

Učinak mravlje i levulinske kiseline na rast i akumulaciju lipida u plijesni *Mortierella isabellina*

Peremin, Ines

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:010312>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-21**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ines Peremin

6663/BT

**UČINAK MRAVLJE I LEVULINSKE KISELINE NA RAST I AKUMULACIJU
LIPIDA U PLIJESNI *Mortierella isabellina***

ZAVRŠNI RAD

Znanstveno-istraživački projekt: "Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz
otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina" (HRZZ-9158)

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

Zagreb, 2017.

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek na uloženom vremenu i strpljenju te savjetima i pomoći pri izradi završnog rada.

Također, zahvaljujem se Igoru Livada, Marini Vnućec i Ljiljani Blažević, tehničkim suradnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada, na susretljivosti i ugodnoj atmosferi.

Hvala izv. prof. dr. sc. Sunčici Beluhan na pomoći i ustupljenim materijalima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Učinak mravlje i levulinske kiseline na rast i akumulaciju lipida u plijesni *Mortierella isabellina*

Ines Peremin, 0058202633

Sažetak: Plijesan *Mortierella isabellina* potencijalni je kandidat za proizvodnju lipida na lignoceluloznim hidrolizatima. Predobradom lignocelulozne sirovine nastaju brojni nusproizvodi koji značajno smanjuju aktivnost celulaza, mikrobní rast i akumulaciju proizvoda. Istražen je učinak pojedinačnih alifatskih kiselina na rast i akumulaciju lipida tijekom submerznog uzgoja plijesni, pri čemu je kao izvor ugljika korištena glukoza. Rezultati su pokazali da je inhibicijski učinak mravlje kiseline jači u odnosu na levulinsku kiselinu. Značajan pad koncentracije biomase i lipida uočen je pri koncentracijama levulinske kiseline iznad 1,111 g L⁻¹. Utvrđeno je da mravlja kiselina pri nižim koncentracijama pospješuje rast biomase plijesni i biosintezu lipida. Pri koncentracijama levulinske kiseline većim od 5,55 g L⁻¹ i koncentracijama mravlje kiseline većim od 0,4 g L⁻¹ nije zabilježen rast plijesni *M. isabellina*.

Ključne riječi: levulinska kiselina, lignocelulozna sirovina, *Mortierella isabellina*, mravlja kiselina, predobrada

Rad sadrži: 32 stranice, 11 slika, 12 tablica, 53 literaturna navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Datum obrane: 18. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Effect of formic and levulinic acid on growth and lipid accumulation of fungus *Mortierella isabellina*

Ines Peremin, 0058202633

Abstract: Fungus *Mortierella isabellina* is a potential candidate for lipid production from lignocellulosic hydrolysates. Numerous by-products, which significantly reduce cellulase activity, microbial growth and product accumulation, are formed during lignocellulosic biomass pretreatment. The effect of individual aliphatic acids on growth and lipid accumulation during the submerged cultivation of fungus using glucose as a carbon source was studied. The results showed that the inhibitory effect of formic acid was stronger compared to levulinic acid. Significant drop in both biomass and lipid concentration was observed at levulinic acid concentrations above 1,111 g L⁻¹. It was found that formic acid at lower concentrations promotes biomass growth and lipid biosynthesis. There was no growth of fungus *M. isabellina* detected at the concentrations of levulinic and formic acid above 5,55 g L⁻¹ and 0,4 g L⁻¹, respectively.

Keywords: formic acid, levulinic acid, lignocellulosic biomass, *Mortierella isabellina*, pretreatment

Thesis contains: 32 pages, 11 figures, 12 tables, 53 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Mirela Ivančić Šantek, Associate professor

Defence date: September 18th 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Lignocelulozne sirovine	2
2.1.1. Sastav lignoceluloznih sirovina	2
2.1.1.1. <i>Celuloza</i>	3
2.1.1.2. <i>Hemiceluloza</i>	3
2.1.1.3. <i>Lignin</i>	3
2.1.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina	4
2.1.3. Inhibitori nastali predobradom lignoceluloznih sirovina	6
2.1.3.1. <i>Mehanizam djelovanja alifatskih kiselina</i>	8
2.2. Proizvodnja mikrobnih lipida iz lignoceluloznih sirovina	9
2.2.1. Oleaginozni mikroorganizmi	10
2.2.2. Biosinteza mikrobnih lipida	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Radni mikroorganizam	12
3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga	12
3.1.3. Ostale kemikalije	13
3.1.4. Hranjiva podloga za uzgoj plijesni u tikvicama	13
3.1.5. Oprema i aparatura	14
3.1.5.1. <i>Centrifuge</i>	14
3.1.5.2. <i>Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)</i>	14
3.1.5.3. <i>Ostala oprema i aparatura</i>	15
3.2. Metode	16
3.2.1. Uzgoj spora plijesni <i>M. isabellina</i>	16
3.2.2. Uzgoj spora plijesni <i>M. isabellina</i> u tikvicama	16
3.2.3. Analitičke metode	17
3.2.3.1. <i>Određivanje mase suhe tvari biomase gravimetrijski</i>	17
3.2.3.2. <i>Određivanje koncentracije glukoze tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)</i>	17
3.2.3.2.1. <i>Priprema uzoraka za HPLC analizu</i>	17
3.2.3.2.2. <i>HPLC analiza</i>	17
3.2.3.3. <i>Određivanje udjela lipida</i>	18
3.2.3.3.1. <i>Kiselinska hidroliza biomase</i>	18
3.2.3.3.2. <i>Ekstrakcija lipida</i>	18
3.2.3.3.3. <i>Izračun udjela lipida</i>	19
3.2.4. Pokazatelji uspješnosti bioprocesa	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
5. ZAKLJUČCI	27
6. POPIS LITERATURE	28
7. PRILOZI	

1. UVOD

Povećana potreba za proizvodnjom biogoriva rezultat je porasta potrošnje energije uslijed ubrzanog rasta populacije i razvoja svjetskog gospodarstva, nestabilnosti cijene kao i ekoloških posljedica izgaranja fosilnih goriva. Smanjenje zaliha nafte procjenjuje se na 2 do 3 % godišnje (Campbell, 2006). Biogoriva se dobivaju preradom organskog materijala, odnosno biomase koja predstavlja obnovljivi izvor energije. Korištenje obnovljivih izvora energije smatra se primarnom strategijom smanjenja emisije stakleničkih plinova. Industrijski značajna biogoriva su bioetanol, biodizel i bioplin. Biogoriva prve generacije proizvode se iz šećernih i škrobnih sirovina, biljnih ulja i masti životinjskog podrijetla. Korištenje poljoprivrednih usjeva za proizvodnju biogoriva dovodi do porasta cijene žitarica i prehrambenih proizvoda (Welker i sur., 2015). Kompeticija s prehrambenom industrijom rezultirala je istraživanjem alternativnih sirovina za proizvodnju biogoriva. Lignocelulozna biomasa predstavlja interesantnu biotehnološku sirovinu za proizvodnju obnovljivih goriva zahvaljujući određenim prednostima. Lignocelulozne sirovine ne koriste se za prehranu ljudi i stoke, lako su dostupne i znatno jeftinije u odnosu na sirovine za proizvodnju biogoriva prve generacije. Međutim, zbog složenog kemijskog sastava lignoceluloze, ove sirovine zahtijevaju odgovarajuću predobradu čija je svrha oslobađanje fermentabilnih šećera koje mikroorganizmi mogu koristiti za rast i sintezu proizvoda.

Trenutno se 95 % biodizela proizvodi iz biljnih ulja, primjerice ulja soje i uljane repice (Azocar i sur., 2010). Posljednjih godina istraživanja su usmjerena prema iskorištavanju mikrobnih lipida za proizvodnju biodizela druge generacije. Određeni mikroorganizmi, tzv. oleaginozni mikroorganizmi, imaju sposobnost akumulacije preko 20 % lipida u suhoj tvari biomase, pretežito u formi triacilglicerola. Biodizel proizveden transesterifikacijom mikrobnih triacilglicerola sličnog je sastava biodizelu dobivenom tradicionalnom proizvodnjom iz jestivih biljnih ulja te se može rabiti kao pogonsko gorivo, s malo ili bez preinaka na postojećim dizelskim motorima (Kumar i sur., 2017). Kombinacija jeftinih sirovina, poput lignoceluloznih, i oleaginoznih mikroorganizama predstavlja mogućnost potencijalnog razvoja optimalnog sustava za proizvodnju biodizela. Trenutni izazovi u proizvodnji biodizela druge generacije odnose se na pronalaženje visokoproduktivnih sojeva otpornih na djelovanje inhibitora nastalih predobradom lignoceluloznih sirovina (Ruan i sur., 2015).

Cilj ovog rada je istražiti učinak različitih koncentracija mravlje i levulinske kiseline, koje se nalaze u lignoceluloznim hidrolizatima, na rast i akumulaciju lipida u plijesni *Mortierella isabellina* prilikom šaržnog uzgoja s glukozom kao izvorom ugljika.

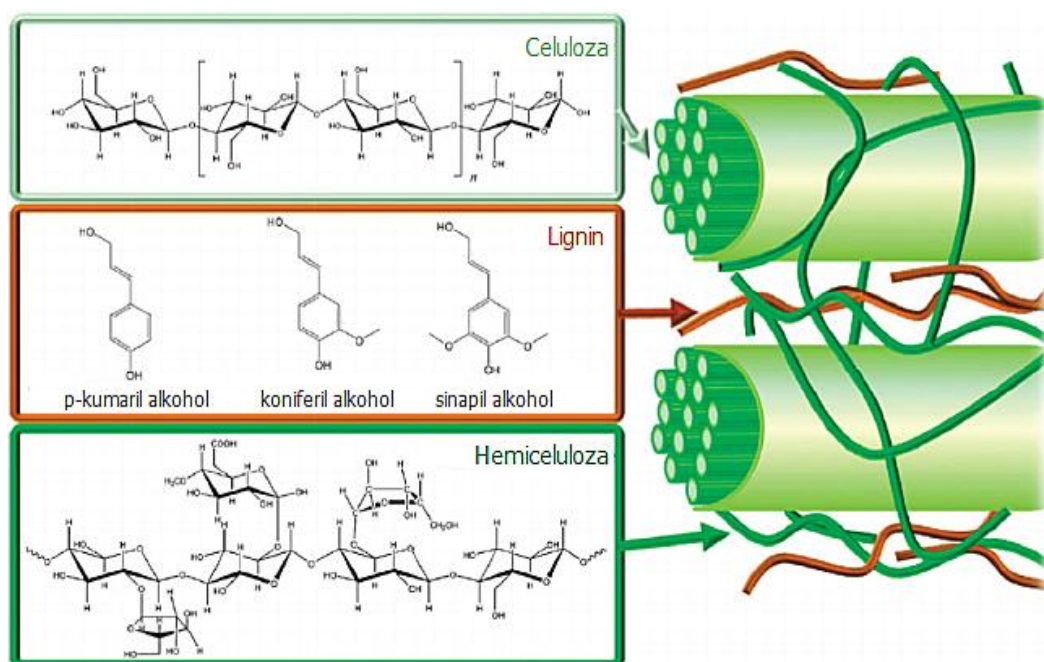
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Lignocelulozne sirovine

U lignocelulozne sirovine ubrajaju se poljoprivredni ostaci (stabljika, oklasak i komušina kukuruza, trava, bagasa šećerne trske), otpad drvoprerađivačke industrije (piljevina i strugotine, otpad papirne industrije), otpad prehrambene industrije, energetske usjevi i komunalni otpadni papir (Ivančić Šantek i sur., 2016). Navedene sirovine koriste se za proizvodnju biogoriva druge generacije. U usporedbi sa šećernim i škrobnim sirovinama cijena lignoceluloznih sirovina je niža, ali je zbog kompleksne strukture sirovine potreban složen proces proizvodnje.

2.1.1. Sastav lignoceluloznih sirovina

Osnovne komponente lignoceluloznih sirovina su celuloza, hemiceluloza i lignin. Ostatak čine manje količine pektina, proteina, ekstraktivnih tvari i pepela (Jørgensen i sur., 2007). Udio pojedine komponente razlikuje se ovisno o vrsti lignocelulozne sirovine. Celuloza i hemiceluloza čine oko 70% cjelokupne biomase te su čvrsto povezane s ligninom kovalentnim i vodikovim vezama što pridonosi robusnosti i otpornosti strukture prema različitim metodama predobrade (McMillan, 1994; Knauf i Moniruzzaman, 2004). Paralelni lanci celuloze tvore mikrovlakna međusobnim povezivanjem vodikovim vezama i van der Waalsovih silama. Mikrovlakna su okružena hemicelulozom i ligninom (slika 1). Celulozna vlakna nastaju udruživanjem mikrovlakana.



Slika 1. Struktura lignoceluloze (prema Alonso i sur., 2012)

2.1.1.1. Celuloza

Celuloza kao osnovni sastojak stanične stijenke osigurava strukturnu potporu biljnom tkivu, a prisutna je i u bakterijama, gljivama i algama. Dvije molekule D-glukoze međusobno su povezane β -1,4-glikozidnom vezom formirajući disaharid celobiozu. Celuloza je linearni polimer sastavljen od ponavljajućih jedinica celobioze (slika 1). Kiselinskom ili enzimskom hidrolizom β -1,4-glikozidne veze dolazi do nastajanja D-glukoze (Bajpai, 2016). Nativna celuloza pretežito je kristalične strukture, dok je manji dio amorfan. Brojne hidroksilne grupe u kristaličnoj celulozi tvore vodikove veze što dovodi do umrežavanja celuloznih lanaca te tako doprinosi čvrstoći kristalične strukture (Zhang i sur., 2008). Amorfna celuloza podložnija je enzimskoj razgradnji (Béguin i Aubert, 1994).

2.1.1.2. Hemiceluloza

Hemiceluloza predstavlja skupinu linearnih i razgranatih polisaharida koji se po sastavu razlikuju ovisno o biljnom tkivu i vrsti, kao i razvojnem stadiju biljke (Sorek i sur., 2014). U usporedbi s celulozom, hemiceluloza je kemijski heterogenog sastava i amorfne strukture. Polisaharidi su sastavljeni od heksoza (D-glukoza, D-galaktoza i D-manoza), pentoza (D-ksiloza i L-arabinoza) i šećernih kiselina (D-glukuronska, D-galakturonska i metilgalakturonska kiselina). Osnovni lanac hemiceluloze je homopolimer ili heteropolimer u kojem su monomerne jedinice najčešće povezane β -1,4-glikozidnom vezom (slika 1). Na ovaj lanac mogu se vezati kraće glikozilne skupine. Osim šećera, hemiceluloza sadrži i manji udio acetilnih skupina. Od svih komponenata lignoceluloze, hemiceluloza je najosjetljivija na termičku i kemijsku obradu (Kumar i sur., 2017).

2.1.1.3. Lignin

Primarna funkcija lignina je održavanje nepropusnosti i pružanje strukturne potpore biljnom tkivu uz zaštitu od mikrobne razgradnje i oksidativnog stresa (Hendriks i Zeeman, 2009). Lignin je kompleksni heteropolimer izgrađen od nelinearno i nasumično povezanih fenilpropanskih jedinica. Tri osnovna monomera su: *p*-kumaril, koniferil i sinapil alkohol (slika 1). Monomeri su međusobno povezani alkil-alkil, aril-aril i alkil-aril eterskim vezama (Kumar i sur., 2009). Lignin predstavlja fizičku prepreku razgradnji polisaharidnih komponenata lignoceluloze zbog čega je nužna predobrada u svrhu njegovog uklanjanja. Na učinkovitost predobrade i saharifikacije utječu sljedeći faktori: ukupni udio lignina u sirovini, sastav lignina, stupanj polimerizacije lignina te priroda i stupanj umreženosti lignina s polisaharidima (Sorek i sur., 2014). Lignin je potencijalna sirovina za proizvodnju kemikalija, goriva i drugih biotehnoloških proizvoda (Welker i sur., 2015).

2.1.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina

Predobradom lignocelulozne sirovine dolazi do promjene fizikalnih i kemijskih karakteristika lignoceluloze što je nužno za učinkovitu hidrolizu polisaharida do fermentabilnih šećera (glukoza, ksiloza, celobioza, ksilobioza). Ciljevi predobrade obuhvaćaju uklanjanje lignina, djelomičnu ili potpunu hidrolizu hemiceluloze i smanjenje kristaličnosti celuloze uz povećanje poroznosti lignoceluloznog materijala. Tijekom posljednjih desetljeća razvijene su razne metode predobrade koje se ugrubo mogu podijeliti na: fizikalne (mehaničko usitnjavanje, piroliza, gama-zračenje), kemijske (alkalna hidroliza, kiselinska hidroliza, ekstrakcija otapalima, ozonoliza), fizikalno-kemijske (eksplozija vlakana s amonijakom, CO₂ ili parom, hidrotermoliza) i biološke (enzimi i mikroorganizmi, Galbe i Zacchi, 2007). Iako se većinom navedenih postupaka oslobađaju polisaharidi iz stanične stijenke sirovine, neki su još uvijek ekonomski neisplativi zbog tehnoloških poteškoća. Neke od metoda predobrade lignoceluloznih sirovina, s pripadajućim prednostima i nedostacima, prikazane su u tablici 1.

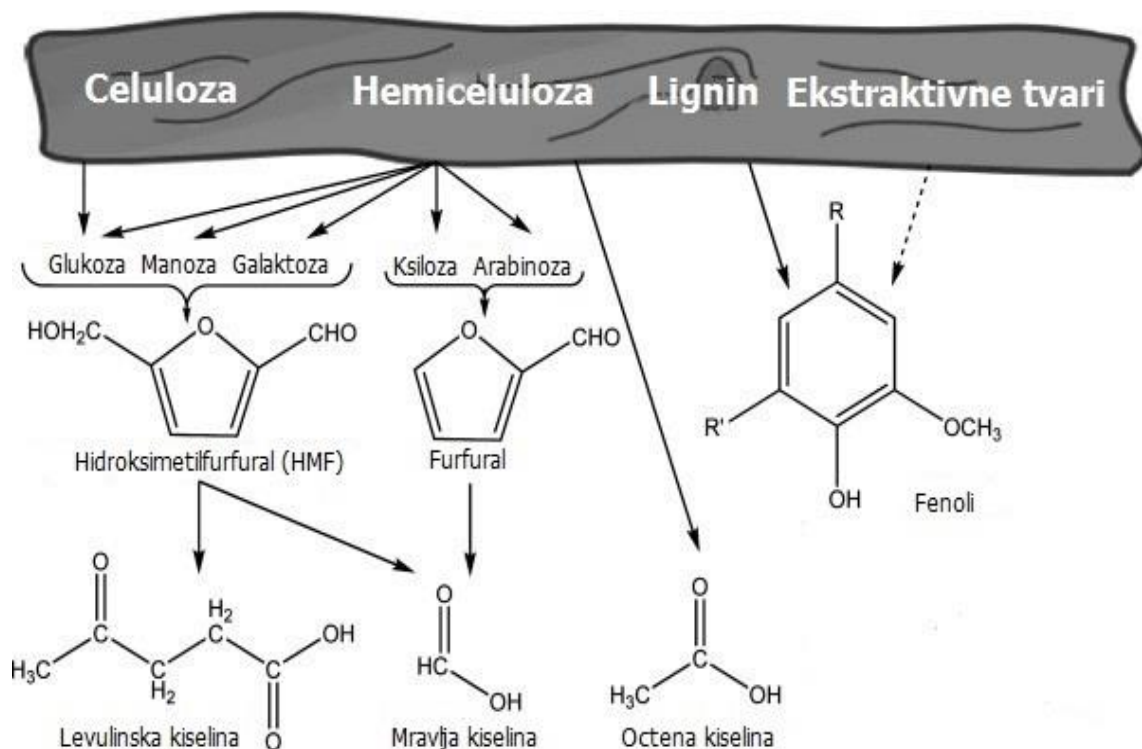
Na izbor metode utječe struktura sirovine, kao i nusproizvodi koji mogu nastati tijekom predobrade. S obzirom na razlike u kemijskom sastavu i fizikalnim karakteristikama, predobrada drvene biomase zahtjevnija je od predobrade poljoprivrednih ostataka. Poljoprivredna biomasa poput stabljika kukuruza, rižine i pšenične slame uglavnom se sastoji od hemiceluloze (32 %) i manjih količina lignina (3-13 %) (Limayem i Ricke, 2012), dok drvo sadrži visok udjel lignina (oko 29 %) i celuloze (oko 44 %) (Demirbaş, 2005) što ga čini otpornijim na obradu. Tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina nastaju brojni inhibitori koji značajno smanjuju efikasnost biokonverzije supstrata u proizvod. Detoksikacija je nužna u slučaju jače inhibicije, akumulacije visokih koncentracija inhibitora u recirkulacijskom toku bioreaktora ili upotrebe mikroorganizama s nižom tolerancijom na inhibitore (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000a). Uklanjanje takvih spojeva iz hidrolizata često je skupo uz relativno velike gubitke fermentabilnih šećera zbog čega je potreban razvoj novih mikrobnih sojeva otpornijih na djelovanje inhibitora (Piotrowski i sur., 2014).

Tablica 1. Pregled različitih metoda predobrade lignoceluloznih sirovina (Kumar i sur., 2009)

metoda predobrade	prednosti	ograničenja i nedostaci
mehaničko usitnjavanje	smanjenje kristaličnosti celuloze	potrošnja energije veća od teoretski sadržane u biomasi
eksplozija parom	degradacija hemiceluloze i transformacija lignina; isplativost	razgradnja dijela frakcije ksilana; nepotpuno razdvajanje lignina od polisaharida; nastajanje inhibitora
eksplozija vlakana s amonijakom (AFEX)	povećanje dostupne površine sirovine; djelomično uklanjanje lignina i hemiceluloze; nema nastajanja inhibitora	neučinkovitost kod većih udjela lignina
eksplozija s CO ₂	povećanje dostupne površine; isplativost; nema nastajanja inhibitora	bez modifikacije lignina i hemiceluloze
ozonoliza	smanjenje udjela lignina; nema nastajanja toksičnih tvari	potrebne velike količine ozona; visoka cijena
kiselinska hidroliza	hidroliza hemiceluloze do ksiloze i ostalih šećera; promjena strukture lignina	visoka cijena; korozija; nastajanje toksičnih tvari
alkalna hidroliza	uklanjanje hemiceluloze i lignina; povećanje dostupne površine sirovine	dugotrajna predobrada; ugrađivanje soli u biomasu
organosolv proces	hidroliza hemiceluloze i lignina	potrebno uklanjanje i reciklacija otapala; visoka cijena
piroliza	nastajanje plinovitih i tekućih proizvoda	visoka temperatura; nastajanje pepela
pulsirajuće električno polje	razgradnja stanične stijenke; jednostavna oprema	potrebna daljnja istraživanja
biološka obrada	degradacija lignina i hemiceluloze; mali utrošak energije	spora hidroliza

2.1.3. Inhibitori nastali predobradom lignoceluloznih sirovina

Inhibitori koji nastaju predobradom lignoceluloze mogu se, s obzirom na kemijsku strukturu i podrijetlo, podijeliti na: alifatske kiseline (octena, mravlja i levulinska kiselina), furanske aldehide (furfural i 5-hidroksimetilfurfural) i fenolne spojeve (slika 2). Hidrolizom celuloze nastaje glukoza, dok se razgradnjom hemiceluloze uz glukozu oslobađaju i ksiloza, manozu, galaktozu i arabinozu. Tijekom predobrade i hidrolize s kiselinama dehidracijom pentoza nastaje furfural, a dehidracijom heksoza 5-hidroksimetilfurfural.



Slika 2. Nastajanje inhibitora rasta tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina (prema Jönsson i sur., 2013)

Pri ekstremnim uvjetima predobrade, kao što su visoka temperatura i niska pH vrijednost, iz 5-hidroksimetilfurfurala nastaju mravlja i levulinska kiselina. Mravlja kiselina također nastaje degradacijom furfurala. Nastanak octene kiseline nije povezan s degradacijom šećera već je rezultat hidrolize acetilnih skupina hemiceluloze (Jönsson i Martín, 2015). Cijepanjem eterskih veza u ligninu oslobađaju se fenolni spojevi od kojih su najzastupljeniji vanilin, 4-hidroksibenzojeva kiselina, 4-hidroksibenzaldehid, dihidrokoniferil-alkohol, koniferil-aldehid, siringaldehid, 2-gvajacilacetaldehid i Hibbert-ovi ketoni (Mitchell i sur., 2013). Neke od ekstraktivnih tvari također su fenolni spojevi.

Inhibitori nastali predobradom lignoceluloznih sirovina utječu na brzinu fermentacije i prinos proizvoda čime se produljuje vrijeme fermentacije i povećavaju operativni troškovi

procesa (Piotrowski i sur., 2014). Također, poznato je da fenolni spojevi inhibiraju celulaze tijekom enzimske hidrolize celuloze (Ximenes i sur., 2011). Zbog kemijske raznovrsnosti inhibitori utječu na različite stanične procese (tablica 2). Njihov učinak očituje se kroz oštećenja stanične membrane i nukleinskih kiselina te inhibiciju enzima odnosno staničnog metabolizma. Iako je udio fenolnih spojeva u lignoceluloznom hidrolizatu relativno nizak, toksičnost tih spojeva veća je u odnosu na furanske aldehide i alifatske kiseline zahvaljujući njihovom hidrofobnom karakteru, što omogućuje brzu difuziju kroz staničnu membranu i rezultira akumulacijom fenola u citosolu (Ibraheem i Ndimba, 2013).

Tablica 2. Učinak inhibitora na stanične procese

inhibitor	način djelovanja	reference
alifatske kiseline octena kiselina, mravlja kiselina, levulinska kiselina	smanjenje razine ATP-a; pad intracelularne pH vrijednosti; povećanje turgora; inhibicija biosinteze makromolekula; inhibicija replikacije DNA; smanjenje količine aminokiselina; inhibicija staničnih enzima	Jönsson i Martín, 2015; Jönsson i sur., 2013; Cherrington i sur., 1990; Mills i sur., 2009
furanski aldehidi HMF, furfural	inhibicija enzima glikolize; denaturacija i oštećenje DNA; oštećenje stanične membrane	Modig i sur., 2002; Hadi i sur., 1989; Zaldivar i sur., 1999
fenolni spojevi	oštećenje stanične membrane; smanjenje razine ATP-a; povećana proizvodnja slobodnih radikala; denaturacija staničnih proteina/enzima; DNA mutageneza; oštećenje citoskeleta; indukcija apoptoze	Heipieper i sur., 1994; Mikulášová i sur., 1990

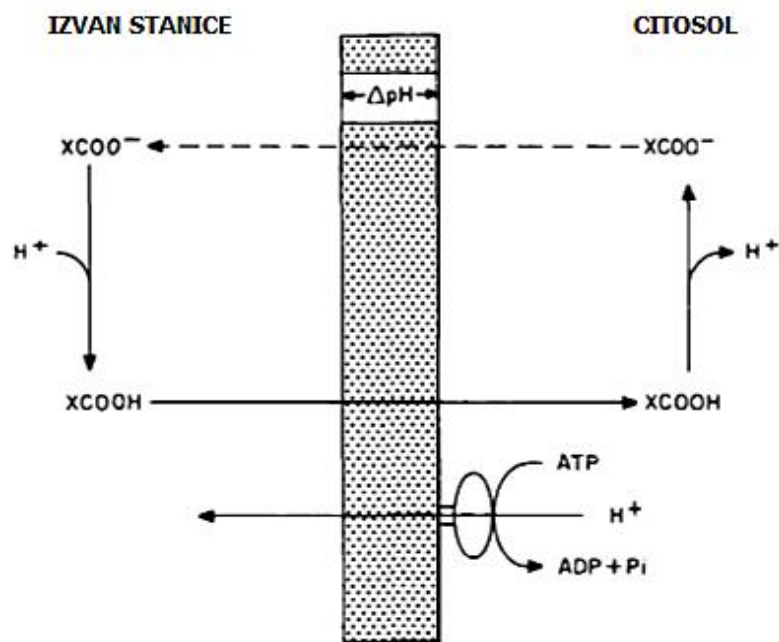
Otpor djelovanju inhibitora zahtijeva složen odgovor mnogih staničnih sustava. Mikrobnе stanice razvile su različite mehanizme rezistencije na učinak inhibitora koji podrazumijevaju detoksikaciju, ekskreciju i popravak nastalih oštećenja. Detoksikacija je osnovni mehanizam kojim stanica uklanja toksične aldehide. Primjerice, redukcijom furfurala

i vanilina pomoću NADPH-ovisne reduktaze nastaju manje toksični alkoholi (Jarboe, 2011). Međutim, to dovodi do smanjenja raspoloživog NADPH za biostintetske reakcije i rezultira sporijom konverzijom šećera (Miller i sur., 2009). Ekskrecija je posredovana ATP-ovisnim transmembranskim pumpama (ATPaze) koje izlučuju toksične komponente u izvanstanični prostor na račun hidrolize ATP-a. U prisutnosti alifatskih kiselina i furanskih aldehida povećava se razina ekspresije transmembranskih ATPaza. Popravci staničnih oštećenja nastalih djelovanjem inhibitora zahtijevaju utrošak ATP-a, NADPH, ugljika i dušika što dodatno iscrpljuje stanicu. Budući da lignocelulozni hidrolizati sadrže smjesu inhibitora s različitim načinima djelovanja, potrebno je simultano djelovanje navedenih staničnih mehanizama (Piotrowski i sur., 2014).

2.1.3.1. Mehanizam djelovanja alifatskih kiselina

Lipofilne nedisocirane alifatske kiseline ulaze u stanicu difuzijom kroz staničnu membranu. Uslijed neutralnog pH u citosolu dolazi do disocijacije kiselina (Pampulha i Loureiro-Dias, 1989) što rezultira padom intracelularne pH vrijednosti. pK_a vrijednosti octene, mravlje i levulinske kiseline su redom 4,75 (25 °C), 3,75 (20 °C) (Weast, 1975-1976) i 4,66 (25 °C) (Soni i sur., 1982). Larsson i sur. (1999) utvrdili su razlike u učinku pojedinačnih alifatskih kiselina na rast kvasca *S. cerevisiae*. Inhibicijski učinak pojedine kiseline ovisi o selektivnoj permeabilnosti stanične membrane i toksičnosti anionskog oblika nastalog disocijacijom.

Predložena su dva mehanizma inhibicije alifatskim kiselinama (Russell, 1992). Nakon ulaska kiseline u citosol, stanica nastoji održati neutralan pH pumpanjem protona u izvanstanični prostor preko H^+ -ATPaze, na račun hidrolize ATP-a (slika 3). Dodatan utrošak energije dovodi do slabijeg rasta stanica. Pri višim koncentracijama kiseline, uslijed iznimno visoke potrebe za energijom, dolazi do iscrpljivanja zaliha ATP-a i acidifikacije citosola. Druga teorija temelji se na pretpostavci da je toksičnost alifatskih kiselina posljedica intracelularne akumulacije aniona. Naime, anionski oblik kiseline je hidrofilan i ne može slobodno prijeći kroz staničnu membranu. Radi postizanja ravnoteže, nedisocirana kiselina difundira u citosol stanice. Kako je ravnotežna koncentracija nedisocirane kiseline funkcija pH, stupanj akumulacije aniona bit će funkcija pH gradijenta kroz staničnu membranu (Russell, 1992). Visoke koncentracije aniona interferiraju s metabolizmom stanice. Primjerice, octena kiselina inhibira NADH dehidrogenazu (Zhao i sur., 2008) što onemogućuje odvijanje procesa oksidativne fosforilacije.



Slika 3. Migracija alifatskih kiselina kroz staničnu membranu uslijed pH gradijenta i odgovarajući stanični odgovor (prema Russell, 1991)

2.2. Proizvodnja mikrobnih lipida iz lignoceluloznih sirovina

Biodizel se smatra zanimljivom alternativom naftnom dizel gorivu zahvaljujući pozitivnim ekološkim karakteristikama. Proizvodi se transesterifikacijom, pri čemu po molu triacilglicerola nastaju tri mola alkilnih estera masnih kiselina (biodizel) i jedan mol glicerola (Kumar i sur., 2017). Tradicionalna proizvodnja biodizela iz jestivih biljnih ulja nailazi na određena ograničenja. Korištenje poljoprivrednih usjeva za proizvodnju goriva kao i sve veći globalni zahtjevi za energijom doveli su do potrebe za nalaženjem alternativnih izvora lipida. Značajan interes usmjeren je prema iskorištavanju lipida izoliranih iz mikrobne biomase. Oleaginozni mikroorganizmi imaju sposobnost akumulacije lipida, prvenstveno u formi triacilglicerola, sa sastavom masnih kiselina sličnim kao i u biljnim uljima (Kumar i sur., 2017). U usporedbi s tradicionalnom kultivacijom biljaka, uzgoj oleaginoznih mikroorganizama neovisan je o klimatskim uvjetima, ne utječe na cijene prehrambenih proizvoda i ne zahtijeva obradive poljoprivredne površine dok je proizvodnja lipida znatno brža. Budući da je cijena sirovine najveća prepreka komercijalizaciji biogoriva, poželjno je korištenje jeftinijih izvora ugljika. Lignocelulozne sirovine predstavljaju jeftine i lako dostupne sirovine za proizvodnju biodizela. Osnovni koraci mikrobne proizvodnje lipida iz lignoceluloznih sirovina su: predobrada sirovine, hidroliza celuloze, biosinteza i izolacija proizvoda.

2.2.1. Oleaginozni mikroorganizmi

Lipidi čine više od 20 % suhe tvari biomase oleaginoznih mikroorganizama (Xu i sur., 2013). Najzastupljenije masne kiseline su: miristinska (C14:0), palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1), linoleinska (C18:2) i linolenska (C18:3) (Ruan i sur., 2012). Sposobnost akumulacije lipida posjeduju neke vrste kvasca, plijesni, bakterija i algi (tablica 3). Sastav i sadržaj lipida variraju ovisno o vrsti. Sposobnost nakupljanja većih količina lipida čini mikroorganizam komercijalno zanimljivijim. Plijesan *Mortierella isabellina* potencijalni je kandidat za proizvodnju lipida na lignoceluloznim hidrolizatima zahvaljujući iznimnoj sposobnosti nakupljanja lipida i otpornosti prema inhibitorima (Ruan i sur., 2012).

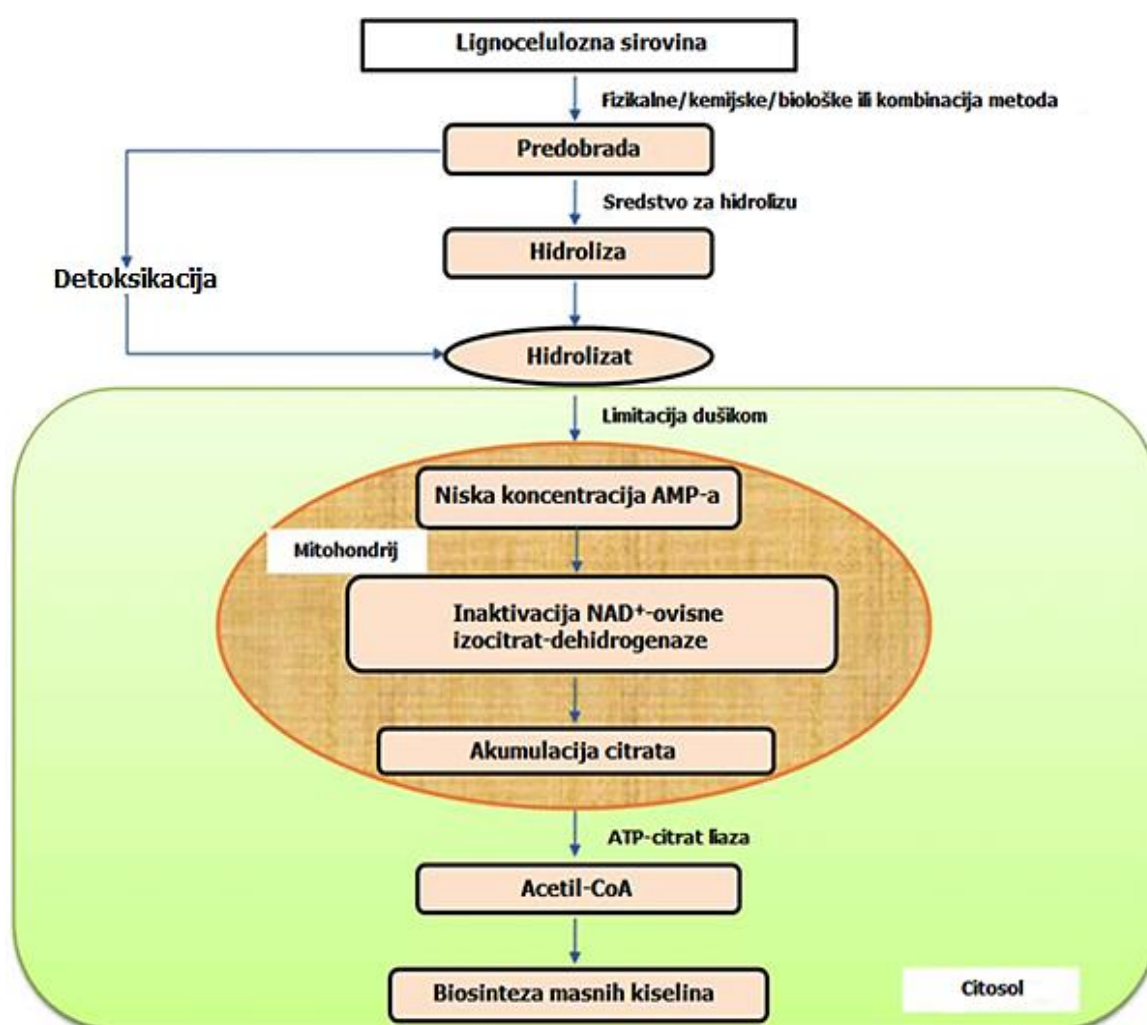
Tablica 3. Sadržaj lipida u suhoj tvari biomase nekih mikroorganizama (Meng i sur., 2009)

mikroorganizam	udio lipida (% s.tv.)	mikroorganizam	udio lipida (% s.tv.)
mikroalge		kvasci	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
bakterije		plijesni	
<i>Arthrobacter sp.</i>	>40	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38	<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Rhodococcus opacus</i>	24-25	<i>Humicola lanuginosa</i>	75
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24	<i>Mortierella vinacea</i>	66

2.2.2. Biosinteza mikrobnih lipida

Nakupljanje lipida u stanicama oleaginoznih mikroorganizama najčešće započinje u uvjetima limitacije izvorom dušika (slika 4) dok je izvor ugljika prisutan u suvišku što rezultira cijepanjem AMP-a u inozin monofosfat (IMP) i amonijeve ione pomoću enzima AMP-deaminaze (Akpınar-Bayazit, 2014). U takvim uvjetima amonijeve ioni stanici služe kao alternativni izvor dušika. Pad koncentracije AMP-a dovodi do smanjenja aktivnosti izocitrat-dehidrogenaze odgovorne za oksidativnu dekarboksilaciju izocitrata do α -ketoglutarata. Budući da se izocitrat ne može efikasno metabolizirati u citratnom ciklusu, dolazi do njegove akumulacije i izomerizacije u citrat. Citrat se iz mitohondrija transportira u citosol gdje se djelovanjem ATP-

citrat liaze cijepa na oksaloacetat i acetil-CoA koji je prekursor za sintezu masnih kiselina. Posjedovanje ATP citrat liaze ključni je faktor akumulacije lipida oleaginoznih mikroorganizama (Muniraj i sur., 2015). Oksaloacetat se reducira u malat koji se zatim, u reakciji kataliziranoj malatnim enzimom, oksidativno dekarboksilira u piruvat uz redukciju NADP^+ u NADPH. Biosinteza masnih kiselina odvija se u citosolu pomoću multienzimskog kompleksa sintaze masnih kiselina, pri čemu su potrebne znatne količine NADPH. Izvor NADPH osigurava upravo reakcija katalizirana malatnim enzimom. Po završetku sinteze, masne kiseline se esterificiraju s glicerolom.



Slika 4. Opća shema proizvodnje mikrobnih lipida na lignoceluloznim hidrolizatima (prema Kumar i sur., 2017)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Radni mikroorganizam

Radni mikroorganizam je kultura plijesni *Mortierella isabellina* iz zbirke mikroorganizama *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (Njemačka), soj UBC 129 (DSM No. 1414). Kultura je čuvana u hladnjaku na +4 °C.

3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

Za pripremu hranjivih podloga korištene su sirovine navedene u tablici 4.

Tablica 4. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

sirovina	proizvođač
glukoza	Kemika, Hrvatska
kvašćev ekstrakt	Carl Roth, Njemačka
diamonijev sulfat	Kemika, Hrvatska
kalijev dihidrogenfosfat	Kemika, Hrvatska
natrijev dihidrogenfosfat	Kemika, Hrvatska
magnezijev sulfat heptahidrat	Kemika, Hrvatska
kalcijev klorid dihidrat	Kemika, Hrvatska
željezov(III) klorid sekstahidrat	Kemika, Hrvatska
bakrov sulfat pentahidrat	Kemika, Hrvatska
cinkov sulfat heptahidrat	Merck, SAD
kobaltov nitrat monohidrat	Kemika, Hrvatska
manganov sulfat pentahidrat	Sigma-Aldrich, SAD
PDA agar	Becton Dickinson, USA
levulinska kiselina	Sigma-Aldrich, SAD
mravlja kiselina	Sigma-Aldrich, SAD

3.1.3. Ostale kemikalije

Kemikalije korištene u istraživanju prikazane su u tablici 5.

Tablica 5. Ostale kemikalije korištene u istraživanju

kemikalija	proizvođač
cinkov sulfat heptahidrat	Merck, SAD
etanol (96%)	Kemika, Hrvatska
kloroform	Macron Fine Chemicals, SAD
klorovodična kiselina	Kemika, Hrvatska
metanol	Kemika, Hrvatska
natrijev klorid	Kemika, Hrvatska
fosforna kiselina	Sigma-Aldrich, SAD
Tween 80	Merck, SAD

3.1.4. Hranjiva podloga za uzgoj plijesni u tikvicama

Proveden je šaržni uzgoj plijesni *M. isabellina* u tekućim hranjivim podlogama s glukozom kao izvorom ugljika. U tablici 6 prikazan je sastav hranjivih podloga. U podloge je nakon sterilizacije dodan inhibitor u odgovarajućoj koncentraciji (tablica 7).

Tablica 6. Sastav hranjivih podloga za uzgoj plijesni u tikvicama

sastojak	koncentracija [g L ⁻¹]
glukoza	50
kvašćev ekstrakt	1
diamonijev sulfat	0,41
kalijev dihidrogenfosfat	7
natrijev dihidrogenfosfat	2
magnezijev sulfat heptahidrat	1,5
kalcijev klorid dihidrat	0,1
željezov(III) klorid sekstahidrat	0,008
bakrov sulfat pentahidrat	0,001
cinkov sulfat heptahidrat	0,001
kobaltov nitrat monohidrat	0,001
manganov sulfat pentahidrat	0,001

Tablica 7. Koncentracije pojedinog inhibitora u tekućim hranjivim podlogama

levulinska kiselina [g L ⁻¹]	mravlja kiselina [g L ⁻¹]
0,555	0,05
1,111	0,1
1,665	0,15
2,222	0,2
3,33	0,3
4,44	0,4
5,55	0,5
6,0	0,6

3.1.5. Oprema i aparatura

3.1.5.1. Centrifuge

Za izdvajanje biomase plijesni iz prevrele hranjive podloge korištena je centrifuga Thermo Scientific SL 8 R (Thermo Fisher Scientific, SAD) (slika 5). Uzorci su centrifugirani u Falcon kivetama od 50 mL. Tijekom pripreme uzoraka za HPLC analizu korištena je centrifuga HC-240 (Tehtnica Železniki, Slovenija) i Eppendorf epruvete od 1,5 mL.

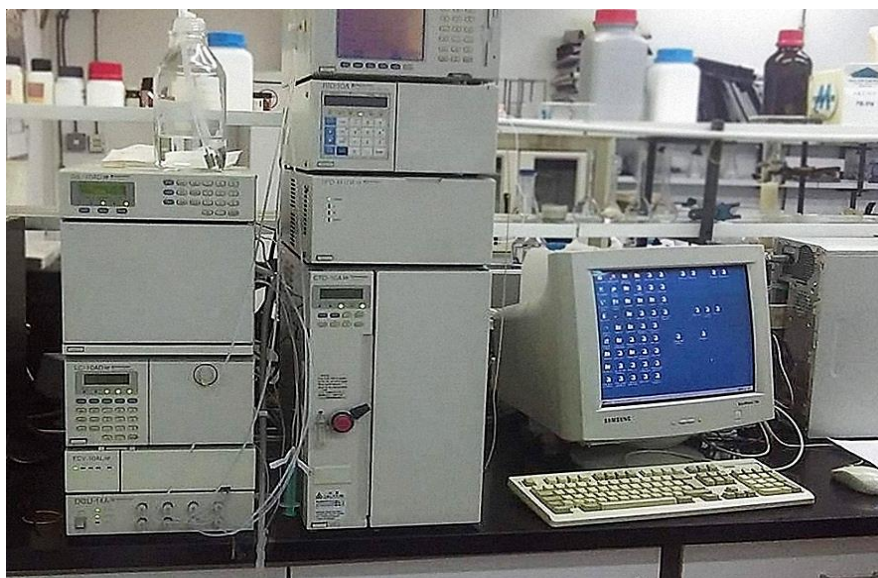


Slika 5. Laboratorijska centrifuga Thermo Scientific SL 8 R (vlastita fotografija)

3.1.5.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)

Nakon centrifugiranja prevrele hranjive podloge, u supernatantu je određena koncentracija neprevrele glukoze pomoću HPLC uređaja Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP}

(Shimadzu, Japan) (slika 6). Uređaj se sastoji od pumpe (LC-10ADVP), otplinjača (DGU-14A), automatskog injektora (SIL-10ADVP), uređaja za grijanje kolone (CTO-10A VP), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm I.D., 9 μm; Sigma-Aldrich, SAD) s predkolonom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm I.D., 9 μm; Sigma-Aldrich, SAD), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10A VP) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10).



Slika 6. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} (vlastita fotografija)

3.1.5.3. Ostala oprema i aparatura

Uz navedenu opremu, laboratorijski pribor i posuđe, u ovom istraživanju korištena je oprema prikazana u tablici 8.

Tablica 8. Ostala oprema i aparatura

oprema	proizvođač
laboratorijska tresilica	B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka
autoklav	Sutjeska, Jugoslavija
tehnička vaga	Tehnica Železniki, Slovenija
analitička vaga	Sartorius, Njemačka
sušionik	Instrumentaria, Hrvatska
vortex mikser	Boeco, Njemačka
pH metar	Metrohm AG, Švicarska

3.2. Metode

3.2.1 Uzgoj spora plijesni *M. isabellina*

Plijesan *M. isabellina* kultivirana je na kosom PDA agaru tjedan dana pri temperaturi od 28 °C. Spore plijesni sastrugane su s površine podloge i resuspendirane uz dodatak otopine Tween 80 koncentracije 1 g L⁻¹. Nakon filtracije kroz sterilnu gazu, spore su pohranjene u hladnjaku na -20 °C. Broj spora po mililitru suspenzije određen je brojanjem u Thoma-ovoj komorici.

3.2.2. Uzgoj plijesni *M. isabellina* u tikvicama

Uzgoj je proveden u Erlenmeyerovim tikvicama od 300 mL koje su sadržavale 50 mL hranjive podloge istog sastava. Pripremljene su po dvije tikvice za svaku odabranu koncentraciju inhibitora (slika 7) i kontrolna podloga koja nije sadržavala inhibitor. Hranjivim podlogama je pH namješten na 5,0 dodatkom 1 M klorovodične kiseline. Tikvice s podlogama sterilizirane su u autoklavu pri temperaturi od 121 °C tijekom 20 min. U ohlađene hranjive podloge dodan je inhibitor u odgovarajućoj koncentraciji, a zatim su podloge inokulirane s 10⁷ spora plijesni *M. isabellina*. Uzgoj je proveden na tresilici pri temperaturi od 28 °C i 120 o min⁻¹, u trajanju od 7 dana. Po završetku uzgoja kultura je centrifugirana 20 min pri 7900 o min⁻¹. Vlažna biomasa podvrgnuta je sušenju, a supernatanti su pohranjeni na -20 °C do analize.



Slika 7. Tikvice s biomasom plijesni uzgojenom pri različitim koncentracijama mravlje kiseline (vlastita fotografija)

3.2.3. Analitičke metode

3.2.3.1. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase gravimetrijski

Nakon centrifugiranja talog biomase plijesni osušen je u sušioniku pri 50 °C do konstantne mase. Masa suhe tvari biomase izračunata je iz razlike mase kiveta nakon sušenja i praznih kiveta:

$$m_X = m_{\text{pune kivete}} - m_{\text{prazne kivete}} \text{ [g]} \quad [1]$$

Koncentracija suhe tvari biomase izračunata je prema izrazu:

$$X = \frac{m_X}{V_p} \text{ [g L}^{-1}\text{]} \quad [2]$$

gdje je:

V_p – volumen podloge [L]

Sadržaj vlage u osušenom uzorku biomase određen je gravimetrijski sušenjem uzorka pri temperaturi od 105 °C do konstantne mase. Udio vlage u biomasi iznosio je približno 3 %. Izračunata vrijednost mase biomase plijesni korigirana je za sadržaj vlage.

3.2.3.2. Određivanje koncentracije glukoze tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Za određivanje koncentracije glukoze nakon završetka uzgoja u tikvicama korišten je uređaj Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP}. Dijelovi uređaja navedeni su u poglavlju 3.1.5.2.

3.2.3.2.1. Priprema uzoraka za HPLC analizu

Nakon separacije biomase plijesni sačuvani su supernatanti iz svake tikvice te je za HPLC analizu izuzeto po 750 µL uzorka i prebačeno u Eppendorf epruvete. Uzorcima je dodano 750 µL 10%-tne otopine cinkovog sulfata u svrhu taloženja proteina. Smjesa je homogenizirana pomoću vortex miksera. Nakon 30 min provedeno je centrifugiranje pri 10000 g u trajanju od 10 min. 150 µL dobivenog supernatanta razrijeđeno je 10x. Prije analize uzorci su filtrirani kroz filter s porama promjera 0,2 µm (CHROMAFIL®, PA-20/25; Macherey-Nagel, Njemačka).

3.2.3.2.2. HPLC analiza

Za pripremu otopina korištena je redestilirana voda čija je vodljivost iznosila manje od 1 µS. Kao pokretna faza korištena je otopina H₃PO₄ (0,1 % vol/vol) u vodi. Po 20 µL svakog uzorka injektirano je i propušteno kroz kolonu pri temperaturi od 55 °C i brzini protoka pokretne faze 0,5 mL min⁻¹.

Nakon analize izvršena je integracija dobivenih kromatograma pomoću računalnog programa CLASS-VP v6.10. Koncentracija glukoze u uzorcima određena je iz jednadžbe baždarnog pravca za standard glukoze. Baždarni dijagram prikazan je u prilogu 7.1.

3.2.3.3. Određivanje udjela lipida

U svrhu određivanja udjela lipida biomasa plijesni *M. isabellina* hidrolizirana je dodatkom klorovodične kiseline te je potom provedena ekstrakcija lipida smjesom otapala kloroform/metanol. Osušena biomasa prethodno je usitnjena u tarioniku u cilju povećanja učinkovitosti hidrolize biomase i ekstrakcije lipida.

3.2.3.3.1. Kiselinska hidroliza biomase

U staklene viala odvagano je po 100 mg usitnjene biomase plijesni. Odvagama je dodan 1 mL 4M klorovodične kiseline te je sadržaj promiješan pomoću votrex miksera. Uzorci su inkubirani 30 min pri sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje. Potom je smjesa zagrijavana 10 min u kipućoj vodi nakon čega su uzorci ohlađeni u ledenoj kupelji.

3.2.3.3.2. Ekstrakcija lipida

Hidrolizatima je dodano po 2 mL smjese otapala kloroform/metanol (1:1, v/v), a potom je sadržaj intenzivno miješan na vortex mikseru tijekom 5 min. Ekstrakcija ukupnih staničnih lipida provedena je preko noći na tresilici pri 120 o min^{-1} . Nakon odvajanja faza (slika 8), donja kloroformska faza, koja sadrži ekstrahirane lipide, prenijeta je pomoću injekcijske igle u čistu staklenu vialu.



Slika 8. Uzorak nakon ekstrakcije (vlastita fotografija)

Zaostali proteini u ekstraktu istaloženi su dodatkom jednakog volumena 0,1 % otopine NaCl te je smjesa homogenizirana pomoću vortex miksera tijekom 1 min. Pomoću injekcijske igle ponovo je izdvojena donja kloroformska faza i prenijeta u suhu, prethodno izvaganu staklenu epruvetu. Kloroform je iz uzoraka uklonjen propuhivanjem s plinovitim dušikom.

3.2.3.3.3. Izračun udjela lipida

Uzorci su osušeni u sušioniku pri temperaturi od 60 °C do konstantne mase. Vaganjem na analitičkoj vagi izmjerena je masa epruveta s lipidima. Udio lipida u biomasi izračunat je prema sljedećem izrazu:

$$w_L = \frac{L}{X} \cdot 100 \text{ [%]} \quad [3]$$

$$L = \frac{m_{el} - m_{ep}}{V_p} \text{ [g L}^{-1}\text{]} \quad [4]$$

gdje su:

m_{el} - masa epruvete s lipidima nakon sušenja [g]

m_{ep} - masa prazne epruvete [g]

L - koncentracija lipida

3.2.4. Pokazatelji uspješnosti bioprocesa

Koeficijent konverzije supstrata u biomasu izračunat je iz omjera koncentracija prirasle biomase i supstrata utrošenog tijekom bioprocesa:

$$Y_{X_{bl}/S} = \frac{X_{bl}}{S_0 - S} \text{ [g g}^{-1}\text{]} \quad [5]$$

gdje su:

X_{bl} - koncentracija biomase bez lipida na kraju uzgoja [g L⁻¹]

S_0 - koncentracija supstrata na početku uzgoja [g L⁻¹]

S - koncentracija supstrata na kraju uzgoja [g L⁻¹]

Koeficijent konverzije supstrata u lipide predstavlja omjer koncentracija sintetiziranih lipida i supstrata utrošenog tijekom bioprocesa:

$$Y_{L/S} = \frac{L}{S_0 - S} \text{ [g g}^{-1}\text{]} \quad [6]$$

Produktivnost nastajanja biomase ($Pr_{x_{bl}}$) i produktivnost sinteze lipida (Pr_L) izračunate su prema sljedećim jednadžbama:

$$Pr_{x_{bl}} = \frac{x_{bl}}{t_u} \text{ [g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}] \quad [7]$$

$$Pr_L = \frac{L}{t_u} \text{ [g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}] \quad [8]$$

gdje je:

t_u - vrijeme trajanja uzgoja [h]

Efikasnost bioprocesa izračunata je iz omjera stvarnog i teorijskog koeficijenta konverzije glukoze u lipide:

$$E = \frac{Y_{L/S_{stv}}}{Y_{L/S_{teor}}} \cdot 100 \text{ [%]} \quad [9]$$

gdje su:

$Y_{L/S_{stv}}$ - stvarni koeficijent konverzije glukoze u lipide [g g^{-1}]

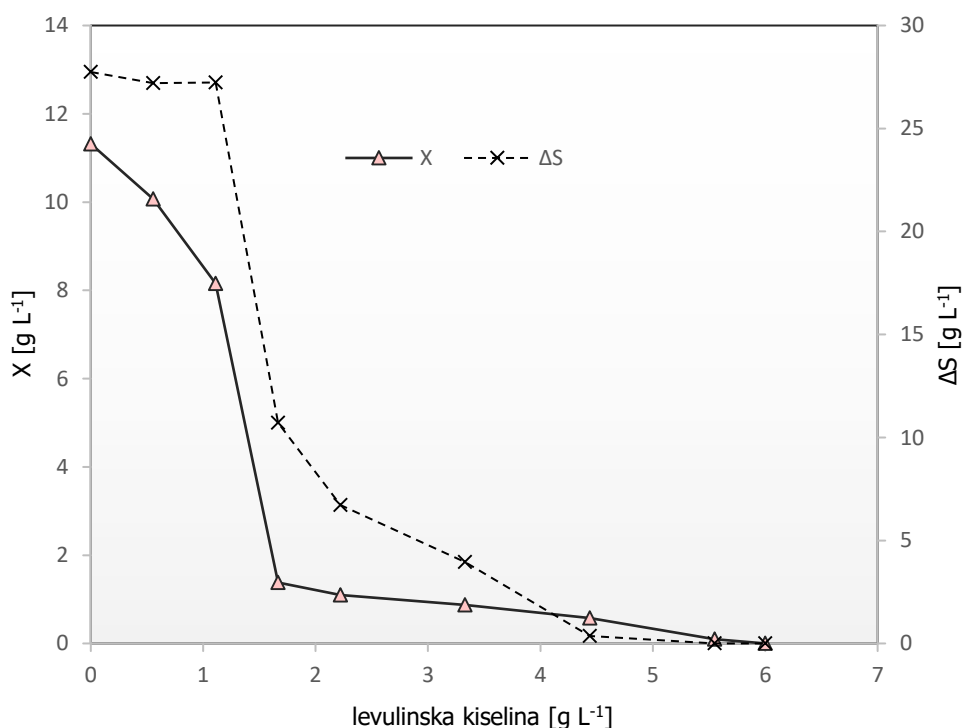
$Y_{L/S_{teor}}$ - teorijski koeficijent konverzije glukoze u lipide [g g^{-1}]

Teorijski koeficijent konverzije glukoze u lipide iznosi $0,32 \text{ g g}^{-1}$ (Jin i sur., 2015).

4. REZULTATI I RASPRAVA

S ciljem istraživanja utjecaja alifatskih kiselina (mravlja i levulinska kiselina) na rast i nakupljanje lipida u plijesni *M. isabellina* proveden je submerzni uzgoj u tikvicama. Tikvice su sadržavale hranjive podloge istog sastava, s glukozom kao izvorom ugljika (50 g L^{-1}), kojima je nakon sterilizacije dodana pojedina kiselina. Pripremljene podloge inokulirane su sa sporama te je proveden uzgoj na tresilici u trajanju od 7 dana. Po završetku uzgoja određena je koncentracija biomase, sadržaj lipida i utrošak supstrata te su na temelju rezultata izračunati koeficijenti pretvorbe supstrata u biomasu i lipide, produktivnost sinteze biomase i lipida i efikasnost bioprocesa.

Istraživanje učinka levulinske kiseline na plijesan *M. isabellina* provedeno je pri koncentracijama kiseline u rasponu od 0 do 6 g L^{-1} . S porastom koncentracije kiseline dolazi do pada koncentracije biomase u podlozi (slika 9). Maksimalna koncentracija biomase postignuta je u uvjetima bez prisutnosti inhibitora i iznosila je $11,3189 \text{ g L}^{-1}$. Značajan inhibicijski učinak uočen je pri koncentracijama levulinske kiseline većim od $1,111 \text{ g L}^{-1}$, dok je pri koncentracijama iznad $5,55 \text{ g L}^{-1}$ nastupila potpuna inhibicija rasta plijesni. Koncentracija zaostale glukoze u podlogama rasla je s koncentracijom kiseline, sukladno slabijem rastu biomase.



Slika 9. Učinak različitih koncentracija levulinske kiseline na rast biomase i utrošak supstrata. X - koncentracija biomase; ΔS - utrošak glukoze

Utjecaj levulinske kiseline na biosintezu lipida prikazan je u tablici 9. Pri koncentraciji levulinske kiseline od 0,555 g L⁻¹ nije zabilježen inhibicijski učinak na akumulaciju lipida. Pri istoj koncentraciji postignut je maksimalan udio lipida u biomasi koji je iznosio 32,56 %. Slično kao i u slučaju koncentracije biomase plijesni, povećanjem koncentracije kiseline iznad 1,111 g L⁻¹ dolazi do smanjenja udjela lipida u biomasi. Koncentracija i udio lipida pri koncentracijama levulinske kiseline od 4,44 i 5,55 g L⁻¹ nisu određeni zbog nedostatne mase biomase za analizu. Zeng i sur. 2013. godine proveli su sličan eksperiment u kojem je kao izvor ugljika korištena ksiloza. Suprotno rezultatima ovog rada, levulinska kiselina pokazala je stimulirajući učinak na rast biomase plijesni *M. isabellina*. Maksimalna koncentracija biomase postignuta je pri koncentraciji kiseline od 8 g L⁻¹.

Tablica 9. Učinak različitih koncentracija levulinske kiseline na biosintezu lipida

levulinska kiselina [g L ⁻¹]	L [g L ⁻¹]	w _L [%]
0	3,022	26,70
0,555	3,279	32,56
1,111	2,339	28,67
1,665	0,226	16,36
2,222	0,206	18,79
3,33	0,136	15,58
4,44	-	-
5,55	-	-

L – koncentracija lipida; w_L – udio lipida u biomasi

Tablica 10 prikazuje vrijednosti koeficijenata konverzije supstrata u biomasu i lipide, produktivnost nastajanja biomase i lipida te efikasnost procesa biosinteze lipida u podlogama koje su sadržavale različite koncentracije levulinske kiseline. S porastom koncentracije levulinske kiseline u podlogama, koeficijent konverzije supstrata u biomasu se smanjuje što je u skladu s prethodno navedenim rezultatima. Produktivnost nastajanja biomase maksimalna je kada u podlozi nije prisutan inhibitor (kontrolna podloga). Vrijednost koeficijenta konverzije supstrata u lipide pri koncentraciji kiseline od 0,555 g L⁻¹ (0,1206 g g⁻¹) slična je vrijednosti za kontrolnu podlogu (0,1089 g g⁻¹) što upućuje da inhibicija biosinteze lipida nastupa pri većim koncentracijama. Produktivnost i efikasnost biosinteze lipida značajno su niže pri

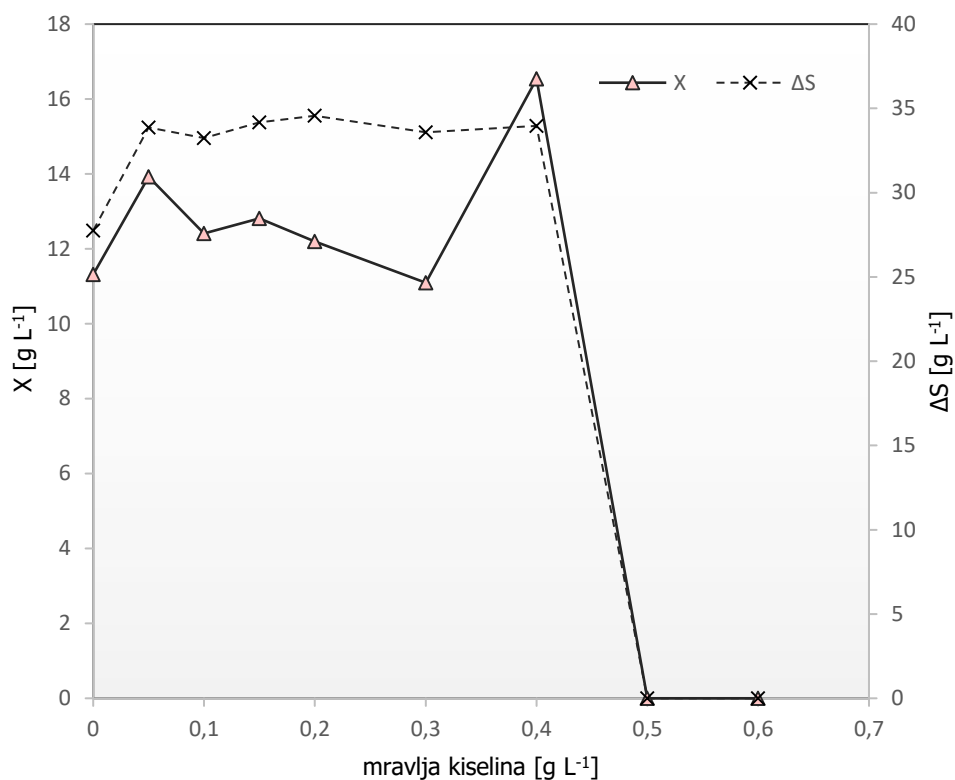
koncentracijama kiseline iznad 1,111 g L⁻¹ što je posljedica slabije proizvodnje lipida uslijed inhibicije rasta mikroorganizma i enzima metaboličkih puteva uključenih u biosintezu lipida.

Tablica 10. Pokazatelji uspješnosti bioprocesa u prisutnosti levulinske kiseline

levulinska kiselina [g L ⁻¹]	Y _{x_{bl}/S} [g g ⁻¹]	Y _{L/S} [g g ⁻¹]	Pr _{x_{bl}} [g L ⁻¹ dan ⁻¹]	Pr _L [g L ⁻¹ dan ⁻¹]	E [%]
0	0,2991	0,1089	1,185	0,432	34,04
0,555	0,2497	0,1206	0,970	0,468	37,68
1,111	0,2137	0,0859	0,831	0,334	26,84
1,665	0,1079	0,0211	0,165	0,032	6,59
2,222	0,1324	0,0307	0,127	0,029	9,58
3,33	0,1861	0,0344	0,105	0,019	10,73
4,44	-	-	-	-	-
5,55	-	-	-	-	-

Y_{x_{bl}/S} - koeficijent konverzije supstrata u biomasu bez lipida; Y_{L/S} - koeficijent konverzije supstrata u lipide; Pr_{x_{bl}} - produktivnost nastajanja biomase bez lipida; Pr_L - produktivnost biosinteze lipida; E - efikasnost biosinteze lipida

Koncentracija mravlje kiseline u podlogama iznosila je 0 - 0,6 g L⁻¹. Ustanovljeno je da ova kiselina pri nižim koncentracijama pozitivno djeluje na rast biomase plijesni i biosintezu lipida (slika 10, tablica 11). Maksimalna koncentracija biomase postignuta je pri koncentraciji kiseline od 0,4 g L⁻¹ i iznosila je 17,048 g L⁻¹, što je 46 % više u odnosu na podlogu bez inhibitora (kontrolna podloga). Zeng i sur. (2013) navode da je maksimalan rast biomase plijesni *M. isabellina* ostvaren pri 2 g L⁻¹ mravlje kiseline. Huang i sur. 2012. godine zaključili su da koncentracije mravlje kiseline ispod 0,7 g L⁻¹ stimuliraju akumulaciju lipida i rast stanica oleaginoznog kvasca *Trichosporon fermentas*. Povećanje potrošnje glukoze s porastom koncentracije kiseline u skladu je s većim zahtjevima za energijom uslijed pojačanog rasta biomase. Pri koncentracijama mravlje kiseline od 0,5 i 0,6 g L⁻¹ nije zabilježen rast biomase plijesni *M. isabellina*. Očito je da pri koncentracijama većim od 0,4 g L⁻¹ nastupa nagla inhibicija rasta.



Slika 10. Učinak različitih koncentracija mravlje kiseline na rast biomase i utrošak supstrata.
X - koncentracija biomase; ΔS - utrošak glukoze

Tablica 11. Učinak različitih koncentracija mravlje kiseline na biosintezu lipida

mravlja kiselina [g L ⁻¹]	L [g L ⁻¹]	w _L [%]
0	3,022	26,70
0,05	4,694	33,72
0,1	4,496	36,23
0,15	4,610	35,98
0,2	4,346	35,63
0,3	4,322	38,94
0,4	5,907	35,72

Maksimalan udio lipida u biomasi (38,94 %) zabilježen je pri 0,3 g L⁻¹ mravlje kiseline. Pojačana biosinteza lipida u prisutnosti inhibitora u korelaciji je s tendencijom za održavanjem neutralnog intracelularnog pH prilikom difuzije kiseline u stanicu. Kao što je opisano u poglavlju 2.1.3.1., disocijacijom alifatskih kiselina u citosolu nastaju protoni koji se transportiraju u izvanstanični prostor preko H⁺-ATPaze pri čemu dolazi do porasta potrebe za ATP-om u stanici. Sličan pozitivan učinak mravlje kiseline na rast i sintezu lipida uočen je i kod drugih oleaginoznih mikroorganizama, kvasaca *Trichosporon cutaneum* i *Rhodospiridium toruloides* te plijesni *Umbelopsis isabellina* (Liu i sur., 2017; Wang i sur., 2016). Mravlja kiselina služila je kao izvor ugljika za rast i nastajanje energije. Pomoću format dehidrogenaze mravlja kiselina se oksidira u ugljikov dioksid uz nastajanje NADH, kojeg stanica koristi za sintezu ATP-a. Tijekom eksponencijalne faze rasta, u suhoj tvari biomase plijesni *U. isabellina*, uzgajane u podlozi koja je uz glukozu sadržavala i mravlju kiselinu, izmjerena je znatno viša koncentracija NADH nego tijekom uzgoja u podlozi koja je sadržavala isključivo glukozu. Osim kao izvor energije, mravlja kiselina služi i kao prekursor u biosintezi aminokiselina serina i metionina (Liu i sur., 2017).

Tablica 12 prikazuje vrijednosti koeficijenata konverzije supstrata u biomasu i lipide, produktivnost nastajanja biomase i lipida te efikasnost procesa biosinteze lipida u podlogama koje su sadržavale različite koncentracije mravlje kiseline.

Tablica 12. Pokazatelji uspješnosti bioprocesa u prisutnosti mravlje kiseline

mravlja kiselina [g L ⁻¹]	Y _{xbl/s} [g g ⁻¹]	Y _{L/s} [g g ⁻¹]	Pr _{xbl} [g L ⁻¹ dan ⁻¹]	Pr _L [g L ⁻¹ dan ⁻¹]	E [%]
0	0,2991	0,1089	1,185	0,432	34,04
0,05	0,2726	0,1386	1,318	0,671	43,33
0,1	0,2381	0,1353	1,131	0,642	42,27
0,15	0,2401	0,1349	1,172	0,659	42,17
0,2	0,2272	0,1257	1,122	0,621	39,30
0,3	0,2018	0,1287	0,968	0,617	40,21
0,4	0,3129	0,1739	1,519	0,844	54,35

Vrijednosti koeficijenata konverzije supstrata u biomasu nisu se značajno mijenjale s porastom koncentracije kiseline. Maksimalna vrijednost ($0,3129 \text{ g g}^{-1}$) ostvarena je pri koncentraciji mravlje kiseline od $0,4 \text{ g L}^{-1}$. Sličan trend pokazuju vrijednosti koeficijenata konverzije supstrata u mikrobne lipide, sukladno prethodnom zaključku da mravlja kiselina pri nižim koncentracijama pospješuje nakupljanje lipida u plijesni *M. isabellina*. Efikasnost biosinteze lipida u prisutnosti kiseline veća je $5,26 - 20,31 \%$ u odnosu na kontrolnu podlogu. Maksimalne vrijednosti produktivnosti nastajanja biomase ($1,519 \text{ g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$) i sinteze lipida ($0,844 \text{ g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$) postignute su pri koncentraciji kiseline od $0,4 \text{ g L}^{-1}$.

Niska pH vrijednost podloge uzrokuje zaustavljanje proliferacije i smanjenje vijabilnosti stanica (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000b). Naime, pri većim koncentracijama kiseline smanjuje se pH vrijednost podloge uslijed čega dolazi do porasta koncentracije nedisociranog oblika kiseline. U usporedbi s disociranom formom, nedisocirana kiselina lakše prolazi kroz staničnu membranu. U citosolu stanice dolazi do disocijacije kiseline i pada intracelularne pH vrijednosti. Nastali protoni transportiraju se u izvanstanični prostor uz utrošak ATP-a. Iscrpljivanje energetskih zaliha stanice pri visokim koncentracijama kiseline dovodi do acidifikacije citosola i potpune inhibicije rasta. Budući da koncentracija nedisocirane kiseline ovisi o pH, potrebno je praćenje pH vrijednosti hranjive podloge tijekom bioprocesa. Anioni nastali disocijacijom kiseline su hidrofilni zbog čega dolazi do njihovog nakupljanja u citosolu. Smatra se da akumulirani anioni ometaju stanični metabolizam (Zhao i sur., 2008).

Inhibicijski učinak mravlje kiseline veći je u odnosu na levulinsku kiselinu. Rast biomase plijesni i biosinteza lipida potpuno su inhibirani pri $0,5 \text{ g L}^{-1}$ mravlje te 6 g L^{-1} levulinske kiseline. pK_a vrijednost mravlje kiseline niža je od pK_a vrijednosti levulinske kiseline što upućuje da će pri istoj pH vrijednosti koncentracija nedisociranog oblika mravlje kiseline biti manja u odnosu na levulinsku kiselinu. Iako nedisocirana kiselina lakše difundira u stanicu, utvrđeno je da i veličina molekule bitno utječe na prijenos tvari kroz staničnu membranu. Mravlja kiselina je manje hidrofobna od levulinske kiseline, no lakše difundira kroz staničnu membranu upravo zahvaljujući manjoj veličini molekule. Osim toga, pretpostavlja se da je anionski oblik mravlje kiseline toksičniji, međutim, mehanizam njegovog djelovanja u stanici još je nepoznat (Larsson i sur., 1999).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti:

1. Levulinska i mravlja kiselina inhibiraju rast plijesni *Mortierella isabellina* i smanjuju prinos lipida. Koncentracije levulinske kiseline do $1,111 \text{ g L}^{-1}$ i mravlje kiseline do $0,4 \text{ g L}^{-1}$ imaju slab inhibicijski učinak na rast plijesni i akumulaciju proizvoda.
2. Pri koncentraciji levulinske kiseline od 6 g L^{-1} i mravlje kiseline od $0,5 \text{ g L}^{-1}$ rast stanica i biosinteza lipida u potpunosti su inhibirani.
3. Inhibicijski učinak mravlje kiseline na rast radnog mikroorganizma i biosintezu lipida značajno je izraženiji nego u prisutnosti levulinske kiseline.

6. POPIS LITERATURE

- Akpınar-Bayazit A. (2014) Fungal Lipids: The Biochemistry of Lipid Accumulation. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* **5**: 409-414
- Alonso D. M., Wettstein S. G, Dumesic J. A. (2012) Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. *Chemical Society Reviews* **41**: 8075-8098.
- Azocar L., Ciudad G., Heipieper H.J., Navia R. (2010) Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. *Applied Microbiology and Biotechnology* **88**: 621-636.
- Bajpai P. (2016) Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production, Springer. str 8.
- Béguin P., Aubert J. P. (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews* **13**: 25-58.
- Campbell C. J. (2006) The Rimini Protocol, an oil depletion protocol: Heading off economic chaos and political conflict during the second half of the age of oil. *Energy Policy* **34**: 1319-1325.
- Cherrington C. A., Hinton M., Chopra I. (1990) Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in Escherichia coli. *Journal of Applied Bacteriology* **68**: 69-74.
- Demirbaş, A. (2005) Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy Sources* **27**: 327-337.
- Galbe M., Zacchi G. (2007) Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **108**: 41-65.
- Hadi S. M., Shahabuddin, Rehman A. (1989) Specificity of the interaction of furfural with DNA. *Mutation Research Letters* **225**: 101-106.
- Heipieper H. J., Weber F. J., Sikkema J., Keweloh H., de Bont J. A. M. (1994) Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnology* **12**: 409-415.
- Hendriks A. T. W. M., Zeeman G. (2008) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **100**: 10-18.
- Huang C., Wu H., Liu Z. J., Cai J., Lou W. Y., Zong M. H. (2012) Effect of organic acids on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Trichosporon fermentans*. *Biotechnology for Biofuels* **5**: 4-16

- Ibraheem O., Ndimba B. K. (2013) Molecular Adaptation Mechanisms Employed by Ethanologenic Bacteria in Response to Lignocellulose-derived Inhibitory Compounds. *International Journal of Biological Sciences* **9**: 598-612.
- Ivančić Šantek M., Miškulin E., Beluhan S., Šantek B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kemija u industriji* **65**: 25-38.
- Jarboe L. R. (2011) YqhD: a broad-substrate range aldehyde reductase with various applications in production of biorenewable fuels and chemicals. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**: 249-257.
- Jin M., Slininger P. J., Dien B. S., Waghmode S., Moser B. R., Orjuela A., da Costa Sousa L., Balan V. (2015) Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. *Trends in Biotechnology* **33**: 43-54
- Jönsson L. J., Alriksson B., Nilvebrant N. O. (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels* **6**: 16-26.
- Jönsson L. J., Martín C. (2016) Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology* **199**: 103-112.
- Jørgensen H., Kristensen J. B., Felby C. (2007) Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **1**: 119-134.
- Knauf M., Moniruzzaman M. (2004) Lignocellulosic biomass processing: a perspective. *International Sugar Journal* **106**: 147-150.
- Kumar D., Singh B., Korstad J. (2017) Utilization of lignocellulosic biomass by oleaginous yeast and bacteria for production of biodiesel and renewable diesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **73**: 654-671.
- Kumar P., Barrett D. M., Delwiche M. J., Stroeve P. (2009) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **48**: 3713-3729.
- Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tengborg C., Stenberg K., Zacchi G., Nilvebrant N. O. (1999) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology* **24**: 151-159.
- Limayem A., Ricke S. C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science* **38**: 449-467.

- Liu Z., Oyetunde T., Hollinshead W. D., Hermanns A., Tang Y. J., Liao W., Liu Y. (2017) Exploring eukaryotic formate metabolisms to enhance microbial growth and lipid accumulation. *Biotechnology for Biofuels* **10**: 22-31.
- McMillan J. D. (1994) Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *American Chemical Society* **566**: 292-324.
- Meng X., Yang J., Xu X., Zhang L., Nie Q., Xian M. (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy* **34**: 1-5
- Mikulášová M., Vodný Š., Pekarovičová A. (1990) Influence of phenolics on biomass production by *Candida utilis* and *Candida albicans*. *Biomass* **23**: 149-154.
- Miller E. N., Jarboe L. R., Turner P. C., Pharkya P., Yomano L. P., York S. W., Nunn D., Shanmugam K. T., Ingram I. O. (2009). Furfural inhibits growth by limiting sulfur assimilation in ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 6132–6141.
- Mills T. Y., Sandoval N. R., Gill R. T. (2009) Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels* **2**: 26-37.
- Mitchell V. D., Taylor C. M., Bauer S. (2013) Comprehensive Analysis of Monomeric Phenolics in Dilute Acid Plant Hydrolysates. *BioEnergy Research* **7**: 654-669.
- Modig T., Lidén G., Taherzadeh M. J. (2002) Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal* **363**: 769–776.
- Muniraj I. K., Uthandi S. K., Hu Z., Xiao L., Zhan X. (2015) Microbial lipid production from renewable and waste materials for second-generation biodiesel feedstock. *Environmental Technology Reviews* **4**: 1-16
- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000a) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology* **74**: 17-24.
- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000b) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* **74**: 25-33
- Pampulha M. E., Loureiro-Dias M. C. (1989) Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* **31**: 547-550.

- Piotrowski J. S., Zhang Y., Bates D. M., Keating D. H., Sato T. K., Ong I. M., Landick R. (2014) Death by a thousand cuts: the challenges and diverse landscape of lignocellulosic hydrolysate inhibitors. *Frontiers in Microbiology* **5**: 90-98.
- Ruan Z., Hollinshead W., Isaguirre C., Tang Y.J., Liao W., Liu Y. (2015) Effects of inhibitory compounds in lignocellulosic hydrolysates on *Mortierella isabellina* growth and carbon utilization. *Bioresource Technology* **183**: 18-24.
- Ruan Z., Zanotti M., Wang X., Ducey C., Liu Y. (2012) Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. *Bioresource Technology* **110**: 198-205
- Russell J. B. (1991) Resistance of *Streptococcus bovis* to acetic acid at low pH: relationship between intracellular pH and anion accumulation. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 255-259.
- Russell J. B. (1992) Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *Journal of Applied Bacteriology* **73**: 363-370
- Soni M. L., Meehrotra R. N., Kapoor R. C. (1982) Dissociation constant and some thermodynamic parameters of levulinic acid. *Indian Journal of Chemistry* **21**: 196-197.
- Sorek N., Yeats T. H., Szemenyei H., Youngs H., Somerville C. R. (2014) The Implications of Lignocellulosic Biomass Chemical Composition for the Production of Advanced Biofuels. *BioScience* **64**: 192-201.
- Wang J., Gao Q., Zhang H., Bao J. (2016) Inhibitor degradation and lipid accumulation potentials of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* using lignocellulose feedstock. *Bioresource Technology* **218**: 892-901.
- Weast R. C. (1975-1976) Handbook of Chemistry and Physics, 56. izd., CRC Press.
- Welker C., Balasubramanian V., Petti C., Rai K., DeBolt S., Mendu, V. (2015) Engineering Plant Biomass Lignin Content and Composition for Biofuels and Bioproducts. *Energies* **8**: 7654-7676.
- Ximenes E., Kim Y., Mosier N., Dien B., Ladisch M. (2011) Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology* **48**: 54-60.
- Xu J., Du W., Zhao X., Zhang G., Liu D. (2013) Microbial oil production from various carbon sources and its use for biodiesel preparation. *Biofuels Bioproducts and Biorefining* **7**: 65-77.
- Zaldivar J., Ingram L. O. (1999) Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnology and Bioengineering* **66**: 203-210.

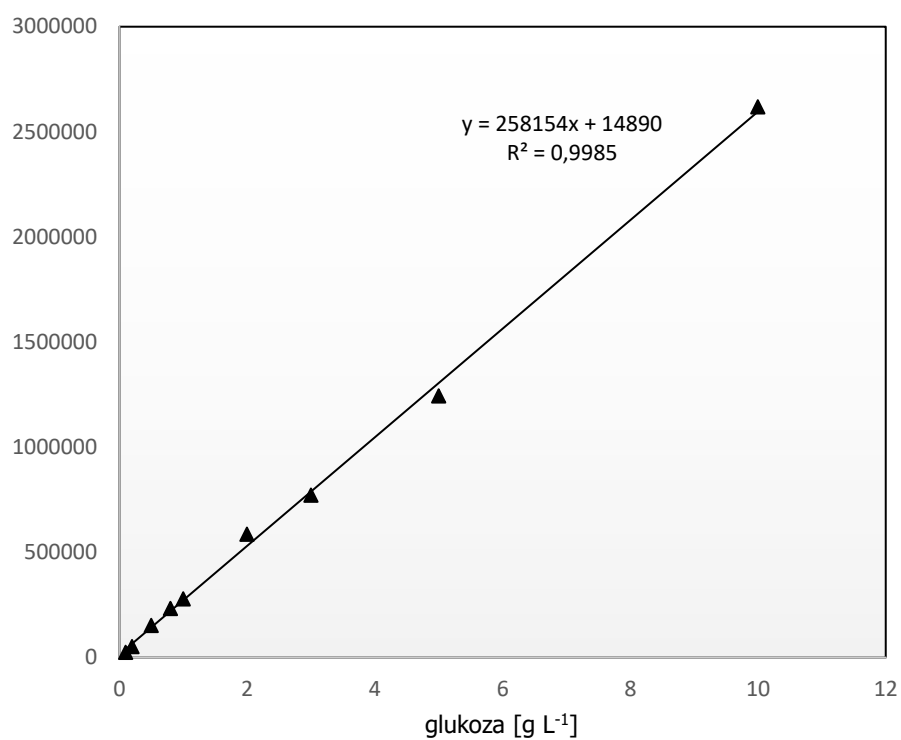
Zeng J., Zheng Y., Yu X., Yu L., Gao D., Chen S. (2013) Lignocellulosic biomass as a carbohydrate source for lipid production by *Mortierella isabellina*. *Bioresource Technology* **128**: 358-391

Zhang Y. P. (2008) Reviving the carbohydrate economy via multi-product biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **35**: 367–375.

Zhao J., Wang Z., Wang M., He Q., Zhang H. The inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* cells by acetic acid quantified by electrochemistry and fluorescence. *Bioelectrochemistry* **72**: 117-21.

7. PRILOZI

Prilog 7.1.



Slika 11. Baždarni pravac za određivanje koncentracije glukoze

Izjava o izvornosti

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Jure Perčič", written over a horizontal line.

ime i prezime studenta