

IZVORNI ZNANSTVENI RAD / ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

# Fotoheterotrofni uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* na hranjivim podlogama s različitim izvorima ugljika

## *Photoheterotrophic cultivation of purple non-sulphur bacterium Rhodovulum adriaticum on the media with different carbon sources*

Mario Novak<sup>1</sup>, Antonija Trontel<sup>1\*</sup>, Nenad Mardetko<sup>1</sup>, Veronika Matoković<sup>1</sup>, Marko Sarić<sup>1</sup>, Mladen Pavlečić<sup>1</sup>, Božidar Šantek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Pierottijeva 6/IV, HR-10000 Zagreb, Croatia

Centar izvrsnosti Bio Pro Cro – Bioprospecting Jadranskog mora

<sup>1</sup>University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Department of Biochemical Engineering, Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology, Pierottijeva 6/IV, HR-10000 Zagreb, Croatia  
Center of Excellence Bio Pro Cro - Marine Bioprospecting

\*Corresponding author: [atrontel@pbf.hr](mailto:atrontel@pbf.hr)

### Sažetak

Ljubičaste nesumporne bakterije zanimljive su s ekološkog i ekonomskog stajališta u održivim biotehnološkim procesima proizvodnje biogoriva, biokemikalija, biopolimera, biomase odnosno sintezi specifičnih spojeva kao što su npr. karotenoidi i pigmenti. Za uspostavu ekološki i ekonomski održivih bioprocasa nužan je adekvatan odabir radnih mikroorganizama, sirovina i uvjeta kultivacije, a dobar primjer za to je razvoj bioprocasa na obnovljivim sirovinama kao što su to lignocelulozne sirovine. U ovom istraživanju proučavan je fotoheterotrofni uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na tekućim hranjivim podlogama koje sadrže glukozu i/ili ksilozu kao izvore ugljika s ciljem dobivanja bakterijske biomase i fotosintetskih pigmenta. Rezultati istraživanja pokazuju da su najveće vrijednosti pokazatelja uspješnosti bioprocasa ( $Y_x = 2,095 \text{ g L}^{-1}$ ;  $Y_{XS} = 0,54 \text{ g g}^{-1}$ ;  $Pr = 0,022 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) vezanih u dobivanje biomase ostvareni kod uzgoja na hranjivoj podlozi s  $5 \text{ g L}^{-1}$  glukoze. Uzgoj *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s  $3 \text{ g L}^{-1}$  glukoze i ksiloze pokazao se najuspješniji za dobivanje fotosintetskih pigmenta (ukupni pigmenti  $13,27 \text{ mg g}^{-1}$  biomase) uz zadovoljavajuće ostale pokazatelje uspješnosti bioprocasa ( $Y_x = 1,507 \text{ g L}^{-1}$ ;  $Y_{XS} = 0,22 \text{ g g}^{-1}$ ;  $Pr = 0,017 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ).

**Ključne riječi:** *Rhodovulum adriaticum*, hranjiva podloga, glukoza, ksiloza, bakterijska biomasa, ukupni fotosintetski pigmenti

### Abstract

Purple non-sulphur bacteria are interesting from ecologic and economic point of view in sustainable biotechnological production of biofuels, biochemicals, biopolymers and biomass as well as specific compounds such as carotenoids and pigments. In order to establish ecological and economic sustainable bioprocesses it is necessary to select adequate working microorganisms, raw materials and cultivation conditions. Development of bioprocesses on the renewable raw materials (e.g. lignocellulose containing feedstocks) are good example for such bioprocess types. In this research, the photoheterotrophic cultivation of purple non-sulfur bacteria *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 was studied on the liquid media containing glucose or /and xylose as a carbon sources in order to produce bacterial biomass and photosynthetic pigments. Results obtained in this study show that the highest values of bioprocess efficiency parameters ( $Y_x = 2,095 \text{ g L}^{-1}$ ;  $Y_{XS} = 0,54 \text{ g g}^{-1}$ ;  $Pr = 0,022 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) related to the biomass production were observed during bacterial cultivation on media with  $5 \text{ g L}^{-1}$ . Cultivation of *R. adriaticum* DSM 2781 on the media with  $3 \text{ g L}^{-1}$  glucose and xylose shows the highest total photosynthetic pigments content ( $13,27 \text{ mg g}^{-1}$  biomass) together with satisfy other bioprocess efficiency parameters ( $Y_x = 1,507 \text{ g L}^{-1}$ ;  $Y_{XS} = 0,22 \text{ g g}^{-1}$ ;  $Pr = 0,017 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ).

**Keywords:** *Rhodovulum adriaticum*, cultivation medium, glucose, xylose, bacterial biomass, total photosynthetic pigments

### Uvod

Ljubičaste bakterije su skupina Gram negativnih eubakterija koje čine izrazito raznoliku i heterogenu skupinu široko rasprostranjenih fotosintetskih mikroorganizama u prirodi. Prisutne su u raznim staništima, 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 (Imhoff, 2006; Madigan i Jung, 2009; Novak i sur., 2017). Razlika između vrsta i rodova fotosintetskih prokariota obično se bazira na morfološkim karakteristikama kao što su



veličina i izgled stanice, struktura citoplazmenih membrana i pigmentata, udjelu pojedinih baza u DNA te nekim fiziološkim značajkama poput različite sposobnosti korištenja izvora ugljika i dušika, sposobnosti aerobne i anaerobne respiracije u mraku i slično (Imhoff, 1995; Imhoff i sur., 2005; Madigan i Jung, 2009). Klasifikacija ljubičastih bakterija tradicionalno se povezuje s metabolizmom sumpora te se podjela na sumporne i nesumporne ljubičaste bakterije najprije zasnivala na različitoj toleranciji i pohranjivanju sumpornih spojeva (Madigan i Jung, 2009). Ljubičaste sumporne bakterije skladište elementarni sumpor unutar stanice, a ljubičaste nesumporne bakterije izvan stanice (Hansen i van Gemerden, 1972). Usporeda na osnovi 16S rRNA sekvenci pokazuje da ljubičaste nesumporne bakterije pripadaju razredima  $\alpha$ - i  $\beta$ -proteobakterija, a ljubičaste sumporne bakterije razredu  $\gamma$ -proteobakterija (Imhoff i sur., 2005; Imhoff, 2006). Ljubičaste nesumporne bakterije mogu iskorištavati široku paletu izvora ugljika i dušika za potrebe sinteze staničnih komponenata i energije, a putevi razgradnje su opsežni i razlikuju se među vrstama i sojevima 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 upotreba kvasčevog ekstrakta koji sadrži visoki udjel B – vitamina te potiče rast pri manjim koncentracijama (Imhoff, 1995; Madukasi i sur., 2009). Ljubičaste nesumporne bakterije pripadaju skupini anoksiogeničnih 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 (Stomp i sur., 2007; Kuo i sur., 2012). Za sve ljubičaste nesumporne 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 donorima elektrona (Madigan i Jung, 2009). 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). Tijekom fototrofnog rasta, pridobivanje energije se odvija putem fotosintetske fosforilacije (Lu i sur., 2011). Fotosintetska fosforilacija uključuje apsorpciju fotona u molekulama pigmentata 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 (Imhoff, 2006; Madigan i Jung, 2009; Zannoni i sur., 2009). Uloga ljubičastih nesumpornih bakterija u suvremenoj biotehnologiji prepoznata je zbog njihove iznimne fiziološke raznolikosti, jednostavnosti prilagodbe na široki raspon uvjeta okoline te sposobnosti biosinteze većeg broja proizvoda s mogućom komercijalnom primjenom (Imhoff, 2006; Novak i sur., 2017). Uporaba fotosintetskih mikroorganizama općenito se smatra jednom od potencijalnih metoda za smanjenje troškova proizvodnje različitih biotehnoloških proizvoda, a važan je i njihov doprinos u održavanju ekološke ravnoteže zahvaljujući upotrebi solarne energije te sposobnosti fiksacije CO<sub>2</sub> i dušika iz atmosfere (Higuchi – Takeuchi i Numata, 2019). Posljednjih godina uvelike se istražuje primjena biomase ljubičastih nesumpornih bakterija u procesima pročišćavanja tla i otpadnih voda iz raznih industrija (Sakpirom i sur., 2017; Sakarika i sur., 2019). 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 visokovrijednih nusprodukata (Merugu i sur., 2012). Stanice su bogate proteinima i esencijalnim aminokiselinama, a sposobne su akumulirati

značajne količine pigmentata, vitamina i bioloških kofaktora (Vrati, 1984; Novak i sur. 2017). Veći intenzitet istraživanja i razvoj bioprocasa doveli su do otkrivanja različitih proizvoda biomase koju su pronašli svoju primjenu u području medicine, bioenergetike, prehrambene industrije i poljoprivrede. Neki od istaknutijih metaboličkih procesa u stanicama uključuju fotobiološku sintezu vodika i biopolimera, čija važnost posebice leži u tome što predstavljaju alternativu proizvodima koji se trenutno dobivaju iz fosilnih izvora (McKinlay i Hardwood, 2010; Higuchi – Takeuchi i Numata, 2019). 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; Sasaki i sur., 2002; Sasaki i sur., 2005). Bakterijski pigmenti se mogu koristiti kao prirodna bojila za hranu ili tekstil, a imaju i potencijalnu farmakološku ulogu (Numan i sur., 2018). Proizvodnja s većim prinosima se uglavnom postiže tijekom fotoheterotrofnog uzgoja (Patrusheva i sur., 2007). Udjeli bakterioklorofila i karotenoida su obično do 10 % udjela suhe tvari biomase, stoga se smatra prikladno istovremeno dobivanje i ostalih visokovrijednih proizvoda metabolizma (Kobayashi i Kobayashi, 1995; Patrusheva i sur., 2007). Zahvaljujući kontinuiranim istraživanjima, uvođenjem metoda genetičkog inženjerstva te uporabom jeftinih organskih i anorganskih materijala i sirovina, očekuje se daljnji razvoj procesa proizvodnje te veća komercijalna primjena stanica ljubičastih nesumpornih bakterija u bliskoj budućnosti.

Fiziologija i potencijal vrste *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, a sadržavala je uzorke blata i vode iz morskog jezera „Malo Jezero“ na otoku Mljetu (Neutzling i sur., 1984). Bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 je interesantna, jer može kao izvor ugljika koristiti glukozu, ksilozu i arabinozu (Hiraishi i Ueda, 1994 i 1995) što je važno za biorafinerijski sustav primjene obnovljivih sirovina kao što su lignocelulozne sirovine (Mardetko i sur., 2018). U ovom istraživanju proučavan je fotoheterotrofni uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranim hranjivim podlogama koje su sadržavale glukozu i/ili ksilozu kao izvore ugljika s ciljem dobivanja bakterijske biomase odnosno fotosintetskih pigmentata kao glavnih proizvoda bioprocasa.

## Materijali i metode

### Radni mikroorganizam

U ovom istraživanju za dobivanje bakterijske biomase odnosno sintezu fotosintetskih pigmentata korištena je ljubičasta nesumporna bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 iz DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Njemačka), a radna kultura se čuva u zbirci mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### Hranjive podloge za dobivanje biomase i fotosintetskih pigmentata bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

U ovom istraživanju za potrebe uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na različitim izvorima ugljika pripremljene su tekuće hranjive podloge čiji sastav je prikazan u Tablici 1. Sve kemikalije korištene u ovom istraživanju su bile p.a. čistoće.

**Tablica 1.** Osnovni sastav izvora ugljika, dušika, soli i faktora rasta u hranjivim podlogama za pripremu inokuluma, proizvodnju biomase i fotosintetskih pigmenata bakterije *R. adriaticum* DSM 2781.

**Table 1.** Basic content of carbon and nitrogen sources, salts and growth factors in media for inoculum preparation as well as biomass and photosynthetic pigments production by bacterium *R. adriaticum* DSM 2781.

Kemikalija / Chemicals	Masena koncentracija / Mass concentration [g L <sup>-1</sup> ]	Podloga za uzgoj inokuluma / Medium for inoculum preparation [g L <sup>-1</sup> ]	Podloge za uzgoj / Media for cultivations [g L <sup>-1</sup> ]		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,8	+	+	+	+
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	+	+	+	+
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	+	+	+	+
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2	+	+	+	+
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,053	+	+	+	+
MnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,2 x 10 <sup>-3</sup>	+	+	+	+
Tiamin klorid /Thiamine chloride	1,0 x 10 <sup>-3</sup>	+	+	+	+
Nikotinska kiselina / Nicotinic acid	1,0 x 10 <sup>-3</sup>	+	+	+	+
Biotin/ Biotin	1,0 x 10 <sup>-5</sup>	+	+	+	+
C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (Na-malat/malate)	2,7	+	-	-	-
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (glukoza/glucose)	3-15	-	+	-	+
C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> (ksiloza/xylose)	3-15	-	-	+	+
Kvašćev ekstrakt / Yeast extract	1,5	+	+	+	+
C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub> Na (Na-glutamat/glutamate)	2,0	+	+	+	+

### Priprema hranjivih podloga

Za uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 koristile su se dvije vrste hranjive podloge. Kemijski definirana hranjiva podloga s malatom kao izvorom ugljika za uzgoj inokuluma (Tablica 1), te kemijski definirana hranjiva podloga s različitim izvorima ugljika (glukoza i/ili ksiloza; Tablica 1). Za pripremu inokuluma odnosno uzgoj bakterijske biomase, hranjiva podloga se priprema tako da se u određeni volumen demineralizirane vode doda izračunata i odvagana masa potrebnih sastojaka hranjive podloge. pH vrijednost hranjive podloge se korigira na 6,9 - 7,0 pomoću 10 % (m/m) otopine NaOH, te se podloga sterilizira 20 minuta na 121°C. Nakon što se hranjiva podloga ohladi, sterilno se dodaju potrebni faktori rasta. Kod hranjivih podloga za uzgoj biomase i sintezu fotosintetskih pigmenata koje sadrže glukozu ili ksilozu kao izvor ugljika, istraživao se utjecaj početne koncentracije izvora ugljika u rasponu od 5 - 15 [g L<sup>-1</sup>] (Tablica 1). Kod uzgoja bakterije u hranjivim podlogama s glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika primjenjene su ove kombinacije jednakih koncentracija izvora ugljika: glukoza i ksiloza 3 [g L<sup>-1</sup>], glukoza i ksiloza 5 [g L<sup>-1</sup>] te glukoza i ksiloza 7.5 [g L<sup>-1</sup>] (Tablica 1). Tijekom ovog istraživanja korisni volumen hranjive podloge u Erlenmeyer tikvicama iznosio je 150 mL.

### Fotoheterotrofni uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u mikroaerofilnim uvjetima na različitim izvorima ugljika

Uzgoji bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 provedeni su u luminostatu pri 2000 Lux - a u mikroaerofilnim uvjetima kroz 96 sati pri temperaturi od 28 °C, bez pH regulacije i miješanja u Erlenmeyer tikvicama s brušenim čepom. Svaka 24 sata izuziman je uzorak (5 mL)

kojem je određena optička gustoća (staklena kiveta promjera 10 mm Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) zbog praćenja rasta bakterijske biomase. Iz dobivene optičke gustoće hranjive podloge pomoću baždarnog pravca ( $X = 0.7509 A_{660} + 0.2783$ ;  $R^2 = 0.9935$ ) procijenjena je koncentracija suhe tvari bakterijske biomase (X). Osim toga, koncentracija bakterijske biomase praćena je i standardnim određivanjem suhe tvari biomase (Novak i sur., 2017). Za spektrofotometrijska mjerenja tijekom ovog istraživanja korišten je spektrofotometar Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Potrošnja izvora ugljika tijekom uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 određivana je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC; Shimadzu CLASS-VP LC-10A VP) prema metodi opisanoj u Mardetko i sur. (2018).

### Ekstrakcija ukupnih fotosintetskih pigmenata i određivanje njihove koncentracije

Ekstrakcija ukupnih pigmenata sintetiziranih tijekom uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 provedena je smjesom organskih otapala uz mehaničku dezintegraciju stanica pomoću staklenih kuglica. Uzorak se prethodno centrifugira na 8000 min<sup>-1</sup> kroz 10 minuta. U zaostali talog bakterijske biomase dodano je 4 g staklenih kuglica i 4 mL smjese acetona i etanola u omjeru 7:2 (vol/vol). Uzorak je naizmjenično podvrgnut intenzivnom miješanju i hlađenju u trajanju od 2 minute u 3 ciklusa intenzivnog miješanja odnosno hlađenja. 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 na 8000 min<sup>-1</sup> kroz 10 minuta. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih



pigmenata u supernatantu nakon ekstrakcije odrađeno je u kvarcnoj kiveri promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) skeniranjem u području valnih duljina od 350 do 900 nm. Koncentracija ukupnih fotosintetskih pigmenata (UFP; uključivo i bakterioklorofila *a*) izračunata je prema izrazu za ekstrakciju primjenom smjese otapala aceton/etanol (Ritchie, 2018):

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

### Određivanje pokazatelja uspješnosti bioprocasa

Pokazatelji uspješnosti određeni su prema slijedećim jednadžbama:

$$Y_X = X - X_0 [g L^{-1}]$$

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

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

$$Y_{UFP} = \frac{UFP}{X - X_0} [g g^{-1}]$$

$$q_S = \frac{Y_S}{t_u} [g L^{-1} h^{-1}]$$

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

Pri čemu je  $Y_X$  prinos biomase na kraju uzgoja [ $g L^{-1}$ ];  $X_0$  početna koncentracija biomase [ $g L^{-1}$ ];  $X$  konačna koncentracija biomase nakon uzgoja [ $g L^{-1}$ ];  $Y_S$  ukupna potrošnja supstrata [ $g L^{-1}$ ];  $S_0$  početna koncentracija supstrata [ $g L^{-1}$ ];  $S$  koncentracija supstrata na kraju uzgoja [ $g L^{-1}$ ];  $Y_{X/S}$  koeficijent konverzije supstrata u biomasu [ $g g^{-1}$ ];  $Y_{UFP}$  koncentracija ukupnih fotosintetskih pigmenata [ $g L^{-1}$ ];  $Y_{UFP}$  prinos ukupnih fotosintetskih pigmenata po prirasloj bakterijskoj biomasu [ $g g^{-1}$ ];  $Pr$  produktivnost rasta biomase [ $g L^{-1} h^{-1}$ ];  $q_S$  brzina potrošnje supstrata [ $g L^{-1} h^{-1}$ ];  $t_u$  vrijeme trajanja uzgoja [h].

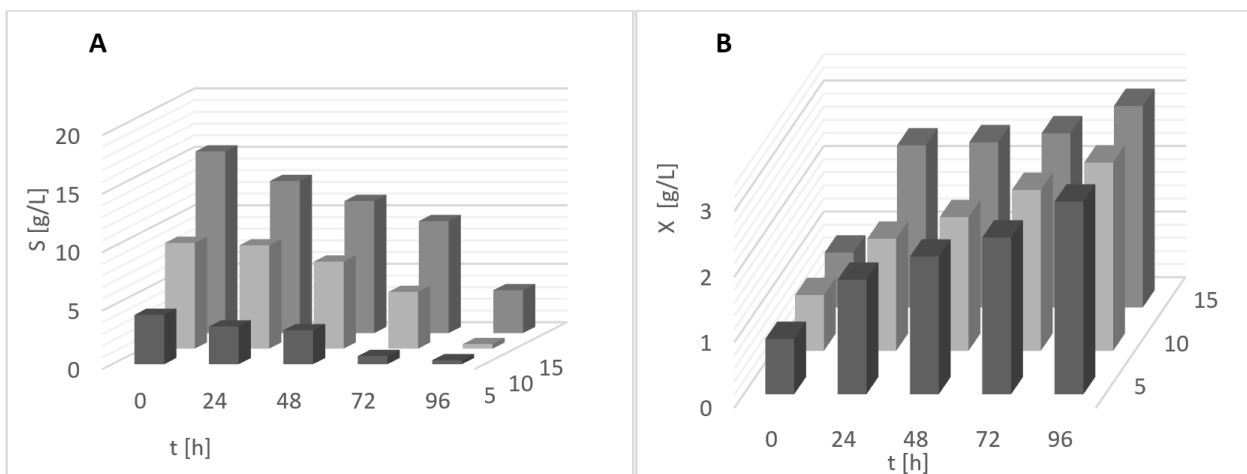
### Rezultati i rasprava

Cilj ovog proučavanja bio je odrediti potencijal fotoheterotrofnog

uzgoja bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 za proizvodnju bakterijske biomase i fotosintetskih pigmenta koji imaju mogućnost primjene za različite svrhe. Biomasa nesumpornih ljubičastih bakterija predstavlja zanimljiv biotehnološki proizvod koji se može koristiti kao izvor proteina (Delamare-Deboutteville i sur., 2019), kao radna kultura u procesu bioremedijacije (Sakpirom i sur., 2017), kao biognojivo ili kao izvor fotosintetskih pigmenata i karotenoida (Alloul i sur., 2020). U ovom istraživanju za izvore ugljika odabrani su glukoza i ksiloza zbog toga što obično čine većinski udjel šećera u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (Marđetko i sur., 2018). Primjena sekundarnih lignoceluloznih sirovina u biotehnološkoj proizvodnji je osobito interesantna jer takve sirovine predstavljaju relativno jeftin, lako dostupan i obnovljiv izvor različitih organskih tvari (Choudhury i sur., 2017; Mirza i sur., 2019).

### Fotoheterotrofni uzgoj bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama s glukozom ili ksilozom kao izvorima ugljika

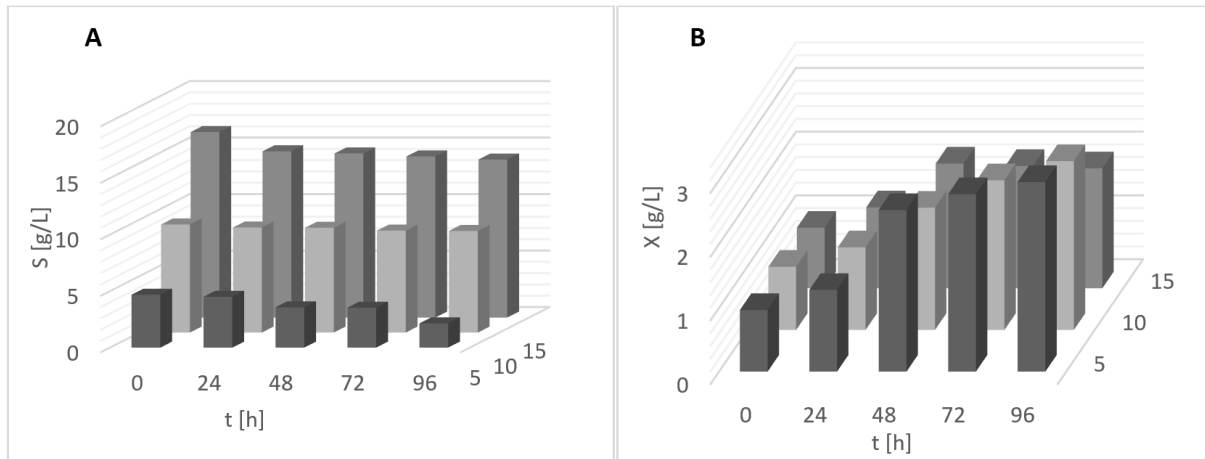
Rast bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 proučavan je na tekućim hranjivim podlogama s glukozom ili ksilozom kao izvorima ugljika s ciljem dobivanja bakterijske biomase odnosno fotosintetskih pigmenata. Koncentracije glukoze i ksiloze odabrane za uzgoj *R. adriaticum* DSM 2781 predstavljaju uobičajne koncentracije tih šećera koje se mogu dobiti procesom predobrade lignoceluloznih sirovina kao što se npr. pšenična slama, sijeno, kukuruzovina ili kukuruzni oklasci (Marđetko i sur., 2018). Sve ljubičaste nesumporne bakterije karakterizira fotoheterotrofni rast na lako razgradljivim organskim spojevima (npr. šećerima) koji služe kao izvori ugljika i elektrona (Madigan i Jung, 2009; Choudhury i sur., 2017). Centralni metabolizam ugljika za većinu istraženih vrsta ljubičastih nesumpornih bakterija uključuje razgradnju ugljikohidrata Entner – Doudoroff ili Embden – Meyerhof – Parnasovim putem, a daljnju ulogu razgradnje i oksidacije preuzimaju reakcije Krebsovog ciklusa (Tang i sur., 2011; Ormerod, 1992; Tabita, 1995).



**Slika 1.** Promjene koncentracije glukoze (A) i bakterijske biomase (B) tijekom uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama s različitim početnim koncentracijama glukoze ( $S$  - koncentracija glukoze;  $X$  - koncentracija biomase;  $t$  - vrijeme)

**Figure 1.** Alteration of glucose (A) and bacterial biomass (B) concentrations during cultivation of *R. adriaticum* DSM 2781 on media with different initial glucose concentrations ( $S$  - glucose concentration;  $X$  - biomass concentration;  $t$  - time)





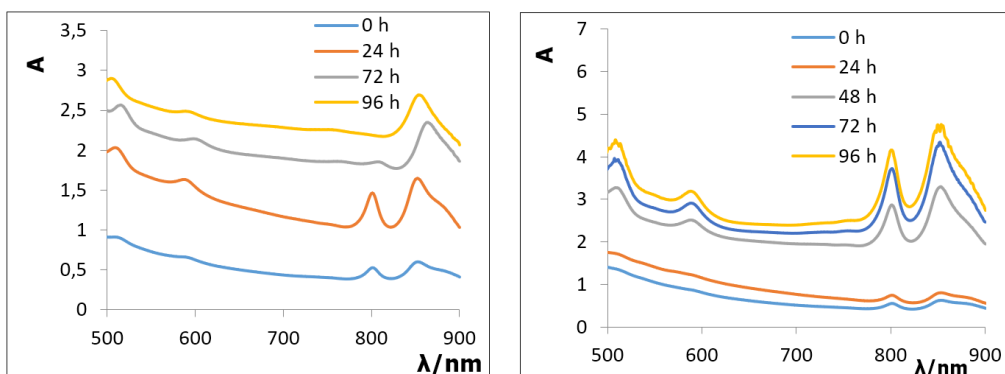
**Slika 2.** Promjene koncentracije ksiloze (A) i bakterijske biomase (B) tijekom uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama s različitim početnim koncentracijama ksiloze (S - koncentracija ksiloze; X - koncentracija biomase; t - vrijeme)

**Figure 2.** Alteration of xylose (A) and bacterial biomass (B) concentrations during cultivation of *R. adriaticum* DSM 2781 on media with different initial xylose concentrations (S - xylose concentration; X - biomass concentration; t - time)

Tijekom uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s 5 g L<sup>-1</sup> glukoze (Slika 1) utrošilo se 3,879 g L<sup>-1</sup> glukoze tijekom 96 sati uzgoja, a prinos biomase je iznosio 2,095 g L<sup>-1</sup>. Koeficijent konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{X/S}$ ) bio je 0,54 g g<sup>-1</sup>. Maksimalna brzina potrošnje glukoze registrirana je od 48. do 72. h kultivacije te je iznosila  $q_s = 0,040$  g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, a ukupna produktivnost bioprocasa bila je 0,022 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Kod uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s 5 g L<sup>-1</sup> ksiloze kao jedinim izvorom ugljika (Slika 2) utrošilo se 2,531 g L<sup>-1</sup> ksiloze tijekom 96 sati uzgoja. Njena maksimalna brzina potrošnje supstrata zabilježena je tek nakon 72 sata ( $q_s = 0,026$  g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) zbog dužeg vremena prilagodbe na ksilozu kao jedini izvor ugljika. Usporedba s uzgojem *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s glukozom pokazuje da je brzina potrošnje ksiloze bila znatno manja. Prinos biomase je bio približno jednak (2,008 g L<sup>-1</sup>). Kada se koncentracija glukoze u hranjivoj podlozi za uzgoj *R. adriaticum* DSM 2781 poveća s 5 na 10 g L<sup>-1</sup> prinos biomase se nije značajnije povećao. Međutim, uočeno je 50 % smanjenje koeficijenta  $Y_{X/S} = 0,23$  g g<sup>-1</sup>. Maksimalna brzina potrošnje glukoze uočena je između 72. i 96. h, a iznosila je 0,090 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Ukupna produktivnost bioprocasa bila je 0,021 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Kada se međusobno usporede uzgoji *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s glukozom i ksilozom kod 10 g L<sup>-1</sup> (Slika 2) može se uočiti da je prinos biomase kod uzgoj na ksilozi bio manji za oko 35 % (1,657 g L<sup>-1</sup> uz utrošak ksiloze od 2,983 g L<sup>-1</sup>). Ukupna produktivnost bioprocasa je iznosila 0,017 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Kod uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s glukozom utrošilo se oko 86 % izvora ugljika, a kod uzgoja na ksilozi samo 29 % izvora ugljika. Daljnje povećanje koncentracije glukoze ili ksiloze u hranjivoj podlozi na 15 g L<sup>-1</sup> povezano je s daljnjim smanjenjem vrijednosti pokazatelja uspješnosti bioprocasa. Tijekom uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s glukozom utrošilo se 79 % glukoze odnosno

samo 16 % ksiloze. Prinos biomase kod uzgoja na hranjivoj podlozi s 15 g L<sup>-1</sup> glukoze bio je 2,236 g L<sup>-1</sup>, a koeficijent  $Y_{X/S}$  je iznosio 0,19 g g<sup>-1</sup>. Kod uzgoja bakterije na hranjivoj podlozi s ksilozom prinos biomase je bio 0,873 g L<sup>-1</sup>, a koeficijent  $Y_{X/S} = 0,36$  g g<sup>-1</sup>. Na osnovi prethodno navedenog jasno je da povećanje koncentracije supstrata uzrokuje pojavu inhibicije supstratom tijekom fotoheterotrofnog uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 te je stoga neophodno odrediti optimalnu početnu koncentracija supstrata koja ne uzrokuje tu pojavu da bi se ostvarila što veća učinkovitost provođenja bioprocasa.

Biomasa ljubičastih nesumpornih bakterija može se primijeniti u procesima pročišćavanja tla i otpadnih voda iz raznih industrija (Kosakarika i sur., 2019) te koristiti kao izvor proteina i esencijalnih aminokiselina, te raznih spojeva kao što su pigmenti i biološki kofaktori (Novak i sur. 2017). 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). U ovom istraživanju bakteriofil *a* i ostali pigmenti određivani su kao ukupni ekstrahirani pigmenti prema Ritchie, 2018. Tijekom određivanja ukupne koncentracije fotosintetskih pigmenta dobivenih uzgojem *R. adriaticum* DSM 2781 na različitim izvorima ugljika uočena su dva karakteristična pika na 800 i 850 nm koji su apsorpcijski maksimumi bakterioklorofila *a* (Slika 3). Međutim, dobiveni pikovi nisu specifični samo za ljubičaste nesumporne bakterije već i za druge fotosintetske bakterije koje posjeduju bakterioklorofil *a*, primjerice zelene sumporne bakterije (Sasaki i sur., 2005).



**Slika 3.** Promjena apsorbancije (A) tijekom uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s glukozom (a) ili ksilozom (b) kao izvorima ugljika

**Figure 3.** Alteration of absorbance (A) during *R. adriaticum* DSM 2781 cultivation on media with glucose (a) or xylose (b) as carbon sources



Ako se glukoza koristi kao jedini izvor ugljika za uzgoj *R. adriaticum* DSM 2781 koncentracija fotosintetskih pigmenta najčešće pada (Tablica 2) zbog odumiranja biomase ili same autolize fotosintetskih pigmenta. Za nesumporne ljubičaste bakterije specifično je što se same kulture brzo prilagođavaju novim uvjetima i mogu de novo sintetizirati cijeli fotosenzitivni kompleks potreban za fotoheterotrofni rast (Kuo i sur., 2012; Stomp i sur., 2007). Međutim, taj „foto-kompleks“ može se i brzo razgraditi ako uzgoj prelazi iz fotoheterotrofnog u heterotrofni uzgoj (Patrusheva i sur., 2007; Numan i sur., 2018). Kada bakterija raste uz prisustvo svjetlosti i izvora ugljika koji se lako metabolizira (npr. glukoza), vidljiva je potrošnja izvora ugljika u prvoj fazi rasta te povećanje ukupne koncentracije fotosintetskih pigmenta (sinteza bakteriofila a te karotenoida i ostalih pigmenta), a potom u drugoj fazi dolazi do smanjenja ukupne koncentracije fotosintetskih pigmenta, uz povećanje koncentracije biomase. U ovom istraživanju kod uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s glukozom također je zabilježena ova pojava (Tablice 2). Najveća koncentracija ukupnih fotosintetskih pigmenta bila je nakon 48 sati uzgoja, a kod koncentracije glukoze u hranjivoj podlozi od 5 g L<sup>-1</sup> iznosila je 7,56 mg g<sup>-1</sup> biomase, kod 10 g L<sup>-1</sup> glukoze 8,04 mg g<sup>-1</sup> biomase. Međutim, kod koncentracije glukoze od 15 g L<sup>-1</sup> došlo je do smanjenja koncentracije

fotosintetskih pigmenta na 3,32 mg g<sup>-1</sup> biomase zbog pojave inhibicije supstratom rasta bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 (Tablica 2). Za razliku od uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s glukozom kod uzgoja na hranjivoj podlozi s ksilozom zabilježena je suprotna pojava tj. koncentracija ukupnih fotosintetskih pigmenta raste tijekom uzgoja i najveća je na kraju bioprocesa (96 h; Tablica 3). Najveća koncentracija ukupnih fotosintetskih pigmenta zabilježena je kod koncentracije ksiloze u hranjivoj podlozi od 10 g L<sup>-1</sup> (6,54 mg g<sup>-1</sup> biomase), kod 5 g L<sup>-1</sup> ksiloze iznosila je 5,23 mg g<sup>-1</sup> biomase, a najmanja je kod koncentracije ksiloze od 15 g L<sup>-1</sup> (2,29 mg g<sup>-1</sup> biomase; Tablica 3). Smanjenje ukupne koncentracije fotosintetskih pigmenta kod 15 g L<sup>-1</sup> ksiloze u hranjivoj podlozi posljedica je pojave inhibicije supstratom gdje zbog usporenog rasta bakterijske biomase dolazi i do smanjene sinteze fotosintetskih pigmenta biomase (Choudhury i sur., 2017). Budući da ksiloza nije povoljan izvor ugljika za rast i dobivanje energije kod *R. adriaticum* DSM 2781 (Slika 2; Hiraishi i Ueda, 1994 i 1995; Choudhury i sur., 2017) potreban je dulji vremenski period za sintezu fotosenzitivnog kompleksa pri čemu se odvija i sinteza fotosintetskih pigmenta čija koncentracija se time dodatno povećava u odnosu na uzgoj s glukozom kao izvorom ugljika.

**Tablica 2.** Koncentracija ukupnih pigmenta tijekom uzgoja bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama s glukozom kao izvorom ugljika

**Table 2.** Total pigment concentration during cultivation of *R. adriaticum* DSM 2781 on cultivation media with glucose as a sole carbon source

Hranjiva podloga/ Medium	Ukupni pigmenti / Total pigments - 48h [mg L <sup>-1</sup> ]	Ukupni pigmenti / Total pigments - 48h [mg g <sub>biomasa</sub> <sup>-1</sup> ]	Ukupni pigmenti / Total pigments - 96h [mg L <sup>-1</sup> ]	Ukupni pigmenti / Total pigments - 96h [mg g <sub>biomasa</sub> <sup>-1</sup> ]
Glukoza/ Glucose 5 g L <sup>-1</sup>	15,65	7,56	6,73	2,29
Glukoza/ Glucose 10 g L <sup>-1</sup>	16,74	8,04	6,54	2,27
Glukoza / Glucose 15 g L <sup>-1</sup>	8,52	3,32	6,77	2,20

**Tablica 3.** Koncentracija ukupnih pigmenta tijekom uzgoja bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama s ksilozom kao izvorom ugljika

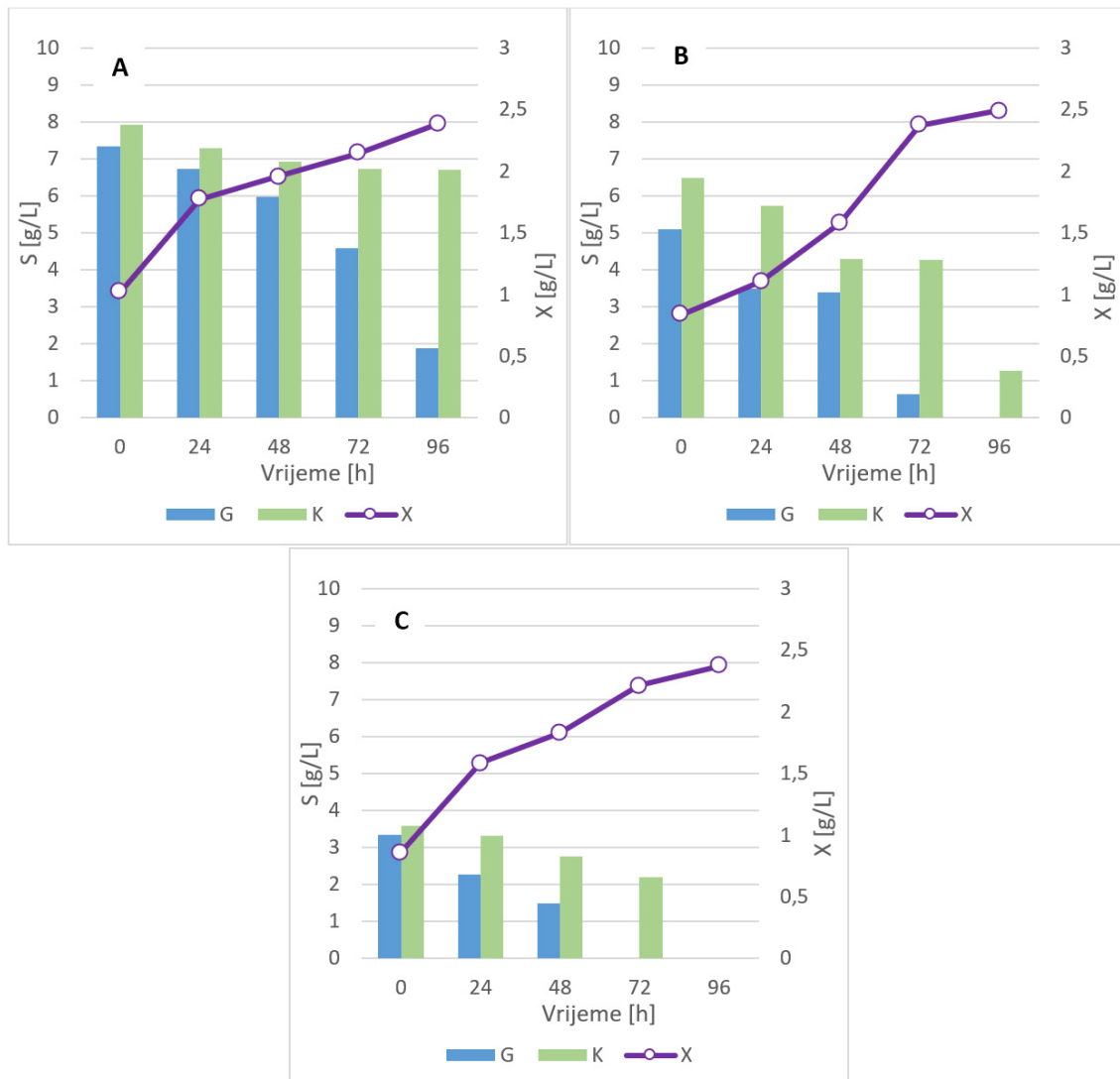
**Table 3.** Total pigment concentration during cultivation of *R. adriaticum* DSM 2781 on cultivation media with xylose as a sole carbon source

Hranjiva podloga/ Medium	Ukupni pigmenti / Total pigments - 48h [mg L <sup>-1</sup> ]	Ukupni pigmenti / Total pigments - 48h [mg g <sub>biomasa</sub> <sup>-1</sup> ]	Ukupni pigmenti / Total pigments - 96h [mg L <sup>-1</sup> ]	Ukupni pigmenti / Total pigments - 96h [mg g <sub>biomasa</sub> <sup>-1</sup> ]
Ksiloza/Xylose 5 g L <sup>-1</sup>	9,58	3,77	15,55	5,22
Ksiloza/Xylose 10 g L <sup>-1</sup>	4,12	2,14	17,33	6,54
Ksiloza/Xylose 15 g L <sup>-1</sup>	2,76	1,41	4,31	2,29

### Fotoheterotrofni uzgoj bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama s glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika

Uzgoj *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama sa samo jednim izvorom ugljika pokazao je da bakterija može rasti na glukozu ili ksilozi kao jednim izvorima ugljika, ali da joj je rast usporen zbog

inhibicije supstratom kod koncentracija izvora ugljika većih od 10 g L<sup>-1</sup> (Slike 1 i 2). Veća koncentracija ukupnih fotosintetskih pigmenta zabilježena je kod uzgoja na hranjivoj podlozi s ksilozom usmjerila je istraživanje prema primjeni oba izvora ugljika u hranjivoj podlozi s ciljem dobivanja što većeg prinosa bakterijske biomase odnosno ukupnih fotosintetskih pigmenta kao što su bakteriofila a, karotenoidi i ostali pigmenti.



**Slika 4.** Promjene koncentracije izvora ugljika i bakterijske biomase tijekom uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama s jednakim koncentracijama glukoze i ksiloze: 3 g L<sup>-1</sup> (A); 5 g L<sup>-1</sup> (B) i 7.5 g L<sup>-1</sup> (C) (S - koncentracija supstrata; G - koncentracija glukoze; K - koncentracija ksiloze; X - koncentracija biomase; t - vrijeme)

**Figure 4.** Changes of carbon sources and bacterial biomass concentrations during cultivation of *R. adriaticum* DSM 2781 on media with equal glucose and xylose concentrations: 3 g L<sup>-1</sup> (A); 5 g L<sup>-1</sup> (B) i 7.5 g L<sup>-1</sup> (C) (S - substrate concentration; G - glucose concentration; K - xylose concentration; X - biomass concentration; t - time)

U ovom dijelu istraživanja koncentracije pojedinih šećera odabrane su tako da budu manje od 10 g L<sup>-1</sup> jer je tijekom uzgoja na koncentracijama pojedinim izvora ugljika od 10 g L<sup>-1</sup> i većim očučena inhibicija supstratom odnosno smanjenje prinosa biomase i fotosintetskih pigmenta (Slike 1. i 2.). Zbog toga su odabrane ove tri kombinacije jednakih koncentracija izvora ugljika (glukoze i ksiloze) u hranjivoj podlozi: 3 g L<sup>-1</sup>, 5 g L<sup>-1</sup> i 7,5 g L<sup>-1</sup>. Rezultati ovog dijela istraživanja prikazani su na Slici 4. Iz prikazanih rezultata je vidljivo da su glukoza i ksiloza tijekom uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s 3 g L<sup>-1</sup> oba šećera potpuno utrošena u periodu od 96 sati. Usporedba s uzgojem *R. adriaticum* DSM 2781 na samo jednom izvoru ugljika (Slike 1 i 2) pokazuje veću pojedinačnu potrošnju supstrata što je najvjerojatnije posljedica potrošnje supstrata za prilagodbu bakterije na promjenu izvora ugljika tijekom uzgoja, ali i za energiju održavanja bakterije u tim uvjetima (Sasaki i sur., 2005). U prethodno navedenom uzgoju prinos biomase je iznosio 1,507 g L<sup>-1</sup>, a koeficijent  $Y_{XS}$  0,22 g g<sup>-1</sup> što je oko 50 % manje nego kod uzgoja na hranjivoj podlozi sa samo jednim izvorom ugljika. Navedeno smanjenje koeficijenta  $Y_{XS}$  posljedica je potrošnje supstrata na energiju održavanja i prilagodbu metabolizma na različite izvore ugljika (Sasaki i sur., 2005). Ukupna produktivnost bioprocesa je iznosila 0,017 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>.

Kod uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s početnom koncentracijom glukoze i ksiloze od 5 g L<sup>-1</sup>, došlo je do potpune potrošnje glukoze te 81 % potrošnje ksiloze. Prinos biomase *R. adriaticum* DSM 2781 je bio oko 10 % veći nego kod uzgoja na hranjivoj podlozi s 3 g L<sup>-1</sup> oba izvora ugljika. Ukupna produktivnost bioprocesa (0,018 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) bila je na približno istoj razini kao i kod uzgoja na hranjivoj podlozi s 3 g L<sup>-1</sup> oba izvora ugljika. Povećanjem početne koncentracije oba izvora ugljika u hranjivoj podlozi dolazi do inhibicije rasta supstratom te je utrošeno samo 72 % glukoze odnosno 15 % ksiloze. Prinos biomase je bio manji u odnosu na uzgoje *R. adriaticum* DSM 2781 manjih početnih koncentracijama oba izvora ugljika. Koeficijent  $Y_{XS}$  je bio na približno istoj razini kao i kod uzgoja na hranjivoj podlozi s 3 g L<sup>-1</sup> oba izvora ugljika (0,21 g g<sup>-1</sup>). Na osnovi rezultata ovog dijela istraživanja vidljivo je da *R. adriaticum* DSM 2781 bolje raste na hranjivim podlogama samo sa jednim izvorom ugljika te bi za dobivanje bakterijske biomase trebalo koristiti hranjive podloge s jednim izvorom ugljika (npr. glukoza) vodeći računa o mogućnostima primjene tog izvora ugljika u industrijskom mjerilu.

Određivanje ukupnih fotosintetskih pigmenta kod uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama s oba izvora ugljika uočavaju se



također karakteristični pikovi na 800 i 850 nm koji u apsorpcijskom spektru odgovaraju bakterioklorofila *a* (Ritchie, 2018). Kod svih uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s oba izvora ugljika najveća koncentracija ukupnih fotosintetskih pigmentata (uključujući i bakteriofila *a*) zabilježena je nakon 48 sati uzgoja, a prema kraju bioprocasa se smanjuje (Tablica 4). Najveće koncentracije ukupnih fotosintetskih pigmentata registrirane su kod uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s 3 g L<sup>-1</sup> glukoze i ksiloze (13,27 mg g<sup>-1</sup> biomase), a čak 88 % manje koncentracije su određene kod uzgoja na hranjivoj podlozi s 7,5 g L<sup>-1</sup> glukoze i ksiloze (1,66 mg g<sup>-1</sup> biomase). Kod uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s 5 g L<sup>-1</sup> glukoze

i ksiloze detektirano je 6,45 mg g<sup>-1</sup> biomase ukupnih fotosintetskih pigmentata. Usporedba s uzgojem *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama sa samo jednim izvorom ugljika pokazuje približno jednake koncentracije ukupnih fotosintetskih pigmentata, a izuzetak je uzgoj na hranjivoj podlozi s 3 g L<sup>-1</sup> glukoze i ksiloze gdje su zabilježene najveće koncentracije fotosintetskih pigmentata. Ova pojava pokazuje da prisustvo ksiloze u malim koncentracijama stimulira sintezu fotosintetskih pigmentata. Međutim, potrebno je provesti dodatna istraživanja i odrediti optimalnu koncentraciju ksiloze koja ima pozitivan učinak na sintezu fotosintetskih pigmentata.

**Tablica 4.** Promjene koncentracije ukupnih pigmentata tijekom uzgoja bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivim podlogama s glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika

**Table 4.** Alteration of total pigment concentration during cultivation of *R. adriaticum* DSM 2781 on media with glucose and xylose as carbon sources

Hranjiva podloga/ Medium	Ukupni pigmenti / Total pigments - 48h [mg L <sup>-1</sup> ]	Ukupni pigmenti / Total pigments - 48h [mg g <sub>biomasa</sub> <sup>-1</sup> ]	Ukupni pigmenti / Total pigments - 96h [mg L <sup>-1</sup> ]	Ukupni pigmenti / Total pigments - 96h [mg g <sub>biomasa</sub> <sup>-1</sup> ]
3 g L <sup>-1</sup> Glukoza i 3 g L <sup>-1</sup> ksiloza / 3 g L <sup>-1</sup> Glucose and 3 g L <sup>-1</sup> Xylose	24,21	13,27	4,26	1,80
5 g L <sup>-1</sup> Glukoza i 5 g L <sup>-1</sup> Ksiloza / 5 g L <sup>-1</sup> Glucose and 5 g L <sup>-1</sup> Xylose	10,14	6,45	2,31	0,92
7,5 g L <sup>-1</sup> Glukoza i 7,5 g L <sup>-1</sup> Ksiloza / 7,5 g L <sup>-1</sup> Glucose and 7,5 g L <sup>-1</sup> Xylose	3,25	1,66	3,81	1,60

## Zaključci

Ljubičaste nesumporne bakterije imaju važnu ulogu u suvremenoj biotehnologiji zahvaljujući njihovoj iznimnoj fiziološkoj raznolikosti i prilagodljivosti na široki raspon uvjeta okoline. Njihova sposobnost sinteze značajnog broja visokovrijednih proizvoda s primjenom u području medicine, bioenergetike te prehrambene industrije i poljoprivrede daje im važnu ulogu u tzv. biorafinerijskom pristupu (Imhoff, 2006; Novak i sur., 2017). Glukoza i ksiloza su interesantan izvor ugljika ako se dobivaju iz obnovljivih sirovina poput slame, sijena, kukurozovine ili kukuruznih oklaska (Mardetko i sur., 2018; Mirza i sur., 2019). U ovom istraživanju glukoza i ksiloza su odabrane kao izvori ugljika jer obično čine većinski udjel šećera u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (Mardetko i sur., 2018). Rezultati istraživanja pokazuju da je kod uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s 5 g L<sup>-1</sup> glukoze zabilježen najveći koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu ( $Y_{X/S}$ ) od 0,54 g g<sup>-1</sup>. Povećanje koncentracije glukoze (10 - 15 g L<sup>-1</sup>) u hranjivoj podlozi povezano je sa smanjenjem koeficijenta  $Y_{X/S}$  (10 g L<sup>-1</sup> = 0,23 g g<sup>-1</sup> i 15 g L<sup>-1</sup> = 0,19 g g<sup>-1</sup>) zbog inhibicije supstratom. Kod uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s većim početnim koncentracijama ksiloze inhibicija supstratom je bila još izraženija te su stoga pokazatelji uspješnosti ( $Y_X$ ,  $Y_{X/S}$  i  $Pr$ ) bili oko 50 % manji u

odnosu na uzgoj kod 5 g L<sup>-1</sup> ksiloze. Kod uzgoja *R. adriaticum* DSM 2781 na hranjivoj podlozi s jednakim koncentracijama oba izvora ugljika (glukoza i ksiloza) najveće vrijednosti pokazatelja uspješnosti bioprocasa zabilježene su kod 5 g L<sup>-1</sup> ( $Y_X = 1,65$  g L<sup>-1</sup>;  $Y_{X/S} = 0,22$  g g<sup>-1</sup> i  $Pr = 0,018$  g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Veće koncentracije oba izvora ugljika inhibiraju rast bakterije *R. adriaticum* DSM 2781. Koncentracija ukupnih fotosintetskih pigmentata (uključujući i bakteriofila *a*) najveća je nakon 48 sati uzgoja (izuzetak je hranjiva podloga s ksilozom gdje registrirana kod 96 h) *R. adriaticum* DSM 2781 kod većine uzgoja provedenih u ovom istraživanju. Za sintezu fotosintetskih pigmentata najpogodnija je hranjiva podloga s jednakom koncentracijom glukoze i ksiloze od 3 g L<sup>-1</sup>. Daljnje povećanje koncentracije oba izvora ugljika u hranjivoj podlozi vezano je uz pojavu inhibicije supstratom rasta *R. adriaticum* DSM 2781 zbog čega dolazi i do smanjenja sinteze fotosintetskih pigmentata.

## Zahvale:

Ovaj rad je financiran 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).

## Literatura

- Allouf 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.
- Choudhury D., Saini S. (2017) Sugar Co-utilization in Microorganisms. U: Gunasekaran, P., Noronha, S., Pandey, A., (ed) *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Functional Genomics and Metabolic Engineering, str. 243-268. Elsevier, Netherlands
- 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. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 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 Research X*, 4 100031.
- Hansen T. A., van Gernerden H. (1972) Sulfide Utilization by Purple Nonsulfur Bacteria. *Archives of Microbiology*, 86 49 – 56.





- Higuchi – Takeuchi M., Numata K. (2019) Marine Purple Photosynthetic Bacteria as Sustainable Microbial Production Hosts. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7 258.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44 (1) 15 – 23.
- Hiraishi A., Ueda Y. (1995) Isolation and characterization of *Rhodovulum strictum* sp. nov. and some other purple nonsulfur bacteria from colored blooms in tidal and seawater pools. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45 (2) 319 – 326.
- Imhoff J. F. (1995) Taxonomy and Physiology of Phototrophic Purple Bacteria and Green Sulfur Bacteria. U: Blankenship, R. E., Madigan, Michael T., Bauer, C. E., (ed) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, str. 6 – 8, Kluwer Academic Publishers, Netherlands,
- Imhoff J. F. (2006) The Phototrophic Alpha – Proteobacteria. U: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E., (ed.) *The Prokaryotes*, vol. 5: *Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*, str. 41 – 64, Springer, New York
- Imhoff J. F., Hiraishi A., Süling J.(2005) Anoxygenic Phototrophic Purple Bacteria. U: Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Garrity, G. M., (ed.) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, str. 119 – 132, Springer, Boston, MA
- Kobayashi M., Kobayashi M. (1995) Waste Remediation and Treatment Using Anoxygenic Phototrophic Bacteria. U: Blakenship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E., (ed.) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration vol 2*, str. 1269 – 1282. Springer, Dordrecht
- Koku H., Eroğlu I., Gündüz U., Yücel M., Türker L. (2002) Aspects of the Metabolism of Hydrogen Production by *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of 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*. *Bioresource Technology*, 113 315 – 318.
- Lu H., Zhang G., Dong S. (2011) Quantitative Study of PNSB Energy Metabolism in Degrading Pollutants Under Weak Light-Micro Oxygen Condition. *Bioresource Technology*, 102 (8) 4968 – 4973.
- Madigan M. T., Jung D. O. (2009) An overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats. U: Neil Hunter, C., Daldal, F., Thurnauer, M. C., Beatty, J. T., (ed.) *The Purple Phototrophic Bacteria*, str. 1 – 15, Springer, Dordrecht
- Madukasi E. I., Dai X., He C., Zhou J. (2009) Potentials of Phototrophic Bacteria in Treating Pharmaceutical Wastewater. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 7 (1) 165 - 174.
- Mardetko N., Novak M., Trontel A., Grubišić M., Galić M., Šantek B. (2018) Bioethanol Production from Dilute-acid Pre-treated Wheat Straw Liquor Hydrolysate by Genetically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 32 (4) 483 – 499.
- McKinlay J. B., Harwood C. S. (2010) Photobiological Production of Hydrogen Gas as a Biofuel. *Current Opinion in Biotechnology*, 21 (3) 244 – 251.
- Merugu R., Rudra M. P. P., Girisham S., Reddy S. M. (2012) Biotechnological Applications of Purple Non Sulphur Phototrophic Bacteria: A Minireview. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 3 (1) 376 – 384.
- 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. *Philippine journal of systematic biology*, 3 (1) 57 – 67.
- Neutzling O., Imhoff J. F., Trüper H. G. (1984) *Rhodospseudomonas adriatica* sp. nov., a new species of the Rhodospirillaceae, dependent on reduced sulfur compounds. *Archives of Microbiology*, 137 256 – 261.
- 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.
- Ormerod J. G. (1992) Physiology of the Photosynthetic Prokaryotes. U: Mann, N. H., Carr, N. G., (ed.) *Photosynthetic Prokaryotes. Biotechnology Handbooks vol 6*, str. 93 - 120. Springer, Boston, MA
- 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*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 8 (7) 187 – 192.
- Ritchie R. J. (2018) Measurement of Chlorophylls *a* and *b* and Bacteriochlorophyll *a* in Organisms From Hypereutrophic Auxinic Waters. *Journal of Applied Phycology*, 30 (6) 3075 – 3087.
- 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. *Microbial Biotechnology*, 13 (5) 1336 – 1365.
- 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. *Research in Microbiology*, 168 (3) 266 – 275.
- Sasaki K., Tanaka T., Nagai S. (1998) Use of Photosynthetic Bacteria for the Production of SCP and Chemicals from Organic Wastes. U: Martin, A. M., (ed.) *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*, str. 247 – 292. Springer, Boston, MA, str.
- Sasaki K., Watanabe M., Suda Y., Ishizuka A., Noparatnaraporn N. (2005) Applications of Photosynthetic Bacteria for Medical Fields. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100 (5) 481 – 488.
- Sasaki K., Watanabe M., Tanaka T., Tanaka T. (2002) Biosynthesis, Biotechnological Production and Applications of 5-Aminolevulinic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58 (1) 23 – 29.
- Stomp M., Huisman J., Stal L. J., Matthijs H. C. P. (2007) Colorful Niches of Phototrophic Microorganisms Shaped by Vibrations of the Water Molecule. *The ISME Journal*, 1 271 – 282.
- 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: Blankenship, R. E., Madigan, Michael T., Bauer, C. E., (ed.) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, str. 885 – 914, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- Tang K. H., Tang Y. J., Blankenship R. E. (2011) Carbon metabolic pathways in phototrophic bacteria and their broader evolutionary implications. *Frontiers in Microbiology*, 2 1 – 23.
- Vrati S. (1984) Single Cell Protein Production by Photosynthetic Bacteria Grown on the Clarified Effluents of Biogas Plant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19 (3) 199 – 202.
- Zannoni D., Schoepp-Cothenet B., Hosler J. (2009) Respiration and Respiratory Complexes. U: Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C., Beatty, J. T., (ed.) *The Purple Phototrophic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration vol 28*, str. 537-561. Springer, Dordrecht