

# Učinak 5-hidroksimetil furfurala i furfurala na rast plijesni *Mortierella isabellina* i sintezu lipida

---

**Madaras, Manda**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*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:159:040504>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-21**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Manda Madaras**

6934/BT

**Učinak 5-hidroksimetil furfurala i furfurala na rast plijesni**  
***Mortierella isabellina* i sintezu lipida**

**ZAVRŠNI RAD**

**Znanstveno-istraživački projekt:**

„Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ, 9158)

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek

**Zagreb, 2017.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof. dr.sc. Mirele Ivančić-Šantek.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## Učinak 5-hidroksimetil furfurala i furfurala na rast plijesni *Mortierella isabellina* i sintezu lipida *Manda Madaras, 6934/BT*

**Sažetak:** Oleaginozni mikroorganizmi proizvode lipide koji se mogu koristiti kao zamjenska sirovina za proizvodnju biodizela umjesto biljnih ulja. Oleaginozna plijesan *Mortierella isabellina* nakuplja triacilglicerole kao stanične rezervne lipide čiji udjel u suhoj tvari biomase iznosi i do 80 %. Lignocelulozna biomasa izvor je jeftinih ugljikohidrata koji se mogu koristiti kao izvor ugljika za rast mikroorganizma i sintezu proizvoda (npr. bioetanola). Procesom predobrade poboljšava se enzimska razgradnja lignocelulozne sirovine s celulazama te se povećava prinos reducirajućih šećera nastalih hidrolizom. Međutim tijekom ovog procesa nastaje niz nusproizvoda iz lignocelulozne sirovine koji inhibiraju radni mikroorganizam i celulolitičke enzime. U ovom radu istražen je učinak furfurala i 5-hidroksimetil furfurala (HMF) na rast i proizvodnju lipida s plijesni *M. isabellina*. Rezultati pokazuju da furfural jače inhibira rast i sintezu lipida od HMF-a. Rast plijesni i sinteza lipida je potpuno inhibirana pri koncentraciji furfurala većoj od 0,6 g/L i HMF-a većoj od 2 g/L.

**Ključne riječi:** *Mortierella isabellina*, lipidi, biodizel, lignoceluloza, inhibitor

**Rad sadrži:** 31 stranice, 14 slika, 3 tablice, 41 literarni navod

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek

**Datum obrane:** 8. rujna, 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### **The effect of 5-hydroxymethyl furfuryl and furfuryl on growth of fungus *Mortierella isabellina* and lipid synthesis**

*Manda Madaras, 6934/BT*

**Abstract:** Lipids produced by oleaginous microorganisms can be used as alternative feedstock for production of biodiesel instead of plant oils. Oleaginous fungus *Mortierella isabellina* has the ability to accumulate triacylglycerols, as cellular storage lipids, up to 80% of the biomass. Lignocellulosic biomass is source of cheap carbohydrates that can be used as carbon source for the microbial growth and product synthesis (e.g. bioethanol production). The pretreatment process improves enzymatic digestibility of lignocellulosic biomass by cellulases and enhanced the yield of reducing sugars by hydrolysis. However, during this process many lignocellulose-derived by-products are formed that inhibit microorganism and cellulolytic enzymes. The influence of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) on the growth and lipid production by fungus *M. isabellina* was investigated. The results indicate that furfural inhibits the growth and lipid synthesis markedly more than HMF. The growth and lipid accumulation of fungus was completely inhibited at concentration of furfural and HMF higher than 0,6 g/L and 2 g/L, respectively.

**Keywords:** *Mortierella isabellina*, lipids, biodiesel, lignocellulose, inhibitor

**Thesis contains:** 31 pages, 14 figures, 3 tables, 41 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD Mirela Ivančić Šantek, Associate professor*

**Defence date:** 8<sup>th</sup> September 2017

# SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. LIGNOCELULOZA</b> .....	<b>2</b>
2.1.1. SASTAV LIGNOCELULOZE.....	2
2.1.2. PREDOBRAĐA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA .....	5
2.1.2.1. Predobrada s kiselinom.....	5
2.1.2.2. Predobrada s vodenom parom.....	6
2.1.2.3. Alkalna predobrada .....	6
2.1.2.4. Oksidativna predobrada.....	7
2.1.2.5. Eksplozija vlakana s amonijakom (eng. Ammonia fiber explosion - AFEX) .....	7
<b>2.2. INHIBITORI</b> .....	<b>7</b>
2.2.1. ORGANSKE KISELINE .....	9
2.2.2. FENOLNI SPOJEVI .....	9
2.2.3. FURAN ALDEHIDI .....	10
2.2.3.1. Furfural.....	10
2.2.3.2. 5-hidroksimetil furfural (HMF) .....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>12</b>
3.1.1. RADNI MIKROORGANIZAM .....	12
3.1.2. SIROVINE ZA PRIPRAVU HRANJIVIH PODLOGA .....	12
3.1.3. OSTALE KEMIKALIJE .....	13
3.1.4. HRANJIVA PODLOGA.....	13
3.1.5. OPREMA I APARATURA.....	14
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>14</b>
3.2.1. UZGOJ I PRIPREMA INOKULUMA SPORA .....	14
3.2.2. ŠARŽNI PROCES PROIZVODNJE LIPIDA U TIKVICAMA.....	14
3.2.3. ANALITIČKE METODE .....	15
3.2.3.1. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase .....	15
3.2.3.2. Određivanje koncentracije glukoze pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC).....	15
3.2.3.3. Određivanje udjela lipida .....	15
3.2.4. POKAZATELJI USPJEŠNOSTI PROCESA .....	16
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>18</b>
<b>4.1. PLIJESAN MORTIERELLA ISABELLINA</b> .....	<b>18</b>
<b>4.2. UČINAK FURFURALA NA RAST PLIJESNI <i>M. ISABELLINA</i> I SINTEZU LIPIDA</b> .....	<b>18</b>
<b>4.3. UČINAK HMF-A NA RAST PLIJESNI <i>M. ISABELLINA</i> I SINTEZU LIPIDA</b> .....	<b>23</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>27</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>28</b>

## 1.UVOD

---

Zbog iscrpljivanja fosilnih izvora energije (plin, nafta, ugljen) iz kojih se danas još uvijek dobiva najveći dio potrebne energije, sve se više istražuje proizvodnja goriva iz obnovljivih izvora u koje spada i proizvodnja bioetanola i biodizela iz lignoceluloznih sirovina (Kumar i sur., 2011). U biodizel druge generacije, ubraja se i biodizel proizveden iz mikrobnih lipida koji oleaginozni mikroorganizmi nakupljaju tijekom rasta u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina. Za razliku od biodizela prve generacije koji se proizvodi iz biljnih ulja (uljana repica, suncokreta, palmino ulje) biodizel proizveden iz lignoceluloznih sirovina (biodizel druge generacije) ne konkurira proizvodnji hrane, te time ne utječe na njezinu cijenu (Chandel i sur., 2011). Enzimaska hidroliza lignocelulozne sirovine prethodi procesu mikrobne proizvodnje biogoriva pri čemu se celuloza hidrolizira do glukoze koju radni mikroorganizam može koristiti kao izvor ugljika. Učinkovitost enzimske hidrolize izvorne lignocelulozne sirovine vrlo je mala što je posljedica strukture sirovine u kojoj su celulozna vlakna obavijena ligninom i hemicelulozom koji onemogućavaju vezanje enzima na supstrat tj. celulozu. Kako bi se celuloza što učinkovitije hidrolizirala, lignocelulozna sirovina se podvrgava postupku predobrade kojom se smanjuje udjel lignina i hemiceluloze, povećava poroznost strukture sirovine, te se smanjuje kristaličnost i stupanj polimerizacije celuloze. Tijekom ovog procesa nastaje i niz nusproizvoda koji inhibiraju celulolitičke enzime i rast radnog mikroorganizma te smanjuju prinos proizvoda (Jönsson i Martín, 2016). Nusproizvodi su prema kemijskom sastavu svrstani u tri skupine: fenolni spojevi, alifatske kiseline i furan aldehidi. Najzastupljeniji nusproizvodi su furan aldehidi, furfural i 5-hidroksimetil furfural (HMF), koji nastaju dehidratacijom šećera pentozna i heksoza (Chandel i sur., 2011).

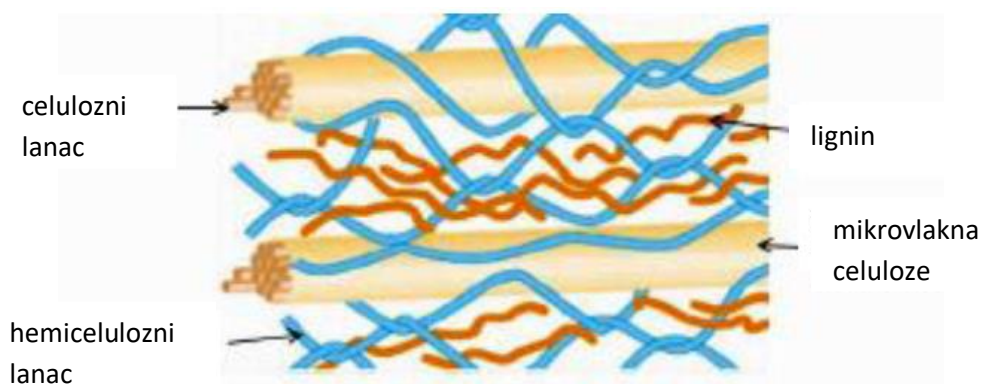
Cilj ovog rada bio je istražiti učinak furfurala i HMF-a na rast plijesni *Mortierella isabellina* i sintezu lipida tijekom šaržnog uzgoja u tikvicama.

## 2. TEORIJSKI DIO

---

### 2.1. Lignoceluloza

Lignoceluloza je najrasprostranjeniji prirodni biopolimer na Zemlji, a godišnje nastane 10-50 milijardi tona ove sirovine na svijetu (Classen i sur., 1999). Lignoceluloza se nalazi u staničnoj stijenci biljne stanice, a građena je od osnovna tri polimera celuloze, hemiceluloze i lignina, te manjim dijelom od pektina, proteina, ekstraktivnih tvari i pepela. Najzastupljeniji polimer u strukturi lignocelulozne sirovine je celuloza (40-80 % suhe tvari), a zatim hemiceluloza (10-45 % suhe tvari) i lignin (5-25 % suhe tvari; slika 1; Chandel i sur., 2010). Sastav lignoceluloze ovisi o vrsti sirovine, starosti i uvjetima uzgoja.



**Slika 1.** Struktura stanične stijenke biljke i osnovne komponente lignoceluloze (Beukes i sur. 2011).

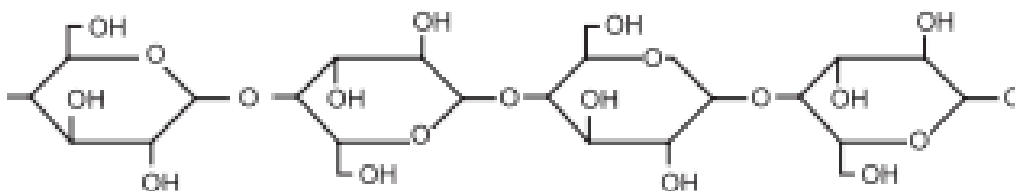
#### 2.1.1. Sastav lignoceluloze

Celuloza je najrasprostranjeniji i najzastupljeniji polisaharid na Zemlji. U prosjeku se godišnje proizvede  $4 \cdot 10^{10}$  tona celuloze (Coughlan, 1985). Celuloza je građena od ravnih lanaca koji sadrže D-glukozu povezanu s  $\beta$ -(1,4)-glikozidnom vezom (slika 1). Broj molekula glukoze u lancu može iznositi od nekoliko stotina pa do nekoliko tisuća jedinica. Dugi paralelni lanci međusobno su povezani vodikovim, van der Waals vezama i hidrofobnim vezama tvoreći tzv. mikrovlakna (slika 1.; Dashtbann i sur., 2009; Horn i sur., 2012).



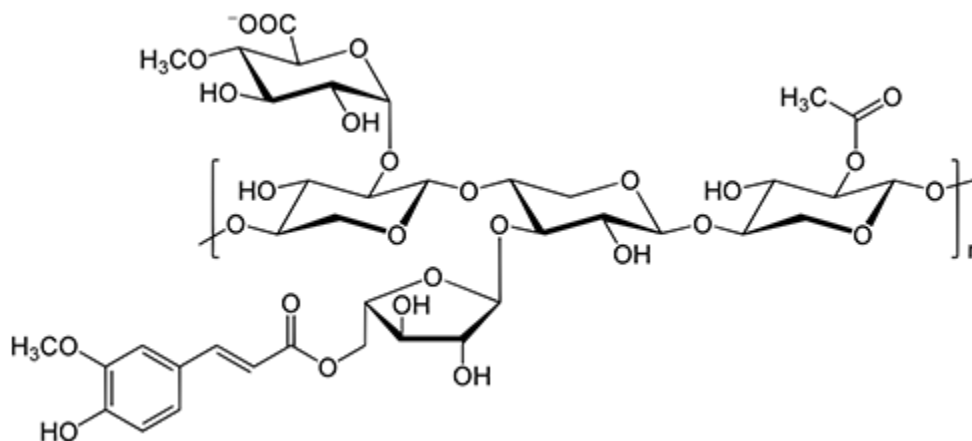
Celulozna mikrovlakna obavijena su s hemicelulozom koja povezuje celulozu s ligninom koji daje mehaničku čvrstoću staničnoj stijenci biljne stanice (slika 1; Beukes i sur., 2011).

Celuloza je pretežito kristalične strukture, a tek manjim dijelom amorfne građe. Zbog velikog broja vodikovih veza, brzina hidrolize kristalične celuloze značajno je sporija od celuloze amorfne strukture. Udjel kristalične i amorfne celuloze ovisi o vrsti lignocelulozne sirovine (Foyle i sur., 2007).



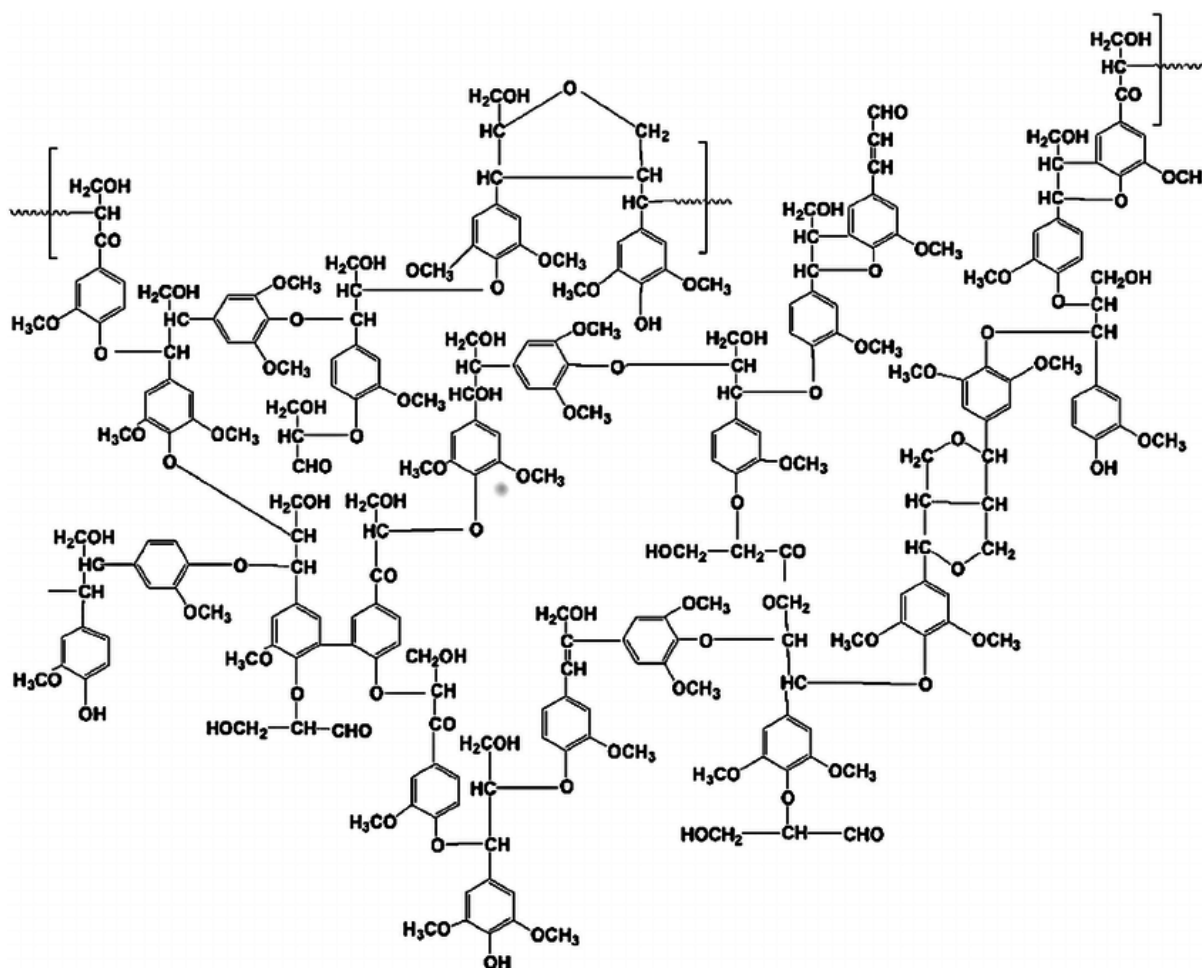
**Slika 2.** Struktura celuloze (Gurunathan i sur., 2015).

Hemiceluloza je razgranati heteropolimer koji se sastoji od šećera pentoza (ksiloza i arabinoza), heksoza (glukoza, manoz, galaktoza) i šećernih kiselina (glukuronska, metilglukuronska i galakturonska kiselina) (slika 3). Stupanj polimerizacije iznosi od 100 do 200 jedinica šećera. Šećeri pentoze i heksoze su unutar strukture povezani  $\beta$ -1,3-,  $\beta$ -1,6- i  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama, te tako tvore amorfnu hidrofилnu strukturu koja se lako hidrolizira razrijeđenim kiselinama i lužinama (Kobayashi i sur., 2012).

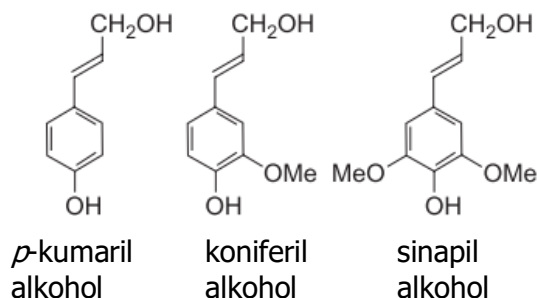


**Slika 3.** Struktura hemiceluloze (Kobayashi i sur., 2012).

Lignin je amorfni polimer koji nastaje polimerizacijom i dehidratacijom tri monolignola, *p*-kumaril alkohola (*p*-hidroksifenil propanol), koniferil alkohola (gvajacil propanol) i sinapil alkohola (siringil alkohol), u fenilpropanoide (*p*-hidroksifenil, gvajacil, i siringal lignin (slika 4 i 5). Fenilpropanske jedinice u strukturi lignina povezane su brojnim alkil-aril, alkil-alkil i aril-aril eterskim vezama (Kumar i sur., 2009). Lignin je hidrofoban, optički inaktivan te vrlo otporan na kemijsku i biološku razgradnju (Juház i sur., 2005). Kovalentnim vezama lignin je povezan s hemicelulozom i celulozom dajući biljnoj stanici strukturnu čvrstoću. Također štiti biljku od razgradnje s hidrolitičkim enzimima te od napada patogena. Udjel i sastav lignina razlikuje se ovisno o vrsti biljke i vrsti tkiva biljke (Martinez i sur., 2005).



**Slika 4.** Struktura lignina (Le Floch i sur., 2015).



**Slika 5.** Osnovne građevne jedinice lignina (OMe=OCH<sub>3</sub> metoksi skupina, Ibrahim i sur., 2011).

### **2.1.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina**

Iskorištenje enzimske hidrolize celuloze u izvornoj lignoceluloznoj sirovini je vrlo mala što je posljedica složene strukture lignocelulozne sirovine. Naime celulozna vlakna obavijena su s hemicelulozom i ligninom koji fizički onemogućuju pristup enzima supstratu tj. vezanje enzima za supstrat i hidrolizu. Kako bi se postigao zadovoljavajući stupanj hidrolize bilo bi potrebno povećati količinu celulaza što bi dodatno značajno povećalo troškove proizvodnje biogoriva (Gray i sur., 2006.). Zbog toga se lignocelulozna sirovina u biorafinerijama za proizvodnju biogoriva podvrgava postupku predobrade jednom ili više različitih metoda predobrade ovisno o vrsti sirovine (Wyman i sur., 2005). Cilj predobrade je ukloniti lignin i hemicelulozu, smanjiti kristaličnost celuloze i povećati poroznost lignocelulozne sirovine, uz što manju degradaciju fermentabilnih šećera nastalih tijekom samog procesa. Prilikom odabira i provođenja postupka predobrade potrebno je voditi računa o nastajanju nusproizvoda koji mogu negativno djelovati na rast radnog mikroorganizma i sintezu proizvoda.

Tijekom posljednjih desetljeća razvijen je velik broj različitih metoda predobrade koji se dijele na fizikalne (usitnjavanje, zračenje, ekstruzija, piroliza), kemijske (ozonoliza, hidroliza s kiselinama i lužinama, oksidativna delignifikacija, organosolv postupak), fizikalno-kemijske (eksplozija vodenom parom, eksplozija vlakana s amonijakom, eksplozija s CO<sub>2</sub>) i biološke metode (razgradnja lignina uz primjenu gljiva bijelog i smeđeg truljenja).

#### ***2.1.2.1. Predobrada s kiselinom***

U proizvodnji biogoriva najčešće se primjenjuje kiselinska predobrada. Postupak predobrade sirovine se provodi s anorganskim kiselinama (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i HNO<sub>3</sub>),

organskim kiselinama (fumarna, octena) i sumpornim dioksidom (Jönsson i Martín, 2016). Tijekom hidrolize dolazi do kidanja Van der Waalsovih, vodikovih i kovalentnih veza kojima su strukturni polimeri lignocelulozne biomase povezani (Li i sur., 2010).

Kiselinskom predobradom sirovine dolazi do hidrolize hemiceluloze, posebice ksilana, pri čemu nastaje ksiloza. Za razliku od hemiceluloze kiselinskom hidrolizom ne dolazi do razgradnje lignina, ali se njegova struktura mijenja što omogućava pristup enzima celuloznim vlaknima. Ovaj se postupak provodi pri povišenim temperaturama i najčešće od 100°C do 150°C.

Međutim, jedan od nedostataka ove metode je nastajanje nusproizvoda, od kojih su najzastupljeniji furan aldehidi (furfural i HMF), alifatske karboksilne kiseline, te fenolni spojevi, koji utječu na celulolitičke enzime i radni mikroorganizam. Zbog korozivnosti kiselina potrebno je koristiti opremu od materijala otpornih na koroziju što dodatno povećava troškove proizvodnje; te je potrebno ukloniti kiselinu nakon predobrade sirovine (Jönsson i Martín, 2016).

#### ***2.1.2.2. Predobrada s vodenom parom***

Predobrada lignocelulozne sirovine s vodom u tekućem ili plinovitom stanju odvija se pri temperaturama između 150°C i 230°C. Pri tome se ne koriste kemikalije i katalizator smanjujući mogućnost korozije. Tijekom predobrade, voda pod visokim tlakom prodire u lignoceluloznu sirovinu, pri čemu dolazi do depolimerizacije hemiceluloze (nastajanje lanaca šećera niže molekulske mase), promjena strukture celuloze i promjena kemijske strukture lignina. Otapanje hemiceluloze kataliziraju hidroksidni ioni nastali disocijacijom vode i slabih kiselina koje nastaju razgradnjom polisaharida. Hidrolizom acetilnih skupina hemiceluloze nastaje octena kiselina, a dehidratacijom pentoza nastalih hidrolizom hemiceluloze nastaje manja količina furfurala. Održavanjem pH u neutralnom području može se smanjiti koncentracija inhibitora (Jönsson i Martín, 2016; Garrote i sur.,1999).

#### ***2.1.2.3. Alkalna predobrada***

Predobrada s lužinama pokazala se vrlo učinkovitom metodom predobrade lignoceluloznih sirovina s manjim udjelom lignina. Predobrada se najčešće provodi pri temperaturama nižim nego kod kiselinske predobrade zbog čega nastaje i manje nusproizvoda koji mogu kasnije negativno djelovati na rast mikroorganizma i na aktivnost celulolitičkih enzima. Ovim postupkom smanjuje se sadržaj lignina i hemiceluloze, te dolazi do bubrenja lignoceluloznih lanaca čime se povećava dostupnost celuloznih lanaca celulolitičkim enzimima. U predobradi najčešće se koriste

NaOH i  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Prednost primjene  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  u odnosu na natrijevu lužinu je niža cijena ove lužine, te mogućnost njene regeneracije s  $\text{CO}_2$  (Joshi i sur., 2011).

#### **2.1.2.4. Oksidativna predobrada**

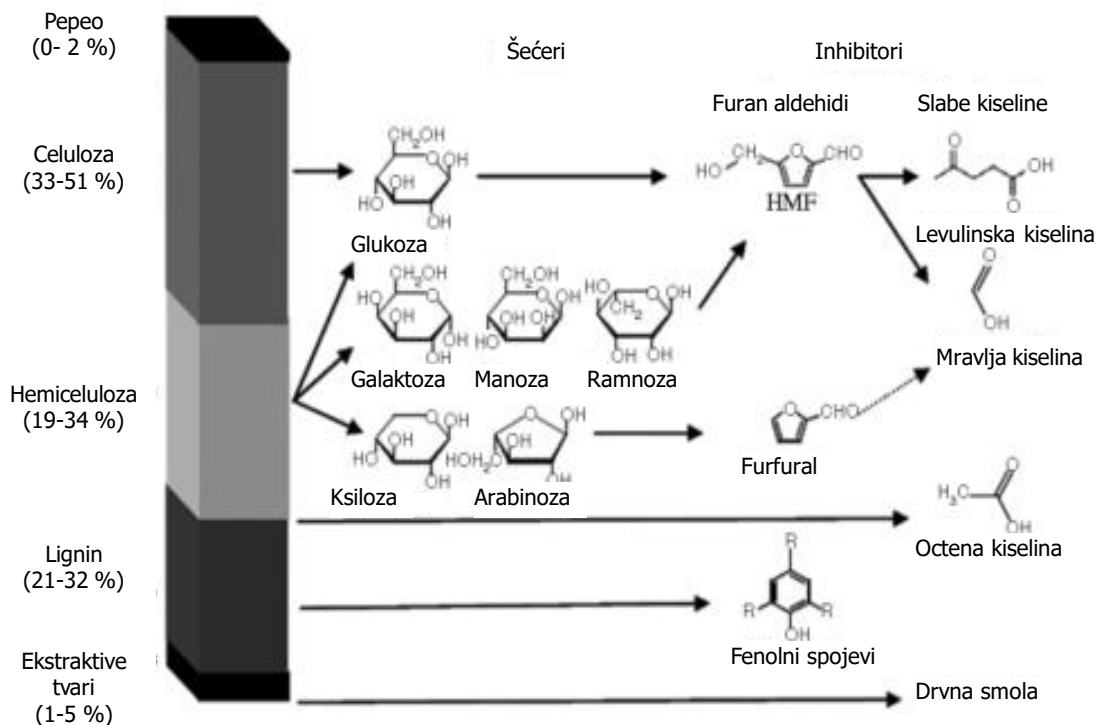
U metode oksidativne predobrade ubraja se ozonoliza, predobrada s vodikovim peroksidom u alkalnim uvjetima ( $\text{pH}=11,5$ ) i mokra oksidacija. Prilikom mokre oksidacije, biomasa se tretira vodom i zrakom ili kisikom pri visokim temperaturama u kratkom vremenu. Oksidativnom predobradom smanjuje se kristaličnost celuloze i pospješuje odvajanje lignina od celuloze i hemiceluloze, uz značajno smanjenje sadržaja hemiceluloze. Lignin se razgrađuje i oksidira do alifatskih karboksilnih kiselina i fenola. Predobradom mokrom oksidacijom uz primjenu alkalija dolazi do smanjenja nastajanja furana i fenolnih aldehida koji negativno utječu na rast mikroorganizma i enzimsku razgradnju (Jönsson i Martín, 2016).

#### **2.1.2.5. Eksplozija vlakana s amonijakom (eng. Ammonia fiber explosion - AFEX)**

AFEX postupak sličan je postupku predobrade s vodenom parom. Lignocelulozna sirovina se tretira tekućim amonijakom pod visokim tlakom (od 100 do 400 psi) i temperaturama od 70 do 200°C; nakon čega se naglo smanji tlak. Tijekom ovog postupka predhidrolize dolazi do dekrystalizacije celuloze, hidrolize hemiceluloze, te izdvajanja i depolimerizacije lignina, pritom se i značajno povećava broj i veličina mikropora u staničnim stijenkama biljne stanice (Bals i sur., 2010).

## **2.2. Inhibitori**

Tijekom predobrade nastaje niz proizvoda razgradnjom osnovnih strukturnih polimera u lignoceluloznoj sirovini (slika 6). Hidrolizom celuloze nastaje D-glukoza, a hidrolizom hemiceluloze nastaju heksoze D-glukoza, D-galaktoza, D-manoza i D-ramnoza, te pentoze D-ksiloza i L-arabinoza. Osim šećera hidrolizom hemiceluloze nastaju i uronske kiseline kao što su D-glukuronska i 4-O-metilglukuronska kiselina.



**Slika 6.** Sastav lignocelulozne sirovine i produkti razgradnje lignocelulozne sirovine (Ibraheem i Ndimba, 2013).

Na primjer, kada želimo postići što veću topivost hemiceluloze i/ili lignina, neizbježno utječemo na već otopljene fragmente tih komponenti i potičemo njihovu razgradnju u spojeve koji kasnije mogu pokazivati inhibitorni utjecaj na enzime i radni mikroorganizam (Jönsson i Martín, 2016). Vrsta i količina nastalih inhibitora prvenstveno ovisi o vrsti biomase te njenom sastavu. Najviše vrsta inhibitora potječe od lignina, a njegov način povezivanja sa ostalim komponentama lignoceluloze i sastav značajno varira u različitim izvorima biomase. Također, način predobrade i parametri procesa fermentacije (koncentracija kisika, pH), mogu dovesti do pogoršanja toksičnog djelovanja inhibitora.

Inhibitori nastali u procesu obrade lignoceluloznih sirovina se mogu svrstati u tri skupine, odnosno tri vrste organskih spojeva, a to su: organske kiseline, derivati furana i fenolni spojevi (Slika 6., Ibraheem i Ndimba, 2013).

### **2.2.1. Organske kiseline**

Najzastupljenije slabe organske kiseline u lignoceluloznom hidrolizatu su octena, mravlja i levulinska. Octena kiselina nastaje hidrolizom acetilnih skupina u hemicelulozi, dok mravlja i levulinska kiselina nastaje razgradnjom HMF-a. Mravlja kiselina također nastaje i razgradnjom furfurala (Jönsson i sur., 2013). Koncentracija pojedinih kiselina u lignoceluloznom hidrolizatu ovisi o vrsti lignocelulozne sirovine te o uvjetima predobrade. Koncentracija octene kiseline iznosi od 1 do 10 g/L, dok koncentracija mravlje kiseline može biti i 10 puta manja od koncentracije octene kiseline (Mills i sur., 2009).

Organske kiseline u nedisociranom obliku difuzijom prolaze kroz staničnu membranu te unutar stanice disociraju. Disocijacijom kiseline smanjuje se pH vrijednost citosola što može dovesti i do smrti stanice (Jönsson i sur., 2013). Zeng i sur. (2013) utvrdili su da mravlja i octena kiselina imaju pozitivan učinak na rast plijesni *Mortierella isabellina* i sintezu lipida. Dodatkom 4 g/L octene i 2 g/L mravlje kiseline u podlogu za uzgoj značajno se povećala koncentracija biomase, dok se prinos lipida udvostručio. Levulinska kiselina u podlozi utječe na povećanje prinosa biomase, dok smanjuje prinos lipida. Smatra se da je smanjen prinos lipida posljedica nedostatka ATP-a potrebnog za sintezu masnih kiselina koji stanica troši za održavanje citosolnog pH (Zeng i sur., 2013).

### **2.2.2. Fenolni spojevi**

Tijekom kiselinske predobrade nastaje niz različitih fenolnih spojeva razgradnjom lignina i ugljikohidrata u lignoceluloznoj sirovini (Popoff i Theander, 1976; Almeida et al., 2007). Većina nastalih fenolnih spojeva je nerazgradljiva ili slabo razgradljiva (Mills i sur., 2009). Fenolni spojevi ugrađuju se u staničnu membranu povećavajući njenu propusnost. Narušavanjem strukture membrane dolazi propuštanja proteina, RNA, ATP, iona iz citosola u izvanstanični prostor. Narušena selektivnost stanične membrane uzrokuje konstantan manjak ATP-a, promjenu proton motorne sile, te poremećaj u funkciji proteina i transportu nutrijenata (Ibraheem i Ndimba, 2013).

Zeng i sur. (2013) su pokazali da derivati lignina imaju veći inhibicijski učinak na rast plijesni *M. isabellina* u usporedbi s organskim kiselinama i furan aldehidima. Također je uočeno povećanje

toksičnosti fenolnih spojeva s obzirom na mjesto vezanja supstituenta (para, orto, meta) na spoj. Orto pozicija povećava toksičnost vanilina, dok metoksi skupina i hidroksilna grupa na meta i para poziciji (ili obrnuto) nemaju utjecaja na toksičnost (Almeida i sur., 2007).

### **2.2.3. Furan aldehidi**

Predobrada razrijeđenim kiselinama najčešće je korištena metoda predobrade lignoceluloznih sirovina, a niski pH uz visoke temperature uzrokuju dehidraciju monomera šećera u hidrolizatu pri čemu nastaje 2-furaldehid (furfural) i 5-hidroksimetilfurfural. Furfural i HMF inhibiraju rast radnog mikroorganizma i sinteza proizvoda metabolizma. Koncentracije ovih inhibitora u lignoceluloznim hidrolizatima iznosi do 5 g/L (Mills i sur., 2009).

#### **2.2.3.1. Furfural**

Dehidracijom pentoza (D-ksiloza i L-arabinoza) nastaje furfural. Furfural je najzastupljeniji nusproizvod u hidrolizatima predobrađenih lignoceluloznih hidrolizata, te u prisustvu drugih inhibitora u lignoceluloznom hidrolizatu njegov negativan učinak na rast mikroorganizma se povećava. Molekula furfurala je hidrofobna pa lako prolazi kroz strukturu stanične membrane i povećava njezinu propusnost. Također smanjuje brzinu replikacije DNK, sintezu ATP-a i proizvoda metabolizma (Ibraheem i Ndimba, 2013). Furfural utječe na rast stanice tako da utječe na prijenos elektrona u stanici, te inhibira enzime glikolize. Također, inhibira malatni enzim koji je ključan za osiguravanje NADPH potrebnog za biosintezu masnih kiselina kod oleaginoznih mikroorganizama, te sintezu prekursora za sintezu masnih kiselina (acetil-CoA i malonil CoA; Ruan i sur., 2014).

Zeng i sur. (2013) proučavali su učinak furfurala na rast i sintezu lipida u plijesni *M. isabellina*, te su utvrdili da koncentracija furfurala do 2 g/L ne utječe na rast plijesni. Značajno manji inhibicijski učinak furfurala na rast mikroorganizma u odnosu na većinu drugih inhibitora nastalih u procesu predobrade posljedica je sposobnosti stanice da uz pomoć vlastitih enzima prevedu furfural u manje toksičan spoj. U kvasacu *Saccharomyces cerevisiae* NADH-ovisna alkohol dehidrogenaza provodi redukciju furfurala u furfural alkohol što ima za posljedicu povećanje prinosa etanola i povećanje koncentracije biomase kvasca (Palmqvist i sur., 1999; Jayakody i sur., 2013).



### **2.2.3.2. 5-hidroksimetil furfural (HMF)**

HMF nastaje dehidracijom heksoza kao što su D-glukoza, D-manoza, D-galaktoza i D-fruktoza. Koncentracija ovog inhibitora u lignoceluloznom hidrolizatu, ovisi o vrsti lignocelulozne sirovine i o uvjetima predobrade. Zeng i sur. (2013) su istraživali učinak HMF-a na rast plijesni *M. isabellina* i sintezu lipida. Pri koncentraciji HMF-a u podlozi od 2 g/L, koncentracija biomase plijesni iznosila je 74,7%, a prinos lipida 76,9% vrijednosti postignute u podlozi bez dodatka inhibitora. Smatra se da je povećana otpornost plijesni na HMF posljedica enzimske konverzije HMF-a u manje toksičan proizvod 5-hidroksimetilfurfural-alkohol (HMFAL). Ruan i sur. (2014) utvrdili su da HMF i furfural imaju sličan učinak na plijesan *M. isabellina*. Utvrđeno je da HMF smanjuje brzinu prijenosa elektrona, neposredno utječe na glikolizu, Krebs-ov ciklus i time na ukupni metabolizam mikroorganizma. Pri koncentracijama HMF-a u podlozi većim od 5 g/L, konverzija supstrata se smanjila za 40 %, koncentracija biomase za 35 %, prinos lipida za 72 %, a maseni udjel lipida u biomasi plijesni za 32 %.

Kod kvasca *S. cerevisiae* je utvrđen je sličan učinak HMF-a na rast i prinos etanola (Wikandari i sur., 2010). Tijekom uzgoja kvasca utvrđeno je da se koncentracija HMF-a smanjuje što je posljedica biotransformacije inhibitora u manje toksičan 5-hidroksimetilfurfural-alkohol. Utvrđeno je i da kvasac također provodi konverziju furfurala u furfural alkohol ili u furoinsku kiselinu (Wikandari i sur., 2010).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

---

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Radni mikroorganizam

Radni mikroorganizam je kultura plijesni *Mortierella isabellina*, soj DSM 1414, dobivena iz zbirke mikroorganizama i staničnih kultura Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ; Braunschweig, Njemačka).

#### 3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

Za pripremu hranjive podloge korištene su sirovine navedene u Tablici 1.

**Tablica 1.** Sirovine za pripremu hranjivih podloga

NAZIV	PROIZVOĐAČ
Glukoza	Carl Roth, Austrija
Kvaščevo ekstrakt	Carl Roth, Austrija
Diamonijev sulfat	Kemika, Hrvatska
Kalijev dihidrogenfosfat	Kemika, Hrvatska
Natrijev dihidrogenfosfat	Kemika, Hrvatska
Natrijev hidrogenfosfat	Kemika, Hrvatska
Magnezijev sulfat heptahidrat	Kemika, Hrvatska
Kalcijev klorid dihidrat	Kemika, Hrvatska
Željezov (III) klorid sekstahidrat	Kemika, Hrvatska
Cinkov sulfat heptahidrat	Merck, USA
Bakrov sulfat pentahidrat	Kemika, Hrvatska
Kobaltov nitrat monohidrat	Kemika, Hrvatska
Manganov sulfat pentahidrat	Sigma, USA
PDA agar	Difco, USA
Furfural	Sigma, USA
5-hidroksimetilfurfural	Sigma, USA
Tween 80	Macrone Fine Chemicals, USA

### **3.1.3. Ostale kemikalije**

**Tablica 2.** Kemikalije korištene u istraživanju

<b>NAZIV</b>	<b>PROIZVOĐAČ</b>
Kloroform	Macrone Fine Chemicals, USA
Metanol	J. T. Backer, USA
Cinkov sulfat heptahidrat	Merck, USA
Fosforna kiselina	Acros Organics, Belgija

### **3.1.4. Hranjiva podloga**

Šaržni uzgoj plijesni proveden je u tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak inhibitora furfurala i HMF-a. Koncentracije furfurala iznosile su od 0,05 do 5 g/L dok su koncentracije HMF-a bile od 0,25 do 2 g/L. Za svaku koncentraciju furfurala u hranjivoj podlozi pripremljene su dvije paralele, dok je za svaku koncentraciju HMF-a u podlozi pripremljen jedan uzorak, te dvije paralele kontrolnog uzorka bez dodatka inhibitora.

**Tablica 3.** Sastav hranjive podloge za šaržni uzgoj plijesni

<b>SASTOJAK HRANJIVE PODLOGE</b>	<b>KONCENTRACIJA</b>
Glukoza	50 g L <sup>-1</sup>
Kvašćev ekstrakt	1 g L <sup>-1</sup>
Kalijev dihidrogenfosfat	7 g L <sup>-1</sup>
Natrijev dihidrogenfosfat	2 g L <sup>-1</sup>
Magnezijev sulfat heptahidrat	1,5 g L <sup>-1</sup>
Kalcijev klorid dihidrat	0,1 g L <sup>-1</sup>
Željezov (III) klorid sekstahidrat	0,08 g L <sup>-1</sup>
Cinkov sulfat heptahidrat	10 mg L <sup>-1</sup>
Kobaltov nitrat monohidrat	10 mg L <sup>-1</sup>
Bakrov sulfat pentahidrat	10 mg L <sup>-1</sup>
Manganov sulfat pentahidrat	10 mg L <sup>-1</sup>

### **3.1.5. Oprema i aparatura**

U izradi ovog rada, uz laboratorijsko posuđe, korištena je i sljedeća oprema:

- Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (Shimadzu CLASS - VP LC - 10A, Shimadzu, Japan).
- Centrifuga (Harrier 18/80, Sanyo, Velika Britanija)
- Tresilica (RM 71 B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka)
- Sušionik (Instrumentaria ST-50, Hrvatska)
- Tehnička vaga (Technica ET-1111, Slovenija)
- Analitička vaga (Sartorius, Njemačka)
- Vrtložna miješalica (Technica ET-1111, Slovenija)
- Boce plina s dušikom
- Hladnjak i zamrzivač

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Uzgoj i priprema inokuluma spora**

Plijesan *Mortierella isabellina* precijepljena je na kosi PDA agar i uzgajana tjedan dana pri sobnoj temperaturi. Pomoću mikrobiološke ušice narasle spore su sastrugane s površine podloge uz dodatak demineralizirane vode s Tween 80. Spore su zatim filtrirane preko sterilne gaze u sterilnu tikvicu, a broj spora po mL suspenzije je određen brojanjem spora u Thomaovoj komorici.

### **3.2.2. Šaržni proces proizvodnje lipida u tikvicama**

Uzgoj plijesni proveden je u hranjivoj podlozi za proizvodnju lipida šaržnim procesom u Erlenmeyerovim tikvicama od 300 mL. Volumen podloge iznosio je 50 mL. Pripremljene podloge određenog sastava su sterilizirane i naciepljene s  $0,5 \times 10^7$  spora. Za svaku koncentraciju inhibitora proveo se šaržni uzgoj na tresilici pri 28 °C na  $140 \text{ o min}^{-1}$  u trajanju od 7 dana. Na kraju uzgoja određena je koncentracija glukoze, biomase, te udjel lipida u biomasi. Po završetku uzgoja, biomasa plijesni je izdvojena vakuum filtracijom prevrele podloge preko membranskog filtra (0,2  $\mu\text{m}$ ). Biomasa je isprana dva puta demineraliziranim vodom. Supernatant je

pohranjen na -20 °C do određivanja koncentracije glukoze pomoću HPLC-a. Biomasa plijesni osušena je u sušioniku na 50°C do konstantne mase. Osušena biomasa plijesni sadržavala je od 3 do 4% vlage.

### **3.2.3. Analitičke metode**

#### ***3.2.3.1. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase***

Suha tvar biomase plijesni je određivana vaganjem osušenog uzorka. Biomasa je osušena u sušioniku pri 50 °C do konstantne mase. Masa suhe tvari je izračunata oduzimanjem mase prazne posudice za sušenje od mase suhe biomase u posudici.

#### ***3.2.3.2. Određivanje koncentracije glukoze pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC)***

Za određivanje koncentracije glukoze tijekom uzgoja kvasca korišten je uređaj Shimadzu CLASS-VP LC-10AVP (Japan). Uređaj se sastoji od crpke (LC-10ADV), otplinjača (DGL-14A), injektora (SIL-10ADV), uređaja za grijanje kolone (CTO-10AVP), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Supelcogel TM H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 µm), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10AVP) i računalnog programa za kromatografiju. Za pripremu svih otopina korištena je redestilirana voda čija je vodljivost iznosila manje od 1 µS. Kao pokretna faza korištena je otopina H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,1 % vol/vol) u vodi. Po 20 µL svakog uzorka injektirano je i propušteno kroz kolonu pri temperaturi od 55 °C i brzini protoka pokretne faze od 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Nakon kromatografske analize integracija dobivenih dijagrama provedena je uz pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10. Koncentracija supstrata u uzorku izračunata je prema jednadžbi baždarnog pravca za standard tj. glukoze. Jednadžba baždarnog pravca za određivanje koncentracije glukoze (0,1 – 10 g/L) glasi:

$$y = 258154x + 14890$$

y-površina pika za glukoze, x- koncentracija glukoze (g/L)

#### ***3.2.3.3. Određivanje udjela lipida***

U osušenoj biomasi plijesni određen je udjel lipida ekstrakcijom s metanolom i kloroformom. U Pyrex staklenu kivetu dodana je izvagana biomasa plijesni (100-200 mg), te je dodano i 0,3 mL vode, 2 mL metanola i 4 mL kloroforma. Ekstrakcija ukupnih staničnih lipida provedena je preko noći uz miješanje na tresilici (120 o min<sup>-1</sup>). Sljedeći dan je ekstrakt filtriran

preko sinter lijevka, a zaostali filtracijski kolač na sinter lijevku je ispran sa smjesom otapala kloroform/metanol/voda (2:1:0,5 , vol/vol). Zaostali proteini u ekstraktu uklonjeni su dodatkom 0,7% NaCl (20% volumena ekstrakta) uz miješanje na vorteksu. Nakon razdvajanja metanolske i kloroformske faze, donja kloroformska faza je izdvojena pomoću staklene šprice s dugačkom injekcijom i prenesena u prethodno izvaganu staklenu epruvetu. Kloroform je uklonjen propuhivanjem ekstrakta s plinovitim dušikom. Uzorak je osušen pri 100 °C do konstantne mase, te je potom epruveta izvagana.

Udjel lipida u biomasi je izračunat prema sljedećoj jednadžbi:

$$w_L = \frac{m_{el} - m_e}{m_X} \cdot 100[\%]$$

$m_{el}$  – masa osušene epruvete s lipidima [g]

$m_e$  – masa prazne suhe epruvete [g]

$m_X$  – masa biomase [g L<sup>-1</sup>]

### **3.2.4. Pokazatelji uspješnosti procesa**

Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu ( $Y_{X_{BL}/S}$ ) računa se kao kvocijent prirasle biomase bez lipida i utrošenog supstrata:

$$Y_{X_{BL}/S} = \frac{X_{BL}}{S_0 - S} [g g^{-1}]$$

$X_{BL}$  – koncentracija biomase bez lipida na kraju uzgoja [g L<sup>-1</sup>]

$S$  – koncentracija supstrata na kraju uzgoja [g L<sup>-1</sup>]

$S_0$  – koncentracija supstrata na početku uzgoja [g L<sup>-1</sup>]

Koeficijent  $Y_{L/S}$  predstavlja omjer mase lipida nastale tijekom uzgoja i mase utrošenog supstrata tj. izvora ugljika:

$$Y_{L/S} = \frac{w_L \cdot X}{S_0 - S} [g g^{-1}]$$

$w_L$  – udio lipida dobiven u biomasi [%]

$X$  – koncentracija biomase [g L<sup>-1</sup>]

Produktivnost sinteze biomase bez lipida ( $Pr_{X_{BL}}$ ) i produktivnost sinteze lipida ( $Pr_L$ ) izračunate su prema sljedećim jednažbama:

$$Pr_{X_{BL}} = \frac{X_{BL}}{t_u} [gL^{-1}h^{-1}]$$

$$Pr_L = \frac{w_L \cdot X_{BL}}{t_u} [gL^{-1}h^{-1}]$$

$t_u$  – trajanje procesa

Iskorištenje procesa izračunava se iz omjera postignutog i teorijskog stupnja konverzije glukoze u lipide ( $Y_{L/Steor} = 0,31 \text{ g g}^{-1}$ ):

$$E = \frac{Y_{L/S}}{Y_{L/Steor}} \cdot 100[\%]$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

---

### 4.1. Plijesan *Mortierella isabellina*

Plijesan *M. isabellina* ubraja se u skupinu oleaginoznih mikroorganizama koji mogu nakupiti značajne količina lipida unutar stanice, a njihov udjel u suhoj tvari biomase može iznositi od 20 % pa čak i do 70 % (Ruan i sur., 2012). Akumulirani lipidi su po kemijskom sastavu traciilgliceroli koji se nakupljaju unutar tzv. lipidnih mješnica u citoplazmi stanice. Nakupljanje lipida ili lipogeneza započinje u uvjetima limitacije rasta mikroorganizma nekim sastojkom podloge (izuzev izvora ugljika), najčešće izvorom dušika, u prisustvu izvora ugljika u suvišku. Pri tome se aktivira AMP-deaminaza koja katalizira reakcije deaminacije adenozin monofosfata u inozin monofosfat uz otpuštanje jedne molekule amonijaka. Time stanica nadoknađuje potreban dušik što ima za posljedicu smanjenje količine ATP-a i nakupljanje citrata. Acetil-CoA potreban za sintezu masnih kiselina nastaje iz citrata djelovanjem enzima ATP-citrat liaze (Ruan, 2014).

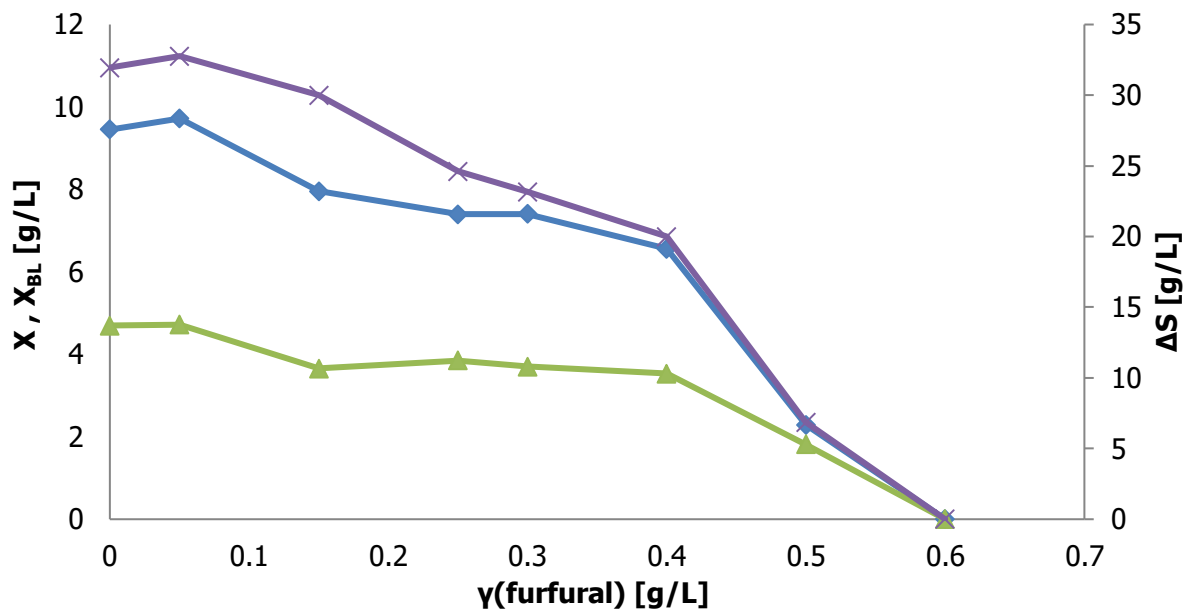
Plijesan *M. isabellina* kao izvor ugljika za rast i sintezu lipida može koristiti šećere pentoze (arabinoza, ksiloza, manoza), heksoze (glukoza, galaktoza, fruktoza) i disaharide (saharoza i celobioza), te glicerol i različite šećere u lignoceluloznim hidrolizatima (Gao i sur., 2013). Utvrđeno je da je plijesan *M. isabellina* otporna na različite nusproizvode koji nastaju tijekom procesa predobrade lignocelulozne sirovine sa sumpornom kiselinom pri visokim temperaturama (furfural, HMF, octena i mravlja kiselina; Zheng i sur., 2013; Fang i sur., 2016). Posljednjih godina sve intenzivnije se istražuje proizvodnja biodizela iz mikrobni lipida pri čemu se kao izvor ugljika koriste sirovine niske tržišne vrijednosti kao što su lignocelulozni hidrolizati (Kumar 2011).

### 4.2. Učinak furfurala na rast plijesni *M. isabellina* i sintezu lipida

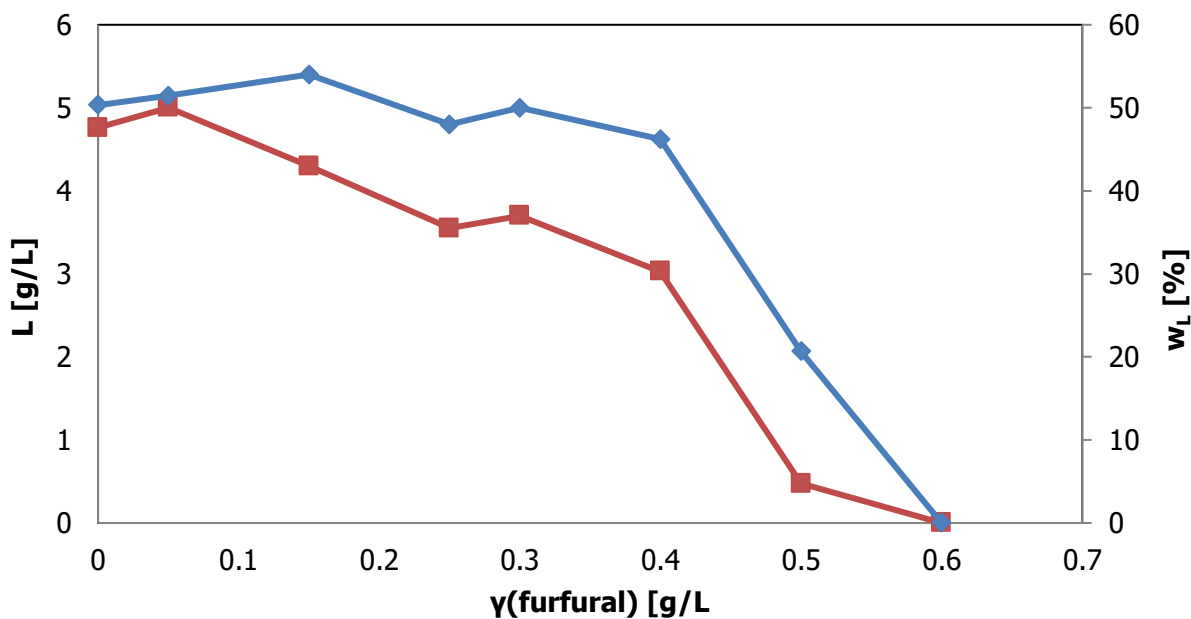
U ovom radu istražen je učinak dva najzastupljenija nusproizvoda koji nastaju tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina, furfural i HMF, na rast plijesni *M. isabellina* i sposobnost nakupljanja lipida. Koncentracija furfurala u podlozi za uzgoj iznosila je 0,25-5 g/L, a HMF-a 0,05-2 g/L. Uzgoj plijesni proveden je na podlozi uz visok početni molarni omjer ugljika i dušika



od 334 mol/mol kako bi se potakla liponeogeneza i učinkovito nakupljanje lipida (Ambruš, 2016). U podlozi jednakog sastava bez dodatka inhibitora uzgojena je kontrolna kultura. Rast



**Slika 7.** Učinak fururala na koncentraciju biomase ( $X$ ,  $\diamond$ ), koncentraciju biomase bez lipida ( $X_{BL}$ ,  $\triangle$ ) i koncentraciju utrošenog supstrata ( $\Delta S$ ,  $\times$ ).



**Slika 8.** Učinak fururala na koncentraciju lipida ( $L$ ,  $\blacksquare$ ) i udjel lipida ( $w_L$ ,  $\diamond$ ).

plijesni i sinteza lipida uz dodatak inhibitora različite koncentracije uspoređen je s kontrolnom kulturom.

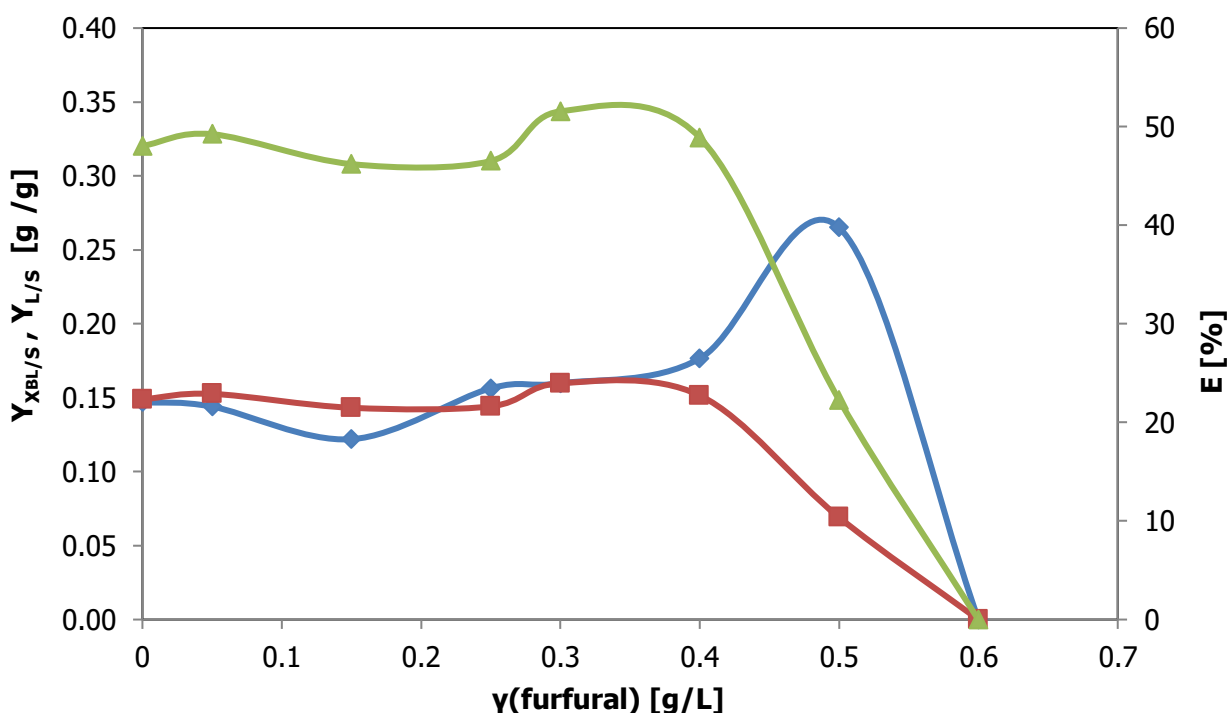
Na slikama 7 i 8 prikazane su vrijednosti koncentracije biomase ( $X$ ), koncentracije biomase bez lipida ( $X_{BL}$ ), koncentracija utrošene glukoze ( $\Delta S$ ), te koncentracija ( $L$ ) i udjel lipida ( $w_L$ ) na kraju uzgoja u podlozi uz različite koncentracije furfurala. U podlogama s koncentracijom furfurala manjom od 0,05 g/L postignute su najveće koncentracije biomase, biomase bez lipida, te koncentracije i udjela lipida. Povećanjem koncentracije furfurala od 0,15 do 0,4 g/L ove vrijednosti se postupno smanjuju. Pri koncentraciji furfurala od 0,4 g/L koncentracija biomase se smanjila 30,6 %, a koncentracija biomase bez lipida za 24,7 % u odnosu na njihovu vrijednost u podlozi bez dodatka inhibitora. Koncentracija lipida iznosila je 3,06 g/L što je za 36,3 % manje nego u podlozi bez inhibitora. Učinak furfurala na udjel lipida bio je manji. Vrijednost udjela lipida smanjila se s 50,3 % (podloga bez furfurala) na 46,2 % (podloga s furfuralom). Povećanje koncentracije furfurala iznad 0,4 g/L značano se smanjuje koncentracija biomase i biomase bez lipida, te udjel i koncentracija lipida.

Furfural je najzastupljeniji inhibitor u lignoceluloznom hidrolizatu dobivenom kiselinskom predobradom. Utvrđeno je da se u njegovoj prisutnosti smanjuje prinos biomase i bioetanol u procesu proizvodnje s kvascem *S. cerevisiae* (Schell i sur., 2003). Također utječe na permeabilnost membrane stanice, inhibira ključne enzime glikolizacije, utječe na transport elektrona i prijenos tvari u stanicu. Utječe i na sintezu lipida smanjujući aktivnost NADP<sup>+</sup> ovisnog malat enzima (malični enzim) koji je odgovoran za sintezu NADPH potrebnog za sintezu masnih kiselina (Vitrinskaya i Soboleva, 1975; Banerjee i sur., 1981; Palmqvist i sur., 1999). Također inhibira sintezu acetil-CoA i malonil-CoA (Beopoulos i sur., 2011).

U literaturi se navodi da je plijesan *M. isabellina* vrlo otporna na furfural i HMF. Zeng i sur. (2013) su proučavali učinak furfurala na rast i sintezu lipida u ovoj plijesni, te su utvrdili da pri koncentraciji furfurala od 2 g/L koncentracija biomase smanjila za 11,8 % u odnosu na koncentraciju biomase u podlozi bez inhibitora. U eksperimentu provedenom u ovom radu, pri koncentraciji furfurala većoj od 0,6 g/L nije zamijećen rast plijesni. Značajno niža otpornost plijesni u provedenom istraživanju može se objasniti time što su podloge za uzgoj bile inokulirane sporama plijesni dok je u istraživanju Zeng i sur. (2013) korištena kultura plijesni stara jedan dan. U kvascu *S. cerevisiae* NADH-ovisna alkohol dehidrogenaza provodi redukciju furfurala u manje toksičan furfural alkohol čime se povećava prinos etanola i rast biomase kvasca (Palmqvist i sur., 1999). Povećana otpornost kulture naciepljene s micelijem plijesni

najvjerojatnije je posljedica sposobnosti kulture da provodi detoksikaciju podloge tj. redukciju furfurala u furfural uz pomoć staničnih enzima. U podlozi nacijepljenoj sa sporama potrebni enzimi za detoksikaciju tek trebaju biti sintetizirani nakon što spore proključaju. To je i najvjerojatnije razlog niske otpornosti ove kulture na furfural. U daljnjim istraživanjima bi bilo potrebno utvrditi učinak furfurala na micelij i usporediti s rezlutatima dobivenim u ovom istraživanju.

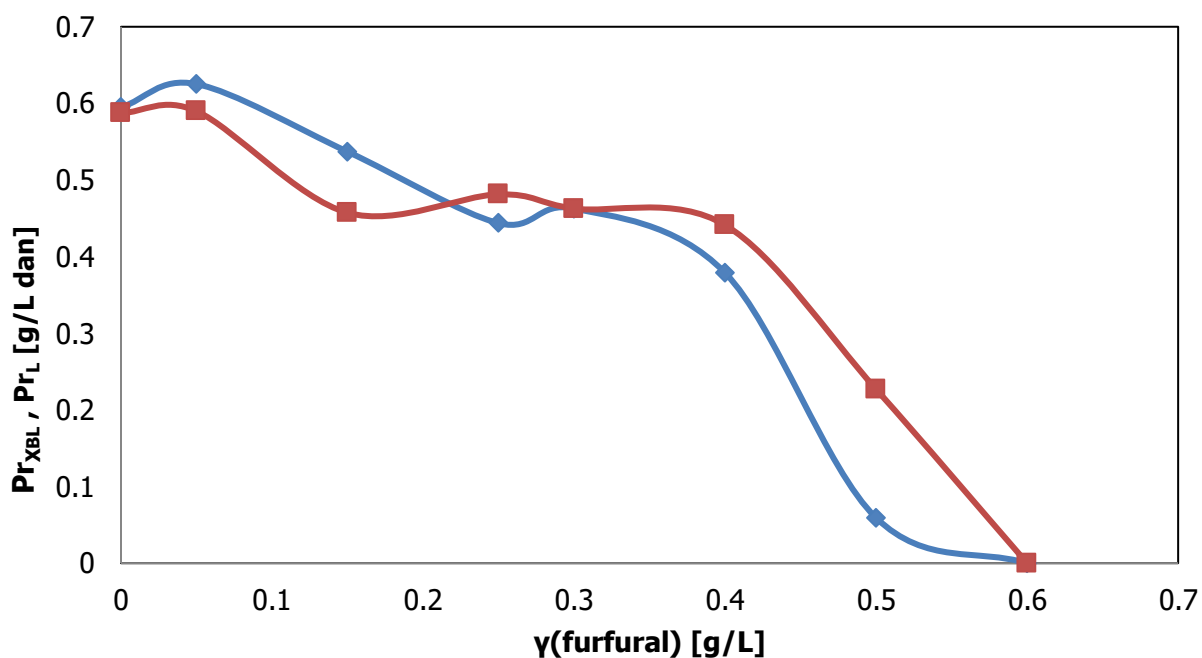
Na slici 9. prikazan je učinak furfurala na vrijednost koeficijenta konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{X/S}$ ) i lipide ( $Y_{L/S}$ ), te iskorištenje procesa (E). Pri koncentracijama furfurala do 0,4 g/L vrijednost koeficijenta konverzije se ne mijenja značajnije. Koeficijent konverzije supstrata u lipide iznosio je od 0,14 do 0,18 g/g dok je koeficijent konverzije supstrata u biomasu iznosio od 0,14-0,17 g/g. Međutim pri koncentraciji furfurala od 0,5 g/L supstrat se većim dijelom trošio za sintezu biomase bez lipida dok se sinteza lipida značajno smanjila. Koeficijent konverzije supstrata u lipide smanjio se za 50 % u odnosu na kontrolnu kulturu, dok se koeficijent konverzije supstrata u biomasu bez lipida udvostručio. Pri koncentraciji furfurala od 0,6 g/L plijesan nije rasla te su vrijednost oba koeficijenta konverzije supstrata bila jednaka nuli.



**Slika 9.** Učinak furfurala na koeficijent konverzije supstrata u biomasu bez lipida ( $Y_{XBL/S}$ ,  $\blacklozenge$ ), koeficijent konverzije supstrata u lipide ( $Y_{L/S}$ ,  $\blacklozenge$ ) i iskorištenje sinteze lipida (E,  $\blacktriangle$ ).

Pokazatelji uspješnosti procesa proizvodnje lipida, iskorištenje, te produktivnost sinteze biomase bez lipida i produktivnost sinteze lipida prikazani su na slikama 9 i 10. Vrijednost iskorištenja procesa proizvodnje lipida (slika 9) nije se značajnije mijenjala pri koncentracijama furfurala manjim od 0,4 g/L i iznosila je od 46-52% teoretskog iskorištenja.

Pri koncentraciji furfurala od 0,5 g/L iskorištenje je palo za 50 % vrijednosti postignute u kontrolnoj podlozi, te pri koncentraciji od 0,6 g/L vrijednost iskorištenja bila je jednaka nuli (slika 10). Produktivnost sinteze biomase bez lipida (0,579 g/L dan) i produktivnost sinteze lipida (0,62 g/L dan) pri najmanjoj koncentraciji furfurala bila je približno jednaka vrijednosti za kontrolnu kulturu. Pri koncentraciji furfurala od 0,5 g/L produktivnost sinteze lipida se značajno smanjila i iznosila je 0,059 g/L dan što je 90 % vrijednosti postignute u kontrolnoj kulturi. Kao što je i očekivano učinak furfurala na produktivnost sinteze biomase bez lipida nešto je manji nego na produktivnost sinteze lipida. Vrijednost produktivnosti sinteze biomase bez lipida iznosio je 0,22 g/L dan što je približno 70 % manje nego u kontrolnoj podlozi. Pri koncentracijama furfurala većim od 0,6 g/L obje produktivnosti jednake su nula.

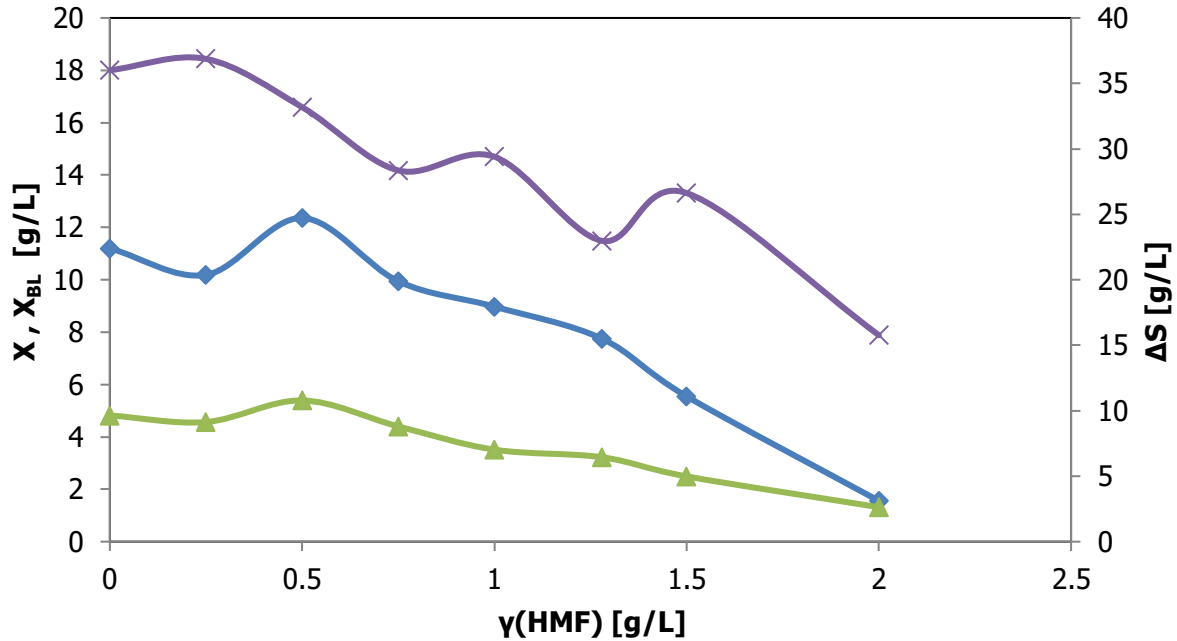


**Slika 10.** Učinak furfurala na produktivnost sinteze biomase bez lipida ( $Pr_{XBL}$ , ■) i produktivnost sinteze lipida ( $Pr_L$ , ◆).

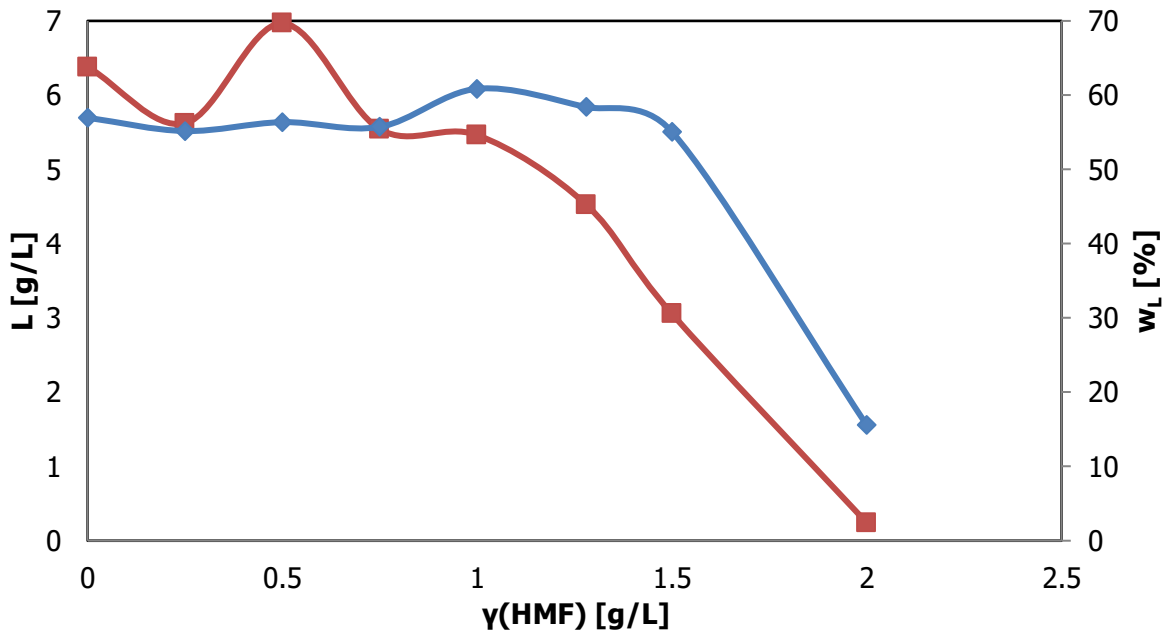
### 4.3. Učinak HMF-a na rast plijesni *M. isabellina* i sintezu lipida

U nastavku istraživanja proučavan je učinak HMF-a na rast plijesni *M. isabellina* i sintezu lipida. Učinak HMF-a na koncentraciju biomase ( $X$ ), koncentraciju biomase bez lipida ( $X_{BL}$ ), koncentraciju utrošene glukoze ( $\Delta S$ ), te koncentraciju ( $L$ ) i udjel lipida ( $w_L$ ) na kraju šaržnog uzgoja prikazan je na slikama 11 i 12. Pri koncentracijama manjim od 0,5 g/L HMF ne utječe značajnije na rast plijesni *M. isabellina*. Daljnje povećanje koncentracije HMF-a utječe na značajnije smanjenje koncentracije biomase, koncentracije biomase bez lipida i koncentracije lipida. Pri koncentraciji HMF-a od 2 g/L koncentracija biomase iznosila je samo 1,3 g/L, dok je koncentracija lipida bila 0,25 g/L. Izraženiji negativan učinak na nakupljanje lipida u miceliju plijesni zamijećen je pri znatno većim koncentracijama HMF-a. Pri koncentraciji HMF većoj od 1,5 g/L smanjio se udjel lipida u biomasi, a pri koncentraciji HMF-a od 2 g/L iznosio 15,5 % što je za 73 % manje od vrijednosti određene u kontrolnoj kulturi. Sličan učinak na rast i nakupljanje lipida u miceliju plijesni zabilježen je i u prisustvu furfurala podlozi. Međutim učinak inhibitora na rast je utvrđen kod znatno nižih koncentracija furfurala u usporedbi s HMF-om što je u skladu s literaturnim podacima (Zeng i sur., 2013). Utvrđena manja otpornost plijesni na HMF u ovom radu može se objasniti kao i kod istraživanja učinka furfurala činjenicom da je podloga naciepljena sporama plijesni dok je u radu Zeng i sur. (2013) podloga naciepljena kulturom plijesni starom jedan dan (micelij). Micelij za razliku od spora sadrži potrebne enzime za *in situ* detoksikaciju dok u kulturi naciepljenoj sa sporama tek moraju biti sintetizirani nakon što spore proključaju.

Iako je 5-HMF manje toksičan od furfurala, njegova konverzija u manje toksičan produkt 2,5-furandimetanol u stanicama kvasca *S. cerevisiae* značajno je sporija. U ovom procesu *in situ* detoksikacije podloge sudjeluje veći broj reduktaza koje kao donor elektrona koriste NADPH i NADH. Utvrđeno je da rast i potrošnja izvora ugljika započinje tek kada koncentracija inhibitora furfurala i/ili HMF-a ne padne ispod određene vrijednosti. Smatra se da pri većim koncentracijama inhibitora NAD(P)H pretežito troši u reakcijama detoksikacije te da je brzina glikolize vrlo mala. Kada se koncentracija inhibitora u podlozi smanji, kofaktor se počinje trošiti u glikolitičkom putu te postupno raste specifična brzina rasta. Faza detoksikacije podloge uzrokuje produženu lag fazu rasta kulture kvasca.



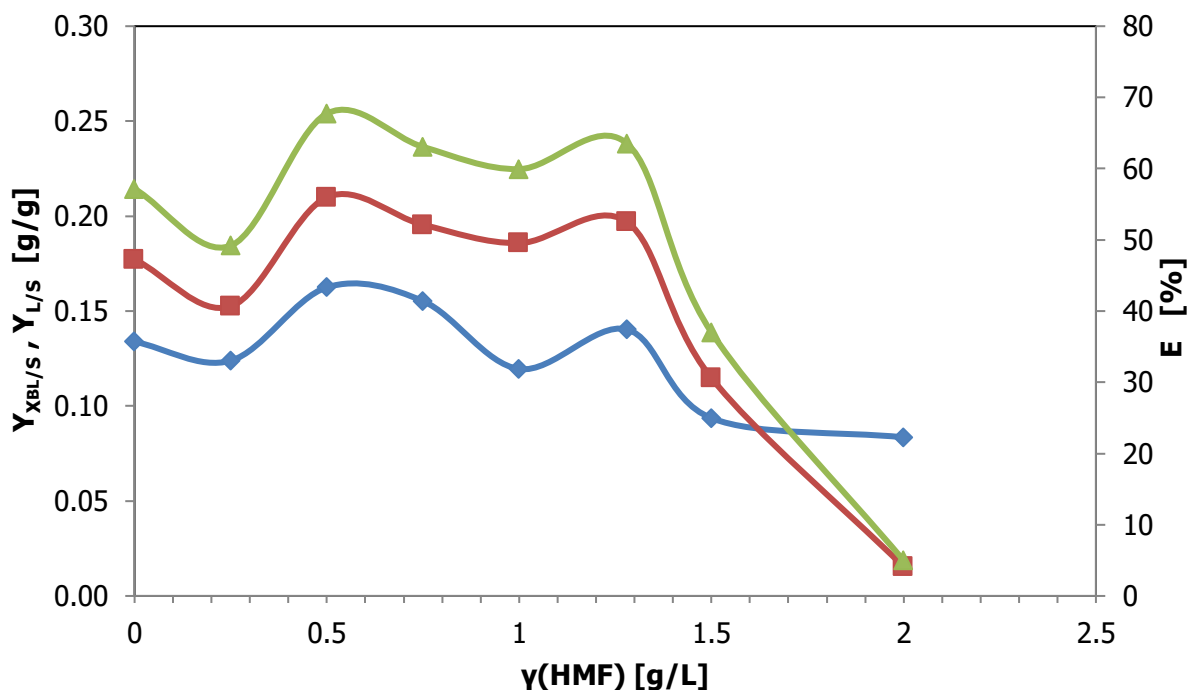
**Slika 11.** Učinak HMF-a na koncentraciju biomase ( $X$ ,  $\diamond$ ), koncentraciju biomase bez lipida ( $X_{BL}$ ,  $\triangle$ ) i koncentraciju utrošenog supstrata ( $\Delta S$ ,  $\times$ ).



**Slika 12.** Učinak fururala na koncentraciju lipida ( $L$ ,  $\blacksquare$ ) i udjel lipida ( $w_L$ ,  $\diamond$ ).

Na slici 13. prikazane su vrijednosti koeficijenta konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{X/S}$ ) i lipide ( $Y_{L/S}$ ). Pri koncentracijama HMF-a manjim od 1,5 g/L vrijednost koeficijenta konverzije

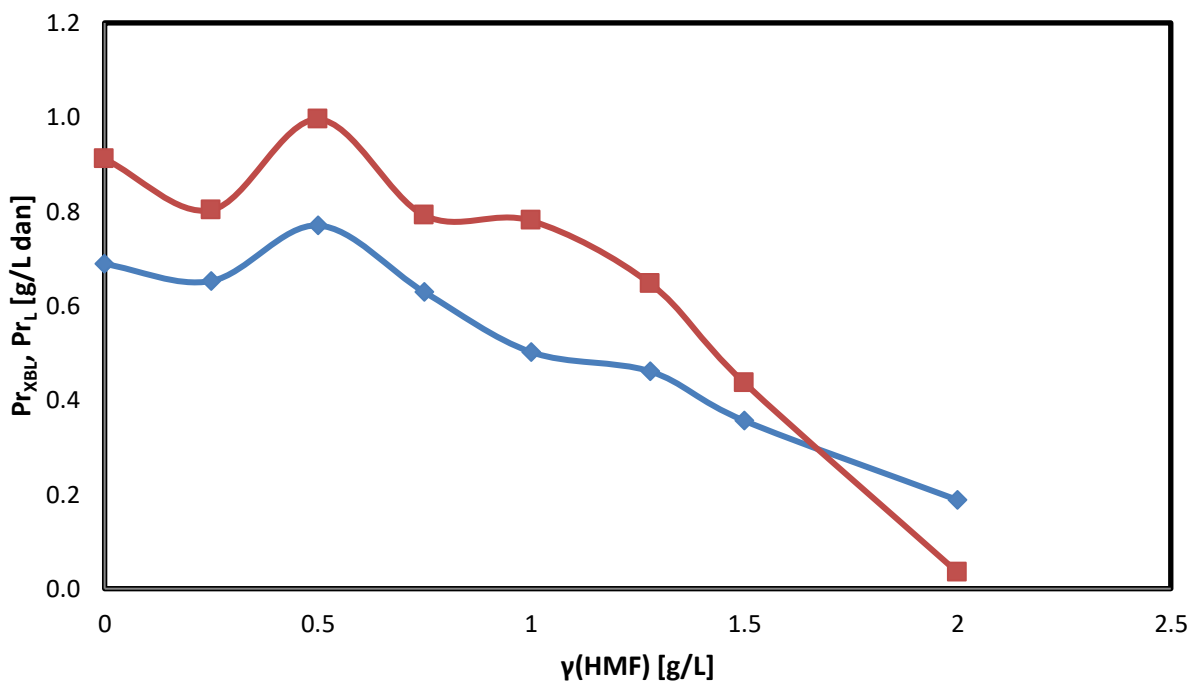
supstrata u lipide bio je nešto veći od koeficijenta konverzije supstrata u biomasu bez lipida što ukazuje da je veća količina supstrata bila korištena za sintezu lipida u miceliju. Međutim porastom koncentracije HMF-a iznad 1,5 g/L koeficijent konverzije supstrata u lipide značajno se smanjio dok je učinak na koeficijent konverzije supstrata u biomasu bio manji. Tako pri koncentraciji HMF-a od 2 g/L vrijednost koeficijenta konverzije supstrata u lipide se smanjio za 92 % ( $Y_{L/S}=0,015$  g/L dan) dok koeficijent konverzije u biomasu smanjio za 37 % ( $Y_{XBL/S}= 0,0835$  g/L dan) u odnosu na vrijednost u kontrolnoj kulturi.



**Slika 13.** Učinak furfurala na koeficijent konverzije supstrata u biomasu bez lipida ( $Y_{XBL/S}$ ,  $\blacklozenge$ ), konverzije supstrata u lipide ( $Y_{L/S}$ ,  $\blacksquare$ ) i iskorištenje sinteze lipida (E,  $\blacktriangle$ ).

Na slikama 13 i 14 prikazan je učinak HMF-a na pokazatelje uspješnosti procesa proizvodnje lipida, produktivnost sinteze lipida ( $Pr_L$ ), iskorištenje (E), te produktivnost sinteze biomase bez lipida ( $Pr_{XBL}$ ). Pri koncentracijama HMF-a 0,5-1,28 g/L vrijednost iskorištenja bila je nešto veća nego u kontrolnoj kulturi, te se može zaključiti da je inhibitor imao pozitivan učinak na proces akumulacije lipida u miceliju. Međutim pri koncentraciji inhibitora u podlozi iznad 1,5 g/L u podlozi smanjuje se koncentracija biomase, ali i udjel lipida u miceliju što je višestruko smanjilo iskorištenje procesa. Pri koncentracijama HMF-a manjim od 0,5 g/L vrijednost ,

produktivnost sinteze lipida i produktivnost sinteze biomase bez lipida nije se mijenjala. Međutim pri koncentracijama HMF-a u podlozi većim od 0,5 g/L njihove se vrijednosti značajno smanjuju; pri koncentraciji HMF-a od 2 g/L vrijednost produktivnosti sinteze lipida iznosila 0,035 g/L dan što je tek 4 % vrijednosti u određenoj u kontrolnoj kulturi. Vrijednost koeficijenta konverzije bez lipida iznosila je 0,19 g/L dan što je 28 % vrijednosti postignute u kontrolnoj kulturi.



**Slika 14.** Učinak HMF-a na produktivnost sinteze biomase bez lipida ( $Pr_{XBL}$ , ■) i produktivnost sinteze lipida ( $Pr_L$ , ◆).

U provedenom istraživanju utvrđeno je da nusproizvodi procesa predobrade, furfural i HMF, negativno utječu na rast plijesni *M. isabellina* i nakupljanje lipida. Plijesan *M. isabellina* pokazala se otpornijom na HMF koji je u lignoceluloznim hidrolizatima najčešće prisutan u manjim koncentracijama od furfurala. Pri nižim koncentracijama, oba inhibitora primarno utječu na koncentraciju biomase bez lipida dok pri višim koncentracijama utječu na proces liponeogeneze smanjujući prinos lipida i učinkovitost sinteze lipida. U daljnim istraživanjima potrebno je istražiti učinak oba inhibitora u kulturi nacijepjenoj s micelijem koji bi trebao biti otporniji na učinak ovih inhibitora.



## 5. ZAKLJUČCI

---

Na osnovu činjenica navedenih u teorijskom dijelu i provedenog istraživanja može se zaključiti:

1. Predobradom lignocelulozne sirovine povećava se iskorištenje enzimske hidrolize celuloze do glukoze, te se smanjuje količina enzima potrebnog za hidrolizu. Postupkom predobrade smanjuje se količina hemiceluloze i lignina, smanjuje kristaličnost celuloze i povećava poroznost čime se poboljšava učinkovitost enzimske hidrolize lignocelulozne sirovine.

2. Tijekom procesa predobrade nastaje niz nusproizvoda koji smanjuju aktivnost celulolitičkih enzima, te inhibiraju rast mikroorganizma i nastajanje proizvoda. Nusproizvodi se dijele u tri skupine: furan aldehidi (furfural, HMF), slabe organske kiseline (mravlja, octena i levulinska) i fenolni spojevi (vanilin, siringaldehid, 4-hidroksidbenzaldehyd).

3. Furan aldehidi, furfural i HMF, inhibiraju rast plijesni *M. isabellina* i smanjuju prinos lipida. Pri nižim koncentracijama furfurala (<0,4 g/L) i HMF-a (<1,28 g/L) negativan učinak na rast biomase je veći, dok je učinak na sintezu lipida vrlo malen. Furfural ima veći inhibicijski učinak na rast plijesni i sintezu proizvoda od HMF-a.

4. Pri koncentraciji furfurala većoj od 0,6 g/L i koncentraciji HMF-a većoj od 2 g/L plijesan *M.isabellina* ne raste, a biosinteza lipida je potpuno inhibirana.

## 6. LITERATURA

---

Almeida J.R.M., Modig T., Petersson A., Hähn-Hägerdal B., Lidén G., Gorwa-Grauslund M.F. (2007) Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **82** : 340-349.

Bals B., Rogers C., Jin M., Balan V., Dale B. (2010) Evaluation of ammonia fibre expansion (AFEX) pretreatment for enzymatic hydrolysis of switchgrass harvested in different seasons and locations. *Biotechnology for Biofuels* **3**:1.

Beukes N., Pletschke B.I. (2011) Effect of alkaline pre-treatment on enzyme synergy for efficient hemicellulose hydrolysis in sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* **102**: 5207-5213.

Chandel A.K., da Silva S.S., Sinhg O.V. (2011) Biofuel production-Recent Developments and Prospects, InTech. str. 225-246.

Chandel A.K., Singh O.V., Ra L.V. (2010) Biotechnological applications of hemicellulosic derived sugars: state-of-the-art. U: Sustainable biotechnology: renewable resources and new perspectives, Om V. Singh, & Steven P. Harvey,ur., Springer, str. 63–81.

Classen P.A.M., van Lier J.B., Lopez-Contreras A.M., et al. (1999) Utilization of biomass for the supply of energy carriers. *Appl Microbial Biotechnol* **52**: 741-755.

Coughlan M. (1985). Cellulases: production, properties and applications. *Biochemical Society Transactions* **13**: 405-406.

Dashtbann M., Schraft H., Qin W. (2009) Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. *International Journal of Biological Sciences* **5(6)**: 578-595.

FAO Food and Agriculture Organization of the United States, <<http://www.fao.org/home/en/>> Pristupljeno 28.lipnja 2017.

Foyle T., Jennings L., Mulcahy P. (2007) Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw. *Bioresource Technology* **98**: 3026-3036.

Garrote G., Domínguez H., Parajó J.C. (1999) Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz als Roh- und Werkstoff* **57** : 191-202.

Gray K. A., Zhao L., Emptage M. (2006) Bioethanol. *Curr Opin Chem Biol.* **10**:141-146.

Gurunathan T., Monhantys., Nayak S. K. A (2015) Review of the Recent Developments in Biocomposites Based on Natural Fibres and Their Application Perspectives. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* **77**: 1– 25.

Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.F., Liden G., Zacchi G. (2006) Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology* **24(12)**: 549-556.

Himmel ME., Ding S.Y., Johnson DK., Adney WS., Nimlos MR., Brady JW., Foust TD. (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, **315**: 804-807.

Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Eijsink V.G.H. (2012) Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels* **5**: 45.

Ibraheem O., Ndimba B.K. (2013) Molecular Adaptation Mechanism Employed by Ethanologenic Bacteria in Response to Lignocellulose-derived Inhibitory Compounds. *Int. J. Biol. Sci.* **9**: 598-612.

Ibrahim M. N. M., Zakaria N., Sipaut C. S., Sulaiman O., & Hashim R. (2011) Chemical and thermal properties of lignins from oil palm biomass as a substitute for phenol in a phenol formaldehyde resin production. *Carbohydrate polymers* **86(1)**, 112-119.

Jayakody L.N., Hayashi N., Kitagaki H. (2013) Molecular mechanism for detoxification of major aldehyde inhibitors for production of bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* from hot-compressed water-treated lignocellulose. *Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments* : 302-311.

Joshi B., Bhatt M.R., Joshi J., Malla R., Sreerama L., Sharma D. (2011) Lignocellulosic ethanol production: Current practices. *Biotechnology and Molecular Biology Review* **6(8)**: 172-182.

Jönsson L., Aliksson B., Nilvebrant N.O. (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels* **6(16)**

Jönsson L., Martín C. (2016) Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology* **199**: 103-112.

Juhász T., Szengyel Z., Réczey K., Siika-Aho M., Viikari L. (2005) Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry* **40** : 3519-3525

Kobayashi H., Ohta H., Fukuoka A. (2012) Conversion of lignocellulose into renewable chemicals by heterogeneous catalysis. *Catalysis Science & Technology* **2(5)**: 869-883

Kumar I., Ramalakshmi M.A., Sivakumar U., Santhanakrishnan P., Zhan, X. (2011) Production of microbial oils from *Mortierella sp* for generation of biodiesel livestock. *African Journal of Microbiology Research* **5(24)**: 4105-4111.

Li C., Knierim B., Manisseri C., Arora R., Scheller H.V., Auer M., Vogel K.P., Simmons B.A., Singh S. (2010) Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresour Technol* **101**: 4900–4906.

Le Floch A., Jourdes M., & Teissedre P. L. (2015) Polysaccharides and lignin from oak wood used in cooperage: Composition, interest, assays: A review. *Carbohydrate research* **417** : 94-102.

Martínez A.T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M.J., Gutiérrez A., del Río J.C. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* **8**: 195-204

Mills T.Y., Sandoval N.R., Gill R.T. (2009) Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanism in *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels* **2(26)**

Ruan Zhenhua (2014) Developing novel biological processes to convert lignocellulose into lipid based biofuel. A dissertation : 53-60.

Wikandari R., Milalti R., Syamsiyah S., Muriana R., Ayuningsih Y. (2010) Effect of furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid on indigenous microbial isolate for bioethanol production. *Agricultural journal* **5(2)**: 105-109.

Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzaple M., Ladisch M.R., Lee Y.Y. (2005) Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour Technol* **96** : 1959-1966.

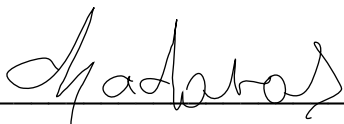
Yang B., Wyman C.E. (2008) Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuel. Bioprod. Biorefin.* **2**: 26-40.

Zeng J., Zheng Y., Yu X., Yu L., Gao D., Chen S. (2013) Lignocellulosic biomass as a carbohydrate source for lipid production by *Mortierella isabellina*. *Bioresource Technology* **128** : 385-391.

Zheng Y., Zhao J., Xu F., Li Y. (2014) Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science* **42** : 36-53.

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

Vlastoručni potpis studenta:



---