Zelena biomasa kao održivi izvor proteina

Galović, Patricia

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:159:390448

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Patricia Galović

7042/PT

ZELENA BIOMASA KAO ODRŽIVI IZVOR PROTEINA

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: Zelena otapala za zelene tehnologije

Mentor: Prof.dr.sc. *Ivana Radojčić Redovniković*

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ZELENA BIOMASA KAO ODRŽIVI IZVOR PROTEINA

Patricia Galović, 0058206333

Sažetak:

Sve veća potražnja za bioraspoloživim kemikalijama, proizvedenim na ekološki i održiv način, zahtjeva i pronalazak načina za dobivanje istih, a biorafinerije predstavljaju jedan obećavajući put za ispunjavanje tih zahtjeva zbog mogućnosti proizvodnje više proizvoda i integrativnog koncepta proizvodnje. Jedna od vrsta biorafinerija je zelena biorafinerija s osnovnim konceptom koji koristi cijelu zelenu biomasu za generiranje raznih zanimljivih proizvoda, uključujući proteine (Ecker i sur., 2012). Važno je imati izvor biomase tijekom cijele godine pa je očuvanje biomase poput silaže neophodno uključiti u projektiranje procesa biorafinacije (Xiu i Shahbazi, 2015). Svježa masa može biti netretirana ili tretirana s komercijalnim inokulantima mikroorganizama.

Cilj našeg istraživanja bio je odrediti udio i veličinu proteina te aminokiselinski sastav četiri biljne vrste: alfalfe, djeteline s travama, koprive i facelije.

Ključne riječi: biokemikalije, biomasa, biorafinerija, proteini, zelena biorafinerija
Rad sadrži: 29 stranica, 5 slika, 3 tablice, 21 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: Prof.dr.sc. *Ivana Radojčić Redovniković*
Pomoć pri izradi: Doris Delač Salopek, mag.ing.
Datum obrane: 16. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for technology and application of cells and biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

GREEN BIOMASS AS SUSTAINABLE SOURCE OF PROTEIN

Patricia Galović, 0058206333

Abstract:

The increasing demand on biobased chemicals, being produced in an ecological and sustainable way, is a well-established estimation and biorefineries represent one promising route to fulfill these requirements due to their multi-product and integrative concepts. One of the biorefinery types is green biorefineries with the basic concept which utilize the whole green biomass to generate a variety of products including proteins (Ecker et al., 2012). It is important to have biomass source through the whole year so conservation of biomass like silage is necessary to be included into designing a biorefinery process (Xiu and Shahbazi, 2015). The fresh mass can be untreated or treated with commercial inoculant.

The aim of our study was to evaluate total protein content, the amino acids composition and the size of isolated proteins in four plant species Alfalfa, clover with herbs, Nettle and Phacelia.

Keywords: biochemicals, biomass, biorefinery, green biorefinery, proteins
Thesis contains : 29 pages, 5 figures, 3 tables, 21 references
Original in: Croatian
Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: Ph.D. *Ivana Radojčić Redovniković*, Full professor
Tehnical support snd assistance: Doris Delač Salopek, mag.ing.
Thesis delivered: July 16th 2018

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1. Općenito o biorafinerijama 2

2.1.1. Biomasa korištena u biorafinerijama 3

2.1.2. Kategorizacija biorafinerija 4

2.1.3. Tehnološki procesi u biorafineriji 5

2.1.4. Proizvodi biorafinerije 6

2.2. Zelene biorafinerije 8

2.2.1. Zelena biomasa 9

2.2.2. Uloga zelene kemije 10

2.2.3. Procesi prerade u zelenoj biorafineriji 10

2.2.4. Proizvodi zelene biorafinerije 11

3. EKSPERIMENTALNI DIO 14

3.1. Materijal 14

3.1.1. Biljni materijal 14

3.1.2. Kemikalije 14

3.1.3. Otopine 15

3.1.4. Oprema 15

3.2. Metode 16

3.2.1. Određivanje ukupnih proteina 16

3.2.2. Određivanje sastava aminokiselina 18

3.2.3. Određivanje veličine izoliranih proteina 19

4. REZULTATI I RASPRAVA 21

5. ZAKLJUČAK 26

6. LITERATURA 27

1. UVOD

Sve veća potražnja za bioraspoloživim kemikalijama, proizvedenim na ekološki i održiv način, zahtjeva i pronalazak načina za dobivanje istih, a biorafinerije predstavljaju jedan obećavajući put za ispunjavanje tih zahtjeva zbog mogućnosti proizvodnje više proizvoda i integrativnog koncepta proizvodnje (Ecker i sur., 2012). „Biorafinerija je održivo procesiranje biomase u niz tržišno vrijednih proizvoda i energije" navedena u IEA Bioenergy Task 42 (The International Energy Agency (IEA) Bioenergy Task 42, 2007). Koncept biorafinerije prihvaća širok spektar tehnologija sposobnih pretvarati izvore biomase u gradivne blokove koji mogu biti dalje prerađeni u proizvode s dodanom vijednošću, biogoriva i kemikalije (Cherubini, 2010). U dvije velike skupine možemo podijeliti proizvode biorafinerija: energetski proizvodi i materijalni proizvodi. Energetski proizvodi su oni koji se koriste radi njihovog energetskog sastava, osiguravaju električnu energiju, toplinu ili mogućnost prijevoza. S druge strane, materijalni proizvodi se ne koriste za energetske potrebe, nego zbog svojih kemijskih ili fizikalnih svojstava (Cherubini, 2010). Zelene biorafinerije su višekratni sustavi koji koriste zelenu biomasu kao svestranu sirovinu za proizvodnju industrijskih proizvoda. Najpoznatiji proizvodi koji se mogu dobiti iz biomase travnjaka su proteini. Proteini su bitni elementi prehrane za ljude i životinje, te važne sirovine za proizvodnju ljepila te farmaceutsku i kozmetičku industriju (Xiu i Shahbazi, 2015). Biomasa doživljava sezonske promjene i berba nije moguća tijekom cijele godine. Upravo zbog toga, biomasa se mora skladištiti. Međutim, prije skladištenja, biomasu je potrebno stabilizirati kako bi se osigurao kontinuirani rad biorafinerije tijekom godine. Biomasa se nakon berbe tretira određenim komercijalnim inokulantima (Clark i sur., 2009).

Kako bi se detektirale biljke (poslijedično i biomasa) s najvećim udjelom proteina, potrebno je svježe biljke i silažu analizirati. Potrebno je odrediti ukupne proteine, aminokiselinski sastav te provesti elektroforezu kako bi se odredila veličina izoliranih proteina. Cilj ovog rada je bio ispitati udio proteina, a analizirale su se četiri različite biljne vrste: alfalfa, facelija, kopriva i mješavina djeteline sa travama.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Općenito o biorafinerijama

Biorafinerije predstavljaju rješenje sve veće potražnje za bioraspoloživim kemikalijama proizvedenim na ekološki i održiv način, zbog mogućnosti biorafinerija da proizvedu više proizvoda i zbog integrativnog koncepta proizvodnje istih (Ecker i sur., 2012). „Biorafinerija je održivo procesiranje biomase u niz tržišno vrijednih proizvoda i energije" (The International Energy Agency (IEA) Bioenergy Task 42, 2007). Koncept biorafinerije obuhvaća široki spektar tehnologija koje pretvaraju biomasu u gradivne blokove koji mogu biti dalje prerađeni u proizvode s dodanom vijednošću, biogoriva i kemikalije. Koncept biorafinerija je jednak današnjim naftnim rafinerijama. Biorafinerija je postrojenje (ili skup postrojenja) koje integrira procese pretvorbe biomase i opremu za proizvodnju biogoriva, energije i kemikalija iz biomase (Cherubini, 2010). Biorafinerija može biti i samostalna jedinica koja različite biološke sirovine može pretvoriti u vrijedne proizvode uključujući energiju, materijale i kemikalije. Biorafinerija zahtjeva integraciju mnogo različitih područja znanja koja obuhvaćaju kemijsko inženjerstvo, kemiju, biologiju, biokemiju, biomolekularni inženjering i mnoga druga područja (Clark i sur., 2006).

Biorafinerija je pogon koji integrira procese pretvorbe biomase i opremu za koprodukciju kemikalija s dodanom vrijednošću, biogoriva, topline i energije iz različitih izvora biomase. To je veliki, integrirani proizvodni pogon koji proizvodi kemikalije i biokemikalije iz biljnih sirovina. Pojam „biorafinerija" odnosi se na pretvorbu biomase u mnoštvo vrijednih kemikalija, proizvoda te energije s minimalnim otpadom i emisijom štetnih plinova (Demirbas, 2010).

U biorafinerijama prve generacije, drvna biomasa se pretvara u materijale i bioenergetske proizvode. U sljedećoj generaciji biorafinerija, sirovina se frakcionira u vrijedne komponente ekstrakcijom, fermentacijom i kontroliranom pirolizom, kao i tradicionalnijim metodama, a dobiveni kemijski proizvodi se dalje pretvaraju u proizvode s dodanom vrijednošću. Biorafinerije druge generacije se temelje na proizvodnji održivih kemijskih proizvoda kroz moderne i dokazane zelene kemijske tehnologije kao što su bioprocesiranje, kontrolirana piroliza, kataliza u vodi i mikrovalno zračenje (Clark, 2007).

Količina obnovljive energije mora se povećati u mnogim sektorima (električna energija, toplina, transport i kemijska industrija), dok se istodobno mora osigurati održivost i

pouzdanost proizvodnje biomase za hranu za ljude i životinje uzimajući u obzir brzorastuće svjetsko stanovništvo. Struja i toplina mogu se osigurati iz različitih obnovljivih izvora poput vjetra, solarne elektrane i hidroelektrane te biomase, dok je jedini izvor obnovljivih izvora ugljika upravo biomasa. Zamjena fosilnog ugljika s obnovljivim ugljikom iz biomase dovodi do razvoja biorafinerijskih postrojenja, gdje se učinkovito proizvode biogoriva, bioenergija, biokemikalije, biomaterijali i hrana (Cherubini i sur., 2009). Sposobnost procesiranja sirovine u raznovrsni tok produkata uvelike povećava mogućnosti biorafinerije kao novog koncepta za zadovoljavanje gospodarskih zahtjeva slobodnog tržišta i ostalih globalnih zahtjeva (Xiu i Shabazi, 2015).

2.1.1. Biomasa korištena u biorafinerijama

Pojam „sirovina" odnosi se na sirove materijale korištene u biorafinerijama. Biomasa je sintetizirana pomoću fotosintetskih procesa koji pretvaraju atmosferski ugljikov dioksid i vodu u šećere. Biljke koriste dobivene šećere te ih sintetiziraju u složenije spojeve općenito nazvane biomasa. Biomasa se djeli u tri kategorije: ugljikohidrati i lignin, trigliceridi te miješani organski ostaci. Obnovljivi sirovi materijali na bazi ugljika za biorafinerije su osigurani iz četiri različita izvora: agrokultura (određeni usjevi i ostaci), šumarstvo, industrija (ostaci) i kućanstvo (otpad i otpadne vode) te akvakultura (alge i morske trave) (Cherubini, 2010).

Povećava se svijest ljudi da sirovi materijali biljnog porijekla (biomasa) imaju potencijal zamijeniti velike količine fosilnih izvora kao sirovina za industrijsku proizvodnju, a to se odnosi i na energetske i na ne-energetske sektore. Na nacionalnoj, regionalnoj i globalnoj razini postoje tri glavna pokretača za korištenje biomase u biorafinerijama za proizvodnju bioenergije, biogoriva i biokemikalija: klimatske promjene, energetska sigurnost i ruralni razvoj (Cherubini, 2010). S obiljem raspoloživih količina biomase, razvoj novih tehnologija koje će iskoristiti biomasu za proizvodnju materijala uz biogoriva predstavljaju važnu priliku za potpuno iskorištavanje naših resursa (FitzPatrick i sur., 2010). Biomasa može doprinijeti održivom razvoju i globalnom očuvanju okoliša jer je obnovljiva (Demirbas, 2010).

Biomasa se jako razlikuje ovisno o vrsti i sezoni, stoga je jedan od zahtjeva biorafinerije da se može prilagoditi na različit sastav polaznih sirovina. Sastav biomase ovisi o vremenskim uvjetima, sezoni i berbi, koja nije jednaka tijekom cijele godine. Prebacivanje sa sirove nafte na biomasu može zahtjevati promjenu kapaciteta kemijskih industrija, uz uvijet

da generiraju materijale i kemikalije u sezonskom vremenskom okviru. Alternativno, biomasa se može skladištiti, međutim prije skladištenja ju treba stabilizirati. Stabilizacija biomase podrazumijeva provedbu postupka silaže (Clark i sur., 2009).

2.1.2. Kategorizacija biorafinerija

Biorafinerija se klasificira na: platforme, proizvode, sirovine i procese. Platforme su najvažnija značajka u ovom pristupu klasifikacije. One su ključni međuproizvodi između sirovina i gotovih proizvoda i mogu se koristiti za povezivanje različitih koncepata biorafinerija. Prema proizvodima koji se dobivaju u biorafinerijama široka je podjela na biorafinerije čiji su glavni produkti prizvodnje energija ili materijalni proizvodi. Sirovina je podijeljena u dvije podgrupe, namjenske sirovine i ostaci. Nekoliko tehnoloških procesa može biti primijenjeno u biorafinacijskim sustavima da pretvori sirovinu za biomasu u tržišno vrijedne proizvode. Oni su podijeljeni u četiri podgrupe: mehanički/fizički, biokemijski, kemijski i termokemijski. Adekvatna kombinacija ova četiri obilježja predstavlja svaki pojedinačni biorafinacijski sustav. Kombinacija pojedinih biorafinacijskih sustava, povezanih njihovim platformama, proizvodima ili sirovinama, pruža pregled najuglednijih biorafinacijskih sustava u mreži za klasifikaciju. Prema prijedlogu pristupa, biorafinerija se opisuje standardnim formatom kao "platforme - proizvodi" i "sirovine" (Cherubini i sur., 2009).

Glavne vrste biorafinerija su:

1. Biorafinerija lignocelulozne sirovine - koristi sirovu smjesu, kao što je biomasa i otpad koji sadrži celulozu.

2. Biorafinerija cijelih usjeva - koristi sirovine kao što su žitarice ili kukuruz.

3. Zelena biorafinerija - koristi biomasu prirodno bogatu vodom kao što su zelena trava, lucerna, djetelina ili nezrele žitarice.

4. Biorafinerija koncepta s dvije platforme - uključuje platforme šećera i sintetičkog plina.

5. Konvencionalna biorafinerija - temelji se na postojećim industrijama, kao što su industrija šećera i škroba.

6. Termokemijska biorafinerija - koja se temelji na mješavini nekoliko tehnologija.

7. Morska biorafinerija - temeljena na biomasi iz mora.

8. Biorafinerija za katalitičku obradu tekuće faze - temeljena na proizvodnji funkcionaliziranih ugljikovodika iz intermedijera izvedenih iz biomase.

9. Biorafinerija temeljena na šumarstvu - temeljena je na punoj integraciji biomase i drugih sirovina (uključujući energiju), za istovremenu proizvodnju celuloze, (papirnatih) vlakana, kemikalija i energije.

Kriterij razvrstavanja vrsta biorafinerija nije homogen: neki od tih sustava odnose se na vrstu sirovine (npr. biorafinerija lignocelulozних sirovina, biorafinerija morske biomase i dr.), dok se drugi usredotočuju na uključene tehnologije (npr. termokemijski konvencionalni koncept i biorafinerija s dvije platforme). U ovakvom tipu klasifikacije nedostaje mogućnost primjene tehnoloških procesa na različite izvore sirovina. Na primjer, biorafinerijski sustav u kojem se drvo plinizira do sintetičkog plina (kao što je proizvodnja Fischer-Tropsch (FT) goriva i kemikalija iz drveta) može se kategorizirati i kao biorafinerija lignocelulozne sirovine (od lignocelulozne biomase) i biorafinerija koncepta s dvije platforme (jer je proizveden sintetički plin). Sustavi biorafinerija koji koriste žitarice i/ili slamu dijelova usjeva (poput konvencionalne proizvodnje bioetanola iz kukuruza) mogu se klasificirati kao biorafinerije cjelovitih usjeva. Ne uzima se u obzir mogućnost kombiniranja različitih biorafinerijskih sustava povezivanjem različitih tehnologija. Na primjer, ako se ugljikohidratna frakcija lignocelulozne sirovine koristi za proizvodnju celuloze i ksiloze, sustav se klasificira kao biorazgradnja lignocelulozne sirovine, ali se također može klasificirati kao biorafinerija na bazi šume i ako je frakcija lignina pirolizirana, također je biorafinerija prikladna i za klasifikaciju kao biorafinerija koncepta s dvije platforme (Cherubini i sur., 2009).

Najviše istaknuta klasifikacija biorafinerija je ona po biomasi koja se prerađuje u istima: „žute" biorafinerije iskorištavaju „suhi" lignocelulozni materijal, „zelene" biorafinerije pretvaraju „mokre" trave iz prirode i nezrele usjeve, „plave" biorafinerije su one koje koriste morske alge, dok „sive" biorafinerije koriste otpad od hrane (Cherubini i sur., 2009).

2.1.3. Tehnološki procesi u biorafineriji

Cilj tehnoloških procesa u biorafinerijama je depolimerizacija i deoksidacija komponenti biomase. Kako bi se sirovina biomase pretvorila u vrijedne proizvode unutar pristupa biorafinerije, nekoliko tehnoloških postupaka i procesa mora se istovremeno

provesti. Oni mogu biti podijeljeni u četiri glavne grupe: termokemijski, biokemijski, mehanički/fizički i kemijski procesi (Cherubini, 2010).

Biomasa ima složen sastav i kao takva, primarnim frakcioniranjem u svoje glavne komponente omogućuje obradu i preradu u širok spektar proizvoda. Međutim, sirovine biomase obično imaju nisku toplinsku stabilnost i visok stupanj funkcionalnosti. Koncept frakcioniranja biomase na osnovne sastojke, važan korak u razvoju biorafinacijskih tehnologija, može imati koristi od širokog spektra bioprocesnih industrija zbog lakoće i poboljšane učinkovitosti povezane s radom sa sirovinama od manje promjenjivog materijala (FitzPatrick i sur., 2010).

Vrijedne kemikalije i polimeri se ekstrahiraju iz biomase. Glavne tehnologije za proizvodnju kemikalija iz biomase su: rafinacija biomase, termokemijska pretvorba, fermentacija i biokonverzije te izdvajanje i nadogradnja proizvoda (Demirbas, 2010).

Termokemijski procesi pretvorbe uključuju tri podkategorije: piroliza, rasplinjavanje i ukapljivanje. Biokemijska konverzija odvija se pri nižim temperaturama, te su niže i brzine reakcija, ali može ponuditi visoku selektivnost proizvoda. Proizvodnja etanola je biokemijska tehnologija pretvorbe koja se korisiti za proizvodnju energije iz biomase. Mnoge učinkovite tehnologije biokemijskih pretvorbi razvile su se u prirodi da razgrađuju molekule od kojih je sastavljena biomasa. Hidroliza se često koristi kao predtretman lignoceluloznih sirovina za razgradnju celuloze i hemiceluloze iz lignoceluloze i razgradnju spojeva u jednostavne šećere. Hidroliza se može provoditi korištenjem kiselina, enzima i/ili hidrotermalnih sredstava, koji uključuju toplu vodu i superkritične metode. Fermentacijom se koristi u industriji za proizvodnju alkoholnih pića, goriva te drugih kemikalija (Demirbas, 2010).

2.1.4. Proizvodi biorafinerije

Proizvodi nastali u biorafinerijama mogu se podijeliti na energetske i materijalne proizvode. Energetski proizvodi su oni koji se koriste radi njihovog energetskog sastava, osiguravaju električnu energiju, toplinu ili mogućnost prijevoza. S druge strane, materijalni proizvodi se ne koriste za energetske potrebe, nego zbog svojih kemijskih ili fizikalnih svojstava. Najvažniji energetski proizvodi proizvedeni u biorafinerijama su: plinovita biogoriva (bioplin, hidrogen, biometan), kruta biogoriva (peleti, lignin, drveni ugljen) i tekuća biogoriva za transport (bioetanol, biodisel, FT-goriva, bio-ulje). Najbitniji kemijski i materijalni proizvodi

su: kemikalije, organske kiseline (derivati šećera), polimeri i smole (furanske i fenolne smole), biomaterijali (drvene ploče, papir, celuloza), hrana i stočna hrana te gnojivo (Cherubini, 2010).

Obnovljiva tekuća biogoriva za transport su privukla veliku pozornost u raznim zemljama diljem svijeta zbog svoje obnovljivosti, održivosti, dostupnosti, regionalnog razvoja, otvaranja novih radnih mjesta u ruralnim područjima te smanjenja emisije stakleničkih plinova i njihove biološke razgradnje. Biogoriva se čine kao potencijalno alternativna "zelenija" zamjenska energija za fosilna goriva. Oni su obnovljivi i dostupni diljem svijeta (Demirbas, 2010). Transportna goriva bazirana na biomasi se identificiraju kao goriva prve i druge generacije biogoriva. Prva generacija se odnosi na ona biogoriva proizvedena iz sirovih materijala koji konkuriraju proizvodnji hrane i prehrambenoj industriji. Upravo zbog navedene konkurencije, ova biogoriva uzrokuju etičke, političke i ekološke zabrinutosti. Kako bi prevladali te probleme, proizvodnja sekundarnih biogoriva (iz sirovih materijala baziranih na otpadu, ostacima i biomasi usjeva koji se ne koriste za prehranu) je postigla svjetski interes u zadnjih nekoliko godina kao moguća „zelenija" alternativa fosilnim gorivima i konvencionalnim biogorivima. Biogoriva druge generacije su proizvedena iz različitih usjeva koji se ne primjenjuju kao izvor hrane ili prehrambena sirovina. Oni uključuju iskorištavanje lignocelulozno materijala, kao što su ostaci iz poljoprivrede, šumarstva i industrije te lignocelulozni usjevi (Cherubini, 2010). Suprotno prvoj generaciji biogoriva, gdje se iskorištava frakcija (sjeme i žitarice) koja predstavlja mali dio moguće biomase, druga generacija biogoriva se može osloniti na iskorištenje cijele biljke za proizvodnju bioenergije (Venturi i Venturi, 2003). Zbog iznimnog tehnološkog napretka, ekološki učinci biogoriva druge generacije mogu imati koristi od upotrebe velikih količina lignocelulozno ostataka i otpada koji su već dostupni: mogu biti glavni izvor sirove materije koja se također može dopuniti sa usjevima koji se ne koriste kao izvor prehrambeno vrijedne sirovine, kao što su višegodišnje trave i brzorastuće šume (Kamm i sur., 2006).

Moderne tehnologije biorafinerija kompatibilne sa standardima organske proizvodnje mogu ekstrahirati proteine iz usjeva sa travnjaka sa hranidbenom vrijednošću sličnom vrijednosti proteina soje te se proizvodni ostaci mogu koristiti za stočnu hranu, proizvodnju bioplina i ekstrakciju vrijednih supstanca (Santamaría-Fernández i sur., 2017a).

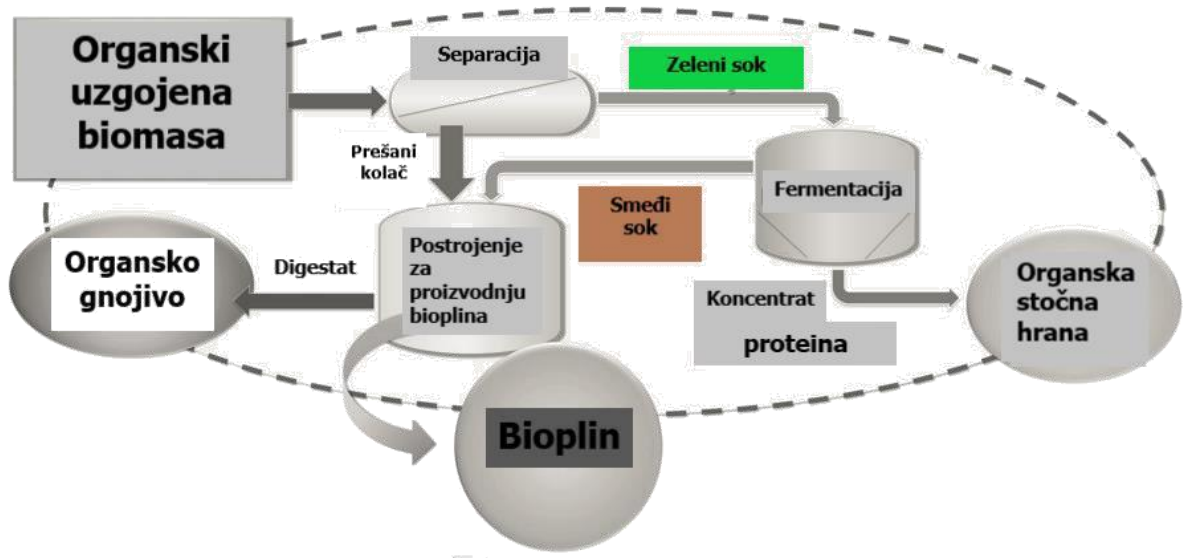
Uvođenje biorafinacijskih tehnika u ekološku proizvodnju za proizvodnju organske hrane sa dodanom vrijednošću od djeteline može riješiti važnije izazove u ekološkoj poljoprivredi. Djetelina može dobiti istaknuto mjesto u rotacijama na farmama bez preživača

te povećati i konsolidirati prinose usjeva. Opskrba proteinima za organsku svinju i perad može se osigurati i proizvesti na lokalnoj razini, s budućom perspektivom za proizvodnju biljnih proteina s dodanom vrijednošću za ljudsku prehranu. Koristeći ostatke za proizvodnju bioplina, sustav proizvodnje također pridonosi suzbijanju upotrebe fosilnih goriva (Fog i sur., 2017).

2.2. Zelene biorafinerije

Zelene biorafinerije su sustavi kojima se proizvodi više raznovrsnih proizvoda prikazanih na slici 1 (Kamm i sur., 2009). Zelene biorafinerije su višekratni sustavi koji koriste zelenu biomasu kao obilnu i svestranu sirovinu za proizvodnju industrijskih proizvoda. To predstavlja inovativan pristup alternativnim primjenama viška biomase travnjaka. Koncept je trenutno u naprednoj fazi razvoja u nekoliko europskih zemalja, posebice u Njemačkoj, Danskoj, Švicarskoj, Nizozemskoj i Austriji (Xiu i Shabazi, 2015).

Zelena biorafinerija je opisana kao primjer poljoprivredne tvornice u području bogatom vegetacijom i zelenilom (Kamm i sur., 2009). Osnovna ideja ovog koncepta je korištenje cijele zelene biomase (poput trave, lucerne i raznih drugih izvora) kako bi se stvorili razni proizvodi koji su sami vrijedni proizvodi ili predstavljaju osnovu za daljnje proizvodne linije. Osim biorazgradivih materijala, ovom tehnologijom mogu biti proizvedena goriva i energija (Xiu i Shahbazi, 2015). Osim koncepta biorafinerija, zelene biorafinerije se temelje na održivim načelima, odnosno na održivom korištenju zemljišta, održivim sirovinama, blagim tehnologijama i opskrbi samoproizvedenom energijom. Postojeće poljoprivredne strukture prerade usjeva, poput sušenja zelenih usjeva, omogućuju primjenu biorafinerijskih tehnologija i zelene biorafinerije kao pomoć u prevladavanju energetski opterećenih i djelomično zastarjelih tehnologija kao što su termičko sušenje sirovina (Kamm i sur., 2015). Tehnološki koncept zelene biorafinerije predstavlja inovativni pristup alternativnim primjenama zelene biomase (Xiu i Shabazi, 2015).



Slika 1. Shema zelene biorafinerije (Santamaría-Fernández i sur., 2017b), prijevod

2.2.1. Zelena biomasa

Zelenu biomasu uglavnom sačinjavaju zeleni usjevi, primjerice trava iz uzgoja trajnih travnjaka, sportskih terena i zaštićenih područja prirode ili usjevi poput lucerne, djeteline i nezrelih žitarica iz opsežnog uzgoja (Kamm i Kamm, 2007). Biomasa predstavlja atraktivan izvor za proizvodnju goriva i kemikalija zbog svoje raznovrsnosti, obnovljivih izvora prirode i blagog utjecaja na okoliš (Xiu i Shabazi, 2015). Tijekom cijele sezone, uzastopnom žetvom i ponovnim rastom istog usjeva može se dobiti maksimalni prinos suhe tvari godišnje. Posebno zato što se trave mogu uzgajati na većini vrsta tla u većini klimatskih područja, kako na normalnim poljoprivrednim tako i na rubnim zemljama (Kamm i sur., 2009). Vrijedne komponente svježe biomase su proteini, topljivi šećeri i frakcije vlakana (tj. celuloza, hemiceluloza i dijelovi lignina). U tim biološkim materijalima su najznačajnije velike koncentracije proteina. Zelena biorafinerija ima za cilj iskorištenje određenih komponenti biomase, koje se obično gube tijekom sazrijevanja ili sušenja biomase. Te komponente su općenito spojevi topljivi u vodi, koji se teško frakcioniraju kada se voda ukloni iz biljne stanice (Xiu i Shahbazi, 2015). Zbog toga bi trava mogla predstavljati vrijedan izvor proteina za perad i svinje. Trenutno, proteinski koncentrat iz biomase lišća i dalje je slabo korišten za prehranu stoke zbog dostupnosti soje. No, u budućnosti korištenje koncentrata proteina od

travnjaka bi moglo predstavljati obećavajuću i održivu alternativu uvozu soje (Brugger i sur., 2016).

2.2.2. Uloga zelene kemije

Primjenom tehnologija zelene kemije za transformaciju nisko vrijednih i široko dostupnih sirovina, uključujući otpad, možemo izgraditi nove ekološki prihvatljive i održive kemijske procese 21. stoljeća (Clark i sur., 2006). Kako bi se uspostavio održiv razvoj biogoriva i biokemikalija nužna je integracija zelene kemije u biorafinerije, uz korištenje tehnologija s blagim utjecajem na okoliš. Zelena kemija može se smatrati skupom načela za proizvodnju i primjenu proizvoda koji žele ukloniti uporabu ili proizvodnju okolišno štetnih i opasnih kemikalija (Cherubini, 2010).

Zelena ili održiva kemija je pokret za razvoj i implementaciju kemijskih proizvoda i procesa koji smanjuju ili uklanjaju uporabu i stvaranje supstanci opasnih za zdravlje ljudi i okoliš. Zelena kemija pruža jedinstvene mogućnosti za inovacije putem zamjene proizvoda, nove proizvodnje sirovina, katalize u vodenim medijima, korištenje mikrovalova i opseg alternativnih ili prirodnih otapala. Potencijal korištenja otpada kao novog resursa i razvoj integriranih objekata koji proizvode više proizvoda iz biomase raspravlja se pod krinkom biorafinerija (Clark i sur., 2012).

2.2.3. Procesi prerade u zelenoj biorafineriji

Danas se zeleni usjevi koriste kao krmne smjese i izvor lisnatog povrća. Proces koji se naziva mokro frakcioniranje zelene biomase, frakcioniranje zelenih kultura, može se koristiti za istovremenu proizvodnju hrane i neprehrambenih proizvoda (Kamm i sur., 2009). Tri glavna koraka kod zelene biorafinacije su: frakcioniranje, taloženje i odvajanje proteina (Corona i sur., 2018).

Primarno frakcioniranje zelene biomase ostaje neophodna operacija za proces prerade u zelenoj biorafineriji. "Prirodno mokre" sirovine zahtijevaju brzu primarnu preradu ili uporabu metoda očuvanja, poput silaže ili sušenja. No, zbog potrošnje energije toplinskih sušara, biomasa se rijetko transformira nakon sušenja, tako da je mehanička frakcija vlažnog

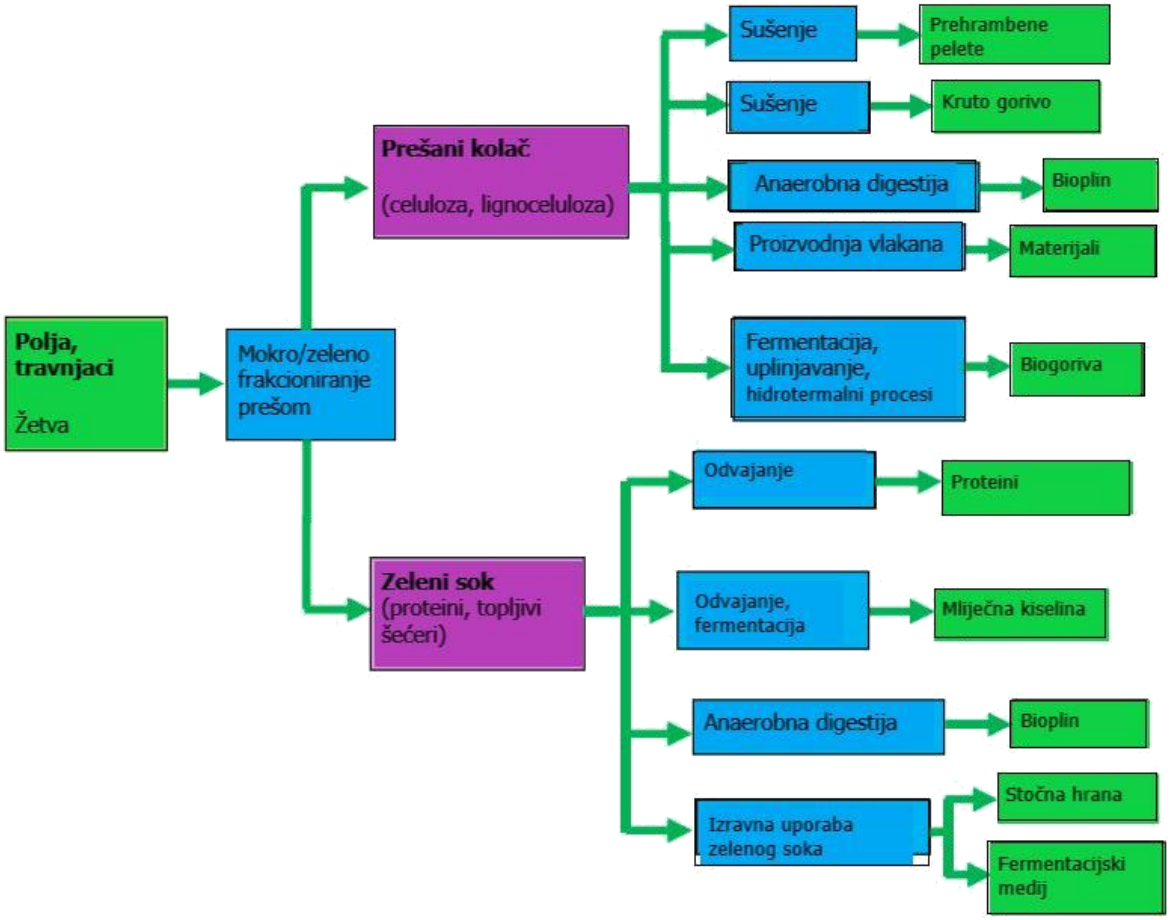
materijala obično prva operacija na biljci u zelenoj biorafineriji. Koristi se kao prvi korak (primarna rafinacija) za izolaciju sastojaka u njihovom prirodnom obliku. Zeleni usjevi (ili vlažni organski otpad) odvajaju se u prešani kolač bogat vlaknima i zeleni sok s hranjivim tvarima pomoću preše. Obje frakcije imaju ekonomsku vrijednost (Kamm i sur., 2009).

Osim celuloze i škroba, prešani kolač sadrži vrijedne boje i pigmente, sirove lijekove i ostale organske spojeve. Zeleni sok sadrži proteine, slobodne aminokiseline, organske kiseline, enzime, hormone te druge organske tvari i minerale. Primjena biotehnoloških metoda prerade je usmjerena posebno na pretvorbe biljne vode koja može istovremeno biti korištena za daljnje tretmane. Također, celuliranje lignincelulozних komponenti je lakše u usporedbi s materijalima lignocelulozne sirovine. U sljedećem koraku zelene biorafinacije (fermentacija) ugljikohidratni sok i jedan dio prešanog kolača se nakon hidrolize mogu koristiti za proizvodnju mliječne kiseline ili lizina. Nakon što je proizvedena, jednostanična biomasa se može primjenjivati kao izvor proteina za krmiva nakon odgovarajućeg sušenja. Pomoćna tvar kod fermentacije mliječne kiseline je natrijev hidroksid. Pomoću ultrafiltracije, reverzne osmoze, bipolarne elektrodijalize i destilacije, mliječna kiselina (90%) se dobiva iz fermentacijskog bujona natrijevog laktata. Lizin hidroklorid je produkt fermentacije lizinom. Nakon odjeljivanja jednostanične biomase ultrafiltiranjem i odvajanja membrane od vode, nakon čega slijedi proces sušenja, dobiva se lizin hidroklorid (50%). Bujon koji zaostaje nakon odvajanje mliječne kiseline ili lizina iz jednostanične biomase se može isporučiti u postrojenje za bioplin. Sušenjem, prešani kolač se može proizvesti u granule za hranu. Međutim, ova vrsta sušenje je energetski vrlo skupa. S energetskog gledišta, bolje je iskorištenje kolača kao silaže. Zaključak koji proizlazi i od strane ekološkog i ekonomskog razmatranja da je nužno povezivanje zelenih biorafinerija sa zelenom industrijom sušenja usjeva (Kamm i sur., 2009).

2.2.4. Proizvodi zelene biorafinerije

Opseg sadašnjeg koncepta zelenih biorafinerija jest da se organski usjevi koriste za hranu za životinje, gnojivo i proizvodnju energije u obliku metana. Svježe dobivena zelena biomasa prvo se odvaja u čvrstu (prešani kolač) i tekuću frakciju (zeleni sok) (Kamm i sur., 2009; Santamaría-Fernández i sur., 2017b). Najpoznatiji proizvodi koji se mogu dobiti iz biomase travnjaka su proteini. Bitni elementi prehrane za ljude i životinje su proteini, koji su također važna sirovina u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Visokokvalitetni proteini za

krmiva i proteini za kozmetičku industriju mogu se proizvesti frakcioniranjem proteina zelenog soka u različitim procesima odvajanja i sušenja. Proteini krmnih smjesa mogu biti kompletna zamjena za proteine soje. Oni imaju čak i prehrambeno-fiziološku prednost zbog svojeg sastava aminokiselina. Opći pristup proizvodnji proteina je žetva svježih biljnih materijala, mljevenje biljnog tkiva, istiskivanje proteinskog soka i zatim zagrijavanje soka kako bi se istaložili proteini (Xiu i Shabazi, 2015). Pored ovog proizvoda proteina za hranidbu dobivaju se dva međuprodukta za proizvodnju organskih proteina (kolač i smeđi sok) od kojih se treba iskoristiti hranjiva i energetska vrijednost. Ovi bi se međuprodukti mogli obraditi anaerobnom digestijom kako bi se dobila bioenergija u obliku metana. Tekući otpad iz procesa, koji sadrži ostatke organskih i hranjivih tvari, mogao bi biti vrijedan kao organsko gnojivo (Santamaría-Fernández i sur., 2017b). Također, vrijednost sirovina proteina od djeteline i trave je obećavajuća jer sastav aminokiselina s visokim sadržajem metionina ukazuje da to može biti vrijedan dodatak grahoricama kao što su grašak, faba grah i lupini (Santamaría-Fernández i sur., 2017a). Glavni proizvodi zelenog soka na koje je usmjerena pozornost su proizvodi poput mliječne kiseline i odgovarajućih derivata, aminokiselina te etanola i proteina. Zeleni sok dobar je izvor kvalitetnih proteina, kozmetičkih proteina, ljudske prehrane ili platformskih kemikalija kao što su mliječna kiselina i lizin, ili se mogu koristiti kao supstrati za proizvodnju bioplina. Glavni fokus je obrada soka u proizvode poput mliječne kiseline i odgovarajućih derivata aminokiselina, etanola i proteina. Prešani kolač može se koristiti za proizvodnju zelenih prehrambenih peleta, kao sirovina za proizvodnju kemikalija kao što je levulinska kiselina, za pretvaranje u ugljen i ugljikovodike (sintetička biogoriva) te kao kruto gorivo. Ostaci pretvorbe primjenjuju se za proizvodnju bioplina u kombinaciji s proizvodnjom topline i električne energije (Kamm i sur., 2009). Proizvodi dobiveni u zelenoj rafineriji prikazani su na slici 2.



Slika 2. Proizvodi zelene biorafinerije proizvedeni iz zelene biomase (Xiu i Shahbazi, 2015), prijevod

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

3.1.1. Biljni materijal

Četiri različite svježe i silirane biljke: alfalfa (*Medicago sativa*), mješavina djeteline i trava, facelija (*Phacelia tanacetifolia*) i kopriva (*Urtica dioica*). Jedna vrsta silaže je bila bez dodatka mikroorganizama, dok je u drugu silažu dodan komercijalni inokulant SILKO (*Lactobacillus plantarum, Pediococcus sp.*, 1 x 10^{11} CFU/mL^{-1} krmna smjesa). Sve biljke su dobivene sa Agronomskog fakulteta u Zagrebu.

3.1.2. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

- Bakrov sulfat pentahidrat, Kemika, Hrvatska
- Deionizirana voda
- Dikalijev fosfat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- EDTA (Kompleksal III), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etanol 96%, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etilklorformijat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Fetalni teleći serum (FBS), Gibco BRL, SAD
- Folin-Ciocalteu-ov reagens, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kalij natrij tartarat, Kemika, Hrvatska
- Kloroform, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Klorovodična kiselina, Kemika, Zagreb
- L – askorbinska kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Monokalijev fosfat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Natrijev hidroksid, Kemika, Hrvatska
- Natrijev karbonat, Kemika, Hrvatska
- Norvalin (interni standard), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Piridin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Polivinil – polipirolidon, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

3.1.3. Otopine

1 M NaOH

Natrijev hidroksid	20 g
Destilirana voda	do 500 mL

1 M HCl

Klorovodična kiselina (37 % w/w)	41,75 ml
Destilirana voda	do 500 mL

Reagens A

Natrijev hidroksid	2 g
Natrijev karbonat	10 g
Destilirana voda	do 500 mL

Reagens B1

Bakrov sulfat pentahidrat	1 g
Destilirana voda	do 100 Ml

Reagens B2

Kalij natrij tartarat	2 g
Destilirana voda	do 100 Ml

Reagens C

Reagens A	50 ml
Reagens B1	0,5 ml
Reagens B2	0,5 ml

3.1.4. Oprema

- analitička vaga, Kern, Njemačka
- GC/MS, GCMS – QP 2010 SE, Shimadzu, Japan
- hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija

- laboratorijska centrifuga, Eppendorf, Njemačka
- laboratorijsko posuđe
- spektrofotometar Thermo Scientific Genesys 10 S UV/VIS, SAD
- sušionik
- tresilica

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje ukupnih proteina

Određivanje ukupnih proteina u lisnatom dijelu biljaka provodi se u tri faze:

1. ekstrakcija proteina iz biljnih stanica
2. određivanje ukupnih proteina po Lowry-u
3. određivanje ukupnih proteina na spektrofotometru

3.2.1.1. Priprema pufera i reagensa za analizu

Pufer za ekstrakciju se priprema u odmjernoj tikvici od 200 mL, dodatkom 3,852 mL 1M KH_2PO_4, 6,152 mL 1M K_2HPO_4, 2 mL 10 mM EDTA te 176 mg L-askorbinske kiseline, a zatim se odmjerna tikvica nadopuni destiliranom vodom do 200 mL.

U odmjernoj tikvici od 500 mL reagens A se priprema dodatkom 2 g natrijevog hidroksida, 10 g Na_2CO_3 te se odmjerna tikvica dopuni destiliranom vodom do 500 mL.

Reagens B1 se priprema dodatkom 1 g bakrova sulfata pentahidrata u odmjernoj tikvici od 100 mL dopunom sa destiliranom vodom do 100 mL.

Reagens B2 se priprema kao i reagens B1 samo što se otapa 2 g kalij natrijevog tartarata.

Reagens C je otopina reagensa A, B1 i B2, a priprema se od 50 mL reagensa A, 0,5 mL reagensa B1 i 0,5 mL reagensa B2.

3.2.1.2. Priprema biljnog materijala i ekstrakcija proteina

Uzorak biljnog materijala se usitni, na analitičkoj vazi se izvaže 200 mg uzorka koji se zaledi na -20°C. Zaleđeni uzorak se u tarioniku usitnjava uz dodatak polivinil – polipirolidona koji veže polifenole i 2 mL hladnog pufera za ekstrakciju (pH-vrijednost=7). Dobiveni ekstrakti se centrifugiraju na +4°C, 20 min pri 140 000 g. Dobiveni supernatant se odvoji i prebaci u kivetu u kojoj se do daljnje analize čuva na -20°C. Na isti način su pripremljeni uzorci silaže s dodanim kulturama mikroorganizama te silaže bez dodatka mikroorganizama.

3.2.1.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u

Lowry metoda za određivanje koncentracije proteina se temelji na reakciji bakrenih iona vezanih na amino skupine peptidne veze i fenolne skupine bočnog ogranka aminokiseline tirozina (Tyr) u proteinu sa Folin-Ciocalteau reagensom, pri čemu nastaje kompleks plavo-ljubičastog obojenja sa apsorpcijskim maksimumom pri 740 nm.

U epruvete treba dodati 1 mL regensa C i 0,2 mL ekstrakta koji se promješaju i ostave na sobnoj temperaturi 10 – 15 minuta. Naglo se dodaje 0,1 mL Folin-Ciocalteau regaensa (u omjeru s destiliranom vodom – 1:2 = Folin-Ciocalteau reagens:dest.voda) uz snažno miješanje na tresilici. Dobivena otopina odstoji na sobnoj temperaturi 60 minuta. Koncentracija proteina mjeri se na spektrofotometru pri 760 nm. Slijepa proba se priprema isto kao i uzorci, no umjesto 0,2 mL ekstrakta se dodaje 0,2 mL destilirane vode.

Iz otopine goveđeg serumskog albumina (BSA), γ(BSA) = 1 mg mL^{-1}, pripremljeno je po 1 mL standardnog niza, kako bi se napravio baždarni dijagram, prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Priprema standardnog niza razrjeđenja BSA

Uzorak	Koncentracija (mg mL^{-1})	Volumen BSA (mL)	Volumen vode (mL)
S0	0,00	0	1,0
S1	0,01	0,01	0,99

S2	0,02	0,02	0,98
S3	0,04	0,04	0,96
S4	0,08	0,06	0,94
S5	0,1	0,1	0,90
S6	0,16	0,16	0,84
S7	0,2	0,2	0,80
S8	0,4	0,4	0,60

3.2.2. Određivanje sastava aminokiselina

Sastav amikonikselina određuje se na način da se pripremi potreban biljni materijal koji se podvrgne hidrolizi. U ovom je slučaju provedena kiselinska hidroliza s klorovodičnom kiselinom. Nakon iste, potebno je derivatizirati aminokiseline. Derivatizacija je postupak pripreme uzorka za provedbu plinske kromatografije. Na kraju su uzorci analizirani plinskom kromatografijom.

3.2.2.1. Priprema biljnog materijala

Biljni materijal za određivanje sastava aminokiselina je pripremljen na isti način kao i za određivanje koncentracije proteina, što je objašnjeno u poglavlju 3.2.1.2. Korišteni su svježi uzorci alfalfe, silaža s dodatkom određene kulture mikroorganizama te silaža bez dodanih mikroorganizama.

3.2.2.2. Kiselinska hidroliza

Kiselinska hidroliza je provedena u sušioniku pri 145°C u trajanju od 8 sati. Hidroliza se provodila sa 200 mg uzorka pripremljenih kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.2. u 6M klorovodičnoj kiselini.

3.2.2.3. Derivatizacija

Derivatizacija je daljni postupak priprave uzorka za analizu plinskom kromatografijom, koji se provodi nakon kiselinske hidrolize. U 100 µL filtrata uzorka dodaje se 5 µL internog standarda norvalina koncentracije 10 mM. Nakon toga se otopina mješta 20 sekundi na tresilici. Slijedeći korak je namještanje pH-vrijednosti otopine na 4 pomoću 1M klorovodične kiseline uz stalnu kontrolu na pH-metru. Nakon što je pH odgovarajući, dodaje se 100 µL prethodno pripremljene otopine vode, etanola i piridina (u volumnim udjelima 60:32:8), nakon čega se otopina miješa na tresilici 20 sekundi. Dalje se dodaje 5 µL (φ > 98%) etilklorformijata te se nakon mješanja na tresilici u trajanju od 20 sekundi, otopina ostavlja 1 minutu na 25°C, nakon čega se ponovno miješa 20 sekundi.

Ekstrakcija se provodi dodatkom 100 µL smjese kloroforma i etilklorformijata (10 µL etilklorformijata + 990 µL kloroforma) što se miješa na tresilici 3 minute kako bi se odvojila vodena faza od kloroforma. Za GC/MS analizu korištena je kloroformna faza.

3.2.2.4. Plinska kromatografija

U plinski kromatograf se injektira 2 µL derivatiziranog uzorka za daljnju analizu.

Kromatografski uvjeti:

Kromatografska kolona: ZEBRON ZB-1701 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)

Detektor: MS detektor sa programom temperatura: 70°C (3 min), 120°C (30°C min^{-1}, 2 min zadržavanje), 150°C (5°C min^{-1}, 3 min zadržavanje) i 330 °C (50°C min^{-1}, 5 min zadržavanje)

Mobilna faza: helij (protok: 0,6 mL min^{-1})

3.2.3. Određivanje veličine izoliranih proteina

Određivanje veličine izoliranih proteina provodi se na način da se najprije priprema materijal. Zatim se provodi SDS elektroforeza po Leammli-ju za razdvajanje proteinskih izolata kako bi se odredila veličina izoliranih proteina.

3.2.3.1. Priprema biljnog materijala

Biljni materijal za određivanje veličine izoliranih proteina je pripreman na isti način kao i za određivanje koncentracije proteina, kao što je objašnjeno u poglavlju 3.2.1.2. Korišteni su svježi uzorci, silaža sa određenom kulturom mikroorganizmima te silaža bez dodanih mikroorganizama.

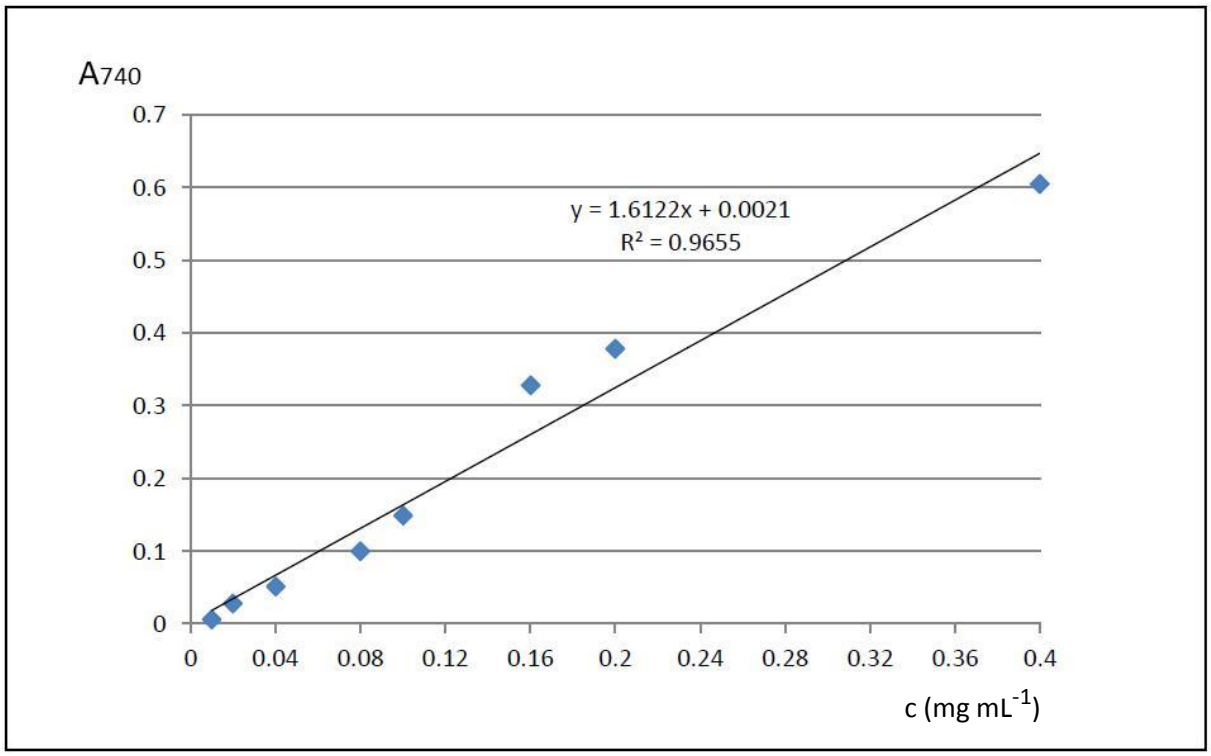
3.2.3.2. Gel elektroforeza

Proteinski izolati razdvojeni su SDS-elektroforezom po Laemmli-ju (Leammli, 1970). Uzorcima proteina dodano je 5 µL pufera za uzorke za elektroforezu po Laemmli-ju te su tretirani 2-3 minute u kipućoj vodenoj kupelji. Potom su uzorci i smjesa standardnih proteina male molarne mase naneseni na prethodno pripremljenu 12%-tnu poliakrilamidnu ploču za elektroforezu. Elektroforeza je provedena u puferu za elektroforezu u aparatu za elektroforezu pri stalnom naponu od 200 V uz hlađenje etanolskom pumpom. Tijek elektroforeze praćen je migracijom boje brom fenol plavo, a po završetku elektroforeze gel je skinut s ploče za elektroforezu i obojan Coomassie plavo otopinom za bojanje, preko noći. Odbojavanje gelova provedeno je u otopini za odbojavanje u kojoj se gelovi i čuvaju.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Proteini prisutni u biljnom materijalu četiri različite biljne vrste (alfalfe, lucerne, koprive i mješavine djeteline i trava) su ekstrahirani iz biljke te je ukupna koncentracija proteina određena metodom po Lowry-u. Sastav aminokiselina određen je plinskom kromatografijom na GC/MS-u, na kromatografskoj koloni ZEBRON ZB-1701. Prije plinske kromatografije su provedene kiselinska hidroliza s klorovodičnom kiselinom i derivatizacija uzorka kao postupci pripreme uzorka za plinsku kromatografiju. Gel elektroforezom je određena veličina izoliranih proteina.

Proteinski izolati iz četiri različite biljne vrste pripremljeni su prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.1. Tijekom priprave izolata dobiveni su supernatanti proteinskih izolata, koji su korišteni kao uzorci za određivanje proteina metodom po Lowry-u. Kako bi se mogao odrediti sadržaj proteina u izolatima, najprije je napravljen baždarni dijagram s poznatima koncentracijama goveđeg albumina (BSA) (slika 3).



Slika 3. Baždarni dijagram za određivanje proteina po Lowry-u

U tablici 2 prikazane su koncentracije proteina određene u pripravljenim izolatima i izražene u mg mL^{-1}. Prikazani su ukupni proteini u svježem uzorku, silaži bez dodanih mikroorganizama (SK) te u silaži sa definiranim kulturama mikroorganizama (SS). Rezultati su prikazani sa standardnom devijacijom.

Tablica 2. Ukupni proteini u svježem uzorku i u silaži sa definiranim kulturama mikroorganizama (SS) i u silaži bez dodanih mikroorganizama (SK)

Uzorci	Svježi uzorak	Silaža SS	Silaža SK
	c (prot) mg mL^{-1}	c (prot) mg mL^{-1}	c (prot) mg mL^{-1}
Alfalfa	25,2573±1,0484	14,6378±0,5263	11,4349±1,0254
Mješavina djeteline i trava	13,9000±1,0528	13,3395±0,9857	13,2016±1,0259
Kopriva	11,2500±1,2524	10,9458±0,4876	10,1344±0,9987
Facelija	17,6843±1,8348	8,0434±1,0254	8,1159±0,8595

* Prikazani rezultati su dobiveni kao srednja vrijednost tri provedene paralele.

U biljnom materijalu alfalfe je određen sastav aminokiselina u svježem uzorku, silaži s dodanim mikroorganizmima i silaži bez dodanih mikroorganizama. Alfalfa je odabrana za analizu aminokiselinskog sastava jer je prethodno, metodom po Lowry-u ustanovljeno da sadrži najveću koncentraciju ukupnih proteina od svih analiziranih biljaka.

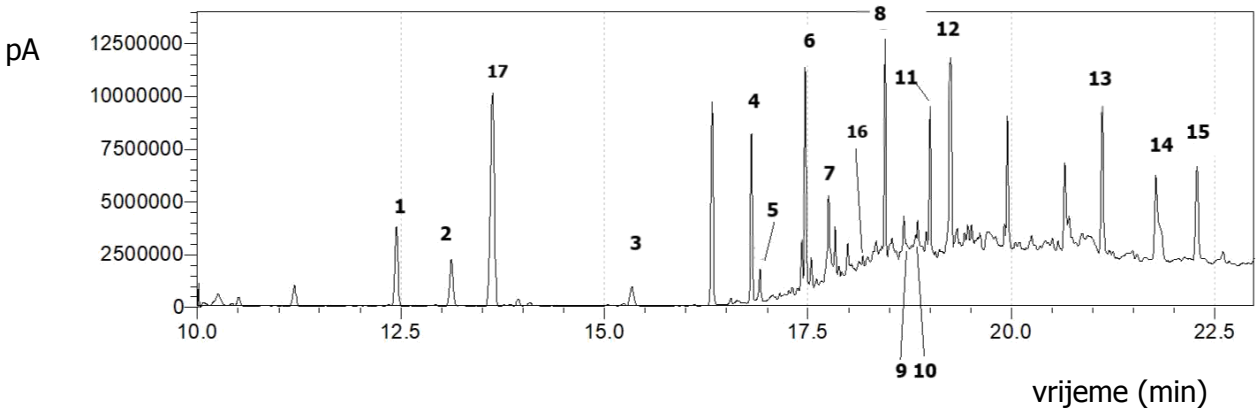
U tablici 3 su prikazani maseni udjeli određenih aminokiselina u uzorku. Udio aminokiselina tirozin i triptofan je prikazan kao zbroj zbog ograničenja kolone korištene za GC/MS analizu.

Tablica 3. Udio aminokiselina u svježem uzorku, silaži bez dodanih mikroorganizama (SK) i silaži s dodanim mikroorganizmima (SS)

W (%/%)	Alfalfa svježi uzorak	Alfalfa SK	Alfalfa SS
Ala (alanin)	0,0008	0,0009	0,0008
Gly (glicin)	0,0009	0,0007	0,0010
Val (valin)	0,0079	0,0005	0,0038
Leu (leucin)	0,0020	0,0004	0,0007
Ile (izoleucin)	0,0029	0,0004	0,0054
Pro (prolin)	0,0001	0	0,0004
Asn (asparagin)	0,0002	0,0001	0,0004
Asp (asparaginska kiselina)	0,0113	0,0089	0,0111
Met (metionin)	0,0097	0	0,0770
Glu (glutaminska kiselina)	0,0060	0,0076	0,0140
Phe (fenilalanin)	0,0128	0,0047	0,0079
His (histidin)	0,0028	0,0036	0,0061
Lys (lizin)	0,0017	0,0023	0,0012
Trp + Tyr (triptofan + tirozin)	0,1408	0,1695	0,0703

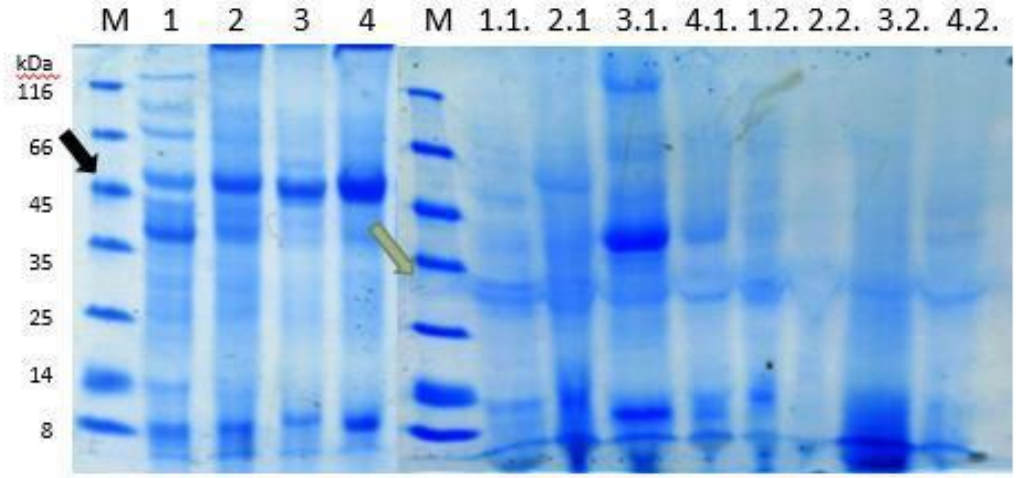
* Prikazani rezultati su dobiveni kao srednja vrijednost tri provedene paralele.

Primjer kromatograma dobivenog analizom uzorka na plinskom kromatogramu prikazan je na slici 4.



Slika 4. Specifičan izgled kromatograma kod određivnja aminokiselinskog sastava na GC/MS-u (1-Ala, 2-Gly, 3-Val, 4-Leu, 5-Ile, 6-Pro, 7-Ser, 8-Asp, 9-Arg, 10-Met, 11-Glu, 12-Phe, 13-Lys, 14-His, 15-Cys, 16-Asn, 17-Norvalin (interni standard))

Na slici 5. su prikazani rezultati SDS gel elektroforeze koja se koristila za provedbu analize staničnih proteina iz različitih biljnih vrsta. Markeri molekulske mase su izraženi u mjernoj jedinici kDa. Crna strelica označava protein veliku jedinicu RuBiSCo, dok siva strelica označava nepoznati protein pri 30 kDa.



Slika 5. Rezultati analize proteina SDS gel elektroforezom (1-alfalfa; 2-djeteline+trave; 3-kopriva; 4-facelija; 1.1.-alfalfa SK; 2.1.-djeteline+trave SK; 3.1.-kopriva SK; 4.1.-facelija SK; 1.2.-alfalfa SS; 2.2.-djeteline+trave SS; 3.2.-kopriva SS; 4.2.-facelija SS; SK - silaža bez dodanih mikroorganizama; SS - silaža s definiranom kulturom mikroorganizama)

Analizirano je ukupno 12 različitih uzoraka. Za analizu su korištene četiri različite biljne vrste (alfalfa, mješavina djeteline i trava, kopriva i facelija), a od njih su analizirani svježi uzorci, silaža s definiranom kulturom mikroorganizama (SS) te silaža bez dodanih mikroorganizama (SK). Postoji razlika kod dobivenih rezultata svježih uzoraka i silaže (s dodanim mikroorganizmima i bez dodanih mikroorganizama). Općenito, u svim analiziranim uzorcima, koncentracija proteina je najviša u svježim uzorcima. Od svih analiziranih biljnih vrsta, u alfalfi je najviše koncetracija proteina, dok je kod svježe koprive najniža koncentracija proteina. Kod svih biljaka, niža je koncentracija proteina u silaži s dodanom definiranom kulturom mikroorganizmama (SS), nego u silaži bez dodanih mikroorganizama (SK). Najniža od svih koncetracija proteina je u silaži (SS) facelije. Veličina izoliranih proteina je analizirana SDS elektroforezom. Najveća razlika u veličini proteina je u ekstraktima svježih biljaka. U uzorcima silaže, posebno silaže bez dodanih mikroorgnizama (SK) su proteini bili djelomično razgrađeni. Proteini male molekulske mase (ispod 14 kDa) identificirani su u uzorcima silaže, kao i protein sa dvije izoforme veličine 30 kDa. Velika RuBisCo jedinica je vidljiva samo u svježem uzorku. Sastav aminokiselina je analiziran u alfalfi jer ima najveću koncentraciju proteina. U uzorku svježe alfalfe je određen podjednak udio svih aminokiselina. U silaži alfalfe bez dodanih mikroorganizama udio glutamata i aspartata je oko 30 %, dok su ostale aminokiseline podjednakih udjela. Kod alfalfa silaže s dodanom definiranom kulturom mikroorganizama, 59 % od ukupnih aminokiselina čini metionin.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju određivanja ukupnih proteina, aminokiselinskog sastava i provodene elektroforeze u uzorcima alfalfe, facelije, mješavine djeteline i trava te u koprivi, došli smo do sljedećih zaključaka:

1. Najveća koncentracija ukupnih proteina je u svježim uzorcima (11,2500 ± 1,2524 mg mL^{-1} - 25,2573 ± 1,0484 mg mL^{-1}).
2. Najniža je koncentracija ukupnih proteina u silaži s dodanom definiranom kulturom mikroorganizama (8,0434 ± 1,0254 mg mL^{-1} - 14,6378 ± 0,5263 mg mL^{-1}).
3. Najveća koncentracija proteina je u svježem uzorku alfalfe (25,2573 ± 1,0484 mg mL^{-1}).
4. Uspoređujući silažu s i bez dodanih mikroorganizama, svježa alfalfa ima najveću koncentraciju proteina, kao i najveću raznolikost sastava aminokiselina.
5. Najveća razlika u veličini proteina je u ekstraktima svježih biljaka određena SDS elektroforezom.
6. U silaži alfalfe bez dodanih mikroorganizama najviši je udio glutamata i aspartata (30% s obzirom na ostale aminokiseline).
7. Kod alfalfa silaže sa definiranom kulturom mikroorganizama, 59% od ukupnih aminokiselina čini metionin.

6. LITERATURA

Brugger, D., Nadler, C., Windisch, W.M., Bolduan, C. (2016) Feed protein value of acidic precipitates obtained from press juices of three types of green forage leaves. *Animal Feed Science and Technology.* **222**: 236 – 241

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

Cherubini, F. (2010) The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management,* **51**: 1412 – 1421

Clark, J.H., Budarin, V., Deswarte, F.E.I., Hardy, J.J.E., Kerton, F.M., Hunt, A.J., Luque, R., Macquarrie, D.J., Milkowski, K., Rodriguez, A., Samuel, O., Tavener, S.J., White, R.J., Wilson, A.J. (2006) Green chemistry and the biorefinery: a partnership for a sustainable future. *Green Chem.,* **8**: 853–860

Clark, J.H. (2007) Green chemistry for the second generation biorefinery – sustainable chemical manufacturing based on biomass. *J Chem Technol Biotechnol,* **82**: 603–609

Clark, J.H., Deswarte, F.E.I., Farmer, T.J. (2009) The integration of green chemistry into future biorefineries. *Biofuels, Bioprod. Bioref.,* **3**: 72–90

Clark, J.H., Luque, R., Matharu, A.S. (2012) Green Chemistry, Biofuels, and Biorefinery. The *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering,* **3**: 183-207

Corona, A., Ambye-Jensen, M., Vega, G.C., Hauschild, M.Z., Birkved, M. (2018) Techno-environmental assessment of the green biorefinery concept: Combining process simulation and life cycle assessment at an early design stage. *Science of the Total Environment,* **635**: 100-111

Demirbas, A. (2010) Biorefinery Technologies for Biomass Upgrading, Energy Sources. *Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, **32**:16, 1547-1558

Ecker, J., Schaffenberger, M., Koschuh, W., Mandl, M., Boehzelt, H. G., Schnitzer, H., Harasek, M., Steinmuller, H. (2012) Green Biorefinery Upper Austria – Pilot Plant operation. *Sep Purif Techno*. **96**: 237-247

FtizPatrick, M., Champagne, P., Cunningham, M.F., Whitney, R.A. (2010) A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology,* **101**: 8915–8922

Fog, E., Ytting, N., Lübeck, M. (2017) Biorefining of proteins from grass clover as an innovative solution to a truly sustainable organic production. *Scientific Conference "Innovative Research for Organic Agriculture 3.0" 19th Organic World Congress*, New Delhi, India, November 9-11, 2017. Organized by ISOFAR, NCOF and TIPI.

Kamm, B., Kamm, M., Schmidt, M., Starke, I., Kleinpeter, E. (2006) Chemical and biochemical generation of carbohydrates from lignocellulose-feedstock (Lupinus nootkatensis)—quantification of glucose. *Chemosphere* **62**: 97–105.

Kamm, B., Kamm, M. (2007) Biorefineries –Multi Product Processes. *Adv Biochem Engin/Biotechnol,* **105**: 175–204

Kamm, B., Kamm, M., Schönicke, P. (2009) Biorefining of Green Biomass – Technical and Energetic Considerations. *Clean*, **37 (1)**: 27-30

Kamm, B., Schönicke, P., Hille, Ch. (2015) Green Biorefinery – Industrial Implementation, *Food Ch Laemmli U.K. (1970)* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature,* **227**: 680-685

Santamaría-Fernández, M., Molinuevo-Salces, B., Kiel, P., Steenfeldt, S., Uellendahl, H., Lübeck, M. (2017a) Lactic acid fermentation for refining proteins from green crops and obtaining a high quality feed for monogastric animals. *Journal of Cleaner Production*, **162**: 875 – 881

Santamaría-Fernández, M., Molinuevo-Salces, B., Lübeck, M., Uellendahl, H. (2017b) Biogas potential of green biomass after protein extraction in an organic biorefinery concept for feed, fuel and fertilizer production. *Renewable Energy,* u postupku objave

The International Energy Agency (IEA), IEA bioenergy Task 42 (2007) <https://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com/en/ieabiorefinery/Activities.htm> Pristupljeno 3. srpnja 2018.

Venturi P., Venturi G. (2003) Analysis of energy comparison for crops in European agricultural systems. Biomass *Bioenergy* **25 (3)**: 235-255.

Xiu, S., Shahbazi, A. (2015) Development of Green Biorefinery for Biomass Utilization: A Review. *Trends in Renewable Energy,* **1**: 2376-2144.

Izjava o izvornosti

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

Galović Patricia

ime i prezime studenta