

PREGLEDNI RAD / REVIEW

Mikroalge – potencijalni izvor lipida za proizvodnju biodizela

Microalgae – a potential source of lipids for biodiesel production

Tonči Rezić¹, Jelena Filipović, Božidar Šantek¹Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6/IV, HR-10000 Zagreb, Hrvatska**Sažetak**

Biomasa mikroalgi predstavlja vrijednu sirovinu za proizvodnju farmaceutskih, prehrambenih i kozmetičkih proizvoda (proteina, masnih kiselina, vitamina, anti-oksidansa, pigmenta, lijekova i imunostimulansa), te proizvodnju biogoriva (biodizela). Temelj učinkovite proizvodnje biomase mikroalgi za dobivanje biogoriva primjena je bioproceno inženjerskih znanja povezanih s izborom mikroalge, hranjive podloge, uvjeta i postupka vođenja bioprocasa u različitim bioreaktorskim sustavima, te metode izdvajanja i pročišćavanja biomase mikroalgi. Kriteriji izbora mikroalge određeni su fiziološkim potencijalom i mogućnošću mikroalge da uspješno nakuplja lipide tijekom bioprocasa. Izbor hranjive podloge, uvjeta i postupka vođenja bioprocasa ključni su za proizvodnju biomase mikroalgi s velikim udjelom lipida. Za dobivanje što veće količine biomase mikroalgi s ciljem proizvodnje biogoriva koriste se različiti bioreaktorski sustavi s jednom ili više podjedinica koji su opremljeni različitim sustavima za nadzor bioprocasa. Osim uvjeta i postupka vođenja bioprocasa u bioreaktoru za uspješnu proizvodnju biogoriva potrebno je izabrati i adekvatne metode za izdvajanje i pročišćavanje biomase odnosno lipida iz biomase mikroalgi. Stoga je u ovom radu dan i pregled metoda za izdvajanje i pročišćavanje biomase odnosno lipida iz biomase mikroalgi nakon uzgoja u bioreaktoru.

Ključne riječi: mikroalge, biotehnološka proizvodnja, bioreaktori, biogoriva, metode izdvajanja i pročišćavanje biomase i lipida iz mikroalgi

Summary

Microalgal biomass represents valuable raw material for pharmaceuticals, food and cosmetic industry (proteins, fatty acids, vitamins, antioxidants, pigments, pharmaceuticals and immunostimulant) as well as for biofuels production (biodiesel). A base of efficient microalgal biomass production for biofuels production is the use of bioprocess engineering knowledge related to the selection of microalgae species, cultivation medium and conditions, bioprocess cultivation techniques in different bioreactor systems as well as microalgal biomass separation and purification. Selection criteria for microalgae species has to be related to the microalgae physiological potentials and its abilities to accumulate lipids during bioprocess. Cultivation medium and conditions as well as bioprocess cultivation techniques in bioreactor system are key parameters for successful production of microalgal biomass with high lipid content. In order to produce large quantities of microalgal biomass for biofuels production different bioreactor systems with one or more subunits (equipped with different monitoring systems) are used. Beside cultivation conditions and bioprocess cultivation techniques in bioreactor system for efficient biofuels production it is necessary to select appropriate methods for biomass as well as lipid separation and purification from microalgal biomass. Therefore, in this work the overview of different methods for biomass and lipids separation and purification from microalgal biomass is also presented.

Keywords: microalgae, biotechnological production, bioreactors, biofuels, biomass and lipids separation and purification methods

1. Uvod

Upotreba fosilnih izvora energije ima negativan utjecaj na društveno-političku i ekonomsku stabilnost pojedinih regija i država odnosno uzrokuje ekološke promjene (npr. promjene temperature atmosfere, emisiju stakleničkih plinova, itd.) (Hallenbeck i Benemann, 2002). Predviđanja pokazuju da će ukupna količina svjetskih izvora nafte biti potrošena u periodu od 100-150 godina, ovisno o potrebi svjetskog tržišta za gorivima proizvedenim iz sirove nafte. Količine plina i ugljena značajno su veće, ali je i njihova primjena i potrošnja porastom proizvodnje i potrošnje, osobito u Aziji, postala ograničena. Predviđanja su da ugljena i plina ima dovoljno za oko 300 godina ako potrošnja ostane na razini iz 2010. godine uvećana za godišnje povećanje potrošnje od 10%. Stoga su značajni napor

i sredstva uloženi u razvoj proizvodnje energije iz obnovljivih izvora (Anonymous 1). Biomasa je obnovljivi izvor energije te predstavlja alternativu fosilnim izvorima energije. Ovisno o vrsti korištene biomase biogoriva se dijele na biogoriva: prve (biogoriva proizvedena iz šećernih (npr. šećerna repa i trska) i škrobnih sirovina (npr. kukuruz i druge žitarice), druge (biogoriva proizvedena iz lignoceluloznih sirovina (npr. sporedni proizvodi iz poljoprivrede i šumarstva odnosno energetski usjevi) i treće generacije (proizvodnja biodizela iz biomase algi). Za proizvodnju biodizela do sada su se uglavnom koristila biljna i životinjska ulja i masti (npr. ulja različitih uljarica i ostatci ulja i masti iz ugostiteljstva odnosno prehrambeno-prerađivačke industrije) (Barnwal i Sharma, 2005).

Kao sirovina za proizvodnju biodizela također se mogu koristiti lipidi izolirani iz biomase mikroalgi (Chisti, 2007).

Corresponding author: trezic@pbf.hr

Neke od prednosti korištenja mikroalgi kao sirovine za proizvodnju biodizela su: brzi rast u nepovoljnim uvjetima, korištenje CO₂ za rast stanica mikroalgi i proizvodnju lipida (Mata i sur., 2010). U povoljnim uvjetima okoline neke vrste mikroalgi mogu nakupiti i do 70% lipida u suhoj tvari biomase. Glavna prednost proizvodnje biodizela iz biomase mikroalgi je mogućnost proizvodnje 58 m³ ulja po hektaru raspoložive površine, što je dvostruko više od količine proizvedene iz drugih vrsta biomase (Barnwal i sur., 2005; Gouveia i Oliveira, 2009). Uz gore navedene prednosti, proizvodnja biomase mikroalgi osigurava uklanjanje CO₂ iz atmosfere, te smanjenje utjecaja stakleničkih plinova na klimatske promjene (neke vrste mikroalgi mogu rasti pri visokim udjelima CO₂ u atmosferi (do 5%)). Međutim, bioprocesi za proizvodnju biomase mikroalgi i lipida te proizvodnja biodizela iz biomase mikroalgi još nisu dovoljno razvijeni. Postojeća tehnologija ne osigurava ekonomski prihvatljivu proizvodnju biodizela iz biomase mikroalgi. Stoga je potrebno razviti nove postupke uzgoja biomase mikroalgi s visokim udjelom lipida u biomasi te osigurati učinkovito izdvajanje i pročišćavanje lipida iz uzgojene biomase. Razvoju ekonomski isplative proizvodnje biomase mikroalgi doprinjet će i korištenje novih tipova bioreaktora kao i optimiranje uvjeta i postupaka vođenja bioprocasa u različitim tipovima bioreaktora. Kada se riješe prethodno navedeni nedostaci industrijske proizvodnje biomase mikroalgi, mikroalge će postati značajna sirovina u proizvodnji biogoriva, biokemikalija, farmaceutskih pripravaka i dodataka prehrani (Barnwal i Sharma, 2005; Gnansounou i sur., 2009). U ovom radu dana je detaljna analiza različitih postupaka proizvodnje lipida pomoću mikroalgi kao i postupaka izdvajanja i pročišćavanja lipida iz biomase mikroalgi.

2. Proizvodnja biomase mikroalgi i izdvajanje lipida iz mikroalgi

2.1. Osnovne morfološke i fiziološke karakteristike mikroalgi

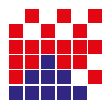
Mikroalge mogu biti prokariotski i eukariotski fotosintetski jednostanični i višestanični mikroorganizmi jednostavne stanične građe. Najpoznatiji predstavnici industrijski značajnih prokariotskih mikroalgi su cijanobakterije (*Cyanophyceae*), a eukariotskih mikroalgi su bičaši (*Euglenophyta*) i neke zelene mikroalge (*Chlorophyta* i *Bacillariophyta*) (Li i sur., 2008a; Li i sur., 2008b). Jednostavna stanična struktura mikroalgi osigurava brz i uspješan rast mikroalgi u nepovoljnim uvjetima okoline. Stoga su prisutne u najrazličitijim ekosustavima kao što su tekući i mirujući vodeni ekosustavi (mora, rijeke, jezera, lagune) odnosno staništa u kojima vladaju nepovoljni uvjeti okoline (neke vrste su izolirane iz gotovo nepristupačnih dijelova pustinja, toplinskih izvora i ispod leda Antartika). Smatra se da postoji preko 50000 različitih vrsta mikroalgi ali je do sada izolirano i klasificirano samo oko 30000 različitih vrsta mikroalgi (Richmond, 2004). Intenzivnim prikupljanjem različitih vrsta mikroalgi posljednjih desetljeća formirane su bogate zbirke mikroalgi [npr. University of Coimbra (Portugal) ima zbirku od 4000 različitih vrsta mikroalgi, University of Texas (SAD) ima 2300 vrsta odnosno Goettingen University (Njemačka) ima 2213 vrsti mikroalgi]. Do sada identificirane i

klasificirane vrste mikroalgi uglavnom pripadaju porodici zelenih mikroalgi (77%) odnosno cijanobakterija (8%). Različite morfološke i fiziološke karakteristike mikroalgi omogućavaju njihovu primjenu u različitim biotehnološkim procesima (npr. proizvodnji vitamina, antioksidansa, lijekova, imunostimulansa, biogoriva i dodataka prehrani).

Triacil gliceridi (TAG) su glavni izvori energije u stanicama mikroalgi i mogu se iskoristiti za proizvodnju biogoriva (biodizela). Stoga su fiziološki mehanizmi biosinteze TAG u stanicama mikroalgi intenzivno istraživani posljednjih godina. Biosinteza TAG dio je primarnog metabolizma mikroalgi i povezana je s membranskim metabolizmom, te mora biti razmatrana kroz cjelokupni stanični metabolizam mikroalgi. Do danas je sekvencionirano 10 genoma mikroalgi, te su najopsežnija fiziološka istraživanja mikroalgi *Chlamydomonas reinhardtii* i mikroalgi iz roda *Nannochloropsis*. Rast mikroalgi i metabolički putevi sinteze TAG različiti su u prije navedenim vrstama. *Chlamydomonas reinhardtii* nakuplja TAG u uvjetima ograničene dobave izvora dušika, dok *Nannochloropsis sp.* sintetizira TAG pri visokim koncentracijama hranjiva u podlozi. Stanice mikroalgi uspješno sintetiziraju TAG na plastidima tijekom fotosinteze. Na tilakoidnim membranama kloroplasta provodi se biosinteza TAG u nizu biokemijskih reakcija. Enzimi membrane endoplazmatskog retikuluma također sudjeluju u sintezi TAG. Poveznica između biosinteze TAG na membranama endoplazmatskog retikuluma i kloroplasta nije do kraja istražena te se pretpostavlja da svi enzimi navedenih biosintetskih puteva još nisu indentificirani. Kada stanice mikroalgi rastu heterotrofno (bez izvora svjetla), nastaju plastidi bogati ugljikohidratima (škrob, β-glukan) bez zelenog klorofilnog pigmenta. Ipak, regulacija i mehanizmi biosinteze i razgradnje TAG slabo su istraženi ne samo u stanicama mikroalgi, nego i kod drugih organizama. Stoga će temeljna fiziološka istraživanja mikroalgi omogućiti razumijevanje metabolizma TAG osobito u uvjetima ograničene dobave hranjiva kao i efikasniju proizvodnju biogoriva iz mikroalgi (Liu i Benning, 2013).

2.2. Mogućnosti primjene mikroalgi u proizvodnji biogoriva

Povećanjem cijene fosilnih goriva i globalnim zatopljenjem uzrokovanim proizvodnjom i izgaranjem fosilnih goriva, te posljedično porastom koncentracije CO₂ u atmosferi, povećao se interes za proizvodnju biogoriva iz obnovljivih izvora. Proizvodnja biogoriva iz obnovljivih izvora predstavlja alternativu proizvodnji goriva iz fosilnih izvora, ali je i izazov na tehnološkoj, biotehnološkoj i društveno-političkoj razini. Društveno-politička razina odgovornosti određena je cijenom, dostupnošću i rasprostranjenošću sirovina koje se koriste u proizvodnji biogoriva. Proizvodnja biogoriva iz šećernih sirovina (npr. šećerna repa i trska) i škrobnih sirovina (npr. kukuruz, pšenica ili ječam) uzrokuje porast cijene prehrambenih proizvoda i dodatno doprinosi financijskim i društveno-političkim nestabilnostima nerazvijenih regija u svijetu. Drvne (ostatci šumarstva i drvne industrije) i otpadne poljoprivredne (ostatci iz poljoprivredne industrije) lignocelulozne sirovine jeftinije su od šećernih i škrobnih sirovina ali su tehnološki zahtjevnije sirovine za proizvodnju biogoriva. U proizvodnji biodizela danas se uglavnom kao sirovine koriste ulja različitih



uljarica (npr. uljana repice i soja) i otpadna prehrambena ulja. Stoga proizvodnja biodizela iz biomase mikroalgi u odnosu na prethodno navedene sirovine ima ove prednosti: a) korištenjem biomase mikroalgi za proizvodnju biodizela ne utječe se na cijenu prehrambenih proizvoda, b) količina potrošne vode tijekom uzgoja biomase mikroalgi značajno je manja od količine potrošne vode potrebne za uzgoj poljoprivrednih kultura i energetske usjeva, c) energetska vrijednost biomase mikroalgi značajno je veća od energetske vrijednosti biljne biomase zahvaljujući mogućnosti da mikroalge proizvedu i nakupe veliki udjel lipida tijekom uzgoja i d) efikasnost konverzije sunčeve energije u kemijsku energiju je ispod 1% kod biljne biomase dok je kod mikroalgi i do 5% (Li i sur., 2008a; Li i sur., 2008b; Sheehan i sur., 1998).

Uz visoko produktivni proces proizvodnje biomase i udjel lipida u biomasi mikroalgi dodatne prednosti u odnosu na uljarice su i način proizvodnje biomase mikroalgi u otvorenim i zatvorenim bioreaktorskim sustavima (foto-bioreaktorima) pri čemu je iskoristivost površine mnogostruko veća u odnosu na iskoristivost površine tijekom uzgoja različitih uljarica. Teoretski mikroalge mogu proizvesti od 10 do 100 puta više lipida po hektaru raspoložive površine. Dodatna prednost je i mogućnost korištenja nepoljoprivrednih površina što dodatno smanjuje cijenu proizvodnje biomase mikroalgi. Međutim, glavni nedostatak proizvodnje biomase mikroalgi je još uvijek relativno niska koncentracija biomase (10 - 30 g/L) u odnosu na biomasu bakterija, kvasca ili plijesni, te stoga relativno niska produktivnost bioprocesa za ekonomski prihvatljivu primjenu u industrijskom mjerilu (Barnwal i Sharma, 2005; Tsukahara i Sawayama 2005; Hossain i sur., 2008; Hu i sur., 2008; Rosenberg i sur., 2008; Schenk i sur., 2008; Rodolfi i sur., 2009).

2.3. Uzgoj mikroalgi u bioreaktorima i dobivanje lipida

Kako bi se ostvarili visoki prinosi lipida i povećala produktivnost proizvodnje biomase mikroalgi, potrebno je osigu-

rati optimalne uvjete uzgoja te odabrati mikroalgu koja efikasno koristi dostupne supstrate neophodne za rast i proizvodnju lipida na određenom području. Za uspješan rast mikroalgi prije svega je potrebno osigurati dovoljne količine izvora ugljika, dušika i fosfora. Primjena kemijski definiranih hranjivih podloga sastavljenih od čistih kemikalija i prilagodavanje njihovog sastava optimalnim uvjetima za rast mikroalgi i proizvodnju lipida značajno poskupljuje proces proizvodnje te je čini ekonomski neodrživom. Stoga se kao alternativa u industrijskom mjerilu koriste kompleksne hranjive podloge pripremljene od jeftinih sirovina koji su sporedni proizvodi industrije mesa, mlijeka, žitarica i alkohola. Neke od sirovina koje se koriste u proizvodnji biomase mikroalgi i proizvodnji lipida prikazane su u tablici 1 pri čemu su grupirane prema količini biogenog elementa kojeg sadrže u najvećoj količini (Barnwal i Sharma, 2005).

Tablica 1. Sirovine - kompleksni izvori ugljika i dušika za uzgoj biomase mikroalgi

Table 1. Raw materials - Complex sources of carbon and nitrogen for microalgae cultivation

Izvor ugljika / <i>Carbon source</i>	Izvor dušika / <i>Nitrogen source</i>
Glicerol / <i>Glycerol</i>	Sojino brašno / <i>Soya flour</i>
Melasa / <i>Molasses</i>	Kvasac, kvašćev ekstrakt / <i>Yeast and yeast extract</i>
Razni lipidi / <i>Various lipids</i>	Kukuruzna močevina / <i>Corn steep liquor</i>
Kukuruzni škrob, dekstrin i hidrolizati / <i>Corn starch, dextrin and hydrolysis products</i>	Kukuruzni gluten (urea) / <i>Corn gluten (urea)</i>
Sirutka (65% laktoza) / <i>Whey (65% lactose)</i>	Mesni i riblji ostatci / <i>Meat and fish remains</i>
Alkoholi (metanol, etanol) / <i>Alcohol (methanol, ethanol)</i>	



Slika 1. Otvoreni sustavi za uzgoj mikroalgi (Moazami i sur., 2012)

Figure 1. Open microalgae cultivation systems (Moazami et al., 2012)



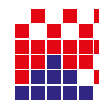
Slika 2. Zatvoreni sustavi za uzgoj mikroalgi u cijevnim fotobioreaktorima (Pulz i sur., 2001)
Figure 2. Close microalgae cultivation systems in tubular photobioreactors (Pulz et al., 2001)

Za proizvodnju 1 L biodizela potrebno je utrošiti od 0,23 do 1,55 kg dušika i 0,029 do 0,145 kg fosfora ovisno o vrsti mikroalge i postupku uzgoja. Da bi se unaprijedila održivost ovog bioprocesa intenzivno se istražuje rast mikroalgi i proizvodnja lipida na kompleksnim hranjivim podlogama (Hossain i sur., 2008). Pri proizvodnji biodizela značajan je i utrošak vode (oko 3726 kg vode za proizvodnju 1 kg biodizela iz biomase mikroalgi) (Yang i sur., 2011). Reciklacijom procesne vode može se ostvariti ušteda utroška vode i sastojaka hranjive podloge od 55% do 84% u odnosu na bioprocese bez reciklacije vode (Gnansounou i sur., 2009).

Industrijske i komunalne otpadne vode izvor su jeftinih hranjivih sastojaka i mogu se koristiti za pripremu hranjivih podloga, uzgoj mikroalgi i proizvodnju biodizela. Prije uzgoja otpadne vode je potrebno prilagoditi potrebama mikroalgi i pripremiti hranjivu podlogu s dovoljnim količinama izvora biogenih elemenata. Upotrebom otpadnih voda za pripremu hranjivih podloga može se reducirati udjel potrebnog dušika i fosfora do 55%, te ostvariti značajne ekonomske uštede (Hu i sur., 2008). Nedostatak upotrebe otpadnih sirovina u pripravi hranjivih podloga vezan je uz rast kontaminanata i smanjenje prinosa biomase mikroalgi zbog kompeticije mikrobnih vrsta za hranjivim tvarima iz otpadnih sirovina. Drugi način smanjenja potrošnje anorganskih izvora fosfata i dušika tijekom proizvodnje biomase mikroalgi je korištenje biomase mikroalgi nakon ekstrakcije lipida iz biomase. Da bi se osigurao tehnološki efikasan bioprocen potrebno je izvršiti reciklaciju ostataka mikroalgi, te optimirati reciklacijske omjere. Ostaci biomase mikroalgi mogu se također koristiti kao stočna hrana, sirovina za anaerobnu razgradnju i proizvodnju bioplina, organsko gnojivo odnosno u procesu gasifikacije (proizvodnja vodika i metana) (Hossain i sur., 2008).

Uvjeti uzgoja mikroalgi u bioreaktoru značajno utječu na prinos biomase i udjel lipida u biomasi mikroalgi kao i na produktivnost bioprocesa proizvodnje lipida. Uzgoj biomase mikroalgi provodi se u otvorenim i zatvorenim bioreaktorskim sustavima. Otvoreni sustavi mogu biti prirodni vodotokovi, jezera i lagune, te umjetno iskopani kanali i bazeni (Brennan i Owende, 2010). U umjetnim otvorenim bioreaktorskim sustavima hranjiva podloga obično se pokreće s lopatastim mješalom oblika mlinskog kotača (Slika 1). Visina sloja hranjive podloge u otvorenim sustavima ovisi o njenoj gustoći i ne bi smjela prelaziti 0,5 m kako bi se osigurala dobra osvjetljenost stanica mikroalgi. Uzgojem mikroalgi u otvorenim bioreaktorskim sustavima moguće je proizvesti od 60 do 200 mg biomase/L na dan ili godišnje oko 30 tona biomase po hektaru korištene površine (Mata i sur., 2010).

Zatvoreni bioreaktorski sustavi obuhvaćaju bioreaktore najrazličitijih konstrukcija prilagođenih fiziološkim specifičnostima mikroalgi i potrebama za njihov optimalan rast i proizvodnju lipida. Za industrijsku primjenu razvijaju se cijevni bioreaktori (Slika 2), bioreaktori s mješanjem pomoću pumpe, bioreaktori s miješanjem pomoću zraka i bioreaktori s imobiliziranim stanicama mikroalgi. Cilj navedenih konstrukcijskih rješenja je osigurati što efikasniju dopremu svjetlosti do površine stanica mikroalgi. Cijevni bioreaktori imaju dužinu cijevi od 20-100 metara i promjer cijevi 3-10 cm. Godišnja proizvodnja iznosi 40-150 tona biomase po hektaru korištene površine (Pulz i Gross, 2001). Najveći do sada izgrađeni cijevni bioreaktor za uzgoj alge *Chlorella sp.* sastoji se od zbijenih horizontalno postavljenih cijevi ukupne dužine 500 km i korisnog volumena od 700 m³ smještenih na 10000 m². Godišnja proizvodnja iznosi 130-150 tona suhe tvari biomase *Chlorella sp.* Usporedba prednosti i nedostataka otvore-



Tablica 2. Prednosti i nedostaci otvorenih i zatvorenih bioreaktorskih sustava za uzgoj mikroalgi
Table 2. Advantages and disadvantages of open and closed bioreactor systems for microalgae cultivation

Značajka / Feature	Otvoreni sustav / Open system	Zatvoreni sustav / Close system
Kapitalni operativni troškovi / Capital and operational investment	Niski / Low	Visoki / High
Opasnost od kontaminacije / Contamination risk	Visoka / High	Mala / Low
Potrebni proctor / Operational area	Velika / Huge	Mala / Slight
Utrošak vode / Water consumption	Visoki / High	Niski / Low
Utrošak CO ₂ / CO ₂ consumption	Visoki / High	Niski / Low
Doprema svjetlosti / Light illumination	Loša / Poor	Dobra / Fine
Kvaliteta biomase / Biomass quality	Niska / Low	Visoka / High
Broj primjenjenih vrsta / Number of cultivated species	Nekoliko vrsta mikroalgi / Several species	Skoro sve vrste mikroalgi / Almost all species
Prilagodljivost proizvodnje / Production adaptability	Mala ili nikakva / Low or negligible	Visoka / High
Reproducibilnost/ Reproducibility	Ovisna o vanjskim uvjetima / External condition dependent	Visoka / High
Kontrola procesa/ Process controle	Teška / Difficult	Dobra / Good
Standardizacija / Standardization	Nemoguća / Impossible	Moguća / Possible
Period potreban za početak procesa u bioreaktoru/ Bioprocess starting period	6-8 tjedana / 6-8 weeks	2-4 tjedna / 2-4 weeks
Prosječne koncentracije suhe tvari biomase/ Average dry weight biomass concentration	0,1-0,2 g/L / 0,1-0,2 g/L	2-8 g/L / 2-8 g/L
Učinkovitost bioprocasa / Bioprocess efficiency	Niska / Low	Visoka / High

nih i zatvorenih bioreaktorskih sustava za uzgoj mikroalgi prikazana je u tablici 2 (Barnwal i sur., 2005; Mata i sur., 2010).

Četiri su osnovna načina uzgoja biomase mikroalgi u bioreaktoru: fotoautotrofni, heterotrofni, miksotrofni i fotoheterotrofni (Chen i sur., 2011). Fototrofni uzgoj karakterizira upotreba energije sunčevih zraka i CO₂, proizvodnja kemijske energije i proces fotosinteze u mikroalgama (Huang i sur., 2010). Ovisno o vrsti mikroalge i uvjetima fototrofnog uzgoja uočene su velike razlike u udjelima proizvedenih lipida u biomasi mikroalgi (od 5% do 68%). Uz udjel lipida u biomasi mikroalgi važan je i prinos biomase mikroalgi. Stoga je za efikasnu proizvodnju biodizela potrebno ostvariti visoke prinose biomase mikroalgi s visokim udjelom lipida. Kako bi se ostvarili visoki prinosi biomase i lipida uzgoj mikroalgi se provodi u dvije faze pri čemu se u prvoj fazi osigurava efikasan rast biomase, a u drugoj sinteza lipida. Druga faza odnosno sinteza lipida provodi se u uvjetima limitacije rasta mikroalge izvorom dušika kako bi se osigurala što veća sinteza lipida u stanicama mikroalgi (Mata i sur., 2010).

Najveće produktivnosti bioprocasa zablježene su tijekom fotoautotrofnog uzgoja biomase *Chlorella sp.* (oko 179 mg/L dan) pri aeraciji 0,25 vvm i 2% CO₂ (Chiu i sur., 2008). Glavna prednost fotoautotrofnog uzgoja je korištenje CO₂ kao jedinog izvora ugljika što osigurava jeftiniju proizvodnju, a ujedno se uklanja i CO₂ koji kao staklenički plin predstavlja ekološki problem. Dodatna prednost ovog uzgoja je i smanjena mogućnost kontaminacije. Zbog povećane potrebe za CO₂ preporučljiva je izgradnja pogona u blizini industrijskih postrojenja koja proizvode povećane količine CO₂ (toplane, energetska postrojenja na ugljen i fosilna goriva). Žbog navedenih

prednosti fotoautotrofni uzgoj se uglavnom izvodi u otvorenim bioreaktorskim sustavima.

Tijekom heterotrofnog uzgoj mikroalge koriste organski izvor ugljika za rast i proizvodnju lipida. Prednosti ovakvog uzgoja u odnosu na autotrofni uzgoj su mogućnost proizvodnje lipida tijekom perioda slabe osvjetljenosti hranjive podloge i tame. Heterotrofni uzgoj karakterizira relativno visoka koncentracija biomase i ograničena doprema svjetlosti do stanica unutar suspenzije biomase u bioreaktorima velikih volumena (Huang i sur., 2010). Heterotrofni uvjeti uzgoja pogoduju postizanju znatno većih produktivnosti bioprocasa u odnosu na autotrofni uzgoj. U nekim slučajevima produktivnost bioprocasa se povećala i do 20 puta u odnosu na fotoautotrofni uzgoj. Za rast i proizvodnju lipida mikroalge mogu koristiti različite organske izvore ugljika kao što su: glukoza, acetat, glicerol, fruktoza, saharoza, laktoza, galaktoza i manoza. Provedena su istraživanja i na kompleksnim hranjivim podlogama pri čemu su kao izvori ugljika korišteni različiti hidrolizati. Na primjer, korištenjem hidrolizata škrobnih sirovina ostvareni su visoki prinosi biomase mikroalgi (2 g/L dan) i lipida (0,93 g/L dan). Tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata kod hidrolizata škroba zabilježene su najveće produktivnosti proizvodnje lipida (3,7 g/L dan). Glavni nedostatak heterotrofnog uzgoja mikroalgi je velika mogućnost rasta različitih kontaminanata (Xu i sur., 2006).

Miksotrofni uzgoj mikroalgi označava korištenje anorganskog (CO₂) i organskog izvora ugljika za rast biomase i proizvodnju lipida. Uzgoj je moguće provoditi s mikroalgama koje fiziološki mogu koristiti organske i anorganske izvore ugljika (Mata i sur., 2010). Promjenom uvjeta uzgoja *Chlorella*

protothecoides iz fotoautotrofnog u heterotrofni uzgoj ostvareno je povećanje prinosa lipida za 40% u odnosu na fotoautotrofni uzgoj (Xu i sur., 2006).

Fotoheterotrofni uzgoj mikroalgi prilagođen je uzgoju mikroalgi koje trebaju svjetlost tijekom metabolizma organskog izvora ugljika. Za razliku od miksotrofnog uzgoja mikroalge tijekom fotoheterotrofnog uzgoja koriste kombinaciju energije svjetlosti i organskog izvora ugljika za rast i proizvodnju lipida, te nije moguće provesti uzgoj bez energije svjetlosti i organskog izvora ugljika. Fotoheterotrofni uzgoj osobito je koristan kod proizvodnje metabolita čija je sinteza regulirana vrstom i intenzitetom svjetlosti, a što je usko povezano sa sintezom vitamina (Chojnacka i Marquez-Rocha, 2004).

Korištenje CO₂ (fotoautotrofni uzgoj) osigurava jeftiniju proizvodnju i uklanjanje viška CO₂ iz atmosfere opterećene industrijskim otpadnim plinovima. Nedostatak fotoautotrofnog uzgoja je smanjeni prinos biomase i udjela lipida u biomasi mikroalgi. Miksotrofni i fotoheterotrofni uzgoj rijetko se primjenjuju za proizvodnju biomase mikroalgi bogatih lipidima zbog problema s kontaminacijom, te konstrukcijskim ograničenjima vezanim uz uvećanje volumena bioreaktora.

Intenzitet i vrsta svjetlosti značajno utječu na prinos biomase i udjel lipida u biomasi mikroalgi. Općenito izvori svjetlosti dijele se na prirodne (sunčeva svjetlost) i umjet-

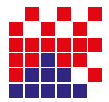
ne (klasične lampe, LED i optička vlakna). Godišnji prinosi lipida ostvareni korištenjem sunčeve svjetlosti na otvorenim bioreaktorskim sustavima su između 20 i 40 tona suhe tvari biomase po hektaru korištene površine. Korištenjem umjetnih izvora svjetlosti u laboratorijskim uvjetima godišnji prinosi se mogu povećati na 60 do 150 tona suhe tvari biomase po hektaru korištene površine zahvaljujući kontroliranom korištenju svjetlosti. Međutim, glavni nedostatak umjetne rasvjete je povećana potrošnja energije, te problemi provođenja uzgoja biomase mikroalgi u industrijskom mjerilu. U laboratorijskom bioreaktoru volumena 40 L korištenje svjetlosti istog inteziteta iz LED lampi osigurava smanjenje utroška energije za 50% (sa 40,32 na 20,16 kWh). Korištenje unutarnjeg osvjetljenja (u suspenziji mikroalgi) osigurava bolji prijenos svjetlosti na stanice mikroalgi u unutrašnjosti bioreaktora što rezultira povećanjem prinosa biomase mikroalgi i lipida. Osobiti napredak u osvjetljavanju unutrašnjosti otvorenih bioreaktorskih sustava za uzgoj mikroalgi ostvaren je korištenjem optičkih vlakana. Korištenjem optičkih vlakana za dopremu sunčeve svjetlosti do stanica mikroalgi u unutrašnjosti bioreaktora potrebno je utrošiti samo 1,0 kWh električne energije (Anonymous; Chen i sur., 2011). U tablici 3. prikazane su značajke korištenja različitih izvora umjetne svjetlosti.

Tablica 3. Osnovne osobine i potrošnja električne energije različitih izvora svjetlosti za uzgoj biomase mikroalgi
Table 3. Features and electricity consumption of different artificial light sources for microalgae cultivation

Izvor svjetlosti / <i>Light Source</i>	Karakteristike / <i>Characteristics</i>	Operacijska stabilnost / <i>Operation stability</i>	Utrošak električne energije (kWh)* / Electricity consumption (kWh)*
Standardna lampa / <i>Conventional artificial light sources</i>	Visoka produktivnost biomase, mali konstrukcijski troškovi, visoka stabilnost, velika osvijetljena površina / <i>Higher biomass productivity, low constructing cost, high stability, large illumination area</i>	Visoka/ <i>High</i>	40,32
LED / <i>LED</i>	Mala potrošnja energije, mala količina oslobođene topline, dugi vijek trajanja, otpornost na paljenje i gašenje, visoka stabilnost, mali konstrukcijski troškovi / <i>Low energy consumption, low heat generation, durability, tolerate high frequency of on-off switching, high stability, low constructing cost</i>	Visoka/ <i>High</i>	20,16
Optička vlakna osvijetljena umjetnim izvorom svjetlosti / <i>Optical fiber excited by artificial light source</i>	Visoka potrošnja energije, mala potreba za prostorom, uniformna raspodjela svjetlosti, mala mogućnost kontaminacije, dobro provođenje svjetlosti / <i>High energy consumption, low space requirement, uniform light distribution, low contamination risk, efficient light conduction</i>	Srednja/ <i>Moderate</i>	36,00
Optička vlakna osvijetljena sunčevom svjetlošću / <i>Optical fiber excited by sun light</i>	Mala potrošnja električne energije, dobro provođenje svjetlosti, uniformna raspodjela svjetlosti, mala potreba za prostorom, mala mogućnost kontaminacije, mali operativni troškovi / <i>Low electricity consumption, efficient light conduction, uniform light distribution, lower space requirement, low contamination risk, lower cost</i>	Mala/ <i>Low</i>	1,00

* Izračun potrošnje električne energije proveden je na osnovi fotobioreaktora volumena 40 L

* The electricity consumption was based on a 40 L photobioreactor



2.4. Izdvajanje biomase mikroalgi iz hranjive podloge odnosno lipida iz biomase mikroalgi

Osim ekoloških, ekonomskih i tehnoloških rizika vezanih uz proizvodnju biomase mikroalgi operacije izdvajanja biomase iz hranjive podloge odnosno izdvajanja lipida iz stanica mikroalgi predstavljaju dodatan tehnološki izazov osobito s aspekta utroška energije. Glavne tehnološke operacije izdvajanja biomase mikroalgi iz hranjive podloge su centrifugiranje, flokulacija, filtracija, prešanje, sedimentacija i flotacija (Uduman i sur., 2010). Troškovi izdvajanja biomase iz hranjive podloge povećavaju troškove proizvodnje suhe tvari biomase mikroalgi za 20% do 30% (Grima i sur., 2003). Većina mikroalgi može se izdvojiti iz hranjive podloge procesom centrifugiranja. Centrifugiranje se provodi pri 500 do 1000 g, te se izdvaja od 80% do 90% ukupne biomase u periodu od 2 do 5 minuta. Nedostaci izdvajanja biomase mikroalgi centrifugiranjem su visoki utrošak energije i oštećenje stanica mikroalgi tijekom centrifugiranja. Da bi se uklonili nedostaci izdvajanja biomase centrifugiranjem izbor i redosljed operacija izdvajanja prilagođava se vrsti mikroalge, gustoći suspenzije i kriterijima osiguranja kakvoće gotovog proizvoda. Uobičajeno je provoditi operacije izdvajanja u dva stupnja pri čemu je prvi stupanj flokulacija, sedimentacija ili flotacija. Ovim postupcima uklanjanja se dio vode iz suspenzije, a koncentracija suhe tvari biomase mikroalgi se povećava u suspenziji na 5% do 10%. Nakon toga se u drugom stupnju uklanja ostatak vode prešanjem, filtracijom ili centrifugiranjem. Utrošak energije u drugom stupnju izdvajanja značajno je veći u usporedbi s prvim stupnjem (Brennan i Owende, 2010).

Flokulacija se može provoditi dodatkom anorganskih flokulanata (soli aluminijske ili željezne) pri čemu dolazi do adsorpcije aluminijskih ili željeznih iona na površinu negativno nabijenih stanica, te stvaranja nakupina stanica i taloženja (Grima i sur., 2003). Izdvajanje mikroalgi flokulacijom primjenjeno je kod vrsta iz rodova *Scenedesmus* i *Chlorella*. Nedostaci izdvajanja mikroalgi iz hranjive podloge flokulacijom su stvaranje velike količine mulja zbog primjene povećanih koncentracija anorganskih koagulanata, osjetljivost flokulacije na promjene pH vrijednosti, selektivnost flokulacije je ograničena na samo neke vrste mikroalgi, a izdvojena biomasa mikroalgi sadrži značajne količine željezovih ili aluminijskih iona, te je potrebno provesti dodatne postupke pročišćavanja.

Flokulacija se može provesti i korištenjem polielektrolita, a najefikasniji su polielektroliti kationskog tipa. Anionski i neutralni polielektroliti pokazali su se neučinkovitim za flokulaciju mikroalgi zbog odbijanja iona disociranih polielektrolita (Bilanovic i sur., 1988). Efikasnost flokulacija mikroalgi korištenjem polielektrolita određena je veličinom molekule i vrstom polielektrolita, funkcionalnim grupama na površini stanica mikroalgi (naboj površine stanične stijenke mikroalgi određen je vrstom i količinom funkcionalnih grupa na površini stanica), pH vrijednošću i sastavom (gustoćom) suspenzije (flokulacija korištenjem kationskih polielektrolita osobito je osjetljiva na prisutnost morske soli), ionskom jakošću i načinom miješanja hranjive podloge s mikroalgama (Uduman i sur., 2010; Grima i sur., 2003). Na flokulaciju polielektrolitima pozitivno utječe visoka koncentracija biomase mikroalgi (osigurava bolji kontakt stanica mikroalgi u suspenziji), brzina rotacije mješala koja omogućava dobar kontakt između stani-

ca i sprječava djelovanje sila smicanja na razbijanje flokula. Korištenjem kombinacije više različitih flokulanata može se ostvariti uspješna flokulacija mikroalgi. Kombinacija polielektrolita i aluminijskih soli korištena je za flokulaciju mikroalgi iz morske vode pri čemu je uspješnost procesa izdvajanja bila potpuna (Sukenic i sur., 1998). Flokulacija i taloženje stanica mikroalgi može se provesti i povećanjem pH vrijednosti suspenzije dodatkom NaOH. Do pojave autoflokulacije (sedimentacije) može doći i tijekom fototrofnog uzgoja zbog iskorištavanja CO₂ iz hranjive podloge i povećanja njene pH vrijednosti (Sukenic i Shelef, 1984).

Sedimentacija mikroalgi iz hranjive podloge korištena je kod izdvajanja biomase mikroalgi nakon uzgoja na otpadnim vodama. Brzina sedimentacije biomase mikroalgi ovisi o specifičnoj težini stanica mikroalgi pri čemu se stanice veće specifične mase lakše izdvajaju od stanica s manjom specifičnom masom (Edzwald, 1993). Da bi se osigurala veća brzina sedimentacije kombinira se sedimentacija i flokulacija, te se primjenjuju sedimentacijski tankovi slični onima za obradu otpadnih voda (Uduman i sur., 2010).

Flotacija se uspješno koristi za izdvajanje čestica promjera manjih od 500 μm, stoga je pogodna za izdvajanje stanica mikroalgi suspenzije. Tijekom flotacije mjehurići plina (uglavnom zraka) prolaskom kroz hranjivu podlogu podižu stanice mikroalgi i nose ih na površinu suspenzije. Na brzinu i efikasnost flotacije značajno utječu ovi čimbenici: tlak i vrijeme zadržavanja mjehurića zraka, reciklacijski omjer (odnos suspenzija/zrak), vrsta i afinitet stanica mikroalgi za kontakta s mjehurićima zraka. Osim toga, proučavan je i proces autoflokulacija (autoflotacija) korištenjem kisika proizvedenog tijekom fotosinteze i rasta mikroalgi nakon flokulacije s aluminijskim solima i polielektrolitima, te je ostvarena 80-90% učinkovitost izdvajanja stanica mikroalgi (Koopman i Lincoln 1983; Mollah i sur., 2004). Nadalje, pokazalo se da je flotacija nakon procesa flokulacije značajno efikasnija od procesa taloženja flokula stanica mikroalgi na dno posude (Edzwald, 1993). Flotacija s većim mjehurićima zraka (promjer sapnice raspršivača zraka 700-1500 μm) primjenjena je za izdvajanje biomase mikroalge *Scenedesmus quadricauda* u kombinaciji s flokulacijom pomoću kationskih i anionskih flokulanata. Na osnovi rezultata istraživanja uočeno je da je kombinacija kationskih flokulanata i flotacije najefikasnija za proces izdvajanja stanice mikroalgi iz hranjive podloge (Chen i sur., 2011). Mollah i suradnici (2004) primjenili su elektrokemijske metode za izdvajanje biomase mikroalgi procesom flotacije. Elektrolizom hranjive podloge s mikroalgama proizveden je vodik, te su mjehurići vodika potiskivali flokule stanica mikroalgi na površinu hranjive podloge. Korištenje elektrokemijskih metoda ograničeno je zbog porasta temperature hranjive podloge tijekom elektrolize te obrastanja elektroda filmom mikroalgi.

Korištenje procesa filtracije za izdvajanje biomase mikroalgi je učinkovito ukoliko se koriste filtri odgovarajuće konstrukcije i veličine pora. Najčešće se koriste rotacijski filtri sa sustavom za ispiranje filtra. Nakupljanjem stanica biomase mikroalgi dolazi do začepljenja pora filtra i zaustavljanja filtracije te je potrebno učestalo pranje filtra. Korištenjem vakuuma filtracije povećava se učinkovitost filtracije, ali i brzina začepljivanja pora filtra (Grima i sur., 2003). Vakuum filtracija i rotacioni vakuum filtri pogodni su za izdvajanje mikroalgi većih promjera stanica (iznad 10 μm). Uspješan rad rotacio-

nog vakuum filtra ovisi o veličini stanica i koncentraciji suspenzije mikroalgi nakon uzgoja mikroalgi u bioreaktoru. Stanice mikroalgi malog promjera ulaze u pore filtra i uzrokuju njegovo začepljenje odnosno zaustavljaju procesa filtracije. Stoga je potrebno osigurati kontrolu parametara proizvodnje mikroalgi u bioreaktoru kako bi se izbjegle promjene u veličini i koncentraciji stanica mikroalgi koje odlaze na proces filtracije. Korištenjem tangencijalnog toka hranjive podloge s mikroalgama ostvaruje se izdvajanje 70-89% stanica mikroalgi, te se povećava učinkovitost filtracije i smanjuje destrukcija stanica mikroalgi (zadržavaju se morfološka i fiziološka svojstva mikroalgi). Učestala zamjena membrana može postati ograničavajući ekonomski faktor za proces tangencijalne filtracije u industrijskom mjerilu. Da bi se osigurala dugotrajnija uporaba membrana istražena je upotreba membrana izrađenih od različitih polimernih materijala, te se najučinkovitijom pokazala primjena membrana izrađenih od poliakrilonitrila. Obrastanje filmom mikroalgi i začepljenje membrane može se smanjiti povećanjem hidrofobnosti površine membrane (Rosignol i sur., 1999). Ipak primjena membranske mikrofiltracije ograničena je na primjenu za osjetljive stanice mikroalgi u malim volumenima. Korištenje centrifugiranja i rotacionih vakuum filtera primjerenije je kod izdvajanja stanica mikroalgi iz suspenzija većih volumena.

Nakon ekstrakcije lipida iz biomase mikroalgi zaočta je velika količina neiskorištene biomase mikroalgi (ovisno o koncentraciji lipida od 20% do 80%). Jedan od načina iskorištavanja preostale biomase je korištenje biomase mikroalgi u proizvodnji bioplina pri čemu se preostala biomasa mikroalgi anaerobnom razgradnjom prevodi u metan i CO₂. Sialve i suradnici (2009) uočili su da se inhibicija procesa metanogeneze u proizvodnji bioplina iz ostataka biomase mikroalgi vrlo često javlja u slučaju kada je udjel proteina u biomasi mikroalgi visok (proizvodi se amonijak i mijenja se sastav i pH hranjive podloge) odnosno kod hranjivih podloga s visokim koncentracijama soli.

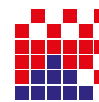
Prema Richmond-u glavni kriteriji izbora metode izdvajanja biomase mikroalgi iz suspenzije je cijena i čistoća izdvojene biomase, te cijena izdvajanja biomase. Za jeftinu biomasu (industrijske čistoće) namjenjenu primjeni u prehrambenom sektoru pogodna je gravimetrijska sedimentacija u kombinaciji s flokulacijom. Za biomasu mikroalgi namjenjenu primjeni u prehrambenom i farmaceutskom sektoru, kao i za brzo izdvajanje biomase mikroalgi primjerenije su operacije kontinuiranog centrifugiranja (rotacioni vakuum filter). Cijena gravimetrijske sedimentacije značajno je niža od cijene izdvajanja rotacionim vakuum filterom (Richmond, 2004).

Drugi važan kriterij za izbor metode izdvajanja je koncentracija biomase nakon izdvajanja i udjel vode u biomasi mikroalgi. Primjenom gravimetrijskih metoda (prvi stupanj) koncentriranja i izdvajanja biomase mikroalgi dobije se biomasa s većim udjelom vode, dok se primjenom rotacionog vakuum filtra i sušenja (drugi stupanj) proizvodi biomasa mikroalgi sa značajno većim udjelom suhe tvari. Nakon prvog stupnja izdvajanja udjel suhe tvari u biomasi mikroalgi je od 5% do 15%. Biomasa mikroalgi s visokim sadržajem vode nije pogodna za skladištenje zbog visokog rizika kontaminacije i gubitka željenih svojstava. Korištenjem gravimetrijske sedimentacije i filtracije u prvom stupnju, te centrifugiranja i sušenja u drugom stupnju, moguće je osigurati zadovoljavajuću kvalitetu

proizvedene biomase i reducirati ukupnu cijenu proizvodnje biomase mikroalgi (Richmond, 2004; Grima i sur., 2003).

Sušenje stanica mikroalgi nužan je korak prije ekstrakcije lipida i proizvodnje biodizela. Prisutnost vode usporava proces ekstrakcije i proizvodnju biodizela transesterifikacijom. Ukoliko su osigurani povoljni klimatski uvjeti, sušenje biomase mikroalgi može se provoditi na otvorenom. Ukoliko klimatski uvjeti nisu zadovoljavajući, sušenje se provodi u sušarama zatvorenog tipa. Energetske bilance su pokazale da je utrošak energije za sušenje biomase mikroalgi u sušarama značajan (može doseći 69% ukupno utrošene energije za proizvodnju biodizela), te doprinosi smanjenju ekonomske održivosti proizvodnje biodizela iz biomase mikroalgi (Sander i Murthy, 2010). Stoga su istraživanja novih tehnoloških rješenja za sušenje biomase mikroalgi nužna. Nakon sušenja mikroalgi potrebno je razbiti stanice mikroalgi te izdvojiti i pročititi željeni proizvod. Stanice mikroalgi mogu se uspješno razbiti korištenjem homogenizatora, kugličnih mlinova, ultrazvuka i toplinskih postupaka, a koriste se i procesi liofilizacije, osmotski tlak, hidroliza sastojaka stanične stijenke korištenjem kiselina, lužina ili enzima. Korištenje toplinskih postupaka i ultrazvuka energetski je neučinkovito, a kakvoća lipida nakon tretmana je relativno niska. Korištenje mlinova i mikrovalova povećalo je energetsku efikasnost te je kakvoća lipida nakon tretmana bila zadovoljavajuća. Alkalna hidroliza uspješno se koristi za razgradnju stanične stijenke mikroalgi prije ekstrakcije lipida. Lipidi iz stanica mikroalgi *Porphyridium cruentum* i *Phaeodactylum tricorutum* uspješno su saponificirani iz mokre biomase korištenjem mješavine kalij hidroksida i etanola (Grima i sur., 2003).

Nakon procesa sušenja biomase potrebno je lipide ekstrahirati iz biomase mikroalgi. Efikasna ekstrakcija lipida iz biomase mikroalgi osobito je značajna kod ekstrakcije iz stanica s malim udjelom lipida. Korištenje mehaničkih preša otežano je zbog čvrstoće staničnog zida mikroalgi. Stoga se najčešće primjenjuje ekstrakcija organskim otapalima. Organska otapala pokazuju visoku selektivnost i dobro otapaju lipide stoga se lipidi lako ekstrahiraju unutar stanica mikroalgi i difundiraju kroz staničnu stijenku mikroalgi. Koriste se organska otapala: heksan, kloroform, izopropanol, metanol, etanol (96%), smjesa heksana i etanola (Richmond, 2004). Nedostatak ekstrakcije organskim otapalima je njihova toksičnost, te zbrinjavanje otapala nakon ekstrakcije. Na efikasnost ekstrakcije uz izabranu metodu ekstrakcije značajno utječe i vrsta mikroalge iz koje se lipidi ekstrahiraju. Kao najefikasnija metoda pokazala se modificirana Blight-ova i Dyer-ova metoda. Premda se n-heksan može uspješno koristiti za ekstrakciju lipida iz uljarica zbog visokog udjela nezasićenih masnih kiselina u stanicama mikroalgi i nepolarosti n-heksana ekstrakcija lipida iz mikroalgi s n-heksanom je otežana. Etanol kao ekstrakcijsko sredstvo ima prednost zbog manje toksičnosti i mogućnosti proizvodnje iz obnovljivih izvora biomase. Međutim, etanol daje manje iskorištenja zbog stvaranja azeotropne smjese (s 5% vode) koja smanjuje efikasnost ekstrakcije. Brzina ekstrakcije limitirana je difuzijom ekstrahiranih lipida iz stanica mikroalgi, te da bi se povećala efikasnost koristi se u kombinaciji s nekom od metoda za razbijanje stanica. Ipak, utrošak energije tijekom razbijanja stanica je značajan pa je korištenje direktne ekstrakcije bez razbijanja stanica ponekad energetski učinkovitije (Ranjan i sur., 2010).



Istražena je i ekstrakcija lipida mikroalgi potpomognuta djelovanjem ultrazvuka i mikrovalova. Usporedbom navedenih metoda tijekom potpomognute ekstrakcije ostvareni su prinosi veći do 50% te je skraćeno vrijeme ekstrakcije. Istraživanja su provedena pri 19, 25, 40 and 300 kHz, te u kombinaciji simultane ultrazvučne i mikrovalne ekstrakcije. Korištenjem ultrazvuka tijekom ekstrakcije mikroalge *Cryptocodinium cohnii* ostvarena su povećanja efikasnosti ekstrakcije do 25,9% (Cravotto i sur., 2008). Ipak, ekstrakcija lipida potpomognuta ultrazvukom nije našla širu industrijsku primjenu zbog značajnih utrošaka energije.

U posljednjih nekoliko godina koristi se ekstrakcija u superkritičnim uvjetima te se koriste i ionske tekućine. Ove metode najčešće se koriste za ekstrakciju farmaceutskih proizvoda iz stanica mikroalgi. Ekstrakcija u superkritičnim uvjetima korištena je za ekstrakciju lipida i proizvodnju biodizela iz *Chlorococcus sp.* (Halim i sur., 2011.). Usporedbom Blight i Dyer-ova metode i ekstrakcije u superkritičnim uvjetima ostvareni su dvostruko veći prinosi lipida nakon ekstrakcije u superkritičnim uvjetima.

Potrebno je naglasiti da izdvajanje i pročišćavanje proizvoda iz biomase mikroalgi značajno povećava proizvodnu cijenu biokemikalija i biogoriva te je potrebno izabrati optimalnu metodu izdvajanja i pročišćavanja lipida kako bi se ostvarili ekološki i ekonomski čimbenici održivog razvoja proizvodnje biokemikalija iz biomase mikroalgi.

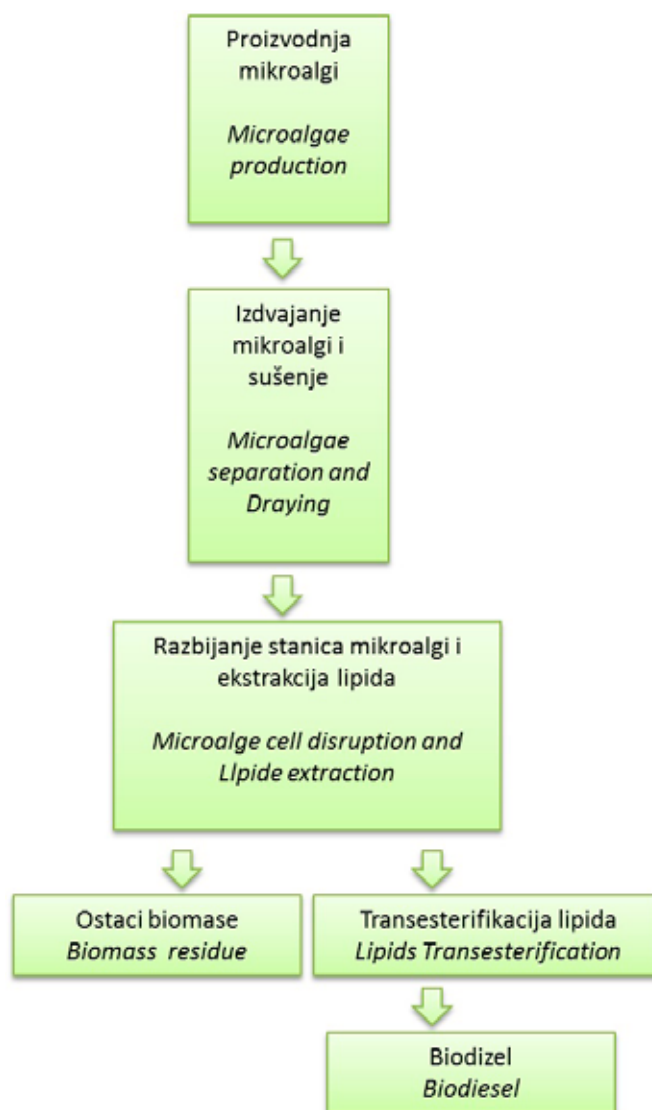
2.5. Proizvodnja biodizela iz lipida mikroalgi

Nakon ekstrakcije lipida iz biomase mikroalgi lipidi se mogu prevesti u biodizel. Nekoliko je načina proizvodnje biodizela iz lipida mikroalgi: transesterifikacija u homogenim uvjetima okoline, transesterifikacija u heterogenim uvjetima okoline i *in situ* transesterifikacija.

Transesterifikacija u homogenim uvjetima okoline provodi se reakcijom između triglicerida i alkohola (npr. metanola ili etanola). Kalij ili natrij hidroksid koriste se kao katalizatori. Međutim, ponekad se zbog visokog udjela masnih kiselina uz transesterifikaciju odvija i saponifikacija (reakcija između masnih kiselina i NaOH ili KOH). Zbog toga smanjuje se prinos biodizela i efikasnost transesterifikacije, te se otežava izdvajanje biodizela. Da bi se izbjegla saponifikacija koriste se kiseli katalizatori (sulfatna kiselina), te se esterifikacija i transesterifikacija odvijaju simultano. Nadalje, primjenjuje se i dvostupanjski proces u kojem je prvi stupanj kataliziran kiselim, a drugi lužnatim katalizatorom (NaOH ili KOH). Na ovaj način se ostvaruju bolji prinosi i izbjegnuta je pojava saponifikacije s lužnatim katalizatorom zbog visokog udjela masnih kiselina. Nedostaci dvostupanjskog procesa su dodatni troškovi (Lam i Lee 2012).

Preliminarna istraživanja pokazala su da se lipidi iz stanica mikroalgi mogu prevesti u biodizel transesterifikacijom korištenjem postojeće opreme za proizvodnju biodizela iz biljnih i otpadnih ulja. Transesterifikacija *C. vulgaris* provedena je pri 43°C korištenjem 0,42 w/w % NaOH i omjera metanola i ulja 14:1. Vrijeme transesterifikacije bilo je iznosilo 90 minuta. Međutim, potrebno je provesti dodatna istraživanja procesa transesterifikacije lipida iz mikroalgi kao i karakteristika biodizela proizvedenog iz biomase mikroalgi (Plata i sur., 2010).

Prednosti transesterifikacije u heterogenim uvjetima su lakše izdvajanje i pročišćavanje proizvoda (biodizela) i višestruka upotreba katalizatora. U literaturi je prisutan relativno mali broj istraživanja transesterifikacije lipida iz mikroalgi u heterogenim uvjetima. Nedavno su provedena istraživanja na lipidima izoliranim iz alge *Nannochloropsis oculata* pri čemu je provedena transesterifikacija pri 50°C korišten uz katalizator CaO i Al₂O₃. Omjer metanola i lipida bio je 30:1, te je dodano 2 w/w% čvrstog katalizatora (izračunato u odnosu na masu lipida u reakcijskoj smjesi). Reakcija je trajala 4 h. Brzina transesterifikacije u heterogenim uvjetima na početku određena je otporima prijenosu mase u čvrstom katalizatoru. Istraživanja su pokazala da korištenjem CaO nastaje vrlo malo biodizela. Međutim korištenjem CaO i Al₂O₃ u masenom omjeru 8:1 ostvareni su najveći prinosi biodizela. Kao katalizator korišteni su također Mg-Zn i zeoliti, ali nisu ostvarene zadovoljavajuće konverzije lipida mikroalgi u biodizel (ispod 30%) (Carrero i sur., 2010).



Slika 3. Blok shema procesa proizvodnje biodizela iz lipida mikroalgi

Figure 3. Blok scheme of biodiesel production process from microalgae lipids

Process *in-situ* transesterifikacije objedinjava dva koraka ekstrakcije i transesterifikaciju. U ovakvom procesu otapalo ima ulogu ekstrakcijskog sredstava i reaktanta. Glavne prednosti procesa *in-situ* transesterifikacije su: olakšano izdvajanje otapala, smanjenje vremena i operativnih troškova proizvodnje biodizela (Shuit i sur. 2010). Uspješna *in situ* transesterifikacija (ostvareni 90% prinosi biodizela) suhe biomase mikroalge *Chlorella sp.* ostvarena je pri masenom omjeru metanola i lipida (315:1) i koncentracije sulfatne kiseline 0,04 mol, a reakcijsko vrijeme bilo je 4 h pri temperaturi 60°C (Ehimen i sur., 2010). Miao i suradnici (2011) dobre rezultate *in-situ* transesterifikacije lipida iz biomase mikroalgi ostvarili su korištenjem dva otapala: heksan u masenom omjeru heksan prema lipidima 76:1 i metanol u masenom omjeru prema lipidima 165:1. Nadalje kao otapala mogu se koristiti: toluen, klorofom, diklormetan (Miao i sur., 2011). Prisutnost vode u većim količinama u potpunosti zaustavlja *in situ* transesterifikaciju. U prisutnosti vode trigliceridi vrlo lako hidroliziraju u digliceride i masne kiseline. Stoga je za uspješno odvijanje transesterifikacije potrebno ukloniti vodu sušenjem biomase kako bi se izbjegla hidroliza triglicerida i dodatni troškovi izdvajanja vode nakon transesterifikacije (Ehimen i sur., 2010). Blok shema proizvodnje biodizela iz lipida biomase mikroalgi prikazan je na slici 3.

3. Zaključak

Uspješnost biotehnoške proizvodnje biomase odnosno lipida mikroalgi određena je fiziološkim potencijalom mikroalge odnosno uvjetima i postupkom vođenja bioprocasa u bioreaktorskom sustavu. Optimalni uvjeti uzgoja u bioreaktorskim sustavima vezani su uz sastav hranjive podloge, efikasnost dopreme svjetlosti do stanica mikroalgi, intenzitet i valnu duljinu svjetlosti, pH, temperaturu, brzinu i način miješanja hranjive podloge u bioreaktoru, te omjer koncentracije otopljenog kisika i CO₂ u hranjivoj podlozi. Nadalje, izborom adekvatne konstrukcije bioreaktorskog sustava i postupka vođenja bioprocasa mogu se dobiti relativno visoki prinosi biomase mikroalgi i udjel lipida u stanicama mikroalgi. Na ukupnu cijenu proizvodnje biomase odnosno lipida mikroalgi značajno utječu i postupci izdvajanja i pročišćavanja biomase odnosno lipida mikroalgi nakon uzgoja u bioreaktorskom sustavu. Stoga je za industrijsku proizvodnju biomase odnosno lipida mikroalgi potrebno odabrati optimalne uvjete i postupak vođenja bioprocasa u bioreaktorskom sustavu tako da se dobije ekološki i ekonomski održivi bioprocasa proizvodnje biomase odnosno lipida mikroalgi za proizvodnju biogoriva (biodizela).

Literatura

Anonymous 1: International Energy Agency (2009) Dostupno na: http://www.iea.org/stats/balancetable.asp?COUNTY_CODE=29, Pristupljeno: 04.07.2013.

Barnwal B.K., Sharma M.P. (2005) Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable and Sustainable Energy Review*, 9, 363–378.

Bilanovic D., Shelef G., Sukenik A. (1988) Flocculation of microalgae with cationic polymers – effects of medium salinity. *Biomass*, 17, 65–76.

Brennan L., Owende P. (2010) Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and ex-

tractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Review*, 14, 557–577.

Carrero A., Vicente G., Rodríguez R., Linares M., del Peso G.L. (2010) Hierarchical zeolites as catalysts for biodiesel production from *Nannochloropsis* microalga oil. *Catalysis Today*, 167, 148–53.

Chen C.Y., Yeh K.L., Aisyah R., Lee D.J., Chang J.S. (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102, 71–81.

Chisti Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advance*, 25, 294–306.

Chiu S.Y., Kao C.Y., Chen C.H., Kuan T.C., Ong S.C., Lin C.S. (2008) Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella sp.* in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology*, 99, 3389–3396.

Chojnacka K., Marquez-Rocha F.J. (2004) Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, 3, 21–34.

Cravotto G., Boffa L., Mantegna S., Perego P., Avogadro M., Cintas P. (2008) Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 898–902.

Edzwald J.K. (1993) Algae, bubbles, coagulants, and dissolved air flotation. *Water Science and Technology*, 27, 67–81.

Ehimen E.A., Sun Z.F., Carrington C.G. (2010) Variables affecting the *in situ* transesterification of microalgae lipids. *Fuel*, 89, 677–84.

Gnansounou, E., Dauriat A., Villegas J., Panichelli L. (2009) Life cycle assessment of biofuels: Energy and greenhouse gas balances. *Bioresource Technology*, 100, 4919–4930.

Gouveia L., Oliveira A.C. (2009) Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 269–274.

Grima M.E., Belarbi E.H., Fernandez F.G.A., Medina A.R., Chisti Y. (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20, 491–515.

Halim R., Gladman B., Danquah M.K., Webley P.A. (2011) Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102, 178–85.

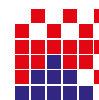
Hallenbeck P.C., Benemann J.R. (2002) Biological hydrogen production: fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1185–1193.

Hossain A.B.M.S., Salleh A., Boyce A.N., Chowdhury P., Naquiddin M. (2008) Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4, 250–254.

Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A. (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54, 621–639.

Huang G.H., Chen F., Wei D., Zhang X.W., Chen G. (2010) Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87, 38–46.

Koopman B., Lincoln E.P. (1983) Autoflotation harvesting of algae from high-rate pond effluents. *Agricultural Wastes*, 5, 231–246.



- Lam K.M., Lee K.T. (2012) Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30, 673–690.
- Li Y., Horsman M., Wu N., Lan C.Q., Dubois-Calero N. (2008b) Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*, 24, 815–20.
- Li Y., Wang B., Wu N., Lan C.Q. (2008a) Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid production of *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 629–636.
- Liu B., Benning C. (2013) Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 300–309.
- Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Review*, 14, 217–232.
- Miao X., Li P., Li R., Zhong J. (2011) In situ biodiesel production from fast-growing and high oil content *Chlorella pyrenoidosa* in rice straw hydrolysate. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–8.
- Moazami N., Ashori A., Ranjbar R., Tangestani M., Eghtesadi R., Nejad A.S. (2012) Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. *Biomass and Bioenergy*, 39, 449–453.
- Mollah M.Y.A., Morkovsky P., Gomes J.A.G., Kesmez M., Parga J., Cocke D.L. (2004) Fundamentals, present and future perspectives of electrocoagulation. *Journal of Hazardous Materials*, 114, 199–210.
- Pulz O., Gross W. (2001) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 287–293.
- Plata V., Kafarov V., Moreno N. (2010) Optimization of third generation biofuels production: biodiesel from microalgae oil by homogeneous transesterification. *Chemical Engineering Transactions*, 21, 1201–1206.
- Ranjan A., Patil C., Moholkar V.S. (2010) Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49, 2979–2985.
- Richmond A. (2004) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.
- Rodolfi L., Zittelli G.C., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R. (2009) Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 100–112.
- Rosenberg J.N., Oyler G.A., Wilkinson L., Betenbaugh M.J. (2008) A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 430–436.
- Rossignol N., Vandanjon L., Jaouen P., Quemeneur F. (1999) Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultra-filtration. *Aquaculture Engineering*, 20, 191–208.
- Sander K., Murthy G.S. (2010) Life cycle analysis of algae biodiesel. *International Journal of Life Cycle Assessment*, 15, 704–714.
- Schenk P.M., Hall S.R.T., Stephens E., Marx U.C., Mussgnug J.H., Posten C, Kruse O., Hankamer B. (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*, 1, 20–43.
- Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P. (1998) A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. NREL/TP-580-24190, National Renewable Energy Laboratory, USA. Dostupno na: www.nrel.gov/biomass/pdfs/24190.pdf. Pristupljeno: 7.7.2013.
- Shuit S.H., Lee K.T., Kamaruddin A.H., Yusup S. (2010) Reactive extraction of *Jatropha curcas* L. seed for production of biodiesel: process optimization study. *Environmental Science & Technology*, 44, 4361–4367.
- Sialve N., Bernet N., Bernard O. (2009) Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27, 409–416.
- Sukenik A., Bilanovic D., Shelef G. (1988) Flocculation of microalgae in Brackish and sea waters. *Biomass*, 15, 187–199.
- Sukenik A., Shelef G. (1984) Algal autoflocculation – verification and proposed mechanism. *Biotechnology Bioengineering*, 26, 142–147.
- Tsukahara K., Sawayama S. (2005) Liquid fuel production using microalgae. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, 48, 251–259.
- Uduman N., Qi Y., Danquah M.K., Forde G.M., Hoadley A. (2010) Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2, 012701, Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1063/1.3294480>. Pristupljeno: 8.7.2013.
- Xu H., Miao X.L., Wu Q.Y. (2006) High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126, 499–507.
- Yang J., Xu M., Hu Q., Sommerfeld M., Chen Y. (2011) Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology*, 102, 159–165.