

Optimizacija uvjeta uzgoja kvasca *Rhodotorula* sp. i traustohitrida *Schizochytrium* sp. na otpadnoj morskoj travi

Morača, Nika

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:204218>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2024.

Nika Morača

**Optimizacija uvjeta uzgoja kvasca
Rhodotorula sp. i traustohitrida
Schizochytrium sp. na otpadnoj morskoj
travi**

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.

ZAHVALA:

Htjela bih prvenstveno zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek na prilici za izradu ovog diplomskog rada, pomoći, podijeljenom znanju i strpljenju.

Također, hvala svim djelatnicima Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, posebno izv. prof. dr. sc. Antoniji Trontel, izv. prof. dr. sc. Mariu Novaku, dr. sc. Nenadu Marđetku i tehničarima Igoru Livadi, Marini Vnućec i Ljiljani Blažević na savjetima i pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Zahvaljujem Toniju na potpori, razumijevanju i strpljenju tijekom cijelog fakultetskog obrazovanja, posebno u teškim trenucima kad mi je to najviše bilo potrebno.

Hvala svim mojim prijateljima i obitelji na podršci, strpljenju i lijepim trenucima tijekom školovanja, a posebno hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili ovo iskustvo.

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

OPTIMIZACIJA UVJETA UZGOJA KVASCA *Rhodotorula* sp. I TRAUSTOHITRIDA *Schizochytrium* sp. NA
OTPADNOJ MORSKOJ TRAVI

Nika Morača, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058214998

Sažetak: S obzirom na iscrpljivanje prirodnih resursa poput fosilnih goriva, postoji velika potreba za pronalaskom obnovljivih izvora energije. Lignocelulozna biomasa, kompleksni polimer, obećavajuća je obnovljiva sirovina koja se može koristiti za proizvodnju bioenergetskih i drugih produkata pomoću različitih tipova mikroorganizama. Cilj ovog rada je optimizacija omjera ugljika i dušika (C:N) u hranjivoj podlozi za uzgoj dva oleaginozna mikroorganizma – kvasca *Rhodotorula* sp. i traustohitrida *Schizochytrium* sp.. U nastavku istraživanja proveden je uzgoj navedenih mikroorganizama na predobrađenoj otpadnoj travi koja je pretežito sadržavala morsku travu *Posidonia oceanica*. Najbolji C:N omjer za rast biomase i prinos lipida bio je 100 g/g za kvasac te 3,75 g/g za traustohitrid. Uzgojem kvasca na predobrađenoj morskoj travi proizvedeno je 73,4 g lipida/kg sirovine, a uzgojem traustohitrida 132,2 g lipida/kg sirovine.

Ključne riječi: omjer C/N, *Rhodotorula*, *Schizochytrium*, lipidi, morska trava

Rad sadrži: 46 stranica, 14 slika, 9 tablica, 46 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga 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. prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević (član)
4. prof. dr. sc. Jasna Novak (zamjenski član)

Datum obrane: 28.11.2024.

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

OPTIMIZATION OF CULTIVATING CONDITIONS OF THE YEAST *Rhodotorula* sp. AND THE
THRAUSTOCHYTRID *Schizochytrium* sp. ON SEAGRASS WASTE

Nika Morača, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058214998

Abstract: As natural resources such as fossil fuels deplete, there is an urgent need to find sustainable energy sources. Lignocellulose, a complex polymer, has emerged as a promising renewable resource which can be used for production of bioenergetic and other products using different kinds of microorganisms. The goal of this thesis is optimization of carbon to nitrogen (C:N) ratio for cultivation of two oleaginous microorganisms – yeast *Rhodotorula* sp. and thraustochytrid *Schizochytrium* sp. using the marine seagrass *Posidonia oceanica* as a substrate. In the following research, the cultivation of mentioned microorganisms was carried out on pretreated waste grass, which predominantly contained *Posidonia oceanica*. The best C:N ratio for biomass growth and lipid yield was 100 g/g for the yeast and 3,75 g/g for the thraustochytrid. Cultivation of yeast on pretreated sea grass yielded 73,4 g of lipids/kg of raw material and cultivation of thraustochytrid yielded 132,2 g of lipids/kg of raw material.

Keywords: C/N ratio, *Rhodotorula*, *Schizochytrium*, lipids, sea grass

Thesis contains: 46 pages, 14 figures, 9 tables, 46 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb 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. Tibela, Landeka Dragičević, PhD, Full professor (member)
4. Jasna, Novak, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: November 28th, 2024

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE	2
2.1.1. Sastav	2
2.1.1.1. Celuloza.....	3
2.1.1.2. Hemiceluloza	3
2.1.1.3. Lignin	3
2.1.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina	4
2.1.2.1. Fizikalne metode predobrade	4
2.1.2.2. Kemijske metode predobrade	4
2.1.2.3. Biološke metode predobrade	5
2.1.3. Enzimaska hidroliza.....	5
2.1.4. Morska trava <i>Posidonia oceanica</i>	6
2.2. RADNI MIKROORGANIZMI.....	7
2.2.1. <i>Rhodotorula</i> sp.	8
2.2.2. <i>Schizochytrium</i> sp.	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	11
3.1.2. Sastojci za pripremu hranjivih podloga	11
3.1.3. Tvari korištene u analizi uzoraka	12
3.1.3.1. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma.....	13
3.1.3.2. Hranjiva podloga za glavni uzgoj kvasca <i>Rhodotorula</i> sp.....	13
3.1.3.3. Hranjiva podloga za glavni uzgoj traustohitrida <i>Schizochytrium</i> sp.....	14
3.1.3.4. Hranjiva podloga s morskom travom za uzgoj kvasca <i>Rhodotorula</i> sp. i traustohitrida <i>Schizochytrium</i> sp.	14
3.1.4. Korištena oprema i aparatura	15
3.1.4.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (eng. Ultra Performance Liquid Chromatography - UPLC).....	15
3.1.4.2. Uređaj za plinsku kromatografiju (eng. Gas Chromatography Flame Ionization Detector, GC-FID).....	15
3.1.4.3. Ostali uređaji.....	15
3.2. METODE	16
3.2.1. Optimizacija omjera ugljika i dušika (C:N) u hranjivoj podlozi.....	16
3.2.2. Predobrada morske trave	17
3.2.3. Enzimaska predobrada morske trave	17

3.2.4. Uzgoj na morskoj travi	17
3.2.5. Analitičke metode	18
3.2.5.1. Gravimetrijska metoda analize	18
3.2.5.2. Spektrofotometrijska analiza	18
3.2.5.3. Određivanje udjela suhe tvari	19
3.2.5.4. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini.....	19
3.2.5.5. Određivanje udjela lignina topljivog u kiselini.....	19
3.2.5.6. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (eng. Ultra Performance Liquid Chromatography - UPLC)	20
3.2.5.7. Određivanje ukupnog udjela lipida	21
3.2.5.8. Određivanje sastava masnih kiselina u biomasi i supstratu plinskom kromatografijom (eng. Gas Chromatography Flame Ionization Detector, GC-FID).....	21
4. RASPRAVA I REZULTATI	23
4.1. Optimizacija Omjera izvora ugljika i dušika (C:N) u hranjivoj podlozi za uzgoj kvasca <i>Rhodotorula</i> sp.	24
4.1.1. Udio lipida postignut tijekom glavnog uzgoja	25
4.1.2. Masne kiseline proizvedene tijekom glavnog uzgoja.....	26
4.2. Optimizacija Omjera izvora ugljika i dušika (C:N) u hranjivoj podlozi za uzgoj traustohitrida <i>Schizochytrium</i> sp.....	27
4.2.1. Udio lipida postignut tijekom glavnog uzgoja	29
4.1.2. Masne kiseline proizvedene tijekom glavnog uzgoja.....	30
4.3. PREDOBRAĐANJE MORSKE TRAVE	31
4.3.1. Sastav morske trave	31
4.3.2. Kiselinski predtretman morske trave	32
4.3.3. Enzimski hidroliza morske trave	34
4.4. UZGOJ KVASCA <i>Rhodotorula</i> sp. NA PREDOBRAĐANOJ MORSKOJ TRAVI.....	35
4.4.1. Udio ekstrahiranih lipida i profil masnih kiselina proizvedenih tijekom uzgoja na predobrađenoj morskoj travi	36
4.5. UZGOJ TRAUSTOHITRIDA <i>Schizochytrium</i> sp. NA PREDOBRAĐANOJ MORSKOJ TRAVI	37
4.5.1. Udio ekstrahiranih lipida i profil masnih kiselina proizvedenih tijekom uzgoja na predobrađenoj morskoj travi	39
5. ZAKLJUČAK.....	41
6. Literatura	42

1. UVOD

Povećanje populacije i globalno zatopljenje dovode do ekstremnih klimatskih promjena poput povećanja razine mora uzrokovane otapanjem ledenjaka te povišenje prosječne temperature u svijetu za 1 -1,5 °C. Fosilna goriva kao ugljen, nafta i zemni plin su neobnovljivi izvori energije, a njihove zalihe se drastično smanjuju. Zbog toga se istražuju obnovljivi izvori energije uključujući solarnu, geotermalnu energiju, hidroenergiju i bioenergiju (Chilakamarry i sur., 2021). Otpad iz poljoprivredne, drveno-prerađivačke industrije i tekstilne industrije pretežito su neiskorišteni dijelovi biljaka i drveća koji su po svom sastavu lignocelulozne sirovine. One su po sastavu građene od tri biopolimera – celuloze, hemiceluloze i lignina te se mogu primjenjivati kao obnovljiva sirovina u proizvodnji biogoriva i u proizvodnji kemikalija kao supstrat za radne mikroorganizme (Gil, 2021). S obzirom da je lignoceluloza kompleksan biopolimer, potrebno je izvršiti predobradu da bi sirovina bila spremna za daljnju razgradnju. Postoje različite metode za oslabljivanje i razbijanje veza unutar lignocelulozne strukture te se odabiru s obzirom na proizvod koji se iz sirovine želi dobiti. Metode se dijele na fizikalne, kemijske i biološke (Roy i sur., 2020).

Morska trava *Posidonia oceanica* lignocelulozna je sirovina koja raste u Sredozemnom moru. Višegodišnja je biljka, nakon godinu dana rasta lišće se odvaja od stabljike te se nakuplja na obali. Velike količine morske trave koje se nakupljaju na plažama predstavljaju posebno velik problem u turističkim mjestima. Posidonija je privukla pažnju kao potencijalna lignocelulozna sirovina koja se može upotrebljavati kao obnovljivi izvor ugljika za proizvodnju raznih bio-produkata (Mnafki i sur., 2024).

Mikroorganizmi poput različitih vrsta bakterija, filamentoznih funga, traustohitrida, mikroalgi i kvasaca koji mogu nakupiti više od 20 % (w/w) lipida po suhoj tvari biomase pod određenim uvjetima uzgoja nazivaju se oleaginoznim mikroorganizmima (Patel i sur., 2020). U tu skupinu spadaju i kvasac *Rhodotorula* sp. i traustohitrid *Schizochytrium* sp. koji su korišteni kao radni mikroorganizmi.

Cilj ovog rada bio povećati prinos biomase i lipida za kvasac *Rhodotorula* sp. i traustohitrid *Schizochytrium* sp. optimizacijom omjera masa izvora ugljika i dušika u hranjivoj podlozi koristeći glukozu kao izvor ugljika. U drugom dijelu ovog rada proveden je uzgoj u kvasca *Rhodotorula* sp. i traustohitrida *Schizochytrium* sp. na predobrađenoj otpadnoj morskoj travi uz dodatak celulolitičkih enzima i optimalan omjer izvora ugljika i dušika.

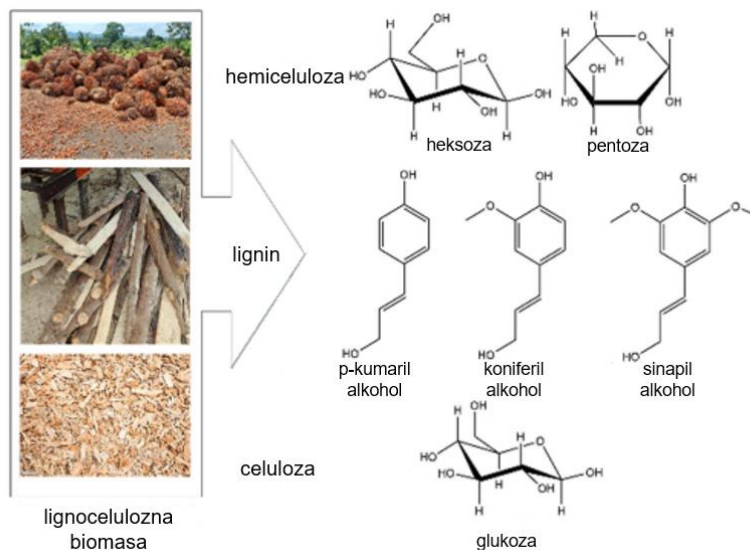
2. TEORIJSKI DIO

2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE

Lignoceluloza, odnosno lignocelulozna biomasa, je najraširenija obnovljiva sirovina u svijetu. U tu skupinu biomaterijala svrstavaju se biorazgradivi otpadi biljnog podrijetla (Baig, 2020). Široku upotrebu u industriji stekla je zbog karakteristika poput dobre rasprostranjenosti i količine, niskih cijena te ekološke prihvatljivosti (Lobo i sur., 2021). Lignocelulozne sirovine mogu biti poljoprivrednog podrijetla – kukuruzovina, kukuruzni oklasci, energetske trave poput miskantusa; šumarskog podrijetla – piljevina, kora drveća, lišće, granje; industrijskog podrijetla – ostaci industrijske prerade poljoprivrednih sirovina kao što su ljuske riže ili bagaza šećerne repe (Cuervo i sur., 2024).

2.1.1. Sastav

Stanične stijenke biljaka sastoje se od tri organske komponente – celuloze, hemiceluloze i lignina. Te komponente su također glavne komponente lignoceluloznih sirovina, a njihov omjer i kvaliteta variraju s obzirom na vrstu i starost biljke. Molekule celuloze su ravnomjerno raspoređene u snopove i definiraju građu stanične stijenke. S hemicelulozom i ligninom tvori vodikove veze, dok su oni međusobno povezani kovalentnom vezom. Stoga, pri izolaciji lignina iz lignocelulozne biomase većinom mogu biti pronađeni mali udjeli ugljikohidrata koji zaostaju nakon razbijanja kovalentne veze s hemicelulozom (Chen, 2014). Građa lignocelulozne sirovine, odnosno njenih komponenti prikazana je na slici 2.1.



Slika 2.1. Građa lignocelulozne sirovine i njenih komponenti (prema Cuervo i sur., 2023)

2.1.1.1. Celuloza

Celuloza je najčešći biopolimer koji se pojavljuje u prirodi, sastavni je dio stanične stijenke biljnih stanica. Promjer celuloznih mikrofibrila unutar stanične stijenke biljaka u prosjeku iznosi 2 – 4 nm, dok celulozni mikrofibrili u bakterijama imaju promjer 4 – 8 nm. Celuloza je linearni homopolisaharid, što znači da u sastavu ima jedan monosaharid – glukozu, te ima kemijsku formulu $(C_6H_{10}O_5)_n$. „n“ predstavlja broj molekula glukoze sadržanih u molekuli celuloze, te stupanj polimerizacije varira između 1510-5500 (Okolie i sur., 2020). Molekule glukoze međusobno su povezane β -1,4-glikozidnim vezama. Unutar celuloze, lanci mogu biti pravilno i nepravilno posloženi što je rezultat prisutnosti polarnih atoma kisika i vodika, a to omogućuje molekulama glukoze formaciju inter- i intra-molekularnih veza (Lobo i sur., 2021).

2.1.1.2. Hemiceluloza

Hemiceluloza je još jedan od glavnih polimera u sastavu biljnih staničnih stijenki. Hemiceluloza je heteropolisaharidna kratkolančana molekula, sadrži različite monosaharidne jedinice, heksoze (β -D-glukoza, β -D- manoz, β -D-galaktoza) i pentoze (β -D-ksiloza i α -L-arabinoza) u većim količinama, dok se heksoze poput fruktoze i ramnoze pojavljuju u manjim količinama (Lobo i sur., 2021). Sastav hemiceluloze razlikuje se s obzirom na vrstu biljke. Na primjer, manani su prisutni u poljoprivrednim otpacima i u mekom drvetu. To su polimeri u kojima su bočni ogranci manoze povezani β -1,4- ili β -1,6-glikozidnim vezama s drugim monosaharidima, tako se pojavljuje glukomanan (lanci glukoze i manoze), galaktomanan (lanci galaktoze i manoze) itd. Ksilan je najčešći polisaharid u hemicelulozi, najviše prisutan u slami i travi. Ksilani su polimeri pretežito sačinjeni od ksiloze čije su molekule međusobno povezane β -1,4-glikozidnim vezama. Osim ksiloze, u malim količinama prisutni su i glukoz, arabinoza i glukuronska kiselina (Okolie i sur., 2020).

2.1.1.3. Lignin

Lignin je polimer sastavljen od fenilpropanskih monomernih jedinica koje su nasumično i nelinearno povezane esterskim vezama. Sadrži tri jednostavna strukturna monomera – p-fenilni monomer (H-tip) izveden iz kumaril alkohola; gvajacilni monomer (G-tip) izveden iz koniferil alkohola; siringilni monomer (S-tip) izveden iz sinapilnog alkohola. Iako ima samo tri osnovne strukture, njihovi omjeri se bitno razlikuju u različitim biljkama (Chen, 2014). S obzirom da je lignin prisutan u lignoceluloznoj biomasi, otežava ekstrakciju celuloze i hemiceluloze u svrhu dobivanja fermentabilnih šećera te ga je potrebno izdvojiti iz biomase (Okolie i sur., 2020).

2.1.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina

Lignoceluloza je kompleksan biopolimer te je stoga potrebno izvršiti predobradu da bi sirovina bila spremna za enzimsku razgradnju uz pomoć celulaza i hemicelulaza. Metode predobrade se dijele na fizikalne, kemijske i biološke (Roy i sur., 2020).

2.1.2.1. Fizikalne metode predobrade

U fizikalne metode predobrade spadaju mehanički predtretmani, ekstruzija, predtretmani zračenjem i drugi. Mehanički predtretmani su jednostavni, ne djeluju negativno na okoliš te ne proizvode toksične tvari i inhibitore. Među njih spadaju mljevenje, sjeckanje i prešanje te iteracije tih metoda. Koriste se ukoliko se lignocelulozna sirovina nadalje koristi kao supstrat u procesu anaerobne digestije jer se pokazalo da su prinosi metana povećani za 25-27 % nakon mehaničkog usitnjavanja sirovine. Mehanička predobrada ima visoke energetske troškove i najčešće prethodi drugim metodama predobrade lignocelulozne sirovine (Khan i sur. 2022). Predtretman ekstruzijom provodi se kombinacijom toplinske i mehaničke energije postignute gibanjem sirovine unutar kućišta ekstrudera različitih izvedbi. Ekstruzijom se sirovina prisiljava na gibanje, uz istovremeno miješanje i/ili zagrijavanje/hlađenje, kroz suženi otvor u prostoru kućišta. Tijekom procesa povećava se temperatura i tlak unutar ekstrudera, te pri izlasku sirovine iz tanka dolazi do razbijanja vlakana lignoceluloze i smanjivanja udjela vlage zbog isparavanja pri povišenoj temperaturi (Khan i sur., 2022). Predtretman zračenjem uključuje zagrijavanje sirovine koristeći mikrovalove, elektronske snopove ili gama zrake. Takvim predtretmanom dolazi do smanjenja kristalčnosti celuloze, hidrolize hemiceluloze i depolimerizacije lignina (Khan i sur., 2022).

2.1.2.2. Kemijske metode predobrade

U kemijske metode predobrade ubrajaju se kiselinska i alkalna predobrada. Predobrada lignocelulozne sirovine kiselinskom hidrolizom na različitim temperaturama dovodi do smanjenja udjela lignina te dolazi do preraspodjele lignina u samoj sirovini čime se poboljšava razgradivost polisaharida pomoću celulolitičkih enzima. Djelovanjem kiseline i povišene temperature dolazi do djelomične hidrolize lanaca celuloze i hemiceluloze pucanjem kovalentnih veza unutar lanaca. Različite organske i anorganske kiseline mogu se koristiti u procesu kiselinske predobrade, kao što su na primjer sumporna, klorovodična, mravlja i octena kiselina. Najčešće se koriste klorovodična i sumporna kiselina u različitim koncentracijama. Iako je ovakav predtretman efikasan u uklanjanju lignina i degradaciji hemiceluloze, negativna strana je to što su kiseline jaki oksidansi. Ukoliko se koriste koncentrirane jake kiseline, one mogu dovesti do stvaranja toksičnih spojeva poput furfurala. Stoga je bitno odabrati optimalnu temperaturu i nižu koncentraciju kiselina da bi se izbjegli negativni efekti (Roy i sur., 2020). Predtretman lužinama provodi se pri nižim

temperaturama u odnosu na kiselinski predtretman. Lignocelulozna sirovina nabubri u prisutnosti lužina poput natrijeva, kalijeva ili amonijeva hidroksida što omogućuje razbijanje veza lignina s hemicelulozom i celulozom te može doći do djelomične razgradnje lignina. Također, povećava se površina unutarnje strukture lignoceluloze čime se povećava površina za vezanje hidrolitičkih enzima. Predtretman lužinama je učinkovit za lignocelulozne sirovine poput poljoprivrednih ostataka zbog manjeg udjela lignina, dok je manje učinkovit i skuplji za tretiranje mekog drva (npr. četinjače) s obzirom na potrebe za višim temperaturama i tlakovima da bi se postigli rezultati slični kiselinskom predtretmanu. Osim navedenih lužina, alkalna predobrada može se provesti korištenjem vapna. Kao jeftin materijal i materijal koji se jednostavno može izdvojiti iz sirovine, vapno je privuklo pažnju kao sredstvo predobrade. Međutim, vapno sadrži kalcijeve ione koji se mogu taložiti na tankovima i opremi u kojoj se provodi proces te ju oštetiti ili začepiti cijevi (Galbe i Zacchi, 2012).

2.1.2.3. Biološke metode predobrade

Korištenje mikroorganizama za predobradu lignocelulozne sirovine je jeftin proces s niskim energetskim troškovima te je značajno manja mogućnost nastajanja tvari koje mogu inhibirati rast mikroorganizma ili smanjiti aktivnost celulolitičkih enzima u odnosu na kiselinsku i alkalnu predobradu. Osim toga, sirovina obrađena biološkim putem ne zahtijeva dodatnu obradu prije korištenja u procesu glavnog uzgoja mikroorganizma. Delignifikacija je primarni cilj biološke predobrade jer uklanjanjem lignina se omogućava učinkovitija hidroliza sirovine uz pomoć celulaza i hemicelulaza. U biološkim metodama najčešće se koriste enzimi te određeni rodovi bakterija i funga (Chen i sur., 2017).

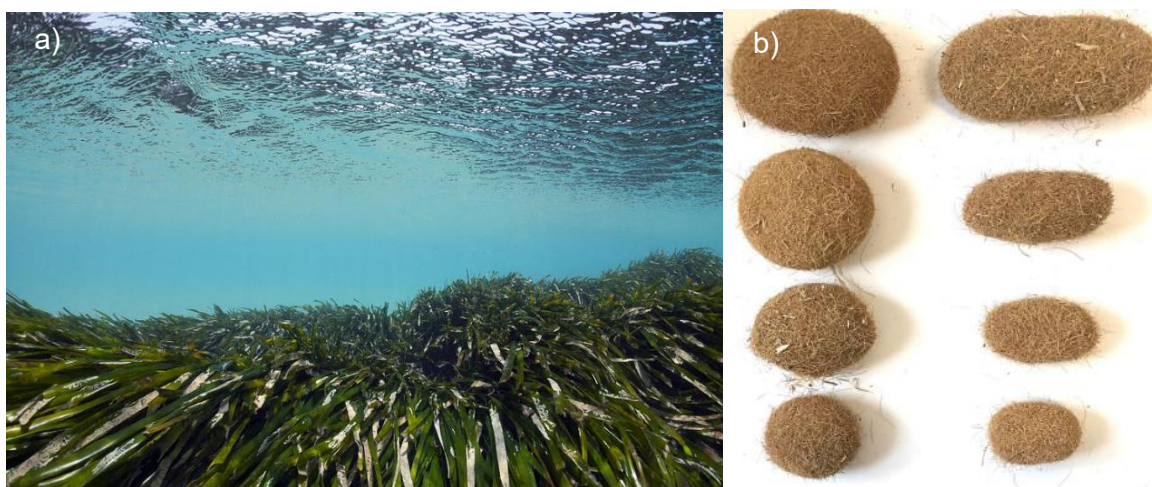
2.1.3. Enzimaska hidroliza

Enzimaska hidroliza lignoceluloznih materijala ovisi ne samo o učinkovitosti enzima, već i o fizikalnim, kemijskim i morfološkim karakteristikama tretiranog materijala. Faktori koji utječu na enzimsku hidrolizu mogu se podijeliti u dvije skupine – faktori vezani uz enzime i faktori vezani uz supstrat. Faktori vezani uz enzime uključuju aktivnost enzima, mogućnost inhibicije produktima, termalnu stabilnost, međusobnu sinergiju i adsorpciju na lignoceluloznu sirovinu. Faktori vezani uz supstrate se fokusiraju na povećanje dostupnosti celuloze enzimima na koju utječu razni čimbenici, na primjer kristaliničnost celuloze, raspodjela lignina i hemiceluloze u sirovini, površina slobodna za vezanje enzima. Kristaliničnost celuloze nepovoljno utječe na hidrolizu sirovine zbog dostupnosti supstrata tj. celuloze, celulazama. Stoga je bitno da se tijekom predtretmana kristalinična celuloza prevede u amorfni oblik koju celulaze učinkovitije hidroliziraju u jednostavnije ugljikohidrate. Prisutnost hemiceluloze i lignina smanjuju dostupnost supstrata tj. celuloze

celuloitičkim enzimima. Tijekom predtretmana potrebno je povećati dostupnost celuloznih vlakana u sirovini, čime se povećava površina tj. supstrat za celulaze (Sun i sur., 2015). Zbog prisutnosti lignina moguća je adsorpcija celulaza na lignin uzrokovana hidrofobnim interakcijama, vodikovim vezama ili elektrostatskim interakcijama. Vezanjem celuloitičkih enzima na lignin smanjuje se aktivnost enzima te se povećavaju troškovi hidrolize. Osim toga, proizvodi razgradnje lignina koji nastaju tijekom predtretmana mogu inhibirati celuloitičke enzime (Yuan i sur., 2021). Osim lignina i proizvoda njegove razgradnje, mnoge druge tvari nastaju tijekom predobrade kao što je glukoza, celobioza i ksilooligosaharidi. Celobioza povezana s triptofanom može se vezati u aktivno mjesto celuloitičkog enzima i time onemogućiti vezanje na supstrat tj. lanac celuloze. Ksilooligosaharidi u vrlo niskim koncentracijama inhibiraju celulaze te smanjuju aktivnost enzima. Glukoza u velikim koncentracijama inhibira celulaze i β -glukozidazu (Sun i sur., 2015).

2.1.4. Morska trava *Posidonia oceanica*

Morska trava *Posidonia oceanica* L. Delile (slika 2.2.a)) je sporo-rastuća endemska vodena biljka koja raste u Sredozemnom i okolnim morima. Radi se o višegodišnjoj biljci koja pokriva morsko dno formirajući podvodne livade. Lišće biljke *P.oceanica* sastoji se od korice i vlati, vlat se nakon jedne godine odvaja od korice, koja ostaje pričvršćena za rizom, te se ispire na obalu. Korice, rizom i korijen se također odvajaju od morskog dna, međusobno se isprepliću te formiraju tzv. egogropile (slika 2.2.b)), nakupine nalik na jajašca, koje se u tom obliku dospiju na obalu (Mnafki i sur., 2024).



Slika 2.2. a) Prikaz morske trave *P. oceanica* (Lo Re, 2015); b) egogropili formirani od dijelova *P.oceanica* (Restaino i sur., 2023)

S ekološkog stajališta, livade posidonije igraju važnu ulogu u ekosistemu Sredozemnog mora. Predstavljaju utočište i izvor hrane brojnim morskim beskralježnjacima i kralježnjacima; korijenje stabilizira morsko dno i sprječava eroziju obala koja se odvija zbog snage valova; služi kao skladište ugljikovog dioksida apsorbirajući ga iz atmosfere i time ublažava utjecaj klimatskih promjena (Amoroso i sur., 2024). Međutim, „livade“ posidonije na morskom dnu, koje se nazivaju i plućima Mediterana, ugrožene su zbog zagađenja mora, mehaničkih utjecaja zbog sidrenja brodova i promjene klimatskih uvjeta (Pansini i sur., 2022). Zbog navedenih problema, livade posidonije se drastično smanjuju na mnogim područjima. To je povećalo potrebu za prevencijom izumiranja te se to pokušava postići sađenjem posidonija (Lo Re, 2015).

S obzirom na velike količine lišća i egogropila koji se ispiru na obale Sredozemlja, posidonija je privukla pažnju kao potencijalna lignocelulozna sirovina koja se može upotrebljavati kao obnovljivi izvor ugljika za proizvodnju raznih bio-produkata. Zbog potrebe za pronalaskom alternativa fosilim gorivima, posidonija je podvrgnuta istaživanjima u kojima se koristi za proizvodnju biogoriva te se ispituju optimalni uvjeti predobrade koji nadalje rezultiraju boljim iskorištenjem celuloze u ovoj sirovini (Mnafki i sur., 2024). Osim toga, primjenu pronalazi kao zamjena kartonskim paketima proizvedenim od drveća (Benito-González i sur., 2018), dodaje se u stočnu hranu, koristi se kao supstrat za proizvodnju biougijena te se dodaje u gnojiva (Amoroso i sur., 2024).

2.2. RADNI MIKROORGANIZMI

Radni mikroorganizmi poput različitih vrsta bakterija, filamentoznih fungi, traustohitrida, mikroalgi i kvasaca mogu proizvesti više od 20 % (w/w) lipida po suhoj tvari biomase te se takva skupina mikroorganizama naziva oleaginozni mikroorganizmi. Ovisno o postavljenim uvjetima uzgoja udio proizvedenih lipida se mijenja i stoga je bitno pratiti procesne parametre kao što su temperatura, pH i omjer ugljika i dušika (Patel i sur., 2020). Pokazalo se da temperature više od 30 °C negativno utječu na prinos lipida, a pH vrijednosti koje se kreću oko neutralne i blago bazične vrijednosti pozitivno utječu na prinose. Također, miješanje od 200 do 300 okretaja po minuti povećava prinose lipida, dok vrijednosti iznad navedenih smanjuju prinose, a vrijednosti niže od toga ubrzavaju metabolizam ugljika koji potiče sintezu ekstracelularnih alkohola (Valdés i sur., 2020). Većina lipida proizvedenih od strane oleaginoznih mikroorganizama su lanci od 4 do 28 ugljikovih atoma. To mogu biti zasićene i nezasićene masne kiseline, dok nezasićene mogu biti mononezasićene (*eng.* monounsaturated fatty acids – MUFA) ili polinezasićene (*eng.* polyunsaturated fatty acids – PUFA) masne kiseline. S obzirom na profil proizvedenih masnih kiselina, oleaginozni mikroorganizmi se mogu koristiti u proizvodnji biodiezela ili kao radni mikroorganizmi za proizvodnju nutraceutika (prehrambeni proizvodi ili dodatci prehrani koji imaju pozitivne učinke na zdravlje). Posebna

pažnja se skreće na mikroorganizme koji proizvode eikozapentaensku (EPA) i dokozaheksaensku (DHA) višestruko nezasićenu masnu kiselinu. One ne mogu biti proizvedene u ljudskom organizmu, mogu se sintetizirati konverzijom drugih omega-3 masnih kiselina, ali stupanj konverzije je prenizak da bi se zadovoljila dnevna potreba za istima. Stoga se u organizam unose hranom. DHA i EPA imaju važne uloge u metaboličkim i imunskim aktivnostima, kao i pozitivne učinke protiv neuroloških i kardiovaskularnih bolesti (Patel i sur., 2020).

2.2.1. *Rhodotorula* sp.

Rod kvasaca *Rhodotorula* sp. uključuje više od 165 vrsta. Ime je poteklo od grčke riječi *rhodos* (crvena) i latinske riječi *torula* (ispupčenje). Njihove kolonije karakterizira brzi rast, glatka površina, mogu biti i bistre i mutne, mekane su i mukoidne. Također, prepoznatljive su po svojoj boji, koja ovisno o proizvedenim pigmentima varira između roze, koraljno crvene, narančaste i žute (Marova i sur., 2011). Mogu se izolirati iz okoliša; prisutni su u zraku, zemlji, travi, jezerima, oceanima i na ljudskoj koži. Većina kvasaca ovog roda nisu patogeni, međutim kvasac vrste *Rhodotorula mucilaginosa* jest oportunistički patogen koji može izazvati infekcije (Kot i sur., 2016).

Koristi različite izvore ugljika, npr. glukozu, galaktozu, saharozu, maltozu, trehalozu, etanol, glicerol i heksadekan. Mogu rasti u prisutnosti 10 % natrijevog klorida, ali ne mogu rasti pri koncentraciji glukoze većoj od 50 %. Mezofilni su mikroorganizmi te dobro rastu na neutralnim do blago kiselim pH vrijednostima. U biotehnologiji se koriste za proizvodnju pigmenta, lipida i enzima te s obzirom na željeni proizvod, potrebno je prilagoditi različite uvjete uzgoja (Kot i sur., 2016). Pigmenti koje *Rhodotorula* sp. proizvodi su primarno karotenoidi poput β -karotena, torulena i torularodina. Produktivnost procesa proizvodnje pigmenta ovisi o dosta faktora kao što su korišteni izvori ugljika i dušika, temperatura i izvori svjetlosti. Pri temperaturi od 20 °C pokazao se najveći prinos pigmenta, dok pri nižim i višim temperaturama prinos se smanjuje za više od 50 %. Također, svjetlo pozitivno utječe na sintezu pigmenta, međutim prejak izvor svjetlosti inhibira rast kvasca te se stoga uzgaja u blago osvijetljenim uvjetima gdje se balansira brz rast i sinteza pigmenta (Grigore i sur., 2023). Faktori koji utječu na sintezu lipida iz kvasca roda *Rhodotorula* sp. su omjeri ugljika i dušika, kao i njihovi izvori, temperatura, pH i koncentracija otopljenog kisika. Optimalni uvjeti omjera ugljika i dušika se prema istraživanjima kreću između 60 i 85, a njihovi izvori drastično utječu na ukupne prinose lipida. U tablici 2.1. prikazani su prinosi lipida tijekom uzgoja kvasca *Rhodotorula glutinis* koristeći različite izvore ugljika i dušika. Iz tablice se može primijetiti da promjenom samo jednog od izvora ugljika/dušika dolazi do drastičnih razlika u udjelu lipida. Najveći udio lipida proizveden je pri uzgoju na glukozu uz kvašćev ekstrakt i amonijev sulfat kao izvore dušika te je iznosio 66,0 % (Kot i sur., 2016).

Tablica 2.1. Prikaz udjela lipida tijekom uzgoja kvasca *Rhodotorula glutinis* uz različite izvore ugljika i dušika (prema Kot i sur., 2016)

Izvor ugljika	Izvor dušika	Udio lipida (%)
glukoza	kvašćev ekstrakt	60,9
glukoza	amonijev sulfat + kvašćev ekstrakt	66,0
glukoza	amonijev sulfat	40,0
glicerol	amonijev klorid + kvašćev ekstrakt	25,0
glicerol	amonijev sulfat	60,7
melasa	amonijev sulfat	39,0
saharozna	amonijev sulfat + kvašćev ekstrakt	50,0

Najveći prinosi lipida su postignuti pri pH vrijednosti 4, međutim nizak pH loše utječe na rast mezofilnih kvasaca roda *Rhodotorula* sp. pH vrijednosti između 5 i 6 pokazale su se boljim za rast uz nešto niži prinos lipida. Također, vrijednosti otopljenog kisika od 25 ± 10 % zasićenja kisikom iz zraka (pO_2) tijekom uzgoja doprinose većim prinosima lipida (Kot i sur., 2016).

2.2.2. *Schizochytrium* sp.

Traustohitridi su morski jednostanični heterotrofni mikroorganizmi koje se u literaturi često naziva mikroalgom. Taksonomski ne spadaju u kategoriju mikroalgi jer ne posjeduju plastide i nemaju mogućnost fotosinteze. Trenutno je poznato devet rodova traustohitrida u koje spadaju *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Japonochytrium*, *Monorhizochytrium*, *Ulkenia*, *Sicyoidochytrium*, *Parietichytrium* i *Botryochytrium*. U biotehnologiji su privukli pažnju zbog mogućnosti proizvodnje intracelularnih lipida u visokim udjelima, pigmenta karotenoida i antioksidansa skvalena (Du i sur., 2021).

Schizochytrium sp. je skupina traustohitrida koju je moguće izolirati iz različitih mora u svijetu, npr. soji SR21 izoliran je na području Japana; soj S31 u Kaliforniji (Wang i sur., 2021). Traustohitridi roda *Schizochytrium* sp. obećavajuća su skupina mikroorganizama u biotehnoškoj proizvodnji lipida te im posebnu pažnju dodaje činjenica da od je ukupnih proizvedenih lipida 30 – 40 % dokozaheksaenska masna kiselina (DHA). Osim toga, proizvode karotenoide uključujući β -karoten, likopen i astaksantin. Istraživanjem uvjeta biotehnoške proizvodnje utvrđeno je da su najbolji izvori ugljika za uzgoj *Schizochytrium* sp. glukoza i glicerol (Chang i sur., 2020). Uzgojem na glukozi ispitivano je koji izvori dušika najbolje utječu na rast biomase te donose najveće prinose lipida. Rezultati su prikazani u tablici 2.2. te se iz rezultata vidi da je pri uzgoju na kvašćevom

ekstraktu i mononatrijevom glutamatu (MSG) vrijednost koncentracije biomase i prinosa lipida gotovo dupla u odnosu na ostale izvore (Jiang i sur., 2017).

Tablica 2.2. Koncentracije biomase i prinosi lipida dobiveni uzgojem *Schizochytrium* sp. na glukozu i različitim izvorima dušika (prema Jiang i sur., 2017)

Izvor dušika	Koncentracija biomase (g/L)	Prinos lipida (g/L)
MSG	28,51	4,01
Kvašćev ekstrakt	26,81	12,10
Pepton	23,51	5,67
Kvašćev ekstrakt + MSG	55,83	19,50
Amonijev klorid	28,67	6,73
Amonijev sulfat	34,83	3,53

Pokazalo se da omjer ugljika i dušika znatno utječe na prinose lipida i karotenoida proizvedenih tijekom uzgoja *Schizochytrium* sp.. Stres mikroorganizma prouzrokovan manjkom dušika povećava prinose karotenoida poput astaksantina, međutim, kada se potroši sav dušik, mikroorganizam prestaje rasti i ulazi u stacionarnu fazu. Stoga je bitno pronaći omjer koji je optimalan za rast biomase i pri tome proizvodi visoke koncentracije lipida i karotenoida. Prema istraživanju Chang i suradnika (2020) pokazalo se da su omjeri C/N 3,75 i 5 (g/g) optimalni za proizvodnju lipida, dok su veći i manji omjeri pogodniji za proizvodnju karotenoida β -karotena i astaksantina.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

Radni mikroorganizmi ispitivani u ovom radu su kvasac *Rhodotorula* sp. koji je 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. Sastojci za pripremu hranjivih podloga

Tablica 3.1. Tvari i hranjive smjese korištene za pripremu hranjivih podloga, proizvođač i čistoća

Sastojak	Oznaka čistoće	Proizvođač
Agar	za upotrebu u biotehnologiji	Biolife, Italija
amonijev sulfat	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
bakrov sulfat pentahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
cinkov sulfat heptahidrat	99 %	Merck, Njemačka
glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalcijev klorid dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalijev dihidrogenfosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
kobaltov sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
kvašчев ekstrakt	za mikrobiologiju	Biolife, Italija
limunska kiselina	p.a.	Merck, Njemačka
magnezijev sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
manganov sulfat monohidrat	p.a.	Merck, Njemačka
mononatrijev glutamat	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
morska sol (nerafinirana)	techn.	Solana Nin, Hrvatska
natrijev molibdat heptahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
pepton	za mikrobiologiju	Merck, Njemačka
željezov sulfat heptahidrat	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
Morska trava	-	Split, Hrvatska

Uzgoj radnih mikroorganizama proveden je na hranjivim podlogama za čiju pripremu su korištene anorganske i organske tvari, kompleksne hranjive smjese i otpadna morska trava (tablica 3.1.). Također, u Tablici 3.2. prikazani su ostale tvari korištene u analizi uzoraka tijekom provođenja eksperimenta.

3.1.3. Tvari korištene u analizi uzoraka

U analizi uzoraka i hidrolizi otpadne morske trave korištena su otapala i tvari navedene u tablici 3.2.

Tablica 3.2. Tvari korištene u analizi uzoraka i enzimi.

Reagens/enzim	Oznaka čistoće	Proizvođač
heksan	p.a.	Merck , Njemačka
kalcijev karbonat	p.a.	Kemika, Hrvatska
kloroform	p.a.	Merck, Njemačka
klorovodična kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
metanol	99,9 %	Merck, Njemačka
metil tridekanoat	standard	Sigma-Aldrich, SAD
natrijev hidroksid	p.a.	Merck, Njemačka
natrijev sulfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
pentadekan	standard	Sigma-Aldrich, SAD
sumporna kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
Cellulase enzyme blend	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD
Viscozyme L	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD

3.1.3. Hranjive podloge

3.1.3.1. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma

Sastav hranjivih podloga za uzgoj inokuluma prikazan je u Tablici 3.3..

Tablica 3.3. Masene koncentracije sastojaka hranjive podloge za uzgoj inokuluma

	Hranjiva podloga za uzgoj kvasca <i>Rhodotorula</i> sp.	Hranjiva podloga za uzgoj traustohitrida <i>Schizochytrium</i> sp.
Tvar	Masena koncentracija (g/L)	
Agar	10	10
Glukoza	20	40
Kvašćev ekstrakt	10	5
NaCl	25	25
Pepton	20	8

3.1.3.2. Hranjiva podloga za glavni uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp.

Sastav hranjive podloge za glavni uzgoj kvasca prikazan je u tablici 3.4. Osim navedenoga, podloga je sadržavala amonijev sulfat kao izvor dušika u različitim masenim koncentracijama što je detaljno opisano u Poglavlju 3.2.1.

Tablica 3.4. Masene koncentracije sastojaka za pripremu hranjive podloge za glavni uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp., pH = 6

Tvar	Masena koncentracija (g/L)
NaCl	25
Glukoza	50
Kvašćev ekstrakt	0,75
KH ₂ PO ₄	2
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,5
Limunska kiselina	0,25
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,1
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,035
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,022
MnSO ₄ *H ₂ O	0,074
Co ₂ SO ₄ *7H ₂ O	0,002 - CoCl*6H ₂ O
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,0013
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,001

3.1.3.3. Hranjiva podloga za glavni uzgoj traustohitrida *Schizochytrium* sp.

Sastav hranjive podloge za uzgoj traustohitrida prikazan je u Tablici 3.5. te je osim navedenoga sadrži mononatrijev glutamat (MSG) različitih koncentracija, što je detaljnije objašnjeno u Poglavlju 3.2.1..

Tablica 3.5. Sastav hranjive podloge za uzgoj traustohitrida *Schizochytrium* sp., pH =6,5

Komponente	Masena koncentracija (g/L)
Glukoza	50
Kvašćev ekstrakt	20
NaCl	25
MgSO ₄ *7H ₂ O	2
KH ₂ PO ₄	1

3.1.3.4. Hranjiva podloga s morskom travom za uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. i traustohitrida *Schizochytrium* sp.

Koncentracija sastojaka hranjive podloge na bazi morske trave prikazana je u Tablici 3.6.. Pripremljene su otopine navedenih soli radi lakšeg dodavanja u predobrađenu morsku travu steriliziranu u autoklavu zajedno sa 100 mL citratnog pufera.

Tablica 3.6. Koncentracija sastojaka hranjive podloge na bazi morske trave

Sastojak	Hranjiva podloga za uzgoj kvasca <i>Rhodotorula</i> sp.	Hranjiva podloga za uzgoj traustohitrida <i>Schizochytrium</i> sp.
	Masena koncentracija (g/L)	
Kvašćev ekstrakt	0,75	10
NaCl	25	25
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,5	2
KH ₂ PO ₄	2	1
MSG	-	54,7
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6	-

3.1.4. Korištena oprema i aparatura

3.1.4.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography - UPLC*)

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

3.1.4.2. Uređaj za plinsku kromatografiju (eng. *Gas Chromatography Flame Ionization Detector, GC-FID*)

Sastav masnih kiselina u ukupnim staničnim lipidima traustohitrida *Schizochytrium* sp. i kvasca *Rhodotorula* sp. određen je pomoću uređaja za plinsku kromatografiju GC 2010 Plus AF (Shimadzu, Japan). Sustav se sastoji od automatskog uzorkivača (AOC-20s), injektora (AOC-20i), termostatirane kapilarne kolone (Zebron ZBFAME Phenomenex, SAD), plameno-ionizacijskog detektora (FID-2010 Plus) i računalnog programa za obradu podataka (GC Solutions v2.32).

3.1.4.3. Ostali uređaji

- analitička vaga (Acculab, SAD; Sartorius, Njemačka)
- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- boca plina s dušikom (Messer Croatia Plin, Hrvatska)
- centrifuga (ThermoFisher Scientific SL 8R, SAD; Witeg, Njemačka)
- hladnjak i zamrzivač
- laboratorijska tresilica (RM 71 B. Braun Biotech. International, Sartorius Group, Njemačka)
- liofilizator (Christ Alpha 1-2 LD PLUS, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka)
- magnetna miješalica (Cimarec i Poly, Thermo Scientific, SAD)
- mlinac za kavu (Gorenje, Slovenija)
- sušionik (Instrumentaria ST-50, Hrvatska)
- tehnička vaga (Tehtnica, Slovenija)
- UV/Vis spektrofotometar (Cary 100 UV-Vis, Agilent Technologies, SAD)
- vodena kupelj (Sutjeska, Jugoslavija)
- vortex mikser (LLG-Labware, Njemačka)

3.2. METODE

3.2.1. Optimizacija omjera ugljika i dušika (C:N) u hranjivoj podlozi

Uzgoj na hranjivim podlogama provodio se u svrhu određivanja optimalnog omjera ugljika i dušika za rast kvasca *Rhodotorula* sp. i traustohitrida *Schizochytrium* sp. Priprema inokuluma navedenih mikroorganizama započeta je prenošenjem čiste kulture iz Petrijeve zdjelice na kosi agar u epruveti koja je nakon naciepljivanja inkubirana dva (kvasac), odnosno tjedan dana (traustohitrid) pri temperaturi od 26 °C. U epruvetu s naraslom kulturom dodano je cca. 5 mL sterilne tekuće hranjive podloge, biomasa s površine čvrste podloge je sastrugana pomoću mikrobiološke ušice i resuspendirana u tekućoj podlozi, te je podloga za uzgoj inokuluma (tablica 3.3.) inokulirana pripremljenom suspenzijom stanica. Radna kultura uzgajana je dva (kvasac) odnosno tjedan dana (traustohitrid) pri temperaturi od 26 °C.

Podloga za uzgoj kvasca prikazana je u tablici 3.4. (poglavlje 3.1.3.2. Podloga za glavni uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp.). Istraživan je učinak omjera ugljika i dušika u hranjivoj podlozi na rast i udio lipida u staničnoj biomasi radnih mikroorganizama. Omjer ugljika i dušika u hranjivoj podlozi iznosio je 25, 50, 75, 100, 125 (g/g). Kao izvor dušika za uzgoj kvasca korišteni su kvašćev ekstrakt i amonijev sulfat. Kvašćev ekstrakt proizvođača BioLife sadrži 10 % (g/g) ukupnog dušika i njegova koncentracija u hranjivoj podlozi iznosila je 0,75 g/L, dok je masa amonijevog sulfata bila promjenjiva i izračunata je s obzirom na odabrani omjer C i N. Pripremljenoj podlozi se pH vrijednost podešavala na 6 pomoću 0,1 M otopina natrijevog hidroksida i sumporne kiseline.

U tablici 3.5. (poglavlje 3.1.3.3. Podloga za glavni uzgoj traustohitrida *Schizochytrium* sp.) prikazana je podloga za uzgoj traustohitrida. Omjer ugljika i dušika u hranjivoj podlozi iznosio je 2,5; 3,75; 5; 7,5; 15 (g/g). Koncentracija izvora ugljika i kvašćevog ekstrakta bila je nepromjenjiva dok je koncentracija mononatrijevog glutamata izračunata iz zadanog omjera ugljika i dušika uzimajući u obzir dušik dodan s kvašćevim ekstraktom. Pripremljenoj podlozi se pH vrijednost podešavala na 6,5 pomoću 0,1 M otopina natrijevog hidroksida i sumporne kiseline.

Pripremljene podloge su sterilizirane u autoklavu i naciepljene s 10 % (v/v) inokuluma kvasca, odnosno traustohitrida. Uzgoj se provodio na laboratorijskoj tresilici tijekom 7 dana pri čemu su svaki dan uzimani uzorci. Uzorcima je izmjerena optička gustoća spektrofotometrijski. Deset mililitara prevrele hranjive podloge dodano je u prethodno izvagane kivete koje su zatim centrifugirane pri 3 500 rpm. Supernatant je izdvojen, a talog je ispran s 10 mL demineralizirane vode te je još jednom centrifugiran u svrhu ispiranja ostataka hranjive podloge. Biomasa je zatim osušena na 105 °C do konstante mase. Osušeni ostatak izvagan je na analitičkoj vagi te je

izračunata koncentracija suhe tvari biomase. Supernatant je zamrznut i kasnije korišten za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC). Na samom kraju uzgoja, preostala prevrela hranjiva podloga u tikvicama je centrifugirana, a izdvojena biomasa je pohranjena na -20 °C do analize. Nakon liofilizacije određen je sastav masnih kiselina s pomoću plinske kromatografije i udio lipida ekstrakcijom pomoću organskih otapala.

3.2.2. Predobrada morske trave

Morska trava je preobrađena sa sumpornom kiselinom pri povišenoj temperaturi (Žugec, 2023). Pripremljena je otopina 0,3 M sumporne kiseline te je 300 g morske trave usitnjeno škarama na komade veličine 1- 2 cm. Morskoj travi (m= 100 g) u Erlenmeyerovim tikvicama od 3 L dodano je 1500 mL sumporne kiseline (omjer tekućine i čvrste faze = 15:1 mL/g) te su sastojci dobro izmiješani. Otvor tikvice prekriven je parafilmom te su tikvice ostavljene u inkubatoru na temperaturi od 80 °C tijekom 24 h. Nakon 24 sata, morska trava je odvojena od tekućeg dijela pomoću sita, a hidrolizat je spremljen u boce i pohranjen na -20 °C. Predobrađena morska trava je ispirana s deioniziranom vodom do neutralnog pH (pH = 7). Morska trava je potom ravnomijerno raspoređena na metalni pladanj i stavljena u sušionik na 50 °C. Nakon sušenja je usitnjena u mlincu za kavu i potom enzimski hidrolizirana.

3.2.3. Enzimska predobrada morske trave

Nakon kiselinske predobrade morska trava je hidrolizirana dodatkom celulaza u količini od 15 FPU/gramu glukana i jednakog volumena Viscozyme-a (0,8 mL). Pripremljen je citratni pufer (50 mM) te je po 100 mL raspoređeno u Erlenmeyerove tikvice s dodanim magnetom i dodano je 5, odnosno 10 % (g/mL) usitnjene kiselinski predobrađene sirovine. Nakon sterilizacije u autoklavu, u uzorke su dodani enzimi sterilizirani filtracijom kroz mikrobiološki filter veličine pora 0,2 µm. Tikvice su postavljene na magnetsku miješalicu te su inkubirane na 50 °C kroz 48 sati. Hidrolizirana morska trava korištena je za pripremu hranjive podloge za uzgoj radnih mikroorganizama.

3.2.4. Uzgoj na morskoj travi

Hidroliziranoj morskoj travi dodane su hranjive tvari potrebne za uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. i traustohitrida *Schizochytrium* sp.. Koncentracija hranjivih tvari navedena je u Tablici 3.6. (poglavlje 3.1.3.4. Hranjiva podloga s morskom travom za uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. i traustohitrida *Schizochytrium* sp.). Koncentracija izvora dušika (amonijev sulfat za kvasce, odnosno mononatrijev glutamat za traustohitride) u hranjivoj podlozi odabrana je na temelju prethodnog uzgoja u kojem je optimiran omjer ugljika i dušika. Pojedini sastojci hranjive podloge pojedinačno

su sterilizirani u autoklavu pri 121 °C 20 min. U tikvice s hidroliziranom morskom travom dodani su pojedini sastojci podloge te su inokulirane s 10 % g/g kvasca *Rhodotorula* sp., odnosno traustohitrida *Schizochytrium* sp.. Kulture su uzgajane na 26 °C, kvasac je uzgajan tijekom 7 dana, dok je traustohitrid uzgajan tijekom 12 dana. Uzorci su izuzimani u kivete pri samom početku uzgoja te prvi, drugi i sedmi dan za kvasac, a drugi, treći, četvrti, peti, osmi, deseti i dvanaesti dan za traustohitride. Određena je koncentracija suhe tvari gravimetrijski, a supernatant je pohranjen na -20 °C i kasnije je u njemu određena koncentracija šećera s pomoću UPLC-a. Na samom kraju uzgoja prevrela hranjiva podloga je centrifugirana. Izdvojeni talog je ispran s demineraliziranom vodom i pohranjen na -20 °C do analize. Zaleđena biomasa je liofilizirana i nakon toga je određen sastav masnih kiselina i udio lipida.

3.2.5. Analitičke metode

3.2.5.1. Gravimetrijska metoda analize

Gravimetrijska metoda korištena je za određivanje porasta koncentracije biomase tijekom uzgoja. Nakon izuzimanja uzorka u prethodno odvagane kivete, one su centrifugirane tijekom 10 minuta na 5000 rpm, supernatant je izdvojen, a talog još jednom ispran deioniziranom vodom. Talog je potom osušen u sušioniku na 105 °C do konstantne mase te nakon hlađenja u eksikatoru izvagan. Koncentracija biomase je potom izračunata prema izrazu:

$$x_{uzorak} = \frac{m_{uzorak} - m_0}{V_{uzorak}} \left(\frac{mg}{L} \right) \quad [1]$$

pri čemu je:

m_{uzorak} – masa uzorka u kiveti (mg)

m_0 – masa prazne kivete (mg)

V_{uzorak} – volumen uzorka izuzetog iz tikvice za uzgoj

3.2.5.2. Spektrofotometrijska analiza

Spektrofotometrijska metoda korištena je kao drugi način analize porasta biomase tijekom uzgoja. Uzorak izuzet iz tikvice za uzgoj prenesen je u kvarcnu kivetu te postavljen u spektrofotometar čija je valna duljina bila namještena na 600 nm. Očitani rezultati su korišteni za prikaz porasta optičke gustoće u vremenu koja je proporcionalna porastu koncentracije biomase. Prema potrebi napravljeni su decimalna razrijeđena prevrele hranjive podloge prije mjerenja optičke gustoće.

3.2.5.3. Određivanje udjela suhe tvari

Morska trava je usitnjena pomoću škara i mlinca za kavu te je na analitičkoj vagi izvagana Petrijeva zdjelica i potom 0,5 g morske trave. Uzorak je stavljen u sušionik na 105 °C i sušen do konstantne mase. Nakon sušenja, uzorak je prenesen u eksikator na hlađenje te ponovno izvagana na analitičkoj vagi. Iz dobivenih podataka je izračunat udio suhe tvari uzorka morske trave prema izrazu:

$$W_{\text{suha tvar}} = \frac{m_{\text{nakon sušenja}} - m_{\text{Petrijeva zdjelica}}}{m_{\text{prije sušenja}} - m_{\text{Petrijeva zdjelica}}} * 100 (\%) \quad [2]$$

3.2.5.4. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini

Za određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini u morskoj travi prvo je odvagano 0,4 g morske trave te je dodana u tikvicu s okruglim dnom. Zatim je dodano 4 mL 72 %-tne otopine sumporne kiseline te je inkubirano sat vremena na 30 °C uz povremeno miješanje s pomoću staklenog štapića. U smjesu je dodano 112 mL deionizirane vode te je smjesa kuhana 4 h uz povratno hladilo. Nakon kuhanja, smjesa je profiltrirana kroz Büchnerov lijevak s filter papirom koji je prethodno osušen na 105 °C i izvagana. Talog na filter papiru predstavlja lignin netopljiv u kiselini, dok se lignin topljiv u kiselini nalazi u filtratu. Filtrat je spremljen za određivanje lignina topljivog u kiselini, a talog je ispran s kipućom deioniziranom vodom do neutralnog pH (pH = 7). Filter papir je zatim osušen u sušioniku na 105 °C do konstantne mase. Nakon sušenja i hlađenja u eksikatoru filter papir s talogom je izvagana te je izračunat udio lignina netopljivog u kiselini prema jednadžbi:

$$W_{\text{lignin netopljiv u kiselini}} = \frac{m_{\text{osušeni talog na filter papiru}} - m_{\text{osušeni filter papir}}}{m_{\text{uzorak morske trave}}} * 100 (\%) \quad [3]$$

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:

$$W_{\text{lignin topljiv u kiselini}} = \frac{A * D * V}{\alpha * b * m} * 100 (\%) \quad [4]$$

pri čemu je:

A = apsorbancija uzorka pri 205 nm

D = faktor razrjeđenja

V = volumen filtrata (L)

$\alpha = 110 \text{ g L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, konstanta

b = širina kivete (1 cm)

m = masa uzorka (g).

3.2.5.6. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (eng. Ultra Performance Liquid Chromatography - UPLC)

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti korištena je kao metoda identifikacije i kvantifikacije ugljikohidrata tijekom uzgoja.

U supernatantima hranjivih podloga izdvojenih tijekom uzgoja provedeno je taloženje proteina cinkovim (II) sulfatom. U 750 μL supernatanta dodano je 750 μL 10 %-tne otopine cinkovog (II) sulfata, sadržaj je izmiješan s pomoću vibromiksera te je suspenzija ostavljena da se proteini istalože 30 min. Nakon toga suspenzija je centrifugirana pri 10 000 rpm 10 minuta kako bi se proteini izdvojili, a pročišćeni supernatant dalje analizirao. Svi uzorci su profiltrirani kroz najlonski filter veličine pora 0,2 μm 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 °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 (tablica 3.7.).

Tablica 3.7. Retencijska vremena i jednadžbe baždarnih pravaca standarda potrebnih za analizu

Analit	Retencijsko vrijeme t_R (min)	Jednadžba baždarnog pravca	R ²
Galakturonska kiselina	4,500	$y = 131524x - 5644$	0,9990
Glukoza	4,815	$y = 140472x - 604,84$	0,9999
Ksiloza	5,141	$y = 136223x + 89,598$	1,0000
Limunska kiselina	4,175	$y = 128049x - 6624,1$	0,9998

3.2.5.7 Određivanje ukupnog udjela lipida

Ekstrakcija lipida iz biomase kvasca *Rhodotorula* sp. i traustohitrida *Schizochytrium* sp. provedena je ekstrakcijom tekuće-tekuće prema protokolu Schneitera i Dauma (2006). Liofilizirani uzorci biomase usitnjeni su u tarioniku te je izvagano 50 mg u staklene kivete s čepom u koje je potom dodano 1,2 mL 2 M klorovodične kiseline. Kivete su stavljene u vodenu kupelj na 10 minuta na 100 °C nakon čega su ohlađene u hladnoj vodi. U ohlađene kivete dodano je 1,5 mL kloroforma i 3 mL metanola, sadržaj je pomiješan s pomoću vibromiksera i postavljen na laboratorijsku tresilicu na 30 minuta. Zatim je dodano 1,5 mL kloroforma i 1,5 mL vode i ponovljeno je vorteksiranje i postavljanje na tresilicu na 30 minuta. Kivete su zatim centrifugirane 5 minuta pri 1000 rpm nakon čega su vidljive razdvojene faze. Gornja faza predstavljala je vodenu fazu, a donja kloroformsku fazu u kojoj su se nalazili lipidi ekstrahirani iz biomase. Donja faza izdvojena je iz kivete pomoću šprice i igle i prebačena u prethodno osušenu i izvaganu epruvetu. Epruvete s kloroformskom fazom uparene su u struji dušika u svrhu hlapljenja kloroforma, pri čemu su u epruveti zaostali samo lipidi. Epruvete su postavljene u sušionik na 50 °C na sat vremena te izvagane na analitičkoj vagi. Udio lipida izračunat je pomoću izraza:

$$w_{lipida} = \frac{m_1 - m_2}{m_u} * 100 (\%) \quad [5]$$

pri čemu je:

m_1 = masa prazne epruvete (g)

m_2 = masa epruvete s lipidima (g)

m_u = masa početnog uzorka (g)

3.2.5.8. Određivanje sastava masnih kiselina u biomasi i supstratu plinskom kromatografijom (eng. Gas Chromatography Flame Ionization Detector, GC-FID)

Za određivanje sastava masnih kiselina potrebno je provesti transesterifikaciju masnih kiselina. Provedena je prema NREL protokulu (National Renewable Energy Laboratory, SAD) prema kojem je prvo bilo potrebno pripremiti otopine standarda. Standard metil tridekanoata (C13:0ME), koncentracije 10 mg/mL, priprema se otapanjem 100 mg metil tridekanoata u 10 mL heksana. Drugi standard – standard pentadekana priređen je otapanjem 10 mg pentadekana u 10 mL heksana. Pripremljene otopine standarda se čuvaju u zamrzivaču pri -20 °C u staklenim vijalama.

U staklene vijale s čepom odvagano je 20 mg liofilizirane usitnjene biomase radnih mikroorganizama, odnosno 40 mg svježe i predobrađene morske trave. Odvaganim analitima se doda 20 µL standarda metil tridekanoata, 200 µL otopine kloroform:metanol (2:1, v/v) i 300 µL 0,6

M otopine HCl u metanolu. Nadalje je potrebno čvrsto zatvoriti vijale, vorteksirati te inkubirati u vodenoj kupelji kroz sat vremena pri 85 °C. U ohlađene uzorke se dodalo 1 mL heksana, uzorci su ponovno vorteksirani te potom ostavljeni sat vremena na sobnoj temperaturi ne miješajući ih da bi se faze razdvojile i razrijedile. Gornja faza je heksanska faza, u njoj su ekstrahirani esteri masnih kiselina iz analita te se koriste za daljnju analizu. Odvojilo se 400 µL u vijalicu predviđenu za plinski kromatograf i dodaje se 10 µL standarda pentadekana. Uzorci se potom analiziraju plinskim kromatografom opremljenim masenim detektorom (FID). Identifikacija masnih kiselina u uzorcima provedena je usporedbom vremena zadržavanja sadržanih metilnih estera s vremenima zadržavanja metilnih estera standardne smjese 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 – C24) analiziranih u istim uvjetima. Koncentracije metilnih estera masnih kiselina u uzorcima normalizirane su prema količini standarda metil tridekanoata i izražene kao maseni udio u suhoj tvari biomase, odnosno sirovine:

$$m_{FAME_{C13} norm} = \frac{\gamma_{Ci}}{\gamma_{C13}} * m_{C13} \quad [6]$$

$$w_{\frac{Ci}{s.tv.}} = \frac{m_{FAME_{C13} norm}}{m_{s.tv.}} * 100 (\%) \quad [7]$$

pri čemu je:

$m_{FAME_{C13} norm}$ – masa standarda C13:0ME (mg)

γ_{Ci} – masena koncentracija metilnog estera masne kiseline (mg/L)

γ_{C13} – masena koncentracija standarda metil tridekanoata (C13) (mg/L)

m_{C13} – masa dodanog standarda metil tridekanoata (C13) (mg)

$w_{\frac{Ci}{s.tv.}}$ – maseni udio metilnih estera masnih kiselina u suhoj tvari biomase (%)

$m_{s.tv.}$ – masa suhe tvari biomase

4. RASPRAVA I REZULTATI

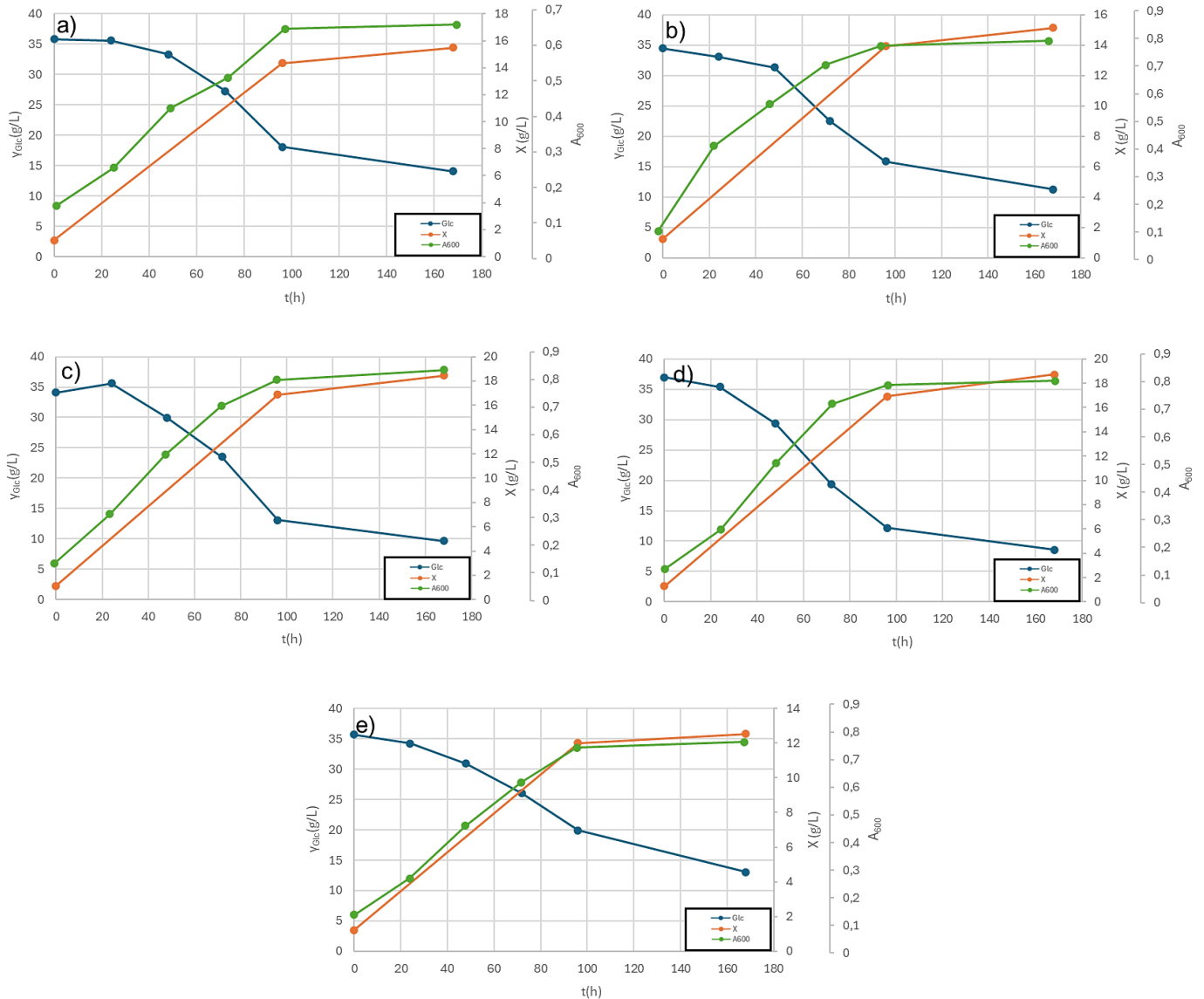
U ovom radu istraživani su optimalni omjeri ugljika i dušika (C:N) za uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. i traustohitrida *Schizochytrium* sp. na otpadnoj morskoj travi u kojoj je po sastavu prevladavala morska trava vrste *Posidonia oceanica*. Posidonija ima visok udio ugljikohidrata od kojih 31,39 % čini celuloza, a 15,7 % hemiceluloza; te sadrži lignin u udjelu od 29,3 %. Udjeli navedenih komponenti mogu varirati s obzirom područje rasta, godišnje doba, koncentraciju soli u moru i dr. (Khiari i Belgacem, 2017). Optimalni omjeri izvora ugljika i dušika određeni su tijekom uzgoja navedenih mikroorganizama na hranjivim podlogama različitih omjera C:N, nakon kojeg su analizirani koncentracija biomase spektrofotometrijskom i gravimetrijskom metodom; potrošnja sastojaka podloge UPLC metodom; udjeli lipida nakon uzgoja ekstrakcijom te sastav masnih kiselina plinskom kromatografijom. Prema dobivenim rezultatima određen je optimalni omjer za uzgoj kvasca i traustohitrida koji je nadalje korišten pri uzgoju na otpadnoj morskoj travi. U svrhu boljeg iskorištenja ugljikohidrata morsku travu se prije korištenja za uzgoj mikroorganizama kiselinski i enzimski predobradilo. Kiselinska hidroliza provodi se u svrhu delignifikacije i taloženja lignina te za poboljšanje razgradivosti polisaharida pomoću otapanja hemiceluloze i povećanja površine na kojoj enzimi tijekom enzimske hidrolize mogu razgrađivati celulozu (Roy i sur., 2020). Kiselinska hidroliza provedena je na usitnenoj morskoj travi korištenjem 0,3 M sumporne kiseline, a enzimska hidroliza s 15 FPU celulaza/g glukana i enzimskog preparata Viscozyme u volumnom omjeru 1:1 (mL/mL). Predobrađena morska trava korištena je kao izvor ugljika za uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. i traustohitrida *Schizochytrium* sp. te je nakon uzgoja UPLC analizom određena promjena koncentracije sastojaka hranjive podloge.

U poglavljima 4.1. (Optimizacija omjera izvora ugljika i dušika (C:N) u hranjivoj podlozi za uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp.), odnosno 4.2. (Optimizacija omjera izvora ugljika i dušika (C:N) u hranjivoj podlozi za uzgoj traustohitrida *Schizochytrium* sp.) prikazani su rezultati uzgoja određeni gravimetrijskom, spektrofotometrijskom i UPLC metodom analize, kao i udjeli lipida i sastav masnih kiselina. Poglavlje 4.3. (Predobrada morske trave) obuhvaća analizu neobrađene morske trave te analizu sastava nakon kiselinske i enzimske hidrolize. Poglavlja 4.4. (Uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. na predobrađenoj morskoj travi) i 4.5. (Uzgoj traustohitrida *Schizochytrium* sp. na predobrađenoj morskoj travi) prikazuju rezultate uzgoja navedenih mikroorganizama u obliku promjene koncentracije sastojaka podloge određenih UPLC metodom.

4.1. OPTIMIZACIJA OMJERA IZVORA UGLJIKA I DUŠIKA (C:N) U HRANJIVOJ PODLOZI ZA UZGOJ KVASCA *Rhodotorula* sp.

Podloga za glavni uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. prikazana je u tablici 3.3. (poglavlje 3.1.3.3. Podloga za glavni uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp.). Odabrano je pet različitih omjera ugljika i dušika koje ispituju njihov optimalni omjer za proizvodnju lipida. Prema Jiru i suradnicima (2017), za proizvodnju lipida omjer C:N bi trebao iznositi najmanje 20 g/g, te su tijekom istraživanja biomasu kvasca uzgajali na omjerima 40-160 g/g. Najveći prinosi lipida su postignuti pri uzgojima uz omjer C:N od 120 i 140 g/g. Prema istraživanju koje su proveli Lopes i suradnici (2020) najveći prinos lipida postignut je pri omjernu C:N = 100 g/g. Stoga, za istraživanje su odabrani omjeri 25; 50; 75; 100; 125 g/g u svrhu ispitivanja rasta biomase i proizvedenih lipida pri većim koncentracijama dušika, kao i potvrđivanje boljeg rasta i prinosa lipida pri malim koncentracijama dušika. Kao izvori dušika korišteni su kvaščev ekstrakt i amonijev sulfat, odabrani prema istraživanju Kot i suradnika (2017) prikazanih u tablici 2.1. (poglavlje 2.2.1. *Rhodotorula* sp.).

Na slici 4.1. prikazani su rezultati sedmodnevnog uzgoja dobiveni gravimetrijskom (X [g/L]) i spektrofotometrijskom (A_{600}) analizom biomase te UPLC analizom potrošnje glukoze (Y_{Glc} [g/L]). Vidljivo je da su najveće koncentracije biomase, kao i najveća potrošnja glukoze, postignuti tijekom uzgoja u tikvicama s omjerima ugljika i dušika 75 i 100 g/g (slika 4.1.c) i d)). Vrijednosti su također veoma slične, uzgojem pri omjeru C:N = 75 koncentracija biomase iznosila je 18,44 g/L, a pri omjeru C:N = 100 je iznosila 18,73 g/L. Najniža koncentracija biomase postignuta je pri omjeru C:N = 125 (slika 4.1.e)) te su stanice ušle u stacionarnu fazu nakon 96 sati uzgoja. Međutim, glukoza se i nakon 96-og sata nastavila trošiti što ukazuje da je mikroorganizam usporio rast i počeo nakupljati lipide. Koncentracije biomase pri najnižim ispitivanim omjerima ugljika i dušika 25 i 50 g/g (slika 4.1.a) i b)) iznosile su između 14 i 16 g/L te su nakon četvrtog dana uzgoja postupno ušle u stacionarnu fazu rasta. Usporedbom rezultata s istraživanjem Jiru i suradnika (2017) postignute su veće koncentracije biomase, prema rezultatima njihovog istraživanja najveća koncentracija je postignuta pri C:N = 120 g/g te je iznosila 12,89 g/L. Blago povećanje koncentracije biomase može se pripisati različitim parametrima uzgoja, iako je podloga jednakog sastava. pH vrijednost tijekom navedenog istraživanja iznosila je 5,5. Pri provedenom uzgoju pH vrijednost podloge bila je 6; prema istraživanju Zhang i suradnika (2019) blago kiselo područje (pH = 5,0 – 6,0) davalo je najveće prinose lipida dok je neutralno područje pogodovalo rastu biomase.

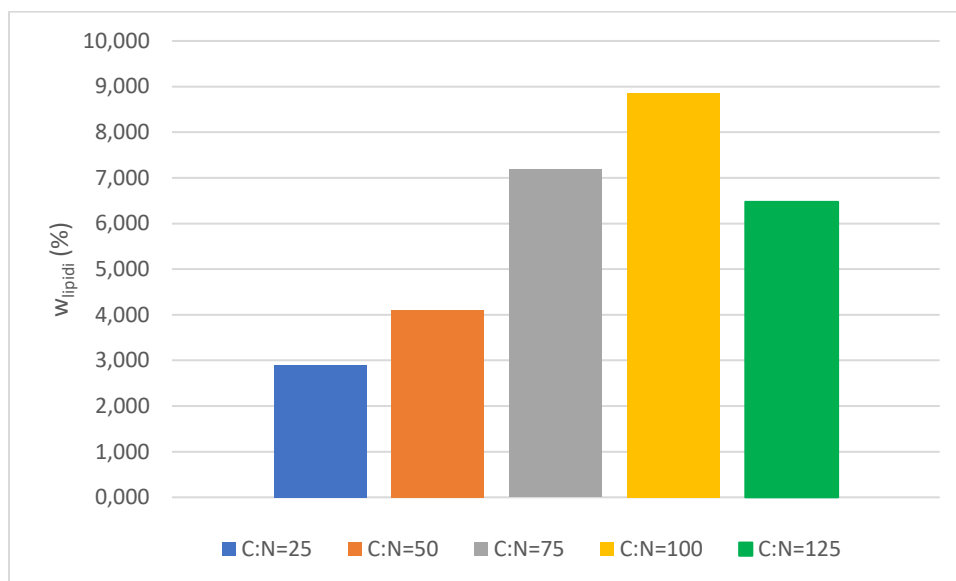


Slika 4.1. Uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. pri različitim omjerima izvora ugljika i dušika **a)** C:N = 25 g/g; **b)** C:N = 50 g/g; **c)** C:N = 75 g/g; **d)** C:N = 100 g/g; **e)** C:N = 125 g/g

4.1.1. Udio lipida postignut tijekom glavnog uzgoja

Provedenom ekstrakcijom lipida iz biomase prikupljeni su podatci potrebni za izračunavanje udjela lipida (poglavlje 3.2.5.7 Određivanje ukupnog udjela lipida). Rezultati su prikazani na slici 4.2.. Najveći udio lipida postignut je pri uzgoju u tikvicama s omjerom C:N = 100 g/g te je iznosio 8,86 %. Također, pri omjerima od 75 i 125 postignuti su viši udjeli kojima su se vrijednosti kretale između 6 i 8 %. Time se može potvrditi da iako su koncentracije biomase tijekom uzgoja pri C:N=125 g/g bile najniže, udio lipida je bio visok što znači da takvi uvjeti pogoduju sintezi lipida. Pri nižim omjerima, udjeli lipida su bili gotovo duplo manji te su im vrijednosti iznosile 2,41 % (C:N = 25) i

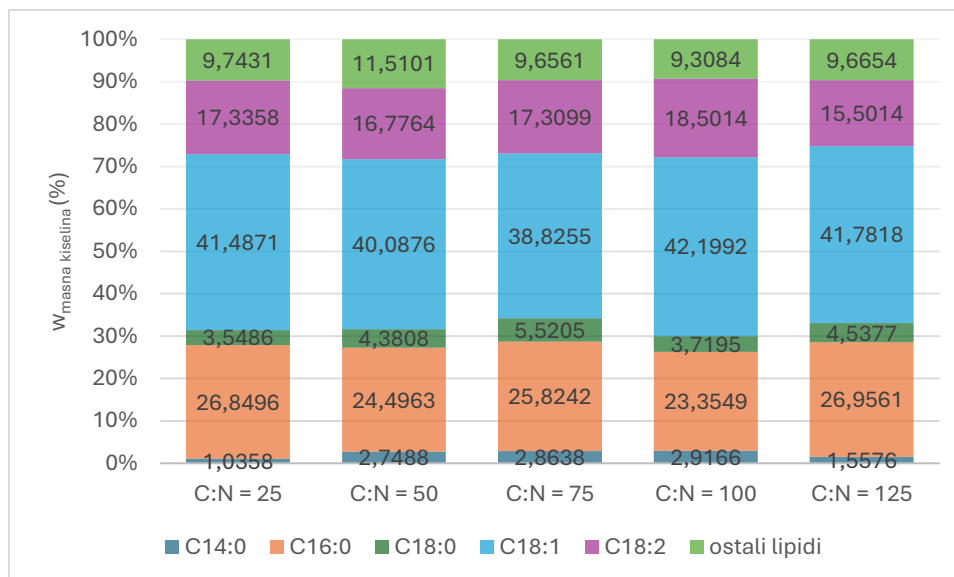
4,10 % (C:N = 50). Istraživanjem koje su proveli Jiru i suradnici (2017) postignuti su viši udjeli lipida koji su iznosili do 42 %, međutim, trend opadanja i porasta udjela lipida s obzirom na omjer C:N je jednak. To potvrđuje da su niže pH vrijednosti pogodnije za sintezu lipida, dok su više vrijednosti povoljnije za rast biomase, kao što je opisano u prethodnom poglavlju (poglavlje 4.1.).



Slika 4.2. Udjeli lipida postignuti tijekom uzgoja kvasca *Rhodotorula* sp. na različitim omjerima ugljika i dušika

4.1.2. Masne kiseline proizvedene tijekom glavnog uzgoja

Rezultati plinske kromatografije prikazani su u obliku udjela prevladavajućih masnih kiselina na slici 4.3.. Po profilu masnih kiselina, u ekstraktu lipida prevladavaju palmitinska (C16:0), oleinska (C18:1) i linolna (C18:2) masne kiseline, dok su u manjim udjelima prisutne miristinska (C14:0), stearinska (C18:0) kao i ostale masne kiseline. U najvećem udjelu je proizvedena oleinska masna kiselina (oko 40 % ukupnih lipida), zatim palmitinska (oko 25 %) i linolna (oko 17 %) masna kiselina, dok su ostale u manjim udjelima. Udjeli masnih kiselina iz ekstrakta lipida biomase koja je uzgajana na različitim omjerima ugljika i dušika ne mijenjaju se značajno s promjenom tih uvjeta. Prema istraživanju Jiru i suradnika (2016) u sastavu masnih kiselina također prevladavaju oleinska masna kiselina (53,82 %), palmitinska (18,63 %) i linolna (13,34 %) masna kiselina. Stearinska i linolenska masna kiselina čine po približno 5 % profila masnih kiselina dok miristinska nije detektirana plinskim kromatografom. Značajnije razlike u udjelima u odnosu na navedeno istraživanje, npr. približno 5 % veći udio palmitinske masne kiseline, odsustvo značajnih udjela linolenske, kao i prisustvo miristinske masne kiseline u profilu masnih kiselina mogu se pripisati različitoj vrsti korištenog radnog mikroorganizma roda *Rhodotorula* sp.

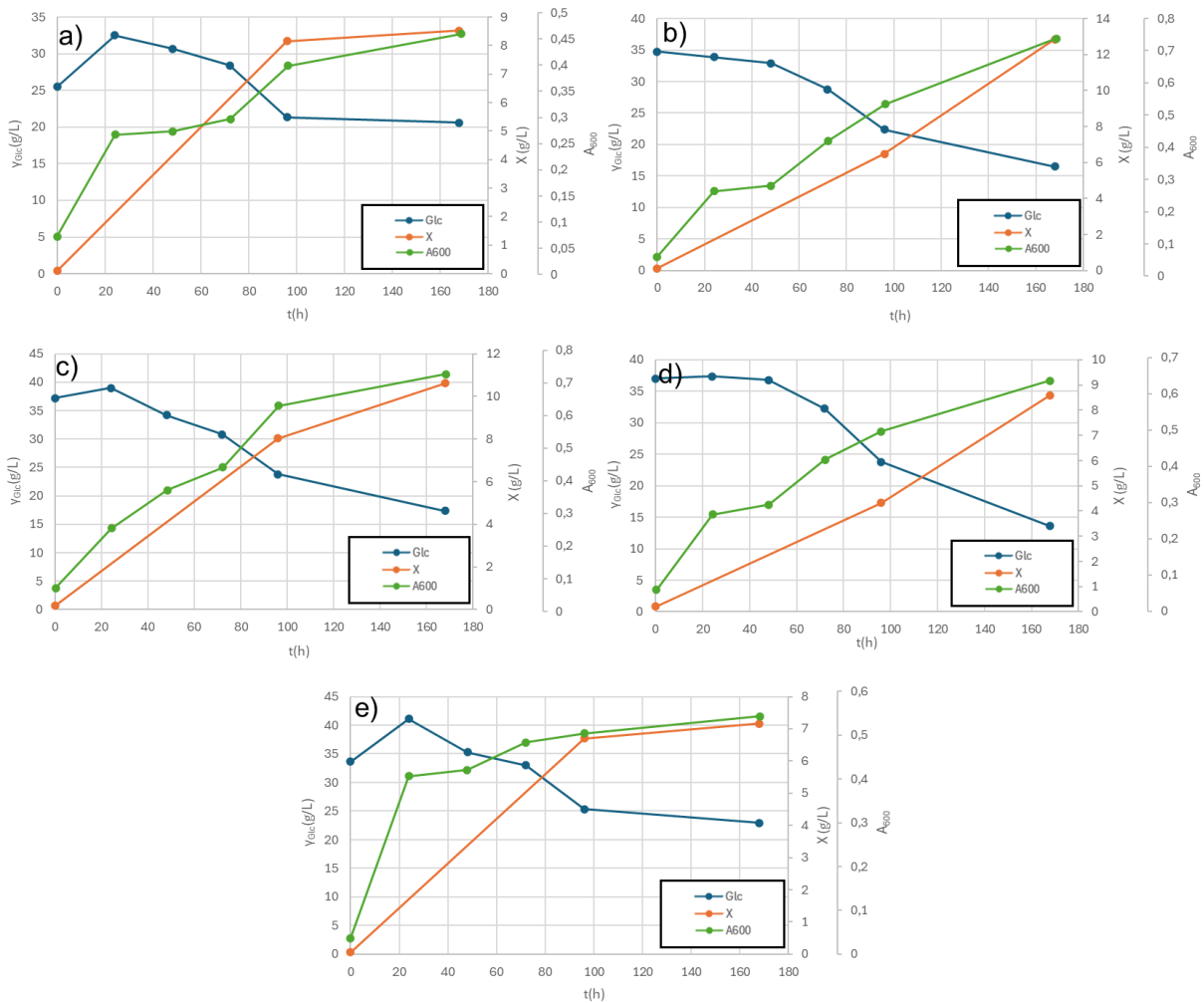


Slika 4.3. Udio masnih kiselina u biomasi kvasca *Rhodotorula sp.*

4.2. OPTIMIZACIJA OMJERA IZVORA UGLJIKA I DUŠIKA (C:N) U HRANJIVOJ PODLOZI ZA UZGOJ TRAUSTOHITRIDA *Schizochytrium sp.*

Podloga korištena za uzgoj traustohitrida *Schizochytrium sp.* prikazana je u Tablici 3.5. (poglavlje 3.1.3.3. Podloga za glavni uzgoj traustohitrida *Schizochytrium sp.*). Kao izvor ugljika u navedenoj podlozi korištena je glukoza, a kao izvor dušika mononatrijev glutamat u kombinaciji s kvašćevim ekstraktom. Prema Jiang i suradnicima (2017), kombinacija dva navedena izvora dušika donosila je najveće prinose biomase i lipida u odnosu na ostale izvore kao što je prikazano u tablici 2.2. (poglavlje 2.2.2. *Schizochytrium sp.*). Odabir 5 različitih omjera ugljika i dušika određen je prema istraživanju Chang i suradnika (2020) gdje su istraživani prinosi lipida pri omjerima C:N = 15; 5; 3,75; 2,5 g/g. Najveći prinos lipida postignut je kod omjera C:N = 5 g/g te C:N = 3,75 g/g, stoga je u ovom radu istražen i omjer 7,5 g/g u svrhu pokrivanja još jedne mogućnosti visokog prinosa lipida.

Glavni uzgoj traustohitrida *Schizochytrium sp.* provodio se 168 sati u podlogama s 5 različitih omjera izvora ugljika i dušika. Na slici 4.4. prikazani su rezultati uzgoja dobiveni gravimetrijskom (X [g/L]) i spektrofotometrijskom (A_{600}) analizom biomase te UPLC analizom potrošnje glukoze (Y_{Glc} [g/L]).



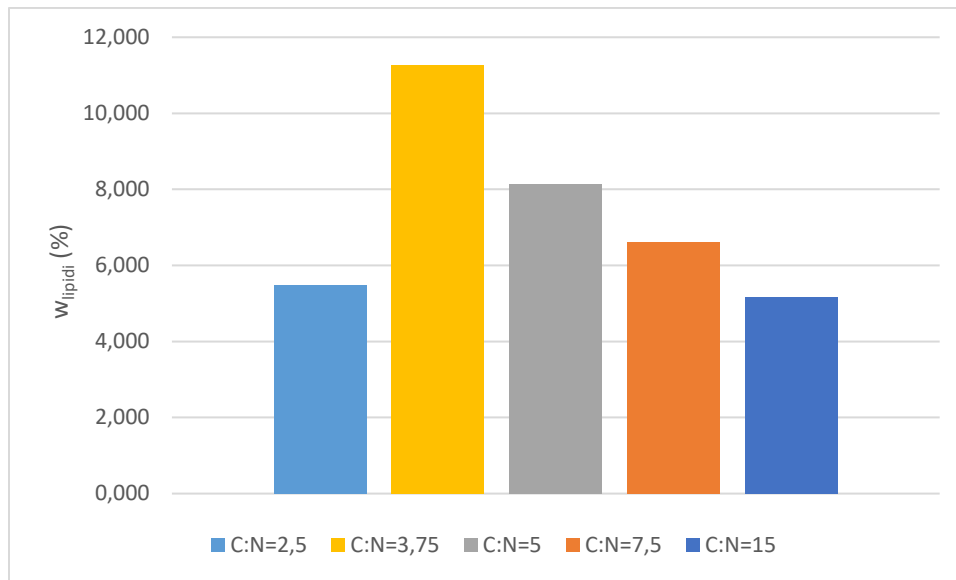
Slika 4.4. Uzgoj traustohitrida *Schizochytrium* sp. pri različitim omjerima izvora ugljika i dušika (C:N) **a)** C:N = 2,5 g/g; **b)** C:N = 3,75 g/g; **c)** C:N = 5 g/g; **d)** C:N = 7,5 g/g; **e)** C:N = 15 g/g

Najveća koncentracija biomase od 12,85 g/L postignuta je u hranjivoj podlozi u kojoj je početni omjer C:N = 3,75 g/g (slika 4.4.b) te hranjivoj podlozi s početnim omjerom C:N = 5 g/g (slika 4.4.c) u kojoj je maksimalna koncentracija biomase na kraju uzgoja iznosila 10,625 g/L. Pri ostalim omjerima C:N, koncentracija biomase iznosila je između 7 i 9 g/L. Iz slike 4.4.d) koja prikazuje omjer C:N = 7,5 g/g vidljivo je da se koncentracija biomase ne povećava znatno u odnosu na najviši i najniži omjer ugljika i dušika. Koncentracija biomase na kraju uzgoja bila je znatno manja u odnosu na koncentracije postignute u radu Jiang i suradnika (2017) koje su dostizale vrijednosti od 55,83 g/L pri uzgoju na istim izvorima ugljika i dušika. To se može pripisati drukčijim omjerima izvora ugljika i dušika i pH vrijednosti hranjive podloge. Ti parametri uzgoja temeljili su se na istraživanju Chang i suradnika (2020) te iako se radi o malim promjenama vrijednosti, one mogu značajno utjecati na uzgoj.

Koncentracija glukoze se znatno mijenjala tijekom prvih četiri dana uzgoja (96 sati) nakon čega se pri omjerima ugljika i dušika 2,5 i 15 (slike 4.4.a) i 4.4.e)) glukoza prestala trošiti. Osim toga, na istim slikama je vidljiva stagnacija u rastu biomase što ukazuje na ulazak mikroorganizma u stacionarnu fazu. Prema Chang i suradnicima (2020), visoki omjeri ugljika i dušika značajno inhibiraju rast stanica s obzirom na ekstremnu limitaciju dušikom koji se potroši tijekom prvog dana uzgoja. S druge strane, niski omjeri izvora ugljika i dušika produljuju vrijeme prije nego što se dušik potroši, što dovodi do smanjenja koncentracije izvora ugljika i izvora energije prikupljenih tijekom procesa glikolize i pentoza-fosfatnog puta. Trošenjem prevelike količine energije za rast, mikroorganizmi prijevremeno ulaze u stacionarnu fazu (Chang i sur., 2020).

4.2.1. Udio lipida postignut tijekom glavnog uzgoja

Udio lipida određen je pomoću jednadžbe [5] (poglavlje 3.2.5.7 Određivanje ukupnog udjela lipida) pomoću podataka prikupljenih ekstrakcijom lipida iz liofilizirane biomase izdvojene iz podloge nakon završetka uzgoja. Prema rezultatima prikazanim na slici 4.5. vidljivo je da je najveći udio lipida postignut pri uzgoju u tikvicama s omjerom C:N = 3,75 g/g te iznosi 11,28 %. Sukladno podacima o koncentraciji biomase, udjeli lipida pri ostalim C:N omjerima opadaju proporcionalno s koncentracijama biomase (poglavlje 4.2.). Omjeri s preniskim (C:N = 15 g/g) i previsokim (C:N = 2,5 g/g) koncentracijama dušika imali su najmanje udjele lipida koje su se kretale između 5 i 6 %, a pri omjerima 5 i 7,5 g/g proizvelo se 8,14, odnosno 6,61 % lipida u biomasi traustohitrida. Pri previsokim omjerima ugljika i dušika, npr. C:N = 15 g/g, stanice tijekom uzgoja prebrzo potroše dušik i ekstremne limitacije dušikom ne potiču sintezu lipida, već inhibiraju rast stanica i time negativno utječu na prinose lipida. Smanjenjem omjera ugljika i dušika se sinteza lipida značajno povećava, dok prevelikim smanjenjem omjera može doći do potrošnje izvora ugljika i energije zbog produljenja vremenskog intervala potrebnog da se sav dušik potroši (C:N = 2,5 g/g). Takvo stanje također negativno utječe na prinose lipida (Chang i sur., 2020). Prema istraživanju Jiang i suradnika (2017), udio lipida za korištene izvore ugljika i dušika dolazi do vrijednosti od 34,97 %. Do razlike je moglo doći zbog različitih parametara uzgoja, kao što je objašnjeno u prethodnom poglavlju, te zbog korištene različite metode ekstrakcije i različite korištene opreme koja može utjecati na rezultate.

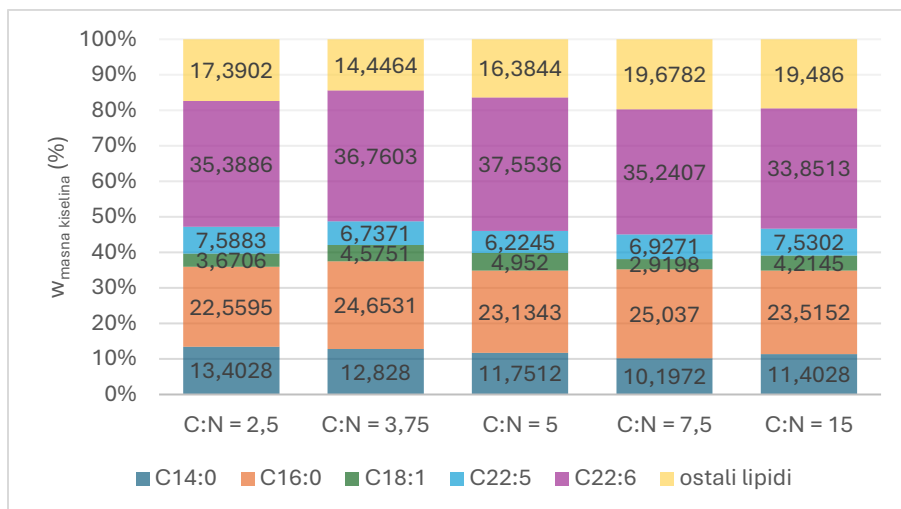


Slika 4.5. Udjeli lipida postignuti tijekom uzgoja traustohitrida *Schizochytrium* sp. na različitim omjerima ugljika i dušika

4.1.2. Masne kiseline proizvedene tijekom glavnog uzgoja

Rezultati plinske kromatografije prikazani su u obliku udjela prevladavajućih masnih kiselina na slici 4.6.. Udjeli pojedinih masnih kiselina nisu se značajno mijenjali između pojedinih omjera ugljika i dušika, već variraju oko jednakih vrijednosti. U najvećim udjelima prisutne su dokozaheksaenska (C22:6), palmitinska (C16:0) i miristinska (C14:0) masna kiselina. U manjim udjelima prisutne su oleinska (C18:1) i dokozapentaenska (C22:5) masna kiselina koje zajedno čine oko 10 % profila masnih kiselina. U sastavu ekstrakta prevladavaju dokozaheksaenska (oko 35 % ukupnih lipida) te palmitinska (oko 24 % ukupnih lipida) masna kiselina.

Prema istraživanju Ren i suradnika (2009) analizom ekstrahiranih lipida plinskom kromatografijom iz traustohitrida *Schizochytrium* sp. dobiveni su rezultati koji pokazuju da 90 % ukupnih lipida čine miristinska, palmitinska, dokozapentaenska i dokozaheksaenska masna kiselina. Miristinska masna kiselina činila je 15 – 20 % ukupnih lipida, stearinska 20 – 30 %, dokozapentaenska oko 20 % te dokozaheksaenska 25 – 40 %. Rezultati provedene analize pokazuju sličan profil masnih kiselina kao u navedenom istraživanju, s najvećom razlikom u udjelu dokozapentaenske masne kiseline. Također, u istraživanju Ren i suradnika (2009) oleinska kiselina pojavljivala se u manjim udjelima, dok su analizom dobiveni udjeli u vrijednosti od oko 4 %. Moguće je da su korištene različite vrste traustohitrida roda *Schizochytrium* koje proizvode veće udjele dokozapentaenske, odnosno manje udjele oleinske masne kiseline.

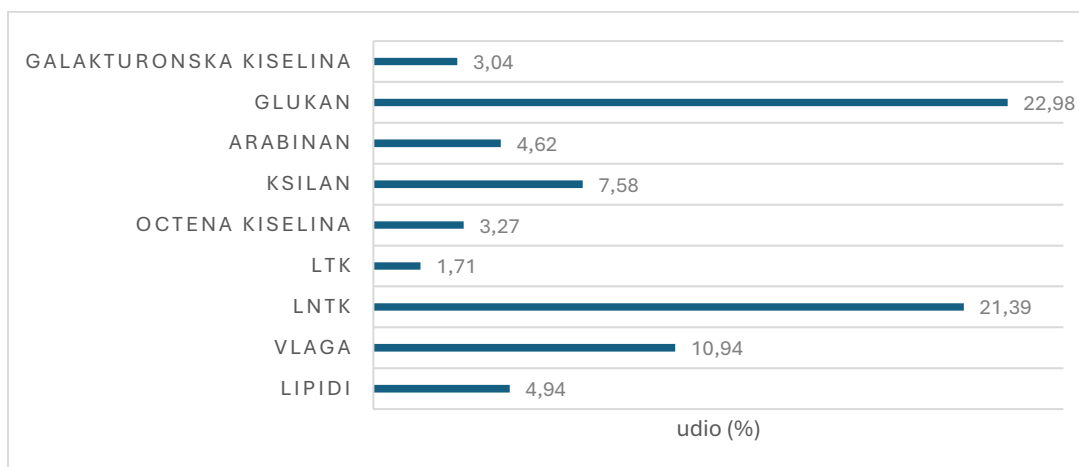


Slika 4.6. Sadržaj masnih kiselina u ekstraktu biomase *Schizochytrium* sp. te njihovi udjeli (%)

4.3. PREDOBRAĐA MORSKE TRAVE

4.3.1. Sastav morske trave

Morskoj travi *Posidonia oceanica* se prije predobrade odredio sastav. Sastav je analiziran određivanjem udjela suhe tvari, određivanjem udjela lignina topljivog i netopljivog u kiselini, ekstrakcijom lipida te UPLC analizom. UPLC analizom te obradom podataka izračunate su koncentracije monosaharida glukoze, ksiloze i arabinoze i pomoću korekcijskog faktora (0,88 za pentoze i 0,9 za heksoze) preračunate u koncentracije, odnosno udjele polisaharida glukana, ksilana i arabinana. Rezultati navedenih analiza prikazani su na slici 4.7.



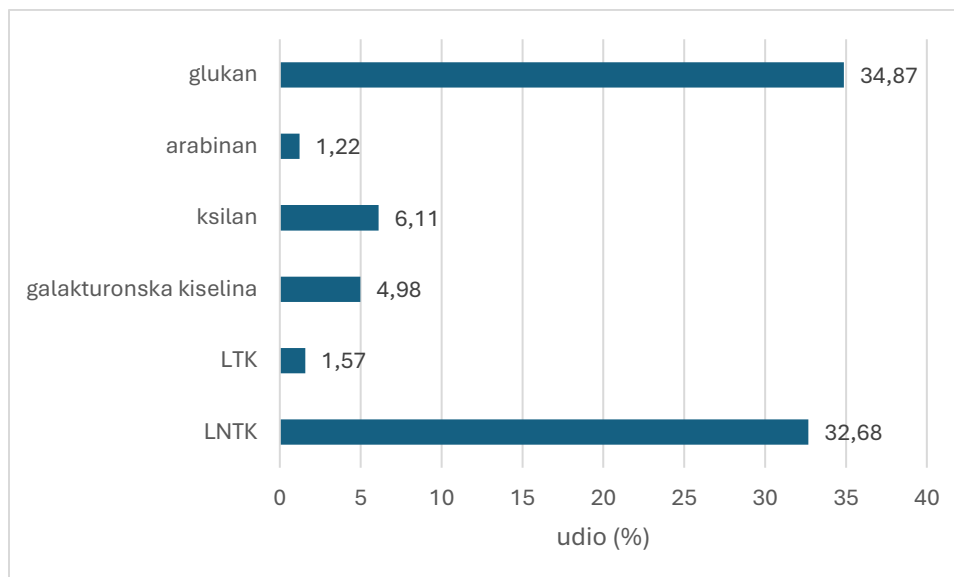
Slika 4.7. Prikaz sastava neobrađene morske trave *Posidonia oceanica* u obliku udjela ugljikohidrata, vlage, lipida te udjelima lignina topljivog (LTK) i lignina netopljivog (LNTK) u kiselini

Prema rezultatima prikazanim na slici 4.7. vidljivo je da većinu sastava morske trave čine polisaharidi glukan, ksilan i arabinan (oko 30 %). Ti polisaharidi su sastavnice lanaca celuloze i hemiceluloze koji su uz lignin glavne komponente svih lignoceluloznih sirovina. Prema literaturi, celuloza čini 31 – 40 %, a hemiceluloza 21 - 35 % ukupnog sastava morske trave *P.oceanica* (Camarena-Bonorad i sur., 2024). Prema Benito-González i suradnicima (2019), sastav suhe tvari čine galaktoza (27 %), glukoza (18 %), arabinoza (21 %), ksiloza (17 %), ramnoza (5 %), fukoza (5 %), manozna (5 %) i galakturonska kiselina (8 %). Udio galakturonske kiseline je veći u odnosu na dobivenu vrijednost (3,04 %). Razlika u udjelu galakturonske kiseline, kao i ostalih sastavnica *P.oceanica* može se pripisati različitim lokacijama rasta, klimatskim uvjetima kao što su temperatura mora, sadržaj morske vode, uzburkanost mora; o godišnjem dobu koje utječe na udjele pojedinih spojeva u morskoj travi (Ismael i sur., 2023). Udio lignina analiziran je kao dvije komponente – lignin topljiv u kiselini (LTK) i lignin netopljiv u kiselini (LNTK). Udio lignina topljivog u kiselini iznosi 1,71 %, dok udio lignina netopljivog u kiselini iznosi 21,39 % sastava *P. oceanica*, te zajedno čine oko 23 % ukupnog sastava. Udio je u skladu s literaturom; Ismael i suradnici (2023) navode da lignin čini 20 – 30 % ukupnog sastava, a Voca i suradnici (2019) navode da udio lignina iznosi oko 27 % ovisno o udjelu vlage u sirovini. Udio vlage dobivene sušenjem svježe sirovine iznosio je 10,94 % koji je teško usporediti s literaturom, s obzirom da ovisi o načinu i vremenu skladištenja sirovine. Udio lipida iznosio je 4,34 % koji je viši u odnosu na istraživanje Masri i suradnika (2018) koji je iznosio 2,3 % što može biti uzrokovano korištenjem različitih metoda ekstrakcije lipida, kao i analiza različitih uzoraka morske trave.

Osim analiziranih tvari, morska trava *P. oceanica* sadrži i 5,1 % proteina; 11,8 % pepela čiji sastav čine kemijski elementi kao magnezij (12,7 %), kalij (14,1 %), fosfor (2,6 %) i aluminij (1 %) u uzorcima izoliranim iz Sredozemnog mora (Masri i sur., 2018). U uzorcima izoliranim iz Jadranskog mora, udio pepela je jako visok te čini 16-36 % sastava morske trave (Voca i sur., 2019).

4.3.2. Kiselinski predtretman morske trave

Predobrada lignocelulozne sirovine kiselinskom hidrolizom provodi se u svrhu delignifikacije i taloženja lignina te za poboljšanje razgradivosti polisaharida pomoću otapanja hemiceluloze i povećanja površine na kojoj enzimi tijekom enzimske hidrolize mogu razgrađivati celulozu (Roy i sur., 2020). Korištena je 0,3 M sumporna kiselina te se predtretman vršio u inkubatoru na temperaturi od 80 °C. Nakon predtretmana, sastav kiselinski predobrađene morske trave *P. oceanica* analiziran je mjerenjem udjela lignina topljivog u kiselini i lignina netopljivog u kiselini te je UPLC analizom određen sadržaj ugljikohidrata. Rezultati su prikazani na slici 4.8..



Slika 4.8. Prikaz sastava kiselinski hidrolizirane morske trave *Posidonia oceanica* u obliku udjela ugljikohidrata, lignina topljivog (LTK) i lignina netopljivog (LNTK) u kiselini

Prema prikazanim rezultatima i usporedbom s rezultatima sadržaja neobrađene morske trave (slika 4.7.) vidljivo je da je udio glukana porastao na vrijednost od 34,87 %, te su se udjeli arabinana i ksilana smanjili na vrijednosti od 1,22 % i 6,11%. Do smanjenja udjela došlo je zbog utjecaja topline tijekom predtretmana na strukturu lignocelulozne sirovine. Sloj lignina koji omotava vlakno hemiceluloze oslabljen je toplinom i time je sumpornoj kiselini omogućeno razbijanje strukture hemiceluloze, odnosno rastavljanje lanca ksilana na ksilozu te arabinana na arabinozu. Produljenjem procesa kiselinskog predtretmana, povišenjem temperature procesa ili korištenjem kiseline veće koncentracije smanjenje udjela navedenih polisaharida bilo bi izraženije (Oladzad i sur., 2024). Udio lignina topljivog u kiselini smanjen je za oko 0,2 % u odnosu na svježu sirovinu, dok se udio lignina netopljivog u kiselini povećao za oko 10 %. U ligninu topljivom u kiselini pucaju aril-eterske veze utjecajem sumporne kiseline čime se dio lignina razgrađuje (Oladzad i sur., 2024).

Lignin zaostao nakon kiselinske hidrolize može značajno utjecati na aktivnost enzima u procesu enzimске hidrolize. U prisutnosti lignina tijekom enzimске hidrolize lignocelulozne sirovine moguća je adsorbicija enzima na lignin. Zbog toga se enzimi talože tijekom procesa zajedno s ligninom te ih nije moguće odvojiti i time je onemogućena ponovna upotreba enzima. Osim toga, derivati lignina koji nastaju tijekom predtretmana inhibiraju rad enzima (Yuan i sur., 2021).

4.3.3. Enzimaska hidroliza morske trave

Enzimaska hidroliza provedena je nakon kiselinskog predtretmana u svrhu razgradnje celuloze na manje saharidne jedinice, odnosno glukozu. U procesu enzimske hidrolize korišteni su enzimi celulaze i Viscozyme. Celulaze su skupina enzima svrstane u tri kategorije – endocelulaze, egzocelulaze i celobiazе. Skupina enzima ima različite uloge u razgradnji celuloze te ju sinergistički prevodi u glukozu. Endoglukanaze reduciraju lanac celuloze na manje lance hidrolizom glikozidnih veza celuloze amorfnе strukture. Egzoglukanaze razgrađuju reducirajuće i nereducirajuće krajeve lanca celuloze i tijekom tog procesa nastaju celobioze koje enzimi celobiazе razgrađuju na molekule glukoze (Singh i sur., 2021). Viscozyme je skupina enzima koja uključuje arabinaze, celulaze, β -glukanaze, hemicelulaze i ksilanaze. Enzimi efektivno i precizno razdvajaju β -1,4-glikozidne veze u lancima celuloze. Za razliku od celulaza, Viscozyme može razgrađivati lance hemiceluloze na ksilozu i arabinozu (Jiang i sur., 2024). Korištenjem kombinacije dva navedena enzima omogućuje se razgradnja celuloze i nerazgrađene hemiceluloze u predobrađenoj morskoj travi. Način provođenja procesa enzimske hidrolize opisan je u poglavlju 3.2.3. Enzimaska predobrada. Nakon 48 sati hidrolize UPLC analizom je utvrđen sastav hidrolizirane sirovine. Rezultati su prikazani u tablici 4.1. kao koncentracije pojedinih komponenti u 5 i 10 % (g/mL) sirovine.

Tablica 4.1. Rezultati UPLC analize hidrolizata morske trave *Posidonia oceanica* nakon enzimske hidrolize

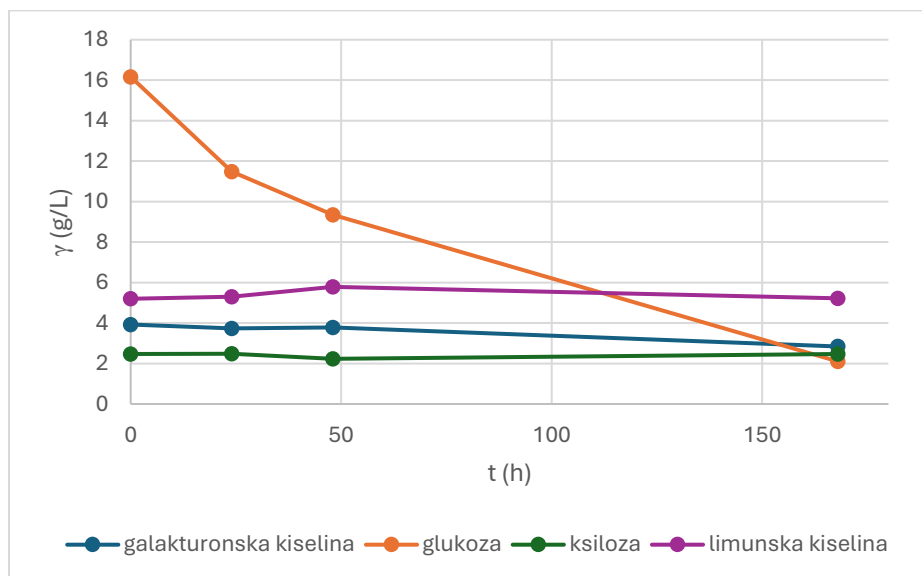
tvar (g/L)	5 % sirovine	10 % sirovine
glukoza	7,2529	16,1669
ksiloza	1,2849	2,5333
galakturonska kiselina	1,9085	3,1483
limunska kiselina	5,1221	4,8455

U tablici je vidljivo da je koncentracija glukoze, ksiloze i galakturonske kiseline gotovo dvostruko veće vrijednosti pri hidrolizi 10 % (g/mL) sirovine u citratnom puferu, u odnosu na 5 % iste. Takvi rezultati su smisleni s obzirom da je u citratni pufer dodana dvostruko veća količina morske trave u tikvice s 10 % sirovine. UPLC analizom arabinoza nije detektirana. To je moguće jer je tijekom kiselinskog predtretmana najviše razgrađena hemiceluloza, dok je cilj enzimske hidrolize bio razgradnja lanaca celuloze u glukozu (Normark i sur., 2014). Zbog dodatka Viscozyme-a koji sadrži ksilanaze i arabinaze omogućena je razgradnja dijela prisutnog ksilana i arabinana. S obzirom na manji udio arabinana nakon kiselinskog predtretmana (1,22 %), koncentracija nastale arabinoze bila je premala za detekciju kromatografskom analizom. Također, koncentracija

limunske kiseline se ne mijenja znatno s obzirom na promjenu mase dodane sirovine jer je koncentracija bila jednaka u oba slučaja.

4.4. UZGOJ KVASCA *Rhodotorula* sp. NA PREDOBRAĐENOJ MORSKOJ TRAVI

Uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. na morskoj travi *Posidonia oceanica* provodio se tijekom 168 sati (7 dana). Inokulum kvasca naciepljen je u tikvice nakon enzimske hidrolize 10 % (g/mL) kiselinski predobrađene morske trave u citratnom puferu zajedno s anorganskim tvarima koje su sadržavale kompleksni izvor dušika, i nutrijente potrebne za rast kvasca. Izvor dušika u hranjivoj podlozi bio je kvaščečev ekstrakt i amonijev sulfat. Početan omjer izvora ugljika i dušika iznosio je 100 g/g. Odabrani omjer temelji se na rezultatima prethodnog uzgoja *Rhodotorula* sp. pri kojem je postignut najveći rast biomase i prinos lipida. Sastav hranjive podloge prikazan je u tablici 3.4. (poglavlje 3.1.3.4. Hranjiva podloga s morskom travom za uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. i traustohitrida *Schizochytrium* sp.). Uzorci su izuzimani tijekom uzgoja, ali u njima nije bilo moguće odrediti koncentraciju biomase spektrofotometrijski i gravimetrijski zbog ostatka nehidrolizirane morske trave. Stoga, je u supernatantima prevrele hranjive podloge određena promjena koncentracija glukoze, ksiloze, galakturonske i limunske kiseline UPLC metodom. Rezultati analize prikazani su na slici 4.9..



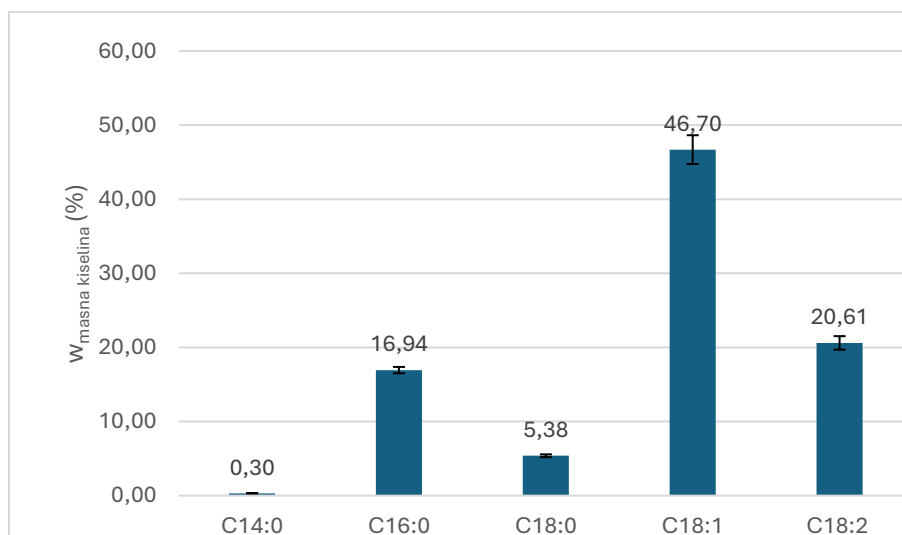
Slika 4.9. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze, limunske i galakturonske kiseline tijekom 168 sati uzgoja kvasca *Rhodotorula* sp. na hidroliziranoj morskoj travipočetnog udjela 10 % (g/mL)

Prema rezultatima prikazanim u tablici, vidljiv je pad koncentracije glukoze od početnih 16,1669 g/L do vrijednosti od 2,1048 g/L. To ukazuje da je kvasac kao supstrat koristio glukozu te da je nakon 7 dana uzgoja gotovo sva glukoza potrošena. Istraživani soj kvasca nije trošio ksiozu i

galakturonsku kiselinu, te je njihova koncentracija bila tijekom uzgoja nepromijenjena. Prema Xue i suradnicima (2024), kvasac *Rhodotorula toruloides* kao supstrate koristi i glukozu i ksilozu, bez obzira na njihov omjer. S druge strane, prema istraživanju Byrtusová i suradnika (2021), kvasac vrste *Rhodotorula kratochvilovae* kao supstrat preferira glukozu, te nakon glukoze troši manozu, glicerol, ksilozu i laktozu tim redoslijedom, s obzirom na supstrate koji su na raspolaganju. U ovoj analizi nije poznata vrsta korištenog kvasca roda *Rhodotorula* sp., tako da se može pretpostaviti da se radi o vrsti kvasca *Rhodotorula* koji nema sposobnost rasta na ksilozi i galakturonskoj kiselini.

4.4.1. Udio ekstrahiranih lipida i profil masnih kiselina proizvedenih tijekom uzgoja na predobrađenoj morskoj travi

Provedenom ekstrakcijom lipida opisanom u poglavlju 3.2.5.7 Određivanje ukupnog udjela lipida, udio lipida u liofiliziranom talogu koji je sadržavao nehidroliziranu morsku travu i biomasu kvasca *Rhodotorula* sp. izdvojenom nakon završetka uzgoja iznosio je $7,34 \pm 0,455$ %. Izračunati broj prikazan je kao prosječna vrijednost ukupnih lipida tri paralelna uzgoja, a masa izdvojenih taloga nehidrolizirane morske trave i biomase kvasca nakon liofilizacije iznosila je $12,582 \pm 0,617$ g. Provođenjem glavnog uzgoja kvasca na omjeru izvora ugljika i dušika koji je odabran za uzgoj na morskoj travi (C:N = 100 g/g) izračunati udio ekstrahiranih lipida iznosio je 8,86 %. Udio je bio nešto veći, što se može objasniti promjenom sadržaja hranjive podloge te je moguće da je rast i proizvodnja lipida bila inhibirana produktima kiselinske predobrade morske trave *Posidonia oceanica*. Prema istraživanju Robles-Iglesias i sur. (2023) kvasci roda *Rhodotorula* sp. pokazuju višu inhibiciju tvarima nastalim tijekom predtretmana, kao npr. furfuralima i hidroksimetil furfuralima, u odnosu na mnoge druge oleaginozne kvasce. Sastav masnih kiselina u liofiliziranom talogu nehidrolizirane morske trave i biomase kvasca izdvojenom nakon uzgoja određen je plinskom kromatografijom te su rezultati prikazani na slici 4.10.



4.10. Udio pojedinih masnih kiselina u ekstraktu lipida kvasca *Rhodotorula* sp.

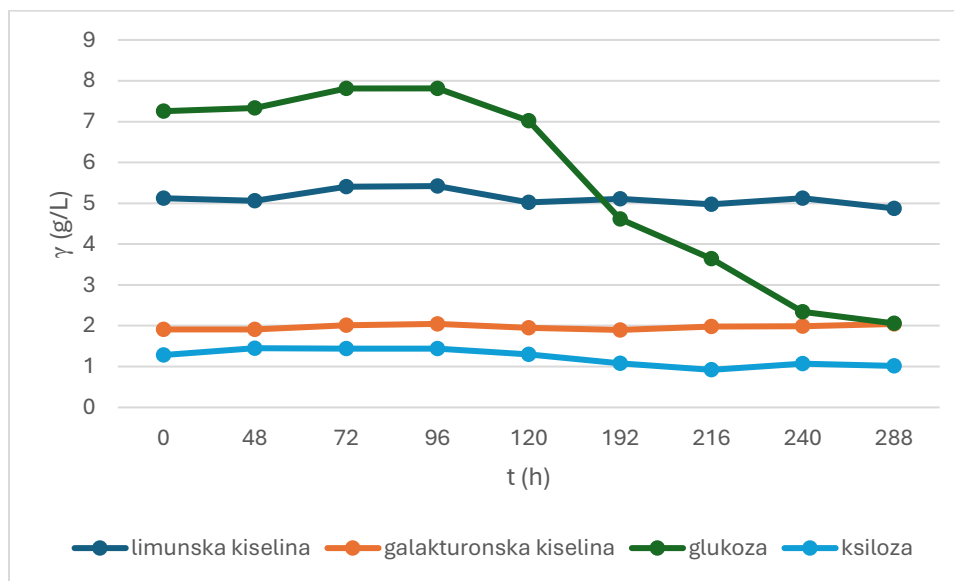
C14:0 – miristinska masna kiselina; C16:0 – palmitinska masna kiselina; C18:0 – stearinska masna kiselina; C18:1 – oleinska masna kiselina; C18:2 – linolna masna kiselina

Prema rezultatima prikazanim na slici 4.10. vidljivo je da oleinska masna kiselina (C18:1) prevladava u sastavu masnih kiselina s udjelom 46,70 %, što je u skladu s rezultatima glavnog uzgoja gdje je udio iznosio između 38 i 42 %. Po udjelima je, za razliku od glavnog uzgoja, druga najzastupljenija masna kiselina linolna (C18:2) s udjelom 20,61 %, a treća palmitinska s udjelom 16,94 %. Značajnog udjela bila je još stearinska masna kiselina (C18:0) čiji udjel je u skladu s glavnim uzgojem te iznosi 5,38 %. Miristinska masna kiselina (C14:0) koje je u profilu masnih kiselina tijekom glavnog uzgoja bilo u udjelu 1 – 3 %, tijekom uzgoja na morskoj travi proizvedeno svega 0,3 %. Prema istraživanju Mast i suradnika (2014), tijekom uzgoja kvasca *Rhodotorula glutinis* na miskantusu, najzastupljenija masna kiselina bila je oleinska, zatim palmitinska i linolna, te u manjim udjelima stearinska i linolenska masna kiselina, dok miristinska masna kiselina nije bila označena kao masna kiselina značajnog udjela u ekstraktu lipida.

4.5. UZGOJ TRAUSTOHITRIDA *Schizochytrium* sp. NA PREDOBRAĐENOJ MORSKOJ TRAVI

Traustohitrid *Schizochytrium* sp. uzgajan je na podlozi koja je sadržavala citratni pufer, 5 % (g/mL) hidrolizirane morske trave *Posidonia oceanica* te kombinaciju anorganskih tvari koje su sadržavale nutrijente potrebne za rast navedenog mikroorganizma i kompleksan izvor dušika. Kao izvor dušika korišteni su kvašćev ekstrakt i mononatrijev glutamat uz početni omjer izvora ugljika i dušika 3,75 g/g. Pri tom omjeru se tijekom prethodnog uzgoja pokazao najveći prinos lipida i porast koncentracije biomase. Soli dodane u podlogu za uzgoj traustohitrida prikazane su u tablici 3.4. (poglavlje 3.1.3.4. Hranjiva podloga s morskom travom za uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. i

traustohitrida *Schizochytrium* sp.). Uzgoj se provodio u dvije tikvice, od kojih je u jednoj trajao 7 dana (168 h), a u drugoj 12 dana (288 h) na tresilici na temperaturi od 26 °C. Izuzimani uzorci analizirani su UPLC metodom u svrhu praćenja potrošnje ugljikohidrata tijekom uzgoja, a koncentracija biomase nije analizirana iz istih razloga kao i pri uzgoju kvasca *Rhodotorula* sp. (poglavlje 4.4. Uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. na predobrađenoj morskoj travi). Rezultati analize prikazani su na slici 4.11. iz kojih se može iščitati da je traustohitrid za rast koristio glukozu čija je koncentracija pala s početnih 7,2529 g/L na vrijednost od 2,0577 g/L. Vidljivo je da se tijekom prvih 4 dana uzgoja koncentracija glukoze nije trošila, već je tijekom trećeg i četvrtog (72 i 96 h) dana blago porasla. Do porasta koncentracije moglo je doći zbog enzimske hidrolize lignocelulozne sirovine s celulazama prisutnim u podlozi. Nakon četvrtog dana, kada se mikroorganizam adaptirao na hranjivu podlogu, koncentracija glukoze naglo je opadala, te je pri kraju uzgoja (240 i 288 h) potrošnja glukoze stagnirala. Vrijeme uzgoja je produljeno zbog sporijeg rasta traustohitrida *Schizochytrium* sp. te uzimajući u obzir adaptaciju mikroorganizma na hranjivu podlogu za glavni uzgoj.

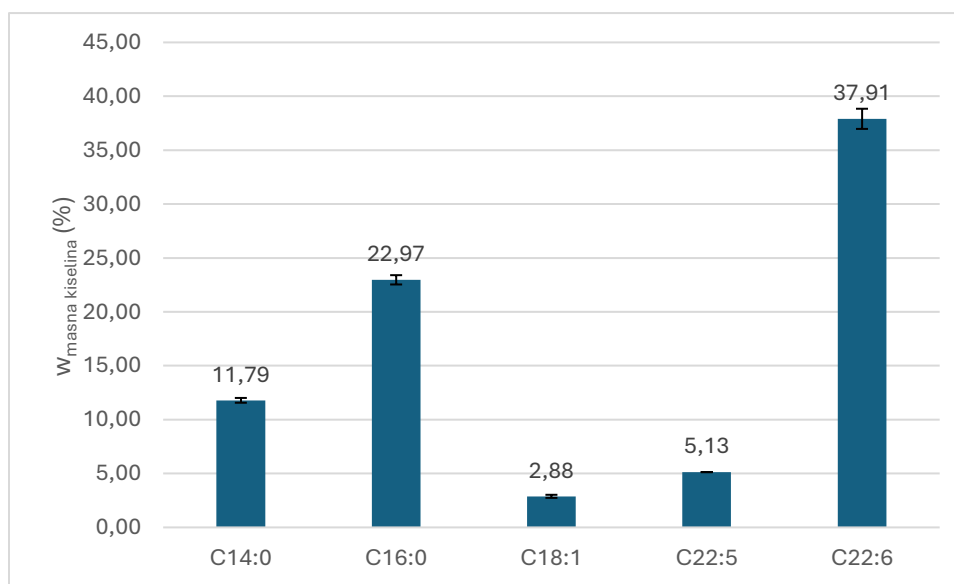


Slika 4.11. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze, limunske i galakturonske kiseline tijekom 168 sati uzgoja traustohitrida *Schizochytrium* sp. na hidroliziranoj morskoj travi

Za razliku od glukoze, za ostale analizirane spojeve nije primjećena značajna promjena koncentracije, što znači da je od navedenih ugljikohidrata traustohitrid *Schizochytrium* sp. kao izvor ugljika jedino koristio glukozu. Takvi rezultati su u skladu s literaturom; prema istraživanju Wang i suradnika (2022), *Schizochytrium* sp. ne može koristiti ksilozu kao izvor ugljika, iako posjeduje endogene enzime ksiloza reduktazu i ksiloza kinazu pomoću kojih metaboličkim putevima može sintetizirati ksilozu.

4.5.1. Udio ekstrahiranih lipida i profil masnih kiselina proizvedenih tijekom uzgoja na predobrađenoj morskoj travi

Lipidi su ekstrahirani iz liofiliziranog taloga izdvojenog nakon završetka uzgoja koji je sadržavao nehidroliziranu morsku travu i biomasu traustohitrida *Schizochytrium* sp. metodom opisanom u poglavlju 3.2.5.7 Određivanje ukupnog udjela lipida. Izračunati udio lipida u talogu iz tikvice u kojoj je uzgoj trajao 7 dana (168 h) udio lipida iznosio je 11,09 % od ukupnih 7,31 g liofiliziranog taloga, a u talogu iz tikvice u kojoj je uzgoj trajao 12 dana (288 h) udio lipida je iznosio 13,22 % u 7,48 g taloga. Iz rezultata je vidljivo da se tijekom posljednjih 5 dana uzgoja sintetiziralo više od 2 % ukupno sintetiziranih lipida što bi značilo da je dulji uzgoj traustohitrida *Schizochytrium* sp. potreban za bolje prinose lipida. Navedena vrijednost ukupnih lipida sintetiziranih tijekom 7 dana uzgoja manja je u odnosu na 11,28 % ekstrahiranih lipida iz biomase traustohitrida nakon glavnog uzgoja pri istom omjeru ugljika od dušika (C:N = 3,75 g/g), dok je vrijednost viša za uzgoj koji je trajao 12 dana. Razlog blagom povećanju udjela lipida može biti produljeno vrijeme uzgoja sa 168 h na 288 h i pogodniji sastav podloge za uzgoj na predobrađenoj morskoj travi. Sadržaj lipida ekstrahiranih iz traustohitrida analiziran je plinskom kromatografijom te je prikazan na slici 4.12. na kojoj se može vidjeti da je sadržaj lipida i njihovi udjeli veoma sličan onima proizvedenim tijekom glavnog uzgoja.



4.12. Udio pojedinih masnih kiselina u ekstraktu lipida traustohitrida *Schizochytrium* sp.

C14:0 – miristinska masna kiselina; C16:0 – palmitinska masna kiselina; C18:1 – oleinska masna kiselina; C22:5 – dokozaheksaenska masna kiselina; C22:6 – dokozaheksaenska masna kiselina

Najzastupljenija masna kiselina u sastavu lipida traustohitrida *Schizochytrium* sp. je dokozaheksaenska masna kiselina (C22:6) s udjelom od 37,91 % koja je bila najzastupljenija tijekom glavnog uzgoja s udjelima od 35 – 38 %. Druga i treća masna kiselina također su bile sukladne s rezultatima glavnog uzgoja, a to su palmitinska (C16:0) i miristinska masna kiselina (C14:0). Od ostalih masnih kiselina, zastupljene su još i oleinska (C18:1) i dokozapentaenska (C22:5) masna kiselina koje su bile u udjelima od $w_{C18:1} = 2,88 \%$ i $w_{C22:5} = 5,13 \%$. Rezultati se djelomično slažu s onima istraživanja Nguyen i suradnika (2018) prema koje je najzastupljenija masna kiselina također dokozaheksaenska udjela 27,30 %, potom palmitinska udjela 24,29 %. Međutim, treća najzastupljenija je dokozapentaenska s udjelom od 13,07 %, dok su miristinska i oleinska prisutne u udjelima manjim od 10 %. Do razlika u omjerima različitih masnih kiselina moglo je doći zbog različite vrste traustohitrida *Schizochytrium* sp. ili zbog razlike u korištenoj lignoceluloznoj sirovini i predtretmanu s obzirom da je u navedenom istraživanju korištena bagaza šećerne trske predobrađena natrijevim hidroksidom.

5. ZAKLJUČAK

1. Optimalan omjer izvora ugljika i dušika u hranivoj podlozi za rast kvasca *Rhodotorula* sp 100 g/g. Uzgojem pri navedenom C:N omjeru mikroorganizam je nakupio 8,86 % lipida, a koncentracija biomase na kraju uzgoja iznosila 18,73 g/L.
2. Najzastupljenije masne kiseline u biomasi kvasca *Rhodotorula* sp. su palmitinska (C16:0), oleinska (C18:1) i linolna (C18:2) masna kiselina.
3. Optimalan omjer izvora ugljika i dušika u hranivoj podlozi za rast traustohitrida *Schizochytrium* sp. na bio je 3,75 g/g. Uzgojem pri navedenom C:N omjeru u biomasi je nakupljeno 11,28 % lipida te je koncentracija biomase na kraju uzgoja iznosila 12,85 g/L.
4. Najzastupljenije masne kiseline u biomasi traustohitrida *Schizochytrium* sp. su dokozaheksaenska (DHA; C22:6), palmitinska (C16:0) i miristinska (C14:0) masna kiselina.
5. Otpadna morska trava sadržavala je 22,98 % glukana, 7,58 % ksilana, 4,62 % arabinana, 3,04 % galakturonske kiseline, 1,71 % lignina topljivog u kiselini, 21,39 % lignina netopljivog u kiselini te 4,94 % ekstraktivnih tvari.
6. Kiselinskom predobradom s 0,3 M sumpornom kiselinom u morskoj travi je porastao udio glukana (34,87 %), ksilana (6,11 %) i lignina netopljivog u kiselini (32,68 %), dok se smanjio udio arabinana (1,22 %) i lignina topljivog u kiselini (1,57 %).
7. Tijekom uzgoja na hidroliziranoj morskoj travi početnog udjela 10 % (g/mL) kvasac *Rhodotorula* sp. za rast je koristio isključivo glukozu te je proizvedeno 7,34 % lipida u izdvojenom talogu biomase i nehidrolizirane morske trave mase 12,582 g, od kojih su najzastupljenije masne kiseline bile oleinska (C18:1) i palmitinska (C16:0) masna kiselina.
8. Tijekom uzgoja traustohitrida *Schizochytrium* sp. na hidroliziranoj morskoj travi početnog udjela 5 % (g/mL) za rast je korištena isključivo glukoza. Proizvedeno je 11,09 % lipida u talogu biomase i nehidrolizirane morske trave mase 7,31 g izdvojenom nakon 7 dana (168 h) uzgoja, odnosno 13,22 % lipida u talogu biomase traustohitrida i nehidrolizirane morske trave mase 7,48 g. U talogu su najzastupljenije masne kiseline bile dokozaheksaenska (C22:6) i palmitinska (C16:0) masna kiselina.

6. LITERATURA

Amoroso G, Cozzolino A, Idbella M, Iacomino G, Motti R, Bonanomi G (2024) The Decomposition Dynamics and Substrate Component Potential of Biomass from the Seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Horticulturae*, **10**, 58. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010058>

Benito-González I, López-Rubio A, Martínez-Abad A, Ballester AR, Falcó I, González-Candelas L i sur. (2019) In-Depth Characterization of Bioactive Extracts from *Posidonia oceanica* Waste Biomass. *Marine Drugs*, **17**, 409. <https://doi.org/10.3390/md17070409>

Benito-González I, López-Rubio A, Martínez-Sanz M (2018) Potential of lignocellulosic fractions from *Posidonia oceanica* to improve barrier and mechanical properties of bio-based packaging materials. *Int J Biol Macromol*, **118**, 542–551. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.052>

Byrtusová D, Szotkowski M, Kurowska K, Shapaval V, Márová I (2021) *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26 - The Source of Multifunctional Metabolites. *Microorganisms*, **9**, 1280. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061280>

Chang M, Zhang T, Guo X, Liu Y, Liu R, Jin Q i sur. (2020) Optimization of cultivation conditions for efficient production of carotenoid-rich DHA oil by *Schizochytrium* sp. S31. *Process Biochem*, **94**, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.007>

Chen H (2014) *Biotechnology of Lignocellulose*, Springer, Nizozemska, str. 25-71. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6898-7_2

Chen H, Liu J, Chang X, Chen D, Xue Y, Liu P i sur. (2017) A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Process Technol*, **160**, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.12.007>

Chilakamarry CR, Mimi Sakinah AM, Zularisam AW, Pandey A, Vo DVN (2021) Technological perspectives for utilisation of waste glycerol for the production of biofuels: A review. *Environ Technol*, **24**, 101902. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101902>

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>

Galbe M, Zacchi G (2012) Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass Bioenerg*, **46**, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.026>

- Gertz C, Aladedunye F, Matthäus B (2017) A new analytical and statistical approach to predict the sensory properties of deep-frying fats and oils to determine the point of discard during processing. *Eur J Lipid Sci Tech*, **119**. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600393>
- Gil A (2021) Current insights into lignocellulose related waste valorization. *J Chem Eng*, **8**, 100186. <https://doi.org/10.1016/j.ceja.2021.100186>
- Grigore DM, Ungureanu-luga M, Pogurschi EN, Băbeanu NE (2023) Transforming Rhodotorula sp. Biomass to Active Biologic Compounds for Poultry Nutrition. *Agriculture*, **13**, 1159. <https://doi.org/10.3390/agriculture13061159>
- Ismael M, Charras Q, Leschevin M, Herfurth D, Roulard R, Quéro A i sur. (2023) Seasonal Variation in Cell Wall Composition and Carbohydrate Metabolism in the Seagrass Posidonia oceanica Growing at Different Depths. *Plants*, **12**, 3155. <https://doi.org/10.3390/plants12173155>
- Jiang G, Ameer K, Ramachandraiah K, Feng X, Tan C, Cai N (2024) Effects of synergistic application of Viscozyme L–wet ball milling on structural, physicochemical and functional properties of insoluble dietary fiber from ginseng residue. *LWT*, **209**, 116777. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116777>
- Jiru TM, Groenewald M, Pohl C, Steyn L, Kiggundu N, Abate D (2017) Optimization of cultivation conditions for biotechnological production of lipid by Rhodotorula kratochvilovae (syn, Rhodosporidium kratochvilovae) SY89 for biodiesel preparation. *Biotech*, **7**, 145. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0769-7>
- Khan MU, Usman M, Ashraf MA, Dutta N, Luo G, Zhang S (2022) A review of recent advancements in pretreatment techniques of lignocellulosic materials for biogas production: Opportunities and Limitations. *J Chem Eng*, **10**, 100263. <https://doi.org/10.1016/j.ceja.2022.100263>
- Khiari R, Belgacem MN (2017) Potential for using multiscale Posidonia oceanica waste, Elsevier, Nizozemska, str. 447–471. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100959-8.00021-4>
- 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>
- Lobo FCM, Franco AR, Fernandes EM, Reis RL (2021) An Overview of the Antimicrobial Properties of Lignocellulosic Materials. *Molecules*, **26**, 1749. <https://doi.org/10.3390/molecules26061749>

Lopes HJS, Bonturi N, Kerkhoven EJ, Miranda EA, Lahtvee PJ (2020) C/N ratio and carbon source-dependent lipid production profiling in *Rhodotorula toruloides*. *Appl Microbiol Biot*, **104**, 2639–2649. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10386-5>

Marova I, Certik M, Breierova E, (2011) Production of enriched biomass by carotenogenic yeasts-application of whole-cell yeast biomass to production of pigments and other lipid compounds. *Biomass*, 345-384. <https://doi.org/10.5772/19235>

Masri MA, Younes S, Haack M, Qoura F, Mehmer 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>

Mast B, Zöhrens N, Schmidl F, Hernandez R, French WT, Merkt N i sur. (2014) Lipid Production for Microbial Biodiesel by the Oleagenous Yeast *Rhodotorula glutinis* Using Hydrolysates of Wheat Straw and *Miscanthus* as Carbon Sources. *Waste Biomass Valori*, **5**, 955–962. <https://doi.org/10.1007/s12649-014-9312-9>

Mnafki R, Morales A, Sillero L, Khiari R, Moussaoui Y, Labidi J (2024) Integral Valorization of *Posidonia oceanica* Balls: An Abundant and Potential Biomass. *Polymers*, **16**, 164. <https://doi.org/10.3390/polym16010164>

Nguyen, H. C., Su, C.-H., Yu, Y.-K., & Huong, D. T. M. (2018). Sugarcane bagasse as a novel carbon source for heterotrophic cultivation of oleaginous microalga *Schizochytrium* sp. *Ind Crop Prod*, **121**, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.005>

Normark M, Winestrand S, Lestander TA, Jönsson LJ (2014) Analysis, pretreatment and enzymatic saccharification of different fractions of Scots pine. *BMC Biotechnol*, **14**, 20. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-20>

Okolie JA, Nanda S, Dalai AK, Kozinski JA (2021) Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass. *Waste Biomass Valori*, **12**, 2145–2169. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01123-0>

Oladzad S, Fallah N, Mahboubi A, Afsham N, Taherzadeh MJ, Toghyani J (2024) Comparison of acid and hydrothermal pretreatments of date waste for value creation. *Sci Rep*, **14**, 18056. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-68879-6>

- Pansini A, Bosch-Belmar M, Berlino M, Sarà G, Ceccherelli G (2022) Collating evidence on the restoration efforts of the seagrass *Posidonia oceanica*: current knowledge and gaps. *Sci Total Environ* **851**. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158320>
- Pardo Cuervo OH, Rosas CA, Romanelli GP (2024) Valorization of residual lignocellulosic biomass in South America: a review. *Environ Sci Pollut R* **31**, 44575–44607. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33968-6>
- Patel A, Karageorgou D, Rova E, Katapodis P, Rova U, Christakopoulos P, Matsakas L (2020) An Overview of Potential Oleaginous Microorganisms and Their Role in Biodiesel and Omega-3 Fatty Acid-Based Industries. *Microorganisms*, **8**, 434. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030434>
- Ren LJ, Huang H, Xiao AH, Lian M, Jin LJ, Ji XJ (2009) Enhanced docosaehaenoic acid production by reinforcing acetyl-CoA and NADPH supply in *Schizochytrium* sp. HX-308. *Bioproc Biosyst Eng*, **32**, 837–843. <https://doi.org/10.1007/s00449-009-0310-4>
- 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>
- Robles-Iglesias R, Naveira-Pazos C, Fernández-Blanco C, Veiga MC, Kennes C (2023) Factors affecting the optimisation and scale-up of lipid accumulation in oleaginous yeasts for sustainable biofuels production. *Renew Sust Energ*, **171**, 113043. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.113043>
- Roy R, Rahman MS, Raynie DE (2020) Recent advances of greener pretreatment technologies of lignocellulose. *Curr Res Green Sustain Chem*, **3**, 100035. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.100035>
- Singh A, Bajar S, Devi A, Pant D (2021) An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technol Reports*, **14**, 100652. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>
- 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>
- Valdés G, Mendonça RT, Aggelis G (2020) Lignocellulosic Biomass as a Substrate for Oleaginous Microorganisms: A Review. *Appl Sci*, **10**, 7698. <https://doi.org/10.3390/app10217698>

Voca N, Grubor M, Peter A, Kricka T (2019) Evaluation of *Posidonia oceanica* waste as a biomass source for energy generation. *BioEnergy 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 and Bioproducts*, **15**, 114. <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02215-w>

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>

Xue SJ, Li XC, Liu J, Zhang XT, Xin ZZ, Jiang WW i sur. (2024) Efficient sugar utilization and high tolerance to inhibitors enable *Rhodotorula toruloides* C23 to robustly produce lipid and carotenoid from lignocellulosic feedstock. *Bioresource Technol*, **407**, 131146. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131146>

Yuan Y, Jiang B, Chen H, Wu W, Wu S, Jin Y, Xiao H (2021) Recent advances in understanding the effects of lignin structural characteristics on enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Biofuels*, **14**, 205. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02054-1>

Zhang W, Wu J, Zhou Y, Liu H, Zhang J (2019) Enhanced lipid production by *Rhodotorula glutinis* CGMCC 2.703 using a two-stage pH regulation strategy with acetate as the substrate. *Energy Sci Eng*, **7**, 2077–2085. <https://doi.org/10.1002/ese3.413>

Žugec M (2023) Uzgoj kvasca *Rhodotorula* sp. i mikroalge *Schizochytrium* sp. na hidrolizatu otpadne morske trave. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja NIKA MORAČA 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.

Nika Morača

Vlastoručni potpis