

# Optimizacija rasta mikroalge *Picochlorum* sp. i proizvodnje lipida u stresnim uvjetima

---

**Mlakić, Lucija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:972570>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-25**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Lucija Mlakić

**OPTIMIZACIJA RASTA  
MIKROALGE *Picochlorum* sp. I  
PROIZVODNJE LIPIDA U  
STRESNIM UVJETIMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirele Ivančić Šantek te uz pomoć mag. ing. Marine Grubišić.

Diplomski rad je izrađen u okviru znanstveno istraživačkog projekta „BioProspecting Jadranskog mora“ financiranog od strane Strukturnih i investicijskih fondova EU u sklopu Operativnog programa „Konkurentnost i kohezija 2014.-2020.“ (Poziv: Vrhunska istraživanja Znanstvenih centara izvrsnosti KK.01.1.1.01).

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

## OPTIMIZACIJA RASTA MIKROALGE *Picochlorum* sp. I PROIZVODNJE LIPIDA U STRESNIM UVJETIMA

*Lucija Mlakić*, univ. bacc. ing. biotechn., 0058211239

**Sažetak:** U ovome radu proveden je uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. s ciljem optimizacije rasta i proizvodnje lipida u stresnim uvjetima izazvanih dodatkom NaCl (0 - 100 g L<sup>-1</sup>) i izostavljanjem izvora dušika i fosfora u hranjivoj podlozi. U istraživanju učinka rastućih koncentracija NaCl utvrđen je najveći udio lipida u suhoj tvari biomase (12,59 %) narasloj u hranjivoj podlozi sa 10 g L<sup>-1</sup> NaCl, a najveća produktivnost rasta biomase mikroalge postignuta je uzgojem u podlozi sa 20 g L<sup>-1</sup> NaCl (0,0211 g L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>). U dvofaznom šaržnom uzgoju istražen je učinak stresa (2. faza rasta) izazvanog nakon rasta mikroalge u optimalnim uvjetima (1. faza rasta). Najveći udjel lipida (14,15 %) postignut je u kontrolnoj hranjivoj podlozi (f/2), dok je nedostatak izvora dušika rezultirao najslabijim rastom biomase. Također je proveden i fototrofni šaržni uzgoj mikroalge u barbotirajućoj koloni uz propuhivanje smjesom zraka i ugljikovog dioksida. Prihranom limitirajućim nutrijentima u prvoj fazi uzgoja omogućen je brz rast i nakupljanje biomase, dok je u drugoj fazi iscrpljivanje izvora dušika i fosfora potaknulo sintezu i nakupljanje lipida. Uz lipide (73,77 %) najzastupljenija makromolekula u suhoj tvari biomase su bili proteini (20,93 %).

**Glavne riječi:** mikroalge, *Picochlorum* sp., nutrijenti, salinitet, barbotirajuća kolona

**Rad sadrži:** 71 stranica, 10 slika, 14 tablica, 163 literaturnih navoda, 5 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek

**Pomoć pri izradi:** Marina Grubišić, mag. ing.

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ksenija Markov (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek (mentor)
3. prof. dr. sc. Jasna Novak (član)
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjenski član)

**Datum obrane:** 25. rujna 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**

**Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

### OPTIMIZATION OF THE GROWTH OF MICROALGAE *Picochlorum* sp. AND LIPID PRODUCTION IN STRESS CONDITIONS

*Lucija Mlakić*, univ. bacc. ing. biotechn., 0058211239

**Abstract:** In this paper, experiments were performed with the aim of optimising growth and lipid accumulation of microalgae *Picochlorum* sp. in stressful conditions via addition of NaCl (0 – 100 g L<sup>-1</sup>) and phosphorus and nitrogen limitation. The culture grown in medium with 10 g L<sup>-1</sup> NaCl resulted in the highest lipid (12.59 %) accumulation, while the highest productivity of biomass was achieved in the medium with 20 g L<sup>-1</sup> NaCl (0.0211 g L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>). In the two-stage batch cultivation, the effect of stress (2<sup>nd</sup> phase) induced after providing optimal growth conditions (1<sup>st</sup> phase) for the microalgae was investigated. The control - f/2 medium resulted in the highest lipid content (14.15 %), while the nitrogen deficient medium had the most inhibitory effect on growth. Phototrophic batch cultivation in bubble column photobioreactor aerated with a mixture of air and carbon dioxide was also performed. Supplementation with limiting nutrients in the first phase of cultivation enabled rapid growth and accumulation of biomass, while the depletion of nitrogen and phosphorus sources in the second phase stimulated synthesis and accumulation of lipids. The most abundant macromolecules in the biomass were lipids (73,77 %), followed by proteins (20,93 %).

**Keywords:** *microalgae, Picochlorum* sp., *nutrients, salinity, bubble column bioreactor*

**Thesis contains:** 71 pages, 10 figures, 14 tables, 163 references, 5 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Mirela Ivančić Šantek, PhD, Full professor

**Technical support and assistance:** Marina Grubišić, MSc.

#### Reviewers:

1. Ksenija Markov, PhD, Full professor (president)
2. Mirela Ivančić Šantek, PhD, Full professor (mentor)
3. Jasna Novak, PhD, Full professor (member)
4. Blaženka Kos, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 25<sup>th</sup> September 2023

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. MIKROALGE</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. UZGOJ MIKROALGI I ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA NJEGA</b> .....	<b>4</b>
2.2.1. Svjetlost, temperatura pH i miješanje .....	6
2.2.2. Nutrijenti .....	8
2.2.3. Izvori ugljika .....	9
<b>2.3. BIOTEHNOLOŠKA PRIMJENA MIKROALGI</b> .....	<b>10</b>
2.3.1. Proizvodnja biogoriva iz mikroalgi.....	11
<b>2.4. UTJECAJ VISOKIH KONCENTRACIJA NATRIJEVOG KLORIDA NA MIKROALGE</b> .....	<b>12</b>
2.4.1. Proizvodnja tvari za regulaciju osmotskog tlaka .....	14
2.4.2. Akumulacija lipida.....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>17</b>
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	17
3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjive podloge.....	17
3.1.3. Ostale kemikalije i kitovi korišteni u eksperimentu.....	18
3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj mikroalge .....	19
3.1.5. Oprema i uređaji .....	20
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>22</b>
3.2.1. Uzgoj inokuluma mikroalge.....	22
3.2.2. Priprema hranjivih podloga.....	22
3.2.3. Optimiziranje saliniteta podloge s obzirom na rast i sastav biomase .....	23
3.2.4. Ispitivanje učinka saliniteta i limitacije izvorom dušika i fosfora na rast i sastav biomase .....	23
3.2.5. Šaržni uzgoj u barbotirajućoj koloni uz propuhivanje CO <sub>2</sub> .....	23
3.2.6. Analitičke metode .....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1. UČINAK SALINITETA NA RAST I SASTAV BIOMASE MIKROALGE</b> .....	<b>33</b>
4.1.1. Šaržni uzgoj mikroalge uz dodatak natrijevog klorida .....	33



4.1.2. Udjeli proteina i lipida u biomasi mikroalge u podlogama s različitim salinitetima .....	37
<b>4.2. ISTRAŽIVANJE UČINKA VISOKOG SALINITETA I LIMITACIJE IZVOROM DUŠIKA I FOSFORA NA RAST I SASTAV BIOMASE MIKROALGE .....</b>	<b>40</b>
4.2.1. Dvofazni šaržni uzgoj mikroalge uz primjenu stresnih uvjeta.....	41
4.2.2. Utjecaj limitacije izvorom dušika i fosfora te visokih koncentracija NaCl na sastav biomase mikroalge <i>Picochlorum</i> sp. ....	44
<b>4.3. ŠARŽNI UZGOJ MIKROALGE U BARBOTIRAJUĆOJ KOLONI.....</b>	<b>49</b>
4.3.1. Sastav biomase <i>Picochlorum</i> sp. tijekom šaržnog uzgoja u barbotirajućoj koloni.	54
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>58</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>59</b>
<b>7. PRILOZI.....</b>	<b>.....</b>

# 1. UVOD

Upotreba mikroalgi seže tisućama godina unazad. Međutim, uzgoj mikroalgi u velikom mjerilu spada u sferu moderne biotehnologije. Napredak u mikroalgalnoj biotehnologiji pridonosi prepoznavanju i boljem korištenju golemog potencijala ovih sveprisutnih fotosintetskih mikroorganizama (Gigova i Marinova, 2016). U prirodnim staništima, mikroalge su često izložene abiotičkim (niske/visoke temperature, suša, niski/visoki intenziteti svjetlosti, nedostatak hranjivih tvari) i biotičkim stresorima (interakcija s drugim mikroorganizmima). Osnova opstanka mikroalgi u surovim okruženjima s varirajućim fizikalno-kemijskim parametrima njihova su izvanredna fiziološka i biokemijska prilagodljivost (Falkowski i sur., 1997). Razvile su niz adaptivnih i obrambenih mehanizama kao što su promjena omjera i sastava glavnih strukturnih i funkcionalnih komponenti stanice (proteini, ugljikohidrati, lipidi, pigmenti), aktivacija neenzimskih i enzimskih obrambenih mehanizama te sinteza tvari s citotoksičnim i antibakterijskim djelovanjem (Gigova i Marinova, 2016).

Komercijalizacija biogoriva ograničena je na uporabu poljoprivrednih kultura koje se koriste u prehrani ljudi i stočarstvu te lignoceluloznih sirovina. Potraga za održivim i obnovljivim alternativnim sirovinama za proizvodnju biogoriva stavila je mikroalge u fokus kao potencijalnu sirovinu za proizvodnju biogoriva koja se ističe visokom brzinom rasta kao i sposobnošću nakupljanja ugljikohidrata (uglavnom u obliku škroba) te lipida - molekula prekursora za proizvodnju biogoriva. Budući da mikroalge tijekom rasta nakupljaju i druge industrijski važne biomolekule (npr. proteine, pigmente i vitamine), mikroalge su obećavajuća sirovina za biorafinerije koje nude profitabilan i konkurentan pristup koprodukciji biogoriva zajedno s drugim visokovrijednim kemikalijama (Figueroa-Torres i sur., 2021). Iako je ovo istraživačko područje već značajno napredovalo, metabolički odgovori mikroalgi na gore navedene stresore još uvijek nisu u potpunosti istraženi pa se ističe potreba za usavršavanjem metoda uzgoja čime bi se omogućila što učinkovitija eksploatacija njihove biomase.

Izazivanjem stresa uz prisustvo izvora energije i ugljika tijekom uzgoja mikroalgi može se potaknuti nakupljanje rezervi energije, ugljikohidrata i/ili lipida. Imajući to na umu, cilj ovog rada bio je provesti dvofazni uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. koja se u brojnim istraživanjima opisanim u literaturi ističe sposobnošću nakupljanja lipida i profilom masnih kiselina pogodnim za proizvodnju biodizela, kao i povećanom tolerancijom (otpornošću) na

razne stresne uvjete. Prije provedbe dvofaznog uzgoja, u preliminarnom eksperimentu istražen je učinak niskih i visokih koncentracija natrijevog klorida, te nedostatak dušika, fosfora na rast i sastav biomase. Nakon odabira pogodnih stresnih uvjeta za poticanje nakupljanja lipida proveden je dvofazni uzgoj u barbotirajućoj koloni uz propuhivanje podloge zrakom i ugljikovim dioksidom. U prvoj fazi uzgoja, prihranom kulture izvorom dušika i fosfora omogućen je brz rast stanica i nakupljanje biomase, a zatim u drugoj fazi uzgoja uslijed iscrpljivanja izvora dušika i fosfora potaknuto je nakupljanje lipida.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MIKROALGE

Mikroalge su fotosintetski mikroorganizmi koji predstavljaju iznimno važnu skupinu organizama vodenog ekosustava (Naselli-Flores i Padišák, 2023). Pokazuju visoki stupanj raznolikosti i uključuju vrste koje s evolucijskog gledišta mogu biti vrlo udaljene te mogu biti jednostanične, kolonijalne ili filamentozne (Postma i sur., 2016). Unatoč njihovoj maloj veličini koja se kreće između 0,2 i 200  $\mu\text{m}$ , mogu pridonijeti ublažavanju klimatskih promjena fiksacijom ugljika (Vu i sur., 2018). Za razliku od heterotrofnih organizama kojima su za rast potrebni različiti organski izvor ugljika, fotosintetski organizmi proizvode biomasu od potpuno oksidiranih anorganskih tvari zahvaljujući apsorbiranoj energiji svjetlosti kao pokretaču biokemijskih reakcija (Demirel i sur., 2018). Glavni kriteriji za klasifikaciju ovih mikroorganizama su pigmentacija, kemijski sastav rezervnih tvari te građa osnovnih staničnih struktura. Prema Mata i sur. (2010), u naziv mikroalge uključeni su organizmi s dvije vrste stanične strukture: prokariotskom strukturom s predstavnicima u koljenima *Cyanophyta* i *Prochlorophyta* te eukariotskom strukturom s predstavnicima u koljenima *Glaucophyta*, *Rhodophyta*, *Ochrophyta*, *Haptophyta*, *Cryptophyta*, *Dinophyta*, *Euglenophyta*, *Chlorarachniophyta* i *Chlorophyta*. Međutim, s aspekta upotrebe u biotehnologiji izdvajaju se cijanobakterije (*Cyanophyta*), zelene alge (*Chlorophyta*) i dijatomeje (*Ochrophyta*).

Razred *Treuboxiophyceae* sastoji se od više od 840 morfološki raznolikih vrsta zelenih mikroalgi, a među njima se nalazi rod *Picochlorum* sp. koji je prvi put opisao Henley i sur. (2004). Mikroalge roda *Picochlorum* sp. nastanjuju pretežno morske i bočate vode te imaju okrugle do ovalne stanice glatke površine, promjera 1,5 - 3,0  $\mu\text{m}$  s jednom jezgrom, mitohondrijem i bočnim kloroplastom. Generalno ne sadrže pirenoide, a kloroplast oblika slova U zauzima dvije trećine stanice te nakuplja škrobna zrnca (Mucko i sur., 2020, Gonzalez-Esquer i sur., 2019).

U ovom eksperimentalnom radu provedeno je istraživanje s morskom mikroalgom *Picochlorum* sp. koju odlikuje nekoliko jedinstvenih karakteristika važnih za biotehnološke primjene kao što su brži rast od drugih često korištenih mikroalgi u biotehnologiji (*Dunaliella*, *Nannochloropsis*), otpornost na visoki intenzitet svjetla i salinitet te prilagođenost na povišene temperature (35 - 40 °C) koje se često postižu tijekom otvorenog uzgoja (Gonzalez-Esquer i sur., 2019, Krishnan i sur., 2021). Istraženo je nekoliko sojeva iz roda *Picochlorum* sp. uključujući *Picochlorum oklahomensis* i *Picochlorum atomus* koji se

smatraju prikladnima za pročišćavanje otpadnih voda i proizvodnju biogoriva i nutraceutika radi sposobnosti izdvajanja biomase flokulacijom, visoke proizvodnje biomase ( $1,8 - 2,1 \text{ g L}^{-1}$ ), visokog sadržaja proteina ( $350 - 550 \text{ g kg}^{-1}$ ) i karotenoida te sposobnosti nakupljanja lipida bez primjene stresnih uvjeta s udjelima lipida  $16 - 25 \%$  u suhoj tvari (Foflonker i sur., 2016). Mikroskopska slika stanica mikroalge *Picochlorum* sp. prikazana je na slici 1.



**Slika 1.** Mikroskopska slika stanica mikroalge *Picochlorum* sp. (vlastita fotografija)

## **2.2. UZGOJ MIKROALGI I ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA NJEGA**

S obzirom na izvor ugljika i energije, mikroalge se mogu uzgajati fotoautotrofno, heterotrofno, miksotrofno i fotoheterotrofno. Najstariji i najčešće korišteni način uzgoja je fotoautotrofni gdje se kao izvor energija koriste svjetlost i  $\text{CO}_2$  za stvaranje kemijske energije procesom fotosinteze. Fotoautotrofni uzgoj pridonosi globalnom smanjenju ugljikova dioksida te se preporuča za uzgoj u velikim mjerilima jer je rizik od kontaminacije manji u usporedbi s ostala tri načina uzgoja, no takvi uvjeti uzgoja rezultiraju najmanjom koncentracijom biomase (Chew i sur., 2018). Heterotrofna kultivacija podrazumijeva korištenje organskog izvora ugljika kao izvor energija te je u nekoliko istraživanja utvrđeno da ovakvim načinom uzgoja postiže veća koncentracija biomase i bolji prinos lipida. Također se mogu izbjeći poteškoće sa osiguravanjem izvora svjetlosti u fotobioreaktorima u velikom mjerilu, no javlja se problem kontaminacije i većih troškova supstrata (Chew i sur., 2018). Miksotrofni uzgoj podrazumijeva korištenje organskih i anorganskih izvora ugljika za rast, a mikroalge koje su pogodne za ovaj tip uzgoja mogu rasti i u fototrofnim i u heterotrofnim uvjetima, ovisno o koncentraciji dostupnih organskih spojeva i dostupnom intenzitetu

svjetlosti. Fotoheterotrofna kultivacija najrjeđe se koristi, a zahtijeva organski izvor ugljika uz obavezno prisustvo izvora svjetlosti (Chew i sur., 2018).

Od 1950-ih godina razvijaju se različiti sustavi uzgoja i tehnologije uzgoja mikroalgi uz korištenje prirodne i umjetne svjetlosti. Za uzgoj mikroalgi u velikom mjerilu koriste se dva glavna principa: uzgoj u otvorenim sustavima u kojemu su mikroalge u izravnom kontaktu s okolišem te uzgoj u poluotvorenim ili zatvorenim posudama - fotobioreaktorima. Pod otvorene sustave spadaju prirodna ili umjetna jezera, plitki kanali s lopatastim miješalima, kružne staze miješane s rotirajućim miješalima i kaskadni sustavi pod nagibom. S druge strane, fotobioreaktori se mogu naći u obliku cijevi, kolona ili ploča u kojima cirkulira suspenzija mikroalgi (Malapascua, 2018). Otvoreni sustavi imaju široku primjenu u industriji zbog manjih troškova izgradnje, jednostavnog rukovanja i održavanja, niske potrošnje energije i jednostavnijeg prijenosa u veće mjerilo. Međutim, takva vrsta kultivacije mikroalgi rezultira nižom koncentracijom biomase te se javljaju problemi kao što su dotok oborinskih voda koje utječu na uvjete rasta mikroalgi mijenjajući salinitet i pH te erozija obala koja rezultira povećanom zamućenosti vode. Drugi problem koji se javlja u otvorenim sustavima je mogućnost kontaminacije protozoama, bakterijama i drugim mikroalgama što krajnji proizvod mogu učini neupotrebljivim. Osim toga, teže je kontrolirati parametre rasta kao što su temperatura i intenzitet svjetlosti. Iz ovih razloga razvijeni su zatvoreni sustavi u kojima je olakšana kontrola procesa te se mogu projektirati u skladu s odabranim sojem. Fotobioreaktori koriste manje prostora uz povećanje dostupnosti svjetla i smanjenje mogućnosti kontaminacije, no također imaju nedostatke kao što su vrlo visoki kapitalni troškovi, pregrijavanje sustava, otežano čišćenje zbog nastajanja mikroalgalnog biofilma na površinama stijenki te nakupljanje velikih količina kisika u podlozi što dovodi do ograničenja rasta (Molina Grima i sur., 1999).

Izbor prikladnog sustava i režima uzgoja potrebno je prilagoditi za svaki pojedinačni soj mikroalgi, a ključne varijable koje se moraju uzeti u obzir su temperatura, pH, salinitet, intenzitet svjetlosti, dostupnost hranjivih tvari i nakupljanje metabolita (Richmond, 2004). Za uzgoj su također bitni procesni parametri kao što su miješanje, promjer i korisni volumen bioreaktora, učestalost izdvajanja biomase i brzina razrjeđenja (Khan i sur., 2018).

### 2.2.1. Svjetlost, temperatura pH i miješanje

Intenzitet svjetlosnog zračenja jedan je od glavnih ograničavajućih faktora u uzgoju mikroalgi jer izravno utječe na fotosintezu, biokemijski sastav mikroalgi i prinos biomase (Krzemińska i sur., 2014). Rast mikroalgi određen je brzinom fotosinteze koja raste s povećanjem intenziteta svjetlosnog zračenja dok ne dostigne maksimalnu brzinu u točki zasićenja. Pri jakom osvjetljenju može se oštetiti fotosintetski sustav uslijed čega se smanjuje intenzitet fotosinteze, pa je stoga potrebno optimizirati sustav za osiguranje potrebne svjetlosti i eksperimentalno odrediti optimalni intenzitet svjetlosnog zračenja kako bi se povećala asimilacija CO<sub>2</sub> uz minimalnu brzinu fotorespiracije (Tredici i Zitelli, 1998; Ye i sur., 2012). Za učinkovito provođenje procesa fotosinteze potrebno je odrediti odgovarajući režim tame/svjetla budući da je svjetlost potrebna za sintezu ATP i NADPH koji služe kao pokretač reakcija u tami tijekom kojih dolazi do sinteze esencijalnih molekula (Cheirsilp i Torpee, 2012). U većini istraživanja se pokazalo da je režim svjetlosti tijekom 16 sati, a zatim tame kroz 8 sati najprikladniji za rast mikroalgi (Jacob-Lopes i sur., 2009). Za uzgoj mikroalgi se mogu koristiti različiti umjetni izvori svjetlosti kao što su svjetleće diode, halogene žarulje i fluorescentne cijevi pri čemu se navedeni izvori svjetlosti razlikuju jedni od drugih u cijeni, potrošnji energije i spektralnoj distribuciji zračenja. Uzimajući u obzir sve spomenute karakteristike, fluorescentne cijevi i svjetleće diode najčešće se koriste u uzgoju mikroalgi. U usporedbi s fluorescentnim cijevima, svjetleće diode omogućavaju bolju kontrolu intenziteta svjetlosti i optimizaciju valne duljine što je pogodno za proizvodnju biomase (Schulze i sur., 2016). Kod većih optičkih gustoća kulture, intenzitet svjetla se smanjuje s povećanjem dubine podloge, stoga se u određenim slučajevima preporučuje postavljanje izvora svjetlosti unutar hranjive podloge radi poboljšanja dobave svjetlosne energije i bolje distribucije fotona (Lee i Palsson, 1995).

Temperatura se smatra jednim od najznačajnijih okolišnih čimbenika zbog utjecaja na brzinu rasta, veličinu stanica i biokemijski sastav biomase. Svaka mikroalga ima svoju optimalnu temperaturu rasta, a povećanje ili smanjenje temperature izvan optimalnog raspona usporava ili čak zaustavlja rast i aktivnost mikroalgi (Bechet i sur., 2017). Kod većine vrsta se optimalno temperaturno područje nalazi u rasponu 20 - 30 °C, no postoje i termofilne alge koje mogu rasti na temperaturama do 40 °C, kao i alge koje rastu u ekstremnim uvjetima kao što su vruća vrela gdje temperature mogu dosegnuti 80 °C (Singh i Singh, 2015, Covarrubias i sur., 2016). Niske temperature utječu na fotosintezu smanjujući učinkovitost asimilacije ugljika, dok previsoke temperature uzrokuju inaktivaciju fotosintetskih proteina te dolazi do

narušavanja energetske ravnoteže u stanici (Atkinson i sur., 2003). Utjecaj temperature na fotosintezu u najvećoj mjeri se odražava na aktivnost enzima ribuloza-1,5-bisfosfata (Rubisco). Rubisco je enzim s dvojnou funkcijom koji može djelovati kao oksigenaza ili karboksilaza ovisno o relativnim količinama O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub> prisutnih u kloroplastu, a temperatura se zbog utjecaja na afinitet ovog enzima prema CO<sub>2</sub> pokazala kao ograničavajući čimbenik brzine rasta i proizvodnje biomase (Salvucci i Crafts-Brandner, 2004).

Sljedeći važan čimbenik za uzgoj mikroalgi je pH vrijednost hranjive podloge koja ima utjecaj na enzimsku aktivnost i akumulaciju lipida u stanicama mikroalgi te ovisi o količini otopljenog CO<sub>2</sub> u hranjivoj podlozi, temperaturi i metaboličkoj aktivnosti stanica (Singh i Dhar, 2011; Zhu i sur., 2016). Većina mikroalgi obično dobro podnosi široke raspone pH, no optimalna pH vrijednost za rast mikroalgi najčešće se nalazi u rasponu 6 - 8, dok se izvan tog intervala prinos biomase znatno smanjuje radi osjetljivosti staničnih enzima koji postaju inaktivni u kiselim uvjetima (Zhu i sur., 2015; Chiranjeevi i Mohan, 2016). S druge strane, vrijednosti pH iznad optimuma utječu na dostupnost nutrijenata u podlozi, a jedan od primjera toga je taloženje fosfata u obliku kalijevog, željezovog i aluminijevog fosfata smanjujući koncentraciju fosfora kojeg stanice mogu koristiti za metaboličke funkcije, dok u slučaju dodatka dušika u obliku amonijevih soli dolazi do povećanja pH vrijednosti hranjive podloge uzrokujući smanjenu dostupnost izvora dušika (Guštin i Marinšek-Logar, 2011, Cai i sur., 2013).

Miješanje igra ključnu ulogu u održavanju ravnoteže plinova i ravnomjerne raspodjele pH vrijednosti i temperature unutar sustava. Također pridonosi smanjenju gradijenta nutrijenata u hranjivoj podlozi te sprječava sedimentaciju stanica u sustavu potičući kretanje stanica između tamnih i svijetlih zona u fotobioreaktoru, čime se poboljšava intenzitet fotosinteze (Brindley i sur., 2004). Miješanje se obično osigurava aeracijom kulture smjesom zraka obogaćenim s CO<sub>2</sub>, pumpama, mehaničkim miješanjem ili kombinacijom navedenih metoda, no pri odabiru odgovarajućeg sustava, potrebno je uzeti u obzir da preintenzivno miješanje može oštetiti stanice i posljedično inhibirati rast kulture radi osjetljivosti stanica na hidrodinamičke i mehaničke sile smicanja (Suh i Lee, 2003; Barbosa i sur., 2004). Glavni čimbenici koji određuju osjetljivost stanica na smicanje su prisutnost lomljivih flagela te sastav i debljina stanične stijenke, intenzitet i vrsta smičnog naprezanja te prikladnost uvjeta kojima su stanice izložene (pH, temperatura, intenzitet svjetlosti) (Brindley i sur., 2004).



### 2.2.2. Nutrijenti

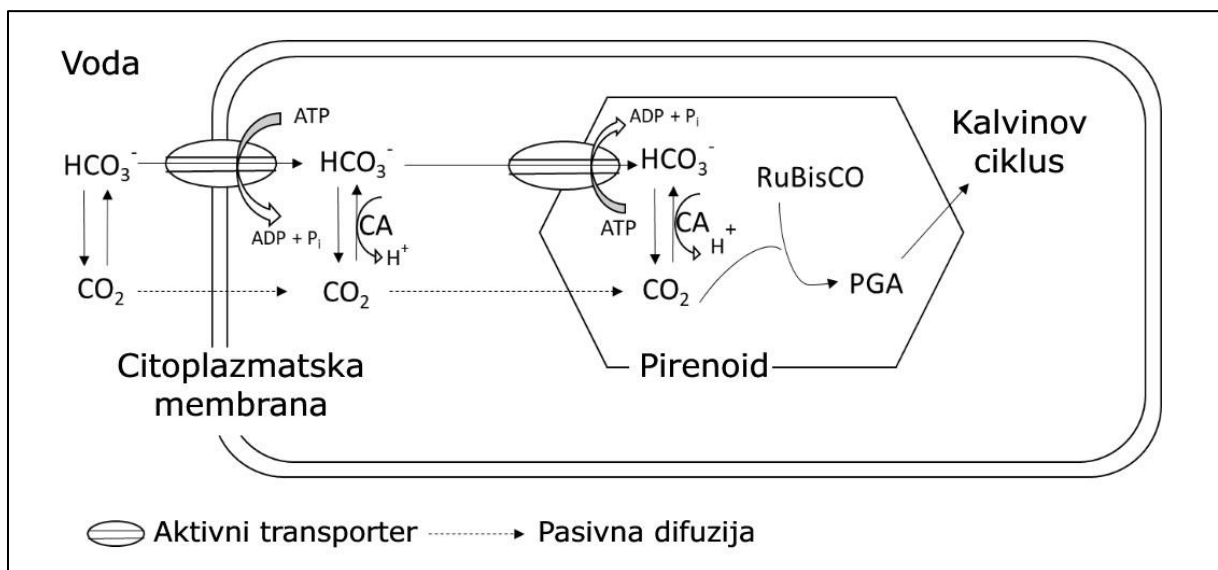
Hranjiva podloga za uzgoj kulture mikroalgi mora sadržavati anorganske tvari kao što su fosfor, dušik i željezo čija potrebna koncentracija varira između različitih vrsta. Minimalne potrebe nutrijenata za rast mikroalgi se mogu odrediti približnom molekulskom formulom  $\text{CO}_{0,48}\text{H}_{1,83}\text{N}_{0,11}\text{P}_{0,01}$  prema kojoj se može vidjeti da su ugljik, dušik i fosfor najvažniji makronutrijenti za autotrofni rast od čega je oko 50 % biomase sastavljeno od ugljika (Acien Fernandez, 2013). Dušik je drugi najzastupljeniji element biomase mikroalgi te je odgovoran za sintezu proteina, nukleinskih kiselina, vitamina i fotosintetskih pigmenata (Richmond, 2004). Najčešće korišteni oblici izvora dušika su  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{NH}_4^+$ , no mogu se koristiti i organski izvori dušika poput uree i aminokiselina (Silva i sur., 2015). Limitacija izvorom dušika koristi se u svrhu poticanja sinteze lipida i ugljikohidrata, a kao posljedica nedostatka dušika obično se javlja promjena boje stanica radi smanjenja koncentracije klorofila te povećanja koncentracije karotenoida u stanici (Becker, 1994).

Fosfor je još jedan bitan nutrijent za rast i metaboličku aktivnost stanica kao što su prijenos energije (ATP) i sinteza nukleinskih kiselina i fosfolipida (Richmond, 2004). U prirodnom okolišu je prisutan u različitim oblicima poput polifosfata, pirofosfata, ortofosfata i metafosfata pri čemu je ortofosfat preferirani oblik te ga mikroalge poput dušika asimiliraju aktivnim transportom (Markou i sur., 2014). Preniske koncentracije fosfora u hranjivoj podlozi djeluju inhibirajuće na produktivnost biomase u nekoliko vrsta mikroalgi, zbog čega su neke od njih razvile prilagodbu tako što akumuliraju intracelularne zalihe fosfora koje se mogu koristiti kada se fosfat iscrpi iz podloge, a taj mehanizam je poznat pod imenom luksuzna akumulacija fosfora (engl. *luxury phosphorus uptake*). Spomenuti mehanizam koristan je za obradu otpadnih voda, no u ostalim slučajevima se treba izbjegavati da bi se maksimizirala proizvodnja biomase po masi dodanih hranjivih tvari (Markou i sur., 2014; Powell i sur., 2009).

Osim već spomenutih makronutrijenata, za odgovarajući rast mikroalgi potrebni su i mikronutrijenti, a to su elementi ugrađeni u bitne organske molekule kao što su koenzimi te sudjeluju u reakcijama koje su neophodne za opstanak stanice. Esencijalni mikronutrijenti su Mg, S, Na, Cl, Ca, Fe, Mo, Mn, Zn, Cu, B i Co, pri čemu se naglasak stavlja na magnezij, sumpor i željezo. Željezo je bitan element u tragovima zbog sudjelovanja u prijenosu elektrona u procesu fotosinteze (Richmond, 2004). Otpadne i morske vode, kao i otpadna gnojiva u svom sastavu već sadrže većinu spomenutih mikronutrijenata.

### 2.2.3. Izvori ugljika

Ugljik je vitalni sastojak organskih tvari koje su proizvod staničnog metabolizma mikroalgi (ugljikohidrati, proteini, nukleinske kiseline, vitamini i lipidi) te se može dodavati u anorganskom i organskom obliku (Richmond, 2004). Različiti izvori i koncentracije ugljika imaju značajne učinke na rast mikroalgi, kao i na sadržaj i sastav metabolita. Među anorganskim oblicima najčešću primjenu nalazi  $\text{CO}_2$  radi ekonomske isplativosti i povoljnog utjecaja na okoliš radi mogućnosti fiksacije  $\text{CO}_2$  iz dimnih plinova ispuštenih iz rafinerijskih postrojenja, čime se smanjuje emisija stakleničkog plina (Wang i sur., 2018). Optimalna koncentracija  $\text{CO}_2$  nalazi se u rasponu 2 - 15 %, a previsoka koncentracija ugljikovog dioksida dovodi do oštećenja kloroplasta i poremećaja u radu organela što zauzvrat uzrokuje lizu stanica (Wang i sur., 2018; Khairy i sur., 2014). Mnoge mikroalge su razvile mehanizam koncentriranja  $\text{CO}_2$  (engl. *carbon concentrating mechanism, CCM*) kako bi se poboljšala učinkovitost fotosinteze. Ovaj mehanizam aktivira se u uvjetima limitacije anorganskog izvora ugljika te se zasniva na principu poboljšanja isporuke dostupnog  $\text{CO}_2$  enzimu Rubisco odgovornog za prvi korak fiksacije ugljikovog dioksida (slika 2.). Ključni enzim koji katalizira konverziju između  $\text{CO}_2$  i  $\text{HCO}_3^-$  je karboanhidraza (CA) (Singh i sur., 2016). S druge strane, visoku razinu  $\text{CO}_2$  obično prati smanjenje pH što se pripisuje disocijaciji ugljične kiseline čime nastaju karbonatni i vodikov ion, a istraživanja su pokazala da kisela sredina negativno utječe na enzime CCM mehanizma čije oštećenje može biti ireverzibilno tijekom duljeg izlaganja visokoj razini  $\text{CO}_2$  (Liran i Tchernov, 2018).



**Slika 2.** Prikaz mehanizma koncentriranja  $\text{CO}_2$  (prema Chai i sur., 2016)

Osim anorganskog ugljika, neke mikroalge mogu koristiti i organski ugljik uključujući glukozu, saharozu, glicerol, galaktozu, ksilozu i glukonat pri čemu se glukoza pokazala kao preferirani izvor ugljika za rast stanica i akumulaciju željenih proizvoda metabolizma radi jednostavne asimilacije u međuproizvode mnogih metaboličkih putova (Chai i sur., 2020). Metabolizam navedenih izvora organskog ugljika može ovisiti o dostupnosti odgovarajućih transmembranskih proteina za odgovarajuće šećere koji omogućuju njihov transport kroz staničnu membranu u stanicu (Tanner, 2000). Slično kao i s anorganskim ugljikom, odgovarajuća koncentracija izvora organskog ugljika mora se pažljivo odrediti tako da ona potakne rast stanica mikroalgi i nakupljanje metabolita, jer u protivnom prekomjerna koncentracija istog inhibira navedene procese (Bashir i sur., 2019). Istraženi su učinci izvora ugljika na količinu i sastav metabolita mikroalgi te je ustanovljeno da odgovarajuća razina CO<sub>2</sub> u autotrofnim uvjetima stimulira sintezu lipida. Zhang i sur. (2014) su ustanovili da je sadržaj proteina mikroalge *Chlorella pyrenoidosa* ostao relativno konstantan bez obzira na promjenu koncentracije CO<sub>2</sub>, a sadržaj ugljikohidrata i lipida se povećavao do razine CO<sub>2</sub> od 3 %, nakon čega je uslijedio pad koncentracije ovih metabolita. Nasuprot tomu, koncentracija ugljikohidrata i lipida u stanicama *Scenedesmus bajacalifornicus* BBKLP-07 rasla je sve do 25 % CO<sub>2</sub>.

### **2.3. BIOTEHNOLOŠKA PRIMJENA MIKROALGI**

Uzgoj mikroalgi u velikom mjerilu počeo je tek prije nekoliko desetljeća kada je postalo jasno da će zbog brzorastuće svjetske populacija doći do nedostatka namirnica bogatih proteinima. Prva kultivacija mikroalgi u velikom mjerilu za komercijalne svrhe je zabilježena u Japanu 1960-ih te su se pokazale kao odličan potencijalni izvor hrane i drugih važnih bioproizvoda kao što su prirodni antibiotici (Khan i sur., 2018). Biomasa mikroalgi sadrži širok raspon organskih spojeva kao što su antioksidansi, biopolimeri, pigmenti, polisaharidi i biopeptidi, a također se pokazala kao dobra sirovina za proizvodnju biometana, bioetanol, biodizela i biovodika. Mikroalge se mogu primijeniti i za fitoremedijaciju širokog raspona otpadnih voda uključujući otpadne vode iz kanalizacije, industrije, poljoprivrede i akvakulture (Ashour i Omran, 2022).

U posljednjih nekoliko godina, pogotovo nakon povećane potražnje za probiotičkim dodacima prehrani, istražuju se zdravstvene dobrobiti mikroalgi. Mikroalge proizvode sterole koji pomažu u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih bolesti, kao i antioksidanse poput astaksantina, β-karotena, dimetilsulfoniopropionata i mikosporina (Mata i sur., 2010).

*Spirulina platensis* i *Spirulina maxima* imaju ulogu u jačanju imunološkog sustava i potiču rast bakterija mliječne kiseline u gastrointestinalnom traktu. *Spirulina* sp. također se koristi u liječenju artritisa, anemije, dijabetesa i raka (Mani i sur., 2007). Zbog prisutnosti esencijalnih hranjivih tvari, mikroalge su jedan od bitnih izvora hrane u azijskim zemljama. Japanski znanstvenici koristili su *Chlorella ellipsoidea* za razvoj raznih prehrambenih proizvoda kao što su kruh i peciva, sladoled, juhe, rezanci, keksi i zeleni čaj, no zbog strogih propisa o sigurnosti hrane i male tržišne potražnje, samo se nekoliko vrsta mikroalgi koristi kao u prehrambene svrhe pa češću primjenu nalaze u vidu dodataka prehrani u obliku tableta, kapsula i tekućih pripravaka (Rizwan i sur., 2018).

### 2.3.1. Proizvodnja biogoriva iz mikroalgi

Uzgoj mikroalgi za proizvodnju biogoriva smatra se vrlo perspektivnim radi mnogih prednosti mikroalgi u usporedbi sa sirovinama koje se koriste za biogoriva prve i druge generacije. Za uzgoj mikroalgi nisu potrebna obradiva zemljišta, stoga su mikroalge koje rastu u slanoj vodi, mulju, otpadnoj vodi ili na neobrađivim i rubnim zemljištima predložene kao održiviji i bogatiji izvor lipida za proizvodnju biogoriva jer ne postoji kompeticija s proizvodnjom hrane. Također zahtijevaju manje vode od kopnenih biljaka iako rastu u vodenom mediju. Nadalje, proizvodnja mikroalgi ne ovisi o godišnjim dobima, postižu visoke produktivnosti biomase, za njihov uzgoj nije potrebna primjena herbicida i pesticida te mogu proizvesti niz drugih vrijednih proizvoda osim lipida kao što su ugljikohidrati, proteini i karotenoidi koji se mogu koristiti kao hrana, gnojivo ili drugi proizvodi s visokom vrijednošću (Cruz i sur., 2018). Razna istraživanja su pokazala da sojevi iz roda *Picochlorum* sp. u određenim uvjetima mogu sintetizirati visok sadržaj lipida u obliku triacilglicerola što ih čini interesantnim za kultivaciju u velikom mjerilu i proizvodnju biogoriva. Primjerice, Dahmen i sur. (2014) su istaknuli biotehnološki potencijal i pokazali mogućnosti korištenja *Picochlorum* sp. kao sirovine za akvakulturu i proizvodnju biodizela. Nadalje, de la Vega i sur. (2011) su u svom radu prikazali prednosti *Picochlorum* sp. HM1 te mogućnosti za uzgoj na otvorenom budući da ovaj soj može rasti u nepovoljnim uvjetima, što se pokazalo i za *Picochlorum renovo* čiji su genom sekvencionirali Dahlin i sur. (2019).

Biodizel se može definirati kao biogorivo koje se sastoji od mono-alkil estera dugolančanih masnih kiselina proizvedeno iz obnovljivih biolipida putem procesa transesterifikacije. To je čisto, ekološki prihvatljivo, netoksično i biorazgradivo gorivo, a izvori lipida za biodizel mogu biti uljarice, otpadno ulje, mikroalge i životinjska mast. Sadržaj

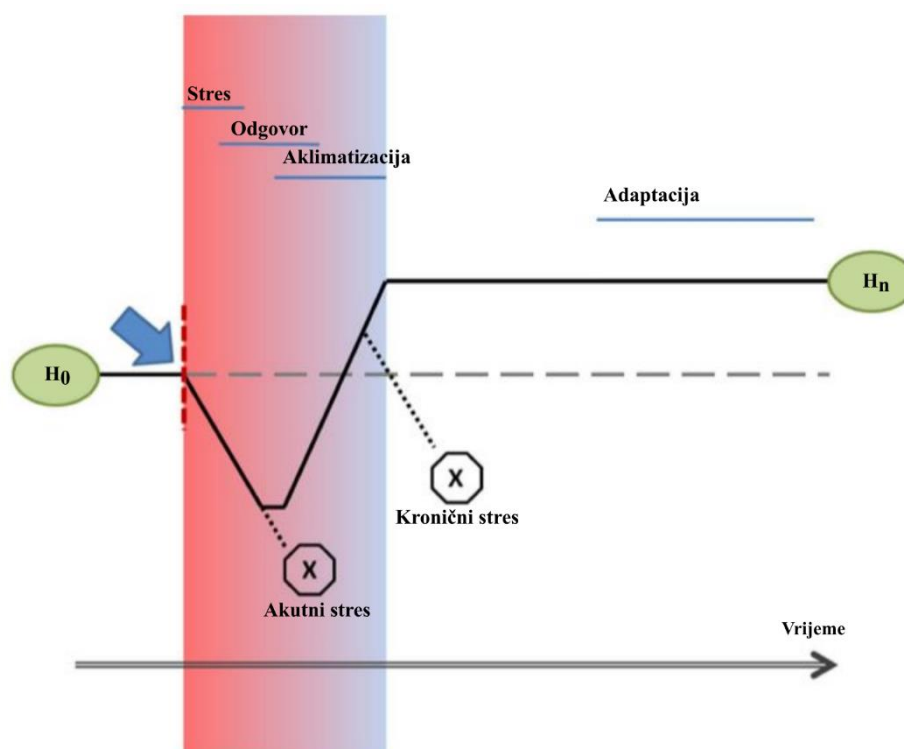
lipida i sastav masnih kiselina mikroalgi su važni čimbenici koje treba uzeti u obzir u procesu proizvodnje biodizela zbog značajnog utjecaja na prinos i kvalitetu krajnjeg proizvoda. Svojstva biogoriva kao što su cetanski broj, svojstva hladnog protoka, oksidacijska stabilnost i jodni broj određena su duljinom ugljikovog lanca i stupnjem nezasićenosti metil-estera masnih kiselina (Akubude i sur., 2018).

Za proizvodnju biodizela potrebno je provesti uzgoj mikroalgi u uvjetima koji potiču sintezu lipida, zatim se izdvaja biomasa, a najčešće metode koje se koriste za izdvajanje biomase su sedimentacija, flokulacija, filtracija i centrifugiranje (Ananthi i sur., 2021). Potom je potrebno provesti procese sušenja i razbijanja stanica, nakon čega slijedi ekstrakcija lipida. Prinos lipida ovisi o topljivosti masnih kiselina i sposobnosti otapala da prodre kroz staničnu membranu. Da bi se minimizirao gubitak i degradacija lipida, važno je odabrati brzu, osjetljivu i učinkovitu metodu, a otapala koja se koriste za ekstrakciju lipida trebaju biti ekonomski isplativa, nehlapljiva, netoksična i nepolarna (Koutra i sur., 2020; Abimbola i sur., 2021). Nakon oslobađanja lipida iz stanice, stanični ostaci se odvajaju filtracijom i centrifugiranjem, a lipidi se izdvajaju iz ekstrakcijskog otapala destilacijom ili uparavanjem. Izravna transesterifikacija novija je metoda te uključuje ekstrakciju lipida i transesterifikaciju objedinjene u jedan proces (Halim i sur., 2012).

#### **2.4. UTJECAJ VISOKIH KONCENTRACIJA NATRIJEVOG KLORIDA NA MIKROALGE**

Prednosti korištenja morske vode ili slanih podzemnih voda za uzgoj mikroalgi u velikim mjerilima (u otvorenim bazenima ili zatvorenim fotobioreaktorima) su dostupnost vode, povoljan sadržaj esencijalnih hranjivih tvari te smanjenje opterećenja na zalihe pitke vode (Borowitzka i Moheimani, 2013; Slade i Bauen, 2013) Morska voda se također može koristiti za procesno hlađenje što može dodatno smanjiti potrošnju vode (Jiang i sur., 2018). Osim gore navedenih prednosti, uzgoj mikroalgi u morskoj vodi također rezultira visokim sadržajem lipida, lakšom ekstrakcijom lipida, smanjenim rizikom kontaminacije i povećanjem učinkovitosti taloženja zbog formiranja flokula čineći proces izdvajanja proizvoda ekonomski isplativijim (Pei i Jiang, 2018). Međutim, da bi se morska voda mogla koristiti kao podloga za uzgoj, imperativ je bioprospekting dostupnih ekosustava s ciljem pronalaska sojeva otpornih na visoki salinitet ili genetska modifikacija sojeva u svrhu veće tolerancije na sol uz odabir mutanata s visokim prinosom biomase i velikom produktivnošću sinteze lipida (Pei i Jiang, 2018; Zhang i sur., 2018). Halotolerantne mikroalge imaju svojstvenu sposobnost prilagodbe i

razvoja u uvjetima visoke koncentracije NaCl, a tolerancija mikroalgi na NaCl je složen fenomen koji uključuje mnoštvo morfoloških, biokemijskih i molekularnih promjena u stanici. Ove mikroalge mogu regulirati transport iona i propusnost membrane te sintetizirati osmolite i druge molekule kako bi održale odgovarajući turgor i štitile stanicu od slobodnih radikala generiranih u uvjetima povećanje koncentracije NaCl, čime se prilagođavaju novoj okolini (Zhang i sur., 2018). Odgovor mikroalgi na visoke koncentracije soli može se podijeliti u tri faze: reakcija na stres, regulacija i aklimatizacija. Odgovor na stres uključuje dotok vode u stanice mikroalgi, što rezultira povećanjem veličine i volumena stanica (Borowitzka, 2018). Stanice algi potom uravnotežuju unutarnji osmotski tlak nakupljanjem osmolita i aktivnim izbacivanjem iona natrija. Faza regulacije uključuje posttranslacijske modifikacije - aktivaciju/deaktivaciju molekula koje apsorbiraju svjetlost (engl. *light harvesting complexes, LHC*), enzima i transportera. Kod *Scenedesmus obliquus* XJ002 i *Chlorella* sp. S30, u uvjetima visoke slanosti zabilježena je inhibicija ekspresije gena za fotosustav II, proteine antenskih molekula i klorofil (Ji i sur., 2018). Faza aklimatizacije uključuje promjene u translacijskoj kontroli gena te aktivaciju  $\text{Ca}^{2+}$  signalizacije (Borowitzka, 2018). Ovaj proces osigurava zaštitu stanica mikroalgi renaturacijom oštećenih staničnih komponenti i pokretanjem antioksidativnog mehanizma (Einali i sur., 2018). Nakupljanje antioksidativnih enzima, osmolita i molekula osmoprotektanata zabilježeno je kod *Neochloris oleoabundans* i *Chlorella* sp. S30 (Li i sur., 2018; de Jaeger i sur., 2018). Istraživanje transkriptoma mikroalgi *Neochloris oleoabundans* i *Picochlorum* sp. pokazalo je pojačanu ekspresiju gena za osmolite i antioksidanse te gena za mehanizam koncentriranja  $\text{CO}_2$  u svrhu opstanka u slanom okruženju (Ji i sur., 2018).



**Slika 3.** Odgovor na stresor (plava strelica) tijekom vremena (prema Borowitzka, 2018)

Na slici 3 nalazi se pojednostavljeni dijagramski prikaz odgovora mikroalgi na stres tijekom proteklog vremena. Kao odgovor na stresne uvjete okoline, originalno ravnotežno stanje ili homeostaza stanice biva poremećena inicirajući signal "stresa" koji dovodi do "odgovora" koji pokreće procese privikavanja stanice na stres čime dolazi do ponovne uspostave homeostaze. U početku dolazi do usporavanja metabolizma što se često uočava kao prestanak pokretljivosti pokretnih stanica i inhibicija fotosinteze, a potom slijedi ponovna uspostava navedenih procesa tijekom faze aklimatizacije. Kada se stanice potpuno prilagode novonastalim uvjetima, postiže se novo stabilno stanje ( $H_n$ ) što znači da stanice više nisu pod stresom. Ako novi uvjeti potraju dovoljno dugo, stanice se također mogu prilagoditi genetskim promjenama, a ako je početni stresor prenaplašen (akutni stres), aklimatizacija neće biti moguća te će nastupiti stanična smrt. Do smrti stanica može doći i ako privikavanje zahtijeva više resursa nego što je dostupno za potpunu aklimatizaciju (Borowitzka, 2018).

#### 2.4.1. Proizvodnja tvari za regulaciju osmotskog tlaka

Zbog čvrste strukture stanične stijenke stanice algi imaju ograničenu sposobnost promjene volumena stanice pa stoga uvelike ovise o topljivim organskim tvarima za osmoregulaciju. To su obično male organske molekule s neutralnim nabojem i niskom toksičnošću pri visokim koncentracijama što omogućuje učinkovito funkcioniranje različitih

enzima (Brown i Simpson, 1972). Nakupljaju se u citosolu i ujednačavaju osmotski tlak u unutar stanice s tlakom u njezinom okolišu. Glicerol je dobar primjer tvari koju proizvodi većina vrsta algi osjetljivih na NaCl u uvjetima visokog saliniteta. Glicerol je visoko topiv i kemijski inertan i netoksičan, a budući da je krajnji produkt metabolizma, proizvodnja i nakupljanje glicerola ne ometa druge metaboličke putove. Također, proizvodnja glicerola iz škroba ne zahtijeva puno energije i ne ovisi o izvoru dušika (Läuchli i Lüttge, 2002). Porast sadržaja glicerola u stanici kao odgovor na povećanje saliniteta zabilježen je kod velikog broja eukariotskih mikroalgi, posebice kod sojeva *Dunaliella*, *Scenedesmus* i *Micrasterias*. Visoka koncentracija glicerola također omogućuje stanicama da vrate prvobitni volumen čak i pod ekstremnim stresom.

Prolin je još jedna osmoregulacijska tvar čija koncentracija linearno raste s povećanjem saliniteta kod viših biljaka i algi (Liu i Zhu, 1997). Kao i glicerol, ima malu molekularnu težinu, neutralno je nabijen i visoko topljiv. Egzogeno primjena prolina smanjuje štetne učinke visokog saliniteta smanjenjem nakupljanja Na<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup> u stanicama (Reynoso i De Gamboa, 1982). Za razliku od *Chlamydomonas* sp. i *Dunaliella salina* kod kojih je primarni osmolit glicerol, sojevi iz roda *Picochlorum* sp. proizvode prolin u uvjetima visokog saliniteta. Pojačana ekspresija gena uključenih u sintezu prolina zabilježena je kod *Picochlorum oklahomensis* i *Picochlorum* SE3 tijekom stresa uzrokovanog visokim koncentracijama natrijevog klorida (Henley i sur., 2004; Foflonker i sur., 2016).

#### 2.4.2. Akumulacija lipida

Za većinu zelenih algi, karakteristično je nakupljanje lipida u uvjetima visokog saliniteta. Ovaj odgovor na visoku slanost može biti koristan za proizvodnju biogoriva (Salama i sur., 2013). Lipidi su spojevi s visokim kapacitetom za pohranu energije, sintetiziraju se kada su stanice algi u nepovoljnim uvjetima okoliša, a nakon što se stanice algi premjeste u optimalne uvjete, razgradnjom lipida dobivaju energiju. Lipidi se sintetiziraju asimilacijom ugljika iz tri različita, neovisno regulirana metabolička puta. Prvi je izravna ugradnja fotosintetski fiksiranog CO<sub>2</sub> u masne kiseline unutar kloroplasta., drugi uključuje razgradnju škroba a treći funkcionira putem razgradnje polarnih lipida (Goncalves i sur., 2016).

Prelazak sa sinteze škroba na sintezu lipida omogućava održavanje energetske rezervi, čime se osigurava preživljavanje. Razgradnja nakupljenog škroba dovodi do proizvodnje iznimno važnog prekursora proizvodnje lipida; glicerol-3-fosfata (G3P), a



akumulirani glicerol također se može pretvoriti natrag u G3P pomoću enzima glicerol kinaze (de Jaeger i sur., 2018). Prethodna istraživanja dala su značajni uvid u to da stanice algi koriste škrob kao proizvod za kratkoročno skladištenje ugljika i energije, a potom se tok ugljika usmjerava u neutralne lipide kao dugoročnu rezervu energije, što se može objasniti činjenicom da sinteza škroba predstavlja brži način skladištenja ugljika. Sintaza masnih kiselina rezultira značajnim gubitkom ugljika zbog pretvorbe piruvata u acetyl-CoA pomoću piruvat dehidrogenaze, dok se glukoza može izravno prevesti u škrob te su potrebe za ATP i NADPH za 50 % odnosno 45 % manje od onih za sintezu triacilglicerola (Subramanian i sur., 2013). Međutim, s aspekta povrata energije, oksidacija masnih kiselina ima očite prednosti u odnosu na oksidaciju škroba. Pri oksidaciji palmitinske kiseline, dobiva se 6,7 ekvivalenata ATP po jednom ugljiku dok oksidacija glukoze putem glikolize, zajedno s ciklusom limunske kiseline, rezultira s 5 ekvivalenata ATP za jednu molekulu ugljika (Johnson i Alric, 2013).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

Radni mikroorganizam korišten u izradi ovog rada je mikroalga *Picochlorum* sp. *Picochlorum* sp. nalazi se u zbirci Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada. Izolirana je iz Jadranskog mora (okolica Šibenika, ožujak 2018. godine) te identificirana do razine roda. Izolacija je provedena analizom sekvence gena 18S rRNA i usporedbom BLAST rezultata s NCBI bazom. *Picochlorum* sp. karakteriziraju zelene stanice jajolikog oblika veličine 2  $\mu$ m.

##### 3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjive podloge

Za pripremu hranjivih podloga u ovom istraživanju korištene su kemikalije navedene u tablici 1.

**Tablica 1.** Kemikalije korištene za pripremu hranjive podloge

Naziv kemikalije	Čistoća	Proizvođač
Natrijev klorid	techn.	Solana Nin, Hrvatska
Kalijev klorid	p.a.	Kemika, Hrvatska
Magnezijev klorid heksahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
Kalcijev klorid dihidrat	p.a.	Merck, Njemačka
Magnezijev sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev hidrogen karbonat	p.a.	Alkaloid, Sjeverna Makedonija
Natrijev nitrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Željezov (III) klorid heksahidrat	p.a.	Sigma-Aldrich, Njemačka
EDTA dinatrijev dihidrat	p.a.	Carlo Erba
Natrijev molibdat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	Merck, Njemačka

**Tablica 1.** Kemikalije korištene za pripremu hranjive podloge – *nastavak*

Naziv kemikalije	Čistoća	Proizvođač
Kobaltov (II) klorid dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Manganov (II) klorid tetrahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Tiamin	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Njemačka
Biotin	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Njemačka
Cijanokobalamin	≥ 98 %	Sigma-Aldrich, Njemačka

### 3.1.3. Ostale kemikalije i kitovi korišteni u eksperimentu

Ostale kemikalije i kitovi korišteni u provedbi eksperimenata navedeni su u tablici 2. Prikazane su kemikalije koje su korištene tijekom provođenja istraživanja u raznim analitičkim metodama.

**Tablica 2.** Ostale kemikalije i kitovi

Naziv kemikalije	Čistoća	Proizvođač
Metil tridekanoat	Standard	Sigma-Aldrich, Njemačka
Heksan	p.a.	Carlo Erba, Francuska
Kloroform	p.a.	Merck, Njemačka
Metanol	Za HPLC	J. T. Baker, SAD
Klorovodična kiselina	p.a., 36 %	Kemika, Hrvatska
Pentadekan	Standard	Sigma-Aldrich, Njemačka
Smjesa F.A.M.E (C4 – C24)	-	Sigma-Aldrich, Njemačka
Kalcijev karbonat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Sumporna kiselina	p.a., 96 %	Merck, Njemačka
Fosforna kiselina	p.a., 96 %	Merck, Njemačka
Etanol	p.a., 99,8 %	Lack-Ner, Češka
Folin-Ciocalteu reagens	Standard	Sigma-Aldrich, Njemačka

**Tablica 2.** Ostale kemikalije i kitovi – *nastavak*

Naziv kemikalije	Čistoća	Proizvođač
Natrijev hidroksid	p.a.	Merck, Njemačka
Bakrov sulfat	p.a.	Alkaloid, Sjeverna Makedonija
Kalijev natrijev tartarat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kit za određivanje koncentracije fosfata	p.a.	Merck, Njemačka
Kit za određivanje koncentracije nitrata	p.a.	Merck, Njemačka

#### 3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj mikroalge

Uzgoj inokuluma i kulture mikroalge *Picochlorum* sp. proveden je u Guillardovoj podlozi (f/2 podloga) (Guillard, 1975). Za pripremu podloge potrebno je pripremiti umjetnu morsku vodu. Umjetna morska voda pripremljena je otapanjem soli navedenih u tablici 3 u destiliranoj vodi, a zatim je sterilizirana pri 121°C te potom ohlađena. Tako pripremljenoj umjetnoj morskoj vodi dodane su otopine soli navedene u tablici 4 koje su prethodno sterilizirane i ohlađene. Pri optimizaciji saliniteta, podloga je pripremljena istim postupkom, ali bez dodatka NaCl koji je dodan naknadno pri nacjepljivanju kultura.

**Tablica 3.** Sastav umjetne morske soli (Cuvelier i Simmons, 2009)

Sastojak	Koncentracija [g L <sup>-1</sup> ]
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,47
KCl	0,75
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	4,07
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	6,04
NaCl	24,55
NaHCO <sub>3</sub>	0,21

**Tablica 4.** Sastav f/2 podloge (Guillard, 1975)

<b>Sastojak</b>	<b>Koncentracija [g L<sup>-1</sup>]</b>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	5,65
NaNO <sub>3</sub>	75
<b>Otopina elemenata u tragovima</b>	<b>Koncentracija [g L<sup>-1</sup>]</b>
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,01
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,01
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	3,15
MnCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,18
Na <sub>2</sub> EDTA	4,16
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,006
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,022
<b>Otopina vitamina</b>	<b>Koncentracija [g L<sup>-1</sup>]</b>
Biotin (vitamin B <sub>7</sub> )	0,0005
Cijanokobalamin (vitamin B <sub>12</sub> )	0,0005
Tiamin (vitamin B <sub>1</sub> )	0,1

### 3.1.5. Oprema i uređaji

#### 3.1.5.1. Laboratorijski bioreaktor

Uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. u velikom mjerilu proveden je u barbotirajućoj koloni izrađenoj od akrilnog stakla, ukupnog volumena 34 L. Sustav za aeraciju sastoji se od cijevi za dovod zraka spojenih na raspršivače zraka (A974 i A972; Hagen, Kanada) smještenih na dnu barbotirajuće kolone. Protok zraka reguliran je pomoću rotametra.

#### 3.1.5.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC*)

Za određivanje sastava šećera u kiselinskim hidrolizatima biomase mikroalge, korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti 1290 Infinity II (Agilent Technologies, SAD). Uređaj se sastoji od pumpe (G7104A), termostata (G7116B),

automatskog injektora (G7167B), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Rezex ROA-Organic Acid H+; Phenomenex, SAD) s pretkolumnom, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) te modula za kontrolu sustava i računalnog programa za obradu podataka (OpenLAB CDS).

### 3.1.5.3. Sustav za plinsku kromatografiju (engl. Gas Chromatography, GC)

Za analizu sastava masnih kiselina u lipidima mikroalgi, korišten je uređaj za plinsku kromatografiju GC-2010 Plus AF (Shimadzu, Kyoto, Japan). Uređaj čine automatski uzorkivač (AOC-20s), injektor (AOC-20i), termostatirane kapilarne kolone (Zebron ZBFAME Phenomenex, SAD), plameno ionizacijski detektor (FID-2010 Plus) i računalni program za obradu podataka (GC Solutions v2.32).

### 3.1.5.4. Ostali uređaji

Osim navedenih uređaja i osnovne potrebne laboratorijske opreme, u provedbi eksperimentalnog dijela ovog rada, korištena je aparatura koja je navedena u tablici 5.

**Tablica 5.** Ostala korištena oprema

<b>Oprema</b>	<b>Model i proizvođač</b>
Centrifuge	CF-10, Witeg, Njemačka SL 8R; ThermoScientific, SAD J-21B; Beckman, Njemačka
Sušionici	ST-05; Instrumentaria, Hrvatska ST-06; Instrumentaria, Hrvatska
Autoklav	Sutjeska, Jugoslavija
Analitička vaga	ALC210.4; Acculab, SAD
Tehnička vaga	ET-1111; Tehtnica, Slovenija
UV/Vis spektrofotometar	Cary 100; Agilent Technologies, SAD
Mikroskop	CH20; Olympus, Japan

**Tablica 5.** Ostala korištena oprema - nastavak

pH metar, termometar	HI 9125; Hanna Instruments, SAD
Magnetska mješalica	VMS-C4; VWR International, SAD
Laboratorijska tresilica	SHKE2000-1CE; ThermoScientific, SAD
Tresilica	RM 71 B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka
Vortex mikser	VM-10; Witeg, Njemačka
Hladnjak i zamrzivač	Bosch, Njemačka
Vodena kupelj	VK5ER; InkoLab, Hrvatska
Ledomat	AF-10; Scotsman, Italija

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Uzgoj inokuluma mikroalge

Za uzgoj inokuluma korištena je f/2 podloga čiji je sastav prethodno opisan u poglavlju 3.1.4. Sterilna hranjiva podloga inokulirana je sa 10 % [v v<sup>-1</sup>] kulture mikroalgi održavane u tekućoj hranjivoj podlozi. Uzgoj je trajao 7 dana na tresilici pri 200 o min<sup>-1</sup>. Mikroalga je osvijetljena toplom bijelom svjetlošću pri čemu su tikvice bile osvijetljene 16 h, a 8 h u mraku.

#### 3.2.2. Priprema hranjivih podloga

Kao što je već navedeno u poglavlju 3.1.4., za uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. korištena je f/2 Guillard podloga. Prvo je pripremljena umjetna morska voda na način da su soli iz tablice 3 izvagane i zatim otopljene u demineraliziranoj vodi. Potom je umjetna morska voda sterilizirana pri 121 °C kroz 20 minuta. Osim toga, pripremljene su i otopine vitamina, metala u tragovima, NaNO<sub>3</sub> i NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O prema zadanim koncentracijama u tablici 4. Navedene otopine su također sterilizirane pri 121 °C, a zatim su dobro ohlađene osim otopine vitamina koja je sterilizirana filtracijom kroz sterilni celulozno acetatni filter veličine pora 0,2 µm.

### 3.2.3. Optimiziranje saliniteta podloge s obzirom na rast i sastav biomase

Ispitivanje utjecaja različitih koncentracija NaCl na rast mikroalge *Picochlorum* sp. proveden je u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL korisnog volumena 200 mL. Uzgoj u modificiranim f/2 hranjivim podlogama  $c(\text{NaCl})=10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $c(\text{NaCl})=25 \text{ g L}^{-1}$ ,  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$  i  $c(\text{NaCl})=75 \text{ g L}^{-1}$  praćen je u tri paralele tikvica, u podlozi  $c(\text{NaCl})=0 \text{ g}$  u jednoj, a u podlozi  $c(\text{NaCl})=100 \text{ g L}^{-1}$  u dvije paralele. Pripremljena je otopina NaCl od  $300 \text{ g L}^{-1}$  koja je sterilizirana pri  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  kroz 20 minuta. Erlenmeyerove tikvice sadržavale su 180 mL podloge, a zatim je u aseptičnim uvjetima dodano 20 mL prethodno uzgojenog inokuluma te određeni volumen  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ , otopine metala u tragovima, vitamina i NaCl. Uzgoj je trajao 13 dana, a provodio se šaržno na tresilici. Za vrijeme uzgoja pratila se optička gustoća i broj stanica tako da je u intervalu od 24 do 48 sati izuzimano 1,5 mL uzorka. Nakon završetka uzgoja, biomasa je centrifugirana pri 5000 rpm, resuspendirana u destiliranoj vodi i ponovno centrifugirana. Zatim je osušena i korištena za provođenje daljnjih analiza.

### 3.2.4. Ispitivanje učinka saliniteta i limitacije izvorom dušika i fosfora na rast i sastav biomase

Drugi eksperiment odnosio se na ispitivanje utjecaja limitacije izvorom dušika i fosfora te visokih razina saliniteta na rast i sastav biomase, a proveden je uzgojem u dvije faze. Prvi dio uzgoja trajao je 7 dana i proveden je u standardnoj f/2 podlozi u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL. Uzgoj inokuluma opisan je u poglavlju 3.2.2. Uzgojena biomasa izdvojena je centrifugiranjem 15 minuta pri 5000 rpm, zatim je isprana destiliranom vodom i resuspendirana u izvornu f/2 podlogu koja je služila kao kontrola te u četiri modificirane f/2 podloge: podloga s limitacijom izvora dušika, podloga s limitacijom izvora fosfora,  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$ ,  $c(\text{NaCl})=75 \text{ g L}^{-1}$ . Svi eksperimenti provedeni su u tri paralele. Uzgoj se provodio šaržno na tresilici pri čemu se pratila optička gustoća stanica i promjena udjela lipida u biomasi vanilin metodom. Kada su kulture ušle u stacionarnu fazu, uzgoj je prekinut, a biomasa je izdvojena za daljnje analize.

### 3.2.5. Šaržni uzgoj u barbotirajućoj koloni uz propuhivanje $\text{CO}_2$

Hranjiva podloga koja se koristila za proces uzgoja u barbotirajućoj koloni je f/2 Guillard podloga kojoj je prema rezultatima iz prijašnja dva eksperimenta koncentracija NaCl bila podešena na  $10 \text{ g L}^{-1}$ . Bioreaktor je napunjen s 30 L hranjive podloge koja je potom nacijepljena s 3,75 L inokuluma. Proveden je fototrofni uzgoj uz korištenje umjetnog izvora tople bijele svjetlosti te stalnu aeraciju zrakom. Protok zraka iznosio je  $2,5 \text{ L min}^{-1}$ , a 12-og



dana uzgoja započeto je s doziranjem CO<sub>2</sub>. Korekcija volumena provodila se dodatkom demineralizirane vode prije izuzimanja uzorka.

Tokom uzgoja pratila se koncentracija izvora dušika i fosfora te se prema dobivenim rezultatima izračunala potrebna koncentracija nutrijenata za prihranu. Sedmog dana uzgoja, u podlogu je dodana prihrana koja se sastojala od otopina NaNO<sub>3</sub> te NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O koje su prethodno sterilizirane su u autoklavu pri 121 °C kroz 20 minuta. Uzorci su izuzimani svakodnevno (25 - 50 mL) u svrhu praćenja rasta kulture brojanjem stanica u Thomaovoj komorici i mjerenjem optičke gustoće. Temperatura i pH hranjive podloge također su određivani svaki dan. Svakih nekoliko dana izuzimani su veći volumeni uzorka u svrhu određivanja sastava biomase. Proces je vođen ukupno 31 dan, nakon čega je biomasa izdvojena centrifugiranjem 15 minuta pri 5000 rpm. Talog je liofiliziran, a superantant je spremljen na -20 °C.

### 3.2.6. Analitičke metode

#### 3.2.6.1. Mjerenje optičke gustoće kulture

Rast biomase mikroalge tijekom uzgoja, praćen je mjerenjem optičke gustoće kulture na valnoj duljini od 540 nm. Uzorak kulture (1,5 mL) izuziman je svakih 24 - 48 h, a po potrebi je razrijeđen destiliranom vodom. Razrjeđivanje je provedeno prije mjerenja optičke gustoće

kulture kako bi izmjerena vrijednost bila u području linearnosti, odnosno u rasponu od 0,1 do 1.

#### 3.2.6.2. Brojanje stanica u Thomaovoj komorici

Prije nanošenja uzorka, Thomaova komorica isprana je destiliranom vodom i etanolom te dobro osušena. Zatim je kap suspenzije mikroalgi prenesena na površinu mrežice i prekrivena pokrovnicom. Pokrovnica je fiksirana povlačeći je naprijed-nazad sve dok se na oba susjedna polja nisu pojavili Newtonovi kolobari (pokrovnica je čvrsto priljubljena i više se ne može pomicati). Pripravak je promatran pod objektivom povećanja 40 puta. Izbrojane su stanice u četiri velika kvadrata. Izračunata je srednja vrijednost broja stanica koja je izražena kao ukupan broj stanica po mililitru suspenzije [1]:

$$N = \frac{m \cdot n \cdot 4000 \cdot 1000}{Q} [1]$$

gdje je:

N - ukupan broj stanica u mililitru suspenzije

m - ukupan broj izbrojanih stanica u kvadratima

n - razrjeđenje suspenzije

Q - broj malih kvadrata u kojima su izbrojane stanice

### 3.2.6.3. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase

Koncentracija biomase na kraju uzgoja određena je gravimetrijskom metodom. Uzorci su centrifugirani u čistim plastičnim kivetama, prethodno osušenim do konstantne mase pri 100 °C te izvaganim nakon hlađenja. Određeni volumen kulture je centrifugiran na 8000 rpm kroz 15 minuta, supernatant je odbačen, a preostala biomasa isprana je s demineraliziranom vodom kako bi se uklonile nečistoće, npr. anorganske soli iz hranjive podloge. Uzorak je zatim ponovno centrifugiran, supernatant odbačen, a biomasa je osušena u sušioniku pri 100 °C do konstantne mase. Kada je biomasa osušena, kivete su ohlađene u eksikatoru i zatim su izvagane. Koncentracija suhe tvari biomase određena je prema jednadžbi [2]:

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

gdje je:

$m_2$  - masa izvagane kivete sa biomasom nakon sušenja [g]

$m_1$  - masa izvagane kivete prije sušenja biomase [g]

V - volumen podloge koji je uzet na centrifugiranje [L].

### 3.2.6.4. Određivanje koncentracije nutrijenata

Za vrijeme zadnjeg uzgoja određivala se koncentracija nitrata i fosfata. Analiza navedenih nutrijenata provedena je u supernatantu koji je izdvojen centrifugiranjem kulture mikroalge.

#### 3.2.6.4.1. Određivanje koncentracije nitrita u podlozi

Za navedenu analizu korišten je kit (Merck, Njemačka). Metoda se temelji na reakciji nitritnih iona u otopini sumporne i fosforne kiseline s 2,6-dimetilfenolom (DMP) pri čemu nastaje 4-nitro-2,6-dimetilfenol. U suhu kivetu od 14 mL otpipetirano je 2 mL reagensa NO<sub>3</sub>-1 te je dodano 250 µL supernatanta i 250 µL reagensa NO<sub>3</sub>-2. Sadržaj kivete vorteksiran je 30 sekundi pri čemu je bila vidljiva promjena boje i oslobađanje topline. Nakon što je prošlo reakcijsko vrijeme od 10 min, izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 357 nm. Osim

toga, izmjerena je i apsorbanija za slijepu probu koja je umjesto uzorka sadržavala demineraliziranu vodu.

Kako bi se izradio baždarni pravac, korišteni su standardi koji su pripremljeni razrjeđenjem otopine natrijevog nitrata koncentracije  $1 \text{ g L}^{-1}$  u demineraliziranoj vodi. Koncentracije dušika bile su u rasponu od  $1 \text{ mg L}^{-1}$  do  $25 \text{ mg L}^{-1}$ . Na temelju izmjerenih apsorbanija otopina poznatih koncentracija izrađen je baždarni dijagram prikazan u prilogu 7.1.

#### *3.2.6.4.2. Određivanje koncentracije fosfata u podlozi*

Za određivanje koncentracije fosfata korišten je kit (Merck, Njemačka). Metoda se temelji na reakciji ortofosfatnih iona u otopini sumporne kiseline s molibdenovim ionima pri čemu nastaje fosfomolibdenska kiselina. Askorbinska kiselina reducira nastali produkt u fosfomolibden plavo (PMB) koji daje plavo obojenje. U 5 mL uzorka dodano je 5 kapi reagensa PO<sub>4</sub>-1. Sadržaj kivete je dobro potom vorteksiran te je dodana jedna mikrožličica reagensa PO<sub>4</sub>-2. Suspenzija je vorteksirana do potpunog otapanja reagensa PO<sub>4</sub>-2. Reakcijsko vrijeme je iznosilo 5 minuta nakon čega je izmjerena apsorbanija pri valnoj duljini od 690 nm.

Za izradu baždarnog pravca korišteni su standardi pripremljeni razrjeđivanjem otopine natrijevog dihidrogenfosfata monohidrata koncentracije  $1 \text{ g L}^{-1}$  u demineraliziranoj vodi. Koncentracije fosfatnih iona bile su u rasponu od  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  do  $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Baždarni pravac izrađen je na temelju izmjerenih apsorbanija otopina poznatih koncentracija fosfata te je prikazan u prilogu 7.2.

#### *3.2.6.5. Određivanje udjela proteina u biomasi mikroalgi*

Metoda po Lowryju, koja se temelji na Biuret reakciji između  $\text{Cu}^{2+}$  i peptidne veze u lužnatom mediju, poznata je kao metoda određivanja količine ukupnih proteina. U navedenoj reakciji dolazi do redukcije  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^{+}$ . Dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa, dolazi do reakcije smjese anorganskih soli s pobočnim lancem tirozina i triptofana. Navedena reakcija dovodi do plavog obojenja pri čemu je intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji proteina. Postupak pripreme uzorka počinje vaganjem 1 - 1,5 mg prethodno osušene i usitnjene biomase mikroalgi u plastične epruvete. Uzorcima je dodan 1 mL 1 M NaOH. Epruvete su stavljene u vodenu kupelj 20 minuta na  $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Uzeto je 100  $\mu\text{L}$  uzorka koji je potom dodan u plastičnu epruvetu s 0,5 mL demineralizirane vode pri čemu su stanice resuspendirane. Potom je dodano 0,5 mL 1 M NaOH. Epruveta je zatvorena i stavljena u

vodenu kupelj pri 95 °C kroz 10 minuta. Sadržaj epruvete ohlađen je na sobnu temperaturu te je dodano 2,5 mL otopine C. Nakon 10 minuta, naglo je dodano 0,5 mL otopine D i sadržaj epruvete je promiješan. Sastav pojedinih korištenih otopina prikazan je u tablici 9. Epruveta je ostavljena 40 minuta u tami na sobnoj temperaturi. Nakon isteka vremena, izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 550 nm. Pomoću baždarnog dijagrama izračuna se koncentracija proteina u uzorku (prilog 7.3). Udio proteina u suhoj tvari biomase mikroalgi određen je prema jednadžbi [4]:

$$m_p = \gamma_p \cdot V_k \quad [3]$$

$$wp = \frac{m_p}{m_x} \cdot 100 \quad [\%] \quad [4]$$

gdje je:

$m_p$  - masa proteina [mg]

$\gamma_p$  - koncentracija proteina [ $\text{mg L}^{-1}$ ]

$V_k$  - volumen reakcijske smjese [mL]

$m_x$  - masa biomase dodana u reakcijsku smjesu [mg]

$w_p$  - udio proteina u biomasi [%]

**Tablica 6.** Otopine potrebne za određivanje koncentracije proteina metodom po Lowryju

Otopina	Sastav otopine
Otopina A	5 % $\text{Na}_2\text{CO}_3$
Otopina B	0,5 % $\text{CuSO}_4$ u 1 % K,Na-tartaratu
Otopina C*	Pomiješa se otopina A i B u omjeru 50 : 1
Otopina D*	Razrijeđeni Folin-Ciocalteu reagens s destiliranom vodom u omjeru 1:1

\*Otopine je potrebno prirediti neposredno prije analize

### 3.2.6.7. Određivanje ukupnih ugljikohidrata u biomasi mikroalgi

Analiza i kvantifikacija monosaharida u kiselinskim hidrolizatima biomase mikroalgi, određena je metodom NREL-a (engl. *National Renewable Energy Laboratory*) instituta (Van Wychen i Laureus, 2013a). Analiza je provedena korištenjem prethodno osušene biomase mikroalgi. Biomasa je usitnjena u keramičkom tarioniku te je  $25 \pm 2$  mg biomase izvagano u staklene viala volumena 10 mL i zabilježeno. Biomasi je potom dodano 250  $\mu\text{L}$  72 %  $w w^{-1}$  sumporne kiseline uz miješanje. Viala su inkubirane u termostatu pri 30 °C kroz sat vremena.

U svrhu stvaranja što boljeg kontakta biomase sa kiselinom, sadržaj je promiješan svakih 5 - 10 minuta. Nakon završene inkubacije dodano je 7 mL demineralizirane vode u vialu pri čemu su one zatvorene gumenim čepovima koji su još dodatno učvršćeni aluminijskim poklopcem. Sadržaj viala dobro je promiješan i stavljen na inkubaciju kroz sat vremena pri 121 °C u autoklavu. Nakon toga, epruvete su dobro ohlađene na sobnu temperaturu te je izuzet alikvot od 3 mL pomoću injekcijske igle. pH vrijednost alikvota podešena je između 6 i 8 dodatkom kalcijevog karbonata. Prije analize, uzorci su profiltrirani kroz najlonski filter veličine pora 0,22 µm u vijalicu za UPLC analizu.

Tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UPLC) određena je koncentracija monosaharida u uzorcima. Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline, a ona je pripremljena korištenjem redestilirane vode vodljivosti manje od 1 µS. Temperatura kromatografske kolone iznosila je 60 °C pri čemu je u nju injektirano 10 µL uzorka brzinom protoka mobilne faze od 0,6 mL min<sup>-1</sup>. Računalni program OpenLAB CDS korišten je u obradi dobivenih kromatograma. Na temelju dobivenih rezultata i prema jednadžbama baždarnih pravaca za standarde glukoze, ksiloze i fukoze, izračunata je koncentracija najzastupljenijih monosaharida u hidrolizatima biomase. Udio pojedinih monosaharida u biomasi ( $\omega_m$ ) izračunat je prema jednadžbi [5]:

$$\omega_m = \frac{\gamma_m \cdot V_h}{m_x} \cdot 100 \quad [\%] \quad [5]$$

gdje je:

$\gamma_m$  - koncentracija monosaharida [mg mL<sup>-1</sup>]

$V_h$  - volumen hidrolizata biomase [7,25 mL]

$m_x$  - masa biomase [mg]

#### 3.2.6.8. *Određivanje udjela lipida u biomasi mikroalge vanilin metodom*

Promjena udjela lipida u biomasi tijekom uzgoja praćena je pomoću kolorimetrijske vanilin metode (Mishra i sur., 2014). Relativno kratko vrijeme potrebno za provedbu analize ističe se kao prednost metode te ju čini primjenjivom za praćenje promjene lipida za vrijeme trajanja samog uzgoja.

Fosfo-vanilin reagens pripremljen je dodatkom 0,6 g vanilina u smjesi 10 mL apsolutnog etanola i 90 mL demineralizirane vode, uz kontinuirano miješanje. Nakon toga je

dodano 400 mL 85 % fosforne kiseline te je tako pripremljeni reagens čuvan u mraku. Uzorcima izuzetim tijekom uzgoja, prije same analize, određena je optička gustoća i koncentracija stanica. Za analizu je izuzeto od 2 do 4 mL uzorka kulture koji je odcentrifugiran. Supernatant je odbačen, a talog je resuspendiran u 100  $\mu$ L demineralizirane vode. Zatim je dodano 2 mL 98 % sumporne kiseline te su tako pripremljeni uzorci inkubirani u vodenoj kupelji pri 85 °C 10 minuta. Nakon isteka vremena, uzorci su hlađeni u ledu 5 minuta te je potom uzorcima dodano 5 mL prethodno pripremljenog fosfo-vanilin reagensa. Nakon 15 minuta reakcije pri 37 °C, izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 530 nm te je izračunata masa lipida prema jednadžbi baždarnog pravca. Udio lipida izračunat je kao omjer mase lipida i mase biomase prema jednadžbi prikazanoj u nastavku [6]:

$$w_l = \frac{m_l}{m_x} \cdot 100 [\%] [6]$$

gdje je:

$m_l$  - masa lipida [mg]

$m_x$  - masa biomase [mg]

$w_l$  - udio lipida u biomasi [%]

Za određivanje udjela lipida, prethodno je određena koncentracija biomase na temelju poznate optičke gustoće te baždarnog pravca ovisnosti  $OD_{540}$  o koncentraciji biomase. Korištena je jednadžba pravca [7]:

$$OD_{540} = 7,9143 x + 0,3576 [7]$$

gdje je:

$x$  – koncentracija biomase [ $mg\ ml^{-1}$ ]

Dobivena vrijednost koncentracije biomase pomnožena je s volumenom uzetim u analizu. Navedeni baždarni dijagrami prikazani su u prilogu 7.4 i 7.5.

### 3.2.6.9. Određivanje sastava masnih kiselina u biomasi mikroalgi

U svrhu identifikacije i kvantifikacije pojedinih masnih kiselina u lipidima mikroalgi, metilni esteri masnih kiselina prethodno su pripremljeni prema NREL metodi za određivanje ukupnih lipida (Van Wychen i Laureus, 2013b). Pripremi uzoraka prethodila je otopina standarda. 100 mg metil tridekanoata otopljeno je u 10 mL heksana pri čemu je dobiven

standard metil tridekanoata (C13:0ME) koncentracije 10 mg mL<sup>-1</sup>. Drugi standard pripremljen je otapanjem 10 mg pentadekana u 1 mL heksana. Dobiveni standard razrijeđen je s heksanom u omjeru 1:10 (100 µL pripremljenog standarda i 900 µL heksana). Tako pripremljene otopine čuvane su u zamrzivaču pri -20 °C u hermetički zatvorenim staklenim vialama volumena 1,5 mL.

U staklene viala odvagano je 5 - 10 mg prethodno osušene i usitnjene biomase. Uzorcima je zatim dodano 20 µL internog standarda metil tridekanoata, 200 µL otopine kloroform:metanol u omjeru 2:1 [v v<sup>-1</sup>] i 300 µL otopine 0,6 M HCl:metanol. Staklene viala zatvorene teflonskim čepom se vorteksiraju, a zatim inkubiraju u vodenoj kupelji pri 85 °C kroz sat vremena. Na ovaj način provedena je reakcija transesterifikacije. Nakon isteka vremena, uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu kroz 15 minuta. Dobro ohlađenim uzorcima, dodan je 1 mL heksana te je sadržaj dobro vorteksiran kroz 60 sekundi. Uzorci su ostavljeni kroz sat vremena na sobnoj temperaturi kako bi došlo do razdvajanja faza. Gornja (heksanska) faza, koja sadrži estere masnih kiselina, izdvojena je u čiste viala i pripremljena za provođenje analize plinskom kromatografijom. Uzorcima je dodan interni standard (IS) pentadekan (5 µL standarda na 200 µL uzorka) te su uzorci prije dodatka internog standarda, prema potrebi razrijeđeni dodatkom heksana. Za analizu uzoraka korišten je plinski kromatograf s plameno ionizacijskim detektorom (engl. *flame ionization detector*, *FID*) koji je prethodno opisan u poglavlju 3.1.5.2. Helij se koristio kao mobilna faza uz protok 1,2 mL min<sup>-1</sup>. Nakon provedene analize, dobivene su različite površine pikova metilnih estera te su uspoređene s kromatogramima dobivenim propuštanjem standardne smjese 37 masnih kiselina (smjesa F.A.M.E C4-C24). Dobivene koncentracije metilnih estera masnih kiselina, izražene su masenim udjelom [% g g<sup>-1</sup>] pojedine masne kiseline u uzorku, prema količini internog standarda C13:0ME. Prilikom izračuna korištene su jednadžbe [8] i [9]:

$$m_{\text{FAME}_{\text{C13 norm}}} = \frac{Y_{\text{Ci}}}{Y_{\text{C13}}} \cdot m_{\text{C13}} \quad [8]$$

$$\omega_{\text{ci/s.tv.}} = \frac{m_{\text{FAME}_{\text{C13 norm}}}}{m_{\text{s.tv.}}} \cdot 100 \quad [\%] \quad [9]$$

gdje je:

$m_{\text{FAME}_{\text{C13 norm}}}$  - masa standarda C13:0ME [mg]

$\gamma_{ci}$  - koncentracija metilnog estera masne kiseline [ $\text{mg L}^{-1}$ ]

$\gamma_{C13}$  - koncentracija standarda metil tridekanoata (C13) [ $\text{mg L}^{-1}$ ]

$m_{C13}$  - masa dodanog standarda metil tridekanoata (C13) [mg]

$\omega_{ci/s.tv.}$  - maseni udio metilnih estera masnih kiselina u suhoj tvari biomase [%]

$m_{s. tv.}$  - masa suhe tvari biomase [g].

### 3.2.6.11. *Određivanje pokazatelja uspješnosti procesa*

Parametri uspješnosti bioprocesa određeni su prema jednadžbi [10]:

$$Pr = \frac{X}{t_{uzgoj}} [10]$$

pri čemu je:

Pr - produktivnost sinteze biomase [ $\text{g L}^{-1} \text{ dan}$ ]

X - koncentracija biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$t_{uzgoj}$  - vrijeme uzgoja [dan]



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Ubrzan razvoj svjetskog gospodarstva rezultirao je nakupljanjem ugljikovog dioksida u Zemljinoj atmosferi što je rezultiralo globalnim zatopljenjem i promjenom klime. Iscrpljivanje zaliha fosilnih goriva i onečišćenje okoliša izazvano njegovim korištenjem potaknulo je interes za alternativnim obnovljivim i ekološki prihvatljivijim sirovinama za proizvodnju biogoriva kao što su mikroalge (Stephens i sur., 2010). Osim kao sirovina za proizvodnju biogoriva kao što je bioetanol i biodizel, biomasa mikroalgi je bogata različitim bioaktivnim tvarima koje imaju primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj, kemijskoj industriji te kao dodatak hrani i krmivima. Pri planiranju uzgoja mikroalgi potrebno je voditi računa o karakteristikama mikroalge, tj. brzini rasta, uvjetima uzgoja, sastavu biomase i otpornosti ka drugim mikroorganizmima u slučaju uzgoja u otvorenim sustavima. Pri tome valja voditi računa da se za uzgoj mikroalgi koriste velike količine vode, te da bi za uzgoj bilo poželjno koristiti industrijske ili komunalne otpadne vode koje mogu sadržavati značajne količine nutrijenata potrebnih za rast. Mikroalge otporne na širok raspon okolišnih uvjeta kao što su visoka temperatura, prisutnost teško razgrađivih tvari u vodi za uzgoj, visoka ionska jakost (povećan salinitet, prisutnost drugih anorganskih tvari) poželjni su proizvodni sojevi (von Alvensleben i sur., 2013).

Kontaminacija raznim okolnim mikroorganizmima također je ozbiljan problem koji često rezultira značajnim ekonomskim gubicima pri proizvodnji u velikom mjerilu (Meseck i sur., 2007). Tolerancija na visoki salinitet s minimalnim učincima na produktivnost i biokemijski profil biomase omogućuje manipulaciju saliniteta radi inhibicije ili smanjenja kontaminacije proizvodne kulture raznim stranim organizmima. Produljeno vrijeme za uspostavu rasta i logaritamski rast mikroalge pruža priliku za kasnije izdvajanje biomase s niskim razinama kontaminacije, što je važan aspekt za kontrolu kvalitete krajnjeg proizvoda (von Alvensleben i sur., 2013). *Picochlorum* sp. se intenzivno istražuje s obzirom na toleranciju na visoki intenzitet svjetlosnog zračenja, visoki salinitet te visoku temperaturu. Pokazalo se da su određeni sojevi mikroalge *Picochlorum* sp. kozmopolitski mikroorganizmi s visokim udjelom lipida i proteina za akvakulturu. Također pokazuju visoku produktivnost i potencijalno široku toleranciju na varijacije saliniteta (Chen i sur., 2012).

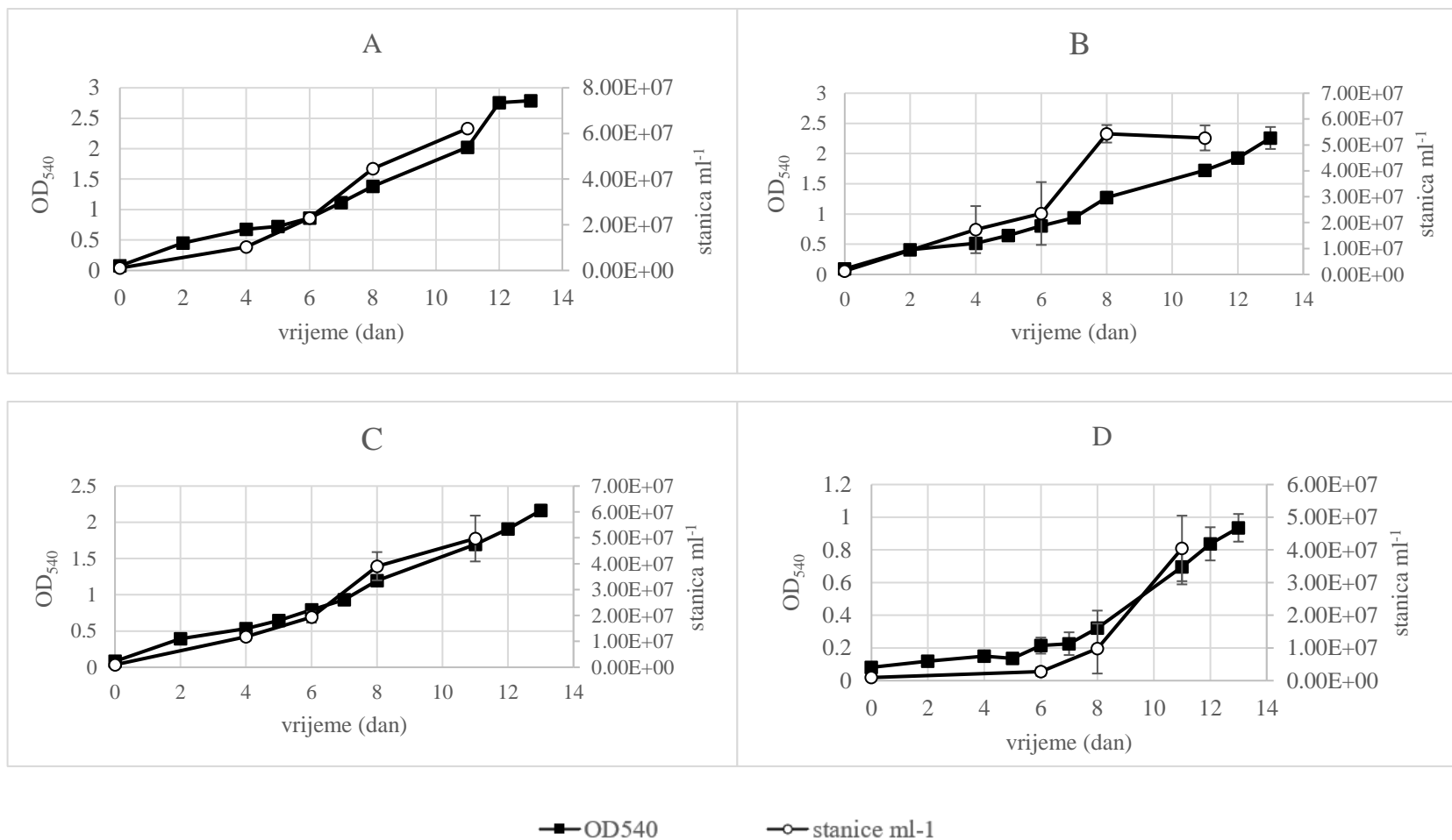
Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj različitih koncentracija NaCl i limitacije izvorom dušika i fosfora na rast i sastav biomase *Picochlorum* sp. U prvom preliminarnom

eksperimentu ispitivao se rast mikroalge u podlogama s različitim koncentracijama NaCl s ciljem odabira uvjeta u kojima se ostvarila visoka produktivnost i visok udjel lipida u biomasi. U drugom preliminarnom eksperimentu proveden je dvofazni uzgoj mikroalge. Prva faza provedena je u optimalnim uvjetima za rast biomase, a u drugoj fazi mikroalga je bila izložena raznim stresnim uvjetima s ciljem povećanja proizvodnje određenih metabolita i sagledavanja razlike utjecaja različitih stresnih uvjeta na rast i sastav biomase. Potom je proveden uzgoj u barbotirajućoj koloni u uvjetima odabranim prema rezultatima analiza biomase koje su se provodile kroz oba preliminarna eksperimenta. Iz uzgoja je dobivena krivulja rasta te se određivao udio proteina, ugljikohidata i lipida u biomasi. Dobiveni rezultati navedeni su u nastavku ovog rada.

#### **4.1. UČINAK SALINITETA NA RAST I SASTAV BIOMASE MIKROALGE**

##### **4.1.1. Šaržni uzgoj mikroalge uz dodatak natrijevog klorida**

S ciljem da se potakne sinteza lipida i/ili ugljikohidata, uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. proveden je pri različitim koncentracijama NaCl u rasponu od 0 do 100 g L<sup>-1</sup>. Eksperimenti su provedeni u tri paralele za istraživane salinitete hranjive podloge. Tijekom uzgoja pratio se rast mikroalge spektrofotometrijski te je određivan broj stanica po mililitru. Mjerenje optičke gustoće (OD) neizravna je metoda koja se široko koristi za praćenje i kontrolu rasta biomase mikroalgi jer se može indirektno povezati s brojem stanica u hranjivoj podlozi (Ribeiro-Rodrigues i sur., 2011). Mikroalge se nespolno razmnožavaju dvojnomo diobom koja rezultira povećanjem broja pojedinačnih stanica. Dobiveno povećanje broja stanica koristi se za dobivanje krivulje rasta i prikazuje se u obliku logaritma broja stanica kao funkcije vremena. Na krivulji se mogu uočiti četiri različite faze (Richmond, 2004). Prvo se javlja lag faza koja je karakterizirana sintezom staničnih komponenata ključnih za bazalni metabolizam. U logaritamskoj ili ekspanencijalnoj fazi može se uočiti ubrzan rast. U stacionarnoj fazi nema promjene broja stanica zbog ravnoteže između broja stanica koje nastaju diobom i stanica koje umiru, a izazvana je iscrpljivanjem hranjivih tvari u podlozi i nakupljanjem proizvoda metabolizma. Posljednja faza na krivulji rasta je faza odumiranja. Krivulje rasta mikroalge *Picochlorum* sp. pri različitim koncentracijama natrijevog klorida u podlozi prikazane su na slici 4.



**Slika 4.** Promjene optičke gustoće i broja stanica po mililitru tijekom uzgoja *Picochlorum* sp. pri različitim koncentracijama NaCl:  
 A ( $c(\text{NaCl})= 0 \text{ g L}^{-1}$ ), B ( $c(\text{NaCl})= 10 \text{ g L}^{-1}$ ), C ( $c(\text{NaCl})= 25 \text{ g L}^{-1}$ ), D ( $c(\text{NaCl})= 50 \text{ g L}^{-1}$ )

Uzgoj pri koncentracijama  $c(\text{NaCl})=75 \text{ g L}^{-1}$  i  $c(\text{NaCl})=100 \text{ g L}^{-1}$  prekinut je nakon četvrtog dana budući da su vrijednosti optičke gustoće ( $\text{OD}_{540}$ ) počele padati te je zaključeno da mikroalga ne može rasti pri ovakovisokom salinitetu. Krivulja rasta za podlogu sa  $c(\text{NaCl})=10 \text{ g L}^{-1}$  pokazuje manje vrijednosti broja stanica u odnosu na podlogu sa  $c(\text{NaCl})=0 \text{ g L}^{-1}$ . Broj stanica po mililitru u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=10 \text{ g L}^{-1}$  počeo je opadati 11. dan dok je optička gustoća nastavila rasti do 13. dana. Podloga sa  $c(\text{NaCl})=25 \text{ g L}^{-1}$  pokazuje sličan trend rasta kao i podloga sa  $c(\text{NaCl})=10 \text{ g L}^{-1}$ , dok uzgoj u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$  karakterizira puno sporiji rast te najmanje vrijednosti  $\text{OD}_{540}$  i broja stanica po mililitru.

Kada se uzmu u obzir rezultati srednjih vrijednosti, najveća vrijednost optičke gustoće kulture zabilježena je u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=0 \text{ g L}^{-1}$ , a najmanja u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$ , dok se u istraživanju De la Vega i sur. (2014) brzina rasta drastično smanjila pri molarnim koncentracijama NaCl nižim od 0,085 M. U tom istraživanju *Picochlorum* sp. HM1 uzgajan je u modificiranim f/2 podlogama te je najveća specifična brzina rasta postignuta u podlozi s molarnom koncentracijom od 0,275 M.

U podlogama sa  $c(\text{NaCl})=10 \text{ g L}^{-1}$  i  $c(\text{NaCl})=25 \text{ g L}^{-1}$  može se uočiti da su srednje vrijednosti  $\text{OD}_{540}$  vrlo slične. Srednja vrijednost broja stanica po mililitru ipak je nešto veća u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=10 \text{ g L}^{-1}$ . Najveća srednja vrijednost broja stanica po mililitru primijećena je u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=0 \text{ g L}^{-1}$  ( $6,21 \cdot 10^7$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ ).

Dobiveni rezultati u skladu su s brojnim istraživanjima koja su pokazala da se brzina rasta smanjuje s povećanjem koncentracije NaCl. Na primjer, de la Vega i sur. (2011) zabilježili su da se rast kultura *Picochlorum* sp. HM1 u podlogama s 0,58, 0,76 i 0,92 M NaCl smanjivao s povećanjem koncentracije NaCl, dok u podlogama s koncentracijom NaCl većom od 0,92 M nije uočen rast. Rast mikroalge *Chlorella* sp. TLD6B također je inhibiran pri visokim koncentracijama NaCl. U tom istraživanju ispitan je učinak NaCl koncentracije od 0 do 0,8 M te je utvrđeno da se vrijednost optičke gustoće smanjuje s povećanjem saliniteta podloge. Zanimljivo je da su podloge s 0,1 M i 0,2 M NaCl imale veće vrijednosti koncentracije biomase od kontrolne podloge bez NaCl unatoč smanjenju vrijednosti  $\text{OD}_{680}$ .

Uzgoj *Picochlorum* sp. prekinut je u eksponencijalnoj fazi kako bi se izbjegla limitacija izvorima dušika i fosfora. Na kraju provedenog uzgoja, gravimetrijski je određena koncentracija biomase. Biomasa mikroalgi obećavajuća je i održiva sirovina sa širokim rasponom primjena za proizvodnju biogoriva, kozmetike, lijekova, funkcionalne hrane i nutraceutika (Gatamaneni i sur., 2018). Štoviše, biomasa mikroalgi idealna je sirovina za

održivu proizvodnju biogoriva uz smanjenje emisije CO<sub>2</sub> zbog svoje raznolikosti i velike brzine rasta. Također, uzgoj biomase nije ograničen na određeni geografski položaj i ne zauzima obradive poljoprivredne površine (Liu i sur., 2019).

**Tablica 7.** Koncentracija (X) i produktivnost biomase (Pr<sub>x</sub>) *Picochlorum* sp. pri različitim salinitetima

c(NaCl)	0 g L <sup>-1</sup>	10 g L <sup>-1</sup>	25 g L <sup>-1</sup>	50 g L <sup>-1</sup>
X [g L <sup>-1</sup> ] (±σ)	0,2505	0,2621 (±0,02)	0,2748 (±0,02)	0,1413 (±0,09)
Pr <sub>x</sub> [g L <sup>-1</sup> dan <sup>-1</sup> ]	0,0193	0,0202	0,0211	0,0109

U tablici 7 prikazane su koncentracije i produktivnosti biomase na kraju uzgoja. Najveća koncentracija biomase zabilježena je pri c(NaCl)=25 g L<sup>-1</sup> te iznosi 0,2748 g L<sup>-1</sup> dok je najmanja koncentracija biomase od 0,1413 g L<sup>-1</sup> dobivena u podlozi sa c(NaCl)=50 g L<sup>-1</sup>. Produktivnost biomase važan je parametar za procjenu rasta mikroalgi, a kreće se od 29 do 890 mg L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup> ovisno o vrsti mikroalge (Cheng i sur., 2018). Maksimalna je produktivnost biomase za *Picochlorum* sp. iznosila 0,0211 g L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup> u podlozi sa c(NaCl)=20 g L<sup>-1</sup>. Najmanja produktivnost od 0,0109 g L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup> dobivena je u podlozi sa c(NaCl)=50 g L<sup>-1</sup>. Von Alvensleben i sur. (2013) proveli su istraživanje utjecaja raspona koncentracija NaCl od 2 - 36 g L<sup>-1</sup> na *Picochlorum atomus* te su dobivene nešto više vrijednosti produktivnosti biomase koje su se kretale između 0,027 i 0,03 g L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>.

Podloga sa c(NaCl)=0 g L<sup>-1</sup> rezultirala je najvećom vrijednosti optičke gustoće, ali ne i najvećom koncentracijom suhe tvari biomase. Slične rezultate dobili su Li i sur. (2021) koji su u hranjivim podlogama sa 0,1 M i 0,2 M NaCl dobili veće vrijednosti koncentracije biomase od kontrolne podloge bez NaCl unatoč smanjenju vrijednosti OD<sub>680</sub>. Fal i sur. (2022) proučavali su utjecaj 0 i 0,2 M NaCl u hranjivoj podlozi na rast, fiziologiju i metabolizam *Chlamydomonas reinhardtii*. Mikroalga je tjedan dana uzgajana u BG11 podlozi nakon čega se svaka dva dana dodavao NaCl do konačne koncentracije od 0,2 M. Podloga s 0,2 M NaCl pokazala je manju specifičnu brzinu rasta od podloge s 0 M NaCl, no produktivnost biomase povećala se u odnosu na podlogu bez NaCl s 0,029 na 0,042 g L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>. Utvrđeno je da su organeli stanica u uvjetima osmotskog stresa bili teži i veći od onih u kontrolnom uzgoju. Također, u uvjetima osmotskog stresa nakupljaju se takozvani osmoprotektanti kao što su glicerol i prolin čija je uloga uravnoteženje osmotskog tlaka i sprječavanje gubitka vode u stanici. Pokazalo se da je NaCl u primjerenim koncentracijama koristan za neke metaboličke

putove i povoljno djeluje na rast mikroalgi, međutim, u previsokim koncentracijama može inhibirati rast i uzrokovati lizu stanica (Pandit i sur., 2017).

#### 4.1.2. Udjeli proteina i lipida u biomasi mikroalge u podlogama s različitim salinitetima

Lipidi koje proizvode mikroalge mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: polarni lipidi, poput glicerofosfolipida, koji imaju važnu ulogu u staničnoj strukturi; i nepolarni lipidi, poput triacilglicerola, koji su uglavnom odgovorni za skladištenje energije (Alishah Aratboni i sur., 2019). Poznato je da primjena stresnih uvjeta u vidu saliniteta, pH, temperature, intenziteta svjetlosti i limitacije nutrijenata inducira sintezu i akumulaciju neutralnih lipida, uglavnom u obliku triacilglicerola (TAG) koji su najprikladniji oblik lipida za proizvodnju biodizela (Scharma i sur., 2012).

Prema rezultatima iz tablice 8 može se vidjeti da je najveći udio lipida dobiven u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=10 \text{ g L}^{-1}$  te je iznosio 12,59 %, dok je najmanji udio od 5,6 % dobiven u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$ . Udio lipida povećao se u uzgojima sa  $c(\text{NaCl})=10 \text{ g L}^{-1}$  i  $c(\text{NaCl})=25 \text{ g L}^{-1}$  u odnosu na kontrolni uzgoj, no s povećanjem koncentracije NaCl, udio lipida u stanicama mikroalge se smanjio. Isto je zapaženo i u istraživanju Li i sur. (2021) gdje se akumulacija lipida u stanicama mikroalge *Chlorella* sp. TLD6B značajno povećala u podlogama sa 5,84 i 11,69  $\text{g L}^{-1}$  NaCl u odnosu na kontrolnu podlogu i podloge s većom koncentracijom NaCl. Uspoređivanjem oba istraživanja može se utvrditi da je optimalna koncentracija NaCl za rast i akumulaciju lipida slična za obje mikroalge, no udio lipida u stanicama *Picochlorum* sp. bio je značajno manji od onog kod mikroalge *Chlorella* sp. TLD6B koja je pri 11,69  $\text{g L}^{-1}$  postigla 31,27 % lipida u suhoj tvari biomase.

**Tablica 8.** Udjeli proteina i lipida u biomasi *Picochlorum* sp. u hranjivoj podlozi s različitim koncentracijama NaCl

<b>c(NaCl)</b>	<b>Proteini [%, g g<sup>-1</sup>] (<math>\pm\sigma</math>)</b>	<b>Lipidi [%, g g<sup>-1</sup>] (<math>\pm\sigma</math>)</b>
<b>0 g L<sup>-1</sup></b>	38,02	6,9
<b>10 g L<sup>-1</sup></b>	49,05 ( $\pm 16,95$ )	12,59 ( $\pm 2,12$ )
<b>25 g L<sup>-1</sup></b>	47,42 ( $\pm 5,08$ )	10,89 ( $\pm 2,43$ )
<b>50 g L<sup>-1</sup></b>	35,52 ( $\pm 2,12$ )	5,6 ( $\pm 2,12$ )

Acquah i sur. (2020) u svome su radu proučavali sastav biomase 17 vrsta mikroalgi u kojoj je raspon udjela proteina iznosio 6 - 58 %. Pokazalo se da većina vrsta mikroalgi sadrži visok sadržaj proteina te se mogu koristiti kao dodaci hrani i krmivima. *Chlorella vulgaris* i *Arthrospira* sp. najčešće se koriste u industriji zbog visokog sadržaja proteina (51 - 58 %

suhe tvari) i povoljnog profila esencijalnih aminokiselina (Becker i sur., 2007; Ismail i sur., 2020). Udio ukupnih proteina u biomasi *Picochlorum* sp. određen je metodom po Lowryju. Prema rezultatima iz tablice 8 može se uočiti da se udio proteina u biomasi bio u rasponu 35,52 -45,05 %, a najveća vrijednost dobivena je u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=10 \text{ g L}^{-1}$ . U podlogama sa  $c(\text{NaCl})=10 \text{ g L}^{-1}$  i  $c(\text{NaCl})=25 \text{ g L}^{-1}$  dobiven je veći udio proteina u usporedbi s kontrolnom podlogom i podlogom  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$ .

Masne kiseline jedan su od glavnih sastojaka biomase mikroalgi i obično čine između 5 % i 60 % suhe tvari stanica (Ben-Amotz i sur., 1985). Lipidi mikroalgi imaju raznolikiji sastav masnih kiselina od onih iz biljnih ulja (Sawangkeaw i Ngamprasertsith, 2013). Uglavnom sadrže masne kiseline s 12, 16 i 18 ugljikovih atoma, a neke vrste mogu sadržavati masne kiseline do 24 ugljikova atoma (Breuer i sur., 2013). Ovisno o prisutnosti dvostrukih veza, mogu se podijeliti na zasićene (engl. *saturated fatty acids*, *SFA*) i nezasićene masne kiseline. Nezasićene masne kiseline se dijele na mononezasićene (engl. *monounsaturated fatty acids*, *MUFA*) i višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polysaturated fatty acids*, *PUFA*) (Suastes-Rivas i sur., 2020).

Analiza sastava masnih kiselina provedena je plinskom kromatografijom prema opisanoj metodi u poglavlju 3.2.6.9. Iz dobivenih rezultata prikazanih u tablici 9, najveći udio ukupnih staničnih lipida čine zasićene masne kiseline. Rezultati ovog eksperimenta odstupaju od rezultata koje su dobili De la Vega i sur. (2011) koji u svom radu navode da u profilu masnih kiselina kod *Picochlorum* sp. HM1 prevladavaju nezasićene masne kiseline te čine oko 60 % ukupnih masnih kiselina.

U podlogama sa  $c(\text{NaCl})=0 \text{ g L}^{-1}$ ,  $c(\text{NaCl})=10 \text{ g L}^{-1}$  i  $c(\text{NaCl})=25 \text{ g L}^{-1}$  najzastupljenija zasićena masna kiselina je heptadekanska kiselina (C17:0) (26,33 - 29,85 %), a slijedi ju palmitinska kiselina (C16:0) (20,86 - 21,69 %), dok za podlogu sa  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$  vrijedi suprotno te se u najvećem udjelu može naći palmitinska kiselina (31,5 %), a potom heptadekanska kiselina (C17:0) (18,5 %). Udio heptadekanske kiseline dobiven u ovom eksperimentu razlikovao se od udjela dobivenih u dostupnoj literaturi za sojeve iz roda *Picochlorum* sp. Kod *Picochlorum oklahomensis* zabilježen je udio od samo 0,15 % ove masne kiseline, dok *Picochlorum* sp. HM1 i *Picochlorum atomus* nisu sadržavali heptadekansku masnu kiselinu (Dahmen i sur., 2014; Zhu i Dunford, 2013; von Alvensleben i sur, 2013). Masne kiseline s neparnim brojem ugljikovih atoma djeluju antialergijski, protuupalno i antifungalno, a koriste se i za proizvodnju biodizela (Bhatia i sur., 2019).

**Tablica 9.** Udjeli lipida u biomasi *Picochlorum* sp. u podlogama s različitim koncentracijama NaCl

MASNA KISELINA	% [g g <sup>-1</sup> ]			
	10 g L <sup>-1</sup>	25 g L <sup>-1</sup>	50 g L <sup>-1</sup>	0 g L <sup>-1</sup>
C6:0, kaproična kiselina	0,06	0	0	0
C10:0, dekanska kiselina	0,34	0,20	0,42	0
C11:0, undekanska kiselina	0	0,12	0,42	0,58
C14:1 cis 9, miristoleična kiselina	0,60	0,35	0,03	0,34
C15:0, pentadekanska kiselina	0,02	0	0	0
C15:1 cis 10, pentadekanoična kiselina	0,14	0,02	0,01	0
C16:0, palmitinska kiselina	21,48	21,69	31,50	20,86
C16:1 cis 9, palmitoleinska kiselina	2,40	1,64	1,76	2,25
C17:0, heptadekanska kiselina	26,33	27,26	18,50	29,85
C17:1 cis 10, heptadekanska kiselina	0,32	0,07	0	0
C18:0, stearinska kiselina	2,53	2,05	0	4,96
C18:1 cis 9, oleinska kiselina	2,12	1,00	0,87	2,59
C18:2 cis 9,12, linolna kiselina	34,27	32,18	39,09	31,41
C18:3 cis 9,12,15, α-linolenska kiselina	8,33	13,28	8,14	7,67
C20:2 cis 11,14, eikozadienska kiselina	0,04	0	0,01	0
C22:2 cis 13,16, dokoziadienska kiselina	0,24	0	0	0
C20:5 cis 5,8,11,14,17, eikozapentaenska kiselina	0	0	0	0,49
C24:0, lignocerična kiselina	0,45	0,12	0,09	0
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19, dokozaheksaenska kiselina	0,36	0	0	0,29
<b>udio u biomasi</b>	12,59 (±2,12)	10,89 (±2,43)	5,60 (±2,12)	6,90
<b>SFA</b>	51,20	51,45	50,92	56,25
<b>MUFA</b>	5,57	3,09	2,67	5,19
<b>PUFA</b>	43,23	45,46	47,24	39,86



Jednostruko nezasićene masne kiseline čine najmanji udio u ukupnim lipidima u svim ispitivanim hranjivim podlogama (2,67 - 5,57 %). Najzastupljenije su bile palmitoleinska kiselina (C16:1 cis 9) i oleinska kiselina (C18:1 cis 9). Višestruko nezasićene kiseline druge su po zastupljenosti u biomasi mikroalge s rasponom udjela 39,86 - 47,24 % od kojih je u svim podlogama najviše zastupljena linolna kiselina (C18:2 cis 9,12) (31,41 - 39,09 %) s najmanjim udjelom u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=0 \text{ g L}^{-1}$ , a najvećim u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$ . Dobiveni profil masnih kiselina u skladu je s istraživanjem von Alvenslebena i sur. (2013) koji navode da su najzastupljenije masne kiseline kod *Picochlorum atomus*  $\alpha$ -linolenska, linolna i palmitinska kiselina čineći do 68 % ukupnih masnih kiselina. De la Vega i sur. (2011) također su zabilježili da *Picochlorum* sp. HM1 u usporedbi s drugim zelenim algama ima visok sadržaj linolne kiseline koja se može naći i u suncokretovom (66,2 %) i sojinom ulju (53,2 %).

#### **4.2. ISTRAŽIVANJE UČINKA VISOKOG SALINITETA I LIMITACIJE IZVOROM DUŠIKA I FOSFORA NA RAST I SASTAV BIOMASE MIKROALGE**

U preliminarnim istraživanjima utvrđeno je da uvjeti uzgoja koji potiču brzi rast mikroalgi rezultiraju biomasom s niskim udjelima željenih metabolita kao što su lipidi, ugljikohidrati i karotenoidi. Nasuprot tome, stresni potiču nakupljanje željenih spojeva i imaju negativan učinak na rast (Liyanaarachchi i sur., 2021). Limitacija izvorom dušika i fosfora jedna je od glavnih strategija za povećanje koncentracije lipida u stanicama zbog lake primjene u laboratorijskom i industrijskom mjerilima, no treba se postići kompromis između rasta biomase i nakupljanja lipida u stanicama (Adams i sur., 2013). Negativni učinak na rast biomase može se ublažiti uzgojem mikroalge u višefaznom procesu, najčešće dvofaznom kao što je napravljeno u ovom istraživanju. U prvoj fazi osiguravaju se optimalni uvjeti rasta za postizanje visoke produktivnosti biomase, nakon čega slijedi izlaganje stanica stresnim uvjetima u drugoj fazi s ciljem nakupljanja željenog spoja (Naggapan, 2019).

Eksperiment je započet uzgojem mikroalge *Picochlorum* sp. u f/2 podlozi izvornog sastava. Sedmog dana biomasa je centrifugirana, isprana destiliranom vodom i resuspendirana u izvornu (kontrolna podloga) i četiri modificirane f/2 podloge - 50 i 75  $\text{g L}^{-1}$  NaCl, podloga bez izvora dušika te podloga bez izvora fosfora. Kultivacija je trajala sve dok nije opažen pad broja stanica i optičke gustoće, nakon čega je uzgoj zaustavljen, biomasa je izdvojena te su na njoj provedene analize kao i u prvom eksperimentu.

#### 4.2.1. Dvofazni šaržni uzgoj mikroalge uz primjenu stresnih uvjeta

Na slici 5 prikazana je kinetika rasta mikroalge *Picochlorum* sp. iz drugog dijela eksperimenta nakon prebacivanja kultura u modificirane f/2 podloge. Rezultati srednjih vrijednosti pokazuju da je optička gustoća kulture bila najviša u kontrolnoj podlozi, a najmanja u podlozi bez izvora dušika. Kultura narasla na podlozi sa  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$  imala je veće vrijednosti  $\text{OD}_{540}$  od kulture narasle na podlozi sa  $c(\text{NaCl})=75 \text{ g L}^{-1}$ , što je bilo očekivano s obzirom na rezultate preliminarnog eksperimenta. Kod uzgoja uz obje koncentracije natrijevog klorida može se zamijetiti da je eksponencijalna faza trajala do 9. dana uzgoja, no u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=75 \text{ g L}^{-1}$ , kultura je po izlasku iz eksponencijalne faze naglo ušla u fazu odumiranja, dok je kultura koja je rasla na podlozi sa  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$  bila u stacionarnoj fazi rasta (s devetog na deseti dan). Kultura u podlozi bez izvora dušika imala je najmanje vrijednosti  $\text{OD}_{540}$  te je šesti dan uzgoja ušla u stacionarnu fazu, brže nego kulture koje su rasle na ostalim podlogama. Nasuprot tomu, limitacija izvorom fosfora nije značajnije utjecala na rast kulture. U istraživanju kojeg su proveli Toumi i Politova (2021) potvrđen je negativan utjecaj limitacije izvorom dušika na rast i koncentraciju biomase mikroalge *Chlorella sorokiniana*. Kultura u podlozi bez dušika bila je samo 2 dana u eksponencijalnoj fazi, dok su kulture u podlogama koje sadržavaju dušik imale eksponencijalni rast 7 dana.

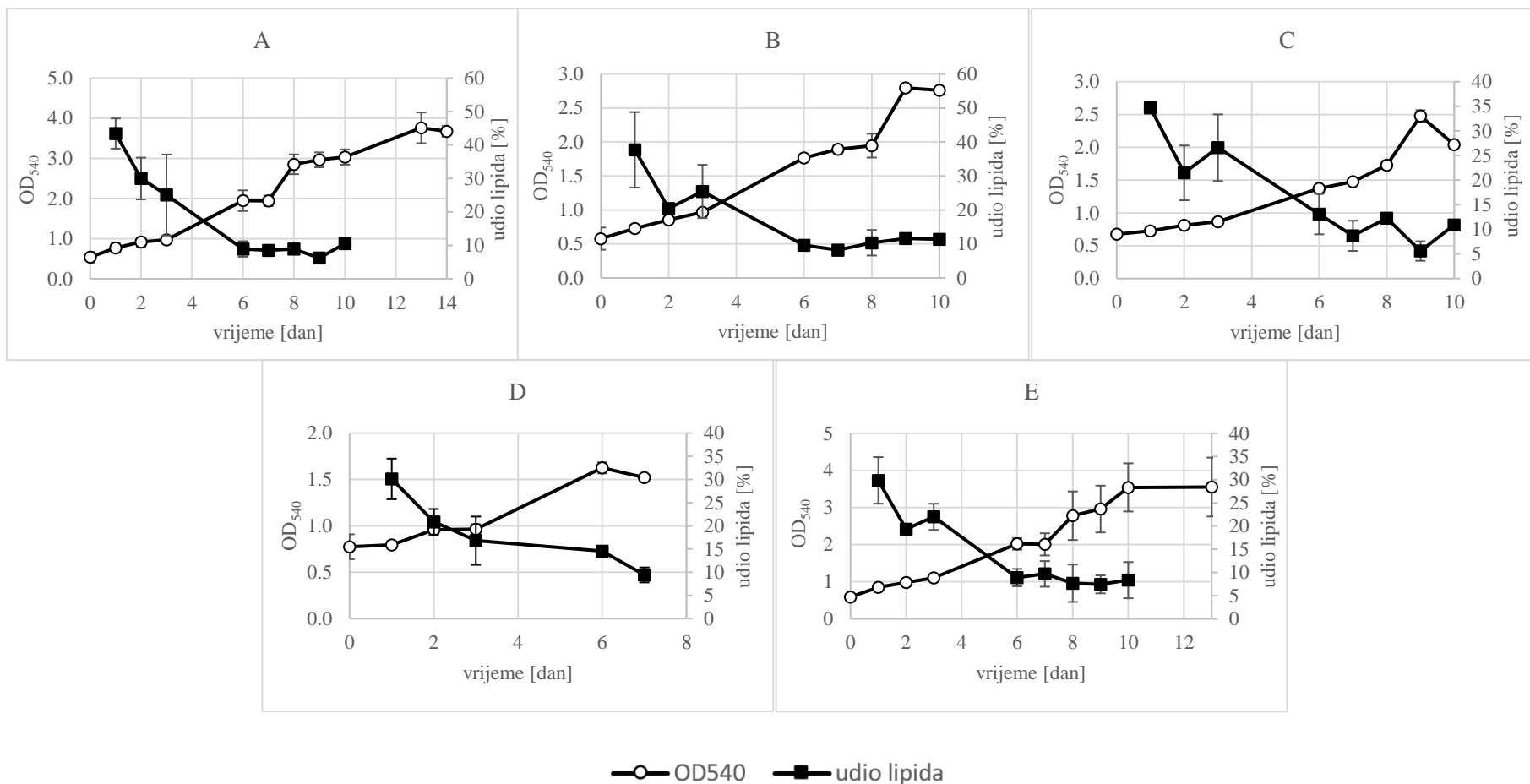
Peti dan uzgoja, primijećena je promjena boje iz zelene u žutu u podlogama bez dušika. Zhu i sur. (2014) su kod mikroalge *Chlorella zofingiensis* također zabilježili promjenu boje biomase u uvjetima bez dušika. U njihovom eksperimentu boja podloge se promijenila iz zelene u žutu nakon 2 dana limitacije dušikom, a 10. dana uzgoja, kada su stanice počele odumirati, boja je bila žućkasto-bijela. Do varijacije u boji kulture dolazilo je zbog raspada klorofila čija je koncentracija naglo pala već 1. dan uzgoja. Ispostavilo se da klorofil i ostali spojevi bogati dušikom mogu biti usmjereni na razgradnju radi reciklacije dušika koji je prijeko potreban stanicama (Gaude i sur, 2007). Smanjen udjel pigmenata može biti razlog za smanjenu fotosintetsku aktivnost u uvjetima limitacije dušikom (Msanne i sur, 2012). Uvjeti limitacije izvorom fosfora također mogu uzrokovati smanjenje sadržaja klorofila u stanicama zbog nedostatka ATP i NADPH potrebnog za sintezu klorofila (Roopnarain i sur., 2014).

Dušik i fosfor su najčešće ograničavajući makroelementi za rast mikroalgi kada se nalaze u prirodnim uvjetima (Moore i sur., 2011). Uključeni su u sastav esencijalnih molekula te imaju različite uloge u metabolizmu stanica: dušik je gradivni element proteina, aminokiselina i nukleinskih kiselina, dok je fosfor sastavni dio nukleinskih kiselina i

fosfolipida (Lin i sur., 2016; Geider i La Roche, 2002). Njihov nedostatak uzrokuje različite fiziološke reakcije i promjene biokemijskog sastava stanice, naročito što se tiče koncentracije lipida i profila masnih kiselina (Abida i sur., 2014). Stoga se uz mjerenje optičke gustoće određivao i udio lipida u stanicama vanilin metodom koja je opisana u poglavlju 3.2.6.8. Navedena metoda korištena je s ciljem praćenja trenda promjene koncentracije lipida tijekom uzgoja, no nije dovoljno precizna za određivanje točne koncentracije lipida u stanicama. Promjena koncentracije lipida u stresnim uvjetima prikazana je na slici 5. Prema rezultatima analize, udio lipida u podlogama koje su bile izložene stresnim uvjetima ne razlikuje se značajno od kontrolne podloge. U podlozi sa  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$  dobiven je najveći iznos srednje vrijednosti udjela lipida (11,35%) što je neznatno više od kontrolne podloge (10,51 %). U podlozi sa  $c(\text{NaCl})=75 \text{ g L}^{-1}$  primijećeno je povećanje udjela lipida zadnji dan uzgoja, no razlog tome bila je smanjena koncentracija biomase radi odumiranja stanica.

Na kraju dvofaznog uzgoja mikroalge, gravimetrijski je određena koncentracija biomase. Rezultati eksperimenta pokazuju da je najveća koncentracija biomase postignuta u kontrolnom uzgoju ( $0,4168 \text{ g L}^{-1}$ ), no najveća produktivnost biomase ostvarena je u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$ . Na kraju uzgoja u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$  i podlozi bez izvora fosfora pokazuju slične vrijednosti koncentracije biomase, nešto manje od kontrolnog uzgoja, a najmanja koncentracija biomase određena je u hranjivoj podlozi bez dodanog izvora dušika ( $0,1871 \text{ g L}^{-1}$ ). Nedostatak izvora dušika najviše je utjecao na smanjenje rasta *Picochlorum* sp., dok nedostatak drugog makronutrijenta, fosfora, nije značajnije utjecao na rast istog.

El-Kassas (2013) je ispitivao utjecaj limitacije izvorom dušika i fosfora na rast mikroalge *Picochlorum* sp. te dobiveni rezultati su pokazali da limitacija nutrijentima negativno utječe na rast biomase. Postignute su slične vrijednosti produktivnosti u podlogama bez dušika i podlogama bez fosfora. Smanjenjem koncentracije fosfora za 50 % i 100 % u odnosu na kontrolnu podlogu došlo je do smanjenja produktivnosti biomase za 30 % odnosno 57 %. Smanjenjem koncentracije dušika za 50 %, produktivnost biomase smanjila se za 8 %, a u podlozi bez dušika produktivnost se smanjila za 58 %.



**Slika 5.** Promjena optičke gustoće i udjela lipida tijekom uzgoja *Picochlorum* sp. A (kontrola, f/2 podloga), B (c (NaCl)=50 g L<sup>-1</sup>), C (c (NaCl)=75 g L<sup>-1</sup>), D (f/2 podloga uz limitaciju izvorom dušika), E (f/2 podloga uz limitaciju izvorom fosfora)

Prema dobivenim rezultatima prikazanim u tablici 11 može se uočiti da je najveći udio lipida od 14,15 % postignut pri rastu mikroalge u kontrolnoj podlozi. U podlozi sa  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$  zabilježena je druga po redu najveća vrijednost udjela lipida (11,51 %), dok je podloga sa  $c(\text{NaCl})=75 \text{ g L}^{-1}$  rezultirala najmanjim udjelom lipida u usporedbi s drugim uzgojima (7,9 %). Vrijednosti udjela lipida dobivene nakon dvofaznog uzgoja u slučaju visokog saliniteta nešto su više od onih u prvom eksperimentu. U prvom je eksperimentu uzgoj u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=75 \text{ g L}^{-1}$  prekinut budući da mikroalga nije rasla, a uzgoj u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$  rezultirao je srednjom vrijednosti udjela lipida od 5,6 %.

Biomasa mikroalge narasle na podlozi bez izvora dušika i fosfora imale su manje udjele lipida od biomase narasle u podlozi s visokim salinitetom pri čemu je biomasa narasla bez dodatka dušika imala manje lipida od biomase narasle bez dodatka izvora fosfora. Obje podloge pokazuju manje udjele lipida u biomasi od kontrolne podloge. Rezultati ovog eksperimenta nisu u skladu s rezultatima istraživanja El Kassasa (2013) gdje je udio lipida u suhoj tvari biomase *Picochlorum* sp. iznosio 19,69 % bez dodanog izvora dušika što je 2,29 puta više od kontrolne podloge. Uzgoj bez dodatka fosfora u spomenutom istraživanju također je rezultirao povećanjem udjela lipida u biomasi, ali ne značajno kao limitacija izvorom dušika. Dobiveni rezultati u kojima uzgoj uz limitaciju nutrijentima nije rezultirao nakupljanjem lipida mogao bi se objasniti činjenicom da kulture nisu bile dovoljno dugo u stacionarnoj fazi kako bi došlo do nakupljanja lipida.

**Tablica 10.** Koncentracija ( $X$ ) i produktivnost biomase ( $Pr_x$ ) na kraju šaržnog uzgoja provedenog u dvije faze na različitim hranjivim podlogama (kontrola - izvorna f/2 podloga, te f/2 hranjiva podloga sa 50 i 75  $\text{g L}^{-1}$  NaCl, 0  $\text{g L}^{-1}$  izvora dušika i 0  $\text{g L}^{-1}$  izvora fosfora)

	f/2	50 $\text{g L}^{-1}$ NaCl	75 $\text{g L}^{-1}$ NaCl	0 $\text{g L}^{-1}$ P	0 $\text{g L}^{-1}$ N
<b>X [<math>\text{g L}^{-1}</math>] (<math>\pm\sigma</math>)</b>	0,4168 ( $\pm 0,09$ )	0,3894 ( $\pm 0,05$ )	0,2501 ( $\pm 0,01$ )	0,3695 ( $\pm 0,15$ )	0,1871 ( $\pm 0,03$ )
<b>Pr<sub>x</sub> [<math>\text{g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}</math>]</b>	0,0298	0,0389	0,0250	0,0284	0,0267

#### 4.2.2. Utjecaj limitacije izvorom dušika i fosfora te visokih koncentracija NaCl na sastav biomase mikroalge *Picochlorum* sp.

U istraživanju Zhu i sur. (2014), *Chlorella zofingiensis* pokazala je brzi rast u hranjivoj podlozi bogatom dušikom, dok je u podlozi s limitirajućom koncentracijom izvora

dušika rast kulture bio inhibiran. Međutim, u podlozi bez dušika znatno se povećao udio lipida. *Nitzshia* sp. NW129 imala je maksimalnu vrijednost udjela lipida od 40,67% u podlozi sa 0,11 mM dušika što je bilo 1,7 puta više u odnosu na kontrolnu podlogu bez limitacije dušikom. Unatoč najvećem udjelu lipida u stanicama, podloga sa 0,11 mM dušika imala je najnižu produktivnost lipida zbog najmanje koncentracije biomase. Iz navedenih istraživanja jasno je vidljiv obrnuto proporcionalni odnos između nakupljanja lipida i rasta stanica.

U istraživanju koje su proveli Yang i sur. (2018) gdje se pratio učinak različitih koncentracija fosfora u hranjivoj podlozi na *Scenedesmus* sp. postojale su značajne razlike u sadržaju lipida u ispitivanim podlogama. Mikroalga uzgajana u podlozi sa 50 mg L<sup>-1</sup> fosfora postigla je sadržaj lipida od 22,3%, dok je u podlozi sa 1 mg L<sup>-1</sup> fosfora udio lipida iznosio 42,5%. U stanicama algi u podlozi sa 50 mg L<sup>-1</sup> fosfora primijećeni su ovalni pirenoidi koji uglavnom sadrže škrob i proteine. Sa smanjenjem koncentracije fosfora, pirenoidi su postupno postajali manji, a kada se koncentracija fosfora smanjila na 1 mg L<sup>-1</sup>, pirenoidi su gotovo nestali. Kao odgovor na nedostatak izvora dušika, u stanicama *C. zoofingensis* došlo je do kratkotrajnog nakupljanja škroba popraćenog s nakupljanjem lipida u stanici. Msanne i sur. (2012) navode da limitacija izvorom dušika izaziva sličan obrazac rane sinteze škroba popraćene s akumulacijom značajne količine lipida u dvije zelene mikroalge: *C. reinhardti* i *Coccomyxa* sp. C-169. U našem eksperimentalnom radu nije mogla biti provedena analiza udjela ugljikohidrata radi nedovoljne količine biomase.

Proteini mikroalgi prisutni su u različitim dijelovima stanice poput citoplazme, organela, plastida, stanične stijenke i jezgre (Safi i sur., 2015). Proizvodnju proteina regulira nekoliko parametara koji bi trebali biti posebno prilagođeni soju mikroalge. Visok udio proteina u staničnoj biomasi uočen je u slučajevima kad se mikroalge uzgajaju u uvjetima bez stresa, dok različiti stresni uvjeti poput izlaganja svjetlosti visokog intenziteta i limitacije nutrijentima uobičajeno potiču nakupljanje molekula bogatih ugljikom poput lipida i ugljikohidrata (Fazeli Danesh i sur., 2017). Dušik je najvažniji parametar za proizvodnju proteina. Zelene alge pokazuju potrebu za dušikom koja odgovara 5 – 10 % njihove biomase, stoga su hranjive podloge razvijene za uzgoj mikroalgi formulirane s između 5 i 50 mmol L<sup>-1</sup> dušika (Amorim i sur., 2020).

Metodom po Lowryju određen je udio ukupnih proteina u biomasi *Picochlorum* sp., a rezultati analize prikazani su u tablici 11. Udio proteina kretao se u rasponu od 34,78 % do 84,16 %. Najveća vrijednost dobivena je u podlozi sa c(NaCl)=75 g L<sup>-1</sup>. Visoki udio proteina

u uvjetima visokog saliniteta pojavio se i kod mikroalge *Vicheria punctata* koja je u podlozi s 0,5 M NaCl postigla udio proteina od 73 %, a u kontrolnom uzgoju bez dodatka soli 23 %. Ispostavilo se da je udio proteina u stanici sporije opadao kroz uzgoj kod kulture koja se nalazila u stresnim uvjetima. Pri visokom salinitetu mikroalga je sporije trošile hranjive tvari budući da je dioba stanica bila inhibirana, dok su u kontrolnoj podlozi nutrijenti bili iscrpljeni zbog intenzivnog rasta i diobe stanica. Osim toga, visoka koncentracija proteina u stanicama pokazala se neophodnom za preživljavanje stresa uzrokovanog visokim salinitetom jer je mikroalga sintetizirala proteine kako bi mogla vršiti zamjenu oštećenih fotosintetskih proteina. Također, za održavanje ionske i osmotske ravnoteže bio je potreban veći broj ionskih pumpi (Sinetova i sur., 2021).

Udio proteina u kontrolnoj podlozi iznosi 46,08 %, a slična vrijednost određena je i u podlozi s limitacijom izvorom dušika (47,13 %). Uspoređujući podloge s limitiranim dušikom i fosforom, podloga s limitacijom izvora fosfora ima značajno manju vrijednost udjela proteina (15,20 %). Dobiveni rezultati nisu u skladu s literaturom koja navodi da se u nedostatku izvora dušika u stanicama mikroalgi usporava sinteza proteina, a metabolizam ugljika se usmjerava prema sintezi ugljikohidrata i/ili lipida (Gao i sur., 2019). Pancha i sur. (2014) zabilježili su da je smanjenje koncentracije izvora dušika sa 247 na 0 mg L<sup>-1</sup> kod mikroalge *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 uzrokovalo pad udjela proteina sa 47,75 % na 16,87 %. Pad udjela proteina u podlozi s limitacijom dušika pripisuje se razgradnji proteina kako bi se mikroalga opskrbila dušikom potrebnim za metaboličke funkcije.

**Tablica 11.** Udjeli proteina i lipida u biomasi *Picochlorum* sp. na kraju šaržnog uzgoja provedenog u dvije faze na različitim hranjivim podlogama (kontrola - izvorna f/2 podloga te f/2 hranjiva podloga sa 50 i 75 g L<sup>-1</sup> NaCl, 0 g L<sup>-1</sup> izvora dušika i 0 g L<sup>-1</sup> izvora fosfora)

uvjeti uzgoja	proteini [%] ( $\pm\sigma$ )	lipidi [%] ( $\pm\sigma$ )
<b>f/2 podloga</b>	46,08 ( $\pm 7,49$ )	14,15 ( $\pm 2,17$ )
<b>c (NaCl)=50 g L<sup>-1</sup></b>	34,78 ( $\pm 14,38$ )	11,51 ( $\pm 4,45$ )
<b>c (NaCl)=75 g L<sup>-1</sup></b>	84,16 ( $\pm 2,49$ )	7,99 ( $\pm 1,24$ )
<b>C (N)=0 g L<sup>-1</sup></b>	47,13 ( $\pm 11,16$ )	8,57 ( $\pm 1,94$ )
<b>C (P)=0 g L<sup>-1</sup></b>	15,20 ( $\pm 0,36$ )	10,00 ( $\pm 3,16$ )

Nakon dvofaznog uzgoja mikroalge *Picochlorum* sp., određen je profil masnih kiselina. Rezultati su prikazani u tablici 12. U svim podlogama prevladavaju zasićene masne kiseline (51.59 % - 57.57 %). U usporedbi s kontrolnom podlogom, podloga bez fosfora sadržavala je više zasićenih masnih kiselina, manje polinezasićenih te neznatno više nezasićenih masnih kiselina. Može se primijetiti da je podloga bez fosfora sadržavala veći udio kaprinske (C10:0), palmitinske (C16:0), heptadekanske (C17:0), oleinske (C18:1 cis 9) i eikosadienoične kiseline (C20:2 cis 11,14) od kontrolne podloge. Podloga bez dodatka dušika ima slične vrijednosti udjela zasićenih masnih kiselina kao i kontrolna podloga. Sadrži više  $\alpha$ -linolenske kiseline (C18:3 cis 9,12,15) od podloge bez dodatka fosfora i kontrolne podloge. Sličan udio  $\alpha$ -linolenske kiseline može se vidjeti i u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$ . Spomenuta podloga ima najmanji udio mononezasićenih masnih kiselina. U usporedbi s kontrolnom podlogom, u podlozi sa  $c(\text{NaCl})=50 \text{ g L}^{-1}$  mikroalga je nakupljala nešto veće količine kaprinske (C10:0), laurinske (C12:0), heptadekanske (C17:0) i lignocerične kiseline (C24:0). U podlozi sa  $c(\text{NaCl})=75 \text{ g L}^{-1}$  povećao se udio zasićenih masnih kiselina u najvećoj mjeri. U toj podlozi uočena je nervonska kiselina (C24:1 cis 15) koja se nije pojavila u ostalim uzgojima te trikozanska kiselina (C23:0) s udjelom od 4,78 % koja se pojavljuje samo u podlozi bez dodatka dušika u znatno manjoj količini (0,3465 %). Pomak prema proizvodnji zasićenih masnih kiselina dogodio se i u istraživanju koje su proveli Hounslow i sur. (2021) u kojem je *Chlorella reinhardtii* bila izložena 0,2 M NaCl. Naime, slobodni radikali kao što su reaktivne kisikove vrste koji nastaju kao posljedica visokog saliniteta, oštećuju polinezasićene masne kiseline koje su sastavni dio stanične membrane (Nagalakshmi i Prasad, 1998).

Maneechote i sur. (2021) navode da se u uvjetima gladovanja dušikom kod mikroalgi *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. i *Haematococcus* sp. sadržaj palmitinske kiseline povećao, dok se sadržaj oleinske kiseline smanjio što je dovelo do povećanja omjera zasićenih masnih kiselina. Profil masnih kiselina mikroalgi ovisi o aktivnosti različitih enzima uključenih u sintezu masnih kiselina. Nedovoljna količina nutrijenata može utjecati na aktivnost ovih specifičnih enzima i dovesti do povećanja ili smanjenja sinteze određenih masnih kiselina. U uvjetima limitacije dušikom kod mikroalge *Scenedesmus dimorphus*, utvrđeno je da se ekspresija gena za palmitoil tioesterazu povećala, što je pojačavalo sintezu palmitinske kiseline. S druge strane, smanjen je sadržaj stearinske kiseline (Sharma i sur., 2001). Ovi rezultati pokazuju da limitacija nutrijentima osim pospješivanja nakupljanja lipida također može utjecati na stupanj zasićenosti masnih kiselina.



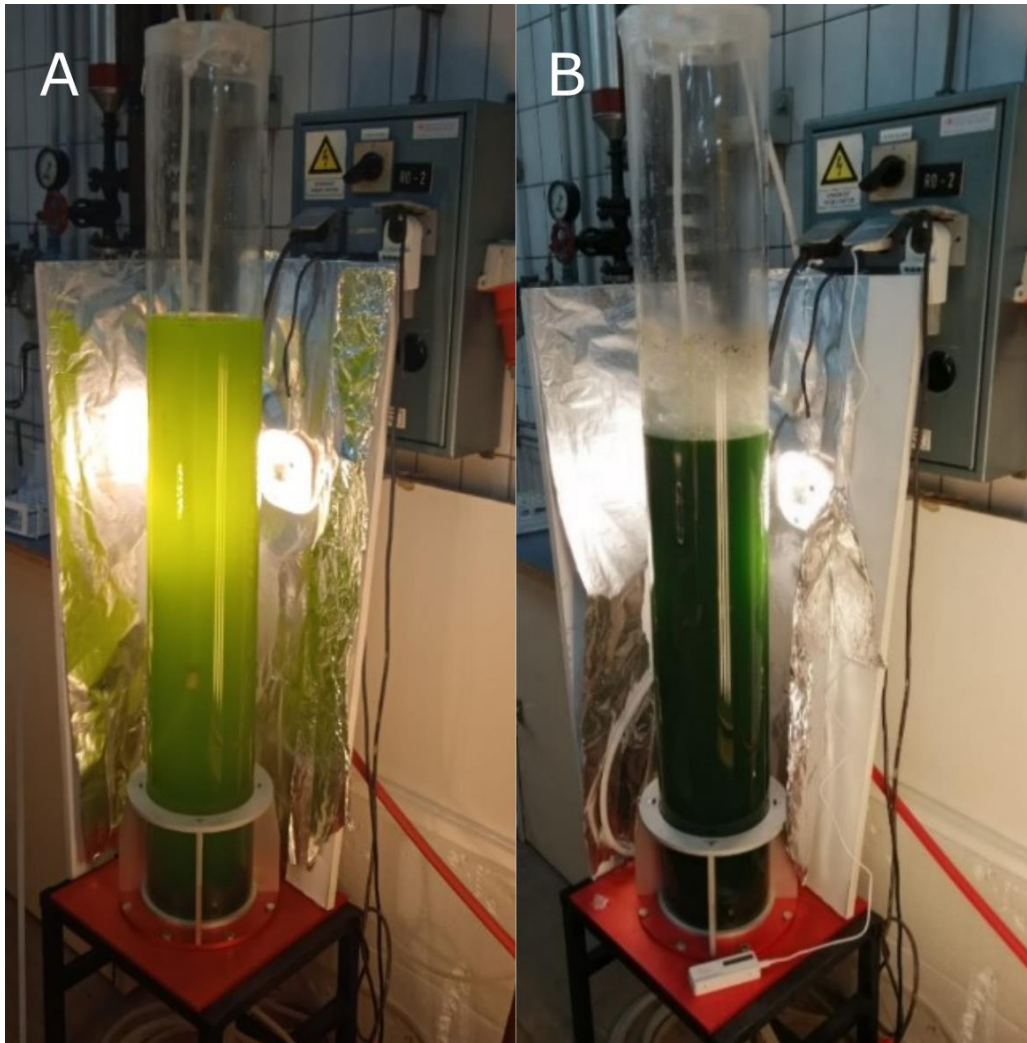
**Tablica 12.** Sastav masnih kiselina u biomasi na kraju šaržnog uzgoja provedenog u dvije faze na različitim hranjivim podlogama (kontrola - izvorna f/2 podloga te f/2 s hranjiva podloga sa 50 i 75 g L<sup>-1</sup> NaCl, 0 g L<sup>-1</sup> izvora dušika i 0 g L<sup>-1</sup> izvora fosfora)

MASNA KISELINA	% [g g <sup>-1</sup> ]				
	0 g L <sup>-1</sup> P	0 g L <sup>-1</sup> N	50 g L <sup>-1</sup> NaCl	75 g L <sup>-1</sup> NaCl	f/2 podloga
C10:0, dekanska kiselina	1,65	1,98	1,78	1,04	0,93
C11:0, undekanska kiselina	0,54	0,37	0	0,33	0,32
C12:0, laurinska kiselina	0,06	0,10	0,57	0,06	0,04
C14:0, miristinska kiselina	0,07	0	0	0	0,08
C14:1 cis 9, miristoleična kiselina	0,04	0	0,20	0,30	0,21
C15:0, pentadekanska kiselina	0	0	0	0	0,01
C15:1 cis 10, pentadekanoična kiselina	0	0	0,06	0	0,15
C16:0, palmitinska kiselina	33,68	32,92	26,81	29,77	31,41
C16:1 cis 9, palmitoleinska kiselina	0,65	0,87	0,81	1,72	1,17
C17:0, heptadekanska kiselina	20,16	16,43	21,46	20,87	18,04
C18:0, stearinska kiselina	0,66	0,54	0,62	0,71	1,40
C18:1 cis 9, oleinska kiselina	7,51	4,90	4,17	3,11	4,82
C18:2 cis 9,12, linolna kiselina	28,80	29,19	30,10	28,09	31,97
C18:3 cis 9,12,15, α-linolenska kiselina	5,79	12,22	12,99	3,48	9,05
C20:1 cis 11, eikozenska kiselina	0	0	0,04	0,04	0
C20:2 cis 11,14, eikozadienska kiselina	0,22	0	0	0	0,02
C23:0, trikozanska kiselina	0	0,35	0	4,78	0
C24:0, lignocerična kiselina	0,11	0,11	0,35	0	0,26
C24:1 cis 15, nervonska kiselina	0	0	0	5,68	0
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19, dokozaheksaenska kiselina	0,06	0,02	0,03	0	0,12
<b>udio u biomasi</b>	10,00 (±3,16)	8,57 (±1,94)	11,51 (±4,45)	7,99 (±1,24)	14,15 (±2,17)
<b>SFA</b>	56,92	52,80	51,59	57,57	52,49
<b>MUFA</b>	8,21	5,77	5,29	10,86	6,36
<b>PUFA</b>	34,87	41,43	43,13	31,57	41,15

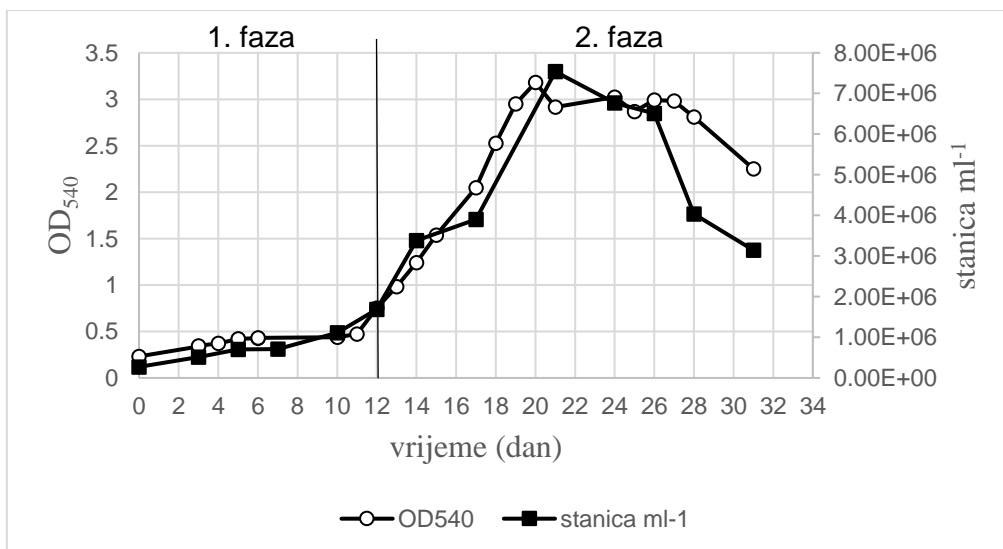
Biomasa uzgojena u podlozi bez izvora dušika i fosfora imala je manji udio lipida od biomase narasle na kontrolnoj podlozi. Limitacija fosforom pogodovala je sintezi zasićenih masnih kiselina (57,57 %). Reitan i sur. (1994) zabilježili su viši udio palmitinske (C16:0) i oleinske (C18:1 cis 9) kiseline te niži relativni udio dugolančanih omega-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina kao rezultat limitacije fosforom što je u skladu s dobivenim rezultatima. Prema literaturnim navodima, limitacija fosforom potiče visoku intra- i interspecifičnu varijabilnost u metaboličkim odgovorima. To rezultira povećanim sadržajem lipida kod *Phaeodactylum tricornutum*, *Monodus subterraneus*, *Chaetoceros* sp. i *Diacronema lutheri* i smanjenim sadržajem lipida u *Nannochloris atomus* i *Tetraselmis* sp. (Abida i sur., 2014; Reitan i sur., 1994; Khozin-Goldberg i sur., 2006). Osim toga, uvjeti limitacije izvorom fosfora karakterizirani su supstitucijom fosfolipida glikolipidima i/ili betain lipidima koji u svojoj strukturi ne sadrže fosfor (Andersson i sur., 2003).

#### **4.3. ŠARŽNI UZGOJ MIKROALGE U BARBOTIRAJUĆOJ KOLONI**

U ovom dijelu eksperimentalnog rada proveden je šaržni uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. u barbotirajućoj koloni uz propuhivanje zrakom i CO<sub>2</sub> s ciljem dobivanja većih prinosa biomase te viših udjela lipida u biomasi. Za šaržni dio uzgoja odabrana je modificirana f/2 podloga c(NaCl)=10 g L<sup>-1</sup>. Barbotirajuća kolona je cilindrična posuda koja na dnu sadrži raspršivač koji omogućuje miješanje i maseni prijenos CO<sub>2</sub> bez stvaranja mehaničkog stresa na stanice algi. Prednost barbotirajuće kolone su niske posmične sile, dobar prijenos mase i visoka učinkovitost iskorištenja CO<sub>2</sub> (Zuccaro i sur., 2020). Uzgoj u barbotirajućoj koloni prikazan je na slici 6.



**Slika 6.** Uzgoj mikroalge *Picochlorum sp.* u barbotirajućoj koloni: A (5. dan uzgoja), B (21. dan uzgoja) (vlastita fotografija)

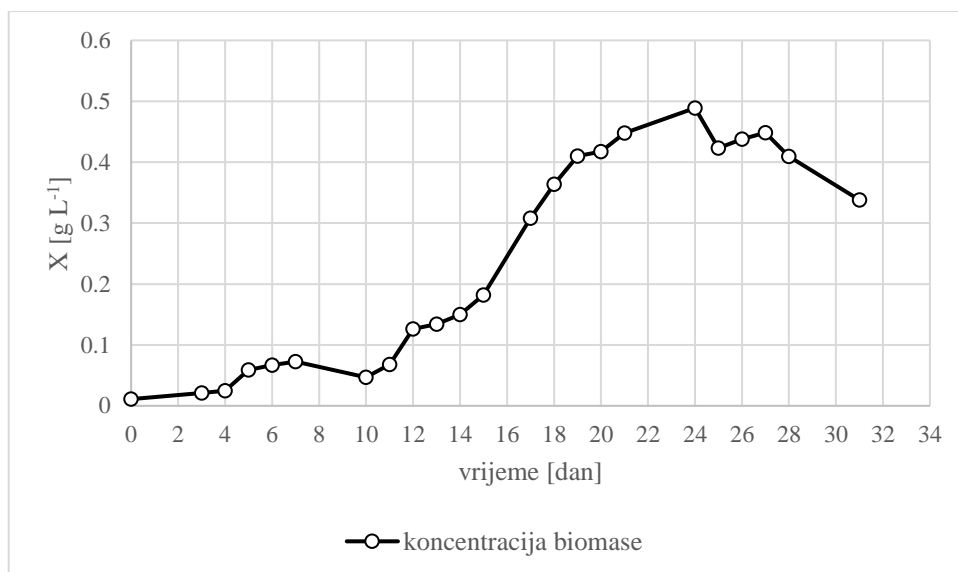


**Slika 7.** Promjena optičke gustoće i broja stanica po mililitru tijekom uzgoja *Picochlorum sp.*

Na slici 7 prikazan je graf promjene optičke gustoće i broja stanica po mililitru kroz 31 dan uzgoja. Može se vidjeti da je prva faza uzgoja, prije propuhivanja CO<sub>2</sub>, karakterizirana dugom lag fazom. Propuhivanje sa smjesom zraka i CO<sub>2</sub> započelo je 12. dana uzgoja. Učinak CO<sub>2</sub> na stopu rasta biomase mikroalgi razlikuje se od vrste do vrste (Chakravarty i Mallick, 2022). Istraživanje de Moraisa i sur. (2007) pokazalo je da *Chlorella kessleri* najbrže raste kada je razina CO<sub>2</sub> podešena na 6%. Povećanje razine CO<sub>2</sub> na 12 % dovelo je do nižih specifičnih brzina rasta. S druge strane, povećanje razine CO<sub>2</sub> nije imalo utjecaj na rast kulture *Scenedesmus obliquus*.

Vrijednosti optičke gustoće prate promjenu broja stanica po mililitru. Vrhunac eksponencijalne faze bio je 20. dana uzgoja kada je optička gustoća iznosila 3,18. Zatim se nastavila stacionarna faza do 28. dana kada je drastično pao broj stanica po mililitru. Koncentracija biomase praćena je gravimetrijskom metodom, a graf ovisnosti koncentracije biomase o vremenu prikazan je na slici 8. Na grafu se može vidjeti nagli porast koncentracije biomase između 11. i 12. dana kada je po iznosima optičke gustoće započela eksponencijalna faza rasta. Najveća koncentracija biomase zabilježena je 24. dana te je iznosila 0,489 g L<sup>-1</sup>, a idući dan uzgoja može se vidjeti pad na 0,423 g L<sup>-1</sup>.

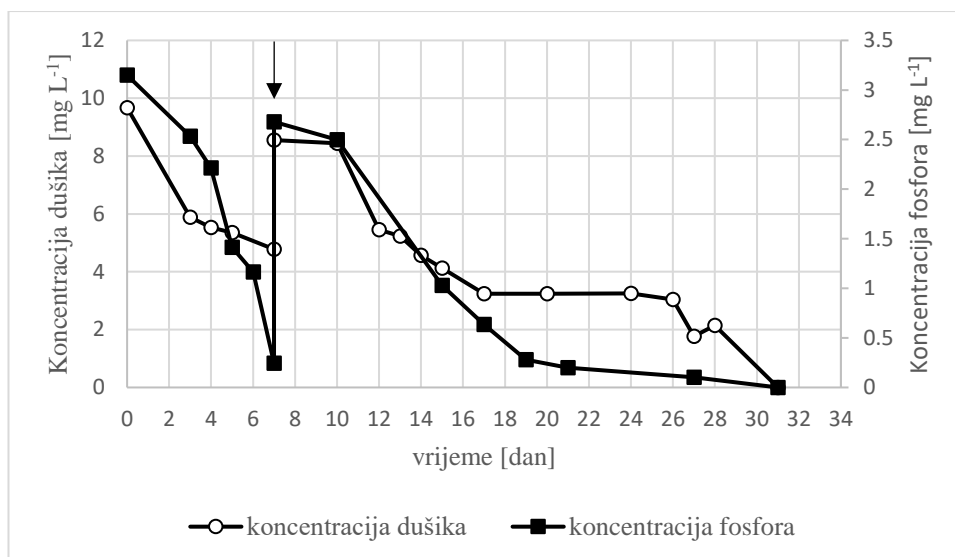
Brzina protoka zraka također ima izravan utjecaj na rast mikroalgi. Ključna je za sprječavanje formiranja nakupina i taloženje stanica na dnu bioreaktora, prijenos mase otopljenih tvari u podlozi i topline te indirektno osigurava ujednačeno osvjetljavanje stanica izvorom svjetlosti (Dasan i sur., 2020). Chakravarty i Malick (2022) proveli su optimizaciju protoka zraka pri uzgoju *Picochlorum soloecismus*. Povećanjem protoka zraka, uočeno je povećanje brzine rasta zbog bolje distribucije nutrijenata i poboljšanog iskorištenja CO<sub>2</sub>. Međutim, brzine propuhivanja podloge veće od 0,7 vvm inhibirale su rast uslijed hidrodinamičkog stresa uzrokovanog jakim silama smicanja koje su izazvale pucanje stanične stijenke mikroalge.



**Slika 8.** Promjena koncentracije biomase tijekom šaržnog uzgoja *Picochlorum* sp.

Na slici 9. prikazana je promjena koncentracije dušika i fosfora u podlozi tijekom šaržnog uzgoja. Fosfor je bitan nutrijent za rast mikroalgi i diobu stanica, a potrebe za fosforom variraju ovisno o vrsti mikroalge. Prema Roopnarain i sur. (2014), optimalna koncentracija fosfora za mikroalge je u rasponu od  $0,001 \text{ g L}^{-1}$  do  $0,179 \text{ g L}^{-1}$ . Dušik također značajno utječe na rast mikroalgi i njihov biokemijski sastav. Mikroalge mogu asimilirati dušik u obliku nitrata, uree i amonijaka. Nitrat se najčešće koristi u kultivaciji mikroalgi jer se u usporedbi s amonijevim solima pokazao stabilniji što se tiče održavanja pH podloge (Procházková i sur., 2013).

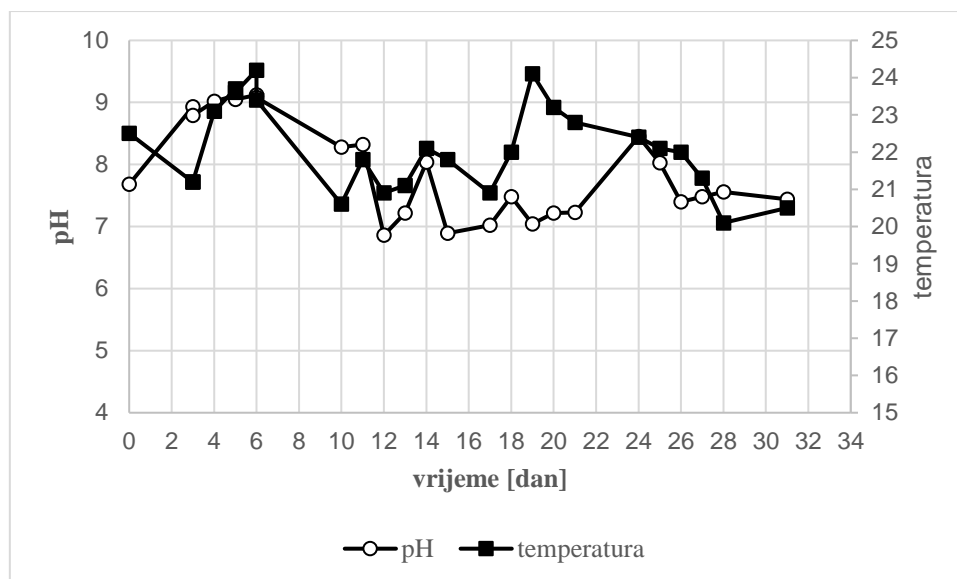
Na početku uzgoja, koncentracija fosfora iznosila je  $3,15 \text{ mg L}^{-1}$ , a dušika  $9,67 \text{ mg L}^{-1}$ . Prihrana s otopinom dušika i otopinom fosfora dodana je 7. dana kada je koncentracija fosfora pala na  $0,24 \text{ mg L}^{-1}$ , a koncentracija dušika na  $4,78 \text{ mg L}^{-1}$ . Dodatkom prihrane, koncentracija dušika porasla je na  $8,44 \text{ mg L}^{-1}$ , a fosfora na  $2,68 \text{ mg L}^{-1}$ . Nakon prihrane, koncentracija fosfora značajno je pala do 18. dana te je do kraja uzgoja bila vrlo niska i limitirajuća za rast, dok je koncentracija dušika padala do 17. dana, zatim se ustalila do 26. dana, nakon čega je ponovno počela padati. U periodu stagnacije trošenja dušika izmjeren je pad udjela proteina u biomasi mikroalge što znači da se metabolizam mikroalge preusmjerio na sintezu drugih makromolekula s manjom potrebom za dušikom.



**Slika 9.** Koncentracija dušika i fosfora u podlozi tijekom šaržnog uzgoja *Picochlorum* sp. (prihrana izvorom dušika i fosfora je naznačena strelicom)

Količina otopljenog CO<sub>2</sub> u podlozi, temperatura i metabolička aktivnost stanica mogu utjecati na pH podloge. Optimalna pH vrijednost za rast mikroalgi kreće se od neutralnog do blago lužnatog pH (7 - 10) (Lu i sur., 2013). Tijekom fotosintetske fiksacije CO<sub>2</sub> u podlozi za uzgoj nakuplja se hidroksidni ion što dovodi do postupnog povećanja pH. Time se pomiče kemijska ravnoteža prema stvaranju HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> koji nije poželjan izvor ugljika za mikroalge. S druge strane, smanjenje pH otopine pomiče kemijsku ravnotežu prema stvaranju CO<sub>2</sub> koji se smatra jednim od preferiranih izvora ugljika za mikroalge. Ipak, ovaj proces može dovesti do ispuštanja CO<sub>2</sub> u atmosferu smanjujući koncentraciju ovog nutrijenta neophodnog za uzgoj mikroalgi (Chowdury i sur., 2020).

Na slici 10 prikazana je promjena pH i temperature tijekom uzgoja *Picochlorum* sp. Na početku uzgoja pH je iznosio 7,68, a zatim se kreće u intervalu od 8,93 do 9,08 do 7. dana uzgoja nakon čega se može vidjeti pad. Nagli pad pH na 6,86 primjetan je 12. dana kada je započeto s doziranjem CO<sub>2</sub>. Temperatura se kretala u rasponu od 20,1 do 24 °C.



**Slika 10.** Promjena pH i temperature tijekom uzgoja *Picochlorum* sp.

#### 4.3.1. Sastav biomase *Picochlorum* sp. tijekom šaržnog uzgoja u barbotirajućoj koloni

Najveći udio proteina u biomasi (55,35 %) izmjeren je 5. dana uzgoja (tablica 13). Slična vrijednost dobivena je i 13. dan uzgoja. Sa smanjenjem dostupnog izvora dušika, udio proteina u biomasi se smanjivao te je zadnjeg dana uzgoja iznosio 20,93 %. Između 20. i 21. dana, može se uočiti pad udjela proteina s 30,02 % na 24,65 %. Za to vrijeme desio se porast udjela lipida.

**Tablica 13.** Maseni udio makromolekula u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp.

Dan uzgoja	Udio [%]		
	Ugljikohidrati	Proteini	Lipidi
<b>5.</b>	/	55,35	/
<b>13.</b>	1,33	52,43	43,68
<b>18.</b>	1,38	32,71	59,36
<b>20.</b>	1,35	30,02	61,83
<b>21.</b>	/	24,65	68,95
<b>25.</b>	1,36	23,11	70,66
<b>27.</b>	1,37	19,58	73,16
<b>31.</b>	1,38	20,93	73,77

Ugljikohidrati su široka kategorija spojeva koja obuhvaća šećere (monosaharidi) i njihove polimere (disaharidi, oligosaharidi i polisaharidi). Proizvodi su fotosinteze i metabolizma fiksacije ugljika (Kalvinov ciklus) (Andreeva i sur., 2021.). Služe dvjema svrhama u metabolizmu mikroalgi: djeluju kao strukturne komponente staničnih stijenki te

kao skladišne komponente unutar stanice. Ugljikohidrati u obliku skladišnih spojeva osiguravaju energiju potrebnu za metaboličke procese organizma te omogućavaju preživljavanje u uvjetima bez svjetlosti (Geider i La Roche, 2002). Udio ugljikohidrata u biomasi ovisi o vrsti mikroalge, načinu uzgoja i uvjetima okoliša, a generalno iznosi oko 20 % suhe mase od čega 10 % otpada na škrob (Laurens i sur., 2012). Ugljikohidrati iz mikroalgi, posebice celuloza u staničnoj stijenci i škrob u citoplazmi, su supstrati za proizvodnju bioetanola (Yuan i sur., 2018.).

Rezultati UPLC analize prikazani su u tablici 13. te pokazuju da metabolizam mikroalge tijekom uzgoja u barbotirajućoj koloni nije bio usmjeren nakupljanju ugljikohidrata čiji je udio u biomasi ostao konstantan od početka do kraja uzgoja (1,33% - 1,38%). Razlog tomu je uska povezanost metaboličkih putova molekula bogatih energijom. Istraživanja su pokazala da postoji kompeticija između sinteze lipida i ugljikohidrata budući da je glavni prekursor za sintezu triacilglicerola glicerol-3-fosfat koji nastaje katabolizmom glukoze (Ho i sur., 2012). U ovom eksperimentu izmjereni su puno veći udjeli lipida nego u prethodnima. Udio lipida dosegao je 43,68 % već u početku eksponencijalne faze te je rastao do kraja uzgoja. Najveći skok udjela lipida dogodio se između 13. i 18. dana kada je vrijednost udjela lipida porasla za 15,68 %. Potom se dogodio još jedan nagli rast udjela lipida između 20. i 21. dana kada je eksponencijalna faza bila na samom vrhuncu. Maksimalni udio lipida u ovom eksperimentu postignut je zadnjeg dana uzgoja te je iznosio 73,77 %. Propuhivanje kulture s CO<sub>2</sub> pokazalo se ključno za proizvodnju lipida što potvrđuju Barahoei i sur. (2022) u čijem se istraživanju koncentracija lipida u stanicama mikroalge povećavala s povećanjem koncentracije CO<sub>2</sub> u podlozi.

Iz tablice 14 može se vidjeti kako se profil masnih kiselina mijenjao tijekom uzgoja. U početku eksponencijalne faze, 13. dan., prevladavale su polinezasićene kisline (51,54 %). Udio višestruko nezasićenih masnih kiselina do kraja eksponencijalne faze smanjio se na 36,44 % dok je za to vrijeme udio zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina porastao. Na kraju uzgoja prevladavale su zasićene masne kiseline. Palmitinska (C16:0) i heptadekanska kiselina (C17:0) na kraju uzgoja činile su čak 44,43 % ukupnih masnih kiselina u biomasi. Od višestruko nezasićenih kiselina prevladavaju linolna (C18:2 cis 9,12) i  $\alpha$ -linolenska kiselina (C18:3 cis 9,12,15). Jedina jednostruko nezasićena kiselina koja se nalazi u značajnijoj količini u biomasi je oleinska kiselina (C18:1 cis 9), a njezin udio iznosio je 19,88 % na kraju uzgoja.



**Tablica 14.** Profil masnih kiselina u biomasi alge *Picochlorum* sp.

Vrijeme (dan)	13.	18.	20.	21.	25.	27.	31.
<b>MASNA KISELINA</b>	<b>udio [%, g g<sup>-1</sup>]</b>						
C11:0, undekanska kiselina	0	0	0	0	0,13	0,16	0
C14:0, miristinska kiselina	0	0	0	0	0,05	0	0
C14:1 cis 9, miristoleična kiselina	0,17	0,30	0,17	0,24	0,23	0,20	0,04
C15:0, pentadekanska kiselina	0	0,12	0,13	0	0,03	0	0
C15:1 cis 10, pentadekanoična kiselina	0	0	0	0,16	0,14	0,12	0
C16:0, palmitinska kiselina	23,88	20,68	21,48	23,11	24,79	24,28	27,23
C16:1 cis 9, palmitoleinska kiselina	1,92	0,65	0,36	0,42	0,38	0,33	0,09
C17:0, heptadekanska kiselina	13,51	23,72	22,37	21,62	18,91	17,68	17,20
C17:1 cis 10, heptadekanoična kiselina	0,09	0	0,07	0,13	0	0	0,01
C18:0, stearinska kiselina	0,86	0,38	0,54	0,80	1,26	1,35	1,26
C18:1 cis 9, oleinska kiselina	6,74	11,05	14,72	15,74	17,66	18,30	19,88
C18:2 cis 9,12, linolna kiselina	30,57	32,31	31,26	29,20	28,40	28,69	27,81
C18:3 cis 9,12,15, $\alpha$ -linolenska Kiselina	20,12	10,30	8,08	7,24	6,07	5,97	5,25
C:20, eikozanska kiselina	0	0	0	0	0	0,14	0
C20:1 cis 11, eikozenska kiselina	0,42	0,47	0,82	1,34	0,99	1,12	0,89
C20:2 cis 11,14, eikozadienska kiselina	0	0	0	0	0,08	0,07	0
C22:5 cis 4,7,10,13,16,19,dokozahexsaenska kiselina	0,58	0	0	0	0,23	0,27	0
C22:2 cis 13,16, dokozadienska kiselina	0,27	0	0	0	0	0	0,34
C23:0, trikozanska kiselina	0	0	0	0	0,35	0,95	0
C24:0, lignocerična kiselina	0,86	0	0	0	0,30	0,38	0
<b>Udio u biomasi</b>	43,68	59,36	61,83	68,95	70,66	73,16	73,77
<b>SFA</b>	39,12	44,90	44,52	45,52	45,82	44,93	45,69
<b>MUFA</b>	9,34	12,48	16,15	18,04	19,41	20,07	20,91
<b>PUFA</b>	51,54	42,61	39,34	36,44	34,77	35,00	33,40

Ova istraživanja doprinijet će boljem razumijevanju učinka stresa na rast i nakupljanje pojedinih metabolita u stanici. Time se u konačnici prilagođavanjem uvjeta uzgoja omogućuje učinkovito nakupljanje pojedinog proizvoda u stanici, u ovom istraživanju lipida, kao sirovine za proizvodnju biodizela treće generacije. Proizvodnja i komercijalizacija biogoriva iz mikroalgi zahtijeva visoka ulaganja, no može se postići uz ekonomične metode uzgoja i indukcije sinteze željenih spojeva. Dodatni prihod mogao bi se ostvariti implementacijom biorafinerijskog pristupa, tj. iskorištavanjem svih komponenti biomase mikroalgi proizvodnjom drugih visokovrijednih spojeva kao što su pigmenti, proteini, ugljikohidrati i vitamini koji se mogu koristiti u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

## 5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata provedenog istraživanja mogu se dovesti sljedeći zaključci:

1. Brzina rasta mikroalge *Picochlorum* sp. se smanjuje s povećanjem koncentracije NaCl u hranjivoj podlozi.
2. Područje koncentracija NaCl od 10 do 25 g L<sup>-1</sup> su optimalne za sintezu lipida i proteina u mikroalgi *Picochlorum* sp., a dok se smanjenjem i povećanjem koncentracije NaCl značajno smanjuje sinteza lipida.
3. Najzastupljenije masne kiseline u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp. su palmitinska (C16:0), heptadekanska (C17:0) i linolna (C18:2 cis 9,12) pri čemu heptadekanska kiselina nije karakteristična za poznate vrste iz roda *Picochlorum* sp. U svim istraživanim uvjetima uzgoja u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp. prevladavale su zasićene masne kiseline.
4. Dvofazni uzgoj uz limitaciju nutrijentima dušikom i fosforom nije pogodovao nakupljanju lipida, dok je kontrolni uzgoj s izvornom f/2 podlogom rezultirao najvećim udjelom lipida u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp..
5. Limitacija izvorom dušika i fosfora negativno utječe na sintezu lipida, dok limitacija izvorom dušika značajno smanjuje i rast mikroalge. Najveća je produktivnost biomase na kraju dvofaznog šaržnog uzgoja u stresnim uvjetima postignuta u hranjivoj podlozi sa 50 g L<sup>-1</sup> NaCl te je iznosila 0,0389 g L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>.
6. Limitacija izvorom dušika i fosfora te dodatak 75 g L<sup>-1</sup> NaCl pogodovao je nakupljanju zasićenih masnih kiselina.
7. Šaržnim uzgojem mikroalge *Picochlorum* sp. u barbotirajućoj koloni (propuhivanje smjesom zraka i CO<sub>2</sub>) u kojem je u prvoj fazi omogućen brz rast biomase (eksponencijalna faza rasta) uz prihranu limitirajućim nutrijentima i nakupljanje lipida u drugoj fazi (stacionarna faza rasta) uslijed limitacije rasta stanica izvorom fosfora i dušika. Dvadeset četvrtog dana rasta postignuta je najveća koncentracija biomase od 0,489 g L<sup>-1</sup>, dok je zadnji dan uzgoja (31. dan) biomasa sadržavala 1,38 % ugljikohidrata, 20,93 % proteina i 73,77 % lipida u suhoj tvari.

## 6. LITERATURA

Abida H, Dolch L-J., Mei C, Villanova V, Conte M, Block MA, i sur. (2014) Membrane Glycerolipid Remodeling Triggered by Nitrogen and Phosphorus Starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* **167**, 118-136. <https://doi.org/10.1104/pp.114.252395>

Abimbola T, Christodoulatos C, Lawal A (2021). Performance and optimization studies of oil extraction from *Nannochloropsis* spp. and *Scenedesmus obliquus*. *J. Clean. Prod.* **311**, 127295. [10.1016/j.jclepro.2021.127295](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127295)

Acien Fernandez FG, Fernandez Sevilla JM, Molina GE (2013) Photobioreactors for the Production of Microalgae. *Rev Environ Sci Biotechnol* **12**, 131-151. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9307-6>

Acquah C, Tibbetts SM, Pan S, Udenigwe C (2020) Chapter 19-Nutritional quality and bioactive properties of proteins and peptides from microalgae. U: Jacob-Lopes E, Maroneze MM, Queiroz MI, Zepka LQ (ured.) Handbook of Microalgae-Based Processes and Products. Academic Press/Cambridge/USA, str. 493-531.

Adams C, Godfrey V, Wahlen B, Seefeldt L, Bugbee B (2013) Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresour Technol* **131**, 188-94.

Aflalo C, Meshulam Y, Zarka A, Boussiba S (2007) On the relative efficiency of two- vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Bioeng* **98**, 300-5.

Akubude VC, Nwaigwe KN, Dintwa E (2018) Production of biodiesel from microalgae via nanocatalyzed transesterification process: A review. *Mater Sci Energ Technol* **2**, 216-225. <https://dx.doi.org/10.1016/j.mset.2018.12.006>

Alishah Aratboni H, Rafiei N, Garcia-Granados R, i sur. (2019) Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microb Cell Fact* **18**, 178. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1228-4>

Amorim ML, Soares J, Coimbra JS dos R, Leite M de O, Albino LFT, Martins MA (2020). Microalgae proteins: Production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Crit Rev Food Sci Nutr* **61**, 1976-2002. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1768046>

Ananthi V, Balaji P, Sindhu R, Kim SH, Pugazhendhi A, Arun A (2021) A critical review on different harvesting techniques for algal based biodiesel production. *Sci Total Environ* **780**, 146467. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146467>

Andersson MX, Stridh MH, Larsson KE, Liljenberg C, Sandelius AS (2003) Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett* **537**, 128-132. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00109-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00109-1)

Arora N, Patel A, Sharma M, Mehtani J, Pruthi PA, Pruthi V, Poluri KM (2017) Insights into the enhanced lipid production characteristics of a fresh water microalga under high salinity conditions. *Ind Eng Chem Res* **56**, 7413-7421. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b00841>

Ashour M, Omran AMM (2022) Recent Advances in Marine Microalgae Production: Highlighting Human Health Products from Microalgae in View of the Coronavirus Pandemic (COVID-19)" *Fermentation* **8**, 466. <https://doi.org/10.3390/fermentation8090466>

Atkinson D, Ciotti BJ, Montagnes DJ (2003) Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5% degrees C (-1). *Proc Biol Sci.* **270** <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2538>

Barahoei M, Hatamipour MS, Afsharzadeh S (2020) CO<sub>2</sub> capturing by *Chlorella vulgaris* in a bubble column photo-bioreactor; Effect of bubble size on CO<sub>2</sub> removal and growth rate *J CO<sub>2</sub> Util* **37**, 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.11.023>

Barbosa, MJ, Hadiyanto H, Wijffels RH (2004) Overcoming Shear Stress of Microalgae Cultures in Sparged Photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* **85**, 78-85. <https://doi.org/10.1002/bit.10862>

Bashir KMI, Mansoor S, Kim NR, Grohmann FR, Shah AA, Cho MG (2019) Effect of organic carbon sources and environmental factors on cell growth and lipid content of *Pavlova lutheri*. *Ann Microbiol* **69**, 353-368. <https://dx.doi.org/10.1007/s13213-018-1423-2>

Bechet Q, Laviale M, Arsapin N, Bonnefond H, Bernard O (2017) Modeling the impact of high temperatures on microalgal viability and photosynthetic activity. *Biotechnol Biofuels* **10**, 136. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0823-z>

Becker E (2007) Microalgae as a source of protein. *Biotechnol Adv* **25**, 207-210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>

Becker EW (1994) *Microalgae-Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge

Ben-Amotz A, Tornabene TG, Thomas WH (1985) Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids *J Phycol* **21**, 72-81. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1985.00072.x>

Bhatia SK, Gurav R, Choi TR, Han YH, Park Y-L, Jung H-R, i sur. (2019). A clean and green approach for odd chain fatty acids production in *Rhodococcus* sp. YHY01 by medium engineering. *Biores Technol* **286**, 121383. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.12138>

Borowitzka MA (2018) The 'stress' concept in microalgal biology—homeostasis, acclimation and adaptation. *J Appl Phycol* **30**, 2815-2825. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1399-0>

Borowitzka MA, Moheimani NR (2013) Sustainable biofuels from algae. *Mitig Adapt Strateg Glob Change* **18**, 13-25. <https://doi.org/10.1007/s11027-010-9271-9>

Breuer G, Lamers PP, Martens DE, Draaisma RB, Wijffels RH (2013). Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour Technol* **143**, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.105>

- Brindley C, Garcia-Malea MC, Acien FG, Fernandez JM, Garcia, JL, Molina E (2004) Influence of Power Supply in the Feasibility of *Phaeodactylum Tricornutum* Cultures. *Biotechnol Bioeng* **87**, 723-733. <https://doi.org/10.1002/bit.20179>
- Brown AD, Simpson JR (1972) Water relations of sugar-tolerant yeasts: The role of intracellular polyols. *Microbiology* **72**, 589–591. doi: 10.1099/00221287-72-3-589
- Cai, T, Park, SY, Li YB (2013) Nutrient Recovery from Wastewater Streams by Microalgae: Status and Prospects. *Renew Sust Energ Rev* **19**, 360-369. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>
- Chai MK, Tan YH, Wong LS (2020) Macronutrient effect on biomass of Microalgae in biofuel production: A review. *Indian Sci Technol* **13**, 2245-2263. <https://doi.org/10.17485/IJST/v13i22.176>
- Chakravarty S, Mallick N (2022) Carbon Dioxide Mitigation and Biodiesel Production by a Marine Microalga under Mixotrophic Mode by Using Transesterification By-Product Crude Glycerol: A Synergy of Biofuels and Waste Valorization. *Environ Technol Innov* **27**, 102441. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102441>
- Cheirsilp B, Torpee S (2012) Enhanced growth and lipid production of micro- algae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresour Technol* **110**, 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.125>
- Chen H, Zheng Y, Zhan J, He C, Wang Q (2017) Comparative metabolic profiling of the lipid-producing green microalga *Chlorella* reveals that nitrogen and carbon metabolic pathways contribute to lipid metabolism, *Biotechnol Biofuels* **10**, 153 <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0839-4>
- Chen TY, Lin HY, Lin CC, Lu CK, Chen, YM (2012). Picochlorum as an alternative to *Nannochloropsis* for grouper larval rearing. *Aquaculture* **338-341**, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01>
- Cheng DL, Ngo HH, Guo WS, Chang SW, Nguyen DD, Kumar SM (2018) Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy. *Biores Technol* **275**, 109-122. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.019>
- Chiranjeevi P, Mohan SV (2016) Critical Parametric Influence on Microalgae Cultivation towards Maximizing Biomass Growth with Simultaneous Lipid Productivity. *Renew Energ* **98**, 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.063>
- Chowdury K, Nahar N, Deb U (2020) The Growth Factors Involved in Microalgae Cultivation for Biofuel Production: A Review. *Comput Water Eng Environ Eng* **9**, 185-215. <https://doi.org/10.4236/cweee.2020.94012>
- Covarrubias Y, Cantoral-Uriza EA, Casas-Flores JS, García-Meza JV (2016) Thermophile mats of microalgae growing on the woody structure of a cooling tower of a thermoelectric power plant in Central Mexico. *Rev Mex Biodivers* **87**, 277-87
- Cruz YR, Aranda DAG, Seidl PR, Diaz GC, Carliz RG, Fortes MM, i sur. (2018) Cultivation Systems of Microalgae for the Production of Biofuels. *Biofuels - State of Development*. <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.74957>

- Dahlin LR, Gerritsen AT, Henard CA, van Wychen S, Linger JG, Kunde Y, i sur. (2019) Development of a high-productivity, halophilic, thermotolerant microalga *Picochlorum renovo*. *Commun Biol* **2**, 388 <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0620-2>
- Dahmen I, Chtourou H, Jebali A, Daassi D, Karray F, Hassairi I, i sur. (2014) Optimisation of the critical medium components for better growth of *Picochlorum* sp. and the role of stressful environments for higher lipid production. *J Sci Food Agri* **94**, 1628-1638. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6470>
- Dantas DM, Oliveira C, Costa RB, Carneiro-DA-Cunha MG, Gálvez A, Bezerra R (2019) Evaluation of antioxidant and antibacterial capacity of green microalgae *Scenedesmus subspicatus*. *Food Sci Technol Int*. <https://doi.org/10.1177/1082013218825024>
- Dasan YK, Lam MK, Yusup S, Lim JW, Show PL, Tan IS, Lee KT (2020) Cultivation of *Chlorella vulgaris* using sequential-flow bubble column photobioreactor: A stress-inducing strategy for lipid accumulation and carbon dioxide fixation. *J CO2 Utili* **41**, 101226. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.101226>
- de Jaeger L, Carreres BM, Springer J, Schaap PJ, Eggink G, Martins Dos Santos VAP, i sur. (2018) *Neochloris oleoabundans* is worth its salt: transcriptomic analysis under salt and nitrogen stress. *PLoS One* **13**, e0194834. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0194834>
- de la Vega M, Díaz E, Vila M, León R (2011) Isolation of a new strain of *Picochlorum* sp. and characterization of its potential biotechnological applications. *Biotechnol Prog* **27**, 1535-1543. <https://doi.org/10.1002/btpr.686>
- Demirel Z, Yilmaz FF, Ozdemir G, Conk Dalay M (2018) Influence of media and temperature on the growth and the biological activities of *Desmodesmus protuberans* (F.E. Fritsch & M.F. Rich) E. Hegewald. *Turk J Fish Aquat Sci* **18**, 1195-1203. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18\\_10\\_06](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18_10_06)
- de Morais MG, Costa JAV (2007) Isolation and Selection of Microalgae from Coal Fired Thermoelectric Power Plant for Biofixation of Carbon Dioxide. *Energy Convers Manag* **48**, 2169-2173. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2006.12.011>
- Einali A (2018) The induction of salt stress tolerance by propyl gallate treatment in green microalga *Dunaliella bardawil*, through enhancing ascorbate pool and antioxidant enzymes activity. *Protoplasma* **255**, 601-611. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1173-1>
- Fal S, Aasfar A, Rabie R, Smouni A, EL Arroussi H (2022) Salt induced oxidative stress alters physiological, biochemical and metabolomic responses of green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Heliyon* **8**, 2405-8440. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08811>.
- Fazeli Danesh A, Ebrahimi S, Salehi A, Parsa A (2017). Impact of nutrient starvation on intracellular biochemicals and calorific value of mixed microalgae. *Biochem Eng J* **125**, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.05.017>.
- Figuerola-Torres GM, Pittman JK, Theodoropoulos C (2021) Optimisation of microalgal cultivation via nutrient-enhanced strategies: the biorefinery paradigm. *Biotechnol Biofuels* **14**, 64. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01912-2>

- Foflonker F, Ananyev G, Qiu H, Morrison A, Palenik B, Dismukes, GC, i sur. (2016) The unexpected extremophile: Tolerance to fluctuating salinity in the green alga *Picochlorum*. *Algal Res* **16**, 465-472. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.003>
- Gao G, Wu M, Fu Q, Li X, Xu J (2019). Bioresource Technology A two-stage model with nitrogen and silicon limitation enhances lipid productivity and biodiesel features of the marine bloom-forming diatom *Skeletonema costatum*. *Bioresour Technol* **289**, 121717. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121717>
- Gatamaneni Loganathan B, Orsat V, Lesfrud M (2018) Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. *Environ Eng Res* **23**, 229-241. <https://doi.org/10.4491/eer.2017.220>
- Gaude N, Bréhélin C, Tischendorf G, Kessler F, Dörmann P (2007) Nitrogen deficiency in *Arabidopsis* affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytol esters. *Plant J* **49**, 729-739. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02992.x>
- Geider R, La Roche J (2002) Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur J Phycol* **37**, 1-17. <https://doi.org/10.1017/S0967026201003456>
- Ghosh A, Khanra S, Mondal M, Halder G, Tiwari ON, Saini S, i sur. (2016) Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals: a review. *Energy Convers Manag* **113**, 104-118. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.01.050>
- Gigova L, Marinova G (2016) Significance of microalgae - grounds and areas. *Genet Plant Physiol* [online], **6**, 85-100, < <http://www.ifrg-bg.com> >. Pristupljeno 25.8.2023.
- Gonzalez-Esquer CR, Wright KT, Sudasinghe N, Carr CK, Sanders CK, Turmo A, Dale T (2019) Demonstration of the potential of *Picochlorum soloecismus* as a microalgal platform for the production of renewable fuels. *Algal Res* **43**, 101658. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101658>
- Grobbelaar JU (2009) Factors governing algal growth in photobioreactors: the 'open' versus 'closed' debate. *J Appl Phycol* **21**, 489-492. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9365-x>
- Guillard RRL (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. U: Smith WL, Chanley MH (ured.) Culture of Marine Invertebrate Animals, 1. izd., Plenum Press, New York, str. 26-60.
- Guštin S, Marinšek-Logar R (2011) Effect of pH, Temperature and Air Flow Rate on the Continuous Ammonia Stripping of the Anaerobic Digestion Effluent. *Process Saf Environ Prot* **89**, 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2010.11.001>
- Henley WJ, Hironaka JL, Guillou L, Buchheim MA, Buchheim JA, Fawley MW, Fawley KP (2004) Phylogenetic analysis of the *Nannochloris*-like algae and diagnoses of *Picochlorum oklahomensis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycologia* **43**, 641-652. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-6-641.1>



- Ho SH, Chen CY, Lee DJ, Chang JS (2011) Perspectives on microalgal CO<sub>2</sub>-emission mitigation systems - a review, *Biotechnol Adv* **29**, 189-198. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.0>
- Ho SH, Chen CY, Chang JS (2012) Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour Technol* **113**, 244-52. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.133>
- Ho SH, Huang SW, Chen CY, Hasunuma T, Kondo A, Chang JS (2013) Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresour Technol* **135**, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015>
- Halim R, Danquah MK, Webley PA (2012) Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnol Adv* **30**, 709-32. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.001>.
- Hoekman SK, Broch A, Robbins C, Cenicerros E, Natarajan M (2012) Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renew Sustain Energy Rev* **16**, 143-169. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.143>
- Hounslow E, Evans CA, Pandhal J, Sydney T, Couto N, Pham TK, i sur. (2021) Quantitative proteomic comparison of salt stress in *Chlamydomonas reinhardtii* and the snow alga *Chlamydomonas nivalis* reveals mechanisms for salt-triggered fatty acid accumulation via reallocation of carbon resources. *Biotechnol Biofuels*. **14**, 121. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01970-6>.
- Ismail I, Hwang Y-H, Joo S-T (2020) Meat analog as future food: A review. *J Anim Sci Technol* **62**, 111-120. <https://doi.org/10.5187/jast.2020.62.2.111>
- Jacob-Lopes E, Scoparo CHG, Lacerda L, Franco TT (2009) Effect of light cycles (night/day) on CO<sub>2</sub> fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chem Eng Proc* **48**, 306-310. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2008.04.007>
- Ji X, Cheng J, Gong D, Zhao X, Qi Y, Su Y, i sur. (2018) The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga—*Scenedesmus obliquus* XJ002. *Sci Total Environ* **633**, 593-599. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.240>
- Jia Z, Liu Y, Daroch M, Geng S, Cheng JJ (2014). Screening, Growth Medium Optimisation and Heterotrophic Cultivation of Microalgae for Biodiesel Production. *Appl Biochem Biotechnol* **173**, 1667-1679. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0954-7>
- Jiang L, Zhang L, Nie C, Pei H (2018) Lipid productivity in limnetic *Chlorella* is doubled by seawater added with anaerobically digested effluent from kitchen waste. *Biotechnol Biofuels* **11**, 1-14. <https://doi.org/doi:10.1186/s13068-017-1003-x>
- Khan MI, Shin JH, Kim JD (2018) The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb Cell Fact* **17**, 36 <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kang MJ, Shin MS, Park JN, Lee SS (2005) The effects of polyunsaturated:saturated fatty acids ratios and peroxidisability index values of dietary fats on serum lipid profiles and hepatic enzyme activities in rats. *Br J Nutr* **94**, 526–32. <https://doi.org/10.1079/bjn20051523>

- Khairy HM, Shaltout, NA, El-Naggar MF, El-Naggar NA (2014). Impact of elevated CO<sub>2</sub> concentrations on the growth and ultrastructure of non-calcifying marine diatom (*Chaetoceros gracilis* F.Schütt). *Egypt J Aquat Res* **40**, 243-250. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2014.08.002>
- Khozin-Goldberg I, Cohen Z (2006) The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*, *Phytochem* **67**, 696-701. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.010>
- Koutra E, Tsafrafidou P, Sakarika M, Kornaros M (2020) Microalgal biorefinery. U: Microalgae cultivation for biofuels production. Elsevier, 163-185.
- Krishnan A, Likhogrud M, Cano M, Edmundson S, Melanson JB, Huesemann M, i sur. (2021) *Picochlorum celeri* as a model system for robust outdoor algal growth in seawater. *Sci Rep* **11**, 11649 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91106-5>
- Krzemińska I, Pawlik-Skowrońska B, Trzcńska M, Tys J (2014) Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess Biosyst Eng* **37**, 735-41. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1044-x>
- Läuchli A, Lüttge U (2002) Salinity: Environment-Plants-Molecules. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Laurens LM, Dempster TA, Jones HD, Wolfrum EJ, Van Wycken S, McAllister JS, i sur. (2012) Algal biomass constituent analysis: method uncertainties and investigation of the underlying measuring chemistries. *Anal Chem* **84**, 1879-87. <https://doi.org/10.1021/ac202668c>
- Lee CG, Palsson B (1995) Light Emitting Diode-Based Algal Photobioreactor with External Gas Exchange. *J Ferment Bioeng* **79**, 257-263. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)90613-5](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)90613-5)
- Li H, Tan J, Mu Y, Gao J (2021) Lipid accumulation of *Chlorella* sp. TLD6B from the Taklimakan Desert under salt stress. *PeerJ* **9**, e11525 <https://doi.org/10.7717/peerj.11525>
- Li X, Yuan Y, Cheng D, Gao J, Kong L, Zhao Q, i sur. (2018) Exploring stress tolerance mechanism of evolved freshwater strain *Chlorella* sp. S30 under 30 g/L salt. *Bioresour Technol* **250**, 495-504. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.072>
- Lin S, Litaker RW, Sunda WG (2016) Phosphorus physiological ecology and molecular mechanisms in marine phytoplankton. *J Phycol* **52**, 10-36. <https://doi.org/10.1111/jpy.12365>
- Liran O, Shemesh E, Tchernov D (2018) Investigation into the CO<sub>2</sub> concentrating step rates within the carbon concentrating mechanism of *Synechocystis* sp. PCC6803 at various pH and light intensities reveal novel mechanistic properties. *Algal Res* **33**, 419-429. <https://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.020>
- Liu J, Zhu JK (1997) Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **114**, 591-596. <https://doi.org/10.1104/pp.114.2.591>
- Liu N, Mou Y, Su K, Li X, Lu T, Yan W, i sur. (2022) The effect of salinity stress on the growth and lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda* FACHB-1297 under xylose

mixotrophic cultivation, *Process Saf Environ Prot* **165**, 887-894  
<https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.07.051>

Liu Z, Adewuyi YG, Shi S, Chen H, Li Y, Liu D, Liu Y (2019) Removal of Gaseous Hg0 Using Novel Seaweed Biomass-based Activated Carbon. *J Chem Eng* **366**, 41-49.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.02.025>

Liyanaarachchi VC, Premaratne M, Ariyadasa TU, Nimarshana PHV, Malik A (2021). Two-stage cultivation of microalgae for production of high-value compounds and biofuels: A review. *Algal Res* **57**, 102353. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102353>

Lu D, Tabil LG, Wang D, Wang G, Emami S (2014) Experimental Trials to Make Wheat Straw Pellets with Wood Residue and Binders. *Biomass Bioenergy* **69**, 287-296.  
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.07.029>

Lu N, Wei D, Chen F, Yang S-T (2013). Lipidomic profiling reveals lipid regulation in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* in response to nitrate or phosphate deprivation. *Process Biochem* **48**, 605-613. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.028>.

Malapascua JR (2018) Photosynthesis Monitoring in Microalgae Mass Cultures (doktorski rad), Sveučilište Južne Bohemije, Faculty of science, České Budějovice.

Maneechote W, Cheirsilp B, Srinuanpan S, Pathom-aree W (2021). Optimizing Physicochemical Factors for Two-Stage Cultivation of Newly Isolated Oleaginous Microalgae from local lake as Promising Sources of Pigments, PUFAs and Biodiesel Feedstocks. *Bioresour Techn Rep* **15**, 100738. [10.1016/j.biteb.2021.100738](https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100738)

Mani UV, Iyer UM, Dhruv SA, Mani IU, Sharma KS. Therapeutic utility of Spirulina. U: M. Gershwin E, Belay A (ured.) *Spirulina in human nutrition and health*, CRC press, str. 85-114.  
<https://dx.doi.org/10.1201/9781420052572.ch4>

Markou G, Vandamme D, Muylaert K (2014) Microalgal and Cyanobacterial Cultivation: The Supply of Nutrients. *Water Res* **65**, 186-202.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.025>

Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sustain Energy Rev* **14**, 217-232.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>

Meseck SL, Wikfors GH, Alix JH, Smith BC, Dixon MS (2007) Impacts of a cyanobacterium contaminating large-scale aquaculture feed cultures of *Tetraselmis chui* on survival and growth of bay scallops, *Argopecten irradians* *J Shellfish Res* **26**, 1071-1074.

Moazami-Goudarzi M, Colman B (2012) Changes in carbon uptake mechanisms in two green marine algae by reduced seawater pH. *J Exp Mar Bio Ecol* **413**, 94-99.  
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.11.017>

Moazami N, Ashori A, Ranjbar R, Tangestani M, Eghtesadi R, Nejad AS (2012) Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. *Biomass Bioenergy*, **39**, 449-453. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.01.046>

Molina Grima E, Ación Fernández FG, Garcia Camacho F, Chisti Y (1999) Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *J Biotechnol* **70**, 231-248.

- Moore CM, Mills MM, Arrigo KR, Berman-Frank I, Bopp L, Boyd PW, i sur. (2013) Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nat Geosci* **6**, 701-710. <https://doi.org/10.1038/ngeo1765>
- Msanne J, Xu D, Konda AR, Casas-Mollano JA, Awada T, Cahoon EB i sur. (2012) Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. *Phytochem* **75**, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.12.007>
- Mucko M, Padisák J, Gligora Udovič M, Pálmai T, Novak T, Medić N, i sur. (2020) Characterization of a high lipid-producing thermotolerant marine photosynthetic pico alga from genus *Picochlorum* (Trebouxiophyceae), *Eur J Phycol* **55**, 384-399. <https://doi.org/10.1080/09670262.2020.1757763>
- Nagalakshmi N, Prasad MNV (1998) Copper-induced oxidative stress in *Scenedesmus bijugatus*: protective role of free radical scavengers. *Bull Environ Contam Toxicol* **61**, 623-8. <https://doi.org/10.1007/s001289900806>
- Nagappan S, Devendran S, Tsai P-C, Dahms H-U, Ponnusamy VK (2019). Potential of two-stage cultivation in microalgae biofuel production. *Fuel* **252**, 339-349. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.04.138>
- Naselli-Flores L, Padisák J (2023) Ecosystem services provided by marine and freshwater phytoplankton. *Hydrobiologia* **850**, 2691-2706. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04795-y>
- Pancha I, Chokshi K, George B, Ghosh T, Paliwal C, Maurya R, i sur. (2014) Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077, *Bioresour Technol* **156**, 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025>
- Pandit PR, Fulekar MH, Karuna MSL (2017) Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. *Environ Sci Pollut Res Int* **24**, 13437-13451. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8875-y>
- Pei H, Jiang L (2018) Mixing seawater with a little wastewater to produce bioenergy from limnetic algae. *Trends Biotechnol* **36**, 480-483. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.12.002>
- Perez-Garcia O, FME Escalante, LED Bashan, Y Bashan (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res* **45**, 11-36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>.
- Postma PR, 't Lam GP, Barbosa MJ, Wijffels RH, Eppink MHM, Olivieri G (2016) Microalgal Biorefinery for Bulk and High-Value Products: Product Extraction Within Cell Disintegration. U: Miklavcic D (ured.) Handbook of Electroporation. Springer International Publishing str. 1-20.
- Powell N, Shilton A, Chisti Y, Pratt S (2009) Towards a Luxury Uptake Process via Microalgae-Defining the Polyphosphate Dynamics. *Water Res* **43**, 4207-4213. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.011>
- Procházková G, Brányiková I, Zachleder V, Brányik T (2013) Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *J Appl Phycol* **26**, 1359–1377. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0154-9>

Reitan KI, Rainuzzo JR, Olsen Y (1994) Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J Phycol* **30**, 972-979. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00972.x>

Reynoso GT, De Gamboa BA (1982) Salt tolerance in the freshwater algae *Chlamydomonas reinhardtii*: Effect of proline and taurine. *Comp Biochem Physiol* **73**, 95–99. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(82\)90098-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90098-6)

Ribeiro-Rodrigues LH, Arenzon A, Raya-Rodriguez MT, Fontoura NF (2011) Algal density assessed by spectrophotometry: a calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *J Environ Chem Ecotoxicol* **3**, 225-228. <https://doi.org/10.5897/JECE2011.025>

Richmond A (2004) Biological principles of mass cultivation. U: Richmond A (ured.) Handbook of microalgae mass cultures. Blackwell Science, Oxford, str. 125-177.

Rizwan M, Mujtaba G, Memon SA, Lee K, Rashid N (2018) Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review, *Renew Sust Energ Rev* **92**, 394-404.

Roopnarain A, Gray VM, Sym SD (2014) Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production *Bioresour Technol* **156**, 408-411. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.092>

Safi C, Frances C, Ursu AV, Laroche C, Pouzet C, Vaca-Garcia C, i sur. (2015) Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. *Algal Res* **8**, 61–68. [doi:10.1016/j.algal.2015.01.002](https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.002)

Salama ES, Kim HC, Abou-Shanab RA, Ji MK, Oh YK, Kim SH, i sur. (2013) Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. *Bioprocess Biosyst Eng* **36**, 827-833. <https://dx.doi.org/10.1007/s00449-013-0919-1>

Salvucci ME, Crafts-Brandner SJ (2004) Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. *Plant Physiol* **134**, 1460-70.

Sawangkeaw R, Ngamprasertsith S (2013). A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production *Renew Sust Energ Rev* **25**, 97-108. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.04.007>

Schulze PS, Pereira HG, Santos TF, Schueler L, Guerra R, Barreira LA, i sur. (2016) Effect of Light Quality Supplied by Light Emitting Diodes (LEDs) on Growth and Biochemical Profiles of *Nannochloropsis oculata* And *Tetraselmis chuii*. *Algal Res* **16**, 387-398. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.034>

Scott SA, Davey MP, Dennis JS, Horst I, Howe CJ, Lea-Smith DJ, i sur. (2010) Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Curr Opin Biotechnol* **21**, 277-286. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.005>

Sharma KK, Schuhmann H, Schenk PM (2012) High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies* **5**, 1532-1553. <https://doi.org/10.3390/en5051532>

- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J Bot* **2012**, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC (2001) Production purification characterization and application of lipases. *Biotechnol Adv* **19**, 627-662. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(01\)00086-6](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(01)00086-6)
- Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P (1998) Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae; Close-out Report, Golden, CO, <https://doi.org/10.2172/15003040>
- Sinetova MA, Sidorov RA, Medvedeva AA, Starikov AY, Markelova AG, Allakhverdiev S, i sur. (2021) Effect of salt stress on physiological parameters of microalgae *Vischeria punctata* strain IPPAS H-242, a superproducer of eicosapentaenoic acid. *J Biotechnol* **331**, 63-73. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jbiotec.2021.03.001>
- Silva NFP, Gonçalves AL, Moreira FC, Silva, TFCV, Martins FG, Alvim-Ferraz MCM, i sur. (2015) Towards Sustainable Microalgal Biomass Production by Phycoremediation of a Synthetic Wastewater: A Kinetic Study. *Algal Res* **11**, 350-358. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.014>
- Singh NK, Dhar DW (2011) Microalgae as Second Generation Biofuel: A Review. *Agron Sustain Dev* **31**, 605-629. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0018-0>
- Singh SK, Sundaram S, Sinha S, Rahman MA, Kapur S (2016) Recent advances in CO<sub>2</sub> uptake and fixation mechanism of cyanobacteria and microalgae. *Crit Rev Environ Sci Technol* **46**, 1297-1323. <https://dx.doi.org/10.1080/10643389.2016.1217911>
- Singh SP, Singh P (2015) Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review. *Renew Sust Energ Rev* **50**, 431-44. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>
- Slade R, Bauen A (2013) Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass Bioenergy* **53**, 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.019>.
- Stephens E, Ross I, King Z i sur. (2010) An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. *Nat Biotechnol* **28**, 126-128 <https://doi.org/10.1038/nbt0210-126>
- Suastes-Rivas JK, Hernández-Altamirano R, Mena-Cervantes VY, Barrios Gómez, EJ, Chairez I (2020). Biodiesel Production, through Intensification and Profitable Distribution of Fatty Acid Methyl Esters by a Microalgae-Yeast Co-culture, Isolated from Wastewater as a Function of the Nutrients' Composition of the Culture Media. *Fuel* **280**, 118633. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118633>
- Suh IS, Lee CG (2003) Photobioreactor Engineering: Design and Performance. *Biotechnol Bioprocess Eng* **8**, 313-321. <https://doi.org/10.1007/BF02949274>
- Talebi AF, Mohtashami SK, Tabatabaei M, Tohidfar M, Bagheri A, Zeinalabedini M, i sur. (2013) Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Res* **2**, 258-267. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.04.003>
- Tanner W (2000) The chlorella hexose/H<sup>+</sup>-symporters. *Int Rev Cytol* **200**, 101-41. [https://dx.doi.org/10.1016/s0074-7696\(00\)00003-6](https://dx.doi.org/10.1016/s0074-7696(00)00003-6).

Toumi A, Politaeva NA (2021) Impact of the nitrate concentration on the biomass growth and the fatty acid profiles of microalgae *Chlorella sorokiniana* IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 689 012026 <https://doi.org/10.1088/1755-1315/689/1/012026>

Tredici, MR, Zittelli GC (1998) Efficiency of Sunlight Utilization: Tubular versus Flat Photobioreactors. *Biotechnol Bioeng* **57**, 187-197. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980120\)57:2<187::AID-BIT7>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980120)57:2<187::AID-BIT7>3.0.CO;2-J)

Van Wychen S, Laurens LML (2013a) Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass: laboratory analytical procedure (LAP), issue date December 2, 2013. Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory. <https://doi.org/10.2172/1118073>

Van Wychen S, Laurens LML (2013b) Determination of total lipids as fatty acid methyl esters (FAME) by in situ transesterification: laboratory analytical procedure (LAP), issue date December 2, 2013. Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory. <https://doi.org/10.2172/1118085>

von Alvensleben N, Stookey K, Magnusson M, Heimann K (2013) Salinity tolerance of *Picochlorum atomus* and the use of salinity for contamination control by the freshwater cyanobacterium *Pseudanabaena limnetica*. *PLoS One* **8**, e63569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063569>

Vu CHT, Lee H-G, Chang YK, Oh H-M (2018) Axenic cultures for microalgal biotechnology: Establishment, assessment, maintenance, and applications. *Biotechnol Adv* **36**, 380-396. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.018>

Wang S, Zheng L, Han X, Yang B, Li J, Sun C (2018) Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of two marine oil-rich microalgal strains in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Acta Oceanol Sin* **37**, 119-126. <https://doi.org/10.1007/s13131-018-1171-y>

Wu L, Xu L, Hu C (2015) Screening and characterization of Oleaginous microalgal species from Northern Xinjiang. *J Microbiol Biotechnol* **25**, 910-917. <https://doi.org/10.4014/jmb.1411.11075>

Yang FF, Xiang W, Li T (2018) Long, L. Transcriptome analysis for phosphorus starvation-induced lipid accumulation in *Scenedesmus* sp. *Sci Rep* **8**, 111. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34650-x>

Ye CP, Zhang MC, Yang YF, Thirumaran G (2012) Photosynthetic performance in aquatic and terrestrial colonies of *Nostoc flagelliforme* (Cyanophyceae) under aquatic and aerial conditions. *J Arid Environ* **85**, 56-61.

Yu WL, Ansari W, Schoepp N, Hannon MJ, Mayfield SP, Burkart MD (2011) Modifications of the metabolic pathways of lipid and triglyceride production in microalgae. *Microb Cell Fact* **10**, 91. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-91>

Yuan Y, Liu H, Li X, Qi W, Cheng D, Tang T, Zhao Q, Wei W, Sun Y (2018) Enhancing Carbohydrate Productivity of *Chlorella* sp. AE10 in Semi-continuous Cultivation and Unraveling the Mechanism by Flow Cytometry. *Appl Biochem Biotechnol* **185**, 419-433. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2667-1>

Zarrinmehr MJ, Farhadian O, Heyrati FP, Keramat J, Koutra E, Kornaros M, i sur. (2019) Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the

microalga, *Isochrysis galbana*. *Egypt J Aquat Res* **46**, 1687-4285. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.11.003>

Zhang L, Pei H, Chen S, Jiang L, Hou Q, Yang Z, i sur. (2018) Salinity-induced cellular cross-talk in carbon partitioning reveals starch-to-lipid biosynthesis switching in low-starch freshwater algae. *Bioresour Technol* **250**, 449-456. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.067>

Zhang W, Zhang P, Sun H, Chen M, Lu S, Li P (2014) Effects of various organic carbon sources on the growth and biochemical composition of *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresour Technol* **173**, 52-58. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.084>

Zhu L (2015) Microalgal Culture Strategies for Biofuel Production: A Review. *Biofpr* **9**, 801-814. <https://doi.org/10.1002/bbb.1576>

Zhu LD, Li ZH, Hiltunen E (2016) Strategies for lipid production improvement in microalgae as a biodiesel feedstock. *Biomed Res Int* **9**, 801-814. <https://doi.org/10.1155/2016/8792548>

Zhu S, Huang W, Xu J, Wang Z, Xu J, Yuan Z (2014) Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis* *Bioresour Technol* **152**, 292-298. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.092>

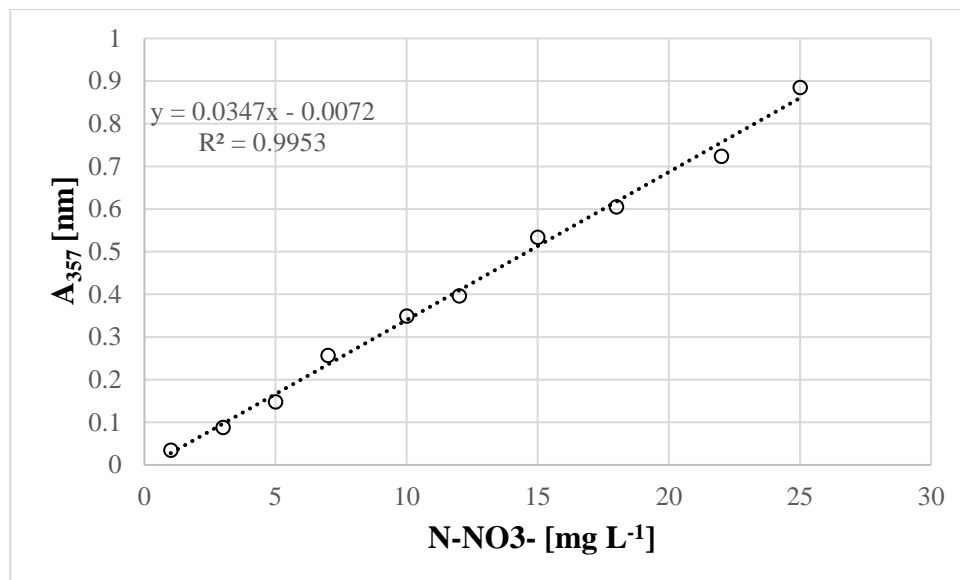
Zhu, Y, Dunford, NT (2013) Growth and biomass characteristics of *Picochlorum oklahomensis* and *Nannochloropsis oculata*. *J Am Oil Chem Soc* **90**, 841-849. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2225-0>

Zuccaro G, Yousuf A, Pollio A, Steyer JP (2020) Microalgae cultivation for biofuels production, 1. izd., Academic Press, London/United Kingdom/Unites States, str. 11-29.

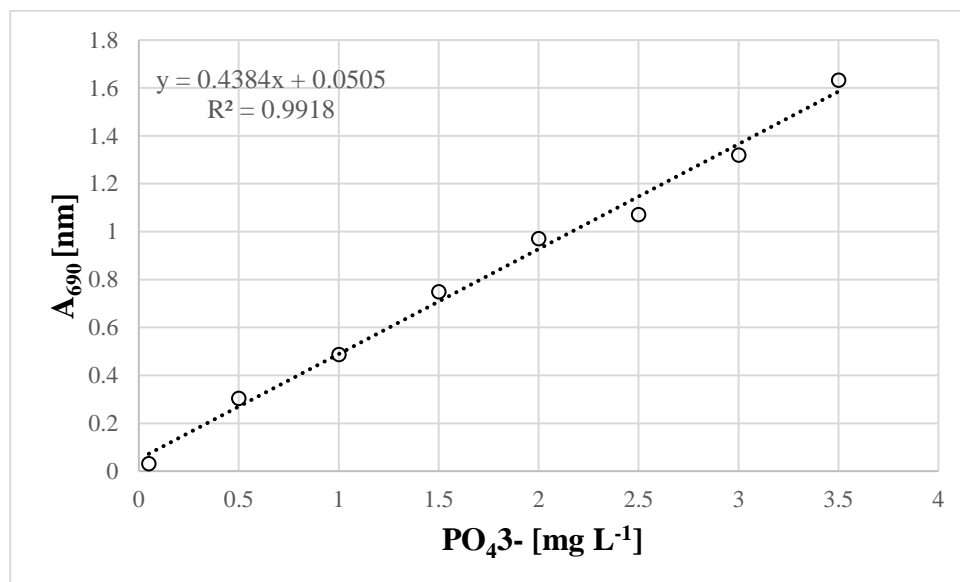


## 7. PRILOZI

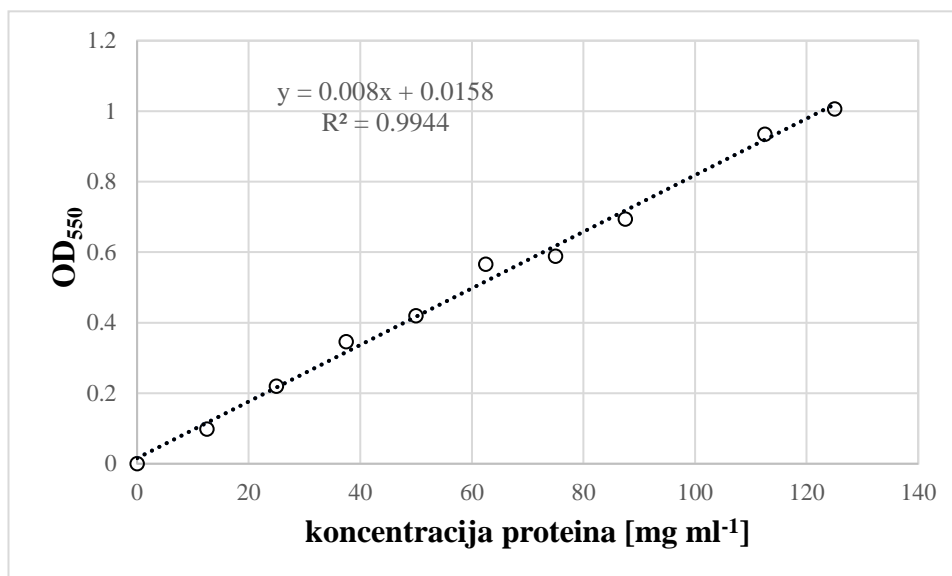
**Prilog 7.1.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije nitrita u uzorku.



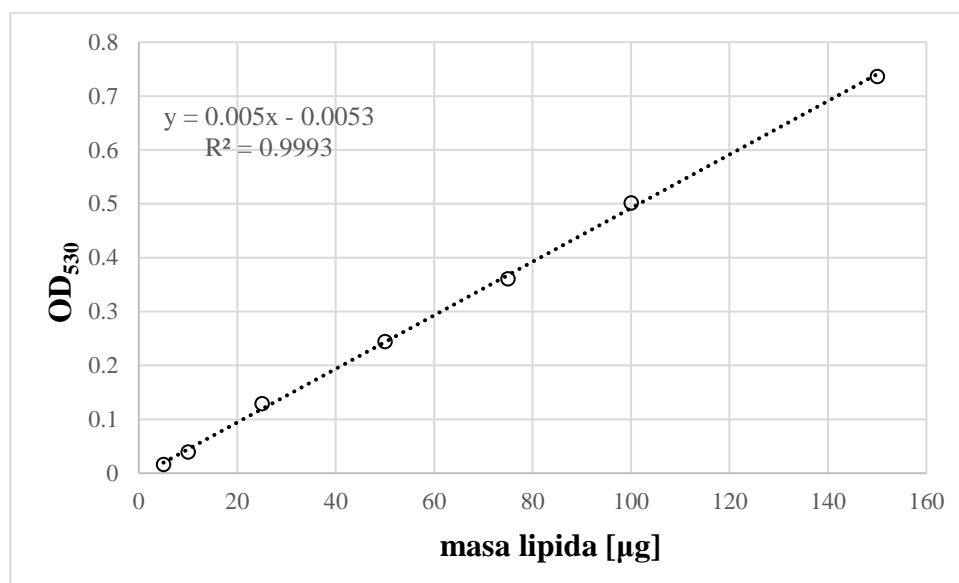
**Prilog 7.2.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije fosfata u uzorku.



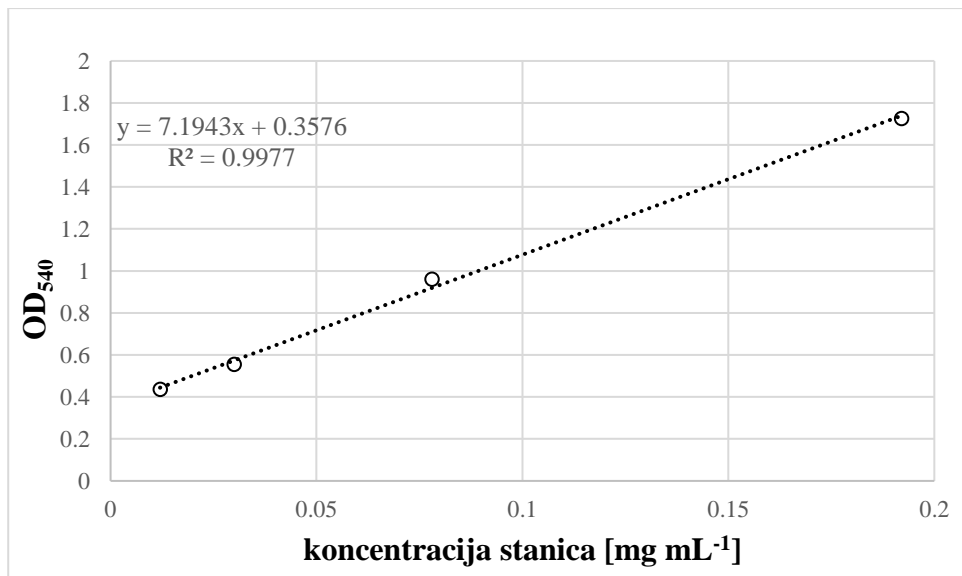
**Prilog 7.3.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina metodom po Lowryju



**Prilog 7.4.** Baždarni dijagrami za određivanje lipida vanilin metodom.



**Prilog 7.5.** Baždarni dijagram optičke gustoće o koncentraciji stanica mikroalgi



## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Lucija Mlakić izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Lucija Mlakić  
Vlastoručni potpis