

# Utjecaj omjera izvora ugljika i dušika na sastav biomase mikroalge *Picochlorum* sp.

---

Jaković, Lorena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

*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:159:266731>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-18**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2021.

Lorena Jaković

**UTJECAJ OMJERA IZVORA  
UGLJIKA I DUŠIKA NA SASTAV  
BIOMASE MIKROALGE  
*Picochlorum* sp.**

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.

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek na pruženoj prilici izrade diplomskog rada pod njezinim mentorstvom. Hvala za vrlo srdačan pristup, prenesena znanja i ideje.*

*Dragoj mag. ing. Marini Grubišić zahvaljujem na strpljenju, pomoći i svemu naučenom tijekom provedbe eksperimentalnog dijela rada. Svim zaposlenicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada također jedno veliko hvala.*

*Posebno hvala obitelji, prijateljima i svima koji su u ovom periodu bili dio moga života. Bez vas i vaše potpore ne bih postigla ono što danas jesam. Hvala na strpljenju, razumijevanju i pruženoj pomoći tijekom cijelog obrazovanja.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

### UTJECAJ OMJERA IZVORA UGLJIKA I DUŠIKA NA SASTAV BIOMASE MIKROALGE *Picochlorum* sp.

Lorena Jaković, univ. bacc. ing. biotechn.  
0058209309

#### Sažetak:

Fototrofnim uzgojem mikroalge *Picochlorum* sp. pri različitim C:N omjerima, istražen je utjecaj na njezin rast i sastav biomase. Najveća postignuta koncentracija stanica od  $3,61 \cdot 10^7$  st  $\text{mL}^{-1}$  zabilježena je u f/2 podlozi i podlozi C:N=13,52 mol mol<sup>-1</sup>. Najveći udjeli proteina (75,26 %) i lipida (9,27 %) zabilježeni su u podlozi s omjerom C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup>. Najveći udio u lipidima čine zasićene masne kiseline (oko 50 %), a najmanji jednostruko nezasićene masne kiseline (oko 6-12 %). S ciljem povećane akumulacije lipida proveden je šaržni uzgoj navedene mikroalge u dvije faze- s i bez izvora dušika. Prilikom limitacije dušikom u drugoj fazi u podlogama s 1 g L<sup>-1</sup> i 2 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, ustanovljeno je smanjenje udjela proteina s 49 % na 47 % te 42 % na 31 % i ukupnog klorofila s 2,48 % na 0,67 % te 2,09 % na 0,58 %, ali je rezultirala povećanom akumulacijom lipida u sastavu biomase u podlozi sa 2 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> sa 3,07 % na 10,22 %. Osim toga, ustanovljena je promjena profila masnih kiselina pri čemu je povećan udio višestruko nezasićenih masnih kiselina u f/2 podlozi i podlozi sa 1 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> u odnosu na podloge koje su sadržavale izvor dušika.

**Ključne riječi:** mikroalge, *Picochlorum* sp., različiti C:N omjeri, limitacija izvorom dušika, lipidi

**Rad sadrži:** 56 stranica, 11 slika, 17 tablica, 49 literaturnih navoda, 6 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. Jasna Novak (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek (mentor)
3. doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo (član)\*
4. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (zamjenski član)

**Datum obrane:** 03.12.2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical engineering  
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology, Malting and Brewing  
Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

EFFECT OF CARBON TO NITROGEN RATIO ON BIOMASS COMPOSITION OF MICROALGA

*Picochlorum* sp.

Lorena Jaković, univ. bacc. ing. biotechn.

0058209309

### Abstract:

Phototrophic cultivation of the microalga *Picochlorum* sp. at different C:N ratios, the influence on its growth and biomass composition was investigated. The highest achieved cell concentration of  $3,61 \cdot 10^7$  cells  $\text{mL}^{-1}$  was recorded in f/2 medium and medium C:N=13,52 mol  $\text{mol}^{-1}$ . The highest share of proteins (75,26 %) and lipids (9,27 %) were recorded in the medium with the ratio C:N=67,64 mol  $\text{mol}^{-1}$ . The largest share in lipids are saturated fatty acids (about 50 %), and the smallest monounsaturated fatty acids (about 6-12 %). With the aim of increased lipid accumulation, batch cultivation of this microalga was carried out in two phases- with and without nitrogen sources. Nitrogen limitation in the second phase in media with 1 g  $\text{L}^{-1}$  and 2 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ , led to a decrease in protein content from 49 % to 47 % and 42 % to 31 % and total chlorophyll from 2,48 % to 0,67 % and 2,09 % to 0,58 %, but resulted in increased lipid accumulation in the biomass composition in the medium with 2 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$  from 3,07 % to 10,22 %. In addition, a change in the obtained fatty acid profile is visible, with an increased share of polyunsaturated fatty acids in the f/2 medium and the medium with 1 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$  compared to the media containing the nitrogen source.

**Keywords:** microalgae, *Picochlorum* sp., different C:N ratios, nitrogen limitation, lipids

**Thesis contains:** 56 pages, 11 figures, 17 tables, 49 references, 6 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:**, PhD, Mirela Ivančić Šantek, Full professor

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

### Reviewers:

1. PhD, Jasna Novak, Full professor
2. PhD, Mirela Ivančić Šantek, Full professor
3. PhD, Marina Cvjetko Bubalo, Assistant professor
4. PhD, Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** December 3<sup>rd</sup>, 2021

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. MIKROALGE</b> .....	2
<b>2.2. UZGOJ MIKROALGI I ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA NJEGA</b> .....	4
2.2.1. Svjetlost, salinitet i temperatura .....	5
2.2.2. pH vrijednost i izvor ugljika.....	6
2.2.3. Nutrijenti .....	7
<b>2.3. PROIZVODI MIKROALGI I NJIHOV POTENCIJAL</b> .....	8
2.3.1. Proteini .....	9
2.3.2. Ugljikohidrati .....	10
2.3.3. Lipidi.....	11
2.3.4. Pigmenti .....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	13
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	13
3.1.1. Radni mikroorganizam .....	13
3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjive podloge.....	13
3.1.3. Ostale kemikalije i kitovi korišteni u eksperimentu .....	14
3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj mikroalge .....	15
3.1.5. Oprema i uređaji .....	17
3.1.5.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (eng. Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) .....	17
3.1.5.2. Sustav za plinsku kromatografiju (eng. Gas Chromatography, GC).....	17
3.1.5.3. Ostali uređaji .....	17
<b>3.2. METODE</b> .....	18
3.2.1. Priprema hranjivih podloga.....	18
3.2.2. Uzgoj inokuluma .....	18
3.2.3. Optimiranje rasta pri različitim koncentracijama izvora dušika i ugljika .....	19
3.2.4. Ispitivanje učinka limitacije izvorom dušika na rast i sastav biomase.....	20
3.2.5. Analitičke metode.....	20
3.2.5.1. Mjerenje optičke gustoće kulture.....	20
3.2.5.2. Određivanje brojčane koncentracije stanica u CellDrop uređaju.....	21
3.2.5.3. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase.....	21
3.2.5.4. Određivanje koncentracije nutrijenata .....	21
3.2.5.4.1. <i>Određivanje koncentracije nitrata u podlozi</i> .....	22
3.2.5.4.2. <i>Određivanje koncentracije fosfata u podlozi</i> .....	22



3.2.5.5. Određivanje sastava pigmenata u biomasi mikroalgi.....	22
3.2.5.6. Određivanje udjela proteina u biomasi mikroalgi.....	23
3.2.5.7. Određivanje ukupnih ugljikohidrata u biomasi mikroalgi.....	24
3.2.5.8. Određivanje udjela lipida u biomasi mikroalge vanilin metodom .....	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1. UČINAK C:N OMJERA NA RAST I SASTAV BIOMASE MIKROALGE .....</b>	<b>28</b>
4.1.1. Šaržni uzgoj mikroalge uz dodatak natrijevog bikarbonata .....	28
4.1.2. Sastav biomase mikroalge .....	34
<b>4.2. ISTRAŽIVANJE UČINKA LIMITACIJE IZVOROM DUŠIKA NA RAST I SASTAV BIOMASE MIKROALGE.....</b>	<b>41</b>
4.2.1. Dvofazni šaržni uzgoj mikroalge uz limitaciju izvorom dušika .....	41
4.2.2. Utjecaj limitacije dušikom na sastav biomase mikroalge .....	45
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>51</b>
<b>7. PRILOZI.....</b>	<b>.....</b>

## 1. UVOD

Mikroalge u današnje vrijeme pronalaze sve češću primjenu u raznim područjima života ističući se radi visoke brzine rasta, smanjene potrebe za predobradom radi odsustva lignina i manjeg sadržaja hemiceluloze, učinkovite fiksacije CO<sub>2</sub>, a time i smanjene emisije stakleničkih plinova (Chen i sur., 2013). Mogu se koristiti kao živi mikroorganizmi u bioremedijacijskim procesima otpadnih voda uklanjajući fosfate i nitrane koji mogu imati negativan učinak na zdravlje ljudi i životinja. Nadalje, postoji mogućnost korištenja cijele biomase mikroalge kao dodatak hrani. Vrlo često se koriste u proizvodnji visoko vrijednih spojeva kao što su karotenoidi, fikobiliproteini, višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA), a sve se više istražuje i mogućnost korištenja mikroalgi u biorafinerijama (Garrido-Cardenas i sur., 2018). Osim navedene važnosti, mikroalge u sastavu svoje biomase sadrže važne makromolekule kao što su proteini, ugljikohidrati, lipidi i pigmenti. Prema literaturi, dodatkom većih koncentracija NaHCO<sub>3</sub> mikroalge imaju mogućnost većeg rasta, a time i postizanja viših koncentracija stanica. Osim toga, moguće je postići i veće udjela lipida (Nunez i Quigg, 2016). Iscrpljivanje hranjivih tvari u podlozi može povećati produktivnost biomolekula kao što su lipidi i ugljikohidrati, ali i smanjiti udio proteina te produktivnost biomase (Finkel i sur., 2016; Goswami i sur., 2021).

Znajući da je za uspješan uzgoj mikroalge, između ostalog potreban i izvor ugljika, u ovom je radu istražen utjecaj različitih molarnih omjera izvora ugljika i dušika, na rast i prinos biomase mikroalge *Picochlorum* sp. Osim toga, provedene su analize kojima se želio istražiti navedeni utjecaj na promjenu sastava biomase. Budući da lipidi mikroalgi predstavljaju velik potencijal u proizvodnji biogoriva, primjenjuju se različite metode kako bi se potaknulo njihovo nakupljanje u stanicama mikroalgi. Jedan od mogućih načina je postizanje uvjeta limitacije izvorom dušika tijekom kultivacije. U takvim, za algu stresnim uvjetima, dolazi do usmjeravanja metabolizma u nakupljanje rezervnih stvari, odnosno lipida i ugljikohidrata u stanicama mikroalgi. Upravo zato, postavljen je još jedan cilj rada koji je bio usmjeren na šaržni uzgoj mikroalge u dvije faze. Biomasa je uzgojena u optimalnim uvjetima te je zatim prebačena u medij s osiromašenim hranjivim tvarima, odnosno u podloge bez dodanog izvora dušika. Istovremeno je ispitan utjecaj dodatka većih koncentracija natrijevog bikarbonata. Provedene su analize sastava biomase dobivene uzgojem u takvim uvjetima, odnosno određen je udio lipida i njihov sastav te udjeli proteina i klorofila. Dobiveni rezultati provedbom ovih eksperimenata, bit će navedeni i objašnjeni u nastavku rada.

## 2. TEORIJSKI DIO

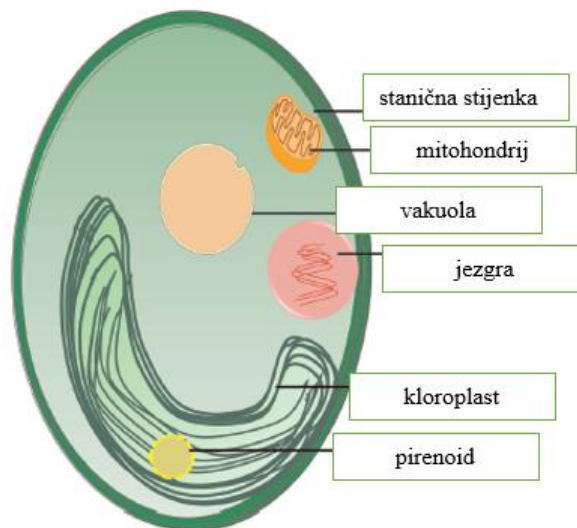
### 2.1. MIKROALGE

Mikroalge su jednostanični fotosintetski organizmi, veličine od nekoliko mikrometara pa do nekoliko stotina mikrometara, koji iz ugljikovog dioksida i pomoću sunčeve svjetlosti stvaraju organsku tvar (šećer). Karakterizira ih prilagodba raznim okolišnim uvjetima, međutim njihov rast može biti ovisan o sunčevoj svjetlosti, vodi i izvoru ugljika (Rizwan i sur., 2018). Osim izvora ugljika, za rast mikroalge važno je osigurati i mikro i makronutrijente kao što su različite anorganske tvari i vitamini. Mikroalge sadrže različite fotosintetske i zaštitne pigmente kao što su klorofili, astaksantin, fukoksantin i druge što ovisi o vrsti mikroalge. Možemo ih podijeliti na dijatomeje (*Bacillariophyta*), zelene alge (*Chlorophyta*), zlatne alge (*Chrysophyta*) te plavo-zelene alge (*Cyanophyta*) (Bleakley i Hayes, 2017). Kao što navode Khan i suradnici (2018), mikroalge imaju sposobnost da 9-10 % sunčeve svjetlosti pretvore u biomasu sa prinosom oko 280 t ha<sup>-1</sup> godišnje. Prinos može biti i manji i u otvorenim i u zatvorenim sustavima, pogotovo tijekom uzgoja veće količine mikroalge. Primjenu pronalaze u raznim područjima upravo radi niza prednosti kao što su brzi rast, sposobnost proizvodnje lipida, visoka stopa fiksacije CO<sub>2</sub> iz zraka (Lee i sur., 2015). Razlikujemo morske i slatkovodne mikroalge, ali one mogu rasti i u otpadnim vodama pri čemu ih karakterizira 90 %-tna učinkovitost uklanjanja fosfata i nitrata. Upotrebljavajući izvore fosfora i dušika iz otpadne vode, mikroalge proizvode biomasu, a u konačnici je željena otpadna voda pročišćena (Goswami i sur., 2021).

Omjer C:N:P utječe na makromolekulski sastav biomase mikroalge. Stanični dušik sastavni je dio proteina, fosfor nukleinskih kiselina i fosfolipida dok se stanični ugljik može naći kao dio proteina, ugljikohidrata, nukleinskih kiselina i lipida. Iscrpljivanjem izvora dušika iz hranjive podloge tijekom uzgoja mikroalge, povećava se C:N omjer pri čemu se smanjuje brzina rasta i udio proteina, a udio rezervnih tvari, lipida i ugljikohidrata, povećava (Finkel i sur., 2016). Prema radu Finkel-a i suradnika (2016) određen je prosječan makromolekulski sastav na temelju istraživanja velikog broja morskih i slatkovodnih vrsta mikroalga. Sastav je izražen u suhoj tvari biomase: 32,2 % proteina, 17,3 % lipida, 15,0 % ugljikohidrata, 17,3 % pepela, 5,7 % RNA, 1,1 % klorofila *a* i 1,0 % DNA. Sve češća primjena mikroalgi u raznim industrijama rezultat je njihovih prednosti kao što su potreba za manjom površinom za uzgoj u usporedbi s drugim usjevima. Nadalje, imaju visoku stopu

fiksacije CO<sub>2</sub> te na taj način mogu smanjiti emisiju stakleničkih plinova (Darvehei i sur., 2018).

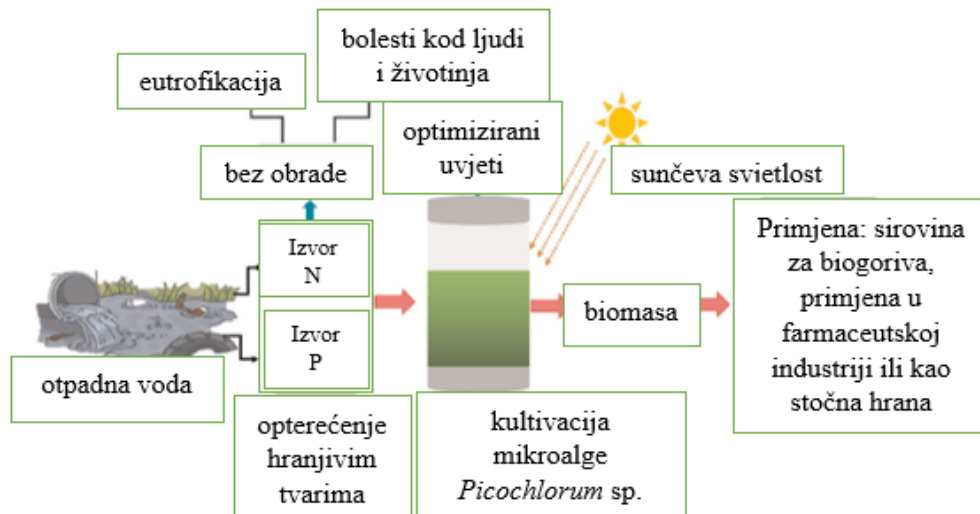
U ovom radu provedeno je istraživanje s morskom mikroalgom *Picochlorum* sp. koja pripada odjeljku *Chlorophyta*. Prosječna veličina ove mikroalge je 1,5-3 μm te ima jedan bočni kloroplast i jedan mitohondrij (Foflonker i sur., 2018). *Picochlorum* sp. je halotolerantna mikroalga što znači da može rasti u vodi visokog saliniteta. Osim toga, može rasti pri višim temperaturama do 40 °C. Građa mikroalge prikazana je na slici 1. Prema radu Tran-a i suradnika (2014), rastu mikroalge *Picochlorum* sp. odgovaraju sljedeći uvjeti: temperatura 25 °C, koncentracija 0,5 M NaCl te pH vrijednost 7,5.



**Slika 1.** Prikaz stanične građe mikroalge *Picochlorum* sp. (prema Goswami i sur., 2021)

Ovisno o korištenom soju, mikroalga može podnijeti visoki intenzitet svjetla pa tako *Picochlorum celeri* podnosi i 1000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> što rezultira poboljšanim rastom (Goswami i sur., 2021). Važno je održavati i odgovarajući ciklus tame i svjetla budući da tijekom mračnih uvjeta dolazi do gubitaka biomase. Biomasi mikroalge čine visokovrijedni proizvodi kao što su lipidi, proteini, ugljikohidrati, karotenoidi (lutein i zeaksantin) te vitamini. U uvjetima limitacije rasta izvorom dušika, stanica mikroalge nakuplja lipide i ugljikohidrate (El Kassas, 2013). Navedena mikroalga ističe se radi prilagodbe raznim okolišnim uvjetima što ju čini primjenjivom za uzgoj u otvorenim bazenima (Moussa i sur., 2019). Jedna od primjena mikroalge *Picochlorum* sp. odnosi se na mogućnost obrade otpadnih voda koje su sve češći problem tijekom raznih industrijskih proizvodnja (slika 2). Naime, velike koncentracije

zaostalih nitrata i fosfata u otpadnim vodama mogu imati negativan utjecaj na zdravlje čovjeka i životinja pa postoji potreba za njihovim uklanjanjem. Mikroalga pri tome koristi nitrata i fosfate kao hranjive tvari što rezultira proizvodnjom biomase koja daljnju primjenu pronalazi u raznim područjima (Goswani i sur., 2021). Iako je potrebno provesti još mnogo istraživanja za primjenu *Picochlorum* sp. u industrijskom procesu pročišćavanja otpadnih voda, njezin potencijal nije upitan.



**Slika 2.** Prikaz potencijala mikroalge *Picochlorum* sp. u uklanjanju nitrata i fosfata iz otpadne vode te daljnja mogućnost primjene (prema Goswami i sur., 2021)

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

Tijekom uzgoja mikroalgi potrebno je zadovoljiti uvjete koji se odnose na osiguranje odgovarajuće svjetlosti, temperature, saliniteta, pH vrijednosti, izvora ugljika te ostalih nutrijenata (Chiranjevi i Mohan, 2016). Postoji mogućnost uzgoja u otvorenim bazenima ili jezerima te u zatvorenim sustavima kao što su to fotobioreaktori. Pojedine sustave karakteriziraju prednosti i nedostaci pri čemu će izbor sustava ovisiti o korištenoj vrsti mikroalge, načinu uzgoja (autotrofno/heterotrofno), dostupnosti hranjivih tvari te o željenoj količini dobivene biomase i njezinoj primjeni. Zatvoreni sustavi ističu se radi moguće standardizacije proizvodnog procesa, jednostavnog procesa miješanja te niskog utroška vode i CO<sub>2</sub>. Međutim nedostatak predstavljaju veći kapitalni i operativni troškovi. Otvorene sustave karakterizira veća trajnost i mogućnost postizanja veće produktivnosti biomase u odnosu na zatvorene sustave (Rizwan i sur., 2018). Iako su izgradnja i uzgoj u otvorenim bazenima vrlo jednostavni, postoji problem koji se tiče moguće kontaminacije, ali i isparavanja vode

(Darvehei i sur., 2018). Nakon odabira odgovarajućeg sustava te uzgoja kulture mikroalge, potrebno je izdvojiti dobivenu biomasu što se smatra jednim od skupljih koraka tijekom proizvodnje. Metode koje se vrlo često koriste su centrifugiranje i taloženje, filtracija i ultrafiltracija, a moguće je kombinirati flokulaciju i flotaciju. S ciljem postizanja što veće produktivnosti, potrebno je odabrati odgovarajući način uzgoja te istražiti utjecaj pojedinih čimbenika na rast određene vrste mikroalge.

### 2.2.1. Svjetlost, salinitet i temperatura

Budući da stanice mikroalge koriste svjetlost kao izvor energije u procesu fotosinteze, s obzirom na intenzitet primijenjenog mikroalge mogu biti limitirane, zasićene i inhibirane sa svjetlošću. Problemi koji mogu biti vezani uz svjetlost odnose se na saznanje da se intenzitet svjetla smanjuje kako se povećava dubina sloja podloge za uzgoj, osobito kod većih optičkih gustoća kulture. Drugi problem predstavlja hidrodinamika kulture, odnosno kretanje stanica unutar medija koje mogu biti bliže, ali i dalje od izvora svjetla (Darvehei i sur., 2018). Određene vrste mikroalgi imaju sposobnost rasta u rasponu valnih duljina 400-700 nm. Kao što navode Al-Qasmi i suradnici (2012), za učinkovito provođenje procesa fotosinteze, potrebno je zadovoljiti režim tame/svjetla. Svjetlost ima važnu ulogu tijekom sinteze ATP-a i NADPH, dok se tijekom perioda tame odvijaju biokemijske reakcije odgovorne za sintezu esencijalnih molekula. Za fiksaciju jedne molekule CO<sub>2</sub> potrebno je 8 fotona, međutim ukoliko je protok fotona velik, moguće je da dođe do fotooštećenja stanice što u konačnici rezultira smanjenom fotosintetskom učinkovitošću. Period tame tu ima važnu ulogu jer tada dolazi do popravljivanja nastalih oštećenja (Gonçalves i sur., 2014). Uočeno je da povećani intenzitet svjetlosti i trajanje svjetlosnog perioda imaju utjecaj na povećanje udjela zasićenih masnih kiselina (SFA) te na smanjenje jednostruko nezasićenih (MUFA) i višestruko nezasićenih (PUFA) masnih kiselina u biomasi mikroalge (Al-Qasmi i sur., 2012).

Sljedeći čimbenik koji ima utjecaj na uzgoj kulture mikroalge jest salinitet. Razlikujemo morske, halofilne i halotolerantne mikroalge pri čemu različite vrste imaju različitu toleranciju prema visokoj slanosti. Salinitet može utjecati na uzgoj mikroalgi uzrokujući osmotski stres ili promjene u staničnim ionskim omjerima te može utjecati na unos ili gubitak iona što rezultira ionskim stresom (Darvehei i sur., 2018). Ukoliko se za uzgoj mikroalge koristi slana voda, potrebno je istražiti utjecaj saliniteta te postupnih ili naglih promjena u slanosti na rast mikroalge. Iako je brzina rasta mikroalgi veća na područjima s većim intenzitetom svjetlosti, postoji mogućnost većeg isparavanja vode što dovodi do

povećane razine slanosti. Ona može dovesti do stresnih uvjeta u stanici pri čemu takve stanice pojačano nakupljaju lipide, ali rastu sporije.

Temperatura predstavlja jedan od ključnih čimbenika koji utječe na rast mikroalge. Međutim, ona nije bitna samo radi izravnog učinka na rast već utječe i na pH vrijednost te apsorpciju plinova u medijima. Osim toga, ima utjecaj na kemijske reakcije i enzimske aktivnosti (Darvehei i sur, 2018). Temperaturno područje u kojem mikroalge mogu provoditi proces fotosinteze je između 15 i 30 °C, međutim optimalni uvjeti podrazumijevaju temperature između 20 i 25 °C. Ukoliko se prelaze više temperature od optimalnih, moguć je nagli pad brzine rasta koji je povezan s inaktivacijom enzima ili promjenom proteina koji su uključeni u procesu fotosinteze. Niže temperature od optimalnih ne predstavljaju tako veliki problem već mogu pozitivno utjecati na proces fotosinteze i stanične diobe (Ras i sur., 2013). Razlikujemo termofilne mikroalge koje mogu podnijeti temperature do 40 °C (*Chaetoceros* i *Anacystis nidulans*) te psihrofilne koji podnose temperature do 17 °C (*Asterionella formosa*). Temperatura ima utjecaj na proces fotosinteze djelujući na aktivnost enzima ribuloze-1,5-bisfosfata (Rubisco). Naime, kao što navode Ras i suradnici (2013) pri temperaturi većoj od 30 °C, afinitet CO<sub>2</sub> prema enzimu Rubisco je smanjen te postaje ograničavajući faktor fotosinteze što u konačnici može dovesti do smanjene proizvodnje biomase mikroalge. Nadalje, pri temperaturama iznad 40 °C može doći do proizvodnje reaktivnih kisikovih radikala koji onda mogu uzrokovati neravnotežna stanja unutar membrane i peroksidaciju masnih kiselina unutar stanice. Određene vrste mikroalgi, koje rastu pri povišenim temperaturama, imaju mogućnost popravka nastalih oštećenja proizvodnjom karotenoida.

### 2.2.2. pH vrijednost i izvor ugljika

Osim prethodno opisanih čimbenika, pH vrijednost i izvor ugljika također imaju važnu ulogu tijekom procesa uzgoja mikroalgi. Naime, oni su usko povezani budući da količina izvora ugljika u obliku CO<sub>2</sub> koji se otapa u podlozi, utječe na vrijednost pH na način da dolazi do njegovog smanjenja s povećanjem koncentracije CO<sub>2</sub> u podlozi. CO<sub>2</sub>, karbonat i bikarbonat neki su od mogućih anorganskih izvora ugljika koji se mogu naći otopljeni u kulturi pri čemu će rast kulture ovisiti o korištenom obliku izvora ugljika pošto ne doprinose svi jednako rastu. Najčešću primjenu pronalazi ugljikov dioksid, a u rijetkim slučajevima karbonat (Darvehei i sur., 2018). Osim anorganskog izvora ugljika, mikroalge imaju mogućnost korištenja i organskih pri čemu je glukoza preferirani izvor ugljika. Moguće je koristiti i saharozu, galaktozu, glicerol, ksilozu te glukonat (Chai i sur., 2020). Postoje određene mikroalge koje

su vrlo osjetljive na pH vrijednosti veće od 8,5 kao što su dijatomeje i veliki dinoflagelati, dok s druge strane postoje određene vrste koje mogu podnositi i pH vrijednosti veće od 9 (Difusa i sur., 2015). Međutim, najčešće se uzgoj mikroalgi provodi u rasponu pH vrijednosti 8,2 i 8,7, ali je moguć uzgoj i između 7 i 9 (Huang i sur., 2017).

Za odgovarajuće odvijanje fotosinteze, a time i za rast mikroalgi, važna je opskrba izvorom ugljika. Naime, u morskoj vodi čija je pH vrijednost oko 8,1, čak više od 90 % anorganskog izvora ugljika nalazi se u formi bikarbonata (White i sur., 2013). Bikarbonat ima veću topljivost od CO<sub>2</sub>, međutim ukoliko se koristi kao izvor ugljika, može doći do promjena u metaboličkoj učinkovitosti i biokemijskom sastavu. Korištenje CO<sub>2</sub> kao izvora ugljika može biti neučinkovito radi mogućeg gubitka u atmosferi, stoga se najčešće natrijev bikarbonat smatra održivom alternativom (Nunez i sur., 2015). Optimalna koncentracija CO<sub>2</sub> za uzgoj mikroalgi ovisi o korištenoj vrsti, ali je najčešće unutar raspona 2 i 15 %. Niska razina CO<sub>2</sub> onemogućuje željeni rast mikroalge, dok previsoka vrijednost može dovesti do oštećenja kloroplasta i ostalih organela (Chai i sur., 2020). Kao što navode White i suradnici (2013) u svome radu, dodatak anorganskog izvora ugljika može potaknuti povećanu potrebu za dušikom sa svrhom sinteze staničnih komponenti. Upravo zato sa povećanjem koncentracije anorganskog izvora ugljika, dolazi do povećanog sadržaja proteina unutar biomase mikroalge. Osim toga, podloge koje sadrže veću koncentraciju izvora ugljika utjecat će na rast mikroalge te nakupljanje lipida i pigmenta u njezinom sastavu biomase. S obzirom na prethodno navedena saznanja, sve je više istraživanja usmjereno na ispitivanje utjecaja dodatka različitih koncentracija izvora ugljika na rast i sastav biomase. Važnu ulogu tijekom uzgoja kulture mikroalge predstavlja i omjer izvora ugljika i izvora dušika (C:N). Ukoliko se uzgoj provodi u uvjetima koji predstavljaju stres za stanicu, dolazi do promjena koje rezultiraju manjim rastom i manjim sadržajem proteina pri čemu se suvišak ugljika iskorištava za skladištenje lipida i ugljikohidrata (Nunez i sur., 2015).

### 2.2.3. Nutrijenti

Rast mikroalgi zahtijeva određene hranjive tvari kao što su makronutrijenti i mikronutrijenti. Od makronutrijenata najviše se ističu fosfor i dušik, a osim njih još natrij, kalcij, kalij i magnezij. Za optimalan rast mikroalgi potrebni su i mikronutrijenati kao što su kobalt, molibden, željezo i mangan (Darvehei i sur., 2018). Fosfor ima važnu ulogu u stanici kao dio molekula pri čemu je fosfat dio okosnice nukleinskih kiselina DNA i RNA, ključnih makromolekula svih živih stanica. Osim toga, bitna je komponenta u energetskim



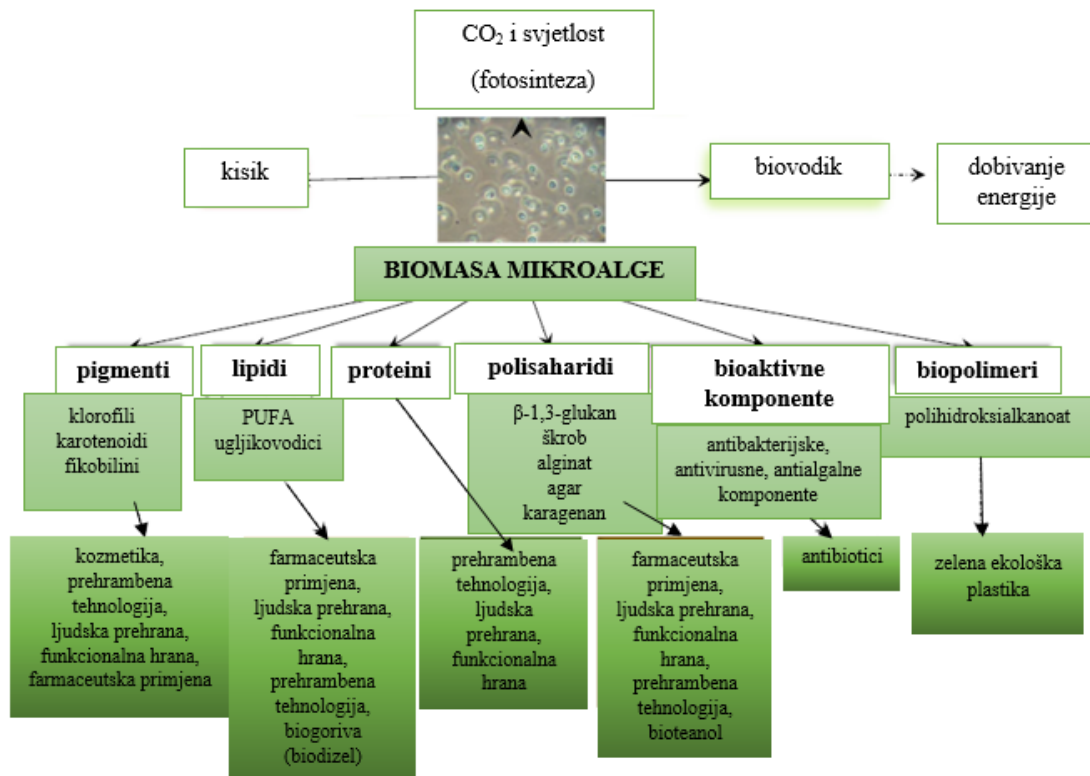
molekulama kao što su to ATP i GTP. U mediju s nedostatkom hranjivih stvari, u ovom slučaju fosfata, može doći do povećanog nakupljanja ugljikohidrata u biomasi mikroalge (El-Kassas, 2013), ali istovremeno do smanjenja udjela proteina i klorofila *a* (Olia i sur., 2020).

Preduvjet za rast i visok prinos biomase predstavlja i izvor dušika. Najčešće korišteni anorganski oblici izvora dušika su  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , a ponekad i  $\text{NO}_2^-$  pri čemu je nitrat termodinamički najstabilniji oblik i oksidira u vodenom okruženju (Chiranjeevi i Mohan, 2016). Dušik je glavna komponenta proteina, nukleotida i nukleinskih kiselina te klorofila. Iscrpljivanjem dušika iz podloge, povećava se omjer C:N pri čemu se povećava sadržaj lipida i ugljikohidrata (Finkel i sur., 2016). Budući da je u tim uvjetima ograničena sinteza spojeva koji sadrže dušik, dolazi do smanjenja udjela proteina, nukleinskih kiselina i klorofila. Ti su spojevi nužni za rast i diobu stanice mikroalge pa u tim uvjetima brzina rasta počinje ovisi o unutarstaničnoj koncentraciji izvora dušika (Griffiths i sur., 2013). Negi i suradnici (2016) navode da uzgoj mikroalgi u uvjetima s limitiranim izvorom dušika može rezultirati sporijim rastom što dovodi do nižih prinosa biomase i energije. Navedeni zaključak ne vrijedi za mali broj vrsta mikroalgi, između ostalog i za mikroalgu *Chlorella minutissima* koja može u takvim podlogama postići ekvivalentni rast onome u podlozi sa dodanim izvorom dušika.

### **2.3. PROIZVODI MIKROALGI I NJIHOV POTENCIJAL**

Upravo radi niza prednosti, mikroalge danas pronalaze sve češću primjenu u raznim područjima (slika 3). Komercijalno se mogu koristiti u prehrani ljudi i životinja (stočna hrana), sastojak su raznih kozmetičkih pripravaka te se koriste za ekstrakciju visoko vrijednih molekula. Mikroalge se vrlo često koriste u obliku prahova, tableta ili tekućine te je već proveden dodatak biomase mikroalgi u razne slatkiše, kruh, rezance te dodatak ekstrakta algi u pića (Liang i sur., 2004). U farmaceutskoj industriji primjenu pronalaze u sintezi raznih antivirusnih, antimikrobnih, antibakterijskih i antitumorskih lijekova (Rizwan i sur., 2018). Mikroalge mogu proizvoditi sterole koji se koriste u liječenju kardiovaskularnih bolesti. Nadalje, one sadrže  $\beta$ -glukan koji ima važnu ulogu u očuvanju imuniteta te smanjuje slobodne radikale i lipide u krvi. Važnu ulogu imaju u akvakulturi na način da poboljšavaju kvalitetu medija za uzgoj te smanjuju rast bakterija što u konačnici dovodi do boljeg preživljavanja (Bleakley i Hayes, 2017). Najčešće korištene mikroalge u prehrani ljudi pripadaju rodovima *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Aphanizomenon* i *Nostoc*. Konzumacija mikroalge *Spirulina* sp. pozitivno djeluje na imunološki sustav te poboljšava količinu bakterija mliječne kiseline u gastrointestinalnom traktu. *Chlorella* sp. se ističe radi velikog sadržaja proteina (51-58 %),

bogata je vitaminima i karotenoidima. Osim toga, zajedno sa mikroalgom iz roda *Arthrospira* koristi se u proizvodnji krema za sunčanje te proizvoda za njegu kose i lica. Od visoko vrijednih proizvoda koji mogu biti dobiveni uzgojem mikroalgi ističu se acetilne kiseline, agaroz, alginati, vitamin B, lutein itd. (Rizwan i sur., 2018). Osim njih, mikroalge imaju mogućnost nakupljanja proteina, ugljikohidrata, lipida i pigmenata.



**Slika 3.** Prikaz mogućeg iskorištenja biomase mikroalge te primjena njezinih proizvoda u raznim područjima (prema Koller i sur., 2014)

### 2.3.1. Proteini

Proteini su jedan od najvažnijih čimbenika rasta imajući važnu ulogu u strukturi i u metabolizmu stanica mikroalgi. Mikroalge predstavljaju izvor esencijalnih aminokiselina, stoga čestu primjenu pronalaze u prehrani ljudi. Kao što je već rečeno, najviše se ističu mikroalge iz rodova *Spirulina* i *Chlorella* koje mogu nakupljati čak do 70 % proteina u svojoj biomasi (Koyande i sur., 2019). Potrebno je provesti odgovarajuću obradu biomase mikroalge budući da celulozna stanična stijenka, koja čini oko 10 % biomase, predstavlja glavni problem u probavi biomase. Tijekom ekstrakcije proteina problem mogu predstavljati visok viskozitet i polisaharidi stanične stijenke kao npr. alginat u smeđim algama i karagenan u crvenim algama. Unatoč visokom sadržaju proteina, problem ugradnje algi u konvencionalnu hranu

predstavlja konzistencija osušene biomase u prahu, vrlo neugodan riblji miris te tamnozeleno boja radi koje proizvod ne izgleda privlačno. Prisustvo određenih aminokiselina razlikovat će se ovisno o vrsti mikroalge pa se tako metionin, lizin i cistein nalaze u vrlo niskim koncentracijama u smeđim algama te leucin i izoleucin u crvenim algama (Bleakley i Hayes, 2017).

### 2.3.2. Ugljikohidrati

Makromolekule koje imaju dvostruku ulogu u stanicama mikroalgi nazivamo ugljikohidrati. Jedna od uloga jest strukturna budući da su složeni polisaharidi dio stanične stijenke mikroalgi, a druga je skladišna pri čemu ugljikohidrati služe kao rezerva energije stanici (Barkia i sur., 2019). Pod pojmom ugljikohidrata podrazumijevamo monosaharide, oligosaharide i polisaharide, a smatraju se glavnim proizvodima dobivenim procesom fotosinteze i Calvinov-im ciklusom. Upravo polisaharidi mikroalgi pronalaze čestu primjenu kao dio kozmetičkih pripravaka. Nadalje, biomasa mikroalgi potencijalna je sirovina u proizvodnji biogoriva budući da ugljikohidrati mikroalgi u svome sastavu imaju manji sadržaj lignina (Chen i sur., 2013). Neke vrste mogu sadržavati i veće količine ugljikohidrata i to najčešće u obliku celuloze i topljivih polisaharida u staničnoj stijenci. U proizvodnji bioetanola, najučinkovitije su mikroalge koje u svom sastavu biomase sadrže glukozu, dok su glavni šećeri u smeđim algama glukan, manitol i alginat (Chen i sur., 2013). Vanjsku staničnu stijenku čine polisaharidi kao što su pektin, alginat i agar dok se unutarnji sloj stanične stijenke uglavnom sastoji od celuloze i drugih materijala kao što su hemiceluloza i glikoproteini. U radu Chen-a i suradnika (2013) navedeno je da najveći sadržaj ugljikohidrata imaju mikroalge iz roda *Chlorella* pri čemu *Chlorella vulgaris* može akumulirati 37-55 % u suhoj tvari biomase. Osim njih, mikroalge iz rodova *Scenedesmus* i *Chlamydomonas* imaju mogućnost nakupljanja velikog udjela ugljikohidrata pa se smatraju odgovarajućim sirovinama u proizvodnji bioetanola. Stanica ima mogućnost pojačanog nakupljanja ugljikohidrata u stresnim uvjetima koji najčešće podrazumijevaju iscrpljivanje izvora dušika u podlozi, promjenu pH vrijednosti i temperature, zračenje te dodatak CO<sub>2</sub>. Međutim, takav način uzgoja može dovesti do smanjenja produktivnosti biomase, stoga je potrebno pronaći rješenje kojim bi se akumulirale veće količine ugljikohidrata, ali bez negativnog utjecaja na rast biomase. Prema literaturi, veće koncentracije dodanog izvora ugljika imaju pozitivan učinak na nakupljanje ugljikohidrata u biomasi. Također, povećanje sadržaja ugljikohidrata može se postići uzgojem mikroalgi u podlozi s limitiranim izvorom dušika. Navedeni zaključak potvrđuje El-Kassas (2013) u svome radu, gdje je za mikroalgu *Picochlorum* sp.

vidljivo povećanje sadržaja ugljikohidrata za 44 % u podlozi bez dodanog  $\text{NaNO}_3$  u odnosu na podlogu koja je sadržavala  $40 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ .

### 2.3.3. Lipidi

Lipidi predstavljaju jedne od najvažnijih makromolekula unutar stanica mikroalgi. Razlikujemo nepolarne (rezervne) i polarne (strukturne) lipide pri čemu su nepolarni lipidi prvenstveno sastavljeni od triacilglicerola (TAG) predstavljajući skladište ugljika i energije, a strukturni lipidi od fosfolipida i glikolipida imajući važnu ulogu kao selektivno propusna membrana (Sharma i sur., 2012). Udio lipida u stanici ovisit će o vrsti korištene mikroalge, ali i o drugim uvjetima uzgoja kao što su faza rasta, intenzitet svjetlosti, salinitet, pH vrijednost, temperatura te dostupnost hranjivih tvari. Prema literaturi, sadržaj lipida u suhoj tvari biomase kreće se oko 5-20 % u optimalnim uvjetima uzgoja (Sharma i sur., 2012). Veći udio lipida (20-50 %) u suhoj tvari biomase moguće je postići u stresnim uvjetima (Barkia i sur., 2019). Kao što je već rečeno, limitacija izvorom dušika predstavlja mikroalgalnoj stanici stresne uvjete pri čemu uzgoj u takvoj podlozi dovodi do usmjeravanja prema sintezi lipida, ali i ugljikohidrata pri čemu je moguće njihovo konkurentsko djelovanje (Chen i sur., 2013). White i suradnici (2013) navode da se akumulacija lipida može potaknuti na dva načina. Jedan od njih podrazumijeva uzgoj mikroalgi u uvjetima ograničenih hranjivih tvari, a drugi način podrazumijeva dvostupanjski proces u kojem uzgoj započinje u podlogama s dostupnim hranjivim tvarima, nakon čega se uzgojena biomasa premješta u podlogu sa ograničenim hranjivim tvarima. Nedostatak izvora dušika dovodi do ograničenja sinteze proteina koji su bitni u proizvodnji biomase. Kako bi stanica to nadoknadila, ona iskorištava dostupne metaboličke puteve za anorgansko vezanje ugljika te sintetizira masne kiseline koje pohranjuje u obliku triacilglicerola. Osim navedenog mehanizma, potrebno je i objasniti da procesom fotosinteze nastaje ATP i NADPH koji predstavljaju skladište energije i nosače elektrona. Oni se troše tijekom proizvodnje biomase pri čemu nastaju ADP i  $\text{NADP}^+$  koji se regeneriraju u fotosustavu. Tijekom limitacije izvorom dušika dolazi do iscrpljivanja  $\text{NADP}^+$  i ADP-a uzrokovanog smanjenom proizvodnjom biomase. Budući da se procesom sinteze masnih kiselina troše ATP i NADPH, nadopunjuju se potrebni akceptor elektrona u obliku  $\text{NADP}^+$  te se de novo masne kiseline skladište u obliku lipida (Fields i sur., 2014).

Rezervni lipidi u svom sastavu sadržavaju pretežno zasićene masne kiseline iako je moguće da sadrže i nezasićene, dok strukturni lipidi imaju visok sadržaj višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA). Upravo PUFA ima važnu ulogu kao strukturna

komponenta stanične membrane, ali se smatra da ima i antioksidativno djelovanje pa može spriječiti stvaranje slobodnih radikala tijekom fotosinteze (Fields i sur., 2014). Palmitinska (C16:0), oleinska (C18:1 cis 9) i linolna (C18:2 cis 9,12) kiselina glavne su komponente biodizela. Naime, prema radu Dahmen-a i suradnika (2013), navedene masne kiseline čine čak 80 % ukupnih masnih kiselina *Picochlorum* sp. u optimalnim uvjetima uzgoja, stoga ona ima veliki potencijal u proizvodnji biodizela. U literaturnim navodima zabilježeno je da mikroalgu *Picochlorum* sp. karakterizira sljedeći profil masnih kiselina: 20-29 % zasićene masne kiseline (SFA), 34-62 % jednostruko nezasićene masne kiseline (MUFA) i 36-51 % višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) (Barten i sur., 2020).

#### 2.3.4. Pigmenti

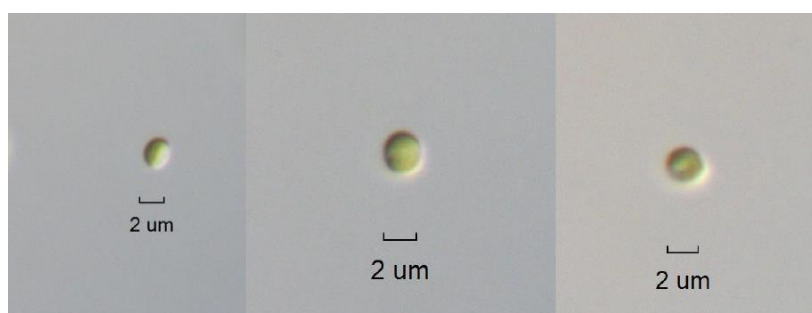
Pigmenti, kao jedan od proizvoda mikroalgi, imaju najveći potencijal u komercijalnoj uporabi u obliku raznih aditiva i bojila u hrani te u farmaceutskoj industriji. Ističu se radi nekoliko uloga kao što su fiksacija CO<sub>2</sub>, apsorpcija svjetlosti, zaštita stanica od oštećenja uzrokovanih prevelikom intenzitetom svjetlosti, a osim toga odgovorni su za određenu boju mikroalgi (Koller i sur., 2014). Pigmente mikroalgi možemo podijeliti na klorofile, karotenoide i fikobiline. Klorofili primjenu pronalaze kao bojilo u raznim namirnicama i pićima, a klorofil *a* česti je dodatak sredstvima osobne higijene. Nadalje, klorofile karakteriziraju antioksidativna i antikancerogena svojstva te mogu imati pozitivan učinak u oporavku jetre. Klorofilin (CHL) je dio klorofila pri čemu njegov dodatak prehrani može spriječiti daljnje napredovanje raka. U uvjetima nedostatka izvora dušika dolazi do razgradnje klorofila i tilakoidne membrane. U tom slučaju narušen je protok elektrona iz fotosustava u transportni lanac pri čemu nastaju reaktivni kisikovi radikali (ROS). Unatoč mogućem antioksidativnom djelovanju stanice, ROS u kombinaciji sa iscrpljenim izvorom dušika može dovesti do trajnog oštećenja stanice (Chai i sur., 2020). Od karotenoida najznačajniju ulogu ima β-karoten koji se vrlo često koristi u multivitaminskim dodacima i tabletama radi prisustva provitamina A. Osim toga, koristi se kao bojilo u maslacu, margarinu i siru (Koyande i sur., 2019).

### 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. Navedenu mikroalgu karakteriziraju zelene stanice jajolikog oblika veličine 2  $\mu\text{m}$  koje su prikazane na slici 4.



**Slika 4.** Mikroskopska slika stanice mikroalge *Picochlorum* sp. (povećanje 400  $\times$ )

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

U pripremi hranjivih podloga u ovom istraživanju korištene su kemikalije navedene u tablici 1.

**Tablica 1.** Prikaz svih korištenih kemikalija u pripremi 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

**Tablica 1.** Prikaz svih korištenih kemikalija u pripremi hranjive podloge- *nastavak*

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
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	-	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
Aceton	p.a., ≥ 99,9 %	Gram-Mol, Hrvatska
Etanol	p.a., 99,8 %	Lach-Ner, Češka
Folin-Ciocalteu reagens	-	Sigma-Aldrich, Švicarska
Natrijev hidroksid	p.a.	Merck, Njemačka
Natrijev karbonat	p.a.	Honeywell, Njemačka

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

Bakrov sulfat	p.a.	Alkaloid, Sjeverna Makedonija
Kalijev natrijev tartarat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Albumin goveđeg seruma	≥ 98 %	Sigma-Aldrich, SAD
Željezov (III) klorid heksahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
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

Pri uzgoju morskih algi, vrlo često se primjenjuje Guillard podoga koja je u ovom istraživanju korištena za pripremu inokuluma, kontrolne podloge i održavanje kulture (Guillard, 1975). Podloga je pripremljena tako da je najprije napravljena umjetna morska voda (eng. Artificial Seawater, ASW) prema sastavu navedenom u tablici 3, a potom su dodane ostale komponente f/2 podloge navedene u tablici 4. Sastav otopine elemenata u tragovima i otopine vitamina prikazan je u tablici 5. Pri optimizaciji omjera dušika i ugljika, podloga je pripremljena istim postupkom uz promjenu dodane količine izvora dušika i dodatak natrijevog bikarbonata kao anorganskog izvora ugljika. Ispitivani omjeri i odgovarajuće koncentracije dušika i natrijevog bikarbonata prikazane su u tablici 6. Sve ostale komponente f/2 podloge kao i sastav umjetne morske vode ostao je isti kao i u originalnoj, odnosno kontrolnoj podlozi.

**Tablica 3.** Sastav i koncentracije umjetne morske vode

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



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

Sastojak	Koncentracija (M)
NaNO <sub>3</sub>	8,82 · 10 <sup>-4</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	3,62 · 10 <sup>-5</sup>
Otopina elemenata u tragovima	1 mL L <sup>-1</sup> podloge
Otopina vitamina	1 mL L <sup>-1</sup> podloge

**Tablica 5.** Sastav i koncentracije ostalih komponenti f/2 podloge

Otopina elemenata u tragovima	1 mL L <sup>-1</sup> podloge
Element	Konačna koncentracija u podlozi (M)
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,17 · 10 <sup>-2</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	1,17 · 10 <sup>-2</sup>
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	9,10 · 10 <sup>-4</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	7,65 · 10 <sup>-5</sup>
CoCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	4,20 · 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,60 · 10 <sup>-5</sup>
Otopina vitamina	1 mL L <sup>-1</sup> podloge
Otopina vitamina	Konačna koncentracija u podlozi (M)
Tiamin x HCl (vitamin B <sub>1</sub> )	2,96 · 10 <sup>-4</sup>
Biotin (vitamin B <sub>7</sub> )	2,05 · 10 <sup>-6</sup>
Cijanokobalamin (vitamin B <sub>12</sub> )	3,69 · 10 <sup>-7</sup>

**Tablica 6.** Prikaz ispitivanih omjera te odgovarajućih koncentracija izvora dušika i izvora ugljika

	NaHCO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>
f/2 podloga	0 g L <sup>-1</sup>	0,88 mM
C:N=13,52 [mol mol <sup>-1</sup> ]	1 g L <sup>-1</sup> =11,9 mM	
C:N=27,05 [mol mol <sup>-1</sup> ]	2 g L <sup>-1</sup> =23,8 mM	
C:N=67,64 [mol mol <sup>-1</sup> ]	5 g L <sup>-1</sup> =59,52 mM	

### 3.1.5. Oprema i uređaji

#### 3.1.5.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (eng. *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).

#### 3.1.5.2. Sustav za plinsku kromatografiju (eng. *Gas Chromatography, GC*)

U provedbi analize sastava masnih kiselina u lipidima mikroalgi, korišten je uređaj za plinsku kromatografiju tvrtke Shimadzu GC-2010 Plus AF (Shimadzu, Kyoto, Japan). Njegov se sustav sastoji od nekoliko dijelova, a to su: automatski uzorkivač (AOC- 20 s), injektor (AOC- 20 i), peć, ZB-FAME kapilarna kolona (30 m, 0,25 mm i.d., 0,25 µm df; Phenomenex, SAD), plameno-ionizacijski detektor (eng. Flame-Ionization Detector, FID) i program za prikupljanje i obradu podataka GC Solutions.

#### 3.1.5.3. Ostali uređaji

Osim navedenih uređaja i osnovne potrebne laboratorijske opreme, u provedbi eksperimentalnog dijela ovog rada, korištena je aparatura koja je navedena u tablici 7.

**Tablica 7.** Ostala korištena oprema

Oprema	Model i proizvođač
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; Tehnica, Slovenija

**Tablica 7.** Ostala korištena oprema- *nastavak*

UV/Vis spektrofotometar	Cary 100; Agilent Technologies, SAD
Mikroskop	CH20; Olympus, Japan
Magnetska miješalica	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
Pumpa	MCP V5.17; Ismatec, Švicarska
Boca plina s dušikom	Messer Croatia Plin, Hrvatska
Hladnjak i zamrzivač	Bosch, Njemačka
Vodena kupelj	VK5ER; InkoLab, Hrvatska
CellDrop	DeNovix, SAD

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. 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. Pomoću magnetne miješalice ubrzalo se otapanje soli nakon čega 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 i 5. Navedene otopine su također sterilizirane pri 121 °C, a zatim dobro ohlađene osim otopine vitamina koja je sterilizirana filtracijom kroz sterilni celulozno acetatni filter veličine pora 0,2 µm. .

#### 3.2.2. Uzgoj inokuluma

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> i temperaturi od 20 °C, a početni pH iznosio je 8,8. Budući da se radi o fototrofnom uzgoju, mikroalga je osvijetljena toplom bijelom svjetlošću pri čemu su tikvice bile osvijetljene 12 h, a 12 h u mraku.

### 3.2.3. Optimiranje rasta pri različitim koncentracijama izvora dušika i ugljika

Ispitivanje utjecaja različitih koncentracija izvora dušika i ugljika, odnosno njihovog omjera na rast mikroalge *Picochlorum* sp., proveden je u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL (slika 5). Kao izvor dušika korišten je natrijev nitrat, a kao anorganski izvor ugljika korišten je natrijev bikarbonat. Pripremljena je otopina natrijevog bikarbonata koncentracije  $100 \text{ g L}^{-1}$  koja je zatim sterilizirana filtracijom kroz sterilni filter veličine pora  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ . Sterilizacija je provedena uz plamenike koristeći prethodno steriliziranu tikvicu od 500 mL. Kombiniranjem različitih koncentracija  $\text{NaNO}_3$  i  $\text{NaHCO}_3$ , ispitani su različiti omjeri ugljika i dušika. Eksperiment je proveden pri navedenim omjerima ugljika i dušika: C:N=13,52  $\text{mol mol}^{-1}$ , C:N=27,05  $\text{mol mol}^{-1}$  i C:N=67,64  $\text{mol mol}^{-1}$  pri čemu su pojedine koncentracije i dobiveni omjeri prikazani u tablici 6. Erlenmeyerove tikvice su sadržavale 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 soli i  $\text{NaHCO}_3$  (tablica 8). Izuzetak je bila kontrolna podloga u koju nije dodan natrijev bikarbonat. Uzgoj je nastavljen kroz 13 dana pri čemu je najčešće u rasponu od 24 do 48 h praćen broj stanica i optička gustoća kulture. Vrijednost pH hranjive podloge održavana je u području 6-8 pomoću 1 M NaOH. Nakon završetka uzgoja, izdvojenoj biomasi određen je sastav pomoću analiza koje će detaljno biti opisane u nastavku.

**Tablica 8.** Volumeni otopina i inokuluma u pripremi kontrolne podloge i podloga različitih omjera ugljika i dušika

	Otopina $\text{NaNO}_3$	Otopina $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	Otopina metala u tragovima	Otopina vitamina	Otopina $\text{NaHCO}_3$	Inokulum
<b>f/2 podloga</b>	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	X	20 mL
<b>C:N=13,52</b> <b>[mol mol<sup>-1</sup>]</b>	204 $\mu\text{L}$	204 $\mu\text{L}$	204 $\mu\text{L}$	102 $\mu\text{L}$	4 mL	20 mL
<b>C:N=27,05</b> <b>[mol mol<sup>-1</sup>]</b>	208 $\mu\text{L}$	208 $\mu\text{L}$	208 $\mu\text{L}$	104 $\mu\text{L}$	8 mL	20 mL
<b>C:N=67,64</b> <b>[mol mol<sup>-1</sup>]</b>	220 $\mu\text{L}$	220 $\mu\text{L}$	220 $\mu\text{L}$	110 $\mu\text{L}$	20 mL	20 mL



**Slika 5.** Aerobni uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. na tresilici (vlastita fotografija)

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

Drugi dio eksperimentalnog rada odnosio se na ispitivanje utjecaja limitacije izvorom dušika na rast i sastav biomase, a proveden je uzgojem u dvije faze. Prvi dio uzgoja proveden je u podlozi s omjerom C:N=13,52 mol mol<sup>-1</sup> pri čemu je uzgoj vođen do kasne eksponencijalne faze rasta. Na isti je način proveden uzgoj u kontrolnoj podlozi koja nije sadržavala izvor ugljika. Prethodno uzgojena biomasa mikroalge narasla u kontrolnoj podlozi i u podlozi s omjerom C:N=13,52 mol mol<sup>-1</sup>, izdvojena je centrifugiranjem i resuspendirana u svježju f/2 podlogu bez izvora dušika (NaNO<sub>3</sub>) uz dodatak NaHCO<sub>3</sub>. Na taj je način započeo drugi dio uzgoja mikroalge s ciljem ispitivanja utjecaja različitih koncentracija natrijevog bikarbonata na sastav biomase, u uvjetima limitacije izvorom dušika. Pri tome su ispitane koncentracije 1 g L<sup>-1</sup> i 2 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, a svi eksperimenti su provedeni u tri paralele.

#### 3.2.5. Analitičke metode

##### 3.2.5.1. Mjerenje optičke gustoće kulture

Rast biomase mikroalge tijekom uzgoja, praćen je mjerenjem optičke gustoće kulture na valnoj duljini od 540 nm. Uzorak kulture (2 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 linearosti, odnosno u rasponu od 0,1 do 1.

#### 3.2.5.2. *Određivanje brojčane koncentracije stanica u CellDrop uređaju*

Rast stanica mikroalge, osim određivanjem optičke gustoće kulture, praćen je i mjerenjem broja stanica u jedinici volumena podloge (broj stanica mL<sup>-1</sup> podloge). CellDrop uređaj i program Brightfield korišteni su za određivanje brojčane koncentracije, ali i veličine stanica. Prije samog korištenja uređaja, potrebno je otpipetirati u komoru 15 μL etanola pod kutem od 45° i pobrisati čistom maramicom te nakon toga pipetirati 10 μL prethodno razrijeđene suspenzije stanica.

#### 3.2.5.3. *Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase*

Koncentracija biomase na kraju uzgoja određena je gravimetrijskom metodom. Uzorci su centrifugirani u čistim kivetama, prethodno osušenim do konstantne mase pri 100 °C te izvaganim nakon hlađenja. Određeni volumen kulture je centrifugiran na 8000 okretaja min<sup>-1</sup> 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. Ponovno je uzorak 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 [1]:

$$\gamma = \frac{m_2 - m_1}{V} [g L^{-1}] \quad [1]$$

gdje je:

m<sub>2</sub>- masa izvagane kivete sa biomasom nakon sušenja [g]

m<sub>1</sub>- masa izvagane kivete prije sušenja biomase [g]

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

#### 3.2.5.4. *Određivanje koncentracije nutrijenata*

Na kraju provedenog uzgoja odredila se koncentracija nitrata i fosfata. Analiza navedenih nutrijenata provedena je u supernatantu koji je izdvojen centrifugiranjem kulture mikroalge.

#### *3.2.5.4.1. Određivanje koncentracije nitrata u podlozi*

Za navedenu analizu korišten je kit (Merck, Njemačka) na način da je u suhu kivetu od 14 mL otpipetirano 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 apsorbancija 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 g L<sup>-1</sup> u demineraliziranoj vodi. Koncentracije dušika bile su u rasponu od 1 mg L<sup>-1</sup> do 25 mg L<sup>-1</sup>. Na temelju izmjerenih apsorbancija otopina poznatih koncentracija, izrađen je baždarni pravac koji se nalazi u Prilogu 7.1.

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

Za određivanje koncentracije fosfata korišten je kit (Merck, Njemačka) pri čemu je u 5 mL uzorka dodano 5 kapi reagensa PO<sub>4</sub>-1. Sadržaj kivete je dobro izmiješan te je dodana jedna mikrožličica reagensa PO<sub>4</sub>-2. Reakcijsko vrijeme je iznosilo 5 minuta nakon čega je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 690 nm. Za izradu baždarnog pravca korišteni su standardi pripremljeni razrjeđivanjem otopine natrijevog dihidrogenfosfata monohidrata koncentracije 1 g L<sup>-1</sup> u demineraliziranoj vodi. Koncentracije fosfatnih iona bile su u rasponu od 0,05 mg L<sup>-1</sup> do 2,5 mg L<sup>-1</sup>. Baždarni pravac izrađen je na temelju izmjerenih apsorbancija otopina poznatih koncentracija fosfata te je prikazan u Prilogu 7.2.

#### *3.2.5.5. Određivanje sastava pigmenata u biomasi mikroalgi*

Za određivanje sastava pigmenata u biomasi mikroalgi najprije je provedena ekstrakcija iz vlažne biomase mikroalgi, a zatim je spektrofotometrijski određena koncentracija klorofila. Za provođenje ekstrakcije korišten je 90 %-tni v v<sup>-1</sup> aceton, a mehaničko razbijanje stanica mikroalgi provedeno je korištenjem staklenih kuglica promjera 0,40-0,60 mm (B. Braun Biotech International GmbH, Njemačka). Prethodno je centrifugirano 10 mL stanične kulture nakon čega je supernatant odbačen, a zaostalom talogu biomase dodano je 2 g staklenih kuglica i 2 mL 90 %-tnog v v<sup>-1</sup> acetona. Prilikom provođenja ekstrakcije, kivete su bile omotane aluminijskom folijom kako bi se spriječio raspad fotosenzitivnih pigmenata uslijed izlaganja svjetlosti. Suspenzija je naizmjenično vorteksirana dva do tri puta, a dobiveni supernatant je prebačen u čistu kivetu uz obavezno hlađenje na ledu. Preostala biomasa ponovno je podvrgnuta procesu ekstrakcije sve do postizanja

potpunog obezbojenja. Broj koraka ekstrakcije se bilježio, a supernatanti nakon svakog koraka ekstrakcije, pridodani su početnom supernatantu.

Koncentracija pigmentata klorofila *a*, *b* i *c*, koji su prethodno ekstrahirani iz biomase mikroalgi, određena je prema metodi koja je definirana u radu Jeffrey-a i Humphrey-a (1975). Dobivenim ekstraktima, određene su apsorbancije pri valnim duljinama od 630 nm, 647 nm, 664 nm i 750 nm. Na temelju dobivenih vrijednosti izračunata je koncentracija fotosintetskih pigmentata [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ] za svaki uzorak koristeći slijedeće jednadžbe [2], [3] i [4] :

$$\text{klorofil } a = \frac{[11,85 \cdot (\text{OD}_{664} - \text{OD}_{750}) - 1,54 \cdot (\text{OD}_{647} - \text{OD}_{750}) - 0,08 \cdot (\text{OD}_{630} - \text{OD}_{750})] \cdot V_e}{L \cdot V_f} \quad [2]$$

$$\text{klorofil } c = \frac{[-1,67 \cdot (\text{OD}_{664} - \text{OD}_{750}) + 7,6 \cdot (\text{OD}_{647} - \text{OD}_{750}) + 24,52 \cdot (\text{OD}_{630} - \text{OD}_{750})] \cdot V_e}{L \cdot V_f} \quad [3]$$

$$\text{klorofil } b = \frac{[-5,43 \cdot (\text{OD}_{664} - \text{OD}_{750}) + 21,03 \cdot (\text{OD}_{647} - \text{OD}_{750}) - 2,66 \cdot (\text{OD}_{630} - \text{OD}_{750})] \cdot V_e}{L \cdot V_f} \quad [4]$$

gdje je:

L- duljina puta svjetlosti kroz uzorak [cm]

$V_e$ - ukupan volumen ekstrakta [mL]

$V_f$ - volumen stanične kulture koji je uzet za ekstrakciju [L].

### 3.2.5.6. 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.

Na temelju prethodno gravimetrijski određene koncentracije, izračunat je volumen podloge koja sadrži 100  $\mu\text{g}$  suhe tvari biomase mikroalgi. Dobiveni volumen podloge dodan je 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. Baždarni pravac je izrađen na temelju izmjerenih apsorbancija uzoraka poznatih koncentracija proteina (Prilog 7.3). Udio proteina u suhoj tvari biomase mikroalgi određen je prema jednadžbi [5]:

$$\text{udio proteina u s. t. biomase} = \frac{m_p}{x_{grav} \cdot V_{pp}} \cdot 100 [\%] \quad [5]$$

gdje je:

$m_p$ - masa proteina [mg]

$x_{grav}$ - koncentracija biomase određena gravimetrijskom analizom [ $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$ ]

$V_{pp}$ - volumen podloge [ $\mu\text{L}$ ].

**Tablica 9.** Potrebne otopine 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.

### 3.2.5.7. Određivanje ukupnih ugljikohidrata u biomasi mikroalgi

Analiza i kvantifikacija monosaharida u kiselinskim hidrolizatima biomase mikroalgi, određena je metodom NREL-a (eng. 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 vialne volumena 10 mL i zabilježeno. Biomasi je potom dodano 250  $\mu\text{L}$  72 % w w<sup>-1</sup> sumporne kiseline uz miješanje. Vialne 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 vialne 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 pripravljena 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, D-glukuronske kiseline i fukoze, izračunata je koncentracija najzastupljenijih monosaharida u hidrolizatima biomase. Baždarni dijagrami prikazani su u Prilogu 7.4. Udio pojedinih monosaharida u biomasi ( $w_m$ ) izračunat je prema jednadžbi [6]:

$$w_m = \frac{\gamma_m \cdot V_h}{m_x} \cdot 100 \quad [\%] \quad [6]$$

gdje je:

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

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

$m_x$ - masa biomase [mg].

#### 3.2.5.8. *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 (Prilog 7.5.). Udio lipida izračunat je kao omjer mase lipida i mase biomase prema jednadžbi prikazanoj u nastavku [7]:

$$w_1 = \frac{m_l}{m_x} \cdot 100 \quad [\%] \quad [7]$$

gdje je:

$m_l$  – masa lipida [mg]

$m_x$  – masa biomase [mg]

$w_1$  – udio lipida u biomasi [%].

Za određivanje udjela lipida, prethodno je potrebno odrediti masu biomase. Masa biomase određena je na temelju poznate optičke gustoće i broja stanica  $\text{mL}^{-1}$  te baždarnog pravca ovisnosti  $\text{OD}_{540}$  o koncentraciji stanica / masi biomase. Korištena je jednadžba pravca [8]:

$$\text{OD}_{540} = 2 \cdot 10^8 \gamma + 10^7 \quad [8]$$

pri čemu je dobivena vrijednost koncentracije pomnožena sa volumenom uzetim u analizu. Navedeni baždarci zajedno sa jednadžbama pravca prikazani su u Prilogu 7.6.

### 3.2.5.9. *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). Priprema otopina standarda prethodila je pripremi uzoraka. Sto miligrama metil tridekanoata otopljeno je u 10 mL heksana pri čemu je dobiven standard metil tridekanoata (C13:0ME) koncentracije 10 mg  $\text{mL}^{-1}$ . Drugi standard pripremljen je otapanjem 10 mg pentadekana u 1 mL heksana. Dobiveni standard razrijeđen je s heksanom u omjeru 1:10 (100  $\mu$ L pripremljenog standarda i 900  $\mu$ L 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. Epruvete su čvrsto zatvorene teflonskim čepom i nakon miješanja sadržaja na vibromikseru stavljene su u vodenu kupelj 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 sadržaj dobro vorteksiran kroz 60 sekundi. Uzorci su ostavljeni kroz 1-4 sata 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 masenim detektorom (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 sa standardnom smjesom 37 masnih kiselina (smjesa F.A.M.E C4-C24) (eng. Fatty Acid Methyl Esters). Dobivene koncentracije metilnih estera masnih kiselina, izražene su masenim udjelom [%] pojedine masne kiseline u uzorku, prema količini internog standarda C13:0ME. Prilikom izračuna korištene su jednadžbe [9] i [10]:

$$m_{\text{FAME}_{\text{C13 norm}}} = \frac{\gamma_{\text{Ci}}}{\gamma_{\text{C13}}} \cdot m_{\text{C13}} \quad [9]$$

$$w_{\text{ci/s.tv.}} = \frac{m_{\text{FAME}_{\text{C13 norm}}}}{m_{\text{s.tv.}}} \cdot 100 \quad [\%] \quad [10]$$

gdje je:

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

$\gamma_{\text{ci}}$  - koncentracija metilnog estera masne kiseline [mg L<sup>-1</sup>]

$\gamma_{\text{C13}}$  - koncentracija standarda metil tridekanoata (C13) [mg L<sup>-1</sup>]

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

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

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

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Kao što je već poznato, mikroalge su mikroskopski jednostanični organizmi koji se primjenjuju u raznim industrijama (Rizwan i sur., 2018). Primjenu pronalaze u prehrambenoj industriji kao hrana za ljude i životinje, u farmaceutskoj industriji, a danas se sve više istražuje i mogućnost korištenja kao sirovine u proizvodnji biogoriva (de la Vega i sur., 2011). Osim toga, brojne vrste mikroalgi imaju mogućnost nakupljanja staničnih sastojaka kao što su lipidi, ugljikohidrati, proteini i drugi bioaktivni spojevi (Koyande i sur., 2019). Upravo sa tim saznanjem, u ovom je istraživanju kao radni mikroorganizam korištena mikroalga *Picochlorum* sp. Navedenu morsku mikroalgu karakterizira mogućnost prilagodbe i rasta u nepovoljnim uvjetima, mala veličina (1,5-3  $\mu\text{m}$ ), brz rast te manji genom (Goswami i sur., 2021). Cilj ovog rada bilo je poboljšanje rasta i prinosa biomase tijekom fototrofnog uzgoja *Picochlorum* sp. pri čemu istraživanje možemo podijeliti u dva dijela.

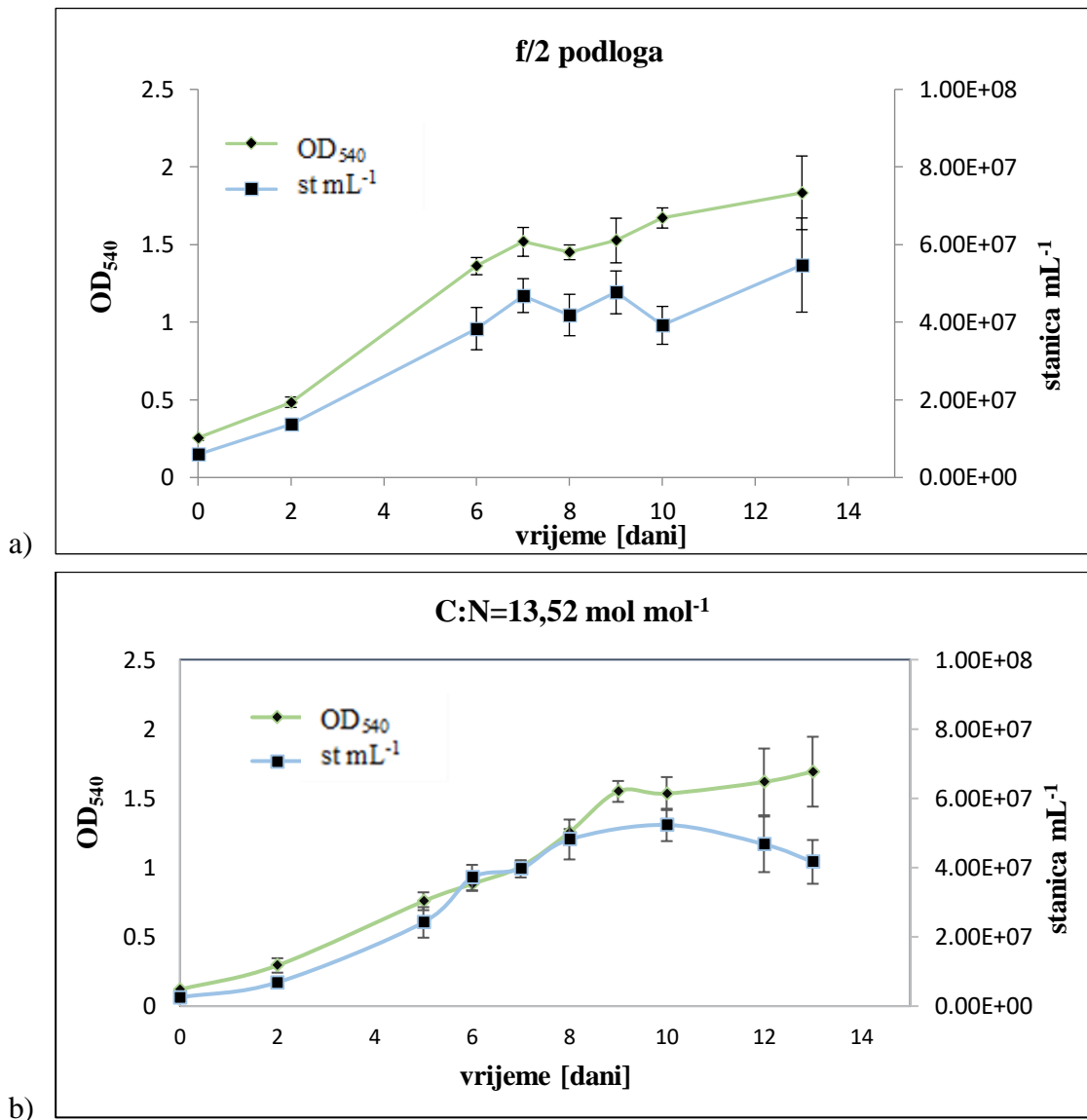
U prvom dijelu eksperimentalnog rada želio se istražiti utjecaj različitih omjera ugljika i dušika na rast biomase te na njezin sastav. Kako bi se dobio različit molarni omjer izvora C i N, korištene su različite koncentracije  $\text{NaHCO}_3$  kao izvora ugljika i  $\text{NaNO}_3$  kao izvora dušika. Drugi dio istraživanja proveden je s ciljem ispitivanja utjecaja limitacije izvorom dušika koji zapravo predstavlja mikroalgi stresne uvjete. Istraživanje je provedeno na način da je odabrana optimalna koncentracija  $\text{NaHCO}_3$  prema dobivenim rezultatima iz prvog dijela istraživanja te je u takvoj podlozi uzgajana mikroalga, ali bez dodanog izvora dušika. U svim eksperimentima, rast mikroalge praćen je različitim metodama kako bi se utvrdila kinetika rasta, a određeni su i udjeli proteina, lipida, ugljikohidrata i pigmenata te sastav masnih kiselina. Dobiveni rezultati navedeni su u nastavku ovog rada.

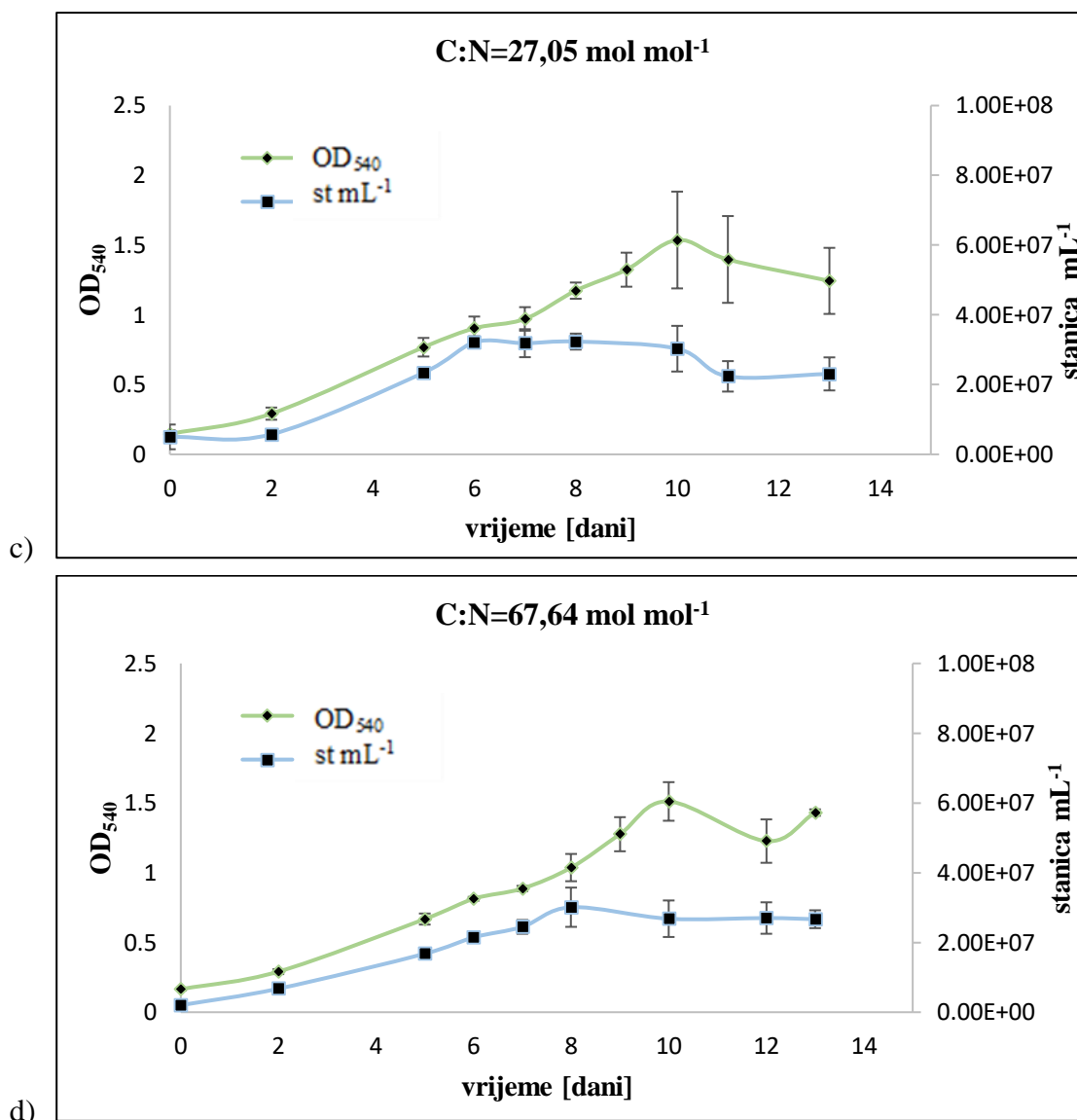
### 4.1. UČINAK C:N OMJERA NA RAST I SASTAV BIOMASE MIKROALGE

#### 4.1.1. Šaržni uzgoj mikroalge uz dodatak natrijevog bikarbonata

Imajući na umu mogućnost poboljšanog rasta i prinosa biomase mikroalgi korištenjem veće koncentracije nutrijenata (Chiranjeevi i Mohan, 2016), uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. proveden je pri različitim koncentracijama anorganskog izvora ugljika. Natrijev bikarbonat korišten je kao izvor ugljika u koncentracijama 1 g L<sup>-1</sup>, 2 g L<sup>-1</sup> i 5 g L<sup>-1</sup> (omjeri ugljika i dušika navedeni u tablici 6). Eksperimenti su provedeni u tri paralele za istraživane omjere C:N i kontrolu (f/2 podloga).

Jedan od ciljeva ovog eksperimentalnog dijela rada odnosio se na praćenje kinetike rasta mikroalge *Picochlorum* sp. Ona podrazumijeva određivanje optičke gustoće stanične kulture te broja stanica po mililitru tijekom vremena uzgoja. Kao što navode Lee i suradnici (2015), krivulju rasta mikroalgi karakterizira nekoliko faza: lag faza ili faza prilagodbe, log faza ili eksponencijalna faza rasta (konstantna brzina rasta), faza usporenog rasta, stacionarna faza i u konačnici faza odumiranja. Na temelju dobivenih rezultata, izrađene su krivulje rasta koje su prikazane na slici 6.





**Slika 6.** Promjene optičke gustoće i brojčane koncentracije stanica tijekom uzgoja pri različitim C:N omjerima mol mol<sup>-1</sup> a) kontrola (f/2 podloga), b) C:N=13,52 mol mol<sup>-1</sup>, c) C:N=27,05 mol mol<sup>-1</sup>, d) C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup>

U kontrolnom je uzgoju do 7. dana uočen rast stanica, nakon čega je uslijedio blagi pad i potom ponovni porast koncentracije stanica, a s time i povećanje optičke gustoće kulture. Vrijednosti OD<sub>540</sub> prate rast stanica uz manja odstupanja desetog dana. Uzgoj je prekinut 13. dana prije nego što su stanice mikroalge ušle u fazu odumiranja. Krivulja rasta kod omjera C:N=13,52 mol mol<sup>-1</sup> pokazuje nešto manji broj stanica po mililitru u odnosu na kontrolnu podlogu pri čemu je i dobivena vrijednost OD<sub>540</sub> bila nešto manja. Desetog dana u podlozi C:N=13,52 mol mol<sup>-1</sup> dobivena je maksimalna vrijednost koncentracije stanica 5,23·10<sup>7</sup> st mL<sup>-1</sup> te je ona neznajno niža u odnosu na maksimalnu vrijednost 5,29·10<sup>7</sup> stanica po mililitru u kontrolnoj podlozi u istraživanju koje su proveli Haji Abolhasani i suradnici

(2018). U tom je istraživanju kao radni mikroorganizam korištena mikroalga *Picochlorum* sp. RCC486 pri čemu se zabilježeni rezultat odnosi na broj stanica u Guillard f/2 podlozi. Na slici 6 (b) vidljivo je i odumiranje stanica nakon 10. dana uzgoja iako je optička gustoća kulture i dalje rasla. Uzgojem u hranjivoj podlozi s omjerom C:N=27,05 mol mol<sup>-1</sup> zabilježena je značajno manja koncentracija stanica u odnosu na kontrolnu podlogu i podlogu s omjerom C:N=13,52 mol mol<sup>-1</sup>. Između 6. i 8. dana broj stanica mL<sup>-1</sup> nije značajno rastao, odnosno vidljiva je stacionarna faza nakon koje je uslijedilo njihovo odumiranje. Najmanji broj stanica i optička gustoća kulture dobiveni su kod omjera C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup> iako nije značajna razlika u odnosu na C:N=27,05 mol mol<sup>-1</sup>.

Uzevši u obzir dobivene rezultate srednjih vrijednosti, optička gustoća kulture bila je najviša u kontrolnoj podlozi, a najmanja u podlozi sa C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup>. Postoji jako mala razlika u rezultatima OD<sub>540</sub> u kontrolnoj podlozi i podlozi s omjerom C i N=13,52 mol mol<sup>-1</sup>. Najveća srednja vrijednost brojčane koncentracije stanica određena je u kontrolnoj podlozi (3,61·10<sup>7</sup>), a najmanja u podlozi sa C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup> (2,02·10<sup>7</sup>). Prema navedenim rezultatima, vidljivo je da vrijednosti optičke gustoće kulture prate rast stanica, iako na pojedinačnim krivuljama rasta možemo vidjeti malo odstupanje. Uzgoj je prekinut u stacionarnoj fazi rasta kako bi se spriječilo odumiranje stanica do kojeg najčešće dolazi radi iscrpljivanja nutrijenata, promjene pH vrijednosti, kontaminacije ili pregrijavanja (Lee i sur., 2015). Nakon završenog uzgoja, izdvojena biomasa iskorištena je za provođenje daljnjih analiza.

Biomasa mikroalgi ima veliku važnost u akvakulturi, prehrani životinja, ali i ljudi, budući da sadrži visoko vrijedne spojeve koji se koriste kao nutraceutici i dijetetski dodaci prehrani (de la Vega i sur., 2011). Na kraju provedenog uzgoja, koncentracija biomase određena je gravimetrijskom metodom (Poglavlje 3.2.4.3.) U tablici 10 prikazani su dobiveni rezultati koncentracije biomase i pripadajuća standardna devijacija. Prema rezultatima, vidljivo je da je najveća koncentracija biomase od 0,7561 g L<sup>-1</sup> zabilježena kod omjera C:N=27,05 mol mol<sup>-1</sup>. Međutim, kod C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup> dobivena je najmanja koncentracija biomase od 0,2839 g L<sup>-1</sup> koja je za 49 % manja od one zabilježene u kontrolnoj podlozi.



**Tablica 10.** Koncentracija i produktivnost biomase pri različitim omjerima ugljika i dušika

	f/2 podloga	C:N=13,52 [mol mol <sup>-1</sup> ]	C:N=27,05 [mol mol <sup>-1</sup> ]	C:N=67,64 [mol mol <sup>-1</sup> ]
X [g L <sup>-1</sup> ] ( $\pm\sigma$ )	0,5583 ( $\pm 0,18$ )	0,6566 ( $\pm 0,04$ )	0,7561 ( $\pm 0,13$ )	0,2839 ( $\pm 0,03$ )
Pr <sub>x</sub> [g L <sup>-1</sup> dan <sup>-1</sup> ]	0,0429	0,0505	0,0582	0,0218

Zhu i Dunford (2013) pratili su rast mikroalge *Picochlorum oklahomensis*, a koncentracije biomase su iznosile i do 2,1 g L<sup>-1</sup>. U spomenutom radu dobivena je značajno veća vrijednost koncentracije biomase nego što je postignuto u ovom istraživanju. Naime, oni navode da je za postizanje maksimalne koncentracije biomase bilo potrebno oko 18 dana uzgoja dok je u ovom istraživanju analiza provedena po završetku 13. dana uzgoja. Osim toga, način uzgoja *Picochlorum oklahomensis* provodio se 12 sati na svjetlu uz aeraciju i potom 12 sati u mraku bez aeracije. Aeracija se općenito provodi sa ciljem otapanja CO<sub>2</sub> iz zraka u podlogu, međutim u našem je istraživanju sa tom svrhom korišten natrijev bikarbonat. I u jednom i drugom istraživanju upotrijebljene su podloge jednakog sastava pri čemu je jedino značajnija razlika u koncentraciji CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O. Prema literaturnim navodima, potrebno je svakodnevno praćenje koncentracije biomase kako bi se moglo uočiti u kojem trenutku se postiže maksimalna vrijednost. U tom je trenutku potrebno izdvojiti biomasu kako u konačnici ne bi došlo do smanjenja mase. Koncentracija biomase zelene mikroalge *Nannochloropsis* sp. prema istraživanju Zhu i Dunford (2013) postiže vrijednost između 0,8 i 3,8 g L<sup>-1</sup>. De la Vega i suradnici (2011) u svome istraživanju navode da je u eksponencijalnoj fazi rasta tijekom uzgoja *Picochlorum* sp. HM1 koncentracija biomase 1,8 g L<sup>-1</sup>. Rezultat koncentracije biomase 0,68 g L<sup>-1</sup> zabilježen je u kontrolnoj podlozi tijekom uzgoja mikroalge *Picochlorum* sp. (Moussa i sur., 2019) dok je u ovom istraživanju dobivena nešto malo niža vrijednost (0,5583 g L<sup>-1</sup>).

Na temelju rezultata koncentracije biomase dobivene na kraju uzgoja, izračunata je produktivnost biomase (tablica 10). U kontrolnoj podlozi njezina je vrijednost iznosila 0,0429 g L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup> i bila je nešto niža u odnosu na rezultat 0,0580 g L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup> dobiven u radu Haji Abolhasani i sur. (2018). U navedenom radu provedeno je istraživanje u kojem je proučen utjecaj triju različitih podloga na rast i proizvodnju biomase *Picochlorum* sp. RCC486.

Usporedba produktivnosti biomase odnosila se na rezultate dobivene u kontrolnoj Guillard podlozi. Maksimalna produktivnost biomase ovog eksperimentalnog rada iznosi  $0,0582 \text{ g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$  u podlozi C:N=27,05 mol mol<sup>-1</sup>. Naime, treba uzeti u obzir da će se dobivene vrijednosti razlikovati ovisno o vrsti mikroalge, o sastavu medija, ali i o različitim uvjetima rasta kao što su svjetlosti, temperatura, miješanje, pH vrijednost i čistoća kulture (Rizwan i sur., 2018).

Dušik i fosfor su dva osnovna makronutrijenta u f/2 podlozi koji presudno utječu na rast i sastav biomase zelenih mikroalgi. Bitno je osigurati pogodan izvor dušika zato što je dušik sastavna komponenta proteina, peptida, klorofila, ATP molekule, DNK i RNA, ali i drugih staničnih sastojaka (Chiranjeevi i Mohan, 2016). Određene vrste mikroalgi mogu kao izvor dušika koristiti nitrate, nitrite, ureu i amonijak. Fosfor je također jedan od esencijalnih hranjivih sastojaka jer je dio energetske bogatih molekula u stanicama, fosfolipida i nukleinskih kiselina. Niže koncentracije fosfora mogu imati utjecaj na promjenu sastava lipida, međutim koncentracija fosfora ipak ne smije biti preniska (Chai i sur., 2020). Osim toga, važno je osigurati optimalnu koncentraciju ovih nutrijenata kako bi se postigla veća produktivnost.

Upravo radi navedene uloge izvora dušika i izvora fosfora, koncentracija ovih nutrijenata određivana je tijekom uzgoja te je određena brzina njihove potrošnje. Kao izvor dušika, u podlogu je dodan NaNO<sub>3</sub>, a kao izvor fosfora NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O. Prema rezultatima iz tablice 11 vidljivo je da je najviše nitrata potrošeno u podlozi C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup> (10,9562 mg L<sup>-1</sup>), a najmanje u kontrolnoj podlozi (9,4835 mg L<sup>-1</sup>). Što se tiče fosfata, najveći utrošak je zabilježen u podlozi C:N=13,52 mol mol<sup>-1</sup> (3,4028 mg L<sup>-1</sup>), a najmanji u kontrolnoj podlozi (2,4006 mg L<sup>-1</sup>). White i suradnici (2013) u svome su radu istraživali utjecaj različitih koncentracija natrijevog bikarbonata tijekom uzgoja *Nannochloropsis salina* i *Tetraselmis suecica*. Između ostalog, određene su koncentracije nutrijenata u stacionarnoj fazi, a zaključeno je da je izvor fosfora na kraju uzgoja potpuno iscrpljen kada je njegova koncentracija u podlozi manja od 3 μM. Na temelju dobivenih rezultata, možemo uočiti da je potrošnja nutrijenata velika te da u skladu s literaturnim navodima, iskoristivost nitrata u podlozi raste s povećanjem koncentracije dodanog bikarbonata. Razlog tome može biti povećana brzina sinteze staničnih sastojaka tj. veća brzina rasta u prisustvu veće koncentracije izvora ugljika (White i sur., 2013).

**Tablica 11.** Koncentracije nutrijenta na kraju uzgoja i brzina potrošnje pri različitim C:N omjerima

	<b>N-NO<sub>3</sub></b> [mg L <sup>-1</sup> ] ( $\pm\sigma$ )	<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b> [mg L <sup>-1</sup> ] ( $\pm\sigma$ )	<b>Potrošnja</b> <b>N-NO<sub>3</sub></b> [mg L <sup>-1</sup> ]	<b>Potrošnja PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b> [mg L <sup>-1</sup> ]
<b>f/2 podloga</b>	2,8425 ( $\pm$ 1,74)	1,0186 ( $\pm$ 0,40)	9,4835 ( $\pm$ 1,74)	2,4006 ( $\pm$ 0,40)
<b>C:N=13,52</b> [mol mol <sup>-1</sup> ]	1,6244 ( $\pm$ 1,26)	0,0374 ( $\pm$ 0,01)	10,7016 ( $\pm$ 1,26)	3,4028 ( $\pm$ 0,30)
<b>C:N=27,05</b> [mol mol <sup>-1</sup> ]	1,5187 ( $\pm$ 1,17)	0,6432 ( $\pm$ 0,31)	10,8073 ( $\pm$ 1,17)	2,9330 ( $\pm$ 0,40)
<b>C:N=67,64</b> [mol mol <sup>-1</sup> ]	1,3700 ( $\pm$ 0,93)	0,2991 ( $\pm$ 0,17)	10,9562 ( $\pm$ 0,93)	3,1198 ( $\pm$ 0,15)

#### 4.1.2. Sastav biomase mikroalge

Primjenom različitih metoda analiziran je sastav biomase, odnosno određen je sadržaj proteina, lipida, ugljikohidrata i pigmenata u biomasi.

Mikroalge predstavljaju jedan od mogućih izvora proteina pa se kao takve koriste u obliku raznih prahova i tableta. Jedan od primjera jest mikroalga *Spirulina* sp. čija biomasa može sadržavati čak do 70 % proteina (Koyande i sur., 2019). Metodom po Lowryju određen je udio ukupnih proteina u biomasi *Picochlorum* sp. Prema dobivenim rezultatima iz tablice 12, možemo uočiti da je udio proteina bio u rasponu 42,12-75,26 %. Između kontrolne podloge te podloga sa C:N=13,52 mol mol<sup>-1</sup> i C:N=27,05 mol mol<sup>-1</sup> postoji mala razlika u udjelu proteina, dok je za podlogu sa C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup> dobivena značajno veća vrijednost.

Naime, Nunez i Quigg (2016) u svome su radu proučavali utjecaj različitih koncentracija NaHCO<sub>3</sub> kao anorganskog izvora ugljika, na sastav biomase tijekom uzgoja mikroalgi *Nannochloropsis salina* i *Phaeodactylum tricornutum*. Prema njihovim rezultatima pri 5 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> postiže se 5 i 9 puta većih udjeli topljivih proteina u odnosu na kontrolne podloge. Dobiveni rezultati u tablici 12, u skladu s literaturnim navodima, ukazuju da

povećana koncentracija izvora ugljika pogoduje nakupljanju proteina u biomasi mikroalgi što je u skladu sa potrošnjom dušika koja je rasla sa povećanjem koncentracije izvora ugljika budući da je on potreban za sintezu proteina. Osim toga, Zhu i Dunford (2013) u svome su radu naveli da je sadržaj proteina u suhoj tvari biomase kod mikroalge *Picochlorum oklahomensis* iznosio 35,90 % dok je kod *Picochlorum* sp. u kontrolnoj podlozi zabilježen udio 47,41 % (tablica 12).

**Tablica 12.** Udjeli proteina, lipida i ugljikohidrata u biomasi mikroalge pri različitim omjerima ugljika i dušika

	proteini [%] ( $\pm\sigma$ )	lipidi [%] ( $\pm\sigma$ )	ugljikohidrati [%] ( $\pm\sigma$ )
<b>f/2 podloga</b>	47,41 ( $\pm 8,20$ )	5,48 ( $\pm 1,31$ )	8,75 ( $\pm 0,27$ )
<b>C:N=13,52 [mol mol<sup>-1</sup>]</b>	49,46 ( $\pm 7,12$ )	4,96 ( $\pm 0,64$ )	7,22 ( $\pm 0,62$ )
<b>C:N=27,05 [mol mol<sup>-1</sup>]</b>	42,12 ( $\pm 8,72$ )	3,07 ( $\pm 0,64$ )	5,72 ( $\pm 0,78$ )
<b>C:N=67,64 [mol mol<sup>-1</sup>]</b>	75,26 ( $\pm 4,12$ )	9,27 ( $\pm 0,74$ )	15,08 ( $\pm 1,00$ )

U određenim uvjetima uzgoja, mikroalge mogu nakupljati značajne količine lipida (Dahmen i sur., 2014). Prosječna količina lipida u biomasi mikroalgi varira između 1 i 700 g kg<sup>-1</sup>, a za mikroalge iz roda *Picochlorum* u rasponu 200 i 350 g kg<sup>-1</sup> (Dahmen i sur., 2014). Prema rezultatima iz tablice 12, možemo vidjeti da je najveći udio lipida iznosio 9,27 % u podlozi sa C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup>, a najmanji u podlozi sa C:N=27,05 mol mol<sup>-1</sup>. Potrebno je naglasiti da su određene vrijednosti značajno niže u usporedbi s očekivanim. De la Vega i suradnici (2011) također navode da je u optimalnim uvjetima moguće postići oko 15-20 % lipida u suhoj stvari biomase.

Lipidi mikroalgi u svom sastavu imaju zasićene i nezasićene masne kiseline čija je identifikacija provedena plinskom kromatografijom prema opisanoj metodi u Poglavlju 3.2.5.9. Mikroalge sadrže masne kiseline s 12 do 22 ugljikova atoma (Dahmen i sur., 2014). Prema rezultatima iz tablice 13, vidljivo je da najveći dio ukupnih staničnih lipida čine zasićene masne kiseline (eng. saturated fatty acids, SFA). U najvećem postotku od zasićenih masnih kiselina prisutna je palmitinska kiselina (C16:0) (27,69-31,16 %), a nakon nje slijedi heptadekanska kiselina (C17:0) (17,25-23,02 %). Jednostruko nezasićene masne kiseline (eng. monounsaturated fatty acids, MUFA) čine najmanji udio u ukupnim lipidima pri čemu je najveći udio iznosio oko 13 % u podlozi sa C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup>. U svim podlogama

najzastupljenija masna kiselina bila je oleinska kiselina (C18:1 cis 9) s maksimalnom vrijednošću od 12,02 % u biomasi narasloj u podlozi sa C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup>. Udio višestruko nezasićenih masnih kiselina (eng. polyunsaturated fatty acids, PUFA) varirao je između 39 % i 42 %, a najveći udio je postignut u biomasi narasloj u podlozi sa C:N=13,52 mol mol<sup>-1</sup>. Najmanji udio određen je u podlozi sa C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup>. Najzastupljenija višestruko nezasićena masna kiselina u biomasi bez obzira na sastav podloge bila je linolna kiselina (C18:2 cis 9,12) (34,97-38,23 %). Yang i suradnici (2014) u svome radu navode da su najzastupljenije masne kiseline u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp. palmitinska, oleinska, linolna i  $\alpha$ -linolenska kiselina. Navedene masne kiseline čine čak od 75 % do 80 % ukupnih lipida biomase što je u skladu sa dobivenim rezultatima Yang-a i suradnika (2014).

Prema Dahmen-u i suradnicima (2014), čak se 71 % ukupnih lipida mikroalge *Picochlorum* sp. sastoji od nezasićenih masnih kiselina. Osim toga, u biomasi prevladavaju višestruko nezasićene masne kiseline u odnosu na jednostruko nezasićene masne kiseline. Međutim, u ovom je radu sadržaj zasićenih i nezasićenih masnih kiselina (ukupan sadržaj jednostruko i višestruko nezasićenih masnih kiselina) bio je približno jednak bez obzira na sastav podloge. Također, udio palmitinske kiseline u svim podlogama bio je dosta sličan i iznosio je oko 30 %, što je u skladu sa rezultatima dobivenim u radu Dahmen-a i suradnika (2014).

Literatura također navodi kako profil masnih kiselina kod *Picochlorum* sp. HM1 čak više od 60 % čine nezasićene masne kiseline, a oko 30 % zasićene masne kiseline (de la Vega i sur., 2011). Uočeno je odstupanje rezultata ovog eksperimentalnog rada s onima dobivenim u radu de la Vega i suradnika. Može se objasniti time što je u navedenom radu analiziran sastav masnih kiselina biomase iz ekspanzijske faze rasta, a u ovome radu sastav je određen za biomasu koja je bila u stacionarnoj fazi rasta. Prema literaturnim navodima, tijekom stacionarne faze rasta povećava se sadržaj zasićenih masnih kiselina, što znači da je u tom slučaju smanjen udio nezasićenih masnih kiselina (Basova, 2005).

**Tablica 13.** Sastav masnih kiselina u biomasi narasloj u kontrolnoj podlozi i podlogama s različitim C:N omjerima

<b>MASNA KISELINA</b>	<b>%</b>			
	<b>f/2 podloga</b>	<b>C:N=13,52 [mol mol<sup>-1</sup>]</b>	<b>C:N=27,05 [mol mol<sup>-1</sup>]</b>	<b>C:N=67,64 [mol mol<sup>-1</sup>]</b>
<i>C11:0, undekanska kiselina</i>	0,275			
<i>C14:0, miristinjska kiselina</i>	0,490	0,193	*	0,200
<i>C14:1 cis 9, miristoleična kiselina</i>	0,719	0,537	0,411	0,425
<i>C15:0, pentadekanska kiselina</i>	1,773	0,830	0,206	0,672
<i>C15:1 cis 10, pentadekanoična kiselina</i>	0,318	0,485	0,243	0,219
<i>C16:0, palmitinska kiselina</i>	31,155	27,690	29,223	29,932
<i>C16:1 cis 9, palmitoleinska kiselina</i>	1,045	0,488	0,068	0,233
<i>C17:0, heptadekanska kiselina</i>	18,600	23,015	22,660	17,251
<i>C18:0, stearinska kiselina</i>	0,685			
<i>C18:1 cis 9, oleinska kiselina</i>	5,658	4,784	5,718	12,021
<i>C18:2 cis 9,12, linolna kiselina</i>	36,057	34,972	38,225	35,385
<i>C18:3 cis 9,12,15, α-linolenska kiselina</i>	3,224	7,006	3,247	3,663
<b>udio u biomasi</b>	5,476 (±1,31)	4,962 (±0,64)	3,073 (±0,64)	9,272 (±0,74)
<b>SFA<sup>1</sup></b>	52,98	51,728	52,089	48,054
<b>MUFA<sup>2</sup></b>	7,74	6,293	6,439	12,898
<b>PUFA<sup>3</sup></b>	39,28	41,978	41,472	39,048

Ugljikohidrati su također sastavni dio stanica mikroalgi koji služe kao rezerva energije i kao strukturne komponente u staničnim stijenkama. Nadalje, vrlo su važni u proizvodnji biogoriva kao što su biometan i biovodik. Vanjski sloj stanične stijenke razlikuje se ovisno o vrsti mikroalge, međutim, on sadrži polisaharide koji se mogu razgraditi u fermentabilne šećere (Chen i sur., 2013). Mikroalge mogu proizvesti etanol, mliječnu kiselinu, octenu kiseline i mravlju kiseline u odsustvu svjetlosti i anaerobnim uvjetima (John i sur., 2011).

Na kraju uzgoja provedena je analiza kojom je određen udio ukupnih ugljikohidrata u biomasi *Picochlorum* sp. Rezultati UPLC analize su prikazani u tablici 12 te pokazuju da je

<sup>1</sup> SFA (eng. saturated fatty acids) zasićene masne kiseline

<sup>2</sup> MUFA (eng. monounsaturated fatty acids) jednostruko nezasićene masne kiseline

<sup>3</sup> PUFA (eng. polyunsaturated fatty acids) višestruko nezasićene masne kiseline

\*Metil esteri masnih kiselina detektirani u uzorku, ali ispod granice kvantifikacije

najveći udio ugljikohidrata u biomasi, dobiven uzgojem mikroalge na podlozi sa C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup>. Prema provedenoj analizi određivanja monosaharida u kiselinskim hidrolizatima biomase mikroalge, najzastupljeniji su bili glukoza, D-glukuronska kiselina i fukoza. Najveće koncentracije navedenih kiselinskih hidrolizata zabilježene su u podlozi C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup> te su iznosile 100,45 mg L<sup>-1</sup> za glukožu, 39,71 mg L<sup>-1</sup> za fukožu te 45,27 mg L<sup>-1</sup> za D-glukuronsku kiselinu. Budući da je poznata činjenica da se ugljikohidrati u stanicama mikroalga nakupljaju u obliku škroba, velika koncentracija glukoze je bila i očekivana. Prema dobivenim rezultatima primijećeno je da je udio ugljikohidrata bio najveći u podlozi sa najvećom koncentracijom NaHCO<sub>3</sub> što odgovara omjeru C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup> (15,08 %), a najmanji udio ugljikohidrata zabilježen je u podlozi s omjerom C:N=27,05 mol mol<sup>-1</sup> (5,72 %).

U istraživanju kojeg su proveli Pancha i suradnici (2015) potvrđen je pozitivan učinak povećanja koncentracija natrijevog bikarbonata na udio ugljikohidrata u uzgoju mikroalge *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. Kao što je navedeno u radu, visoke koncentracije NaHCO<sub>3</sub> kao izvora anorganskog ugljika, rezultiraju većom aktivnosti enzima ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze (Rubisco). Naime, enzim Rubisco katalizira karboksilaciju ribuloze-1,5-bisfosfata u kojoj se sintetizira 3-fosfoglicerat, supstrat u biosintezi ugljikohidrata i masnih kiselina kod biljaka i mikroalgi. Upravo zbog toga se s povećanjem koncentracije NaHCO<sub>3</sub> očekuje i veći udio ugljikohidrata u biomasi mikroalge. Chen i suradnici (2013) navode da *Chlorella vulgaris* može nakupljati velike količine ugljikohidrata pri čemu su najčešće unutar raspona 37-55 %. Ovisno o korištenom soju *Chlorella vulgaris*, udio ugljikohidrata može biti i manji te poprimati vrijednosti do 18 % (Ho i sur., 2013). Iz navedenog se zaključuje da se sastav i metabolizam ugljikohidrata razlikuju ovisno o korištenoj vrsti mikroalge.

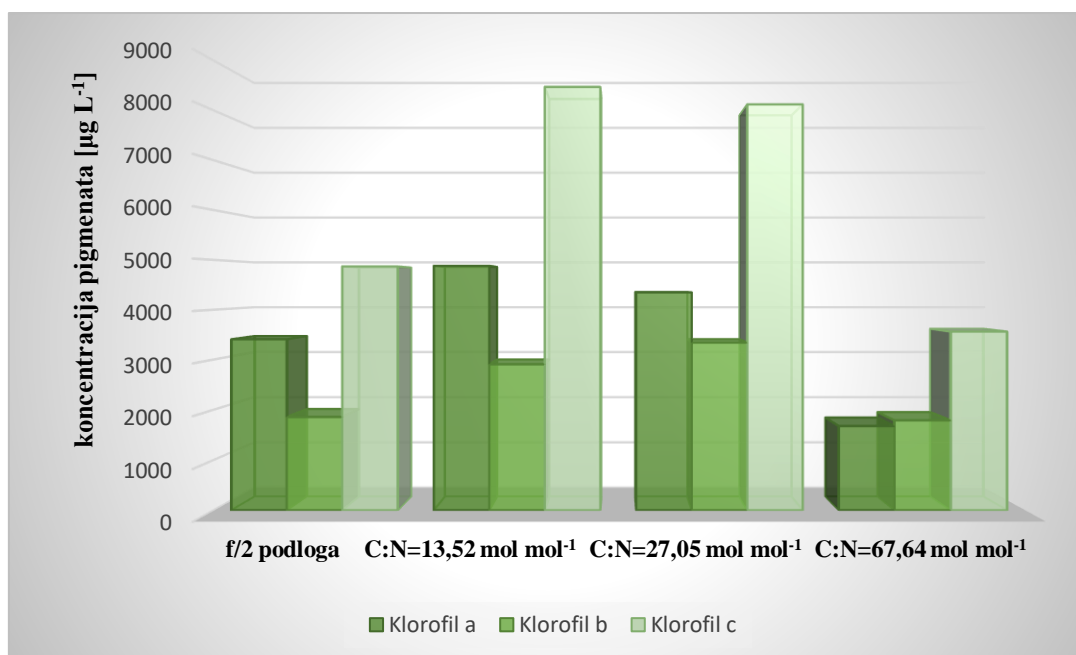
Sve češću primjenu u farmaceutici, prehrambenoj tehnologiji i kozmetičkim proizvodima, pronalaze upravo pigmenti mikroalga. Najzastupljeniji pigmenti u biomasi mikroalgi su klorofili, karotenoidi i fikobilini pri čemu klorofili daju zeleno obojenje, karotenoidi narančasto ili žuto, a fikobilini crveno ili plavo. Imaju nekoliko značajnih uloga kao što su fiksacija CO<sub>2</sub>, apsorpcija energije svjetlosti i zaštita stanice od oštećenja uzrokovanog pretjeranim osvjetljenjem (Koller i sur., 2014). Klorofili i karotenoidi su molekule koje su topljive u mastima za razliku od fikobilina koji su topljivi u vodi. Sinteza pigmenta ovisi o nekoliko čimbenika od kojih su najznačajniji pH vrijednost, temperatura, salinitet, intenzitet svjetlosti i dostupnost hranjivih sastojaka (Begum i sur., 2015).

Jedni od najznačajnijih pigmenata su upravo klorofili pri čemu razlikujemo klorofil *a*, klorofil *b* i klorofil *c*. Njihovi produkti razgradnje nastaju uslijed izlaganja visokom zračenju svjetlosti, kisiku ili slabim kiselinama, a predstavljaju prirodni zaštitni sustav mikroalge.

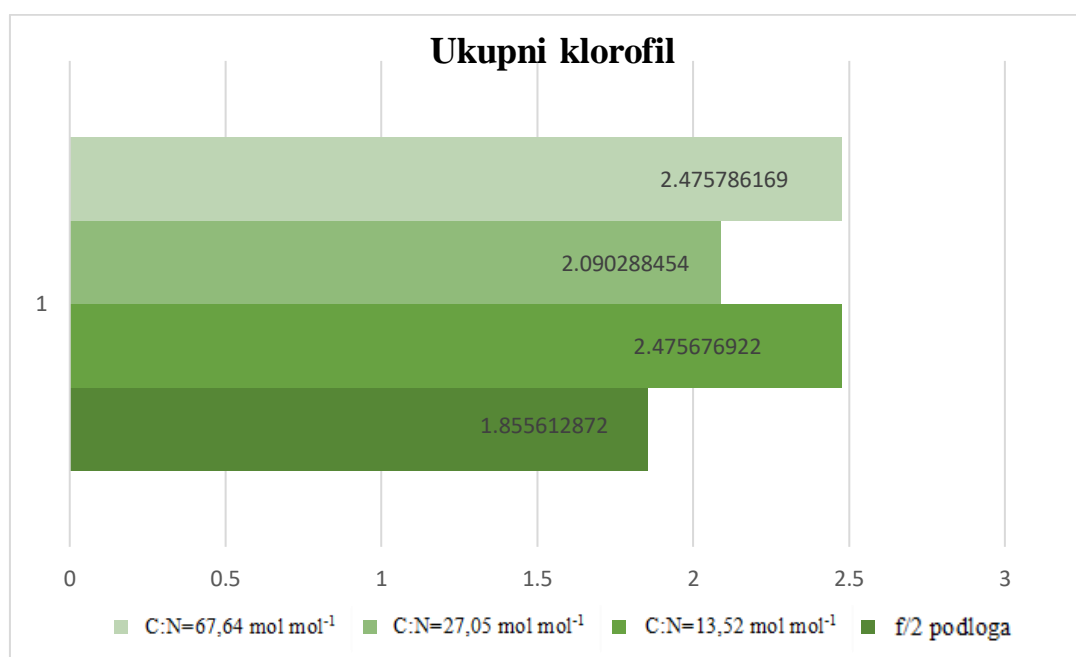
Provedena je analiza kojom je određen sastav pigmenata prema metodi navedenoj u Poglavlju 3.2.5.5. Prema dobivenim rezultatima, klorofil *a* i klorofil *c* bili su zastupljeniji u biomasi u odnosu na klorofil *b*. Iznimka je biomasa narasla u podlozi C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup> u kojoj je određena koncentracija klorofila *b* nešto veća u odnosu na klorofil *a* (slika 7). Najveće koncentracije pigmenata dobivene su u podlozi s omjerom C:N=13,52 mol mol<sup>-1</sup> i C:N=27,05 mol mol<sup>-1</sup>. Također su izračunati udjeli pojedinih klorofila i njihov zbroj koji je prikazan na slici 8. Ukupni udio pigmenata iznosio je između 1,86 % i 2,48 %, a prema literaturnim podacima udio ukupnog klorofila u suhoj tvari biomase najčešće varira između 0,5 % i 1,5 % (Becker, 2013). Najmanji udio zamijećen je u kontrolnoj podlozi što bi značilo da dodatak natrijevog bikarbonata utječe na povećanje koncentracije klorofila. Od svih klorofila, u najvećem je postotku zabilježen klorofil *c*.

Prema istraživanju kojeg su proveli White i suradnici (2013), rezultati pokazuju da je dodatak većih koncentracija NaHCO<sub>3</sub> u uzgoju mikroalge *Nannochloropsis salina*, imao pozitivan učinak na koncentracije pojedinih pigmenata kao što su klorofil *a*, lutein i violaksantin. Isti zaključak donesen je i u radu u kojem je zabilježena veća koncentracija klorofila *a* i klorofila *b* koristeći veće koncentracije natrijevog bikarbonata tijekom uzgoja mikroalge *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 (Pancha i sur., 2015). Rezultati dobiveni istraživanjem tijekom uzgoja morske mikroalge *Picochlorum* sp. u skladu su s literaturnim navodima. Kako navodi literatura, to se može objasniti povećanjem pH vrijednosti medija uslijed otapanja natrijevog bikarbonata te je na taj način smanjena mogućnost razgradnje klorofila (Koca i sur., 2007).





**Slika 7.** Prikaz vrijednosti koncentracija klorofila *a*, klorofila *b* i klorofila *c* u kontrolnom mediju i pri različitim C:N omjerima



**Slika 8.** Prikaz ukupnog udjela klorofila u biomasi mikroalge pri različitim C:N omjerima

## 4.2. ISTRAŽIVANJE UČINKA LIMITACIJE IZVOROM DUŠIKA NA RAST I SASTAV BIOMASE MIKROALGE

Prema literaturnim podacima, uzgoj mikroalgi u podlogama s limitiranim izvorom dušika, dovodi do nakupljanja određenih staničnih sastojaka. Imajući to na umu, proveden je drugi dio istraživanja koji je započeo uzgojem mikroalge u podlogama s izvorom dušika (bez limitacije rasta izvorom dušika). Sedmog dana biomasa je centrifugirana i resuspendirana u svježju f/2 podlogu bez izvora dušika. Pripremljena je kontrolna podloga i podloge sa koncentracijama  $1 \text{ g L}^{-1}$  i  $2 \text{ g L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ . Uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. trajao je do 16. dana u podlogama bez izvora dušika. Praćena je optička gustoća kulture, broj stanica po mililitru te udio lipida. Po završetku uzgoja provedene su sve analize kao u prethodnom eksperimentu, osim određivanja udjela ugljikohidrata radi nedovoljne količine biomase za provedbu analize.

### 4.2.1. Dvofazni šaržni uzgoj mikroalge uz limitaciju izvorom dušika

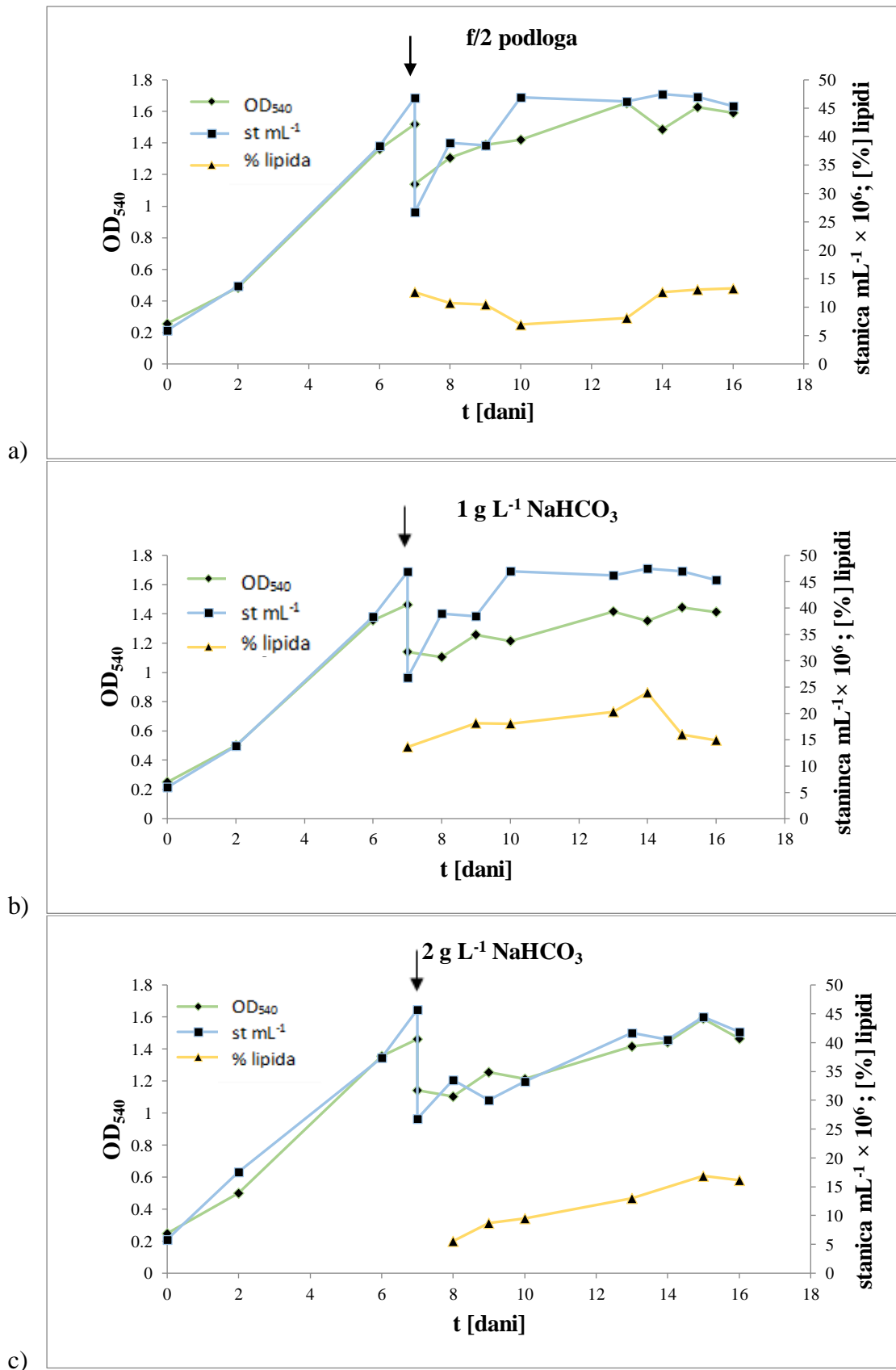
Kinetika rasta mikroalge *Picochlorum* sp., tijekom šaržnog uzgoja u dvije faze, prikazana je na slici 9. Kao što je označeno na slici, sedmog dana određene su vrijednosti broja stanica i  $\text{OD}_{540}$  prije i nakon prebacivanja biomase u podlogu bez dušika. Vidljiv je pad iz razloga što je stanici bilo potrebno određeno vrijeme za prilagodbu na novonastale uvjete. Četrnaestog je dana u kontrolnoj podlozi zabilježeno  $4,75 \cdot 10^7$  st  $\text{mL}^{-1}$  što je ujedno i najveća postignuta vrijednost. Uspoređujući maksimalnu vrijednost, vidljivo je da je ona nešto manja u odnosu na onu iz prvog dijela istraživanja ( $5,23 \cdot 10^7$  st  $\text{mL}^{-1}$ ) koja je zabilježena u podlozi C:N=13,52 mol mol<sup>-1</sup>. Iako je dobivena manja maksimalna vrijednost broja stanica po mililitru nego u prvom dijelu istraživanja, zabilježeni rezultati broja stanica i optičke gustoće kulture su u konačnici ipak nešto veći.

Gledajući krivulju rasta u kontrolnoj podlozi, možemo uočiti da vrijednosti  $\text{OD}_{540}$  prate vrijednosti dobivenog broja stanica. Izuzetak je jedino u 14. danu u kojem je postignut maksimalan broj stanica, ali je optička gustoća kulture niža nego prethodnog dana. U podlozi s koncentracijom  $1 \text{ g L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ , dobivena je najmanja srednja vrijednost st  $\text{mL}^{-1}$  i optičke gustoće kulture, iako razlika nije značajna u odnosu na druge podloge. Pri sva tri ispitana uvjeta nema značajnog odstupanja između izbrojanih stanica i dobivene vrijednosti  $\text{OD}_{540}$ .

Kao što je već prethodno navedeno, istražena je mogućnost uzgoja biomase u optimalnim uvjetima i zatim njenog prijenosa u podlogu bez izvora dušika. Prema literaturi,

takav bi uzgoj trebao rezultirati povećanom akumulacijom lipida u biomasi mikroalge (Dahmen i sur., 2013). Imajući to na umu, svakodnevno je praćen udio lipida prema vanilin metodi opisanoj u Poglavlju 3.2.5.8. Navedena metoda korištena je sa ciljem praćenja udjela lipida tijekom cjelokupnog uzgoja budući da ju karakterizira vrlo brzo određivanje. Iako daje indicaciju o promjeni udjela lipida u stanici, ne smatra se dovoljno preciznom metodom za određivanje točne koncentracije lipida. Na slici 9 prikazana je promjena udjela lipida tijekom uzgoja za kontrolnu podlogu te podloge u koje je dodan natrijev bikarbonat koncentracije  $1 \text{ g L}^{-1}$  i  $2 \text{ g L}^{-1}$ . U kontrolnoj podlozi, udio lipida padao je od 7. do 10. dana, a nakon toga vidljiv je porast. Podloga s koncentracijom  $1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$  bilježi rast udjela lipida sve do 14. dana, nakon čega je vidljivo smanjenje. Bez obzira što je za povećano nakupljanje lipida potrebno izložiti stanicu stresu (npr. limitacija rasta izvorom dušika), moguće je da su u ovom slučaju stresni uvjeti predugo trajali te su na taj način rezultirali smanjenim sadržajem lipida. U podlozi s koncentracijom  $2 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ , udio lipida se povećavao sve do posljednjeg dana uzgoja kada je zabilježen pad.

Nunez i Quigg (2016) u svome su radu također istraživali nakupljanje lipida u podlozi bez dušika za mikroalge *Nannochloropsis salina* i *Phaeodactylum tricornutum*. Prema njihovim rezultatima, nakon prebacivanja biomase u svježi medij bez izvora dušika, zabilježen je osam puta veći udio lipida u odnosu na podloge koje su sadržavale izvor dušika. Osim toga, zabilježeno je i deset puta više nakupljenih lipida u podlozi sa najvećom koncentracijom  $\text{NaHCO}_3$  ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolnu podlogu. Kada uspoređujemo rezultate uzgoja prethodno navedenih mikroalgi s uzgojem mikroalge *Picochlorum* sp., možemo donijeti isti zaključak prema kojem je najveći udio lipida zabilježen u podlozi s najvišom koncentracijom bikarbonata, a najmanji u kontrolnoj podlozi bez dodatka bikarbonata. Dobivene vrijednosti udjela lipida bile su u rasponu od oko 5 do 25 % ovisno o korištenoj podlozi i danu uzgoja.



**Slika 9.** Prikaz promjene optičke gustoće kulture, broja stanica i udjela lipida tijekom uzgoja u dvije faze pri čemu je prelazak u drugu fazu uzgoja naznačen strelicom: a) kontrolna podloga, b) podloga s  $1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ , c) podloga s  $2 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$

Na kraju šaržnog uzgoja mikroalge *Picochlorum* sp. u dvije faze, gravimetrijom je određena koncentracija biomase. Prema rezultatima gravimetrije dobivene su visoke koncentracije biomase koje ne možemo smatrati relevantnima budući da je bila vidljiva velika količina istaloženog  $\text{NaHCO}_3$  radi nedovoljnog ispiranja biomase. Usporedbom vrijednosti brojčanih koncentracijama stanica zadnjeg dana uzgoja možemo zaključiti da su bile vrlo slične za sve tri hranjive podloge (slika 9) te da se razlika u koncentraciji suhe tvari biomase može pripisati istaloženom natrijevom bikarbonatu. Naime, završetkom prve faze uzgoja, stanica uz dodatak različitih koncentracija natrijevog bikarbonata više nije bila usmjerena na sintezu biomase, već na povećanu akumulaciju lipida unutar biomase. Usporedbom koncentracija suhe tvari (tablica 14) s koncentracijama suhe tvari dobivenih u prethodnom eksperimentu (tablica 10) može se zaključiti da su vrijednosti precijenjene i u podlogama bez dodanog izvora dušika dosežu čak  $1,558 \text{ g L}^{-1}$ . El-Kassas (2013) u svome radu navodi da je tijekom uzgoja *Picochlorum* sp. u podlozi bez dodanog izvora dušika produktivnost biomase iznosila  $0,068 \text{ g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ . Griffiths i suradnici (2014) navode da je tijekom eksponencijalnog rasta mikroalge *Chlorella vulgaris*, zabilježena koncentracija biomase  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  u podlogama sa osiromašenim izvorom dušika, dok je u podlogama bez dodanog izvora dušika, postignuta vrlo niska koncentracija biomase ( $0,8 \text{ g L}^{-1}$ ). Prema navedenoj literaturi, vidljivo je moguće smanjenje koncentracije biomase tijekom uzgoja mikroalge u podlogama s limitiranim izvorom dušika, međutim navedeni zaključak ne možemo donijeti i za ovo istraživanje budući da dobivene rezultate koncentracije biomase ne smatramo u potpunosti točnima.

**Tablica 14.** Koncentracija i produktivnost biomase na kraju šaržnog uzgoja provedenog u dvije faze (s i bez izvora dušika)

	f/2 podloga	$1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$	$2 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$
<b>X</b> [ $\text{g L}^{-1}$ ] ( $\pm\sigma$ )	0,397 ( $\pm 0,01$ )	0,912 ( $\pm 0,24$ )	1,558 ( $\pm 0,24$ )
<b>Pr<sub>x</sub></b> [ $\text{g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ]	0,0248	0,0570	0,0974

Koncentracije izvora dušika i fosfora, kao dva glavna makronutrijenta, određene su na kraju uzgoja *Picochlorum* sp. Najmanja koncentracija fosfata zabilježena je u podlozi s koncentracijom  $1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$  te je iznosila  $0,0180 \text{ mg L}^{-1}$  što ukazuje da je fosfor u potpunosti utrošen (tablica 15). Najviše fosfata zaostalo je u kontrolnoj podlozi isto kao i u prvom dijelu istraživanja koji nije proveden u stresnim uvjetima. Ovaj je eksperiment proveden na način da je mikroalga *Picochlorum* sp. prethodno uzgojena u podlozi s izvorom dušika, a nakon toga je prebačena u podlogu bez izvora dušika. Prema rezultatima iz tablice 15, vidljivo je da su u podlogama s dodanim natrijevim bikarbonatom zaostale veće koncentracije dušika, dok je u kontrolnoj podlozi koncentracija preostalog dušika bila manja. Međutim, očekivano je da u podlogama ne bude izvora dušika budući da je biomasa prebačena u podlogu bez dušika. Dobiveni rezultati mogli bi se objasniti time da je dušik bio prisutan u otopini vitamina koja se koristila u pripremi f/2 podloge pa se je na taj način našao u podlozi na kraju uzgoja.

**Tablica 15.** Koncentracije nutrijenta i brzina potrošnje u pojedinim podlogama tijekom druge faze uzgoja (bez izvora dušika)

	N-NO <sub>3</sub> [mg L <sup>-1</sup> ] ( $\pm\sigma$ )	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [mg L <sup>-1</sup> ] ( $\pm\sigma$ )	Potrošnja N-NO <sub>3</sub> [mg L <sup>-1</sup> ]	Potrošnja PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [mg L <sup>-1</sup> ]
<b>f/2 podloga</b>	0,5610 ( $\pm 0,13$ )	0,1273 ( $\pm 0,00$ )	11,765 ( $\pm 0,13$ )	3,2916 ( $\pm 0,00$ )
<b>1 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub></b>	0,8660 ( $\pm 0,23$ )	0,0180 ( $\pm 0,01$ )	11,460 ( $\pm 0,23$ )	3,4010 ( $\pm 0,01$ )
<b>2 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub></b>	1,5043 ( $\pm 0,00$ )	0,0906 ( $\pm 0,00$ )	10,822 ( $\pm 0,00$ )	3,3283 ( $\pm 0,00$ )

#### 4.2.2. Utjecaj limitacije dušikom na sastav biomase mikroalge

Na kraju uzgoja *Picochlorum* sp. u podlozi s limitiranim izvorom dušika, provedene su analize kojima je određen udio proteina, udio lipida uz sastav masnih kiselina te koncentracija pojedinih pigmenata u biomasi mikroalge.

Tijekom uzgoja mikroalge *Picochlorum* sp. u podlozi bez izvora dušika, sadržaj proteina bio je najveći u kontrolnoj podlozi, a najmanji u podlozi sa najvećom koncentracijom natrijevog bikarbonata (tablica 16). Uspoređujući rezultate analize u podlozi sa dodanim izvorom dušika i bez izvora dušika, možemo uočiti da je dobiven nešto manji udio proteina u podlogama bez izvora dušika. Najveći postotak iznosio je 53,53 % i to u kontrolnoj podlozi,

dok je u podlozi s izvorom dušika iznosio 75,26 % i to kod omjera C:N=67,64 mol mol<sup>-1</sup>. Prema istraživanoj literaturi, smanjeni udjeli proteina u podlogama sa limitiranim izvorom dušika su i očekivani. Iako prema zabilježenim rezultatima nije značajna razlika u udjelima proteina, možemo pretpostaviti da je došlo do razgradnje proteina u mikroalgama sa svrhom opskrbe stanice dušikom. Također, Nunez i Quigg (2016) prema Berges i Falkowski (1998) navode da je u tim uvjetima smanjena sposobnost mikroalgi da koriste ugljik za sintezu proteina čime se smanjuje njihov udio. Uzgoj dijatomeje *Phaeodactylum tricornutum* u podlozi bez izvora dušika rezultirao je smanjenim udjelima topljivih proteina (Nunez i Quigg, 2016). Danesh i suradnici (2017) navode da je koncentracija proteina u biomasi mikroalge smanjena sa 512 mg L<sup>-1</sup> na 472,76 mg L<sup>-1</sup> u uvjetima limitacije izvorom dušika. Uspoređujući rezultate rasta u kontrolnoj podlozi i podloge bez dodanog NaNO<sub>3</sub> tijekom uzgoja *Picochlorum* sp., dobivena koncentracija proteina bila je 3 puta manja u uvjetima limitacije izvorom dušika (El-Kassas, 2013). U skladu sa literaturnim navodima, dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost smanjenog udjela proteina korištenjem podloge za uzgoj bez dodanog izvora dušika.

**Tablica 16.** Udjeli proteina i lipida u biomasi mikroalge u podlogama bez izvora dušika

	proteini [%] ( $\pm\sigma$ )	lipidi [%] ( $\pm\sigma$ )
<b>f/2 podloga</b>	53,53 ( $\pm 2,73$ )	8,31 ( $\pm 2,54$ )
<b>1 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub></b>	46,74 ( $\pm 2,68$ )	8,98 ( $\pm 2,21$ )
<b>2 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub></b>	31,26 ( $\pm 2,83$ )	10,22 ( $\pm 3,16$ )

Limitacija izvorom dušika predstavlja jedan od mogućih čimbenika koji utječe na povećanu akumulaciju lipida unutar stanice mikroalge (Dahmen i sur., 2014). Prema dobivenim rezultatima prikazanim u tablici 16, možemo vidjeti da je najveći udio lipida iznosio 10,22 % u podlozi s koncentracijom 2 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>. U prvom dijelu istraživanja, kod iste koncentracije NaHCO<sub>3</sub> koja odgovara omjeru C:N=27,05 mol mol<sup>-1</sup>, dobiven je najmanji udio lipida te je iznosio 3,07 % (tablica 12). U tom slučaju možemo zaključiti da je uzgoj *Picochlorum* sp. u podlozi bez dušika kod navedene koncentracije rezultirao više od 3 puta većom akumulacijom lipida. Također, u podlozi bez dušika s koncentracijom 1 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> zabilježena je nešto veća vrijednost udjela lipida pri čemu isti zaključak možemo donijeti i za kontrolnu podlogu. Isti zaključak donesen je i u radu tijekom uzgoja *Picochlorum*

sp., gdje je zabilježena vrijednost lipida  $160 \text{ g kg}^{-1}$  u kontrolnoj podlozi, a skoro 3 puta veća vrijednost lipida dobivena je u podlozi bez dodanog  $\text{NaNO}_3$  ( $378 \text{ g kg}^{-1}$ ) (Moussa i sur., 2019). Uzgoj u uvjetima limitacije dušikom rezultirao je povećanom akumulacijom lipida pri čemu se njihov udio povećava dodatkom većih koncentracija natrijevog bikarbonata.

Profil masnih kiselina određen je nakon uzgoja mikroalge *Picochlorum* sp. u podlozi bez izvora dušika. Rezultati su prikazani u tablici 17 pri čemu možemo uočiti da je udio metilnih estera masnih kiselina veći nego u analizi provedenoj nakon uzgoja mikroalge u podlozi s izvorom dušika. Udjeli variraju od 8,31 % u f/2 podlozi bez dodanog  $\text{NaHCO}_3$  do 10,22 % u podlozi s koncentracijom  $2 \text{ g L}^{-1}$  natrijevog bikarbonata. Vidljivo je da je uzgoj s limitiranim izvorom dušika utjecao na profil masnih kiselina. Udio  $\alpha$ -linolenske kiseline (C18:3 cis 9,12,15) se neznatno povećao, dok je uočena i  $\gamma$ -linolenska kiselina (C18:3 cis 6,9,12). U f/2 podlozi bez dodatka dušika udio ove masne kiseline iznosio je čak 25,60 %, dok je udio u podlogama uz dodatak bikarbonata bio značajno niži (9,96 % i 6,06 %). U f/2 podlozi bez dodatka dušika prevladavaju nezasićene masne kiseline (57,76 %). Nadalje, dodatkom natrijevog bikarbonata, ovisno o njegovoj koncentraciji, povećava se udio zasićenih masnih kiselina uz smanjenje višestruko nezasićenih masnih kiselina. Međutim, u prethodno provedenom istraživanju u kojem je korištena f/2 hranjiva podloga s izvorom dušika, dodatak bikarbonata nije značajnije utjecao na udio zasićenih, jednostruko nezasićenih i višestruko nezasićenih masnih kiselina (tablica 13).

Sastav masnih kiselina u biomasi narasloj na f/2 bez dodanog bikarbonata sličan je sastavu lipida koji su dobili Moussa i sur. (2019) za *Picochlorum* sp. uzgojen u sličnim uvjetima uzgoja. U navedenom radu zabilježeno je oko 31 % SFA te oko 69 % PUFA u lipidima, ali bez prisustva MUFA. Prema tablici 17, u podlozi s koncentracijom  $2 \text{ g L}^{-1}$  natrijevog bikarbonata, oko 60 % lipida čine zasićene masne kiseline, a oko 40 % jednostruko i višestruko nezasićene masne kiseline. Od zasićenih masnih kiselina u najvećem postotku prevladava palmitinska kiselina (C16:0) (22,86-30,34 %), a nakon nje slijedi heptadekanska kiselina (C17:0) (11,75-34,11 %). Stearinska kiselina (C18:0) prisutna je isključivo u kontrolnoj podlozi i to u vrlo malom postotku (0,191 %). Od jednostruko nezasićenih masnih kiselina ističe se oleinska kiselina (C18:1 cis 9) (4,18-6,51 %), a od višestruko nezasićenih linolna kiselina (C18:2 cis 9,12) (23,18-27,99 %). U uvjetima limitacije izvorom dušika zabilježen je veći udio polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) nego tijekom uzgoja u podlogama s dodanim  $\text{NaNO}_3$ , što je u skladu s literaturnim navodima (El-Kassas, 2013; Moussa i sur., 2019).



**Tablica 17.** Sastav masnih kiselina u podlogama bez izvora dušika

MASNA KISELINA	%		
	f/2 podloga	1 g L <sup>-1</sup> NaHCO <sub>3</sub>	2 g L <sup>-1</sup> NaHCO <sub>3</sub>
<i>C11:0, undekanska kiselina</i>	0,1461		
<i>C12:0, laurinska kiselina</i>	0,1731		
<i>C14:0, miristinska kiselina</i>	0,4732	0,3102	0,2146
<i>C14:1 cis 9, miristoleična kiselina</i>	0,2810	0,2771	
<i>C15:0, pentadekanska kiselina</i>	1,12	0,3598	0,4117
<i>C15:1 cis 10, pentadekanoična kiselina</i>	0,1543	0,4467	0,1514
<i>C16:0, palmitinska kiselina</i>	22,86	30,34	25,23
<i>C16:1 cis 9, palmitoleinska kiselina</i>	0,9073	0,7257	0,1964
<i>C17:0, heptadekanska kiselina</i>	11,75	14,48	34,11
<i>C18:0, stearinska kiselina</i>	0,1906		
<i>C18:1 cis 9, oleinska kiselina</i>	4,18	6,51	4,91
<i>C18:2 cis 9,12, linolna kiselina</i>	23,31	27,99	23,18
<i>C18:3 cis 6,9,12, γ-linolenska kiselina</i>	25,60	9,96	6,06
<i>C18:3 cis 9,12,15, α-linolenska kiselina</i>	8,85	8,60	5,53
<b>udio u biomasi</b>	8,31 (±2,54)	8,98 (±2,21)	10,22 (±3,16)
<b>SFA<sup>1</sup></b>	36,71	45,49	59,97
<b>MUFA<sup>2</sup></b>	5,52	7,96	5,26
<b>PUFA<sup>3</sup></b>	57,76	46,55	34,77

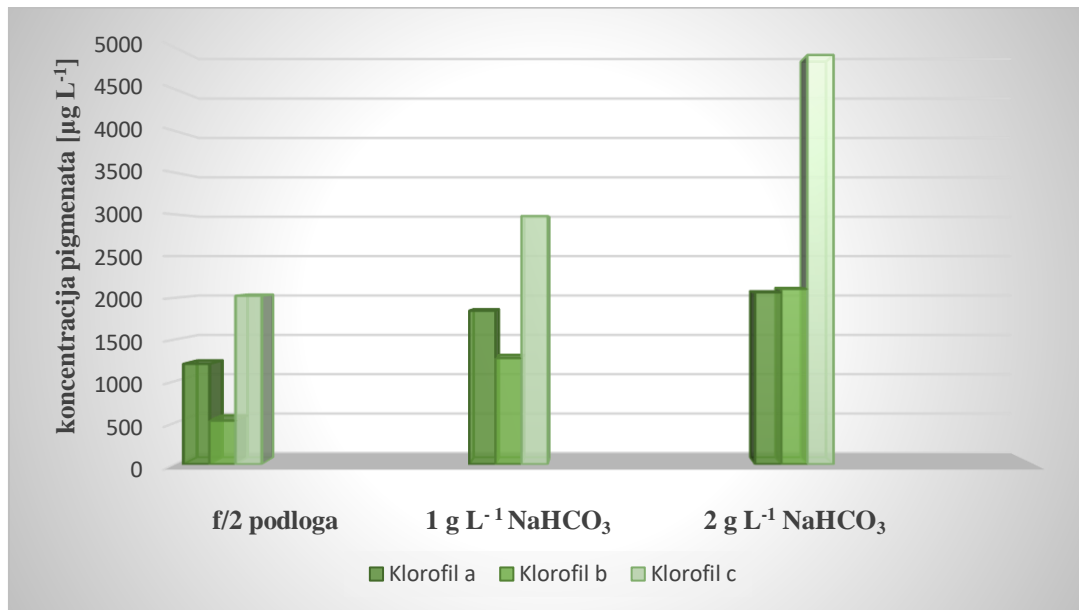
Na kraju uzgoja mikroalge *Picochlorum* sp. provedena je analiza sastava pigmentata prema istoj metodi kao i u prvom dijelu istraživanja. Prema obrađenim rezultatima koji su prikazani na slici 10, vidljivo je da je u sve tri podloge dobivena najveća koncentracija klorofila *c*, a najmanja klorofila *b*, izuzev podloge s koncentracijom 2 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> gdje je ipak nešto malo veća koncentracija klorofila *b* u odnosu na klorofil *a*. Osim toga, primijećeno je da koncentracije klorofila rastu s dodatkom NaHCO<sub>3</sub>. Prema dobivenim rezultatima (slika 11) vidljivo je da su postignuti manji udjeli ukupnog klorofila u biomasi u odnosu na provedeni uzgoj mikroalge u podlozi s izvorom dušika (slika 8). Time je potvrđeno da uzgoj mikroalge u podlozi bez izvora dušika može rezultirati smanjenim udjelom klorofila kao što

<sup>1</sup> SFA (eng. saturated fatty acids) zasićene masne kiseline

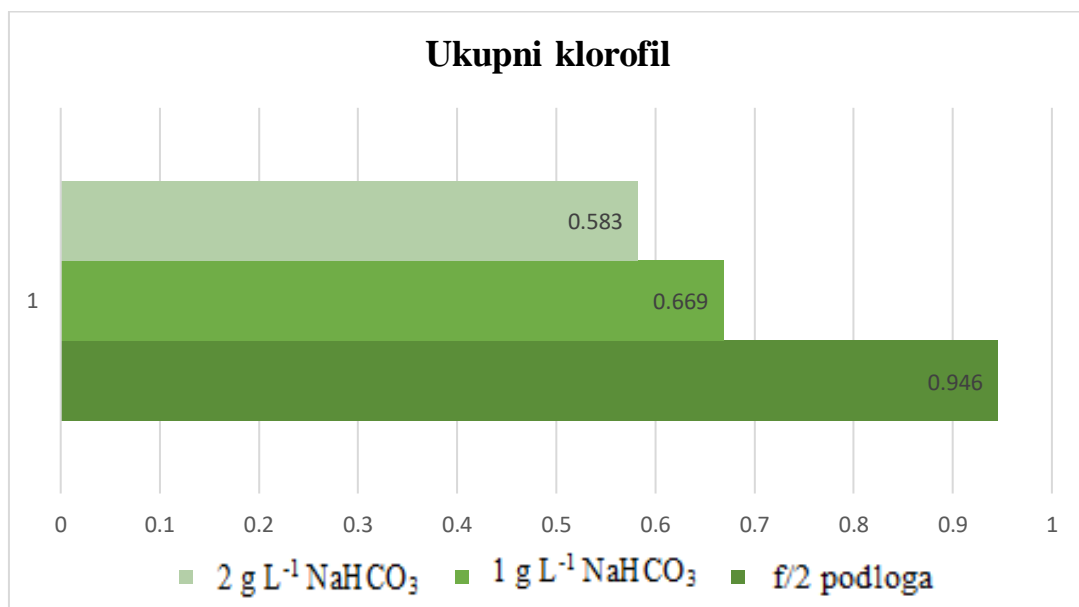
<sup>2</sup> MUFA (eng. monounsaturated fatty acids) jednostruko nezasićene masne kiseline

<sup>3</sup> PUFA (eng. polyunsaturated fatty acids) višestruko nezasićene masne kiseline

navode Griffiths i suradnici (2014). Moussa i suradnici (2019) su također potvrdili navedeno dobivši 2 puta manju vrijednost klorofila *a* u podlozi bez  $\text{NaNO}_3$  u odnosu na podlogu sa dodanim izvorom dušika. U uvjetima ograničenja hranjivim tvarima, u ovom slučaju izvorom dušika, smanjuje se udio klorofila budući da on sadrži dušik u svojoj strukturi i dušik je potreban za njegovu sintezu. Osim toga, protok elektrona kroz fotosustav počinje slabiti što dovodi do stvaranja reaktivnih kisikovih radikala (Griffiths i sur., 2014).



**Slika 10.** Prikaz vrijednosti koncentracija klorofila *a*, klorofila *b* i klorofila *c* u kontrolnom mediju i pri koncentracijama 1 g L<sup>-1</sup> i 2 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> u podlogama bez izvora dušika



**Slika 11.** Prikaz ukupnog udjela klorofila u biomasi mikroalge u kontrolnom mediju i pri koncentracijama 1 g L<sup>-1</sup> i 2 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> u podlogama bez izvora dušika

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog eksperimentalnog rada i dobivenih rezultata doneseni su sljedeći zaključci:

1. Produktivnost procesa i prinos mikroalgalne biomase raste s porastom C:N omjera ( $\leq 27,05 \text{ mol mol}^{-1}$ ) u f/2 podlozi uz dodatak izvora dušika.
2. Porastom C:N omjera (13,52-67,64  $\text{mol mol}^{-1}$ ) u f/2 podlozi u prisutnosti izvora dušika, raste udio lipida, ugljikohidrata i najzastupljenijih proteina u biomasi mikroalge.
3. Najzastupljenije masne kiseline u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp. su palmitinska (C16:0), heptadekanska (C17:0) i linolna (C18:2 cis 9,12) neovisno o C:N omjeru.
4. Porast C:N omjera u f/2 hranjivoj podlozi utječe na porast ukupnih klorofila (*a*, *b* i *c*) u biomasi, pri čemu je klorofil *c* najzastupljeniji.
5. Dodatak natrijevog bikarbonata u f/2 podlogu bez izvora dušika povećava udio lipida i smanjuje udio proteina. Također se mijenja sastav masnih kiselina pri čemu dolazi do povećanja udjela zasićenih, a smanjenja nezasićenih masnih kiselina.
6. Koncentracija klorofila *a*, *b* i *c* u biomasi mikroalge povećava se dodatkom natrijevog bikarbonata u f/2 podlozi bez izvora dušika. Najzastupljeniji je klorofil *c*, dok je udio klorofila *a* i *b* približno upola manji.

## 6. LITERATURA

Al-Qasmi M, Raut N, Talebi S, Al-Rajhi S, Al-Barwani T (2012) A review of effect of light on microalgae growth. In *Proceedings of the world congress on engineering* **1**. [http://www.iaeng.org/publication/WCE2012/WCE2012\\_pp608-610.pdf](http://www.iaeng.org/publication/WCE2012/WCE2012_pp608-610.pdf)

Barkia I, Saari N, Manning SR (2019) Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Marine drugs* **17**, 304. <https://doi.org/10.3390/md17050304>

Barten RJ, Wijffels RH, Barbosa MJ (2020) Bioprospecting and characterization of temperature tolerant microalgae from Bonaire. *Algal Research* **50**, 102008. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102008>

Basova MM (2005) Fatty acid composition of lipids in microalgae. *International Journal on Algae*, **7**. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v7.i1.30>

Becker EW (2013) Microalgae for Human and Animal Nutrition. U: Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, 2. izd. (Richmond A, Hu Q, ured.), John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, str. 461-503.

Begum H, Yusoff FM, Banerjee S, Khatoon H, Shariff M (2016) Availability and utilization of pigments from microalgae. *Critical reviews in food science and nutrition* **56**, 2209-2222. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>

Bleakley S, Hayes M (2017) Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods* **6**, 33. <https://doi.org/10.3390/foods6050033>

Chai MK, Tan YH, Wong LS (2020) Macronutrient effect on biomass of Microalgae in biofuel production: A review. *Indian Journal of Science and Technology* **13**, 2245-2263. <https://doi.org/10.17485/IJST/v13i22.176>

Chen CY, Zhao XQ, Yen HW, Ho SH, Cheng CL, Lee DJ, Feng WB, Chang JS (2013) Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal* **78**, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.006>

Chiranjeevi P, Mohan SV (2016) Critical parametric influence on microalgae cultivation towards maximizing biomass growth with simultaneous lipid productivity. *Renewable Energy* **98**, 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.063>

- Dahmen I, Chtourou H, Jebali A, Daassi D, Karray F, Hassairi I, Sayadi S, Abdelkafi S, Dhouib A (2014) Optimisation of the critical medium components for better growth of *Picochlorum* sp. and the role of stressful environments for higher lipid production. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**, 1628-1638. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6470>
- Danesh AF, Ebrahimi S, Salehi A, Parsa A (2017) Impact of nutrient starvation on intracellular biochemicals and calorific value of mixed microalgae. *Biochemical Engineering Journal* **125**, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.05.017>
- Darvehei P, Bahri PA, Moheimani NR (2018) Model development for the growth of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **97**, 233-258. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.08.027>
- 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. *Biotechnology Progress* **27**, 1535-1543. <https://doi.org/10.1002/btpr.686>
- Difusa A, Talukdar J, Kalita MC, Mohanty K, Goud VV (2015) Effect of light intensity and pH condition on the growth, biomass and lipid content of microalgae *Scenedesmus* species. *Biofuels* **6**, 37-44. <https://doi.org/10.1080/17597269.2015.1045274>
- El-Kassas HY (2013) Growth and fatty acid profile of the marine microalga *Picochlorum* sp. grown under nutrient stress conditions. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* **39**, 233-239. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2013.12.007>
- Fields MW, Hise A, Lohman EJ, Bell T, Gardner RD, Corredor L, Moll K, Peyton BM, Characklis GW, Gerlach R (2014) Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**, 4805-4816. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5694-7>
- Finkel ZV, Follows MJ, Liefer JD, Brown CM, Benner I, Irwin AJ (2016) Phylogenetic diversity in the macromolecular composition of microalgae. *PLoS One* **11**, e0155977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155977>
- Foflonker F, Mollegard D, Ong M, Yoon HS, Bhattacharya D (2018) Genomic analysis of *Picochlorum* species reveals how microalgae may adapt to variable environments. *Molecular biology and evolution* **35**, 2702-2711. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy167>

Garrido-Cardenas JA, Manzano-Agugliaro F, Acien-Fernandez FG, Molina-Grima E (2018) Microalgae research worldwide. *Algal research* **35**, 50-60. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.005>

Goswami RK, Agrawal K, Verma P (2021) Phycoremediation of nitrogen and phosphate from wastewater using *Picochlorum* sp.: A tenable approach. *Journal of Basic Microbiology*. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100277>

Griffiths MJ, van Hille RP, Harrison ST (2014) The effect of nitrogen limitation on lipid productivity and cell composition in *Chlorella vulgaris*. *Applied microbiology and biotechnology* **98**, 2345-2356. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-013-5442-4>

Guillard RRL (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. U: Culture of Marine Invertebrate Animals, (Smith, W. L., Chanley, M. H., ured.), Plenum Press, New York, str. 26–60.

Haji Abolhasani M, Safavi M, Goodarzi MT, Kassae SM, Azin M (2018) Statistical optimization of medium with response surface methodology for biomass production of a local Iranian microalgae *Picochlorum* sp. RCC486. *Advanced Research in Microbial Metabolites & Technology* **1**, 39-49. <https://dx.doi.org/10.22104/armmt.2018.3075.1017>

Ho SH, Huang SW, Chen CY, Hasunuma T, Kondo A, Chang JS (2013) Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresource technology* **135**, 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.100>

Huang Q, Jiang F, Wang L, Yang C (2017) Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms. *Engineering* **3**, 318-329. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.020>

Jeffrey SW, Humphrey GF (1975) New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls *a*, *b*, *c* and *c2* in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **167**, 191–194. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3)

John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A (2011) Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource technology* **102**, 186-193. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.139>

- 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>
- Koca N, Karadeniz F, Burdurlu HS (2007) Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. *Food Chemistry* **100**, 609-615. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.079>
- Koller M, Muhr A, BrauneGG G (2014) Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal research* **6**, 52-63. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>
- Koyande AK, Chew KW, Rambabu K, Tao Y, Chu DT, Show PL (2019) Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness* **8**, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>
- Lee E, Jalalizadeh M, Zhang Q (2015) Growth kinetic models for microalgae cultivation: a review. *Algal research* **12**, 497-512. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.004>
- Liang S, Liu X, Chen F, Chen Z (2004) Current microalgal health food R & D activities in China. In *Asian pacific phycology in the 21st century: Prospects and challenges* (pp. 45-48). Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0944-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0944-7_7)
- Mishra SK, Suh WI, Farooq W, Moon M, Shrivastav A, Park MS, Yang JW (2014) Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource technology* **155**, 330-333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.077>
- Moussa IDB, Chtourou H, Hassairi I, Sayadi S, Dhouib A (2019) The effect of switching environmental conditions on content and structure of lipid produced by a wild strain *Picochlorum* sp. *Renewable Energy* **134**, 406-415. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.11.050>
- Negi S, Barry AN, Friedland N, Sudasinghe N, Subramanian S, Pieris S, Omar Holguin F, Dungan B, Schaub T, Sayre, R (2016) Impact of nitrogen limitation on biomass, photosynthesis, and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana*. *Journal of applied phycology* **28**, 803-812. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0652-z>

Nunez M, Quigg A (2016) Changes in growth and composition of the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Nannochloropsis salina* in response to changing sodium bicarbonate concentrations. *Journal of Applied Phycology* **28**, 2123-2138. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0746-7>

Olia MSJ, Azin M, Sepahi AA, Moazami N (2020) Miniaturized culture method for the statistical study of growth rate and carbohydrate content of *Picochlorum* sp. D8 isolated from the Persian Gulf. *Renewable Energy* **149**, 479-488. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.12.069>

Pancha I, Chokshi K, Ghosh T, Paliwal C, Maurya R, Mishra S (2015) Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource technology* **193**, 315-323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.107>

Ras M, Steyer JP, Bernard O (2013) Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **12**, 153-164. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9310-6>

Rizwan M, Mujtaba G, Memon SA, Lee K, Rashid N (2018) Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **92**, 394-404. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>

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>

Tran D, Giordano M, Louime C, Tran N, Vo T, Nguyen D, Hoang T (2014) An isolated *Picochlorum* species for aquaculture, food, and biofuel. *North American Journal of Aquaculture* **76**, 305-311. <https://doi.org/10.1080/15222055.2014.911226>

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>



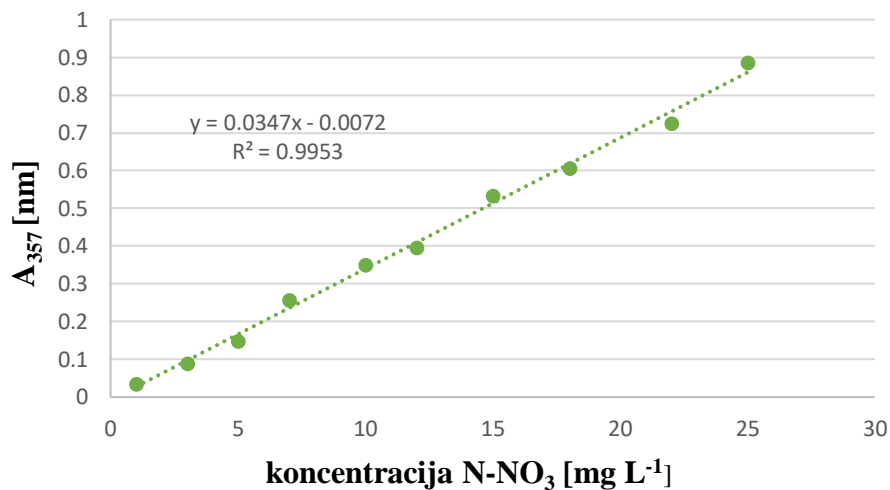
White DA, Pagarette A, Rooks P, Ali ST (2013) The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. *Journal of applied phycology* **25**, 153-165. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9849-6>

Yang F, Xiang W, Sun X, Wu H, Li T, Long L. (2014) A novel lipid extraction method from wet microalga *Picochlorum* sp. at room temperature. *Marine drugs* **12**, 1258-1270.

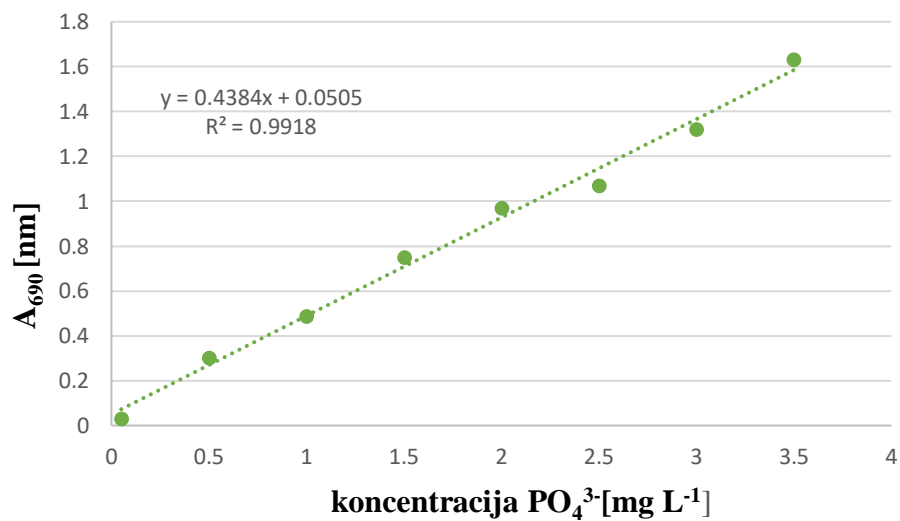
Zhu Y, Dunford NT (2013) Growth and biomass characteristics of *Picochlorum oklahomensis* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **90**, 841-849. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2225-0>

## 7. PRILOZI

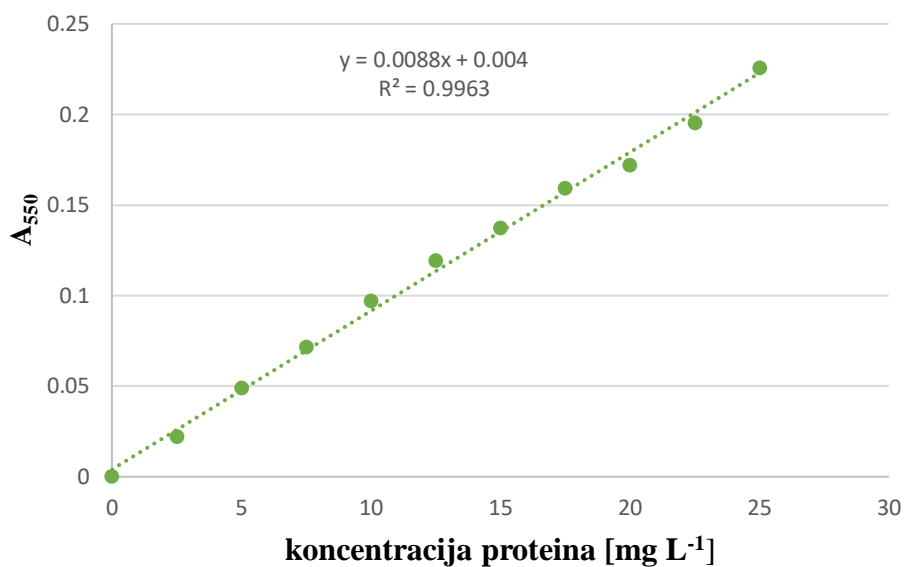
Prilog 7.1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije nitrata



Prilog 7.2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije fosfata

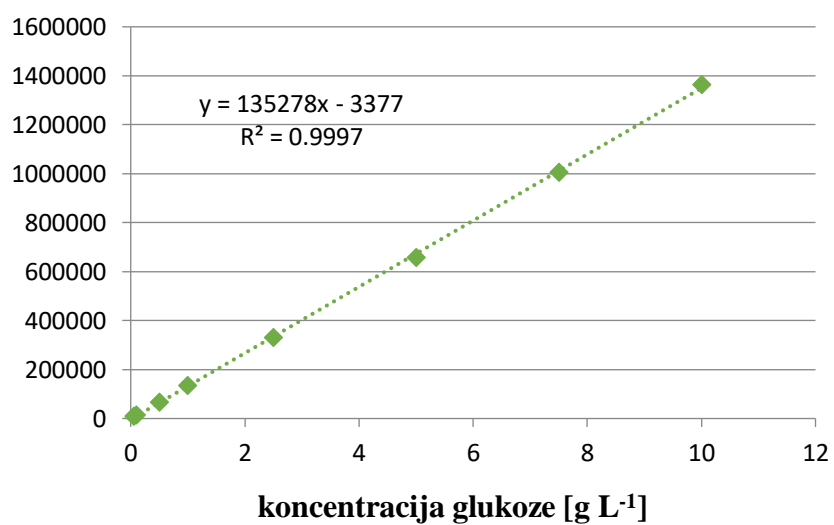


**Prilog 7.3.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina metodom po Lowryju

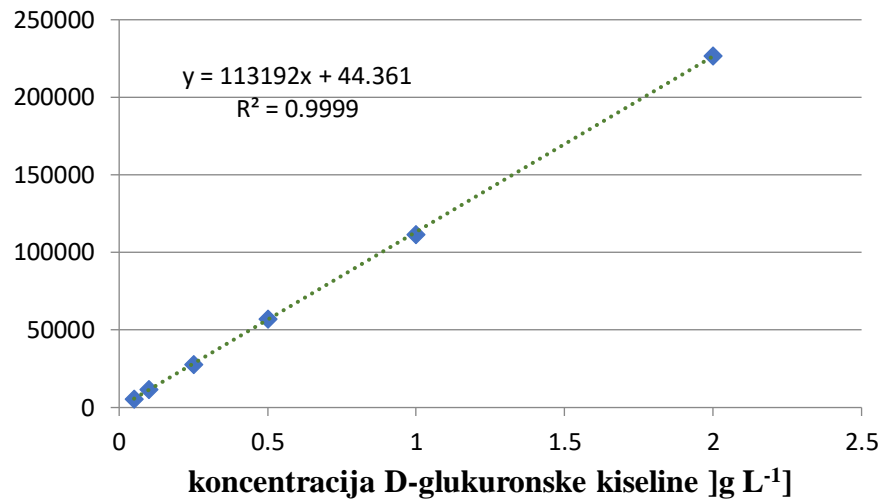


**Prilog 7.4.** Baždarni dijagrami za određivanje koncentracija ugljikohidrata UPLC analizom

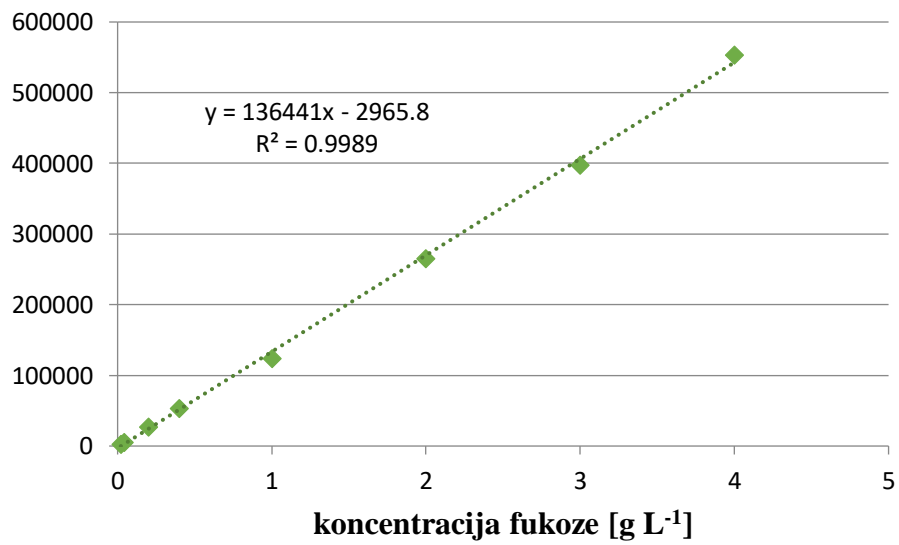
a) Glukoza



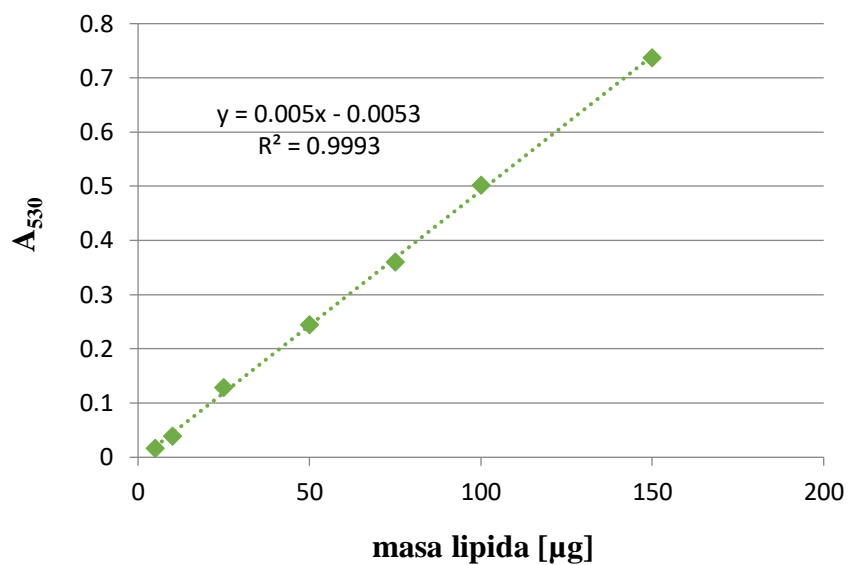
b) D-glukuronska kiselina



c) Fukoza

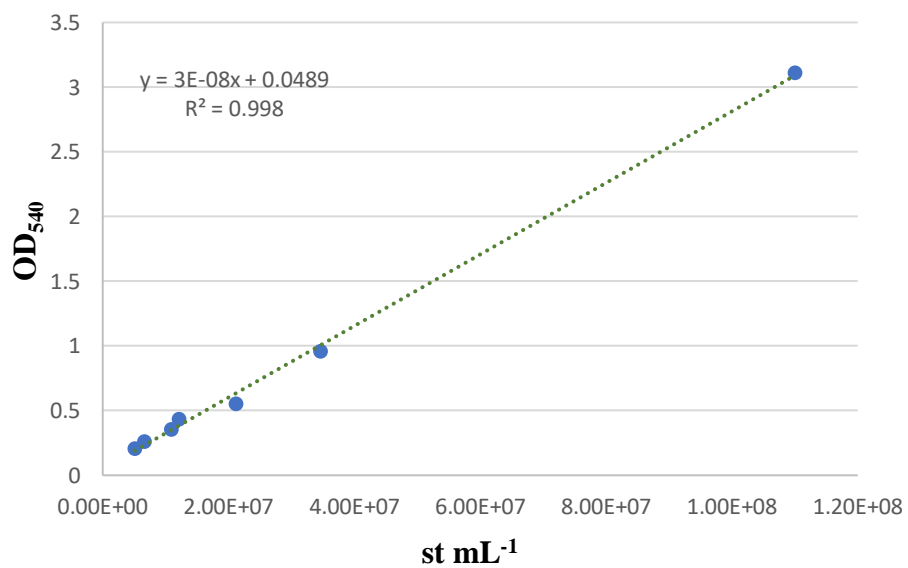


**Prilog 7.5.** Baždarni dijagram za određivanje lipida vanilin metodom

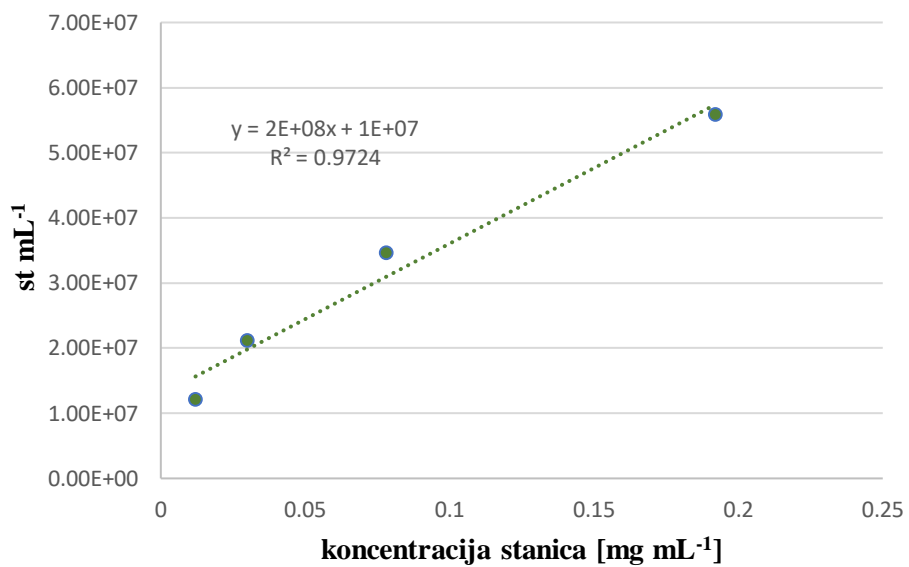


**Prilog 7.6.** Baždarni dijagrami

a) Ovisnost  $OD_{540}$  o broju stanica po mililitru

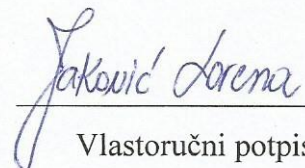


b) Ovisnost broja stanica po mililitru o koncentraciji stanica



## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja LORENA JAKOVIĆ 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.

A handwritten signature in blue ink that reads "Jaković Lorena". The signature is written in a cursive style with a large initial 'J'. A horizontal line is drawn below the signature.

Vlastoručni potpis