

Učinak reciklacije lignocelulolitičkih enzima na proizvodnju lipida s kvascem *Trichosporon oleaginosus* uzgojenim na hidrolizatu kukuruznog oklaska

Gruičić, Ana-Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:224478>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-08**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Ana-Marija Gručić

6647/BT

**Učinak reciklacije lignocelulolitičkih enzima na proizvodnju
lipida s kvascem *Trichosporon oleaginosus* uzgojenim na
hidrolizatu kukuruznog oklaska**

ZAVRŠNI RAD

Znanstveno-istraživački projekt:

„Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ, 9158)

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

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Učink reciklacije lignocelulolitičkih enzima na proizvodnju lipida s kvascem *Trichosporon oleaginosus* uzgojenim na hidrolizatu kukuruznog oklaska

Ana-Marija Gručić, 0058202493

Sažetak: Mikrobni lipidi, proizvedeni uz pomoć oleaginoznih mikroorganizama na lignoceluloznim supstratima, obećavajuća su alternativa nafti kao sirovina za proizvodnju dizela. Oleaginozni kvasac *Trichosporon oleaginosus* može nakupiti i do 80% lipida u biomasi prilikom rasta u uvjetima limitacije dušikom. Mikrobna proizvodnja lipida uključuje hidrolizu lignocelulozne sirovine do fermentabilnih šećera, koji se koriste za mikrobni rast i sintezu lipida. U ovom radu prikazan je novi proces odvojene hidrolize i proizvodnje lipida uz reciklaciju enzima, koji je proveden u četiri ponovljena ciklusa. Nehidrolizirani, teško razgradivi čvrsti ostatak s adsorbiranim celulazama, izdvojen je i nanovo korišten u narednim ciklusima enzimske hidrolize. Dobiveni rezultati pokazali su da se reciklacijom nehidrolizirane biomase u četiri ciklusa smanjuje dodana količina enzima do 30% njegove optimalne količine, bez značajnijeg utjecaja na učinkovitost hidrolize lignocelulozne sirovine i produktivnost nakupljanja lipida. Prosječna vrijednost koncentracije biomase iznosila je 23,23 gL⁻¹, a udio lipida u biomasi 47,58 %.

Ključne riječi: biodizel, celulaze, lignoceluloza, lipidi, oleaginozni mikroorganizmi

Rad sadrži: 33 stranice, 7 slika, 8 tablica, 54 literaturna 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: Izv. prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek

Pomoć pri izradi: Marina Vnućec, Ljiljana Blažević, Igor Livada

Datum obrane: 18. rujna, 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

The effect of lignocellulosic enzymes recycling on lipid production by yeast *Trichosporon oleaginosus* grown on corn cob hydrolysate

Ana-Marija Gruičić, 0058202493

Abstract: Microbial lipids produced from lignocellulosic biomass by oleaginous microorganisms are promising alternative feedstock to petroleum in biodiesel production. Oleaginous yeast *Trichosporon oleaginosus* has the ability to accumulate lipids up to 80% of the biomass under nitrogen-limited growth conditions. Microbial lipid production involves hydrolysis of lignocellulosic biomass into fermentable sugars, which are used for microbial growth and lipid synthesis. Here we report a novel process of the separate hydrolysis and lipid production with enzyme recycling conducted in four repeated cycles. Unhydrolysed recalcitrant solids with adsorbed cellulases were separated and recycled to the subsequent cycles of enzymatic hydrolysis. Obtained results indicated that enzyme recycling with the unhydrolysed solids reduced the enzyme loading up to 30% of the optimal enzyme loading without significant effect on efficiency of lignocellulose hydrolysis and lipid productivity. Average value of biomass concentration and lipid content was 23,23 gL⁻¹ and 47,58 %, respectively.

Keywords: biodiesel, cellulases, lignocellulose, lipid, oleaginous microorganisms

Thesis contains: 33 pages, 7 figures, 8 tables, 54 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: Izv. prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek

Technical support and assistance: Marina Vnučec, Ljiljana Blažević, Igor Livada

Defence date: 18th Semptember 2017

SADRŽAJ:

1. UVOD	5
2. TEORIJSKI DIO	2
2. 1. Podjela biogoriva	2
2. 1. 1. Podjela sekundarnih biogoriva	2
2. 1. 1. 1. Prva generacija	2
2. 1. 1. 2. Druga generacija	2
2. 1. 1. 3. Treća generacija.....	3
2. 2. Lignocelulozne sirovine i njihov sastav	3
2. 2. 1. Komponente lignocelulozne sirovine	4
2. 3. Tipovi predobrade i njihove prednosti i nedostaci	6
2. 3. 1. Fizikalna predobrada	6
2. 3. 2. Fizikalno-kemijska predobrada	6
2. 3. 3. Kemijska predobrada	6
2. 3. 4. Biološka predobrada	7
2. 4. Hidroliza predobrađene sirovine	7
2. 4. 1. Ovisnost udjela fermentabilnih šećera.....	7
2. 5. Proces proizvodnje lipida iz lignoceluloznih sirovina	7
2. 5. 1. Uzgoj uz prethodnu hidrolizu	7
2. 5. 2. Istodobna hidroliza i uzgoj.....	8
2. 6. Oleaginozni mikroorganizmi	8
2. 6. 1. Oleaginozni kvasci	8
2. 7. Metabolički put sinteze lipida	9
2.8. Biodizel i njegove karakteristike	13

3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3. 1. MATERIJALI	14
3. 1. 1. Radni mikroorganizam.....	14
3. 1. 2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga.....	14
3. 1. 3. Kemikalije i enzimi	14
3. 1. 4. Hranjive podloge	15
3.1.4.1. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj predkulture	15
3.1.4.2. Hranjiva podloga za uzgoj kvasca <i>Trichosporon oleginosus</i> u tikvicama	15
3. 1. 5. Oprema i aparatura	16
3. 2. METODE	17
3. 2. 1. Priprema kulture kvasca <i>T. oleaginous</i> uzgojene na kosom agaru	17
3. 2. 2. Priprema i uzgoj inokuluma	17
3. 2. 3. Uzgoj predkulture kvasca <i>T. oleaginous</i>	17
3. 2. 4. Enzimaska hidroliza lignocelulozne sirovine i uzgoj kvasca <i>T. oleaginous</i>	17
3. 2. 5. Analitičke metode	19
3. 2. 5. 1. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari biomase	19
3. 2. 5. 2. Određivanje koncentracije glukoze i ksiloze pomoću uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC).....	19
3. 2. 5. 3. Određivanje udjela lipida u biomasi kvasca	20
3. 2. 5. 4. Pokazatelji uspješnosti bioprocesa.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
5. ZAKLJUČAK	28
6. LITERATURA	29

1. UVOD

Godine neodgovornog i bezbrižnog iscrpljivanja ograničenih neobnovljivih resursa na Zemlji, u cilju zadovoljavanja potreba rastućeg svjetskog gospodarstva za pogonskim gorivom i energijom, daleko su iza nas. Drastično smanjenje raspoloživih zaliha, a kamo li njihovo potpuno iscrpljenje, rezultiralo bi nezamislivim kaosom na globalnoj razini – što se može dogoditi već u relativno bliskoj budućnosti. Naime, postojeća količina zaliha se, uzevši u obzir današnji tempo potrošnje, procjenjuje dostatnom za sljedećih 40 do 50 godina. Zbog toga, velik broj današnjih istraživanja usmjeren je na pronalazak novih, obnovljivih i ekološki prihvatljivih izvora energije.

U kategoriji takvih novih alternativnih izbora, jasno su se pozicionirala biogoriva - po definiciji: goriva dobivena iz bioloških izvora (Muniraj i sur., 2014). U navedenu skupinu spadaju: bioetanol, biometanol, biodizel, bioplin, vodik, itd. Ta kategorija važna je radi svoje obnovljivosti, odnosno širine spektra izvora iz kojih se može dobiti, lake degradacije i pri tome male količine emitiranih štetnih ispušnih plinova (Singh i sur., 2011).

Sve se više istražuju mogućnosti proizvodnje sekundranih biogoriva, a pogotovo biodizela, budući da za njegovo korištenje ne bi bile potrebne veće preinake današnjih motora motornih vozila (Muniraj i sur., 2014). Biodizel se može dobiti transesterifikacijom mikrobnih lipida, najčešće metanolom, koje su tijekom uzgoja sintetizirali i akumulirali oleaginozni mikroorganizmi (Papanikolaou i Aggelis, 2011).

Cilj ovoga rada bio je istražiti mogućnost proizvodnje lipida uz pomoć kvasca *Trichosporon oregonosus* na enzimskom hidrolizatu predobrađenih kukuruznih oklasaka, u procesu odvojene hidrolize sirovine i uzgoja mikroorganizma uz reciklaciju celulolitičkih enzima.

2. TEORIJSKI DIO

2. 1. Podjela biogoriva

Općenito, biogoriva se mogu podijeliti u dvije velike skupine – primarnu i sekundarnu. Primarna biogoriva koriste se u izvornom obliku (kao trupci drveta, drvni peleti, prirodni plin, itd.) za grijanje, kuhanje i proizvodnju električne energije. Sekundarna biogoriva (bioetanol, biodizel, bioplin, itd.) dobivaju se iz organskih materijala koji uključuju sirovine biljnog i životinjskog podrijetla. Proizvode se uz pomoć mikroorganizama, a mogu se koristiti kao pogonska goriva, odnosno moguća zamjena nafte (Singh i sur., 2011).

2. 1. 1. Podjela sekundarnih biogoriva

Sekundarna biogoriva podijeljena su u tri generacije s obzirom na ishodišne sirovine i tehnologije proizvodnje (Singh i sur., 2011).

2. 1. 1. 1. Prva generacija

Prva od triju generacija podrazumijeva biogoriva dobivena iz sirovina bogatih šećerom i škrobom (kukuruz, ječma, šećerne trske, melase, itd.), biljnih ulja i otpadnih masti životinjskog podrijetla (Singh i sur., 2011). Pošto su sve navedene sirovine izrazito važne u prehrambenoj industriji, njihov uzgoj i navedene potrebe zahtijevale bi velike poljoprivredne površine i uvelike utjecale na formiranje cijene hrane (Singh i sur., 2011). Stoga, bez konkretnih i sveobuhvatnih društvenih dogovora, proizvodnja ovakvih goriva je u ograničenim okvirima.

2. 1. 1. 2. Druga generacija

Svojevrsno rješenje problema prve generacije biogoriva je druga generacija u kojoj se kao sirovina za proizvodnju upotrebljava lignocelulozna biomasa (većinom drvni i poljoprivredni otpad). Osnovni problem proizvodnje ovakvih goriva leži u: složenoj predobradi sirovine, posebnim zahtjevima u procesnoj opremi (Stevens i sur., 2004) i nedovoljno razvijenim i stoga još preskupim tehnologijama. Naprimjer: plinovita biogoriva (metan i vodik) zahtjevno je transportirati te se moraju prevesti u tekuće stanje hlađenjem i kompresijom – što je energetski zahtjevan proces za koji je potrebno razviti dodatnu infrastrukturu (Rude i sur., 2009). Kod tekućih biogoriva (biodizel i bioetanol), transport je uvelike jednostavniji (Azocar i sur., 2010). Također, prijelaz s upotrebe fosilnih goriva na upotrebu tekućih biogoriva je

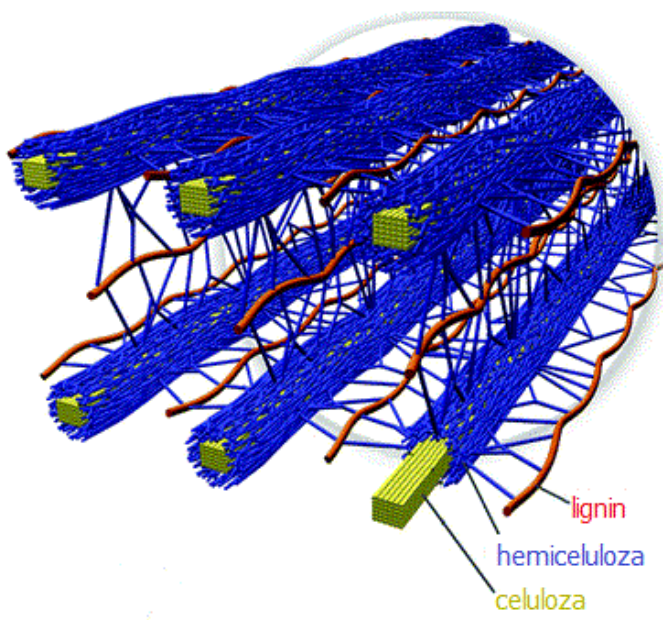
jednostavniji, s obzirom da nisu potrebne veće preinake na postojećim motorima motornih vozila (Muniraj i sur., 2014).

2. 1. 1. 3. Treća generacija

Posljednja generacija biogoriva podrazumijeva ona koja su dobivena iz algi. S obzirom na veliki raspon različitih zemljopisnih područja i okolišnih uvjeta pod kojima mogu rasti, alge su se profilirale kao novi obećavajući radni mikroorganizam. Upravu su alge najveći proizvođači kisika, kao i najveći potrošači CO₂, koji im služi kao izvog ugljika. Mikroalge korištene u biotehničkim procesima mogu proizvesti proteine, lipide i ugljikohidrate - iz kojih se daljnjim procesima mogu dobiti biogoriva (Singh i sur., 2011).

2. 2. **Lignocelulozne sirovine i njihov sastav**

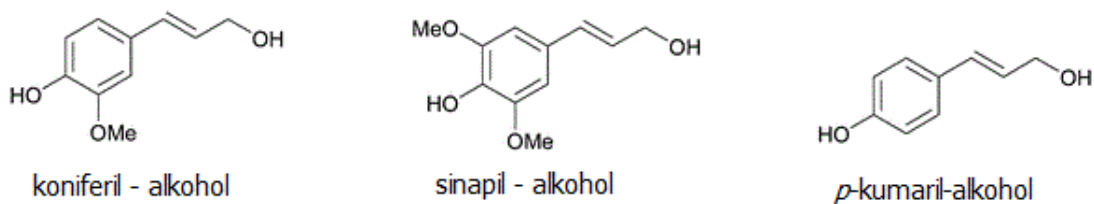
Lignocelulozna sirovina je biomasa koja u obliku drvnog ili poljoprivrednog otpada najčešće ostaje neiskorištena, a sastoji se od tri osnovna strukturna polimera: celuloze (35 - 55%), hemiceluloze (20 - 40%) i lignina (10 - 25%) (Ghosh i Ghose, 2003). Izvorna lignocelulozna sirovina nije pogodna za rast mikroorganizama. Potrebno ju je hidrolizirati, odnosno razgraditi njenu strukturu kako bi nastali fermentabilni šećeri, tj. monosaharidi i disaharidi koje mikroorganizmi mogu asimilirati i trošiti za rast i sintezu proizvoda.



Slika 1. Struktura lignocelulozne sirovine (Brandt i sur., 2013)

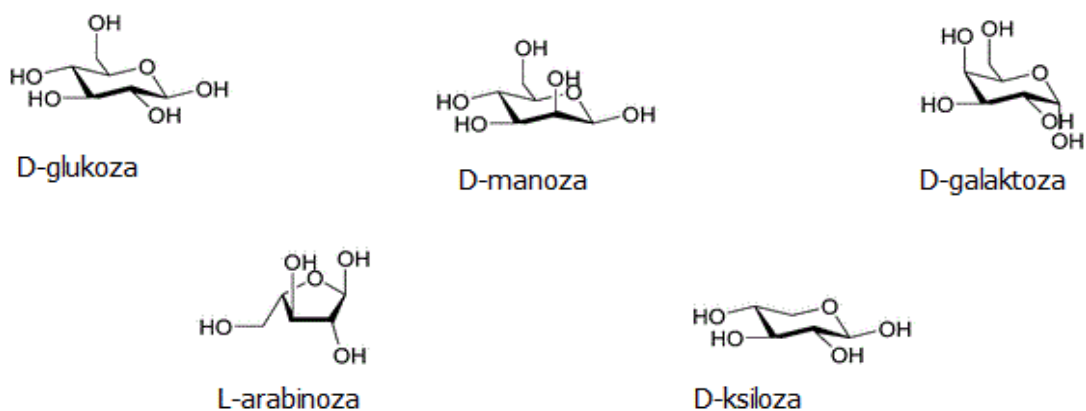
2. 2. 1. Komponente lignocelulozne sirovine

Lignin je kompleksan, hidrofoban i unakrsno povezan polimer, koji se sastoji od tri fenolne komponente: koniferil – alkohola, sinapil – alkohola i *p* – kumaril – alkohola (Menon i Rao, 2012). Prisutan je u biljnim staničnim stijenkama dajući stanici strukturnu potporu i zaštitu od mikrobne razgradnje i oksidativnog stresa. Lignin se smatra ljepilom koje povezuje strukturne komponente lignocelulozne biomase i dodatno je čini netopljivom u vodi (Bajpai, 2016).



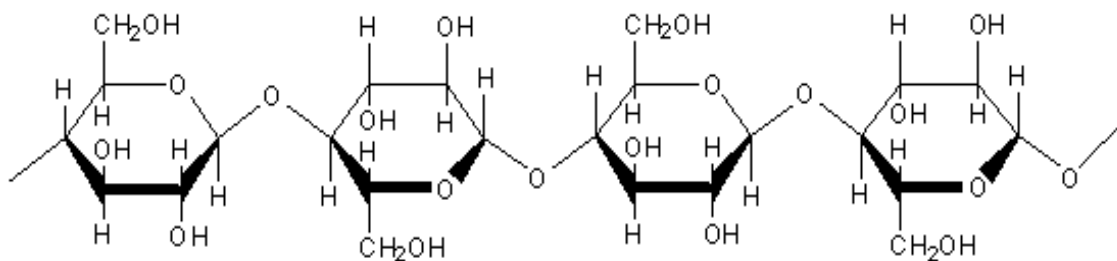
Slika 2. Komponente lignina (Brandt i sur., 2013)

Hemiceluloza je heteropolimer sastavljen od monosaharida: ksiloze, arabinoze, manoze, galaktoze i glukoze (Slika 3). Oblaže celulozna mikrovlakna, što doprinosi čvrstoći stanične stijenke (Kim i Lee, 2009). Tijekom predobrade, hidrolizom hemiceluloze nastaju monosaharidi koji se u uvjetima predobrade prevode u furfural i 5-hidroksimetil furfural, najzastupljenije inhibitore u lignoceluloznom hidrolizatu (Palmqvist i Hahn- Hägerdal, 2000).

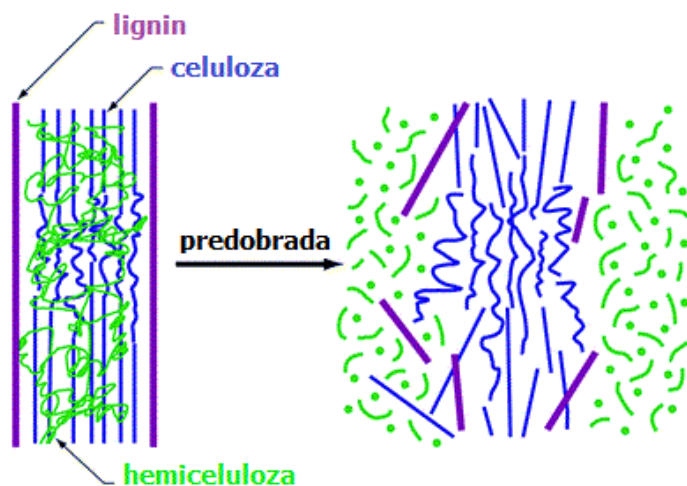


Slika 3. Komponente hemiceluloze (Brandt i sur., 2013)

Celuloza je polimer glukoze u kojem su glukozne jedinice međusobno povezane β - 1,4 - glikozidnom vezom. Zbog prisutnosti hemiceluloze i lignina, i svoje kristalične strukture, celuloza je teško biorazgradiva (El-Fadel i sur., 1996). Između dugolančanih celuloznih polimera prisutne su vodikove i van der Waalsove veze – koje omogućuju formiranje celuloznih mikrovlakana (Bajpai 2016). Osim u kristaličnom, celuloza je prisutna i u amorfnom obliku, u značajno manjem udjelu. Amorfna celuloza podložnija je enzimskoj hidrolizi od one s kristaličnom strukturom (Menon i Rao, 2012).



Slika 4. Glukozne jedinice povezane β - 1,4 - glikozidnom vezom (Royal Society Of Chemistry, 2017)



Slika 5. Učinak predobrade na strukturu lignocelulozne sirovine (Brandt i sur., 2013)

Svrha predobrade lignocelulozne sirovine je: odvajanje pojedinih komponenata koje je čine (Oh i sur., 2002), smanjanje kristaličnosti celuloze i uklanjanje lignina (Sun i Cheng, 2002). Tijekom predobrade potrebno je očuvati strukturu hemicelulozne frakcije, smanjiti nastanak inhibitora i smanjiti ukupne troškove (Menon i Rao, 2012). Izbor optimalne vrste predobrade ovisi o: sastavu sirovine, utjecaju na okoliš i ekonomskim zahtjevima.

2. 3. Tipovi predobrade i njihove prednosti i nedostaci

Sve poznate varijante predobrade sirovine mogu se svrstati u četiri skupine: fizikalne, fizikalno-kemijske, kemijske i biološke.

2. 3. 1. Fizikalna predobrada

Fizikalna predobrada najčešće prethodi ostalim metodama predobrade, a provodi se kako bi se smanjila veličina čestica sirovine. U ovu skupinu ubrajaju se sljedeće metode: mljevenje, zračenje mikrovalovima i γ -zrakama, ekstruzija, piroliza, itd. Navedene metode smanjuju stupanj kristalčnosti celuloze, ali uz značajan utrošak energije – često i veće od teoretskog utroška (Menon i Rao, 2012). Dodatni nedostatak je i slabo uklanjanje lignina.

2. 3. 2. Fizikalno-kemijska predobrada

Ova skupina obuhvaća: eksploziju vodenom parom, amonijakom ili ugljikovim dioksidom, mikrovalno – kemijsku predobradu i predobradu tekućom vrućom vodom. Navedenim metodama postiže se uklanjanje lignina, odnosno promjene njegove strukture te se razgrađuje hemiceluloza i smanjenje kristalčnosti celuloze (Menon i Rao, 2012). Kao osnovni nedostatak ovih metoda navodi se nastajanje inhibitora i moguća opasnost po okoliš zbog čega je potrebno provesti reciklaciju ili zbrinjavanje kemikalija koje se koriste u predobradi.

2. 3. 3. Kemijska predobrada

Smanjanje stupnja polimerizacije celuloze i njene djelomične dekrystalizacije, razgradnja lignina i hemiceluloze i povećanje dostupnosti celuloze u sirovini, može se postići i upotrebom različitih kemijskih sredstava. Od kiselina, najčešće se upotrebljava razrjeđena sumporna kiselina (Menon i Rao, 2012). Osim te, koriste se i: klorovodična (Wang i sur., 2010), dušična (Himmel i sur., 1997) i fosforna (Zhang i sur., 2007; Marzalletti i sur., 2008). Osim kiselina koriste se i različite lužine: kalcijev, kalijev, natrijev i amonijev hidroksid, od kojih je natrijev u najčešćoj upotrebi (Menon i Rao, 2012). Sve navedene kemikalije mogu se koristiti u koncentriranom ili razrjeđenom obliku, nekad uz visoke temperature, što poskupljuje proces. Također, za primjenu ovakvih metoda potrebno je koristiti opremu otpornu na korozivne kemikalije koje se koriste, a kako nastaju toksični proizvodi, tj. inhibitori, nužno je provesti njihovu detoksifikaciju.

Spomenuti nedostaci prethodno navedenih metoda predobrade nisu karakteristični za predobradu ozonom. Ova metoda je izrazito učinkovita, može se provoditi i pri sobnoj temperaturi, ali je zbog velike potrebne količine ozona izrazito neisplativa (Sun i Cheng, 2002).

2. 3. 4. Biološka predobrada

Još jedna obećavajuća metoda predobrade je biološka obrada. Prednosti ove metode su: nepotrebnost korištenja kemikalije, mali utrošak energije, ekološka prihvatljivost i blagi uvjeti za provođenje metode (Kurakake i sur., 2007; Salcachúa i sur., 2011). Biološka obrada podrazumijeva korištenje gljiva bijelog i smeđeg truljenja koje sintetiziraju potrebne enzime, a to su liginin peroksidaze i fenol oksidaze (Malherbe i Cloete, 2003). Njihov rast i metabolizam treba pažljivo kontrolirati, što otežava provođenje procesa koji je vrlo spor i za koji je potreban relativno velik prostor za uzgoj.

2. 4. Hidroliza predobrađene sirovine

Fermentabilni šećeri se iz lignoceluloznih sirovina mogu dobiti kiselinskom ili češće, enzimskom hidrolizom. Kiselinska hidroliza je složen postupak kao i kiselinska predobrada - što se tiče energetskog utroška, opreme, korištenja i zbrinjavanja kemikalija. Enzimska hidroliza provodi se pod puno blažim uvjetima, daje veći prinos proizvoda, iziskuje puno manje troškove opreme i ne predstavlja opasnost za okoliš (Menon i Rao, 2012). Obično se koriste celulolitički enzimski preparati koji sadržavaju endo i egzoglukanaze, celulaze, karboksimetil-celulaze, hemicelulaze i dr. Osnovni nedostatak primjene enzima njihova je visoka cijena (Menon i Rao, 2012).

2. 4. 1. Ovisnost udjela fermentabilnih šećera

Koncentracija fermentabilnih šećera ovisi o: fizikalno-kemijskim karakteristikama same sirovine, odabranom tipu predobrade i u konačnici, efikasnosti same hidrolize hemiceluloze i celuloze (Martínez i sur., 2015).

2. 5. Proces proizvodnje lipida iz lignoceluloznih sirovina

2. 5. 1. Uzgoj uz prethodnu hidrolizu

Proces uzgoja uz prethodnu hidrolizu je dvostupanjski proces – u kojem u prvom stupnju enzimskom hidrolizom strukturnih polisaharida u lignoceluloznoj sirovini nastaju fermentabilni šećeri, a u drugom se dobiveni hidrolizat koristi kao izvor ugljika za rast radnog mikroorganizma i sintezu proizvoda. Prednost ovog procesa je provođenje oba stupnja u optimalnim uvjetima – enzimska hidroliza na 50°C i uzgoj mikroorganizama na 30°C. Dugo trajanje ukupnog procesa, visoki troškovi i izloženost hidrolitičkih enzima inhibitorima osnovni su nedostaci ovog tipa procesa (Choudhary i sur., 2015).

2. 5. 2. Istodobna hidroliza i uzgoj

Porast koncentracije glukoze i celobioze inhibira aktivnost celulaza i time smanjuje brzinu hidrolize (Erdei i sur., 2013; Wyman, 1994), što se može izbjeći istovremenim provođenjem hidrolize lignocelulozne sirovine i uzgoja mikroorganizma. Prednosti ovog bioprocasa pred dvostupanjskim procesom uzgoja uz prethodnu analizu su: povećanje produktivnosti bioprocasa i prinosa biomase, jednostavnije vođenje procesa i manji kapitalni troškovi. Nedostatak procesa je njegovo vođenje na nižoj temperaturi od optimalne za celulaze, čime im se smanjuje aktivnost do 30%. Zbog toga se moraju upotrijebiti veće količine enzima, što poskupljuje proizvodnju (Ivančić Šantek i sur., 2014).

Konsolidirani proces je integrirani proces u kojem sintezu celulaza i proizvoda provodi jedan radni mikroorganizam. Ovaj proces zanimljiv je s ekonomskog stajališta, ali budući da u prirodi ne postoji mikroorganizam koji bi mogao provoditi sve nabrojano, potrebno ga je konstruirati metodama genetičkog inženjerstva (Ivančić Šantek i sur., 2014).

2. 6. Oleaginozni mikroorganizmi

Oleaginozni mikroorganizmi skupina su mikroorganizama koja može akumulirati velike količine lipida čiji udio u suhoj tvari biomase može iznositi iznad 20% (masa/masa). U ovu skupinu ubrajaju se: kvasci, plijesni i mikroalge, a u manjem broju i bakterije (Thevenieau i Nicaud, 2013). Eukariotski organizmi (kvasci, plijesni i mikroalge) sintetiziraju triacilglicerole koji su sličnog sastava kao biljna ulja, dok prokariotski organizmi (bakterije) sintetiziraju specifične lipide. Najzastupljenije masne kiseline u mikrobnim lipidima su: palmitinska kiselina (C16:0), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1), linolna (C18:2) i linolenska (C18:3) (Xu i sur., 2013). Produktivnost sinteze lipida u procesima s oleaginoznim kvascima značajno je veća u usporedbi s plijesnima i mikroalgama. Sastav i količina proizvedenih lipida ovise o vrsti mikroorganizma, limitirajućem supstratu i vrsti bioprocasa (Thevenieau i Nicaud, 2013). Kad se iscrpi izvor ugljika u podlozi, oleaginozni mikroorganizmi započet će trošiti nakupljene lipide (Papanikolaou, 2011).

2. 6. 1. Oleaginozni kvasci

Oleaginozni kvasci nakupljaju velike količine lipida čiji udio u suhoj tvari biomase može iznositi do 80% (Jin i sur., 2014). Manji dio nakupljenih lipida (~5%) otpada na lipide u staničnim organelama (Ageitos i sur., 2010). Lipidi oleaginoznih kvasaca od posebnog su interesa kao sirovina za industrijsku proizvodnju radi svojih biokemijskih i fizikalno-kemijskih svojstava (Ageitos i sur., 2010). U oleaginozne kvasce ubrajaju se sljedeći rodovi: *Candida*,

Cryptococcus, *Lipomyces*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Rhizpus*, *Trichosporon* i *Yarrowia* (Thevenieau i Nicaud, 2013).

Kvasci mogu sintetizirati lipide koristeći različite izvore ugljika pa čak i asimilirati lipide prisutne u podlozi za rast i ugraditi ih u stanične lipide (Ageitos i sur., 2010). Omjer molova izvora ugljika i dušika (C:N) ključan je za postizanje maksimalnog potencijala nakupljanja lipida u oleaginoznim mikroorganizmima. Kod oleaginoznih kvasaca, omjer C:N obično premašuje 65 mola ugljika po molu dušika (Yin i sur., 2015; Weete i sur., 1980). Sinteza lipida započinje kada koncentracija limitirajućeg nutrijenta (dušika) padne ispod 10% njegove početne vrijednosti, uz uvjet da je izvor ugljika u podlozi u suvišku (Ratledge, 2004). Iako se za poticanje lipogeneze najčešće primjenjuje limitacija dušikom, može se primjeniti i limitacija drugim tvarima u podlozi: cinkom, željezom, magnezijem (Beopoulos i sur., 2009), kao i fosfatima i sulfatima (Wu i sur., 2010; Wu i sur., 2011). Optimalna temperatura rasta kod većine oleaginoznih kvasaca je od 25 do 30°C, dok je optimalna pH vrijednost u rasponu od 4 do 7. Teoretski prinos lipida iznosi 0,32 g/g glukoze i 0,34 g/g ksiloze (Papanikolaou i Aggelis, 2011).

Većina oleaginoznih kvasaca može rasti na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina, kao *Trichosporon oleaginosus* koji kao fermentabilne šećere iz lignoceluloznih hidrolizata koristi: monosaharide (glukozu, galaktozu, ksilozu), disaharide (saharozu, laktozu, trehalozu, celobiozu, melibiozu) i trisaharid rafinozu (Gujjari i sur., 2011).

2. 7. Metabolički put sinteze lipida

Nakon ulaska u stanicu, molekula glukoze se u glikolitičkom putu razgrađuje na dvije molekule piruvata. Sintetizirani piruvat transportira se u mitohondrije gdje se oksidativno dekarboksilira. Spomenuta reakcija katalizirana je enzimskim kompleksom piruvat-dehidrogenazom, koja također katalizira i prijenos, oksidativnom dekarboksilacijom nastale, acetilne skupine na CoA. Dobiveni acetil-CoA koristi se u citratnom ciklusu (eng. cytric acid cycle, CAC), pri čemu je prva od niza reakcija aldolna kondenzacija acetil-CoA i oksaloacetata. Produkt reakcije je citratna kiselina koja, ovisno o metaboličkim potrebama stanice, sudjeluje u narednim reakcijama. Kad se usljed nedostatka izvora dušika smanji brzina rasta stanice, dolazi do nakupljanja citratne kiseline, koja se onda preusmjerava u drugi metabolički put – sintezu masnih kiselina.

Budući da se sinteza masnih kiselina odvija u citosolu, nakupljena citratna kiselina (citrat) transportira se iz mitohondrija u citosol, u zamjenu za malat. Izlaskom citrata iz mitohondrija i njegovim ulaskom u citosol, iz citosola se u mitohondrij transportira malat – što je poznato pod nazivom citrat-malatni ciklus, a označava početak ciklusa sinteze masnih kiselina (Muniraj i sur., 2015). Citrat prelazi u citosol preko citrat-malat translokaze (CMT) gdje se, pod utjecajem ATP ovisne citrat liaze (ACL), konvertira u acetyl-CoA i oksaloacetat – što je obratna reakcija prvoj reakciji citratnog ciklusa. Ovaj enzim ključan je za učinkovitu sintezu masnih kiselina jer nastali acetyl-CoA u tom ciklusu služi kao prekursor (Muniraj i sur., 2015).

Nastali oksaloacetat transportira se u mitohondrij, za potrebe daljnjih reakcija citratnog ciklusa. Transport se ne obavlja u obliku oksaloacetata, nego se on pomoću malat-dehidrogenaze (MDH) reducira u malat.

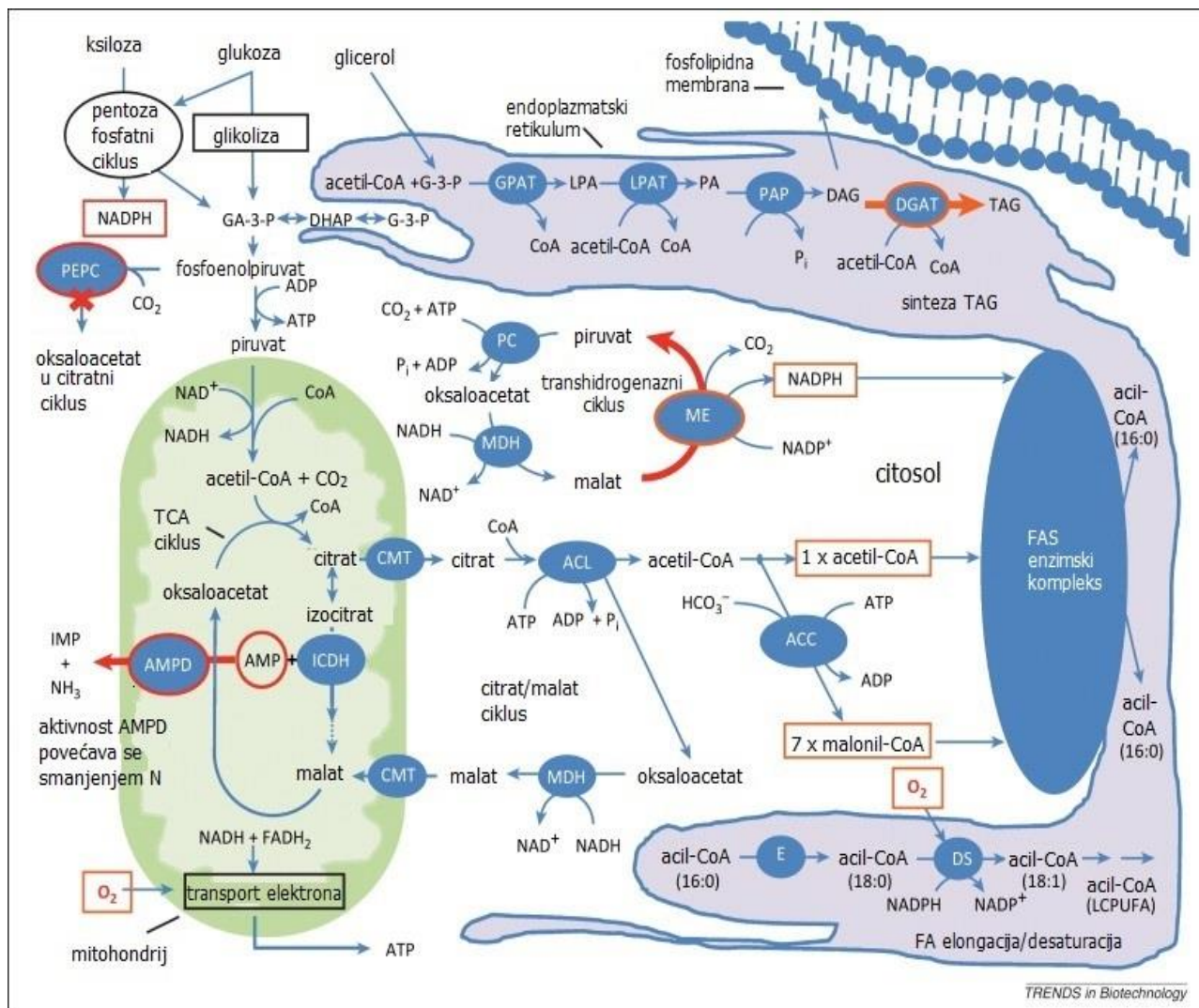
Potom se dobiveni malat oksidativno dekarboksilira u piruvat koji će ući u mitohondrij. Reakcija je katalizirana malatnim enzimom (ME) uz nastajanje nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) koji je nužan za sintezu masnih kiselina (Muniraj i sur., 2015).

Iz citrata dobiveni acetyl-CoA karboksilira se u malonil-CoA uz katalitičko djelovanje enzima acetyl-CoA-karboksilaze (ACC), smještenog na endoplazmatskom retikulumu.

Sinteza zasićenih masnih kiselina odvija se u citosolu, pomoću enzimskog kompleksa sintaze masne kiseline (eng. Fatty acid synthase, FAS), a počinje prenošenjem acetylne jedinice iz acetyl-CoA na ACP (acil nosač protein – podjedinicu sintaze) (Bossa i sur., 1969), što je katalizirano acetyl-transacilazom. Malonilna jedinica iz sintetiziranog malonil-CoA također se prenosi na ACP, uz pomoć malonil-transacilaze. Prva reakcija u nizu sinteze masnih kiselina je kondenzacija acetylne i malonilne jedinice, a potom slijede: redukcija, dehidratacija i još jedna redukcija. Rezultat je butiril-ACP koji ulazi u novi krug elongacije lanca, odnosno u reakciju kondenzacije s novom, na ACP-u vezanom, malonilnom skupinom. Elongacija se odvija dok se ne sintetizira palmitoil-ACP (16:0) ili stearoil-ACP (18:0) (Muniraj i sur., 2015), a s ACP-a se oslobađaju u obliku slobodnih masnih kiselina (palmitinske ili stearinske) pomoću ACP-tioesteraze (Courchesne i sur., 2009). Daljnje produljenje lanca masne kiseline i uvođenje nezasićenih kovalentnih veza odvija se na membrani endoplazmatskog retikuluma, uz potrebne enzime. Ključna tri enzima za sintezu lipida u oleaginoznim mikroorganizmima su: ATP ovisna citrat liaza (ACL), malatni enzim (ME) i acetyl-CoA-karboksilaza (ACC) (Ratledge, 2004).

Triacilgliceroli formiraju se uzastopnim aciliranjem glicerol-3-fosfata pomoću katalitičkog djelovanja triju aciltransferaza i jedne fosfataze. Ove reakcije poznate su kao „Kennedyjev put“ sinteze triacilglicerola (Angerbauer i sur., 2008). Dihidroksiaceton-fosfat (DHAP) je također, uz glicerol-3-fosfat (G-3-P), supstrat za sintezu fosfatidne kiseline (PA).

Defosforilacijom PA nastaje diacilglicerol (DAG), za što su potrebne tri izoenzima fosfatidne fosfataze (PAP) od kojih je: jedan vezan na membranu endoplazmatskog retikuluma, drugi na mitohondrij, a treći se nalazi u citosolu. Posljednji korak sinteze triacilglicerola može biti izveden na više načina (Ageitos i sur., 2011). U reakciji ovisnoj o koncentraciji acetil-CoA, ATP-om aktivirana masna kiselina veže se na DAG uz posredovanje diacilglicerol aciltransferaze DgaP1 (Athenstaedt and Daum, 2006). Ista reakcija može biti katalizirana i acil-acil protein nosačem sintazom (Gangar i sur., 2001).



ACC: acetil-CoA karboksilaza, ACL: ATP citrat liaza, AMPD: AMP deaminaza, CMT: citrat-malat translokaza, DAG: diacilglicerid, DGAT: diacilglicerol aciltransferaza, DHAP: dihidroksiaceton fosfat, DS: desaturaza, E: elongaza, FA: masna kiselina, FAS: sintaza masnih kiselina, GA-3-P: glicer aldehid-3-fosfat, G-3-P: glicerol-3-fosfat, GPAT: glicerol-3-fosfat aciltransferaza, ICDH: izocitrat dehidrogenaza, IMP: inozin monofosfat, LCPUFA: dugolančana poli-nezasićena masna kiselina, LPA: lizofosfatidna kiselina, LPAT: lizofosfatidna transferaza, MDH: malat dehidrogenaza, ME: malatni enzim, NADH: nikotinamid adenin dinukleotid, NADPH: nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, PA: fosfatidna kiselina, PAP: fosfatidna fosfataza, PEP: fosfoenolpiruvat, PC: piruvat karboksilaza, TCA: trikarboksilna kiselina

Slika 6. Metabolički put sinteze lipida (Jin i sur., 2015)

2.8. Biodizel i njegove karakteristike

Biodizel je gorivo koje se dobiva transesterifikacijom konvencionalnih ili nekonvencionalnih (mikrobnih) ulja i masti s kratkolančanim alkoholima – u većini slučajeva s metanolom, iako se transesterifikacija može provesti i s etanolom i butanolom (Papanikolaou i Aggelis, 2011). Za razliku od naftnog dizela, biodizel ima manju ogrijevnu vrijednost jer sadrži kisik (oko 10%) i manji udio ugljika. Ipak, kako biodizel karakterizira veća gustoća od naftnog dizela, njihova razlika u volumetrijskoj ogrijevnoj vrijednosti iznosi duplo manje – 5 do 6%. Također, biodizel je veće molekularne mase od dizela – zbog čega su prilikom destilacije potrebne veće temperature nego za naftni dizel. Zbog svoje strukture, biodizel ima zadovoljavajući cetanski broj, obično veći od naftnog dizela tipa 2. Kinematička viskoznost biodizela značajno je veća od viskoznosti naftnog dizela, otprilike za dvije jedinice (Hoekman i sur., 2012).

Kao glavni parametri, čije određene vrijednosti biodizel treba ispuniti da bi se mogao koristiti kao motorno gorivo su: cetanski broj, kinematična viskoznost, filtrabilnost, oksidacijska stabilnost i mazivost (Knothe, 2009) – od kojih su filtrabilnost i oksidacijska stabilnost obilježene kao kritična svojstva. Prema istraživanjima, optimalan sastav biodizela trebao bi imati relativno visok udio nezasićenih masnih kiselina, kako bi se smanjio problem filtrabilnosti goriva koja je ovisna o kinematičnoj viskoznosti, a ista se smanjuje s povećanjem stupnja nezasićenja. S druge strane, potreban je nizak udio višestruko nezasićenih masnih kiselina i što veći udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina da se poveća oksidacijska stabilnost goriva (Hoekman i sur., 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3. 1. MATERIJALI

3. 1. 1. Radni mikroorganizam

Korišteni radni mikroorganizam u ovom eksperimentu bio je kvasac *Trichosporon oleginosus* iz zbirke organizama Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ; Braunschweig, Njemačka), soja DSM – 11815. Kultura je čuvana u hladnjaku na +4 °C.

3. 1. 2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

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

Tablica 1. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

Sirovina	proizvođač
kukuruzni oklasak	okolica Ludbrega
kvaščevo ekstrakt	Roth, Austrija
pepton	Roth, Austrija
glukoza	Difco, SAD

3. 1. 3. Kemikalije i enzimi

U tablicama 2 i 3 navedene su kemikalije i enzimi korišteni za pripremu hranjivih podloga, u analizi prevrele komine i izolaciji lipida.

Tablica 2. Kemikalije korištene u istraživanju

Kemikalija	Proizvođač
kalijev dihidrogenfosfat	Kemika, Hrvatska
magnezijev sulfat heptahidrat	Kemika, Hrvatska
natrijev hidrogenfosfat	Kemika, Hrvatska
kalcijev klorid	Kemika, Hrvatska
kalcijev hidroksid	Kemika, Hrvatska
fosforna kiselina	Kemika, Hrvatska
etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA)	Merck, SAD

kloroform	Sigma, SAD
metanol	Sigma, SAD
etanol (96%)	Kemika, Hrvatska
željezov sulfat heptahidrat	Kemika, Hrvatska
manganov sulfat monohidrat	Kemika, Hrvatska
monohidrat limunske kiseline	Merck, SAD
natrijev hidroksid	Kemika, Hrvatska
sulfatna kiselina	Kemika, Hrvatska
cinkov sulfat heptahidrat	Merck, SAD

Tablica 3. Enzimski preparat korišten u istraživanju

Enzim	opis	Proizvođač
Cellic CTec2	enzimski preparat ima celulolitičku, hemicelulolitičku, β – glikozidaznu, pektinaznu aktivnost	Novozymes, Danska

3. 1. 4. Hranjive podloge

3.1.4.1. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj predkulture

Predkultura je uzgojena u tekućoj hranjivoj podlozi sastava: 20 gL⁻¹ glukoze, 20 gL⁻¹ peptona i 10 gL⁻¹ kvašćevog ekstrakta (YPD podloga).

Čista kultura kvasca *T. oleaginosus* čuvana je i održavana na kosim YPD agaroznim podlogama uz dodatak 20 gL⁻¹ agara.

3.1.4.2. Hranjiva podloga za uzgoj kvasca *Trichosporon oleaginosus* u tikvicama

Uzgoj kvasca *T. oleaginosus* proveden je u tekućoj hranjivoj podlozi s predobrađenim kukuruznim oklaskom kao izvorom ugljika. Predobrađeni kukuruzni oklasci priređeni su tako da su usitnjeni i pomiješani s 2 %-tnom natrijevom lužinom uz omjer otopine lužine i suhe tvari kukuruznog oklasak (eng. liquid to solid ratio, LSR) 8:1 L kg⁻¹, te ih se kuhalo 30 min pri temperaturi od 121 °C u autoklavu. Nakon filtracije i ispiranja do neutralne pH vrijednosti, filtarski kolač osušen je pri 50 °C do konstantne mase. Predobrađeni kukuruzni oklasak sadržavao je oko 5 % vlage.

Predobrađeni kukuruzni oklasak hidroliziran je uz pomoć enzimskog preparata Cellic CTec2 uz dodatak 50 mM citratnog pufera (0,5 M, pH = 5). U priređeni hidrolizat kukuruznog oklaska, dodana je sterilizirana koncentrirana otopina hranjivih tvari (10x) i koncentrirana otopina soli (100x). Sastav koncentrirane otopine hranjivih tvari prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Sastav koncentrirane otopine hranjivih tvari (10x)

Sastojak podloge	Koncentracija /volumen
magnezijev sulfat heptahidrat	2 gL ⁻¹
natrijev hidrogenfosfat	9,5 gL ⁻¹
kalijev dihidrogenfosfat	27 gL ⁻¹
kvaščevev ekstrakt	10 gL ⁻¹
etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA)	1 gL ⁻¹

Koncentrirana otopina soli (100x) bila je sljedećeg sastava: 4 gL⁻¹ CaCl₂, 0,55 gL⁻¹ FeSO₄ x 7 H₂O, 0,52 g L⁻¹ monohidrata limunske kiseline, 0,1 gL⁻¹ ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,076 gL⁻¹ MnSO₄ x H₂O, 0,1 gL⁻¹ EDTA i 200 µL 9M H₂SO₄.

3. 1. 5. Oprema i aparatura

- tehnička vaga (Tehnica ET – 1111, Slovenija)
- analitička vaga (Sartorius Group, Njemačka)
- magnetna mješalica (Technica ET -1111, Slovenija)
- tresilica (RM 71 B, Braun Biotech. International, Sartorius Group, Njemačka)
- centrifuga (Harrier 18/80, Sanyo, Velika Britanija)
- uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti – HPLC (Shimadzu CLASS – VP LC – 10A, Shimadzu, Japan) – dijelovi uređaja:
 - pumpa (LC – 10AD_{VP})
 - otplinjač (DGU – 14A)
 - injektor (SIL – 10AD_{VP})
 - uređaj za grijanje kolone (CTO – 10A_{VP})
 - analitička kolona (ionsko-izmjenjivačka kolona Supelcogel C610H; 5 cm, ID 4,6 mm, 9 µm, Sigma)
 - pretkolona (Supelcogel H Guard Column, Sigma)
 - detektor indeksa loma (RID – 10A)

- modul za kontrolu sustava (SCL – 10A_{VP})
- računalni program CLASS – VP verzija 6.10
- standardno laboratorijsko posuđe i pribor

3. 2. METODE

3. 2. 1. Priprema kulture kvasca *T. oleaginosus* uzgojene na kosom agaru

Kultura kvasca *T. oleaginosus* uzgojena je na kosoj hranjivoj podlozi u epruvetama, tijekom dva dana, na temperaturi od 28 °C. Porasla kultura čuvana je u hladnjaku na +4 °C.

3. 2. 2. Priprema i uzgoj inokuluma

Na 100 mL hranjive podloge u Erlenmeyerovoj tikvici od 500 mL, nacijepjen je kvasac *Trichosporon oleaginosus* s kosog agara. Uzgoj se provodio dva dana na tresilici uz broj okretaja 150 min⁻¹ i na 30°C.

3. 2. 3. Uzgoj predkulture kvasca *T. oleaginosus*

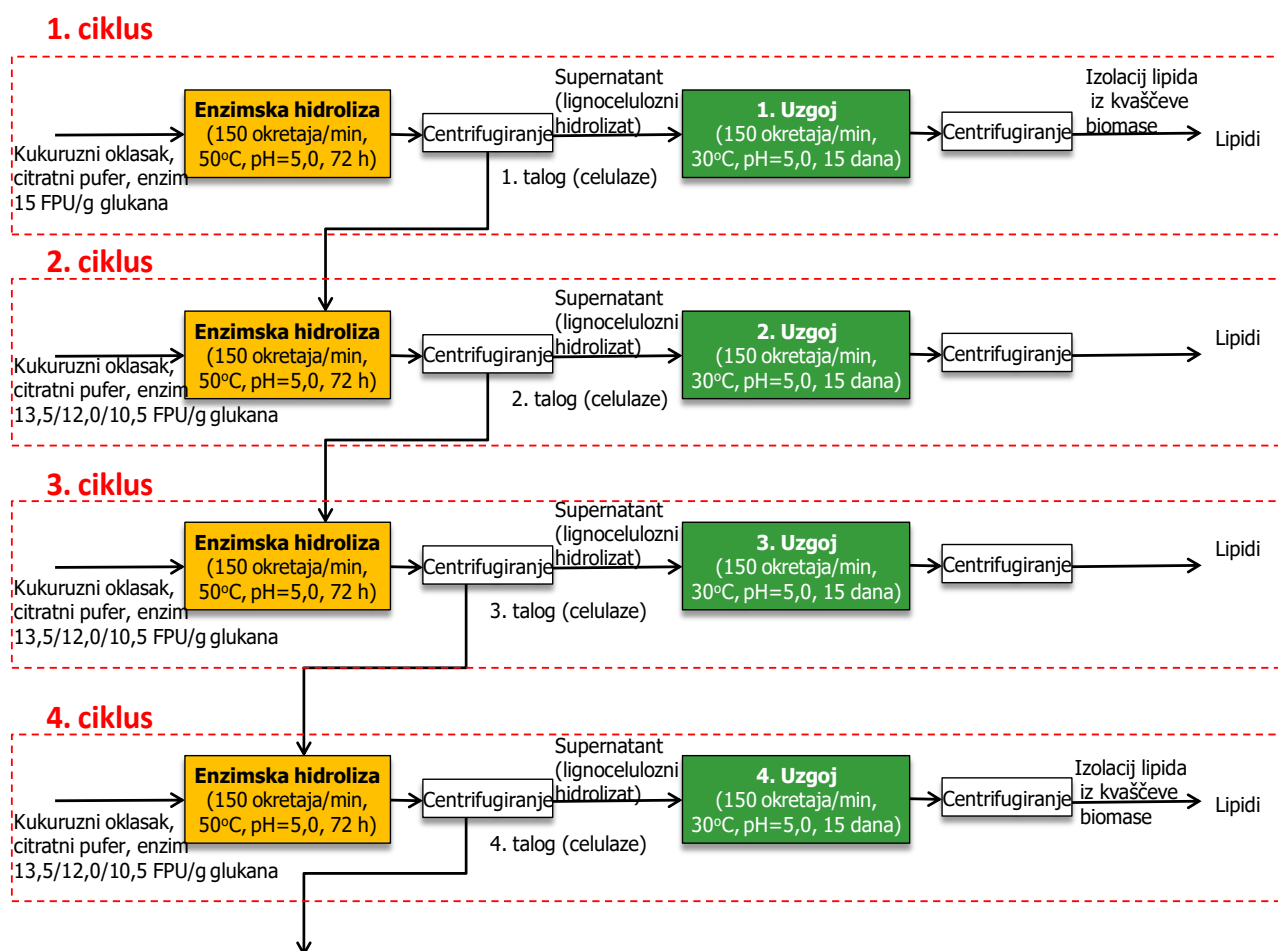
Predkultura je uzgojena u Erlenmeyerovoj tikvici od 500 mL sa 100 mL YPD tekuće podloge. Podloga je nacijepjena s biomasom kvasca *T. oleaginosus* prorasloj na kosom YPD agaru. Kultura je uzgajana pri temperaturi od 30 °C tijekom 2 dana.

3. 2. 4. Enzimska hidroliza lignocelulozne sirovine i uzgoj kvasca *T. oleaginosus*

U Erlenmeyerovu tikvicu od 300 mL sterilizirano je 15 g predobrađenih kukuruznih oklasaka. U aseptičnim uvjetima u tikvicu je dodano 100 mL prethodno steriliziranog (121°C, 20 minuta) 0,5 M citratnog pufera i 15 FPU (eng. Filter Paper Units) enzimskog preparata Cellic CTec2 po gramu glukana. Enzimski preparat Cellic CTec2 prethodno je steriliziran filtracijom kroz membranu veličine pora 0,2 μm (Sartorius). Provedena su četiri ciklusa enzimske hidrolize lignocelulozne sirovine s različitim količinama celulolitičkih enzima uz reciklaciju enzima (slika 7, tablica 5). U prvom ciklusu enzimske hidrolize korišteno je 15 FPU po gramu glukana (6 paralela), a drugom, trećem i četvrtom ciklusu hidrolize 13,5, 12,0 i 10,5 FPU po gramu glukana (tablica 5). Za svaku odabranu količinu enzima priređene su dvije paralelne enzimske hidrolize i uzgoja. Vrijednosti koncentracija supstrata na početku i kraju uzgoja, te koncentracije biomase i lipida na kraju izračunate su kao prosječna vrijednost dviju paralela.

Tablica 5. Količina celulolitičkih enzima korištenih u eksperimentu

ciklus	količina enzima (FPU/g glukana)		
	1.	15,0	15,0
2.	13,5	12,0	10,5
3.	13,5	12,0	10,5
4.	13,5	12,0	10,5



Slika 7. Shema provedenog eksperimenta.

Enzimski hidroliza predobrađenog kukuruznog oklasaka provedena je pri 50°C uz miješanje na magnetnoj mješalici, tijekom tri dana. Nakon završenog prvog ciklusa enzimske hidrolize, centrifugiranjem je u aseptičnim uvjetima odvojen čvrsti dio (talog) od tekućeg dijela (prvi lignocelulozni hidrolizat). Čvrsti dio (talog) koji je sadržavao adsorbirane celulolitičke enzime na nehidroliziranoj lignoceluloznoj sirovini korišten je u idućem, drugom ciklusu hidrolize. Talog je pridodan kukuruznom oklasku (15 g), 50 mM citratnom puferu (100 mL) i enzimu u

novoj Erlenmeyerovoj tikvici od 300 mL. U drugom, trećem i četvrtom ciklusu dodana je smanjena količina enzima (tablica 5). Nakon svakog provedenog ciklusa enzimske hidrolize, u aseptičnim se uvjetima centrifugiranjem izdvojilo tekući od čvrstog dijela, koji je nanovo korišten u idućoj hidrolizi. Isti postupak korišten je i za dobivanje trećeg i četvrtog taloga. Tekući dio dobiven centrifugiranjem navedenih hidrolizata (supernatant) koristio se za pripremu hranjive podloge za uzgoj kvaščeve biomase i sintezu lipida. Lignoceluloznom hidrolizatu dodana je koncentrirana otopina soli i 100x koncentrirana otopina soli, te je podloga inokulirana s predkulturom (10 %, vol/vol).

3. 2. 5. Analitičke metode

3. 2. 5. 1. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari biomase

U prethodno izvagane plastične kivete (ukupnog volumena 50 mL) dodano je po 45 mL suspenzije biomase. Biomasa je izdvojena centrifugiranjem deset minuta pri 4000 okretaja min^{-1} te je isprana dva puta s demineraliziranom vodom i osušena na 105°C , do konstantne mase. Nakon hlađenja, kivete su izvagane te je izračunata koncentracija biomase kvasca na kraju uzgoja prema sljedećoj jednadžbi:

$$X = \frac{m_{ok} - m_{pk}}{V_{uz}} \quad [\text{gL}^{-1}]$$

m_{ok} - masa osušene kivete s biomasom [g]

m_{pk} - masa prazne kivete [g]

V_{uz} - volumen uzorka [L]

3. 2. 5. 2. Određivanje koncentracije glukoze i ksiloze pomoću uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC)

U supernatantima kulture određena je koncentracija ksiloze i glukoze na početku i kraju uzgoja. Koncentracija monosaharida određena je pomoću HPLC-a uređaja Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP}(Japan). Priprema uzoraka podloge za analizu sastojao se od nekoliko koraka. U Eppendorfove epruvetu dodano je 0,75 μL supernatanta kulture i 0,75 μL cinkovog sulfata

heptahidrata (10 %, masa/masa). Smjesa je pomiješana na vorteks mješalici trideset sekundi, te je ostavljena trideset minuta na sobnoj temperaturi da se istalože proteini. Istaloženi proteini izdvojeni su centrifugiranjem petnaest minuta na 10 000 okretaja/min. U nove Eppendorfove epruvete dodano je 1350 μL destilirane vode (provodljivosti 1 μS) i 150 μL pročišćenog supernatanta. Otopina je pomiješana na vorteks mješalici, a zatim filtrirana kroz membranu veličine pora 0,2 μm (Sartorius, Njemačka) u vijale za HPLC analizu.

Kao pokretna faza koristila se 0,1%-tna vodena otopina H_3PO_4 . Kroz kolonu su propušteni injektirani uzorci volumena 20 μL , pri temperaturi od 55°C i protoku pokretne faze od 0,5 mLmin^{-1} . Nakon kromatografske analize, provedena je integracija dobivenih dijagrama računalnim programom CLASS-VP verzija 6.10. Koncentracija glukoze i ksiloze izračunata je korištenjem jednadžbi baždarnih pravaca za standardne otopine (0,1- 5 g/L). Uvrštavanjem površine pika za pojedini monosaharid (y) u jednadžbu baždarnog pravca (tablica 6.) izračunate su njihove koncentracije (x).

Tablica 6. Jednadžbe baždarnih pravaca za glukozu i ksilozu

standard	vrijeme zadržavanja (min)	jednadžba baždarnog pravca	R ²
glukoza	13,98	$y = 258\ 154\ x + 14\ 890$	0,9999
ksiloza	14,78	$y = 245\ 250\ x + 19\ 319$	0,9989

3. 2. 5. 3. Određivanje udjela lipida u biomasi kvasca

Ekstrakcija lipida iz stanične biomase kvasca provedena je ekstrakcijom prema promijenjenom propisu Schneitera i Dauma (2006) i Folcha i sur. (1957). Prije postupka ekstrakcije vlažna biomasa kvasca izdvojena na kraju uzgoja bila je osušena je pri 50°C do konstantne mase te usitnjena u tarioniku.

U Pirex epruvete volumena 14 mL dodano je 200 mg zračno suhog uzorka kvaščeve biomase, 0,3 mL vode, 2 mL metanola i 4 mL kloroforma. Ekstrakcija lipida iz biomase kvasca provedena je uz miješanje na tresilici (120 min^{-1}) preko noći. Uzorci su profiltrirani kroz sinter lijevak, a zaostali talog na lijevku ispran je smjesom otapala korištenom u ekstrakciji lipida. U idućem koraku, stanični proteini u ekstraktu lipida istaloženi su dodatkom 0,034% magnezijevog klorida. Nakon petnaest minuta miješanja na tresilici (180 okretaja/min), uzorci su ostavljeni da odstoje na +4°C dok se jasno ne odvoje dvije faze –

donja kloroformska (u kojoj su otopljeni lipidi) i gornja metanolska. Upotrebom plastične šprice s dugačkom iglom, kloroformska faza izdvojena je i prenesena u novu epruvetu. Propuhivanjem uzoraka s plinovitim dušikom uklonjena su organska otapala. Zaostali tragovi otapala i vode u uzorcima lipida uklonjeni su sušenjem na temperaturi od 105°C.

Udio lipida u biomasi kvasca izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$w_L = \frac{m_{e+L} - m_e}{m_u \times (1 - w_{H_2O})} \times 100 \quad [\%]$$

w_L - udio lipida [%]

w_L - udio vlage u biomasi [%]

m_{e+L} - masa epruvete s lipidima [g]

m_e - masa prazne epruvete [g]

m_u - masa uzorka biomase [g]

Udio vlage u uzorku biomase određen je gravimetrijski. U prethodno izvagane i suhe staklene epruvete dodana je biomasa kvasca te su epruvete izvagane. Biomasa je osušena na 105°C do konstantne mase. Nakon hlađenja, epruvete su izvagane te je prema sljedećoj jednadžbi izračunat udio vlage u biomasi kvasca:

$$w_{H_2O} = \frac{m_{e+Xs} - m_e}{m_{e+Xv} - m_e} \times 100 \quad [\%]$$

m_{e+Xs} – masa epruvete i osušene biomase [g]

m_e – masa prazne epruvete [g]

m_{e+Xv} – masa epruvete i biomase prije sušenja [g]

3. 2. 5. 4. Pokazatelji uspješnosti bioprocesa

Koeficijent konverzije supstrata u produkt izražen je kao omjer dobivene koncentracije lipida i mase predobrađene sirovine:

$$Y_L = \frac{\gamma_L}{\gamma_{\text{predobrađena sirovina}}} \quad [\text{gg}^{-1}]$$

$Y_{L/S}$ – koeficijent konverzije supstrata u lipide $[\text{gg}^{-1}]$

γ_L – koncentracija lipida $[\text{g}]$

$\gamma_{\text{predobrađena sirovina}}$ – koncentracija upotrebjene predobrađene sirovine $[\text{gL}^{-1}]$

Na isti način izračunat je stupanj konverzije supstrata, odnosno predobrađene sirovine u biomasu bez lipida.

$$Y_{XbL} = \frac{\gamma_{XbL}}{\gamma_{\text{predobrađena sirovina}}} \quad [\text{gg}^{-1}]$$

$Y_{XbL/S}$ – koeficijent konverzije supstrata u biomasu bez lipida $[\text{gg}^{-1}]$

γ_{XbL} – koncentracija biomase bez lipida $[\text{g}]$

$\gamma_{\text{predobrađena sirovina}}$ – koncentracija upotrebjene predobrađene sirovine $[\text{gL}^{-1}]$

Produktivnost sinteze lipida izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

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

Pr_L – produktivnost lipida $[\text{g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}]$

γ_L – koncentracija lipida [g L⁻¹]

t – vrijeme uzgoja [dani]

Na isti način izračunata je produktivnost biomase bez lipida:

$$Pr_{XbL} = \frac{Y_{XbL}}{t} \quad [\text{g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}]$$

Pr_{XbL} – produktivnost biomase bez lipida [g L⁻¹ dan⁻¹]

γ_L – koncentracija biomase bez lipida [g L⁻¹]

t – vrijeme uzgoja [dani]

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome radu istražena je mogućnost reciklacije celulolitičkih enzima u šaržnom procesu proizvodnje lipida, uz pomoć oleaginoznog kvasca *Trichosporon oleaginosus*, na enzimskom hidrolizatu lignocelulozne sirovine kao izvoru ugljika za rast i nakupljanje lipida. Oleaginozni kvasci započinju nakupljati lipide u uvjetima limitacije rasta stanice izvorom dušika, tj. kada koncentracija izvora dušika u podlozi padne ispod 10% početne vrijednosti, a izvor ugljika je u suvišku (Ratledge, 2004). Udio nakupljenih lipida u biomasi kvasca *T. oleaginosus*, na kraju šaržnog uzgoja s pritokom supstrata, može iznositi čak i do 80% suhe tvari biomase (Zhang i sur., 2011). Kao izvor ugljika u ovome radu, upotrebljena je lignocelulozna sirovina, tj. kukuruzni oklasci koji su prethodno usitnjeni i predobrađeni 2% natrijevom lužinom pri 121°C, kako bi se smanjio udio lignina i poboljšala razgradnja lignocelulozne sirovine celulazama. Enzimskom hidrolizom predobrađene lignocelulozne sirovine nastaju monosaharidi (ksiloza i glukoza) i disaharidi (celobioza i ksilobioza) koje kvasac *Trichosporon oleaginosus* asimilira i koristiti za rast i sintezu lipida. Nehidrolizirana lignocelulozna sirovina koja se izdvaja iz lignoceluloznog hidrolizata nakon enzimске hidrolize, sadrži adsorbirane celulolitičke enzime koji još imaju zadovoljavajuću celulolitičku aktivnost. Izdvajanjem nehidrolizirane lignocelulozne sirovine (taloga) i vraćanjem u idući stupanj hidrolize, moguće je postići značajne uštede u ukupnim troškovima proizvodnje biodizela u biorafineriji.

Proveden je bioproces u kojem je u prvom koraku hidroliziran preobrađeni kukuruzni oklasak, uz pomoć celulolitičkih enzima. Nakon hidrolize, izdvojeni tekući dio (lignocelulozni hidrolizat) koristio se kao izvor ugljika za rast i sintezu lipida, a izdvojeni nehidrolizirani dio sirovine korišten je u idućem stupnju enzimске hidrolize.

U prethodnim eksperimentima provedena je optimizacija enzimске hidrolize predobrađenog kukuruznog oklaska mijenjanjem dvaju ključnih parametara: količine upotrebljenog enzima i omjera mase supstrata i volumena tekućeg dijela podloge. Optimalna količina enzima Cellic CTec2 iznosila je 15 FPU po gramu glukana u lignoceluloznoj sirovini, dok je optimalni omjer mase supstrata i volumena tekućeg dijela podloge iznosio 1:20 (g mL⁻¹).

Glukoza i ksiloza najzastupljeniji su monosaharidi u enzimskom hidrolizatu predobrađenog kukuruznog oklaska, a kako je koncentracija celobioze bila manja od 5 gL⁻¹, njena vrijednost nije prikazana u rezultatima (tablica 7). Učinkovitost enzimске hidrolize u sva četiri ciklusa praćena je određivanjem koncentracije glukoze i ksiloze. U prvom ciklusu hidrolize dodana je optimalna količina enzima (15 FPU g⁻¹) te je prosječna vrijednost koncentracije šećera uzeta

kao referentna vrijednost s kojom se uspoređivalo vrijednosti u iduća tri ciklusa. Koncentracija glukoze nakon prve enzimske hidrolize iznosila je od 66 do 72,5 gL⁻¹ (tablica 7), a nakon druge hidrolize, njena vrijednost iznosila je od 66 do 67,8 gL⁻¹. U trećem i četvrtom lignoceluloznom hidrolizatu, raspon koncentracija glukoze bio je sličan onome u drugom ciklusu i iznosio je 59,9 - 62,1 gL⁻¹ (treći ciklus) i 61,4 - 62,3 gL⁻¹ (četvrti ciklus). U usporedbi s prvom enzimskom hidrolizom, koncentracije glukoze nakon druge, treće i četvrte hidrolize neznatno su manje (oko 10 %). Smanjenje dodane količine enzima 10, 20 i 30% (u drugom, trećem i četvrtom ciklusu) nije značajnije utjecalo na prinos glukoze u lignoceluloznim hidrolizatima. Slično je utvrđeno usporedbom koncentracija ksiloze u četiri lignocelulozna hidrolizata, koja je nakon enzimske hidrolize u sva četiri ciklusa iznosila 34,6 - 40,5 gL⁻¹. Na njenu vrijednost nije utjecala količina dodanog enzima u posljednje tri hidrolize. Nešto niža koncentracija glukoze u hidrolizatima drugog, trećeg i četvrtog ciklusa najvjerojatnije je posljedica inhibicije celulaza nusproizvodima predobrade sirovine, čija se koncentracija u drugom, trećem i četvrtom lignoceluloznom hidrolizatu povećala zbog reciklacije nehidroliziranog taloga.

Tablica 7. Koncentracije glukoze i ksiloze na početku ($S_{0,glc}$, $S_{0,xyl}$) i na kraju uzgoja (S_{glc} , S_{xyl}), utrošena glukoza i ksiloza (ΔS_{glc} , ΔS_{xyl}), koncentracija biomase (X) i lipida (L)

Ciklus	količina enzima (FPU g ⁻¹ glukana)	$S_{0,glc}$ (gL ⁻¹)	$S_{0,xyl}$ (gL ⁻¹)	S_{glc} (gL ⁻¹)	S_{xyl} (gL ⁻¹)	ΔS_{glc} (gL ⁻¹)	ΔS_{xyl} (gL ⁻¹)	X (gL ⁻¹)	L (gL ⁻¹)
1	15	67,8	35,1	4,3	21,9	63,5	13,2	24,3	11,1
	15	72,5	40,5	0,4	17,6	72,1	22,8	26,6	11,5
	15	66,0	34,6	0,0	18,4	66,0	16,2	23,4	11,1
2	13,5	67,8	37,9	4,6	25,0	63,2	12,9	23,0	10,3
	12,0	72,5	37,8	8,8	27,8	63,7	10,0	18,1	10,3
	10,5	66,0	35,7	4,4	23,3	61,6	12,4	21,8	10,5
3	13,5	61,7	39,5	5,7	28,3	56,0	11,2	23,1	13,4
	12,0	62,1	39,3	0,8	23,8	61,2	15,5	22,4	10,8
	10,5	59,9	38,6	1,8	26,0	58,1	12,6	23,1	10,5
4	13,5	62,3	39,9	12,3	29,1	50,0	10,7	24,8	11,0
	12,0	62,0	39,6	4,0	26,4	58,0	13,2	25,0	10,8
	10,5	61,4	39,3	12,0	25,9	49,4	13,4	23,1	10,7

Dobiveni lignocelulozni hidrolizati korišteni su kao izvori ugljika za rast i sintezu lipida s kvascem *T. oleaginousus*. Završetkom uzgoja, određene su koncentracije biomase i lipida u podlozi (tablica 7). Nakon prvog uzgoja, koncentracije biomase i lipida bile su nešto veće u odnosu na koncentracije određene u sljedećim trima uzgojima, u kojima su njihove vrijednosti bile slične. Nakon prvog ciklusa, prosječna koncentracija biomase iznosila je 24,7 gL⁻¹, a nakon drugog i trećeg ciklusa uzgoja, prosječna vrijednost koncentracije biomase iznosila je 21 i 22,9 gL⁻¹, što je oko 10% manje u odnosu na dobivenu koncentraciju nakon prvog ciklusa. Vraćanjem taloga iz prethodnog ciklusa enzimske hidrolize u sljedeći, količina inhibitora rasta mikroorganizma u podlozi se povećavala te je bilo za očekivati da će koncentracija biomase u narednom ciklusu dodatno smanjiti. Međutim, njena vrijednost nakon četvrtog ciklusa uzgoja imala je prosječnu vrijednost od 24,3 gL⁻¹, što je jednako koncentraciji biomase nakon prvog ciklusa. Postupak reciklacije enzima nije značajnije utjecao na vrijednost koncentracije lipida. Nakon prvog uzgoja, njena je vrijednost iznosila 11,2 gL⁻¹, dok je u iduća tri uzgoja koncentracija lipida bila neznatno niža. Iz prikazanih rezultata istraživanja može se zaključiti da reciklacija taloga, kojom se iz ciklusa u ciklus dodatno povećavao sadržaj inhibitora u podlozi, nije značajnije utjecala na rast mikroorganizma i sintezu lipida. Dobivene koncentracije lipida slične su vrijednostima dobivenima za kvasac *Cryptococcus curvatus* uzgojen na hidrolizatu stabljike kukuruza u procesu istovremene enzimske hidrolize i uzgoja mikroorganizma (Gong i sur., 2014). Prosječni udio lipida u biomasi bio je 47,58%.

Pokazatelji uspješnosti procesa prikazani su u tablici 8. Vrijednost produktivnosti sinteze biomase bez lipida i sinteze lipida bile su ujednačene, neovisno o ciklusu i količini dodanih celulaza. Najveća vrijednost produktivnosti sinteze biomase bez lipida izmjerena je u prvom i četvrtom ciklusu uzgoja i iznosila je 0,9 gL⁻¹dan⁻¹, dok je njena prosječna vrijednost bila 0,84 gL⁻¹dan⁻¹. Najveća produktivnost lipida iznosila je 0,77 gL⁻¹dan⁻¹, a dobivena je u trećem ciklusu uzgoja u kojem je izmjerena i najveća koncentracija lipida u podlozi. Prosječna vrijednost produktivnosti lipida u eksperimentu bila je nešto manja od maksimalne određene vrijednosti i iznosila je 0,74 gL⁻¹dan⁻¹.

Tablica 8. Pokazatelji uspješnosti procesa – produktivnost sinteze biomase bez lipida (Pr_{Xbl}), produktivnost sinteze lipida (Pr_L), koeficijent konverzije supstrata u biomasu bez lipida ($Y_{Xbl/S}$), koeficijent konverzije supstrata u lipide ($Y_{L/S}$)

Ciklus	količina enzima (FPU g ⁻¹ glukana)	Pr_{Xbl} (gL ⁻¹ dan ⁻¹)	Pr_L (gL ⁻¹ dan ⁻¹)	$Y_{Xbl/S}$ (mg/g)*	$Y_{L/S}$ (mg/g)**
1	15	0,88	0,74	88,26	73,96
	15	1,01	0,76	100,64	76,37
	15	0,82	0,74	81,79	73,90
2	13,5	0,85	0,69	84,53	68,77
	12,0	0,52	0,68	52,00	68,46
	10,5	0,75	0,70	75,43	70,07
3	13,5	0,65	0,89	65,12	89,20
	12,0	0,78	0,72	77,57	71,93
	10,5	0,84	0,70	84,33	69,77
4	13,5	0,93	0,73	92,50	73,06
	12,0	0,95	0,72	94,55	72,25
	10,5	0,83	0,71	82,81	71,45

* grami biomase kvasca bez lipida po gramu predobrađenog kukuruznog oklaska

** miligrami lipida po gramu predobrađenog kukuruznog oklaska

Vrijednosti koeficijenta konverzije supstrata u lipide i biomasu bez lipida, imale su slične vrijednosti za sva četiri uzgoja. Prosječna vrijednost koeficijenta konverzije predobrađene sirovine u biomasu bez lipida, iznosila je 81,63 mg/g, a prosječni koeficijent konverzije predobrađene sirovine u lipide 73,72 mg/g.

Vrijednosti koeficijenta konverzije supstrata u lipide i produktivnosti sinteze lipida u ovome radu bile su nešto veće od vrijednosti dobivenih za kvasce *Cryptococcus curvatus* i *Rhodosporidium toruloides* i plijesan *Mortierella isabellina*, koji su također uzgojeni na enzimskim hidrolizatima različitih lignoceluloznih sirovina (Liang i sur., 2012; Xie i sur., 2012; Ruan i sur., 2013).

Na temelju provednog eksperimenta može se zaključiti da se reciklacijom enzima može smanjiti količina dodanog enzima za hidrolizu lignocelulozne sirovine i do 30 % bez značajnijeg učinka na prinos fermentabilnih šećera. Reciklacija nehidrolizirane lignocelulozne sirovine (talog) nije značajnije utjecala na aktivnost celulolitičkih enzima, rast mikroorganizma i sintezu lipida s kvascem *T. oleaginous*. Smanjenjem količine enzima i do 30%, uz reciklaciju nehidroliziranog dijela lignocelulozne sirovine, mogu se postići značajne uštede u proizvodnji biogoriva u biorafineriji.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti:

1. Koncentracije glukoze i ksiloze dobivene enzimskom hidrolizom ujednačenih su vrijednosti u sva četiri provedena ciklusa. Izdvajanjem taloga koji sadrži enzime adsorbirane na nehidroliziranom kukuruznom oklasaku i njegovom reciklacijom u idući ciklus enzimske hidrolize može se smanjiti količina dodanog enzima i do 30 % od optimalne bez značajnijeg učinka na prinose glukoze i ksiloze.
2. Neovisno o dodanoj količini celulolitičkih enzima upotrebljenih za hidrolizu predobrađenog kukuruznog oklaska, vrijednosti koncentracije biomase kvasca *T. oleaginosus* i udjela lipida u biomasi, u sva četiri uzgoja imale su slične vrijednosti. Prosječna koncentracija biomase kvasca iznosila je $23,23 \text{ gL}^{-1}$, a prosječni udio lipida u biomasi bio je 47,58%.
3. Produktivnost provedenog procesa proizvodnje lipida nije se značajnije mijenjala sa smanjenjem dodane količine enzima i do 30 %, što može omogućiti značajne uštede u proizvodnji.

6. LITERATURA

Anonymous 1, Royal Society Of Chemistry (2017)

<<http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/Carbohydrates.htm>> pristupljeno 20.7.2017.

Angerbauer C., Siebenhofer M., Mittelbach M., Guebitz G.M. (2008) Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **99**: 3015-3056.

Ageitos J.M., Vallejo J.A., Veiga – Crespo P., Villa T.G. (2010) Oily yeasts as oleaginous factories. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**: 1219-1227.

Athenstaedt K., Daum G. (2006) The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* **3**: 1355-1369.

Azocar L., Ciudad G., Heipieper H.J., Navia R. (2010) Biotechnological processes of biodiesel production using alternative oils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**: 621-363.

Bajpai P. (2016) Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production, 1. Izd. Springer. str. 7-12.

Beopoulos A., Cescut J., Haddouche R., Uribelarrea J.L., Molina-Jouve C., Nicaud J.M. (2009) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production, *Prog. Lipid. Res.* **48**: 375-387.

Brandt A., Gräsvik J., Hallett J.P., Welton T. (2013) Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem* **15**: 550-583.

Bossa F., Rotilio G., Fasella P., Malmstrom B.G. (1969) An optional rotatory dispersion investigation of fungal laccase, *Eur. J. Biochem.* **10**: 395-398.

Cardona A., Sanchez O. (2007) Fuel ethanol production: process design and integration opportunities. *Bioresour. Technol.* **98**: 15-27.

Choudhary J., Singh S., Nain L. (2015) Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology* **21**: 82-92.

- Courchesne N.M.D., Parisien A., Wang B., Lan C.Q. (2009) Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches, *J. Biotechnol* **141**: 31-41.
- El-Fadel M., Findikakis A.N., Leckie I.O (1996) Temperature effects in modeling solid waste biodegradation. *Environ. Technol.* **19**: 915-935.
- Erdei B., Galbe M., Zacchi G. (2013) Simultaneous Saccharification and co-fermentation of whole wheat in integrated ethanol production. *Biomass Energ.* **56**: 506-514.
- Gangar A., Karande A.A., Rajasekharan R. (2001) Purification and characterization of acyl-acyl carrier protein synthetase from oleaginous yeast and its role in triacylglycerol biosynthesis. *Biochem. J.* **360**: 471-479.
- Gong Z., Shen H., Yang Q., Xie H., Zhao Z.K. (2014) Lipid production from corn stover by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biotechnology for biofuels* **7**: 158
- Gosh P., Ghose T.K. (2003) Bioethanol in India: recent past and emerging future. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* **85**: 1-27.
- Gujjari P., Suh S., Coumes K., Zhou J.J. (2011) Characterization of oleaginous yeasts revealed two novel species: *Trichosporon cacaoliposililis* sp. nov. and *Trichosporon oleaginosus* sp. nov. *Mycologia* **103**: 1110-1118.
- Himmel M.E., Adney W.S., Baker J.O., Elander R., McMillan J.D., Nieves R.A. (1997) Advanced bioethanol production technologies: a perspective. *Fuels Chem Biomass* **666**: 2-45.
- Hoekman S.K., Broch A., Robbins C., Cenicerros E., Natarajan M. (2012) Review of biodiesel composition, properties and specification. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16**: 143-169.
- Iassonova D.R., Hammond E.G., Beattie S.E. (2008) Oxidative stability of polyunsaturated triacylglycerols encapsulated in oleaginous yeast. *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 711-716.
- Ivančić Šantek M., Miškulin E., Beluhan S., Šantek B. (2014) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kem. Ind.* **65**: 25-38.

Jin M., Slininger P.J., Dien B.S., Waghmode S., Moser B.R. Orjuela A., Costa Sousa L., Balan V (2014) Microbial lipid – based lignocellulosic biorefinery: feasibility and changes. *Trends in Biotechnology* **33**: 43-54.

Kim S., Lee T. (2009) Degradation of lignocellulosic materials under sulfidogenic and methanogenic conditions. *Waste Manage* **29**: 224-227.

Knothe G. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy and Environmental Science* **2**: 759-776.

Kurakake M., Ide N., Komaki T. (2007) Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of office paper. *Curr. Microbiol.* **54**: 424-8.

Liang Y.N, Tang T.Y., Umagiliyage A.L., Siddaramu T., McCarroll M., Choudhary R. (2012) Utilization of sorghum bagasse hydrolysates for producing microbial lipids. *Appl. Energ.* **91**: 451–458.

Liu W., Wang J., Yu Z., Bao J. (2012) Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by yeast *Trichosporon curtaneum*. *Bioresource Technology* **118**: 13-18.

Malherbe S., Cloete T.E. (2003) Lignocellulosic biodegradation and applications: a review. *Environ. Sci. Biotechnol.* **1**: 105-114

Martínez E.J., Vijaya R., González-Ándres F., Gómez X. (2015) New biofuel alternatives: integrating waste management and single cell oil production. *Int. J. Mol. Sci.* **16**: 9385-9405.

Marzioletti T., Olarte M.B.V., Sievers C., Hoskins T.J.C., Agrawal P.K., Jones C.W. (2008) Dilute acid hydrolysis of loblolly pine: a comprehensive approach. *J. And EC Res.* **47**: 7131-40.

Menon V., Rao M. (2012) Trends in bioconversion og lignocellulose: Biofuels, platform chemicals and biorafinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science* **38**: 522-550.

Muniraj I.K., Uthandi S.K., Hu Z., Xiao L., Zhan X. (2014) Microbial lipid production from renewable and waste materials for second generation-biodiesel feedstock. *Environmental Technology Reviews* **4**: 1-16.

Oh K.K., Kim Y.S., Yoon H.H., Tae B.S. (2002) Pretreatment of lignocellulosic biomass combination of ammonia recycled percolation and dilute acid process. *J. Ind. Chem.* **8**: 64-70.

Palmqvist E., Hahn-Hägerlad B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol.* **74**: 25-33.

Papanikolaou S. (2011) Oleaginous yeasts: biochemical events related with lipid synthesis and potential biotechnological applications. *Ferment. Technol.* **1**: 1-3.

Papanikolaou S., Aggelis G. (2011) Lipid of oleaginous yeasts, part I: biochemistry of single cell oil production, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **113**: 1031-1051.

Ratlidge C. (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production, *Biochemie* **86**: 807-815.

Ruan Z.H., Zanotti M., Zhong Y., Liao W., Ducey C., Liu Y. (2013) Co-hydrolysis of lignocellulosic biomass for microbial lipid accumulation. *Biotechnol. Bioeng.* **110**: 1039-1049.

Rude M.A., Schirmer A. (2009) New microbial fuels: a biotech perspective. *Curr Opin Microbiol* **12**: 274-281.

Salvachúa D., Prieto A., López-Abelairas M. Lu-Chau T., Martínez A.T., Martínez M.J. (2011) Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresour. Technol* **102**: 7500-6.

Singh A., Olsen S.I., Nigam P.S. (2011) A viable technology to generate third-generation biofuel. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **86**: 1349-1353.

Sun Y., Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* **83**: 1-11.

Stevens D.J., Worgetten M., Sadler J. (2004), *Biofuels for transportation: an examination of policy and technical issues*. IEA Bioenergy Task 39 Liquid Biofuels, Final Report 2001-2003.

Thevenieau F., Nicaud J.M. (2013) Microorganismem as sources of oils. *Oilseeds and Fats Crops and Lipids* **20**: 1-8.

Wang H., Wang J., Fanh Z., Wang X., Bu H. (2010) Enhanced bio-hydrogen production by anaerobic fermentation of apple pomace with enzyme hydrolysis. *Int. J. Hydrogen Energ.* **35**: 8303-9.

Weete J.D., Weber D.J. (1980) Lipid biochemistry of fungi and other organisms, Plenum press, New York and London.

Wu S.G., Zhao X., Sheen H., Wang Q., Zhao Z.K. (2011) Microbial lipid production *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions, *Bioresource Technol.* **102**: 1803-1807.

Wu S.G., Hu C., Jin G., Zhao X., Zhao Z.K. (2010) Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*, *Bioresource Technol* **101**: 6124-1629.

Wyman C.E. (1994) Ethanol from lignocellulosic biomass: technology economics and opportunities, *Bioresour. Technol.* **50**: 3-15.

Xie H.B., Shen H.W., Gong Z.W., Wang Q., Zhao Z.B.K., Bai F.W. (2012) Enzymatic hydrolysates of corn stover pretreated by a N-methylpyrrolidone-ionic liquid solution for microbial lipid production. *Green Chem.* **14**: 1202–1210.

Xu J., Wei D., Zhao X., Xuebing Z., Zhang G., Liu D. (2013) Microbial oil production from various carbon sources and its use for biodiesel preparation. *Biofuels Bioprod. Bioref.* **7**: 65-77.

Zhang Y.H.P., Ding S.Y., Mielenz J.R., Cui J.B., Elandre R.T., Laser M. (2007) Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **97**: 214-23.

Zhang J., Fang X., Zhu X.L., Li Y., Xu H.P., Zhao B.F., Chen L., Zhang X.D. (2011) Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* grown in fed-batch culture. *Biomass. Bioenerg.* **35**: 1906-1911.

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.


ime i prezime studenta