

Heterotrofni i miksotrofni uzgoj mikroalge *Chlamydomonas* sp.

Komušar, Leonarda

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:546982>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2019.

Leonarda Komušar

1156/BPI

**HETEROTROFNI I
MIKSOTROFNI UZGOJ
MIKROALGE *CHLAMYDOMONAS*
SP.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirele Ivančić Šantek, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć mag. ing. Marine Grubišić. Diplomski rad je izrađen u okviru HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-9717).

ZAHVALA

Veliku zahvalu dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek koja mi je omogućila izradu ovog diplomskog rada te je uvijek imala strpljenja za moje upite i savjetovala me tijekom izrade rada.

Također, veliko hvala upućujem mag. ing. Marini Grubišić zbog uloženog truda, znanja, strpljenja i vremena, te ugodne atmosfere prilikom izrade rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i dečku na strpljenju, moralnoj podršci, ljubavi te povjerenju koje su mi ukazali tijekom studiranja.

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

HETEROTROFNI I MIKSOTROFNI UZGOJ MIKROALGE *CHLAMYDOMONAS SP.*

Leonarda Komušar, 1156/BPI

Sažetak:

Istražen je rast tri soja mikroalgi, D2-1, F10 i D10, na različitim izvorima ugljika pri miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima uzgoja. Najveći prinos biomase za sva tri soja postignut je na melasi kao izvoru ugljika pri početnoj koncentraciji do 35 g L⁻¹. Određen je učinak omjera izvora ugljika i dušika (C/N) u hranjivoj podlozi na rast i makromolekularni sastav stanične biomase mikroalge *Chlamydomonas sp.* pri različitim uvjetima uzgoja. Pri nižem omjeru C/N od 10 mol mol⁻¹ zamijećeno je značajno nakupljanje i lipida i ugljikohidrata neovisno o načinu uzgoja. Međutim heterotrofni uvjeti uzgoja potaknuli su proizvodnju ugljikohidrata u stanicama mikroalge, dok su miksotrofni uvjeti uzgoja podupirali nakupljanje lipida. Proveden je jednostavni šaržni uzgoj mikroalge *Chlamydomonas sp.* s pritokom supstrata u cilju postizanja visoke koncentracije biomase. Zadnji dan uzgoja postignuta je maksimalna produktivnost biomase (1,10 g L⁻¹ dan⁻¹), ugljikohidrata (0,31 g L⁻¹ dan⁻¹) i lipida (0,14 g L⁻¹ dan⁻¹).

Ključne riječi: mikroalge, *Chlamydomonas sp.*, lipidi, pigmenti, masne kiseline

Rad sadrži: 68 stranica, 22 slike, 19 tablica, 97 literaturnih navoda, 0 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. Blaženka Kos
2. Prof.dr.sc. Mirela Ivančić Šantek
3. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
4. Prof.dr.sc. Vlatka Petravić Tominac

Datum obrane: 27. studenog 2019.

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: Food Technology *or* Biotechnology *or* Nutrition

HETEROTROPHIC AND MIXOTROPHIC CULTIVATION OF MICROALGAE *CHLAMYDOMONAS SP.*

Leonarda Komušar, 1156/BPI

Abstract:

The growth of three microalgal strains, D2-1, F10 and D10, on different carbon sources was studied under mixotrophic and heterotrophic conditions. The highest biomass yield for all studied strains was obtained mixotrophically with molasses as carbon source at initial concentrations below 35 g L⁻¹. The influence of the carbon to nitrogen (C/N) ratio of cultivation media on growth of *Chlamydomonas* sp. and macromolecular composition of cell biomass was assessed under different cultivation conditions. At lower C/N ratio of 10 mol mol⁻¹ significant increase of both lipid and carbohydrate accumulation was observed regardless of the cultivation conditions. However, heterotrophic conditions stimulated carbohydrate production, while mixotrophic conditions enhanced lipid accumulation. A simple fed-batch process for high cell density cultivation of *Chlamydomonas* sp. was conducted. The last day of heterotrophic cultivation, maximum productivities of biomass (1,10 g L⁻¹ day⁻¹), carbohydrates (0,31 g L⁻¹ day⁻¹) and lipid (0,14 g L⁻¹ day⁻¹) synthesis were achieved.

Keywords: microalgae, *Chlamydomonas* sp., lipids, pigments, fatty acids

Thesis contains: 68 pages, 22 figures, 19 tables, 97 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

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

Technical support and assistance: *Marina Grubišić, mag. ing.*

Reviewers:

1. Prof.dr.sc. Blaženka Kos
2. Prof.dr.sc. Mirela Ivančić Šantek
3. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
4. Prof.dr.sc. Vlatka Petravić Tominac

Thesis defended: 27 November 2019

Sadržaj	stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KLASIFIKACIJA MIKROALGI	2
2.2. UZGOJ MIKROALGI	4
2.2.1. Čimbenici rasta mikroalgi	4
2.2.2. Sustavi za uzgoj mikroalgi	6
2.2.3. Načini uzgoja mikroalgi	8
2.3. PROIZVODI MIKROALGI	10
2.3.1. Makromolekule	10
2.3.1.1. <i>Ugljikohidrati</i>	10
2.3.1.2. <i>Proteini</i>	11
2.3.1.3. <i>Lipidi</i>	12
2.3.2. Pigmenti	13
2.3.2.1. <i>Klorofili</i>	13
2.3.2.2. <i>Karotenoidi</i>	15
2.3.2.3. <i>Fikobilini</i>	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Radni mikroorganizam	17
3.1.2. Sirovine za pripremu hranjive podloge	17
3.1.3. Ostale kemikalije korištene u eksperimentima	18
3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj mikroalgi	18
3.1.4.1. <i>Hranjive podloge za istraživanje rasta mikroalgi na različitim izvorima ugljika</i>	19
3.1.4.2. <i>Hranjive podloge za istraživanje rasta mikroalgi na različitim izvorima dušika</i>	20
3.1.4.3. <i>Hranjiva podloga za šaržni uzgoj s pritokom supstrata</i>	20
3.1.5. Oprema i aparatura	20
3.1.5.1. <i>HPLC</i>	20
3.1.5.2. <i>Sustav za plinsku kromatografiju (GC)</i>	20
3.1.5.3. <i>Ostali uređaji</i>	21
3.2. METODE	21
3.2.1. Mjerenje optičke gustoće kulture	21
3.2.2. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase	22

3.2.3.	Ispitivanje rasta mikroalgi na različitim izvorima ugljika u heterotrofnim i miksotrofnim uvjetima rasta	22
3.2.4.	Učinak koncentracije izvora ugljika na rast mikroalgi	23
3.2.5.	Optimiranje koncentracije izvora dušika	24
3.2.6.	Šaržni uzgoj s pritokom supstrata	24
3.2.7.	Određivanje udjela ugljikohidrata u biomasi	25
3.2.7.1.	<i>Kiselinska hidroliza mikroalgi</i>	25
3.2.7.2.	<i>Određivanje koncentracije monosaharida pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) te tekućinske kromatografije ultravisoke učinkovitosti (UPLC)</i>	25
3.2.8.	Određivanje udjela proteina u biomasi	26
3.2.8.1.	<i>Određivanje proteina metodom po Lowry-ju</i>	26
3.2.8.2.	<i>Određivanje proteina metodom po Bradford-u</i>	27
3.2.9.	Određivanje udjela lipida u biomasi	28
3.2.10.	Analiza sastava pigmenata u biomasi	28
3.2.10.1.	<i>Ekstrakcija pigmenata</i>	28
3.2.10.2.	<i>Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije klorofila a i klorofila b</i>	29
3.2.11.	Određivanje sastava masnih kiselina u ukupnim lipidima izoliranim iz mikroalgi	29
3.2.12.	Određivanje parametra uspješnosti bioprocesa	31
4.	REZULTATI I RASPRAVA	32
4.1.	ISPITIVANJE RASTA MIKROALGI NA RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJIKA U HETEROTROFNIM I MIKSOTROFNIM UVJETIMA RASTA	33
4.2.	UČINAK KONCENTRACIJE IZVORA UGLJIKA NA RAST MIKROALGI	36
4.3.	UČINAK OMJERA C/N NA SASTAV STANIČNE BIOMASE I UDIO KLOROFILA	40
4.3.1.	Sastav makromolekula	42
4.3.2.	Sastav pigmenata	43
4.3.3.	Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima	44
4.4.	ŠARŽNI UZGOJ S PRITOKOM SUPSTRATA	47
4.4.1.	Sastav makromolekula	48
4.4.2.	Sastav pigmenata	51
4.4.3.	Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima	53
5.	ZAKLJUČCI	57
6.	LITERATURA	59

1. UVOD

Alge se stoljećima koriste u prehrani ljudi na području Azije, Afrike i Meksika, a danas se sve češće koriste kao dodatak prehrani zbog iznimnih nutritivnih svojstava. One su bogat izvor proteina, ugljikohidrata, minerala, vitamina, pigmenta i niza biološki aktivnih molekula s protuupalnim, antioksidativnim, antitumorskim, antivirusnim i imunostimulativnim djelovanjem (Becker, 2007). Ubrzan porast broja stanovništva na Zemlji, nedovoljne količine hrane i iscrpljivanje zaliha fosilnih goriva u svijetu, potaknuo je istraživanja na području uzgoja algi i mikroalgi u velikom mjerilu (Marques i sur., 2011). Također, mikroalge predstavljaju jedan od najperspektivnijih resursa za proizvodnju biogoriva te bioremedijaciju (Solovchenko i sur., 2011). Općenito, mikroalge su heterogena grupa mikroorganizama, koja se obično nalazi u slatkovodnim i morskim staništima. Imaju veliki ekološki značaj, s obzirom da doprinose do 40 % kisika u atmosferi te su glavni proizvođači organske tvari u oceanima i morima. Čine veliku, nedovoljno istraženu skupinu mikroorganizama te tako pružaju nov neistražen izvor vrijednih proizvoda (Priyadarshani i Rath, 2012). U stresnim uvjetima, mikroalge usmjeravaju tok ugljika u metaboličkim putevima prema sintezi i nakupljanju rezervnih ugljikohidrata i lipida (Gouveia, 2011).

U ovom radu bio je cilj istražiti rast tri soja mikroalgi (D2-1, F1 i D10) u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima na različitim izvorima ugljika. Također, istražen je učinak omjera izvora ugljika i dušika (C/N) na rast i makromolekulski sastav biomase mikroalge *Chlamydomonas* sp., te udio pigmenata i sastav masnih kiselina u ukupnim staničnim lipidima. S ciljem postizanja visoke koncentracije biomase mikroalgi, proveden je jednostavi šaržni uzgoj *Chlamydomonas* sp. s pritokom supstrata u heterotrofnim uvjetima uzgoja. Analiziran je makromolekulski sastav, udjel klorofila te sastav masnih kiselina u ukupnim staničnim lipidima tijekom uzgoja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KLASIFIKACIJA MIKROALGI

Mikroalge su heterogena grupa mikroorganizama opisana kao jednostanični, ili jednostavni višestanični kolonijalni fotoautotrofni sustav. Ubrajaju se u prokariotske ili eukariotske mikroorganizme široke biološke raznolikosti (Marques i sur., 2011). Filogenetska raznolikost posljedica je različitosti metaboličkih puteva i makromolekulskog sastava koji uključuje raznolikosti pigmentata, fotosintetskih rezervnih proizvoda, masnih kiselina i lipida, ulja, sterola i ugljikohidrata te bioaktivnih spojeva, uključujući i sekundarne metabolite (Heimann i Huerlimann, 2015). Jednostavna stanična struktura mikroalgi omogućava stanici brzu adaptaciju na promjene u okolini i brz rast uz dostatan prinos biomase. Zbog toga ih nalazimo u različitim ekosustavima kao što su tekući i mirujući vodeni ekosustavi (mora, rijeke, jezera, lagune) odnosno staništa u kojima vladaju ekstremni uvjeti života (npr. nepristupačni dijelovi pustinje, toplinski izvori i ispod leda Antarktika). Znanstvena literatura ukazuje na postojanje od 200 000 do nekoliko milijuna vrsta mikroalgi, dok broj vrsta viših biljaka na zemlji iznosi oko 250 000 (Singh i Saxena, 2015).

Filogenija mikroalgi i srodnih mikroorganizama razvila se u posljednjih nekoliko godina. Povijesno, vrste mikroalgi su prepoznate na temelju fenotipskih svojstava, kao što su morfologija cijelog organizma, stanična anatomija i ultrastruktura, metabolizam i fiziologija (Marques i sur., 2011). Živa bića na zemlji raspodijeljena su u 6 carstava: Bacteria, Protozoa, Chromista, Fungi, Plantae i Animalia. Mikroalge su raspodijeljene u 3 prethodno navedena carstva: Plantae, Chromista i Protozoa (Tablica 1.) (Cavalier-Smith, 2004).

Tablica 1. Klasifikacija algi unutar tri carstava prema Cavalier-Smith-u (1998, 2010), sa primjerima od komercijalne važnosti (Heimann i Huerlimann, 2015).

Carstvo	Koljeno	Podcarstvo	Red/Podred	Primjeri
Plantae	Biliphyta ¹	Glaucophyta ¹	Glaucophyta	
		Rhodophyta ¹	/Rhodellophytina ¹	
			/Macrorhodophytina ¹	Prasinophytae ¹
	Viridiplantae	Chlorophyta	/Chlorophytina ¹	Tetraphytiae ¹ (<i>Ulva</i> , <i>Chlamydomonas</i> ,

¹ Nova klasifikacija

				<i>Chlorella,</i> <i>Tetraselmis)</i>
			/Phragmophytina ¹	Charophytae, Rudophytae ¹
Chromista	Harosa ¹	Heterokonta	Ochrophyta	Dijatomeje, pedinelidi, silikoflagelati, pelagofiti, smeđe alge, ksantofiti, krizofiti, eustigmatofiti, rafidofiti
			Bigyra	Labyrinthulae, npr. Traustochytridi
		Alveolata	Myozoa	Dinoflagelati (npr. <i>Cryptocodinium</i>), Perkinsis, Apicomplexa
		Rhizaria	Ciliophora	Cilijati
			Cercozoa	Chlotachniophyta, npr. <i>Bigelowiella</i>
			Reataria	Foraminifera, Radiozoa
	Hacrobia ¹		Haptophyta	<i>Pavlova,</i> <i>Prymnesium,</i> <i>Isochrysis,</i> <i>Chrysochromulina</i>
			Cryptista	<i>Rhodomonas,</i> <i>Chryptomonas</i>
			Heliozoa	Centrohelia
Protozoa	Eozoa	Euglenozoa	Euglenozoa	Euglenoeida, Diplonemea, Postgaardea, Kinetoplastea

¹ Nova klasifikacija.

2.2. UZGOJ MIKROALGI

2.2.1. Čimbenici rasta mikroalgi

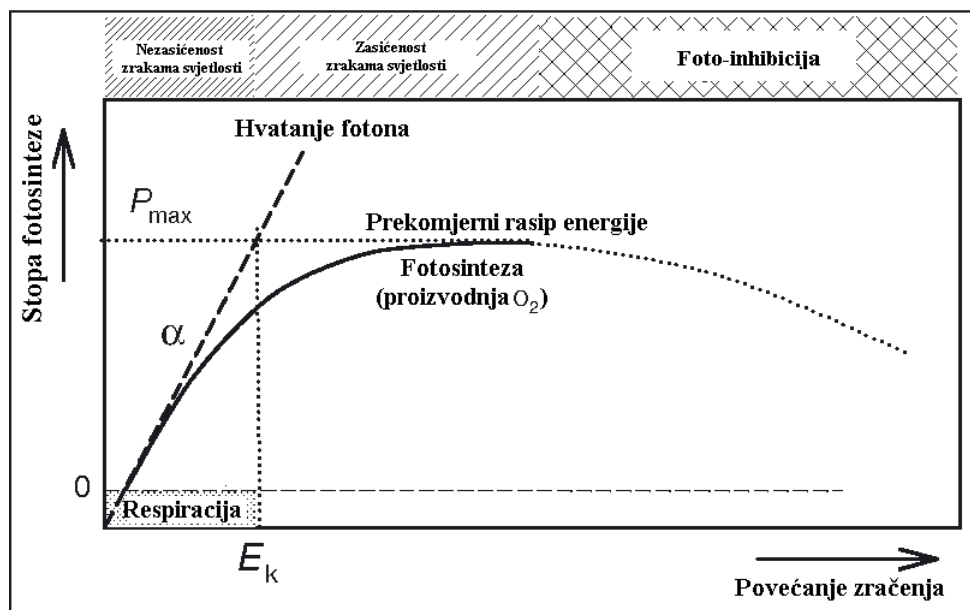
Za maksimalan rast mikroalgi, potrebno je osigurati fiziološki optimalne uvjete rasta tj. pH, temperaturu, intenzitet svjetla te odgovarajuću koncentraciju hranjivih tvari. Pri tome je važan odabir bioreaktora za uzgoj jer njegove konstrukcijske karakteristike utječu na rast mikroorganizma (Pulz, 2001). Konstrukcijske karakteristike bioreaktora utječu na okolišne uvjete u kojima se odvija rast mikroalgi, što posljedično utječe na produktivnost samog procesa uzgoja. Uzgoj mikroalgi provodi se u dva različita sustava, prvi se provodi u prirodnim otvorenim jezerima i ribnjacima (Slika 2., a), a drugi u kontroliranim uvjetima u fotobioreaktoru (PBR) (Griffiths, 2013). U tablici 2. prikazani su ključni čimbenici koji neposredno utječu na rast mikroalgi, te posljedice njihove previsoke ili preniske vrijednosti.

Tablica 2. Učinak pojedinih čimbenika na rast mikroalgi (Griffiths, 2013).

Čimbenik	Vrlo niska vrijednost	Vrlo visoka vrijednost
Svjetlost	Nemogućnost provođenja fotosinteze, spori rast	Fotoinhibicija, foto- i oksidativna oštećenja u stanici
Temperatura	Sporiji rast	Smrt stanica
Nutrijenti	Inhibicija rasta	Toksičnost/inhibicija
Miješanje	Slab prijenos mase, taloženje biomase, područja bez otopljenog kisika	Visok utrošak energije, oštećenje stanice uslijed jakih sila smicanja

Svjetlost predstavlja ključni limitirajući čimbenik rasta pri fotoautotrofnim uvjetima uzgoja mikroalgi o čemu naknadno ovisi izgled PBR-a (Pulz, 2001). Fotosintetska aktivnost mikroalgi mijenja se ovisno o intenzitetu svjetlosti tako da porastom osvjetljenja, raste i brzina fotosinteze (Slika 1.). U fazi nedostatnog toka svjetlosti, brzina fotosinteze raste. Kada stanice

postanu zasićene količinom svjetla, smanjuje se količina apsorbiranih fotona, te posljedično nema daljnjeg povećanja brzine fotosinteze s povećanjem intenziteta svjetlosti. Izlaganjem previsokom intenzitetu svjetlosnog zračenja, stanice postaju foto-inhibirane te se brzina fotosinteze počinje smanjivati (Tablica 2., Slika 1.). Slika 1. prikazuje ovisnost brzine fotosinteze o intenzitetu zračenja svjetlosti (puna linija). Početni nagib pravca na početnom dijelu krivulje (α , deblja isprekidana linija) pokazuje maksimalnu kvantnu učinkovitost fotosintetskog transporta elektrona. Sjecište između maksimalne brzine fotosinteze (P_{max}) i α predstavlja optimalni intenzitet zračenja, E_k . (Griffiths, 2013; Malapascua i sur, 2014).



Slika 1. Ovisnost fotosinteze o intenzitetu zračenja svjetlosti (Malapascua i sur, 2014).

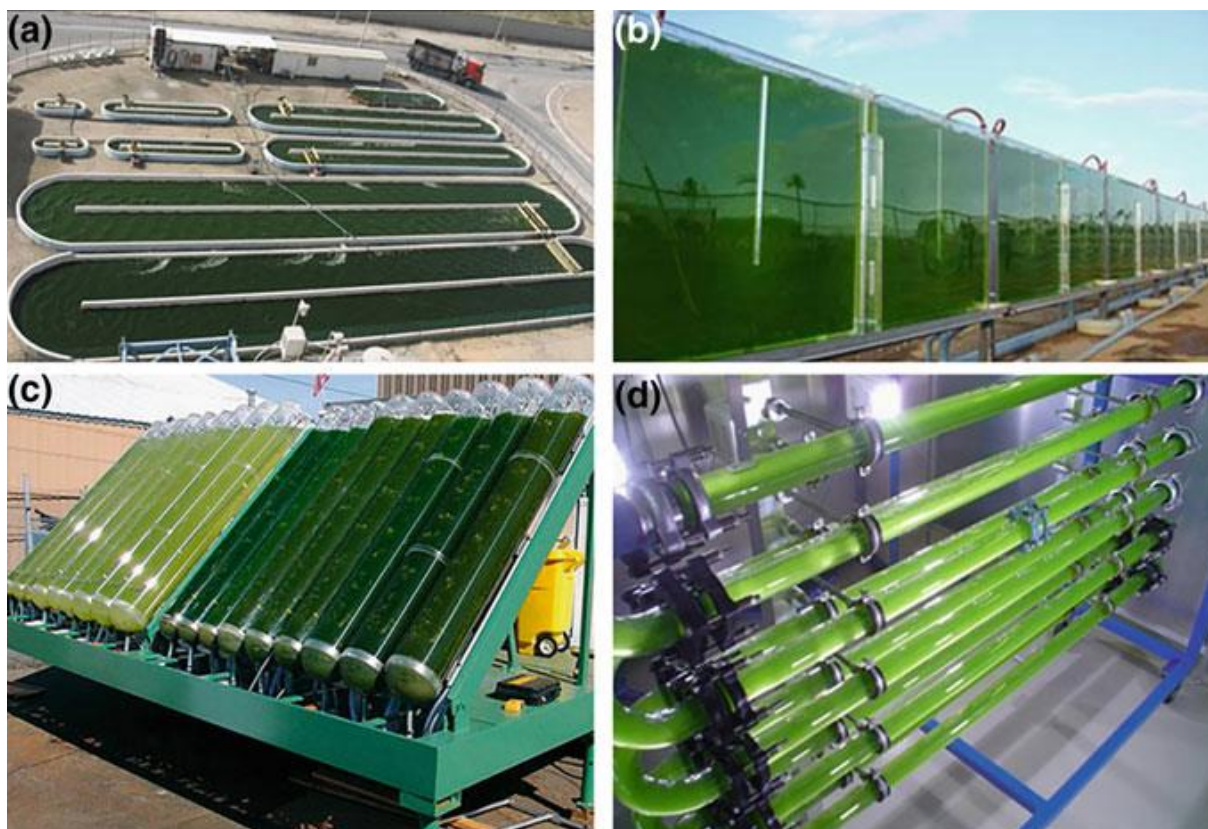
Osim svjetlosti, temperatura je jedan od čimbenika koji je zahtjevan za kontrolu i održavanje, pogotovo u otvorenim sustavima za uzgoj. Optimalna temperatura uzgoja mikroalgi kreće se između 20°C i 30°C (Chisti, 2008). Mnoge stanice mikroalgi mogu tolerirati temperaturu i do 15°C nižu od optimalne, no temperatura samo par stupnjeva viša od optimalne može dovesti do smrti stanica (Mata i sur., 2010). Također, povišene temperature uzrokuju smanjenje učinkovitosti fotosinteze. Postoji veza između dostupnosti svjetlosti i visine temperature prilikom uzgoja. Primjerice, u slučaju naglog porasta svjetlosnog zračenja kod temperatura nižih od optimalnih, može doći do foto-inhibitornog stresa jer nisu sposobne apsorbirati fotone (Tablica 2.) (Griffiths, 2013).

Optimalna opskrba hranjivim tvarima, uglavnom ugljikom, dušikom i fosforom, zajedno s drugim makro- i mikronutrijentima potrebnima za rast, preduvjet je za visok prinos biomase (Pulz, 2001). S obzirom na to da hranjive tvari predstavljaju veliki trošak kod uzgoja

mikroalgi, potrebno je dizajnirati reaktorski sustav koji omogućava učinkovito recikliranje hranjivog medija. Sve hranjive tvari neophodne za rast, s izuzetkom svjetla i anorganskog ugljika, mogu se u dostatnim količinama otopiti u tekućem mediju. Ugljik je glavni sastojak stanica mikroalgi (često čini 50 % suhe tvari biomase), a obično se dobiva iz ugljikovog dioksida (Chisti, 2007; Chisti, 2008). S obzirom na to da je koncentracija CO₂ u zraku vrlo mala, za rast mikroalgi potrebno je dovoditi zrak obogaćen s CO₂ (npr. plinovi izgaranja iz termoelektrana) (Pulz, 2001). U kulturama mikroalgi visoke gustoće, ključni izazov je osiguravanje prijenosa mase hranjivih tvari, pogotovo CO₂ u stanice i O₂ van stanice. Kako bi se omogućio optimalan prijenos mase i topline, potrebno je osigurati dobar sustav miješanja u bioreaktoru (Tablica 2.) (Griffiths, 2013).

2.2.2. Sustavi za uzgoj mikroalgi

Za uzgoj mikroalgi koriste se različiti otvoreni i zatvoreni bioreaktorski sustavi (Richmond, 2000). Nema sumnje da se veliki otvoreni bazeni i dalje najčešće koriste za uzgoj mikroalgi, ali je njihova upotreba ograničena na manje zahtjevne sojeve mikroalgi koje mogu tolerirati značajnije promjene u okolini (Carvalho i sur., 2006). Zbog sve većeg interesa za različite proizvode iz biomase mikroalgi, sve više se za uzgoj koriste zatvoreni bioreaktorski sustavi, posebno za proizvodnju visoko vrijednih proizvoda (npr. pigmenata) za koje je potrebno osigurati visoki stupanj sterilnosti procesa. Unatoč višoj cijeni i kompleksnosti, zatvoreni sustavi omogućavaju bolju kontrolu procesa uzgoja, a sam uzgoj se provodi u fotobioreaktorima (PBR). PBR je reaktor u kojem se organizmi koji dobivaju energiju iz svjetlosti, poput algi, biljaka, i određenih mikrobnih stanica (fototrofa), koriste za provođenje reakcija (Mata i sur., 2010). U smislu konstrukcije, zatvoreni PBR-i se mogu podijeliti na pločaste fotobioreaktore (Slika 2., b), barbotirajuće kolone (eng. column photobioreactors) (Slika 2., c) i cijevne fotobioreaktore (Slika 2., d) (Zhang i sur., 2018). U tablici 3. prikazana je usporedba otvorenih i zatvorenih bioreaktorskih sustava.



Slika 2. Prikaz različitih bioreaktorskih sustava za uzgoj mikroalgi. (a) otvoreni bazeni; (b) pločasti PBR; (c) barbotirajuće kolone; (d) cijevni PBR (Zhang i sur., 2018).

Tablica 3. Usporedba otvorenih i zatvorenih bioreaktorskih sustava (Griffiths, 2013).

	Otvoreni sustavi	Zatvoreni sustavi
Vrsta mikroalge		
Izbor vrste	Ograničen	Fleksibilan
Glavni kriterij za izbor vrste	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kompetitivnost kod rasta ▪ Tolerancija na širok raspon vanjskih uvjeta 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Otpornost na sile smicanja ▪ Tolerancija na promjenu temperature ▪ Otpornost na visoke konc. O₂
Rizik od kontaminacije	Visok	Smanjen
Sterilnost	Nesterilno	Sterilno
Svjetlost		
Učinkovitost iskorištenja svjetlosti	Niska	Visoka
Omjer površine i volumena	Malen (5-10 m ⁻¹)	Velik (20-200 m ⁻¹)
Kontrola procesa		
Miješanje	Slabo	Dobro
Prijenos mase plin-tekućina	Slab	Dovoljan/visok
Gubitak CO ₂	Visok	Ovisi o pH i reciklaciji zraka
Nakupljanje O ₂	Nisko	Visoko

Mogućnost pregrijavanja	Niska	Visoka
Kontrola temperature	Teža kontrola, no hlađenje nije toliko potrebno obzirom na veliki volumen bazena	Lakša kontrola, no hlađenje je češće potrebno
Hidrodinamički stres	Nizak	Visok
Gubitak vode uslijed isparavanja	Površinsko isparavanje	Ovisi o dizajnu hlađenja
Ovisnost o vremenskim uvjetima	Visoka	Niža
Razdoblje uzgoja	Limitirano	Produženo
Produktivnost		
Koncentracija biomase	Niska (<1 gL ⁻¹)	Visoka (>2 gL ⁻¹)
Produktivnost biomase	Niska	Visoka
Reproducibilnost	Varijabilna, no postaje konzistentna s vremenom	Moguća unutar određenih granica
Trošak		
Kapitalni trošak	Nizak	Visok
Najskuplji operativni parametar	Miješanje	Temperatura
Potreba za dovođenjem energije	Niska	Visoka
Efikasnost izdvajanja biomase	Niska zbog niske koncentracije biomase	Viša zbog visoke koncentracije biomase

2.2.3. Način uzgoja mikroalgi

Postoje tri načina uzgoja mikroalgi: heterotrofni, miksotrofni i fotoautotrofni (Venkatesan i sur., 2015). Fotoautotrofni oblik uzgoja je onaj kod kojeg mikroorganizmi za rast koriste anorganske izvore ugljika (CO₂ ili bikarbonate), a fotosintezom se svjetlosna energija provodi u kemijsku energiju. Kod heterotrofnog uzgoja, mikroalge koriste organski izvor ugljika za rast, a sam uzgoj se provodi bez prisustva svjetla. Najčešće se ovaj tip uzgoja koristi za proizvodnju visoko vrijednih proizvoda. Miksotrofni oblik uzgoja predstavlja kombinaciju fotoautotrofnog i heterotrofnog uzgoja, gdje mikroalge koriste organski izvor ugljika i sunčevu svjetlost za rast (Pires, 2015).

Fotoautotrofni oblik uzgoja mikroalgi provodi se i u otvorenim i u zatvorenim sustavima (Marques i sur., 2011). Ugljik, dušik i fosfor su tri najvažnija hranjiva sastojka za autotrofni rast, a njihov unos ovisi o brojnim čimbenicima, primjerice, okolišnim uvjetima, vrsti mikroalge, omjerima hranjivih sastojaka i stopi rasta. Kao izvor ugljika može se koristiti ugljikov dioksid iz dimnih plinova iz termoelektrana (Pires, 2015). Prilikom ovog načina uzgoja recikliraju se staklenički plinovi te se smanjuje njihova emisija u atmosferu. U posljednjih

nekoliko godina razvijaju se zatvoreni fotoautotrofni kultivacijski sustavi s transparentnim stjenkama (staklenim ili plastičnim), kako bi se prevladali osnovni nedostaci otvorenih sustava, a to je pretežito niska produktivnost i učestala pojava kontaminacije, te time omogućio uzgoj mikroalgi s niskom tolerancijom na okolišne promjene (Grobbelaar, 2013).

Kao što je prethodno navedeno, kod heterotrofnog uzgoja mikroalge kao izvor ugljika koriste organske tvari, a sam uzgoj se provodi bez prisustva svjetlosti (Ogbonna i Moheimani, 2015). Pri tome se koriste monosaharidi (npr. galaktoza, glukoza i manoz), šećerni alkoholi (npr. manitol), karboksilne kiseline (npr. acetat) i disaharidi (npr. saharoza i laktoza). Zelene alge imaju transportni sustave za prijenos heksoza, no ne i sustave za transport pentoza poput ksiloze (Nagarajan i sur., 2018). Za razliku od konvencionalnog fotoautotrofnog uzgoja, uzgojem mikroalgi na organskom izvoru ugljika, povećava se brzina rasta i koncentracija biomase te sadržaj lipida i/ili ugljikohidrata u stanici (Perez-Garcia i sur., 2011). Neki izvori ugljika mogu pogodovati heterotrofnom uzgoju, no ne nužno i miksotrofnom, i obratno (Ogbonna i Moheimani, 2015). Osim organskog ugljika, drugi nutrijenti, poput dušika, također su od iznimne važnosti. Mala koncentracija dušika u hranjivoj podlozi ima veliki utjecaj na profil masnih kiselina i lipida te pogoduje njihovom nakupljanju. Glavna prednost ovog oblika uzgoja je dostupni i razvijeni bioreaktori za uzgoj te jednostavniji scale-up procesa (Eriksen, 2008; Pires, 2015). No, heterotrofni oblik uzgoja ima nekoliko glavnih ograničenja:

- postoji ograničen broj mikroalgi koje mogu rasti heterotrofno,
- veći su troškovi proizvodnje zbog većeg utroška energije i cijene organskog supstrata,
- rizik od kontaminacije i natjecanje s drugim mikroorganizmima kontaminantima za supstrat/e,
- moguća inhibicija rasta izvorom ugljika,
- nemogućnost sinteze nekih metabolita u odsustvu svjetlosti (Perez-Garcia i Bashan, 2015).

Neke mikroalge brže rastu na organskom izvoru ugljika u prisustvu svjetlosti. Miksotrofni rast ne zahtijeva konstantnu prisutnost svjetla, što donekle umanjuje energetske troškove (Ogbonna i McHenry, 2015). Ovaj oblik uzgoja predstavlja kombinaciju fotoautotrofnog i heterotrofnog uzgoja (Pires, 2015). Kod miksotrofnog uzgoja, CO₂ i organski izvori ugljika se simultano apsorbiraju te tako respiratorni i fotosintetski metabolizam djeluju istovremeno (Perez-Garcia i Bashan, 2015). Neke mikroalge nisu pravi miksotrofi, no imaju

moгуćnost prebacivanja između fotoautotrofnog i miksotrofnog metabolizma, ovisno o okolišnim uvjetima. Primjerice, prilikom miksotrofnog uzgoja *Spirulina plantensis*, gdje je kao organski izvor ugljika korištena melasa, uočena su dva trenda rasta s točkom usmjeravanja s heterotrofnog na miksotrofni uzgoj (Andrade i Costa, 2007). Miksotrofne kulture obično pokazuju veću stopu rasta od heterotrofnih i fotoautotrofnih kultura (Perez-Garcia i sur., 2011). Unatoč tome, miksotrofni uzgoj se rijetko koristi za proizvodnju ulja iz mikroalgi (Chen i sur., 2011).

2.3. PROIZVODI MIKROALGI

Iako se biomasa mikroalgi već stoljećima koristi kao hrana ili dodatak prehrani, njihov masovni uzgoj započeo je prije nekoliko desetljeća (Marques i sur., 2011). Biomasa mikroalgi ima veliku nutritivnu vrijednost te je bogat izvor proteina, ugljikohidrata, lipida, vlakana, vitamina, pigmenta i minerala (Becker, 2007). Danas se mikroalge uglavnom prodaju kao zdrava hrana ili dodatak prehrani u obliku tableta, kapsula te tekućina (Marques i sur., 2011). Tržišne cijene biomase algi i pojedinih komponenti izdvojenih iz biomase mijenjaju se ovisno o globalnom području na kojem se vrši distribucija, stvarnoj situaciji na tržištu, a posebno čistoći proizvoda. Mora se uzeti u obzir da proizvodi mikroalgi koji imaju najveće tržišne vrijednosti, kao što su pigmenti i višestruko nezasićene masne kiseline, obično čine niski postotak u suhoj tvari biomase. Izolacija i pročišćavanje ovih proizvoda tehnički je vrlo zahtjevna i skupa (Koller i sur., 2014). Osim u proizvodnji proizvoda visoke tržišne vrijednosti, sve se više istražuje mogućnost primjene mikroalgi u proizvodnji obnovljivih izvora energije (poput bioetanol, biodizela i bioplina) pomoću mikroalgi. Ekonomski isplativa proizvodnja trebala bi se zasnivati na principu biorafinerije u kojoj bi se sve komponente mikroalge, kao i nusproizvodi, iskoristile kako bi se ostvario dodatni prihod (Marques i sur., 2011).

2.3.1. Makromolekule

Glavne komponente mikroalgi uključuju lipide, proteine i ugljikohidrate (Singh i sur., 2015). Oni su sintetizirane tijekom rasta mikroalgi, a njihov udio u suhoj tvari ovisi o uvjetima uzgoja (Marques i sur., 2011).

2.3.1.1. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati su esencijalne komponente svake žive stanice. Mikroalge sadrže veliku količinu ugljikohidrata, a oni imaju dvije glavne funkcije u stanici – služe kao rezerve energije

i kao strukturne komponente u staničnim stijenkama. Stanične stjenke mikroalgi sastoje se od 2 sloja, unutarnjeg i vanjskog, sačinjenih od celuloze i hemiceluloze (John i sur., 2011).

Najčešći rezervni polisaharidi mikroalgi obično su škrob i glikogen, a sam raspon polisaharida koje mikroalge proizvode je širok. Primjerice, neke alge proizvode glukane, sulfatirane polisaharide, poput ulvana u zelenim mikroalgama; agara, agaroze, agaropektina, i karagenana kod crvenih mikroalgi te manitola, alginata, fukoidana i laminarina kod smeđih mikroalgi (Chen i sur., 2013; Jung i sur., 2013). Nakon hidrolize ugljikohidrata, oslobađaju se jednostavni ugljikohidrati (osnovne građevne jedinice) poput glukoze, manoze, ksiloze i arabinoze, čiji je sastav kod različitih vrsta algi prikazan u Tablici 5. Ti ugljikohidrati služe kao učinkoviti supstrat u mikrobnim fermentacijama za proizvodnju biogoriva (Wei i sur., 2013). Također, ugljikohidrati proizvedeni od strane ovih mikroorganizama od rastućeg su značaja zbog potencijalne farmakološke primjene. Primjerice, jedan od važnijih koji vrijedi spomenuti je β -1,3-glukan. On je stimulans imunostava, antioksidans i tvar koja regulira razinu kolesterola u krvi, a najčešće se dobiva uzgojem mikroalge *Chlorella* sp. (Spolaore i sur., 2006).

Tablica 4. Sastav ugljikohidrata nekih vrsta mikroalgi (Marou i sur., 2012).

Mikroalga	Ksiloza [%]	Manoza [%]	Glukoza [%]	Galaktoza [%]	Raminoza [%]
<i>Chlorococcum</i> sp.	27	15	47	9	-
<i>Spirulina platensis</i>	7	9,3	54,4	-	22,3
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	-	2,3	74,9	4,5	1,5
<i>Nitzschia closterium</i>	7	16,8	32,6	18,4	7,7
<i>Phaeodactylum tnicornutum</i>	7,5	45,9	21	8,9	8,6
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	1	4,5	85,3	1,1	5,5

Alge koje ne mogu provoditi diobu stanica u mraku, mogu koristiti organski ugljik i akumulirati visoke količine ugljikohidrata. Učinak nedostatka svjetla na rast stanice sličan je limitaciji rasta s npr. izvorom ugljika ili dušika. Stanična dioba je zaustavljena zbog nedostatka svjetlosti. Ugljik koji se metabolizira se pohranjuje kao rezervni polisaharid što dovodi do povećanja udjela ugljikohidrata u stanici (Nagarajan i sur., 2018). Također, do akumulacije ugljikohidrata dolazi kod limitacije rasta s nekim od nutrijenata, a limitacija sumporom jedna je od najučinkovitijih načina poticanja nakupljanja ugljikohidrata (Vítová i sur., 2015).

2.3.1.2. Proteini

Prije otprilike šest desetljeća, započeta je masovna proizvodnja određenih proteinima bogatih mikroalgi. Opsežne analize pokazale su kako su proteini algi imaju visoku nutritivnu

vrijednost, sličnu proteinima biljnog podrijetla koji se uobičajeno koriste u prehrani (Becker, 2007). Manji je nedostatak moguće primijetiti među aminokiselinama koje sadrže sumpor, metioninom i cisteinom, što je karakteristično za mnoge biljne proteine (Becker, 2013). Također, puno mikroalgalnih kultura sadrži manju količinu lizina i triptofana. Proteini crvenih mikroalgi sadrže vrlo malo leucina i izoleucina, dok smeđe alge sadrže vrlo malo metionina, cisteina i lizina (Bleakley i Hayes, 2017). U industrijskoj proizvodnji najčešće se koristi *Chlorella vulgaris* zbog visokog udjela proteina (51 % - 58 % suhe tvari biomase) i pogodnog sastava esencijalnih aminokiselina. Zbog visokih troškova proizvodnje i tehničkih poteškoća vezanih uz uključivanje mikroalgalnih materijala u prehrambene pripravke, ideja uzgoja mikroalgi u svrhu proizvodnje proteina još nije dovoljno iskorištena (Becker, 2007).

2.3.1.3. Lipidi

Lipidi su jedan od najvažnijih biopolimera u svakom živom organizmu. Sve membrane eukariotskih i prokariotskih stanica izgrađene su od lipida ili masti. Također, lipidi služe kao rezervni izvor energije u mikroorganizmima, biljkama i životinjama (Nagarajan, 2018). Lipidi koje proizvode mikroalge obično uključuju neutralne lipide, polarne lipide, estere voska, sterole te prenile derivate poput tokoferola, karotenoida, terpena, kinina i derivate pirola (npr. klorofile) (Sharma i sur., 2012). Dva su osnovna lipida u mikroalgama ovisno o njihovoj funkciji: strukturni (polarni) lipidi i rezervni (nepolarni) lipidi. Rezervni lipidi su većinom u obliku triacilglicerola (TAG) građenih pretežito od zasićenih masnih kiselina te nekih nezasićenih masnih kiselina (Sharma i sur., 2012). Strukturni lipidi uključuju fosfolipide, koji čine 20-ak % strukturnih lipida; glikolipide, koji su glavni strukturni elementi membrane kloroplasta; betain i specifični lipide poput skvalena koji se nalaze samo u nekim vrstama algi. Strukturni lipidi sadrže veliku količinu višestruko nezasićenih masnih kiselina. (Nagarajan, 2018).

U optimalnim uvjetima rasta, proizvodi se velika količina biomase, ali s relativno malim udjelom lipida (5 % - 20 % suhe tvari biomase, uključujući lipide membrana koje pretežito sadrže glicerol) (Sharma i sur., 2012). Sinteza i akumulacija velikih količina TAG-a, popraćena znatnim promjenama u sastavu lipida i masnih kiselina, posljedica je izloženosti stresu uzrokovanom kemijskim i fizikalnim promjenama u okolini (Gouveia, 2011). U osnovi, mikroalgalna biomasa i TAG-i se „natječu“ za fotosintetski asimilat te je potrebno preusmjeravanje metaboličkih puteva za biosinteze lipida (Sharma i sur., 2012). Kod niske koncentracije glukoze i dušika, mikroalge imaju tendenciju skladištiti glukozu u obliku lipida

kako bi preživjele u uvjetima odsutnosti izvora ugljika (Abdollahi i Dubljevic, 2012). Kad se uspori rast mikroalgi i smanji potreba za sintezom lipida u membranama, stanice preusmjeravaju fluks ugljika ka sintezi masnih kiselina i TAG-a (Sharma i sur., 2012). Osim nutrijenata, na promjenu sastava lipida u biomasi mikroalgi utječe intenzitet svjetlosti. Niski intenziteti svjetlosti induciraju stvaranje polarnih lipida, posebno membranskih polarnih lipida povezanih s kloroplastom. Visoki intenzitet svjetlosti smanjuje ukupni udio polarnih lipida uz isto povećanje neutralnih rezervnih lipida, najčešće TAG-a (Sharma i sur., 2012). Također, temperatura ima veliki utjecaj na sastav masnih kiselina kod mikroalgi. Najčešće uočena promjena sastava membranskih lipida, kao posljedica promjene temperature, je promjena u nezasićenosti masnih kiselina (Sharma i sur., 2012). Dakle, sadržaj lipida znatno se povećava (dvostruko ili trostruko) kada su stanice izložene nepovoljnim uvjetima, poput foto-oksidacijskog stresa ili gladovanja (Hu i sur., 2008; Gouveia i sur., 2009).

Najzastupljenije masne kiseline kod mikroalgi su palmitinska kiselina (16:0), te oleinska kiselina (18:1, ω 9), linolna kiselina (18:2, ω 9, 12) te γ -linolenska kiselina (18:3, ω 6, 9, 12) (Karthikeyan, 2013; Yao i sur, 2015). Masne kiseline duljine lanaca 20 ili više ugljikovih atoma koriste se u zdravstvene svrhe, dok su masne kiseline kraćih lanaca od 20 ugljikovih atoma pogodne za proizvodnju biogoriva (Minhas i sur., 2016). Mikroalge se koriste u proizvodnji višestruko nezasićenih masnih kiselina (eng. polyunsaturated fatty acids, PUFA): linolna (18:2, ω 9, 12), γ -linolenska (18:3, ω 6, 9, 12), eikozatetraenska (20:3, ω 8, 11, 14), arahidonska (20:4, ω 5, 8, 11, 14) i eikozapentaenska masna kiselina (EPA) (20:5, ω 5, 8, 11, 14, 17). Na primjer, γ -linolenska kiselina se smatra učinkovitim pri snižavanju razine kolesterola u krvnoj plazmi te se koristi kao dodatak prehrani (Becker, 2013).

2.3.2. Pigmenti

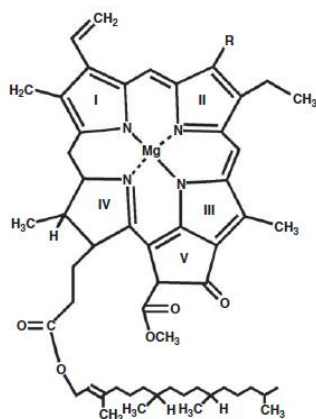
Pigmenti su sastavni dio fotosintetskog sustava mikroalgi (Masojídek i sur., 2013). Odgovorni su za apsorpciju svjetlosti, fiksaciju CO₂, zaštitu stanica mikroalgi od oštećenja zbog prekomjernog zračenja te, daju boju kulturi mikroalgi. Postoje tri glavne skupine pigmenata kod mikroalgi: klorofili, karotenoidi i fikobilini (Koller i sur., 2014). Pigmenti imaju primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Priyadarshani i Rath, 2012).

2.3.2.1. *Klorofili*

Klorofil je primarni fotosintetski pigment u mikroalgama. Ukupni postotak klorofila u mikroalgama je u rasponu od 0,5 % do 1,5 % u suhoj tvari (Becker, 2013). Molekule klorofila

sastoje se od tertrapirolnog prstena koji sadrži središnji atom magnezija i dugi lanac terpenoidnog alkohola (osim klorofila *c*) (Slika 3.). Te molekule su nekovalentno vezane s apoproteinima, važnim dijelovima lipoproteina. Strukturno, različite vrste klorofila označene kao *a*, *b*, *c*, *d*, *e* i *f* razlikuju se po bočnim skupinama supstituenata na tetrapirolnom prstenu (Masojidek i sur., 2013). Svi klorofili apsorbiraju svjetlost u dva glavna područja: plavom ili plavo-zelenom (450 – 475 nm) i crvenom (630 – 675 nm), što rezultira njihovom karakterističnom zelenom bojom (Masojidek i sur., 2013). Kod klorofila *b* metilna skupina u prstenu II klorofila *a* zamijenjena je formilnom skupinom (Slika 3.). Ta strukturna razlika rezultira time da je klorofil *a* plavo-zeleni pigment s maksimalnom apsorbancijom od 660 do 665 nm, a klorofil *b* zeleno-žuti pigment s maksimalnom apsorbancijom od 642 do 652 nm (Hosikian i sur., 2010; Humphrey, 1980).

Klorofil *a* se pojavljuje kod svih fotosintetskih organizama. Klorofil *b* moguće je naći kod Chlorophyta i njihovih potomaka, dok se klorofil *c* pojavljuje isključivo kod Rhodophyta (Christaki i sur., 2015). Klorofil *a* je glavni pigment za prikupljanje svjetlosti koji pretvara svjetlosnu energiju u kemijsku energiju. Klorofil *b* se indirektno uključuje u fotosintezu te prenosi svjetlosnu energiju koju apsorbira klorofil *a* (Dharma i sur., 2017). Klorofil *a* je najobilnija i najvažnija struktura svih klorofila te odgovara otprilike 75 % zelenog pigmenta u prirodi. Ova molekula ima bioaktivna svojstva i široku primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji te može doseći visoku tržišnu vrijednost. Bioaktivni potencijal molekule povezan je sa složenom strukturom konjugiranih veza u pirolnom prstenu što omogućava antioksidacijsko djelovanje (Queiroz i sur., 2017). Također, otkriveno je kako klorofil može ubrzati zacjeljivanje rana za više od 25 %. Budući da klorofil stimulira rast tkiva, između ostalog zbog slične strukture hemoglobinu, on sprječava pojavu rasta bakterija na ranjenom području i ubrzava zacjeljivanje rana. Osim toga, jedna od najznačajnijih aktivnosti klorofila proizlazi iz njegove prevencije raka, obzirom da „zarobljava“ mutagene u gastrointestinalnom traktu (Hosikian i sur., 2010).



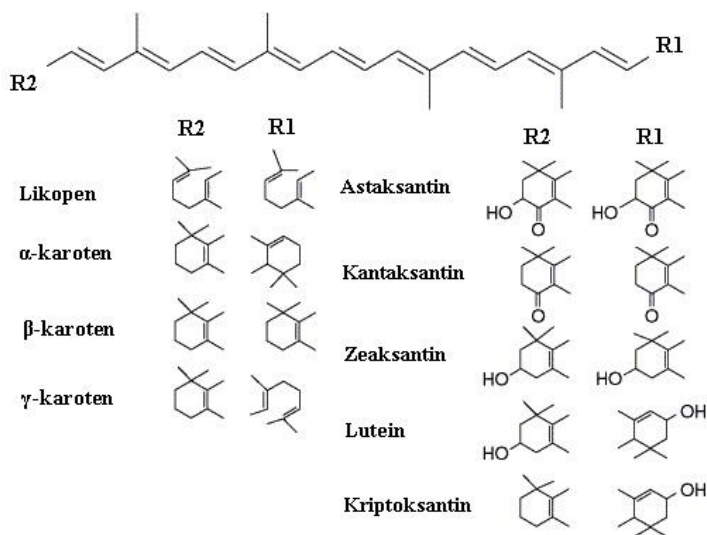
Slika 3. Struktura klorofila (R= -CH₂ za klorofil *a*, -CHO za klorofil *b*) (Masojidek i sur., 2013).

2.3.2.2. *Karotenoidi*

Karotenoidi su prirodni pigmenti koji poboljšavaju učinkovitost iskorištenja svjetlosne energije kod algi u područjima sunčevog zračenja kod kojih klorofili ne apsorbiraju svjetlost (470 – 600 nm) te ih štite od sunčevog zračenja (Becker, 2013; Scheer, 2008). Oni su žuti, narančasti ili crveni lipofilni pigmenti alifatske ili acikličke strukture, koja se sastoji od osam izoprenoidnih jedinica. Likopen je preteča svim karotenoidima sintetiziranim u algama. Moguće je razlikovati dvije glavne skupine karotenoida: pigmente sastavljene od ugljikovodika bez kisika; odnosno karotene i njihove derivate s kisikom, ksantofile, s epoksi-, hidroksilnom, ketonskom, karboksilnom, glikozidnom ili acetilenskom skupinom. Sve alge sadrže karotenoide, a njihova raznolikost veća je nego kod viših biljaka. Iako se neki karotenoidi poput β-karotena, violaksantina i neoksantina javljaju u većini mikroalga, ostale vrste su ograničene samo na neke sojeve (Becker, 2013). Slika 4. prikazuje kemijske strukture određenih vrsta karotenoida (Astley, 2003).

Odsutnost ne-fotosintetskih potpornih struktura poput korijenja i stabljike također pogoduju mikroalgama. Zbog jednostavne stanične strukture i činjenice da se nalaze u podvodnoj okolini gdje imaju dobar pristup vodi, CO₂ i drugim nutrijentima, generalno učinkovitije prevode sunčevu energiju u biomasu. Primarni karotenoidi poput luteina služe kao pomoćni pigmenti koji prenose apsorbiranu energiju do klorofila te se tako širi spektar apsorpcije svjetlosti algi ili biljaka. Sekundarni karotenoidi poput astaksantina i kantaksantina igraju ulogu u zaštiti stanice (Gong i Bassi, 2016). Zahvaljujući svojem antioksidacijskom svojstvu, karotenoidi štite stanicu od slobodnih radikala, sprječavaju peroksidaciju lipida i promiču stabilnost i funkcionalnost fotosintetskog sustava (Grossman i sur., 2004). Osobito

poboljšavaju fluidnost stanične membrane u uvjetima visoke temperature i svjetlosti (Gong i Bassi, 2016). Također, karotenoidi su važni dodaci prehrani zbog mnogih sposobnosti poput protu-upalnog, protu-angiogenog, kardio-zaštitnog i hepato-zaštitnog djelovanja (Nagarajan i sur., 2018).



Slika 4. Kemijska struktura određenih vrsta karotenoida (Astley, 2003).

2.3.2.3. Fikobilini

Fikobilini se nalaze uglavnom u stromi kloroplasta cijanobakterija, rodofita, glaukofita i nekih kriptomonada (Koller i sur., 2014). Kemijski su građeni od kromofora – bilina – koji su tetrapiroli otvorenog lanca, kovalentno vezani tioesterskim vezama na apoproteine (Dufossé i sur., 2005). Postoje četiri glavna oblika fikobilina u mikroalgama: fikocijanin (λ_{\max} (maksimalna apsorpcija) = 610 – 625 nm), fikoeritrin (λ_{\max} = 540 – 570 nm), fikoeritrocijanin (λ_{\max} = 560 – 600 nm) i alofikocijanin (λ_{\max} = 650 – 660 nm) (Kannaujiya i sur., 2017). Fikobilini su važna skupina pigmenata koji pomoću komplementarne kromatske prilagodbe optimiziraju apsorpciju svjetlosti u stanicama fitoplanktona te pokazuju odličan potencijal kao biomarkeri za pojedine vrste cijanobakterija (Sobiechowska-Sasim i sur., 2014). Crveni fikobilin – fikoeritrin i plavi fikobilin – fikocijanin, topivi su u vodi i mogu poslužiti kao prirodna bojila u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Dufossé i sur., 2005).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizam

Sojevi mikroalgi D10 koji pripada rodu *Chlamydomonas*, te sojevi D2-1 i F10 koji pripadaju rodu *Chlorella* izolirani su u ožujku 2018. godine iz rijeke Gacke (Čorak, 2018).

3.1.2. Sirovine za pripremu hranjive podloge

Za pripremu hranjivih podloga korištene su kemikalije navedene u Tablici 5.

Tablica 5. Popis korištenih kemikalija za pripremu hranjivih podloga.

Naziv	Proizvođač
Natrijev nitrat	Kemika, Hrvatska
Kalcijev klorid dihidrat	Kemika, Hrvatska
Magnezijev sulfat heptahidrat	Kemika, Hrvatska
Dikalijev fosfat	Kemika, Hrvatska
Kalijev dihidrogenfosfat	Kemika, Hrvatska
Natrijev klorid	J. T. Baker, SAD
Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)	Gram Mol, Hrvatska
Kalijev hidroksid	Kemika, Hrvatska
Željezov (II) sulfat heptahidrat	Kemika, Hrvatska
Sumporna kiselina	Acros Organics, Belgija
Borna kiselina	Kemika, Hrvatska
Cinkov sulfat heptahidrat	Merck, SAD
Manganov (II) klorid tetrahidrat	Kemika, Hrvatska
Molibden (VI) oksid	Kemika, Hrvatska
Bakrov (II) sulfat pentahidrat	Gram Mol, Hrvatska
Kobaltov (II) nitrat heksahidrat	Kemika, Hrvatska
Kvašćev ekstrakt	Roth, Austrija
B ₁₂	Sigma, Hrvatska
Biotin	Sigma, Hrvatska
Glukoza	Difco, SAD
Fruktoza	Kemika, Hrvatska
Laktoza	Kemika, Hrvatska
Maltoza	Sigma, Hrvatska

Galaktoza	Difco, SAD
Saharoza	Gram Mol, Hrvatska
Celobioza	Sigma, Hrvatska
Arabinoza	Kemika, Hrvatska
Ksilozna	Kemika, Hrvatska
Glicerol	Sigma, Hrvatska
Melasa (50 % suhe tvari)	Sladorana Županja, Hrvatska
Octena kiselina	Alkaloid, Skopje

3.1.3. Ostale kemikalije korištene u eksperimentima

Ostale kemikalije koje su se koristile navedene su u Tablici 6.

Tablica 6. Popis ostalih kemikalija i njihovi proizvođači.

Naziv	Proizvođač
Sumporna kiselina (72% vol/vol)	Acros Organics, Belgija
Kalcijev karbonat	Kemika, Hrvatska
Fosforna kiselina	Merck, SAD
Folin-Ciocalteu reagens	Sigma, Hrvatska
Kalij-natrij tartarat	FisherScientific, UK
Natrijev karbonat	Gram Mol, Hrvatska
Metanol	J. T. Baker, SAD
Kloroform	Macron Fine Chemicals, SAD
Aceton	Gram Mol, Hrvatska
Natrijev hidroksid	Merck, SAD
Heksan	Chromaslov Honeywell
Bradfordov reagens	Sigma, Hrvatska
Triklor octena kiselina	Merck, SAD

3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj mikroalgi

Za pripremu inokuluma, održavanje kulture te uzgoj korištena je Bold's Basal Medium (BBM) podloga. Sastav podloge naveden je u Tablici 7. U BBM podlogu dodano je 0,5 mL L⁻¹ otopine vitamina čiji je sastav prikazan u Tablici 8.

Tablica 7. Sastav BBM podloge.

Minerali	Koncentracija [M]
NaNO ₃	2,94·10 ⁻³
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,70·10 ⁻⁴
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3,04·10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	4,31·10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	1,29·10 ⁻³
NaCl	4,28·10 ⁻⁴
Alkalna otopina EDTA: EDTA (Triplex III) KOH	1,71·10 ⁻⁴ 5,53·10 ⁻⁴
Zakiseljena otopina željeza: FeSO ₄ · 7H ₂ O H ₂ SO ₄ , konc.	1,79·10 ⁻⁵ 1 mL ⁻¹
Otopina bora: H ₃ BO ₃	1,85·10 ⁻⁴
Otopina metala u tragovima: ZnSO ₄ · 7H ₂ O MnCl ₂ · 4H ₂ O MoO ₃ CuSO ₄ · 5H ₂ O Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	3,07·10 ⁻⁵ 7,28·10 ⁻⁶ 4,93·10 ⁻⁶ 6,29·10 ⁻⁶ 1,68·10 ⁻⁶

Tablica 8. Sastav f/2 otopine vitamina.

Vitamin	Koncentracija [M]
Tiamin (vitamin B ₁)	2,96·10 ⁻⁷
Biotin (vitamin H)	2,05·10 ⁻⁹
Cijanokobalamin (vitamin B ₁₂)	3,69·10 ⁻¹⁰

3.1.4.1. Hranjive podloge za istraživanje rasta mikroalgi na različitim izvorima ugljika

Kao izvori ugljika korišteni su: glukoza, fruktoza, laktoza, maltoza, galaktoza, saharoza, celobioza, arabinoza, ksiloza, glicerol, melasa i octena kiselina. Izvori ugljika otopljeni su u BBM podlozi. U BBM podlogu dodano je 0,5 mL L⁻¹ otopine vitamina (Tablica 8.). Koncentracija svakog pojedinog izvora ugljika iznosila je 5 g L⁻¹. Kao kontrola korištena je BBM podloga jednakog sastava bez dodanog izvora ugljika.

Odabrana su tri izvora ugljika na kojima je izmjeren najveći rast optičke gustoće kulture, te je provedeno istraživanje učinka koncentracija istih na prirast biomase. Za uzgoj je korištena

BBM podloga, u kojoj su otopljeni odabrani izvori ugljika u koncentracijama 10, 35, 50 i 70 g L⁻¹.

3.1.4.2. *Hranjive podloge za istraživanje rasta mikroalgi na različitim izvorima dušika*

Za istraživanje rasta na različitim izvorima dušika, korištena je BBM podloga. U BBM podlogu dodana je glukoza i natrijev nitrat pri različitim C/N omjerima (mol mol⁻¹). Za provedeni eksperiment C/N omjeri iznosili su 5, 10, 20, 30 i 40 mol mol⁻¹. Također, dodano je 0,5 mL L⁻¹ f/2 otopine vitamina (Tablica 8.) te antibiotik ampicilin u koncentraciji od 100 µg L⁻¹. Koncentracija glukoze iznosila je 20 g L⁻¹, a koncentracija kvašćevog ekstrakta iznosila je 2 g L⁻¹.

3.1.4.3. *Hranjiva podloga za šaržni uzgoj s pritokom supstrata*

Za uzgoj je korištena BBM podloga s dvostruko većom koncentracijom minerala u odnosu na originalnu BBM podlogu. Koncentracija glukoze iznosila je 20 g L⁻¹, a koncentracija kvašćevog ekstrakta iznosila je 2 g L⁻¹. U podlogu je dodano i 0,5 mL L⁻¹ otopine vitamina te antibiotik ampicilin u koncentraciji od 100 µg L⁻¹.

3.1.5. Oprema i aparatura

3.1.5.1. *HPLC*

HPLC je uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (Shimadzu CLASS-VP LC-10A, Shimadzu, Japan). Uređaj se sastoji od crpke (LC-10 ADVP), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10ADVP), uređaja za grijanje kolone (CTO-10AVP), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Supelcogel H Guard Column, Sigma), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10AVP) i računalnog programa za kromatografiju.

3.1.5.2. *Sustav za plinsku kromatografiju (GC)*

Korišteni uređaj za plinsku kromatografiju je tvrtke Shimadzu GC 2010 *Plus* AF (Shimadzu, Kyoto, Japan). Sustav se sastoji od: automatskog uzorkivača (150 mjesta; AOC – 20 s), injektora (AOC – 20i), peći, RTX- 5 kapilarne kolone (30 m, 0,25 mm i.d., 0,25 µm df; Restek, Bellefonte, SAD), plameno-ionizacijskog detektora (eng. Flame-Ionization Detector, FID) i programa za prikupljanje i obradu podataka GC Solutions verzija 2.32.

3.1.5.3. Ostali uređaji

Uz laboratorijsko posuđe i potrošni laboratorijski materijal, u izradi ovoga rada korištena je oprema navedena u Tablici 9.

Tablica 9. Ostala korištena oprema.

Oprema	Proizvođač
Centrifuga	Harrier 18/80, Sanyo, Velika Britanija ThermoScientific, SL 8R, SAD
Tresilica	RM 71 B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka
Vrtložna miješalica	Technica ET-1111, Slovenija
Sušionik	Instrumentaria ST-50, Hrvatska
Tehnička vaga	Technica ET-1111, Slovenija
Analitička vaga	Sartorius, Njemačka
UV/Vis spektrofotometar	Cary 13E Varian, Mulgrave, Australija
Kvarcne kivete promjera 10 mm	Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka
Mikroskop	Olympus CH20, Tokyo, Japan
Boce plina sa dušikom	Messer Croatia Plin, Zaprešić, Hrvatska
Autoklav	Sutjeska, Beograd, Jugoslavija
Hladnjak i zamrzivač	Bosch, Njemačka

3.2. METODE

3.2.1. Mjerenje optičke gustoće kulture

Rast mikroalgi tijekom uzgoja praćen je izuzimanjem uzorka podloge kojem je izmjerena optička gustoća na spektrofotometru pri 540 i 720 nm. Uzorci su prethodno, po potrebi, razrjeđivani destiliranom vodom kako bi optička gustoća bila između 0,1 i 1,0.

3.2.2. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase

Tijekom uzgoja praćena je i promjena koncentracije biomase gravimetrijskom analizom. Prije izuzimanja uzorka, izvagana je masa prazne kivete (m_1). Određeni volumen podloge (10 mL) izuzet tijekom uzgoja je centrifugiran. Supernatant je korišten za daljnje analize, a talog tj. biomasa mikroalgi je potom isprana destiliranom vodom kako bi se uklonili ostaci podloge i soli te ponovno centrifugirana. Supernatant nakon drugog centrifugiranja je baćen, a talog zaostao u kiveti je osušen u sušioniku na 105 °C. Nakon hlađenja u eksiktoru izvagana je masa kivete koja je sadržavala osušeni talog (m_2). Koncentracija biomase izračunata je kao kvocijent razlike mase m_2 i m_1 i uzetog volumena podloge (V) [1].

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

3.2.3. Ispitivanje rasta mikroalgi na različitim izvorima ugljika u heterotrofnim i miksotrofnim uvjetima rasta

Ispitivanje rasta mikroalgi na različitim izvorima ugljika provedeno je u tekućoj podlozi, u dvije mikrotitarske ploče s 96 jažica. U 180 μ L BBM podloge s odgovarajućim izvorom ugljika (Poglavlje 3.1.4.1.), dodano je 20 μ L prethodno uzgojenog inokuluma te je korisni volumen u svakoj jažici iznosio 200 μ L. Jedna je ploča korištena za ispitivanje miksotrofnog rasta, a druga za ispitivanje rasta bez prisustva svjetlosti odnosno, heterotrofnog rasta. Ispitivanje je provedeno za 3 soja: D10, D2-1 i F10. Raspored sojeva te izvora ugljika unutar jažica za obje vrste uzgoja, prikazan je na slici 3. Uzgoj je proveden na tresilici za mikrotitarske pločice uz rotaciju 250 rpm, na 25 °C. Kako bi se postigli uvjeti za heterotrofni uzgoj, mikrotitarska pločica bila je omotana u aluminijsku foliju u svrhu sprječavanja izloženosti svjetlu. Uvjeti za miksotrofni uzgoj postignuti su osiguravanjem izvora svjetlosti i postavljanjem režima 16 sati svjetlo, 8 sati tama. Uzgoj je praćen određivanjem optičke gustoće kulture na 540 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica, te vizualnim opažanjem. Razlike promjene optičke gustoće zadnjeg i prvog dana uzgoja, na pojedinim izvorima dušika, odnosno ugljika uspoređivane su međusobno i sa razlikom optičke gustoće kulture izrasle na kontrolnoj podlozi.

SOJ	D2-1	D2-1	D2-1	D2-1	F10	F10	F10	F10	D10	D10	D10	D10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Glc	Gly	Gal	K	Glc	Gly	Gal	K	Glc	Gly	Gal	K
B	Glc	Gly	Gal	K	Glc	Gly	Gal	K	Glc	Gly	Gal	K
C	Fru	Xyl	Lac	K	Fru	Xyl	Lac	K	Fru	Xyl	Lac	K
D	Fru	Xyl	Lac	K	Fru	Xyl	Lac	K	Fru	Xyl	Lac	K
E	Sah	Mal	Cel	K	Sah	Mal	Cel	K	Sah	Mal	Cel	K
F	Sah	Mal	Cel	K	Sah	Mal	Cel	K	Sah	Mal	Cel	K
G	Me50	Ara	HAc	K	Me50	Ara	HAc	K	Me50	Ara	HAc	K
H	Me50	Ara	HAc	K	Me50	Ara	HAc	K	Me50	Ara	HAc	K

Copyright © 2009 Edita Aksamitiene

Slika 5. Shema mikrotitarske ploče s rasporedom triju sojeva mikroalgi, D10, D2-1 i F10, te različitih izvora ugljika.²

3.2.4. Učinak koncentracije izvora ugljika na rast mikroalgi

Prethodno odabrana 3 izvora ugljika za svaki od sojeva (D10, D2-1 i F10) dodani su u BBM podlogu u koncentracijama 10, 35, 50 i 70 g L⁻¹. U 180 µL BBM podloge odgovarajućeg sastava (Poglavlje 3.1.4.1.), inokulirano je 20 µL prethodno uzgojene kulture te je korisni volumen u svakoj jažici iznosio 200 µL. Jedna je ploča korištena za ispitivanje miksotrofnog rasta, a druga za ispitivanje rasta bez prisustva svjetlosti odnosno, heterotrofnog rasta. Ispitivanje je provedeno za 3 soja: D10, D2-1 i F10. Raspored sojeva te izvora ugljika unutar jažica za obje vrste uzgoja, prikazan je na slici 4. Uzgoj je proveden pri uvjetima navedenim u poglavlju 3.2.3.

² Glc – glukoza, Fru – fruktoza, Ara – arabinoza, Mal – maltoza, Lac – laktoza, Cel – celobioza, Gal – galaktoza, Xyl – ksiloza, Gly – glicerol, HAc – octena kiselina, Sah – saharoza, Me50 – melasa, K – kontrola (podloga bez izvora ugljika tj. BBM tekući medij uz dodatak otopine vitamina te 20 µL inokuluma).

SOJ	D2-1	D2-1	D2-1	D2-1	F10	F10	F10	F10	D10	D10	D10	D10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Me 10g/L	Glc 10g/L	Sah 10g/L	K	Me 10g/L	HAc 10g/L	Cel 10g/L	K	Me 10g/L	Sah 10g/L	Fru 10g/L	K
B	Me 10g/L	Glc 10g/L	Sah 10g/L	K	Me 10g/L	HAc 10g/L	Cel 10g/L	K	Me 10g/L	Sah 10g/L	Fru 10g/L	K
C	Me 35g/L	Glc 35g/L	Sah 35g/L	K	Me 35g/L	HAc 35g/L	Cel 35g/L	K	Me 35g/L	Sah 35g/L	Fru 35g/L	K
D	Me 35g/L	Glc 35g/L	Sah 35g/L	K	Me 35g/L	HAc 35g/L	Cel 35g/L	K	Me 35g/L	Sah 35g/L	Fru 35g/L	K
E	Me 50g/L	Glc 50g/L	Sah 50g/L	K	Me 50g/L	HAc 50g/L	Cel 50g/L	K	Me 50g/L	Sah 50g/L	Fru 50g/L	K
F	Me 50g/L	Glc 50g/L	Sah 50g/L	K	Me 50g/L	HAc 50g/L	Cel 50g/L	K	Me 50g/L	Sah 50g/L	Fru 50g/L	K
G	Me 70g/L	Glc 70g/L	Sah 70g/L	K	Me 70g/L	HAc 70g/L	Cel 70g/L	K	Me 70g/L	Sah 70g/L	Fru 70g/L	K
H	Me 70g/L	Glc 70g/L	Sah 70g/L	K	Me 70g/L	HAc 70g/L	Cel 70g/L	K	Me 70g/L	Sah 70g/L	Fru 70g/L	K

27119115.001 2009 Edita Aksamitiene

Slika 6. Shema mikrotitarske ploče s rasporedom triju sojeva mikroalgi, D10, D2-1 i F10, uz različite koncentracije izvora ugljika.

3.2.5. Optimiranje koncentracije izvora dušika

Sastav podloga za optimiranje koncentracije izvora dušika naveden je u poglavlju 3.1.4.2. Kao radni mikroorganizam korišten je soj mikroalge D10. Uzgoj je proveden u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL, prilikom čega je korisni volumen iznosio 200 mL, a volumen inokuluma je iznosio 10% volumena podloge. Uzgoj je vođen kroz tjedan dana na tresilici pri brzini rotacije od 200 o min⁻¹ i sobnoj temperaturi od 20 do 25 °C. Proveden je heterotrofni uzgoj bez prisustva svjetla, te miksotrofni uzgoj za koji su uvjeti postignuti osiguravanjem izvora svjetlosti i postavljanjem režima 16 sati svjetlo, 8 sati tama.

3.2.6. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata

Proveden je šaržni uzgoj s pritokom supstrata u heterotrofnim uvjetima tj. bez prisustva svjetla. Kao radni mikroorganizam korišten je soj mikroalge D10. Podloga za uzgoj je pripremljena kako je prikazano u poglavlju 3.1.4.3. Uzgoj je proveden u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL, prilikom čega je korisni volumen iznosio 200 mL. Volumen inokuluma je pritom iznosio 10 % volumena podloge. Uzgoj je trajao 15 dana, a svaki dan je uzeta po jedna tikvica za analizu makromolekula, pigmenata i sastava masnih kiselina u ukupnim lipidima biomase. Trinaestog dana uzgoja kultura je prihranjena s glukozom i kvašćevim ekstraktom,

tako da je krajnja koncentracija glukoze u podlozi iznosila 20 g L^{-1} , a kvašćevog ekstrakta 2 g L^{-1} . Uzgoj je vođen na tresilici na 200 o min^{-1} pri sobnoj temperaturi koja je iznosila oko 30°C .

3.2.7. Određivanje udjela ugljikohidrata u biomasi

3.2.7.1. *Kiselinska hidroliza mikroalgi*

Određivanje sastava monosaharida i udjela ugljikohidrata u biomasi mikroalgi proveden je prema metodi NREL-a (eng. *National Renewable Energy Laboratory*, USA) (Van Wychen i Laurens, 2013a). U Pirex staklene epruvete odvagano je 25 mg prethodno osušene biomase mikroalgi te je dodano $250 \mu\text{L}$ 72% (w/w) sumporne kiseline. Sadržaj epruvete je polagano miješan kako ne bi došlo do lijepljenja biomase za stjenke epruvete te se ostvario što bolji kontakt biomase sa kiselinom. Epruvete su zatim kroz sat vremena inkubirane u termostatu na 30°C , uz miješanje sadržaja svakih $5 - 10$ minuta. Nakon sat vremena u epruvete je dodano 7 mL deionizirane vode te je smjesa pažljivo promiješana. Zatim je smjesa zagrijana na 121°C kroz sat vremena u autoklavu. Nakon hlađenja uzorka na sobnu temperaturu, iz svake epruvete je uzet alikvot od 3 mL . Dodatkom kalcijeva karbonata je podešena pH vrijednost na 5 . Neutralizirani uzorci profiltrirani su kroz najlonski filter pora veličine $0,22 \mu\text{m}$ u vijalicu za HPLC/UPLC analizu.

3.2.7.2. *Određivanje koncentracije monosaharida pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC)*

HPLC metodom analizirani su kiselinski hidrolizati biomase mikroalgi. Kao mobilna faza korištena je $0,1 \%$ vol/vol otopina H_3PO_4 u redestiliranoj vodi, čija je vodljivost manja od $1 \mu\text{S}$. Injektirano je po $20 \mu\text{L}$ svakog uzorka na kromatografsku kolonu. Temperatura pećnice iznosila je 55°C , a brzina protoka mobilne faze podešena je na $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Podaci su analizirani pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10. Jednadžbe baždarnih pravaca prikazuju ovisnost površine ispod krivulje pika o koncentraciji šećera za najzastupljenije monosaharide u hidrolizatima biomase mikroalgi (Tablica 10). Dobiveni rezultat za svaki monosaharid množen je sa $7,25$ kako bi se dobila vrijednost u miligramima (mg). Ukupan udio ugljikohidrata u biomasi mikroalgi jednak je omjeru sume mase svih pojedinih monosaharida u hidrolizatu i mase biomase mikroalgi uzete za analizu (25 mg suhe tvari biomase).

Tablica 10. Popis monosaharida i odgovarajućih jednadžbi baždarnih pravaca.

Monosaharid	Rt [min]	Jednadžba pravca
glukoza	13,012	$y = 380396x - 7042,3$
ksiloza	13,813	$y = 362057x + 5598,2$
arabinoza	14,952	$y = 366483x + 9888,8$

3.2.8. Određivanje udjela proteina u biomasi

3.2.8.1. *Određivanje proteina metodom po Lowry-ju*

Količina ukupnih proteina u biomasi mikroalgi određena je metodom po Lowry-ju. Metoda se zasniva na Biuret reakciji između Cu^{2+} (u prisustvu baze) i peptidne veze pri čemu nastaje tamno plavo obojenje. Dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa, smjesa anorganskih soli reagira s pobočnim lancem tirozina i triptofana što daje plavo-zeleno obojenje.

Za određivanje proteina po Lowry-ju bilo je potrebno oko 100 μg suhe tvari biomase mikroalgi. Prema poznatoj koncentraciji biomase, izračunat je volumen podloge koji je sadržavao 100 μg suhe tvari biomase mikroalgi (V_{pp}). Dobiveni volumen podloge (V_{pp}) dodan je u plastičnu epruvetu s 0,5 mL NaOH. Stanice su resuspendirane u tekućini te je dodano još 0,5 mL 1 M NaOH. Slijepa proba je sadržavala vodu umjesto podloge. Pripremljena epruveta je začepljena teflonskim čepom i stavljena u kipuću vodu. Nakon 5 minuta kuhanja sadržaj je ohlađen na sobnu temperaturu te je dodano 2,5 mL otopine C (Tablica 11.). Nakon 10 minuta uzorku je naglo dodano 0,5 mL otopine D (Tablica 11.) i sadržaj je promiješan. Epruveta je ostavljena u tami na sobnoj temperaturi kroz 40 minuta. Potom je izmjerena apsorbancija uzorka pri 750 nm prema slijepoj probi. Prema jednadžbi baždarnog pravca ($y=2,21498+0,05068x$) izračunata je masa proteina (m_p). Baždarni pravac definira odnos apsorbancije uzorka pri 750 nm (A_{750}) i mase proteina u uzorku. Udio proteina u suhoj tvari biomase mikroalgi izračunao se prema jednadžbi [2]:

$$\text{Udio proteina u suhoj tvari biomase} = \frac{m_p}{X_{grav} \cdot V_{pp}} \cdot 100 [\%] \quad [2]$$

m_p – masa proteina [g]

X_{grav} – koncentracija biomase (gravimetrijski) [gL^{-1}]

V_{pp} – volumen podloge [L]

Tablica 11. Popis potrebnih otopina za provođenje metode po Lowry-ju.

Otopina A	5 % Na ₂ CO ₃
Otopina B	0,5 % CuSO ₄ u 1 % K,Na-tartaratu
Otopina C	pomiješa se otopina A i B u omjeru 50 volumena otopine A na jedan volumen otopine B (prirediti neposredno prije pokusa)
Otopina D	Razrijeđeni Folin-Ciocalteu reagens (u omjeru 1vol : 1vol s destiliranom vodom; prirediti neposredno prije pokusa)

3.2.8.2. *Određivanje proteina metodom po Bradford-u*

Ekstrakcija proteina provedena je prema metodi koju su predložili Slocombe i sur. (2013) uz nekoliko modifikacija. Za analizu proteina izvagano je 5 mg suhe biomase mikroalgi i resuspendirano u 200 µL 24 % (w/v) TCA (triklor octena kiselina). Uzorci su inkubirani u vodenoj kupelji pri temperaturi od 85 °C tijekom 15 minuta. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, uzorcima je dodano 600 µL vode HPLC čistoće pri čemu je koncentracija TCA pala na 6 % (w/v). Uzorci su centrifugirani na 14000 g i 4°C tijekom 20 minuta. Supernatant je odbačen, a talog resuspendiran u 500 µL 0,1 M NaOH. Tako pripremljeni uzorci inkubirani su u vodenoj kupelji na 65°C tijekom 2 h. Nakon inkubacije uzorci su ohlađeni te je provedeno centrifugiranje na 10000 g tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Talog je odbačen, a supernatant pohranjen na -20°C do daljnje analize.

Kvantifikacija proteina provedena je metodom po Bradford-u. Metoda se bazira na reakciji proteina sa bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) u kiselom mediju. CBB reagira prvenstveno sa pobočnim grupama Arg, a u manjoj mjeri i sa pobočnim grupama His, Lys, Tyr, Trp i Phe. Boja se na proteine veže hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama što stabilizira boju u anionskom obliku i dovodi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu. Pri tome se apsorpcijski maksimum boje pomiče sa 465 nm na 595 nm što se prati spektrofotometrijski (Bradford, 1976).

Za analizu je bilo potrebno 40 µL ekstrakta proteina. Ekstraktu je dodano 1200 µL Bradford reagensa te je smjesa inkubirana tijekom 15 min na sobnoj temperaturi. Slijepa proba sadržavala je 40 µL deionizirane vode umjesto uzorka. Apsorbancija je izmjerena pri 595 nm.

Prema jednadžbi baždarnog pravca ($y = 1,20187x$) izračunata je koncentracija proteina u uzorku (mg mL^{-1}).

3.2.9. Određivanje udjela lipida u biomasi

Lipidi iz biomase mikroalgi ekstrahirani su sa smjesom otapala metanol i kloroform prema promijenjenom propisu Bligh-a i Dyer-a (1959). Prethodno je vlažna biomasa mikroalgi osušena pri $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ do konstantne mase i usitnjena u tarioniku. U staklene kivete je dodano 100 mg biomase te potom 4 mL metanola, 2 mL kloroforma i 0,4 mL vode. Sadržaj je potom vorteksiran jednu minutu. Zatim je dodano još 2 mL kloroforma i 2 mL vode kako bi se razdvojile dvije faza te je ponovljeno vorteksiranje kroz jednu minutu. Suspenzija biomase mikroalgi je uklonjena filtriranjem kroz sinter lijevak. Filtrat je izdvojen u čistu epruvetu, a preostala biomasa algi je ponovno podvrgnuta ekstrakciji sa smjesom metanola i kloroforma u omjeru 1:1. Ponovljena je filtracija kroz sinter lijevak da bi se izdvojila biomasa, a dobiveni filtrat je pridodan prethodnom. Nakon razdvajanja faza, donja kloroformska faza je izdvojena staklenom špricom s dugačkom iglom i prenesena u prethodno izvaganu epruvetu. Kloroform je uklonjen propuhivanjem s plinovitim dušikom. Zatim su lipidi dodatno osušeni na 100°C kroz 1 sat da bi se iz uzorka uklonili eventualni tragovi vode koji su zaostali u kloroformskoj fazi. Nakon vaganja osušene epruvete, udio lipida u biomasi mikroalgi, izračunat je prema jednadžbi [3].

$$w_L = \frac{m_{oe} - m_{pe}}{m_x \cdot (1 - w_{H_2O/X})} \cdot 100 [\%] \quad [3]$$

m_{oe} – masa osušene epruvete s lipidima;

m_{pe} – masa prazne suhe epruvete;

m_x – masa biomase algi korigirana za sadržaj vlage ($w_{H_2O/X}$)

3.2.10. Analiza sastava pigmenata u biomasi

3.2.10.1. *Ekstrakcija pigmenata*

Ekstrakcija pigmenata iz vlažne biomase mikroalgi provedena je 90 %-tnim acetonom. Za mehaničko razbijanje stanica korištene su staklene kuglice. Ekstrakcija je provedena u plastičnim epruvetama od 15 mL omotanim aluminijskom folijom kako bi se spriječio raspad fotosenzibilnih pigmenata uslijed izlaganja svjetlosti. Alikvot podloge od 10 ili 7 mL je centrifugiran i dekantiran. Izdvojenoj biomasi dodano 2 g staklenih kuglica i 2 mL 90 %-tnog acetona. Sadržaj je dva do tri puta naizmjenično vorteksiran 30 sekundi uz hlađenje u ledu, te

je suspenzija centrifugirana na 5000 o min⁻¹ deset minuta. Dobiveni supernatant koji je sadržavao ekstrahirane pigmente dekantiran je u plastičnu epruvetu, a preostala biomasa ponovno je podvrgnuta postupku ekstrakcije do njenog potpunog obezbojenja. Supernatanti dobiveni nakon svakog koraka ekstrakcije pridodan je početnom supernatantu.

3.2.10.2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije klorofila *a* i klorofila *b*

Koncentracija pigmentata klorofila *a* i klorofila *b* iz biomase mikroalgi određena je spektrofotometrijski prema metodi Jeffrey-a i Humphrey-a (1975). U dobivenim ekstraktima određena je apsorbancija pri valnim duljinama od 630 nm, 647 nm, 664 nm i 750 nm te je napravljen *scan* valnim duljina u rasponu od 350 do 750 nm. Koncentracija klorofila *a* i *b*, izražena u mg L⁻¹, određena je pomoću jednadžbi [4] i [5]:

$$\text{Klorofil } a = \frac{11,85 \cdot (\text{OD}_{664} - \text{OD}_{750}) - 1,54 \cdot (\text{OD}_{647} - \text{OD}_{750}) - 0,08 \cdot (\text{OD}_{630} - \text{OD}_{750}) \cdot V_e}{\alpha \cdot V_f} \quad [4]$$

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

3.2.11. Određivanje sastava masnih kiselina u ukupnim lipidima izoliranim iz mikroalgi

Sadržaj pojedinih masnih kiselina u lipidima mikroalgi određen je plinskom kromatografijom. Masne kiseline u uzorku prije analize prevedene su u metilne estere transesterifikacijom. Metil esteri masnih kiselina pripremljeni su prema NREL metodi za određivanje ukupnih lipida (Van Wychen i Laurens, 2013b).

U epruvete je izvagano je 5 – 10 mg biomase mikroalgi i stavljeno na sušenje. Nakon toga su epruvete sa suhom biomasom ponovno izvagane te je na temelju razlika u masama određen udio vode u uzorcima. Za određivanje ukupnih lipida izvagani su uzorci biomase od 5 – 10 mg u staklenim epruvetama.

Kao prvi standard korišten je metil tridekanoat (C13: 0ME) koncentracije 10 mg mL⁻¹. Za pripremu drugog standarda izvagano je približno 10 mg pentadekana koji je otopljen u 1 mL heksana HPLC kvalitete. Pripremljeni standard je razrijeđen u omjeru 1:10 prije dodavanja uzorcima. Oba standarda stavljena su u male GC bočice volumena 1,5 mL i zatvorena PTFE / silikon / PTFE poklopcem. Potrebno je paziti da se ograniči isparavanje jer je vrlo važno održavati zabilježenu početnu koncentraciju. Standardi su se čuvali u laboratorijskom zamrzivaču na -20 °C.

Proces transesterifikacije proveden je pri 85 °C u vodenoj kupelji. U epruvete s izvaganom biomasom dodano je 20 µL prethodno pripremljenog standarda C13:0 ME (10 mg mL⁻¹). Zatim, dodano je 200 µL otopine kloroform:metanol (2:1, v/v) i 300 µL otopine 0,6M HCl:metanol. Pripremljene staklene epruvete s biomasom i regensima stavljene su u zagrijanu kupelj na 85 °C kroz jedan sat. Nakon toga uzorci se hlade minimalno 15 minuta, ne dulje od jednog sata, na sobnoj temperaturi. Nakon hlađenja, u svaki uzorak dodan je 1 ml heksana HPLC čistoće. Uzorci su dobro promiješani te ostavljeni na sobnoj temperaturi najmanje 1 sat kako bi se faze razdvojile. Potom se gornja faza izdvaja u zasebnu vijalu te priprema za analizu na GC-u. Uzorke je potrebno razrijediti tako da koncentracije budu unutar kalibracijske krivulje. Uzorci su razrijeđeni 3 puta sa heksanom HPLC čistoće te se u njih, prije analize na GC-u, dodaje određeni volumen internog standarda pentadekana (5 µL na 200 µL uzorka). Uzorci su analizirani na plinskom kromatografu GC-2010 Plus (Shimadzu, Japan) opremljenom masenim detektorom (FID). Uvjeti rada plinskog kromatografa prikazani su u Tablici 12. Identifikacija pojedinih masnih kiselina provedena je usporedbom vremena zadržavanja metilnih estera pojedinih masnih kiselina s vremenima zadržavanja metilnih estera standardne smjese 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 - C24) analiziranih u istim uvjetima. Sastav metilnih estera masnih kiselina u ukupnim lipidima izražen je masenim udjelom (%) pojedine masne kiseline u uzorku.

Tablica 12. Uvjeti rada na uređaju za plinsku kromatografiju.

Kolona	Kapilarna kolona ZB-FAME (Zebron), 30 m x 0,25 mm debljina filma 0,20 µm, stacionarna faza: cijanopropil-silikon
Detektor	FID
Temperatura injektora	250 °C
Temperaturni program	100 °C uz zadržavanje 2 min; 10 °C min ⁻¹ do 140 °C; 3 °C min ⁻¹ do 190°C ; 30 °C min ⁻¹ do 260 °C uz zadržavanje 2 min
Plin nosač i protok	Helij, 1,2 mL min ⁻¹
Parametri FID	Helij (30 mL min ⁻¹), dušik (40 mL min ⁻¹), kisik (400 mL min ⁻¹)
Omjer razdijeljena	1 : 15
Temperatura detektora	260 °C
Količina injektiranog uzorka	2 µL

3.2.12. Određivanje parametra uspješnosti bioprocesa

Parametri uspješnosti bioprocesa određeni su prema jednažbama [6], [7], [8] i [9].

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \cdot \ln \frac{X}{X_0} \quad [6]$$

μ – specifična brzina rasta [h^{-1}];

X – koncentracija biomase u vremenu t_n [g L^{-1}];

X_0 – početna koncentracija biomase [g L^{-1}];

Δt – interval vremena ($t_n - t_0$).

$$Pr_X = \frac{X}{t_u} \quad [7]$$

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

X – koncentracija biomase u vremenu t_n [g L^{-1}];

t_u – trajanje uzgoja [dan].

$$Pr_{UH} = \frac{w_{UH} \cdot X}{t_u} \quad [8]$$

Pr_{UH} – produktivnost sinteze ugljikohidrata [$\text{g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$],

w_{UH} – udio ugljikohidrata u suhoj tvari biomase,

X – koncentracija biomase u vremenu t_n [g L^{-1}];

t_u – trajanje uzgoja [dan].

$$Pr_L = \frac{w_L \cdot X}{t_u} \quad [9]$$

Pr_L – produktivnost sinteze lipida [$\text{g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$],

w_L – udio lipida u suhoj tvari biomase,

X – koncentracija biomase u vremenu t_n [g L^{-1}];

t_u – trajanje uzgoja [dan].

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kao što je već definirano u poglavlju 2.3., mikroalge sadrže značajne količine ugljikohidrata, lipida, vlakana, vitamina, pigmenata i minerala. Komercijalno najinteresantniji proizvodi mikroalgi su lipidi, pigmenti i biološki aktivne molekule s antivirusnim, antibakterijskim, antitumorskim i imunostimulativnim djelovanjem. Posebno su interesantni lipidi s dugolančanim, višestruko nezasićenim omega-6 i omega-9 masnim kiselinama (Ahlgren i sur., 1992; Griehl i sur., 2011; Priyadarshani i Rath, 2012). Osim u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, mikroalge se primjenjuju i u proizvodnji biogoriva (poput bioplina, biovodika, bioetanola, biodizela i sl.; Marques i sur., 2011).

Sojevi mikroalgi korišteni u ovom istraživanju izolirani su iz vodotoka rijeke Gacke u 2018. godini (Čorak, 2018). Istraživanja su provedena sa sojevima F10 i D2-1 koji pripadaju rodu *Chlorella* i sojem D10 koji pripada rodu *Chlamydomonas*. U radu je istražen utjecaj pojedinih izvora ugljika te njihove koncentracije na rast prethodno navedenih sojeva u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima uzgoja (Poglavlje 2.2.3). Rezultati istraživanja i rasprava rezultata prikazani su u poglavljima 4.1. i 4.2.

Važni čimbenici koji utječu na rast mikroalgi poput intenziteta i valne duljine izvora svjetlosti, koncentracije mikro i makro nutrijenata, ali i soj mikroalge odabran za uzgoj, uvelike utječe na sastav dobivene biomase (Ravindran i sur., 2016). Stoga je u ovom radu istražen učinak molarnog omjera C/N (10 i 30 mol mol⁻¹) u hranjivoj podlozi i uvjeta uzgoja (prisustvo i odsustvo svjetlosti tj. miksotrofni i heterotrofni uzgoj) tijekom šaržnog uzgoja mikroalge *Chlamydomonas* sp. (D10) na organskom izvoru ugljika. Tijekom uzgoja praćena je koncentracija biomase te je analiziran makromolekulski sastav i sadržaj pigmenata te masnih kiselina u ukupnim lipidima. Rezultati uzgoja su prikazani u poglavlju 4.3.

Na kraju istraživanja proveden je šaržni uzgoj s pritokom supstrata u heterotrofnim uvjetima. Svakodnevno je određivana koncentracija biomase mikroalge, makromolekulski sastav biomase te udjel pigmenata i sadržaj masnih kiselina u ukupnim lipidima. Sastav makromolekula, pigmenata te masnih kiselina uspoređen je s literaturnim podacima za isti soj. Rezultati istraživanja prikazani su u poglavlju 4.4.

4.1. RAST MIKROALGI NA RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJIKA U HETEROTROFNIM I MIKSOTROFNIM UVJETIMA

Ispitivanje rasta na različitim izvorima ugljika provedeno je metodom navedenom u poglavlju 3.2.3. Količina narasle biomase mikroalgi na pojedinim izvorima ugljika procijenjena je na temelju vizualne usporedbe intenziteta obojenja kultura u jažicama (Slike 10. i 11.) i određivanjem optičke gustoće kulture pri 540 nm (Slike 7., 8. i 9.).

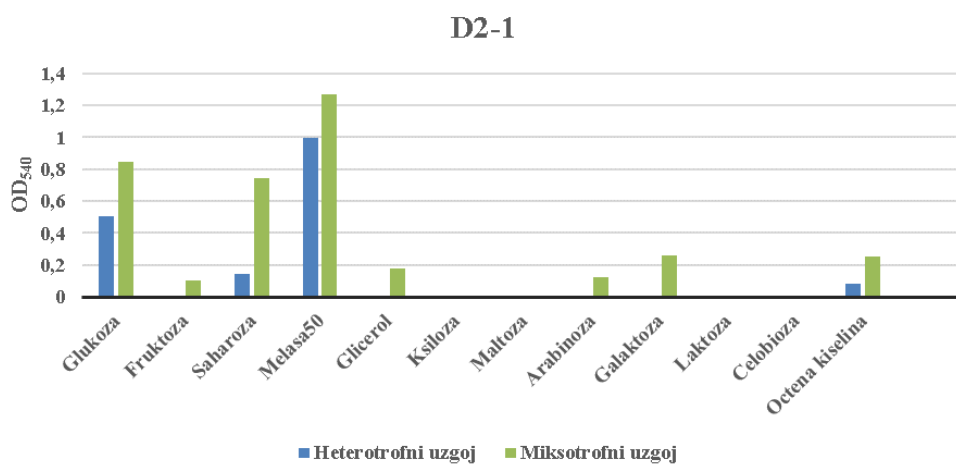
Prema slikama 7., 8. i 9. moguće je uočiti kako je porast kulture mikroalgi značajniji pri miksotrofnim nego heterotrofnim uvjetima rasta, a dobiveni rezultati su sukladni s literaturom (Perez-Garcia i sur., 2011). Kod sojeva D2-1 i F10 moguće je zamijetiti odsustvo rasta pri heterotrofnim uvjetima uzgoja kod većine izvora ugljika (Slike 7. i 8.). Odsustvo rasta soja D2-1 pri heterotrofnim uvjetima uzgoja moguće je uočiti kod fruktoze, glicerola, ksiloze, maltoze, arabinoze, galaktoze, laktoze i celobioze. Odsustvo rasta soja F10 pri heterotrofnim uvjetima uzgoja moguće je zamijetiti prilikom uzgoja na fruktozi, saharozi, melasi, glicerolu, ksilozi, maltozi, arabinozi, galaktozi te laktozi. Soj D10 podjednako je rastao u heterotrofnim i miksotrofnim uvjetima uzgoja (Slika 9.), što je bio jedan od razloga odabira ovog soja za daljnje istraživanje. Prethodno navedene činjenice potvrđene su vizualnim uspoređivanjem obojenja kulture mikroalgi u jažicama (Slike 10. i 11.).

Kod sojeva D2-1 i D10, pri heterotrofnim i miksotrofnim uvjetima uzgoja, kao optimalan izvor ugljika pokazala se melasa (Slike 7. i 9.). Osim na melasi, soj D2-1 dobro je rastao na glukozi, a nešto slabije na saharozi (Slika 7.). Soju D10 je za rast odgovaralo više izvora ugljika. Osim melase; fruktoza, saharoza te, naposljetku, glukoza, pokazali su se kao pogodni izvor ugljika za uzgoj ovog soja (Slika 9.). Pri heterotrofnim uvjetima uzgoja, najveći rast biomase soja F10 postignut je na glukozi, dok se pri miksotrofnim uvjetima uzgoja kao optimalni izvor ugljika pokazala octena kiselina. Osim octene kiseline i glukoze, rastu ovog soja pogodovao je uzgoj na celobiozi kao izvoru ugljika (Slika 8.).

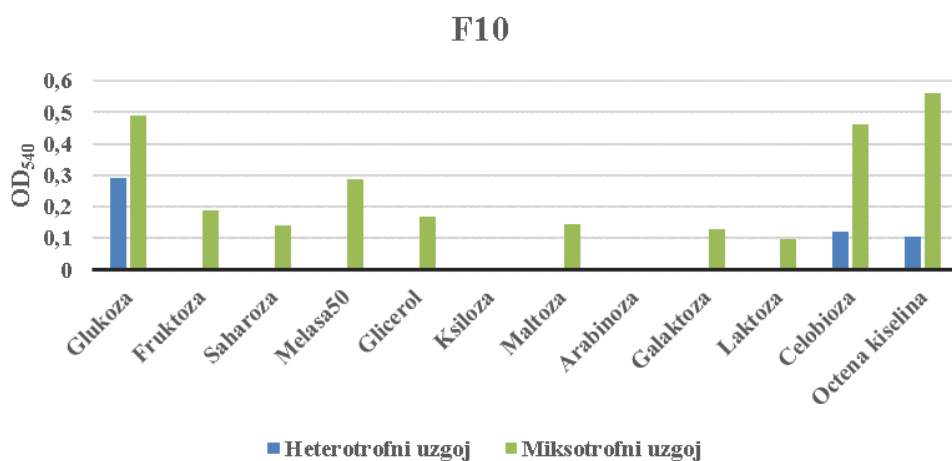
Odsustvo rasta soja F10 pri heterotrofnim uvjetima uzgoja uočeno je kod uzgoja na svim izvorima ugljika osim glukoze, celobioze i octene kiseline. Veći prirast biomase postignut je u miksotrofnim uvjetima uzgoja, dok je odsustvo rasta ovog soja utvrđeno samo kod uzgoja na ksilozi i arabinozi (Slika 8.). Kod soja D2-1 je odsustvo rasta pri heterotrofnim uvjetima uzgoja moguće zamijetiti kod svih izvora ugljika osim glukoze, saharoze, melase i octene kiseline.

Miksotrofni uzgoj se opet pokazao uspješnijim, tj. odsustvo rasta ovog soja moguće je uočiti kod uzgoja na ksilozi, maltozi, laktozi i celobiozi kao izvorima ugljika (Slika 7.).

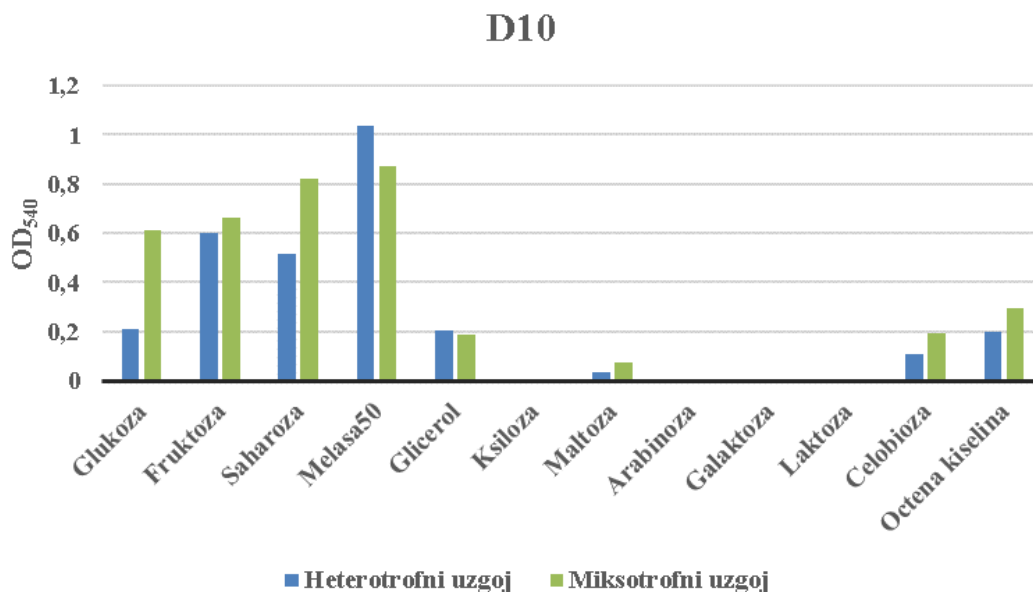
Pri miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima uzgoja soj D10 nije rastao na ksilozi, arabinozi, galaktozi i laktozi (Slika 9.). Zamijećen je izostanak rasta svih sojeva na ksilozi i arabinozi kao izvorima ugljika, što je sukladno s literaturom u kojoj se navodi da kod zelenih mikroalgi nije pronađen transportni sustav za šećere pentoze (Nagarajan i sur, 2018). Također, laktoza se nije pokazala kao povoljan supstrat za uzgoj u većini slučajeva, što je u suglasju s literaturom (Cerón García i sur., 2006; Zhang i sur., 2014).



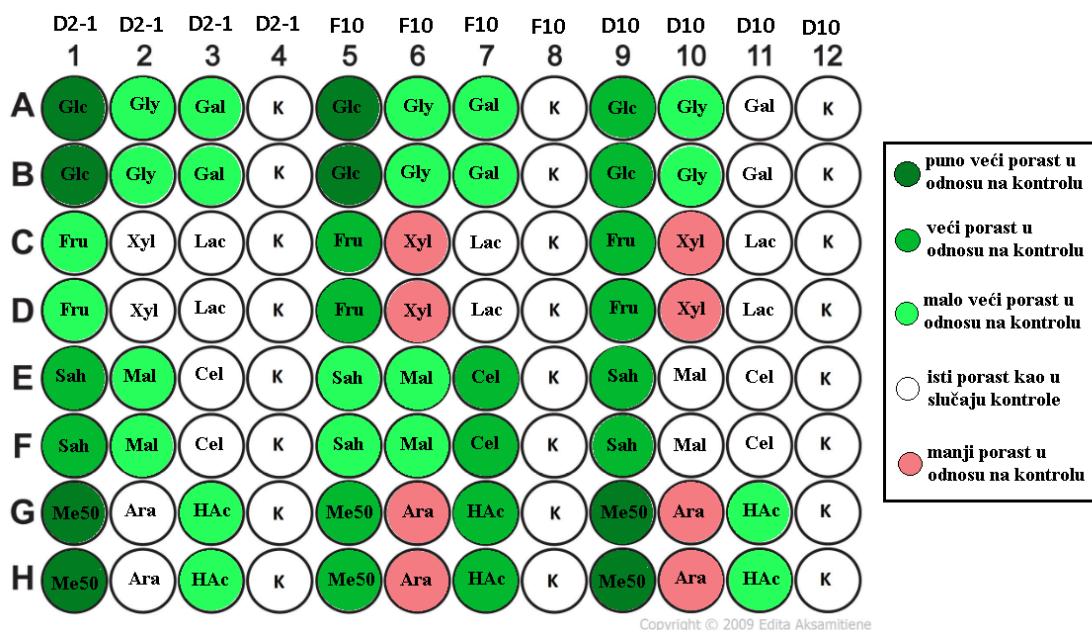
Slika 7. Rast soja D2-1 na različitim izvorima ugljika u heterotrofnim i miksotrofnim uvjetima uzgoja.



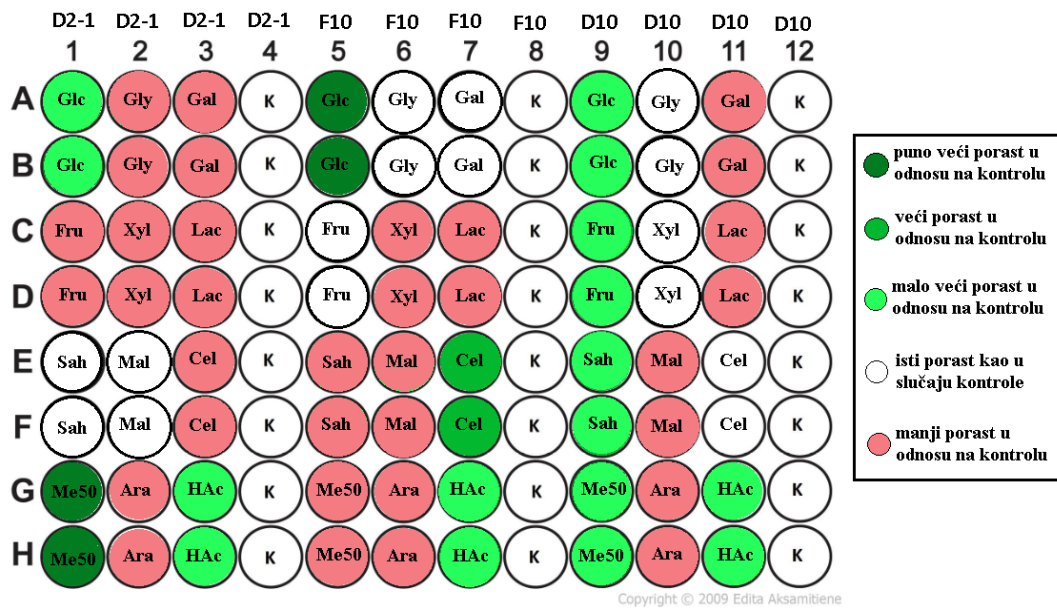
Slika 8. Rast soja F10 na različitim izvorima ugljika u heterotrofnim i miksotrofnim uvjetima uzgoja.



Slika 9. Rast soja D10 na različitim izvorima ugljika u heterotrofnim i miksotrofnim uvjetima uzgoja.



Slika 10. Vizualna procjena rasta mikroalgi na različitim izvorima ugljika u miksotrofnim uvjetima uzgoja.



Slika 11. Vizualna procjena rasta mikroalgi na različitim izvorima ugljika u heterotrofnim uvjetima uzgoja.

4.2. UČINAK KONCENTRACIJE IZVORA UGLJIKA NA RAST MIKROALGI

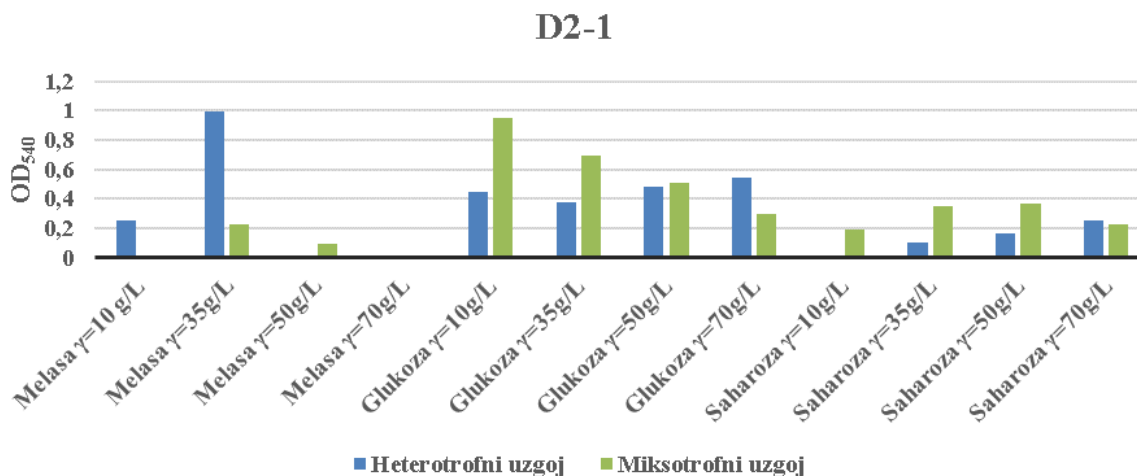
U nastavku istraživanja proučavan je učinak koncentracije izvora ugljika na rast i to s odabranim izvorima ugljika koji su omogućili najveći prirast biomase sojeva D2-1, F10 i D10 u prethodno provedenom eksperimentu (Poglavlje 4.1.). Uspješnost rasta na različitim koncentracijama optimalnih izvora ugljika određena je vizualnim uspoređivanjem rasta biomase mikroalge s obzirom na intenzitet obojenja kulture u jažicama (Slike 15. i 16.) i usporedbom optičke gustoće kultura pri 540 nm međusobno i s kontrolom (Slike 12., 13., 14.).

Prirast biomase za svaki pojedini soj mikroalge ovisio je o izvoru ugljika i uvjetima uzgoja (miksotrofni i heterotrofni uvjeti). Tako je nešto veći prirast biomase soja D10 postignut u heterotrofnim uvjetima uzgoja i to kod sva tri izvora ugljika (melasa, saharoza i fruktoza), dok je kod sojeva D2-1 i F10 rast ovisio o vrsti izvora ugljika. Kao najpogodniji izvor ugljika za rast svih istraženih sojeva mikroalgi pokazala se melasa. Melasa se često koristi kao podloga za uzgoj različitih mikroorganizama jer, osim različitih šećera (saharoze, glukoze i fruktoze), sadrži proteine, elemente u tragovima i vitamine koji snažno podupiru rast (Bae i Shoda, 2004; Šarić i sur., 2016). Pri heterotrofnim uvjetima uzgoja, najveći rast biomase sojeva D2-1 i F10 određen je na melasi uz koncentracije 35 g L⁻¹, dok je za soj D10 najveći porast biomase zabilježen pri uzgoju na melasi uz koncentracije 10 g L⁻¹ (Slike 12., 13. i 14.). Značajno slabiji rast biomase soja D2-1 na saharozi u odnosu na melasu postignut je i u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima, što i potvrđuje da makro i mikronutrijenti prisutni u melasi pogoduju

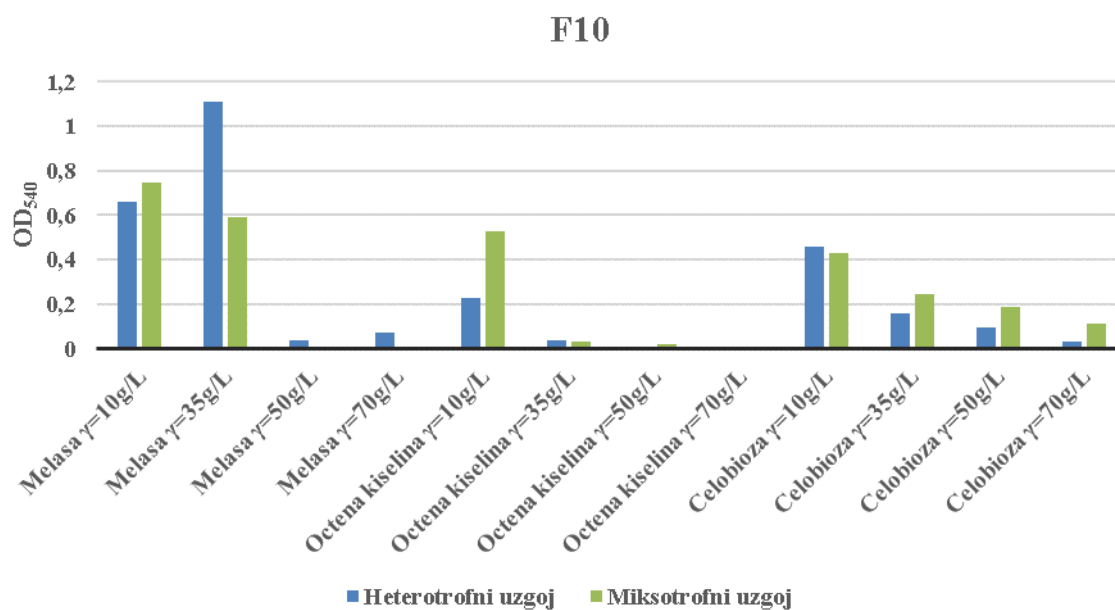
rastu. U miksotrofnim uvjetima, najveći porast biomase utvrđen je pri uzgoju sojeva D10 i F10 na melasi koncentracije 10 g L^{-1} (Slike 13. i 14.), dok je najveći porast biomase soja D2-1 postignut kod uzgoja na glukozu koncentracije 10 g L^{-1} (Slika 12.).

Pri visokim koncentracijama ugljika rast biomase bio je inhibiran što je rezultiralo manjim prirastom biomase. Koncentracija izvora ugljika kod koje dolazi do pojave supstratne inhibicije različita je za svaki soj, vrstu izvora ugljika i način uzgoja (miksotrofni i heterotrofni uzgoj). Inhibicija rasta sojeva F10 i D2-1 uočena je pri koncentracije melase veće od 35 g L^{-1} , dok je kod soja D10 isto uočeno kod koncentracije melase veće od 10 g L^{-1} i to u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima uzgoja. Optičke gustoće biomase izmjerene za sva tri soja ukazuju na inhibiciju supstratom kod viših koncentracija svih izvora ugljika. Vizualnim opažanjem potvrđen je isti trend (Slike 15. i 16.).

U nastavku istraživanja korišten soj D10 koji je pokazao najveći porast biomase na različitim izvorima ugljika u heterotrofnim i miksotrofnim uvjetima uzgoja, te je prethodnim istraživanjima pokazao i najveći udio lipida (Čorak, 2018). Cilj istraživanja bio je utvrditi učinak molarnog omjera C/N te uvjeta uzgoja (miksotrofni i heterotrofni uzgoj) na sastav staničnih makromolekula (lipida, proteina i ugljikohidrata). Kao izvor ugljika za uzgoj ovog soja odabrana je glukoza iako se melasa u prethodnim istraživanjima pokazala najboljim supstratom za rast biomase. Razlog tome je kompleksan sastav melase, i značajne količine anorganskog i organskog izvora dušika koji podupiru rast biomase mikroalgi (Arumugam i sur., 2013; Šarić i sur., 2016). Preporučuje se daljnje istraživanje rasta ovog soja na prethodno određenim optimalnim izvorima ugljika (melasi, saharozi i fruktozi).

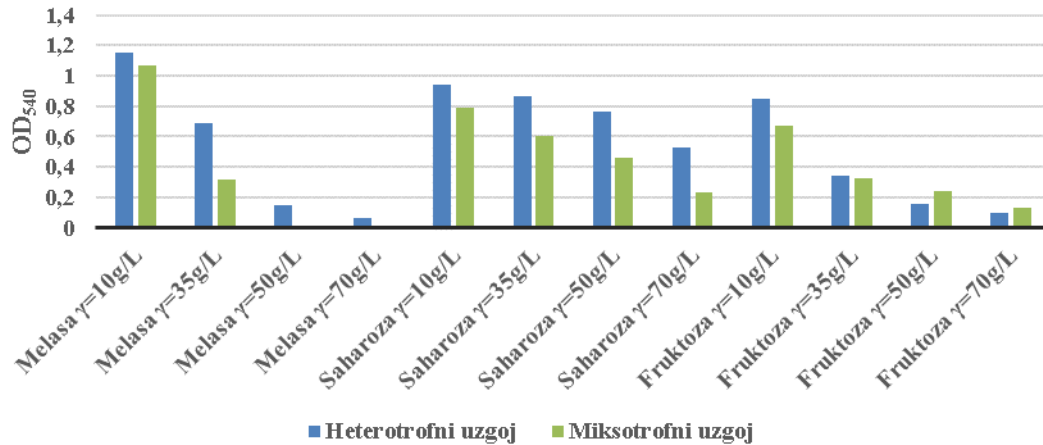


Slika 12. Rast soja D2-1 na različitim koncentracijama melase, glukoze i saharoze ($\gamma=10, 35, 50$ i 70 gL^{-1}) pri heterotrofnim i miksotrofnim uvjetima.

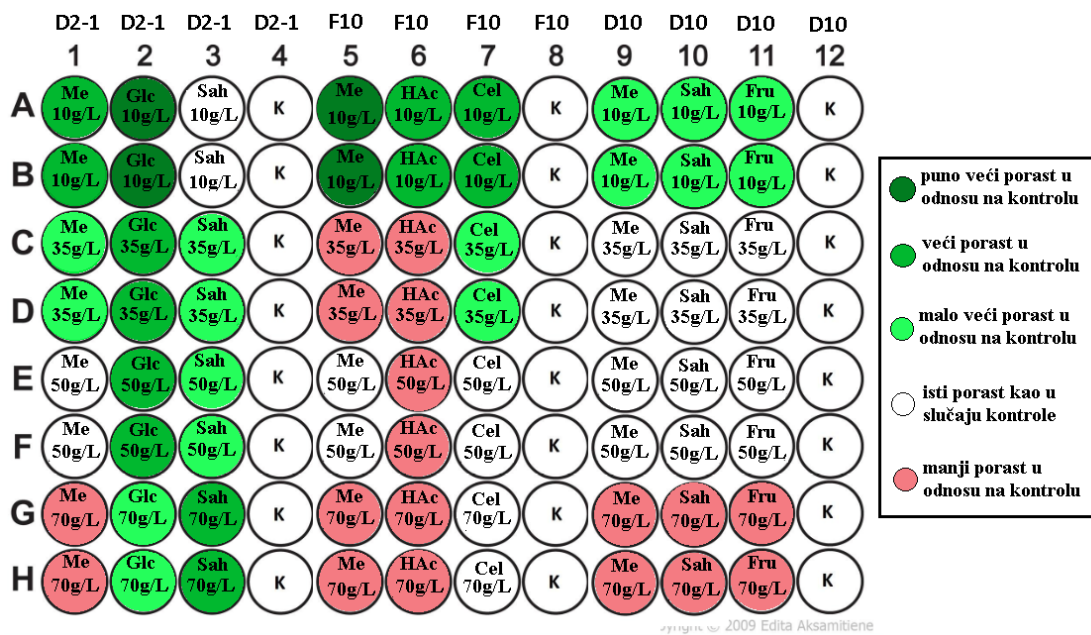


Slika 13. Rast soja F10 na različitim koncentracijama melase, octene kiseline i celobioze ($\gamma=10, 35, 50$ i 70 gL^{-1}) pri heterotrofnim i miksotrofnim uvjetima.

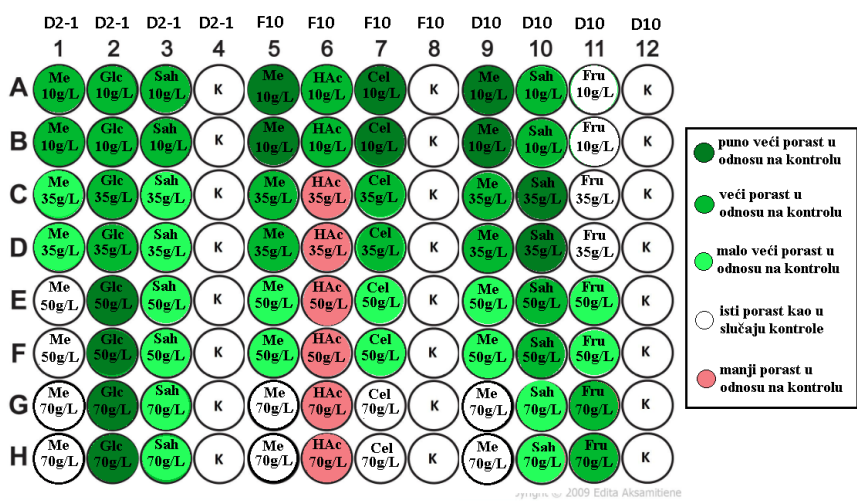
D10



Slika 14. Rast soja D10 na različitim koncentracijama melase, saharoze i fruktoze ($\gamma=10, 35, 50$ i 70gL^{-1}) pri heterotrofnim i miksotrofnim uvjetima.



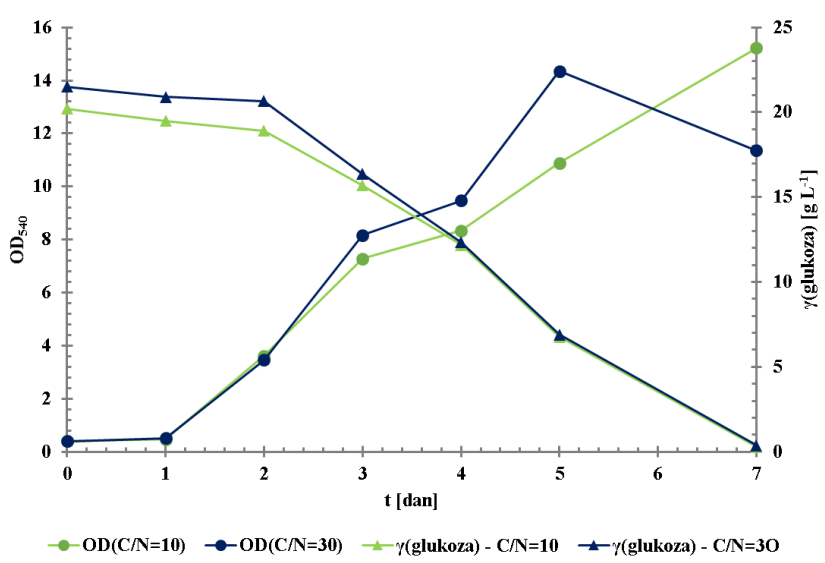
Slika 15. Vizualna procjena rasta mikroalgi na različitim koncentracijama izvora ugljika u miksotrofnim uvjetima.



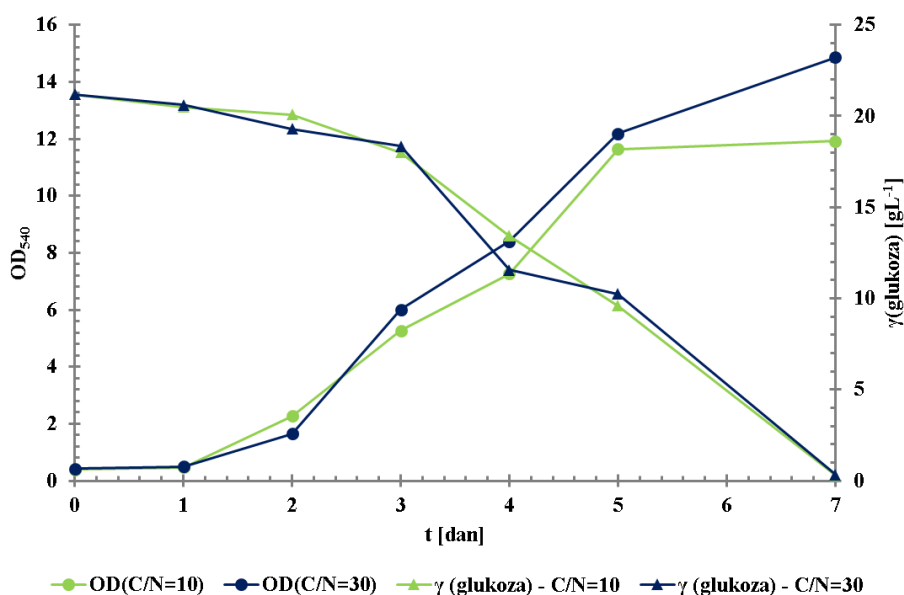
Slika 16. Vizualna procjena rasta mikroalgi na različitim koncentracijama izvora ugljika u heterotrofnim uvjetima.

4.3. UČINAK OMJERA C/N NA SASTAV STANIČNE BIOMASE I UDIO KLOROFILA

Istraživanje učinka molarnog omjera C/N provedeno je metodom opisanom u poglavlju 3.2.5. Slike 17. i 18. prikazuju rast biomase (optičke gustoće pri 540 nm) i koncentracije glukoze (g L⁻¹) dobivene šaržnim uzgojem kulture u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima uzgoja pri molarnim omjerima C/N od 10 i 30 mol mol⁻¹. Na krivuljama rasta biomase mikroalge uočavaju se pojedine faze rasta: lag faza ili faza indukcije, eksponencijalna faza, faza usporenog rasta, stacionarna faza i faza odumiranja (Couteau, 1996).



Slika 17. Miksotrofni uzgoj pri različitim C/N omjerima (C/N=10 mol mol⁻¹, C/N=30 mol mol⁻¹).



Slika 18. Heterotrofni uzgoj pri različitim C/N omjerima ($C/N=10 \text{ mol mol}^{-1}$, $C/N=30 \text{ mol mol}^{-1}$).

Lag faza ili faza indukcije predstavlja vrijeme potrebno za fiziološku prilagodbu stanica mikroalgi na promjene uvjeta uzgoja (Couteau, 1996). Kod sva četiri provedena uzgoja, ona je trajala kratko, točnije 1 dan, nakon čega kulture mikroalgi ulaze u eksponencijalnu fazu rasta te dolazi do porasta utroška limitirajućeg izvora ugljika (glukoze) (Slike 17. i 18.). Od 1. do 5. dana uzgoja moguće je uočiti eksponencijalnu fazu rasta u svim uzgojima, osim u miksotrofnim uvjetima pri molarnom omjeru C/N od 10 mol mol^{-1} , gdje se ona produžuje do 7. dana uzgoja (Slike 17. i 18.). Tijekom eksponencijalne faze rasta, stanice konstantnom brzinom troše glukozu. Treća faza rasta je faza usporenog rasta. Rast kulture stanica se usporava kada hranjive tvari, svjetlo, pH, ugljični dioksid ili drugi fizički i kemijski čimbenici počinju ograničavati rast (Couteau, 1996). Ovu fazu je moguće uočiti kod heterotrofnog uzgoja pri C/N omjeru 30 mol mol^{-1} od 5. do 7. dana uzgoja (Slika 18.). Slijedi stacionarna faza kod koje se brzina odumiranja i brzina rasta stanica izjednačavaju. Kod heterotrofnog uzgoja pri molarnom omjeru C/N od 10 mol mol^{-1} ova faza traje od 5. do 7. dana uzgoja (Slika 18.). Naposljetku dolazi do faze odumiranja tijekom koje se koncentracija stanica drastično smanjuje, najčešće uslijed iscrpljivanja nutrijenata u podlozi, promijene pH podloge, nakupljanja toksičnih metabolita, moguće kontaminacije, pregrijavanja i sl. (Lee i sur., 2015). Faza odumiranja vidljiva je na krivulji miksotrofnog rasta pri C/N omjeru 30 mol mol^{-1} od 5. do 7. dana (Slika 17.). Nakon ulaska kulture u fazu usporenog rasta, uzgoj je prekinut i biomasa je izdvojena za daljnje analize.

4.3.1. Sastav makromolekula

Na kraju šaržnog uzgoja u izdvojenoj biomasi određeni su udjeli ugljikohidrata, proteina i lipida (Poglavlja 3.2.7., 3.2.8.1. i 3.2.9.).

Tablica 13. Koncentracija biomase, produktivnost biomase, ugljikohidrata i lipida pri različitim uvjetima uzgoja i molarnim omjerima C/N.

	C/N omjeri [mol mol ⁻¹]	X [g L ⁻¹]	Pr_X [g L ⁻¹ dan ⁻¹]	Pr_{UH} [g L ⁻¹ dan ⁻¹]	Pr_L [g L ⁻¹ dan ⁻¹]
Miksotrofni uzgoj	10	11,04	1,58	0,88	0,41
	30	10,85	1,55	0,84	0,20
Heterotrofni uzgoj	10	10,99	1,57	1,08	0,31
	30	11,99	1,71	1,06	0,30

U tablici 13. vidljivo je da različiti uvjeti uzgoja i molarni omjeri C/N nisu imali veliki utjecaj na koncentraciju biomase na kraju uzgoja, koja je iznosila između 10,85 i 11,99 g L⁻¹. Produktivnost biomase je iznosila u većini slučajeva 1,5 g L⁻¹ dan⁻¹. No, kod heterotrofnih uvjeta uzgoja pri molarnom omjeru C/N od 30 mol mol⁻¹, dolazi do porasta vrijednosti produktivnosti koja je pritom iznosila 1,71 g L⁻¹ dan⁻¹. Zhang i sur. (2018) su postigli najveću produktivnost biomase, koja je iznosila 2 g L⁻¹ dan⁻¹, pri heterotrofnim uvjetima uzgoja i molarnom omjeru C/N od 40 mol mol⁻¹, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

Tablica 14. prikazuje udjele analiziranih makromolekula kod različitih uvjeta uzgoja i molarnih omjera C/N. Heterotrofni uvjeti uzgoja pogodovali su nakupljanju ugljikohidrata čiji je udio bio 10 % veći nego na kraju miksotrofnog uzgoja. Također, uzgoj kod omjera C/N od 10 mol mol⁻¹, više je pogodovao nakupljanju ugljikohidrata nego omjer C/N od 30 mol mol⁻¹. U kiselinskom hidrolizatu najzastupljeniji je monosaharid bila glukoza, čiji je udio iznosio između 81,85 i 89,56 % suhe tvari biomase. Ostali monosaharidi (ksiloza, manoza, galaktoza, arabinoza, riboza i fukoza) zastupljeni su u manjoj mjeri te im je udio u kiselinskom hidrolizatu iznosio ispod 10 % (Tablica 15.). Najveća produktivnost nakupljanja ugljikohidrata je ostvarena kod heterotrofnog uzgoja pri omjeru C/N od 10 mol mol⁻¹ te je iznosila 1,08 g L⁻¹ dan⁻¹. Najmanja produktivnost je ostvarena kod miksotrofnog uzgoja pri C/N omjeru 30 mol mol⁻¹, a iznosila je 0,84 g L⁻¹ dan⁻¹ (Tablica 14.). Nakupljanju lipida je također pogodovao manji C/N omjer (mol mol⁻¹) tj. najveći udio lipida je postignut kod miksotrofnog uzgoja i omjera C/N od 10 mol mol⁻¹ te je iznosio 26,23 % suhe tvari biomase. Općenito, udio lipida se kretao između

17,68 i 26,23 % što je u skladu s literaturom u kojoj se navodi da kod uzgoja mikroalge *Chlamydomonas* sp. na BBM hranjivoj podlozi udio lipida iznosi između 15 i 37 % (Salama i sur., 2013). Također, činjenica da je veći udio lipida dobiven u miksotrofnim nego heterotrofnim uvjetima uzgoja, sukladna je s literaturom (Cheirsilp i Torpee, 2012; Moon i sur., 2013). Produktivnost lipida se kretala od 0,20 do 0,41 g L⁻¹ dan⁻¹ (Tablica 13.).

Udio proteina u suhoj tvari biomase određen metodom po Lowry-ju je bio ispod 0,3 % što je daleko niže od vrijednosti za istraživanu vrstu mikroalgi (Senroy i Pal, 2014). Najvjerojatnije metoda po Lowryju daje lažno niske vrijednosti proteina u stanici zbog interferencije nekih od tvari u staničnom lizatu (Tablica 14.).

Tablica 14. Udio analiziranih makromolekula pri različitim vrstama uzgoja (heterotrofni i miksotrofni uzgoj) te različitim omjerima C/N (C/N=10, 30 mol mol⁻¹).

	C/N omjeri [mol mol ⁻¹]	Ugljikohidrati [%]	Lipidi [%]	Proteini [%]
Miksotrofni uzgoj	10	56,09	26,23	0,31
	30	54,32	12,84	0,14
Heterotrofni uzgoj	10	69,09	19,89	0,18
	30	61,84	17,67	0,13

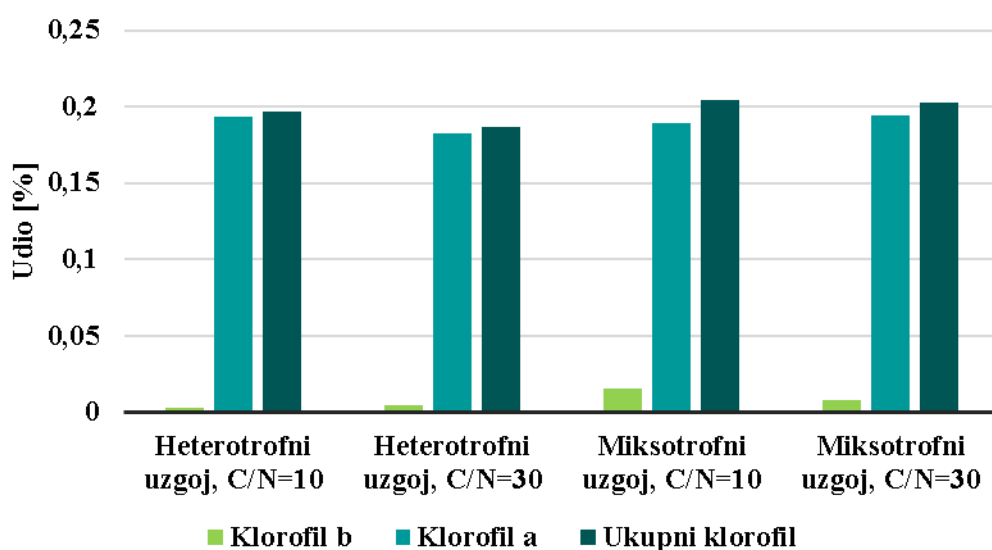
Tablica 15. Udio pojedinih monosaharida u kiselinskom hidrolizatu pri različitim vrstama uzgoja (heterotrofni i miksotrofni uzgoj) te različitim omjerima C/N (C/N=10, 30 mol mol⁻¹).

	C/N omjeri [mol mol ⁻¹]	Glukoza [%]	Ksiloza + manoza + galaktoza [%]	Arabinoza + riboza + fukoza [%]
Miksotrofni uzgoj	10	82,85	9,55	7,59
	30	86,43	7,84	5,73
Heterotrofni uzgoj	10	87,03	6,81	6,16
	30	89,56	5,94	4,50

4.3.2. Sastav pigmenata

Sastav pigmenata određen je metodom opisanom u poglavlju 3.2.10. Na slici 19. prikazani su udjeli klorofila *a* i *b* te ukupnih klorofila u biomasi mikroalgi pri različitim uvjetima uzgoja te različitim omjerima C/N (mol mol⁻¹). Najveći udio klorofila *a*, koji je iznosio 0,19 % suhe tvari biomase, određen je kod miksotrofnog uzgoja pri omjeru C/N od 30 mol mol⁻¹. Neki mutanti mikroalge *Chlamydomonas* sp. uključuju sojeve koji ne mogu sintetizirati

klorofil *b* (Harris, 2001). Tako je prilikom uzgoja ovog soja mikroalge *Chlamydomonas* sp. udio klorofila *a* bio puno veći od udjela klorofila *b*. Najveća vrijednost udjela klorofila *b* od 0,015 % suhe tvari biomase postignuta je kod miksotrofnog uzgoja pri omjeru C/N 10 mol mol⁻¹. Veći udio klorofila *a* u odnosu na klorofil *b* rezultirala je plavo-zelenim obojenjem kulture mikroalgi (Poglavlje 2.3.2.1.). Općenito, manji molarni omjer C/N (10 mol mol⁻¹) te miksotrofni uvjeti uzgoja su više pogodovali nakupljanju klorofila. Tako je na slici 19. moguće uočiti da je najveći udio ukupnih klorofila, koji je iznosio 0,20 % suhe tvari biomase, postignut upravo pri miksotrofnom uzgoju pri omjeru C/N od 10 mol mol⁻¹.



Slika 19. Udio klorofila *a* i *b*, te ukupnog klorofila u biomasi algi pri različitim vrstama uzgoja (heterotrofni i miksotrofni uzgoj) te različitim omjerima C/N (C/N=10, 30 mol mol⁻¹).

4.3.3. Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima

Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima određen je metodom prikazanom u poglavlju 3.2.11. Tablica 16. prikazuje sastav metil estera masnih kiselina u ukupnim lipidima kod različitih vrsta uzgoja (heterotrofnog i miksotrofnog) i omjera C/N (mol mol⁻¹). Iz nje je vidljivo kako su najzastupljenije masne kiseline sljedeće: zasićena masna kiselina C16:0 (palmitinska kiselina), jednostruko nezasićena omega-9 masna kiselina C18:1 cis 9 (oleinska kiselina) te višestruko nezasićene omega-3 masne kiseline C18:2 cis 9,12 (linolna kiselina) i C18:3 cis 9,12,15 (α -linolenska kiselina). Ovakav sastav masnih kiselina kod mikroalge *Chlamydomonas* sp. u skladu je s literaturnim podacima gdje se ove četiri masne kiseline navode kao najzastupljenije (Tatsuzawa i sur., 1996; Li i sur., 2010; James i sur. 2011). Udio zasićenih i

nezasićenih masnih kiselina je gotovo jednak, što je sukladno s literaturom i čini *Chlamydomonas* sp. poželjnim sojem za proizvodnju biodizela (Singh i sur., 2013).

Najveći udio zasićenih masnih kiselina (SFA, eng. Saturated Fatty Acids) u ukupnim lipidima, koji je iznosio 52,54 %, dobiven je miksotrofnim uzgojem pri omjeru C/N od 30 mol mol⁻¹. Najzastupljenija zasićena masna kiselina, kao što je prethodno navedeno, bila je palmitinska kiselina, čiji je udio iznosio 48,13 %. Najmanji udio zasićenih masnih kiselina dobiven je heterotrofnim uzgojem kod omjera C/N od 30 mol mol⁻¹ te je iznosio 40,53 %, od čega je udio najzastupljenije, palmitinske kiseline, bio 32,53 %. Kod ovog uzgoja, značajno se povećao udio margarinske kiseline (C17:0), koji je iznosio 7,79 %.

Udio višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA, eng. Polyunsaturated Fatty Acids) na kraju gotovo svih provedenih uzgoja bio je podjednak. No, kod heterotrofnog uzgoja pri omjeru C/N od 30 mol mol⁻¹, udio ovih masnih kiselina je odskakao tj. bio najveći i iznosio 34,43 %. Kod drugih uvjeta uzgoja, udio PUFA je iznosio između 23 i 24 %. Najzastupljenija PUFA bila je oleinska kiselina, čiji je najveći udio iznosio 25,64 %, što je u skladu s literaturom (Singh i sur., 2013). Veći udio ove kiseline moguće je zamijetiti kod omjera C/N od 10 mol mol⁻¹. Udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina (MUFA, eng. Monounsaturated Fatty Acids) većinom je bio podjednak udjelu višestruko nezasićenih masnih kiselina te je iznosio između 25,04 i 27,18 %. Kao što je prethodno navedeno, najzastupljenije višestruko nezasićene masne kiseline su linolna i α -linolenska kiselina kojima je najveći udio postignut kod heterotrofnog uzgoja pri omjeru C/N od 30 mol mol⁻¹. Pritom je udio linolne kiseline iznosio 18,76 %, a udio α -linolenske kiseline 9,87%.

Tablica 16. Sastav metilnih estera masnih kiselina u ukupnim lipidima pri različitim vrstama uzgoja (heterotrofni i miksotrofni uzgoj) te različitim omjerima C/N (C/N=10, 30 mol mol⁻¹).

C/N omjeri [mol mol ⁻¹]	Miksotrofni uzgoj		Heterotrofni uzgoj	
	10	30	10	30
Metil ester masne kiseline	Udio [%, gg⁻¹]			
C6:0, kapronska kiselina	-	1,18	-	-
C14:0, miristinska kiselina	*	0,01	-	0,20
C15:1 cis 10, pentadekanoična kiselina	-	0,06	-	-
C16:0, palmitinska kiselina	47,03	48,13	45,86	32,53
C16:1 cis 9, palmitoleinska kiselina	1,15	*	1,54	2,43
C17:0, heptadekanska (margarinska) kiselina	3,26	3,19	3,96	7,79

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

C17:1 cis 10, heptadekanoična kiselina	-	*	-	-
C18:0, stearinska kiselina	*	0,05	*	*
C18:1 cis 9, oleinska kiselina	24,60	23,23	25,64	22,61
C18:2 cis 9,12, linolna kiselina	12,17	11,38	12,80	18,76
C18:3 cis 6,9,12, γ-linolenska kiselina	2,86	3,39	3,43	5,80
C18:3 cis 9,12,15, α-linolenska kiselina	8,93	8,99	6,77	9,87
C20:1 cis 11, gondoična kiselina	*	0,41	*	*
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19, dokozaheksaenska kiselina	*	*	*	*
SFA³	50,29	52,54	49,82	40,53
MUFA⁴	25,75	23,69	27,18	25,04
PUFA⁵	23,96	23,77	23,00	34,43

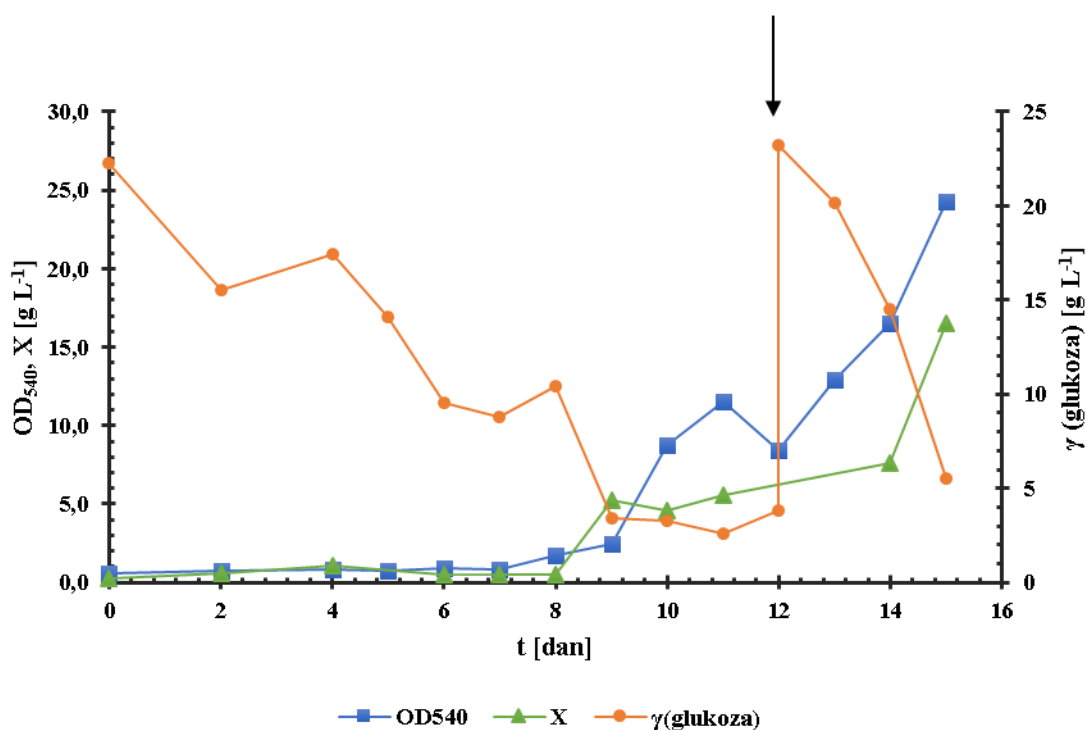
³ SFA (eng. saturated fatty acids) zasićene masne kiseline.

⁴ MUFA (eng. monounsaturated fatty acids) jednostruko nezasićene masne kiseline.

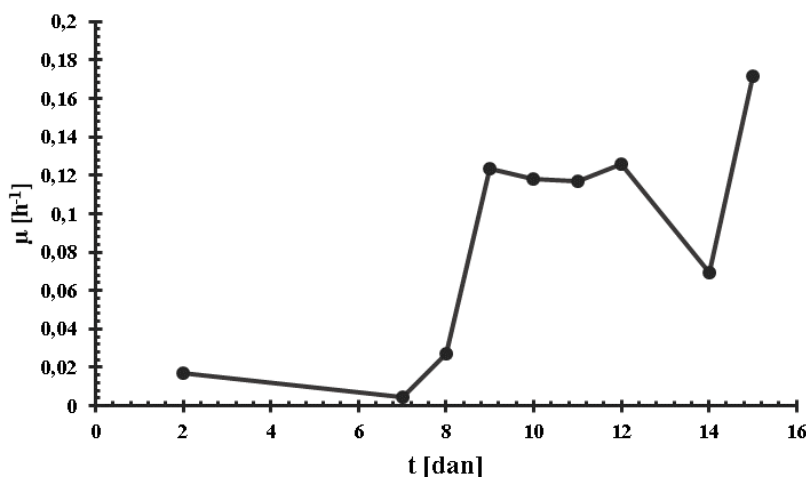
⁵ PUFA (eng. polyunsaturated fatty acids) višestruko nezasićene masne kiseline.

4.4. ŠARŽNI UZGOJ S PRITOKOM SUPSTRATA

Šaržni uzgoj s pritokom supstrata proveden je s mikroalgom *Chlamydomonas* sp. u heterotrofnim uvjetima uz glukozu kao izvor ugljika (Poglavlje 3.2.6.). Uzgoj je proveden u Erlenmeyerovim tikvicama na tresilici. Kinetika rasta praćena je izuzimanjem uzoraka svakih 24 sata u kojima je potom određena optička gustoća kulture mikroalgi te koncentracija stanica gravimetrijom. Cilj uzgoja bio je istražiti promjenu sastava makromolekula u stanici (ugljikohidrati, proteini i lipidi), pigmentata (klorofil *a* i *b*) i sastava masnih kiselina u izoliranim ukupnim lipidima iz stanične biomase.



Slika 20. Heterotrofni šaržnog uzgoja s pritokom supstrata mikroalge *Chlamydomonas* sp.



Slika 21. Promjena specifične brzine rasta tokom uzgoja.

Temperatura tijekom uzgoja se mijenjala i iznosila je između 30 i 35°C, što je bilo znatno više od optimalne temperature za rast mikroalge *Chlamydomonas* sp. koja iznosi oko 28 °C (Vítová i sur., 2011). Činjenicom da je temperatura uzgoja bila viša od optimalne, moguće je objasniti dugu lag fazu ili fazu indukcije, koja je iznosila sedam dana (Slika 20.). Naime, u prethodnim uzgojima ove mikroalge, lag faza uzgoja iznosila je otprilike 1 dan (Poglavlje 4.3.). Osmog dana uzgoja uočen je porast koncentracije stanica mikroalgi, što označava ulazak kulture u eksponencijalnu fazu rasta. Rast koncentracije biomase pratio je nagli pad koncentracije glukoze. Trinaestog dana, koncentracija glukoze iznosila je približno 2 g L⁻¹, te je kultura prihranjena s koncentriranom otopinom glukoze (Slika 20., prihrana naznačena strelicom). Koncentracija glukoze je nakon prihrane iznosila otprilike 23 g L⁻¹. Uz glukozu, prihrana je sadržavala i kvašćev ekstrakt. Uzgoj je završen 15. dana kada je koncentracija glukoze pala na približno 5 g/L. Kultura mikroalgi je tada bila u eksponencijalnoj fazi rasta i imala najveću specifičnu brzinu rasta od 0,17 h⁻¹ (Slika 21.). Koncentracija biomase mikroalge iznosila je 16,48 g L⁻¹ (Slika 20.). Najveća ostvarena produktivnost biomase postignuta je petnaestog dana uzgoja te je iznosila 1,10 g L⁻¹ dan⁻¹.

4.4.1. Sastav makromolekula

U uzorcima izuzimanim tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata određen je makromolekulski sastav stanice i sastav masnih kiselina (prema metodama opisanim u Poglavljima 3.2.7., 3.2.8. i 3.2.9.).

U tablici 17. prikazana je promjena udjela makromolekula (ugljikohidrata, lipida i proteina) tijekom uzgoja. Mikroalga *Chlamydomonas* sp. akumulira značajne količine

ugljikohidrata, čiji udio u suhoj tvari biomase iznosi između 45 i 60 % (Chen i sur., 2013; Trczinski i sur., 2012). Kod ovog uzgoja, udio ugljikohidrata se povećavao prema kraju uzgoja kada je dosegao udio od otprilike 56 % suhe tvari biomase, što odgovara prethodno navedenom rasponu udjela ugljikohidrata. Kao i kod prethodnog uzgoja (Poglavlje 4.3.1.), glukoza je bila najzastupljeniji monosaharid u kiselinskom hidrolizatu. Maksimalan udio, koji je iznosio 88,41 %, dosegnut je 11. dana uzgoja. Ostali monosaharidi bili su zastupljeniji na početku uzgoja (Tablica 18.). Najveća produktivnost sinteze ugljikohidrata zabilježena je 14. dan te je iznosila $0,31 \text{ g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$. Dokazano je da mikroalga *Chlamydomonas* sp. u stresnim uvjetima sintetizira značajne količine sulfatiranih polisaharida. Sulfatirani polisaharidi su bioaktivne molekule, pretežito izolirane iz izvanstaničnog matriksa te, ponekad, iz staničnih stjenki mikroalgi. Oni imaju linearnu strukturu i posjeduju protuupalno, antioksidativno, antitumorsko, antivirusno, imunostimulativno i neurozaštitno djelovanje te tako iskazuju veliku važnost u području biotehnologije, farmaceutike i biomedicine (Kamble i sur., 2018).

Udio lipida u biomasi se također povećavao tijekom uzgoja (kroz vrijeme), a najveća vrijednost je zabilježena 12. dana uzgoja, kada je iznosio 30,91% suhe tvari biomase (Tablica 17.). Niži udio lipida na početku uzgoja je posljedica intenzivnog rasta kulture u prisutnosti dovoljne količine izvora dušika i ugljika u hranjivoj podlozi. Dvanaestog dana uzgoja, kada je udio lipida bio najveći, koncentracija glukoze je bila izrazito niska. U literaturi je navedeno da prilikom limitacije uzgoja nekim nutrijentom, npr. izvorom dušika, dolazi do nakupljanja lipida kod mikroalgi, dok se rast kulture usporava. U prisutnosti izvora ugljika u podlozi, tok ugljika se u metaboličkim putevima preusmjerava ka sintezi masnih kiselina i lipida. Nakon prihrane s glukozom i kvašćevim ekstraktom, udio lipida se smanjio i iznosio je 25,02 % suhe tvari biomase. Ovo smanjenje moguće je pripisati dodatku nutrijenta kojim je rast biomase pri kraju šaržnog uzgoja bio limitiran zbog čega je došlo i do nakupljanja lipida. Najveća produktivnost lipida je ostvarena 14. dana te je iznosila $0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$.

Udio proteina određen je pomoću dvije metode, metodom po Lowry-ju opisanom u poglavlju 3.2.8.1. te metodom po Bradford-u opisanom u poglavlju 3.2.8.2.. Vrijednosti udjela proteina prema navedenim metodama značajno su razlikovale (Tablica 17). Dok su vrijednosti udjela proteina prema Bradford-u bile ujednačene tijekom čitavog uzgoja (4,88 - 7,86 %), udjeli proteina prema Lowry-ju bili su najveći prvih osam dana uzgoja (35,36 - 46,46 %) dok je njihova vrijednost naglo pala ispod 1 % suhe tvari biomase devetog dana uzgoja. Ovako mali udio proteina u biomasi mikroalgi nije zabilježen u literaturi što ukazuje na moguću interferenciju nekih tvari prisutnih u alkalnim hidrolizatima korištenim za određivanje proteina

po Lowry-ju. Poznato je da niz tvari u staničnom lizatu i tvari koje se koriste pri pripremi pufera mogu interferirati s metodom određivanja proteina kao što su detergentski, ugljikohidrati, glicerol, tricin, EDTA, Tris, kalijeve soli, tvari sa sulfhidrilnom skupinom, većina fenolnih spojeva, mokraćna kiselina, gvanin, ksantin, magnezij i kalcij (Olson i Markwell, 2007). Fiziološki neprihvatljivo niske udjele proteina u zadnjim danima uzgoja moguće je prema literaturi pripisati interferenciji ugljikohidrata i/ili lipida prisutnih u biomasi. Moguće je zapaziti da se povećanjem udjela ugljikohidrata i lipida u biomasi značajno smanjuje udio proteina prema Lowry-ju (Tablice 14. i 17.). Naime, reducirajući šećeri prisutni u alkalnom staničnom lizatu mogu reagirati s Cu^{2+} ionima u otopini B za određivanje proteina prema Lowry-ju (Olson i Markwell, 2007). Osim ugljikohidrata, fosfolipidi također mogu interferirati s Lowry-jevom metodom, posebice kod oleaginoznih mikroorganizama kojima pripadaju i mikroalge (Yao et al., 2015; Neidleman, 1993). Zbog toga je provedena ekstrakcija proteina prema promijenjenom protokolu i naknadno određivanje koncentracije proteina prema Bradford-u (Slocombe i sur., 2013; Bradford, 1976).

Udio proteina po Bradford-u se nije značajno mijenjao tijekom uzgoja, te je iznosio 4,88 % suhe tvari biomase na početku uzgoja i 6,16 % suhe tvari biomase na kraju uzgoja (Tablica 17.). Određeni udjeli proteina tijekom uzgoja bili su značajno manji od vrijednosti prikazanih u literaturi za mikroalgu *Chalmydomonas* sp. koji iznose od 43 do 56 % (Senroy i Pal, 2014). Ovako mala vrijednost udjela proteina u biomasi najvjerojatnije je posljedica gubitaka proteina tijekom postupka pripreme proteinskog ekstrakta.

Tablica 17. Prikaz promjene udjela analiziranih makromolekula tokom heterotrofnog šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

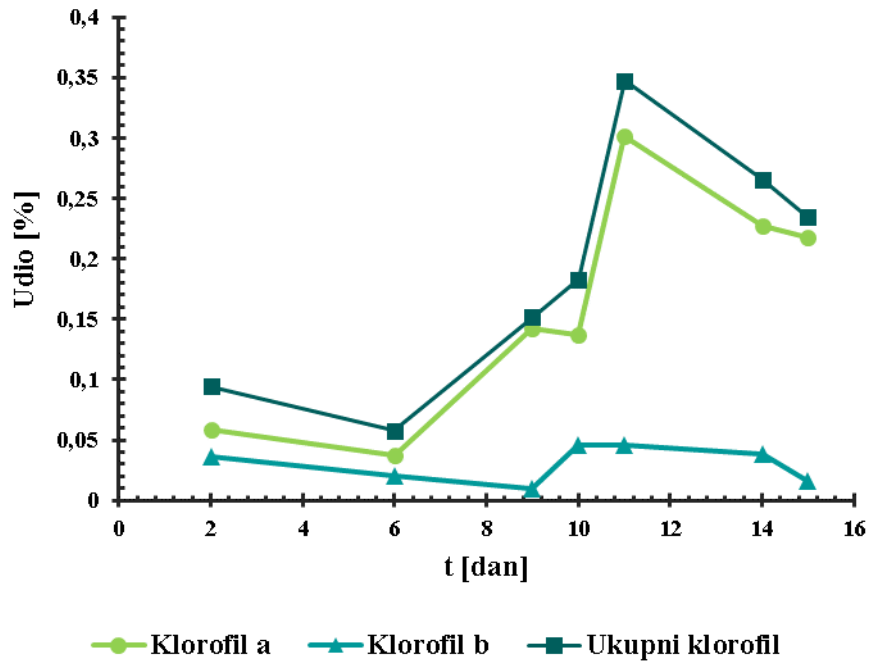
Vrijeme uzgoja [dan]	Ugljikohidrati [%]	Lipidi [%]	Lowry Proteini [%]	Bradford Proteini [%]
2	-	-	35,36	4,88
8	23,03	-	46,46	-
10	32,3	16	0,74	-
11	54,53	20,36	0,95	6,99
12	56,99	30,91	-	7,86
14	56,92	25,02	0,59	6,16

Tablica 18. Promjena udjela ugljikohidrata u kiselinskom hidrolizatu tokom heterotrofnog šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

Vrijeme uzgoja [dan]	Glukoza [%]	Ksiloza + manoz + galaktoza [%]	Arabinoza + riboza + fukoza [%]
8	74,36	12,07	13,57
10	82,42	7,67	9,91
11	88,41	5,13	6,45
12	84,82	7,75	7,43
14	83,47	8,36	8,17

4.4.2. Sastav pigmenata

Kao kod prethodnog uzgoja (Poglavlje 4.3.2.), udio klorofila *a* je bio puno veći od udjela klorofila *b*. Najveći udio ukupnih klorofila zabilježen je jedanaestog dana uzgoja te je iznosio 0,34 % suhe tvari biomase, nakon čega se smanjuje te je zadnji dan uzgoja iznosio 0,23 % suhe tvari biomase (Slika 22.). Na slici 22. je također moguće uočiti da krivulja promjene udjela klorofila *a* u vremenu slijedi isti trend kao krivulja promjene udjela ukupnih klorofila, tj. najveći udio klorofila *a* je bio 11. dana uzgoja kada je iznosio 0,30 % suhe tvari biomase. Nakon 11. dana slijedi nagli pad udjela klorofila *a* koji je na kraju uzgoja iznosio 0,22 % suhe tvari biomase. Udio klorofila *b* je također dosegnuo najveću vrijednost pri 11. danu uzgoja kada je iznosio 0,046 % suhe tvari biomase. U narednim danima uzgoja, udio klorofila *b* je se smanjivao te je zadnji dan iznosio 0,016 % suhe tvari biomase. Smanjivanje udjela klorofila moguće je obrazložiti činjenicom da promjena sastava podloge uslijed nakupljanja metabolita i iscrpljivanja pojedinih nutrijenata iz hranjive podloge mogu utjecati na akumulaciju pigmenata (Sharma i sur., 2014). Tijekom šaržnog fototrofnog uzgoja zelene mikroalge *Neochloris oleoabundans* također je zapaženo smanjenje udjela klorofila u biomasi (Li i sur., 2008.). Smanjenje udjela klorofila autori su pripisali iscrpljivanju izvora dušika u hranjivoj podlozi kojeg stanica nadomješta lako dostupnim dušikom razgradnjom klorofila ali i drugih unutarstaničnih molekula. Limitacija rasta dušikom iz hranjive podloge i razgradnja klorofila u cilju dobivanja dušika za neometan eksponencijalni rast biomase najvjerojatniji je razlog smanjenju udjela klorofila u biomasi tijekom posljednja četiri dana uzgoja mikroalge *Chlamydomonas* sp. (Slika 22.)



Slika 22. Promjena udjela klorofila *a* i *b* u biomasi mikroalge *Chlamydomonas* sp. tokom heterotrofnog šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

4.4.3. Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima

Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima određen je plinskom kromatografijom prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.11. Tablica 19. prikazuje sastav metil estera masnih kiselina u ukupnim lipidima tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata. Iz nje je vidljivo da su najzastupljenije masne kiseline: zasićena masna kiselina C16:0 (palmitinska kiselina), jednostruko nezasićena omega-9 masna kiselina C18:1 cis 9 (oleinska kiselina) te višestruko nezasićene omega-3 masne kiseline C18:2 cis 9,12 (linolna kiselina) i C18:3 cis 9,12,15 (α -linolenska kiselina). Udjeli pojedinih masnih kiselina mijenjali su se tijekom uzgoja kao posljedica promjene koncentracije nutrijenata u hranjivoj podlozi, nakupljanja metabolita i starosti kulture (Darki i sur., 2017; Sharma i sur., 2012). Posljedično dolazi do promjene udjela ukupnih zasićenih, jednostruko nezasićenih i višestruko nezasićenih masnih kiselina.

Udio ukupnih zasićenih masnih kiselina se tijekom uzgoja nije značajno mijenjao te je iznosio od 30,25 % do 41,11 % zadnji dan uzgoja. Ovaj rezultat je u skladu s literaturom gdje se navodi da je udio zasićenih masnih kiselina kod mikroalge *Chlamydomonas* sp. 43 % suhe tvari biomase dobiven pri sličnim uvjetima uzgoja (Tatsuzawa i sur., 1996). Najzastupljenija zasićena masna kiselina bila je, kao i kod prethodnog uzgoja (Poglavlje 4.3.3.), palmitinska kiselina. Palmitinska kiselina je najzastupljenija zasićena masna kiselina u prirodi. Ona je osnovna masna kiselina u ciklusu sinteze masnih kiselina te služi kao prekursor za sintezu dugolančanih zasićenih i nezasićenih masnih kiselina. Zato je i udio ove masne kiseline u biomasi stanice opravdano najveći tijekom čitavog uzgoja, a iznosio je između 24,13 i 31,16 % suhe tvari biomase mikroalge. Osim palmitinske kiseline, moguće je zamijetiti kako tijekom uzgoja dolazi do značajnog porasta udjela heptadekanske (margarinske) masne kiseline s 0,78 na 14,8 % suhe tvari biomase. Na početku uzgoja detektirane su i laurinska (C14:0), miristinska (C16:0), trikozilna (C23:0) i lignocerična (C24:0) masna kiselina, čije su koncentracije u lipidnim ekstraktima posljednjih dana uzgoja bile ispod granice detekcije metode.

Ukupni udio nezasićenih masnih kiselina se tijekom uzgoja nije značajno mijenjao. No, moguće je uočiti kako se omjer MUFA i PUFA mijenjao tijekom uzgoja. Tako je početni udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina, koji je iznosio 11,55 % suhe tvari biomase, porastao na 18,86 % zadnji dan uzgoja, dok se udio višestruko nezasićenih masnih kiselina smanjio sa 48,54 % suhe tvari biomase na 40,04 %. Najzastupljenija jednostruko nezasićena masna kiselina bila je oleinska kiselina čiji je udio tijekom uzgoja porastao s 4,17 % na 17,49 % zadnji dan uzgoja. Palmitinska i oleinska kiselina su najzastupljenije masne kiseline u majčinom

mlijeku, što čini lipide mikroalgi pogodnim dodatkom dječjim prehranbenim proizvodima (Delaš i sur., 2005). Također, na samom početku uzgoja, prisutna je nervonska kiselina, čija najveća koncentracija iznosi 23,41 % suhe tvari biomase, drugog dana uzgoja. Najzastupljenije višestruko nezasićene masne kiseline su linolna, γ -linolenska i α -linolenska masna kiselina. Najviši udio linolne kiseline postignut je zadnji dan uzgoja te je iznosio 21,31 % suhe tvari biomase. Vidljivo je kako njezini udjeli rastu do jedanaestog dana uzgoja, nakon čega njezin udio opada. Najviši udio γ -linolenske kiseline postignut je sedmi dan uzgoja, kada je kultura ušla u eksponencijalnu fazu rasta, te je iznosio 12,32 % suhe tvari biomase. Ostalo vrijeme uzgoja ova masna kiselina nije značajno mijenjala svoj udio. Najveći udio α -linolenske masne kiseline postignut je na početku uzgoja, te je iznosio 19,75 % suhe tvari biomase. Tijekom uzgoja, udio ove masne kiseline je opadao do krajnjeg udjela koji je iznosio 12,09 %. Također je zabilježen visok udio linoelaidinske kiseline na samom početku uzgoja, nakon čega ona nestaje.

Tablica 19. Promjena sastava metil estera masnih kiselina u ukupnim lipidima tijekom heterotrofnog šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

Vrijeme uzgoja [dan]	2	7	8	9	10	11	12	14	15
Metil ester masne kiseline	Udio [%, g g ⁻¹]								
C6:0, kapronska kiselina	-	-	-	-	-	*	-	-	-
C10:0, kapratna kiselina	-	-	-	*	-	-	-	-	-
C11:0, undekanska kiselina	-	-	-	*	-	*	-	-	-
C12:0, laurinska kiselina	3,37	11,97	-	*	-	-	0,68	*	-
C14:0, miristinska kiselina	1,76	3,18	*	*	0,085	0,005	0,40	0,295	0,3
C14:1 cis 9, miristoleična kiselina	-	-	-	0,465	0,81	0,99	0,15	0,835	0,96
C15:0, pentadekanska kiselina	-	-	-	-	0,225	*	*	0,445	0,505
C15:1 cis 10, pentadekanoična kiselina	1,50	2,07	-	0,22	0,16	*	*	0,61	0,385
C16:0, palmitinska kiselina	25,89	*	30,25	27,82	26,045	24,125	27,69	28,09	31,165
C16:1 cis 9, palmitoleinska kiselina	3,97	-	*	1,31	1,28	1,42	2,24	1,125	1,545
C17:0, heptadekanska (margarinska) kiselina	0,78	-	5,41	9,135	9,635	13,275	11,50	10,815	14,075
C17:1 cis 10, heptadekanoična kiselina	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C18:0, stearinska kiselina	2,39	*	*	*	0,66	*	*	*	*
C18:1 trans 9, elaidinska kiselina	-	-	-	*	*	-	-	-	-
C18:1 cis 9, oleinska kiselina	4,17	*	10,45	12,43	12,28	12,205	12,22	16,33	17,49
C18:2 trans 9,12, linoelaidinska kiselina	15,50	30,73	-	-	*	*	*	-	*
C18:2 cis 9,12, linolna kiselina	9,09	*	15,91	19,055	18,33	21,035	18,51	18,17	21,305
C18:3 cis 6,9,12, γ-linolenska kiselina	4,20	*	12,32	11,875	11,355	13,1	10,96	10	11,43
C18:3 cis 9,12,15, α-linolenska kiselina	19,75	4,41	15,63	15,215	11,4	11,875	15,36	12,13	12,085
C20:0, arahidska (eikozanoidna) kiselina	-	-	-	-	*	*	-	-	-
C20:1 cis 11, gondoična kiselina	*	-	*	*	*	*	*	0,51	*
C20:2 cis 11,14, eikozadienoična kiselina	*	*	-	-	-	*	-	-	-
C20:3 cis 8,11,14, eikozatetraenoična kiselina	-	-	-	-	*	*	-	-	-

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

C20:5 cis 5,8,11,14,17, eikozapentaenska kiselina	*	*	*	-	-	*	-	-	-
C21:0, Heneikozilna kiselina	-	-	-	-	*	-	-	-	-
C22:0, behenijska (dokozaoidna) kiselina	-	-	-	-	*	*	-	-	-
C22:1 cis 13, eručna kiselina	-	-	-	-	*	-	-	-	-
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19, dokozaheksaenska kiselina	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C23:0, trikozilna kiselina	-	3,78	-	-	*	*	0,29	-	*
C24:0, lignocerična kiselina	5,73	20,44	3,13	-	*	*	-	-	-
C24:1 cis 15, nervonska kiselina	1,91	23,41	6,89	-	*	*	-	-	-
SFA³	39,91	39,38	30,25	36,96	43,675	38,59	40,56	40,025	41,105
MUFA⁴	11,55	23,41	17,34	14,43	14,91	15,4	14,62	19,405	18,86
PUFA⁵	48,54	37,21	52,41	48,61	41,415	46,01	44,83	40,565	40,035

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

³ SFA (eng. saturated fatty acids) zasićene masne kiseline.

⁴ MUFA (eng. monounsaturated fatty acids) jednostruko nezasićene masne kiseline.

⁵ PUFA (eng. polyunsaturated fatty acids) višestruko nezasićene masne kiseline.

5. ZAKLJUČCI

1. Izvori ugljika za rast

- Pogodni izvori ugljika za rast istraživanih sojeva mikroalgi su:
 - melasa, glukoza i saharoza za soj D2-1
 - melasa, octena kiselina i celobioza za soj F10
 - melasa, glukoza, saharoza i fruktoza za soj D10
- Istraživane mikroalge (sojevi D2-1, F10 i D10) ne mogu koristiti ksilozu, arabinozu i laktozu kao izvor ugljika za rast.
- Miksotrofni uvjeti rasta pogoduju bržem rastu biomase od heterotrofnih uvjeta.
- Melasa je najpogodniji izvor ugljika za rast istraživanih sojeva mikroalgi koji omogućava najveći prirast biomase.
 - Koncentracija melase iznad 35 g L^{-1} inhibira rast sojeva D2-1 i F10 u heterotrofnim uvjetima uzgoja, dok se u miksotrofnim uvjetima inhibicija rasta javlja pri koncentracijama većim od 10 g L^{-1} .
 - Inhibicija rasta soja D10 u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima uzgoja javlja se pri koncentracijama melase većim od 10 g L^{-1} .

2. Makromolekulski sastav stanice

- Uvjeti uzgoja (heterotrofni i miksotrofni), molarni omjeri C/N i način uzgoja (šaržni i šaržni s pritokom supstrata) utječu na makromolekulski sastav stanice mikroalge *Chlamydomonas* sp..
- Heterotrofni uvjeti uzgoja i manji molarni omjer C/N (10 mol mol^{-1}) pogoduju nakupljanju ugljikohidrata u stanici (69,09 %). Produktivnost nakupljanja ugljikohidrata iznosila je $1,08 \text{ g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$.
- Neovisno o uvjetima i načinu uzgoja te sastavu hranjive podloge, najzastupljeniji monosaharid u staničnim ugljikohidratima je glukoza s udjelom većim od 75 %.
- Nakupljanju lipida tijekom šaržnog uzgoja pogodovali su miksotrofni uvjeti uzgoja, te manji molarni omjer C/N od 10 mol mol^{-1} . Produktivnost biosinteze lipida iznosila je $0,41 \text{ g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$.
- Heterotrofni šaržni uzgoj s pritokom supstrata pogoduje nakupljanju ugljikohidrata (56,92 %) dok u manjoj mjeri pogoduje nakupljanju lipida (30,91 %) u stanici. Proteini su najmanje zastupljene makromolekule u biomasi mikroalge i iznosili su 4,88 % suhe tvari biomase na početku uzgoja i 6,16 % suhe tvari biomase na kraju uzgoja. Zadnji

dan uzgoja postignuta je najveća produktivnost nakupljanja ugljikohidrata od $0,31 \text{ g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ i najveća produktivnost lipida od $0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$.

3. Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima

- Najzastupljenije masne kiseline u ukupnim lipidima mikroalge *Chlamydomonas* sp. bile su palmitinska kiselina, margarinska kiselina, oleinska kiselina, linolna kiselina, α -linolenska kiselina i γ -linolenska kiselina.
- Promjena molarnog omjera C/N (10 i 30 mol mol⁻¹) kod šaržnog miksotrofnog uzgoja nije utjecala na sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima. Kod heterotrofnog šaržnog uzgoja veća vrijednost molarnog omjera C/N (30 mol mol⁻¹) utjecala je na povećanje udjela višestruko nezasićenih masnih kiselina (linolna kiselina i α -linolenska kiselina) uz smanjenje zasićenih masnih kiselina (palmitinska).
- Udjel zasićenih masnih kiselina tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata se nije značajno mijenjao, dok se udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina povećao, na račun smanjenja udjela višestruko nezasićenih masnih kiselina.

4. Klorofil *a* i *b*

- Udio klorofila *a* je značajno veći od udjela klorofila *b* u mikroalgi *Chlamydomonas* sp..
- Heterotrofni šaržni uzgoj s pritokom supstrata pogoduje nakupljanju klorofila *a* i *b*, a najveći udio ukupnih klorofila od 0,31 % postignut je 11. dana uzgoja (0,30 % klorofila *a* i 0,046 % klorofila *b*).
- Povećanju udjela ukupnih klorofila u stanici pogoduju miksotrofni uvjeti uzgoja te niži molarni omjer C/N (10 mol mol⁻¹).

6. LITERATURA

Abdollahi, J., Dubljevic, S. (2012) Lipid production optimization and optimal control of heterotrophic microalgae fed-batch bioreactor. *Chem. Eng. Sci.* **84**, 619-627.

Ahlgren, G., Gustafsson, I.-B., Boberg, M. (1992) FATTY ACID CONTENT AND CHEMICAL COMPOSITION OF FRESHWATER MICROALGAE1. *J. Phycol.* **28** (1), 37–50. doi:10.1111/j.0022-3646.1992.00037.x

Andrade, M. R., Costa, J. A. V. (2007) Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture* **264**, 130-134. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.11.021

Arumugam, M., Agarwal, A., Arya, M. C., Ahmed, Z. (2013) Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresour. Techn.* **131**, 246-249.

Astley, S. B. (2003) ANTIOXIDANTS | Role of Antioxidant Nutrients in Defense Systems. U: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition 2. izd. (Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P. M., ured.), Elsevier Science Ltd., Cambridge, str. 282-289.

Bae, S., Shoda, M. (2004) Bacterial Cellulose Production by Fed-Batch Fermentation in Molasses Medium. *Biotechnol. Prog.* **20**, 1366-1371.

Becker, E. W. (2007) Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* **25** (2), 207-210. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.11.002

Becker, E. W. (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.

Bleakley, S., Hayes, M. (2017) Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods* **6**(5), 33. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.11.002

Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37** (8), 911-917.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Carvalho, A. P., Meireles, L. A., Malcata, F. X. (2006) Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* **22**, 1490–1506.

Cavalier-Smith (2004) Only six kingdoms of life. *Proc. R. Soc. Lond. B* **271**, 1251–1262.

Cerón García, M. C., García Camacho, F., Sánchez Mirón, A., Fernández Sevilla, J. M., Chisti, Y., Molina Grima, E. (2006) Mixotrophic Production of Marine Microalga *Phaeodactylum tricornutum* on Various Carbon Sources. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16** (5) , 689–694.

Cheirsilp, B., Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresour. Technol.* **110**, 510–516.

Chen, C. Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J., Chang, J. S. (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour. Technol.* **102**, 71-81. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.159

Chen, C. Y., Zhao, X. Q., Yen, H. W., Ho, S. H., Cheng, C. L., Lee, D. J., Bai, F. W., Chang, J. S. (2013) Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem. Eng. J.* **78**, 1–10.

Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **25**, 294-306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001

Chisti, Y. (2008) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology* **26**, 126–131.

Christaki, E., Bonos, E., Florou-Paneri, P. (2015) Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition. U: Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances (Kim, S. K., ured.), Elsevier Inc., San Diego, str. 233-241.

Couteau, P. (1996): Micro alge. U: Manual on the production and use of live food for aquaculture (Lavens, P., Sorgeloos, P., ured.), FAO, Rim, str. 7-48.

Čorak, I. (2018) Izolacija i karakterizacija sojeva slatkovodnih mikroalgi. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnoški fakultet.

Darki, B. Z., Seyfabadi, J., Fayazi, S. (2017) Effect of nutrients on total lipid content and fatty acids profile of *Scenedesmus obliquus*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **60**, 1-12.

Delaš, I., Kaćunko, T., Beganović, J., Delaš, F. (2005) Sastav masnih kiselina majčinog mlijeka i pripravaka dječje hrane. *Mljekarstvo* **55** (2), 101-112.

Dharma, A., Sekatresna W., Zein, R., Zulkarnain, C., Nasir, N. (2017) Chlorophyll and Total Carotenoid Contents in Microalgae Isolated from Local Industry Effluent in West Sumatera, Indonesia. *Der Pharma Chem.* **9** (18), 9-11.

Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K. N., Ravishankar, G. A. (2005) Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci. Technol.* **16** (9), 389–406. doi:10.1016/j.tifs.2005.02.006

Eriksen, N. T. (2008) The technology of microalgal culturing. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1525-1536. doi: 10.1007/s10529-008-9740-3

Gong, M., Bassi, A. (2016) Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnol. Adv.* **34** (8),1396-1412. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.10.005

Gouveia, L. (2011) *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*, Springer, London.

Gouveia, L., Marques, A. E., Lopes da Silva, T., Reis, A. (2009) *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 821–826. doi: 10.1007/s10295-008-0495-6

Griehl, C., Polhardt, H., Müller, D., Bieler, S. (2011) Microalgae growth and fatty acid composition depending on carbon dioxide concentration. U: *Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy* (Johansen, M. N., ured.), Nova Science Publishers Inc., New York, str. 413-455.

Griffiths, M. J. (2013) *Microalgal Cultivation Reactor Systems*. U: *Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value-Added Products* (Bux, F., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 51-76.

- Grobbelaar, J. U. (2013) Inorganic Algal Nutrition. U: Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, 2. izd. (Richmond, A., Hu, Q., ured.), John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, str. 123-134.
- Grossman, A.R., Lohr, M., Im, C.S., (2004) *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 119-173. doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.092328
- Harris, E. H. (2001) *Chlamydomonas* as a Model Organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**,363-406.
- Heimann, K., Huerlimann, R. (2015) Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species. U: Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances (Kim, S. K., ured.), Elsevier Inc., San Diego, str. 25-38.
- Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., Danquah, M. K. (2010) Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *Int. J. Chem. Eng.* **2010**, 11. doi:10.1155/2010/391632
- Hu, D. W., Liu, H., Yang, C. L., Hu, E. Z. (2008) The design and optimization for light-algae bioreactor controller based on artificial neural network-model predictive control. *Acta Astronaut.* **63**,1067–1075. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x
- Humphrey, A. M. (1980) Chlorophyll. *Food Chem.* **5** (1), 57-67.
- James, G. O., Hocart, C. H., Hillier, W., Chen, H., Kordbacheh, F., Price, G. D., Djordjevic, M. A. (2011) Fatty acid profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen deprivation. *Bioresour. Technol.* **102**(3), 3343–3351. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.051
- Jeffrey, S. W., Humphrey, G. F. (1975) New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls *a*, *b*, *c* and *c2* in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.* **167**, 191-194.
- John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M., Pandey, A. (2011) Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.* **102**, 186–193.
- Jung, K. A., Lim, S. R., Kim, Y., Park, J. M. (2013) Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. *Bioresour. Technol.* **135**, 182–190.

- Kamble, P., Cheriyaundath, S., Lopus, M., Sirisha, V. L. (2018) Chemical characteristics, antioxidant and anticancer potential of sulfated polysaccharides from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol.* **30** (3), 1641–1653. doi:10.1007/s10811-018-1397-2
- Kannaujiya, V. K., Sundaram, S., Sinha, R. P. (2017) Phycobiliproteins: Recent Developments and Future Applications. Springer, Singapore, str. 21-44.
- Karthikeyan, S. (2013) Strain Selection for Biodiesel Production. U: Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value-Added Products (Bux, F., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 17-43.
- Koller, M., Muhr, A., Braunegg, G. (2014) Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Res.* **6**, 52-63. doi: 10.1016/j.algal.2014.09.002
- Lee, E., Jalalizadeh, M., Zhang, Q. (2015) Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal Res.* **12**, 497–512.
- Li, Y., Han D., Hu G., Dauvillee, D., Sommerfeld, M., Ball, S., Hu, Q. (2010) Chlamydomonas starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. *Metab. Eng.* **12**, 387-391.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C. Q. (2008) Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81** (4), 629–636. doi:10.1007/s00253-008-1681-1
- Malapascua, J. R. F., Jerez, C. G., Sergejevová, M., Figueroa, F. L., Masojídek, J. (2014) Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures: application of chlorophyll fluorescence techniques. *Aquat. Biol.* **22**, 123-140. doi: 10.3354/ab00597
- Marchetti, J., Bougaran, G., Jauffrais, T., Lefebvre, S., Rouxel, C., Saint-Jena, B., Lukomska, E., Robert, R., Cadoret, J.P. (2013) Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of *Isochrysis* sp. (T-iso). *J. Appl. Phycol.* **25**, 109–119.
- Marou, G., Angelidaki I., Georgakakis D. (2012) Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 631-645. doi: 10.1007/s00253-012-4398-0

Marques, A. E., Miranda, J. R., Batista, A. P., Gouveia, L. (2011) *Microalgae Biotechnological Applications: Nutrition, Health and Environment*. U: *Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy* (Johansen, M. N., ured.), Nova Science Publishers Inc., New York, str. 1-60.

Masojídek, J., Torzillo, G., Koblížek, M. (2013) *Photosynthesis in Microalgae*. U: *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 2. izd. (Richmond, A., Hu, Q., ured.), John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, str. 21-37.

Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S. (2010) *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **14**, 217-232.

Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., Adholeya, A. (2016) *A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids*. *Front. Microbiol.* **7**, 546.

Moon, M., Kim, C. W., Park, W.-K., Yoo, G., Choi, Y.-E., Yang, Y.-W. (2013) *Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii**. *Algal Res.* **2**(4), 352–357.

Nagarajan, D., Lee, D.-J., Chang, J. (2018) *Heterotrophic Microalgal Cultivation*. U: *Bioreactors for Microbial and Energy Conversion* (Liao, Q., Chang, J., Herrmann, C., Xia, A., ured.), Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapur, str. 117-161.

Neidleman, S. L. (1993) *Occurrence and response to environmental stresses in nonmammalian organisms*. U: *Phospholipid Handbook* (Cevec, G., ured.), Marcel Dekker, New York, str. 23-38.

Olson, B. J. S. C., Markwell, J. (2007) *Assays for Determination of Protein Concentration*. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **48**.

Ogbonna, J. C., McHenry, M. P. (2015) *Culture Systems Incorporating Heterotrophic Metabolism for Biodiesel Oil Production by Microalgae*. U: *Biomass and Biofuels from Microalgae: Advances in Engineering and Biology* (Moheimani, N. R., McHenry, M. P., de Boer, K., Bahri, P. A., ured.), Springer International Publishing, Cham, str. 63-74.

Ogbonna, J. C., Moheimani, N. R. (2015) Potentials of Exploiting Heterotrophic Metabolism for Biodiesel Oil Production by Microalgae. U: Biomass and Biofuels from Microalgae: Advances in Engineering and Biology (Moheimani, N. R., McHenry, M. P., de Boer, K., Bahri, P. A., ured.), Springer International Publishing, Cham, str. 45-62.

Perez-Garcia, O., Bashan, Y. (2015) Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. U: Algal Biorefineries (Prokop A., Bajpai R., Zappi M., ured.), Springer, Cham, str. 61-131. doi:10.1016/j.watres.2010.08.037

Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., Bashan, L. E., Bashan, Y. (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.* **45**, 11-36. doi: 10.1007/978-3-319-20200-6_3

Pires, J. C. M. (2015) Mass Production of Microalgae. U: Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances (Kim, S. K., ured.), Elsevier Inc., San Diego, str. 55-65.

Priyadarshani, I., Rath, B. (2012) Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *J. Algal Biomass Utiln.* **3** (4), 89-100.

Pulz, O., (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 287-293.

Queiroz, M. I., Fernandes, A. S., Deprá, M. C., Jacob-Lopes, E., Queiroz Zepka, L. (2017) Introductory Chapter: Chlorophyll Molecules and Their Technological Relevance. U: Chlorophyll (Jacob-Lopes, E., Queiroz Zepka, L., Queiroz, M. I., ured.), IntechOpen Limited, London, str. 1-5.

Ravindran, B., Gupta, S. K., Cho, W.-M., Kim, J. K., Lee, S. R., Jeong, K.-H., Lee, D. J., Choi, H.-C. (2016) Microalgae Potential and Multiple Roles—Current Progress and Future Prospects—An Overview. *Sustainability* **8** (12), 1215-1231. doi: 10.3390/su8121215

Richmond, A. (2000) Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. *J. Appl. Phycol.* **12**, 441–451.

Salama, E.-S., Kim, H.-C., Abou-Shanab, R. A. I., Ji, M.-K., Oh, Y.-K., Kim, S.-H., Jeon, B.-H. (2013) Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas*

mexicana and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **36**(6), 827–833. doi: 10.1007/s00449-013-0919-1

Scheer, H. (2008) Chlorophylls and Carotenoids, Chemistry of. U: Wiley Encyclopedia of Chemical Biology (Begley, T. P., ured.), John Wiley & Sons Inc., New Jersey, str. 1-11. doi: 10.1002/9780470048672.webc083

Senroy, S., Pal, R. (2014) Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics. *Proc. Zool. Soc. Lond.* **68**, 1-8. doi:10.1007/s12595-013-0089-9.

Sharma, G., Kumar, M., Ali, M. I., Jasuja, N. D. (2014) Effect of Carbon Content, Salinity and pH on *Spirulina platensis* for Phycocyanin, Allophycocyanin and Phycoerythrin Accumulation. *J. Microb. Biochem. Technol.* **6** (4), 202-206.

Sharma, K. K., Schuhmann, H., Schenk, P. M. (2012) High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies* **5**, 1532-1553.

Singh, B., Liu, Y., Sharma, Y. S. (2013) Synthesis of Biodiesel/Bio-Oil from Microalgae. U: U: Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value-Added Products (Bux, F., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 99-110.

Singh, J., Saxena, R. C. (2015) An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. U: Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances (Kim, S. K., ured.), Elsevier Inc., San Diego, str. 11-22.

Singh, P., Gupta, S. K., Guldhe, A., Rawat, I., Bux, F. (2015) Microalgae Isolation and Basic Culturing Techniques. U: Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances (Kim, S. K., ured.), Elsevier Inc., San Diego, str. 43-52.

Slocombe, S. P., Ross, M., Thomas, N., McNeill, S., Stanley, M. S. (2013) A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresour. Technol.* **129**, 51-57.

Sobiechowska-Sasim, M., Stoń-Egiert, J., Kosakowska, A. (2014) Quantitative analysis of extracted phycobilin pigments in cyanobacteria—an assessment of spectrophotometric and spectrofluorometric methods. *J. Appl. Phycol.* **26** (5), 2065-2074. doi: 10.1007/s10811-014-0244-3

Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Chivkunova, O. (2011) Real-Time Spectral Techniques for the Detection of Buildup of Valuable Compounds and Stress in Microalgal Cultures: Implications for Biotechnology. U: *Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy* (Johansen, M. N., ured.), Nova Science Publishers Inc., New York, str. 251-277.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006) Commercial Applications of Microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **101**, 87-96.

Šarić, Lj. Ć., Filipčev, B. V., Šimurina, O. D., Plavšić, D. V., Šarić, B. M., Lazarević, J. M., Milanović, I. Lj. (2016) Sugar beet molasses: properties and applications in osmotic dehydration of fruits and vegetables. *Food Feed Res.* **43** (2), 135-144.

Tatsuzawa, H., Takizawa, E., Wada, M., & Yamamoto, Y. (1996) FATTY ACID AND LIPID COMPOSITION OF THE ACIDOPHILIC GREEN ALGA *CHLAMYDOMONAS* SP. *J. Phycol.* **32**, 598-601.

Trczinski, A. P., Hernandez, E., Webb, C. (2012) A novel process for enhancing oil production in algae biorefineries through bioconversion of solid by-products. *Bioresour. Technol.* **116**, 295-301.

Van Wychen, S., Laurens, L. M. L. (2013a) Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass: laboratory analytical procedure (LAP), issue date December 2, 2013. Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory.

Van Wychen, S., Laurens, L. M. L. (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.

Venkatesan, J., Manivasagan, P., Kim, S. K. (2015) Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances. U: *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances* (Kim, S. K., ured.), Elsevier Inc., San Diego, str. 1-7.

Vítová, M., Bišová, K., Hlavová, M., Kawano, S., Zachleder, V., Čížková, M. (2011) *Chlamydomonas reinhardtii*: duration of its cell cycle and phases at growth rates affected by temperature. *Planta* **234** (3), 599-608.

- Vítová, M., Bišová, K., Kawano, S., Zachleder, V. (2015) Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1204–1218.
- Wei, N., Quarterman, J., Jin, Y. S. (2013) Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. *Trends. Biotechnol.* **31**(2),70–77.
- Yao, L., Gerde, J. A., Lee, S. L., Wang, T., Harraata, K. A. (2015) Microalgae Lipid Characterization. *J. Agric Food Chem.* **63**, 1773-1787. doi: 10.1021/jf5050603
- Zhang W., Zhang, P., Sun, H., Chen, M., Lu, S., Li., P. (2014) Effects of various organic carbon sources on the growth and biochemical composition of *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresour. Technol* **173**, 52-58.
- Zhang, L., Zhang, B., Zhu, X., Chang, H., Ou, S., Wang, H. (2018) Role of Bioreactors in Microbial Biomass and Energy Conversion. U: Bioreactors for Microbial and Energy Conversion (Liao, Q., Chang, J., Herrmann, C., Xia, A., ured.), Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapur, str. 39-78.
- Zhang, Z., Tan, Y., Wang, W., Bai, W., Fan, J., Huang, J., Wan, M., Li, Y. (2018) Efficient heterotrophic cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol.* **31** (3), 1545-1554. doi:10.1007/s10811-018-1666-0.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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.

Leonarda Komušar

Ime i prezime studenta