

Uzgoj plijesni *Mortierella isabellina* na hidrolizatu kukuruznog oklaska

Tomić, Marija

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:159:506332>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-
biotehnološki fakultet Prediplomski
studij Biotehnologija**

Marija Tomić

7197/BT

**UZGOJ PLIJESNI *Mortierella isabellina* NA
HIDROLIZATU KUKURUZNOG OKLASKA**

ZAVRŠNI RAD

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

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

Zagreb, 2018.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek na strpljenju i uloženom trudu pri izradi završnog rada. Također, zahvaljujem se Marini Grubišić, mag. ing. i tehničarima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada Marini Vnućec, Ljiljani Blažević i Igoru Livadi na stručnoj pomoći.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij: Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Uzgoj plijesni *Mortierella isabellina* na hidrolizatu kukuruznog oklaska

Marija Tomić, 7197

Sažetak: Oleaginozni mikroorganizmi poput plijesni *Mortierella isabellina* nakupljaju lipide u uvjetima limitacije rasta izvorom dušika u prisutnosti suviška izvora ugljika. Mikrobnii lipidi su alternativna sirovina za proizvodnju biodizela druge generacije. Lignocelulozna biomasa je nusproizvod poljoprivredne i drvne industrije i može se koristiti kao jeftin izvor ugljika za rast mikroorganizama. Iako jeftina, lignocelulozna biomasa ima vrlo složen sastav zbog čega se podvrgava različitim postupcima predobrade koji povećavaju cijenu biogoriva. U ovom istraživanju *Mortierella isabellina* je uzgojena na hidrolizatu alkalno predobrađenih kukuruznih oklasaka uz limitaciju rasta izvorom dušika. Tijekom rasta dva najzastupljenija šećera u lignoceluloznom hidrolizatu, glukoza i ksiloza, su se trošila redosljedno. Najveće vrijednosti koncentracije lipida od $10,614 \text{ gL}^{-1}$ i produktivnosti sinteze lipida od $0,87115 \text{ gL}^{-1}\text{dan}^{-1}$ postignute su jedanaesti dan uzgoja.

Ključne riječi: biodizel, lignocelulozne sirovine, mikrobnii lipidi, *Mortierella isabellina*

Rad sadrži: 34 stranice, 11 slika, 6 tablica, 59 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: izv. prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek **Pomoć pri izradi:**

Marina Grubišić, mag.ing.

Datum obrane: 18. lipnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Cultivation of fungus *Mortierella isabellina* on corn cob hydrolysate

Marija Tomić, 7197

Abstract: Oleaginous microorganisms such as fungus *Mortierella isabellina* accumulate lipids under nitrogen limited conditions in presence of a excess carbon source. The microbial lipids are alternative feedstock for the production of second generation biodiesel. Lignocellulose biomass is a by-product obtained from the agricultural and wood industry and can be used as a cheap carbon source for growth of microorganisms. Although inexpensive, lignocellulose biomass has a very complex composition due to which it has to be subjected to different pretreatment procedures that increase the price of biofuel. In this study, *Mortierella isabellina* was cultivated on the enzymatic hydrolysate of alkali-prepared corn cobs under nitrogen limited conditions. During the growth two main sugars in lignocellulosic hydrolysate, xylose and glucose, were consumed sequentially. The highest lipid productivity and lipid concentration of $0.87115 \text{ gL}^{-1}\text{day}^{-1}$ and 10.614 gL^{-1} , respectively, was obtained at the eleventh day of cultivation.

Keywords: biodiesel, lignocellulose biomass, microbial lipids, *Mortierella isabellina*

Thesis contains: 34 pages, 11 pictures, 6 tables, 59 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: PhD Mirela Ivančić Šantek, Associate professor

Technical support and assistance: Marina Grubišić, mag.ing.

Defence date: June 18th 2018

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE	2
2.1.1. CELULOZA.....	2
2.1.2. HEMICELULOZA.....	3
2.1.3. LIGNIN.....	3
2.2. PREDOBRAĐA I HIDROLIZA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA	4
2.2.1. FIZIČKA PREDOBRAĐA.....	4
2.2.2. FIZIKALNO-KEMIJSKA PREDOBRAĐA.....	5
2.2.3. KEMIJSKA PREDOBRAĐA.....	6
2.2.4. BIOLOŠKA PREDOBRAĐA.....	6
2.2.5. ENZIMSKA HIDROLIZA PREDOBRAĐENE SIROVINE.....	6
2.3. INHIBITORI I NUSPROIZVODI	7
2.3.1. INHIBITORI.....	7
2.3.2. NUSPROIZVODI U PROIZVODNJI BIODIZELA IZ LIGNOCELULOZNIH SIROVINA.....	8
2.4. OLEAGINOZNI MIKROORGANIZMI I BIOSINTEZA LIPIDA	8
2.4.1. <i>MORTIERELLA ISABELLINA</i>	9
2.4.2. BIOSINTEZA LIPIDA.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. RADNI MIKROORGANIZAM.....	13
3.1.2. SIROVINE I KEMIJSKE KORIŠTENE U PRIPREMI HRANJIVE PODLOGE.....	13
3.1.3. OSTALE KEMIJSKE KORIŠTENE U ISTRAŽIVANJU.....	14
3.1.4. HRANJIVA PODLOGA.....	14
3.1.5. UREĐAJI I OPREMA.....	15
3.1.5.1. UREĐAJ ZA VISOKO DJELOTVORNU TEKUĆINSKU KROMATOGRAFIJU (HPLC).....	15
3.1.5.2. OSTALA OPREMA I UREĐAJI.....	16
3.2. METODE	16
3.2.1. UZGOJ ČISTE KULTURE PLIJESNI.....	16
3.2.2. UZGOJ PLIJESNI U TIKVICAMA.....	16
3.2.3. PRIPREMA HIDROLIZATA KUKURUZNIH OKLASAKA ZA UZGOJ PLIJESNI.....	17
3.2.4. UZGOJ PLIJESNI U TIKVICAMA NA LIGNOCELULOZNOM HIDROLIZATU.....	17
3.2.5. ANALIZA UZORAKA.....	18
3.2.5.1. ODREĐIVANJE UDJELA LIPIDA.....	18
3.2.5.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FERMENTABILNIH ŠEĆERA POMOĆU TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE UČINKOVITOSTI (HPLC).....	19
3.2.5.3. BOJANJE LIPIDA U UZORCIMA.....	20
3.2.5.4. PRORAČUN PARAMETARA USPJEŠNOSTI BIOPROCESA.....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
5. ZAKLJUČAK	27
6. LITERATURA	28

1. UVOD

Ograničene količine fosilnih izvora energije (nafta, zemni plin i ugljen) za proizvodnju goriva, kao i buđenja ekološke svijesti čovječanstva, dovelo je do sve većeg razvoja alternativnih rješenja tj. biogoriva. Zamjena dizelu dobivenom iz fosilnih izvora je biodizel (Bibić, Filipović, 2007) dobiven transesterifikacijom masti životinjskog podrijetla ili ulja biljnog podrijetla (palma, suncokret, uljana repice ili soja) (Pinzi i sur., 2013, Leiva-Candia i sur., 2014). Najveća prepreka u komercijalnoj proizvodnji i široj upotrebi biodizela su ograničene sirovine za njegovu proizvodnju. Potrošnja velikih količina biljnih ulja za proizvodnju biodizela rezultirala je povećanjem cijene prehrambenih ulja biljnog podrijetla (Huang i sur., 2009). Moguće rješenje ovog problema je korištenje lipida mikrobnog podrijetla kao sirovine za proizvodnju biodizela. Sastav mikrobnih lipida sličan je lipidima biljnog podrijetla, a najvećim dijelom su prisutni kao triacilgliceroli i slobodne masne kiseline (Cohen i sur., 2005). Međutim, danas je proizvodnja mikrobnih lipida još uvijek skuplja od proizvodnje biljnih ulja i životinjskih masti zbog visokih troškova za izvor ugljika i ekstrakciju lipida. Razvojem tehnologije proizvodnje lipida očekuje se smanjenje njihove cijene. S druge strane zbog sposobnosti nakupljanja lipida s značajnim udjelom vrijednih nezasićenih masnih kiselina (npr. eikozapentanoične i arahidonske kiseline) ovi proizvodi mogu pozitivno utjecati na isplativost proizvodnje biodizela (Hiruta i sur., 1996, Papanikolaou i sur., 2011, Papanikolaou i sur., 2010, Jin i sur., 2015). Oleaginozni mikroorganizmi kao što su *Cunninghamella echinulata* (Fakas i sur., 2009), *Trichosporon fermentans* (Huang i sur., 2009), *Mortierella isabellina* (Harde i sur., 2016), *Thamnidium elegans* (Zikou i sur., 2013) mogu rasti na lignoceluloznim hidrolizatima i proizvoditi mikrobne lipide. Lignocelulozna biomasa obećavajući je i jeftin supstrat zbog raznih prednosti kao što su obnovljivost, održivost te rasprostranjenost (Gan i sur., 2006, Perlack i sur., 2011). Problemi vezani uz troškove transporta i dugotrajnog skladištenja izbjegnuti su zbog dostupnosti i različitog vremena berbe sirovina (Zhu i sur., 2008). Najčešće korišteni lignocelulozni materijali su poljoprivredni i drvni ostaci kao pšenična slama, kukuruzni oklasci, zelena i suha trava, piljevina i strugotine (Sun i Cheng, 2002), a za njihovo uspješno korištenje, kao izvora fermentabilnih šećera, potrebna je prethodna predobrada i enzimaska hidroliza (Jin i sur., 2015).

Cilj ovog rada je provođenje šaržnog uzgoja plijesni *Mortierella isabellina* na hidrolizatu kukuruznih oklasaka i sinteza lipida koji bi poslužili kao sirovina za proizvodnju biodizela. Svakodnevna analiza sastava biomase i prevrele hranjive podloge provedena je s ciljem optimizacije bioprocasa sinteze lipida i povećanja učinkovitosti.

2. TEORIJSKI DIO

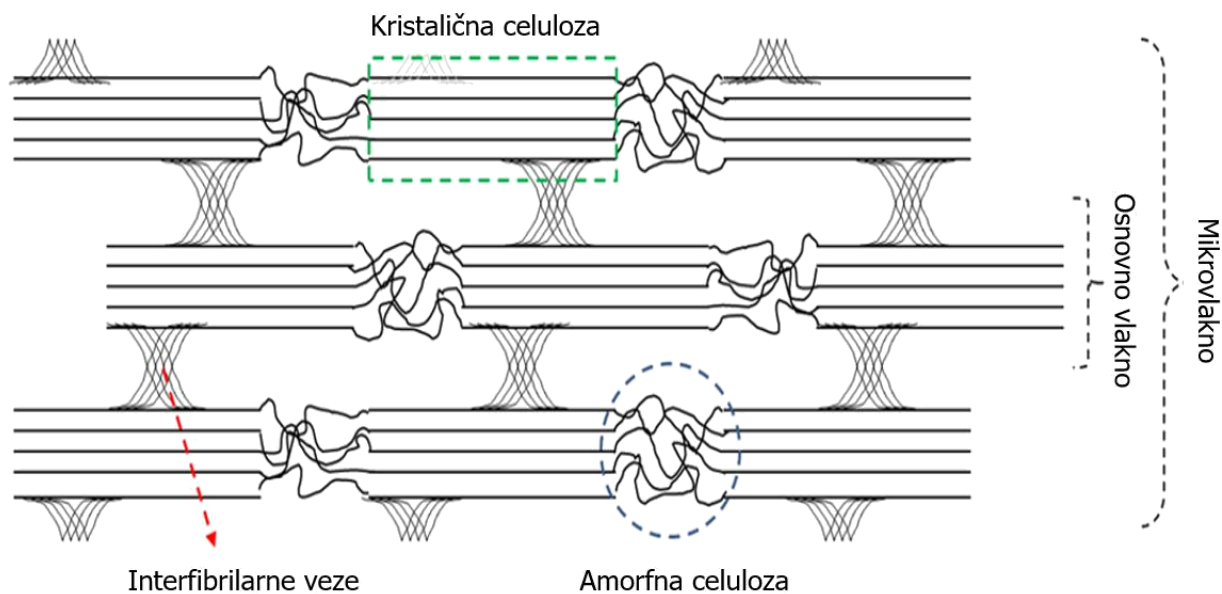
2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE

Problem korištenja prehrambenih materijala kao sirovina za proizvodnju biogoriva u biorafinerijama prve generacije potaknuo je razvoj biorafinerija druge generacije, koje kao sirovinu koriste lignoceluloznu biomasu (Sims i sur., 2010). Velika količina neželjenog lignoceluloznog otpada koja nastaje u šumarstvu, poljoprivredi i prehrambenoj industriji koristi se kao vrijedan izvor sirovina umjesto biljaka uljarica (Sun i Cheng, 2002). Lignocelulozna sirovina je zbog svog složenog sastava teško razgradiva (Jin i sur., 2015), a polisaharidi staničnih stijenki mogu se koristiti kao sirovina za proizvodnju biogoriva tek nakon hidrolize na jednostavne šećere (saharifikacija). Stanične stijenke viših biljaka su fleksibilne, ali složene strukture sastavljene od prirodnih polimera celuloze, hemiceluloze i lignina koji održavaju strukturni integritet biljnih stanica (Ragauskas i sur., 2006, Solomon i sur., 2007). Celuloza i hemiceluloza su polisaharidi građeni od različitih monosaharida, dok je lignin aromatski heteropolimer sintetiziran iz fenilpropanoidnih prekursora. Sastav i postotak ovih polimera razlikuje se ovisno o vrsti biljke, a zanimljivo je da se njihov sastav mijenja s dobi, fazom rasta i okolišnim uvjetima (Jeffries, 1994).

Udio celuloze u kukuruznim oklascima iznosi 45%, hemiceluloze 35%, a lignina 15% (Howard i sur., 2003).

2.1.1. CELULOZA

Celuloza je linearni homopolimer sastavljen od molekula monosaharida D-glukoze povezanih β -1,4 glikozidnim vezama koje tvore dugačke lance (fibrile). Lanci celuloze sadrže brojne hidroksilne skupine koje tvore vodikove veze unutar istog lanca, ali i između paralelno poredanih lanaca. Tako međusobno povezani lanci tvore osnovna celulozna vlakna. Osnovna vlakna zajedno tvore mikrovlakna (mikrofibrile), a njihov se položaj i duljina razlikuje u različitim dijelovima stanične stijenke, odnosno cijele biljke. Celuloza se unutar biljaka pojavljuje u kristaličnom i amorfnom obliku. Za razliku od prevladavajućeg kristaličnog oblika, amorfnu oblik celuloze podložniji je enzimskoj i kiselinskoj razgradnji. U lignoceluloznoj biomasi celuloza je povezana s hemicelulozom i ligninom što značajno utječe na uspješnost njene hidrolize.



Slika 1. Shematski prikaz mikroskopske strukture celuloznog vlakna (preuzeto iz Börjesson i Westman, 2015)

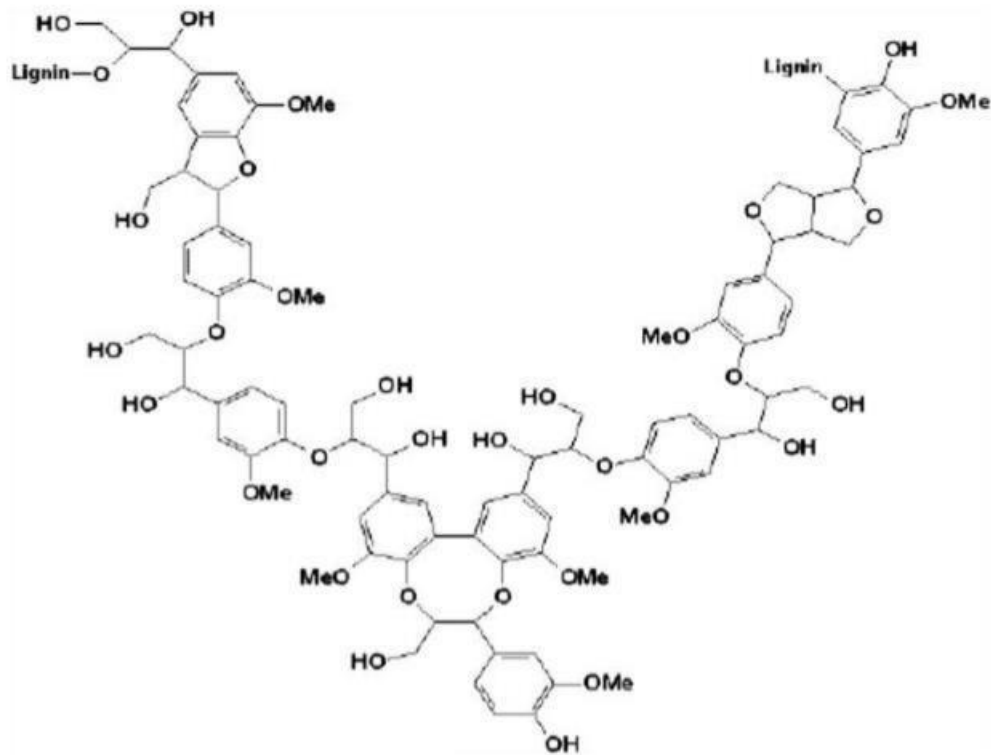
2.1.2. HEMICELULOZA

Hemiceluloza je složeni ugljikohidratni polimer i čini 25-30% ukupne suhe tvari biljke. To je polisaharid s manjom molekularnom masom od celuloze, a građen je od D-ksiloze, D-manoze, D-galaktoze, D-glukoze, L-arabinoze, 4-*O*-metilglukurona te D-galakturonske i D-glukuronske kiseline. Šećeri su međusobno povezani s β -1,4 te u manjoj mjeri s β -1,3-glikozidnim vezama (Perez i sur., 2002). Kao i celuloza, u prirodi se pojavljuje povezan s drugim biljnim polimerima koji utječu na njezinu dostupnost.

2.1.3. LIGNIN

Lignin je heteropolimer kojeg pronalazimo u staničnoj stijenci biljaka. Zbog svoje izrazito složene strukture teško je razgradljiv s enzimskim pripravcima ili kiselinama. Za razliku od celuloze, lignin se sastoji se od niza kemijski različitih podjedinica čiji sastav varira između različitih biljaka pa čak i između različitih biljnih tkiva iste biljke (Ralph i sur., 2004). Najučestalije podjedinice su *p*-hidroksifenil, gvajacil i siringil (Hosokawa i sur., 2001, Jeffries, 1994). Heterogen kemijski sastav i različite kemijske veze (ugljik-ugljik veze i eterske veze) čine lignin teško razgradivim supstratom (Hemelinck i sur., 2005). Upravo je zato glavna uloga lignina u biljkama, odnosno lignoceluloznoj biomasi, zaštita od patogenih mikroorganizama iz okoline. Lignin prisutan u lignoceluloznoj biomasi obavija celulozna vlakna i onemogućava

enzimsku hidrolizu celuloze sprječavajući fizički kontakt enzima celulaza i celuloznih vlakana što dovodi do smanjenog prinosa fermentabilnih šećera (glukoze i ksiloze). Zbog navedenih razloga predstavlja jedan od glavnih problema u proizvodnji biogoriva iz lignoceluloznih sirovina (Weng i sur., 2008).



Slika 2. Struktura lignina (preuzeto iz Bajpaj, 2016)

2.2. PREDOBRAĐA I HIDROLIZA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

Biosinteza mikrobnih lipida iz lignoceluloznih materijala sastoji se od tri osnovna koraka: predobrade sirovine, enzimske hidrolize lignocelulozne sirovine do fermentabilnih šećera i proizvodnje lipida (Ruan i sur., 2015).

2.2.1. FIZIČKA PREDOBRAĐA

Većina lignocelulozne biomase zahtijeva mehaničku predobradu radi smanjenja veličine čestica sirovine i povećanja učinkovitosti enzimske hidrolize. Neke od metoda su mljevenje, zračenje (npr. γ -zrake) i ekstruzija. Energetski zahtjevi predobrade ovise o kristaličnosti strukture i željenoj veličini čestica. Nedostatak je utrošak velike količine energije, zbog čega je proces često ekonomski neisplativ (Menon i Rao, 2012).

2.2.2. FIZIKALNO-KEMIJSKA PREDOBRAĐA

Tip predobrade koji uključuje kemijske i fizikalne metode naziva se fizikalno-kemijska predobrada. Najčešće korištene metode su: eksplozija parom, eksplozija vlakana amonijakom (AFEX) i predobrada toplom vodom (Brodeur i sur., 2011, Mosier i sur., 2005).

1. Eksplozija parom

Kod ove metode lignocelulozna biomasa se tretira visokim tlakom zasićene vodene pare, a zatim se naglo smanjuje tlak uslijed čega dolazi do dekompresije sustava. Postupak se vodi pri temperaturi 160-260 °C uz odgovarajući nadtlak (0,69-4,83 MPa) kroz kratko vrijeme, a zatim se tlak naglo spušta na atmosferski. Biomasi je potrebno držati na povišenom tlaku radi hidrolize hemiceluloze, dok visoke temperature uzrokuju slabljenje strukture lignina. Ova metoda predobrade pokazala se učinkovitom za predobradu različitih vrsta lignoceluloznih sirovina (Kurabi i sur., 2005, Ruiz i sur., 2006, Varga i sur., 2004).

2. Eksplozija vlakana amonijakom (eng. Ammonium fiber explosion, AFEX)

AFEX je proces vrlo sličan eksploziji pare. Biomasa se izlaže tekućem amonijaku pri visokoj temperaturi i tlaku kroz kratko vrijeme, a zatim se tlak spušta. Količina upotrijebljenog amonijaka iznosi 1-2 kg/kg suhe tvari biomase, temperatura 90 °C, a vrijeme zadržavanja 30 minuta. Vrlo je koristan tretman za obradu raznih vrsta trava (Zheng i sur., 2009). Neke od prednosti korištenja AFEX-a su reciklacija amonijaka iz prethodnog ciklusa obrade te jednostavnost izvedbe postupka. Nedostatak je slaba razgradnja lignina, tako da se ovom predtretmanu ne mogu izložiti lignocelulozne sirovine s velikim udjelom lignina (Taherzadeh i sur., 2008).

3. Predobrada toplom vodom

Tokom ove predobrade lignocelulozna biomasa se kuha u vodi uz visoke temperature i tlak. Ovim načinom predobrade povećava se dostupnost celuloznih vlakana te samim time povećava prinos fermentabilnih šećera (heksoza i pentoza) enzimskom hidrolizom predobrađene sirovine. Prednost ovog postupka je niska, odnosno zanemariva koncentracija inhibitora (Kim i sur., 2009).

2.3.3. KEMIJSKA PREDOBRAĐA

1. Kiselinska predobrada

Tretman sirovine kiselinom uključuje upotrebu koncentriranih kiselina za razgradnju kristalične celuloze i razrijeđenih kiselina za hidrolizu amorfne celuloze. Najčešće korištena kiselina je sumporna kiselina (72% H₂SO₄), koja se koristi za različite vrste biomase (Digman i sur., 2010, Li i sur., 2010). Također se koriste i druge kiseline, kao što su klorovodična kiselina (HCl), fosforna kiselina (H₃PO₄) i dušična kiselina (HNO₃). Prednost postupka je uspješna hidroliza hemiceluloze (Zhang i sur., 2007). Ovisno o uvjetima provođenja (temperatura, tlak) i sastavu sirovine, predobrada može potrajati nekoliko minuta do nekoliko sati (Saha i sur., 2005).

2. Alkalna predobrada

Alkalna predobrada uključuje korištenje kemikalija kao što su natrijeva, kalcijeva ili amonijeva lužina (NaOH, CaOH₂, NH₄OH₂). Lužine uzrokuju razgradnju glikozidnih lanaca i estera što posljedično uzrokuje strukturne promjene lignina, djelomičnu dekristalizaciju celuloze i hidrolizu hemiceluloze (Cheng i sur., 2010, Ibrahim i sur., 2011, McIntosh i sur., 2010). Tijekom alkalne predobrade biomasa se namače u alkanj otopini uz miješanje kod određene temperature kroz određeni vremenski period.

Vrlo je učestala kombinacija kiselinske i alkalne predobrade radi uspješnije hidrolize lignina i hemiceluloze, a prije samog koraka enzimske hidrolize potrebno je isprati zaostale kiseline i lužine te ukloniti nastale inhibitore (Manon i Rao, 2012).

2.2.4. BIOLOŠKA PREDOBRAĐA

U biološkoj predobradi koriste se razni mikroorganizmi (bakterije i gljive) koji razgrađuju lignoceluloznu sirovinu i čine ju prikladnijom za naknadnu razgradnju enzimima (Sun i sur., 2008). Često se koriste gljive bijelog truljenja kao *Phanerochaete chrysosporium*, *Daedalea flavida* i *Phlebia fascicularia* (Howard i sur., 2003, Arora i sur., 2002). Biološka predobrada vrlo je obećavajuća tehnika s nizom prednosti kao što su nizak utrošak energije i kemikalija te ekološki prihvatljiv način rada. Međutim, osnovni nedostaci su spora mikrobiološka razgradnja biomase, pažljiva kontrola uvjeta uzgoja i potreban veliki prostor za provedbu predobrade. Osim toga većina gljiva uz lignin razgrađuje celulozu i hemicelulozu, smanjujući time njihov udio u biomasi (Eggeman i sur., 2005).

2.2.5. ENZIMSKA HIDROLIZA PREDOBRAĐENE SIROVINE

S ciljem hidrolize strukturnih ugljikohidrata do fermentabilnih šećera najčešće se koriste celulolitički enzimi. Uz celulolitičke enzime, pomoću kojih iz celuloze dobivamo željenu glukozu,

koriste se i hemicelulaze za hidrolizu hemiceluloze do pretežno ksiloze i glukoze. Najčešće korišteni celulolitički enzimi su enzimi mikrobnog podrijetla iz plijesni *Trichoderma reesei* (Hendriks i Zeeman, 2009). Upravo je enzimska hidroliza polisaharida iz predobrađene sirovine u fermentabilne šećere prvi stupanj dvostupanjskog procesa proizvodnje biogoriva iz lignoceluloznih sirovina. U drugom stupnju se dobiveni lignocelulozni hidrolizat koristi kao izvor ugljika za rast radnog mikroorganizma i sintezu proizvoda (Choudhary i sur., 2015).

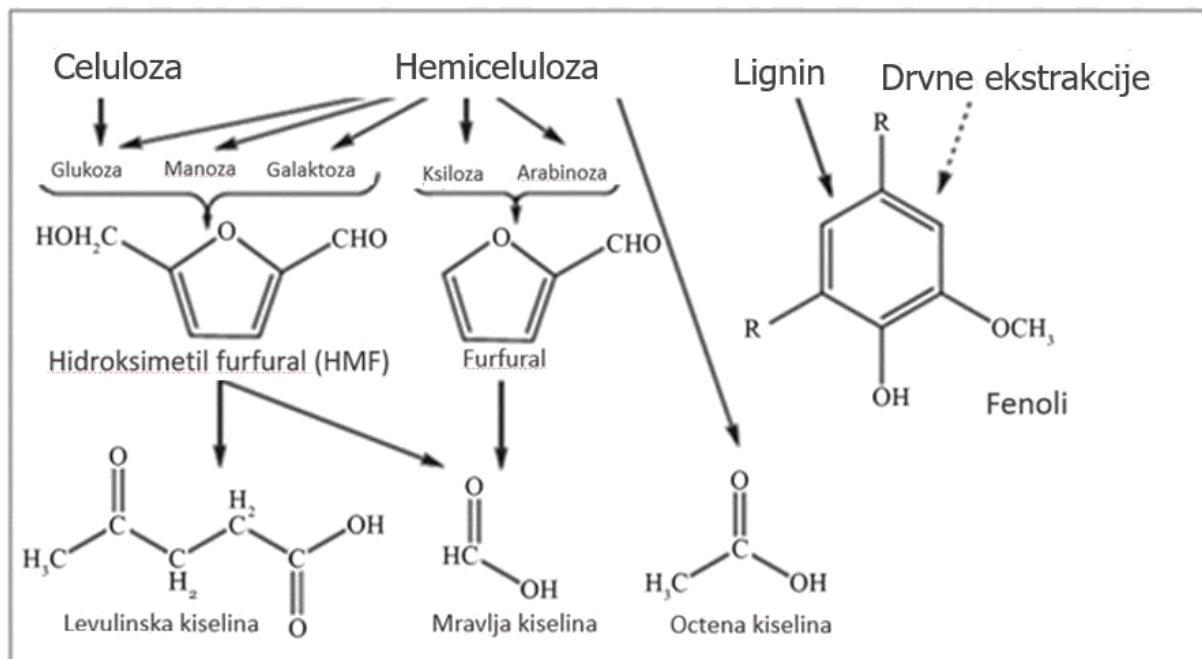
2.3. INHIBITORI I NUSPROIZVODI

2.3.1. INHIBITORI

Neželjena niska produktivnost procesa, odnosno slab prinos lipida najčešće je posljedica inhibicije celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima te mikroorganizma producenta inhibitorima prisutnim u lignoceluloznim hidrolizatima.

Tijekom predobrade sirovine nastaju mnogi inhibitori različitog kemijskog sastava koji uključuju slabe kiseline (octena kiselina, mravlja kiselina i levulinska kiselina), derivate furana (furfural i hidroksimetilfurfural (HMF)) i fenolne spojeve (vanilin i siringaldehid). Nastali inhibitori inhibiraju celulaze i hemicelulaze te ometaju rast stanica radnog mikroorganizma i posljedično smanjuju nakupljanje lipida.

Oleaginozna plijesan *Mortierella isabellina* pokazala se vrlo otpornom na inhibitore lignoceluloznih hidrolizata kao što su furfural, HMF i fenolni spojevi. Utjecaj inhibitora na rast i potrošnju supstrata vidljiv je na početku uzgoja, ali nakon brze prilagodbe mikroorganizma na inhibitore u podlozi rast stanica i akumulacija lipida značajno su se poboljšali. *Mortierella isabellina* može rasti u prisutnosti furfurala ($\sim 1 \text{ gL}^{-1}$), hidroksimetilfurfurala ($\sim 2,5 \text{ gL}^{-1}$), ferulinske ($\sim 0,5 \text{ gL}^{-1}$) i kumarne kiseline ($\sim 0,5 \text{ gL}^{-1}$) bez značajnije promjene brzine rasta. U koncentracijama većima od toleriranih inhibitori počinju utjecati na mikrobni metabolizam, pri čemu dolazi do smanjenja ili potpunog zaustavljanja rasta biomase i sinteze lipida (Ruan i sur., 2015).



Slika 3. Proizvodi predobrade lignocelulozne sirovine (preuzeto iz Jonsson i sur., 2013).

2.3.2. NUSPROIZVODI U PROIZVODNJI BIODIZELA IZ LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

Ispativost procesa proizvodnje biodizela iz lignoceluloznih sirovina može se povećati prodajom nastalih nusproizvoda biorafinerije. Lignin se može koristiti za proizvodnju toplinske ili električne energije te za proizvodnju kemikalija i goriva. U slučaju uzgoja oleaginoznih organizama, nakon ekstrakcije lipida, kolač nepatogene biomase može se prodati kao hrana za životinje ili kao sirovina u proizvodnji biopolimera (Jin i sur., 2015, Zakzeski i sur., 2010). Višestruko nezasićene masne kiseline mogu se koristiti kao dodatak hrani i u proizvodnji nutraceutika.

2.4. OLEAGINOZNI MIKROORGANIZMI I BIOSINTEZA LIPIDA

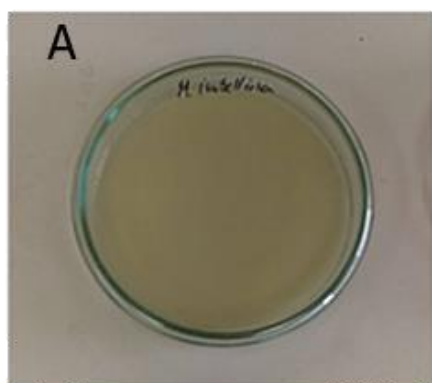
Mikroorganizmi koji imaju sposobnost nakupljanja značajnih količina lipida u obliku neutralnih triacilglicerola nazivaju se oleaginozni mikroorganizmi (Koutinas i sur., 2011), a obuhvaćaju različite vrste kvasaca, algi, plijesni i bakterija. Za razliku od neoleaginoznih organizama, koji sintetiziraju značajno manje količine lipida prvenstveno potrebne za sintezu membrana u stanici, oleaginozni mikroorganizmi veći dio lipida pohranjuju kao rezervni materijal stanice (Ratledge, 2004). Lipidi čine više od 20 % suhe tvari biomase oleaginoznih mikroorganizama (Xu i sur., 2013), a najzastupljenije masne kiseline u lipidima su: miristinska

(C14:0), palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1), linoleinska (C18:2) i linolenska (C18:3) (Ruan i sur., 2012). Udio pojedinih masnih kiselina razlikuje se ovisno o mikroorganizmu producentu i izvoru ugljika za rast (Xu i sur., 2013).

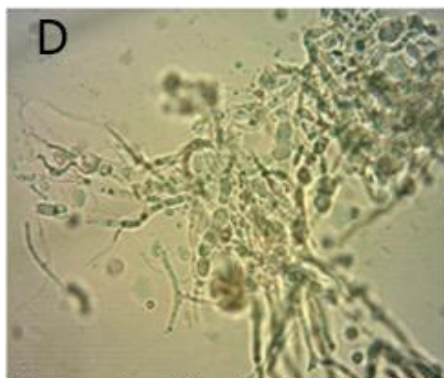
Sastav masnih kiselina u lipidima mikrobnog podrijetla sličan je repičinom ulju koje se koristi kao najčešća sirovina za proizvodnju biodizela prve generacije. Upravo zbog toga su mikrobnii lipidi alternativna sirovina za proizvodnju biodizela (Ruan i sur., 2012).

2.4.1. MORTIERELLA ISABELLINA

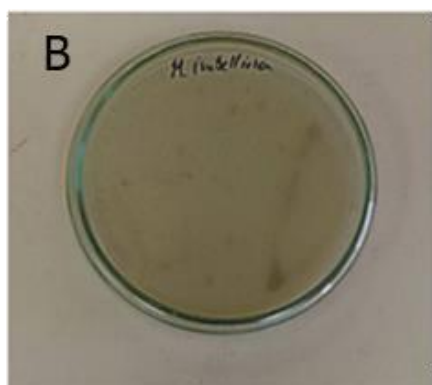
Rod *Mortierella* su plijesni tla koje pripadaju redu *Mortierellales* unutar pododjeljka *Mucoromycotina*, a odjeljka *Zygomycota* (Hibbett i sur., 2007). Saprofitni su organizmi koji se mogu pronaći u tlu, na trulom lišću i drugim organskim materijalima (Webster i Weber, 2007). Filamentozna gljiva *Mortierella isabellina* uspješno se uzgaja na kemijskim definiranim podlogama, ali i na hidrolizatima raznih lignoceluloznih sirovina kao što su primjerice kukuruzni oklasci. Prilikom uzgoja uz limitaciju rasta izvorom dušika plijesan *Mortierella isabellina* učinkovito previre fermentabilne šećere, odnosno izvor ugljika, uz nakupljanje značajnih količina staničnih lipida čiji udio može iznositi do 80%. Najpogodniji izvor ugljika za uzgoj plijesni *Mortierella isabellina* je glukoza, zatim ksiloza, fruktoza i alkohol glicerol, dok se slabiji rast i sinteza lipida postiže na saharozi (Chatzifragkou i sur., 2010, Ruan i sur., 2012, Xu i sur., 2013). Također, neizostavan sastojak podloge je dušik, a kao najpogodniji izvor dušika prilikom uzgoja ove plijesni pokazao se kvašćev ekstrakt i diamonijev sulfat u omjeru 1:1 (Gao i sur., 2013). Zadovoljavajuća temperatura za uzgoj plijesni *Mortierella isabellina* kreće se od 25 °C do 30 °C , a optimalna pH vrijednost podloge je u rasponu 4,5-6,0 (Ruan i sur., 2012).



2. dan uzgoja, micelij plijesni



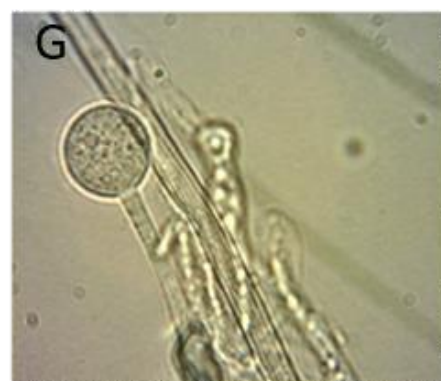
2. dan uzgoja, mikroskopski prikaz micelija (400x)



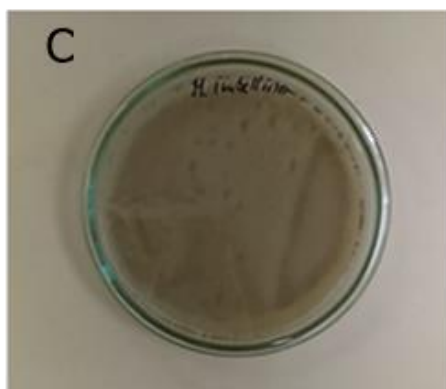
3. dan uzgoja, početak sporulacije



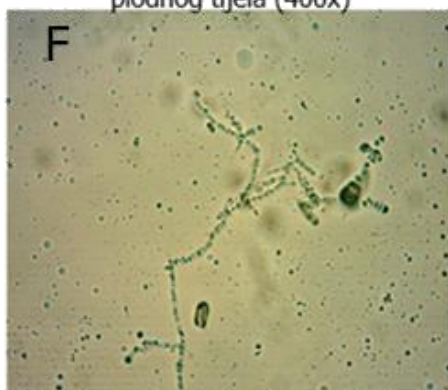
3. dan uzgoja, mikroskopski prikaz plodnog tijela (400x)



3. dan uzgoja, mikroskopski prikaz plodnog tijela (1000x)



6. dan uzgoja, formirane spore

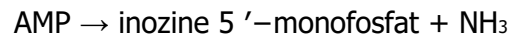


6. dan uzgoja, mikroskopski prikaz spora (400x)

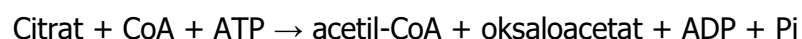
Slika 4. Rast plijesni *Mortierella isabellina* na čvrstoj PDA podlozi (A, B, C) i mikroskopski preparati (D, E, F, G) (vlastita fotografija)

2.4.2. BIOSINTEZA LIPIDA

Za unaprjeđenje procesa proizvodnje, tj. nakupljanja lipida potrebno je objasniti biokemijski put sinteze samih lipida u oleaginoznim organizmima. Kao što je već prije spomenuto dobiveni lipidi su u obliku triacilglicerola (esteri alkohola glicerola i masnih kiselina). Akumulaciji lipida unutar stanice prethodi smanjenje brzine rasta uslijed limitacije jednom od komponenti podloge (najčešće limitacija dušikom) u prisutnosti izvora ugljika. U takvim uvjetima izvor ugljika se koristi za sintezu lipida, dok kod neoleaginoznih mikroorganizama dolazi do nakupljanja rezervnih polisaharida. Kada je koncentracija preostalog dušik u podlozi vrlo niska, aktivira se enzim AMP deaminaza i razgrađuje AMP (adenozin monofosfat) uz nastajanje amonijaka (NH_3), odnosno potrebnog dušika. Aktivnost ovog enzima u uvjetima limitacije dušikom povećava se i do pet puta.



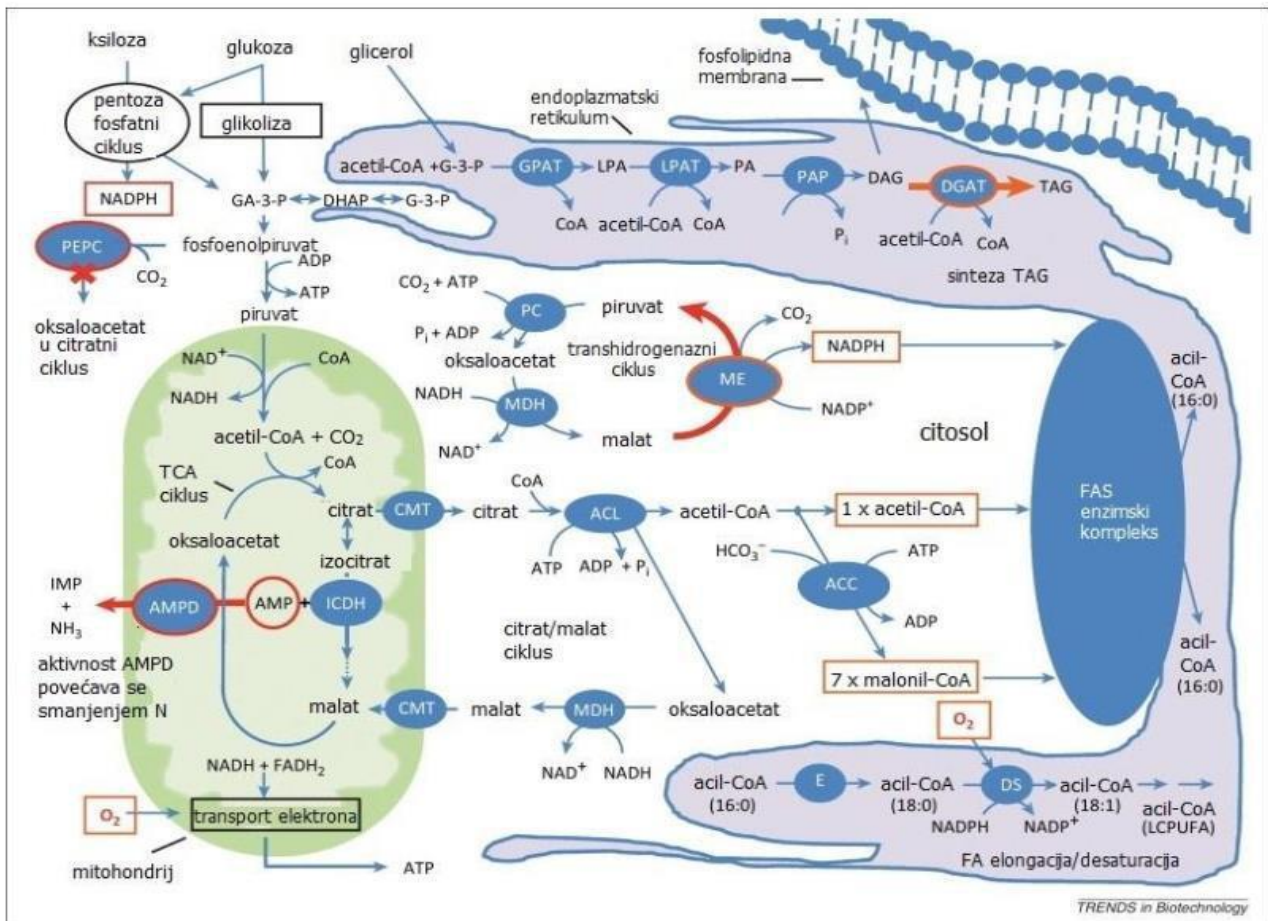
Kao rezultat smanjenja koncentracije AMP-a ciklus limunske kiseline se usporava i dolazi do nakupljanja izocitrata zbog smanjene aktivnosti izocitrat dehidrogenaze, čija je aktivnost regulirana koncentracijom AMP-a. Posljedično dolazi do nakupljanja citrata u mitohondriju stanice. Važno je napomenuti da su oleaginozni mikroorganizmi većinom eukarioti i imaju mitohondrij u kojem se odvija ciklus limunske kiseline. Akumulirani citrat se zatim iz mitohondrija prenosi u citosol stanice pomoću citrat-malat translokaze, gdje se pomoću citrat liaze i utroška jedne molekule ATP-a (adenozin trifosfat) cijepa u acetil-CoA (acetil koenzim A) i oksaloacetat.



Oksaloacetat se prevodi malat dehidrogenazom u malat koji se može transportirati u mitohondrij citrat-malat translokazom ili se prevodi u piruvat uz sintezu NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) i CO_2 pomoću malatnog enzima.



Nastali acetil-CoA i NADPH proizvedeni kao posljedica limitacije dušikom koriste se u sintezi masnih kiselina, odnosno triacilglicerola. Udio pojedinih masnih kiselina ovisi o vrsti oleaginoznog mikroorganizma, a kod kvasaca i plijesni većina nastalih masnih kiselina ima šesnaest ili osamnaest ugljikovih atoma (C16, C18), a najmanje zastupljena masna kiselina je linolenska (C18:3) koje ima manje od 20% (Ratledge, 2004).



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: gliceraldehid-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 5. Metabolički put biosinteze lipida (preuzeto iz Jin i sur., 2015.)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. RADNI MIKROORGANIZAM

Korišteni radni mikroorganizam je plijesan *Mortierella isabellina*, soj DSM 1414, iz zbirke organizama *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ; Braunschweig, Njemačka).

3.1.2. SIROVINE I KEMIKALIJE KORIŠTENE U PRIPREMI HRANJIVE PODLOGE

Komponente za pripremu hranjive podloge navedene su u Tablici 1.

Tablica 1. Komponente hranjive podloge korištene za šaržni uzgoj plijesni *Mortierella isabellina*

KOMPONENTA HRANJIVE PODLOGE	PROIZVOĐAČ
Hidrolizat kukuruznog oklaska	Hrvatsko Zagorje, Hrvatska
Kvaščevo ekstrakt	Roth, Austrija
Diamonijev sulfat	Kemika, Hrvatska
Kalijev dihidrogenfosfat	Kemika, Hrvatska
Natrijev dihidrogenfosfat	Kemika, Hrvatska
Natrijev hidrogenfosfat	Kemika, Hrvatska
Magnezijev sulfat heptahidrat	Kemika, Hrvatska
Kalcijev klorid dihidrat	Kemika, Hrvatska
Željezov (III) klorid sekstahidrat	Kemika, Hrvatska
Cinkov sulfat heptahidrat	Merck, SAD
Bakrov sulfat pentahidrat	Kemika, Hrvatska
Kobaltov nitrat monohidrat	Kemika, Hrvatska
Manganov sulfat pentahidrat	Sigma, SAD
PDA agar	Difco, USA

3.1.3. OSTALE KEMIKALIJE KORIŠTENE U ISTRAŽIVANJU

Osim navedenih komponenti podloge, ostale kemikalije korištene tokom istraživanja navedene su u Tablici 2.

Tablica 2. Kemikalije korištene u istraživanju

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
Citratni pufer	Kemika, Hrvatska
Enzimski pripravak (Cellic CTec2)	Sigma Aldrich, SAD
Ampicilin	Carl Roth, Austrija
Kloroform	Macron Fine Chemicals, SAD
Metanol	J. T. Backer, SAD
Cinkov sulfat heptahidrat	Merck, SAD
NaCl	Kemika, Hrvatska
Sudan crveno B	Kemika, Hrvatska
Fosforna kiselina	Acros Organics, Belgija
Etanol (96 %)	Kemika, Hrvatska

3.1.4. HRANJIVA PODLOGA

Podloga korištena za šaržni uzgoj plijesni sadržavala je enzimski hidrolizat predobrađenog kukuruznog oklasaka. Kukuruzni oklasak predobrađen je s 2% otopinom NaOH tijekom 18 h pri 50°C. Ostale komponente podloge navedene su u Tablici 3. Molarni omjer izvora ugljika i dušika u podlozi (C:N) iznosio je 50 mol mol⁻¹.

Tablica 3. Sastav hranjive podloge za šaržni uzgoj plijesni *Mortierella isabellina*

KOMPONENTA HRANJIVE PODLOGE	KONCENTRACIJA (g L⁻¹)
Kvašćev ekstrakt	1
Kalijev dihidrogenfosfat	7
Dinatrijev hidrogenfosfat	2
Magnezijev sulfat heptahidrat	1,5
Kalcijev klorid dihidrat	0,1
Željezov (III) klorid heksahidrat	0,08
Cinkov sulfat heptahidrat	0,001
Kobaltov nitrat monohidrat	0,001
Bakrov sulfat pentahidrat	0,001
Manganov sulfat pentahidrat	0,001
Diamonijev sulfat	0,82

3.1.5. UREĐAJI I OPREMA

3.1.5.1 UREĐAJ ZA VISOKO DJELOTVORNU TEKUĆINSKU KROMATOGRAFIJU (HPLC)

Koncentracija glukoze i ksiloze u supernatantima uzoraka izuzetih tijekom uzgoja određena je pomoću uređaja za kromatografiju Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} (Shimadzu; Kyoto, Japan).

Uređaj se sastoji od: crpke (LC-10ADVP), otplinjača (DGU-14A), automatskog uzorkivača (SIL-10ADVP), uređaja za grijanje kolone (CTO-10AVP), analitičke kolone (ionsko - izmjenjivačka kolona Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm i.d., 9 μm; SigmaAldrich Co. (LLC), St. Louis, SAD) s predkolonom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm i.d., 9 μm; Sigma-Aldrich Co. (LLC), St. Louis, SAD), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10AVP) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10).

3.1.5.2 OSTALA OPREMA I UREĐAJI

Osim navedenih uređaja korišten je osnovni laboratorijski pribor odnosno stakleno posuđe, plamenici, hladnjak (+4 °C), zamrzivač (-20 °C), osobno računalo, mikroskop, boca s dušikom i uređaji navedeni u Tablici 4.

Tablica 4. Uređaji korišteni u istraživanju.

UREĐAJ	PROIZVOĐAČ, ZEMLJA PROIZVODNJE
Tehnička vaga	Tehnica ET – 1111, Slovenija
Analitička vaga	Sartorius Group, Njemačka
Tresilica	Sartorius Group, Njemačka
Magnetska miješalica	Tehnica ET – 1111, Slovenija
Sušionik	Instrumentaria ST-50, Hrvatska
Centrifuga	Sanyo, Velika Britanija

3.2. METODE

3.2.1. UZGOJ ČISTE KULTURE PLIJESNI

Kultura plijesni *Mortierella isabellina* uzgojena je na čvrstoj podlozi s krumpirovim bujonom (PDA). Podloga je pripravljena otapanjem 20 gL⁻¹ agara i iste količine glukoze u krumpirovom bujonu. Nakon formiranja spora (10-14 dana) kultura je čuvana na +4 °C, a suspenzija spora plijesni dobivena je struganjem mikrobiološkom ušicom s površine podloge. Suspenzija je profiltrirana kroz sterilnu gazu i korištena za uzgoj u tikvicama.

Krumpirov bujon pripremljen je kuhanjem 150 g narezanog krumpira u 0,5 L vode. Nakon kuhanja bujon je profiltriran kroz sterilnu gazu, a dobiveni filtrat je korišten za pripremu podloge.

3.2.2. UZGOJ PLIJESNI U TIKVICAMA

Uzgoj plijesni za inokulum provodio se preko noći u podlozi dobivenoj otapanjem 20 gL⁻¹ glukoze i 4 gL⁻¹ kvašćevog ekstrakta u krumpirovom bujonu. 100 mL hranjive podloge naciepljeno je s 20 mL prethodno dobivene otopine spora koncentracije $7,38 \cdot 10^7$ spora po mililitru.

3.2.3. PRIPREMA HIDROLIZATA KUKURUZHNIH OKLASAKA ZA UZGOJ PLIJESNI

Predobrađena usitnjena lignocelulozna sirovina podvrgnuta je enzimskoj hidrolizi u tikvici. Koncentracija suhe tvari sirovine iznosila je 150 gL^{-1} , a koncentracija celulitičkih enzima Cellic CTec2 30 FPU po gramu glukana u sirovini (7 mL enzimskog pripravka) (Slika 6.). Enzimski pripravak prethodno je filtriran kroz mikrobiološki filter (veličine pora $0,2 \mu\text{m}$), a zbog dodatne zaštite od kontaminacije dodan je i antibiotik ampicilin (60 mgL^{-1}). Reakcija se provodila uz 50 mM citratni pufer (pH 5,0). Enzimska hidroliza provedena je kroz 72 sata pri $50 \text{ }^\circ\text{C}$ na magnetskoj miješalici. Suspenzija je prije uzgoja centrifugirana, a talog odbačen.



Slika 6. Kukuruzni oklasci prije i nakon enzimske hidrolize (vlastita fotografija)

3.2.4. UZGOJ PLIJESNI U TIKVICAMA NA LIGNOCELULOZONOM HIDROLIZATU

Dobiveni lignocelulozni hidrolizat korišten je kao izvor ugljika za uzgoj plijesni *Mortierella isabellina* i proizvodnju lipida. Uzgoj je proveden u Erlenmayerovim tikvicama na tresilici (140 o min^{-1}) kroz 20 dana pri $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Korištene su tikvice volumena 300 mL u kojima je volumen sterilne hranjive podloge iznosio 40 mL. Tikvice su naciepljene s prekonoćnom kulturom plijesni *Mortierella isabellina* volumena 4 mL (10% volumena podloge). Tijekom uzgoja svaki dan se izuzimao uzorak i provodila se analiza prevrele podloge s ciljem određivanja količine nakupljenih lipida i potrošenog izvora ugljika (glukoze i ksiloze). Sadržaj tikvice filtrirao se vakuum filtracijom, a zatim su filtrat i filtracijski kolač (biomasa plijesni) bili podvrgnuti daljnjim analizama.

3.2.5. ANALIZA UZORAKA

3.2.5.1. ODREĐIVANJE UDJELA LIPIDA

Biomasa dobivena filtracijom podvrgnuta je sušenju pri 50 °C kroz 24 h. Udio vlage u uzorku određen je naknadno dosušivanjem uzoraka pri 105 °C do konstantne mase. Izmjerena je masa uzorka i određena koncentracija biomase u podlozi. Za određivanje udjela lipida dobivenu biomasu bilo je potrebno usitniti u tarioniku u fini prah, a zatim je odvagano po 200 mg u epruvetu za ekstrakciju. Ekstrakcija lipida provedena je smjesom otapala kloroforma i metanola prema propisu Schneitera i Dauma (2006) i Folch i sur. (1957). U svaku epruvetu za ekstrakciju dodano je po 2 mL metanola, 0,3 mL vode i 4 mL kloroforma. Ekstrakcija je provedena preko noći na tresilici (140 o min⁻¹). Dobivena suspenzija je zatim filtrirana kroz sinter lijevak uz ispiranje filtracijskog kolača sa smjesom otapala korištenih za ekstrakciju radi što boljeg iskorištenja. Proteini u ekstraktu uklonjeni su taloženjem s 0,1% NaCl-om (20% volumena filtrata). Nakon dodatka NaCl-a sadržaj u epruveti promiješan je na vorteksu. Nakon odvajanja kloroformske faze s lipidima i vodene faze, istaloženi proteini su se nalazili na granici između dvije faze. Donja kloroformska faza izdvojenja je pažljivo pomoću plastične šprice s iglom i premještena u suhu izvaganu epruvetu. Otapalo iz ekstrakta uklonjeno je propuhivanjem plinovitim dušikom. Lipidi su dodatno osušeni kroz 4 h na 100 °C radi uklanjanja eventualno zaostale vode i organskih otapala, a potom izvagani. Udio lipida u biomasi plijesni *Mortierella isabellina* izračunat je prema jednadžbi (1).



Slika 7. Epruveta s ekstrahiranim lipidima (vlastita fotografija)

$$w(L) = \frac{\text{---}}{\text{---}} * 100 (\%) \quad (1).$$

m_o = masa epruvete s lipidima (g)

m_p = masa prazne epruvete (g)

m_x = masa biomase plijesni (g)

$w_{H_2O/x}$ = udio vlage u biomasi plijesni (%)

Biomasa plijesni korigirana je za udio vlage zaostao nakon sušenja pri 50 °C dodatnim sušenjem pri 105 °C prema jednadžbi (2):

$$w_{H_2O/x} = \left(1 - \frac{\text{---}}{\text{---}}\right) * 100 (\%) \quad (2).$$

m prije sušenja = masa biomase prije sušenja (g)

m poslije sušenja = masa biomase nakon sušenja na 105 °C (g)

3.2.5.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FERMENTABILNIH ŠEĆERA POMOĆU TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE UČINKOVITOSTI (HPLC)

HPLC metodom analizirani su svi uzorci izuzimani tokom uzgoja radi praćenja koncentracije ksiloze i glukoze. Prije analize potrebno je u uzorcima hranjive podloge ukloniti proteine. Proteini su uklonjeni taloženjem dodatkom 10% otopine cinkova sulfata heptahidrata. Hranjiva podloga i $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ pomiješani su u omjeru 1:1 (vol/vol). Taloženje se provodilo 10 minuta, a zatim su se istaloženi proteini uklonili centrifugiranjem. Supernatanti su razrijeđeni destiliranom vodom još pet puta i filtrirani u vijalice kroz filter za šprice veličine pora 0,22 μm . Zatim su pripremljeni uzorci podvrgnuti analizi na HPLC-u. Koncentracija šećera izračunata je prema jednadžbi baždarnih pravaca. Baždarni pravci dobiveni su analizom

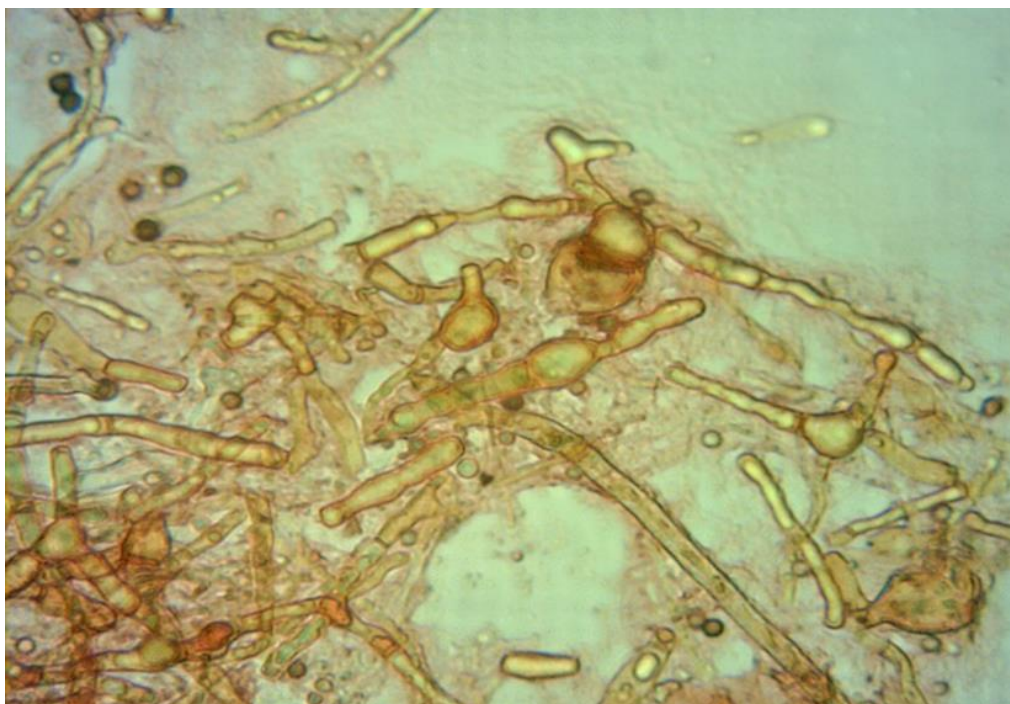
standardnih otopina glukoze i ksiloze (0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 5,0, 7,0, 10,0 $g L^{-1}$). Kao pokretna faza tokom analize korištena je otopina fosforne kiseline u vodi (0,1% vol/vol), temperatura kolone iznosila je 55°C, tlak 30 bara, a injektirano je 20 μL uzorka, odnosno otopina standarda. Vremena zadržavanja pojedinih šećera na koloni, kao i jednadžbe pravaca potrebnih za izračun koncentracija navedeni su u Tablici 5.

Tablica 5. Vremena zadržavanja i jednadžbe pravca glukoze i ksiloze.

ŠEĆER	VRIJEME ZADRŽAVANJA (t_R)	JEDNADŽBA PRAVCA
Glukoza	13,093 min	$y = 377242,1858x - 4487,0600$
Ksiloza	13,888 min	$y = 362057,0878x + 5598,6137$

3.2.5.3. BOJANJE LIPIDA U UZORCIMA

Pred kraj uzgoja provelo se bojanje lipida u uzorcima prevrele podloge. Pomoću mikrobiološke ušice uzet je mali dio prevrele podloge i nanesen na predmetnicu. Uzorak je osušen na zraku i fiksiran provlačenjem predmetnice kroz plamenik. Na predmetnicu s uzorkom stavljeno je par kapi boje Sudan crveno B otopljene u etanolu. Nakon 5 minuta uzorak je ispran s etanolom radi uklanjanja viška boje. Preparat je mikroskopiran pri povećanju od 400 puta radi detekcije lipida. Nakupine lipida unutar micelija poprimile su žuto-smeđe obojenje.



Slika 8. Mikroskopski preparat staničnih nakupina lipida plijesni *Mortierella isabellina* obojan s Sudan crvenim B (400x) (vlastita fotografija)

3.2.5.4. PRORAČUN PARAMETARA USPJEŠNOSTI BIOPROCESA

Prvi pokazatelj uspješnosti bioprocesa je koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu koji se računa prema jednadžbi (3):

$$Y_{Xb/S} = \frac{X_b - X_0}{S_0 - S} \quad (\text{gg}^{-1}) \quad (3).$$

X_b = koncentracija biomase bez lipida (gL^{-1})

S_0 = koncentracija supstrata na početku uzgoja (gL^{-1})

S = koncentracija supstrata (gL^{-1})

Koeficijent pretvorbe supstrata u lipide nastalih tijekom uzgoja računat je prema jednadžbi (4):

$$Y_{L/S} = \frac{W_L \cdot X}{S_0 - S} \quad (\text{gg}^{-1}) \quad (4).$$

W_L = udio lipida u biomasi (%)

X = koncentracija biomase (gL^{-1})

Produktivnost sinteze biomase bez lipida izračunata je prema jednadžbi (5), a produktivnost sinteze lipida izračunata je prema jednadžbi (6):

$$Pr_{Xb} = \frac{X_b - X_0}{t_u} \quad (\text{gL}^{-1}\text{dan}^{-1}) \quad (5).$$

X_0 = koncentracija biomase bez lipida na početku uzgoja (gL^{-1})

t_u = ukupno vrijeme procesa (dan)

$$Pr_L = \frac{W_L \cdot X_b - W_L \cdot X_0}{t_u} \quad (\text{gL}^{-1}\text{dan}^{-1}) \quad (6).$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju proveden je uzgoj oleaginozne plijesni *Mortierella isabellina* na tresilici kroz 20 dana pri optimalnoj temperaturi od 30 °C i pH 5,0 optimalnom za rast i sintezu lipida (opisano u poglavlju 3.2.4.). Uzgoj se provodio u 24 tikvice u kojima su vladali jednaki uvjeti, a svakih 24 sata uzgoja izuzimana je po jedna ili dvije tikvice radi određivanja koncentracije izvora ugljika te sastava i koncentracije biomase. Uzgoj je započeo u optimalnim uvjetima s dovoljnom koncentracijom fermentabilnih šećera (glukoza i ksiloza) kao izvorom ugljika i različitih kompleksnih ili anorganskih izvora ostalih biogenih elemenata. Izvor dušika u podlozi bio je kvašćev ekstrakt i diamonijev sulfat. Plijesan koja je podvrgnuta istraživanju oleaginozni je mikroorganizam i ima sposobnost nakupljanja staničnih lipida u uvjetima limitacije rasta nekim od biogenih elemenata podloge (npr. dušik, fosfor, željezo itd).

Limitacija rasta stanice najčešće je uzrokovana limitacijom izvorom dušika, odnosno nakupljanje lipida započinje kada koncentracija dušika u podlozi padne ispod 10% početne vrijednosti uz uvjet da je koncentracija izvora ugljika u suvišku. Oleaginozni mikroorganizmi tada asilimilirani izvor ugljika usmjeravaju u sintezu lipida, za razliku od neoleaginoznih koji troše ugljikohidratni supstrat za sintezu polisaharida (npr. škrob, glikogen, trehaloza itd.), odnosno rezervnih tvari u organizmu (Ratledge, 2004.).

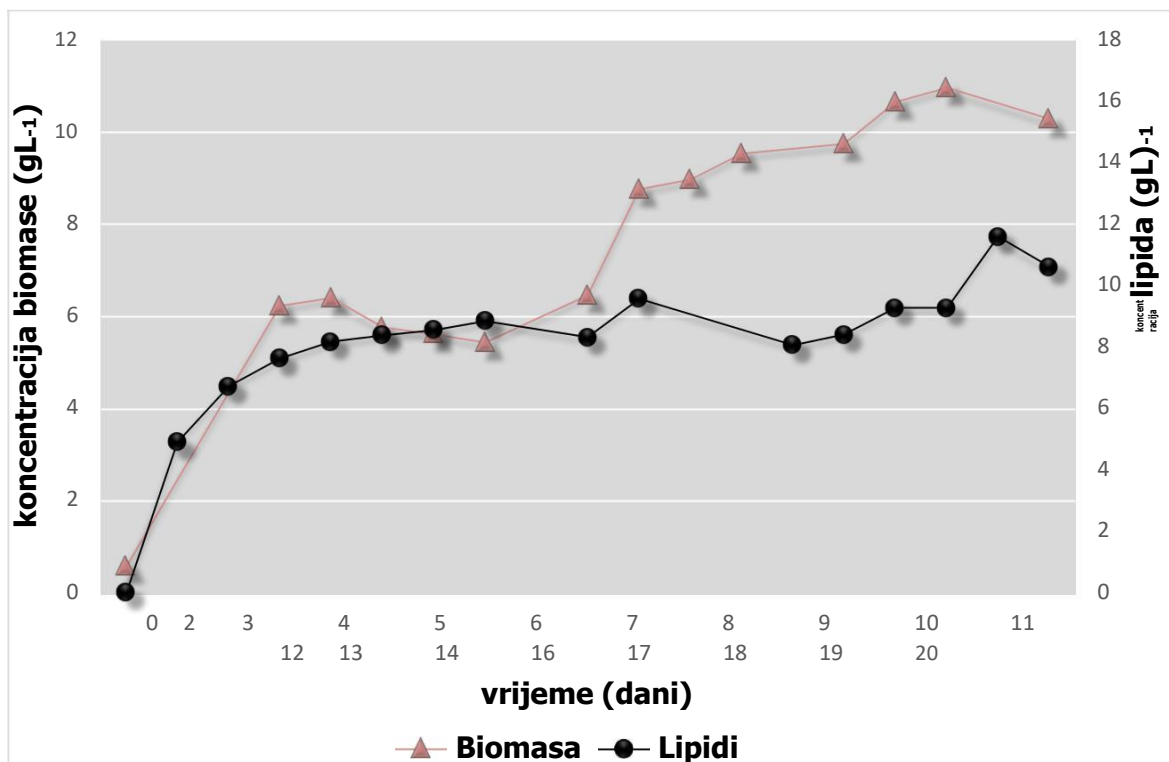
Izvor ugljika u ovom istraživanju dobiven je hidrolizom kukuruznih oklasaka iz područja Hrvatskog Zagorja. Hidroliza sirovine prethodno je opisana u poglavlju 3.2.3., a fermentabilni šećeri koji su prevladali u podlozi su glukoza i ksiloza. U uzorcima prevrele podloge tokom istraživanja praćena je promjene njihove koncentracije HPLC-om (3.2.5.2). Osim potrošnje izvora ugljika, praćen je udio nakupljenih lipida i rast biomase prikazanih na Slici 9. i 10.

Prinos biomase plijesni s lipidima iznosio je 20,251 gL⁻¹, a prinos samih lipida 10,569 gL⁻¹. Harde i sur. (2016) proveli su slično istraživanje uzgoja s plijesni *Mortierella isabellina* na glukozi i ksilozi kao izvoru ugljika i dobili gotovo iste vrijednosti prinosa biomase i lipida. Ostali izračunati parametri uspješnosti bioprocasa prikazani su u Tablici 6.

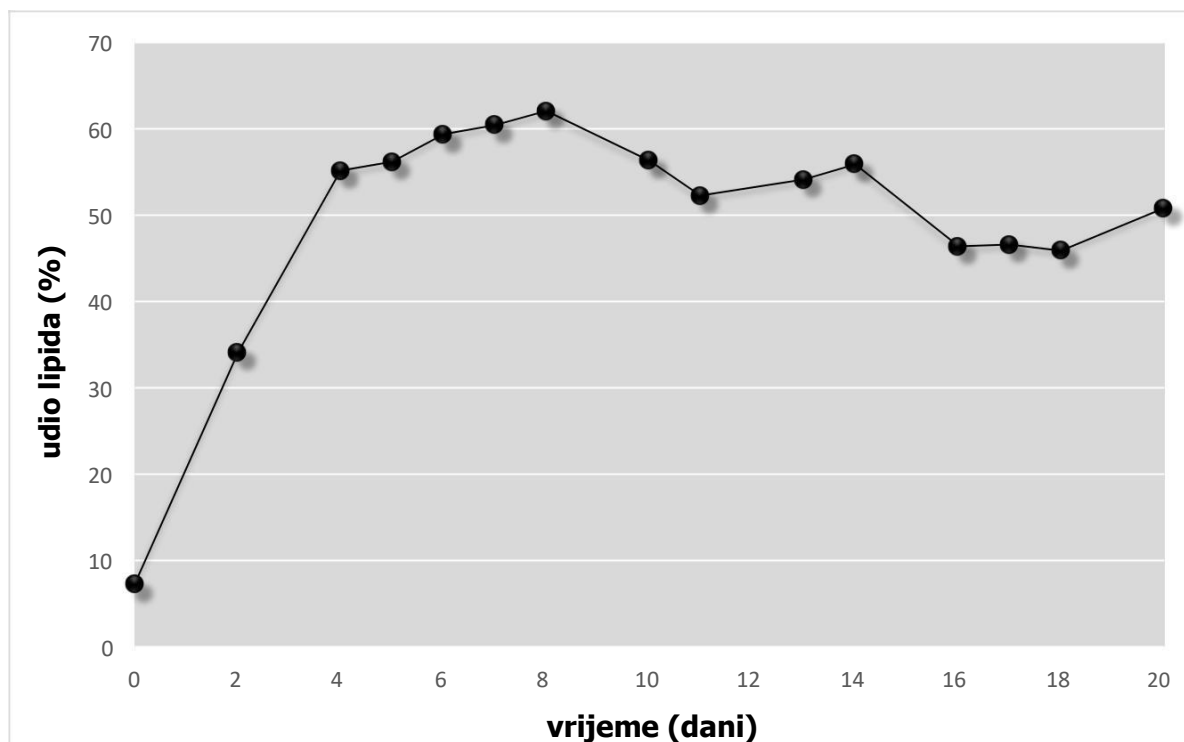
Tablica 6. Izračunati parametri uspješnosti bioprocesa

PARAMETAR	REZULTAT
$Y_{Xb/S}$ (gg^{-1})	0,09910 (20.dan uzgoja)
$Y_{L/S}$ (gg^{-1})	0,10241 (20.dan uzgoja)
Pr_{Xb} ($gL^{-1}dan^{-1}$)	0,74260 (11.dan uzgoja) 0,48414 (20.dan uzgoja)
Pr_L ($gL^{-1}dan^{-1}$)	0,87115 (11.dan uzgoja) 0,53071 (20.dan uzgoja)

Usporedbom dobivenih rezultata s literaturnim podacima pronalazimo istraživanje uzgoja plijesni *Mortierella isabellina* na alkalnom hidrolizatu kukuruznog oklaska koje su proveli Ruan i sur. (2012) gdje su uzgojem postigli produktivnost (Pr_L) od $0,64800\text{ gL}^{-1}\text{dan}^{-1}$, udio lipida 29,5% i prinos lipida od $2,48\text{ gL}^{-1}$. Literaturno istraživanje vođeno je znatno kraće (80 sati) nego ovdje opisano istraživanje, zato su prinos lipida i udio lipida manjih vrijednosti. Iz Tablice 6. vidljivo je da se maksimalne produktivnosti vođenog procesa (Pr_L , Pr_{Xb}) postižu jedanaestog dana uzgoja, nakon čega vrijednosti opadaju. Za postizanje optimalnih rezultata, uzgoj bi se trebao voditi kraće vrijeme, ali dovoljno dugo da se potroši veći dio fermentabilnih šećera podloge. Koeficijenti konverzije supstrata u biomasu i lipide izračunati su na kraju uzgoja kada je izvor ugljika potpuno utrošen. Koeficijent konverzije supstrata u biomasu bez lipida iznosio je $0,0991\text{ gg}^{-1}$, a koeficijent konverzije supstrata u lipide $0,10241\text{ gg}^{-1}$.

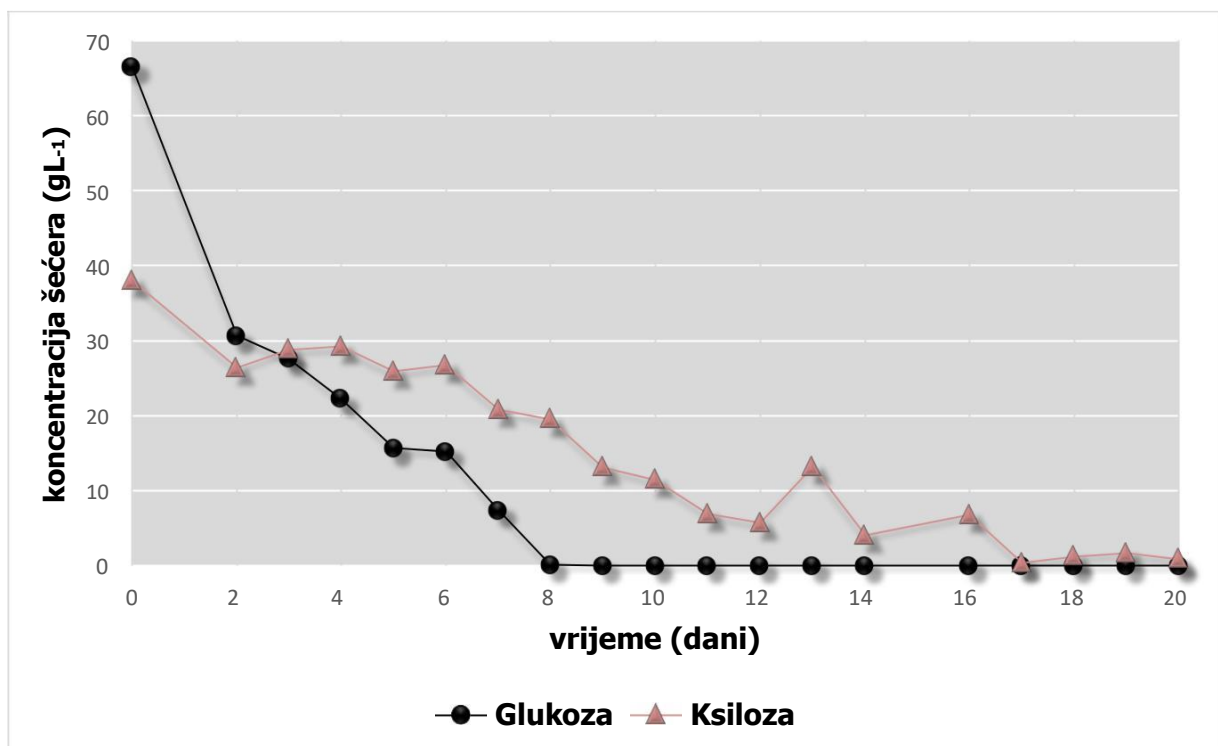


Slika 9. Prikaz promjene koncentracije biomase i lipida u vremenu



Slika 10. Prikaz promjene udjela lipida u biomasi u vremenu

Analizom koncentracije biomase i lipida i udjela lipida o vremenu (Slike 9.-11.) možemo primijetiti da do limitacije izvora dušika i nakupljanja lipida dolazi vrlo brzo nakon drugog dana uzgoja. Uvidom u Sliku 9. vidimo da se koncentracija biomase povećava sve do zadnjeg dana uzgoja, a koncentracija lipida se nakon postizanja određene vrijednosti ne mijenja značajnije tokom uzgoja. Takav slučaj intenzivnog rasta koncentracije lipida, pa ustaljenja na približnim vrijednostima zabilježili su i Harde i sur. (2016). Iz Slike 10. vidimo da udio lipida, kao i koncentracija, raste intenzivno prvih dana uzgoja, a zatim se u idućoj fazi uzgoja udio ustaljuje na vrijednostima oko 50%. Prosječan udio lipida, ne računajući nulti dan, iznosio je 50,967 %, a najveći udio lipida postignut je osmog dana uzgoja i iznosio je 62,029 %. Takve vrijednosti su očekivane i uobičajene za korišteni mikroorganizam producent. Međutim, pred sam kraj uzgoja udio lipida značajnije opada dok koncentracija biomase raste. Rezervne tvari stanice se uslijed limitacije izvorom ugljika (nakon 14. dana uzgoja) troše za endogeni metabolizam mikroorganizma. U slučaju oleaginoznih mikroorganizama rezervne tvari su upravo lipidi. Takav slučaj zabilježili su Papanikolaou i sur. (2004) , gdje su uvidjeli da plijesan *Mortierella isabellina* vrlo brzo konzumira akumulirane lipide nakon iscrpljivanja fermentabilnih šećera iz medija.



Slika 11. Prikaz promjene koncentracije glukoze i ksiloze u vremenu

Kada u podlozi nalazimo više izvora ugljika mikroorganizam prvo troši najpogodniji izvor (obično glukoza), a zatim i ostale. Uvidom u Sliku 11. vidimo da plijesan *Mortierella isabellina* preferira glukozu nad ksilozom i nju prvu koristi prilikom rasta. Nakon sedmog dana uzgoja potrošila se gotovo sva glukoza podloge, a takav slučaj brzog utroška glukoze zabilježili su i Harde i sur. (2016). Nakon utroška glukoze, plijesan počinje brže asimilirati ksilozu kao sljedeći najzastupljeniji šećer u podlozi. Zadnjih dana uzgoja ksiloza se u potpunosti utrošila te dolazi do razgradnje nakupljenih lipida stanice, što je vidljivo iz Slike 10. i Slike 11. Naime kada posljednjih dana uzgoja koncentracija ksiloze padne ispod 10 gL^{-1} udio lipida u stanici počinje postepeno opadati.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti:

1. Lignocelulozna sirovina građena je od tri polimera: celuloze, hemiceluloze i lignina. Lignin i hemiceluloza, koji obavijaju lance celuloze u lignoceluloznoj sirovini, onemogućavaju fizički kontakt enzima celulaza sa supstratom (celulozom) i smanjuju učinkovitost enzimske hidrolize sirovine s celulazama.

2. Alkalnom predobradom prethodno usitnjene lignocelulozne sirovine smanjuje se udio lignina i hemiceluloze, dok se udio celuloze povećava. Također se smanjuje kristaličnost native celuloze, a njezini lanci postaju dostupni celulolitičkim enzimima čime se poboljšava učinkovitost celulolitičke razgradnje lignocelulozne sirovine.

3. Najzastupljeniji fermentabilni šećeri u korištenom enzimskom hidrolizatu kukuruznog oklaska su glukoza ($66,498 \text{ gL}^{-1}$) i ksiloza ($38,005 \text{ gL}^{-1}$).

4. Plijesan *Mortierella isabellina* koristi šećere glukozu i ksilozu iz enzimskog hidrolizata kukuruznog oklaska za rast i sintezu lipida. Plijesan šećere troši redosljedno, prvo glukozu, a zatim ksilozu.

5. U uvjetima limitacije dušika u podlozi plijesan *Mortierella isabellina* koristi izvore ugljika za sintezu značajnih količina staničnih lipida. Najveći udio lipida postignut je osmog dana uzgoja plijesni i iznosi 62,029%.

6. Najveća produktivnost sinteze lipida iznosi $0,87115 \text{ gL}^{-1}\text{dan}^{-1}$, a produktivnost sinteze biomase bez lipida iznosi $0,74260 \text{ gL}^{-1}\text{dan}^{-1}$ i postignute su jedanaestog dana uzgoja plijesni. Daljnjim uzgojem plijesni produktivnosti se smanjuju.

7. Iscrpljivanjem izvora ugljika (glukoze i ksiloze) u podlozi plijesan *Mortierella isabellina* koristi nakupljene lipide za endogeni metabolizam stanice.

6. LITERATURA

- Arora D.S., Chander M., Gill P.K. (2002) Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in the degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration & Biodegradation* **50**: 115-120.
- Bajpai P. (2016) Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production, 1.izd., Springer. str. 7-12.
- Bibić, Dž., Hribernik, A., Filipović, I., Kegl, B. (2007) Utjecaj alternativnih goriva na izgaranja kod dizelovih motora. *Goriva i maziva : časopis za tribologiju, tehniku podmazivanja i primjenu tekućih i plinovitih goriva i inženjerstvo izgaranja* **46(3)**: 205-213.
- Brodeur G., Yau E., Badal K., Collier J., Ramachandran K.B., Ramakrishnan S. (2011) Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzym Research* **2011**: 1-17.
- Börjesson M., Westman G. (2015) Crystalline Nanocellulose – Preparation, Modification, and Properties, Cellulose - Fundamental Aspects and Current Trends, Dr. Matheus Poletto (Ed.), *Intech*
- Chatzifragkou A., Fakas S., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Aggelis G., Papanikolaou S. (2009) Commercial sugars substrates for lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. *European Journal of Lipid Science and Technology* **112(9)**: 1048-1057.
- Cheng YS, Zheng Y, Yu CW, Dooley TM, Jenkins BM, Vander Gheynst JS. (2010) Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **162**: 1768-1784.
- Choudhary J., Singh S., Nain L. (2015) Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology* **21**: 82-92.
- Cohen Z., Ratledge C., editors.(2005) Single cell oils, 2.izd., AOCs Press. str. 29-51.
- Digman M.F., Shinnars K.J., Casler M.D., Dien B.S., Hatfield R.D, Jung H.J. Muck R.E., Weimer P.J. (2010) Optimizing on-farm pretreatment of perennial grasses for fuel ethanol production. *Bioresource Technology* **101**: 5305-5314.

Eggeman T., Elander R.T. (2005) Process economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresource Technology* **96**: 2019-2025.

Fakas S., Papanikolaou S., Batsos A., Galiotou-Panayotou M., Mallouchos A., Aggelis G. (2009) Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass & Bioenergy* **33**: 573–580.

Folch J. Lees M., Sloane Stanley G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animale tissues. The *Journal of Biological Chemistry* **226(1)**: 1-22.

Gao D., Zeng J., Zheng Y., Yu X., Chen S. (2013) Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. *Bioresource Technology* **133**: 315-321.

Harde S.M., Wang Z., Horne M., Zhu J.Y., Pan X. (2016) Microbial lipid production from SPORL-pretreated Douglas fir by *Mortierella isabellina*. *Fuel* **175** : 64-74.

Hamelinck C.N., van Hooijdonk G., Faaij A.P.C. (2005) Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass & Bioenergy* **28**: 384-410.

Hibbett D.S., Yao Y.J., Zhang N. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* **111** : 509–547.

Hiruta O., Futamura T., Takebe H., Satoh A., Kamisaka Y., Yokochi T., Nakahara T., Suzuki O. (1996) Optimization and scale-up of gamma-linolenic acid production by *Mortierella ramanniana* MM 15-1, a high gamma-linolenic acid producing mutant. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **82**: 366–370.

Hendriks A.T.W.M., Zeeman G. (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **100**: 10-18.

Hosokawa M., Suzuki S., Umezawa T., Sato Y. (2001) Progress of lignification mediated by intercellular transportation of monolignols during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia mesophyll* cells. *Plant Cell Physiology* **42**: 959-968.

Howard R.L. Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L., Howard S. (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal Of Biotechnology* **2(12)**: 602-619

- Huang C. Zong M.H., Wu H., Liu Q.P. (2009) Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource Technology* **100(19)**: 4535–4538.
- Ibrahim M.M., El-Zawawy W.K., Abdel-Fattah Y.R., Soliman N.A., Agblevor F.A. (2011) Comparison of alkaline pulping with steam explosion for glucose production from rice straw. *Carbohydrate Polymers* **83**: 720-726.
- Jeffries T.W. (1994) *Biochemistry of microbial degradation*, 1.izd., Kluwer Academic Publishers. str. 233–277.
- Jin M., Slininger P.J., Dien B.S., Waghmode S., Moser B.R. Orjuela A., Costa Sousa L., Balan V (2015) Microbial lipid – based lignocellulosic biorefinery: feasibility and changes. *Trends in Biotechnology* **33(1)**: 43-54.
- Jonsson L., Alriksson B., Nilvebrant N.O. (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels* **6**: 16.
- Leiva-Candia D.E., Pinzi S., Redel-Macías M.D., Koutinas A., Webb C., Dorado M.P. (2014) The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel* **123**: 33–42.
- Li C., Knierim B., Manisseri C., Arora R., Scheller H.V., Auer M., Vogel K .P. Simmons B.A., Singh S. (2010) Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology* **101**: 4900-4906.
- Kim Y., Mosier N.S., Ladisch M.R. (2009) Enzymatic digestion of liquid hot water pretreated hybrid poplar. *Biotechnology Progress* **25**: 340-348.
- Koutinas A.A., Papanikolaou S. (2011) *Handbook of biofuels production – processes and technologies*. Woodhead Publishing, 1.izd., str. 177–198.
- Kurabi A, Berlin A, Gilkes N, Kilburn D, Bura R, Robinson J, Markov E.A., Skomarovsky A., Gusakov A., Okunev O., Sinitsyn A., Gregg D., Xie D., Saddler J. (2005) Enzymatic hydrolysis of steam-exploded and ethanol organosolv-pretreated Douglas Fir - by novel and commercial fungal cellulases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **121**: 219-230.
- McIntosh S., Vancov T. (2010) Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresource Technology* **101**: 6718-6727.

- Menon V., Rao M. (2012) Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals and biorafinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science* **38**: 522-529.
- Mosier N.S., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzapple M., Ladisch M. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **96**: 67-86.
- Papanikolaou S., Sarantou S., Komaitis M., Aggelis G. (2004) Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *Journal of Applied Microbiology* **96(4)**: 868-875.
- Papanikolaou S., Aggelis G. (2011) Lipids of oleaginous yeasts. Part II. Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology* **113**: 1052-1073.
- Papanikolaou S., Aggelis G. (2010) *Yarrowia lipolytica*: a model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology* **112**: 639- 654.
- Pérez J., Muñoz-Dorado J., de la Rubia T., Martínez J. (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* **5(2)**: 53-63.
- Pinzi S., Leiva-Candia D., López-García I., Redel-Macías M.D., Dorado M.P. (2013) Latest trends in feedstocks-for biodiesel production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **8**: 126-143.
- Ragauskas A.J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C.A., Frederick W.J. Jr, Hallett J.P., Leak D.J., Liotta C.L., Mielenz J.R., Murphy R., Templer R., Tschaplinski T. (2006) The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* **311**: 484-489.
- Ralph J., Lundquist K., Brunow G., Lu F., Kim H., Schatz P.F., Marita J.M., Hatfield R.D., Ralph S.A., Christensen J.H., Boerjan W. (2004) Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Reviews* **3**: 29-60.
- Ratledge C., (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* **11**: 807-815.
- Ruan, Z., Hollinshead, W., Isaguirre, C., Tang, Y.J., Liao, W., Liu, Y.(2015) Effects of inhibitory compounds in lignocellulosic hydrolysates on *Mortierella isabellina* growth and carbon utilization, *Bioresource Technology* **183**: 1-24.

- Ruan Z., Zanotti M., Wang X., Ducey C., Liu Y., (2012) Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. *Bioresource Tehnology* **110**: 198-205.
- Ruiz E., Cara C., Ballesteros M., Manzanares P., Ballesteros I., Castro E. (2006) Ethanol production from pretreated Olive tree wood and sunflower stalks by an SSF process. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **129**: 631-643.
- Saha B.C., Iten L.B., Cotta M.A., Wu Y.V. (2005) Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biotechnology Progress* **21**: 816-822.
- Schneider R., Daum G. (2006) Extraction of Yeast Lipids. *Methods in Molecular Biology* **313**: 41-45.
- Sims R.E, Mabee W., Saddler J., Taylor M. (2010) An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology* **101(6)**: 1570-1580.
- Solomon B.D., Barnes J.R., Halvorsen K.E. (2007) Grain and cellulosic ethanol: history, economics, and energy policy. *Biomass & Bioenergy* **31**: 416-425.
- Sun, Y., Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review, *Bioresource Technology* **83**: 1-11.
- Taherzadeh M.J., Karimi K. (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences* **9**: 1621-1651.
- Varga E., Reczey K., Zacchi G. (2004) Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance the enzymatic digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **113**: 509-523.
- Webster J., Weber R. W. S. (2007) Introduction to fungi, 3.izd., Cambridge University Press. str. 197.
- Weng J.K., Li X., Bonawitz N.D., Chapple C. (2008) Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology* **19(2)**: 166-172.
- 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, Bioproducts and Biorefining* **7**: 65-77.

Zakzeski J., Bruijninx P.C.A., Jongerius A. L., Weckhuysen B.M. (2010) The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals . *Chemical reviews* **110(6)**: 3552-3599.

Zhang Y.H.P., Ding S.Y., Mielenz J.R., Cui J.B., Elander R.T., Laser M., Himmel M.E., McMillan J.R., Lynd L.R. (2007) Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnology and Bioengineering* **97**: 214-223.

Zheng Y., Pan Z., Zhang R. (2009) Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* **2**: 51-68.

Zikou E., Chatzifragkou A., Koutinas A.A., Papanikolaou S. (2013) Evaluating glucose and xylose as cosubstrates for lipid accumulation and c-linolenic acid biosynthesis of *Thamnidium elegans*. *Journal of Applied Microbiology* **114 (4)**:1020–1032.

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.

M. Tomić

Marija Tomić