

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Zora Kelemen, Marko Sarić

Biorafinerijski pristup iskorištavanju otpadne trave i pivskog tropa za proizvodnju specifičnih biokemikalija i biogoriva s pomoću odabranih vrsta mikroorganizama

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod vodstvom doc.dr.sc. Marija Novaka i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020/2021.

POPIS KRATICA

KH= Kiselinski hidrolizat otpadnog pivskog tropa

DKH= Kiselinski hidrolizat otpadnog pivskog tropa tretiran aktivnim ugljenom (detoksicirani)

EH= Enzimski hidrolizirana čvrsta faza pivskog tropa zaostala nakon kiselinske hidrolize

BD= 2,3-butandiol

EtOH= Etanol

MK= Mliječna kiselina

ALA= 5-aminolevulinska kiselina

PHA= polihidroksialkanoati

UPLC= tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

GC-FID= plinska kromatografija s plameno-ionizacijskom detekcijom

LTK= udjel lignina topljivog u kiselini

HRCB= horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Biorafinerijsko iskorištavanje obnovljivih sirovina	1
1.2. Lignocelulozne sirovine	3
1.2.1. Lignoceluloza	3
1.2.2. Celuloza	5
1.2.3. Hemiceluloza	7
1.2.4. Lignin	8
1.3. Predobrada lignocelulozne sirovine	9
1.3.1. Inhibitori nastali kiselinskom predobradom	12
1.4. Otpadni pivski trop	14
1.5. Otpadna trava	15
1.6. Odabrani mikroorganizmi za biorafinerijsko korištenje lignoceluloznih sirovina	16
1.6.1. Plijesni <i>Fusarium verticillioides</i>, <i>Botryosphaeria dothidea</i> i <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lagenariae</i>	17
1.6.2. Ljubičaste nesumporne bakterije - <i>Rhodobacter capsulatus</i>, <i>Rhodovulum adriaticum</i> i <i>Rhodobacter azotoformans</i>	19
1.6.3. Bakterija <i>Paenibacillus polymyxa</i>	21
1.7. Odabrani proizvodi bioprocasa utemeljenih na lignoceluloznim sirovinama	23
1.7.1. Biokemikalije	23
1.7.1.1. 2,3-butandiol	23
1.7.1.2. Mliječna kiselina	24
1.7.1.3. Etanol	26
1.7.1.4. Masne kiseline	27
1.7.1.5. Fotosintetski pigmenti	28
1.7.1.6. Enzimi - celulaze i ksilanaze	29
1.7.2. Korištenje mikrobne biomase u novim biotehnološkim procesima	31
1.7.2.1. Iskorištavanje biomase ljubičastih nesumpornih bakterija	31
1.7.2.2. Iskorištavanje biomase funga	33
1.7.2.3. Hitin i hitozan	34
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	37
3. MATERIJAL I METODE	39
3.1. Procesni dijagram biorafinerijskog iskorištavanja otpadne trave i otpadnog pivskog tropa za proizvodnju specifičnih biokemikalija i biogoriva	39
3.2. Materijali	41

3.2.1. Radni mikroorganizmi korišteni u istraživanju biorafinerijskog koncepta iskorištavanja otpadnih lignoceluloznih sirovina	41
3.2.2. Sirovine, kemikalije i enzimi korišteni u istraživanju	41
3.2.3. Hranjive podloge	45
3.2.3.1. Hranjive podloge za uzgoj plijesni <i>Fusarium verticillioides</i> JCM 23107, <i>Botryosphaeria dothidea</i> JCM 2738 i <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lagenariae</i> JCM 9293	45
3.2.3.2. Hranjiva podloga za uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija - <i>Rhodobacter capsulatus</i> JCM 21090^T, <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 i <i>Rhodobacter azotoformans</i> JCM 9340	47
3.2.3.3. Hranjive podloge za uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742	49
3.2.3.3.1. Kemijski definirane hranjive podloge za uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742	49
3.2.3.3.2. Kompleksne hranjive podloge za uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 u biorektorskim sustavima	51
3.2.4. Oprema	52
3.2.4.1. Bioreaktori i reaktor za obradu lignoceluloznih sirovina	52
3.2.4.1.1. Bioreaktori s miješalom	52
3.2.4.1.2. Barbotirajući bioreaktor	53
3.2.4.1.3. Horizontalni rotirajući cijevni reaktor	54
3.2.4.1.4. Visokotlačni reaktor za obradu lignoceluloznih sirovina	54
3.2.4.2. Uređaj za plinsku kromatografiju	55
3.2.4.3. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)	55
3.2.4.4. Centrifuge	56
3.2.4.5. UV-Vis spektrofotometar	56
3.2.4.6. Ostala oprema	57
3.3. Metode	58
3.3.1. Priprema inokuluma za uzgoj biomase plijesni i bakterija	58
3.3.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina	59
3.3.2.1. Predobrada otpadnog pivskog tropa	59
3.3.2.2. Predobrada otpadne trave	59
3.3.3. Priprema hranjivih podloga za istraživanje kinetike rasta mikroorganizama	60
3.3.3.1. Priprema hranjive podloge za uzgoj plijesni <i>Fusarium verticillioides</i> JCM 23107, <i>Botryosphaeria dothidea</i> JCM 2738 i <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lagenariae</i> JCM 9293	60
3.3.3.2. Priprema hranjivih podloga za uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija <i>Rhodobacter capsulatus</i> JCM 21090 ^T , <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 i <i>Rhodobacter azotoformans</i> JCM 9340	60

3.3.3.3. Priprema hranjive podloge za uzgoj bakterije <i>P. polymyxa</i> DSM 742 na kemijski definiranim podlogama	60
3.3.3.4. Priprema podloge za šaržni uzgoj bakterije <i>P. polymyxa</i> DSM 742 u bioreaktoru s miješalom na hidrolizatu dobivenom kiselinskom predobradom otpadnog pivskog tropa	61
3.3.3.5. Priprema podloge za šaržni uzgoj bakterije <i>P. polymyxa</i> DSM 742 u bioreaktoru s miješalom na detoksiciranom hidrolizatu dobivenom kiselinskom predobradom otpadnog pivskog tropa	61
3.3.3.6. Priprema podloge za šaržni uzgoj bakterije <i>P. polymyxa</i> DSM 742 u bioreaktoru s miješalom na hidrolizatu dobivenom enzimskom hidrolizom čvrste faze nakon kiselinske predobrade otpadnog pivskog tropa	61
3.3.4. Optimiranje uvjeta rasta i proizvodnje enzima i biokemikalija pomoću odabranih mikroorganizama	62
3.3.4.1. Uzgoj plijesni <i>Botryosphaeria dothidea</i> JCM 2738, <i>Fusarium verticillioides</i> JCM 23107 i <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lagenariae</i> JCM 9293 na podlozi s glukozom i kiselinski obrađenoj otpadnoj travi kao izvorima ugljika za proizvodnju enzima	62
3.3.4.2. Ispitivanje kinetike rasta bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 i sinteze proizvoda na kemijski definiranim podlogama	62
3.3.4.3. Uzgoj plijesni <i>Botryosphaeria dothidea</i> JCM 2738 u barbotirajućem bioreaktoru na kiselinskom hidrolizatu otpadne trave	63
3.3.4.4. Uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 na hranjivoj podlozi KH	63
3.3.4.5. Uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 na hranjivoj podlozi DKH	63
3.3.4.6. Uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 na hranjivoj podlozi EH	64
3.3.5. Istraživanje rasta ljubičastih nesumpornih bakterija na otpadnoj vodi dobivenoj nakon bioprocesa uzgoja plijesni	64
3.3.6. Analitičke metode	65
3.3.6.1. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC)	65
3.3.6.2. Određivanje optičke gustoće podloge	65
3.3.6.3. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase	65
3.3.6.4. Određivanje enzimске aktivnosti	66
3.3.6.5. Određivanje koncentracije proteina	66
3.3.6.6. Određivanje koncentracije i sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom s plameno-ionizacijskom detekcijom kiselina	66
3.3.6.7. Određivanje hitina i hitozana u biomasi plijesni	69
3.3.6.8. Fotosintetski pigmenti	69
3.3.6.9. Određivanje sastava čvrstih uzoraka lignoceluloznih sirovina	70
3.3.6.9.1. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini	70
3.3.6.9.2. Udjel lignina topljivog u kiselini (LTK)	71
3.3.6.9.3. Određivanje furana spektrofotometrijski	71

3.3.7.	Proračun pokazatelja uspješnosti uzgoja	72
4.	REZULTATI	73
4.1.	Istraživanje proizvodnje ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima pomoću odabranih vrsta plijesni iz roda <i>Botryosphaeria</i> i <i>Fusarium</i>	74
4.1.1.	Uzgoj plijesni <i>Botryosphaeria dothidea</i> JCM 2738, <i>Fusarium verticillioides</i> JCM 23107 i <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lagenariae</i> JCM 9293 na podlozi s glukozom i kiselinski obrađenoj otpadnoj travi kao izvorima ugljika za proizvodnju enzima	74
4.1.2.	Uzgoj plijesni <i>Botryosphaeria dothidea</i> JCM 2738 u barbotirajućem reaktoru	78
4.2.	Iskorištavanje ljubičastih nesumpornih bakterija za pročišćavanje otpadne vode dobivene nakon procesa uzgoja plijesni <i>Botryosphaeria dothidea</i> JCM 2738	81
4.3.	Istraživanje proizvodnje biokemikalija i biogoriva pomoću bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742	87
4.3.1.	Uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 na kemijski definiranim podlogama	87
4.3.2.	Uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 na tekućim hidrolizatima otpadnog pivskog tropa dobivenim fizikalno–kemijskim i enzimskim metodama predobrade	93
5.	RASPRAVA	97
5.1.	Biorafinerijsko korištenje otpadne trave - Istraživanje proizvodnje ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima pomoću odabranih vrsta plijesni iz roda <i>Botryosphaeria</i> i <i>Fusarium</i>	102
5.2.	Iskorištavanje ljubičastih nesumpornih bakterija za pročišćavanje otpadne vode dobivene nakon procesa uzgoja plijesni <i>Botryosphaeria dothidea</i> JCM 2738	106
5.3.	Biorafinerijsko korištenje otpadnog pivskog tropa - Istraživanje proizvodnje biokemikalija i biogoriva pomoću bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742	108
6.	ZAKLJUČCI	113
7.	ZAHVALE	116
8.	POPIS LITERATURE	117
9.	SAŽETAK	135
10.	SUMMARY	137
	PRILOZI	139

1. UVOD

1.1. Biorafinerijsko iskorištavanje obnovljivih sirovina

Prirodni resursi su materijalni elementi potrebni za opstanak i razvoj čovjeka. a uključuju mineralne resurse i vodu te zemljišne i biološke resurse. Resursi se mogu kategorizirati prema njihovoj obnovljivosti u obnovljive i neobnovljive izvore. Obnovljivi izvori mogu se obnoviti ljudskom aktivnošću, primjerice poljoprivredom. Neobnovljivi izvori, također poznati kao iscrpni resursi, jesu oni čije se rezerve i volumen mogu izmjeriti kao što su mineralni resursi. Obnovljivi izvori mogu se dalje podijeliti na resurse koji su stalno dostupni (poput energije Sunca, zraka, vjetra, vode i energije plime i oseke) i biološke resurse (uključujući razne biljke, životinje, mikroorganizme, i njihovu okolinu, koja se sastoji od ekosustava). Razlika između obnovljivih i neobnovljivih resursa je relativna. Na primjer, nafta, ugljen i prirodni plin su neobnovljivi izvori, ali su nastali iz drevnih životinja i biljaka dugoročnim utjecajem fizikalnih, kemijskih i geoloških promjena u slojevima zemlje (Zhou, 2013). Prema statusu recikliranja resursa i njegovom doprinosu raznim sektorima nacionalne ekonomije, resursi se mogu podijeliti u pet kategorija. Prvi, iscrpni, ali nepovratni resursi uglavnom se odnose na naftu, ugljen, prirodni plin, uran i druge energetske izvore. Drugi se mogu reciklirati i uglavnom se odnose na rude, papir i staklo. Treći su dostupni, ali iscrpni resursi, primjerice voda i zrak. Četvrti obnovljivi izvori uglavnom se odnose na poljoprivredne prirodne resurse, uključujući zemljišta i ribu. Peti su obnovljivi resursi, kao što su šumski resursi i usjevi. Biljna biomasa je privukla svjetsku pozornost zbog svoje svestranosti u konverziji i recikliranju. Biomasa nije samo obnovljivi izvor energije, već se može koristiti i za proizvodnju različitih kemijskih proizvoda. Glavna komponenta biljne biomase su ugljikohidrati, koji ne utječu na okoliš tijekom proizvodnih procesa. Drugo, biomasa uključuje poljoprivredni i otpad iz šuma te potencijalne onečišćivače okoliša, poput ostataka usjeva, stajskog gnoja i organskog otpada. Treće, i možda najvažnije, biomasa je dio poljoprivredne proizvodnje, koja je korisna u razvoju ruralnog gospodarstva i prihoda poljoprivrednika. Stoga svestrana industrija biomase svojim recikliranjem resursa igra značajnu ulogu u ekonomiji. Recikliranje biomase učinkovito je rješenje problema opskrbe energijom i ublažavanje onečišćenja okoliša (Chen, 2015).

Biorafinerija je postrojenje koja prevodi biomasu u energiju i druge korisne proizvode poput biokemikalija i biogoriva. Međunarodna agencija za energiju definirala je biorafiniranje kao održivu preradu biomase u spektar proizvoda na biološkoj osnovi (hrana, krmivo, kemikalije, materijali) i bioenergiju (biogoriva, energija i/ili toplina) (IEA, 2013). Biorafinerije mogu osigurati više kemikalija frakcioniranjem početne sirovine (biomase) u više međuprodukata (ugljikohidrati, proteini, trigliceridi) koji se mogu dalje pretvoriti u proizvode s dodanom vrijednosti. Korištenje biomase kao sirovine može donijeti korist smanjenjem utjecaja na okoliš, konkretno, smanjenjem emisije štetnih plinova. Uz to, biorafinerije su namijenjene postizanju sljedećih ciljeva: djelomična zamjena trenutnim gorivima i kemijskim građevnim jedinicama, opskrba novim baznim kemikalijama za proizvodnju novih materijala, otvaranje novih radnih mjesta, uključujući ruralna područja, valorizacija otpada (poljoprivredni, gradski i industrijski otpad) te postizanje smanjenja emisija stakleničkih plinova (Qureshi i sur., 2014). Biorafinerije se mogu klasificirati na temelju četiri glavne značajke:

1. **platforme:** odnose se na ključne međuprodukte koji nastaju tijekom prerade sirovina u konačne proizvode. Najvažniji međuprodukti su: bioplin iz anaerobne digestije, sintetski plin iz uplinjavanja, vodik iz reformiranja pare, elektrolize vode i fermentacije, C6-šećeri iz hidrolize saharoze, škroba, celuloze i hemiceluloze, C5-šećeri iz hidrolize hemiceluloze i celuloze, lignin iz prerade lignocelulozne biomase.
2. **proizvodi:** biorafinerije se mogu grupirati u dvije glavne kategorije prema pretvorbi biomase u energetski ili neenergetski proizvod. U ovoj klasifikaciji mora se prepoznati glavno tržište:
 - biorafinerije vođene energijom: glavni proizvod je energija, npr. biogoriva, struja i toplina.
 - biorafinerije vođene materijalom: glavni proizvod je proizvod na biološkoj osnovi
3. **sirovine:** namjenske sirovine (usjevi šećera, škrobni usjevi, lignocelulozni usjevi, usjevi na bazi ulja, trave, morska biomasa) i otpaci (otpaci na bazi ulja, lignocelulozni otpaci, organski otpaci i drugi)
4. **proces:** postupak konverzije biomase u konačni proizvod:
 - mehanički/fizikalni: kemijska struktura komponenata biomase je očuvana. Ova operacija uključuje prešanje, mljevenje, odvajanje, destilaciju itd.

- biokemijski: procesi pri umjerenoj temperaturi i tlaku, uz primjenu mikroorganizama ili enzima.
- kemijski procesi: promjena supstrata djelovanjem kemikalija (npr. hidroliza, transesterifikacija, hidrogeniranje, oksidacija)
- termokemijski: na sirovinu djeluju ekstremni uvjeti (visoki tlak i visoka temperatura, sa ili bez katalizatora) (Cherubini i sur., 2009)

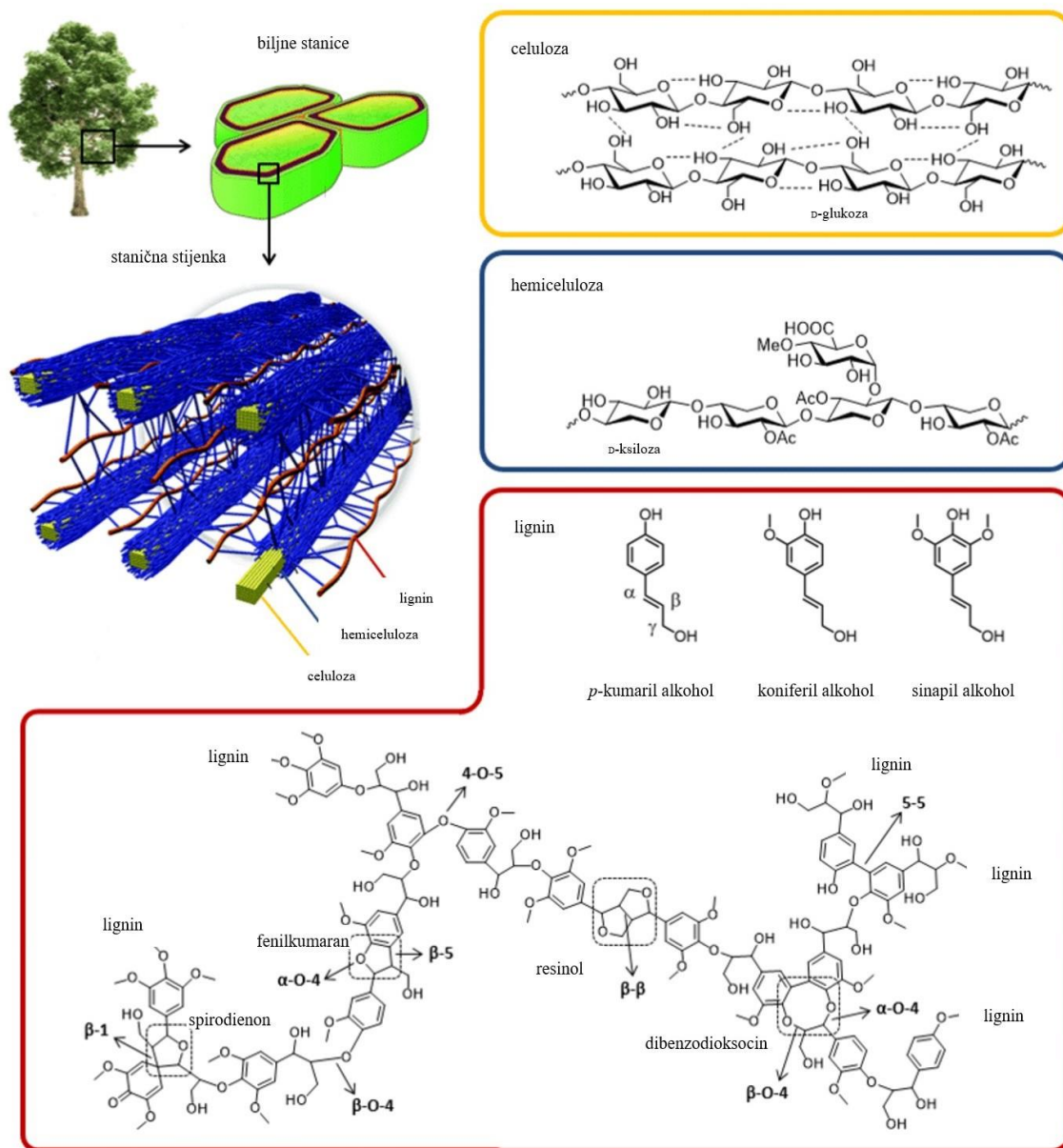
1.2. Lignocelulozne sirovine

1.2.1. Lignoceluloza

U zadnjih nekoliko desetljeća biljna biomasa postala je interesantna alternativa fosilnim gorivima za transport i zamjena za petrokemikalije. Porast cijene nafte, eksploatacija prirodnih resursa, prenapučenost populacije i potražnja za ekološkim proizvodima stvaraju potrebu za obnovljivim alternativama fosilnim gorivima i petrokemikalijama (Chen, 2015; de Jong i Goosselink, 2014). Lignocelulozna biomasa je obnovljivi organski materijal nastao rastom bilja. Lignocelulozna sirovina može biti nusproizvod poljoprivrede (kukuruzni oklasci, stabljika i komušina kukuruza, trava, sijeno, bagasa šećerne trske), drvoprerađivačke (piljevina i strugotine, otpaci papirne industrije) ili prehrambene industrije, komunalni otpadni papir i energetske usjevi (Ivančić Šantek i sur., 2016; Al Seadi i sur., 2008).

Biljna biomasa smatra se obnovljivim izvorom jer nastaje procesom fotosinteze, koristeći sunčevu energiju, vodu i CO₂. Tijekom fotosinteze sunčeva energija se pohranjuje unutar kemijskih veza (Merklein i sur., 2016). Lignoceluloza je najdostupniji obnovljivi izvor na planeti jer se konstantno generira fotosintezom (Ping i Zhao, 2007). Lignocelulozna biomasa ima brojne prednosti (nad fosilnim gorivima): niske je cijene, dostupna je u velikim količinama i rasprostranjena je na širokom geografskom području. Biomasa se može transformirati u energiju, kemikalije ili gorivo (Chen, 2015; de Jong i Gosselink, 2014). Lignoceluloza čini sastavni dio stanične stijenke biljaka. Ona ima funkciju pružanja mehaničke potpore, sprječavanja hlapljenja vode, daje stanici oblik i štiti ju od nametnika (Taherzadeh i Jeihanipour, 2012). Lignoceluloznu biomasu čine polisaharidi (celuloza, hemiceluloza i pektin), lignin, ekstraktivne tvari (voskovi, smole, ulja i sl.) te pepeo. Lanci glukoze u strukturi celuloze umreženi su u mikrofibrile, a oni su obavijeni hemicelulozom i dodatno učvršćeni ligninom (Slika 1.) (Sanderson, 2011). Celuloza i hemiceluloza povezane

su vodikovim vezama dok je lignin kovalentno vezan na hemicelulozu. Pretpostavlja se da njihove međusobne interakcije imaju bitnu ulogu u otpornosti lignoceluloze te utječu na brzinu njezine razgradnje (Zoghلامي i Paës, 2019). Udio pojedinih polimera u lignoceluloznoj biomasi ovisi o vrsti i porijeklu sirovine. U Tablici 1. prikazan je udio pojedinih polimera u različitim sirovinama.



Slika 1. Prikaz građe lignoceluloze (Van den Bosch i sur., 2018).

Tablica 1. Udio celuloze, hemiceluloze i lignina u suhoj tvari biomase različitih sirovina (Bajpai, 2016).

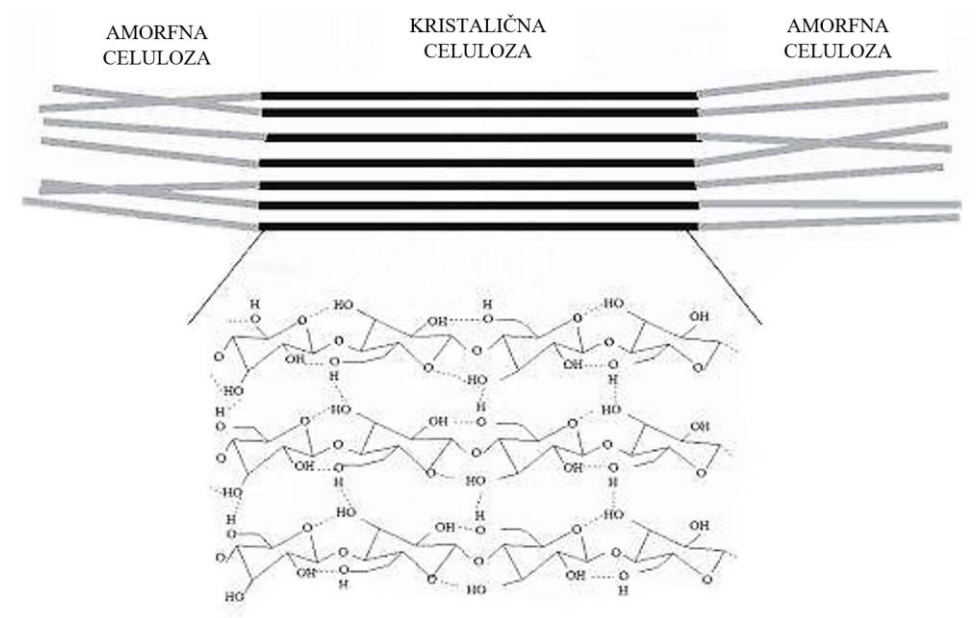
	Celuloza [% w/w]	Hemiceluloza [% w/w]	Lignin [%w/w]
Tvrdo drvo	40-55	24-40	18-25
Meko drvo	45-50	25-35	25-35
Sijeno	30	50	15
Kukuruzni oklasci	45	35	15
Trava	25-40	35-50	10-30
Proso	45	31,4	12

1.2.2. Celuloza

Celuloza je linearni homopolimer sačinjen od β -D-glukopiranoznih jedinica povezanih β -1,4-glikozidnim vezama. Čini većinu mase lignoceluloze i glavna je komponenta stijenke biljaka. Osim u biljnoj staničnoj stijenci, može se pronaći i u bakterijama, plijesnima i algama (Bajpai, 2016). Lanci celuloze sastavljeni su od nekoliko stotina do više tisuća jedinica D-glukoze i čine mikrofibrile koji zbijeni daju celulozna vlakna (Zoghلامي i Paës, 2019). Ovaj oblik celuloze je poznat i kao amorfna celuloza. Dvije jedinice glukoze u lancu čine dimer celobiozu. Celuloza nije topljiva u vodenim otopinama, razrijeđenim kiselinama ni lužinama pri sobnoj temperaturi (Chen, 2016).

Značajna količina celuloze postoji u kristaličnom obliku. Zbog tri slobodne hidroksilne skupine na svakoj jedinici glukoze dolazi do međusobnog povezivanja linearnih lanaca celuloze vodikovim vezama i Van der Waalsovima silama te nastaje kristalična celuloza (Estela i Luis, 2013). Ona je kompaktne strukture (Slika 2.) te vrlo otporna na kemijsku i enzimsku hidrolizu. Enzimi celulaze veliki su u odnosu na vlakna pa mogu razgraditi samo celulozu na površini kristalične celuloze, tj. ne mogu se uvlačiti unutar njezine strukture. To dovodi do slabe razgradnje celuloze te manjeg oštećenja (Sun i sur., 2016). Kemijskom predobradom može se razgraditi amorfna celuloza i samo površina kristalične dok se

mehaničkom predobradom, poput mljevenja, smanjuje veličina čestica i kristaličnost celuloze pa se ostvaruje i bolja enzimaska hidroliza (Yeh i sur., 2010).

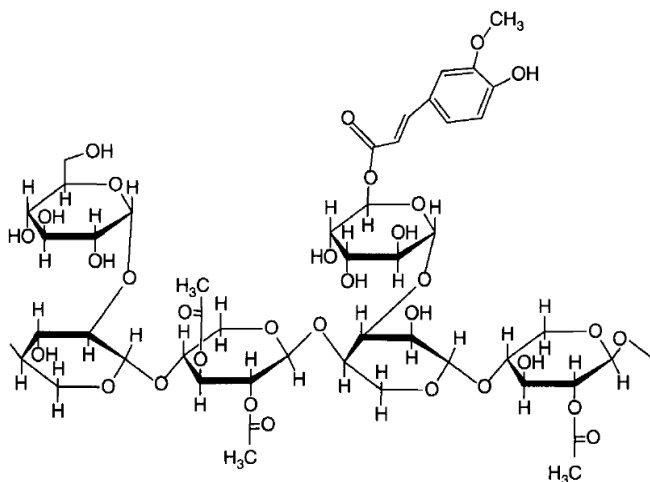


Slika 2. Prikaz amorfne i kristalične celuloze (Estela i Luis, 2013).

Esterifikacijom i eterifikacijom slobodnih hidroksilnih skupina glukoze, celulozi se mogu promijeniti svojstva poput čvrstoće, fleksibilnosti, sposobnosti vezanja vode i drugih tvari (Stenstad i sur., 2007). Osim izolacijom iz biljne biomase, celuloza se može dobiti i bakterijskom sintezom. Celuloza pripada biorazgradivim polimerima stoga ima široko područje primjene kao zamjena za plastiku. Celuloza i njeni derivati se koriste u prehrambenoj industriji za promjenu reoloških svojstva hrane, npr. ima potencijal kao dodatak vegetarijanskom mesu. Također može se koristiti kao stabilizator i zgušnjivač u farmaceutici i kozmetici. Služi i za proizvodnju membranskih sustava i filmova te u industriji papira. U biomedicini se koristi za potporu tkiva, ciljanu dostavu lijekova, zacjeljivanje rana, izradu umjetnih žila i drugo (Ullah i sur., 2016).

1.2.3.Hemiceluloza

Hemiceluloza je naziv za skupinu heteropolimera koji se nalaze u lančanom i razgranatom obliku (Taherzadeh i Jeihanipour, 2012). Za razliku od celuloze, hemiceluloza je građena od kraćih polimera, koje se sastoje od 150 do 200 jedinica (Ahmad N. i Zakaria M., 2019). Sadrži pentoze (arabinoza i ksiloza), heksoze (manoza, glukoza i galaktoza) te uronske kiseline (glukuronska, metilgalakturonska i galakturonska kiselina), a njihov udio ovisi o izvoru, vrsti i tkivu biljne sirovine (de Jong i Gosselink, 2014). U travama i slami većinu hemiceluloze čine ksilani dok u drvnjoj biomasi prevladavaju glukomanani. Ksilani su sastavljeni od β -D-ksilopiranoznih jedinica povezanih β -1,4-glikozidnim vezama (Slika 3.). Ksilani osim ksiloze sadrže i arabinozu te glukuronsku, mravlju i ferulinsku kiselinu (Bajpai, 2016). Hemiceluloza može biti acetilirana na C2 i C3 atomu osnovnog lanca ksiloze (Zhou i sur., 2016). Acetilne skupine ometaju vezanje enzima na celulozu i mijenjaju njezinu hidrofobnost. Smanjenjem broja acetilnih skupina može se utjecati na dinamiku razgradnje lignoceluloze (Zoghlami i Paës, 2019).



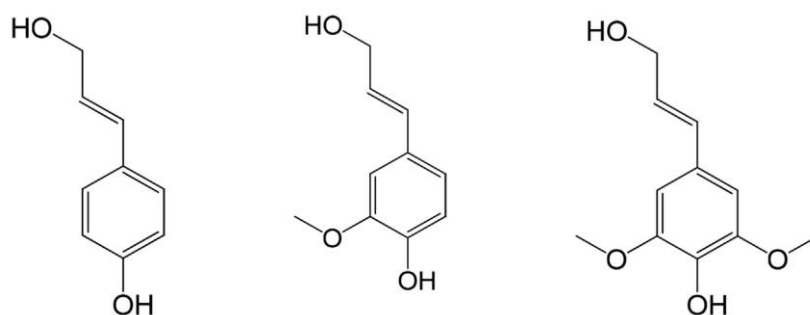
Slika 3. Kemijska struktura hemiceluloze (heteroksilana) (Taherzadeh i Jeihanipour, 2012).

Zbog razgranate strukture hemiceluloze, ona se u prirodi nalazi u amorfnom obliku (Sun i sur., 2016) te se lakše hidrolizira od celuloze. Hidrolizom hemiceluloze oslobađaju se fermentabilni pentoze i heksoze. S obzirom da hemiceluloza obavija celulozna vlakna, njezinim se uklanjanjem može povećati površina celuloze koja je dostupna enzimima, a time i uspješnost razgradnje. To se danas najuspješnije obavlja različitim kemijskim predtretmanima (alkalnim, kiselinskim i dr.; Zoghlami i Paës, 2019; Chen, 2015).

1.2.4.Lignin

Lignin je složeni polimer građen od fenilpropanskih jedinica povezanih kovalentnim i eterskim vezama. Kemijska struktura fenilpropanskih jedinica je prikazana na Slici 4. Za razliku od celuloze i hemiceluloze, lignin postoji u obliku heterogene trodimenzionalne mreže (Chen, 2015). U otpadnoj travi lignin čini 17-24 % (w/w) suhe tvari biomase dok u mekom drvu može zauzimati i do 30 % (w/w) suhe tvari biomase. U stanicama biljaka lignin nema određenu poziciju već ispunjava slobodan prostor stijenke te se sintetizira dokle god ima prostora. Sintezom lignina dobiva se čvrsta hidrofobna struktura koja postavlja druge komponente stijenke na njihovo mjesto. Ona nije fleksibilna i ne može se produžiti pa je time zaustavljen rast stanice (Taherzadeh i Jeihanipour, 2012).

Lignin povećava čvrstoću stijenke te joj pruža hidrofobnost koja pomaže u transportu vode kroz biljku. Također, lignin otežava razgradnju stijenke hidrolitičkim enzimima biljnih patogena (Bomble i sur., 2017). Prisutnost lignina u lignocelulozi primarno je odgovorna za rezistenciju na predobradu. Čvrsto je povezan uz hemicelulozu i celulozu te se njegovim uklanjanjem povećava razgradivost lignocelulozne biomase. Osim što stvara fizikalnu barijeru, lignin smanjuje biorazgradivost tako da nespecifično veže i adsorbira hidrolitičke enzime te su njegovi derivati toksični za rast mikroorganizama. Delignifikacijom dolazi do bubrenja biomase, promjene strukture lignina, povećanja površine i dostupnosti celuloze celulolitičkim enzimima (Bajpai, 2016).



Slika 4. Kemijska struktura fenilpropanskih monomera (de Jong i Gosselink, 2014). Slijeva nadesno: kumaril-alkohol, koniferil-alkohol i sinapil-alkohol.

Unatoč tome što je izvor problema prilikom hidrolize lignoceluloze, lignin ima široku primjenu u industriji i on je zapravo je najjeftinija sirovina iz koje se mogu dobiti aromatski spojevi. Enzimskom hidrolizom lignina mogu se dobiti različiti spojevi poput niskomolekulskih fenola, ferulinske kiseline, vanilinske kiseline, ketona i alkana benzena, toluena i ksilena (Chen, 2015, de Jong i Gosselink, 2014). Zbog svoje visoke ogrjevne vrijednosti, u tvornicama papira se spaljuje radi grijanja i proizvodnje električne struje. Lignosulfonati se dodaju u cement kako bi usporili njegovo sušenje (Flatt i Schober, 2012). Isto tako, zbog svoje razgranate strukture može vezati raznolike spojeve pa se dodaje u boje, pigmente, životinjsku hranu i različite smole radi promjene njihovih reoloških svojstava. Lignin, kao biološki supstitut plastici, biogorivo i obnovljiva sirovina, smanjuje ovisnost industrije o fosilnim gorivima (Vavilala i sur., 2019).

1.3. Predobrada lignocelulozne sirovine

Otpornost lignocelulozne biomase na mikrobnu i enzimsku hidrolizu posljedica je kompleksnosti strukturnih polimera lignoceluloze. Višeslojna struktura lignoceluloze zapravo je najveća prepreka široj uporabi u industriji. Čimbenici koji utječu na otpornost lignoceluloze dijele se na strukturne i kemijske. Strukturni uključuju specifičnu površinu celuloze, njenu kristaličnost, stupanj polimerizacije, volumen i veličinu pora, dok kemijske čimbenike čine sastav i udio lignina, hemiceluloze i acetilnih skupina (Zoghlami i Paës, 2019). Predobradom lignocelulozne biomase postiže se veće iskorištenje sirovina. Predobradom se narušava struktura biomase i smanjuje se otpornost na hidrolizu te dolazi do promjene sastava lignoceluloze: hidrolizira se hemiceluloza, izdvaja se celuloza te se djelomično ili potpuno uklanja lignin. Celuloza se zatim može hidrolizirati do fermentabilnih šećera (Harmsen i sur., 2013). Glavna zadaća predobrade je smanjiti kristaliničnost celuloze i ukloniti prepreke koje onemogućuju enzimima maksimalan pristup vlaknima celuloze (Ahmad i Rafein Zakaria, 2019).

Postoje različite vrste predobrade, a s obzirom na način djelovanja dijele se na fizikalne, kemijske, fizikalno-kemijske i biološke. Predobrade se mogu uspoređivati na temelju njihove cijene, djelotvornosti, mogućnosti obnavljanja katalizatora, mogućnosti frakcioniranja različitih komponenta lignoceluloze, količini inhibitora koji nastaju, gubicima ugljikohidrata i dr. (Bajpai, 2016).

Fizikalnim metodama predobrade povećava se specifična površina lignoceluloze smanjenjem veličine čestica i narušavanjem pravilnosti strukture. Postoji više vrsta fizikalne predobrade: mehaničko usitnjavanje, piroliza, ekstruzija i zračenje. Usitnjavanjem, primjerice mljevenjem se dobivaju čestice različitih dimenzija (Vrdoljak, 2019; Sun i sur., 2016). Produljenjem vremena obrade, značajno se smanjuje veličina čestica i kristaličnost celuloze, ali se i povećava potreba za energijom (Yeh i sur., 2010). Kada se obavi samo mehanička predobrada, nerijetko je energija potrebna za mljevenje veća od teorijske energije pohranjene u biomasi (Menon i Rao, 2012). Mehaničko usitnjavanje je najčešće korištena predobrada zajedno s drugim metodama jer je potrebno smanjiti veličinu čestica prije daljnje obrade, npr. kemijske ili biološke (Bajpai, 2016; Sun i sur., 2016).

Kemijska predobrada jedna je od najčešće primjenjivanih metoda jer se njome uklanja lignin i dio hemiceluloze, smanjuje se stupanj polimerizacije celuloze i njena kristaličnost (Behera i sur., 2014). Kemijske metode uključuju korištenje lužina, kiselina, organskih otapala, ionskih tekućina, ozona, vruće vode i dr. Prije provođenja kiselinske hidrolize, biomasa se usitnjava, a zatim se namače u otopini kiseline tijekom određenog vremenskog perioda. Nakon provedene predobrade, izdvajaju se tekuća i čvrsta faza te se neutraliziraju prije fermentacije (Bensah i Mensah, 2013). Kiselina koja se primjenjuje može biti razrijeđena ili koncentrirana. Mane primjene koncentrirane kiseline su štetnost za okoliš, potreba za recikliranjem i korozivno djelovanje na opremu pogona. Zbog toga se češće primjenjuje razrijeđena kiselina. Obrada razrijeđenom kiselinom (0,2-2 % w/w) provodi se pri povišenim temperaturama (160-220 °C) i tlaku s vremenom zadržavanja od nekoliko minuta (Fičko, 2019; Marđetko i sur., 2018; Shafiei i sur., 2015). Kiseline koje se koriste su sumporna, dušična, klorovodična, fosforna te mravlja i druge (Amin i sur., 2017; Behera i sur., 2014). Pri povišenoj temperaturi u kiselim uvjetima oslabljuju vodikove veze unutar lignoceluloze te kiselina ulazi u njenu strukturu. Kiselina uzrokuje cijepanje glikozidne veze unutar hemiceluloze i amorfne celuloze. Dolazi do oslobađanja glukoze, ksiloze, manoze, octene kiseline i dr. (Shafiei i sur., 2015; Behera i sur., 2014). Uklanjanjem hemiceluloze povećava se uspješnost enzimske razgradnje celulazama jer se povećava slobodna površina celuloze. Također, dolazi do supstitucije hidroksilne skupine u ligninu sa kiselinskom pa lignin topiv u kiselini prelazi u tekuću fazu (Harmsen i sur., 2010). Prema Shafiei i sur. (2015) otprilike 80-100 % hemiceluloze je topljivo u kiselini dok topljivost lignina varira u rasponu 4-26 %. Prednosti primjene kiselinske predobrade su niska cijena i jednostavnost izvođenja. Glavni

nedostatak kiselinske predobrade je potreba za neutralizacijom. Nakon obrade pH-vrijednost dobivenog kiselinskog hidrolizata kreće se između 1 i 2, a da bi se većina fermentacija mogla provesti, neutralizacija se provodi lužinama pri čemu nastaje netopljivi talog, odnosno otpad. Također, problem predstavlja razgradnja oslobođenih šećera. Ne samo da se smanjuje ukupan prinos fermentabilnih šećera već se oni razgrađuju u spojeve koji inhibiraju rast mikroorganizama (Harmsen i sur., 2010).

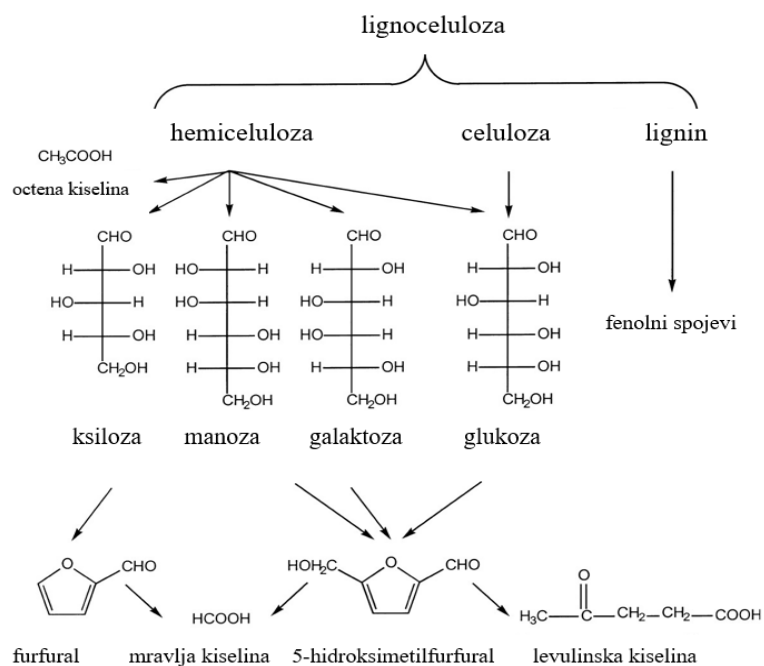
Biološke metode predobrade uključuju primjenu mikroorganizama ili enzima koji mijenjaju strukturu i kemijski sastav lignoceluloze (Bajpai, 2016). Tijekom evolucije, mikroorganizmi su razvili stanične mehanizme kojima si osiguravaju energiju za život iz okoliša. Jedan od mehanizama uključuje razgradnju lignoceluloze lučenjem enzima. Neki od njih razgrađuju staničnu stijenku biljaka i oslobađaju šećere koje mikroorganizmi mogu metabolizirati i iskoristiti za dobivanje energije (de Souza, 2013). Najčešće korišteni mikroorganizmi za razgradnju lignoceluloze su bakterije te plijesni bijelog, smeđeg i mekog truljenja. One ponajviše razgrađuju lignocelulozu dvjema vrstama enzima: hidrolitičkim i oksidativnim. Hidrolitički enzimi razgrađuju lignin i otvaraju prstene aromatskih spojeva u ligninu dok hidrolitički razgrađuju polisaharide (Andlar i sur., 2018). Najveći broj enzima pripada skupini glikozid-hidrolaza. One uključuju celobiohidrolaze (odcjepljuju celobiozu s krajeva celuloze), endoglukanaze (rascjepljuju lance unutar amorfne celuloze) i β -glukozidaze (oslobađaju jedinice glukoze iz oligosaharida) (Østby i sur., 2020).

U prirodi enzimi mogu osigurati mikroorganizmima rast na lignocelulozi kao jedinom izvoru ugljika. Oni djeluju u sinergiji s mikroorganizmima producentima jer si mikroorganizmi izlučivanjem enzima osiguravaju povoljnu kemijsku okolinu za degradaciju lignoceluloze (Bomble i sur., 2017). Na enzimsku hidrolizu utječu enzimski i supstratni čimbenici. Enzimski čimbenici se odnose na povećanje aktivnosti enzima i njihove temperaturne stabilnosti te smanjenje inhibicije produktom. Čimbenici koji su povezani uz supstrat odnose se na povećanje dostupnosti celuloze. Na njih utječe kristaliničnost i udio celuloze, dostupna površina celuloze i udio lignina i hemiceluloze u sirovini (Sun i sur., 2016). Biološka predobrada ima mnoštvo prednosti u odnosu na prethodno navedene metode: ne koriste se agresivne kemikalije, ne zahtjeva puno energije, odvija se u blagim uvjetima i ekološki je prihvatljiva. Najveća mana biološke predobrade je dugo trajanje procesa te zahtjevna kontrola parametara uzgoja (Sun i sur. 2016; Menon i Rao, 2012; Sun i Cheng,

2002). Također, moguće je da prilikom biološke predobrade plijesni iskorištavaju celulozu i hemicelulozu kao supstrat pa posljedično smanjuju oštećenje (Bajpai, 2016).

1.3.1. Inhibitori nastali kiselinskom predobradom

Kiselinskom hidrolizom se oslobađaju fermentabilni šećeri, ali osim njih nastaju i drugi spojevi te neki od njih imaju inhibicijsko djelovanje na rast mikroorganizama (Lee i sur., 2013). U kiselinskim hidrolizatima pronađeno je više od 35 potencijalnih inhibitora koji utječu na fermentaciju, a najčešći su: slabe organske kiseline, furani i fenoli (Shafiei i sur., 2015; Nichols i sur., 2005). Razgradnjom hemiceluloze oslobađaju se ksiloza, manoza, galaktoza i octena kiselina. Octena kiselina nastaje odcjepljivanjem acetilnih skupina koje su vezane unutar hemiceluloze. Glukoza se oslobađa iz celuloze i hemiceluloze. Razgradnjom lignina nastaju aromatski spojevi (fenoli). S obzirom da se proces hidrolize odvija u kiselim uvjetima pri visokoj temperaturi, istovremeno se odvija oslobađanje šećera koji se nalaze u sastavu hemiceluloze i celuloze te njihova daljnja razgradnja (Singh i sur., 2019). Razgradnjom pentoza i heksoza nastaju furfural, 5-hidroksimetilfurfural te mravlja i levulinska kiselina (Slika 5; Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000). Navedeni inhibitori smanjuju biološku aktivnost radnih mikroorganizama, oštećuju njihovu DNK te inhibiraju sintezu proteina i RNK. Furani utječu na aktivnost enzima glikolize i Krebsovog ciklusa dok primjerice, fenoli mijenjaju strukturu stanične membrane. Slabe organske kiseline inhibiraju rast mikroorganizama zakiseljavanjem citosola i smanjuju aktivnost celulaza te time posljedično utječu na enzimsku hidrolizu i konačno oštećenje (Singh i sur., 2019; Mhlongo i sur., 2015; Jönsson i sur., 2013). Zbog sinergističkog djelovanja, inhibicijski učinak je jači u prisutnosti više različitih inhibitora u hidrolizatu nego samo u prisutnosti jednog inhibitora (Sjulander i Kikas, 2020; Jönsson i sur., 2013).



Slika 5. Spojevi nastali tijekom hidrolize lignocelulozne sirovine (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000).

Kako se tijekom kiselinske predobrade nastajanje inhibitora ne može spriječiti, tijekom godina razvila se tehnologija njihovog uklanjanja prije fermentacije. Fizikalne tehnike se temelje na adsorpciji aktivnim ugljenom ili zeolitima, ekstrakciji organskim otapalima, membranskim procesima ili ionskoj izmjeni dok se kemijske oslanjaju na konverziju inhibitora u manje toksične spojeve, primjerice furfurala u furfural alkohol (Lee i sur., 2013; Liu i sur., 2004). Jedna od istraživanih metoda je i biološka razgradnja inhibitora koja podrazumijeva uključivanje mikroorganizama u uklanjanje inhibitora iz hidrolizata. Biološka metoda ima prednost u odnosu na gore navedene jer je jeftinija, ne zahtjeva dodatak kemikalija i stvara vrlo male količine (većinom) biorazgradivog otpada (Singh i sur., 2019; Nichols i sur. 2005).

1.4. Otpadni pivski trop

Tijekom procesa proizvodnje piva nastaje velika količina različitih nusproizvoda. Glavne sirovine za proizvodnju piva su voda, slad (proklijalo, osušeno i obrađeno zrno pivarskog ječma), hmelj i kvasac kao radni mikroorganizam. Proizvodnja piva započinje procesom ukomljavanja. Tijekom ukomljavanja mljeveni slad se namače u pripremljenoj vodi pri različitim temperaturama i kroz različito vrijeme zadržavanja, a time se aktiviraju enzimi (proteolitički enzimi, α -amilaze, β -amilaze npr.) dostupni u zrnu slada te tako dolazi do ošećerenja, odnosno ekstrakcije hranjivih tvari. Nakon željenog stupnja ošećerenja, odnosno željene količine fermentabilnih šećera, tekući dio (sladovina) se odvaja i koristi za daljnju proizvodnju piva, kruti dio koji zaostaje je otpadni pivski trop. Nakon ekstrakcije tvari tijekom ukomljavanja koristi se kao filtracijsko sredstvo na kominskom filteru, a zatim postaje otpadom. Uz otpadni kvasac, glavni je nusproizvod industrije piva te sačinjava oko 85% ukupnog nastalog otpada (Matijašević, L. 2015; Tang i sur., 2009). Na 1 hektolitar proizvedenog piva nastaje od 14 do 20 kg pivskog tropa. Najčešće se upotrebljava kao krmivo zbog svoje nutritivne vrijednosti i niske cijene ili za proizvodnju bioplina. Naime, zbog visokog udjela vlage i šećera sklon je brzom kvarenju pa često završi na odlagalištu prije nego što se iskoristi kao sirovina u biotehnološkim procesima. S obzirom na dostupnost, nisku cijenu i sastav, otpadni pivski trop predstavlja značajnu sirovinu za razne biotehnološke procese. Otpadni pivski trop sačinjavaju neekstrahirane tvari mljevenog zrna slada (pljevica te ugljikohidrati). Sadrži oko 40-50 % polisaharida, 30 % proteina, 5% pepela i 15 % lignina. Sastav ovisi o vrsti ječma, postupku slađenja i ukomljavanja. Otpadni pivski trop smatra se lignoceluloznom biomasom jer pola mase čine celuloza, hemiceluloza i lignin. Među polisaharidima mogu se pronaći i arabinoksilan, škrob, glukani, ksiloza, glukozna i arabinoza. Dobar je izvor aminokiselina, od koji su esencijalne: triptofan, fenilalanin, histidin, metionin i lizin (Ikram i sur. 2017).

Zbog visokog udjela polisaharida ima velik potencijal za primjenu u industrijskim procesima proizvodnje enzima, etanola, mliječne kiseline, ksilitola, butanola, aktivnog ugljena, oligosaharida i drugih (Ferraz i sur., 2013). Razgradnjom otpadnog pivskog tropa oslobađaju se fermentabilni šećeri koji su supstrat za rast mikroorganizama i proizvodnju biokemikalija. Dodatno, fenolni spojevi iz otpadnog pivskog tropa pokazuju imunomodulacijsko djelovanje u upalnim procesima. Pretpostavlja se da izolati proteina otpadnog pivskog tropa smanjuju sintezu upalnih citokina IFN- γ (McCarthy i sur., 2013).

Prema dostupnim podacima u Republici Hrvatskoj proizvede se oko 3,4 milijuna hektolitara piva i oko 46 000 do 68 000 tona otpadnog tropa. Ta količina proizvedenog pivskog tropa predstavlja velik potencijal za razvoj novih biotehnoloških proizvodnji baziranih na biorafinerijskom iskorištavanju otpadnih sirovina za proizvodnju vrijednih biokemikalija, biopolimera i biogoriva (Mijatović, 2019; Brewers of Europe, 2018; HGK, 2017).

1.5. Otpadna trava

Trave su jedna od najraširenijih biljnih porodica koja broji između 7500 i 10000 vrsta. One zauzimaju veću površinu na Zemlji nego ijedna druga porodica bilja te su prilagođene na raznolika staništa. U Hrvatskoj je zabilježeno 355 vrsta trava (Mareković i sur., 2009). Otpadna trava dobivena košnjom je jedan od izvora lignoceluloze koji bi mogao poslužiti za proizvodnju biokemikalija. Trave (*Poaceae*) pripadaju razredu jednosupnica. Jednosupnice, poput trava i žitarica, u prosjeku sadrže manje udio lignina u usporedbi sa drvom (Tablica 1.) (Kallioinen, 2014). Hemicelulozu trava ponajviše čini ksilan te manje količine ksiloglukana i drugih glukana (Scheller i Ulvskov, 2010). Kao i ostale lignocelulozne sirovine, trava je otporna na razgradnju i potrebno je provesti njezinu predobradu da bi se oslobodili fermentabilni šećeri. Proizvodnja biogoriva se pretežito temelji na kukuruzu i šećernoj repi, a prednost otpadne trave je to što ne konkurrira na tržištu hrane (de Oliveira i sur., 2014). Osim što se koriste kao izvor lignoceluloze za proizvodnju biokemikalija, nakon siliranja, trave mogu poslužiti kao stočna hrana i u proizvodnji bioplina (Jennings, 2021).

1.6. Odabrani mikroorganizmi za biorafinerijsko korištenje lignoceluloznih sirovina

Razvojem znanosti dolazimo do novih spoznaja u biotehnologiji, što nam omogućuje implementaciju održivih bioprocasa koji se baziraju na proizvodnji širokog spektra proizvoda pomoću mikroorganizama u različitim bioreaktorskim sustavima. Cilj je takvih novih tehnologija, odnosno biorafinerijskog principa iskoristiti velik potencijal mikroorganizama za dobivanje proizvoda poput biogoriva, raznih biokemikalija i biopolimera iz obnovljivih izvora sirovina. Mikroorganizmi zbog svoje fiziološke raznolikosti te sposobnosti rasta na različitim izvorima ugljika u različitim uvjetima mogu se koristiti kao radni mikroorganizmi u biorafinerijama baziranim na lignoceluloznim sirovinama. Primjena lignoceluloznih sirovina poput otpadne trave te otpadnog pivskog tropa smatra se posebice interesantnom jer takve sirovine predstavljaju izuzetno jeftin, lako dostupan i obnovljiv izvor organskog materijala (Mirza i sur., 2019).

Predmet interesa ovog rada su neke plijesni i bakterije koje su odabrane zbog svog biotehnološkog potencijala za proizvodnju raznolikog spektra proizvoda. Primjerice, plijesni koje se koriste u biotehnologiji mogu rasti na otpadnim lignoceluloznim sirovinama iz raznih industrija, a koriste se u industrijskim procesima zbog svoje metaboličke svestranosti, poznate po proizvodnji širokog spektra kemikalija, poput organskih kiselina, polisaharida, čimbenika rasta, pigmentata, antibiotika i enzima (Borges i sur., 2021). Uloga bakterija u suvremenoj biotehnologiji važna je zahvaljujući njihovoj iznimnoj fiziološkoj raznolikosti i prilagodljivosti na široki raspon uvjeta, a sposobne su sintetizirati značajni broj visokovrijednih proizvoda kao što su 2,3-butandiol i mliječna kiselina (Matoković, 2020; Imhoff, 2006). Nadalje njihova uporaba u biotehnologiji doprinosi ekonomskoj i ekološkoj održivosti procesa proizvodnje. Osim korištenja bakterija kao proizvođača raznih biokemikalija, neke bakterijske vrste se mogu koristiti u održavanju ekološke ravnoteže (Higuchi –Takeuchi i Numata,2019). Dobar primjer su fototrofne bakterije, koje su sposobne rasti na otpadnim vodama iz industrija. Korištenjem raznih procesa obrade sirovina i korištenjem raznih mikroorganizama u različitim fazama proizvodnog procesa, možemo razviti nove održive bioprocese za proizvodnju širokog spektra proizvoda, a na taj način smanjujemo ekološki utjecaj a povećavamo ekonomsku vrijednost.

1.6.1. Plijesni *Fusarium verticillioides*, *Botryosphaeria dothidea* i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae*

Plijesan *Botryosphaeria dothidea* (Slika 6.) je biljni patogen rasprostranjen širom svijeta koji može zaraziti stotine drvenastih biljnih vrsta (Marsberg i sur., 2017) uključujući i mnoge vrste od prehrambenog značaja te uzrokovati trulež plodova, pjegavost listova, odumiranje grančica, rak stabljike i grana te smrt drveća (Tang i sur., 2012; Phillips i sur., 2005). Ali unatoč problemima koje može stvoriti ova plijesan, ona se može iskoristi za proizvodnju enzima te vrijednih biokemikalija kao što su antioksidansi. Antioksidanti mogu inhibirati slobodne radikale i imaju važnu ulogu u prehrani ljudi, zaštiti hrane, kozmetici protiv starenja itd. Plijesan *Botryosphaeria dothidea* pokazala veliki potencijal za proizvodnju spojeva s antioksidacijskim djelovanjem (Druzian i sur., 2020).

Fusarium verticillioides (Slika 6.) je široko rasprostranjena plijesan koja može zaraziti i uništiti ekonomski važne usjeve i žitarice. Poznate su po proizvodnji mikotoksina koji mogu biti opasni po zdravlje. *F. verticillioides* parazitira kao hemibiotrof, što znači da ima biotrofnu fazu na živom domaćinu nakon čega slijedi nekrotrofna faza na mrtvom tkivu (Ma i sur., 2013). Česta pojava s patogenim rastom na kukuruzu je proizvodnja fumonizina, skupine visoko otrovnih sekundarnih metabolita. Konzumacija hrane kontaminirane fumonizinima povezana je s raznim bolestima životinja i epidemiološki je povezana s rakom jednjaka u ljudi (Gilchrist i sur., 1995). Iako ova plijesan može predstavljati opasnost, važan su izvor enzima lipaza. Lipaze iz plijesni *Fusarium verticillioides* dobivaju se uzgojem na čvrstim supstratima koristeći pšenične mekinje kao supstrat. Na temelju njihovih hidrolitičkih i transesterifikacijskih aktivnosti, proizvedene lipaze su okarakterizirane kao pH-ovisne, te veću konverziju supstrata postižu u alkalnom mediju. Temperaturno područje povoljno za aktivnost lipaza je od 30 do 45 °C (Borges i sur., 2021). Selektivnost lipaza ovisi o sastavu podloge, a otpadna biljna ulja mogu poslužiti kao izvor masnih kiselina. Prema autorima Borges i sur. (2021), korištenje slobodnih i imobiliziranih lipaza iz plijesni *Fusarium verticillioides* predstavlja ekonomsko učinkovitu metodu u promicanju reakcije transesterifikacije između postižući prinose od 90% u 72 sata, što potvrđuje industrijski potencijal ovih lipaza.

Plijesan *Fusarium oxysporum* (Slika 6.) je askomicetna gljiva pronađena u tlima različitih staništa od pustinja do tropskih i umjerenih šuma, travnjaka i tla tundre (Stoner, 1981). Sojevi *F. oxysporum* sveprisutni su stanovnici tla koji mogu postojati kao saprofiti te razgrađuju lignin (Crawford i sur., 1981) i složene ugljikohidrate (Bhat i sur., 1995; Christakopoulos i sur., 1996). Iako su u tlu uglavnom bezopasni ili čak mogu biti korisni biljni endofiti ili saprofiti tla, mnogi sojevi plijesni *F. oxysporum* su biljni patogeni, što je osobito značajno za poljoprivredu (Gordon i sur., 1989; Katan, 1971). Ova plijesan ima sposobnost otapanja zlata, a zatim izlučivanja na svoju površinu, prekrivajući se zlatom. Stoga se razmatra kao mogući način u otkrivanju skrivenih podzemnih rezervi zlata (Anand i sur., 2019). Također ima važnu ulogu u proizvodnji enzima celulaza i ksilanaza tijekom rasta na polučvrstim supstratima (Najjarzadeh i sur., 2021). Osim enzima koji razgrađuju celulozu i hemicelulozu, utvrđeno je da ova plijesan proizvodi i lipaze, čija se koncentracija povećava uslijed dodatka masnih kiselina i ulja u hranjivu podlogu (Rapp, 1995). Ona također može akumulirati lipide. Na podlozi s glukozom utvrđeno je da biomasa ove plijesni sadrži 42 % (w/w) lipida na suhu tvar, a na podlozi sa saharozom, uz visok omjera ugljika i dušika, zabilježeno je čak 49 % (w/w) lipida u suhoj tvari biomase (Patel i sur., 2020).



Slika 6. Plijesni na agaru, lijevo *Fusarium verticillioides* JCM 23107, u sredini *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, desno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293 (izvor: vlastite fotografije).

1.6.2. Ljubičaste nesumporne bakterije - *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodovulum adriaticum* i *Rhodobacter azotoformans*

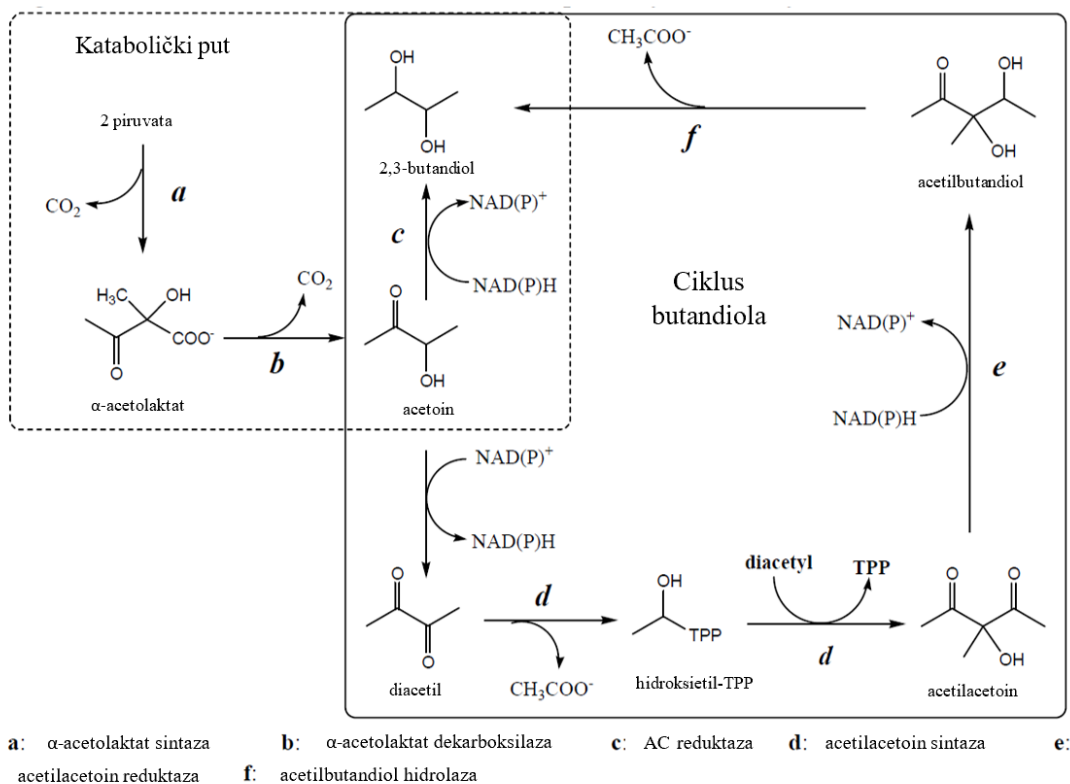
Ljubičaste nesumporne bakterije pripadaju fototrofnim ljubičastim bakterijama te čine njihovu najraznovrsniju skupinu (Novak i sur 2020; Imhoff i Trüper, 1989). Njihova raznolikost se očituje u varijacijama morfologije, strukture unutarnje membrane, sastavu proizvedenih karotenoida, korištenje izvora ugljika i elektron-donorima. Većina vrsta nesumpornih ljubičastih bakterija posjeduje bičeve kojima se kreće. Iako mogu rasti uz izvor svjetla i samo CO₂ kao izvor ugljika, većina vrsta preferira fotoheterotrofni rast na svjetlu i uz neki izvor ugljika kao što su različite organske tvari npr. masne kiseline, organske kiseline (sukcinat ili malat), alkoholi, ugljikohidrati i aromatski spojevi. S obzirom na potrebe za kisikom, ljubičaste nesumporne bakterije su mikroaerofili, te su neke vrste iznimno osjetljive na prisutnost kisika, ali većina tolerira kisik te mogu rasti u aerobnim uvjetima bez svjetla. U uvjetima bez svjetla, sinteza fotosintetskih pigmenata je potisnuta te su kulture slabo obojene ili bezbojne (Matoković, 2020; Rudolf C. i Grammel H., 2012). Kao faktori rasta kod uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija obično su potrebni različiti vitamini: biotin, tiamin, niacin te *p*-aminobenzojeva kiselina. Kvašćev ekstrakt potiče rast većine vrsta. Trenutno su ljubičaste nesumporne bakterije podijeljene u šest rodova (Imhoff, 1995). Ljubičaste nesumporne bakterije, izolirane iz raznih staništa, zanimljive su s ekološkog i ekonomskog aspekta jer se mogu koristiti u održivim procesima proizvodnje vodika kao biogoriva, za sintezu biokemikalija poput aminolevulinske kiseline za proizvodnju biopolimera (PHB), za sintezu specifičnih spojeva kao što su karotenoidi i fotosintetski pigmenti te za proizvodnju biomase (Novak i sur., 2017). Najčešće spominjana primjena ljubičastih nesumpornih bakterija je u proizvodnji 5-aminolevulinske kiseline (5-ALA). Ova se kiselina najviše proizvodi mikrobnom fermentacijom, najčešće s pomoću fotosintetskih bakterija s obzirom da je mikrobnna proizvodnja jednostavnija od kemijske sinteze te daje veće prinose (Liu i sur., 2014). Primjena genetički modificiranih sojeva daje do 50 % veće prinose 5-ALA te je do sada proveden velik broj istraživanja s različitim sojevima fotosintetskih bakterija (Meng i sur., 2016; Liu i sur., 2015; Xiu-yan i sur., 2005; Sasaki i sur., 1991). Ova kiselina se može koristiti kao herbicid ili pojačivač biljne tolerancije na stres. Nema štetnog djelovanja na usjeve, ljude i životinje te je biorazgradiva. Osim toga, uočen je velik potencijal ALA na medicinskom polju zbog mogućnosti lokaliziranja tumora i fotodinamičke terapije (Nunkaew i sur., 2014; Nishikawa i sur., 1999).

Neke vrste ljubičastih nesumpornih bakterija mogu sintetizirati i polihidroksialkanoate (PHA), koji zbog biorazgradivosti i potencijala za proizvodnju bioplastike s novim svojstvima, imaju velik značaj za razvoj novih materijala. Ulažu se veliki naponi za smanjenje cijene PHA, primjenom mikroorganizama koji provode fotosintezu pa tako mogu fiksirati CO₂ te istovremeno sintetiziraju PHA. Do sinteze PHA dolazi kada je rast stanice limitiran dušikom, fosforom ili sumporom, a izvor ugljika se nalazi u suvišku. Sinteza PHA je istraživana u nekoliko vrsta ljubičastih nesumpornih bakterija, između ostalih u *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides* i *Rhodopseudomonas palustris*. Uzgojem na butiratu kao jedinom izvoru ugljika pokazalo se da od navedenih triju vrsta najviše PHA u suhoj tvari biomase nakuplja bakterija *Rhodobacter sphaeroides* (čak do 70%), slijedi je *Rhodospirillum rubrum* (do 50%) dok *Rhodopseudomonas palustris* proizvodi najmanje PHA (oko 4%) (Higuchi-Takeuchi i sur., 2016). Osim proizvodnje PHA na kemijsko definiranim izvorima ugljika, istražio se i potencijal ljubičastih nesumpornih bakterija za sintezu PHA tijekom obrade otpadnih voda u pilot postrojenju. Koristeći mikrobne kulture ljubičastih nesumpornih bakterija, došlo je do značajnog smanjenja organskog opterećenja, smanjila se koncentracija sumpornih spojeva a proizvela se dostatna količina mikrobne biomase koja je sadržavala PHA (Sawayama i sur., 1999). Osim toga, ljubičaste nesumporne bakterije mogu proizvoditi vodik. Sagorijevanjem vodika nastaje voda kao glavni produkt, stoga se vodik smatra čistim gorivom. U podlozi sa sukcinatom kao izvorom ugljika bakterija *Rhodospirillum rubrum* može proizvesti 21 mL L⁻¹h⁻¹ vodika. Pritom proizvodnja vodika traje 70 h nakon eksponencijalne faze rasta, iako je u stacionarnoj fazi rasta manja. Navedeni rezultati sugeriraju da proizvodnja vodika nije striktno povezana s rastom bakterijskih stanica (Bianchi i sur., 2008). U svijetu već postoji primjena ovog procesa, npr. u Španjolskoj je izgrađeno postrojenje za obradu otpadne vode iz domaćinstava s ciljem proizvodnje vodika (Vasiliadou i sur., 2018). Ljubičaste nesumporne bakterije također imaju sposobnost bioremedijacije. Imobilizirana bakterija *Rhodobacter sphaeroides* pokazala se uspješnom u obradi otpadnih voda tvornica papira i rafinerije šećera (Nagadomi i sur., 2000). Također se može koristiti za obradu otpadnih industrijskih voda i kanalizacije. Takvim tretmanom značajno se smanjuju biološka potrošnja kisika te koncentracija organskih tvari, klorida, bikarbonata i sulfata pri čemu pH-vrijednost ostaje neutralna (Merugu i sur., 2014). S obzirom da mogu koristiti H₂S kao elektron-donor, ove bakterije se mogu koristiti za uklanjanje sumporovodika čime dolazi do smanjenja neugodnih mirisa i toksičnosti otpadnih voda (Bullard i sur., 2009).

1.6.3. Bakterija *Paenibacillus polymyxa*

Bakterija *Paenibacillus polymyxa* (prethodno zvana *Bacillus polymyxa*) je štapičasta, sporogena, gram-pozitivna bakterija (Jeong i sur., 2019). Zbog mogućnosti tvorbe spora može se prilagoditi raznolikim staništima te je pronađena u tlu, rizosferi, unutrašnjosti biljnog tkiva i u fermentiranoj hrani (Padda i sur., 2017). Poznata je po proizvodnji sekundarnih metabolita, antimikrobnih lipopeptida. Neki od lipopeptida su antibiotici polipeptini, polimiksini te fusaricidini (antimikotici) koji inhibiraju biljne patogene pa se mogu koristiti u poljoprivredi (Li i Chen, 2019). Bakterija *P. polymyxa* također pomaže rastu biljaka fiksacijom dušika iz atmosfere te sintezom biljnih hormona (Padda i sur., 2017).

Osim primjene u poljoprivredi, bakterija *P. polymyxa* ima potencijal za proizvodnju biokemikalija, polimera i enzima. Primjerice celulaza, glukanaza, proteaza, ksilanaza, egzopolisaharida te 2,3-butandiola (Lal i Tabacchioni, 2009). Sinteza 2,3-butandiola odvija se biokemijskim putem iz piruvata (Slika 7.) (Okonkwo, 2017). Iz jednog mola glukoze nastaju dva mola piruvata koji se prevode u jedan mol 2,3-butandiola te se u toj reakciji reoksidira jedan mol NADH. Teorijski prinos 2,3-butandiola iz glukoze iznosi $0,67 \text{ mol mol}^{-1}$ (Lal i Tabacchioni, 2009). Najveće koncentracije 2,3-butandiola postignute su pri anaerobnim i mikroaerobnim uvjetima jer je u aerobnim uvjetima fluks piruvata usmjeren u Krebsov ciklus. Kada bakterija raste u uvjetima limitacije kisikom, α -acetolaktat sintaza katalizira reakciju kondenzacije dvije molekule piruvata u α -acetolaktat, a zatim α -acetolaktat dekarboksilaza prevodi navedeni spoj u *D* ili *L*-acetoin. Izomeri 2,3-butandiola nastaju djelovanjem različitih stereospecifičnih acetoin reduktaza ili acetilacetoin reduktaza u ciklusu butandiola (Slika 7). Bakterija *P. polymyxa* može proizvesti *L*-(+)-2,3-butandiol čistoće 98 % (Sabra i sur., 2011). Osim 2,3-butandiola, bakterija *Paenibacillus polymyxa* tijekom uzgoja proizvodi i etanol, laktat, formijat, acetat, mliječnu kiselinu i sukcinat (Hakizimana i sur., 2020).



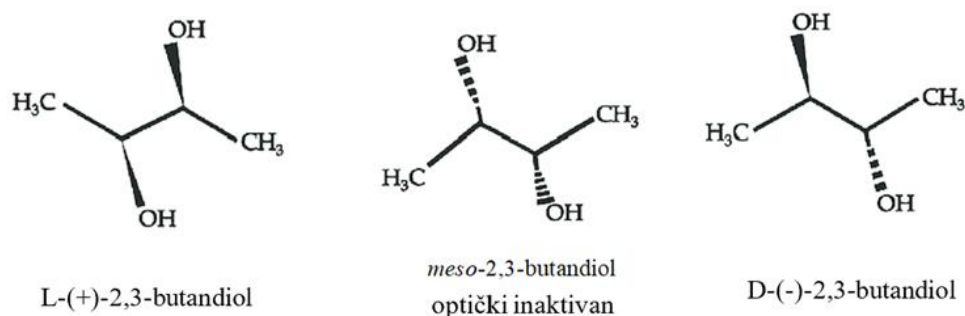
Slika 7. Biokemijski put nastajanja 2,3-butandiola (Giovannini i sur., 2008).

1.7. Odabrani proizvodi bioprocasa utemeljenih na lignoceluloznim sirovinama

1.7.1. Biokemikalije

1.7.1.1. 2,3-butandiol

2,3-butandiol je kiralna molekula diola mase 90,12 Da. Pri sobnoj temperaturi je bezbojna tekućina ili je u kristalnoj formi. Temperatura vrelišta iznosi 180 °C, a temperatura ledišta - 60 °C (Okonkwo, 2017). Ogrjevna vrijednost 2,3-butandiola iznosi 27,198 J g⁻¹ te je bliska vrijednosti etanola i drugih goriva. Dehidracijom 2,3-butandiola nastaje metil-etil-keton koji se može koristiti kao aditiv mlaznom gorivu i smolama ili kao otapalo (Syu, 2001). Esterifikacijom 2,3-butandiola nastaju poliuretani koji se koriste u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Kada se 2,3-butandiol dehidrira može se dobiti i diacetil, aroma koja se koristi u prehrambenoj industriji (Lal i Tabacchioni, 2009). Molekula 2,3-butandiola se pojavljuje u tri izomera: desnozakrećući, lijevozakrećući i *meso*-oblik (Slika 8).



Slika 8. Stereoizomeri 2,3-butandiola (Hakizimana i sur., 2020).

2,3-butandiol se može proizvesti kemijskom i biološkom sintezom. Za kemijsku sintezu 2,3-butandiola potrebni su *n*-butan i 2-buten koji se oksidiraju kisikom pri 357 °C i povišenom tlaku. Prelijevanjem vode preko reakcijske smjese nastaje 2,3-butilenoksid. Zatim hidrolizom 2,3-butilenoksida nastaje 2,3-butandiol. Dobiveni stereoisomer 2,3-butandiola ovisi o izomeru 2-butena koji je korišten (Okonkwo, 2017). Drugi način dobivanja 2,3-butandiola je mikrobiološkom proizvodnjom. Za vrijeme Drugog svjetskog rata povećala se potražnja za 1,3-butadienom, monomerom koji se koristi u sintezi gume i plastike. 1,3-butadien se može dobivati preradom derivata nafte ili reakcijom dehidracije 2,3-butandiola (Sabra i sur., 2011). Tijekom tog perioda provodila su se mnoga istraživanja mikrobiološke proizvodnje 2,3-butandiola te njegove konverzije u 1,3-butadien.

Pokazalo se da bakterije rodova *Paenibacillus*, *Klebsiella* i *Enterobacter* mogu proizvesti 2,3-butandiol uz velike prinose (Ma i sur., 2009). Osim visoke produktivnosti, prednost bakterije *K. pneumoniae* je što za rast može koristiti različite izvore ugljika koji se nalaze u lignoceluloznim sirovinama. Sličnu produktivnosti na glukozi ostvaruje bakterija *Enterobacter aerogenes* (Sabra i sur., 2011). Glavni nedostatak ovih dvaju mikroorganizma je njihova patogenost: *K. pneumoniae* uzrokuje upalu pluća, meningitis, te infekcije krvotoka i rana (CDC) dok *E. aerogenes* uzrokuje upale mokraćnih puteva i rana (Song i sur., 2010). Prednost bakterije *P. polymyxa* je što pripada grupi I. mikroorganizama na temelju parametra biosigurnosti, što znači da je mala vjerojatnost da može uzrokovati bolest u ljudi i životinja. Također, *P. polymyxa* može proizvesti L-2,3-butandiol visoke optičke čistoće (98%) dok drugi mikroorganizmi većinom proizvode *meso*-izomer. L-2,3-butandiol je poželjan izomer jer je, u odnosu na *meso*-izomer, lakše dehidrirati ga u stereospecifičnoj reakciji do 1,3-butadiena (Okonkwo, 2017). Nakon fermentacije, 2,3-butandiol se izdvaja iz podloge različitim tehnikama poput: stripiranja, pervaporacije, ekstrakcijom otapalima, reverznom osmozom i isoljavanjem s KCl ili K₂CO₃ (Xiu i Zeng, 2008). Biološki značaj 2,3-butandiola još nije u potpunosti razjašnjen. Pretpostavlja se da ga stanice mikroorganizma producenta koriste za skladištenje ugljika i energije te regulaciju omjera NADH/NAD⁺. Također, pretvorbom piruvata (pKa 2,45) u 2,3-butandiol (pKa 14,9) prevenira se zakiseljavanje citosola stanice (Sabra i sur., 2011).

1.7.1.2. Mliječna kiselina

Mliječna kiselina ili 2-hidroksipropionska kiselina je najčešća hidroksikarboksilna kiselina u prirodi (Datta i Henry, 2006). Može se dobiti fermentacijom ili kemijskom sintezom. Proizvodnja postupkom fermentacije privukla je interes zbog svojih prednosti, a to su proizvodnja čistih izomera L(+)- ili D(-)- mliječne kiseline, upotreba obnovljivih i jeftinih sirovina, mala potrošnja energije i blagi uvjeti potrebni za provođenje mikrobnog procesa proizvodnje mliječne kiseline (Žunar i sur., 2020). Prirodna je organska kiselina s dugom poviješću primjene u prehrambenoj, farmaceutskoj, tekstilnoj i kemijskoj industriji. Posljednjih godina potražnja za mliječnom kiselinom znatno se povećala zbog njene upotrebe kao monomera u proizvodnji polilaktične kiseline (engl. polylactic acid PLA) (Ouyang i sur., 2013), koji je biorazgradivi i biokompatibilni polimer sa širokim spektrom primjene (Abdel-Rahman i sur., 2013).

U prehrambenoj industriji, koja čini velik dio potražnje, mliječna kiselina se koristi kao sredstvo za zakiseljavanje zbog blagog kiselog okusa u usporedbi s drugim kiselinama koje se koriste u hrani, te kao konzervans u maslinama i ukiseljenom povrću. Također se koristi kao aroma, regulator pH-vrijednosti i inhibitor nepoželjnih bakterija u preradi hrane, poput slatkiša, kruha, bezalkoholnih pića, piva i drugih proizvoda. Neophodno nastaje fermentacijom hrane, npr. nalazi se u jogurtu, maslacu i konzerviranom povrću. Mliječna kiselina ima primjenu u industriji štavljenja kože, u procesima uklanjanja kamenca, u tekstilnoj industriji kao sredstvo za vezivanje boje, a može zamijeniti etilen glikol u antifrizu, što rezultira većom učinkovitošću i nižim troškovima. U kemijskoj industriji, mliječna kiselina može se prevesti u etanol, propilen glikol i akrilne polimere. Derivati mliječne kiseline, soli i esteri koriste se kao otapala, emulgatori i plastifikatori (Idler i sur., 2015). Mliječna kiselina se također koristi u proizvodnji propilen-oksida, acetaldehida, akrilne kiseline, propionske kiseline, 2,3-pentandiona, etil laktata, laktida i polilaktične kiseline. U farmaceutskoj industriji derivati mliječne kiseline koriste se u implantatima, tabletama, dijalizi, kirurškim šavovima i kontroliranim sustavima za otpuštanje lijekova. U kozmetičkoj industriji mliječna kiselina se koristi u proizvodnji higijenskih i estetskih proizvoda zbog rehidratirajućeg, antimikrobnog i pomlađujućeg djelovanja na kožu. Također se koristi u proizvodima za oralnu higijenu (Castillo Martinez i sur., 2013).

1.7.1.3. Etanol

Etanol je hlapljiva, bezbojna tekućina koja ima blagi miris. Gori plavim plamenom, bez dima, koji nije uvijek vidljiv pri normalnom svjetlu. Fizikalna svojstva etanola prvenstveno proizlaze iz prisutnosti njegove hidroksilne skupine i kratkoće ugljikovog lanca. Etanolna hidroksilna skupina može sudjelovati u vodikovoj vezi, pa je stoga etanol viskozniji i manje hlapljiv od manje polarnih organskih spojeva slične molekulske mase poput propana (Lide, 2000). Etanol se može proizvoditi petrokemijski, hidratacijom etilena ili biološkim postupcima tj. fermentacijom ugljikohidrata pomoću mikroorganizama. Koji će postupak biti ekonomičniji, ovisi o prevladavajućim cijenama zaliha nafte i žitarica. Tako su se npr. za industrijsku proizvodnju etanola u SAD-u 1970-ih godina koristile petrokemijske sirovine, no 1980-ih su uveli subvencije za etanol proizveden iz kukuruza pa se danas gotovo u cijelosti proizvodi iz te sirovine (Wittcoff i sur., 2004).

Najznačajnija uporaba etanola kao čiste kemikalije je kao motorno gorivo i dodatak gorivu. Primjerice, Brazil se posebno oslanja na upotrebu etanola kao pogonskog goriva, dijelom i zbog toga što je ova država jedan od vodećih svjetskih proizvođača etanola. Benzin koji se prodaje u Brazilu sadrži najmanje 25 % bezvodnog etanola. Prednost bioetanola u odnosu na benzin je što molekula etanola sadrži kisik, a to omogućuje potpunije sagorijevanje ugljikovodika (Yuksel i Yuksel, 2004). Osim toga upotrebom bioetanola smanjuje se emisija stakleničkih plinova, posebice ugljikovog monoksida i dušikovih oksida kao i toksičnih aromatskih spojeva (Zhang i sur., 2012).

Etanol spada u tzv. bazne kemikalije, koje se koriste kao sirovine za daljnju preradu u kemijskoj industriji, ili za laboratorijsku primjenu. Značajna je i širom svijeta rasprostranjena primjena etanola kao prekursora za druge organske spojeve kao što su etil-halogenidi, etil-esteri, dietil-eter, octena kiselina i etil-amini (Priscila i sur., 2011). Etanol se smatra univerzalnim otapalom, jer struktura njegove molekule omogućuje otapanje i polarnih, hidrofilnih i nepolarnih, hidrofobnih spojeva. Kako etanol također ima nisku točku vrenja, lako ga je ukloniti iz otopine koja je korištena za otapanje ostalih spojeva, što ga čini popularnim sredstvom za ekstrakciju biljnih ulja. Etanol se nalazi u bojama, tinkturama, flomasterima i proizvodima za osobnu njegu. Polisaharidi se talože iz vodene otopine u prisutnosti etanola, a zbog toga se koristi u pročišćavanju DNA i RNA (Fregel i sur., 2010).

1.7.1.4. Masne kiseline

Masne kiseline su karboksilne kiseline s dugim alifatskim lancem, koji može biti zasićen ili nezasićen. Većina masnih kiselina u prirodi ima nerazgranati lanac s parnim brojem atoma ugljika, koji iznosi od 4 do 28 (Moss i sur., 1997). Masne kiseline glavni su sastojak lipida (do 70 % w/w) kod nekih mikroorganizama kao što su mikroalge (Chen i sur., 2012), ali kod većine drugih organizama ne nalaze se u samostalnom obliku, već postoje kao tri glavne vrste estera: trigliceridi, fosfolipidi i kolesterilni esteri. U bilo kojem od ovih oblika, masne kiseline su važni prehrambeni izvori energije za životinje i važne su strukturne komponente stanica. Masne kiseline obično se industrijski proizvode hidrolizom triglicerida te naknadnim uklanjanjem glicerola. Fosfolipidi predstavljaju drugi izvor masnih kiselina. Neke masne kiseline proizvode se sintetički hidrokarboksilacijom alkena (Zhang i sur., 2011). Masne kiseline uglavnom se koriste u proizvodnji sapuna, kako u kozmetičke svrhe, tako i u slučaju metalnih sapuna, koji služe kao maziva.

Masne kiseline se također putem svojih metilnih estera prevode u masne alkohole i masne amine, koji su preteča površinski aktivnih sredstava, deterdženata i maziva. Pored toga, masne kiseline se primjenjuju kao emulgatori, sredstva za teksturiranje, sredstva za vlaženje, sredstva protiv pjene ili sredstva za stabilizaciju emulzija (Johansson i Svensson, 2001). Esteri masnih kiselina s jednostavnijim alkoholima (kao što su metil-, etil-, *n*-propil-, izopropil- i butil- esteri) koriste se kao omekšivači u kozmetici i drugim proizvodima za osobnu njegu te kao sintetička maziva (Sturms i sur., 2017) dok se esteri masnih kiselina sa složenijim alkoholima, poput sorbitola, etilen-glikola, dietilen-glikola i polietilen-glikola, konzumiraju u hrani ili se koriste za obradu vode ili kao tekućine za obradu metala (Xin i sur., 2015). Još jedna primjena masnih kiselina je u proizvodnji biodizela, alternativnog goriva za dizel motore. To je obnovljivo, netoksično gorivo s niskom emisijom plinova (Sandrolhosseini i sur., 2011). Više vrsta mikroalgi, bakterija i kvasaca mogu sintetizirati više od 20 % masenog udjela lipida u suhoj tvari i poznati su kao oleaginozni mikroorganizmi. Određene vrste mogu sintetizirati lipide i do 70 % masenog udjela u suhoj tvari, ovisno o uvjetima uzgoja, poput visokog omjera C / N. Najpoznatiji primjeri su mikroalge *Chlorella vulgaris* i *Chlamydomonas reinhardtii*, kvasci *Cryptococcus curvatus* i *Rhodospiridium toruloides* te plijesni *Fusarium oxysporum* i *Fusarium equiseti* (Patel i sur., 2020).

1.7.1.5. Fotosintetski pigmenti

Karotenoidi su skupina prirodnih pigmenata u koju spada preko 750 kemijskih spojeva koje sintetiziraju biljke, alge i fotosintetske bakterije. Ova skupina spojeva može se podijeliti na ksantofile (koji sadrže kisik) i karotene (koji su isključivo ugljikovodici i ne sadrže kisik). Svi navedeni spojevi su derivati tetraterpena, što znači da su sintetizirani iz 8 molekula izoprena i sadrže 40 atoma ugljika. Karotenoidi općenito apsorbiraju valne duljine od 400 do 550 nm (ljubičasto do zeleno svjetlo) zbog čega su žute, narančaste ili crvene boje. Voće i povrće osigurava većinu od 40 do 50 karotenoidnih spojeva koji se nalaze u ljudskoj prehrani. α -karoten, β -karoten, β -kriptoksantin, lutein, zeaksantin i likopen najčešći su karotenoidi u prehrani (Wang, 2014). Osnovne građevne jedinice karotenoida su izopentenil-difosfat (IPP) i dimetilalil-difosfat (DMAPP) (Nisar i sur., 2015). Ova dva izomera izoprena koriste se za tvorbu različitih spojeva, ovisno o biološkom putu koji se koristi za sintezu izomera (Kuzuyama i Seto, 2012).

Poznato je da biljke koriste dva različita puta za proizvodnju IPP-a: put citosolne mevalonske kiseline (MVA) i plastidni put metileritritol-4-fosfata (MEP). Za proizvodnju karotenoida biljke koriste MEP za sintezu IPP-a i DMAPP-a (Nisar i sur., 2015). Put MEP-a rezultira smjesom IPP:DMAPP u omjeru 5:1 (Kuzuyama i Seto, 2012). IPP i DMAPP sudjeluju u nekoliko reakcija, što rezultira glavnim karotenoidnim prekursorom, geranilgeranil difosfatom (GGPP). GGPP se može prevesti u karotene ili ksantofile prolazeći kroz niz različitih koraka unutar biosintetskog puta karotenoida. Provedene su mnoge studije kako bi se ispitaio antioksidacijski, antikancerogeni i antimikrobni potencijal karotenoida. Oni bi u budućnosti mogli služiti kao alternativa sintetski dobivenim tvarima koje se primjenjuju u hrani, a također se mogu primijeniti u farmaceutskoj industriji u razvoju novih lijekova za razna patološka stanja. Osim toga, istražuje se mogućnost primjene karotenoida u smanjenju rizika obolijevanja od raka i neurodegeneracijskih bolesti (Tanaka i sur., 2012).

1.7.1.6. Enzimi - celulaze i ksilanaze

Poznato je da enzimi igraju presudnu ulogu kao katalizatori, što dovodi do njihove uporabe u raznim industrijama (Adrio i Demain, 2005). Preko 500 industrijskih proizvoda dobiva se pomoću enzima (Johannes i Zhao, 2006; Kumar i Singh, 2013). Potražnja za industrijskim enzimima kontinuirano raste, vođena sve većom potrebom za održivim razvojem. Mikroorganizmi su služili i služe kao jedan od najznačajnijih izvora mnogih enzima (Adrio i Demain, 2008). Mnogi industrijski procesi, uključujući kemijsku sintezu za proizvodnju kemikalija i lijekova, imaju nekoliko nedostataka: niska katalitička učinkovitost, nedostatak enantiomerne specifičnosti za kiralnu sintezu, potreba za visokom temperaturom, niskim pH-vrijednostima i visokim tlakom. Također, upotreba organskih otapala dovodi do problema odlaganja organskog otpada. Enzimi imaju prednost za navedene primjene jer djeluju u blagim reakcijskim uvjetima (npr. temperatura, pH-vrijednost, atmosferski uvjeti), ne trebaju zaštitu funkcionalnih skupina supstrata, imaju dugo vrijeme poluraspada, visoku stereoselektivnost koja daje stereo- i regio-kemijski definirane produkte reakcijama bržim za 10^5 do 10^8 puta (Johnson, 2013). Nadalje, enzimi se mogu genetički i kemijski modificirati kako bi se poboljšala njihova ključna svojstva: stabilnost, specifičnost supstrata i specifična aktivnost. Iako postoje nedostaci i kod upotrebe enzima, npr. određeni enzimi zahtijevaju kofaktore, ovi problemi se ipak mogu riješiti različitim pristupima poput recikliranja kofaktora i upotrebe cijelih stanica.

Mnogobrojni industrijski procesi koriste enzime ili katalizatore cijelih mikrobnih stanica. Ljudska aktivnost svakodnevno doprinosi ogromnoj količini lignoceluloznog otpada koji se proizvodi. Nažalost, njen puni potencijal obično nije iskorišten, i većina biomase završava na odlagalištima. Lignocelulolitički enzimi su ključni za razvoj ekonomične, ekološki prihvatljive i održive biološke metode za predtretman i razgradnju lignocelulozne biomase koja se može iskoristiti za dobivanje važnih krajnjih proizvoda kao što su enzimi, organske kiseline, kemikalije, hrana za životinje i biogoriva.

Ksilanaze su klasa enzima koji razgrađuju linearni polisaharid ksilan u ksilozu, razgrađujući na taj način hemicelulozu, jednu od glavnih sastavnica biljnih staničnih stijenki. Komercijalne primjene ksilanaze uključuju izbjeljivanje drvene pulpe bez klora prije postupka izrade papira. Osim toga, ksilanaze se koriste i kao dodaci hrani peradi; u pšeničnom brašnu za poboljšanje rukovanja tijestom i kvalitete pečenih proizvoda (Beg, 2001); za ekstrakciju kave, biljnih ulja i škroba; u poboljšanju hranjivih svojstava poljoprivredne silaže

i stočne hrane; te u kombinaciji s pektinazom i celulazom za bistrenje voćnih sokova. U budućnosti se ksilanaze mogu koristiti za proizvodnju biogoriva iz otpadnog biljnog materijala (Amorim i sur., 2005; Prema i Subramaniyan, 2002).

Celulaze su enzimi koji kataliziraju celulozu, razgradnju celuloze i nekih srodnih polisaharida. Enzimi potrebni za hidrolizu celuloze uključuju (1) endoglukanaze, koje nasumce razgrađuju lance celuloze; (2) celobiohidrolaze, koji oslobađaju dimere glukoze s oba kraja celuloznih lanaca; i (3) beta-glukozidaze, koje proizvode glukozu iz oligomernih lanaca (Adrio i Demain, 2014). Iako se celulaze već dugi niz godina široko koriste u obradi tekstila, ti enzimi dobivaju dodatno razmatranje na tržištu enzima zahvaljujući svojoj sposobnosti razgradnje lignocelulozne sirovine. Trošak celuleze ključno je pitanje u postizanju niske cijene pretvorbe lignocelulozne biomase u biogoriva i druge proizvode (Rubin, 2008; Wilson, 2009; Zhang, 2011). Plijesni mogu proizvesti nativne celuleze u koncentracijama većim od 100 g L^{-1} (Demain AL. I Vaishnav P., 2009). Prema Svjetskom fondu za divlje životinje (WWF), industrija celuloze i papira, koja uključuje proizvode poput uredskog i katalošskog papira, sjajnog papira i ambalaže na bazi papira, koristi preko 40% ukupnog industrijskog drva kojim se trguje na svjetskoj razini (Shah, 2013). U toj industriji celuleze imaju veliku ulogu, primjerice koriste se za uklanjanje boje, bioremedijaciju industrijskog otpada, izbjeljivanje i poboljšanje vlakana. Sposobnost celuleza da uklanjaju nečistoće glavni je fokus njihove upotrebe u proizvodnji deterdženata.

Celuleze su dostupne na tržištu različitih marki. Na primjer, Celluzyme[®] (Novozyme A/S, Danska) i Carezyme[®] (Sigma-Aldrich, SAD) dvije su glavne marke koje se primjenjuju u mješavinama deterdženata. Te se smjese deterdženata uglavnom primjenjuju u pranju tkanina od pamuka i mješavina pamuka. Ovi deterdženti vrše modifikacije vlakana na tkanini kako bi poboljšali svjetlinu boje, mekoću te uklonili čestice tla. Biotehnologija hrane danas celuleze smatra neprocjenjivim resursom zbog njihove povećane primjenjivosti u širokom spektru procesa. Pročišćavanje sokova od voća i povrća, smanjenje viskoznosti nektara, koncentriranje pirea, promjena osjetilnih svojstava voća, ekstrakcija karotenoida, ekstrakcija maslinovog ulja i poboljšanje kvalitete pekarskih proizvoda jedni su od različitih procesa u prehrambenoj biotehnologiji u kojima se celuleze koriste širom svijeta. Naposljetku, treba spomenuti primjenu celuleza u proizvodnji biogoriva ošeceranjem lignoceluloznih sirovina (Jayasekara i Ratnayake, 2019).

1.7.2. Korištenje mikrobne biomase u novim biotehnološkim procesima

1.7.2.1. Iskorištavanje biomase ljubičastih nesumpornih bakterija

Ljubičaste nesumporne bakterije prepoznate su u suvremenoj biotehnologiji zbog njihove iznimne fiziološke raznolikosti, jednostavnosti prilagodbe na široki raspon uvjeta, te sposobnosti sinteze većeg broja proizvoda s mogućom komercijalnom primjenom (Imhoff, 2006). One su dio prirodne populacije vlažnih, neobrađenih polja i laguna za obradu otpadnih voda, gdje provode biorazgradnju organskih i anorganskih spojeva te istovremeno sintetiziraju visokovrijedne nusproizvode (Merugu i sur., 2012). Uporaba fotosintetskih mikroorganizama općenito se smatra jednom od potencijalnih metoda za smanjenje troškova proizvodnje, a važan je i njihov doprinos u održavanju ekološke ravnoteže zahvaljujući upotrebi solarne energije te sposobnosti fiksacije CO₂ i dušika iz atmosfere (Higuchi – Takeuchi i Numata, 2019). Istraživanje i razvoj tehnologije doveli su prepoznavanja mnogih proizvoda biomase ove skupine bakterija koju a imaju potencijalnu primjenu u području medicine, bioenergetike te prehrambene i poljoprivredne industrije (McKinlay i Hardwood, 2010; Higuchi – Takeuchi i Numata, 2019). Iako je najčešća primjena ljubičastih bakterija u proizvodnji 5-aminolevulinske kiseline (Liu i sur., 2014) i bioplastike, točnije polihidroksialkanoata (Higuchi-Takeuchi i sur., 2019) posljednjih godina uvelike se istražuje primjena biomase ljubičastih nesumpornih bakterija u procesima pročišćavanja tla i otpadnih voda iz raznih industrija (Matoković, 2020; Sakarika i sur., 2020; Vasiliadou i sur., 2018; Kobayashi i Kobayashi, 1995).

Jedan od primjera je obrada otpadnih voda tvornica papira i rafinerije šećera pomoću imobiliziranih stanica bakterije *Rhodobacter sphaeroides* (Nagadomi i sur., 2000). Biomasa ove bakterije se također može koristiti za obradu otpadnih industrijskih voda i kanalizacije (Matoković, 2020; Novak i sur., 2020; Novak i sur., 2017). U tretiranim otpadnim vodama je pokazano značajno smanjenje biološke potrošnje kisika te smanjenje koncentracije organskih tvari, klorida, bikarbonata i sulfata pri čemu je pH ostao neutralan (Merugu i sur., 2014). S obzirom da mogu koristiti H₂S kao elektron donor, ove bakterije se mogu koristiti za uklanjanje sumporovodika čime dolazi do smanjenja neugodnih mirisa i toksičnosti u otpadnim vodama (Bullard i sur., 2009). Također je pomoću biomase ljubičastih bakterija postignuto djelotvorno pročišćavanje voda koje potječu iz farmaceutske industrije i imaju veliku kemijsku potrošnju kisika (KPK) (Madukasi i sur., 2009), otpadnih voda iz stočarstva (Myung i sur., 2004), voda koje sadrže ulje (Takeno i sur., 2005) i slično. Mnoge vrste

razgrađuju i azo-boje koje pripadaju skupini sintetičkih bojila te se često nalaze u otpadnim vodama tekstilne industrije (Frigaard, 2016; Liu i sur., 2006). Pročišćavanje otpadnih voda peradarske farme ljubičastim nesumpornim bakterijama istovremeno omogućava rast bakterijske biomase koja potiče rast biljaka i tako obrađene otpadne vode sadrže tvari za poticanje rasta biljaka kao što je aminolevulininska kiselina, polifosfati te razni indoli. Primjerice, dokazano je da u tom procesu vrste *Rhodopseudomonas faecalis* i *Rhodopseudomonas palustris* sintetiziraju visoku razinu 5-aminolevulininske kiseline (ALA) u otpadnoj vodi i na svjetlu i u mraku, a pritom nakon 72 sata dolazi do razgradnje 88,1 % kemijskih spojeva koji doprinose kemijskoj potrošnji kisika (Bunraksa i sur., 2020). Biomasa iz navedenih procesa obrade izrazito je bogata hranjivim sastojcima te može poslužiti kao komponenta krmiva ili gnojivo u poljoprivredi, a također može absorbirati i eliminirati neugodne mirise koji se oslobađaju iz otpadnih materijala (Kobayashi i Kobayashi, 1995). Jednostanični protein (*single – cell protein*, eng.) oblik je sirovog ili rafiniranog proteina koji potječe od algi, kvasaca ili bakterija, a koristi se za ishranu životinja ili ljudi. Iako se mikroalge i cijanobakterije opsežno istražuju i koriste se kao jednostanični proteini, postoji nekoliko prednosti korištenja ljubičastih nesumpornih bakterija u odnosu na alge (Vrati, 1984; Sasaki i sur., 1998; Hülsen i sur., 2018; Delamare - Deboutteville i sur., 2019). Osim ekonomskih prednosti, ove su bakterije dobar izvor proteina s obzirom na to da sirovi proteini čine 60-70 % njihove ukupne suhe tvari (Vrati, 1984; Kobayashi i Kobayashi, 1995). Također su bogate esencijalnim aminokiselinama, karotenoidnim pigmentima i vitaminima, poput pantotenske kiseline, niacina, folne kiseline te vitaminima E, B₁₂, B₂, B₁ i B₆, što ih čini pogodnima za ishranu riba i ostalih životinja. Uz to, ugljikohidrati čine 20-25 % od mase suhe tvari nekih bakterija, što takvu biomasu čini prikladnom za razne slatkovodne ribe (George i sur, 2020).

Ljubičaste nesumporne bakterije, osim što se koriste za poticanje rasta riba i škampa, također mogu poboljšati njihov imunitet i zaštititi ih od bolesti. Probiotička smjesa ovih bakterija može spriječiti bolest škampa, poboljšati preživljavanje i rast škampa, a također održavati kvalitetu vode koja se koristi za uzgoj škampa. Također je utvrđeno da *Rhodovulum sulfidophilum* PS342 može djelovati kao sredstvo za biokontrolu proizvodnjom proteolitičkih enzima za održavanje kvalitete vode i antimikrobnih spojeva za zaštitu škampa od bolesti izazvanih bakterijama iz roda *Vibrio* (George i sur, 2020). Jedno od značajki ovih bakterija je i nakupljanje polifosfata i proizvodnja raznih spojeva za poticanje rasta biljaka. Osim što

imaju pozitivan učinak na rast biljaka, povećavaju prinos i kvalitetu jestive biljne biomase, mogu povećati otpornost na stres u okolišu te otpornost na utjecaj teških metala u biološkim uvjetima (Alloul, 2019; Sakarika i sur., 2020; Costa i sur., 2017).

1.7.2.2. Iskorištavanje biomase funga

Globalizacijom svjetske industrije, tržište industrije ambalaže poraslo je tijekom posljednjih godina. Postojeći uobičajeni industrijski materijali za pakiranje, polistiren i polietilen, uglavnom se temelje na naftnim derivatima koji imaju razne nedostatke u vidu velike potrošnje energije tijekom proizvodnje, poteškoća u razgradnji i time izazivaju zagađenje okoliša. „Zeleni“ biokompoziti dobiveni iz prirodnih materijala mogu ponuditi održivu alternativu plastičnoj ambalaži proizvedenoj na bazi nafte u širokom rasponu primjene (Cotettet i sur., 2020; Girometta i sur., 2019). Primjerice, tvrtka Shenzhen Teq Dev., razvila je ambalažni materijal na bazi micelija koristeći poljoprivredne sirovine, kao što su stabljike kukuruza ili pšenična slama. Proizvod ima nekoliko korisnih svojstava jer je biorazgradiv i lagan. Također doprinosi recikliranju poljoprivrednih proizvoda i nusproizvoda te može zamijeniti postojeće ambalažne materijale, smanjujući na taj način onečišćenje okoliša (Girometta i sur., 2019). Biomaterijal također pokazuje dobru elastičnost i puferska svojstva, što ga čini posebno prikladnim kao materijal za pakiranje (Nawawi i sur., 2020; Cerimi i sur., 2019; Haneef i sur., 2017). U tekstilnoj industriji je trend korištenje zamjena za prirodnu kožu. Takav materijal se može izraditi na bazi gljiva i predstavlja skupinu tkanina koje su prihvatljive s etičkog i ekološkog aspekta i sve više udovoljavaju estetskim i funkcionalnim očekivanjima potrošača te postaju prihvaćene kao alternativa goveđoj i sintetičkoj koži (Jones i sur., 2021), a dobivaju se recikliranjem jeftinih nusproizvoda iz poljoprivrede i šumarstva u hitinske polimere i druge polisaharide. Nakon fizikalne i kemijske obrade micelija gljive, dobiva se materijal koji vizualno nalikuje koži i pokazuje usporediva svojstva materijala i taktilnosti (Jones i sur., 2021). Na kraju, miceliji različitih gljiva su komercijalno dostupni, jeftini i važni u prehrani ljudi i za različite biotehnološke proizvode (Cotettet i sur., 2020; Girometta i sur., 2019).

1.7.2.3.Hitin i hitozan

U prethodnom poglavlju opisana je upotreba biomase plijesni i nekih gljiva za proizvodnju novih materijala. Osim same biomase, plijesni su izvor polimera hitina i hitozana koji počinju dobivati sve veću važnost u suvremenim bioprocima. Stanične stijenke plijesni su bogate hitinom i hitozanom, a udio u suhoj tvari biomase može biti između 5-10% (Shiwei i sur., 2020; Nawawi i sur., 2020). Značajne količine se mogu sintetizirati tijekom aerobnog uzgoja a dokazano je da se udio hitina i hitozana mijenja s promjenom morfologije plijesni (Sharifyazd i Karimi, 2017; Karimi i sur., 2006). Hitin izdvojen iz gljiva znatno je hidrofobniji od hitina izdvojenog iz rakova, što ukazuje na mogućnost primjene za oblaganje hidrofilnih materijala poput celuloze a može se i primijeniti kao premaz, membrane te za pakiranje (Nawawi i sur., 2020), a miješanjem kompleksa hitina i β -glukana iz gljiva u različitim omjerima mogu se dobiti novi materijali s prilagodljivim vlačnim svojstvima.

Hitin je po strukturi dugolančani polimer *N*-acetilglukozamina. Ovaj polisaharid primarna je komponenta staničnih stijenki gljiva, egzoskeleta člankonožaca, poput rakova i insekata, trenica mekušaca, kljunova glavonožaca i ljustica riba (Amemiya i sur., 2015). Jednu od mogućih primjena hitin može naći u poljoprivredi budući da je dobar induktor biljnih obrambenih mehanizama za kontrolu bolesti (El Hadrami i sur., 2010). Ima potencijala za upotrebu kao gnojivo ili sredstvo za poboljšanje tla, dakle za poboljšanje plodnosti i otpornosti biljaka što u konačnici može povećati prinos usjeva (Debode i sur., 2016; Sarathchandra i sur., 1996). Primjeri potencijalne uporabe kemijski modificiranog hitina u preradi hrane uključuju proizvodnju jestivih filmova te kao dodatak za zgušnjavanje i stabiliziranje hrane i emulzija u prehrambenoj industriji (Tzoumaki i sur., 2011; Shahidi i sur., 1999). U postupcima povećanja čvrstoće papira koriste se hitin i hitozan (Gaellstedt i sur., 2005; Hosokawa i sur., 1990). Također su istraživani kao adjuvansi u cjepivima zbog svoje sposobnosti stimuliranja imunološkog odgovora (Elieh Ali Komi i sur., 2017). Hitin i hitozan su u fazi razvoja kao nosači u istraživanjima tkivnog rasta i zacjeljivanja rana, te u pokušajima pronalaska funkcionalnijih zavoja, kirurškog konca i materijala za alotransplantaciju (Bedian i sur., 2017; Cheung i sur., 2015). Šavovi od hitina istraživani su dugi niz godina, ali trenutno nisu prisutni na tržištu. Glavni problem je nedostatak elastičnosti te komplicirana izrada niti (Ducheyne i sur., 2011). Hitinska nano-vlakna ekstrahiraju se iz otpadaka rakova i gljiva radi mogućeg razvoja proizvoda u tkivnom inženjerstvu, medicini i industriji (Ifuku, 2014). Nedavno je hitin predložen za upotrebu u građevinskim konstrukcijama, alatima i drugim

čvrstim predmetima od kompozitnog materijala hitina u kombinaciji s drugim materijalima. Hitin kao biopolimer djeluje kao vezivo u stvaranju kompozitnog materijala sličnog betonu. Autori vjeruju da bi se otpadni materijali iz proizvodnje hrane (npr. ribe ljuske, egzoskeleti rakova i insekata) mogli koristiti kao sirovina za proizvodne procese (Shiwei i sur, 2020).

Hitozan je linearni polisaharid koji se sastoji od β -1,4-vezanih D-glukozamina (deacetilirana jedinica) i N-acetil-D-glukozamina (acetilirana jedinica). Može se pripremiti alkalnom hidrolizom hitina. U poljoprivredi se hitozan obično koristi za tretiranje sjemena i kao pojačivač rasta biljaka te kao ekološki prihvatljiv biopesticid koji pojačava sposobnost biljaka da se brane od gljivičnih infekcija (Linden i sur., 2000). Hitozan može smanjiti okolišni stres uslijed suše i siromašnog tla, ojačati vitalnost sjemena, povećati prinose i usporiti propadanje voća i povrća (Linden i Stoner, 2007). Hortikulturalna primjena hitozana povećava cvjetanje i produžuje život rezanog cvijeća i božićnih drvca. Hitozan se može koristiti u hidrologiji kao dio postupka filtracije, budući da omogućava povezivanje sitnih čestica sedimenta, koje se potom uklanjaju tijekom pješčane filtracije. Kao dodatak u filtraciji vode, hitozan u kombinaciji s pijeskom uklanja do 99% zamućenja (Woodmansey, 2002). Također uklanja iz vode teške metale, boje i ulja. Hitozan pripada biološkim adsorbensima koji se koriste za uklanjanje teških metala bez negativnih utjecaja na okoliš (Yong i sur., 2015.) U kombinaciji s bentonitom, želatinom, silikagelom ili drugim sredstvima za fino pročišćavanje koristi se za bistrenje vina, medovine i piva. Dodan pri kraju procesa proizvodnje, hitozan poboljšava flokulaciju i uklanja stanice kvasca, čestice voća i organske tvari koje zamućuju vino (Howard, 2006). Hitozan se koristi za smanjenje krvarenja u nekim obolima za rane, a za medicinsku uporabu u SAD-u dobio je odobrenje 2003. godine. Također može usporiti bakterijske i gljivične infekcije te ublažiti opekline (Zhang i sur., 2015; Ducheyne i sur., 2011). Hitozanska hemostatska sredstva su soli dobivene miješanjem hitozana s organskom kiselinom (poput jantarne ili mliječne kiseline). Hemostatski agens djeluje interakcijom između stanične membrane eritrocita (negativni naboj) i protoniranog hitozana (pozitivni naboj) što dovodi do uključivanja trombocita i brzog stvaranja tromba (Baldrick, 2010).

Mikrobiološko onečišćenje prehrambenih proizvoda ubrzava proces kvarenja i povećava rizik od bolesti uzrokovanih potencijalno opasnim patogenima. Kontaminacija hrane obično dolazi s površine hrane, što čini površinsku obradu i pakiranje presudnim čimbenicima koji

osiguravaju kvalitetu i sigurnost hrane. Biorazgradivi filmovi hitozana mogu očuvati različite prehrambene proizvode, Te pritom zadržavaju svoju čvrstoću i ograničavaju gubitak mase zbog dehidracije. Danas se već razvijaju kompozitni biorazgradivi filmovi koji sadrže hitozan i antimikrobna sredstva što predstavlja sigurnu alternativu za očuvanje prehrambenih proizvoda (Al-Tayyar i sur., 2020). Dodatak ulja klinčića i β -ciklodekstrina značajno povećava antimikrobno djelovanje filmova hitozana protiv bakterija *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* i *Candida albicans* (Farahat, 2020).

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Primjenom fizikalno-kemijskih i bioloških metoda predobrade lignoceluloznih sirovina u kombinaciji s uzgojem odgovarajućih radnih mikroorganizama, koji koriste komponente lignoceluloze, mogu se pronaći nova rješenja za ekološki i ekonomski održive procese proizvodnje različitih biotehnoških produkata. Stoga je opći cilj ovog rada razvoj održivih procesa biorafinerijskog iskorištavanja otpadne trave i otpadnog pivskog tropa, kao obnovljivih lignoceluloznih sirovina, za dobivanje proizvoda visoke dodane vrijednosti: enzima (lignocelulolitički enzimi), biomaterijala (hitin i hitozan), biomase kao izvora vrijednih sastojaka (pigmenata i masnih kiselina), baznih biokemikalija (2,3-butandiol, mliječna kiselina) i biogoriva (etanol).

Na našem području otpadna trava i otpadni pivski trop dostupni su u značajnim količinama. Kako se ove potencijalne biotehnoške sirovine ne bi tretirale kao otpad, što se u današnje vrijeme ne može smatrati primjerenim, željelo se ukazati na mogućnost njihovog korištenja za razvoj novih bioprocasa. Biorafinerijski princip znači razvoj procesa koji imaju smanjeni utjecaj na okoliš te iskorištavaju obnovljive sirovine u najvećoj mogućoj mjeri. Da bi to bilo moguće, u ovom radu je primijenjeno više metoda predobrade sirovine i nekoliko radnih mikroorganizama koji prema dostupnoj literaturi nisu ranije korišteni na pivskom tropu i otpadnoj travi. Radi boljeg iskorištavanja svih vrsta otpada nastalog u prikazanom procesu, također je bio cilj istražiti mogućnost korištenja fototrofnih mikroorganizama za obradu otpadne vode koja bi nastala tijekom proizvodnje lignocelulolitičkih enzima osmišljene u ovom radu. Stoga je istražena mogućnost korištenja navedene otpadne vode za proizvodnju komercijalno zanimljive mikrobne biomase kao izvora pigmenata i masnih kiselina.

Specifični ciljevi ovog rada su:

- Provesti proces predobrade otpadne lignocelulozne biomase (otpadna trava i otpadni pivski trop) fizikalno-kemijskim i biološkim metodama.
- Istražiti kinetiku rasta plijesni *Botryosphaeria dothidea*, *Fusarium verticillioides* i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* na čvrstoj podlozi dobivenoj kiselinskom hidrolizom otpadne trave i među navedenim plijesnima provesti odabir najboljeg producenta lignocelulolitičkih enzima s obzirom na enzimsku aktivnost. Odabranu plijesan, koja posjeduje najveću lignocelulolitičku enzimsku aktivnost, uzgojiti u

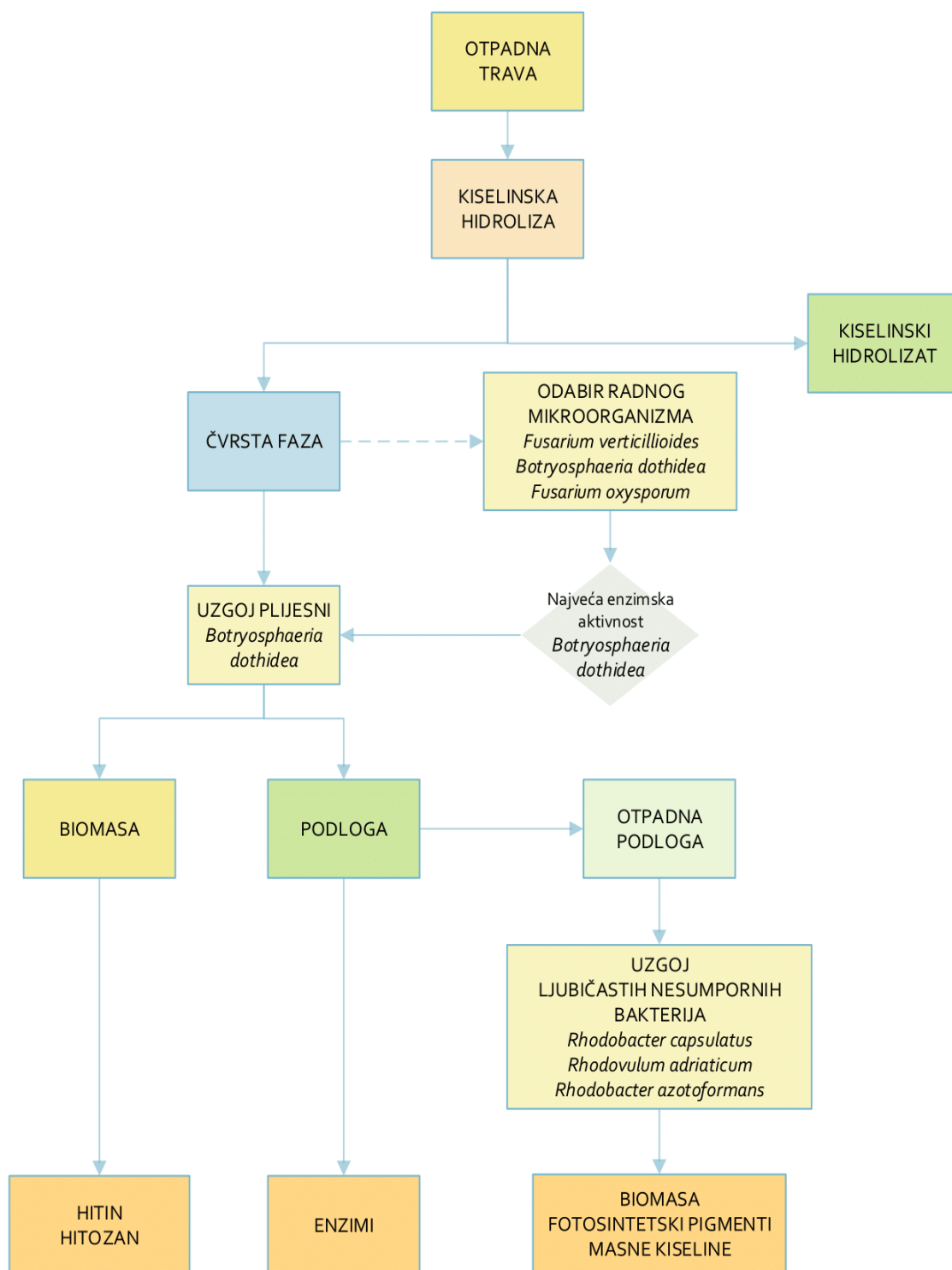
većem mjerilu u barbotirajućem bioreaktoru na podlogama s prethodno obrađenom otpadnom travom kako bi se proizveli lignocelulolitički enzimi.

- Istražiti utjecaj izvora ugljika (glukoze, ksiloze i njihove kombinacije) na rast i sintezu 2,3-butandiola, mliječne kiseline i etanola pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742.
- Fizikalno-kemijskim te enzimskim metodama obraditi otpadni pivski trop s ciljem dobivanja tekućih lignoceluloznih hidrolizata kao hranjivih podloga za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, te potom provesti šaržni uzgoj navedene bakterije u bioreaktoru s miješalom i istražiti proizvodnju 2,3-butandiola, mliječne kiseline i etanola.
- Radi boljeg iskorištavanja svih vrsta otpada nastalog u procesu proizvodnje enzima, primijeniti otpadnu podlogu iz procesa proizvodnje lignocelulolitičkih enzima kao sirovinu za uzgoj biomase fototrofnih ljubičastih nesumpornih bakterija koja sadrži fotosintetske pigmente i masne kiseline.
- Izdvojenu biomasu plijesni, kao sekundarni proizvod dobiven nakon provedene proizvodnje lignocelulolitičkih enzima, iskoristiti za proizvodnju biopolimera hitina i hitozana.

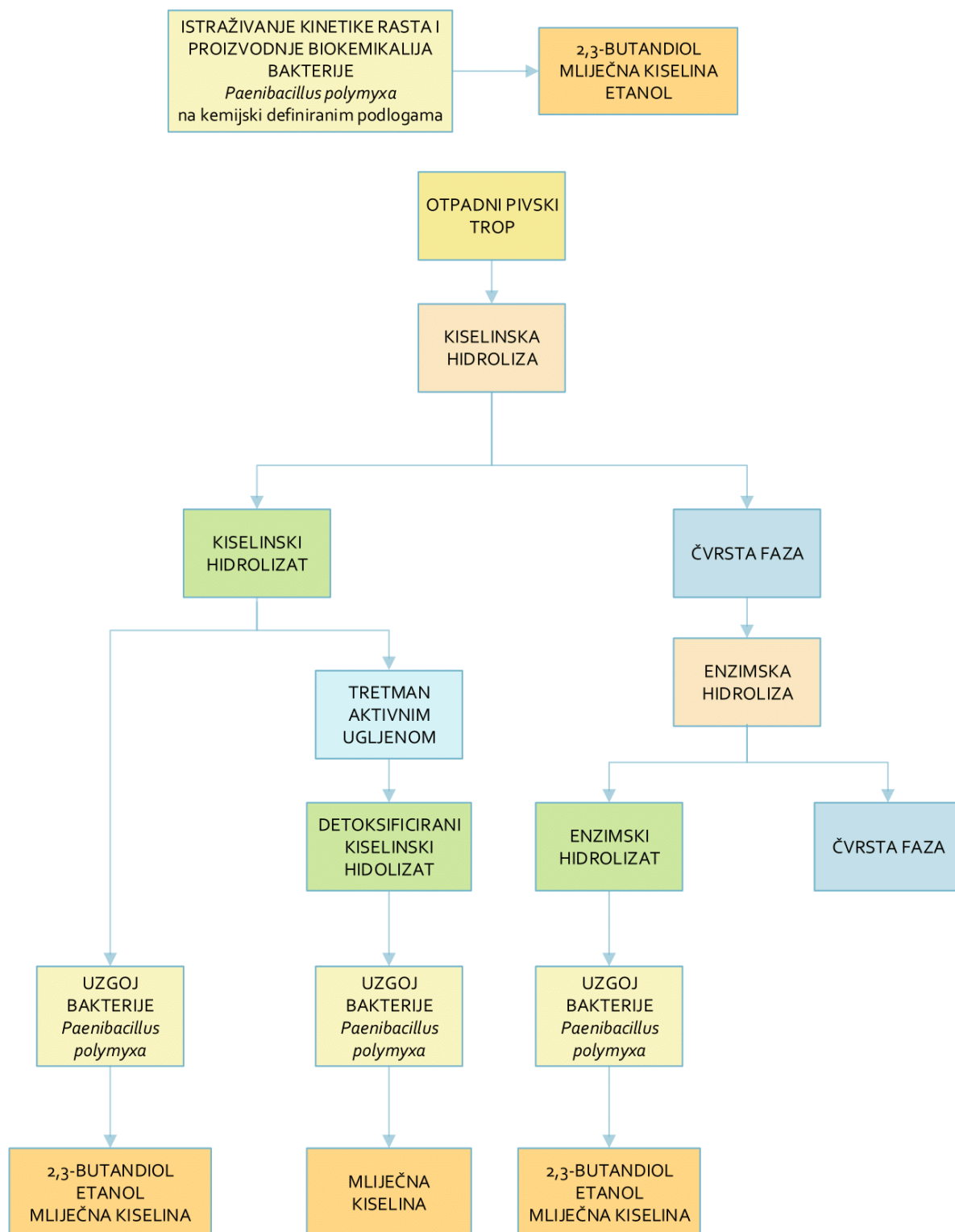
3. MATERIJAL I METODE

3.1. Procesni dijagram biorafinerijskog iskorištavanja otpadne trave i otpadnog pivskog tropa za proizvodnju specifičnih biokemikalija i biogoriva

Tijek provedbe eksperimenata u ovome radu shematski je prikazan na Slikama 9. i 10.



Slika 9. Biorafinerijsko iskorištavanje otpadne trave.



Slika 10. Biorafinerijsko iskorištavanje otpadnog pivskog tropa

3.2.Materijali

3.2.1. Radni mikroorganizmi korišteni u istraživanju biorafinerijskog koncepta iskorištavanja otpadnih lignoceluloznih sirovina

Radni mikroorganizmi u ovom radu bile su plijesni *Fusarium verticillioides* JCM 23107, *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293, ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T, *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 te bakterija *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva. Radne kulture plijesni i bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 čuvane su odgovarajućim na hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama na 4°C, dok su kulture ljubičastih nesumpornih bakterija čuvane u odgovarajućim Erlenmeyerovim tikvicama na svjetlu i sobnoj temperaturi.

3.2.2. Sirovine, kemikalije i enzimi korišteni u istraživanju

Tablica 2. Sirovine, kemikalije i komercijalni enzimi korišteni u istraživanju.

Kemikalija	Stupanj čistoće	Proizvođač
agar	tehnički	Biolife, Italija
aktivni ugljen	p.a.	Kemika, Hrvatska
amonijev acetat	≥ 98 %	Merck KgaA, Njemačka
amonijev sulfat	≥ 99 %	Honeywell, SAD
arabinogalaktan	>95 %	Megazyme, Irska
arabinoksilan	95 %	Megazyme, Irska
bakrov sulfat pentahidrat	99 %	Honeywell, SAD
borna kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
Cellulase enzyme blend	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD
cinkov klorid	p.a.	Kemika, Hrvatska

Tablica 2.-nastavak Sirovine, kemikalije i komercijalni enzimi korišteni u istraživanju.

činkov sulfat heptahidrat	99 %	Merck KgaA, Njemačka
dinitrosalicilna kiselina	96 %	Kemika, Hrvatska
etanol	96 %	GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska
fenol	99 %	Kemika, Hrvatska
galaktomanan	98 %	Megazyme, Irska
glukoza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
glutamat	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
kalijev dihidrogenfosfat	≥ 99 %	Kemika, Hrvatska
kalijev hidrogenfosfat	≥ 98 %	Kemika, Hrvatska
kalijev natrijev tartarat	p.a.	Kemika, Hrvatska
karboksimetilceluloza	99 %	Sigma-Aldrich, SAD
kobaltov klorid heksahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
ksiloza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
kukuruzna močevina	za upotrebu u biotehnologiji	Dynamite Baits, UK
kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
lihenan	80 %	Megazyme, Irska
magnezijev sulfat heptahidrat	≥ 99 %	LACH NER d.o.o., Češka
malat	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
manganov klorid dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
manganov sulfat	98 %	Kemika, Hrvatska

Tablica 2.-nastavak Sirovine, kemikalije i komercijalni enzimi korišteni u istraživanju.

mesni ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
mikrokristalična celuloza	99 %	Sigma-Aldrich, SAD
mravlja kiselina	» 98 %	Honeywell, SAD
natrijev hidroksid	≥ 98 %	Merck KGaA, Njemačka
natrijev molibdat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev tartarat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
octena kiselina	99,5 %	Avantor, SAD
pepton	za upotrebu u biotehnologiji	Fischer Scientific, UK
sumporna kiselina	96 %	Merck KgaA, Njemačka
Tween 80	99 %	Merck KgaA, Njemačka
Viscozyme L	za upotrebu u biotehnologiji	Novozyme, Danska
željezov sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
tiamin klorid	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
nikotinska kiselina	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
cijanokobalamin	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
kalcijev klorid dihidrat	p.a.	Merck, Njemačka
biotin	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD

Lignocelulozne sirovine korištene u istraživanjima su otpadna trava (92 % suhe tvari) i otpadni pivski trop (91 % suhe tvari). Pivski trop je dobiven tijekom proizvodnje piva u mikropivovari Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada. Sastav otpadnog pivskog tropa te otpadne trave, određen nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize (Poglavlje 3.3.6.9) prikazan je u Tablici 3. U Tablici 4. nalazi se sastav čvrste faze nakon kiselinske hidrolize i enzimske hidrolize čvrste faze dobivene kiselinskom hidrolizom, također određeni prethodno navedenom metodom.

Tablica 3. Kemijski sastav suhe tvari otpadnog pivskog tropa i otpadne trave.

Tvar	Maseni udio u otpadnom pivskom tropu [%]	Maseni udio u otpadnoj travi [%]
glukani	30,68	30,14
ksilani	4,65	14,59
arabinani	4,79	2,46
topivi lignin	4,17	2,88
netopivi lignin + pepeo	19,86	28,94
octena kiselina	1,26	1,77
mravlja kiselina	1,02	0,00
furani	1,57	-

Tablica 4. Kemijski sastav suhe tvari čvrste faze nakon kiselinske hidrolize i enzimske hidrolize čvrste faze otpadnog pivskog tropa dobivene kiselinskom hidrolizom.

Tvar	Maseni udio u čvrstoj fazi nakon kiselinske hidrolize [%]	Maseni udio u čvrstoj fazi nakon enzimske hidrolize [%]
glukani	36,69	14,18
ksilani	2,13	3,53
arabinani	1,36	3,45
topivi lignin	1,91	0,44
netopivi lignin + pepeo	47,49	43,52
octena kiselina	1,75	2,23
mravlja kiselina	3,63	2,48
furani	1,47	1,36

3.2.3. Hranjive podloge

3.2.3.1. Hranjive podloge za uzgoj plijesni *Fusarium verticillioides* JCM 23107, *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293

Podloge su pripremljene tako da se izračunata i odvagana masa potrebnih tvari iz Tablice 5. doda u Erlenmeyerove tikvice te se doda određen volumen demineralizirane vode. Zatim slijedi sterilizacija u autoklavu tijekom 20 minuta pri 121 °C. Na isti način se priprema hranjiva podloga za barbotirajući reaktor samo što se sterilizacija provodi u bioreктору. Hranjive podloge za čuvanje kulture su istog sastava kao podloga C, ali bez otpadne trave uz dodatak 15 g/L agara.

Tablica 5. Kemijski sastav hranjivih podloga za uzgoj plijesni *Fusarium verticillioides* JCM 23107, *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293.

Kemikalija	γ [g L ⁻¹]		
	podloga A	podloga B	podloga C
glukoza	-	10,0	30,0
ekstrakt kvasca	5,0	5,0	5,0
amonijev hidrogenfosfat	1,4	1,4	1,4
kalijev dihidrogenfosfat	2,0	2,0	2,0
kalijev hidrogenfosfat	0,5	0,5	0,5
magnezijev sulfat heptahidrat	0,2	0,2	0,2
manganov sulfat heptahidrat	0,1	0,1	0,1
bakrov sulfat pentahidrat	0,1	0,1	0,1
Tween 80	1,0	1,0	1,0
kiselinski obrađena otpadna trava	200	10,5	11,1

3.2.3.2. Hranjiva podloga za uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija - *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T, *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340

Za uzgoj inokuluma korištena je podloga sastava navedenog u Tablici 6., dok je za uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu, korištena podloga dobivena nakon uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea* u barbotirajućem reaktoru (Poglavlje 3.2.4.1.2). Fermentirana podloga nakon uzgoja je centrifugirana kako bi se uklonila biomasa plijesni i dijelovi nerazgrađenog supstrata. Volumen tekuće faze izuzet nakon uzgoja iznosio je 1,5 L i raspoređen je u tikvice manjeg volumena, te steriliziran u autoklavu kroz 20 minuta na 121 °C. U ohlađenu podlogu je dodano 1 mL otopine vitamina (Tablica 7.) i 1 mL otopine elemenata u tragovima (Tablica 8.). Hranjive podloge za čuvanje kulture podloga sastava su navedenog u Tablici 6 uz dodatak tvari rasta i elemenata u tragovima (Tablica 7 i 8).

Tablica 6. Kemijski sastav hranjive podloge za uzgoj inokuluma ljubičastih nesumpornih bakterija.

Tvar	γ [g L ⁻¹]
ekstrakt kvasca	1,500
malat	4,000
glutamat	4,000
amonijev sulfat	0,800
kalijev dihidrogenfosfat	0,500
kalijev hidrogenfosfat	0,500
magnezijev sulfat heptahidrat	0,200
kalcijev klorid dihidrat	0,053
manganov sulfat heptahidrat	1,2·10 ⁻³

Tablica 7. Kemijski sastav otopine vitamina.

Kemikalija	γ [g L⁻¹]
tiamin klorid	$1 \cdot 10^{-3}$
nikotinska kiselina	$1 \cdot 10^{-3}$
cijanokobalamin	$1 \cdot 10^{-6}$
biotin	$1 \cdot 10^{-5}$

Tablica 8. Kemijski sastav otopine elemenata u tragovima.

Kemikalija	γ [g L⁻¹]
amonijev sulfat	0,8000
kalijev dihidrogenfosfat	0,5000
kalijev hidrogenfosfat	0,5000
magnezijev sulfat heptahidrat	0,2000
kalcijev klorid dihidrat	0,0530
manganov sulfat heptahidrat	0,0012

3.2.3.3. Hranjive podloge za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

3.2.3.3.1. Kemijski definirane hranjive podloge za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

Inokulum bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 uzgojen je na podlozi s peptonom (5 g L^{-1}) i mesnim ekstraktom (3 g L^{-1}). Kulture su prethodno čuvane na čvrstim podlogama u Petrijevim zdjelicama istog sastava uz dodatak 15 g L^{-1} agara.

Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u tikvicama proveden je na dva izvora ugljika (pojedinačno i u kombinaciji 1:1) pri različitim koncentracijama. Sastav podloge nalazi se u Tablici 9. U svaku podlogu dodano je 3 mL L^{-1} otopine elemenata u tragovima čiji je sastav naveden u Tablici 10.

Tablica 9. Kemijski sastav podloge i faktori rasta za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742.

	Podloga								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tvar	$\gamma \text{ [g L}^{-1}\text{]}$								
glukoza	30,0	50,0	70,0	-	-	-	10,0	20,0	30,0
ksiloza	-	-	-	30,0	50,0	70,0	10,0	20,0	30,0
kvašćev ekstrakt	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
pepton	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
magnezijev sulfat heptahidrat	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
kalijev dihidrogenfosfat	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
kalijev hidrogenfosfat	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
amonijev acetat	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
amonijev sulfat	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

Tablica 10. Kemijski sastav otopine elemenata u tragovima za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranim podlogama.

Tvar	γ [g L⁻¹]
željezov sulfat heptahidrat	2,500
kobaltov klorid heksahidrat	0,075
bakrov sulfat pentahidrat	0,031
borna kiselina	0,258
cinkov klorid	0,021
natrijev molibdat dihidrat	0,023
kalijev natrijev tartarat	2,100

3.2.3.3.2. Kompleksne hranjive podloge za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktorskim sustavima

Za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktorima korištene su tri kompleksne podloge. Kiselinskom predobradom (Poglavlje 3.3.2) otpadnog pivskog tropa u visokotlačnom reaktoru dobivena je tekuća faza koja je korištena kao podloga za uzgoj u bioreaktoru s miješalom (podloga KH) (Poglavlje 3.2.4.1.1). Čvrsta faza dobivena kiselinskom predobradom otpadnog pivskog tropa enzimski je hidrolizirana te je dobivena tekuća faza koja je korištena za uzgoj bakterije u bioreaktoru s miješalom (podloga EH) (Poglavlje 3.2.4.1.2.). Treća podloga bila je detoksicirana tekuća faza dobivena nakon kiselinske predobrade otpadnog pivskog tropa (podloga DKH) (Poglavlje 3.3.3). U sve tri navedene podloge, prije uzgoja, dodano je 4 g L^{-1} kvašćevog ekstrakta (izvor dušika). Sastav podloga za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktorskim sustavima nalazi se u Tablici 11.

Tablica 11. Kemijski sastav podloge nakon kiselinske i enzimske hidrolize pivskog tropa*.

	Podloga KH ^a	Podloga DKH ^b	Podloga EH ^c
Tvar	$\gamma \text{ [g L}^{-1}\text{]}$		
celobioza	6,97	/	3,69
glukoza	26,89	22,04	33,27
ksiloza	11,57	9,67	3,68
arabinoza	5,62	4,73	0,52
octena kiselina	0,77	0,77	5,65

-u svaku podlogu dodan je kvašćev ekstrakt u koncentraciji od 4 g L^{-1}

^a - Kiselinski hidrolizat otpadnog pivskog tropa

^b - Kiselinski hidrolizat otpadnog pivskog tropa tretiran aktivnim ugljenom

^c - Enzimski hidrolizirana čvrsta faza pivskog tropa zaostala nakon kiselinske hidrolize

3.2.4. Oprema

3.2.4.1. Bioreaktori i reaktor za obradu lignoceluloznih sirovina

3.2.4.1.1. Bioreaktori s miješalom

Za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na hranjivoj podlozi dobivenoj enzimskom hidrolizom zaostalog čvrstog dijela otpadnog pivskog tropa nakon kiseline hidrolize (podloga EH) korišten je bioreaktor s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Njemačka) (Slika 11.). Izrađen je od nehrđajućeg čelika te je ukupnog volumena od 30 L. Miješalo ima tri turbine postavljene na tri visine, od kojih svaka ima 6 ravnih lopatica. Elektromotor koji pokreće miješalo ima snagu 0,9 kW. Kontrolnom jedinicom bioreaktora može se regulirati i pratiti temperatura i pH-vrijednosti podloge, brzina okretaja miješala, protok zraka u reaktor, razina pjene i podloge kao i parcijalni tlak kisika u podlozi (polarografska kisikova elektroda). Reaktor je moguće istovremeno opskrbiti s najviše četiri različita plina. Ulazni i izlazni membranski filteri za zrak nalaze se na poklopcu reaktora. Na poklopcu se također nalaze i tri ulaza koja se mogu koristiti za nacjepljivanje hranjive podloge i dodavanje različitih otopina pomoću peristaltičkih pumpa koje su u sklopu uređaja. Reaktor se sterilizira vodenom parom preko plašta.



Slika 11. Bioreaktor s miješalom Biostat Cplus (izvor: vlastita fotografija).

U staklenom bioreaktoru s miješalom (Biostat MD, B. Braun Biotech International, Njemačka) proveden je uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kiselinskom hidrolizatu (podloga KH). Korisni volumen reaktora iznosi 1,5 L. Miješalo ima jednu turbinu sa 6 ravnih lopatica. Bioreaktor je povezan s komandnom pločom preko koje se provodi automatska regulacija temperature i pH-vrijednosti. Reaktor s podlogom sterilizira se vodenom parom u autoklavu.

3.2.4.1.2. Barbotirajući bioreaktor

Aerobni uzgoj plijesni *Botryosphaeria dothidea* proveden je u laboratorijskom bioreaktoru Chemap AG (Volketswil, Švicarska) (Slika 12.) korisnog volumena 5 L. Zrak se uvodi u bioreaktor preko filtera za zrak te kroz sapnicu koja se nalazi u središtu reaktora. Aeracija se regulira pomoću rotametra. Sterilizacija hranjive podloge odvija se indirektno vodenom parom. Uzorkovanje se provodi kroz otvor na poklopcu reaktora.



Slika 12. Bioreaktor Chemap AG (izvor: vlastita fotografija).

3.2.4.1.3. Horizontalni rotirajući cijevni reaktor

Horizontalni rotirajući cijevni reaktor (Slika 13.) korišten je za enzimsku hidrolizu čvrste faze zaostale nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa. Bioreaktor je izrađen od nehrđajućeg čelika, a sastoji se od reaktora, kontrolne jedinice, nosača i elektromotora. Snaga elektromotora iznosi 0,9 kW a ukupni volumen je 30 L. Pomoću kontrolne jedinice može se regulirati broj okretaja, koji iznosi maksimalno 60 min^{-1} . Unutar reaktora nalaze se dva lopatasta miješala dimenzija $0,6 \times 0,04 \text{ m}$.



Slika 13. Horizontalni rotirajući cijevni reaktor (izvor: vlastita fotografija).

3.2.4.1.4. Visokotlačni reaktor za obradu lignoceluloznih sirovina

Za predobradu lignocelulozne sirovine razrijeđenom sumpornom kiselinom (Poglavlje 3.3.2) korišten je visokotlačni reaktor tvrtke „Marus-ATM” (Zagreb, Hrvatska) (Slika 14.) ukupnog volumena 20 L. Lignocelulozna sirovina se stavlja u perforiranu košaru te se prelijeva razrijeđenom sumpornom kiselinom. Reaktor se grije preko plašta koji sadrži termičko ulje. Ono se grije u vanjskoj posudi pomoću električnih grijača. Pumpa omogućuje strujanje zagrijanog ulja unutar plašta reaktora. Mjeri se temperatura sadržaja u reaktoru te temperatura termičkog ulja, koja se može regulirati pomoću kontrolne jedinice. Na kraju procesa otvara se ventil za paru te se ona ispušta iz reaktora.

Također, kada se smjesa ohladi, otvara se ventil na dnu reaktora koji služi za ispuštanje tekućeg dijela hidrolizata. Čvrsti dio ostaje u perforiranoj košari koja se vadi s gornje strane, nakon otvaranja poklopca.



Slika 14. Visokotlačni reaktor za obradu lignoceluloznih sirovina (izvor: vlastita fotografija).

3.2.4.2. Uređaj za plinsku kromatografiju

Koncentracije i sastav estera masnih kiselina u biomasi ljubičastih nesumpornih bakterija određene su pomoću Shimadzu GC-2010Plus AF sustava (Shimadzu, Kyoto, Japan). Ovaj uređaj se sastoji od automatskog uzorkivača i injektora (AOC-20i), peći s kapilarnom kolonom, te FID detektora i računala s GC Solutions programom za prikupljanje i obradu podataka.

3.2.4.3. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

Tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti, uređajem UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD, analizirani su tekući uzorci dobiveni tijekom opisanih eksperimenata. Uređaj (Slika 13.) se sastoji od crpke (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H⁺, Phenomenex) dimenzija 150×7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB

CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 μL , a protok mobilne faze 0,6 mL min^{-1} .



Slika 15. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC) (izvor: vlastita fotografija).

3.2.4.4. Centrifuge

Za izdvajanje plijesni i bakterijske biomase iz hranjive podloge korištena je centrifuga Beckman, Model J-21B. Za izdvajanje biomase iz uzoraka korištena je centrifuga „Thermo Scientific SL 8R“. Da bi se uzorci pripremili za UPLC analize, korištena je centrifuga „CF-10“ (Witeg, Njemačka).

3.2.4.5. UV-Vis spektrofotometar

Spektrofotometar Cary 100, UV-VIS“ (Agilent Technologies, SAD) radi pri valnim duljinama od 190 do 900 nm, a rezultati mjerenja spremaju se u „Cary WinUV software“. Ovim spektrofotometrom određena je:“

- apsorbancija hranjive podloge kao indirektnog pokazatelja rasta stanica bakterija, na valnoj duljini od 600 i 660 nm.
- apsorpcijski spektar suspenzije ekstrahiranih fotosintetskih pigmenata u rasponu valnih duljina od 350 do 900 nm za određivanje njihove koncentracije
- apsorbancija pri 595 nm za određivanje koncentracije proteina po Bradfordu

- apsorbancija pri 575 nm za određivanje koncentracije ksiloze i glukoze

Za mjerenje optičke gustoće hranjive podloge izuzeti uzorci s biomasom su homogenizirani i prebačeni u staklene kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Njemačka). Za određivanje proteina po Bradfordu i enzimske aktivnosti korištene su plastične kivete.

3.2.4.6. Ostala oprema

Analitička vaga Shimadzu, AX-200 W/O AC ECTA korištena je za odvage kemikalija te za određivanje suhe tvari biomase, dok je za potrebe vaganja sirovina korištena tehnička vaga Tehnica ET-1211 tvrtke Tehnica Železniki. Za sušenje centrifugiranih uzoraka s bakterijskom biomasom, izuzetih tijekom rasta stanica, korišten je sušionik Instrumentaria ST-50. Hranjive podloge, reaktor i laboratorijsko posuđe sterilizirani su korištenjem autoklava tvrtke Sutjeska. Za dobivanje koncentrata proteina korištena je filtarska membrana za centrifugu (Merck).

Za pohranu uzoraka korišten je zamrzivač Gorenje. Uzgoj u tikvicama proveden je na tresilici RM 71 (B. Braun Biotech. International, Sartorius group). Vrtložna miješalica korištena je za homogenizaciju uzoraka prije analize. Termomikser TS-100 (BioSan) korišten je za miješanje i održavanje stalne temperature tijekom određivanja enzimske aktivnosti. Za termostatiranje tijekom pripreme uzoraka za analizu plinskom kromatografijom korištena je vodena kupelj Inko.

3.3. Metode

3.3.1. Priprema inokuluma za uzgoj biomase plijesni i bakterija

Za uzgoj inokuluma plijesni *Fusarium verticillioides* JCM 23107, *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 i *Fusarium oxysporum f. sp. lagenariae* JCM 9293, sastrugana biomasa plijesni prebaci se s čvrste podloge iz Petrijeve zdjelice u tikvicu za uzgoj. Hranjive podloge za čuvanje kulture su sastava kao podloga C (Tablica 11), ali bez otpadne trave uz dodatak 15 g/L agara. Za čuvanje kulture korištene su Petrijeve zdjelice a prije korištenja kulture su svježe nacijačene 48 sati prije.

Tikvica je sadržavala 25 mL podloge A čiji je sastav naveden u Tablici 5. Nakon 48 sati, prešlo se sa površinskog statičnog uzgoja na submerzni dinamički uzgoj dodatkom 190 mL tekuće podloge B prema sastavu u Tablici 5. Uzgoj inokuluma je bio vođen pri temperaturi od 28 °C na tresilici pri 130 o min⁻¹.

Za inokulum ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090T, *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 uzeto je po 20 mL prethodno poraslih kultura svake vrste i prebačeno u tekuće podloge sastava opisanog u Tablici 6. Uzgoj inokuluma vođen je pri temperaturi od 28 °C, pri mikroaerofilnim uvjetima te stalnom osvjetljenju (1500 Lux) bez miješanja.

Priprema inokuluma bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 započeta je izuzimanjem prethodno porasle kulture sa čvrste podloge u Petrijevim zdjelicama sastava 15 g L⁻¹ agara, 5 g L⁻¹ peptona i 3 g L⁻¹ mesnog ekstrakta. Kultura se prvo uzgaja preko noći u 20 mL podloge s peptonom (5 g L⁻¹) i mesnim ekstraktom (3 g L⁻¹) bez miješanja pri 30 °C. Zatim se 10 mL tako porasle prekonoćne kulture precijepi u Erlenmeyerovu tikvicu koja sadrži 100 mL iste podloge te se također uzgaja preko noći pri istim uvjetima.

3.3.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina

3.3.2.1. Predobrada otpadnog pivskog tropa

Sirovina za pripremu hranjivih podloga za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru bila je otpadni pivski trop. Najprije je provedena kiselinska hidroliza u visokotlačnom reaktoru (180 °C /10 minuta) (Marđetko i sur., 2018). Korišteno je 10 L otopine 0,5 % H₂SO₄ za predobradu 1 kg suhe tvari pivskog tropa. Nakon obrade odvojeno je 6,8 L tekuće faze (kiselinski hidrolizat pivskog tropa) i 170 g čvrste faze (nehidrolizirani ostatak pivskog tropa). Dobivena tekuća faza, nakon hlađenja, uz dodatak 4 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta koristila se kao podloga za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom (Poglavlje 3.2.4.1.1.).

Čvrsta faza dobivena kiselinskom predobradom podvrgnuta je enzimskoj hidrolizi. Korišteni enzimi bili su Viscozyme L 5% vol vol⁻¹ (Novozyme) i Cellulase enzyme blend 2% vol vol⁻¹ (Sigma-Aldrich), u 5 L acetatnog pufera (pH 5) s 350 g suhe tvari čvrste faze nastale kiselinskom predobradom pivskog tropa. Enzimski tretman odvijao se u horizontalnom rotirajućem cijevnom reaktoru (HRCB) kroz 30 sati pri 40 °C i 20 o min⁻¹. Nakon tretmana izdvojeno je 160 g suhe tvari čvrste faze i 5 L tekuće faze. Iz tekuće faze filtracijom je izdvojen čvrsti ostatak, nakon toga je dodano 4 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta i takva podloga je korištena za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom (Poglavlje 3.2.4.1.1.). Rezultati sastava pivskog tropa i čvrste faze nakon kiselinske obrade te čvrste faze nakon enzimske obrade prikazani su u Tablici 11. u poglavlju 3.2.3.3.2.

3.3.2.2. Predobrada otpadne trave

Za pripremu hranjive podloge za rast plijesni (Poglavlje 3.3.3.1.) uzeto je 500 g suhe tvari otpadne trave. Pripremljeno je 10 L 0,5 %-tne otopine H₂SO₄. Otpadna trava prebačena je u visokotlačni reaktor te je dodana otopina sumporne kiseline. Predobrada se odvijala pri 180 °C uz vrijeme zadržavanja od 10 min. Na kraju procesa izdvojene su čvrsta i tekuća faza.

3.3.3. Priprema hranjivih podloga za istraživanje kinetike rasta mikroorganizama

3.3.3.1. Priprema hranjive podloge za uzgoj plijesni *Fusarium verticillioides* JCM 23107, *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293

Hranjive podloge za uzgoj plijesni, pripremljene su tako da se u određen volumen demineralizirane vode doda izračunata i odvagana masa potrebnih tvari iz Tablice 5. Zatim slijedi sterilizacija u autoklavu tijekom 20 minuta pri 121 °C. Na isti način se priprema hranjiva podloga za barbotirajući reaktor samo što se sterilizacija provodi in situ u bioreaktoru.

3.3.3.2. Priprema hranjivih podloga za uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T, *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340

Podloga za uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija bila je otpadna prevrela podloga koja zaostaje nakon izdvajanja biomase plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738. Podloga se sterilizirala u autoklavu tijekom 20 minuta pri 121 °C. U ohlađenu podlogu je dodano 1 mL otopine vitamina i 1 mL otopine elemenata u tragovima (Tablice 7. i 8.).

3.3.3.3. Priprema hranjive podloge za uzgoj bakterije *P. polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranim podlogama

U Erlenmeyerovim tikvicama od 250 mL pripremljeno je 150 mL podloge sastava prikazanog u Tablici 9., a pH-vrijednost podešena je na 6,5 pomoću 2M H₂SO₄ i 3M NaOH. Pripremljene su koncentrirane otopine (500 g L⁻¹ glukoze i 500 g L⁻¹ ksiloze), te otopina elemenata u tragovima (Tablica 10.). Nakon sterilizacije, u svaku tikvicu dodano je 3 mL L⁻¹ sterilno filtrirane otopine elemenata u tragovima i određeni volumen koncentriranih otopina šećera, ovisno o željenoj početnoj koncentraciji izvora ugljika u odabranom uzgoju. Početne koncentracije izvora ugljika prikazane u Tablici 9. iznosile su: 30, 50 i 70 g L⁻¹ glukoze odnosno ksiloze te kada se istraživao utjecaj oba izvora ugljika dodano je 10+10, 20+20 i 30+30 g L⁻¹ glukoze i ksiloze.

3.3.3.4. Priprema podloge za šaržni uzgoj bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom na hidrolizatu dobivenom kiselinskom predobradom otpadnog pivskog tropa

Tekućoj fazi dobivenoj nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa u visokotlačnom bioreaktoru (Poglavlje 3.3.2.) dodano je 4 g L^{-1} kvašćevog ekstrakta. Cijeli bioreaktor sa podlogom steriliziran je *ex-situ* u autoklavu ($121 \text{ °C} / 20$ minuta). Nakon sterilizacije, podešena je pH-vrijednost podloge 6,5 pomoću otopine NaOH ($c = 2 \text{ mol L}^{-1}$). Volumen podloge bio je 1 L. Nakon hlađenja podloga je inokulirana s 7 % vol/vol inokuluma koji je pripremljen prema protokolu opisanom u poglavlju 3.3.1.

3.3.3.5. Priprema podloge za šaržni uzgoj bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom na detoksiciranom hidrolizatu dobivenom kiselinskom predobradom otpadnog pivskog tropa

Tekuća faza dobivena kiselinskom predobradom najprije je centrifugirana na 5000 o min^{-1} tijekom 30 min te je izdvojen supernatant. Zatim je dodano 18 g L^{-1} aktivnog ugljena i otopina je dobro miješana u vremenskom intervalu od 1 h. Da bi se uklonio aktivni ugljen na kojeg su adsorbirani inhibitori provedena je vakuum-filtracija na Büchnerovom lijevku. Dobiveni filtrat, uz dodatak 4 g L^{-1} kvašćevog ekstrakta, korišten je za uzgoj bakterije *P. polymyxa* DSM 742. Volumen podloge iznosio je 1 L. Cijeli bioreaktor s podlogom steriliziran je *ex-situ* u autoklavu ($121 \text{ °C} / 20$ minuta). Nakon sterilizacije i hlađenja, podešena je pH-vrijednost podloge na 6,5 pomoću otopine NaOH ($c = 2 \text{ mol L}^{-1}$). Tako pripremljena podloga je inokulirana s 7 % vol/vol inokuluma (Poglavlje 3.3.1) te je inokulacijom započet uzgoj.

3.3.3.6. Priprema podloge za šaržni uzgoj bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom na hidrolizatu dobivenom enzimskom hidrolizom čvrste faze nakon kiselinske predobrade otpadnog pivskog tropa

Nakon završetka enzimske hidrolize čvrstog dijela nastalog kiselinskom predobradom otpadnog pivskog tropa u visokotlačnom bioreaktoru, iz tekuće faze se izdvaja zaostali čvrsti

dio, doda se 4 g L^{-1} kvašćevog ekstrakta u filtrat te se tako pripremljena podloga sterilizira u biorektoru Biostat Cplus (Poglavlje 3.2.4.1.1.). Nakon sterilizacije, podešena je pH-vrijednost podloge na 6,5 u reaktoru pomoću otopine NaOH ($c= 2 \text{ mol L}^{-1}$). Volumen podloge iznosio je 5 L. Nakon hlađenja podloga je inokulirana s 7 % vol/vol inokuluma koji je pripremljen prema protokolu opisanom u poglavlju 3.3.1.

3.3.4. Optimiranje uvjeta rasta i proizvodnje enzima i biokemikalija pomoću odabranih mikroorganizama

3.3.4.1. Uzgoj plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, *Fusarium verticillioides* JCM 23107 i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293 na podlozi s glukozom i kiselinski obrađenoj otpadnoj travi kao izvorima ugljika za proizvodnju enzima

Za određivanje kinetike sinteze enzima korištene su kemijski definirane podloge s glukozom i otpadnom travom kao izvorom ugljika. Volumen inokuluma od 190 mL je prebačen u tikvice s 450 mL podloge C prema sastavu u Tablici 5. U preliminarnom eksperimentu istraženo je proizvode li plijesni lignocelulolitičke enzime. Nakon 4 dana submerznog uzgoja izmjerena je aktivnost endoglukanaza i ksilanaza kod plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, *Fusarium verticillioides* JCM 23107 i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293, prema metodi opisanoj u Poglavlju 3.3.6.4. Nakon obrade rezultata, u drugom eksperimentu ponovno su uzgajane sve tri plijesni, no svakodnevno je praćena koncentracija proteina i enzimska aktivnost. Svi uzgoji provedeni su pri sobnoj temperaturi, na tresilici, na 130 o min^{-1} .

3.3.4.2. Ispitivanje kinetike rasta bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 i sinteze proizvoda na kemijski definiranim podlogama

Za određivanje kinetike rasta biomase i proizvodnje 2,3-butandiola koristile su se kemijski definirane podloge pripremljene sa glukozom te sa ksilozom kao izvorom ugljika te kombinacijom glukoze i ksiloze u omjeru 1:1 (Poglavlje 3.2.3.3.1.). Nacijepljeno je 10 mL inokuluma u 150 mL podloge. Uzgoj je vođen 40 sati pri pH 6,5 na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ uz konstantno miješanje od 130 o min^{-1} . Sterilno su izuzimani uzorci volumena 5 mL u određenim

vremenskim intervalima. Biomasa je određena turbidimetrijski i gravimetrijski. Kemijski sastav podloge određen je UPLC analizom supernatanta nakon centrifugiranja.

3.3.4.3. Uzgoj plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 u barbotirajućem bioreaktoru na kiselinskom hidrolizatu otpadne trave

Ukupni volumen podloge za barbotirajući bioreaktor iznosio je 2 L prema sastavu iz Tablice 5. Kao inokulum korišteno je 190 mL prethodno narasle kulture plijesni *Botryosphaeria dothidea* prema postupku opisanom u Poglavlju 3.2.3.1. Svaki dan se pratila enzimska aktivnost, koncentracija proteina i potrošnja izvora ugljika UPLC analizom. Uzgoj je proveden na sobnoj temperaturi bez regulacije pH-vrijednost podloge. Proces je vođen aerobno, a protok zraka iznosio je 5 L min⁻¹.

3.3.4.4. Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na hranjivoj podlozi KH

Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kiselinskom hidrolizatu pivskog tropa uz dodatak kvašćevog ekstrakta proveden je u bioreaktoru s miješalom (Poglavlje 3.2.4.1.1.). Nakon inokulacije (7 % v/v), uzgoj je vođen u mikroaerofilnim uvjetima (30 °C / pH 6,5 / 96 sati) uz miješanje (250 o min⁻¹). Biomasa je praćena turbidimetrijski i gravimetrijski. Kemijski sastav podloge određen je UPLC analizom supernatanta nakon centrifugiranja.

3.3.4.5. Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na hranjivoj podlozi DKH

Podloga dobivena detoksikacijom hidrolizata dobivenog kiselinskom predobradom otpadnog pivskog tropa pripremljena je prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.3.3.2. Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na podlozi DKH uz dodatak kvašćevog ekstrakta proveden je u bioreaktoru s miješalom (Poglavlje 3.2.4.1.1.). Nakon inokulacije (7 % v/v), uzgoj je vođen u mikroaerofilnim uvjetima (30 °C / pH 6,5 / 96 sati) uz miješanje (250 o min⁻¹). Biomasa je praćena turbidimetrijski i gravimetrijski. Kemijski sastav podloge određen je UPLC analizom supernatanta nakon centrifugiranja.

3.3.4.6. Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na hranjivoj podlozi EH

Uzgoj bakterije *P. polymyxa* DSM 742 proveden je u 5 L enzimskog hidrolizata čvrstog ostatka kiselinske predobrade pivskog tropa u (Poglavlje 3.2.3.3.2.). Dodano je 4 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta kao izvor dušika. Korišten je bioreaktor Biostat Cplus tvrtke Sartorius. Podloga je inokulirana sa 7 % (vol vol⁻¹) inokuluma. Uzgoj se provodio pri pH 6,5, temperaturi od 30 °C, u mikroaerofilnim uvjetima tijekom 96 h. Broj okretaja miješala iznosio je 250 o min⁻¹. Uzorak se uzimao sterilno u određenim vremenskim intervalima. Određivala se optička gustoća podloge, suha tvar biomase gravimetrijom te sastav podloge UPLC analizom.

3.3.5. Istraživanje rasta ljubičastih nesumpornih bakterija na otpadnoj vodi dobivenoj nakon bioprocesa uzgoja plijesni

Kako bi se istražila mogućnost rasta ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090T, *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 na otpadnoj vodi iz biotehnološke proizvodnje točnije supernatantu podloge iz uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea*, koncentracija biomase praćena je turbidimetrijski tako da je određena optička gustoća pri 660 nm. Nakon završetka uzgoja plijesni, izdvojeno je 2 L bistre podloge centrifugiranjem koja je zatim sterilizirana u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 min. U Erlenmeyerove tikvice sterilno je dodano po 200 mL ohlađene podloge, 1 mL otopine vitamina i 1 mL otopine elemenata u tragovima te su nacijepljene s 20 mL inokuluma bakterija. Uzgoj vođen je pri temperaturi od 28 °C, u mikroaerofilnim uvjetima te stalnom osvjetljenju bez miješanja. Svakog dana sterilno su uzimani uzorci kako bi se turbidimetrijski pratio rast bakterijske biomase mjerenjem apsorbancije. Na kraju uzgoja (7 dan) određivala se koncentracija ukupnih pigmenata prema postupku opisanom u Poglavlju 3.3.6.8.

3.3.6. Analitičke metode

3.3.6.1. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

Za pripremu uzorka za UPLC analizu izuzeto je 750 μL supernatanta uzoraka i dodano je 750 μL 10%-tne otopine ZnSO_4 (čija je svrha vezati proteine i nečistoće nastale tijekom procesa). Sadržaj je homogeniziran i ostavljen 20 minuta u mirovanju. Nakon toga su uzorci centrifugirani na 13 500 rpm pri 5 min. Volumen od 1,5 mL nastalog supernatanta filtriran je kroz mikrobiološki filter (0,2 μm , Sartorius) u staklenu vijalu i tako pripremljen uzorak se koristio za UPLC-analizu. Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 μL , a protok mobilne faze 0,6 mL min^{-1} . Temperatura kolone iznosila je 60 $^\circ\text{C}$. Dobiveni kromatogrami analizirani su programom OpenLab CDS. Iz dobivenih kromatograma je koncentracija tvari izračunata pomoću baždarnih pravaca (Tablica 19.).

3.3.6.2. Određivanje optičke gustoće podloge

Uzorak uzet tijekom fermentacije je odmah po uzorkovanju homogeniziran na vrtložnoj miješalici te je odmah 2,5 mL uzorka prebačeno u staklenu kivetu za mjerenje apsorbancije. Spektrofotometrom „Cary 100“ je izmjerena optička gustoća podloge pri 600 za bakteriju *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, a na 660 nm valne duljine za ljubičaste nesumporne bakterije.

3.3.6.3. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase

U osušene i izvagane kivete otpipetiran je odgovarajući volumen uzorka uzetog tijekom uzgoja. Volumen uzorka bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 iznosio je 10 mL, a uzorka ljubičastih nesumpornih bakterija 40 mL. Uzorak je centrifugiran (8000 rpm /10 minuta) kako bi se biomasa izdvojila u obliku taloga. Nakon odlijevanje supernatanta, kivete s biomasom osušene su na 50 $^\circ\text{C}$ do konstantne mase. Ohlađene kivete izvagane su na analitičkoj vagi, a dobivene mase biomase korištene su za određivanje koncentracije biomase (X) prema sljedećoj ovisnosti:

$$X_{g/L} = \frac{m_{ok} - m_{pk}}{V_{uz}} \quad [1]$$

m_{ok} - masa osušene kivete s biomasom,

m_{pk} - masa prazne suhe kivete,

V_{uz} - volumen uzorka

3.3.6.4. Određivanje enzimske aktivnosti

Svaki dan, uključujući 0. dan, sterilno je izuzeto 1,5 mL uzorka podloge za rast plijesni te je uzorak centrifugiran ($10\ 000\ \text{min}^{-1}$ / 5 minuta). U dvije prazne Eppendorf kivete izvagano je 5-10 mg arabinoksilana i karboksimetilceluloze. Zatim je u svaku Eppendorf kivetu dodano 0,5 mL supernatanta te 0,5 mL destilirane vode. Enzimska reakcija provedena je kroz 30 min na termomikseru pri $50\ ^\circ\text{C}$. Nakon toga se iz svake Eppendorf kivete izuzelo 0,6 mL otopine i pomiješano je s 0,6 mL DNS reagensa (dinitrosalicilna kiselina). Reakcija obojenja se odvijala 15 minuta na termomikseru pri $95\ ^\circ\text{C}$. Za stabilizaciju boje dodano je 0,2 mL 40 % otopine kalijeva natrijeva tartarata. Nakon hlađenja u ledu izmjerena je apsorbancija pri 575 nm u plastičnim kivetama.

Jedna jedinica (U/L) aktivnosti predstavlja oslobođenu množinu šećera u μmol tijekom 30 minuta u reakcijskoj smjesi od 1 litre.

3.3.6.5. Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina, u plastičnu kivetu stavljeno je 1,2 mL Bradfordovog reagensa. Nakon toga dodano je 30 μL supernatanta uzorka. Otopina je ostavljena stajati na sobnoj temperaturi 20 min te je očitana apsorbancija pri 595 nm. Koncentracija izoliranih proteina izračunata je pomoću dobivenog baždarnog dijagrama jednadžbe pravca:

$$A = 0,3037 \times c + 0,0143 \quad [2]$$

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

Sastav i koncentracija masnih kiselina u biomasi ljubičastih nesumpornih bakterija određeni su metodom plinske kromatografije s plameno-ionizacijskom detekcijom (GC-FID). Prije analize uzoraka GC-FID metodom provedena je transesterifikacija masnih kiselina u metilne estere, a potom ekstrakcija u odgovarajuće otapalo (heksan).

Osušena biomasa ljubičastih nesumpornih bakterija je samljevena kako bi se mogla provesti transesterifikacija masnih kiselina u metilne estere prema NREL protokolu (Wycken

i Laurens, 2013). Izvagano je 10 mg biomase ljubičastih sumpornih bakterija koja je potom prenesena u staklene kivete volumena 10 mL, prethodno osušene u eksikatoru preko noći.

U kivetu je zatim dodano 20 μL metil tridekanoata ($\gamma = 10 \text{ mg mL}^{-1}$; prvi interni standard), 200 μL otopine kloroform:metanol (2:1, v/v) i 300 μL smjese otopine HCl ($\gamma=0,6 \text{ mol L}^{-1}$) i metanola (1:1, v/v). Sadržaj kivete izmiješan je na vrtložnoj miješalici, a nakon toga stavljen u vodenu kupelj na 85 °C kroz 1 sat kako bi se provela transesterifikacija masnih kiselina prisutnih u uzorku biomase. Nakon termostatiranja u vodenoj kupelji kivete su ohlađene na sobnu temperaturu nakon čega je uzorku dodano 1 mL heksana. Zatim je sadržaj bočice izmiješan na vrtložnoj miješalici kako bi se provela ekstrakcija nastalih estera u heksansku fazu i ostavljen 1 sat na sobnoj temperaturi da se razdvoje faze. Gornji heksanski sloj nakon izdvajanja se prema potrebi može razrijediti dodatkom heksana. Volumen od 200 μL odgovarajućeg razrjeđenja ili originala heksanske faze otpipetira se u vijalu za plinsku kromatografiju u koju je dodano 5 μL pentadekana ($\gamma = 1 \text{ mg mL}^{-1}$; drugi interni standard) i zatvori sa PTFE/silikonskim čepom. Ovako pripremljeni uzorak koristi se za analizu estera masnih kiselina na GC-FID-u.

GC-FID analiza provedena je na GC- 2010 Plus uređaju (Shimadzu, Kyoto, Japan; poglavlje 3.2.4.2.). Parametri metode pri kojima je provedena analiza sastava estera masnih kiselina prikazani su u Tablici 12. Identificiranje i kvantificiranje estera masnih kiselina provedeno je usporedbom s retencijskim vremenima i baždarnim pravcima određenim za metilne estere standardne smjese 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 - C24, Supelco) prema uvjetima navedenim u Tablici 12. Sastav metilnih estera masnih kiselina izražen je masenim udjelom (%) pojedine masne kiseline u uzorku.

Tablica 12. Parametri GC-FID metode za određivanje sastava i koncentracije estera masnih kiselina.

Parametar	Uvjeti
Kolona	ZB-FAME (Zebron), 30 m x 0,25 mm, df 0,20 μm
Detektor	FID
Plin nosač/protok	Helij / 1,2 mL min ⁻¹
Temperaturni program	100 °C, 4 min 10 °C / min → 140 °C 3 °C / min → 190 °C 30 °C / min do 260 °C 260 °C, 2 min
Temperatura injektora	250 °C
Temperatura detektora	260 °C
Koeficijent razdijeljena	1:15
Volumen injektiranja	2 μL

Izračun ukupnih masnih kiselina provodi se prema formuli:

$$\text{Ukupni lipid}_{C13 \text{ normal}} = \sum_{C4-C24} \frac{FAME \ C_i}{FAME \ C13} * C_{\text{dodanog FAME C13}} \quad [3]$$

Izračun ukupnih masnih kiselina kao postotka na suhu tvar biomase uzetog za transesterifikaciju:

$$\% \text{ ukupni FAME} = \%_{\text{ukupni FAME}} = \frac{\text{ukupni FAME C13 normal}}{\text{masa suhe tvari uzorka}} * 100\% \quad [4]$$

-napomena FAME predstavlja: metilni esteri masnih kiselina (Fatty Acid Methyl Esters)

3.3.6.7. Određivanje hitina i hitozana u biomasi plijesni

Za izdvajanje hitina i hitozana korišteno je 3,6 g osušene i usitnjene biomase plijesni *Botryosphaeria dothidea*. Biomasa je suspendirana u 108 mL natrijeve lužine koncentracije 20 g L⁻¹ i kuhana dva sata pri 90 °C uz refluks (omjer volumena otopine NaOH i mase suhe tvari biomase iznosi 30:1). Alkalno netopljiva frakcija odvojena je centrifugiranjem (8000 o min⁻¹/10 min). Dobiveni supernatant je dekantiran, a netopljivi talog resuspendiran je u destiliranoj vodi i centrifugiran je pri istim uvjetima. Postupak ispiranja proveden je do neutralne pH-vrijednosti supernatanta. Neutraliziranom talogu dodano je 144 mL 10% -tne (w/w) octene kiseline (omjer volumena otopine HAc i mase suhe tvari biomase iznosi 40:1) te je dobivena suspenzija kuhana tijekom 4 sata uz refluks i povremeno miješanje. Hitin je odvojen kao talog centrifugiranjem pri 8000 o min⁻¹ tijekom 10 minuta. Zatim je ispiran s destiliranom vodom do neutralne pH-vrijednosti, a hitozan se izdvojio iz supernatanta dodavanjem 4 mol L⁻¹ NaOH i podizanjem pH-vrijednosti supernatanta na pH 9. Vakuum filtracijom na Büchnerovom lijevku izdvojen je hitozan. Kristali hitina i hitozana su isprani destiliranom vodom do neutralne pH-vrijednosti. Dobiveni kristali osušeni su pri 60 °C do konstantne mase (Pochanavanich i Suntornsuk, 2002).

3.3.6.8. Fotosintetski pigmenti

Za određivanje količine pigmenata sterilno je izuzeto 10 mL uzorka. Uzorak je centrifugiran 15 min pri 8000 o min⁻¹. Supernatant je odvojen za UPLC analizu, a u istaloženu bakterijsku biomasu se dodalo se 5 mL smjese acetona i etanola (7:2 vol/vol) za ekstrakciju ukupnih pigmenata. Zatim je dodano 4 g staklenih kuglica te je uzorak podvrgnut intenzivnom miješanju tijekom 2 min nakon čega je uzorak ohlađen u ledu kroz 2 minute. Ovaj postupak intenzivnog miješanja te hlađenja ponovljen je tri puta. Zbog osjetljivosti ekstrahiranih pigmenata te bakterioklorofila, postupak ekstrakcije proveden je u mraku kako ne bi došlo do degradacije pigmenata. Nakon toga je uzorak centrifugiran 10 minuta pri 8000 o min⁻¹, oko 4 mL supernatanta preneseno je u kvarcnu kivetu te je skenirano u području od 350 do 900 nm kako bi se odredili maksimumi i minimumi apsorbancije ekstrahiranih pigmenata. Masena koncentracija bakterioklorofila *a* izračunata je po sljedećoj formuli (Matoković, 2020; Novak, 2020):

$$\gamma_{g/L} = 0.348209 \times (A_{648} - A_{850}) - 0.16583 \times (A_{665} - A_{850}) + 12.11114 \times (A_{775} - A_{850}) \quad [5]$$

3.3.6.9. Određivanje sastava čvrstih uzoraka lignoceluloznih sirovina

Određivanje sastava otpadne trave, otpadnog pivskog tropa i čvrste faze dobivene nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa u visokotlačnom reaktoru provedeno je nakon prethodne dvostupanjske kiselinske hidrolize prema propisu Nacionalnog laboratorija za obnovljive izvore energije (eng. National Renewable Energy Laboratory, NREL). Uzorak koji je prethodno osušen i usitnjen u fini prah u tarioniku odvagan je u tikvicu s okruglim dnom na analitičkoj vagi (oko 0,4 g suhe tvari uzorka). Zatim je dodano 4 mL sumporne kiseline (72 % w/w) i ostavljeno u termostatu (30 °C / 1 sat) uz povremeno miješanje staklenim štapićem. Potom je dodano 112 mL demineralizirane vode, čime je koncentracija sumporne kiseline u smjesi smanjena na 4 % (w/w). Tikvica je pričvršćena na povratno hladilo te je njezin sadržaj zagrijan do vrenja i potom kuhan 4 sata uz povremeno miješanje. Nakon hidrolize uzorci su ohlađeni pod mlazom vode i filtrirani preko Büchnerovog lijevka kroz prethodno osušeni i izvagani filter papir, a volumen filtrata je izmjeren menzutom i korišten za analizu topljivog lignina i monosaharida. Zaostali talog ispiran je s vrućom vodom do neutralne pH-vrijednosti i potom korišten za analizu netopljivog lignina. Udio lignina topljivog u kiselini u filtratu određen je spektrofotometrijski neposredno nakon hidrolize. Ostatak filtrata je korišten za analizu ugljikohidrata i drugih tvari UPLC metodom (Poglavlje 3.3.6.1). Rezultati dvostupanjske kiselinske hidrolize nalaze se u Tablici 3. i Tablici 4. u Poglavlju 3.2.3.3.2.

3.3.6.9.1. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini

Čvrsti dio uzorka zaostao na filteru nakon dvostupanjske hidrolize je zajedno s filtrom prebačen u prethodno osušenu i odvaganu Petrijevu zdjelicu. Nakon sušenja do konstantne mase pri 105 °C, hlađenja u eksikatoru i vaganja izračunat je udjel lignina netopljivog u kiselini prema jednadžbi [6]:

$$w(LNTK; \%) = \frac{m_{\text{osušeni filter s talogom}} - m_{\text{filter}}}{m_{\text{uzorka}}} * 100\% \quad [6]$$

3.3.6.9.2. Udjel lignina topljivog u kiselini (LTK)

U filtratu hidrolizata nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize određen je udjel lignina topljivog u kiselini spektrofotometrijski pri valnoj duljini 205 nm, koristeći kvarcne kivete. Kao slijepa proba bio je korišten zrak. Pritom su razrjeđenja filtrata pripravljena tako da očitana apsorbancija iznosi 0,7-1. Udjel lignina topljivog u kiselini izračunat je prema jednadžbi [7]:

$$w(LTK; \%) = \frac{A * D * V}{\alpha * b * m} \quad [7]$$

gdje je:

w (LTK)-udjel lignina topljivog u kiselini [%],

A - apsorbancija uzorka izmjerena pri 205 nm,

D - faktor razrjeđenja,

V - volumen filtrata [L],

α - koeficijent ekstrinkcije lignina [$\text{g L}^{-1} \text{cm}^{-1}$] (prema metodi TAPPI UM250 iznosi $110 \text{ g L}^{-1} \text{cm}^{-1}$),

b - širina kivete (iznosi 1 cm),

m - masa uzorka uzetog u analizu.

3.3.6.9.3. Određivanje furana spektrofotometrijski

U tekućoj fazi nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize spektrofotometrijski je određena koncentracija furana, mjerenjem apsorbancija pri 284 i 320 nm (prema metodi iz rada Martinez i sur, 2000). Baždarni pravac prethodno je izrađen mjerenjem apsorbancije otopina furana poznate koncentracije. Uzorak je razrijeđen demineraliziranom vodom u omjeru 1:1000 te su izmjerene apsorbancije pri 284 i 320 nm i izračunata je njihova razlika. Koncentracija furana određena je iz sljedeće jednadžbe baždarnog pravca [8]:

$$\gamma_{g/L} = \frac{\Delta A - 0,0173}{191,02} \quad [8]$$

gdje je

γ (furani) – masena koncentracija furana [g L^{-1}]

$\Delta A = A_{284} - A_{320}$

3.3.7. Proračun pokazatelja uspješnosti uzgoja

Na temelju navedenih jednadžbi izračunati su pokazatelji uspješnosti uzgoja:

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

$$Y_P = P - P_0 \text{ [g L}^{-1}\text{]}$$

$$Y_{P/S} = \frac{Y_P}{Y_S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \text{ [g g}^{-1}\text{]}$$

$$\ln S = \ln S_0 + r_S * t$$

$$\ln P = \ln P_0 + r_P * t$$

$$\ln X = \ln X_0 + \mu * t$$

gdje je:

S_0, P_0 - početna koncentracija supstrata, odnosno produkta [g L⁻¹],

S, P - konačna koncentracija supstrata, odnosno produkta [g L⁻¹],

X_0 - početna koncentracija biomase [g L⁻¹],

X - konačna koncentracija biomase [g L⁻¹],

μ - specifična brzina rasta mikroorganizma [h⁻¹],

Y_S - ukupna potrošnja supstrata [g L⁻¹],

Y_P - ukupni prinos produkta [g L⁻¹],

$Y_{P/S}$ - koeficijent konverzije supstrata u produkt [g g⁻¹],

r_S - maksimalna brzina potrošnje supstrata [h⁻¹],

r_P - maksimalna brzina nastanka produkta [h⁻¹].

4. REZULTATI

U ovom poglavlju biti će prikazani rezultati razvoja procesa u kojem je primijenjen biorafinerijski princip korištenja dviju lignoceluloznih sirovina: otpadne trave i otpadnog pivskog tropa.

Rezultati su podijeljeni u dva potpoglavlja.

U prvom potpoglavlju (4.1) prikazani su rezultati istraživanja mogućnosti biorafinerijskog korištenja otpadne trave. Nakon različitih metoda predobrade ove sirovine prvi je korak proizvodnja ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima pomoću odabranih vrsta plijesni iz roda *Botryosphaeria* i *Fusarium*. Potom su izdvojeni ekstracelularni lignocelulolitički enzimi iz tekuće faze, a hitin i hitozan su izdvojeni iz biomase plijesni. Pritom zaostaje otpadna voda koja je dalje korištena kao sirovina za drugi mikrobn proces u kojem je proizvedena biomasa fototrofnih ljubičastih nesumpornih bakterija (*Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T, *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340) koje sadrže masne kiseline i pigmente. Rezultati su prikazani na Slikama 16. - 22. te u Tablicama 13. – 16.

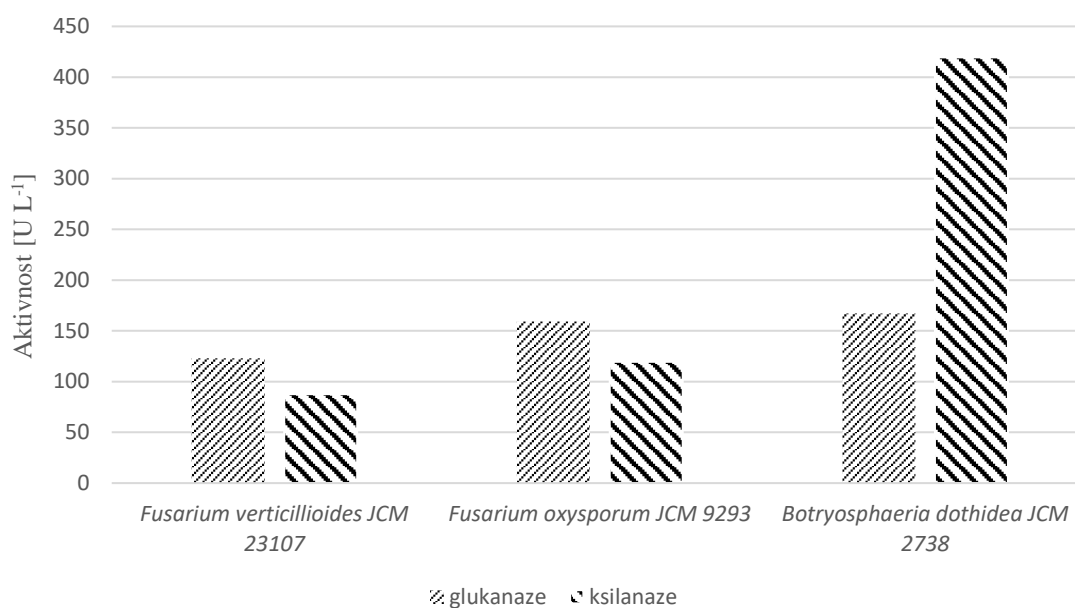
U drugom potpoglavlju (4.2) prikazani su rezultati istraživanja mogućnosti razvoja procesa za proizvodnju biokemikalija i biogoriva (2,3-butandiol, mliječna kiselina, etanol) iz otpadnog pivskog tropa pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742. Preliminarno istraživanje je provedeno na kemijski definiranim podlogama u kojima su kao izvori ugljika korišteni monosaharidi karakteristični za kiselinske hidrolizate (glukoza i ksiloza). Na temelju tog preliminarnog istraživanja odabrani su uvjeti za fermentaciju tekućih hranjivih podloga dobivenih različitim fizikalno–kemijskim i enzimskim metodama predobrade pivskog tropa. Lignocelulozni hidrolizati dobiveni navedenim metodama predobrade korišteni su za uzgoj u različitim biorektorskim sustavima. Rezultati su prikazani na Slikama 23. – 27. te u Tablicama 17. i 18.

4.1. Istraživanje proizvodnje ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima pomoću odabranih vrsta plijesni iz roda *Botryosphaeria* i *Fusarium*

Provedena su istraživanja submerzne proizvodnje ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima pomoću odabranih vrsta plijesni iz roda *Botryosphaeria* i *Fusarium* na hranjivoj podlozi (Tablica 5.) koja je kao izvore ugljika sadržavala glukozu i kiselinski obrađenu otpadnu travu (Slike 16. – 20., Tablica 13.). Uzgoj odabrane plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 u barbotirajućem reaktoru opisan je u poglavlju 3.3.4.1, a sastav podloge je naveden u Tablici 5. Rezultati istraživanja iskorištavanja ljubičastih nesumpornih bakterija za pročišćavanje otpadne vode dobivene nakon procesa uzgoja plijesni (Poglavljje 3.3.5.), prikazani su na Slikama 21. – 22. te Tablicama 14. -16.

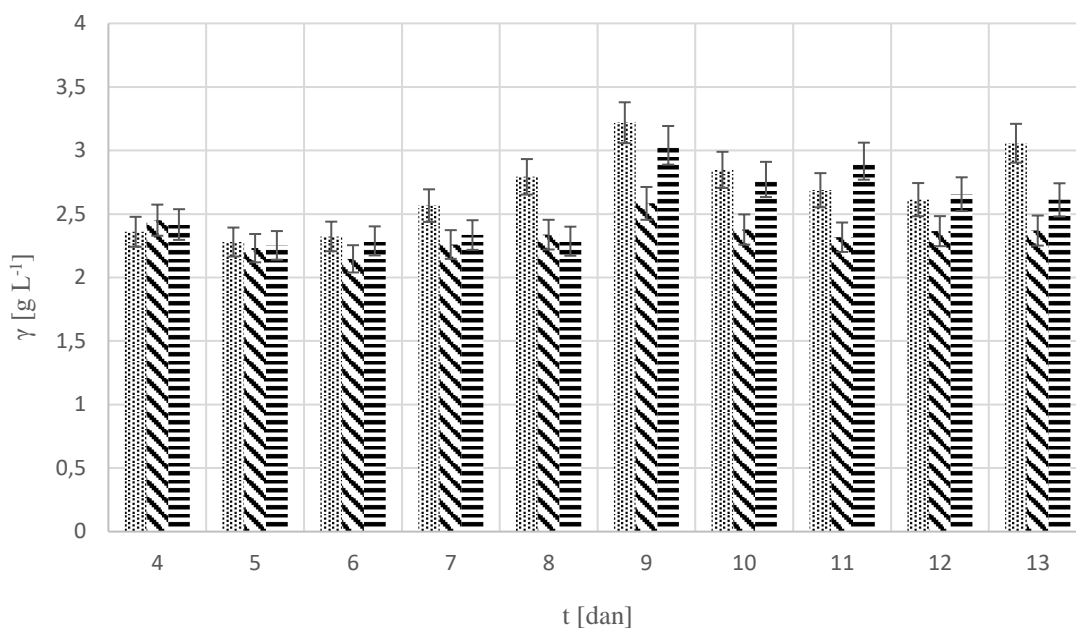
4.1.1. Uzgoj plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, *Fusarium verticillioides* JCM 23107 i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293 na podlozi s glukozom i kiselinski obrađenoj otpadnoj travi kao izvorima ugljika za proizvodnju enzima

Proveden je uzgoj plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, *Fusarium verticillioides* JCM 23107 i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293 na podlozi s glukozom i kiselinski obrađenoj otpadnoj travi kao izvorima ugljika za proizvodnju enzima. Prvo je istražen potencijal ovih plijesni za proizvodnju enzima, dok je drugi dio istraživanja bio usmjeren prema točnijem određivanju enzimске aktivnosti. S obzirom na sastav sirovine koja se koristi u istraživanju, za potpunu enzimsku hidrolizu potrebni su enzimi koji razgrađuju celulozu, hemicelulozu i lignin. Budući da je najveći dio otpadne trave čine glukani (polimeri glukoze) i ksilani (polimeri ksiloze), a u strukturnim ugljikohidratima trave prisutno je manje arabinoze i glukuronske kiseline) (Vrdoljak 2019; Chen, 2015; de Jong i Gosselink, 2014), za enzimsku razgradnju trave potrebne su glukanaza i ksilanaza kako bi proces bio isplativ. Rezultati su prikazani na Slici 16.



Slika 16. Enzimaska aktivnost endoglukanaza i ksilanaza nakon 4 dana submerznog uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, *Fusarium verticillioides* JCM 23107 i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293.

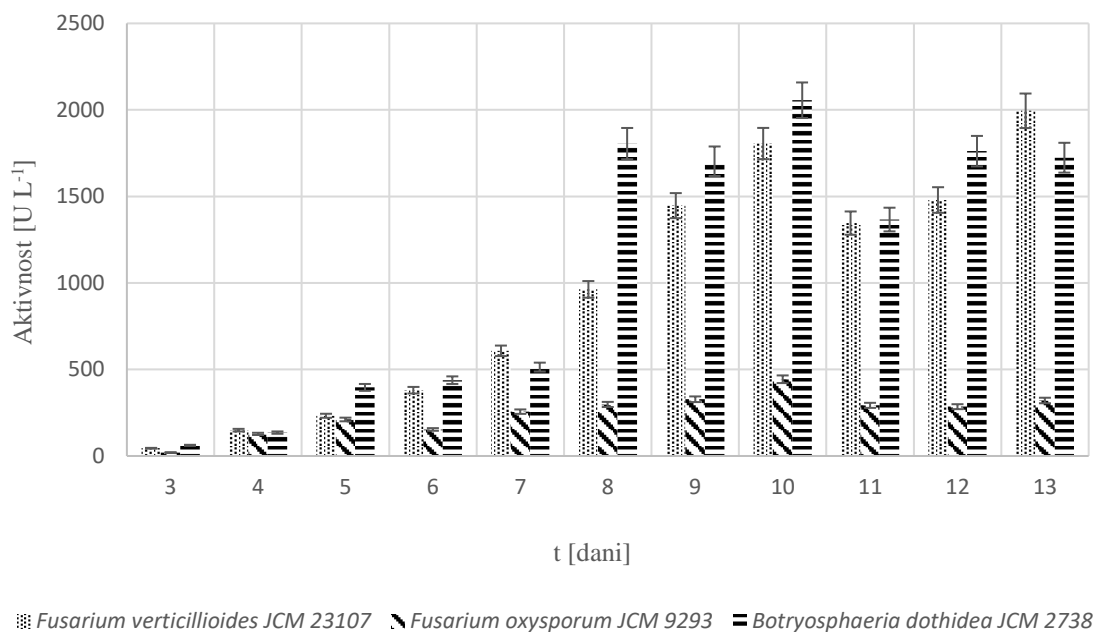
Aktivnost endoglukanaza i ksilanaza izmjerena je nakon 4 dana uzgoja. Iz dobivenih rezultata (Slika 16.) vidljivo je da najveću aktivnost ksilanaza postigla plijesan *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 s aktivnošću otprilike 420 U L⁻¹ što je više nego dvostruko u odnosu na aktivnost ksilanaza ostalih plijesni, dok je za endoglukanaze utvrđeno da su bile manje razlike među korištenim sojevima plijesni (otprilike 120 - 170 U L⁻¹), no najveću aktivnost su imale također kod plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 koja je imala veću aktivnost za 36 % i 5 % u odnosu na *Fusarium verticillioides* JCM 23107 i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293. Kao najslabiji proizvođač lignocelulolitičkih enzima pokazala se plijesan *Fusarium verticillioides* JCM 23107, s oko 5 puta manjom aktivnošću ksilanaza i 25 % manjom aktivnošću endoglukanaza (123 U L⁻¹) od plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738. Na temelju rezultata prikazanih na Slici 14., utvrđeno je da ove tri plijesni imaju potencijala za razgradnju lignoceluloznih sirovina. Stoga je odlučeno provesti detaljnije ispitivanje tako da se svakih 24 sata analiziraju masena koncentracija ukupnih proteina te aktivnost endoglukanaza i ksilanaza u supernatantu hranjive podloge kako bi se dobili točniji podaci o promjeni enzimske aktivnosti tijekom uzgoja na otpadnoj travi i glukozi. Rezultati su prikazani na Slici 17.



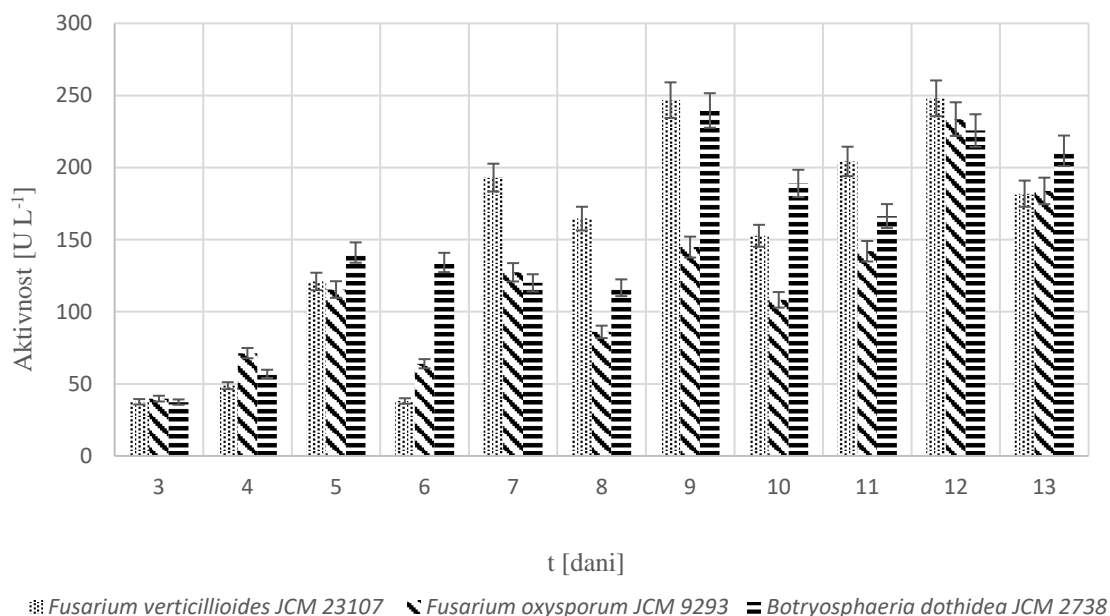
⊠ *Fusarium verticillioides* JCM 23107 ⊡ *Fusarium oxysporum* JCM 9293 ⊢ *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738

Slika 17. Masena koncentracija ukupnih proteina određena u supernatantu tijekom uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, *Fusarium verticillioides* JCM 23107 i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293 na podlozi sa glukozom i otpadnom travom.

Najviša koncentracija proteina zabilježena kod plijesni *Fusarium verticillioides* JCM 23107 nakon 9 dana i iznosila je 3,22 g L⁻¹ te kod plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 također nakon 9 dana je iznosila 3,04 g L⁻¹. Najniža koncentracija proteina bila je kod plijesni *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293, tek 2,58 g L⁻¹ isto nakon 9 dana uzgoja. Nakon 9. dana koncentracija proteina se počela smanjivati, iako su zabilježeni pojedinačni skokovi kod pojedinih vrsta u 11. i 13. danu. Potrebno je uzeti u obzir činjenicu da veća koncentracija proteina ne znači nužno i njihovu veću aktivnost s obzirom da svi ekstracelularni enzimi nisu nužno lignocelulolitički. Koncentracija ukupnih proteina je određena prema metodi opisanoj u poglavlju 3.3.6.5., a enzimska aktivnost prema metodi u poglavlju 3.3.6.4 (Slike 18. – 19).



Slika 18. Enzimaska aktivnost ksilanaza tijekom uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, *Fusarium verticillioides* JCM 23107 i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293 na podlozi sa glukozom i otpadnom travom.



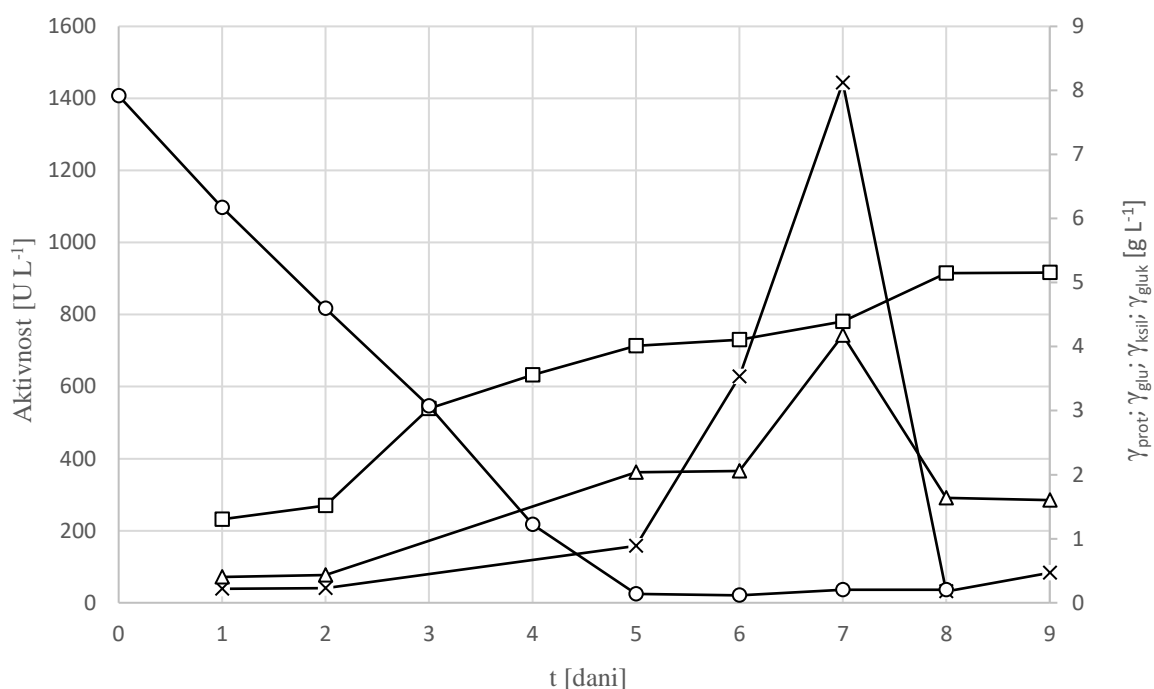
Slika 19. Enzimaska aktivnost endoglukanaza tijekom uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, *Fusarium verticillioides* JCM 23107 i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293 na podlozi sa glukozom i otpadnom travom.

Plijesan *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 postigla je najveće vrijednosti aktivnosti ksilanaza s maksimalnom aktivnošću od 2055 U L⁻¹ nakon 10 dana. Plijesan *Fusarium verticillioides* JCM 23107 postiže nešto manju aktivnost, 1995 U L⁻¹ nakon 13 dana. Plijesan *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293 pokazala je značajno nižu aktivnost, koje je iznosila maksimalno 443 U L⁻¹ nakon 10 dana.

Plijesni *Fusarium verticillioides* JCM 23107 i *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 postižu sličnu maksimalnu aktivnost endoglukanaza nakon 9 dana (oko 240 U L⁻¹), dok kod *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293 najveća aktivnost iznosi 233 U L⁻¹ i postignuta je tek nakon 12 dana (Slika 19). Uzgojem plijesni *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293 zabilježene su najmanje vrijednosti koncentracije proteina (Slika 15) te enzimске aktivnosti ksilanaza (Slika 18) i endoglukanaza (Slika 19). Za nastavak eksperimenata uzgojem u bioreaktoru odabrana je plijesan *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 s obzirom na najveću aktivnost ukupnih lignocelulolitičkih enzima.

4.1.2. Uzgoj plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 u barbotirajućem reaktoru

Na temelju preliminarnih istraživanja opisanim u Poglavlju 4.1.1, uzgoj plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, odabrane zbog visoke enzimске aktivnosti ksilanaza i endoglukanaza, proveden je u barbotirajućem bioreaktoru na podlozi sa otpadnom travom i glukozom bez kontrole pH-vrijednosti i uz visok stupanj aeracije (opisano u poglavlju 3.3.4.1.).



Slika 20. Promjena koncentracije proteina, glukoze te aktivnost endoglukanaza i ksilanaza tijekom uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 u barbotirajućem bioreaktoru na podlozi sa otpadnom travom i glukozom [—□— proteini (prot), —○— glukoza (glu), —x— ksilanaze (ksil), —△— glukanaze (gluk)].

Nakon 5 dana uzgoja gotovo je potpuno utrošena glukoza u podlozi (Slika 20.), nakon čega počinje nagli porast aktivnosti ksilanaza i endoglukanaza. Za oba enzima pokazao se isti trend obzirom da dosežu maksimum aktivnosti 7. dana uzgoja (1444 U L^{-1} za ksilanazu i 743 U L^{-1} za endoglukanazu), nakon čega slijedi nagli pad obiju aktivnosti. Koncentracija proteina je kontinuirano rasla tijekom uzgoja, a vrhunac je dosegla 9. dan uzgoja kada je iznosila $5,16 \text{ g L}^{-1}$.

Nakon završenog bioprocesa u barbotirajućem bioreaktoru, odlučeno je istražiti enzimsku aktivnost koncentrata proteina koji se dobije koncentriranjem supernatanta. Pomoću filterske membrane za centrifugu koja zadržava sve tvari s molekulskom masom većom od $10\,000$ dobiveno je 15 mL koncentrata proteina centrifugiranjem 80 mL supernatanta dobivenog nakon tjedan uzgoja *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 u barbotirajućem bioreaktoru. Dobivena koncentracija proteina iznosila je $26,7 \text{ g L}^{-1}$. Istražena je i enzimska aktivnost koncentrata (Tablica 13) pri čemu su osim endoglukanazne i ksilanazne aktivnosti, određene

i galaktanazna i mananazna aktivnost. U koncentratu proteina dobivena je aktivnost endoglukanaza 388 % veća nego u supernatantu, a aktivnost ksilanaza je 396 % veća.

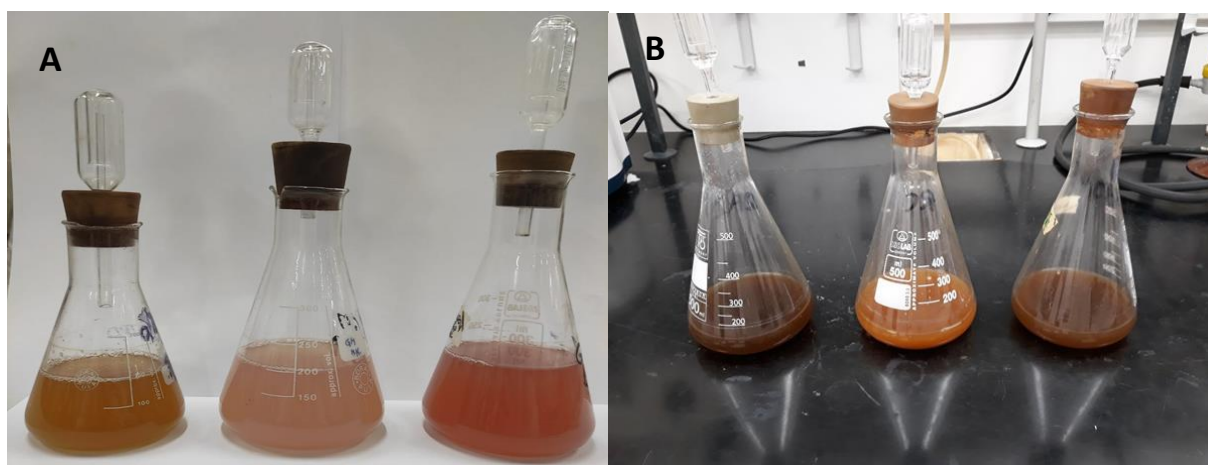
Tablica 13. Aktivnost enzima u koncentratu proteina.

Enzim	E.C. broj	Aktivnost [U L ⁻¹]
1,4- β -D-glukan 4-glukanohidrolaza	3.2.1.4	4682
egzoglukanaza	3.2.1.X.	2622
endo-1,3(4)-glukanaza	3.2.1.6	2884
endo-1,4- β -ksilanaza	3.2.1.136	5715
endo-1,3- β -galaktanaza	3.2.1.181	4105
endo-1,4- β -mananaza	3.2.1.78	5024

Osim komercijalno zanimljivih ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima prisutnih u fermentiranoj podlozi, biomasa plijesni također predstavlja vrijedan produkt. Ona sadrži hitin i hitozan, koji su izolirani prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.6.7. (Pochanavanich i Suntornsuk, 2002) te se pokazalo da je udio hitozana u suhoj tvari biomase bio oko 38 %, a udio hitina oko 25 %. Vrijednosti za hitin treba uzeti s oprezom zbog prisutnosti ostalih nečistoća u podlozi.

4.2. Iskorištavanje ljubičastih nesumpornih bakterija za pročišćavanje otpadne vode dobivene nakon procesa uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738

Istražena je mogućnost rasta ljubičastih nesumpornih bakterija na otpadnoj podlozi iz uzgoja plijesni. Time se željelo spriječiti bacanje podloge te, pridržavajući se biorafinerijskog principa, kao dodatni proizvod dobiti bakterijsku biomasu bogatu proteinima, fotosintetskim pigmentima i masnim kiselinama. Rezultati su prikazani na Slikama 21. i 22. te Tablicama 14. -16. Za određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata korištena je metoda opisana u poglavlju 3.3.6.8., a za koncentraciju i vrstu masnih kiselina metoda opisana u poglavlju 3.3.6.6.

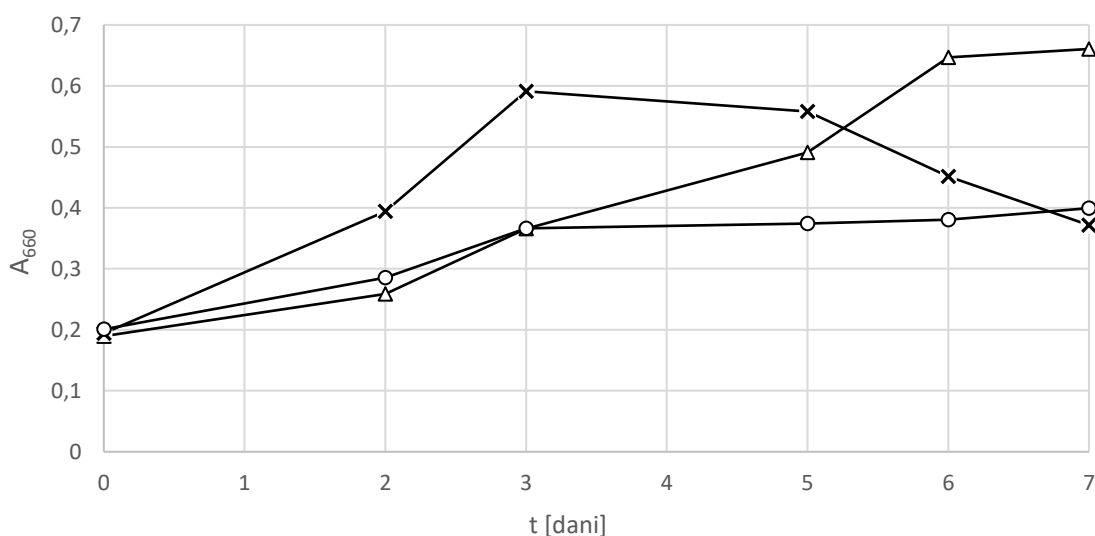


Slika 21. A. Prikaz različitog obojenja biomase bakterija *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T, *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 na početku uzgoja u hranjivoj podlozi.

B. Obojenost podloge s biomasom bakterija nakon tjedan dana (lijevo *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340, sredina *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T, desno *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781).

Otpadna podloga nije sadržavala šećere iz prethodnog uzgoja plijesni, već samo proizvedene proteine. Intenzitet obojenja podloge indikator je rasta ljubičastih nesumpornih bakterija. Sposobnost rasta ljubičastih nesumpornih bakterija na otpadnoj podlozi dokazuje i smanjenje apsorbancije podloge nakon centrifugiranja. Bakterija *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T postiže najveću koncentraciju biomase od 3,75 g L⁻¹, a na kraju uzgoja koncentracija biomase bakterije gravimetrijski je određena te je za *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 iznosila je 1,96 g L⁻¹, dok je za *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 iznosila

1,39 g L⁻¹. Unatoč najmanjem prirastu biomase (1,39 g L⁻¹), bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 uklonila je najviše sastojaka podloge, što je vidljivo iz smanjenja apsorbancije. Vrijednost apsorbancije početne podloge iznosila je 1,96, dok je apsorbancija supernatanta ove bakterijske kulture nakon 7 dana uzgoja iznosila 0,6361, što znači smanjenje na trećinu početne vrijednosti. Apsorbancija supernatanta za bakteriju *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T iznosila je nakon 7 dana 0,7493 (38% od početne), a za bakteriju *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 bila je 0,9170 (47% od početne vrijednosti).



Slika 22. Apsorbancija hranjivih podloga tijekom uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija na supernatantu podloge zaostale nakon uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 (—Δ— *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T, —×— *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 —○— *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781).

Dobivena biomasa sadrži pigmente i lipide kao komercijalno zanimljive proizvode. Sama biomasa ljubičastih nesumpornih bakterija također se može smatrati vrijednim proizvodom s obzirom da je bogata proteinima. Postupcima opisanim u Poglavlju 3.3.6.8 određeni su ukupni pigmenti i iz rezultata je vidljivo da bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 sadrži najveću koncentraciju fotosintetskih pigmenata (1,16 mg L⁻¹). Slijedi je bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 (0,93 mg L⁻¹ fotosintetskih pigmenata), dok je kod bakterije *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T detektirana najmanja koncentracija

fotosintetskih pigmenata ($0,90 \text{ mg L}^{-1}$) koja je otprilike četvrtinu manja nego kod najuspješnije od ovih triju bakterija.

Sastav lipida u biomasi ljubičastih nesumpornih bakterija određen je prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.6.6. Primjenom GC-FID metode određeni su sastav lipida u proizvedenoj biomasi uzgojenih ljubičastih nesumpornih bakterija te koncentracije pojedinih masnih kiselina (Tablica 12., Poglavlje 3.2.4.2.; Wychen i sur., 2013). Ljubičaste nesumporne bakterije nakon uzgoja provedenog na supernatantu podloge iz uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 sadrže između 1,8 % (bakterija *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T) i 3,4 % (bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781) ukupnih masnih kiselina u suhoj tvari (Tablice 14.-16.). Od desetak detektiranih masnih kiselina (Tablica 14.), najveći udjeli su zabilježeni za cis-10-heptadekanoičnu kiselinu (14 – 21 %) te cis-10-pentadekanoičnu kiselinu (10 – 13 %). Kod *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 detektiran je visok udio trans-9-oktadekanoične kiseline (13 – 15 %; Tablica 15.). Zanimljivo je da su C:20 masne kiseline nađene samo kod *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 (Tablica 16.). Ostale masne kiseline zastupljene su u manjem postotku.

Tablica 14. Sastav i udio masnih kiselina u suhoj tvari biomase ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T tijekom uzgoja na podlozi iz uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738.

Masna kiselina		γ [mg L ⁻¹]	w ukupno [%]
Oznaka	Naziv		
C11:0	undekanska kiselina	3,662	2,87
C12:0	dodekanska kiselina (laurinska kiselina)	4,248	3,34
C14:0	tetradekanska kiselina (miristinska kiselina)	5,53	4,34
C14:1 cis 9	cis-9-tetradekanoična kiselina (miristinska kiselina)	3,686	2,89
C15:0	pentadekanska kiselina	5,806	4,56
C15:1 cis 10	cis-10-pentadekanoična kiselina	16,644	13,07
C16:0	heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina)	11,938	9,37
C16:1 cis 9	cis-9-heksadekanoična kiselina (palmitoleinska kiselina)	9,704	7,62
C17:0	heptadekanska (margarinska) kiselina	11,368	8,92
C17:1 cis 10	cis-10-heptadekanoična kiselina	27,884	21,89
C18:1 cis 9	cis-9-oktadekanoična kiselina (oleinska kiselina)	9,978	7,83
C18:2 cis 9,12	cis-9, cis-12-oktadekanoična kiselina (linolna kiselina)	11,014	8,65
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19	cis-4, cis-7, cis-10, cis-13, cis-16, cis-19- dokosaheksaenska kiselina	5,912	4,64
W ukupne masne kiseline, biomasa [%]	1,775		

Tablica 15. Sastav i udio masnih kiselina u suhoj tvari biomase ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 tijekom uzgoja na podlozi iz uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738.

Masna kiselina		γ [mg L⁻¹]	w ukupno [%]
Oznaka	Naziv		
C11:0	undekanska kiselina	3,854	2,43
C12:0	dodekanska kiselina (laurinska kiselina)	3,952	2,49
C14:0	tetradekanska kiselina (miristinska kiselina)	5,382	3,40
C14:1 cis 9	cis-9-tetradekanoična kiselina (miristinska kiselina)	2,994	1,89
C15:0	pentadekanska kiselina	6,56	4,14
C15:1 cis 10	cis-10-pentadekanoična kiselina	15,27	9,64
C16:0	heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina)	9,894	6,24
C16:1 cis 9	cis-9-heksadekanoična kiselina (palmitoleinska kiselina)	9,246	5,84
C17:0	heptadekanska (margarinska) kiselina	11,806	7,45
C17:1 cis 10	cis-10-heptadekanoična kiselina	22,364	14,11
C18:0	oktadekanska kiselina (stearinska kiselina)	10,548	6,66
C18:1 cis 9	cis-9-oktadekanoična kiselina (oleinska kiselina)	10,138	6,40
C18:1 trans 9	trans-9-oktadekanoična kiselina	20,592	13,00
C18:2 cis 9,12	cis-9, cis-12-oktadekanoična kiselina (linolna kiselina)	11,006	6,95
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19	cis-4-cis-7-cis-10-cis-13-cis-16-cis-19- dokosaheksaenska kiselina	14,85	9,37
Wukupne masne kiseline, biomasa [%]	2,826		

Tablica 16. Sastav i udio masnih kiselina u suhoj tvari biomase ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja na podlozi iz uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738.

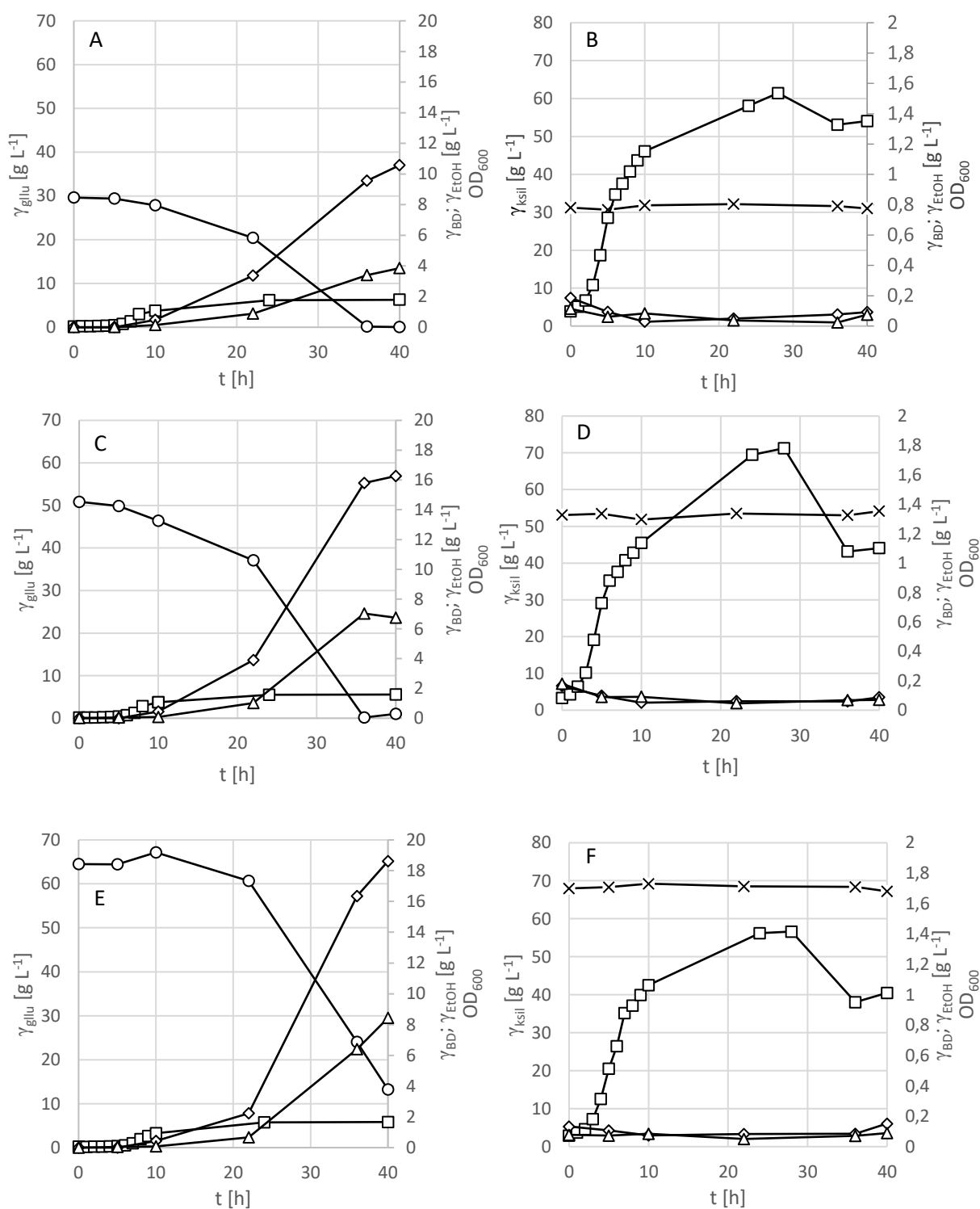
Masna kiselina		γ [mg L ⁻¹]	W ukupno [%]
Oznaka	Naziv		
C14:1 cis 9	cis-9-tetradekanoična kiselina (miristinska kiselina)	2,906	2,17
C15:0	pentadekanska kiselina	4,876	3,63
C15:1 cis 10	cis-10-pentadekanoična kiselina	13,616	10,15
C16:0	heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina)	8,654	6,45
C16:1 cis 9	cis-9-heksadekanoična kiselina (palmitoleinska kiselina)	6,784	5,06
C17:1 cis 10	cis-10-heptadekanoična kiselina	17,76	13,24
C18:1 cis 9	cis-9-oktadekanoična kiselina (oleinska kiselina)	10,62	7,92
C18:1 trans 9	trans-9-oktadekanoična kiselina	20,556	15,32
C18:2 cis 9,12	cis-9, cis-12-oktadekanoična kiselina (linolna kiselina)	10,112	7,54
C18:2, trans 9,12	trans-9, trans-12-oktadekanoična kiselina	10,352	7,72
C20:0	eikozanoinska (arahidinska) kiselina	12,054	8,99
C20:1 cis 11	cis-11-eikozanoinska kiselina	11,95	8,91
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19	cis-4-cis-7-cis-10-cis-13-cis-16-cis-19- dokosaheksaenska kiselina	3,904	2,91
Wukupne masne kiseline, biomasa [%]	3,381		

4.3. Istraživanje proizvodnje biokemikalija i biogoriva pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

U ovom poglavlju će biti prikazani rezultati istraživanja proizvodnje biokemikalija i biogoriva pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742. Rezultati uzgoja ove bakterije na kemijski definiranim podlogama prikazani su u poglavlju 4.3.1., na Slikama 23. i 24. te u Tablicama 17. i 18. Korištene podloge opisane su u 3.2.3.3 a metode u 3.2.4.2. Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na tekućim hidrolizatima otpadnog pivskog tropa dobivenim fizikalno–kemijskim i enzimskim metodama predobrade opisan je u poglavlju 3.3.2, te Tablici 11. Hranjive podloge opisane su u poglavlju 3.2.3.3.2. a metode u poglavlju 3.3.4.4 – 3.3.4.6.

4.3.1. Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranim podlogama

Kemijski definirane podloge pripremljene s glukozom odnosno ksilozom kao izvorom ugljika te kombinacijom glukoze i ksiloze u omjeru 1:1 opisane su u Poglavlju 3.3.3.3. Na Slici 23. prikazani su rezultati uzgoja na glukozu kao jedinom izvoru ugljika. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je kod svih uzgoja s glukozom kao jedinim izvorom ugljika, eksponencijalna faza rasta nastupila nakon otprilike 6 sati uzgoja, a trajala je do 28. sata. Najveća brzina potrošnje glukoze primijećena je između 10. i 35. sata pri svim početnim koncentracijama glukoze. U uzgojima kod kojih je početna koncentracija glukoze iznosila od 30 ili 50 g L⁻¹ glukoza je potrošena nakon 36 sati uzgoja. U eksperimentu s početnom koncentracijom glukoze 70 g L⁻¹ bilo je prisutno još 13,2 g L⁻¹ nefermentirane glukoze nakon 40 sati uzgoja. Maksimalne vrijednosti optičke gustoće određene pri 600 nm (OD₆₀₀) postignute tijekom uzgoja bakterije *P. polymyxa* DSM 742 bile su 1,790 kad je početna koncentracija glukoze iznosila 30 g L⁻¹, 1,589 kad je početna koncentracija glukoze iznosila 50 g L⁻¹ te 1,663 za 70 g L⁻¹ glukoze a ostvarene su u posljednjem satu uzgoja. Ostvarene specifične brzine rasta bile su 0,318 h⁻¹ za rast na 30 g L⁻¹, 0,219 h⁻¹ za 50 g L⁻¹ i 0,216 h⁻¹ za 70 g L⁻¹ glukoze. Primijećeno je da se pri najmanjoj početnoj koncentraciji glukoze od 30 g L⁻¹ ostvaruje najveća vrijednost OD₆₀₀ pa se pretpostavlja da pri 50 i 70 g L⁻¹ glukoze dolazi do blage inhibicije rasta supstratom. Unatoč tome, najveće koncentracije produkata (2,3-butandiol i etanola) nastale su uzgojem bakterije na podlozi s najvećom koncentracijom glukoze (70 g L⁻¹).



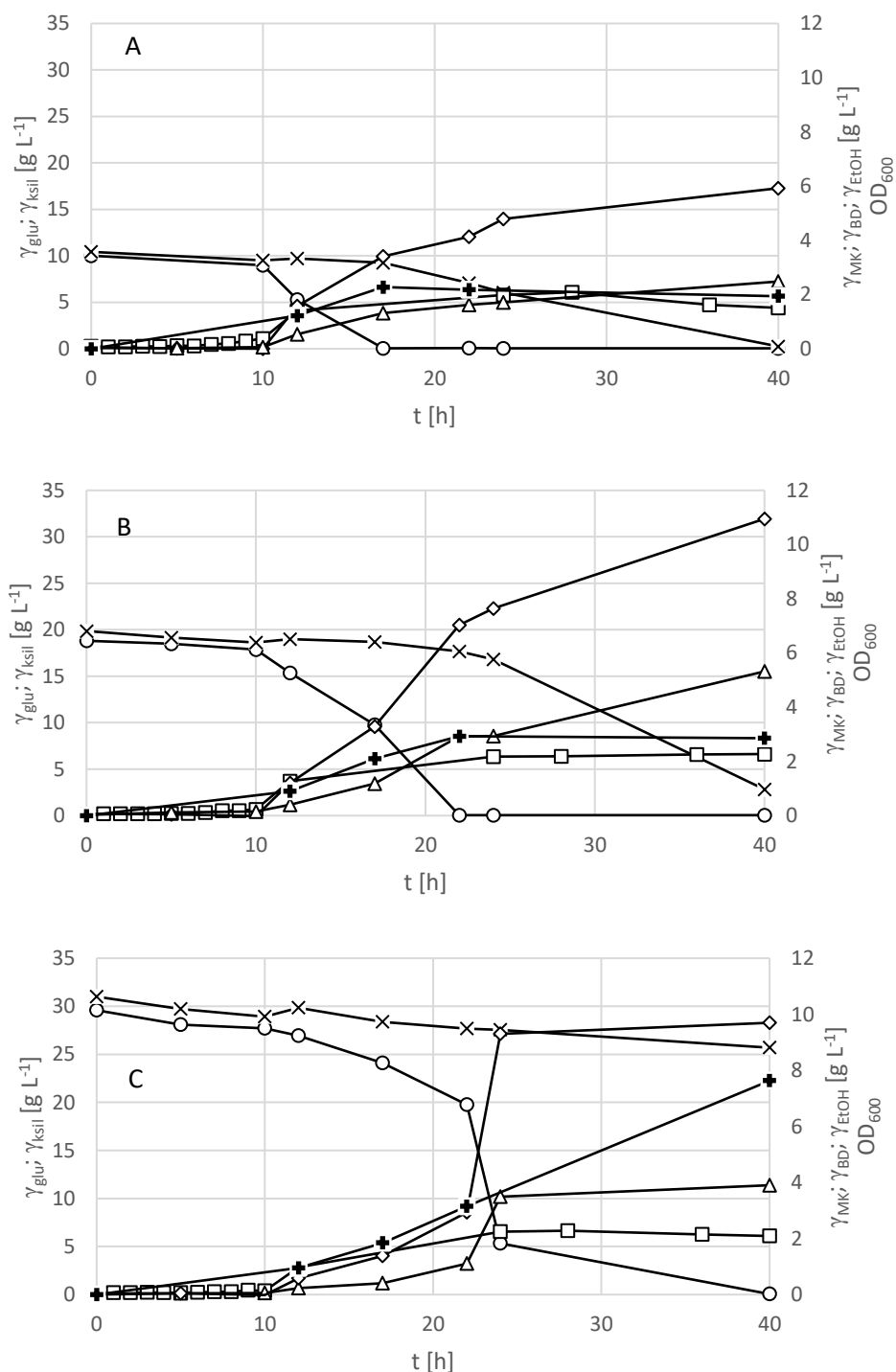
Slika 23. Uzgoj bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u kemijski definiranim podlogama sa glukozom kao izvorom ugljika (A; C; E) ili ksilozom kao izvorom ugljika (B; D; F).

[—□— OD_{600} , —○— glukoza (glu), —×— ksiloza (ksil), —△— etanol (EtOH), —◇— 2,3-butandiol (BD)]

Rezultati uzgoja prikazani su na Slici 23. te u Tablici 17. Uz početnu koncentraciju glukoze od 30 g L^{-1} , maksimalna koncentracija BD iznosila je $10,57 \text{ g L}^{-1}$, dok je koncentracija etanola iznosila $3,85 \text{ g L}^{-1}$. Prilikom uzgoja u podlozi s početnom koncentracijom glukoze 50 g L^{-1} dobiveno je $53,8 \%$ više BD ($16,26 \text{ g L}^{-1}$) nego tijekom uzgoja kad je početna koncentracija bila 30 g L^{-1} , ali dobiveno je i 43% više etanola ($6,75 \text{ g L}^{-1}$). Kod uzgoja kad je početna koncentracija glukoze iznosila 70 g L^{-1} dobiveno je najviše BD ($18,61 \text{ g L}^{-1}$) što je za $12,62 \%$ više u odnosu na 50 g L^{-1} i $42,2 \%$ više u odnosu na 30 g L^{-1} . S obzirom da je u hidrolizatu pivskog tropa zastupljena i ksiloza, utvrđena je kinetika rasta i sinteze proizvoda na podlogama sa ksilozom kao jedinim izvorom ugljika i to sa početnim koncentracijama od $30, 50$ i 70 g L^{-1} ksiloze. Tijekom uzgoja u podlozi kad je početna koncentracija ksiloze iznosila 50 g L^{-1} zabilježena je najviša koncentracija biomase prikazana kao vrijednost OD_{600} i to u 28. satu ($1,7811$), dok je u podlozi s 30 g L^{-1} ksiloze tijekom istog sata primijećena 13% niža vrijednost ($1,5363$) od vrijednosti ostvarene na 50 g L^{-1} ksiloze, a najniža vrijednost OD_{600} u 28. satu određena je u podlozi s početnom koncentracijom ksiloze od 70 g L^{-1} ($1,4156$) što je za 20% niža vrijednost od vrijednosti ostvarene na 50 g L^{-1} ksiloze. Vrijednosti koncentracije biomase određene kao OD_{600} vrijednost kod uzgoja na ksilozi kao jedinom izvoru ugljika su manje nego kad je glukoza jedini izvor ugljika i to za 24% (za 30 g L^{-1} ugljikohidrata), 30% (za 50 g L^{-1} ugljikohidrata) i 39% (za 70 g L^{-1} ugljikohidrata). U sva tri uzgoja na podlozi s ksilozom vidljiv je pad vrijednosti OD_{600} nakon 28. sata što nije primijećeno prilikom uzgoja na glukozi. Također tijekom uzgoja nije došlo do značajnog utroška ksiloze, neovisno o početnoj koncentraciji, a time nije došlo ni do signifikantnog nastajanja produkata kao što su etanol ni butandiol.

Fizikalno-kemijskim metodama predobrade kao što je predobrada lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru pomoću slabe kiseline (Marđetko i sur., 2018), dobivaju se tekući hidrolizati koji sadrže pretežno ugljikohidrate kao što su glukoza i ksiloza te neke druge u puno manjim (ili zanemarivim) koncentracijama. Kako hidrolizati lignoceluloznih sirovina sadrže više izvora ugljika, potrebno je također istražiti kinetiku rasta bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u takvim podlogama. Početne koncentracije izvora ugljika (glukoze i ksiloze) u kemijski definiranim podlogama stoga su bile podešene tako da svaka podloga sadrži jednaku koncentraciju glukoze i ksiloze, tj. oba monosaharida u koncentraciji $10, 20$ odnosno 30 g L^{-1}). Tako su ukupne koncentracije monosaharida u podlogama A, B i C iznosile $20, 40,$

odnosno 60 g L^{-1} Rezultati istraživanja prikazani su na Slici 22. i u Tablici 17. Sastav podloge opisan je u Poglavlju 3.2.3.3.



Slika 24. Uzgoj bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u kemijski definiranim podlogama sa glukozom i ksilozom kao izvorom ugljika (A – 10 g L^{-1} glukoze i 10 g L^{-1} ksiloze; B – 20 g L^{-1} glukoze i 20 g L^{-1} ksiloze; C – 30 g L^{-1} glukoze i 30 g L^{-1} ksiloze). [\square – OD_{600} , \circ –glukoza (glu), \times –ksiloza (ksil), \triangle –etanol (EtOH), \diamond –2,3-butandiol (BD), \blacklozenge –mliječna kiselina (MK)].

Tijekom uzgoja na podlozi A te na podlozi B (20 g L^{-1}), eksponencijalna faza započela je nakon 7. sata uzgoja dok je kod podloge C započela nakon 9. sata. Glukoza je potpuno utrošena u 17. satu, a ksiloza u 40. satu uzgoja na podlozi sa 10 g L^{-1} glukoze i ksiloze. Kod uzgoja na 20 g L^{-1} glukoze i ksiloze, glukoza je bila potrošena u 24. satu dok je na kraju uzgoja zaostalo 14 % početne koncentracije ksiloze ($2,82 \text{ g L}^{-1}$). Glukoza se isto potpuno utroši u podlozi s početnom koncentracijom od 30 g L^{-1} nakon 24. sata, a također je zapaženo najmanji utrošak ksiloze te je na kraju uzgoja iznosio 85 % početne koncentracije ($25,68 \text{ g L}^{-1}$).

Brzina potrošnje glukoze (Tablica 17.) je 2-3 puta veća u podlogama s oba izvora ugljika nego u podlogama koje sadrže samo glukozu. Isto tako, za razliku od podloga koje sadrže samo ksilozu, u ovom slučaju kada su prisutna oba izvora ugljika, dolazi do djelomične potrošnje ksiloze, pogotovo pri nižim početnim koncentracijama (10 i 20 g L^{-1}). Tijekom uzgoja bakterije *P. polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranim podlogama sa kombinacijom izvora ugljika dobiveni su produkti: 2,3-butandiol butandiol, etanol i mliječna kiselina. Na samom kraju uzgoja (40. sat) zabilježene su najviše vrijednosti koncentracija produkata. Početak sinteze proizvoda odvija se nakon 10. sata tj. nakon ulaska u eksponencijalnu fazu rasta, s time da se sinteza nastavlja i tijekom stacionarne faze rasta. Maksimalna koncentracija BD ostvarena je na podlozi s 20 g L^{-1} početne koncentracije glukoze i ksiloze te iznosi $10,95 \text{ g L}^{-1}$. Na podlozi s 10 g L^{-1} početne koncentracije dobivena je upola manja koncentracija BD ($5,92 \text{ g L}^{-1}$). Pri najvećoj koncentraciji oba izvora ugljika (30 g L^{-1}) dobiveno je $9,70 \text{ g L}^{-1}$ što je 22 % manje od maksimalne koncentracije BD dobivene uzgojem na 20 g L^{-1} početne koncentracije glukoze i ksiloze. U odnosu na uzgoje provedene na glukozu kao jedinom izvoru ugljika, brzina sinteze BD (Tablica 17.) je višestruko veća: $0,840 \text{ h}^{-1}$ (podloga A), $0,356 \text{ h}^{-1}$ (podloga B), $0,256 \text{ h}^{-1}$ (podloga C) naspram $0,102 \text{ h}^{-1}$ (30 g L^{-1}), $0,12 \text{ h}^{-1}$ (50 g L^{-1}) i $0,13 \text{ h}^{-1}$ (70 g L^{-1}). Brzina sinteze BD na podlogama sa glukozom povećava se s povećanjem koncentracije izvora ugljika dok se u podlogama s oba izvora ugljika smanjuje. Na podlozi s 10 g L^{-1} glukoze i ksiloze dobiveno je $2,48 \text{ g L}^{-1}$ etanola, dok je na podlozi s 20 g L^{-1} šećera dobiveno dva puta više ($5,32 \text{ g L}^{-1}$).

Pri najvećoj početnoj koncentraciji glukoze i ksiloze (30 g L^{-1}) dobiveno je 26,6 % manje etanola nego na podlozi s 20 g L^{-1} , ali 57 % više nego na podlozi s 10 g L^{-1} . Uspoređujući krajnje koncentracije mliječne kiseline u podlogama, vidljivo je da koncentracija proizvedene MK raste s porastom početne koncentracije šećera: na podlozi s najviše (30 g L^{-1}) glukoze i ksiloze dobiveno je najviše MK ($7,63 \text{ g L}^{-1}$), na 20 g L^{-1} glukoze i ksiloze dobiveno je 62,6 % manje ($2,85 \text{ g L}^{-1}$) MK, a na 10 g L^{-1} glukoze i ksiloze dobiveno je 74,6 % manje ($1,94 \text{ g L}^{-1}$) MK u odnosu na maksimalnu koncentraciju.

Tablica 17. Specifične brzine rasta, potrošnje supstrata i sinteze proizvoda te pokazatelji uspješnosti uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranim podlogama.

Vrsta podloge	μ [h ⁻¹]	$r_{S \text{ glu}}$ [h ⁻¹]	$r_{S \text{ ksil}}$ [h ⁻¹]	r_{BD} [h ⁻¹]	r_{EtOH} [h ⁻¹]	$Y_{P/S \text{ za BD}}$ [g g ⁻¹]	$Y_{P/S \text{ za EtOH}}$ [g g ⁻¹]
Glukoza 30 g L^{-1}	0,318	0,341	/	0,102	0,109	0,012	0,130
Glukoza 50 g L^{-1}	0,219	0,384	/	0,120	0,154	0,007	0,135
Glukoza 70 g L^{-1}	0,216	0,053	/	0,130	0,162	0,005	0,164
Ksiloza 30 g L^{-1}	0,204	/	/	/	/	/	/
Ksiloza 50 g L^{-1}	0,213	/	/	/	/	/	/
Ksiloza 70 g L^{-1}	0,184	/	/	/	/	/	/
Glukoza + ksiloza 10 g L^{-1}	0,297	0,778	0,248	0,840	/	0,291	0,122
Glukoza + ksiloza 20 g L^{-1}	0,291	1,056	0,137	0,356	/	0,304	0,148
Glukoza + ksiloza 30 g L^{-1}	0,220	0,410	/	0,256	/	0,277	0,112

μ -specifična brzina rasta,

$r_{S \text{ glu}}$ -brzina potrošnje glukoze,

$r_{S \text{ ksil}}$ -brzina potrošnje ksiloze,

r_{BD} -brzina sinteze 2,3-butandiola,

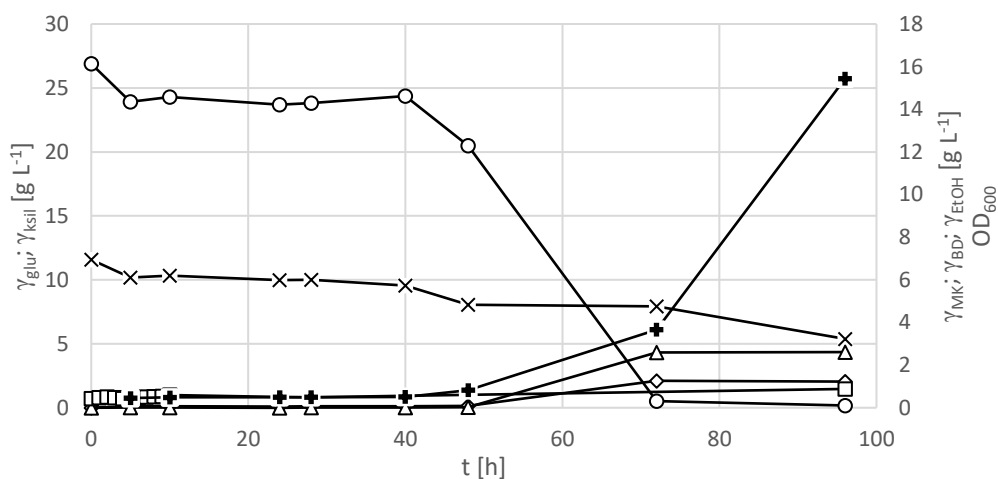
r_{EtOH} -brzina sinteze etanola,

$Y_{P/S \text{ za BD}}$ -koeficijent pretvorbe supstrata u produkt za 2,3-butandiol,

$Y_{P/S \text{ za EtOH}}$ -koeficijent pretvorbe supstrata u produkt za etanol.

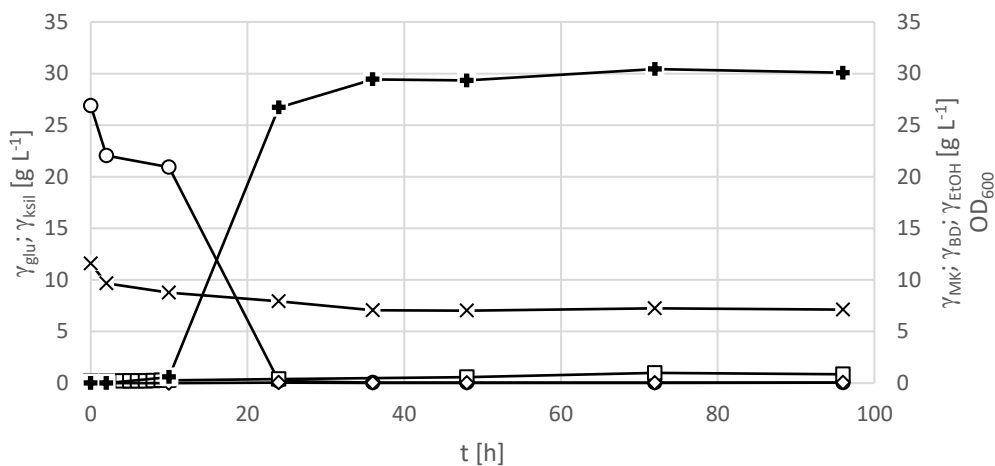
4.3.2. Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na tekućim hidrolizatima otpadnog pivskog tropa dobivenim fizikalno–kemijskim i enzimskim metodama predobrade

U ovom dijelu istraživanja prvo je provedena kiselinska hidroliza otpadnog pivskog tropa (Poglavlje 3.3.2.1.) u visokotlačnom reaktoru da bi se dobila tekuća hranjiva podloga za uzgoj. Za usporedbu je provedena i detoksikacija kiselinskog hidrolizata dodatkom aktivnog ugljena radi mogućeg smanjenja koncentracije inhibicijskih spojeva. Čvrsti dio nakon kiselinske hidrolize tretiran je komercijalnim lignocelulolitičkim enzimima. Dobiveni hidrolizati (kiselinski, detoksicirani kiselinski i enzimski) korišteni su za šaržni uzgoj bakterije *P. polymyxa* DSM 742u bioreaktoru s miješalom u svrhu proizvodnje korisnih biokemikalija u bioreaktorskim sustavima. Na Slikama 25. – 27. prikazani su dobiveni rezultati.

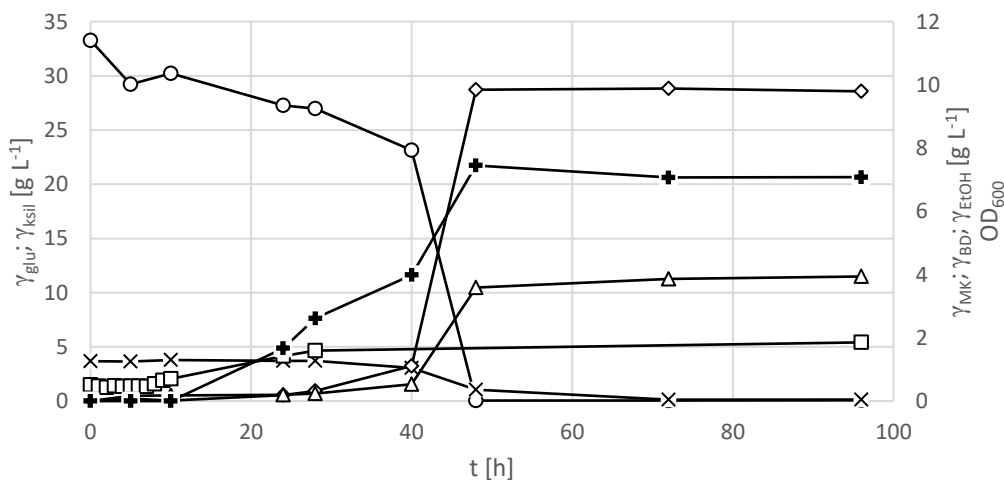


Slika 25. Šaržni uzgoj bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom proveden na hidrolizatu dobivenom kiselinskom hidrolizom otpadnog pivskog tropa.

[—□— OD₆₀₀ prvog decimalnog razrjeđenja, —○— glukoza (glu), —×— ksiloza (ksil), —△— etanol (EtOH), —◇— 2,3-butandiol (BD), —+— mliječna kiselina (MK)]



Slika 26. Šaržni uzgoj bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom proveden na a detoksiciranom hidrolizatu dobivenom kiselinom hidrolizom otpadnog pivskog tropa [—□— OD₆₀₀ prvog decimalnog razrjeđenja, —○— glukoza (glu), —×— ksiloza (ksil), —▲— etanol (EtOH), —◇— 2,3-butandiol (BD), —■— mliječna kiselina (MK)]



Slika 27. Šaržni uzgoj bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom proveden na hidrolizatu dobivenom enzimskom hidrolizom zaostale čvrste faze nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa u [—□— OD₆₀₀ prvog decimalnog razrjeđenja, —○— glukoza (glu), —×— ksiloza (ksil), —▲— etanol (EtOH), —◇— 2,3-butandiol (BD), —■— mliječna kiselina (MK)]

Iz rezultata je vidljivo da je na sve tri podloge (Slike 25-27) lag faza rasta trajala je duže nego u eksperimentima na kemijskim definiranim podlogama, oko 10 sati. Prilikom uzgoja bakterije *P. polymyxa* DSM 742 na hidrolizatu dobivenom kiselinskom hidrolizom otpadnog pivskog tropa (Slika 23.) zapaženo je da se glukoza iz podloge utroši nakon 72. sata uzgoja, a maksimalna brzina potrošnje iznosi $0,127 \text{ h}^{-1}$. Ksilozu se troši sporije i konačna koncentracija na kraju uzgoja iznosila je 46 % od početne (pala je s $11,58 \text{ g L}^{-1}$ na $5,38 \text{ g L}^{-1}$). Već nakon 48 h postignuta je koncentracija BD koja se nije više mijenjala, a u tom vremenu je postignuta i maksimalna koncentracija mliječne kiseline koja je nakon toga bila u laganom padu. U istom tom vremenu nastala je glavina etanola čija se koncentracija produženim uzgojem tek neznatno povećala. Nakon 72 sata uzgoja sintetiziralo se $1,26 \text{ g L}^{-1}$ BD, $2,5 \text{ g L}^{-1}$ EtOH te $3,6 \text{ g L}^{-1}$ mliječne kiseline. Na kraju uzgoja (96. sat) došlo je do pada koncentracije BD ($1,22 \text{ g L}^{-1}$), dok su koncentracije ostalih proizvoda porasle ($15,43 \text{ g L}^{-1}$ mliječne kiseline i $2,61 \text{ g L}^{-1}$ EtOH).

Istražen je i rast bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u podlogama dobivenim detoksikacijom kiselinskog hidrolizata pivskog tropa pomoću aktivnog ugljena (Slika 26.). Rezultati uzgoja na detoksiciranom kiselinskom hidrolizatu pivskog tropa u bioreaktoru s miješalom prikazani su na Slici 24. U eksponencijalnoj fazi rasta je vidljiv porast potrošnje glukoze, te na kraju njezin potpuni utrošak. Primjerice kod nedetoksiciranog kiselinskog hidrolizata glukoza se počela trošiti nakon 40. sata uzgoja. Utrošak ksiloze na kraju uzgoja (96. sat) iznosio je 38,5 % od početne koncentracije (smanjenje s $11,58 \text{ g L}^{-1}$ na $7,12 \text{ g L}^{-1}$). Nakon 24 sata uzgoja proizvedeno je $26,7 \text{ g L}^{-1}$ mliječne kiseline, što čini 87,7 % ukupne proizvodnje. Produkti nastali tijekom uzgoja detoksiciranog kiselinskog hidrolizata pivskog tropa su mliječna kiselina i octena kiselina $30,07 \text{ g L}^{-1}$ mliječne kiseline i $3,96 \text{ g L}^{-1}$ octene kiseline na kraju uzgoja koji je trajao 96 h.

Čvrsti dio koji zaostaje nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa podvrgnut je enzimskoj hidrolizi u acetatnom puferu u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB) (Poglavlje 3.3.3.6.) Tako dobivena podloga sadržavala je $33,27 \text{ g L}^{-1}$ glukoze i $3,68 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze (Slika 27). Tijekom uzgoja opaženo je da eksponencijalna faza traje 17 sati, od 7. do 24. sata uzgoja (OD_{600} prvog decimalnog razrjeđenja za 24. sat iznosi 1,599). Izračunato je da je najveća brzina potrošnje glukoze iznosila $0,758 \text{ h}^{-1}$ / Tablica 18.). Nakon 48 sati uzgoja koncentracije produkata bile su: $9,84 \text{ g L}^{-1}$ BD, $3,58 \text{ g L}^{-1}$ EtOH i $7,45 \text{ g L}^{-1}$ MK te se nisu do kraja uzgoja značajno mijenjale (Slika 25.).

Tablica 18. Pokazatelji uspješnosti uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kompleksnim podlogama

Vrsta podloge	μ [h ⁻¹]	$r_{S\text{ glu}}$ [h ⁻¹]	$r_{S\text{ ksil}}$ [h ⁻¹]	r_{BD} [h ⁻¹]	r_{EtOH} [h ⁻¹]	r_{MK} [h ⁻¹]	$Y_{P/S, BD}$ [g g ⁻¹]	$Y_{P/S, EtOH}$ [g g ⁻¹]
Hidrolizat dobiven kiselinskom hidrolizom	/	0,127	/	0,097	0,17	/	0,254	0,102
Detoksificirani hidrolizat dobiven kiselinskom hidrolizom	/	0,235	/	/	/	0,273	0,001	0,000
Hidrolizat dobiven enzimskom hidrolizom čvrstog dijela dobivenog kiselinskom hidrolizom	/	0,758	/	0,160	0,13	/	0,033	0,070

μ -specifična brzina rasta,

$r_{S\text{ glu}}$ -brzina potrošnje glukoze,

$r_{S\text{ ksil}}$ -brzina potrošnje ksiloze,

r_{BD} -brzina sinteze 2,3-butandiola,

r_{EtOH} -brzina sinteze etanola,

r_{MK} -brzina sinteze mliječne kiseline,

$Y_{P/S, BD}$ -koeficijent pretvorbe supstrata u produkt za 2,3-butandiol,

$Y_{P/S, EtOH}$ -koeficijent pretvorbe supstrata u produkt za etanol

5. RASPRAVA

Cilj ovog rada je razvoj ekološki i ekonomski održivih procesa za biorafinerijsko iskorištavanje otpadnog pivskog tropa i otpadne trave. Biorafinerijski princip znači razvoj održivih procesa koji imaju smanjeni utjecaj na okoliš, te iskorištavanje obnovljivih sirovina u što većoj mjeri za dobivanje proizvoda visoke dodane vrijednosti kao što su enzimi, biomaterijali poput hitina i hitozana, bazne biokemikalije poput 2,3-butandiola te mliječne kiseline i biogoriva etanola (Qureshi i sur., 2014). Otpadna lignocelulozna biomasa zbog niže cijene i dostupnosti u velikim količinama predstavlja vrijedan resurs za različite biotehnoške proizvodnje. Otpadna trava najviše se koristi kao stočna hrana a u posljednje vrijeme sve više nalazi svoju primjenu u brojnim biotehnoškim procesima kao što su: proizvodnja biogoriva, proizvodnja bioplina, suspaljivanje s ugljenom i/ili samostalnim izravnim spaljivanjem za proizvodnju toplinske i/ili električne energije, u proizvodnji biokemikalija, u proizvodnji papira, u proizvodnji mliječne kiseline na polučvrstim supstratima, u proizvodnji aminokiselina te kao silaža. Također, trava kao lignocelulozni materijal se ne koristi u prehrambenoj industriji te tako ne konkurira proizvodnji hrane (Vrdoljak 2019; Chen, 2015; de Jong i Gosselink, 2014; Kallioinen, 2014). Otpadna poljoprivredna lignocelulozna sirovina jeftinija je od šećerne i škrobne sirovine, ali je tehnološki značajno zahtjevnija jer je potrebno provesti odgovarajući način predobrade same sirovine za dobivanje krajnjeg visokovrijednog proizvod (de Oliveira i sur., 2014), stoga je zanimljiva kao sirovina za uzgoj plijesni te proizvodnju enzima jer nije potrebna prethodna predobrada.

Kako bi se otpadna trava iskoristila kao biotehnoška sirovina uz poštovanje biorafinerijskog principa, najprije je provedena fizikalno-kemijska predobrada. Za tu svrhu su odabrani odgovarajući uvjeti hidrolize razrijeđenom sumpornom kiselinom u visokotlačnom bioreктору, koji je već ranije korišten za predobradu lignoceluloznih sirovina (Marđetko i sur., 2018; Chen, 2015; de Jong i Gosselink, 2014; Kallioinen, 2014). Tekuća faza dobivena nakon kiselinske predobrade trave je odvojena za druge svrhe, a čvrsta faza (sastav prikazan u Tablici 4) koja se inače odbacuje, korištena je za proizvodnju enzima. Na početku ovog istraživanja pažnja je bila usredotočena na selekciju odabranih vrsta plijesni iz roda *Botryosphaeria* i *Fusarium* za proizvodnju ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima (Poglavlje 4.1.1). Lignocelulolitički enzimi igraju presudnu važnu ulogu kao biokatalizatori, što dovodi do njihove uporabe u raznim granama industrije (Adrio i Demain, 2005). Potražnja za industrijskim enzimima kontinuirano raste, vođena sve većom potrebom za održivim

razvojem (Adrio i Demain, 2008). Lignocelulolitički enzimi su ključni za razvoj ekonomične, ekološki prihvatljive i održive biološke metode za predobradu i razgradnju lignocelulozne biomase.

U preliminarnim eksperimentima korištene su 3 plijesni: *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, *Fusarium verticillioides* JCM 23107 i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293. Ovi sojevi plijesni istraživani su zbog toga što postoje podaci o njihovoj sposobnosti proizvodnje lignocelulolitičkih enzima (Borges i sur., 2021; Najjarzadeh i sur 2021; Patel i sur., 2020; Marsberg i sur., 2017). Parametri koji su praćeni prilikom selekcije bili su koncentracija ukupnih proteina, te aktivnosti glukanaze i ksilanaze pri submerznom uzgoju u podlozi koja je sadržavala čvrstu fazu trave zaostalu nakon kiselinske hidrolize trave i glukoze. Obzirom da je plijesan *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 pokazala najveću aktivnost ukupnih lignocelulolitičkih enzima, odabrana je kao radni mikroorganizam za nastavak istraživanja koji je proveden uzgojem u nešto većem volumenu hranjive podloge. U ovoj fazi istraživanja korišten je barbotirajući bioreaktor, pri čemu je korisni volumen hranjive podloge iznosio 2 L, a proces je proveden bez kontrole pH-vrijednosti i uz jaku aeraciju (5 L min^{-1}).

Osim proizvodnje enzima, odabrana plijesan *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 proizvodi i značajne količine biomase koja se može iskoristiti za izolaciju hitina i hitozana (Poglavlje 4.2.). Tako proizvedena biomasa plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 može se promatrati kao sekundarni proizvod jer može poslužiti kao izvor hitina i hitozana za primjenu u poljoprivredi, medicini i raznim granama industrije (Bedian i sur., 2017; Debode i sur., 2016; Yong i sur., 2015; El Hadrami i sur., 2010).

Pored lignocelulolitičkih enzima kao primarnog proizvoda te biomase plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 kao izvora hitina i hitozana, željelo se postići što bolje iskorištavanje svih vrsta otpada nastalog u procesu. U ovom istraživanju je otpadna voda iz proizvodnje lignocelulolitičkih enzima, provedene pomoću plijesni u barbotirajućem bioreaktoru, iskorištena kao sirovina za uzgoj tri vrste fototrofnih ljubičastih nesumpornih bakterija. Korištena je bez drugih dodataka te su uspoređene vrste bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 3940, *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T i *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u svrhu proizvodnje mikrobne biomase te masnih kiselina i pigmenata (Poglavlje 4.2.). Rast biomase ljubičastih nesumpornih bakterija za vrijeme uzgoja praćen je vizualno usporedbom obojenja podloge, a na kraju uzgoja (koji je trajao 7 dana) bakterijska biomasa

određena je gravimetrijski. Najveću koncentraciju biomase postigla je bakterija *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T. Paralelno s rastom ljubičastih nesumpornih bakterija na otpadnoj vodi, došlo je do uklanjanja sastojaka iz hranjive podloge. To je procijenjeno praćenjem pada apsorbancije supernatanta odvojenog centrifugiranjem. Najveći pad apsorbancije zabilježen je primjenom bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 (Slika 22), za koju je procijenjeno da je uklonila najviše sastojaka podloge iako je gravimetrijski određeno da je imala najmanji prirast biomase. Ljubičaste nesumporne bakterije prepoznate su u suvremenoj biotehnologiji zbog njihove iznimne fiziološke raznolikosti, jednostavnosti prilagodbe na široki raspon uvjeta te sposobnosti sinteze većeg broja proizvoda s mogućom komercijalnom primjenom (Imhoff, 2006). Uporaba fotosintetskih mikroorganizama općenito se smatra jednom od potencijalnih metoda za smanjenje troškova proizvodnje, a važan je i njihov doprinos u održavanju ekološke ravnoteže zahvaljujući upotrebi solarne energije te sposobnosti fiksacije CO₂ i dušika iz atmosfere (Higuchi Takeuchi i Numata, 2019). Ljubičaste nesumporne bakterije proizvode velik niz raznih biokemikalija kao što su 5-aminolevulinska kiselina, masne kiseline, razni pigmenti, prirodni polimeri kao što je polihidroksialkanoat, osim toga proizvode i vodik kao potencijalno biogorivo, a sama biomasa predstavlja vrijedan izvor proteina i može se koristiti u procesima bioremedijacije. U fermentaciji provedenoj s bakterijom *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 proizvedena je najveća koncentracija bakterioklorofila *a*, a bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 također je proizvela značajnu koncentraciju ovog pigmenta. Ovo preliminarno istraživanje mogućnosti proizvodnje pigmenta i istovremenog pročišćavanja otpadne vode potrebno je proširiti i pritom provesti optimiranje uvjeta uzgoja uz opsežnije analize koje bi obuhvatile određivanje koncentracija različitih pigmenta u podlozi i njihovih masenih udjela u suhoj tvari bakterijske biomase (Bunraksa i sur., 2020; Alloul, 2019; Sakarika i sur., 2020; Costa i sur., 2017). Maseni udjeli ukupnih masnih kiselina u suhoj tvari ljubičastih nesumpornih bakterija iznosili su 1,7 % - 3,4 % (w/w). Najviše ukupnih masnih kiselina sadržavala je suha tvar bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, a najmanje bakterija *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T. Prilikom nastavka optimiranja uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija trebalo bi voditi računa ne samo o masenom udjelu, već i o raznolikosti sastava masnih kiselina i njihovoj različitoj zastupljenosti u biomasi pojedinih bakterija, što je vidljivo iz prikazanih rezultata (Tablice 14-16).

Druga sirovina koja se koristila za bioarinerijsko iskorištavanje je pivski trop. Pivski trop je nusproizvod koji nastaje u velikim količinama tokom cijele godine, a zbog svog visokog udjela proteina i ugljikohidrata se može koristiti i kao sirovina u biotehnologiji za proizvodnju fenolnih kiselina, mliječne kiseline, bioplina, bioetanol, ksilitola, pululana te kao podloga za uzgoj mikroorganizama i proizvodnju enzima, ali kao dodatak ili nosač za imobilizaciju stanica kvasca pri fermentaciji piva. Najčešće se koristi kao hrana za stoku, dodatak proizvodima namijenjenim za ljudsku prehranu, sirovina za proizvodnju građevinskog materijala, ugljena, papira, energije, no ima i potencijal za primjenu kao adsorbent (Beluhan, 2001). Proizvodnja biokemikalija poput 2,3-butandiol predstavlja skup proces jer ovisi o izvoru ugljika i sirovini koja se koristi. Upotrebom jeftine otpadne sirovine poput pivskog tropa može uvelike smanjiti troškove proizvodnje i time proces proizvodnje učiniti ekonomski i ekološki održivim (Amraoui i sur., 2021). Otpadni pivski trop je također zanimljiva sirovina za biorafinerije. Kako tijekom procesa proizvodnje piva nastaje velika količina različitih nusproizvoda (na 1 hektolitar piva koji se proizvede nastaje od 14 do 20 kg pivskog tropa), a otpadni pivski trop sačinjava oko 85 % ukupnog nastalog otpada (Amraoui i sur. 2021; Tang i sur., 2009) a zbog visokog udjela polisaharida ima velik potencijal za primjenu u biotehnoškim industrijskim proizvodnjama (Ferraz i sur., 2013). Osim samih bio-sirovina veliku ulogu kao proizvođači biogoriva, biokemikalija i biomaterijala u biorafinerijama, imaju i odgovarajući mikroorganizmi koji se koriste.

Drugi dio istraživanja bio je fokusiran na razvoj procesa za proizvodnju biokemikalija (2,3-butandiol, mliječna kiselina) i biogoriva (etanol) pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742. Najprije je ova bakterija uzgajana u kemijski definiranim podlogama koje su sadržavale glukozu i ksilozu kao najzastupljenije monosaharide koji se mogu očekivati u tekućim kiselinskim hidrolizatima otpadnog pivskog tropa (Poglavlje 4.3.2). Bakterija *Paenibacillus polymyxa* može proizvesti različite kemijske spojeve (Jeong i sur., 2019; Okonkwo, 2017; Lal i Tabacchioni, 2009), a u ovom istraživanju bio je cilj proizvesti 2,3-butandiol, mliječnu kiselinu i etanol na tekućim hidrolizatima pivskog tropa jer zasad prema našim saznanjima nema dostupne literature o primjeni ove bakterije u takvim biotehnoškim procesima. Pivski trop koji zaostaje nakon proizvodnje piva može predstavljati jeftinu sirovinu za biotehnoške proizvodnje (Drakopoulos i sur., 2021; Matijašević Lj. i Vojvodić V., 2015; Ferraz i sur., 2013). Pivski trop se u velikoj mjeri koristi kao stočna hrana. S biotehnoškog gledišta, on se može koristiti i kao polučvrsta

komponenta hranjive podloge za uzgoj plijesni (Drakopoulos i sur., 2021). Nakon prikladne predobrade takve sirovine, tekući dio koji sadrži glukozu i ksilozu može poslužiti kao izvor ugljika za submerzni uzgoj u bioreaktorskim sustavima. Količina piva koja sa proizvede u Republici Hrvatskoj procijenjena je na 3,4 milijuna hektolitara. Na tu količinu proizvede se otprilike 17 kg tropa po 100 L piva, odnosno 57 800 tona otpadnog tropa, što predstavlja veliku količinu koja se mora zbrinuti (Mijatović, 2019; Brewers of Europe, 2018; HGK, 2017). Razvoj novih procesa iskorištavanja otpadnih sirovina, predstavlja ne samo velik potencijal za proizvodnju novih materijala nego i mogućnost za nova radna mjesta valorizirajući raznolik otpad uz smanjenje emisije stakleničkih plinova (Qureshi i sur., 2014). Biorafinerijskim postupkom iskorištavanja otpadnih sirovina možemo stvoriti procese koji su ekološki i ekonomski održivi. Otpadni pivski trop je u ovom istraživanju tretiran slabom sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru (0,5 % H₂SO₄ / 10 minuta / 180 °C) pri čemu se dobije tekuća frakcija tj. kiselinski hidrolizat koji sadrži glukozu i ksilozu te čvrsta frakcija koja je naknadno hidrolizirana komercijalnim lignocelulolitičkim enzimima radi što većeg iskorištenja fermentabilnih šećera iz polazne sirovine. Dobivene podloge su korištene kao izvor ugljika tijekom uzgoja istraživane bakterije za proizvodnju biokemikalija i biogoriva. Rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* prikazani su na slikama 25 – 27.

5.1. Biorafinerijsko korištenje otpadne trave - Istraživanje proizvodnje ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima pomoću odabranih vrsta plijesni iz roda *Botryosphaeria* i *Fusarium*

U ovom radu, plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, *Fusarium verticillioides* JCM 23107 i *Fusarium oxysporum* JCM 9293 su prvotno uzgajane na podlozi s glukozom i čvrstoj fazi dobivenoj kiselinskom obradom otpadne trave kao izvorima ugljika. Tekući kiselinski hidrolizat trave korišten je za razvoj drugih bioprocasa u sklopu biorafinerijskog koncepta te nije dalje razmatran u ovom radu. Cilj je bio potaknuti proizvodnju ekstracelularnih enzima pomoću odabranih plijesni, točnije lignocelulolitičkih enzima koji bi se mogli koristiti u daljnjim bioprocasima obrade lignoceluloznih sirovina. Prvo se istražilo dolazi li uopće do aktivacije sinteze enzima. Glukani (polimeri uglavnom glukoze) i ksilani (polimeri uglavnom ksiloze) s prisutnošću arabinoze i glukuronske kiseline) čine najveći udio otpadne trave pa je bilo nužno detektirati glukanaze i ksilanaze u našem istraživanju. Mjerenjem enzimske aktivnosti iz dobivenih rezultata prikazanim na Slici 14., dokazano je da sve tri istraživane plijesni imaju glukanaznu i ksilanaznu aktivnost, a plijesan *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 je imala skoro dvostruko veću ksilanaznu aktivnost (420 U L^{-1}) od ostalih plijesni. Endoglukanazna aktivnost bila je ujednačena kod sve tri istraživane plijesni (123 U L^{-1} , 159 U L^{-1} i 167 U L^{-1}). U narednom eksperimentu detaljnije su istražene aktivnost endoglukanaza i ksilanaza te koncentracija proteina u razmacima od 24 sata (Slika 15). Najveće koncentracije proteina zabilježene su nakon 9 dana kod plijesni *Fusarium verticillioides* JCM 23107 (oko $3,2 \text{ g L}^{-1}$) te istoga dana kod plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 (94 % od najveće) dok je najmanja koncentracija proteina bila je kod plijesni *Fusarium oxysporum* JCM 9293, tj. oko 80 % od najveće postignute koncentracije.

Od ove tri plijesni, *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 postiže najviše vrijednosti aktivnosti ksilanaza s maksimalnom aktivnošću izmjerenom nakon 10 dana (Slika 16.). Pomoću plijesni *Fusarium verticillioides* postiže se podjednaka, ali nešto manja aktivnost (oko 3 % razlike), međutim za to je potreban 3 dana duži uzgoj, što je nepovoljnije za komercijalnu proizvodnju enzima. Plijesan *Fusarium oxysporum* JCM 9293 ostvaruje svoju maksimalnu proizvodnju ksilanaza također 10. dana, ali je ona značajno manja i iznosi tek oko 20% od aktivnosti postignute kod najboljeg producenta. (Slika 18.). Endoglukanaze plijesni *Fusarium verticillioides* JCM 23107 nakon 9 dana pokazuju najveću aktivnost (blizu 250 U L^{-1}), a svega 3 % manju vrijednost istoga dana postižu endoglukanaze plijesni *Botryosphaeria dothidea*

JCM 2738. Najveća aktivnost endoglukanaze koju je proizvela plijesan *Fusarium oxysporum* JCM 9293 iznosila je oko 6 % manje nego kod najboljeg producenta, ali je postignuta tek nakon 12 dana, tj. 4 dana kasnije. Za danje istraživanje proizvodnje ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima u većem mjerilu u barbotirajućem biorektoru odabrana je plijesan *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 s obzirom na najveću aktivnost ukupnih lignocelulolitičkih enzima (Slika 18. – 19.).

Plijesan *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, koja je tijekom uzgoja na tresilici pokazala najveću enzimsku aktivnost ksilanaza i endoglukanaza uzgojena pri istoj temperaturi, bez kontrole pH vrijednosti te uz stalno miješanje i visok stupanj aeracije. Poznato je da koncentracija kisika i miješanje pozitivno utječe na rast plijesni te na sintezu enzima (Bakri i sur., 2011). Aktivnosti ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima naglo su rasle nakon utroška glukoze iz podloge te su 7 dana kasnije dosegle vrijednost iznad 1440 U L⁻¹ za ksilanaze odnosno otprilike upola manju vrijednost za endoglukanaze (Slika 20.). Ako se usporede rezultati uzgoja u barotirajućem biorektoru te uzgoj na tresilicama za istu plijesan, može se vidjeti da je u isto vrijeme (7 dana) kod uzgoja na tresilici (Slika 18.) ksilanazna aktivnost bila skoro 3 puta manja, a glukanazna aktivnost čak 6 puta manja (slika 17). Ovi podaci potvrđuju važnost aeracije tijekom uzgoja plijesni za proizvodnju enzima (Druzian i sur., 2020; Fičko 2019; Bakri i sur., 2011). Budući da su maksimalne aktivnosti ksilanaza i endoglukanaza postignute nakon 7 dana uzgoja, to se vrijeme može preporučiti za komercijalnu proizvodnju ovih dvaju enzima na podlozi s travom u istraženim uvjetima. Kako je koncentracija ukupnih proteina rasla i nakon 7. dana te je bila najveća na završetku uzgoja, u budućim eksperimentima može se istražiti proizvodnja drugih komercijalno interesantnih enzima pomoću iste plijesni, uz produženo vrijeme uzgoja. Koncentracija proteina je kontinuirano rasla tijekom uzgoja, a vrhunac je dosegla 9. dan uzgoja kada je iznosila 5,16 g L⁻¹, otprilike 1.5 puta više u odnosu na uzgoj na tresilicama (Slika 17 i Slika 20).

Nakon završenog bioprocasa u barbotirajućem biorektoru, centrifugiranja te koncentriranja ekstracelularnih proteina prisutnih u supernatantu, određena je enzimska aktivnost proteinskog koncentrata (Tablica 13.). Koncentracija ovako pročišćenih proteina iznosila je 5 puta više nego u fermentacijskoj podlozi, dok su aktivnosti endoglukanaza i ksilanaza u koncentratu proteina bile veće skoro 390 odnosno 400 puta. U dostupnoj literaturi nisu pronađeni podaci o enzimskoj aktivnosti plijesni *Botryosphaeria dothidea*, iako je poznato da se mnoge plijesni mogu koristiti za biotehnošku proizvodnju različitih enzima,

najčešće lignocelulolitičkih (Kumar i sur., 2008). Infanzón-Rodríguez i sur. (2020) objavili su podatak o aktivnosti endoglukanaze od 280 U L^{-1} proizvedenoj pomoću plijesni *Fusarium verticillioides* na otpadnim ostacima sirka. U drugom istraživanju (Vasquez-Montoya i sur., 2019), u kojem je karboksimetilceluloza korištena kao jedini izvor ugljika, dobivena je aktivnost endoglukanaze od 464 U L^{-1} , a egzoglukanaze od 102 U L^{-1} . Kod drugih istraživanja, enzimski aktivnost plijesni *Fusarium oxysporum* nije detaljno određivana, već je samo utvrđeno da posjeduje jaku pektinaznu, ksilanaznu i amilaznu aktivnost te srednje jaku β -glukozidaznu aktivnost (Kwon i sur., 2007). Kod srodne plijesni *Fusarium graminearum* određena je aktivnost endoglukanaza od $320\text{-}330 \text{ U L}^{-1}$ koja se postiže između 7. i 9. dana te aktivnost ksilanaza od 880 U L^{-1} koja se postiže u 7. danu. Plijesan je uzgajana na smjesi glukoze, pektina i zobnih mekinja koji su služili kao izvori ugljika (Kikot i sur., 2010). Kod srodne plijesni *Fusarium graminearum*, uzgajane u Erlenmayer tikvicama na tresilicama pri 150 O/min , na smjesi glukoze, pektina i zobnih mekinja kao izvora ugljika dana, određena je aktivnost endoglukanaza od $320\text{-}330 \text{ U L}^{-1}$ koja se postiže između 7. i 9. te aktivnost ksilanaza od 880 U L^{-1} koja se postiže u 7. danu (Kikot i sur., 2010).

Kako je ranije navedeno u teorijskom dijelu rada, poznato je da biomasa plijesni također predstavlja visokovrijedan produkt te da između ostalog sadrži vrlo vrijedne biopolimere poput hitina i hitozana. Istraživanja iskorištavanja hitina i hitozana su u posljednje vrijeme jako intenzivirana zbog njihove primjene u raznim područjima ljudske djelatnosti (Cotettet i sur., 2020; Girometta i sur., 2019). Iz biomase plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, odvojene centrifugiranjem, hitin i hitozan su izolirani prema postupku opisanom u radu Pochanavanich i Suntornsuk (2002). Pokazalo se da je maseni udio hitozana u suhoj tvari biomase ove plijesni bio oko 38 %, a udio hitina oko 25 %. Kako udio hitina u suhoj tvari plijesni obično iznosi 10 - 20 % (Garcia-Rubio i sur., 2020), to se odlično slaže s dobivenim rezultatima ukoliko se uzmu u obzir nečistoće

Iz raznih biotehnoloških proizvodnji, nakon izolacije biomase i izolacije biokemikalija ili biogoriva iz prevrele podloge, zaostaje otpadna podloga. Kako takva podloga još sadrži komponente koje istraživani mikroorganizam nije iskoristio za svoj rast i sintezu proizvoda, ona predstavlja biološko opterećenje za okoliš i može pridonijeti samom zagađenju voda (Novak i sur. 2020; Frigaard, 2016). Otpadna hranjiva podloga nakon uzgoja mikroorganizama, u ovom slučaju plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 nakon biotehnološkog procesa proizvodnje lignocelulolitičkih enzima, može predstavljati opasnost

za okoliš ili biti problematična za zbrinjavanje. Da bi se smanjio utjecaj na okoliš, a pridržavajući se biorafinerijskog principa iskorištavanja svih dostupnih sirovina, takva otpadna voda, tj., ostatak hranjive podloge iz proizvodnje, može se iskoristiti za uzgoj fototrofnih mikroorganizama, koji ne zahtijevaju visoke koncentracije izvora ugljika u samoj hranjivoj podlozi jer mogu koristiti i CO₂ iz zraka kao izvor ugljika (Matoković, 2020; Novak i sur., 2020; Novak i sur., 2017), a mogu rasti na širokom rasponu hranjivih tvari fotoheterotrofno u mikroaerofilnim uvjetima pod svjetlom uz prisutnosti različitih organskih spojeva.

Za preliminarno istraživanje mogućnosti obrade otpadnih voda iz uzgoja plijesni, sa težnjom da se smanji količina otpada iz biotehnoloških procesa, korištene su ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 3940, *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T i *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781.

5.2. Iskorištavanje ljubičastih nesumpornih bakterija za pročišćavanje otpadne vode dobivene nakon procesa uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738

Posljednjih godina uvelike se istražuje primjena biomase ljubičastih nesumpornih bakterija u procesima pročišćavanja tla i otpadnih voda iz raznih industrija (Matoković, 2020; Sakarika i sur., 2020; Vasiliadou i sur., 2018; Kobayashi i Kobayashi, 1995). U ovom radu istražena je mogućnost uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija na podlozi iz proizvodnje plijesni. Time se sprječava nepotrebno bacanje podloge te se istovremeno ostvaruje proizvodnja više vrijednih proizvoda iz jedne sirovine. U ovom slučaju proizvod iz otpadne vode, nastale u procesu, je biomasa bogata proteinima, fotosintetskim pigmentim te masnim kiselinama (Slike 21. i 22., Tablice 14. - 16.). Otpadna podloga nije sadržavala šećere (podaci nisu prikazani) iz prethodnog uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, već samo dio proteina koji je preostao nakon koncentriranja lignocelulolitičkih enzima, a uzgoj triju vrsta ljubičastih nesumpornih bakterija proveden je fotoheterotrofno, u mikroaerofilnim uvjetima pod svjetlom.

Tijekom vremena zamijećeno je smanjenje obojenja podloge, praćeno kao smanjenje apsorbancije podloge, što je poslužilo kao indikator rasta. Gravimetrijskom analizom, opaženo je da ljubičasta nesumporna bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 3940 najbrže počinje rasti, no već nakon 3 dana dolazi do odumiranja biomase. Bakterije *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T i *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 rasle su sporije, pri čemu je bakterija *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T postigla najveću koncentraciju biomase od 3,75 g L⁻¹ dok je koncentracija biomase bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 bila je 52 % , a bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 37 % niža (Slika 22). Osim što su uzgajane bakterije smanjile apsorbanciju podloge i time pokazale svoju sposobnost rasta na otpadnoj podlozi od proizvodnje enzima opisane u ovom radu, proizvedena biomasa poslužila je za izdvajanje pigmenata i masnih kiselina. Bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 proizvela je najveću koncentraciju fotosintetskih pigmenata (1,16 mg L⁻¹), a slijede je bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 te *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T koje proizvode oko 80 % od maksimalne vrijednosti.

Ekstrakcijom lipida iz biomase, transesterifikacijom i ekstrakcijom nastalih metil-estera u organsko otapalo te detekcijom GC-FID metodom dobiveno je da ljubičaste nesumporne bakterije sadrže između 1,7 % i 3,4 % ukupnih masnih kiselina u suhoj tvari

(Tablice 14. - 16.). Detektirano je desetak masnih kiselina, a najveći udjeli su zabilježeni za cis-10-heptadekanoičnu kiselinu (14 - 21 %) te cis-10-pentadekanoičnu kiselinu (10 - 13 %). Kod bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 detektiran je velik udio trans-9-oktadekanoične kiseline (13 – 15 %). Zanimljivo je da su C:20 masne kiseline nađene samo u biomasi *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781. Ostale masne kiseline zastupljene su u manjem postotku u samoj biomasi bakterija (Tablice 14. - 16.). S obzirom na raznolik sastav masnih kiselina i visok udio proteina, osušena biomasa ljubičastih nesumpornih bakterija se može komercijalno koristiti za razne svrhe (Matoković, 2020; Novak i sur., 2020; Sakarika i sur., 2020; Novak i sur., 2017).

5.3. Biorafinerijsko korištenje otpadnog pivskog tropa - Istraživanje proizvodnje biokemikalija i biogoriva pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

Biorafinerijski princip iskorištavanja pivskog tropa za proizvodnju biokemikalija i biogoriva pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 dosad još nije bio istražen. U razvoju održivog procesa pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na otpadnim sirovinama iz pivarske industrije, prvotno se ispitivala kinetika rasta te kinetika proizvodnje 2,3-butandiola na kemijski definiranim podlogama sa glukozom ili/i ksilozom kao izvorom ugljika i energije. Na Slikama 23. i 24. prikazani su dobiveni rezultati uzgoja. Iz eksperimentalnih podataka izračunale su specifične brzine. Najveća specifična brzina rasta ostvarena je pri najmanjoj istraživanoj koncentraciji glukoze kao jedinog izvoga ugljika u podlozi i pritom je brzina bila obrnuto proporcionalna koncentraciji glukoze u istraživanom opsegu koncentracija. Kad je početna koncentracija tijekom uzgoja bila 30 g L^{-1} , specifična brzina rasta je $0,318 \text{ h}^{-1}$, a povećanjem koncentracije (50 i 70 g L^{-1} ; Slika 23) brzina rasta opada za 40 %. Pri uzgoju na ksilozi najveća je specifična brzina rasta bila pri srednjoj koncentraciji (50 g/L). U podlogama s kombinacijom glukoze i fruktoze najveća je brzina rasta postignuta pri najvećim koncentracijama, tj. uz 30 g/L glukoze i isto toliko ksiloze.

Detektirani produkti uzgoja bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u kemijskim definiranim podlogama sa glukozom kao izvorom ugljika su 2,3-butandiol (BD) i etanol (EtOH) (Slika 23; Tablica 17.). Maksimalna koncentracija BD koja je proizvedena, raste sa početnom koncentracijom glukoze u podlozi, pa je tako kod uzgoja s 70 g L^{-1} glukoze postignuta maksimalna koncentracija od $18,61 \text{ g L}^{-1}$, a kod nižih početnih koncentracija glukoze imamo 13 % manje za uzgoj na 50 g L^{-1} te 44 % manju kod uzgoja sa početnom koncentracijom glukoze od 30 g L^{-1} . Maksimalna koncentracija etanola također raste sa porastom početne koncentracije izvora ugljika. Kod uzgoja kad je koncentracija glukoze bila 30 g L^{-1} , proizvedeno je oko 4 g L^{-1} etanola, a kod uzgoja kad je koncentracija glukoze bila 50 g L^{-1} otprilike 45 % više, a kod uzgoja kad je koncentracija glukoze bila 70 g L^{-1} čak 53 % više (Slika 23; Tablica 17). Tijekom uzgoja u podlogama sa ksilozom kao jedinim izvorom dušika nije došlo do značajnog utroška ksiloze, neovisno o početnoj koncentraciji (Slika 23.; Tablica 17.), a time nije došlo ni do značajnog nastajanja produkata kao što su etanol ili BD što ukazuje da ksiloza kao jedini izvor ugljika nema utjecaj na kinetiku sinteze produkata.

Dobiveni hidrolizati lignoceluloznih sirovina sadrže više izvora ugljika (Mardetko i sur., 2018), stoga je potrebno bilo istražiti i kinetiku rasta i sinteze produkata kod bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u kemijski definiranim podlogama koja sadrže kombinaciju više vrsta izvora ugljika. Podloge su sadržavale izvor ugljika u omjeru 1:1 a rezultati istraživanja prikazani su na Slici 24. te u Tablici 17. Iz rezultata je vidljivo da je brzina potrošnje glukoze (Tablica 17.) 2-3 puta veća u podlogama s oba izvora ugljika nego u podlogama koje sadrže samo glukozu. Isto tako, za razliku od podloga koje sadrže samo ksilozu, u prisutnosti oba izvora ugljika, dolazi do djelomične potrošnje ksiloze, pogotovo pri nižim početnim koncentracijama. Za razliku od eksperimenata s jednim šećerom kao izvorom ugljika u podlozi kad se kao proizvodi nastali BD i etanol, tijekom uzgoja bakterije *P. polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranim podlogama s kombinacijom izvora ugljika pored ovih dvaju proizvoda dobivena je i mliječna kiselina. Brzina sinteze BD povećava se s povećanjem ukupne koncentracije izvora ugljika. Maksimalna koncentracija BD ostvarena je na podlozi s 20 g L^{-1} početne koncentracije glukoze i ksiloze te iznosi skoro 11 g L^{-1} . Na podlozi s 10 g L^{-1} početne koncentracije dobivena je skoro upola manja koncentracija BD. Pri najvećoj koncentraciji oba izvora ugljika (30 g L^{-1}) dobiveno je $9,70 \text{ g L}^{-1}$ što je 22 % manje od maksimalne postignute koncentracije BD. Najviše etanola dobiveno je na podlozi sa 40 g L^{-1} ukupnih šećera ($5,32 \text{ g L}^{-1}$), a na podlozi sa 20 g L^{-1} ukupnih šećera otprilike 50 % manje. Koncentracija proizvedene MK raste s porastom početne koncentracije šećera: na podlozi s najviše ($30 + 30 \text{ g L}^{-1}$) glukoze i ksiloze dobiveno je najviše MK ($7,63 \text{ g L}^{-1}$), na $20 + 20 \text{ g L}^{-1}$ glukoze i ksiloze dobiveno je 62,6 % manje MK, a na podlozi sa $10 + 10 \text{ g L}^{-1}$ glukoze i ksiloze dobiveno je 74,6 % manje MK u odnosu na maksimalnu koncentraciju (Slika 24.; Tablica 17.). Eksperimentalni podaci dobiveni tijekom uzgoja bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u podlogama sa dva izvora ugljika nam ukazuju mogućnost proizvodnje više korisnih proizvoda tijekom jednog uzgoja na izvorima ugljika dobivenih predobradom otpadnih lignoceluloznih sirovina poput pivskog tropa.

Jedna od efikasnih metoda predobrade lignoceluloznih sirovina je kiselinaska hidroliza pri povišenim temperaturama i tlaku (Mardetko i sur., 2018). Sastav tekućeg dijela dobivenog nakon hidrolize naveden je u Tablici 11. Čvrsti dio je podvrgnut enzimskoj hidrolizi u svrhu što većeg iskorištenja dobivenih fermentabilnih ugljikohidrata pivskog tropa. Kiselinaski hidrolizat je također podvrgnut i detoksikaciji aktivnim ugljenom radi mogućeg smanjenja koncentracije inhibicijskih spojeva, a samim tretmanom nije došlo do promjene koncentracije

ugljikohidrata. (Tablica 11). Tako dobiveni hidrolizati (kiselinski, detoksicirani kiselinski i enzimski) iskorišteni su kao tri različite podloge za šaržni uzgoj u bioreaktoru sa miješalom bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u svrhu proizvodnje biokemikalija (Slike 25. – 27).

Iz rezultata je vidljivo da je faza adaptacije bakterije *P. polymyxa* DSM 742 na nove uvjete otprilike ista ako se usporede rezultati sa uzgojem u tikvicama i traje oko 10 sati. (slika 24). Dobiveni kiselinski hidrolizati otpadnog pivskog tropa, izrazito su tamne boje, te tijekom vremena dolazi do prelaženja kompleksnih spojeva iz topivih u netopive (Marđetko i sur., 2018), primjerice kompleksnih spojeva sa zaostalim ligninom. Zbog toga je samo turbidimetrijsko određivanje suhe tvari biomase mjerenjem optičke gustoće bilo nešto otežano, i nije bilo primarni cilj ovog istraživanja te je primarni interes bio određivanje kinetike sinteze produkata te potrošnje supstrata tijekom uzgoja na kompleksnim podlogama u bioreaktoru. Tijekom uzgoja bakterije *P. polymyxa* DSM 742 na podlozi KH (poglavlje 3.2.3.3.2) zapaženo je da se tek nakon 28. sata glukoza iz podloge počinje značajnije trošiti a specifična brzina potrošnje glukoze u tom periodu iznosila je $0,127 \text{ h}^{-1}$. Ksilozu se također počela trošiti nakon 28. sata uzgoja, tj. tek kad se koncentracija glukoze smanjila za 22 %. Konačna koncentracija ksiloze na kraju uzgoja iznosila je 46 % od njezine početne koncentracije. Omjer glukoze i ksiloze u kiselinskom hidrolizatu na početku uzgoja bio je 1:0,43 za razliku od ispitivanja na kemijski definiranim podlogama gdje su šećeri bili u jednakom omjeru (1:1). Manja konačna koncentracija produkata (BD, EtOH i MK) nastala je tijekom uzgoja kiselinskom hidrolizatu pivskog topa (Slika 25) nego u kemijski definiranim podlogama (Slika 24). Nakon 72 sata uzgoja u kiselinskom hidrolizatu proizvedeno je $1,26 \text{ g L}^{-1}$ BD, $2,5 \text{ g L}^{-1}$ EtOH te $3,6 \text{ g L}^{-1}$ mliječne kiseline.

Kako kiselinski hidrolizati lignoceluloznih sirovina osim poželjnih fermentabilnih šećera, sadrže i nepoželjne kemijske komponente koje mogu inhibirati rast mikroorganizama i sintezu proizvoda (Marđetko i sur. 2018; Bensah i Mensah, 2013) potrebno je bilo ispitati rast i sintezu željenih proizvoda na detoksiciranom kiselinskom hidrolizatu pivskog tropa (Podloga DKH Tablica 11; Poglavlje 3.3.3.5). Tretiranje kiselinskih hidrolizata aktivnim ugljenom predstavlja jeftin i brz način uklanjanja inhibitora. Aktivni ugljen može učinkovito adsorbirati furfural, hidroksimetil-furfural, različite aromatske spojeve i organske kiseline, a nešto slabije adsorbira octenu kiselinu (Sjulander i Kikas, 2020). Uklanjanjem inhibitora može se utjecati na brzinu rasta i prinos biomase (Mhlongo i sur., 2015; Pienkos i Zhang, 2009). Stoga je i istražen rast bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u podlogama dobivenim

detoksikacijom kiselinskog hidrolizata pivskog tropa (Slika 26). Faza adaptacije mikroorganizma za rast u podlozi DKH traje otprilike isto kao i kod uzgoja na podlozi KH (≈ 10 sati). Do kraja uzgoja (96 sati) glukoza se potpuno utroši, dok je utrošak ksiloze na kraju uzgoja iznosio je 38,5 %. U tom vremenu proizvedeno je 30,07 g L⁻¹ mliječne kiseline te 3,96 g L⁻¹ octene kiseline te je došlo do zanemarive proizvodnje 2,3-butandiola i etanola. Na temelju dobivenih rezultata pretpostavlja se da se adsorpcijom na aktivni ugljen adsorbiraju i neki spojevi odgovorni za aktivaciju sinteze BD. Njihovom adsorpcijom došlo je preusmjerenja metabolizma bakterije u smjeru stvaranja značajne količine mliječne kiseline (dva puta veća koncentracija od one ostvarene uzgojem na kiselinskom hidrolizatu). Dobiveni rezultati ukazuju da se različitim metodama obrade iste sirovine, otpadnog pivskog tropa, može dobiti više različitih proizvoda, što se može primijeniti za razvoja koncepta biorafinerije.

Primjenjujući biorafinerijski princip iskorištavanja obnovljivih sirovina, težimo smanjenju otpada iz industrijske proizvodnje, tj. „zero waste“ biorafinerijama. Čvrstio dio koji zaostaje nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa sadrži neiskorištene ugljikohidrate (36,69 % w/w glukana) a umjesto da se takva vrijedna sirovina baci, ona se može enzimskim metodama obraditi te se time povećava ukupno iskorištenje polazne sirovine, te se povećava količina dostupnih fermentabilnih šećera za različite biotehnološke procese. Za razliku od podloge KH, ova podloga (EH) sadržavala je 23,73 % više glukoze (33,27 g L⁻¹ naspram 26,89 g L⁻¹) i 68,2 % manje ksiloze (3,68 g L⁻¹ naspram 11,58 g L⁻¹). Brzina potrošnje glukoze bila je najveća za uzgoj na hidrolizatu dobivenom enzimskom hidrolizom čvrstog dijela (0,758 h⁻¹), 69 % manja za detoksicirani kiselinski hidrolizat (0,235 h⁻¹) te najmanja za kiselinski hidrolizat (0,127 h⁻¹). Do kraja uzgoja na podlozi EH potpuno su utrošene i glukoza i ksiloza. Maksimalne koncentracije produkata postignute su nakon 48 sati uzgoja (BD 9,84 g L⁻¹, EtOH 3,58 g L⁻¹ i MK 7,45 g L⁻¹) te se nisu do kraja uzgoja značajno mijenjale (Slika 27.). Završna koncentracija MK (7,08 g L⁻¹) u podlozi EH bila je 50 % niža (15,43 g L⁻¹) od koncentracije MK dobivene na podlozi KH te 76 % niža (30,07 g L⁻¹) od koncentracije MK dobivene na podlozi DKH. Brzina sinteze BD na hidrolizatu dobivenom enzimskom hidrolizom čvrstog dijela je 1,65 puta veća od brzine sinteze BD na kiselinskom hidrolizatu (0,16 h⁻¹ naspram 0,097 h⁻¹). Unatoč razlici u brzini sinteze, prilikom uzgoja na kiselinskom hidrolizatu ostvaren je veći koeficijent pretvorbe supstrata u produkt (nego prilikom uzgoja na enzimskom hidrolizatu) i za BD (0,254 g g⁻¹ naspram 0,033 g g⁻¹) i

za EtOH (0,102 g g⁻¹ naspram 0,070 g g⁻¹). Proizvodnji MK najviše pogoduje uzgoj bakterije *P. polymyxa* DSM 742 na detoksiciranom kiselinskom hidrolizatu gdje je od 38,46 g L⁻¹ ukupne koncentracije glukoze i ksiloze proizvedeno 30,07 g L⁻¹ MK (tablica 18).

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju može se zaključiti slijedeće:

1. Sve tri ispitivane plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, *Fusarium verticillioides* JCM 23107 i *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lagenariae* JCM 9293 proizvodile su lignocelulolitičke enzime na podlozi s predobrađenom otpadnom travom. Detaljnijim istraživanjem kinetike sinteze enzima utvrđeno je da plijesan *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 ima najveći potencijal za proizvodnju lignocelulolitičkih enzima. Postignuta je aktivnost ksilanaza od 2055 U L⁻¹ nakon 10 dana uzgoja na tresilici pri 28 °C. Aktivnost endoglukanaza iznosila je 240 U L⁻¹ nakon 9 dana. Najveća koncentracija proteina iznosila je 3,04 g L⁻¹ u devetom danu uzgoja.
2. U barbotirajućem reaktoru na podlozi s otpadnom travom i glukozom plijesan *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 postignula je aktivnost endoglukanaza od 743 U L⁻¹ i aktivnost ksilanaza od 1444 U L⁻¹, a u koncentriranom supernatantu 2884 U L⁻¹ za glukozu i 5715 U L⁻¹ za ksilanazu. Koncentrirani supernatant sadržavao je 26,7 g L⁻¹ proteina.
3. Ispitivanjem rasta bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranim podlogama utvrđeno je da početna koncentracija glukoze značajno utječe na kinetiku rasta bakterije, dok je utjecaj ksiloze na rast zanemariv. Najveće koncentracije proizvoda (18 g L⁻¹ 2,3-butandiola i 8,42 g L⁻¹ etanola) ostvarene su uzgojem bakterije na podlozi s najviše glukoze (70 g L⁻¹) kao jednim izvorom ugljika
4. Brzina potrošnje glukoze je dva do tri puta veća tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u kemijski definiranim podlogama s oba izvora ugljika nego u podlogama koje sadrže samo glukozu te dolazi do djelomične potrošnje ksiloze. Maksimalna koncentracija 2,3-butandiola ostvarena je na podlozi s 20 g L⁻¹ početne koncentracije glukoze i ksiloze te iznosi 10,95 g L⁻¹ te je opaženo da koncentracija proizvedene mliječne kiseline raste s porastom početne koncentracije šećera u podlozi.
5. Kiselinskom hidrolizom otpadnog pivskog tropa dobiven je tekući hidrolizat sa 26,89 g L⁻¹ glukoze i 11,57 g L⁻¹ ksiloze. Glavni proizvod dobiven šaržnim uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kiselinskom hidrolizatu u bioreaktoru s miješalom

je mliječna kiselina ($15,43 \text{ g L}^{-1}$), a pored nje dobiveni su i etanol ($2,61 \text{ g L}^{-1}$) te 2,3-butandiol ($1,22 \text{ g L}^{-1}$).

6. Kad se za šaržni uzgoj u bioreaktoru sa miješalom sustavu koristi kiselinski hidrolizat tretiran aktivnim ugljenom bakterija *P. polymyxa* DSM 742 većinom proizvodi mliječnu kiselinu ($30,07 \text{ g L}^{-1}$), a prisutnost 2,3-butandiola i etanola nije detektirana.
7. Uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na podlozi dobivenoj enzimskom hidrolizom zaostalog čvrstog dijela nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa ostvarena je veća koncentracija 2,3-butandiola nego u uzgojima na ostalim hidrolizima ($9,79 \text{ g L}^{-1}$). Uz 2,3-butandiol, proizvedeni su i etanol ($3,94 \text{ g L}^{-1}$) te mliječna kiselina ($7,07 \text{ g L}^{-1}$).
8. Različitim metodama obrade otpadnog pivskog tropa moguće je dobiti podloge za uzgoj korisnih mikroorganizama poput bakterije *Paenibacillus polymyxa* i time preusmjeriti proizvodnju u više korisnih biokemikalija, što pridonosi cilju razvoja koncepta biorafinerije.
9. Ljubičaste nesumporne bakterije mogu rasti na otpadnoj vodi iz uzgoja plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 bez dodatnih izvora ugljika i dušika. *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 uklonio je najviše sastojaka podloge, što procijenjeno kao razlika vrijednost absorbacije podloge na početku ($1,9676$) i na kraju uzgoja ($0,6361$).
10. U biomasi bakterije *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 određena je najveća koncentraciju fotosintetskih pigmenata koja je iznosila $1,16 \text{ mg L}^{-1}$.
11. Ekstrakcijom lipida iz biomase nesumpornih ljubičastih bakterija pokazalo se da ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090^T, *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 sadrže između 1,7 % i 3,4 % ukupnih masnih kiselina u suhoj tvari. Detektirano je desetak masnih kiselina, a najveći udjeli su zabilježeni za cis-10-heptadekanoičnu kiselinu (14 - 21 %) te cis-10-pentadekanoičnu kiselinu (10 - 13 %). C:20 masne kiseline nađene samo u biomasi bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781.

12. Iskorištavanjem otpadne biomase plijesni *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 izolirani su polimeri hitin i hitozan. Biomasa plijesni sadržavala je 38 %, hitozana i oko 25 % hitina, što ukazuje na mogućnost korištenja biomase ove plijesni u proizvodnji biorazgradivih polimera.

13. Razvijen je održivi biorafinerijski proces u kojem je primjenom fizikalno-kemijskih i enzimskih metoda provedena predobrada otpadne trave i pivskog tropa te su proizvedene bazne kemikalije kao što su 2,3-butandiol, mliječna kiselina i etanol s pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742. Dodatno, nusproizvodi pojedinih postupaka proizvodnje enzima ili baznih kemikalija kao što su otpadna podloga i biomasa plijesni korišteni su, redom, za proizvodnju biomase nesumpornih ljubičastih bakterija (izolacija pigmentata i masnih kiselina), i za izolaciju biomaterijala (hitina i hitozana) podupirući dodatno biorafinerijski pristup proizvodnji spektra različitih bioproizvoda, te težeći principu tzv. „zero waste“ biorafinerije.

7. ZAHVALE

Željeli bi smo prvo zahvaliti našem mentoru, doc. dr. sc. Mariju Novaku koji nas je stručno vodio prilikom izrade ovoga rada, poticao na rad te imao veliko razumijevanje i strpljenje u prenošenju znanja i iskustva.

Također se zahvaljujemo doc. dr. sc. Antoniji Trontel, Nenadu Marđetku, mag. ing. bioproc., dr. sc. Blanki Ljubas i Marini Grubišić, mag. ing. bioproc. te drugim djelatnicima Zavoda na pomoći, trudu i uloženom vremenu te ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.

Zahvaljujemo obiteljima i svim prijateljima koji su bili uz nas tijekom izrade ovog rada.

8. POPIS LITERATURE

Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2013) Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol. Adv.* **31**, 877- 902.

Adrio, J.L., Demain, A.L. (2005) Microbial Cells and Enzymes-A Century of Progress. U: *Methods in Biotechnology. Microbial Enzymes and Biotransformations* (Barredo, J.L., ured.), Humana Press, Totowa, str. 1–27.

Adrio, J.L., Demain, A.L. (2008) Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol. Biotechnol.* **38**, 41–45.

Adrio, J.L., Demain, A.L. (2014) Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules* **4**, 117–139.

Ahmad, N., Zakaria, M., (2019) Oligosaccharide from Hemicellulose. U: *Lignocellulose for Future Bioeconomy* (Ariffin, H., Sapuan, S.M., Hassan, M.A., ured.), Elsevier, Netherlands, str. 135-152.

Al Seadi, T., Rutz, D., Prassl, H., Köttner, M., Finsterwalder, T., Volk, S., Janssen, R. (2008) *Priručnik za bioplin* <http://www.eihp.hr/hrvatski/pdf/Prirucnik_za_bioplin_w>. Pristupljeno 25. travnja 2021.

Alloul, A. (2019) Volatile fatty acids impacting phototrophic growth kinetics of purple bacteria: paving the way for protein production on fermented wastewater. *Water Res.* **152**, 138–147.

Al-Tayyar, N.A., Youssef, A.M., Al-hindi, R. (2020) Antimicrobial food packaging based on sustainable bio-based materials for reducing foodborne pathogens: A review. *Food Chem.* **310**, 125915.

Amemiya, C.T., Fernandez, J.G., Sohn, J.J., Tang, W.J. (2015) Chitin is endogenously produced in vertebrates. *Curr Biol.* **25**, 897–900.

Amin, F., Khalid, H., Zhang, H., Rahman, S., Zhang, R., Liu, G., Chen, C. (2017) Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *AMB Express* **7**, 72.

Amorim, D.S., Jorge, J.A., Monti, R., Polizeli, M.L., Rizzatti, A.C., Terenzi, H.F. (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 577–591.

Amraoui Y., Prabhu A., Vivek N., Coulon F., Chandel AK., Willoughby N., Jacob S., Koutinas A., Kumar V. (2021) Enhanced 2,3-Butanediol production by mutant *Enterobacter*

ludwigii using brewers' spent grain hydrolysate: Process optimization for a pragmatic biorefinery loom. *Chem. Eng. J.* **427**, 130851.

Anand, R., Bohu, T., Kaksonen, A.H., Lintern, M., Kaksonen, A.H., Mei, Y., Noble, R. (2019) Evidence for fungi and gold redox interaction under Earth surface conditions. *Nat. Commun.* **10**, 2290.

Andlar, M., Rezić, T., Mardetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., Šantek, B. (2018) Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng. Life Sci.* **18**, 768-778.

Bajpai, P., (2016) *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production*. Springer, Singapore.

Bakri, Y., Mekaeel, A., Koreih, A. (2011) Influence of agitation speeds and aeration rates on the Xylanase activity of *Aspergillus niger* SS7. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **54**, 659-664.

Baldrick, P. (2010) The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul. Toxicol. Pharm.* **56**, 290–299.

Bedian, L., Villalba-Rodríguez, AM., Hernández-Vargas, G., Parra-Saldivar, R., Iqbal, H.M. (2017) Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **98**, 837–846.

Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S. (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 326–338.

Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., Kumar, S. (2014) Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable Sustainable Energy Rev.* **36**, 91-106.

Beluhan, S (2001) Nova valorizacija sladnih klica, nusproizvoda sladara. *Svijet piva* **6**, 35:10-13.

Bensah, E., Mensah, M. (2013) Chemical Pretreatment Methods for the Production of Cellulosic Ethanol: Technologies and Innovations. *Int. J. Chem. Eng.* 1-21.

Bhat, M.K., Christakopoulos, P., Claeysens, M., Kekos, D., Macris, B.J. (1995) Purification and mode of action of a low molecular mass endo-1,4- β -D-glucanase from *Fusarium oxysporum*. *J. Biotechnol.* **39**, 85–93.

Bianchi, L., De Philippis, R., Melis, A., Melnicki, M.R. (2008) Hydrogen production during stationary phase in purple photosynthetic bacteria. *Int. J. Hydrogen Energy* **33**, 6525-6534.

Bomble, Y., Lin, C., Amore, A., Wei, H., Holwerda, E., Ciesielski, P., Donohoe, B., Decker, S., Lynd, L., Himmel, M. (2017) Lignocellulose deconstruction in the biosphere. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **41**, 61-70.

Borges, J.P., Quilles Junior, J.C., Ohe, T.H.K. (2021) Free and Substrate-Immobilised Lipases from *Fusarium verticillioides* P24 as a Biocatalyst for Hydrolysis and Transesterification Reactions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **193**, 33–51.

Brewers of Europe (2018) Beer statistics 2018 edition.

<<https://brewersofeurope.org/uploads/mycms-files/documents/publications/2018/EU-beer-statistics-2018-web.pdf>>. Pristupljeno 20. travnja 2021.

Bullard, G.L., Lathrop, J.R., McGarvey, J.A., Miller, W.G., Silva, C.J. (2009) Induction of purple sulfur bacterial growth in dairy wastewater lagoons by circulation. *Lett. Appl. Microbiol.* **49**, 427-433.

Bunraksa, T., Kantachote, D., Chaiprapat, S. (2020) The potential use of purple nonsulfur bacteria to simultaneously treat chicken slaughterhouse wastewater and obtain valuable plant growth promoting effluent and their biomass for agricultural application. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **28**, 101721.

Castillo Martinez, F. A., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti A., Oliveira, R. P. S. (2013) Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci. Tech.* **30**, 70-83.

CDC (2021) *Klebsiella pneumoniae* in Healthcare Settings, CDC-Center for Disease Control and Prevention, <<https://www.cdc.gov/hai/organisms/klebsiella/klebsiella.html>> Pristupljeno 19. travnja 2021.

Cerimi, K., Akkaya, K.C., Pohl, C. (2019) Fungi as source for new bio-based materials: a patent review. *Fungal Biol. Biotechnol.* **6**, 17.

Chen, H. (2015) *Lignocellulose Biorefinery Engineering*. Woodhead Publishing, Cambridge.

Chen, H. (2016) *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*, 1. izd., Springer, Nizozemska.

Chen, L., Liu, T., Zhang, W., Chen, X., Wang, J. (2012) Biodiesel production from algae oil in free acids by two-step catalytic conversion. *Bioresour. Technol.* **111**, 208-214.

Cherubini, F., Jungmeier, G., Wellisch, M., Willke, T., Skiadas, I., Van Ree, R., de Jong, E. (2009) Toward a common classification approach for biorefinery systems. *Model. Anal.* **3**, 534–546.

Cheung, R.C., Ng, T.B., Wong, J.H., Chan, W.Y. (2015) Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Mar. Drugs* **13**, 5156–5186.

Christakopoulos, P., Claeysens, M., Kekos, D., Macris, B., Nerinckx, W. (1996) Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3. *J. Biotechnol.* **51**, 181-189.

Costa, S., Ganzerli, S., Rugiero, I., Pellizzari, S., Pedrini, P., Tamburini, E. (2017) Potential of *Rhodobacter capsulatus* Grown in Anaerobic-Light or Aerobic-Dark Conditions as Bioremediation Agent for Biological Wastewater Treatments. *Water* **9**, 108.

Cottet, C., Ramirez-Tapias, Y., Delgado, J., de la Osa, O., Salvay, A., Peltzer, M. (2020) Biobased Materials from Microbial Biomass and Its Derivatives. *Materials* **13**, 1263.

Crawford, D.L., Pometto III, A.L. (1983) Lignocellulose degradation by *Fusarium* species. *Can. J. Bot.* **61**, 1194–1198.

Datta, R., Henry, M. (2006) Lactic acid: Recent advances in products, processes and technologies – A review. *J. Chem. Technol. Biot.* **81**, 1119-1129.

de Jong, E., Gosselink, R. (2014) Lignocellulose-Based Chemical Products. U: *Bioenergy Research: Advances and Applications* (Gupta, V.K., Kubicek, C.P., Saddler, J., Xu, F., Tuohy, M.G., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 277-313.

de Oliveira, D., Finger-Teixeira, A., Rodrigues Mota, T., Salvador, V., Moreira-Vilar, F., Correa Molinari, H. (2014) Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnol. J.* **13**, 1224-1232.

de Souza, W. R. (2013) Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. U: *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass – Techniques, Applications and Commercialization* (Chandel, A. K., Silva, S., ured.), IntechOpen.

Debode, J., De Tender, C., Soltaninejad, S., Van Malderghem, C., Haegeman, A., Van der Linden, I., Cottyn, B., Heyndrickx, M., Maes, M. (2016) Chitin mixed in potting soil alters lettuce growth, the survival of zoonotic bacteria on the leaves and associated rhizosphere microbiology. *Front. Microbiol.* **7**, 565.

Delamare-Deboutteville, J., Batstone, D.J., Kawasaki, M., Stegman, S., Salini, M., Tabrett, S., Smullen, R., Barnes, A.C., Hülsen, T. (2019) Mixed Culture Purple Phototrophic Bacteria is an Effective Fishmeal Replacement in Aquaculture. *Water Res.* **10**, **4**, 100031.

Demain, A.L., Vaishnav, P. (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* **27**, 297–306.

Drakopoulos, D., Suylok, M., Krska, R., Logrieco, A., Vogelgsang, S. (2021) Raised concerns about the safety of barley grains and straw: A Swiss survey reveals a high diversity of mycotoxins and other fungal metabolites. *Food Control*. **125**, 107919.

Druzian, S.P., Pinheiro, L.N., Susin, N.M.B. (2020) Production of metabolites with antioxidant activity by *Botryosphaeria dothidea* in submerged fermentation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **43**, 13–20.

Ducheyne, P., Healy, K., Hutmacher, D.E., Grainger, D.W., Kirkpatrick, C.J. (2011) *Comprehensive biomaterials*, Elsevier, Amsterdam.

El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., Daayf, F. (2010) Chitosan in plant protection. *Mar. Drugs* **8**, 968–987.

Elieh Ali Komi, D., Sharma, L., Dela Cruz, C.S. (2017) Chitin and Its Effects on Inflammatory and Immune Responses. *Clin. Rev. Allerg. Immu.* **54**, 213–223.

Estela, R., Luis, J. (2013) Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars. U: *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass – Techniques, Applications and Commercialization* (Chandel, A. K., Silva, S., ured.), IntechOpen.

Farahat, M. (2020) Enhancement of β -Cyclodextrin Production and Fabrication of Edible Antimicrobial Films Incorporated with Clove Essential Oil/ β -cyclodextrin Inclusion Complex. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **48**, 12–23.

Ferraz, E., Coroado, J., Gamelas, J., Silva, J., Rocha, F., Velosa, A. (2013) Spent brewery grains for improvement of thermal insulation of ceramic bricks. *J. Mater. Civil Eng.* **25**, 1638-1646.

Fičko, V. (2019) Enzimaska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka i proizvodnja etanola pomoću plijesni *Mucor indicus*. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Flatt R., Schober, I. (2012) Superplasticizers and the rheology of concrete. U: *Woodhead Publishing Series in Civil and Structural Engineering. Understanding the Rheology of Concrete* (Roussel, N., ured.), Woodhead Publishing, Sawston, str. 144-208.

Fregel, R., González, A., Cabrera, M. (2010) Improved ethanol precipitation of DNA. *Electrophoresis* **31**, 1350-1352.

Frigaard, N. U. (2016) Biotechnology of anoxygenic phototrophic bacteria. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **156**, 139 – 154.

Gaellstedt M., Brottman A., Hedenqvist M.S. (2005) Packaging related properties of protein and chitosan coated paper. *Packag. Technol. Sci.* **18**, 160–170.

Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., Trevijano-Contador, N. (2020) The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Front. Microbiol.* **10**, 2993.

George, D.M., Vincent, A.S., Mackey, H.R. (2020) An overview of anoxygenic phototrophic bacteria and their applications in environmental biotechnology for sustainable resource recovery. *Biotechnol. Rep.* **28**, e00563.

Gilchrist, D.G. Bostock, R.M., Wang, H. (1995) Sphingosine-related mycotoxins in plant and animal diseases. *Can. J. Bot.* **73**, 459–467.

Giovannini, P., Mantovani, M., Medici, A., Pedrini, P. (2008) Production of 2,3-butanediol by *Bacillus stearothermophilus*: Fermentation and metabolic pathway. *Chem. Eng. Trans.* **14**, 281-286.

Girometta, C., Picco, A.M., Baiguera, R.M., Dondi, D., Babbini, S., Cartabia, M., Savino, E. (2019) Physico-mechanical and thermodynamic properties of mycelium-based biocomposites: A review. *Sustainability* **11**, 281.

Gordon, T.R., Jacobson, D.J., Okamoto, D. (1989) Colonization of muskmelon and nonsusceptible crops by *Fusarium oxysporum* f. sp. Melonis and other species of *Fusarium*. *Phytopathology* **79**, 1095–1100.

Hakizimana, O., Matabaro, E., Lee, B. (2020) The current strategies and parameters for the enhanced microbial production of 2,3-butanediol. *Biotechnol. Rep.* **25**, e00397.

Haneef, M., Ceseracciu, L., Canale, C., Bayer, I.S., Heredia-Guerrero, J.A., Athanassiou, A. (2017) Advanced materials from fungal mycelium: Fabrication and tuning of physical properties. *Sci. Rep.* **7**, 41292.

Harmsen, P., Huijgen, W., Bermudez, L., Bakker, R. (2010) Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. *Wageningen Food & Biobased Research*, Wageningen.

Harmsen, P., Lips, S., Bakker, R. (2013) Pretreatment of lignocellulose for biotechnological production of lactic acid. *Wageningen Food & Biobased Institute Research*, Wageningen.

HGK (2017) Studija Ekonomskog instituta: Industrija piva generira 1,8 % BDP-a. <<https://www.hgk.hr/pivarska-industrija-iznad-hrvatskog-prosjeka>> Pristupljeno 20. lipnja 2021.

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), e0160981.

Higuchi-Takeuchi, M., Numata, K. (2019) marine purple photosynthetic bacteria as sustainable microbial production hosts. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, 258.

Hosokawa J., Nishiyama M., Yoshihara K., Kubo T. (1990) Biodegradable film derived from chitosan & homogenized cellulose. *Ind. Eng. Chem. Res.* **44**, 646–650.

Howard, D. (2006, 16. lipnja) Fining & Clarifying Agents, <<http://makewine.com/makewine/fining.html>>. Pristupljeno 8. travnja 2021.

Hülßen, T., Hsieh, K., Lu, Y., Tait, S., Batstone, D. J. (2018) Simultaneous treatment and single cell protein production from agri-industrial wastewaters using purple phototrophic bacteria or microalgae – A comparison. *Bioresour. Technol.* **254**, 241 – 223.

Idler, C., Venus, J., Kamm, B. (2015) Microorganisms for the production of lactic acid and organic lactates. *Microbiology Monographs* **26**, 225-273.

IEA, International Energy Agency (2013) Bioenergy Task 42, <<https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2013/10/Task-42-Biobased-Chemicals-value-added-products-from-biorefineries.pdf>>. Pristupljeno 1. lipnja 2021.

Ifuku, S. (2014) Chitin and chitosan nanofibers: Preparation and chemical modifications. *Molecules* **19**, 18367–18380.

Ikram, S., Huang, L., Zhang, H., Wang, J. and Yin, M. (2017) Composition and nutrient value proposition of brewers spent grain. *J. Food Sci.* **82**, 2232-2242.

Imhoff, J. F. (1995) Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulfur bacteria. U: Anoxygenic photosynthetic bacteria (Blankenship, R.E., Madigan, M.T., Bauer, C.E., ured.), 1.izd., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, str. 5-11.

Imhoff, J. F. (2006) The phototrophic alpha-proteobacteria. U: The Prokaryotes (Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E., ured.), Springer, New York, str. 41 – 64.

Imhoff, J. F., Trüper, H. G. (1989) The purple non sulfur bacteria. *Man. System. Bacteriol.* **3**, 1658-1661.

Infanzón-Rodríguez, M.I., Ragazzo-Sánchez, J.A., del Moral, S. (2020) Production and characterization of an enzyme extract with cellulase activity produced by an indigenous strain

of *Fusarium verticillioides* ITV03 using sweet sorghum bagasse. *Biotechnol. Lett.* **42**, 2271–2283.

Ivančić – Šantek, M., Miškulin, E., Beluhan, S., Šantek, B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kem. Ind.* **65**, 25-38.

Jayasekara, S., Ratnayake R. (2019) *Microbial Cellulases: An Overview and Applications*, U: *Cellulose* (Pascual A.R., ured.), IntechOpen, London.

Jennings, J. A., Coblenz, W. K. (2011) Principles of silage making, <<https://www.uaex.uada.edu/publications/pdf/FSA-3052.pdf>>. Pristupljeno 5. svibnja 2021.

Jeong, H., Choi, S., Ryu, C., Park, S. (2019) Chronicle of a Soil Bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681 as a Tiny Guardian of Plant and Human Health. *Front. Microbiol.* **10**, 1-16.

Johannes, T.W., Zhao, H. (2006) Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 261–267.

Johansson, I., Svensson, M. (2001) Surfactants based on fatty acids and other natural hydrophobes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **6**, 178-188.

Johnson, E.A. (2013) Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts – the ascomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 503–517.

Jones, M., Gandia, A., John, S. (2021) Leather-like material biofabrication using fungi. *Nat. Sustain.* **4**, 9–16.

Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.O. (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels* **6**, 16.

Kallioinen, A. (2014). Development of pretreatment technology and enzymatic hydrolysis for biorefineries. VTT Technical Research Centre of Finland. (Doktorska disertacija).

Karimi, K., Emtiazi, G., Taherzadeh, M. J. (2006) Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. *Process Biochem.* **41**, 653-658.

Katan, J. (1971) Symptomless carriers of the tomato *Fusarium* wilt pathogen. *Phytopathology* **61**, 1213–1217.

Kikot, G., Roque, H., Alconada, T. (2010) Extracellular enzymes of *Fusarium graminearum* isolates. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **53**, 779-783.

Kobayashi, M., Kobayashi, M. (1995) Waste Remediation and Treatment Using Anoxygenic Phototrophic Bacteria. U: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Advances in Photosynthesis*

and Respiration vol 2., (Blakenship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E., ured.) Springer, Dordrecht, str. 1269 – 1282.

Kumar, A., Singh, S. (2013) Directed evolution: Tailoring biocatalysis for industrial application. *Crit. Rev. Biotechnol.* **33**, 365–378.

Kumar, R., Singh, S., Singh, O.V. (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 377–91.

Kuzuyama, T., Seto, H. (2012) Two distinct pathways for essential metabolic precursors for isoprenoid biosynthesis. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* **88**(3), 41–52.

Kwon, H. W., Yoon, J. H., Kim, S. H., Hong, S. B., Cheon, Y., Ko, S. J. (2007) Detection of extracellular enzymes activities in various *Fusarium* spp. *Mycobiology* **35**, 162–165.

Lal, S., Tabacchioni, S. (2009) Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. *Indian J. Microbiol.* **49**, 2-10.

Lee, H.J., Lim, W.S., Lee, J.W. (2013) Improvement of ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysates by the removal of inhibitors. *J. Ind. Eng. Chem.* **19**(6), 2010-2015.

Li, Y., Chen, S. (2019) Fusaricidin produced by *Paenibacillus polymyxa* WLY78 Induces systemic resistance against *Fusarium* Wilt of Cucumber. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5240.

Lide, D.R. (2000) CRC Handbook of Chemistry and Physics. 81. izd., CRC press, Boca Raton, str. 46-47.

Linden, J.C., Stoner, R.J. (2007) Pre-harvest application of proprietary elicitor delays fruit senescence. U: *Advances in Plant Ethylene Research* (Ramina A., Chang C., Giovannoni J., Klee H., Perata P., Woltering E., ured.), Springer, Dordrecht, str. 301–302.

Linden, J.C., Stoner, R.J., Knutson, K.W., Gardner-Hughes, C.A. (2000) Organic disease control elicitors. *Agro Food Ind. Hi-Tech* **11**, 32–34.

Liu, G., Zhou, J., Wang, J. (2006) Bacterial Decolorization of Azo Dyes by *Rhodopseudomonas palustris*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1069–1074.

Liu, S., Zhang, G., Li, X., Zhang, J. (2014) Microbial production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 7349–7357.

Liu, S., Zhang, G., Li, X., Zhang, J. (2015) Optimization of Influencing Factors on Biomass Accumulation and 5-Aminolevulinic Acid (ALA) Yield in *Rhodobacter sphaeroides* Wastewater Treatment. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 1920–1927.

- Liu, Z.L., Slininger, P.J., Dien, B.S., Berhow, M.A., Kurtzman, C.P., Gorsich, S.W. (2004) Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 345–352.
- Ma, C., Wang, A., Qin, J., Li, L., Ai, X., Jiang, T., Tang, H., Xu, P. (2009) Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 49–57.
- Ma, L.J., Geiser, D.M., Proctor, R.H., Rooney, A.P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D.M., Manners, J.M., Kazan, K. (2013) *Fusarium* pathogenomics. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**, 399–416.
- Madukasi, E. I., Dai, X., He, C., Zhou, J. (2009) Potentials of Phototrophic Bacteria in Treating Pharmaceutical Wastewater. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* **7**, 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**, 483-499.
- Mareković, S., Hršak, V., Jelaska, S.D., Nikolić, T., Plazibat, M. (2009) The grasses (*Poaceae*) of Medvednica Nature Park, Croatia. *Natura Croatica* **18**, 135-154.
- Marsberg, A., Kemler, M., Jami, F., Nagel, J.H., Postma-Smidt, A., Naidoo, S., Wingfield, M.J., Crous, P.W., Spatafora, J.W., Hesse, C.N., Robbertse, B., Slippers, B. (2017) *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. *Mol. Plant Pathol.* **18**, 477–488.
- Martinez, A., Rodriguez, M.E., York, S.W., Preston, J.F., Ingram, L.O. (2000) Use of UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass. *Biotechnol. Prog.* **16**, 637-641.
- Matijašević, Lj., Vojvodić (ur.), V. (2015) Zaštita okoliša: Održive tehnologije u procesima proizvodnje pive. *Kem. u ind.*, **64**(9-10), 540-546.
- Matoković, V. (2020) Utjecaj izvora dušika, ugljika i svjetlosti na kinetiku rasta nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- McCarthy, A.L., O'Callaghan, Y.C., Connolly, A., Piggott, C.O., FitzGerald, R.J., O'Brien, N.M. (2013) In vitro antioxidant and anti-inflammatory effects of brewers' spent grain protein rich isolate and its associated hydrolysates. *Food Res. Int.* **50**, 205–212.

McKinlay, J. B., Harwood, C. S. (2010) Photobiological Production of Hydrogen Gas as a Biofuel. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 244 – 251.

Meng, Q., Zhang, Y., Ju, X., Ma, C., Ma, H., Chen, J., Zheng, P., Sun, J., Zhu, J., Ma, Y., Zhao, X., Chen, T. (2016) Production of 5-aminolevulinic acid by cell free multi-enzyme catalysis. *J. Biotechnol.* **226**, 8-13.

Menon, V., Rao, M. (2012) Trends in bioconversion of lignocelluloses: Biofuel, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* **38**, 522-550.

Merklein, K., Fong, S.S., Deng, Y. (2016) Biomass utilization. U: Biotechnology for Biofuel Production and Optimization (Eckert, C.A., Trinh, C.T., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 291-324.

Merugu, R., Prashanthi, Y., Sarojini, T., Badgu, N. (2014) Bioremediation of waste waters by the anoxygenic photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* SMR 009. *Int. J. Res. Environ. Sci. Technol.* **4**, 16-19.

Merugu, R., Rudra, M. P. P., Girisham, S., Reddy, S. M. (2012) Biotechnological applications of purple son sulphur phototrophic bacteria: A Minireview. *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* **3**, 376 – 384.

Mhlongo, S., den Haan, R., Viljoen-Bloom, M., van Zyl, W. (2015) Lignocellulosic hydrolysate inhibitors selectively inhibit/deactivate cellulase performance. *Enzyme Microb. Tech.* **81**, 16-22.

Mijatović, A. (2019). Pivarska industrija u Hrvatskoj. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.

Mirza, S. S., Qazi, J. I., Liang, Y., Chen, S. (2019) Growth characteristics and photofermentative biohydrogen production potential of purple non sulfur bacteria from sugar cane bagasse. *Fuel* **255**, 115805.

Moss, G. P., Smith, P. A. S., Tavernier, D. (1997) Pure and Applied Chemistry, 2. izd., International Union of Pure and Applied Chemistry, Zurich, str. 1307–1375.

Myung, K. K., Choi, K. M., Yin, C. R., Lee, K. Y., Im, W. T., Ju, H. L., Lee, S. T. (2004) Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodopseudomonas palustris*, isolated from eutrophicated ponds. *Biotechnol. Lett.* **26**, 819 – 822.

Nagadomi, H., Takahashi, K., Sasaki, K., Yang, H.C. (2000) Simultaneous removal of chemical oxygen demand and aerobic treatment of sea water using an immobilised phototrophic bacterium of porous ceramic plates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 57-62.

- Najjarzadeh N., Matsakas L., Rova U., Christakopoulos P. (2021) How carbon source and degree of oligosaccharide polymerization affect production of cellulase-degrading enzymes by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Front. Microbiol.* **12**, 652655.
- Nawawi, W. M. F. W., Jones, M. P., Kontturi, E., Mautner, A., Bismarck, A. (2020) Plastic to elastic: Fungi-derived composite nanopapers with tunable tensile properties. *Compos. Sci. Technol.* **198**, 108327.
- Nichols, N., Dien, B., Guisado, G., López, M. (2005) Bioabatement to remove inhibitors from biomass-derived sugar hydrolysates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **121**, 379-390.
- Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N.C., Pogson, B.J. (2015) Carotenoid metabolism in plants. *Mol. Plant* **8**, 68–82.
- Nishikawa, S., Watanabe, K., Tanaka, T., Miyachi, N., Hotta, Y., Murooka, Y. (1999) Rhodobacter sphaeroides mutants which accumulate 5-aminolevulinic acid under aerobic and dark conditions. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 798-804.
- Novak, M., Pavlečić, M., Harutyunyan, B., Goginyan, V., Horvat, P. & Šantek, B. (2017) Characteristics and selection of cultures of photosynthetic purple non-sulphur bacteria as a potential 5-aminolevulinic acid producers. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **12**(3-4), 113-119.
- Novak, M., Šantek, B., Pavlečić, M., Sarić, M., Matoković, V., Marđetko, N., Trontel, A., (2020) Fotoheterotrofni uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* na hranjivim podlogama s različitim izvorima ugljika. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **15**, 115-123.
- Nunkaew, T., Kantachote, D., Kanzaki, H., Nitoda, T., Ritchie, R.J. (2014) Effects of 5-ALA containing supernatants from selected *Rhodospseudomonas palustris* strains on rice growth under NaCl stress, with mediating effects on chlorophyll, photosynthetic electron transport and antioxidative enzymes. *Electron. J. Biotechnol.* **17**, 19-26.
- Okonkwo, C. (2017) Process development and metabolic engineering to enhance 2,3-butanediol production by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. (Doktorska disertacija)
- Østby, H., Hansen, L., Horn, S., Eijsink, V., Várnai, A. (2020) Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 623-657.
- Ouyang, J., Ma, R., Zheng, Z., Cai, C., Zhang, M., Jiang, T. (2013) Open fermentative production of L-lactic acid by *Bacillus* sp. Strain NL01 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material. *Bioresour. Technol.* **135**, 475- 480.

Padda, K.P., Puri, A., Chanway, C.P. (2017) *Paenibacillus polymyxa*: A Prominent Biofertilizer and Biocontrol Agent for Sustainable Agriculture. U: *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture* (Meena V., Mishra P., Bisht J., Pattanayak A., ured.), Springer, Singapore, str. 165-191.

Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* **74**, 25-33.

Patel, A., Karageorgou, D., Rova, E., Katapodis, P., Rova, U., Christakopoulos, P., Matsakas, L. (2020) An overview of potential oleaginous microorganisms and their role in biodiesel and omega-3 fatty acid-based industries. *Microorganisms* **8**, 434.

Perković, L. (2020) Proizvodnja etanola s pomoću kvasaca iz roda *Spathaspora* na hidrolizatima dobivenim kiselinskom predobradom izluženih rezanaca šećerne repe. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Phillips, A.J.L., Rumbos, I.C., Alves, A., Correia, A. (2005) Morphology and phylogeny of *Botryosphaeria dothidea* causing fruit rot of olives. *Mycopathologia* **159**, 433–439.

Pienkos, P., Zhang, M. (2009) Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose* **16**, 743-762.

Ping S., Zhao H. (2007) *Biomass and bioenergy manual*. Japan Energy Society ed., Chemical Industry Press, Beijing.

Pochanavanich, P., Suntornsuk, W. (2002) Fungal chitosan production and its characterization. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**, 17-21.

Prema, P., Subramaniyan, S. (2002) Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit. Rev. Biotechnol.* **22**, 33–64.

Priscila, C., Zonetti, J., Celnik, S., Letichevsky, A., Gaspar B., Appel G.L. (2011) Chemicals from ethanol – The dehydrogenative route of the ethyl acetate one-pot synthesis. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **334**, 29-34.

Qureshi, N., Hodge, D., Vertès, A. (2014) *Biorefineries. Integrated Biochemical Processes for Liquid Biofuels*, 1. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 59.

Rapp, P. (1995) Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum*. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 832-838.

Rubin, E.M. (2008) Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* **454**, 841–845.

Rudolf, C., Grammel H. (2012) Fructose metabolism of the purple non-sulfur bacterium *Rhodospirillum rubrum*: Effect of carbon dioxide on growth, and production of bacteriochlorophyll and organic acids. *Enzyme Microb. Technol.* **50**, 238-246.

Sabra, W., Quitmann, H., Zeng, A., Dai, J., Xiu, Z. (2011) Microbial Production of 2,3-Butanediol. U: *Comprehensive Biotechnology* (Moo-Young, M., ured.), Elsevier B.V., Amsterdam, str. 87-97.

Sakarika, M., Spanoghe, J., Sui, Y., Wambacq, E., Grunert, O., Haesaert, G., Spiller, M., Vlaeminck, S.E. (2020) Purple non-sulphur bacteria and plant production: benefits for fertilization, stress resistance and the environment. *Microb Biotechnol.* **13**, 1336-1365.

Sanderson, K. (2011) Lignocellulose: A chewy problem. *Nature* **474**, S12-S14.

Sandrolhosseini, A. R., Moxsin, M. M., Nang, H. L. L., Norozi, M., Yunus, W. M. M., Zakaria, A. (2011) Physical properties of normal grade biodiesel and winter grade biodiesel. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 2100-2111.

Sarathchandra, S. U., Watson, R. N., Cox, N. R., di Menna, M. E., Brown, J. A., Burch, G., Neville, F. J. (1996) Effects of chitin amendment of soil on microorganisms, nematodes, and growth of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Biol. Fertil. Soils* **22**, 221–226.

Sasaki, K. (1998) Hydrogen and 5-Aminolevulinic Acid Production by Photosynthetic Bacteria. U: *Biohydrogen* (Zaborsky, O.R., Benemann, J.R., Matsunaga, T., Miyake, J., San Pietro, A., ured.), Springer, Boston, str. 133-142.

Sasaki, K., Tanak, T., Nishinori, Y., Hayashi, M. (1991) Enhanced production of 5-ALA by repeated addition of levulinic acid and supplement of precursors in photoheterotrophic culture of *Rhodobacter spheroides*. *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 403-406.

Sawayama, S., Tsukahara, K., Yagishita, T. (1999) Wastewater treatment and poly- β -hydroxybutyrate production using lighted upflow anaerobic sludge blanket method. *J. Biosci. Bioeng.* **5**, 683-689.

Scheller, H.V., Ulvskov, P. (2010) Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 263-289.

Shafiei M., Kumar R., Karimi K. (2015) Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. U: *Lignocellulose-Based Bioproducts. Biofuel and Biorefinery Technologies* (Karimi K., ured.), 1. izdanje, Springer, Switzerland.

Shah SR. (2013) Chemistry and applications of cellulase in textile wet processing. *Res. J. Eng. Sci.* **2**, 1-5.

- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.J. (1999) Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Sci. Technol.* **10**, 37–51.
- Sharifyazd, S., Karimi, K. (2017) Effects of fermentation conditions on valuable products of ethanolic fungus *Mucor indicus*. *Electron. J. Biotechnol.* **30**, 77-82.
- Shiwei, N., Dritsas, S., Fernandez, J.G. (2020) Martian biolith: A bioinspired regolith composite for closed-loop extraterrestrial manufacturing. PLOS ONE. (objavljeno online 16. rujna 2020.).
- Singh, B., Kumar, P., Yadav, A., Datta, S. (2019) Degradation of fermentation inhibitors from lignocellulosic hydrolysate liquor using immobilized bacterium, *Bordetella* sp. *Chem. Eng. J.* **361**, 1152-1160.
- Sjulander, N., Kikas, T. (2020) Origin, Impact and Control of Lignocellulosic Inhibitors in Bioethanol Production—A Review. *Energies* **13**, 4751.
- Song, E., Park, K., Jang, E., Lee, E., Chong, Y., Cho, O., Kim, S., Lee, S., Sung, H., Kim, M., Jeong, J., Kim, Y., Woo, J., Choi, S. (2010) Comparison of the clinical and microbiologic characteristics of patients with *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes* bacteremia: a prospective observation study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **66**, 436-440.
- Stenstad, P., Andresen, M., Tanem, B., Stenius, P. (2007) Chemical surface modifications of microfibrillated cellulose. *Cellulose* **15**, 35-45.
- Stoner, M.F. (1981) Ecology of *Fusarium* in noncultivated soils. U: *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy* (Nelson P.E., Toussoun T.A., Cook R.J., ured.), Pennsylvania State University Press, State College, str. 276–286.
- Sturms, R., White, D., Vickerman, K.L. (2017) Lubricant Properties of $\omega - 1$ Hydroxy Branched Fatty Acid-Containing Natural and Synthetic Lipids. *Tribol Lett.* **65**, 99.
- Sun, S., Sun, S., Cao, X., Sun, R. (2016) The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour. Technol.* **199**, 49-58.
- Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* **83**, 1–11.
- Syu, M. (2001) Biological production of 2,3-butanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 10-18.
- Taherzadeh, M., Jeihanipour, A. (2012) Recalcitrance of lignocellulosic biomass to anaerobic digestion. *Biogas Prod.* 27-54.

Takeno, K., Yamaoka, Y., Sasaki K. (2005) Treatment of oil-containing sewage wastewater using immobilized photosynthetic bacteria. *World J. Microbiol Biotechnol* **21**, 1385-1391.

Tanaka, T., Shnimizu M., Moriwaki H. (2012) Cancer chemo prevention by carotenoids. *Molecules* **17**, 3202–3242.

Tang, D., Yin, G., He, Y., Hu, S., Li, B., Li, L., Liang, H., Borthakur, D. (2009) Recovery of protein from brewer's spent grain by ultrafiltration. *Biochem. Eng. J.* **48**, 1-5.

Tang, W., Ding, Z., Wang, Y., Guo, L.Y. (2012) Phylogenetic and pathogenic analyses show that the causal agent of apple ring rot in China is *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Dis.* **96**, 486–496.

Tzoumaki, M. V., Moschakis, T., Kiosseoglou, V., Biliaderis, C. G. (2011) Oil-in-water emulsions stabilized by chitin nanocrystal particles. *Food Hydrocolloids* **25**, 1521–1529.

Ullah, H., Santos, H., Khan, T. (2016) Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. *Cellulose* **23**, 2291-2314.

Van den Bosch, S., Koelewijn, S., Renders, T., Van den Bossche, G., Vangeel, T., Schutyser, W., Sels, B. (2018) Catalytic Strategies Towards Lignin-Derived Chemicals. *Top. Curr. Chem.* **376**, 36.

Vasiliadou, I.A., Berná, A., Manchon, C., Melero, J.A., Martinez, F., Esteve-Nuñez, A., Puyol, D. (2018) Biological and Bioelectrochemical Systems for Hydrogen Production and Carbon Fixation Using Purple Phototrophic Bacteria. *Front. Energy Res.* (objavljeno online 13. studenog 2018.).

Vavilala, S.L., Ghag, S.B., D'Souza, J.S. (2019) Lignin: Understanding and Exploring Its Potential for Biofuel Production. U: Woodhead Publishing Series in *Energy, Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts* (Hosseini, M., ured.), Woodhead Publishing, Sawston, str. 165-186.

Vázquez-Montoya, E., Castro-Ochoa, L., Maldonado-Mendoza, I., Luna-Suárez, S., Claudia, C. (2019) Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. *Rev. Argent. Microbiol.* **52**, 4-12.

Vrati, S. (1984) Single Cell Protein Production by Photosynthetic Bacteria Grown on the Clarified Effluents of Biogas Plant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 199 – 202.

Vrdoljak, J. (2019) Usporedba procesa kiselinske i alkalne predobrade otpadne trave u visokotlačnom reaktoru. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet.

Wang X.D. (2014) Carotenoids. U: Modern Nutrition in Health and Disease, 11. izd. (Ross C.A., Caballero B., Cousins R.J., Tucker K.L., Ziegler T.R., ured.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, str. 427-439.

Wilson, B.D. (2009) Cellulases and biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol* **20**, 295–299.

Wittcoff, H.A., Reuben, B.G., Plotkin, J.S. (2004) *Industrial Organic Chemicals*. John Wiley & Sons, New Jersey, str. 136–147.

Woodmansey, A. (2002) Chitosan Treatment of Sediment Laden Water – Washington State I-90 Issaquah Project. Federal Highway Administration U.S. Department of Transportation. <<https://www.fhwa.dot.gov/engineering/geotech/>>. Pristupljeno 8. travnja 2021.

Xin, Z., Kaili, N., Yongli, Z., Fang, W., Li, D., Tianwei T. (2015) Enzymatic production and functional characterization of d-sorbitol monoesters with various fatty acids. *Catal. Commun.* **72**, 138-141.

Xiu, Z.L., Zeng, A.P. (2008) Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 917-926.

Xiu-yan, L., Xiang-yang, X., Qing-lan, M., Wei-hong, W. (2005) Biological formation of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *J. Environ. Sci.* **7**, 152-155.

Yeh, A., Huang, Y., Chen, S. (2010) Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Carbohydr. Polym.* **79**, 192-199.

Yong, S.K., Shrivastava, M., Srivastava, P., Kunhikrishnan, A., Bolan, N. (2015) Environmental applications of chitosan and its derivatives. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **233**, 1–43.

Yuksel, F., Yuksel, B. (2004) The use of ethanol-gasoline blend as a fuel in an SI engine. *Renew. Energ.* **29**, 1181-1191.

Zhang, L., Liu, Y., Niu, X., Liu, Y., Liao, W. (2012) Effects of acid and alkali treated lignocellulosic materials on cellulase/xylanase production by production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 and corresponding enzymatic hydrolysis. *Biomass Bioenergy* **37**, 16-24.

Zhang, Y., Riduan, S.N. (2011) Catalytic hydrocarboxylation of alkenes and alkynes with CO₂. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50**, 6210-6212.

Zhang, Y.H.P. (2011) What is vital (and not vital) to advance economically-competitive biofuels production. *Process Biochem.* **46**, 2091–2110.

Zhang, Y.-J., Gao, B., Liu, X.W. (2015) Topical and effective hemostatic medicines in the battlefield. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 10–19.

Zhou, Q. X. (2013) *Introduction of Resource Recycling Science and Engineering*. Chemical Industry Press, Beijing, str. 17.

Zhou, X., Li, W., Mabon, R., Broadbelt, L. (2016) A Critical Review on Hemicellulose Pyrolysis. *Energy Technol.* **5**, 52-79.

Zoghalmi, A., Paës, G. (2019) Lignocellulosic biomass: Understanding recalcitrance and predicting hydrolysis. *Front. Chem.* **7**, 874.

Žunar, B., Trontel, A., Svetec Miklenić, M., Prah, J., Štafa, A., Marđetko, N., Novak, M., Šantek, B., Svetec, I. (2020) Metabolically engineered *Lactobacillus gasser* JCM 1131 as a novel producer of optically pure L- and D-lactate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 111-116.

9. SAŽETAK

Zora Kelemen, Marko Sarić

Biorafinerijski pristup iskorištavanju otpadne trave i pivskog tropa za proizvodnju specifičnih biokemikalija i biogoriva s pomoću odabranih vrsta mikroorganizama

Primjena biorafinerijskog principa znači razvoj održivih procesa koji imaju smanjeni utjecaj na okoliš, te iskorištavanje obnovljivih sirovina u što većoj mjeri, za dobivanje proizvoda visoke dodane vrijednosti. Otpadna lignocelulozna biomasa zbog niže cijene i široke dostupnosti predstavlja vrijedan resurs za biotehnošku proizvodnju. Upotrebom jeftine otpadne sirovine, poput pivskog tropa i otpadne trave, mogu se uvelike smanjiti troškovi proizvodnje i time sam proces učiniti ekonomski i ekološki održivim. Biorafinerijskim iskorištavanjem obnovljivih otpadnih sirovina mogu se dobiti proizvodi visoke dodane vrijednosti kao što su enzimi, biomaterijali poput hitina i hitozana, bazne biokemikalije poput 2,3-butandiola i mliječne kiseline te biogoriva kao etanol. Ovim radom istraženi su procesi dobivanja spomenutih biokemikalija, biopolimera i biogoriva. Prvi dio istraživanja posvećen je primjeni otpadne trave za proizvodnju lignocelulolitičkih enzima pomoću triju plijesni iz rodova *Botryosphaeria* i *Fusarium*, među kojima je plijesan *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 pokazala najveću aktivnost ukupnih lignocelulolitičkih enzima (743 U L^{-1}). Biomasa ove plijesni, izdvojena nakon proizvodnje enzima u barbotirajućem bioreaktoru, sadrži hitin (oko 25 %) i hitozan (oko 38 %) koji su izolirani kao komercijalno zanimljivi proizvodi. Pri izdvajanju enzima, proizvedenih u opisanom procesu, zaostaje otpadna voda koja je korištena kao hranjiva podloga za tri vrste fototrofnih ljubičastih nesumpornih bakterija čija biomasa sadrži vrijedne pigmente i masne kiseline. Bakterija *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 proizvela je najveću koncentraciju pigmenata ($1,16 \text{ mg L}^{-1}$), a najviše ukupnih masnih kiselina sadržavala je suha tvar bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 (3,4 % w/w). Drugi dio istraživanja bio je fokusiran na razvoj procesa za proizvodnju biokemikalija i biogoriva (2,3-butandiol, mliječna kiselina, etanol) pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kiselinskom i enzimskom hidrolizatu pivskog tropa. Uzgoj je proveden na podlogama sa izvorima ugljika prisutnim u hidrolizatima dobivenim predobradom otpadnog pivskog tropa te u bioreaktoru s miješalom na tekućim hidrolizatima otpadnog pivskog tropa dobivenim fizikalno-kemijskim i enzimskim

predobradama. Odabirom vrste predobrade, a time i sastava podloge za uzgoj, pokazalo se da istraživana bakterija *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 proizvodi različite omjere ciljnih produkata. Prilikom korištenja detoksiciranog kiselinskog hidrolizata pivskog tropa sinteza produkata je usmjerena prema proizvodnji mliječne kiseline (maksimalno 30,07 g L⁻¹), a prilikom korištenja enzimski hidroliziranog čvrstog dijela koji zaostaje nakon kiselinske hidrolize otpadnog pivskog tropa dobije se više produkata i to 2,3-butandiol u koncentraciji od 9,84 g L⁻¹, etanol 3,58 g L⁻¹ te mliječna kiselina u koncentraciji od 7,45 g L⁻¹. Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost razvoja daljnjih procesa iskorištavanja otpadnog pivskog tropa i otpadne trave s ciljem dobivanja više proizvoda iz jedne sirovine, primjenjujući biorafinerijski princip.

Ključne riječi: biorafinerija, lignoceluloza, lignocelulolitički enzimi, 2,3 -butandiol, *Paenibacillus polymyxa*

10. SUMMARY

Zora Kelemen, Marko Sarić

Biorefinery principle of waste grass and spent brewers' grains utilization for the production of specific biochemicals and biofuels using selected types of microorganisms

The biorefinery concept implies the development of sustainable processes which have a lower impact on the environment and the utilization of renewable resources on a large scale to produce high-value products. Lignocellulosic waste represents a valuable resource for different biotechnological productions because of its low cost and high supply. By using cheap feedstock, such as brewers' spent grains and waste grass, costs of production can be greatly diminished, and therefore more economically and ecologically/environmentally sustainable. Biorefining such renewable resources can produce different high-value products: enzymes, biomaterials such as chitin and chitosan, bulk biochemicals such as 2,3-butanediol and lactic acid, and biofuels like bioethanol. This research project aims to explore different processes of these aforementioned compounds. The first part of the research is dedicated to usage of waste grass for the production of lignocellulolytic enzymes via three fungi in the genus *Botryosphaeria* and *Fusarium*, from which the mold *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 had the highest total lignocellulolytic activity (743 U L⁻¹). The biomass of this mold, extracted after enzyme production, contained chitin (25 % w/w) and chitosan (38 % w/w) which were isolated as commercially interesting product. After enzyme isolation, residual wastewater was used as a growing medium for the cultivation of three species of purple nonsulphur bacteria whose biomass contains valuable pigments and fatty acids. The bacteria *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 produced the highest concentration of pigments (1,16 mg L⁻¹), and the highest total fatty acid mass fraction was contained in the dry weight of *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 (3,4 % w/w). The second part of the research was focused on the development of the production process of biochemicals and biofuels (2,3-butanediol, lactic acid, ethanol) via the bacteria *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 on acid and enzyme hydrolysates of spent brewers' grains. The cultivation was conducted on chemically defined media containing sugars often found in the hydrolysates of brewers' spent grains and on the hydrolysates of brewers' spent grains which were pretreated with physicochemical and

enzymatic methods of pretreatment. By choosing the type of the pretreatment method, and consequently the composition of the medium, it was demonstrated that the bacteria *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 can produce various ratios of different products: while using detoxified acid hydrolysate, product synthesis was oriented towards lactic acid production (max. 30,07 g L⁻¹) and while using the enzymatically treated solid fraction (residual after acid pretreatment) 2,3-butanediol (9,84 g L⁻¹), ethanol (3,58 g L⁻¹) and lactic acid (7,45 g L⁻¹) were produced. Based on the results of this research, it is evident that the further development of these biorefinery processes can increase utilization of waste grass and spent brewers' grains with the goal of producing multiple products from one type of feedstock.

Key words: Biorefinery, lignocellulose, lignocellulolytic enzymes, 2,3-butanediol, *Paenibacillus polymyxa*

PRILOZI

Tablica 19. Jednadžbe kalibracijskih pravaca za UPLC analizu

Tvar	RT (min)	Jednadžba kalibracijskog pravca	R²
mliječna kiselina	6,632	$y = 61091x + 8832,5$	0,9934
mravlja kiselina	7,11	$y = 47328x + 53,595$	1,0000
2,3-butandiol	9,914	$y = 116579x + 3003,6$	0,9995
octena kiselina	7,816	$y = 57358x + 697,25$	1,0000
glukoza	4,821	$y = 135278x - 3377$	0,9997
ksiloza	5,164	$y = 129878x - 627,53$	0,9998