

Kinetika rasta i sinteza bakterioklorofila tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Sarić, Marko

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:159:706826>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-05**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno - biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Marko Sarić

7378/BT

**Kinetika rasta i sinteza bakterioklorofila tijekom uzgoja ljubičaste
nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781**

ZAVRŠNI RAD

Znanstveno-istraživački projekt: *"Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih
lignoceluloznih sirovina "* (HRZZ-9717)

Mentor: doc. dr.sc. *Mario Novak*

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu u sklopu projekta "*Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina* " (HRZZ-9717) pod vodstvom prof. dr. sc. Božidara Šanteka, te *Bioprospecting Jadranskog mora BioProCro (KK.01.1.1.01.0002)* uz mentorstvo doc. dr. sc. Maria Novaka te Nenada Marđetka mag.ing kao pomoć u izradi.

Zahvaljujem svome mentoru doc.dr.sc. Mariu Novaku i Nenadu Marđetku, mag.ing. na uloženom vremenu, savjetima i pomoći pri izradi završnog rada.

Zahvaljujem i doc.dr.sc. Antoniji Trontel na susretljivosti i korisnim savjetima.

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

Kinetika rasta i sinteza bakterioklorofila tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Marko Sarić, 7378/BT

Sažetak:

Ljubičaste nesumporne bakterije izolirane iz raznih staništa zanimljive su s ekološke strane i ekonomske strane u održivim procesima proizvodnje vodika kao biogoriva, s medicinske strane za sintezu biokemikalija kao aminolevulininska kiselina, za proizvodnju biopolimera (PHB) koji ne zagađuju okoliš i biomase te sintezu specifičnih spojeva kao karotenoida i pigmenata. Svrha održivog razvoja bioprocasa je korištenje obnovljivih izvora sirovina, primjerice lignoceluloznih sirovina. Cilj ovog rada bio je analizirati kinetiku rasta, potrošnju supstrata i sintezu fotosintetskih pigmenata ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom rasta na podlogama koje sadrže glukozu i ksilozu kao izvor ugljika, te rast na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina dobivenim kiselinskom predobradom u visokotlačnom reaktoru. Rezultati su pokazali da je najviši prinos biomase tijekom rasta na glukozu, a za sintezu pigmenata je najbolje koristiti podlogu s glukozom i ksilozom kao izvorom ugljika. Također je pokazano da je bakterija sposobna rasti na tretiranim i netretiranim hidrolizatima lignoceluloznih sirovina.

Ključne riječi: kinetika rasta, ljubičaste nesumporne bakterije, bakterioklorofil

Rad sadrži: 39 stranica, 14 slika, 11 tablica, 50 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Mario Novak

Pomoć pri izradi: Nenad Marđetko, mag.ing

Datum obrane:

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 Brewing

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Growth kinetics and bacteriochlorophyll synthesis during cultivation of purple non sulphur bacteria *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Marko Sarić, 7378/BT

Abstract:

Purple non-sulfur bacteria isolated from different habitats are interesting from ecologic and economic point in sustainable processes for production of hydrogen as biofuel, in medicine for synthesis biochemicals such as aminolevulinic acid, for production of eco-friendly biopolymers (PHB) and biomass along with synthesis of specific compounds such as carotenoids and pigments. Purpose of sustainable development of bioprocess is usage of renewable sources, for example lignocellulosic materials. Aim of this thesis was analysis of growth kinetics, substrate utilization and synthesis of photosynthetic pigments in purple non-sulfur bacteria *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 during growth on media containing glucose and xylose as carbon source and analysis of growth on lignocellulosic hydrolysates obtained by acidic pretreatment in high-pressure reactor. Results have shown that highest yield of biomass was during growth on glucose and the best medium for pigment synthesis is mixture of glucose and xylose. It has been also shown that bacteria is capable of growing on treated and non-treated hydrolysates of lignocellulosic materials.

Keywords: growth kinetics, purple non sulphur bacteria, bacteriophyl

Thesis contains: 39 pages, 14 figures, 11 tables, 50 references, 0 supplements

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 Mario Novak, Assistant Professor

Technical support and assistance: MA Nenad Marđetko

Defence date:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Fotosintetske bakterije – specifičnosti uzgoja.....	2
2.1.1. Zelene bakterije	2
2.1.2. Ljubičaste bakterije	3
2.2. Ljubičaste nesumporne bakterije u biotehnološkoj proizvodnji.....	6
2.2.1. Primjena ljubičastih nesumpornih bakterija u biotehnološkoj proizvodnji biokemikalija	6
2.2.2. Primjena ljubičastih nesumpornih bakterija u biotehnološkoj proizvodnji biopolimera	7
2.2.3. Primjena ljubičastih nesumpornih bakterija u biotehnološkoj proizvodnji biogoriva ...	7
2.2.4. Primjena biomase ljubičastih nesumpornih bakterija u bioremedijaciji i kao izvor proteina.....	8
2.3. Karotenoidi, pigmenti i bakterioklorofil kod ljubičastih nesumpornih bakterija, sinteza i primjena	8
2.4. Bioreaktorski sustavi i specifičnosti uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija	9
3. MATERIJALI I METODE.....	11
3.1.1. Hranjive podloge	11
3.1.2. Radni mikroorganizam	12
3.1.3. Ostale kemikalije	12
3.1.4. Aparature i uređaji	12
3.1.4.1. Spektrofotometar	12
3.1.4.2. Centrifuga	13
3.1.4.3. Vage	13

3.1.4.4. Sušionik.....	13
3.1.4.5. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC).....	13
3.1.4.6. Ostala oprema	14
3.2. Metode.....	14
3.2.1 Određivanje kinetike rasta bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781	14
3.2.1.1 Priprema podloge.....	14
3.2.1.2 Nadzor procesa uzgoja bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781	15
3.3. Određivanje optičke gustoće	16
3.4. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase bakterija	16
3.5. Priprema uzoraka za UPLC -analizu	16
3.6. Ekstrakcija ukupnih pigmenata i određivanje bakterioklorofila <i>a</i>	16
3.7. Uzgoj nesumporne ljubičaste bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781	17
3.8. Određivanje parametara uspješnosti tijekom uzgoja bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781.....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	19
4.1. Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 na podlogama sa glukozom kao izvorom ugljika.....	20
4.2. Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 na podlogama sa ksilozom kao izvorom ugljika	23
4.3. Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 na podlogama sa glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika	26
4.4. Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 na hidrolizatima dobivenim pretretmanom kukuruzovine i oklasaka slabom kiselinom	29
5. ZAKLJUČCI	34
6. POPIS LITERATURE.....	35

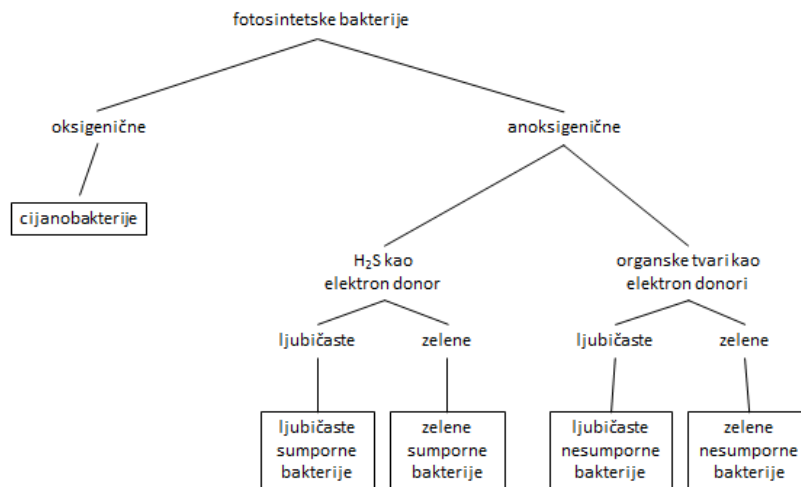
1. UVOD

U ovom radu proveo se uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na definiranim podlogama koje sadrže ugljikohidrate sadržane u pretretanim lignoceluloznim sirovinama (glukoza i/ili ksiloza), te kompleksnim podlogama, točnije hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (kukuruzovina; kukuruzni oklasci) dobivenim tretmanima slabim kiselinama u visokotlačnom reaktoru. Uzgoji su vođeni u mikroaerofilnim uvjetima pod konstantnim osvjetljenjem. Ljubičaste nesumporne bakterije zanimljive su s ekološke strane jer su sposobne proizvoditi vodik koji može služiti kao biogorivo (D'addario i sur., 1998), s medicinske strane za sintezu biokemikalija koje je neisplativo sintetizirati kemijskim putem (Liu i sur., 2014), kao što je aminolevulinska kiselina i razni pigmenti te karotenoidi, s industrijske strane za proizvodnju biopolimera kao što je polihidroksibutirat koji ne zagađuju okoliš i same biomase koja može poslužiti za bioremedijaciju te kao izvor proteina za ishranu (Higuchi-Takeuchi i sur., 2016). Kako bi sam proces uzgoja ili/i proizvodnje određene biokemikalije bio održiv potrebno je koristiti izvore sirovina koji su obnovljivi i imaju nisku cijenu. Stoga je upotreba lignoceluloznih sirovina u biotehnološkim procesima je posebno zanimljiva zbog široke rasprostranjenosti, dostupnosti i obnovljivosti lignoceluloznih materijala, uz određeni stupanj pretretmana da se dobije oblik sirovine tj., izvor ugljika koji istraživani soj mikroorganizma može koristiti. Glavni izvori ugljika u tretiranim lignoceluloznim sirovinama su glukoza i ksiloza, stoga je cilj ovog rada bio je analizirati kinetiku rasta, potrošnju supstrata i sintezu fotosintetskih pigmenata ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u definiranim i kompleksnim podlogama koje sadrže te ugljikohidrate. Istraživanje je pokazalo da bakterija najbrže raste u podlogama sa glukozom kao izvorom ugljika, a za maksimalnu sintezu pigmenata je najbolje koristiti podlogu s glukozom i ksilozom. Također je pokazano da je bakterija sposobna rasti na tretiranim i netretiranim hidrolizatima lignoceluloznih sirovina, što ukazuje na mogućnost daljnjeg razvoja održivih procesa sinteze raznih biokemikalija na podlogama dobivenim tretmanima lignoceluloznih sirovina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Fotosintetske bakterije – specifičnosti uzgoja

Fotosintetske bakterije mogu se naći u slatkovodnim, morskim, kiselim i lužnatim vodama te u raznim otpadnim vodama. Te bakterije imaju važnu ulogu u asimilaciji CO₂ i fiksaciji dušika iz atmosfere (Lascelles i suradnici, 1978). Općenito, fotosintetske bakterije se mogu podijeliti na oksigenične kod kojih nastaje kisik te na anoksigenične u čijem metabolizmu ne dolazi do stvaranja kisika. Fotosintetske bakterije pretvaraju svjetlosnu energiju u kemijsku slobodnu energiju. Većina tih bakterija pripada skupini eubakterija, ali neke poput halobakterija, pripadaju arhebakterijama. Sve fotosintetske eubakterije sadrže fotokemijske reakcijske centre koji sadrže jednu ili više molekulu klorofila. Svaki reakcijski centar se sastoji od primarnog elektron donora (bakterioklorofil), početnog elektron akceptora (bakterioklorofil ili bakteriofeofitin) i jednog ili više sekundarnih akceptora (FeS centri, kinoni). Ponekad je sekundarni elektron donor (citokrom c) čvrsto vezan na reakcijski centar. Kompleksi za hvatanje svjetla služe povećanju efikasnosti apsorpcije svjetla za svaki reakcijski centar (Olson i Pierson 1987).

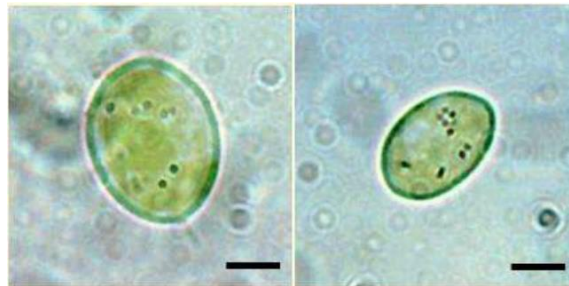


Slika 1. Podjela fotosintetskih bakterija

2.1.1. Zelene bakterije

Zelene bakterije su porodica obligatnih anaerobnih fotoautotrofnih bakterija. Dije se na zelene sumporne i zelene nesumporne bakterije. Reakcijski centar zelenih sumpornih bakterija je sličan fotosustavu I oksigeničnih fotosintetskih organizama (npr. biljke i alge). Budući da FeS centri u reakcijskom centru mogu reducirati NAD⁺ feredoksinom i feredoksin NAD (P)⁺ oksidacijsko-redukcijskim enzimom, zelene sumporne bakterije ne ovise o povratnom toku elektrona za redukciju ugljika. Nisu pokretne. Postoje zelene i smeđe vrste zelenih sumpornih bakterija. Zelene vrste sadrže bakterioklorofil *c* ili *d* te karotenoide

klorobakten i OH-klorobakten kao pigmente za hvatanje svjetla (Gloe i sur., 1975; Schmidt 1978). Smeđe vrste posjeduju bakterioklorofil *e* te karotenoide izorenieraten i β -izorenieraten kao pigmente za hvatanje svjetla (Liaaen-Jensen, 1965). Razlike u sadržaju pigmenata je odgovoran za razlike u svojstima apsorpcije svjetla. Smeđe vrste imaju širi apsorpcijski spektar, između 480 i 550 nm. Sve vrste rastu s CO₂ kao jedinim izvorom ugljika. U prisutnosti sulfida i CO₂ samo se acetat i piruvat asimiliraju kao organski izvori ugljika. Sulfid se koristi kao elektron donor i izvor sumpora pri čemu se oksidira do sulfata. Neke vrste mogu koristiti tiosulfate i vodik kao elektron donore. Većina vrsta zahtijeva vitamin B₁₂ kao faktor rasta (Imhoff, 1995).



Slika 2. Zelene fotosintetske bakterije (preuzeto s www.researchgate.net)

2.1.2. Ljubičaste bakterije

Ljubičaste bakterije su mala skupina Gram – negativnih eubakterija koja se sastoji od samo 30-ak vrsta. Jednostanične su, razmnožavaju se binarnom diobom i u većini slučajeva se pokreću bičem. Sve ljubičaste bakterije su sposobne rasti anaerobno na svjetlu s CO₂ kao izvorom ugljika i reduciranim anorganskim tvarima kao elektron donorima (Madigan i Jung 2009). Jedini biokemijski put za fiksaciju ugljika kod ljubičastih bakterija je Calvinov ciklus. Ljubičaste bakterije prenose elektrone od elektron donora direktno na citokrom bc₁ za stvaranje NADH ili NADPH koji se koriste za anabolizam (Cogdell i sur., 2006.). Većina fotosintetskih pigmenata su bakterioklorofil *a* ili *b* te razni karotenoidi iz skupine spiriloksantina, rodopinala, sferoidena ili okenona (Schmidt, 1978). Fotosintetske ljubičaste bakterije se dijele na ljubičaste sumporne i ljubičaste nesumporne bakterije. Ljubičaste sumporne bakterije koriste sulfide ili sumpor kao elektron donore (Debabrata i Nitai, 2007), a ljubičaste nesumporne bakterije koriste organske tvari kao elektron donore, ali također mogu koristiti sulfide pri nižim koncentracijama.

2.1.2.1 Ljubičaste sumporne bakterije

Ljubičaste sumporne bakterije koriste anorganske sumporne spojeve kao elektron donore, npr. H₂S. Anaerobne su ili mikroaerofilne, te se mogu naći vodenim okolišima kao

što su izvori vruće vode, vode stajačice i estuariji bogati sulfatima (Pfennig, 1967, 1978a, 1989). Koriste sulfide ili tiosulfate kao elektron donore, pri čemu se sumpor oksidira i dolazi do nastajanja njegovih granula. Podijeljene su u dvije porodice, *Chromatiaceae* koji proizvode unutarstanične granule sumpora i *Ectothiorhodospiraceae* koje proizvode izvanstanične granule sumpora. Također postoji razlika u strukturi njihovih unutrašnjih membrana (Jung i Madigan, 2008). Većina su striktni anaerobi koji zahtijevaju vitamin B₁₂ kao jedini faktor rasta.

2.1.2.2 Ljubičaste nesumporne bakterije

Ljubičaste nesumporne bakterije su najraznolikija skupina fototrofnih ljubičastih bakterija (Imhoff i Trüper 1989). Raznolikost se očituje u varijacijama morfologije, strukture unutarnje membrane, sastavu karotenoida, iskorištavanju izvoru ugljika i elektron donorima. Većina vrsta se pokreće bičevima. Preferirani rast svih vrsta je fotoheterotrofno u anaerobnim uvjetima pod svjetlom s različitim organskim supstratima kao što su masne kiseline, ostale organske kiseline (sukcinat ili malat), primarni i sekundarni alkoholi, ugljikohidrati i aromatski spojevi. Mnoge vrste su također sposobne rasti fotoautotrofno s molekularnim vodikom ili sulfidima kao elektron donorima te samo s CO₂ kao izvorom ugljika (Hansen i Van Gemerden 1972). Neke vrste su iznimno osjetljive na kisik, ali većina je tolerantna te dobro raste u aerobnim uvjetima bez svjetla. U uvjetima bez svjetla, sinteza fotosintetskih pigmenata je potisnuta te su kulture slabo obojene ili bezbojne. Kao faktori rasta obično su potrebni biotin, tiamin, niacin te p-aminobenzojeva kiselina. Kvaščev ekstrakt potiče rast većine vrsta. Podijeljene su u šest rodova (Imhoff 1995).

a. rod *Rhodospirillum*

Rhodospirillum stanice su spiralnog oblika, široke 0.5 – 1.5 µm. Ovaj rod koristi polarni bič za kretanje. Ove bakterije imaju intracitoplazmatsku fotosintetsku membranu raspoređenu u obliku mjehurića, lamela ili nakupina, ali ne intruzije citoplazmatske membrane u obliku prsta. *Rsp. rubrum*, *Rsp. fulvum*, *Rsp. oxigens*, *Rsp. photometricum* i *Rsp. meliscchianum* pripadaju ovom rodu (Madigan i Jung 2009).

b. rod *Rhodopseudomonas*

Rhodopseudomonas stanice su štapićastog oblika i pokazuju polaran rast, dijeleći se asimetrično. Koriste bič za pokretanje. Sadržavaju intracitoplazmatsku fotosintetsku membranu. *Rps. palustris*, *Rps. acidophila*, *Rps. rutica* te *Rps. viridis* pripadaju ovom rodu.

c. rod *Rhodomicrobium*

Bakterije ovog roda su jajolike. Koriste se peritrihalnim bičevima za kretanje. Razmnožavaju se pupanjem te imaju omeđene intracitoplazmatske membrane. *Rhodomicrobium vannielii* je član ovog roda.

d. rod *Rhodopila*

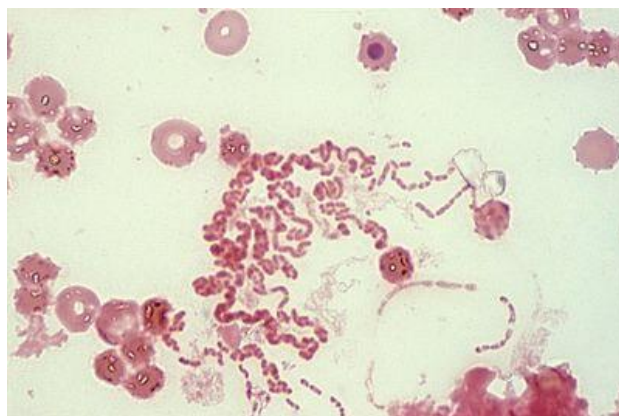
Stanice ovog roda su sferične do jajolike. Koriste bičeve za pokretanje. Fotosintetske membrane ovih bakterija su mjehuraste. Mogu rasti pri niskim pH, te su im biotin i p-aminobenzojeva kiselina potrebne kao faktori rasta. Osjetljive su na kisik. *Rhodopila globiformis* je član ovog roda.

e. rod *Rhodocyclus*

Rhodocyclus stanice su tanke, zakrivljene te su velike 0.3 – 0.7 µm u promjeru. Mogu biti pokretne pomoću bičeva ili nepokretne. Imaju intracitoplazmatske membrane koje tvore male intruzije u obliku prsta unutar citoplazmatske membrane (Madigan i Jung 2009). *Rcy. tenuis*, *Rcy. galatinosus* i *Rcy. purpureus* su članovi ovog roda.

f. rod *Rhodobacter*

Rhodobacter je prije bio uključen u rod *Rhodopseudomonas*, ali je razdvojen na temelju svojih invaginacijskih intracitoplazmatskih membrana kod kojih se mogu pojaviti mjehurići u tankim presjecima. Stanice su jajolike do štapičaste i dijele se binarnom diobom. Mogu biti pokretne ili nepokretne. Sve vrste zahtijevaju tiamin, a većina i biotin. Dodatne vitaminske potrebe su promjenjive između vrsta. Fotosintetski pigmenti su bakterioklorofil *a* i karotenoidi sferoidne grupe. *Rba. sphaeroides*, *Rba. sulfidophilus*, *Rba. capsulatus*, *Rba. blasticus* i *Rba. adriaticus* su članovi ovog roda (Madigan i Jung 2009).



Slika 3. Ljubičasta nesumporna bakterija *Rhodobacter capsulatus* (preuzeto iz Bacterio-Web.)

2.2. Ljubičaste nesumporne bakterije u biotehnološkoj proizvodnji

Ljubičaste nesumporne bakterije imaju veliki potencijal u biotehnologiji. 5-aminolevulinska kiselina je najpoznatija kemikalija koju proizvode ljubičaste nesumporne bakterije. Također se mogu primijeniti za sintezu biopolimera kao što je polihidroksibutirat (PHB). Kako bi se smanjilo zagađenje atmosfere korištenjem fosilnih goriva, istražuje se primjena bakterija u proizvodnji vodika koji je jedan od čistih izvora energije. Brojni pigmenti, koji služe bakterijama za hvatanje svjetla i koji sadrže antioksidativna i antikancerogena svojstva, mogli bi se izolirati iz bakterijske biomase, dok se biomasa se može koristiti i kao životinjska hrana budući da je bogata proteinima. Moguća primjena ljubičastih nesumpornih bakterija se može naći u lagunama pri deodorizaciji i uklanjanju otrovnih plinova kao što su metan i sumporovodik jer ih mogu skoristiti kao izvor elektrona te u tretiranju otpadnih industrijskih voda.

2.2.1. Primjena ljubičastih nesumpornih bakterija u biotehnološkoj proizvodnji biokemikalija

Jedna od primjena ljubičastih nesumpornih bakterija je u proizvodnji 5-aminolevulinske kiseline (5-ALA). ALA je međuprodukt u sintezi različitih tetrapirolnih molekula (npr. klorofil, hem, vitamin B12) u svim živućim organizmima (Kang i sur., 2012). Postoje dva različita biokemijska puta u kojima može nastati ALA: C4 put (Sheminov put) koji je prisutan u ljubičastim bakterijama, kvascima i stanicama sisavaca te C5 put koji je prisutan u mnogim biljkama i mikroorganizmima (Woodard i Dailey, 1995). Danas se ALA najviše proizvodi mikrobnom fermentacijom, najčešće fotosintetskim bakterijama jer kemijska sinteza ALA ima niske prinose i kompliciranija je u usporedbi s mikrobnom proizvodnjom (Liu i sur., 2014). ALA se proizvodi i divljim sojem bakterija i mutantima. Primjena mutantskih sojeva je mnogo primjerenija za proizvodnju ALA. Do sada je mnogo sojeva fotosintetskih bakterija i njihovih mutanata ispitano (Sasaki i sur., 1991; Xiu-yan i sur., 2005; Liu i sur., 2015; Meng i sur., 2016) te se može koristiti kompleksna i kemijski definirana podloga (Heiko i sur., 1993). Nedavno je primijenjena sinteza ALA korištenjem multienzijske katalize bez stanica. ALA se može koristiti kao herbicid ili pojačivač biljne tolerancije na stres (Nunkaew i sur., 2014). Nije štetna za usjeve, ljude i životinje te je biorazgradiva. Nedavno je uočen velik potencijal ALA na polju medicine zbog primjene u lokaliziranju tumora i fotodinamičke terapije (Seiji i sur., 1999).

2.2.2. Primjena ljubičastih nesumpornih bakterija u biotehnološkoj proizvodnji biopolimera

Polihidroksialkanoati (PHA) su biopoliesteri koji služe kao unutarstanična pohrana ugljika i energije. PHA može služiti kao alternativa plastici koja se dobiva iz nafte zbog svoje biorazgradivosti i biokompatibilnosti. Iako su uloženi napor u smanjenje cijene PHA, cijene potrebnih izvora ugljika kao što su šećeri i biljna ulja su još uvijek visoke u usporedbi s plastikom na bazi nafte. Kako bi se riješio ovaj problem, znanstvenici se fokusiraju na direktnu fiksaciju CO₂ pomoću fotosinteze za sintezu PHA. Do sinteze PHA dolazi kada je rast stanice limitiran dušikom, fosforom ili sumporom, a izvor ugljika se nalazi u suvišku (Higuchi-Takeuchi i sur., 2016). Smatra se da su za sintezu PHA potrebna tri gena *phaA* (β-ketotiolaza), *phaB* (acetoacetyl-koenzim A reduktaza) i *phaC* (PHA sintaza) (Rehm i Steinbüchel, 1999). Sinteza PHA je proučavana kod nekih vrsta ljubičastih nesumpornih bakterija kao što su *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides* i *Rhodopseudomonas palustris*. Pokazano je da *Rhodospirillum rubrum* može sadržavati do 50% PHA u suhoj tvari biomase, *Rhodobacter sphaeroides* 60-70% te *Rhodopseudomonas palustris* 4% kada se butirat koristi kao jedini izvor ugljika (Higuchi-Takeuchi i sur., 2016). Obrada otpadne vode u reaktoru pomoću anaerobnih fototrofnih bakterija se pokazala primjerenom za proizvodnju PHA (Sawayama i sur., 1999).

2.2.3. Primjena ljubičastih nesumpornih bakterija u biotehnološkoj proizvodnji biogoriva

Većina današnje svjetske potrebe za energijom se oslanja na fosilna goriva. Korištenje fosilnih goriva uzrokuje klimatske promjene zbog emisije onečišćivača poput CO_x, NO_x, SO_x, C_xH_x, čađe, pepela i ostalih organskih tvari. Ti onečišćivači se oslobađaju u atmosferu kao rezultat sagorijevanja. Kako bi se izbjeglo takvo onečišćenje, vodik je predložen kao glavni izvor energije u budućnosti. Sagorijevanjem vodika nastaje voda kao glavni produkt, stoga se vodik smatra čistim gorivom. Ljubičaste nesumporne bakterije proizvode vodik u prisutnosti svjetla pomoću enzima nitrogenaze prema jednadžbi: $2 \text{ N}_2 + 8 \text{ e}^- + 8 \text{ H}^+ + 16 \text{ ATP} \rightarrow 2 \text{ NH}_3 + \text{ H}_2 + 16 \text{ ADP} + 16 \text{ Pi}$ (Ito i suradnici, 1980). U odsutnosti dušika, nitrogenaza reducira protone pri čemu nastaje molekularni vodik prema jednadžbi $2 \text{ H}^+ + 2 \text{ e}^- + 4 \text{ ATP} \rightarrow \text{ H}_2 + 4 \text{ ADP} + 4 \text{ Pi}$ (Bulen i suradnici, 1965). U usporedbi s ostalim plinovitim gorivima poput metana, vodik je bezopasan za ljude i okoliš (Debabrata i Veziroğlu, 2001). Fototrofne bakterije se pokazuju kao najpogodniji mikroorganizmi za biološku proizvodnju vodika. To je zbog njihovog visokog teoretskog koeficijenta konverzije supstrata u proizvod, djelovanja u anaerobnim uvjetima, sposobnosti da koriste široki spektar svjetlosne energije te mogućnosti

korištenja organskih supstrata iz otpadnih voda (D'addario i sur., 1998). Pokazano je da ljubičasta nesumporna bakterija *Rhodospirillum rubrum* može proizvoditi 21 mL L⁻¹h⁻¹ vodika na podlozi sa sukcinatom kao izvorom elektron donora te da proizvodnja traje 70 h nakon prestanka log faze rasta, iako je proizvodnja u stacionarnoj fazi rasta manja. Ti rezultati sugeriraju da proizvodnja vodika nije striktno povezana s rastom bakterijskih stanica (Bianchi i sur., 2008). U Španjolskoj je napravljeno postrojenje za obradu otpadne vode iz domaćinstava s ciljem proizvodnje biogoriva, tj. vodika (Berna i sur., 2018).

2.2.4. Primjena biomase ljubičastih nesumpornih bakterija u bioremedijaciji i kao izvor proteina

Bakterijska biomasa ljubičastih bakterija se može koristiti kao izvor proteina. Osim proteinima, bakterijska biomasa je bogata mastima i vitaminima te sadrži značajnu količinu karotenoida i bioloških kofaktora koji su korisni. U bazenima za anaerobnu obradu vode koji koriste ljubičaste bakterije, otpadni bakterijski mulj se može koristiti kao hrana za ribe i dodatak poljoprivrednim površinama (Banerjee i sur., 2000, Getha i sur., 1998, Kobayashi i Tchan, 1973). Imobilizirana *Rhodobacter sphaeroides* se pokazala uspješnom u tretiranju otpadnih voda tvornica papira i rafinerije šećera (Nagadomi i sur., 1999). Također se može koristiti za obradu otpadnih industrijskih voda te kanalizacije. U tretiranim vodama je pokazano signifikantno smanjenje biološke potrošnje kisika te smanjenje koncentracije organskih tvari, klorida, bikarbonata i sulfata pri čemu je pH ostao neutralan (Badgu i sur., 2014). Još jedna moguća primjena je u anaerobnim lagunama za uklanjanje H₂S koji bakterijama služi kao donor elektrona. Time dolazi do smanjenja neugodnih mirisa i toksičnosti u lagunama (Bullard i sur., 2009).

2.3. Karotenoidi, pigmenti i bakterioklorofil kod ljubičastih nesumpornih bakterija, sinteza i primjena

Karotenoidi su vrsta nezasićenih ugljikovodika i njihovih oksigeniranih derivata koji se sastoje od osam izoprenoidskih jedinica (Goodwin, 1980). Nedavno su karotenoidi dobili interes u biotehnologiji kao dodatak prehrani budući da može pomoći u održavanju funkcije stanica i prevenciji bolesti. Karotenoidi su izoprenoidni pigmenti koje proizvode mnoge bakterije i gljive te mnogi fotosintetski eukarioti. Obično su crvene, narančaste ili žute boje zbog svojih konjugiranih polienskih lanaca. U svim fotosintetskim organizmima, karotenoidi olakšavaju sklapanje fotosintetskog reakcijskog centra i stupaju u interakciju s njim kao pomoćni pigmenti koji prikupljaju svjetlost i antioksidansi. Također mijenjaju fluidnost i permeabilnost membrane. Karotenoidi igraju dvostruku ulogu u antenama ljubičastih

bakterija (Chen i sur., 2006). Pomažu u prikupljanju svjetla apsorbirajući fotone u opsegu spektra 450-550 nm koji su većinom nedostupni bakterioklorofilu *a*. Također imaju fotoprotektivnu ulogu u sprječavanju tripleta pobuđenog stanja bakterioklorofila *a* koji bi inače mogao proizvesti štetne reaktivne oksidanse. Karotenoidi imaju široku primjenu u farmaceutskoj i u industriji proizvodnje životinjske hrane te akvakulturi. Biosinteza karotenoida kod ljubičastih bakterija se može podijeliti u 2 tipa: put spiriloksantina koji obuhvaća i "normalne" i "neobične" puteve koji vode do spiriloksantina (npr. kod *Rhodospirillum rubrum*) ili sferodiena (npr. kod *Rhodobacter capsulatus* i *Rhodobacter sphaeroides*). Drugi tip je put okenona koji vodi do okenona ili ostalih ketokarotenoida kao konačnih produkata (npr. kod *Allochromatium oekenii*) (Chen i sur., 2006; Kuo i sur., 2012). Za oba biosintetska puta, zajednički korak je oksidacija fitoena koju katalizira enzim fitoen desaturaza. Biosinteza karotenoida kod ljubičastih bakterija počinje kondenzacijom dviju molekula geranilgeranil pirofosfata pomoću enzima fitoen sintaze CrtB pri čemu nastaje fitoen. Fitoen desaturaza CrtI zatim desaturira fitoen tri ili četiri puta, pri čemu nastaje neurosporen ili likopen. Oba ova međuprodukta su zatim hidroksilirana na poziciji 1 pomoću hidroksilaze CrtC, zatim desaturirana na poziciji 3 i 4 pomoću CrtD koji je homolog CrtI. Zatim slijedi metilacija na prvoj hidroksilnoj grupi pomoću enzima metiltransferaze CrtF, i kod organizama koji proizvode sferoidenon i 2,2 J-diketospiriloksantin, ketolacija na poziciji 2 pomoću ketolaze CrtA. Također postoji značajna raznolikost biokemijskog puta zbog potencijalne asimetrije između krajeva karotenoida. Biosinteza karotenoida je dobro proučena biokemijski i genetski kod organizama koji proizvode sferoiden (Gu i sur., 2008; Wang i sur., 2012; Zhou i sur., 2014). Anoksigenične fototrofne ljubičaste bakterije su glavna skupina fototrofnih bakterija koje pretvaraju svjetlosnu energiju u kemijsku anoksigeničnom fotosintezom u prisutnosti fotosintetskih pigmenata. Izvedene su brojne studije kako bi se pronašla antioksidativna, antikancerogena i antimikrobna svojstva mikrobnih pigmenata. Oni bi mogli biti alternativa sintetski dobivenim tvarima u hrani i farmaceutskoj tehnologiji u razvijanju novih lijekova za razna patološka stanja. Također se proučava potencijal pigmenata u smanjenju rizika obolijevanja od raka i neurodegenerativnih bolesti (Moriwaki i sur., 2012).

2.4. Bioreaktorski sustavi i specifičnosti uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija

Dizajn fotobioreaktora ima važnu ulogu jer biološka proizvodnja biogoriva ili biokemikalija poput raznih pigmenata pomoću fotofermentativnih bakterija (npr. *Rhodobacter*) zahtijeva prikladno osvjetljenje u anaerobnim ili aerobnim uvjetima. Optimalno iskorištenje svjetla i optimalna penetracija svjetla u fotobioreaktor je ključna za više prinose. U literaturi se

spominje korištenje zatvorenih cijevnih fotobioreaktora za laboratorijsku upotrebu i veliku tehnološku proizvodnju (Ramana i sur., 1991; Lee i Low 1991; Dvorin 1992; Kretschmer i Pulz 1993;). U konvencionalnim fotobioreaktorima koji koriste vanjsko osvjetljenje dolazi do naglog pada svjetlosnog intenziteta zbog visoke koncentracije stanica, produkata ili nastanka biofilma na površini reaktora (Chang i sur., 1997). Iako je kratki svjetlosni put teoretski najbolji za postizanje visokog iskorištenja svjetla, izvor svjetla ne može biti u bliskom kontaktu s bakterijskom kulturom jer stvara veliku količinu topline. Obično je iskorištenje svjetlosne energije u konvencionalnim bioreaktorima manje od 10% (Arai i sur., 1995; Fascetti i Todini 1995). Za biološku proizvodnju primjerice vodika su također konstruirani horizontalni cijevni bioreaktori u obliku serpentine ili ploče (Pulz i Scheibenbogen 1998), kao i vertikalni cijevni bioreaktori (Benemann i sur., 1989; Gabel i sur., 1992). Nedavne studije upućuju na to da su intenzitet svjetla i ciklusi dana i noći dva ključna parametra koji utječu na proizvodnju vodika i ostalih (foto)biokemikalija. Na primjeru uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodobacter sphaeroides* je pokazano da proizvodnja raste porastom intenziteta svjetlosti te da dolazi do zasićenja pri 270 W/m^2 . Također je pokazano da nedostatak infracrvenog svjetla (valne duljine 750-950 nm) smanjuje proizvodnju za 39%. Primijećeno je da osvjetljenje nakon inokulacije stimulira proizvodnju vodika i povećava koeficijent konverzije supstrata u proizvod.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1. Hranjive podloge

U ovom radu koristile su se kemijski definirane podloge te kemijski kompleksne podloge (hidrolizati kukuruznih oklasaka te kukuruzovine dobiveni tretmanom slabom kiselinom u visokotlačnom reaktoru). Sastav soli, faktora rasta te izvora dušika za kemijski definirane podloge prikazan je u Tablici 1. Ugljikohidrati korišteni u ovom radu navedeni su u Tablici 2. Sastav hidrolizata kukuruznih oklasaka i kukuruzovine korištenim tijekom za uzgoja nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 prikazan je u Tablici 3. Pretretmani lignoceluloznih sirovina i dobivanje hidrolizata nisu bili dio ovog rada. Hidrolizati su dobiveni tijekom istraživanja na projektu "Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina " (HRZZ-9717) i korišteni kao hranjiva podloga za istraživanje rasta i sinteze bakterioklorofila *a* tijekom rasta nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781.

Tablica 1. Sastav soli, faktora rasta te izvora dušika u kemijski definiranim hranjivim podlogama za uzgoj nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Tvar	Koncentracija/(gL ⁻¹)
ekstrakt kvasca (Merck KGaA)	1.5
C ₅ H ₈ NO ₄ Na (Sigma, ≥99%)	4
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Zorka, ≥99%)	0.8
KH ₂ PO ₄ (Kemika, ≥99%)	0.5
K ₂ HPO ₄ (Kemika, ≥98%)	0.5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.2
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0.053
MnSO ₄ · 7 H ₂ O	1.2 · 10 ⁻³
tiamin klorid	10 ⁻³
nikotinska kiselina	10 ⁻³
cijanokobalamin	10 ⁻⁶
biotin	10 ⁻⁵
pH 6.8 - 7	

Tablica 2. Izvori ugljika u kemijski definiranim hranjivim podlogama za uzgoj nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Izvor ugljika	Koncentracija/(g ^L ⁻¹)
malat (Acros Organics, ≥99%)	4
glukoza (Sigma, ≥99%)	5; 10; 15
ksiloza (Sigma, ≥99%)	5; 10; 15
glukoza i ksiloza	3; 3
glukoza i ksiloza	5; 5
glukoza i ksiloza	7.5; 7.5

Tablica 3. Sastav hidrolizata kukuruznih oklasaka i kukurozovine korištenim tijekom za uzgoja nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Hidrolizat	Početna koncentracija/(g ^L ⁻¹)	
	glukoza	ksiloza
kukuruzovina	3,842	9,349
oklasci	2,834	24,930

3.1.2. Radni mikroorganizam

Radni mikroorganizam u ovom radu tijekom istraživanja je bila nesumporna ljubičasta bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva.

3.1.3. Ostale kemikalije

Aceton (Kemika, 99.5%), etanol (GRAM-MOL d.o.o., 96%), natrijev hidroksid (T.T.T. d.o.o., 98%), kalcijev hidroksid (Kemika, 96%), sumporna kiselina (Merck, 96%)

3.1.4. Aparature i uređaji

3.1.4.1. Spektrofotometar

Pomoću spektrofotometra „Cary 100, UV-VIS; Agilent Technologies“ određeno je:

- Promjena optičke gustoće hranjive podloge kao indirektnog pokazatelja rasta stanica bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, na valnoj duljini od 660 nm.
- Snimanje adsorpcijskog spektra biomase tijekom uzgoja u rasponu valnih duljina od 350 do 900 nm.
- Snimanje adsorpcijskog spektra ekstrahiranih pigmenata tijekom uzgoja u rasponu valnih duljina od 350 do 900 nm.

3.1.4.2. Centrifuga

Za izdvajanje bakterijske biomase iz hranjive podloge korištena je centrifuga „Harrier 18/80, Sanyo“ pri broju okretaja od 8000 o min⁻¹, a za pripremu uzoraka za HPLC centrifuga „Beckman, Model J-21B“ pri broju okretaja od 10000 o min⁻¹.

3.1.4.3. Vage

Analitička vaga „Shimadzu“, AX-200 W/O AC ECTA korištena je za određivanje suhe tvari biomase, dok se za sve ostale potrebe vaganja koristila tehnička vaga „Tehtnica“ ET-1211.

3.1.4.4. Sušionik

Za sušenje centrifugiranih uzoraka s bakterijskom biomasom izuzetih tijekom rasta stanica korišten je sušionik „Instrumentaria ST-50“.

3.1.4.5. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC)

Tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti, (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD), određene su koncentracije supstrata. Uređaj se sastoji od crpke (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija 150×7.8 mm s odgovarajućim pretkOLONAMA, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (**OpenLAB CDS**). Kao mobilna faza korištena je 0.0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 µL, a protok mobilne faze 1 mLmin⁻¹.



Slika 4. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC)

3.1.4.6. Ostala oprema

Od ostalog laboratorijskog pribora korišteno je stakleno i plastično posuđe, plamenici, vorteks miješalica, autoklav i zamrzivač za čuvanje uzoraka na temperaturi -20 °C.

3.2. Metode

3.2.1 Određivanje kinetike rasta bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

3.2.1.1 Priprema podloge

U ovom radu se za uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 koristilo 4 vrste hranjive podloge. Kemijski definirana podloga sa malatom kao izvorom ugljika za uzgoj inokuluma, kemijski definirana kontrolna podloga bez izvora ugljika, kemijski definirane podloge sa izvorima ugljika (glukoza ili/i ksiloza), te kemijski kompleksne podloge tj., hidrolizati kukuruznih oklasaka i kukuruzovine dobiveni pretretmanom slabom kiselinom (0.5 % H₂SO₄) u visokotlačnom reaktoru pri 180 °C te vremenu zadržavanja 10 minuta.

Kemijski definirana hranjiva podloga za uzgoj inokuluma bila je pripremljena tako da se u određen volumen demineralizirane vode doda izračunata i odvagana masa potrebnih tvari iz Tablice 1. te izvor ugljika malat u koncentraciji od 4 g/L. Pripremljena podloga se neutralizirala dodatkom natrijevog hidroksida. U tikvicu sa brušenim čepom prebacilo se po 150 mL hranjive podloge, zatim se podloga sterilizira 20 minuta / 121 °C. Nakon sterilizacije u ohlađenu podlogu dodaje sterilno preko filtera po 1 mL otopine vitamina i 1 mL otopine elemenata u tragovima.

Kontrolna podloga kao kemijski definirana podloga nije sadržavala izvor ugljika, nego samo potreban izvor dušika te soli za rast koji su se dodali u određen volumen demineralizirane vode prema izračunatoj i odvaganoj masi potrebnih tvari (Tablica 1). Pripremljena podloga se neutralizirala dodatkom natrijevog hidroksida. U tikvicu sa brušenim čepom prebacilo se po 150 mL hranjive podloge, zatim se podloga sterilizira 20 minuta / 121 °C. Nakon sterilizacije u ohlađenu podlogu dodaje sterilno preko filtera po 1 mL otopine vitamina i 1 mL otopine elemenata u tragovima.

Kemijski definirane podloge (glukoza i ksiloza kao izvor ugljikohidrata) pripremljene su tako da se u određen volumen demineralizirane vode doda izračunata i odvagana masa potrebnih tvari iz Tablice 1. te izvor ugljika (glukoza; ksiloza ili glukoza + ksiloza ovisno o eksperimentu). U prvom setu eksperimenata dodana je glukoza tako da je početna koncentracija bila 5, 10 ili 15 g/L. U drugom setu eksperimenata dodana je ksiloza kao izvor ugljika, tako da je početna koncentracija bila 5, 10 ili 15 g/L. U trećem setu eksperimenata,

gdje se istraživao utjecaj dva izvora ugljika (glukoze i ksiloze) na rast ljubičaste nesumporne bakterije, glukoza i ksiloza je dodana u hranjivu podlogu tako da je početna koncentracija bila 3 g/L glukoze i 3 g/L ksiloze, odnosno 5 g/L glukoze i 5 g/L ksiloze te 7.5 g/L glukoze i 7.5 g/L ksiloze. Pripremljene podloge su se neutralizirale dodatkom natrijevog hidroksida. U tikvice sa brušenim čepom prebacilo se po 150 mL hranjive podloge, zatim se podloga sterilizira 20 minuta / 121 °C. Nakon sterilizacije u ohlađenu podlogu dodaje sterilno preko filtera po 1 mL otopine vitamina i 1 mL otopine elemenata u tragovima.

Kompleksne podloge, hidrolizati kukuruznih oklasaka i kukuruzovine dobiveni su pretretmanom slabom kiselinom (0.5 % H₂SO₄) u visokotlačnom reaktoru pri 180 °C te vremenu zadržavanja 10 minuta u sklopu istraživanja na projektu "Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina" (HRZZ-9717). Sastav hidrolizata lignoceluloznih sirovina je prethodno određen pomoću HPLC te je prikazan u Tablici 3. Dobiveni hidrolizati se neutraliziraju dodatkom krutog kalcijevog hidroksida pri čemu dolazi do nastajanja taloga kalcijevog sulfata. Talog se izdvojio centrifugiranjem od supernatanta. Supernatant se dekantira. Polovica dobivenog supernatanta se tretirala sa aktivnim ugljenom radi dodatnog odbojenja te adsorpcije inhibitorских spojeva koji bi mogli utjecati na rast testiranog soja ljubičaste nesumporne bakterije. Tretman aktivnim ugljenom se provodi tako da se u određen volumen doda 18 g/L aktivnog ugljena i miješa sat vremena. Nakon toga se otopina filtrira pomoću vakuum filtracije te se filtrat koristi kao hranjiva podloga. 150 mL podloge tretirane i netretirane aktivnim ugljenom se tada raspoređuje u tikvice sa brušenim čepom, sterilizira 20 minuta / 121 °C, a nakon sterilizacije u ohlađenu podlogu dodaje se sterilno preko filtera po 1 mL otopine vitamina i 1 mL otopine elemenata u tragovima.

3.2.1.2 Nadzor procesa uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Svaki dan, uključujući 0. dan uzimani su uzorci po 5 mL iz svake tikvice. Iz svakog se uzorka na spektrofotometru očitavala adsorbancija na 660 nm za 0. razrjeđenje. Uzorak se tada centrifugira na 8000 min⁻¹ 10 minuta. Supernatant je odvajan i korišten za analizu pomoću tekućinske kromatografije ultra djelotvornosti (u daljnjem tekstu UPLC), dok se izdvojena biomasa stavlja na sušenje te je nakon toga gravimetrijski određuje masa nastale bakterijske biomase. Također se iz izdvojene mokre biomase određivala količina nastalog bakterioklorofila *a*, pomoću ekstrakcije sa otapalom (acetona: etanol; 7:2 vol/vol) u mraku i temperaturi od 0°C te određivanjem koncentracije pomoću analize na spektrofotometru.

3.3. Određivanje optičke gustoće

Absorbancija uzoraka očitavana je na spektrofotometru, model „Cary 13E, Varian“ na valnoj duljini od 660 nm. Također se napravio tzv „scan“ uzorka u području od 350 do 900 nm, radi određivanja adsorpcijskih minimuma i maksimuma za biomasu ljubičastih nesumpornih bakterija.

3.4. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase bakterija

U osušene i izvagane kivete otpipetirano je 5 mL uzorka uzetog nakon svakog dana uzgoja. Uzorak je centrifugiran 10 minuta na 8000 min^{-1} . Supernatant je primijenjen za određivanje koncentracije izvora ugljika (glukoze i ksiloze). Kivete s talogom bakterijske biomase sušene su na $75 \text{ }^\circ\text{C}$ do konstantne mase. Ohlađene kivete vagane su na analitičkoj vagi, a dobivene mase biomase korištene su za određivanje njene koncentracije ($X \text{ [gL}^{-1}\text{]}$) prema slijedećoj ovisnosti;

$$X = \frac{m_{ok} - m_{pk}}{V_{uz}} \text{ [gL}^{-1}\text{]}$$

m_{ok} - masa osušene kivete s biomasom,

m_{pk} - masa prazne suhe kivete,

V_{uz} - volumen uzorka

3.5. Priprema uzoraka za UPLC -analizu

Odmjeri se $750 \mu\text{L}$ supernatanta uzoraka i doda $750 \mu\text{L}$ pripremljene 10%-tne otopine ZnSO_4 (čija je svrha vezati proteine i nečistoće nastale tijekom procesa). Sadržaj se dobro homogenizira i ostavi 20 minuta u mirovanju. Nakon toga se uzorci centrifugiraju na $10000 \text{ min}^{-1}/15 \text{ min}$. Volumen od 1.5 ml nastalog supernatanta se filtrira kroz mikrobiološki filter ($0.2 \mu\text{m}$, Sartorius) u staklenu vialu i tako pripremljen uzorak se koristi za UPLC-analizu.

3.6. Ekstrakcija ukupnih pigmenata i određivanje bakterioklorofila *a*

Sterilno se uzme uzorak od 10 mL . Uzorak se centrifugira 15 min pri 8000 min^{-1} , supernatant se odvoji za HPLC analizu, a u istaloženu bakterijsku biomasu se doda smjesa acetona i etanola u omjeru 7:2 (vol/vol) za ekstrakciju ukupnih pigmenata. Zatim se doda 4 g staklenih kuglica te se uzorak podvrgne intezivnom miješanju 2 min nakon čega se uzorak hladi u ledu 2 min . Ovaj postupak intezivnog miješanja te hlađenja se ponavlja tri puta. Zbog osjetljivosti ekstrahiranih pigmenata te bakterioklorofila, postupak ekstrakcije se provodi u mraku kako ne bi došlo do degradacije pigmenata. Nakon toga uzorak se centrifugira 10 min pri 8000 min^{-1} , oko 4 mL supernatanta se stavi u kvarcnu kivetu te se skenira u području od 350 do

900 nm za određivanje maksimuma i minimuma apsorbancije ekstrahiranih pigmenata. Koncentracija bakterioklorofila *a* se računala po sljedećoj formuli = **0.348209 × (A₆₄₈ - A₈₅₀) - 0.16583 × (A₆₆₅ - A₈₅₀) + 12.11114 × (A₇₇₅ - A₈₅₀)** (prema Ritchie, 2018).

3.7. Uzgoj nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Hranjive podloge za uzgoj nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 pripremile su se prema 3.2.1.1 (kontrolna podloga bez izvora ugljika, devet podloga s ugljikohidratima te četiri podloge s hidrolizatima dobivenim predtretmanom kukuruznih oklasaka i kukuruzovine slabom kiselinom). Podloge su nacijepnjene sa 10 mL inokuluma bakterija prethodno poraslih na podlozi opisanoj u 3.2.1.1. Uzgoj je bio vođen pri temperaturi od 28 °C, mikroaerofilnim uvjetima te stalnom osvjetljenju bez miješanja.

Svakog dana sterilno su uzimani uzorci određenog volumena te praćena je potrošnja izvora ugljika UPLC analizom supernatanta te rast bakterijske biomase mjerenjem apsorbancije.

Koncentracija bakterioklorofila *a*, određivala se svakih 48 sati prema postupku opisanom u 3.2.1.2.

3.8. Određivanje parametara uspješnosti tijekom uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Za izračunavanje pokazatelja uspješnosti biotehnološkog procesa korištene su sljedeće jednadžbe:

1. Potrošnja supstrata (ΔS)

$$\Delta S = S_0 - S \quad [\text{gL}^{-1}]$$

S_0 = koncentracija supstrata na početku uzgoja

S = koncentracija supstrata na kraju uzgoja

2. Prinos mase biomase (Y_x)

$$Y_p = X - X_0 \quad [\text{gL}^{-1}]$$

X_0 - koncentracija biomase na početku uzgoja

X - koncentracija biomase na kraju uzgoja

3. Koeficijent konverzije supstrata u biomasu ($Y_{x/s}$)

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad [\text{gg}^{-1}]$$

4. Produktivnost proizvodnje biomase (P_r)

$$P_r = \frac{Y_p}{t_u} \quad [\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}]$$

t_u - ukupno vrijeme trajanja uzgoja

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom je radu proveden uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlogama s različitim izvorima ugljika. Cilj je bio odrediti kinetiku rasta ljubičaste nesumporne bakterije na izvorima ugljika koji potječu iz tretirane lignocelulozne sirovine (glukoza ili/i ksiloza), te testirati potencijal za proizvodnju pigmenata tijekom rasta istraživanog mikroorganizma. Prvi dio istraživanja bio je usmjeren prema istraživanju potencijala glukoze ili/i ksiloze kao izvora ugljika u kemijski definiranim podlogama, za rast tijekom uzgoja istraživane bakterije, dok je drugi dio istraživanja bio usmjeren prema istraživanju mogućnosti rasta bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kompleksnim podlogama dobivenim pretretmanima lignoceluloznih sirovina (hidrolizati kukuruznih oklasaka i kukuruzovine dobiveni tretmanima slabom kiselinom u visokotlačnom reaktoru). Na grafovima je prikazana promjena koncentracija izvora ugljika te biomase tijekom uzgoja i apsorbancija prevrele podloge s valnim duljinama u rasponu od 400 do 900 nm. Nakon rezultata slijedi rasprava i izračun pokazatelja uspješnosti procesa.

U poglavlju 4.1. (Slike 5. i 6. te Tablice 4. i 5.) prikazani su rezultati uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlogama sa glukozom kao izvorom ugljika, s različitim početnim koncentracijama glukoze.

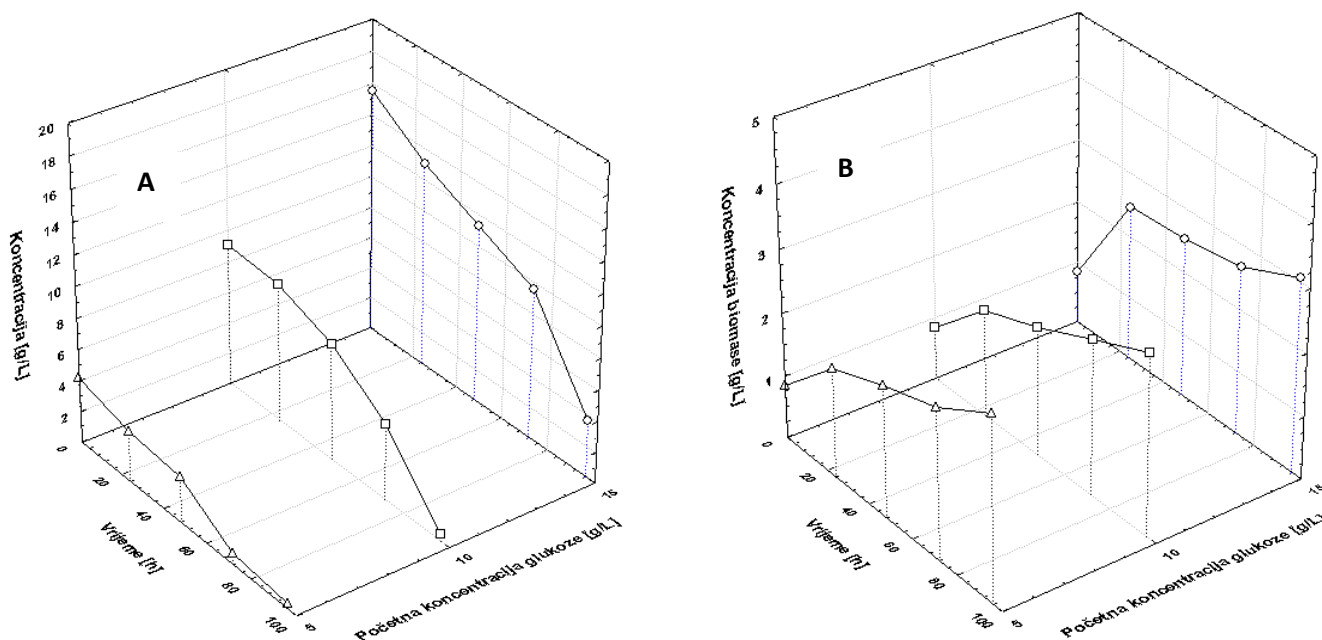
U poglavlju 4.2. (Slike 7. i 8. te Tablice 6. i 7.) prikazani su rezultati uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlogama sa ksilozom kao izvorom ugljika, s različitim početnim koncentracijama ksiloze.

U poglavlju 4.3. (Slike 9 i 10. te Tablice 8. i 9.) prikazani su rezultati uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlogama sa glukozom i ksilozom kao izvorom ugljika, s različitim početnim koncentracijama glukoze i ksiloze.

U poglavlju 4.4. (Slike 11.-14. te Tablice 10. i 11.) prikazani su rezultati uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlogama sa hidrolizatima dobivenim pretretmanom kukuruzovine i oklasaka slabom kiselinom kao izvorom ugljika.

4.1. Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlogama sa glukozom kao izvorom ugljika

U ovom setu eksperimenata istraživao se rast bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlozi s glukozom radi moguće primjene u biotehnologiji – za proizvodnju biokemikalija, biogoriva, biopolimera te biomase bogate fotosintetskim pigmentima te proteinima.



Slika 5. Potrošnja ugljikohidrata (A) i promjena koncentracije bakterijske biomase (B) u podlogama sa različitim početnim koncentracijama glukoze s tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

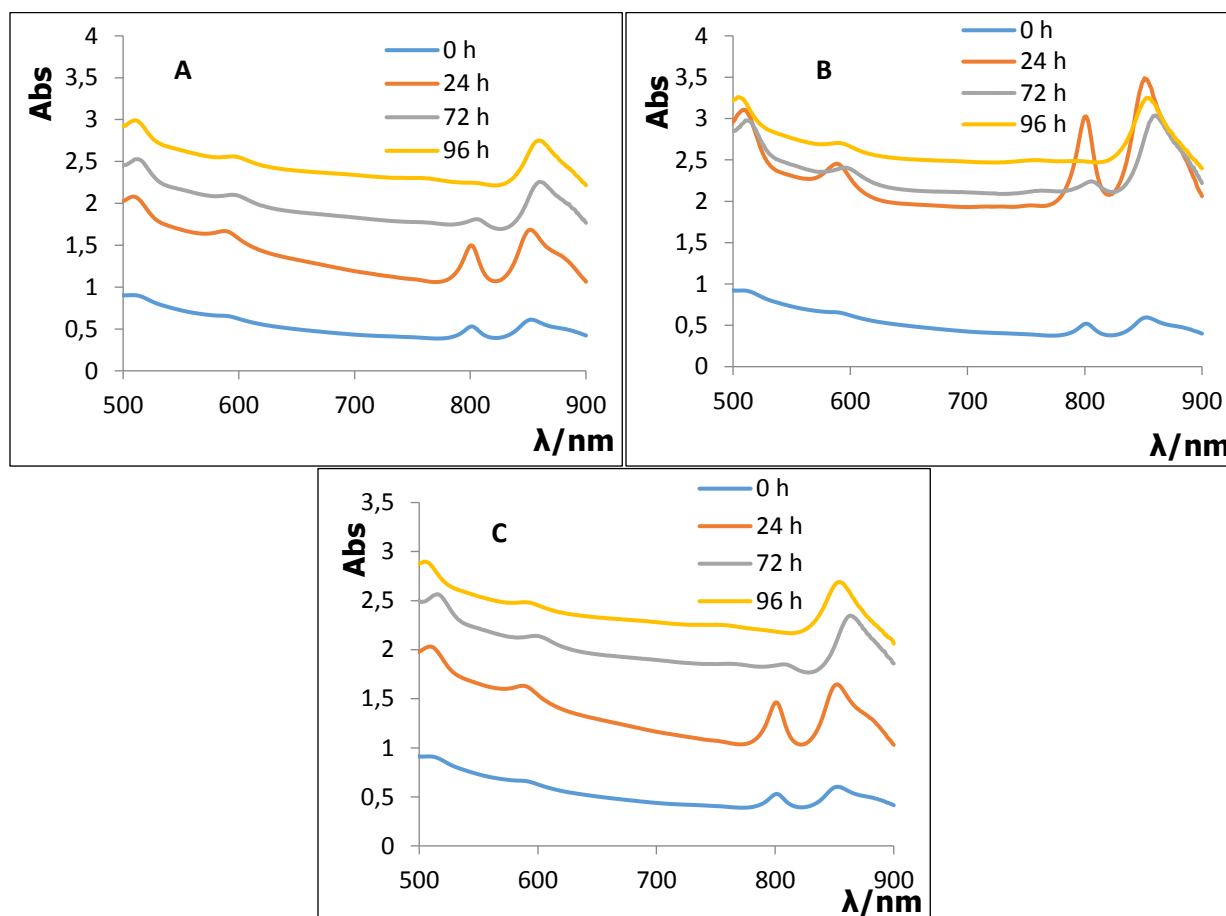
Tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije na podlozi s 5 g/l glukoze utrošilo se od 3,879 g/l glukoze tijekom 96 sati uzgoja. Prinos biomase je iznosio 2,095 g/l, a koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,54 g/g. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila 48. do 72. sata te je iznosila 0,095 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Ukupna produktivnost je iznosila 0,022 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije na podlozi s 10 g/l glukoze došlo je do potrošnje glukoze od 8,65 g/l tijekom 96 sati uzgoja. Prinos biomase je iznosio 2,022 g/l, a koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,23 g/g. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila 72. do 96. sata te je iznosila 0,192 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Ukupna produktivnost je iznosila 0,021 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije na podlozi s 15 g/l glukoze došlo je do potrošnje glukoze od 11,873 g/l tijekom 96 sati uzgoja. Prinos biomase je iznosio 2,236 g/l, a koeficijent konverzije supstrata u

biomasu 0,19 g/g. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila 72. do 96. sata te je iznosila $0,254 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Ukupna produktivnost je iznosila $0,023 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Tablica 4. Parametri uspješnosti procesa za uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranoj podlozi sa glukozom kao izvorom ugljika

Podloga	(ΔS) [g/L]	(Y_x) [g/L]	($Y_{x/s}$) [g/g]	(Pr) [$\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$]
glukoza 5 g/L	3,878918	2,095116	0,54012	0,023292
glukoza 10 g/L	8,650142	2,022333	0,23379	0,021065
glukoza 15 g/L	11,873087	2,236214	0,18834	0,023292

Također je određivana apsorbancija cijele podloge kako bi iz podataka za apsorbanciju pri 660 nm mogla izračunati koncentracija biomase u uzorcima te izračunati koncentraciju bakterioklorofila *a* prema formuli u poglavlju 3.6.



Slika 6. Ovisnost apsorbancije biomase *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 o valnoj duljini u podlozi tijekom uzgoja sa početnom koncentracijom glukoze 5 (A); 10 (B) i 15 (C) g/l

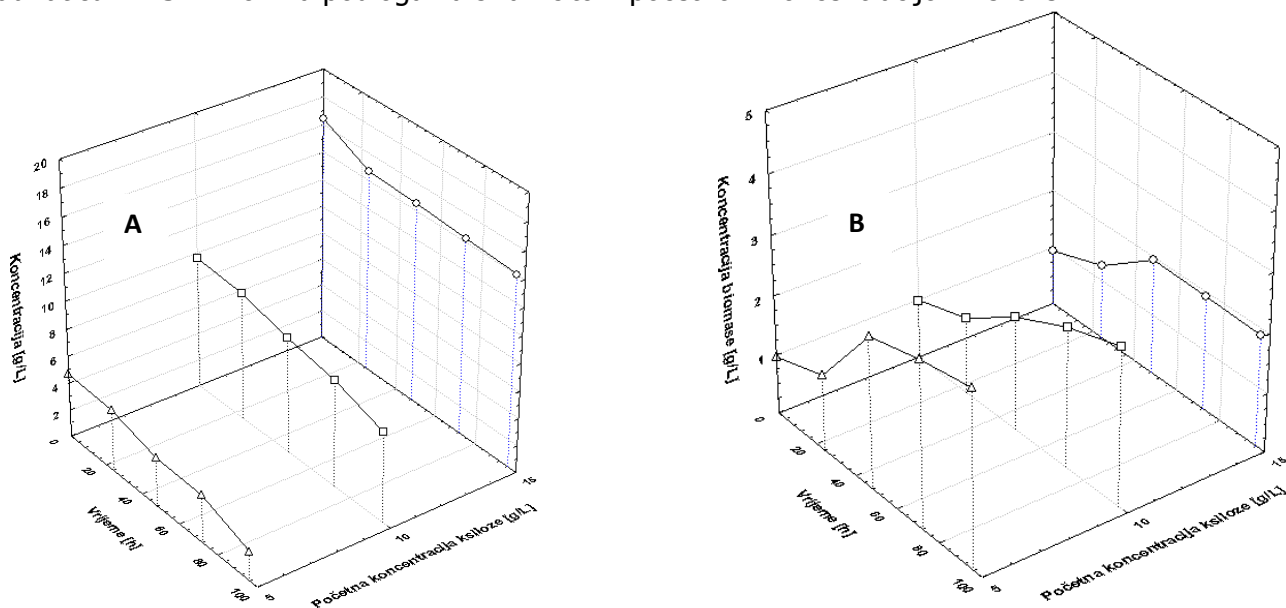
Iz rezultata se vide dva karakteristična pika na 800 i 850 nm koji su apsorpcijski maksimumi bakterioklorofila *a*. Ti pikovi nisu specifični samo za ljubičaste bakterije već i za druge fotosintetske bakterije koje posjeduju bakterioklorofil *a*, primjerice zelene sumporne bakterije i bakterije roda *Heliobacteria*. Pigmenti su određivani kako bi se odredio utjecaj sastava i koncentracije hranjive podloge na njihovu sintezu, a iz njihove količine se indirektno može vidjeti i koncentracija živih ljubičastih bakterija. Tijekom vremena koncentracija pigmenata pada (Tablica 5), što zbog pada koncentracije biomase ili same razgradnje pigmenata tijekom uzgoja. Kod svih uzgoja na glukozi kao izvoru ugljika, najveća količina bakterioklorofila *a* bila je nakon 48 sati uzgoja; pri koncentraciji glukoze od 5 g/l iznosila je 7,56 mg/g biomase, pri koncentraciji od 10 g/l 8,04 mg/g biomase. Pri koncentraciji od 15 g/l glukoze, sintetizirano je 3,32 mg pigmenata po gramu biomase.

Tablica 5. Koncentracija bakterioklorofila *a* tijekom uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranoj podlozi sa glukozom kao izvorom ugljika

Podloga	Pigmenti nakon 48h [mg l⁻¹]	Pigmenti nakon 96h [mg l⁻¹]
glukoza 5 g/L	15,65	6,73
glukoza 10 g/L	16,74	6,54
glukoza 15 g/L	8,52	6,77
kontrola	8,98	7,08

4.2. Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlogama sa ksilozom kao izvorom ugljika

Ksiloza je ugljikohidrat koji se dobiva u višim koncentracijama tijekom pretretmana lignoceluloznih sirovina, pa je bilo zanimljivo istražiti potencijal ksiloze za uzgoj istraživanog mikroorganizma. U ovom setu eksperimenata istraživao se rast bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlogama s različitim početnom koncentracijom ksiloze.



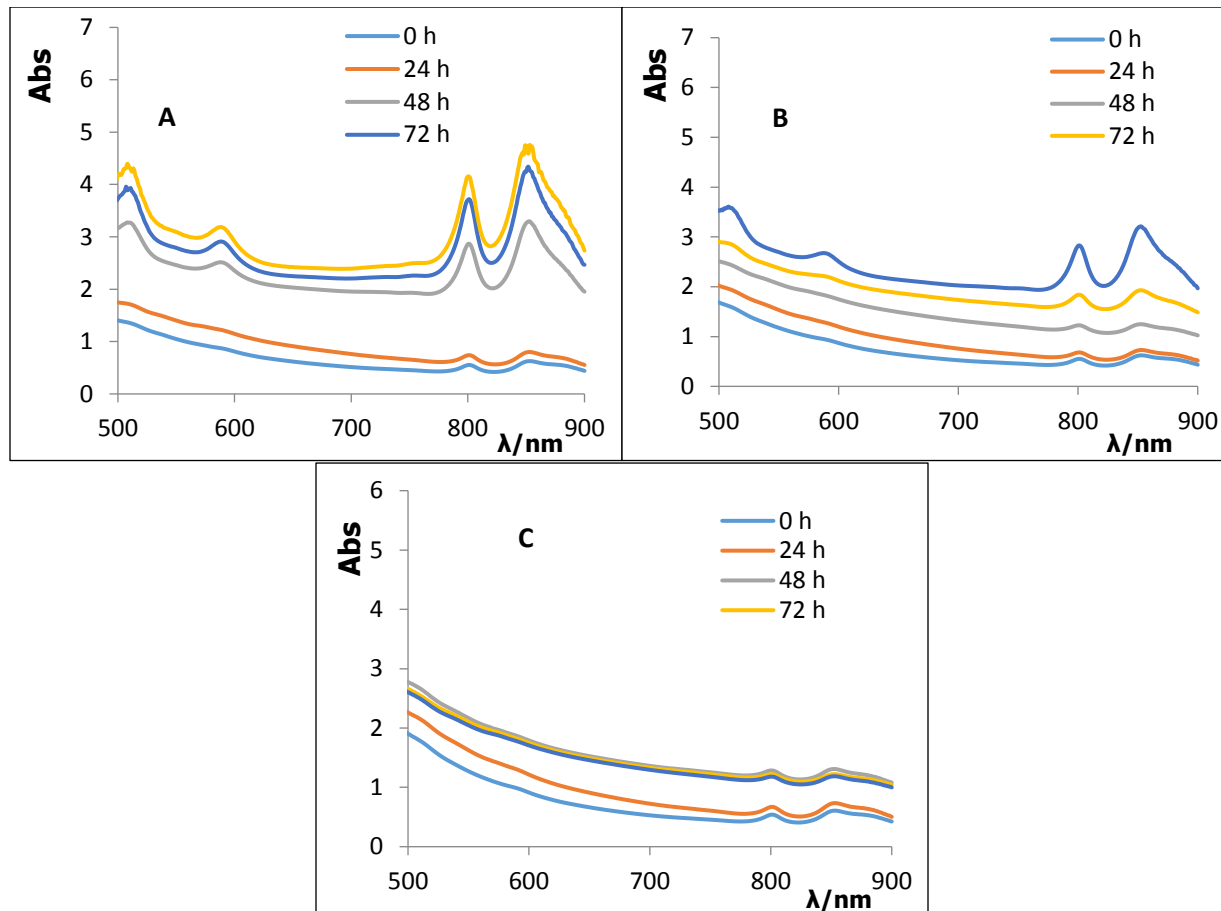
Slika 7. Potrošnja ugljikohidrata (A) i promjena koncentracije bakterijske biomase (B) u podlogama sa različitim početnim koncentracijama ksiloze tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije na podlozi s 5 g/l ksiloze došlo je do potrošnje ksiloze od 2,531 g/l tijekom 96 sati uzgoja. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila između 72. do 96. sata te je iznosila 0,059 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Prinos biomase se izračunao iz očitavanja OD vrijednosti te izračuna prema baždarnom pravcu. Izračunato je da je prinos biomase iznosio 2,008 g/l. Iz podataka može se izračunati koeficijent konverzije supstrata u biomasu, te je iznosio 0,79 g/g. Ova vrijednost se mora uzeti sa zadržskom. Na vrijednost OD kao indikatora povećanja koncentracije biomase utječe i boja same podloge, pa je vjerojatno da je obojenje podloge imalo veći utjecaj na samo očitavanje OD vrijednosti od porasta biomase te nije prikaz realne koncentracije. Tijekom uzgoja na podlozi s početnom koncentracijom ksiloze od 10 g/L tijekom 96 sati uzgoja prinos biomase je iznosio 1,657 g/l, a utrošak ksiloze bio je 2,983 g/L. Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu u tom slučaju je bio 0,55 g/g. Ukupna produktivnost je iznosila 0,017 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije na podlozi s 15 g/l

ksiloze došlo je do potrošnje ksiloze od 2,435 g/l tijekom 96 sati uzgoja. Prinos biomase je iznosio 0,873 g/l, a koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,36 g/g. Maksimalna brzina potrošnje supstrate je bila od 0. do 24. sata te je iznosila 0,087 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Ukupna produktivnost je iznosila 0,0009 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Kao što je vidljivo iz rezultata, porastom koncentracije ksiloze dolazi do smanjenja konverzije supstrata u biomasu, a kao i produktivnosti sinteze biomase.

Tablica 6. Parametri uspješnosti procesa za uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranoj podlozi sa ksilozom kao izvorom ugljika

Podloga	ΔS [g/l]	Y_x [g/l]	$Y_{x/s}$ [g/g]	Pr [$\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$]
ksiloza 5 g/l	2,530925	2,007868	0,79333	0,020917
ksiloza 10 g/l	2,983	1,656976	0,5554	0,017260
ksiloza 15 g/l	2,43532	0,873322	0,35861	0,000906



Slika 8. Ovisnost apsorbancije biomase *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 o valnoj duljini u podlozi tijekom uzgoja sa početnom koncentracijom ksiloze 5 (A); 10 (B) i 15 (C) g/l

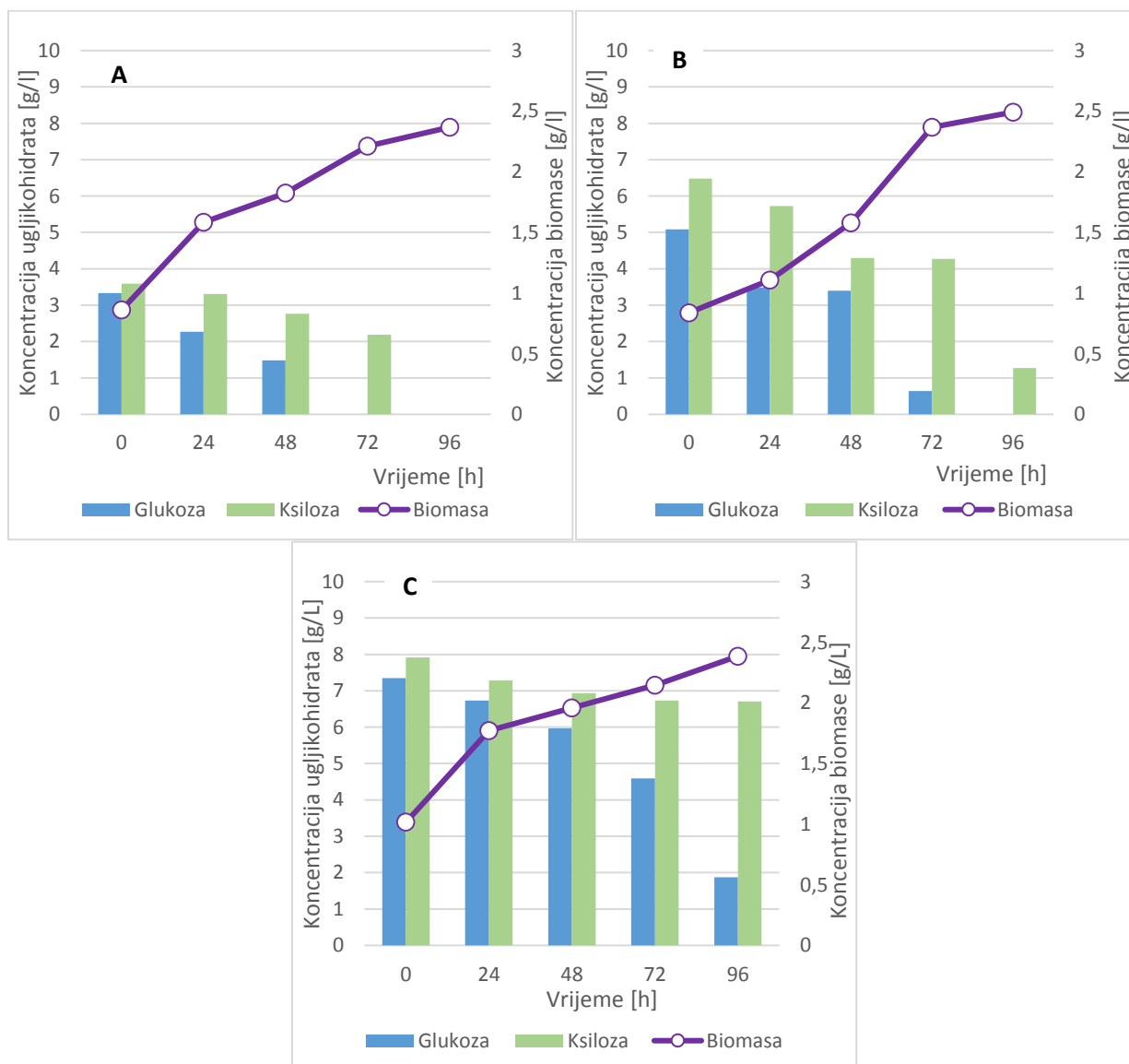
Kao i kod uzgoja na glukozi, na grafovima se vide dva karakteristična pika na 800 i 850 nm koji su apsorpcijski maksimumi bakterioklorofila *a*. Za razliku od uzgoja na glukozi, tijekom vremena se povećava količina pigmenata. Kod svih uzgoja na ksilozi najveća količina bakterioklorofila *a* bila je nakon 96 sati uzgoja; pri koncentraciji ksiloze od 5 g/l iznosila je 5,23 mg/g biomase, pri koncentraciji od 10 g/l 6,54 mg/g biomase te pri koncentraciji od 15 g/l ksiloze 2,29 mg/g biomase.

Tablica 7. Koncentracija bakterioklorofila *a* tijekom uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranoj podlozi sa ksilozom kao izvorom ugljika

Podloga	Pigmenti nakon 48h/ [mg l⁻¹]	Pigmenti nakon 96h/ [mg l⁻¹]
ksiloza 5 g/l	9,58	15,55
ksiloza 10 g/l	4,12	17,33
ksiloza 15 g/l	2,76	4,31

4.3. Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlogama sa glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika

Istraživao se rast bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlozi s glukozom i ksilozom radi primjene u biotehnologiji – za proizvodnju biokemikalija, biogoriva, biopolimera te biomase bogate fotosintetskim pigmentima te proteinima. Podloga je sadržavala i glukozu i ksilozu kako bi se istražilo utječe li prisutnost oba šećera na povećanu brzinu rasta bakterija i sinteze bakterioklorofila *a*.



Slika 9. Potrošnja ugljikohidrata te promjena koncentracije bakterijske biomase tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u podlogama sa početnom koncentracijom glukoze i ksiloze od 3 g/l (A); od 5 g/l (B); od 7.5 g/l (C)

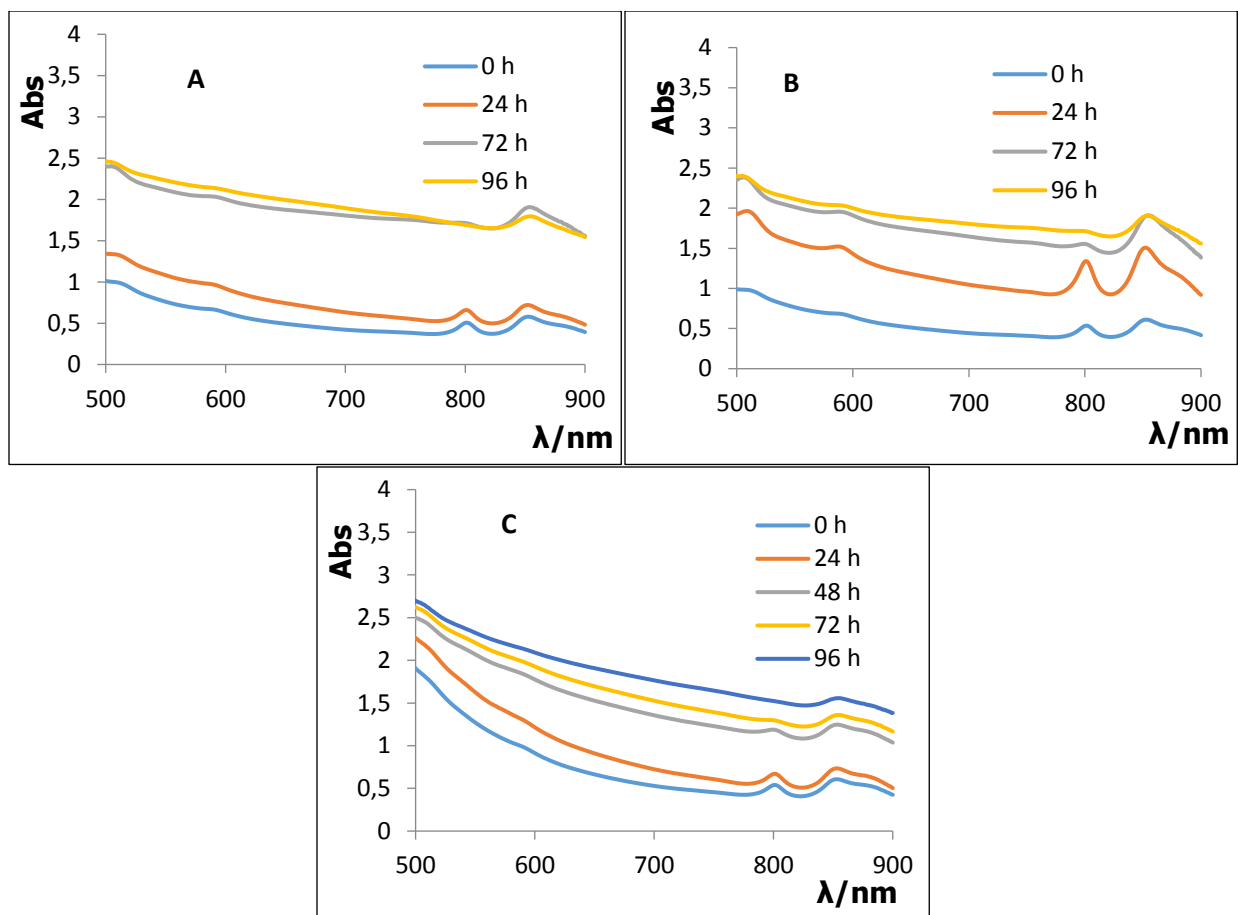
Tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije na podlozi s 3 g/l glukoze i 3 g/l ksiloze došlo je do potrošnje glukoze od 3,331 g/l i ksiloze od 3,593 g/l tijekom 90 sati uzgoja. Prinos biomase je iznosio 1,507 g/l, a koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,22 g/g. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila 48. do 72. sata te je iznosila 0,160 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Ukupna produktivnost je iznosila 0,017 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Na podlozi s 5 g/l glukoze i 5 g/l ksiloze došlo je do potrošnje glukoze od 5,087 g/l i ksiloze od 5,212 g/l tijekom 90 sati uzgoja. Prinos biomase je iznosio 1,654 g/l, a koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,16 g/g. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila 72. do 96. sata te je iznosila 0,157 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Ukupna produktivnost je iznosila 0,018 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Na podlozi s 7.5 g/l glukoze i 7.5 g/l ksiloze došlo je do potrošnje glukoze od 5,474 g/l i ksiloze od 1,206 g/l tijekom 96 sati uzgoja. Prinos biomase je iznosio 1,370 g/l, a koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,21 g/g. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila 72. do 96. sata te je iznosila 0,114 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Ukupna produktivnost je iznosila 0,014 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Tablica 8. Parametri uspješnosti procesa za uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranoj podlozi sa glukozom i ksilozom kao izvorom ugljika

Podloga	(ΔS) [g/l]	(Y_x) [g/l]	($Y_{x/s}$) [g/g]	(Pr) [$\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$]
glukoza + ksiloza 3 g/l	3,331006; 3,59358	1,506919	0,21762	0,016744
glukoza + ksiloza 5 g/l	5,086654; 5,211552	1,654409	0,16065	0,018382
glukoza + ksiloza 7.5 g/l	5,474221; 1,206284	1,369582	0,20501	0,014417

Tablica 9. Koncentracija bakterioklorofila *a* tijekom uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranoj podlozi sa glukozom i ksilozom kao izvorom ugljika

Podloga	Pigmenti nakon 48h [mg l^{-1}]	Pigmenti nakon 96h [mg l^{-1}]
glukoza + ksiloza 3 g/l	24,21	4,26
glukoza + ksiloza 5 g/l	10,14	2,31
glukoza + ksiloza 7.5 g/l	3,25	3,81



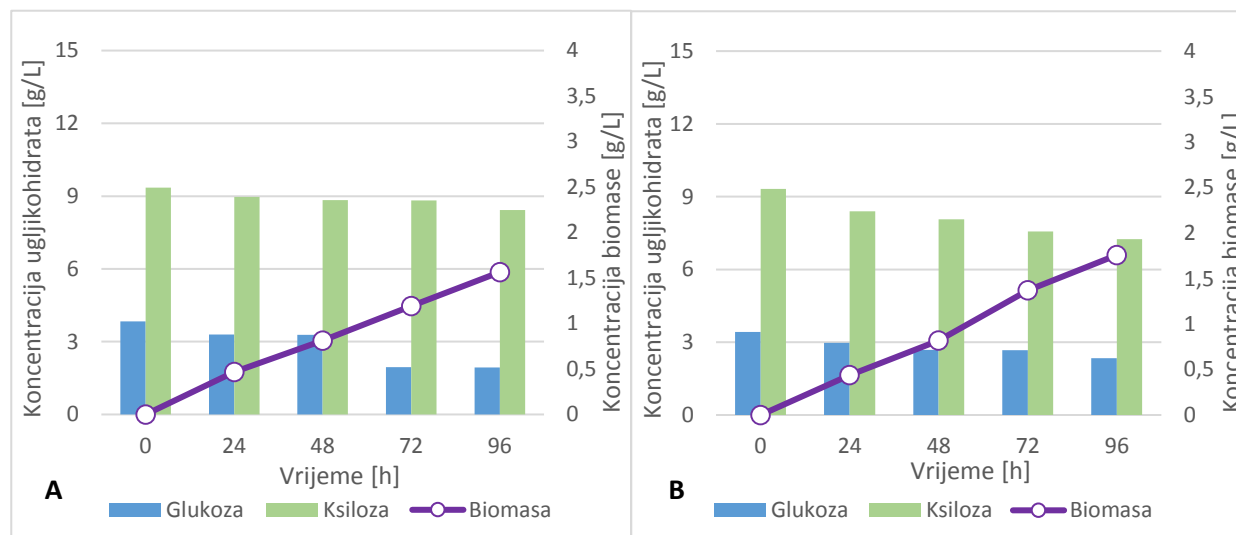
Slike 10. Ovisnost apsorbancije biomase *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 o valnoj duljini u podlozi tijekom uzgoja sa početnom koncentracijom glukoze i ksiloze 3 + 3 g/l (**A**); 5+5 g/l (**B**) i 7.5+7.5 g/l (**C**)

Kao i kod prijašnjih uzgoja, na grafovima se vide dva karakteristična pika na 800 i 850 nm koji su apsorpcijski maksimumi bakterioklorofila *a*, ali nisu toliko izraženi u usporedbi sa uzgojima u podlogama koje sadrže samo jedan izvor ugljika. Tijekom vremena se smanjuje količina pigmenata zbog odumiranja stanica. Kod svih uzgoja na glukozi i ksilozi najveća količina bakterioklorofila *a* bila je nakon 48 sati uzgoja; pri koncentraciji glukoze i ksiloze od 3 g/l iznosila je 13,27 mg/g biomase, pri koncentraciji od 5 g/l 6,45 mg/g biomase te pri koncentraciji od 7,5 g/l glukoze i ksiloze 1,66 mg/g biomase.

4.4. Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na hidrolizatima dobivenim pretretmanom kukuruzovine i oklasaka slabom kiselinom

Istraživao se rast bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlozi s hidrolizatima dobivenim pretretmanom kukuruzovine i oklasaka slabom kiselinom također radi primjene u biotehnologiji – za proizvodnju biokemikalija, biogoriva, biopolimera te biomase bogate fotosintetskim pigmentima te proteinima. Za razliku od prethodnih uzgoja, ovdje je korištena kemijski kompleksna podloga te je takva sirovina mnogo jeftinija od kemijski definiranih podloga. Iz tog razloga je bilo važno istražiti kinetiku rasta *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na ovakvim supstratima jer bi u slučaju dobrog rasta primjena ove bakterije u biotehnologiji značajno smanjila troškove. Očekuje se rast bakterije, no sporiji nego što je to kod kemijski definiranih podloga zbog prisutnosti inhibitorских spojeva.

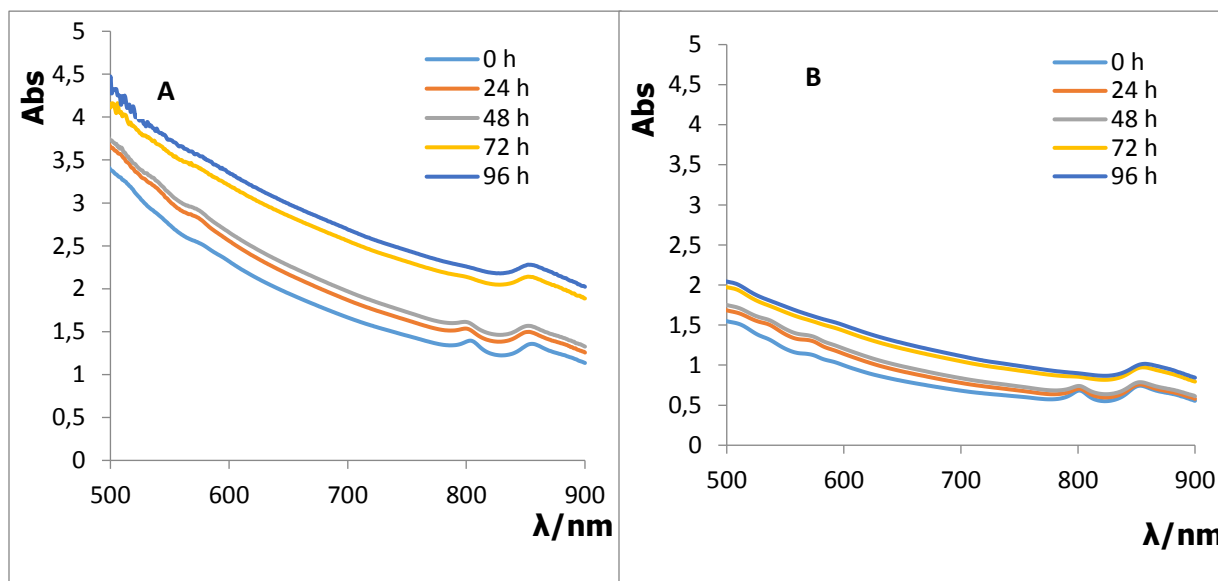
Kod uzgoja na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina je računat prirast biomase kao razlika apsorbancije podloge između 0. i 24. sata, 24. i 48. sata itd. i taj rezultat je prikazan na slikama 11 i 13. Razlog je što je hranjiva podloga i prije i nakon tretmana aktivnim ugljenom bila obojana što utječe na apsorbanciju pa samim time i na izračun koncentracije bakterijske biomase.



Slika 11. Potrošnja ugljikohidrata te promjena koncentracije biomase tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na hidrolizatima dobivenim pretretmanom kukuruzovine.

A ne-tretirani hidrolizati. **B** hidrolizati tretirani aktivnim ugljenom.

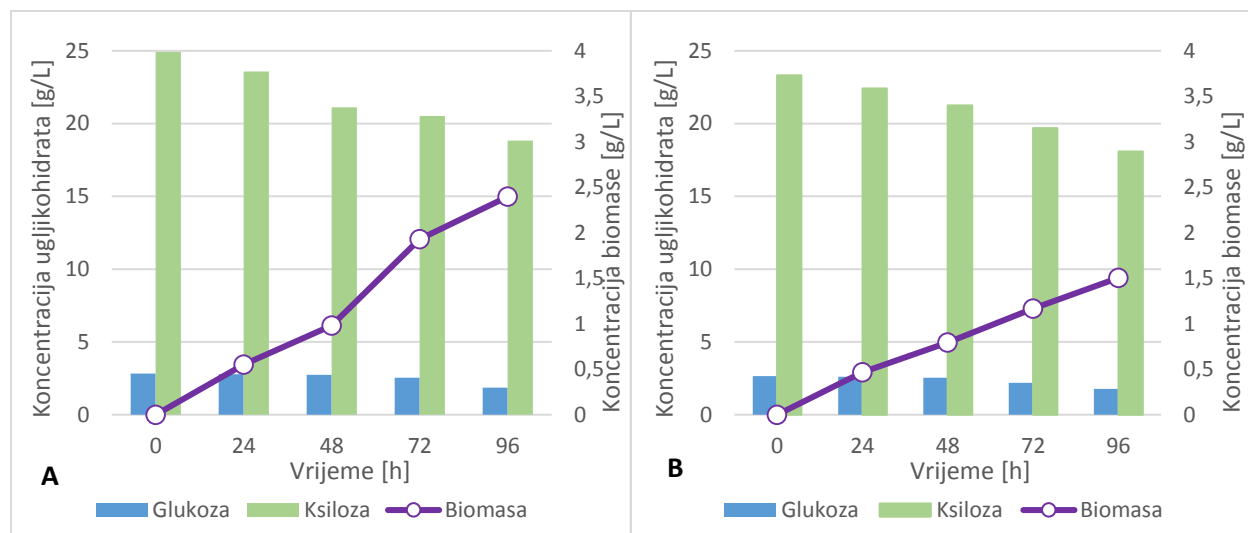
Prije početka uzgoja ustanovljeno je da podloga s hidrolizatima kukuruzovine sadrži 3,842 g/l glukoze i 9,349 g/l ksiloze. Tijekom 96 sati uzgoja je došlo do potrošnje glukoze od 1,9101 g/l te 0,9274 g/l ksiloze. Prinos biomase je iznosio 1,096 g/l, a koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,39 g/g. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila 48. do 72. sata te je iznosila 0,056 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Ukupna produktivnost je iznosila 0,011 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Tijekom 96 sati uzgoja na hidrolizatima kukurozovine tretiranim aktivnim ugljenom došlo je do potrošnje glukoze od 1,076 g/l te 2,077 g/l ksiloze. Prinos biomase je iznosio 1,321 g/l, a koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,42 g/g. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila 0. do 24. sata te je iznosila 0,057 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Ukupna produktivnost je iznosila 0,014 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Količina bakterioklorofila *a* je bila gotovo jednaka nakon 48 i 96 sati uzgoja i iznosila je 0,017 mg.



Slika 12. Ovisnost apsorbancije biomase *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 o valnoj duljini u podlozi tijekom uzgoja na hidrolizatima dobivenim pretretmanom kukuruzovine.

A ne-tretirani hidrolizati. **B** hidrolizati tretirani aktivnim ugljenom.

Kao i kod prijašnjih uzgoja, na grafovima se vide dva karakteristična pika na 800 i 850 nm koji su apsorpcijski maksimumi bakterioklorofila *a*. Tijekom vremena količina pigmenta ostaje gotovo ista. Na hidrolizatima kukuruzovine količina pigmenta iznosila je 8,49 mg/g biomase, na tretiranoj kukuruzovini 8,27 mg/g biomase.

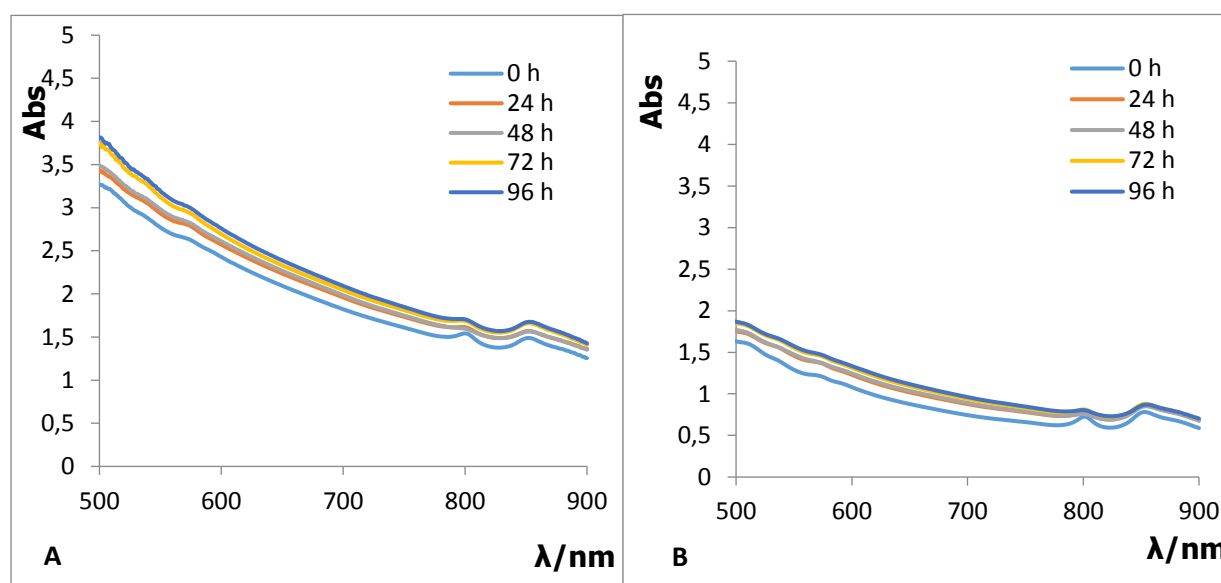


Slika 13. Potrošnja ugljikohidrata te promjena koncentracije biomase tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na hidrolizatima dobivenim pretretmanom kukuruznih oklasaka. **A** ne-tretirani hidrolizati. **B** hidrolizati tretirani aktivnim ugljenom.

Prije početka uzgoja ustanovljeno je da podloga s hidrolizatima oklasaka sadrži 2.834 g/l glukoze i 24,930 g/l ksiloze. Tijekom 96 sati uzgoja je došlo do potrošnje glukoze od 0,977 g/l te 6,104 g/l ksiloze. Prinos biomase je iznosio 1,8446 g/l, a koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,26 g/g. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila 24. do 48. sata te je iznosila 0,104 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Ukupna produktivnost je iznosila 0,019 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Najveća količina bakterioklorofila *a* je bila nakon 96 sati uzgoja i iznosila je 0,016 mg. Prije početka uzgoja ustanovljeno je da podloga s hidrolizatima oklasaka tretiranih aktivnim ugljenom sadrži 2,645 g/l glukoze i 23,318 g/l ksiloze. Tijekom 96 sati uzgoja je došlo do potrošnje glukoze od 0,868 g/l te 5,227 g/l ksiloze. Prinos biomase je iznosio 1,039 g/l, a koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,17 g/g. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila 72. do 96. sata te je iznosila 0,084 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Ukupna produktivnost je iznosila 0,011 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$. Najveća količina bakterioklorofila *a* je bila nakon 96 sati uzgoja i iznosila je 0,028 mg.

Tablica 10. Parametri uspješnosti procesa za uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski kompleksnoj podlozi – hidrolizati lignoceluloznih sirovina

Podloga	(ΔS) [g/L]	(Y_x) [g/L]	($Y_{x/s}$) [g/g]	(Pr) [gL ⁻¹ h ⁻¹]
kukuruzovina	1,910119; 0,927436	1,0969	0,38657	0,011426
tretirana kukuruzovina	1,076426; 2,077228	1,3213	0,41897	0,013763
oklasak	0,97749; 6,10352	1,8446	0,26050	0,019215
tretirani oklasak	0,867565; 5,2268	1,0387	0,17044	0,010820



Slika 14. Ovisnost apsorbancije biomase *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 o valnoj duljini u podlozi tijekom uzgoja na hidrolizatima dobivenim pretretmanom kukuruznih oklasaka.

A ne-tretirani hidrolizati. **B** hidrolizati tretirani aktivnim ugljenom.

Kao i kod prijašnjih uzgoja, na grafovima se vide dva karakteristična pika na 800 i 850 nm koji su apsorpcijski maksimumi bakterioklorofila *a*. Tijekom vremena količina pigmenata se gotovo i ne mijenja. Na hidrolizatima oklasaka količina pigmenata je iznosila 6,10 mg/g biomase te na tretiranim oklascima 8,78 mg/g biomase.

Tablica 11. Koncentracija bakterioklorofila *a* tijekom uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina kao kemijski kompleksnoj podlozi

Podloga	Pigmenti nakon 48h/ [mg^l⁻¹]	Pigmenti nakon 96h/ [mg^l⁻¹]
kukuruzovina	6,91	6,70
tretirana kukuruzovina	6,77	6,70
oklasak	5,97	6,45
tretirani oklasak	6,98	7,13

Najveći prinos biomase se ostvaruje na podlogama s 5 g/l glukoze, 5 g/l ksiloze. Najmanji prinos biomase se ostvaruje na hidrolizatima oklasaka vjerojatno zbog najviše količine tvari koje inhibiraju rast bakterija. Najviši koeficijent konverzije supstrata u proizvod je kod uzgoja na podlozi s 5 g/l ksiloze, a najniži kod hidrolizata oklasaka tretiranih aktivnim ugljenom. Tretman hidrolizata aktivnim ugljenom utječe na proces, time da smanjuje početno obojenje podloge koje utječe na osvjetljenje tijekom uzgoja. Također tretmanom se smanjuje količina inhibitornih tvari. Parametri uspješnosti kod tretiranih hidrolizata i enetretiranih su slični, što znači da postoji mogućnost uzgoja nesumpornih ljubičastih bakterija u procesima sa obrađenim i pretretiranim lignoceluloznim sirovinama. Najveća produktivnost se ostvaruje na podlogama s glukozom te je najveća maksimalna brzina potrošnje supstrata bila uočena na podlozi s 15 g/l glukoze. Kod rasta na hidrolizatima oklasaka uočen je najveći prirast biomase unatoč najvišoj koncentraciji ksiloze koja je vjerojatno djelovala inhibitorno u kemijski definiranim podlogama.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobivenih tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na različitim izvorima ugljika izvedeno je više zaključaka:

1. Tijekom uzgoja na podlozi s glukozom kod svih koncentracija glukoze su dobivene slične vrijednosti prinosa biomase i produktivnosti. Razlika je vidljiva jedino u koeficijentu pretvorbe supstrata u biomasu, pri čemu je koeficijent najveći kod koncentracije glukoze od 5 g/l (0,54 g/g), dok je pri višim koncentracijama koeficijent značajno niži (0,23 g/g i 0,19 g/g).
2. Tijekom uzgoja na podlozi s ksilozom kod svih koncentracija ksiloze su dobivene slične vrijednosti potrošnje supstrata. Značajno se razlikuju vrijednosti prinosa biomase, koeficijenta konverzije supstrata u biomasu i produktivnost kod različitih koncentracija ksiloze. Pri koncentraciji ksiloze od 5 g/l postignute su najviše vrijednosti svih parametara uzgoja. Pri višim koncentracijama ksiloze vidljiva je inhibicija supstratom koja značajno utječe na vrijednosti prinosa biomase, koeficijenta konverzije supstrata u biomasu i produktivnost (vrijednosti niže i više od 50% od vrijednosti pri koncentraciji ksiloze od 5 g/l).
3. Prilikom uzgoja na podlozi s glukozom i ksilozom kod svih koncentracija supstrata su dobivene slične vrijednosti prinosa biomase, koeficijenta konverzije supstrata u biomasu i produktivnosti. Najefikasnijim se pokazao uzgoj pri koncentraciji glukoze i ksiloze od 5 g/l (prinos biomase 1,65 g/l i produktivnost od 0,018 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$), iako je koeficijent konverzije supstrata u biomasu oko 30% niži nego kod ostalih uzgoja. Pri koncentracijama glukoze i ksiloze od 7,5 g/l dolazi do slabije potrošnje ksiloze u prisutnosti visoke koncentracije glukoze.
4. Tijekom uzgoja na hidrolizatima kukuruzovine dolazi do promjene odnosa potrošenog supstrata prije i nakon tretmana aktivnim ugljenom (prije tretmana se dominantno trošila glukoza, a nakon tretmana ksiloza). Ostali parametri se ne razlikuju značajno. Kod uzgoja na hidrolizatima oklasaka, mnogo efikasniji se pokazao uzgoj bez tretmana aktivnim ugljenom te su tu postignute najviše vrijednosti procesnih parametara, unatoč visokoj koncentraciji ksiloze.
5. Koncentracija bakterioklorofila *a* je najviša nakon 48 sati uzgoja, osim kod uzgoja na podlozi s ksilozom gdje je najviša koncentracija postignuta nakon 96 sati. Najpogodnija podloga za sintezu pigmenata je podloga sa glukozom i ksilozom od 3 g/l, dok je kod ostalih uzgoja primijećena inhibicija sinteze povećanjem koncentracije supstrata. Na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina, koncentracija pigmenata se s vremenom ne mijenja.

6. POPIS LITERATURE

- Banerjee S., Azad S.A., Vikineswary S., Selvaraj O.S., Mukherjee T.K. (2000) Phototrophic bacteria as fish feed supplement. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **13**: str. 991-994
- Bianchi L., De Philippis R., Melis A., Melnicki M.R. (2008) Hydrogen production during stationary phase in purple photosynthetic bacteria *Int J Hydrogen Energy* **33**: str. 6525-6534
- Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. (1995) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, 1.izd., Imhoff J. F., Kluwer Academic Publishers, str. 5-6, 8-11
- Bulen W.A., Bums R.C., Le Comte J.R. (1965) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 53: str. 532
- Bullard G.L., Lathrop J.R., McGarvey J.A., Miller W.G., Silva C.J. (2009) Induction of purple sulfur bacterial growth in dairy wastewater lagoons by circulation *Letters in Applied Microbiology* **49**: str. 427-433
- Chen, D., Y. Han, and Z. Gu (2006) Application of statistical methodology of the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Proc. Biochem.* **41**: str. 1773–1778.
- D'addario E., Fascetti E., Robertiello A., Todin O. (1998) Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes *Int J Hydrogen Energy* **23**: str. 753-760
- Debabrata D., Veziroğlu T.N. (2001) Hydrogen production by biological processes: a survey of literature *Int J Hydrogen Energy* **26**: str. 13-28
- Dvorin SA. (1992) A factory of commercial cultivation of micro-algae. *Proceedings of the 1st European Workshop on Micro-algal Biotechnology: Algology*
- Eroglu I., Gündüz U., Türker L., Uyar B., Yücel M. 2007 Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors *Int J Hydrogen Energy* **32**: str. 4670-4677
- Fascetti E., Todini O.(1995) *Rhodobacter sphaeroides* RV cultivation and hydrogen production in a one- and two-stage chemostat. *Appl Microbiol Biotechnol* **44**: str. 300-304
- Getha K., Chong V.C., Vikineswary S. (1998) Potential use of the phototrophic bacteria, *Rhodospirillum rubrum* as an aquaculture feed. *Asian Fish. Sci.* **10**: str. 223-232

- Goodwin, T. W. (1980) *The Biochemistry of Carotenoids*. Chapman and Hall, London, UK.
- Gu Z., D. Chen, Y. Han, Z. Chen, and F. Gu (2008) Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. *LWT* **41**: str. 1082–1088.
- Hansen T. A. i Van Gemerden H. (1972) Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria *Arch Mikrobiol* **86**: str. 49-56
- Heiko H., Walter G., Hanke T. (1993) Photoinduced Damage in Leaf Segments of Wheat (*Triticumaestivum* L.) and Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Treated with 5-Aminolevulinic Acid I. Effect on Structural Components of the Photosynthetic Apparatus. *Journal of Plant Physiology*, **142 (2)**: str. 230-236.
- Higuchi-Takeuchi M., Morisaki K., Toyooka K., Numata K. (2016) Synthesis of High-Molecular-Weight Polyhydroxyalkanoates by Marine Photosynthetic Purple Bacteria
- Imhoff J. F., Trüper H. G. (1989) The purple non sulfur bacteria *Manual of Systematic Bacteriology*, **3**: str. 1658-1661
- Jung D.O., Madigan M.T. (2008) *The Purple Phototrophic Bacteria*, 1. izdanje, Springer, str. 4
- Kang, Z., Zhang J., Zhou J., Qi Q., Du G., Chen J. (2012) *Recent advances in microbial production of δ -aminolevulinic acid and vitamin B₁₂*. *Biotechnology Advances*, **30**: str. 1533–1542.
- Kim B.W., Chang K.P., Chang H.N. (1997) Effect of light source on the microbiological desulfurization in a photobioreactor. *Bioprocess Eng* **17**: str. 343-348
- Kim J.S., Ito K., Takahashi H. (1980) The relationship between nitrogenase activity and hydrogen evolution in *Rhodopseudomonas palustris*. *Agric Biol Chem* **44**: str. 827-833
- Kobayashi M., Tchan Y.T. (1973) Treatment of industrial waste solutions and production of useful by-products using a photosynthetic bacterial method. *Water Res.* **7**: str. 1219-1224
- Kuo, F. H., Y. H. Chien, and C. J. Chen (2012) Effects of light sources on growth and carotenoid content of photosynthetic bacteria *Rhodopseudomonas palustris*. *Bioresour. Technol.* **113**: str. 315–318.
- Lee Y.K., Low C.S. (1991) Effect of photobioreactor inclination on the biomass of an outdoor algal culture. *Biotechnol Bioeng* **38**: str. 995-1000

- Liu S., Zhang, G., Li, X., Zhang, J. (2014). Microbial production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: str. 7349–7357.
- Liu S.; Zhang G.; Li, X.; Zhang J. (2015) Optimization of Influencing Factors on Biomass Accumulation and 5-Aminolevulinic Acid (ALA) Yield in *Rhodobacter sphaeroides* Wastewater Treatment, *Journal of Microbiology and Biotechnology* **25 (11)**: str. 1920–1927.
- Meng Q, Zhang Y, Ju X, Ma C, Ma H, Chen J, Zheng P, Sun J, Zhu J, Ma Y, Zhao X, Chen T. (2016) Production of 5-aminolevulinic acid by cell free multi-enzyme catalysis. *Journal of Biotechnology* **20**: str. 2268-13.
- Merugu R., Prashanthi Y., Sarojini T., Badgu N. (2014) Bioremediation of waste waters by the anoxygenic photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* SMR 009. *International Journal of Research in Environmental Science and Technology* **4**: str. 16-19
- Miyamoto K., Wable O., Benemann J.R. (1989) Vertical tubular photobioreactor: design and operation. *Biotechnol Let* **10**: str. 703-710
- Nagadomi H., Takahashi K., Sasaki K., Yang H.C. (2000) Simultaneous removal of chemical oxygen demand and aerobic treatment of sea water using an immobilised photosynthetic bacterium of porous ceramic plates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**: str. 57-62
- Nakada E., Asada Y., Arai T., Miyake J. (1995) Light penetration into cell suspensions of photosynthetic bacteria and relation to hydrogen production. *J Ferment Bioeng* **80**: str. 53-59
- Nunkaew T., Kantachote D., Kanzaki H., Nitoda T., Ritchie RJ. (2014) Effects of 5ALA containing supernatants from selected *Rhodospseudomonas palustris* strains on rice growth under NaCl stress, with mediating effects on chlorophyll, photosynthetic electron transport and antioxidative enzymes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17 (1).
- Pfennig N (1967) Photosynthetic bacteria. *Ann Rev Microbiol* **21**: str. 285–324
- Pfennig N (1978a) General physiology and ecology of photo-synthetic bacteria *Clayton RK and Sistrom WR (eds) The Photosynthetic Bacteria*, str. 3–18. Plenum Press, New York
- Pfennig N (1989) Ecology of phototrophic purple and green sulfur bacteria *Schlegel HG and Bowien B (eds) Autotrophic Bacteria*, str. 97–116
- Pierson B.K., Olson J.M. (1987) Photosynthesis, 1.izd., Elsevier, str. 21

- Pulz O., Kretschmer P. (1993) Perspectives of phototrophic micro-organisms in environment protection and ecology. *Acta Biotechnol* **6**: str. 517-520
- Pulz O., Scheibenbogen K. (1998) Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **59**: str. 123-152
- Rehm BH, Steinbüchel A. (1999) Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis *International Journal of Biological Macromolecules* **25**: str. 3-19.
- Sasaki K, Tanak T., Nishinori Y., Hayashi M. (1991) Enhanced production of 5ALA by repeated addition of Levulinic acid and supplement of precursors in photoheterotrophic culture of *Rhodobacter spheroides*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **71 (6)**: str. 403-406.
- Sasikala K., Ramana C.H.V., Rao P.R. (1991) Environmental regulation for optimal biomass yields and photo production of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *Int J Hydrogen Energy* **16**: str. 597-601
- Sawayama S., Tsukahara K., Yagishita T. (1999) Wastewater treatment and poly- β -hydroxybutyrate production using lighted upflow anaerobic sludge blanket method. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **5**: str. 683-689
- Semenenko VE, Gabel BV, Tsoglin LN. (1992) Closed type photobioreactor. *Proceedings of the 1st European Workshop on Microalgal Biotechnology: Algology*.
- Tanaka, T., M. Shnimizu i H. Moriwaki (2012) Cancer chemo prevention by carotenoids. *Molecules* **17**: 3202–3242.
- Vasiliadou I.A., Berná A., Manchon C., Melero J.A., Martinez F., Esteve-Nuñez A., Puyol D. (2018) Biological and Bioelectrochemical Systems for Hydrogen Production and Carbon Fixation Using Purple Phototrophic Bacteria. *Frontiers in Energy Research* **6**: str. 3
- Wang, G., H. Grammel, K. Abou-Aisha, R. Sagesser, and R. Ghosh (2012) High-level production of the industrial product lycopene by the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: str. 7205–7215.
- Woodard, S.I., Dailey, H.A. (1995). Regulation of heme biosynthesis in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **316**: str. 110–115.

- Xiu-yan L., Xiang-yang X., Qing-lan M., Wei-hong W. (2005) Biological formation of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *Journal of environmental sciences* **7**: str. 152-155.
- Zhou, Q., P. Zhang, and G. Zhang (2014) Biomass and carotenoid production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: Effects of light intensity. *Bioresour. Technol.* **171**: str. 330–335.)

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

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

Larić

ime i prezime studenta