

# Utjecaj izvora dušika, ugljika i svjetlosti na kinetiku rasta nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

---

**Matoković, Veronika**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:159:574427>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-12**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Veronika Matoković

1278/BPI

**UTJECAJ IZVORA DUŠIKA,  
UGLJIKA I SVJETLOSTI NA  
KINETIKU RASTA NESUMPORNE  
LJUBIČASTE BAKTERIJE  
*Rhodovulum adriaticum* DSM 2781**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu znanstveno – istraživačkih projekata „Bioprospecting Jadranskog mora BioProCro“ (KK.01.1.1.01.0002) i „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-9717) pod mentorstvom doc. dr. sc. Maria Novaka te uz pomoć asisenta Nenada Marđetka, mag.ing.bioproc.

*Posebno se zahvaljujem svom mentoru, doc. dr. sc. Mariu Novaku na uloženom vremenu, korisnim savjetima te pruženoj pomoći tijekom izrade diplomskog rada.*

*Također se zahvaljujem svim ostalim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na pomoći i ugodnoj atmosferi.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### UTJECAJ IZVORA DUŠIKA, UGLJIKA I SVJETLOSTI NA KINETIKU RASTA NESUMPORNE LJUBIČASTE BAKTERIJE *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

*Veronika Matoković, 1278/BPI*

**Sažetak:** Primjena ljubičastih nesumpornih bakterija kao proizvođača komercijalno zanimljivih proizvoda prepoznata je već godinama. Međutim, u svrhu postizanja ekološki i ekonomski održivih bioprocasa, nužan je odabir odgovarajućih obnovljivih sirovina kao i uvjeta uzgoja radnog mikroorganizma. Cilj ovog rada bio je ispitati sposobnost uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na različitim izvorima svjetlosti (obična žarulja i bijelo LED svjetlo), uz izvore ugljika koji se dobivaju predobradom lignoceluloznih sirovina te istražiti mogućnost zamjene skupljih izvora dušika (diamonijev fosfat i kvašćev ekstrakt) s kukuruznom močevinom. Rezultati istraživanja pokazali su da ispitivani izvori svjetlosti utječu na sintezu pigmenata, ali ne i na brzinu rasta. Tijekom mikroaerofilnih uzgoja na svjetlu, prinos biomase, brzina rasta i koeficijent konverzije supstrata u biomasu povećavaju se s porastom koncentracije kukuruzne močevine u podlozi. U istim uvjetima uzgoja, koncentracije diamonijeva fosfata u podlozi nisu imale značajniji utjecaj na dobivene pokazatelje uspješnosti. Proveden je i šaržni uzgoj bakterije u aerobnim uvjetima u mraku u bioreaktoru s miješalom. Uzgoj na podlozi s glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika te s diamonijevim fosfatom i kvašćevim ekstraktom kao izvorima dušika rezultirao je najboljim pokazateljima uspješnosti procesa ( $Y_X = 2,819 \text{ g L}^{-1}$ ;  $Pr = 0,117 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ;  $Y_{XS} = 0,521 \text{ g g}^{-1}$ ;  $\mu = 0,551 \text{ h}^{-1}$ ).

**Ključne riječi:** ljubičaste nesumporne bakterije, *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, izvori dušika, izvori svjetlosti, bioreaktor s miješalom

**Rad sadrži:** 69 stranica, 21 slika, 13 tablica, 69 literaturnih navoda, 3 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. Antonija Trontel
2. Doc.dr.sc. Mario Novak
3. Doc.dr.sc. Andreja Leboš Pavunc
4. Prof.dr.sc. Blaženka Kos (zamjena)

**Datum obrane:** 17. srpnja 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Graduate Thesis

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### EFFECTS OF NITROGEN, CARBON AND LIGHT SOURCES ON GROWTH KINETICS OF PURPLE NON-SULFUR BACTERIA *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

*Veronika Matoković, 1278/BPI*

**Abstract:** The application of purple non-sulfur bacteria as producers of commercially interesting products has been recognized for years. However, in order to achieve ecologically and economically sustainable bioprocesses, it is necessary to select appropriate renewable feedstock as well as optimal growing conditions for the working microorganism. The aim of this study was to examine the ability of bacteria *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 to grow under different light sources (incandescent light and white LED light), on carbon sources obtained after pretreatment of lignocellulosic feedstock and to explore the possibility of replacing expensive nitrogen sources (diammonium phosphate and yeast extract) with corn steep liquor. Current study found that the examined light sources affect the synthesis of pigments, but not the bacterial growth rate. Under light-micro oxygen conditions, an increase in biomass yield, growth rate and biomass-to-substrate yield coefficient with increasing initial concentrations of corn steep liquor in the medium was observed. Under the same growing conditions, different diammonium phosphate concentrations in the medium did not have a significant effect on the obtained performance indicators. Batch cultivation under dark/aerobic conditions in a stirred tank bioreactor was also investigated. Bacterial growth on glucose and xylose as carbon sources and with diammonium phosphate and yeast extract as nitrogen sources in the medium resulted with the best performance indicators ( $Y_X = 2.819 \text{ g L}^{-1}$ ;  $Pr = 0.117 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ;  $Y_{X/S} = 0.521 \text{ g g}^{-1}$ ;  $\mu = 0.551 \text{ h}^{-1}$ ).

**Keywords:** purple non-sulfur bacteria, *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, nitrogen source, light source, stirred tank bioreactor

**Thesis contains:** 69 pages, 21 figures, 13 tables, 69 references, 3 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

**Technical support and assistance:** *Nenad Marđetko, MSc.*

#### **Reviewers:**

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

**Thesis defended:** July 17<sup>th</sup>, 2020

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
<b>2.1. LJUBIČASTE NESUMPORNE BAKTERIJE</b> .....	3
2.1.1. Klasifikacija i općenite karakteristike .....	3
2.1.2. Fiziologija .....	5
2.1.3. Biotehnološka primjena .....	8
2.1.3.1. Obrada otpadnih voda i bioremedijacija tla .....	9
2.1.3.2. Fotobiološka proizvodnja vodika .....	10
2.1.3.3. Proizvodnja pigmenata, raznih biokemikalija i fiziološki aktivnih spojeva .....	10
2.1.3.4. Proizvodnja biopolimera .....	12
2.1.4. Načini uzgoja .....	12
2.1.4.1. Sustavi za fototrofni način uzgoja .....	14
2.1.4.2. Sustavi za kemotrofni način uzgoja .....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	17
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	17
3.1.1. Radni mikroorganizam .....	17
3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga .....	17
3.1.3. Ostale kemikalije .....	18
3.1.4. Hranjive podloge .....	18
3.1.4.1. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma .....	19
3.1.4.2. Hranjive podloga za ispitivanje utjecaja različitog izvora svjetlosti na rast u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu .....	19
3.1.4.3. Hranjive podloga za ispitivanje utjecaja različitog izvora dušika na rast u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu .....	20
3.1.4.4. Hranjive podloge za ispitivanje utjecaja izvora dušika na rast tijekom uzgoja u aerobnim uvjetima u mraku u bioreaktoru s miješalom .....	21
3.1.5. Oprema i aparatura .....	21
3.1.5.1. Bioreaktor s miješalom .....	21
3.1.5.2. Centrifuge .....	22
3.1.5.3. Spektrofotometar .....	22
3.1.5.4. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC) .....	23
3.1.5.5. Ostala oprema i aparatura .....	23
<b>3.2. METODE</b> .....	24
3.2.1. Priprema inokuluma .....	24
3.2.2. Priprema hranjivih podloga za ispitivanje utjecaja različitog izvora svjetlosti na rast u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu .....	25
3.2.3. Priprema hranjivih podloga za ispitivanje utjecaja različitih koncentracija odabranih izvora dušika na rast u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu .....	25
3.2.4. Priprema hranjivih podloga za ispitivanje utjecaja različitog izvora dušika na rast tijekom uzgoja u aerobnim uvjetima u mraku u bioreaktoru s miješalom .....	25



3.2.5. Provedba i nadzor uzgoja bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima pri ispitivanju utjecaja različitog izvora svjetlosti na rast .....	26
3.2.6. Provedba i nadzor uzgoja bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu pri ispitivanju utjecaja različitih koncentracija odabranih izvora dušika na rast.....	26
3.2.7. Provedba i nadzor šaržnog uzgoja bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku u bioreaktoru s miješalom .....	27
3.2.8. Analitičke metode .....	27
3.2.8.1. Određivanje optičke gustoće tijekom uzgoja.....	27
3.2.8.2. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari biomase bakterije .....	27
3.2.8.3. Određivanje koncentracije izvora ugljika u podlozi .....	28
3.2.8.4. Ekstrakcija ukupnih pigmenata i spektrofotometrijsko određivanje bakterioklorofila a .....	28
3.2.9. Određivanje specifične potrošnje kisika bakterije u bioreaktoru s miješalom .....	29
3.2.10. Određivanje pokazatelja uspješnosti provedenih uzgoja.....	30
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>31</b>
4.1. UTJECAJ RAZLIČITOG IZVORA SVJETLOSTI NA RAST BAKTERIJE <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 U MIKROAEROFILNIM UVJETIMA NA SVJETLU .....	33
4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH KONCENTRACIJA ODABRANIH IZVORA DUŠIKA NA RAST BAKTERIJE <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 U MIKROAEROFILNIM UVJETIMA NA SVJETLU ..	37
4.3. ŠARŽNI UZGOJI BAKTERIJE <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 U AEROBNIM UVJETIMA U MRaku U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM - NA RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJIKA I DUŠIKA ....	43
4.3.1. Utjecaj različitih izvora dušika na rast bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 uz glukozu u podlozi kao izvoru ugljika.....	44
4.3.2. Utjecaj različitih izvora dušika na rast bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 uz ksilozu u podlozi kao izvoru ugljika.....	48
4.3.3. Utjecaj različitih izvora dušika na rast bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 uz glukozu i ksilozu u podlozi kao izvorima ugljika .....	52
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>56</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>58</b>
<b>7. PRILOZI .....</b>	<b>68</b>

## 1. UVOD

Ubrzani i nezaustavljiv ekonomski razvoj ima za posljedicu sve veću potražnju za novim materijalima, resursima i ljudskim potencijalom, što nažalost dovodi do degradacije okoliša, neodržive uporabe ograničenih prirodnih resursa i porasta zagađenja vode, tla i zraka. Svjetska industrija i gospodarstvo su u velikoj mjeri ovisni o fosilnim gorivima kao primarnim izvorima energije, a njihovo iskorištavanje doprinosi širenju zagađenja i negativnih utjecaja na okoliš, uključujući globalno zatopljenje, promjenu kvalitete ekosustava te sve veći gubitak bioraznolikosti (Correa i sur., 2019).

Razvojem novih tehnologija i znanja moguće je riješiti neke od navedenih problema. Nove spoznaje u biotehnologiji omogućuju implementaciju održivih bioprocenih tehnologija, baziranim na proizvodnji širokog spektra proizvoda s pomoću mikroorganizama u bioreaktorskim sustavima. Cilj je takvih novih tehnologija iskoristiti velik potencijal mikroorganizama za dobivanje proizvoda poput biogoriva, raznih biokemikalija i biopolimera iz obnovljivih izvora sirovina, tj. primijeniti tzv. biorafinerijski princip.

Vrlo zanimljivu skupinu mikroorganizama za takav biorafinerijski princip proizvodnje čine upravo ljubičaste nesumporne bakterije. Uloga ljubičastih nesumpornih bakterija u suvremenoj biotehnologiji važna je zahvaljujući njihovoj iznimnoj fiziološkoj raznolikosti i prilagodljivosti na široki raspon uvjeta u okolini, a mogu sintetizirati značajni broj visokovrijednih proizvoda s primjenom u području medicine, bioenergetike te prehrambene i poljoprivredne industrije (Imhoff, 2006). Mogu se uzgajati u fototrofnim i kemotrofnim sustavima, a od velike je važnosti istražiti povezanost sinteze visoko vrijednih produkata s odabranim načinom uzgoja. Njihova uporaba može doprinijeti ekonomičnosti bioprocena, a također je bitno naglasiti njihovu ulogu u održavanju ekološke ravnoteže zahvaljujući upotrebi solarne energije i sposobnosti fiksacije CO<sub>2</sub> i dušika iz atmosfere (Higuchi – Takeuchi i Numata, 2019).

Nadalje, za uspješnu primjenu u biorafinerijama, nužno je istražiti njihovu sposobnost rasta i sinteze proizvoda na sirovinama iz obnovljivih izvora. Naime, posljednjih godina postoji velik interes za razvoj biorafinerija baziranim na lignocelulozi, jer takve sirovine predstavljaju izuzetno jeftin, lako dostupan i obnovljiv izvor organskog materijala (Mirza i sur., 2019).

Međutim, za korištenje takvih sirovina, nužan je proces predobrade kako bi došlo do oslobađanja fermentabilnih šećera koje bakterije mogu koristiti za rast i aktivnost. Kompleksnu strukturu lignoceluloze čine celuloza, hemiceluloza i lignin, a njihova hidroliza tijekom predobrade rezultira heterogenom smjesom različitih spojeva, pri čemu većinski udio čine ugljikohidrati glukoza i ksiloza (Marđetko i sur., 2018).

Shodno tome, cilj ovog rada bio je istražiti sposobnost uzgoja nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u bioreaktorskim sustavima na svjetlu i u mraku na spomenutim izvorima ugljika iz predobrade lignoceluloznih sirovina. Osim toga, u ovom radu je istražen utjecaj različitih izvora svjetlosti tijekom fotoheterotrofnog rasta te mogućnost zamjene skupljih izvora dušika, poput diamonijeva fosfata (DAP) i kvašćeva ekstrakta, s ekonomičnijom sirovinom poput kukuruzne močevine (CSL – *corn steep liquor*, eng.). Osim mikroaerofilnih uzgoja na svjetlu, proveden je i šaržni uzgoj bakterije u bioreaktoru s miješalom u kompletno aerobnim uvjetima u mraku, s ciljem ispitivanja kemoheterotrofnog rasta bakterije i postizanja visokih stopa rasta i sinteze biomase.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. LJUBIČASTE NESUMPORNE BAKTERIJE

#### 2.1.1. Klasifikacija i općenite karakteristike

Ljubičaste nesumporne bakterije su gram-negativni prokarioti koji čine izrazito heterogenu skupinu široko rasprostranjenih fotosintetskih mikroorganizama u prirodi. Diferencijacija između vrsta i rodova fotosintetskih prokariota obično se bazirala na morfološkim karakteristikama kao što su veličina i izgled stanice, struktura intracitoplazmatskih membrana i pigmenata, pojedini udjeli baza u DNA te nekim fiziološkim značajkama poput različitog iskorištavanja izvora ugljika i dušika, sposobnosti aerobne i anaerobne respiracije u mraku i slično (Imhoff, 1995). Klasifikacija ljubičastih bakterija tradicionalno se povezivala s metabolizmom sumpora te se podjela na sumporne i nesumporne ljubičaste bakterije sve do 70-ih godina prošlog stoljeća najprije zasnivala na različitoj toleranciji na sumporne spojeve (Madigan i Jung, 2009). Međutim, dokazano je da neke ljubičaste nesumporne bakterije toleriraju povišene koncentracije sulfida u okolini stanice, a da se glavna uočena razlika između dviju skupina ljubičastih bakterija odnosi na skladištenje elementarnog sumpora. Ljubičaste sumporne bakterije skladište elementarni sumpor unutar stanice, a ljubičaste nesumporne bakterije izvan stanice (Hansen i van Gemerden, 1972). Takvu klasifikaciju ljubičastih bakterija podržavaju i suvremene filogenetske analize temeljene na usporednom 16S rRNA sekvencioniranju prema kojima ljubičaste nesumporne bakterije pripadaju razredima  $\alpha$ - i  $\beta$ -proteobakterija, a ljubičaste sumporne bakterije razredu  $\gamma$ -proteobakterija (Imhoff i sur., 2005).

Trenutno je poznato 20-ak rodova ljubičastih nesumpornih bakterija raspoređenih unutar  $\alpha$ - i  $\beta$ - razreda proteobakterija, a morfološka, citološka i fiziološka svojstva na osnovi filogenetskih analiza pokazuju da postojeći rodovi obuhvaćaju skupine vrsta koje pokazuju visoki stupanj sličnosti i s nekim gram-negativnim nefototrofnim prokariotima (Madigan i Jung, 2009; Imhoff i sur., 2005). Većina ih pripada razredu  $\alpha$ - proteobakterija u kojem se definiraju 3 veće filogenetske grupe (Imhoff, 2006).

Grupa  $\alpha$ -1 proteobakterija čini najveću skupinu vrsta obično spiralnog oblika te broji ukupno 9 rodova. Tipični predstavnik grupe je rod *Rhodospirillum*, a ostali pripadnici su rodovi *Phaeospirillum*, *Rhodospira*, *Roseospira*, *Rhodocista*, *Roseospirillum*, *Rhodopila*, *Rhodothalassium* i *Rhodovibrio* (Imhoff, 2006).

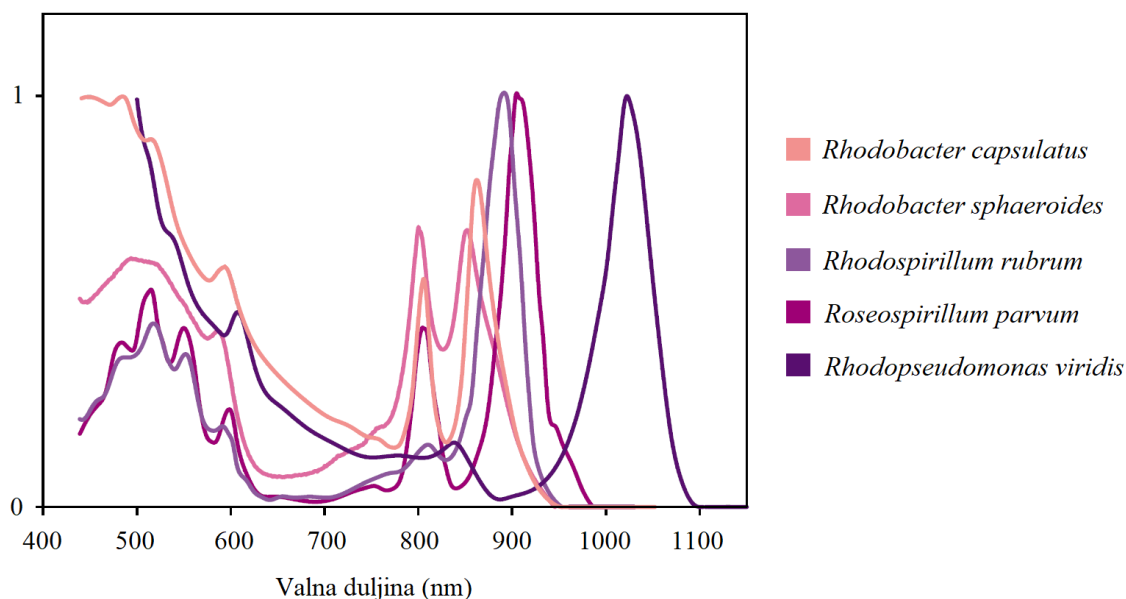
Grupu  $\alpha$ -2 karakterizira prisutnost lamenarnih intracelularnih membrana paralelnih s citoplazmatskom membranom te rast i dioba stanica pupanjem. Tipični predstavnik je rod *Rhodopseudomonas*, a grupa obuhvaća i vrste rodova *Rhodoplanes*, *Rhodoblastus*, *Blastochloris*, *Rhodomicrobium* i *Rhodobium* (Imhoff, 2006).

Značajke pripadnika  $\alpha$ -3 grupe razreda proteobakterija su prisutnost karotenoida sferoidne serije i vezikulirani tip intracitoplazmatskih membrana (Imhoff, 2006). Grupa uključuje slatkovodne vrste roda *Rhodobacter* te morske mezofilne i halofilne vrste unutar roda *Rhodovulum* (Hiraishi i Ueda, 1994).

Predstavnici razreda  $\beta$ - proteobakterija su vrste iz rodova *Rhodocyclus*, *Rhodoferax* i *Rubrivivax*, a u usporedbi s  $\alpha$ - razredom proteobakterija, karakterizira ih puno manja razvijenost intracelularnih membrana (Imhoff i sur., 2005). Tipični predstavnik je rod *Rhodocyclus*.

Ljubičaste nesumporne bakterije pripadaju skupini anoksigeničnih fotosintetskih prokariota te posjeduju karakteristične fotosintetske pigmente – bakterioklorofile *a* ili *b* te karotenoide koji daju specifične boje kolonija u rasponu između ljubičaste, crvene, smeđe i narančaste (Madigan i Jung, 2009; Montano i sur., 2009). Specifični apsorpcijski maksimumi nalaze se u rasponu između 450 i 550 nm za karotenoide, odnosno između 715 i 1050 nm za bakterioklorofile (Kuo i sur., 2012; Stomp i sur., 2007) (slika 1). U prirodi se javljaju razni morfološki oblici, većinom štapičastog ili ovoidnog oblika, pokretni ili nepokretni te nesporogeni, a većina vrsta se razmnožava binarnom diobom (Madigan i Jung, 2009). S obzirom da ljubičaste nesumporne bakterije uglavnom karakterizira fotoheterotrofni način rasta, obično obitavaju u vodenim staništima i sedimentima koji pružaju značajne količine topivih organskih tvari, anoksične uvjete te dovoljnu količinu svjetlosti (Frigaard, 2016; Imhoff, 2006). Predstavnici ljubičastih nesumpornih bakterija su široko rasprostranjeni u prirodi, a mogu se naći u jezerima, ribnjacima, otpadnim vodama, kanalizaciji, obalnim lagunama te ostalim vodenim staništima, kao i u sedimentima, vlažnom tlu i neobrađenim

poljima (Madigan i Jung, 2009; Imhoff, 2006). Uz iznimku nekih ekstremofilnih vrsta, optimalan pH u okolišu iznosi 6,5 do 7,0, a odgovaraju im temperature u rasponu od 25 do 35 °C. Također, većina vrsta može tolerirati koncentraciju reduciranih sumpornih spojeva do 0,5 mM u okolini stanice (Madigan i Jung, 2009; Montano i sur., 2009).



**Slika 1.** Apsorpcijski spektar pigmentata tipičnih predstavnika ljubičastih nesumpornih bakterija (prema Stomp i sur., 2007)

### 2.1.2. Fiziologija

Ljubičaste nesumporne bakterije čine skupinu mikroorganizama koja pokazuje impresivnu metaboličku svestranost i prilagodljivost na različite uvjete koji se mogu naći u prirodnoj okolini (McKinlay i Harwood, 2010). Glavni čimbenik pri regulaciji formiranja fotosintetskog aparata u stanicama fototrofnih ljubičastih bakterija je prisutnost kisika u mediju. Kada postoji odgovarajući izvor svjetlosti i kisik postane limitirajući faktor tijekom rasta, stanice kreću u sintezu opsežnog sustava intracitoplazmatskih membrana i pigmentata nužnih za apsorpciju svjetlosti i pridobivanje energije (Zeiger i Grammel, 2009). Za razliku od cijanobakterija, biljaka i algi, ljubičaste nesumporne bakterije koriste jedinstveni fotosustav sličan fotosustavu II koji kao slabiji reducens nije u mogućnosti oksidirati vodu i proizvesti

kisik. Shodno tome, za rast je nužno prisustvo elektron donora koji ima niži redoks potencijal od vode (McKinlay, 2014).

Za sve ljubičaste neusmporne bakterije karakterističan je fotoheterotrofni rast na lako razgradljivim organskim spojevima koji služe kao izvori ugljika i elektrona. Alternativno, moguć je i fotoautotrofni rast uz CO<sub>2</sub> kao izvor ugljika te vodikom i manjim koncentracijama reduciranih sumpornih spojeva ili željezovih (II) kationa kao donora elektrona (Madigan i Jung, 2009). Tijekom fototrofnog rasta, pridobivanje energije se odvija putem fotosintetske fosforilacije (Lu i sur., 2011). Fotosintetska fosforilacija uključuje apsorpciju fotona u molekulama pigmenata koja rezultira ekscitacijom elektrona i njihovim cirkuliranjem kroz fotosustav. Time dolazi do formiranja transmembranskog gradijenta protona koji predstavlja pokretačku silu za sintezu ATP-a ili redukciju NADP<sup>+</sup> u NADPH (Ormerod, 1992). U uvjetima limitacije kisikom, osim fototrofnog rasta, određene vrste ljubičastih nesumpornih bakterija poput *Rhodobacter capsulatus* i *Rhodobacter sphaeroides* pokazuju sposobnost rasta anaerobnom respiracijom ili fermentacijom u mraku (Madigan i Jung, 2009; Zannoni i sur., 2009; Imhoff, 2006).

Iako tolerancija na kisik varira među vrstama, mnoge ljubičaste nesumporne bakterije mogu koristiti organske spojeve kao izvore elektrona i ugljika za rast u mraku i pri aerobnim uvjetima (Keppen i sur., 2013). Brza i adekvatna adaptacija metabolizma na aerobni rast omogućena je zahvaljujući postojanju niske respiratorne aktivnosti i tijekom fototrofnog rasta (Lu i sur., 2011; Imhoff, 1995). Također, kod nekih vrsta uočena je sposobnost kemolitotrofnog rasta u mraku uz donore elektrona kao što su vodik ili tiosulfat te kisik kao konačni elektron akceptor. Pri uvjetima koji uključuju prisustvo kisika, sinteza ATP-a i regeneracija potrebnih biokemijskih reducensa odvija se procesom oksidativne fosforilacije (Lu i sur., 2011).

Ljubičaste nesumporne bakterije mogu iskoristavati široku paletu izvora ugljika i dušika za potrebe biosinteze staničnih komponenti i energije, a putevi razgradnje su opsežni i razlikuju se među vrstama i sojeva unutar istih vrsta (Koku i sur., 2002). Kao faktori rasta, obično su nužni izvori B – vitamina poput tiamina, niacina, p – aminobenzojeve kiseline ili biotina. Također, moguća je i upotreba kvasčevog ekstrakta kao faktora rasta jer sadrži relativno visok udio B – vitamina u ukupnom sastavu (Madukasi i sur., 2009; Imhoff, 1995).

Biokemija i metabolička regulacija potrošnje izvora ugljika u različitim uvjetima detaljno je istražena u radu autora Tabita (1995). Centralni metabolizam ugljika za većinu istraženih vrsta uključuje razgradnju ugljikohidrata Entner – Doudoroff ili Embden – Meyerhof – Parnasovim putem, a daljnju ulogu razgradnje i oksidacije preuzimaju reakcije citratnog ciklusa (Tang i sur., 2011; Tabita, 1995; Ormerod, 1992). Pri upotrebi anorganskih elektron donora fiksacija CO<sub>2</sub> se odvija preko Calvinovog ciklusa (Ormerod, 1992).

Poznato je da ljubičaste nesumporne bakterije mogu rasti na velikom broju različitih aminokiselina, alkohola, organskih kiselina i ugljikohidrata, a posebice ostvaruju dobar rast na acetatu i piruvatu te međuproduktima citratnog ciklusa kao što su malat ili sukcinat (Tabita, 1995). Rast na acetatu uočen je kod svih vrsta ljubičastih nesumpornih bakterija, međutim putevi razgradnje se razlikuju. Za manji broj vrsta poput *Rhodopseudomonas palustris* poznato je da imaju sposobnost fotoasimilacije aromatskih spojeva (Gibson i Hardwood, 1995). Uz fotoheterotrofni rast na reduciranim organskim spojevima poput metanola, propionske kiseline, glicerola i acetona, nužna je prisutnost CO<sub>2</sub> i njegova fiksacija putem Calvinog ciklusa, čime se troši višak reducirajućih ekvivalenata za održavanje redoks ravnoteže u stanici (Golomysova i sur., 2010; Tabita, 1995). Osim putem Calvinovog ciklusa, moguće je usmjeravanje viška elektrona i u proizvodnju vodika putem enzima nitrogenaze, što je posebice interesantno za potencijalnu proizvodnju biovodika (McKinlay, 2014).

Najprikladniji izvori dušika za rast su amonijak, elementarni dušik, kvašćev ekstrakt i neki organski spojevi dušika poput glutamata i aspartata. Neke vrste mogu koristiti i nitrat, međutim rast je puno slabiji u odnosu na druge izvore dušika (Imhoff, 2006). U stanicama ljubičastih nesumpornih bakterija razlikuju se dva strogo regulirana puta razgradnje amonijaka. Primarni put podrazumijeva reakcije glutamin sintetaze i glutamat sintaze te se odvija pri uvjetima limitacije amonijakom. Alternativno, pri povišenim koncentracijama amonijaka, odvija se sekundarni put preko glutamat dehidrogenaze (Klemme, 1989). Nadalje, uz nekoliko manjih iznimaka, ljubičaste nesumporne bakterije fiksiraju elementarni dušik tijekom fototrofnog i kemotrofnog rasta putem enzima nitrogenaze (Madigan i Jung, 2009).

Sumpor i reducirani sumporni spojevi imaju bitnu ulogu fotosintetskih donora elektrona tijekom rasta za određene ljubičaste nesumporne bakterije. Slatkovodne vrste su većinom inhibirane već pri manjim koncentracijama sulfida, međutim morske *Rhodovulum* vrste iskazuju izrazitu tolerantnost i rastu na koncentracijama sulfida većim od 2 mM. Tu se posebice



ističe vrsta *Rhodovulum sulfidophilum* (Hiraishi i Ueda, 1994). Rast na reduciranim sumpornim spojevima poput sumporovodika rezultira oksidacijom do elementarnog sumpora, sulfata ili tiosulfata. Za većinu vrsta ljubičastih nesumpornih bakterija finalni produkt oksidacije sulfida i tiosulfata je ekstracelularni elementarni sumpor pakiran u globule (Frigaard, 2016; Hansen i van Gemerden, 1972). U nekim vrstama poput *Rhodovulum veldkampii*, *Rhodovulum euryhalinum* i *Rhodovulum adriaticum* elementarni sumpor je međuprodukt oksidacije sulfida do sulfata (Imhoff, 2006; Hiraishi i Ueda, 1994; Neutzling i sur., 1984). Neke od bakterija mogu asimilirati sulfate, međutim u prisustvu reduciranih sumpornih spojeva, asimilacija sulfata je reprimirana (Imhoff, 2006).

### 2.1.3. Biotehnološka primjena

Posljednjih godina uvelike se istražuje primjena biomase ljubičastih nesumpornih bakterija u procesima pročišćavanja tla i otpadnih voda iz raznih industrija (Sakarika i sur., 2019; Kobayashi i Kobayashi, 1995). Ljubičaste nesumporne bakterije dio su prirodne populacije vlažnih, neobrađenih polja i laguna za obradu otpadnih voda, a njihova prisutnost rezultira biorazgradnjom organskih i anorganskih spojeva te istovremenom biosintezom visoko vrijednih nusprodukata (Merugu i sur., 2012). Stanice su bogate proteinima i esencijalnim aminokiselinama, a sposobne su akumulirati značajne količine pigmenata, vitamina i bioloških kofaktora (Vrati, 1984). Intenziviranje istraživanja i razvoj tehnologije doveli su do primjene mnogih proizvoda biomase u području medicine, bioenergetike te prehrambene i poljoprivredne industrije. Neki od istaknutijih procesa u stanicama uključuju fotobiološku proizvodnju vodika i biopolimera, čija važnost posebice leži u tome što predstavljaju alternativu proizvodima koji se trenutno dobivaju iz fosilnih izvora (Higuchi – Takeuchi i Numata, 2019; McKinlay i Hardwood, 2010).

Zahvaljujući kontinuiranim istraživanjem, uvođenjem metoda genetičkog inženjerstva te uporabom jeftinih organskih i anorganskih materijala, očekuje se daljni razvoj tehnologije proizvodnje te veća komercijalna primjena stanica ljubičastih nesumpornih bakterija u skorijoj budućnosti.

### 2.1.3.1. Obrada otpadnih voda i bioremedijacija tla

Prednosti pročišćavanja otpadnih komunalnih i inudstrijskih voda pomoću ljubičastih nesumpornih bakterija te praktična primjena proizvoda biomase detaljno su istraženi u radu autora Kobayashi i Kobayashi (1995). Moguće je postići efikasno pročišćavanje voda s visokim udjelom KPK (kemijska potrošnja kisika) iz farmaceutske industrije (Madukasi i sur., 2009), stočarske industrije (Myung i sur., 2004), vode s povišenom koncentracijom ulja (Takeno i sur., 2005) i slično. Mnoge vrste mogu degradirati azo boje koje pripadaju skupini sintetičkih bojila te se često nalaze u otpadnim vodama tekstilne industrije (Frigaard, 2016; Liu i sur., 2006). Biomasa iz navedenih obrada izrazito je bogata nutritivnim sastojcima te može poslužiti kao hranjivo za životinje i gnojivo u poljoprivredi, a također može absorbirati i eliminirati neugodne mirise koji se oslobađaju iz otpadnih materijala (Kobayashi i Kobayashi, 1995). Proizvodnja SCP-a (*single – cell protein*, eng.) iz mikrobne biomase tijekom postupka pročišćavanja otpadnih voda i materijala istražuje se već godinama, a ljubičaste nesumporne bakterije posebno obećavaju s obzirom na količinu i kvalitetu proizvoda (Delamare - Deboutteville i sur., 2019; Hülsen i sur., 2018; Sasaki i sur., 1998; Vrati, 1984). Ukupni udio proteina u stanicama može iznositi između 60 i 70 % stanične mase, a profil sadržanih aminokiselina može se usporediti s onima iz životinjskog mesa, jajeta ili soje (Kobayashi i Kobayashi, 1995; Vrati, 1984).

Nadalje, pripadnici anoksigeničnih fototrofa čine veliku skupinu mikroorganizama koji obitavaju u neobrađenim poljima te značajno doprinose pročišćavanju i plodnosti tla (Frigaard, 2016). Sposobnost bioremedijacije toksičnih metala poput kadmija, nikla ili olova te metala s radioaktivnim izotopima, uočena je kod velikog broja vrsta (Frigaard, 2016; Sakpirom i sur., 2016). Neki pripadnici ljubičastih nesumpornih bakterija posjeduju i sposobnost razgradnje sintetičkih pesticida u tlu (Merugu i sur., 2012). Nadalje, Sakarika i suradnici (2019) istaknuli su primjenu ljubičastih nesumpornih bakterija u biljnoj proizvodnji koja potencijalno može poboljšati rast biljaka, povećati prinose i kvalitetu jestive biljne biomase, povećati otpornost na okolišni stres te ublažiti emisiju stakleničkih plinova. Poznato je da neki proizvodi biomase, poput 5 – aminolevulinske kiseline i 3 – indol octene kiseline, djeluju kao tipični fitohormoni te reguliraju razvoj i razne fiziološke procese biljaka (Sakarika i sur., 2019; Sakpirom i sur., 2016).

### 2.1.3.2. Fotobiološka proizvodnja vodika

Biovodik je gorivo dobiveno iz prirodnog izvora, a u usporedbi s klasičnim gorivima daje do 3 puta veći prinos energije i predstavlja gorivo s veoma niskim ekološkim otiskom, posebice iz razloga što je glavni produkt njegova izgaranja voda (Mirza i sur., 2019). Svjetska potražnja za vodikom je ogromna, a trenutno se čak 96% vodika dobiva iz fosilnih goriva (Anonymous 1, 2018).

Većina fototrofnih mikroorganizama može provoditi fotobiološku proizvodnju vodika, međutim anoksigenični fotosintetski prokarioti poput ljubičastih nesumpornih bakterija pokazuju izrazito veliki potencijal u odnosu na oksigenične fototrofe (Akkerman i sur., 2002). Oksigenični fototrofi stvaraju kisik tijekom rasta, a on djeluje inhibirajuće na enzime koji sudjeluju u proizvodnji vodika (Higuchi – Takeuchi i Numata, 2019). Stanice ljubičastih nesumpornih bakterija provode proizvodnju vodika putem enzima nitrogenaze, koja se u uvjetima limitacije dušikom ponaša kao ATP – ovisna hidrogenaza te sintetizira molekularni vodik kao jedini produkt reakcije (McKinlay i Hardwood, 2010).

Kako bi fotobiološka proizvodnja vodika bila ekonomski održiva, posljednjih se godina istražuje uporaba raznih otpadnih materijala, poput komunalnog ili poljoprivrednog otpada (Higuchi – Takeuchi i Numata, 2019; Mirza i sur., 2019). Proizvodnja vodika u kombinaciji s procesom obrade otpadnih voda smatra se obećavajućom opcijom za uštedu uložene energije. Osim što proizvodnju biovodika čini operativno izvedivim, postiže se i djelomično pročišćavanje vode uklanjanjem organskog materijala (Merugu i sur., 2012).

### 2.1.3.3. Proizvodnja pigmenata, raznih biokemikalija i fiziološki aktivnih spojeva

Skupinu značajnih proizvoda biomase ljubičastih nesumpornih bakterija čine pigmenti bakterioklorofili i karotenoidi te ostali produkti i međuprodukti njihovih biosintetskih puteva poput 5- aminolevulininske kiseline (5-ALA), vitamina B12, profirina te koenzima Q<sub>10</sub> (Sasaki i sur., 1998). Bakterioklorofili, vitamin B12 i porfirini se proizvode uobičajenim putem sinteze tetrapirola u fotosintetskim bakterijama putem Sheminovog puta biosinteze, pri čemu je početni korak kondenzacija glicina i sukcinata do 5 – ALA (Noparatnaraporn i sur., 1986). Karotenoidi se dobivaju putem sinteze terpenoida, a njihova biosinteza je usko povezana sa sintezom koenzima Q<sub>10</sub> (Sasaki i sur., 1998).

Bakterijski pigmenti se mogu koristiti kao prirodna bojila za hranu ili tekstil, a imaju i potencijalnu farmakološku primjenu (Numan i sur., 2018). Proizvodnja s većim prinosima se uglavnom postiže tijekom fotoheterotrofnog rasta, međutim, trenutno se razvijaju procesi koji će omogućiti masovnu proizvodnju u aerobnim uvjetima u mraku (Patrusheva i sur., 2007). Bakterioklorofili i karotenoidi obično čine manje od 10 % udjela suhe tvari biomase, stoga se smatra prikladnim istovremena proizvodnja i ostalih vrijednih proizvoda (Patrusheva i sur., 2007; Kobayashi i Kobayashi, 1995). Porfirini se koriste kao naširoko komercijalizirani lijek za bolesti jetre te dijagnozu i liječenje raka, a mikrobn proizvodnja je moguća primjenom ljubičastih nesumpornih bakterija. Vrsta *Rhodobacter sphaerodies* može proizvesti i do 100 mg L<sup>-1</sup> ekstracelularnog porfirina, a daljnje povećanje prinosa moguće je postići imobilizacijom stanica (Sasaki i sur., 2005). Široku medicinsku primjenu ima i vitamin B12, a može se upotrijebiti i kao dodatak prehrani (Kobayashi i Kobayashi, 1995). Tijekom anaerobnog rasta *Rhodobacter sphaerodies* na svjetlu, moguće je dobiti do 87 µg vitamina B12 po gramu suhe tvari biomase (Sasaki i sur., 2005). 5 – ALA ima ulogu biljnog faktora rasta, insekticida i herbicida, a u medicini se primjenjuje za fotodinamičku dijagnozu i terapiju te pri tretiranju bolesti uzrokovanih trovanjem teškim metalima (Sakarika i sur., 2019; Sasaki i sur., 2002). Komercijalna proizvodnja kemijskom sintezom je skupa i komplicirana, stoga se danas uglavnom istražuju biotehnološki postupci proizvodnje pomoću mutiranih sojeva fotosintetskih bakterija (Novak i sur., 2017). Mutirani sojevi roda *Rhodobacter* pokazali su se kao izuzetno dobri producenti tijekom mikroaerofilnih uvjeta na svjetlu (Novak i sur., 2017; Kamiyama i sur., 2000). Važnu primjenu imaju i proizvodi sinteze terpenoida, poput koenzima Q<sub>10</sub>. Koenzim Q<sub>10</sub> koristi se već godinama u tretiranju kardiovaskularnih bolesti, a trenutno se istražuje njegova primjena u dodacima prehrani. Komercijalizacija proizvodnje moguća je u mikroaerofilnim uvjetima u mraku zahvaljujući simultanim dobivanjem velikih prinosa biomase i relativno visokog udjela koenzima Q<sub>10</sub> u stanicama bakterija (Sasaki i sur., 2002).

Ljubičaste nesumporne bakterije imaju potencijalnu ulogu i u proizvodnji ekstracelularnih enzima važnih za industriju (celulaze, amilaze, proteaze i lipaze), a njihova proizvodnja upotrebom stanica *Rhodobacter capsulatus* i *Rhodopseudomonas acidophila* opisana je u radu Merugu i suradnika (2010). Nadalje, neke bakterije poput one iz roda *Rhodovulum* mogu proizvoditi ekstracelularne polimerne tvari koje sadrže velik udio nukleinskih kiselina, proteina i biopolimera (Higuchi – Takeuchi i Numata, 2019; Merugu i sur., 2012). Važno je istaknuti sintezu nukleinskih kiselina s obzirom na njihovu široku medicinsku primjenu. Trenutno se dobivaju *in vitro* transkripcijom ili kemijskom sintezom, što

predstavlja veoma skupu metodu za proizvodnju u većim mjerilima. Vrsta *Rhodovulum sulfidophilum* se smatra dobrim mikrobnim proizvođačem RNA molekula s obzirom da nije uočena prisutnost ribonukleaza u stanici (Higuchi – Takeuchi i Numata, 2019).

#### 2.1.3.4. Proizvodnja biopolimera

Uloga ljubičastih nesumpornih bakterija u proizvodnji biopolimera uočena je zahvaljujući sposobnosti akumulacije značajnih količina polihidroksialkanoata (PHA) u odgovarajućim uvjetima (Lorrungruang i sur., 2006). PHA u posljednje vrijeme privlače mnogo pozornosti zbog toga što predstavljaju moguću alternativu plastici dobivenoj iz fosilnih izvora, a značajni su po svojoj biorazgradivosti i biokompatibilnosti (Higuchi – Takeuchi i Numata, 2019). Stanice provode sintezu PHA u svrhu skladištenja viška ugljika i energije tijekom limitacije dušikom ili pri drugim uvjetima koji ograničavaju sintezu proteina (Imhoff, 2006), a PHA može činiti i do 70 % udjela suhe tvari biomase pri odgovarajućim uvjetima rasta (Brandl i sur., 1991). U usporedbi s ostalim fotosintetskim bakterijama, neke vrste ljubičastih nesumpornih bakterija mogu postići i do tri puta veće prinose PHA u optimalnim uvjetima biosinteze (Lorrungruang i sur., 2016).

Nadalje, uočena je i akumulacija polifosfata što je posebice zanimljivo za primjenu biomase ljubičastih nesumpornih bakterija u proizvodnji električne energije (Lai i sur., 2017). Polifosfati su linearni biopolimeri, a funkcija u stanici im je skladištenje energije i fosfata. Uočeno je da ljubičaste nesumporne bakterije stvaraju polifosfate pod anaerobnim uvjetima na svjetlu tijekom stacionarne faze. Svjetlost omogućava nakupljanje intracelularnog polifosfata i stabilizira učinkovitost uklanjanja fosfora (Liang i sur., 2010).

#### 2.1.4. Načini uzgoja

Da bi se postigla najveća moguća produktivnost ljubičastih nesumpornih bakterija na ekonomični način, od ključne je važnosti istražiti povezanost sinteze visoko vrijednih produkata s odabranim načinom uzgoja. Shodno već spomenutoj fiziološkoj raznolikosti ljubičastih nesumpornih bakterija, moguć je fototrofni uzgoj kojeg karakterizira pridobivanje energije iz svjetla u anaerobnim uvjetima te kemotrofni uzgoj u aerobnim uvjetima gdje se

energija dobiva iz kemijskih spojeva. Izvor ugljika može biti CO<sub>2</sub> ili organska molekula (Sakarika i sur., 2019).

Potencijal fakultativnih fotosintetskih bakterija kao proizvođača fotosintetskih pigmentata, vitamina, koenzima i drugih vrijednih proizvoda prepoznati su desetljećima (Zeiger i Grammel, 2009). Konvencionalni fototrofni sustavi pružaju optimalne količine navedenih produkata, a posebice se preferira fotoheterotrofni način rasta koji najviše pogoduje brzom rastu te visokim prinosima biomase, proizvodnji vodika, pigmentata i raznih spojeva povezanih sa sintezom fotosintetskog aparata (Keppen i sur., 2013; Kuo i sur., 2012; McKinlay i Hardwood, 2010).

Međutim, industrijalizacija i komercijalizacija proizvodnje u fotosintetskim uvjetima ima svoja ograničenja, a posebice je problem limitacija opskrbom svjetla u sustavu (Sasaki i sur., 2002; Watanabe i sur., 1998). Shodno tome, pristupa se razvoju novih bioprocasa za maksimalnu ekspresiju fotosintetskih gena tijekom kemotrofnog rasta, odnosno pod aerobnim i mikroaerofilnim uvjetima u mraku, u konvencionalnim bioreaktorima koji nude novu perspektivu za daljnju industrijalizaciju proizvodnje (Zeiger i Grammel, 2009).

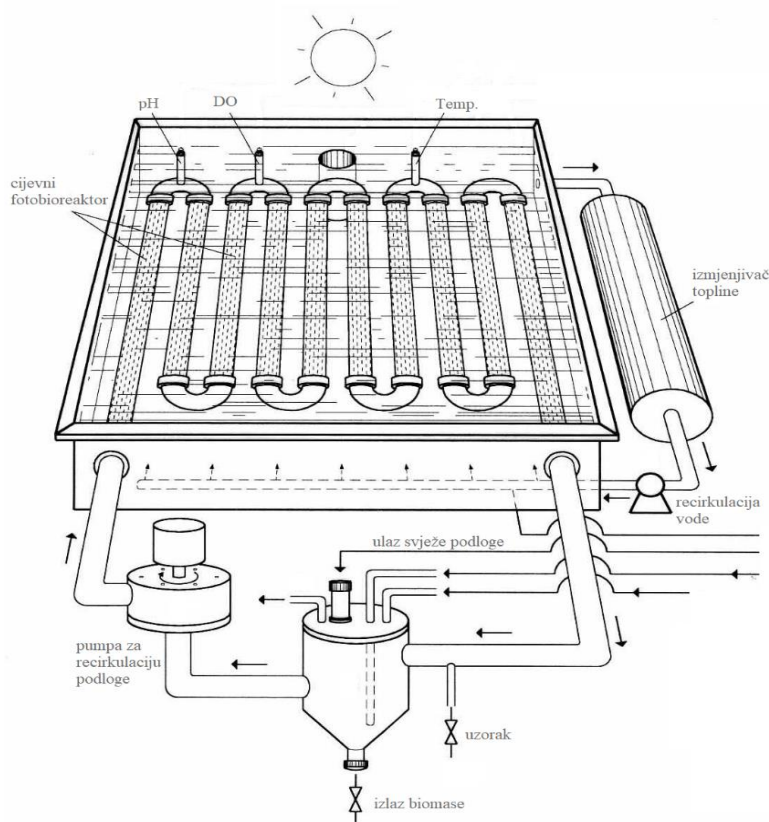
Neke vrste poput *Rhodovulum sulfidophilum* daju vrlo visoke prinose biomase u mraku s visokim stupnjem aeracije, a sinteza fotosintetskog aparata je znatno manje inhibirana prisustvom kisika u odnosu na pripadnike rodova *Rhodobacter* i *Rhodospirillum* (Masuda i sur., 2000; Shioi i Doi, 1990). Zahvaljujući metodama genetičkog inženjerstva, moguća je industrijska proizvodnja nekih važnih proizvoda s pomoću genetički modificiranih sojeva postupkom dvostupanjskog uzgoja u mraku: prvi stupanj s izrazitom aeracijom za postizanje visoke stope rasta i unosa supstrata te drugi stupanj u mikroaerofilnim uvjetima za proizvodnju vitamina B12, bakterioklorofila, karotenoida (Noparatnaraporn i sur., 1986) ili 5-aminolevulinske kiseline (Sasaki i sur., 2002). Svjetlost nije nužna za sintezu bakterioklorofila i međuprodukata njegove sinteze, pa se relativno visoki prinosi mogu postići održavanjem mikroaerofilnih uvjeta u mraku (Zeiger i Grammel, 2009). Patrusheva i suradnici (2017) postigli su puno veću sintezu bakterioklorofila pomoću *Rhodobacter capsulatus* u mikroaerofilnim uvjetima u mraku nego tijekom obično preferiranog fotoheterotrofnog načina rasta.

#### 2.1.4.1. Sustavi za fototrofni način uzgoja

Fototrofni uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija uglavnom podrazumijeva fotobioreaktore koji čine zatvoreni sustav s umjetnim okruženjem: kontinuirano osvjetljenje adekvatnog intenziteta i odgovarajući medij u kojem se postiže optimalna biokonverzija (Kuo i sur., 2012). Najčešće izvedbe fotobioreaktora u uporabi su vertikalni kolonski (recirkulirajući air - lift ili barotirajuća kolona), pločasti, membranski te cijevni fotobioreaktor (Alloul i sur., 2020; Akkerman i sur., 2002). Obično su izrađeni od stakla koje omogućuje veću apsorpciju svjetlosti (Lien i sur., 2018).

Produktivnost fotobioreaktora limitirana je svjetlošću te je nužan visoki omjer površine i volumena. Fotokemijski koeficijenti u fotobioreaktorima su relativno niski (maksimalno 10 %) te imaju tendenciju smanjenja pri većim intenzitetima svjetlosti (zbog efekta zasićenja svjetlošću – svi fotoni se ne mogu upotrijebiti za reakcijsku energiju već se rasipaju u obliku toplinske energije). U svrhu provođenja efikasnog bioprocasa, nužno je razrijediti svjetlost i rasporediti ga što je više moguće kroz volumen fotobioreaktora. To se obično postiže intenzivnim miješanjem tako da su stanice izložene svjetlu samo kratkotrajno (Akkerman i sur., 2002).

Nedostatak fotobioreaktora je i trošak umjetne rasvjete, međutim troškovi se mogu umanjiti primjenom učinkovitijih izvora svjetlosti. Obično se koriste svjetla sa žarnom niti ili halogene lampe koje emitiraju široki spektar valnih duljina svjetlosti koji apsorbiraju molekule pigmentata. Korisnu alternativu za osvjetljavanje predstavljaju svjetleće diode (LED) jer troše malo energije i imaju dug životni vijek, a mogu se specifično prilagoditi opsegu valne duljine koji odgovara fotosintetskim apsorpcijskim spektrima (Kuo i sur., 2012). Nadalje, moguće su i tzv. vanjske izvedbe fotobioreaktora koje upotrebljavaju prirodnu sunčevu svjetlost (Carlozzi i Sacchi, 2001). Takav jedan primjer vanjske izvedbe cijevnog fotobioreaktora prikazan je na slici 2. Glavna prednost im je ekonomičnost zbog korištenja prirodne sunčeve svjetlosti, ali probleme stvaraju otežana regulacija uvjeta, izravno izlaganje UV zračenju te svojstvena nekontinuiranost opskrbe svjetlom, što rezultira sporijim rastom i fluktuacijom količine pigmentata tijekom rasta (Lien i sur., 2018; Kuo i sur., 2012). Otvoreni sustavi, poput onih za uzgoj mikroalgi po principu umjetnih jezera, kružnih ribnjaka, nagibnih sustava ili kanala, još nisu dovoljno istraženi. Razlog je česta kontaminacija i veoma teško postizanje selektivne proizvodnje samo ljubičastih nesumpornih bakterija u takvim uvjetima (Alloul i sur., 2020).



**Slika 2.** Shematski prikaz cijevnog fotobioreaktora s kontrolom temperature tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodospseudomonas palustris* 42OL pod vanjskim svjetlom (prema Carlozzi i sur., 2001)

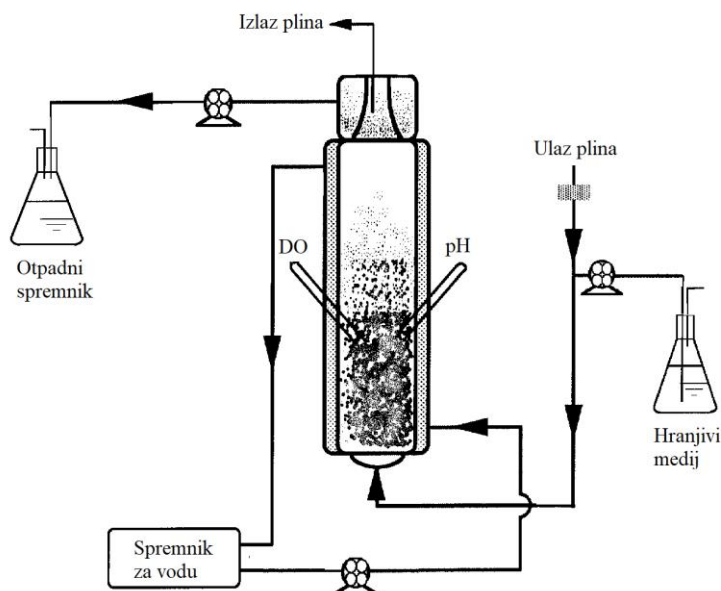
#### 2.1.4.2. Sustavi za kemotrofni način uzgoja

Kemotrofni uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija odvija se bez prisustva svjetla u sustavu, a zahtjeva aerobne uvjete u svrhu pridobivanja potrebne energije (Keppen i sur., 2013). Mogu se koristiti konvencionalni bioreaktori za provođenje aerobnih uzgoja, obično bioreaktor s miješalom, vertikalna air – lift ili barbotirajuća kolona (Yen i Shih, 2009; Watanabe i sur., 1998).

Kemotrofni uzgoj nije ovisan o velikom omjeru površine i volumena, odnosno nije limitiran dotokom svjetla u bioreaktor. Shodno tome, konstrukcija bioreaktora s miješalom i njegov scale – up s obzirom na veličinu, miješanje, prijenos kisika i produktivnost su jednostavniji u odnosu na fotobioreaktore. Ugrađeno miješalo omogućava dobru aeraciju



sustava, međutim takav tip bioreaktora ima određene limitacije, poput velike potrošnje energije te postizanje velikih sila smicanja koje predstavljaju hidrodinamički stres za stanice tijekom uzgoja (Zhong, 2010).



**Slika 3.** Shematski prikaz kemotrofnog sustava s vertikalnom barbotirajućom kolonom korištenom za proizvodnju stanica ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum* sp. PS88 u aerobnim uvjetima u mraku (prema Watanabe i sur., 1998)

Dobru alternativu čine barbotirajuće kolone u kojima se miješanje osigurava uvođenjem i raspršivanjem zraka u podlozi te air – lift kolone s prostorno usmjerenim tokom podloge. Watanabe i suradnici (1998) su izvjestili o vrlo visokom prinosu od  $42,7 \text{ g L}^{-1}$  biomase bakterije *Rhodovulum* sp. PS88 nakon provođenja kontinuiranog uzgoja u jednostavnoj barbotirajućoj koloni, uz visoki stupanj aeracije sustava (slika 3). Nadalje, uporaba takvih bioreaktora posebice je interesantna za provođenje uzgoja u mikroaerofilnim uvjetima u mraku. Autori Yen i Shin (2009) proveli su usporednu studiju mikroaerofilnog uzgoja u mraku bakterije *Rhodobacter sphaeroides* u air – lift koloni i bioreaktoru s miješalom u svrhu proizvodnje koenzima  $Q_{10}$ . Veći prinosi biomase dobiveni su u bioreaktoru s miješalom, ali je sinteza koenzima  $Q_{10}$  bila za 40 % veća u air – lift koloni. Kao mogući razlog navodi se nehomogena distribucija otopljenog kisika koja pogoduje visokom sadržaju koenzima  $Q_{10}$  u stanicama bakterije.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

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

##### 3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga

Za pripremu hranjivih podloga korištene su kemikalije navedene u tablici 1.

**Tablica 1.** Kemikalije za pripremu hranjivih podloga

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
Glukoza	≥ 99%	Kemika, Hrvatska
Ksilozna	≥ 99%	Kemika, Hrvatska
Natrijev malat	≥ 99%	Kemika, Hrvatska
Kvašćev ekstrakt	za biotehnologiju	Kemika, Hrvatska
CSL	za biotehnologiju	Kemika, Hrvatska
Natrijev glutamat	≥ 99%	Kemika, Hrvatska
Diamonijev fosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Diamonijev sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalijev dihidrogenfosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Dikalijev fosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Magnezijev sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalcijev klorid dihidrat	p.a.	Merck, Njemačka
Manganov sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska

Tiamin hidroklorid	≥ 99%	Sigma – Aldrich, Njemačka
Nikotinska kiselina	≥ 99%	Sigma – Aldrich, Njemačka
Biotin	≥ 99%	Sigma – Aldrich, Njemačka

### 3.1.3. Ostale kemikalije

Ostale kemikalije korištene u istraživanju prikazane su u tablici 2.

**Tablica 2.** Ostale kemikalije korištene u istraživanju

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
Etanol	≥ 99%	Kemika, Hrvatska
Aceton	≥ 99%	Kemika, Hrvatska
Natrijev hidroksid	p.a.	Kemika, Hrvatska
Sumporna kiselina	≥ 99%	Kemika, Hrvatska
Cinkov sulfat heptahidrat	≥ 99%	Kemika, Hrvatska
Sredstvo protiv pjenjenja	/	Carl Roth, Austrija
pH puferi za kalibraciju	pH 4,0; 7,0	Hamilton, Švicarska

### 3.1.4. Hranjive podloge

Za potrebe uzgoja inokuluma i u svrhu ispitivanja rasta bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na različitim izvorima ugljika i dušika te promatranje utjecaja svjetlosti na rast, sve korištene podloge su sadržavale temeljni sastav soli i faktora rasta prikazan u tablici 3.

U poglavljima 3.1.4.1. – 3.1.4.4. opisane su specifičnosti sastava svake podloge, odnosno koncentracije odabranih izvora ugljika i dušika u podlozi za svaki provedeni eksperiment.

**Tablica 3.** Temeljni sastav soli i faktora rasta u hranjivim podlogama

Kemikalija	Masena koncentracija [g L <sup>-1</sup> ]
Diamonijev sulfat heptahidrat	0,8
Kalijev dihidrogenfosfat	0,5
Dikalijev fosfat	0,5
Magnezijev sulfat heptahidrat	0,2
Kalcijev klorid dihidrat	0,053
Manganov sulfat heptahidrat	1,2 x 10 <sup>-3</sup>
Tiamin klorid	1,0 x 10 <sup>-3</sup>
Nikotinska kiselina	1,0 x 10 <sup>-3</sup>
Biotin	1,0 x 10 <sup>-5</sup>

#### 3.1.4.1. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma

Za uzgoj inokuluma, podloga je kao izvor ugljika sadržavala 2,7 g L<sup>-1</sup> malata, a kao izvore dušika natrijev glutamat u koncentraciji od 2,0 g L<sup>-1</sup> te kvašćev ekstrakt u koncentraciji od 1,5 g L<sup>-1</sup>. Ostale soli i faktori rasta su prikazani u tablici 3.

#### 3.1.4.2. Hranjive podloga za ispitivanje utjecaja različitog izvora svjetlosti na rast u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu

Za ispitivanje utjecaja različitog izvora svjetlosti na rast bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu, korištene su dvije podloge različitog sastava ovisno o korištenim izvorima ugljika i dušika. Specifičnosti za obje podloge su prikazane u tablici 4.

**Tablica 4.** Izvori ugljika i dušika u podlogama za ispitivanje utjecaja različitog izvora svjetlosti na rast bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu

Kemikalija	Masena koncentracija [g L <sup>-1</sup> ]	
	Podloga 1	Podloga 2
Glukoza	5,0	/
Ksiloz	5,0	/
Malat	/	2,7
Kvašev ekstrakt	1,5	1,5
Diamonijev fosfat	3,0	/
Natrijev glutamat	/	2,0

3.1.4.3. Hranjive podloga za ispitivanje utjecaja različitog izvora dušika na rast u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu

U svrhu ispitivanja utjecaja različitog izvora dušika na rast bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu, korištene su podloge čije su koncentracije izvora ugljika i dušika u podlogama prikazane su u tablici 5. Za oba ispitivana izvora dušika pripremljene su po četiri podloge, od kojih je svaka sadržavala različitu masenu koncentraciju odabranog izvora dušika u podlozi: 1, 3, 5 i 7 g L<sup>-1</sup>.

**Tablica 5.** Izvori ugljika i dušika u podlogama za ispitivanje utjecaja različitih izvora dušika na rast bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu

Kemikalija	Masena koncentracija [g L <sup>-1</sup> ]	
	Podloge s DAP-om	Podloge sa CSL-om
Glukoza	4,0	5,0
Ksiloz	8,0	10,0
Malat	/	/
Kvašev ekstrakt	1,5	/
CSL	/	1,0; 3,0; 5,0; 7,0
Diamonijev fosfat	1,0; 3,0; 5,0; 7,0	/

### 3.1.4.4. Hranjive podloge za ispitivanje utjecaja različitog izvora dušika na rast tijekom uzgoja u aerobnim uvjetima u mraku u bioreaktoru s miješalom

Specifičnosti sastava podloge za šaržne uzgoje bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, provedene u bioreaktoru s miješalom u aerobnim uvjetima u mraku, prikazane su u tablici 6. Korišteno je šest različitih podloga ovisno o odabranim izvorima dušika i ugljika u podlozi, pri čemu su sve podloge sadržavale isti temeljni sastav soli i faktora rasta prikazan u tablici 3.

**Tablica 6.** Izvori ugljika i dušika u podlogama tijekom šaržnih uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, u bioreaktoru s miješalom

Kemikalija	Masena koncentracija [g L <sup>-1</sup> ]					
	Uzgoj 1	Uzgoj 2	Uzgoj 3	Uzgoj 4	Uzgoj 5	Uzgoj 6
Glukoza	5,0	5,0	/	/	5,0	5,0
Ksilozna	/	/	5,0	5,0	5,0	5,0
Kvašćev ekstrakt	1,5	/	1,5	/	1,5	/
CSL	/	5,0	/	5,0	/	5,0
Diamonijev fosfat	3,0	/	3,0	/	3,0	/

### 3.1.5. Oprema i aparatura

#### 3.1.5.1. Bioreaktor s miješalom

U svrhu ispitivanja rasta bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na različitim izvorima ugljika i dušika tijekom aerobnog uzgoja u mraku korišten je bioreaktor s miješalom i dvostrukim plaštom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Njemačka) prikazan na slici 4. Građen je od nehrđajućeg Cr–Ni čelika ukupnog volumena 30 L te je opremljen s tri podesive Rushtonove turbine koje pokreće elektromotor snage 0,9 kW. Maksimalna brzina rotacije miješala je 3000 rpm. Bioreaktor je opremljen kontrolnom jedinicom s ugrađenim sustavom za mjerenje i praćenje temperature, pH, brzine okretaja miješala te parcijalnog tlaka kisika u reaktoru.



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

#### *3.1.5.2. Centrifuge*

Za potrebe izdvajanja bakterijske biomase iz suspenzije korištena je centrifuga Thermo Scientific SL 8R (Thermo Fischer Scientific, SAD). U svrhu analitike korištene su centrifuge HC-240 (Tehtnica Železniki, Slovenija) i Eppendorf 5804 R (Njemačka).

#### *3.1.5.3. Spektrofotometar*

Za potrebe analitike tijekom uzgoja korišten je spektrofotometar Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Optička gustoća uzoraka određena je u staklenim kivetama promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka). Za određivanje apsorpcijskog spektra ekstrahiranih pigmenta tijekom uzgoja korištena je kvarcna kiveta promjera 10 mm istog proizvođača.

#### 3.1.5.4. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

Za određivanje koncentracije izvora ugljika tijekom uzgoja, korišten je UPLC uređaj 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) (slika 5). Uređaj je opremljen pumpom (G7104A 1290 Flexible Pump) i otplinjačem, automatskim injektorom (G7167B 1290 Vialsampler), termostatom (G7116B), pretkolumnom i analitičkom kolonom (ionsko – izmjenjivačka kolona Rezex ROA – Organic Acid H+; Phenomenex, SAD, detektorom indeksa loma (G7162A 1260 RID), modulom za kontrolu sustava (SCL – 10Avp) i računalnim programom za obradu podataka (OpenLAB CDS).



**Slika 5.** UPLC uređaj 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)

#### 3.1.5.5. Ostala oprema i aparatura

Osim već navedene opreme i aparature te laboratorijskog pribora i posuđa, u istraživanju je korištena i oprema prikazana u tablici 7.



**Tablica 7.** Ostala oprema i apartura

Oprema	Model i proizvođač
Tehnička vaga	ET – 1211; Tehtnica, Slovenija
Analitička vaga	ALC210.4; Acculab, SAD
Sušionik	ST – 05; Instrumentaria, Hrvatska
Vrtložna mješalica	LLG – uniTEXTER 1; LLG – Labware, Njemačka
pH metar	HI 9125; Hanna Instruments, SAD
Autoklav	Sutjeska, Jugoslavija
Hladnjak i zamrzivač	Bosch, Njemačka
Najlonski filteri za šprice (0,2 $\mu\text{m}$ )	Sigma – Aldrich, Njemačka

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema inokuluma

Sastav hranjive podloge za inokulum je prethodno opisan u poglavlju 3.1.4.1. Izvagane mase sastojaka otopljene su u demineraliziranoj vodi do odgovarajućeg volumena, a pH je podešen na između 6,8 i 7,0 dodatkom natrijeva hidroksida. Podloga je sterilizirana u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 minuta, a termosenzibilni sastojci dodani su nakon sterilizacije i hlađenja preko filtera promjera pora 0,2  $\mu\text{m}$ .

Uzgoj inokuluma je proveden u mikroaerofilnim uvjetima tijekom 2 do 3 dana pri temperaturi od 28 °C, 2000 luxa ispod obične žarulje, u tikvicama s brušenim čepom.

### 3.2.2. Priprema hranjivih podloga za ispitivanje utjecaja različitog izvora svjetlosti na rast u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu

Za provedbu ispitivanja utjecaja različitog izvora svjetlosti na rast bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu, pripremljene su dvije podloge čiji je sastav opisan u poglavlju 3.1.4.2.

Sastojci su otopljeni u određenom volumenu demineralizirane vode te je po 150 mL podloge raspodijeljeno u tikvice s brušenim čepom. Prethodno je podešena pH vrijednost podloge na između 6,8 i 7,0 dodatkom natrijeva hidroksida uz eventualnu korekciju sumpornom kiselinom. Sterilizacija je izvedena u autoklavu pri 121 °C/20 minuta. Nakon hlađenja su dodani termosenzibilni sastojci preko filtera promjera pora 0,2  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.3. Priprema hranjivih podloga za ispitivanje utjecaja različitih koncentracija odabranih izvora dušika na rast u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu

U svrhu ispitivanja utjecaja različitih koncentracija odabranih izvora dušika na rast bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu, pripremljeno je ukupno osam podloga čiji je sastav opisan u poglavlju 3.1.4.3. Pripremljene su 4 podloge s različitim koncentracijama diamonijeva fosfata (1,0; 3,0; 5,0 i 7,0 g L<sup>-1</sup>) te 4 podloge s različitim koncentracijama CSL-a (1,0; 3,0; 5,0 i 7,0 g L<sup>-1</sup>). Postupak pripreme podloge jednak je onome opisanom u poglavlju 3.2.2.

### 3.2.4. Priprema hranjivih podloga za ispitivanje utjecaja izvora dušika na rast tijekom uzgoja u aerobnim uvjetima u mraku u bioreaktoru s miješalom

Pripremljeno je ukupno šest različitih podloga za uzgoje bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku u bioreaktoru s miješalom. Sastav svake podloge je opisan u poglavlju 3.1.4.4.

Ovisno o ispitivanom supstratu, otopljene su pripadajuće mase izvora ugljika i dušika u 4,5 L demineralizirane vode. Sterilizacija podloge je odrađena u samom bioreaktoru,

indirektno vodenom parom pri 121 °C/20 minuta preko dvostrukog plašta. Termosenzibilni sastojci dodani su naknadno nakon sterilizacije i hlađenja na temperaturu uzgoja preko filtera promjera pora 0,2  $\mu\text{m}$ . Vrijednost pH podloge podešena je na između 6,8 i 7,0 dodatkom natrijeva hidroksida.

### 3.2.5. Provedba i nadzor uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima pri ispitivanju utjecaja različitog izvora svjetlosti na rast

Ispitivanje rasta bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 ovisno o vrsti svjetlosti (bijelo LED svjetlo i obična žarulja) provedeno je u 2 tikvice s glukozom i ksilozom te u 2 tikvice s malatom kao izvorom ugljika. Način pripreme podloga je opisan u poglavlju 3.2.3. Podloge su inokulirane s 15 mL prethodno pripremljenog inokuluma, a ukupni radni volumen u tikvicama iznosio je 150 mL.

Uzgoji su vođeni u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu 144 h pri temperaturi od 28 °C, pri čemu pH vrijednost tijekom uzgoja nije regulirana. Svaka 24 sata izuzeto je 5 mL uzorka kojem je određena optička gustoća u svrhu praćenja prirasle biomase i određivanja apsorpcijskih minimuma i maksimuma (poglavljje 3.2.8.1.). Nadalje, provedena je ekstrakcija ukupnih pigmenata i spektrofotometrijsko određivanje bakterioklorofila *a* (poglavljje 3.2.8.4.). Potrošnja izvora ugljika tijekom uzgoja praćena je postupkom opisanim u poglavlju 3.2.8.3.

### 3.2.6. Provedba i nadzor uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu pri ispitivanju utjecaja različitih koncentracija odabranih izvora dušika na rast

Provedeno je ukupno 8 uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu, pri čemu su korištene podloge pripremljene na način opisan u poglavlju 3.2.3. Uzgoj je proveden u tikvicama s brušenim čepom, na svjetlu obične žarulje (2000 luxa), u trajanju od 96 h i temperaturi od 28 °C. Vrijednost pH tijekom uzgoja nije regulirana. Postupak uzrokovanja, provedba i nadzor uzgoja jednaki su postupku opisanom u prethodnom poglavlju (3.2.5.).

### 3.2.7. Provedba i nadzor šaržnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku u bioreaktoru s miješalom

Ukupno je provedeno šest šaržnih uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku u bioreaktoru s miješalom. Priprema podloga je bila prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.4. Inokulacija je odrađena u aseptičnim uvjetima s 500 mL prethodno uzgojenog inokuluma, a konačni radni volumen u bioreaktoru iznosio je 5,0 L. U svrhu kalibracije pH elektrode korišteni su puferi pH vrijednosti 4,0 i 7,0. Vrijednost pH održavana je u optimalnom području za uzgoj bakterije između 6,8 i 7,0, automatskom regulacijom pritoka 3 M otopina NaOH i H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Uzgoji su provedeni na temperaturi od 28 °C, čije je održavanje postignuto cirkulacijom rashladne vode kroz dvostruki plašt. Aeracija je vršena sterilnim zrakom protoka 2,5 L min<sup>-1</sup>, pri čemu je broj okretaja miješala tijekom uzgoja iznosio 400 rpm. Sredstvo protiv pjenjenja dodavano je prema potrebi. Ukupno trajanje uzgoja bilo je 24 h. Tijek uzgoja praćen je aseptičnim izuzimanjem uzoraka svaki sat analitičkim metodama opisanim u poglavljima 3.2.8.1 - 3.2.8.3. Također, provedeno je uzorkovanje svaka dva sata za određivanje sintetiziranih pigmenata nakon provedene ekstrakcije (poglavlje 3.2.8.4.).

### 3.2.8. Analitičke metode

#### 3.2.8.1. Određivanje optičke gustoće tijekom uzgoja

U svrhu praćenja rasta biomase te radi određivanja apsorpcijskih minimuma i maksimuma bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja, mjerena je optička gustoća skeniranjem uzoraka u području valnih duljina ( $\lambda$ ) od 350 do 900 nm. Prirast biomase praćen je pri valnoj duljini od 650 nm. Uzorak je prije analize dobro homogeniziran.

#### 3.2.8.2. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari biomase bakterije

Uzorci izuzeti tijekom uzgoja stavljani su u prethodno osušene i izvagane Falcon kivete te centrifugirani pri 8000 rpm tijekom 10 minuta. Talog je osušen u sušioniku pri 75 °C do

konstantne mase. Koncentracija suhe tvari biomase  $X$  [ $\text{g L}^{-1}$ ] određena je prema sljedećem izrazu:

$$X = \frac{m_2 - m_1}{V_{uz}} \quad [1]$$

pri čemu je  $m_1$  masa prazne kivete [g];  $m_2$  masa kivete s talogom nakon sušenja [g];  $V_{uz}$  volumen uzorka [L].

### *3.2.8.3. Određivanje koncentracije izvora ugljika u podlozi*

Koncentracija izvora ugljika u supernatantu kulture određena je tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UPLC). U svrhu prethodnog taloženja proteina, supernatanat uzorka je pomiješan s 10 %-tnom otopinom cinkova sulfata u omjeru 1:1 (vol/vol). Nakon 10 minuta, suspenzija je centrifugirana pri 10000 rpm, 15 minuta. Prije analize, uzorci su profiltrirani kroz filter promjera pora  $0,2 \mu\text{m}$ .

Kao mobilna faza korištena je otopina sumporne kiseline koncentracije 0,0025 M. Injektirano je  $10 \mu\text{L}$  uzorka i propušteno kroz kolonu pri temperaturi od  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  uz brzinu protoka mobilne faze od  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ . Dobiveni kromatogrami obrađeni su pomoću računalnog programa OpenLAB CDS, a nepoznate koncentracije izvora ugljika u uzorcima određene su prema jednadžbama baždarnih dijagrama za glukozu, ksilozu i malat. Baždarni dijagrami s pripadajućim jednadžbama pravaca prikazani su u prilogima 7.1 – 7.3.

### *3.2.8.4. Ekstrakcija ukupnih pigmenata i spektrofotometrijsko određivanje bakterioklorofila a*

Ekstrakcija ukupnih pigmenata sintetiziranih tijekom uzgoja provedena je sa smjesom organskih otapala uz mehaničku dezintergaciju stanica pomoću staklenih kuglica. Volumen uzorka za ekstrakciju pigmenata tijekom mikroaerofilnih uzgoja na svjetlu bio je 5 mL, odnosno 20 mL kod uzgoja u bioreaktoru s miješalom u aerobnim uvjetima. Uzorak je centrifugiran 10 minuta pri 8000 rpm. Supernatant je dekantiran, a preostala biomasa se koristila za ekstrakciju i određivanje ukupnih pigmenata. Biomasi je dodano 4 g staklenih kuglica i 4 mL smjese acetona i etanola u omjeru 7:2 (vol/vol). Biomasa s kuglicama za dezintergaciju stanica se zatim tri puta naizmjenično podvrgavala intenzivnom miješanju u

trajanju od 2 minute te hlađenju u ledu, također 2 minute. U svrhu sprječavanja raspada fotosenzibilnih pigmenata uslijed izlaganja svjetlosti, postupak ekstrakcije je proveden u mraku, a kivete su bile zaštićene aluminijskom folijom. Nakon provedene ekstrakcije, uzorak je centrifugiran 10 minuta pri 8000 rpm.

Spektrofotometrijsko određivanje bakterioklorofila  $a$  u supernatantu nakon ekstrakcije odrađeno je u kvarcnoj kiveri skeniranjem u području valnih duljina od 350 do 900 nm. Koncentracija bakterioklorofila  $a$  [ $\text{mg L}^{-1}$ ] izračunata je prema izrazu za ekstrakciju primjenom smjese otapala etanol/acetona (Ritchie, 2018):

$$P = 0,348209(A_{648} - A_{850}) - 0,16583(A_{665} - A_{850}) + 12,11114(A_{775} - A_{850}) \quad [2]$$

### 3.2.9. Određivanje specifične potrošnje kisika bakterije u bioreaktoru s miješalom

Specifična brzina potrošnje kisika tijekom aerobnih uzgoja u mraku u bioreaktoru s miješalom određena je tzv. direktnom metodom. Tijekom 5. i 9. sata uzgoja prekinuta je dobava zraka u bioreaktor te je svakih 5 sekundi zabilježena vrijednost postotka zasićenja podloge kisikom. Aeracija je ponovno pokrenuta prije nego što je postignuta kritična vrijednost koncentracije otopljenog kisika u podlozi nakon koje specifična brzina respiracije ( $q_{O_2}$ ) prestaje biti konstantna. Vrijednost specifične brzine potrošnje kisika opisana je sljedećom jednačinom:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C_S - C_L) - q_{O_2} X \quad [3]$$

pri čemu je  $t$  vrijeme [h];  $C_L$  koncentracija otopljenog kisika u podlozi [mol ili g  $\text{O}_2 \text{ m}^{-3}$ ];  $C_S$  koncentracija zasićenja podloge kisikom [mol ili g  $\text{O}_2 \text{ m}^{-3}$ ];  $K_L a$  volumni koeficijent prijenosa kisika [ $\text{h}^{-1}$ ];  $q_{O_2}$  specifična brzina potrošnje kisika [mol ili g  $\text{O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ];  $X$  koncentracija biomase [g  $\text{L}^{-1}$ ]. Prvi član u jednačini opisuje dobavu (prijenos) kisika iz zraka u podlogu, a drugi potrošnju kisika koju provode bakterijske stanice. Potrošnja kisika u sustavu ( $-qX$ ) je konstantna tijekom prekida aeracije, stoga se dobiva linearna ovisnost koncentracije kisika u podlozi o vremenu. Nagib pravca predstavlja potrošnju kisika u sustavu, a specifična brzina potrošnje kisika se odredi na temelju koncentracije biomase u satu u kojem je proveden prekid aeracije.

### 3.2.10. Određivanje pokazatelja uspješnosti provedenih uzgoja

Pokazatelji uspješnosti određeni su prema sljedećim jednadžbama:

$$Y_X = X - X_0 \quad [4]$$

$$Y_S = S_0 - S \quad [5]$$

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad [6]$$

pri čemu je  $Y_X$  prinos biomase na kraju uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ];  $X_0$  početna koncentracija biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ];  $X$  konačna koncentracija biomase nakon uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ];  $Y_S$  ukupna potrošnja supstrata [ $\text{g L}^{-1}$ ];  $S_0$  početna koncentracija supstrata [ $\text{g L}^{-1}$ ];  $S$  koncentracija preostalog supstrata nakon uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ];  $Y_{X/S}$  koeficijent konverzije supstrata u biomasu [ $\text{g g}^{-1}$ ]

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \times \ln \frac{X}{X_0} \quad [7]$$

pri čemu je  $\mu$  specifična brzina rasta [ $\text{h}^{-1}$ ];  $\Delta t$  vremenski interval [h];  $X_0$  početna koncentracija biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ];  $X$  koncentracija biomase u određenom vremenu (t) [ $\text{g L}^{-1}$ ].

$$Pr = \frac{X - X_0}{t_u} \quad [8]$$

pri čemu je  $Pr$  produktivnost sinteze biomase [ $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ];  $X$  konačna koncentracija biomase nakon provedenog uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ];  $t_u$  vrijeme trajanja uzgoja [h].

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Fiziologija bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, koja pripada skupini morskih ljubičastih nesumpornih bakterija, nije detaljnije istražena još od prve izolacije i identifikacije vrste 80-ih godina prošlog stoljeća. Vrsta je izolirana iz Winogradsky kolone, izvorno postavljene 1951./1952. od strane začetnika Jadranske mikrobiologije, Vlaha Cviića, a sadržavala je uzorke blata i vode iz morskog jezera Malo Jezero na otoku Mljetu (Neutzling i sur., 1984). Shodno tome, cilj ovog istraživanja bio je ispitati fiziološke značajke ove bakterije u svrhu njene potencijalne primjene u biorafinerijama, odnosno za potrebe biotehnoške, pa tako i farmaceutske, prehrambene i kozmetičke industrije. Također, ovaj rad predstavlja nastavak i nadogradnju prethodnim istraživanjima provedenih u sklopu znanstveno – istraživačkih projekata „Bioprospecting Jadranskog mora BioProCro“ (KK.01.1.1.01.0002) te „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-9717).

Za većinu provedenih eksperimenata, kao izvori ugljika odabrani su glukoza i ksiloza, koji obično čine većinski udio šećera u sastavu hidroliziranih komponenata lignoceluloznih sirovina (Mardetko i sur., 2018). Biotehnoška primjena otpadnih sirovina, poput lignoceluloze, smatra se posebice interesantnom jer takve sirovine predstavljaju izuzetno jeftin, lako dostupan i obnovljiv izvor organskog materijala (Mirza i sur., 2019). Nadalje, nakon izvora ugljika, drugu važnu i veću komponentu hranjivog medija čini izvor dušika, čiji se doprinos i cijena često zanemaruje pri valorizaciji biotehnoških procesa. Stoga je cilj ovoga rada bio istražiti mogućnost zamjene skupljih izvora dušika poput diamonijeva fosfata (DAP) i kvašćeva ekstrakta s ekonomičnijom sirovinom poput kukuruzne močevine (CSL – *corn steep liquor*, eng.). CSL se definira kao kondenzirani i fermentirani kukuruzni ekstrakt dobiven postupkom usitnjavanja kukuruza, a predstavlja jeftinu sirovinu bogatu organskim dušikom. Također, sadrži i visoku razinu nekoliko važnih vitamina i elemenata u tragovima, čime predstavlja interesantnu alternativu kvašćevom ekstraktu kao izvoru nužnih faktora rasta (Loy i Lundy, 2019). Međutim, nužno je spomenuti njegov glavni nedostatak, a to je varijabilni sastav koji može ovisiti o vrsti i stanju kukuruza te velikom broju drugih faktora uključenih u preradu kukuruza (Liggett i Koffler, 1948).

Za većinu vrsta koje pripadaju skupini ljubičastih nesumpornih bakterija, preferirani način rasta je uz odgovarajući izvor ugljika i svjetlosti te pri minimalnim koncentracijama



otopljenog kisika u mediju. Shodno navedenom, u ovom radu su prikazani i opisani uzgoji bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, provedeni u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu, pri čemu se zasebno ispitivao utjecaj različitog izvora svjetlosti na rast te utjecaj različitih koncentracija odabranih izvora dušika u podlozi. U poglavlju 4.1. opisano je istraživanje utjecaja svjetla obične žarulje i bijelog LED svjetla na kinetiku rasta bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima. Kao izvori ugljika poslužili su glukoza i ksiloza te malat, a provedeno je ukupno četiri uzgoja u trajanju od 144 sata. Poglavlje 4.2. sadrži prikaz i opis rezultata ispitivanja utjecaja različitih koncentracija odabranih izvora dušika na kinetiku rasta bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu ispod obične žarulje. Provedene su dvije grupe uzgoja: jedna uz dodatak kvašćevog ekstrakta i različitih koncentracija DAP-a, druga grupa uz dodatak različitih koncentracija CSL-a kao izvora dušika u podlozi.

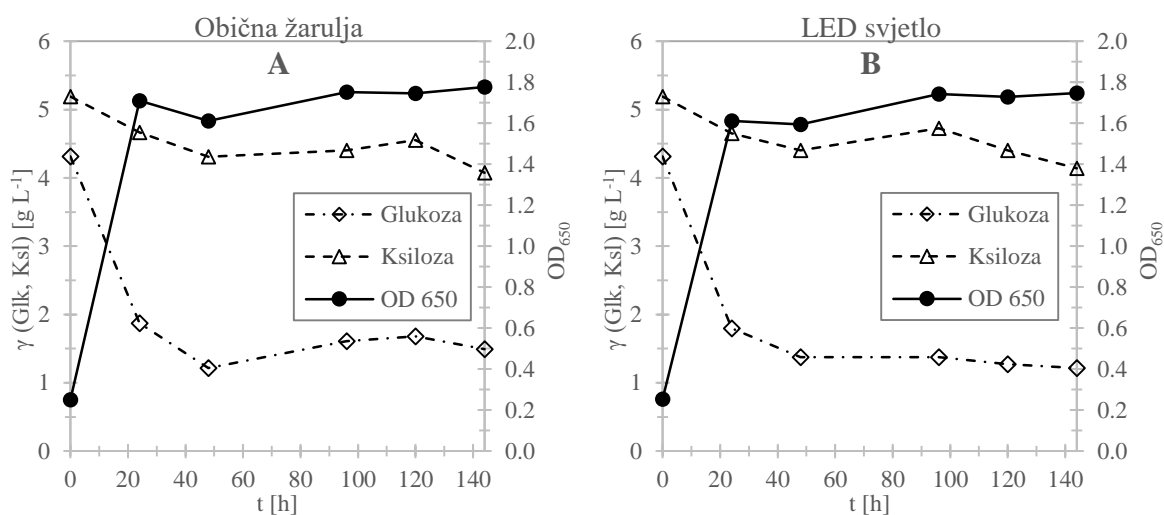
Nadalje, shodno istaknutim prednostima kemotrofnog načina uzgoja u teorijskom dijelu rada, tematika istraživanja bila je usmjerena i u ispitivanje kemoheterotofnog rasta bakterije u svrhu postizanja visokih stopa rasta i sinteze biomase. U poglavlju 4.3. opisani su uzgoji bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 provedeni u aerobnim uvjetima u mraku, šaržnim postupkom u biorektoru s miješalom. Uzgoji su provedeni pri konstantnoj temperaturi i pH vrijednosti u trajanju od 24 h. Provedeno je ukupno šest uzgoja, uz dodatak oba ili jednog od odabranih izvora ugljika – glukoze ili ksiloze, uz istovremeno ispitivanje utjecaja različitog izvora dušika u podlozi. Kao i u prethodnom eksperimentu, za svaki su odabrani izvor ugljika provedena po dva uzgoja: jedan uz dodatak DAP-a i kvašćevog ekstrakta, drugi uz dodatak CSL –a kao izvora dušika. Cilj je bio istražiti kinetiku rasta, potrošnju odabranih supstrata, odrediti specifičnu brzinu potrošnje kisika tijekom uzgoja te postići što veći prinos biomase u danim uvjetima.

Tijekom svih provedenih uzgoja praćena je promjena koncentracije biomase, potrošnja supstrata, te udio pigmenta bakterioklorofila *a* u biomasi bakterije. Tijekom aerobnih uzgoja praćena je i specifična brzina potrošnje kisika. Postupci navedenih analitičkih metoda su opisani u poglavlju 3.2.6.. Grafički prikazi su poslužili za prezentiranje tijeka uzgoja te promjene udjela bakterioklorofila *a* u biomasi. Pokazatelji uspješnosti provedenih uzgoja su detaljno opisani u tekstu i/ili prikazani u tablicama.

#### 4.1. UTJECAJ RAZLIČITOG IZVORA SVJETLOSTI NA RAST BAKTERIJE *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 U MIKROAEROFILNIM UVJETIMA NA SVJETLU

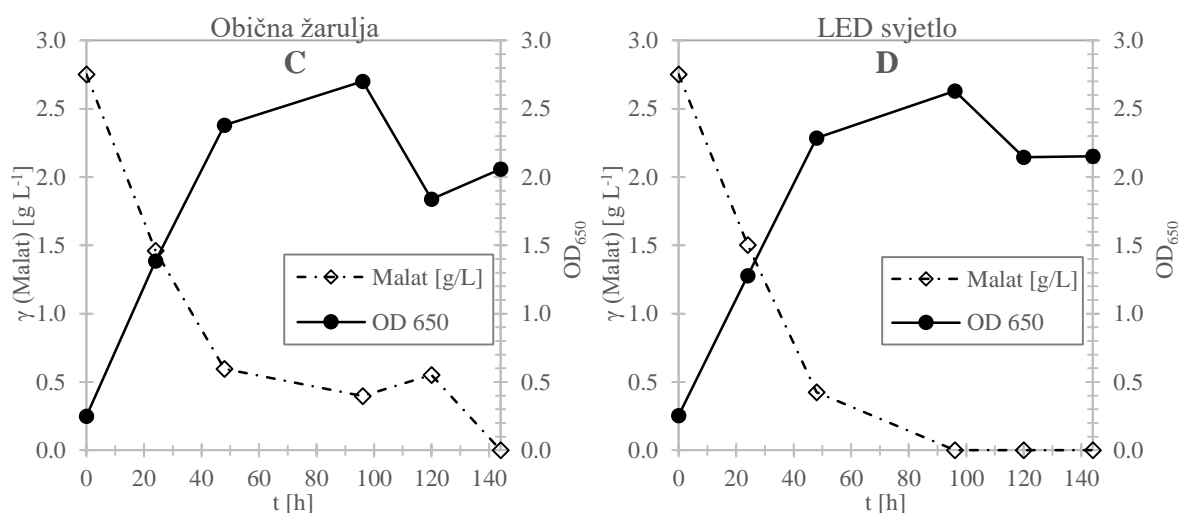
U svrhu ispitivanja utjecaja različitog izvora svjetlosti na rast i sintezu pigmenta bakterioklorofila *a* bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, vođene su po dvije grupe uzgoja: prva grupa uz običnu žarulju kao izvora svjetlosti, druga ispod bijelog LED svjetla. Za svaku provedenu grupu uzgoja, pripremljena je podloga s  $5 \text{ g L}^{-1}$  glukoze i  $5 \text{ g L}^{-1}$  ksiloze kao izvorima ugljika te podloga s malatom koncentracije  $2,7 \text{ g L}^{-1}$ . Ukupno trajanje uzgoja bilo je 144 sata, na temperaturi od  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  i pri konstantnoj pH vrijednosti.

Tijek uzgoja bakterije provedenih u mikroaerofilnim uvjetima na glukozi i ksilozi uz običnu žarulju te s bijelim LED svjetlom kao izvorom svjetlosti prikazan je na slici 6. Uočen je vrlo rani ulazak u stacionarnu fazu rasta. Točnije, već nakon 24. sata uzgoja, nevezano za ispitivani izvor svjetlosti. Do završetka eskponencijalne faze rasta za oba ispitivana slučaja, potrošeno je oko 60 % glukoze te 10 % ksiloze. Ostatak supstrata zaostaje u podlozi sve do završetka uzgoja.



**Slika 6.** Tijek uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 provedenih u mikroaerofilnim uvjetima na glukozi i ksilozi uz običnu žarulju (A) te s bijelim LED svjetlom (B) kao izvorom svjetlosti

Uzgoji bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima provedeni na malatu prikazani su na slici 7. Tijek uzgoja se vidljivo razlikuje u usporedbi s uzgojima na glukozi i ksilozi. Završetak eksponencijalne faze rasta vidljiv je nakon 48 sati kod oba ispitivana izvora svjetlosti. U tom periodu potrošeno je 78 % malata ispod obične žarulje, odnosno 85 % ispod bijelog LED svjetla. Između 48. i 120. sata uzgoja ispod obične žarulje nije uočena izraženija potrošnja malata, dok je ispod bijelog LED svjetla malat u potpunosti utrošen već nakon 100. sata uzgoja.



**Slika 7.** Tijek uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 provedenih u mikroaerofilnim uvjetima na malatu uz običnu žarulju (C) te s bijelim LED svjetlom (D) kao izvorom svjetlosti

U svrhu izračuna pokazatelja uspješnosti provedenih uzgoja, određivana je optička gustoća uzoraka pri valnoj duljini od 650 nm, koja je onda naknadno postavljena u korelaciju s podacima dobivenim gravimetrijskom metodom. Pokazatelji uspješnosti tijekom mikroaerofilnih uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 uz različite izvore svjetlosti prikazani su u tablici 8. Ispod obične žarulje uz glukozu i ksilozu u podlozi, prirast biomase je iznosio 1,846 g L<sup>-1</sup>, uz produktivnost sinteze biomase od 0,013 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Dobiveni rezultat se podudara s rezultatom prethodnog istraživanja ove bakterije provedenog pod istim uvjetima i količinom supstrata (Sarić, 2019). Nešto manji prinos od 1,807 g L<sup>-1</sup> dobiven je uz bijelo LED svjetlo, pri čemu je produktivnost sinteze biomase također iznosila 0,013 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Za specifične brzine rasta postignute su potpuno iste vrijednosti, odnosno 0,038 h<sup>-1</sup>. Može se

zaključiti da nije uočena veća razlika između uzgoja vođenih ispod obične žarulje te bijelog LED svjetla na ispitivanim koncentracijama glukoze i ksiloze u podlozi.

**Tablica 8.** Pokazatelji uspješnosti tijekom mikroaerofilnih uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 uz različite izvore svjetlosti

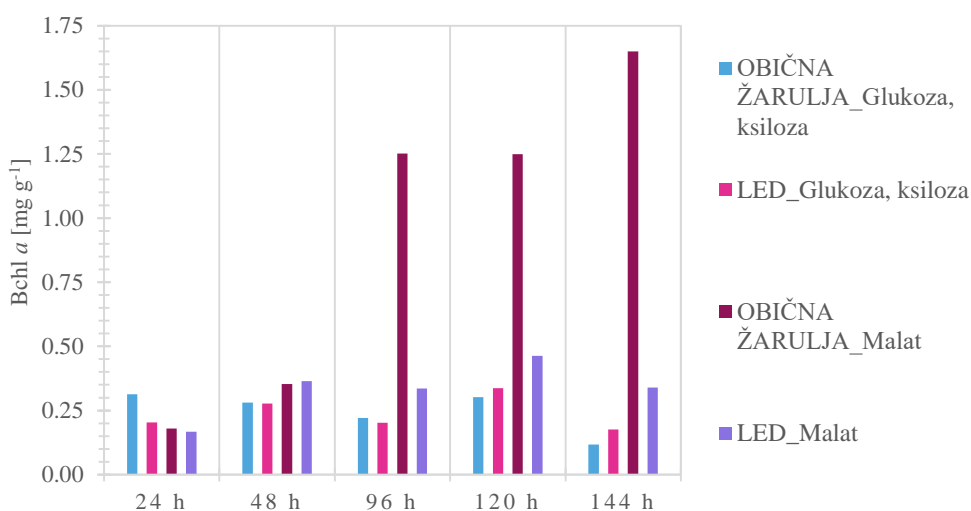
Izvor svjetlosti	Izvor ugljika	$Y_x$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_{x/s}$ [g g <sup>-1</sup> ]	$Pr$ [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]
Obična žarulja	Glukoza Ksiloza	1,846	0,469	0,013	0,038
	Malat	2,187	0,794	0,015	0,037
LED svjetlo	Glukoza Ksiloza	1,807	0,435	0,013	0,038
	Malat	2,296	0,834	0,016	0,037

U slučaju uzgoja s malatom kao izvorom ugljika, također je vidljiva minimalna razlika u pokazateljima uspješnosti provedenih uzgoja. Poput uzgoja na glukozi i ksilozi, nije uočen veći utjecaj ispitanih izvora svjetlosti na prirast biomase, stopu rasta i produktivnost sinteze biomase. Iako je tijekom uzgoja ispod bijelog LED svjetla postignut veći prirast biomase u vrijednosti od 2,296 g L<sup>-1</sup>, prinos pod običnom žaruljom je manji samo za 5 % te iznosi 2,187 g L<sup>-1</sup>. Isto vrijedi i za koeficijent konverzije malata u biomasu. Produktivnost sinteze biomase te specifična brzina rasta jednake su za oba ispitivana slučaja.

U usporedbi s uzgojima na glukozi i ksilozi, prinosi biomase na malatu postižu za preko 20 % veće vrijednosti uz izrazito visoke koeficijente konverzije malata u biomasu. Takvi rezultati su i očekivani, s obzirom da je poznato da većina vrsta ljubičastih nesumpornih bakterija izrazito dobro raste na intermedijerima citratnog ciklusa poput malata (Tabita, 1995). Slični prinosi biomase u podjednakim uvjetima uzgoja postignuti su i u radu Novak i suradnici (2017).

Obične žarulje se veoma često koriste za osvjetljavanje tijekom uzgoja fotosintetskih bakterija jer emitiraju široki spektar koji većinski apsorbiraju bakterijski pigmenti (Kuo i sur., 2012). Emisija obične žarulje, za razliku od bijelog LED svjetla, ulazi u infracrveno područje

elektromagnetskog spektra s povećanim intenzitetom, što odgovara pojasu valnih duljina bakterijskog bakterioklorofila. Bijelo LED svjetlo pak postiže maksimalne intenzitete u užem pojasu vidljivog elektromagnetskog spektra, točnije između 400 i 700 nm. Na slici 8 prikazan je udio bakterioklorofila *a* u biomasi tijekom provedenih uzgoja u mikroaerofilnim uvjetima na ispitivanim izvorima svjetlosti. S obzirom na veću količinu glukoze i ksiloze u podlozi, stanice su veoma rano ušle u stacionarnu fazu rasta te nije došlo do značajnije promjene udjela bakterioklorofila *a* tijekom trajanja uzgoja. Također, veće razlike u udjelu s obzirom na korišteni izvor svjetlosti nisu uočene.



**Slika 8.** Udio bakterioklorofila *a* u biomasi tijekom uzgoja provedenih u mikroaerofilnim uvjetima ispod obične žarulje i bijelog LED svjetla

Prednost obične žarulje izraženija je kada se promatraju uzgoji provedeni na malatu. Tijekom trajanja uzgoja provedenih ispod obične žarulje vidljiv je rast udjela bakterioklorofila *a* u biomasi, posebice nakon 48. sata uzgoja. Nužno je napomenuti da je tada uočena i smanjena potrošnja malata u podlozi. U konačnom satu uzgoja, najveći udio postignut je na malatu uz običnu žarulju te iznosi 1,650 mg bakterioklorofila *a* po gramu biomase. Pri uzgoju na malatu uz bijelo LED svjetlo, vidljiv je manji porast udjela pigmenta. Međutim, povećanje je zanemarivo u usporedbi s uzgojem ispod obične žarulje. Iako se obično smatraju efikasnijima, može se zaključiti da upotreba bijelog LED svjetla nije optimalna za postizanje povećane sinteze bakterioklorofila i njegovih derivata.

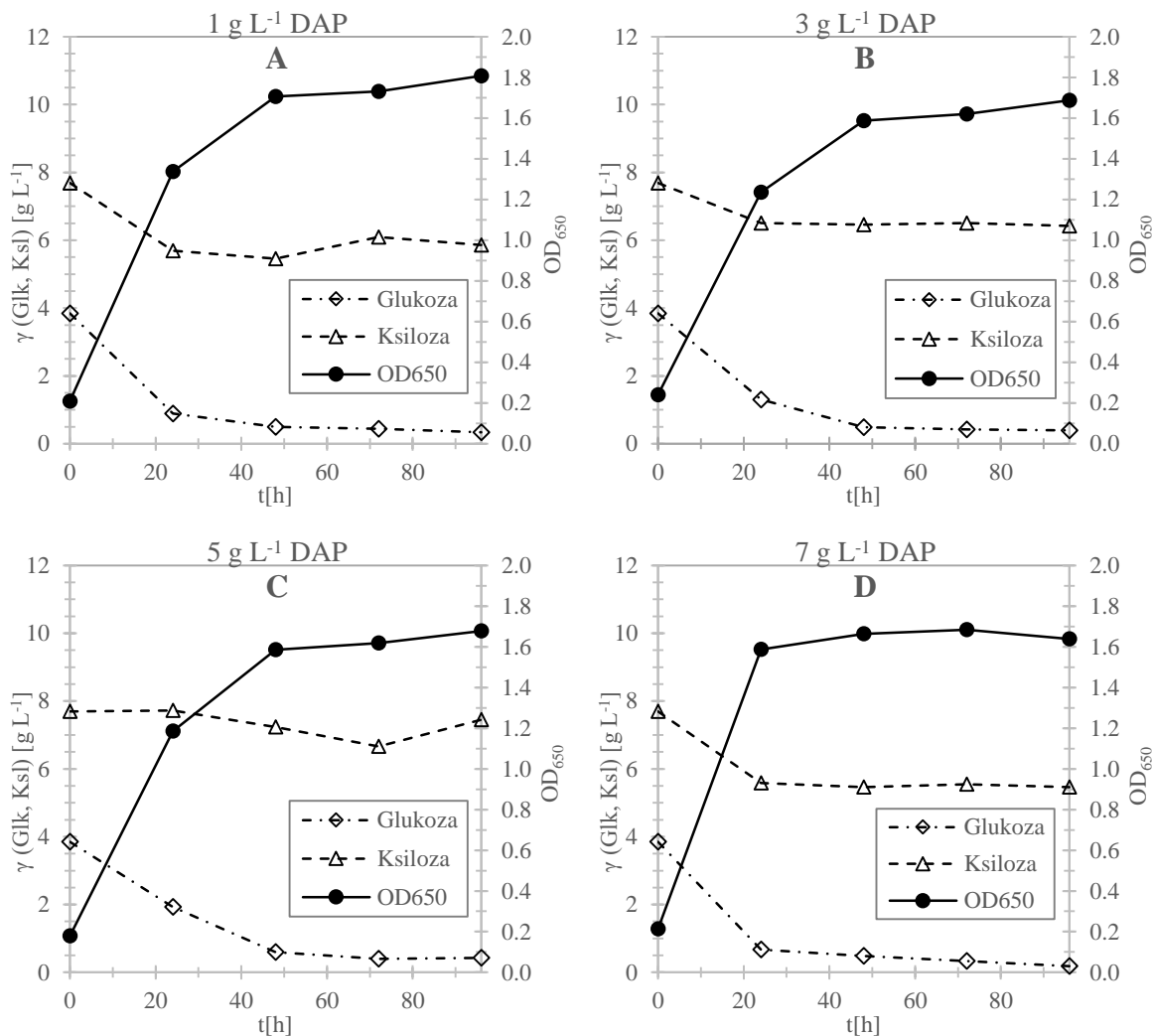
## 4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH KONCENTRACIJA ODABRANIH IZVORA DUŠIKA NA RAST BAKTERIJE *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 U MIKROAEROFILNIM UVJETIMA NA SVJETLU

U svrhu ispitivanja rasta na različitim koncentracijama odabranih izvora dušika, provedene su po dvije grupe uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu obične žarulje (2000 luxa). Prva grupa uzgoja provedena je uz različite koncentracije DAP-a i 1,5 g L<sup>-1</sup> kvašćeva ekstrakta, a druga uz različite koncentracije CSL-a kao izvor dušika u podlozi. Ispitane su četiri različite masene koncentracije izvora dušika: 1, 3, 5 i 7 g L<sup>-1</sup>. Svi uzgoji su provedeni u trajanju od 96 sati, na temperaturi od 28 °C i pri konstantnoj pH vrijednosti.

Također, kako bi se istovremeno ispitao i rast bakterije na sirovini kao što je lignoceluloza, uzgoji su provedeni na ksilozi i glukozu kao izvorima ugljika, u omjeru 2:1. Točnije, u podlozi se na početku uzgoja nalazilo 8 g L<sup>-1</sup> ksiloze te 4 g L<sup>-1</sup> glukoze. Navedeni šećeri čine najzastupljenije ugljikohidrate u sastavu hidroliziranih komponenata lignoceluloznih sirovina, pri čemu obično ksilozi pripada većinski udio. Promatran je i utjecaj ukupno dodane količine izvora ugljika, s obzirom da je prethodno uočeno da povišene koncentracije u mediju mogu djelovati inhibirajuće na rast bakterije i sintezu pigmenta (Sarić, 2019).

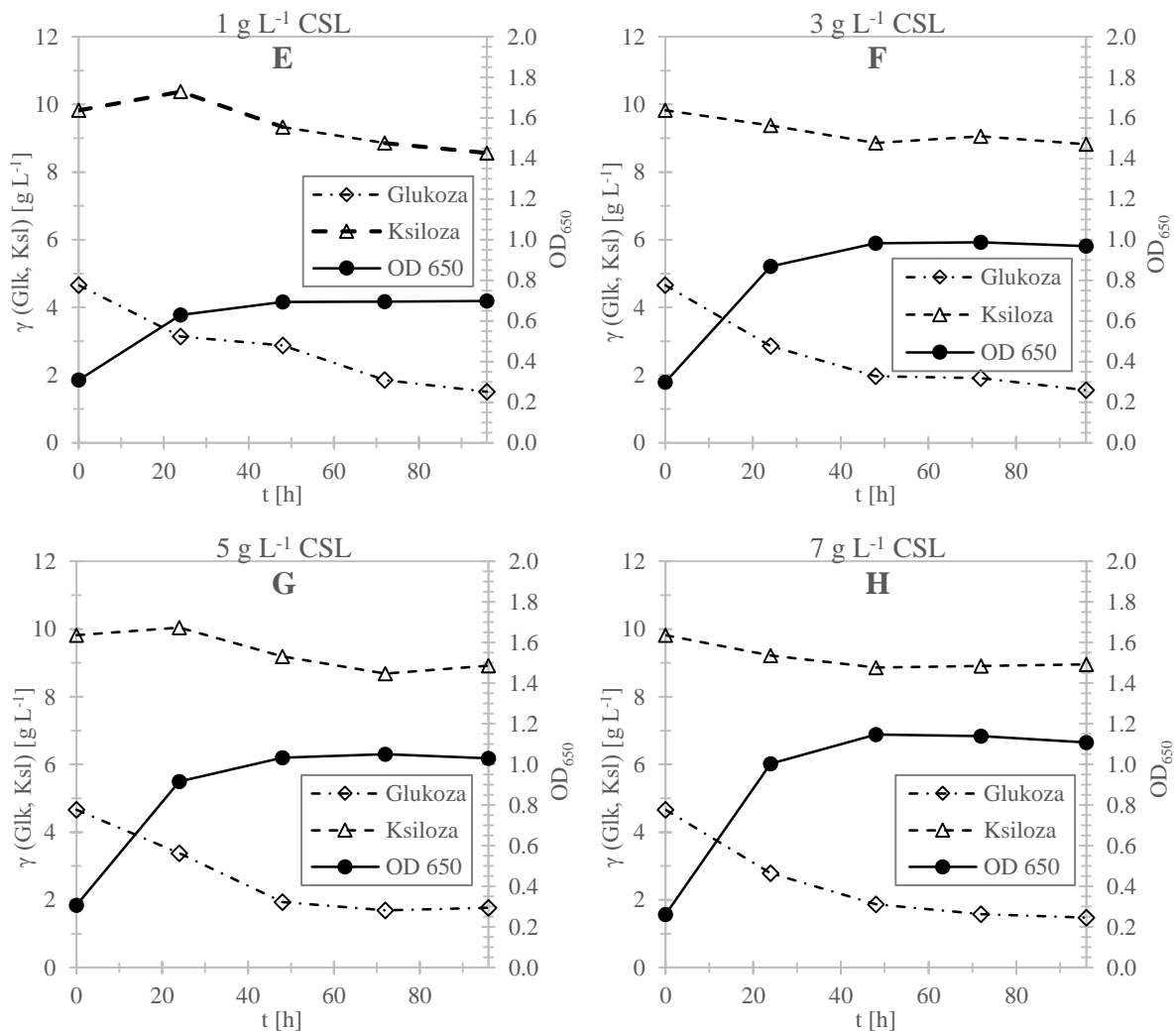
Promjena koncentracije supstrata i biomase tijekom uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 uz kvašćev ekstrakt i različite koncentracije DAP-a kao izvora dušika, prikazani su na slici 9. Ulazak u stacionarnu fazu uočen je relativno rano, već nakon 24. sata uzgoja pri koncentraciji DAP-a od 7 g L<sup>-1</sup>, odnosno nakon 48. sata za ostale uzgoje. Tijek uzgoja uz različite koncentracije CSL-a kao izvora dušika prikazan je na slici 10. Kao i kod uzgoja s DAP-om, ulazak u stacionarnu fazu rasta za sve ispitivane koncentracije CSL-a u podlozi uočen je već u 48. satu uzgoja.

Tijekom svih provedenih uzgoja, uočena je nagla potrošnja glukoze i ksiloze tijekom eksponencijalne faze rasta, koja zatim stagnira s ulaskom stanica u stacionarnu fazu. Nakon završetka eksponencijalne faze rasta tijekom uzgoja s DAP –om i kvašćevim ekstraktom, potrošeno je između 80 i 90 % glukoze te manje od 30 % ksiloze u podlozi.



**Slika 9.** Krivulje rasta bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu pri koncentracijama DAP-a kao izvora dušika od 1 g L<sup>-1</sup> (A), 3 g L<sup>-1</sup> (B), 5 g L<sup>-1</sup> (C) i 7 g L<sup>-1</sup> (D)

Kod uzgoja provedenih s CSL-om, potrošnja glukoze i ksiloze je puno manja u odnosu na uzgoje s DAP-om i kvašćevim ekstraktom te raste s porastom koncentracije izvora dušika u podlozi. Točnije, uočeno je smanjenje glukoze za 38 % pri koncentraciji CSL-a od 1 g L<sup>-1</sup> te za 60 % pri najvećoj koncentraciji od 7 g L<sup>-1</sup> CSL-a. Nešto manja potrošnja glukoze od 58 % vidljiva je kod uzgoja s 3 i 5 g L<sup>-1</sup> CSL-a u podlozi. Tijekom svih uzgoja provedenih s CSL – om, koncentracija ksiloze se pri završetku stacionarne faze smanjila za manje od 10 %. Ostatak supstrata zaostaje u podlozi sve do završetka uzgoja nakon 96 sati.



**Slika 10.** Krivulje rasta bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu pri koncentracijama CSL-a kao izvora dušika od 1 g L<sup>-1</sup> (E), 3 g L<sup>-1</sup> (F), 5 g L<sup>-1</sup> (G) i 7 g L<sup>-1</sup> (H)

Pokazatelji uspješnosti provedenih uzgoja izračunati su na temelju podataka dobivenih određivanjem optičke gustoće uzoraka pri valnoj duljini od 650 nm i podataka dobivenim gravimetrijskom metodom. Izračunati pokazatelji uspješnosti za uzgoje provedene pri različitim koncentracijama odabranih izvora dušika prikazani su u tablici 9.

Najveći prinos biomase od 1,933 g L<sup>-1</sup> dobiven je na kraju uzgoja s početnom koncentracijom DAP-a od 1 g L<sup>-1</sup>. Međutim, navedeni rezultat je samo za 10 % veći od najmanje vrijednosti postignute kod uzgoja s 7 g L<sup>-1</sup> DAP-a u podlozi. Za usporedbu s prethodnim istraživanjima ove bakterije, nešto manji prinosi biomase postignuti su u radu Sarić



(2019), gdje su kao izvori dušika u podlozi korišteni natrijev glutamat u koncentraciji od 4 g L<sup>-1</sup> te kvašćev ekstrakt s koncentracijom od 1,5 g L<sup>-1</sup>.

Specifične brzine rasta bakterije u danim uvjetima su praktički podjednake, a u prosjeku iznose 0,039 h<sup>-1</sup>. Isto vrijedi i za postignute produktivnosti sinteze biomase tijekom uzgoja koje u prosjeku postižu vrijednosti od 0,019 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Nadalje, koeficijenti konverzije supstrata u biomasu se nešto više razlikuju. Najveća vrijednost je postignuta prilikom uzgoja s 5 g L<sup>-1</sup> DAP-a, a najmanja kod uzgoja s 7 g L<sup>-1</sup> DAP-a kao izvora dušika u podlozi. Shodno dobivenim rezultatima, može se zaključiti da ispitivane koncentracije DAP-a u podlozi nemaju veliki utjecaj na stopu rasta, kao niti na konačni prinos biomase bakterije.

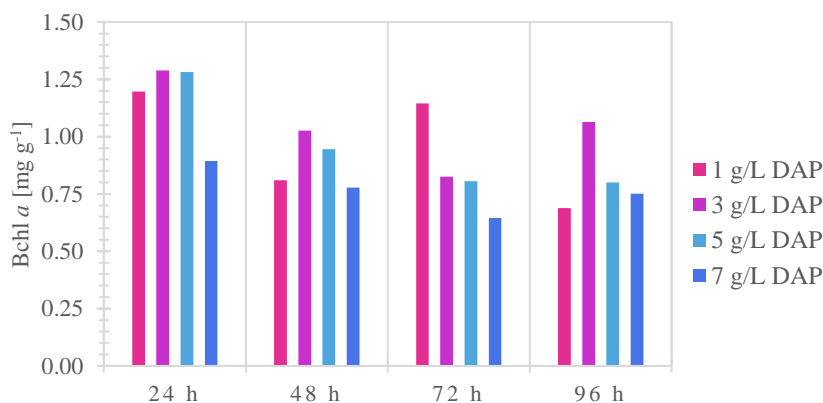
**Tablica 9.** Pokazatelji uspješnosti tijekom mikroaerofilnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na svjetlu uz različite koncentracije odabranih izvora dušika

Izvor dušika	$\gamma$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_x$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_{x/s}$ [g g <sup>-1</sup> ]	$Pr$ [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]
DAP	1	1,933	0,362	0,020	0,039
	3	1,750	0,371	0,018	0,037
	5	1,812	0,496	0,019	0,040
	7	1,724	0,293	0,018	0,039
CSL	1	0,471	0,107	0,003	0,026
	3	0,810	0,197	0,006	0,032
	5	0,875	0,230	0,006	0,032
	7	1,025	0,253	0,007	0,035

Pri kraju uzgoja provedenih na CSL-u, vidljivo je da prirast biomase raste s porastom koncentracije CSL-a kao izvora dušika u podlozi. Ipak, nužno je napomenuti da je uočena veoma mala razlika u rezultatima dobivenih tijekom uzgoja s 3 i 5 g L<sup>-1</sup> CSL-a. Najmanji prinos biomase dobiven je nakon uzgoja s 1 g L<sup>-1</sup> CSL-a, a najveći kod 7 g L<sup>-1</sup> CSL-a te iznosi 1,025 g L<sup>-1</sup>. Vidljivo je da najveći prinos biomase nakon uzgoja s CSL-om postiže 40 % manju vrijednost od vrijednosti najmanjeg prinosa biomase dobivenog kod uzgoja s DAP-om. Isto se može uočiti i usporedbom produktivnosti sinteze biomase tijekom provedenih uzgoja. Očito je

da ispitivane koncentracije CSL-a nisu dostatne za postizanje istih rezultata poput onih koji su postignuti tijekom uzgoja s DAP-om i kvašćevim ekstraktom kao izvorom dušika u podlozi. Nadalje, koeficijenti konverzije supstrata u biomasu vidljivo rastu s porastom koncentracije CSL-a u podlozi, ali također postižu puno manje vrijednosti. Isto vrijedi i za specifičnu brzinu rasta biomase koja pri početnoj koncentraciji od  $7 \text{ g L}^{-1}$  CSL-a postiže maksimalan iznos od  $0,035 \text{ h}^{-1}$ .

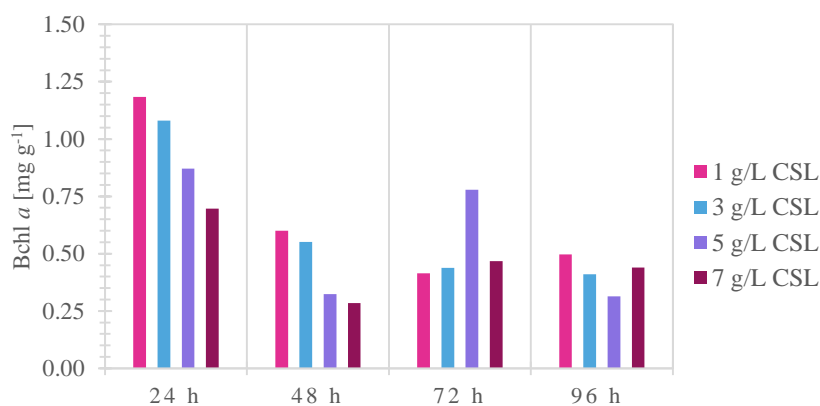
Promjene udjela bakterioklorofila *a* u biomasi bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja provedenih uz DAP i kvašćev ekstrakt kao izvorima dušika prikazane su na slici 11. Za uzgoje provedene uz CSL kao izvor dušika, promjene udjela bakterioklorofila *a* u biomasi tijekom trajanja uzgoja su prikazane na slici 12.



**Slika 11.** Udio bakterioklorofila *a* u biomasi bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja provedenih u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu uz kvašćev ekstrakt i pri različitim koncentracijama DAP-a kao izvora dušika u podlozi

Nakon završetka eksponencijalne faze rasta tijekom uzgoja provedenih uz DAP i kvašćev ekstrakt kao izvorima dušika, udio pigmenta bakterioklorofila *a* u stanicama bakterije prosječno iznosi malo više od 0,1 % suhe tvari biomase. Dobiveni rezultat je u skladu s prethodnim istraživanjima ove bakterije, gdje je uočeno da pri većim koncentracijama izvora ugljika u podlozi, udio bakterioklorofila *a* u biomasi poprima puno manje vrijednosti od onih navedenih u dostupnoj literaturi (Sarić, 2019; Patrusheva i sur., 2017). Najveći udio bakterioklorofila *a* nakon završetka eksponencijalne faze rasta uočen je tijekom uzgoja s

početnim koncentracijama DAP-a od 3 i 5 g L<sup>-1</sup> u podlozi. Ulaskom u stacionarnu fazu rasta, udio pigmenta u biomasi poprima manje vrijednosti te pri završetku uzgoja dolazi do prosječnog smanjenja udjela u biomasi za 30 %. Prosječna vrijednost udjela bakterioklorofila *a* na kraju provedenih uzgoja je nešto veća od 0,08 %, pri čemu je najveći udio od 1,064 mg g<sup>-1</sup> postignut u podlozi s 3 g L<sup>-1</sup> DAP-a. S obzirom da količina pigmenta tijekom uzgoja indirektno ukazuje na koncentraciju živih stanica bakterije u podlozi, smanjenje udjela pigmenta bakterioklorofila *a* nakon ulaska u stacionarnu fazu rasta je očekivan.



**Slika 12.** Udio bakterioklorofila *a* u biomasi bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja provedenih u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu uz različite koncentracije CSL-a kao izvora dušika

Za uzgoje provedene s CSL-om kao izvorom dušika u podlozi, uočeno je da pri završetku eksponencijalne faze rasta, manje početne koncentracije CSL-a rezultiraju većim udjelom bakterioklorofila *a* u biomasi bakterije. Najveći udio od 1,183 mg bakterioklorofila *a* po gramu biomase, postignut je kod uzgoja s 1 g L<sup>-1</sup> CSL-a u podlozi. Najmanji udio bakterioklorofila *a* od 0,696 mg g<sup>-1</sup> biomase postignut je kod uzgoja s početnom koncentracijom od 7 g L<sup>-1</sup> CSL-a. Tijekom trajanja stacionarne faze rasta vidljiv je izraženiji pad vrijednosti udjela pigmenta zbog odumiranja stanica i razgradnje pigmenta, pri čemu prosječni udio bakterioklorofila *a* u biomasi nakon uzgoja iznosi manje od 0,05 %.

### 4.3. ŠARŽNI UZGOJI BAKTERIJE *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 U AEROBNIM UVJETIMA U MRAKU U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM - NA RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJIKA I DUŠIKA

Uzgoj fakultativnih fototrofa u uvjetima bez izvora svjetlosti i sa značajnom aeracijom sustava predstavlja alternativan način za postizanje visokih stopa rasta i prinosa biomase takvih mikroorganizama. Upotrebom kemotrofnih sustava nastoje se izbjeći mogući problemi fototrofnih načina uzgoja, poput limitacije izvorom svjetlosti, visokih troškova umjetne rasvjete i slično (Watanabe i sur., 1998). Metabolizam ovih bakterija u aerobnim uvjetima u mraku se definira kao kemoheterotrofni, pri čemu energiju za rast pridobivaju procesom stanične respiracije (Keppen i sur., 2013). Kako bi se osigurao odgovarajući stupanj aeracije i homogenizacije tijekom rasta bakterije, svi uzgoji opisani u ovom poglavlju su provedeni u bioreaktoru s miješalom.

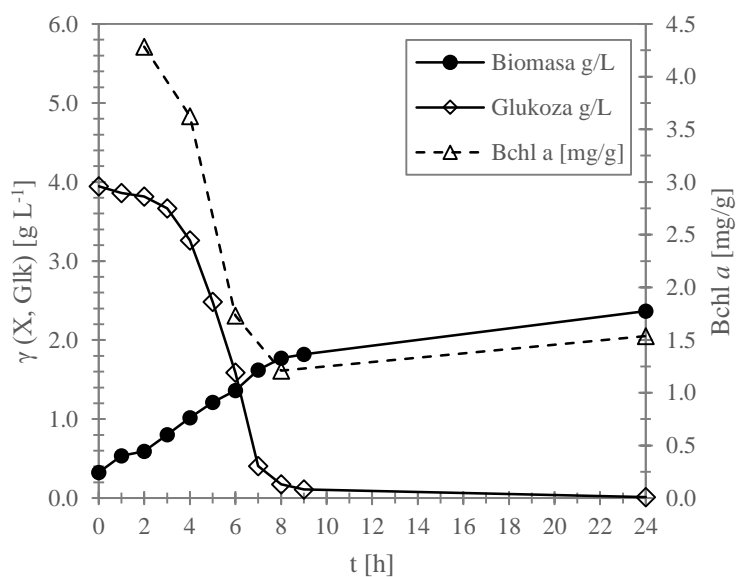
Očekuje se da će u danim uvjetima, bakterija postići veću brzinu rasta i veće prinose u odnosu na prethodne uzgoje provedene na svjetlu. Tada se tako dobivena biomasa potencijalno može iskoristiti za provedbu sekundarnog uzgoja u uvjetima koji više odgovaraju sintezi intracelularnih spojeva vezanih za sintezu fotosintetskog aparata (Zeiger i Grammel, 2009; Noparatnaraporn i sur., 1986).

Za postizanje uspješnog kemoheterotrofnog rasta bakterije, nužan je odabir odgovarajućih izvora ugljika i dušika u podlozi. Radije već ranije spomenutih prednosti upotrebe otpadnih lignoceluloznih sirovina u biotehnološkim procesima, kao izvori ugljika tijekom uzgoja odabrani su glukoza i ksiloza. Također, kao i u prethodnom eksperimentu, istražen je potencijal CSL-a kao izvora dušika u podlozi. Ispitivanjem i ukazivanjem na sposobnost ove bakterije da raste na podlogama koje sadrže navedene izvore ugljika i dušika otvaraju se razne mogućnosti za buduću provedbu ekonomski i ekološki održivih procesa proizvodnje različitih proizvoda biomase.

#### 4.3.1. Utjecaj različitih izvora dušika na rast bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 uz glukozu u podlozi kao izvoru ugljika

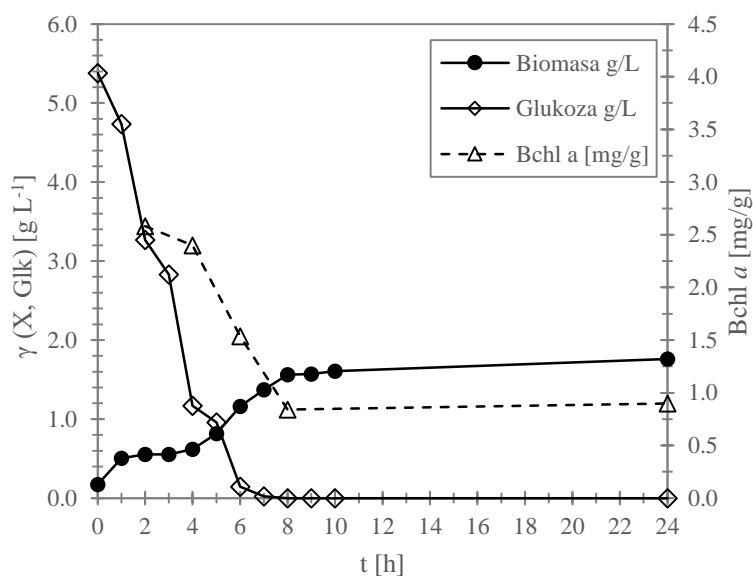
Provedena su ukupno dva uzgoja na glukozu kao izvoru ugljika u podlozi, pri čemu je prvi uzgoj vođen uz dodatak  $3 \text{ g L}^{-1}$  diamonijevog fosfata (DAP-a) i  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  kvašćevog ekstrakta, a drugi uz  $5 \text{ g L}^{-1}$  CSL-a kao izvora dušika (poglavlje 3.1.4.4.; tablica 6: uzgoj 1 i 2).

Na slici 13 prikazana je potrošnja glukoze, promjena koncentracije biomase te promjena udjela pigmenta bakterioklorofila *a* u biomasi tijekom šaržnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, u aerobnim uvjetima u mraku, na glukozu kao izvoru ugljika te DAP-u i kvašćevom ekstraktu kao izvoru dušika. Prinos biomase na kraju provedenog uzgoja iznosio je  $2,042 \text{ g L}^{-1}$ , pri čemu je produktivnost sinteze biomase bila  $0,085 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Najveći udio glukoze u podlozi potrošen je do završetka eksponencijalne faze rasta, točnije preko 95 % od početne koncentracije. Ukupno je utrošeno  $3,934 \text{ g L}^{-1}$  glukoze, uz koeficijent konverzije glukoze u biomasu od  $0,519 \text{ g g}^{-1}$ .



**Slika 13.** Tijek šaržnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, u bioreaktoru s miješalom, na glukozu kao izvoru ugljika te DAP-u i kvašćevom ekstraktu kao izvoru dušika

Ulazak u eksponencijalnu fazu rasta uočen je u 2. satu uzgoja, a maksimalna specifična brzina rasta postignuta je dva sata kasnije te je iznosila  $0,258 \text{ h}^{-1}$ . Za usporedbu, postignuta stopa rasta bakterije je do sedam puta veća nego kod prethodno provedenih mikroaerofilnih uzgoja na svjetlu. Takvi rezultati su i očekivani, s obzirom da je uzgoj proveden u uvjetima značajne aeracije koji obično omogućuju postizanje viših stopa rasta (Watanabe i sur., 1998; Noparatnaraporn i sur., 1986). Svi navedeni pokazatelji uspješnosti prikazani su i u tablici 10. Specifična brzina potrošnje kisika određena u 5. satu uzgoja iznosila je  $0,638 \text{ mg O}_2$  po gramu biomase. U 9. satu uzgoja, pri završetku eksponencijalne faze rasta, vrijednost specifične brzine rasta se smanjila za 40 % te je iznosila  $0,367 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}$  biomase.



**Slika 14.** Tijek šaržnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, u bioreaktoru s miješalom, na glukozi kao izvoru ugljika te CSL-u kao izvoru dušika

Tijek šaržnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, na glukozi kao izvoru ugljika te CSL-u kao izvoru dušika, prikazan je slici 14. Dobiveni prinos biomase na kraju uzgoja bio je za oko 20 % manji u odnosu na prinos dobiven u prethodnom uzgoju, odnosno  $1,589 \text{ g L}^{-1}$ . Glukoza je utrošena u potpunosti već u 8. satu uzgoja, ukupno  $5,379 \text{ g L}^{-1}$ . Nakon 8. sata, vidljiv je ulazak bakterije u stacionarnu fazu rasta. Postignuti koeficijent konverzije iznosio je  $0,295 \text{ g g}^{-1}$ , što je za 43 % manje u usporedbi s prethodnim uzgojem. Produktivnost sinteze biomase bila je  $0,066 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Eksponencijalna

faza rasta uočena je nešto kasnije, odnosno između 4. i 8. sata uzgoja. Maksimalna specifična brzina rasta od  $0,295 \text{ h}^{-1}$  postignuta je u 5. satu uzgoja. Tada je dobivena i vrijednost specifične brzine potrošnje kisika od  $0,564 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}$  biomase. Ulaskom u stacionarnu fazu, točnije u 9. satu uzgoja, dolazi do smanjenja specifične brzine potrošnje kisika na vrijednost od  $0,245 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}$  biomase. Svi navedeni pokazatelji uspješnosti prikazani su i u tablici 11.

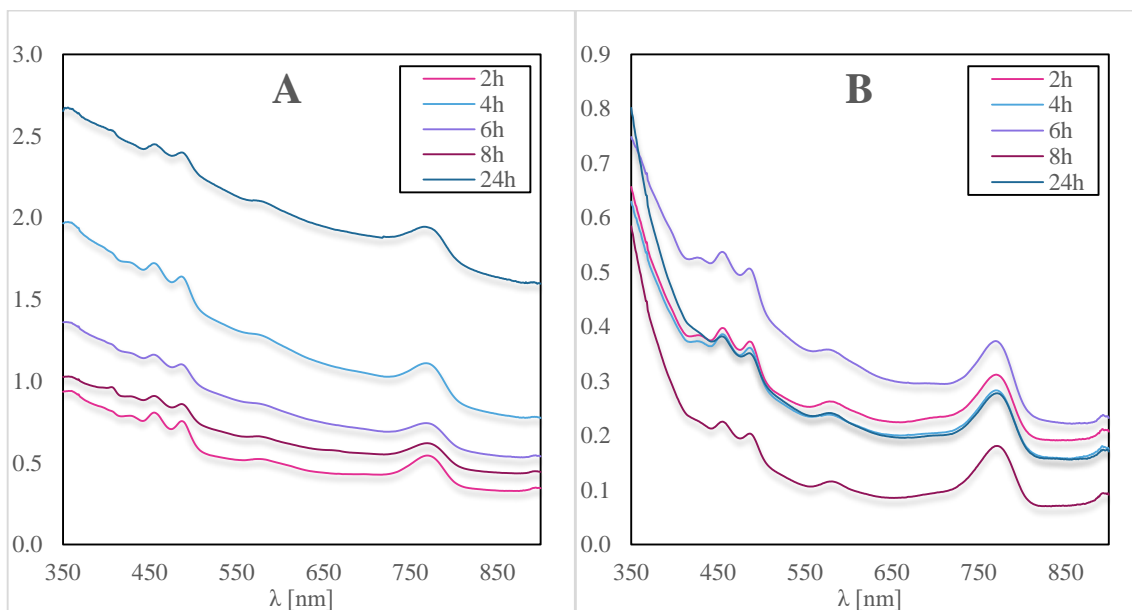
**Tablica 11.** Pokazatelji uspješnosti šaržnih uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, u bioreaktoru s miješalom, na glukozu kao izvoru ugljika i različitim izvorima dušika

Izvor dušika	$Y_x$ [ $\text{g L}^{-1}$ ]	$Y_{x/s}$ [ $\text{g g}^{-1}$ ]	$Pr$ [ $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]	$\mu$ [ $\text{h}^{-1}$ ]
DAP i kv. ekstrakt	2,042	0,519	0,085	0,258
CSL	1,589	0,295	0,066	0,295

Nešto veća vrijednost stope rasta bakterije uočena je uz CSL kao izvor dušika u podlozi, međutim konačni prinos biomase te produktivnost provedenog uzgoja su puno veći uz DAP i kvašćev ekstrakt kao izvor dušika. Shodno postignutim pokazateljima uspješnosti provedenih uzgoja, može se zaključiti da bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 preferira DAP i kvašćev ekstrakt u danj koncentraciji kao izvore dušika u podlozi s glukozom tijekom rasta. Mogući razlog takvim rezultatima je već spomenuta varijabilost sastava CSL-a, odnosno nedostatna količina dušikovitih spojeva te ostalih faktora nužnih za rast i sintezu proizvoda biomase, koji se obično osiguravaju dodatkom kvašćeva ekstrakta (Liggett i Koffler, 1948). Ispitivana koncentracija CSL-a nije bila dostatana za postizanje očekivanih rezultata. Međutim, s obzirom na dobivene rezultate u prethodnom eksperimentu (poglavlje 4.2.), može se zaključiti da bi povećanje početne koncentracije CSL-a u podlozi rezultiralo većim prinosima na kraju uzgoja.

Nadalje, u svrhu praćenja promjene udjela bakterioklorofila *a* u biomasi bakterije tijekom uzgoja, provedena je ekstrakcija pigmenata te spektrofotometrijsko skeniranje supernatanta nakon ekstrakcije u području valnih duljina od 350 do 900 nm. Specifični apsorpcijski spektri ekstrahiranih pigmenata tijekom šaržnih uzgoja bakterije *Rhodovulum*

*adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, na glukozu kao izvoru ugljika te DAP-u i kvašćevom ekstraktu (A), odnosno CSL-u (B) kao izvoru dušika, prikazani su na slici 15.



**Slika 15.** Apsorpcijski spektri ekstrahiranih pigmenata tijekom šaržnih uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, u bioreaktoru s miješalom, na glukozu kao izvoru ugljika te DAP-u (A) i CSL-u (B) kao izvoru dušika

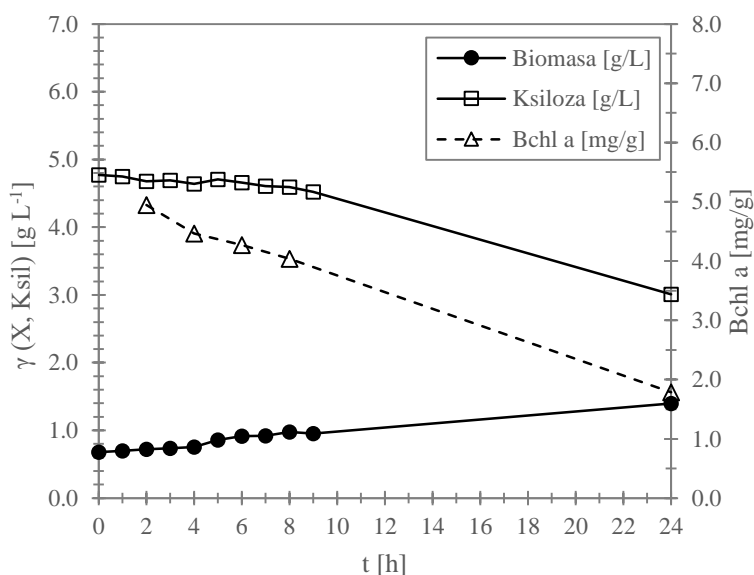
Ekstrakcija pigmenata organskim otapalima rezultira promjenom njihovog kemijskog okruženja. Shodno tome, dolazi do značajnih pomaka *in vivo* apsorpcijskih maksimuma bakterioklorofila *a* s područja valnih duljina između 850 i 910 nm na valnu duljinu od 775 nm nakon ekstrakcije (Oren, 2011). Upravo je pri toj valnoj duljini moguće vidjeti apsorpcijske maksimume bakterioklorofila *a* dobivene ekstrakcijom iz biomase tijekom provedenih uzgoja (slika 15). Nadalje, za oba uzgoja uočeno je smanjenje udjela bakterioklorofila *a* u stanicama bakterije za približno 65 % u odnosu na početni udio pri prvoj ekstrakciji i određivanju pigmenata. Takvi rezultati su i očekivani, s obzirom da su se uzgoji odvijali pri izrazito aerobnim uvjetima te je sinteza fotosintetskog aparata obično reprimirana sa značajnim prisustvom kisika u mediju (Keppen i sur., 2013). Udio bakterioklorofila *a* u biomasi pri početnom određivanju u 2. satu uzgoja iznosio je 4,283 mg g<sup>-1</sup> kod uzgoja s DAP-om, odnosno 1,539 mg g<sup>-1</sup> na kraju uzgoja. Početni udio bakterioklorofila u podlozi s CSL-om iznosio je 2,581 mg g<sup>-1</sup>, a konačni 0,899 mg g<sup>-1</sup>. Može se uočiti da su postignuti i do 2 puta veći udjeli bakterioklorofila u biomasi tijekom uzgoja s DAP-om i kvašćevim ekstraktom, u odnosu na



uzgoje s CSL-om kao izvorom dušika u podlozi. Bakterioklorofil je činio nešto manje od 0,2 % udjela suhe tvari biomase kod uzgoja s DAP-om, odnosno 0,1 % kod uzgoja s CSL-om kao izvorom dušika u podlozi.

#### 4.3.2. Utjecaj različitih izvora dušika na rast bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 uz ksilozu u podlozi kao izvoru ugljika

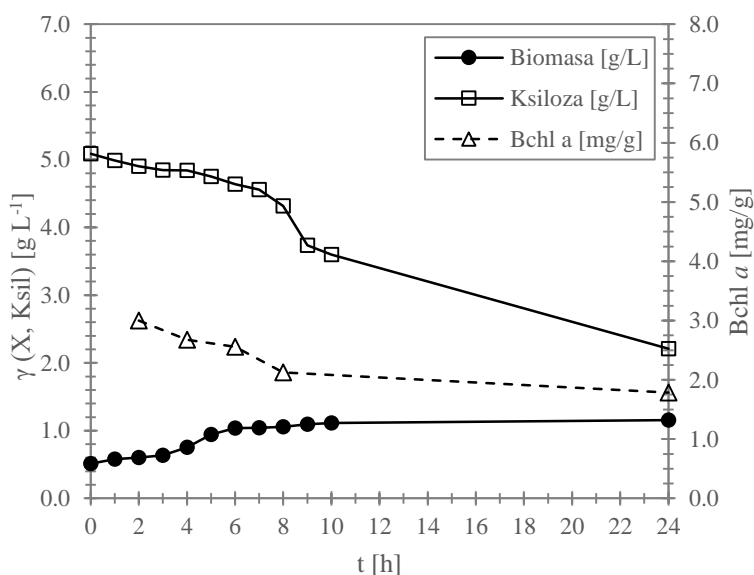
Provedena su dva uzgoja na ksilozi kao izvoru ugljika. Kao i u prethodnom eksperimentu, prvi uzgoj je odrađen na podlozi s  $3 \text{ g L}^{-1}$  DAP-a i  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  kvašćeva ekstrakta, a drugi s  $5 \text{ g L}^{-1}$  CSL – a kao izvora dušika tijekom uzgoja (poglavlje 3.1.4.4.; tablica 6: uzgoj 3 i 4).



**Slika 16.** Tijek šaržnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, u bioreaktoru s miješalom, na ksilozi kao izvoru ugljika te DAP-u i kvašćevom ekstraktu kao izvoru dušika

Na slici 16 prikazan je tijek šaržnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, na ksilozi kao izvoru ugljika te DAP-u i kvašćevom ekstraktu kao izvoru dušika. Tijekom prvih 9 sati uzgoja, uočena je minimalna potrošnja izvora ugljika, točnije, potrošeno je manje od 10 % od početne vrijednosti koncentracije ksiloze u

podlozi. S obzirom da stanice bakterije rastu tijekom cijelog trajanja uzgoja te nije primjećen ulazak u stacionarnu fazu rasta, najveća potrošnja ksiloze i prirast biomase je uočen u drugoj polovici uzgoja, odnosno između 9. i 24. sata kada je utrošeno 40 % ksiloze u podlozi. Konačni prinos biomase bio je  $0,714 \text{ g L}^{-1}$ , uz produktivnost sinteze biomase od  $0,030 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Potrošeno je ukupno  $1,763 \text{ g L}^{-1}$  ksiloze, dok je koeficijent konverzije ksiloze u biomasu iznosio  $0,405 \text{ g g}^{-1}$ . Maksimalna specifična brzina rasta postignuta je u 4. satu uzgoja te je iznosila  $0,119 \text{ h}^{-1}$ . Stopa rasta je očekivano veća u odnosu na stopu rasta tijekom mikroaerofilnih uzgoja na svjetlu, međutim, vrijednost je duplo manja u odnosu na prethodne uzgoje na glukozu. Svi navedeni pokazatelji uspješnosti provedenog uzgoja na ksilozi prikazani su i u tablici 12. Vrijednost specifične brzine potrošnje kisika određene u 5. satu uzgoja bila je  $0,344 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}$  biomase. U 9. satu uzgoja je vrijednost neznatno manja te je iznosila  $0,307 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}$  biomase.



**Slika 17.** Tijek šaržnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, u bioreaktoru s miješalom, na ksilozi kao izvoru ugljika te CSL-u kao izvoru dušika

Tijek šaržnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku na ksilozi kao izvoru ugljika te CSL-u kao izvoru dušika prikazan je na slici 17. Na kraju uzgoja dobiveno je  $0,645 \text{ g L}^{-1}$  biomase, uz produktivnost sinteze od  $0,027 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Dobiveni prinos biomase manji je za oko 12 % u odnosu na prinos dobiven u prethodnom

uzgoju s DAP-om i kvašćevim ekstraktom kao izvorom dušika. Potrošeno je  $2,877 \text{ g L}^{-1}$  ksiloze, a koeficijent konverzije ksiloze u biomasu bio je  $0,224 \text{ g g}^{-1}$ . Dobivena vrijednost je za 42 % manja od postignutog koeficijenta konverzije prethodnog uzgoja na ksilozi. Maksimalna specifična brzina rasta također je postignuta u 4. satu te je iznosila  $0,199 \text{ h}^{-1}$ . Svi navedeni pokazatelji uspješnosti prikazani su i u tablici 12. Specifična brzina potrošnje kisika u 5. satu uzgoja iznosila je  $0,311 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}$  biomase. U 9. satu je dobivena nešto manja vrijednost od  $0,288 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}$  biomase.

**Tablica 12.** Pokazatelji uspješnosti šaržnih uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, u bioreaktoru s miješalom, na ksilozi kao izvoru ugljika i različitim izvorima dušika

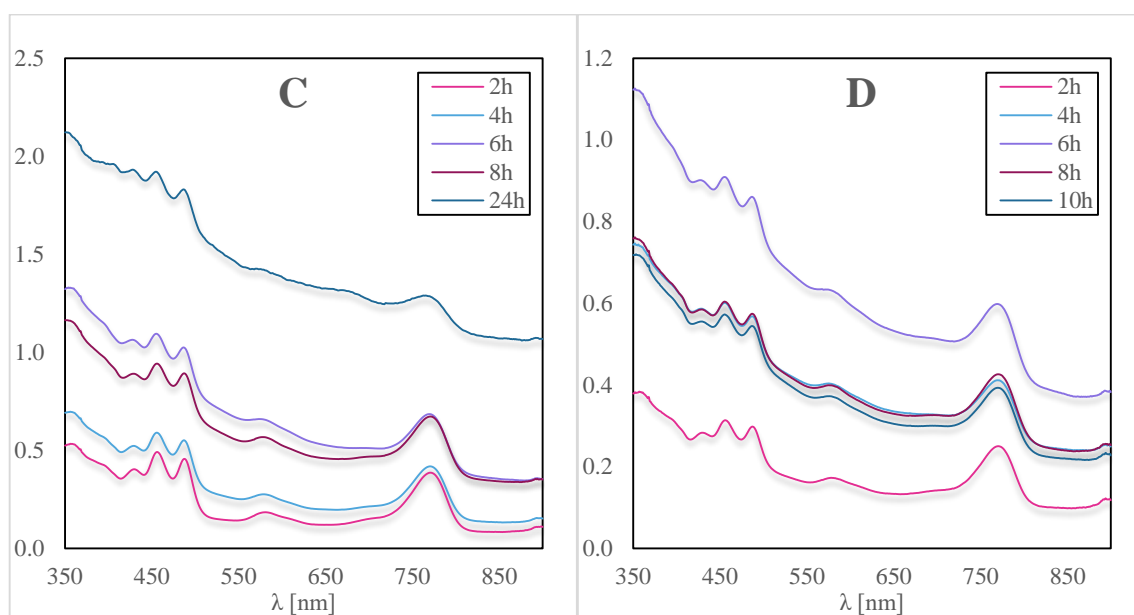
Izvor dušika	$Y_x [\text{g L}^{-1}]$	$Y_{x/s} [\text{g g}^{-1}]$	$Pr [\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}]$	$\mu [\text{h}^{-1}]$
DAP i kv. ekstrakt	0,714	0,405	0,030	0,119
CSL	0,645	0,224	0,027	0,199

U odnosu na uzgoje s glukozom kao izvorom ugljika, uzgoji provedeni na ksilozi rezultirali su sa 60 do 65 % manje prinosa biomase bakterije. Tijekom uzgoja provedenih na glukozu, uočen je ulazak u stacionarnu fazu rasta već nakon 10. sata, dok prilikom uzgoja na ksilozi, biomasa sporo i kontinuirano raste sve do završetka uzgoja. To je posebice vidljivo tijekom uzgoja uz DAP i kvašćev ekstrakt kao izvore dušika (slika 16). Kod uzgoja s CSL-om kao izvorom dušika, rast je minimalno izražen nakon 10. sata, iako je očita daljnja potrošnja ksiloze. Može se spomenuti mogućnost eventualnog produljenja tjeka uzgoja u svrhu postizanja većih prinosa biomase na ksilozi kao izvoru ugljika, međutim, očito je da bakterija preferira glukozu kao izvor ugljika za rast. Isto je uočeno i u radovima Sarić (2019) i Madaras (2019).

Kao i u prethodnim eksperimentima provedenim na glukozu, postignuta je veća stopa rasta bakterije uz CSL kao izvor dušika u podlozi. Razlika u produktivnosti i prinosu biomase na uzgojima sa ksilozom je ipak nešto manja, međutim, i u ovom slučaju su vrijednosti veće kod uzgoja na danim koncentracijama DAP-a i kvašćeva ekstrakta u podlozi. Može se zaključiti

da bi i u ovom slučaju povećanje početne koncentracije CSL-a u podlozi potencijalno rezultiralo boljim pokazateljima uspješnosti na kraju uzgoja.

Nadalje, promatrana je i promjena udjela pigmenta bakterioklorofila *a* u biomasi bakterije tijekom uzgoja. Apsorpcijski spektri ekstrahiranih pigmenata tijekom šaržnih uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, na ksilozi kao izvoru ugljika te DAP-u (C) i CSL-u (D) kao izvoru dušika prikazani su na slici 18.



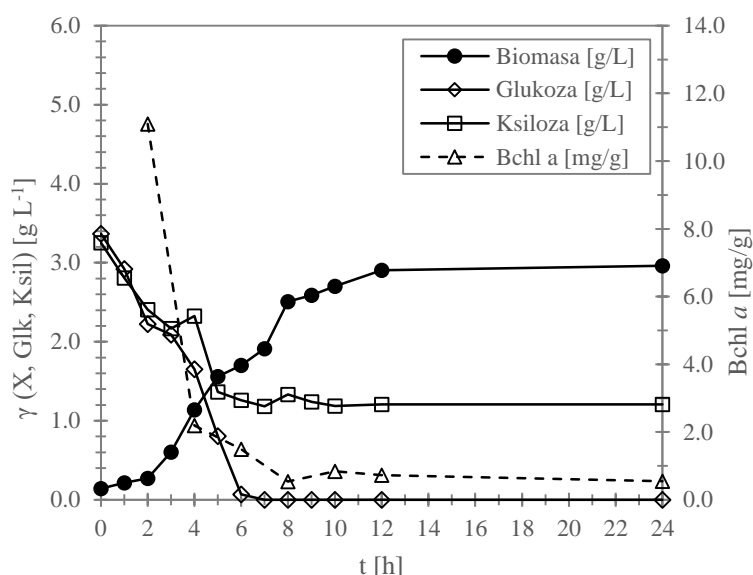
**Slika 18.** Apsorpcijski spektri ekstrahiranih pigmenata tijekom šaržnih uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, u bioreaktoru s miješalom, na ksilozi kao izvoru ugljika te DAP-u (C) i CSL-u (D) kao izvoru dušika

Karakteristične apsorpcijske maksimume bakterioklorofila *a* moguće je vidjeti pri valnoj duljini od 775 nm nakon ekstrakcije organskim otapalom. Udio bakterioklorofila *a* u biomasi kontinuirano opada tijekom oba uzgoja na ksilozi. U 2. satu uzgoja uz DAP i kvašćev ekstrakt kao izvore dušika u podlozi, udio bakterioklorofila *a* u biomasi bio je 4,948 mg g<sup>-1</sup>, odnosno 3,000 mg g<sup>-1</sup> kod uzgoja s CSL-om u podlozi. Udio bakterioklorofila nakon uzgoja s DAP-om i kvašćevim ekstraktom smanjen je za 64 % u odnosu na početni udio te je iznosio 1,788 mg g<sup>-1</sup>. Nakon uzgoja s CSL-om kao izvorom dušika u podlozi, došlo je do smanjenja udjela za 40 % te je konačna vrijednost bila 1,784 mg bakterioklorofila po gramu biomase. Oba

uzgoja su rezultirala s nešto manje od 0,2 % bakterioklorofila *a* u biomasi bakterije. Podjednaki rezultati su postignuti i u prethodnim uzgojima koji su provedeni na glukozi kao izvoru ugljika.

#### 4.3.3. Utjecaj različitih izvora dušika na rast bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 uz glukozu i ksilozu u podlozi kao izvorima ugljika

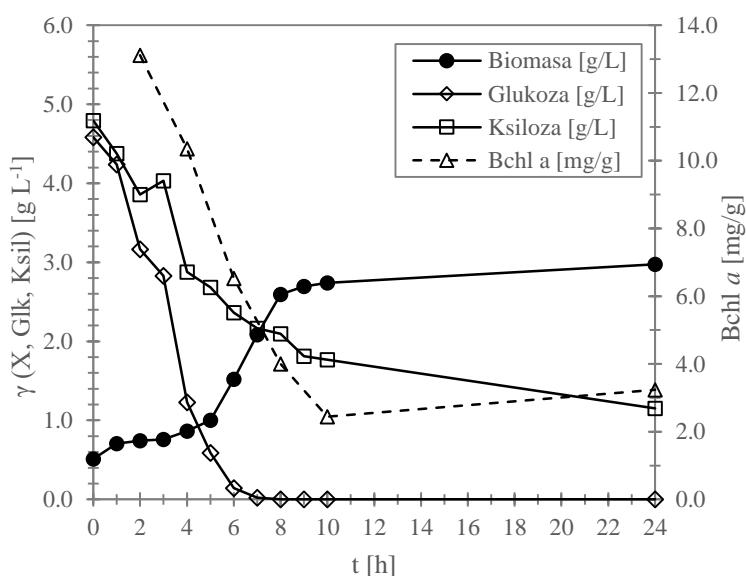
Provedena su ukupno dva uzgoja na glukozu i ksilozi kao izvorima ugljika. Osim promatranja utjecaja izvora dušika, cilj je bio istražiti prisutnost oba ugljikohidrata u podlozi na rast bakterije u danim uvjetima. Kao i u prethodnim eksperimentima, jedan uzgoj je odrađen uz dodatak  $3 \text{ g L}^{-1}$  DAP-a i  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  kvašćeva ekstrakta, drugi s  $5 \text{ g L}^{-1}$  CSL – a kao izvora dušika tijekom uzgoja (poglavlje 3.1.4.4.; tablica 6: uzgoj 5 i 6).



**Slika 19.** Tijek šaržnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, u bioreaktoru s miješalom, na glukozu i ksilozi kao izvorima ugljika te DAP-u i kvašćevom ekstraktu kao izvoru dušika

Na slici 19 prikazan je tijek šaržnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, uz glukozu i ksilozi kao izvore ugljika te DAP-u i kvašćevom ekstraktu kao izvorima dušika. Prirast biomase na kraju uzgoja je iznosio  $2,819 \text{ g L}^{-1}$ , što čini najveću vrijednost postignutog prinosa biomase tijekom uzgoja bakterije

*Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u ovom radu. Produktivnost sinteze biomase iznosila je  $0,117 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Ukupna potrošnja supstrata bila je  $5,413 \text{ g L}^{-1}$ , od čega je potrošnja glukoze  $3,365 \text{ g L}^{-1}$ , odnosno ksiloze  $2,048 \text{ g L}^{-1}$ . Koeficijent konverzije supstrata u biomasu iznosio je  $0,521 \text{ g g}^{-1}$ . Ulazak u eksponencijalnu fazu rasta uočen je nakon 2. sata uzgoja, a maksimalna specifična brzina rasta postignuta je 2 sata kasnije te je iznosila  $0,551 \text{ h}^{-1}$ . Svi navedeni pokazatelji uspješnosti uzgoja prikazani su i u tablici 13. Specifična brzina potrošnje kisika određena je u 5. satu uzgoja i iznosila je  $0,794 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ biomase}$ . U 9. satu, pri ulasku u stacionarnu fazu rasta, specifična brzina potrošnje kisika je bila nešto manja i iznosila  $0,564 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ biomase}$ .



**Slika 20.** Tijek šaržnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, u bioreaktoru s miješalom, na glukozi i ksilozi kao izvorima ugljika te CSL-u kao izvoru dušika

Tijek šaržnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku na glukozi i ksilozi kao izvorima ugljika te CSL-u kao izvoru dušika prikazan je na slici 20. Postignuti prinos biomase bio je za 12 % manji u odnosu na prinos u prethodnom uzgoju, a iznosio je  $2,464 \text{ g L}^{-1}$ . Produktivnost uzgoja bila je  $0,103 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Koeficijent konverzije supstrata u biomasu iznosio je  $0,300 \text{ g g}^{-1}$ , a ukupna je potrošeno  $8,227 \text{ g L}^{-1}$  supstrata, točnije  $4,584 \text{ g L}^{-1}$  glukoze i  $3,643 \text{ g L}^{-1}$  ksiloze. Koeficijent konverzije supstrata u biomasu manji je za 43 % u odnosu na uzgoj proveden s DAP-om i kvašćevim ekstraktom kao

izvorom dušika u podlozi. Kao i u prethodnim uzgojima provedenim na CSL-u kao izvoru dušika u podlozi, ulazak u eksponencijalnu fazu rasta uočen je tek u 4. satu uzgoja. Maksimalna specifična brzina rasta postignuta je u 5. satu te je iznosila  $0,340 \text{ h}^{-1}$ . Navedeni pokazatelji uspješnosti uzgoja prikazani su i u tablici 13. Tijekom 5. sata uzgoja određena je specifična brzina potrošnje kisika u iznosu od  $0,491 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}$  biomase. Pri ulasku u stacionarnu fazu rasta, odnosno u 9. satu uzgoja, potrošnja kisika je iznosila  $0,219 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}$  biomase.

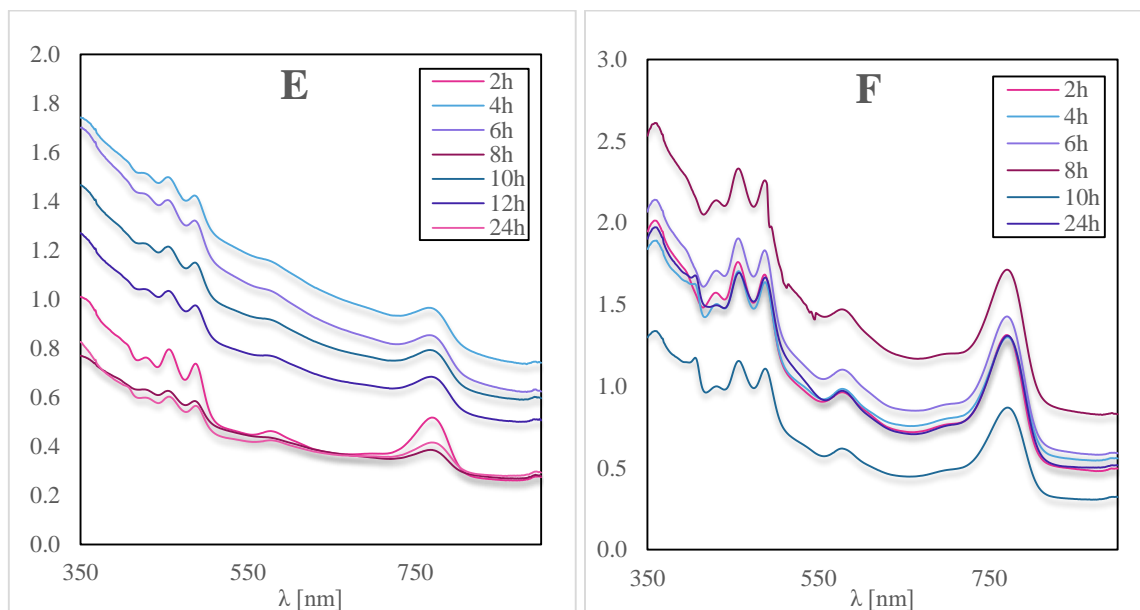
**Tablica 13.** Pokazatelji uspješnosti šaržnih uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku, u bioreaktoru s miješalom, na glukozu i ksilozi kao izvorima ugljika i različitim izvorima dušika

Izvor dušika	$Y_x [\text{g L}^{-1}]$	$Y_{x/s} [\text{g g}^{-1}]$	$Pr [\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}]$	$\mu [\text{h}^{-1}]$
DAP i kv. ekstrakt	2,819	0,521	0,117	0,551
CSL	2,464	0,300	0,103	0,340

Tijekom oba uzgoja uočen je nagli pad koncentracije glukoze u podlozi, pri čemu je veliki udio glukoze potrošen već do 6. sata uzgoja. U prvim satima uzgoja vidljiva je istovremena potrošnja oba izvora ugljika, međutim, potrošnja ksiloze je puno sporija te u oba slučaja zaostaje u podlozi na kraju uzgoja. Takva pojava preferencijalne upotrebe glukoze kod većine mikroorganizama rezultat je globalnog regulatornog mehanizma, poznatijeg kao katabolička represija izvorom ugljika. Ukoliko je u mediju prisutan preferirani izvor ugljika, dolazi do inhibicije unosa i razgradnje manje poželjnog izvora ugljika, u ovom slučaju ksiloze (Choudhury i Saini, 2017). Nadalje, iako je u prethodnim eksperimentima uočena veća stopa rasta u podlozi s CSL-om kao izvorom dušika, ovdje se može primjetiti upravo suprotno. Tijekom uzgoja s DAP-om i kvašćevim ekstraktom u podlozi postignuta je za 40 % veća vrijednost maksimalne brzine rasta. I ovom slučaju se može zaključiti da bi veće koncentracije CSL-a u podlozi rezultirale boljim pokazateljima uspješnosti uzgoja.

Promjena udjela bakterioklorofila *a* tijekom provedenih uzgoja praćena je provođenjem ekstrakcije pigmenta organskim otapalom te skeniranjem supernatanta u području valnih duljina od 350 do 900 nm. Apsorpcijski spektri ekstrahiranih pigmenta tijekom šaržnih uzgoja

bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku na glukozu i ksilozi kao izvorima ugljika te DAP-u (E) i CSL-u (F) kao izvoru dušika prikazani su na slici 21.



**Slika 21.** Apsorpcijski spektri ekstrahiranih pigmenata tijekom šaržnih uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u aerobnim uvjetima u mraku u bioreaktoru s miješalom na glukozu i ksilozi kao izvorima ugljika te DAP-u (E) i CSL-u (F) kao izvoru dušika

Početni udio pigmenta bakterioklorofila *a* u biomasi kod uzgoja s DAP-om i kvašćevim ekstraktom iznosio je 11,095 mg g<sup>-1</sup> biomase, a kod uzgoja s CSL-om 13,111 mg g<sup>-1</sup> biomase. U usporedbi s prethodnim uzgojima, stanice su u početnoj fazi sadržavale puno veći udio pigmenta u biomasi. Bakterioklorofil *a* činio je oko 1 % suhe tvari biomase, a takav rezultat se može usporediti s podacima u dostupnoj literaturi (Patrusheva i sur., 2017). Nadalje, za oba uzgoja je uočen nagli pad udjela pigmenta u biomasi tijekom eksponencijalne faze rasta, točnije pad od 90 % tijekom uzgoja s DAP-om i 80 % tijekom uzgoja s CSL-om kao izvorom dušika u podlozi. Konačni udio bakterioklorofila *a* nakon uzgoja s DAP-om bio je 0,546 mg g<sup>-1</sup> biomase, odnosno manji od 0,1%. Pri završetku uzgoja s CSL-om podlozi, udio je iznosio 0,3 %, odnosno 3,231 mg bakterioklorofila po gramu biomase.



## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Tijekom mikroaerofilnog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 uz različite izvore svjetlosti, nije primjećen značajniji utjecaj na konačni prinos biomase, produktivnost sinteze biomase i brzinu rasta. Međutim, uočena je povećana sinteza bakterioklorofila *a* ispod obične žarulje, s malatom kao izvorom ugljika u podlozi. U podlozi s glukozom i ksilozom nije primjećena veća razlika u udjelu pigmenta ovisno o ispitivanim izvorima svjetlosti.

2. Ispitivane koncentracije DAP-a kao izvora dušika u podlozi tijekom rasta u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu nisu imale veći utjecaj na dobivene pokazatelje uspješnosti. Postignuti su prinosi biomase u rasponu od 1,724 do 1,933 g L<sup>-1</sup>, uz prosječnu brzinu rasta od 0,039 h<sup>-1</sup> te produktivnost sinteze od oko 0,019 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Postignuti koeficijenti konverzije su ipak u nešto širem rasponu ( $Y_{XS} = 0,293 - 0,496 \text{ g g}^{-1}$ ), pri čemu je najveći dobiven kod uzgoja s 5 g L<sup>-1</sup> DAP-a. Najveći udio bakterioklorofila *a* (1,28 mg g<sup>-1</sup>) postignut je kod uzgoja s 3 i 5 g L<sup>-1</sup> DAP-a u podlozi pri završetku eksponencijalne faze rasta.

3. Kod uzgoja u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu s CSL-om kao izvorom dušika u podlozi, uočeno je povećanje prinosa biomase, stope rasta i koeficijenta konverzije s porastom početne koncentracije CSL-a u podlozi. Najbolji rezultati su dobiveni na podlozi s 7 g L<sup>-1</sup> CSL-a ( $Y_X = 1,025 \text{ g L}^{-1}$ ;  $Pr = 0,007 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ;  $Y_{XS} = 0,253 \text{ g g}^{-1}$ ;  $\mu = 0,035 \text{ h}^{-1}$ ). Nadalje, uočeno je smanjenje udjela pigmenta s povećanjem koncentracije CSL-a u podlozi na kraju eksponencijalne faze: najveći udio je postignut u podlozi s 1 g L<sup>-1</sup> CSL-a (1,18 mg g<sup>-1</sup>).

4. Šaržni uzgoj u aerobnim uvjetima u mraku, na glukozu kao izvoru ugljika te DAP-u i kvašćevom ekstraktu kao izvoru dušika, rezultirao je prinosom biomase od 2,042 g L<sup>-1</sup>. Produktivnost je iznosila 0,085 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, a koeficijent konverzije 0,519 g g<sup>-1</sup>. Specifična brzina rasta je bila 0,258 h<sup>-1</sup>. Uz CSL kao izvor dušika u podlozi, postignut je 20 % manji prinos

biomase ( $Y_X = 1,589 \text{ g L}^{-1}$ ;  $Pr = 0,066 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), odnosno čak 43 % manji koeficijent konverzije ( $Y_{X/S} = 0,295 \text{ g g}^{-1}$ ) tijekom uzgoja. Brzina rasta bakterije je iznosila  $0,295 \text{ h}^{-1}$ .

5. Uzgoji na ksilozi rezultirali su najlošijim pokazateljima uspješnosti uzgoja provedenih u aerobnim uvjetima u mraku. Uz DAP i kvašćev ekstrakt kao izvorima dušika, postignut je prinos biomase od  $0,714 \text{ g L}^{-1}$  ( $Pr = 0,030 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Koeficijent konverzije je iznosio  $0,405 \text{ g g}^{-1}$ , a specifična brzina rasta  $0,119 \text{ h}^{-1}$ . Na kraju uzgoja s CSL-om u podlozi, postignut je 12 % manji prinos biomase ( $Y_X = 0,645 \text{ g L}^{-1}$ ;  $Pr = 0,027 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) uz 44 % manji koeficijent konverzije ksiloze u biomasu ( $0,224 \text{ g g}^{-1}$ ). Brzina rasta je bila  $0,199 \text{ h}^{-1}$ .

6. Šaržni uzgoj u aerobnim uvjetima u mraku uz glukozu i ksilozu kao izvorima ugljika te s DAP-om i kvašćevim ekstraktom kao izvorom dušika rezultirao je najboljim pokazateljima uspješnosti uzgoja ( $Y_X = 2,819 \text{ g L}^{-1}$ ;  $Pr = 0,117 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ;  $Y_{X/S} = 0,521 \text{ g g}^{-1}$ ;  $\mu = 0,551 \text{ h}^{-1}$ ). Uzgoj s CSL-om u podlozi je rezultirao za oko 12 % manjim prinosom ( $Y_X = 2,464 \text{ g L}^{-1}$ ;  $Pr = 0,103 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) te 42 % manjim koeficijentom konverzije supstrata u biomasu ( $0,300 \text{ g g}^{-1}$ ). Ipak, u ovom slučaju je postignuta nešto manja specifična brzina rasta od  $0,340 \text{ h}^{-1}$ .

7. Tijekom provednih uzgoja u aerobnim uvjetima u mraku dolazi do očekivanog smanjenja udjela bakterioklorofila *a* u biomasu, pri čemu nije uočen značajniji utjecaj izvora dušika u podlozi. Prosječni udio na kraju uzgoja je iznosio oko 0,2 %. Dobivena vrijednost je duplo veća u odnosu na uzgoje provedene u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlu.

8. Najveće specifične brzine potrošnje kisika su postignute tijekom 5. sata uzgoja, pri čemu je najveća vrijednost dobivena tijekom uzgoja na glukozu i ksilozi kao izvorima ugljika te DAP-u i kvašćevom ekstraktu kao izvoru dušika ( $q_{O_2} = 0,794 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ biomase}$ ). Najmanja je postignuta tijekom uzgoja na ksilozi i CSL-u ( $q_{O_2} = 0,311 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ biomase}$ ). Tijekom 9. sata provedenih uzgoja dolazi do očekivanog smanjenja vrijednosti specifične brzine potrošnje kisika. S obzirom na izvor dušika u podlozi, potrošnja kisika je manja tijekom rasta na podlogama koje sadrže CSL.

## 6. LITERATURA

Akkerman, I., Janssen, M., Rocha, J., Wijffels, R. H. (2002) Photobiological Hydrogen Production: Photochemical Efficiency and Bioreactor Design. *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 1195 - 1208. doi: 10.1016/S0360-3199(02)00071-X

Alloul, A., Cerruti, M., Adamczyk, D., Weissbrodt, D. G., Vlaeminck, S. R. (2020) Control Tools to Selectively Produce Purple Bacteria for Microbial Protein in Raceway Reactors. bioRxiv 2020.01.20.912980. doi: 10.1101/2020.01.20.912980

Anonymous 1 (2018) Transport and the Hydrogen Economy, <<https://www.world-nuclear.org/information-library/non-power-nuclear-applications/transport/transport-and-the-hydrogen-economy.aspx>>. Pristupljeno 21. travnja 2020.

Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., Lloyd, R., Fuller, R. C. (1991) The Accumulation of Poly(3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter sphaeroides*. *Arch. Microbiol.* **155**, 337 – 340.

Carlozzi, P., Sacchi, A. (2001) Biomass Production and Studies on *Rhodospseudomonas palustris* Grown in an Outdoor, Temperature Controlled, Underwater Tubular Photobioreactor. *J. Biotechnol.* **88**, 239 – 249.

Choudhury, D., Saini, S. (2017) Sugar Co-utilization in Microorganisms. U: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Functional Genomics and Metabolic Engineering (Gunasekaran, P., Noronha, S., Pandey, A., ured.), Elsevier, Netherlands, str. 246.

Correa, D. F., Beyer, H. L., Fargione, J. E., Hill, J. D., Possingham, H. P., Thomas-Hall, S. R., Schenk, P. M. (2019) Towards the Implementation of Sustainable Biofuel Production Systems. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **107**, 250 – 263.

---

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. X* **4**, 100031. doi: 10.1016/j.wroa.2019.100031

Frigaard, N. U. (2016) Biotechnology of Anoxygenic Phototrophic Bacteria. U: Anaerobes in Biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 156, (Hatti-Kaul R., Mamo G., Mattiasson B., ured.), Springer, Cham, str. 139 – 154.

Gibson, J., Harwood, C. S. (1995) Degradation of Aromatic Compounds by Nonsulfur Purple Bacteria. U: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, (Blankenship, R. E., Madigan, Michael T., Bauer, C. E., ured.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, str. 991 – 1003.

Golomysova, A., Gmelsky, M., Ivanov, P. S. (2010) Flux Balance Analysis of Photoheterotrophic Growth of Purple Nonsulfur Bacteria Relevant to Biohydrogen Production. *Int. J. Hydrogen Energy* **35** (23), str. 12751 – 12760. doi: 10.1016/j.ijhydene.2010.08.133

Hansen, T. A., van Gemerden, H. (1972) Sulfide Utilization by Purple Nonsulfur Bacteria. *Arch. Mikrobiol.* **86**, 49 – 56.

Higuchi – Takeuchi, M., Numata, K. (2019) Marine Purple Photosynthetic Bacteria as Sustainable Microbial Production Hosts. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, 258. doi: 10.3389/fbioe.2019.00258

Hiraishi, A. Ueda, Y. (1994) Intrageneric Structure of the Genus *Rhodobacter*: Transfer of *Rhodobacter sulfidophilus* and related marine species to the genus *Rhodovulum* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44** (1), 15 – 23.

---

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. doi: 10.1016/j.biortech.2018.01.032

Imhoff, J. F. (1995) Taxonomy and Physiology of Phototrophic Purple Bacteria and Green Sulfur Bacteria. U: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, (Blankenship, R. E., Madigan, Michael T., Bauer, C. E., ured.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, str. 6 – 8.

Imhoff, J. F. (2006) The Phototrophic Alpha – Proteobacteria. U: The Prokaryotes, vol. 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses, (Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E., ured.), Springer, New York, str. 41 – 64.

Imhoff, J. F., Hiraishi, A., Süling, J.(2005) Anoxygenic Phototrophic Purple Bacteria. U: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, (Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Garrity, G. M., ured.), Springer, Boston, MA, str. 119 – 132.

Kamiyama, H., Hotta, Y., Tanaka, T., Nishikawa, S., Sasaki, K. (2000) Production of 5-Aminolevulinic Acid by a Mutant Strain of a Photosynthetic Bacteria. *Seibutu-Kougaku* **78**, 48 – 55.

Keppen, O. I., Krasil'nikova, E. N., Lebedeva, N. V., Ivanovskii, R. N. (2013) Comparative Study of Metabolism of the Purple Photosynthetic Bacteria Grown in the Light and in the Dark under Anaerobic and Aerobic Conditions. *Microbiology* **82** (5), 547 – 553.

Klemme, J. H. (1989) Organic Nitrogen Metabolism of Phototrophic Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **55** (3), 197 – 219.

Kobayashi, M., Kobayashi, M. (1995) Waste Remediation and Treatment Using Anoxygenic Phototrophic Bacteria. U: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. *Advances in Photosynthesis and Respiration* vol 2, (Blakeship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E., ured.) Springer, Dordrecht, str. 1269 – 1282.

Koku, H., Eroğlu, I., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L. (2002) Aspects of the Metabolism of Hydrogen Production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 1315 – 1329.

Kuo, F. S., Chien, Y. H., Chen, C. J. (2012) Effects of Light Sources on Growth and Carotenoid Content of Photosynthetic Bacteria *Rhodospseudomonas palustris*. *Bioresour. Technol.* **113**, 315 – 318. doi: 10.1016/j.biortech.2012.01.087

Lai, Y. C., Liang, C. M., Hsu, S. C., Hsieh, P. H., Hung, C. H. (2017) Polyphosphate Metabolism by Purple Non-Sulfur Bacteria and its Possible Application on Photo-Microbial Fuel Cell. *J. Biosci. Bioeng.* **123** (6), 722 – 730. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.01.012

Liang, C. M., Hung, C. H., Hsu, S. C., Yeh, I. C. (2010) Purple Nonsulfur Bacteria Diversity in Activated Sludge and its Potential Phosphorus-Accumulating Ability Under Different Cultivation conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 709 – 719.

Lien, D. T., Thi, D., Uyen, T., Thi, L., Cong, N., Ha, H. P., Ngoc, C. T. (2018) Optimization Production Conditions of Photosynthetic Purple Bacteria Biomass at Pilot Scale to Remove Sulphide from Aquaculture Pond. *J. Viet. Env.* **9** (2), 112 – 117. doi: 10.13141/jve.vol9.no2.pp112-117

Liggett, R. W., Koffler, H. (1948) Corn Steep Liquor in Microbiology. *Bacteriol. Rev.* **12** (4), 297 – 311.

---

Liu, G. F., Zhou, J. T., Wang, J., Song, Z. Y., Qv, Y. Y. (2006) Bacterial Decolorization of Azo Dyes by *Rhodopseudomonas palustris*. *World J. Microb. Biot.* **22** (10), 1069 – 1074.

Lorrungruang, C., Martthong, J., Sasaki, K., Noparatnaraporn, N. (2006) Selection of Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 14F for Polyhydroxyalkanoate Production with Two-Stage Aerobic Dark Cultivation. *J. Biosci. Bioeng.* **102** (2), 128 – 131. doi: 10.1263/jbb.102.128

Loy, D. D., Lundy, E. L. (2019) Nutritional Properties and Feeding Value of Corn and Its Coproducts. U: Corn. Chemistry and Technology, 3.izd., (Serna – Saldivar, S. O., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 646.

Lu, H., Zhang, G., Dong, S. (2011) Quantitative Study of PNSB Energy Metabolism in Degrading Pollutants Under Weak Light-Micro Oxygen Condition. *Bioresour. Technol.* **102** (8), 4968 – 4973. doi: 10.1016/j.biortech.2011.01.027

Madaras, M. (2019) Uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija u bioreaktoru s miješalom bez izvora svjetlosti na različitim izvorima ugljika. Diplomski rad. Zagreb, Prehrambeno – biotehnološki fakultet.

Madigan, M. T., Jung, D. O. (2009) An overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats. U: The Purple Phototrophic Bacteria, (Neil Hunter, C., Daldal, F., Thurnauer, M. C., Beatty, J. T., ured.), Springer, Dordrecht, str. 1 – 15.

Madukasi, E. I., Dai, X., He, C., Zhou, J. (2009) Potentials of Phototrophic Bacteria in Treating Pharmaceutical Wastewater. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* **7** (1), 165 - 174. doi: 10.1007/bf03326128

---

Mardetko, N., Novak, M., Trontel, A., Grubišić, M., Galić, M., Šantek, B. (2018) Bioethanol Production from Dilute-acid Pre-treated Wheat Straw Liquor Hydrolysate by Genetically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **32** (4), 483 – 499.

Masuda, S., Nagashima, K. V. P., Shimada, K., Matsuura, K. (2000) Transcriptional Control of Expression of Genes for Photosynthetic Reaction Center and Light-Harvesting Proteins in the Purple Bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *J. Bacteriol.* **182** (10), 2778 – 2786. doi: 10.1128/JB.182.10.2778-2786.2000

McKinlay, J. B. (2014) Systems Biology of Photobiological Hydrogen Production by Purple Non – sulfur Bacteria. U: *Microbial BioEnergy: Hydrogen Production. Advances in Photosynthesis and Respiration* vol. 38, (Zannoni, D., De Philippis, R., ured.), Springer, Dordrecht, str. 155 – 176.

McKinlay, J. B., Harwood, C. S. (2010) Photobiological Production of Hydrogen Gas as a Biofuel. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21** (3), 244 – 251. doi: 10.1016/j.copbio.2010.02.012

Merugu, R. C., Girisham, S., Reddy, S. M. (2010) Extracellular Enzymes of Two Anoxygenic Phototrophic Bacteria Isolated From Leather Industry Effluents. *BioChem.: Indian J.* **4** (2), 86 – 88.

Merugu, R., Rudra, M. P. P., Girisham, S., Reddy, S. M. (2012) Biotechnological Applications of Purple Non Sulphur Phototrophic Bacteria: A Minireview. *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* **3** (1), 376 – 384.

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.



---

Montano, G. L., Chan, J. S., Jarabelo, R. E., Pastor, A. B. I., Dela Cruz, T. E. E. (2009) Isolation and Characterization of Purple Nonsulfur Bacteria (PNSB) from a Rice Paddy Soil in Bulacan, Philippines. *Philipp. J. Syst. Biol.* **3** (1), 57 – 67.

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.

Neutzling, O., Imhoff, J. F., Trüper, H. G. (1984) *Rhodopseudomonas adriatica* sp. nov., a new species of the Rhodospirillaceae, dependent on reduced sulfur compounds. *Arch. Microbiol.* **137**, 256 – 261.

Noparatnaraporn, N., Nishizawa, Y., Nagai, S. (1986) Stimulation of Vitamin B12 Formation in Aerobically-Grown *Rhodopseudomonas gelatinosa* Under Microaerobic Condition. *Biotechnol. Lett.* **8** (7), 491 – 496.

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. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **12** (3-4), 113 – 119.

Numan, M., Bashir, S., Mumtaz, R., Tayyab, S., Rehman, N. U., Khan, A. L., Shinwari, Z. K., Al-Harrasi, A. (2018) Therapeutic Applications of Bacterial Pigments: a Review of Current Status and Future Opportunities. *3 Biotech.* **8**, 207. doi: doi.org/10.1007/s13205-018-1227-x

Oren, A. (2011) Characterization of Pigments of Prokaryotes and Their Use in Taxonomy and Classification. *Methods Microbiol.* **28**, 261 – 282.

Ormerod, J. G. (1992) Physiology of the Photosynthetic Prokaryotes. U: Photosynthetic Prokaryotes. Biotechnology Handbooks vol 6, (Mann, N. H., Carr, N. G., ured.), Springer, Boston, MA, str. 93 - 120.

Patrusheva, E. V., Fedorov, A. S., Belera, V. V., Minkevich, I. G., Tsygankov, A. A. (2007) Synthesis of Bacteriochlorophyll *a* by the Purple Nonsulfur Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Appl. Biochem. Microbiol.* **8** (7), 187 – 192. doi: 10.1134/S000368380702010X

Ritchie, R. J. (2018) Measurement of Chlorophylls *a* and *b* and Bacteriochlorophyll *a* in Organisms From Hypereutrophic Auxinic Waters. *J. Appl. Phycol.* **30** (6), 3075 – 3087. doi: 10.1007/s10811-018-1431-4

Sakarika, M., Spanoghe, J., Sui, Y., Wambacq, E., Grunert, O., Haesaert, G., Spiller, M., Vlaeminck, S. S. (2019) Purple non-sulphur bacteria and plant production: benefits for fertilization, stress resistance and the environment. *Microb. Biotechnol.* **0** (0), 1 – 30. doi: 10.1111/1751-7915.13474

Sakpirom, J., Kantachote, D., Nunkaew, T., Khan, E. (2017) Characterizations of Purple Non-Sulfur Bacteria Isolated from Paddy Fields, and Identification of Strains with Potential for Plant Growth-Promotion, Greenhouse Gas Mitigation and Heavy Metal Bioremediation. *Res. Microbiol.* **168** (3), 266 – 275. doi: 10.1016/j.resmic.2016.12.001

Sarić, M. (2019) Kinetika rasta i sinteza bakterioklorofila tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781. Završni rad. Zagreb, Prehrambeno – biotehnološki fakultet.

Sasaki, K., Tanaka, T., Nagai, S. (1998) Use of Photosynthetic Bacteria for the Production of SCP and Chemicals from Organic Wastes. U: Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products, (Martin, A. M., ured.), Springer, Boston, MA, str. 247 – 292.

---

Sasaki, K., Watanabe, M., Suda, Y., Ishizuka, A., Noparatnaraporn, N. (2005) Applications of Photosynthetic Bacteria for Medical Fields. *J. Biosci. Bioeng.* **100** (5), 481 – 488. doi: 10.1263/jbb.100.481

Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T., Tanaka, T. (2002) Biosynthesis, Biotechnological Production and Applications of 5-Aminolevulinic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58** (1), 23 – 29. doi: 10.1007/s00253-001-0858-7

Shioi, Y., Doi, M. (1990) Aerobic and Anaerobic Photosynthesis and Bacteriochlorophyll Formation in *Rhodobacter sulfidophilus*. U: Current Research in Photosynthesis, (Baltscheffsky, M., ured.), Springer, Dordrecht, str. 2759 – 2762.

Stomp, M., Huisman, J., Stal, L. J., Matthijs, H. C. P. (2007) Colorful Niches of Phototrophic Microorganisms Shaped by Vibrations of the Water Molecule. *ISME J.* **1**, 271 – 282. doi: 10.1038/ismej.2007.59

Tabita, F. R. (1995) The Biochemistry and Metabolic Regulation of Carbon Metabolism and Fixation in Purple Bacteria Redox Balance and Carbon Metabolism Central Pathways for Organic Carbon Metabolism. U: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, (Blankenship, R. E., Madigan, Michael T., Bauer, C. E., ured.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, str. 885 – 914.

Takeno, K., Yamaoka, Y., Sasaki, K. (2005) Treatment of Oil-Containing Sewage Wastewater Using Immobilized Photosynthetic Bacteria. *World J. Microb. Biot.* **21**, 1385 – 1391.

Tang, K. H., Tang, Y. J., Blankenship, R. E. (2011) Carbon metabolic pathways in phototrophic bacteria and their broader evolutionary implications. *Front. Microbiol.* **2**, 1 – 23.

Vrati, S. (1984) Single Cell Protein Production by Photosynthetic Bacteria Grown on the Clarified Effluents of Biogas Plant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19** (3), 199 – 202.

Watanabe, M., Sasaki, K., Nakashimada, Y., Nishio, N. (1998) High Density Cell Culture of a Marine Photosynthetic Bacterium *Rhodovulum* sp. With Self - Flocculated Cells. *Biotechnol. Lett.* **20** (12), 1113 – 1117.

Yen, H. W., Shih, T. Y. (2009) Coenzyme Q<sub>10</sub> Production by *Rhodobacter sphaeroides* in Stirred Tank and in Airlift Bioreactor. *Bioprocess and Biosyst. Eng.* **32** (6), 711 – 716. doi: 10.1007/s00449-008-0294-5

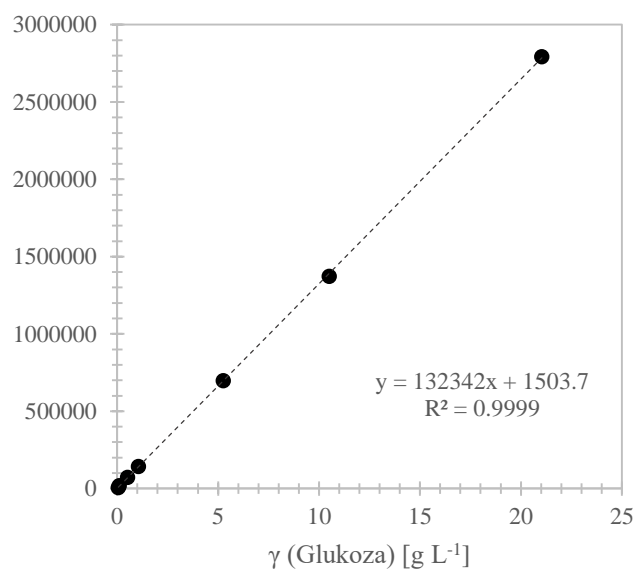
Zannoni, D., Schoepp-Cothenet, B., Hosler, J. (2009) Respiration and Respiratory Complexes. U: The Purple Phototrophic Bacteria. *Advances in Photosynthesis and Respiration* vol 28, (Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C., Beatty, J. T., ured.), Springer, Dordrecht, str. 546.

Zeiger, L., Grammel, H. (2010) Model-Based High Cell Density Cultivation of *Rhodospirillum rubrum* Under Respiratory Dark Conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **105** (4), 729 – 739. doi: 10.1002/bit.22589

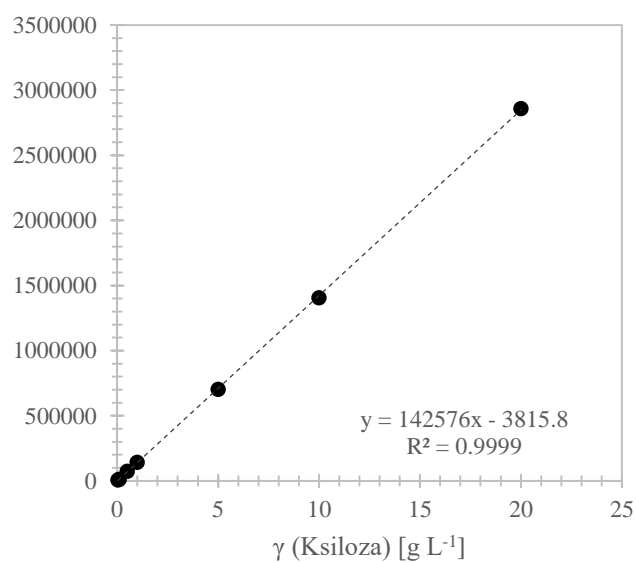
Zhong, J. J. (2010) Recent Advances in Bioreactor Engineering. *Korean J. Chem. Eng.* **27** (4), 1035 – 1041. doi: 10.1007/s11814-010-0277-5

## 7. PRILOZI

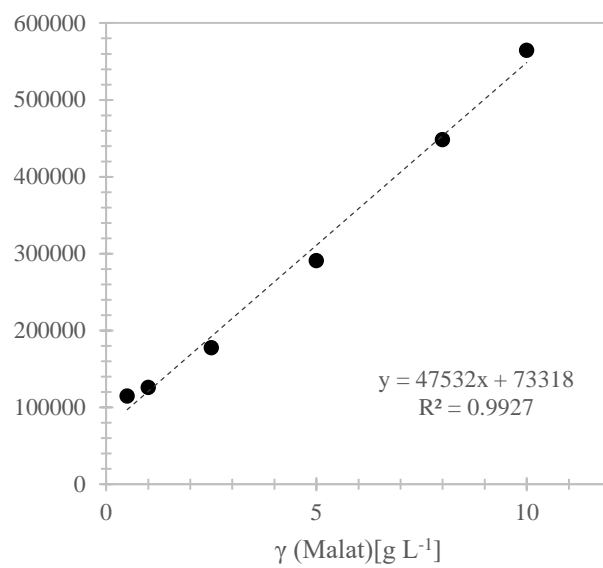
Prilog 7.1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze na UPLC-u



Prilog 7.2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ksiloze na UPLC-u



Prilog 7.3. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije malata na UPLC-u



## **Izjava o izvornosti**

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

  
\_\_\_\_\_