

Uzgoj traustohitrida *Schizochytrium* sp. na hranjivim podlogama uz dodatak nusproizvoda prehrambene industrije i industrije biogoriva

Davidović, Ana

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:159:571211>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2024.

Ana Davidović

**UZGOJ TRAUSTOHITRIDA
SCHIZOCHYTRIUM SP. NA HRANJIVIM
PODLOGAMA UZ DODATAK
NUSPROIZVODA PREHRAMBENE
INDUSTRIJE I INDUSTRIJE BIOGORIVA**

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

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta „Biorafinerijski sustav za proizvodnju biogoriva i biokemikalija iz neprehrambenih lignoceluloznih sirovina“ (IP-2022-10-3075) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek na prilici, vodstvu i podršci prilikom izrade ovog rada. Hvala tehničarima Igoru Livadi, Marini Vnućec i Ljiljani Blažević te izv. prof. dr. sc. Antoniji Trontel na pomoći pri provedbi eksperimentalnog dijela rada. Posebno hvala prof. dr. sc. Božidaru Šanteku na svim riječima podrške i znanju koje je na nas prenio. Na kraju, najveća hvala mojoj obitelji, prijateljima i Anti na razumijevanju i podršci koju su mi pružili tijekom cijelog obrazovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

UZGOJ TRAUSTOHITRIDA *Schizochytrium* sp. NA HRANJIVIM PODLOGAMA UZ DODATAK
NUSPROIZVODA PREHRAMBENE INDUSTRIJE I INDUSTRIJE BIOGORIVA

Ana Davidović, univ. bacc. ing. biotechn.

0058213602

Sažetak: S obzirom na suvremene izazove poput klimatskih promjena i zagađenja, razvijaju se nove politike usmjerene na održivi razvoj i gospodarenje otpadom. Mikrobnii lipidi proizvedeni pomoću traustohitrida *Schizochytrium* sp. održiva su alternativa ribljem ulju u proizvodnji omega-3 masnih kiselina, posebno zbog sposobnosti rasta na nusproizvodima prehrambene industrije i industrije biogoriva kao što su sirutka, otpadni glicerol i ulja. Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj različitih izvora ugljika na rast *Schizochytrium* sp. te na udjel lipida i sastav masnih kiselina u biomasi. Najviši prirasti biomase ostvareni su uzgojem na glukozii i glicerolu uz dodatak vitamina (14,27 g/L i 8,52 g/L). Prinos biomase na sirutki i ulju bio je znatno niži, a iznosio je 3,67 g/L odnosno 3,15 g/L. Sastav masnih kiselina u biomasi varirao je ovisno o sastavu hranjive podloge i izvoru ugljika. Najviši udio DHA u masnim kiselinama (36,75 %) postignut je nakon 12 dana uzgoja na 12,6 g/L glicerola.

Ključne riječi: sirutka, glicerol, *Schizochytrium*, lipidi, DHA,

Rad sadrži: 54 stranice, 21 sliku, 14 tablica, 45 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. Ksenija Markov (član)
4. prof. dr. sc. Jasna Novak (zamjenski član)

Datum obrane: 28. studeni 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

CULTIVATION OF THRAUSTOCHYTRID *Schizochytrium* sp. ON GROWTH MEDIA USING FOOD AND BIOFUEL INDUSTRY BY-PRODUCTS

Ana Davidović, univ. bacc. ing. biotechn
0058213602

Abstract: In response to modern challenges like climate change and pollution, new policies are being developed to promote sustainable development and waste management. Microbial lipids produced by the thraustochytrid *Schizochytrium* sp. present a sustainable alternative to fish oil in omega-3 fatty acid production, particularly due to its ability to grow on by-products from the food and biofuel industries, such as whey, waste glycerol, and oils. This study aimed to investigate the effects of various carbon sources on the growth of *Schizochytrium* sp. and on lipid content and fatty acid composition in biomass. The highest biomass yields were achieved using glucose and glycerol with added vitamins (14,27 g/L and 8,52 g/L). Biomass yield on whey and oil was significantly lower, at 3,67 g/L and 3,15 g/L, respectively. Fatty acid composition varied with substrate composition, with the highest DHA content (36,75 %) obtained after 12 days of growth on 12,59 g/L glycerol.

Keywords: whey, glycerol, *Schizochytrium*, lipids, DHA

Thesis contains: 54 pages, 21 figures, 14 tables, 45 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) Ksenija Markov, 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. RADNI MIKROORGANIZAM..... | 2 |
| 2.1.1. Klasifikacija radnog mikroorganizma | 2 |
| 2.1.2. Građa, podrijetlo i specifičnost radnog mikroorganizma | 3 |
| 2.2. PROIZVODI METABOLIZMA TRAUSTOHITRIDA <i>SCHIZOCHYTRIUM SP.</i> | 4 |
| 2.2.1. Dokozaheksaenska kiselina (DHA) | 4 |
| 2.2.2. Eikozapentaenska kiselina (EPA) | 5 |
| 2.2.3. Pigmenti..... | 5 |
| 2.2.4. Steroli | 6 |
| 2.2.5. Biomasa..... | 7 |
| 2.3. SIROVINE I SUPSTRATI ZA UZGOJ TRAUSTOHITRIDA <i>SCHIZOCHYTRIUM SP.</i> | 7 |
| 2.3.1. Izvori ugljika | 7 |
| 2.3.2. Izvori dušika..... | 8 |
| 2.3.3. Vitamini..... | 8 |
| 2.4. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI UZGOJA | 9 |
| 2.4.1. Koncentracija otopljenog kisika | 9 |
| 2.4.2. Ionska jakost..... | 9 |
| 2.4.3. Temperatura uzgoja | 10 |
| 2.4.4. pH vrijednost..... | 10 |
| 2.5. TIPOVI PROCESA..... | 10 |
| 2.6. BIOSINTEZA MASNIH KISELINA U <i>SCHIZOCHYTRIUM SP.</i> | 12 |
| 2.6.1. Put sintaze masnih kiselina (FAS)..... | 13 |
| 2.6.2. Put poliketid sintaze (PKS)..... | 14 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 15 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 15 |
| 3.1.1. Radni mikroorganizam | 15 |
| 3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga | 15 |
| 3.1.3. Ostale kemikalije..... | 15 |
| 3.1.4. Hranjiva podloga korištena za uzgoj inokuluma traustohitrida | 16 |
| 3.1.5. Hranjive podloge za glavni uzgoj..... | 16 |
| 3.1.6. Oprema i aparatura..... | 19 |
| 3.1.6.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC) | 19 |
| 3.1.6.2. Uređaj za plinsku kromatografiju (GC)..... | 19 |
| 3.1.6.3. Centrifuge | 19 |
| 3.1.6.4. Preostala oprema i aparatura | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2. METODE | 20 |
| 3.2.1. Uzgoj inokuluma traustohitrida | 20 |
| 3.2.2. Hranjiva podloga na bazi sirutke (1. uzgoj) | 20 |
| 3.2.3. Hranjiva podloga na bazi sirutke – optimizacija podloge (2. uzgoj) | 21 |
| 3.2.4. Obogaćena hranjiva podloga na bazi sirutke (3. uzgoj) | 21 |
| 3.2.5. Utjecaj koncentracije izvora ugljika na rast i sintezu lipida (4. uzgoj) | 21 |
| 3.2.6. Izdvajanje biomase | 22 |
| 3.2.7. Analitičke metode | 22 |
| 3.2.7.1. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari | 22 |
| 3.2.7.2. Određivanje udjela lipida u biomasi traustohitrida | 23 |
| 3.2.7.3. Određivanje sastava masnih kiselina u biomasi | 23 |
| 3.2.7.4. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC analiza) | 24 |
| 3.2.7.5. Određivanje koncentracije ulja u prevreloj podlozi | 25 |
| 3.2.8. Određivanje pokazatelja uspješnosti procesa | 26 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 28 |
| 4.1. PRINOS BIOMASE TRAUSTOHITRIDA <i>SCHIZOCHYTRIUM</i> SP. UZGOJENOG NA PODLOGAMA RAZLIČITIH SASTAVA | 29 |
| 4.1.1. Hranjiva podloga na bazi sirutke (1. uzgoj) | 29 |
| 4.1.2. Hranjiva podloga na bazi sirutke - optimiranje sirutke (2. uzgoj) | 31 |
| 4.1.3. Obogaćena hranjiva podloga i podloga na bazi sirutke (3. uzgoj) | 34 |
| 4.1.4. Utjecaj koncentracije izvora ugljika na rast i sintezu lipida (4. uzgoj) | 37 |
| 4.1.5. Usporedba rezultata sva četiri uzgoja | 41 |
| 4.2. USPOREDBA PRINOSA LIPIDA | 42 |
| 5. ZAKLJUČCI | 49 |
| 6. LITERATURA | 50 |

1. UVOD

Vodeći problemi modernog doba uključuju prekomjernu urbanizaciju, glad, bolesti, ratove, siromaštvo, neravnopravnost, zagađenje mora, tla i zraka te klimatske promjene. Političari diljem svijeta pokušavaju se nositi s tim izazovima donošenjem različitih odredbi, pravilnika i zakona. Pojmovi poput održivog razvoja i kružnog gospodarstva često se ističu u ovim raspravama. Cilj ovih politika je osigurati održivo gospodarenje resursima, produljenje životnog vijeka proizvoda i iskorištenje nusproizvoda s ciljem smanjenja otpada te povećanje korištenja obnovljivih izvora energije, sve kako bi se zadovoljile sadašnje potrebe čovječanstva istovremeno omogućujući budućim generacijama da zadovolje vlastite potrebe (Hák i sur., 2016). S obzirom na rastuću globalnu populaciju i sve veću potrebu za energijom, hranom i ostalim resursima te potreba za inovativnim i održivim rješenjima postaje sve izraženija.

U tom kontekstu, iskorištenje mikroorganizama ističe se kao potencijalno važan doprinos održivom razvoju. Njihova sposobnost brzog rasta čini ih idealnim kandidatima za primjenu u procesima proizvodnje biogoriva, prehrambenih i farmaceutskih proizvoda (Kujawska i sur., 2021). Jedan od novih pripadnika ove skupine je *Schizochytrium* sp., oleaginozni heterotrofni mikroorganizam, čiji se lipidi koriste kao dodatak prehrani i kozmetici, dok se ostatak biomase koristi kao dodatak za prehranu riba i školjkaša. Omega-3 masne kiseline izolirane iz biomase ovog mikroorganizma se koriste u proizvodnji lijekova i dodataka prehrani za prevenciju i liječenje raznih stanja (Nguyen i sur., 2018). Za uzgoj mikroorganizma *Schizochytrium* sp. nije potrebno plodno tlo niti slatka voda, čime se smanjuje pritisak na poljoprivredne resurse, a optimizacijom samog procesa može se postići ekonomska isplativost.

Ovaj mikroorganizam može rasti na različitim otpadnim izvorima ugljika, što smanjuje troškove proizvodnje i doprinosi smanjenju otpada drugih industrija (Nguyen i sur., 2018). Sirovine poput glicerola, otpadnog ulja i otpadne sirutke predstavljaju jeftinije alternative glukozu, na kojoj se *Schizochytrium* sp. najčešće uzgaja. Uzgoj mikroorganizma *Schizochytrium* sp. na otpadnim sirovinama predstavlja inovativan biotehnološki pristup koji kombinira proizvodnju vrijednih bioproizvoda s učinkovitim iskorištavanjem nusproizvoda drugih industrija. Osim što su jeftine, otpadne sirovine su često dostupne u velikim količinama te je mala vjerojatnost njihove nestašice.

Cilj ovog rada bio je istražiti optimizaciju rasta *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 na sirutci, glicerolu i jestivom ulju te ispitati njegovu sposobnost sinteze masnih kiselina. Kako bi se proces optimirao, istražen je učinak različitih dodataka podlozi kao i omjeri C/N. Rezultati uzgoja dobiveni su gravimetrijskim određivanjem biomase te određivanjem koncentracije supstrata i lipida kromatografskim metodama.

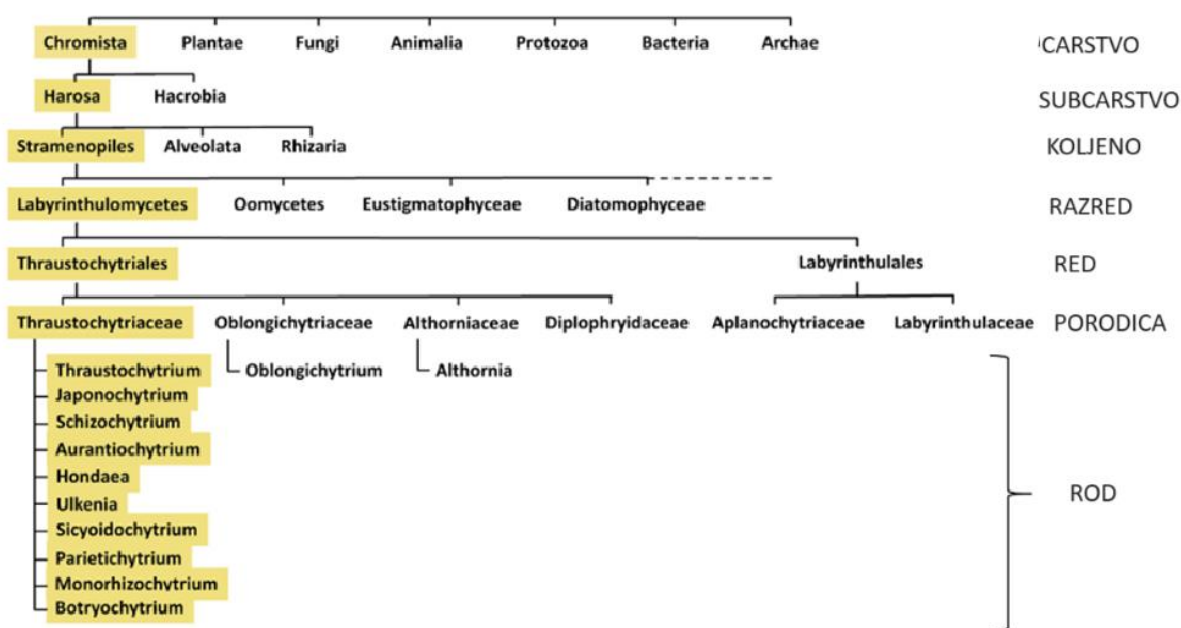
2. TEORIJSKI DIO

Velika globalna potražnja za održivim i ekološki prihvatljivim proizvodnim procesima potaknula je značajan interes za korištenje industrijskih nusproizvoda za uzgoj mikroorganizama. Neki od primjera iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije su uzgoj *Schizochytrium* sp. na otpadnoj sirutci, glicerolu i otpadnom ulju. Ovaj traustohitrid privukao je pažnju znanstvenika zbog svojih nutritivnih prednosti, ali i potencijala za proizvodnju biogoriva. Korištenje nusproizvoda druge industrije kao osnovne sirovine i proizvodnja dokozaheksaenske kiseline (DHA) i biomase, ne samo da smanjuje ekološki utjecaj, već i doprinosi bioekonomiji kroz proizvodnju komercijalno vrijednih spojeva.

2.1. RADNI MIKROORGANIZAM

2.1.1. Klasifikacija radnog mikroorganizma

Schizochytrium sp. je jednostanični mikroorganizam, koja pripada carstvu kromista (*Chromista*), subcarstvu *Harosa*, koljenu *Stramenopiles*, razredu *Labyrinthulomycetes*, redu *Thraustochytriales* i porodici *Thraustochytriaceae* (Morabito i sur., 2019). Prikaz filogenetskog stabla nalazi se na slici 1. Velik broj znanstvenika ga ubraja u mikroalge, dok drugi navode da nije mikroalga jer ne posjeduje plastide i ne provodi fotosintezu te ga svrstavaju u traustohitride. Traustohitridi su prvi puta opisani prije 80 godina te su se od tada svrstavali u različite taksonomske skupine (Cavalier-Smith i sur., 1994). Prvo su svrstani u funge točnije *Phycomycetes* zbog njihove sposobnosti proizvodnje zoospora i struktura sličnih rizoidu, no Cavalier-Smith je to odbacio i svrstao ih u kromiste.



Slika 1. Filogenetsko stablo *Schizochytrium* sp. (prema Morabito i sur., 2019)

Traustohitridi su morski jednostanični protisti. Za razliku od većine mikroalgi nemaju

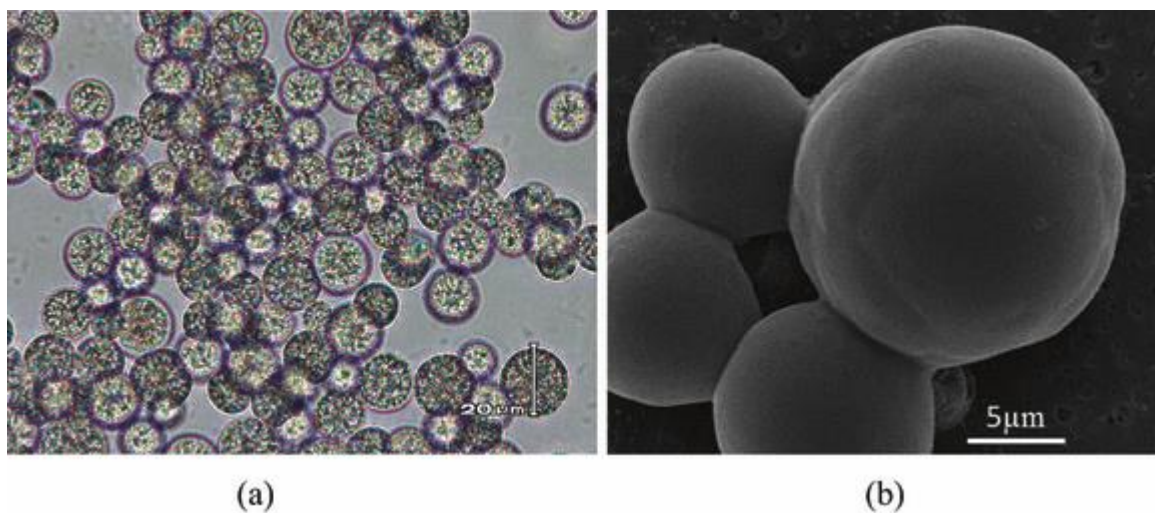
kloroplaste, posljedično, ne mogu provoditi fotosintezu. Pripadaju skupini obligatnih heterotrofa, tj. za rast im je potreban organski izvor ugljika (Morabito i sur., 2019).

Izolirani su pretežito iz oceana, obalnih područja i estuarija rijeka, a rasprostranjeni od površine oceana do dubine od 2000 m, a pronađeni su i u sedimentima i okolišu gdje prevladavaju niske temperature. Rasprostranjeni su u vodama gdje je visoka koncentracija organskog izvora ugljika koji nastaje raspadom organskih tvari na površini morskog dna (Morabito i sur., 2019).

Velik broj različitih sojeva traustohitrida koji se koriste u biotehnološkoj proizvodnji izolirani su iz lignocelulozne biomase nastale raspadom ostataka u šumi mangrova. Kako rastu na raspadajućoj organskoj tvari imaju veliku ulogu u razgradnji biološkog materijala i reciklaciji nutrijenata morskih i obalnih ekosistema te ih svrstavamo u saprofitske mikroorganizme (Morabito i sur., 2019).

2.1.2. Građa, podrijetlo i specifičnost radnog mikroorganizma

Schizochytrium sp. je oleaginozni jednostanični mikroorganizam sfernog oblika. Promjer stanice može biti i do 30 μm . Fotografije traustohitrida *Schizochytrium* sp. dobivene svjetlosnim i elektronskim skenirajućim mikroskopom nalaze se na slici 2. *Schizochytrium* sp. S31 (ATCC 20888) je odabrani soj korišten u ovom istraživanju. Izoliran je iz estuarijskih voda Tihog oceana u Kaliforniji i očuvan u američkoj zbirci stanica (engl. *American Type Culture Collection*, ATCC).



Slika 2. *Schizochytrium* sp. (a) fotografija dobivena svjetlosnom mikroskopijom (povećanje x400) i (b) fotografija dobivena elektronskim skenirajućom mikroskopijom (povećanje x5000). (Hong i sur., 2011).

Mikroorganizmi koji imaju sposobnost sinteze i nakupljanja visokih koncentracija lipida (≥ 20 % g/g suhe tvari biomase) spadaju u skupinu oleaginoznih mikroorganizama. Osim traustohitrida u tu skupinu ubrajamo i neke bakterije, kvasce, mikroalge i plijesni (Maza i sur.,

2020). Postotak lipida u suhoj tvari biomase traustohitrida *Schizochytrium* sp. seže i do 50 %, od čega i do 35 % lipida čini DHA (Chang i sur., 2020; Zeb i sur., 2019). Mikrobnii lipidi se intenzivno nakupljaju u citoplazmi u obliku hidrofobnih tijela zvanii lipidne kapljice. Kemijskim sastavom su slični biljnim uljima, kemijski sastav- triacilgliceroli. Za poticanje sinteze lipida potreban je visok molarni ili maseni omjer izvora ugljika i dušika (C/N) uz prisustvo kisika. Ulje dobiveno iz *Schizochytrium* sp. je deklarirano sigurnim i pogodnim za ljudsku upotrebu, GRAS statusom (engl. *Generally Recognized As Safe*) (Puri i sur., 2023). U cilju poboljšanja proizvodnih karakteristika različiti sojevi traustohitrida modificirani su primjenom genetičkog inženjerstva (Wang i sur., 2021).

2.2. PROIZVODI METABOLIZMA TRAUSTOHITRIDA *SCHIZOCHYTRIUM* SP.

Schizochytrium sp. proizvodi širok spektar proizvoda poput lipida, pigmenata, sterola, enzima i biomase. U lipidima prevladavaju miristinska (C14:0), palmitinska (C16:0), dokosapentaenoična (C22:5) i dokozaheksaenska (C22:6) kiselina (Wang i sur., 2022). Biomasa traustohitrida se koristi kao dodatak prehrani, za proizvodnju omega-3 masnih kiselina za prehrambenu industriju, kao hrana za životinje (posebno u akvakulturi), dodatak u proizvodnji kozmetičkih proizvoda, kao dodatak u funkcionalnoj hrani i pićima, kao lipidi za biorazgradivu plastiku (Wang i sur., 2022).

2.2.1. Dokozaheksaenska kiselina (DHA)

Dokozaheksaenska kiselina je dugolančana polinezasićena omega-3 masna kiselina kemijske formule $C_{22}H_{32}O_2$. Sastoji se od 22 ugljikova atoma i 6 cis dvostrukih veza. Važna je za zdravlje mozga, očiju i srca te ima ključnu ulogu u razvoju i funkciji moždanih stanica (Byreddy, 2016). Ključna je komponenta staničnih membrana mozga i važna za razvoj mozga fetusa i novorođenčadi, stoga se dodaje u mlijeko za novorođenčad. Također pomaže i u smanjenju upala, snižavanju razine triglicerida u krvi i poboljšavanju zdravlja krvnih žila (Byreddy, 2016). Znanstvene studije su također dokazale da suplementacija s DHA ublažava simptome poremećaja hiperaktivnosti i deficita pažnje (engl. *Attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD) (Bonvicini i sur., 2016). Izvori ove omega-3 masne kiseline uz riblje ulje su i alge (Byreddy, 2016).

Današnja prehrana, pogotovo u zapadnjačkim zemljama ne sadržava dovoljne količine omega-3 masnih kiselina te se preporučuje suplementacija dodatcima prehrani poput ribljeg ulja (Byreddy, 2016). Riblja jetra nije održiv izvor ovih masnih kiselina posebno u vrijeme velikog izlova ribe i sve većeg zagađenja mora, što dovodi do nakupljanja toksičnih tvari poput teških metala u ribi i ribljim proizvodima. Stoga se znanost i industrija okreću pronalasku novih vrsta mikroorganizama, koji imaju sposobnost nakupljanja velikog udjela lipida u stanicama te

se njihovo ulje može koristiti kao alternativa ribljem ulju.

Schizochytrium sp. je mikroorganizam koji ima sposobnost akumulacije 30 % - 40 % DHA u ukupnim masnim kiselinama (Chang i sur., 2020). U posljednjih deset godina objavljen je niz znanstvenih radova na temu nakupljanja i izolacije DHA iz lipida *Schizochytrium* sp. i modifikacije njegovog genoma s ciljem povećanja prinosa DHA. *Schizochytrium* sp. S31 (ATCC 20888) se smatra pogodnim sojem za industrijsku proizvodnju dokozaheksaenske kiseline (DHA) zbog sposobnosti proizvodnje i do 300 mg/L na dan (Chang i sur., 2013).

2.2.2. Eikozapentaenska kiselina (EPA)

Eikozapentaenska kiselina je još jedna važna omega-3 masna kiselina kemijske formule $C_{20}H_{30}O_2$. EPA sadrži 20 ugljikovih atoma i 5 cis dvostrukih veza (Ma i sur., 2022). Ima važnu ulogu u smanjenju upala u tijelu, te se njenim dodatkom prehrani preveniraju i liječe kronične bolesti poput artritisa i kardiovaskularnih bolesti (Ma i sur., 2022). EPA se metabolizira u organizmu u protuupalne tvari, uključujući eikozanoide, rezolvine i protektine, koji imaju važnu ulogu u imunološkom sustavu i regulaciji upala. Istraživanja o utjecaju eikozapentaenske kiseline na psihičko zdravlje sugeriraju pozitivan utjecaj kod liječenja depresije i drugih mentalnih poremećaja (Ma i sur., 2022). Kao i DHA, EPA se izolira iz ribljeg ulja i algi.

Mikroorganizmi poput *Schizochytrium* sp. mogu učinkovito sintetizirati EPA iz jednostavnih izvora ugljika poput glukoze i glicerola (Thurn i sur., 2022). Mikroorganizmi sadrže slične metaboličke puteve kao i viši organizmi, ali uz njih posjeduju i alternativne puteve sinteze i karakteristične varijante enzima koji povećavaju učinkovitost sinteze dugolančanih masnih kiselina. U algama je EPA važna za izgradnju stanične membrane te kao rezervna tvar koja omogućava prilagodbu organizma stresnim uvjetima u okolini poput promjene temperature ili limitacije nutrijentima (Thurn i sur., 2022).

2.2.3. Pigmenti

Karotenoidi su prirodni pigmenti rasprostranjeni u različitim vrstama voća, povrća, gljiva i cvijeća. Boja im varira od žute do crvene, a topljivi su u lipidima. Koriste se u kozmetici, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji u funkciji bojila i antioksidansa. Neki od karotenoida koje sintetiziraju traustohitridi su astaksantin, zeaksantin, kantaksantin, ehinenon, feonikosantin i β -karoten (Park i sur., 2018). Astaksantin zbog svojih superiornih antioksidativnih svojstava predstavlja zanimljivu komponentu lijekova i suplemenata protiv raka, pretilosti, dijabetesa i različitih vrsta upala.

β -karoten, prekursor vitamina A, pomaže prevenciji bolesti uzrokovanih deficijencijom vitamina A poput sljepoće, disfunkciji imuniteta i bolesti kože. Kombinacije pigmenata izoliranih iz morskih organizama i omega-3 masnih kiselina predstavlja kvalitetan dodatak prehrani s

pozitivnim utjecajem na ljudsko zdravlje (Park i sur., 2018).

Schizochytrium sp. osim DHA i EPA-e može sintetizirati β -karoten i astaksantin (Tang i sur., 2022). Park i sur. su u svome radu iz 2018. godine dokazali prisutnost biokemijskih puteva i enzima za sintezu karotenoida. Koncentracija suhe tvari biomase može dostići 200 g/L tijekom četverodnevne kultivacije, pri čemu lipidi čine više od 60 % suhe mase (Tang i sur., 2022). Ove karakteristike ukazuju na veliki potencijal ovog organizma kao "tvornice" za proizvodnju nutrijenata topljivih u lipidima. Međutim, enzimi uključeni u biosintezu astaksantina u *Schizochytrium* još uvijek nisu u potpunosti poznati. Daljnje razumijevanje puta biosinteze karotenoida je ključno za povećanje proizvodnje astaksantina (Tang i sur., 2022).

Rezultati uzgoja u tikvicama na tresilici (šaržni uzgoj) i šaržnog uzgoja s prihranjivanjem ukazali su na to da su optimalni uvjeti za proizvodnju ulja bogatog karotenoidima i DHA korištenje glicerola (75 g/L) kao izvora ugljika uz 0,25 g/L KH_2PO_4 i omjer C/N od 75:20 (Chang i sur., 2020). Promjene u aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT) sugerirale su moguću povezanost između sadržaja karotenoida i antioksidativnog sustava. Tijekom faze sinteze lipida, put sinteze β -karotena također je bio pojačan, što ukazuje na to da se proizvodi više karotenoida u svrhu obrane metabolizma od oksidativnog stresa u stanicama (Chang i sur., 2020).

2.2.4. Steroli

Steroli su ključne strukturne i regulatorne komponente eukariotskih stanica. U oleaginom mikroorganizmu *Schizochytrium* sp. S31, biosintetski put sterola primarno proizvodi kolesterol, stigmasterol, lanosterol i cikloartenol (Bi i sur., 2023). Steroli imaju ključnu ulogu u rastu *Schizochytrium*, sintezi karotenoida i masnih kiselina. Regulacija mehanizma sterola i karotenoida je međusobno povezana tako da inhibicija sinteze sterola smanjuje brzinu sinteze karotenoida pri smanjenju ekspresije gena HMGR i crtI^{BY}. Inhibicija sinteze sterola također može potaknuti akumulaciju masnih kiselina. Razumijevanje ovih regulatornih mehanizama može poboljšati rast *Schizochytrium* sp. u izazovnim uvjetima i unaprijediti proizvodnju DHA ili drugih vrijednih kemikalija (Bi i sur., 2023).

Analiza sterola tijekom uzgoja traustohitrida *Schizochytrium* sp. na 20 g/L glukoze otkrila je da su razine kolesterola i stigmasterola umjereno opale nakon 48 sati uzgoja, a zatim su nakon 72 sata naglo porasle, dosegnuvši 0,55 mg/g suhe tvari biomase i 1,17 mg/g suhe tvari biomase (Bi i sur., 2023). Suprotno tome, razine intermedijera metabolita lanosterola i cikloartenola naglo su porasle nakon 48 sati, ali su opale nakon 72 sata, dosegnuvši 2,47 mg/g suhe tvari biomase i 2,66 mg/g suhe tvari biomase (Bi i sur., 2023). Iz navedenih rezultata je vidljivo da se sinteza i akumulacija sterola odvija u stacionarnoj fazi rasta *Schizochytrium* sp.

2.2.5. Biomasa

Suha tvar biomase traustohitrida *Schizochytrium* sp. sadrži visoke koncentracije omega-3 masnih kiselina koje se mogu koristiti u ljudskoj prehrani, ali i kao dohrana za stoku, perad i u akvakulturi. U radu Joen i sur. iz 2022. godine prikazan je utjecaj dodatka praha biomase *Schizochytrium* sp. na rast pilića. Prah je pripremljen sušenjem traustohitrida uzgojenog na glukozu uz dodatak kvašćevog ekstrakta, morske soli i KH_2PO_4 . Tako uzgojena biomasa sadržavala je 29.4 % DHA (g/g) i 63.4 % (g/g) palmitinske kiseline. U radu je uočen pozitivan utjecaj dodatka praha traustohitrida na rast pilića, bez negativnih učinaka na karakteristiku trupa i kvalitetu mesa, a zabilježene su i povećane razine DHA u batku ispitanih pilića.

Studija Zhu La i sur. iz 2021. godine imala je za cilj utvrditi učinak dodatka traustohitrida *Schizochytrium* sp. na rast i antioksidativni kapacitet u teladi mliječnih krava. Povećane količine *Schizochytrium* sp. u punom mlijeku ili zamjenama za mlijeko rezultirale su značajnim povećanjima ne samo tjelesne težine, već i prosječnog dnevnog prirasta.

2.3. SIROVINE I SUPSTRATI ZA UZGOJ TRAUSTOHITRIDA *SCHIZOCHYTRIUM* SP.

Optimalna podloga za rast ovog mikroorganizma sadrži izvore ugljika, dušika, anorganske soli i elemente u tragovima.

2.3.1. Izvori ugljika

Schizochytrium sp. može koristiti širok spektar izvora ugljika od kojih je najčešće korištena glukoza, zbog relativno efektivnog metaboličkog puta *Schizochytrium* sp. kojim se glukoza učinkovito prevodi u lipide. Maksimalni teoretski prinos lipida po utrošenoj glukozu iznosi 31 % (g/g), dok su eksperimentalno dostignute vrijednosti do 20 % (g/g) (Wang i sur., 2021).

Drugi najčešći izvor ugljika za uzgoj *Schizochytrium* sp. je glicerol, koji dokazano povećava koncentraciju DHA u biomasi i to za 31.75 % u odnosu na biomasu uzgojenu na glukozu (Wang i sur., 2021). Osim pozitivnog utjecaja na nakupljanje DHA u biomasi, upotreba glicerola kao glavnog izvora ugljika za kultivaciju traustohitrida korisna je i iz ekološkog aspekta. Globalna proizvodnja biodizela u svijetu iznosi 41,3 milijardi litara, a otpadni glicerol je glavni nusproizvod ove industrije. Potrošnja otpadnog glicerola predstavlja jedan od glavnih zadataka ove industrije, s ciljem smanjenja otpada i smanjenja troškova proizvodnje (Kujawska i sur., 2021).

Ostali korišteni izvori ugljika su melasa šećerne trske, bagaza šećerne trske, i različiti biljni hidrolizati te ostatci prehrambene industrije i biootpad.

Sirutka je žuto zelena tekućina izdvojena iz mlijeka tijekom proizvodnje sira. Predstavlja jeftiniji izvor ugljika u obliku laktoze te izvor dušika. U sirutci se nalazi oko 40 % (g/g) laktoze.

Na svaki proizvedeni kilogram sira nastaje 9 L otpadne sirutke. Na godišnjoj razini se u svijetu generira oko 11 miliona tona otpadne sirutke te ta brojka svake godine raste (Lucakova i sur., 2022). Potreba za iskorištenjem ovog nutritivno vrijednog nusproizvoda je velika. Trenutno se polovica otpadne sirutke u svijetu koristi u biotehnološkim procesima za proizvodnju bioetanola, bioplina, proteina, hrane za životinje, farmaceutskih proizvoda i gnojiva (Lucakova i sur., 2022). Potencijalni načini iskorištenja sirutke limitirani su zbog njenog visokog udjela minerala (8-10 % m/v), a demineralizacijom nastaje otpadna voda, koja se također može koristiti kao izvor dušika u proizvodnji *Schizochytrium* sp.

Otpadna ulja iz prehrambene industrije također predstavljaju alternativni izvor ugljika za uzgoj *Schizochytrium* sp., ali njihova upotreba u podlozi za uzgoj još nije adekvatno istražena.

2.3.2. Izvori dušika

Najčešće korišteni izvori dušika za proizvodnju DHA pomoću *Schizochytrium* sp. su pepton i kvašičev ekstrakt, koji su često korišteni u kombinaciji jedan s drugim te natrijev glutamat (Wang i sur., 2021). Ovakvi organski izvori dušika su skupi.

Kao alternativa, neki sojevi ovog mikroorganizma mogu koristiti anorganske izvore dušika poput NH_4OH i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, koji su jeftiniji, ali njihova uporaba može dovesti do povećanja elemenata u tragovima i vitamina (Wang i sur., 2021).

Osim anorganskih izvora dušika istraživane su i otpadne vode različitih industrija poput otpadne vode od proizvodnje alanina i sirutke koja također služi i kao izvor ugljika.

2.3.3. Vitamini

Biotin (vitamin B7) je esencijalan kofaktor u biosintezi masnih kiselina jer sudjeluje u reakcijama karboksilacije koje omogućuju pretvorbu acetil-CoA u malonil-CoA, što predstavlja prvi korak u sintezi masnih kiselina. Studije su pokazale da dodatak biotina može povećati proizvodnju lipida, čime se optimizira prinos biomase (Singh i sur., 2014).

Tiamin (vitamin B1) je kofaktor za niz enzima uključenih u metabolizam ugljikohidrata, posebno u dekarboksilaciji piruvata u acetil-CoA, što osigurava ključni prekursor za biosintezu masnih kiselina i energiju za rast stanica (Tani i sur., 2018). Dodavanje tiamina u medij može potaknuti staničnu diobu i rast, jer ubrzava metabolizam ugljikohidrata (Tani i sur., 2018).

Cijanokobalamin (vitamin B12) sudjeluje u sintezi nukleotida i metionina, koji su ključni za diobu stanica i rast traustohitrida (Ford i Hutner, 1955). Studije sugeriraju da dodatak cijanokobalamina može poboljšati rast, osobito u uvjetima gdje je rast ograničen zbog nedostatka ovog vitamina (Singh i sur., 2014).

Optimalna koncentracija ovih vitamina u mediju može značajno poboljšati rast i metaboličku učinkovitost *Schizochytrium* sp., što je ključno za povećanje prinosa lipida i time poboljšanje industrijskih procesa proizvodnje omega-3 masnih kiselina (Singh i sur., 2014).

2.4. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI UZGOJA

Kultivacijski uvjeti koji imaju najveći utjecaj na rast mikroorganizma i sintezu DHA su otopljeni kisik, temperatura, pH i koncentracija soli.

2.4.1. Koncentracija otopljenog kisika

Schizochytrium sp. je aerobni mikroorganizam te je njegov rast ovisan o kisiku. Najveća koncentracija otopljenog kisika se tijekom uzgoja utroši u prvoj fazi uzgoja, tijekom rasta i replikacije biomase. U toj fazi koncentracija otopljenog kisika ima najveći utjecaj na sam proces. Istraživanja su pokazala da se limitacijom dušika u podlozi smanjuje i potreba na kisiku te se potiče nakupljanje lipida u drugoj fazi uzgoja (Wang i sur., 2021). Zbog utjecaja koncentracije otopljenog kisika na rast kulture provedena su različita istraživanja vezana uz aeraciju podloge i različite tipove bioreaktora koji omogućuju najbrži rast i sintezu lipida. Istražene su različite brzine miješanja i konstrukcije reaktora, od bioreaktora sa jednim miješalom ili više miješala do barbotirajućih kolona (Wang i sur., 2021). Najbolji rast i brzina sinteze lipida postignuta je u bioreaktoru koji je konstruirao Guo i sur. (2017). Navedena studija fokusirala se na novi dizajn bioreaktora koji omogućuje visoku aeraciju u kombinaciji sa strategijom kontrole otopljenog kisika za ekonomičnu proizvodnju DHA. Sastojao se od spremnika od 50 L, lopatičastog miješala uz dva dodatna miješala i četiri razbijača vrtloga. Za izradu lopatica miješala korištena je porozna membrana od nehrđajućeg čelika, a lopatice su se rotirale oko vlastite osi i oko osovine miješala, istovremeno ispuštajući mjehuriće zraka koji se preko lopatica uvodi u podlogu, čime je ostvaren inovativni dizajn bioreaktora za uzgoj traustohitrida. Dvostrukom rotacijom i propuhivanjem zraka kroz lopatice smanjena je mogućnost začepljenja pora i omogućen duži vijek miješala. Osim koncentracije kisika praćene su i promjene pH, temperature te biomase. Uzgojem u inovativnom bioreaktoru dobivena je veća koncentracija ukupne biomase od biomase dobivene u konvencijalnom bioreaktoru, ali je najveći udio DHA u ukupnim lipidima bio niži. Stoga je proces podijeljen u tri faze i svakoj fazi su prilagođeni fizikalni parametri te su dobiveni maksimumi koncentracija biomase i DHA. Korišteni supstrat je glukoza. Maksimum koncentracije suhe tvari biomase (X_{max}) je iznosio 151,0 g/L, maksimalna koncentracija i udio DHA u podlozi su iznosili 44,3 g/L i 29.33 % (g/g) (Guo i sur., 2017).

2.4.2. Ionska jakost

Koncentracija soli pri kojoj odabrani mikroorganizam raste je u intervalu 2 – 50 g/L. Ovisno o području iz kojeg je izoliran i koncentraciji soli u vodi različiti sojevi podnose širi interval koncentracija soli. Istražen je utjecaj različitih osmotskih tlakova te su rezultati pokazali da je najveći i najbrži rast biomase zabilježen pri visokim osmotskim tlakovima, dok se više lipida akumulira pri nižim koncentracijama soli, tj. nižim vrijednostima osmotskog tlaka (Hu i sur.,

2015).

Treba uzeti u obzir da velike koncentracije soli dovode do korozije bioreaktora tijekom procesa. Korozija ima negativan utjecaj na kvalitetu proizvoda, a cijena cijelog procesa raste. Nastanak korozije može se kontrolirati dodatkom 1 % natrijevog sulfata umjesto 2 % (g/g) morske soli (Wang i sur., 2021).

2.4.3. Temperatura uzgoja

Temperatura je jedan od uvjeta procesa koji značajno utječe na rast i nakupljanje lipida u biomasi. Većina istraživanja koristila je jednu temperaturu za cijeli proces, ali najbolji prinos biomase i udjel lipida je dobiven pri 30 °C tijekom prvih 32 sata nakon čega je temperatura smanjena na 20 °C na 12 sati. Postotak DHA u ukupnim masnim kiselinama tijekom ovako provedenog procesa iznosio je 51,98 % (g/g) (Zeng i sur., 2011). Kontrola temperature u industrijskim uvjetima je energetski zahtjevan i skup proces, te se njeno podešavanje treba uskladiti i s ekonomskim aspektom proizvodnje (Wang i sur., 2021).

2.4.4. pH vrijednost

Osim navedenih parametara pH također utječe na uspješnost procesa uzgoja traustohitrida *Schizochytrium* sp. Pogodna pH vrijednost za uzgoj ovog mikroorganizma iznosi između 5,0 i 8,0. Neutralni pH je optimalan za rast i nakupljanje lipida, dok je kiseliji pH optimalan za sintezu DHA. Procesi u dvije faze su i u ovom slučaju dali najbolje rezultate (Wang i sur., 2021).

2.5. TIPOVI PROCESA

Zbog kompleksne mreže metaboličkih reakcija traustohitrida *Schizochytrium* sp. odgovornih za rast stanice i sintezu lipida, ispitani su različiti tipovi procesa za proizvodnju DHA te su rezultati prikazani u tablici 1.

Qu i sur. su 2013. godine proveli šaržni uzgoj traustohitrida *Schizochytrium* sp. na glukozi kao izvoru ugljika i proveli procjenu učinkovitosti uzgoja. U seriji fermentacija testirane su različite početne koncentracije glukoze (60, 80, 100, 120 g/L). Vrijeme fermentacije, suha tvar biomase i ukupni lipidi su rasli s porastom početne koncentracije glukoze. Sadržaj DHA i produktivnost se smanjivala kod visokih koncentracija glukoze (iznad 100 g/L). Prinos DHA se linearno povećavao s porastom koncentracije supstrata, a kod visokih koncentracija glukoze dolazi do odstupanja od utvrđenih ovisnosti (Qu i sur., 2013). Inhibicijski učinak visokih koncentracija glukoze može se objasniti represijom katabolizma. Glukoza je brzo metabolizirajući izvor ugljika i energije koji povećava koncentraciju ATP-a unutar stanica, što uzrokuje represiju biosinteze enzima i usporava sintezu izvora energije (Qu i sur., 2013).

U istom radu objavljeni su i rezultati testiranja najbolje metode prihranjivanja kulture traustohitrida u bioreaktoru od 10 L. Šaržni uzgoj s prihranjivanjem pokazao se učinkovitim u

smanjenju učinka inhibicije rasta uzrokovane visokom koncentracijom supstrata. Kod ovog uzgoja bitan je odabir pogodnog režima prihrane, kako bi se dosegnula željena produktivnost. Testirane su četiri vrste metode prihrane: pulsno prihranjivanje (engl. *pulse feeding*), prihranjivanje stalnom brzinom (engl. *constant speed feeding*), prihranjivanje povratnom vezom (engl. *feed-back feeding*) i prihranjivanje povratnom vezom uz održavanje koncentracije otopljenog kisika (engl. *DO feed-back feeding*). Kod metode pulsnog prihranjivanja hranjiva tvar se dodaje u sustav periodički, u obliku impulsa. Nakon vrlo brzog dodatka visoke koncentracije hranjivih tvari povećava se koncentracija hranjivih tvari u hranjivom mediju, nakon čega mikroorganizmi metaboliziraju dostupne hranjive tvari. Prilikom prihranjivanja konstantnom brzinom, brzina dodavanja prihrane se temelji na procijenjenim potrebama mikroorganizma za hranom te se brzina ni koncentracija supstrata u podlozi ne mijenjaju. Prihranjivanje prema koncentraciji otopljenog kisika koristi izmjerenu koncentraciju otopljenog kisika kao signal za dodavanje hranjiva. Tijekom razgradnje supstrata i rasta mikroorganizmi troše kisik i koncentracija otopljenog kisika u podlozi opada, kada ponestane supstrata koncentracija otopljenog kisika postepeno raste i kada prijeđe određenu vrijednost započinje nanovo prihrana. Od četiri testirane metode prihranjivanja najbolji rezultati su postignuti provođenjem povratne veze temeljene na trenutnoj koncentraciji izvora ugljika tj. glukoze u podlozi prije dodatka hranjiva. Kada senzor detektira da koncentracija glukoze pala ispod prethodno određene granice, sustav automatski dodaje prihranu što omogućuje održavanje optimalne koncentracije glukoze u hranjivom mediju.

Opetovani šaržni uzgoj (engl. *repeated-batch process*), koji se provodi zamjenom 90 % (vol/vol) dijela prevrele hranjive podloge sa svježim medijem pri čemu 10 % (vol/vol) služi kao inokulum za idući ciklusa uzgoja, učinkovita je strategija za povećanje proizvodnje DHA pomoću traustohitrida *Schizochytrium* sp. (Qu i sur., 2013). Ovaj način uzgoja smanjuje vrijeme potrebno za pripremu kulture, inokulaciju, čišćenje i sterilizaciju fermentora između fermentacijskih ciklusa.

Kod oleaginoznih mikroorganizama proces uzgoja i proizvodnje najčešće se provodi u dvije faze. U prvoj fazi se odvija rast stanica, a u drugoj fazi akumulacija lipida. Stresni uvjeti za stanicu dovode do veće akumulacije lipida, u slučaju oleaginoznih mikroorganizama to je najčešće limitacija dušikom (Jiang i sur., 2017). Mikroorganizam nastavlja trošiti izvor ugljika, ali je proces sinteze proteina usporen ili zaustavljen pa stanice skladište energiju u obliku lipida unutar stanice. Potrebno je naglasiti da prinos biomase i sinteza lipida nisu linearno ovisni o koncentraciji izvora dušika (Jiang i sur., 2017).

Dvostupanjski procesi s različitim kontrolnim parametrima koriste se u bioprocima kako bi se optimizirala proizvodnja specifičnih metabolita, kao što su lipidi bogati DHA. Svaki od ovih procesa temelji se na podešavanju ključnih uvjeta za rast stanica i nakupljanje željenih

proizvoda u različitim fazama fermentacije. Najučestaliji procesi su dvostupanjski proces s kontrolom temperature, dvostupanjski proces s kontrolom koncentracije otopljenog kisika, dvostupanjski proces s kontrolom osmotskog tlaka (Zeng i sur. 2011, Guo i sur. 2018 i Hu i sur. 2015).

Iz tablice je vidljivo da su najbolji rezultati dobiveni u dvostupanjskim procesima s kontrolom temperature i koncentracije otopljenog kisika te su prinosi biomase i DHA iznosili 84,40 g/L i 4,00 g/L za procese s kontrolom temperature, a prinos biomase za proces s kontrolom otopljenog kisika je iznosio 151,00 g/L. Ovako visoki prinosi biomase su omogućavaju industrijsku primjenu traustohitrida *Schizochytrium* sp. za proizvodnju lipida i DHA. Provedbom dvostupanjskih procesa s kontrolom osmotskog tlaka nisu postignuti zadovoljavajući rezultati, iako postoji teoretska osnova potrebno je provesti dodatnu optimizaciju uzgoja.

Tablica 1. Usporedba različitih vrsta uzgoja *Schizochytrium* sp.

| Vrsta procesa | Ispitivano | Rezultati * | Izvor |
|--|--|---|------------------|
| Šaržni uzgoj | optimalna konc. glukoze za proizvodnju DHA = 100 g/L | X=52,55 g/L L=22,40 g/L P=8,84 g/L | Qu i sur., 2013 |
| Polukontinuirani uzgoj | Feed-back strategija dokazana najboljom | X= 72,37 g/L L=48,86 g/L P=18,38 g/L | Qu i sur., 2013 |
| Opetovani šaržni uzgoj s izmjenom hranjive podloge | Zamjena 90 % podloge svježom podlogom nakon 96 h | X= 60,85 g/L L= 30,67 g/L P=11,28 g/L | Qu i sur., 2013 |
| Dvostupanjski proces s kontrolom temperature | 1 stupanj: 30 °C na 32 h 2 stupanj: 20 °C na 12 h | X=84,4 g/L L=13,42 g/L P=4,00 g/L | Zeng i sur. 2011 |
| Dvostupanjski proces s kontrolom koncentracije otopljenog kisika | Lopaticice od porozne membrane od nehrđajućeg čelika | X= 151,0 g/L P= 44,3 g/L | Guo i sur. 2018 |
| Dvostupanjski proces s kontrolom osmotskog tlaka | Osmotski tlak 811,76 mosm/L | X= 33,03 g/L P= 18,10 g/L | Hu i sur. 2015 |

* (X- konc. suhe tvari biomase, L- konc. lipida, P- konc. DHA)

2.6. BIOSINTEZA MASNIH KISELINA U *SCHIZOCHYTRIUM* SP.

Traustohitridi sintetiziraju masne kiseline na multienzimskom kompleksu sintaza masnih kiselina ili FAS (engl. *fatty acid synthase*) koji sadrži više katalitički aktivnih mjesta povezanih katalitički neaktivnim regijama. Osim toga, posjeduju desaturaze i elongaze, koje omogućuju sintezu niskih koncentracija C16:1, C18:1, C18:2, arahidonske kiseline (ARA), EPA i drugih nezasićenih masnih kiselina (Aasen i sur., 2016).

Uz ovaj put sinteze kojim nastaju najvećim dijelom masne kiseline duljine lanca C14:0 i C16:0 ovi mikroorganizmi imaju alternativni put poliketid sintaze (engl. *polyketide synthase*, PKS) koji omogućava nakupljanje DHA. Iako je to potvrđeno kod samo nekoliko sojeva, pretpostavlja se da svi sojevi koji proizvode visoke količine DHA koriste PKS put kao glavni mehanizam za njezinu sintezu. U ovom putu DHA nastaje sukcesivnim produžavanjem lanaca uz malonil-CoA, slično postupcima koje provodi FAS put, no bez uklanjanja dvostruke veze koja se uvodi pomoću malonil-CoA u većini ciklusa. Ova prilagodba omogućava uštedu NADPH (redukcijske snage) i uklanja potrebu za molekularnim kisikom i NADPH (Aasen i sur., 2016).

2.6.1. Put sintaze masnih kiselina (FAS)

Glukoza, se glikolizom prevodi u acetil-CoA. Limitacija izvorom dušika tijekom uzgoja ima za posljedicu smanjuje koncentracije AMP-a i smanjene aktivnosti AMP-ovisne izocitrat dehidrogenaze, enzima citratnog ciklusa, što dovodi do akumulacije citrata koji se transportira u citosol. Citrat liaza cijepa citrat na oksaloacetat i acetil-CoA. Oksaloacetat se u sprezi s maličnim enzimom i piruvat-karboksilazom pretvara u piruvat uz oslobađanje NADPH (Qiu, 2003).

NADPH potreban za sintezu masnih kiselina nastaje u putu pentozna fosfata. Sintaza masnih kiselina je kompleks enzima koji katalizira sve reakcije potrebne za sintezu masnih kiselina. Sintezu provodi acilni nosač (ACP) na kojeg je vezan CoA. Djelovanjem enzima acetil-CoA karboksilaze iz acetil-CoA i HCO_3^- uz utrošak ATP-a nastaje malonil-CoA. Enzim β -keto-sintaza katalizira kondenzaciju acetil-CoA i malonil-CoA kako bi nastao acetoacetyl-ACP (Qiu, 2003).

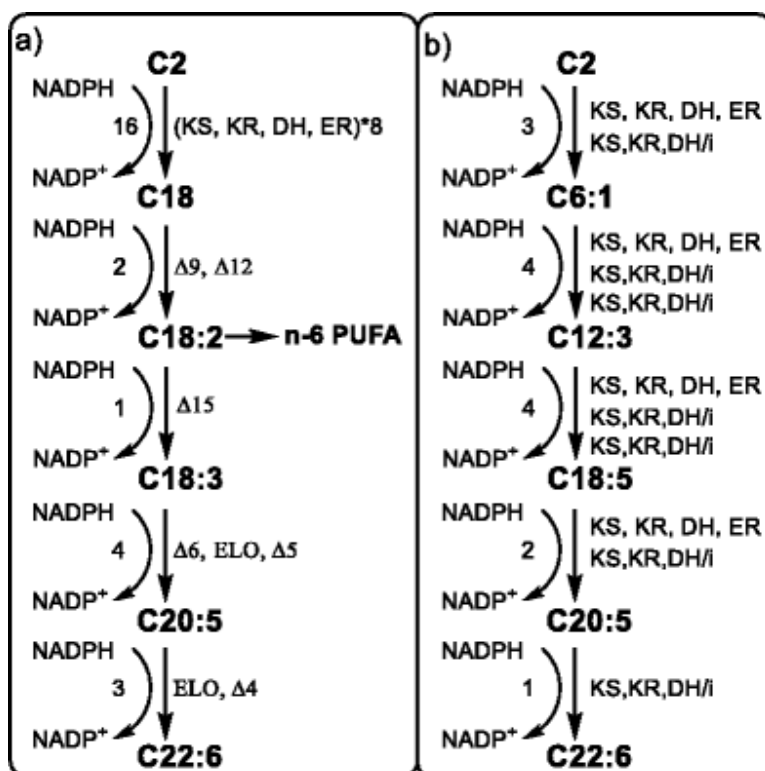
Reakcijama redukcije, dehidratacije i ponovne redukcije keto-skupina na 3-C atomu se pretvara u metilensku i nastaje butiril-ACP. Sinteza se nastavlja kondenzacijom malonil-CoA sa novonastalim butiril-ACP te se ponavlja redukcija, dehidratacija i redukcija i tako sve do palmitata (Qiu, 2003). Daljnje modifikacije masnih kiselina, uključujući produljenje lanca i uvođenje nezasićenih veza, odvijaju se u endoplazmatskom retikulumu (ER). Reakcije elongacije kataliziraju elongaze, poput malonil-palmitoil transacilaze. Uvođenje nezasićenih veza u lanac kataliziraju ER oksidaze, tj. hidrofobni membranski proteini (Lisičar, 2013).

Dulje masne kiseline sintetiziraju enzimi endoplazmatskog retikuluma produljuju palmitat dodavajući jedinice od dva ugljika. Ovaj put zahtjeva prisutnost kisika pa se naziva i aerobni put sinteze masnih kiselina. FAS put može proizvesti jednostavne masne kiseline koje zatim prolaze kroz dodatne modifikacije (desaturacija i elongacija) kako bi se dobila DHA (Qiu, 2003).

2.6.2. Put poliketid sintaze (PKS)

Put poliketidne sintaze (engl. *polyketide synthase*, PKS) koji se još naziva i anaerobni put nalazi se kod bakterija i nekih eukariota poput traustohitrida *Schizochytrium*. Put poliketidne sintaze se razlikuje od FAS puta jer ne zahtjeva prisustvo kisika za uvođenje dvostrukih veza. Poliketidi su sekundarni metaboliti koji sadrže više blokova keto grupa (-CH₂-CO-). U PKS putu DHA se sintetizira sukcesivnim koracima elongacije s malonil-CoA, slično kao kod FAS puta, ali bez uklanjanja dvostruke veze uvedene iz malonil-CoA u većini ciklusa, čime se štedi redukcijska snaga (NADPH) i uklanja potreba za molekularnim kisikom i NADPH koje zahtijevaju desaturaze (Qiu, 2003). Ovaj put je sličan FAS putu, ali poliketid sintaza često preskače dehidrataciju i redukciju, te ovako nastale masne kiseline variraju po svojoj strukturi i sadržavaju keto i hidroksile grupe te dvostruke veze (Qiu, 2003).

Skraćeni shematski prikaz oba puta je prikazan na slici 3. Sojevi sa visokom koncentracijom DHA koriste PKS put kao glavni put sinteze DHA. Na slici 3. je vidljivo da FAS put koristi značajno više energije pohranjene u NADPH molekulama što ga čini energetski nepovoljnijim putem, dok PKS put za sintezu DHA zahtjeva velik broj enzima. Ključni enzimi u sintezi lipida, odgovorni za njihovo nakupljanje su izocitrat dehidrogenaza, citrat liaza i malični enzim (Qiu, 2003).



Slika 3: Alternativni biokemijski putevi proizvodnje DHA; a) Put sinteze masnih kiselina b) Put poliketid sintaze (Aasen i sur., 2016)

KS- ketoacil sintaza; KR- ketoreduktaza; DH- dehidrogenaza; DH/I- bifunkcionalna dehidrataza i trans-cis izomeraza; ER- enoil reduktara; Δ – desaturaze; ELO- elongaze

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizam

Radni mikroorganizam korišten u ovom radu je traustohitrid *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 iz američke zbirke mikroorganizama (engl. *American Type Culture Collection* (ATCC, Sjedinjene Američke Države)).

3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

Za provedbu eksperimenata ovog rada korištene su različite hranjive podloge na bazi glukoze, sirutke, glicerola i jestivog ulja. Sve sirovine korištene za pripremu hranjivih podloga navedene su u tablici 2.

Tablica 2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

| Sastojak | Oznaka čistoće | Proizvođač |
|-------------------------------|----------------------|--------------------------|
| Kvašćev ekstrakt | Za mikrobiologiju | Biolife, Italija |
| Natrijev glutamat | p.a. | Sigma-Aldrich, Švicarska |
| Morska sol | Tehnička čistoća | Solana Nin, Hrvatska |
| Amonijev sulfat | p.a. | Gram-Mol, Hrvatska |
| Pepton | Za biotehnologiju | Sigma-Aldrich, Švicarska |
| Magnezijev sulfat heptahidrat | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| Kalijev dihidrogenfosfat | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| Glukoza | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| Sirutka | Za prehrambene svrhe | Veronika, Hrvatska |
| Glicerol | ≥ 99 % | Fisher chemical, Kanada |
| Jestivo ulje | Za prehrambene svrhe | Zvijezda, Hrvatska |
| Tiamin | ≥ 98,5 % | Sigma-Aldrich, Švicarska |
| Biotin | ≥ 98,5 % | Kemika, Hrvatska |
| Cijanokobalamin | ≥ 98,5 % | Sigma-Aldrich, Švicarska |

3.1.3. Ostale kemikalije

U eksperimentalnom radu su osim sirovina navedenih u tablici 2. korištene i kemikalije navedene u tablici 3.

Tablica 3. Ostale kemikalije korištene tijekom eksperimentalnog rada

| Naziv kemikalije | Oznaka čistoće | Proizvođač |
|--------------------|----------------|-----------------------|
| Sumporna kiselina | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| Natrijev hidroksid | p.a. | Merck K GaA, Njemačka |

Tablica 3. Ostale kemikalije korištene tijekom eksperimentalnog rada - nastavak

| Naziv kemikalije | Oznaka čistoće | Proizvođač |
|-------------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| Metanol | ≥ 99.9% | Honeywell, Riedel-de Haen, Njemačka |
| Kloroform | ≥ 99.8% | Honeywell, Riedel-de Haen, Njemačka |
| n-Heksan | ≥ 97.0% | Honeywell, Riedel-de Haen, Njemačka |
| Cinkov sulfat heptahidrat | 99% | Merck KGaA, Njemačka |
| Klorovodična kiselina | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| Sukcinat | p.a. | Sigma-Aldrich, Švicarska |
| Monohidrat limunske kiseline | p.a. | Merck KGaA, Njemačka |
| Octena kiselina | p.a. | Honeywell, Riedel-de Haen, Njemačka |
| Tween 80 | p.a. | Merck, Njemačka |
| Sumporna kiselina | p.a. | Carlo Erba, Italija |
| Pentadekan | standard | Sigma-Aldrich, Švicarska |
| Metil tridekanoat | standard | Sigma-Aldrich, Švicarska |
| Etanol | p.a. | Gram-Mol, Hrvatska |

3.1.4. Hranjiva podloga korištena za uzgoj inokuluma traustohitrida

Uzgoj inokuluma traustohitrida *Schizochytrium* sp. proveden je u podlozi čiji se sastav nalazi u tablici 4. Hranjiva podloga pripravljena je otapanjem sastojaka navedenih u tablici 4. u demineraliziranoj vodi. Nakon pripreme podloge pH vrijednost je podešena na 6,5. Pripremljena podloga je nakon toga sterilizirana u autoklavu na 120 °C.

Tablica 4. Sastav hranjive podloge za uzgoj inokuluma

| Sastojak | Koncentracija (g/L) |
|--------------------------|---|
| Glukoza | 40,0 (1. i 3. uzgoj) i 30,0 (2. i 4. uzgoj) |
| Pepton | 8,0 |
| Kvašćev ekstrakt | 5,0 |
| Krupna morska sol | 25,0 |

3.1.5. Hranjive podloge za glavni uzgoj

Provedena su četiri uzgoja pri čemu je istražen učinak sastava hranjive podloge i vremena uzgoja na rast i sintezu lipida. Hranjiva podloga na bazi sirutke (1. uzgoj) sadržavala je sirutku proizvođača Mini mljekara Veronika d.o.o. volumnog udjela od 25 %, 50 % ili 100 % (vol/vol). Nadalje, istražen je učinak različitih izvora dušika (kvašćev ekstrakt, natrijev glutamat i

amonijev sulfat) te dodatak kalijevog dihidrogen fosfata na rast. Pripremljeno je petnaest podloga različitog sastava, a sve su sadržavale dodatnih 50 g/L glicerola. Ostali sastojci prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Sastav hranjivih podloga na bazi sirutke (1. uzgoj)

| Naziv uzorka | Sirutka (%) | Drugi sastojci podloge |
|--------------|-------------|---|
| 1/25/0 | 25 | 25 g/L morske soli |
| 2/50/0 | 50 | 25 g/L morske soli |
| 3/100/0 | 100 | 25 g/L morske soli |
| 4/25/KE | 25 | 2 g/L kvašćevog ekstrakta 25 g/L morske soli |
| 5/50/KE | 50 | 2 g/L kvašćevog ekstrakta 25 g/L morske soli |
| 6/100/KE | 100 | 2 g/L kvašćevog ekstrakta 25 g/L morske soli |
| 7/25/NH4 | 25 | 1 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 25 g/L morske soli |
| 8/50/NH4 | 50 | 1 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 25 g/L morske soli |
| 9/100/NH4 | 100 | 1 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 25 g/L morske soli |
| 10/25/NG | 25 | 3 g/L Na glutamat 25 g/L morske soli |
| 11/50/NG | 50 | 3 g/L Na glutamat 25 g/L morske soli |
| 12/100/NG | 100 | 3 g/L Na glutamat 25 g/L morske soli |
| 13/25/KH | 25 | 3 g/L KH ₂ PO ₄ 25 g/L morske soli |
| 14/50/KH | 50 | 3 g/L KH ₂ PO ₄ 25 g/L morske soli |
| 15/100/KH | 100 | 3 g/L KH ₂ PO ₄ 25 g/L morske soli |

Za 2. uzgoj (Hranjiva podloga na bazi sirutke – optimiranje sirutke) pripremljeno je šest hranjivih podloga na bazi glukoze, glicerola, sirutke i kombinacije sirutke i glicerola. Sastav hranjivih podloga nalazi se u tablici 6.

Nakon pripreme hranjivih podloga i sterilizacije u autoklavu sterilno je dodano 1 mL otopine vitamina po 1 L podloge. Otopina vitamina je sastava: 100 mg/L tiamin, 0,5 mg/L biotin, 0,5 mg/L cijanokobalamin.

Tablica 6. Hranjive podloge na bazi sirutke- optimiranje sirutke (2. uzgoj)

| Naziv hranjive podloge | Sastav hranjive podloge |
|------------------------|---|
| 1/GLC | 8,06 g/L glukoza, 10 g/L kvašćevog ekstrakta, 10 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli, 2 g/L MgSO ₄ x 7H ₂ O, 1 g/L KH ₂ PO ₄ + vitamini |
| 2/GLY | 12,59 g/L glicerol, 10 g/L kvašćevog ekstrakta, 10 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli, 2 g/L MgSO ₄ x 7H ₂ O, 1 g/L KH ₂ PO ₄ + vitamini |
| 3/LAC | 50 % sirutka 2,5 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli + vitamini |
| 4/LAC | 100 % sirutka 5 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli + vitamini |
| 5/LAC I GLY | 50 % sirutka 40 g/L glicerola, 7,5 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli + vitamini |
| 6/ LAC I GLY | 100 % sirutka 40 g/L glicerola, 10 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli + vitamini |

*GLC- glukoza, GLY- glicerol, LAC- laktoza

Pripremljeno je trinaest različitih hranjivih podloga za uzgoj na obogaćenoj hranjivoj podlozi i podlozi na bazi sirutke (3. uzgoj). U trećem uzgoju optimiran je sastav obogaćene hranjive podloge koja je sadržavala kvašćev ekstrakt i Na- glutamat kao izvor dušika, Mg²⁺ i izvor anorganskog fosfata. Kao izvor ugljika korištena je glukoza i glicerol u koncentracijama 40 i 80 g/L. Hranjiva podloga na bazi sirutke obogaćena je dodatkom izvora dušika (kvašćev ekstrakt i Na-glutamat). Sastavi podloga prikazani su u tablici 7. Nakon pripreme podloge vrijednost pH je podešena na 6,5.

Tablica 7. Sastav obogaćenih hranjivih podloga i podloga na bazi sirutke (3. uzgoj)

| Naziv podloge | Sastav hranjive podloge |
|------------------|--|
| 1/80GLC | 80 g/L glukoze, 10 g/L kvašćevog ekstrakta, 10 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli, 2 g/L MgSO ₄ x 7H ₂ O, 1 g/L KH ₂ PO ₄ |
| 2/40GLC | 40 g/L glukoze, 5 g/L kvašćevog ekstrakta, 5 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli, 1 g/L MgSO ₄ x 7H ₂ O, 1 g/L KH ₂ PO ₄ |
| 3/80GLY | 80 g/L glicerola, 10 g/L kvašćevog ekstrakta, 10 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli, 2 g/L MgSO ₄ x 7H ₂ O, 1 g/L KH ₂ PO ₄ |
| 4/40GLY | 40 g/l glicerola, 5 g/L kvašćevog ekstrakta, 5 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli, 1 g/L MgSO ₄ x 7H ₂ O, 1 g/L KH ₂ PO ₄ |
| 5/10SIR | 10% sirutka, 15 g/L morske soli |
| 6/25SIR | 25 % sirutka, 15 g/L morske soli |
| 7/100SIR | 100 % sirutka, 15 g/L morske soli |
| 8/10SIR | 10 % sirutka, 5 g/L kvašćevog ekstrakta, 5 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli |
| 9/25SIR | 25 % sirutka, 5 g/L kvašćevog ekstrakta, 5 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli |
| 10/100SIR | 100 % sirutka, 5 g/L kvašćevog ekstrakta, 5 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli |

Tablica 7. Sastav obogaćenih hranjivih podloga i podloga na bazi sirutke (3. uzgoj) - nastavak

| Naziv hranjive podloge | Sastav hranjive podloge |
|------------------------|--|
| 11/10SIR | 10 % sirutka, 5 g/L kvašćevog ekstrakta, 15 g/L morske soli |
| 12/25SIR | 25 % sirutka, 5 g/L kvašćevog ekstrakta, 15 g/L morske soli |
| 13/100SIR | 100 % sirutka, 5 g/L kvašćevog ekstrakta, 15 g/L morske soli |

Utjecaj različitih izvora ugljika na rast i sintezu lipida ispitan je 4. uzgojem. Istražen je rast traustohitrida na glicerolu, jestivom ulju i glukozi. Hranjiva podloga za uzgoj sadržavala je: 10 g/L kvašćevog ekstrakta, 10 g/L Na- glutamata, 15 g/L morske soli, 2 g/L $MgSO_4 \times 7H_2O$, 1 g/L KH_2PO_4 i izvor ugljika. Početna koncentracija izvora ugljika iznosila je 20, 40 i 60 g/L. U podloge sa jestivim uljem dodano je i 0,5 % Tween 80. pH vrijednost podloge podešena je na 6,0 nakon čega je sterilizirana u autoklavu. Nakon sterilizacije podloga dodana je otopina vitamina istog sastava i koncentracije kao u 3. uzgoju.

3.1.6. Oprema i aparatura

3.1.6.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

U eksperimentalnom radu, pri određivanju utroška izvora ugljika, korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju (eng. Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) model 1290 Infinity II (Agilent Technologies, SAD). Uređaj uključuje pumpu (G7104A), automatski injektor (G7167B), pećnicu (G7116B), analitičku kolonu (ionsko-izmjenjivačka kolona Rezex ROA-Organic Acid H+; Phenomenex, SAD) s pripadajućom pretkolonom, detektor indeksa loma (G7162A 1260 RID), modul za kontrolu sustava, te računalni program za obradu podataka (OpenLAB CDS).

3.1.6.2. Uređaj za plinsku kromatografiju (GC)

Za određivanje masenih kiselina u lipidima korišten je uređaj za plinsku kromatografiju GC 2010 Plus AF (Schimadzu, Japan). Uređaj 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).

3.1.6.3. Centrifuge

Pri izdvajanju biomase korištene su centrifuge Beckman J-21B (SAD), Thermo Scientific SL 8R (SAD). Za analitičke svrhe korištena je centrifuga Eppendorf 5804 R (Njemačka) za centrifugiranje uzoraka u mikroeprijetama volumena 1,5 mL ili 2 mL.

3.1.6.4. Preostala oprema i aparatura

Uz prethodno navedene uređaje korištena je i sljedeća oprema:

- (1) analitička vaga (Sartorius, Njemačka; Acculab, SAD)
- (2) tehnička vaga (Tehtnica ET-1111, Slovenija)
- (3) vodena kupelj (Sutjeska, Jugoslavija)
- (4) sušionik (Instrumentaria ST-50, Hrvatska)
- (5) laboratorijska tresilica (RM 71 B. Braun Biotech. International, Sartorius Group, Njemačka)
- (6) vortex mikser (WM-10, Witeg, Njemačka)
- (7) autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- (8) ledomat (AF-10, Scotsman, Italija)
- (9) boca plina s dušikom (Messer Croatia Plin, Hrvatska)
- (10) hladnjak i zamrzivač
- (11) UV/Vis spektrofotometar (Cary 100 UV-Vis, Agilent Technologies, SAD)
- (12) Mikroskop (CH20:Olympus, Japan)
- (13) pH metar, termometar (HI 9125; Hanna Instruments, SAD)
- (14) Pumpa (MCP V5.17; Ismatec, Švicarska)
- (15) Rotavapor

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj inokuluma traustohitrida

Inokulum traustohitrida *Schizochytrium* sp. uzgajan je na tekućoj hranjivoj podlozi čiji su sastav i priprema opisani u poglavlju 3.1.4. Hranjiva podloga korištena za uzgoj inokuluma traustohitrida. Inokulum je pripremljen precjepljivanjem traustohitrida sa čvrste hranjive podloge i postupnim povećanjem volumena kulture. Uzgoj je proveden na tresilici pri 200 rpm i sobnoj temperaturi. Te je precjepljivan svaka 3 - 4 dana.

3.2.2. Hranjiva podloga na bazi sirutke (1. uzgoj)

Pripremljeno je petnaest različitih podloga u dvije paralele. U Erlenmeyerove tikvice od 300 ml dodano je 100 mL podloge i pH vrijednost podešena na 6,5. Sastavi hranjivih podloga opisani su u poglavlju 3.1.5. Hranjive podloge za glavni uzgoj. Tako pripremljene podloge inokulirane su s 10% (vol/vol) inokuluma pripremljenog kako je opisano u poglavlju 3.2.1. Uzgoj inokuluma traustohitrida. Nakon inokulacije izuzet je nulti uzorci od 5 mL, tikvice su postavljene na rotacionu tresilicu uz 200 okretaja po minuti na 26 °C. Šaržni uzgoj je trajao 8 dana te su zadnji dan izuzeti uzorci za gravimetrijsku i UPLC analizu, 25 mL iz svake tikvice.

3.2.3. Hranjiva podloga na bazi sirutke – optimizacija podloge (2. uzgoj)

Kako bi se ispitaio utjecaj dodatka otopine vitamina na rast biomase traustohitrida pripremljeno je šest različitih podloga u tri paralele na način opisan u poglavlju 3.1.5. Hranjive podloge za glavni uzgoj. Po 200 mL hranjive podloge sterilizirano je u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL te je u svaku dodano 1 mL otopine vitamina po 1 L podloge te su inokulirane sa 10 % (vol/vol) inokuluma pripremljenog kako je opisano u poglavlju 3.2.1. Uzgoj inokuluma traustohitrida. Iz prve paralele su uzeti uzorci 1., 3. i 5. dan. Ti uzorci korišteni su za gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase. Peti dan su prve paralele skinute s tresilice, izuzet je i uzorak za određivanje koncentracije lipida te su prevrele podloge centrifugirane kako bi se izdvojila biomasa. Kulture su centrifugirane u plastičnim kivetama od 50 mL, a nakon odlijevanja supernatanta nakon centrifugiranja, u kivetu je dodana nanovo prevrela hranjiva podloga te je kiveta nanovo centrifugirana. Postupak je ponavljan za preostalu prevrelu hranjivu podlogu. Nakon što je cijela kultura centrifugirana, talog biomase je ispran deioniziranom vodom te ponovno centrifugiran. Supernatant je odliven, a biomasa zaleđena na - 20 °C. Osmi i deveti dan uzeti su uzorci iz druge paralele svih tikvica te su deveti dan skinute sve druge paralele s tresilice i ponovljen je postupak centrifugiranja prethodno opisan uz izdvajanje uzorka za određivanje koncentracije lipida. Uzorci treće paralele svih šest kultura uzeti su deseti i dvanaesti dan. Dvanaesti dan je bio zadnji dan uzgoja te je treća paralela skinuta s tresilice i ponovljen je postupak centrifugiranja uz izdvajanje biomase za određivanje koncentracije lipida. Svi uzorci su zaleđeni na - 20 °C.

3.2.4. Obogaćena hranjiva podloga na bazi sirutke (3. uzgoj)

Proveden je šaržni uzgoj traustohitrida *Schizochytrium* sp. u Erlenmeyerovim tikvicama od 300 mL, 100 mL hranjive podloge pripremljeno je kako je u poglavlju 3.1.5. Hranjive podloge za glavni uzgoj. Trinaest tikvica inokulirano je sa 10 % (vol/vol) inokuluma pripremljenog kako je opisano u poglavlju 3.2.1. Uzgoj inokuluma traustohitrida. Izuzet je 1 mL uzorka iz svake tikvice te su tikvice stavljene na rotacionu tresilicu uz 200 okretaja po minuti na 26 °C. Četiri dana nakon inokulacije sa tresilice su skinuti uzorci s manjim koncentracijama izvora ugljika, označeni sa brojevima 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12. Nakon sedam dana sa tresilice su skinute i preostale tikvice. Nakon uklanjanja prevrele podloge sa tresilice uzeti su uzorci za daljnje analize.

3.2.5. Utjecaj koncentracije izvora ugljika na rast i sintezu lipida (4. uzgoj)

Kako bi se usporedio rast traustohitrida na glukozi, glicerolu i ulju proveden je 4. šaržni uzgoj. Pripremljeno je devet različitih podloga u dvije paralele. Podloge su pripremljene prema poglavlju 3.1.5. Hranjive podloge za glavni uzgoj. Podloge se razlikuju samo prema koncentracijama i vrsti izvora ugljika. Kao izvori ugljika korišteni su glukoza, glicerol i jestivo ulje u koncentracijama od 20, 40 i 60 g/L. Uzorci podloga sa 20 g/L izvora C uzimani su odmah

nakon naciepljivanja, 1., 2., 3., 5. i 7. dan, a 5. i 7. dan su prva i druga paralela centrifugirane kako bi se izdvojila biomasa za analizu masnih kiselina. Uzorci podloga sa 40 g/L izvora C uzimani su odmah nakon naciepljivanja, 1., 3., 5., 7. i 9. dan, 7. i 9. dan su prva i druga paralela centrifugirane. Uzorci podloga sa 60 g/L izvora C uzimani su odmah nakon naciepljivanja, 1., 3., 5., 7., 8., 9. i 10. dan, 8. i 10. dan prva i druga paralela su centrifugirane.

3.2.6. Izdvajanje biomase

Izdvajanje biomase provedeno je nakon završetka uzgoja. Za sve prevrele podloge, osim podloga u kojima je glavni izvor C bilo jestivo ulje, procedura je jednaka. 40 mL prevrele hranjive podloge prenese se u plastičnu kivetu ukupnog volumena od 50 mL. Provedeno je centrifugiranje pri 4000 rpm kroz 15 min. Supernatant je odbačen, a u istu kivetu nadodano je još 40 mL podloge te je ponovljeno centrifugiranje pri istim uvjetima. Postupak je ponavljan sve dok nije obrađen ukupan volumen podloge. Talog biomase na dnu kivete ispran je sa 30 mL deionizirane vode, vorteksiran i ponovno centrifugiran. Supernatant je odbačen, a talog biomase pohranjen u škrinju na -20 °C.

Prevrele podloge koje su sadržavale jestivo ulje obrađene su pomoću heksana. U plastične kivete od 50 mL preneseno je 35 mL prevrele podloge i 10 mL heksana. Uzorak je vorteksiran i centrifugiran kroz 5 min na 4000 rpm. Supernatant je izdvojen i zaleđen na - 20 °C te korišten za daljnje analitike. U kivetu sa talogom biomase je preneseno još 35 mL uzorka i 10 mL heksana. Postupak je ponavljan dok sva podloga nije obrađena. Talog biomase na kraju je ispran vodom kako je opisano u tekstu iznad i spremljen na - 20 °C. Tijekom centrifugiranja uzorka sa heksanom izdvaja se masni sloj između podloge i heksana koji u sebi sadrži ulje i nešto biomase. Zbog nemogućnosti izdvajanja te biomase iz sloja, taj sloj je prenesen sa supernatantom.

3.2.7. Analitičke metode

3.2.7.1. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari

Određivanje koncentracije suhe tvari biomase traustohitrida provedeno je prenošenjem 5 ili 10 mL homogeniziranog uzorka prevrele podloge u plastičnu kivetu od 14 mL prethodno osušenu i izvaganu. Provedeno je centrifugiranje pri 4500 rpm kroz 10 min. Supernatant je dekantiran i pripremljen za određivanje koncentracije ugljikohidrata pomoću UPLC-a. Talog biomase ispran je sa 10 mL deionizirane vode te je ponovljeno centrifugiranje pri istim parametrima. Talog biomase je nakon ispiranja sušen u sušioniku na 70 °C do konstantne mase. Nakon hlađenja u eksikatoru kiveta sa suhom biomasom je izvagana te je suha tvar biomase izračunata prema jednadžbi 1.

$$X = \frac{m_2 - m_1}{V_p} \quad [1]$$

pri čemu je :

X- koncentracija suhe tvari biomase (g/L)

m_1 - masa prazne osušene kivete (g)

m_2 - masa kivete sa osušenom biomasom (g)

V_p - volumen uzet za analizu (L)

3.2.7.2. Određivanje udjela lipida u biomasi traustohitrida

Kako bi se odredila koncentracija lipida u biomasi, provedena je ekstrakcija lipida prema prilagođenom protokolu Schneitera i Dauma (2006). 14 mL prevrele podloge centrifugirano je 10 min na 5000 rpm. Supernatant je dekantiran, a biomasa isprana deioniziranom vodom te ponovno centrifugirana. U vlažnu biomasu dodano je 5 mL 4M HCl-a i inkubirano 10 min na 100 °C. Uzorci su ohlađeni u ledu te je provedena ekstrakcija pomoću 10 mL smjese otapala (kloroform:metanol = 2:1; vol/vol). Uzorci su vorteksirani minimalno 1 min te su ostavljeni na sobnoj temperaturi da se slojevi razdvoje. Nakon što su slojevi razdvojeni dugom čistom injekcijskom iglom izvučen je donji sloj koji je sadržavao lipide otopljene u kloroformskoj fazi. Taj sloj je prenesen u čistu prethodno izvaganu epruvetu te je kloroform uklonjen propuhivanjem s plinovitim dušikom. Ekstrahirani lipidi dodatno su osušeni u sušioniku pri 70 °C u svrhu uklanjanja eventualnih zaostalih tragova kloroformske faze te su epruvete ohlađene u eksikatoru i izvagane na analitičkoj vagi. Masena koncentracija lipida izračunata je prema jednadžbi 2, a maseni udio lipida u biomasi prema jednadžbi 3,

$$\gamma_L = \frac{m_2 - m_1}{V} [2]$$

$$w_L = \frac{\gamma_L}{X} * 100 [3]$$

Pri čemu je :

γ_L – masena koncentracija lipida (g/L)

m_2 – masa lipida i epruvete nakon sušenja (g)

m_1 – masa prazne i suhe epruvete (g)

V- uzeti volumen uzorka prevrele podloge (L)

w_L – maseni udio lipida u biomasi (%)

X- koncentracija suhe tvari biomase (g)

3.2.7.3. Određivanje sastava masnih kiselina u biomasi

Tranesterifikacija masnih kiselina provedena je prema NREL protokolu (engl. *National Renewable Energy Laboratory*, USA) za određivanje ukupnih lipida. Pripremljeni su potrebni standardi. Standard metil tridekanoata (C13:0ME), koncentracije 10 mg/mL, pripremljen je

otapanjem 100 mg metil tridekanoata u 10 mL heksana. Drugi standard priređen je vaganjem 10 mg pentadekana koji je otopljen u 1 mL heksana. Standard potom je razrijeđen s heksanom u omjeru 1:10 (100 μ L pripremljenog standarda i 900 μ L heksana). Otopine standarda su čuvane u zamrzivaču pri -20 °C u staklenim vijalama volumena 1,5 mL. U staklene vijale je izvagano 5-10 mg osušene i usitnjene biomase traustohitrida te je biomasi dodano 20 μ L standarda metil tridekanoata, 200 μ L otopine kloroform:metanol (2:1, v/v) i 300 μ L 0,6 M otopine HCl u metanolu. Staklene vijale su začepljene te su potom dobro promiješane. Nakon jednog sata inkubacije vodenoj kupelji pri 85 °C vijale su ohlađene na sobnu temperaturu te je dodano po 1 mL heksana, uzorak je dobro promiješan na vibro mikseru. Nakon jednog sata faze su se razdijelile. Gornja, heksanska faza, sadržavala je estere masnih kiselina te je korištena za daljnju analizu. U vijalicu se dodano je 400 μ L gornje faze i 10 μ L standarda pentadekana. Uzorci su analizirani plinskim kromatografom opremljenim masenim detektorom (engl. *Flame Ionization Detector*, FID). Helij je korišten kao plin nositelj. Temperature injektora i detektora bile su 250 i 260 °C. Analiza je provedena prema sljedećem temperaturnom režimu: 100 °C tijekom 2 minute, zatim je temperatura povećana s 100 °C na 140 °C brzinom od 3 °C/min, te s 140 °C na 190 °C brzinom od 3 °C/min, pa do 260 °C brzinom od 30 °C/min, s zadržavanjem na toj temperaturi tijekom 2 minute. Za kontrolu instrumenta, prikupljanje podataka i analizu podataka korišten je Shimadzu LabStation Software. Identifikacija masnih kiselina u uzorcima provedena je usporedbom vremena zadržavanja njihovih metilnih estera s vremenima zadržavanja metilnih estera standardne smjese 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 - C24) analiziranih u istim uvjetima. Dobivene koncentracije metilnih estera masnih kiselina normalizirane su prema količini standarda C13:0 ME i izražene masenim udjelom u suhoj tvari biomase prema jednadžbi 5:

$$m_{c13norm} = \frac{\gamma_{ci}}{\gamma_{c13}} \cdot m_{c13} \quad [4]$$

$$W_{ci/s.tv} = \frac{m_{c13norm}}{m_{5.tv}} \cdot 100 \quad (\%) \quad [5]$$

pri čemu je:

$m_{c13norm}$ – masa standarda C13:0ME (mg)

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

γ_{c13} – koncentracija standarda metil tridekanoata (C13) (mg/L)

m_{c13} – masa dodanog standarda metil tridekanoata (C13) (mg)

$W_{ci/s.tv}$ – maseni udio metilnih estera masnih kiselina u suhoj tvari biomase (%)

$m_{5.tv}$ – masa suhe tvari biomase (g)

3.2.7.4. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC analiza)

Identifikacija i kvantifikacija ugljikohidrata te mliječne kiseline u hranjivim podlogama i

supernatantima prevrelih podloga provedena je tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti.

Supernatanti su tretirani cinkovim (II) sulfatom kako bi se istaložili proteini. U 750 µL supernatanta dodano je 750 µL 10 %-tne otopine cinkovog (II) sulfata, sadržaj je vorteksiran i ostavljen na mirovanju 15 minuta. Nakon toga je provedeno centrifugiranje na 10 000 rpm 10 minuta kako bi se proteini istaložili te je za analizu izdvojen supernatant.

Svi uzorci profiltrirani su kroz najlonski filter veličine pora 0,2 nm u vijale za UPLC analizu. Na kromatografsku kolonu injektirano je 10 µL pojedinog uzorka. Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline. Brzina mobilne faze iznosila je 0,6 mL/min, 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 (x) (tablica 8).

Tablica 8. Retencijska vremena i jednadžbe baždarnih pravaca komponenti određenih u supernatantima prevrelih hranjivih podloga

| Spoj | Retencijsko vrijeme (min) | Jednadžba baždarnog pravca | R ² |
|----------|---------------------------|----------------------------|----------------|
| Glukoza | 5,228 | Y=140381,12x-157,58 | 1,000 |
| Laktoza | 4,572 | Y=136753x-1492,5 | 0,999 |
| Glicerol | 7,438 | Y=115909x+3051,8 | 0,9999 |

3.2.7.5. Određivanje koncentracije ulja u prevreloj podlozi

Kako bi se izdvojilo preostalo ulje tijekom uzgoja kulture na jestivom ulju kao izvoru ugljika, prevrela podloga se nakon uzgoja podvrgla centrifugiranju čime je izdvojena biomasa i supernatant. Neiskorišteno ulje izdvojeno je ekstrakcijom s heksadekanom. U kivetu od 50 mL preliveno je 30 mL supernatanta te je dodano 10 mL heksana. Kiveta je začepljena i vorteksirana 1 min kako bi se sadržaj dobro izmiješao. Nakon vorteksiranja kiveta je ostavljena u uspravnom položaju 20 min kako bi se slojevi supernatanta i ekstrahiranog ulja u heksanu odvojili. Kada su se slojevi heksana i supernatanta odvojili, gornji sloj heksana je pipetom izvučen iz falkonice. Tikvica s okruglim dnom je osušena i izvagana te je u nju dodan ekstrakt prevrele podloge u heksanu. Heksan je uparen pri sniženom tlaku i 50 °C pomoću rotavapora. Tikvica je nakon isparavanja ponovno osušena do konstantne mase (100 °C) i izvagana. Razlika mase tikvice nakon isparavanja heksana i čiste tikvice čini masu ulja zaostalog u supernatantu. Koncentracija ulja u prevreloj podlozi računa se prema jednadžbi 6:

$$\gamma_u = \frac{m_2 - m_1}{V} \quad [6]$$

Pri čemu je:

γ_L – masena koncentracija ulja (g/L)

m_2 – masa ulja i tikvice nakon sušenja (g)

m_1 – masa prazne i suhe tikvice (g)

V- uzeti volumen uzorka prevrele podloge (L)

3.2.8. Određivanje pokazatelja uspješnosti procesa

Parametri uspješnosti bioprocesa određeni su prema jednadžbama (7, 8, 9 i 10) :

Prinos biomase:

$$y_x = X - X_0 \quad [7]$$

gdje je:

Y_x - prinos biomase (g/L);

X-koncentracija biomase na kraju uzgoja (g/L);

X_0 - početna koncentracija biomase (g/L).

Specifična brzina rasta:

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \cdot \ln \frac{X}{X_0} \quad [8]$$

gdje je:

μ - specifična brzina rasta (1/h);

X- koncentracija biomase u vremenu t_n (g/L);

X_0 - početna koncentracija biomase (g/L);

Δt - interval vremena ($t_n - t_0$).

Produktivnost sinteze biomase:

$$P_{r_x} = \frac{X}{tu} \quad [9]$$

gdje je:

P_{r_x} - produktivnost sinteze biomase (g/L dan)

X- koncentracija biomase u vremenu t (g/L)

tu- trajanje uzgoja (dan).

Koeficijent konverzije supstrata u biomasu:

$$y_{x/s} = \frac{X-X_0}{S_0-S} \quad [10]$$

gdje je:

$y_{x/s}$ - koeficijent konverzije supstrata u biomasu (g/L)

X_0 - početna koncentracija biomase (g/L)

X - koncentracija biomase na kraju uzgoja (g/L)

S_0 - početna koncentracija supstrata (g/L)

S - koncentracija supstrata na kraju uzgoja (g/L).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu istražena je mogućnost primjene jeftinih izvora ugljika za rast i sintezu lipida s traustohitridom *Schizochytrium* sp. Nusproizvodi prehrambene industrije i industrije biogoriva, sirutka, otpadni glicerol i ulja, pokazali su se kao pogodni izvori ugljika za rast mnogih mikroorganizama. Neki oleaginozni mikroorganizmi mogu koristiti hidrofobne supstrate kao što su ulja i masti za rast i sintezu lipida pregrađujući masne kiseline u one za njih karakteristične. Najčešće korišteni hidrofobni supstrati su otpadna ulja nastala u procesima pripreme hrane i otpadne životinjske masti (Vyas i sur., 2023). Glicerol koji nastaje kao nusproizvod u procesu proizvodnje biodizela također se pokazao kao pogodan izvor ugljika za rast oleaginoznih mikroorganizama i sintezu lipida. U procesu proizvodnje biodizela nastaju značajne količine otpadnog glicerola. Sirutka, nusproizvod u proizvodnji sira, može poslužiti kao alternativni izvori ugljika, dušika i faktora rasta za rast, sintezu lipida i ostalih visokovrijednih proizvoda s pomoću mikroorganizma *Schizochytrium* sp. Primjena ovih alternativnih supstrata omogućila bi smanjenje troškova proizvodnje i smanjenje otpada. Sposobnost mikroorganizma da raste na odabranom izvoru ugljika ovisi o fiziološkim karakteristikama samog mikroorganizma. Osim izvora ugljika, otpadne sirovine često sadrže i druge tvari koje mogu inhibirati rast mikroorganizma te ih je prije primjene potrebno predobraditi kako bi se uklonile ili kako bi se njihova koncentracija smanjila te time omogućio rast mikroorganizma na podlozi.

U ovom radu korištena je sirutka, koja osim izdvajanja dijela proteina nije bila dodatno predobrađena te je korištena u različitim volumnim udjelima za pripremu hranjivih podloga. Koncentracija laktoze u sirutci je iznosila oko 40 g/L. Da bi mikroorganizam mogao rasti na laktozi mora imati enzim β -galaktozidazu (poznatu i kao laktaza) kako bi razgradio laktozu na njene osnovne šećere, glukozu i galaktozu. Osim laktoze sirutka sadrži i značajne koncentracije proteina, mliječne kiseline i anorganskih soli, a njen sastav ovisi o procesu u kojem ovaj nusproizvod nastaje. Osim sirutke istražen je rast na glicerolu. Glicerol se razgrađuje u glikolizi preko dihidroksiaceton fosfata (DHAP) te koristiti u sintezi lipida (lipogeneza). Iz tog razloga je zanimljiv kao supstrat za uzgoj traustohitrida i sintezu masnih kiselina. Uz glicerol, istražen je rast na jestivom ulju kao zamjena za otpadno ulje iz prehrambene industrije i ugostiteljstva. Jestivo ulje se sastoji uglavnom od triglicerida čijom razgradnjom nastaju glicerol i masne kiseline. Glicerol se razgrađuje u metaboličkim putevima koji su već navedeni u tekstu više, a masne kiseline se β -oksidacijom razgrađuju do acetyl-CoA koji se dalje može koristiti za dobivanje energije ili biosintezu lipida. Mikroorganizam je također uzgajan na glukozu kao uobičajenom izvoru ugljika te je korištena za rast kontrolne kulture u svrhu usporedbe rasta na različitim hranjivim podlogama.

4.1. PRINOS BIOMASE TRAUSTOHITRIDA *SCHIZOCHYTRIUM* SP. UZGOJENOG NA PODLOGAMA RAZLIČITIH SASTAVA

Prvi dio eksperimentalnog rada temelji se na četiri odvojena uzgoja mikroorganizma *Schizochytrium* sp. nakon kojih je biomasa centrifugirana i odvojena od supernatanta. Provedene su analize biomase i supernatanta. Sastav hranjivih podloga korištenih u ovom radu prikazan je u poglavlju 3.1.5. Hranjive podloge za glavni uzgoj, a njihova priprema opisana je u poglavlju 3.2. METODE.

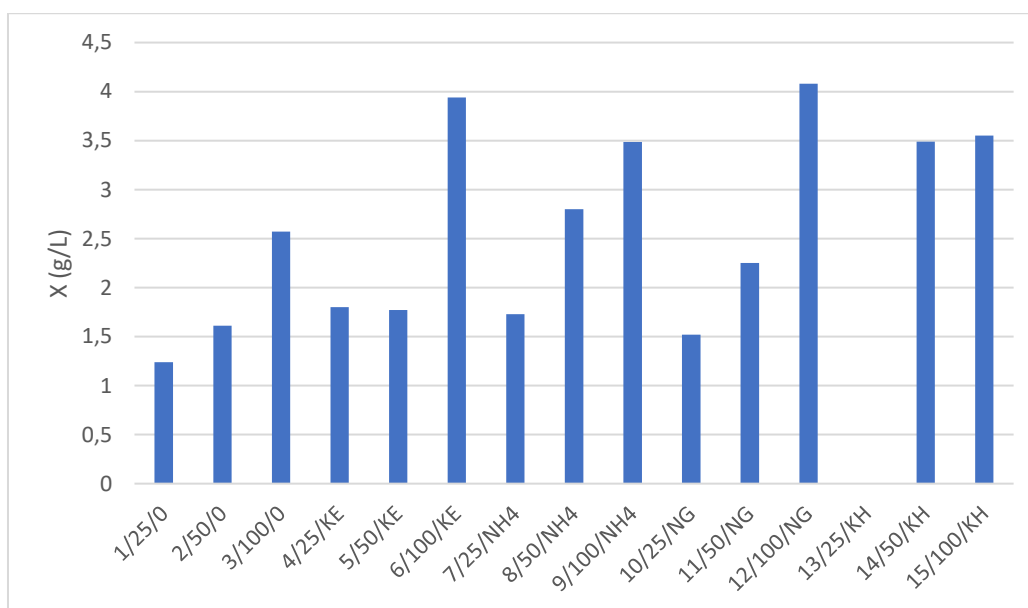
4.1.1. Hranjiva podloga na bazi sirutke (1. uzgoj)

Za prvi uzgoj korištena je hranjiva podloga na bazi sirutke uz dodatak 50 g/L glicerola. Preliminarnim uzgojem traustohitrida *Schizochytrium* sp. na laktozi iz sirutke izmjeren je spor rast mikroorganizma uz vrlo niske prinose biomase stoga je u hranjive podloge prvog uzgoja dodan dodatan izvor ugljika, glicerol. Sirutka kao nusproizvod prehrambene industrije sadrži oko 40 g/L laktoze. Iako genom traustohitrida *Schizochytrium* sp. sadrži gene koji kodiraju za enzime potrebne za metabolizam laktoze, učinkovitost uzgoja na sirutci ovisi o optimizaciji uvjeta rasta, kao što su dodatak drugih hranjivih tvari, pH podloge i koncentraciji otopljenog kisika (Patel i sur., 2020).

U prvom eksperimentu istražen je rast mikroorganizma na hranjivoj podlozi na bazi sirutke bez i uz dodatak ostalih hranjivih sastojaka koji bi mogli imati povoljan učinak na rast i sintezu masnih kiselina: različiti izvori dušika (kvašćev ekstrakt - KE, natrijev glutamat - NG i amonijevog sulfata - NH) i izvor fosfata (kalijev dihidrogen fosfat - KH). Volumni udjeli sirutke iznosili su 25 %, 50 % i 100 % (vol/vol). Izvor dušika ima važnu ulogu u rastu mikroorganizma, ali i prinosu lipida i udjelu DHA u ukupnim masnim kiselinama (Jiang i sur., 2017). Kvašćev ekstrakt osim izvora dušika sadrži i faktore rasta, ali često predstavlja jedan od skupljih sastojaka podloge. Kako bi se optimizirao proces i smanjila cijena same hranjive podloge istraženi su i drugi izvori dušika. Dodatak natrijevog glutamata ubrzava potrošnju supstrata, ali inhibira nakupljanje lipida, dok amonijev sulfat povećava prinos lipida i DHA, ali negativno utječe na rast traustohitrida (Jiang i sur., 2017).

Na slici 4. prikazan je rast mikroorganizma, tj. koncentracije suhe tvari biomase (X). Iz rezultata je vidljivo da je su najveće vrijednosti koncentracije postignute na hranjivim podlogama s čistom sirutkom uz dodatak kvašćevog ekstrakta (6/100/KE) i Na-glutamata (12/100/NG). Koncentracije suhe tvari biomase na kraju uzgoja iznosile su 3,94 i 4,08 g/L. Nešto niže vrijednosti koncentracije biomase određene su na kraju uzgoja na hranjivim podlogama s 50 % i 100 % (vol/vol) sirutke uz dodatak kalijevog dihidrogen fosfata (14/50/KH i 15/100/KH) te na hranjivoj podlozi sa 100 % (vol/vol) sirutke uz dodatak amonijevog sulfata - NH (9/100/NH₄). U odnosu na hranjivu podlogu koja je isključivo sadržavala sirutku i glicerol

(25 % (vol/vol) sirutka - 1/25/0, 50 % (vol/vol) sirutka - 2/50/0, 100 % (vol/vol) sirutka - 3/100/0) u svim drugim podlogama došlo je do povećanja prirasta biomase iz čega možemo zaključiti da su svi ispitani izvori dušika pozitivno utjecali na rast traustohitrida *Schizochytrium* sp. Natrijev glutamat pokazao se kao najpogodniji izvor dušika za rast na hranjivoj podlozi na bazi sirutke. Slično su zamijetili u svom istraživanju Jiang i sur. (2017) gdje je zabilježena najveća koncentracija biomase u uzorku s dodanih 10 g/L natrijeva glutamata i iznosila je 28,51 g/L, nakon 4 dana uzgoja na 80 g/L glukoze kao glavnom izvoru ugljika. U istom istraživanju utvrđeno je da je najveća koncentracija lipida u biomasi, postignuta uz dodatak kvašćevog ekstrakta kao jedinog izvora dušika, a iznosila je 12,10 g/L. Pri dodatku dušika u obliku amonijeva sulfata u navedenom radu zabilježena je koncentracija biomase od 34,84 g/L, ali je zabilježena značajno niža koncentracija lipida od 3,53 g/L.



Slika 4. Koncentracija biomase na kraju prvog uzgoja

(25 % (vol/vol) sirutke (1/25/0), 50 % (vol/vol) sirutke (2/50/0), 100% (vol/vol) sirutke (3/100/0), 25 % (vol/vol) sirutke i kvašćev ekstrakt (4/25/KE), 50 % (vol/vol) sirutke i kvašćev ekstrakt (5/50/KE), 100% (vol/vol) sirutke (6/100/KE), 25 % (vol/vol) sirutke i amonijev sulfat (7/25/NH₄), 50 % (vol/vol) sirutke i amonijev sulfat (8/50/NH₄), 100% (vol/vol) sirutke i amonijev sulfat (9/100/NH₄), 25 % (vol/vol) sirutke i natrijev glutamat (10/25/NG), 50 % (vol/vol) sirutke i natrijev glutamat (11/50/NG), 100% (vol/vol) sirutke i natrijev glutamat (12/100/NG), 25 % (vol/vol) sirutke i kalijev dihidrogen fosfat (13/25/KH), 50 % (vol/vol) sirutke i kalijev dihidrogen fosfat (14/50/KH), 100% (vol/vol) sirutke i kalijev dihidrogen fosfat (15/100/KH))

Usporedba s istraživanjem Jianga i sur. pokazuje da, iako je najveći rast zabilježen pri korištenju istih izvora dušika, koncentracija biomase u njihovom radu značajno premašuje vrijednosti iz ovog istraživanja. Ključna razlika odnosi se na odabrani izvor ugljika – dok je u ovom radu korištena sirutka s dodatkom glicerola, Jiang i sur. koristili su glukoze, preferirani izvor ugljika za većinu mikroorganizama, koji osigurava višu specifičnu brzinu rasta. Traustohitridi mogu rasti na laktozi i glicerolu, ali su prinosi biomase niži u odnosu na glukoze. Osim laktoze sirutka korištena za pripremu podloga sadrži i mliječnu kiselinu u koncentraciji

od 5,7 g/L u 100 % sirutki. pH vrijednost hranjive podloge podešena na 6,5 i tijekom uzgoja se nije značajno mijenjala. Mliječna kiselina već pri niskim koncentracijama od 2 g/L može usporiti rast mikroorganizama poput kvasaca i bakterija, a pri višim koncentracijama i plijesni (Stanojević-Nikolić i sur., 2016; Narendranath i sur., 2001), ali njen utjecaj na rast traustohitrida još nije dovoljno istražen. Pretpostavlja se da su navedeni faktori utjecali na niži prinos biomase u ovom istraživanju.

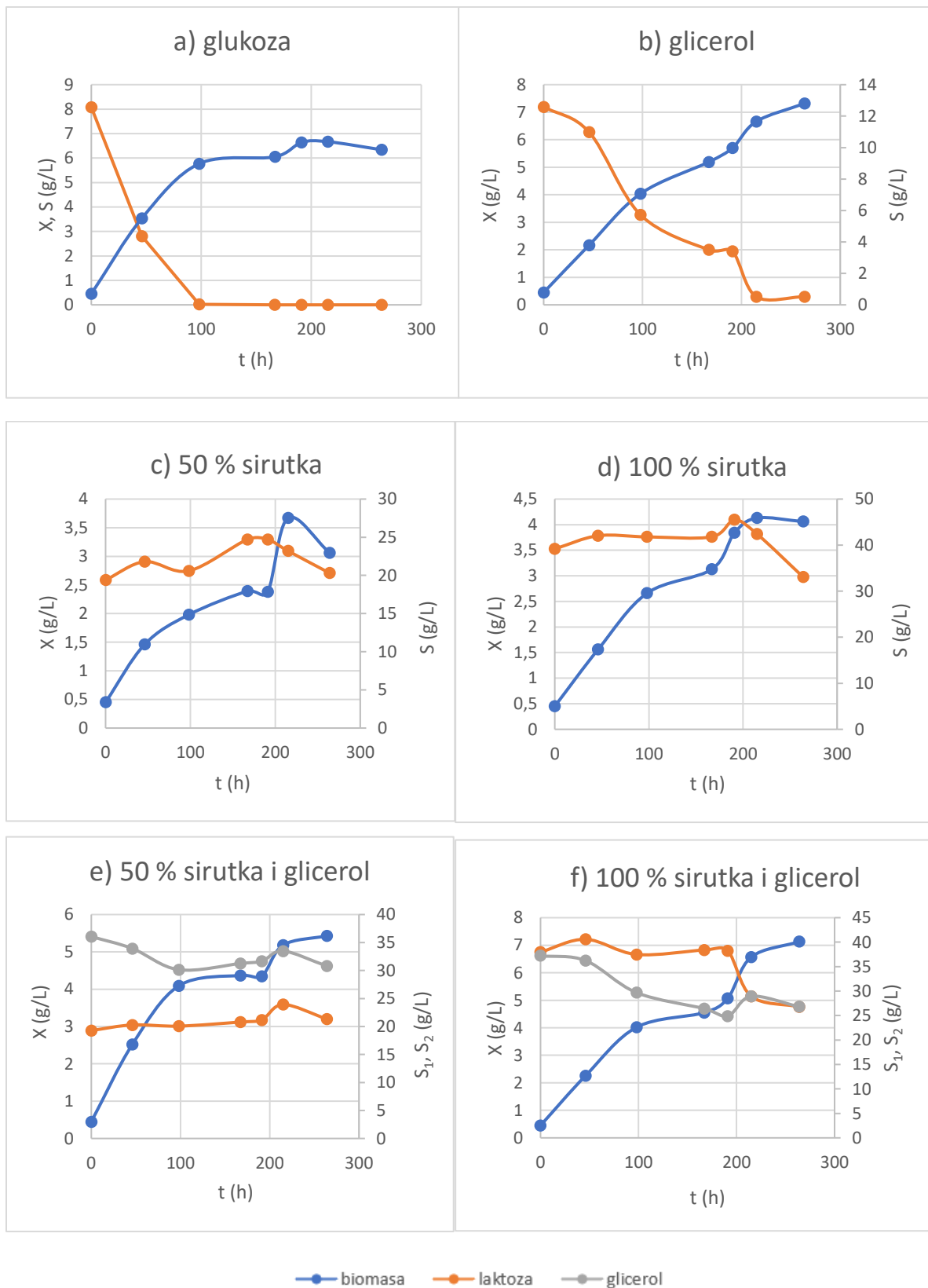
U tablici 9. prikazani pokazatelji uspješnosti procesa. Prirast biomase (Y_x) se kretao u intervalu od 0,79 do 3,63 g/L. Specifična brzina rasta traustohitrida iznosila je od 0,005 do 0,011 1/h. Produktivnost sinteze biomase bila je približno podjednaka za uzorke 9/100/NH₄, 14/50/KH i 15/100/KH i iznosila je oko 0,38 g/L dan, a najviša produktivnost je zabilježena na hranjivoj podlozi 6/100/KE za koji je iznosila 0,436 g/L dan. Najviša vrijednost koeficijenta pretvorbe supstrata u biomasu ($Y_{x/s}$) zabilježena je za uzorak 15/100/KH i iznosila je 0,296 g/g.

Tablica 9. Pokazatelji uspješnosti procesa za 1. uzgoj

| Oznaka podloge | Y_x (g/L) | μ (1/h) | Pr_x (g/L dan) | $Y_{x/s}$ (g/g) |
|-----------------------|-------------|-------------|------------------|-----------------|
| 1/25/0 | 0,79 | 0,005 | 0,099 | 0,061 |
| 2/50/0 | 1,16 | 0,007 | 0,145 | 0,067 |
| 3/100/0 | 2,12 | 0,009 | 0,265 | 0,117 |
| 4/25/KE | 1,35 | 0,007 | 0,169 | 0,086 |
| 5/50/KE | 1,32 | 0,007 | 0,165 | 0,073 |
| 6/100/KE | 3,49 | 0,011 | 0,436 | 0,164 |
| 7/25/NH ₄ | 1,28 | 0,007 | 0,160 | 0,080 |
| 8/50/NH ₄ | 2,35 | 0,010 | 0,294 | 0,129 |
| 9/100/NH ₄ | 3,04 | 0,011 | 0,380 | 0,148 |
| 10/25/NG | 1,07 | 0,006 | 0,134 | 0,081 |
| 11/50/NG | 1,80 | 0,008 | 0,225 | 0,112 |
| 12/100/NG | 3,63 | 0,011 | 0,454 | 0,228 |
| 14/50/KH | 3,04 | 0,011 | 0,380 | 0,257 |
| 15/100/KH | 3,10 | 0,011 | 0,388 | 0,296 |

4.1.2. Hranjiva podloga na bazi sirutke - optimiranje sirutke (2. uzgoj)

Kako u prvom uzgoju nisu postignuti dovoljni prinosi biomase prihvatljivi za industrijsku proizvodnju opisani u prijašnjim radovima (Jiang i sur., 2017; Qu i sur., 2013), a koji su u pravilu iznosili iznad 20 g/L, 2. uzgoj je proveden uz dodatak otopine vitamina. Dodatak vitamina u medij za kultivaciju može značajno poboljšati rast i metaboličku aktivnost mikroorganizama te omogućiti maksimalno iskorištenje supstrata. Biotin, tiamin i cijanokobalamin igraju ključne uloge u enzimatskim reakcijama koje su povezane s rastom stanica i sintezom lipida (Tani i sur., 2018; Singh i sur., 2014).



Slika 5. Uzgoj traustohitrida *Schizochytrium* sp.(2. uzgoj); koncentracija suhe tvari biomase označena je sa X, a koncentracija supstrata sa S

Podloga se sastoji od: a) 8,06 g/L glukoze, b) 12,59 g/L glicerola, c) 50 % (vol/vol) sirutke, d) 100 % (vol/vol) sirutke, e) 50 % (vol/vol) sirutke (S₁-laktoza) i 40 g/L glicerola (S₂), f) 100 % (vol/vol) sirutke (S₁-laktoza) i 40 g/L glicerola (S₂)

Na slici 5 od a do f prikazane su krivulje rasta za svih šest uzoraka. Prije same analize potrebno je prokomentirati da je zbog trajanja uzgoja od 12 dana i učinka isparavanja vode iz podloge došlo do koncentriranja podloge, a kako se radi o nižim koncentracijama utrošenog supstrata i prinosa biomase taj učinak vidljiv je i na krivuljama rasta prikazanim na slici 5 kod mjerenja odrađenih nakon 200 h uzgoja. Najveća koncentracija suhe tvari biomase izmjerena je u 2. uzorku sa 12,59 g/L glicerola kao glavnog izvora ugljika, a iznosila je 7,32 g/L.

Najveće produktivnost rasta biomase postignute su na standardnoj hranjivoj podlozi s glukozom, glicerolom, Na-glutamatom i kvašćevim ekstraktom bez dodatka sirutke. Produktivnost na hranjivoj podlozi s glukozom iznosila je 0,031 1/h, odnosno 0,032 1/h na hranjivoj podlozi s glicerolom. Produktivnost na hranjivoj podlozi koja je isključivo sadržavala sirutku u ovom uzgoju bio je nešto veći nego u prethodnom uzgoju, ali još uvijek znatno niži od produktivnosti izračunatih prilikom rasta na glukozu i glicerolu.

Za uzorke 5 i 6 (slika 5 e) i f)) koji su uz laktozu iz sirutke sadržavali i glicerol također su zabilježeni veći prirasti biomase u odnosu na prethodni uzgoj iako je početna koncentracija glicerola dodanog u podlogu bila za 10 g/L niža. Bitno je primijetiti kako je koncentracija laktoze u podlozi stagnirala kroz prvih 200 h uzgoja te nakon 200 h počinje lagano opadati, dok je koncentracija glicerola u podlozi padala simultano s rastom biomase iz čega možemo zaključiti kako *Schizochytrium* sp. preferira glicerol kao izvor ugljika u odnosu na laktozu te ga prvog troši kada se sirutka i glicerol skupa nalaze u podlozi. U radu Qu i sur. (2013) ispitane su različite vrste procesa, između kojih i šaržni uzgoj na glukozu. Rezultati su pokazali da koncentracija suhe tvari biomase raste s porastom koncentracije glukoze u intervalu glukoze od 60 do 120 g/L. Za koncentracije glukoze od 60 i 80 g/L suha tvar biomase je iznosila 36,18 i 43,08 g/L što je značajno veće od eksperimentalno dobivenih rezultata u ovom radu. Bitno je naglasiti da je eksperiment Qu i sur. proveden u bioreaktoru od 35 L, uz kontrolirano miješanje i aeraciju što je zasigurno pridonijelo poboljšanju uzgoja i visokim prinosima biomase i DHA. Za industrijsku proizvodnju biomase proizvodnog mikroorganizma ovi rezultati su i dalje nezadovoljavajući jer ovako niski prirasti biomase na sirutci nisu optimalni za izolaciju proizvoda u industrijskom mjerilu. Niski prirasti biomase značajno utječu na povećanje cijene izoliranih proizvoda zbog smanjenja proizvodne učinkovitosti, većih troškova ekstrakcije te većih kapitalnih i operativnih troškova.

U tablici 10 prikazani su pokazatelji uspješnosti procesa za drugi uzgoj. Najviša specifična brzina rasta zabilježena je kod rasta na glukozu i iznosila je 0,014 1/h, a najniža izračunata specifična brzina rasta iznosila je 0,007 1/h kod uzgoja na 50 % (vol/vol) sirutci. Specifična brzina rasta na samom glicerolu, u odnosu na brzinu rasta na glicerolu u kombinaciji sa sirutkom je viša za od 0,003 do 0,005 1/h najvjerojatnije zbog inhibicije drugim tvarima

prisutnim u sirutki kao što je mliječna kiselina i anorganskih soli.

Zbog koncentriranja prevrele podloge isparavanjem dijela vode tijekom uzgoja i vrlo malih razlika u koncentracijama biomase i supstrata na početku i kraju uzgoja ili pogreške prilikom izvođenja mjerenja $Y_{x/s}$ i Y_x za uzorke koji su sadržavali 50 % (vol/vol) sirutke i 40 g/L glicerola u podlozi imaju nerealno visoke vrijednosti i ne predstavljaju pravo stanje uspješnosti procesa za navedene podloge.

Tablica 10. Pokazatelji uspješnosti procesa za 2. uzgoj

| Sastav (koncentracije sirutke i glicerola) | Y_x (g/L) | μ (1/h) | Pr_x (g/L dan) | $Y_{x/s}$ (g/g) | $Y_{x/s}$ (g/L) |
|--|-------------|-------------|------------------|-----------------|-----------------|
| 8,06 g/L glukoza | 5,89 | 0,014 | 0,031 | 0,729 | 0,080 |
| 12,56 g/L glicerol | 6,87 | 0,013 | 0,032 | 0,546 | 0,064 |
| 50 % (vol/vol) sirutka | 2,61 | 0,007 | 0,010 | 1,752 | 0,128 |
| 100 % (vol/vol) sirutka | 3,61 | 0,008 | 0,014 | 0,402 | 0,023 |
| 50 % (vol/vol) sirutka + 40 g/L glicerol | 4,98 | 0,009 | 0,019 | 0,796 | 0,123 |
| 100 % (vol/vol) sirutka + 40 g/L glicerol | 6,68 | 0,010 | 0,025 | 0,276 | 0,038 |

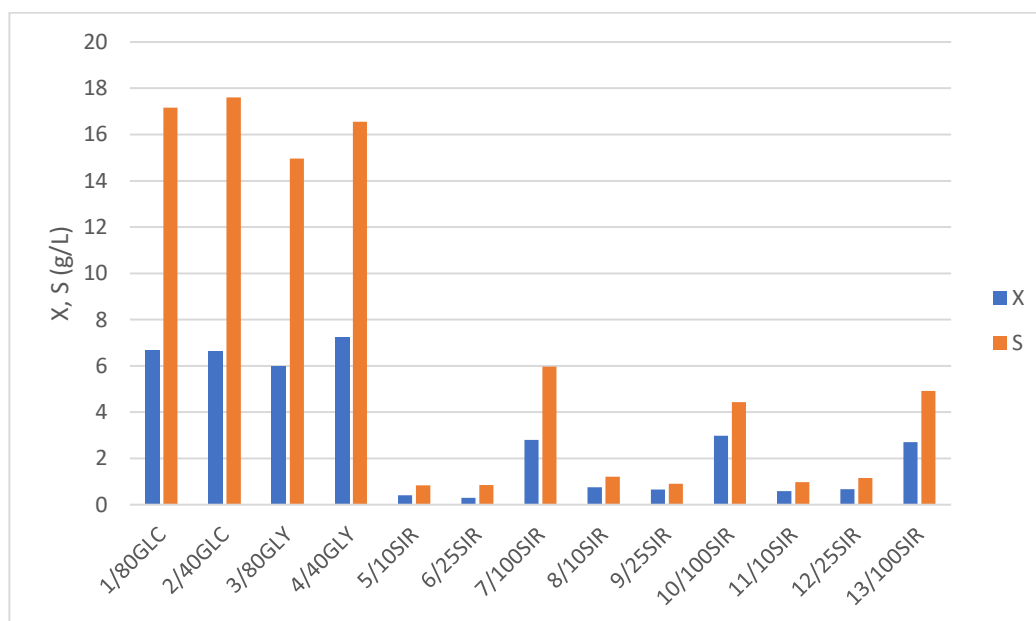
4.1.3. Obogaćena hranjiva podloga i podloga na bazi sirutke (3. uzgoj)

Priprema podloga za uzgoj 3 opisana je u poglavlju 3.2.3. Ispitivanje utjecaja različitih omjera izvora ugljika i dušika na rast (3. uzgoj). Pripremljeno je 13 različitih podloga, od kojih su prve dvije sadržavale glukozu kao izvor ugljika, 3 i 4 su sadržavale glicerol, a 5 - 13 podloge su sadržavale sirutku tj. laktozu kao izvor ugljika. Iz rezultata prikazanih na slici 6 jasno je vidljivo da je razlika u koncentraciji biomase i utrošku supstrata na kraju uzgoja između prve četiri kontrolne tikvice i ostalih devet tikvica velika.

Prinosi biomase uzgojene na glukozu i glicerolu su približno jednaki. Također je bitno naglasiti da nije zabilježena značajna razlika između koncentracije suhe tvari biomase u podlogama koje su sadržavale 80 g/L supstrata i podlogama koje su sadržavale 40 g/L supstrata do čega je najvjerojatnije došlo zbog inhibicije rasta traustohitrida visokom koncentracijom supstrata. Do inhibicije supstratom dolazi već pri koncentracijama glicerola većim od 40 g/L (Hu i sur., 2015). Visoka koncentracija dovodi do povišenja osmotskog tlaka koji rezultira transportom vode iz stanice, dehidracijom i stresom za stanicu, što otežava održavanje normalnih životnih funkcija i rast samih stanica (Mehta i sur., 2023). Visoka koncentracija glicerola također dovodi do nakupljanja metaboličkih međuprodukata, inhibicije enzima odgovornih za metabolizam glicerola i snižavanja pH zbog nakupljanja organskih kiselina što može također uzrokuje inhibiciju rasta (Mehta i sur., 2023).

U podlozi s 80 g/L glicerola naraslo je 6,00 g/L suhe tvari biomase, a u podlozi s 40 g/L glicerola uzgojeno je 7,23 g/L suhe tvari biomase što je ujedno i najviša koncentracija

biomase dobivena u 2. uzgoju. Pri izdvajanju biomase uzgojene na glicerolu došlo je do stvaranja tankog sloja biomase na površini kivete u kojoj je podloga centrifugirana. Možemo pretpostaviti da se radi o stanicama s višim udjelom lipida koje su zbog manje gustoće a izdvojile na površinu. Najveća koncentracija biomase u podlogama sa sirutkom izmjerena je za uzorak 10/100SIR i iznosila je 2,98 g/L, podlogu je osim 100 % (vol/vol) sirutke dodan kvašćev ekstrakt, natrijev glutamat i morska sol. U uzorcima sa sirutkom i morskom soli (5/10/SIR, 6/25/SIR I 7/100/SIR) zabilježene su najniže vrijednosti koncentracije biomase. Iz toga možemo zaključiti da je za viši prirast biomase osim dušika koji se nalazi u sirutci potrebno dodati dodatne izvore dušika. Dodatak dušika u obliku kvašćevog ekstrakta i natrijevog glutamata u omjeru 1:1 (10 g/L za prva četiri uzorka i 5 g/L za 8., 9. i 10. uzorak) pozitivno je utjecao na rast biomase. Ovako niska koncentracija biomase odgovara podacima iz rada Wu i sur. (2005) u kojem je izmjereni X za rast *Schizochytrium* sp. na laktozi iznosio 2,79 g/L, a na glukozu 5,51 g/L, što su nešto niže vrijednosti od izmjerenih u ovom istraživanju iz čega možemo zaključiti da *Schizochytrium* sp. preferira glukozu i glicerol u odnosu na laktozu, na kojoj sporije raste i postiže niže koncentracije suhe tvari biomase.



Slika 6. Koncentracija biomase i utrošak supstrata na kraju uzgoja na obogaćenim hranjivim podlogama (3. uzgoj)

Podloge su sadržavale: (1/80GLC)- 80 g/L glukoze u kompleksnoj podlozi, (2/40GLC)- 40 g/L glukoze u kompleksnoj podlozi, (3/80GLY)- 80 g/L glicerola u kompleksnoj podlozi, (4/40GLY)- 40 g/L glicerola u kompleksnoj podlozi, (5/10SIR)- 10 % (vol/vol) sirutke, (6/25SIR)- 25 % (vol/vol) sirutke, (7/100SIR)- 100 % (vol/vol) sirutke, (8/10SIR)- 10 % (vol/vol) sirutke, kvašćev ekstrakt i natrijev glutamat, (9/25SIR)- 25 % (vol/vol) sirutke, kvašćev ekstrakt i natrijev glutamat, (10/100SIR)- 100 % (vol/vol) sirutke, kvašćev ekstrakt i natrijev glutamat, (11/10SIR)- 10 % (vol/vol) sirutke i kvašćev ekstrakt, (12/25SIR)- 25 % (vol/vol) sirutke i kvašćev ekstrakt, (13/100SIR)- 100 % (vol/vol) sirutke i kvašćev ekstrakt.

U tablici 11 prikazani su izračunati pokazatelji uspješnosti procesa za uzgoj na obogaćenim hranjivim podlogama. Prilikom izračuna pokazatelja uspješnosti uzgoja za uzorke

5/10SIR i 6/25SIR primijećeno je da kultura nije rasla. Izmjerena koncentracija nakon 4 dana bila je približno jednaka koncentraciji biomase u podlozi nakon inokulacije. Najveća specifična brzina rasta biomase i produktivnost za biomasu zabilježena je za uzorak 4/40GLY te je iznosila 0,029 1/h i 1,695 g/L dan. Najveće brzine rasta i produktivnosti na hranjivim podlogama na bazi izmjerene su na čistoj sirutki (7/100SIR) i hranjivoj podlozi s kvašćevim ekstraktom i natrijevim glutamatom (10/100SIR), a iznosile su 0,011 1/h te 0,336 i 0,361 g/L dan. Vrijednosti koeficijenta pretvorbe supstrata u biomasu kretale su se od 0,133 g/g do 0,571 g/g, a najveći je zabilježen na hranjivoj podlozi s kvašćevim ekstraktom i natrijevim glutamatom (10/100SIR).

Tablica 11. Pokazatelji uspješnosti za rast na obogaćenim hranjivim podlogama (3. uzgoj)

| Naziv uzorka | Sastav podloge | Y_x (g/L) | μ (1/h) | Pr_x (g/L dan) | $Y_{x/s}$ (g/g) |
|--------------|---|-------------|-------------|------------------|-----------------|
| 1/80GLC | 80 g/L glukoze, kvašćev ekstrakt, Na-glutamat, morska sol, $MgSO_4 \times 7H_2O$, KH_2PO_4 | 6,22 | 0,016 | 0,889 | 0,362 |
| 2/40GLC | 40 g/L glukoze, kvašćev ekstrakt, Na-glutamat, morska sol, $MgSO_4 \times 7H_2O$, KH_2PO_4 | 6,17 | 0,016 | 0,881 | 0,350 |
| 3/80GLY | 80 g/L glicerola, kvašćev ekstrakt, Na-glutamat, morska sol, $MgSO_4 \times 7H_2O$, KH_2PO_4 | 5,55 | 0,015 | 0,793 | 0,371 |
| 4/40GLY | 40 g/L glicerola, kvašćev ekstrakt, Na-glutamat, morska sol, $MgSO_4 \times 7H_2O$, KH_2PO_4 | 6,78 | 0,029 | 1,695 | 0,410 |
| 5/10SIR | 10 % (vol/vol) sirutke | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 6/25SIR | 25 % (vol/vol) sirutke | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 7/100SIR | 100 % (vol/vol) sirutke | 2,35 | 0,011 | 0,336 | 0,394 |
| 8/10SIR | 10 % (vol/vol) sirutke, kvašćev ekstrakt i natrijev glutamat | 0,30 | 0,005 | 0,075 | 0,248 |
| 9/25SIR | 25 % (vol/vol) sirutke, kvašćev ekstrakt i natrijev glutamat | 0,21 | 0,004 | 0,053 | 0,233 |
| 10/100SIR | 100 % (vol/vol) sirutke, kvašćev ekstrakt i natrijev glutamat | 2,53 | 0,011 | 0,361 | 0,571 |
| 11/10SIR | 10 % (vol/vol) sirutke i kvašćev ekstrakt | 0,13 | 0,003 | 0,033 | 0,133 |
| 12/25SIR | 25 % (vol/vol) sirutke i kvašćev ekstrakt | 0,22 | 0,004 | 0,055 | 0,191 |
| 13/100SIR | 100 % (vol/vol) sirutke i kvašćev ekstrakt | 2,25 | 0,011 | 0,321 | 0,457 |

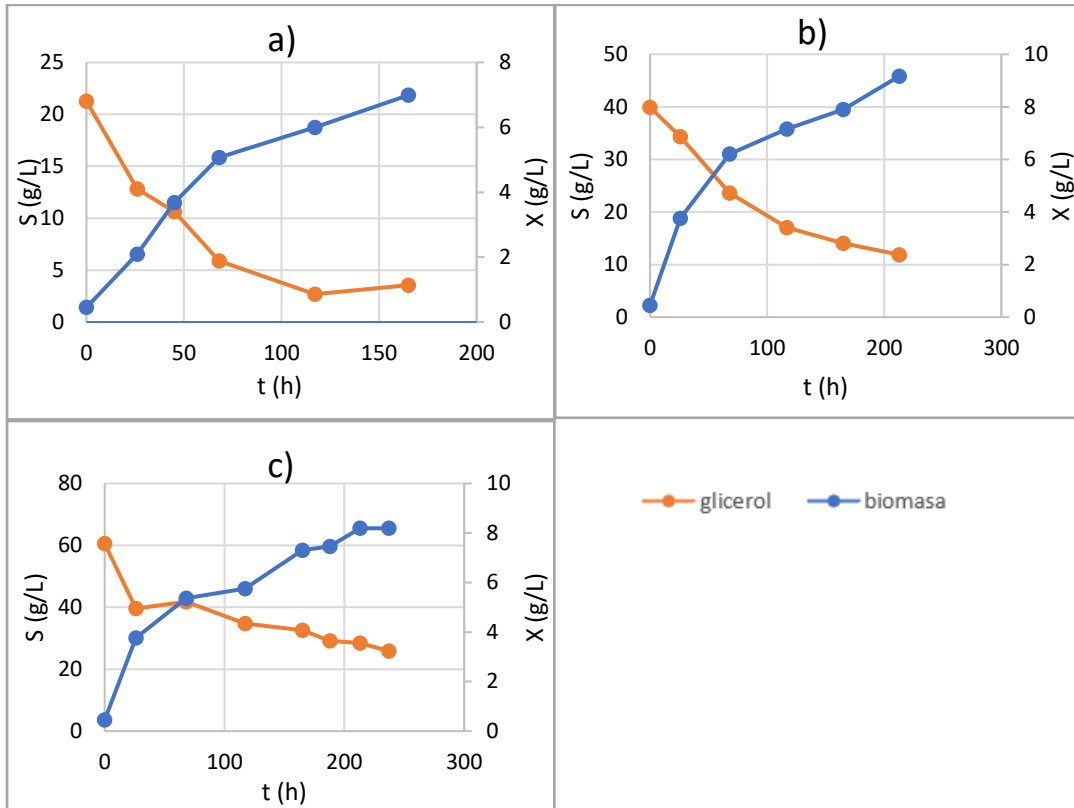
4.1.4. Utjecaj koncentracije izvora ugljika na rast i sintezu lipida (4. uzgoj)

Oleaginozni mikroorganizmi koji nakupljaju značajne količine lipida, poput *Schizochytrium* sp., mogu rasti na uljima, jer sadrže enzime za njihovu razgradnju, a ulja predstavljaju izvor ugljika u obliku triglicerida i slobodnih masnih kiselina te su pogodna za sintezu lipida jer sadrže dugolančane masne kiseline koje mikroorganizmi mogu koristiti za proizvodnju vlastitih lipida (Koreti i sur., 2022). Iako istraživanje mogućnosti rasta traustohitrida *Schizochytrium* sp. na otpadnom ulju još nije zabilježeno, istražena je mogućnost uzgoja drugih oleaginoznih mikroorganizama. Tako je u istraživanju Gao i sur. (2022) ispitan rast kvasca *Rhodospordium toruloides* na otpadnom kuhinjskom ulju te je zabilježena sinteza lipida. Iako je sam proces sinteze nešto sporiji zbog kompleksne strukture otpadnog kuhinjskog ulja i inhibitora rasta koji se u njemu nalaze dokazana je mogućnost sinteze lipida iz te otpadne sirove. Stoga je u ovom radu ispitan rast proizvodnog mikroorganizma *Schizochytrium* sp. na jestivom ulju te prinosi biomase i sastav masnih kiselina. Kao kontrolne podloge korištene su podloge sa različitim koncentracijama glukoze i glicerola kao glavnih izvora ugljika. Rast traustohitrida *Schizochytrium* sp. je dokazan na ova dva supstrata i prema literaturnim navodima iz teorijskog dijela rada izmjereni su visoki prinosi kako biomase tako i DHA.

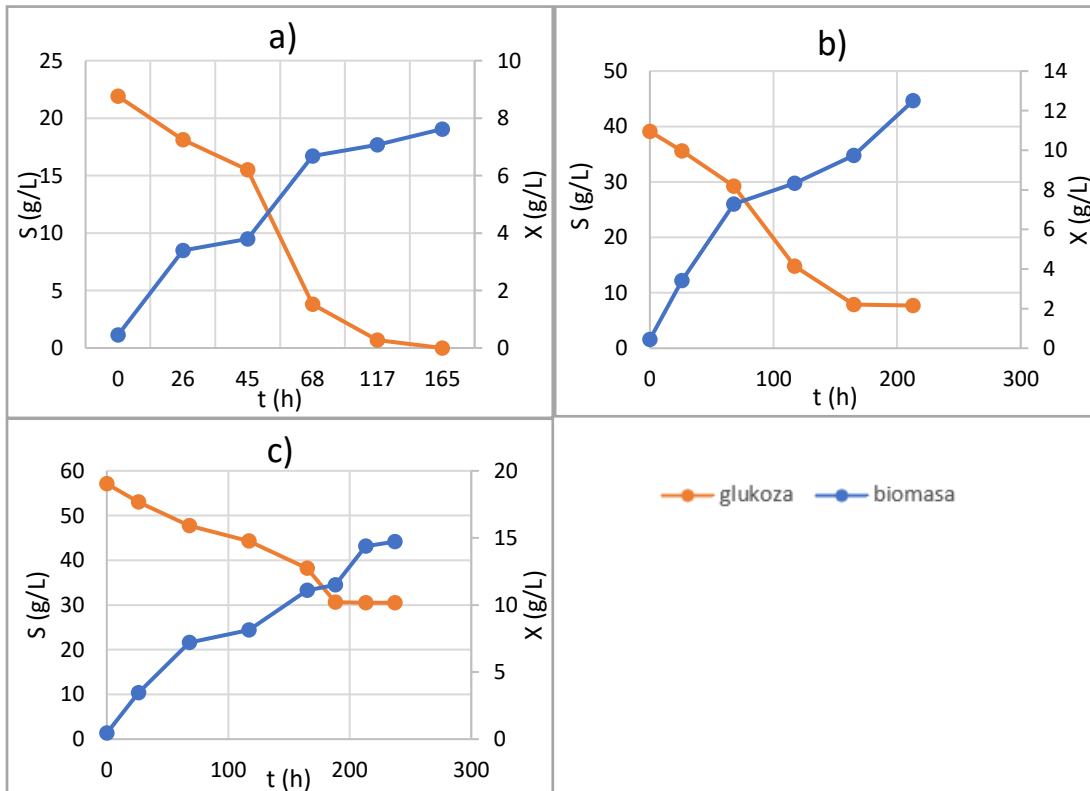
U 4. uzgoju uspoređen je rast *Schizochytrium* sp. na tri različita izvora ugljika, glukozi, glicerolu i jestivom ulju, te pri tri koncentracije supstrata, 20 g/L, 40 g/L i 60 g/L na kompleksnim podlogama (KP - 10 g/L kvašćevog ekstrakta, 10 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli, 2 g/L $MgSO_4 \times 7H_2O$, 1 g/L KH_2PO_4 uz dodatak otopine vitamina). Koncentracije biomase i supstrata u podlozi praćene su tijekom uzgoja te se na slikama 13, 14 i 15 nalaze krivulje rasta 4. uzgoja. Zbog različitih koncentracija supstrata u podlogama teško je uspoređivati nagibe krivulja rasta stoga su u nastavku uspoređene koncentracije biomase za vrijeme uzgoja na različitim supstratima istih koncentracija te su grafovi prikazani na slikama 16, 17 i 18.

Na slici 16 nalazi se grafički prikaz rasta koncentracije suhe tvari biomase na 20 g/L glukoze, glicerola ili jestivog ulja. Iz grafa je vidljivo da je najveći prinos biomase zabilježen pri uzgoju na glukozi, nakon toga na glicerolu, a najmanja vrijednost prinosa biomase zabilježena je za uzgoj proveden na jestivom ulju kao glavnom izvoru ugljika.

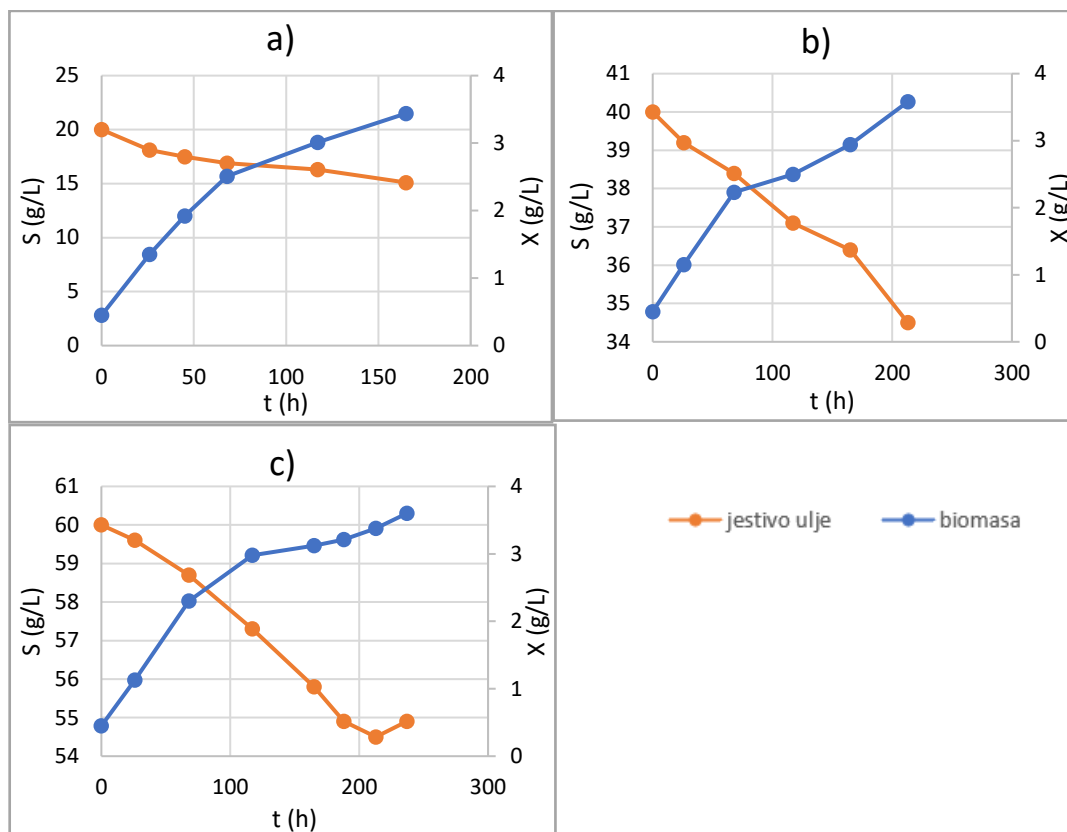
Na slici 17 prikazana je ovisnost koncentracije biomase o trajanju uzgoja na 40 g/L supstrata. Uzgoj je trajao duže zbog veće početne koncentracije supstrata, pri 200 h uzgoja uočen je porast koncentracije koji se može pripisati koncentriranju podloge zbog djelomičnog isparavanja vode tijekom dugog uzgoja. Koncentracije biomase na kraju uzgoja za rast na glukozi i glicerolu bile su primjetno više od uzgoja na 20 g/L istog supstrata, dok je razlika između koncentracija biomase kod uzgoja na 20 g/L i 40 g/L ulja gotovo neprimjetna. Najvjerojatnije je došlo do inhibicije rasta visokom koncentracijom supstrata ili drugih intermedijera nastalih prilikom razgradnje ulja.



Slika 13. Krivulja rasta traustohitirida *Schizochytrium* sp. na glicerolu (S) početne koncentracije: a) 20 g/L, b) 40 g/L, c) 60 g/L (4. uzgoj)



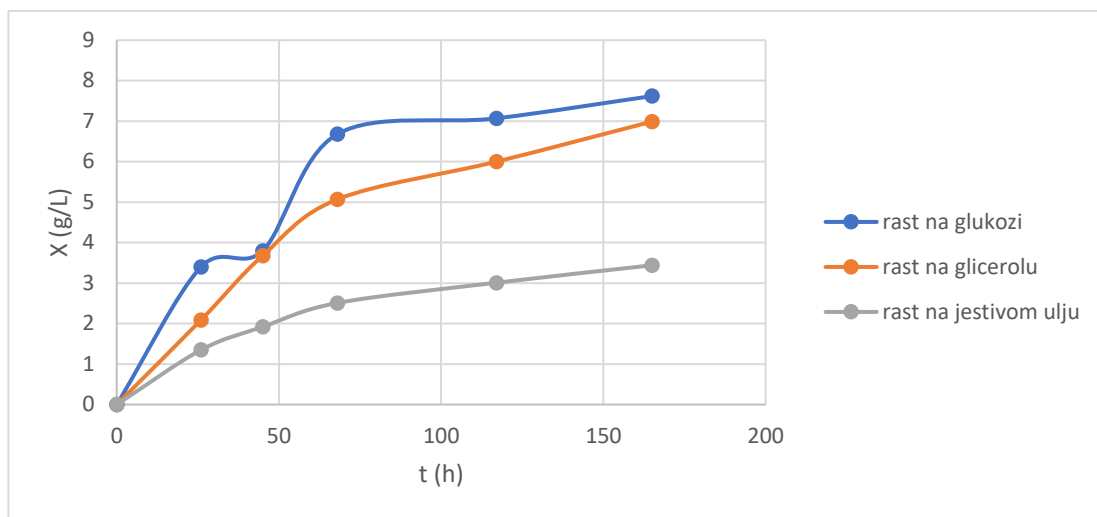
Slika 14. Krivulja rasta traustohitirida *Schizochytrium* sp. na glukozi (S) početne koncentracije: a) 20 g/L, b) 40 g/L, c) 60 g/L (4. uzgoj)



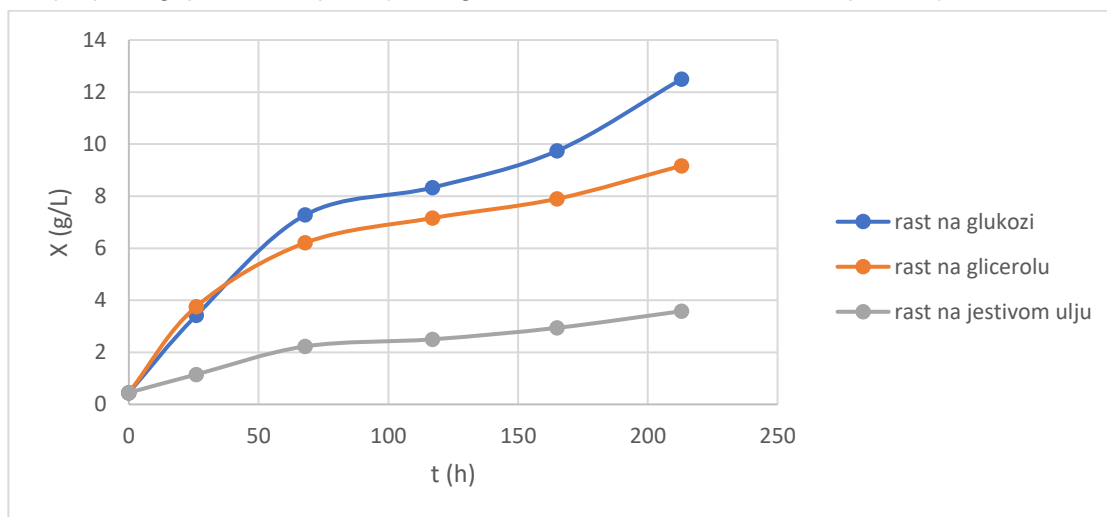
Slika 15. Krivulja rasta traustohitrida *Schizochytrium* sp. na jestivom ulju (S) početne koncentracije: a) 20 g/L, b) 40 g/L, c) 60 g/L (4. uzgoj)

Na slici 18 prikazan je rast biomase na 60 g/L različitih supstrata. Koncentracija biomase prilikom rasta na ulju nije se povećala ni pri visokoj koncentraciji supstrata iako je trajanje uzgoja bilo najduže. Također je primjetan učinak koncentriranja podloge zbog dugog uzgoja u tikvicama koje nemaju mogućnost kontrole isparavanja poput bioreaktora. Najviša izmjerena vrijednost koncentracije biomase zabilježena je kod rasta na 60 g/L glukoze i iznosila je 14,72 g/L. Koncentracija biomase na kraju uzgoja na 50 g/L glukoze u istraživanju Scott i sur. (2011) iznosila je 23,87 g/L, što je značajno više od 14,72 g/L dobivenih u ovom istraživanju, dok se udjeli masnih kiselina u biomasi navedeni u poglavlju 4.2. Usporedba prinosa lipida. podudaraju sa udjelima dobivenim u ovom istraživanju.

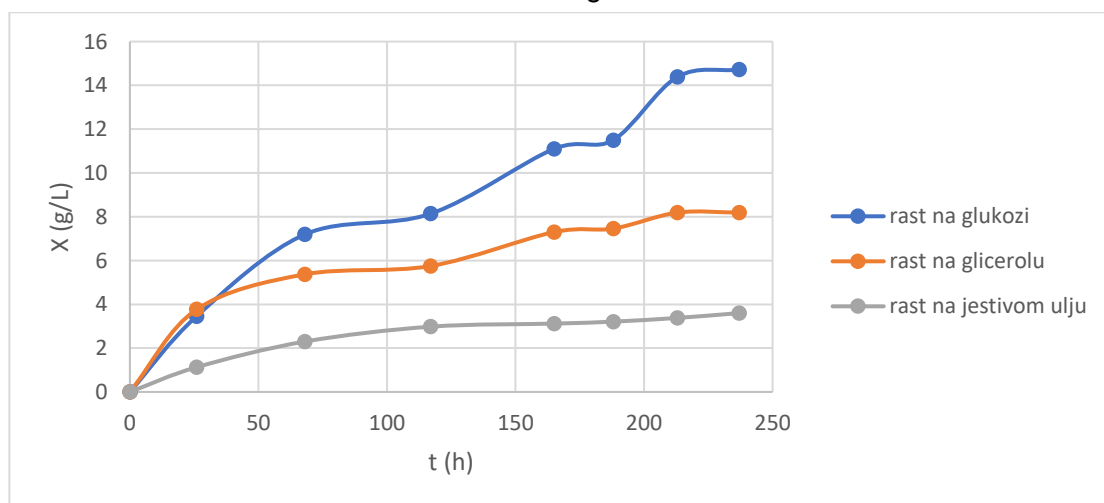
Promatrajući dobivene rezultate može se povući paralela između uzgoja na glukozi i glicerolu pri kojima su dobivene značajno više koncentracije suhe tvari biomase u odnosu na koncentraciju suhe tvari biomase dobivenu pri uzgoju na jestivom ulju.



Slika 16. Ovisnost koncentracije biomase traustohitrida *Schizochytrium* sp. o vremenu trajanja uzgoja na hranjivim podlogama s početnom koncentracijom supstrata od 20 g/L



Slika 17. Ovisnost koncentracije biomase traustohitrida *Schizochytrium* sp. o vremenu trajanja uzgoja na hranjivim podlogama s početnom koncentracijom supstrata od iznosila 40 g/L



Slika 18. Ovisnost koncentracije biomase traustohitrida *Schizochytrium* sp. o vremenu trajanja uzgoja na hranjivim podlogama s početnom koncentracijom supstrata od 60 g/L

U tablici 12 prikazane su izračunate vrijednosti za parametre uspješnosti procesa. Najviši zabilježeni prinosi biomase izmjereni na 40 g/L i 60 g/L glukoze. Najveća specifična brzina rasta iznosi 0,017 1/h , a izmjerena je pri rastu na 20 g/L glicerola i 20 g/L glukoze.

Tablica 12. Pokazatelji uspješnosti uzgoja na različitim koncentracijama izvora ugljika u KP (4. uzgoj)

| Sastav podloge | Y _x (g/L) | μ (1/h) | Pr _x (g/L dan) | Y _{x/s} (g/g) | Y _{x/s} (g/L) |
|------------------|----------------------|---------|---------------------------|------------------------|------------------------|
| 20 g/L glukoze | 7,17 | 0,017 | 0,043 | 0,327 | 0,067 |
| 40 g/L glukoze | 12,05 | 0,016 | 0,057 | 0,384 | 0,114 |
| 60 g/L glukoze | 14,27 | 0,015 | 0,060 | 0,536 | 0,159 |
| 20 g/L glicerola | 6,54 | 0,017 | 0,040 | 0,369 | 0,137 |
| 40 g/L glicerola | 8,72 | 0,014 | 0,041 | 0,311 | 0,093 |
| 60 g/L glicerola | 7,74 | 0,012 | 0,033 | 0,223 | 0,048 |
| 20 g/L ulja | 2,99 | 0,012 | 0,018 | 0,610 | 0,080 |
| 40 g/L ulja | 3,13 | 0,010 | 0,015 | 0,569 | 0,065 |
| 60 g/L ulja | 3,15 | 0,009 | 0,013 | 0,618 | 0,088 |

*KP- kompleksna podloga (10 g/L kvašćevog ekstrakta, 10 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli, 2 g/L MgSO₄ x 7H₂O, 1 g/L KH₂PO₄ uz dodatak otopine vitamina

Najviši koeficijenti pretvorbe supstrata u produkt izmjereni su pri rastu na jestivom ulju, iako treba uzeti u obzir mogućnost pogreške pri mjerenju koncentracije suhe tvari biomase, pogotovo pri višim koncentracijama supstrata zbog otežanog ispiranja neutrošenog ulja na stijenkama tikvice. Također se pri izdvajanju biomase centrifugiranjem izdvajao se sloj ulja između supernatanta i heksana, ali i stanice *Schizochytrium* sp.

4.1.5. Usporedba rezultata sva četiri uzgoja

Iz rezultata prikazanih i pojašnjenih u prethodnim poglavljima jasno je vidljivo da je prirast biomase traustohitrida *Schizochytrium* sp. najviši uz rast na 60 g/L glukoze, 10 g/L kvašćevog ekstrakta, 10 g/L Na- glutamata, 15 g/L morske soli, 2 g/L MgSO₄x7H₂O, 1 g/L KH₂PO₄i otopine vitamina. Najviši prirast biomase izmjeren u ovom radu iznosio je 14,27 g/L. Najbolji rezultati rasta traustohitrida na glicerolu postignuti su pri istim uvjetima i dodatcima u podlogu te koncentraciji glicerola od 40 g/L, a prirast je iznosio 8,72 g/L.

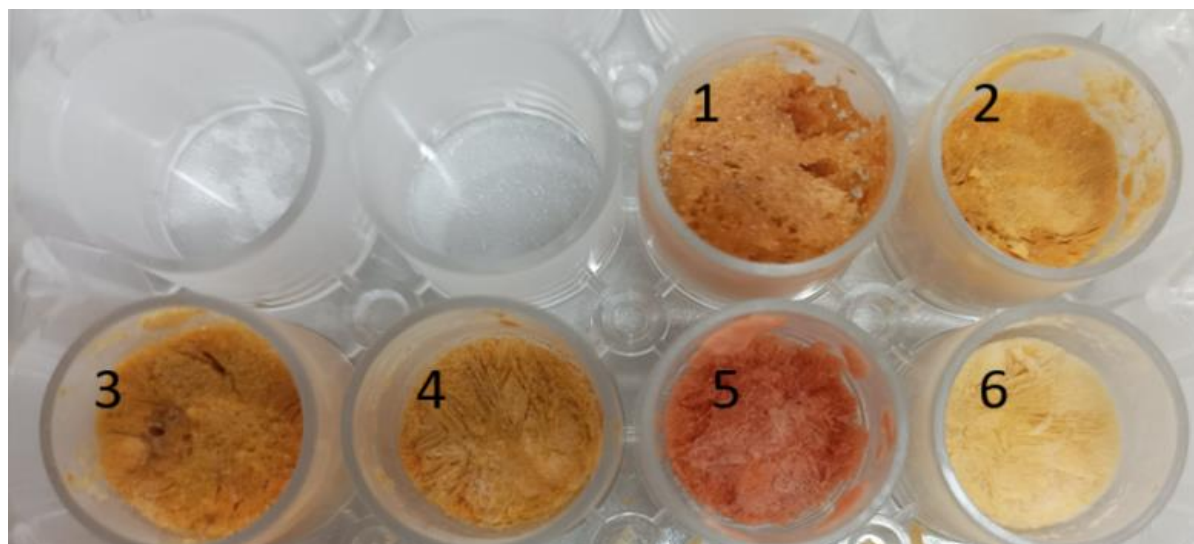
Rast na sirutci, značajno je slabiji nego na glukozi i glicerolu najvjerojatnije zbog prisutnih anorganskih soli i mliječne kiseline koji inhibiraju rast i potrošnju izvora ugljika. Najveći rast zabilježen je pri uzgoju na koncentriranoj sirutci uz dodatak natrijeva glutamata i 50 g/L glicerola u podlogu pri čemu je *Schizochytrium* sp. trošio glicerol za rast.

Zapažen je dobar rast traustohitrida *Schizochytrium* sp. na ulju iako je potrebno provesti daljnju optimizaciju uvjeta uzgoja kao bi se postigli bolji prinosi biomase i/ili lipida. Osim niskih prinosa biomase, oko 3,10 g/L, analitičke metode korištene za određivanje uspješnosti rada

morale su biti prilagođene supstratu s obzirom da je ulje otežavalo izdvajanje biomase, ali i određivanje zaostalog supstrata u podlozi.

Osim parametara uspješnosti procesa uočene su i razlike u boji podloga i izdvojenih biomasa. Razlike u boji prouzrokovane su sintezom pigmenata, β -karotena u različitim koncentracijama ovisno o izvoru i koncentraciji supstrata. Primjer različitih obojenja liofilizirane biomase nalazi se na slici 19, najintenzivnije narančasto-crveno obojenje primijećeno je u uzorku uzgajanom na 100 % (vol/vol) sirutci bez dodatnih izvora ugljika kroz 12 dana. Do sinteze veće koncentracije pigmenta najvjerojatnije je došlo zbog velike koncentracije soli i mliječne kiseline bez dodatnih izvora ugljika osim laktoze, što je potaknulo sekundarni metabolizam i sintezu pigmenata.

Slika 19. Liofilizirane biomase traustohitrida *Schizochytrium* sp.



Hranjiva podloga se sastojala od: **1.** 20 g/L ulja, kvašćevog ekstrakta, Na- glutamata, morske soli, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 i otopine vitamina (uzgoj 4.); **2.** 80 g/L glukoze, kvašćevog ekstrakta, Na- glutamata, morske soli, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 (uzgoj 3.); **3.** 80 g/L glicerola, kvašćevog ekstrakta, Na- glutamata, morske soli, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 (uzgoj 3.); **4.** 50 % (vol/vol) sirutki, Na- glutamata, morska sol, otopina vitamina (2. uzgoj); **5.** 100 % (vol/vol) sirutki, Na- glutamata, morska sol, otopina vitamina (2. uzgoj); **6.** 50 % (vol/vol) sirutki i 40 g/7 glicerola, Na- glutamat, morska sol, otopina vitamina (2. uzgoj)

4.2. USPOREDBA PRINOSA LIPIDA

Specifičnost traustohitrida *Schizochytrium* sp. i njegova prednost pred drugim vrstama mikroorganizama je sposobnost sinteze visokih udjela lipida, u obliku lipidnih kapi, u vlastitoj biomasi. Osim visokih prinosa lipida koji su zabilježeni u različitim istraživanjima, važan je i sastav masnih kiselina, konkretno udio dokozaheksaenske kiseline (DHA) i eikozapentaenske kiseline (EPA), omega-3 masnih kiselina. Istraživanja pokazuju da različiti izvori ugljika i dušika značajno utječu na rast *Schizochytrium* sp. te sintezu DHA i drugih masnih kiselina.

U radu Wu i sur. (2005) istražen je rast na glukozi, fruktozi, laktozi i maltozi koji su služili kao glavni izvori ugljika. Najviši prirast biomase od 5,51 g/L ostvaren je na glukozi, a na laktozi

tek 2,79 g/L. Udio lipida u biomasi traustohitrida uzgojenog na laktozi iznosio je tek 1,80 % (g/g), dok je na glukozu iznosio 44 % (g/g).

Također je istražen utjecaj različitih izvora dušika na rast i sintezu lipida te je najviši prirast biomase postignut u podlozi s dodatkom natrijeva nitrata, 7,46 g/L, ali je udio DHA u ukupnim lipidima iznosio tek 6,86 % (g/g). Pri dodatku natrijeva glutamata prinos biomase iznosio je 6,59 g/L, nešto niže u odnosu na natrijev nitrat, ali je maseni udio lipida iznosio 33,33 %, a udio DHA u ukupnim lipidima 26,58 % (g/g). Za industrijsku proizvodnju DHA na traustohitridu je osim prirasta biomase vrlo važan i udio DHA u ukupnim lipidima, stoga je za industrijsku proizvodnju DHA pogodniji natrijev glutamat kao izvor dušika, na kojem je postignut nešto niži prirast biomase, ali značajno viši maseni udio DHA u ukupnim lipidima. Prirast biomase u podlozi s kvašćevim ekstraktom iznosio je 6,11 g/L, udio lipida u biomasi 33,77 % (g/g), a udio DHA u ukupnim lipidima 15,19 %.

Prema rezultatima ovog istraživanja dodatak natrijeva glutamata u podlogu ima pozitivan učinak na rast i sintezu DHA, stoga bi dodatak natrijeva glutamata u podloge sa sirutkom, tj. laktozom, trebao imati pozitivan učinak na rast biomase i sintezu lipida, iz tog razloga je u podloge drugog uzgoja, koje su sadržavale laktozu, dodano 5 g/L natrijeva glutamata na 40 g/L laktoze, u podloge s manje ili više izvora ugljika dodano je natrijeva glutamata u istom omjeru.

U radu Wu. i sur. (2005) utvrđena je početna koncentracija glukoze, 60 g/L, koja je dala najviši prinos biomase, 6,56 g/L, a udio lipida je iznosio 34,1 % (g/g). Pri početnoj koncentraciji glukoze od 20 g/L, prinos biomase bio je nešto niži, 5,46 g/L, ali je udio lipida u biomasi iznosio 44 % (g/g), pri koncentraciji od 20 g/L glukoze zabilježen je i najviši udio DHA u biomasi, a iznosio je 5,82 % (g/g). Kada mikroorganizam potroši sav dostupan izvor ugljika iz podloge, počinje trošiti vlastite zalihe lipida kao i metaboličke kiseline iz podloge proizvedene tijekom rasta (Wu i sur., 2005). U radu Sahin i sur., (2018) najviši maseni udio DHA u biomasi traustohitrida iznosio je 43,1 %, a postignut je rastom na glicerolu, dok je rastom na glukozu izmjeren nešto niži udio od 32,5 %, potrebno je naglasiti kako je u ovom radu korišten dodatak etanola i acetil Co-A u podlogu kako bi se potaknulo nakupljanje DHA. Povišena koncentracija C i ograničena koncentracija N potiču nakupljanje lipida, ali mogu negativno utjecati na prirast biomase.

Hranjiva podloga s glicerolom daje nešto niži prirast biomase, ali najviši udio DHA u ukupnoj biomasi (Sahin i sur., 2018). Osim navedenih parametara na rast i sintezu masnih kiselina utječe i pH vrijednost. U radu Wu i sur. (2005) najviša koncentracija suhe tvari biomase zabilježena je pri pH 7, a iznosila je 6,01 g/L. Pri istoj vrijednosti pH izmjeren je najviši maseni udio DHA u suhoj tvari biomase, a iznosio je 5,23 %, maseni udio ukupnih lipida u suhoj tvari biomase iznosio je do 40 %, a maseni udio DHA u ukupnim lipidima 13 %.

U ovom dijelu eksperimentalnog rada su, iz prethodno izdvojene biomase, ekstrahirani lipidi te je određena njihova koncentracija. Mjerenja su provedena za 2. i 4. uzgoj metodom opisanom u poglavlju 3.2.7.2. Određivanje udjela lipida u biomasi prema protokolu Schneitera i Dauma (2006). Tijekom uzgoja je provedeno 2 - 3 mjerenja udjela lipida u podlozi, a rezultati su prikazani u tablicama 13 i 14.

U tablici 13 prikazani su rezultati mjerenja masenog udjela lipida u biomasi za drugi uzgoj. Najviše vrijednosti masenog udjela lipida izmjerene su 12. dan, ali su vrijednosti niske u odnosu na literaturne navode. Moguće je da je do odstupanja od očekivanih rezultata došlo zbog nesavršenosti same metode određivanja lipida, ali i niskih koncentracija izvora ugljika te malih prirasta biomase, što dovodi do povećanja utjecaja manjih odstupanja na rezultate.

Tablica 13. Udio lipida u biomasi za 2. uzgoj prema protokolu Schneitera i Dauma

| 2. uzgoj | Udio lipida u biomasi (%) (g/g) | | |
|---|---------------------------------|--------|---------|
| | 5. dan | 9. dan | 12. dan |
| Sastav podloge | | | |
| 8,06 g/L glukoze (KP) | 4,39 | 7,58 | 10,31 |
| 12,59 g/L glicerola (KP) | 5,92 | 10,46 | 11,08 |
| 50 % (vol/vol) sirutka+ Na-glutamat | 2,52 | 4,35 | 6,30 |
| 100 % (vol/vol) sirutka+ Na-glutamat | 2,42 | 3,91 | 5,19 |
| 50 % (vol/vol) sirutka+ Na-glutamat+ 40 g/L glicerol | 6,37 | 12,56 | 14,21 |
| 100 % (vol/vol) sirutka+ Na-glutamat+40 g/L glicerol | 6,84 | 11,62 | 12,97 |

*KP- kompleksna podloga (10 g/L kvašćevog ekstrakta, 10 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli, 2 g/L MgSO₄ x 7H₂O, 1 g/L KH₂PO₄ uz dodatak otopine vitamina

Najviši udio lipida u biomasi izmjeren je u uzorku koji se sastojao od 20 g/L laktoze (50 % (vol/vol) sirutka) i 40 g/L glicerola nakon 12 dana uzgoja, a iznosio je 14,21 %. U odnosu na rezultate dobivene na sirutci bez dodatka glicerola, ovaj maseni udio je 2,74 puta viši. Što odgovara pretpostavci postavljenoj na prijašnjim istraživanjima, da glicerol pozitivno utječe na sintezu lipida, te se u podlogama sa sirutkom može koristiti kao dodatan izvor ugljika. Najviši udio lipida u biomasi kod uzgoja na laktozi kao jedinom izvoru ugljika ostvaren je također 12. dan uzgoja na 20 g/L laktoze, a iznosio je 6,3 % (g/g). Kod uzgoja na 40 g/L laktoze (100 % (vol/vol) sirutke) rezultati su bili nešto niži, 5,19 % (g/g). U usporedbi sa rezultatima Wu i sur. (2005) koji su zabilježili da je udio lipida u biomasi traustohitrida uzgojenog na laktozi iznosio 1,80 % (g/g) (peti dan uzgoja), udio lipida u ukupnoj biomasi za ovo istraživanje iznosio 2,52 % (g/g) što je nešto više u odnosu na istraživanje Wu i sur. Viši maseni udjeli lipida mogu se pripisati dodatku natrijeva glutamata kao dodatnog izvora dušika u podlogu sa sirutkom.

Sirutka se nije pokazala kao najbolji izvor ugljika niti za rast niti za sintezu lipida. Iako

traustohitrid *Schizochytrium* sp. ima sposobnost rasta na laktozi, taj rast je usporen, a prinosi biomase niski kao i maseni udio lipida u biomasi. Kako bi se pospješio rast i proizvodnja lipida na sirutci potrebno je dodatno istražiti načine predobrade sirutke koji bi omogućili uklanjanje potencijalno inhibirajućih sastojaka poput mliječne kiseline i visoke koncentracije anorganskih soli. Osim optimizacije predobrade sirutke i dodatka natrijeva glutamata treba uzeti u obzir i mogućnost dodatka dodatnog izvora ugljika, kako je učinjeno u drugom uzgoju, dodatkom glicerola. Time je postignut viši maseni udio lipida u biomasi.

Izmjereni su vrlo niski maseni udjeli lipida u biomasi traustohitrida koji je rastao na glukozi i glicerolu kao jedinicima izvorima ugljika u odnosu na literaturne navode. Kako ovako niski maseni udjeli ne odgovaraju ni udjelima dobivenim plinskom kromatografijom možemo pretpostaviti da ova metoda nije najpogodnija za analizu visokih udjela lipida u biomasi ili je prilikom izvođenja metode došlo do ljudske pogreške prilikom razrjeđivanja uzorka.

Rezultati mjerenja masenog udjela lipida u biomasi za četvrti uzgoj prikazani su u tablici 14. Mjerenja za svaki uzorak prevrele podloge su provedena dva dana kako bi se mogao pratiti napredak sinteze lipida. Najviši maseni udio lipida izmjeren je kod rasta na 60 g/L glicerola 8. dan uzgoja, a iznosio je 37,82 % (g/g). Prilikom centrifugiranja podloge sa 60 g/L glicerola 10. dan nije bilo moguće centrifugiranjem izdvojiti svu biomasu. Najvjerojatnije je taloženje pomoću centrifugalne sile otežano upravo zbog visokih koncentracija lipida u biomasi. Supernatant nije bio bistar, nego značajno zamućen te je sadržavao biomasu koja se nije uspjela istaložiti niti centrifugiranjem pri 4500 rpm u trajanju od 50 min te je zbog toga došlo do odstupanja vrijednosti rezultata od očekivanih. Osim zamućenja supernatanta, na vrhu sloja supernatanta stvorio se sloj ljepljive biomase debljine oko dva milimetra. Ovakav učinak visokih koncentracija glicerola na izdvajanje biomase zabilježen je i u istraživanju Patil i Gogate (2015).

Tablica 14. Udio lipida u biomasi za 4. uzgoj prema protokolu Schneitera i Dauma

| 4. uzgoj | | Udio lipida u biomasi (%) (g/g) uzgojenoj na KP sa: | | |
|-----------------------|----------|---|-------|---------|
| Konc. supstrata (g/L) | t (dani) | glicerolu | ulju | glukozi |
| 20 | 5 | 30,35 | 16,14 | 18,73 |
| 20 | 7 | 34,64 | 11,42 | 19,12 |
| 40 | 7 | 34,90 | 16,52 | 25,56 |
| 40 | 9 | 28,35 | 10,18 | 28,69 |
| 60 | 8 | 37,82 | 11,79 | 27,96 |
| 60 | 10 | 20,14 | 12,50 | 28,82 |

*KP- kompleksna podloga (10 g/L kvašćevog ekstrakta, 10 g/L Na-glutamat, 15 g/L morske soli, 2 g/L MgSO₄ x 7H₂O, 1 g/L KH₂PO₄ uz dodatak otopine vitamina

Najviši udio lipida u biomasi uzgojenoj na glukozi iznosio je 28,82 % (g/g), pri početnoj

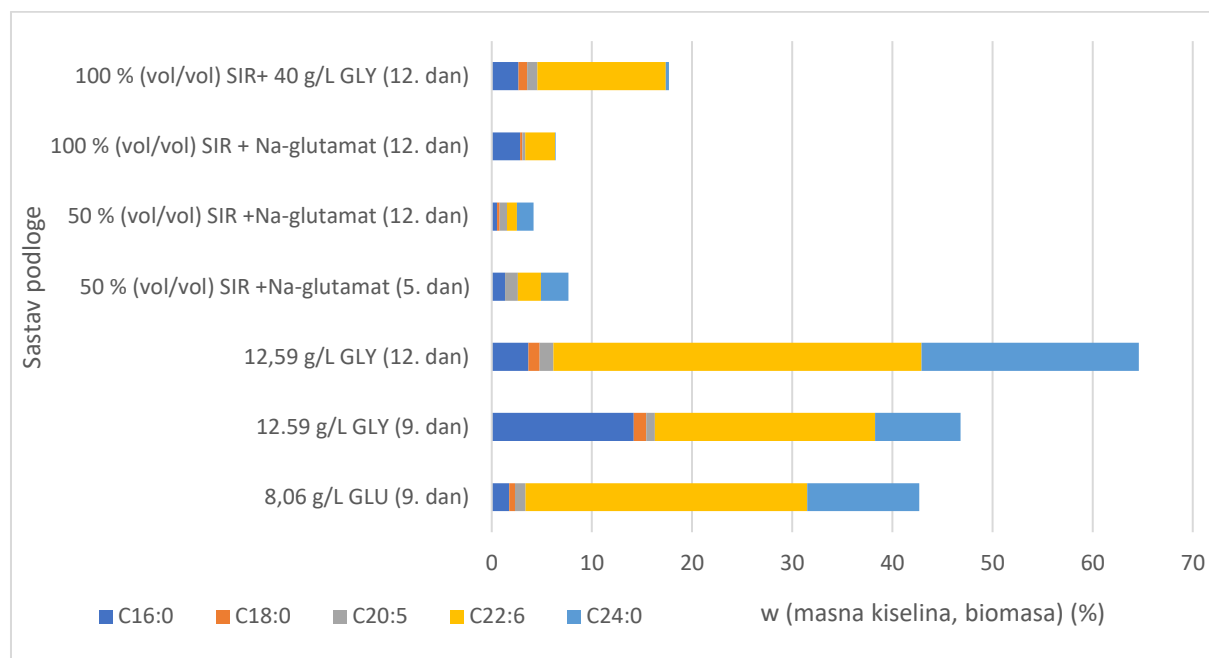
koncentraciji supstrata od 60 g/L, a približno jednake vrijednosti dobivene su i kod početne koncentracije glukoze od 40 g/L. Povećanje masenih udjela lipida u biomasi kod visokih koncentracija supstrata posljedica je povećanja omjera C:N, što dokazano potiče akumulaciju lipida (Patil i Gogate, 2015). Kod uzgoja na ulju zabilježeni su niži rezultati udjela lipida u biomasi, a kretali su se od 10,18 do 16,52 % (g/g). Iako je poznato da traustohitridi imaju sposobnost rasta na otpadnom ulju trenutno nisu dostupna istraživanja u kojima su zabilježeni parametri uspješnosti uzgoja na ulju.

Ispitivanje udjela lipida za odabrane uzorke provedeno je metodom opisanom u poglavlju 3.2.7.3. Određivanje sastava masnih kiselina u biomasi. Najzastupljenije masne kiseline u biomasi *Schizochytrium* sp. su palmitinska kiselina (C16:0), stearinska kiselina (C18:0), EPA (C20:5 cis 5,8,11,14,1), DHA (C22:6 cis 4,7,10,13,1) i lignocerinska kiselina (C24:0). Osim navedenih, u manjim koncentracijama detektirane su i sljedeće masne kiseline: C14:0, C15:0, C17:0, C20:0, C20:3 (cis 5,8,11,14,1), C20:4 (cis 5,8,11,14), C23:0 i C24:1 cis 15.

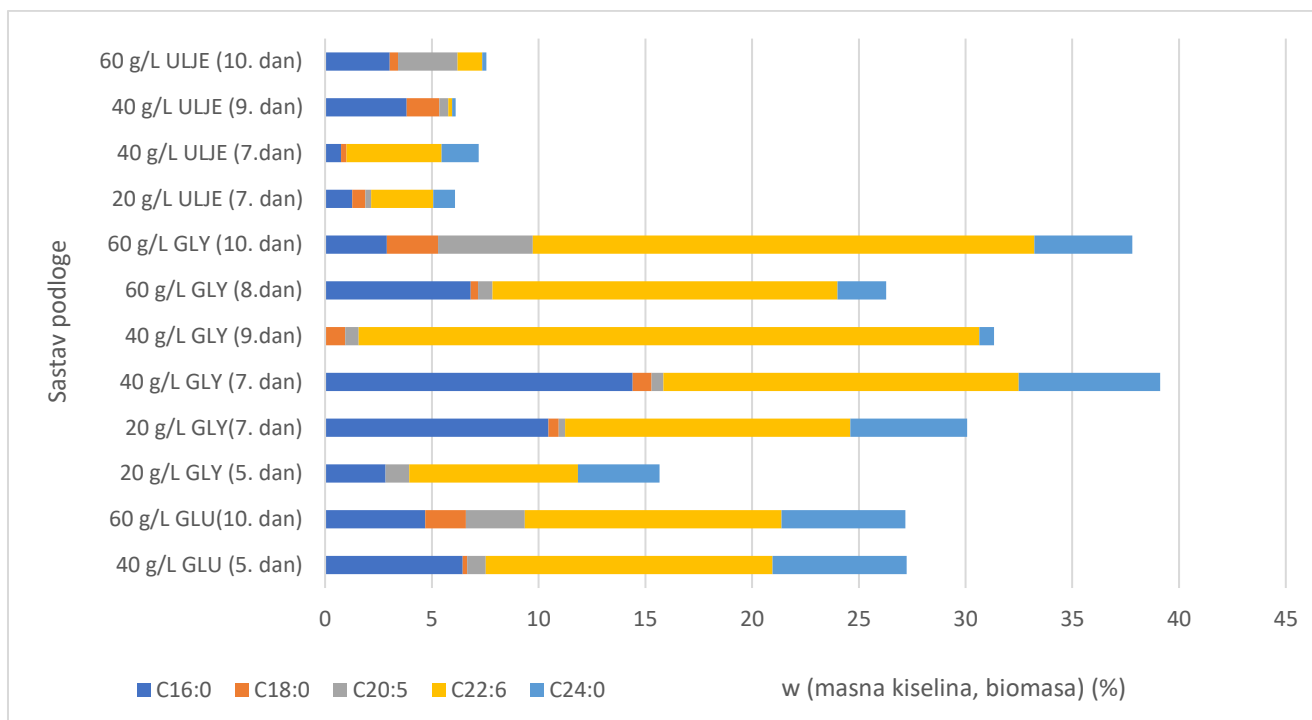
Na slikama 20 i 21 nalazi se udjel masnih kiselina u biomasi *Schizochytrium* sp izdvojenoj nakon drugog i četvrtog uzgoja. Na slikama je vidljivo odstupanje udjela lipida u biomasi prikazanih u tablicama 13 i 14. Iz rezultata sa slika zaključujemo da sirutka i ulje nisu najbolje sirovine za industrijsku proizvodnju DHA i drugih masnih kiselina zbog niskog udjela ukupnih masnih kiselina u biomasi traustohitrida. Najviši udio masnih kiselina u biomasi traustohitrida uzgojenoj na jestivom ulju zabilježen je 10. dan, na podlozi sa 60 g/L jestivog ulja, a iznosio je 7,56 % (g/g), potrebno je naglasiti da ova vrijednost nije značajno viša od vrijednosti postignute 7. dan na podlozi sa 20 g/L jestivog ulja, koja je iznosila 6,08 % (g/g) i ujedno predstavlja najnižu zabilježenu vrijednost udjela masnih kiselina u biomasi uzgojenoj na ulju. Kod uzgoja na 50 % (vol/vol) sirutci uz dodatak Na-glutamata 5. dan postignut je udio masnih kiselina u biomasi traustohitrida u iznosu od 7,65 %, koji se produženjem uzgoja od 12. dana smanjio na 4,18 % (g/g). Ovakvo sniženje udjela masnih kiselina u biomasi nije zabilježeno prethodnim mjerenjem udjela lipida u biomasi prema protokolu Schneitera i Dauma (2006) prikazanim u tablici 13, ali su iznosi udjela pre niski za industrijsku primjenu bez obzira na odstupanje rezultata mjerenja pomoću ove dvije različite metode. Rezultati mjerenja udjela masnih kiselina u biomasi za uzgoja na 100 % (vol/vol) sirutci otprilike se poklapaju sa rezultatima dobivenim u tablici 13, a iznose 6,36 % (g/g) nakon 12. dana uzgoja. Kako bi se ove otpadne sirovine mogle koristiti u proizvodnji DHA pomoću traustohitrida *Schizochytrium* sp. potrebno je provesti dodatna unaprjeđenja samog procesa, od uzgoja do ekstrakcije proizvoda ili primjenom genetičkog inženjerstva poboljšati proizvodni mikroorganizam kako bi se postiglo bolje iskorištenje. Uz dodatak glicerola u podlogu sa sirutkom postignuto je povećanje udjela masnih kiselina u ukupnoj biomasi traustohitrida koji je iznosio 17,70 % (g/g)

što je približno jednako vrijednosti udjela lipida u biomasi prikazanoj u tablici 13, za drugi uzgoj. Dodatak glicerola u podlogu sa 50 % (vol/vol) sirutkom omogućio je porast ukupnih masnih kiselina povećavajući najviše udio DHA u biomasi. Udjeli ostalih masnih kiselina u biomasi nisu se značajnije mijenjali.

Najviši udio masnih kiselina u biomasi traustohitrida ostvaren je uzgojem na glicerolu (12. dan), gdje je najviši postotak DHA u ukupnim masnim kiselinama traustohitrida izmjeren u uzorku koji je sadržavao 12,59 g/L glicerola u hranjivoj podlozi na početku uzgoja, a iznosio je 36,75 % (g/g). Kod rasta na 50 g/L glicerola Scott i sur. (2011) zabilježili su koncentracija biomase od 25,11 g/L, udio lipida u biomasi iznosio je 38,95 % (g/g), a udio DHA u ukupnim masnim kiselinama 36,49 % (g/g), dok rezultati prikazani na slici 12 pokazuju udio od 37,81 % (g/g) masnih kiselina u biomasi kod uzgoja traustohitrida na 60 g/L glicerola kroz 10 dana. Na slici 12. prikazani su rezultati mjerenja ukupnih masnih kiselina u biomasi, 27,2 % (g/g) za uzgoj na 40 i 60 g/L glukoze, dok je udio DHA u ukupnim masnim kiselinama iznosio 44,22 % (g/g). Ovakvi rezultati odgovaraju rezultatima prikazanim u istraživanju Scott i sur. (2011) koji su proveli uzgoj na 50 g/L glukoze te odredili maseni udio masnih kiselina u biomasi i udio DHA u ukupnim masnim kiselinama, udio masnih kiselina u biomasi iznosio je 30,09 % (g/g), a udio DHA u ukupnim masnim kiselinama 36,05 % (g/g). Rezultati dobiveni mjerenjem udjela masnih kiselina u biomasi i udjela DHA u ukupnim masnim kiselinama odgovaraju literaturnim podacima za podloge koje su sadržavale glicerol i glukozu.



Slika 20. Maseni udjeli masnih kiselina u biomasi traustohitrida *Schizochytrium* sp. uzgojenog na podlogama različitih sastava (2. uzgoj)



Slika 21. Maseni udjeli masnih kiselina u biomasi traustohitrida *Schizochytrium* sp. uzgojenog na podlogama različitih sastava (4. uzgoj)

5. ZAKLJUČCI

1. Oleaginozni traustohitrid *Schizochytrium* sp. koristi glukozu, glicerol, sirutku i ulje kao izvor ugljika za rast i sintezu lipida. Glukoza i glicerol omogućavaju najbrži rast i najveći prinos biomase.
2. Dodatkom vitamina tiamin, biotin i cijanokobalamin pospješuje se brzina rasta i prinos biomase. Najveća koncentracija biomase od 14,27 g/L postignuta je pri uzgoju na hranjivoj podlozi sa 60 g/L glukoze, 10 g/L kvašćevog ekstrakta, 10 g/L Na- glutamata, 15 g/L morske soli, 2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/L KH_2PO_4 uz dodatak otopine vitamina.
3. Traustohitrid *Schizochytrium* sp. može rasti na 10-100 %-tnoj sirutci trošeći laktozu kao izvor ugljika uz niske priraste biomase. Najviši prinos biomase od 3,67 g/L postignut je na 100 %-tnoj sirutci. Dodatkom 40 g/L glicerola u 100 %-tnu sirutku postiže se prinos biomase od 6,84 g/L.
4. Jestivo ulje pogodan je izvor ugljika za rast traustohitrida *Schizochytrium* sp. Najveći prinos biomase u hranjivoj podlozi sa 60 g/L jestivog ulja iznosio je 3,15 g/L. Daljnja optimizacija uvjeta uzgoja, posebno aeracije hranjive podloge i prihrane uljem, neophodna je kako bi se povećao prinos biomase i udjel lipida biomasi.
5. Najzastupljenije masne kiseline u biomasi *Schizochytrium* sp. su palmitinska kiselina (C16:0), stearinska kiselina (C18:0), EPA (C20:5 cis 5,8,11,14,1), DHA (C22:6 cis 4,7,10,13,1) i lignocerinska kiselina (C24:0).
6. Najviši udio DHA u biomasi iznosio je 36,75 % a postignut je 12. dana uzgoja na hranjivoj podlozi koja se sastojala od 12,59 g/L glicerola, 10 g/L kvašćevog ekstrakta, 10 g/L Na- glutamata, 15 g/L morske soli, 2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/L KH_2PO_4 uz dodatak otopine vitamina.
7. Prilikom uzgoja na podlogama različitih početnih koncentracija glukoze (8 g/L, 20 g/L, 40 g/L i 60 g/L) najviši prirast biomase zabilježen je na podlozi sa 60 g/L glukoze, a iznosio je 14,27 g/L. Pri nižim početnim koncentracijama glukoze u kompleksnoj podlozi, izmjerena je niža koncentracija biomase na kraju uzgoja.
8. Najviši prirast biomase uzgojene na glicerolu iznosio je 8,72 g/L, pri početnoj koncentraciji glicerola od 40 g/L, pri nižim i višim početnim koncentracijama glicerola (12,6 g/L, 20 g/L i 60 g/L) zabilježen je niži prirast. Kod početne koncentracije glicerola više od 50 g/L dolazi do otežanog izdvajanja biomase iz podloge.

6. LITERATURA

Aasen IM, Ertesvåg H, Heggset TMB (2016) Thraustochytrids as production organisms for docosahexaenoic acid (DHA), squalene, and carotenoids. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 4309–4321. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7498-4>

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

Schneider R, Daum G (2006) Extraction of yeast lipids. *Methods mol biol* **313**, 41–45. <https://doi.org/10.1385/1-59259-958-3:041>

Bonvicini C, Faraone SV, Scassellati C (2016) Attention-deficit hyperactivity disorder in adults: A systematic review and meta-analysis of genetic, pharmacogenetic and biochemical studies. *Mol Psychiatr* **21(7)**, 872–884. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.74>

Byreddy AR (2016) Thraustochytrids as an alternative source of omega-3 fatty acids, carotenoids and enzymes. *Lipid Technol* **28**, 68-70. <https://doi.org/10.1002/lite.201600019>

Cavalier-Smith T, Allsopp MTEP, Chao EE (1994) Thraustochytrids are chromists, not Fungi: 18S rRNA signatures of Heterokonta. *Phil Trans R Soc Lond B* **346**, 387–397. <http://doi.org/10.1098/rstb.1994.0156>

Chang G, Gao N, Tian G, Wu Q, Chang M, Wang X (2013) Improvement of docosahexaenoic acid production on glycerol by *Schizochytrium* sp. S31 with constantly high oxygen transfer coefficient. *Bioresour Technol* **142**, 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.107>.

Chang M, Zhang T, Guo X, Liu Y, Liu R, Jin Q et al. (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>.

Ford JE, Hutner SH (1955) Role of Vitamin B12 in the Metabolism of Microorganisms. *Vitam Horm* **13**, 101-136. [https://doi.org/10.1016/s0083-6729\(08\)61024-9](https://doi.org/10.1016/s0083-6729(08)61024-9).

Gao Z, Ma Y, Liu Y, Wang Q (2022) Waste cooking oil used as carbon source for microbial lipid production: Promoter or inhibitor. *Environ Res* **203**, 111-124. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111881>

Guo D, Ji X, Ren L, Li G, Huang H (2017) Improving docosahexaenoic acid production by

Schizochytrium sp. using a newly designed high-oxygen-supply bioreactor. *AIChE J* **63**, 4278–4286. <https://doi.org/10.1002/aic.15783>.

Hák T, Janoušková S, Moldan B (2016) Sustainable Development Goals: A need for relevant indicators. *Ecol Indic* **60**, 565–573. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.08.003>.

Hong DD, Anh HTL, Thu NTH (2011) Study on biological characteristics of heterotrophic marine microalga—schizochytrium mangrovei pq6 isolated from Phu Quoc island, Kien Giang province, Vietnam. *Phycol* **47**, 944–954. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01012.x>

Hu X, Ren L, Chen S, Zhang L, Ji X, Huang H (2015) The roles of different salts and a novel osmotic pressure control strategy for improvement of DHA production by Schizochytrium sp. *Bioproc Biosyst Eng* **38**, 2129–2136. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1452-1>.

Jiang X, Zhang J, Zhao J, Gao Z, Zhang C i Chen M (2017) Regulation of lipid accumulation in Schizochytrium sp. ATCC 20888 in response to different nitrogen sources. *Lipid Sci Tech* **119(10)**, 1700025. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700025>

Jeon JJ, Kim HJ, Kang HK, Kim CH, Kim HS, Hong EC i sur. (2022) Effects of Dietary Thraustochytrid *Schizochytrium sp.* and Other Omega-3 Sources on Growth Performance, Carcass Characteristics, and Meat Quality of Broilers. *Animal* **12(9)**, 1166. <https://doi.org/10.3390/ani12091166>

Koreti D, Kosre A, Jadhav SK (2022) A comprehensive review on oleaginous bacteria: an alternative source for biodiesel production. *Bioresour Bioprocess* **9**, 47. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00527-1>

Kujawska N, Talbierz S, Dębowski M, Kazimierowicz J, Zieliński M (2021) Cultivation Method Effect on Schizochytrium sp. Biomass Growth and Docosahexaenoic Acid (DHA) Production with the Use of Waste Glycerol as a Source of Organic Carbon. *Energies* **14**, 2952. <https://doi.org/10.3390/en14102952>

Lian M, Huang H, Ren L (2010) Increase of Docosahexaenoic Acid Production by Schizochytrium sp. Through Mutagenesis and Enzyme Assay. *Appl Biochem Biotechnol* **162**, 935–941. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8865-8>

Lisičar J (2013) Proizvodnja lipida sa kvascem *Trichosporon oleaginosus* na glukozu i ksilozi uz limitaciju rasta izvorom dušika (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

- Lucakova S, Branyikova I, Branyik T (2022) Wastewater from the demineralization of cheese whey for cost-efficient cultivation of spirulina. *J Appl Phycol* **34**, 89–99. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02644-4>
- Ma W, Liu M, Zhang Z (2022) Efficient co-production of EPA and DHA by Schizochytrium sp. via regulation of the polyketide synthase pathway. *Commun Biol* **5**, 1356. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04334-4>
- Maza DD, Viñarta SC, Su Y, Guillamón JM, Aybar MJ (2020) Growth and lipid production of Rhodotorula glutinis r4, in comparison to other oleaginous yeasts. *J Biotechnol* **310**, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.01.012>
- Mehta P, Rani R, Gupta R (2023) Simultaneous production of high-value lipids in Schizochytrium sp. by synergism of chemical modulators. *Appl Microbiol Biotechnol* **107**, 6135–6149. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12698-8>
- Morabito C, Bournaud C, Maës C, Schuler M, Aiese R, Cigliano Y i sur. (2019) The lipid metabolism in thraustochytrids. *Prog Lipid Res* **76**, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.101007>
- Narendranath NV, Thomas KC, Ingledew WM (2001) Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of Saccharomyces cerevisiae in a minimal medium. *J Ind Microbiol Biot* **26(3)**, 171–177. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000090>
- Nguyen HC, Su CH, Yu YK, Huong DTM (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>
- Park H, Minsoo K, Seo JW, Ju JH, Heo SY, Park SM i sur. (2018) Enhanced production of carotenoids using a Thraustochytrid microalgal strain containing high levels of docosahexaenoic acid-rich oil. *Bioproc Biosyst Eng* **41**, 1355–1370. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1963-7>
- Patel A, Mikes F, Matsakas L (2020) Valorization of cheese whey using microbial fermentations: A comprehensive review. *Bioresource Technol* **313**, 2749-2764. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10408-2>
- Patil KP, Gogate PR (2015) Improved synthesis of Docosahexaenoic acid (DHA) using Schizochytrium limacinum SR21 and sustainable media. *Chem Eng J* **268**, 187-196. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.01.050>

Puri M, Gupta A, Sahni S (2023) *Schizochytrium* sp. *Trends Microbiol* **31(8)**, 872–873. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.01.010>

Qiu X (2003) Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7,10,13,16,19): two distinct pathways. *Plefa* **68(2)**, 181-186. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(02\)00268-5](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(02)00268-5)

Qu L, Ren L, Sun G, Ji X, Nie Z, Huang H (2013) Batch, fed-batch and repeated fed-batch fermentation processes of the marine Thraustochytrid *Schizochytrium* sp. for producing docosahexaenoic acid. *Bioprocess Biosyst Eng* **36(12)**, 1905–1912. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0966-7>

Sahin D, Tas E, Altindag UH (2018) Enhancement of docosahexaenoic acid (DHA) production from *Schizochytrium* sp. S31 using different growth medium conditions. *AMB Expr* **8**, 7. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0540-4>

Scott SD, Armenta RE, Berryman KT, Norman AW (2011) Use of raw glycerol to produce oil rich in polyunsaturated fatty acids by a thraustochytrid. *Enzyme Microb Tech* **48**, 267-272. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.11.008>

Singh P, Liu Y, Li L (2014) Ecological dynamics and biotechnological implications of thraustochytrids from marine habitats. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**, 5789–5805. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5780-x>

Stanojević-Nikolić S, Dimić G, Mojović LJ, Pejcin J, Djukić-Vuković A, Kocić-Tanackov S (2016) Antimicrobial Activity of Lactic Acid Against Pathogen and Spoilage Microorganisms. *J Food Process Pres* **40**, 990-998. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12679>

Tang X, Man Y, Hu X, Xu X, Ren L (2022) Identification of carotenoids biosynthesis pathway in *Schizochytrium* sp. and utilization in astaxanthin biosynthesis. *Enzyme Microb Tech* **156**, 110018. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110018>

Tani N, Yoneda K, Suzuki I (2018) The effect of thiamine on the growth and fatty acid content of *Aurantiochytrium* sp. *Algal Res* **36**, 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.012>

Thurn AL, Stock A, Gerwald S (2022) Simultaneous photoautotrophic production of DHA and EPA by *Tisochrysis lutea* and *Microchloropsis salina* in co-culture. *Bioresour Bioprocess* **9**, 130. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00612-5>

Vyas S, Matsakas L, Rova U, Christakopoulos P i Patel A (2023) Insights into hydrophobic waste valorization for the production of value-added oleochemicals. *Microb Biotechnol* **16**,

177–183. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14122>

Wang Q, Han W, Jin W, Gao S, Zhou X (2021) Docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.: review and prospect. *Food Biotechnol* **35(2)**, 111–135. <https://doi.org/10.1080/08905436.2021.1908900>

Wu S, Yu S, Lin L (2005) Effects of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. *Process Biochem* **40**, 3103–3108. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.007>

Zeb L, Wang X, Zheng WL, Teng X, Shafiq X, Mu Y i sur. (2019) Microwave-assisted three-liquid-phase salting-out extraction of docosahexaenoic acid (DHA)-rich oil from cultivation broths of *Schizochytrium limacinium* SR21. *Food Bioprod Process* **118**, 237–247. <https://doi:10.1016/j.fbp.2019.09.008>.

Zeng Y, Ji X, Lian M, Ren L, Jin L, Ouyang P i sur. (2011) Development of a temperature shift strategy for efficient docosahexaenoic acid production by a marine fungoid protist, *Schizochytrium* sp. HX-308. *Appl Biochem Biotech* **164(3)**, 249–255. <https://doi:10.1007/s12010-010-9131-9>.

Zhu La ALT, Pierce KM, Liu WH, Gao ST, Bu DP, Ma L (2021) Supplementation with *Schizochytrium* sp. enhances growth performance and antioxidant capability of dairy calves before weaning. *Anim Feed Sci Tech* **271**, 114. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114779>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Ana Davidović 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.

Vlastoručni potpis