

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Marjeta RESNIK

**ENCIMSKA HIDROLIZA CELIČNE STENE
MIKROALGE *Scenedesmus quadricauda***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Marjeta RESNIK

ENCIMSKA HIDROLIZA CELIČNE STENE MIKROALGE
Scenedesmus quadricauda

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF MICROALGAE *Scenedesmus quadricauda* CELL WALL

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je bila imenovana prof. dr. Romana Marinšek Logar in za recenzenta prof. dr. Tom Turk.

Mentorica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Recenzent: prof. dr. Tom Turk

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter Raspor
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Romana Marinšek Logar
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Tom Turk
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 9.12.2011

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Marjeta Resnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 602.3/.4:582.263:577.15(043)=163.6
KG biotehnologija/alge/mikroalge/*Scenedesmus quadricauda*/uporaba mikroalg/biopresesi/gojenje mikroalg/fotobioreaktorji/celična stena/encimi/celulaze/hemicelulaze/ksilanaze/Roxazyme VP (CT)/Roxazyme G2 G/Roxazyme WX (CT)/hidroliza celične stene/encimska kinetika/empirični model/reduksijski sladkorji
AV RESNIK, Marjeta
SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/TURK, Tom (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2011
IN ENCIMSKA HIDROLIZA CELIČNE STENE MIKROALGE *Scenedesmus quadricauda*
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 56 str., 24 pregл., 19 sl., 14 pril., 57 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V diplomskem delu smo s cenovno sprejemljivimi encimskimi pripravki Roxazyme VP (CT) (VP), Roxazyme G2 G (G) in Roxazyme WX (CT) (WX) (DSM Nutritional Products) izvedli hidrolizo celične stene mikroalge *Scenedesmus quadricauda*. Encimski pripravki so mešanice celulaz in hemicelulaz. Biomaso smo pridobili z gojenjem mikroalge v 50 in 100 L fotobiorektorju. Inokulum smo pripravljali v erlenmajericah (predstavljal je 10 % celotnega volumna) ali pa smo reciklirali del biomase dobljene ob žetvi. Sproti smo spremljali temperaturo in pH ter slednjega vzdrževali med 7 in 8 z dovajanjem CO₂. Rast kulture smo spremljali z merjenjem optične gostote pri 654 nm in štetjem celic z mikroskopom in hemocitometrom. Pridobili smo 723,4 g centrifugirane mokre biomase, ki smo jo pred encimsko hidrolizo avtoklavirali. Encime smo dodali skupaj s tetraciklinom. Hidroliza je potekala pri temperaturah 25 in 50 °C ter pH 5 in 7. Merili smo koncentracijo reduksijskih sladkorjev in koncentracijo organske snovi. S pomočjo kinetičnega modela prvega reda smo izračunali parametre za nadaljnjo analizo. Dva izmed treh encimskih pripravkov sta razgrajevala mikroalgnjo celično steno. Encimski pripravek WX, ki ima ksilanazno aktivnost, ni deloval, zato sklepamo, da celična stena ni vsebovala ksilana. Pripravek VP je bolje hidroliziral mikroalgnjo celično steno kakor pripravek G, ob tem pa nismo opazili statistično značilnih razlik ($p>0,05$) med hidroliznimi donosi v različnih razmerah inkubacije. Primerjali smo tudi povprečne hidrolizne donose dveh posameznih encimskih pripravkov in mešanice teh dveh encimskih pripravkov in delno potrdili hipotezo, da bo hidroliza pri uporabi encimskih mešanic večja kakor pri posameznih encimskih pripravkih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
DC UDK 602.3/.4:582.263:577.15(043)=163.6
CX biotechnology/algae/microalgae/*Scenedesmus quadricauda*/commercial applications/bioprocesses/microalgae cultivation/photobioreactors/cell wall/enzymes/cellulase/hemicellulase/ xylanase/Ronozyme VP (CT)/Roxazyme G2 G/Ronozyme WX (CT)/cell wall hydrolysis/ enzyme kinetics/empirical model/reducing sugars
AU RESNIK, Marjeta
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/TURK, Tom (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2011
TI ENZYMATIC HYDROLYSIS OF MICROALGAE *Scenedesmus quadricauda* CELL WALL
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 56 p., 24 tab., 19 fig., 14 ann., 57 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In this study, cell walls of microalgae *Scenedesmus quadricauda* were hydrolyzed by three different preparations of feed enzymes: Ronozyme VP (CT) (VP), Roxazyme G2 G (G) and Ronozyme WX (CT) (WX) (DSM Nutritional Products) with cellulolytic and hemicellulolytic activity. The strain was cultured in 50 and 100 L photobioreactor. The inoculum represented 10 % of total volume or semi-continuous conditions were kept by returning part of biomass after harvesting. Temperature and pH were monitored on-line and pH was regulated between 7 and 8 by adding CO₂. Growth rate was observed by measuring optical density at 654 nm and by counting cells with hemocytometer. The total weight of centrifuged wet biomass was 723.4 g. Before enzymatic hydrolysis the biomass was autoclaved. Enzymes were added with Tetracycline and kept with biomass at temperature 25 and 50 °C, pH 5 and 7. To evaluate enzymatic hydrolysis reducing sugar content and total organic load was measured. Parameters were calculated by first-order reaction kinetics model. Two out of three enzymes hydrolyzed the cell walls of which VP produced more reducing sugars than G. No increase in concentration of reducing sugar was measured for WX (xylanolytic activity), therefore it is assumed that the cell wall did not contain xylane. The hypothesis, that combination of enzymes will more efficiently hydrolyze the cell wall of microalgae, was partially confirmed. No statistically significant ($p>0,05$) difference was observed between hydrolysis yield at different conditions of incubation.

KAZALO VSEBINE

| | |
|--|-----------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION | IV |
| KAZALO PREGLEDNIC | VIII |
| KAZALO SLIK | IX |
| KAZALO PRILOG | X |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | XI |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA | 1 |
| 1.2 CILJI NALOGE | 2 |
| 1.3 DELOVNE HIPOTEZE | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 MIKROALGE | 3 |
| 2.2 MIKROALGNA BIOTEHNOLOGIJA | 3 |
| 2.2.1 Mikroalgni proizvodi danes in potenciali uporabe mikroalg | 3 |
| 2.2.1.1 Mikroalge v prehrani in živalski krmi | 3 |
| 2.2.1.2 Kozmetika | 4 |
| 2.2.1.3 Molekule z visoko dodano vrednostjo | 4 |
| 2.2.1.4 Čistilne naprave | 5 |
| 2.2.1.5 Gnojila | 5 |
| 2.2.1.6 Energija | 5 |
| 2.2.1.7 Zajem in sekvestracija CO ₂ | 5 |
| 2.2.2 Sistematika biotehnološko pomembnih mikroalg | 7 |
| 2.2.3 Pripravljalni procesi | 10 |
| 2.2.4 Gojenje | 10 |
| 2.2.4.1 Odprti bazeni | 10 |
| 2.2.4.2 Fotobioreaktorji (FBR) | 10 |
| 2.2.4.3 Primerjava proizvodnih sistemov za mikroalge | 11 |
| 2.2.5 Zaključni procesi | 13 |
| 2.3 ODPIRANJE CELIČNE STENE | 13 |
| 2.3.1 Sestava celične stene | 14 |
| 2.3.2 Gradniki celične stene | 15 |
| 2.3.3 Encimi | 15 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 3 | MATERIAL IN METODE..... | 17 |
| 3.1 | POTEK DELA | 17 |
| 3.2 | MATERIAL | 18 |
| 3.2.1 | Mikroorganizem | 18 |
| 3.2.2 | Fotobioreaktor | 18 |
| 3.2.3 | Encimi | 18 |
| 3.2.3.1 | Encimski pripravek RONOZYME VP (CT) | 18 |
| 3.2.3.2 | Encimski pripravek ROXAZYME G2 G | 19 |
| 3.2.3.3 | Encimski pripravek RONOZYME WX (CT) | 19 |
| 3.2.4 | Laboratorijske kemikalije | 19 |
| 3.2.5 | Laboratorijski pribor | 20 |
| 3.2.6 | Laboratorijske aparature | 20 |
| 3.2.7 | Gojišča | 21 |
| 3.2.7.1 | Gojišče po Jaworskem (CCAP, 2011) | 21 |
| 3.2.7.2 | Plantfer-U | 21 |
| 3.2.7.3 | Agarske plošče za dokazovanje okužbe | 22 |
| 3.2.8 | Pufer in raztopine | 22 |
| 3.2.8.1 | Citratni pufer pH=5 | 22 |
| 3.2.8.2 | 10 % (vol.) triklorocetna kislina..... | 23 |
| 3.2.8.3 | Reagent za test redukcijskih sladkorjev | 23 |
| 3.2.8.4 | Standardne raztopine glukoze | 23 |
| 3.2.8.5 | Reagent PAHBAH | 24 |
| 3.3 | METODE | 24 |
| 3.3.1 | Pridobivanje algne biomase..... | 24 |
| 3.3.1.1 | Inokulum | 24 |
| 3.3.1.2 | Fotobioreaktor | 24 |
| 3.3.2 | Spremljanje rasti | 27 |
| 3.3.2.1 | Spektrofotometrično..... | 27 |
| 3.3.2.2 | Štetje celic | 27 |
| 3.3.2.3 | Fotografiranje mikroskopskega preparata..... | 27 |
| 3.3.3 | Žetev mikroalgne biomase | 27 |
| 3.3.4 | Encimska hidroliza mikroalgne celične stene | 27 |
| 3.3.4.1 | Izbira inkubacijskih razmer | 27 |
| 3.3.4.2 | Priprava encimov..... | 28 |
| 3.3.4.3 | Priprava reakcijske mešanice | 29 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3.3.4.4 | Inkubacija in odvzem vzorcev..... | 29 |
| 3.3.4.5 | Spremljanje encimske aktivnosti..... | 29 |
| 3.3.4.6 | Test redukcijskih sladkorjev..... | 29 |
| 3.3.4.7 | Določanje suhe (SS) in organske snovi (OS) v reakcijski mešanici | 30 |
| 3.3.5 | Analiza rezultatov..... | 30 |
| 3.3.5.1 | Rastna krivulja..... | 30 |
| 3.3.5.2 | Encimska razgradnja | 30 |
| 3.3.5.3 | Statistična analiza..... | 31 |
| 4 | REZULTATI | 32 |
| 4.1 | GOJENJE MIKROALGE <i>S. quadricauda</i> | 32 |
| 4.2 | FOTOGRAFIRANJE MIKROSKOPSKEGA PREPARATA | 34 |
| 4.3 | ENCIMSKA HIDROLIZA CELIČNE STENE | 35 |
| 4.3.1 | Spremljanje razgradnje mikroalgnih celičnih sten | 35 |
| 4.3.2 | Primernost različnih encimskih pripravkov za razgradnjo mikroalgne celične stene | 38 |
| 4.3.3 | Primerjava hidroliznih donosov..... | 40 |
| 4.3.3.1 | Primerjava hidroliznih donosov v različnih razmerah inkubacije..... | 40 |
| 4.3.3.2 | Primerjava hidroliznih donosov posameznega encimskega pripravka z mešanicó | 42 |
| 4.3.3.3 | Primerjava hidroliznih donosov encimskih pripravkov VP in G pri različnih inkubacijskih pogojih | 43 |
| 5 | RAZPRAVA..... | 45 |
| 5.1 | GOJENJE MIKROALGE <i>S. quadricauda</i> | 45 |
| 5.2 | FOTOGRAFIRANJE MIKROSKOPSKEGA PRIPRAVKA | 45 |
| 5.3 | ENCIMSKA HIDROLIZA CELIČNE STENE | 46 |
| 5.3.1 | Encimska kinetika in modeliranje encimskega delovanja..... | 46 |
| 5.3.2 | Spremljanje razgradnje mikroalgnih celičnih sten | 46 |
| 5.3.3 | Primernost različnih encimskih pripravkov za razgradnjo mikroalgne celične stene | 47 |
| 5.3.4 | Primerjava hidroliznih donosov..... | 47 |
| 6 | SKLEPI | 49 |
| 7 | POVZETEK..... | 50 |
| 8 | VIRI | 52 |

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|---|----|
| Preglednica 1: Polinenasičene maščobne kisline v mikroalgah (Spolaore in sod., 2006: 91) | 4 |
| Preglednica 2: Alge in njihova biotehnološka uporaba (Tomaselli, 2004; Toman, 1996; Pulz in Gross, 2004; Lee, 1999; NCBI, 2011; Sedmak, 2011) | 8 |
| Preglednica 3: Prednosti in slabosti različnih sistemov za gojenje alg (Carlsson in sod, 2007: 14, 15)..... | 12 |
| Preglednica 4: Seznam uporabljenih kemikalij | 19 |
| Preglednica 5: Laboratorijske aparature | 20 |
| Preglednica 6: Priprava založnih raztopin za gojišče po Jaworskem | 21 |
| Preglednica 7: Sestava gnojila Plantfer-U | 21 |
| Preglednica 8: Sestava hranilnega agarja | 22 |
| Preglednica 9: Priprava raztopine citronske kisline | 22 |
| Preglednica 10: Priprava raztopine dinatrijevega hidrogen ortofosfata | 22 |
| Preglednica 11: Priprava triklorocetne kisline | 23 |
| Preglednica 12: Priprava posameznih raztopin za test redukcijskih sladkorjev | 23 |
| Preglednica 13: Priprava standardnih raztopin glukoze | 23 |
| Preglednica 14: Priprava reagenta za določanje koncentracije redukcijskih sladkorjev .. | 24 |
| Preglednica 15: Pregled gojenja mikroalge <i>S. quadricauda</i> v fotobioreaktorju..... | 25 |
| Preglednica 16: Pregled uporabljenih encimskih pripravkov in kratice s katerimi jih bomo v nadaljevanju označevali | 28 |
| Preglednica 17: Priporočena količina encimskega pripravka na substrat..... | 28 |
| Preglednica 18: Priprava encimskih pripravkov..... | 29 |
| Preglednica 19: Masa pridobljene mokre biomase..... | 33 |
| Preglednica 20: Koncentracija organske snovi v treh reakcijskih mešanicah (1, 2, 3) z encimskim pripravkom G pri pH=7 in T=25 °C..... | 35 |
| Preglednica 21: Izračunane koncentracije proizvoda, ki ga lahko dobimo iz substrata v določeni reakcijski mešanici (vrednost b) v različnih razmerah inkubacije | 39 |
| Preglednica 22: Hidrolizni donosi encimskih pripravkov v različnih razmerah inkubacije | 40 |
| Preglednica 23: Hidrolizni donosi encimskih pripravkov VP in G ter mešanice VP+G v različnih razmerah inkubacije | 42 |
| Preglednica 24: Hidrolizni donosi encimskih pripravkov VP in G v različnih razmerah inkubacije | 43 |

KAZALO SLIK

| | |
|---|----|
| Slika 1: Shema poti do končnega biotehnološkega proizvoda | 3 |
| Slika 2: Celična stena <i>Scenedesmus quadricauda</i> (Bisalputra in Weier, 1963: 1017)..... | 15 |
| Slika 3: Molekulska struktura celuloze in mesta delovanja celulaz (Kumar in sod., 2008: 379)..... | 16 |
| Slika 4: Polimerna kemijska struktura hemiceluloze in tarče delovanja hidrolitičnih encimov, ki so vpleteni v hemicelulozno razgradnjo (Kumar in sod., 2008: 379) | 16 |
| Slika 5: Shema dela | 17 |
| Slika 6: Cevni fotobioreaktor | 18 |
| Slika 7: Pridobivanje mikroalgne biomase | 26 |
| Slika 8: Rastna krivulja mikroalge <i>Scenedesmus quadricauda</i> v fotobioreaktorju pri 3. gojitvi..... | 32 |
| Slika 9: Rastna krivulja mikroalge <i>Scenedesmus quadricauda</i> v fotobioreaktorju pri 6. gojitvi (vzdrževanje logaritemske faze rasti) | 33 |
| Slika 10: Fotografija celic <i>S. quadricauda</i> po centrifugiranju s fotoaparatom Canon PowerShot A640 nameščenim na mikroskop (1000× povečava mikroskopa) (levo); fotografija inokuluma mikroalge <i>S. quadricauda</i> s konfokalno mikroskopijo (desno)..... | 34 |
| Slika 11: Spreminjanje koncentracije reduksijskih sladkorjev s časom v treh reakcijskih mešanicah (1, 2, 3) z encimskim pripravkom VP pri pH=5 in T=50 °C. Encimi niso bili dodani aseptično. | 35 |
| Slika 12: Spreminjanje koncentracije reduksijskih sladkorjev s časom v treh reakcijskih mešanicah (1, 2, 3) z encimskim pripravkom G pri pH=7 in T=25 °C | 36 |
| Slika 13: Spreminjanje koncentracije reduksijskih sladkorjev s časom v dveh reakcijskih mešanicah (2, 3) z encimskim pripravkom VP pri pH=7 in T=50 °C | 37 |
| Slika 14: Spreminjanje koncentracije reduksijskih sladkorjev v reakcijskih mešanicah (1, 2, 3) z encimskim pripravkom WX pri pH=7 in T=50 °C | 38 |
| Slika 15: Spreminjanje koncentracije reduksijskih sladkorjev v reakcijskih mešanicah (1, 2, 3) z mešanico encimskih pripravkov VP+WX pri pH=7 in T=25 °C | 39 |
| Slika 16: Skupni povprečni hidrolizni donosi v različnih razmerah inkubacije s 95 % intervali zaupanja povprečnih vrednosti..... | 41 |
| Slika 17: Povprečni hidrolizni donosi encimskih pripravkov VP in G ter mešanice encimskih pripravkov VP+G s 95 % intervali zaupanja povprečnih vrednosti | 42 |
| Slika 18: Skupni povprečni hidrolizni donosi encimskih pripravkov VP in G v različnih razmerah inkubacije s 95 % intervali zaupanja povprečnih vrednosti | 44 |
| Slika 19: Povprečna hidrolizna donosa encimskih pripravkov VP in G (v vseh razmerah inkubacije) s 95 % intervaloma zaupanja povprečnih vrednosti..... | 44 |

KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Teoretičen opis izpeljave empiričnega modela prvega reda za opis encimske kinetike
- Priloga A2: Tipičen primer krivulje naraščanja koncentracije produkta s časom
- Priloga A3: Utemeljitev uporabe empiričnega modela prvega reda za opis encimske kinetike
- Priloga B: Koncentracija proizvoda, ki ga lahko dobimo iz substrata v določeni reakcijski mešanici (vrednost b), koncentracija organske snovi in hidrolizni donos encimskih pripravkov v različnih razmerah inkubacije
- Priloga C1: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev s časom v reakcijskih mešanicah z encimskim pripravkom VP v različnih razmerah inkubacije
- Priloga C2: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev s časom v reakcijskih mešanicah z encimskim pripravkom G v različnih razmerah inkubacije
- Priloga C3: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev s časom v reakcijskih mešanicah z encimskim pripravkom WX v različnih razmerah inkubacije
- Priloga C4: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev s časom v reakcijskih mešanicah z mešanico encimskih pripravkov VP+G v različnih razmerah inkubacije
- Priloga C5: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev s časom v reakcijskih mešanicah z mešanico encimskih pripravkov VP+WX v različnih razmerah inkubacije
- Priloga C6: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev s časom v reakcijskih mešanicah z mešanico encimskih pripravkov G+WX v različnih razmerah inkubacije
- Priloga D1: Rezultati statistične analize primerjave povprečnih hidroliznih donosov v različnih razmerah inkubacije z metodo analize variance (ANOVA)
- Priloga D2: Rezultati statistične analize primerjave povprečnih hidroliznih donosov encimskih pripravkov VP in G v različnih razmerah inkubacije z metodo analize variance (ANOVA)
- Priloga D3: Rezultati statistične analize primerjave povprečnih hidroliznih donosov encimskega pripravka VP in mešanice dveh encimskih pripravkov VP+G z metodo analize variance (ANOVA)
- Priloga D4: Rezultati statistične analize primerjave povprečnih hidroliznih donosov encimskega pripravka G in mešanice dveh encimskih pripravkov VP+G z metodo analize variance (ANOVA)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|------------------------------|--|
| ANOVA | metoda analize variance |
| C | ogljik |
| CO ₂ | ogljikov dioksid |
| dH ₂ O | deionizirana voda |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| FBR | fotobioreaktor |
| g | gravitacijski pospešek (m/s ²) |
| G | Roxazyme G2 G |
| H | vodik |
| H ₂ O | voda |
| HA | hranilni agar |
| K | kalij |
| m | masa |
| Mg | magnezij |
| N | dušik |
| NO ₃ ⁻ | nitratni ion |
| O ₂ | molekularni kisik |
| OD ₆₅₄ | optična gostota ($\lambda=654$) |
| OS | organska snov |
| obr. | obratov |
| P | fosfor |
| PCR | verižna reakcija s polimerazo |
| rRNA | ribosomska ribonukleinska kislina |
| S | žveplo |
| <i>S. quadricauda</i> | <i>Scenedesmus quadricauda</i> |
| SS | suha snov |
| VP | Ronozyme VP (CT) |
| WX | Ronozyme WX (CT) |

1 UVOD

Mikroalge so mikroskopske alge, ki jih najdemo v vodah in na zemeljskih površinah po vsem svetu. Lahko so enocelične ali se združujejo v kolonije (Tomaselli, 2004). Večinoma so fotoavtotrofni organizmi, kar pomeni, da energijo za svoje potrebe pridobivajo s fotosintezo in s tem v precejšnjem deležu prispevajo k produkciji kisika na Zemlji (Möller, 2006).

Biotehnologija mikroalg je tesno povezana z biotehnološko proizvodnjo makroalg in je mlajša veja algne biotehnologije. Mikroalgni proizvodi segajo od biomase za hrano in krmo do specifičnih snovi uporabnih v kozmetični in prehranski industriji. Uporabljamо jih tudi v pri čiščenju odpadnih voda in gnojenju. Mnogi v mikroalgah vidijo potencial za pridobivanje bioenergije ter zajem CO₂ (Pulz in Gross, 2004; Costa in de Moraes, 2011; Spolaore in sod., 2006).

Lahko jih gojimo v odprtih bazenih ali v zaprtih sistemih t. i. fotobiorektorjih (Tredici, 2004). Za svojo rast potrebujejo svetlobo, makroelemente (C, P, N, S, K, Mg), mikroelemente in glede na vrsto še specifične druge substrate (Becker, 1996).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Odprtje celične stene je pomemben korak na poti do končnega biotehnološkega proizvoda iz mikroalgne biomase. Celično steno perforiramo ali razgradimo, zato da pridemo do metabolita v celici ali dobimo proizvode iz celične stene (Molina Grima in sod., 2004).

Alge imajo glede na strukturo in kemijsko sestavo raznolike celične stene. Večinoma so sestavljene iz mreže celuloznih vlaken, ki je dopolnjena z drugimi polisaharidi (Madigan in Martinko, 2006). Tradicionalna metoda za hidrolizo celuloze temelji na kemijskem katalitičnem procesu, ki poteka pri visoki temperaturi in tlaku. Biomaso moramo že pred tem obdelati z eno od fizikalnih metod. Ta proces je energijsko potraten in pogosto škoduje celičnim snovem, ki jih želimo pridobiti (Fu in sod., 2010). Za hidrolizo celične stene lahko uporabimo celulaze, encime, ki hidrolizirajo celulozo (Harun in Danquah, 2011) in hemicelulaze, ki delujejo sinergistično s celulazami in pripomorejo k učinkovitejši razgradnji (Möller, 2006). Encimska hidroliza je napreden pristop, saj za njeno izvedbo porabimo manj energije, je specifična in pridobimo manj stranskih proizvodov (Fu in sod., 2010). V okviru diplomske naloge smo v fotobioreaktorju gojili mikroalge *Scenedesmus quadricauda*, ki smo jim s cenovno dostopnimi encimi poskusili čim bolj uspešno razgraditi celično steno.

1.2 CILJI NALOGE

Cilji diplomskega dela so:

- vzgojiti ustreznou količino mikroalgne biomase v fotobioreaktorju,
- encimsko čim bolj uspešno razgraditi celično steno mikroalge *Scenedesmus quadricauda*,
- ugotoviti, kateri izmed treh testiranih encimskih pripravkov oziroma katera kombinacija encimskih pripravkov najbolj učinkovito razgradi mikroalgne celične stene,
- primerjati uspešnost encimske razgradnje celične stene mikroalg pri dveh različnih temperaturah in dveh različnih vrednostih pH.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Uporabljeni encimski pripravki (mešanice celulaz in hemicelulaz) delujejo na celično steno mikroalge *Scenedesmus quadricauda*, kar zaznamo kot povečano koncentracijo redukcijskih sladkorjev v reakcijski mešanici,
- encimska aktivnost bo največja v začetnih urah inkubacije,
- hidroliza mikroalgnih celičnih sten bo največja pri temperaturi 25 °C in pH vrednosti 7,
- hidroliza mikroalgnih celičnih sten bo večja pri kombinaciji dveh encimskih pripravkov kakor pri posameznem encimskem pripravku.

2 PREGLED OBJAV

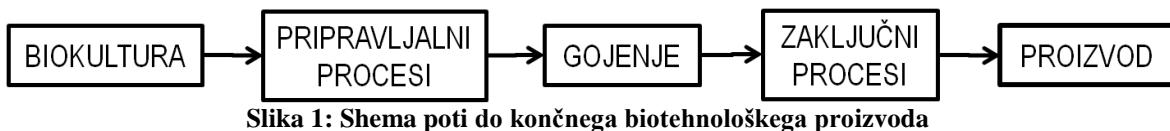
2.1 MIKROALGE

V aplikativni fikologiji izraz mikroalge vključuje mikroskopske alge v širšem pomenu besede in oksigene fotosintetske bakterije (Tomaselli, 2004). Lahko so enocelične ali kolonijske oblike. Kadar imajo celice urejene v verigo rečemo, da so vlaknaste (filamentozne) (Madigan in Martinko, 2006). Večinoma so prostoživeče, vendar jih nekaj živi v simbiozi z drugimi organizmi. Značilna je zveza z glivami, ki oblikuje lišajski organizem (Tomaselli, 2004; Toman, 1996).

2.2 MIKROALGNA BIOTEHNOLOGIJA

Mikroalgna biotehnologija je tesno povezana z makroalgno biotehnologijo in je mlajša veja alge biotehnologije. Aplikacije segajo od enostavne proizvodnje biomase za hrano in krmo do proizvodov za ekološke aplikacije in kozmetiko (Pulz in Gross, 2004; Spolaore in sod., 2006). Za večino aplikacij se trg še razvija (Pulz in Gross, 2004). Mikroalge so tudi potencialen vir biogoriv (Costa in de Moraes, 2011).

Pot do končnega biotehnološkega proizvoda po navadi poteka po sledeči shemi:



V nadaljevanju bomo najprej opisali mikroalgne proizvode, ki so danes na voljo na tržišču in potenciale uporabe mikroalg. Nato bomo opisali pot, ki vodi do teh proizvodov.

2.2.1 Mikroalgni proizvodi danes in potencialni uporabe mikroalg

2.2.1.1 Mikroalge v prehrani in živalski krmi

Na tržišču so dostopne mikroalge v obliki tablet, kapsul in napitkov. Uporabljam jih kot prehranske dodatke, naravna prehranska barvila, lahko jih dodajamo v hrano, žvečilne gumije in v pijače (Spolaore in sod., 2006). Mikroalge, ki jih gojimo za prehrano so: *Arthrospira (Spirulina)*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nostoc* in *Aphanizomenon* (Pulz in Gross, 2004).

Uporabljam jih tudi za krmljenje živali, od morskih do hišnih in hlevskih živali. Za krmo gojimo naslednje mikroalge: *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* in *Thalassiosira*. Pri gojenju rib in školjk jih uporabljam za izboljševanje proizvoda. Umetno gojenim organizmom, kot sta losos in postrv, v krmi manjka pigmentov, ki bi jim dajali značilno barvo, zato jim dodajamo karotenoidne pigmente, kot je astaksantin. Čeprav ga je velika večina na trgu proizvedena sintetično, lahko uporabimo tudi algo *Haematococcus*, ki je naraven vir tega barvila.

Podobno uporabljamo tudi cianobakterijo *Arthrospira (Spirulina)* za krape in diatomejo *Haslea ostrearia* za ostrige (Spolaore in sod., 2006)

2.2.1.2 Kozmetika

Mikroalgne ekstrakte dodajamo v različne kozmetične pripravke npr. kreme proti staranju kože, pilinge, nege za obnovo in osvežitev kože... Večinoma uporabljamo vrsti *Arthrospira (Spirulina)* in *Chlorella* (Spolaore in sod., 2006).

2.2.1.3 Molekule z visoko dodano vrednostjo

Mikroalge so potencialen vir polinenasičenih maščobnih kislin (Preglednica 1). Na tržišču je dostopna le eikozapentaenojska kislina (EPA), saj proizvodnja ostalih ni ekonomsko konkurenčna drugim virom (Spolaore in sod., 2006).

Preglednica 1: Polinenasičene maščobne kisline v mikroalgah (Spolaore in sod., 2006: 91)

| Polinenasičene maščobne kisline | Struktura | Potencialna aplikacija | Producent |
|-------------------------------------|------------------------------|--|--|
| γ-linolenska kislina (GLA) | 18:3 ω6, 9, 12 | Otroške formule, prehranski dodatki | <i>Arthrospira</i> <i>(Spirulina)</i> |
| Arahidonska kislina (AA) | 20:4 ω6, 9, 12 ,15 | Otroške formule, prehranski dodatki | <i>Porphyridium</i> |
| Eikozapentaenojska kislina (EPA) | 20:5 ω3, 6, 9, 12, 15 | Prehranski dodatki, uporaba v akvakulturah | <i>Nannochloropsis</i> , <i>Phaeodactylum</i> , <i>Nitzschia</i> |
| Dokozaheksaenojska kislina (DHA) | 22:6 ω3, 6, 9, 12, 15, 18 | Otroške formule, prehranski dodatki, uporaba v akvakulturah | <i>Cryptocodium</i> , <i>Schizochytrium</i> |

Pigmente, dobljene iz mikroalg (β -karoten, astaksantin in drugi), uporabljamo zaobarvanje hrane (npr. pomarančnega soka), krmni dodatek ribam in perutnini ter v kozmetični industriji. Najprimernejša vrsta za pridobivanje β -karotena je *Dunaliella salina* (Spolaore in sod., 2006). Naravna barvila so tudi fikobiliproteini, ki jih komercialno proizvajamo s cianobakterijo *Arthrospira (Spirulina)* in rdečo algo *Porphyridium*. Študije kažejo na zdravilne učinke teh molekul, kar bi lahko pripeljalo do njihove uporabe v farmacevtski industriji. Uporabni so tudi za proizvodnjo fluorescentnih reagentov v imunologiji (Spolaore in sod., 2006).

Mikroalge so primeren vir biokemikalij s stabilnimi izotopi. Zmožne so vključevanja stabilnih izotopov (^{13}C , ^{15}N in ^{2}H) iz relativno cenovno ugodnih anorganskih molekul ($^{13}\text{CO}_2$, $^{15}\text{NO}_3$, $^{2}\text{H}_2\text{O}$) v vrednejše organske spojine (aminokisline, ogljikovodike, lipide in nukleinske kisline). Tako lahko določamo strukturo teh molekul na atomski ravni in študiramo metabolizem (Spolaore in sod., 2006).

2.2.1.4 Čistilne naprave

Tehnologije čiščenja odpadnih voda prvenstveno temeljijo na bakterijskih populacijah, vendar pomen alg ni zanemarljiv (Toman, 1996). Alge izboljšajo odstranjevanje hranil, težkih kovin in patogenov ter proizvajajo O₂, ki ga nato porabijo heterotrofne aerobne bakterije. Alge lahko čistijo odpadne vode bodisi direktno bodisi posredno z dovajanjem kisika bakterijam, kar pomaga samemu bakterijskemu čiščenju (Munoz in Guieysse, 2006).

Pri tipičnem aerobnem čiščenju odpadnih komunalnih voda mehansko prezračevanje predstavlja več kot 50 % skupne porabe energije. Z uporabo mikroalg lahko izboljšamo energijsko učinkovitost čistilne naprave. Takšno povezano delovanje mikroalg in bakterij bi lahko uporabili tudi pri odstranjevanju nevarnih snovi, saj je veliko snovi lažje razgradljivih v aerobnih kot v anaerobnih razmerah. Dovajanje kisika z algami je varnejše, saj je manj možnosti za izpust nevarnih snovi ali aerosolov kakor pri mehanskem prezračevanju. Vendar so mikroalge običajno bolj občutljive in rastejo počasneje kakor bakterije, zato je odstranjevanje snovi omejeno z nastajanjem O₂, kar je direktno povezano z mikroalgnogno aktivnostjo (Munoz in Guieysse, 2006).

Mikroalge lahko uporabimo tudi direktno za odstranjevanje nutrientov npr. dušikovih in fosfatnih ionov. Le-te odstranjujemo z različnimi biološkimi in kemičnimi procesi, vendar alge obetajo možnost odstranitve hranil z neto energijskimi prihranki. Hranil ne izgubimo, ampak pridobimo algro biomaso, ki jo lahko porabimo za krmo ali za pretvorbo v energijo (Kryder, 2007). Prav tako lahko z algami razgrajujemo različne organske snovi in odstranjujemo toksične kovine (Munoz in Guieysse, 2006).

2.2.1.5 Gnojila

Mikroalge proizvajajo polimere, ki vplivajo na zadrževanje vode in delcev v zemlji. Poleg tega proizvajajo bioaktivne snovi, ki vplivajo na višje rastline, zato je možen razvoj proizvodnje biološko aktivnih mikroalgnih spojin proti rastlinskim boleznim (Pulz in Gross, 2004).

2.2.1.6 Energija

Mikroalge so potencialni substrat v bioplarnah, polisaharidni delež lahko uporabimo za proizvodnjo bioetanola, lipidni delež lahko s transesterifikacijo pretvorimo v biodizel, celotno biomaso lahko s pirolizo in termokemičnim utekočinjanjem spremenimo v bio-olje ali pa z njimi proizvajamo vodik. Alge za pretvorbo v bioenergijo morajo biti visoko produktivne, njihova žetev enostavna, gojiti pa jih moramo po enaki ali nižji ceni v primerjavi z biomaso drugih organizmov (Carlsson in sod., 2007; Costa in de Moraes 2011).

2.2.1.7 Zajem in sekvestracija CO₂

Spošna zavest o vplivu povečane koncentracije CO₂ v atmosferi na okolje je pripeljala do iskanja različnih rešitev za zmanjševanje izpustov CO₂. Ko zajemu CO₂ sledi dolgoročno shranjevanje le-tega, govorimo o sekvestraciji CO₂ (Carlsson in sod., 2007).

Predlagali so različne strategije zajema CO₂, ki jih v splošnem lahko razdelimo v naslednje skupine: (1) pristopi, ki temeljijo na kemijskih reakcijah; (2) direktno črpanje pod zemljo oz. v ocean; (3) biološki zajem CO₂. Slednji poteka v fotosintetskih organizmih, ki CO₂ pretvarjajo v organsko snov. Ker mikroalge rastejo veliko hitreje kakor kopenske rastline, ocenjujejo, da so pri zajemu CO₂ 10 do 50-krat učinkovitejše (Ho in sod., 2011). Vendar se moramo zavedati, da ta zajem ni trajen, saj ogljik aktivno kroži (npr. izpust med izgorevanjem biogoriv pridobljenih iz biomase). Na takšen način ga lahko speljemo v cikel, med katerim ne pride do izpustov dodatnega CO₂ (Kumar in sod., 2010). Za doseganje trajnostnih rezultatov, moramo proces zajema sklopiti z drugimi, kot je npr. čiščenje odpadnih voda ali odstranjevanje težkih kovin iz okolja. Kombinacija fiksacije CO₂, proizvodnje biogoriva in čiščenja odpadnih voda bi lahko bila dobra alternativa obstoječim strategijam zajema CO₂. Prav tako so z mikroalgami opravili tudi določene raziskave o sposobnosti alg za zajem dimnih plinov iz tovarn (Ho in sod., 2011).

2.2.2 Sistematika biotehnološko pomembnih mikroalg

Za uspešno izvedbo biotehnološkega procesa, ki nas pripelje do proizvodov, moramo že pred začetkom bioprocesa vso skrb nameniti izboru in pripravi industrijske biokulture (Smole Možina, 1996). Za boljše razumevanje mikroalg, ki jih uporabljamo v biotehnoloških procesih, sledi njihova sistematika.

Tradicionalno so alge razvrščali glede na njihovo barvo, kar se je v določeni meri ohranilo vse do danes. Glavni kriteriji za razvrščanje alg so: vrste pigmentov, rezervna snov in sestava celične stene. Dodatni kriteriji upoštevajo še citološke in morfološke značilnosti kot so: prisotnost celic z bički, struktura bička, način delitve jedra in celice, prisotnost ovojnice endoplazemskega retikla okrog kloroplasta, prisotnost povezave med endoplazemskim retiklom in jedrno membrano (Tomaselli, 2004).

Splošnega klasifikacijskega sistema za alge ni, saj je taksonomija podvržena konstantnim in hitrim spremembam in sledi najnovejšim izsledkom. Tradicionalno taksonomska razvrščanje je v navzkrižju s polifletsko naravo skupin alg (Barsanti in Gualtieri, 2006).

Lee je bil eden prvih znanstvenikov, ki je opozoril na filogenetsko pomembnost dodatnih ovojnici okrog kloroplastov. Alge je razdelil v štiri skupine. Prva skupina vključuje prokariotske alge, medtem ko ostale tri vključujejo evkariotske alge razdeljene glede na evolucijo kloroplasta. V Preglednici 2 smo opisali skupine alg in za njihovo razvrstitev v veliki meri uporabili Leejevo klasifikacijo (Tomaselli, 2004).

Čeprav Leejeva klasifikacija med alge uvršča tudi cianobakterije, velja prikazati tudi drugačen pogled na njihovo uvrstitev. Prokariotska narava teh organizmov, ki nimajo jasno razmejenega jedra kot tudi ne številnih drugih organelov značilnih za evkarionte, vključno z njihovo dejansko povezanostjo z bakterijami, jih dokončno uvršča med bakterije in ne med alge, kamor so jih uvrščali nekdaj. Ne glede na to ostajata izraza cianobakterije in starejši modrozeleni algi (*Cyanophyceae*) sinonima in sta zato marsikje še vedno oba v veljni. Oba opisujeta mikroorganizme in vključujeta tako enocelične kot večcelične prokarionte, ki vsebujejo klorofil a in imajo oksigeno fotosintezo. Rezultati biokemijskih analiz gradbenih delov cianobakterij in genetske analize njihovih 16S ali 23S rRNA so razlog velikih sprememb v taksonomskem razvrščanju (Sedmak, 2011).

Preglednica 2: Alge in njihova biotehnološka uporaba (Tomaselli, 2004; Toman, 1996; Pulz in Gross, 2004; Lee, 1999; NCBI, 2011; Sedmak, 2011)

| Alge | Pigmenti | Rezervna snov | Uporaba | Biotehnološko pomembne mikroalge |
|---|--|--|--|--|
| PROKARIOTSKE ALGE | | | | |
| Cianobakterije (Cyanophyta, modro-zelene cepljivke, cianofiti, cianoficeje, modrozelene alge) | Klorofil a, fikocianin in fikoeritrin | Glikogen, cianoficin in polifosfatne granule | Prehranski dodatki, njihovi metaboliti so potencialno pomembni terapevtiki | <i>Arthrospira (Spirullina), Nostoc commune</i> in <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> |
| Prochlorophyta (Prochlorales, proklorofiti) | Klorofila a in b | | Ni biotehnoloških aplikacij | |
| EVKARIOTSKE ALGE, ki imajo kloroplast obdan z dvema membranama | | | | |
| Glaucophyta | | | Ni biotehnoloških aplikacij | |
| Rhodophyta (rdeče alge) | Fikoeritrin, fikocianin in klorofil a | Floridejski škrob | Pridobivanje arahidonske kisline (AA), pigmentov in ekstracelularnih polisaharidov | <i>Porphyridium</i> |
| Chlorophyta (zelene alge) | Klorofil a in b, karotenoidi | Škrob | Pridobivanje astaksantina (barvilo za akvakulture in naravni antioksidant), prehranski dodatki | <i>Chlorella</i> , <i>Dunaliella</i> in <i>Haematococcus</i> |
| EVKARIOTSKE ALGE, ki imajo kloroplast obdan z eno dodatno membrano endoplazemskega retikla | | | | |
| Euglenida (Euglenophyta, evglenofiti) | Klorofila a in b, α in β-karoteni in nekaj ksantofilov | Paramilon (paraškrob) | Pomembne pri biološkem čiščenju odpadne vode | |
| Dynophyceae (Dynophyta, dinoflagelatne alge) | Klorofila a in c ₂ , karotenoidi | Škrob | Potencialni vir omega-3 nenasičenih maščob | |

Se nadaljuje.

Nadaljevanje Preglednice 2: Alge in njihova biotehnološka uporaba (Tomaselli, 2004; Toman, 1996; Pulz in Gross, 2004; Lee, 1999; NCBI, 2011; Sedmak, 2011)

| Alge | Pigmenti | Rezervna snov | Uporaba | Biotehnološko pomembne mikroalge |
|--|---|--|--|---|
| EVKARIANTSKE ALGE, ki imajo kloroplast obdan z dvema dodatnima membranama endoplazemskega retikla | | | | |
| Cryptophyta | | | Ni biotehnoloških aplikacij | |
| Chrysophyceae (Chrysophyta, rumene oziroma zlate alge) | Klorofili a, c ₁ in c ₂ , ksantofili in β-karoten | Krizolaminarin | Krma kotačnikov in školjk v akvakulturah | |
| Prymnesiophyta | Klorofili a, c ₁ , c ₂ ter fukoksantin | Krizolaminarin | Krma školjkam, še posebno ostrigam | <i>Pavlova lutheri</i> in <i>Isochrysis spp</i> |
| Bacillariophyta (kremenaste alge, tudi <i>Diatomeae</i>) | Klorofili a, c ₁ in c ₂ , ksantofil diatomin in β-karoten | Krizolaminarin in lipidi | Biološko čiščenje odpadnih voda, krma v akvakulturah, ostanki diatomej (diatomejska zemlja) v filtracijskih in adsorpcijskih postopkih | |
| Xanthophyceae (rumeno zelene alge) | Klorofil a in karotenoidi, lahko tudi klorofil c | Krizolaminarin, olja, manitol in glukoza | Ni biotehnoloških aplikacij | |
| Eustigmato-phyceae (Eustigmato-phyta) | Klorofil a in violaksantin | | Krma v akvakulturah, potencialen vir polinenasičenih maščobnih kislin | <i>Nannochloropsis</i> |
| Raphidophyceae (Raphidophytes) | Klorofili a, c ₁ , c ₂ , karotenoidi, (fukoksantin in hetero-ksantin) | | Ni biotehnoloških aplikacij | |
| Phaeophyceae (Phaeophyta, rjave alge) | Fukoksantin, klorofili a, c ₁ , in c ₂ | Laminarin | Pridobivanje alginata | |

2.2.3 Pripravljalni procesi

Če želimo, da bi nam mikroorganizmi izdelali proizvode, jim moramo zagotoviti energijo in snovi, ki jih za to potrebujejo. V ta namen moramo poznati potrebe delovnih mikroorganizmov za preživetje in delovanje, sestavo in količino snovi, ki naj bi bila vgrajena v proizvode, ter možne vire snovi, ki jih lahko damo v gojišča mikroorganizmov (Perdih, 1996). Poznati moramo zahteve posamezne vrste v naravnem okolju, torej njeni ekologijo in parametre, kot so izbira gojišča, pH, temperature, svetlobe. Gojišče mora vsebovati nujne elemente, ki so za alge ogljik, fosfor, dušik, žveplo, kalij in magnezij. Elemente kot sta železo in mangan alge potrebujejo v majhnih količinah, medtem ko natrij ni esencialen, potrebe po kalciju pa so specifične glede na vrsto. Različni drugi elementi kot so kobalt, cink, bor, baker in molibden so potrebni mikroelementi. Nekatere alge potrebujejo še organske substrate (vitamine, nukleinske kisline in rastne faktorje). Alge lahko gojimo v tekočih ali na trdnih gojiščih (Becker, 1996; Toman, 1996).

2.2.4 Gojenje

Fototrofne organizme gojimo v fotobioreaktorjih. Ta izraz v širšem pomenu besede zajema tudi odprte bazene, vendar ga bomo v nadaljevanju uporabljali le za zaprte sisteme za gojenje alg (Tredici, 2004).

2.2.4.1 Odprti bazeni

To so plitvi bazeni v katerih gojimo alge. Hranila zagotovimo z odtočno vodo iz bližnjih zemljišč ali z usmerjanjem vode iz čistilnih naprav. Mešanje poteka s kolesi ali drugimi vrtečimi strukturami. Določeno mešanje dobimo tudi s primerno oblikovanimi vodniki. Algne kulture so lahko definirane (eden ali več izbranih sevov) ali so sestavljene iz mešanice nedefiniranih sevov (Carlsson in sod., 2007).

V uporabi so tri glavne oblike odprtih bazenov: (1) poševni sistemi, kjer je mešanje zagotovljeno s črpanjem in gravitacijskim tokom; (2) krožni bazeni, kjer mešanje povzroča rotirajoča ročka in (3) bazeni v obliki tekaške proge (t.i. »raceway ponds«), kjer bioprosesna brozga kroži, zaradi delovanja vrtečih koles. Možno je tudi gojenje v jezerih in naravnih bazenih (Tredici, 2004).

2.2.4.2 Fotobioreaktorji (FBR)

Fotobioreaktorji so sistemi za gojenje fototrofnih organizmov, pri čemer večina svetlobe (>90 %) ne pride direktno do površine kulture, ampak mora preiti čez prosojne stene reaktorja. Posledično fotobioreaktorji močno omejijo ali preprečijo izmenjavo plinov med kulturo in atmosfero ter vnos kontaminentov (Tredici, 2004). V fotobioreaktorje lahko na kontroliran način dovajamo vodo, CO₂ in hranila ter odstranjujemo kisik (Carlsson in sod., 2007).

Po obliku jih razvrščamo na: (1) cevne ali ploščate; (2) horizontalne, poševne, vertikalne ali spiralne in (3) vjugaste in povezane; po načinu delovanja pa še na: (4) mešanje z zrakom ali črpalko in (5) enofazni bioreaktorji (izmenjava plinov poteka v ločenem razdelku) ali dvofazni (kontinuirana izmenjava plinov poteka v samem reaktorju). Dodatno lahko

fotobioreaktorje razdelimo še glede na material iz katerega so narejeni (steklo, plastika,...) (Tredici, 2004).

2.2.4.3 Primerjava proizvodnih sistemov za mikroalge

Izbira primerenega sistema za gojenje je odvisna od namena samega gojenja. Zaprti sistemi so manj primerni za čiščenje odpadnih voda, ker je cena previsoka. Po drugi strani proizvodi z visoko vrednostjo in kvaliteto, ki jih proizvajamo le v manjših količinah, potrebujejo proizvodnjo v bioreaktorjih (Carlsson in sod., 2007). V Preglednici 3 je navedenih še nekaj primerjav.

Preglednica 3: Prednosti in slabosti različnih sistemov za gojenje alg (Carlsson in sod, 2007: 14, 15)

| Parameter oz. problematika | Odprti bazeni | Fotobioreaktorji |
|-----------------------------------|--|--|
| Prostor | Velik | Samo za fotobioreaktor majhen |
| Izguba vode | Zelo velika, lahko pride do precipitacije soli | Majhna |
| Izguba CO ₂ | Velika, odvisno od globine bazena | Majhna |
| Koncentracija kisika | Običajno dovolj majhna zaradi spontanega izpusta plinov | Nakopičenje v zaprtih sistemih zahteva pripomočke za izmenjavo plinov (O ₂ moramo odstraniti, da preprečimo inhibicijo fotosinteze in fotooksidativne poškodbe) |
| Temperatura | Zelo variabilna, nekaj kontrole možne z globino bazena | Pogosto je potrebno hlajenje (s škropljenjem vode na fotobioreaktor ali potopom cevi v hladne kopeli) |
| Strig | Majhen (nežno mešanje) | Velik (hitri in turbulentni tokovi, ki so potrebni za dobro mešanje, črpajo čez priprave za izmenjavo plinov) |
| Čiščenje | Ni potrebno | Je potrebno (rast na stenah in nabiranje umazanije zmanjšata svetlobno intenziteto), to povzroča obrabo in s tem zmanjša življenjsko dobo FBR |
| Tveganje za kontaminacijo | Veliko (omejuje število vrst, ki jih lahko gojimo) | Majhno |
| Kvaliteta biomase | Variabilna | Ponovljiva |
| Koncentracija biomase | Majhna, med 0,1 in 0,5 g/L | Velika, med 2 in 8 g/L |
| Fleksibilnost proizvodnje | Možnih je samo nekaj vrst, zahtevna zamenjava | Velika, možna zamenjava |
| Kontrola procesa in ponovljivost | Omejena (hitrost toka, mešanje, temperatura le z globino bazena) | Možna znotraj določenih meja |
| Odvisnost od vremena | Velika (svetlobna intenziteta, temperatura, padavine) | Srednja (svetlobna intenziteta, hlajenje) |
| Zagon | 6-8 tednov | 2-4 tedne |
| Stroški delovanja | Majhni (mešanje, dovajanje CO ₂) | Zelo veliki (dovajanje CO ₂ , kontrola pH, odstranjevanje kisika, ohlajanje, čiščenje, vzdrževanje) |
| Stroški zbiranja biomase (žetve) | Veliki, odvisno od vrste | Manjši zaradi velike koncentracije biomase in boljše kontrole nad vrstami in pogojji rasti |

2.2.5 Zaključni procesi

Zaključni procesi so odvisni od končnega proizvoda, vendar večinoma vključujejo naslednje stopnje: zbiranje biomase ali žetev, sušenje biomase, odpiranje celične stene in izolacijo ter čiščenje proizvoda (Molina Grima in sod., 2004).

Biomaso zbiramo ali žanjemo s centrifugiranjem, flokulacijo, membransko filtracijo in s separacijo z ultrazvokom. Metoda, ki jo izberemo je odvisna od vrste mikroalge, gostote celic in pogosto tudi od pogojev gojenja (Carlsson in sod., 2007).

Temu sledi odstranjevanje preostale vode, kar lahko dosežemo z naslednjimi metodami: sušenje z razprševanjem, sušenje z rotacijskim bobnom, sušenje z zamrzovanjem in sušenje na soncu (Molina Grima in sod., 2004).

Pogosto moramo celično steno mikroalg odpreti in prav na to stopnjo se bomo bolj osredotočili v nadaljevanju. Izolacija ter čiščenje proizvoda sta odvisna od tega kaj želimo izolirati iz biomase.

2.3 ODPIRANJE CELIČNE STENE

Odprtje celične stene je pomemben korak na poti do končnega bioteknološkega proizvoda iz mikroalgne biomase. Celično steno odpremo, perforiramo ali razgradimo, zato da dosežemo snovi v celici ali dobimo proizvode iz celične stene. Znotrajcelični proizvodi so barvila, proteini in olja, ki jih uporabljamo za krmo, prehranske dodatke in v akvakulturah. Primera uporabe predvsem ogljikovih hidratov iz stene kot tudi znotrajceličnih prizvodov, sta pridobivanje metana v bioplarnah in proizvodnja bioetanola. Pri proizvodnji bioetanola iz celične stene pridobimo sladkorje, ki jih nato pretvorimo v etanol. Procesu pridobivanja sladkorjev rečemo saharifikacija (Molina Grima in sod., 2004; Becker, 2007; Costa in de Morais, 2011; Sialve in sod., 2009).

Obstaja več metod, s katerimi lahko celično steno odpremo. V splošnem jih delimo na fizikalne, kemijske in encimske. Izbor metode je odvisen od mikroalgne celične stene in želenega proizvoda (Molina Grima in sod., 2004).

Fizikalne metode, ki jih uporabljamo za obdelavo celic so: visokotlačna homogenizacija, mešanje biomase ob prisotnosti steklenih ali keramičnih kroglic in ultrazvok. Za obdelavo biomase v velikem obsegu najpogosteje uporablajo homogenizatorje, ki s strižnimi silami delujejo na različne tipe celic. Tako npr. homogeniziramo celice mikroalge *Haematococcus*, ki jo uporabljamo kot krmo za ribe, saj to pripomore k večji dostopnosti in asimilaciji pigmentov (E. Molina Grima 2004). To mikroalgo uporabljamo tudi za proizvodnjo pigmenta astaksantina. Izolacija je uspešnejša, če celice pred postopki izolacije dodatno obdelamo. Mešanje biomase s steklenimi in keramičnimi kroglicami uporabljamo za mikroalge *Scenedesmus obliquus*, *S. platensis* in *Monodus subterraneus*. Ultrazvok uporabljamo pri pridobivanju proteinov, saj so le-ti občutljivi za pritisk in temperaturo. Ta metoda je primerna za manjše količine biomase (Molina Grima in sod., 2003, 2004).

Kemijske metode temeljijo na uporabi organskih topil (toluena, alkanov ali alkoholov) in alkalnih sredstev. Slednja učinkovito delujejo na celične stene, vendar niso uporabna, ko želimo pridobiti občutljive proizvode, kot so proteini. Uporabna so za izolacijo prostih maščobnih kislin (Molina Grima in sod., 2003, 2004). Saharifikacijo lahko izvedemo tudi s kislo hidrolizo, ki ima slabo lastnost v potencialni razgradnji sproščenih monosaharidov. To vodi do manjših donosov enostavnih sladkorjev (Möller, 2006).

Prednosti encimske hidrolize pred drugimi metodami, kot je npr. kisla hidroliza, so manjša poraba energije, manjši stroški ravnjanja z odpadki in izogib težavam povezanih z rjavenjem opreme (Sun in Cheng, 2002). Uporaba encimov je napreden pristop, saj delujejo specifično in zato dobimo manj stranskih proizvodov (Fu in sod., 2010). Za obdelavo celične stene mikroalg s celulozno celično steno lahko uporabimo encime, ki hidrolizirajo celulozo (Harun in Danquah, 2011).

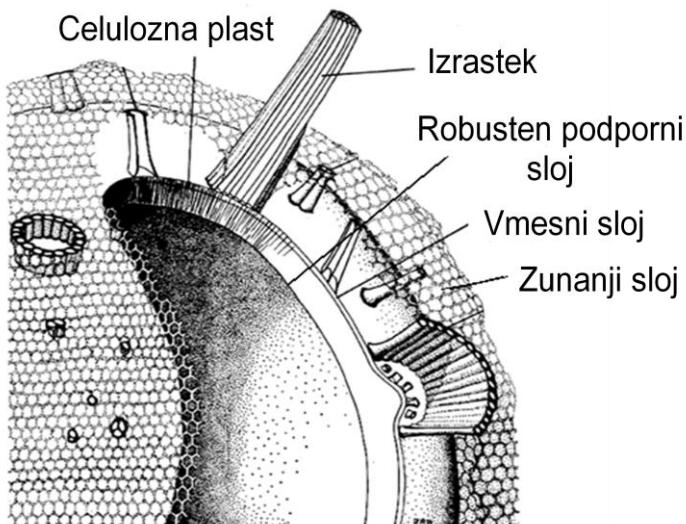
V nadaljevanju bomo natančneje opisali mikroalgne celične stene in encime, ki jih lahko uporabimo za njihovo odprtje.

2.3.1 Sestava celične stene

Alge imajo raznolike celične stene tako po strukturi kot tudi po kemijski sestavi. Večinoma so njihove celične stene sestavljene iz mreže celuloznih vlaken, ki je dopolnjena z drugimi polisaharidi kot so: pektin, ksilan, manan, alginska in fucinska kislina. Nekatere alge imajo celične stene ojačene s kalcijevim karbonatom, druge s hitinom, diatomeje imajo v stenah kremen, medtem ko evglenoidi nimajo celičnih sten. V stenah so pore, široke od 3 do 5 nm. Propustne so za snovi z majhno molekulsko maso kot so: voda, ioni, plini in druge majhne hranilne molekule potrebne za metabolizem in rast, niso pa propustne za makromolekule (Madigan in Martinko, 2006). Evkariontske alge celično steno vedno sestavljajo na zunanjih strani celične membrane in je v več pogledih primerljiva s celično steno višjih rastlin. Materiale, potrebne za izgradnjo celične stene, zberejo v Golgijskih veziklih in jih prenesejo skozi membrano. Tam imajo encimske komplekse, ki so odgovorni za sintezo mikrofibril (Barsanti in Gualtieri, 2006).

Celično steno zelenih alg (*Chlorophyta*) sestavljata fibrilna komponenta in amorfni matriks. Fibrilna komponenta je toga in daje celični steni trdnost. Najdemo jo bolj na notranji strani. Obdaja jo amorfni matriks, ki je bolj na zunanjih strani (van den Hoek in sod., 1995). Celična stena vsebuje celulozo, ksilan, manan, 1,3 in 1,4- β -glukane ter arabinogalaktanske proteine in ne vsebuje lignina (Tuohy in Popper, 2010). Vsebuje tudi netopno strukturo iz ogljika, ki je odporna na bakterijsko in kemijsko razgradnjo (Zeliber in sod., 1988).

Alga *S. quadricauda* ima celično steno sestavljeno iz treh slojev. Notranji sloj je iz celuloze in ločuje posamezne celice, medtem ko zunanjji sloj drži celice cenobija skupaj. Med njima je tanek vmesni sloj (Bisalputra in Weier, 1963). Van den Hoek in sod. (1995) poročajo, da je na notranji strani stene alg rodu *Scenedesmus* robusten podporni sloj, ki vsebuje sporopoleninu podobne snovi. Hagewald (1997) pa poroča, da celična stena vsebuje hemicelulozo. Takeda (1996) je v celični steni več vrst rodu *Scenedesmus* dokazal prisotnost glukoze (glavni sladkor) ter galaktoze in manoze.



Slika 2: Celična stena *Scenedesmus quadricauda* (Bisalputra in Weier, 1963: 1017)

2.3.2 Gradniki celične stene

Celuloza je nerazvejan polimer, pri katerem so D-glukozne enote povezane z β -1,4 glikozidnimi vezmi. V povprečni molekuli celuloze je povezanih 10 000 do 15 000 glukoznih ostankov. Glikozidne vezi v β konfiguraciji omogočajo nastanek zelo dolgih in ravnih verig. Raztegnjene verige celuloze se lahko povežejo v snope vzporednih verig, ki jih imenujemo vlakna, ta pa se lahko sestavijo v močne in toge mreže. Mreže stabilizirajo intra- in intermolekulske vodikove vezi (Boyer, 2005).

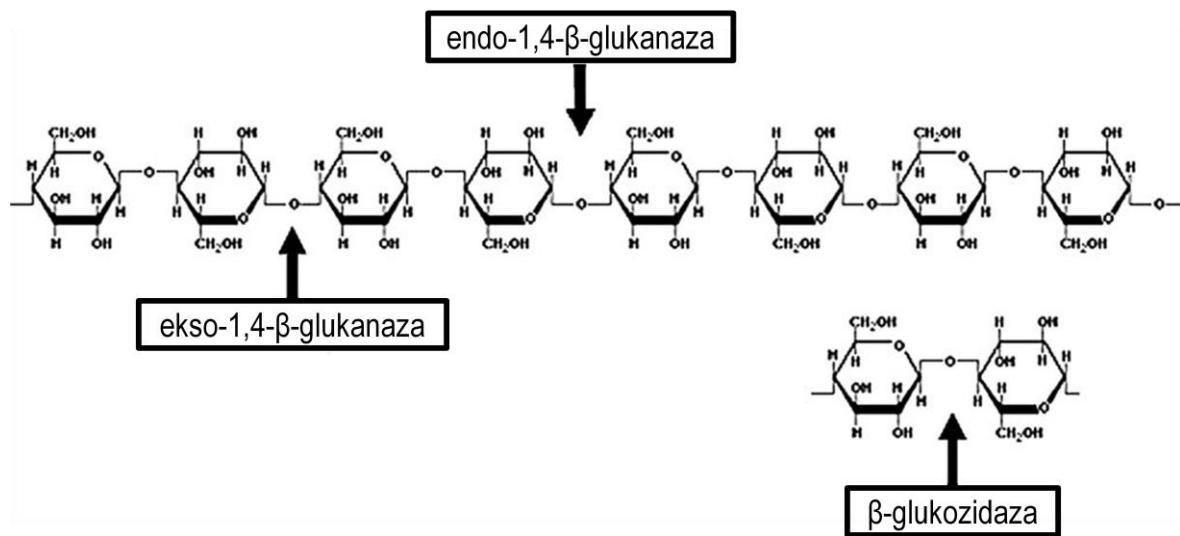
Hemicelulozo sestavlja heterogeni polimeri zgrajeni iz pentoz (D-ksiloza, D-arabinoza), heksoz (D-manoza, D-glukoza in D-galaktoza) in sladkornih kislin (Kumar in sod., 2008).

Če želimo celično steno razgraditi, moramo torej prekiniti togo celulozno strukturo, zato uporabimo encime celulaze. Razgradnja bo še učinkovitejša, če uporabimo tudi encime, ki delujejo na druge dele celične stene (Hedenskog in sod., 1969).

2.3.3 Encimi

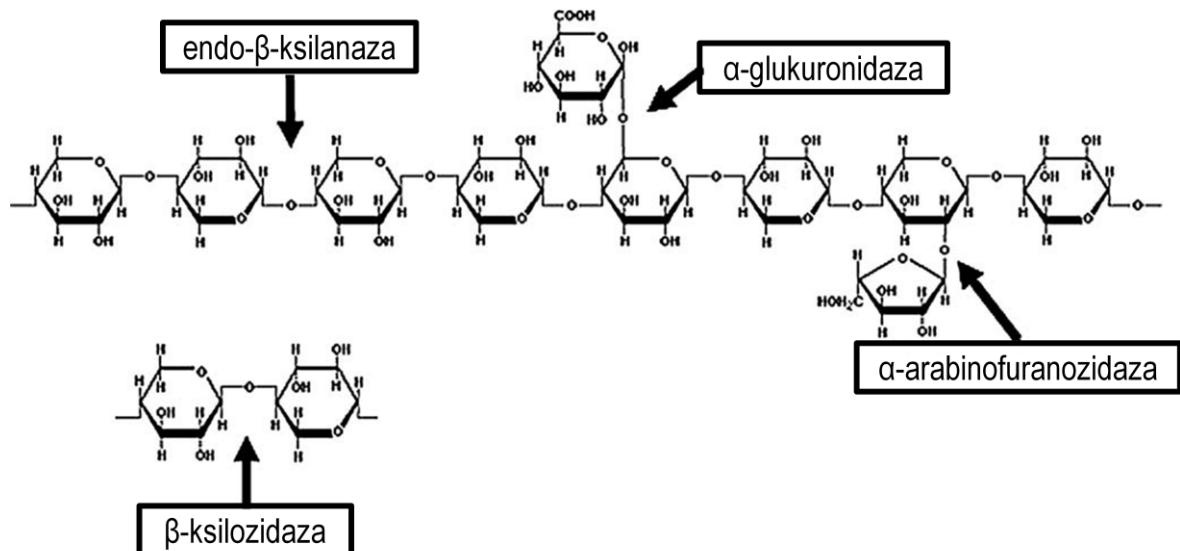
Organizmi, ki so zmožni razgrajevati celulozni material, običajno proizvajajo ekstracelularni ali membransko vezani celulazni sistem, ki je sestavljen iz kombinacije več encimov (Kumar in sod., 2008; Levy in sod., 2002). Encimom, ki hidrolizirajo celulozo, rečemo celulaze. Razdelimo jih v tri glavne skupine: endo-1,4- β -glukanaze (EC 3.2.1.4), ekso-1,4- β -glukanaze (EC 3.2.1.91) in β -glukozidaze (EC 3.2.1.21) (Levy in sod., 2002).

Endo-1,4- β -glukanaze naključno hidrolizirajo 1,4 vezi v celulozni molekuli. Ekso-1,4- β -glukanaze sproščajo celobiozo (najmanjšo ponavljajočo celulozno enoto, disaharid) s tem, ko cepijo konci verig. β -glukozidaze sproščajo glukozne monomere iz celobioze.



Slika 3: Molekulska struktura celuloze in mesta delovanja celulaz (Kumar in sod., 2008: 379)

V razgradnjo hemiceluloze so vpleteni različni encimi (Kumar in sod., 2008). Hemicelulaze delujejo synergistično s celulazami in pripomorejo k učinkovitejši razgradnji (Möller, 2006).

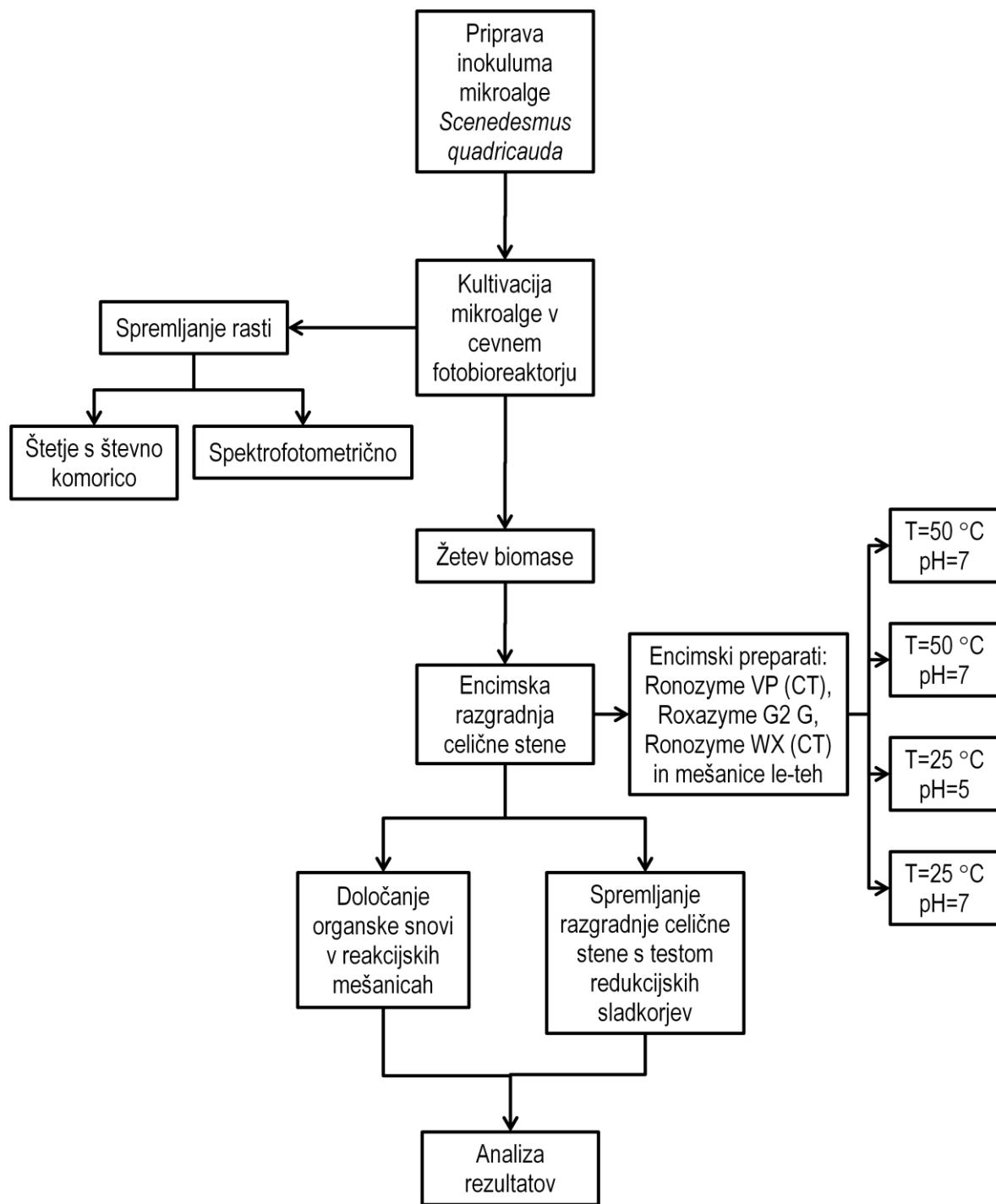


Slika 4: Polimerna kemijska struktura hemiceluloze in tarče delovanja hidrolitičnih encimov, ki so vpleteni v hemicelulozno razgradnjo (Kumar in sod., 2008: 379)

Na učinkovitost encimske hidrolize vpliva več različnih dejavnikov, npr. značilnosti uporabljeni biomase (lastnosti celične stene), razmere med hidrolizo (mešanje, lastnosti encimov) in predobdelava substrata. Za doseganje najboljših rezultatov moramo predobdelavo in sam proces encimske hidrolize optimizirati. Značilnosti celične stene, ki lahko vplivajo na proces, so: specifična površina, na katero lahko encim deluje, obseg polimerizacije, vsebnost lignina in obseg O-acetilacije (Möller, 2006).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 5: Shema dela

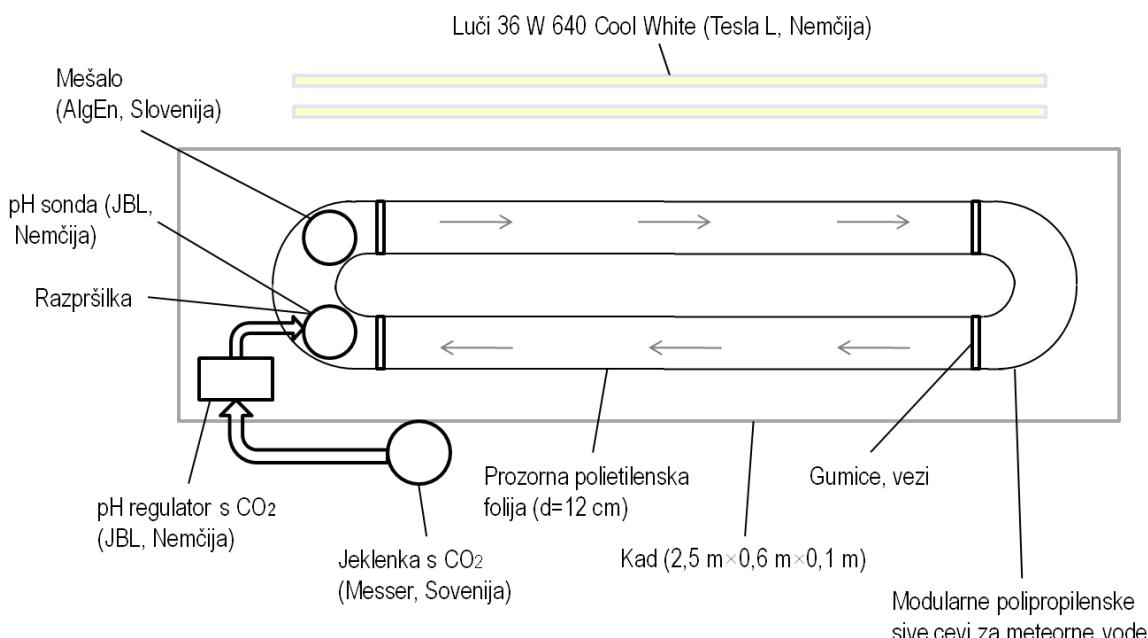
3.2 MATERIAL

3.2.1 Mikroorganizem

Uporabili smo mikroalgo *Scenedesmus quadricauda* iz zbirke Katedre za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Za ta mikroorganizem smo se odločili, ker je relativno dobro raziskan in so gojišča zanj znana.

3.2.2 Fotobioreaktor

Mikroalgo *Scenedesmus quadricauda* smo gojili v cevnem fotobioreaktorju, ki smo ga v sodelovanju s podjetjem AlgEn sestavili iz elementov, prikazanih na Sliki 6. Fotobioreaktor smo namestili na laboratorijski pult pri oknu in ga dodatno osvetljevali z lučmi (2 krat 36 W), oddaljenimi 30 cm od cevi. V prostoru je bila sobna temperatura.



Slika 6: Cevni fotobioreaktor

3.2.3 Encimi

Za razgradnjo celične stene mikroalge *Scenedesmus quadricauda* smo uporabili tri različne encimske pripravke proizvajalca DSM Nutritional Products, ki so po sprejemljivih cenah dostopni na tržišču.

3.2.3.1 Encimski pripravek RONOZYME VP (CT)

Proizvajajo ga s submerzno kultivacijo plesni *Aspergillus aculeatus*. Ima naslednje aktivnosti: endo-1,3(4)- β -glukanazno (EC/IUB Št. 3.2.1.6), β -glukanazno, pektinazno in hemicelulazno (Product Data Sheet, 2004a).

3.2.3.2 Encimski pripravek ROXAZYME G2 G

Pridobivajo ga iz plesni *Trichoderma longibrachiatum*. Njegove glavne aktivnosti so : endo-1,4- β -glukanazna (EC/IUB št. 3.2.1.4), endo-1,3(4)- β -glukanazna (EC/IUB št. 3.2.1.6) in endo-1,4- β -ksilanazna (EC/IUB št. 3.2.1.8) (Product Data Sheet, 2004b).

3.2.3.3 Encimski pripravek RONOZYME WX (CT)

Encim izdeluje plesen *Thermomyces lanuginosus*, vendar ga v industrijskem merilu proizvajajo s plesnijo *Aspergillus oryzae*. Glavna aktivnost je endo-1,4- β -ksilanazna (EC/IUB št. 3.2.1.8) (Product Data Sheet, 2004c).

3.2.4 Laboratorijske kemikalije

Pri raziskovalnem delu smo uporabili kemikalije, ki so zbrane v Preglednici 4.

Preglednica 4: Seznam uporabljenih kemikalij

| Kemikalija | Proizvajalec |
|--|-------------------------------|
| $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ | Kemika, Hrvaška |
| Antibiotik tetraciklin | Sigma, ZDA |
| Biotin | Sigma, ZDA |
| $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ | Kemika, Hrvaška |
| $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | Kemika, Hrvaška |
| $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | Merck, Nemčija |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ | Merck, Nemčija |
| $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | Merck, Nemčija |
| CCl_3COOH | Merck, Nemčija |
| ciankobalamin (vitamin B12) | Serva, ZDA |
| EDTA FeNa | Sigma, ZDA |
| EDTA Na ₂ | Sigma, Nemčija |
| H ₃ BO ₃ | Merck, Nemčija |
| Hranilni agar | Biolife, Italija |
| KH ₂ PO ₄ | Merck, Nemčija |
| MgSO ₄ × 7H ₂ O | Merck, Nemčija |
| MnCl ₂ × 4H ₂ O | Riedel, Nemčija |
| Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O | Merck, Nemčija |
| Na ₂ SO ₃ | Merck, Nemčija |
| NaHCO ₃ | Merck, Nemčija |
| NaNO ₃ | Merck, Nemčija |
| NaOH | Merck, Nemčija |
| PAHBAH | Sigma, Nemčija |
| Plantfer-U | S. C. CHIMRO S.R.L., Romunija |
| tiamin HCl (vitamin B1) | Merck, Nemčija |

3.2.5 Laboratorijski pribor

Pri laboratorijskem delu smo uporabili naslednji laboratorijski pribor:

- laboratorijska steklovina (erlenmajerice, pipete, čaše, merilne bučke, epruvete, HACH epruvete, serumske stekleničke),
- žarilni lončki,
- števna komora Neubauer, Nemčija,
- polavtomatske pipete Finnpipette, ThermoFisher Scientific, ZDA (10-100 µL, 100-1000 µL, 1-5 mL),
- nastavki za pipete Plastibrand, Nemčija,
- laboratorijske rokavice,
- mikrocentrifugirke Plastibrand, Nemčija,
- gumijasti pokrovčki in železni pokrovčki za serumske stekleničke,
- plastične centrifugirke Plastibrand, Nemčija,
- pipetna žogica,
- kivete Plastibrand, Nemčija,
- pokrovčki za HACH epruvete,
- merilni valji,
- eksikator.

3.2.6 Laboratorijske aparature

Preglednica 5: Laboratorijske aparature

| Aparat | Proizvajalec |
|--|------------------------------------|
| Avtoklav | Kambič, Slovenija |
| Bunsenov gorilnik | TLOS, Hrvatska |
| Centrifuga | Beckman Coulter, ZDA |
| Centrifuga | Clair, Avstrija |
| Digitalni fotoaparat PowerShot A640 | Canon, Japonska |
| Digitalni fotoaparat PowerShot A590 IS | Canon, Japonska |
| Laminarij | Scholzen Technic, Švica |
| Magnetno mešalo | Snijders, Nizozemska; IKA, Nemčija |
| Mikroskop | |
| pH meter | Thermo Scientific, ZDA |
| Spektrofotometer | Pharmacia Biotech, ZDA |
| Spektrofotometer | Shimadzu, Japonska |
| Tehtnica | Mettler-Toledo, Nemčija |
| Tehtnica | Kern, Nemčija |
| Vodna kopel | Kambič, Slovenija |
| Vortex mešalo | Tehtnica, Slovenija |
| Stresalnik | Infors HT, Švica |
| Zamrzovalnik | Gorenje, Slovenija |
| Sušilnik | Instrumentaria, Hrvatska |
| Eksikator | |
| Žarilna peč | |

3.2.7 Gojišča

Za gojenje mikroalg smo uporabljali dve različni gojišči.

3.2.7.1 Gojišče po Jaworskem (CCAP, 2011)

Najprej smo pripravili založne raztopine, kot je prikazano v Preglednici 6.

Preglednica 6: Priprava založnih raztopin za gojišče po Jaworskem

| Založne raztopine | Na 200 mL deionizirane vode |
|--|--|
| 1 Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O | 4,0 g |
| 2 KH ₂ PO ₄ | 2,48 g |
| 3 MgSO ₄ ×7H ₂ O | 10,0 g |
| 4 NaHCO ₃ | 3,18 g |
| 5 EDTA FeNa | 0,45 g |
| EDTA Na ₂ | 0,45 g |
| 6 H ₃ BO ₃ | 0,496 g |
| MnCl ₂ ×4H ₂ O | 0,278 g |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ×4H ₂ O | 0,2 g |
| 7 ciankobilamin (vitamin B12) | 0,008 g |
| tiamin HCl (vitamin B1) | 0,008 g |
| biotin | 0,008 g |
| 8 NaNO ₃ | 16,0 g |
| 9 Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O | 3,58 g |
| Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O | 7,2 g |

Končno gojišče smo pripravili tako, da smo odpipetirali po 1mL vsake založne raztopine in dodali destilirano ali vodovodno vodo do 1 L.

3.2.7.2 Plantfer-U

Preglednica 7: Sestava gnojila Plantfer-U

| Sestava | % | Koncentracija [g/L] |
|-------------------------------|----------|----------------------------|
| N | 7,8 | 100 |
| P ₂ O ₅ | 7,8 | 100 |
| K ₂ O | 7,03 | 90 |
| B | 0,025 | 0,3 |
| Co | 0,001 | 0,01 |
| Cu | 0,0025 | 0,3 |
| Fe | 0,05 | 0,6 |
| Mg | 0,025 | 0,3 |
| Mn | 0,033 | 0,4 |
| Mo | 0,001 | 0,01 |
| S | 0,075 | 0,9 |
| Zn | 0,025 | 0,3 |

Gnojilo Plantfer-U smo zmešali z vodo v razmerju 1:300 in tako dobili končno gojišče.

3.2.7.3 Agarske plošče za dokazovanje okužbe

Uporabili smo gojišče hrnilni agar (HA).

| Preglednica 8: Sestava hrnilnega agarja | |
|--|--------------------------------|
| Sestava | Koncentracija [g/L] |
| Goveji ekstrakt | 3 |
| Pepton | 5 |
| Agar | 15 |

Hrnilni agar smo raztopili v destilirani vodi v koncentraciji 23 g/L. Sterilizirali smo ga v avtoklavu 15 minut pri 121 °C.

3.2.8 Pufer in raztopine

3.2.8.1 Citratni pufer pH=5

Citatni pufer pH=5 smo pripravili tako, da smo zmešali 0,1 M raztopino citronske kisline in 0,2 M raztopino dinatrijevega hidrogen ortofosfata v ustreznom razmerju. pH smo umerili na 5.

| Preglednica 9: Priprava raztopine citronske kisline | | |
|--|-----------------|-----------------------------|
| Sestavina | Količina | Končna koncentracija |
| C ₆ H ₈ O ₇ ×H ₂ O | 21,01 g | 0,1 M |
| Dodali smo dH ₂ O do 1 L | | |

| Preglednica 10: Priprava raztopine dinatrijevega hidrogen ortofosfata | | |
|--|-----------------|-----------------------------|
| Sestavina | Količina | Končna koncentracija |
| Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O | 35,60 g | 0,2 M |
| Dodali smo dH ₂ O do 1 L | | |

3.2.8.2 10 % (vol.) triklorocetna kislina

Preglednica 11: Priprava triklorocetne kisline

| Sestavina | Količina | Končna koncentracija |
|---|----------|----------------------|
| CCl ₃ COOH | 10,0 g | 10 % (vol.) |
| Kislino smo počasi dodajali v 90 mL dH ₂ O | | |

3.2.8.3 Reagent za test reduksijskih sladkorjev

Preglednica 12: Priprava posameznih raztopin za test reduksijskih sladkorjev

| Sestavina | Količina | Končna koncentracija |
|--|----------|----------------------|
| Na ₂ SO ₃ | 12,6 g | 1 M |
| Dodamo dH ₂ O do 100 mL | | |
| NaOH | 20,0 g | 5 M |
| NaOH smo na mešalu počasi raztopili v 80 mL dH ₂ O in nato dodali dH ₂ O do 100 mL | | |
| C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ×2H ₂ O | 14,7 g | 0,5 M |
| Dodali smo dH ₂ O do 100 mL | | |
| CaCl ₂ | 2,22 g | 0,2 M |
| Dodali smo dH ₂ O do 100 mL | | |

3.2.8.4 Standardne raztopine glukoze

Preglednica 13: Priprava standardnih raztopin glukoze

| Sestavina | Količina | Končna koncentracija |
|---|----------|----------------------|
| C ₆ H ₁₂ O ₆ | 0,540 g | 6 mM |
| Dodali smo dH ₂ O do 500 mL | | |

Iz 6 mM raztopine glukoze smo nato z redčenjem pripravili še 3,8 mM, 3 mM, 2 mM in 1 mM raztopino glukoze.

3.2.8.5 Reagent PAHBAH

Reagent je obstojen le eno uro, zato smo vedno pripravili svežega.

Preglednica 14: Priprava reagenta za določanje koncentracije redukcijskih sladkorjev

| Sestavina | Količina |
|--|----------|
| 1 M Na ₂ SO ₃ | 5 mL |
| 0,5 M natrijevega citrata | 5 mL |
| 5 M NaOH | 5 mL |
| Dodamo dH ₂ O do približno 80 ml. | |
| 0,2 M CaCl ₂ | 5 mL |
| Dodajamo po kapljicah med mešanjem na magnetnem mešalu. | |
| PAHBAH | 1 g |
| dH ₂ O smo dodali do skupnega volumna 100 mL. | |

3.3 METODE

3.3.1 Pridobivanje algne biomase

3.3.1.1 Inokulum

Najprej smo pripravili inokulum mikroalge, ki smo ga nato prenesli v fotobioreaktor. Inokulum (pri gojitvah 1, 2, 3, 9, 10, 11, 12) je predstavljal približno 10 % volumna medija, ki smo ga inokulirali. Pripravili smo ga v 5 L erlenmajericah in ga inkubirali pri sobni temperaturi pri naravni osvetlitvi na okenski polici. Po 3., 4., 5., 6. in 7. gojitvi smo kulturo le delno centrifugirali, gojišče in del biomase, smo vrnili v fotobioreaktor (Slika 7, Preglednica 15). To pomeni, da smo za inokulum npr. 4. gojitev porabili del biomase 3. gojitve. S tem smo celice vzdrževali v logaritemski fazni rasti. Koncentracijo vrnjenih celic smo določili z merjenjem OD₆₅₄.

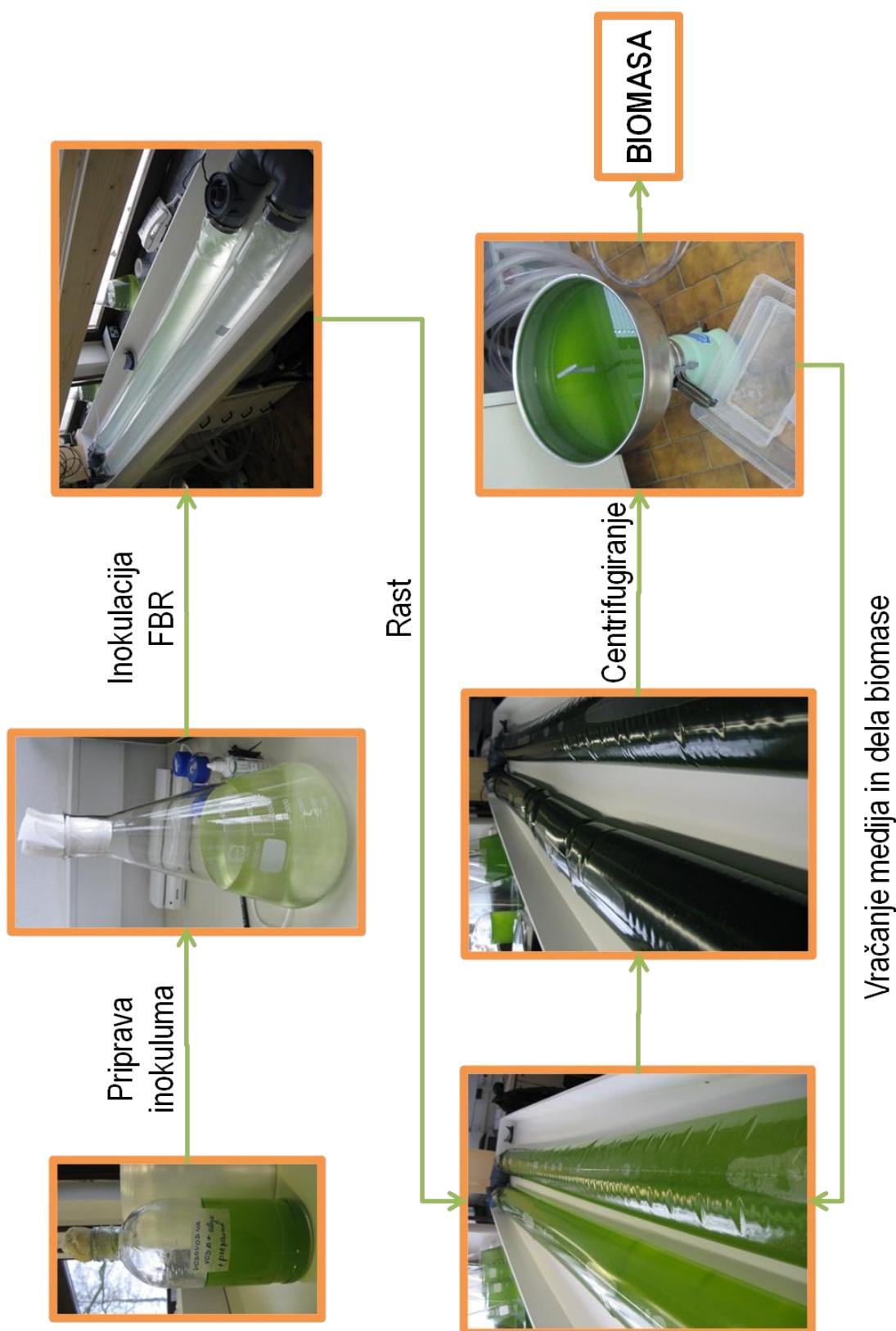
3.3.1.2 Fotobioreaktor

Sledilo je gojenje mikroalg v fotobioreaktorju. Opravili smo 12 gojitev. Gojišča, ki smo jih uporabili, so navedena v Preglednici 15. pH vrednost smo tekom gojenja regulirali z dovajanjem CO₂ in jo vzdrževali v intervalu med 7 in 8. Sproti smo spremeljali tudi temperaturo.

Preglednica 15: Pregled gojenja mikroalge *S. quadricauda* v fotobioreaktorju

| Št. gojtve | Datum | Gojišče | |
|------------|--------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| | | Sestavina | Količina |
| 1 | 15.1. do 26.1.2010 | vodovodna voda | 60 L |
| | | Plantfer-U | 330 mL |
| 2 | 26.1. do 2.2.2010 | vodovodna voda | 60 L |
| | | Plantfer-U | 300 mL |
| 3 | 2.2. do 2.3.2010 | vodovodna voda | 50 L |
| | | gojišče po Jaworskem | 50 mL vsake založne raztopine |
| 4 | 2.3. do 9.3.2010 | ostanek po centrifugiranju* | 50 L |
| 5 | 9.3. do 16.3.2010 | ostanek po centrifugiranju* | 50 L |
| | | Plantfer U | 50 mL |
| 6 | 16.3. do 29.3.2010 | ostanek po centrifugiranju* | 50 L |
| 7 | 29.3. do 15.4.2010 | vodovodna voda | 50 L |
| | | ostanek po centrifugiranju* | 50 L |
| | | Plantfer-U | 100 mL |
| 8 | 15.4. do 4.5.2010 | ostanek po centrifugiranju* | 100 L |
| | | Plantfer-U | 200 mL |
| | | gojišče po Jaworskem | 10 mL vsake založne raztopine |
| 9 | 4.5. do 18.5.2010 | vodovodna voda | 90 L |
| | | Plantfer-U | 150 mL |
| | | založna raztopina 7 po Jaworskem | 100 mL |
| 10 | 18.5. do 3.7.2010 | vodovodna voda | 90 L |
| | | gojišče po Jaworskem | 90 mL vsake založne raztopine |
| 11 | 7.7. do 18.8.2010 | vodovodna voda | 90 L |
| | | gojišče po Jaworskem | 80 mL vsake založne raztopine |
| 12 | 31.8. do 7.10.2010 | deionizirana voda | 90 L |
| | | gojišče po Jaworskem | 100 mL vsake založne raztopine |
| | | Plantfer-U | 50 mL |

*Gojišče in del celic predhodne gojitev.



Slika 7: Pridobivanje mikroalgne biomase

3.3.2 Spremljanje rasti

3.3.2.1 Spektrofotometrično

Rast alg smo spremajali s spektrofotometrom Novaspec II Visible, Pharmacia Biotech, ZDA. Odvzeli smo tri vzorce iz fotobioreaktorja in merili optično gostoto pri valovni dolžini 654 nm.

3.3.2.2 Štetje celic

Za štetje celic smo uporabili števno kamrico hemocitometer Neubauer improved in mikroskop. Prešteli smo celice v 5 E kvadratkih v diagonali in štetje ponovili 3-krat, torej smo skupaj prešteli 15 E kvadratkov. Izračunali smo povprečje na 1 kvadrat, pri čemer je volumen 1 E kvadratka $0,2 \times 0,2 \times 0,1$ mm. Izračunali smo število celic na mL. Celice smo šteli s $400 \times$ povečavo mikroskopa.

3.3.2.3 Fotografiranje mikroskopskega preparata

Nativni mikroskopski preparat smo fotografirali na dva načina. V prvem primeru smo ga fotografirali s fotoaparatom Canon PowerShot A640, ki smo ga namestili na mikroskop. V drugem primeru smo uporabili konfokalno mikroskopijo na Inštitutu za patofiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

3.3.3 Žetev mikroalgne biomase

Biomaso smo koncentrirali s centrifugo Milky, Clair, Avstrija. Nato smo jo prenesli v 50 mL plastične centrifugirke in še enkrat centrifugirali s centrifugo Allegra X-12R, Beckman Coulter, ZDA, 3 minute pri $2500 \times g$. Biomaso smo stehtali in shranili v zamrzovalniku pri $-20^{\circ}C$.

3.3.4 Encimska hidroliza mikroalgne celične stene

3.3.4.1 Izbira inkubacijskih razmer

Od proizvajalca smo z elektronsko pošto dobili zgolj skope informacije o optimalnih razmerah delovanja encimskih pripravkov: »Temperurni optimum je med 20 in $25^{\circ}C$, optimalen pH je v širokem območju okrog nevtralnega med 4 in 10«. Med pregledovanjem literature smo zasledili naslednje:

- Encimski pripravek Ronozyme VP (CT) proizvajajo s submerzno kultivacijo plesni *Aspergillus aculeatus* (Product Data Sheet, 2004a). Glukanaze izolirane iz tega organizma delujejo optimalno pri temperaturi med 50 in $70^{\circ}C$ ter pH med 2,5 in 5 (de Vries in Visser, 2001).
- Encimski pripravek Roxazyme G2 G pridobivajo iz plesni *Trichoderma longibrachiatum* (Product Data Sheet, 2004b). Temperurni optimum encima endo-1,3(4)- β -glukanazne (EC/IUB št. 3.2.1.6) je $50^{\circ}C$, pH optimum tega encima je 5 (Sharma in Nakas, 1987).

- Encimski pripravek Ronozyme WX (CT) izdeluje plesen *Thermomyces lanuginosus* (Product Data Sheet, 2004c). Ksilanaze tega organizma optimalno delujejo pri temperaturah od 60 do 70 °C in pri pH med 6,5 in 7 (Xiong in sod., 2004).

Na podlagi vseh teh podatkov smo se odločili, da aktivnost encimov spremljamo pri temperaturah 25 in 50 °C ter pri pH vrednostih 5 in 7.

Zaradi boljše preglednosti bomo v nadaljevanju encimske pripravke navajali s kraticami (Preglednica 16):

Preglednica 16: Pregled uporabljenih encimskih pripravkov in kratice s katerimi jih bomo v nadaljevanju označevali

| Encimski pripravek oz. mešanica encimskih pripravkov | Kratica |
|---|----------------|
| Ronozyme VP (CT) | VP |
| Roxazyme G2 G | G |
| Ronozyme WX (CT) | WX |
| Ronozyme VP (CT) in Roxazyme G2 G | VP+G |
| Ronozyme VP (CT) in Ronozyme WX (CT) | VP+WX |
| Roxazyme G2 G in Ronozyme WX (CT) | G+WX |

3.3.4.2 Priprava encimov

Encime smo dodajali glede na navodila proizvajalca (Preglednica 17):

Preglednica 17: Priporočena količina encimskega pripravka na substrat

| Encimski pripravek | Količina encimskega pripravka na kg substrata |
|---------------------------|--|
| VP | 300 – 1200 mg |
| G | 50 – 200 mg |
| WX(CT) | 150 – 300 mg |

Dodali smo zgornjo priporočeno količino encima, in sicer preračunano na 5 g mokre mikroalgne biomase.

Encime smo najprej raztopili v avtoklavirani deionizirani vodi, v katero smo dodali antibiotik, s katerim smo poskušali preprečiti rast bakterij. Končna koncentracija tetraciklina je bila 2 µg/mL. Sledilo je mešanje na magnetnem mešalu. Tako smo pripravili raztopine encimov, ki smo jih nato dodali v reakcijske mešanice (Preglednica 18).

Preglednica 18: Priprava encimskih pripravkov

| Encimski pripravek | V (dH₂O) [mL] | m (encim) [mg] | V (tetraciklin) [µL] | Koncentracija encima [mg/mL] |
|---------------------------|---|---------------------------------|---|---|
| RONOZYME VP (CT) | 10 | 200 | 25 | 20 |
| ROXAZYME G2 G | 30 | 100 | 75 | 3,3 |
| RONOZYME WX (CT) | 20 | 100 | 50 | 5,0 |

3.3.4.3 Priprava reakcijske mešanice

Za eno inkubacijo smo pripravili 18 serumskih stekleničk s 60 mL citratnega pufra pH=5 oz. z deionizirano vodo (pH=7). Dodali smo 5 g odmrznjene biomase mikroalge *Scenedesmus quadricauda* in jih avtoklavirali. Počakali smo, da so se mešanice ohladile in odvzeli vzorce ob času 0 h. Nato smo dodali 300 µL encimske mešanice raztopljeni v pufru (ko smo biomaso dodali v pufer) oz. deionizirani vodi (ko smo biomaso dodali v deionizirano vodo).

Izraz reakcijska mešanica se torej nanaša na posamezno serumsko stekleničko s pufrom oz. deionizirano vodo, algnjo biomaso ter encimom z antibiotikom.

3.3.4.4 Inkubacija in odvzem vzorcev

Reakcijske mešanice smo inkubirali v komori pri temperaturah 25 in 50 °C ter s stresanjem 120 obr./min. Vzorce smo jemali v časovnih intervalih pri 0 h, 4 h, 24 h, 48 h in 72 h. Iz reakcijskih mešanic smo vzeli 1 mL vzorca in ga prenesli v Eppendorf epruveto ter nato dodali 120 µl 10% (vol.) triklorocetne kisline, s katero smo ustavili encimsko delovanje.

3.3.4.5 Spremljanje encimske aktivnosti

Encimsko aktivnost pripravkov smo spremljali z merjenjem koncentracije redukcijskih sladkorjev. Pri vsaki cepitvi polisaharida nastaneta iz ene dve krajši molekuli, pri čemer se sprosti en dodaten redukcijski konec. Redukcijski konec polisaharidne ali oligosaharidne verige je tisti, ki se lahko oksidira. Na uspešnost delovanja encimov lahko sklepamo po številu sproščenih redukcijskih sladkorjev (Lever, 1977).

3.3.4.6 Test redukcijskih sladkorjev

V HACH epruvete smo odpipetirali 5 mL pripravljenega reagenta PAHBAH. Vzorce smo odtalili in premešali na vorteksu. Za vsak vzorec smo naredili dve ponovitvi. Po 100 µl vzorcev smo dodali v epruvete z reagentom PAHBAH, jih zamašili in premešali na vorteksu. Nato smo jih segrevali 10 min pri 100 °C in ohladili v hladni vodi. Razvila se je rumena barva, katere intenziteto smo izmerili spektrofotometrično pri 420 nm.

Vzporedno smo pripravili tudi umeritveno krivuljo s standardnimi koncentracijami glukoze. V HACH epruvete z reagentom PAHBAH smo odpipetirali v dveh ponovitvah (0 mM v treh ponovitvah) po 100 µl standardnih raztopin glukoze (0; 1 mM; 2 mM; 3 in 3,8 mM). Nato smo ravnali enako kot pri vzorcih. Narisali smo umeritveno krivuljo A₄₂₀ v odvisnosti od koncentracije.

3.3.4.7 Določanje suhe (SS) in organske snovi (OS) v reakcijski mešanici

Za sušenje smo uporabili žarilne lončke. Predhodno smo jih očistili in prežarili (24 h, 105 °C) ter ohladili v eksikatorju. Stehtali smo jih na analitski tehnicni. V stehtane lončke smo odpipetirali vzorec in jih ponovno stehtali. Nato smo jih sušili pri 105 °C 24 h. Po končanem sušenju smo lončke previdno prenesli v eksikator, jih ohladili in stehtali. Lončke z vzorcem smo prenesli v segreto žarilno peč in 24 h žarili pri 550 °C. Nato smo jih previdno prenesli v eksikator, jih ohladili in stehtali. Organsko snov smo izračunali po Enačbi 1 (Clesceri in sod., 1998):

$$m(\text{organska snov}) = m(\text{suha snov in lonček}) - m(\text{anorganska snov in lonček}) \quad \dots(1)$$

3.3.5 Analiza rezultatov

3.3.5.1 Rastna krivulja

Rastno krivuljo smo izrisali s programom MS office excel. Merili smo optično gostoto in s števno kamrico šteli celice pod mikroskopom. Nato smo ti dve spremenljivki povezali z linearno regresijo in tako dobili linearno zvezo med optično gostoto in številom celic v 1 mL.

3.3.5.2 Encimska razgradnja

3.3.5.2.1 Encimska kinetika

Encimsko kinetiko smo modelirali z empiričnim modelom. S tem smo dobili kinetične parametre, s katerimi smo primerjali encimske aktivnosti različnih encimskih pripravkov v različnih razmerah.

Model za časovni potek koncentracije proizvoda (reduktijskih sladkorjev) (Enačba 2):

$$[P](t) = c - be^{-rt} \quad \dots(2)$$

Pri čemer je $[P]$ koncentracija proizvoda (reduktijskih sladkorjev), parameter c je maksimalna koncentracija proizvoda (reduktijskih sladkorjev, ki so že v slednji obliki ali še v obliki polisaharidov, ki se bodo razgradili v reduktijske sladkorje), parameter b je koncentracija proizvoda, ki ga lahko dobimo iz substrata (koncentracija reduktijskih sladkorjev, ki jo lahko dobimo iz polisaharidov), r je hitrostna konstanta in t je čas.

Parametra c in b smo izračunali z nelinearno metodo najmanjših kvadratov.

Izpeljava in utemeljitev modela sta opisani v Prilogi A.

3.3.5.2.2 Hidrolizni donos

Fu in sod. (2010) so v svoji raziskavi za primerjavo vpliva pH in T na encimsko aktivnost uporabili vrednost hidroliznega donosa. Izračunali so jo po Enačbi 3:

$$\text{Hidrolizni donos} = \frac{\text{Koncentracija redukcijskih sladkorjev}}{\text{Celokupna koncentracija sladkorjev}} \times 100 \% \quad \dots(3)$$

Odločili smo se za podoben pristop, le da smo namesto *Celokupne koncentracije sladkorjev* določili koncentracijo organske snovi v posamezni reakcijski mešanici. Najbolj ustrezen bi bilo določiti koncentracijo substrata na katerega delujejo encimski pripravki, vendar je za tovrstno raziskavo tak pristop prezapleten. Zato smo se odločili, da je koncentracija organske snovi v posamezni reakcijski mešanici dovolj dober pokazatelj koncentracije substrata. Za potrebe tega dela smo hidrolizni donos definirali z Enačbo 4:

$$\text{Hidrolizni donos} = \frac{b}{\text{Koncentracija organske snovi}} \times 100 \% \quad \dots(4)$$

pri čemer je parameter b koncentracija redukcijskih sladkorjev, ki jih lahko dobimo iz substrata za določeno reakcijsko mešanico.

Izračunali smo povprečen hidrolizni donos določenega encima oz. encimske mešanice v vseh razmerah poskusa in povprečen hidrolizni donos vseh encimov ter mešanic v določenih razmerah poskusa. Tako smo med seboj primerjali različne razmere poskusov in različne encime oz. njihove mešanice, ki smo jih uporabili v posameznem poskusu.

3.3.5.3 Statistična analiza

Povprečja smo izračunali z Enačbo 5 (Košmelj, 2001):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots(5)$$

pri čemer je \bar{x} povprečna vrednost, n število vzorcev in x_i vrednost i-te meritve.

Vzorčni standardni odklon smo izračunali po Enačbi 6 (Košmelj, 2001):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \dots(6)$$

pri čemer je s vzorčni standardni odklon, x_i vrednost i-te meritve, \bar{x} povprečna vrednost in n število vzorcev.

Podatke smo statistično analizirali z metodo analize variance (ANOVA) kot enofaktorski poskus in kot dvofaktorski poskus s ponovitvami. Pri prvi smo izvedli tudi multipli test sredin po Tukeyu. Uporabili smo program MS office excel. Rezultate smo prikazali v obliki preglednic in slik. V stolpcih slike je prikazan 95 % interval zaupanja.

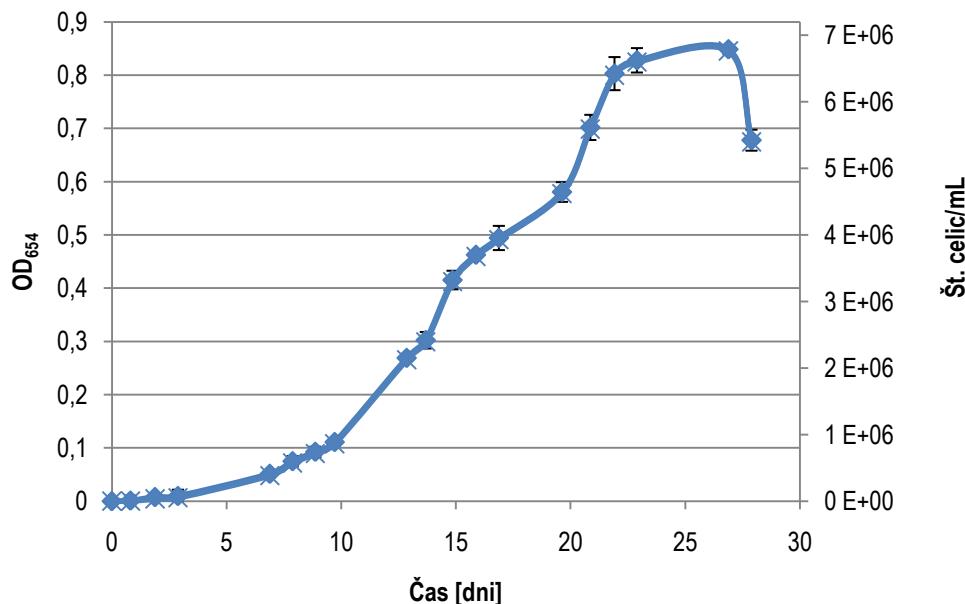
4 REZULTATI

4.1 GOJENJE MIKROALGE *S. quadricauda*

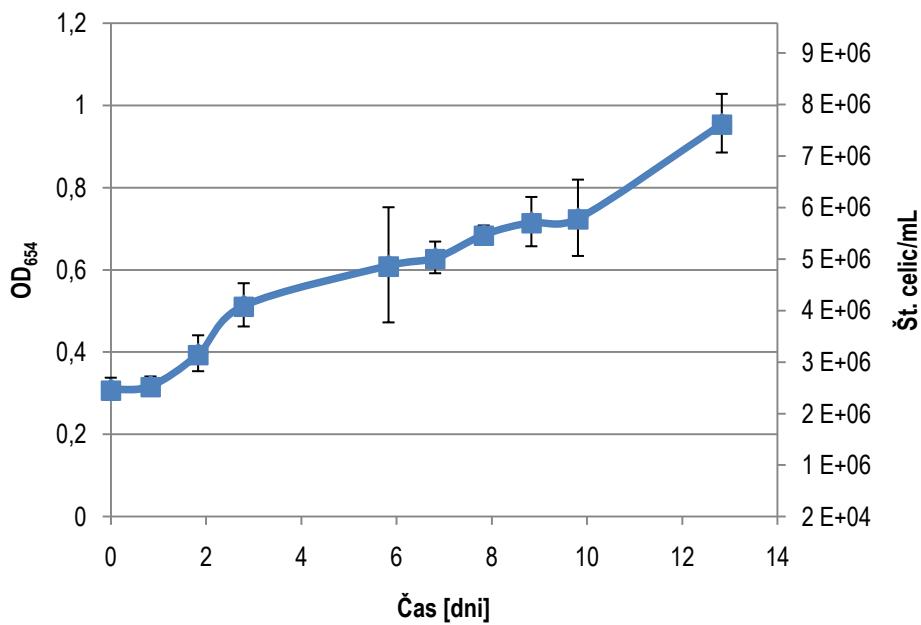
V okviru diplomskega dela smo v sodelovanju s podjetjem AlgEn d.o.o. v cevnem fotobioreaktorju gojili mikroalgo *Scenedesmus quadricauda* in tako dobili ustreznou količino biomase za nadaljnje delo.

Rastno krivuljo mikroalge *S. quadricauda* v fotobioreaktorju prikazujeta Slika 8 in Slika 9. Glede na rastno krivuljo pri 3. gojitvi, smo določili vrednost $OD_{654}=0,3$, pri kateri so celice že v logaritemski fazi rasti (Slika 8). Pri 4., 5., 6., 7. in 8. gojitvi smo del biomase reciklirali in količino vrnjene biomase uravnali na to vrednost. S tem smo skrajšali čas gojenja (Slika 9, Preglednica 15).

Čeprav smo pH vzdrževali med 7 in 8, smo zaradi težav z dovajanjem CO_2 izjemoma izmerili najvišji pH=9,01 in najnižji pH=6,86. Temperatura je bila 20 ± 6 °C. Maksimalno temperaturo smo izmerili 26 °C, medtem ko smo minimalno temperaturo izmerili takoj po vnosu sveže vode v bioreaktor, in sicer 14 °C, vendar se je le-ta že čez noč ogrela na 22 °C.



Slika 8: Rastna krivulja mikroalge *Scenedesmus quadricauda* v fotobioreaktorju pri 3. gojitvi.
Prikazan je tudi vzorčni standardni odklon meritev OD_{654} ($n=3$).



Slika 9: Rastna krivulja mikroalge *Scenedesmus quadricauda* v fotobioreaktorju pri 6. gojitvi (vzdrževanje logaritemsko faze rasti). Prikazano je povprečje in ustrezen vzorčni standardni odklon meritev OD₆₅₄ (n=3).

Maksimalno gostoto celic smo dosegli pri šesti gojitvi, in sicer $8,7 \times 10^6$ celic/mL (šteto pod mikroskopom s hemocitometrom) oz. $7,6 \times 10^6$ celic/mL (izračunano glede na izmerjen OD₆₅₄) (Slika 9).

Opravili smo 12 gojitev v fotobioreaktorju in pridobili 723,4 g centrifugirane mokre biomase (Preglednica 19).

Preglednica 19: Masa pridobljene mokre biomase

| Št. gojtive | Datum | m(mokra biomasa) [g] |
|----------------|--------------------|-------------------------|
| 1 | 15.1. do 26.1.2010 | 25,3 |
| 2 | 26.1. do 2.2.2010 | 32,7 |
| 3 | 2.2. do 2.3.2010 | 59,1 |
| 4 | 2.3. do 9.3.2010 | 43,0 |
| 5 | 9.3. do 16.3.2010 | 79,9 |
| 6 | 16.3. do 29.3.2010 | 61,5 |
| 7 | 29.3. do 15.4.2010 | 112,9 |
| 8 | 15.4. do 4.5.2010 | 75,0 |
| 9 | 4.5. do 18.5.2010 | 59,1 |
| 10 | 18.5. do 3.7.2010 | 83,1 |
| 11 | 7.7. do 18.8.2010 | 0,0* |
| 12 | 31.8. do 7.10.2010 | 91,9 |
| SKUPAJ: | | 723,4 |

*Rast ni bila zadovoljiva, biomaso smo zavrgli.

4.2 FOTOGRAFIRANJE MIKROSKOPSKEGA PREPARATA

Med rastjo v fotobioreaktorju smo večinoma opazili posamične celice mikroalge *S. quadricauda* (Slika 10, levo), medtem ko smo pri opazovanju inokuluma, ki smo ga pripravljali v erlenmajericah, opazili tudi cenobije s 4 celicami (Slika 10, desno).



Slika 10: Fotografija celic *S. quadricauda* po centrifugirjanju s fotoaparatom Canon PowerShot A640 nameščenim na mikroskop (1000× povečava mikroskopa) (levo); fotografija inokuluma mikroalge *S. quadricauda* s konfokalno mikroskopijo (desno)

4.3 ENCIMSKA HIDROLIZA CELIČNE STENE

4.3.1 Spremljanje razgradnje mikroalgnih celičnih sten

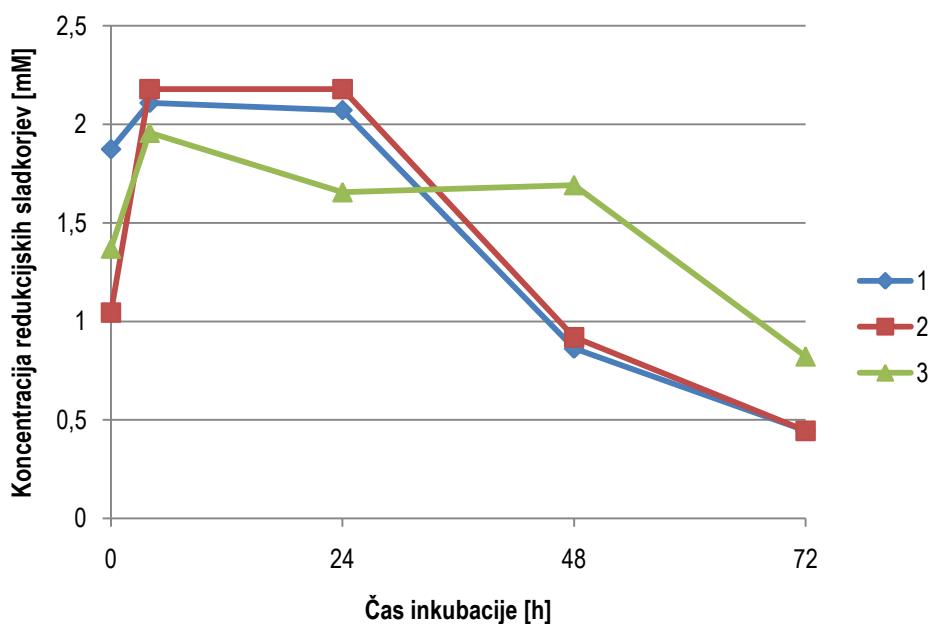
Razgradnjo mikroalgnih celičnih sten smo spremljali z merjenjem koncentracije redukcijskih sladkorjev. Na uspešnost delovanja določenega encimskega pripravka smo sklepali po narasli koncentraciji le-teh.

V reakcijskih mešanicah smo izmerili različno začetno koncentracijo redukcijskih sladkorjev (Slika 11, Slika 12, Priloga C). Prav tako je bila različna začetna koncentracija organske snovi (Preglednica 20, Priloga B).

Preglednica 20: Koncentracija organske snovi v treh reakcijskih mešanicah (1, 2, 3) z encimskim pripravkom G pri pH=7 in T=25 °C

| Reakcijska mešanica | Koncentracija organske snovi [g/L] |
|---------------------|------------------------------------|
| 1 | 15,4 |
| 2 | 14,6 |
| 3 | 11,4 |

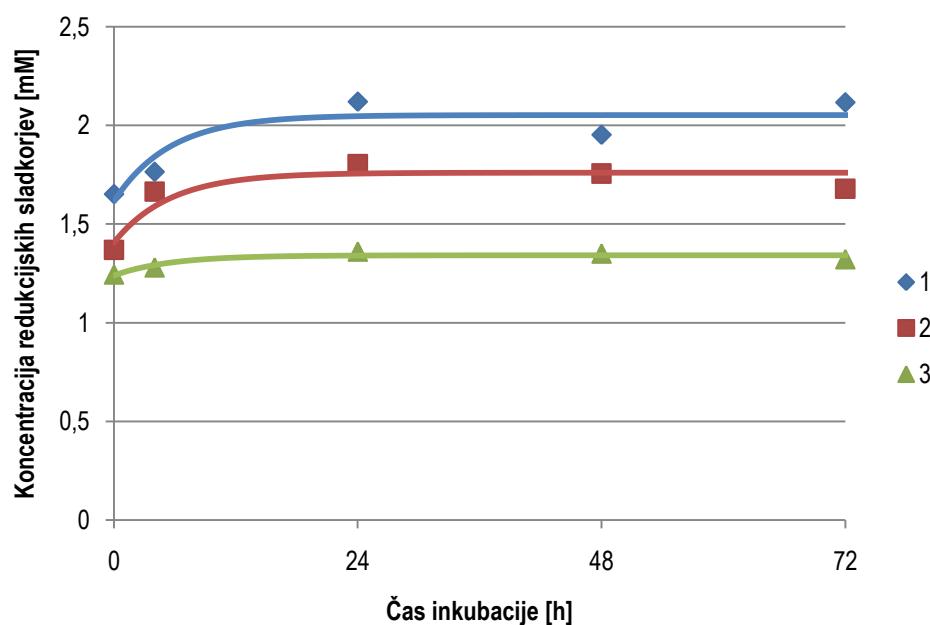
Sprva smo poskus izvedli tako, da encimskih pripravkov nismo dodali aseptično. Reakcijske mešanice smo inkubirali na stresalniku v naslednjih razmerah poskusa: T=50 °C, pH=5, 120 obr./min. Po 4 in 24 urah inkubacije smo izmerili višje koncentracije redukcijskih sladkorjev v primerjavi z začetno koncentracijo, nato pa je le-ta začela padati (Slika 11).



Slika 11: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev s časom v treh reakcijskih mešanicah (1, 2, 3) z encimskim pripravkom VP pri pH=5 in T=50 °C. Encimi niso bili dodani aseptično.

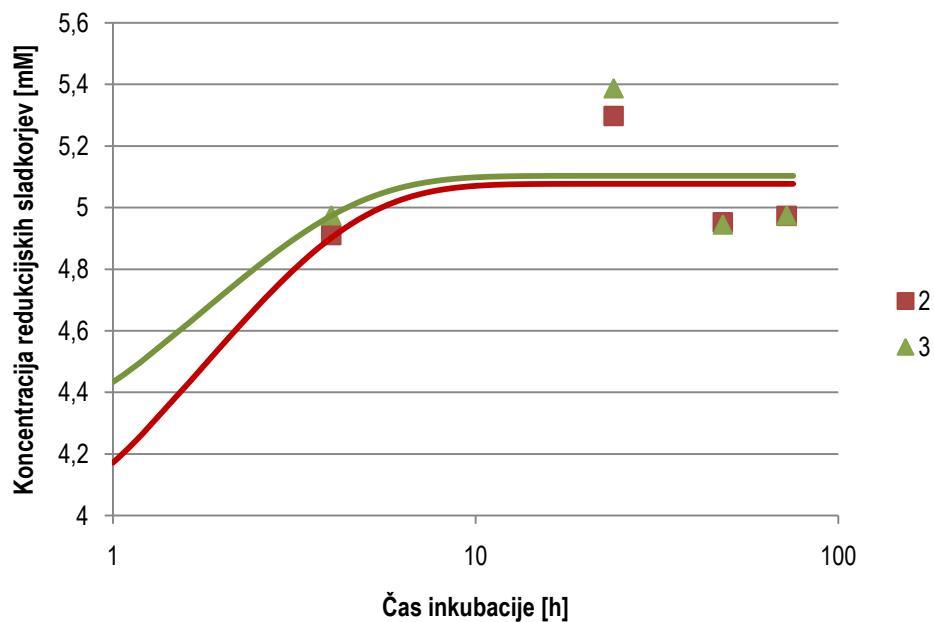
Z razmazom reakcijskih mešanic in encimskih pripravkov na plošče (HA) smo dokazali bakterijsko okužbo. Postopek smo spremenili in se odločili, da med raztapljanjem encimov dodamo še antibiotik tetraciklin. Dodali smo ga enako koncentracijo kot se uporablja pri testu Ames. S tem smo želeli zaustaviti bakterijsko rast.

Vse nadaljnje poskuse smo izvedli z antibiotikom. Koncentracija redukcijskih sladkorjev je povečini s časom naraščala in nato ostala enaka. Eksperimentalno dobljene podatke smo modelirali z izbranim kinetičnim modelom in spremembo koncentracije redukcijskih sladkorjev med inkubacijo prikazali na grafu (Slika 12, Priloga C).



Slika 12: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev s časom v treh reakcijskih mešanicah (1, 2, 3) z encimskim pripravkom G pri pH=7 in T=25 °C. V reakcijski mešanici 1 je bila koncentracija organske snovi 15,4 g/L, v reakcijski mešanici 2: 14,6 g/L in v reakcijski mešanici 3: 11,4 g/L. Pri pripravi encimov smo dodali antibiotik.

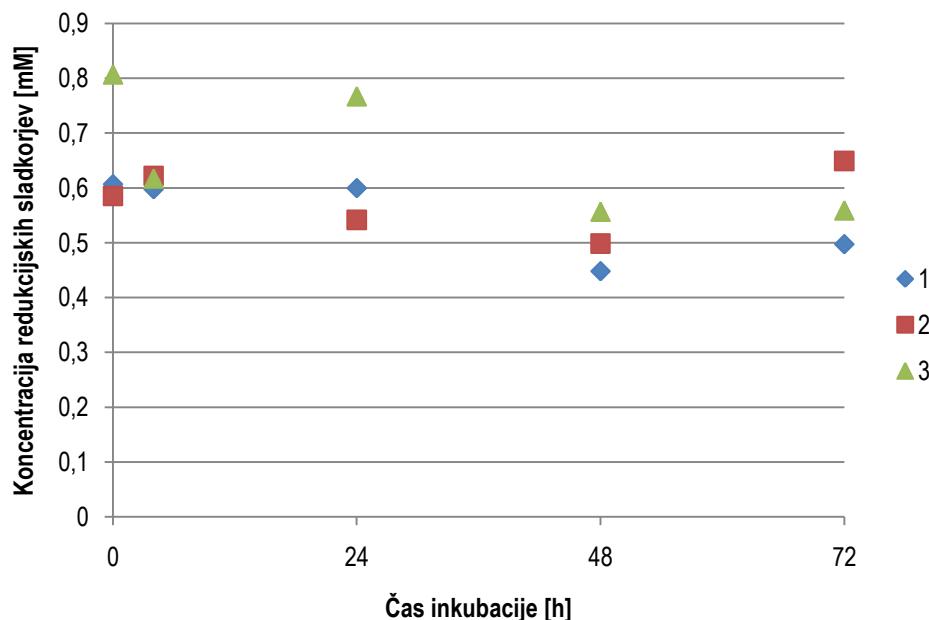
Največjo spremembo v koncentraciji redukcijskih sladkorjev smo izmerili v začetnih urah inkubacije (Slika 13).



Slika 13: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev s časom v dveh reakcijskih mešanicah (2, 3) z encimskim pripravkom VP pri pH=7 in T=50 °C. V reakcijski mešanici 2 je bila koncentracija organske snovi 12,9 g/L in v reakcijski mešanici 3: 14,0 g/L. Pri pripravi encimov smo dodali antibiotik.

4.3.2 Primernost različnih encimskih pripravkov za razgradnjo mikroalgne celične stene

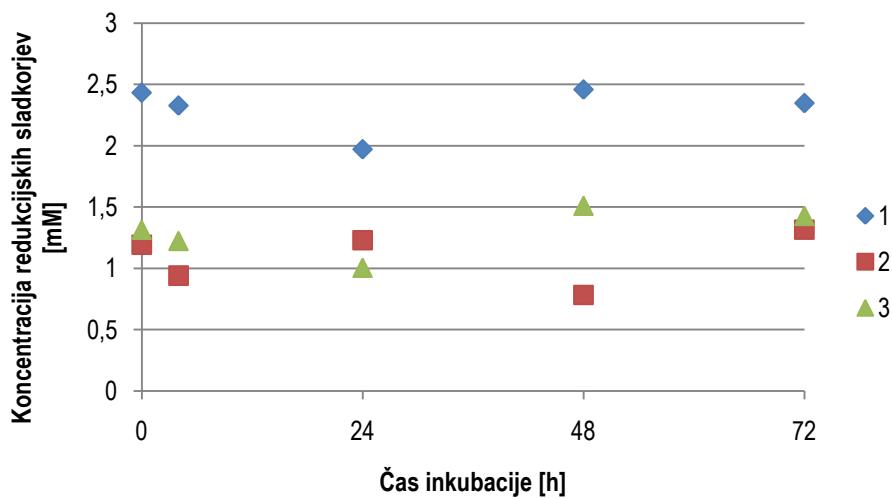
Pri inkubaciji encimskega pripravka WX z mikroalgno biomaso nismo izmerili povečanja koncentracije redukcijskih sladkorjev (Slika 14, Priloga C3).



Slika 14: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev v reakcijskih mešanicah (1, 2, 3) z encimskim pripravkom WX pri pH=7 in T=50 °C. V reakcijski mešanici 1 je bila koncentracija organske snovi 10,5 g/L, v reakcijski mešanici 2: 11,7 g/L in v reakcijski mešanici 3: 12,4 g/L.

Do povečanja koncentracije redukcijskih sladkorjev ni prišlo tudi v naslednjih primerih: mešanica encimskih pripravkov VP+WX pri pH=5 in T=50 °C ter pH=7 in T=25 °C (Slika 15, Priloga C5) in mešanica VP+G pri pH=7 in T=25 °C (Priloga C4).

V mešanici encimskih pripravkov G+WX nismo izmerili naraščanja redukcijskih sladkorjev le pri eni reakcijski mešanici pri pH=7 in T=25 °C (Priloga C6).



Slika 15: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev v reakcijskih mešanicah (1, 2, 3) z mešanico encimskih pripravkov VP+WX pri pH=7 in T=25 °C. V reakcijski mešanici 1 je bila koncentracija organske snovi 15,4 g/L, v reakcijski mešanici 2: 6,44 g/L in v reakcijski mešanici 3: 11,8 g/L.

V vseh ostalih primerih smo izmerili povečevanje koncentracije redukcijskih sladkorjev s časom (Slika 12, Priloga C1, Priloga C2, Priloga C4, Priloga C5, Priloga C6). Za vsako reakcijsko mešanico smo izračunali vrednost b (Preglednica 21).

Preglednica 21: Izračunane koncentracije proizvoda, ki ga lahko dobimo iz substrata v določeni reakcijski mešanici (vrednost b) v različnih razmerah inkubacije

| Encimski pripravek | b [mM] | | | |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | pH=5 T=50 °C | pH=7 T=50 °C | pH=5 T=25 °C | pH=7 T=25 °C |
| VP1 | 0,2692 | 0,3159 | 0,1832 | 0,5673 |
| VP2 | 0,8762 | 1,5651 | 1,6064 | 0,8792 |
| VP3 | 0,4100 | 1,1567 | 0,8046 | 0,7679 |
| G1 | 0,6760 | 0,0924 | 0,2287 | 0,4357 |
| G2 | 0,1303 | 0,0695 | 0,1023 | 0,3540 |
| G3 | 0,0168 | 0,6665 | 0,2579 | 0,1035 |
| VP+G1 | 0,4219 | 0,2792 | 1,1428 | / |
| VP+G2 | 0,3856 | 0,3836 | 4,2530 | / |
| VP+G3 | 1,1984 | 0,1011 | 2,2166 | / |
| VP+WX1 | / | 0,2478 | 0,2818 | / |
| VP+WX2 | / | 0,4408 | 0,3396 | / |
| VP+WX3 | / | 0,6861 | 0,5809 | / |
| G+WX1 | 0,0774 | 0,2497 | 0,0574 | 0,0756 |
| G+WX2 | 0,3442 | 0,4675 | 0,0936 | 0,1721 |
| G+WX3 | 0,2609 | 0,3130 | 0,0253 | / |

4.3.3 Primerjava hidroliznih donosov

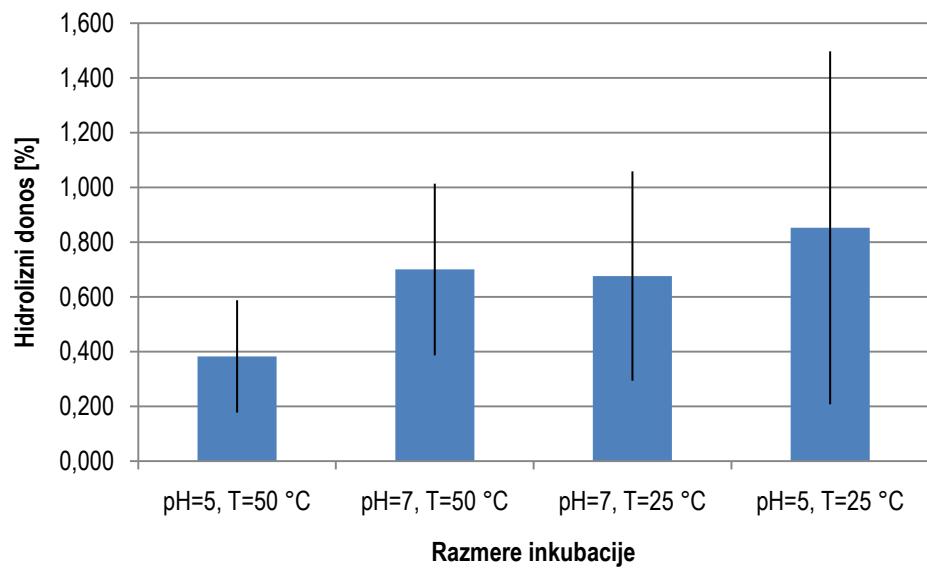
4.3.3.1 Primerjava hidroliznih donosov v različnih razmerah inkubacije

V Preglednici 22 so zbrani hidrolizni donosi encimskih pripravkov v različnih razmerah inkubacije.

Preglednica 22: Hidrolizni donosi encimskih pripravkov v različnih razmerah inkubacije

| Encimski pripravek | Razmere inkubacije | Hidrolizni donos [%] | | | |
|--------------------------------|--------------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | pH=5 T=50 °C | pH=7 T=50 °C | pH=7 T=25 °C | pH=5 T=25 °C |
| VP | 0,253 | 0,669 | 0,849 | 0,211 | |
| | 0,594 | 2,18 | 1,11 | 1,92 | |
| | 0,378 | 1,49 | 0,988 | 0,681 | |
| G | 0,532 | 0,127 | 0,510 | 0,273 | |
| | 0,105 | 0,128 | 0,438 | 0,178 | |
| | 0,0135 | 0,757 | 0,162 | 0,191 | |
| VP+G | 0,488 | 0,634 | / | 1,31 | |
| | 0,317 | 0,741 | / | 4,21 | |
| | 1,24 | 0,225 | / | 2,34 | |
| VP+WX | / | 0,399 | / | 0,302 | |
| | / | 0,956 | / | 0,364 | |
| | / | 1,18 | / | 0,623 | |
| G+WX | 0,0957 | 0,254 | / | 0,0577 | |
| | 0,309 | 0,410 | / | 0,0971 | |
| | 0,267 | 0,355 | / | 0,0291 | |
| Povprečen hidrolizni donos [%] | 0,38 | 0,70 | 0,68 | 0,85 | |
| Vzorčni standardni odklon | 0,32 | 0,57 | 0,36 | 1,16 | |

Največji skupen povprečen hidrolizni donos smo izmerili pri pH=5 in T=25 °C (Preglednica 22, Slika 16), vendar je statistična analiza pokazala, da se skupni povprečni hidrolizni donosi v različnih razmerah ne razlikujejo statistično značilno ($p>0,05$) (Priloga D1). Izvedli smo tudi multipli test sredin po Tukeyu. Med primerjanimi pari ni statistično značilnih razlik ($p>0,05$).



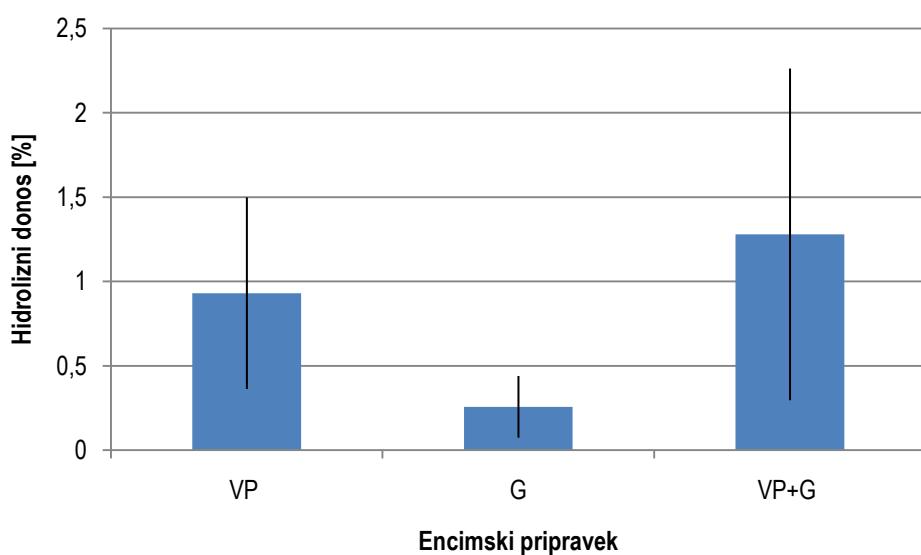
Slika 16: Skupni povprečni hidrolizni donosi v različnih razmerah inkubacije s 95 % intervali zaupanja povprečnih vrednosti. Povprečja se statistično značilno ne razlikujejo ($p>0,05$).

4.3.3.2 Primerjava hidroliznih donosov posameznega encimskega pripravka z mešanico

Primerjali smo povprečen hidrolizni donos posameznega encimskega pripravka VP in G z mešanico encimskih pripravkov VP+G pri treh razmerah inkubacije (Preglednica 23, Slika 17). Povprečji hidroliznih donosov encimskega pripravka VP in mešanice VP+G se statistično značilno ne razlikujeta ($p=0,489$) (Priloga D3). Povprečji hidroliznih donosov encimskega pripravka G in mešanice VP+G se statistično značilno razlikujeta ($p=0,026$) (Priloga D4), mešanica ima večji povprečni hidrolizni donos.

Preglednica 23: Hidrolizni donosi encimskih pripravkov VP in G ter mešanice VP+G v različnih razmerah inkubacije

| Encimski pripravek | Hidrolizni donos [%] | | | Povprečen hidrolizni donos [%] | Vzorčni standardni odklon |
|--------------------|----------------------|--------------|--------------|--------------------------------|---------------------------|
| | Razmere inkubacije | pH=5 T=50 °C | pH=7 T=50 °C | | |
| VP | 0,253 | 0,669 | 0,211 | 0,93 | 0,74 |
| | 0,594 | 2,18 | 1,91 | | |
| | 0,378 | 1,49 | 0,681 | | |
| G | 0,532 | 0,127 | 0,273 | 0,256 | 0,238 |
| | 0,105 | 0,128 | 0,178 | | |
| | 0,0135 | 0,757 | 0,191 | | |
| VP+G | 0,488 | 0,634 | 1,31 | 1,28 | 1,28 |
| | 0,317 | 0,741 | 4,21 | | |
| | 1,24 | 0,225 | 2,34 | | |



Slika 17: Povprečni hidrolizni donosi encimskih pripravkov VP in G ter mešanice encimskih pripravkov VP+G s 95 % intervali zaupanja povprečnih vrednosti. Povprečji encimskega pripravka G in mešanice VP+G se statistično značilno razlikujeta ($p=0,026$). Povprečji encimskega pripravka VP in mešanice VP+G se statistično značilno ne razlikujeta ($p=0,489$).

4.3.3.3 Primerjava hidroliznih donosov encimskih pripravkov VP in G pri različnih inkubacijskih pogojih

Mikroalgno celično steno sta v vseh testiranih razmerah razgrajevala le encimska pripravka VP in G (Preglednica 22). Skupen povprečen hidrolizni donos teh dveh encimskih pripravkov je bil največji pri pH=7 in T=50 °C (Preglednica 24, Slika 18), medtem ko je imel encimski pripravek VP povprečno večji hidrolizni donos kakor encimski pripravek G (Preglednica 24, Slika 19).

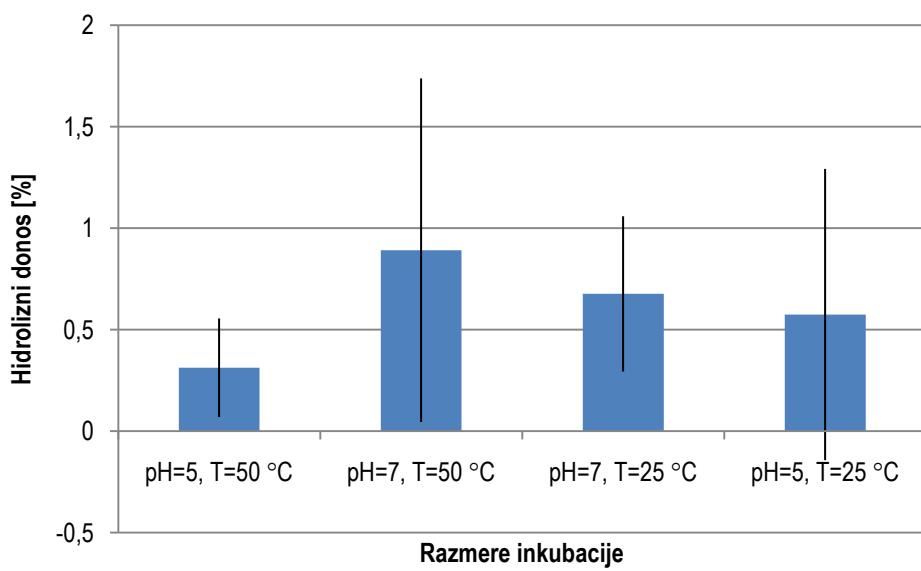
Preglednica 24: Hidrolizni donosi encimskih pripravkov VP in G v različnih razmerah inkubacije

| Encimski pripravek | Hidrolizni donos [%] | | | | | Povprečen hidrolizni donos [%] | Vzorčni standardni odklon |
|--------------------------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|---------------------------|
| | Razmere inkubacije | pH=5 T=50 °C | pH=7 T=50 °C | pH=7 T=25 °C | pH=5 T=25 °C | | |
| VP | 0,253 | 0,669 | 0,849 | 0,211 | | | |
| | 0,594 | 2,18 | 1,11 | 1,91 | | | |
| | 0,378 | 1,49 | 0,988 | 0,681 | 0,94 | 0,63 | |
| G | 0,532 | 0,127 | 0,510 | 0,273 | | | |
| | 0,105 | 0,128 | 0,438 | 0,178 | | | |
| | 0,0135 | 0,757 | 0,162 | 0,191 | 0,285 | 0,223 | |
| Povprečen hidrolizni donos [%] | 0,313 | 0,89 | 0,676 | 0,575 | | | |
| Vzorčni standardni odklon | 0,231 | 0,81 | 0,364 | 0,683 | | | |

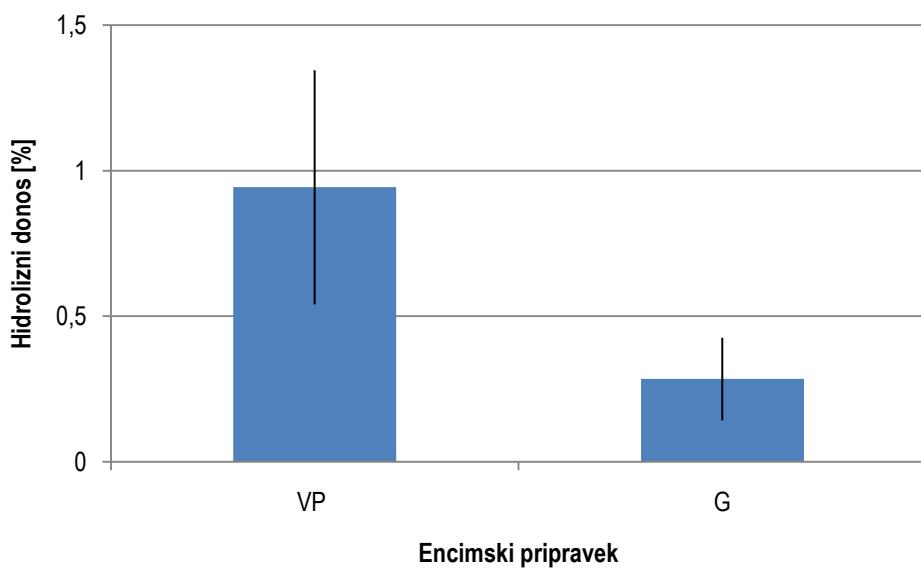
Ker je ta izračun lahko posledica naravne variabilnosti, smo z metodo analize variance (ANOVA) preverili naslednje ničelne domneve:

- različne razmere inkubacije enako vplivajo na oba encimski pripravka,
- povprečni hidrolizni donosi so v različnih razmerah inkubacije enaki,
- encimski pripravka imata enaka povprečna hidrolizna donosa.

Podatki prvi in drugi ničelni domnevi ne nasprotujejo ($p=0,40$ in $p=0,21$), medtem ko tretjo ničelno domneo zavračajo v korist alternativne. Pri stopnji značilnosti 0,05 trdimo, da encimski pripravki VP in G nimata enakih povprečnih hidroliznih donosov ($p=0,0026$) (Priloga D2).



Slika 18: Skupni povprečni hidrolizni donosi encimskih pripravkov VP in G v različnih razmerah inkubacije s 95 % intervaloma zaupanja povprečnih vrednosti. Povprečja se statistično značilno ne razlikujejo ($p=0,21$).



Slika 19: Povprečna hidrolizna donosa encimskih pripravkov VP in G (v vseh razmerah inkubacije) s 95 % intervaloma zaupanja povprečnih vrednosti. Povprečji se statistično značilno razlikujeta ($p=0,00026$).

5 RAZPRAVA

5.1 GOJENJE MIKROALGE *S. quadricauda*

Rastno krivuljo lahko razdelimo na štiri faze: lag fazo ali fazo prilagajanja, eksponentno ali logaritemsko fazo, stacionarno fazo in fazo odmiranja (Madigan in Martinko, 2006). Z namenom, da bi pridobili čim več biomase v čim krajšem času, smo kulturo vzdrževali v eksponentni ali logaritemski fazi rasti (Slika 9).

Bioprocес smo vodili na dva načina (Slika 7). S stališča masne bilance sta bila to zaprti bioprocес, pri katerem smo v bioreaktor na začetku dodali reaktante in iz njega odvzeli proizvode, ter bioprocес z recikлом, kjer smo del biomase in medij vračali (Pavko, 1996). Opazili smo, da je svetloba prvi omejujoč dejavnik rasti mikroalg v cevnem fotobioreaktorju. Celice so se namnožile do take mere, da svetloba najverjetnejše ni več dosegla notranjosti fotobioreaktorja, zato smo morali del biomase odvesti preden je zmanjkalo hranil v gojišču. Celice so dobro rastle na preostanku gojišča prejšnje gojitve. Primer je 6. gojitev v cevnem fotobioreaktorju (Preglednica 15, Slika 9, Preglednica 19).

Rast mikroalg smo spremljali s štetjem celic pod mikroskopom in merjenjem optične gostote. Vrednosti smo povezali z linearno regresijo, tako da smo lahko iz merjenja optične gostote izračunali število celic. Pri izmerjeni največji optični gostoti smo celice nato tudi prešteli in ugotovili, da je med prešteto ($8,7 \times 10^6$ celic/mL) in izračunano ($7,6 \times 10^6$ celic/mL) vrednostjo prišlo do razlik. Vzrokov za neujemanje obeh vrednosti je več. Pri veliki gostoti celic je bila homogenost odvetih vzorcev manjša, saj so celice tvorile skupke in se posedale na dno fotobioreaktorja. To je vplivalo na obe metodi za določanje rasti. Pomanjkljivost merjenja optične gostote je tudi v tem, da se že pri nizkih koncentracijah biomase pojavijo napake v meritvah zaradi odstopanj od Beer-Lamertovega zakona in neceličnih delcev, ki tudi sipajo svetlubo (Batič in Bayer, 1996).

5.2 FOTOGRAFIRANJE MIKROSKOPSKEGA PRIPRAVKA

Pri pregledovanju mikroalg pod mikroskopom smo opazili, da so celice v fotobiorektorju večinoma posamične, medtem ko smo v erlenmajericah opazili tudi cenobije s 4 celicami (Slika 10). Obliko kolonije lahko opazno spremojamo z uporabo različnih gojišč. Pri nizki slanosti ali majhni koncentraciji fosforja več vrst rodu *Scenedesmus* raste v enocelični obliki. Z različnimi gojivvenimi parametri lahko vplivamo tudi na prisotnost izrastkov (Lee, 1999). Prav tako predvidevamo, da je mešanje vplivalo na odsotnost cenobijev v fotobioreaktorju.

5.3 ENCIMSKA HIDROLIZA CELIČNE STENE

5.3.1 Encimska kinetika in modeliranje encimskega delovanja

Encimska kinetika proučuje hitrost delovanja encimov glede na pogoje delovanja. To je zelo široko področje, ki danes dobiva izjemen pomen (Schnell in Maini, 2003). Je najstarejši pristop k razumevanju encimskih mehanizmov in ostaja tudi najpomembnejši. Kinetične parametre uporabljamo za primerjavo encimskih aktivnosti (Nelson in Cox, 2005).

Hitrost delovanja encima je odvisna od načina njegovega delovanja, zato iz dinamike delovanja encimov lahko sklepamo na mehanizem delovanja (Schnell in Mendoza, 1997; Schnell in Maini, 2000; Schnell in Mendoza, 2000). Pri modeliranju encimske kinetike celulaz modele grobo delimo v štiri razrede: (1) empirični modeli; (2) modeli, ki temeljijo na Michaelis-Mentenovem modelu; (3) modeli povezani z adsorpcijo in modeli razviti za topne substrate. Empirični modeli pomagajo pri vrednotenju vplivov različnih lastnosti substratov in encimov na hidrolizo (Bansal in sod., 2009).

V našem primeru imamo opraviti z encimskimi pripravki, ki delujejo na različne substrate: celulozo, 1,3 in 1,4- β -glukane, hemicelulozo, pektin in ksilan. Delovanje je večstopenjsko (razgrajujemo polimere), v encimskem pripravku imamo več različnih encimov in substrati so kompleksni. Opraviti imamo torej s kompleksnim sistemom. V celoten sistem encimske katalize imamo le površen vpogled, kar nam ne omogoča, da bi lahko postavili kakršenkoli utemeljen kinetični model. Po principu Ockhamove britve in po izsledkih, ki sta jih opravila Srividhya in Schnell, 2006, smo se odločili, da agregatno kinetiko modeliramo kot proces prvega reda, da torej predpostavimo, da je hitrost delovanja encimskega pripravka v vsakem trenutku sorazmerna s koncentracijo substrata (karkoli že je substrat).

Izpeljavo in utemeljitev modela smo opisali v Prilogi A. Z modeliranjem eksperimentalno dobljenih podatkov, smo dobili parametre za primerjavo in ovrednotenje rezultatov.

5.3.2 Spremljanje razgradnje mikroalgnih celičnih sten

Predvidevamo, da je različna začetna koncentracija redukcijskih sladkorjev (Slika 11, Slika 12, Priloga C) in organske snovi v reakcijskih mešanicah (Preglednica 20, Priloga B) posledica različne koncentracije substrata v reakcijskih mešanicah, same strukture biomase, njenega shranjevanja in tudi predobdelave (avtoklaviranja) biomase. Razmere gojenja biomase niso bile konstantne, zato se je razlikovala tudi biomasa, ki smo jo uporabili pri encimski hidrolizi.

Presenetilo nas je znižanje koncentracije redukcijskih sladkorjev med inkubacijo (Slika 11). Sodeč po literaturi (Harun in Danquah, 2011) smo pričakovali, da bo koncentracija redukcijskih sladkorjev naraščala do 24 h in nato ostala enaka. Ker smo podoben vzorec zniževanja koncentracije redukcijskih sladkorjev opazili v vseh poskusnih mešanicah, smo predvidevali, da so takšni rezultati posledica bakterijske okužbe. Verjetno smo bakterije v reakcijske mešanice zanesli z encimskimi pripravki in le-te porabljajo redukcijske sladkorje. Okužbo smo dokazali z razmazom reakcijskih mešanic na plošče (HA). Odločili

smo se okužbo zaustaviti z antibiotikom. Encimske pripravke bi pred dodajanjem lahko tudi filtrirali in jih na ta način sterilizirali, vendar se za to nismo odločili, ker so relativno slabo topni.

Pri poskusu z antibiotikom je koncentracija redukcijskih sladkorjev v prvih 24 urah naraščala in nato ostala enaka (Slika 12). To tudi najverjetnejše potrjuje, da so sproščeni redukcijski sladkorji posledica encimske hidrolize in ne morebitnega spontanega razpada celične stene. Upočasnitev reakcije po 24 urah nakazuje, da se reakcija bliža ravnotežnemu stanju.

Encimska aktivnost (pri poskusu z dodanim antibiotikom) je bila največja v začetnih urah inkubacije, saj smo takrat izmerili največjo spremembbo v koncentraciji redukcijskih sladkorjev (Slika 13, Priloga C).

5.3.3 Primernost različnih encimskih pripravkov za razgradnjo mikroalgne celične stene

V reakcijskih mešanicah z encimskim pripravkom WX nismo izmerili povečanja koncentracije redukcijskih sladkorjev (Slika 14, Priloga C3), zato smo predvidevali, da leta ni razgrajeval mikroalgne celične stene. Izločili smo ga iz nadaljnje analize. Encimski pripravek WX ima ksilanazno aktivnost, zato sklepamo, da v mikroalgnih celičnih stenih ni bilo prisotnega primernega substrata ali da le ta ni bil dostopen za encim. Takeda (1996) v celičnih stenah različnih vrst rodu *Scenedesmus* ni dokazal prisotnosti ksiloze.

Do povečanja koncentracije redukcijskih sladkorjev ni prišlo tudi pri kombinaciji encimskih pripravkov VP+G in VP+WX, vendar le v določenih razmerah (Slika 15, Priloga C4, Priloga C5). Najverjetnejše te razmere niso bile primerne za encimsko delovanje. V mešanici encimskih preparatov G+WX nismo izmerili naraščanja redukcijskih sladkorjev le pri eni reakcijski mešanici pri pH=7 in T=25 °C (Priloga C6). Glede na to, da je v drugih dveh reakcijskih mešanicah prišlo do nastanka proizvoda, smo sklepali, da kombinacija teh dveh pripravkov učinkuje na substrat.

5.3.4 Primerjava hidroliznih donosov

Hipoteze, da bo hidroliza mikroalgnih celičnih sten največja pri temperaturi 25 °C in pH vrednosti 7, ne moremo potrditi. Skupni povprečni hidrolizni donosi v različnih razmerah inkubacije se statistično značilno ne razlikujejo ($p>0,05$) (Slika 16, Priloga D1). Podobno je primerjava skupnih hidroliznih donosov encimskih pripravkov VP in G v različnih razmerah pokazala, da se povprečja statistično značilno ne razlikujejo (Slika 18).

Pri primerjavi povprečnih hidroliznih donosov encimskih pripravkov VP in G z mešanico VP+G smo ugotovili, da je povprečen hidrolizni donos encimskega pripravka G manjši od povprečnega hidroliznega donosa mešanice. Povprečna hidrolizna donosa encimskega pripravka VP in mešanice se statistično značilno ne razlikujeta ($p=0,489$) (Slika 17). Delno smo potrdili hipotezo, da bodo encimske mešanice delovale bolje kakor posamezni encimi. Verjetno je encimski pripravek VP prispeval več k skupnemu razgrajevanju mikroalgnih celičnih sten mešanice.

Nato smo primerjali povprečna hidrolizna donosa encimskih pripravkov VP in G in ugotovili, da ima encimski pripravek VP večji hidrolizni donos kot encimski pripravek G (Slika 19). Verjetno je vzrok v različnih encimskih aktivnostih. Encimski pripravek VP ima naslednje aktivnosti: endo-1,3(4)- β -glukanazno (EC/IUB Št. 3.2.1.6), β -glukanazno, pektinazno in hemicelulazno (Product Data Sheet, 2004a), medtem ko ima encimski pripravek G naslednje aktivnosti: endo-1,4- β -glukanazno (EC/IUB št. 3.2.1.4), endo-1,3(4)- β -glukanazno (EC/IUB št. 3.2.1.6) in endo-1,4- β -ksilanazno (EC/IUB št. 3.2.1.8) (Product Data Sheet, 2004b). Sklepamo, da sta bili pri slednjem aktivni endo-1,4- β -glukanazna in endo-1,3(4)- β -glukanazna aktivnost. Glede na to, da encimski pripravek WX ni deloval (glavna aktivnost je endo-1,4- β -ksilanazna (EC/IUB št. 3.2.1.8) (Product Data Sheet, 2004c)), sklepamo, da tudi pri encimskem pripravku G ta aktivnost ni povečala koncentracije redukcijskih sladkorjev. Predvidevamo, da se pri VP ni aktivirala β -glukanazna aktivnost, ki cepi vezi v celobiozi (Kumar in sod., 2008). Končni proizvodi našega poskusa so verjetno različno dolgi oligosaharidi. Hidrolizne proizvode bi lahko identificirali z metodami, ki temeljijo na klasičnih analitskih tehnikah, spektroskopskih in kromatografskih tehnikah ter elektroforezi. Takšne tehnike uporabljamo tudi za določanje kemijske sestave celičnih sten (Möller, 2006).

Pri encimski hidrolizi celičnih sten je razumevanje njihove zgradbe ključnega pomena. Zaradi odpornosti celuloze na encimsko hidrolizo je posebno pomembna opredelitev njenih lastnosti (Möller, 2006). Menimo, da bi bilo pri nadaljnjem raziskovanju smiselno natančneje definirati substrat, ki smo ga uporabili v encimski hidrolizi, torej celično steno mikroalge *Scenedesmus quadricauda*. Tako bi lahko natančneje sklepali, katere encimske aktivnosti so najprimernejše za naš substrat.

V raziskavi smo uporabili encimske pripravke proizvajalca DSM Nutritional Products, ki so po sprejemljivih cenah dostopni na tržišču. Te pripravke dodajamo krmi pri vzreji živali, saj izboljšajo izrabo krme (Centeno in sod., 2006). Glede na to, da sta dva encimska pripravka hidrolizirala celično steno mikroalge *S. quadricauda* in da je ena izmed možnih aplikacij mikroalgne biomase prav krma sklepamo, da bi encimska pripravka Ronozyme VP (CT) in Roxazyme G2 G lahko uporabili kot krmni dodatek tudi pri krmljenju mikroalgne biomase.

Z obstoječo raziskavo smo prvo hipotezo delno potrdili, drugo v celoti potrdili, tretje ne moremo potrditi in četrto smo delno potrdili.

6 SKLEPI

- Delno smo potrdili, da uporabljeni encimski pripravki delujejo na celično steno mikroalge *Scenedesmus quadricauda*. Dva (Ronozyme VP (CT) in Roxazyme G2 G) od treh uporabljenih encimskih pripravkov razgrajujeta mikroalgno celično steno, kar smo dokazali z izmerjeno povečano koncentracijo redukcijskih sladkorjev.
- Potrdili smo, da je encimska aktivnost največja v začetnih urah inkubacije.
- Ne moremo potrditi, da je hidroliza mikroalgnih celičnih sten z izbranimi encimskimi pripravki največja pri temperaturi 25 °C in pH vrednosti 7, saj nam ni uspelo dokazati statistično značilnih razlik med hidroliznimi donosi v različnih razmerah inkubacije ($p>0,05$).
- Delno lahko potrdimo, da je hidroliza mikroalgnih celičnih sten večja pri kombinaciji dveh encimskih pripravkov kakor pri posameznem encimskem pripravku.
- Mikroalgne celične stene je najbolje hidroliziral encimski pripravek Ronozyme VP (CT). Med hidroliznimi donosi v različnih razmerah inkubacije nam ni uspelo dokazati statistično značilnih razlik ($p>0,05$).

7 POVZETEK

Mikroalge so mikroskopske alge. Večinoma so fotoavtotrofni organizmi, kar pomeni, da za svojo rast potrebujejo le anorganske mineralne ione in svetlobo. Uporabljamo jih v prehrani ljudi in živalski krmi, v kozmetični industriji, kmetijstvu, čistilnih napravah za čiščenje odpadne vode, mnogi pa njihov potencial vidijo tudi v pridobivanju energije. Gojimo jih v odprtih bazenih ali v zaprtih sistemih za gojenje alg t. i. fotobioreaktorjih. Izbera načina gojenja je predvsem odvisna od končnega proizvoda. V primerih, ko je končni proizvod znotraj celice ali ko želimo pridobiti enostavne sladkorje iz celične stene, moramo slednjo odpreti, perforirati ali razgraditi. V ta namen lahko uporabimo encime, ki so dovolj specifični in delujejo v blagih razmerah postopka.

V okviru diplomskega dela smo mikroalgo *Scenedesmus quadricauda* gojili v cevnem fotobioreaktorju in tako pridobili biomaso za encimsko hidrolizo njene celične stene. Celice v fotobioreaktorju smo poskušali vzdrževati v logaritemski fazi rasti in tako pospešiti samo pridobivanje biomase. Inokulum smo pripravljali v 5 L erlenmajericah na okenski polici ali pa smo reciklirali del biomase pridobljene ob žetvi. Med gojenjem smo pH vrednost vzdrževali med 7 in 8 z dovajanjem CO₂. Spremljali smo tudi temperaturo, ki je bila 20±6 °C. Rast kulture smo spremljali z merjenjem optične gostote pri 654 nm in štetjem celic pod mikroskopom s hemocitometrom. Maksimalna gostota celic je bila 7,6×10⁶ celic/mL. V fotobioreaktorju smo opravili smo 12 gojitev in pridobili 723,4 g centrifugirane mokre biomase. Opazili smo, da mikroalga *S. quadricauda* v fotobioreaktorju večinoma raste posamično, medtem ko v erlenmajericah tvori tudi cenobije. Predvidevamo, da je mešanje vplivalo na odsotnost cenobijev v fotobioreaktorju .

Hidrolizo celične stene smo izvedli s cenovno sprejemljivimi encimskimi pripravki (mešanice celulaz in hemicelulaz) pri temperaturah 25 in 50 °C ter pri pH vrednostih 5 in 7. Merili smo koncentracijo redukcijskih sladkorjev in koncentracijo organske snovi. S pomočjo kinetičnega modela prvega reda smo izračunali parametre za nadaljnjo analizo. Največjo spremembo v koncentraciji redukcijskih sladkorjev smo izmerili v začetnih urah inkubacije, zato predvidevamo, da je encimska aktivnost takrat največja. Upočasnitev reakcije po 24 urah morda nakazuje, da se reakcija bliža ravnotežnemu stanju. Preverili smo, kateri izmed treh uporabljenih encimskih pripravkov najbolje hidrolizira mikroalgno celično steno. Ugotovili smo, da Ronozyme WX (CT), ki ima ksilanazno aktivnost, ni deloval, saj nismo izmerili povečevanja koncentracije redukcijskih sladkorjev. Sklepamo, da v celični steni ni bilo ksilana. Primerjali smo tudi hidrolizni donos dveh posameznih encimskih pripravkov in mešanice obeh encimskih pripravkov. Mešanica VP+G je statistično značilno ($p<0,05$) bolje hidrolizirala mikroalgno celično steno kakor encimski pripravek G, medtem ko to ne velja za encimski pripravek VP ($p>0,05$). S tem smo delno potrdili hipotezo, da bo hidroliza z encimskimi mešanicami večja kakor tista s posameznimi encimskimi pripravki. Ugotovili smo, da ima encimski pripravek Ronozyme VP (CT) večji hidrolizni donos kot Roxazyme G2 G. Predvidevamo, da je to zaradi razlik v njuni aktivnosti in da ima prvi primernejše encimske aktivnosti za izbran substrat. Ronozyme VP (CT) ima naslednje aktivnosti: endo-1,3(4)-β-glukanazno (EC/IUB Št. 3.2.1.6), β-glukanazno, pektinazno in hemicelulazno. S primerjavo encimske hidrolize v različnih razmerah inkubacije smo poskušali ugotoviti, v katerih razmerah delujejo bolje. S

to raziskavo nam ni uspelo dokazati statistično značilnih razlik med povprečnimi hidroliznimi donosi v različnih razmerah inkubacije ($p>0,05$).

8 VIRI

- Bansal P., Hall M., Realff M. J., Lee J. H., Bommarius A. S. 2009. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances*, 27: 833-848
- Barsanti L., Gualtieri P. 2006. *Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Boca Raton, CRC Press: 301 str.
- Batič M., Bayer K. 1996. Merjenje bioloških parametrov v bioreaktorjih. V: *Biotehnologija - osnovni pojmi*. Raspored P. (ur.). Ljubljana, Bia: 689-702
- Becker E. W. 1996. *Microalgae: Biotechnology and microbiology*. New York, Cambridge University Press: 293 str.
- Bisalputra T., Weier T. E. 1963. The cell wall of *Scenedesmus quadricauda*. *American Journal of Botany*, 50, 10: 1011-1019
- Boyer R. 2005. *Temelji biokemije*. 2. izd. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Carlsson A. S., van Beilen J. B., Möller R., Clayton D. 2007. *Micro- and macro-algae: Utility for industrial applications. Outputs from the EPOBIO project*. Berks, CPL Press: 82 str.
- CCAP. 2011. *Culture Collection of Algae and Protozoa: JM (Jaworski's Medium): Media recipes*. Argyll, Dunstaffnage Marine Laboratory: 1 str.
<http://www.ccap.ac.uk/media/pdfrecipes.htm> (jan. 2010)
- Centeno M. S. J., Ponte P. I. P., Ribeiro T., Prates J. A. M., Ferreira L. M. A., Soares M. C., Gilbert H. J., Fontes C. M. G. A. 2006. Galactanases and mannanases improve the nutritive value of maize and soybean meal based diets for broiler chicks. *Journal of Poultry Science*, 43: 344-350
- Clesceri L. S., Greenberg A. E., Eaton A. D. 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington D. C., American Public Health Association: 1220 str.
- Costa J. A. V., de Moraes M. G. 2011. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*, 102, 1: 2-9
- de Vries R. P., Visser J. 2001. *Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 4: 497–522
- Fu C. C., Hung T. C., Chen J. Y., Su C. H., Wu W. 2010. Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction. *Bioresource Technology*, 101, 22: 8750-8754

- Gonzales F., Romera E., Ballester A., Blazquez M. L., Munoz J. A., Garcia-Balboa C. 2011. Algal biosorption and biosorbents. V: Microbial biosorption of metals. Kotrba P., Mackova M., Macek T. (eds.). New York, Springer: 160-178
- Hagewald H. E. 1997. Taxonomy and phylogeny of *Scenedesmus*. Korean Journal of Phycology, 12, 4: 235-246
- Harun, R., Danquah M. K. 2011. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. Chemical Engineering Journal, 168, 3: 1079-1084
- Hedenskog G., Enebo L., Vendlova J., Prokeš B. 1969. Investigation of some methods for increasing the digestibility *in vitro* of microalgae. Biotechnology and Bioengineering, 11, 1: 37-51
- Ho S.-H., Chen C.-Y., Lee D.-J., Chang J.-S. 2011. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems: A review. Biotechnology Advances, 29, 2: 189-198
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.
- Kryder L. R. 2007. Microalgae for wastewater treatment and reuse. CE598 Water reuse. Albuquerque, University of New Mexico, Water Resources Program:10 str. <http://www.docstoc.com/docs/50981026/Microalgae-for-Wastewater-Treatment-and-Reuse> (apr. 2011)
- Kumar A., Ergas S., Yuan X., Sahu A., Zhang Q., Dewulf J., Malcata F. X., van Langenhove H. 2010. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. Trends in Biotechnology, 28, 7: 371-380
- Kumar R., Singh S., Singh V. O. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35, 5: 377-391
- Lee R. E. 1999. Phycology. 3rd ed. Cambridge, Cambridge University press: 614 str.
- Lever M. 1977. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): effect of bismuth on the reaction. Analytical Biochemistry, 81, 1: 21-27
- Levy I., Shani Z., Shoseyov O. 2002. Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4-β-glucanase and cellulose-binding domains. Biomolecular Engineering, 19, 1: 17-30
- Madigan M. T., Martinko J. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. New Jersey, Pearson Prentice Hall: 992 str.

- Molina Grima E., Acien Fernandez F. G., Robles Medina A. 2004. Downstream processing of cell-mass and products. V: Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. Richmond A. (ed.). Oxford, Blackwell Science: 215-251
- Molina Grima M. E., Belarbi E.-H., Fernandez A. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20, 7-8: 491-515
- Möller R. 2006. Cell wall saccharification. EPOBIO: Realising the economic potential of sustainable resources: Bioproducts from non-food crops. Newbury, CPL Press: 60 str.
- Munoz R., Guieysse B. 2006. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*, 40, 15: 2799-2815
- NCBI. 2011. Taxonomy browser: Algae. Bethesda, NCBI-National Center for Biotechnology Information: database
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi> (jul. 2011)
- Nelson D. L., Cox M. M. 2005. Lehninger principles of biochemistry. 4th ed. New York, W. H. Freeman and Company: 1119 str.
- Pavko A. 1996. Masne bilance in načini vodenja bioprocesov. V: Biotehnologija - osnovna znanja. Raspored P. (ur.). Ljubljana, Bia: 425-436
- Perdih A. 1996. Izbor in priprava substratov. V: Biotehnologija - osnovna znanja. Raspored P. (ur.). Ljubljana, Bia: 367-382
- Product Data Sheet. 2004a. Ronozyme VP (CT). Bassel, DSM Nutritional Products: 2 str.
- Product Data Sheet. 2004c. Ronozyme WX (CT). Bassel, DSM Nutritional Products: 2 str.
- Product Data Sheet. 2004b. Roxazyme G2 G. Bassel, DSM Nutritional Products: 2 str.
- Pulz O., Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 6: 635-648
- Schnell S., Maini P. K. 2003. A century of enzyme kinetics: Reliability of the Km and Vmax estimates. *Comments on Theoretical Biology*, 8, 2-3: 169-187
- Schnell S., Mendoza C. 1997. Closed form solution for time dependent enzyme kinetics. *Journal of Theoretical Biology*, 187, 2: 207-212
- Schnell S., Mendoza C. 2000. Enzyme kinetics of multiple alternative substrates. *Journal of Mathematical Chemistry*, 27: 155-170
- Schnell S., Maini P. K. 2000. Enzyme kinetics at high enzyme concentration. *Bulletin of Mathematical Biology*, 62, 3: 483-499

- Sedmak B. 2011. Cianobakterije in njihovi toksini: Kdo so, kje jih najdemo in kako delujejo? Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 96 str.
- Sharma A., Nakas J. P. 1987. Preliminary characterization of laminarinase from *Trichoderma longibrachiatum*. Enzyme and Microbial Technology, 9, 2: 89-93
- Sialve B., Bernet N., Bernard O. 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. Biotechnology Advances, 27, 4: 409-416
- Smole Možina S. 1996. Izbor, priprava in shranjevanje industrijskih biokultur. V: Biotehnologija - osnovna znanja. Raspored P. (ur.). Ljubljana, Bia: 349-365
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101, 2: 87-96
- Srividhya J., Schnell S. 2006. Why substrate depletion has apparent first-order kinetics in enzymatic digestion. Computational Biology & Chemistry, 30, 3: 209-214
- Sun Y., Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology, 83, 1: 1-11
- Takeda H. 1996. Cell wall sugars of some *Scenedesmus* species. Phytochemistry, 42, 3: 673 - 675
- Toman M. J. 1996. Alge. Izbor, priprava in shranjevanje industrijskih biokultur. V: Biotehnologija - osnovna znanja. Raspored P. (ur.). Ljubljana, Bia: 129-147
- Tomaselli L. 2004. The microalgal cell. V: Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. Richmond A. (ed.). Oxford, Blackwell Science: 3-19
- Tredici M. R. 2004. Mass production of microalgae: Photobioreactors. V: Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. Richmond A. (ed.). Oxford, Blackwell Science: 178-211
- Tuohy Z. A., Popper M. G. 2010. Beyond the green: Understanding the evolution puzzle of plant and algal cell walls. Plant Physiology, 153, 2: 373-383
- Xiong H., Nyysölä A., Jänis J., Pastinen O., von Weymarn N., Leisola M., Turunen O. 2004. Characterization of the xylanase produced by submerged cultivation of *Thermomyces lanuginosus* DSM 10635. Enzyme and Microbial Technology, 35, 1: 93-99
- van den Hoek C., Mann D. G., Jahns H. M. 1995. Algae: an introduction to phycology. Cambridge, Cambridge University Press: 623 str.
- Zelibor J. L. Jr., Romankiw L., Hatcher P. G., Colwell R. R. 1988. Comparative analysis of the chemical composition of mixed and pure cultures of green algae and their

decomposed residues by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. Applied
and Environmental Microbiology, 54, 4: 1051-1060

ZAHVALA

Vsak korak nas pelje naprej in ker ta korak ni bil ravno sila enostaven, sem hvaležna vsem, ki ste mi kakorkoli pomagali.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar za vodenje in strokovno pomoč pri izvedbi diplomske naloge.

Hvala Robertu Reinhardtu, ki ve odgovore na vsa moja vprašanja in velike probleme spreminja v papirnate zmaje.

Hvala Borutu Lazarju za sprejem v algni svet in vse pogovore brez »pravih« odgovorov.

Zahvaljujem se vsem na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnou biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete, ki so mi prijazno pomagali in svetovali. Hvala Marti Majdič za vse napotke, tople besede in potrpljenje.

Prof. dr. Tomu Turku se zahvaljujem za strokoven pregled diplomske naloge.

Hvala moji družini in prijateljem za vso spodbudo.

PRILOGE

Priloga A1: Teoretičen opis izpeljave empiričnega modela prvega reda za opis encimske kinetike

Predpostavili smo, da je hitrost delovanja encimskega pripravka v vsakem trenutku sorazmerna s koncentracijo substrata. $[S](t)$ je koncentracija substrata in naš pogoj pomeni diferencialno enačbo:

$$[\dot{S}](t) = \frac{d[S]}{dt} = r[S]$$

Splošne rešitve take diferencialne enačbe so oblike:

$$[S](t) = [S_0] e^{rt}$$

(r je v našem procesu negativen. Enačbo bi lahko zapisali tudi z minusom v eksponentu, vendar se bomo temu odpovedali in s tem zmanjšali možnosti za napake pri računanju.)

Zapisati želimo model za časovni potek koncentracije produkta (reduktivnih sladkorjev) $y(t)$. Predpostavimo, da obstaja enostavna zveza med koncentracijo substrata in koncentracijo proizvoda: ena enota substrata da p enot proizvoda:

$$[P](t) = [P_0] + p ([S_0] - [S](t))$$

$[P_0]$ je začetna koncentracija proizvoda in $[S_0]$ je začetna koncentracija substrata. Faktor p označuje razmerje med njima (koliko molov reduktivnih sladkorjev dobimo iz enega mola celuloze).

Za lažje računanje bomo označili:

$$c = [P_0] + p [S_0]$$

$$b = p [S_0]$$

Konstanta c torej pomeni maksimalno koncentracijo proizvoda (reduktivnih sladkorjev, ki so že v slednji obliki ali še v obliki polisaharidov, ki bodo razgrajeni v reduktivne sladkorje). Konstanta b pomeni koncentracijo proizvoda, ki ga lahko dobimo iz substrata (koncentracijo reduktivnih sladkorjev, ki jih lahko dobimo iz polisaharidov). S tako definiranimi konstantami je naš model:

$$[P](t) = c - be^{rt}$$

Parametra $[P_0]$ in $[S_0]$ sta na videz predvsem določena s substratom, vendar sta v resnici odvisna tudi od encima: verjetno različni encimi razgradijo različen delež skupnega substrata. Konstanti b in c vključujeta tako začetne pogoje, ki so določeni s substratom, kot tudi p , ki je odvisen od encima. Tipičen primer take krivulje prikazujemo v Prilogi A2.

Opis poskusa: imamo 3 steklenice z reakcijskimi mešanicami. Vzorce jemljemo na začetku (0 h) ter po 4 h, 24 h, 48 h in 72 h inkubacije. Iz vsake steklenice vzamemo po en vzorec in izmerimo koncentracijo redukcijskih sladkorjev (proizvoda). Steklenice imajo različno začetno in končno koncentracijo proizvoda. Encimi v vseh steklenicah delajo z enako hitrostjo in koncentracija proizvoda se približuje maksimalni koncentraciji. Hitrost delovanja encima je sorazmerna s koncentracijo substrata. Za vsak encimski pripravek imamo torej 3 reakcijske mešanice, za vsako reakcijsko mešanico imamo 5 meritev. Za tri različne reakcijske mešanice imamo različne vrednosti $c \{c_1, c_2, c_3\}$ in $b \{b_1, b_2, b_3\}$, ampak eno samo vrednost r . Poskušamo opisati proces:

$$[P_1](t) = c_1 - b_1 e^{rt}$$

$$[P_2](t) = c_2 - b_2 e^{rt}$$

$$[P_3](t) = c_3 - b_3 e^{rt}$$

Parametre modela $\{c_1, c_2, c_3, b_1, b_2, b_3, r\}$ bomo poiskali z metodo najmanjših kvadratov odstopanj od izmerjenih vrednosti. Vsota kvadratov odstopanj je:

$$S(\{c_k\}, \{b_k\}, r) = \sum_{K=1}^3 \sum_{i=1}^n ([P_k](t_i) - [P_{ki}])^2 = \sum_{K=1}^3 \sum_{i=1}^n (c_k - b_k e^{rt_i} - [P_{ki}])^2$$

Iščemo take $\{c_k\}, \{b_k\}, r$, da bo gornji S najmanjši, torej morajo biti odvodi enaki 0:

$$\frac{\partial S}{\partial c_k} = 2 \sum_{i=1}^n (c_k - b_k e^{rt_i} - [P_{ki}]) = 0, \quad \text{za } k = 1, 2, 3$$

$$\frac{\partial S}{\partial b_k} = -2 \sum_{i=1}^n e^{rt_i} (c_k - b_k e^{rt_i} - [P_{ki}]) = 0, \quad \text{za } k = 1, 2, 3$$

$$\frac{\partial S}{\partial r} = -2 \sum_{K=1}^3 b_k \sum_{i=1}^n t_i e^{rt_i} (c_k - b_k e^{rt_i} - [P_{ki}]) = 0$$

To je sedem enačb za sedem parametrov. Iz prvih šestih enačb je enostavno izraziti $\{c_k\}$ in $\{b_k\}$ iz r :

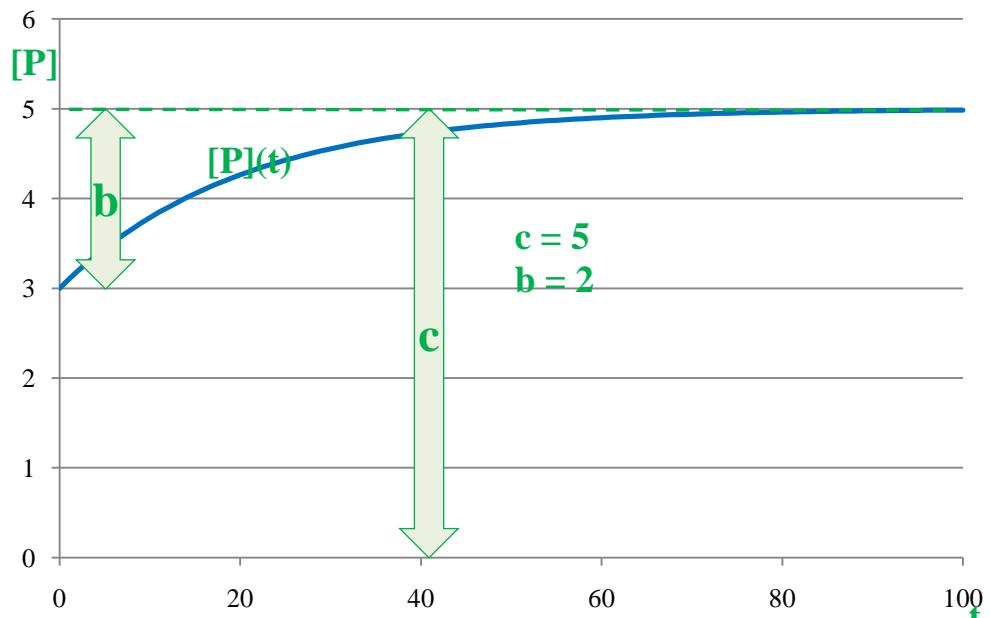
$$b_k(r) = \frac{n \sum [P_{ki}] e^{rt_i} - \sum e^{rt_i} \sum [P_{ki}]}{(\sum e^{rt_i})^2 - n \sum e^{2rt_i}}, \quad \text{za } k = 1, 2, 3$$

$$c_k(r) = \frac{\sum e^{2rt_i} \sum [P_{ki}] - \sum e^{rt_i} \sum [P_{ki}] e^{rt_i}}{(\sum e^{rt_i})^2 - n \sum e^{2rt_i}}, \quad \text{za } k = 1, 2, 3$$

Zadnje enačbe $\frac{\partial S}{\partial r} = 0$ se ne da rešiti analitično, zato jo moramo reševati numerično. Za naše primere smo uporabili orodje »goal seek« v programu Microsoft Office Excel. V

praksi se izkaže, da je izračun $r \rightarrow \{c_k\}, \{b_k\} \rightarrow \frac{\partial S}{\partial r}$ precej numerično nestabilen, zato smo morali pred iskanjem natančnega minimuma najprej uganiti dober približek, kar smo naredili ročno s tabeliranjem funkcije S .

Primer take analize kaže izmerjene podatke kot nepovezane točke in tri krivulje, ki so bile izračunane s skupnim r kot debelejše krivulje.



Priloga A2: Tipičen primer krivulje naraščanja koncentracije produkta s časom

Priloga A3: Utemeljitev uporabe empiričnega modela prvega reda za opis encimske kinetike

Ideja o kinetičnem modelu prvega reda je morda groba in navidezno neutemeljena. Intuitivno si jo lahko razlagamo tako, da gre za kompleks medsebojnih vplivov, termodinamičnih značilnosti in drugih nekontroliranih faktorjev, in da se skupni učinek množice pod-procesov, ki sestavljajo skupni proces in imajo lahko vsak svojo kinetiko, sešteje v najbolj preprost model razgradnje. Ker so modeli prvega reda v naravi zelo pogosti, bi si drznili celo postaviti hipotezo, da se množica raznovrstnih procesov agregatno (skoraj vedno) obnaša podobno. To bi bilo analogno zakonu velikih števil v verjetnosti oz. statistiki, ki pravi, da se množica dovolj pohlevnih slučajnih spremenljivk (skoraj vedno) agregatno obnaša kot normalno porazdeljena slučajna spremenljivka. Tako hipotezo bi bilo potrebno ovrednotiti s teoretično študijo na področju (meta) encimske kinetike, kjer bi lahko študirali (matematično ali s simulacijami) kakšna merila morajo izpolnjevati pod procesi in kaj pomeni »skoraj vedno«. Taka študija daleč presega okvire tega dela.

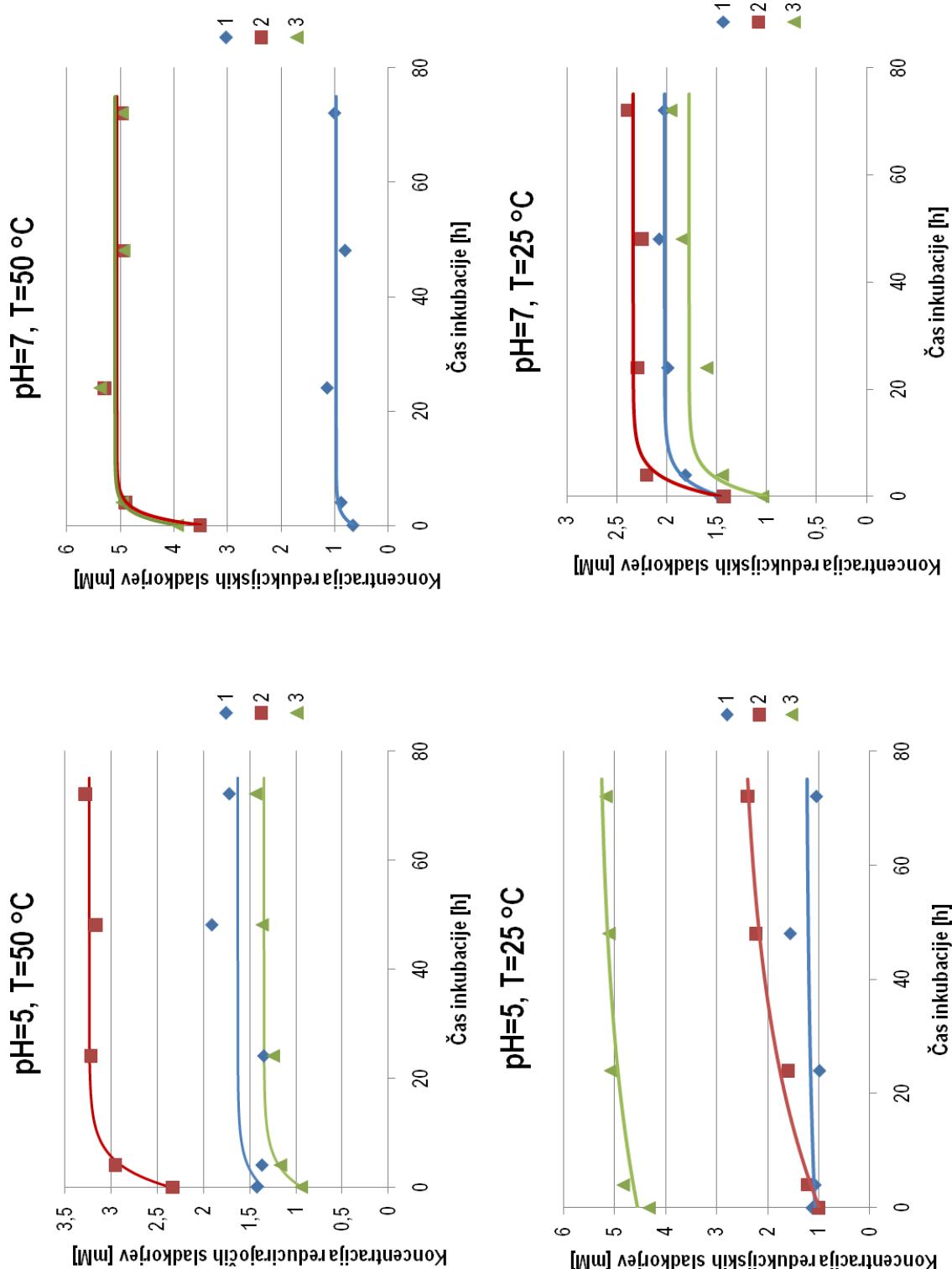
Priloga B: Koncentracija proizvoda, ki ga lahko dobimo iz substrata v določeni reakcijski mešanici (vrednost b), koncentracija organske snovi in hidrolizni donos encimskih pripravkov v različnih razmerah inkubacije

| Encim in inkubacijski pogoji | b [mM] | b [g/L] | c(org. snov) [g/L] | Hidrolizni donos [%] |
|------------------------------|----------|-----------|--------------------|----------------------|
| VP pH=5, T=50 °C | 0,2692 | 0,04850 | 19,1 | 0,253 |
| | 0,8762 | 0,1579 | 26,6 | 0,594 |
| | 0,4100 | 0,07389 | 19,5 | 0,378 |
| VP pH=7, T=50 °C | 0,3159 | 0,05693 | 8,51 | 0,669 |
| | 1,565 | 0,2820 | 12,9 | 2,19 |
| | 1,157 | 0,2084 | 14,0 | 1,49 |
| VP pH=7, T=25 °C | 0,5673 | 0,1022 | 12,0 | 0,849 |
| | 0,8792 | 0,1584 | 14,3 | 1,11 |
| | 0,7679 | 0,1384 | 14,0 | 0,988 |
| VP pH=5, T=25 °C | 0,1832 | 0,03302 | 15,7 | 0,211 |
| | 1,606 | 0,2895 | 15,1 | 1,915 |
| | 0,8046 | 0,1450 | 21,3 | 0,681 |
| G pH=5, T=50 °C | 0,6760 | 0,1218 | 22,9 | 0,532 |
| | 0,1303 | 0,0234 | 22,4 | 0,105 |
| | 0,01680 | 0,003027 | 22,4 | 0,0135 |
| G pH=7, T=50 °C | 0,09243 | 0,01666 | 13,1 | 0,127 |
| | 0,06952 | 0,01253 | 9,80 | 0,128 |
| | 0,6665 | 0,1201 | 15,9 | 0,757 |
| G pH=7, T=25 °C | 0,4357 | 0,07851 | 15,4 | 0,510 |
| | 0,3540 | 0,06378 | 14,6 | 0,438 |
| | 0,1035 | 0,01865 | 11,5 | 0,162 |
| G pH=5, T=25 °C | 0,2287 | 0,04122 | 15,1 | 0,273 |
| | 0,1023 | 0,01843 | 10,4 | 0,178 |
| | 0,2579 | 0,04647 | 24,4 | 0,191 |
| WX pH=5, T=50 °C | / | / | 25,8 | / |
| | / | / | 23,1 | / |
| | / | / | 23,8 | / |
| WX pH=7, T=50 °C | / | / | 10,5 | / |
| | / | / | 11,7 | / |
| | / | / | 12,4 | / |
| WX pH=7, T=25 °C | / | / | 10,6 | / |
| | / | / | 8,96 | / |
| | / | / | 9,24 | / |
| WX pH=5, T=25 °C | / | / | 15,4 | / |
| | / | / | 16,0 | / |
| | / | / | 19,3 | / |

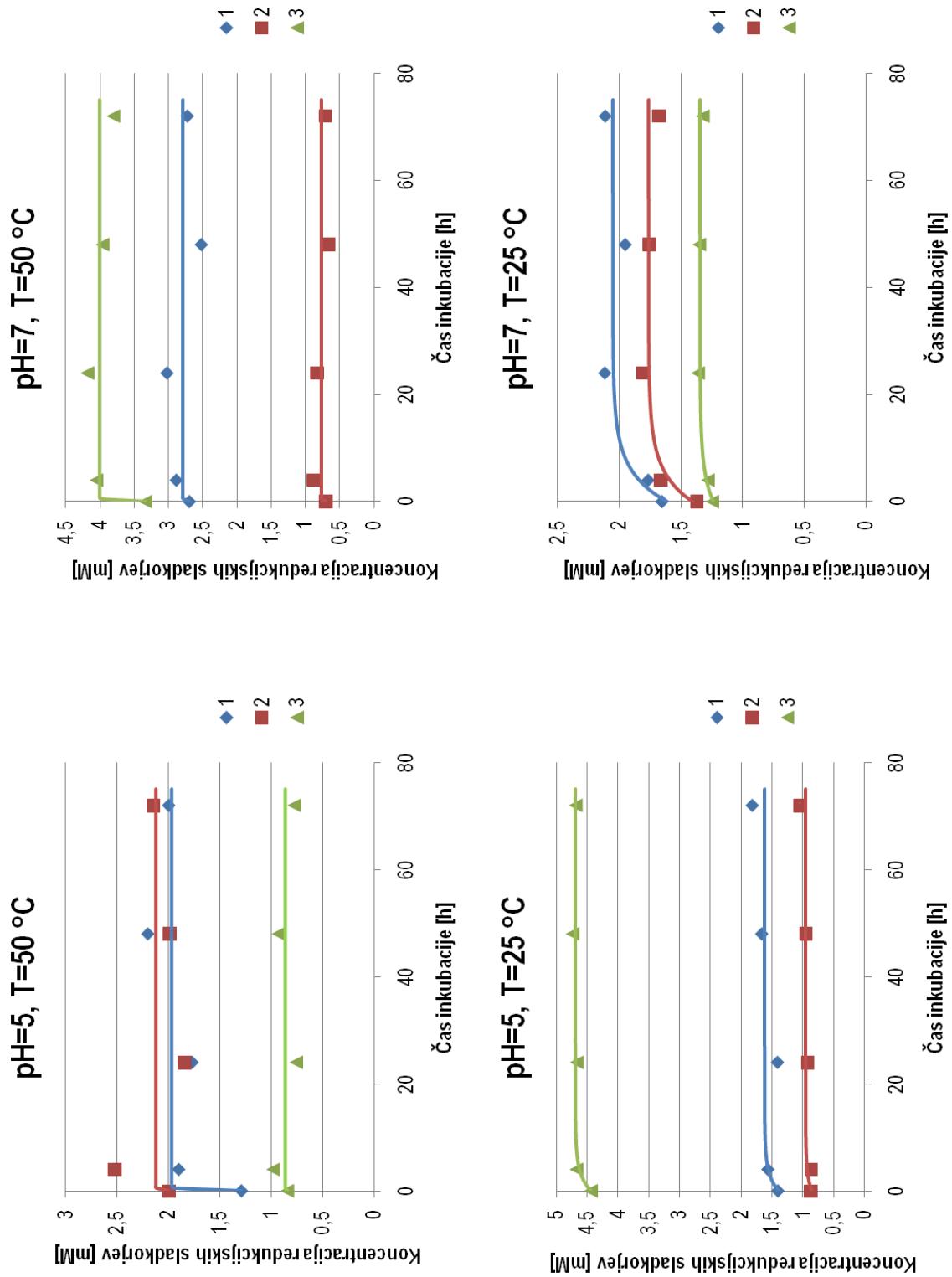
Se nadaljuje.

Nadaljevanje Priloge B: Koncentracija proizvoda, ki ga lahko dobimo iz substrata v določeni reakcijski mešanici (vrednost b), koncentracija organske snovi in hidrolizni donos encimskih pripravkov v različnih razmerah inkubacije

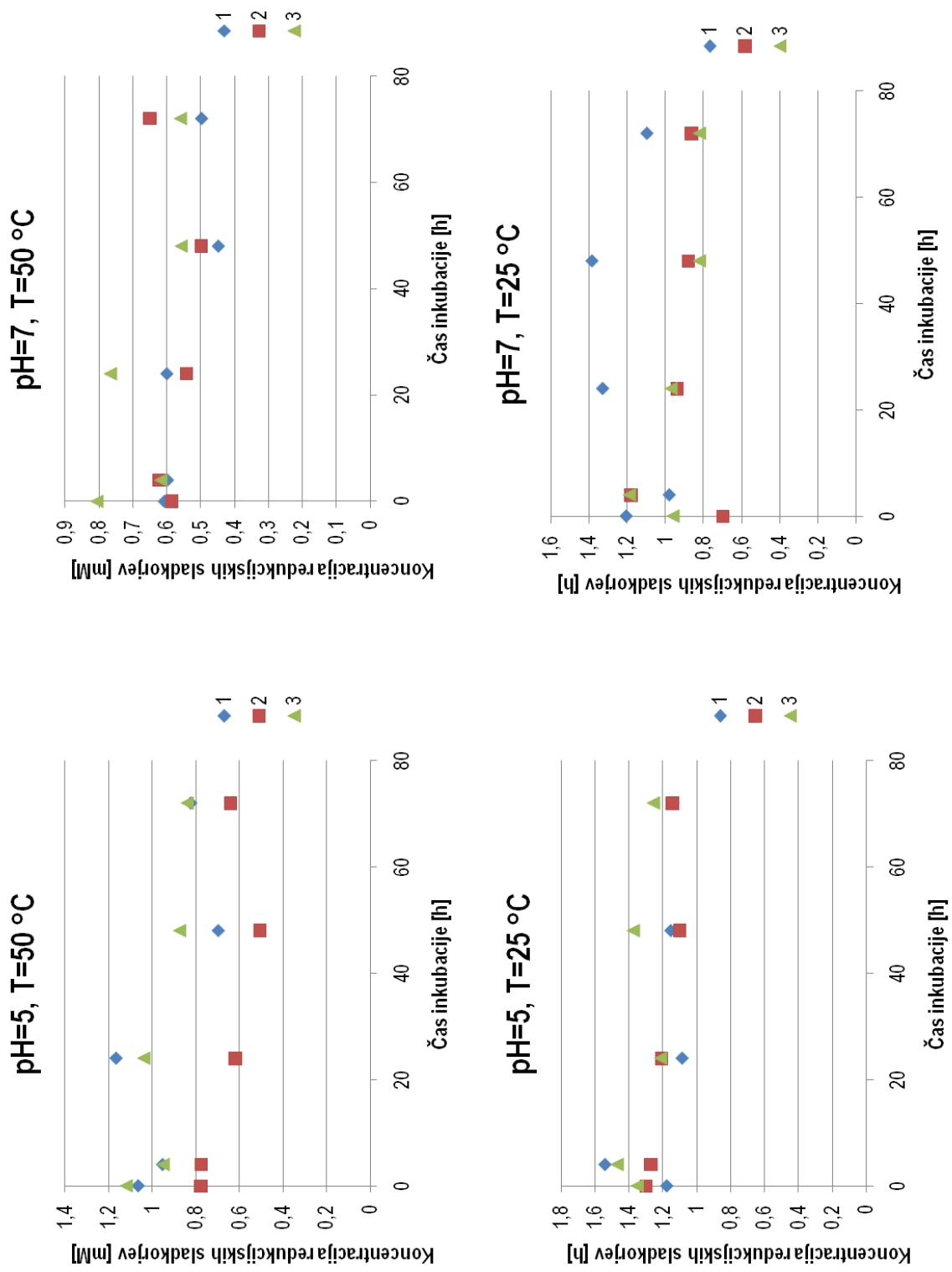
| Encim in inkubacijski pogoji | b [mM] | b [g/L] | c(org. snov) [g/L] | Hidrolizni donos [%] |
|------------------------------|----------|-----------|--------------------|----------------------|
| VP+G pH=5, T=50 °C | 0,4219 | 0,07602 | 15,6 | 0,488 |
| | 0,3856 | 0,06948 | 21,9 | 0,317 |
| | 1,198 | 0,2160 | 17,4 | 1,24 |
| VP+G pH=7, T=50 °C | 0,2792 | 0,05031 | 7,93 | 0,634 |
| | 0,3836 | 0,06912 | 9,30 | 0,741 |
| | 0,1011 | 0,01821 | 8,10 | 0,225 |
| VP+G pH=7, T=25 °C | / | / | 6,72 | / |
| | / | / | 14,0 | / |
| | / | / | 14,9 | / |
| VP+G pH=5, T=25 °C | 1,143 | 0,2059 | 15,7 | 1,31 |
| | 4,253 | 0,7664 | 18,2 | 4,21 |
| | 2,217 | 0,3994 | 17,1 | 2,34 |
| VP+WX pH=5, T=50 °C | / | / | 24,3 | / |
| | / | / | 22,4 | / |
| | / | / | 22,4 | / |
| VP+WX pH=7, T=50 °C | 0,2478 | 0,04466 | 11,2 | 0,399 |
| | 0,4408 | 0,07944 | 8,3 | 0,956 |
| | 0,6861 | 0,1236 | 10,5 | 1,18 |
| VP+WX pH=7, T=25 °C | / | / | 15,4 | / |
| | / | / | 6,44 | / |
| | / | / | 11,8 | / |
| VP+WX pH=5, T=25 °C | 0,2818 | 0,05078 | 16,8 | 0,302 |
| | 0,3396 | 0,06119 | 16,8 | 0,364 |
| | 0,5809 | 0,1047 | 16,8 | 0,623 |
| G+WX pH=5, T=50 °C | 0,0774 | 0,01396 | 14,6 | 0,0957 |
| | 0,3442 | 0,06202 | 20,1 | 0,309 |
| | 0,2609 | 0,04702 | 17,6 | 0,267 |
| G+WX pH=7, T=50 °C | 0,250 | 0,04499 | 17,7 | 0,254 |
| | 0,467 | 0,08424 | 20,5 | 0,410 |
| | 0,313 | 0,05640 | 15,9 | 0,355 |
| G+WX pH=7, T=25 °C | / | / | 7,28 | / |
| | / | / | 16,5 | / |
| | / | / | 13,4 | / |
| G+WX pH=5, T=25 °C | 0,05743 | 0,01035 | 17,9 | 0,0577 |
| | 0,09355 | 0,01686 | 17,4 | 0,0971 |
| | 0,02532 | 0,004562 | 15,7 | 0,0291 |



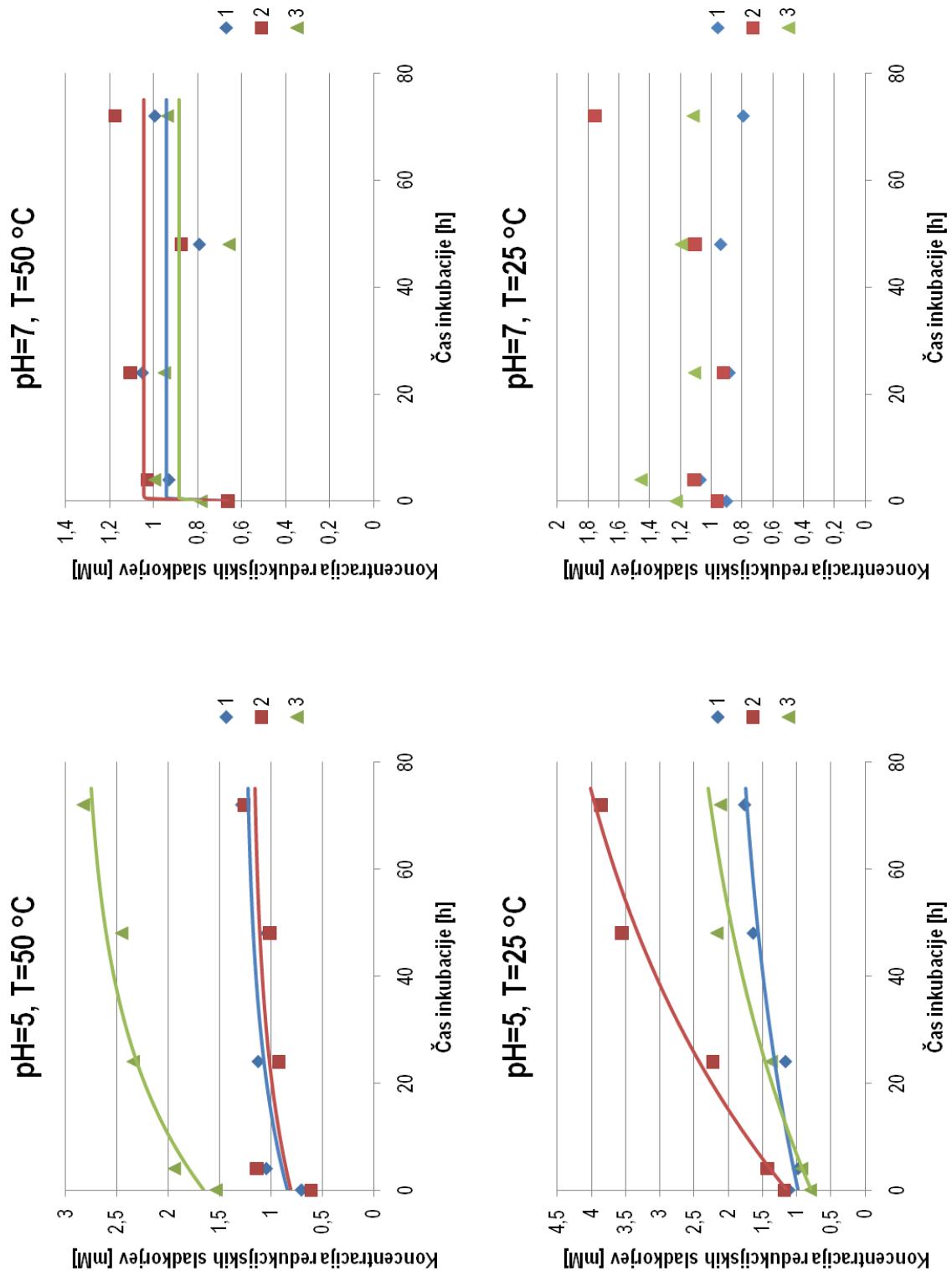
Priloga C1: Spreminjanje koncentracije reducirajočih sladkorjev s časom v reakcijskih mešanicah z encimskim pripravkom VP v različnih razmerah inkubacije



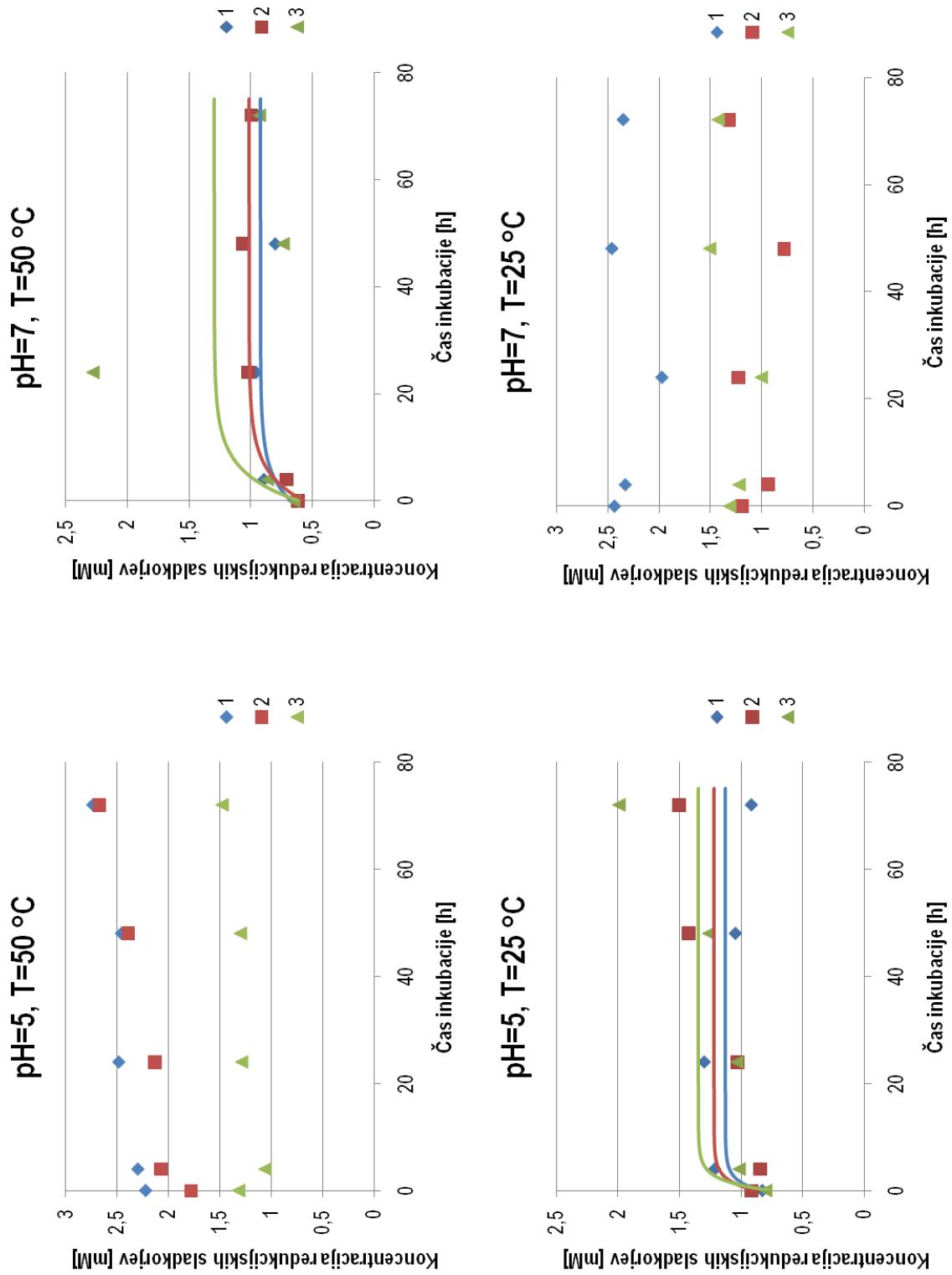
Priloga C2: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev s časom v reakcijskih mešanicah z encimskim pripravkom G v različnih razmerah inkubacije



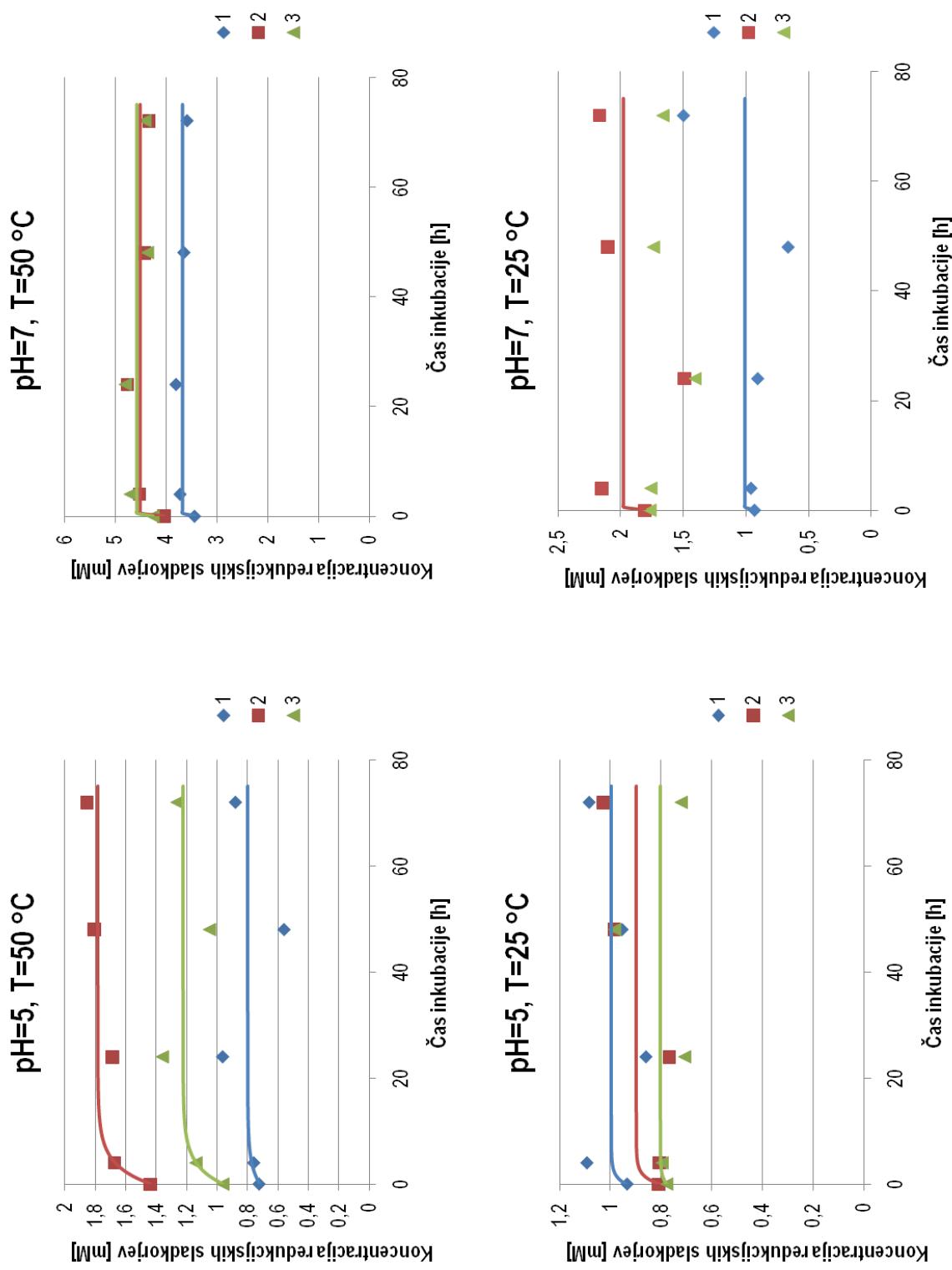
Priloga C3: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev s časom v reakcijskih mešanicah z encimskim pripravkom WX v različnih razmerah inkubacije



Priloga C4: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev s časom v reakcijskih mešanicah z mešanico encimskih pripravkov VP+G v različnih razmerah inkubacije



Priloga C5: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev s časom v reakcijskih mešanicah z mešanico encimskih pripravkov VP+WX v različnih razmerah inkubacije



Priloga C6: Spreminjanje koncentracije redukcijskih sladkorjev s časom v reakcijskih mešanicah z mešanico encimskih pripravkov G+WX v različnih razmerah inkubacije

Priloga D1: Rezultati statistične analize primerjave povprečnih hidroliznih donosov v različnih razmerah inkubacije z metodo analize variance (ANOVA)

| Primerjava | Stopinje prostosti | F-vrednost | P-vrednost | F-kritična vrednost |
|-------------------------------------|--------------------|------------|------------|---------------------|
| Med različnimi razmerami inkubacije | 3 | 0,87189 | 0,46289 | 2,81647 |
| Znotraj skupine | 44 | | | |
| Skupaj | 47 | | | |

Priloga D2: Rezultati statistične analize primerjave povprečnih hidroliznih donosov encimskih pripravkov VP in G v različnih razmerah inkubacije z metodo analize variance (ANOVA)

| Primerjava | Stopinje prostosti | F-vrednost | P-vrednost | F-kritična vrednost |
|-------------------------------------|--------------------|------------|------------|---------------------|
| Med različnimi razmerami inkubacije | 3 | 1,69316 | 0,20852 | 3,23887 |
| Med različnimi encimskimi pripravki | 1 | 12,7107 | 0,00258 | 4,494 |
| Interakcija | 3 | 1,04176 | 0,40091 | 3,23887 |
| Znotraj skupine | 16 | | | |
| Skupaj | 23 | | | |

Priloga D3: Rezultati statistične analize primerjave povprečnih hidroliznih donosov encimskega pripravka VP in mešanice dveh encimskih pripravkov VP+G z metodo analize variance (ANOVA)

| Primerjava | Stopinje prostosti | F-vrednost | P-vrednost | F-kritična vrednost |
|--|--------------------|------------|------------|---------------------|
| Med posameznim encimskim pripravkom in encimsko mešanico | 1 | 0,50142 | 0,48907 | 4,494 |
| Znotraj skupine | 16 | | | |
| Skupaj | 17 | | | |

Priloga D4: Rezultati statistične analize primerjave povprečnih hidroliznih donosov encimskega pripravka G in mešanice dveh encimskih pripravkov VP+G z metodo analize variance (ANOVA)

| Primerjava | Stopinje prostosti | F-vrednost | P-vrednost | F-kritična vrednost |
|--|--------------------|------------|------------|---------------------|
| Med posameznim encimskim pripravkom in encimsko mešanico | 1 | 6,050901 | 0,025661 | 4,493998 |
| Znotraj skupine | 16 | | | |
| Skupaj | 17 | | | |