
	200	Glukoza	1,7172	5,724
		Fruktoza	1,1660	3,887
		Saharoza	1,1163	3,721

Dodatno, tijekom uzgoja plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 pri brzini okretaja od 200 o/min, uzeti su uzorci iz svake podloge i pripremljeni mikroskopski preparati radi proučavanja rasta plijesni. Primijećen je dimorfizam, što znači da *F. oxysporum* JCM 9293 posjeduje sposobnost rasta u obliku kvasaca (sferične stanice) i u obliku micelija (nitaste stanice). Mikroskopski preparati prikazani su na slici 11. Na svim ispitivanim podlogama, plijesan pokazuje rast i u obliku kvasca i u obliku micelija, osim na CSL podlozi s glukozom kao izvorom ugljika (slika 11.d), gdje pretežito raste u obliku micelija.



Slika 11. Mikroskopski preparati *F. oxysporum* JCM 9293 pri rastu na 200 o/min na; a) KMP podlozi sa glukozom; b) KMP podlozi sa fruktozom; c) KMP podlozi sa saharozom; d) CSL podlozi sa glukozom; e) CSL podlozi sa fruktozom; f) CSL podlozi sa saharozom

Tablica 8. Pokazatelji uspješnosti procesa pri uzgoju plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 na KMP podlogama pri različitim brojevima okretaja

Br. okretaja (o/min)	50			100			200		
	Glu	Fru	Sah	Glu	Fru	Sah	Glu	Fru	Sah
Y _{EtOH/S} (g/g)	-	-	0,012	0,058	0,0423	0,003	0,002	-	-
Y _{EtOH/S} max. (g/g)	-	-	-	-	0	-	0,0185	-	0,015
Y _{Glc/S} (g/g)	0,095	-	0,109	-	-	0,035	-	-	-
Y _{Glc/S} max. (g/g)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,008
Y _{Man/S} (g/g)	0,022	0,081	-	0,038	0,104	-	-	0,023	-
Y _{Man/S} max. (g/g)	-	-	-	0,081	0,107	-	-	-	-
Y _{Eri/S} (g/g)	0,012	0,019	-	0,011	-	-	-	-	-
Y _{Eri/S} max. (g/g)	-	-	-	-	-	-	0,013	0,025	-
Y _{Oct/S} (g/g)	0,0388	-	-	0,0577	0,046	-	0,007	-	-
Y _{Oct/S} max. (g/g)	-	-	-	-	-	-	0,081	0,0415	-
Y _{Ksi/S} (g/g)	-	-	-	-	0,024	0,078	-	-	0,019
Y _{Ksi/S} max. (g/g)	-	-	-	-	0,087	-	-	-	-
Pr _{EtOH} (g/Lh)	-	-	0,004	0,019	0,009	0,002	0,001	-	-
Pr _{EtOH} max. (g/Lh)	-	-	-	-	-	-	0,005	-	0,005
Pr _{Glc} (g/Lh)	0,022	-	0,036	-	-	0,018	-	-	-
Pr _{Glc} max. (g/Lh)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,003
Pr _{Man} (g/Lh)	0,005	0,011	-	0,013	0,021	-	-	0,006	-
Pr _{Man} max. (g/Lh)	-	-	-	0,027	0,022	-	-	-	-
Pr _{Eri} (g/Lh)	0,003	0,003	-	0,004	-	-	-	-	-
Pr _{Eri} max. (g/Lh)	-	-	-	-	-	-	0,004	0,006	-
Pr _{Oct} (g/Lh)	0,009	-	-	0,019	0,009	-	0,002	-	-
Pr _{Oct} max. (g/Lh)	-	-	-	-	-	-	0,023	0,010	-
Pr _{Ksi} (g/Lh)	-	-	-	-	0,005	0,004	-	-	0,006
Pr _{Ksi} max. (g/Lh)	-	-	-	-	0,018	-	-	-	-
E _{EtOH} (%)	-	-	2,139	11,408	8,270	0,565	0,409	-	-
E _{EtOH} max. (%)	-	-	-	-	-	-	3,618	-	2,784
E _{Glc} (%)	10,872	-	11,818	-	-	3,854	-	-	-
E _{Glc} max. (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,881
E _{Man} (%)	2,198	7,965	-	3,780	10,303	-	-	2,277	-
E _{Man} max. (%)	0	-	-	7,980	10,580	-	-	-	-
E _{Eri} (%)	1,194	1,903	-	1,112	-	-	-	-	-
E _{Eri} max. (%)	-	-	-	-	-	-	1,311	2,411	-
E _{Oct} (%)	3,884	-	-	5,776	4,585	-	0,669	-	-
E _{Oct} max. (%)	-	-	-	-	-	-	8,082	4,150	-
E _{Ksi} (%)	-	-	-	-	2,636	0,800	-	-	1,947
E _{Ksi} max. (%)	-	-	-	-	9,397	-	-	-	-

Tablica 9. Pokazatelji uspješnosti procesa pri uzgoju plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 na CSL podlogama pri različitim brojevima okretaja

Br. okretaja (o/min)	50			100			200		
	Glu	Fru	Sah	Glu	Fru	Sah	Glu	Fru	Sah
$Y_{EtOH/S}$ (g/g)	-	-	0,016	0,053	0,049	0,003	-	-	-
$Y_{Glc/S}$ (g/g)	0,034	0,057	0,099	0,009	-	0,015	-	-	0,009
$Y_{Glc/S}$ max. (g/g)	-	-	-	0,033	-	-	0,028	0,013	-
$Y_{Man/S}$ (g/g)	-	-	-	0,023	0,038	-	0,002	0,020	-
$Y_{Man/S}$ max. (g/g)	-	-	-	0,033	-	-	0,046	-	-
$Y_{Eri/S}$ (g/g)	-	-	0,009	-	-	-	-	-	0,003
$Y_{Ksi/S}$ (g/g)	-	-	-	0,012	-	-	0,009	-	-
Pr_{EtOH} (g/Lh)	-	-	0,003	0,020	0,008	0,001	-	-	-
Pr_{Glc} (g/Lh)	0,008	0,009	0,020	0,003	-	0,006	-	-	0,003
Pr_{Glc} max.(g/Lh)	-	-	-	0,012	-	-	0,007	0,003	-
Pr_{Man} (g/Lh)	-	-	-	0,009	0,006	-	0,001	0,005	-
Pr_{Man} max.(g/Lh)	-	-	-	0,012	-	-	0,012	-	-
Pr_{Eri} (g/Lh)	-	-	0,002	-	-	-	-	-	0,001
Pr_{Ksi} (g/Lh)	-	-	-	0,005	-	-	0,002	-	-
Pr_{Ksi} max.(g/Lh)	-	-	-	-	-	-	0,006	-	-
E_{EtOH} (°°)	-	-	2,891	10,436	9,621	0,573	-	-	-
E_{Glc} (%)	3,894	6,453	10,721	1,068	-	1,596	-	-	0,961
E_{Glc} max. (%)	-	-	-	3,789	-	-	3,225	1,482	-
E_{Man} (%)	-	-	-	2,316	3,792	-	0,235	1,929	-
E_{Man} max. (%)	-	-	-	3,235	-	-	4,521	-	-
E_{Eri} (%)	-	-	0,956	-	-	-	-	-	0,317
E_{Ksi} (%)	-	-	-	1,328	-	-	0,936	-	-
E_{Ksi} max. (%)	-	-	-	-	-	-	2,441	-	-

Prema parametrima uspješnosti prikazanim u tablici 8 možemo vidjeti da su dobivene relativno niske vrijednosti koeficijenta konverzije. Najveći koeficijent konverzije od 0,109 g/g dobiven je za glicerol prilikom rasta na glukozi i brzini okretaja od 50 o/min, što čini efikasnost od 11,818 % i produktivnost od 0,036 g/Lh. Pri uzgoju plijesni na fruktozi i brzini okretaja od 100 o/min, konačni koeficijent konverzije fruktoze u manitol iznosi 0,104 g/g, pri čemu su produktivnosti i efikasnost 0,021 g/Lh odnosno 10,303 %. U istim uvjetima manitol u najvećoj koncentraciji nastaje u 25 h uzgoja te mu maksimalna konverzija fruktoze u manitol iznosi 0,107 g/g, efikasnost procesa proizvodnje manitola 10,38 %, te produktivnost od 0,022 g/Lh. Ostali parametri uspješnosti prikazani su u tablici 8.

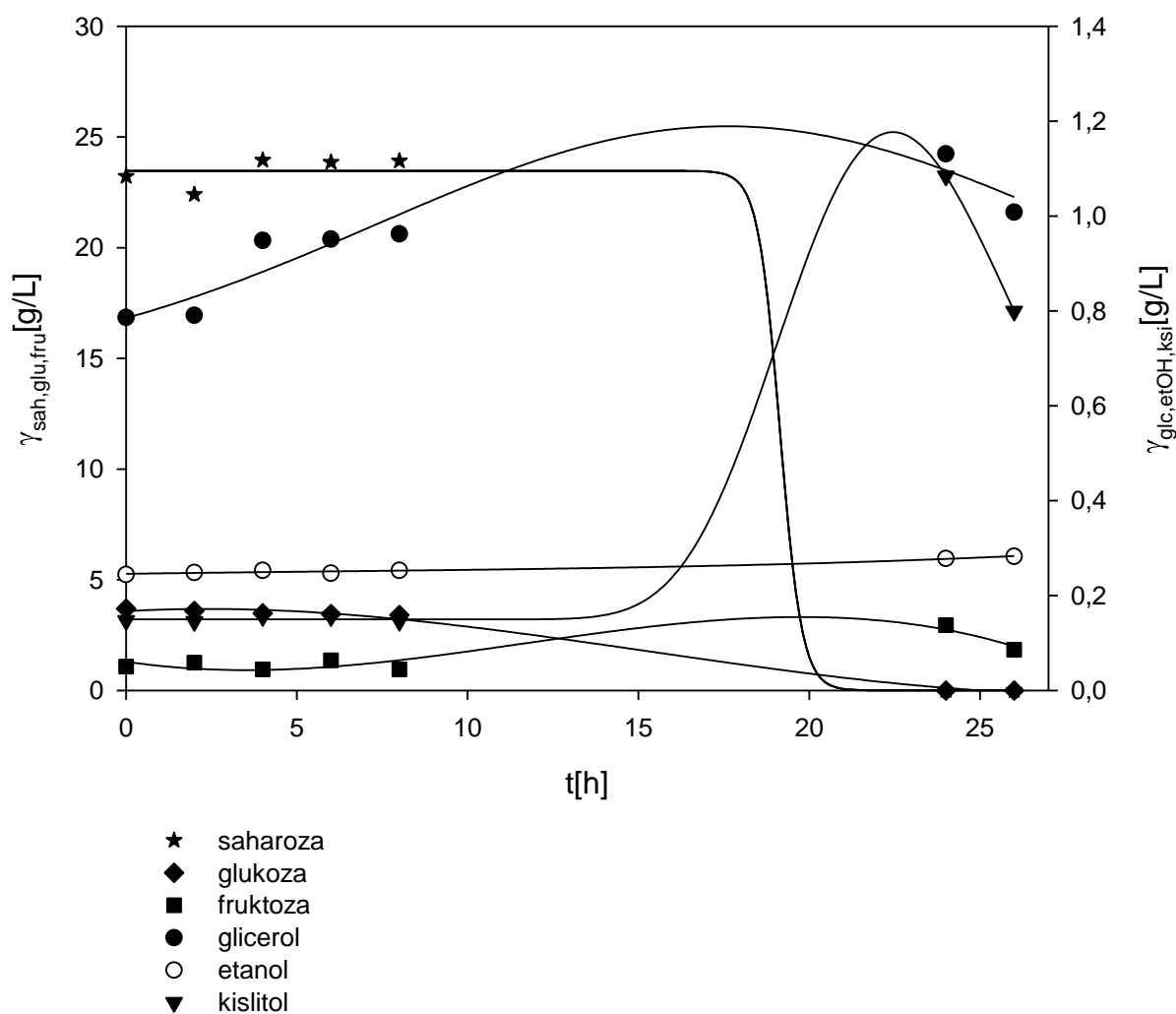
Prema parametrima uspješnosti navedenim u tablici 9, može se vidjeti da je uzgojem *F. oxysporum* JCM 9293 u podlozi s CSL-om, najveći koeficijent konverzije saharoze u glicerol od 0,099 g/g dobiven pri 50 o/min pri čemu su produktivnost i efikasnost iznosile 0,02 g/Lh odnosno 10,721 %. Ove vrijednosti su ujedno i najveće vrijednosti produktivnosti i efikasnosti procesa pri uzgoju na CSL podlogama, uz produktivnost etanola na glukozi pri 100 o/min koja također iznosi 0,02 g/Lh.

Uzgoj pri 50 o/min pokazao je proizvodnju biokemikalija u najvećim koncentracijama, međutim pri većim brojevima okretaja nastaje više različitih biokemikalije nego što nastaje pri 50 o/min. Etanol je jedina biokemikalija koja je detektirana u svim korištenim podlogama pri svim izvorima ugljika, s najvećom koncentracijom od 0,96 g/L na CSL podlozi s glukozom kao izvorom ugljika pri 100 o/min.

S obzirom na rezultate uzgoja *F. oxysporum* JCM 9293 u tikvicama s odbijačima vrtloga kao sirovina za uzgoj u bioreaktoru odabrana je melasa, to jest saharoza kao izvor ugljika, a kao izvor dušika odabrana je KMP podloga. S obzirom da se uzgoj u bioreaktoru s miješalom provodio u podlozi većeg volumena, odabrano je 200 o/min kako bi se osigurao dotok kisika i rast biomase.

4.3. UZGOJ PLIJESNI *F. oxysporum* JCM 9293 U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM

Uzgoj plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 proveden je u KMP podlozi sa saharozom kao izvorom ugljika. Sastav podloge opisan je u poglavlju 3.1.5. Uzgoj je proveden u bioreaktoru s miješalom koji je opisan u poglavlju 3.2.5. Uzgoj je proveden pri 200 o/min, temperaturi od 30 °C, s periodičnim uzimanjem uzoraka. Rezultati provedenog uzgoja prikazani su grafički (slika 12), a izračunati parametri uspješnosti prikazani su u tablici 10.



Slika 12. Promjena koncentracije supstrata i produkata tijekom uzgoja *F. oxysporum* JCM 9293 u bioreaktoru s miješalom

Rezultati prikazani na slici 12 pokazuju da uzgojem *F. oxysporum* JCM 9293 u reaktoru s miješalom nastaju tri biokemikalije; etanol, glicerol i ksilitol. Iste tri biokemikalije su nastale i pri uzgoju u tikvicama s odbijačima vrtloga u KMP podlozi sa saharozom kao izvorom ugljika pri 200 o/min. Ksilitol je nastao u najvećoj koncentraciji od 1,13 g/L u 24h uzgoja te mu se do kraja uzgoja koncentracija smanjila na 1,01 g/L. Na slici 12 se također može vidjeti da su saharoza i glukoza u potpunosti potrošene, pa je *Fusarium oxysporum* JCM 9293 počeo uz preostalu fruktozu trošiti glicerol i ksilitol kao izvore ugljika te su se njihove koncentracije smanjile do kraja uzgoja, kako je već objašnjeno u radu Suihko (1983). Najveći koeficijent konverzije saharoze u ksilitol, produktivnost i efikasnost procesa proizvodnje ksilitola dobiveni su 24 h uzgoja te iznose 0,04 g/g, 0,036 g/Lh i 4,159 % (tablica 10).

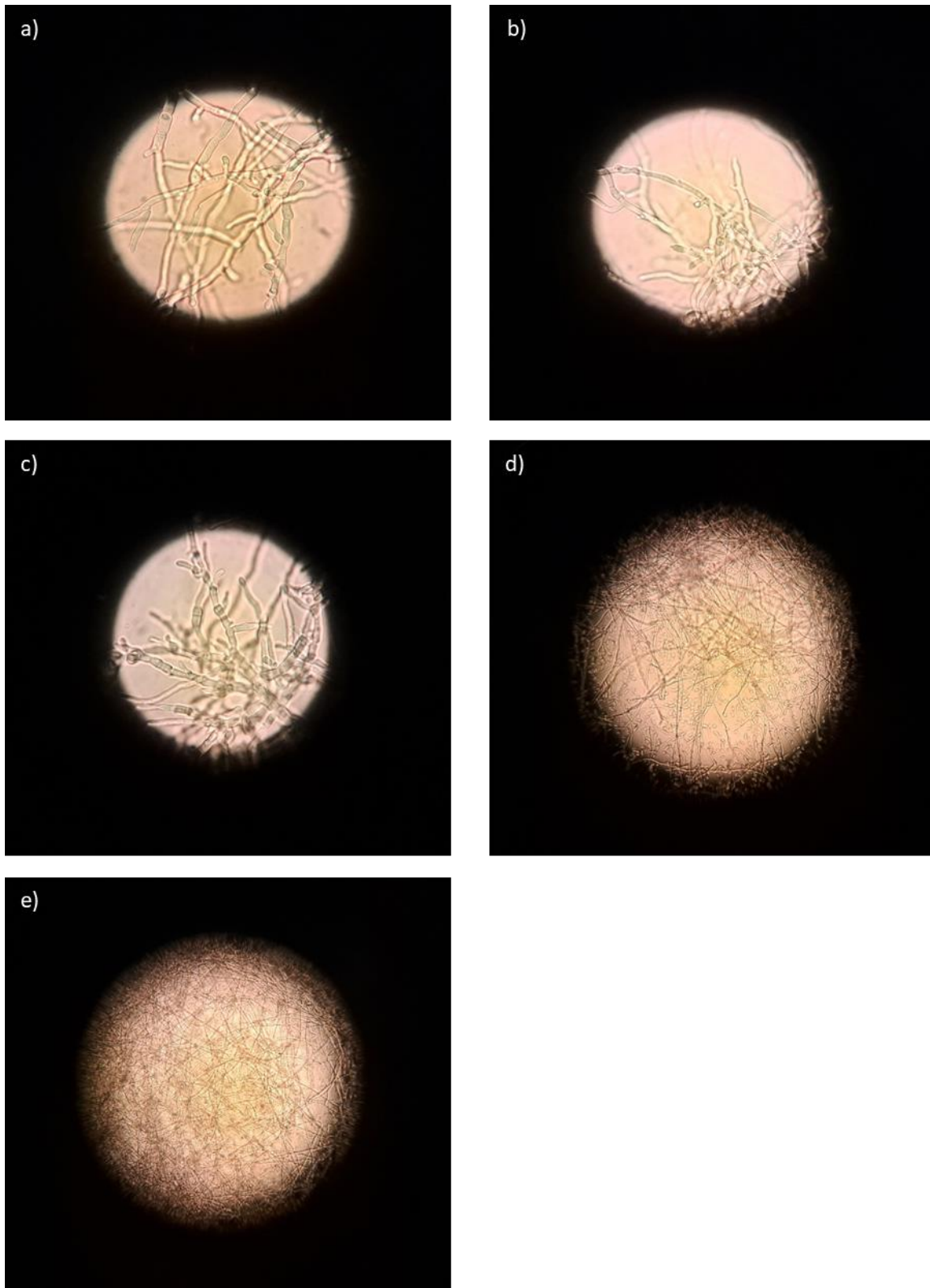
U istraživanju Ruiz i suradnici (2007) su provodili proizvodnju etanola i ksilitola pomoću plijesni *F. oxysporum* VTT-D-80134, a koristili su više izvora ugljika među kojima je bila i glukoza. Podloga je po sastavu bila slična KMP podlozi u ovome radu te su kao izvori dušika korišteni pepton i kvašćev ekstrakt, a broj okretaja miješala u reaktoru iznosio je 500. U svome radu su izvijestili o tome da ksilitol ne nastaje kada se u podlozi kao glavni izvor ugljika koristi glukoza. Međutim, kada su izvori ugljika glukoza i ksiloza, dolazi do proizvodnje manjih količina ksilitola. Najveća koncentracija ksilitola u njihovom radu iznosila je 0,051 g/L. U ovom radu se kao podloga u bioreaktoru s miješalom koristila saharoza, koja se sastoji od glukoze i fruktoze, a kao proizvod fermentacije nastaje ksilitol u koncentraciji od 0,799 g/L. Ta koncentracija je znatno veća nego u radu koje su proveli Ruiz i suradnici (2007).

Nadalje, Ruiz i suradnici (2007) su dobili koeficijent konverzije glukoze u etanol u iznosu od 0,38 g/g, što je značajno veće od vrijednosti 0,002 g/g dobivene u ovom radu pri 200 o/min. Razlike u rezultatima između ovog rada i istraživanja (Ruiz i sur., 2007) mogu se pripisati različitim faktorima. Ruiz i suradnici su proveli svoje istraživanje u bioreaktoru s miješalom kojem je brzina okretaja bila puno veća (500 o/min). Također, kao izvor ugljika koristili su glukoza, dok je u ovom istraživanju korištena saharoza kao izvor ugljika.

Tablica 10. Pokazatelji uspješnosti uzgoja plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 u bioreaktoru

Pokazatelji uspješnosti	Iznos
$Y_{\text{EtOH/S}}$ (g/g)	0,002
$Y_{\text{Glc/S}}$ (g/g)	0,010
$Y_{\text{Glc/S max.}}$ (g/g)	0,015
$Y_{\text{Ksi/S}}$ (g/g)	0,028
$Y_{\text{Ksi/S max.}}$ (g/g)	0,040
Pr_{EtOH} (g/Lh)	0,001
Pr_{Glc} (g/Lh)	0,0004
$Pr_{\text{Glc max.}}$ (g/Lh)	0,013
Pr_{Ksi} (g/Lh)	0,025
$Pr_{\text{Ksi max.}}$ (g/Lh)	0,036
E_{EtOH} (%)	0,306
E_{Glc} (%)	1,039
$E_{\text{Glc max.}}$ (%)	1,611
E_{Ksi} (%)	2,895
$E_{\text{Ksi max.}}$ (%)	4,159

Na slici 13 su prikazani mikroskopski preparati uzoraka koji su uzimani tijekom uzgoja u bioreaktoru. U uzorku koji je uzet odmah nakon inokuliranja podloge u bioreaktoru (slika 13. a), može se vidjeti da je količina porasle plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 mala te da plijesan raste u micelijskom obliku. Daljnjim tijekom uzgoja, količina micelija plijesni se povećava (slika 13.b i 13.c). U 5. uzorku (slika 13.d) uočava se pojava rasta u obliku kvasaca i sve gušći rast plijesni te se u zadnjem uzorku (slika 13.e) može vidjeti gust rast plijesni koji je pretežito micelijskog oblika.



Slika 13. Mikroskopski preparati *F. oxysporum* pri uzgoju u bioreaktoru; a) nakon inokulacije; b) nakon 4 sata; c) nakon 8 sati; d) nakon 24 sata; e) nakon 26 sati

4.4. ANALIZA SASTAVA MASNIH KISELINA U BIOMASI PLIJESNI *F. oxysporum* JCM 9293

Jedan od ciljeva uzgoja plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 u tikvicama i bioreктору s miješalom bio je određivanje sastava masnih kiselina u biomasi plijesni. Nakon odvajanja biomase plijesni od hranjivih podloga centrifugiranjem, biomase plijesni su osušene u sušioniku do konstantne mase. Zatim su sastav i koncentracija masnih kiselina u biomasi plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 određeni metodom plinske kromatografije s plameno-ionizacijskom detekcijom (GC-FID), kao što je opisano u poglavlju 3.3.9.

Analizom uzoraka biomase plijesni detektirane su 33 različite masne kiseline: oktanska kiselina (C8:0), dekanska kiselina (C10:0), undekanska kiselina (C11:0), dodekanska kiselina (C12:0), miristinska kiselina (C14:0), miristoleinska kiselina (c14:1 cis 9), pentadekanska kiselina (C15:0), pentadekoična kiselina (C15:1 cis 10), palmitinska kiselina (C16:0), palmitoleinska kiselina (C16:1 cis 9), margarinska kiselina (C17:0), heptadekanoična kiselina (C17:1 cis 10), stearinska kiselina (C18:0), elaidinska kiselina (C18:1 trans 9), oleinska kiselina (C18:1 cis 9), linoelaidna kiselina (C18:2 trans 9,12), linolna kiselina (C18:2 cis 9,12), γ -linolenska kiselina (C18:3 cis 6,9,12), α -linolenska kiselina (C18:3 cis 9,12,15), arahidinska kiselina (C20:0), gondoična kiselina (C20:1 cis 11), eikozadienska kiselina (C20:2 cis 11,14), eikozatrienska kiselina (C20:3 cis 8,11,14), eikozatrenska kiselina (C20:3 cis 11,14,17), eikozapentaenska kiselina (C20:5 cis 5,8,11,14,17), heneikozilna kiselina (C21:0), dokosanoidna kiselina (C22:0), eručna kiselina (C22:1 cis 13), dokosadeična kiselina (C22:2 cis 13,16), dokosaheksaenska kiselina (C22:6 cis 4,7,10,13,16,19), trikozilna kiselina (C23:0), lignocerična kiselina (C24:0) i nervonska kiselina (C24:1 cis 15). Rezultati analize udjela masnih kiselina u biomasi plijesni plinskom kromatografijom su prikazani u tablici 11.

Tablica 11. Udio masnih kiselina u biomasi plijesni nakon uzgoja *F. oxysporum* dobivene nakon uzgoja u tikvicama s obijačima vrtloga i u bioreктору s miješalom

HRANJIVA PODLOGA	Broj okretaja (o/min)	Izvor ugljika	Udio masnih kiselina u biomasi (%)
KMP PODLOGA	50	Glukoza	5,90
		Fruktoza	10,65
		Saharoza	n.d.
	100	Glukoza	7,49
		Fruktoza	7,30
		Saharoza	9,43
	200	Glukoza	11,76
		Fruktoza	7,80
		Saharoza	4,83
		Saharoza (Bioreaktor)	9,51
CSL PODLOGA	50	Glukoza	n.d.
		Fruktoza	1,92
		Saharoza	5,12
	100	Glukoza	0,59
		Fruktoza	7,23
		Saharoza	7,89
	200	Glukoza	24,45
		Fruktoza	15,61
		Saharoza	7,67

*n.d.= nije detektirano

Prema rezultatima u tablici 11, može se primijetiti da uzgojem pri 50 o/min masne kiseline nisu detektirane u KMP podlozi sa saharozom te CSL podlozi sa glukozom. U svim drugim podlogama masne kiseline su detektirane. Pri 50 o/min najveći udio masnih kiselina od 10,65 % nastao je u KMP podlozi sa fruktozom. Na CSL podlozi pri 50 o/min najveći udio masnih kiselina (5,12 %) nastao je u podlozi sa saharozom. Pri 100 o/min najveći udijeli masnih kiselina nastaju na saharozi kao izvoru ugljika i u KMP (9,43 %) i u CSL (7,89 %) podlozi. Pri 200 o/min najveći udijeli masnih kiselina nastaju na glukozu kao izvoru ugljika i u KMP (11,76 %) i u CSL podlozi (24,45 %). Također, 24,45 % je najveći udio masnih kiselina koji je detektiran u ovom eksperimentu. Prosječan udio masnih kiselina izoliranih iz biomase uzgojene na svim KMP podlogama iznosi 8,24 %, a na CSL podlogama 9,17 %. Najviše zastupljene masne kiseline bile su palmitinska, stearinska, oleinska i linoelaidna kiselina. One su detektirane u gotovo svim podlogama osim na KMP podlogama sa saharozom pri 50 i 100 o/min te CSL podlogama sa glukozom pri 50 i 100 o/min. Također, undekanska kiselina je detektirana u gotovo svim podlogama osim u KMP podlogama sa saharozom pri 50 i 100 o/min i CSL podlogama sa glukozom pri 50 i 200 o/min. Arahinska, eikozatrienska, eikozapentaenska

i eručna kiselina detektirane su u samo jednoj od podloga u koncentracijama manjim od 2 mg/L. U najvećoj koncentraciji nastala je oleinska kiselina pri 200 o/min, u CSL podlozi s fruktozom gdje je detektirano 96,883 mg/L kiseline, te na CSL podlozi sa glukozom gdje je detektirano 95,943 mg/L kiseline. Bhatia i Arneja (1978) analizirali su različite masne kiseline u *Fusarium* vrstama, uključujući *F. oxysporum*. U svome istraživanju navode oleinsku kiselinu kao masnu kiselinu koju su detektirali u većim koncentracijama od drugih masnih kiseline.

Naim i suradnici (1985) proučavali su utjecaj kvašćevog ekstrakta, mesnog ekstrakta, CSL-a i melase na proizvodnju lipida pomoći plijesni *F. oxysporum*. U njihovom istraživanju, gotovo sve podloge rezultirale su većim udjelima masnih kiselina, nego što je to u slučaju ovog rada. Primjerice, na podlozi sa glukozom (40 g/L) i kvašćevim ekstraktom (6 g/L), detektirali su 31 % ukupnih masnih kiselina, dok je u ovom radu pri sličnim uvjetima najviše postignuto 11,76 %. Kada su koristili 40 g/L glukoze i 8 g/L CSL-a kao izvor dušika dobili su 32 % masnih kiselina, dok je pri sličnim uvjetima u ovom radu dobiven udio masnih kiselina od 24,45 %. U istraživanju (Naim i sur., 1985), kada kao izvor dušika koriste CSL ili kvašćev ekstrakt, udio detektiranih masnih kiselina bio je približno jednak (31 % i 32 %). Međutim, u ovom radu, u CSL podlozi sa glukozom dobiveno je 24,45 % masnih kiselina, što je značajno veća vrijednost od rezultata dobivenog u KMP podlozi (11,76 %) s kvašćevim ekstraktom. U istraživanju (1985), koristeći medij s 80 g/L melase i 8 g/L CSL-a, detektirali su 35 % masnih kiselina. U ovom radu, korištenjem 40 g/L melase i 8 g/L CSL-a, postignuto je najviše 7,89 % ukupnih masnih kiselina. Rezultati ovog rada su znatno niži od rezultata dobivenih u spomenutom istraživanju, a razlog tomu bi moglo biti to što su u ovom radu korištene duplo manje koncentracije izvora ugljika. Također, Naim i suradnici (1985) nisu naveli broj okretaja koji su koristili prilikom uzgoja pa se ne može odrediti da li je broj okretaja bio jedan od čimbenika koji je utjecao na razlike u rezultatima.

5. ZAKLJUČCI

1. Plijesni *T. terrestris* CBS 45675, *B. dothidea* JCM 2738, *F. oxysporum* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 rastle su na svim testiranim izvorima ugljika (glukoza, fruktoza, saharoza, ksiloza i celobioza) osim na arabinozi gdje nije zamijećen rast niti jedne testirane plijesni. Krajnji produkti metabolizma ovih plijesni su etanol, octena kiselina, manitol, ksilitol, eritrol i glicerol.
2. Među testiranim plijesnima, *F. oxysporum* JCM 9293 je odabran kao radni mikroorganizam jer je proizveo 6 različitih biokemikalija (etanol, octenu kiselinu, mliječnu kiselinu, manitol, eritrol i ksilitol).
3. Plijesan *F. oxysporum* JCM 9293 raste i proizvodi biokemikalije u KMP i CSL podlogama na tresilici pri svim testiranim brojevima okretaja (50, 100 i 200 o/min). Porastom broja okretaja povećava se koncentracija proizvedene biomase od 37 % do 307 % ovisno o supstratu, a smanjuje se koncentracija produkata. Udio proizvedenih masnih kiselina na CSL podlogama s glukozom i fruktozom tijekom uzgoja na tresilici pri broju okretaja od 200 u minuti je dvostruko veći u usporedbi sa KMP podlogama s istim izvorima ugljika.
4. Tijekom uzgoja *F. oxysporum* JCM 9293 na KMP podlozi s fruktozom i CSL podlogama sa glukozom i fruktozom detektirano je nastajanje crvenog pigmenta maksimuma apsorbancije pri 500 nm što odgovara maksimumu apsorbancije pigmenta bikaverina kojeg proizvodi ova plijesan.
5. Tijekom uzgoja plijesni *F. oxysporum* JCM 9293 u bioreaktoru s miješalom proizvedeni su ksilitol (0,8 g/L), glicerol (1,01 g/L) i etanol (0,28 g/L). Ujedno je proizvedeno 5,12 g/L biomase, a udio masnih kiselina u biomasi plijesni iznosi je 9,51 %. Najzastupljenija masna kiselina bila je oleinska kiselina (27,48 mg/L).
6. Kako bi se povećali prinosi i optimirala proizvodnja željenog metabolita tijekom uzgoja potrebno je provesti daljnju optimizaciju procesa.

6. LITERATURA

Alavijeh RS, Karimi K, Van den Berg C (2020) An integrated and optimized process for cleaner production of ethanol and biodiesel from corn stover by *Mucor indicus*, *J Clean Prod* **249**, 119321. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119321>.

Almeida M, Guimarães VM, Falkoski DL, Visser EM, Siqueira GA, Milagres AMF, Rezende ST (2013) Direct ethanol production from glucose, xylose and sugarcane bagasse by the corn endophytic fungi *Fusarium verticillioides* and *Acremonium zeae*. *J Biotechnol* **168**, 1, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.032>.

Badgajar KC, Bhanage BM (2018) Dedicated and waste feedstocks for biorefinery: an approach to develop a sustainable society. U: Waste biorefinery, Elsevier, str. 3-38.

Barr ME (1983) The ascomycete connection. *Mycologia* **75**, 1, 1-13. doi:10.1080/00275514.1983.12021631

Berdy J (2005) Bioactive microbial metabolites. *J antibiot* **58**, 1, 1-26.

Bhatia IS, Arneja JS (1978) Effect of different cultural conditions on the chemical composition of lipids of *Fusarium oxysporum*. *J Sci Food Agr* **29**, 7, 611-618. doi: 10.1002/jsfa.2740290707

Bilal M, Xu S, Iqbal HMN, Cheng H (2020) *Yarrowia lipolytica* as an emerging biotechnological chassis for functional sugars biosynthesis. *Crit Rev Food Sci* **61**, 535–552. doi: 10.1080/10408398.2020.1739000

Bispo RLB, Ceccato-Antonini SR, Tosta CD, Fontanetti A, Prado VS, Takita MA, Rosa-Magri MM (2023) Sugarcane molasses as substrate to soil yeasts: Indole-3-acetic acid production and maize initial growth promotion. *Biocatal Agri Biotechnol* **47**, 102618. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102618>

Brakhage AA, Schroekh V (2011) Fungal secondary metabolites. Strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet Biol* **48**, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.04.004>

Breuil C, Wojtczak G, Saddler JN (1986) Production and localization of cellulases and β -glucosidase from the thermophilic fungus *Thielavia terrestris*. *Biotechnol Lett* **8**, 9, 673–676. doi:10.1007/bf01025980

Britannica (2023a) The Editors of Encyclopaedia. Mold. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/mold-fungus>. Pristupljeno 27 studenog 2023.

Britannica (2023b) The Editors of Encyclopaedia. Molasses. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/topic/molasses>. Pristupljeno 12. listopada 2023.

Brown SH, Bashkirova L, Berka R, Chandler T, Doty T, McCall K, McCulloch M, McFarland S, Thompson S, Yaver D, Berry A (2013) Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid. *Appl microbiol biot* **97**, 20, 8903-12. doi: 10.1007/s00253-013-5132-2.

Bušić A, Marđetko N, Kundas S, Morzak G, Belskaya H, Ivančić Šantek M, Šantek B. (2018) Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. *Food technol biotech* **56**, 3, 289-311. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5546>

Chen H (2014) *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. Springer Dordrecht Heidelberg New York London, 1-185.

Cherubini F (2010) The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energ Convers Manage* **51**, 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>

Chiang C, Knight SG (1960) Metabolism of D-xylose by moulds. *Nature* **188**, 4744, 79-81. <https://doi.org/10.1038/188079a0>

Clark J, Deswarte F (2015) *The Biorefinery Concept: An Integrated Approach*. U: Introduction to Chemicals from Biomass,, 2. izdanje, Clark, J. and Deswarte, F. (ured.), John Wiley and Sons Ltd., The Atrium, Southern Gate, Chichester PO19 8SQ, Ujedinjeno Kraljevstvo.

Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WF, Philips AJ, Groenewald JZ (2006) Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Stud mycol* **55**, 1, 235-253.

Da Silva MC, Bertolini MC, Ernandes JR (2001) Biomass production and secretion of hydrolytic enzymes are influenced by the structural complexity of the nitrogen source in *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus nidulans*. *J Basic Microb* **41**, 5, 269-80. doi: 10.1002/1521-4028(200110)41:5<269::AID-JOBM269>3.0.CO;2-#.

Deeba F, Kumar KK, Wani SA, Singh AK, Sharma J, Gaur NA (2022) Enhanced biodiesel and β -carotene production in *Rhodotorula pacifica* INDKK using sugarcane bagasse and molasses by an integrated biorefinery framework. *Bioresource Technol* **351**, 127067. doi: 10.1016/j.biortech.2022.127067

Dickman KG, Grollman AP (2010) Nephrotoxicity of Natural Products: Aristolochic Acid and Fungal Toxins. U: McQueen CA (ured.), *Comprehensive Toxicology*, 2 izd., Elsevier, New York, str. 433-458.

Esmaeili H, Keikhosro K (2018) Optimization of fermentation conditions for efficient ethanol production by *Mucor hiemalis*. *Turk J Biochem* **43**, 6, 587-594. <https://doi.org/10.1515/tjb-2017-0290>.

Fernando S, Adhikari S, Chandrapal C, Murali N (2006) Biorefineries: current status, challenges, and future direction. *Energ Fuel* **20**, 1727–1737. <https://doi.org/10.1021/ef060097w>

Fonseca-Peralta HM, Pineda-Hidalgo KV, Castro-Martínez C, Contreras-Andrade I (2022) Effect of Zinc-Calcium on Xylose Consumption by *Mucor circinelloides* (MN128960): Xylitol and Ethanol Yield Optimization. *Energies* **15**, 3, 906. <https://doi.org/10.3390/en15030906>

Gordon TR, Okamoto D, Jacobson DJ (1989) Colonization of muskmelon and nonsusceptible crops by *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis and other species of *Fusarium*. *Phytopathology* **79**, 10, 1095–1100. doi:10.1094/Phyto-79-1095.

Hendriksen HV, Mathiasen TE, Adler-Nissen J, Frisvad JC, Emborg C (2007) Production of mannitol by *Penicillium* strains. *J Chem Technol Biotech* **43**, 3, 223–228. doi:10.1002/jctb.280430308

Ibrahim SRM, Sirwi A, Eid BG, Mohamed SGA, Mohamed GA (2021) Bright Side of *Fusarium oxysporum*: Secondary Metabolites Bioactivities and Industrial Relevance in Biotechnology and Nanotechnology. *J Fungi* **7**, 11, 943. <https://doi.org/10.3390/jof7110943>

Jamir L, Kumar V, Kaur J, Kumar S, Singh H (2021) Composition, valorization and therapeutical potential of molasses: a critical review. *Environ Technol Rev* **10**, 1, 131–142. doi:10.1080/21622515.2021.1892203

Joshi, VK, Devender A, Anju B, Shashi B (2003) Microbial pigments. *Indian J Biotechnol* **2**, 362-369. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/11334>

Jovanović B, Mach RL, Mach-Aigner AR (2014) Erythritol production on wheat straw using *Trichoderma reesei*. *AMB Express* **4**, 34 . <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0034-y>

Kamm B, Kamm M (2004) Principles of biorefineries. *Appl microbiol biot* **64**, 137–145. doi:10.1007/s00253-003-1537-7

- Karaffa L, Díaz R, Papp B, Fekete E, Sándor E, Kubicek CP (2015) A deficiency of manganese ions in the presence of high sugar concentrations is the critical parameter for achieving high yields of itaconic acid by *Aspergillus terreus*. *Appl microbiol biot* **99**, 7937-7944. doi:10.1007/s00253-015-6735-6
- Kendrick A, Ratledge C (1992) Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* **27**, 1, 15–20. doi:10.1007/bf02537052
- Kumar PKR, Singh A, Schügerl K (1991) Formation of acetic acid from cellulosic substrates by *Fusarium oxysporum*. *Appl microbiol biot* **34**, 5, 570–572. doi:10.1007/bf00167900
- Lu J, Peng C, Ji XJ, You J, Cong L, Ouyang P, Huang H (2011) Fermentation characteristics of *Mortierella alpina* in response to different nitrogen sources. *Appl biochem biotech* **164**, 7, 979-990. doi:10.1007/s12010-011-9189-z
- Lu Z, Yang CW, Tsao GT (1995) Fermentation of xylose to glycerol by *Rhizopus javanicus*. *Appl biochem biotech* **51**, 1, 83–95. doi:10.1007/bf02933413
- Maity SK (2015) Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I. *Renew Sust Energ Rev* **43**, 1427-1455.
- McGinnis MR, Tyring SK (1996) Introduction to Mycology. U: Baron S (ured.). Medical Microbiology. 4 izd, University of Texas Medical Branch at Galveston. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8125/>
- McMillan JD, Boynton BL (1994) Arabinose utilization by xylose-fermenting yeasts and fungi. *Appl biochem biotech* **45**, 569-584. doi:10.1007/bf02941831
- Mendonca M, Dos Santos MC, Pereira AK, Fill TP, Forte MBS, Bicas JL (2021) Recovery and purification of bikaverin produced by *Fusarium oxysporum* CCT7620. *Food Chem: X* **12**, 100136. doi: 10.1016/j.fochx.2021.100136
- Merli G, Becci A, Amato A, Beolchini F (2021) Acetic acid bioproduction: The technological innovation change. *Sci Total Environ* **1**, 798:149292. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149292.
- Moo-Young, Murray (2019) Comprehensive biotechnology, 3rd izd, Elsevier, Waterloo.
- Moore D, Alexopoulos, CJ, Ahmadjian V (2023) Fungus. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/fungus>. Pristupljeno 27. listopada 2023.

- Naim N, Saad RR, Naim MS (1985) Production of lipids and sterols by *Fusarium oxysporum* (Schlecht). Utilization of some agro-industrial by-products as additives and basal medium. *Agr Wastes* **14**, 3, 207–220. doi:10.1016/s0141-4607(85)80031-7
- Panagiotou G, Christakopoulos P, Olsson L (2005) The influence of different cultivation conditions on the metabolome of *Fusarium oxysporum*. *J Biotechnol* **118**, 3, 304–315. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.05.004>.
- Phillips AJL, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ, Crous PW (2013) The *Botryosphaeriaceae*: Genera and species known from culture. *Stud mycol* **76**, 51–167. doi: <https://doi.org/10.3114/sim0021>.
- Purane NK, Sharma SK, Salunkhe PD, Labade DS, Tondlikar MM (2012) Gluconic acid production from golden syrup by *Aspergillus niger* strain using semiautomatic stirred-tank fermenter. *J Microb Biochem Technol* **4**, 92–95. doi: 10.4172/1948-5948.1000077
- Rabha J, Jha DK (2018). Metabolic diversity of *penicillium*. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, Elsevier, str. 217–234.
- Rosgaard L, Pedersen S, Cherry JR, Harris P, Meyer AS (2006) Efficiency of new fungal cellulase systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulose. *Biotechnol Progr* **22**, 2, 493–498. doi: 10.1021/bp050361o
- Ruiz E, Romero I, Moya M, Sanchez S, Bravo V, Castro E (2007) Sugar fermentation by *Fusarium oxysporum* to produce ethanol. *World J Microb Biot* **23**, 259–267. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9222-5>
- Saha BC, Racine FM (2011) Biotechnological production of mannitol and its applications. *Appl microbiol biot* **89**, 879–891. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2979-3>
- Sanchez S, Demain AL (2011) 1.12 Secondary Metabolites. U: Moo-Young M (ured.) *Comprehensive Biotechnology*, 2 izd, Academic Press, str 155–167.
- Sanchez S, Ruiz B, Rodriguez-Sanoja R, Flores-Cotera LB (2013) Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes, and Nutraceuticals. U: McNeil B, Archer D, Giavasis I, Harvey L (ured.), Woodhead Publishing, Oxford, str. 194–223.
- Sankpal NV, Kulkarni BD (2002) Optimization of fermentation conditions for gluconic acid production using *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils. *Process Biochem* **37**, 12, 1343–1350. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00335-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00335-1)

- Santos MC, Mendonça MD, Bicas JL (2020) Modeling bikaverin production by *Fusarium oxysporum* CCT7620 in shake flask cultures. *Bioresour Bioprocess* **7**, 13. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-0301-5>
- Shindy, H (2016) Basics in colors, dyes and pigments chemistry: A review. *Int J Chem* **2**, 29, 2016.
- Show PL, Oladele KO, Siew QY, Aziz Zakry FA, Lan, JCW, Ling TC (2015). Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Front life sci* **8**, 3, 271-283.
- Suihko ML (1983) The fermentation of different carbon sources by *Fusarium oxysporum*. *Biotechnol Lett* **5**, 721–724. <https://doi.org/10.1007/BF01386491>
- Suihko ML, Suomalainen I, Enari TM (1983) D-xylose catabolism in *Fusarium oxysporum*. *Biotechnol Lett* **5**, 525-30. <https://doi.org/10.1007/BF01184943>
- Sutherland JB, Pometto III AL, Crawford DL (1983) Lignocellulose degradation by *Fusarium species*. *Can J Botany* **61**, 4, 1194–1198. doi:10.1139/b83-126.
- 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.
- Vertes AA, Hodge D, Qureshi N (2017) Biorefineries: Integrated Biochemical Processes for Liquid Biofuels, Elsevier, Oxford, Ujedinjeno kraljevstvo, str. 59-63.
- White MM, James TY, O'Donnell K, Cafaro MJ, Tanabe Y, Sugiyama J (2006). Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia* **98**, 6, 872-884. doi:10.1080/15572536.2006.11832617
- Xiao J, Zhang Q, Gao YQ, Tang JJ, Zhang AL, Gao JM (2014) Secondary Metabolites from the Endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and Their Antifungal, Antibacterial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities. *J Agric and Food Chem* **62**, 16, 3584–3590. doi:10.1021/jf500054f

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Paulina Sara Bingula izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis