

Uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. i mikroalge *Schizochytrium* sp. na hidrolizatu otpadne morske trave

Žugec, Mihaela

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:965481>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Mihaela Žugec

**Uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. i
mikroalge *Schizochytrium* sp. na
hidrolizatu otpadne morske trave**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirele Ivančić Šantek.

Diplomski rad izrađen je u okviru znanstveno istraživačkog projekta „BioProspecting Jadranskog mora“ financiranog od strane Strukturnih i investicijskih fondova EU u sklopu Operativnog programa „Konkurentnost i kohezija 2014.-2020.“ (Poziv: Vrhunska istraživanje Znanstvenih centara izvrsnosti KK.01.1.1.01).

Željela bih zahvaliti mentorici, prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek na pruženoj prilici za izradu ovog rada, predloženoj temi, stručnom vodstvu, savjetima i pomoći.

Hvala svim djelatnicima Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, posebno dr. sc. Nenadu Marđetku i tehničarima Igoru Livadi, Marini Vnućec i Ljiljani Blažević na susretljivosti i pomoći prilikom rada u laboratoriju.

Hvala prijateljima, kolegama i obitelji na podršci, a najviše mojim roditeljima – hvala za sve.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

UZGOJ KVASCA *Rhodotorula* sp. I MIKROALGE *Schizochytrium* sp. NA HIDROLIZATU
OTPADNE MORSKE TRAVE

Mihaela Žugec, univ. bacc. ing. biotechn.
0058212439

Sažetak: Korištenje fosilnih goriva ima neupitan negativan učinak na okoliš, zdravlje ljudi i promjenu klime. S obzirom da smo suočeni s njihovim skorim iscrpljivanjem, javlja se potreba za alternativnim izvorima energije kao što je lignocelulozna biomasa koja je sveprisutna i jeftina. Kompleksnost strukture ove sirovine otežava njezinu razgradnju do jednostavnih tvari što ograničava njezinu primjenu u industrijskim procesima. Cilj ovog rada bio je pronaći pogodne uvjete za predobradu lignocelulozne sirovine otpadne morske trave *Posidonia oceanica* te optimirati enzimsku hidrolizu kako bi se dobio visok prinos fermentabilnih šećera za uzgoj oleaginoznih mikroorganizama. Najveća učinkovitost postignuta je predobradom sirovine 0,3 M sumpornom kiselinom (24 sata na 80 °C) nakon koje je slijedila enzimska hidroliza s 15 FPU celulaza/g glukana i enzimskim pripravkom Viscozyme u omjeru 1:1 (mL/mL) u odnosu na dodane celulaze. Na hidrolizatima i filtratu kiselinske predobrade uspješno je proveden uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. i mikroalge *Schizochytrium* sp. te su proizvedeni lipidi.

Ključne riječi: *morska trava, predobrada, Rhodotorula, Schizochytrium, lipidi*

Rad sadrži: 61 stranica, 15 slika, 9 tablica, 53 literaturna navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo (član)
4. prof. dr. sc. Jasna Novak (zamjenski član)

Datum obrane: 26. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

CULTIVATION OF YEAST *Rhodotorula* sp. AND MICROALGAE *Schizochytrium* sp. IN WASTE SEAGRASS HYDROLYSATE

Mihaela Žugec, univ. bacc. ing. biotechn.
0058212439

Abstract: The use of fossil fuels has a negative effect on the environment, human health and climate change. Considering their soon exhaustion, there is a need for alternative sources of energy, such as lignocellulosic biomass, which is ubiquitous and cheap. Complex structure of this biomass makes its decomposition to simple compounds difficult and limits use in industrial processes. The goal of this experiment was to find convenient conditions for pretreatment of waste seagrass *Posidonia oceanica* and optimize enzymatic hydrolysis to get a high yield of fermentable sugars for cultivation of oleaginous microorganisms. The highest efficiency was achieved by pretreatment with 0,3 M sulfuric acid (24h at 80 °C) followed by enzymatic hydrolysis with 15 FPU cellulases/g glucan and enzyme mixture Viscozyme in volume ratio 1:1 (mL/mL). Cultivation of yeast *Rhodotorula* sp. and microalgae *Schizochytrium* sp. was successfully carried out in the hydrolysates and acid pretreatment filtrate and lipids were produced.

Keywords: *seagrass, pretreatment, Rhodotorula, Schizochytrium, lipids*

Thesis contains: 61 pages, 15 figures, 9 tables, 53 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: Mirela Ivančić Šantek, PhD, Full professor

Reviewers:

1. Blaženka Kos, PhD, Full professor (president)
2. Mirela Ivančić Šantek, PhD, Full professor (mentor)
3. Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate professor (member)
4. Jasna Novak, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 26th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE	3
2.1.1. Građa lignoceluloze.....	3
2.1.2. Otpadna morska trava.....	5
2.1.3. Predobrada lignoceluloznih sirovina.....	7
2.1.3.1. Podjela metoda predobrade.....	7
2.1.3.2. Kiselinska predobrada.....	8
2.1.3.3. Alkalna predobrada.....	9
2.1.4. Enzimaska hidroliza.....	9
2.2. BIOGORIVA	10
2.2.1. Biogoriva prve generacije.....	11
2.2.2. Biogoriva druge generacije.....	11
2.2.3. Biogoriva treće generacije.....	12
2.2.4. Biogoriva četvrte generacije.....	13
2.2.5. Proizvodnja biodizela.....	13
2.2.5.1. Radni mikroorganizmi.....	14
2.2.5.1.1. <i>Rhodotorula</i> sp.	15
2.2.5.1.2. <i>Schizochytrium</i> sp.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	18
3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga.....	18
3.1.3. Ostale kemikalije i enzimi.....	18
3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj kvasca i mikroalge.....	19
3.1.5. Oprema i aparatura.....	20
3.1.5.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC).....	20
3.1.5.2. Preostala oprema i aparatura.....	20
3.2. METODE.....	21
3.2.1. Predobrada morske trave kiselinom i lužinom.....	21
3.2.2. Optimiranje enzimske hidrolize morske trave.....	21
3.2.3. Enzimaska hidroliza predobrađene sirovine.....	22
3.2.4. Kiselinska predobrada i enzimska hidroliza morske trave te uzgoj kvasca i mikroalge.....	23

3.2.5. Analitičke metode	23
3.2.5.1. Gravimetrijsko određivanje udjela suhe tvari u morskoj travi.....	23
3.2.5.2. Gravimetrijsko određivanje sadržaja pepela u morskoj travi.....	24
3.2.5.3. Kiselinska hidroliza sirovine	24
3.2.5.4. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini	25
3.2.5.5. Određivanje udjela lignina topljivog u kiselini	25
3.2.5.6. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC analiza)	26
3.2.5.7. Određivanje koncentracije reducirajućih šećera DNS metodom	27
3.2.5.8. Određivanje celulolitičke aktivnosti enzimskog pripravka	28
3.2.5.9. Određivanje udjela lipida u uzorku	29
3.2.6. Izračunavanje udjela strukturnih ugljikohidrata.....	30
3.2.7. Izračunavanje iskorištenja sirovine	31
3.2.8. Izračunavanje iskorištenja pojedinog polisaharida i udjela uklonjenog lignina	31
3.2.9. Izračunavanje iskorištenja enzimske hidrolize	32
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	33
4.1. Sastav izvorne sirovine.....	34
4.2. Kiselinska i alkalna predobrada otpadne morske trave	35
4.3. Optimizacija enzimske hidrolize otpadne morske trave	40
4.4. Enzimska hidroliza predobrađene otpadne morske trave.....	42
4.5. Uzgoj mikroorganizama i proizvodnja lipida na hidrolizatu otpadne morske trave	45
4.5.1. Uzgoj kvasca <i>Rhodotorula</i> sp.	46
4.5.2. Uzgoj mikroalge <i>Schizochytrium</i> sp.....	49
4.5.3. Lipidi	52
5. ZAKLJUČCI.....	55
6. LITERATURA	56
7. PRILOG	

1. UVOD

Sve veća industrijalizacija i nagli porast broja stanovnika dovode do velikih globalnih problema koji se tiču opskrbe hranom, energijom, klimatskih promjena i ekstremnih vremenskih uvjeta te zagađenja (Shuba i Kifle., 2018). Smatra se da će se fosilna goriva potpuno iscrpiti u idućih 50 godina stoga se sve više okreće alternativnim izvorima energije koji će zamijeniti fosilna goriva te smanjiti emisiju CO₂ i njezine štetne učinke na okoliš (Mat Aron i sur., 2020).

Lignocelulozna biomasa (kao što je šumski i drvni otpad, poljoprivredni ostaci, energetske usjevi i sl.) smatra se najraširenijom ugljično neutralnom obnovljivom sirovinom na Zemlji jer se njezinom razgradnjom u atmosferu ispušta onoliko CO₂ koliko ga je biljka uzela iz atmosfere kroz proces fotosinteze (Zuccaro i sur., 2020; Bajpai, 2016). Lignoceluloza se sastoji od celuloze, hemiceluloze i lignina (Yousuf i sur., 2020). Prisutnost lignina i hemiceluloze čini celulozu teško dostupnom celulolitičkim enzimima i stoga otežava njezinu hidrolizu na jednostavnije šećere. Zbog toga je nužna predobrada lignocelulozne biomase kojom se mijenja veličina čestica, struktura i kemijska svojstva biomase te na taj način pospješuje brzina i učinkovitost enzimske hidrolize (Bajpai, 2016). Tijekom proteklih nekoliko desetljeća istražene su brojne metode predobrade, svaka s određenim prednostima i manama. Učinkovitost metode ovisi o vrsti, odnosno sastavu sirovine. Najčešće se primjenjuju kiselinska i alkalna predobrada (Zhang i sur., 2020).

Morska trava *Posidonia oceanica* endemska je vrsta široko rasprostranjena Sredozemnim morem. Ujese gubi velike količine lišća koje se zbog djelovanja valova akumulira na obalama te narušava njihov estetski izgled, ali uzrokuje i pojavu neugodnih mirisa i insekata (Restaino i sur., 2023). Nakupine lišća smatraju se otpadom i najčešće se zbrinjavaju odlaganjem na deponije, ali počinje se prepoznavati njihova vrijednost i mogućnost upotrebe u razne svrhe, posebno kao lignocelulozna sirovina u proizvodnji biogoriva i energije (Voca i sur., 2019).

Biogoriva se proizvode pretvorbom fermentabilnih šećera ili lipida, podrijetlom iz biomase, u različite oblike energije (Mat Aron i sur., 2020). Jedan od njih je biodizel, ester nižih alkohola i dugolančanih masnih kiselina (Sinčić, 2014). Kako bi se smanjila konkurencija između proizvodnje hrane i biogoriva, razvijaju se metode proizvodnje biodizela iz lipida mikrobnog podrijetla. U tu svrhu koriste se oleaginozni mikroorganizmi, kao što su *Rhodotorula* sp. i *Schizochytrium* sp., koji imaju sposobnost proizvodnje i nakupljanja više od 20 % (g/g) lipida.

Cilj ovog rada bio je istražiti potencijal upotrebe otpadne morske trave kao lignocelulozne sirovine, odnosno supstrata za uzgoj mikroorganizama, uz optimizaciju uvjeta predobrade i enzimske hidrolize. Uz to je istražena mogućnost uzgoja oleaginoznih mikroorganizama, kvasca *Rhodotorula* sp. i mikroalge *Schizochytrium* sp. na predobrađenoj sirovini u svrhu biosintetiziranja lipida za proizvodnju biodizela.

2. TEORIJSKI DIO

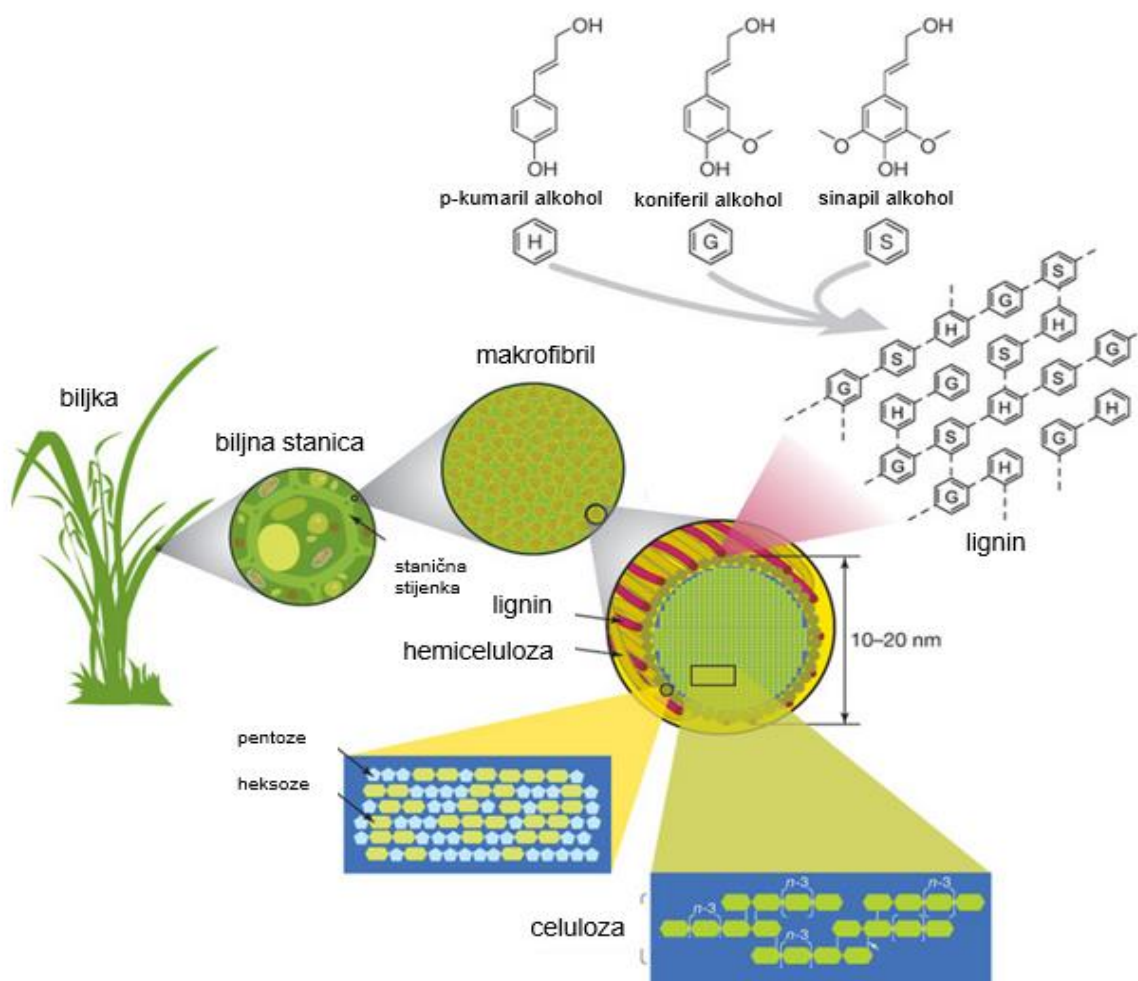
2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE

Lignoceluloza je najrasprostranjenija obnovljiva sirovina na Zemlji. Nastaje procesom fotosinteze iz atmosferskog ugljikovog dioksida i vode uz pomoć sunčeve energije. Najvećim dijelom se sastoji od polisaharida, fenolnih polimera i proteina koji čine kompleksnu strukturu (Yousuf i sur., 2020). Biomasa se definira kao biorazgradivi organski materijal biljnog, životinjskog ili mikrobnog porijekla (Shadid i sur., 2021). U lignoceluloznu biomasu ubraja se šumski i drveni otpad (npr. lišće, kora, piljevina), poljoprivredni ostaci (npr. slama, kukuruzovina i kukuruzni oklasci, bagasa) energetske usjevi (npr. slatki sirak, miskantus, divlji proso), industrijski otpad (npr. iz proizvodnje papira) (Bajpai, 2016). Godišnje se deforestacijom i poljoprivrednom proizvodnjom proizvede 5 – 8 tona lignocelulozne biomase. Smatra se vrlo pogodnom sirovinom za proizvodnju biogoriva jer je jeftina, široko rasprostranjena i lako dostupna, ne predstavlja konkurenciju proizvodnji hrane i ekološki je prihvatljiva (Mat Aron i sur., 2020).

2.1.1. Građa lignoceluloze

Lignoceluloza se sastoji od celuloze umotane u gustu strukturu hemiceluloze i lignina koji učvršćuju staničnu stijenku (slika 1). Manji preostali dio čine ekstraktivni spojevi, pektin, proteini i pepeo (Yousuf i sur., 2020). Ovisno o sirovini i vrsti biljnih stanica, suha tvar lignocelulozne biomase obično se sastoji od 35 – 50 % celuloze, 20 – 35 % hemiceluloze i 10 – 15 % lignina. Omjeri polimera mijenjaju se i unutar same biljke ovisno o njezinoj starosti, razvojnom stadiju i drugim uvjetima (Bajpai, 2016).

Celuloza je homopolisaharidni nerazgranati polimer sastavljen od molekula D-glukoze povezanih β -1,4-glikozidnim vezama u ravne lance. Glavni je sastojak primarne stanične stijenke biljaka, bakterija, algi i oomiceta što je čini najčešćim i najdostupnijim organskim polimerom (Yousuf i sur., 2020). Temeljna građevna jedinica celuloze je celobioza, disaharid sastavljen od dviju glukoznih molekula. Celulozni lanac se može sastojati od nekoliko tisuća do nekoliko stotina tisuća molekula glukoze (Kucharska i sur., 2018). 20 – 300 celuloznih lanaca čvrsto je povezano vodikovim vezama i van der Waalsovima interakcijama u mikrofibrile, a oni se grupiraju u veće makrofibrile. Zahvaljujući vodikovim vezama, celuloza tvori kristalinične i amorfne regije (Bajpai, 2016). Oko 2/3 celuloze je u kristaliničnom obliku što je jedan od najvažnijih faktora razgradivosti i brzine hidrolize celuloze (Maurya, 2015).



Slika 1. Struktura lignocelulozne sirovine (prema Potters i sur., 2010)

Hemiceluloza je razgranati heteropolisaharid sastavljen od prosječno 500 – 3000 različitih šećernih jedinica. Najčešće su pentoze (ksiloza i arabinoza), heksoze (manoza, glukoza, galaktoza i ramnoza) te šećerne kiseline (glukuronska i galakturonska kiselina) (Yousuf i sur., 2020). Homopolimer ili heteropolimer čini okosnicu na koju su β -1,4- ili β -1,3- glikozidnim vezama vezani kratki ogranci različitih šećera. Sastav hemiceluloze se razlikuje ovisno o biljnoj vrsti, mjestu rasta i godišnjem dobu. Tako, na primjer, u travi i slami prevladava ksilan, a u drvu četinjača glukomanan (Kucharska i sur., 2018). Ksilan se u većini biljaka pretežito sastoji od 1,4- β -D-ksilopiranoze uz koju mogu biti prisutni arabinoza, glukuronska kiselina ili octena kiselina (Bajpai, 2016). Zbog niskog stupnja polimerizacije, za razliku od celuloze, podložnija je razgradnji u monosaharide (Baruah i sur., 2018).

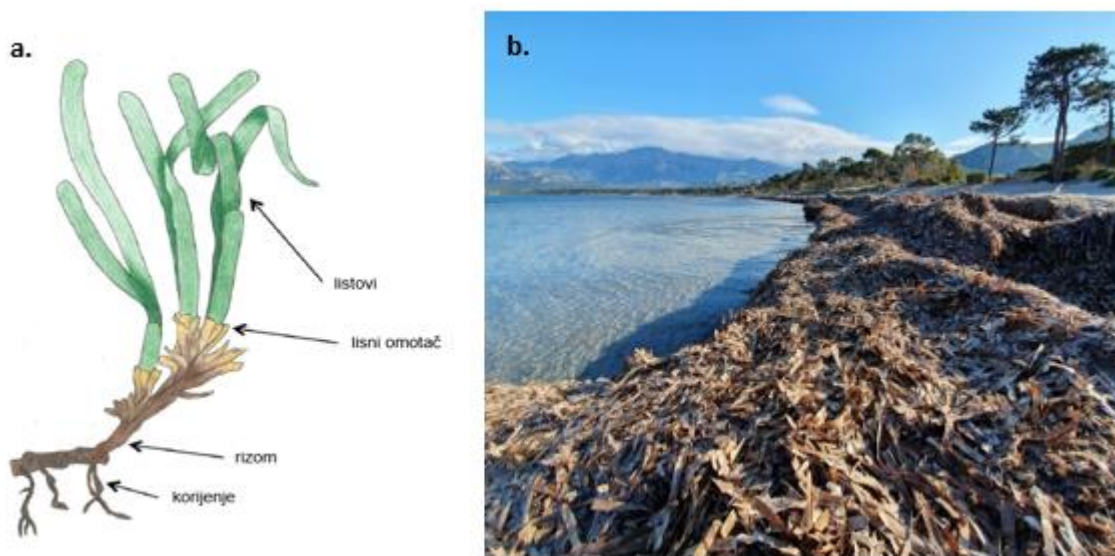
Lignin je razgranati aromatski polimer fenilpropanskih monomernih jedinica umreženih u kompleksnu amorfnu strukturu. Monomeri (kumaril alkohol, koniferil alkohol i sinapil alkohol) su međusobno povezani ugljik-ugljik ili eterskim vezama nepravilnim redoslijedom (Rajesh Banu i sur., 2021). Lignin se može smatrati ljepilom koje povezuje sve komponente lignoceluloze kovalentnim vezama i čini je netopljivom u vodi. Zaslužan je za rigidnost i nepropusnost te otpornost stanica na oksidativni stres i mikrobnju razgradnju. U pravilu najviše lignina sadrži drvena lignocelulozna biomasa, dok ga u zeljastim biljkama ima najmanje (Bajpai, 2016).

2.1.2. Otpadna morska trava

Posidonija (*Posidonia oceanica* (L.) Delile), poznatija kao oceanski porost, morska trava ili lažina, endemska je mediteranska morska cvjetnica. Ujedno je najrasprostranjenija vrsta morske trave, a tvori podvodne livade prekrivajući više od 2 %, tj. preko 40 000 km² morskog dna Mediterana (Restaino i sur., 2023). Raste na muljevitom i pjeskovitom morskom dnu, obično na dubini 1 – 40 metara, osim u zaljevima i estuarijima većih rijeka (Campagne i sur., 2015). Glavni faktor njezine rasprostranjenosti je prozirnost mora s obzirom da joj je potrebna sunčeva svjetlost za provođenje procesa fotosinteze. Na sjevernom dijelu Jadrana, gdje je manja prozirnost morske vode, livade posidonije rastu do 20 m dubine, dok se na srednjem i južnom Jadranu prostiru čak do 50 m dubine (Voca i sur., 2019). Ima puzeću položenu stabljiku (rizom) ukorijenjenu u tlo. Izdanci koji rastu iz rizoma sadrže snop od 4 – 8 tamno zelenih listova koji mogu doseći do 1 m duljine (slika 2.a) (Boudouresque, 2012). U Hrvatskoj je posidonija strogo zaštićena vrsta Zakonom o zaštiti prirode (Voca i sur., 2019).

Livade posidonije imaju važnu ulogu u ekosustavu jer predstavljaju stanište i izvor hrane za velik broj vrsta riba i drugih morskih životinja (Voca i sur., 2019). Na listovima žive brojni organizmi kao što su bakterije, mikro- i makroalge, spužve, mahovnjaci i kolutičavci (Kanjer i sur., 2019). Također su važne za oksigenaciju morske vode, jer dnevno po m² na dubini od 10 metara proizvedu preko 14 litara kisika, te za sekvestraciju ugljikovog dioksida. Listovi sadrže 23 – 40 % ugljika. Posidonija veliku sposobnost akumulacije teških metala, posebno u rizomima, zbog čega djeluje kao bioindikator koncentracije teških metala u ekosustavu (Campagne i sur., 2015).

Lišće posidonije ima životni vijek oko godinu dana, nakon čega se odvaja od ostatka biljke i akumulira se na obalama (slika 2.b) (Campagne i sur., 2015). Proces akumulacije je najizraženiji tijekom jeseni kada se otpadanje najviše lišća vremenski preklopi s pojačanom aktivnošću valova. Posidonija godišnje proizvede prosječno 500 g/m² suhe tvari biomase, a količina otpadne biomase koja dođe do obale ovisi o morskim strujama i vjetrovima te veličini livade. Nakupine, od nekoliko centimetara debljine do čak 2,5 m, ponašaju se kao prirodna brana koja smanjuje jačinu valova i na taj način umanjuju eroziju obale (Restaino i sur., 2023). Estetski su nepoželjne i često se smatraju onečišćenjem obale i mora, a zapravo su indikator čiste i prozirne vode, dobro očuvanog morskog okoliša i bogatog morskog života. No prekomjernom akumulacijom dolazi do stvaranja sumporovodika, što uzrokuje neugodan miris, te razvoja insekata, npr. muha. To je posebna smetnja u mjestima s turističkim potencijalom stoga nakupine morske trave na obali zahtijevaju zbrinjavanje (Voca i sur., 2019). Mrtvi dijelovi korijenja i rizoma mogu se zbog konstantnog kretanja mora i valova međusobno ispreplesti i tvoriti kuglice nazvane egagropili koje se također, poput lišća, nakupljaju na obalama (Restaino i sur., 2023).



Slika 2. a. Anatomija morske trave *P. oceanica* (prema Kaal i sur., 2016); **b.** Naslage *P. oceanica* na obali (Fullgrabe, 2020)

U prošlosti se suha morska trava upotrebljavala u razne svrhe: u građevini kao izolacijski materijal; u poljoprivredi kao kompost, umjesto slame, kao zaštitni sloj na poljoprivrednim površinama; u tekstilnoj industriji kao zamjena za pamuk, punjenje madraca i jastuka te proizvodnju tepiha; proizvodnju košara; kao sirovina u proizvodnji papira pa čak i kao hrana za

životinje. Danas se tretira kao otpad i uglavnom se odlaže na odlagališta bez iskorištavanja. Potencijal biomase morske trave kao lignocelulozne sirovine u proizvodnji goriva i energije privlači sve više pažnje te se istražuju kemijske karakteristike i moguće primjene (Voca i sur., 2019). Također se istražuje i upotreba egagropila za bioremedijaciju, konstrukcijske materijale ili proizvodnju bioplastike (Restaino i sur., 2023).

2.1.3. Predobrada lignoceluloznih sirovina

Lignocelulozna biomasa ima veliki potencijal za primjenu kao alternativa neobnovljivim izvorima energije u konceptu biorafinerija (Zhang i sur., 2020). Biorefinerije su održiva postrojenja koja integriraju različite tehnologije (termokemijske, biokemijske, uzgoj mikroorganizama) za konverziju biomase u biogoriva, biokemikalije, biomaterijale i druge vrijedne proizvode. Cilj je maksimalno iskorištavanje sirovine uz stvaranje što manje otpada (Shadid i sur., 2021). Postoje brojni pristupi pretvorbi lignoceluloznih sirovina u fermentabilne šećere (Bajpai, 2016). Glavni izazov njihovom korištenju predstavlja složena struktura i otpornost stanične stijenke na mikrobnu i enzimsku razgradnju zbog čega je nužan korak predobrade (Zhang i sur., 2020). Lignin, osim što djeluje kao fizička barijera, negativno utječe na hidrolizu sirovine zbog nespecifičnog vezanja hidrolitičkih enzima i toksičnosti derivata lignina prema mikroorganizmima. Zadaća predobrade je razbiti strukturu lignina, ukloniti hemicelulozu i smanjiti kristaliničnost celuloze da bi se povećala poroznost i unutarnja specifična površina te dostupnost celuloznih vlakna celulolitičkim enzimima (Bajpai, 2016).

Predobrada čini preko 40 % ukupnih troškova konverzije lignoceluloznih sirovina i uvelike utječe na ostatak procesa. S obzirom na različit sastav i svojstva različitih vrsta biomase, ne postoji univerzalan način predobrade (Zhang i sur., 2020). Neki od zahtjeva koje proces predobrade mora zadovoljiti su niski kapitalni i operativni troškovi, mogućnost izdvajanja svih komponenti u upotrebljivom obliku, izbjegnuto stvaranje nusproizvoda koji djeluju kao inhibitori u kasnijim fazama iskorištavanja sirovine, minimalan utrošak energije te minimalni gubici fermentabilnih šećera (Bajpai, 2016). Ni jedna do sada istražena metoda ne ispunjava sve kriterije, već svaka ima svoje prednosti i mane (Zhang i sur., 2020).

2.1.3.1. Podjela metoda predobrade

Metode predobrade prema funkciji i reagensu najčešće se dijele u četiri skupine: fizikalne, kemijske, biološke i fizikalno-kemijske metode (Bajpai, 2016).

Fizikalne metode su mehaničko usitnjavanje (sjeckanje, rezanje, drobljenje, mljevenje), predobrada zračenjem (γ -zrake, mikrovalovi, ultrazvuk, elektronski snopovi), ekstruzija i piroliza. Koriste za smanjenje veličine sirovine ili narušavanje strukture stanične stijenke kako bi se povećala dostupna površina. Glavni nedostatak većine fizikalnih metoda je visoki utrošak energije, potreba za posebnom opremom i posljedično povećani troškovi procesa (Zhang i sur., 2020; Bajpai, 2016).

Kemijske metode omogućavaju depolimerizaciju, povećanje topljivosti i kidanje veza među makromolekulama (Bajpai, 2016). Iziskuju manje energije od fizikalnih, ali zahtijevaju upotrebu kemikalija. Obično se provode uz povišenu temperaturu i tlakove kako bi se ubrzao proces i povećala učinkovitost (Usmani i sur., 2021). Nedostatak je nastajanje inhibitora. U kemijske metode ubrajaju se kiselinska i alkalna predobrada, ozonoliza, predobrada organskim otapalima, ionskim tekućinama i sulfitom (Bajpai, 2016).

Biološke metode odnose se na upotrebu enzima ili mikroorganizama koji proizvode lignocelulolitičke enzime za selektivnu razgradnju lignina i hemiceluloze prije enzimske hidrolize. U tu svrhu najčešće se koriste gljive bijelog truljenja, a osim njih i gljive smeđeg i mekog truljenja te neke bakterije (Sun i sur., 2016). Prednosti bioloških metoda su blagi uvjeti, nizak utrošak energije, nema upotrebe kemikalija i ekološki su prihvatljive, no nedostaci su dugotrajnost procesa, potreba za velikim prostorom i strogom kontrolom uvjeta uzgoja (Bajpai, 2016).

Fizikalno-kemijske metode su kombinacija fizikalnih i kemijskih metoda koje utječu na fizičke i kemijske karakteristike sirovine kako bi se postigla što veća učinkovitost procesa. Obuhvaćaju hidrotermalnu i oksidacijsku predobradu, eksploziju vodenom parom, eksploziju vlakana amonijakom, upotrebu superkritičnog ugljikovog dioksida i sl. (Zhang i sur., 2020).

2.1.3.2. Kiselinska predobrada

Kiselinskom predobradom postiže se narušavanje kemijske strukture lignina i hidroliza hemiceluloze te pomaže razgradnji celuloze na jednostavne šećere. Može se provoditi razrijeđenom (0,1 – 10 %) ili koncentriranom (30 – 70 %) kiselinom, no koncentrirane kiseline su toksične i korozivne pa zahtijevaju opremu otpornu na koroziju zbog čega nisu poželjne te se na industrijskoj razini najčešće upotrebljavaju razrijeđene kiseline. Dva su načina provođenja predobrade: visoka temperatura (iznad 180 °C) tijekom kraćeg vremenskog perioda (1 – 5 min) i niža temperatura (ispod 120 °C) uz dulje vrijeme zadržavanja (30 – 90 minuta) (Maurya i sur.,

2015). Kiseline koje se najčešće koriste su sumporna, klorovodična, fosforna i dušična kiselina. Osim anorganskih, istražuje se i korištenje organskih kiselina kao što su mravlja, oksalna i maleinska (Baruah i sur., 2018).

U nekim slučajevima moguće je preskočiti korak enzimske hidrolize ako je kiselina već razgradila sirovinu do fermentabilnih šećera, no nakon kiselinske predobrade nužno je dobro isprati sirovinu kako bi se neutralizirala prije fermentacije (Kumar i Sharma, 2017).

Kiselinskom predobradom mogu nastati nepoželjni nusproizvodi: furfural (iz pentoza), 5-hidroksimetilfurfural (iz heksoza), fenolne kiseline i aldehidi koji djeluju kao inhibitori fermentacije. Njihova koncentracija povećava se s povećanjem vremena zadržavanja i temperature. Daljnjom razgradnjom iz furfurala nastaju mravlja i furoična kiselina, a iz 5-hidroksimetilfurfurala mravlja i levulinska kiselina. Iako postoje različite metode detoksifikacije, one predstavljaju dodatan korak u procesu i povećavaju ukupne troškove stoga se stvaranje inhibitora nastoji izbjeći ili barem smanjiti (Baruah i sur., 2018).

2.1.3.3. Alkalna predobrada

Alkalna predobrada je također vrlo često istraživana i primjenjivana metoda. Temelji se na otapanju lignina u lužnatoj otopini. U tu svrhu se koriste lužine kao što su natrijev, kalcijev, kalijev i amonijev hidroksid. Natrijev hidroksid pokazao se najučinkovitijim (Bajpai, 2016). Tijekom alkalne predobrade dolazi do reakcije saponifikacije koja uzrokuje cijepanje intermolekulskih esterskih veza između hemiceluloze i lignina. Osim toga, lužina izaziva bubrenje celuloze, što smanjuje njezinu kristaliničnost i stupanj polimerizacije, a povećava unutarnju površinu, te uklanjanje acetilnih grupa i uronskih kiselina iz hemiceluloze (Baruah i sur., 2018). Uklanjanjem lignina smanjuje se broj mjesta nespecifičnog vezanja enzima što također pozitivno djeluje na uspješnost enzimske hidrolize. Učinkovitost alkalne predobrade ovisi o udjelu lignina u sirovini – veća je kod sirovina s manje lignina kao što je poljoprivredni otpad, dok je kod crnogoričnog drva učinkovitost manja (Kucharska i sur., 2018). Za razliku od kiselinske predobrade, uglavnom se odvija na nižoj temperaturi (iako to produljuje vrijeme zadržavanja) te nastaje manje inhibitora. Nedostatak je ireverzibilno stvaranje soli i ponekad njihovo inkorporiranje u biomasu tijekom predobrade (Bajpai, 2016).

2.1.4. Enzimska hidroliza

Nakon predobrade lignocelulozne sirovine obično slijedi enzimska hidroliza kako bi se oslobođeni ugljikohidrati preveli u fermentabilne monomere. Enzimska hidroliza je visoko

učinkovit i ekonomski isplativ način hidrolize sirovine budući da omogućuje iskorištenje polisaharida više od 90 %. Enzimi koji provode hidrolizu lignoceluloze su celulaze i hemicelulaze. Najveći izazov uspješnosti hidrolize predstavlja stvaranje optimalne kombinacije enzima koji moraju djelovati sinergistički. Zbog heterogenosti hemiceluloze, potrebna je kompleksna mješavina enzima kao što su ksilaze, mananaze, ksilozidaze i arabinofuranozidaze (Usmani i sur., 2021). Celulaze uključuju egzoglukanaze, endoglukanaze i β -glukozidaze. Endoglukanaze cijepaju β -1,4-glikozidne veze unutar amorfnih područja celuloze čime nastaju reducirajući i nereducirajući krajevi lanaca. Egzoglukanaze oslobađaju celobiozu s krajeva celuloznih lanaca, a β -glukozidaze cijepaju celobiozu na dvije molekule glukoze (Andlar i sur., 2018). Komercijalne celulaze najčešće se proizvode pomoću plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Trichoderma*. Osim njih, razgradnja celuloze može se postići i monooksigenazama (Usmani i sur., 2021).

Enzimska hidroliza se provodi u blagim uvjetima, temperaturi 40 – 50 °C i pH vrijednosti 4,5 – 5 (Verardi i sur., 2020). Učinkovitost hidrolize ovisi o provedenoj predobradi sirovine, odnosno stupnju polimerizacije i kristaliničnosti celuloze te veličini i površini čestica (Andlar i sur., 2018). Lignocelulozna biomasa ima dvije vrste površine: vanjsku površinu, koja je vezana uz oblik i veličinu čestica, i unutarnju površinu koja ovisi o kapilarnoj strukturi celuloznih vlakana. Kako je za katalitičku reakciju nužna fizička interakcija enzima i celuloze, dostupnost površine ima veliku ulogu (Behera i sur., 2014). Lignin i acetilne grupe hemiceluloze mogu predstavljati mjesta nespecifičnog vezanja enzima kojim dolazi do gubitka enzima i limitacije enzimske hidrolize (Verardi i sur., 2020).

2.2. BIOGORIVA

Sagorijevanjem fosilnih goriva u atmosferu se oslobađaju velike količine ugljikovog dioksida (CO₂). On se teško razgrađuje i zajedno s ostalim plinovima odlazi u više dijelove atmosfere gdje stvaraju efekt staklenika što uzrokuje klimatske promjene. Za razliku od fosilnih goriva, sagorijevanjem biogoriva ne povećava se udio CO₂, već se u atmosferu vraća CO₂ kojeg je biljka uzela u procesu fotosinteze. Biogoriva se definiraju kao plinovita, tekuća ili kruta goriva podrijetlom iz biomase, pri čemu je biomasa biorazgradiv dio proizvoda, otpada i ostataka biljnog i životinjskog podrijetla iz poljoprivrede, šumarstva i s njima povezanih djelatnosti te biorazgradiv dio industrijskog i komunalnog otpada (Sinčić, 2014). Najveći proizvođači

biogoriva u svijetu su SAD i Brazil. SAD proizvodi gotovo sav bioetanol iz kukuruza, dok je u Brazilu glavna sirovina šećerna trska, a obje države proizvode biodizel primarno iz soje. U Europi se najčešće proizvodi bioetanol iz kukuruza, pšenice i šećerne repe, a biodizel iz uljane repice i korištenog jestivog ulja (Jeswani i sur., 2020).

Svrstavaju se u četiri generacije kao biogoriva prve, druge, treće i četvrte generacije. Biogoriva različitih generacija ne razlikuju se u svojoj strukturi, već je razlika u korištenim sirovinama (Callegari i sur., 2019). Drugi način podjele je na konvencionalna biogoriva (prva generacija), koja se dobivaju dobro utvrđenim tehnologijama fermentacije, destilacije i transesterifikacije, i napredna biogoriva koja su još u razvojnoj, pilotnoj ili demonstracijskoj fazi te proizvodnja uglavnom još nije komercijalizirana (Jeswani i sur., 2020; Sinčić, 2014).

2.2.1. Biogoriva prve generacije

Biogoriva prve generacije proizvode se iz šećernih (šećerna repa i šećerna trska) i škrobnih (kukuruz, krumpir, pšenica, ječam) sirovina te biljnih ulja (iz uljane repice, suncokreta, soje i sl.) (Mat Aron i sur., 2020). To su sirovine koje se koriste za proizvodnju hrane zbog čega dolazi do konkurencije između proizvođača biogoriva i proizvođača hrane za sirovinu i plodno tlo. Također zahtijevaju upotrebu gnojiva, vode i pesticida što povećava troškove njihove proizvodnje (Liu i sur., 2021). Sirovine se uzgajaju kao monokulture čime se smanjuje bioraznolikost, šire se bolesti i štetnici (Callegari i sur., 2019). Šećerne sirovine sadrže velike količine saharoze koja se može ekstrahirati i fermentirati u bioetanol. Ulja se ekstrahiraju i prevode u bioetanol ili biodizel fermentacijom ili transesterifikacijom. Škrobne sirovine moraju proći proces predobrade prije fermentacije kako bi se dugolančani polimer glukoze pocijepao na fermentabilne jedinice. Nakon fermentacije, biogoriva prolaze destilacijsku kolonu kako bi se uklonile nečistoće. Proizvodnja biogoriva prve generacije je široko komercijalizirana i godišnje se proizvede oko 50 milijardi litara (Mat Aron i sur., 2020).

2.2.2. Biogoriva druge generacije

Biogoriva druge generacije proizvode se iz neprehrambenih lignoceluloznih sirovina kao što su ostaci iz proizvodnje žitarica (slama, kukuruzovina), energetski usjevi te druge otpadne biomase. One nisu konkurencija hrani jer ne traže opskrbu vodom, gnojiva ni posebnu kvalitetu tla. Neke biomase mogu biti sirovina i prve i druge generacije, npr. biljno ulje je sirovina za prvu generaciju, no iskorišteno otpadno biljno ulje, koje više nije za konzumaciju, spada u sirovine za drugu generaciju biogoriva (Callegari i sur., 2019). Problem iskorištavanja ovih sirovina je

potreba za prethodnom predobradom. Tri su glavne tehnologije konverzije lignocelulozne biomase u biogoriva, a to su termokemijske, biokemijske i hibridne metode. Termokemijske metode, nazivaju se još i BTL pretvorbom (eng. Biomass-To-Liquid), najprije prevode biomasu u sintezni plin pirolizom i gasifikacijom, a potom u metanol, etanol ili smjese ugljikovodika (BTL benzin i BTL dizel) različitim katalitičkim reakcijama (Sinčić, 2014). Provode se na temperaturi 350 – 550 °C ili 700 – 800 °C za biomasu s visokim udjelom lignina. Biokemijske metode upotrebljavaju mikroorganizme (npr. bakterije i kvasce) za hidrolizu dugih lanaca polisaharida u monosaharide na temperaturi 30 – 65 °C. Hibridne metode su kombinacija termokemijskih i biokemijskih metoda pri čemu se intermedijer proizveden biokemijskim procesom, termokemijski transformira u krajnji proizvod. Glavni nedostatak biogoriva druge generacije je veliki utrošak energije tijekom proizvodnje (Mat Aron i sur., 2020).

2.2.3. Biogoriva treće generacije

Biogoriva treće generacije ekstrahiraju se iz biomase makroalgi i mikroalgi. Energija se iz njih može proizvesti direktno, ekstrakcijom lipida, ili indirektno, kada se čitave upotrijebe kao sirovina za fermentaciju (Callegari i sur., 2019). Mikroalge rastu brže od biljaka (mogu se sakupljati već nakon 5 – 6 dana uzgoja) i ne zahtijevaju velike ni obradive površine pa ne predstavljaju konkurenciju poljoprivredi, stočarstvu ili izgradnji stambenih jedinica za stanovanje ljudi (Mat Aron i sur., 2020). Mogu se uzgajati u otvorenim i zatvorenim sustavima. Otvoreni sustavi su jednostavni i jeftini, ali manje učinkoviti i postoji opasnost od kontaminacije. Zatvoreni sustavi su skuplji, ali omogućuju bolju kontrolu parametara uzgoja (Callegari i sur., 2019). Mikroalge su odgovorne za uklanjanje do 40 % CO₂ iz atmosfere. Proizvode različite biomolekule kao što su proteini, vitamini, ugljikohidrati, lipidi. Mogu proizvesti 15 – 300 puta više lipida od prehrambenih usjeva. Lipidi se koriste za proizvodnju biogoriva termokemijskim ili biokemijskim procesom. Najčešće se koristi termokemijski proces jer ima najveću učinkovitost konverzije, a najkraće trajanje i niže troškove. Rast mikroalgi ovisi o uvjetima uzgoja kao što su temperatura, intenzitet svjetlosti, koncentracija CO₂ i pH. Tri su tipa mikroalgi prema načinu ishrane: autotrofne (koriste anorganski ugljik), heterotrofne (koriste organski ugljik) i miksotrofne (koriste anorganski i organski ugljik). Sposobnost proizvodnje biogoriva varira između različitih vrsta. Miksotrofna mikroalga *Chlorella* sp. može proizvesti 69 % više lipida od heterotrofnih vrsta. Neke mikroalge sadrže do 80 % lipida u suhoj tvari biomase stanica. Najveći prinos lipida je kada se mikroalge uzgajaju u stresnim uvjetima, a koji su to uvjeti (npr. povećanje ili smanjenje temperature, povećanje intenziteta svjetla) ovisi o vrsti zbog

čega je nužno pronaći optimalne uvjete pojedinog soja (Mat Aron i sur., 2020). Za uzgoj su potrebne velike količine svježe vode i nutrijenata (dušika i fosfora) što povećava cijenu proizvodnje. To se djelomično može prevladati uzgojem mikroalgi u otpadnim vodama čime se potreba za vodom smanjuje za 90 % te potpuno ispunjavaju zahtjevi za nutrijentima (Callegari i sur., 2019). Sušenje biomase i ekstrakcija lipida također zahtijevaju veliki utrošak energije. Biogoriva podrijetlom iz mikroalgi su lakše hlapiva i time manje stabilna u odnosu na biogoriva prve i druge generacije (Mat Aron i sur., 2020).

2.2.4. Biogoriva četvrte generacije

Četvrta generacija biogoriva proizvodi se pomoću genetički modificiranih mikroalgi. Cilj je genetičkim i metaboličkim inženjerstvom stvoriti mikroalge koje će biti prilagođenije uzgoju u otpadnim vodama i koje mogu asimilirati velike količine CO₂ kako bi se povećala produktivnost procesa proizvodnje. Genetički modificirane mikroalge mogu se proizvoditi u zatvorenim ili otvorenim sustavima. Kod otvorenih sustava postoji opasnost od ispiranja mikroalgi u okoliš što može dovesti do neželjenih promjena u prirodnom staništu i kompetencije s autohtonim vrstama (Mat Aron i sur., 2020). Smatra se da su biogoriva četvrte generacije ugljično negativna jer genetički modificirane alge troše više CO₂ nego što ga nastaje izgaranjem biogoriva. Zahvaljujući tome, ova biogoriva imaju najmanji utjecaj na okoliš (Sinčić, 2014).

2.2.5. Proizvodnja biodizela

Biodizel je monoalkilni ester nižih alkohola i dugolančanih masnih kiselina iz ulja ili masti biljnog ili životinjskog podrijetla. Prirodna ulja i masti su po sastavu triacilgliceroli (trigliceridi), tj. esteri masnih kiselina i glicerola. Masne kiseline mogu sadržavati različit broj ugljikovih atoma, najčešće 12 – 24, koji su međusobno različito povezani pa zbog toga imaju raznolika svojstva. Biodizel se proizvodi transesterifikacijom ulja i masti pomoću metanola, etanola ili drugog alkohola, uz prisutnost kiselog ili baznog katalizatora (Sinčić, 2014). Fizikalna i kemijska svojstva biodizela slična su konvencionalnom dizelu što olakšava njegovu upotrebu. Sirovine kao što su alge i mikroalge imaju potencijal smanjenja troškova proizvodnje za 60 – 90 %. Glavna prednost im je visoka produktivnost, a najveće poteškoće stvara ekstrakcija lipida (Callegari i sur., 2019).

Neke od prednosti biodizela su: obnovljive sirovine koje manje doprinose stvaranju dodatnog CO₂; ispušni plinovi koji nastaju sagorijevanjem sadrže manje ugljikovog monoksida, neizgorenih ugljikovodika, čvrstih čestica, policikličkih aromata i drugih štetnih supstanci; lakše je razgradiv od ulja iz kojih se proizvodi; ima više plamište (iznad 100 °C) koje omogućuje

sigurniji rad i skladištenje. Nedostaci su: manji sadržaj energije u odnosu na petrodizel, sagorijevanjem se ispušta više dušikovih oksida, može doći do oksidacije i stvaranja taloga tijekom skladištenja, može doći do izlučivanja kristalića estera zasićenih masnih kiselina pri nižim temperaturama zbog čega se mogu začepiti filteri (Sinčić, 2014).

2.2.5.1. Radni mikroorganizmi

Mikroorganizme koji imaju sposobnost proizvodnje i nakupljanja visokih koncentracija lipida ($\geq 20\%$ w/w suhe tvari biomase) nazivamo oleaginoznim mikroorganizmima (Maza i sur., 2020). Tu se ubrajaju neke mikroalge, bakterije, kvasci i plijesni. Mikrobnii lipidi se najintenzivnije nakupljaju tijekom stacionarne faze rasta i strukturom su slični biljnim uljima. Najčešće su građeni kao triacilgliceroli. S obzirom da nemaju naboj, ne mogu se ugraditi u staničnu membranu, već se u citoplazmi nakupljaju u obliku hidrofobnih tijela nazvanih lipidne kapljice. Za biosintezu lipida potreban je visok molarni ili maseni omjer izvora ugljika i dušika (C/N) i aeracija. Koncentracija otopljenog kisika u podlozi može utjecati na sastav masnih kiselina (Zuccaro i sur., 2020).

Mikroorganizmi se mogu uzgajati na lignoceluloznim sirovinama što uključuje sljedeće korake: predobrada sirovine, enzimska hidroliza predobrađene sirovine, biokonverzija šećera u lipide i ekstrakcija lipida (Mat Aron i sur., 2020). Izazov u takvoj proizvodnji predstavlja kontrola C/N omjera, potrebna visoka koncentracija šećera i prisutnost inhibitora. Prednost odvojene hidrolize i biokonverzije je veća učinkovitost, s obzirom da se hidroliza obično provodi na temperaturi 40 – 50 °C, a uzgoj na 30 – 37 °C. Nedostatak je što može doći do inhibicije hidrolitičkih enzima visokom koncentracijom oslobođenih šećera. Da bi se to izbjeglo, hidroliza i fermentacija se mogu provoditi istovremeno pa mikroorganizmi odmah troše šećere nastale hidrolizom. Ograničenje ove tehnike su različite potrebe enzima i mikroorganizama u smislu temperature i pH vrijednosti (Zuccaro i sur., 2020).

Usko grlo mikrobne proizvodnje lipida je njihova ekstrakcija iz stanica s obzirom na nedostatak dovoljno učinkovitih i jeftinih metoda. Najčešće se primjenjuje ekstrakcija otapalima jer omogućuje najveći prinos ekstrahiranih lipida. Kako bi se smanjili ukupni troškovi, istraživanja se usmjeravaju na provođenje *in situ* transesterifikacije koja predstavlja ekstrakciju lipida i konverziju u biodizel u jednom koraku (Zuccaro i sur., 2020).

2.2.5.1.1. *Rhodotorula sp.*

Oleaginozni kvasci mogu brzo rasti na različitim izvorima ugljika te imaju najveće poznate brzine nakupljanja lipida od svih organizama (Brandenburg i sur., 2021). Imaju kratak životni ciklus, potrebno je manje rada u odnosu na proizvodnju biljnih ulja, manje su pogođeni izmjenama godišnjih doba i proizvodnja ne ovisi o geografskoj lokaciji. Neki od rodova u kojima su pronađeni su *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Trichosporon* i *Lipomyces* (Maza i sur., 2020). Kada se uzgajaju u uvjetima limitacije dušikom, ali sa suviškom izvora ugljika, dolazi do aktivacije kaskade reakcija koje dovode do stvaranja intermedijera kao što je acetil-CoA. Oleaginozni kvasci tada proizvode lipide, pretežno triacilglicerole, za razliku od ne-oleaginoznih kvasaca koji će u takvim uvjetima proizvoditi i nakupljati polisaharide. Najčešće masne kiseline su oleinska (C18:1), linolna (C18:2), palmitinska (C16:0) i palmitoleinska (C16:1) kiselina (Zuccaro i sur., 2020).

Naziv roda *Rhodotorula* dolazi od riječi *rhodos* (grč. crveno) i *torus* (lat. ispupčenje). Kolonije ovih kvasaca su obojene, mogu biti raznih nijansi krem, žute, ružičaste, narančaste ili crvene boje koja potječe od pigmenata karotenoida. Većina vrsta koje pripadaju ovom rodu su mezofilni i aerobni organizmi, iako neki uspijevaju i pri niskim temperaturama (Kot i sur., 2016). Temperatura uzgoja ovisno o vrsti može biti 18 – 30 °C (Mussagy i sur., 2022). Mogu metabolizirati glukozu, galaktozu, saharozu, maltozu, trehalozu, etanol, glicerol i heksadekan kao izvore ugljika. Mogu rasti u prisutnosti 10 % NaCl, a ne toleriraju koncentracije glukoze iznad 50 %. Izolirani su iz raznolikih staništa, npr. zraka, tla, mora, jezera, hrane, ljudske kože. Većina sojeva je nepatogena (Kot i sur., 2016).

Kvasci iz roda *Rhodotorula sp.* mogu akumulirati 40 – 70 % w/w intracelularnih lipida uz istovremeni suvišak izvora ugljika i limitaciju dušikom. Pokazalo se da imaju prednost pred drugim vrstama oleaginoznih kvasaca jer mogu rasti na različitim jeftinim izvorima ugljika kao što su ugljikohidrati, organske kiseline, glicerol, otpadne vode, industrijski nusproizvodi. Na lipogenezu također utječe koncentracija sumpora i fosfata u hranjivoj podlozi (Kot i sur., 2016). Udio lipida i sastav masnih kiselina može varirati ovisno o aeraciji, temperaturi, pH vrijednosti, koncentraciji inokuluma, sastavu hranjive podloge, trajanju uzgoja i soju kvasca. Lipidi koje sintetizira *Rhodotorula sp.* mogu se koristiti kao sirovina za proizvodnju biodizela, ali i kao izvor nutritivno bogatih masnih kiselina (aditivi u hrani, dodaci prehrani) (Maza i sur., 2020).

Tipičan predstavnik ovog roda je *Rhodotorula glutinis*. Osim lipida, sintetizira industrijski važne karotenoide (β -karoten, torulen i torularodin) i enzime (lipaze, invertaze, pektinaze, tanin

acil hidrolaze) (Kot i sur., 2016). Karotenoidi štite stanicu kvasca od oksidacije i UV zračenja (Mussagy i sur., 2022). No karotenoidi imaju i brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, a kako ih ljudski organizam ne može sam sintetizirati, potrebno ih je unositi hranom. Mikrobná sinteza karotenoida učinkovitija je od izolacije iz biljaka ili kemijske sinteze (Kot i sur., 2016).

2.2.5.1.2. *Schizochytrium* sp.

Oleaginozne mikroalge su prokariotski ili eukariotski mikroorganizmi koji, zahvaljujući svojoj jednostavnoj staničnoj strukturi, mogu brzo rasti u različitim uvjetima. Lipidi koje nakupljaju sastoje se od zasićenih i nezasićenih masnih kiselina s 12 – 22 ugljikova atoma, a neke od njih ubrajaju se u ω -3 i ω -6 obitelji masnih kiselina. Uz izvor ugljika, mikroalge za rast zahtijevaju i druge nutrijente, posebno dušik i fosfor, stoga im se dodaju različiti vitamini i soli. Bitni parametri uzgoja su koncentracija kisika i CO₂, temperatura, pH i intenzitet svjetla (Zuccaro i sur., 2020).

Schizochytrium sp. je jednostanični eukariotski heterotrofni morski mikroorganizam (Du i sur., 2019). Neki znanstvenici ga ubrajaju u mikroalge, dok drugi navode da nije mikroalga jer nema plastide i ne provodi fotosintezu te se klasificira kao *Thraustochytrid* (Du i sur., 2021). Može nakupljati lipide od 50 – 77 % w/w suhe tvari stanice (Shuba i Kifle., 2018). Sastav lipida je jednostavan, prevladavaju miristinska (C14:0), palmitinska (C16:0), dokosapentaenoična (C22:5) i dokosaheksaenoična (C22:6) kiselina. Miristinska i palmitinska kiselina mogu se upotrijebiti za proizvodnju biodizela (Wang i sur., 2022). Posebno je od interesa dokosaheksaenoična kiselina (eng. docosahexaenoic acid, DHA) koja može činiti 30 – 70 % ukupnih masnih kiselina. DHA je esencijalna ω -3 masna kiselina koja može regulirati upale, oksidativni stres, imunitet i metabolizam kolesterola (Ding i sur., 2022). Izvori DHA su riblje ulje i lipidi iz mikroalgi, a mikroalgalna DHA se lakše metabolizira u ljudskom tijelu (Wang i sur., 2021). Američka agencija za hranu i lijekove (eng. Food and Drug Administration, FDA), dodijelila je DHA izoliranoj iz *Schizochytrium* sp. GRAS status (eng. Generally Recognized As Safe) (Du i sur., 2021).

Schizochytrium sp. može koristiti širok raspon izvora ugljika među kojima su glukoza, glicerol, lignocelulozni hidrolizati, otpadne vode (Du i sur., 2021). Kao izvor dušika najčešće se primjenjuju kvašćev ekstrakt, pepton ili natrijev glutamat. Neki sojevi mogu koristiti anorganske izvore dušika, npr. amonijev sulfat, koji su jeftiniji te ih mikroorganizmi brže iskorištavaju. Visok omjer C/N općenito pogoduje rastu biomase i nakupljanju lipida, ali ako je previsok smanjit će se udio DHA u lipidima. Idealno je 70 – 120 g/L izvora ugljika i 8 – 11 g/L izvora

dušika. *Schizochytrium* sp. za rast odgovara salinitet 2 – 50 g/L, a pH vrijednost 5 – 8 (Wang i sur., 2021). Optimalna temperatura za uzgoj je u rasponu 20 – 30 °C (Polbrat i sur., 2021). Više temperature pogoduju rastu stanica, a niže temperature akumulaciji lipida (Wang i sur., 2021).

Ekstrakcija lipida iz stanica mikroalgi predstavlja izazov zbog kompleksne i čvrste stanične stijenke. Usporedbom različitih metoda razbijanja stanične stijenke *Schizochytrium* sp., pokazalo se da tretman stanica lizozimom i celulazama prije ekstrakcije rezultira najbržom ekstrakcijom i najvećim udjelom DHA (Chen i sur., 2023).

Osim lipida, proizvode i terpenoide, uključujući karotenoide, sterole (kolesterol, stigmasterol, lanosterol, cikloartenol) i skvalen (Bi i sur., 2023). Najvažniji karotenoid u *Schizochytrium* sp. je astaksantin koji ima jako antioksidativno djelovanje i važnu ulogu u prevenciji raka (Du i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

Radni mikroorganizmi korišteni u ovom radu su kvasac *Rhodotorula* sp. izoliran iz Jadranskog mora i nalazi se u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta u Zagrebu te mikroalga *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 iz zbirke mikroorganizama American Type Culture Collection (ATCC, Sjedinjene Američke Države).

3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

U eksperimentu je kao lignocelulozna sirovina korištena otpadna morska trava s 88,8 % suhe tvari. Ostale sirovine korištene za pripremu hranjivih podloga navedene su u tablici 1.

Tablica 1. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

Sirovina	Oznaka čistoće	Proizvođač
kvašćev ekstrakt	za mikrobiologiju	Biolife, Italija
natrijev glutamat	p.a.	Sigma-Aldrich, Švicarska
magnezijev sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
morska sol	techn.	Solana Nin, Hrvatska
kalijev dihidrogenfosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
amonijev sulfat	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
kalcijev klorid dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska

3.1.3. Ostale kemikalije i enzimi

U eksperimentalnom radu korištene su i kemikalije te enzimi navedeni u tablici 2.

Tablica 2. Ostale kemikalije i enzimi korišteni tijekom eksperimentalnog rada

Naziv kemikalije	Oznaka čistoće	Proizvođač
natrijev hidroksid	p.a.	Merck KGaA, Njemačka
sumporna kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalcijev karbonat	p.a.	Kemika, Hrvatska
glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
monohidrat limunske kisljine	p.a.	Merck KGaA, Njemačka
3,5-dinitrosalicilna kiselina	p.a.	Sigma-Aldrich, Švicarska
natrijev sulfit	p.a.	Kemika, Hrvatska
fenol	99%	Kemika, Hrvatska
kalij natrij tartarat	p.a.	Kemika, Hrvatska
metanol	≥ 99,9%	Merck KGaA, Njemačka
kloroform	≥ 99,8%	Honeywell, Njemačka
magnezijev klorid heksahidrat	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
cinkov sulfat heptahidrat	99%	Merck KGaA, Njemačka
ampicilin	p.a.	Fisher Scientific, UK
Cellulaze enzyme blend	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, Švicarska
Viscozyme L	za upotrebu u biotehnologiji	Novozymes, Danska

3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj kvasca i mikroalge

Koncentracije soli korištenih za pripremu hranjivih podloga za uzgoj kvasca prikazane su u tablici 3. Pripremljene su koncentrirane otopine soli radi lakšeg dodavanja u podlogu i sterilizacije u autoklavu. Navedene koncentracije pojedinih soli dodane su u tikvicu sa 100 mL filtrata kiselinske predobrade morske trave te tikvice s 50 g L⁻¹ i 100 g L⁻¹ predobrađene morske trave u kojima je provedena enzimska hidroliza tijekom 48 sati.

Tablica 3. Sastav hranjivih podloga

Sastojak hranjive podloge	Koncentracija	
	Podloga za uzgoj kvasca	Podloga za uzgoj mikroalge
amonijev sulfat	5 g L ⁻¹	-
kalijev dihidrogenfosfat	1 g L ⁻¹	1 g L ⁻¹
magnezijev sulfat heptahidrat	0,05 g L ⁻¹	2 g L ⁻¹
morska sol	15 g L ⁻¹	25 g L ⁻¹
kalcijev klorid dihidrat	0,01 g L ⁻¹	-
kvašćev ekstrakt	1 g L ⁻¹	10 g L ⁻¹
natrijev glutamat	-	10 g L ⁻¹

3.1.5. Oprema i aparatura

3.1.5.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

U eksperimentalnom radu korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) 1290 Infinity II (Agilent Technologies, SAD). Uređaj se sastoji od pumpe (G7104A), automatskog injektora (G7167B), pećnice (G7116B), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Rezex ROA-Organic Acid H⁺; Phenomenex, SAD) s odgovarajućom pretkolonom, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID), modula za kontrolu sustava i računalnog programa za obradu podataka (OpenLAB CDS).

3.1.5.2. Preostala oprema i aparatura

Uz navedeni uređaj te laboratorijsko posuđe i pribor, korištena je i sljedeća oprema:

- UV/Vis spektrofotometar (Cary 100 UV-Vis, Agilent Technologies, SAD)
- analitička vaga (Sartorius, Njemačka; Acculab, SAD)
- tehnička vaga (Tehtnica ET-1111, Slovenija)
- mlinac za kavu (Gorenje, Slovenija)
- vodena kupelj (Sutjeska, Jugoslavija)
- centrifuga (ThermoFisher Scientific SL 8R, SAD; Witeg, Njemačka)

- laboratorijski termostat-inkubator (BTE-S, Termo-medicinski aparati Bodalec & Havočić, Hrvatska)
- sušionik (Instrumentaria ST-50, Hrvatska)
- magnetna miješalica (Cimarec i Poly, Thermo Scientific, SAD)
- laboratorijska tresilica (RM 71 B. Braun Biotech. International, Sartorius Group, Njemačka)
- vortex mikser (WM-10, Witeg, Njemačka)
- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- ledomat (AF-10, Scotsman, Italija)
- mufolna peć (IP-08, Iskraterm, Slovenija)
- boca plina s dušikom (Messer Croatia Plin, Hrvatska)
- hladnjak i zamrzivač

3.2. METODE

3.2.1. Predobrada morske trave kiselinom i lužinom

Provedena je kiselinska i alkalna predobrada morske trave s tri različite koncentracije kiseline, odnosno lužine. Korištene su 0,15 M, 0,3 M i 0,75 M H₂SO₄ za kiselinsku te 0,15 M, 0,3 M i 0,75 M NaOH za alkalnu predobradu. Početni omjer tekućeg dijela (otopine sumporne kiseline, tj. natrijeve lužine) i čvrstog dijela (morske trave) iznosio je L:S = 15:1 (mL g⁻¹). Po 5 g suhe tvari morske trave (prethodno usitnjene škarama na dužinu oko 2 cm) pomiješano je u odgovarajućem omjeru s kiselinom/lužinom u Erlenmeyerovim tikvicama od 300 mL koje su zatim stavljene u vodenu kupelj na temperaturu 80 °C tijekom 24 sata. Predobrađena sirovina je filtrirana preko Büchnerovog lijevka. Filtrat je spremljen na -20 °C, a čvrsti ostatak je ispran kipućom vodom do neutralnog pH i osušen na 50 °C te kasnije usitnjen u mlincu i korišten za određivanje koncentracije ugljikohidrata i lignina, određivanje udjela suhe tvari i pepela te enzimsku hidrolizu.

3.2.2. Optimiranje enzimske hidrolize morske trave

Ispitan je učinak koncentracije sirovine i dodanog celulolitičkog enzima (Cellulase enzyme blend) te enzimskog pripravka Viscozyme L na učinkovitost hidrolize izvorne sirovine (morske trave). Enzimska hidroliza provedena je u ukupnom volumenu od 30 mL. U Erlenmeyerove tikvice od 100 mL dodano je 5 % (1,5 g), odnosno 10 % (3 g) sirovine usitnjene u mlincu.

Tikvice su zatvorene vatenim čepom i sterilizirane u autoklavu. Nakon hlađenja, u tikvice je u aseptičnim uvjetima dodano po 30 mL također steriliziranog citratnog pufera ($c = 50 \text{ mM}$, pH 4,8), antibiotik (ampicilin 100 mg L^{-1}) i enzim/i. Celulaze su dodane u količini od 5, 15 i 30 FPU/g glukana, a Viscozyme 0,01 g proteina/g suhe tvari sirovine te u volumnom omjeru 1:1 (mL/mL) s celulazama. Viscozyme je mješavina različitih enzima specijaliziranih za lignocelulozu. Neki od tih enzima su arabinaze, celulaze, hemicelulaze, ksilanaze i β -glukanaze. Sastav reakcijskih smjesa prikazan je u tablici 4. Enzimaska hidroliza provedena je tijekom 24 h na $50 \text{ }^\circ\text{C}$ uz konstantno miješanje na magnetnoj miješalici. Tekući dio smjese izdvojen je za određivanje koncentracije ugljikohidrata. U tu svrhu, nekoliko mililitara uzorka je u plastičnim kivetama od 15 mL kuhano u kipućoj vodenoj kupelji 10 min kako bi se denaturirali i istaložili proteini. Kivete su zatim ohlađene u ledu te centrifugirane 10 min pri 6000 rpm. U bistrom supernatantu određena je koncentracija ugljikohidrata UPLC analizom.

Tablica 4. Sastav reakcijskih smjesa za enzimsku hidrolizu neobrađene sirovine

Tikvica	1	2	3	4	5	6	7	8
Sirovina (%)	5	5	5	10	10	10	10	10
Celulaze (FPU g^{-1})	5	15	30	5	15	30	15	15
Viscozyme L	-	-	-	-	-	-	0,01 g g^{-1}	1:1 mL/mL

3.2.3. Enzimaska hidroliza predobrađene sirovine

Na temelju rezultata enzimske hidrolize izvorne morske trave, odabrani su uvjeti enzimske hidrolize za predobrađenu sirovinu. U plastične kivete volumena 15 mL stavljeno je 5 %, odnosno 10 % predobrađene sirovine u 4 mL 50 mM citratnog pufera te je dodano 15 FPU celulaza/g glukana i Viscozyme u volumnom omjeru 1:1 (mL/mL) prema volumenu dodanih celulaza. Također je dodan ampicilin (100 mg L^{-1}). Sirovina i pufer su prethodno sterilizirani u autoklavu te je dodavanje enzima provedeno u aseptičnim uvjetima. Enzimaska hidroliza provedena je na $50 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 24 h uz konstantno miješanje na tresilici. Nakon hidrolize enzimi su denaturirani kuhanjem te je centrifugiranjem izdvojen supernatant za određivanje koncentracije ugljikohidrata.

3.2.4. Kiselinska predobrada i enzimaska hidroliza morske trave te uzgoj kvasca i mikroalge

Prema postignutom iskorištenju enzimske hidrolize predobrađene sirovine, kao metoda predobrade odabrana je kiselinska hidroliza morske trave s 0,3 M sumpornom kiselinom. Škarama je usitnjeno 200 g morske trave na dužinu oko 2 cm i dodana je kiselina u omjeru L:S = 15:1 (mL g⁻¹). Erlenmeyerove tikvice sa smjesom stavljene su u vodenu kupelj 24 sata na 80 °C. Predobrađena sirovina je procijeđena preko plastičnog cjedila te je filtrat spremljen na -20 °C. Čvrsti dio ispran je kipućom vodom do neutralnog pH, osušen i usitnjen u mlincu. Nakon toga je provedena enzimaska hidroliza predobrađene sirovine uz dodatak celulaza u količini od 15 FPU/gramu glukana i jednakog volumena Viscozyme-a. U 100 mL citratnog pufera (50 mM), u tikvicama od 300 mL, dodano je 5 % (g/mL) usitnjene predobrađene sirovine. Nakon 24 sata enzimske hidrolize uzeti su uzorci za analizu koncentracije šećera te je u dio tikvica dodano još 5 % sirovine pri čemu je u te tikvice odmah na početku bila dodana ukupna količina enzima. Predobrađena sirovina i pufer su prethodno sterilizirani u autoklavu. Tikvice su 48 sati nakon početka enzimske hidrolize nacijepljene s 10 % (mL/mL) inokuluma kvasca, odnosno mikroalge, uz dodatak potrebnih soli. Također su nacijepljene i tikvice u kojima je podloga pripremljena na bazi filtrata kiselinske hidrolize morske trave.

Uzgoj je proveden tijekom 7 dana na laboratorijskoj tresilici na temperaturi 25 °C. Treći, peti i sedmi dan za kvasac, odnosno drugi, četvrti i sedmi dan za mikroalgu, uzeta je po jedna tikvica radi analize. Sadržaj tikvice je centrifugiran u plastičnoj kivetici 10 min pri 6000 rpm. Supernatant je izdvojen za određivanje koncentracije ugljikohidrata, a talog je resuspendiran u deioniziranoj vodi kako bi se isprali ostaci podloge i soli. Ponovljeno je centrifugiranje te je supernatant odbačen, a talog spremljen na -20 °C.

Kada je završen uzgoj, talozi su odležani i osušeni u sušioniku na 55 °C na prethodno izvaganom masnom papiru. Nakon sušenja su izvagani i usitnjeni u mlincu za kavu.

3.2.5. Analitičke metode

3.2.5.1. Gravimetrijsko određivanje udjela suhe tvari u morskoj travi

Morska trava usitnjena je u mlincu za kavu te je na analitičkoj vagi u Petrijevu zdjelicu odvagano 0,5 g morske trave koja je zatim osušena u sušioniku na 105 °C do konstantne mase.

Nakon hlađenja u eksikatoru, Petrijeva zdjelica s osušenom sirovinom je ponovno izvagana. Udio vlage, odnosno suhe tvari, izračunat je prema izrazu:

$$X = \frac{m_s}{m_v} \times 100 (\%) \quad [1]$$

gdje je:

X – udio suhe tvari (%)

m_s – masa osušene morske trave (g)

m_v – masa vlažne morske trave (g).

3.2.5.2. Gravimetrijsko određivanje sadržaja pepela u morskoj travi

U prethodno žarene i izvagane porculanske lončice, odvagano je 0,5 g zračno suhe neobrađene i predobrađene morske trave te je uzorak osušen do konstantne mase na 105 °C i izvagana kako bi se početna masa sirovine korigirala za udio vlage. Lončići sa sirovinom su zagrijavani na Bunsenovom plameniku do potpune karbonizacije, a zatim preneseni u mufolnu peć zagrijanu na 550 °C gdje su žareni do konstantne mase. Nakon hlađenja u eksikatoru, lončići su izvagani te je udio pepela izračunat prema formuli:

$$w_p = \frac{m_p}{m_u \times X} \times 100 (\%) \quad [2]$$

pri čemu je:

m_p – masa pepela (g)

m_u - masa uzorka (g)

X – udio suhe tvari u uzorku (%).

3.2.5.3. Kiselinska hidroliza sirovine

Kako bi se u izvornoj i predobrađenoj morskoj travi odredila koncentracija ugljikohidrata te lignina topljivog i netopljivog u kiselini, provedena je kiselinska hidroliza. U okruglu tikvicu s ravnim dnom dodano je 0,4 g sirovine usitnjene u mlincu i 4 mL 72 %-tne H₂SO₄. Sadržaj u tikvici povremeno je miješan staklenim štapićem kako bi se ostvario što bolji kontakt sirovine i

kiseline. Nakon jednog sata inkubacije u termostatu na temperaturi 30 °C, dodano je 112 mL demineralizirane vode tako da je koncentracija sumporne kiseline iznosila 4 %. Uzorci su kuhani 4 sata uz povratno hladilo. Nakon kuhanja, vrući uzorak je profiltriran kroz prethodno osušen i izvagan celulozni filter postavljen na Büchnerov lijevak. U zaostalom čvrstom dijelu sirovine na filter papiru određen je lignin netopljiv u kiselini, a u filtratu koncentracija ugljikohidrata i lignina topljivog u kiselini. Koncentracija ugljikohidrata određena je UPLC analizom prije čega su filtrati neutralizirani kalcijevim karbonatom do pH vrijednosti ≈ 4 .

3.2.5.4. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini

Talog na filter papiru nakon kiselinske hidrolize najprije je ispiran kipućom deioniziranom vodom do neutralnog pH, a zatim je osušen je u sušioniku na 105 °C i izvagan. Udio lignina netopljivog u kiselini izračunat je prema formuli:

$$w(\text{LNTK}) = \frac{m_{(\text{osušeni filter papir s talogom})} - m_{(\text{osušeni prazni filter papir})}}{m_{(\text{uzorak sirovine uzet za analizu})}} \times 100 (\%) \quad [3]$$

3.2.5.5. Određivanje udjela lignina topljivog u kiselini

Udio lignina topljivog u kiselini određen je u filtratu kiselinske hidrolize, mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 205 nm UV/Vis spektrofotometrom. Uzorak je prethodno razrijeđen deioniziranom vodom kako bi apsorbancija bila u području od 0,7 do 1. Udio lignina topljivog u kiselini izračunat je prema izrazu:

$$w(\text{LTK}) = \frac{A \times D \times V}{\alpha \times b \times m} \times 100 (\%) \quad [4]$$

gdje je:

A = apsorbancija uzorka pri 205 nm

D = faktor razrjeđenja

V = volumen filtrata (L)

α = konstanta, 110 g L⁻¹ cm⁻¹

b = širina kivete (1 cm)

m = masa uzorka (g).

3.2.5.6. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC analiza)

Identifikacija i kvantifikacija ugljikohidrata te limunske, octene i mravlje kiseline u kiselinskim hidrolizatima izvorne i predobrađene sirovine, sirovini nakon izvršene enzimske hidrolize te hranjivim podlogama provedena je tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti.

U supernatantima hranjivih podloga izdvojenih tijekom uzgoja kvasca i mikroalge provedeno je taloženje proteina cinkovim (II) sulfatom. U 750 μL supernatanta dodano je 750 μL 10 %-tne otopine cinkovog (II) sulfata, sadržaj je vorteksiran i ostavljen na mirovanju 15 minuta. Nakon toga je centrifugiran na 10 000 rpm 10 minuta kako bi se proteini istaložili te je za analizu izdvojen supernatant.

Svi uzorci profiltrirani su kroz najlonski filter veličine pora 0,2 nm u vijale za UPLC analizu. Na kromatografsku kolonu injektirano je 10 μL pojedinog uzorka. Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline. Brzina mobilne faze iznosila je 0,6 mL min^{-1} , a temperatura pećnice 60 $^{\circ}\text{C}$. Kromatogrami su analizirani pomoću računalnog programa OpenLAB CDS. Koncentracija spoja izračunata je pomoću jednadžbi baždarnih pravaca koje prikazuju ovisnost površine ispod krivulje pika (A) o koncentraciji spoja (x) (tablica 5).

Tablica 5. Retencijska vremena i jednadžbe baždarnih pravaca komponenti određenih u hidrolizatima morske trave tijekom eksperimenta

Spoj	Retencijsko vrijeme	Jednadžba baždarnog pravca	R ²
Galakturonska kiselina	4,992	$A = 11977x - 1302,3$	1,0000
Glukoza	5,080	$A = 140381,12x - 157,58$	1,0000
Ksilozna	5,590	$A = 144244x - 1142,6$	0,9991
Arabinoza	5,604	$A = 128443x - 3314,1$	0,9989
Limunska kiselina	4,661	$A = 141807x - 13750$	0,9997
Mravlja kiselina	7,400	$A = 47328x + 53,595$	1,0000
Octena kiselina	7,683	$A = 57358x + 697,25$	0,98

3.2.5.7. *Određivanje koncentracije reducirajućih šećera DNS metodom*

Aktivnost enzimskog pripravka celulaza korištenog u eksperimentalnom radu određena je pomoću DNS metode (Miller, 1959). Metoda se temelji na spektrofotometrijskom određivanju koncentracije reducirajućih šećera čija slobodna karbonilna skupina u lužnatoj sredini reagira s 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom (DNS). Karbonilna skupina šećera oksidira u karboksilnu, a 3,5-dinitrosalicilna kiselina reducira u 3-amino-5-nitrosalicilnu kiselinu. Jedan mol šećera reagira s jednim molom DNS kiseline pri čemu DNS reagens mijenja boju iz svijetlo žute u crveno smeđu. Koncentracija nastale 3-amino-5-nitrosalicilne kiseline određuje se mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 575 nm.

Pripremljeni su sljedeći reagensi:

- Citratni pufer:

Pripremljen je 1 M pufer otapanjem 210 g monohidrata limunske kiseline u 750 mL vode te je dodano 50–60 g NaOH da bi se pH vrijednost podesila na 4,3. Zatim je dodana voda do ukupnog volumena 1 L te je provjerena pH vrijednost koja mora iznositi 4,5. Pufer je po potrebi razrjeđivan demineraliziranom vodom u omjeru 1:20 kako bi se dobio 50 mM citratni pufer.

- DNS reagens

U 100 mL demineralizirane vode otopljeno je 1 g 3,5-dinitrosalicilne kiseline, 0,05 g natrijevog sulfita i 1 g NaOH te je dodano 0,2 mL fenola. Reagens je čuvan u tamnoj boci na +4°C.

- Rochelleove soli:

20 g kalij natrij tartarata otopljeno je u 50 mL demineralizirane vode.

- Standardna otopina glukoze:

Otopljen je 1 g glukoze u 100 mL demineralizirane vode.

Postupak:

U epruvetama su pripremljeni razrijeđeni standardi glukoze na sljedeći način:

GS1: 1 mL standardne otopine glukoze + 4 mL 50 mM citratnog pufera.

GS2: 1 mL standardne otopine glukoze + 2 mL 50 mM citratnog pufera.

GS3: 1 mL standardne otopine glukoze + 1 mL 50 mM citratnog pufera.

GS4: 1 mL standardne otopine glukoze + 0,5 mL 50 mM citratnog pufera.

Po 0,5 mL pojedinog standarda glukoze (GS1 – GS4) i 1 mL 50 mM citratnog pufera stavljeno je u epruvetu te je dodan 1,5 mL DNS reagensa. Napravljena je i slijepa proba koja je umjesto glukoznog standarda sadržavala 1,5 mL deionizirane vode. Reakcijska smjesa se 15 min kuhala u vodi koja ključa. Epruvete su ohlađene u hladnoj vodi te je dodano 0,5 mL Rochelleovih soli. Razrijeđeno je 0,6 mL uzorka sa 7,5 mL demineralizirane vode te je izmjerena apsorbancija pri 575 nm prema slijepoj probi.

3.2.5.8. *Određivanje celulolitičke aktivnosti enzimskog pripravka*

Ukupna celulolitička aktivnost enzimskog pripravka određena je FPA testom (eng. Filter Paper Assay) sa supstratom netopljivim u vodi (filter papir Whatman No. 1) propisanim od strane Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (eng. International Union for Pure and Applied Chemistry, IUPAC). Testom se određuje količina enzima potrebnog za oslobađanje 4 mg mL⁻¹ glukoze hidrolizom 50 mg filter papira tijekom 60 min pri 50 °C. Ukupna celulolitička aktivnost iskazuje se kao FPU (eng. Filter Paper Units) po mililitru originalnog enzimskog pripravka.

Postupak:

Pripremljena su različita razrjeđenja enzimskog pripravka. U epruvete je dodan 1 mL 50 mM citratnog pufera te je u njega potopljen supstrat, zarolan filter papir dimenzija 1,0 x 6,0 cm. Slijepa proba je sadržavala 1,5 mL citratnog pufera te supstratna kontrola 1,5 mL pufera i supstrat. Za svako razrjeđenje enzima pripremljena je enzimska kontrola s 1 mL pufera. Epruvete su inkubirane 10 min u vodenoj kupelji na 50 °C. U epruvete sa supstratom i enzimskom kontrolom dodano je 0,5 mL odgovarajućeg enzimskog razrjeđenja te su sve epruvete inkubirane u vodenoj kupelji 60 min na 50 °C. Enzimska reakcija je zaustavljena dodatkom 1,5 mL DNS reagensa te je koncentracija reducirajućih šećera određena DNS metodom.

Izračunavanje celulolitičke aktivnosti:

Nacrtno je baždarni pravac, tj. ovisnost apsorbancije A_{575} o koncentraciji glukoze izmjerene DNS metodom sa standardnim otopinama glukoze. Izračunata je razlika apsorbancije (ΔA) pojedinog razrjeđenja enzimskog pripravka i sume apsorbancija odgovarajućih enzimskih i supstratnih kontrola. Iz jednadžbe baždarnog pravca, uvrštavanjem ΔA , izračunata je oslobođena koncentracija glukoze za svako razrjeđenje te je u baždarni dijagram ucrtana

ovisnost razrjeđenja enzima uzetog u reakciju o odgovarajućoj koncentraciji glukoze. Na temelju dobivenog pravca određeno je razrjeđenje enzimskog pripravka (enzyme dilution rate, EDR) potrebno da se oslobodi 4 mg glukoze.

Ukupna celulolitička aktivnost enzimskog pripravka određena je prema jednadžbi:

$$FPA = \frac{0,37}{EDR} \text{ (FPU mL}^{-1}\text{)} \quad [5]$$

gdje je 4 mg glukoze = $4 \text{ mg} / (0,18 \text{ mg } \mu\text{mol}^{-1} \times 1 \text{ mL} \times 60 \text{ min}) = 0,37 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$.

3.2.5.9. Određivanje udjela lipida u uzorku

Ekstrakcija lipida iz stanične biomase kvasca *Rhodotorula* sp. i mikroalge *Schizochytrium* sp. provedena je ekstrakcijom tekuće-tekuće prema propisu Schneitera i Dauma (2006). 150 mg osušenog i usitnjenog taloga u kojem su se nalazile stanice kvasca, odnosno mikroalge, stavljeno je u staklene kivete te je dodano 0,3 mL vode, 2 mL metanola i 4 g staklenih kuglica promjera 0,25 – 0,3 mm. Stanice su razbijane vorteksiranjem tijekom 10 minuta. U kivete je dodano 4 mL kloroforma te je sadržaj ponovno dobro vorteksiran. Ekstrakcija staničnih lipida je provedena uz miješanje na tresilici preko noći. Talog i staklene kuglice uklonjeni su filtracijom uzorka kroz sinter lijevak, uz ispiranje smjesom kloroforma i metanola u omjeru 2:1 (v/v). Ekstrakt lipida je pročišćen dodatkom 0,034 % MgCl₂ (20 % volumena ekstrakta) uz miješanje na vortex mikseru. Nakon odvajanja faza, donja kloroformska faza izdvojena je pomoću šprice s iglom i prenesena u čistu izvaganu epruvetu. Kloroform je iz ekstrakta uklonjen propuhivanjem uzorka plinovitim dušikom. Epruveta je izvagana na analitičkoj vagi te je udio lipida u uzorku izračunat prema sljedećoj jednadžbi:

$$w_L = \frac{m_2 - m_1}{m_u} \times 100 \text{ (%) } \quad [6]$$

pri čemu je:

w_L = udio lipida u uzorku (%)

m_1 = masa prazne epruvete (g)

m_2 = masa epruvete s lipidima (g)

m_u = masa uzorka uzetog u analizu (g).

3.2.6. Izračunavanje udjela strukturnih ugljikohidrata

Masa polisaharida (glukana, ksilana, arabinana) u sirovini izračunata je iz mase odgovarajućih monosaharida (glukana, ksilana, arabinana) u izvornoj i predobrađenoj sirovini nakon kiselinske hidrolize te enzimskim hidrolizatima uz pomoć korektivnog faktora prema jednadžbi:

$$m_p = \gamma_{\text{msah}} \times V_{\text{hidrolizat}} \times K_f \quad [7]$$

gdje je:

m_p = masa polisaharida (g)

γ_{msah} = koncentracija monosaharida (g L^{-1})

$V_{\text{hidrolizat}}$ = volumen hidrolizata/filtrata (L)

K_f = korektivni faktor, omjer molekulske mase monomerne građevne jedinice ugljikohidrata i monosaharida: za pentoze (ksiloza i arabinoza) $K_f = 0,88$ ($132 \text{ g mol}^{-1} / 150 \text{ g mol}^{-1}$), za heksoze (glukoza) $K_f = 0,9$ ($162 \text{ g mol}^{-1} / 180 \text{ g mol}^{-1}$).

Udio strukturnih ugljikohidrata (w_{CHO} , %) u suhoj tvari sirovine računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$w_{\text{CHO}} = \frac{m_p}{m_{\text{uz}} \times w_{\text{s.tv.}}} \times 100 \% \quad [8]$$

gdje je :

m_p = masa polisaharida (g)

m_{uz} = masa uzorka za analizu (g)

$w_{\text{s.tv.}}$ = udio suhe tvari u sirovini.

3.2.7. Izračunavanje iskorištenja sirovine

Iskorištenje sirovine postignuto predobradom (η , %) izračunato je prema jednadžbi:

$$\eta = \frac{m_{s.tv.2}}{m_{s.tv.1}} \times 100 \% \quad [9]$$

uz:

$m_{s.tv.1}$ = masa suhe tvari izvorne sirovine (g)

$m_{s.tv.2}$ = masa suhe tvari predobrađene sirovine (g).

3.2.8. Izračunavanje iskorištenja pojedinog polisaharida i udjela uklonjenog lignina

Nakon provedene kiseline i alkalne predobrade, izračunata su iskorištenja (η_P , %) pojedinih polisaharida za različite uvjete predobrade prema jednadžbi:

$$\eta_P = \frac{m_{FK} \times w_{s.tv.} \times w_{CHO}}{m_{sir} \times w_{s.tv./sir} \times w_{CHO/sir}} \times 100 \% \quad [10]$$

pri čemu je:

m_{FK} = masa filtarskog kolača, tj. čvrste faze nakon predobrade (g); $w_{s.tv.}$ = udio suhe tvari u predobrađenoj sirovini; w_{CHO} = udio polisaharida u predobrađenoj sirovini; m_{sir} = masa izvorne sirovine uzete za predobradu (g); $w_{s.tv./sir}$ = udio suhe tvari u izvornoj sirovini; $w_{CHO/sir}$ = udio polisaharida u izvornoj sirovini.

Na sličan način izračunat je udio lignina ($w_{ukl.lignin}$, %) uklonjenog predobradom pri različitim uvjetima:

$$w_{ukl.lignin} = \left(1 - \frac{m_{FK} \times w_{s.tv.} \times w_{lignin}}{m_{sir} \times w_{s.tv./sir} \times w_{lignin/sir}} \right) \times 100 \% \quad [11]$$

gdje je:

w_{lignin} = udio lignina u predobrađenoj sirovini; $w_{lignin/sir}$ = udio lignina u izvornoj sirovini.

3.2.9. Izračunavanje iskorištenja enzimske hidrolize

Iskorištenje enzimske hidrolize (η_{EH} , %), tj. udio hidroliziranog polisaharida, izračunato je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\eta_{EH} = \frac{m_p}{m_{sir} \times w_{s.tv.} \times w_{P/sir}} \times 100 \% \quad [12]$$

gdje je:

m_p = masa polisaharida u enzimskom hidrolizatu (g); m_{sir} = masa izvorne/predobrađene sirovine uzete za enzimsku hidrolizu (g); $w_{s.tv.}$ = udio suhe tvari u izvornoj/predobrađenoj sirovini; $w_{P/sir}$ = udio polisaharida u izvornoj/predobrađenoj sirovini.

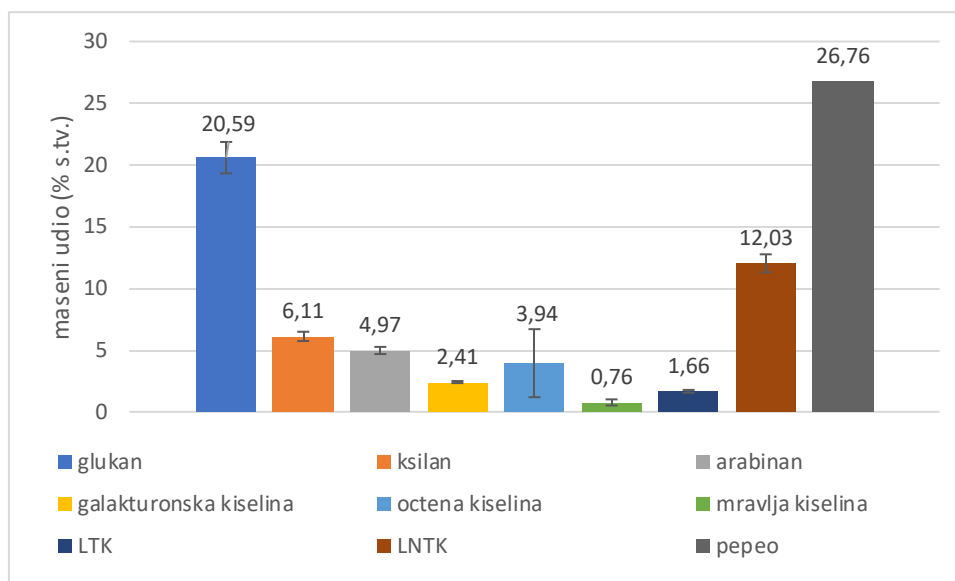
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu istraživana je mogućnost primjene otpadne morske trave kao izvora ugljika za rast kvasca *Rhodotorula* sp. i mikroalge *Schizochytrium* sp i sintezu lipida. Otpadna morska trava sadržavala je većim dijelom listove posidonije, oceanski porost ili vogu (lat. *Posidonia oceanica*) za koju je poznato da sadrži visok udjel ugljikohidrata (celuloza 42,9 %, hemiceluloza 13,6 %) i značajne količine lignina (23,8 %) (Pilvtepe i sur., 2013). Morska trava se djelovanjem morskih struja nakuplja na obalama Jadrana i tretira se isključivo kao otpad. U prošlosti se suha morska trava primjenjivala se za ishranu stoke, u poljoprivredi, građevinskom sektoru, tekstilnoj industriji, proizvodnji papira itd. (Voca i sur., 2019). Osim ugljikohidrata i lignina, morske trave obiluju i drugim funkcionalnim tvarima kao što su proteini, lipidi, polifenoli, pigmenti i druge biološki aktivne tvari s antivirusnim, antimikrobnim i antikancerogenim djelovanjem koji bi biorafineriji omogućili dodatan izvor prihoda od njihove prodaje (Xu i sur., 2023). Cilj ovoga rada bio je hidrolizirati otpadnu morsku travu do jednostavnih šećera koje bi mikroorganizmi koristili kao izvor ugljika za rast i sintezu lipida. U prvom dijelu istraživanja kiselinskom hidrolizom određen je sastav izvorne sirovine za uzgoj (udjel ugljikohidrata i šećera), uz gravimetrijsko određivanje udjela suhe tvari i pepela. Provedena je kiselinska i alkalna predobrada sirovine i optimizacija enzimske hidrolize u cilju poboljšanja prinosa fermentabilnih šećera. Koncentracija sulfatne kiseline i natrijeve lužine za predobradu sirovine iznosila je 0,15 M, 0,3 M i 0,75 M uz omjer tekućeg (otopine) i čvrstog dijela (izvorne sirovine) 15:1 (mL/g). Predobrada je trajala 24 h na temperaturi 80 °C. Enzimska hidroliza je najprije provedena s 5 % i 10 % (g/mL) izvorne sirovine uz dodatak 5, 15 i 30 FPU celulaza/g glukana te enzimskog preparata Viscozyme 0,01 g proteina/g suhe tvari sirovine i u volumnom omjeru 1:1 (mL/mL) s obzirom na volumen dodanog celulolitičkog enzima.

Eksperimentalno je određena aktivnost celulolitičkog preparata prema filter papiru kao supstratu (eng. Filter Paper Assay). Za enzimsku hidrolizu predobrađene sirovine u idućem eksperimentu korišteno je 15 FPU celulolitičkih enzima /g glukana uz 5 % i 10 % (g/mL) izvorne sirovine te Viscozyme u volumnom omjeru 1:1 (mL/mL) prema volumenu dodanih celulolitičkih enzima. Koncentracije monosaharida određene su UPLC analizom te su izračunati udjeli hidroliziranih polisaharida. Nakon odabira uvjeta koji su omogućili najveći prinos fermentabilnih šećera, proveden je uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. i mikroalge *Schizochytrium* sp. na predobrađenoj i ošećerenoj morskoj travi. Tijekom uzgoja su uzimani uzorci kako bi se odredila koncentracija monosaharida u supernatantu i masa lipida u talogu hranjive podloge.

4.1. SASTAV IZVORNE SIROVINE

Sastav morske trave *P. oceanica* korištene u ovom radu određen je metodama opisanim u Poglavlju 3.2.5. i prikazan je na slici 3. Prema vrijednosti koncentracija monosaharida (glukoze, ksiloze i arabinoze), određenih UPLC analizom, izračunate su njihove mase u kiselinskom hidrolizatu te su pomoću odgovarajućih korekcijskih faktora (0,88 za pentoze i 0,9 za heksoze) preračunate u mase i udjele polisaharida (glukana, ksilana i arabinana) prisutnih u izvornoj sirovini.



Slika 3. Sastav suhe tvari morske trave (LTK = lignin topljiv u kiselini, LNTK = lignin netopljiv u kiselini)

U zračno suhoj morskoj travi određeno je 11,2 % vlage. Najveći udio u sastavu morske trave čine ugljikohidrati, ukupno 34,08 % suhe tvari, pri čemu prevladava gluklan. Analitička kolona korištena u ovom radu ne može razdvojiti ksilozu, galaktozu i manozu i imaju isto retencijsko vrijeme. Uz ugljikohidrate, kao sastavni dio lignocelulozne sirovine, prisutan je i lignin koji ukupno (lignin topljiv i lignin netopljiv u kiselini) čini 13,39 % suhe tvari. Octena i mravlja kiselina nastale su tijekom postupka kiselinske hidrolize, uslijed hidrolize esterificiranih –OH skupina s šećera.

P. oceanica sastoji se od 30 – 40 % celuloze, 15 – 25 % hemiceluloze i 25 – 30 % lignina (Khadraoui, 2022; Voca i sur., 2019; Pilavtepe i sur., 2013). Prema Masri i sur. (2017) glukoza čini 55,99 %, ksiloza s manozom i fruktozom 3,67 % (w/w), ramnoza 7,17 % (w/w) i fukoza 1,23 % (w/w) suhe tvari. Ben Salem i sur. (2017) navode da je ukupan udio šećera u sirovini 53,40, a čine ga galaktoza (25,38 mol %), glukoza (24,37 mol %), arabinoza (21,64 mol %),

ramnoza (11,83 mol %), ksiloza (10,88 mol %) i fukoza (5,90 mol %). Sastav sirovine može varirati zbog različitih uvjeta u staništu kao što je klima te sastav morske vode i sedimenta, ali i zbog izloženosti sunčevoj svjetlosti i drugim vremenskim uvjetima na obali nakon što je lišće izbačeno iz mora (Masri i sur., 2017). Manje razlike javljaju se također ovisno o primijenjenim metodama određivanja i uvjetima separacije komponenti (Ben Salem i sur., 2017).

Određen je i udio pepela, kao anorganski ostatak nakon izgaranja biomase, i on iznosi 26,76 % što je značajno više od literaturnih 11 % (Masri i sur., 2017) i 17 % (Chiodo i sur., 2015). Međutim, u istraživanju Voca i sur. (2019), gdje su uzorci morske trave (*P. oceanica*) bili sakupljeni s tri različite lokacije zapadne obale Istre, uočeno je da udio pepela u suhoj biomasi, koja je neko vrijeme ležala na obali, varira u rasponu 15 – 27 % ovisno o lokaciji te je viši (preko 30 %) i manje varira u svježoj biomasi sakupljenoj iz morske vode. Može se zaključiti da na sastav pepela utječu različiti vanjski utjecaji kojima je biomasa izložena te da sušenjem dolazi do smanjena udjela pepela. Za razliku od drvene biomase koja uglavnom sadrži niske udjele anorganskih tvari u vlaknima, lisna tkiva sadržavaju veće koncentracije mineralnih tvari radi njihove akumulacije u vakuolama i citosolu (Voca i sur., 2019). U istraživanju Masri i sur. (2017) glavni anorganski elementi identificirani u pepelu posidonije bili su kalcij i magnezij, uz nešto manje prisutne sumpor, aluminij i stroncij. Osim što je morska trava bogata mineralnim tvarima, visok udio pepela može biti i posljedica prisutnosti pijeska i različitih drugih (mikro)organizama (npr. dijatomeja) na listovima s obzirom da biomasa nije bila oprana prije eksperimenta (Kanjer i sur., 2019). Pranje svježom vodom nije poželjan korak u industrijskom mjerilu zbog povećanja troškova procesa (Lymperatou i sur., 2022).

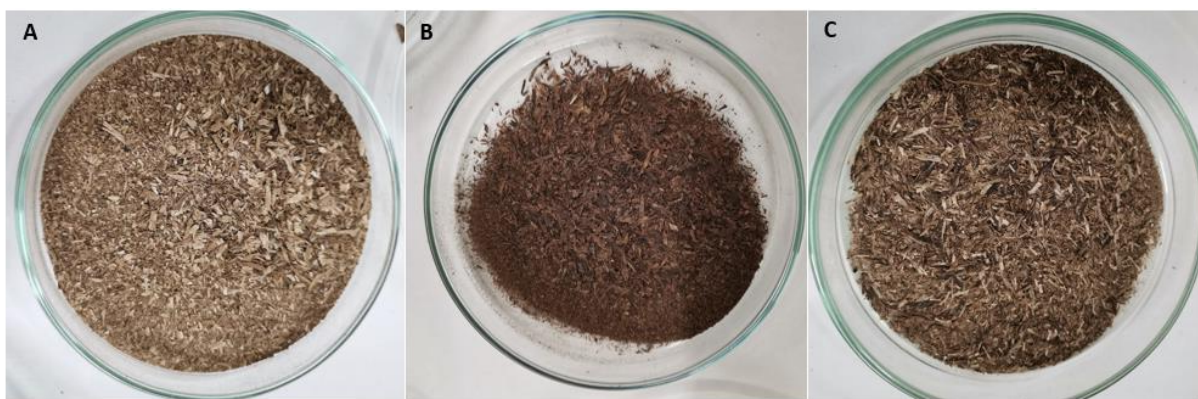
Ostatak sastava posidonije koji nije određen u ovom radu prema literaturi čine lipidi 2,3 %, proteini 0,5 % (Masri i sur., 2017), tanini 5 – 10 %, slobodne ili esterski vezane fenolne kiseline 2 % te klorofil, kutin i voskovi (Kaal i sur., 2016).

4.2. KISELINSKA I ALKALNA PREDOBRAĐA OTPADNE MORSKE TRAVE

Poput ostalih lignoceluloznih sirovina, morsku travu je potrebno predobraditi da bi se mogla koristiti kao sirovina u biotehnološkim procesima. Najčešće istraživane i primjenjivane metode su kiselinska i alkalna predobrada. Važni parametri prilikom predobrade su temperatura, trajanje i koncentracija kiseline, odnosno lužine. Visoke koncentracije kiseline zahtijevaju niže temperature, kraće trajanje procesa i omogućuju visoke prinose saharifikacije, no nisu poželjne zbog izrazite korozivnosti i toksičnosti te visoke cijene (Behera i sur., 2014). Iz tog razloga, u

ovom radu su odabrane niže koncentracije kiseline i lužine uz zadržavanje na nižoj temperaturi, ali kroz dulje vrijeme.

Predobrada morske trave provedena je sa sulfatnom kiselinom i natrijevom lužinom u koncentracijama 0,15 M, 0,3 M i 0,75 M. Ostali uvjeti (trajanje 24 h, temperatura 80 °C, omjer tekućeg i čvrstog dijela 15:1 (mL/g)) bili su jednaki za sve koncentracije. Sastav čvrste faze predobrađene sirovine određen je UPLC analizom nakon kiselinske hidrolize, a prikazan je u tablici 6. Također je UPLC analizom određen sastav tekućih faza (filtrata) dobivenih predobradom, no zbog visoke ionske jakosti uzoraka predobrađenih lužinom, nije došlo do razdvajanja šećera na kromatografskoj koloni. Na temelju koncentracija monosaharida u filtratu kiselinske predobrade izračunat je udio polisaharida koji su tijekom predobrade razgrađeni i otopljeni u tekućoj fazi i rezultati su prikazani u tablici 7. Usitnjena izvorna i predobrađena sirovina prikazana je na slici 4.



Slika 4. A – izvorna sirovina, B – sirovina predobrađena kiselinom, C – sirovina predobrađena lužinom (*vlastita fotografija*)

Povećanjem koncentracije kiseline i lužine, povećava se udio glukana u čvrstoj fazi predobrađene sirovine pri čemu su s istim koncentracijama postignute slične vrijednosti. Udjeli ksilana i arabinana se smanjuju povećanjem koncentracije kiseline jer je došlo do hidrolize ksilana i arabinana u hemicelulozi do jednostavnih šećera ksiloze i arabinoze koji su topljivi u vodi. Pri većoj koncentraciji kiseline razgrađeno je više hemiceluloze što je vidljivo i iz koncentracija šećera te udjela razgrađenih polisaharida prikazanih u tablici 7. Kod predobrade lužinom udjeli ksilana i arabinana u čvrstoj fazi su značajno veći u odnosu na kiselinsku predobradu. Udio galakturonske kiseline povećao se pri višim koncentracijama kiseline, a smanjio se povećanjem koncentracije lužine, no kod 0,75 M lužine nije detektirana.

Tablica 6. Sastav otpadne morske trave predobrađene sa sulfatnom kiselinom i natrijevom lužinom različitih koncentracija pri 80 °C tijekom 24 sata (srednja vrijednost ± standardna devijacija)

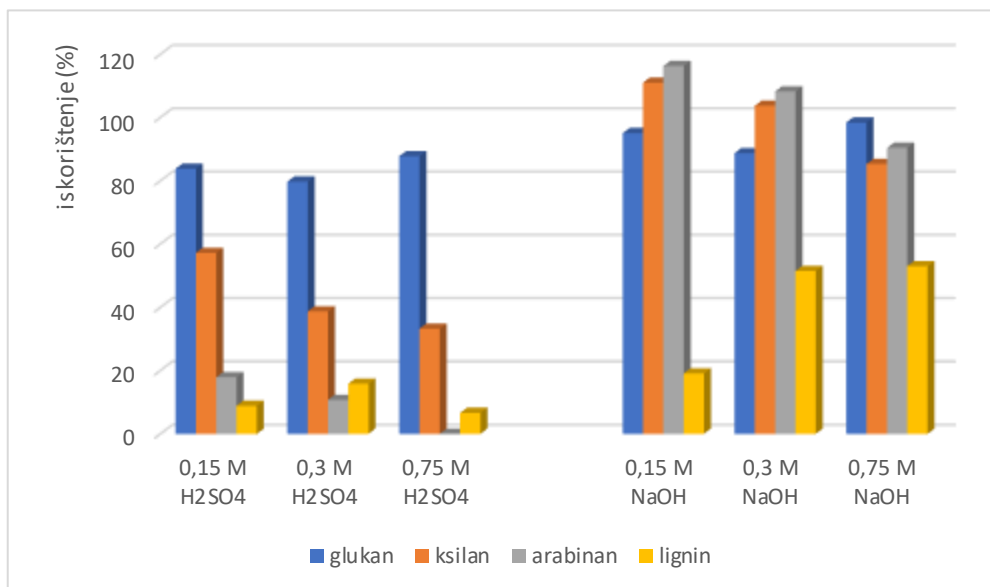
Komponenta (%, g/g)	Uvjeti predobrade					
	0,15 M H ₂ SO ₄	0,3 M H ₂ SO ₄	0,75 M H ₂ SO ₄	0,15 M NaOH	0,3 M NaOH	0,75 M NaOH
suha tvar	95,0 ± 0,21	94,74 ± 0,06	95,27 ± 0,13	91,11 ± 0,69	91,63 ± 0,21	93,6 ± 0,24
glukan	32,44 ± 1,35	39,39 ± 0,40	39,51 ± 1,61	31,60 ± 1,62	38,35 ± 0,60	43,64 ± 0,47
galakturonska kiselina	3,91 ± 0,48	5,82 ± 0,94	5,69 ± 0,32	4,24 ± 0,51	1,28 ± 0,39	0,0
ksilan	6,57 ± 0,50	5,67 ± 0,83	4,44 ± 0,51	10,95 ± 1,10	13,30 ± 0,84	11,23 ± 0,24
arabinan	1,67 ± 0,97	1,28 ± 0,78	0,0	9,33 ± 1,65	11,29 ± 1,42	9,68 ± 0,77
mravlja kiselina	1,49 ± 0,90	0,527 ± 0,02	0,0	14,89 ± 4,25	11,3 ± 3,95	0,0
octena kiselina	0,89 ± 0,03	1,85 ± 0,92	0,0	0,0	0,0	0,0
lignin topljiv u kiselini	1,48 ± 0,06	1,4 ± 0,01	1,37 ± 0,01	1,62 ± 0,14	1,2 ± 0,04	1,2 ± 0,01
lignin netopljiv u kiselini	21,98 ± 2,27	26,23 ± 1,50	27,95 ± 1,48	16,26 ± 1,85	12,74 ± 0,42	12,67 ± 0,62
pepeo	4,27	4,02	2,68	10,67	9,84	12,01
iskorištenje sirovine (%)	56,0	44,0	48,0	68,0	52,0	49,6

Tablica 7. Sastav tekuće faze (filtrata) nakon predobrade sulfatnom kiselinom i udjeli polisaharida koji su predobradom razgrađeni u monosaharide i otopljeni u tekućoj fazi (srednja vrijednost ± standardna devijacija)

Komponenta	Uvjeti predobrade		
	0,15 M H ₂ SO ₄	0,3 M H ₂ SO ₄	0,75 M H ₂ SO ₄
glukoza (g/L)	0,14 ± 0,01	0,30 ± 0,021	0,50 ± 0,007
ksiloza (g/L)	0,99 ± 0,03	3,07 ± 0,012	4,13 ± 0,257
arabinoza (g/L)	5,21 ± 0,051	4,63 ± 0,061	4,52 ± 0,339
galakturonska kiselina (g/L)	0,42 ± 0,024	0,31 ± 0,011	0,39 ± 0,15
octena kiselina (g/L)	0,26 ± 0,104	0,45 ± 0,012	0,48 ± 0,002
iskorištenje glukana (%)	0,55 ± 0,039	1,33 ± 0,09	2,44 ± 0,036
iskorištenje ksilana (%)	12,95 ± 0,38	44,16 ± 0,177	66,68 ± 4,148
iskorištenje arabinana (%)	83,97 ± 0,826	81,93 ± 1,073	89,73 ± 6,716

Pri 0,15 i 0,3 M H₂SO₄ došlo je do nastanka nusprodukata, mravlje i octene kiseline kao posljedice hidrolize esterificiranih –OH skupina ugljikohidrata (Behera i sur., 2014). Octena kiselina detektirana je i u filtratu kiselinske predobrade te je njezina koncentracija rasla s povećanjem koncentracije H₂SO₄. Mravlja kiselina nastala je i predobradom s 0,15 i 0,3 M lužinom, dok octena kiselina nije detektirana. Tijekom kiselinske predobrade također može doći do nastanka furfurala (degradacijom pentoza) i 5-hidroksimetilfurfurala (degradacijom heksoza). Njihovom daljnjom razgradnjom može također nastati mravlja i levulinska kiselina. Predobradom se u svim uvjetima značajno smanjio udio pepela u sirovini. Najviše pepela ostalo je pri 0,75 M NaOH, a najmanje pri 0,75 H₂SO₄.

Izračunata su iskorištenja hidrolize polisaharida kao udjeli hidroliziranog polisaharida u odnosu na udio polisaharida prisutnog u izvornoj sirovini te su prikazana na slici 5. Povećanjem koncentracije H₂SO₄ povećava se iskorištenje glukana, međutim smanjuju se iskorištenja ksilana i arabinana zbog djelomične hidrolize hemiceluloze i prevođenja u vodotopljiv oblik. Kod predobrade lužinom postignuta su veća iskorištenja polisaharida u odnosu na kiselinsku predobradu. Iskorištenja ksilana i arabinana pri 0,15 i 0,3 M NaOH prelaze 100 % što nije moguće, a ta odstupanja mogu se pripisati velikoj heterogenosti lignocelulozne biomase i načinu uzorkovanja koje prethodi analizi sirovine.



Slika 5. Iskorištenje polisaharida i udio ukupnog uklonjenog lignina tijekom predobrade otpadne morske trave pri različitim uvjetima

Udio lignina topljivog u kiselini nije se značajnije promijenio tijekom predobrade. Udio lignina netopljivog u kiselini povećao se povećanjem koncentracije H₂SO₄, dok je povećanjem koncentracije NaOH njegov udio smanjen. Na temelju udjela lignina preostalog u čvrstoj fazi nakon predobrade, izračunati su udjeli ukupnog uklonjenog lignina (slika 5). Povećanje koncentracije NaOH pospješilo je njegovo uklanjanje iz sirovine te je pri 0,3 i 0,75 M NaOH uklonjeno preko 50%. Kiselinom predobradom uklonjeno je samo 6 – 15 % ukupnog lignina.

Rezultati prikazani u tablicama 6 i 7 te slici 5 su u skladu s očekivanjima prema literaturi s obzirom da se u istraživanjima s drugim lignoceluloznim sirovinama također pokazalo da kiselinska predobrada najviše djeluje na hidrolizu hemiceluloze, dok je predobrada lužinom najučinkovitija za uklanjanje lignina (Behera i sur., 2014).

Predobrađena sirovina sadrži veći udio suhe tvari što je posebno uočljivo kod sirovine predobrađene kiselinom. Najveće iskorištenje sirovine, s obzirom na masu čvrste faze nakon predobrade, postignuto je pri 0,15 M NaOH, a najmanje pri 0,3 M H₂SO₄.

4.3. OPTIMIZACIJA ENZIMSKE HIDROLIZE OTPADNE MORSKE TRAVE

Provedena je enzimaska hidroliza izvorne sirovine s različitim koncentracijama sirovine i enzima kako bi se odredili najpovoljniji uvjeti. Uz celulaze, ispitan je dodatak enzimskog pripravka Viscozyme L. Prije dodavanja enzima, sirovina je bila usitnjena u mlincu za kavu i sterilizirana u autoklavu. Usitnjavanjem se osim smanjenja veličine čestica, smanjuje i kristaliničnost celuloze te se povećava specifična površina čestica (Kumar i Sharma, 2017). Iako se sterilizacija ne smatra predtretmanom jer se saharifikacija celuloze i hemiceluloze odvija tek na temperaturama iznad 150 °C, dolazi do otvaranja stanične stijenke što olakšava pristup enzimima (Masri i sur., 2017). Nakon enzimske hidrolize, određene su koncentracije monosaharida u supernatantima te izračunati udjeli hidroliziranih polisaharida s obzirom na sastav izvorne sirovine i prikazani su u tablici 8. Povećanjem koncentracije enzima, povećala se koncentracija glukoze, a time i udio hidroliziranog glukana kod obje koncentracije sirovine. Općenito, dodatak veće koncentracije enzima dovodi do povećanja brzine i prinosa saharifikacije (Pilavtepe i sur., 2013). Koncentracija ksiloze i arabinoze bila je manja kod veće koncentracije celulaza prilikom hidrolize 5 % sirovine, dok kod hidrolize 10 % sirovine nisu detektirane. Viscozyme doprinosi razgradnji ksilana i arabinana u sirovini što je očekivano s obzirom da između ostalih, sadrži enzime za razgradnju hemiceluloze.

Tablica 8. Koncentracije monosaharida i šećerne kiseline te udjeli hidroliziranih polisaharida tijekom enzimske hidrolize izvorne sirovine različitim koncentracijama enzima (srednja vrijednost ± standardna devijacija)

koncentracija sirovine	5 % (g/mL) sirovine			10 % (g/mL) sirovine				
	5 FPU/g	15 FPU/g	30 FPU/g	5 FPU/g	15 FPU/g	30 FPU/g	15 FPU/g + 0,01 g/g Viscozyme	15 FPU/g + Viscozyme 1:1
glukoza (g/L)	0,63*	0,73 ± 0,04	1,04 ± 0,12	0,87 ± 0,002	1,34*	3,30*	5,06 ± 0,007	2,16 ± 1,25
ksiloza (g/L)	0,31*	0,22 ± 0,05	0,20 ± 0,10	0,00	0,00	0,00	4,56 ± 0,002	1,05 ± 0,6
arabinoza (g/L)	0,56*	0,43 ± 0,06	0,37 ± 0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	1,26 ± 0,73
galakturonska kiselina (g/L)	0,41*	0,41 ± 0,01	0,36 ± 0,05	0,65 ± 0,002	0,65*	0,80*	0,00	0,78 ± 0,45
udio hidroliziranog glukana (%)	6,13*	7,18 ± 0,40	10,28 ± 1,23	4,26 ± 0,01	6,58*	16,26*	24,93 ± 0,03	10,64 ± 0,06
udio hidroliziranog ksilana (%)	10,04*	7,06 ± 1,75	6,61 ± 3,11	0,00	0,00	0,00	73,98 ± 0,03	16,97 ± 0,11
udio hidroliziranog arabinana (%)	22,43*	17,06 ± 2,28	14,65 ± 4,44	0,00	0,00	0,00	0,00	25,04 ± 0,09

*standardna devijacija nije izračunata jer je analiziran samo jedan uzorak

Kako su troškovi jedan od najvažnijih čimbenika mogućnosti primjene bilo kojeg biotehnološkog procesa u industrijskom mjerilu, za nastavak eksperimenta nije odabrana najviša aktivnost celulaza od 30 FPU, već 15 FPU, koja daje zadovoljavajuće rezultate, te dodatak enzimskog pripravka Viscozyme u volumnom omjeru 1:1 s celulazama da bi se postigla razgradnja ksilana i arabinana.

4.4. ENZIMSKA HIDROLIZA PREDOBRAĐENE OTPADNE MORSKE TRAVE

Čvrsti ostatak nakon predobrade kiselinom i lužinom podvrgnut je enzimskoj hidrolizi. Predobrađena sirovina dodana je u koncentraciji od 5 % i 10 % (g/mL), celulaze 15 FPU/g glukana te je u kombinaciji s 10 % sirovine ispitan učinak enzimskog pripravka Viscozyme. Nakon enzimske hidrolize, u supernatantima su određene koncentracije monosaharida te nusproizvoda reakcije (octena i mravlja kiselina) (tablica 9). Detektirana je i limunska kiselina s obzirom da je reakcija provedena u citratnom puferu. Izračunati su udjeli (%) hidroliziranih polisaharida s obzirom na sastav predobrađene sirovine te su prikazani na slici 6.

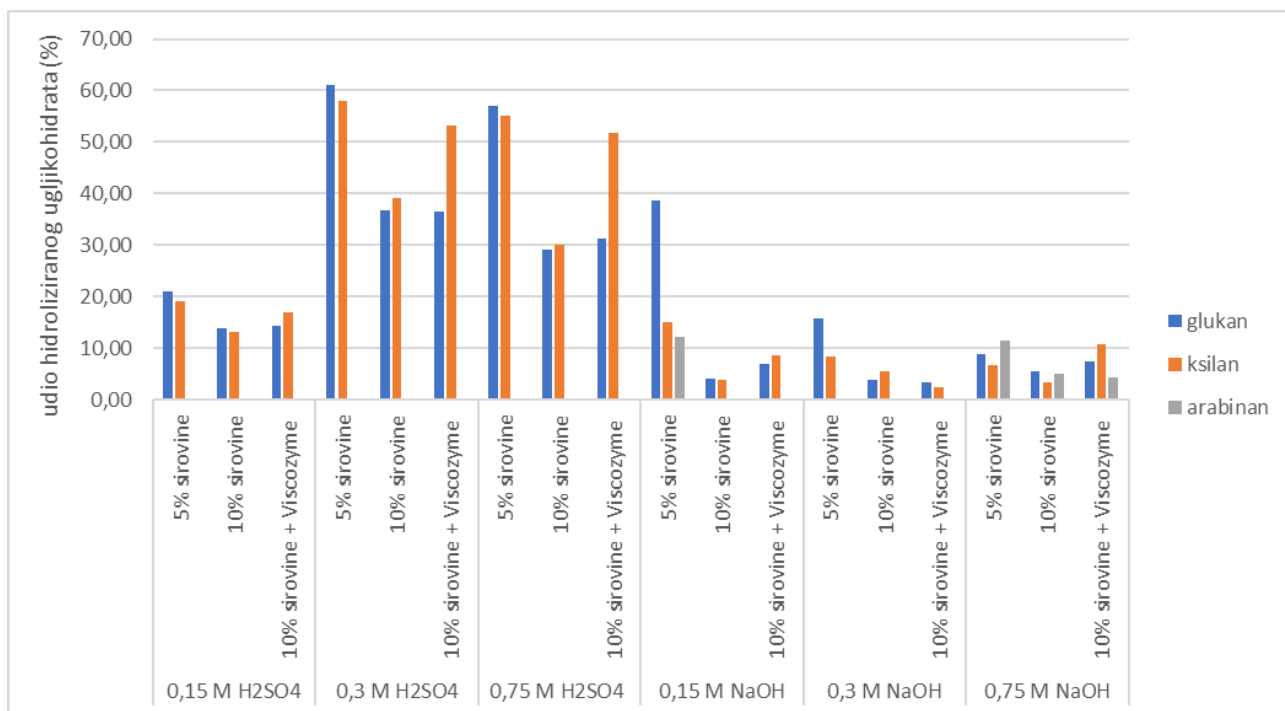
Kod uzoraka sirovine predobrađenih kiselinom koncentracije oslobođene glukoze iznosile su 3,61 – 15,27 g/L, a ksiloze 0,68 – 3,24 g/L. Arabinoza nije detektirana zbog niskog udjela arabinana prisutnog u predobrađenoj sirovini prije enzimske hidrolize. Uočen je porast koncentracije nastalih monosaharida s povećanjem koncentracije sirovine, no ipak su udjeli hidroliziranih polisaharida niži u smjesi s 10 % sirovine. Dodatak Viscozyme-a nije doprinio udjelu hidroliziranog glukana, ali je povećao udio hidroliziranog ksilana. Koncentracija galakturonske kiseline povećala se s povećanjem koncentracije kiseline upotrijebljene za predobradu te povećanjem koncentracije sirovine, a posebno dodatkom Viscozyme-a.

Enzimskom hidrolizom sirovine predobrađene lužinom nastale su manje koncentracije monosaharida; 0,89 – 6,18 g/L glukoze, 0,22 – 1,29 g/L ksiloze i 0,44 – 0,59 g/L arabinoze. Arabinoza nije detektirana u uzorcima predobrađenim s 0,15 M NaOH i 10 % sirovine za hidrolizu te uzorcima predobrađenim s 0,3 M NaOH. Nema pravilnog trenda promjene koncentracija monosaharida, već one variraju ovisno o uvjetima. Najbolja iskorištenja polisaharida postignuta su s 5 % sirovine predobrađene 0,15 M lužinom. Došlo je do nastanka mravlje kiseline kod hidrolize sirovine 0,75 M lužinom te octene kiseline kod sirovina predobrađenih 0,3 i 0,75 M lužinom.

Ako se usporede udjeli enzimski hidroliziranih polisaharida predobrađene i izvorne sirovine, prema slici 6 i tablici 8, može se zaključiti da je enzimska hidroliza učinkovitija kada se sirovina prethodno predobrađi, što je u skladu s literaturom (Masri i sur., 2017). Iako je kiselinska predobrada uklonila samo mali udio lignina iz sirovine, došlo je do promjena u njegovoj strukturi koje su omogućile enzimima bolji pristup te je sirovina postala lakše razgradiva (Bajpai, 2016). Također je i uklanjanje hemiceluloze tijekom kiselinske predobrade doprinijelo povećanju poroznosti sirovine i olakšalo enzimsku hidrolizu celuloze (Maurya i sur., 2015).

Tablica 9. Koncentracije monosaharida i kiselina dobivenih enzimskom hidrolizom predobrađene sirovine s 15 FPU celulaza /g glukana

	0,15 M H ₂ SO ₄			0,3 M H ₂ SO ₄			0,75 M H ₂ SO ₄		
	5% sirovine	10% sirovine	10% sirovine + Viscozyme	5% sirovine	10% sirovine	10% sirovine + Viscozyme	5% sirovine	10% sirovine	10% sirovine + Viscozyme
glukoza (g/L)	3,61	4,77	4,93	12,68	15,27	15,18	11,92	12,16	13,03
ksiloza (g/L)	0,68	0,93	1,20	1,77	2,39	3,24	1,32	1,44	2,49
limunska kiselina (g/L)	2,89	2,98	3,05	9,35	9,65	9,44	9,56	9,10	8,94
galakturonska kiselina (g/L)	0,10	0,13	0,97	0,48	0,69	5,00	0,58	0,64	6,31
	0,15 M NaOH			0,3 M NaOH			0,75 M NaOH		
	5% sirovine	10% sirovine	10% sirovine + Viscozyme	5% sirovine	10% sirovine	10% sirovine + Viscozyme	5% sirovine	10% sirovine	10% sirovine + Viscozyme
glukoza (g/L)	6,18	1,28	2,25	3,09	1,03	0,89	2,03	2,47	3,38
ksiloza (g/L)	0,85	0,43	0,96	0,57	0,51	0,22	0,39	0,41	1,29
arabinoza (g/L)	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,59	0,52	0,44
limunska kiselina (g/L)	9,50	9,18	7,92	9,37	6,34	6,17	9,14	8,26	7,99
galakturonska kiselina (g/L)	0,52	0,52	0,39	0,33	0,23	0,23	0,35	0,36	0,31
mravlja kiselina (g/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00
octena kiselina (g/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,76	0,76	0,30	0,62	0,00



Slika 6. Udjeli hidroliziranih polisaharida tijekom enzimske hidrolize predobrađene sirovine dodatkom 15 FPU celulaza /g glukana

Za nastavak eksperimenta odabrana je morska trava predobrađena s 0,3 M H₂SO₄. Pri toj koncentraciji kiseline u čvrstom dijelu nakon predobrade zaostaju značajne količine glukana koja se učinkovito razgrađuje enzimskom hidrolizom što omogućuje korištenje tako tretirane sirovine kao supstrata za rast mikroorganizama. Osim glukana, postignut je i najveći udio hidroliziranog ksilana.

4.5. UZGOJ MIKROORGANIZAMA I PROIZVODNJA LIPIDA NA HIDROLIZATU OTPADNE MORSKE TRAVE

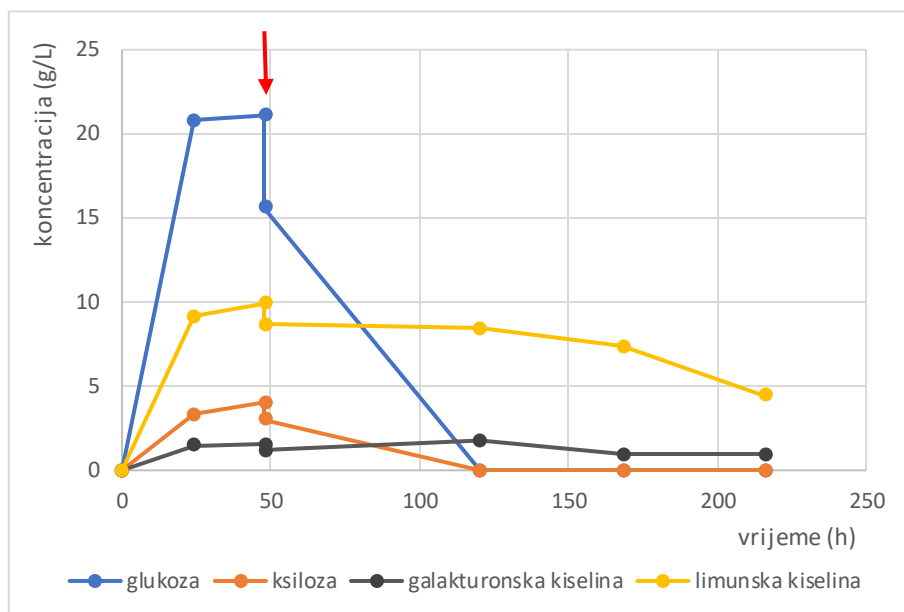
Morska trava je predobrađena s 0,3 M H₂SO₄. Čvrsti dio nakon predobrade podvrgnut je enzimskoj hidrolizi s 15 FPU celulaza /g glukana i enzimskim preparatom Viscozyme u volumnom omjeru 1:1 (mL/mL) s celulazama. Enzimska predhidroliza provedena je u dvije serije tikvica tijekom 48 h. Serija A sadržavala je 5 % (g/mL) sirovine, dok je u seriju B na početku bilo dodano 5 % sirovine, a zatim još 5 % nakon 24 h kako bi ukupna koncentracija sirovine iznosila 10 % (g/mL), uz dodatak ukupne potrebne količine enzima na početku. Uzorci su uzeti u 24. i 48. satu enzimske hidrolize te je provedena analiza sastava UPLC metodom.

Nakon 48 h tikvice su nacijepljene kulturom mikroorganizama. S obzirom na visoku stabilnost celulolitičkih enzima očekivano je da se hidroliza preostalih polisaharida nastavila. Osim inokuluma, u podlogu su dodani i određeni makro i mikronutrijenti potrebni za rast mikroorganizama. Nakon inokulacije ponovno je uzet uzorak za analizu sastava. Također su pripremljene hranjive podloge na bazi tekućeg dijela (filtrata) iz kiselinske predobrade (uz dodatak soli i prethodnu neutralizaciju s CaCO_3) te su u njih nacijepljeni mikroorganizmi.

4.5.1. Uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp.

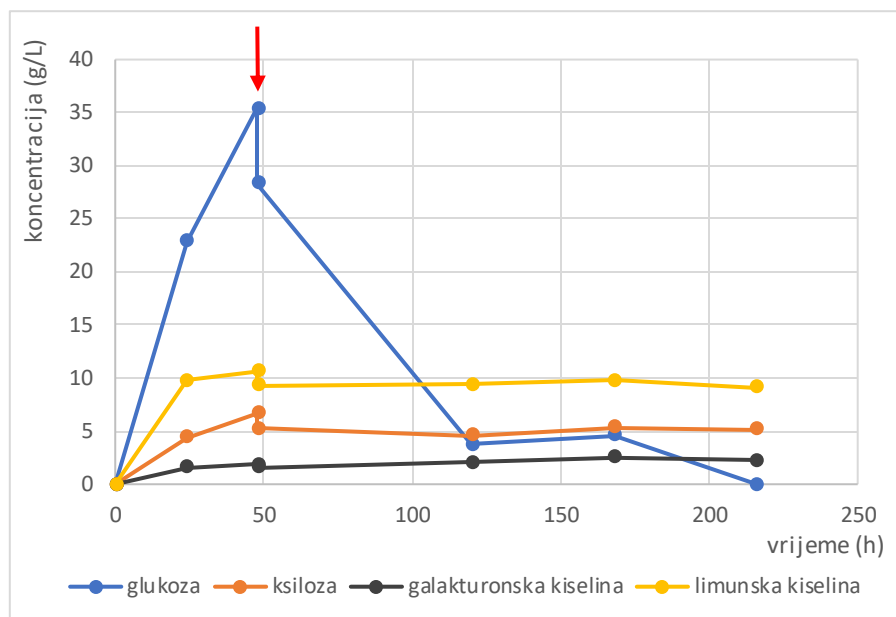
Promjene koncentracije monosaharida i limunske kiseline tijekom enzimske predhidrolize i uzgoja kvasca *Rhodotorula* sp. u podlogama s 5 % i 10 % sirovine prikazane su na slikama 7 i 8. U podlozi s 5 % sirovine gotovo sva glukoza, ksiloza i galakturonska kiselina nastale su hidrolizom u prva 24 h, dok su u idućih 24 h koncentracije neznatno porasle. Iako je u seriji B prvi dan također bilo samo 5 % sirovine, zbog dvostruke koncentracije enzima nastalo je 2 g/L glukoze i 1 g/L ksiloze više u odnosu na seriju A. Dodatnih 5 % sirovine u seriji B omogućilo je značajnije povećanje koncentracije glukoze i ksiloze tijekom drugog dana hidrolize: glukoze za 12,58 g/L i ksiloze za 2,27 g/L. Zbog povećane gustoće podloge nije došlo do proporcionalnog rasta koncentracija monosaharida.

Enzimskom predhidrolizom u A seriji tikvica ukupno je nastalo 20,79 g/L glukoze, 4,04 g/L ksiloze, 1,51 g/L galakturonske kiseline i 9,90 g/L limunske kiseline. U trenutku inokulacije i dodavanja otopina soli podloga je razrijeđena pa je posljedično smanjena koncentracija supstrata te je uzgoj započeo s 15,61 g/L glukoze, 3,03 g/L ksiloze, 1,16 g/L galakturonske kiseline i 8,65 g/L limunske kiseline. Uzorci za analizu podloge uzeti su treći, peti i sedmi dan uzgoja. Već treći dan uzgoja, iz podloge s 5 % sirovine bila je iscrpljena sva glukoza i ksiloza (slika 7). *Rhodotorula* sp., poput većine ostalih mikroorganizama, kao primarni izvor ugljika koristi glukozu. Nakon iscrpljivanja glukoze i ksiloze, došlo je do smanjenja koncentracije limunske kiseline, posebno između petog i sedmog dana. Ukupno je utrošeno 4,21 g/L limunske kiseline koja je u hranjivu podlogu dodana kao pufer (enzimska hidroliza). Koncentracija galakturonske kiseline se blago povećala do trećeg dana uzgoja, zatim smanjila između trećeg i petog dana te se do kraja uzgoja više nije promijenila.



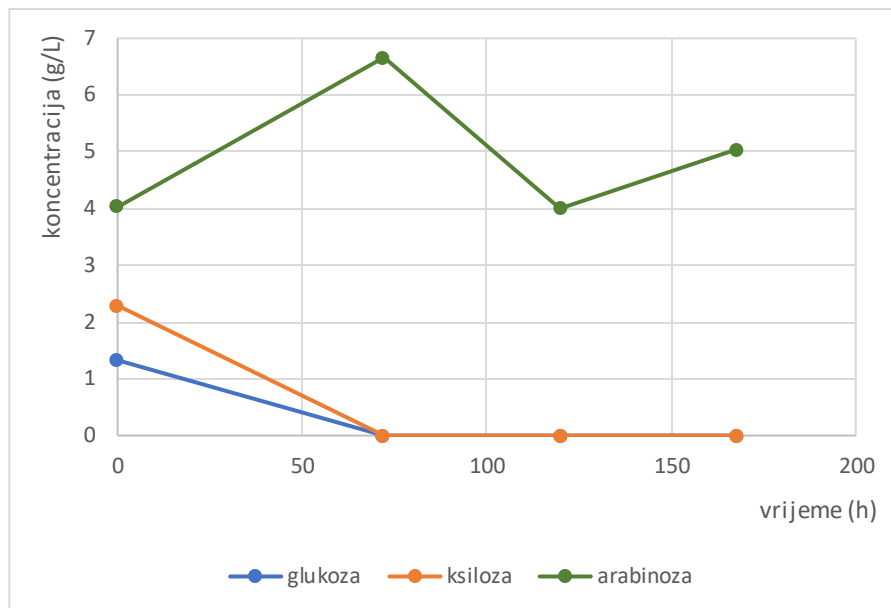
Slika 7. Koncentracija šećera i limunske kiseline tijekom predhidrolize i uzgoja kvasca *Rhodotorula* sp. u podlozi s 5 % (g/mL) sirovine (strelica označava dodatak inokuluma – početak uzgoja)

U B seriji tikvica s 10 % sirovine u podlozi, enzimskom predhidrolizom ukupno je nastalo 35,42 g/L glukoze, 6,66 g/L ksiloze, 1,89 g/L galakturonske kiseline i 10,61 g/L limunske kiseline (slika 8). Također je inokulacijom podloge došlo do njezinog razrjeđenja te su koncentracije na početku uzgoja iznosile 28,37 g/L glukoze, 5,28 g/L ksiloze, 1,57 g/L galakturonske kiseline i 9,27 g/L limunske kiseline. Uzorci za analizu podloge također su uzeti treći, peti i sedmi dan uzgoja. Tijekom prva tri dana uzgoja došlo je do naglog smanjenja koncentracije glukoze. Peti dan je zabilježen blagi porast koncentracije, a do zadnjeg dana uzgoja sva glukoza je bila iscrpljena iz podloge. U koncentracijama ksiloze, galakturonske i limunske kiseline došlo je do neznatnih varijacija tijekom trajanja uzgoja.



Slika 8. Koncentracija šećera i limunske kiseline tijekom predhidrolize i uzgoja kvasca *Rhodotorula* sp. u podlozi s 10 % (g/mL) sirovine (strelica označava dodatak inokuluma – početak uzgoja)

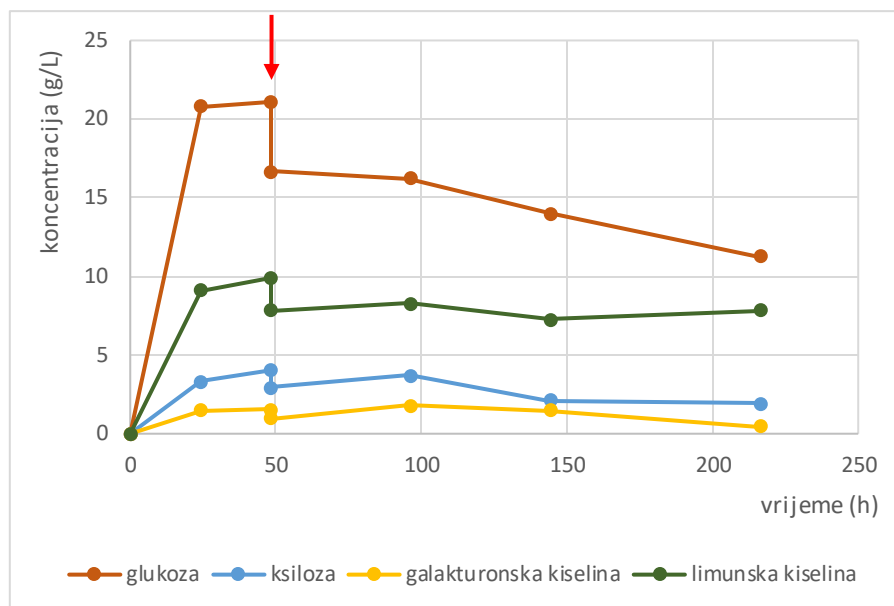
Podloga za uzgoj kvasca na bazi filtrata kiselinske predobrade sirovine na početku uzgoja je sadržavala 1,33 g/L glukoze, 2,29 g/L ksiloze i 4,04 g/L arabinoze (slika 9). Glukoza i ksiloza bile su potpuno iscrpljene iz podloge tijekom prva tri dana uzgoja. Koncentracija arabinoze se nije značajnije mijenjala tijekom uzgoja, te se može zaključiti da ovaj kvasac najvjerojatnije ne može koristiti arabinozu kao izvor ugljika što nije u skladu s rezultatima s nizom studija objavljenih u literaturi s različitim vrstama ovoga kvasca (Nagahama i sur., 2003). Zbog toga je potrebno u nastavku istraživanja detaljnije istražiti sposobnost asimilacije različitih izvora ugljika u širem rasponu koncentracija uključujući i arabinozu.



Slika 9. Koncentracija šećera tijekom uzgoja kvasca *Rhodotorula* sp. u podlozi na bazi filtrata kiselinske predobrade sirovine

4.5.2. Uzgoj mikroalge *Schizochytrium* sp.

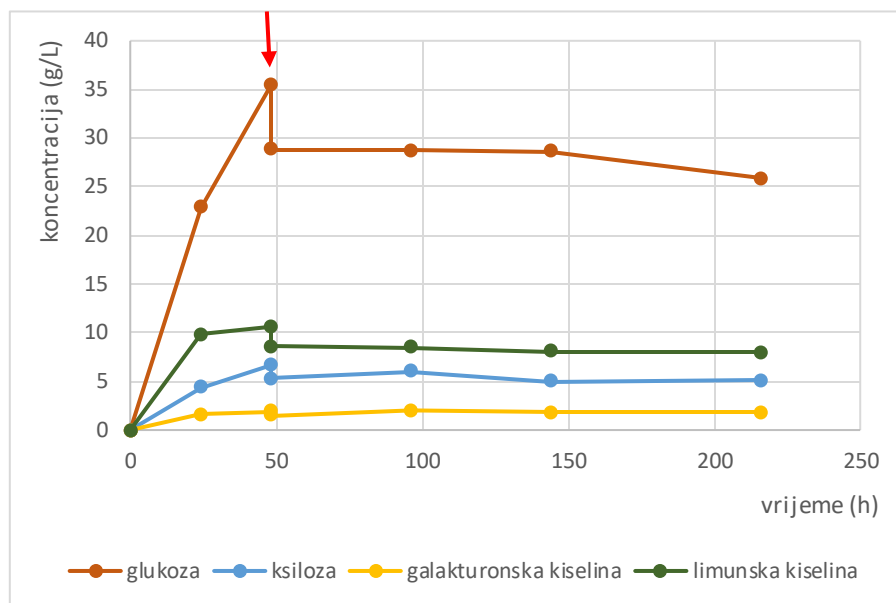
S obzirom da je enzimaska predhidroliza predobrađene sirovine za uzgoj kvasca i mikroalge bila provedena na identičan način, u podlogama za uzgoj mikroalge prije naciepljivanja vrijedili su isti uvjeti, opisani u poglavlju 4.5.1. Nakon inokulacije, u podlozi s 5 % sirovine bilo je 16,64 g/L glukoze, 2,93 g/L ksiloze, 0,99 g/L galakturonske kiseline i 7,86 g/L limunske kiseline (slika 10). Uzorci za analizu uzeti su drugi, četvrti i sedmi dan uzgoja. Tijekom prva dva dana uzgoja došlo je do neznatnog smanjenja koncentracije glukoze, dok su koncentracije ostalih komponenti blago porasle. Od drugog do sedmog dana uočen je ujednačen trend smanjenja koncentracije glukoze. Ukupno je utrošeno 5,41 g/L glukoze. Koncentracije ostalih komponenti neznatno su varirale.



Slika 10. Koncentracija šećera i limunske kiseline tijekom predhidrolize i uzgoja mikroalge *Schizochytrium* sp. u podlozi s 5 % sirovine (strelica označava dodatak inokuluma – početak uzgoja)

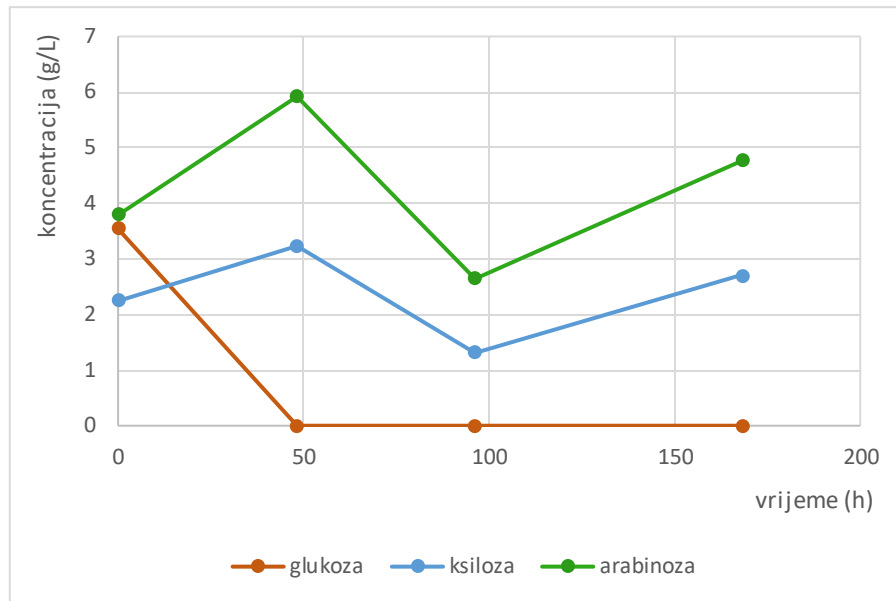
U podlozi s 10 % sirovine uzgoj je započeo s 28,84 g/L glukoze, 5,31 g/L ksiloze, 1,48 g/L galakturonske kiseline i 8,62 g/L limunske kiseline (slika 11). Uzorci za analizu također su uzeti drugi, četvrti i sedmi dan uzgoja. Do značajnijeg smanjenja koncentracije glukoze u podlozi došlo je tek između četvrtog i sedmog dana uzgoja, a ukupno je utrošeno 3,01 g/L glukoze. Promjene koncentracija ostalih komponenti su zanemarive. Prema literaturi, *Schizochytrium* sp. nema gene koji bi kodirali za enzime potrebne za metabolizam ksiloze stoga ju ne može koristiti kao izvor ugljika što se pokazalo i u ovom eksperimentu (Wang i sur., 2022a).

Neznatna potrošnja izvora ugljika u hranjivoj podlozi može biti posljedica inhibicije rasta mikroorganizma inhibitorima nastalih predobradom sirovine i fenolnim spojevima kojima obiluje posidonija (Yousuf i sur., 2020; Wang i sur., 2022b).



Slika 11. Koncentracija šećera i limunske kiseline tijekom predhidrolize i uzgoja mikroalge *Schizochytrium* sp. u podlozi s 10 % sirovine (strelica označava dodatak inokuluma – početak uzgoja)

Hranjiva podloga za uzgoj mikroalge na bazi filtrata dobivenog kiselinskom predobradom sirovine na početku uzgoja je sadržavala 3,54 g/L glukoze, 2,25 g/L ksiloze i 3,79 g/L arabionze (slika 12). Glukoza je potpuno iscrpljena iz podloge tijekom prva dva dana uzgoja. Koncentracije arabinoze i ksiloze se nisu značajnije mijenjale jer istraživana vrsta mikroorganizma najvjerojatnije nema sposobnost asimilacije ovih šećera što je u skladu s literaturom (Aki i sur., 2003).



Slika 12. Koncentracija šećera tijekom uzgoja mikroalge *Schizochytrium* sp. u podlozi na bazi filtrata kiselinske predobrade sirovine

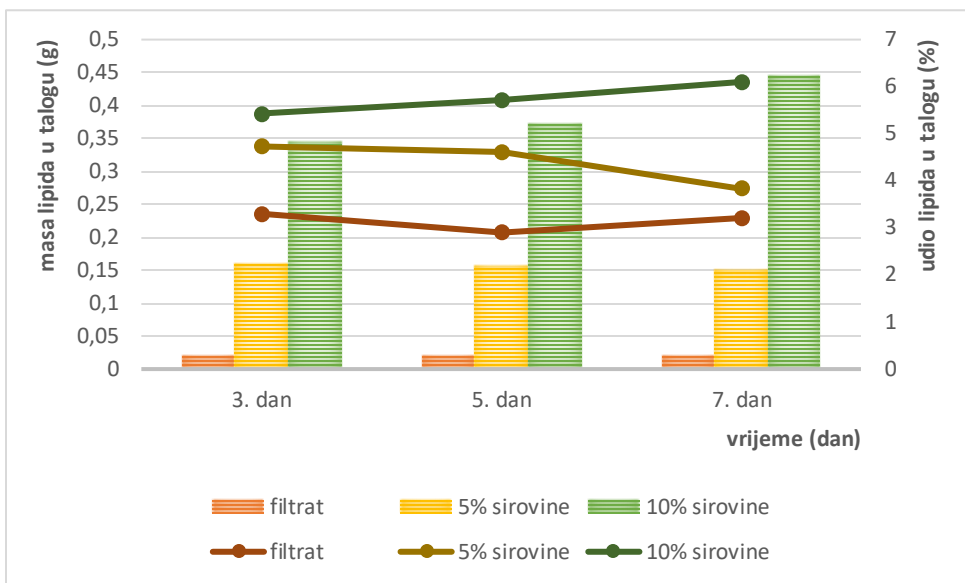
Usporedbom brzine potrošnje glukoze kao primarnog izvora ugljika u različitim podlogama korištenim za uzgoj mikroalge *Schizochytrium* sp. može se zaključiti da sastav hranjive podloge utječe na trajanje lag faze. Veći udjel predobrađene sirovine znači veću koncentraciju inhibitora rasta, a time i sporiju potrošnju izvora ugljika. Povećanjem udjela sirovine povećava se i viskoznost podloge čime se smanjuje prijenos mase, posebice kisika koji može biti limitirajući supstrat za rast.

4.5.3. Lipidi

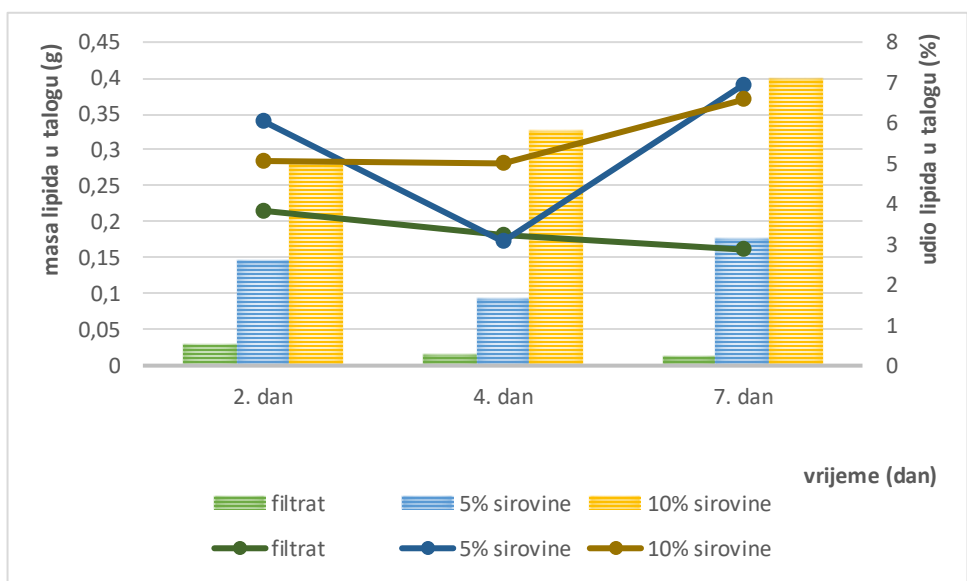
Kvasac *Rhodotorula* sp. i mikroalga *Schizochytrium* sp. uzgajani u ovom eksperimentu svrstavaju se u oleaginozne mikroorganizme što znači da imaju sposobnost proizvodnje lipida do 70 % mase suhe tvari stanica u odgovarajućim uvjetima. To ih čini poželjnim mikroorganizmima u proizvodnji biodizela (Galafassi i sur., 2012). Enzimski hidrolizirana predobrađena morska trava daje hranjivu podlogu bogatu fermentabilnim šećerima, ali siromašnu na dušiku i fosforu zbog čega je pogodna za uzgoj oleaginoznih mikroorganizama s obzirom da do lipogeneze dolazi u uvjetima limitacije dušikom i fosforom, ali uz suvišak izvora ugljika (Masri i sur., 2017).

Hranjiva podloga je sadržavala nerazgrađene čestice sirovine zbog čega nije bilo moguće pratiti rast stanica spektrofotometrijski mjerenjem optičke gustoće niti odrediti masu stanica na kraju uzgoja. Talog s ostacima podloge i mikrobnim stanicama je bio osušen i usitnjen te su iz

njega ekstrahirani lipidi kako je opisano u poglavlju 3.2.5.8. Određena je masa lipida i udio lipida u talogu.



Slika 13. Promjena mase lipida (stupci) i udjela lipida u talogu (linije) tijekom uzgoja kvasca *Rhodotorula sp.* u različitim podlogama



Slika 14. Promjena mase lipida (stupci) i udjela lipida u talogu (linije) tijekom uzgoja mikroalge *Schizochytrium sp.* u različitim podlogama

Kao što je vidljivo na slici 13, prilikom uzgoja kvasca, s obzirom da je u podlozi s 5 % sirovine i podlozi na bazi filtrata sva glukoza bila iscrpljena u prva 3 dana uzgoja, tijekom daljnjeg uzgoja nije došlo do povećanja mase lipida u talogu. Suprotno tome, u podlozi s 10 %

sirovine u kojoj je kvasac do kraja uzgoja na raspolaganju imao glukozu, uočeno je povećanje mase i udjela lipida u talogu, a isto vrijedi i za mikroalgu (slika 14). Što je bila veća početna koncentracija glukoze u podlozi, proizvedeno je više lipida uzgojem oba mikroorganizma. Kod mikroalge je u podlozi na bazi filtrata došlo do smanjenja mase i udjela lipida s vremenom. U podlozi s 5 % sirovine, masa i udio lipida bili su smanjeni 4. dan. Odstupanje može biti zbog rasta stanica na površini čestica sirovine i heterogenosti taloga. Ekstrakcija lipida iz stanične biomase također ovisi o metodi razbijanja stanica i primijenjenim otapalima (Vasconcelos i sur., 2018).

Otpadna morska trava pokazala se pogodnim izvorom ugljika za rast kvasca *Rhodotorula* sp. i mikroalge *Schizochytrium* sp. i sintezu mikrobnih lipida. Predobrada sirovine pokazala se neophodnim korakom u iskorištavanju ove sirovine čime je osiguran visok prinos fermentabilnih šećera enzimskom hidrolizom. Kiselinska predobrada sirovine uz nisku koncentraciju sulfatne kiseline i temperaturu (0,3 M sumporna kiselina i 80 °C) omogućila je visoku koncentraciju fermentabilnih šećera za rast mikroorganizama i sintezu lipida. U nastavku istraživanja potrebno je optimirati uzgoj mikroorganizama primjenom postupne prihrane sirovinom (npr. šaržni uzgoj s pritokom supstrata) kako bi se omogućila adaptacija mikroorganizma na hranjivu podlogu, a time i poboljšala produktivnost i prinos proizvoda.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata provedenog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Morska trava korištena u ovom eksperimentu sadrži 20,59 % glukana, 6,11 % ksilana, 4,97 % arabinana, 2,41 % galakturonske kiseline, 1,66 % lignina topljivog u kiselini, 12,03 % lignina netopljivog u kiselini i 26,76 % pepela u suhoj tvari.
2. Povećanjem koncentracije kiseline i lužine prilikom predobrade otpadne morske trave, povećava se udio glukana u predobrađenoj sirovini uslijed djelomične razgradnje lignina i hemiceluloze. Alkalna predobrada učinkovitije smanjuje količinu lignina u sirovini.
3. Dodatak enzimskog pripravka Viscozyme L ne utječe na hidrolizu glukana, ali povećava udio hidroliziranog ksilana.
4. Način predobrade utječe na učinkovitost enzimske hidrolize sirovine s celulazama. Najpogodnija metoda predobrade otpadne morske trave je predobrada 0,3 M sumpornom kiselinom pri temperaturi od 80 °C tijekom 24 sata. Učinkovitost enzimske hidrolize kiselinski predobrađene sirovine iskazane udjelom hidroliziranog ugljikohidrata iznosila je 36,82 – 61,17 % glukana i 39,11 – 57,98 % ksilana, ovisno o početnoj koncentraciji sirovine i dodatku enzimskog pripravka Viscozyme L.
5. Uzgojem kvasca *Rhodotorula* sp. na enzimskom hidrolizatu otpadne morske trave proizvedeno je 0,15 g lipida u podlozi s 5 % (g/mL) predobrađene sirovine, 0,44 g lipida u podlozi s 10 % (g/mL) predobrađene sirovine i 0,02 g lipida u podlozi na bazi filtrata kiselinske predobrade.
6. Uzgojem mikroalge *Schizochytrium* sp. na enzimskom hidrolizatu otpadne morske trave proizvedeno je 0,18 g lipida u podlozi s 5 % (g/mL) predobrađene sirovine, 0,39 g lipida u podlozi s 10 % (g/mL) predobrađene sirovine i 0,01 g lipida u podlozi na bazi filtrata kiselinske predobrade.

6. LITERATURA

Aki T, Hachida K, Yoshinaga M, Katai Y, Yamasaki T, Kawamoto S, i sur., (2003) Thraustochytrid as a potential source of carotenoids. *J Amer Oil Chem Soc* **80**, 789–794. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0773-2>

Andlar M, Rezić T, Marđetko N, Kracher D, Ludwig R, Šantek B (2018) Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng Life Sci* **18**, 768–778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>

Bajpai P (2016) Pretreatment of lignocelulosic biomass for biofuel production, Springer, Singapur, str.7 –55.

Baruah J, Nath BK, Sharma R, Kumar S, Deka RC, Baruah DC, i sur. (2018) Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. *Front Energy Res* **6**, 141. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>

Behera S, Arora R, Nandhagopal N, Kumar S (2014) Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renew Sust Energy Rev* **36**, 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>

Ben Salem Y, Abdelhamid A, Mkadmini Hammi K, Le Cerf D, Bouraoui A, Majdoub H. (2017) Microwave-assisted extraction and pharmacological evaluation of polysaccharides from *Posidonia oceanica*. *Biosci Biotech Bioch* **81**, 1917–1925. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1361808>

Bi Y Guo P, Liu L, Chen L, Zhang W (2023) Elucidation of sterol biosynthesis pathway and its co-regulation with fatty acid biosynthesis in the oleaginous marine protist *Schizochytrium* sp. *Front Bioeng Biotechnol* **11**, 1188461. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1188461>

Boudouresque CF, Bernard G, Bonhomme P, Charbonnel E, Diviacco G, Meinesz A, i sur. (2012) Protection and Conservation of *Posidonia Oceanica* Meadows, RAMOGE and RAC/ SPA Publisher, Tunis, str. 11.

Brandenburg J, Blomqvist J, Shapaval V, Kohler A, Sampels S, Sandgren M, i sur., (2021) Oleaginous yeasts respond differently to carbon sources present in lignocellulose hydrolysate. *Biotechnol Biofuels* **14**, 124. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01974-2>

- Callegari A, Bolognesi S, Cecconet D, Capodaglio AG (2019) Production technologies, current role, and future prospects of biofuels feedstocks: A state-of-the-art review. *Crit Rev Envir Sci Tech* **50**, 384–436. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1629801>
- Campagne CS, Salles JM, Boissery P, Deter J (2015) The seagrass *Posidonia oceanica*: Ecosystem services identification and economic evaluation of goods and benefits. *Mar Pollut Bull* **97**, 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.05.061>
- Chen W, Li T, Du S, Chen H, Wang Q (2023) Microalgal polyunsaturated fatty acids: Hotspots and production techniques. *Front Bioeng Biotechnol* **11**:1146881. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1146881>
- Chiodo V, Zafarana G, Maisano S, Freni S, Urbani F (2016) Pyrolysis of different biomass: Direct comparison among *Posidonia Oceanica*, Lacustrine Alga and White-Pine. *Fuel* **164**, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.09.093>
- Ding J, Fu Z, Zhu Y, He J, Ma L (2022) Enhancing docosahexaenoic acid production of *Schizochytrium* sp. by optimizing fermentation using central composite design. *BMC Biotechnol* **22**, 39. <https://doi.org/10.1186/s12896-022-00769-z>
- Du F, Wang YZ, Xu YS, Shi TQ, Liu WZ, Sun XM, i sur. (2021) Biotechnological production of lipid and terpenoid from thraustochytrids. *Biotechnol Adv* **48**, 107725. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107725>
- Du H, Liao X, Gao Z, Li Y, Lei Y, Chen W, i sur. (2019) Effects of methanol on biomass, and fatty acid and carotenoid biosynthesis in *Schizochytrium limacinum* B4D1. *Appl Environ Microb* **85**, e01243-19. <https://doi.org/10.1128/aem.01243-19>
- Fullgrabe L (2020) Les banquettes de posidonie: défenses naturelles contre l'érosion des plages. < <https://seaescape.fr/blog/2020/10/20/banquettes-posidonie/> > Pristupljeno 25. kolovoza 2023.
- Galafassi S, Cucchetti D, Pizza F, Franzosi G, Bianchi D, Compagno C (2012) Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresour Technol* **111**, 398–403. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.004>
- Jeswani HK, Chilvers A, Azapagic A (2020) Environmental sustainability of biofuels: a review. *Proc R Soc A* **476**, 20200351. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.5208549.v1>

- Kaal J, Serrano O, Nierop KG, Schellekens J, Cortizas AM, Mateo MÁ (2016) Molecular composition of plant parts and sediment organic matter in a Mediterranean seagrass (*Posidonia oceanica*) mat. *Aquat Bot* **133**, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2016.05.009>
- Kanjer L, Mucko M, Car A, Bosak S (2019) Epiphytic diatoms on *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves from eastern Adriatic Sea. *Nat Croat* **28**, 1–20. <https://doi.org/10.20302/NC.2019.28.1>
- Kharaoui M (2022) Valorisation des déchets de posidonie pour l'obtention de matériaux biosourcés à forte valeur ajoutée (doktorski rad), Université Grenoble Alpes, Grenoble.
- Kot AM, Błażej S, Kurcz A, Gientka I, Kieliszek M (2016) *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Appl Microbiol Biot* **100**, 6103–6117. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7611-8>
- Kucharska K, Rybarczyk P, Hołowacz I, Łukajtis R, Glinka M, Kamiński M. (2018) Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. *Molecules* **23**, 2937. <https://doi.org/10.3390/molecules23112937>
- Kumar AK, Sharma S (2017) Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresour Bioprocess*, **4**, 1–19. doi:10.1186/s40643-017-0137-9
- Liu Y, Cruz-Morales P, Zargar A, Belcher MS, Pang B, Englund E., i sur. (2021) Biofuels for a sustainable future. *Cell* **184**, 1636–1647. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.052>
- Lymperatou A, Engelsen TK, Skiadas IV, Gavala HN (2022) Different pretreatments of beach-cast seaweed for biogas production. *J Clean Prod* **362**, 132277. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132277>
- Masri MA, Younes S, Haack M, Qoura F, Mehlmer N, Brück T (2018) A seagrass-based biorefinery for generation of single-cell oils for biofuel and oleochemical production. *Energy Technol* **6**, 1026–1038. <https://doi.org/10.1002/ente.201700604>
- Mat Aron NS, Khoo KS, Chew KW, Show PL, Chen WH, Nguyen THP (2020) Sustainability of the four generations of biofuels—a review. *Int J Energ Res* **44**, 9266–9282. <https://doi.org/10.1002/er.5557>

- Maurya DP, Singla A, Negi S (2015) An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech* **5**, 597–609. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0279-4>
- Maza DD, Viñarta SC, Su Y, Guillamón JM, Aybar MJ (2020) Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* r4, in comparison to other oleaginous yeasts. *J Biotechnol* **310**, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.01.012>
- Mussagy CU, Ribeiro HF, Santos-Ebinuma VC, Schuur B, Pereira JFB (2022) *Rhodotorula* sp.-based biorefinery: a source of valuable biomolecules. *Appl Microbiol Biotechnol* **106**, 7431–7447. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12221-5>
- Nagahama T, Hamamoto M, Nakase T, Horikoshi K (2003) *Rhodotorula benthica* sp. nov. and *Rhodotorula calyptogenae* sp. nov., novel yeast species from animals collected from the deep-sea floor, and *Rhodotorula lysiniphila* sp. nov., which is related phylogenetically. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 897–903. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02395-0>
- Pilavtepe M, Celiktaş MS, Sargin S, Yesil-Celiktaş O (2013) Transformation of *Posidonia oceanica* residues to bioethanol. *Ind Crop Prod* **51**, 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.020>
- Półbrat T, Konkol D, Korczyński M (2021) Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. – A review. *Biocatal Agric Biotechnol* **35**, 102076. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102076>
- Potters G, Van Goethem D, Schutte F (2010) Promising Biofuel Resources: Lignocellulose and Algae. *Nature* **3**, 14 <<https://www.nature.com/scitable/content/structure-of-lignocellulose-14464273/>> Pristupljeno 22. kolovoza 2023.
- Rajesh Banu J, Preethi Kavitha S, Tyagi VK, Gunasekaran M, Karthikeyan OP, Kumar G (2021) Lignocellulosic biomass based biorefinery: A successful platform towards circular bioeconomy. *Fuel* **302**, 121086. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121086>
- Restaino OF, Giosafatto CVL, Mirpoor SF, Cammarota M, Hejazi S, Mariniello L, i sur. (2023) Sustainable Exploitation of *Posidonia oceanica* Sea Balls (Egagropili): A Review. *Int J Mol Sci* **24**, 7301. <https://doi.org/10.3390/ijms24087301>

Shahid MK, Batool A, Kashif A, Nawaz MH, Aslam M, Iqbal N, i sur. (2021). Biofuels and biorefineries: Development, application and future perspectives emphasizing the environmental and economic aspects. *J Environ Manage* **297**, 113268. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113268>

Shuba ES, Kifle D (2018) Microalgae to biofuels: “Promising” alternative and renewable energy, review. *Renew Sust Energ Rev*, **81**, 743–755. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.042>

Sinčić D (2014) Kemijsko-inženjerski aspekti proizvodnje biodizela. I. Biogoriva, svojstva biodizela i osnove proizvodne tehnologije. *Kem Ind* **63**, 19–31.

Sun S, Sun S, Cao X, Sun R (2016) The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technol* **199**, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>

Usmani Z, Sharma M, Awasthi AK, Lukk T, Tuohy MG, Gong L, i sur. (2021) Lignocellulosic biorefineries: The current state of challenges and strategies for efficient commercialization. *Renew Sust Energ Rev* **148**, 111258. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111258>

Vasconcelos B, Teixeira JC, Dragone G, Teixeira JA (2018) Optimization of lipid extraction from the oleaginous yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Lipomyces kononenkoae*. *AMB Expr* **8** **126**, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0658-4>

Verardi A, Lopresto CG, Blasi A, Chakraborty S, Calabrò V (2020) Bioconversion of lignocellulosic biomass to bioethanol and biobutanol. U: Yousuf A, Pirozzi D, Sannino F (ured.) *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*, Academic Press, London/San Diego/Cambridge/Oxford, str. 67–125.

Voca N, Grubor M, Peter A, Kricka T (2019) Evaluation of *Posidonia oceanica* waste as a biomass source for energy generation. *Bioenerg Res* **12**, 1104–1112. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-10032-7>

Wang LR, Zhang ZX, Nong FT, Li J, Huang PW, Ma W, i sur. (2022) Engineering the xylose metabolism in *Schizochytrium* sp. to improve the utilization of lignocellulose. *Biotechnol Biofuels* **15**, 114. <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02215-w>

Wang LR, Zhang ZX, Wang YZ, Li ZJ, Huang PW, Sun XM (2022) Assessing the potential of *Schizochytrium* sp. HX-308 for microbial lipids production from corn stover hydrolysate. *Biotechnol J* **17**, 2100470. <https://doi.org/10.1002/biot.202100470>

Wang Q, Han W, Jin W, Gao S, Zhou X (2021) Docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium sp.*: review and prospect. *Food Biotechnol* **35**, 111–135. <https://doi.org/10.1080/08905436.2021.1908900>

Xu J, Liao W, Liu Y, Guo Y, Jiang S, Zhao C (2023) An overview on the nutritional and bioactive components of green seaweeds. *Food Prod Process and Nutr* **5**, 1–21. <https://doi.org/10.1186/s43014-023-00132-5>

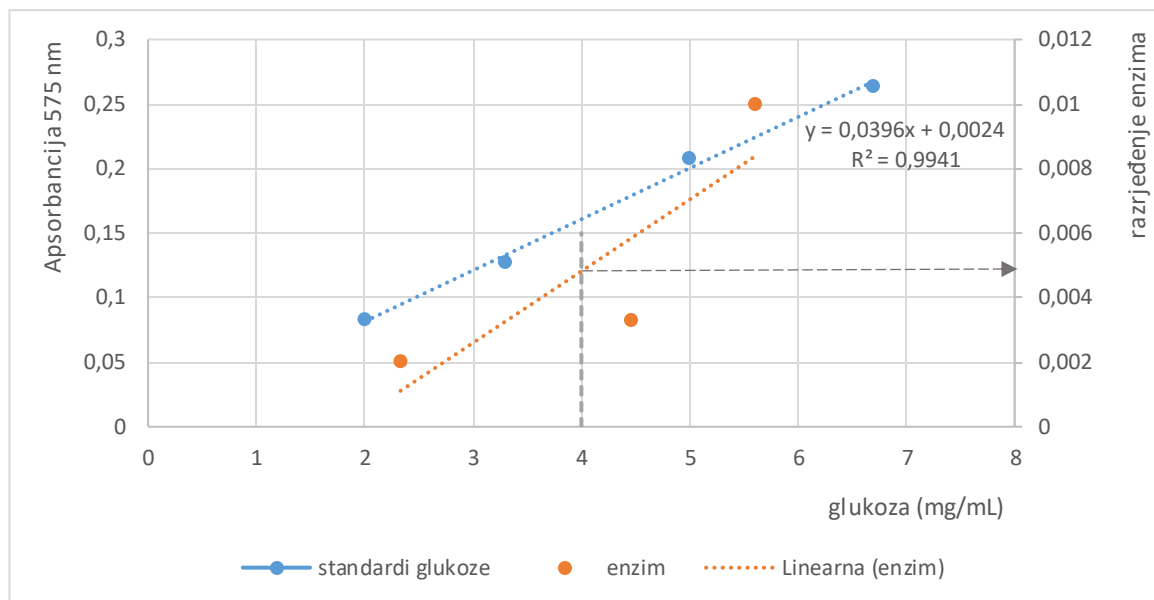
Yousuf A, Pirozzi D, Sannino F (2020) Fundamentals of lignocellulosic biomass. U: Yousuf A, Pirozzi D, Sannino F (ured.) *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*, Academic Press, London/San Diego/Cambridge/Oxford, str. 1–14.

Zhang J, Zhou H, Liu D Zhao X (2020) Pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification of cellulose. U: Yousuf A, Pirozzi D, Sannino F (ured.) *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*, Academic Press, London/San Diego/Cambridge/Oxford, str. 17–55.

Zuccaro G, Pirozzi D, Yousuf A (2020) Lignocellulosic biomass to biodiesel. U: Yousuf A, Pirozzi D, Sannino F (ured.) *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*, Academic Press, London/San Diego/Cambridge/Oxford, str. 127–159.

7. PRILOG

7.1. Određivanje ukupne celulolitičke aktivnosti komercijalnog enzimskog pripravka Cellulase enzyme blend



Slika 15. Baždarni dijagram za određivanje celulolitičke aktivnosti komercijalnog enzimskog pripravka

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja MIHAELA ŽUGEC izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Mihaela Žugec