

# Uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija u bioreaktoru s miješalom bez izvora svjetlosti na različitim izvorima ugljika

---

**Madaras, Manda**

**Master's thesis / Diplomski 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:159:361338>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-06-26**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2019.

Manda Madaras

1158/BPI

**Uzgoj ljubičastih nesumpornih  
bakterija u bioreaktoru s miješalom  
bez izvora svjetlosti na različitim  
izvorima ugljika**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 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 uz pomoć asistenta Nenada Marđetka, mag. ing. bioproc.

*Željela bih se prvenstveno zahvaliti svom mentoru doc. dr. sc. Mariu Novaku na pruženoj prilici, korisnim savjetima, uloženom vremenu i pomoći tijekom izrade ovog rada. Također se zahvaljujem svima iz Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada, a posebice svima iz „poluindustrije“.*

*Međutim, najveće hvala mojoj obitelji i prijateljima, bez kojih, zasigurno, ne bih ni pisala ovu zahvalu.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### Uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija u bioreaktoru s miješalom bez izvora svjetlosti na različitim izvorima ugljika *Manda Madaras, 1158/BPI*

**Sažetak:** Ljubičaste bakterije se kroz zadnjih nekoliko desetljeća prezentiraju kao modelni organizmi za istraživanje i shvaćanje fotosintetskih prokariota zahvaljujući njihovoj iznimnoj sposobnosti prilagodbe raznim uvjetima okoline. Također, ljubičaste nesumporne bakterije su naročito zanimljive s komercijalnog aspekta s obzirom na činjenicu da proizvode veliki niz proizvoda kao što su vodik, pigmenti, biokemikalije, biopolimeri i mnoge druge. U ovom radu se ispitivao aerobni kemoheterotrofni rast, potrošnja supstrata, te sinteza pigmenata bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u bioreaktoru s miješalom bez prisutnosti svjetla uz različite izvore ugljika. Kao izvori ugljika su se koristile glukoza i ksiloza, te hidrolizat lignocelulozne biomase dobiven kiselinskom predobradom u visokotlačnom reaktoru. Uzgoj *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 je pokazao slabiji rast, te sintezu pigmenata tijekom uzgoja na glukozi i ksilozi, dok je *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 najveću produktivnost  $0,154 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$  procesa postigao tijekom uzgoja na predobrađenoj lignoceluloznoj biomasi. Također, tijekom tog procesa se postigao i najveći prinos biomase bakterije  $3,7 \text{ g L}^{-1}$ . Najviše vrijednosti koncentracije pigmenata, prikazane kao vrijednosti bakterioklorofila a, su postignute tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na glukozi i ksilozi  $8,599 \text{ mg L}^{-1}$ .

**Ključne riječi:** ljubičaste nesumporne bakterije, *Rhodovulum adriaticum*, lignocelulozna biomasa, bakterioklorofil, bioreaktor s miješalom

**Rad sadrži:** 65 stranica, 18 slika, 8 tablica, 86 literaturnih navoda, 1 prilog

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** Nenad Marđetko, mag. ing. bioproc.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc. dr. sc. Antonija Trontel
2. Doc. dr. sc. Mario Novak
3. Prof. dr. sc. Verica Dragović Uzelac
4. Doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (zamjena)

**Datum obrane:** 22. listopada 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### CULTIVATION OF PURPLE NON-SULFUR BACTERIA IN A STIRRED TANK BIOREACTOR UNDER DARK CONDITIONS WITH DIFFERENT CARBON SOURCES

*Manda Madaras, 1158/BPI*

**Abstract:** In the last couple of decades purple non-sulfur bacteria have presented themselves as a model organism for researching and understanding of photosynthetic prokaryotes thanks to their excellent capability of adapting to different environmental conditions. These bacteria are also interesting in a commercial aspect due to their capability of producing a grand array of products such as biohydrogen, pigments, biochemicals, biopolymers etc. In this thesis, aerobic chemoheterotrophic growth, substrate consumption and pigment biosynthesis of bacteria *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 and *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 in a stirred tank bioreactor under dark conditions with different carbon sources, was studied. Glucose, xylose and lignocellulosic hydrolysates, obtained by acidic pretreatment in high-pressure reactor, were used as carbon sources for cultivation. Results obtained by *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 showed poor growth and photosynthetic pigments synthesis on glucose and xylose, while results obtained by *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 showed great success. The highest bioprocess productivity of  $0.154 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  was observed during cultivation on pretreated lignocellulosic biomass. During that process, the highest yield of biomass of  $3.7 \text{ g L}^{-1}$  was achieved, as well. The most successful medium for pigment biosynthesis, shown as bacteriochlorophyll a concentration, was glucose/xylose medium reaching  $8.599 \text{ mg L}^{-1}$  of bacteriochlorophyll a.

**Keywords:** purple non-sulfur bacteria, *Rhodovulum adriaticum*, lignocellulosic biomass, bacteriochlorophyll, stirred tank bioreactor

**Thesis contains:** 65 pages, 18 figures, 8 tables, 86 references, 1 supplement

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD Mario Novak, Assistant professor

**Technical support and assistance:** Nenad Mardetko, mag. ing. bioproc.

#### Reviewers:

1. PhD Antonija Trontel, Assistant professor
2. PhD Mario Novak, Assistant professor
3. PhD Verica Dragović Uzelac, Full professor
4. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 22<sup>nd</sup> October 2019

# SADRŽAJ:

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	3
2.1.	Fotosintetski prokarioti .....	3
2.1.1.	Podjela, morfologija i metabolizam fotosintetskih prokariota .....	3
2.1.2.	Cijanobakterije .....	4
2.1.3.	Zelene sumporne bakterije ( <i>Chlorobiaceae</i> ).....	5
2.1.4.	Heliobakterije.....	6
2.1.5.	Zelene nesumporne bakterije ( <i>Chloroflexus</i> ) .....	6
2.1.6.	Ljubičaste bakterije .....	7
2.2.	Anoksigenične sumporne bakterije.....	8
2.2.1.	Klasifikacija (taksonomija) .....	8
2.2.2.	Metabolizam ljubičastih bakterija .....	9
2.3.	Ljubičaste nesumporne bakterije .....	11
2.3.1.	Morfologija i metabolizam.....	11
2.3.2.	Klasifikacija ljubičastih nesumpornih bakterija.....	12
2.3.3.	Biotehnološka primjena ljubičastih nesumpornih bakterija .....	13
2.3.3.1.	<i>Biogoriva</i> .....	13
2.3.3.2.	<i>Biokemikalije</i> .....	14
2.3.3.3.	<i>Biopolimeri</i> .....	15
2.3.3.4.	<i>Pigmenti</i> .....	15
2.3.3.5.	<i>Bioremedijacija i obrada otpadnih voda</i> .....	16
2.4.	Uvjeti uzgoja nesumpornih ljubičastih bakterija.....	18
2.4.1.	Bioreaktorski sustavi.....	18
2.4.1.1.	<i>Fotobioreaktor</i> .....	18
2.4.1.2.	<i>Bioreaktor s miješalom</i> .....	19
2.4.2.	Usporedba uzgoja na svjetlu i u mraku .....	21
2.4.3.	Usporedba anaerobnog i aerobnog načina uzgoja nesumpornih ljubičastih bakterija .....	22
3.	EKSPERIMENTALNI DIO .....	23
3.1.	Materijali.....	23
3.1.1.	Radni mikroorganizmi .....	23
3.1.2.	Kemikalije i hranjive podloge.....	23
3.1.3.	Uređaji i pribor.....	25



3.1.3.1.	<i>Bioreaktor s miješalom</i> .....	25
3.1.3.2.	<i>Spektrofotometar</i> .....	26
3.1.3.3.	<i>Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC)</i> .....	26
3.1.3.4.	<i>Centrifuga</i> .....	27
3.1.3.5.	<i>Ostali uređaji i oprema</i> .....	27
3.2.	Metode rada .....	28
3.2.1.	Priprema inokuluma za uzgoj bakterija u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom.....	28
3.2.2.	Priprema kemijski definiranih hranjivih podloga za šaržni uzgoj bakterija u laboratorijskom bioreaktoru .....	28
3.2.3.	Priprema kompleksne hranjive podloge za šaržni uzgoj <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 u laboratorijskom bioreaktoru .....	29
3.2.4.	Šaržni uzgoj bakterija <i>Rhodobacter azotoformans</i> JCM 9340 i <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 u bioreaktoru s miješalom i nadzor procesa .....	30
3.2.4.1.	<i>Uzgoj bakterije Rhodobacter azotoformans JCM 9340</i> .....	30
3.2.4.2.	<i>Uzgoj bakterije Rhodovulum adriaticum DSM 2781</i> .....	30
3.2.5.	Analitičke metode .....	31
3.2.5.1.	<i>Određivanje optičke gustoće uzoraka izuzetih tijekom šaržnog uzgoja bakterije</i> .....	31
3.2.5.2.	<i>Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase bakterija</i> .....	31
3.2.5.3.	<i>UPLC određivanje koncentracije izvora ugljika u hranjivoj podlozi</i> .....	32
3.2.5.4.	<i>Ekstrakcija ukupnih pigmenata i određivanje bakterioklorofila a</i> .....	32
3.2.6.	Određivanje specifične potrošnje kisika bakterija <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 i <i>Rhodobacter azotoformans</i> JCM 9340.....	33
3.2.7.	Pokazatelji uspješnosti uzgoja bakterija.....	34
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	36
4.1.	Uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija <i>Rhodobacter azotoformans</i> JCM 9340 i <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 u bioreaktoru s miješalom na podlogama s glukozom kao izvorom ugljika aerobno u mraku .....	37
4.2.	Uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija <i>Rhodobacter azotoformans</i> JCM 9340 i <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 u bioreaktoru s miješalom na podlogama s ksilozom kao izvorom ugljika aerobno u mraku .....	43
4.3.	Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 u bioreaktoru s miješalom na kemijski definiranoj podlozi s glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika i na kompleksnoj podlozi hidrolizata sijena aerobno u mraku.....	48
5.	ZAKLJUČCI.....	56
6.	LITERATURA .....	57
7.	PRILOZI .....	66
7.1.	Baždarni dijagram za određivanje koncentracije supstrata tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti .....	66

***UVOD***

# 1. UVOD

Nagli porast u globalnoj industrijalizaciji doveo je do ozbiljnih ekoloških problema kao što su energetska kriza, onečišćenje okoliša, te globalno zatopljenje. Lignocelulozna biomasa predstavlja rješenje kao najrasprostranjeniji izvor biološkog materijala, koji se kontinuirano obnavlja fotosintetskim redukcijama CO<sub>2</sub> pomoću energije sunca. Lignocelulozna sirovina čini većinski udio otpada u poljoprivrednoj i šumarskoj industriji, kao i otpadnih voda u prehrambenoj industriji, te industriji pulpe i papira (Saratale i sur., 2008).

Upotreba lignoceluloznih sirovina u biotehnologiji je izuzetno zanimljiva zbog široke rasprostranjenosti i obnovljivosti. Međutim korištenje tih sirovina je još uvijek ograničeno zbog manjka mikroorganizama koji ih mogu koristiti u nativnoj formi. Potreban je opsežniji proces predobrade da bi se takva sirovina razgradila na fermentabilne šećere koje mikroorganizmi mogu koristiti. Kompleksnu strukturu lignoceluloze čine celuloza, hemiceluloza i lignin, te su međusobno povezane jakim kovalentnim i slabim nekovalentnim vezama. Predtretmanom lignoceluloznih sirovina dolazi do hidrolize strukture pri čemu dobivamo heterogenu smjesu različitih spojeva, a većinski su to ugljikohidrati: glukoza, ksiloza, manoz, galaktoza, arabinoza i razne organske kiseline (Marđetko i sur., 2018). Prema tome, vidljiv je značajan potencijal upotrebe lignoceluloznih sirovina kao izvora ugljika u procesima proizvodnje biogoriva, prehrambenih proizvoda i kemikalija, te može pomoći u pronalasku rješenja kod zbrinjavanja otpada, kao i u smanjivanju rastuće ovisnosti o fosilnim gorivima kao primarnim izvorima energije.

Anoksigenične fotosintetske ljubičaste bakterije predstavljaju veliku skupinu fotosintetskih mikroorganizama koji su široko rasprostranjeni u prirodi. Poznato je oko 50 vrsti ovih organizama, te su neki od njih postali primarni modelni sustavi u istraživanju fotosinteze (Madigan i Jung, 2009). Dijele se na ljubičaste sumporne i ljubičaste nesumporne bakterije.

Ljubičaste nesumporne bakterije (purple nonsulfur bacteria – PNSB) su fenotipski raznolika netaksonomska skupina čije se mogućnosti primjene za ljudsku upotrebu iz dana u dan povećavaju. Primjenjive su za sintezu vodika, koji se sve više istražuje kao alternativa konvencionalnim gorivima dobivenih iz neobnovljivih sirovina, za sintezu raznih biokemikalija

koje se za sad proizvode daleko skupljim kemijskim postupcima koji su kompliciraniji i ekološki neprihvatljiviji, za proizvodnju bioplastike (polihidroksibutirat), te za bioremedijaciju vode i tla zagađenih teškim metalima i radioaktivnim izotopima. Također, njihova biomasa je izuzetno korisna kao sirovina za ishranu stoke zahvaljujući visokim koncentracijama proteina (Fiedor i sur., 2016).

Ljubičaste nesumporne bakterije mogu rasti fotoautotrofno, kemoautotrofno, fotoheterotrofno, kemoheterotrofno s različitim elementima kao elektron akceptorima, te mogu provoditi fermentaciju, kao i staničnu respiraciju (Kantachote i sur., 2005). Upravo je sposobnost stanične respiracije ljubičastih nesumpornih bakterija u bioreaktoru s miješalom u aerobnim uvjetima u mraku istražena u ovom radu. Kao supstrat za rast bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 korištene su glukoza i ksiloza. Ta dva šećera su najprisutnija u hidrolizatu lignoceluloznih sirovina na kojemu se također ispitivao rast navedenih bakterija.

Uz potrošnju supstrata i kinetike rasta, u ovom radu se određivala i potrošnja kisika, te sinteza fotosintetskih pigmenata ljubičastih nesumpornih bakterija u kemijski definiranim i kemijski kompleksnim hranjivim podlogama. Rezultatima dobivenim u ovom radu će se pokazati primjena ovakvih uvjeta kod uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija, te njihova sposobnost sinteze spojeva i kemikalija za industrijsku proizvodnju na podlogama dobivenim predobradom lignoceluloznih sirovina.

***TEORIJSKI DIO***

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. FOTOSINTETSKI PROKARIOTI

Fotosinteza (grč.: phos – svjetlost, syntithenai – spajati s nečim) predstavlja centralnu rutu u globalnom kruženju ugljika, te služi kao glavni ulazni tok organskog ugljika u biosferu (Kirk, 1994). To je kompleksni fizikalno – kemijski proces koji se pojavljuje kod raznih skupina organizama u kojem pigmenti apsorbiraju svjetlosnu energiju i konvertiraju je u kemijsku energiju u obliku organskih ugljikohidrata, pritom koristeći CO<sub>2</sub> i vodu (Ormerod, 1992). Proces fotosinteze provode razni organizmi, kao što su biljke, alge, cijanobakterije, razne fototrofne bakterije, koji posjeduju pigmente za apsorpciju svjetlosti. Ta energija svjetlosti se dalje prevodi u kemijsku energiju preko kompleksnog fotosintetskog sustava, te će se u konačnici iskoristiti za sintezu ugljikohidrata, kisika i raznih drugih spojeva potrebnih za rast i razvoj organizma producenta (Yurkov i Beatty 1998; Shiba i sur., 1979).

Fotosintetski prokarioti predstavljaju veliki potencijal za uporabu u biotehnološkoj industriji. Zahvaljujući njihovoj sposobnosti fiksacije CO<sub>2</sub>, te sintezi raznih proizvoda koji su pronašli svoju komercijalnu primjenu, moguće je procesom njihovog uzgoja povezati ekonomsku i ekološku održivost. Proizvedena biomasa je pronašla svoju primjenu u proizvodnji biogoriva, poljoprivredi, farmaceutici, te u prehrambenoj industriji (Skjanes i sur., 2007).

Također, fotosintetski prokarioti se mogu koristiti i u procesima razgradnje azo-boja i pesticida, uklanjanja toksičnih metala i radioizotopa, fotosintetske proizvodnje vodika, biosinteze karotenoida i ostalih terpenoida, proizvodnje membranskih proteina i u raznim drugim primjenama (Frigaard, 2016).

#### 2.1.1. Podjela, morfologija i metabolizam fotosintetskih prokariota

Predstavnici fotosintetskih prokariota mogu se podijeliti na oksigenične i anoksigenične. Najveća razlika između oksigeničnih i anoksigeničnih prokariota jest njihova sposobnost proizvodnje kisika kao međuprodukta u reakcijama fiksacije ugljika. Sposobnost proizvodnje

kisika se temelji na vrsti pigmenata koje koriste fotosintetski mikroorganizmi, te strukturi i kompleksnosti fotosintetskog sustava koji posjeduju (Stainer i sur., 1981). Svi oksigenični fototrofi posjeduju dvije vrste fotosustava, fotosustav I koji služi kao jaki reducens, te fotosustav II koji služi kao slabiji reducens, zajedno su povezani u seriju redoks reakcija. Anoksigenični fototrofi posjeduju samo jedan od tih dvaju fotosustava. Shodno tome možemo razlikovati tri tipa fotosintetskih prokariota s obzirom na posjedovanje jednog ili oba fotosustava.

Prvi tip čine prokarioti koji posjeduju oba sustava, fotosustav I i fotosustav II, te su najrasprostranjeniji predstavnici ovog tipa oksigenične cijanobakterije. Drugi tip fotosintetskih prokariota, koji provode striktno anaerobnu anoksigeničnu fotosintezu pomoću fotosustava I, čine zelene sumporne bakterije i heliobakterije, a treći tip čine anoksigenične fotosintetske ljubičaste bakterije i zelene nesumporne bakterije *Chloroflexus*, koje posjeduju samo fotosustav II (Ormerod, 1992).

### 2.1.2. Cijanobakterije

Cijanobakterije, u prošlosti poznate kao modro – zelene alge, su raznolika skupina Gram – negativnih oksigeničnih fotosintetskih prokariota. Metabolička fleksibilnost im je omogućila rast i razvoj u širokom rasponu uvjeta okoline kao što su, alkalni i kiseli uvjeti, uvjeti visokih i niskih temperatura, te morski ili slatkovodni uvjeti (Singh i sur., 2014). Za razliku od ostalih Gram – negativnih bakterija, cijanobakterije imaju puno deblji peptidoglikanski sloj koji može doseći debljinu od 700 nm, što je i do 70 puta više od debljine peptidoglikanskog sloja većine bakterija (Hoiczuk i Hansel, 2000). Periferni dio protoplasta cijanobakterija sadrži tilakoide s vodotopivim proteinima fikobilisomima i granulama glikogena (Colyer i sur., 2005).

Iako su cijanobakterije morfološki poprilično raznolike, uslijed mogućnosti obitavanja u širokom rasponu prirodnih staništa, metabolički su poprilično uniformne. CO<sub>2</sub> fiksiraju Calvinovim ciklusom, uz glavni enzim RuBisCo – ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza oksigenaza, iz kojeg potječu važne preteče za biosintezu: heksoze, pentoze i trioza-fosfati. Kao izvor dušika koriste amonijak, a u odsutstvu amonijaka u okolini, većina cijanobakterija provode fiksaciju dušika (Ormerod, 1992).

Biomasa cijanobakterija bi mogla poslužiti kao sirovina za proizvodnju etanola jer posjeduju peptidoglikanski sloj unutar stanične stijenke koji se jednostavno može razgraditi lizozimima. Također, cijanobakterije za skladištenje ugljikohidrata koriste glikogen koji je poželjniji od škroba kao fermentacijska sirovina. U posljednjih nekoliko desetljeća znanstvenici pokušavaju genetičkim inženjerstvom postići sintezu etanola u stanicama cijanobakterija. Gao i sur. (2012) su postigli najvišu koncentraciju etanola od  $5,5 \text{ g L}^{-1}$  s mutantom *Synechocystis sp.* PCC 6803, te s produktivnošću od  $212 \text{ mg L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ .

Cijanobakterija *Arthospira plantensis* (Spirulina) proizvodi sulfatni polisaharid spirulan koji postiže razne pozitivne efekte kod ljudske primjene kao antioksidans, antikoagulant, antiviralni i imuno-stimulacijski agent (Vonshak, 1997).

### 2.1.3. Zelene sumporne bakterije (*Chlorobiaceae*)

Zelene sumporne bakterije predstavljaju energetske najefikasnije fototrofe u smislu iskorištenja svjetlosne energije, te bi iz tog razloga trebale biti puno zastupljenije u biotehnološkoj primjeni. Međutim, nutritivna izbirljivost i striktna anaerobnost usporavaju realizaciju njihovog potencijala. Zelene sumporne bakterije možemo podijeliti na smeđe i zelene vrste. Zelene vrste sadrže bakterioklorofil c ili d, karotenoide - klorobakten i OH-klorobakten kao pigmente za prikupljanje svjetlosti (Schmidt 1978; Gloe i sur., 1975), dok smeđe vrste imaju bakterioklorofil e i karotenoid izorenieratene i  $\beta$ -izorenieratene (Schmidt i sur., 1965). Intenzitet svjetla ima velik učinak na količinu, veličinu i sastav bakterioklorofila. Za rast su im neophodni anorganski elektron donori kao  $\text{H}_2\text{S}$ , tiosulfati ili  $\text{H}_2$ . Ove bakterije su obligatni anaerobi i fototrofi, te fiksiraju  $\text{CO}_2$  pomoću citratnog ciklusa koristeći reducirane sumporne spojeve ili  $\text{H}_2$  kao elektron donore, te acetat i propionat (Ormerod, 1992).

Zelene sumporne bakterije posjeduju određene prednosti u odnosu na druge mikroorganizme kod uklanjanja sulfida, a to su da izlučuju elementarni sumpor ekstracelularno, čime se olakšava njegova sedimentacija i korištenje u gnojivima, imaju veću produktivnost oksidacije sulfida, veću otpornost na povišene koncentracije sumpora, te veći afinitet za vezanje molekula sulfida (Henshaw i Zhu, 2001). U eksperimentu Henshaw i Zhu-a istraživana je



sposobnost zelene sumporne bakterije, *Chlorobium limicola* DSM 257, oksidacije H<sub>2</sub>S u kontinuiranom fotobioreaktoru s čvrstim slojem, te je 92-95% ulaznog toka H<sub>2</sub>S bilo oksidirano u elementarni sumpor.

#### 2.1.4. Heliobakterije

Heliobakterije predstavljaju strukturno najjednostavnije fotosintetske prokariote zbog nedostatka invaginacija citoplazmatske membrane i klorosoma (Gest i Favinger, 1983). Ove bakterije su također striktni anaerobi kao i zelene sumporne bakterije, te im prisutnost kisika limitira područja rasta i razmnožavanja. Glavni pigment im je bakterioklorofil g, s apsorpcijskim maksimumom pri 790 nm, koji služi kao primarni elektron donor. Ovi sporogeni mikroorganizmi tijekom rasta koriste jednostavne organske spojeve, kao što je laktat, te reducirane izvore sumpora, uz biotin kao bitan faktor rasta. Posjeduju enzim nitrogenazu koja omogućuje uspješnu fiksaciju dušika (Ormerod, 1992).

#### 2.1.5. Zelene nesumporne bakterije (*Chloroflexus*)

Termofilne zelene nesumporne bakterije posjeduju dvije vrste bakterioklorofila, bakterioklorofil c, smješten u klorosomima, s apsorpcijskim pikom na 750 nm, te bakterioklorofil a koji je smješten na proteinima koji povezuju klorosome s unutarnjom stranom stanične membrane. Sinteza fotosintetskog aparata, uključujući veličinu i količinu klorosoma, je regulirana intenzitetom svjetla, brzinom rasta i nutritivnim faktorima, te je inhibirana kisikom (Oelze i Fuller, 1987). Optimalni uvjeti uzgoja uključuju visoki intenzitet svjetlosti, pH oko 8 i temperaturu 55°C uz H<sub>2</sub> ili H<sub>2</sub>S kao elektron donore.

Ovi fakultativni anaerobi ne posjeduju Calvinov ciklus, nego fiksaciju CO<sub>2</sub> vrše metaboličkim procesom koji uključuje 3-hidroksipropionat i acetil CoA kao intermedijere (Holo, 1989). Također, ove bakterije mogu koristiti H<sub>2</sub>S za redukciju CO<sub>2</sub>.

### 2.1.6. Ljubičaste bakterije

Ljubičaste bakterije su fotosintetski gram-negativni prokarioti koji konvertiraju svjetlosnu energiju u kemijsku energiju procesom anoksičnične fotosinteze. Ljubičaste bakterije posjeduju fotosintetske pigmente – bakterioklorofile a i b, te karotenoide koji daju jarku boju kulturi ovih bakterija. Mogu rasti fotoautotrofno s CO<sub>2</sub> kao jedinim izvorom ugljika i reduciranim anorganskim tvarima kao elektron donorima (Madigan i Jung, 2009). Za razliku od zelenih bakterija, ljubičaste bakterije posjeduju intracitoplazmatsku membranu koja potječe od i nastavlja se na citoplazmatsku membranu, te udubine mogu biti u obliku vezikula, lamela ili cijevi (Ormerod, 1992). Tradicionalno ih dijelimo na ljubičaste sumporne i ljubičaste nesumporne bakterije.

Također, ljubičaste bakterije kao i oksigenični prokarioti – cijanobakterije, posjeduju sposobnost stvaranja energije fotofosforilacijom. Međutim, za razliku od cijanobakterija, fotosinteza se kod ljubičastih bakterija najčešće odvija u anoksičnim uvjetima (bez prisutnosti kisika). Tu karakteristiku dijele s zelenim sumpornim bakterijama, zelenim nesumpornim bakterijama i heliobakterijama (Blankenship i sur., 1995). S obzirom na tu činjenicu, ljubičaste bakterije se najčešće mogu naći u raznim vodenim staništima kao što su jezera, bare i estuariji, te često i u lagunama za obradu otpadnih voda. U takvim staništima osnovna fizikalno – kemijska svojstva kao što su: koncentracija sulfida, pH, kvaliteta izvora svjetla i intenzitet svjetlosti, te temperatura diktiraju količinu i raznolikost ljubičastih bakterija (Madigan i Jung, 2009).

Ljubičaste nesumporne bakterije i neke ljubičaste sumporne bakterije ostvaruju brzi rast na svjetlu uz široki raspon organskih supstrata koji uključuju mono i dikarboksilne kiseline, alkohole i šećere (Dutton i Evans, 1978).

Iako je rast nekih ljubičastih bakterija inhibiran prisutstvom O<sub>2</sub>, većina ih može rasti u aerobnim i mikroaerofilnim uvjetima u mraku.

## 2.2. ANOKSIGENIČNE LJUBIČASTE BAKTERIJE

Anoksigenične fototrofne ljubičaste bakterije predstavljaju veliku skupinu fotosintetskih prokariota koja nastanjuje razna vodena i kopnena staništa. Ljubičaste bakterije su fotosintetski gram-negativni prokarioti koji posjeduju fotosintetske pigmente – bakterioklorofile i karotenoide, te mogu rasti fotoautotrofno s CO<sub>2</sub> kao jedinim izvorom ugljika i reduciranim anorganskim tvarima kao elektron donorima (Madigan i Jung, 2009).

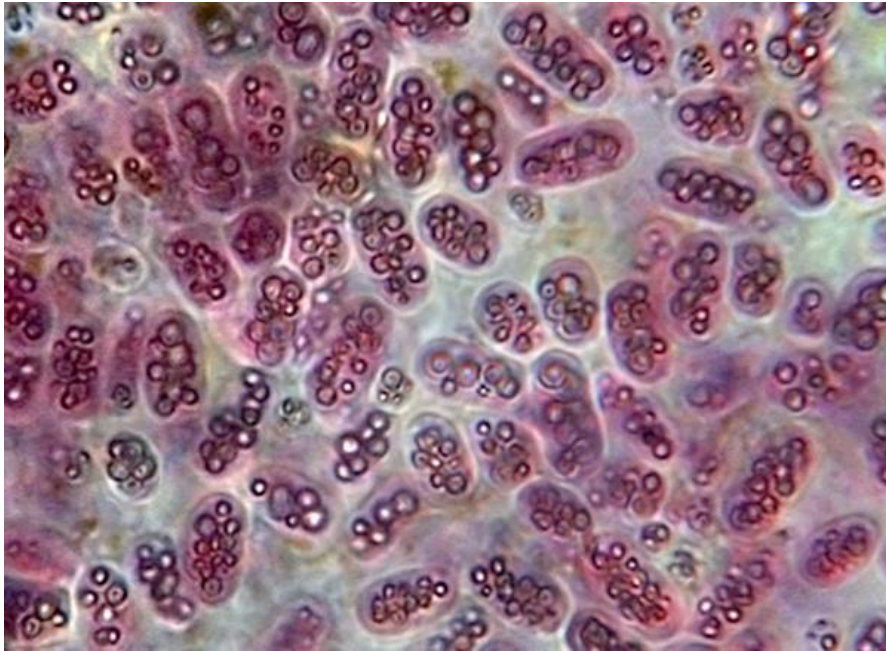
Za razliku od cijanobakterija i eukariotskih mikroalgi, anoksigenične fototrofne ljubičaste bakterije ne mogu koristiti vodu kao elektron donor, stoga ne može doći do stvaranja kisika. Ove bakterije koriste samo jedan fotosustav – fotosustav II, te zahtjevaju prisutstvo elektron donora koji ima niži redoks potencijal od vode. Najčešće su to sulfidi ili neki drugi reducirani sumporni spojevi, kao i vodik ili neke manje organske molekule (Imhoff, 1995).

### 2.2.1. Klasifikacija (taksonomija)

Glavna podjela ljubičastih bakterija je na ljubičaste sumporne bakterije i ljubičaste nesumporne bakterije. Ta podjela je bila zasnovana na činjenici da ljubičaste nesumporne bakterije ne rastu u staništima gdje su prisutni sumporni spojevi, te ne mogu oksidirati sumporovodik. Međutim, Hansen i van Gemerden (1972) su proveli uzgoje u kemostatu, te su pokazali da ti kriteriji za podjelu nisu ispravni. Dokazali su da je većina ljubičastih nesumpornih bakterija sposobna rasti pri niskim koncentracijama sumpora (manjima od 0,5 mM), te mogu oksidirati sumporovodik do elementarnog sumpora, sulfata ili tetracionata. Ipak, važna razlika između tih dviju skupina jest da se kod ljubičastih sumpornih bakterija elementarni sumpor skladišti intracelularno u granulama, dok ljubičaste nesumporne bakterije izlučuju elementarni sumpor ekstracelularno. Tako se na Slici 1. mogu vidjeti svijetle globule elementarnog sumpora unutar samih stanica ljubičastih sumpornih bakterija, dok stanice ljubičastih nesumpornih bakterija izlučuju elementarni sumpor ekstracelularno.

Ove tvrdnje za provedbu klasifikacije ljubičastih bakterija su bile potvrđene i filogenetskim analizama temeljenim na usporedbi 16S rRNA sekvencioniranju, te se pokazalo da ljubičaste

sumporne bakterije pripadaju razredu  $\delta$ -proteobakterije, dok ljubičaste nesumporne bakterije pripadaju razredu  $\alpha$ - ili  $\beta$ -proteobakterije (Imhoff i sur., 2005).



**Slika 1.** Mikroskopski prikaz fototrofnih ljubičastih sumpornih bakterija *Chromatium okenii* s globulama sumpora unutar samih stanica (Plewka, 2005)

Oko 25 vrsti ljubičastih sumpornih bakterija se mogu svrstati u dvije porodice *Chromatiaceae* i *Ectothiorhodospiraceae*. Najviše ih pripada porodici *Chromatiaceae*, te su to bakterije koje skladište sumpor u periplazmi stanice, te je nekolicina njih u porodici *Ectothiorhodospiraceae* koje proizvode ekstracelularni sumpor. Sve vrste ljubičastih nesumpornih bakterija pripadaju porodici *Rhodospirillaceae* (Madigan i Jung, 2009).

### 2.2.2. Metabolizam ljubičastih bakterija

Metabolizam ljubičastih sumpornih bakterija se najčešće povezuje sa sulfidima i svjetlosnom energijom, te se njihov rast karakterizira kao fotoautotrofni gdje sulfide, tiosulfate ili  $H_2$  koriste kao fotosintetske elektron donore (Brune, 1995). Najbitnija uloga ljubičastih sumpornih bakterija je konverzija  $H_2S$  u druge sumporne spojeve, time se uklanja  $H_2S$ , koji je visoko toksičan

za biljke, životinje, te za mnoge bakterije. Oksidacijom sumporovodika nastaju netoksični sumporni spojevi, kao što su elementarni sumpor i sulfat. Time se osiguravaju povoljni uvjeti za rast biljaka, životinja i aerobnih bakterija na površinskim vodama u uvjetima dovoljne količine kisika za staničnu respiraciju (Madigan i Jung, 2009).

Neke vrste mogu koristiti i željezove (II) katione koje oksidiraju u željezove (III) katione ili nitrit koji oksidiraju u nitrat. Što se tiče organskih izvora ugljika, organske kiseline i masne kiseline su preferirani spojevi za ljubičaste sumporne bakterije, te su kratkolančani alkoholi i ugljikohidrati kod nekih vrsta, također, prihvatljivi (Sojka, 1978). Većina vrsti ljubičastih sumpornih bakterija je ekstremofilno, te su to najčešće halofilne i acidofilne vrste (Madigan i Jung, 2009).

Ljubičaste nesumporne bakterije preferiraju fotoheterotrofni rast u podlogama koje sadrže izvore ugljika u organskim molekulama kao što su malat ili piruvat, te amonijak kao izvor dušika. U medije se često dodaje i kvašćev ekstrakt koji služi kao izvor B-vitamina, ali i kao promotor rasta s obzirom na to da sadrži razne organske komponente, kao što su amino kiseline i masne kiseline, koje potpomažu sintezi staničnih dijelova kod ovih bakterija (Sojka, 1978).

Iako je rast nekih ljubičastih bakterija inhibiran prisutstvom  $O_2$ , većina ih može rasti u aerobnim i mikroaerofilnim uvjetima u mraku kao kemoheterotrofi/kemolitotrofi, koristeći kisik kao elektron akceptor za oksidaciju organskih supstrata (nesumporne ljubičaste bakterije) ili  $H_2S$  (sumporne ljubičaste bakterije). Organski supstrati se u mraku u aerobnim uvjetima metaboliziraju pomoću citratnog ciklusa i lanaca za prijenos elektrona koji sadrže citokrome te stvaraju proton motornu silu za proizvodnju energije u obliku ATP molekula (Ormerod, 1992).

## 2.3. LJUBIČASTE NESUMPORNE BAKTERIJE

### 2.3.1. Morfologija i metabolizam

Ljubičaste nesumporne bakterije su gram-negativne, pokretne ili nepokretne, nesporogene, štapičastog oblika, uobičajeno široke od 0,5 do 1,5  $\mu\text{m}$  i duge od 2 do 10  $\mu\text{m}$ . Reprezentativne vrste imaju ili bakterioklorofil a ili bakterioklorofil b, te su kulture obojane crveno zbog prisutnosti karotenoida. Optimalan rast postižu pri temperaturama između 25°C i 35°C i u pH rangu 6,5-7,0 (Montano i sur., 2009).

Ni jedna vrsta ljubičastih nesumpornih bakterija ne posjeduje sposobnost tvorbe globula elementarnog sumpora unutar stanične strukture, te ne mogu rasti u pretjerano lužnatoj, niti u pretjerano slanoj okolini (Imhoff i sur., 1984). Ljubičaste nesumporne bakterije predstavljaju najraznolikiju skupinu fototrofnih ljubičastih bakterija. Ova raznolikost se očituje u promjenjivoj morfologiji, unutarnjim membranskim strukturama, sastavu karotenoida i utilizaciji izvora ugljika i elektron donora.

Iako mogu rasti u različitim uvjetima okoline, preferirani način rasta im je fotoheterotrofni u anaerobnim uvjetima uz izvor svjetlosti s CO<sub>2</sub> kao izvorom ugljika i reduciranim anorganskim spojevima kao elektron donorima (Novak i sur., 2017). Kao faktori rasta su im potrebni vitamini biotin, tiamin, niacin i p-aminobenzojeva kiselina, a rast im je poboljšan i s dodatkom malih količina kvašćevog ekstrakta (Imhoff, 1995).

Mnogi predstavnici ove skupine mogu rasti i pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima u mraku kao kemoheterotrofi, nekolicina i kao kemolitotrofi. Pri aerobnim uvjetima u mraku sinteza fotosintetskih pigmenata je reprimirana, a kulture bakterije su blijedo obojane ili nebojane (Zeiger i Grammel, 2010). Čak i pri fotoautotrofnim uvjetima rasta (anaerobno uz izvor svjetlosti) mnoge vrste pokazuju značajni respiratorni kapacitet. Respiracija je pri takvim uvjetima inhibirana svjetlošću. Činjenica da postoji respiratorna aktivnost i pri fotoautotofnim uvjetima rasta omogućava ovim bakterijama da uspješno adaptiraju svoj metabolizam promjenama u okolini (Imhoff, 1995).

### 2.3.2. Klasifikacija ljubičastih nesumpornih bakterija

Sve vrste ljubičastih nesumpornih bakterija pripadaju porodici Rhodospirillaceae, a glavni rodovi su: *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopila*, te *Rhodocyclus*.

Rod *Rhodobacter* je u starijoj literaturi pripadao rodu *Rhodopseudomonas*, no kasnije se ustanovilo da postoje razlike u invaginaciji intracitoplazmatske membrane, te se kod roda *Rhodobacter* invaginacije očituju u obliku mjehura u tankim presjecima.

Stanice su ovoidne ili štapičaste, te se dijele binarnom diobom. Mogu biti pokretne ili nepokretne (Novak i sur., 2017). Sve vrste zahtijevaju tiamin, a većina i biotin. Dodatne vitaminske potrebe su promjenjive između vrsta. Fotosintetski pigmenti su bakterioklorofil a i karotenoidi sferoidne grupe. *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter veldkampii*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter blasticus* i *Rhodobacter azotoformans* su neke od vrsta ovog roda (Sirnvas i sur., 2007).

Zahvaljujući modernoj tehnologiji genetičkog inženjerstva napravili su se veliki iskoraci u taksonomskoj i klasifikacijskoj analizi bakterija. Pomoću molekularnih filogenetskih istraživanja temeljenih na 16S rRNA sekvencioniranju, može se dokazati razlika između dva mikroorganizma koji su do tog trenutka bili smatrani jednom vrstom. Na taj način je i otkriven *Rhodobacter azotoformans* u istraživanju Hiraishi i sur. (1996). Također otkrila se i razlika između slatkovodnih i morskih ljubičastih nesumpornih bakterija koji su bili svrstani u rod *Rhodobacter*, te su na temelju analiza u istraživanju Hiraishi i Ueda (1994) predložili prebacivanje bakterija koje obitavaju u morskim vodama u novi rod *Rhodovulum*. Neki od predstavnika ovog roda su *Rhodovulum adriaticum*, *Rhodovulum sulfidophilus*, *Rhodovulum marinum*, *Rhodovulum strictum* i drugi.

### 2.3.3. Biotehnološka primjena ljubičastih nesumpornih bakterija

Primjena ljubičastih nesumpornih bakterija u biotehnološkoj industriji je vrlo raznolika zahvaljujući njihovoj sposobnosti rasta u raznim uvjetima, te sposobnosti proizvodnje niza tvari i spojeva koji su pronašli svoje mjesto u komercijalnoj primjeni.

S obzirom na njihovu sposobnost korištenja različitih supstrata, naročito manjih organskih molekula, često se koriste za obradu otpadnih voda s visokom vrijednošću BPK (biokemijska potrošnja kisika) (Madukasi i sur., 2010). Tijekom obrade otpadnih voda, nesumporne ljubičaste bakterije sintetiziraju razne fiziološki aktivne tvari kao što su pigmenti, proteini, vitamini, te razni antimikrobni agenti. Navedeni proizvodi su pronašli svoju primjenu u prehrambenoj industriji, u medicini, te u kozmetičkoj industriji (Lu i sur., 2011). Zahvaljujući svojem bogatom nutritivnom sastavu, biomasa ljubičastih bakterija nastala u procesu obrade otpadnih voda se dalje može koristiti u proizvodnji hrane za ribu, te hrane za stoku i perad ili kao organsko gnojivo (Kobayashi, 1995).

U zadnje vrijeme se sve više istražuju na području proizvodnje 5-aminolevulinske kiseline, spoja koji se često koristi u onkološkoj dijagnostici, a još se uvijek komercijalno proizvodi kompliciranim i skupim kemijskim postupcima (Liu i sur., 2014). Nadalje, uočena je i mogućnost sinteze polihidroksibutirata, biopolimera koji predstavlja alternativu konvencionalnoj plastici. Vodik kao biogorivo je također jedan visokovrijedan proizvod, ne toliko ekonomski, ali ekološki vrijedan proizvod koji se danas prezentira na tržištu kao jedan od najboljih alternativa za zamjenu fosilnih goriva.

#### 2.3.3.1. Biogoriva

Tijekom proteklih deset godina, veliki napredak je postignut u razvijanju čišćih i efikasnijih sustava za proizvodnju bioenergije. Vodik ( $H_2$ ) se smatra biogorivom s niskim ekološkim otiskom posebice iz razloga što je jedan od glavnih produkata izgaranja voda. Vodik je obnovljivi izvor energije, te se može ponovno i proizvesti iz vode. Konvencionalne metode proizvodnje vodika su skupocjene, te je istraživačima u cilju pronaći jeftiniji način kako bi vodik kao gorivo postao pristupačniji širim masama.



Biološka proizvodnja vodika pomoću mikroorganizama ima brojne prednosti, te se prezentira kao isplativija alternativa trenutnim industrijskim metodama proizvodnje (Markov i Weaver, 2008). Termokemijski i elektrokemijski procesi proizvodnje vodika su energetski neefikasni i u većini slučajeva ekološki neprihvatljivi. S druge strane, biološki procesi proizvodnje vodika su većinom vođeni u umjerenim uvjetima temperature i tlaka, koristeći različite organske tvari kao izvore ugljika s visokim prinosima, te tako predstavljaju energetski isplativiju opciju.

Ljubičaste nesumporne bakterije najviše obećavaju na polju proizvodnje vodika u odnosu na druge mikroorganizme iz razloga što imaju visok koeficijent konverzije supstrata u produkt, proizvode vodik u anaerobnim uvjetima, rastu pri različitim valnim duljinama svjetlosti, te mogu rasti na različitim organskim supstratima podrijetlom iz otpada i otpadnih voda (Basak i Das, 2007).

Nitrogenaza je enzim koji ima ključnu ulogu kod nesumpornih ljubičastih bakterija u kataliziranju reakcija nastajanja vodika. U prisutnosti svjetla katalizira reakciju :  $2 \text{N}_2 + 8\text{e}^- + 8\text{H}^+ + 16 \text{ATP} \rightarrow 2 \text{NH}_3 + \text{H}_2 + 16 \text{ADP} + 16 \text{Pi}$  (Kim i sur., 1980). Tijekom uvjeta limitacije dušikom nitrogenaza katalizira reakciju redukcije protona uz nastajanje vodika prema jednadžbi :  $2 \text{H}^+ + 2\text{e}^- + 4 \text{ATP} \rightarrow \text{H}_2 + 4 \text{ADP} + 4 \text{Pi}$  (Bulen i sur., 1965).

Najveću limitaciju uporabe vodika kao goriva predstavlja njegova eksplozivnost u doticaju s kisikom, što vodi ka poteškoćama u njegovom skladištenju i distribuciji (Salakkam i sur., 2019).

Neke od nesumpornih ljubičastih bakterija koje fotofermentacijom proizvode vodik su: *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sulfidophilus*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum* i druge (Basak i Das, 2007).

#### 2.3.3.2. Biokemikalije

Jedna od biokemikalija koja je pronašla svoju primjenu na raznim poljima, kao što su medicina, poljoprivreda i prehrambena industrija, zahvaljujući svojim biokemijskim karakteristikama, je 5-aminolevulinska kiselina (5-ALA). Danas se 5-ALA najviše proizvodi mikrobnom fermentacijom, najčešće fotosintetskim bakterijama jer kemijska sinteza 5-ALA ima niske prinose i kompliciranija je u usporedbi s mikrobnom proizvodnjom (Liu i sur., 2014).

Sinteza 5-aminolevulinske kiseline se odvija pomoću dva metabolička puta: C4 put (Sheminov put), koji je prisutan kod ljubičastih bakterija, kvasaca i sisavaca, te C5 put koji je prisutan kod biljaka i nekih mikroorganizama. Istražena je sinteza 5-aminolevulinske kiseline kod

divljih tipova i mutanata ljubičastih nesumpornih bakterija uzgajanih u kemijski definiranim i kemijski kompleksnim podlogama (Novak i sur., 2017).

Također, istraženo je da ljubičaste nesumporne bakterije uspješno sintetiziraju i izlučuju indol-3-acetatnu kiselinu u prisutnosti L-triptofana (Mujahid i sur., 2010). Indol-3-acetatna kiselina je tipičan fitohormon koji regulira razne razvojne i fiziološke procese kod biljaka (Xu i sur., 2013).

#### 2.3.3.3. *Biopolimeri*

Dokazano je da ljubičaste bakterije posjeduju sposobnost sinteze polihidroksialkanoata, biopolimera s relativno velikom molekulskom masom od 100 000 do 1 500 000, koji služe za pohranjivanje ugljika i energije u stanici (Clinton Fuller, 1995). Polihidroksialkanoat se pokazao kao zadovoljavajuća alternativa konvencionalnoj plastici. Stanice bakterija počinju sintetizirati PHA kada je rast limitiran dušikom, fosforom ili sumporom, a izvora ugljika ima u suvišku (Higuchi-Takeuchi i sur., 2016).

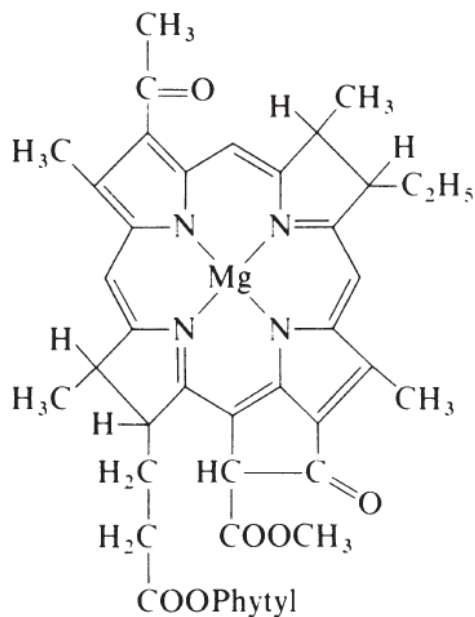
Uslijed kontroliranih uvjeta rasta biomase, na specifičnim supstratima mogu se doseći i količine od oko 50% polihidroksibutirata u suhoj tvari biomase. Brandl i sur. (1991) su uzgajali *Rhodobacter spheroides* na acetatu (i u kombinacijama acetata s malatom, piruvatom, glukozom, krotonatom i propionatom), te su ostvarili prinose od 50-65% polihidroksialkanoata u suhoj tvari biomase, od čega je 98% bilo polihidroksibutirat.

#### 2.3.3.4. *Pigmenti*

Mnoge ljubičaste nesumporne bakterije su fakultativni anaerobi, te u prisutnosti kisika mogu rasti kemotrofno s kisikom kao elektron akceptorom. Međutim kako se količina kisika u okolini smanjuje tako se počinju u stanicama bakterija sintetizirati fotosintetski pigmenti i potrebni proteini za vezanje. Postoje dvije vrste jedinica za apsorpciju svjetla i one prenose energiju ekscitacije na fotokemijski reakcijski centar na kojemu se odvija primarna fotokemija i prijenos elektrona. Intenzitet svjetlosti igra veliku ulogu u sintezi staničnih organela za provođenje fotosinteze, no pokazalo se da je i kisik značajan kontrolirajući faktor (McEwan, 1994).

Kod ljubičastih nesumpornih bakterija najčešći pigmenti su bakterioklorofil a i bakterioklorofil b, te razni karotenoidi (Takaichi, 2009). Fotoautotrofno nesumpornih ljubičastih bakterija se temelji na pigmentima, odnosno bakterioklorofilima i karotenoidima. Reakcijski centar se sastoji od molekule bakterioklorofila koja je okružena drugim molekulama za prikupljanje svjetlosti, uključujući karotenoide, feofitine i lanac molekula za prijenos elektrona (Fenchel i sur., 2012).

Fototrofno uzgajane stanice *Rhodobacter azotoformans* sintetiziraju vezikularnu intracitoplazmatsku membranu zajedno s bakterioklorofilom a, koji je esterificiran fitolom, i karotenoide iz skupine sferoidena (Hiraishi i sur., 1996).



**Slika 2.** Molekularna struktura bakterioklorofila a (Ormerod, 1992)

#### 2.3.3.5. Bioremedijacija i obrada otpadnih voda

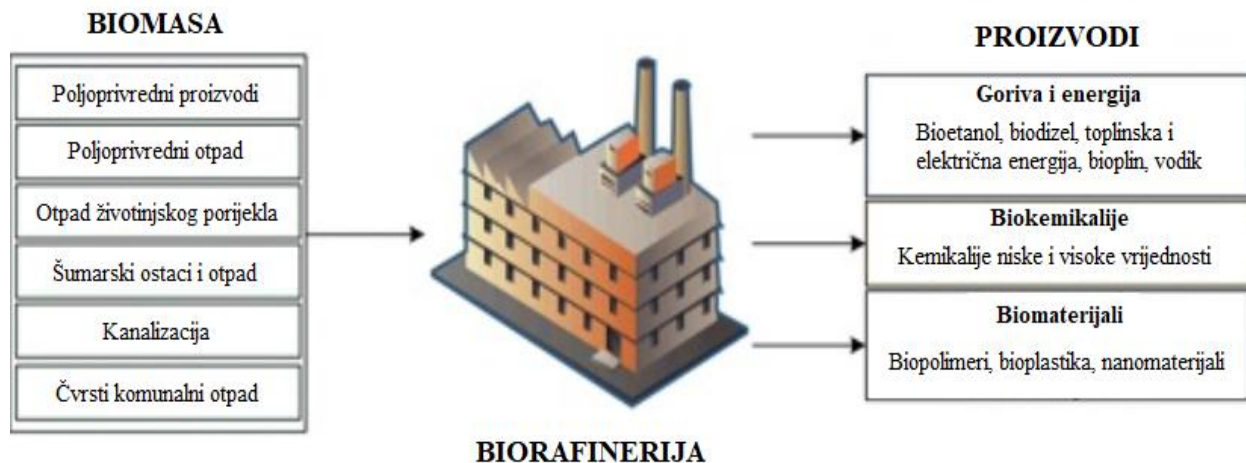
Upotreba fotosintetskih bakterija za obradu otpadnih voda se pokazala ekonomski isplativom opcijom. Prilikom obrade se snižava vrijednost BPK (biokemijsku potrošnju kisika), u vidu smanjenja koncentracije organskih tvari – klorida, bikarbonata i sulfata (Merugu i sur., 2014), ali i vrijednost KPK (kemijska potrošnja kisika) vode, te pritom dolazi do sinteze spojeva koji su od velikog komercijalnog značaja. U takve spojeve spadaju jednostanični proteini (single cell

proteins - SCP), biopolimeri, antimikrobne i terapijske tvari i dr. (Madukasi i sur., 2010). Zahvaljujući adaptaciji na raznolike uvjete, ljubičaste nesumporne bakterije su korištene u mnogim istraživanjima obrade otpadnih voda.

Ove su se bakterije pokazale efikasnim u obradi otpadnih voda s visokim udjelom lateksa (Choorit i sur., 2002), otpadnih voda iz stočarstva (Myung i sur., 2004), otpadnih voda iz tvornica za proizvodnju konzervirane tune (Prasertsan i sur., 1997), kanalizacijske otpadne vode koje sadrže ulja (Takeno i sur., 2005), a Madukasi i sur. (2010) su pokazali kako bakterije *Rhodobacter spheroides* efikasno djeluju na opasne zagađivače otpadnih voda farmaceutske industrije, te smanjuju vrijednost KPK (kemijska potrošnja kisika) za 80%.

Sastav mikrobne flore u kanalizacijskim lagunama i otpadnim vodama je vrlo bitan, te je potrebno uspostaviti ravnotežu oksigeničnih i anoksigeničnih fotosintetskih mikroorganizama u takvim sustavima. Jedna od preporučenih metoda kontrole je određivanje količine klorofila a i b, te bakterioklorofila a, gdje koncentracija klorofila može poslužiti kao indirektna metoda određivanja količine oksigeničnih mikroorganizama kao što su alge i cijanobakterije, a koncentracija bakterioklorofila za određivanje anoksigeničnih mikroorganizama – ljubičaste i zelene bakterije. Poznavajući količinu bakterioklorofila prisutnog u takvim staništima može se lakše pretpostaviti distribucija dušika, jer anoksigenične bakterije koriste fotosintetske sustave za fiksaciju dušika, ali i sintezu vodika (Ritchie, 2018).

Bolje zbrinjavanje otpada vodi ka budućim ekološkim beneficijama kao što su smanjenje zagađenja nadzemnih i podzemnih voda, te transformaciji organskog otpada u visokovrijedne proizvode. Jedan od oblika efikasne transformacije otpada u visokovrijedne proizvode predstavljaju biorafinerije. Pod pojmom biorafinerije podrazumijevamo postrojenje koje koristi otpad životinjskog i biljnog podrijetla kao sirovinu za dobivanje proizvoda visoke kvalitete kao što su energija, goriva, materijali i kemikalije (Moscovicz i sur., 2018). Uzimajući to sve u obzir, ljubičaste nesumporne bakterije pokazuju veliki potencijal kod upotrebe u biorafinerijama zbog svoje sposobnosti proizvodnje vodika, polihidroksialkanoata, visokovrijednih kemikalija, jednostaničnih proteina, te u konačnici i zbog same biomase bakterija koja je bogata proteinima i lipidima.



**Slika 3.** Prikaz ulaznih i izlaznih komponenti biorafinerijskog postrojenja (Shah i sur., 2017)

## 2.4. UVJETI UZGOJA LJUBIČASTIH NESUMPORNIH BAKTERIJA

### 2.4.1. Bioreaktorski sustavi

Kako bi se odabrao adekvatan bioreaktor za uzgoj stanica bakterija, potrebno je obratiti pozornost na prijenos mase unutar samog bioreaktora, prijenos topline, te homogenost sastava podloge tijekom uzgoja (Wang i Zhong, 2007). Kod uzgoja stanica ljubičastih nesumpornih bakterija se također treba uzeti u obzir izvor, te intenzitet svjetla, jer je u mnogim istraživanjima dokazana bitna povezanost sinteze visokovrijednih proizvoda tijekom fotosintetskog uzgoja.

Miješanje u bioreaktoru je jedan bitan parametar kojim se postiže veća produktivnost i veći prinos biomase, jer djeluje kao limitirajući faktor i u slučaju gdje su svi ostali kriteriji zadovoljeni. Miješanje potpomaže jednolikoj distribuciji nutrijenata i plinova, te osigurava održavanje stanica u suspenziji (Yen i sur., 2019).

#### 2.4.1.1. Fotobioreaktor

Za uzgoj fototrofnih mikroorganizama u zatvorenim sustavima najviše se koriste fotobioreaktori. U fotobioreaktorima najveće probleme predstavljaju svjetlost, odnosno koji izvor svjetlosti koristiti (intenzitet, valna duljina), povećanje efikasnosti konverzije svjetla, te kako

osigurati zadovoljavajuću koncentraciju biomase stanica tijekom dužeg uzgoja. Uz prikladni izvor svjetlosti i efikasno hidrodinamičko miješanje moguće je ostvariti visokoproduktivni fototrofni kultivacijski sustav. U fotobioreaktorima se miješanje osigurava upuhivanjem zraka ili nekog određenog plina. Najčešći fotobioreaktori u uporabi su cijevni fotobioreaktori (horizontalni i vertikalni – barbotirajuća kolona i air-lift bioreaktor) i fotobioreaktor s ravnim pločama (Yen i sur., 2019).

#### *2.4.1.2. Bioreaktor s miješalom*

Uslijed neizbježnih limitacija kod uporabe fotobioreaktora zbog pada svjetlosnog intenziteta, kod povišenih koncentracija stanica, produkata ili nastanka biofilma na stijenkama reaktora, uzgoj fakultativno fotosintetskih nesumpornih ljubičastih bakterija se sve više istražuje u aerobnim uvjetima u mraku (Kanno i sur., 2018; Keppen i sur., 2013; Zeiger i Grammel, 2009).

Jedan od najkonvencionalnijih bioreaktora u kojem se mogu postići uvjeti aerobnosti i mraka je bioreaktor s miješalom, u kojem se prijenos mase i topline, raspršivanje zraka u sitne mjehuriće i homogenizacija osiguravaju miješalom uronjenim u vertikalnu posudu. U bioprocima se najčešće upotrebljavaju turbinska, lopatičasta i propelerska miješala koja osiguravaju različite načine strujanja tekućine unutar posude (aksijalno, radijalno i tangencijalno strujanje), te se u bioreaktor postavljaju odbijači kako bi se spriječilo nastajanje vrtloga (Garcia-Ochoa i sur., 2011). Osim adekvatnog miješala, bioreaktor mora posjedovati i izmjenjivač topline, osjetila za mjerenje pH, temperature, koncentracije otopljenog kisika, te dovode kiselina i lužina, sredstava protiv pjenjenja i inokuluma. Procesi u bioreaktoru s miješalom se mogu voditi šaržno, šaržno s pritokom supstrata, polukontinuirano ili kontinuirano.

Bioreaktor s miješalom ima brojne prednosti koje uključuju jednostavnost održavanja i pranja, osiguravanje zadovoljavajućih uvjeta homogenizacije, jednostavnost provedbe scale-up procesa, kontrola i praćenje procesa, dugogodišnje iskustvo i široko poznavanje ovih bioreaktora (Wang i Zhong, 2007).

Veliki nedostatak bioreaktora s miješalom je to što je energetski neučinkovit s obzirom na utrošak energije za pokretanje miješala i energije za provedbu aeracije. Također problem stvara i hidrodinamički stres na stanice mikroorganizama, uzrokovan ubrzanim miješanjem za postizanje

većeg prijenosa kisika u tekuću fazu. Takav problem se može očitovati u promjeni morfologije stanica, te smanjenju produktivnosti i rasta biomase (Garcia-Ochoa i sur., 2011).

Za uzgoj fotosintetskih mikroorganizama se također istražuju fotobioreaktori s miješalima. Takvi bioreaktori osiguravaju uspješnije hidrodinamičko miješanje od uobičajenih fotobioreaktora (Chang i sur., 2017; Singh i Sharma, 2012; Ogbonna i sur., 1999; Ogbonna i sur., 1996). Međutim veliki problem je još uvijek osigurati optimalni intenzitet, iskorištenje i prodiranje svjetla u bioreaktor. U Tablici 1. su usporedno prikazane karakteristike cijevnog fotobioreaktora i fotobioreaktora s miješalom.

**Tablica 1.** Usporedba karakteristika cijevnog fotobioreaktora i fotobioreaktora s miješalom (Zhu, 2015; Singh i Sharma, 2012; Garcia-Ochoa i sur., 2011; Ogbonna i sur., 1996)

<b>karakteristike</b>	<b>cijevni fotobioreaktor</b>	<b>fotobioreaktor s miješalom</b>
prijenos mase	srednji	visok
miješanje	aeracija	miješalo/aeracija
stres na stanice uzrokovan silama smicanja	slab	visok
utrošak energije	nizak	visok
potencijal za scale up	osrednji	visok
jednostavnost čišćenja	otežano	osrednje
$P_{osvjetljenje}/V$	visoki	niski
aeracija	zadovoljavajuća	zadovoljavajuća
kontrola parametara uzgoja	otežana	precizna
limitirajući faktor	svjetlost	svjetlost
mogućnost uzgoja nefotosintetskih vrsta	ne	da
cijena konstrukcije i održavanja	niska	srednja

#### 2.4.2. Usporedba uzgoja na svjetlu i u mraku

Aerobno u mraku, ljubičaste nesumporne bakterije rastu kao kemoheterotrofi staničnom respiracijom. Kada kisik postane limitirajući faktor, te se intenzitet svjetlosti pojača, ovi fakultativno fotosintetski mikroorganizmi počinju sintetizirati složeni sustav intracitoplazmatskih membrana za prikupljanje svjetlosti. Pri takvim se uvjetima njihov metabolizam mijenja u fotoheterotrofni (s organskim supstratima kao izvorima ugljika i elektrona) ili fotoautotrofni (s CO<sub>2</sub> i anorganskim elektron donorom poput vodika). Također, u anaerobnim uvjetima bez prisutstva svjetlosti mogu rasti anaerobnom respiracijom (Hädicke i sur., 2011).

U radu Keppen i sur. (2013) prikazano je da bakterija *Rhodobacter spheroides* ima 50% manji rast biomase u aerobnim uvjetima u mraku u odnosu na aerobni rast na svjetlu, dok je sinteza bakterioklorofila bila nešto veća u mraku nego na svjetlu. Slična situacija je i kod *Rhodobaca bogoriensis* gdje je koncentracija biomase za otprilike 25% manja u mraku pri aerobnim uvjetima od koncentracije biomase dobivene uz izvor svjetlosti, a koncentracija bakterioklorofila veća za oko 15% u mraku od one na svjetlu. U radu je prikazana i aktivnost enzima specifičnih za citratni ciklus, te je ustanovljeno da je enzima citratnog ciklusa više kada ne postoji izvor svjetlosti. Pri anaerobnim uvjetima na svjetlu, organske tvari se oksidiraju u citratnom ciklusu i služe kao izvori ugljika i kao donori elektrona za biosintetske puteve unutar stanice, a ATP se sintetizira fotofosforilacijom. Pri aerobnim uvjetima u mraku, citratni ciklus također ima bioenergetsku funkciju. ATP se u mraku pretežno dobiva preko oksidativne fosforilacije u respiratornom lancu prijenosa elektrona. Kao donori elektrona za respiratorni lanac se koriste NADH<sup>+</sup> molekule dobivene u citratnom ciklusu (Keppen i sur., 2013).

Provedeno je i određivanje apsorbancije kultura uzgajanih u mraku i na svjetlu te razlika u zabilježenim pikovima. Kultura koja je bila uzgajana anaerobno na svjetlu je sadržavala bakterioklorofil a s apsorpcijskim maksimumima 376, 590, 804, i 860nm, karotenoide i sferoidene s pikovima na 447 i 510 nm. Kultura koja je uzgajana aerobno na svjetlu i u mraku također ima karakteristične pikove bakterioklorofila pri 804 i 860 nm, međutim ne pokazuje pikove karotenoida. Time se pokazuje da je biosinteza karotenoida osjetljivija na promjenu uvjeta izvora svjetlosti (Lin i sur., 2014).



### 2.4.3. Usporedba anaerobnog i aerobnog načina uzgoja nesumpornih ljubičastih bakterija

Ljubičaste nesumporne bakterije imaju sposobnost rasta pri anaerobnim uvjetima na svjetlu ili u mraku ili mogu dobivati energiju za rast aerobnom respiracijom. Pri anaerobnim uvjetima na svjetlu posjeduju intracitoplazmatski membranski sustav koji sačinjava fotosintetski aparat i posjeduju strukturne komponente potrebne za prikupljanje svjetlosti, posljedični transport elektrona i transdukciju energije (Hui i sur., 2015; Roh i sur., 2004).

Pri aerobnim uvjetima, sinteza takvog sustava je inhibirana, a geni za sintezu bakterioklorofila su reprimirani prisutstvom kisika i svjetla (Keppen i sur., 2013). U radu Keppen i sur. (2013) je ustanovljeno da je koncentracija bakterioklorofila u anaerobnim uvjetima na svjetlu kod bakterije *Rhodobacter spheroides* otprilike 10 puta veća od koncentracije bakterioklorofila u aerobnim uvjetima na svjetlu, isti rezultati su dobiveni i s vrstom *Rhodobaca bogoriensis* gdje je također koncentracija bakterioklorofila bila veća 10 puta veća pri anaerobnim uvjetima. U istom radu je određivana i koncentracija biomase navedenih bakterija pri istim uvjetima, te je ustanovljeno da je i koncentracija za polovinu veća pri anaerobnim uvjetima kod *Rba. spheroides*, te za sedminu kod *Rba. bogoriensis*. Arai i sur. su 2008. godine, proučavajući promjenu u transkriptomu bakterije *Rhodobacter spheroides* prilikom tranzicije metabolizma s anaerobne fotosinteze na aerobnu respiraciju, dokazali da je ekspresija gena za sintezu organela fotosintetskog sustava i gena za sintezu bakterioklorofila i karotenoida istoga trena zaustavljena kada su stanice došle u doticaj s kisikom.

Jedna od evolucijskih prednosti koje su razvile ljubičaste nesumporne bakterije jest sinteza karotenoida u svrhu zaštite fotosintetskog aparata od utjecaja svjetlosti i kisika. Šlouf i sur. (2012) su tu karakteristiku istražili na bakteriji *Rhodobacter spheroides*, te su pokazali da se sinteza sferoidena, kao glavnog karotenoida, odvija u anaerobnim uvjetima, no u trenutku kada bakterija dođe u doticaj s kisikom, enzim sferoiden monooksigenaza katalizira reakciju ugradnje keto-skupine pritom formirajući sferoidenon. Učinak ove reakcije se očituje u povećanju konjugiranosti molekule karotenoida, pritom smanjujući energiju najnižeg stanja tripleta kako bi mogao efikasnije vezati slobodne radikale kisika – singleta kisika ( $^1\text{O}_2$ ) i/ili tripleta bakterioklorofila a.

***EKSPERIMENTALNI DIO***

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

Radni mikroorganizmi u ovom istraživanju su bile nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva.

##### 3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge

Za uzgoj nesumpornih ljubičastih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 korištene su kemijski definirane i kompleksne hranjive podloge (hidrolizati lignoceluloznih sirovina – sijena), dobivene tretmanom slabom kiselinom u visokotlačnom reaktoru pri 180°C uz vrijeme zadržavanja od 5 min. Za uzgoj inokuluma u tikvicama je korištena kemijski definirana hranjiva podloga. Sastav soli, faktora rasta te izvora dušika za kemijski definirane podloge prikazan je u Tablici 2. Izvori ugljika korišteni u ovom radu navedeni su u Tablici 3. Sastav poznatih sastojaka hranjive podloge dobivene predobradom sijena korištene tijekom uzgoja nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 prikazan je u Tablici 4. Predobrade lignoceluloznih sirovina i dobivanje hidrolizata su odrađeni u sklopu drugog rada, te se u ovom radu neće opisivati. Hidrolizati su dobiveni tijekom istraživanja na projektu "Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina" (HRZZ-9717) i korišteni su kao hranjiva podloga za istraživanje rasta i sinteze pigmenata tijekom uzgoja nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u bioreaktoru s miješalom pri aerobnim uvjetima u mraku.

**Tablica 2.** Sastav soli, faktora rasta te izvora dušika u kemijski definiranim hranjivim podlogama za uzgoj nesumpornih ljubičastih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340

kemikalija	kemijska formula	$\gamma$ [g L <sup>-1</sup> ]	čistoća	proizvođač
kvašćev ekstrakt	-	1,5	za upotrebu u biotehnologiji	Merck KGaA
natrijev glutamat	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub> Na	3	≥99%	Sigma
diamonijev fosfat	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4	≥99%	Zorka
diamonijev sulfat	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,8	≥99%	Zorka
kalijev dihidrogen fosfat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	≥99%	Kemika
dikalijev fosfat	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	≥98%	Kemika
magenzijev sulfat heptahidrat	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2	≥98%	Kemika
kalcijev klorid	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,053	≥99%	Kemika
manganov sulfat	MnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1,2 · 10 <sup>-3</sup>	≥99%	Kemika
tiamin klorid	-	10 <sup>-3</sup>	/	Sigma
nikotinska kiselina	-	10 <sup>-3</sup>	/	Sigma
cijanokobalamin	-	10 <sup>-6</sup>	/	Sigma
biotin	-	10 <sup>-5</sup>	/	Sigma

**Tablica 3.** Izvori ugljika u kemijski definiranim hranjivim podlogama za uzgoj nesumpornih ljubičastih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340

<i>Rhodobacter azotoformans</i> JCM 9340		<i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781		proizvođač (čistoća)
izvori ugljika	$\gamma$ [g L <sup>-1</sup> ]	izvori ugljika	$\gamma$ [g L <sup>-1</sup> ]	
malat(inokulum)	5	malat(inokulum)	5	Acros Organics (≥99%)
glukoza	15	glukoza	15	Sigma (≥99%)
ksiloza	15	ksiloza	15	Sigma (≥99%)
		glukoza+ksiloza	10+10	Sigma (≥99%)

**Tablica 4.** Sastav hranjive podloge koja je sadržavala hidrolizat slame nakon kiselnog pretretmana za uzgoj nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

tvar	$\gamma$ [g L <sup>-1</sup> ]
kvaščev ekstrakt	1,5
glukoza	2,91
ksiloza	8,12
arabinoza	0,865

Ostale kemikalije uporabljene u izradi eksperimentalnog dijela:

Aceton (Kemika, 99,5%), etanol (GRAM-MOL d.o.o., 96%), natrijev hidroksid (T.T.T. d.o.o., 98%)

### 3.1.3. Uređaji i pribor

#### 3.1.3.1. Bioreaktor s miješalom

Za proces šaržnog uzgoja nesumpornih ljubičastih bakterija korišten je laboratorijski bioreaktor s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Njemačka) izrađen od nehrđajućeg čelika ukupnog volumena 30 L. Maksimalna brzina rotacije miješala je 3000 min<sup>-1</sup>. Miješalo pokreće elektromotor snage 0,9 kW. Miješalo se sastoji od tri turbine koje se mogu postaviti na različite udaljenosti od podnice reaktora. Svaka turbina ima po 6 ravnih lopatica. Bioreaktor je opremljen kontrolnom jedinicom s ugrađenim sustavom za mjerenje i praćenje osnovnih parametara procesa: temperatura, pH, brzina okretaja miješala, te parcijalni tlak kisika u reaktoru. Hranjiva podloga se sterilizira zajedno s bioreaktorom pomoću indirektno vodene pare preko dvostrukog plašta. Bioreaktor ima izlaz za izuzimanje uzoraka koji se može sterilizirati parom, kao i *in situ* sterilizabilan izlaz za pražnjenje reaktora (Kostelac, 2016). Na Slici 4. je prikazan bioreaktor s miješalom Biostat Cplus koji se koristio za sve provedene uzgoje bakterija.



**Slika 4.** Bioreaktor s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Njemačka)

### *3.1.3.2. Spektrofotometar*

Spektrofotometar Cary 100, UV-VIS; Agilent Technologies je korišten tijekom ovog istraživanja za određivanje apsorbancije uzoraka izdvojenih tijekom šaržnog uzgoja bakterija u laboratorijskom bioreaktoru. Izuzete suspenzije su homogenizirane i prebačene u staklene kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka). Optička gustoća 0. razrjeđenja suspenzije bakterijske biomase određena je pri valnoj duljini ( $\lambda$ ) od 660 nm. Pomoću spektrofotometra su snimani i apsorpcijski spektri ekstrahiranih pigmenata tijekom uzgoja u rasponu valnih duljina od 450 do 900 nm. Tijekom određivanja apsorpcijskog spektra ekstrahiranih pigmenata koristile su se kvarcne kivete (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) promjera 10 mm.

### *3.1.3.3. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC)*

Određivanje koncentracije supstrata u uzorcima provedeno je na tekućinskom kromatografu ultra djelotvornosti UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II (Santa Clara, SAD)

sustavom. UPLC uređaj je opremljen: crpkom (G7104A 1290 Flexible Pump) i otplinjačem, injektorom (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnicom, analitičkom kolonom (Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup>, Phenomenex) dimenzija 150×7,8 mm s odgovarajućim pretkOLONAMA, detektorom indeksa loma (G7162A 1260 RID), modulom za kontrolu sustava (SCL-10Avp) i računalnim programom 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 mL min<sup>-1</sup>.

#### *3.1.3.4. Centrifuga*

Bakterijska biomasa je iz suspenzije izdvajana pomoću centrifuge Harrier 18/80, Sanyo (Velika Britanija) pri broju okretaja od 8000 o min<sup>-1</sup> tijekom 10 min, a za pripremu uzoraka za UPLC, odnosno za izdvajanje istaloženih proteina iz supernatanta, korištena je centrifuga Beckman, Model J-21B pri broju okretaja od 10000 o min<sup>-1</sup> tijekom 15 min.

#### *3.1.3.5. Ostali uređaji i oprema*

- analitička vaga „Shimadzu“, AX-200 W/O AC ECTA (Shimadzu, Kyoto, Japan)
- tehnička vaga „Tehtnica“ ET-1211 (Železniki d.o.o., Železniki, Slovenija)
- autoklav („Sutjeska“, Beograd, Jugoslavija)
- sušionik „Instrumentaria“ ST-50 (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- staklena sisaljka na vodeni mlaz s gumenim vakuum crijevom
- stakleno i plastično posuđe, plamenici, vorteks miješalica, hladnjaci i zamrzivač za čuvanje uzoraka na temperaturi -20°C

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Priprema inokuluma za uzgoj bakterija u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom

Za uzgoj inokuluma bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 koristila se kemijski definirana podloga s malatom kao izvorom ugljika. Uzgoj inokuluma se provodio u tikvicama s brušenim čepom. Ukupni volumen inokuluma je iznosio 0,6 L. Podloga se pripremala tako da je dodana izračunata masa svakog pojedinog sastojka iz Tablice 2., malat kao izvor ugljika u koncentraciji od 5 g L<sup>-1</sup>, a natrijev glutamat kao izvor dušika u koncentraciji 3 g L<sup>-1</sup>, te se dopunilo demineraliziranom vodom. Takva pripremljena podloga se neutralizirala dodatkom 3 M otopine natrijevog hidroksida do pH 6,8 – 7. Podloga se zatim sterilizira u autoklavu 20 minuta tijekom 121°C, te se poslije sterilizacije preko filtera u podlogu dodaje 1 mL otopine vitamina i 1 mL otopine elemenata u tragovima. Biomasa nesumpornih ljubičastih bakterija se uzgajala tijekom 7 dana pri 28°C i 2000 lux.

### 3.2.2. Priprema kemijski definiranih hranjivih podloga za šaržni uzgoj bakterija u laboratorijskom bioreaktoru

Kemijski definirane hranjive podloge za uzgoj u bioreaktoru s miješalom su se pripremale tako da se u volumenu od 4 L demineralizirane vode pomiješa odvagana masa sastojaka navedenih u Tablici 2., te se dodaju odgovarajući izvori ugljika i dušika. Prvi uzgoj u bioreaktoru se provodio s *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 uz glukozu kao izvor ugljika u koncentraciji 15 g L<sup>-1</sup>, drugi uzgoj je proveden uz iste uvjete, no uz ksilozu kao izvor ugljika, također u koncentraciji 15 g L<sup>-1</sup>. Kod trećeg uzgoja s istom bakterijom istraživana je utjecaj prisutnosti dvije vrste izvora ugljika, glukoze i ksiloze, u istim koncentracijama – 10 g L<sup>-1</sup>. Kod prva dva uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na glukozu i ksilozi zasebno koristio se natrijev glutamat kao izvor dušika u koncentraciji 3 g L<sup>-1</sup>, a tijekom uzgoja na dva izvora ugljika – glukozu i ksilozi, koristio se diamonijev fosfat kao izvor dušika u koncentraciji 4 g L<sup>-1</sup>.

Uzgoj nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 provodio se dva puta na kemijski definiranim. Sastav hranjivih podloga je bio isti, naveden u Tablici 2., s glukozom kao izvorom ugljika u koncentraciji 15 g L<sup>-1</sup> u prvom uzgoju, te ksilozom u istoj



koncentraciji od 15 g L<sup>-1</sup> tijekom drugog uzgoja. Kao izvor dušika koristio se natrijev glutamat u koncentraciji 3 g L<sup>-1</sup>. Nakon miješanja svih sastojaka iz Tablice 2., pripremljene podloge su se neutralizirale dodatkom natrijevog hidroksida do pH 6,8 - 7. Hranjiva podloga se prije svakog uzgoja sterilizirala u bioreaktoru indirektno vodenom parom pri 121°C / 20min preko dvostrukog plašta jedan dan prije provođenja uzgoja. Prije inokuliranja hranjive podloge dodano je 100 mL otopine vitamina i elemenata u tragovima.

### 3.2.3. Priprema kompleksne hranjive podloge za šaržni uzgoj *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u laboratorijskom bioreaktoru

U sklopu istraživanja na projektu "Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina " (HRZZ-9717) provodila se predobrada sijena slabom kiselinom (0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) u visokotlačnom reaktoru pri 180°C uz vrijeme zadržavanja 5 min. Volumen tako dobivene kompleksne podloge je bio 4,2 L, te je u ovom istraživanju korištena za uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u bioreaktoru s miješalom. Prethodno je potrebno provesti adsorpciju aktivnim ugljenom. Adsorpcijom će se izdvojiti tvari koje uzrokuju zamućenje podloge ali i inhibitorski spojevi, kao što su furfurali, hidroksimetil furfurali, te aromatski spojevi, koji bi mogli utjecati na kinetiku rasta testiranog soja ljubičaste nesumporne bakterije.

Tretman aktivnim ugljenom se provodi tako da se u određeni volumen podloge doda 20 g L<sup>-1</sup> aktivnog ugljena i miješa na magnetnoj miješalici sat vremena kako bi se osigurala maksimalna kontaktna površina između aktivnog ugljena i tvari hranjive podloge. Nakon toga se otopina filtrira pomoću vakuum filtracije. Uslijed zaostatka zamućenja u podlozi, podloga se centrifugirala kako bi se postiglo maksimalno izbistrenje (8000 o/min, 15 min). Nakon odvajanja supernatanta, dobiveni volumen podloge je bio nešto manji od 4 L te se nadopunio do 4 L demineraliziranom vodom. U takvu podlogu su dodane preostale tvari iz Tablice 4., te je podlogom napunjen reaktor.

### 3.2.4. Šaržni uzgoj bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u bioreaktoru s miješalom i nadzor procesa

#### 3.2.4.1. Uzgoj bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340

Za uzgoj bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 korištene su kemijski definirane podloge čiji su sastavi prikazani u Tablicama 2. i 3., te su se podloge pripremale na način opisan u potpoglavlju 3.2.2. Korisni volumen bioreaktora je bio 4 L za oba uzgoja bakterije. Prije samog uzgoja hranjiva podloga se sterilizirala indirektno u bioreaktoru na 121°C tijekom 20 minuta. Nakon hlađenja podloge na radnu temperaturu od 28°C bioreaktor je inokuliran s 15% (vol/vol) bakterijske kulture. Kao izvor ugljika u prvom uzgoju je korištena glukoza, a za drugi uzgoj ksiloza. Uzgoj se provodio u aerobnim uvjetima, te se aeracija vršila tako da je zasićenje hranjive podloge kisikom ( $pO_2$ ) iznosilo 75 – 95%.

pH hranjive podloge tijekom uzgoja je bio 7 ( $\pm 0,05$ ), a moguće oscilacije u pH vrijednosti su korigirane s 3 M NaOH i 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tijekom šaržnog uzgoja bakterija uzorkovalo se svakih sat vremena za određivanje koncentracije biomase i supstrata, te svaka dva sata za određivanje količine sintetiziranih pigmenata. Ukupno vrijeme trajanja svakog uzgoja je bilo 12 sati.

Svaki uzorak volumena 10 mL se analizirao spektrofotometrijski odmah nakon izuzimanja, te se svakih dva sata spektrofotometrijski određivala količina prisutnih pigmenata nakon ekstrakcije.

#### 3.2.4.2. Uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 se provodio četiri puta, tri puta na kemijski definiranim podlogama i zadnji, četvrti, uzgoj na kompleksnoj hranjivoj podlozi dobivenoj kiselinskom hidrolizom sijena. Sastavi podloga su prikazani u Tablicama 2., 3. i 4., te su se kemijski definirane podloge pripremale postupkom opisanim u potpoglavlju 3.2.2., dok se kompleksna podloga za uzgoj pripremila na način opisan u potpoglavlju 3.2.3. Kao i kod uzgoja bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 hranjiva podloga je sterilizirana u bioreaktoru indirektno vodenom parom pri 121°C tijekom 20 minuta. Radni volumen bioreaktora je bio 4 L za svaki uzgoj. Nakon hlađenja podloge na 28°C bioreaktor je inokuliran s 15 % v/v bakterijske

kulture prethodno uzgojene u Erlenmayerovim tikvicama pri 28°C i intenzitetom svjetlosti od 2000 lux.

Uzgoj se provodio u aerobnim uvjetima, te se aeracija vršila tako da je zasićenje hranjive podloge kisikom ( $pO_2$ ) iznosilo 75 – 95%. Tijekom uzgoja bakterija, pH je bio 7 ( $\pm 0,05$ ), te je održavan na toj vrijednosti pomoću 3 M NaOH i 3 M  $H_2SO_4$ . Tijekom šaržnog uzgoja je praćen procesom uzorkovanja svakih sat vremena za određivanje koncentracije biomase i supstrata, te svaka dva sata za određivanje količine sintetiziranih pigmenata. Svaki uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 je trajao 24 h. Volumeni uzoraka su bili 10 mL. Koncentracija biomase je određivana spektrofotometrijski i gravimetrijski, a količina pigmenata se određivala spektrofotometrijski nakon ekstrakcije.

### 3.2.5. Analitičke metode

Tijekom uzgoja bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 u bioreaktoru s miješalom praćeni su ovi pokazatelji rasta: optička gustoća hranjive podloge, gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase bakterija, UPLC određivanje koncentracije izvora ugljika, spektrofotometrijsko određivanje količine pigmenata u apsorpcijskom spektru od 450 do 900 nm.

#### 3.2.5.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka izuzetih tijekom šaržnog uzgoja bakterije

Optička gustoća uzoraka se određivala mjereći apsorbanciju homogeniziranog uzorka izuzetog svakih sat vremena pomoću spektrofotometra pri 660 nm u staklenoj kiveti. Također se napravio tzv „scan“ uzorka u području od 450 do 900 nm, radi određivanja apsorpcijskih minimuma i maksimuma za biomasu i pigmente ljubičastih nesumpornih bakterija.

#### 3.2.5.2. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase bakterija

U prethodno osušene i izvagane kivete za centrifugiranje otpipetirano je 10 mL uzetog uzorka, a zatim se uzorak centrifugira 10 minuta tijekom  $8000 \text{ min}^{-1}$ . Supernatant se odvoji od

taloga, te se talog bakterijske biomase suši u sušioniku na 75°C do konstantne mase. Ohlađene kivete vagane su na analitičkoj vagi. Koncentracija suhe tvari biomase se računa prema ovoj jednadžbi:

$$X = \frac{m_{ok} - m_{pk}}{V_{UZ}} \quad [\text{g L}^{-1}]$$

$m_{ok}$  - masa osušene kivete s biomasom,

$m_{pk}$  - masa prazne suhe kivete,

$V_{uz}$  - volumen uzorka

### 3.2.5.3. UPLC određivanje koncentracije izvora ugljika u hranjivoj podlozi

UPLC metodom analizirani su uzorci izuzimani tijekom procesa uzgoja nesumpornih ljubičastih bakterija u bioreaktoru s miješalom. Prethodno pripremanju uzorka za UPLC, bilo je potrebno uzorke još jednom centrifugirati pri 8000 min<sup>-1</sup> tijekom 10 minuta kako nebi došlo do pojave naknadnog zamućenja. Nakon toga, supernatant je u omjeru 1:1 (vol/vol) pomiješan s 10 % - tnom otopinom ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O kako bi se istaložili proteini. Taloženje se provodilo 10 minuta, a zatim su se istaloženi proteini uklonili ponovnim centrifugiranjem na 10000 min<sup>-1</sup>/ 15 min. Na kraju je supernatant filtriran u staklenu vijalu kroz filter za šprice veličine pora 0,20 μm (Sartorius), te su pripremljeni uzorci podvrgnuti UPLC analizi. Kao mobilna faza tijekom analize korištena je otopina sumporne kiseline u vodi (0,0025 M) s protokom 0,6 mL min<sup>-1</sup>, temperatura pećnice je iznosila 60°C, a temperatura RID detektora 40°C, tlak u koloni 40 bara, a injektirano je po 10 μL uzorka uz brzinu protoka mobilne faze od 0,6 mL min<sup>-1</sup>. U Prilogu 7.1. nalaze se jednadžbe baždarnih dijagrama preko kojih su izračunate koncentracije šećera u analiziranim uzorcima.

### 3.2.5.4. Ekstrakcija ukupnih pigmenata i određivanje bakterioklorofila a

Za određivanje koncentracije sintetiziranih pigmenata, svaka dva sata je izuziman uzorak od 10 mL, te je centrifugiran 15 min pri 8000 min<sup>-1</sup>, a supernatant je izdvojen. Za ekstrakciju pigmenata je korištena smjesa otapala, acetona i etanola u omjeru 7:2 (vol/vol) koja je dodana u istaloženu bakterijsku biomasu nakon izdvajanja supernatanta. Zatim je dodano 4 g staklenih

kuglica koje će povećati slobodnu površinu biomase, te se uzorak podvrgava intenzivnom mješanju 2 min nakon čega se uzorak hladi u ledu pri 0°C 2 min. Ovaj postupak intenzivnog mješanja 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<sup>-1</sup>, oko 4 mL supernatanta se stavi u kvarcnu kivetu te se skenira u području od 450 do 900 nm za određivanje maksimuma i minimuma apsorbancije ekstrahiranih pigmenata.

Koncentracija bakterioklorofila se računala po sljedećoj formuli za ekstrakcije primjenom smjese otapala etanol/acetone prema Ritchie, (2018):

$$P = 0,348209 \times (A_{648} - A_{850}) - 0,16583 \times (A_{665} - A_{850}) + 12,11114 \times (A_{775} - A_{850}) \quad [\text{mg L}^{-1}]$$

### 3.2.6. Određivanje specifične potrošnje kisika bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340

Tijekom uzgajanja bakterija u bioreaktoru s miješalom provodilo se i određivanje specifične brzine potrošnje kisika (q) tijekom petog i desetog sata uzgoja. Određivanje se provodilo direktnom metodom gdje se u reaktoru prekinula dobava zraka, te se zapisivala vrijednost postotka zasićenja podloge kisikom svakih 5 sekundi. Za vrijeme prekida aeracije koncentracija otopljenog kisika ne smije pasti ispod kritične vrijednosti jer tada specifična brzina respiracije (q) prestaje biti konstantna. Vrijednost specifične potrošnje kisika opisuje jednadžba kojom se izražava promjena koncentracije otopljenog kisika tijekom mikrobnog procesa:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a \cdot (C_S - C_L) - q \cdot X$$

t – vrijeme

C<sub>L</sub> – koncentracija otopljenog kisika u podlozi (mol ili g O<sub>2</sub> m<sup>-3</sup>)

C<sub>S</sub> – koncentracija zasićenja podloge kisikom (mol ili g O<sub>2</sub> m<sup>-3</sup>)

q – specifična brzina potrošnje kisika (mol ili g O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> biomase)

X – koncentracija biomase (g L<sup>-1</sup>)

Prvi član u jednadžbi opisuje dobavu (prijenos) kisika iz zraka u podlogu, a drugi potrošnju kisika koju provode mikrobne stanice. Potrošnja kisika u sustavu ( $-qX$ ) se može smatrati konstantnom tijekom prekida aeracije, te dobivamo linearnu ovisnost na grafu. Iz jednadžbe tog dobivenog pravca prema jednadžbi:  $\frac{dC_L}{dt} = -q \cdot X$  određujemo  $q$  prema vrijednosti koncentracije biomase u tom satu uzgoja.

### 3.2.7. Pokazatelji uspješnosti uzgoja bakterija

Prinos biomase ( $Y_x$ ) predstavlja razliku koncentracije biomase na kraju uzgoja i koncentracije biomase na početku uzgoja:

$$Y_x = X - X_0 \quad [\text{g L}^{-1}]$$

Potrošnja supstrata ( $\Delta S$ ) predstavlja razliku početne koncentracije supstrata i koncentracije supstrata na kraju uzgoja:

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

Koeficijent  $Y_{X/S}$  predstavlja masu prirasle biomase tijekom uzgoja mikroorganizma po masi utrošenog supstrata, a izračunava se prema ovoj ovisnosti:

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

gdje je  $X$  - koncentracija suhe tvari biomase na kraju uzgoja,  $X_0$  - koncentracija suhe tvari biomase na početku uzgoja,  $S$  - koncentracija supstrata na kraju uzgoja i  $S_0$  - koncentracija supstrata na početku uzgoja.

Produktivnost uzgoja bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 predstavlja vrijednost koncentracija suhe tvari prirasle bakterijske biomase u jedinici vremena, a izračunava se prema ovoj jednadžbi:

$$Pr = \frac{X - X_0}{t_u} \quad [\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}]$$

gdje je  $t_u$  – vrijeme trajanja uzgoja.

***REZULTATI I RASPRAVA***

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju su prikazani i opisani rezultati šaržnog uzgoja nesumpornih ljubičastih bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranim i kemijski kompleksnim hranjivim podlogama s različitim izvorima ugljika. Uzgojem na kemijski definiranim podlogama htjela se ispitati kinetika rasta i potrošnja supstrata kako bi se uvidjela potencijalna mogućnost uzgoja na obrađenim lignoceluloznim sirovinama – kompleksnoj podlozi koja od ugljikohidrata većinski sadrži glukozu i ksilozu. Ispitivao se i potencijal bakterija za sintezu pigmenata tijekom šaržnog uzgoja pri aerobnim uvjetima bez izvora svjetlosti, te sposobnost stanične respiracije određujući specifičnu brzinu potrošnje kisika.

U prvom potpoglavljju 4.1. se ispitivao rast nesumpornih ljubičastih bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na glukozu kao izvoru ugljika. U ovom poglavlju će se uvidjeti aspekti uzgoja u uvjetima prisutstva jedne vrste ugljikohidrata, bez izvora svjetlosti i u prisutnosti kisika kao krajnjeg akceptora elektrona.

Potom se u drugom potpoglavljju 4.2. ispitivao rast navedenih bakterija na ksilozi kao izvoru ugljika. Uslijed slabijeg rasta *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 na glukozu i ksilozi kao zasebnim izvorima ugljika, na dalje se ispitivao samo rast *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 uz prisutnost dvije vrste supstrata, glukoze i ksiloze, te je taj uzgoj opisan u potpoglavljju 4.3.

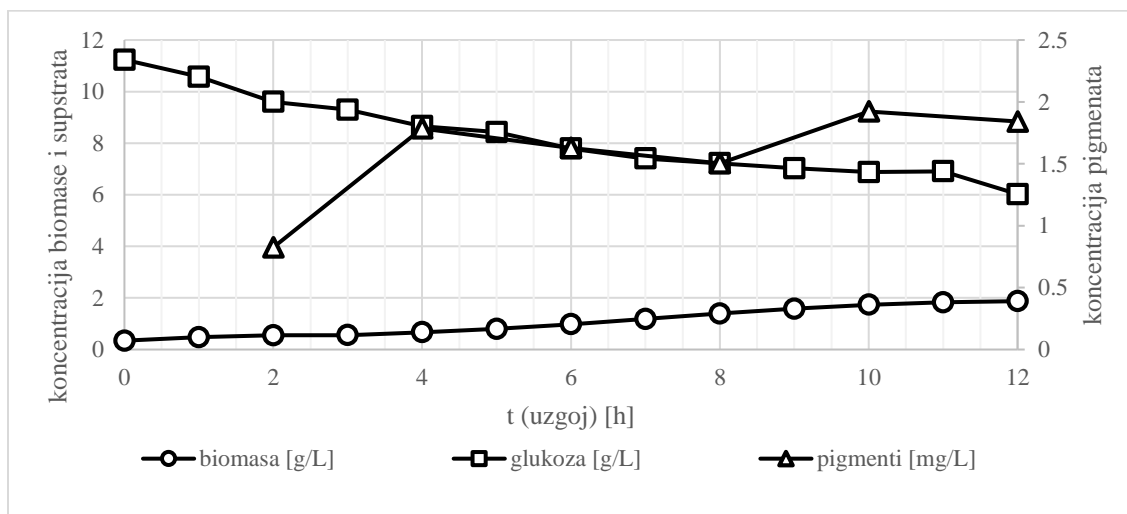
U konačnici se proveo i uzgoj nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u kompleksnoj podlozi dobivenoj kiselinskom predobradom sijena koji je također opisan u potpoglavljju 4.3. Time se htio ispitati rast i sinteza pigmenata ovog soja uz izvore ugljika koji potječu iz hidrolizirane lignocelulozne sirovine. Sposobnost ove bakterije da raste u podlogama koje su dobivene predobradom lignoceluloznih sirovina pruža razne mogućnosti za provođenje ekološki i ekonomski isplativijih bioprocasa s nesumpornim ljubičastim bakterijama, te sama primjena tih bakterija u biorafinerijama i postrojenjima koja koriste lignoceluloznu biomasu za proizvodnju raznih komercijalno vrijednih proizvoda.



#### 4.1. Uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u bioreaktoru s miješalom na podlogama s glukozom kao izvorom ugljika aerobno u mraku

U ovom poglavlju bit će opisani rezultati dva uzgoja, šaržni uzgoj bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 na glukozu kao izvoru ugljika, te uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na glukozu. Usporedit će se rast tih dvaju mikroorganizama, potrošnja supstrata, potrošnja kisika, te sinteza pigmenta, čime će se uvidjeti njihova sposobnost prilagodbe uvjetima u bioreaktoru. Procesni parametri oba uzgoja su isti, temperatura je 28°C, pH = 7, protok zraka je iznosio 2,5 L min<sup>-1</sup>, a brzina okretaja miješala 450 min<sup>-1</sup>.

Ovim eksperimentom je ispitivana kinetika rasta i potrošnje supstrata bakterija uz glukozu kao jedini izvor ugljika u podlozi u prisutnosti kisika bez izvora svjetlosti, čime bi se njihov metabolizam u ovom slučaju okarakterizirao kao kemoheterotrofni, odnosno bakterije energiju dobivaju staničnom respiracijom (Hädicke i sur., 2011). Ukupno vrijeme trajanja uzgoja je bilo 24 sata kod bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, dok je uzgoj *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 trajao 12 h. Uzorci su se uzimali tijekom prvih 12 sati svakih sat vremena, te sljedeći dan se zadnji put uzorkovalo na kraju 24. sata uzgoja.



**Slika 5.** Potrošnja supstrata (□), promjena koncentracije biomase (○) i promjena koncentracije pigmenta (Δ) bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 tijekom uzgoja na glukozu

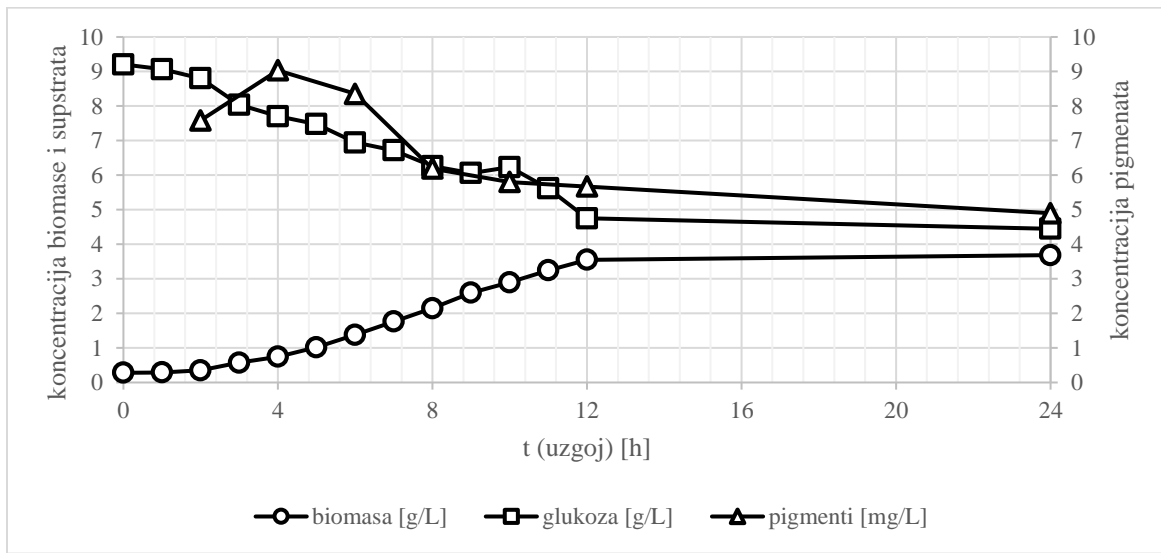
Tijek uzgoja bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 je vidljiv na Slici 5. gdje su prikazane vrijednosti potrošnje supstrata, promjena masene koncentracije biomase i promjena masene koncentracije pigmenata tijekom 12 sati uzgoja. Prirast biomase bakterije je u 12 sati uzgoja iznosio  $1,531 \text{ g L}^{-1}$ . Ukupna potrošnja glukoze tijekom 12 sati uzgoja je iznosila  $5,210 \text{ g L}^{-1}$ . Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila u zadnjem satu uzgoja, te je iznosila  $0,884 \text{ g L}^{-1}$ , dok je maksimalna specifična brzina rasta biomase bila između 3. i 11. sata uzgoja i iznosi  $0,143 \text{ h}^{-1}$ . Produktivnost šaržnog uzgoja bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 iznosi  $0,128 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Svi navedeni pokazatelji uspješnosti se mogu vidjeti i u Tablici 5.

Proces uzgoja bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 je morao biti prekinut nakon 12 sati uslijed intenzivnog pjenjenja podloge, te se nije mogao provesti do 24. sata uzgoja. Jedan od razloga pjenjenja podloge su egzopolisaharidi koje izlučuju ljubičaste bakterije kao površinske adhezine uslijed prilagodbe na različite uvjete okoline. Takve površinski aktivne tvari im omogućuju lakše vezanje na biotičke i abiotičke tvari, odnosno lakšu međusobnu adheziju stanica kulture i formaciju biofilma (Fritts i sur., 2017). Uz površinske adhezine koje izlučuju ove bakterije, pjenjenju je doprinjela i sama aeracija, miješanje, te izlučivanje staničnih proteina uslijed autolize stanica.

Pjenjenje uzrokuje smanjenje radnog volumena bioreaktora, izuzimanje stanica i metabolita iz hranjive podloge, kontaminacije, te smanjenje prijenosa kisika iz plinovite u tekuću fazu. Također se može dogoditi šteta na procesnoj opremi uslijed začepljenja cjevovoda, filtera, ventila, te oštećenja miješala (Delvigne i Lecomte, 2010).

Za vrijeme uzgoja bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 određivane su i apsorbancije pigmenata u svakom parnom satu uzgoja koje su prikazane na Slici 8. Određivana je apsorbancija cijele podloge kako bi se iz podataka za apsorbanciju pri 660 nm mogla izračunati koncentracija biomase u uzorcima te posljedično za izračunavanje koncentracija bakterioklorofila a prema formuli u poglavlju 3.2.5.4. Ekstrakcija ukupnih pigmenata i određivanje bakterioklorofila a. Određivanjem koncentracije pigmenata, odnosno bakterioklorofila a se htjela uvidjeti sposobnost adaptacije ovih bakterija datim uvjetima. S obzirom na činjenicu da je u mnogim radovima dokazana inhibicija sinteze fotosintetskih membrana tijekom aerobnog uzgoja u mraku, očekivao se sličan ishod i u ovom slučaju (Hui i sur., 2015; Zeiger i Grammel, 2010; Roh i sur., 2004). Koncentracija bakterioklorofila a je u našem slučaju korištena i kao indikacija koncentracije

ukupnih pigmenata, ali i kao indirektni pokazatelj koncentracije živih nesumpornih ljubičastih bakterija. Kao što se može vidjeti na Slici 5., koncentracija pigmenata u stanicama biomase bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 varira tijekom uzgoja, a maksimalna određena koncentracija je u desetom satu, te iznosi 1,92 mg/L.



**Slika 6.** Potrošnja supstrata ( $\square$ ), promjena koncentracije biomase ( $\circ$ ) i promjena koncentracije pigmenata ( $\Delta$ ) bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja na glukozi

Kod šaržnog uzgoja nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, prikazanog na Slici 6., u 24 sata došlo je do potrošnje  $4,757 \text{ g L}^{-1}$  glukoze. Prinos biomase je iznosio  $3,405 \text{ g L}^{-1}$ , što je dvostruko veće od prirasta biomase bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340. Međutim, u obzir se mora uzeti i činjenica da je uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 trajao dvostruko duže. Koeficijent konverzije supstrata u biomasu  $0,716 \text{ g g}^{-1}$ . Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila između 11. i 12. sata uzgoja, te je iznosila  $0,86 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Nakon drugog sata uzgoja koncentracija biomase linearno raste sve do 12. sata, te je u tom periodu uzgoja vrijednost specifične brzine rasta bakterije  $0,231 \text{ h}^{-1}$ . Time se može zaključiti da je stacionarna faza otprilike trajala do 2. sata uzgoja, jer je bilo potrebno određeno vrijeme prilagodbe na uvjete u bioreaktoru. Produktivnost uzgoja u prvih 12 sati je iznosila  $0,273 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , što je dvostruko više od produktivnosti bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340, a

produktivnost cjelokupnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 je 0,142 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Svi navedeni pokazatelji uspješnosti su prikazani u Tablici 5.

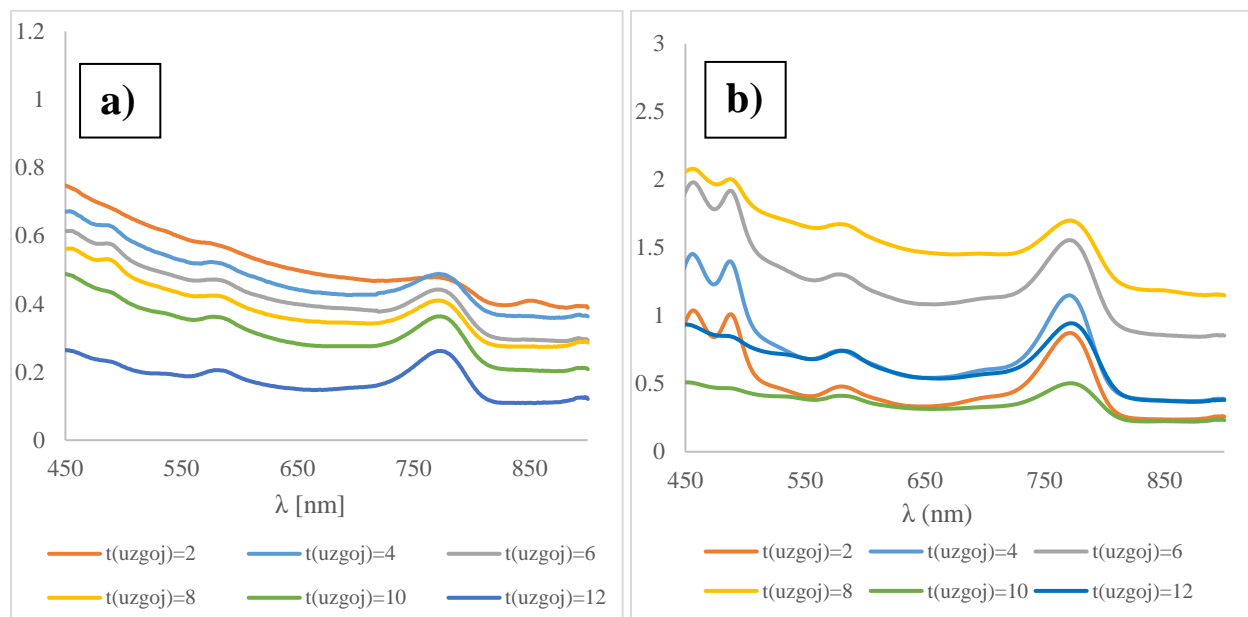
**Tablica 5.** Pokazatelji uspješnosti procesa šaržnog uzgoja bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 u bioreaktoru s miješalom na glukozu kao izvoru ugljika

vrsta bakterije	$Y_x$ [g L <sup>-1</sup> ]	$\Delta S$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_{x/s}$ [g g <sup>-1</sup> ]	$Pr_{12}$ [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$Pr_{24}$ [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
<b><i>Rhodobacter azotoformans</i> JCM 9340</b>	1,531	5,210	0,294	0,128	-
<b><i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781</b>	3,405	4,757	0,716	0,273	0,142

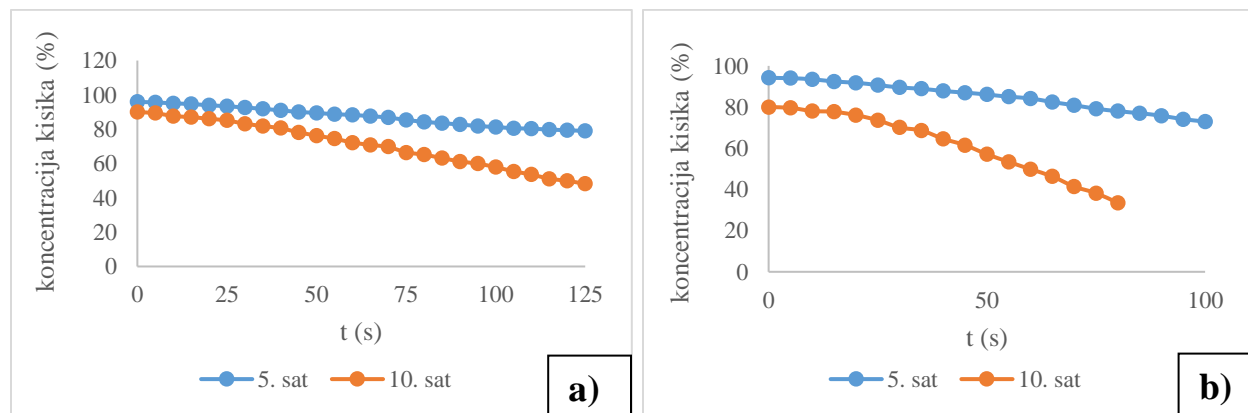
Što se tiče koncentracije pigmenata kod uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, situacija je nešto drugačija s obzirom na uzgoj *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340, te je na Slici 6. vidljiv pad nakon 4. sata uzgoja. Ovakav ishod situacije bi se mogao objasniti prisutstvom kisika koji regulira sintezu fotosintetskih pigmenata. Kod većine nesumpornih ljubičastih bakterija dolazi do represije gena za sintezu fotosintetskog aparata u prisutnosti kisika, ova značajka je stečena evolucijski kako bi se spriječio nastanak toksičnog oblika bakterioklorofila i kisika u uvjetima svjetla (Keppen i sur., 2013). U četvrtom satu uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 je izmjerena maksimalna koncentracija pigmenata, te iznosi 9,03 mg L<sup>-1</sup>, a u nastavku uzgoja koncentracija pada. Pad koncentracije pigmenata bi se moglo objasniti odumiranjem stanica biomase pri čemu dolazi do razgradnje pigmenata.

Na Slici 7. pod b) je prikazano spektrofotometrijsko određivanje pigmenata nakon ekstrakcije opisane u poglavlju 3.2.5.4. Određivanje se provodilo svaka dva sata uzgoja, te se mjerila apsorbancija u rasponu valnih duljina od 450 do 900 nm. Pod a) je prikazana ovisnost apsorbancije biomase *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 o valnoj duljini, te se može uočiti karakterističan pik pri 770 nm koji prema literaturnim navodima (Ritchie, 2018; Lin i sur., 2014) odgovara bakterioklorofilu a. Na Slici 7. pod b) su prikazane i vrijednosti apsorbancije u ovisnosti

o valnoj duljini za bakteriju *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, te se i tu u svakom uzorku očituju apsorpcijski maksimumi bakterioklorofila a pri 770 nm.



**Slika 7.** Spektrofotometrijsko određivanje apsorpcije sintetiziranih pigmenata na glukozi kod **a)** *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340, **b)** *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781



**Slika 8.** Prikaz potrošnje kisika u 5. i 10. satu uzgoja bakterije: **a)** *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i **b)** *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na glukozi

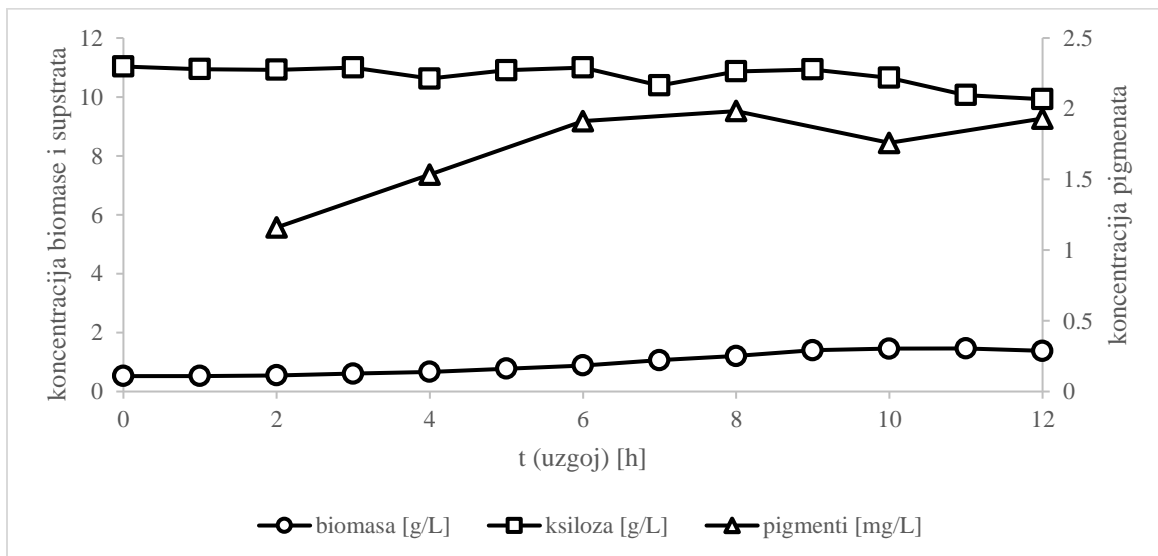
Tijekom uzgoja bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 se u 5. i 10. satu uzgoja određivala specifična brzina potrošnje kisika metodom opisanom u potpoglavlju 3.2.6., te su rezultati prikazani na Slici 8. Kod bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 izračunata vrijednost specifične brzine potrošnje kisika ( $q$ ) u 5. satu iznosi 0,191 mg O<sub>2</sub>/g biomase, a u 10. satu iznosi 0,217 mg O<sub>2</sub>/g biomase. Iako se biomasa u 5 sati uzgoja između dva određivanja dvostruko povećala, sposobnost respiracije je porasla za 14%.

Za bakteriju *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 vrijednosti specifične brzine potrošnje kisika su nešto veće u odnosu na bakteriju *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 uslijed većeg prirasta biomase. U 5. satu uzgoja vrijednost  $q$  iznosi 0,241 mg O<sub>2</sub>/g biomase, a u 10. satu uzgoja 0,288 mg O<sub>2</sub>/g biomase, što je otprilike 20% veća vrijednost. Prirast koncentracije biomase bakterije u tih 5 sati je iznosila 1,881 g L<sup>-1</sup>, odnosno koncentracija biomase se u tih 5 sati dvostruko povećala.

#### 4.2. Uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u bioreaktoru s miješalom na podlogama s ksilozom kao izvorom ugljika aerobno u mraku

U drugom dijelu eksperimenta se ispitivao rast bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na ksilozi kao jedinom izvoru ugljika u podlozi. Ksilozu predstavlja ugljikohidrat koji je jedan od najzastupljenijih u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina, te zajedno s glukozom čini većinski udio fermentabilnih šećera za uzgoj mikroorganizama.

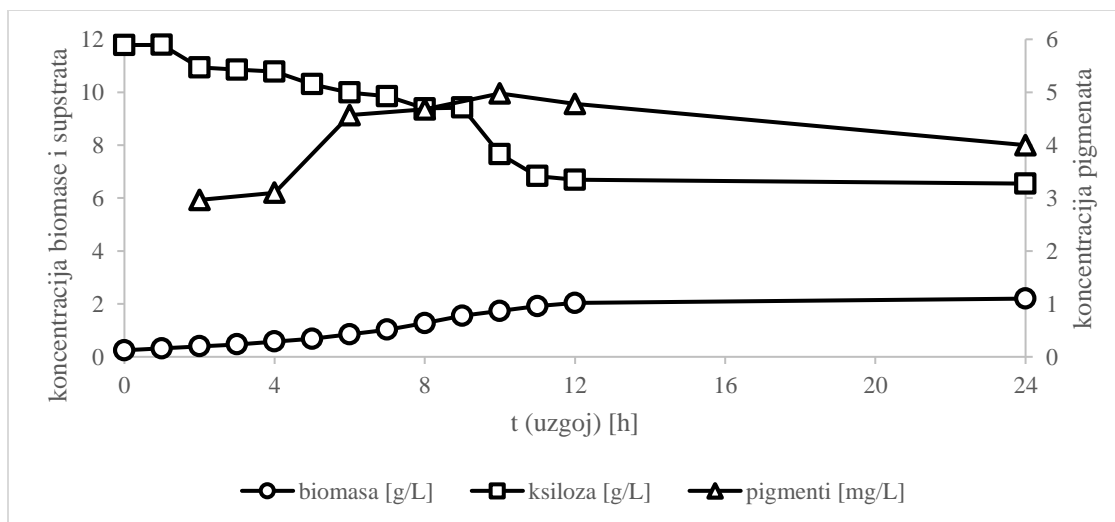
U nastavku će biti prikazan rast bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, potrošnja supstrata, potrošnja kisika, te sinteza pigmenta uz ksilozu kao izvor ugljika, čime će se uvidjeti njihova sposobnost prilagodbe uvjetima u bioreaktoru. Procesni parametri oba uzgoja su isti kao i kod prethodnih uzgoja na glukozu, temperatura je 28°C, pH = 7, protok zraka je iznosio 2,5 L min<sup>-1</sup>, a brzina okretaja miješala 450 min<sup>-1</sup>. Ukupno vrijeme trajanja uzgoja je bilo 24 sata kod bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, a kod *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 12 sati. Uzorci su se uzimali tijekom prvih 12 sati svakih sat vremena, te sljedeći dan se zadnji put uzorkovalo na kraju 24-tog sata uzgoja.



**Slika 9.** Potrošnja supstrata (□), promjena koncentracije biomase (○) i promjena koncentracije pigmenta (Δ) bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 tijekom uzgoja na ksilozi

Za vrijeme aerobnog šaržnog uzgoja nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 u mraku na podlozi s ksiloza, došlo je do potrošnje 1,11 g L<sup>-1</sup> ksiloze. Prirast biomase bakterije je u 12 sati uzgoja iznosio 0,85 g L<sup>-1</sup>, a koeficijent konverzije supstrata u biomasu 0,766 g g<sup>-1</sup>. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila između šestog i sedmog sata uzgoja, te je iznosila 0,610 g L<sup>-1</sup>, dok je maksimalna brzina rasta biomase bila između 4. i 9. sata uzgoja, te u tom vremenskom rasponu specifična brzina rasta bakterije iznosi 0,14 h<sup>-1</sup>. Tijekom ovog uzgoja se također dogodilo zamućenje tijekom noći, stoga je ukupno vrijeme trajanja uzgoja 12 h. Produktivnost cijelog uzgoja iznosi 0,071 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Na Slici 9. je vidljiv tijek procesa, te se na temelju rasta biomase stanica bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 može uočiti prisutnost stacionarne faze do 4. sata uzgoja, te početak faze rasta, no ni u jednom trenutku ne dolazi do nekog značajnijeg porasta biomase. Što je i očekivani rezultat s obzirom da je izvor ugljika ksiloza, koja predstavlja manje preferirani izvor ugljika od glukoze, odnosno veći rast biomase je bio manifestiran kod uzgoja na glukozi. Krivulja sinteze pigmenata je slična krivulji sinteze pigmenata tijekom uzgoja na glukozi, te se vidi značajan rast u prvih 6 sati uzgoja, potom pad i ponovni rast koncentracije. Maksimalni prirast pigmenta kod *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 se dogodio između 4. i 6. sata uzgoja i iznosio je 0,38 mg/L, a maksimalna koncentracija je bila u 8. satu uzgoja i iznosi 1,983 mg L<sup>-1</sup>.



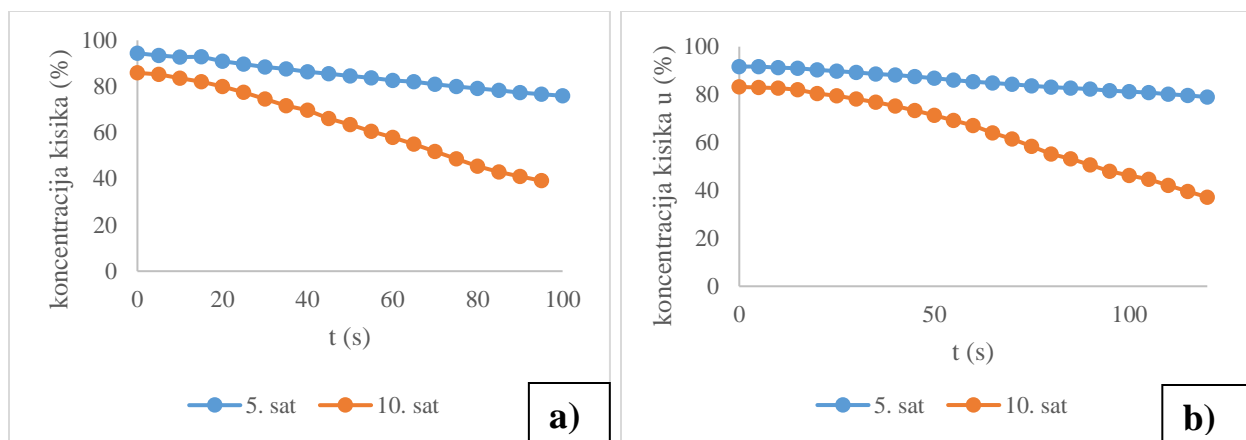
**Slika 10.** Potrošnja supstrata (□), promjena koncentracije biomase (○) i promjena koncentracije pigmenata (Δ) bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja na ksilozi



Šaržni uzgoj nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, prikazan na Slici 10., pri istim uvjetima rasta biomase kao i kod bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 je pokazao manje uspjeha od uzgoja na glukozi. Prirast biomase bakterije je u 24 sata uzgoja iznosio  $1,952 \text{ g L}^{-1}$ , što je ponovno, kao i na glukozi, dvostruko veće od prirasta biomase bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340. Koncentracija supstrata koja se utrošila tijekom procesa iznosi  $5,233 \text{ g L}^{-1}$ , te je koeficijent konverzije supstrata u biomasu  $0,373 \text{ g g}^{-1}$ . Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila između 9. i 10. sata uzgoja, te je iznosila  $1,755 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Nakon trećeg sata uzgoja koncentracija biomase linearno raste sve do kraja 12. sata, do trećeg sata je rast bio nešto sporiji. Specifična brzina rasta bakterije između 3. i 12. sata uzgoja iznosi  $0,162 \text{ h}^{-1}$ . Takav rast se može objasniti potrebom za adaptacijom vrste metabolizma, odnosno adaptacijom na generalne uvjete uzgoja u bioreaktoru. Tijekom prvih 12 sati uzgoja produktivnost *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 iznosi  $0,149 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , te je dvostruko veća od one ostvarene kod *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340. Produktivnost cijelog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 je  $0,081 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Kao što se moglo i očekivati, prinos biomase i potrošnja supstrata na ksilozi je značajnije manja od istih pokazatelja uspješnosti kod uzgoja na glukozi. Glukoza je preferirani izvor ugljika za većinu organizama, pa tako i za ovu nesumpornu ljubičastu bakteriju, stoga je rast na ksilozi sporiji.

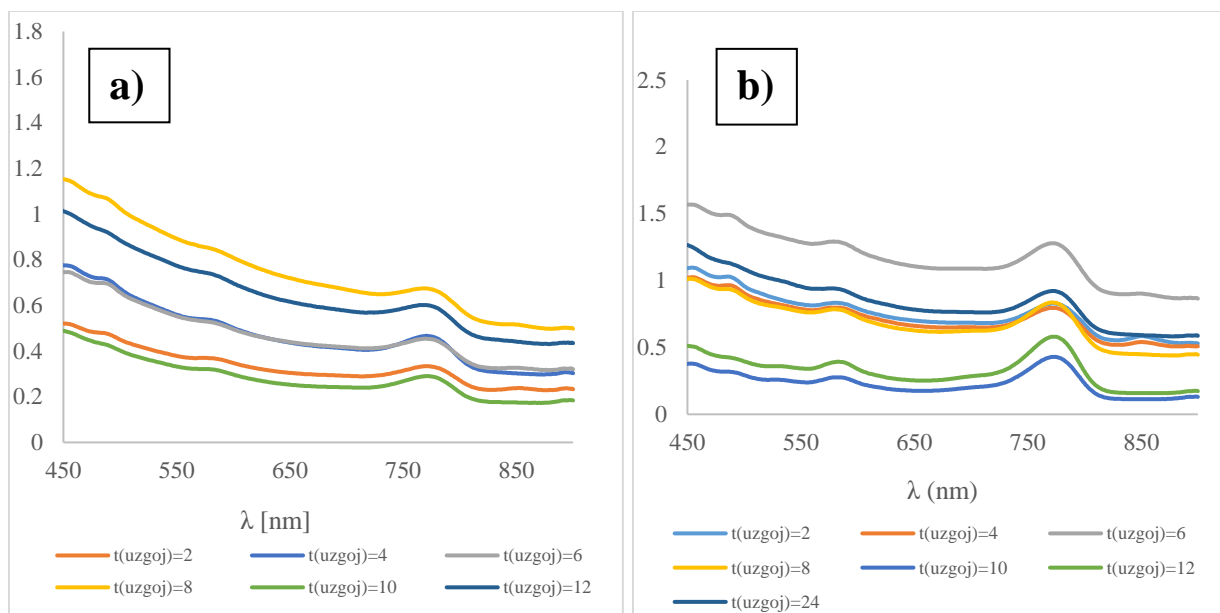
Tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na ksilozi koncentracija pigmenata do 12. sata uzgoja raste, za razliku od uzgoja na glukozi gdje je koncentracija pigmenata tijekom većine uzgoja padala. Najveći porast u koncentraciji pigmenata se dogodio između 4. i 6. sata uzgoja, što je isto kao i kod bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340, te iznosi  $1,46 \text{ mg L}^{-1}$ . Maksimalna vrijednost koncentracije je određena u 10. satu uzgoja, te iznosi  $4,977 \text{ mg L}^{-1}$ .



**Slika 11.** Prikaz potrošnje kisika u 5. i 10. satu uzgoja kod bakterija: **a)** *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i **b)** *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na ksilozi

Tijekom uzgoja bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na ksilozi, u 5. i 10. satu uzgoja određivala se specifična brzina potrošnje kisika metodom opisanom u potpoglavlju 3.2.6. Kod bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 izračunata vrijednost specifične brzine potrošnje kisika ( $q$ ) u 5. satu iznosi  $0,231 \text{ mg O}_2/\text{g biomase}$ , a u 10. satu je za nešto više od 65% veća i iznosi  $0,389 \text{ mg O}_2/\text{g biomase}$ . Prirast biomase stanica bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 u periodu između dva određivanja potrošnje kisika iznosi  $0,68 \text{ g L}^{-1}$ , što čini povećanje koncentracije biomase, u tih 5 sati uzgoja između dva mjerenja potrošnje kisika, za otprilike 90%.

Za bakteriju *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 vrijednosti specifične brzine potrošnje kisika su u ovom slučaju manje u odnosu na bakteriju *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340, iako je prirast biomase tijekom cijelog procesa bio veći. U 5. satu uzgoja vrijednost  $q$  iznosi  $0,165 \text{ mg O}_2/\text{g biomase}$ , a u 10. satu uzgoja  $0,275 \text{ mg O}_2/\text{g biomase}$ , što je 70% veća vrijednost  $q$ . Prirast koncentracije biomase bakterije u tih 5 sati je iznosila  $1,049 \text{ g L}^{-1}$  što je u postotcima oko 150% veća masa stanica.



**Slika 12.** Spektrofotometrijsko određivanje apsorbancije sintetiziranih pigmenata na ksilozi kod **a) *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340** i **b) *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781**

Kao i kod uzgoja na glukozi, na Slici 12. ponovno možemo vidjeti samo karakteristične pikove za bakterioklorofil *a* pri 770 nm i kod uzgoja *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i kod uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781. Apsorbancije pigmenata su se određivale kako bi se posljedično mogla odrediti sama koncentracija istih. Pomoću koncentracije bakterioklorofila *a* izračunate prema formuli iz poglavlja 3.2.5.4. Ekstrakcija ukupnih pigmenata i određivanje bakterioklorofila *a*, možemo uvidjeti sposobnost sinteze pigmenata, odnosno sinteze cjelokupnog fotosintetskog sustava koji ovisi o pigmentima.

**Tablica 6.** Pokazatelji uspješnosti procesa šaržnog uzgoja bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u bioreaktoru s miješalom na ksilozi kao izvoru ugljika

vrsta bakterije	$Y_x$ [g L <sup>-1</sup> ]	$\Delta S$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_{x/s}$ [g g <sup>-1</sup> ]	$Pr_{12}$ [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$Pr_{24}$ [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
<b><i>Rhodobacter azotoformans</i> JCM 9340</b>	0,850	1,110	0,766	0,071	-
<b><i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781</b>	1,952	5,233	0,373	0,149	0,081

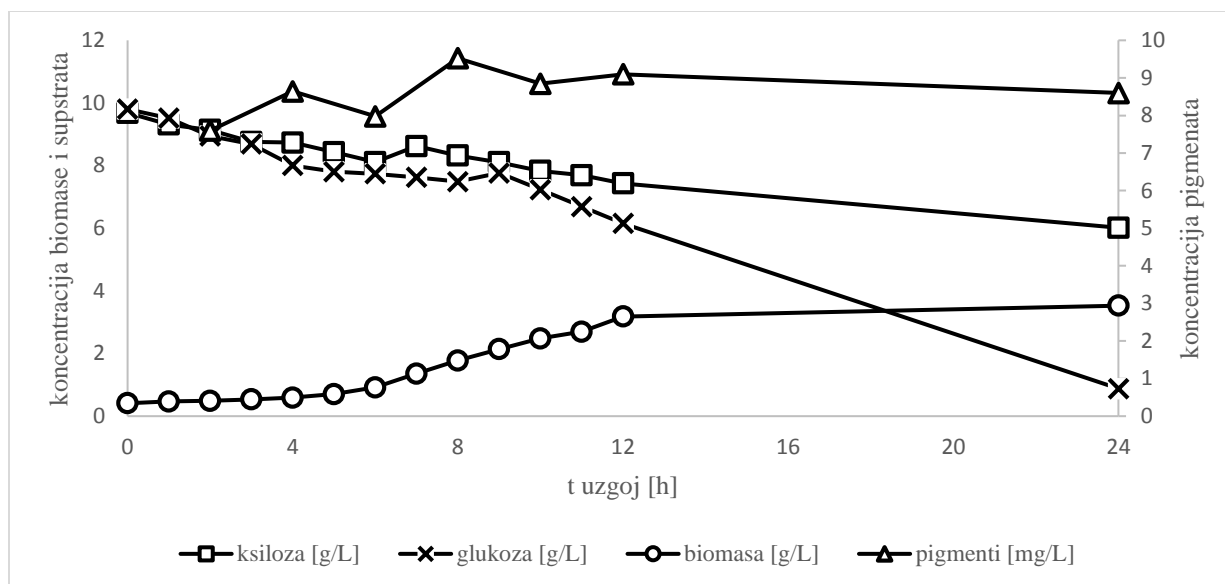
Na temelju svih pokazatelja uspješnosti koji se mogu vidjeti u tablicama 5. i 6. možemo zaključiti da odabrani uvjeti u reaktoru – aerobnost i mrak, tijekom rasta na glukozu ili ksilozi kao izvorima ugljika, više odgovaraju bakteriji *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781.

Glukoza i ksiloza su ugljikohidrati koji se u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina pojavljuju u najvišim koncentracijama jer nastaju kao produkti razgradnje hemiceluloze i celuloze, stoga su prethodna dva eksperimenta poslužila kao preliminarna za određivanje mikroorganizma koji ima veću uspješnost rasta na ta dva šećera. U oba slučaja to je bila nesumporna ljubičasta bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, te će se ona koristiti u sljedeća dva uzgoja, na kemijski definiranoj podlozi uz prisutnost i glukoze i ksiloze, te na samom hidrolizatu lignocelulozne sirovine – sijena kao kompleksnoj podlozi.

#### 4.3. Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u bioreaktoru s miješalom na kemijski definiranoj podlozi s glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika i na kompleksnoj podlozi hidrolizata sijena aerobno u mraku

Nakon što je u prethodnim poglavljima prikazan puno uspješniji rast bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u odnosu na *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340, u ovom poglavlju se nadalje htio prikazati rast te bakterije na podlozi s glukozom i ksilozom, te u konačnici na kompleksnoj podlozi hidrolizata lignocelulozne sirovine – sijena.

U prvom eksperimentu se koristila podloga koja je sadržavala i glukozu i ksilozu kako bi se istražio utjecaj prisutnosti oba šećera na brzinu rasta biomase bakterije i sintezu pigmenta u bioreaktoru s miješalom pri aerobnom uzgoju u mraku kroz 24 sata.

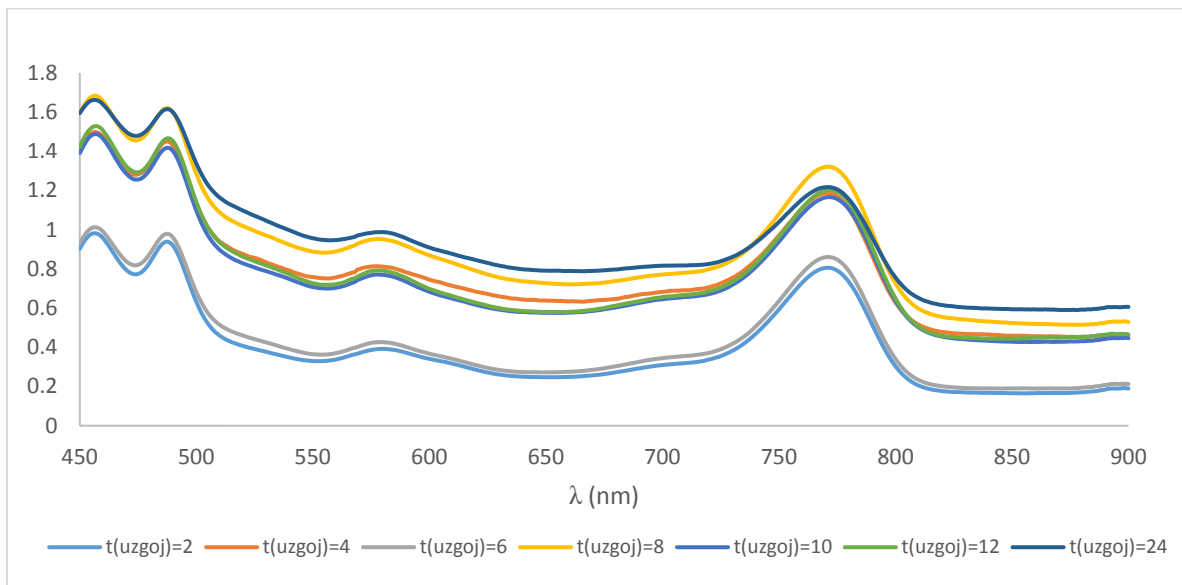


**Slika 13.** Potrošnja ksiloze ( $\square$ ), potrošnja glukoze ( $\times$ ) i promjena koncentracije biomase ( $\circ$ ) i pigmentata ( $\Delta$ ) bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja

Prema Slici 13. vidljivo je da se stanice bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prvih 4 sata uzgoja prilagođavaju uvjetima u bioreaktoru, jer tijekom tog vremena nema značajnijeg prirasta u koncentraciji biomase. Eksponencijalna faza rasta mikrobnih stanica započinje u 4. satu uzgoja, te koncentracija biomase raste sve do kraja uzgoja, a ukupni prinos biomase stanica *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 iznosi  $3,116 \text{ g L}^{-1}$ . Maksimalni prirast biomase je bio u 12. satu uzgoja, te iznosi  $0,487 \text{ g L}^{-1}$ , a specifična brzina rasta bakterije tijekom ekspanencijalne faze je iznosila  $0,211 \text{ h}^{-1}$ . Koncentracija glukoze se smanjivala tijekom procesa, te je na kraju preostalo  $0,88 \text{ g L}^{-1}$ , uz sveukupnu potrošnju glukoze  $8,922 \text{ g L}^{-1}$ . Koncentracija ksiloze nije imala pad kao koncentracija glukoze, no tijekom cijelog uzgoja se postepeno trošila, te je ukupno potrošeno  $3,669 \text{ g L}^{-1}$ . S obzirom na te podatke o potrošnji supstrata, može se zaključiti da se kod ove nesumporne ljubičaste bakterije ne očituje katabolička represija preferiranim izvorom ugljika, nego se oba ugljikohidrata troše istovremeno, samo s različitim brzinama potrošnje.

Koeficijent konverzije ukupnih supstrata u biomasu iznosi  $0,247 \text{ g g}^{-1}$ , što je skoro trostruko manje od koeficijenta konverzije izračunatog za uzgoj na glukozi, te za 30% manje od koeficijenta konverzije za uzgoj na ksilozi. Produktivnost procesa tijekom prvih 12 sati uzgoja

iznosi  $0,231 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , produktivnost ukupnog procesa  $0,13 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , što je za oko 10% manja produktivnost od one dobivene tijekom uzgoja na glukozu, ali je veća za oko 40% od produktivnosti na ksilozi. Svi pokazatelji uspješnosti ovoga procesa su prikazani u Tablici 7.

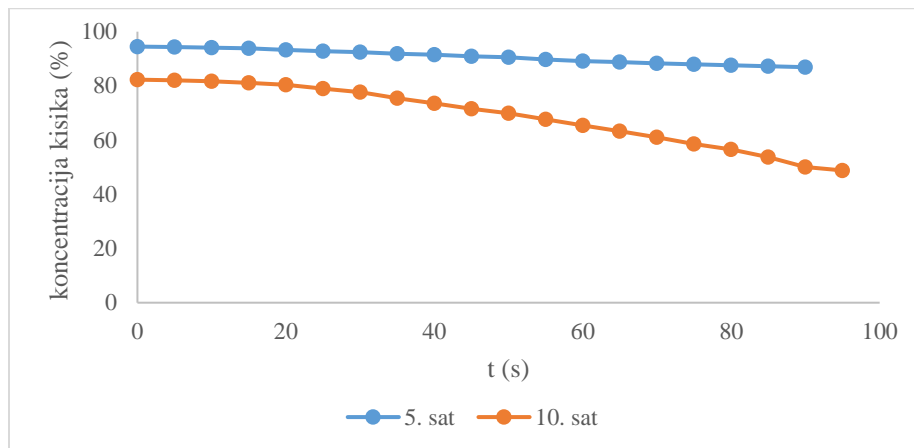


**Slika 14.** Spektrofotometrijsko određivanje apsorpcije sintetiziranih pigmentata u ovisnosti o valnoj duljini na glukozu i ksilozi kod bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom 24 sata

Koncentracija pigmentata je već na početku uzgoja bila dosta visoka, te je iznosila  $7,598 \text{ mg L}^{-1}$ . Tijekom uzgoja je vrijednost koncentracije varirala, čime možemo zaključiti da sinteza pigmentata nije vezana uz rast biomase stanica. Koncentracija pigmentata je u 8. satu uzgoja postigla svoju maksimalnu vrijednost od  $9,521 \text{ mg L}^{-1}$ , što je za ovu bakteriju najviša postignuta koncentracija pigmentata u odnosu na maksimalne koncentracije postignute tijekom ostalih uzgoja. Najveći prirast u koncentraciji pigmentata je bio između 6. i 8. sata uzgoja, te iznosi  $1,545 \text{ mg L}^{-1}$ .

Svaka dva sata uzgoja se određivala vrijednost apsorpcije u spektru valnih duljina od 450 do 900, te se dobio spektrofotogram sa Slike 14. Kao i u svakom od prethodnih uzgoja, najistaknutiji su pikovi pri 770 nm koji su karakteristični za bakterioklorofil a. Međutim tijekom

ovog uzgoja uočavaju se i pikovi pri 455 nm i 486 nm koji bi se mogli okarakterizirati kao OH-sferoideni i sferoidenoni (Lin i sur., 2014).



**Slika 15.** Prikaz potrošnje kisika u 5. i 10. satu uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na glukozu i ksilozi kao izvorima ugljika

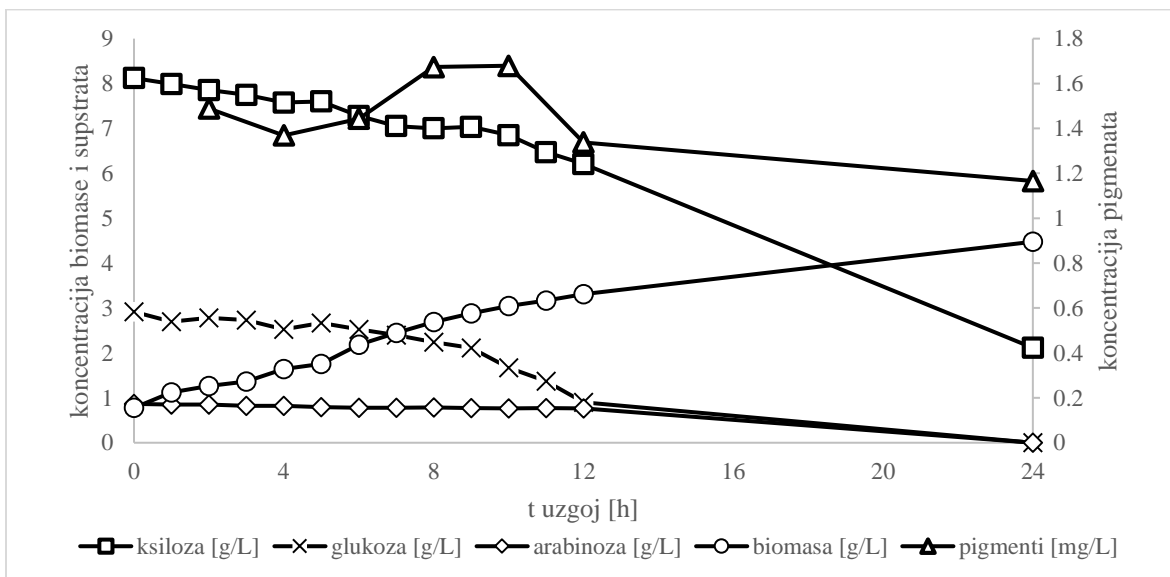
Na Slici 15. je prikazana potrošnja kisika u 5. i 10. satu uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, te možemo vidjeti da je potrošnja kisika veća tijekom 10. sata uzgoja kao i u svakom prethodnom slučaju zbog povećanja količine stanica biomase koje vrše staničnu respiraciju. Na temelju određenih potrošnji, izračunate su vrijednosti specifične brzine potrošnje kisika ( $q$ ), te je za 5. sat uzgoja dobivena vrijednost  $q$  0,134 mg O<sub>2</sub>/ g biomase, a za 10. sat uzgoja 0,18 mg O<sub>2</sub>/ g biomase uz prirast biomase od 1,781 g L<sup>-1</sup>.

**Tablica 7.** Pokazatelji uspješnosti procesa šaržnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u bioreaktoru s miješalom na glukozu i ksilozi kao izvorima ugljika

	$Y_x$ [g L <sup>-1</sup> ]	$\Delta S_{ksiloza}$ [g L <sup>-1</sup> ]	$\Delta S_{glukoza}$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_{x/s}$ [g g <sup>-1</sup> ]	$Pr_{12}$ [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$Pr_{24}$ [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
<b><i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781</b>	3,116	3,669	8,922	0,247	0,231	0,130

Ovim eksperimentom se bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 pokazala sposobnom rasti u danim uvjetima uz ksilozu i glukozu kao izvore ugljika, te je, uslijed dobrih rezultata ovog uzgoja, proveden uzgoj na hidrolizatu lignocelulozne sirovine – sijena.

Na samom početku uzgoja su se odredile koncentracije šećera u hidrolizatu, te uslijed manjih koncentracija dodano je još glukoze i ksiloze u koncentracijama koje su navedene u Tablici 4. Kiselinskim predtretmanom sijena dobivena je kompleksna podloga koja osim navedenih šećera sadrži i mnogo drugih sastojaka kao što su arabinoza, manoz, galaktoza, organske kiseline, glukuronska, octena, ferulična i p-kumarična kiselina. Međutim u najvećoj koncentraciji sadrži ksilozu jer se kiselinskom predobradom hidroliza hemiceluloze odvija brže od celuloze (Marđetko, 2018). Ovim se eksperimentom htjela ispitati mogućnost rasta ove bakterije u uvjetima koji nisu najpovoljniji za rast s obzirom na prisutnost raznih inhibitora nastalih tijekom predtretmana, te bi se uvidjevši mogućnost rasta ljubičaste nesumporne bakterije dalje moglo istraživati na polju iskorištenja lignoceluloznih sirovina u biorafinerijskom smislu proizvodnje raznih kemikalija, goriva i materijala.

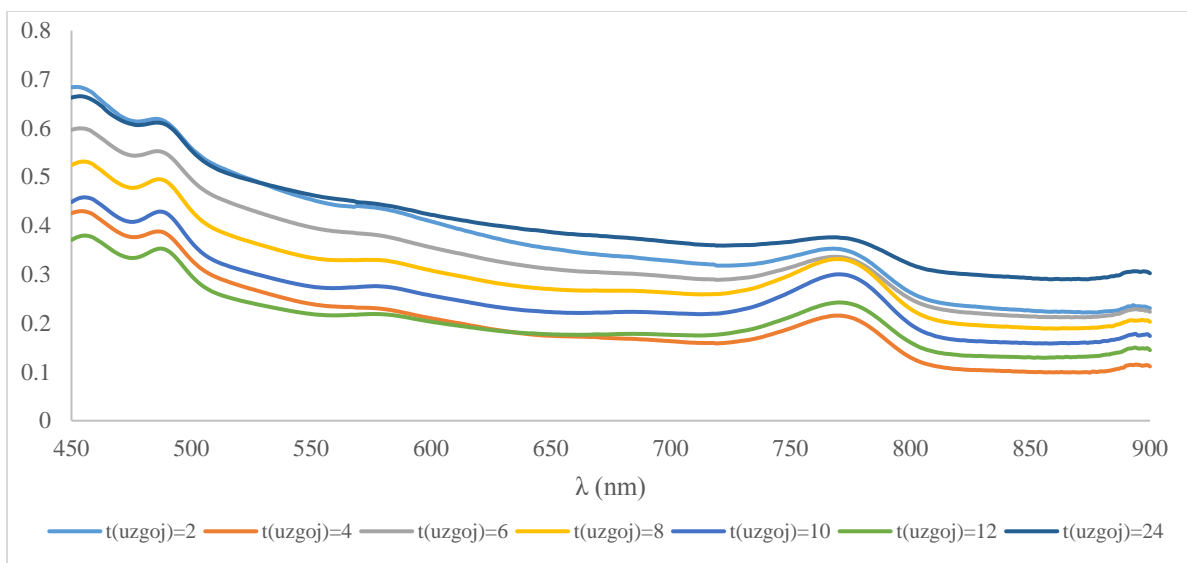


**Slika 16.** Potrošnja supstrata: ksiloze (□), glukoze (X), arabinoze (◇), promjena koncentracije biomase(○) i pigmenata (Δ) bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja na hidrolizatu sijena



Na Slici 16. se može vidjeti tijekom rasta bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, tijekom potrošnje supstrata, te sinteza pigmenta za vrijeme procesa. Kada se uzmu u obzir svi provedeni uzgoji s ovom bakterijom, ovaj uzgoj je ostvario najveći prirast biomase bakterije u vrijednosti od  $3,7 \text{ g L}^{-1}$ , što je oko 8% veće od prirasta biomase dobivenog tijekom uzgoja na glukozi. S obzirom da je ovo kompleksna hranjiva podloga, ne može se utvrditi točan sastav, te ne možemo ustanoviti koji je sastojak ili skupina sastojaka djelovala povoljno na rast biomase. Što se tiče potrošnje ugljikohidrata, tijekom uzgoja se određivala koncentracija glukoze, ksiloze i arabinoze. Mikroorganizam je najviše potrošio ksiloze u koncentraciji  $6,008 \text{ g L}^{-1}$ , s obzirom da je koncentracija ksiloze bila najviša u samom početku. Međutim, do najveće potrošnje ksiloze je došlo u zadnjih 12 sati uzgoja nakon što je koncentracija glukoze pala ispod  $1 \text{ g L}^{-1}$ . Ukupna potrošnja glukoze je bila  $2,916 \text{ g L}^{-1}$ , te je do kraja procesa bila potpuno utrošena, a arabinoze  $0,865 \text{ g L}^{-1}$ . Očigledno je da se arabinoza utrošila prije ksiloze, čime se vidi hijerarhija u potrošnji ugljikohidrata, glukoza se troši najbrže, potom arabinoza čija je potrošnja katabolički reprimirana glukozom, a zatim ksiloza. Prirast bakterijske biomase je bio najveći između 4. i 12. sata uzgoja, čime se taj vremenski raspon može definirati kao eksponencijalna faza. Specifična brzina rasta *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u tom periodu iznosi  $0,099 \text{ h}^{-1}$ .

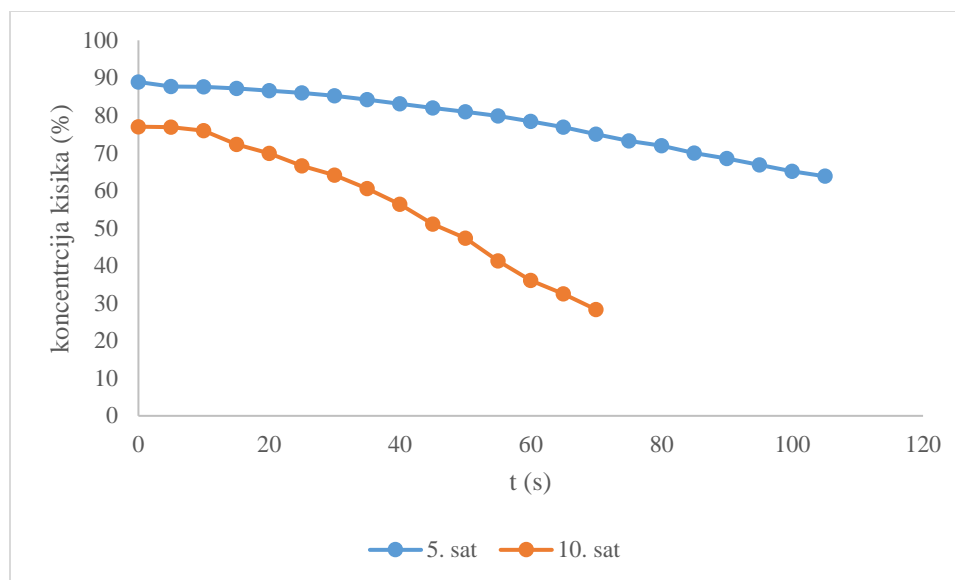
Uzevši u obzir ukupnu potrošnju svih supstrata i rast biomase, izračunata je vrijednost koeficijenta konverzije supstrata u biomasu u iznosu od  $0,378 \text{ g g}^{-1}$ , što je otprilike dvostruko manje od najvišeg dobivenog koeficijenta konverzije kod uzgoja na glukozi  $0,716 \text{ g g}^{-1}$ . Produktivnost uzgoja u prvih 12 sati je iznosila  $0,211 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  što je za 23% manje od najviše vrijednosti produktivnosti u prvih 12 sati uzgoja na glukozi. No produktivnost ukupnog procesa je dosegla najvišu vrijednost u odnosu na produktivnosti ostalih uzgoja provedenih s bakterijom *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, te iznosi  $0,154 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



**Slika 17.** Spektrofotometrijsko određivanje apsorbancije sintetiziranih pigmenata u ovisnosti o valnoj duljini bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 uzgajane na hidrolizatu sijena

Koncentracija pigmenata je dosegla svoju maksimalnu vrijednost od  $1,679 \text{ mg L}^{-1}$  u 10. satu uzgoja nakon čega je koncentracija padala i dosegla svoju minimalnu vrijednost  $1,166 \text{ mg L}^{-1}$  na kraju uzgoja. Usporedivši koncentracije pigmenata u ovom uzgoju s koncentracijama pigmenata ostalih provedenih uzgoja s ovom bakterijom, možemo uvidjeti značajno manju količinu ukupnih sintetiziranih pigmenata.

Što se tiče spektrofotograma na Slici 17., kao i kod uzgoja na glukozi i ksilozi, vidljiva su tri istaknuta pika. Apsorpcijski maksimum bakterioklorofila a pri  $770 \text{ nm}$ , te dva manja pri  $455 \text{ nm}$  i  $486 \text{ nm}$  koji bi prema Lin i sur. (2014) odgovarali OH-sferoidenima i sferoidenonima, odnosno skupinama karotenoida. Ljubičaste nesumporne bakterije sintetiziraju karotenoide koji štite cjelokupni fotosintetski aparat od štetnih radikala koji nastaju prisutstvom svjetla i/ili kisika. Također karotenoidi služe kao pomoćni pigmenti za prikupljanje energije svjetla, te su potrebni za stabilo i uspješno sklapanje kompleksa za prikupljanje svjetla (Chi i sur., 2014).



**Slika 18.** Prikaz potrošnje kisika u 5. i 10. satu uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na hidrolizatu sijena

Na Slici 18. možemo vidjeti potrošnju kisika u bioreaktoru tijekom uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u 5. i 10. satu uzgoja. Brzina potrošnje kisika je značajno veća u 10. satu uzgoja s obzirom na veću koncentraciju živih stanica biomase. S obzirom na veći nagib pravca dobivamo i veću vrijednost specifične brzine potrošnje kisika u 10. satu uzgoja koja iznosi 0,303 mg O<sub>2</sub> / g biomase, dok u 5. satu uzgoja je vrijednost dvostruko manja i iznosi 0,169 mg O<sub>2</sub> / g biomase. Prirast biomase u 5 sati uzgoja između dva mjerenja specifične brzine potrošnje kisika iznosi 1,295 g L<sup>-1</sup>.

**Tablica 8.** Pokazatelji uspješnosti procesa šaržnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u bioreaktoru s miješalom na hidrolizatu sijena

	$Y_x$ [g L <sup>-1</sup> ]	$\Delta S_{glukoza}$ [g L <sup>-1</sup> ]	$\Delta S_{ksiloza}$ [g L <sup>-1</sup> ]	$\Delta S_{arabinoza}$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_{x/s}$ [g g <sup>-1</sup> ]	$Pr_{12}$ [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$Pr_{24}$ [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
<i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781	3,700	2,916	6,008	0,865	0,378	0,211	0,154

***ZAKLJUČCI***

## 5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobivenih tijekom uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 na različitim izvorima ugljika izvedeno je više zaključaka:

1. Tijekom provedenih uzgoja s glukozom kao izvorom ugljika veći prirast biomase je ostvarila bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u koncentraciji od  $3,405 \text{ g L}^{-1}$ , uz koeficijent konverzije supstrata u biomasu u vrijednosti od  $0,716 \text{ g g}^{-1}$  za potrošenih  $4,757 \text{ g L}^{-1}$  glukoze. Bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 je ostvarila dvostruko manji prirast biomase od  $1,531 \text{ g L}^{-1}$ , s potrošnjom glukoze od  $5,209 \text{ g L}^{-1}$ , te koeficijentom konverzije supstrata u biomasu  $0,294 \text{ g L}^{-1}$ . Produktivnost ukupnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 je  $0,142 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , dok je produktivnost dvanaestosatnog uzgoja bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340  $0,128 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , što je dvostruko manje od produktivnosti ostvarene s *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prvih dvanaest sati.
2. Tijekom uzgoja bakterija na podlozi koja je sadržavala ksilozu kao jedini izvor ugljika, svi pokazatelji uspješnosti su značajno manji od onih dobivenih tijekom uzgoja na glukozu, a *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 je i u ovom slučaju ostvarila veći prirast biomase ( $1,952 \text{ g L}^{-1}$ ), no i veću potrošnju supstrata ( $5,233 \text{ g L}^{-1}$ ). Koeficijent konverzije supstrata u biomasu je bio dvostruko veći kod bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 ( $0,766 \text{ g g}^{-1}$ ) uslijed manje potrošnje supstrata ( $1,11 \text{ g L}^{-1}$ ). *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 je ostvarila dvostruko veću dvanaestosatnu produktivnost ( $0,149 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) od bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340, a produktivnost ukupnog procesa je iznosila  $0,081 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .
3. Prilikom uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlozi s ksilozom i glukozom, ostvaren je prirast biomase  $3,116 \text{ g L}^{-1}$ , produktivnost cijelokupnog uzgoja je bila  $0,13 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , a koeficijent konverzije supstrata u biomasu je iznosio  $0,247 \text{ g g}^{-1}$ . Potrošnja ksiloze ( $3,669 \text{ g L}^{-1}$ ) je bila znatno manja od potrošnje glukoze ( $8,922 \text{ g L}^{-1}$ ).

4. Što se tiče prirasta biomase, te produktivnosti procesa, najuspješniji je bio uzgoj *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na hidrolizatima sijena uz 3,7 g L<sup>-1</sup> prirasle biomase i uz produktivnost od 0,154 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Najviše se utrošilo ksiloze (6,008 g L<sup>-1</sup>), koje je bilo i najviše u početnoj hranjivoj podlozi, zatim glukoze (2,916 g L<sup>-1</sup>), a najmanje se utrošilo arabinoze (0,865 g L<sup>-1</sup>).
5. Najviša koncentracija bakterioklorofila a se postigla tijekom uzgoja *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlozi s glukozom i ksilozom, te je iznosila 8,599 mg L<sup>-1</sup>. Na podlozi s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina, ne dolazi do značajnije promjene u koncentraciji pigmenata tijekom uzgoja, te koncentracija varira u rasponu 1,166 – 1,673 mg L<sup>-1</sup>.
6. Kod bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 najveća specifična brzina potrošnje kisika u 5. satu, a i u 10. satu uzgoja je određena uz ksilozu kao izvor ugljika. U 5. satu iznosi 0,231 mg O<sub>2</sub>/ g biomase, a u 10. satu iznosi 0,389 mg O<sub>2</sub>/ g biomase. Bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 je najveću specifičnu potrošnju kisika ostvarila prilikom uzgoja na hidrolizatu sijena u 10. satu uzgoja, 0,303 mg O<sub>2</sub>/ g biomase bakterije, a najveću specifičnu brzinu potrošnje kisika u 5. satu uzgoja je ova bakterija pokazala tijekom rasta na glukozi.

***LITERATURA***

## 6. LITERATURA

- Arai, H., Roh, J. H., Kaplan, S. (2008) Transcriptome Dynamics during the Transition from Anaerobic Photosynthesis to Aerobic Respiration in *Rhodobacter spheroides*. *J. Bacteriol.* **190**, 286-299.
- Basak, N., Das, D. (2007) The prospect of purple non sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 31-42.
- Blankenship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E. (1995) Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. U: Advances in Photosynthesis and Respiration (Sharkey, T.D., Eaton-Rye, J., ured.), 2. izd., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., Lloyd, R., Fuller, R. C. (1991) The accumulation of poly (3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter spheroides*. *Arch. Microbiol.* **155**, 337-340.
- Brune D. C. (1995) Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. U: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, (Blankenship, R.E., Madigan, Michael T., Bauer, C.E., ured.), Springer, Netherlands.
- Bulen, W. A., Bums, R. C., Le Comte, J. R. (1965) Nitrogen Fixation: Hydrosulfite as Electron Donor with Cell-free Preparations of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodospirillum rubrum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **53**, 532-539.
- Chang, J. S., Show, P. L., Ling, T. C., Chen, C. Y., Ho, S. H., Tan, C. H., Nagarajan, D., Phong, W. N. (2017) Photobioreactors. U: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls (Larroche, C., Sanroman, M.A., Du, G., Pandey, A., ured.), Elsevier B.V., 313-352.
- Chi, S. C., Mothersole, D. J., Dilbeck, P., Niedzwiedzki, D. M., Zhang, H., Qian, P., Vasilev, C., Grayson, K. J., Jackson, P. J., Martin, E. C., Li, Y., Holten, D., Junter, C. N. (2015) Assembly of functional photosystem complexes in *Rhodobacter spheroides* incorporating carotenoids from the spirilloxanthin pathway. *Biochim. Biophys. Acta.* **1847** (2), 189-201



- Choorit, W., Thanahoset, P., Throngpradistha, J., Sasaki, K., Noparatnaraporn, N. (2002) Identification and cultivation of photosynthetic bacteria in wastewater from a concentrated latex processing factory. *Biotechnol. Lett.* **24** (13), 1055-1058.
- Clinton Fuller (1995) Polyesters and Photosynthetic Bacteria, From Lipid Cellular Inclusions to Microbial Thermoplastics. U: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria (Blankenship, R. E., Madigan, Michael T., Bauer, C. E., ured.), Springer, Netherlands.
- Colyer, C. L., Kinkade, C. S., Viskari, P. J., Landers, J. P. (2005) Analysis of cyanobacterial pigments and proteins by electrophoretic and chromatographic methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **382** (3), 559-569.
- Delvigne, F., Lecomte, J. P. (2010) Foam formation and control in bioreactors. U: Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (Flickinger, M.C., ured.), 1-13.
- Dutton, P. L., Evans, W. C. (1978) Metabolism of aromatic compounds by *Rhodospirillaceae*. U: The Photosynthetic Bacteria (Clayton, R. K., Sistrom, W. R., ured.) Plenum Press, New York, 719-726.
- Fenchel, T., King, G. M., Blackburn, T. H. (2012) Bacterial Metabolism U: Bacterial Biogeochemistry, (Fenchel, T., King, G. M., Blackburn, T. H., ured.), Elsevier Ltd., 1-34.
- Fiedor, J., Ostachowicz, B., Baster, M., Lankosz, M., Burda, K. (2016) Quantification of purple non-sulphur phototrophic bacteria and their photosynthetic structures by means of total reflection X-ray fluorescence spectrometry (TXRF). *J. Anal. At. Spectrom.* **31**, 2078-2088.
- Frigaard, N. U. (2016) Biotechnology of Anoxygenic Phototrophic Bacteria. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **156**, 139-154.
- Fritts, R. K., LaSarre, B., Stoner, A. M., Posto, A. L., McKinlay, J. B. (2017) Aem.asm.org <<https://aem.asm.org/content/83/4/e03035-16/article-info>>. Pristupljeno 1. listopada 2019.
- Gao, Z., Zhao, H., Li, Z., Tan, X., Lu, X. (2012) Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. *Energy Environ Sci.* **5** (12), 9857-9865.

- Garcia-Ochoa, F., Santos, V. E., Gomez, E. (2011) Stirred Tank Bioreactors. U: Comprehensive Biotechnology (Moo-Young, M., Butler, M., Webb, C., Moreira, A., Grodzinski, B., Cui, Z. F., Agathos, S., ured.), 2. izd., Pergamon Press, 179-198.
- Gest, H., Favinger, J. L. (1983) *Heliobacterium chlorum*, an anoxygenic brownish-green photosynthetic bacterium containing a „new“ form of bacteriochlorophyll. *Arch. Microbiol.* **136**, 11-16.
- Gloe, A., Pfenning, N., Brockmann Jr., H., Trowitzsch, W. (1975) New Bacteriochlorophyll from Brown-Colored Chlorobiaceae. *Arch. Microbiol.* **102**, 103-109.
- Goodwin, T. W. (1980) The Biochemistry of Carotenoids. Chapman and Hall, London, UK
- Hädicke, O., Grammel, H., Klamt, S. (2011) Metabolic network modeling of redox balancing and biohydrogen production in purple nonsulfur bacteria. *BMC Syst. Biol.* **5** (150), 1-18.
- Hansen, T. A., Van Gemerden, H. (1972) Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria. *Arch. Mikrobiol.* **86**, 49-56.
- Henshaw, P. F., Zhu, W. (2001) Biological conversion of hydrogen sulphide to elemental sulphur in a fixed-film continuous flow photo-reactor. *Water Res.* **35**(15), 3605-3610.
- Higuchi-Takeuchi, M., Morisaki, K., Toyooka, K., Numata, K. (2016) Synthesis of High-Molecular-Weight Polyhydroxyalkanoates by Marine Photosynthetic Purple Bacteria. *Plos ONE* **11** (8), 1-17.
- Hiraishi, A., Ueda, Y. (1994) Intrageneric Structure of the Genus *Rhodobacter*: Transfer of *Rhodobacter sulfidophilus* and related Marine Species to the Genus *Rhodovulum* gen. nov. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **44**, 15-23.
- Hiraishi, A., Muramatsu, K., Ueda, Y. (1996) Molecular Genetic Analyses of *Rhodobacter azotoformans* sp.nov. and Related Species of Phototrophic Bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **19**, 168-177.
- Hoiczky, E., Hansel, A. (2000) Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J. Bacteriol.* **182** (5), 1191-1199.

- Holo, H. (1989) *Chloroflexus aurantiacus* secretes 3-hidroxypropionate, a possible intermediate in the assimilation of CO<sub>2</sub> and acetate. *Arch. Microbiol.* **151**, 252-256.
- Hui, C.J., Prihastyanti, M. N. U., Brotosudarmo, T. H. P. (2015) Preliminary Evaluation of the Pigments Content from *Rhodobacter sphaeroides* at Stages during Photosynthetic Growth. *Procedia Chem.* **14**, 101-107.
- Imhoff, J. F. (1995) Taxonomy and Physiology of Phototrophic Purple Bacteria and Green Sulfur Bacteria. U: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, (Blankenship, R. E., Madigan, Michael T., Bauer, C. E., ured.), Springer, Netherlands, 6-8.
- Imhoff, J. F., Trüper, H. G., Pfenning, N. (1984) Rearrangement of the Species and Genera of the Phototrophic „Purple Nonsulfur bacteria“. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 340-343.
- Imhoff, J. F., Hiraishi, A., Süling, J. (2005) Anoxygenic Phototrophic Bacteria. U: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., ured.), 2. izdanje, Springer, New York, USA, 119-132.
- Kanno, N., Matsuura, K., Haruta, S. (2018) Different Metabolism Responses to Carbon Starvation between Light and Dark Conditions in the Purple Photosynthetic Bacterium, *Rhodospseudomonas palustris*. *Microbes Environ.* **33** (1), 83-88.
- Kantachote, D., Torpee, S., Umsakul, K. (2005) The potential use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. *Electron. J. Biotechnol.* **8**, 314-323.
- Keppen, O. I., Krasil'nikova, E. N., Lebedeva, N. V., Ivanovskii, R. N. (2013) Comparative Study of Metabolism of the Purple Photosynthetic Bacteria Grown in the Light and in the Dark under Anaerobic and Aerobic Conditions. *Microbiology* **82** (5), 547-553.
- Kim, J. S., Ito, K., Takahashi, H. (1980) The relationship between nitrogenase activity and hydrogen evolution in *Rhodospseudomonas palustris*. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 827-833.
- Kirk, J. T. O (1994) Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press, Cambridge.

- Kobayashi, M. (1995) Waste remediation and Treatment Using Anoxygenic Phototrophic Bacteria. U: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria (Blankenship, R. E., Madigan, Michael T., Bauer, C. E., ured.), Springer, Netherlands.
- Kostelac, D. (2016) Proizvodnja i karakterizacija  $\alpha$ -amilaze bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu, srpanj 2016.
- Kuo, F. H., Chien, Y. H., Chen, C. J. (2012) Effects of light sources on growth and carotenid content of photodynamic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*. *Bioresour. Technol.* **113**, 315-319.
- Lin, Z., Cui, X., Zhao, C., Yang, S., Imhoff, J. F. (2014) Pigments accumulation via light and oxygen in *Rhodobacter capsulatus* strain XJ-1 isolated from saline soil. *J. Basic Microbiol.* **54**, 828-834.
- Liu, S., Zhang, G., Li, X., Zhang, J. (2014). Microbial production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Appl. Microbiol. Biot.* **98**, 7349–7357.
- Lu, H., Zhang, G., Dong, S. (2011) Quantitative study of PNSB energy metabolism in degrading pollutants under weak light-micro oxygen condition. *Bioresource Technol.* **102**, 4968-4973.
- Madigan, M. T., Jung, D. O. (2009) An overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats. U: The Purple Phototrophic Bacteria, (Neil Hunter, C., Daldal, F., Thurnauer, M. C., Beatty, J. T., ured.), Springer, The Netherlands, 1-15.
- Madukasi, E. I., Dai, X., He, C., Zhou, J. (2010) Potential of phototrophic bacteria in treating pharmaceutical wastewater. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* **7** (1), 165-174.
- Mardetko, N., Novak, M., Trontel, A., Grubišić, M., Galić, M., Šantek, B. (2018) Bioethanol Production from Dilute-acid Pre-treated Wheat Straw Liquor Hydrolysate by Genetically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **32**(4), 483-499.
- Markov, S., Weaver, P. F. (2008) Bioreactors for H<sub>2</sub> Production by Purple Nonsulfur Bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **145**, 79-86.
- McEwan, A. G. (1994) Photosynthetic electron transport and anaerobic metabolism in purple non-sulphur phototrophic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **66**, 151-164.

- Merugu R., Prashanthi Y., Sarojini T., Badgu N. (2014) Bioremediation of waste waters by the anoxygenic photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* SMR 009. *Int. J. Environ. Sci. Te.* **4**, 16-19.
- Montano, G. L., Chan, J. S., Jarabelo, R. E., Pastor, A. B. I., Dela Cruz, T. E. E. (2009) Isolation and characterization of purple nonsulfur bacteria (PNSB) from a rice paddy soil in Bulacan, Philippines. *Philip. J. Sys. Biol.* **3**, 57-67.
- Moscoviz, R., Trably, E., Bernet, N., Carrere, H. (2018) The environmental biorefinery: state-of-the-art on the production of hydrogen and value-added biomolecules in mixed-culture fermentation. *Green Chem.* **20**, 3159-3179.
- Mujahid, M., Sasikala, C. and Ramana, C. V. (2010) Production of indole-3-acetic acid and related indole derivatives from L-tryptophan by *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 1001–1008.
- Myung, K. K., Choi, K. M., Yin C. R., Lee, K. Y., Im, W. T., Lim, J. H., Lee, S. T. (2004) Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodospseudomonas palustris*, isolated from eutrophicated ponds. *Biotech. Lett.* **26** (10), 819-822.
- Novak, M., Pavlečić, M., Harutyunyan, B., Goginyan, V., Horvat, P., Šantek, B. (2017) Characteristic and selection of culture of photosynthetic purple non-sulphur bacteria as a potential 5-aminolevulinic acid producers. *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.* **12** (3-4), 113-119.
- Oelze, J., Fuller, R. C. (1987) Growth and control of development of the photosynthetic apparatus in *Chloroflexus aurantiacus*. *Arch. Microbiol.* **148**, 132-136.
- Ogbonna, J. C., Yada, H., Masui, H., Tanaka, H. (1996) A Novel Internally Illuminated Stirred Tank Photobioreactor for Large-Scale Cultivation of Photosynthetic Cells. *J. Ferment. Bioeng.* **82** (1), 61-67.
- Ogbonna, J. C., Soejima, T., Tanaka, H. (1999) An integrated solar and artificial light system for internal illumination of photobioreactors. *J. Biotechnol.* **70**, 289-297.
- Ormerod, J. G. (1992) Physiology of the Photosynthetic Prokaryotes. U: Photosynthetic Prokaryotes (Mann, N. H., Carr, N. G., ured.), Biotechnology Handbooks, vol 6, Springer, Boston, MA, 93-120.

Plewka, M. (2005) Plingfactory.de

<<http://www.plingfactory.de/Science/Atlas/Kennkarten%20Procaryota/e-procaryota/e-source/Chromatium%20okenii.html/>>. Pristupljeno 29. rujna 2019.

Prasertsan, P., Jaturapornpipat, M., Sirpatana, C. (1997) Utilization and treatment of tuna condensate by photosynthetic bacteria. *Pure. Appl. Chem.* **69** (11), 2438-2445.

Ritchie, R. J. (2018) researchgate.net

<[https://www.researchgate.net/publication/323944603\\_Measurement\\_of\\_chlorophylls\\_a\\_and\\_b\\_and\\_bacteriochlorophyll\\_a\\_in\\_organisms\\_from\\_hypereutrophic\\_auxinic\\_waters](https://www.researchgate.net/publication/323944603_Measurement_of_chlorophylls_a_and_b_and_bacteriochlorophyll_a_in_organisms_from_hypereutrophic_auxinic_waters)>. Pristupljeno 12. kolovoza 2019.

Roh, J. H., Smith, W. E., Kaplan, S. (2004) Effects of oxygen and Light Intensity on Transcriptome Expression in *Rhodobacter spheroides* 2.4.1. *J. Biol. Chem.* **279**, 9146-9155.

Salakkam, A., Plangklang, P., Sittijunda, S., Kongkeitkajorn, M. B., Lunprom, S., Reungsang, A. (2019) Bio-hydrogen and Methane Production from Lignocellulosic Materials. U: Biomass for Bioenergy – Recent Trends and Future Challenges (El-Fatah Abomohra, A., ured.) Intech-Open, 1-40.

Saratale, G. D., Chen, S. D., Lo, Y. C., Saratale, R. G., Chang, J. S. (2008) Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation – a review. *J. Sci. Ind. Res.* **67**, 962-979.

Shah, A., Manandhar, A., Khanal, S., Ozkan, E. (2017) ohioonline.osu.edu <<https://ohioline.osu.edu/factsheet/fabe-6602>>. Pristupljeno 30. rujna 2019.

Schmidt, K., Pfennig, N., Jensen Liaaen, S. (1965) Carotenoids of *Thiorhodaceae*. *Arch. Microbiol.* **52**, 132-146.

Schmidt, K. (1978) Biosynthesis of carotenoids. U: The Photosynthetic Bacteria (Clayton, R. K. i Sistrom, W. R., ured.) Plenum Press, New York, NY, 729-750

Shiba, T., Simidu, U., Taga, N. (1979) Distribution of aerobic bacteria which contain bacteriochlorophyll a. *Appl. Environ. Microbiol.* **38** (1), 43-45.

- Singh, R. N., Sharma, S. (2012) Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **16**, 2347-2353.
- Singh, S. K., Sundaram, S., Kishor, K. (2014) Photosynthetic Microorganisms – Mechanism For Carbon Concentration, Springer Science+Business Media , 15-52.
- Sirnivas, T. N. R., Kumar, P. A., Sasikala, Ch., Ramana, Ch. V., Imhoff, J. F. (2007) *Rhodobacter vinaykumarii* sp. nov., a marine phototrophic alphaproteobacterium from tidal waters, and emended description of the genus *Rhodobacter*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **57**, 1984-1987.
- Skjanes, K., Lindblad, P., Muller, J. (2007) BioCO<sub>2</sub>: a multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO<sub>2</sub> while producing H<sub>2</sub> and high value products. *Biomol. Eng.* **24** (4), 405-413.
- Sojka, G. A. (1978) Metabolism of nonaromatic organic compounds. U: The Photosynthetic Bacteria (Clayton, R.K. i Siström, W.R., ured.), Plenum Press, New York, USA, 707-718.
- Stanier, R. Y., Pfennig, N., Trüper, H. G. (1981) Introduction to the Phototrophic Prokaryotes. U: The Prokaryotes, (Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balowa, A., Schlegel, H. G., ured.), Springer-Verlag, Berlin, 197-211.
- Šlouf, V., Chabera, P., Olsen, J. D., Martin, E. C., Qian, P., Hunter, C. N., Polivka, T. (2012) Photoprotection in a purple phototrophic bacterium mediated by oxygen-dependant alteration of carotenoid excited-state properties. *PNAS*, **109** (22), 8570-8575.
- Takaichi, S. (2009) Distribution and Biosynthesis of Carotenoids. U: The Purple Phototrophic Bacteria (Neil Hunter, C., Daldal, F., Thurnauer, M.C., Beatty, J.T., ured.), Springer Science + Business Media B.V., 97-117.
- Takeno, K., Yamaoka, Y., Sasaki, K. (2005) Treatment of oil-containing sewage wastewater using immobilized photosynthetic bacteria. *W.J. Of Microbiol. Biotech.* **21**(89), 1385-1391.
- Vonshak, A. (1997) *Spirulina platensis* arthrospira: physiology, cell-biology and biotechnology (Vonshak, A., ured.), CRC Press.
- Wang, S. J., Zhong, J. J. (2007) Bioreactor Engineering. U: Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, (Yang, S. T., ured.), 2.izd, Elsevier B.V., 45-68.

Xu, J., Feng, Y., Wang, Y., Lin, X. (2013) Characteristics of purple nonsulfur bacteria grown under *Stevia* residue extractions. *Lett. Appl. Microbiol.* **57**, 420-426.

Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C. Y., Nagarajan, D., Chang, J. S. (2019) Design of photobioreactors for algal cultivation. U: Biomass, Biofuels and Biochemicals (Pandey, A., Venkata Mohan, S., Chang, J. S., Hallenbeck, P., Larroche, C., ured.) Elsevier, 23-45.

Yurkov, V., Beatty, J. T. (1998) Isolation of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria from black smoker plume waters of the juan de fuca ridge in the pacific ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (1), 337-341.

Zeiger, L., Grammel, H. (2010) Model-Based High Cell Density Cultivation of *Rhodospirillum rubrum* Under Respiratory Dark Conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **105** (4), 729-739

Zhu, L. (2015) Microalgal culture strategies fro biofuel production: a review. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **9**, 801-814.



***PRILOZI***

## 7. PRILOZI

### 7.1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije supstrata tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti

**Tablica 9.** Retencijska vremena i baždarni pravci (UPLC)

spoj	$t_R$ [min]	jednadžba baždarnog pravca	$R^2$ [-]
glukoza	5,06	$A = 83241 \gamma(\text{glukoza}) + 11510$	0,9986
ksiloza	3,75	$A = 66325 \gamma(\text{ksiloza}) + 9629,3$	0,9997
arabinoza	5,5	$A = 151554 \gamma(\text{arabinoza}) - 7676,4$	0,999

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Ime i prezime studenta