

# Inhibicijski učinak fenolnih spojeva na rast plijesni *Mortierella isabellina* i sintezu lipida

---

**Kuzmić, Marija**

**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:159:170443>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-07**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Marija Kuzmić**

7115/BT

**INHIBICIJSKI UČINAK FENOLNIH SPOJEVA 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 Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Mirele Ivančić Šantek.*

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek na uloženom vremenu, strpljenju i stručnoj pomoći pri izradi završnog rada.*

*Također, zahvaljujem se Igoru Livadi, tehničkom suradniku Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na pruženoj stručnoj pomoći i izrazito ugodnoj atmosferi.*

## 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**

**Inhibicijski učinak fenolnih spojeva na rast plijesni *Mortierella isabellina* i sintezu lipida**

**Marija Kuzmić, 0058207052**

**Sažetak:** Lignocelulozne sirovine koriste se za proizvodnju biogoriva i biokemikalija. Zbog njihove složene strukture, prije samog bioprocesa, potrebno ih je podvrgnuti metodama predobrade i hidrolize. Tim postupcima nastaju, osim fermentabilnih šećera, brojni nusproizvodi od kojih neki mogu inhibirati radni mikroorganizam. Oleaginozna plijesan *Mortierella isabellina* ima sposobnost nakupljanja velikih količina intracelularnih lipida (do 80% suhe tvari biomase) što ju čini obećavajućim organizmom u proizvodnji biodizela. Cilj ovog rada bio je istražiti učinak fenolnih spojeva (vanilin i 4-hidroksibenzaldehid) nastalih tijekom predobrade lignocelulozne sirovine na rast *M. isabellina* i sintezu lipida. Rezultati su pokazali da vanilin i 4-hidroksibenzaldehid značajno inhibiraju rast plijesni i sintezu lipida. Pri koncentracijama vanilina i 4-hidroksibenzaldehida većim od 1,2 i 0,6 g L<sup>-1</sup>, rast i akumulacija lipida bili su u potpunosti inhibirani.

**Ključne riječi:** 4-hidroksibenzaldehid, lignoceluloza, *Mortierella isabellina*, predobrada, vanilin

**Rad sadrži:** 30 stranica, 16 slika, 9 tablica, 33 literaturna navoda

**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:** 18. 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**

**Inhibitory effect of phenolic compounds on growth of fungus *Mortierella isabellina* and lipid synthesis**

**Marija Kuzmić, 0058207052**

**Abstract:** Lignocellulosic raw materials are used in production of biofuels and biochemicals. Because of their complex structure, prior to the bioprocess itself, they have to be subjected to pre-treatment and hydrolysis. These processes generate, along with fermentable sugars, numerous byproducts, some of which may inhibit the working microorganism in the production process. The oleaginous fungus *Mortierella isabellina* has the ability to accumulate large quantities of intracellular lipids (up to 80% of dry cell weight) that makes it a promising organism for use in biodiesel production. The aim of this paper was to investigate effect of phenolic compounds (vanillin and 4-hydroxybenzaldehyde) produced during lignocellulose pretreatment on the growth of *M. isabellina* and lipid synthesis. The results showed that vanillin and 4-hydroxybenzaldehyde significantly inhibit the fungus growth and lipid synthesis. At concentrations of vanillin and 4-hydroxybenzaldehyde higher than 1,2 and 0,6 g L<sup>-1</sup> respectively, the growth and lipid accumulation was completely inhibited.

**Keywords:** 4-hydroxybenzaldehyde, lignocellulose, *Mortierella isabellina*, pretreatment, vanillin

**Thesis contains:** 30 pages, 16 figures, 9 tables, 33 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:** September 18th, 2017.

## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. Lignocelulozne sirovine.....	2
2.1.1. Općenito o lignoceluloznim sirovinama.....	2
2.1.2. Celuloza.....	3
2.1.3. Hemiceluloza.....	4
2.1.4. Lignin.....	4
2.2. Priprema lignoceluloznih sirovina za uzgoj mikroorganizama.....	6
2.2.1. Predobrada lignoceluloznih sirovina.....	6
2.2.2. Hidroliza strukturnih ugljikohidrata.....	8
2.2.3. Inhibitori.....	9
2.2.3.1. Fenolni spojevi.....	10
2.2.4. Detoksikacija.....	11
2.3. <i>Mortierella isabellina</i> .....	12
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>13</b>
3.1. Materijali.....	13
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	13
3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga.....	13
3.1.3. Ostale kemikalije.....	13
3.1.4. Tekuća hranjiva podloga za uzgoj u tikvicama.....	14
3.1.5. Oprema i aparatura.....	15
3.1.5.1. Centrifuga.....	15
3.1.5.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC).....	15
3.1.5.3. Ostala oprema i aparatura.....	16
3.2. Metode.....	17
3.2.1. Uzgoj spora plijesni <i>Mortierella isabellina</i> .....	17

3.2.2. Uzgoj plijesni <i>Mortierella isabellina</i> u tikvicama.....	17
3.2.3. Analitičke metode.....	18
3.2.3.1. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari biomase.....	18
3.2.3.2. Određivanje koncentracije glukoze pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC).....	18
3.2.3.2.1. Priprema uzoraka za HPLC analizu.....	18
3.2.3.2.2. HPLC analiza.....	19
3.2.3.3. Određivanje udjela lipida.....	19
3.2.4. Pokazatelji uspješnosti bioprocesa.....	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>21</b>
4.1. Utjecaj vanilina na rast biomase plijesni <i>M. isabellina</i> i sintezu lipida.....	21
4.2. Utjecaj 4-hidroksibenzaldehida na rast biomase plijesni <i>M. isabellina</i> i sintezu lipida.....	24
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>27</b>
<b>6. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>28</b>



# 1. UVOD

Zbog smanjenja rezervi i porasta cijene fosilnih goriva, kao i zbog emisije stakleničkih plinova, danas se sve više proizvode alternativna goriva. Biogoriva druge generacije proizvode se iz lignoceluloznih sirovina (poljoprivredni ostaci, šumarski ostaci, komunalni otpad) koje se najvećim dijelom sastoje od tri polimera: celuloze, hemiceluloze i lignina (Janušić i sur., 2008; Bajpai, 2016). Kako bi se lignocelulozne sirovine mogle podvrgnuti mikrobnj biokonverziji, potrebno ih je predobraditi i hidrolizirati. Cilj predobrade je uklanjanje lignina i većeg dijela hemiceluloze, dok je svrha hidrolize dobivanje fermentabilnih ugljikohidrata iz strukturnih ugljikohidrata. Primjenom navedenih metoda nastaje niz nusproizvoda, potencijalnih inhibitora radnog mikroorganizma. Inhibitori porijeklom iz lignoceluloznih sirovina svrstani su u tri osnovne skupine (Fillat i sur., 2017): slabe kiseline (octena kiselina, mravlja kiselina, levulinska kiselina), derivati furana (2-furaldehid i 5-hidroksimetilfurfural) i fenolni spojevi (vanilin, siringaldehid, *p*-kumarinska kiselina, 4-hidroksibenzaldehid, ferulinska kiselina itd.). U proizvodnji biodizela, kao radni mikroorganizmi koriste se vrste bakterija, kvasaca, plijesni i mikroalgi koje imaju sposobnost akumulacije intracelularnih lipida (oleaginozni mikroorganizmi). Oleaginozna plijesan *Mortierella isabellina* može akumulirati do 86% intracelularnih lipida po suhoj tvari biomase (Meng i sur., 2009).

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj fenolnih spojeva (vanilin i 4-hidroksibenzaldehid) na rast biomase plijesni *Mortierella isabellina* i sintezu lipida. Osim toga, za izradu ovog završnog rada bilo je nužno proučiti kompleksnu strukturu lignoceluloznih sirovina te metode za njihovu predobradu i hidrolizu, inhibitore koji pri tome nastaju te mehanizam njihovog djelovanja na mikroorganizme, kao i metode uklanjanja istih.

Eksperimentalni dio rada sastojao se od: uzgoja plijesni u tekućim hranjivim podlogama s različitim koncentracijama ispitivanih inhibitora, centrifugiranja prevrele komine, sušenja biomase, gravimetrijskog određivanja koncentracije suhe tvari biomase, ekstrakcije lipida smjesom otapala kloroform:metanol (1:1 vol/vol) iz osušene biomase i određivanja koncentracije preostale glukoze u prevreloj komini HPLC metodom.

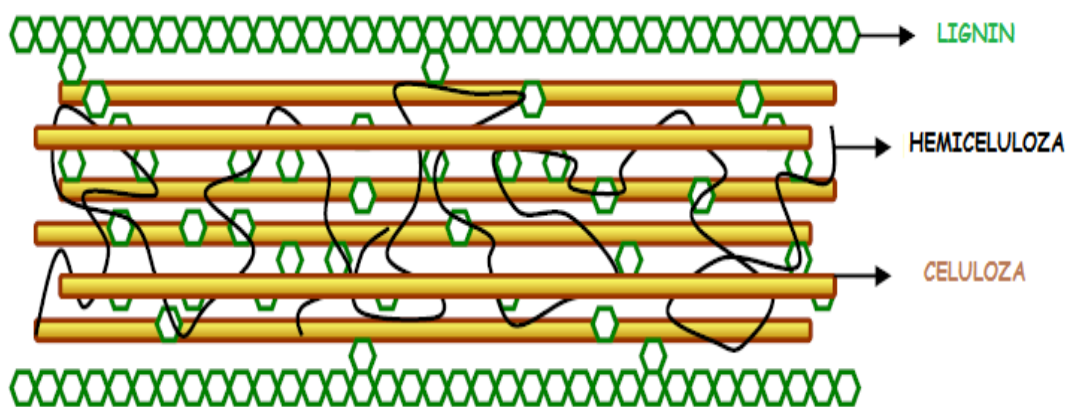
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Lignocelulozne sirovine

#### 2.1.1. Općenito o lignoceluloznim sirovinama

Lignocelulozne sirovine moguće je podijeliti u nekoliko skupina: poljoprivredni ostaci, šumarski ostaci i kruti komunalni otpad (Janušić i sur., 2008). Ova vrsta sirovine sve se više upotrebljava u biotehnološkim procesima kao supstrat za dobivanje različitih proizvoda, ponajprije biogoriva.

Lignocelulozni materijal sastoji se od tri osnovna polimera: celuloze (30 - 50%), hemiceluloze (15 - 35%) i lignina (10 - 20%) uz manje količine pektina, proteina i pepela (Bajpai, 2016). Međutim, udio navedenih polimera varira ovisno o podrijetlu lignocelulozne sirovine. Na primjer, bjelogorično drvo većinom se sastoji od celuloze, dok pšenična slama i lišće imaju više hemiceluloze. Udio pojedinog polimera u sirovini varira i ovisno o dobi i fazi rasta biljke te drugim uvjetima (Bajpai, 2016). Celuloza i hemiceluloza čine otprilike 70 % ukupne biomase i čvrsto su vezane za lignin kovalentnim i vodikovim vezama što cijelu strukturu čini robusnom (Knauf i Moniruzzaman, 2004). Hemiceluloza i celuloza hidrolizom se prevode u fermentabilne šećere koje mikroorganizmi mogu koristiti kao izvor ugljika u bioprocusu. S druge strane, lignin većina mikroorganizama ne može koristiti kao izvor ugljika pa ga je potrebno u čim većem postotku ukloniti predobradom. Shematski prikaz strukture lignocelulozne sirovine je na slici 1.

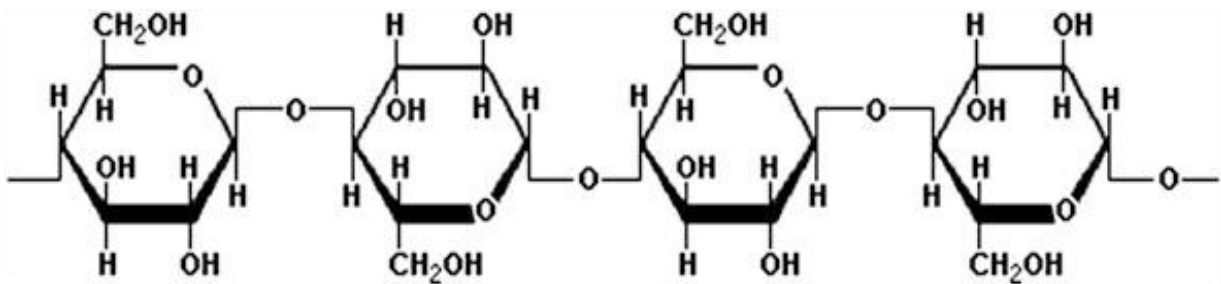


Slika 1. Struktura lignocelulozne sirovine (prema Mussatto i Teixeira, 2010)

### 2.1.2. Celuloza

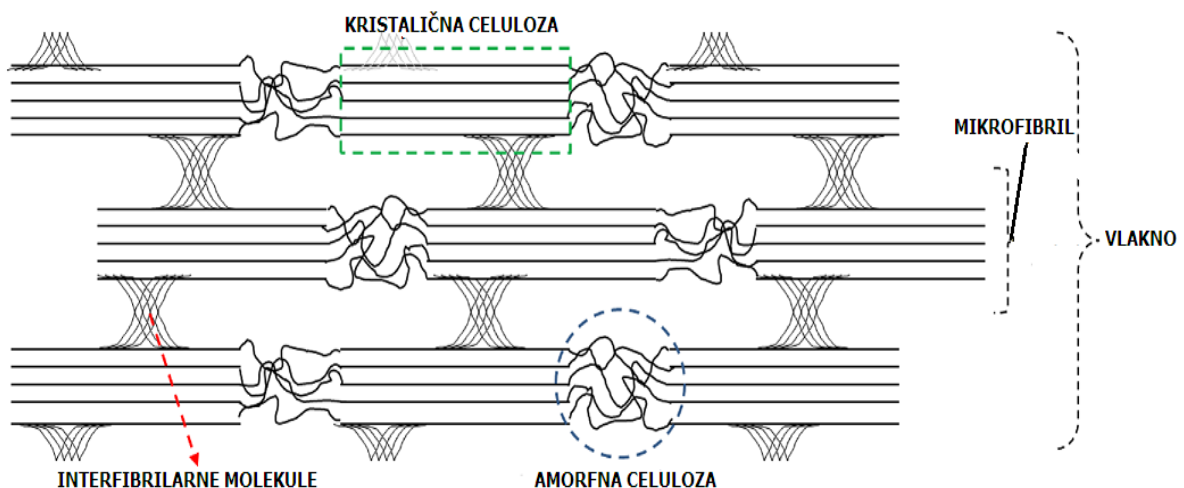
Celuloza je najzastupljeniji sastojak stanične stijenke biljke koji joj pruža strukturnu potporu. Sastoji se od  $\beta$ -D-glukopiranoznih jedinica povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnom vezom (slika 2).

Lanci celuloze sadrže od 10 000 (drvo) do 15 000 (pamuk) glukopiranoznih jedinica (Fengel i Wegener, 1984).



Slika 2. Struktura celuloze (Bajpai, 2016)

Celulozni lanci (20-300) povezani su vodikovim vezama i van der Waalsovima silama tvoreći mikrofibrile. Nakupine mikrofibrila tvore celulozna vlakna. U lignoceluloznim sirovinama, celuloza je većim dijelom prisutna u kristaličnom obliku, ali malim postotkom i u amorfnom obliku (slika 3). Celulolitički enzimi značajno učinkovitije hidroliziraju  $\beta$ -1,4-glikozidnu vezu u amorfnoj celulozi u usporedbi s kristaličnom celulozom (Laureano-Perez i sur., 2005).

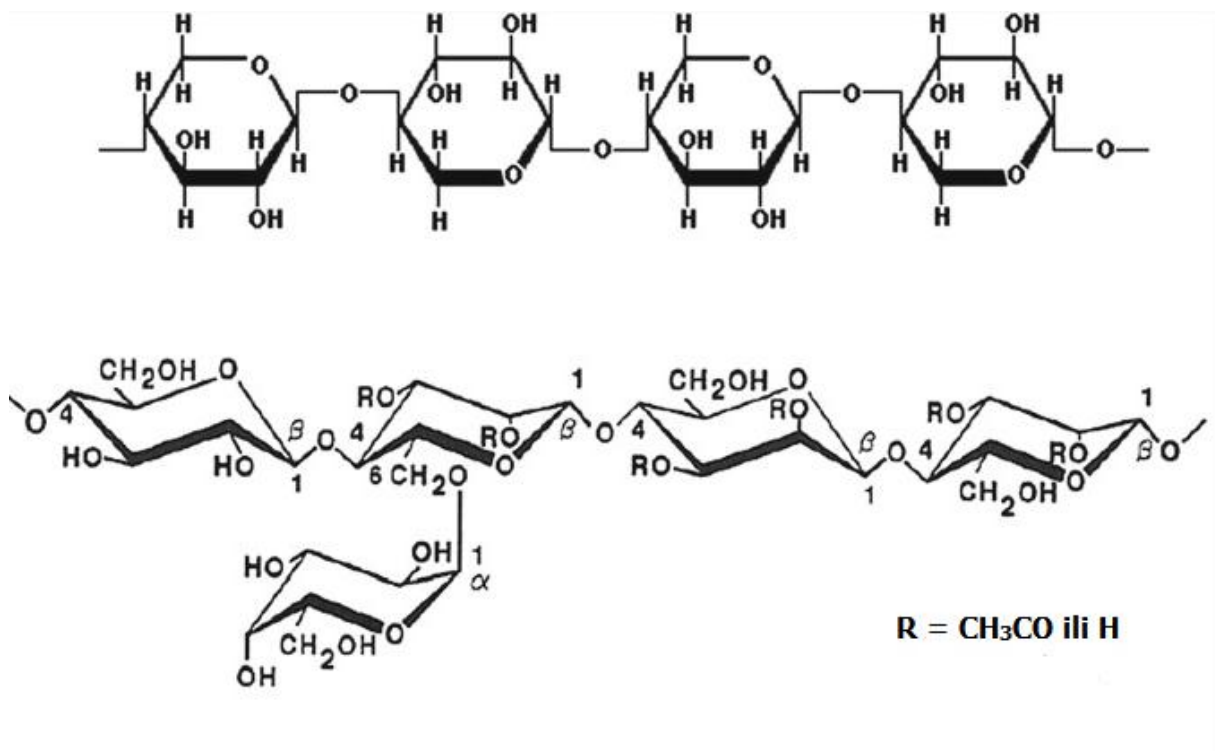


Slika 3. Struktura celuloznog vlakna (prema Börjesson i Westman, 2015)

### 2.1.3. Hemiceluloza

Hemiceluloza se sastoji od homopolimernog ili heteropolimernog glavnog lanca na kojeg su vezani kratki bočni lanci  $\beta$ -1,4-glikozidnom vezom ili rjeđe  $\beta$ -1,3-glikozidnom vezom. U sastav hemiceluloze ulaze različite vrste monosaharida: pentoze (ksiloza, ramnoza i arabinoza) te heksoze (glukoza, manozna i galaktoza), ali i neke kiseline (4-O-metilglukuronska, D-glukuronska, D-galakturonska). Sastav hemiceluloze ovisi o sirovini iz koje potječe. Primjerice, hemiceluloza iz poljoprivredne biomase (slama, trava) najvećim se dijelom sastoji od ksilana, a iz mekog drva od glukomanana (Fengel i Wegener, 1984), prikazanih na slici 4.

U usporedbi s celulozom, hemiceluloza ima manju molekulsku masu i razgranatiju strukturu (Fengel i Wegener, 1984; Saha, 2003). Zbog navedenih strukturnih karakteristika i kemijskog sastava, ova komponenta lignoceluloznih sirovina najlakše se hidrolizira tijekom predtretmana (Hendriks i Zeeman, 2009).

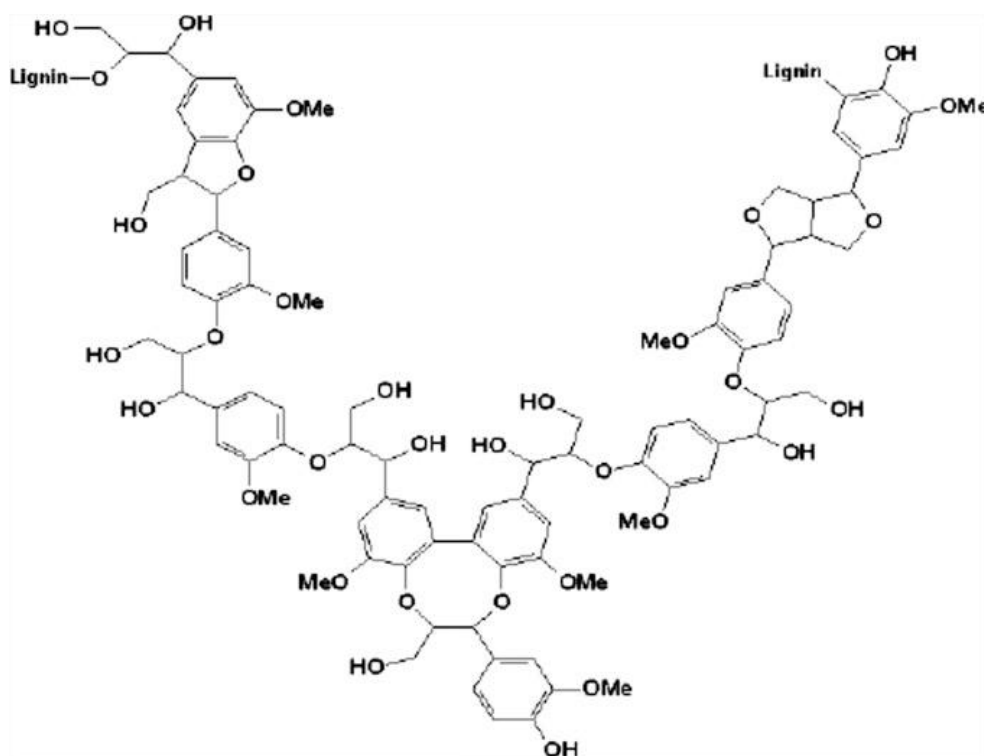


Slika 4. Struktura ksilana i galaktoglukomanana (prema Bajpai, 2016)

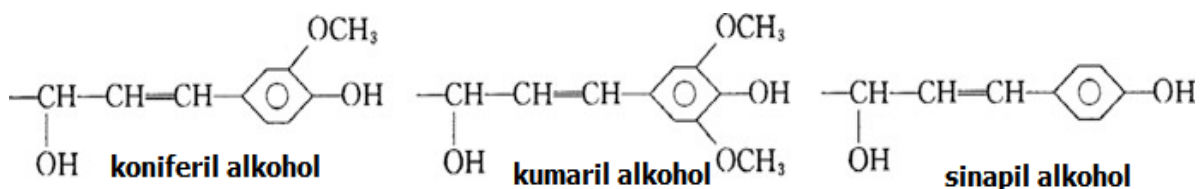
### 2.1.4. Lignin

Lignin je polimer sastavljen od fenilpropanskih jedinica nelinearno i nasumično povezanih alkil-arilnim, alkil-alkilnim i aril-eterskim vezama (njegovu kompleksnu strukturu pokazuje slika 5). Glavni monomeri od kojih je građen lignin su: koniferil alkohol, kumaril alkohol i sinapil alkohol čije su strukture prikazane na slici 6.

Ovaj polimer izgrađuje stanične stijenke biljaka i zaslužan je za njihovu strukturnu stabilnost, nepropusnost i otpornost prema patogenim mikroorganizmima. Udio lignina u staničnoj stijenci razlikuje se od jedne do druge biljne vrste. Zeljaste biljke poput trave imaju najniži, a meko drvo najviši sadržaj lignina (Hendriks i Zeeman, 2009). Lignin se često naziva „ljepilom“ koje povezuje komponente lignocelulozne sirovine. Čvrsto je povezan s celuloznim vlaknima, što uvelike otežava enzimsku i mikrobnu hidrolizu polisaharidnih komponenata lignocelulozne sirovine. Chang i Holtzaple (2000) pokazali su da je enzimska hidroliza to učinkovitija što je više lignina uklonjeno iz sirovine u procesu predobrade.



Slika 5. Struktura lignina (Bajpai, 2016)



Slika 6. Osnovne strukturne jedinice lignina (prema Chen, 2014)

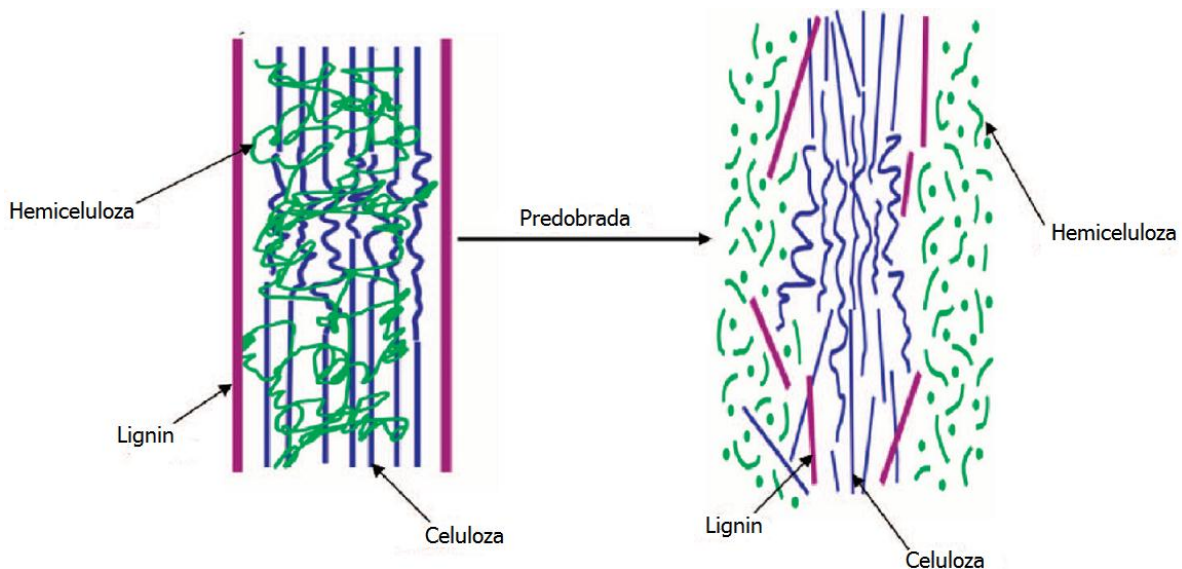
## 2.2. Priprema lignoceluloznih sirovina za uzgoj mikroorganizama

Lignocelulozne sirovine koriste se u biotehnologiji kao supstrat pri proizvodnji različitih biogoriva i biokemikalija. Međutim, mikroorganizmi ne mogu koristiti izvornu lignoceluloznu sirovinu za rast i proizvodnju željenog proizvoda, već je sirovinu prije bioprocesa potrebno prevesti u oblik pogodan za asimilaciju. U metode pripreme lignoceluloznih sirovina za bioprocen ubrajaju se predobrada, hidroliza te detoksikacija.

### 2.2.1. Predobrada lignoceluloznih sirovina

Predobrada se smatra jednim od najvažnijih procesa u svakoj biorafineriji koji značajno utječe na sve ostale operacije koje slijede u procesu proizvodnje biogoriva. Ciljevi predobrade su: izdvajanje lignina i modifikacija lignocelulozne strukture, hidroliza hemiceluloze, dekristalinizacija celuloze i povećanje poroznosti sirovine. Učinak predobrade na lignoceluloznu sirovinu prikazan je na slici 7. Zadaća predobrade je poboljšati učinkovitost enzimske hidrolize koja se provodi u sljedećem koraku pripreme sirovine, smanjiti troškove za miješanje i izdvajanje proizvoda, te smanjiti trajanje bioprocesa (Olsson i Hahn-Hägerdal, 1996).

Metode predobrade mogu se podijeliti na: fizikalne (mljevenje), fizikalno-kemijske (predobrada parom/autohidroliza, hidrotermoliza i mokra oksidacija), kemijske (alkalna predobrada, predobrada razrijeđenom kiselinom, oksidirajućim sredstvima, organskim otapalima), biološke i električne (Kumar i sur., 2009). Neke od najčešće korištenih metoda predobrade prikazane su u tablici 1. Različite metode predobrade temelje se na različitim kemijskim reakcijama i načinima interakcije s komponentama lignocelulozne sirovine. Važno je napomenuti da na uspješnost predobrade utječe i vrsta supstrata, odnosno njegova fizikalna i kemijska svojstva.



Slika 7. Shematski prikaz predobrade lignoceluloze (prema Kumar i sur., 2009)

Tablica 1. Vrste predobrade i njihove osnovne karakteristike (prema Limayem i Ricke, 2012)

Predobrada	Glavne karakteristike
<p><i>Razrijeđena kiselina</i> (<math>H_2SO_4</math>, <math>HCl</math> (0,5-5%))</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-praktična i jednostavna metoda</li> <li>-učinkovita hidroliza hemiceluloze s visokim prinosom jednostavnih šećera</li> <li>-nastaju toksični inhibitori</li> <li>-potrebna je reciklacija kiseline</li> </ul>
<p><i>Vruća voda</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-otapa se većina hemiceluloze</li> <li>-bez kemikalija i toksičnih inhibitora</li> <li>-nije učinkovita metoda za meko drvo</li> </ul>
<p><i>Vapno</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-visok ukupan prinos šećera uključujući pentoze i heksoze</li> <li>-učinkovito za tvrdo drvo i poljoprivredne ostatke</li> </ul>
<p><i>Ekspanzija vlakana s amonijakom (AFEX)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-učinkovito za poljoprivredne ostatke, uglavnom za kukuruznu stočnu hranu bez formiranja toksičnih produkata</li> <li>-nepogodna metoda za materijale bogate ligninom</li> <li>-regeneracija amonijaka</li> <li>-nema otpadnih voda</li> </ul>
<p><i>Perkolacija s amonijakom</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-visoka redistribucija lignina (85%)</li> <li>-reciklacija amonijaka</li> <li>-postižu se teoretski prinosi</li> </ul>
<p><i>Ekspanzija s parom uz katalizator</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-pogodna za obradu poljoprivrednih ostataka i tvrdog drva</li> <li>-uklanjanje velikih frakcija hemiceluloze</li> <li>-nije učinkovito za obradu mekog drva</li> </ul>
<p><i>Organsko otapalo</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-prinos fermentabilnih šećera je povećan u kombinaciji s kiselinama</li> <li>-učinkovito za tvrdo i meko drvo</li> <li>-mala koncentracija šećera iz hemiceluloze</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>-nastajanje toksičnih inhibitora</li> <li>-potrebna reciklacija otapala</li> <li>-velika kapitalna ulaganja</li> </ul>
<i>SPORL metoda (eng. Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-prikladna za materijale s visokim udjelom lignina, meko i tvrdo drvo</li> <li>-najveća energetska učinkovitost</li> <li>-nastaje minimalno inhibitora</li> <li>-ekspanzija s parom u kombinaciji s SPORL u prisutnosti katalizatora učinkovita je za meko drvo</li> <li>-isplativost</li> </ul>
<i>Ozon</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-učinkovito uklanja lignin iz širokog spektra lignoceluloznih sirovina bez nastajanja inhibitora</li> <li>-skup</li> </ul>
<i>Alkalna vlažna oksidacija</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-kombinacijom kisika, vode, visoke temperature i lužine smanjuje se nastajanje toksičnih inhibitora</li> <li>-visok stupanj delignifikacije sirovine</li> <li>-nizak stupanj hidrolize oligosaharida</li> </ul>
<i>Biološka predobrada (gljive smeđeg, bijelog i mekog truljenja)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-ekološki prihvatljiva metoda</li> <li>-mala potrošnja energije i kemikalija</li> <li>-spora biokonverzija</li> </ul>

### 2.2.2. Hidroliza strukturnih ugljikohidrata

Hidroliza se provodi nakon predobrade lignocelulozne sirovine, a prije fermentacije, s ciljem dobivanja fermentabilnih šećera iz hemiceluloze i celuloze. Provodi se s kiselinama (razrijeđenom ili koncentriranom sumpornom ili klorovodičnom kiselinom) ili enzimima (fungalnim i bakterijskim celulazama i hemicelulazama).

Hidroliza s razrijeđenim kiselinama može se voditi kao jednostupanjski ili dvostupanjski proces. Kod oba postupka dolazi do dehidracije nastalih jednostavnih šećera, tj. do nastajanja inhibitora fermentacije (najčešće 5-hidroksimetilfurfural i furfural).



Hidroliza s koncentriranim kiselinama je učinkovitija, karakterizira ju brza i potpuna razgradnja polisaharida pri niskim temperaturama te niska koncentracija nastalih inhibitora. Nedostatak ove metode je obavezno uklanjanje kiseline, najčešće neutralizacijom s kalcijevim hidroksidom.

S druge strane, enzimsku hidrolizu karakteriziraju niža cijena cjelokupnog procesa i visok prinos fermentabilnih šećera. Glavna mana enzimske hidrolize je još uvijek visoka cijena enzima. Enzimska hidroliza može se provoditi neposredno prije bioprocasa (eng. separate hydrolysis and fermentation) ili istovremeno s uzgojem mikroorganizma (eng. simultaneous saccharification and fermentation) (Rezić i sur., 2016).

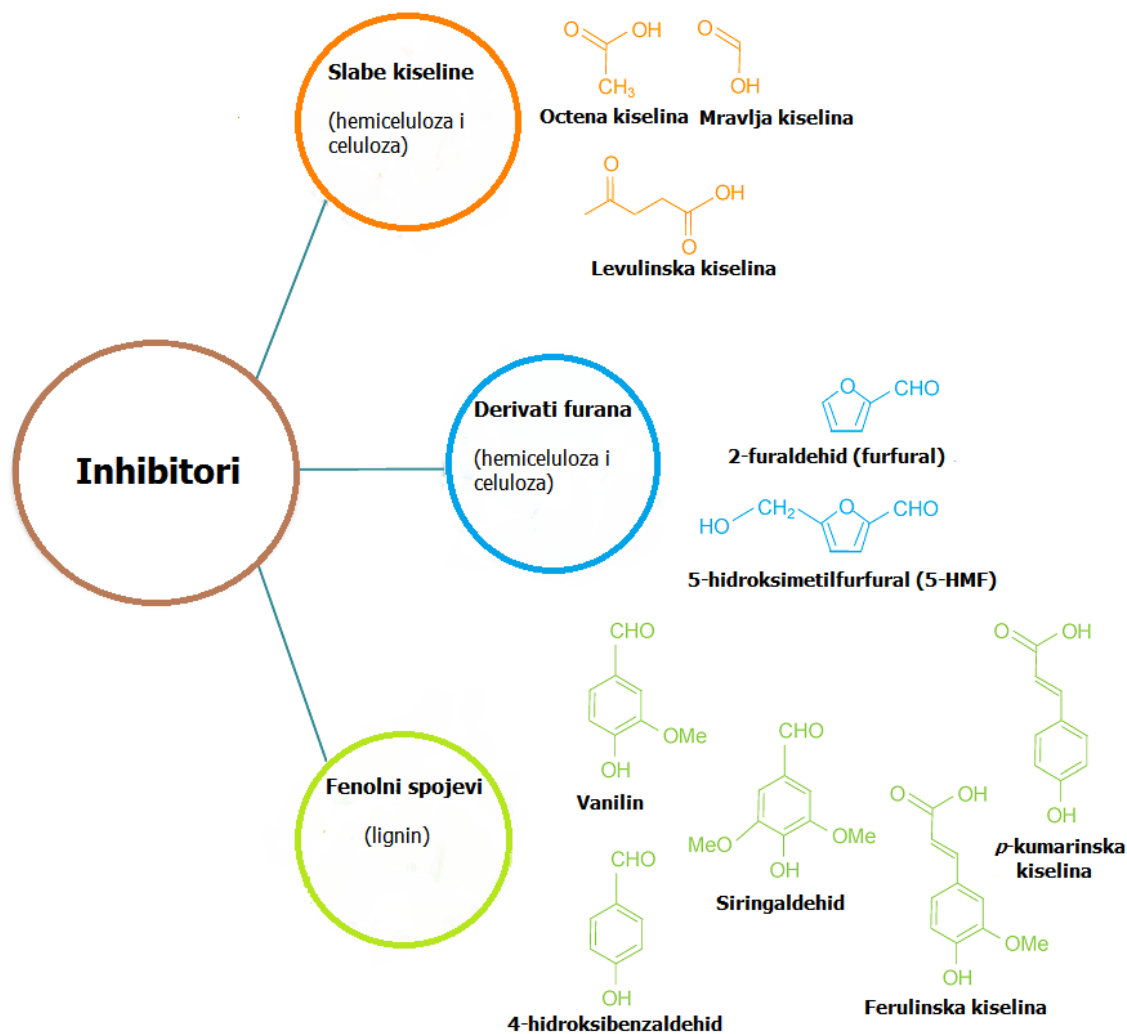
### 2.2.3. Inhibitori

U procesu predobrade lignocelulozne sirovine nastaju brojni nusproizvodi. Neki od tih nusproizvoda djeluju kao inhibitori celulozičkih enzima i radnog mikroorganizma u bioprocasu. Chandel i sur. (2011) navode da toksičnost inhibitora ovisi o njegovoj koncentraciji, vrsti mikroorganizma koji se koristi u bioprocasu te načinu i uvjetima uzgoja (pH, inokulum, otopljeni kisik i temperatura).

Fillat i sur. (2017) podijelili su inhibitore u tri osnovne skupine (slika 8):

- Slabe kiseline (octena kiselina, mravlja kiselina i levulinska kiselina)
- Derivati furana (2-furaldehid i 5-hidroksimetilfurfural)
- Fenolni spojevi (vanilin, siringaldehid, *p*-kumarinska kiselina, 4-hidroksibenzaldehid, ferulinska kiselina)

Iako svi navedeni inhibitori uzrokuju fiziološke promjene mikroorganizama i smanjenje učinkovitosti bioprocasa, mehanizam djelovanja i stupanj citotoksičnosti među skupinama inhibitora se značajno razlikuje.



Slika 8. Inhibitori koji nastaju predobradom lignoceluloze (prema Fillat i sur., 2017)

### 2.2.3.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi uključuju kiseline (ferulinsku, vanilinsku, 4-hidroksibenzojevu i siringinsku kiselinu), alkohole (gvajakol, katehol i vanilil alkohol) te aldehide (vanilin, siringaldehid i 4-hidroksibenzaldehid).

Većina ih nastaje iz lignina tijekom predobrade lignocelulozne sirovine. Fenolni spojevi su toksičniji za radne mikroorganizme od furana i slabih kiselina (Chandel i sur., 2011). Nadalje, pokazalo se da su fenolni spojevi s manjom molekulskom masom toksičniji od visokomolekulskih fenolnih spojeva (Clark i Mackie, 1984).

Derivati lignina inhibiraju mikroorganizam tako da se ugrađuju u njegovu staničnu membranu, mijenjajući njezinu selektivnost ka propuštanju određenih tvari, te omjer lipida i proteina. Ovakve promjene u strukturi membrane omogućuju neselektivno propuštanje proteina, RNA, ATP i iona iz citoplazme, što rezultira smanjenom razinom ATP-a u stanici, promjenom funkcije

proteina i otežanim prijenosom hranjivih tvari kroz membranu. Palmqvist i sur. (1999) pokazali su da većina derivata lignina uzrokuje promjene u strukturi bioloških membrana koje negativno utječu na asimilaciju šećera i rast mikrobnih stanica. Osim toga, fenolni spojevi su odgovorni za povećanje koncentracije vodikovog peroksida, superoksida i superhidroksida u stanicama koji reagiraju s funkcionalnim skupinama proteina/enzima i uzrokuju njihovu denaturaciju. Nadalje, fenolni spojevi uzrokuju oštećenja citoskeleta i DNA, te induciraju programiranu smrt stanice.

Brojna istraživanja pokazala su da fenolni spojevi smanjuju aktivnost celulaza, enzima koji se primijenjuju u postupku hidrolize polisaharidnih komponenata lignoceluloze. Ximenes i sur. (2010) istraživali su kako prisutnost fenola utječe na aktivnost celulaza i  $\beta$ -glukozidaza. Nakon inkubacije navedenih enzima s fenolima i brojnih analiza, utvrdili su da fenoli inhibiraju i deaktiviraju celulaze, a u većoj mjeri i  $\beta$ -glukozidaze. Qin i sur. (2016) također su zaključili da lignin i fenoli negativno utječu na aktivnost celulaza u enzimskoj hidrolizi sirovine, odnosno smanjuju prinos fermentabilnih šećera. Vanilin, jedan od glavnih predstavnika skupine fenolnih spojeva, inhibira DNA-ovisnu protein kinazu uzrokujući lomove u lancu DNA. Qin i sur. (2016) uočili su da vanilin uzrokuje deaktivaciju i taloženje enzima, te da na stupanj inhibicije vanilina utječe i prisutnost hidroksilnih, karbonilnih te metoksi grupa u njegovoj strukturi.

#### 2.2.4. Detoksikacija

Inhibitori koji su nastali tijekom predobrade mogu se ukloniti prije samog bioprocesa brojnim fizikalnim, kemijskim i biološkim metodama detoksikacije.

Za uklanjanje derivata lignina (fenola), rijetko se koriste fizikalne metode. Moguće je koristiti evaporaciju pod vakuumom kojom se mogu eliminirati hlapljive tvari iz lignoceluloznog hidrolizata, među kojima i vanilin, ali ne i nehlapljive toksične tvari (Chandel i sur., 2011). Primjenom ove metode Wilson i sur. (1989) uspjeli su ukloniti 54% octene kiseline, 100% furfurala i tek 29% vanilina iz lignoceluloznog hidrolizata.

Neke od kemijskih metoda kojima je moguće provesti detoksikaciju derivata lignina su: neutralizacija, ionska izmjena smolama, ekstrakcija s etil-acetatom, ekstrakcija s dietil-eterom itd. Neutralizacija je postupak koji uklanja dio fenola (i furfurala) taloženjem (Chandel i sur., 2011). Ionskom izmjenom mogu se ukloniti derivati lignina, octena kiselina i furfural. Chandel i sur. (2007) su koristeći ionsku izmjenu uspjeli ukloniti 63,4% furana i čak 75,8% fenola. Ekstrakcijom s etil-acetatom ili dietil-eterom uklonjeno je 84% fenola iz hidrolizata drva eukaliptusa (Cruz i sur., 1999).

Pri uklanjanju lignina, vrlo učinkovitom se pokazala mikrobna predobrada lignoceluloze. Naime, neki mikroorganizmi imaju sposobnost degradacije lignina tijekom inkubacije s lignoceluloznom sirovinom, dok hemicelulozu i celulozu ne degradiraju. Nakon mikrobnog predtretmana, hidroliza se može provesti koristeći manje količine kiseline, niže temperature i kraće vrijeme postupka (Kuhar i sur., 2008).

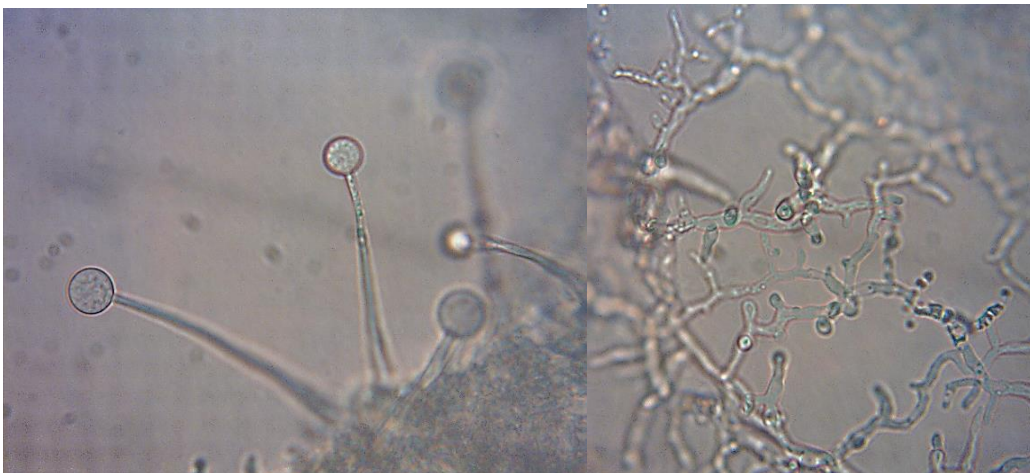
U svrhu detoksikacije, često se koriste fungalni lignolitički enzimi lakaze i peroksidaze koji su učinkoviti u uklanjanju fenola. Primjenom lakaza, Martin i sur. (2002) uklonili su 80% fenola iz hidrolizata šećerne trske. Do sličnih rezultata došli su i Chandel i sur. (2007) uklonivši 77% fenola iz hidrolizata šećerne trske primjenom lakaze izolirane iz *Cythus bulleri*.

Postoji još velik broj metoda detoksikacije, međutim ni jedna nije podjednako uspješna za sve skupine inhibitora, zbog čega se intenzivno istražuju nove metode detoksikacije.

### **2.3. *Mortierella isabellina***

Plijesni vrste *Mortierella* žive kao saprofiti u tlu, na trulom lišću i drugom organskom materijalu. Neke vrste mogu živjeti i na fekalijama ili egzoskeletima člankonožaca (Webster i Weber, 2007). Gotovo svi pripadnici ove vrste su nepatogeni za biljke, životinje i ljude.

Xing i sur. (2012) pokazali su da *Mortierella isabellina* vrlo uspješno asimilira šećere iz hidrolizata kukuruznih vlakana i koristi ih za rast i nakupljanje lipida (sadržaj lipida iznosio je preko 50% suhe tvari biomase). Nadalje, GC/MS analizom potvrdili su da je sastav nakupljenih masnih kiselina sličan sastavu biljnih ulja, što *M. isabellinu* čini obećavajućom vrstom za proizvodnju biodizela.



Slika 9. Mikroskopska slika sporangija (lijevo) i micelija (desno) plijesni *Mortierella isabellina* (Ambruš, 2016)

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Radni mikroorganizam

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

#### 3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

Popis sirovina potrebnih za pripremu hranjivih podloga u ovom istraživanju prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

Naziv sirovine	Proizvođač
Glukoza monohidrat	Difco, SAD
Kvaščevo ekstrakt	Roth, Austrija
Diamonijev sulfat	Kemika, Hrvatska
Kalijev dihidrogenfosfat	Kemika, Hrvatska
Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat	Kemika, Hrvatska
Magnezijev sulfat heptahidrat	Kemika, Hrvatska
Kalcijev klorid dihidrat	Kemika, Hrvatska
Željezo (III) klorid šestahidrat	Kemika, Hrvatska
Cinkov sulfat heptahidrat	Merck, SAD
Bakrov sulfat pentahidrat	Kemika, Hrvatska
Kobaltov nitrat monohidrat	Kemika, Hrvatska
Manganov sulfat pentahidrat	Sigma, SAD
PDA agar	Difco, SAD

#### 3.1.3. Ostale kemikalije

U tablici 3 navedene su ostale kemikalije korištene u analizi sastava biomase, te za pripremu suspenzije spora plijesni.

Tablica 3. Ostale kemikalije

<b>Naziv sirovine</b>	<b>Proizvođač</b>
Kloroform	Macron Fine Chemicals, SAD
Metanol	J.T. Backer, SAD
Etanol (96%)	Kemika, Hrvatska
Tween 80	Macron Fine Chemicals, SAD
Klorovodična kiselina	Kemika, Hrvatska
Natrijev klorid	Kemika, Hrvatska
Vanilin	Sigma, SAD
4-hidroksibenzaldehid	Sigma, SAD

#### 3.1.4. Tekuća hranjiva podloga za uzgoj u tikvicama

Uzgoj plijesni *Mortierella isabellina* proveden je u tekućoj hranjivoj podlozi čiji je sastav dan u tablici 4.

Tablica 4. Sastav hranjive podloge za uzgoj plijesni u tikvicama

<b>Sastojak hranjive podloge</b>	<b>Masena koncentracija</b>
Glukoza	50 g L <sup>-1</sup>
Kvaščev ekstrakt	1 g L <sup>-1</sup>
Kalijev dihidrogenfosfat	7 g L <sup>-1</sup>
Natrijev dihidrogenfosfat	2 g L <sup>-1</sup>
Diamonijev sulfat	0,41 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	0,008 g L <sup>-1</sup>
Cinkov sulfat heptahidrat	1 mg L <sup>-1</sup>
Kobaltov nitrat monohidrat	1 mg L <sup>-1</sup>
Bakrov sulfat pentahidrat	1 mg L <sup>-1</sup>
Manganov sulfat pentahidrat	1 mg L <sup>-1</sup>

### 3.1.5. Oprema i aparatura

#### 3.1.5.1. Centrifuga

Na kraju uzgoja, prevrela hranjiva podloga sa izraslim peletima plijesni centrifugirana je u polipropilenskim kivetama s konusnim dnom volumena 50 mL (Greiner Nio-One GmbH, Njemačka). Korištena je centrifuga Thermo Scientific SL 8R (Thermo Fisher Scientific, SAD) prikazana na slici 10.



Slika 10. Centrifuga Thermo Scientific SL 8R (Thermo Fisher Scientific, SAD, vlastita fotografija)

#### 3.1.5.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)

U supernatantima kulture nakon centrifugiranja određena je koncentracija glukoze pomoću uređaja za kromatografiju Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu, Japan). Sastavni dijelovi navedenog uređaja (slika 11) su: crpka (LC-10ADVP), otplinjač (DGU-14A), injektor (SIL-10ADVP), uređaj za grijanje kolone (CTO-10AVP), analitička kolona (ionsko-izmjenjivačka kolona Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm i.d., 9 μm; SigmaAldrich Co. (LLC), St. Louis, SAD), predkolona (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm i.d., 9 μm; Sigma-Aldrich Co. (LLC), St. Louis, SAD), detektor indeksa loma (RID-10A), modul za kontrolu sustava (SCL-10AVP) i računalni program za kromatografiju (CLASS-VP v6.10).



Slika 11. Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> sustav za kromatografiju (Shimadzu, Japan, vlastita fotografija)

### 3.1.5.3. Ostala oprema i aparatura

Ostala korištena oprema i aparatura nalazi se u tablici 5. Osim opreme i aparature navedene u tablici 5, korištene su Erlenmeyerove tikvice, epruvete, kivete, plamenik, medicinske injekcije i ostali osnovni laboratorijski pribor. Za čuvanje kemikalija i uzoraka korišteni su hladnjak (+4 °C) te zamrzivač (-20 °C).

Tablica 5. Ostala oprema i aparatura

<b>Oprema i aparatura</b>	<b>Proizvođač</b>
Tresilica	Certomat RM, B. Braun Biotech. International, Sartorius Group, Njemačka
Autoklav	Sutjeska, Jugoslavija
Sušionik	Instrumentaria ST-50, Hrvatska
pH metar	Metrohm AG, Švicarska
Tehnička vaga	Tehtnica ET-1211, Slovenija
Analitička vaga	Sartorius, Njemačka
Vibromikser	Tehtnica, Slovenija



## 3.2. Metode

### 3.2.1. Uzgoj spora plijesni *Mortierella isabellina*

Uzgoj spora radnog mikroorganizma proveden je na kosom PDA agaru kroz tjedan dana na sobnoj temperaturi. Spore su sastrugane s površine podloge i resuspendirane u demineraliziranoj vodi uz dodatak Tween 80. Suspenzija je filtrirana preko sterilne gaze u tikvicu u aseptičnim uvjetima. Broj spora po mililitru suspenzije određen je brojanjem u Thomaovoj komorici.

### 3.2.2. Uzgoj plijesni *Mortierella isabellina* u tikvicama

Pripremljena je hranjiva podloga za uzgoj plijesni (sastav podloge prikazan je u tablici 4) te joj je određen pH i po potrebi korigiran na pH=5. U Erlenmeyerove tikvice od 300 mL dodano je po 50 mL podloge, koje su potom začepljene vatenim čepom i sterilizirane u autoklavu 20 minuta na 121 °C. Nakon hlađenja hranjive podloge, u tikvice je dodan inhibitor određene koncentracije (tablica 6 i tablica 7). Rađene su po dvije paralele za svaku koncentraciju inhibitora. Svaka tikvica je naciepljena s  $1 \cdot 10^7$  spora. Uzgoj je proveden na tresilici pri 28 °C na 180 o  $\text{min}^{-1}$  u trajanju od 7 dana. Po završetku uzgoja, prevrela komina (slika 12) je centrifugirana 16 minuta na 7900 o  $\text{min}^{-1}$ . Biomasa je osušena na temperaturi do 50 °C do konstantne mase, a supernatant je pohranjen u zamrzivač na -20 °C do analize.

Tablica 6. Koncentracije vanilina u pojedinim tikvicama

Broj tikvice	1	2	3	4	5	6	7
Koncentracija (g L <sup>-1</sup> )	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6

Tablica 7. Koncentracije 4-hidroksibenzaldehida u pojedinim tikvicama

Broj tikvice	1	2	3	4	5	6
Koncentracija (g L <sup>-1</sup> )	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6



Slika 12. Prevrela komina na kraju uzgoja plijesni *Mortierella isabellina* u tikvicama s različitim koncentracijama inhibitora (vlastita fotografija)

### 3.2.3. Analitičke metode

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

Kiveta s biomasom osušenom do konstantne mase izvagana je na analitičkoj vagi. Određen je i udio vlage u osušenom uzorku biomase koji je iznosio približno 3%. Masa biomase korigirana za sadržaj vlage dobivena je prema sljedećoj formuli:

$$m_{\text{biomase}} = (m_{\text{kivete s osušenom biomasom}} - m_{\text{prazne kivete}}) * 0,97 \text{ [g]}$$

$$X = \frac{m_{\text{biomase}}}{V_{\text{podloge}}} \text{ [g L}^{-1}\text{]}$$

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

##### 3.2.3.2.1. Priprema uzoraka za HPLC analizu

U Eppendorf epruveticu otpipetirano je 750  $\mu\text{L}$  supernatanta (prevrela podloga) i 750  $\mu\text{L}$  cinkovog sulfata heptahidrata (10%) te je sadržaj promiješan na vibromikseru. Nakon 30 minuta, izvršeno je centrifugiranje točno 10 minuta. Uzorci su potom razrijeđeni 10 $\times$  destiliranom vodom u novoj, suhoj Eppendorf epruvetici. Razrijeđeni uzorci profiltrirani su kroz filter s porama od 0,2  $\mu\text{m}$  (Chromafil®Xtra PA(NY) – 20  $\mu\text{m}/25 \text{ mm}$ ; Macherey-Nagel GmbH CoKG, Njemačka) u viala za HPLC analizu.

### 3.2.3.2.2. HPLC analiza

Koncentracija glukoze u podlozi na kraju uzgoja plijesni određena je Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> sustavom za kromatografiju (poglavlje 3.1.5.2.). Za pripravu pokretne faze korištena je redestilirana voda vodljivosti manje od 1  $\mu\text{S}$ . Kao pokretna faza korištena je otopina  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (0,1% vol/vol) u vodi. Injektirano je po 20  $\mu\text{L}$  svakog uzorka i propušteno kroz kolonu pri 55  $^\circ\text{C}$  i brzini protoka mobilne faze od 0,5  $\text{mL min}^{-1}$ . Analiza dobivenih kromatograma provedena je pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10. Koncentracija supstrata u uzorku određena je pomoću jednadžbe baždarnog pravca za glukozu.

Jednadžba baždarnog pravca za glukozu (0,1-5  $\text{g L}^{-1}$ ):

$$y = 258154x + 14890$$

### 3.2.3.3. Određivanje udjela lipida

Osušena biomasa plijesni *M. Isabellina* usitnjena je u tarioniku te je 100 mg tako usitnjene biomase prebačeno u staklene epruvete za ekstrakciju. U svaku epruvetu dodan je 1 mL 4M klorovodične kiseline te je sadržaj promiješan na vibromikseru. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi minimalno 30 minuta uz povremeno protresanje epruveta, sadržaj epruveta podvrgnut je kuhanju u kipućoj vodi točno 10 minuta, a odmah nakon toga epruvete su stavljene u ledenu kupelj. Hidrolizatu je potom dodano 2 mL smjese otapala kloroforma i metanola u omjeru 1:1 (vol/vol). Sadržaj epruveta intenzivno je miješan na vibromikseru 5 minuta. Stanični lipidi ekstrahirani su na tresilici preko noći. Nakon odvajanja faza, donja faza, koja je sadržavala ekstrahirane lipide, prebačena je pomoću medicinske injekcije u čistu Pyrex epruvetu za ekstrakciju s čepom. Izmjeren je volumen dobivene faze te joj je dodan jednak volumen 0,1% (w/v) otopine natrijeva klorida. Sadržaj epruvete je ponovno promiješan na vibromikseru otprilike 1 minutu, a nakon odvajanja faza donja kloroformska faza prebačena je u suhu i prethodno izvaganu epruvetu. Kloroform je uklonjen iz uzorka propuhivanjem s plinovitim dušikom. Uzorak je osušen pri 105  $^\circ\text{C}$  do konstantne mase te je izvagana epruveta s lipidima. Udjel (W) i koncentracija (L) lipida određene su prema sljedećim jednadžbama:

$$W_{\text{lipida}} = \frac{m_{\text{epruvete s osušenim lipidima}} - m_{\text{prazne epruvete}}}{m_{\text{uzorka}}} [\%]$$

$$L = W_{\text{lipida}} * X [\text{g L}^{-1}]$$

### 3.2.4. Pokazatelji uspješnosti bioprocesa

Koeficijent konverzije supstrata u biomasu bez lipida:

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

pri čemu je  $X_{bl} = (1 - W_{lipida}) * X [\text{g L}^{-1}]$

$X_{bl}$  – koncentracija suhe biomase bez lipida  $[\text{g L}^{-1}]$

$S_0$  – koncentracija supstrata (glukoze) na početku uzgoja  $[\text{g L}^{-1}]$

$S$  – koncentracija supstrata (glukoze) na završetku uzgoja  $[\text{g L}^{-1}]$

Koeficijent konverzije supstrata u lipide:

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

$L$  – koncentracija lipida  $[\text{g L}^{-1}]$

Produktivnost nastajanja biomase bez lipida:

$$Pr_{X_{bl}} = \frac{X_{bl}}{t_u} [\text{g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}]$$

$t_u$  – ukupno trajanje uzgoja [dani]

Produktivnost sinteze lipida:

$$Pr_L = \frac{L}{t_u} [\text{g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}]$$

Iskorištenje procesa:

$$E = \frac{Y_{L/S}}{Y_{L/S_{teor}}} * 100 [\%]$$

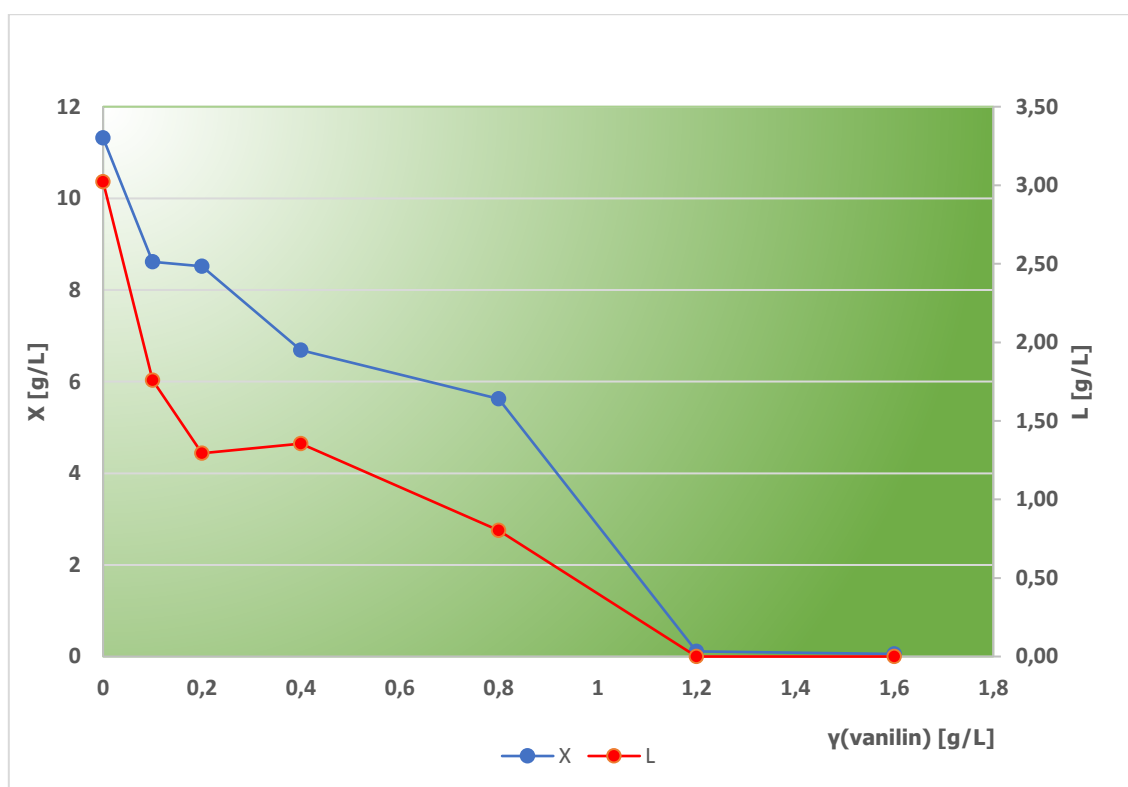
$Y_{L/S}$  – koeficijent konverzije supstrata (glukoze) u proizvod (lipide)  $[\text{g g}^{-1}]$

$Y_{L/S_{teor}}$  – teoretski koeficijent konverzije glukoze u lipide ( $Y_{L/S_{teor}} = 0,32 \text{ g g}^{-1}$ )

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Utjecaj vanilina na rast biomase plijesni *M. isabellina* i sintezu lipida

Proveden je šaržni submerzni uzgoj plijesni *M. isabellina* na glukozu u tikvicama s rasponom koncentracija vanilina 0-1,6 g L<sup>-1</sup>. Na kraju uzgoja, određena je koncentracija suhe tvari biomase gravimetrijski (3.2.3.1.) i udio lipida u biomasi ekstrakcijom s organskim otapalom (3.2.3.3.). HPLC metodom određena je koncentracija glukoze u prevreloj komini (3.2.3.2.). Na slici 13 prikazana je ovisnost koncentracije biomase i koncentracije lipida na kraju uzgoja u podlozi o početnoj koncentraciji vanilina u podlozi.



Slika 13. Ovisnost koncentracije biomase i lipida na kraju uzgoja o koncentraciji vanilina u podlozi

Iz grafa je vidljiv trend smanjenja koncentracije biomase i lipida povećanjem koncentracije vanilina. Inhibicija je uočena već pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji vanilina od 0,1 g L<sup>-1</sup>. Koncentracija biomase je pri koncentraciji vanilina od 0,1 g L<sup>-1</sup> umanjena za 23,87% u odnosu na kontrolnu kulturu (0 g L<sup>-1</sup> vanilina), a koncentracija lipida za čak 41,79%.

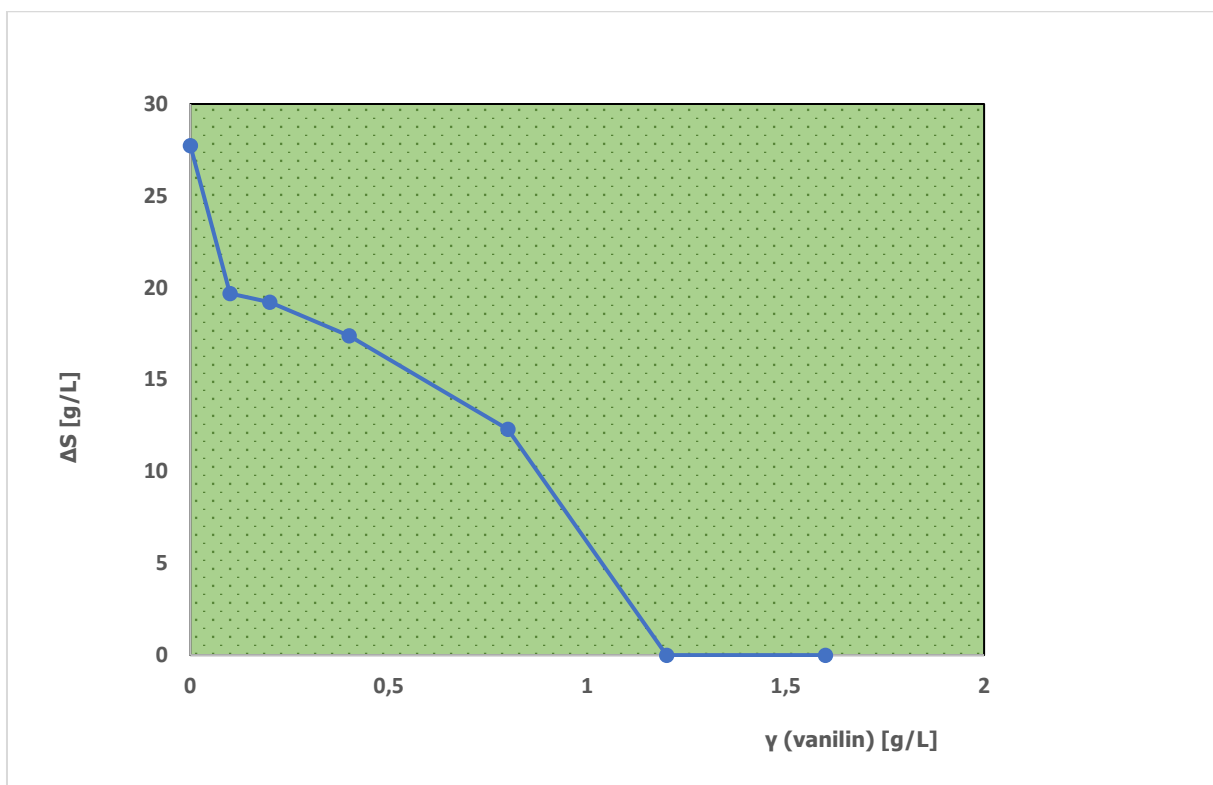
Smanjenje koncentracije biomase približno je proporcionalno početnoj koncentraciji vanilina u podlozi. Pri koncentraciji vanilina većoj od 0,8 g L<sup>-1</sup> zabilježen je drastičan pad koncentracije biomase (0,1 g L<sup>-1</sup>). Koncentracija lipida također se smanjuje proporcionalno porastu

koncentracije vanilina. Zbog vrlo niske koncentracije biomase pri koncentracijama vanilina većim od  $0,8 \text{ g L}^{-1}$ , udjel lipida nije bilo moguće odrediti. Pri koncentraciji vanilina od  $1,2 \text{ g L}^{-1}$  rast biomase i sinteza lipida u potpunosti su inhibirani.

Zeng i sur. (2012) uzgajali su *M. isabellina* na ksilozi ( $S_0 = 30 \text{ g L}^{-1}$ ) uz prisutnost vanilina te su utvrdili da vanilin značajno inhibira rast biomase i sintezu lipida pri koncentracijama višim od  $1 \text{ g L}^{-1}$ , što je vrlo slično rezultatima ovog istraživanja.

Suprotno tome, Larsson i sur. (2000) utvrdili su da vanilin pri koncentraciji od  $1 \text{ g L}^{-1}$  neznatno inhibira rast kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, što upućuje na veću toleranciju kvasca na vanilin od plijesni *M. isabellina*.

Na slici 14 prikazana je ovisnost koncentracije utrošene glukoze o početnoj koncentraciji vanilina u hranjivoj podlozi. HPLC analizom supernatanata utvrđeno je da je koncentracija utrošene glukoze obrnuto proporcionalna koncentraciji vanilina u podlozi na početku uzgoja.



Slika 14. Ovisnost koncentracije utrošene glukoze o koncentraciji vanilina u podlozi

U kontrolnoj kulturi ( $0 \text{ g L}^{-1}$  vanilina) koncentracija utrošene glukoze bila je najveća. Pošto u kontrolnoj kulturi nije bio prisutan inhibitor, velike količine glukoze trošile su se na rast biomase i sintezu lipida. Dodatkom vanilina rast biomase i sinteza lipida bili su djelomično ili potpuno inhibirani. Porastom koncentracije vanilina, pojačavao se njegov inhibicijski učinak na rast

mikroorganizma, odnosno nastajale su manje koncentracije biomase, zbog čega se smanjila vrijednost koncentracije utrošene glukoze u podlozi.

Na temelju koncentracija biomase, lipida i utrošene glukoze određenih u prevreloj komini, izračunati su pokazatelji uspješnosti procesa: koeficijent konverzije supstrata u proizvod ( $Y_{L/S}$ ), koeficijent konverzije supstrata u biomasu bez lipida ( $Y_{X_{bi}/S}$ ), produktivnost sinteze lipida ( $Pr_L$ ), produktivnost nastajanja biomase bez lipida ( $Pr_{X_{bi}}$ ) i iskorištenje procesa ( $E$ ) te su prikazani u tablici 8.

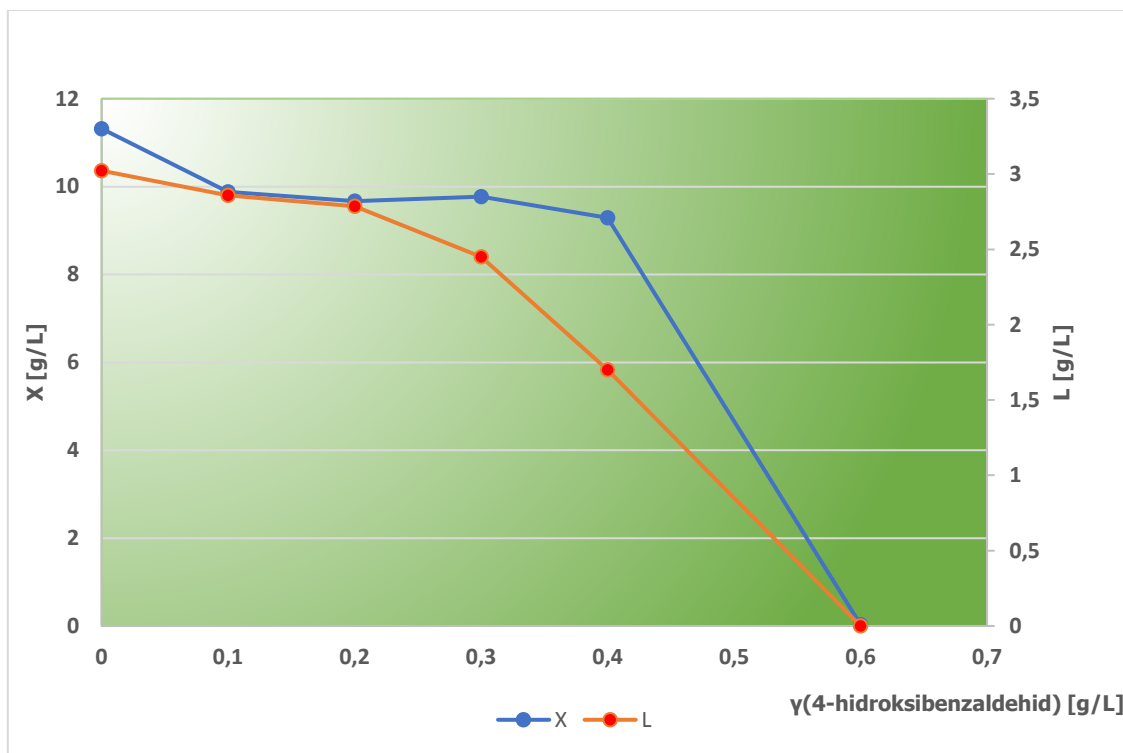
Tablica 8. Utjecaj vanilina na pokazatelje uspješnosti procesa

<b>Koncentracija vanilina (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>Y_{L/S}</math> (g g<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>Y_{X_{bi}/S}</math> (g g<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>Pr_L</math> (g L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>Pr_{X_{bi}}</math> (g L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>)</b>	<b>E (%)</b>
0	0,1089	0,2991	0,4314	1,1854	34,02
0,1	0,0894	0,3484	0,2514	0,9794	27,95
0,2	0,0872	0,3761	0,1843	1,0320	20,99
0,4	0,0783	0,3066	0,1943	0,7611	24,45
0,8	0,0651	0,3925	0,1143	0,6891	20,34
1,2	-	-	-	0,0143	-
1,6	-	-	-	0,0080	-

Vrijednosti produktivnosti sinteze lipida i biomase bez lipida smanjile su se s porastom koncentracije vanilina. Vrijednosti koeficijenata konverzije supstrata u biomasu bez lipida i koeficijenata konverzije supstrata u lipide ukazuju da se povećanjem koncentracije vanilina povećava utrošak supstrata za rast biomase, dok se smanjuje utrošak supstrata za sintezu lipida. Iskorištenje procesa smanjivalo se s povećanjem koncentracije vanilina, što je u skladu s izmjerenim vrijednostima koncentracije lipida.

## 4.2. Utjecaj 4-hidroksibenzaldehida na rast biomase plijesni *M. isabellina* i sintezu lipida

Istražen je učinak 4-hidroksibenzaldehida ( $0-0,6 \text{ g L}^{-1}$ ) na rast i sintezu lipida s plijesni *M. isabellina*. Na slici 15 prikazana je ovisnost koncentracije biomase i lipida na kraju uzgoja o koncentraciji 4-hidroksibenzaldehida u hranjivoj podlozi na početku uzgoja.



Slika 15. Ovisnost koncentracije biomase i lipida na kraju uzgoja o koncentraciji 4-hidroksibenzaldehida u podlozi

4-hidroksibenzaldehid inhibira rast biomase plijesni i sintezu lipida. Pri koncentraciji 4-hidroksibenzaldehida od  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  koncentracija biomase je smanjena za 12,69%, a koncentracija lipida za 5,43% u odnosu na kontrolnu kulturu ( $0 \text{ g L}^{-1}$  4-hidroksibenzaldehida). Koncentracija biomase u ovisnosti o koncentraciji 4-hidroksibenzaldehida slabo se smanjuje s porastom koncentracije inhibitora do  $0,4 \text{ g L}^{-1}$ , a pri većim koncentracijama inhibitora rast biomase izostaje. Koncentracija lipida također slijedi sličan trend pada vrijednosti kao i koncentracija biomase. U usporedbi s vanilinom, 4-hidroksibenzaldehid se pokazao kao slabiji inhibitor pri nižim koncentracijama ( $0 - 0,4 \text{ g L}^{-1}$ ), dok je veći inhibicijski učinak 4-hidroksibenzaldehida utvrđen pri koncentracijama većim od  $0,4 \text{ g L}^{-1}$ .

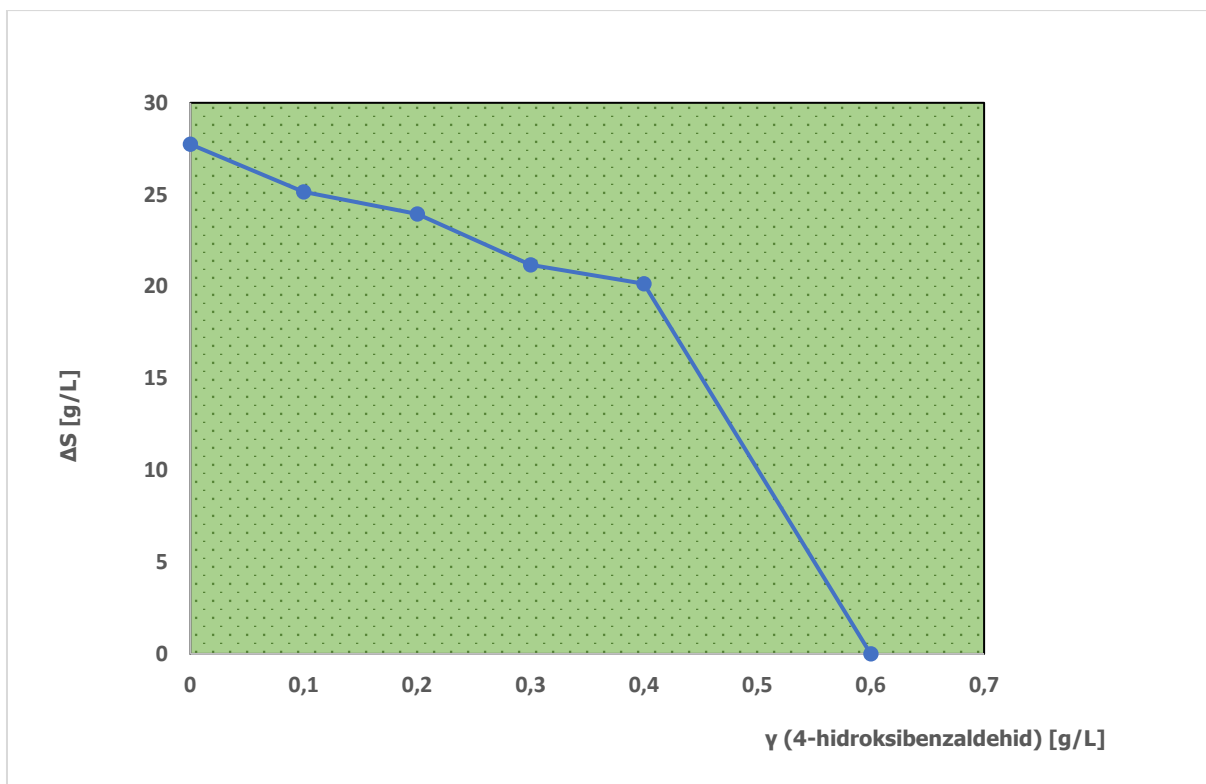
Istraživanja Zeng i sur. (2012) pokazala su da je 4-hidroksibenzaldehid snažniji inhibitor rasta plijesni *M. isabellina* od vanilina. U navedenom istraživanju utvrđeno je da pri koncentraciji 4-



hidroksibenzaldehida od  $0,75 \text{ g L}^{-1}$  dolazi do potpune inhibicije rasta mikroorganizma, što je slično rezultatima ovog istraživanja.

Nadalje, jači inhibicijski učinak 4-hidroksibenzaldehida od vanilina na rast utvrđen je i kod drugih mikroorganizama. Istraživanja koja su proveli Hu i sur. (2009) pokazala su da 4-hidroksibenzaldehid ima jači inhibicijski učinak na rast kvasca *Rhodospiridium toruloides* od vanilina.

Na slici 16 prikazana je ovisnost koncentracije utrošene glukoze u prevreloj komini o koncentraciji 4-hidroksibenzaldehida u podlozi na početku uzgoja.



Slika 16. Ovisnost koncentracije utrošene glukoze na kraju uzgoja o koncentraciji 4-hidroksibenzaldehida u podlozi

Koncentracija utrošene glukoze bila je najveća u kontrolnoj kulturi ( $0 \text{ g L}^{-1}$  4-hidroksibenzaldehida) i smanjivala se povećanjem koncentracije 4-hidroksibenzaldehida u podlozi.

Utjecaj 4-hidroksibenzaldehida na pokazatelje uspješnosti procesa ( $Y_{L/S}$ ,  $Y_{X_b/S}$ ,  $Pr_L$ ,  $Pr_{X_b}$ ,  $E$ ) prikazan je u tablici 9.

Tablica 9. Utjecaj 4-hidroksibenzaldehida na pokazatelje uspješnosti procesa

<b>Koncentracija 4- hidroksibenzaldehida (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Y<sub>L/s</sub> (g g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Y<sub>x<sub>bl</sub>/s</sub> (g g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pr<sub>L</sub> (g L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pr<sub>x<sub>bl</sub></sub> (g L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>)</b>	<b>E (%)</b>
0	0,1088	0,2991	0,4314	1,1854	34,02
0,1	0,1136	0,2793	0,4083	1,0034	35,51
0,2	0,1163	0,2874	0,3980	0,9834	36,62
0,3	0,1156	0,3463	0,3500	1,0454	36,13
0,4	0,0843	0,3765	0,2427	1,0843	26,34
0,6	-	-	-	-	-

Pri koncentracijama manjim od 0,4 g L<sup>-1</sup> učinak inhibitora na produktivnost sinteze biomase plijesni bez lipida je zanemariv. Naprotiv, produktivnost sinteze lipida se smanjuje s porastom koncentracije lipida. Vrijednosti koeficijenata konverzije supstrata u biomasu bez lipida i koeficijenata konverzije supstrata u lipide pokazuju da se povećava utrošak supstrata za rast biomase, bez značajnijeg učinka na sintezu lipida. Očekivano, vrijednosti iskorištenja procesa sinteze nisu se značajnije mijenjale s porastom koncentracije 4-hidroksibenzaldehida.

## 5. ZAKLJUČCI

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

1. Primjena lignoceluloznih sirovina kao izvora ugljika za rast mikroorganizama i sintezu proizvoda zahtjeva prethodnu predobradu sirovine i hidrolizu strukturnih polisaharida do fermentabilnih šećera.
2. Tijekom procesa predobrade nastaju nusproizvodi koji mogu imati inhibicijski učinak na rast radnog mikroorganizma i sintezu proizvoda te na celulolitičke enzime. Inhibitori nastali predobradom dijele se u tri osnovne skupine: slabe kiseline, derivate furana i fenolne spojeve. Fenolni spojevi ubrajaju se u skupinu najtoksičnijih inhibitora.
3. Pri koncentracijama vanilina 0,1-0,8 g L<sup>-1</sup> sinteza lipida u plijesni *M. isabellina* značajno se smanjuje, dok je učinak na rast biomase slabije izražen. Pri koncentracijama vanilina većim od 1,2 g L<sup>-1</sup> *M. isabellina* ne raste i ne nakuplja lipide.
4. 4-hidroksibenzaldehid u koncentracijama nižim od 0,3 g L<sup>-1</sup> podloge ne utječe na rast plijesni *M. isabellina* i sintezu lipida. Pri koncentracijama 4-hidroksibenzaldehida većim od 0,6 g L<sup>-1</sup> *M. isabellina* ne raste i ne nakuplja lipide.

## 6. POPIS LITERATURE

- Ambruš N. (2016) Proizvodnja lipida pomoću plijesni *Mortierella isabellina*. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Bajpai P. (2016) Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production, Springer, str. 7-12
- Börjesson M., Westman G. (2015) Crystalline Nanocellulose: Preparation, Modification, and Properties. U: Poletto M., Ornaghi Junior H. L., ur., *Cellulose: Fundamental Aspects and Current Trends*, InTech
- Chandel A. K., Kapoor R. K., Singh A., Kuhad R. C. (2007) Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology*, **98**: 1947-1950
- Chandel A. K., da Silva S. S., Singh O. V. (2011) Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production. U dos Santos Bernardes M. A., ur. Biofuel Production: Recent Developments and Prospects. INTECH. str. 225-246
- Chang V. S., Holtzaple M. T. (2000) Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **84**: 5-37
- Chen H. (2014) Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose, U: Chen H. Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice, Springer, str. 25-71
- Clark T. A., Mackie K. L. (1984) Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. *Chemical Technology and Biotechnology* **34**: 101-110
- Cruz J. M., Dominguez J. M., Dominguez H., Parajo J. C. (1999) Solvent extraction of hemicellulose wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity. *Food Chemistry* **67**: 147-153
- Fengel D., Wegener G. (1984) Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de Gruyter
- Fillat Ú., Ibarra D., Eugenio M. E., Moreno A. D., Tomás-Pejó E., Martín-Sampedro R. (2017) Laccases as a Potential Tool for the Efficient Conversion of Lignocellulosic Biomass: A review. *Fermentation* **3**(2), 17
- Hendriks A. T. W. M., Zeeman G. (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **100**: 10-18

- Hu C., Zhao X., Zhao J., Wu S., Zhao Z. K. (2009) Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology* **100**: 4843-4847.
- Janušić V., Ćurić D., Krička T., Voća N., Matin A. (2008) Predtretmani u proizvodnji bioetanola iz lignocelulozne biomase. *Poljoprivreda* **14**: 53-58
- Knauf M., Moniruzzaman M. (2004) Lignocellulosic Biomass Processing: A perspective. *International Sugar Journal* **106**: 147-150
- Kuhar S., Nair L. M., Kuhad R. C. (2008) Pretreatment of lignocellulosic material with fungi capable of higher lignin degradation and lower carbohydrate degradation improves substrate acid hydrolysis and the eventual conversion to ethanol. *Canadian Journal of Microbiology*, **54**: 305-313
- Kumar P., Barrett D. M., Delwiche M. J., Stroeve P. (2009) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **48**: 3713-3729
- Larsson S., Quintana-Sáinz A., Reimann A., Nilvebrant N. O., Jönsson L. J. (2000) Influence of Lignocellulose-Derivate Aromatic Compounds on Oxygen-Limited Growth and Ethanolic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **84-86**: 617-632
- Laureano-Perez L., Teymouri F., Alizadeh H., Dale B. E. (2005) Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: Characterization of pretreated corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **124**: 1081-1099
- Limayem A., Ricke S. C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science* **38**: 449-467
- Martin C., Galbe M., Wahlbom C. F., Hahn-Hägerdal B., Johnsson L. J. (2002) Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* **31**: 274-282
- Meng X., Yang J., Xu X., Zhang L., Nie Q., Xian M. (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, **34**: 1-5

- Mussatto S. I., Teixeira J. A. (2010) Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. FORMATEX 897-907
- Olsson L., Hahn-Hägerdal B. (1996) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microb. Technol.* **18**: 312-331
- Palmqvist E., Almeida J. S., Hahn-Hägerdal B. (1999) Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnology and Bioengineering* **62**: 447-454
- Rezić T., Ivančić Šantek M., Andlar M., Pavlečić M., Šantek B. (2016) Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanol iz lignoceluloznih sirovina. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **11 (1-2)**: 6-17
- Qin L., Li W.-C., Liu L., Zhu J.-Q., Li X., Li B.-Z., Yuan Y.-J. (2016) Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase. *Biotechnology for Biofuels*
- Saha B. C. (2003) Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **30**: 279-291
- Webster J., Weber R. W. S. (2007) Introduction to fungi, 3.izd., Cambridge, str. 197
- Wilson J. J., Deschatelets L., Nishikawa N. K. (1989) Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam pretreated aspen wood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776. *Applied Microbiology and Biotechnology* **31**: 592-596
- Ximenes E., Kim Y., Mosier N., Dien B., Ladisch M. (2010) Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology* **48**: 54-60
- Xing D., Wang H., Pan A., Wang J., Xue D. (2012) Assimilation of corn fiber hydrolysates and lipid accumulation by *Mortierella isabellina*. *Biomass and bioenergy* **39**: 494-501
- 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**: 385-39

Izjava o  
izvornosti

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

Marija Kuzmić