

VISOKA ŠOLA ZA VARSTVO OKOLJA

DIPLOMSKO DELO

**FERMENTACIJA MANITOLA Z UPORABO TERMOFILNIH
BAKTERIJ**

EVA SKRBINŠEK

VELENJE, 2020

VISOKA ŠOLA ZA VARSTVO OKOLJA

DIPLOMSKO DELO

**FERMENTACIJA MANITOLA Z UPORABO TERMOFILNIH
BAKTERIJ**

EVA SKRBINŠEK

Varstvo okolja in ekotehnologije

Mentor: pred. dr. Goran Pipuš

Somentor: Sean Michael Scully, M. Sc.

VELENJE, 2020

Številka: 726-29/2017-2

Datum: 22. 1. 2019

Na podlagi Diplomskega reda izdajam naslednji

SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

Študentka Visoke šole za varstvo okolja **Eva Skrbinšek** lahko izdela diplomsko delo z naslovom v slovenskem jeziku:

Fermentacija manitola z uporabo termofilnih bakterij

Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku:

Mannitol fermentation by thermophilic anaerobes

Mentor: **pred. dr. Goran Pipuš**

Somentor: **Sean Michael Scully, M. Sc.**

Diplomsko delo mora biti izdelano v skladu z Diplomskim redom VŠVO.

Pouk o pravnem sredstvu: zoper ta sklep je dovoljena pritožba na Senat VŠVO v roku 8 delovnih dni od prejema sklepa.



Izr. prof. dr. Boštjan Pokorny
dekan

Visoka šola za varstvo okolja

Trg mladosti 7 | 3320 Velenje

t: 03 898 64 10 | f: 03 89864 13 | e: info@vsvo.si

www.vsvo.si



Appendix 2: Decision on Bachelor's thesis



Document No.: 726-29/2017-2

Date and place: 21 January 2019, Velenje

Based on the Degree Requirements of the Environmental Protection College the following

DECISION ON BACHELOR'S THESIS
is issued to the student of the Environmental Protection College

Eva Skrbinšek
to be entitled to write her bachelor's thesis:

title of her bachelor's thesis in the English
language: Mannitol fermentation by
thermophilic anaerobes

title of her bachelor's thesis in the Slovene
language: Fermentacija manitola z uporabo
termofilnih bakterij

mentor: Goran Pipuš, Ph. D.

co-mentor: Sean Michael Scully, M. Sc.

The bachelor's thesis shall be written and structured in compliance with the Guidelines for Bachelor's Thesis Writers.

Caution: An appeal against this decision to the Senate of the college is allowable within 3 working days.



Dean

Boštjan Pokorny, Ph.D., Associate Professor

IZJAVA O AVTORSTVU

Podpisani/a Eva Skrbinšek, vpisna številka 34130037, študent/ka visokošolskega strokovnega študijskega programa Varstvo okolja in ekotehnologije, sem avtor/ica diplomskega dela z naslovom **Fermentacija manitola z uporabo termofilnih bakterij**, ki sem ga izdelal/a pod:

- mentorstvom pred. dr. Gorana Pipuša in
- somentorstvom Seana Michael Scullya, M. Sc.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je predloženo delo moje avtorsko delo, torej rezultat mojega lastnega raziskovalnega dela;
- oddano delo ni bilo predloženo za pridobitev drugih strokovnih nazivov v Sloveniji ali tujini;
- so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem delu, navedena oz. citirana v skladu z navodili VŠVO;
- so vsa dela in mnenja drugih avtorjev navedena v seznamu virov, ki je sestavni element predloženega dela in je zapisan v skladu z navodili VŠVO;
- se zavedam, da je plagiatstvo kaznivo dejanje;
- se zavedam posledic, ki jih dokazano plagiatstvo lahko predstavlja za predloženo delo in moj status na VŠVO;
- je diplomsko delo jezikovno korektno in da je delo lektoriral/a dr. Aleksandra Gačić, univ. dipl. prof. zgo. in slov.;
- dovoljujem objavo diplomskega dela v elektronski obliki na spletni strani VŠVO;
- sta tiskana in elektronska verzija oddanega dela identični.

Datum: ____ . ____ . _____

Podpis avtorja/ice: _____

Država, ki ne more nadzorovati svojih energetskih virov, ne more nadzorovati svoje prihodnosti.« Barack Obama, nekdanji predsednik Združenih držav Amerike

»Ozaveščanje o najbolj nujnih okoljskih vprašanjih našega časa je bolj pomembno kot kdajkoli prej.« Leonardo DiCaprio, filmski zvezdnik in velik zagovornik za blaginjo našega planeta

ZAHVALA

Iskreno bi se zahvalila Seanu M. Scullyu, in sicer za sprejem somentorstva, njegov čas, ki mi ga je posvetil v času študija na Islandiji, ter za vso pomoč in svetovanje med praktičnim usposabljanjem. Želela bi se zahvaliti tudi islandskemu nadzorniku Johannu Orlygssonu, ki mi je omogočil, da sem bila del tega projekta/eksperimenta.

Prav tako se zahvaljujem svojemu mentorju pred. dr. Goranu Pipušu za sprejem mentorstva in pomoč pri izdelavi diplomskega dela.

Navsezadnje se zahvaljujem svoji družini in partnerju za spodbudo in potrpljenje v času pisanja dela.

IZVLEČEK

Izčrpanje zalog nafte in vse večje povpraševanje po »zeleni« in trajnostni energiji je v zadnjih desetih do dvajsetih letih povečalo zanimanje za biogoriva. Biogoriva so vsa goriva, ki nastajajo iz biološkega materiala in predstavljajo koncept, ki se je nedavno omejil na obnovljive vire ogljika. Bioetanol je trenutno proizveden iz rastlin, vendar bi se lahko prihodnja biomasa alg uporabila kot alternativni vir za proizvodnjo bioetanola.

Rjavi makroalgi *Ascophyllum nodosum* in *Laminaria digitata*, smo uporabili kot vir manitola, ki je poceni vir ogljika in imata skupaj s termofilnimi bakterijami znotraj razreda *Clostridia* velik potencial za proizvodnjo tretje generacije biogoriv. Namen praktičnega dela je bila preučitev termofilnih bakterij (znotraj razreda bakterij *Clostridia*) za fermentacijo manitola in algnih izvlečkov, ki naravno vsebujejo večje koncentracije manitola.

Za preizkus smo uporabili 41 sevov, ki spadajo v rodove *Caldanaerobacter*, *Caldicellulosiruptor*, *Thermoanaerobacter*, *Thermobrachium*, *Caldanaerobius* in *Thermoanaerobacterium*, ter prišli do ugotovitev, da je bilo 11 sevov (od izbranih 41) sposobnih fermentirati manitol v etanol. Izbrane bakterije roda *Thermoanaerobacter* so porabljale manitol pogosteje kot drugi rodovi in sev (iz tega rodu) *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* je dosegel največji donos končnega produkta (etanola) z 87,5-odstotnim teoretičnim donosom.

Pogoje za ekstrakcijo manitola iz rjavih makroalg *Ascophyllum nodosum* in *Laminaria digitata* smo izvedli z različnimi koncentracijami (0 M, 0,05 M in 0,1 M) klorovodikove kisline (HCl) pri različnih temperaturah (0 °C, 25 °C in 50 °C). Seve, ki so bili bolj uspešni pri tvorbi končnega produkta na manitolu, smo gojili na ekstraktih dveh vrst rjavih alg, *Ascophyllum nodosum* in *Laminaria digitata*, razredčenih na koncentracijo 20 mM manitola. Pet sevov od šestih (*T. siderophilus*, *T. pseudoethanolicus*, *T. brockii* subsp. *Finnii*, *T. brockii* subsp. *brockii* in *T. sulfurigignens*) je doseglo tvorbo končnega produkta iz ekstraktov rjavih alg.

V končni fazi smo analizirali bakterijo *T. pseudoethanolicus* z uporabo komercialnega manitola in izvlečkov manitola iz dveh vrst makro alg, *Ascophyllum nodosum* in *Laminaria digitata*, za tvorbo končnih produktov.

Rezultati poskusov kažejo, da so termofilni anaerobi znotraj razreda bakterij *Clostridia* obetavni kandidati za potencialno pridobivanje etanola kot biogoriva s fermentacijo manitola iz rjavih makroalg *Ascophyllum nodosum* in *Laminaria digitata*.

Ključne besede: biogoriva tretje generacije, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria digitata*, termofilni anaerobi *Clostridia*, morske alge, manitol, etanol, energija.

ABSTRACT

Due to the depletion of oil reserves and growing demand for "green" and sustainable energy, the interest in biofuel has increased in the last ten to twenty years. Biofuels are defined as fuels derived from biological material, a concept that has recently been limited to renewable carbon sources. Bioethanol is currently produced from plants, but marine biomass could be used as an alternative source for its production in the future.

Brown macroalgae, *Ascophyllum nodosum* and *Laminaria digitata*, which have been used in this experiment, naturally contain mannitol, a cheap source of carbon. Together with thermophilic bacteria from the class *Clostridia*, they have great potential for biomass production. The purpose of the practical work was to study thermophilic bacteria for the fermentation of mannitol and algal extracts, which naturally contain higher concentrations of mannitol.

We examined the following 6 main genera (41 strains): *Caldanaerobacter*, *Caldicellulosiruptor*, *Thermoanaerobacter*, *Thermobrachium*, *Caldanaerobius*, *Thermoanaerobacterium*; in the end, we discovered that 11 out of 41 strains have utilized mannitol and successfully fermented it to ethanol. The class *Thermoanaerobacter* has proven to have utilized mannitol more often than the other genera, and that the highest yield of the final product (ethanol), which is 87,5-percent of the theoretical yield, was produced by *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus*.

The conditions for the extraction of mannitol from the algae *A. nodosum* and *L. digitata* were examined by varying the Hydrochloric acid (HCl) concentration (0 M, 0,05 M and 0,1 M) at different temperatures (0 °C, 25 °C and 50 °C). The strains that were more successful in formation of the final product on mannitol, were grown on extracts of two brown algae species, *Ascophyllum nodosum* and *Laminaria digitata*, diluted to a concentration of 20 mM mannitol. The five mannitol-degrading strains of *Thermoanaerobacter* (*T. siderophilus*, *T. pseudoethanolicus*, *T. brockii* subsp. *Finnii*, *T. brockii* subsp. *brockii* and *T. sulfurigignens*) yielded good ethanol yields from the macro algal extracts.

In the final phase (kinetic experiment), *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* was analyzed using commercial mannitol and mannitol extracts from two species of macro algae, *Ascophyllum nodosum* and *Laminaria digitata*, to form the final products.

The results thus show that the thermophilic anaerobes from the class *Clostridia* are promising candidates for the fermentation of mannitol and for the potential production of ethanol as a biofuel.

Keywords: third-generation biofuels, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria digitata*, *Clostridia* thermophilic anaerobes, seaweed, mannitol, ethanol, energy.

KAZALO

1	UVOD	1
1.1	OPREDELITEV ZNANSTVENEGA PROBLEMA.....	1
1.1.1	Zakonodajni okvir okoljske politike.....	1
1.1.1.1	Evropska direktiva o spodbujanju uporabe obnovljivih virov energije (OVE)	2
1.2	NAMEN, CILJI IN HIPOTEZE DIPLOMSKEGA DELA.....	2
1.3	METODE DELA.....	2
2	TEORETIČNI DEL	4
2.1	BIOGORIVA.....	4
2.1.1	Opredelitev biogoriv.....	4
2.1.1.1	Biomasa.....	4
2.2	RAZVOJ BIOGORIV	4
2.2.1	Prva generacija biogoriv	4
2.2.2	Druga generacija biogoriv.....	5
2.2.3	Tretja generacija biogoriv	5
2.2.4	Četrta generacija biogoriv.....	6
2.3	BIOTANOL.....	7
2.4	ALGE	8
2.4.1	Razvrstitev alg.....	8
2.4.2	Rjave makroalge	9
2.4.2.1	<i>Laminaria digitata</i>	9
2.4.2.2	<i>Ascophyllum nodosum</i>	10
2.5	PRIDOBIVANJE BIOETANOLA IZ ALG	12
2.5.1	Sestava alg in njihova vloga pri proizvodnji biogoriv	12
2.5.1.1	Ogljikovi hidrati	12
2.5.1.1.1	<i>Sladkor glukoza in manitol</i>	13
2.5.1.2	Lipidi	14
2.5.2	Štiri glavne faze pridobivanja biomase (makro) alg.....	14
2.5.3	Predobdelava biomase morskih alg.....	14
2.5.4	Metode hidrolize	15
2.5.4.1	Kislinska hidroliza z razredčeno kislino	15
2.5.4.2	Kislinska hidroliza z alkalno snovjo	16
2.5.4.3	Encimska hidroliza	16
2.5.5	Proces fermentacije.....	17
2.5.5.1	Ločena hidroliza in fermentacija (SHF)	17
2.5.5.2	Istočasna saharifikacija in fermentacija (SSF).....	17
2.5.6	Glikoliza in metabolizem piruvata v etanol	17
2.6	ORGANIZMI PRIMERNI ZA PROCES FERMENTACIJE	18
2.7	ANAEROBNI TERMOFILNI MIKROORGANIZMI	19
2.7.1	Vpliv temperature na bakterije	19
2.7.1.1	Toplotno odporni encimi.....	20
2.8	FERMENTACIJA ETANOLA S TERMOFILNIMI BAKTERIJAMI.....	20
2.9	TERMOFILNA BAKTERIJA <i>CLOSTRIDIA</i>	21
2.9.1	<i>Clostridium</i>	21
2.9.2	<i>Caldanaerobacter</i>	21
2.9.3	<i>Caldicellulosiruptor</i>	21
2.9.4	<i>Thermoanaerobacter</i>	22
2.9.5	<i>Thermoanaerobacterium</i>	22
2.9.6	<i>Thermobrachium</i>	22
3	EKSPERIMENTALNI DEL.....	23

3.1	EKSTRAKCIJA.....	23
3.2	ORGANIZMI.....	23
3.2.1	Priprava raztopin in gojišč	25
3.3	EKSTRAKCIJA MANITOLA.....	27
3.3.1	Vzorčenje in priprava alg	27
3.3.2	Vpliv različnih pogojev ekstrakcije na pridobivanje manitola iz rjavih alg.....	27
3.3.2.1	Ekstrakcija manitola z uporabo večje količine biomase alg	28
3.3.3	Določanje hitrosti ekstrakcije	28
3.4	ANAEROBNA FERMENTACIJA MANITOLA.....	28
3.4.1	Fermentacija ekstraktov manitola iz makroalg	28
3.4.2	Določanje hitrosti fermentacije manitola in ekstraktov manitola iz makroalg s sevom <i>Thermoanaerobacter pseudoethanolicus</i>	28
4	REZULTATI.....	30
4.1	VPLIV EKSTRAKCIJSKIH POGOJEV NA DONOSE MANITOLA IZ RJAVIH MAKROALG.....	30
4.2	HITROST EKSTRAKCIJE MANITOLA	31
4.2.1	Ekstrakcija z uporabo večje količine biomase alg	33
4.3	FERMENTACIJA MANITOLA IN TVORBA ETANOLA Z RAZLIČNIMI SEVI RAZREDA <i>CLOSTRIDIA</i>	33
4.3.1	Fermentacija ekstraktov na makroalgah z izbranimi sevi	36
4.4	HITROST FERMENTACIJE ETANOLA S SEVOM <i>THERMOANAEROBACTER PSEUDOETHANOLICUS</i> (DSM 2355).....	38
5	DISKUSIJA.....	42
5.1	KEMIČNA SESTAVA IN EKSTRAKCIJA MANITOLA IZ MAKROALG.....	42
5.2	DOLOČANJE USTREZNOSTI BAKTERIJSKIH SEVOV ZA FERMENTACIJO MANITOLA.....	42
5.3	FERMENTACIJA MANITOLA V EKSTRAKTIH MAKROALG Z IZBRANIMI SEVI TERMOFILNIH ANAEROBNIH BAKTERIJ.....	43
6	ZAKLJUČEK	44
7	SUMMARY	45
8	LITERATURA IN VIRI.....	46

KAZALO SLIK

Slika 1: Molekulska struktura etanola (Vir: Etanol 2018).....	7
Slika 2: Nahajališča rjavih alg (Vir: Distribution of kelps ... 2018).....	10
Slika 3: Morfološka struktura <i>Laminarie digitata</i> (Vir: <i>Laminaria digitata</i> ... 2018)	10
Slika 4: Distribucija alge <i>Ascophyllum nodosum</i> (Vir: Natural world ... 2018).....	11
Slika 5: Prikaz rumenih mehurjev, zaradi katerih alga ostane plavajoča na vodi (Vir: Algues brunes 2018).....	11
Slika 6: Poenostavljena shema razcepa glukoze na številne končne produkte, pri katerem delujejo anaerobne bakterije (Vir: Scully in Orlygsson 2014b, str. 8).	18
Slika 7: Soxhletov ekstraktor (Vir: Soxhletov ekstraktor 2018).....	23
Slika 8: Zaporedna ekstrakcija (trdno-tekoča) manitola iz <i>Ascophyllum nodosum</i> pri različnih temperaturah in koncentracijah klorovodikove kisline (HCl).....	30
Slika 9: Zaporedna trdno-tekoča ekstrakcija manitola iz <i>Laminaria digitata</i> pri različnih temperaturah in koncentracijah klorovodikove kisline (HCl).....	31
Slika 10: Ekstrakcija manitola in fenolov iz <i>Ascophyllum nodosum</i> s koncentracijo 0,05 klorovodikove kisline (HCl) in pri temperaturi 25 °C.....	32
Slika 11: Ekstrakcija manitola in fenolov iz <i>Laminaria digitata</i> s koncentracijo 0 M klorovodikove kisline (HCl) in pri temperaturi 25 °C.....	32
Slika 12: Tvorba končnih produktov iz 20 mM manitola s sevi iz rodu <i>Thermoanaerobacter</i> po petdnevem fermentiranju serije	33
Slika 13: Tvorba končnih produktov iz 20 mM manitola s sevi iz rodu <i>Caldicellulosiruptor</i> po petdnevem fermentiranju serije	34
Slika 14: Tvorba končnih produktov iz 20 mM manitola seva <i>C. subterraneus subsp.</i> <i>pacificus</i> iz rodu <i>Caldanaerobacter</i> po petih dneh serijske fermentacije.....	35
Slika 15: Tvorba končnih produktov iz 20 mM manitola s sevi <i>Thermoanaerobacterium</i> , <i>Caldanaerobius</i> in <i>Thermobrachium</i> po petih dneh serijske fermentacije	36
Slika 16: Fermentacijski produkti izbranih sevov rodu <i>Thermoanaerobacter</i> po petih dneh na ekstraktih <i>Ascophyllum nodosum</i>	37
Slika 17: Fermentacijski produkti izbranih sevov rodu <i>Thermoanaerobacter</i> po petih dneh na ekstraktih <i>Laminaria digitata</i>	37
Slika 18: Pretvorba glukoze v etanol s sevom <i>Thermoanaerobacter pseudoethanolicus</i> (DSM 2355) (Vir: Chades in sod. 2018, str. 1931).....	38
Slika 19: Fermentacija manitola v etanol (20 mM) s sevom <i>Thermoanaerobacter</i> <i>pseudoethanolicus</i> (DSM 2355)	39
Slika 20: Fermentacija/razgradnja manitola v etanol na izvlečku rjave alge <i>Ascophyllum</i> <i>nodosum</i> s sevom <i>Thermoanaerobacter pseudoethanolicus</i> (DSM 2355).....	40
Slika 21: Razgradnja/fermentacija manitola v etanol na izvlečku rjave alge <i>Laminaria</i> <i>digitata</i> s sevom <i>Thermoanaerobacter pseudoethanolicus</i> (DSM 2355).....	40

1 UVOD

Naš planet trenutno zaseda 7,6 milijarde prebivalcev, do leta 2030 pa se bo to število povečalo na 8,6 milijarde in skoraj 10 milijard do leta 2050 (World population ... 2019). V zadnjem stoletju je pritisk na naravno okolje večji kot kdaj koli prej v zgodovini človeštva. Prenaseljenost našega planeta postaja vedno večji ekonomski, socialni in okoljevarstveni problem, kar lahko v bližnji prihodnosti vodi v večjo energetske krizo, nasilje in stisko med ljudmi, predvsem zaradi pomanjkanja dobrin. Degradacija okolja je najbolj neposredna in očitna skrb. Glavni razlog okoljskih degradacij (erozije, onesnaževanje vodnih virov, širjenja puščav, podnebnih sprememb itd.) stoji predvsem za visokim gospodarskim porastom (tehnološkim napredkom) in demografskim razmahom. Ko se bomo zares vsi zavedali težav, bomo začeli tudi sprejemati boljše odločitve predvsem v smeri potrošništva, namreč minimalistično življenje bi lahko zelo razbremenilo okolje. Kar se tiče prehoda na trajnostno energijo in trajnostno kmetijstvo, bo ta trajal veliko dlje, ker je to precej zapletena in dolgoročna strategija rasti. Zaskrbljenost glede razpoložljivosti naravnih virov (goriv), trgovinske bilance in podnebnih sprememb je privedla do uvedbe mednarodnih sporazumov in pogodbe za biogoriva v Združenih državah Amerike (ZDA), Braziliji, Evropski uniji (EU) in drugih državah ter postala pomembna tema mnogih okoljskih in ekonomskih vprašanj.

1.1 OPREDELITEV ZNANSTVENEGA PROBLEMA

Človeštvo se bo v bližnji prihodnosti počasi, a zagotovo, začelo spopadati z vedno večjim pomanjkanjem fosilnih goriv. Zaradi tega se raziskovalci, oblikovalci politik in celotno prebivalstvo vse bolj usmerjajo k alternativnim in zlasti obnovljivim virom energije, da bi se lahko v prihodnje izognili različnim katastrofam, tako naravnim kot družbenim. Seveda bi le-ta energija morala biti cenovno dostopna za vstop na trg po konkurenčnih cenah.

Zagotavljanje zadostnih zalog energije v prihodnosti ni samo vprašanje zmanjševanja odvisnosti od uvoza energetskih surovin, temveč odpira nova vprašanja, ki narekujejo široko paleto političnih pobud z hkratnim spreminjanjem virov in tehnologij. Za enkrat sta se v svetu uveljavili le prva in druga generacija biogoriv, ki temeljita predvsem na rabi obdelovalnih površin oziroma poljščin, ki vsebujejo dovolj sladkorja, škroba in rastlinskih maščob. Zaradi tega prihaja na dan vedno več vprašanj v povezavi z njihovo trajnostjo in ali so le-ta ekološko sprejemljiva.

Veliko manj poudarka je bilo na proizvodnji tretje generacije biogoriv oziroma izkoriščanju morske biomase, natančneje biomase alg. Njihova prednost je ta, da ne vplivajo na cene hrane, vendar rastejo zelo hitro, kar pomeni posledično hitro pridelavo. Alge se lahko vzgajajo v odprtih bazenih ali zaprtih bioreaktorjih, v katerih je mogoče pridelati veliko večjo količino olja kot na enaki površini iz rastlin, ki se uporabljajo za pridelavo biogoriv prve generacije. Ta se še v svetu ni uveljavila predvsem zaradi očitnega pomanjkanja metodologije te vrste biomase, visokih stroškov predelave in različne kemijske sestave alg (Chades in sod. 2018).

Zaradi naraščajočega povpraševanja po trajnostni energiji sedanje industrializirane družbe so vlade začele pospeševati komercialno proizvodnjo biogoriv, da bi lahko dosegle nove cilje, ki jih je določila Evropska komisija.

1.1.1 Zakonodajni okvir okoljske politike

V zadnjih desetletjih se je razumevanje trajnostnega razvoja in zavedanje okoljskih problemov znatno povečalo, kar je sčasoma vodilo v razvoj okoljske politike. Rezultat tega je prosperiteta okoljskih programov, ki bi v večji meri pozitivno vplivala na podnebne spremembe, izboljšala varnost pri oskrbi z energijo (rabi naravnih virov) in zmanjšanju izpustov toplogrednih plinov ter spodbujala konkurenčnost.

1.1.1.1 Evropska direktiva o spodbujanju uporabe obnovljivih virov energije (OVE)

Na osnovi Direktive 2009/28/ES (2009) z dne 23. aprila 2009 o spodbujanju uporabe energije iz obnovljivih virov, spremembi in poznejši razveljavitvi direktiv 2001/77/ES in 2003/30/ES in Odločbe Komisije Evropske skupnosti št. C(2009) 5174 je morala vsaka država članica sprejeti Nacionalni akcijski načrt za obnovljive vire energije (AN-OVE) za obdobje 2010-2020 in ga posredovati Evropski komisiji do 30. junija 2010 (Akcijski načrt ... 2018).

Slednja Direktiva (EU) 2018/2001 Evropskega parlamenta in Sveta (2018) je bila sprejeta leta 2014, in sicer na osnovi zavez sprejetih v okviru Pariškega sporazuma o podnebnih spremembah na podlagi 21. konference pogodbenic Okvirne konvencije Združenih narodov o spremembi podnebja. Evropska unija (EU) si postavlja vedno bolj ambiciozne cilje, zlasti na področju rabe energije (zmanjšanje le-te), večjega napredka na tehnološkem področju (energetsko učinkovitejša tehnologija), spodbujanja uporabe javnega prometa in seveda zmanjšanja emisij toplogrednih plinov v EU in njene energetske odvisnosti. Natančneje, vse članice EU so zavezane k cilju, da bo delež energije iz obnovljivih virov na nivoju EU predstavljal najmanj 32 % med letoma 2020 in 2030. Vsaka država članica mora podati letno poročilo Evropski komisiji, in sicer o ukrepih, ki so bili sprejeti, in napredku v smeri izvajanja zadanih ciljev. Na podlagi teh podatkov komisija pripravi poročil o napredku.

Ključnega pomena je medsebojno sodelovanje vlad na globalni ravni in to na takšen način, da posvetimo več pozornosti izobraževanju in ozaveščanju ljudi saj bi to pripomoglo k oblikovanju in ohranjanju prihodnjega oblikovanja politik v smislu spodbude in podpore političnih odločitev, ki ščitijo okolje.

1.2 NAMEN, CILJI IN HIPOTEZE DIPLOMSKEGA DELA

Namen dela je raziskati različne poti in možnosti uporabe manitola, ekstrahiranega iz rjavih alg *Laminaria digitata* in *Ascophyllum nodosum* ter njegovo uporabo kot možnega substrata za proizvodnjo etanola s termofilnimi vrstami bakterij znotraj razreda *Clostridia*. V ta namen so bili preučeni vplivi različnih temperatur (0 °C, 25 °C in 50 °C) in različne koncentracije klorovodikove kisline (HCl) (0 M, 0,05 M in 0,1 M) na ekstrakcijo manitola, temu sta sledila še dva kinetična poskusa fermentacije manitola ekstrahiranega iz rjavih alg.

Hipoteza 1: Ekstrakcija manitola (izvedena pod istimi pogoji v obeh primerih alg) bo učinkovitejša pri vrsti rjave alge *Lamniaria digitata* kot pa pri vrsti *Ascophyllum nodosum*.

Hipoteza 2: Rod *Caldanaerobacter* je boljši katalizator pretvorbe manitola v etanol v primerjavi z drugimi petimi rodovi (*Caldicellulosiruptor*, *Thermoanaerobacter*, *Thermobrachium*, *Caldanaerobius* in *Thermoanaerobacterium*).

Hipoteza 3: Bakterija *C. subterraneus subsp. pacificus* (DSM 12653) ima boljši izkoristek v primerjavi z ostalimi uporabljenimi bakterijami (*C. subterraneus subsp. Subterraneus*, *C. Uzonensis*, *C. Tengcongensis*, *C. subter. subsp. Yonseiensis*) iz rodu *Caldanaerobacter*.

1.3 METODE DELA

Prvi del diplomskega dela je teoretičen in precej obširen; tukaj bom uporabila predvsem opisno/deskriptivno metodo dela, kjer bom s pomočjo zbrane literature ali gradiva opisovala dejstva in jih kategorizirala, kar je temelj za nadaljnje razumevanje diplomskega dela. Navedla bom nekaj znanih dejstev o štirih generacijah biomase in njihove glavne značilnosti. Večji poudarek bo predvsem na tretji generaciji biogoriv, spoznavanju biomase alg za proizvodnjo biogoriv in natančnejši pregled (dveh vrst) rjavih alg *Ascophyllum nodosum* in *Laminaria digitata*, ki sta bili uporabljeni v poskusu. Sledil bo še pregled termofilnih bakterij, ki imajo

pomembno funkcijo pri praktičnem delu eksperimenta, prav tako sledi poglobitev v različne procese za pridobivanje energije iz biomase (makro) alg.

V praktičnem delu diplomskega dela bom uporabila eksperimentalno-kavzalno metodo, kjer bomo z različnimi testiranjmi, preizkusi in opazovanji pridobili podatke, s katerimi bom ovrgla hipotezo ali potrdila svoja predvidevanja o končnem rezultatu, ki so teoretična in praktična osnova samega diplomskega dela.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 BIOGORIVA

2.1.1 Opredelitev biogoriv

Biogorivo je v ustrezni zakonodaji definirano kot tekoče ali plinasto gorivo, namenjeno uporabi v transportnem sektorju za pogonska goriva (Uredba o trajnostnih ... 2017).

Biogoriva so po naravi biološko razgradljiva, trajnostna, privlačna in ekološka vrsta goriva z majhnim vplivom na okolje. Z drugimi besedami so neizčrpna. Kljub temu da jih uvrščamo pod obnovljive vire energije, pa zgorevanje biogoriv, kot je etanol, oddaja CO₂ v ozračje, vendar ne doprinese nobenih sprememb k celotnemu ogljikovemu dioksidu. Celoten energijski krog je nevtralen glede na sproščen oziroma vezan ogljik (Ethanol and the ... 2019).

Pridobljen je iz sorazmerno nedavno odmrle biološke snovi, za razliko od fosilnih goriv, ki se pridobivajo iz davno odmrle biološke snovi. Biogoriva se najpogosteje pridobiva iz različnih rastlin in snovi rastlinskega izvora, ki jim pravimo biomasa.

2.1.1.1 Biomasa

Z besedo »biomasa« označujemo snovi, ki so predvsem organskega (rastlinskega) izvora. Se pravi, predstavlja rastlinske, človeške in živalske organske odpadke. Biomasa nastaja z naravnim procesom, imenovanim fotosinteza, ki nastaja v notranjosti kloroplasta, na membranah, imenovanih tilakoid. Slednje vsebujejo proteinske komplekse in koencim ATP (adenozin trifosfat) – sintazo, ki med drugim skrbi za transport elektronov in protonov iz lumna (notranjosti) tilakoide v stromo kloroplastov, pri čemer se tvorita molekuli ATP in NADH (nikotinamid adenin dinukleotid). Ti molekuli služita za reakcijo, imenovano Kalvinov cikel, kjer oddajata svojo energijo za sintezo sladkorjev in se potem v obliki NADH in ADP (adenozin difosfat) vračata nazaj v tilakoid po nove zaloge energije (Selvaraj in Fofana 2012).

Biomasa spada med obnovljiv vir energije in se nahaja v treh oblikah, in sicer v trdnem stanju (les, krma), tekočem (biogoriva) in kot plin (bioplin). Med tekoča goriva spadajo biodizel, rastlinsko olje, metanol in etanol.

Lesno biomaso v trdnem stanju sestavljajo naslednje tri glavne komponente:

- celuloza (C₆H₁₀O₅)_n,
- hemiceluloza in
- veziva, imenovana lignin.

Glede na način proizvodnje in vrsto primarne biomase jih lahko razdelimo na biogoriva prve, druge in tretje generacije.

2.2 RAZVOJ BIOGORIV

2.2.1 Prva generacija biogoriv

Temelji na bioprocesih razgradnje lahko fermentibilnih/razgradljivih ogljikovih hidratov (sladkorjev), ki jih vsebujejo rastline s škrobom iz koruze in saharozo iz sladkornega trsa ter sladkorne pese, vključno z živalsko mastjo. Ta goriva (prve generacije biomase) so neposredno povezana z biomaso, ki se uporabljajo za prehrano. Ravno tukaj je ena glavnih pomanjkljivosti ta, da je rast posevkov, namenjenih izključno za pridobivanje goriva, dvignila sporno razpravo o »živilih proti gorivu«, saj neposredno konkurira proizvodnji hrane, kar posledično vodi k zvišanju cen hrane. Poleg bioetanol, ki je predelan s fermentacijo sladkorjev, je drugo pomembno biogorivo iz prve generacije biodizel, pridelan s predelavo

rastlinskih olj. Ta vrsta biogoriv so edina, ki se proizvajajo v večjem obsegu in se uporabljajo v komercialne namene.

2.2.2 Druga generacija biogoriv

Goriva druge generacije biomase so opredeljena kot gorivo, proizvedeno iz širokega nabora različnih surovin lignocelulozne biomase, ki izvira iz štirih možnih različnih virov: energetskih rastlin (kmetijskih rastlin), kmetijskih ostankov (npr. staleža koroze, pšenice, slame, riža), gozdnih ostankov (npr. listje, veje) in odpadkov (komunalni trdi odpadki, živilski odpadki) (Scully in Orlygsson 2014b). Uporaba lignocelulozne biomase kot substrata, ki je pogosto kmetijski stranski proizvod, je tudi pomembna razlika biogoriv prve in druge generacije, saj se le-ta ne pridobivajo iz poljščin, namenjenih za prehrano. Zaradi tega je druga generacija biogoriv ekološko, ekonomsko in družbeno bolj sprejemljiva oziroma bolj trajnostna kot biogoriva prve generacije. Kljub temu se mora soočiti z drugo problematiko s tehničnega ali finančnega vidika, saj so zbiranje, prevoz in predelava druge generacije biomase precej dragi.

2.2.2.1 Tehnološki postopek proizvodnje bioetanola iz lignocelulozne biomase

Bioetanol lahko proizvajamo s fermentacijo (alkoholnim vrenjem) sladkorjev (glukoze). Običajno se ga pridobiva s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. Obstaja več različnih načinov oziroma postopkov izločanja sladkorjev (odvisno od vrste rastline). Običajno pa gre za proces, ki temelji na mehanski, kemični in toplotni obdelavi. S tem izločimo sladkor in ga pretvorimo v enostavne sladkorje (glukoza, ksiloza, ...), medtem ko mora celuloza najprej hidrolizirati v sladkor pred pretvorbo v bioetanol.

Za ekstrakcijo sladkorja iz biomase poznamo tri glavne procese (Pridobivanje bioetanola ... 2019):

- kislinsko hidrolizo s koncentrirano kislino,
- kislinsko hidrolizo z razredčeno kislino in
- encimsko hidrolizo.

Potem sledi proces fermentacije. Fermentacija ali alkoholno vrenje je anaerobni proces, s katerim se enostavni sladkorji pretvorijo v etanol z uporabo mikroorganizmov, ki uporabljajo fermentirane sladkorje za pridelavo in proizvodnjo etanola in drugih stranskih produktov (Cruz in sod. 2014).

Reakcija: $C_5H_{12}O_6$ (glukoza) \rightarrow $2C_2H_5OH$ (etanol) + $2CO_2$ (ogljikov dioksid) + toplota
 180,159 g/mol \rightarrow 92,139 g/mol + 88,02 g/mol
 100 g sladkorja \rightarrow 51,14 g etanola + 48,86 g ogljikovega dioksida

Teoretični izkoristek donosa etanola: 51,14 %

Medtem ko je proizvodnja bioetanola z uporabo lignocelulozne biomase napredovala in se razvijala v smislu predelave biomase in razvoja mikroorganizmov, ki so primerni za to nalogo, je bilo opravljeno bistveno manj dela na področju biomase iz morja, kot so makroalge. Ravno zato se dogajajo pozitivni premiki v smislu razvoja tretje generacije biogoriv, za katere bodo po mnenju znanstvenikov poskrbele alge.

2.2.3 Tretja generacija biogoriv

Tretja generacija biogoriv temelji na gojenju alg, mikroalg ali enoceličnih mikroorganizmov, evkariontskih in prokariontskih (cianobakterij) (Bullis 2007). Alge so eden izmed najbolj primernih virov za proizvodnjo biodizla (mikroalge) (Khan in sod. 2017), vendar pa so lahko uporaben vir tudi za proizvodnjo tekočih goriv, kot je etanol (makroalge). Za etanol je potem

potrebna še nadaljnja razgradnja lipidov in drugih organskih spojin, predvsem zaradi velike vsebnosti ogljikovih hidratov (laminaran, manitol ...) (Chojnacka in Kim 2015).

Morske alge (predvsem rdeče in rjave makroalge lahko služijo kot potencialni neizkoriščen vir za pridobivanje bioetanola izdelajo ogromno količino biomase z majhnim vložkom sredstev in nizkimi operativnimi stroški. Makroalge nabiramo (žanjemo) periodično večkrat letno v njihovem naravnem okolju ali v morskih gojiščih. Alge lahko gojimo na površinah, ki so nerodovitna in težje dostopna. Izredno hitro rastejo (Bullis 2007). Olja, ki so naravni proizvod alg lahko s predelavo pretvorimo v naftnim primerljive energente: bencin, dizelsko gorivo, letalska goriva in surovine za proizvodnjo plastičnih materialov in zdravil (prav tam) (Andrich in sod. 2005). Čeprav so danes komercialna biogoriva tretje generacije pridobljena iz mikroalgne biomase je biomase iz makroalg na svetovnem nivoju občutno večja od proizvodnje mikroalg (Ji in sod. 2016).

Biotehnologija makroalg se nanaša na proizvodnjo različnih biotehnoloških izdelkov: fikocianin, karotenoidi (β -karoten, astaksantin), maščobne kisline in lipidi, polisaharidi, imunski modulatorji, ki najdejo aplikacijo v zdravstvu, hrani, kozmetiki, krmi in prehranskih dopolnilih, farmacevtskih izdelkih in nenazadnje proizvodnji goriv (Chojnacka in Kim 2015).

Z nadaljnjim razvojem tretje generacije biogoriv se lahko izognemo:

- krčenju gozdov, kar bi posledično pomenilo odstranitev biomase (torej hranilnih snovi) in spremembo biogeokemičnih ciklov;
- degradaciji in izgubi tal oziroma rodovitnosti tal (za katerega vemo, da je neobnovljiv vir);
- spreminjanju vodne hidrološke bilance;
- izgubi biotske raznovrstnosti (saj bi dodatno krčenje in posek gozdov povzročil pomor živalskih in rastlinskih vrst oziroma njihovo izumrtje);
- za rast ne potrebujejo nobenih gnojil, herbicidov, pesticidov, ki prispevajo k onesnaženju tal in preoblikovanju biogeokemičnih ciklov elementov;
- ne potrebujejo sveže vode;
- vsebujejo fosfate in dušik, ki so osnovna hranila ter se lahko uporabljajo kot gnojila.

To so le nekatere izmed pozitivnih lastnosti biogoriv tretje generacije. Biomasa alg ima potencial za proizvodnjo različnih biogoriv. Kljub temu pa še obstajajo pomembne tehnološke ovire, povezane predvsem z visokimi stroški predelave alg (in učinkovitosti le-te), zaradi česar je odprtih še veliko vprašanj. Zaradi tega množične proizvodnje v prihodnosti ne moremo pričakovati.

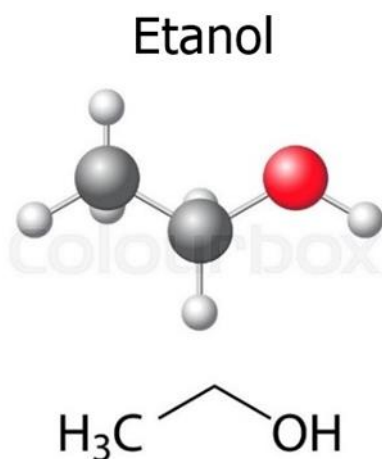
2.2.4 Četrta generacija biogoriv

V četrto generacijo biogoriv prištevajo tehnološko zahtevne načine pretvorb organskih molekul, ki jih proizvajajo organizmi, in goriva iz genetsko spremenjenih organizmov, ki ne sodijo v nobeno od ostalih kategorij biogoriv. Eden od primerov razvoja biogoriva četrte generacije temelji na izrabi genetsko spremenjenih bakterij *Escherichia coli*, ki so v osnovi del normalne flore človeških prebavil, po drugi strani pa tudi najbolj razširjen laboratorijski mikroorganizem. Večina skupin je bolj naklonjenih cianobakterijam (modrozelenim algam) ali zelenim algam, vendar pa je *E. coli* precej lažje genetsko spremeniti. Raziskovalci iz kalifornijskega podjetja LS9 so najprej pri cianobakterijah identificirali gene, ki zapisujejo za encime, odgovorne za sintezo alkanov. Biosinteza teh ogljikovodikov je pri živih bitjih redka zmožnost, tako da so do seznama potrebnih encimov (genov) prišli s primerjavo genomov cianobakterij, ki jih proizvajajo, in tistih, ki jih ne. Te gene so prenesli v bakterije *E. coli* na tak način, da je prišlo do sinteze encimov, ti pa so omogočili proizvodnjo različnih ogljikovodikov. Alkani so se izločali iz celic v gojišče, od koder jih je bilo lahko izolirati. Prednost alkanov pred večino drugih

biogoriv je v tem, da jih je mogoče neposredno uporabiti za pogon avtomobilskih motorjev (Dolinar 2010).

2.3 BIOTANOL

Etanol s kemijsko formulo C_2H_5OH je etilni alkohol in je bistra, brezbarvna, vnetljiva tekočina z vreliščem pri $78,3\text{ }^\circ\text{C}$ in z značilnim vonjem. Pridobimo ga lahko s sintezo iz surove nafte, premoga ali zemeljskega plina. Etanol je hlapljiva tekočina (zlahka izhlapi), dobro se meša z vodo in večino organskih snovi. Pridobimo ga lahko s fermentacijo sladkorjev, ki je kataboličen proces, ki poteka tako v prokariotskih kot evkariotskih mikroorganizmih, kot so bakterije in kvasovke. Etanol se uporablja kot topilo, aditiv za gorivo kot surovina za proizvodnjo drugih kemikalij in je prisoten v številnih alkoholnih pijačah (Behrens in Kyle 1996). Etanol se zaradi majhne toksičnosti in sposobnosti raztapljanja napolarnih snovi uporablja tudi kot topilo za pripravo medicinskih preparatov ter tudi parfumov in rastlinskih preparatov itd. Poleg tega se uporablja kot razkužilo (70-odstotni etanol), saj lahko ubije mikroorganizme, kot so bakterije, gobe in virusi, in sicer z denaturiranjem njihovih beljakovin in lipidov (Brust 2010).



Slika 1: Molekulska struktura etanola (Vir: Etanol 2018)

Prednosti bioetanola

Glavne prednosti uporabe bioetanola so (Scully in Orlygsson 2014b):

- podaljšanje trajanja dobave fosilnih goriv z mešanjem bioetanola z bencinom;
- zmanjšanje odvisnosti od naftnih držav;
- zmanjšanje pojava onesnaženja z zmanjšanjem emisij toplogrednih plinov (TGP);
- ustvarjanje manj škodljivih končnih produktov, kot so: prašni delci, dušikovi oksidi in druga onesnaževala, ki posledično pripomorejo k tanjšanju ozonske plasti;
- bioetanol je popolnoma biorazgradljiv;
- bioetanol je brez težav vključen v že obstoječi sistem proizvodnje pogonskih goriv;
- dodajanje do 10 % bioetanola v konvencionalno gorivo ne zahteva prilagoditev motorjev;
- bioetanol se lahko proizvaja z uporabo mikroorganizmov v procesu fermentacije.

Zgorevanje biogoriv, kot je etanol, sprošča ogljikov dioksid (CO_2) v ozračje po naslednji reakciji:

Reakcija: $C_2H_5OH(l)$ etanol + $3O_2(g)$ kisik \rightarrow $2CO_2(g)$ ogljikov dioksid + $3H_2O(l)$ voda

V zadnjih desetletjih se je povpraševanje po etanolu kot obnovljivem gorivu za promet močno povečalo. Etanol naj bi delno zamenjal bencin v prometu.

Obstajajo tri splošne kategorije mešanic etanola in bencina, ki so danes na trgu najbolj poznane in uporabljene:

- **E5** (5 % bioetanola in 95 % bencina),
- **E10** (10 % bioetanola in 90 % bencina): V sodobnih bencinskih motorjih (brez dodatnih prilagoditev motorja) (Etanol 2019) lahko uporabljamo mešanico do E10, to je do 10 % bioetanola, primešanega bencinu, v prilagojenih motorjih pa tudi čisti etanol. Zmes etanola in bencina ima višjo oktansko številko, medtem ko ima sam etanol nižjo vrednost. Etanol je sicer bolj primeren tudi kot gorivo za gorivne celice, za neposredno pretvorbo kemijske energije v električno energijo (Etanol 2019).
- **E85** (85 % bioetanola in 15 % bencina): Bioetanol se lahko uporablja tudi kot 85-odstotna mešanica z bencinom, vendar z uporabo stabilizacijskega dodatka in le v avtomobilih, ki so prilagojeni na več vrst goriv. Kar je posledično povezano z dodatnimi stroški. Tako gorivo se lahko uporablja tudi kot gorivo za avtobuse (z izboljšanim sredstvom za vžig motorja). Pa vendar je najpogostejša uporaba etanola v Evropi trenutno prek konverzije v derivate, kot je etilni terciarni butilni eter (ETBE) (Krajnc 2007).

Etanol ima ključno vlogo pri spodbujanju trajnosti v prometnem sektorju na svetovni ravni. Njegova promocija in razvoj pomenita doseganje globalnih okoljskih in socialno-ekonomskih razvojnih ciljev. ZDA in Brazilija prispevata daleč največ k sami proizvodnji etanola. V Braziliji uporabljajo prilagojene motorje, ki lahko uporabljajo hidrirani etanol, torej zmes, ki je sestavljena iz 93 % etanola in 7 % vode (Etanol 2019). Evropa je največja proizvajalka biodizla, pri čemer je Nemčija ena od držav, v kateri predstavlja poraba biodizla okoli 3 % porabe skupnega goriva (Kumar in Vikash 2013).

Sama proizvodnja etanola je precej na široko razpredena; to pomeni, da je tukaj več medsektorskih povezav, ki segajo tako v kmetijski kot v energetske sektor. Dolgoročna pot za proizvodnjo etanola ostaja nejasna, saj je njegova prihodnost kot alternativni vir goriva povezana z negotovostmi, povezanimi s fizičnimi omejitvami, svetovnimi gospodarskimi razmerami in družbenimi prednostnimi nalogami v državah. Medtem ko potencialna raba morskih alg postaja vse bolj raznolika, prihaja na dan vse več vprašanj v povezavi z varovanjem okolja. V primeru, da bo povpraševanja po morskih algah vedno več (zlasti redkih in endemičnih vrst), se zna zgoditi, da bo želja prevladovala in bomo te ekosisteme preobremenili do točke, na kateri ne bo vrnitve in bodo območja trajno prizadeta; in ker je v naravi vse med seboj povezano, bo to tudi vplivalo na druge ekosisteme. Vsekakor je jasno, da bi gojenje morskih alg moralo potekati odgovorno na strani distributerja z doseganjem »zlate sredine«, pri čemer bodo zadovoljili povpraševanju, a brez dodatnih pritiskov na okolje.

2.4 ALGE

Alge so raznovrstna skupina fotosintetskih organizmov in obstajajo v različnih oblikah in velikostih. Naseljujejo širok spekter ekstremnih habitatov, ki zajemajo tako vodne (morske in sladkovodne) kot kopenske ekosisteme. V to skupino fotosintetskih organizmov uvrščamo enocelične (mikroalge, fotosintetske bakterije in fitoplankton) in večcelične alge (makroalge in filamentozne alge) (Chojnacka in Kim 2015).

2.4.1 Razvrstitev alg

Alge so glede na njihovo morfologijo in velikost razvrščene v mikroalge in makroalge.

Mikroalge zajemajo diatomeje (*Bacillariophyceae*), *dinoflagelate* (*Pyrrhophyta*), zelene, rumeno-zelene flagelate (*Prasino-phyta*; *Prymnesiophyta*; *Cryptophyta*, *Chrysophyta* in

Rhaphidophyta) in modrozelenih cepeljivke ali cianobakterije (*Cyanophyta*). Razlika med algami in cianobakterijami je ta, da so alge fotosintetski evkarionti, medtem ko so cianobakterije fotosintetski prokarionti (Hurd in sod. 2014).

Makroalge so razdeljene na tri osnovne razrede: zelene (*Chlorophyta*), rjave in rdeče alge. Alge so v nekaterih življenjskih obdobjih enocelične, kot spore, gameti ali zigoti, lahko pa so začasno planktonične (Chojnacka in Kim 2015).

Osnova za razvrstitev alg je tudi njihova lastna pigmentacija (Chojnacka in Kim 2015). S pomočjo pigmentov, kot je klorofil, prejemajo energijo sončne svetlobe in vodo ter pretvarjajo ogljikov dioksid (CO_2) v različne kemijske spojine (metabolite) in uporabno biomaso. Svetloba, ki jo klorofil absorbira, vodi do nastanka oksidantov in reducentov, zaradi česar nastane molekula adenozin trifosfat (ATP). Ta molekula pretvori ogljikov dioksid v ogljikove hidrate. Glavna ogljikova hidrata sta glukoza in sukroza (Xu in sod. 2014).

2.4.2 Rjave makroalge

Rjave makroalge so kot obnovljiva biomasa primerne za proizvodnjo bioetanola zaradi hitre rasti in visoke vsebnosti sladkorjev (ogljikovih hidratov). Celotna vsebnost ogljikovih hidratov v rjavih morskih algah je med 40 % pri vrstah, kot so *S. felvellum*, in 64 % za *L. digitata*. Sestavljajo jih polisaharidi, kot so laminarin, manitol, celuloza, alginat in fukoidan. Laminarin vsebuje verigo β -1,3 glukanov, ki tvorijo največji skladiščni polisaharid v rjavih morskih algah. Koncentraciji laminarina in manitola se skozi leto spreminjata, kar je odvisno od vremenskih sprememb v različnih letnih časih; koncentraciji sta najnižji pozimi in najvišji poleti. Razlog za to je v obilni količini sončnih žarkov, ki so na voljo za tvorbo celičnega skladiščnega tkiva poleti in porabo teh tkiv pozimi. Alginat, znan tudi kot alginska kislina, najdemo v celičnih stenah rjavih morskih alg, tvorijo pa ga ponavljajoče se verige guluronskih in manuronskih kislin. Alginati tvorijo do 50 % deleža ogljikovih hidratov v rjavih morskih algah (Ji in sod. 2016).

V eksperimentu smo uporabili dve komercialno nabrani vrsti rjavih makroalg, natančneje *L. digitata* in *A. nodosum*, zaradi njihovih naravno visokih koncentracij manitola. V nadaljevanju sledi nekaj njihovih glavnih značilnosti.

2.4.2.1 *Laminaria digitata*

Laminaria digitata je trdna, usnjasta, nepremična, temno rjava morska alga, ki spada v red *Laminariales* in se geografsko pojavlja v severovzhodnem Atlantskem morju od Grenlandije proti jugu do Cape Coda (ZDA) in v severovzhodnem Atlantiku, od severne Rusije in Islandije na jug v Francijo. Najdemo jo na obali Britanskih otokov, opazili so jo tudi na Aljaski (Drew 1910). *Laminaria digitata* večinoma raste v plitkih vodah na kamnitih podlagah in je najboljše vidna spomladi (Edwards in Watson 2011).



Slika 2: Nahajališča rjavih alg (Vir: Distribution of kelps ... 2018)

Fizikalne lastnosti

Sporofitno steblo je izredno zapleteno, saj je značilna prisotnost treh različnih strukturnih delov (slika 3) (Drew 1910):

- **holdfast ali apterus:** kar pomeni v dobesednem prevodu čvrsti oprijem. S tem delom se alge na spodnjem robu zasidrajo na skalnato podlago, zahvaljujoč prisotnosti konoidnih štrlečic, imenovanih rizoidi;
- **vijak ali pecelj (stipe):** je gladek, v preseku gibljiv in ovalen ter je lahko v premer večji od 2,5 cm, v dolžino pa meri 12 cm;
- **lamina ali rezilo:** je velika in ima obliko dlani, s številnimi bolj ali manj običajnimi prstnimi segmenti. Pogosto se razvije v specializirane organe, kot so flotacijski mehur in reprodukcijski organi. Površina je gladka in enakomerna.



Slika 3: Morfološka struktura *Laminarie digitata* (Vir: *Laminaria digitata* ... 2018)

Mladi sporofiti se pojavljajo vse leto z viškom spomladi in jeseni ter so sposobni rasti skozi vse leto, s stopnjo, ki je sezonsko nadzorovana in ki kaže obdobje hitre rasti od februarja do julija ter počasnejše rasti od avgusta do januarja. *Laminaria digitata* je trajnica, zato živi od štiri do šest let in lahko doseže dolžino 2 metra (Edward in Watson 2011).

2.4.2.2 *Ascophyllum nodosum*

Ascophyllum nodosum je ena od vrst rjavih morskih alg, imenovanih tudi norveški kelp. Rjava morska alga *Ascophyllum nodosum* spada v veliko skupino *Phaeophyceae*, v družini *Fucaceae* in je edina vrsta rodu *Ascophyllum*. Kar zadeva njeno porazdelitev, se pojavlja vzdolž švedske zahodne obale (Aberg 1992). Najdemo jo tudi na območjih severnoatlantskega zmernege pasu zaščitene skalne obale (Gollety in sod. 2011).



Slika 4: Distribucija alge *Ascophyllum nodosum* (Vir: Natural world ... 2018)

Rast in življenjski cikel

Vrsta ima zelo dolgo življenjsko dobo, od 10 do 15 let (prav tam). Karoteni jim dajejo značilno rjavo barvo. Celična stena je celulozno-hitinska (A review ... 2009). Stopnja rasti je zelo počasna, vendar se s starostjo rastline veča. Rastlina zraste največ ob jutrih, sledi ji stalni upad čez ves dan. V prvem letu rasti bo rastlina zrastle cca. 0,2 cm na leto, v drugem letu pa se bo rast dvignila na 1,5 cm na leto. Prvi zračni mehur se oblikuje komaj v petem letu, po katerem vsako leto proizvedejo le enega. Apteris ali koreninski del (Holdfa), ki veže celotno rastlino na podlago, je močan in vztrajen, saj se obdrži tudi do nekaj desetletij, iz njih pa se čez čas razvijejo in regenerirajo novi frondi. Najnižja stopnja rasti je v novembru in decembru, medtem ko je najvišja pozno pomladi in zgodaj poleti (BIOTIC species ... 2018). Da lahko alga podpira svoje steblo (stipe), ki nenehno raste, so se razvili mehurji, imenovani pnevmatociste, ki držijo celotno algo dvignjeno in plavajočo (*Ascophyllum nodosum* ... 2018).



Slika 5: Prikaz rumenih mehurjev, zaradi katerih alga ostane plavajoča na vodi (Vir: Algues brunes 2018)

Vsestranska uporaba

Ascophyllum nodosum se lahko uporablja na področju toksikologije, za spremljanje koncentracije težkih kovin v morski vodi, pridelavo alginske kisline kot vir hrane za prehrano ljudi in živali ali kot gnojilo zaradi kombinacije obeh makrohranil (N, P, K) in mikrohranil (Ca, Mg, S, Mn, Cu, Fe, Zn itd.) (Sabir in sod. 2014), tudi za ekstrakcijo manitola in številnih drugih spojin. *Ascophyllum nodosum* se uporablja za ekstrakcijo alginske kisline, polisaharida, ki se uporablja v hrani za ljudi in živali (Evans in Critchley 2014).

2.5 PRIDOBIVANJE BIOETANOLA IZ ALG

Dolgoročni komercialni vidik pridobivanja bioetanola iz morskih alg je odvisen od izbire metod, predvsem pri hidrolizi in fermentaciji zaradi njunega bistvenega splošnega učinka na donos etanola. Učinkovitost tvorbe etanola je najprej odvisna od količine fermentiranega sladkorja, ki se sprosti med hidrolizo. V fazi fermentacije se tvori etanol na podlagi razpoložljivih reducirajočih sladkorjev in učinkovitosti fermentirajočega organizma. Izbira metod v teh dveh kritičnih fazah tvorbe bioetanola iz morskih alg mora biti učinkovita, stroškovno učinkovita in trajnostna, predvsem ko gre za proizvodnjo v komercialnem obsegu. Optimizacija izbranih faz hidrolize in fermentacije predstavlja velik izziv pri tvorbi etanola na svetovni ravni. Pridobivanje bioetanola iz alg vključuje naslednje faze: predobdelava biomase, hidroliza, fermentacija in pridobitev etanola (Ra in Kim 2015).

Saharifikacija biomase rjavih alg je relativno preprost proces zaradi odsotnosti lignina. Saharifikacija v dveh korakih ali kombinacijski pristop predobdelave sta v uporabi za izboljšanje donosa reducirajočih sladkorjev, ki se jih da z ustreznimi sevi mikroorganizmov pod omejenimi pogoji fermentirati v bioetanol (Offei in sod. 2018; Dave in sod. 2019). Ker v morskih algah ni lignina, vsebujejo pa nizko raven celuloze, so ti postopki preprostejši in zahtevajo manj energije kot trenutne predobdelave za saharifikacijo lignocelulozne biomase. Pomanjkanje »vodljivih« mikroorganizmov, ki učinkovito pretvarjajo monosaharide, pridobljene iz morskih alg, v etanol, je ena največjih omejitev makroalg kot surovin za pridobivanje bioetanola (Smachetti in sod. 2018).

2.5.1 Sestava alg in njihova vloga pri proizvodnji biogoriv

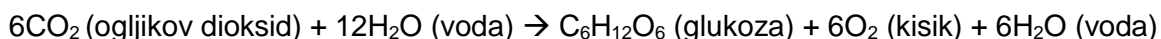
Alge vsebujejo široko paleto kemičnih spojin, kot so: beljakovine, lipide (maščobne kisline) in minerali, ter velike koncentracije ogljikovih hidratov (Iji in Kadam 2013). Biomasa alg se lahko uporablja za proizvodnjo dveh vrst biogoriva (bioetanol in biodizla) ravno zaradi kopičenja večjih koncentracij ogljikovih hidratov in lipidov (maščobnih kislin).

Izbira pretvorbene poti, ki temelji na algah, za proizvodnjo uporabne energije in transportnih goriv je odvisna od različnih parametrov, kot so kemijske značilnosti določene vrste alg, pogoji, značilni za določeno lokacijo (v smislu zaloge virov in donosa biomase), in seveda želeni končni izdelek. Makroalge so v splošnem primernejše za proizvodnjo bioplina in bioetanola prek fermentativnega procesa, in ne biodizla. Razlog je v tem, da te vrste običajno ne vsebujejo visokih količin lipidov/olja, iz katerih prek biokemijskih in termokemijskih procesov v glavnem pridobivamo biodizel. Makroalge so ustrezen substrat za proizvodnjo bioetanola prek hidrolize, kateri sledi fermentacija, in sicer zaradi velike količine različnih ogljikovih hidratov, predvsem glukoze, galaktoze in manitola, ter nizke količine lignina (Rocca in sod. 2015).

2.5.1.1 Ogljikovi hidrati

Ogljikove hidrate lahko v grobem razdelimo na monosaharide, polisaharide, oligosaharide in kompleksne ogljikove hidrate. Ogljikovi hidrati so najpogostejši polimeri v živi naravi. Sestavljajo jih trije elementi: ogljik, vodik in kisik. Ogljikovi hidrati so rezultat procesa fotosinteze pri rastlinah, algah in cianobakterijah, pri živalih pa v procesu procesa glukoneogeneze (Chojnacka in Kim 2015). Morske alge v splošnem vsebujejo visoke količine sestavljenih sulfatnih ogljikovih hidratov (polisaharidov). Polisaharidi so polimerne strukture ogljikovih hidratov, kjer so posamezne enote povezane z glikozidno vezjo. Nekatere vrste morskih alg vsebujejo do 70 % polisaharidov, tj. polisaharidov celičnih sten (celuloza, hemiceluloza, ksilan in manan), intracelularnih polisaharidov (algin, agar in karagenan) in skladiščnih polisaharidov (amilopektin, laminaran in floridejski škrob). Ti sestavljeni polisaharidi služijo kot skladiščno in podporno strukturno tkivo, podobno kot celična stena (Offei in sod. 2018).

Reakcija fotosinteze:



Zelene alge vsebujejo glukane (polimer z glukoze; celuloza in škrob), rdeče alge vsebujejo agar, rjave alge pa vsebujejo manitol, alginat (alginska kislina) in glukane (celuloza in laminarin) (Goecke in sod. 2013). Biomasa alg vsebuje znatno višje ravni polisaharidov kot kopenske rastline. Celotna narava ogljikovih hidratov je odvisna od vrste alg, starosti rastline in sezonske žetve (Lji in Kadam 2013). Proizvodnja polisaharidov vključuje naslednje korake: izbor surovin, stabilizacija in mletje biomase, ekstrakcija in čiščenje, precipitacija in sušenje (Chojnacka in Kim 2015).

2.5.1.1.1 *Sladkor glukoza in manitol*

GLUKOZA

Glukoza s kemijsko formulo $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, predstavlja vir energije v vseh celicah vseh tkivih in se pojavlja kot edini vir energije živčevju in eritrocitih. Glukoza igra glavno vlogo v presnovi rastlin, živali in številnih mikroorganizmov. Relativno bogata je s potencialno energijo. Glukoza se nahaja v organizmih v krvi, prenaša se iz prebavil v vse celice telesa in se porablja pri celičnem dihanju pri pridobivanju energijsko bogate snovi, adenzin trifosfata (ATP). Fermentacija je splošen izraz za anaerobno razgrajevanje glukoze ali drugih organskih hranil, katerega namen je pridobitev energije v obliki ATP. Ker so živi organizmi najprej živeli v atmosferi brez kisika, je anaerobni razkroj glukoze gotovo najstarejši biološki mehanizem za pridobitev energije iz organskih energijsko bogatih molekul (Nelson in Cox 2009).

MANITOL

Manitol je naravno prisotni ogljikov hidrat ali sladki alkohol v celični steni alg s šestimi ogljikovimi atomi in kemijsko formulo $\text{C}_6\text{H}_8(\text{OH})_6$ (Mehta in Parekh 1978). V naravi ga lahko najdemo v zelenjavi (zelena, buča, čebula itd.), morskih algah, kvasovkah, glivah, lišajih, sadju in številnih drugih rastlinah (Lee 1967).

Zaradi edinstvene evolucijske zgodovine in njihovega habitata imajo rjave alge nekaj posebnih značilnosti v metabolizmu. Eden od teh je cikel manitola, ki igra osrednjo vlogo pri njihovi fiziologiji, saj manitol deluje kot shranjevanje ogljika, osmoprotektant in antioksidant. Glede na vrsto pregledanih rjavih alg lahko manitol predstavlja od 20 do 30 % njihove suhe teže biomase (Groisillier in sod. 2014). V naravi se manitol pogosto pojavlja kot D-manitol. To je alditol, ki nastaja z redukcijo iz monosaharida D-manoze. Njegova molekulska masa je 182 g/mol. Pri sobni temperaturi je inertna brezbarvna bela trdna snov, brez vonja, ki ima zelo nizko topnost v vodi in nizko higroskopsko (Saha in Racine 2011).

Uporablja se za farmacevtske, kemijske in zdravstvene namene. Gre za dober antioksidant, lahko pa se uporablja tudi kot alternativno sladilo saharozi za prehrano diabetikov (ima kalorično vrednost le $1,6 \text{ kcalg}^{-1}$ v primerjavi s saharozo 4 kcalg^{-1}). Pogosto se pridobiva s katalitičnim hidrogeniranjem zmesi fruktoze in glukoze v vodni raztopini pri visoki temperaturi. Mlečnokislinske bakterije, kvasovke in glive so znane po tem, da proizvajajo manitol. Te bakterije pretvorijo fruktozo v manitol s 100-odstotnim izkoristkom iz mešanice glukoze in fruktoze (1:2). Glukozo pretvorimo v mlečno kislino in očetno kislino, fruktozo pa pretvorimo v manitol. Encim, odgovoren za pretvorbo fruktoze v manitol, je NADPH (nikotinamid adenine dinukleotid fosfat) ali NADH (nikotinamid adenine dinukleotid), odvisni manitol dehidrogenaza (MDH). Fruktozo lahko pretvorimo tudi v manitol z uporabo MDH v prisotnosti kofaktorja NADPH ali NADH (prav tam) (Saha in Racine 2011).

2.5.1.2 Lipidi

Lipid je najbolj pomemben sestavni del alg, predvsem kot surovina v proizvodnji biodizla. Nekaterne vrste alg sestavlja do 40 % maščobnih kislin glede na njihovo celotno težo, drugače se ti deleži razlikujejo glede na vrsto alg. Te maščobne kisline pa lahko ekstrahiramo in pretvorimo v biogoriva. Raznolikost lipidov alg in njihova sposobnost prilaganja okolju sta razlog, da so alge danes tako razširjene (Arts in sod. 2009).

Lipidi niso pomembni samo z energetskega in prehranskega vidika, temveč igrajo pomembno vlogo v vseh življenjskih organizmih. Lahko so živalskega ali rastlinskega izvora. Prepoznamo jih po tem, da so zgrajeni iz glicerola (alkohol s tremi OH-skupinami) in imajo na sebi zaestrene maščobne kisline. Ker je večji del nepolaren (kemično so triestri maščobnih kislin in glicerola), so bolj topni v nepolarnih topilih (npr. alkoholu), ne pa v vodi. Lahko jih razdelimo v dve glavni skupini (Diversity of lipids ... 2010):

- lipidi z estrsko strukturo (voski, triacilgliceroli in sestavljeni lipidi),
- lipidi z neestrsko strukturo (steroidi, izoprenoidi, lipidofilni vitamini in eikozanoidi).

Polarni lipidi in steroli so pomemben strukturni sestavni del celičnih membran, ki delujejo kot selektivna prepustnostna ovira za celice in organele. Ti lipidi vzdržujejo posebne funkcije membrane, s čimer matrici omogočajo širok izbor presnovnih procesov in neposredno sodelujejo pri membranski fuziji (Arts in sod. 2009).

2.5.2 Štiri glavne faze pridobivanja biomase (makro) alg

Štiri glavne faze proizvodnje biogoriv so (Offei in sod. 2018):

- gojenje, vključno s proizvodnjo »semen« (naravne zaloge, gojenje na nanesenem materialu (priobalni sistemi, odprti ribniki)),
- nabiranje (ročno mehanizirano),
- konzerviranje in skladiščenje, vključno s čiščenjem/pranjem,
- pridobivanje energije (biokemijski procesi: anaerobna presnovna (AD) fermentacija).

Uspešnost prihodnje uporabe goriv, pridobljenih iz biomase makroalg, je odvisna od izvedbe procesa, ki mora biti optimiziran in energijsko učinkovit v vsaki od teh štirih faz. Enako kot pri mikroalgah je razvoj novih in naprednih metod pri gojenju morskih alg in tehnik nabiranja bistven za gospodarsko in energetsko uporabnost biogoriva, pridobljenega iz makroalg (Offei in sod. 2018).

2.5.3 Predobdelava biomase morskih alg

Namen predobdelave je povečati vsebnost energije ali doseči višjo stopnjo pretvorbe biomase in povečati lastnosti energijsko bogatih molekul. Matrica celične stene se mora razgraditi in razkrojiti take polimerne molekule v fermentacijske sladkorje (Jiang in sod. 2016).

Predobdelava makroalg lahko izboljša celotno učinkovitost procesa fermentacije pri proizvodnji etanola. Mehanska in/ali kislinska predobdelava lahko s pomočjo hidrolitičnih encimov izboljšata hidrolizo sladkorjev makroalg in donos etanola v tem procesu (Rocca in sod. 2015).

Glavni predobdelovalni in obdelovani postopki, ki pridejo na vrsto po nabiranju morskih alg, so pranje, sušenje in drobljenje.

PRANJE

Morske alge po nabiranju običajno operemo z vodo, da odstranimo kamne, pesek in drugo neželjeno umazanijo. Pranje pri viru je mogoče boljše možnost, saj s tem varčujemo s pitno vodo. To je bolj stroškovno učinkovita in trajnostna možnost (Offei in sod. 2018).

SUŠENJE

Pred skladiščenjem je priporočeno sušenje morskih alg. To ne le podaljša življenjske dobe alg, temveč tudi zmanjša stroške prevoza. Sušenje morskih alg je pri proizvodnji etanola dolgotrajen obdelovalni proces, ki vzame veliko energije, saj je vsebnost vlage v sveže nabranih morskih algah ogromna (85–90 %) (Offei in sod. 2018).

Metode sušenja (Offei in sod. 2018):

- sušenje z zamrzovanjem,
- sušenje na soncu (v sončnem vremenu lahko traja od 2 do 3 dni, v deževnih dobah pa do 7 dni, potrebne ogromne površine) in
- sušenje v peči.

DROBLJENJE (MILLING)

Gre za predobdelovalni proces, ki poveča površino biomase, predvsem za delovanje katalizatorjev v fazah hidrolize in fermentacije. Zaradi zmanjšane velikosti se zmanjša tudi prostornina morskih alg, s čimer je povečana učinkovitost transporta in skladiščenja (Milledge in sod. 2014) (Offei in sod. 2018).

2.5.4 Metode hidrolize

Hidroliza je proces, pri katerem se razcepijo glavne komponente lignoceluloznega materiala (LCM), ki se primarno razvije za proizvodnjo etanola. Proces hidrolize pri proizvodnji etanola vključuje razcep sestavljenih sladkorjev (ogljikovih hidratov), kot so laminarin, celuloza, manitol, alginat, ulvan, karaginan in agar v morskih algah, na enostavne sladkorje, kot so glukoza, galaktoza, manoza, fukoza, ksiloza in arabinoza, za fermentacijo v etanol (Offei in sod. 2018).

Ekstrakcija sladkorja iz biomase alg vključuje tri glavne procese (Offei in sod. 2018):

- kislinsko hidrolizo z razredčeno kislino,
- kislinsko hidrolizo z razredčeno alkalno snovjo in
- encimsko hidrolizo (specifični encimi, kot so celulaza, ksilanaza in glukozidaza, ki med procesom olajšujejo sproščanje sladkorjev).

Povprečni delež sladkorjev, ki se lahko sprosti iz vseh ogljikovih hidratov v morskih algah, se lahko izrazito spreminja glede na vrsto in uporabljeno metodo hidrolize. Sproščeni sladkorji so lahko podvrženi mikrobnim fermentaciji, v kateri proizvedejo bioetanol in/ali biobutanol (Rocca in sod. 2015).

2.5.4.1 Kislinska hidroliza z razredčeno kislino

PREDNOSTI

Prednosti kislinske hidrolize s koncentrirano kislino:

- najbolj razširjena metoda obdelave morskih alg na področju raziskovanja bioetanola,
- stroškovno učinkovita s krajšim reakcijskim časom kot trenutne metode hidrolize, ki so v uporabi,
- močne kisline, kot sta žveplova kislina (H_2SO_4) in klorovodikova kislina (HCl), so najpogosteje uporabljene kot kemijski katalizatorji za hidrolizo morskih alg (Offei in sod. 2018).

SLABOSTI

Izrazita slabost uporabe kislinskih katalizatorjev je proizvodnja inhibitorjev v obliki 5-(hidroksimetil) furfurala $C_5H_4O_2$ (5-HMF) ali furfuralne in levulinične kisline. Ti inhibitorji so produkti dehidracije heksoz (C6-reducirajočih sladkorjev) in pentoz (C5-reducirajočih sladkorjev), kar je posledica visoke koncentracije kisline in dolgega retencijskega časa. Inhibitorji lahko ovirajo fermentacijo reducirajočih sladkorjev tako, da poškodujejo DNK ter zavirajo sintezo beljakovin in organizmov, ki fermentirajo RNK, kot je kvas (Offei in sod. 2018).

Rešitev?

Z uporabo aktivnega oglja bi lahko odstranili inhibitorje in s tem uspešno povečali donos etanola na gram prisotne galaktoze. Gre za različne metode, kot so »apnenje« (uporaba kalcijevih ionov, visokega pH in kalcijevega hidroksida), uporaba etil acetata. Zaradi potrebe po predobdelavi, saharifikaciji in aplikaciji materialov za odstranitev fermentacijskih inhibitorjev je lahko proizvodnja biotanola iz morskih alg izrazito dražj. Metoda hidrolize z razredčeno kislino je bolj stroškovno učinkovita v primerjavi z uporabo encimov in drugih metod, predvsem ker obstaja že uveljavljen trg za proizvodnjo in uporabo močnih kislinskih katalizatorjev. Trditev, da je obdelava z razredčeno kislino bolj stroškovno učinkovita v primerjavi z drugimi metodami hidrolize, torej delno drži. Hidroliza morskih alg s kislinskimi katalizatorji se potemtakem zdi obetavna zaradi občutne učinkovitosti in gospodarnosti. Je pa postopek manj trajnosten, saj ima velik vpliv na okolje zaradi strupenosti kislinskih katalizatorjev in odstranjevanja soli, ki nastanejo pri razredčevanju (Offei in sod. 2018).

2.5.4.2 Kislinska hidroliza z alkalno snovjo

Toplotna hidroliza z razredčeno alkalno snovjo je neposredna alternativa hidrolizi z razredčeno kislino. V tem primeru je kot katalizator namesto kisline uporabljena baza. Pri višjih temperaturah in daljših reakcijskih časih hidroksidni ioni baz reagirajo z hidrokoloide v morskih algah (agarofiti in karaginofigi) ter ustvarijo gele, ki so preveč viskozni, da bi lahko fermentirali. To predstavlja izziv pri uporabi hidrolize z alkalno snovjo, predvsem pri rdečih morskih algah. Z biorafinerijskim pristopom pa lahko to omilimo, saj se hidrokoloide ekstrahirajo, preden začne na njegovem ostanku potekati hidroliza z razredčeno alkalno snovjo (Offei in sod. 2018). Trenutno pri hidrolizi morskih alg še ni ugotovljenih prednosti uporabe baznega katalizatorja pred uporabo kislinskega katalizatorja. Potrebna bi bila tehniško-gospodarska analiza, da bi ugotovili, na katerih področjih se bazni in kislinski katalizatorji lahko izkažejo za koristne (Offei in sod. 2018).

2.5.4.3 Encimska hidroliza

Encimska hidroliza je najbolj učinkovita pri pretvorbi sestavljenih polisaharidov v enostavne sladkorje z bolj učinkovito pretvorbo in manj pogostimi strupenimi stranskimi produkti. Najbolj pogosti encimi, ki so uporabljeni pri saharifikaciji (hidrolizi) morskih alg, so celulaze. Celulaze se naravno nahajajo v celuloitičnih bakterijskih vrstah *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermonospora*, *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Ruminococcus*, *Erwini*, *Acetovibrio*, *Microbispora* in *Streptomyces*. Najdemo jih tudi v glivnih vrstah *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Humicola* in *Schizophillum* (Offei in sod. 2018).

Uporaba encimov v hidrolizi v primerjavi z drugimi metodami ponuja ogromne prednosti pri donosih visoko reducirajočih sladkorjih. Encimi so občutljivi na pH (idealno območje pH za celulaze je 4–6) in mogoče je za povečanje učinkovitosti in vzdrževanje optimalnega delovanja encimov potrebna uporaba blažilcev ali sredstev za uravnavanje pH z bazami in kisljinami. To pa ustvari dodatne stroške. Največja slabost uporabe encimov so visoki stroški proizvodnje, dolg reakcijski čas in pridobitev encimov. Stroški so povezani s komercialnimi encimi, kar ostaja izziv za komercialno proizvodnjo bioetanola (Offei in sod. 2018).

2.5.5 Proces fermentacije

Po predobdelavi se pri saharifikaciji polimerne verige razcepijo na monomerne sladkorje, ki delujejo kot substrati za sledečo fermentacijo. Saharifikacija je lahko ločen korak, ki mu sledi fermentacija, ali pa poteka istočasno s fermentacijo, čemur pravimo sočasna saharifikacija in fermentacija (Jiang in sod. 2016).

Fermentacija je kritična faza celotnega procesa proizvodnje bioetanola, predvsem ker gre za fazo, kjer organizem proizvaja etanol iz reducirajočih sladkorjev, ki so pridobljeni s hidrolizo.

2.5.5.1 Ločena hidroliza in fermentacija (SHF)

Ta proces je najbolj razširjen, predvsem zaradi fleksibilnosti glede izbire procesa hidrolize. Omogoča tudi uporabo optimalnih pogojev tako za katalizatorje kot za fermentirajoče organizme v hidrolizi in procesu fermentacije. V SHF se najprej zaključi proces hidrolize, reducirajoči sladkorji (neobvezen korak) pa so pridobljeni prek centrifugacije ali filtracije, preden organizem vstopi v proces fermentacije. Oba procesa se lahko odvijata v istem reaktorju, ni pa nujno (Offei in sod. 2018).

2.5.5.2 Istočasna saharifikacija in fermentacija (SSF)

V procesu SSF sta encim za saharifikacijo in fermentirajoči organizem, kot je kvas, istočasno in pod enakimi pogoji delovanja dana v reaktor. Proces je stroškovno učinkovit, ker se hidroliza in fermentacija odvijata v istem reaktorju istočasno, niso pa vedno doseženi optimalni pogoji za oba procesa. Pogoji za saharifikacijo (hidrolizo) in fermentacijo namreč niso enaki, razlika je predvsem v temperaturi. Običajno poteka proces hidrolize pri temperaturi od 45 do 55 ° C, medtem ko proces fermentacije poteka med 28 in 40 ° C (Offei in sod. 2018).

2.5.6 Glikoliza in metabolizem piruvata v etanol

Glikoliza (Emden-Meyerhof-Parnasova (EMP) pot ali pot heksoze-difosfata) je univerzalni način pridobivanja energije, prisotne v vseh heterotrofnih organizmih. Gre za primarni metabolizem oziroma presnovo glukoze preko difosfata fruktoze (FDP) do nastanka dveh molekul piruvata, dveh molekul reduciranega nikotinamid adenin dinukleotida (NAD) in dveh molekul adenuzin trifosfata (ATP) brez sodelave zunanjega prejemnika. Glikoliza je univerzalna metabolna pot razgradnje ogljikovih hidratov, ki preko niza encimsko kataliziranih reakcij vodi do nastanka piruvata (Nelson in Cox 2005)

V grobem lahko glikolizo razdelimo na dva dela; prvih pet reakcij predstavlja pripravljalno fazo, drugih pet reakcij pa donosno fazo.

V pripravljalni fazi se za fosforilacijo glukoze porabita dve molekuli ATP. Iz heksoze nato nastaneta triozi, dve molekuli gliceraldehid-3-fosfata (G-3-P). V donosni fazi se vsaka molekula G-3-P oksidira in fosforilira z anorganskim fosfatom. Energija se sprosti, ko se vsaka od dveh molekul 1,3-bifosfoglicerata pretvori v piruvat. Sproščena energija se shrani v obliki štirih molekul ATP, del energije pa se shrani tudi v obliki dveh molekul NADH. Poteka v citosolu, neodvisno od prisotnosti kisika (prav tam) (Nelson in Cox 2005).

Piruvat, ki nastane z glikolizo, se v anaerobnih pogojih lahko pretvori v laktat (mlečno kislinsko vrenje, ki poteka v določenih mikroorganizmih ter tkivih in kot je primer tudi pri rakastih celicah) ali pa v etanol in CO₂ (alkoholno vrenje, kot je primer pri *S. cerevisiae*). Pri aerobnih organizmih, kamor sodijo številne bakterije in večina evkariontov, pa poteče oksidacija piruvata do CO₂ in H₂O preko oksidativne fosforilacije. Aerobni organizmi pridobijo največ energije s celičnim dihanjem v mitohondrijih v procesu oksidativne fosforilacije, glikoliza pa predstavlja le del te poti (Nelson in Cox 2005).

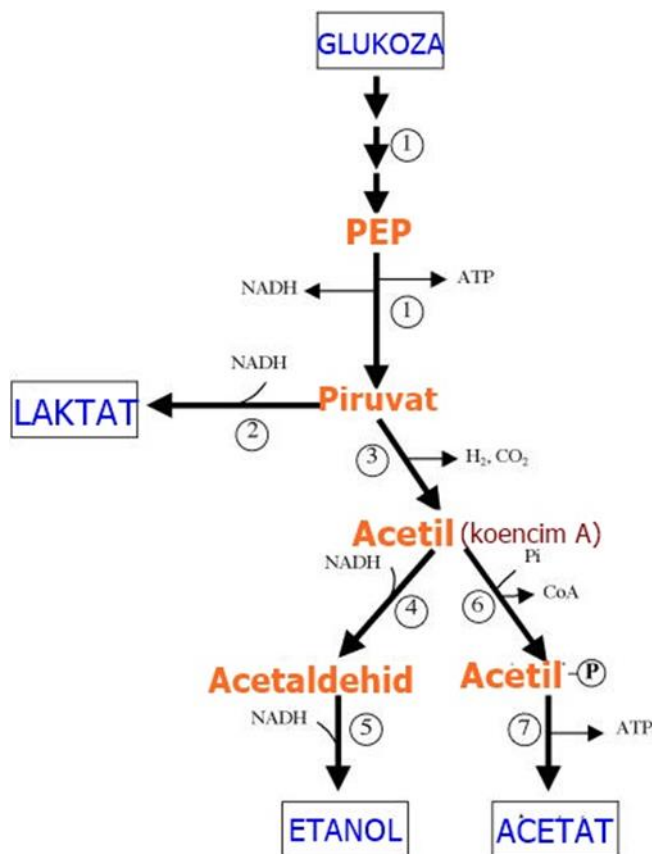
Tretji glavni korak katabolizma piruvata vodi do nastanka etanola. V nekaterih rastlinskih tkivih in določenih nevretenčarjih, protistih in mikroorganizmih, kot so pivske kvasovke, se piruvat pod hipoksičnimi ali anaerobnimi pogoji pretvori v etanol in CO₂. Takemu procesu pravimo fermentacija etanola (alkohola). Oksidacija piruvata je pomemben kataboličen proces (Nelson in Cox 2005).

Kvasovke in drugi mikroorganizmi fermentirajo glukozo v etanol in CO₂ namesto v laktat. Glukozo se pretvori v piruvat s procesom glikolize, piruvat pa se pretvori v etanol in CO₂ v dveh korakih (Nelson in Cox 2005):

V prvem koraku se piruvat dekarboksilira v nepovratni reakciji, ki ga katalizira piruvat dekarboksilaza. Ta reakcija je enostavna dekarboksilacija in ne zajema neto oksidacije piruvata. Piruvat dekarboksilaza zahteva Mg²⁺ in ima tesno vezan koencim (Nelson in Cox 2005).

V drugem koraku alkoholna dehidrogenaza reducira acetaldehid v etanol z reducirano močjo, ki jo zagotavlja NADH, produkt dehidrogenacije gliceraldehida 3-fosfata. Etanol in CO₂ sta tako končna produkta fermentacije etanola (prav tam) (Nelson in Cox 2005).

Reakcija: Glukoza + 2ADP + 2P_i → 2 etanol + 2CO₂ + 2ATP + 2H₂O voda



Slika 6: Poenostavljena shema razcepa glukoze na številne končne produkte, pri katerem delujejo anaerobne bakterije (Vir: Scully in Orlygsson 2014b, str. 8).

2.6 ORGANIZMI PRIMERNI ZA PROCES FERMENTACIJE

Za fermentacijo reducirajočih sladkorjev v etanol so uporabljeni številni organizmi. Večinoma gre za glivne in bakterijske vrste. Največja težava pri proizvodnji etanola je najti proizvajalca etanola, ki je sposoben izkoristiti in fermentirati sladkorje ter obenem obdržati svojo

robustnost/stabilnost pod negativnimi pogoji. Za razliko od predobdelave in hidrolize, ki sta manj selektivna glede surovega materiala, je fermentacija odvisna od vrste alge, saj se polisaharidi iz različnih vrst alg lahko razcepijo na različne vrste sladkorjev. Uporaba teh različnih sladkorjev pa zahteva različne seve mikroorganizmov (Robak in Balcerek 2019).

Danes je večina bioetanola proizvedenega z uporabo že ustaljenih mezofilnih organizmov, kljub nekaterim bistvenim prednostim pri uporabi termofilnih mikroorganizmov, kot so višje temperature pri obratovanju in uporaba brez glukočnih heksoz in pentoz, npr. ksiloza in arabinoza (Scully in Orlygsson 2014b).

Najbolj znani mikroorganizmi, ki se danes uporabljajo za proizvodnjo etanola, so kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* in bakterija *Zymomonas mobilis*. *S. cerevisiae* je najbolj razširjen organizem, ki se ga uporablja pri fermentaciji reducirajočih sladkorjev iz številnih vrst biomase zaradi njegove nizke cene in razpoložljivosti. Oba organizma imata zelo visoke izkoristke etanola (>1,9 mol etanol/mol heksoze) ali s kvasovko *Zymomonas mobilis* z nižjimi donosi. Čeprav sta *S. cerevisiae* in *Z. mobilis* na splošno odlična proizvajalca etanola, imata omejen spekter substrata, ki jima omogoča, da razgradita samo glukozo, fruktozo in saharozo v etanol (Scully in sod. 2015), nista pa primerna za proizvodnjo etanola iz kompleksnih substratov. Zato je lahko uporaba termofilnih bakterij s širokim razponom substratov in visokimi izkoristki boljše možnost za proizvodnjo etanola iz kompleksnih biomas (Jessen in Orlygsson 2012).

Med najpomembnejše lastnosti dobrih proizvajalcev etanola pa zagotovo uvrščamo njihovo odpornost na etanol. Stopnje rasti številnih organizmov se občutno zmanjšajo z naraščanjem koncentracije etanola. Prisotnost večjih koncentracij etanola v fermentacijskem mediju lahko povzroči uničenje vodikovih vezi, kar vodi do denaturacije beljakovin. S tem pride do raztapljanja lipidov in beljakovin v celični membrani. Celična membrana je pomembna, ker uravnava vstop in izstop snovi v celico in iz nje. Kadar pride do uničenja le-te se skozi njo začne iztekati citoplazma (celična tekočina), ki postopoma privede do lize oziroma propada celice (Scully in Orlygsson 2014).

Uporaba termofilnih bakterij s širokim izborom substratov in visokih donosov je torej boljše možnost za proizvodnjo etanola iz sestavljenih biomas. Že nekaj časa je znano, da so številne termofilne bakterije visoko učinkoviti proizvajalci etanola.

2.7 ANAEROBNI TERMOFILNI MIKROORGANIZMI

2.7.1 Vpliv temperature na bakterije

Obstoj življenja pri visokih temperaturah je precej presenetljiv, saj se razteza čez celotno temperaturno območje, pod lediščem vode pa do vrelišča. Veliko različnih mikrobov preživi in raste pri še tako povišanih temperaturah. Mikrobi, ki imajo prednost v vročem okolju, se imenujejo termofili (grško za »ljubitelje toplote«) in so le ena od različnih vrst »ekstremofila«, ki živijo v ekstremnih pogojih.

Mikroorganizmi so razvrščeni glede na svojo optimalno (T_{opt}) in maksimalno (T_{max}) rastno temperaturo. Zmerni termofili imajo optimalno rast v temperaturnem območju od 50 °C do 64 °C, ekstremni termofili med 65 °C in 79 °C, medtem ko hipertermofili najbolje rastejo pri več kot 80 °C. Posamezni člani skupin imajo splošni temperaturni razpon nekje med 20 in 40 °C (Scully in Orlygsson 2014b), enako kot večina življenjskih oblik danes, vendar je ta veliko večji med nekaterimi skupinami bakterij (Russell in Fukunaga 1990).

Habitati termofilnih anaerobnih organizmov vključujejo geotermalna območja, globokomorske odprtine, usedline na rečnih bregovih in umetne habitate, kot so kompostniki, trdni komunalni odpadki ali blato iz čistilnih naprav (Holst in sod. 1997).

2.7.1.1 Toplotno odporni encimi

Encimi so molekule, ki sodelujejo v življenjsko pomembnih procesih, kot so metabolni procesi, od katerih je odvisno življenje vsake celice. Encimi iz termofilnih anaerobov in hipertermofilnih mikroorganizmov so termostabilni in prikazujejo nepopravljivo denaturacijo beljakovin le pri visokih temperaturah. Termični encimi imajo tudi visoko temperaturo za maksimalno aktivnost. Encimi so beljakovine in večino beljakovin denaturira toplota. V nasprotju s tem so termični encimi stabilni pri visokih temperaturah, kar jim omogoča ne le nadaljevanje dela, temveč tudi hitrejše delovanje, saj višje temperature pomenijo tudi hitrejše reakcijske hitrosti (Scully in Orlygsson 2014b). Termofilne encime lahko uporabimo v več industrijskih procesih, pri katerih lahko nadomestijo mezofilne encime ali kemikalije. To odpira nove možnosti za optimizacijo procesov. Ti encimi, zlasti tisti, ki so aktivni in stabilni pri temperaturah do 100 °C, se uporabljajo za proučevanje prilagoditve beljakovin na visoke temperature in za boljše razumevanje stabilnosti beljakovin na splošno (Bruins in sod. 2001).

Kot posledica rasti pri visokih temperaturah in edinstvenih makromolekularnih lastnostih imajo lahko termofilne bakterije visoko stopnjo metabolizma, fizikalno in kemično stabilne encime ter nižjo rast, vendar višje donose končnega proizvoda kot podobne mezofilne vrste (Zeikus 1979).

Bakterije iz vrst *Clostridia* so zanimive zaradi odpornosti na skrajne okoljske razmere in sposobnosti proizvodnje potencialnih biogoriv iz široke palete substratov, vključno z monosaharidi, prisotnimi v lignocelulozni biomasi.

2.8 FERMENTACIJA ETANOLA S TERMOFILNIMI BAKTERIJAMI

V zadnjih desetletjih je študija termofilnih in hipertermofilnih mikroorganizmov postala obsežno področje raziskav predvsem zaradi edinstvenih lastnosti, ki jih imajo. Ti mikroorganizmi so glede na svoje posebne lastnosti, kot so visoka termostabilnost (termični encimi), toleranca pri ekstremnih pH-vrednostih ali njihova zmogljivost pri visokih koncentracijah organskih topil, primerna orodja za široko področje uporabe (Bruins in sod. 2001). Razvili so več strukturnih in kemičnih prilagoditev, ki jim omogočajo, da preživijo in rastejo pri povišanih temperaturah. Ti odzivi na spremembe temperature vključujejo spremembe v sestavi in stabilnosti membrane, presnovnem potencialu, transportu aminokislin, regulativnih mehanizmih, metilaciji riboze aminoacil-tRNA, termostabilnosti proteinov in prehranskih potrebah (Welker 1991).

Ena od največjih ovir pri doseganju visokih koncentracij etanola pri termofilnih je zmanjšanje tvorjenih končnih produktov. Za razliko od anaerobnih bakterij, ki rastejo pri nižjih temperaturah, fermentacija z mešanimi kislinami poteka v manjšem obsegu (Scully in Orlygsson 2014a).

Termofilna *Clostridia* v primerjavi s kvasovkami vrst *Saccharomyces* ali *Zymomonas* lahko fermentira polimere biomase ali pentoze, ki so hidrolizirani ostanki iz hemiceluloze, neposredno v etanol. *Clostridium thermocellum* je edina znana bakterija, ki proizvaja etanol neposredno iz celuloze pri visokih temperaturah (Kurose in sod. 1989).

Sledi kratek pregled termofilnih bakterij iz vrst rodu *Clostridia*, v katerih bodo poudarjene njihove glavne značilnosti in različni metabolizmi.

2.9 TERMOFILNA BAKTERIJA *CLOSTRIDIA*

Termofilne bakterije rodu *Clostridia* so rod grampozitivnih bakterij iz debla *Firmicutes*. Bakterije iz tega rodu so obvezni anaerobi in zato ne morejo uporabljati O_2 kot končni akceptor elektrona za rast, ker je zanje toksičen. Nasprotno lahko uporabljajo različne druge spojine, kot so: CO_2 , CO , NO_3^- , NO_2^- , NO , N_2O , SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, S_0 , $Fe(III)$, $Mn(IV)$ in $Mo(VI)$ kot končni prejemnik elektronov, kar kaže na široko presnovno raznolikost (Canganella in Wiegel 2014). So paličaste oblike in veljajo za vseprisotne, saj so bile izolirane iz številnih habitatov in okolij. Značilno je, da živijo v geotermalnih kontinentalnih ogrevanih območjih, ki vključujejo vroče vrelce, gejzirje, solfaterne in bazene z blatom (»blatne lonce«), v termobiotičnih morskih okoljih, kot so geotermalno ogrevane plaže in geotermalni vodonosniki (Zeikus 1979).

2.9.1 *Clostridium*

Clostridium je velik in zelo raznolik rod v razredu *Clostridia* (družina *Clostridiaceae*, *Clostridiales*) iz debla *Firmicutes* in trenutno vsebuje več kot 200 veljavno opisanih vrst, od katerih je približno 15 termofilnih. *Clostridium* je paličaste oblike. Večina termofilnih vrst tega rodu ima T_{opt} v območju med 45 in 65 °C (Scully in Orlyngson 2014b). Optimalno temperaturno območje za rast je med 30 in 37 °C, vendar pa se pri 25 °C številni sevi enako dobro povečajo, rast pa se lahko pojavi pri 10 °C. Običajno jih je mogoče izolirati iz širokega spektra habitatov, bogatih s hranili. Najdemo jih v najrazličnejših habitatih, kot so tla, sladkovodne in morske usedline, v siru, vampu zdravih telet, živalskih iztrebkih in v najrazličnejših kliničnih vzorcih ljudi in živali (v krvi, urinu, trebuhu, ranah itd.) (Ashton 1981).

Izkoristki etanola iz vrst *Clostridium* so na splošno zmerni (Rainey 2008). Ugotovljeno je bilo, da številne vrste hidrolizirajo biopolimere kot dodatek fermentaciji, zaradi česar so te vrste cilj obsežnih raziskav v proizvodnji biogoriv kompleksne biomase (Scully in Orlyngson 2014a).

2.9.2 *Caldanaerobacter*

Ta rod vsebuje dve vrsti, in sicer; *Caldanaerobacter subterraneus*, s štirimi podvrstami, in *Caldanaerobacter uzonensis*. To so striktni anaerobni heterotrofi. Rod je lahko gram pozitiven ali negativen (Scully in Orlyngsson 2014b). Vrste *Caldanaerobacter* vključujejo termofilne fermentacijske bakterije, ki lahko rastejo na substratih ogljikovih hidratov z acetatom in L-alaninom kot glavnim produktom. Večina sevov bakterije raste pri 80 °C in se zato uvršča med ekstremne termofilne bakterije. Bakterije obeh vrst potrebujejo kvasni ekstrakt za rast. Sevi so lahko izolirani iz vročih kopenskih in podzemeljskih ekosistemov ter globokomorskih hidrotermalnih odprtih (Rainey in sod. 2015).

2.9.3 *Caldicellulosiruptor*

Le-ta je izredno termofilen, gram-pozitiven, fermentacijski anaerob, ki se lahko uporablja za širok obseg substratov, vključno s celulozo, hemicelulozo, škrobom, pektinom, pentozo in heksozo. Ne tvori spor. Zmogljivost sočasne uporabe vrste kompleksnih surovin za biomaso je zelo zanimiva značilnost te bakterije za proizvodnjo vodika (H_2) in bioplina (Ivanova in sod. 2009). Rast se pojavi v temperaturnem območju od 45 do 82 °C z optimumom v območju od 65 do 75 °C. Vse vrste *Caldicellulosiruptor* lahko uporabljajo fruktozo, galaktozo, glukozo, ksilozo in pektin prek klasične EMP-poti (Emden-Meyerhof-Parnasova (EMP) pot ali pot heksoze-difosfata). Monosaharidi, disaharidi, polisaharidi in sladkorni alkoholi služijo kot fermentacijski substrati. Glavni fermentacijski produkti rodu *Caldicellulosiruptor* so vodik, ogljikov dioksid in acetat (Rainey 2008).

2.9.4 *Thermoanaerobacter*

Ta rod vsebuje 15 vrst in pet podvrst (Scully in Orlygsson 2014a). Barvanje po gramu se razlikuje med posameznimi vrstami in celo znotraj sevov iste vrste. Optimalna temperatura za rast je nekje med 55 in 75 °C, s stopnjami rasti med 35 in 78 °C. Vrednost pH za rast se giblje od pH 4,0 do 9,9, pri čemer je pH-vrednost optimalna 5,8–8,5. Vse vrste lahko rastejo organoheterotrofno z uporabo različnih poti fermentacije, vključno s homoacetogenim fermentiranjem ali z uporabo anorganskih akceptorjev elektronov. Na splošno imajo njene vrste zelo širok substratni spekter in tipični fermentacijski produkti iz heksoze so etanol, acetat, laktat, H₂ in CO₂ (Rainey in sod. 2015; Wagner in Wiegel 2008).

2.9.5 *Thermoanaerobacterium*

V ta rod spadajo ekstremni termofili z optimumom rasti temperature med 55 in 70 °C. Celice imajo gram-pozitivno strukturo celične stene, vendar so številni sevi negativni. Celice so paličasto oblikovane in gibljive z več vstavljenimi flagelami, razen *Thermoanaerobacterium aciditolerans*, ki ima en sam polarni flagellum. V nekaterih vrstah so prisotne endospore. Razpon pH za rast je širok nekje med 3,2 in 8,5. Končni produkti fermentacije iz heksoze so očetna kislina, etanol, mlečna kislina, H₂ in CO₂. Zlasti vrsta *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* ima zelo širok substratni spekter, zato lahko razgradi vrsto sladkorjev v lignocelulozni biomasi, vključno s škrobom, ksilanom, glukozo, celobiozo, ksilozo, arabinozo, manozo in galaktozo, ki se nato razgradijo na široko paleto izdelkov, vključno z etanolom, acetatom, laktatom, ogljikovim dioksidom in vodikom, ki omejujejo njihovo uporabo (Rainey in sod. 2015).

2.9.6 *Thermobrachium*

Celice so običajno paličastih oblik in pogosto izkazujejo pravo razvejanost. Po Gramu so pozitivne, čeprav se celice nekaterih sevov lahko hitro razbarvajo. Celice so običkane in le počasi gibljive. Ta rod je sestavljen samo iz enega tipa in vrste, *Thermobrachium celere*, ki predstavlja heterotrofno presnovo. Habitati vključujejo antropogeno segreta okolja (kompost) in geotermalno segreta okolja (tople vrelce in sedimente) ter mezobiotske sladkovodne usedline (Wiegel 2015).

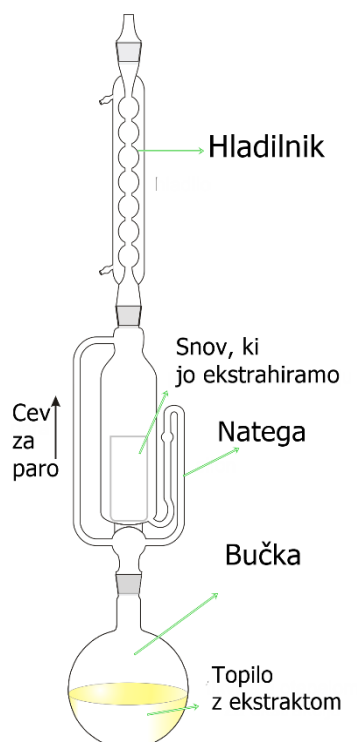
3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je proces, s katerim lahko iz zmesi odstranimo neko določeno sestavino. Za uspešno ekstrakcijo mora imeti raztopina v drugi fazi večjo topnost kot v prvotni fazi. Osnovna raztopina je v stiku z drugo raztopino (topilom), ki se ne meša z osnovno raztopino. Ekstrakcija vključuje dva zaporedna postopka; mešanje zmesi s topilom in ločevanje obeh faz. Optimalne pogoje ekstrakcije določimo empirično z izbiro različnih topil, prostorninskih razmerij, temperature, moči stresanja in števila ekstrakcij. Pomembno je poznati tudi odvisnost porazdelitve snovi med topili, saj lahko s prilagajanjem časa ekstrakcije vplivamo na večjo selektivnost procesa (Definition of ... 2018).

Pri tem procesu uporabljamo dva glavna postopka (Luque de Castro in García Ayuso 2000):

- **ekstrakcijo trdne snovi:** Za ekstrakcijo iz trdnih zmesi pogosto uporabimo napravo, ki se imenuje Soxhletov aparat. Ekstrakcijsko topilo segrevamo v bučki, pare se kondenzirajo v hladilniku in zbrani kondenzat kaplja na trdno zmes v tulcu iz filtrirnega papirja. Ekstrahirana spojina se nabira v bučki. V tulcu ostanejo netopne sestavine prvotne zmesi. Ko raztopina napolni nastavek do višine odtoka, steče po načelu natege nazaj v bučko in postopek se ponovi.



Slika 7: Soxhletov ekstraktor (Vir: Soxhletov ekstraktor 2018)

- **ekstrakcijo tekoče snovi:** Porazdelitev spojin iz zmesi v dveh topilih, ki se med seboj ne mešata (običajno voda in organsko topilo). Ta postopek se po navadi izvaja z uporabo lija ločnika.

3.2 ORGANIZMI

Za eksperiment smo izbrali 41 sevov (navedenih spodaj), in sicer 14 iz rodu *Thermoanaerobacter*, pet iz rodu *Caldanaerobacter*, devet iz rodu *Caldicellusiruptor*, devet iz rodu *Thermoanaerobacterium*, pet iz *Caldanaerobacter* in en sev iz rodu *Thermobrachium*.

Natančno izbrane termofilne bakterije vrste *Clostridia* so bile pridobljene iz nemške zbirke mikroorganizmov in celičnih kultur (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (GmbH), DSM).

Caldanaerobacter:

- *C. subterraneus* subsp. *pacificus* (DSM 12653),
- *C. subterraneus* subsp. *Subterraneus* (DSM 13054),
- *C. uzonensis* (DSM 18923),
- *C. tengcongensis* (DSM 15242),
- *C. subter.* subsp. *yonseiensis* (DSM 13777).

Caldicellulosiruptor:

- *Caldicellulosiruptor changbaiensis* (DSM 26941),
- *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (DSM 8903),
- *Caldicellulosiruptor owensis* (DSM 13100),
- *Caldicellulosiruptor bescii* (DSM 6725),
- *Caldicellulosiruptor acetigenus* (DSM 7040),
- *Caldicellulosiruptor lactoaceticus* (DSM 9545),
- *Caldicellulosiruptor kristjanssonii* (DSM 12137),
- *Caldicellulosiruptor hydrothermalis* (DSM 18901),
- *Caldicellulosiruptor kronotskiensis* (DSM 18902).

Thermoanaerobacter:

- *Thermoanaerobacter acetoethylicus* (DSM 2359),
- *Thermoanaerobacter brockii* subsp. *brockii* (DSM 1457),
- *T. brockii* subsp. *finnii* (DSM 3389),
- *T. brockii* subsp. *lactiethylicus* (DSM 9801),
- *Thermoanaerobacter italicus* (DSM 9252),
- *Thermoanaerobacter ethanolicus* (DSM 2246),
- *Thermoanaerobacter kivui* (DSM 2030),
- *Thermoanaerobacter mathrani* subsp. *mathrani* (DSM 11426),
- *T. pentosaceus* (DSM 25963),
- *T. pseudoethanolicus* (DSM 2355),
- *Thermoanaerobacter siderophilus* (DSM 12299),
- *Thermoanaerobacter sulfurigignens* (DSM 17917),
- *Thermoanaerobacter sulfurophilus* (DSM 11584),
- *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (DSM 567),
- *Thermoanaerobacter uzonensis* (DSM 18761),
- *T. wiegelii* (DSM 10319).

Thermoanaerobacterium:

- *Thermoanaerobacterium thermostercoris* (DSM 22141),
- *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (DSM 2229),
- *Thermoanaerobacterium aotearoense* (DSM 10170),
- *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (DSM 571),
- *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (DSM 7060),
- *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* (DSM 7097),
- *Thermoanaerobacterium aciditolerans* (DSM 16487).

Caldanaerobius:

- *Caldanaerobius polysaccharolyticus* (DSM 13641),

- *Caldanaerobius zeae* (DSM 13642),
- *Caldanaerobius fijiensis* (DSM 17918).

Thermobrachium:

- *Thermobrachium celere* (DSM 8682).

3.2.1 Priprava raztopin in gojišč

Količina in kvaliteta hranilnih snovi imata ključen pomen za hitrost celične rasti in s tem za rast mikroorganizmov. Za rast mikroorganizmov so nujno potrebne beljakovine, ogljikovi hidrati, mineralne soli, voda in posebne rastne obogatitve.

Za rast mikroorganizmov so potrebni:

- Makrohranila: C, H, N, O, P, S;
- Mikrohranila: K, Na, Mg, Fe, Ca;
- elementi v sledovih: Mn, Zn, Co, Cu, Mo;
- rastni faktorji: aminokisliline, vitamini, purini, pirimidini.

Mikrohranila so potrebna v majhnih, a pomembnih količinah in so udeležena kot kofaktorji v številnih encimih in celičnih strukturah.

Organizme smo gojili v bazalnem mineralnem (BM) mediju.

Natančen pregled kemikalij, ki so bile uporabljene za pripravo medija (gojišča) (na liter), so naslednje:

- mononatrijev fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) 3,04 g + ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) 5,43 g;
- amonijev klorid (NH_4Cl) 0,3 g;
- natrijev klorid (NaCl) 0,3 g;
- kalcijev klorid ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) 0,11 g;
- magnezijev diklorid ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) 0,1 g;
- ekstrakti kvasa 2,0 g;
- resazurin (modro barvilo, uporabljeno kot oksidacijsko-redukcijski indikator) 1 mg;
- raztopina elementov v sledovih 1 ml;
- raztopina vitamina (DSM141) 1 ml;
- natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO_3) 0,8 g.

Raztopina elementov v sledovih (na liter) je bila sestavljena iz naslednjih kemikalij:

- železov diklorid ($\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$) 2,0 g;
- EDTA oziroma etilendiamintetraocetna kislina ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) 0,5 g;
- bakrov diklorid (CuCl_2) 0,003 g;
- borova kislina (H_3BO_3);
- cinkov klorid (ZnCl_2);
- Manganov (II) klorid tetrahidrat ($\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$);
- amonijev heptamolibdat ($(\text{NH}_4)_7\text{Mo}_7\text{O}_{24}$);
- aluminijev klorid (AlCl_3);
- kobaltov (II) klorid ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$);
- nikelj (II) klorid (NiCl_2);
- natrijev sulfid ($\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$) 0,3 g;
- klorovodikova kislina HCl 1 ml.

Raztopina vitaminov je vsebovala:

- biotin (vitamin B₇) -C₁₀H₁₆N₂O₃S, 2,0 mg;
- folno kislino (vitamin B₉) -C₁₉H₁₉N₇O₆, 2,0 mg;
- piridoksin-HCL (vitamin B₆) -C₈H₁₁NO₃, 10,0 mg;
- tiamin-HCL (vitamin B₁) -C₁₂H₁₇N₄OS⁺, 5,0 mg;
- riboflavine (B complex) -C₁₇H₂₀N₄O₆, 5,0 mg;
- niacinsko kislino (vitamin B₃) -C₆H₅NO₂, 5,0 mg;
- pantotensko kislino (vitamin B₅) -C₉H₁₇NO₅, 5,0 mg;
- kobalamin (vitamin B₁₂) -C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P, 0,1 mg;
- aminobenzojsko kislino C₇H₇NO₂, 5,0 mg;
- lipojsko kislino C₈H₁₄O₂S₂, 5,0 mg;
- destilirano vodo dH₂O 1 L.

Vse sestavine smo zmešali v erlenmajerico in kuhali na toplotni plošči, dokler se raztopina ni spremenila iz modre v rožnato barvo. Ko se je pripravljen medij ohladil (na sobni temperaturi), smo ohlajeno mešanico (cca. 11 ml) dodali v serumske stekleničke (25 ml). Za ustvarjenje anaerobnega okolja smo serumske stekleničke prepihovali z dušikom (N₂). Nazadnje smo jih tesno zaprli in jih dali v parni sterilizator oziroma avtoklav za enourno sterilizacijo (60 min) pri 121 °C in tlaku 1 bar.

Po parni sterilizaciji smo v serumske stekleničke dodali izvlečke alg. Te so bile sterilizirane s postopkom tindalizacije, ki se običajno uporablja za sterilizacijo gojišč. Serumske stekleničke so bile segrete dvakrat pri 90 °C za 60 minut. Vse druge komponente medija smo dodali ločeno s pomočjo filtra (0,45 µm) steriliziranih raztopin.

V serumske stekleničke smo po avtoklaviranju dodali 0,6 ml raztopine z vitamini in elementi v sledih, 0,25 ml 1 M glukoze ali 1 M manitola in 0,15 ml raztopine, ki je vsebovala cistein HCl (reducirno sredstvo, ki vsebuje žveplo-Na₂S), s sterilno bombažno vato (predhodno namočeno v etanol) in s filtrirno brizgo (Millex-GS 0,22 µm).

Vse inokulacijske zaloge sevov smo vzeli iz zamrznjenih (-20 °C) kultur s strogo degasiranim 30 % (v/v) glicerolom in reaktivirali na mediju (gojišču), ki je vseboval glukozo (20 mM). Reaktivirane kulture smo inokulirali (2 % v/v) iz eksponencialne rastne faze v 25-mililitrske serumske stekleničke (razmerje tekočina – plin 1 : 1). Kulture smo gojili sedem dni in pregledali tvorbo končnega produkta.

Vsi poskusi so bili izvedeni pri temperaturi 65 °C in pri pH 7,0 z razmerjem tekoče – plinske faze (L – G) 1 : 1, kjer je plinska faza sestavljena iz dušika. V vseh primerih so bili poskusi izvedeni v treh ponovitvah.

Delovna oprema:

- zaščitna oprema (laboratorijska halja, rokavice),
- laboratorijska steklovina,
- plinski kromatograf,
- pH-meter,
- avtoklav,
- pečica hot air (za sušenje algastega materiala),
- inkubator,
- spektrofometer; proizvajalca Bioscreen Inc. (sistem za samodejno analizo krivulje rasti mikroorganizmov),
- magnetna mešalnica,
- dispencer za gojišča,
- brezprašna komora,

- tehcnice (zelo natančne),
- inkubatorji,
- hladilniki,
- zamrzovalnik,
- termostatske vodne kopeli,
- mehanski mešalec,
- membranski filter,
- pomivalni stroj za pranje laboratorijske posode.

3.3 EKSTRAKCIJA MANITOLA

3.3.1 Vzorčenje in priprava alg

Rjave alge (več kilogramov) smo nabrali v letu 2015. *Ascophyllum nodosum* smo pridobili na obali, skrajno severno od Akureyrija, v juliju 2015. *Laminari digitata* smo prav tako pridobili na severu, vendar bližje kraja Husavik.

Zbrane vzorce rjavih alg smo prepeljali v laboratorij in na hitro oprali s hladno vodo (vodo iz pipe), nato se je material sušil v pečici pri 45 °C naslednjih 48 ur. Posušene alge smo potem zmleli v zelo fin prah z uporabo drobilnika na manj kot 2 µm. Ves fini material smo nato zaprli v nepredušne zaboje do nadaljnje uporabe.

3.3.2 Vpliv različnih pogojev ekstrakcije na pridobivanje manitola iz rjavih alg

Trdno – tekočo (S – L, v razmerju 1 : 1) ekstrakcijo manitola iz *A. nodosum* in *L. digitata* smo izvedli pri treh različnih temperaturah, in sicer pri 0, 25 in 50 °C, ter pri naslednjih koncentracijah klorovodikove kisline: 0, 50, 100 mM HCl. En gram predhodno zmletih alg smo položili v polipropilensko epruveto z 10 ml raztopine klorovodikove kisline (0, 0,05 M ali 0,1 M HCl), čemur je sledilo popolno mešanje pri 250 rpm (obrti na minuto) za 15 minut in pod kotom 45 stopinj. Ekstrakcijska raztopina je bila nato shranjena pri –40 °C za nadaljnjo analizo manitola, fenola in proteinov.

S tem postopkom smo želeli ugotoviti, kakšni pogoji bi bili potrebni za nadvse uspešno ekstrakcijo manitola. Nato smo nadaljevali z optimizacijo teh pogojev s kinetiko ekstrakcije, kjer smo imeli zelo podobne pogoje, vendar smo jih prilagodili na podlagi rezultatov prejšnjega eksperimenta (izvedenega pred tem).

Uporabljene analitične metode:

- **Določanje manitola:** Za analize smo uporabili kolometrično metodo, ki jo je opisal Sanchez (1998). Če povzamem, 25 µL razredčenega vzorca (manj kot 5 mM manitola) smo dodali na mikroplošče, na katerih je bilo danih 125 µL 500 mM natrijev format (pH 3,0) in 75 µL 5 mM periodične kisline (močan oksidacid). Dodali smo 75 µL sveže pripravljene reakcijske raztopine (100 mM acetilacetona, 2 M amonijevega acetata, 20 mM tiosulfata), vse na hitro premešali pri 150 rpm in nato 2 minuti inkubirali pri 100 °C na mikroplošči. Vzorce smo nato odčitali na spektrofometru-Bioscreenu C (Growth Curves Ltd., Finska) pri 412 nm proti slepemu vzorcu, pripravljenemu, kot je opisano, razen reakcijska raztopina je bila zamenjana za destilirano vodo, da se popravi barvna raztopina. Standarde smo pripravili z manitolom (kupljen pri dobavitelju) v koncentracijskem območju 0,5–5 mM.
- **Določanje fenolnih snovi:** Fenolne spojine so bile analizirane z uporabo kolometrične metode kjer smo prenesli 250 µL vzorca in 1,25 ml destilirane vode (dH₂O) na mikrotubo, v katero smo dodali še 125 µl Folin-Ciocalteu reagenta (zmes fosfatov, molibdatov in volframatov). Po 5 minutah smo dodali še 375 µL 20 % (mas./vol.) natrijevega karbonata (Na₂CO₃), nato pa še 500 µl destilirane vode (dH₂O) in inkubirali

pri sobni temperaturi za dve uri. Določanje celokupnih fenolov se določa spektrofotokemično pri 760 nm na spektrofotometru proizvajalca Shimadzu UV-1800 UV) s kvarčno kiveto ($l = 1$ cm). Kot standard smo uporabili galsko kislino (GAE: 0–100 $\mu\text{g/ml}$).

- **Določanje vsebnosti beljakovin/proteinov:** Beljakovine so bile analizirane z uporabo Kjeldahlove metode. Metoda določa vsebnost dušika v organskih in anorganskih snoveh. Zajema segrevanje vzorca pri 360–410 °C s koncentrirano žveplovo kislino (H_2SO_4), ki razgradi organski vzorec z oksidacijo, da se reducirani dušik sprosti kot amonijev sulfat.
- **Določanje maščob:** Za ekstrakcijo iz trdne zmesi smo uporabili Soxhletov aparat. Ekstrakcija maščob je potekala s heksanom.
- **Določanje pepela:** S sežigom vzorca pri 550 °C je bil pepel določen s tehtanjem preostanka.

3.3.2.1 Ekstrakcija manitola z uporabo večje količine biomase alg

Izvedli smo ekstrakcijo v večjem obsegu z namenom, da bi imeli več materiala za naslednji korak, in sicer proces fermentacije.

Uporabili smo 100 g vzorca rjavih alg, ekstrahirali z 1 L bodisi 50 mM HCl (*A. nodosum*) ali dH_2O (*L. digitata*) pri 200 rpm (obratih na minuto) za 10 minut pri 25 °C. Nadaljevali smo s centrifugiranjem pri 4700 rpm, za 15 minut pri 4 °C. Nato smo še dodali 10 g kalcijevega klorida (CaCl_2) za obarjanje prisotnega alginata in nastalo raztopino centrifugirali pri 4700 rpm in 4 °C za 15 minut. S pomočjo natrijevega hidroksida 12 M (NaOH), ki je izredno močna baza, smo uravnavali pH-raztopine »supertanta« na nevtralnem pH 7,0 in ga filtrirali (ločili od oborine) zaporedoma skozi najlonsko mrežo 53 in 5 μm . Ekstrakti so bili analizirani na vsebnost manitola in celotne fenole v štirih ciklih.

3.3.3 Določanje hitrosti ekstrakcije

Na osnovi rezultatov predhodnega poskusa smo ekstrahirali 10 g materiala alg (trije vzorci) s 100 ml ekstrakcijske raztopine (50 mM HCl za *A. nodosum* ali dH_2O za *L. digitata*). Vzorce smo nato zmešali pri 250 rpm in odstranili »supernatant« v 15 minutah skozi triminutne intervale, centrifugirali pri 13.000 rpm in vsebino shranili pri –40 °C, za nadaljnjo analizo manitola, fenolov in beljakovin.

3.4 ANAEROBNA FERMENTACIJA MANITOLA

3.4.1 Fermentacija ekstraktov manitola iz makroalg

Bazalni medij (gojišče) je bil pripravljen z redčenjem ekstraktov alg na ekvivalentno 20 mM manitola. Mediji so bili pripravljeni v 25-mililitrskih serumskih stekleničkah. Tlak in optično gostoto smo ponovno določili po 7 dneh inkubacije, kjer smo nato medije analizirani za končne produkte.

3.4.2 Določanje hitrosti fermentacije manitola in ekstraktov manitola iz makroalg s sevom *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus*

Thermoanaerobacter pseudoethanolicus smo gojili na manitolu (20 mM) in manitolnih ekstraktih iz makroalg (ekvivalentno 20 mM manitolu) v 125-mililitrskih serumskih steklenicah pri razmerju tekoče – plinske faze (L – G; 1 : 1). Vzorci so bili periodično odvzeti za analizo vodika in hlapnih končnih produktov, sprva vsake štiri ure, nato po 12 urah.

Poskus smo izvedli z namenom, da analiziramo in izmerimo hitrost fermentacije manitola ter ugotovimo, katere spremenljivke vplivajo na proces. To bi povečalo količino etanola in tudi ekstrakcijo manitola iz kelpa ter pri tem zmanjšalo čas, potreben za ekstrakcijo. Na ta način pa lahko hkrati postopoma preučujemo tudi dva različna postopka (fermentacijo manitola in ekstrakcijo manitola) z uporabo kinetičnega poskusa.

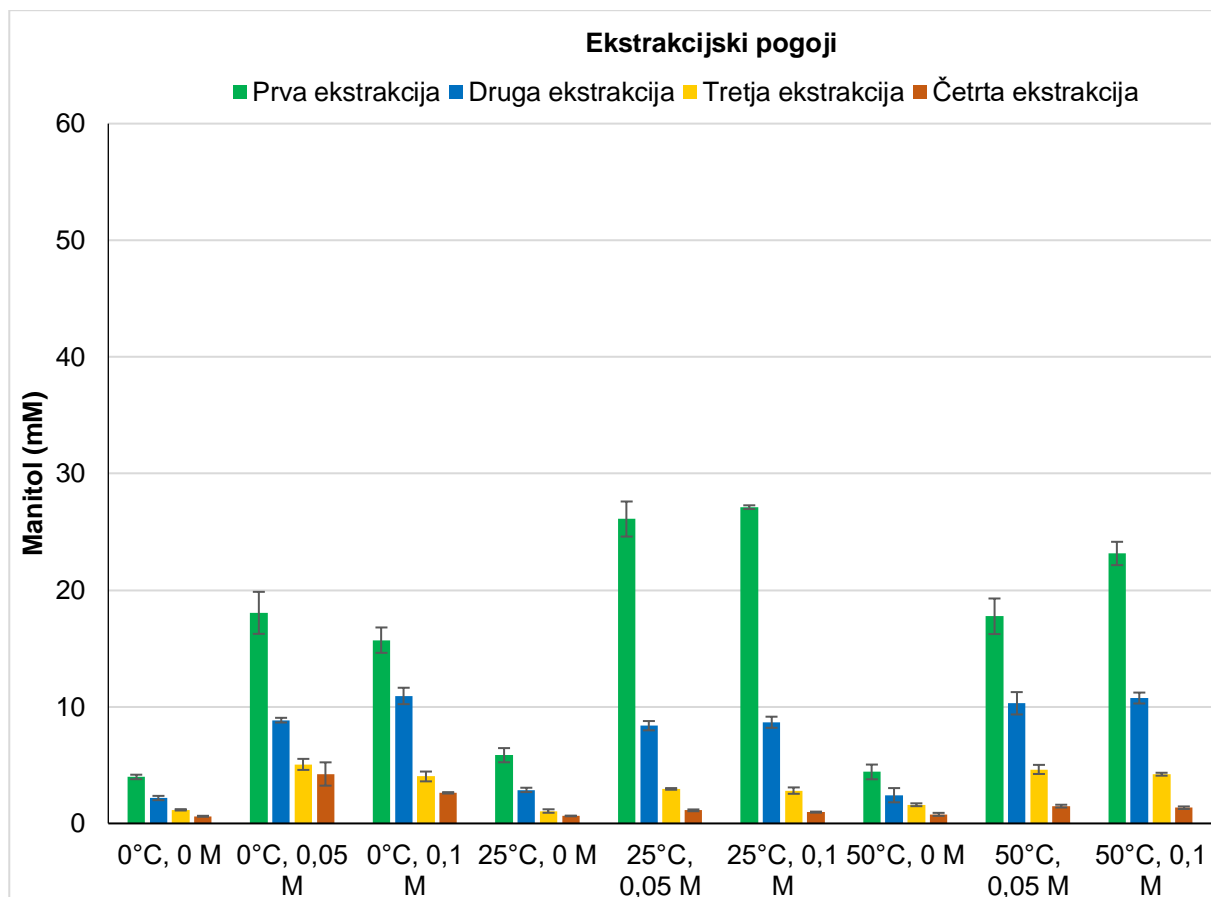
Uporabljene analitične metode:

- **Merjenje vodika:** Koncentracijo vodika (H_2) v steklenicah (s kulturami) smo izmerili s pomočjo plinskega kromatografa proizvajalca Chromatograph-Perkin Elmer, kot je opisano v publikaciji (Orlygsson in Baldursson 2007).
- **Merjenje alkoholov – etanol:** Analizirali smo s pomočjo plinskega kromatografa (plinska kromatografija (GC). GC (Gas chromatography) se uporablja za ločevanje hlapnih spojin, pri čemer mora biti zmes v plinastem stanju. V primeru, da spojina ni dovolj hlapna, jo je treba z analizo derivatizirati, kar spremeni funkcionalnost analitov. Hlapne maščobe kisline so bile pripravljene v treh paralelkah za vsak sev, z uporabo naslednjih sestavin: 200 μ L vzorca (predhodno centrifugiramo pri 13 000 vrt./min 3 minute), 100 μ L 0,1-odstotne w/v krotanske kisline, 100 μ L 25-odstotne v/v mravljinčne kisline, 600 μ L dH_2O .

4 REZULTATI

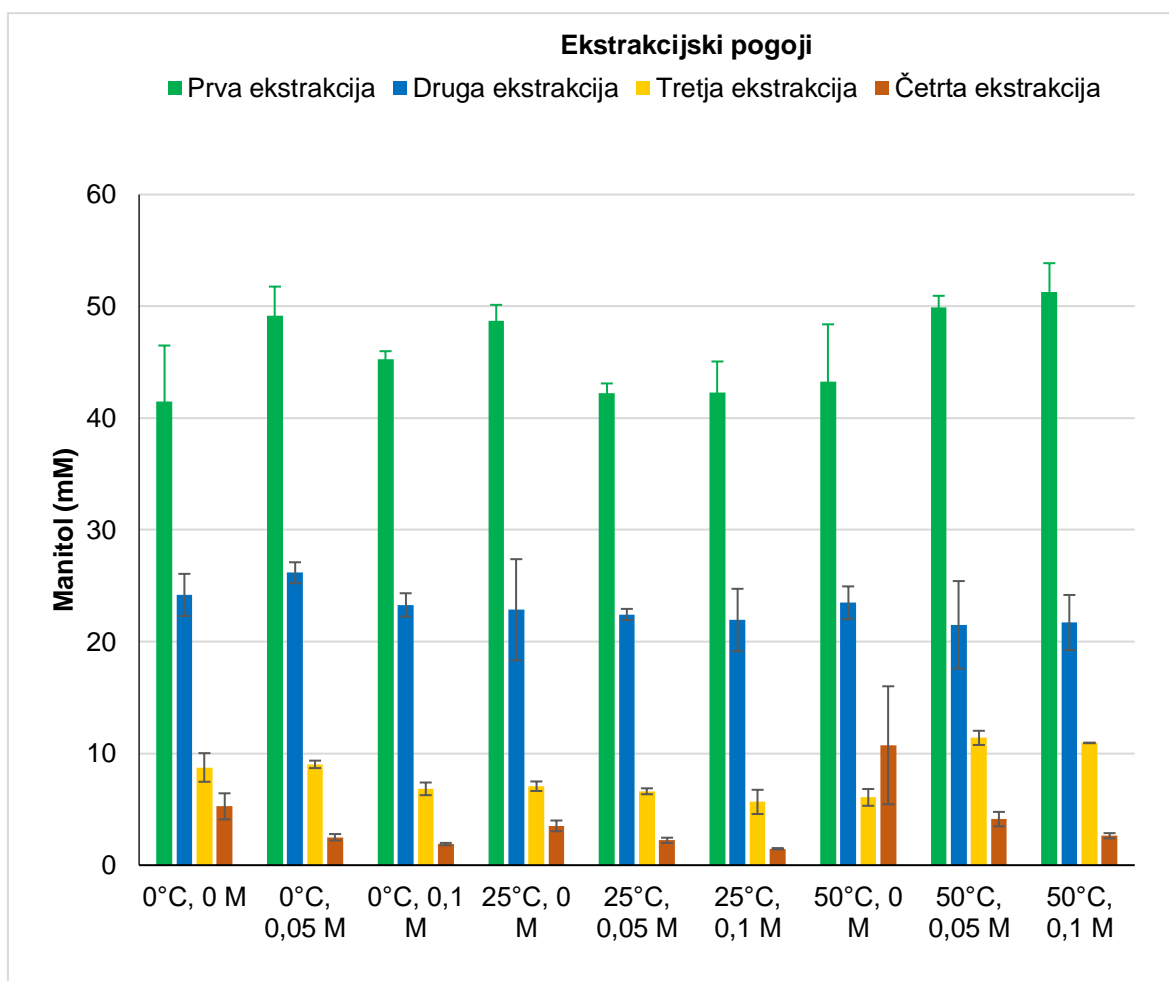
4.1 VPLIV EKSTRAKCIJSKIH POGOJEV NA DONOSE MANITOLA IZ RJAVIH MAKROALG

Ascophyllum nodosum in *Laminaria digitata* sta po štirih uspešnih krogih ekstrakcije (po centrifugiranju) bili vsakič analizirani. Rezultati ekstrakcije so se spreminjali s spremembo temperature. Najnižje koncentracije pridobljenega manitola so bile vedno pri nižjih temperaturah (0 °C) in najvišje pri 25 °C. Prvi krog ekstrakcije je prispeval najvišjo količino manitola (50 %). Z vsako nadaljnjo ekstrakcijo se je količina manitola zmanjševala. Skupna količina manitola, izločenega iz te makroalge, se je gibala med 7,95 in 39,6 mM (slika 8).



Slika 8: Zaporedna ekstrakcija (trdno-tekoča) manitola iz *Ascophyllum nodosum* pri različnih temperaturah in koncentracijah klorovodikove kisline (HCl)

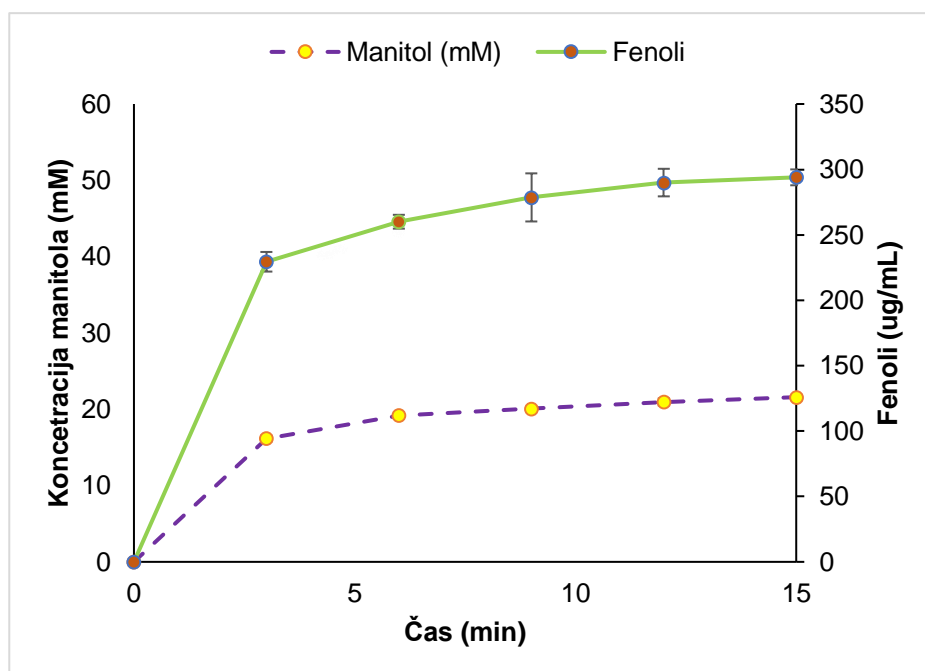
Koncentracija pridobljenega manitola pri *Laminaria digitata* je znašala od 71,3 do 86,9 mM (slika 9). Koncentracija manitola se je spreminjala veliko manj v odvisnosti od koncentracije HCl in temperature v primerjavi z *A. nodosumom*. Na podlagi rezultatov lahko trdim, da so bile ekstrakcije učinkovite. Manitol se je hitro ekstrahiralo s preizkušeni raztopinami (v prvih nekaj minutah). Največ manitola je bilo ekstrahirano s prvo ekstrakcijo (vsaka nadaljnja ekstrakcija (istega materiala) je pomenila manj manitola).



Slika 9: Zaporedna trdno-tekoča ekstrakcija manitola iz *Laminaria digitata* pri različnih temperaturah in koncentracijah klorovodikove kisline (HCl)

4.2 HITROST EKSTRAKCIJE MANITOLA

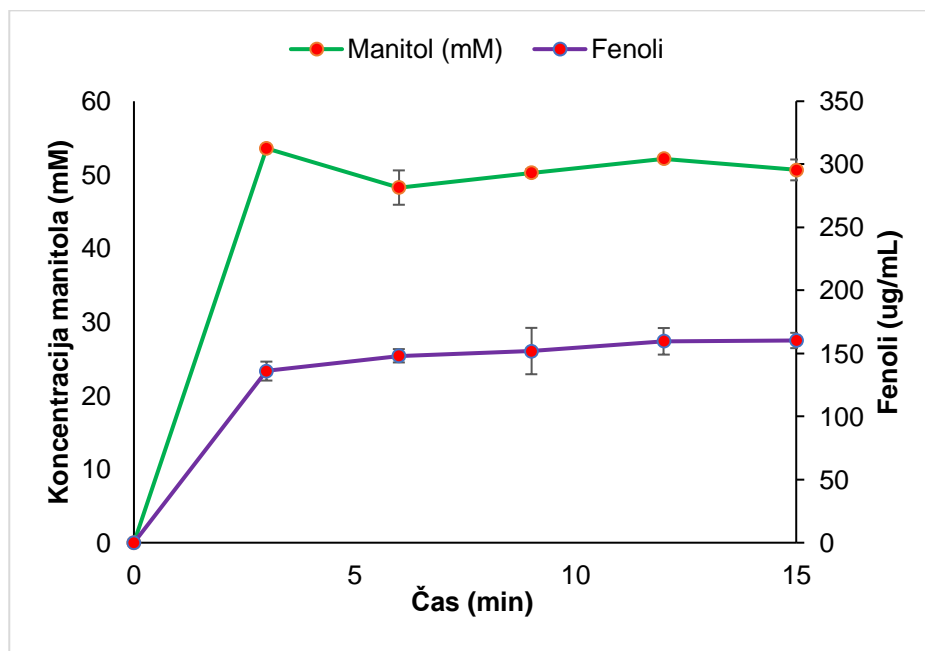
Za hitrost ekstrakcije manitola smo manitol in celotno vsebnost fenolov analizirali v 15-minutnem intervalu (pregled na vsake 3 minute), tako za *A. nodosum* (slika 10) kot za *L. digitata* (slika 11). Na slikah je prikazana koncentracija ekstrahiranega manitola in fenola v odvisnosti od časa. Za ta del diplomskega dela so bili izbrani točno določeni pogoji, in sicer temperatura, ki ni presegala 25 °C in 50 mM klorovodikove kisline (HCl). V tej analizi se galska kislina ($C_7H_6O_5$) uporablja kot standard za določanje vsebnosti fenola v dveh algah. V *A. nodosumu* je bilo sproščanje fenolov veliko večje od koncentracije pridobljenega manitola in precej hitro (v prvih dveh minutah), ko je bil dosežen maksimum pri približno 250 $\mu\text{g/ml}$ ekvivalenta galske kisline (GAE); nato se je upočasnila, dokler ni dosegla najvišje vrednosti (300 $\mu\text{g/ml}$ GAE) po približno 14 minutah. Navišja koncentracija manitola, ki je bila ekstrahirana je dosegla vrednost 15 mM po 3 minutah ekstrakcije. Fazi hitre ekstrakcije manitola sledi faza koncentracij, ki po 15 minutah ne presežejo večje koncentracije od 21 mM manitola.



Slika 10: Ekstrakcija manitola in fenolov iz *Ascophyllum nodosum* s koncentracijo 0,05 klorovodikove kisline (HCl) in pri temperaturi 25 °C

Pri *Laminaria digitata* (slika 11) je bila situacija ravno nasprotna, količine fenolov so bile veliko manjše. Prvi vrh so dosegli okoli 150 µg/ml po približno 2 minutah, sledil je precej stacionaren trend pred zaustavitvijo po 14 minutah pri vrednosti ekstrakcije 160 µg/ml.

Nasprotno pa je bil vrhunec sproščanega manitola dosežen po 3 minutah (kar dvakrat več kot *A. nodosum*), kar ustreza 54 mM. Nato se je začel zmanjševati v naslednjih dveh minutah in pol.



Slika 11: Ekstrakcija manitola in fenolov iz *Laminaria digitata* s koncentracijo 0 M klorovodikove kisline (HCl) in pri temperaturi 25 °C

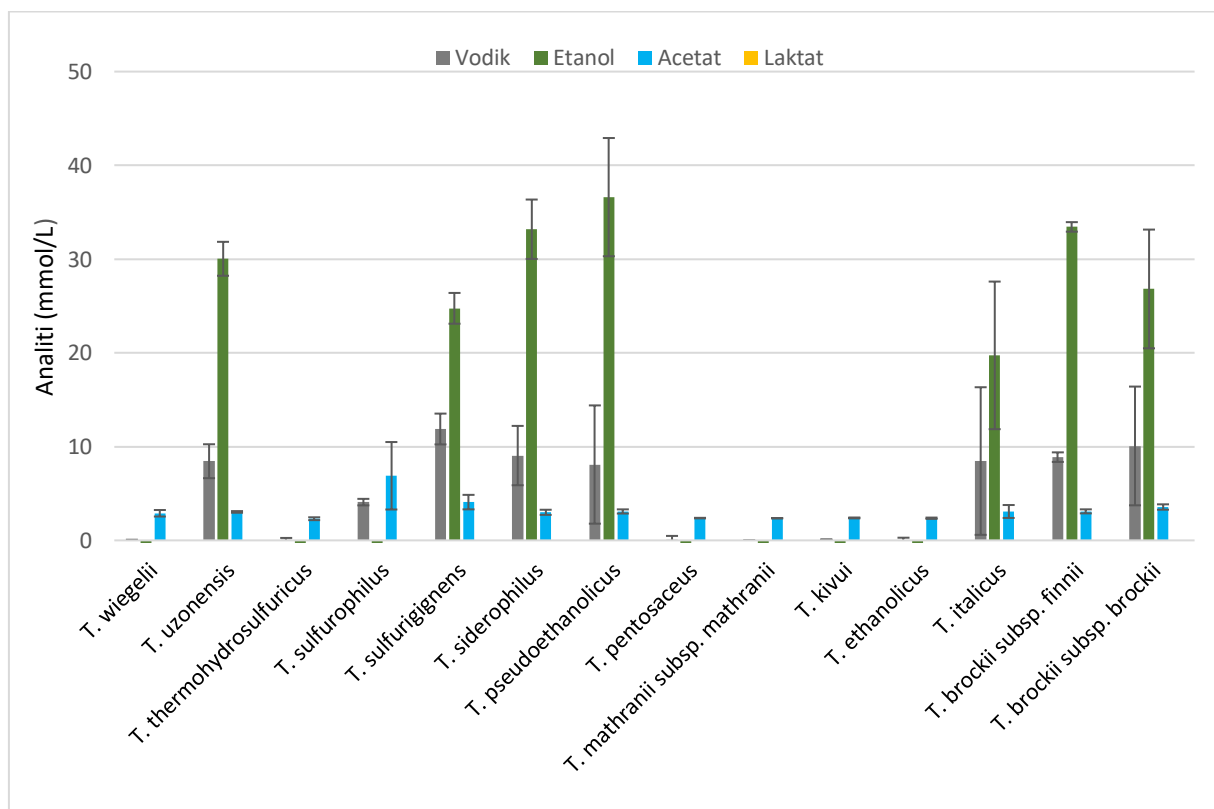
4.2.1 Ekstrakcija z uporabo večje količine biomase alg

Izvedena je bila tudi ekstrakcija manitola večjega obsega (100 g) v optimalnih pogojih (25 °C, 50 mM HCl), da smo dobili več materiala za nadaljnje delo. Rezultati so pokazali, da je prva ekstrakcija iz obeh alg dosegla najvišje koncentracije manitola pri 19,91 mM in 65,15 mM (*A. nodosum* in *L. digitata*). Za zmanjšanje viskoznosti smo dodali CaCl₂, da smo precipitirali koekstrahiran alginat.

4.3 FERMENTACIJA MANITOLA IN TVORBA ETANOLA Z RAZLIČNIMI SEVI RAZREDA CLOSTRIDIA

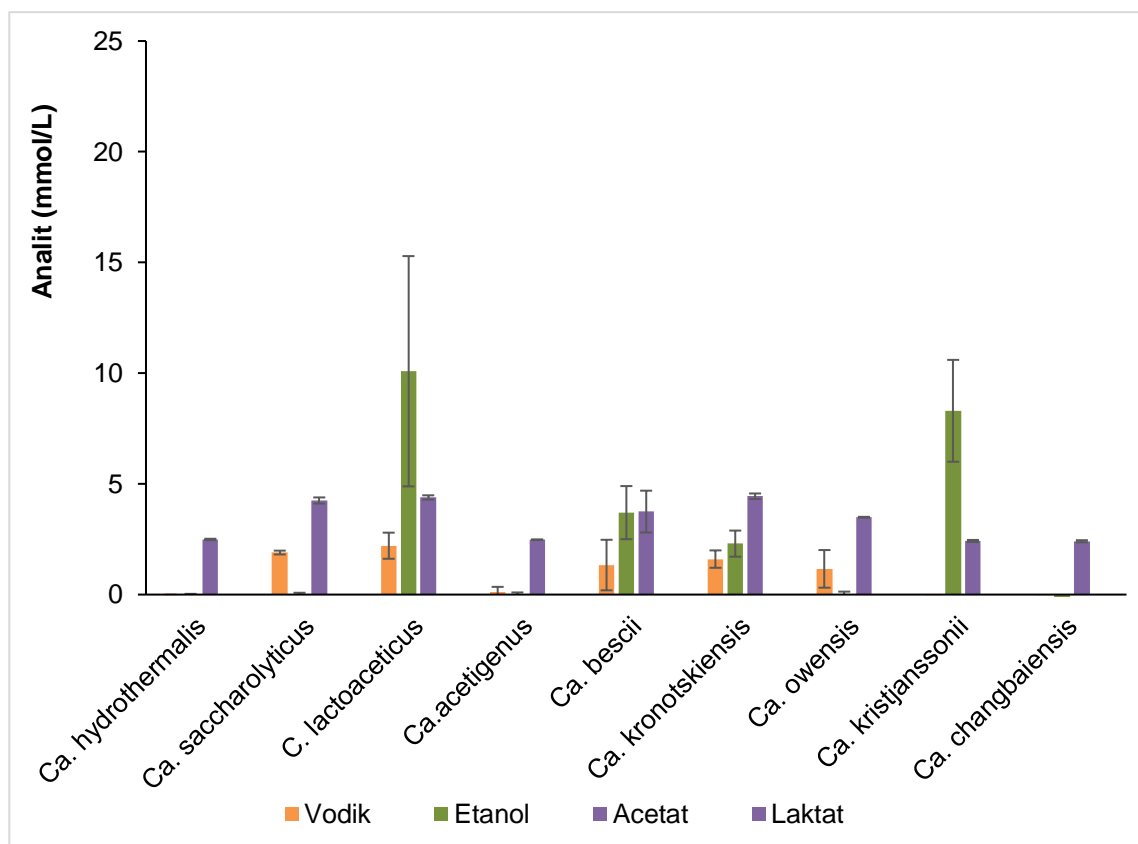
Izbranih je bilo 41 sevov razreda *Clostridia*. Vrste sevov termofilne *Clostridia* iz rodov *Thermoanaerobacter*, *Caldanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Caldicellulosiruptor* in *Thermobrachium* smo analizirali z uporabo 20 mM manitola kot edinega ogljikovega vira. Večina sevov, ki so bili pozitivni na uporabo manitola, je bila iz rodu *Thermoanaerobacter*. Med drugimi rodovi je bilo tudi znotraj teh nekaj pozitivnih, in sicer pri *Caldanaerobacter* (1 od 5 vrst) (slika 14), *Caldicellulosiruptor* (2 od 9, tako šibko pozitivni) (slika 13), *Thermoanaerobacter* (7 od 14) (slika 12) in *Thermoanaerobacterium* (1 od 7). *T. celere* in *Caldanaerobius* sevi niso koristili manitola. Sedem sevov, ki pripadajo rodu *Thermoanaerobacter* izkazuje sposobnost tvorbe visoke koncentracije etanola kot končni produkt fermentacije 20 mM manitola (slika 12), medtem ko je skoraj pri vseh drugih sevih nastajal acetat kot glavni končni produkt. Štirje sevi rodu *Thermoanaerobacter* so proizvedli več kot 30 mmol etanola in zelo malo očetne kisline ali mlečne kisline ali drugih snovi.

Sedem sevov (od 14) v rodu *Thermoanaerobacter* je proizvedlo visok delež etanola vse od 20 mM in več. Najvišji delež/izkoristek je dosegel sev *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* (35 mM) (slika 12).



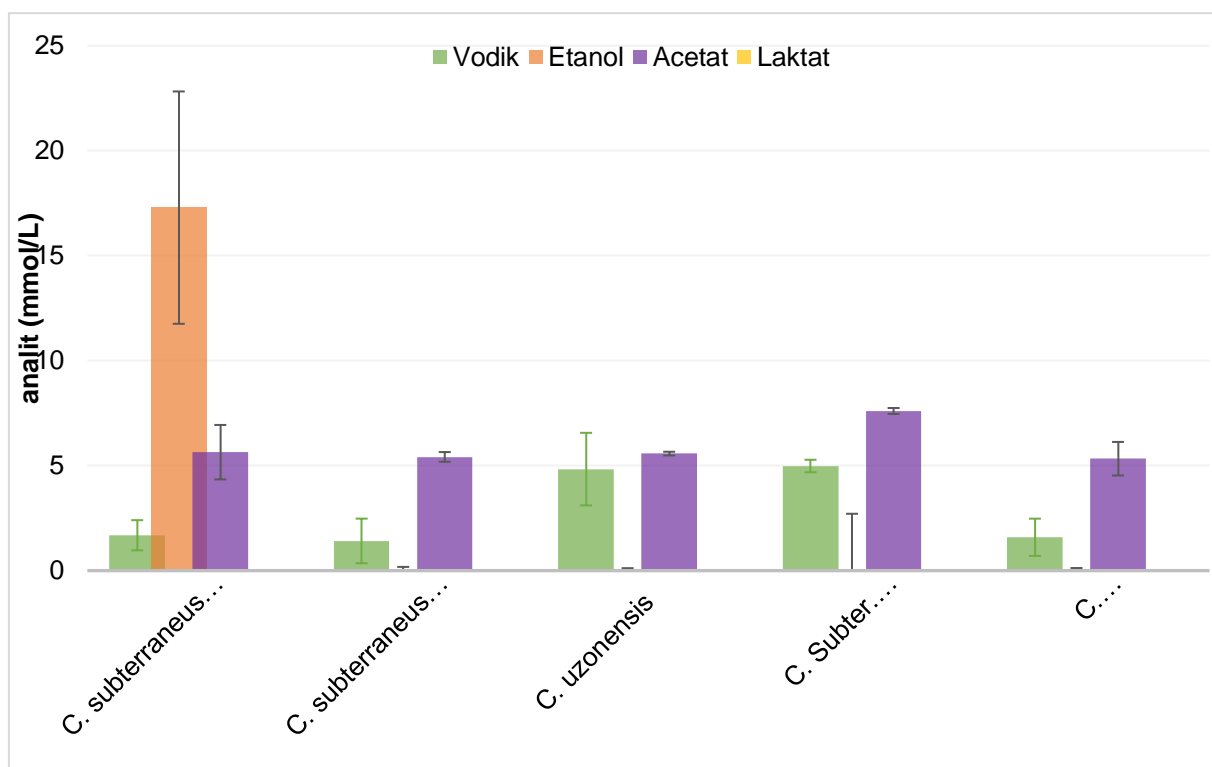
Slika 12: Tvorba končnih produktov iz 20 mM manitola s sevi iz rodu *Thermoanaerobacter* po petdnevem fermentiranju serije

Po petdnevem fermentiranju sta dva seva, *C. lactoaceticus* and *C. kristjanssonii* (iz rodu *Caldicellulosiruptor*), dokazala, da porabljata manitol za tvorbo končnega produkta etanola z naslednjimi koncentracijami: 10 mM in 8 mM, kar je enako 25 % in 20 % teoretičnega izkoristka za tvorbo etanola (slika 13).



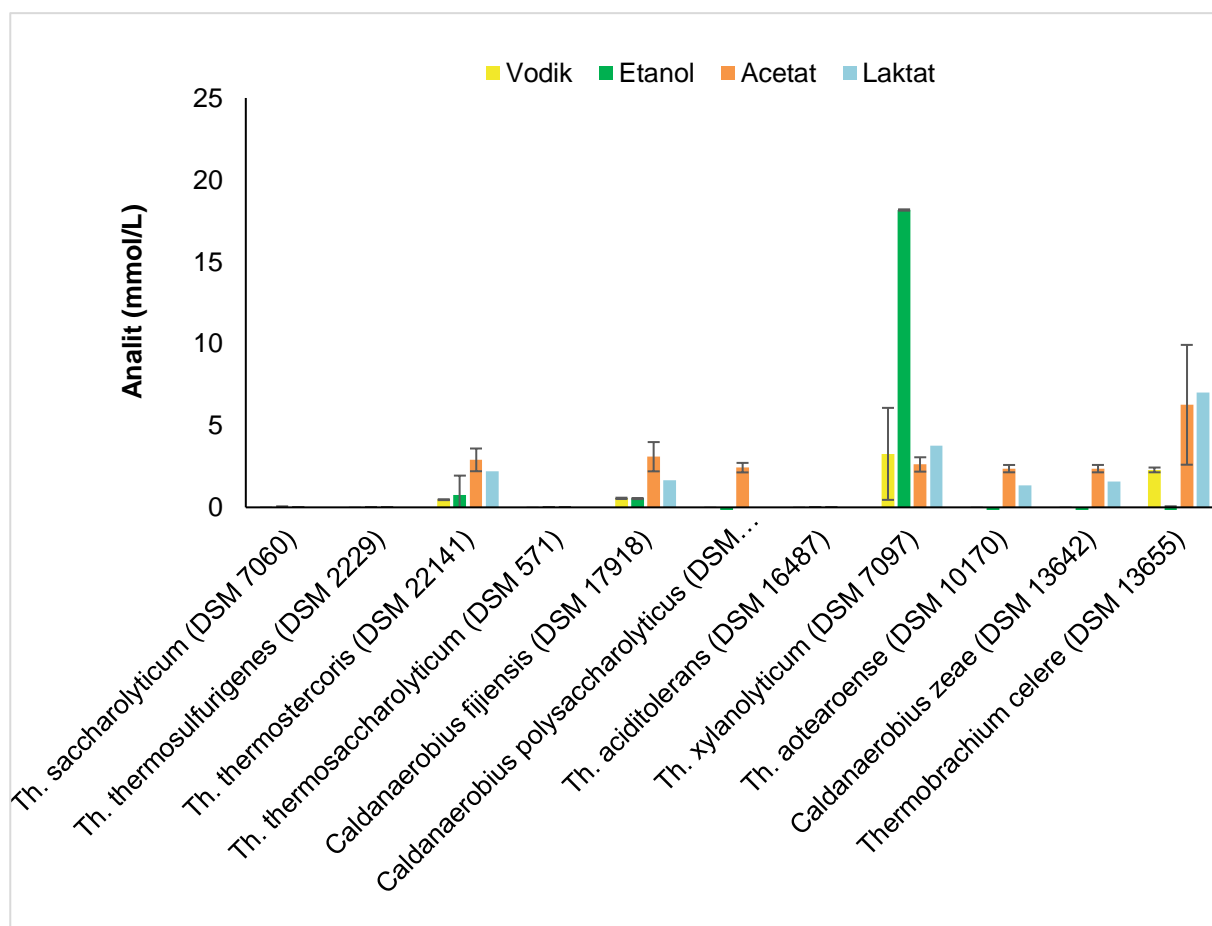
Slika 13: Tvorba končnih produktov iz 20 mM manitola s sevi iz rodu *Caldicellulosiruptor* po petdnevem fermentiranju serije

V rodu *Caldanaerobacter* je le *C. subterraneus subsp. Pacificus* povzročil nastanek okoli 17 mM/L etanola, kar ustreza 42,5 % teoretičnega izkoristka, medtem ko so pri vseh drugih sevih kot glavna končna produkta nastala bodisi vodik ali acetat (slika 14).



Slika 14: Tvorba končnih produktov iz 20 mM manitola seva *C. subterraneus subsp. pacificus* iz rodu *Caldanaerobacter* po petih dneh serijske fermentacije

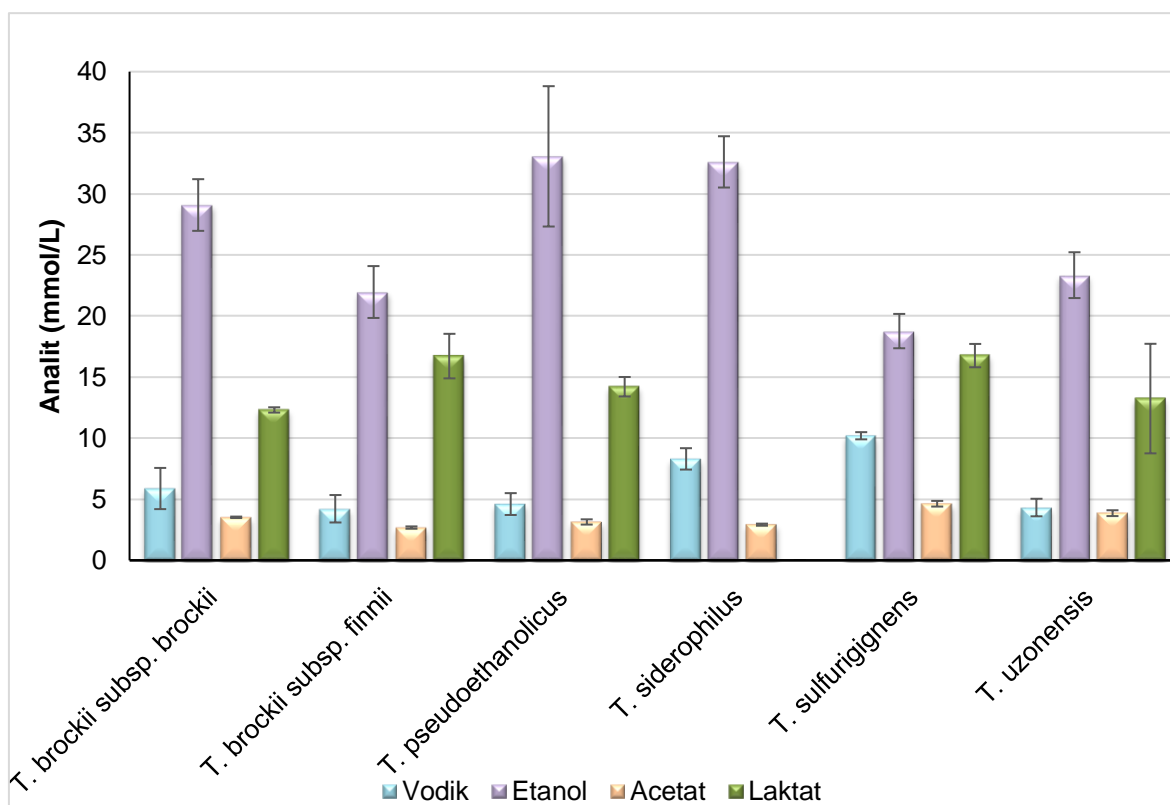
Sev *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* je bil edini iz rodu *Thermoanaerobacterium*, ki je proizvajal etanol kot končni produkt fermentacije (vendar koncentracija ni bila visoka, saj je bila le 18,2 mM), medtem ko so vsi sevi *Caldanaerobacter* in *Thermobrachium* proizvedli acetat ali pa ni bilo proizvodnje (slika 15).



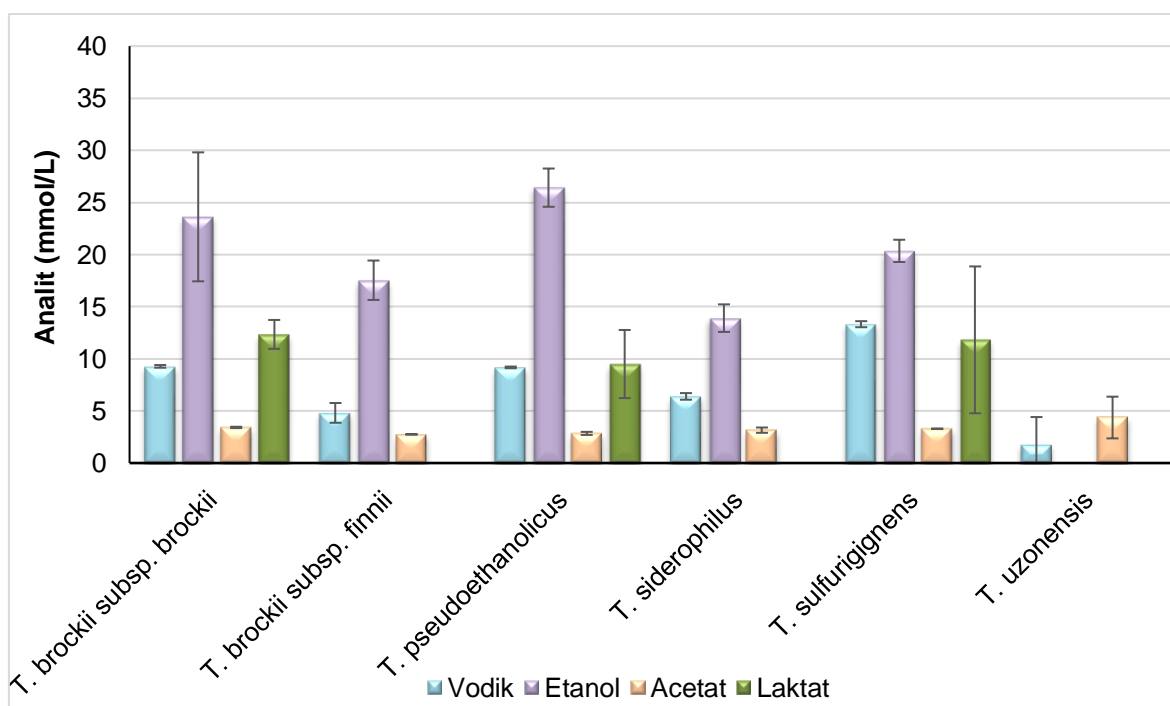
Slika 15: Tvorba končnih produktov iz 20 mM manitola s sevi *Thermoanaerobacterium*, *Caldanaerobius* in *Thermobrachium* po petih dneh serijske fermentacije

4.3.1 Fermentacija ekstraktov na makroalgah z izbranimi sevi

Seve, ki so bili bolj uspešni pri tvorbi končnega produkta na manitolu, smo gojili na ekstraktih dveh vrst rjavih alg, *Ascophyllum nodosum* in *Laminaria digitata*, razredčenih na koncentracijo, kot že omenjeno, ekvivalentno 20 mM manitola. Edini sevi, ki kažejo tvorbo končnega produkta iz ekstraktov, spadajo v rod *Thermoanaerobacter*. Pet vrst od šestih (*T. siderophilus*, *T. pseudoethanolicus*, *T. brockii* subsp. *Finnii*, *T. brockii* subsp. *Brockii* in *T. sulfurigignens*) je proizvedlo velike količine etanola iz obeh vrst makroalg. Ena vrsta seva, natančneje *T. uzonensis*, je proizvedel etanol le na ekstraktu alge *Ascophyllum nodosum* (slika 16). Donos etanola (če predpostavimo, da je pri tem manitol edini vir ogljika) na ekstraktu *A. nodosum* obsega med 52,5 % (*T. sulfurigignens*) do 92,3 % (*T. pseudoethanolicus*), pri fermentaciji ekstrakta *L. digitate* (slika 17) pa je bil teoretični donos etanola med 52,1 % (*T. sulfurigignens*) in 67,6 % (*T. pseudoethanolicus*) (Chades in sod. 2018).



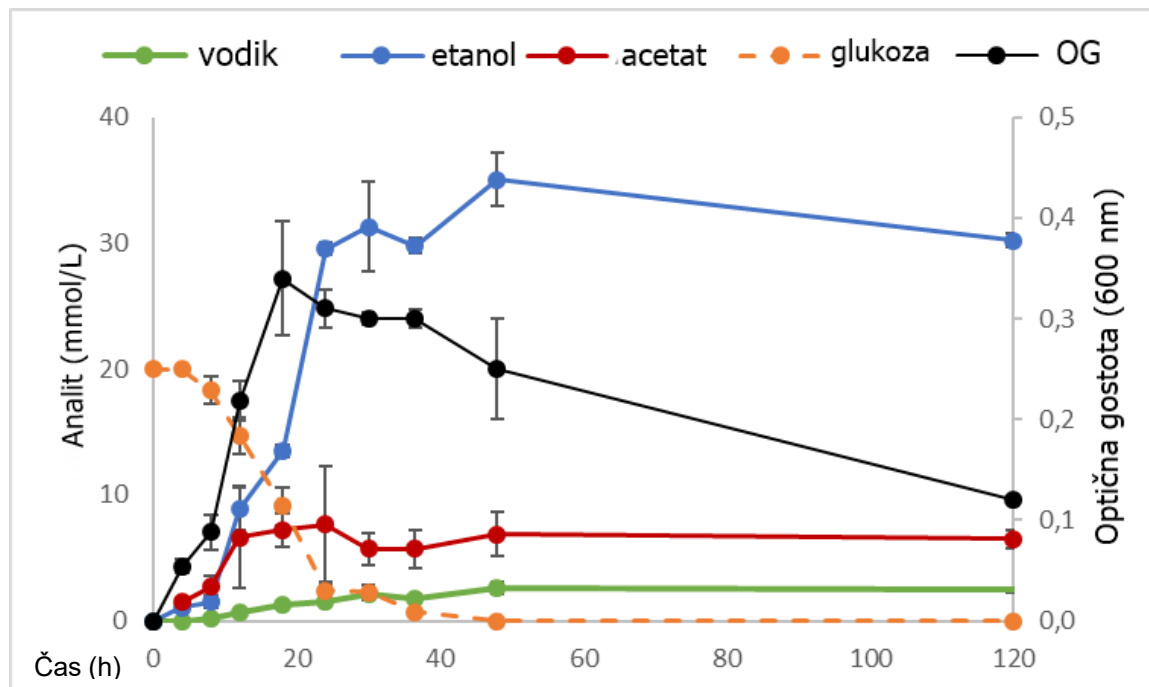
Slika 16: Fermentacijski produkti izbranih sevov rodu *Thermoanaerobacter* po petih dneh na ekstraktih *Ascophyllum nodosum*



Slika 17: Fermentacijski produkti izbranih sevov rodu *Thermoanaerobacter* po petih dneh na ekstraktih *Laminaria digitata*

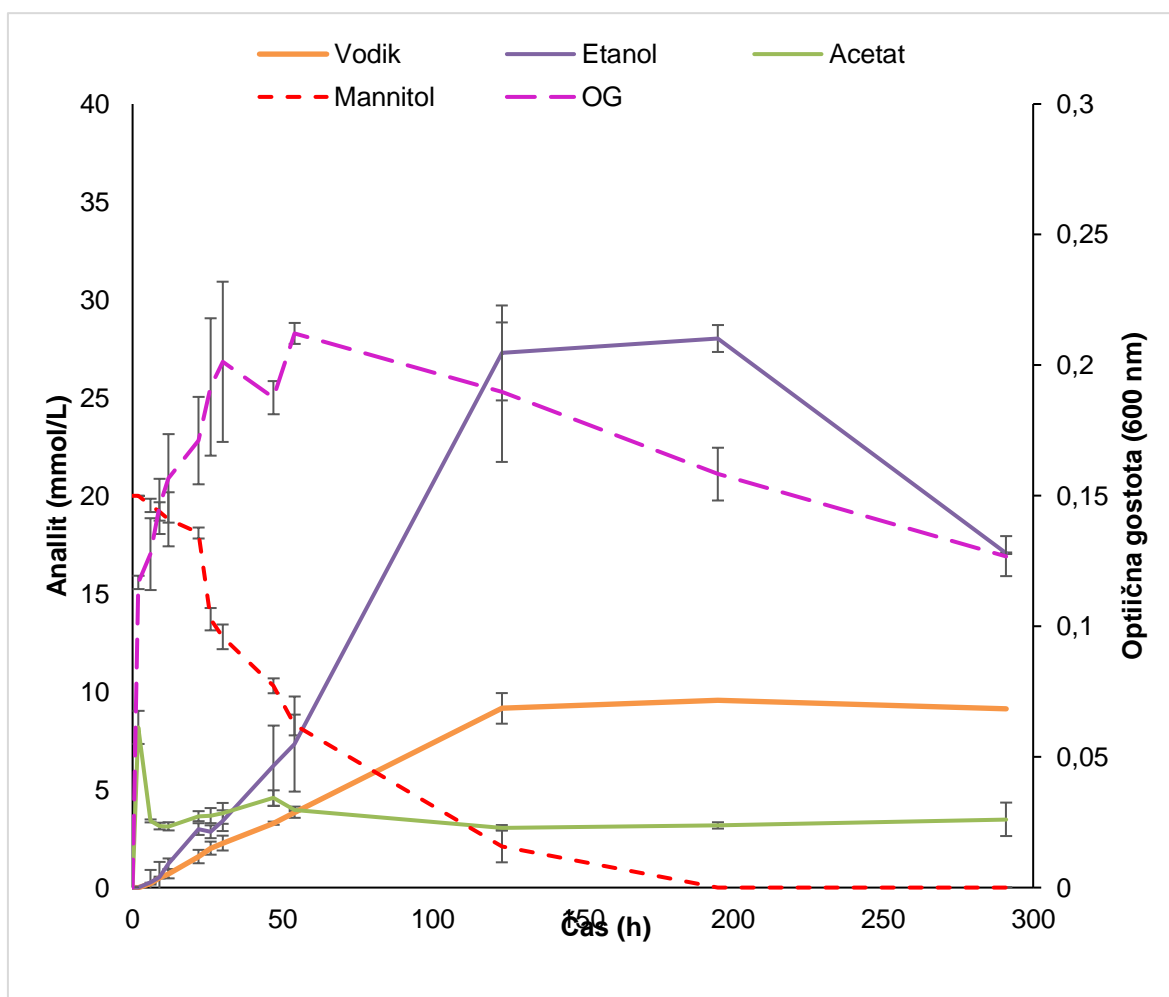
4.4 HITROST FERMENTACIJE ETANOLA S SEVOM *THERMOANAEROBACTER PSEUDOETHANOLICUS* (DSM 2355)

Da bi lahko rezultate lažje primerjali, smo najprej izvedli kinetični poskus na glukozi (slika 18) in manitolu (slika 19) in šele potem na izvlečkih rjavih alg (slika 20, 21).



Slika 18: Pretvorba glukoze v etanol s sevom *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* (DSM 2355) (Vir: Chades in sod. 2018, str. 1931)

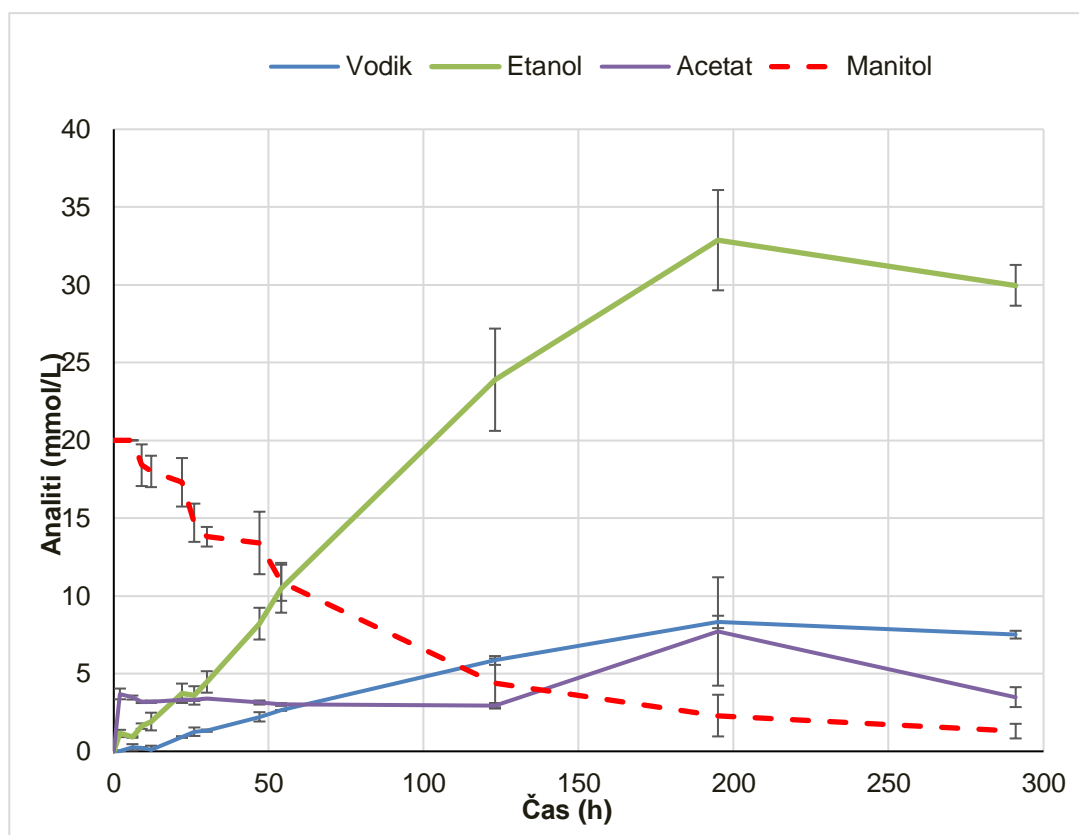
Sev *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* je pokazal, da dobimo najboljši izkoristek etanola (87,5 % teoretičnega) pri 20 mM manitola v prejšnjih poskusih, zato smo izvedli z izbranim sevom še kinetični poskus. Za boljšo primerjavo rezultatov je bil najprej izveden poskus samo na glukozi ($C_6H_{12}O_6$), ki je pokazal, da se glukoza hitro fermentira v etanol s sevom *T. pseudoethanolicus*, ki doseže približno 35 mM, kar je 87,5 % teoretičnega izkoristka po 48 urah (slika 18). Za nadaljnjo preiskavo fermentacije s to bakterijo so bili izvedeni še kinetični poskusi na manitolu (slika 19) in izvlečkih rjavih alg iz *Ascophyllum nodosum* (slika 20) in *Laminaria digitata* (slika 21).



Slika 19: Fermentacija manitola v etanol (20 mM) s sevom *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* (DSM 2355)

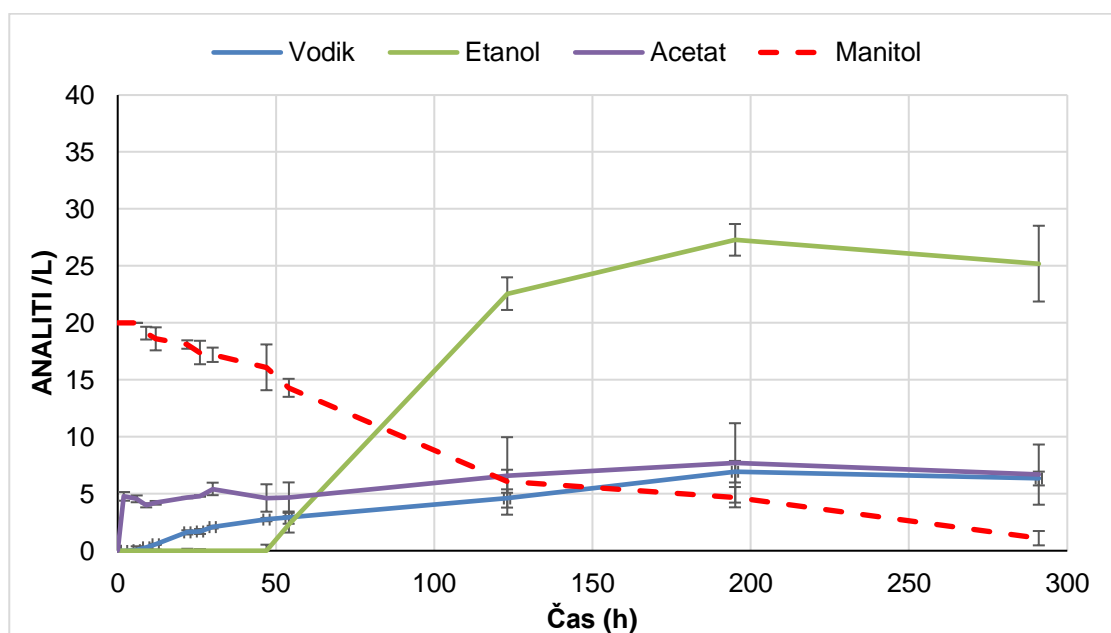
Na sliki 19 lahko vidimo fermentacijo manitola v etanol po komaj 110 urah. Količina etanola in vodika se je počasi, a zagotovo povečevala. V tem času smo dobili največji dejanski izkoristek etanola, 28.1 mM (po 123 urah), kar je 70 % teoretičnega izkoristka, nato pa se je koncentracija etanola po 190 urah spet povečala, preden se je dokončno zmanjšala.

Produkcija acetata na začetku kaže vrh s približno 8 mM, potem se je acetat spustil na 4 mM in se do konca ni spreminjal.



Slika 20: Fermentacija/razgradnja manitola v etanol na izvlečku rjave alge *Ascophyllum nodosum* s sevom *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* (DSM 2355)

Na sliki 21 (*Laminaria digitata*) lahko vidimo, da je acetat začel nastajati takoj in je bil najvišji začetni produkt, prav tako je bilo pri *Ascophyllum nodosum* (slika 20), potem se ni več spreminjal. Vodnik se je zelo počasi povečal in nato ohranil dokaj stabilen trend koncentracije pri obeh izvlečkih alg. Načeloma so bili med rastjo obeh ekstraktov dobljeni podobni rezultati, pri katerih je bil etanol končni produkt, acetat in vodnik sta ostala pod 10 mmol/L.



Slika 21: Razgradnja/fermentacija manitola v etanol na izvlečku rjave alge *Laminaria digitata* s sevom *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* (DSM 2355)

Na splošno so bili dobljeni visoki donosi etanola na ekstraktih *Ascophyllum nodosuma* (slika 20), med 18,8 in 33,1 mM, v primerjavi z ekstrakti *Laminaria digitata* (0,0–26,4 mM). Čas fermentacije manitola v etanol je bil na obeh izvlečkih rjavih alg dosežen po 195 urah.

Če primerjamo fermentacijo na izvlečku rjavih alg (slika 20, 21) in brez izvlečkov, torej samo na manitolu (slika 19), lahko opazimo, da je bila fermentacija v etanol počasnejša na izvlečkih rjavih alg. Razlog zato je verjetno to, da je bil manitol morda manj dostopen mikroorganizmom zaradi drugih spojin v vzorcu.

5 DISKUSIJA

5.1 KEMIČNA SESTAVA IN EKSTRAKCIJA MANITOLA IZ MAKROALG

Začetek eksperimenta oziroma vzorčenje se je začelo sredi poletja, saj je takrat vsebnost manitola v algah na samem vrhuncu. Zbrani vzorci alg, natančneje *Ascophyllum nodosum* in *Laminaria digitata*, so vsebovali ogljikove hidrate, katerih koncentracije so bile >70 % na suho maso z veliko frakcijo pepela. *Laminaria digitata* je vsebovala tudi manj kot 1 % maščobe, kar je nižje od normalne vrednosti, vendar bi jo lahko pripisali relativno nizki količini ekstrahiranega materiala alg (približno 10 g).

Manitol je bil ekstrahiran iz dveh vrst rjavih alg, *Ascophyllum nodosum* in *Laminaria digitata* (slika 8, 9), pod blagimi pogoji (poglavje 4.1). Med eksperimentom, spremljanje kinetike ekstrakcije manitola pod izbranimi pogoji, smo opazili, da so se največje koncentracije manitola ekstrahirale že v prvem ali drugem krogu ekstrakcije (v manj kot 5 minutah), zaradi zmanjševanja donosa manitola.

Rjava alga *Ascophyllum nodosum* s koncentracijo manitola v razponu 5–10 g na 100 g suhe snovi, je pokazala nižje donose manitola, medtem ko je *Laminaria digitata*, ki je imela koncentracijo manitola v sezoni od 3 do 21 % suhe teže, veliko večji izkoristek ekstrakcije.

Vendar pa rezultati ekstrakcije manitola niso povezani samo z začetno količino manitola v dveh algah, temveč so povezani tudi s količino karbolne kisline (fenol), ki jo sestavljajo, saj lahko večja količina fenolov povzroči upočasnevanje procesa oziroma ga le-ta zavira.

Med dvema algama se je *Laminaria digitata* izkazala kot bolj primeren in učinkovit substrat za ekstrakcijo manitola v primerjavi z *Ascophyllum nodosum*.

5.2 DOLOČANJE USTREZNOSTI BAKTERIJSKIH SEVOV ZA FERMENTACIJO MANITOLA

Pri tej fazi eksperimenta so bili izbrani naslednji termofilni klostridiji: *Thermoanaerobacter*, *Caldanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Caldicellulosiruptor*, *Caldaerobius*, *Thermobrachium* in *Caloramator*. Glede na pridobljene podatke iz samega eksperimenta smo prišli do zaključka, da je uporaba manitola bolj kot ne omejena predvsem na rodove *Thermoanaerobacter*. Nekateri sevi *Caldicellulosiruptorja* so sicer pokazali šibko pozitivne rezultate, a je bilo vseeno premalo za večje donose etanola.

Dobitke etanola pri presejanju smo primerjali s teoretičnim donosom etanola iz manitola, izhajajoč iz enačbe: 1 mol glukoze ($C_6H_{12}O_6$) \rightarrow 2 mol CO_2 + 2 mol etanol (C_2H_6O), iz katere izhaja, da mora iz 20 mM glukoze (ali manitola) nastane 40 mol etanola.

Torej je teoretični izkoristek etanola:

$$\frac{20 \text{ mmol glukoze}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{2 \text{ mmol etanola}}{1 \text{ mmol glukoze}} = \frac{40 \text{ mmol etanola}}{1 \text{ L}} \text{ (ali 40 mM).}$$

Če naredimo poskus, v katerem fermentira 20 mM glukoze, in na koncu eksperimenta izmerimo, da nastane 35 mM etanola, lahko izračunamo odstotek teoretičnega izkoristka, kot sledi:

% teoretični izkoristek = (izmerjena koncentracija) / (teoretični izkoristek) 100 %

$$\% \text{ teoretični izkoristek} = \frac{\text{izmerjena koncentracija}}{\text{teoretični izkoristek}} \cdot 100 \%$$

V tem primeru je odstotek teoretičnega izkoristka etanola:

$$\% \text{ teoretični izkoristek} = \frac{35 \text{ mM}}{40 \text{ mM}} \cdot 100 \% = 87,5 \%$$

V tem pogledu je bil najvišji dejanski izkoristek etanola okoli 35 mM/L, kar je 87,5 % teoretičnega donosa etanola, dosežen s sevom *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus*, kar je dober rezultat.

5.3 FERMENTACIJA MANITOLA V EKSTRAKTIH MAKROALG Z IZBRANIMI SEVI TERMOFILNIH ANAEROBNIH BAKTERIJ

Nekateri sevi rodov *Caldicellulosiruptor*, *Caldanaerobacter* in *Thermoanaerobacterium* so imeli pozitivno rast ob nastajanju končnega produkta na manitolu, vendar na naše presenečenje niso uporabili ekstraktov, ki vsebujejo manitol pridobljen iz *Ascophyllum nodosum* ali *Laminarie digitata*. Vendar smo dobili pozitivne rezultate pri rodu *Thermoanaerobacter*, kjer je pet sevov proizvedlo etanol na ekstraktih iz dveh omenjenih rjavih alg. Najvišjo koncentracijo etanola, 33,1 mM, smo pridobili s sevom *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* na izvlečkih *Ascophyllum nodosum*. Na splošno so bili višji donosi etanola pridobljeni pri ekstraktih *Ascophyllum* (med 18,8 in 33,1 mM) v primerjavi z ekstrakti *Laminarie digitata* (0,0–26,4 mM). Jasno je, da je najboljši rod *Thermoanaerobacter*, ki je proizvedel več kot 30 mM etanola iz ekstraktov makroalg, ki vsebujejo 20 mM manitola.

Pri fermentaciji manitola so *Thermoanaerobacter* in še posebej sevi *T. uzonensis*, *T. sulfurigignens*, *T. siderophilus*, *T. pseudoethanolicus*, *T. italicus*, *T. brockii* subsp. *finnii* in *T. brockii* subsp. *Brockii* (7 sevov od 14) pokazali, da imajo boljše sposobnost kataboliziranja manitola v etanol kot drugi rodovi in sevi. Drugi sevi so bili dokaj neuspešni pri proizvodnji etanola in so namesto tega imeli večji donos acetata ali vodika.

Pri kinetičnem poskusu smo ugotovili, da je bila fermentacija v etanol na izvlečkih rjavih alg (*Laminaria digitata* in *Ascophyllum nodosum*), ki so vsebovali manitol, počasnejša v primerjavi s fermentacijo brez izvlečkov rjavih alg in samo na manitolu. Razlog za to je verjetno ta, ker manitol ni bil tako dostopen mikroorganizmom zaradi drugih spojin v matrici vzorca.

Izhajajoč iz predpostavke, da so izbrani sevi dobri proizvajalci etanola in če le-ti rastejo na sladkorju, kot je manitol, bi to moralo povzročiti tvorbo reduciranega končnega produkta, kot je etanol. Ker je bil končni produkt analiziran po petih dneh, je možno, da so nekateri sevi pokazali zapozneno tvorbo etanola, kot je bilo to opaziti v kinetičnih poskusih s *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus*, s čistim manitolom in manitolom iz izvlečkov alg. Manjše količine končnih produktov na ekstraktih alg, ki so vsebovale manitol, so lahko posledica inhibicijskih pojavov iz ko-ekstrahiranih soli ali drugih inhibitorских spojin (slika 19, 20, 21). Počasna razgradnja manitola s *T. pseudoethanolicus* je lahko problematična za komercializacijo proizvodnje bioetanola iz makroalg. Meritev optične gostote med temi fermentacijami ni bila možna zaradi zelo motne narave ekstraktov alg.

6 ZAKLJUČEK

Na osnovi eksperimentov smo prišli do različnih ugotovitev, med drugim, da je bakterija iz rodu *Clostridia* zaradi svoje posebne fiziologije in metabolične poti, obetavni kandidat za fermentacijo manitola, ki je dober substrat za nadaljnjo proizvodnjo etanola. Manitol je torej potencialno primeren vir ogljika na področju pridobivanja tretje generacije bioetanola.

Na začetku diplomskega dela smo si zastavili tri hipoteze, in sicer sem predvidevala, da bo ekstrakcija manitola (izvedena pod istimi pogoji v obeh primerih alg) učinkovitejša pri vrsti rjave alge *Lamniaria digitata* kot pa pri vrsti *Ascophyllum nodosum*. To hipotezo lahko potrdim, kar lahko vidimo pri grafičnem prikazu (slika 8, 9). Alga *Laminaria digitata* je v končni fazi imela večji (skupni) donos manitola (med 72 mM in 86 mM) in manj fenolov (okoli 100 µg/ml). Prvi krog ekstrakcije je prispeval več kot 50 % ekstrahiranega manitola, z vsako nadaljnjo ekstrakcijo se je manitol zmanjševal. Situacija je bila precej nasprotna pri rjavi algi *Ascophyllum nodosum*, kjer je bilo ekstrahiranega manitola vedno manj kot 40 mM (med 7 mM in 39,6 mM) in veliko več fenolov (okoli 300 µg/ml). Na splošno se je izkazalo, da je ekstrakcija manitola relativno lahka, hitra, mogoča v blagih pogojih in predvsem ekonomsko izvedljiva.

Z drugo hipotezo sem predvidevala, da bo rod *Caldanaerobacter* tisti, ki se bo izmed vseh drugih petih rodov (*Caldicellulosiruptor*, *Thermoanaerobacter*, *Thermobrachium*, *Caldanaerobius* in *Thermoanaerobacterium*) najbolje prilagodil pogojem in bo kataboliziral manitol v etanol. S tretjo hipotezo sem pa predvidevala, da bo bakterija *C. subterraneus subsp. pacificus* imela boljši izkoristek v primerjavi z ostalimi uporabljenimi bakterijami (*C. subterraneus subsp. subterraneus*, *C. Uzonensis*, *C. Tengcongensis*, *C. subter. subsp. Yonseiensis*) iz rodu *Caldanaerobacter*. Ti dve hipotezi lahko zavržem, vendar ne v celoti; dokazali smo namreč, da so bili najboljši sevi, ki so sposobni katabolizirati manitol v etanol, iz rodu *Thermoanaerobacter*, v padajočem vrstnem redu: *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus*, *T. brockii subsp. finni*, *T. siderophilus*, *T. uzonensis*, *T. brockii subsp. brockii*, *T. sulfurigignens* in *T. italicus*. *T. pseudoethanolicus* je bil najboljši proizvajalec etanola, tako iz čistega manitola kot iz biomase makroalg. Natančneje, najvišji dejanski donos etanola okoli 35 mM/L, to je 87,5 % teoretičnega donosa etanola, je ustvaril sev *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus*. Vendar pa je tudi sev *C. subterraneus subsp. pacificus*, edini iz rodu *Caldanaerobacter*, povzročil minimalno sproščanje etanola okoli 17 mM/L, kar ustreza 42,5 % teoretičnega izkoristka (slika 14).

Uporaba manitola kot potencialnega fermentabilnega sladkorja je s širšega vidika precej ugodna, saj se lahko v procesu ekstrakcije iz morskih alg izolirajo številne druge gospodarsko pomembne spojine in hranila, kot so: alginati, laminarin in fenoli. Drugi stranski produkti (vitamini in minerali v sledovih itd.) imajo številne gospodarske namene. Glede uporabe morskih alg za proizvodnjo bioetanola lahko trdim, da ima številne potencialne koristi, saj bi na ta način lahko zmanjšali ali pa skoraj v celoti odpravili nekatere negativne vplive na okolje (npr: krčenje gozdov, zmanjšanje biotske raznovrstnosti (samo v primeru lastnega kultiviranja v prirejenih sistemih), uporaba FFS-jev/pesticidov), ki jih povzročamo z uporabo drugih klasičnih goriv/energije. Seveda je še prezgodaj, da bi v celoti ocenili vse okoljske, socialne ali gospodarske vplive obsežne proizvodnje biogoriv tretje generacije v praksi; še veliko dela in dodatnih študij bo potrebno za to, da bo ta vrsta biogoriv postala globalna praksa z čim manjšim vplivom na okolje.

7 SUMMARY

Based on the experiments, we have reached different conclusions; due to their specific physiology and metabolic pathway that allows them to consume this specific carbohydrate, thermophilic clostridia are a promising candidate for the fermentation of mannitol, which is a fairly good substrate for further ethanol production. Mannitol is a potentially suitable source of carbon in the third-generation ethanol biomass.

At the beginning of the research, we made two hypotheses; we assumed that the type of brown algae *Lamniaria digitata* would be more suitable for the extraction of mannitol, having a higher yield compared to algae *Ascophyllum nodosum*. This hypothesis can be confirmed, as it is evident in the graphic display; figures 8 and 9. Algae *Laminaria digitata* had ultimately higher yields of mannitol (between 72 mM and 86 mM) and fewer phenols (about 100 µg/mL); the situation was reversed with the algae *Ascophyllum nodosum*, where the concentration of the extracted mannitol was always lower than 40 mM (between 7 mM and 39,6 mM), but it contained a much higher concentration of phenols (about 300 µg/mL). In general, mannitol extraction has been proved to be relatively easy, quick and possible in mild conditions and, above all, economically feasible.

Our second hypothesis assumed that the genus *Caldanaerobacter* would adapt to the conditions the most successfully, compared to all other five genera (*Caldicellulosiruptor*, *Thermoanaerobacter*, *Thermobrachium*, *Caldanaerobius* and *Thermoanaerobacterium*) and that it would catabolize mannitol into ethanol. Our third hypothesis stated that the bacterium *C. subterraneus subsp. pacificus* would have a higher yield of ethanol than other bacteria from the genus *Caldanaerobacter* (*C. subterraneus subsp. Subterraneus*, *C. Uzonensis*, *C. Tengcongensis*, *C. subter. subsp. Yonseiensis*). These two hypotheses can be rejected, but not entirely; we proved that the best strains capable of catabolizing mannitol into ethanol were from the genus *Thermoanaerobacter* in the descending order: *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus*, *T. brockii subsp. Finnii*, *T. siderophilus*, *T. uzonensis*, *T. brockii subsp. brockii*, *T. sulfurigignens* and *T. italicus*. *T. pseudoethanolicus* was the most successful producer of ethanol, both from pure mannitol and from macroalgae biomass. More specifically, the highest ethanol yield—about 35 mM/L, i.e. 87.5 % of the theoretical yield of ethanol—was produced by the strain *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus*. However, a strain of *C. subterraneus subsp. Pacificus*, the only one from the genus *Caldanaerobacter*, produced a minimal ethanol release—about 17mM/L—, which corresponds to 42.5 % of theoretical efficiency (figure 14).

The use of mannitol as a potential fermentable sugar is quite favourable from a broader point of view, as many other economically important compounds and nutrients, such as alginates, laminarin and phenols, can be isolated from seaweed during the extraction process. Other by-products (trace minerals and vitamins, etc.) have many economic uses. The use of marine algae for the production of bioethanol is said to have numerous potential benefits, since it could reduce or almost completely eliminate certain negative environmental effects (for example: deforestation, reduction of biodiversity, use of pesticides) caused by using other conventional fuels or energy. Obviously, it is too early to entirely assess all environmental, social or economic impacts of the extensive production of third-generation biofuels in practice. What is more, plenty of work and additional studies will still be needed to make this type of biofuels a global practice and to make everything as environmentally friendly as possible.

8 LITERATURA IN VIRI

A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in ireland. 2009. Medmrežje: http://www.fao.org/uploads/media/0902_SEI_-_A_Review_of_the_Potential_of_Marine_Algae.pdf (5. 11. 2018)

Aberg, P. (1992). Size-based demography of the seaweed *Ascophyllum nodosum* in stochastic environments. *Ecology*, 73 (4), str. 1488–1501.

Akcijski načrt za obnovljive vire energije. Medmrežje: <http://www.energetika-portal.si/dokumenti/strateski-razvojni-dokumenti/akcijski-nacr-za-obnovljivo-energijo/> (3. 11. 2018)

Arts, M. T., Brett, M. T., Kainz, M. (2009). *Lipids in aquatic ecosystems*. London, Springer Science & Business Media.

Ascophyllum nodosum (L.) Le Jolis. Medmrežje: http://www.seaweed.ie/descriptions/ascophyllum_nodosum.php (10. 12. 2018)

Ashton, D. H. (1981). Thermophilic organisms involved in food spoilage: Thermophilic anaerobes not producing hydrogen sulfide. *Journal of Food Protection*, 44 (2), str. 146–148.

Behrens, P. W., Kyle, D. J. (1996). Microalgae as a source of fatty acids. *Journal of Food Lipids*, 3 (4), str. 259–272.

Bruins, M. E., Janssen, A. E., Boom, R. M. (2001). Thermozyms and their applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90 (2), str. 155.

Brust, J. (2010). Ethanol and cognition: indirect effects, neurotoxicity and neuroprotection: a review. *International journal of environmental research and public health*, 7 (4), str. 1540–1557.

Bullis, K. 2007: Algae-based fuels set to bloom. Medmrežje: <https://www.technologyreview.com/s/407268/algae-based-fuels-set-to-bloom/> (23. 11. 2018)

Canganella, F., Wiegel, J. (2014). Anaerobic thermophiles. *Life*, 4 (1), str. 77–104.

Chades, T., Scully, S. M., Ingvadottir, E. M., Orlygsson, J. (2018). Fermentation of mannitol extracts from brown macro algae by thermophilic *Clostridia*. *Frontiers in microbiology*, 9, str. 1931.

Chojnacka, K., Kim, S. K. (2015). Introduction of marine algae extracts. V: *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag, str. 1–14.

Dave, N., Selvaraj, R., Varadavenkatesan, T. Vinayagam, R. (2019). A critical review on production of bioethanol from macroalgal biomass. *Algal Research*, 42, 101606.

Definition of extraction. Medmrežje: <https://www.chemicool.com/definition/extraction.html> (5. 11. 2018)

Direktiva (EU) 2018/2001 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 11. decembra 2018 o spodbujanju uporabe energije iz obnovljivih virov. *Ur. l. EU*, št. L 328/82.

Direktiva 2009/28/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 23. aprila 2009 o spodbujanju uporabe energije iz obnovljivih virov, spremembi in poznejši razveljavitvi direktiv 2001/77/ES in 2003/30/ES. *Ur. L. EU*, št. L 140/16.

- Diversity of lipids in algae. Ranchi, Birla Institute of technology, 2010, str. 1–9.
- Dolar, M. 2010: Ko bo nafta spet malo dražja... Medmrežje: <http://novebiologije.blogspot.com/2010/09/ko-bo-nafta-spet-malo-drazja.html> (25. 11. 2018)
- Drew, G. H. (1910). The reproduction and early development of *Laminaria digitata* and *Laminaria saccharina*. *Annals of Botany*, 24 (93), str. 177–190.
- Edwards, M., Watson, L. (2011). Cultivating *Laminaria digitata*. *Aquaculture Explained*, 26 (26), str. 1–71.
- Etanol. Medmrežje: <http://www.surovine.si/etanol.php> (29. 6. 2019)
- Etanol. Medmrežje: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Etanol> (5. 11. 2018)
- Ethanol and the environment. 2019. Medmrežje: https://www.eia.gov/energyexplained/index.php?page=biofuel_ethanol_environment (25. 11. 2018)
- Evans, F. D., Critchley, A. T. (2014). Seaweeds for animal production use. *Journal of Applied Phycology*, 26 (2), str. 891–899.ž
- Gollety, C., Thiebaut, E., Davout, D. (2011). Characteristics of the *Ascophyllum nodosum* stands and their associated diversity along the coast of Brittany, France. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 91 (3), str. 569–577.
- Groisillier, A., Shao, Z., Michel, G., Goulitquer, S., Bonin, P., Krahulec, S., ... Tonon, T. (2014). Mannitol metabolism in brown algae involves a new phosphatase family. *Journal of Experimental Botany*, 65 (2), str. 559–570.
- Holst, O., Manelius, Å., Krahe, M., Märkl, H., Raven, N., & Sharp, R. (1997). Thermophiles and fermentation technology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 118(3), 415–422. Medmrežje 27: doi:10.1016/s0300-9629(97)00002-9 (14. 11. 2018)
- Hurd, C., Harrison, P., Bischof, K., Lobban, C. (2014). Seaweed thalli and cells. V: *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge, Cambridge University Press, str. 1–47.
- Iji, P. A., Kadam, M. M. (2013). Prebiotic properties of algae and algae-supplemented products. V: *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*. Oxford, Woodhead Publishing, str. 658–670.
- Ingvadottir, E. M., Scully, S. M., Orlygsson, J. (2017). Evaluation of the genus of *Caldicellulosiruptor* for production of 1, 2-propanediol from methylpentoses. *Anaerobe*, 47, str. 86–88.
- Jessen, J. E., Orlygsson, J. (2012). Production of ethanol from sugars and lignocellulosic biomass by *Thermoanaerobacter* J1 isolated from a hot spring in Iceland. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, str. 1–7.
- Ji, S. Q., Wang, B., Lu, M., Li, F. L. (2016). Direct bioconversion of brown algae into ethanol by thermophilic bacterium *Defluviitalea phaphyphila*. *Biotechnology for biofuels*, 9 (1), str. 81.
- Jiang, R., Ingle, K. N., Golberg, A. (2016). Macroalgae (seaweed) for liquid transportation biofuel production: what is next? *Algal Research*, 14, str. 48–57.

Khan, S., Siddique, R., Sajjad, W., Nabi, G., Hayat, K. M., Duan, P., Yao, L. (2017). Biodiesel production from algae to overcome the energy crisis. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24 (4), str. 163–167.

Krajnc, N. 2007: Kmetje in proizvodnja biogoriv. Medmrežje: http://www.gozdis.si/data/publikacije/15_proizvodnja_biogoriv.pdf (29. 6. 2019)

Kumar, P., Vikash, B. (2013). Introduction to biofuels. V: *Biofuels production*. New Jersey, John Wiley & Sons, str. 1–7.

Kurose, N., Miyazaki, T., Kakimoto, T., Yagyū, J., Uchida, M., Obayashi, A., Murooka, Y. (1989). Isolation of plasmids from thermophilic clostridia and construction of shuttle vectors in *Escherichia coli* and cellulolytic clostridia. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 68 (5), str. 371–374.

Laminaria digitata X1/2. Medmrežje: <https://razottoli.files.wordpress.com/2011/12/67-laminaria-digitata.jpg> (12. 12. 2018)

Lee, W. H. (1967). Carbon balance of a mannitol fermentation and the biosynthetic pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 15 (5), str. 1206–1210.

Lee, Y. J., Dashti, M., Prange, A., Rainey, F. A., Rohde, M., Whitman, W. B., Wiegand, J. (2007). *Thermoanaerobacter sulfurigenus* sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium that reduces 1 M thiosulfate to elemental sulfur and tolerates 90 mM sulfite. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57 (7), str. 1429–1434.

Luque de Castro, M. D., García Ayuso, L. E. (2000). Environmental applications | Soxhlet Extraction. V: *Encyclopedia of separation science*. B.k., Academic Press, str. 2701–2709.

Natural world range of *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed). Medmrežje: https://en.wikipedia.org/wiki/Ascophyllum#/media/File:Ascophyllum_nodosum_natural_range.jpg (12. 12. 2018)

Nelson, D. L., Cox, M. M. 2009: Lehninger principles of biochemistry. Medmrežje: http://sutlib2.sut.ac.th/sut_contents/H99772.pdf (29. 6. 2019)

Nelson D.L., Cox M.M. 2005. Lehninger principles of biochemistry. 4th ed. New York, Freeman and Company.

Offei, F., Mensah, M., Thygesen, A., Kemausuor, F. (2018). Seaweed bioethanol production: A process selection review on hydrolysis and fermentation. *Fermentation*, 4 (4), 99.

Pridobivanje bioetanola v energetske namene. Medmrežje: <https://docplayer.net/21440699-Pridobivanje-bioetanola-v-energetske-namene.html> (29. 6. 2019)

Priloga 4: Energijske vrednosti biogoriv in goriv. 2012. Medmrežje: <https://www.google.com/search?q=Energijske+vrednosti+biogoriv+in+goriv&oq=Energijske+vrednosti+biogoriv+in+goriv&aqs=chrome..69i57j33.420j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8> (29. 6. 2019)

Ra, C. H., Kim, S. K. (2015). Bioethanol Production from Macroalgae and Microbes. V: *Marine Bioenergy: trends and developments*. New York, CRC Press, str. 257–271.

Rainey, F. A. (2008). *Caldicellulosiruptor*. V: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. New York, John Wiley & Sons, str. 1275.

- Rainey, F. A., Jollen, B. J., Small, A. M. (2015). Clostridium. V: *Bergey's Manual of Systematic of Archaea and Bacteria*. New York, John Wiley & Sons, str. 1224–1256.
- Robak, K., Balcerak, M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. Medmrežje: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6117988/> (26. 6. 2019)
- Rocca, S., Agostini, A., Giuntoli, J., Marelli, L. 2015: Biofuels from algae: technology options, energy balance and GHG emissions. Medmrežje: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC98760/algae_biofuels_report_21122015.pdf (29. 6. 2019)
- Russell, N. J., Fukunaga, N. (1990). A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 6 (2-3), str. 171–182.
- Sabir, A., Yazar, K., Sabir, F., Kara, Z., Yazici, M. A., Goksu, N. (2014). Vine growth, yield, berry quality attributes and leaf nutrient content of grapevines as influenced by seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) and nanosize fertilizer pulverizations. *Scientia Horticulturae*, 175, str. 1–8.
- Saha, B. C., Racine, F. M. (2011). Biotechnological production of mannitol and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89 (4), str. 879–891.
- Scully, S. M., Orlygsson, J. (2014a). Branched-chain alcohol formation from branched-chain amino acids by *Thermoanaerobacter brockii* and *Thermoanaerobacter yonseiensis*. *Anaerobe*, 30, str. 82–84.
- Scully, S. M., Orlygsson, J. (2014b). Recent advances in second generation ethanol production by thermophilic bacteria. *Energies*, 8 (1), str. 1–30.
- Scully S.M. & Orlygsson J.(2015), Medmrežje 62; Biological production of alcohols, Faculty of Natural Resource Sciences, University of Akuryri (10. 1. 2019).
- Selvaraj, K., Fofana, B. (2012). An overview of plant photosynthesis modulation by pathogen attacks. V: *Advances in photosynthesis-fundamental aspects*. Rijeka, InTech, str. 465-487.
- Soxhletov ekstraktor. Medmrežje: https://www.periodni.com/gallery/soxhletov_ekstraktor.png (12. 12. 2018)
- Uredba o trajnostnih merilih za biogoriva in emisiji toplogrednih plinov v življenjskem ciklu goriv v prometu. *Ur. l. RS*, št. 19/17.
- Wagner, I. D., Wiegel, J. (2008). Diversity of thermophilic anaerobes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125 (1), str. 1–43.
- Welker, N. E. (1991). *Genetics of thermophilic bacteria. [Bacillus stearothermophilus:a2]*. Evanston, Department of biochemistry, molecular biology and cell biology, str. 10.
- Wiegel, J. (2015). Thermobrachium. V: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. New York, John Wiley & Sons, str. 848.
- World population prospects 2019: Highlights. 2019. Medmrežje: <https://www.un.org/development/desa/publications/world-population-prospects-2019-highlights.html> (10. 11. 2018)
- Xu, C., Zhang, J., Mihai, D. M., Washington, I. (2014). Light-harvesting chlorophyll pigments enable mammalian mitochondria to capture photonic energy and produce ATP. *Journal of Cell Science*, 127 (2), str. 388–399.

Zeikus, J. G. (1979). Thermophilic bacteria: ecology, physiology and technology. *Enzyme and Microbial Technology*, 1 (4), str. 243–252.