

# Fototrofni uzgoj mikroalge *Nannochloropsis* sp. u otvorenom sustavu i projekt postrojenja za proizvodnju biodizela

---

Drmić, Agnes

Master's thesis / Diplomski rad

2020

*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:159:995668>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-11**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2020.

Agnes Drmić

1272/BPI

**FOTOTROFNI UZGOJ  
MIKROALGE  
*NANNOCHLOROPSIS* SP. U  
OTVORENOM SUSTAVU I  
PROJEKT POSTROJENJA ZA  
PROIZVODNJU BIODIZELA**

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

Diplomski rad je izrađen u okviru znanstveno-istraživačkog projekta „Bioprospecting Jadranskog mora“, financiranog sredstvima Europskog fonda za regionalni razvoj (voditeljica projekta dr. sc. R. Čož Rakovac).

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek na uloženom trudu, znanju, idejama i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala mag. ing. Marini Grubišić na uloženom vremenu i strpljenju pri realizaciji praktičnog dijela rada. Također, hvala ostalim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada.*

*Na kraju, hvala mojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju i podršci koju su mi pružali tijekom cijelog obrazovanja.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,  
Industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### FOTOTROFNI UZGOJ MIKROALGE *NANNOCHLOROPSIS* SP. U OTVORENOM SUSTAVU I PROJEKT POSTROJENJA ZA PROIZVODNJU BIODIZELA

*Agnes Drmić, 1272/BPI*

#### Sažetak:

Lipidi izolirani iz biomase mikroalgi *Nannochloropsis* sp. predstavljeni su kao perspektivna sirovina za proizvodnju biodizela. U ovom radu proveden je fototrofni šaržni uzgoj s pritokom supstrata u otvorenom sustavu na izvornoj f/2 podlozi uz dodatak natrijevog bikarbonata te fototrofni šaržni uzgoj s pritokom supstrata u barbotirajućoj koloni na izvornoj f/2 podlozi bez dodatnog izvora ugljika. Tijekom uzgoja praćene su promjene udjela proteina, ugljikohidrata i lipida u izdvojenoj biomasi kao i sastav pigmenata te profil masnih kiselina u ukupnim lipidima. Utvrđeno je da u periodu smanjene koncentracije fosfora, metabolizam mikroalge se usmjerava prema akumulaciji lipida i ugljikohidrata kao rezervnih makromolekula uz smanjenje udjela proteina. Posljednjeg dana šaržnog uzgoja u otvorenom bazenu postignuta je koncentracija biomase od 0,515 g L<sup>-1</sup>, a maksimalna produktivnost biomase od 0,8796 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> postignuta je osamnaestog dana uzgoja. Šaržnim uzgojem u barbotirajućoj koloni koncentracija biomase na kraju uzgoja iznosila je 0,458 g L<sup>-1</sup>, a produktivnost sinteze biomase tada je bila 0,8297 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Kemijska flokulacija sa željezovim (III) kloridom potvrđena je kao alternativna metoda za izdvajanje stanica mikroalgi. Naposljetku, u radu je predstavljen elaborat tehničko-tehnološkog rješenja postrojenja za proizvodnju biodizela.

**Ključne riječi:** mikroalge, *Nannochloropsis* sp., lipidi, masne kiseline, biodizel

**Rad sadrži:** 86 stranica, 22 slike, 20 tablica, 111 literaturnih navoda, 4 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. Tibela Landeka Dragičević
2. Prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek
3. Prof. dr. sc. Jasna Novak
4. Doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo (zamjena)

**Datum obrane:** 22. prosinca 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### PHOTOTROPHIC CULTIVATION OF MICROALGAE *NANNOCHLOROPSIS* SP. IN OPEN POND SYSTEM AND PROJECT FOR BIODIESEL PRODUCTION FACILITY

*Agnes Drmić, 1272/BPI*

#### **Abstract:**

Lipids isolated from biomass of microalgae *Nannochloropsis* sp. are presented as a promising feedstock for biodiesel production. Cultivation methods used in this paper were phototrophic fed-batch cultivation with substrate inflow in an open pond system on the original f/2 medium with sodium bicarbonate and phototrophic fed-batch cultivation with substrate inflow on the original f/2 medium without supplementation of carbon source in a bubble column. Changes in the content of proteins, carbohydrates and lipids were monitored in the separated algae biomass during cultivation. The composition of pigments and the profile of fatty acids in total lipids were as well monitored simultaneously. During the period of reduced phosphorus concentration it was confirmed that metabolic responses of microalgae lead to the accumulation of lipids and carbohydrates as reserve macromolecules and to a decrease in protein content. On the last day of fed-batch cultivation in open pond, biomass concentration of 0,515 g L<sup>-1</sup> was achieved. The maximum productivity of 0,8796 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> was achieved eighteenth day of cultivation. Additionally, on the last day of fed-batch cultivation in bubble column, biomass concentration was 0,458 g L<sup>-1</sup> and productivity of biomass synthesis was 0,8297 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Chemical flocculation with iron (III) chloride has been confirmed as an alternative method for microalgae cell harvesting. Lastly, technical-technological solution for a biodiesel production facility was presented in this paper.

**Keywords:** microalgae, *Nannochloropsis* sp., lipids, fatty acids, biodiesel

**Thesis contains:** 86 pages, 22 figures, 20 tables, 111 references, 4 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:** *PhD. Mirela Ivančić Šantek, Full professor*

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

#### **Reviewers:**

1. PhD. *Tibela Landeka Dragičević*, Full professor
2. PhD. *Mirela Ivančić Šantek*, Full professor
3. PhD. *Jasna Novak*, Full professor
4. PhD. *Marina Cvjetko Bubalo*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 22 December 2020



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. MIKROALGE .....	2
2.1.1. Taksonomija i morfologija mikroalgi iz roda <i>Nannochloropsis</i> .....	2
2.2. UZGOJ MIKROALGI .....	3
2.2.1. Čimbenici koji utječu na sintezu biomase .....	3
2.2.1.1. Svjetlost.....	4
2.2.1.2. Temperatura.....	4
2.2.1.3. Nutrijenti .....	4
2.2.1.4. pH i salinitet .....	5
2.2.1.5. Miješanje.....	5
2.2.2. Načini uzgoja mikroalgi .....	5
2.2.3. Kultivacijski sustavi.....	7
2.2.3.1. Otvoreni sustav .....	8
2.2.3.2. Zatvoreni bioreaktorski sustav .....	9
2.3. BIOTEHNOLOŠKI POTENCIJAL MIKROALGI .....	11
2.4. PROIZVODNJA BIODIZELA.....	12
2.4.1. Biosinteza lipida .....	12
2.4.2. Postupci izdvajanja biomase mikroalgi .....	14
2.4.3. Ekstrakcija lipida iz biomase mikroalgi .....	15
2.4.4. Proizvodnja biodizela iz lipida mikroalgi.....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>18</b>
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	18
3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjive podloge .....	18
3.1.3. Ostale kemikalije i kitovi korišteni u eksperimentu .....	19
3.1.4. Hranjiva podloga za uzgoj mikroalgi .....	19
3.1.5. Oprema i aparatura.....	21
3.1.5.1. Kultivacijski sustavi.....	21
3.1.5.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC) .....	21
3.1.5.3. Uređaj za plinsku kromatografiju (GC).....	22
3.1.5.4. Ostala oprema.....	22
3.2. METODE .....	23
3.2.1. Uzgoj inokuluma mikroalgi.....	23
3.2.2. Fototrofni nesterilni uzgoj mikroalgi u otvorenom sustavu .....	23
3.2.2.1. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata u otvorenom bazenu .....	24
3.2.2.2. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata u barbotirajućoj koloni.....	24
3.2.3. Izdvajanje biomase mikroalgi.....	25
3.2.3.1. Centrifugiranje.....	25

3.2.3.2. Flokulacija.....	25
3.2.4. Analitičke i mikrobiološke metode .....	26
3.2.4.1. Mjerenje optičke gustoće kulture.....	26
3.2.4.2. Brojanje stanica u Thomaovoj komorici.....	27
3.2.4.3. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari biomase .....	27
3.2.4.4. Određivanje koncentracije nutrijenata u podlozi.....	28
3.2.4.4.1. Određivanje koncentracija nitrata u podlozi .....	28
3.2.4.4.2. Određivanje koncentracije fosfata u podlozi .....	28
3.2.4.5. Određivanje sastava pigmenata u biomasi mikroalgi .....	29
3.2.4.5.1. Ekstrakcija pigmenata .....	29
3.2.4.5.2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije klorofila.....	29
3.2.4.6. Određivanje udjela proteina u biomasi mikroalgi .....	30
3.2.4.7. Određivanje ukupnih ugljikohidrata u biomasi mikroalgi .....	31
3.2.4.8. Određivanje udjela suhe tvari biomase mikroalgi .....	32
3.2.4.9. Određivanje udjela lipida u biomasi mikroalgi .....	33
3.2.4.10. Određivanje sastava masnih kiselina u biomasi mikroalgi .....	33
3.2.4.11. Određivanje pokazatelja uspješnosti bioprocesa .....	35
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>36</b>
4.1. REZULTATI UZGOJA MIKROALGI.....	36
4.1.1. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata u otvorenom bazenu .....	36
4.1.1.1. Sastav makromolekula .....	39
4.1.1.2. Sastav pigmenata .....	41
4.1.1.3. Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima.....	42
4.1.2. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata u barbotirajućoj koloni.....	46
4.1.2.1. Sastav makromolekula .....	48
4.1.2.2. Sastav pigmenata .....	49
4.1.2.3. Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima.....	50
4.1.3. Usporedba uzgoja u otvorenom bazenu i barbotirajućoj koloni.....	54
4.1.4. Izdvajanje biomase mikroalgi flokulacijom.....	55
4.2. ELABORAT TEHNIČKO-TEHNOLOŠKOG RJEŠENJA POGONA ZA PROIZVODNJU BIODIZELA .....	59
4.2.1. Projektna dokumentacija .....	59
4.2.2. Projektni zadatak .....	59
4.2.2.1. Opće tehničke i proizvodne karakteristike postrojenja.....	59
4.2.2.2. Kakvoća proizvoda .....	60
4.2.2.3. Sirovine .....	60
4.2.2.4. Transport .....	60
4.2.2.5. Skladišni prostor .....	60
4.2.2.6. Radni ciklus.....	60
4.2.2.7. Dobava procesne vode i zbrinjavanje otpadnih voda postrojenja .....	61

4.2.2.8. Energetski izvori.....	61
4.2.2.9. Mjerno-regulacijski i kontrolno upravljački sustav.....	61
4.2.2.10. Rješavanje otpadnih voda i materijala.....	61
4.2.3. Prostorni plan s prikazom lokacije.....	62
4.2.4. Shematski prikaz operacija tehnološkog procesa proizvodnje biodizela.....	63
4.2.5. Tehnološke jedinice postrojenja (proizvodni i pomoćni objekti).....	64
4.2.5.1. Prihvat i skladištenje lipida mikroalgi.....	64
4.2.5.2. Priprema i skladištenje otopine katalizatora.....	64
4.2.5.3. Obrada lipida mikroalgi.....	65
4.2.5.4. Proizvodnja biodizela.....	65
4.2.5.5. Pročišćavanje biodizela.....	66
4.2.5.6. Laboratorij.....	67
4.2.5.7. Skladištenje biodizela.....	68
4.2.5.8. Skladištenje glicerola.....	68
4.2.5.9. Skladištenje metanola.....	68
4.2.5.10. Skladištenje klorovodične kiseline.....	68
4.2.5.11. Privremeno skladištenje komunalnog, opasnog i bezopasnog otpada.....	68
4.2.6. Potrošnja vode, otpadne vode postrojenja i njihovo pročišćavanje.....	70
4.2.7. Specifikacija i opis opreme.....	71
4.2.8. Popis tehnoloških parametara prostorija.....	73
4.2.9. Glavna tehnološka shema.....	74
4.2.10. Dispozicijsko rješenje postrojenja (tlocrt).....	75
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>76</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>77</b>
<b>7. PRILOZI</b>	

***UVOD***

# 1. UVOD

Mnoge aktivnosti svjetskog stanovništva temelje se na izgaranju fosilnih goriva. Upravo proizvodnja i potrošnja nafte i ostalih neobnovljivih izvora energije predstavlja značajan pritisak na okoliš – emisija stakleničkih plinova, onečišćenje zraka i tla, stvaranje otpada i izlivanje nafte. Ti pritisci pridonose klimatskim promjena, narušavanju prirodnih ekosustava i nepovratno utječu na ljudsko zdravlje. S obzirom na porast ukupnog stanovništva povećava se i potreba za izvorima energije. Prema zakonu ponude i potražnje neizbježno je smanjenje zaliha ugljikovodika i povećanje cijena postojećih energenata. Stoga se značajni napori i sredstva ulažu u razvoj proizvodnje energije iz obnovljivih izvora među kojima se ističu: energija vjetra, sunčeva energija, hidroenergija, geotermalna energija te energija dobivena iskorištenjem biomase. Osim raznih uljarica, otpadnog jestivog ulja i životinjskih masti, kao perspektivna sirovina za proizvodnju biogoriva, razmatraju se lipidi izolirani iz biomase mikroalgi. Različite fiziološke i morfološke značajke omogućile su primjenu biomase mikroalgi u proizvodnji farmaceutskih, prehrambenih i kozmetičkih proizvoda te u proizvodnji biodizela. Međutim, vrlo niski prinosi onemogućuju komercijalnu i ekonomsku održivost proizvodnje. Dodatna financijska sredstva i nove spoznaje vezane uz optimalne uvjete kultivacije za postizanje većeg prinosa biomase sa željenim sastavom masnih kiselina neophodni su u ovom trenutku. Kao jedna od najperspektivnijih mikroalgi za proizvodnju biodizela navode se mikroalge iz roda *Nannochloropsis* (Sukami, 2014).

Cilj ovog rada je provesti fototrofni uzgoj mikroalge iz roda *Nannochloropsis* u dva otvorena sustava za uzgoj na  $f/2$  hranjivoj podlozi s i bez dodatnog anorganskog izvora ugljika. Tijekom uzgoja određivan je prinos biomase kao i promjena sastava makromolekula ovisno o koncentraciji nutrijenata. Jedan od ciljeva rada bio je i utvrđivanje učinkovitosti flokulacije u izdvajanju biomase iz hranjivog medija. Prema dobivenim rezultatima izrađen je elaborat tehničko – tehnološkog rješenja za tvornicu za proizvodnju biodizela u kojoj se kao osnovna sirovina koriste lipidi mikroalgi. Na lokaciji je predviđena izgradnja otvorenih bazena za uzgoj mikroalgi.

***TEORIJSKI DIO***

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MIKROALGE

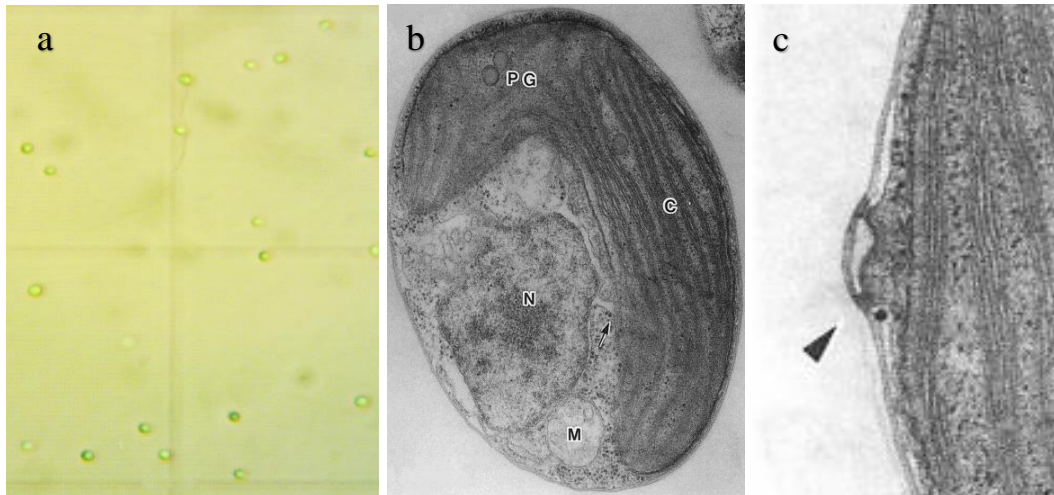
Mikroalge predstavljaju raznoliku skupinu prokariotskih i eukariotskih fotosintetskih jednostaničnih i kolonijskih mikroorganizama jednostavne stanične građe koja se sastoji od stanične stijenke i membrane, bez oblikovane jezgrine ovojnice. Upravo jednostavna stanična građa osigurava mikroalgama brz i uspješan rast u nepovoljnim uvjetima okoline. Njihova prirodna staništa su tekući i mirujući vodeni ekosustavi: oceani, mora, jezera, rijeke i lagune (Richmond, 2004). Osim toga, mikroalge mogu podnijeti širok raspon temperatura, pH-vrijednosti i saliniteta kao i različite intenzitete svjetlosti. Stoga su prisutne i u najekstremnijim primjerima ekosustava kao što su nepristupačni dijelovi pustinje, toplinski izvori te ispod leda Antarktika (Barsanti i sur., 2008). Ovisno o vrsti, njihova veličina može varirati od nekoliko mikrometara do nekoliko stotina mikrometara ( $\mu\text{m}$ ). Do danas je taksonomski opisano preko 50 000 različitih vrsta mikroalgi, međutim procjenjuje se da je njihov broj puno veći, po nekim izvorima seže i do milijun neklasificiranih vrsta (Guiry, 2012). Od 50 000 znanstveno opisanih vrsta, do sada je manje od sto proizvedeno u laboratorijskom mjerilu.

Najpoznatiji predstavnici industrijskih značajnih prokariotskih mikroalgi su cijanobakterije (Cyanophyceae), a eukariotskih mikroalgi dijatomeje (Bacillariophyta), zlatne mikroalge (Chrysophyceae) te neke zelene vrste mikroalgi (Chlorophyta) (Li i sur., 2008).

#### 2.1.1. Taksonomija i morfologija mikroalgi iz roda *Nannochloropsis*

Mikroalge iz roda *Nannochloropsis* su jednostanične nepokretne zelene mikroalge koje pripadaju: koljenu Ochrophyta, razredu Eustigmatophyceae i obitelji Monodopsidaceae. Prvi put u literaturi ih spominje Hibberd (1981) i smješta prema navedenoj taksonomskoj klasifikaciji. Do danas je u ovaj rod svrstano sedam poznatih vrsta: *Nannochloropsis australis*, *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloropsis granulata*, *Nannochloropsis limnetica*, *Nannochloropsis oceanica*, *Nannochloropsis oculata* i *Nannochloropsis salina* (Guiry i sur., 2014). Vrste iz roda *Nannochloropsis* su karakterizirane malim okruglim stanicama, promjera do 5  $\mu\text{m}$  i jednostavnom morfologijom. U stanicama je prisutan kloroplast s jasno vidljivim tilakoidima koji se nalazi u neposrednoj blizini jezgre (Murakami i Hashimoto, 2008). Drugi prisutni organeli i stanične strukture su: mitohondrij, lipidne kapljice te strukture nalik pirenooidima (Suda i sur., 2002) koji su prikazani na slici 1. Dominantni pigmenti su klorofil *a*, violaksantin, zeaksantin i  $\beta$ -karoten. S manjim udjelima prisutni su sekundarni pigmenti: kantaksantin i astaksantin. (Lubián i sur., 2000). Povećanje udjela keto-karotenoida u sastavu

pigmenata povezano je s promjenom boje kulture iz zelene u crveno – narančastu, a uvjetovano je starenjem kulture i iscrpljivanjem hranjivih sastojaka (Antia i Chen, 1982). Osim toga, identificirane su kao najperspektivniji fotoautotrofni proizvođači eikosapentaenoične kiseline (EPA) (Spolaore i sur., 2006a). Zelene alge nastanjuju morska, slatkovodna i kopnena staništa (Heimann i Huerlimann, 2015). Od sedam vrsta iz roda *Nannochloropsis*, samo *Nannochloropsis limnetica* nastanjuje slatkovodna staništa te ima diferencirana obilježja (Suda i sur., 2002).



**Slika 1.** Mikroskopski prikaz mikroalgi iz roda *Nannochloropsis* (a) mikroalge korištene u eksperimentu (vlastita fotografija); (b) različiti organeli: C - kloroplast; N - nukleus (jezgra); M - mitohondrij; PG - plastoglobuli (Suda i sur., 2002); (c) papila (Suda i sur., 2002).

## 2.2. UZGOJ MIKROALGI

Održivi uzgoj mikroalgi u industrijskom mjerilu moguće je ostvariti sintezom proizvoda visoke vrijednosti. Mnoge vrste mikroalgi pokazuju potencijal za uzgoj u velikom mjerilu, ali izostanak podataka iz komercijalnih uzgoja ograničava njihovu primjenu. Potrebne su velike količine biomase mikroalgi za nadmetanje s ostalim sirovinama u proizvodnji prehrambenih i farmaceutskih proizvoda te biodizela (Khan i sur., 2018). Jedino unaprjeđenje metoda uzgoja, koje će rezultirati povećanjem količine sintetizirane biomase, može zamijeniti primjenu ulja iz različitih uljarica (primjerice uljane repice i soje) u proizvodnji biodizela (Rezić i sur., 2014).

### 2.2.1. Čimbenici koji utječu na sintezu biomase

Na rast kulture mikroalgi značajno utječu: intenzitet svjetlosti, dostupnost hranjivih sastojaka, temperatura, pH-vrijednost, salinitet te miješanje i aeracija u kultivacijskom sustavu.



### 2.2.1.1. Svjetlost

Opskrba svjetlošću ima ključnu ulogu u dizajniranju fotobioreaktora jer je neophodna za odvijanje fotosinteze. Mikroalgama je potrebna kao izvor energije za pretvorbu apsorbirane vode i CO<sub>2</sub> u biomasu (Benemann i Oswald, 1996). Sforza i suradnici (2012) su dokazali da se fotosintetska aktivnost mijenja ovisno o porastu ili smanjenju osvjetljenja. Nemogućnost provođenja fotosinteze i spori rast rezultati su preslabog osvjetljenja. S druge strane, ako je intenzitet svjetlosti iznad kritične vrijednosti, dolazi do fotoinhibicije i brzina fotosinteze se smanjuje. Stoga je eksperimentalno potrebno utvrditi optimalni intenzitet svjetlosti kako bi se povećala brzina asimilacije CO<sub>2</sub> uz minimalni efekt fotoinhibicije. Uz to, potrebno je odrediti optimalno trajanje perioda svjetla i tame. Gammanpila i suradnici (2015) su potvrdili da je vrijeme od 16 sati svjetla i 8 sati tame najprikladnije za rast mikroalge *Chlorella vulgaris* i algi iz roda *Nannochloropsis*.

### 2.2.1.2. Temperatura

Nakon svjetlosti, temperatura je drugi limitirajući faktor koji utječe na rast mikroalgi. Optimalni temperaturni interval za većinu mikroalgi je 20 – 30 °C (Singh i Singh, 2015). Primjerice, alge iz roda *Nannochloropsis* imaju najveći prinos biomase u temperaturnom intervalu od 19 – 21 °C (Kunjapur i Aldridge, 2010). Mnoge vrste mogu tolerirati temperature i do 15 °C niže od optimalne, međutim temperatura za svega 2 do 4 °C viša od optimalne može rezultirati smrću stanica (Mata i sur., 2010). Niske temperature utječu na usporavanje asimilacije ugljika, dok previsoke dovode do inaktivacije fotosintetskih proteina (Khan i sur., 2018). U zatvorenim sustavima mogu se pojaviti problemi s pregrijavanjem tijekom vrućih ljetnih mjeseci. Tada temperatura u bioreaktoru može doseći i do 55 °C. Kako bi se izbjegle temperaturne fluktuacije, potrebno je osigurati učinkovit način održavanja optimalne temperature pomoću sustava za grijanje i hlađenje (Moheimani, 2005).

### 2.2.1.3. Nutrijenti

Algama su potrebni dušik i fosfor kao glavni hranjivi sastojci (Benemann i Oswald, 1996). Ostale potrebne komponente za rast su makronutrijenti: natrij, magnezij, kalcij i kalij te mikronutrijenti: molibden, mangan, bor, kobalt, željezo, cink i drugi elementi u tragovima. Različite vrste mikroalgi mogu imati drugačije potrebe za hranjivim sastojcima. Međutim, glavni su zahtjevi jednaki za gotovo sve vrste i uključuju esencijalne hranjive sastojke, organski ili anorganski izvor ugljika, dušik i fosfor (Grobbelaar, 2004).

#### 2.2.1.4. pH i salinitet

Još jedan važan čimbenik koji utječe na rast kulture je pH-vrijednost. Većina mikroalgi ima optimalni raspon pH-vrijednosti između 8,2 i 8,7 iako se mogu uzgajati u rasponu od 7 do 9 (Huang i sur., 2017). Ključno je zadržati pH kulture unutar optimalne vrijednosti kako bi se spriječila degradacija stanica uslijed staničnih procesa potaknutih promjenom kiselosti odnosno lužnatosti podloge.

S druge strane, salinitet značajno utječe na biokemijski sastav stanica mikroalgi, a predstavlja koncentraciju soli u hranjivoj podlozi. Izlaganje algi nižim ili višim razinama slanosti od onih na koje su prilagođene, dovodi do promjene brzine rasta i sastava biomase (Juneja i sur., 2013). Istraživanja su pokazala da promjena saliniteta utječe na udjele proteina, ugljikohidrata i lipida u stanici. Bartley i suradnici (2013) sugeriraju proizvodnju alge *Nannochloropsis salina* pri nižim koncentracijama soli do kraja eksponencijalne faze rasta. Ulaskom kulture u stacionarnu fazu, potrebno je povećati salinitet podloge što će u konačnici rezultirati povećanjem udjela lipida u stanicama.

#### 2.2.1.5. Miješanje

Općenito, svrha miješanja u bioreaktorima je sprječavanje nastajanja kemijskih (hranjive tvari, metaboliti), fizikalnih (pH, kisik) i temperaturnih gradijenata (Gaurina Srček i sur., 2016). Miješanje kulture mikroalgi potrebno je iz još nekoliko razloga: kako bi se spriječilo taloženje stanica odnosno nastajanje mrtvih zona, kako bi se osigurala jednolika izloženost stanica svjetlosti te poboljšala izmjena plinova (Wang i sur., 2012). Ako su ispunjeni svi ostali zahtjevi potrebni za rast algi, a izostavljeno je miješanje, produktivnost sinteze biomase bit će znatno smanjena. Između ostalog, važno je odrediti optimalnu brzinu miješanja. Ako je brzina okretaja miješala premala, dolazi do taloženja biomase, slabog prijenosa hranjivih tvari te stvaranja područja bez otopljenog kisika. Intenzivno miješanje rezultira visokim utroškom energije i oštećenjem stanica uslijed jakih sila smicanja (Griffiths, 2013). Miješanje se u bioreaktorima za uzgoj mikroalgi postiže aeracijom pomoću mjehurića plina obogaćenim CO<sub>2</sub>, upotrebom mehaničkih miješala ili pumpi (Wang i sur., 2012).

#### 2.2.2. Načini uzgoja mikroalgi

Postoje četiri osnovna načina kultivacije mikroalgi: fotoautotrofni, heterotrofni, miksotrofni i fotoheterotrofni (Chojnacka i Marquez-Rocha, 2004).

Fotoautotrofna kultivacija je najčešći način uzgoja mikroalgi, a podrazumijeva korištenje energije sunčevih zraka i anorganski izvor ugljika. Ovakav način uzgoja osigurava ekonomičnost proizvodnje zbog upotrebe ugljikovog dioksida kao jedinog izvora ugljika, a uz to smanjuje udio tog stakleničkog plina u atmosferi što danas predstavlja veliki ekološki problem (Ma i sur., 2016). Iz navedenog razloga, postrojenja za fotoautotrofni uzgoj se najčešće grade u blizini industrijskih postrojenja koja proizvode velike količine ugljikovog dioksida poput toplana, energetske postrojenja na ugljen i fosilna goriva (Rezić i sur., 2014). Takvi proizvodni pogoni otpuštaju otpadne plinove koji sadrže do 13 % CO<sub>2</sub> (Huang i sur., 2010). Dodatna prednost ovakvog načina uzgoja je i smanjena mogućnost kontaminacije. Zbog svih navedenih prednosti, fotoautotrofni uzgoj se provodi u otvorenim bioreaktorskim sustavima (Chen i sur., 2011).

Tijekom heterotrofnog uzgoja mikroalge koriste organski izvor ugljika za rast i sintezu lipida (Chojnacka i Marquez-Rocha, 2004). Kao izvor organskog ugljika, mikroalge mogu asimilirati različite izvore kao što su: glukoza, acetat, glicerol, fruktoza, saharoza, laktoza, galaktoza i manozna (Liang i sur., 2009). Prednost ovakvog uzgoja u odnosu na autotrofni je mogućnost sinteze lipida tijekom perioda slabe osvjetljenosti ili tame (Rezić i sur., 2014). Heterotrofni uzgoj karakterizira visoka koncentracija biomase kao i ograničena doprema svjetlosti do stanica unutar suspenzije biomase u bioreaktorima velikih volumena (Huang i sur., 2010). Produktivnost sinteze lipida pri heterotrofnim uvjetima uzgoja je i do 20 puta veća u odnosu na fototrofni uzgoj. Međutim, zbog šećera koji se koriste kao izvori ugljika, postoji velika opasnost od kontaminacije što je ujedno i glavni nedostatak ovog tipa uzgoja (Chen i sur., 2011).

Miksotrofni uzgoj mikroalgi podrazumijeva korištenje anorganskog (CO<sub>2</sub>) i organskog izvora ugljika (Chen i sur., 2011) uz svjetlost kao glavni izvor energije. Ovaj tip uzgoja je moguće provoditi s mikroalgama koje mogu rasti pri fotoautotrofnim i heterotrofnim uvjetima, a ovisno o količini dostupne svjetlosti i izvoru ugljika (Mata, 2010).

Fotoheterotrofni uzgoj je prilagođen uzgoj u kojem mikroalge trebaju svjetlost tijekom metabolizma organskog izvora ugljika (Chen i sur., 2011).

Zaključno, korištenje CO<sub>2</sub> u fotoautotrofnom uzgoju osigurava jeftiniju proizvodnju i uklanjanje viška CO<sub>2</sub> iz atmosfere opterećene otpadnim industrijskim plinovima (Rezić i sur., 2014). Usprkos niskom prinosu biomase, zbog jednostavnosti procesa i niskih operativnih troškova ovaj tip uzgoja se najčešće primjenjuje. Heterotrofni uzgoj daje puno veće prinose u

odnosu na ostale načine uzgoja. Međutim, problemi s kontaminacijama su vrlo veliki, posebice ako se koriste bioreaktori otvorenog tipa. Miksotrofni i fotoheterotrofni uzgoj se rijetko primjenjuju zbog visokog rizika od kontaminacije i problema vezanih uz dimenzioniranje većih volumena bioreaktora (Gouveia, 2011). Usporedba sva četiri načina uzgoja prikazana je u tablici 1.

**Tablica 1.** Usporedba karakteristika različitih načina uzgoja (Chen i sur., 2011).

<b>Karakteristika</b>	<b>Fotoautotrofno</b>	<b>Heterotrofno</b>	<b>Miksotrofno</b>	<b>Fotoheterotrofno</b>
Izvor energije	svjetlost	organski ugljik	svjetlost i organski ugljik	svjetlost
Izvor ugljika	anorganski	organski	anorganski i organski	organski
Izvor svjetlosti	obavezan	nije potreban	neobavezan	obavezan
Produktivnost sinteze biomase	niska	visoka	srednja	srednja
Rizik od kontaminacije	nizak	visok	visok	visok
Tip bioreaktora	fotobioreaktor, otvoreni sustav	konvencionalni bioreaktor	fotobioreaktor	fotobioreaktor
Troškovi	niski	srednji	visoki	visoki

### 2.2.3. Kultivacijski sustavi

Reaktorski sustav je ključan u održavanju povoljnog okruženja za rast stanica i biosintezu željenih staničnih proizvoda. Zbog toga izbor kultivacijskog sustava zahtjeva poznavanje fiziologije mikroorganizma producenta (Griffiths, 2013). Sustav za uzgoj mikroalgi mora udovoljavati sljedećim zahtjevima (Richmond, 2000):

1. Osiguravanje dovoljno svjetlosti unatoč dnevnim i sezonskim varijacijama i gustoći kulture mikroalgi
2. optimalno miješanje i prijenos mase uz izbjegavanje oštećenja stanica silama smicanja
3. sustav za održavanje optimalne temperature

4. jednostavno čišćenje i održavanje
5. niske kapitalne i operativne troškove.

Mikroalge se mogu uzgajati na dva načina, u zatvorenom bioreaktorskom sustavu pri strogo kontroliranim uvjetima te u prirodno ili umjetno napravljenim otvorenim sustavima (Brennan i Owende, 2010).

#### 2.2.3.1. Otvoreni sustav

Uzgoj mikroalgi u otvorenim sustavima u primjeni je od sredine prošlog stoljeća (Borowitzka, 1999). Prednosti uzgoja u ovakvim sustavima su: relativno jeftina gradnja i održavanje kao i niski operativni troškovi, mala potrošnja energije i jednostavno prenošenje sustava u veće mjerilo (Tan i sur., 2020). Glavna ograničenja su: podložnost kontaminacijama, mala gustoća stanica, teško održavanje optimalnih uvjeta uzgoja što se ponajviše odnosi na temperaturu i svjetlost zbog lokalnih vremenskih i klimatskih uvjeta, visoki troškovi izdvajanja biomase (Carvalho i sur., 2006). Zbog navedenih razloga, ograničen broj vrsta mikroalgi može uspješno rasti u otvorenim sustavima (Borowitzka, 1999). Riječ je o vrstama koje zahtijevaju neuobičajene uvjete uzgoja. Primjerice, alge iz roda *Spirulina* rastu pri visokom pH, *Dunaliella salina* uspijeva u vodi visokog saliniteta dok alge iz roda *Chlorella* trebaju visoku koncentraciju nutrijenata u hranjivoj podlozi (Griffiths, 2013). Ekstremni uvjeti uzgoja onemogućavaju rast ostalih vrsta mikroorganizama čime je osiguran uzgoj čiste kulture. Ovakvi sustavi se dijele na: prirodne (jezera, lagune, ribnjaci) i umjetne (bazeni, iskopani kanali) (Jiménez i sur., 2003).

Kružni bazeni (eng. *circular ponds*) su prvi umjetno napravljeni otvoreni sustavi za uzgoj mikroalgi. To su jednostavne, okrugle betonske konstrukcije s horizontalnom rotirajućom miješalicom (Lee, 2001). Ovakvi sustavi su u pravilu visine između 30 – 70 cm i širine do 45 m. Upravo je promjer bazena ograničavajući faktor zbog lošeg učinka miješanja kada rotacijska ruka postane predugačka (iznad 50 m u promjeru) (Shen i sur., 2009). Trenutno se kružni bazeni najviše koriste za uzgoj mikroalgi iz roda *Chlorella* u Japanu i na Tajvanu (Tan i sur., 2020).

Otvoreni bazeni s recirkulacijom podloge (eng. *raceway ponds*) su najčešće korišteni otvoreni sustavi za komercijalnu proizvodnju mikroalgi (Griffiths, 2013). Riječ je o bazenima ovalnog oblika s jednom ili više petlji kod kojih se hranjiva podloga pokreće s lopatastim miješalom nalik mlinskom kotaču (Rezić i sur., 2014). Obično se grade od betona ili nabijene zemlje prekrivene plastičnim folijama. Visina sloja hranjive podloge iznosi između 15 – 20 cm kako bi se osigurala dobra osvjetljenost stanica mikroalgi (Brennan i Owende, 2010). Kod ovakvih sustava, CO<sub>2</sub> se osigurava iz zraka, iako je za dodatnu opskrbu plin moguće propuštati

kroz aeratore smještene na dnu bazena. Danas se najviše koriste u SAD, Kini, Izraelu i Indiji dok se najveći pogon od 5000 m<sup>2</sup> nalazi u južnoj Kaliforniji (Spolaore i sur., 2006b). Slika 2 prikazuje najčešće izvedbe otvorenih bioreaktorskih sustava.



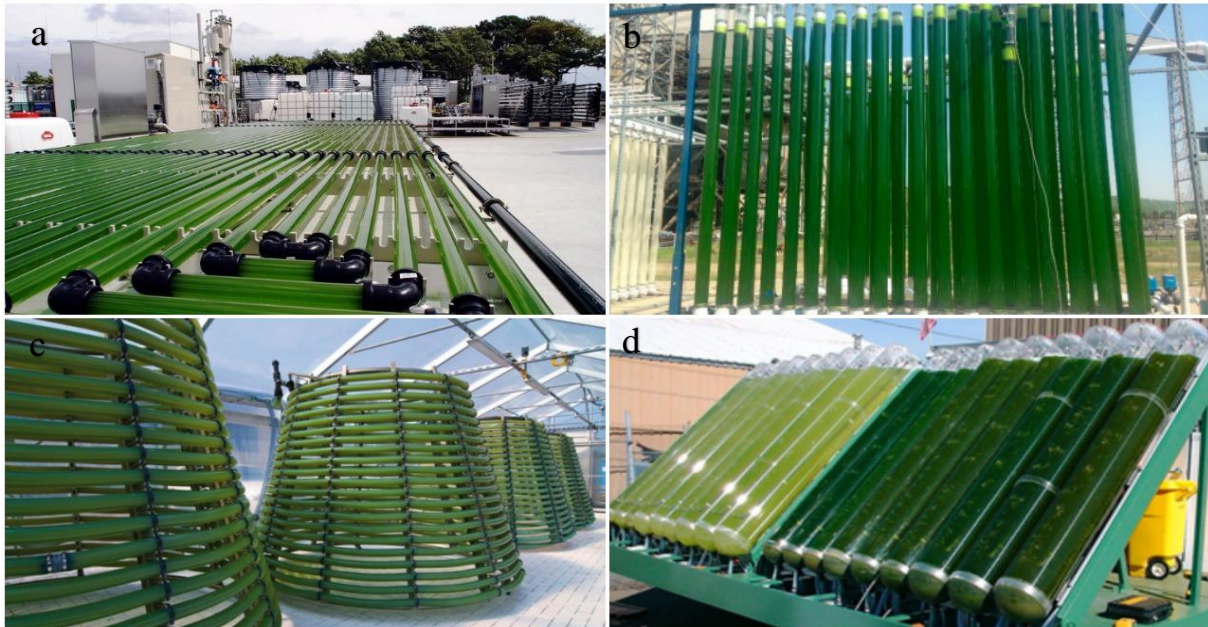
**Slika 2.** Prikaz otvorenih bioreaktorskih sustava za uzgoj mikroalgi (a) kružni bazeni (b) otvoreni bazeni s recirkulacijom podloge (El-Baz i Baky, 2018).

#### 2.2.3.2. Zatvoreni bioreaktorski sustav

Unatoč većim troškovima izgradnje zatvorenih sustava u odnosu na otvorene, veći prinos biomase i mogućnost uzgoja različitih vrsti mikroalgi doveli su do značajnog interesa za izgradnju zatvorenih bioreaktorskih sustava (Griffiths, 2013). Zatvoreni sustavi, tzv. fotobioreaktori (eng. *photobioreactor*, *PBR*) imaju mnoge prednosti: smanjena mogućnost kontaminacije, jednostavno miješanje, nizak utrošak vode i CO<sub>2</sub>, dobra doprema svjetlosti, moguća standardizacija proizvodnog procesa, jednostavno čišćenje i održavanje sustava, veća gustoća stanica što ujedno smanjuje troškove izdvajanja biomase te visoka učinkovitost bioprocasa (El-Baz i Baky, 2018). Osim visokih kapitalnih troškova, nedostatak zatvorenih sustava je opasnost od pregrijavanja što sustav za kontrolu temperature čini neophodnim (Griffiths, 2013). Zatvoreni bioreaktorski sustavi obuhvaćaju bioreaktore najrazličitijih konstrukcija prilagođenih fiziološkim specifičnostima mikroalgi i potrebama za njihov optimalan rast i proizvodnju lipida (Rezić i sur., 2014). Pri izradi se koriste prozirni materijali kao što su staklo, plastika ili pleksiglas (Shen i sur., 2009). Prema konstrukciji fotobioreaktori mogu biti: cijevni i pločasti.

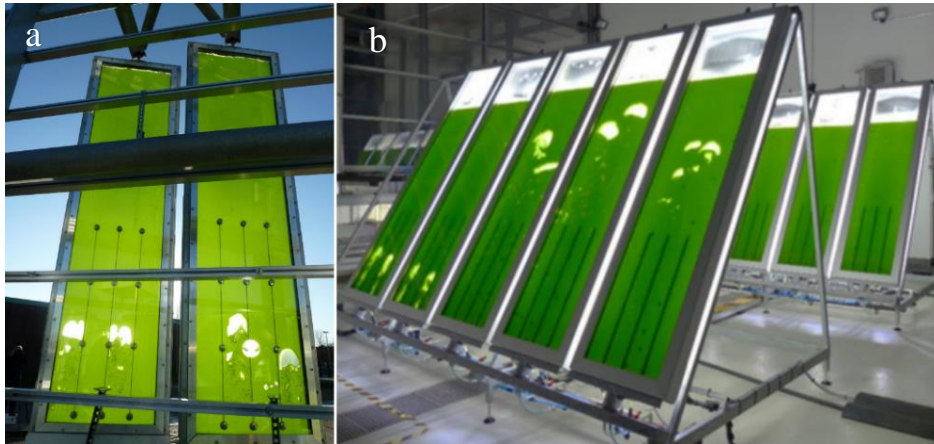
Cijevni fotobioreaktori (eng. *tubular photobioreactor*) se često koriste za komercijalnu proizvodnju mikroalgi zbog jednostavne izgradnje i dobre osvjetljenosti stanica (Ugwu i sur., 2008). Promjer cijevi je u pravilu između 3 – 10 cm, dok je dužina cijevi između 20 – 100 metara (Chisti, 2007). Ovakva konstrukcijska rješenja podrazumjevaju duge cijevi koje su na krajevima međusobno povezane U-cijevima, a mogu biti postavljene: horizontalno, vertikalno,

spiralno ili koso (Hamed, 2016). Najveći do sada izgrađeni vertikalni cijevni fotobioreaktor se nalazi u gradu Klötze u Njemačkoj (Torzillo i Zittelli, 2015). Postrojenje je smješteno na 10000 m<sup>2</sup> površine, a obuhvaća cijevi ukupne dužine 500 km, korisnog volumena 700 m<sup>3</sup>. Godišnja proizvodnja iznosi 130 – 150 tona suhe tvari biomase alge *Chlorella vulgaris* (Schenk i sur., 2008). Različite izvedbe cijevnih bioreaktorskih sustava prikazane su na slici 3.



**Slika 3.** Prikaz cijevnih bioreaktora za uzgoj mikroalgi (a) horizontalni fotobioreaktor (De Vree i sur., 2015) (b) vertikalni fotobioreaktor (Mohler i sur., 2019) (c) spiralni fotobioreaktor (Koller, 2015) (d) koso postavljene barbotirajuće kolone (Bitog i sur., 2011).

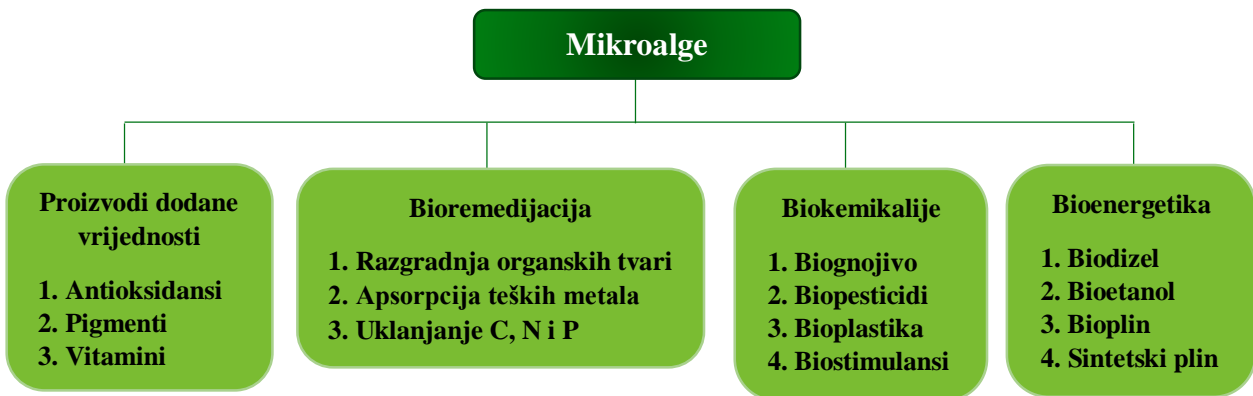
Pločasti fotobioreaktori (eng. *flat panel photobioreactor*) su prozirne pravokutne posude različitih dimenzija koje mogu biti postavljene okomito ili pod kutem (Tan i sur., 2020) kako je prikazano na slici 4. Primjerice, Sierra i suradnici (2008) su u istraživanju koristili fotobioreaktor s ravnim pločama visine 1,5 m, dužine 2,5 m i širine 0,07 m. Glavna karakteristika ovakvih sustava je velik omjer površine i volumena što omogućuje efikasnu dopremu svjetlosti do stanica mikroalgi (El-Baz i Baky, 2018).



**Slika 4.** Prikaz pločastih bioreaktora (a) pločasti fotobioreaktor postavljen okomito (Gifuni i sur., 2018) (b) pločasti fotobioreaktor postavljen koso (Koller i sur., 2017).

### 2.3. BIOTEHNOLOŠKI POTENCIJAL MIKROALGI

Različite morfološke i fiziološke karakteristike omogućavaju primjenu mikroalgi u mnogim granama industrije poput prehrambene, farmaceutske i kozmetičke. Osim u navedenim područjima, mikroalge se danas sve više koriste u procesu bioremedijacije tla i otpadnih voda, agronomiji te u proizvodnji biogoriva gdje se alge naziva trećom generacijom biomase. Na slici 5 prikazane su moguće komercijalne primjene.



**Slika 5.** Komercijalna primjena mikroalgi (preuzeti i prilagođeno iz rada Musa i sur., 2019).

Mikroalge imaju izuzetno visoku hranjivu vrijednost. Posebno su bogate vlaknima, vitaminima, mineralima i bjelančevinama. Od vitamina i minerala sadrže vitamine A, C, D, E, K, te vitamine B-kompleksa, kao i niacin, jod, kalij, željezo, magnezij i kalcij (Priyadarshani i Rath, 2012).

Pigmenti predstavljaju financijski najvrjedniji proizvod mikroalgi koji se intenzivno koristi kao bojilo u prehrambenoj industriji, zatim u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji te u



kliničkim i laboratorijskim istraživanjima kao oznaka za antitijela i receptore (Santigos-Santos i sur., 2004).

Bioremedijacija otpadnih voda pomoću mikroalgi obećavajuća je opcija jer značajno olakšava primjenu uobičajenih metoda poput centrifugiranja, gravimetrijskog taloženja, flotacije i tangencijalne filtracije (Christenson i Sims, 2011). Mikroalge pokazuju visoku efikasnost uklanjanja nitrata, fosfata i teških metala (Schneider i sur., 2012). Najbolji rezultati su pokazali da je bioremedijacijom u biomasu mikroalgi fiksirano 65 % ukupnog dušika i do 55 % ukupnog fosfora iz otpadne vode (Mulbry i sur., 2010). Osim navedenog, mikroalge su privukle pozornost zbog sposobnosti fiksiranja velikih količina CO<sub>2</sub> iz otpadne vode, ali i iz zraka (Bux, 2013).

## **2.4. PROIZVODNJA BIODIZELA**

Biodizel je smjesa alkilnih estera masnih kiselina dobivenih transesterifikacijom biljnih ulja i životinjskih masti (Mata i sur., 2010). Danas se intenzivno istražuju novi proizvodni postupci koji bi mogli zamjeniti proizvodnju biodizela iz uljarica. Prednosti korištenja mikroalgi za proizvodnju biodizela su te što uzgoj mikroalgi ne zahtijeva velike površine zemlje kao što je to slučaj s uzgojem uljarica (Chisti, 2007). Zbog toga biodizel proizveden pomoću mikroalgi ne kompromitira proizvodnju hrane. Osim toga, mikroalge rastu izuzetno brzo u usporedbi s kopnenim biljkama. Velika ulaganja u istraživanja i rezultati dobiveni laboratorijskim uzgojem upućuju da bi industrijska proizvodnja biodizela iz lipida mikroalgi mogla biti izvediva u bliskoj budućnosti (Huang i sur., 2010).

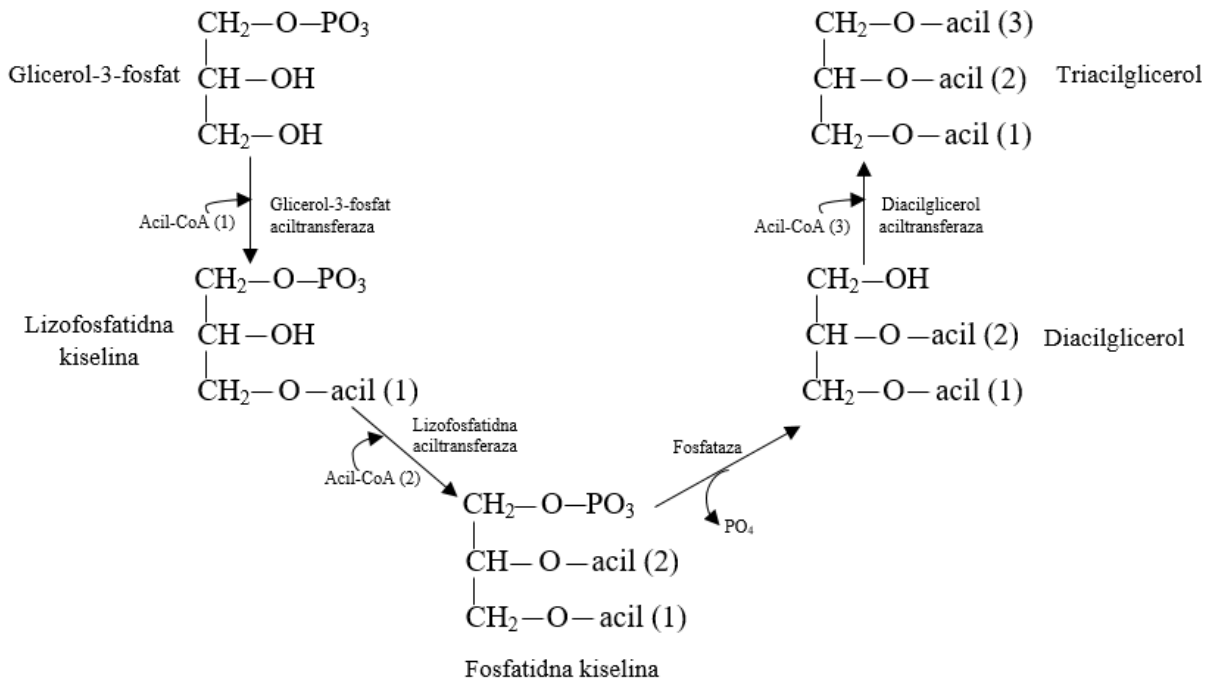
### **2.4.1. Biosinteza lipida**

Lipidi su osnovni biopolimeri u stanicama živih bića. Lipidi koji su ključni za izgradnju stanica mikroalgi se mogu podijeliti u dvije skupine: neutralni (trigliceridi, kolesterol) i polarni lipidi (fosfolipidi, galaktolipidi) (Huang i sur., 2010). Udio lipida u biomasu oleaginoznih mikroalgi uglavnom varira između 20 – 50 % (Chisti, 2007). U laboratorijskim uvjetima neke vrste mogu nakupiti 56 – 60 % lipida u suhoj tvari biomase. Također, poznato je da mikroalge za sintezu lipida mogu koristiti anorganski (CO<sub>2</sub>) i organski izvor ugljika (glukoza, acetat) te se koncentracija i sastav masnih kiselina razlikuju od vrste do vrste. Zbog prethodno navedenih činjenica, važno je istraživati i objasniti fiziološke mehanizme biosinteze triacilglicerola. Put sinteze se sastoji od tri koraka: sinteza acetyl-CoA, produljenje lanaca masnih kiselina i biosinteza triglicerida (Huang i sur., 2010).

Yang i suradnici (2000) su opisali metaboličke puteve sinteze acetil-CoA uz iskorištenje CO<sub>2</sub> ili glukoze. Zaključeno je da je gliceraldehid-3-fosfat (GAP) ključni međuprodukt u oba metabolička puta. Formiranje acetil-CoA u fotosintetskim reakcijama uključuje reakcije na svjetlu i reakcije Calvinovog ciklusa koje se odvijaju u kloroplastu. GAP iz Calvinovog ciklusa se transportira u citoplazmu, nakon čega je protok ugljika usmjeren ka sintezi šećera ili oksidaciji glikolitičkim putem do piruvata (Huang i sur., 2010). Potom slijedi karboksilacija acetil-CoA u malonil-CoA u ATP-ovisnoj reakciji koju katalizira acetil-CoA karboksilaza. Reakcija se odvija u dva stupnja: karboksilacija biotinskog kofaktora pomoću bikarbonata te prijenos karboksilne grupe na acetil-CoA pri čemu nastaje malonil-CoA.

Biosinteza masnih kiselina započinje kovalentnim vezanjem malonilne jedinice na proteinski nosač acila (eng. *acyl carrier protein, ACP*). Reakcije sinteze masnih kiselina uključuju: kondenzaciju, redukciju karbonilne skupine, dehidrataciju i redukciju dvostruke veze, produžavajući acilni lanac za dva ugljikova atoma u svakom ciklusu. Ma i suradnici (2016) su utvrdili da su najzastupljenije masne kiseline kod mikroalgi iz roda *Nannochloropsis*: palmitinska kiselina (C16:0), palmitoleinska kiselina (C16:1) i oleinska kiselina (C18:1). Kod pojedinih vrsta uočeni su visoki udjeli eikosapentaenoične kiseline (C20:5).

Općenito se smatra da postoje dva načina sinteze triglicerida u stanicama eukariotskih mikroalgi: acetil-CoA ovisni Kennedyjev put i alternativni put posredovan fosfolipidom. Kennedyjev put, prikazan na slici 6, se odvija u endoplazmatskom retikulumu, a započinje prijenosom acilnog lanca s CoA na poziciju 1 glicerol-3-fosfata što rezultira formiranjem lizofosfatidne kiseline uz djelovanje glicerol-3-fosfat aciltransferaze. Druga acil-CoA ovisna acilacija je katalizirana aciltransferazom lizofosfatidne kiseline što dovodi do stvaranja fosfatidne kiseline koja predstavlja središnji metabolit u sintezi triacilglicerola. Zatim, defosforilacijom fosfatidne kiseline koju katalizira fosfataza oslobađa se diacilglicerol. Konačnu acilaciju pokreće diacilglicerol aciltransferaza koja diacilglicerol prevodi u triacilglicerol (Li i sur., 2014; Cagliari i sur., 2011; Ohlrogge i Browse, 1995).



**Slika 6.** Kennedyjev put sinteze triacilglicerola (preuzeto i prilagođeno iz rada Cagliari i sur., 2011).

#### 2.4.2. Postupci izdvajanja biomase mikroalgi

Operacije izdvajanja biomase mikroalgi iz hranjive podloge predstavljaju dodatan tehnološki izazov s aspekta potrošnje energije i kapitalnih troškova. Studije su pokazale da čak 20 – 30 % ukupnih proizvodnih troškova otpada na postupke izdvajanja stanica (Barros i sur., 2015). Sve metode izdvajanja imaju za cilj uklanjanje velike količine hranjive podloge i koncentriranje stanica kako bi se olakšalo daljnje korake prerade, poput ekstrakcije bioaktivnih spojeva (Tan i sur., 2020). Glavne tehnološke operacije izdvajanja biomase mikroalgi su: sedimentacija, centrifugiranje, filtracija, flokulacija i flotacija (Singh i Patidar, 2018). Uobičajeno je provoditi izdvajanje u dva stupnja, pri čemu je prvi stupanj flokulacija, flotacija ili sedimentacija. Svrha ovog stupnja je uklanjanje dijela vode i povećanje koncentracije suhe tvari biomase u suspenziji na 5 – 10 %. U drugom stupnju uklanja se ostatak vode filtracijom, centrifugiranjem ili prešanjem. Ovaj stupanj iziskuje veći utrošak energije u usporedbi s prvim stupnjem (Rezić i sur., 2014; Brennan i Owende, 2010). U ovom radu za izdvajanje stanica mikroalgi korišteno su dvije metode: centrifugiranje i flokulacija koji su detaljnije opisani u nastavku.

Centrifugiranje je separacijska operacija koja omogućava razdvajanje stanica iz medija pomoću centrifugalne sile, a na temelju veličine čestica i razlike u gustoći (Soomro, 2016).

Učinkovitost izdvajanja ovim postupkom je i do 95 % (Heasman i sur., 2000). Nedostaci separacije biomase centrifugiranjem su visoki investicijski i operacijski troškovi.

Flokulacija je proces izdvajanja slobodno plutajućih stanica mikroalgi koje dodatkom flokulirajućeg sredstva agregiraju u veće nakupine (Muylaert i sur., 2017). Sredstva za flokulaciju se mogu podijeliti u dvije skupine: anorganski flokulanti i polielektroliti. Primjer anorganskih flokulanata su soli metala poput željezovog (III) klorida ( $\text{FeCl}_3$ ), aluminijev sulfat ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ), željezov sulfat ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) (Brennan i Owende, 2010). Dodatkom anorganskog flokulanta dolazi do adsorpcije aluminijevih ili željezovih iona na negativno nabijenu površinu stanica mikroalgi, nakon čega se formiraju nakupine stanica koje se talože (Grima i sur., 2003). Ovim postupkom moguće je izdvojiti do 95 % biomase mikroalgi (Chatsungnoen i Chisti, 2016). Međutim, velike količine mulja, visoki troškovi pročišćavanja izdvojene biomase koja sadrži značajne količine metalnih iona kao i selektivnost flokulacije koja je ograničena samo na neke vrste mikroalgi, čine korištenje anorganskih flokulanata nepoželjnim (Rinanti i Purwadi, 2018). Flokulacija se može provesti primjenom polielektrolita, pri čemu se najčešće koriste oni kationskog tipa zbog negativno nabijene površine stanica mikroalgi. Visoka učinkovitost izdvajanja, niska cijena te prihvaćenost s ekološkog aspekta omogućuje široko korištenje polielektrolita kao flokulirajućeg sredstva.

#### 2.4.3. Ekstrakcija lipida iz biomase mikroalgi

Ekstrakciji lipida i proizvodnji biodizela prethodi sušenje stanica mikroalgi (Kim, 2015). Sander i Murthy (2010) su pomoću energetske bilance dokazali da je utrošak energije za sušenje biomase mikroalgi u sušarama vrlo velik. Procjene su da doseže i do 69 % ukupno utrošene energije za proizvodnju biodizela. Upravo ovaj visok postotak značajno doprinosi smanjenju ekonomske održivosti proizvodnje biodizela iz biomase mikroalgi. Stoga su mnoga istraživanja usmjerena prema novim tehnološkim rješenjima za sušenje biomase, koje se može provoditi na otvorenom ili u sušarama zatvorenog tipa.

Nakon sušenja biomase, pojedine metode ekstrakcije zahtijevaju razbijanje stanica koje olakšava daljnje izdvajanje i pročišćavanje željenog proizvoda (Rezić i sur., 2014). Za razbijanje stanica se mogu koristiti fizikalne (ultrazvuk, kuglični mlinovi, visokotlačni homogenizator), kemijske (liofilizacija, osmotski tlak, hidroliza komponenti stanične stijenke korištenjem kiseline ili lužine) i biološke metode (enzimska razgradnja stanične stijenke).

Najčešće korištene metode ekstrakcije lipida iz biomase mikroalgi su mehaničke preše, ekstrakcija superkritičnom tekućinom i ekstrakcija organskim otapalom (Ranjith Kumar i sur.,

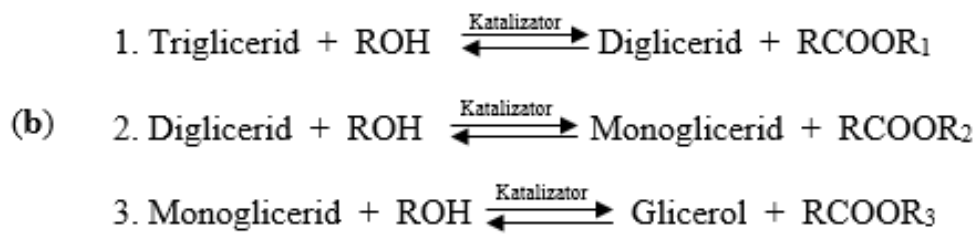
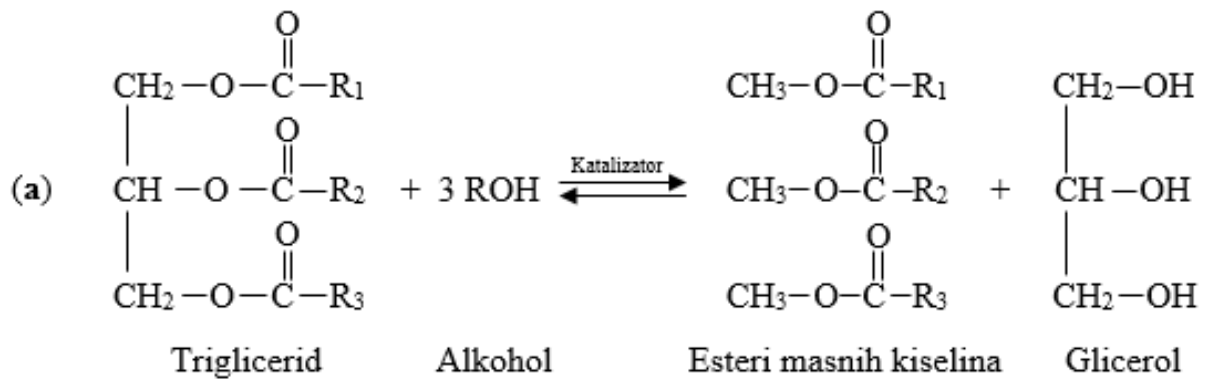
2015). Metode ekstrakcije s organskim otapalom koje su definirali Folch i suradnici (1957) te Bligh i Dyer (1959) uključuju korištenje kloroforma i metanola u različitim omjerima. Iako je ekstrakcija lipida s kloroformom učinkovita, danas se ne pribjegava njegovom korištenju zbog izlaganja ekološkim i zdravstvenim rizicima. Stoga se koriste druga otapala koja su manje toksična poput etanola, izopropanola, butanola, heksana ili kombinacije više otapala u različitim omjerima (Sheng i sur., 2011).

#### 2.4.4. Proizvodnja biodizela iz lipida mikroalgi

Nakon ekstrakcije lipida iz biomase mikroalgi, lipidi se mogu prevesti u biodizel. Čitav postupak proizvodnje biodizela iz lipida mikroalgi je u posljednjih nekoliko godina dobro istražen. Potvrđeno je da se tehnološke operacije za proizvodnju biodizela iz biljnih ulja mogu primijeniti i u ovom slučaju zbog fizikalnih i kemijskih sličnosti biljnih ulja s lipidima mikroalgi (Huang i sur., 2010).

Biodizel se dobiva transesterifikacijom (alkoholizom) u prisustvu kiselih ( $H_2SO_4$ ) ili baznih (NaOH ili KOH) katalizatora. Najčešće se provodi bazno-katalizirana transesterifikacija jer je oko 4000 puta brža od kiselo-katalizirane. Reakcija transesterifikacije se može uspješno katalizirati intracelularnim i ekstracelularnim lipazama (Fukunda i sur., 2001). Međutim, visoka cijena enzimskih pripravaka ograničava njihovo korištenje. Osim triglicerida, drugi ključan supstrat u reakciji je alkohol. Najčešće korišteni alkoholi su: metanol, etanol, propanol i butanol (Huang i sur., 2010).

Transesterifikacija je reakcija u tri reverzibilna koraka, u prvom koraku se trigliceridi prevode u digliceride, zatim digliceridi u monogliceride koji se u završnom koraku pretvaraju u estere (biodizel) i glicerol kao nusproizvod. Cjelokupna reakcija je prikazana na slici 7, gdje radikali  $R_1$ ,  $R_2$  i  $R_3$  predstavljaju alifatske lance masnih kiselina, a R predstavlja alkilnu skupinu alkohola. Teorijski, molarni omjer alkohola i ulja iznosi 3:1, ali u svrhu boljeg iskorištenja reakcije u praksi se primjenjuje omjer 6:1. Odnos između mase sirovog lipida i mase sintetiziranog biodizela je oko 1:1, što znači da se iz 1 kg ulja može dobiti 1 kg biodizela (Mata i sur., 2010).



**Slika 7.** Transesterifikacija (a) Opća jednačba (b) Reakcija u tri koraka (preuzeto i prilagođeno iz rada Fukuda i sur., 2001).

***EKSPERIMENTALNI DIO***

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

Za provedbu eksperimenta korišten je soj mikroalge D3 koji pripada rodu *Nannochloropsis*, a izoliran je iz Jadranskog mora (okolica Šibenika, ožujak 2018. godine).

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

Za pripremu hranjive podloge korištene su kemikalije navedene u tablici 2.

**Tablica 2.** Kemikalije za pripremu hranjive podloge.

Naziv kemikalije	Čistoća	Proizvođač
Natrijev klorid	techn.	Solana Nin, Hrvatska
Kalijev klorid	p.a.	Kemika, Hrvatska
Magnezijev klorid heksahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
Kalcijev klorid dihidrat	p.a.	Merck, Njemačka
Magnezijev sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev hidrogen karbonat	p.a.	Alkaloid, Sjeverna Makedonija
Natrijev nitrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Željezov (III) klorid heksahidrat	p.a.	Sigma-Aldrich, Njemačka
EDTA dinatrijev dihidrat	p.a.	Carlo Erba
Bakrov sulfat pentahidrat	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
Natrijev molibdat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
Kobaltov (II) klorid dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Manganov (II) klorid tetrahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Tiamin	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Njemačka
Biotin	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Njemačka
Cijanokobalamin	≥ 98 %	Sigma-Aldrich, Njemačka



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

Ostale kemikalije i kitovi korišteni u eksperimentu navedene su u tablici 3.

**Tablica 3.** Ostale kemikalije i kitovi.

Naziv kemikalije	Čistoća	Proizvođač
Metil tridekanoat	standard	Sigma-Aldrich, Njemačka
Heksan	p.a.	Carlo Erba, Francuska
Kloroform	p.a.	Merck, Njemačka
Metanol	za HPLC	J. T. Baker, SAD
Klorovodična kiselina	p.a., 36 %	Kemika, Hrvatska
Pentadekan	standard	Sigma-Aldrich, Njemačka
Smjesa F.A.M.E (C4 – C24)	standard	Sigma-Aldrich, Njemačka
Kalcijev karbonat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Sumporna kiselina	p.a., 96 %	Merck, Njemačka
Aceton	p.a., ≥ 99,9 %	Gram-Mol, Hrvatska
Etanol	p.a., 99,8 %	Lach-Ner, Češka
Folin-Ciocalteu reagens	standard	Sigma-Aldrich, Švicarska
Natrijev hidroksid	p.a.	Merck, Njemačka
Natrijev karbonat	p.a.	Honeywell, Njemačka
Bakrov sulfat	p.a.	Alkaloid, Sjeverna Makedonija
Kalijev natrijev tartarat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Albumin goveđeg seruma	≥ 98 %	Sigma-Aldrich, SAD
Željezov (III) klorid heksahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
Kit za određivanje koncentracije fosfata	p.a.	Merck, Njemačka
Kit za određivanje koncentracije nitrata	p.a.	Merck, Njemačka

### 3.1.4. Hranjiva podloga za uzgoj mikroalgi

Za pripremu inokuluma i uzgoj kulture mikroalgi korištena je Guillardova podloga (f/2 podloga) koja se primjenjuje pri uzgoju morskih algi, posebice dijatomeja (Guillard, 1975). Podloga je pripremljena priređivanjem umjetne morske vode (eng. *Artificial seawater*, ASW) u koju su dodane ostale komponente podloge (anorganske soli, otopina vitamina i otopina elemenata u tragovima). Alga koja je korištena u istraživanju ne pripada skupini dijatomeja pa se u podlogu za njezin uzgoj ne dodaje otopina natrijevog metasilikata. Sastav umjetne morske

vode naveden je u tablici 4 dok je sastav otopina ostalih komponenti podloge naveden u tablici 5.

**Tablica 4.** Sastav umjetne morske vode.

<b>Sastojak</b>	<b>Koncentracija u podlozi [mol L<sup>-1</sup>]</b>
NaCl (ninska sol)	$4,24 \cdot 10^{-1}$
KCl	$9,52 \cdot 10^{-3}$
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	$2,00 \cdot 10^{-2}$
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	$8,50 \cdot 10^{-3}$
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	$2,45 \cdot 10^{-2}$
NaHCO <sub>3</sub>	$2,50 \cdot 10^{-3}$

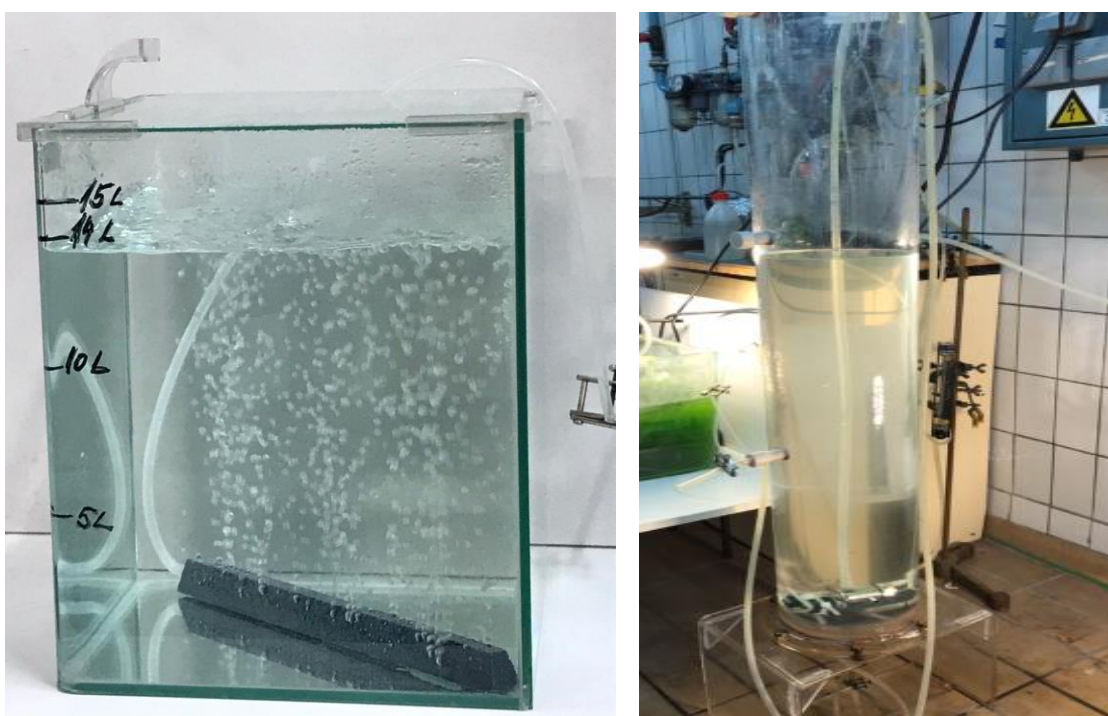
**Tablica 5.** Sastav otopina ostalih komponenti f/2 podloge.

<b>Sastojak</b>	<b>Koncentracija u podlozi [mol L<sup>-1</sup>]</b>
NaNO <sub>3</sub>	$8,82 \cdot 10^{-4}$
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	$3,62 \cdot 10^{-5}$
<b>Otopina elemenata u tragovima</b>	<b>Koncentracija u podlozi [mol L<sup>-1</sup>]</b>
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	$1,17 \cdot 10^{-5}$
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	$1,17 \cdot 10^{-5}$
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	$3,93 \cdot 10^{-8}$
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	$2,60 \cdot 10^{-8}$
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	$7,65 \cdot 10^{-8}$
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	$4,20 \cdot 10^{-8}$
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	$9,10 \cdot 10^{-7}$
<b>Otopina vitamina</b>	<b>Koncentracija [mol L<sup>-1</sup>]</b>
Tiamin (vitamin B <sub>1</sub> )	$2,96 \cdot 10^{-7}$
Biotin (vitamin H)	$2,05 \cdot 10^{-9}$
Cijanokobalamin (vitamin B <sub>12</sub> )	$3,69 \cdot 10^{-10}$

### 3.1.5. Oprema i aparatura

#### 3.1.5.1. Kultivacijski sustavi

Uzgoj mikroalge *Nannochloropsis* sp. proveden je u dva kultivacijska sustava: staklenom akvariju i barbotirajućoj koloni, izrađenoj od akrilnog stakla. Akvarij je opremljen plastičnim učvršćivačima koji pridržavaju stakleni poklopac. Ukupan volumen akvarija iznosi 16 L, a barbotirajuće kolone 34 L. Sustav za aeraciju sastoji se od cijevi za dovod zraka koja je spojena na raspršivače zraka (A974 i A972; Hagen, Kanada) smještene na dnu oba kultivacijska sustava. Protok zraka je reguliran pomoću rotametra. Kultivacijski sustavi prikazani su na slici 8.



**Slika 8.** Akvarij i barbotirajuća kolona sa sustavom za aeraciju (vlastita fotografija).

#### 3.1.5.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

Za određivanje ukupnih ugljikohidrata u biomasi mikroalgi korišten je UPLC uređaj (1290 Infinity II; Agilent Technologies, SAD). Sustav se sastoji od: pumpe (G7104A), automatskog injektora (G7167B), termostata (G7116B), analitičke kolone (Rezex<sup>TM</sup> ROA-Organic Acid H+ (8 %), Phenomenex, SAD), detektora indeksa loma (G7162 A 1260 RID), modula za kontrolu sustava i računalnog programa za obradu podataka (OpenLAB CDS).

### 3.1.5.3. Uređaj za plinsku kromatografiju (GC)

Plinsko-kromatografska analiza otopina metilnih estera masnih kiselina u heptanu je provedena pomoću uređaja GC 2010 Plus AF (Shimadzu, Japan). Uređaj se sastoji od: automatskog uzorkivača (AOC-20s), injektora (AOC-20i), termostatirane kapilarne kolone (Zebron ZB-FAME; Phenomenex, SAD), plameno-ionizacijskog detektora FID-2010 Plus (eng. *Flame Ionization Detector, FID*) i računalnog programa za obradu podataka (GC Solutions v.2.32). Korištena kapilarna kolona je duljine 30 m i unutarnjeg promjera 0,25 mm. Debljina sloja iznosi 0,20 µm, a kolona je ispunjena stacionarna faza s cijanopropil-silikonom. Za provedbu analize potrebni su plinovi: helij, sintetski zrak i vodik (Messer Croatia Plin, Hrvatska).

### 3.1.5.4. Ostala oprema

Uz prethodno navedenu opremu, laboratorijsko posuđe i pribor te ostali laboratorijski potrošni materijal, u ovom istraživanju korištena je i oprema prikazana u tablici 6.

**Tablica 6.** Ostala korištena oprema.

Oprema	Model i proizvođač
	CF-10, Witeg, Njemačka
Centrifuge	SL 8R; ThermoScientific, SAD J-21B; Beckman, Njemačka
Sušionici	ST-05; Instrumentaria, Hrvatska ST-06; Instrumentaria, Hrvatska
Autoklav	Sutjeska, Jugoslavija
Analitička vaga	ALC210.4; Acculab, SAD
Tehnička vaga	ET-1111; Tehnica, Slovenija
UV/Vis spektrofotometar	Cary 100; Agilent Technologies, SAD
Mikroskop	CH20; Olympus, Japan
Magnetska miješalica	VMS-C4; VWR International, SAD
Laboratorijska tresilica	SHKE2000-1CE; ThermoScientific, SAD
Vortex mikser	VM-10; Witeg, Njemačka
Pumpa	MCP V5.17; Ismatec, Švicarska
Boca plina s dušikom	Messer Croatia Plin, Hrvatska

Vodena kupelj	VK5ER; InkoLab, Hrvatska
pH metar, termometar	HI 9125; Hanna Instruments, SAD
Hladnjak	Gorenje, Slovenija
Zamrzivač	ZFC340WBB, Zanussi, Italija
Ledomat	AF-10; Scotsman, Italija

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Uzgoj inokuluma mikroalgi

Zelena mikroalga, koja pripada rodu *Nannochloropsis*, uzgojena je u tekućoj hranjivoj podlozi čiji su sastav i način pripreme opisani u poglavlju 3.1.4. *Hranjiva podloga za uzgoj mikroalgi*. Priprema inokuluma je provedena postepenim povećanjem volumena kulture. U prvoj fazi, uzgoj inokuluma je započeo u Erlenmeyerovoj tikvici volumena 500 mL u kojoj se nalazilo 190 mL sterilizirane, a potom i ohlađene hranjive podloge. Inokulacija je provedena s 20 mL originalne kulture. Uzgoj je trajao 7 dana na tresilici pri 200 rpm i temperaturi od 25 °C, uz osvjetljenje umjetnim izvorom svjetlosti toplo – bijele boje prema režimu 12 sati svjetlo, 12 sati tama. U drugoj fazi je prethodno uzgojena kultura prebačena u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 2 L s 800 mL sterilne hranjive podloge. Uzgoj u ovoj fazi je trajao 14 dana i proveden je prema prethodno opisanim uvjetima.

### 3.2.2. Fototrofni nesterilni uzgoj mikroalgi u otvorenom sustavu

Fototrofni uzgoj mikroalgi proveden je u otvorenom bazenu i barbotirajućoj koloni. Oba sustava su prije punjenja hranjivom podlogom očišćena uz dodatak lužine i prebrisana korištenjem dezinfekcijskog sredstava (Bacillol plus; Hartmann, Njemačka). Pripremljena hranjiva podloga kao i otopina  $\text{NaNO}_3$  i otopina  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , koje su korištene za prihranu supstrata, sterilizirane su u autoklavu pri 121 °C kroz 20 minuta. Nakon što je podloga prebačena u kultivacijske sustave, uključena je aeracija u svrhu bržeg hlađenja podloge. Inokulacija je provedena 24 sata nakon prebacivanja hranjive podloge u sustave. Pri uzgoju su korištena LED svjetla (Model: 001412; Ferrotehna, Hrvatska) uz režim 12 sati svjetlo i 12 sati tama. Uzorci su izuzimani svakodnevno s ciljem praćenja rasta kulture mjerenjem optičke gustoće i brojanjem stanica u Thomaovoj komorici. Tijekom uzgoja praćena je potrošnja dušika i fosfora u podlozi.

### *3.2.2.1. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata u otvorenom bazenu*

Šaržni uzgoj s pritokom supstrata proveden je u fototrofnim uvjetima rasta. U otvorenom bazenu ukupnog volumena 16 L, dodano je 14 L hranjive podloge. Podloga je inokulirana s 1 L fototrofno uzgojenog inokuluma. Uzgoj je vođen šaržno do kraja eksponencijalne faze rasta, odnosno do ulaska kulture u stacionarnu fazu.

Iz otvorenog bazena svakodnevno je izuziman uzorak u svrhu praćenja rasta kulture i analize sastava biomase mikroalgi. Svaki dan je izuzimano 20 mL podloge iz koje je mjerena optička gustoća kulture i određivan broj stanica. Pomoću pH metra i termometra praćena je promjena pH-vrijednosti i temperature. Temperatura je varirala između 22 i 24,8 °C dok je pH-vrijednost podloge bila u intervalu od 8,09 do 8,78. U prosjeku, svaki treći dan je izuziman veći volumen podloge od 300 mL. Tijekom cijelog uzgoja veći volumen podloge je izuzet ukupno 7 puta. Iz tih uzoraka, osim mjerenja optičke gustoće kulture i broja stanica, pripremljeni su uzorci za određivanje koncentracija lipida, proteina, pigmenata, ugljikohidrata, kao i uzorci za analizu sastava masnih kiselina i gravimetrijsko određivanje suhe tvari. Uzorci supernatanta, koji su iz podloge izdvojeni centrifugiranjem, korišteni su za određivanje koncentracije nutrijenata.

Prvi dan uzgoja u otvoreni bazen dodano je 500 mL otopine NaHCO<sub>3</sub>. Druga prihrana je provedena 14. dan uzgoja tako što je u podlogu dodano: 19,3 mL otopine NaNO<sub>3</sub>, 14,1 mL otopine NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 14,1 mL otopine elemenata u tragovima i 7 mL otopine vitamina. Treća prihrana volumena 250 mL dodana je 19. dan uzgoja te je sadržavala isključivo otopinu NaHCO<sub>3</sub>. Četvrta, ujedno i posljednja prihrana od 250 mL otopine NaHCO<sub>3</sub> provedena je 22. dan uzgoja. 26. dan uzgoja iz otvorenog bazena izuzeto je 1000 mL uzorka koji je korišten kao inokulum za barbotirajuću kolonu. Uzgoj je ukupno trajao 28 dana.

### *3.2.2.2. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata u barbotirajućoj koloni*

Šaržni uzgoj s pritokom supstrata proveden je u barbotirajućoj koloni ukupnog volumena 34 L u koji je prebačeno 20 L sterilne hranjive podloge. Volumen inokuluma je iznosio 5 % volumena podloge, odnosno 1000 mL. Inokulum za ovaj kultivacijski sustav je izuzet iz otvorenog bazena 26.-og dan uzgoja kada je koncentracija stanica iznosila  $6,88 \cdot 10^7$  stanica po mililitru kulture. Tijekom uzgoja praćena je promjena temperature koja je bila u intervalu između 21,4 i 24,5 °C, dok je pH-vrijednost bila oko 8 uz manja odstupanja (7,74 – 8,16).

Iz sustava je svakodnevno izuziman manji volumen podloge od 40 mL iz kojeg je mjerena optička gustoća kulture i određivan broj stanica. U razmaku od tri do četiri dana izuziman je veći volumen podloge od 500 mL iz kojeg su pripremljeni uzorci za provođenje ostalih analiza.

Uzgoj je vođen šaržnim načinom s pritokom supstrata tako što je nakon izuzimanja većeg uzorka, volumen u reaktoru nadomješten dodatkom sterilne demineralizirane vode do početnog volumena od 21 L. Izmjena volumena je tijekom uzgoja provedena ukupno šest puta: trećeg, šestog, devetog, trinaestog, šesnaestog i dvadesetog dana. Osim toga, trinaestog dana uzgoja provedena je i prihrana dodatkom 20 mL otopine  $\text{NaNO}_3$  i 20 mL otopine  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Uzgoj je trajao 23 dana odnosno do ulaska kulture u stacionarnu fazu rasta.

### 3.2.3. Izdvajanje biomase mikroalgi

Biomasa mikroalgi je iz podloge izdvojena na dva načina: centrifugiranjem i flokulacijom sa željezovim (III) kloridom. Dobiveni talozi su osušeni u sušioniku na 50 °C nakon čega su korišteni za pripremu uzoraka za analizu. Izdvojeni uzorci supernatanta su pohranjeni u zamrzivaču na -20 °C.

#### 3.2.3.1. Centrifugiranje

Centrifugiranjem je izdvojena biomasa mikroalgi iz hranjive podloge u barbotirajućoj koloni i iz 4 L podloge iz otvorenog bazena. Pri tome je korištena Beckman J-21B (SAD) centrifuga, a uzorci su centrifugirani u plastičnim kivetama volumena 500 mL. Kultura je centrifugirana pri 5000 rpm tijekom 15 minuta uz ispiranje deioniziranom vodom kako bi se uklonila zaostala sol iz podloge.

#### 3.2.3.2. Flokulacija

Kao što je i prethodno objašnjeno, flokulacija je postupak izdvajanja biomase mikroalgi koji se zasniva na agregaciji stanica u veće nakupine uz dodatak flokulirajućeg sredstva. Ovim postupkom je izdvojena biomasa iz 4,7 L podloge iz otvorenog bazena. Proces je proveden dodatkom anorganskog flokulanta: otopina željezovog (III) klorida.

Kako bi se ispitalo može li zelena mikroalga iz roda *Nannochloropsis* uspješno tvoriti flokule dodatkom željezovog (III) klorida, pripremljena je vodena otopina  $\text{FeCl}_3$  koncentracije  $10 \text{ g L}^{-1}$ . Nakon što je primijećeno formiranje flokula, u svrhu utvrđivanja najmanjeg volumena otopine flokulanta kojeg je potrebno dodati kako bi se formirale flokule, izuzeto je 100 mL

podloge iz otvorenog bazena. Eksperimentom je određeno da je neophodno 8,5 mL pripremljene otopine FeCl<sub>3</sub> kako bi se supernatant izbistrio.

Podloga iz otvorenog bazena je podijeljena u 4 menzure: jednu od 2 L i dvije menzure od 1 L dok je 700 mL preostale podloge prebačeno u čašu od 1 L. Za flokulaciju biomase iz većih volumena podloge pripremljena je otopina FeCl<sub>3</sub> koncentracije 100 g L<sup>-1</sup>. U uzorke je postepeno dodavana otopina flokulanta te je praćen tijek flokulacije.

Uspješnost flokulacije je ispitana tako da je u suhe kivete, po dvije paralele, dodano po 30 mL supernatanta iz menzure. U druge dvije čiste kivete dodano je po 5 mL istaložene biomase mikroalgi. Uzorci su centrifugirani i stavljeni na sušenje na 50 °C. Iz razlika mase kivete s talogom nakon sušenja i mase prazne kivete te usporedbom uzoraka supernatanta i taloga određena je učinkovitost izdvajanja stanica mikroalgi. Pri tome je korišten izraz [1]:

$$E = \frac{\gamma_1}{\gamma_1 + \gamma_2} \cdot 100 \quad [\%] \quad [1]$$

gdje je:

$\gamma_1$  - koncentracija biomase mikroalgi u izdvojenom talogu [g L<sup>-1</sup>]

$\gamma_2$  – koncentracija biomase mikroalgi u supernatantu zaostalom nakon flokulacije [g L<sup>-1</sup>].

Uzorci iz menzura su istog dana centrifugirani i spremljeni za daljnje analize. Čaša sa 700 mL uzorka je ostavljena u hladnjaku na 4 °C kroz 16 sati s ciljem ispitivanja utjecaja vremena flokulacije na njenu uspješnost. Određivanje učinkovitosti flokulacije je provedeno prema prethodno opisanom postupku.

### 3.2.4. Analitičke i mikrobiološke metode

#### 3.2.4.1. Mjerenje optičke gustoće kulture

Optička gustoća kulture mjerena je s ciljem praćenja rasta biomase mikroalgi. Izuzetim uzorcima podloge izmjerena je apsorbancija pri valnim duljinama 540 nm i 720 nm. Po potrebi je priređeno odgovarajuće razrjeđenje s deioniziranom vodom tako da izmjerena optička gustoća bude u intervalu između 0,1 i 1,0. Za mjerenje su korištene semi-mikro plastične kivete (Kartell, SAD).



### 3.2.4.2. Brojanje stanica u Thomaovoj komorici

Koncentracija stanica mikroalgi u uzorcima određena je brojanje u Thomaovoj komorici. Prije nanošenja uzorka, Thomaova komorica i pokrovnica su isprane deioniziranom vodom i etanolom te dobro osušene. Zatim je kap, prethodno homogenizirane suspenzije stanica, nanesa na površinu ugravirane kvadratne mrežice i prekrivena pokrovnicom. Nakon pojave Newtonovih kolobara, odnosno dobrog fiksiranja pokrovnice, pomoću mikroskopa su izbrojane stanice u četiri dijagonalna velika kvadrata. Uzorak je promatran pri ukupnom povećanju 400 puta. Naposljetku je izračunata srednja vrijednost broja stanica u cijeloj komorici, a rezultat je izražen kao broj stanica mikroalgi po mililitru suspenzije. Za izračun je korišten izraz [2]:

$$N = \frac{16 \cdot n_{\text{sred}} \cdot f}{10^{-4}} \quad [2]$$

gdje je:

N - broj stanica mikroalgi po mililitru suspenzije

$n_{\text{sred}}$  - srednja vrijednost stanica u izbrojanim kvadratima

f - razrjeđenje.

### 3.2.4.3. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari biomase

Tijekom uzgoja gravimetrijskom analizom je praćena promjena koncentracije biomase mikroalgi. Prazne kivete bez čepova su stavljene u sušionik na 100 °C kroz 5 sati. Prije izuzimanja uzorka, osušene kivete su ohlađene u eksikatoru, a potom i izvagane. Prethodno definirani volumen podloge (10 mL ili 25 mL), izuzet tijekom uzgoja, je centrifugiran pri 8000 rpm tijekom 15 minuta. Supernatant je odbačen, a zaostali talog je resuspendiran s deioniziranom vodom kako bi se uklonili ostatci podloge i soli. Nakon ponovnog centrifugiranja supernatant je odbačen, a talog biomase je osušen u sušioniku pri 100 °C do konstantne mase. Potom je, nakon hlađenja u eksikatoru, izvagana masa kivete s osušenim talogom. Koncentracija suhe tvari [ $\text{g L}^{-1}$ ] određena je prema jednadžbi [3]:

$$\gamma = \frac{m_2 - m_1}{V_p} \quad [3]$$

gdje je:

$m_1$  - masa prazne kivete [g]

$m_2$  - masa kivete s talogom nakon sušenja [g]

$V_p$  - volumen podloge [L].

#### 3.2.4.4. *Određivanje koncentracije nutrijenata u podlozi*

Tijekom uzgoja praćena je promjena koncentracije nitrata i fosfata u podlozi. Analiza koncentracije nutrijenata ispitivana je u uzorcima supernatanata kada je izuziman veći volumen podloge. Osim toga, kada je mjerenjem optičke gustoće kulture uočeno da je došlo do stagnacije u rastu, određena je koncentracija nutrijenata i provedena je prihrana. Prihrana je obavljena dodatkom otopine natrijevog nitrata i otopine natrijevog dihidrogenfosfata monohidrata.

##### 3.2.4.4.1. *Određivanje koncentracija nitrata u podlozi*

Koncentracija nitrata u uzorcima supernatanata je određena pomoću kita (Merck, Njemačka). Metoda se temelji na reakciji nitratnih iona u otopini sumporne i fosforne kiseline s 2,6-dimetilfenolom (DMP) pri čemu nastaje 4-nitro-2,6-dimetilfenol. Dobiveni produkt reakcije se detektira spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 357 nm.

U suhu kivetu od 14 mL otpipetirano je 2 mL reagensa  $\text{NO}_3$ -1. Reagensu je dodano 250  $\mu\text{L}$  uzorka supernatanta (5 – 25 °C). Zatim je dodano 250  $\mu\text{L}$  reagensa  $\text{NO}_3$ -2 i sadržaj je vorteksiran 30 sekundi. Miješanjem dolazi do promjene boje i oslobađanja topline. Reakcijsko vrijeme iznosi 10 minuta, a nakon isteka tog vremena izmjerena je apsorbancija. Pri mjerenju je korištena kvarcna kiveta (Agilent Technologies, SAD). Slijepa proba je umjesto uzorka sadržavala demineraliziranu vodu.

Za izradu baždarnog pravca korišteni su standardi pripremljeni razrjeđenjem otopine natrijevog nitrata koncentracije 1 g  $\text{L}^{-1}$  u demineraliziranoj vodi. Koncentracije dušika su bile u rasponu od 1 do 25 mg  $\text{L}^{-1}$ . Na temelju izmjerenih apsorbancija otopina poznatih koncentracija izrađen je baždarni pravac prikazan u prilogu 7.1.

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

Koncentracija fosfata u uzorcima supernatanata je određena pomoću kita (Merck, Njemačka). Metoda se temelji na reakciji ortofosfatnih iona u otopini sumporne kiseline s molibdenovim ionima pri čemu nastaje fosfomolibdenska kiselina. Askorbinska kiselina reducira nastali produkt u fosfomolibden plavo (PMB) koji daje plavo obojenje. Mjerenje je provedeno spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 690 nm.

U 5 mL uzorka (10 – 35 °C) dodano je 5 kapi reagensa  $\text{PO}_4$ -1. Nakon što je sadržaj dobro izmiješan dodana je jedna mikrožličica reagensa  $\text{PO}_4$ -2. Suspenzija je vorteksirana do

potpunog otapanja reagensa  $\text{PO}_4^{2-}$ . Reakcijsko vrijeme iznosi 5 minuta, nakon čega je izmjerena apsorbanacija. Za mjerenje je korištena kvarcna kiveta (Agilent Technologies, SAD). Slijepa proba je umjesto uzorka sadržavala demineraliziranu vodu.

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

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

Analizi sastava pigmenata prethodila je ekstrakcija iz vlažne biomase mikroalgi. Koncentracija klorofila određena je spektrofotometrijskom analizom.

##### *3.2.4.5.1. Ekstrakcija pigmenata*

Za ekstrakciju pigmenata iz vlažne biomase mikroalgi korišten je 90 %-tni (v/v) aceton. Mehaničko razbijanje stanica mikroalgi provedeno je sa staklenim kuglicama promjera 0,40 – 0,60 mm (B. Braun Biotech International GmbH, Njemačka).

10 mL stanične kulture je centrifugirano pri 8000 rpm tijekom 15 minuta. Supernatant je odbačen, a zaostalom talogu biomase dodano je 2 g staklenih kuglica i 2 mL 90 %-tnog (v/v) acetona. Kivete su omotane aluminijskom folijom s ciljem sprječavanja raspada fotosenzitivnih pigmenata uslijed izlaganja svjetlosti. Suspenzija je dva do tri puta naizmjenično vorteksirana 30 sekundi uz hlađenje na ledu da bi se spriječila degradacija pigmenata. Dobiveni supernatant je dekantiran u čistu kivetu, a preostala biomasa je ponovno podvrgnuta postupku ekstrakcije. Ekstrakcija je ponavljana do potpunog obezbojenja biomase, a supernatanti dobiveni nakon svakog koraka ekstrakcije su pridodani početnom supernatantu.

##### *3.2.4.5.2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije klorofila*

Koncentracija pigmenta klorofila *a*, *b* i *c*, ekstrahiranih iz biomase mikroalgi, određena je prema metodi koju su definirali Jeffrey i Humphrey (1975). Dobiveni ekstrakti korišteni su za spektrofotometrijsko mjerenje na UV/VIS spektrofotometru pomoću kojeg je izmjerena apsorbanacija uzoraka na valnim duljinama od 630 nm, 647 nm, 664 nm i 750 nm. U rasponu valnih duljina od 200 do 800 nm snimljen je apsorpcijski spektar. Pri mjerenju je korištena kvarcna kiveta (Agilent Technologies, SAD). Na temelju dobivenih vrijednosti izračunata je

koncentracija fotosintetskih pigmenata [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ] u svakom uzorku pomoću jednadžbi [4], [5] i [6]:

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

$$\text{Klorofil } c = \frac{[-1,67 \cdot (\text{OD}_{664} - \text{OD}_{750}) + 7,6 \cdot (\text{OD}_{647} - \text{OD}_{750}) + 24,52 \cdot (\text{OD}_{630} - \text{OD}_{750})] \cdot V_e}{L \cdot V_f} \quad [5]$$

$$\text{Klorofil } b = \frac{[-5,43 \cdot (\text{OD}_{664} - \text{OD}_{750}) + 21,03 \cdot (\text{OD}_{647} - \text{OD}_{750}) - 2,66 \cdot (\text{OD}_{630} - \text{OD}_{750})] \cdot V_e}{L \cdot V_f} \quad [6]$$

gdje je:

L - duljina puta svjetlosti kroz uzorak [cm]

$V_e$  - ukupan volumen ekstrakta [mL]

$V_f$  - volumen stanične kulture koji je centrifugiran [L].

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

Metodom po Lowry-ju određena je količina ukupnih proteina u biomasi mikroalgi. Metoda se temelji na Biuret reakciji između  $\text{Cu}^{2+}$  i peptidne veze u lužnatom mediju pri čemu dolazi do redukcije  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^+$ , odnosno do pojave tamno plavog obojenja. Dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa (otopina fosfovolframat-fosfomolibdata), smjesa anorganskih soli reagira s pobočnim lancem tirozina i triptofana što rezultira plavim obojenjem.

Za analizu proteina metodom po Lowryju potrebno je oko 100  $\mu\text{g}$  suhe tvari biomase mikroalgi. Prema poznatoj koncentraciji biomase, koje je određivana gravimetrijskom analizom tijekom uzgoja, izračunat je volumen podloge koji sadrži 100  $\mu\text{g}$  suhe tvari biomase mikroalgi. Izračunati volumen podloge ( $V_{pp}$ ) dodan je u plastičnu epruvetu s 0,5 mL deionizirane vode. Stanice su resuspendirane te je dodano 0,5 mL 1 M NaOH. Epruveta je zatvorena s plastičnim čepom te je stavljena u vodenu kupelj na 85 °C kroz 10 minuta. Sadržaj je zatim ohlađen na sobnu temperaturu te je dodano 2,5 mL otopine C (tablica 7). Nakon 10 minuta naglo je dodano 0,5 mL otopine D (tablica 7) i sadržaj je pomiješan. Epruveta je ostavljena u tami na sobnoj temperaturi kroz 40 minuta. Potom je izmjerena apsorbancija pri 550 nm prema slijepoj probi te je prema baždarnom dijagramu izračunata masa proteina. Baždarni pravac je izrađen na temelju izmjerenih apsorbancija uzoraka poznatih koncentracija proteina te je prikazan u prilogu 7.3. Udio proteina u suhoj tvari biomase mikroalgi određen je prema izrazu [7]:

$$\text{Udio proteina u suhoj tvari biomase} = \frac{m_p}{X_{\text{grav}} \cdot V_{pp}} \cdot 100 \quad [\%] \quad [7]$$

gdje je:

$m_p$  - masa proteina [mg]

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

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

**Tablica 7.** Otopine potrebne za određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-ju.

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

\*Otopine je potrebno prirediti neposredno prije analize.

#### 3.2.4.7. Određivanje ukupnih ugljikohidrata u biomasi mikroalgi

Analiza sastava i kvantifikacija monosaharida u kiselinskim hidrolizatima biomase mikroalgi provedena je prema NREL metodi (*eng. National Renewable Energy Laboratory*) koju su predložile Van Wychen i Laureus (2013a).

U staklene vialice volumena 10 mL odvagano je  $25 \pm 2$  mg prethodno osušene i usitnjene biomase mikroalgi. Nakon vaganja, uzorku je dodano 250  $\mu\text{L}$  72 % (w/w) sumporne kiseline uz miješanje. Vialice su inkubirane sat vremena u termostatu na 30 °C uz miješanje sadržaja svakih 5 – 10 minuta kako bi se ostvario što bolji kontakt biomase s kiselinom. Nakon inkubacije u vialice je dodano 7 mL deionizirane vode (koncentracija sumporne kiseline pada na 4 % (w/w)) te su zatvorene gumenim čepovima koji su dodatno učvršćeni aluminijskim poklopcem. Sadržaj je pažljivo promiješan. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani na 121 °C kroz sat vremena u autoklavu. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu iz svake vialice je, pomoću injekcijske igle, izuzet alikvot od 3 mL. Dodatkom kalcijevog karbonata pH-vrijednost alikvota je podešena između 6 - 8. Neutralizirani uzorci su profiltrirani kroz najlonski filter veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$  u vijalicu za UPLC analizu.

Koncentracija monosaharida u uzorcima je određena pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UPLC). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline, a za njezinu pripremu je uporabljena redestilirana voda vodljivosti manje od 1  $\mu\text{S}$ . Na kromatografsku kolonu, temperature 60  $^{\circ}\text{C}$ , injektirano je 10  $\mu\text{L}$  uzorka pri brzini protoka mobilne faze od 0,6  $\text{mL min}^{-1}$ . Dobiveni kromatogrami su obrađeni pomoću računalnog programa OpenLAB CDS. Koncentracija najzastupljenijih monosaharida u hidrolizatima biomase mikroalgi izračunata je prema jednadžbama baždarnih pravaca za standarde glukoze, maltoze, galaktoze i fukoze. Baždarni dijagrami su prikazani u prilogu 7.4. Suma svih udjela pojedinih monosaharida predstavlja ukupni udio ugljikohidrata u biomasi mikroalgi, a udio pojedinih monosaharida u biomasi izračunava se prema jednadžbi [8]:

$$\omega_m = \frac{\gamma_m \cdot V_h}{m_x} \cdot 100 \quad [\%] \quad [8]$$

gdje je:

$\gamma_m$  - koncentracija monosaharida [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]

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

$m_x$  - masa biomase [mg].

#### 3.2.4.8. Određivanje udjela suhe tvari biomase mikroalgi

Udio suhe tvari u biomasi mikroalgi određen je gravimetrijskom analizom. U staklene epruvete izvagano je oko 100 mg osušene (na 50  $^{\circ}\text{C}$ ) i usitnjene biomase. Uzorci su stavljani u sušionik na 105  $^{\circ}\text{C}$  i sušeni do konstantne mase. Nakon hlađenja do sobne temperature u eksikatoru, početna masa je korigirana za sadržaj vlage. Udio suhe tvari je izračunat prema jednadžbi [9]:

$$\omega_{s.tv.} = \frac{m_2}{m_1} \cdot 100 \quad [\%] \quad [9]$$

gdje je:

$m_1$  - masa uzorka prije sušenja [mg]

$m_2$  - masa uzorka nakon sušenja [mg].

### 3.2.4.9. Određivanje udjela lipida u biomasi mikroalgi

Ekstrakcija ukupnih lipida iz biomase mikroalgi je provedena sa smjesom otapala metanola i kloroforma prema metodi koju su definirali Bligh i Dyer (1959). U staklene kivete je odvagano 100 mg prethodno osušene (na 50 °C) i usitnjene biomase mikroalgi. Nakon vaganja, svakom uzorku je dodano 4 mL metanola, 2 mL kloroforma i 0,4 mL vode. Sadržaj je vorteksiran 60 sekundi, nakon čega je dodano još 2 mL kloroforma i 2 mL vode s ciljem razdvajanja faza. Ponovljeno je vorteksiranje u trajanju od 60 sekundi. Suspendirana biomasa je izdvojena filtracijom kroz sinter lijevak, dok je dobiveni filtrat skupljan u čistu epruvetu. Zaostala biomasa je podvrgnuta ponovnoj ekstrakciji sa smjesom metanola i kloroforma u omjeru 1 : 1 (v/v). Nakon filtracije dobiveni filtrat je pridodan prethodnom. Organska faza, odnosno donja kloroformska faza je izdvojena pomoću staklene injekcije s dugačkom iglom i prenesena u prethodno izvaganu staklenu epruvetu. Kloroform je iz uzoraka uklonjen propuhivanjem s plinovitim dušikom, nakon čega su ekstrahirani lipidi osušeni u sušioniku na 100 °C kroz sat vremena kako bi se uklonili mogući tragovi vode zaostali u kloroformskoj fazi. Epruveta je nakon sušenja ohlađena u eksikatoru, a potom i izvagana na analitičkoj vagi. Udio lipida u biomasi mikroalgi je izračunat prema jednadžbi [10]:

$$\omega_L = \frac{m_2 - m_1}{m_x \cdot \omega_{H_2O/X}} \cdot 100 \quad [\%] \quad [10]$$

gdje je:

$m_1$  - masa prazne epruvete [g]

$m_2$  - masa epruvete s lipidima nakon sušenja [g]

$m_x$  - masa biomase izvagane za analizu [g]

$\omega_{H_2O/X}$  - udio vlage u biomasi.

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

Identifikacija i kvantifikacija pojedinih masnih kiselina u lipidima mikroalgi određena je plinskom kromatografijom. Neposredno prije analize, provedena je transesterifikacija masnih kiselina u metilne estere. Pri tome, metilni esteri masnih kiselina su pripremljeni prema NREL protokolu za određivanje ukupnih lipida (Van Wychen i Laureus, 2013b).

Pripremi uzoraka prethodila je priprema potrebnih otopina standarda. Standard metil tridekanoata (C13:0ME), koncentracije 10 mg mL<sup>-1</sup>, je pripremljen otapanjem 100 mg metil tridekanoata u 10 mL heksana. Drugi standard je priređen vaganjem 10 mg pentadekana koji je otopljen u 1 mL heksana. Dobiveni standard je potom razrijeđen s heksanom u omjeri 1 : 10

(100  $\mu\text{L}$  pripremljenog standarda i 900  $\mu\text{L}$  heksana). Otopine standarda se čuvaju u zamrzivaču na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  u staklenim vialama volumena 1,5 mL.

Postupak pripreme uzorka započinje vaganjem 5 – 10 mg prethodno osušene (na  $50\text{ }^\circ\text{C}$ ) i usitnjene biomase mikroalgi u staklene epruvete. Uzorcima je dodano 20  $\mu\text{L}$  pripremljenog internog standarda metil tridekanoata, 200  $\mu\text{L}$  otopine kloroform : metanol u omjeru 2 : 1 (v/v) i 300  $\mu\text{L}$  otopine 0,6 M HCl : metanol. Epruvete su zatvorene s plastičnim čepom te su nakon vorteksiranja stavljene u vodenu kupelj na  $85\text{ }^\circ\text{C}$  kroz sat vremena radi provođenja reakcije transesterifikacije. Nakon sat vremena, uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu kroz 15 minuta. Ohlađenim uzorcima je dodan 1 mL heksana, nakon čega je smjesa dobro promiješana vorteksiranjem. Sadržaj je ostavljen na sobnoj temperaturi kroz 1 – 4 sata kako bi se faze razdvojile. Gornja, heksanska faza koja sadrži estere masnih kiselina je izdvojena u čiste viale. Prije analize na plinskom kromatografu, uzorci su razrijeđeni 5 puta s heksanom kako bi koncentracije bile unutar kalibracijske krivulje. Razrijeđenje je pripremljeno tako da je u 400  $\mu\text{L}$  heksana dodano 100  $\mu\text{L}$  izdvojene heksanske faze. Razrijeđenim uzorcima je dodano 12,5  $\mu\text{L}$  standarda pentadekana koncentracije  $1\text{ mg mL}^{-1}$  (5  $\mu\text{L}$  standarda na 200  $\mu\text{L}$  uzorka).

Uzorci su analizirani na plinskom kromatografu GC-2010 Plus AF (Shimadzu, Japan) s masenim detektorom (FID). Kao mobilna faza korišten je helij uz protok  $1,2\text{ mL min}^{-1}$ . Identifikacija pojedinih masnih kiselina je provedena usporedbom vremena zadržavanja metilnih estera standardne smjese 37 masnih kiselina (smjesa F.A.M.E C4 – C24) (eng. *Fatty Acid Methyl Esters*) analiziranih u istim uvjetima. Dobivene koncentracije metilnih estera masnih kiselina izražene su masenim udjelom [%] pojedine masne kiseline u uzorku prema količini internog standarda C13 : 0ME. Pri izračunu su korištene jednadžbe [11] i [12]:

$$m_{\text{FAME}_{\text{C13 norm}}} = \frac{\gamma_{\text{Ci}}}{\gamma_{\text{C13}}} \cdot m_{\text{C13}} \quad [11]$$

$$\omega_{\text{Ci/s.tv.}} = \frac{m_{\text{FAME}_{\text{C13 norm}}}}{m_{\text{s.tv.}}} \cdot 100 \quad [\%] \quad [12]$$

gdje je:

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

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

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

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

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

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



### 3.2.4.11. Određivanje pokazatelja uspješnosti bioprocesa

Parametri uspješnosti bioprocesa određeni su prema jednadžbama [13], [14] i [15]:

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \cdot \ln \frac{X}{X_0} \quad [13]$$

gdje je:

$\mu$  - specifična brzina rasta [ $\text{h}^{-1}$ ]

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

$X_0$  - početna koncentracija biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$\Delta t$  - vremenski interval ( $t_n - t_0$ ).

$$\text{Pr}_X = \frac{X}{t_u} \quad [14]$$

gdje je:

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

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

$t_u$  - trajanje uzgoja [dan].

$$\text{Pr}_L = \frac{\omega_L \cdot X}{t_u} \quad [15]$$

gdje je:

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

$\omega_L$  - udio lipida u suhoj tvari biomase

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

$t_u$  - trajanje uzgoja [dan].

***REZULTATI I RASPRAVA***

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati sastava biomase i uspješnosti provedenih uzgoja mikroalge *Nannochloropsis* sp. u otvorenim sustavima.

U nastavku poglavlja prikazan je elaborat tehničko-tehnološkog rješenja za postrojenje za proizvodnju biodizela prema projektnom zadatku.

### 4.1. REZULTATI UZGOJA MIKROALGI

U ovom poglavlju prikazani su i opisani rezultati fototrofnog šaržnog uzgoja s pritokom supstrata mikroalge *Nannochloropsis* sp. u open pond sustavu i u barbotirajućoj koloni. Također, su prikazani i rezultati uspješnosti izdvajanja biomase mikroalge kemijskom flokulacijom.

Kao što je prethodno navedeno, mikroalge iz roda *Nannochloropsis* su zelene alge s velikim potencijalom u proizvodnji lipida. U skladu s tim, cilj ovog istraživanja bio je usmjeren prema ispitivanju sastava biomase kao i praćenju rasta u svrhu određivanja mogućnosti primjene lipida mikroalgi u proizvodnji biodizela.

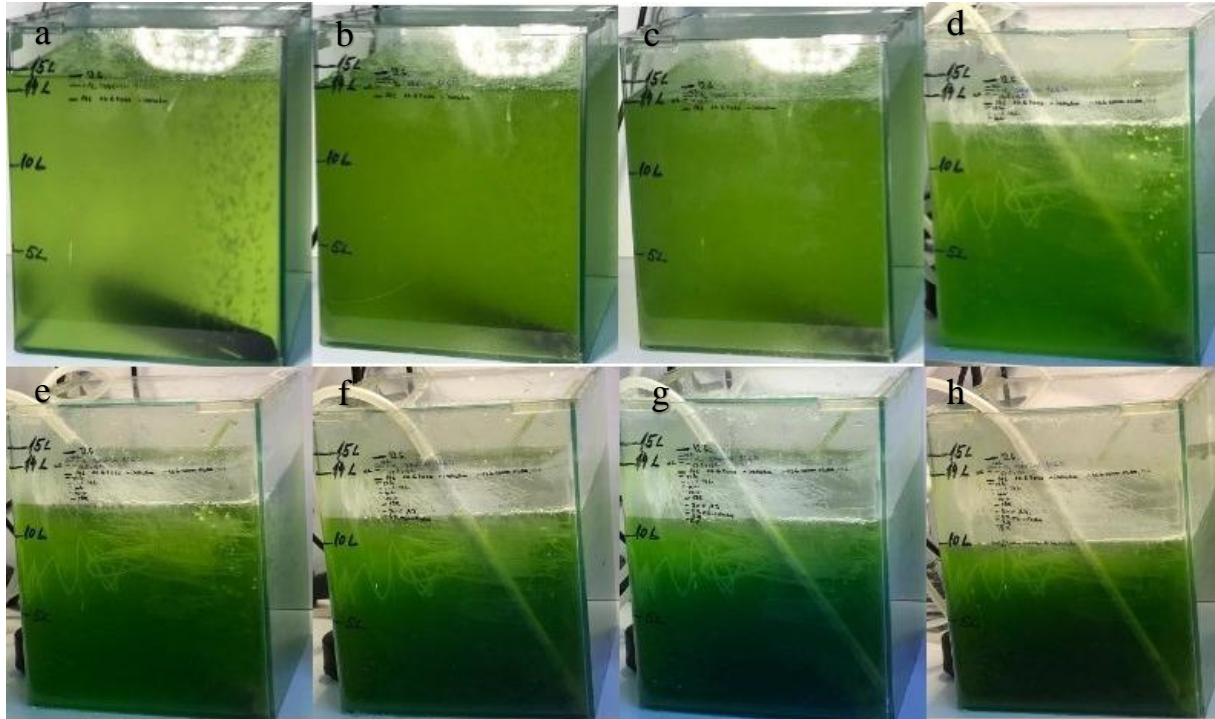
Kao radni mikroorganizam u ovom istraživanju korišten je soj mikroalge D3 koji je izoliran iz Jadranskog mora u okolini Šibenika u ožujku 2018. godine. Prema morfologiji ova izolirana mikroalga okarakterizirana je kao *Nannochloropsis* sp.

#### 4.1.1. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata u otvorenom bazenu

Nakon provedenog uzgoja inokuluma na način opisan u poglavlju 3.2.1., započet je fototrofni uzgoj u otvorenom bazenu. Stakleni bazen opremljen je raspršivačem zraka koji je spojen na cijev za dovod zraka. Za uspostavljanje fototrofnih uvjeta uzgoja, bazen je osvijetljen umjetnim izvorom svjetlosti toplo – bijele boje pomoću LED svjetla (Model: 001412, Ferrotehna) prema režimu 12 sati svjetlo i 12 sati tama. Uzgoj je proveden na Guillardovoj (f/2) podlozi bez dodatka izvora silicija, a koja je pripravljena na način opisan u poglavlju 3.1.4. U otvorenom bazenu ukupnog volumena 16 L, dodano je 14 L početnog volumena hranjive podloge koja je inokulirana s 1 L fototrofno uzgojenog inokuluma. Temperatura podloge je tijekom uzgoja bila između 22 i 24,8 °C, a pH-vrijednost podloge varirala je od 8,09 do 8,78. Cilj uzgoja u otvorenom bazenu bio je postizanje visoke koncentracije biomase nakon čega je uslijedila limitacija fosforom kao jedan od osnovnih mehanizama usmjeravanja metabolizma prema nakupljanju rezervnih tvari u stanici – lipida. Uzgoj je vođen do kraja eksponencijalne

faze i ulaska kulture u stacionarnu fazu rasta, a ukupno je trajao 28 dana. Na slici 9 prikazan je tijek uzgoja u otvorenom bazenu od inokulacije do posljednjeg dana uzgoja.

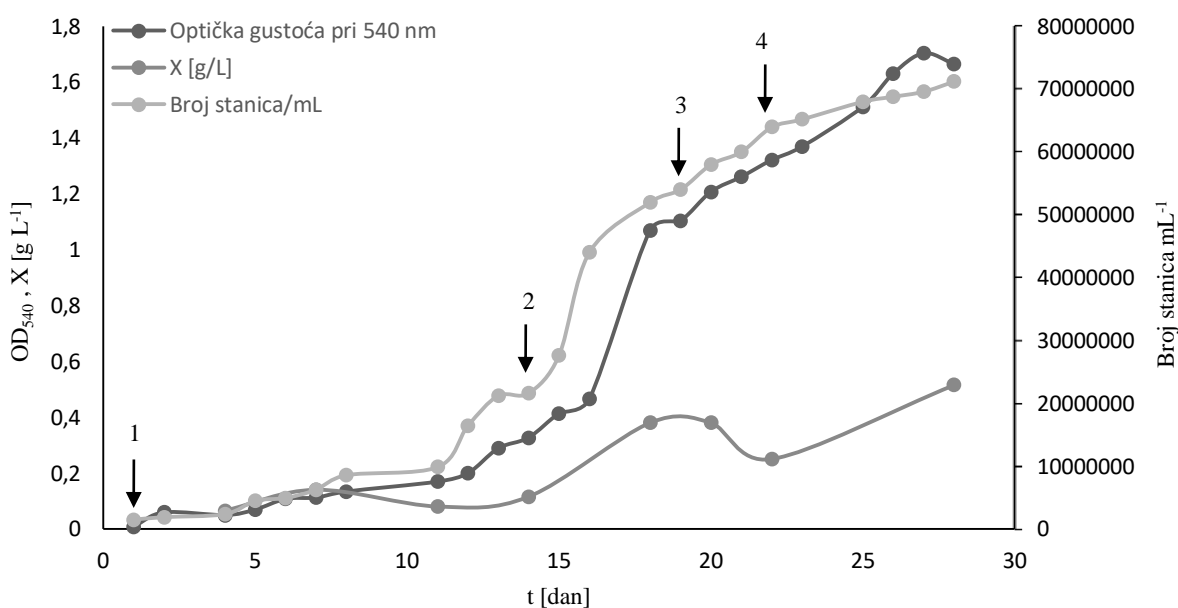
U svrhu praćenja rasta kulture i analize sastava biomase mikroalgi svakodnevno je izuziman uzorak kulture. Uzorcima je određivana optička gustoća, koncentracija biomase gravimetrijski i broj stanica po mililitru. Svaka tri do četiri dana određivana je koncentracija limitirajućih nutrijenata potrebnih za rast (dušik i fosfor).



**Slika 9.** Praćenje tijeka rasta mikroalgi iz roda *Nannochloropsis* u otvorenom bazenu (a) 1. dan uzgoja (b) 5. dan uzgoja (c) 8. dan uzgoja (d) 14. dan uzgoja (e) 18. dan uzgoja (f) 21. dan uzgoja (g) 25. dan uzgoja (h) 28. dan uzgoja (vlastita fotografija).

Uzgoj u otvorenom bazenu proveden je uz dodatak natrijevog bikarbonata kao dodatnog izvora ugljika. Tijekom eksperimenta prihrana s bikarbonatom dodana je ukupno tri puta: prvog, 19.-tog i 22.-og dana uzgoja. U podlogu je dodan odgovarajući volumen koncentrirane otopine  $\text{NaHCO}_3$  kako bi se postigla koncentracija bikarbonata od  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  u kulturi. Prihrana s izvorima dušika i fosfora provedena je 14.-tog dana uzgoja tako da je dodano: 19,3 mL otopine  $\text{NaNO}_3$  koncentracije  $75 \text{ g L}^{-1}$ , 14,1 mL otopine  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  koncentracije  $5 \text{ g L}^{-1}$ , 14,1 mL otopine elemenata u tragovima i 7 mL otopine vitamina. Prihrane s izvorima dušika, fosfora i natrijevog bikarbonata označene su strelicama na slici 11 na kojoj se vidi značajan porast koncentracije dušika s  $5,1 \text{ mg L}^{-1}$  na  $18,7 \text{ mg L}^{-1}$  i porast koncentracije fosfora s  $0,002 \text{ mg L}^{-1}$  na  $0,272 \text{ mg L}^{-1}$ . Tijekom vremena uzgoja dolazi do pada koncentracije nutrijenata uslijed rasta

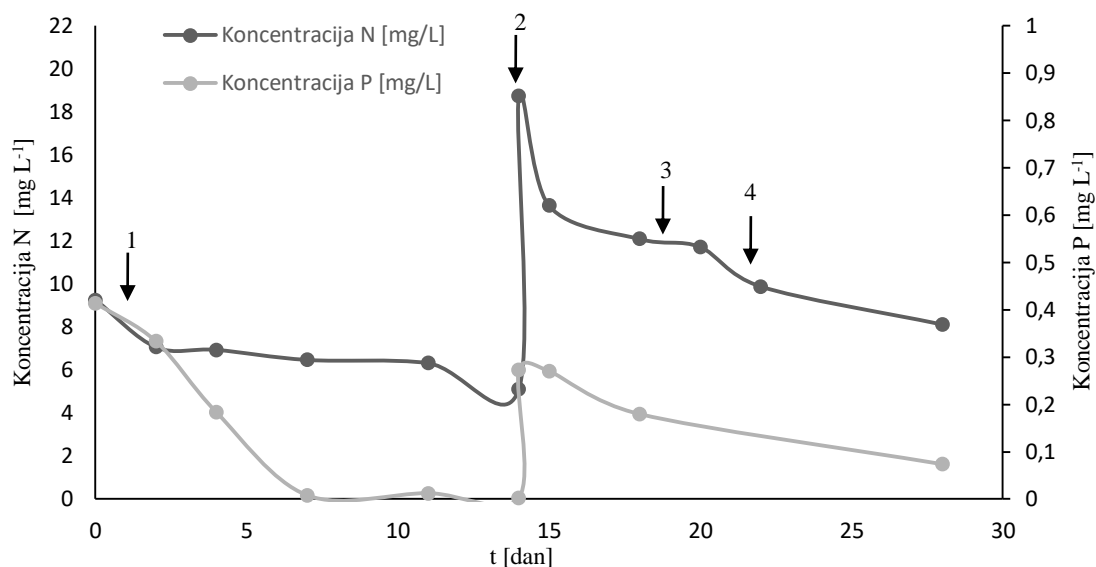
kulture. Naknadnom analizom uzoraka podloge uočen je značajan pad koncentracije fosfora između 7. i 14. dana uzgoja. U navedenom vremenskom razdoblju koncentracija fosfora je s  $0,007 \text{ mg L}^{-1}$  pala na  $0,0021 \text{ mg L}^{-1}$ . Međutim, na slici 10 koja prikazuje promjenu optičke gustoće i broja stanica tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata te promjenu koncentracije suhe tvari vidljivo je da u periodu od 7. do 14. dana uzgoja koncentracija stanica mikroalgi nije u padu iako u navedenom razdoblju traje limitacija fosforom. U uvjetima suviška dušika omogućeno je nakupljanje nezasićenih masnih kiselina i veća produktivnost biomase. S druge strane, porast optičke gustoće i broja stanica može biti rezultat isparavanja vode kao sastavne komponente podloge što je dovelo do koncentriranja kulture. Smanjenje broja stanica po mililitru u kulturi upućivalo je na ulazak kulture u stacionarnu fazu rasta, te je kultura zadržana u toj fazi nekoliko dana kako bi se u stanicama akumulirali lipidi. Naime, prema radu Su i suradnika (2010) nakupljanje lipida najčešće se odvija upravo u fazi usporenog rasta i stacionarnoj fazi.



**Slika 10.** Promjena optičke gustoće, broja stanica i koncentracije suhe tvari biomase tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u otvorenom bazenu. Brojevi predstavljaju prihrane: **1-** prihrana s  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ , **2-** prihrana s  $75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ ,  $5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $14,1 \text{ mL}$  otopine elemenata u tragovima i  $7 \text{ mL}$  otopine vitamina, **3 i 4-** prihrane s  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ .

Kultura mikroalgi je u periodu između jedanaestog i osamnaestog dana uzgoja bila u eksponencijalnoj fazi rasta i u tom periodu dosegla je specifičnu brzinu rasta od  $0,0099 \text{ h}^{-1}$ . Koncentracija biomase mikroalgi tada je iznosila  $0,08 \text{ g L}^{-1}$  jedanaestog odnosno  $0,38 \text{ g L}^{-1}$  osamnaestog dana uzgoja. Najveća ostvarena produktivnost biomase postignuta je osamnaestog

dana uzgoja, a iznosila je  $0,879 \text{ mg L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ . Identični rezultati zabilježeni su u radu Bellou i Aggelis (2013) u kojem se navodi da je pri specifičnoj brzini rasta mikroalge *Nannochloropsis salina* od  $0,007 \text{ h}^{-1}$  postignuta koncentracija biomase od  $0,108 \pm 0,0086 \text{ g L}^{-1}$ . Koncentracija biomase nakon inokulacije je iznosila  $0,065 \text{ g L}^{-1}$ , a na kraju uzgoja  $0,515 \text{ g L}^{-1}$ .



**Slika 11.** Promjena koncentracije dušika i fosfora tijekom fototrofnog uzgoja u otvorenom bazenu. Brojevi predstavljaju prihrane: **1**- prihrana s  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ , **2**- prihrana s  $75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ ,  $5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $14,1 \text{ mL}$  otopine elemenata u tragovima i  $7 \text{ mL}$  otopine vitamina, **3** i **4**- prihrane s  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ .

#### 4.1.1.1. Sastav makromolekula

Među ciljevima istraživanja bilo je istražiti sastava biomase mikroalgi (proteina, ugljikohidrata, lipida i pigmenata) te određivanje profila masnih kiselina, a rezultati su prikazani u nastavku. U tablici 9 prikazani su udjeli analiziranih makromolekula u stanicama mikroalgi.

Udio proteina u biomasi određen je metodom po Lowry-ju (poglavlje 3.2.4.6.). Iz priložene tablice vidljivo je da je sadržaj proteina na početku uzgoja znatno niži ( $4,701 \%$  -  $7,597 \%$ ), a da se nakon jedanaestog dana uzgoja povećava na  $13,991 \%$  te se do kraja uzgoja nije značajnije mijenjao. Prema radu Camacho – Rodríguez i suradnika (2013) navodi se da pri uvjetima niže koncentracije dušika dolazi do smanjenja fotosintetske aktivnosti i preusmjerenja metaboličkih procesa prema sintezi lipida i ugljikohidrata uz smanjenje sadržaja proteina. Međutim, smanjenje udjela proteina uočeno je tek zadnjeg dana uzgoja što je najvjerojatnije posljedica pregradnje.

Udio ugljikohidrata određen je za 22. i 28. dan uzgoja kada je količina sintetizirane biomase bila dostatna za provedbu analize iz poglavlja 3.2.4.7. Kako je navedeno u radu Camacho – Rodríguez i suradnika, iscrpljivanjem dušika iz hranjive podloge raste udio ugljikohidrata. U skladu s literaturom, 22.-og dana uzgoja udio ugljikohidrata je bio 5,344 %, a 28.-og dana uzgoja 6,603 %. Poznato je da stanice zelenih mikroalgi ugljikohidrate akumuliraju u formi škroba (Mayers i sur., 2013 ). U skladu s tim, u kiselinskim hidrolizatima najzastupljeniji monosaharid je bila glukoza s udjelom od 45,88 % 22.-og dana uzgoja i 42,48 % u ukupnim ugljikohidratima zadnjeg dana uzgoja. Osim glukoze, u uzorcima su detektirani i maltoza, galaktoza, fukoza te L-ramnoza. U tablici 8 prikazani su udjeli šećera u uzorcima.

**Tablica 8.** Prikaz promjene sastava ugljikohidrata u stanicama mikroalgi *Nannochloropsis* sp..

Ugljikohidrati	Vrijeme uzgoja [dan]	
	22	28
Glukoza	45,883	42,482
Maltoza	16,942	16,318
Galaktoza	9,623	20,869
Fukoza	27,553	19,864
L-ramnoza	-	0,467

Na sadržaj lipida u biomasi mikroalgi iz roda *Nannochloropsis* utječu mnogi čimbenici poput: intenziteta svjetlosti, saliniteta te koncentracija dušika i fosfata u hranjivoj podlozi (Pal i suradnici, 2011; Mühlroth i sur. 2017). Iz tablice 9 vidljivo je da udio lipida raste do jedanaestog dana uzgoja. Limitacija fosforom utječe na preraspodjelu različitih klasa lipida u stanici mikroalge *N. oceanica*. Razgrađuju se fosforilirani lipidi te se sintetiziraju lipidi bez fosfora. U mikroalgi *Chlorella* zamijećeno je da stanice brže reagiraju na nedostatak fosfora nego dušika u podlozi. Naime stanice najčešće sadrže dovoljno dušika (intermedijeri i proizvodi metaboličkih puteva, građevne jedinice i makromolekule) te je potrebno duže vrijeme rasta u podlozi bez dušika da stanice prestanu rasti te da se uoči razlika u sastavu makromolekula kao posljedica promjene u metabolizmu stanice. Učinak limitacije fosforom je brži te se kroz kraće vrijeme uočava promjena u udjelu makromolekula tj. lipida kao što je to zamijećeno u mikroalgi *Chlorella kessleri* (Shrestha i sur., 2020). Dodatak izvora fosfora četrnaestog dana uzgoja utječe na stagnaciju udjela lipida od osamnaestog do dvadeset i drugog dana uzgoja, nakon čega posljednjeg dana uzgoja vrlo niska koncentracija fosfora dovodi do ponovnog rasta udjela lipida (slika 11, tablica 9). Na ovaj način potvrđeni su literaturni navodi

da su promjene udjela rezervnih makromolekula posljedica promjene koncentracije dušika i fosfora u podlozi. Nakon prihrane i pada udjela lipida, daljnjom potrošnjom nutrijenata koji pred kraj uzgoja postaju limitirajući, ponovno dolazi do povećane akumulacije lipida koja do kraja uzgoja doseže 13,187 %. Osim dušika, za sintezu lipida ključan je i izvor ugljika. S obzirom na dodatak otopine natrijevog bikarbonata koncentracije  $75 \text{ g L}^{-1}$  (500 mL prvog dana uzgoja te po 250 mL devetnaestog i dvadeset i drugog dana uzgoja), ugljik nije razmatran kao limitirajući faktor u akumulaciji lipida.

**Tablica 9.** Prikaz promjene udjela makromolekula u stanicama mikroalgi *Nannochloropsis* sp. tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u otvorenom bazenu.

Vrijeme uzgoja [dan]	Proteini [%]	Ugljikohidrati [%]	Lipidi [%]
4	4,701	-	2,583
7	7,597	-	6,001
11	13,991	-	8,037
14	11,551	-	7,238
18	9,831	-	8,368
20	10,795	-	9,478
22	17,761	5,344	9,341
28	12,859	6,603	13,187

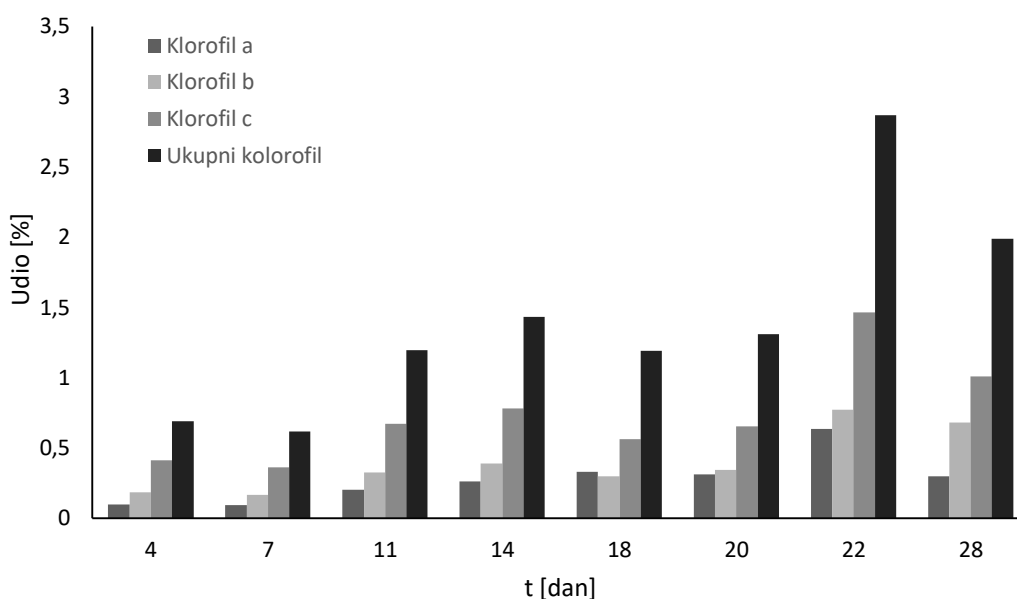
#### 4.1.1.2. Sastav pigmenata

Prema istraživanju Faé Neto i suradnika (2018) mikroalge iz roda *Nannochloropsis* sadrže žuto – zeleni kloroplast koji je bogat klorofilom *a* (uz izostanak klorofila *b* i *c*),  $\beta$ -karotenom i različitim ksantofilima poput: violaksantina, kantaksantina, astaksantina, neoksantina, zeaksantina te luteina na temelju analize na HPLC uređaju. Ksantofili su većinom pigmenti žute boje koji imaju dvije ključne funkcije: apsorpciju energije za korištenje u fotosintezi te zaštita klorofila od oštećenja uzrokovanih svjetlošću. Udio klorofila je određen spektrofotometrijskom metodom koja je opisana u poglavlju 3.2.4.5.

Na slici 12 prikazani su udjeli klorofila *a*, *b* i *c* te udio ukupnih klorofila u biomasi mikroalgi. Najmanji udio klorofila određen je sedmog dana uzgoja kada je udio klorofila *a* iznosio 0,09 %, klorofila *b* 0,166 % i klorofila *c* 0,362 %. Najveći udio klorofila uočen je dvadeset i drugog dana uzgoja nakon dodatka otopine natrijevog bikarbonata kada je iznosio 2,868 % biomase mikroalgi. Posljednjeg dana uzgoja kao posljedica iscrpljivanja nutrijenata iz



hranjive podloge dolazi do pada udjela klorofila. Tijekom kompletnog uzgoja najviša je bila koncentracija klorofila *c*, a najmanje klorofila *a*.



**Slika 12.** Prikaz promjene udjela klorofila *a*, klorofila *b* i klorofila *c* te promjene ukupnog udjela klorofila *a*, *b* i *c* u biomasi mikroalgi tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

#### 4.1.1.3. Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima

Identifikacija i kvantifikacija masnih kiselina u ukupnim lipidima mikroalgi provedena je prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.4.10. Sastav masnih kiselina određen je: četvrti, sedmi, jedanaesti, četrnaesti, osamnaesti, dvadeseti, dvadeset i drugi te dvadeset i osmi dan uzgoja, a u tablici 10 prikazane su promjene udjela masnih kiselina u biomasi.

Najzastupljenije masne kiseline tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata su: zasićene masne kiseline C16:0 (palmitinska kiselina) i C17:0 (heptadekanska kiselina) te višestruko nezasićene masne kiseline C18:2 cis 9,12 (linolna kiselina) i C18:3 cis 9,12,15 ( $\alpha$ -linolenska kiselina). U svim uzorcima detektirana je manja količina C14:0 (miristinske kiseline), C14:1 cis 9 (miristoleične kiseline) i C15:1 cis 10 (pentodekanoične kiseline). S udjelima između 3,04 % i 6,7 % u svim uzorcima identificirana je palmitoleinska kiselina. Udjeli pojedinih masnih kiselina značajno ovise o uvjetima i načinu uzgoja kao i o koncentraciji nutrijenata u hranjivoj podlozi te vrsti mikroalge. Ma i suradnici (2014) su odredili profile masnih kiselina za 9 vrsta mikroalgi iz roda *Nannochloropsis*. Usporedbom dobivenih rezultata šaržnog uzgoja s podacima u navedenom radu, vidljivo je da profil masnih kiselina mikroalge iz ovog istraživanja najviše odgovara profilu masnih kiselina mikroalge *Nannochloropsis*

*limnetica* CCMP505 (Ma i sur., 2014). Međutim, potrebno je istaknuti da uzgoj mikroalge *Nannochloropsis limnetica* CCMP505 nije proveden u morskoj već slatkoj vodi.

Udio zasićenih masnih kiselina nije se značajnije mijenjao tijekom uzgoja. Na početku udio SFA je iznosio 39,17 %, 20.-tog dana uzgoja je iznosio 46,47 %, a posljednjeg 43,5 %. Promjena udjela zasićenih masnih kiselina najviše je povezana s promjenom udjela palmitinske kiseline kao najzastupljenije zasićene masne kiseline. Krienitz i Wirth (2006) dokazali su da kod uzgoja mikroalge *N. limnetica* pri uvjetima uzgoja identičnim onima u ovom radu, udio masnih kiselina ovisi o koncentraciji fosfora u hranjivoj podlozi. Povećanjem koncentracije fosfora uočeno je i povećanje koncentracije palmitinske kiseline. Upravo taj trend primijećen je kod šaržnog uzgoja s pritokom supstrata. Koncentracija fosfora bila je vrlo niska u periodu od sedmog do četrnaestog dana uzgoja. U tablici 10 u navedenom periodu vidljiv je pad udjela palmitinske kiseline s 22,2 % sedmog dana na 17,77 % četrnaestog dana. Nakon prihrane koja je provedena 14.-tog dana uzgoja, vidljiv je ponovni porast udjela palmitinske kiseline na 21,337 % te ponovni pad do kraja uzgoja zbog potrošnje fosfora na konačnih 16,997 %. Na početku uzgoja detektirane su i kapronska, kaprilna, undekanska te lignocerična kiselina čije su koncentracije u kasnijim uzorcima bili ispod granice detekcije ili nisu opće detektirane. 14.-og, 20.-og i 28.-og dana uzgoja kvantificirane su visoke koncentracije stearinske kiseline koja je prekursor za sintezu dugolančanih zasićenih i nezasićenih masnih kiselina. Udio je bio 12,628 % 14.-og dana, 12,883 % 20.-og dana, 12,351 22.-og dana i 11,35 % posljednjeg dana uzgoja. Ostale dane uzgoja, koncentracija stearinske kiseline je bila ispod granice detekcije. Iz tablice 10 vidljivo je da 14.-og, 20.-og i 28.-og dana uzgoja s povećanjem udjela stearinske kiseline dolazi do pada udjela linolne i  $\alpha$ -linolenske kiseline. Udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina bio je u blagom padu, s početnih 7,235 % na kraju uzgoja iznosio je 4,649 %.

Najzastupljenija jednostruko zasićena masna kiselina je palmitoleinska kiselina čiji je udio četvrtog dana uzgoja bio 5,506 % odnosno 3,04 % 28.-mog dana uzgoja.

Udio višestruko nezasićenih masnih kiselina je tijekom cijelog uzgoja bio najviši te se nezatno smanjio s početnih 53,591 % na konačnih 51,851 %.

**Tablica 10.** Promjena sastava metil estera masnih kiselina u ukupnim lipidima tijekom fototrofnog šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u otvorenom bazenu.

<b>Vrijeme uzgoja [dan]</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>22</b>	<b>28</b>
<b>Metil ester masne kiseline</b>	<b>Udio [%]</b>							
<b>C6:0, kapronska (heksanska) kiselina</b>	2,636	1,564	1,151	-	-	-	-	-
<b>C8:0, kaprilna (oktanska) kiselina</b>	-	0,958	-	-	-	-	-	-
<b>C11:0, undekanska kiselina</b>	-	0,276	-	-	-	-	-	-
<b>C14:0, miristinska (tetradekanska) kiselina</b>	0,202	1,172	0,525	0,154	0,457	0,388	0,395	1,102
<b>C14:1 cis 9, miristoleična kiselina</b>	1,104	0,177	1,063	0,868	1,131	1,002	0,976	0,981
<b>C15:0, pentadekanska kiselina</b>	0,167	0,190	0,122	*	*	*	-	*
<b>C15:1 cis 10, pentadekanoična kiselina</b>	0,625	1,050	1,096	0,610	0,748	0,527	0,544	0,629
<b>C16:0, palmitinska (heksadekanska) kiselina</b>	23,528	22,200	20,973	17,767	21,337	17,900	17,755	16,997
<b>C16:1 cis 9, palmitoleinska kiselina</b>	5,506	6,703	5,124	3,279	4,219	3,596	3,604	3,040
<b>C17:0, heptadekanska kiselina</b>	12,641	12,008	14,423	13,675	16,546	15,295	14,547	14,051
<b>C17:1 cis 10, heptadekanoična kiselina</b>	*	-	0,089	*	*	*	*	*
<b>C18:0, stearinska (oktadekanska) kiselina</b>	*	*	*	12,628	*	12,883	12,351	11,350
<b>C18:1 cis 9, oleinska kiselina</b>	*	*	*	*	*	*	*	*
<b>C18:2 cis 9,12, linolna kiselina</b>	23,808	22,307	23,689	22,567	24,618	22,317	22,928	24,157
<b>C18:3 cis 9,12,15, <math>\alpha</math>-linolenska kiselina</b>	29,783	31,027	31,746	28,453	30,943	26,092	26,901	27,694
<b>C24:0, lignocerična kiselina</b>	-	0,369	-	-	*	*	-	*

<b>C24:1 cis 15, nervonska kiselina</b>	-	-	-	*	-	-	-	-
<b>C22:6 cis 4,7,10,13,16,19 dokosaheksaenska kiselina</b>	*	*	*	*	*	*	*	*
<b>SFA<sup>1</sup></b>	39,173	38,737	37,193	44,222	38,340	46,466	45,047	43,500
<b>MUFA<sup>2</sup></b>	7,235	7,930	7,372	4,757	6,098	5,125	5,123	4,649
<b>PUFA<sup>3</sup></b>	53,591	53,333	55,435	51,021	55,562	48,408	49,829	51,851

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

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

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

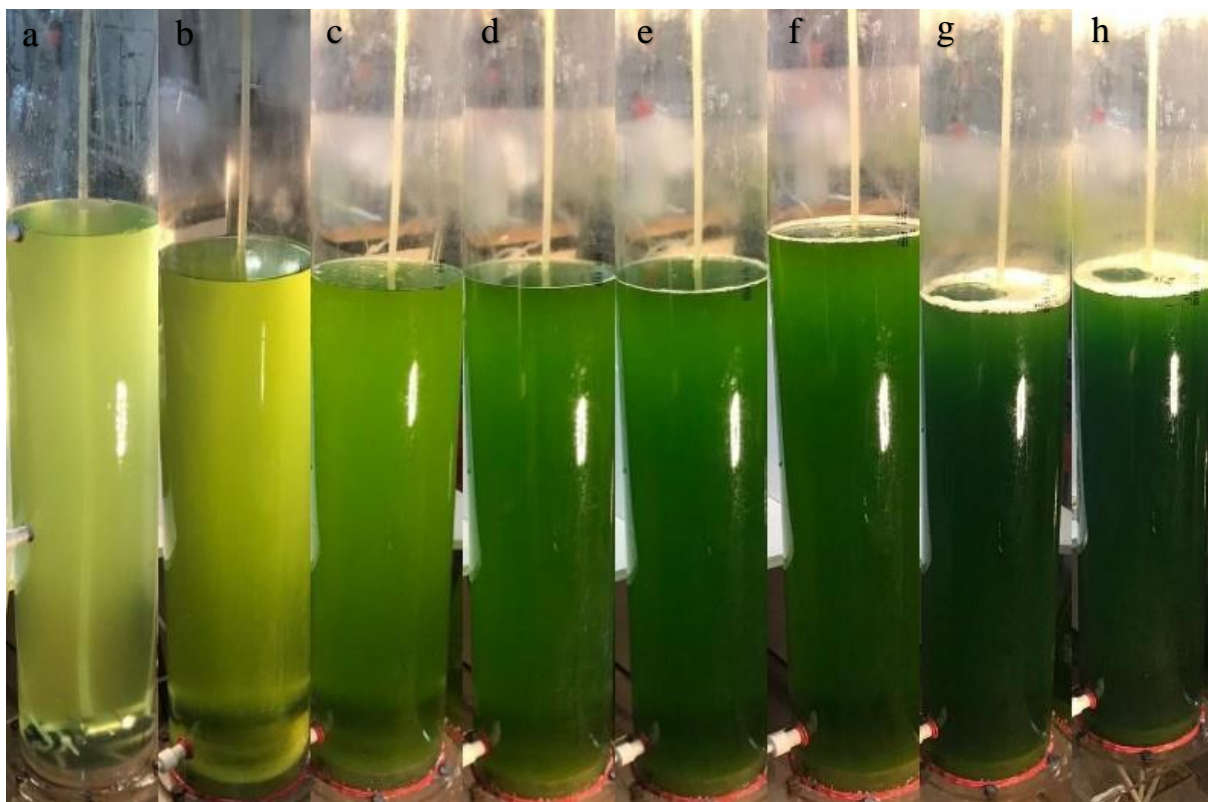
<sup>3</sup>PUFA (eng. *polyunsaturated fatty acids*) višestruko nezasićene masne kiseline.

#### 4.1.2. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata u barbotirajućoj koloni

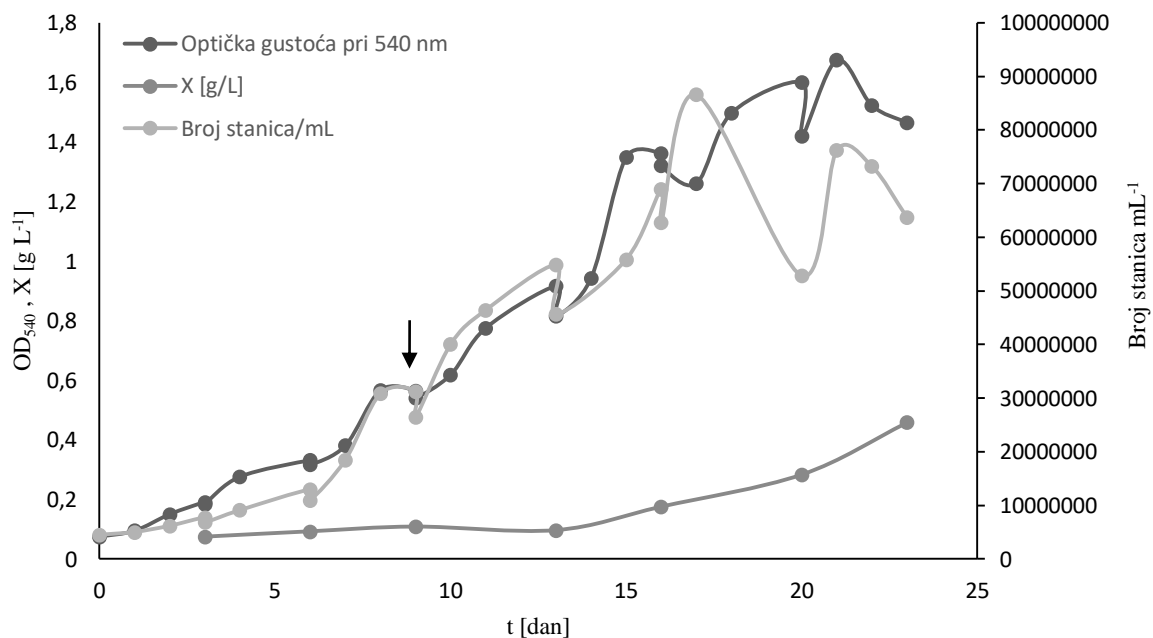
Šaržni uzgoj s pritokom supstrata proveden je u barbotirajućoj koloni opremljenoj raspršivačima zraka koji su smješteni na dnu kolone. Za osvjetljenje kulture korištene su LED lampe kao izvor svjetlosti toplo – bijele boje uz režim 12 sati svjetlo i 12 sati tama. Uzgoj je proveden na Guillardovoj ( $f/2$ ) podlozi koja je pripremljena prema uputama iz poglavlja 3.1.4. Kolona ukupnog volumena 34 L ispunjena je s 20 L hranjive podloge koja je naciepljena 1 L inokuluma. Inokulum za ovaj kultivacijski sustav je izuzet iz otvorenog bazena 26.-tog dan uzgoja, kada je koncentracija stanica iznosila  $6,88 \cdot 10^7$  stanica po mililitru. Tijekom uzgoja temperatura podloge je bila u rasponu od 21,4 °C do 24,5 °C dok je pH-vrijednost bila u intervalu od 7,74 do 8,16. Kao i kod uzgoja u otvorenom bazenu, cilj je bio postizanje visoke koncentracije biomase te usmjeravanje metabolizma u smjeru nakupljanja lipida uslijed limitacije fosforom. Uzgoj je vođen 23 dana odnosno do ulaska kulture u stacionarnu fazu rasta. Na slici 13 prikazan je tijek rasta mikroalgi od inokulacije do 23. dana uzgoja.

Uzorak je svakodnevno izuziman s ciljem praćenja rasta kulture tako da je mjerena optička gustoća i određivan broj stanica po mililitru. U razmaku od tri do četiri dana izuziman je veći volumen podloge od 500 mL iz kojeg su pripremljeni uzorci za analize sastava biomase i određivanje koncentracije limitirajućih supstrata potrebnih za rast stanica (dušik i fosfor).

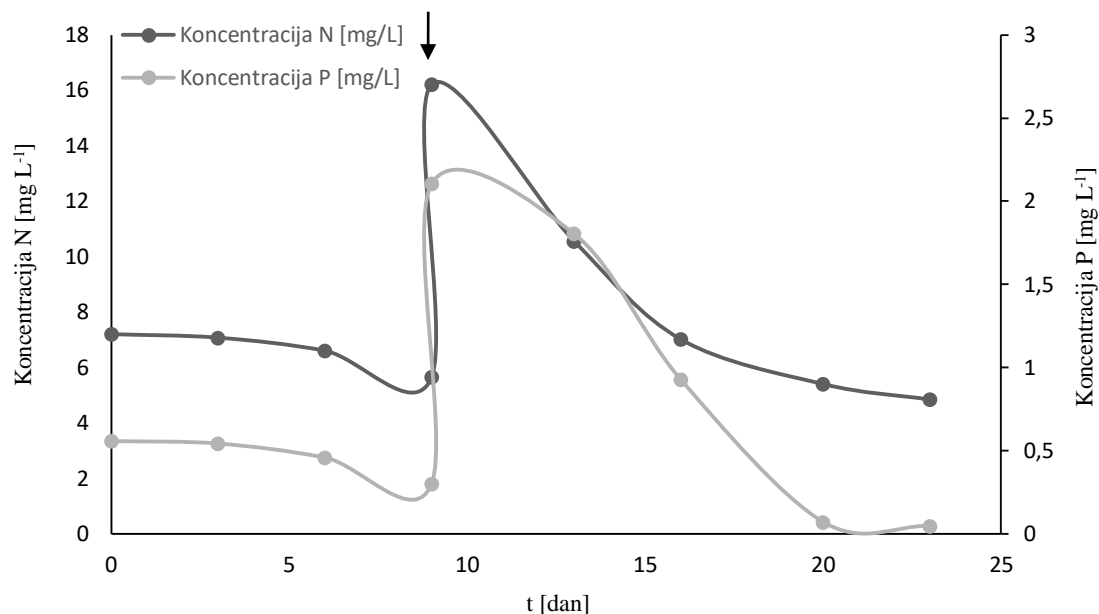
Uzgoj je vođen šaržno s pritokom supstrata tako da je nakon izuzimanja većeg uzorka od 500 mL, volumen u koloni nadomješten dodatkom sterilne demineralizirane vode do početnog volumena od 21 L. Izmjena volumena provedena je ukupno šest puta: trećeg, šestog, devetog, trinaestog, šesnaestog i dvadesetog dana, a kultivacija je vođena bez dodatka natrijevog bikarbonata. Prihrana s izvorom dušika i fosfora provedena je devetog dan uzgoja tako da je dodano: 20 mL otopine  $\text{NaNO}_3$  i 20 mL otopine  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  što je strelicom označeno na slikama 14 i 15. Uočeno je povećanje koncentracije dušika s  $5,65 \text{ mg L}^{-1}$  na  $16,21 \text{ mg L}^{-1}$  kao i povećanje koncentracije fosfora s  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  na  $2,105 \text{ mg L}^{-1}$ . Tijekom uzgoja dolazi do kontinuiranog pada koncentracije nutrijenata uslijed rasta kulture (slika 15). Posljednja tri dana uzgoja uočena je vrlo niska koncentracija fosfora koja je bila u intervalu od  $0,069 \text{ mg L}^{-1}$  do  $0,045 \text{ mg L}^{-1}$ . U skladu s tim, na slici 14 koja prikazuje promjenu optičke gustoće i broja stanica te promjenu koncentracije suhe tvari biomase tijekom šaržnog uzgoja, vidljivo je da 20.-tog dana uzgoja dolazi do značajnog pada u broju stanica po mililitru i manjeg pada optičke gustoće. Nakon stagnacije rasta kulture, uzgoj je završen. Praćenje tijeka rasta prikazano je na slici 13.



**Slika 13.** Praćenje tijekom rasta mikroalgi iz roda *Nannochloropsis* u barbotirajućoj koloni (a) 1. dan uzgoja (b) 3. dan uzgoja (c) 7. dan uzgoja (d) 10. dan uzgoja (e) 13. dan uzgoja (f) 17. dan uzgoja (g) 21. dan uzgoja (h) 23. dan uzgoja (vlastita fotografija).



**Slika 14.** Promjena optičke gustoće, broja stanica i koncentracije suhe tvari biomase tijekom šaržnog uzgoja u barbotirajućoj koloni. Strelicom je prikazana prihrana s  $75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  i  $5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ .



**Slika 15.** Promjena koncentracije dušika i fosfora tijekom fototrofnog šaržnog uzgoja u barbotirajućoj koloni. Strelicom je prikazana prihrana s  $75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  i  $5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ .

Koncentracija biomase nakon inokulacije je iznosila  $0,0359 \text{ g L}^{-1}$ , a posljednji dan uzgoja  $0,458 \text{ g L}^{-1}$ .

#### 4.1.2.1. Sastav makromolekula

U tablici 11 prikazana je promjena udjela proteina, ugljikohidrata i lipida u izdvojenoj biomasi, a u nastavku rada prikazan je sastav pigmenata te profil masnih kiselina u ukupnim lipidima.

Sadržaj proteina tijekom uzgoja se dosta mijenjao. Iz tablice 11 vidljivo je da je udio proteina na početku procesa najviši (oko 20 %) pa postepeno pada do trinaestog dana uzgoja kada je dodana prihrana (otopina  $\text{NaNO}_3$  koncentracije  $75 \text{ g L}^{-1}$  i otopina  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  koncentracije  $5 \text{ g L}^{-1}$ ). Nakon prihrane udio proteina raste do 22,616 %. Daljnjom potrošnjom supstrata sadržaj proteina ponovo pada i na kraju uzgoja ima udio od 8,813 %. Navedene promjene su očekivane i potvrđene u mnogim radovima jer tijekom perioda smanjene koncentracije izvora dušika očekivano je smanjenje udjela proteina. Dong i suradnici (2013) potvrđuju da mikroalga *N. oceanica* razvija niz fizioloških strategija za preživljavanje perioda smanjene koncentracije dušika. Metabolički odgovori uključuju promjene u sastavu pigmenata, nakupljanje lipida, smanjenje fotosinteze, fiksaciju ugljika te smanjenje koncentracije proteina.

Udio ugljikohidrata analiziran je samo za posljednji dan uzgoja i tada je utvrđeno da je njegov udio iznosio 7,703 %. Udio ugljikohidrata u ovom udjelu sugerira da se u podlozi posljednjeg dana uzgoja nalazi niska koncentracija fosfora koja rezultira skladištenjem rezervnih tvari, odnosno u ovom slučaju ugljikohidrata. U kiselinskom hidrolizatu najzastupljeniji monosaharid je bila galaktoza s udjelom od 37,803 %. Utvrđena je prisutnost još tri monosaharida: glukoze (24,263 %), fukoze (15,528 %) i L-ramnoze (2,804 %) te maltoze (19,603 %).

Udio lipida iznosio je između 4,493 % i 9,022 % što je u skladu s literaturom u kojoj se navodi da je udio lipida mikroalge *Nannochloropsis oculata* kultivirane na f/2 podlozi oko 7,90 %, a kod smanjenja koncentracije dušika za 75 % u odnosu na optimalnu vrijednost taj udio raste do 15,31 % (Converti, 2009).

S obzirom na sve izneseno, fiziološka karakterizacija i primjena proteomičkog pristupa omogućavaju bolje razumijevanje staničnog odgovora mikroalgi na promjene u okolišu. To će u konačnici omogućiti manipulaciju metaboličkim procesima u cilju poboljšanja proizvodnje ulja algi i drugih vrijednih proizvoda.

**Tablica 11.** Prikaz promjene udjela makromolekula u stanicama mikroalgi tijekom šaržnog uzgoja u barbotirajućoj koloni.

Vrijeme uzgoja [dan]	Proteini [%]	Ugljikohidrati [%]	Lipidi [%]
3	20,326	-	6,227
6	20,764	-	7,416
9	17,950	-	4,493
13	22,616	-	8,043
17	11,059	-	9,022
20	-	-	8,339
23	8,813	7,703	7,312

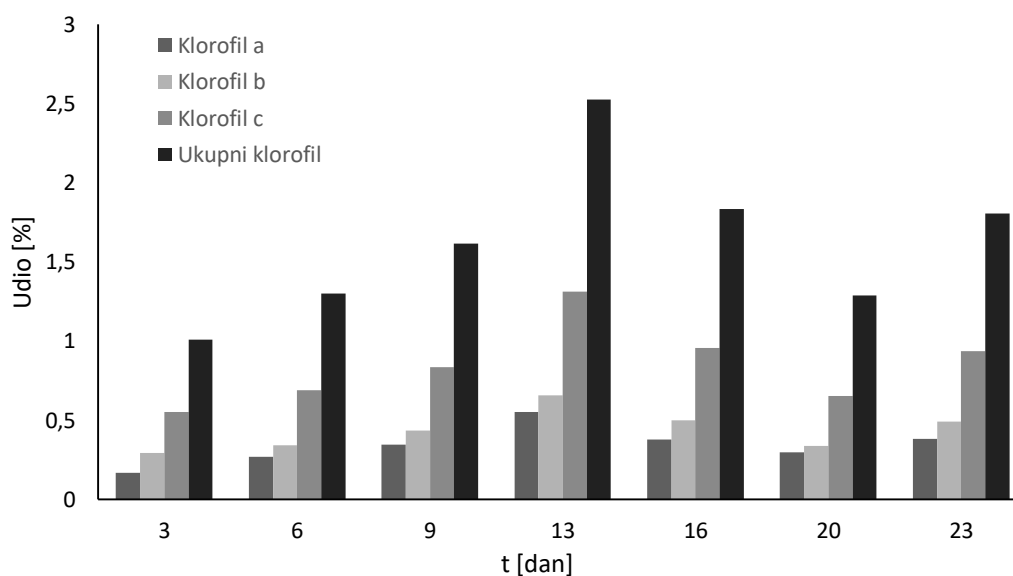
#### 4.1.2.2. Sastav pigmenata

Za ekstrakciju pigmenata iz vlažne biomase korišten je 90 %-tni aceton, a koncentracija pigmenata klorofila *a*, *b* i *c* određena je prema metodi koju su definirali Jeffrey i Humphrey (1975).



Na slici 16 prikazani su udjeli klorofila *a*, klorofila *b* i klorofila *c* kao i udio ukupnih klorofila u biomasi mikroalgi. Najmanji udio klorofila uočen je na početku uzgoja odnosno pri prvoj analizi koja je provedena treći dan kultivacije. Udio klorofila *a* u biomasi iznosio je 0,166 %, udio klorofila *b* 0,292 %, a udio klorofila *c* 0,551 %. Najveći udio fotosintetskih pigmenta postignut je nakon prihrane – trinaestog dan uzgoja. Udio klorofila *a* tada je iznosio 0,552 %, klorofila *b* 0,658 %, a udio klorofila *c* 1,313 %. Potrošnjom limitirajućih supstrata dolazi do pada udjela ukupnih klorofila što je vidljivo kod uzoraka nakon što je provedena prihrana. Na kraju uzgoja udio ukupnih klorofila iznosio je 1,806 % suhe tvari biomase od čega je 0,382 % bilo klorofila *a*, 0,491 % klorofila *b* i 0,934 % klorofila *c*. Kod svih analiza uočeno je da je udio klorofila *c* bio najveći, a udio klorofila *a* najmanji.

Nwe Oo i suradnici (2017) su potvrdili da alge iz roda *Nannochloropsis* pokazuju veliki potencijal u sintezi pigmenta. U navedenom radu, alge iz roda *Nannochloropsis* postigle su veće koncentracije klorofila u odnosu na alge iz roda *Chlorella* koje su priznate kao jedni od organizama s najvišim sadržajem klorofila u prirodi.



**Slika 16.** Prikaz promjene udjela klorofila *a*, klorofila *b* i klorofila *c* te promjene ukupnog udjela klorofila *a*, *b* i *c* u biomasi mikroalgi tijekom šaržnog uzgoja mikroalge *Nannochloropsis* sp. u barbotirajućoj koloni.

#### 4.1.2.3. Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima

Promjena sastava masnih kiselina u ukupnim lipidima mikroalgi tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata prikazana je u tablici 12. Analiza je provedena za: treći, šesti, deveti, trinaesti, sedamnaesti, dvadeseti te dvadeset i prvi dan uzgoja.

Najzastupljenije masne kiseline tijekom šaržnog uzgoja su: zasićene masne kiseline C16:0 (palmitinska kiselina) i C17:0 (heptadekanska kiselina) te višestruko nezasićene masne kiseline C18:2 cis 9,12 (linolna kiselina) i C18:3 cis 9,12,15 ( $\alpha$ -linolenska kiselina). U svim uzorcima detektirani su manji udjeli: C14:0 (miristinske kiseline), C14:1 cis 9 (miristoleične kiseline) te C15:1 cis 10 (pentodekanoične kiseline). S udjelima od 3,994 % do 7,714 % u svim je uzorcima detektirana i C16:1 cis 9 (palmitoleinska kiselina). Vidljivo je da su iste masne kiseline bile u identičnim udjelima prisutne i tijekom šaržnog uzgoja u otvorenom bazenu.

Idealni radni mikroorganizam kao izvor lipida za proizvodnju biodizela trebao bi imati odgovarajući sastav masnih kiselina uz visok udio lipida u biomasi. Knothe (2009) navodi da bi za kvalitetno biodizelsko gorivo, lipidi mikroalgi morali biti što sličniji sastavu masnih kiselina kod većine biljnih ulja. Naime, takva ulja imaju profil masnih kiselina u tipičnom rasponu od C16 do C18 te visok udio zasićenih masnih kiselina. Tijekom uzgoja udio zasićenih masnih kiselina se mijenjao. Udio SFA (eng. *saturated fatty acids*) na početku uzgoja bio je 40,843 %, a na kraju uzgoja doseže maksimalni udio od 62,542 %. Promjena udjela SFA najviše ovisi o promjeni udjela palmitinske kiseline kao najzastupljenije zasićene masne kiseline. Njezin je udio na početku uzgoja 16,146 %, a zatim sedamnaestog dana uzgoja nakon prihrane iznosi 19,867 % te do kraja uzgoja doseže udio od 23,428 %. Trećeg i šestog dana uzgoja kvantificirani su visoki udjeli stearinske kiseline od oko 15 % koja je važna za sintezu dugolančanih masnih kiselina. Do kraja uzgoja, koncentracija stearinske kiseline se povećava na 17,389 %.

Udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina tijekom uzgoja varirao je s početnih 5,721 % trećeg dana uzgoja na maksimalnih 16,341 % devetog dana uzgoja te konačnih 9,579 %. Najzastupljenija MUFA (eng. *monounsaturated fatty acids*) bila je palmitoleinska kiselina čiji je udio bio najviši devetog dana uzgoja i iznosio 7,714 % ukupnih lipida.

Udio višestruko nezasićenih masnih kiselina se tijekom uzgoja dosta mijenjao. S početnih 53,436 % pada na 29,499 % devetog dana uzgoja te na kraju uzgoja ima udio od 27,88 %.

Hoffmann i suradnici (2010) predstavljaju alge iz roda *Nannochloropsis* kao najperspektivnije u proizvodnji eikosapentaenoične kiseline (C20:5 cis 5,8,11,14,17). Također navode da udio ove masne kiseline može varirati od 1,1 % do čak 12 % ovisno o uvjetima i načinu uzgoja. U ovom radu nije detektirano prisustvo navedene masne kiseline.

**Tablica 12.** Promjena sastava metil estera masnih kiselina u ukupnim lipidima tijekom fototrofnog šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u barbotirajućoj koloni.

Vrijeme uzgoja [dan]	3	6	9	13	17	20	21
<b>Metil ester masne kiseline</b>	<b>Udio [%]</b>						
<b>C6:0, kapronska (heksanska) kiselina</b>	0,480	0,360	-	-	-	-	-
<b>C11:0, undekanska kiselina</b>	0,225	0,196	-	-	-	-	-
<b>C12:0, laurinska (dodekanska) kiselina</b>	0,157	0,104	-	-	-	-	-
<b>C14:0, miristinska (tetradekanska) kiselina</b>	0,830	0,164	0,672	0,640	0,634	0,664	1,510
<b>C14:1 cis 9, miristoleična kiselina</b>	0,946	1,036	1,762	1,431	1,374	1,380	1,609
<b>C15:0, pentadekanska kiselina</b>	0,251	-	0,162	*	*	0,154	0,104
<b>C15:1 cis 10, pentadekanoična kiselina</b>	0,576	0,316	0,720	0,593	0,713	0,684	1,492
<b>C16:0, palmitinska (heksadekanska) kiselina</b>	16,146	15,598	33,453	19,866	19,867	19,116	23,428
<b>C16:1 cis 9, palmitoleinska kiselina</b>	4,200	4,332	7,714	4,473	3,994	4,025	4,776
<b>C17:0, heptadekanska kiselina</b>	7,713	10,605	19,874	16,097	16,151	17,500	20,110
<b>C17:1 cis 10, heptadekanoična kiselina</b>	*	*	*	0,033	0,153	0,128	0,276
<b>C18:0, stearinska (oktadekanska) kiselina</b>	15,044	15,189	*	*	*	*	17,389
<b>C18:1 trans 9, elaidinska kiselina</b>	-	-	6,144	1,113	2,281	1,579	1,425
<b>C18:1 cis 9, oleinska kiselina</b>	*	*	*	*	*	-	*
<b>C18:2 trans 9,12, linolelaidna kiselina</b>	-	-	-	*	-	-	-
<b>C18:2 cis 9,12, linolna kiselina</b>	18,594	19,583	29,499	25,460	25,885	25,530	27,880
<b>C18:3 cis 9,12,15, <math>\alpha</math>-linolenska kiselina</b>	34,842	31,856	*	30,294	29,101	29,240	*

<b>C20:2 cis 11,14, eikozadienoična kiselina</b>	-	-	-	-	*	-	-
<b>C24:0, lignocerična kiselina</b>	-	0,650	*	*	*	*	*
<b>C24:1 cis 15, nervonska kiselina</b>	-	0,011	-	-	-	*	-
<b>C22:6 cis 4,7,10,13,16,19 dokosaheksaenska kiselina</b>	*	*	*	*	*	*	*
<b>SFA<sup>1</sup></b>	40,843	42,866	54,161	36,602	36,652	37,434	62,542
<b>MUFA<sup>2</sup></b>	5,721	5,696	16,341	7,643	8,362	7,796	9,579
<b>PUFA<sup>3</sup></b>	53,436	51,438	29,499	55,754	54,986	54,770	27,880

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

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

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

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

#### 4.1.3. Usporedba uzgoja u otvorenom bazenu i barbotirajućoj koloni

U nastavku poglavlja prikazana je usporedba uspješnosti uzgoja u oba kultivacijska sustava s obzirom na produktivnost biomase, proteina, lipida, te ugljikohidrata. U tablicama 13 i 14 prikazane su produktivnosti biomase i makromolekula tijekom uzgoja.

Iz tablice 13 vidljivo je da tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u otvorenom bazenu nakon dodatka izvora ugljika dolazi do povećanja produktivnosti biosinteze staničnih makromolekula. Maksimalna produktivnost biosinteze lipida i proteina postignuta je zadnjeg dana uzgoja. Najviša vrijednost produktivnosti biosinteze lipida iznosila je  $0,1011 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , a proteina  $0,0985 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Također je uočeno da nakon prihrane s izvorima dušika i fosfora, koja je provedena četrnaestog dana uzgoja, dolazi do rasta produktivnosti biomase s  $0,3423 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  na  $0,8796 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  osamnaestog dana uzgoja. Iscrpljivanjem izvora fosfora, produktivnost biomase pada na  $0,7664 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  posljednjeg dana uzgoja.

**Tablica 13.** Prikaz produktivnosti biomase te biosinteze proteina, lipida i ugljikohidrata tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u otvorenom bazenu.

Vrijeme uzgoja	Pr <sub>X</sub>	Pr <sub>P</sub>	Pr <sub>L</sub>	Pr <sub>UH</sub>
[dan]	[mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]			
4	0,6771	0,0318	0,0175	-
11	0,3030	0,0424	0,0244	-
14	0,3423	0,0395	0,0248	-
18	0,8796	0,0865	0,0736	-
20	0,7917	0,0855	0,0750	-
28	0,7664	0,0985	0,1011	0,0506

Tablica 14 prikazuje produktivnost biomase i produktivnost biosinteze makromolekula tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u barbotirajućoj koloni. Nakon prihrane s otopinom NaNO<sub>3</sub> i otopinom NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> devetog dana uzgoja, uočen je blagi rast produktivnosti lipida s  $0,0225 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  na  $0,0247 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  trinaestog dana uzgoja. U istom vremenskom razdoblju dolazi do pada produktivnosti biosinteze proteina s  $0,0897 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  na  $0,0696 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

**Tablica 14.** Prikaz produktivnosti biomase te biosinteze proteina, lipida i ugljikohidrata tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u barbotirajućoj koloni.

<b>Vrijeme uzgoja</b>	<b>Pr<sub>X</sub></b>	<b>Pr<sub>P</sub></b>	<b>Pr<sub>L</sub></b>	<b>Pr<sub>UH</sub></b>
<b>[dan]</b>	<b>[mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>]</b>			
3	1,0278	0,2089	0,0640	-
9	0,5000	0,0897	0,0225	-
13	0,3077	0,0696	0,0247	-
16	0,4557	0,0504	0,0410	-
23	0,8297	0,0731	0,0607	0,0639

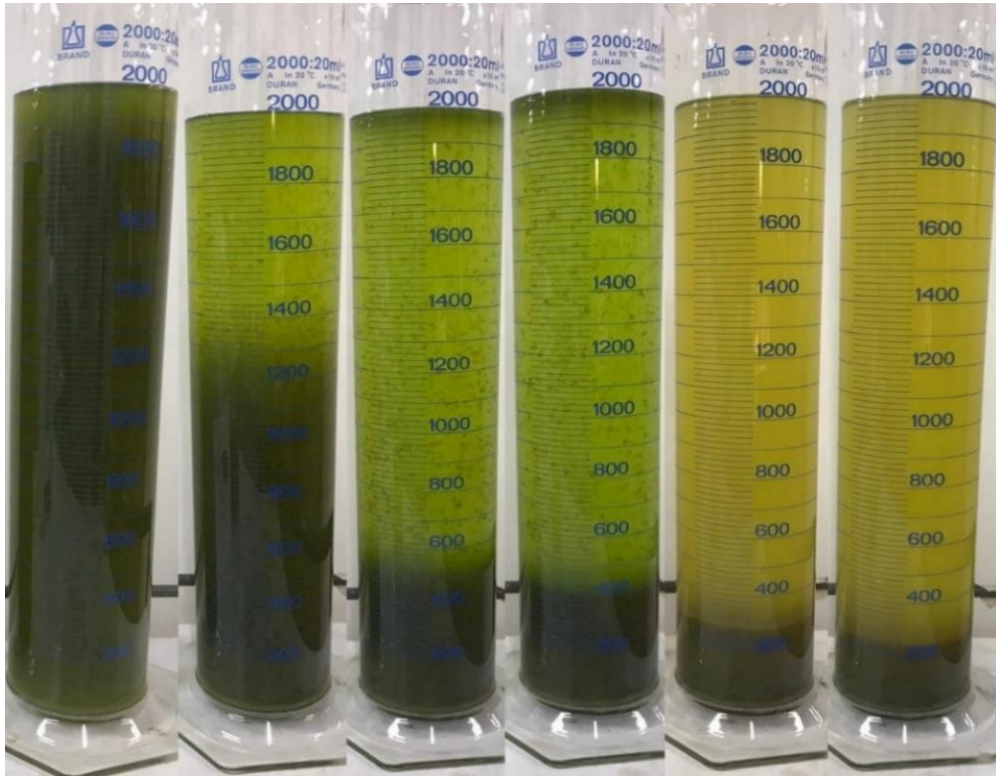
Usporedbom rezultata produktivnosti biosinteze lipida i proteina zaključeno je da je kod šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u otvorenom bazenu postignuta veća brzina rasta kao i veća produktivnost sinteze lipida i proteina.

#### 4.1.4. Izdvajanje biomase mikroalgi flokulacijom

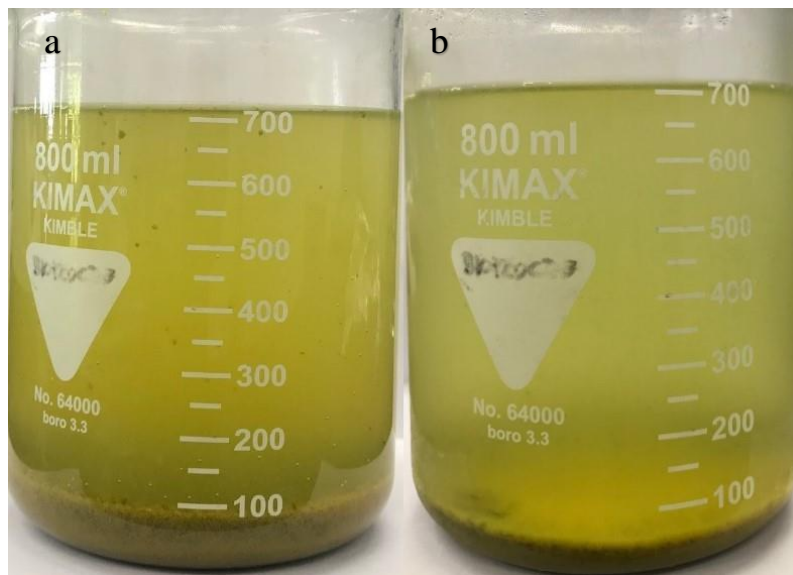
Nakon uzgoja u otvorenom bazenu, određeni volumen podloge (4,7 L) izuzet je za izdvajanje biomase flokulacijom, dok je u preostalom volumenu biomasa izdvojena uobičajenom metodom odnosno centrifugiranjem. Kao flokulacijsko sredstvo korištena je otopina željezovog (III) klorida koncentracije 100 g L<sup>-1</sup>. S ciljem ispitivanja utjecaja vremena flokulacije na njenu uspješnost, flokulacija je praćena 16 sati, pri čemu je efikasnost izdvajanja određena nakon 2 sata te sutradan nakon 16 sati. Iz menzura je biomasa izdvojena istog dana, dok je biomasa iz čaše izdvojena nakon 16 sati. Tijek odvijanja flokulacije u menzuri prikazan je na slici 17, dok slika 18 prikazuje flokulaciju u čaši prvog dana i stanje nakon 16 sati.

**Tablica 15.** Prikaz rezultata flokulacije.

<b>Uzorak</b>	<b>Paralela</b>	<b>Masa biomase [g]</b>	<b>Efikasnost [%]</b>
Menzura	Talog 1	0,0235	
	Talog 2	0,0195	
	Supernatant 1	0,0008	87,76
	Supernatant 2	0,0002	
Čaša	Talog 1	0,0525	
	Talog 2	0,0532	
	Supernatant 1	0,0007	91,2
	Supernatant 2	0,001	



**Slika 17.** Tijek odvijanja flokulacije u menzuri (vlastita fotografija).



**Slika 18.** Tijek odvijanja flokulacije u čaši (a) stanje prvog dana (b) stanje nakon 16 sati (vlastita fotografija).

Proračun prikazan u tablici 15, pokazuje da je iskorištenje flokulacije provedeno u menzurama istog dana 87,76 % dok je iskorištenje flokulacije provedeno u čaši nakon 16 sati odležavanja oko 91,2 % što je razlika od 3,44 %. Svi uzorci su centrifugirani, a izdvojena biomasa je spremljena za daljnje analize.

U nastavku poglavlja, u tablici 16 prikazani su rezultati sastava masnih kiselina u ukupnim lipidima u biomasi izdvojenoj flokulacijom kao i usporedba sa sastavom masnih kiselina u biomasi izdvojenoj centrifugiranjem.

**Tablica 16.** Prikaz sastava metil estera masnih kiselina u ukupnim lipidima u uzorcima izdvojenim centrifugiranjem i flokulacijom zadnjeg dana fototrofnog šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u otvorenom bazenu.

Vrijeme uzgoja [dan]	28	
Metil ester masne kiseline	Udio [%]	
Izdvajanje biomase	Centrifugiranje	Flokulacija
<b>C6:0, kapronska (heksanska) kiselina</b>	-	3,231
<b>C14:0, miristinska (tetradekadska) kiselina</b>	1,102	1,687
<b>C14:1 cis 9, miristoleična kiselina</b>	0,981	0,428
<b>C15:0, pentadekanska kiselina</b>	*	0,476
<b>C15:1 cis 10, pentadekanoična kiselina</b>	0,629	*
<b>C16:0, palmitinska (heksadekadska) kiselina</b>	16,997	45,400
<b>C16:1 cis 9, palmitoleinska kiselina</b>	3,040	7,962
<b>C17:0, heptadekanska kiselina</b>	14,051	*
<b>C17:1 cis 10, heptadekanoična kiselina</b>	*	*
<b>C18:0, stearinska (oktadekadska) kiselina</b>	11,350	*
<b>C18:1 cis 9, oleinska kiselina</b>	*	*
<b>C18:2 cis 9,12, linolna kiselina</b>	24,157	40,816
<b>C18:3 cis 9,12,15, <math>\alpha</math>-linolenska kiselina</b>	27,694	-
<b>C23:0, trikozilna kiselina</b>	-	*
<b>C24:0, lignocerična kiselina</b>	*	*
<b>C22:6 cis 4,7,10,13,16,19 dokosaheksaenska kiselina</b>	*	*
<b>SFA<sup>1</sup></b>	43,500	50,794
<b>MUFA<sup>2</sup></b>	4,649	8,390
<b>PUFA<sup>3</sup></b>	51,851	40,816

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

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

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

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



Iz tablice 16 vidljivo je značajno odstupanje u udjelima masnih kiselina određenih u biomasi izdvojenoj centrifugiranjem i flokulacijom. Pri tome, riječ je o uzorcima koji su izdvojeni istog dana. Uočeno je da su pojedine masne kiseline u jednom uzorku određene s vrlo visokim udjelom, a u drugom uzorku uopće nisu detektirane. Primjerice, C6:0 (kapronska kiselina) nije detektirana u uzorku izdvojenom centrifugiranjem dok je u flokuliranom uzorku njezin udio iznosio 3,231 %. Sličan trend uočen je i kod C18:3 cis 9,12,15 ( $\alpha$ -linolenske kiseline) koja je u centrifugiranom uzorku prisutna s 27,694 % dok u uzorku izdvojenom flokulacijom ova masna kiselina nije detektirana. Najzastupljenija masna kiselina u centrifugiranom uzorku je  $\alpha$ -linolenske kiseline (27,694 %), a u uzorku izdvojenom flokulacijom to je palmitinska kiselina s 45,4 %. Pentadekanoična, heptadekanska te stearinska kiselina određene su s udjelima od 0,629 %, 14,051 % i 11,35 % u centrifugiranoj biomasi, a u flokuliranoj biomasi njihova koncentracija je bila ispod granice kvantifikacije. Značajna odstupanja uočena su i kod udjela ukupnih zasićenih, jednostruko nezasićenih i višestruko nezasićenih masnih kiselina. Osim toga, udio lipida u stanicama mikroalgi izdvojenih centrifugiranjem iznosi 13,187 % dok je kod stanica mikroalgi izdvojenih flokulacijom taj udio 1,103 %. Natrijev hidroksid, katalizator u reakciji transesterifikacije, troši se u reakciji sa željezovim (III) kloridom kojim je tretirana biomasa. S obzirom da NaOH tada više nije u dovoljnom suvišku, reakcija transesterifikacije nije provedena do kraja što objašnjava manji udio i drugačiji profil udjela masnih kiselina (Demirbas, 2008). S obzirom na sve navedeno, zaključuje se da biomasa mikroalgi izdvojena flokulacijom nije pogodna za analizu sastava ukupnih lipida plinskom kromatografijom.

## **4.2. ELABORAT TEHNIČKO-TEHNOLOŠKOG RJEŠENJA POGONA ZA PROIZVODNJU BIODIZELA**

### 4.2.1. Projektna dokumentacija

Realizaciji bilo kojeg proizvodnog pogona prethodi poduzetnička ideja koja se dalje razvija u razradi projektnog zadatka uz prethodno istraživanje. Zatim je potrebno izraditi studiju izvedivosti na temelju koje se odlučuju daljnji koraci u ostvarivanju projekta. Ako studija izvedivosti pokaže da je projekt isplativ, započinje se s izradom idejnog projekta.

Idejni projekt predaje se državnim institucijama u cilju utvrđivanja posebnih uvjeta i uvjeta priključenja, odnosno uvjeta gradnje određenim lokacijskom dozvolom. Javno pravna tijela koja uključuju Hrvatske vode, Vodovod, HAKOM (*Hrvatska regulatorna agencija za mrežne djelatnosti*), HEP (*Hrvatska elektroprivreda*) i druge dužna su 15 dana nakon primitka projekta izdati potrebne uvjete. Ako se po isteku navedenog vremenskog roka uvjeti ne dostave, smatra se da oni ne postoje pa projektant može započeti s izradom glavnom projekta.

Prema Zakonu o gradnji (2019) glavni projekt je definiran kao skup međusobno usklađenih projekata kojima se daje tehničko rješenje građevine i dokazuje ispunjavanje temeljnih zahtjeva za građevinu te drugih propisanih i određenih zahtjeva i uvjeta. Točnije, glavni projekt je onaj koji se predaje na izdavanje građevinske dozvole. Popis mapa glavnog projekta čine: arhitektonski projekt, građevni projekt konstrukcije, tehničko-tehnološki projekt, projekt elektroinstalacija, projekt vatrodojave, projekt vodovoda i kanalizacije, projekt strojarskih instalacija, elaborat zaštite od požara, elaborat zaštite na radu, elaborat zaštite okoliša, te plan izvođenja radova i drugi ovisno o vrsti i namjeni građevine.

Izvedbenim projektom razrađuje se tehničko rješenje dano glavnim projektom, a izrađuje se u slučaju građenja građevina 1. skupine u koju se ubrajaju građevine planirane Državnim planom prostornog razvoja.

### 4.2.2. Projektni zadatak

#### *4.2.2.1. Opće tehničke i proizvodne karakteristike postrojenja*

U industrijskoj proizvodnji biodizela koriste se različite tehnologije, a u ovom projektu predviđen je način proizvodnje procesom transesterifikacije alkalnim katalizatorom kojim je moguće ostvariti visoke konverzije masti odnosno ulja u odgovarajuće estere u kratkom vremenu. Tehnološki postupak proizvodnje biodizela, planiranog kapaciteta od 10 000 tona godišnje i definirane kvalitete sukladno normi HRN EN 14214, provodi će se u suvremenom

postrojenju koje je u potpunosti automatizirano s kontinuiranom proizvodnjom. Postrojenje čini proizvodno zatvorenu cjelinu međusobno povezanih reaktora.

#### *4.2.2.2. Kakvoća proizvoda*

Kakvoća biodizela mora zadovoljavati Uredbu o kakvoći biogoriva (NN 141/2005) kojom se propisuju granične vrijednosti značajki kakvoće biogoriva koja se stavljaju u promet na domaće tržište, način utvrđivanja kakvoće biogoriva te način utvrđivanja sukladnosti. Također, biodizel koji dolazi u obliku čistog biogoriva ili je umješan u visokom postotku u tekuće naftno gorivo mora udovoljavati propisanim graničnim vrijednostima značajki kakvoće prema zahtjevu norme HRN EN 14214.

#### *4.2.2.3. Sirovine*

Biodizel se proizvodi iz lipida mikroalgi. U sklopu tvornice nalazi se i postrojenje, odnosno otvoreni bazeni za uzgoj mikroalgi iz roda *Nannochloropsis*. Iz sintetizirane biomase ekstrahiraju se lipidi koji se prevode u biodizel. Na lokaciji je predviđen prostor za izgradnju više bazena za uzgoj mikroalgi iz kojih se ekstrahira sirovina za proizvodnju.

#### *4.2.2.4. Transport*

Dobava sirovine, otprema glicerola i distribucija biodizela na tržište Republike Hrvatske i izvoz u susjedne države provodi će se autocisternama.

#### *4.2.2.5. Skladišni prostor*

Prilikom projektiranja pogona potrebno je predvidjeti izgradnju spremnika za skladištenje: sirovina (lipida mikroalgi), otopine katalizatora, biodizela, glicerola i metanola. Na lokaciji je potrebno osigurati mjesto za privremeno skladištenje komunalnog, opasnog i neopasnog otpada kao i skladište klorovodične kiseline. Ovisno o tvari koja se skladišti predviđena je izgradnja vanjskih podzemnih i nadzemnih spremnika koji mogu biti jednostijenski ili dvostijenski. Za pojedine tvari potrebno je osigurati unutarnje spremnike.

#### *4.2.2.6. Radni ciklus*

Postrojenje za proizvodnju biodizela radi neprekidno 330 dana u godini. Distribucija glicerola i biodizela na tržište odvija se radnim danom.

#### *4.2.2.7. Dobava procesne vode i zbrinjavanje otpadnih voda postrojenja*

Dobava svježe vode za sanitarne i tehnološke potrebe planirana je iz mreže javne vodoopskrbe. Osim toga, predviđena je izgradnja separatora za pročišćavanje otpadne tehnološke vode iz pogona kao i izgradnja sabirne jame za sanitarne otpadne vode. Potrebno je izgraditi razvod za odvodnju oborinskih i tehnoloških voda u kanal za ispust.

#### *4.2.2.8. Energetski izvori*

Za energetske izvore predviđena je električna energija iz trafostanice u krugu tvornice od 10 kV na 380/220 V te kao rezervni sustav brzo startajući generator (380/220 V).

#### *4.2.2.9. Mjerno-regulacijski i kontrolno upravljački sustav*

Predviđena je izgradnja kontrolne sobe za praćenje procesa računalom i prikaz varijabli u realnom vremenu, pohranjivanje, pretraživanje i prikaz procesnih podataka do pet godina unatrag. Planirana je ugradnja alarma kao i sustav za njihovo evidentiranje i poništavanje. U kontrolnoj sobi nalazit će se centralizirano automatsko i ručno upravljanje izvršnim jedinicama. Osim toga, bit će osiguran i sustav za prijenos podataka na udaljeno izdvojeno računalo (server).

#### *4.2.2.10. Rješavanje otpadnih voda i materijala*

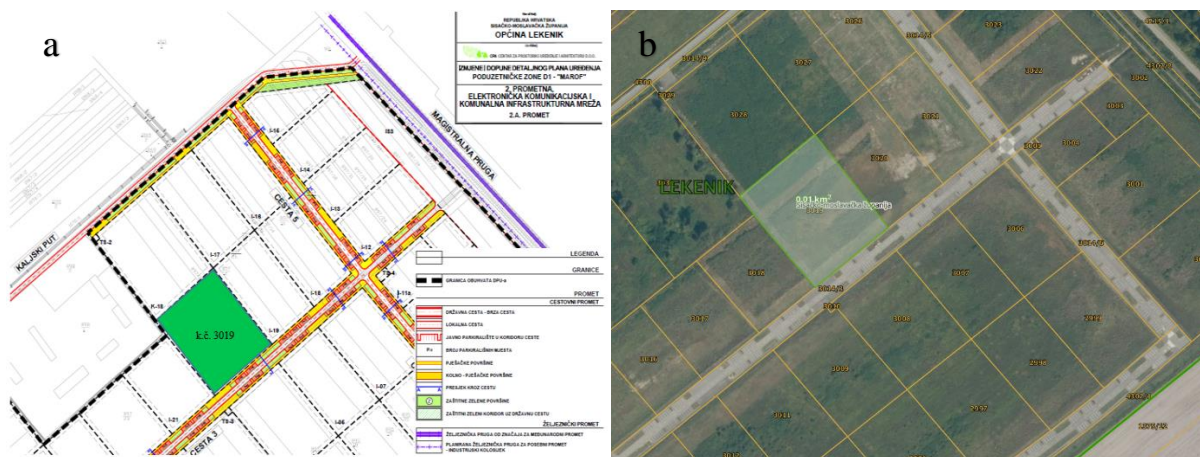
Otpadne vode postrojenja prije ispuštanja u građevine javne odvodnje potrebno je obraditi sukladno Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/2020). Druge zaostale materijale potrebno je zbrinuti u skladu sa sljedećim zakonskim uredbama: Zakon o održivom gospodarenju otpadom (NN 94/2013, NN 73/2017, NN 14/2019, NN 98/2019), Uredba o kategorijama, vrstama i klasifikaciji otpada s katalogom otpada i listom opasnog otpada (NN 50/2005).

#### 4.2.3. Prostorni plan s prikazom lokacije

Za makrolokaciju postrojenja odabrana je Sisačko-moslavačka županija, općina Lekenik. Sisačko-moslavačka županija se nalazi u panonskom području Hrvatske i ima vrlo važno mjesto u povezivanju jadranskog i kontinentalnog prostora Republike Hrvatske kao i u povezivanju prometnog prostora Hrvatske u širi regionalni i europski prometni prostor. Odabrana lokacija smještena je 20 kilometara sjeverozapadno od Siska i 40-ak kilometara jugoistočno od Zagreba.

Za mikrolokaciju odabrana je poduzetnička zona Marof Lekenik. Zemljište proizvodne gospodarske namjene ima izgrađenu kolnu i pješačku površinu, povezano je na vodovodnu mrežu, sanitarnu i oborinsku odvodnju, dovedeni su priključci za javnu rasvjetu te telekomunikacijsku i elektroenergetsku mrežu (Poduzetnička zona Marof Lekenik, 2020). Prednosti poduzetničke zone su dobra prometna povezanost s autocestom, državnom cestom, željeznicom te blizina zračne luke Zagreb (udaljenost 30 kilometara). Na slici 19 prikazana je odabrana katastarska čestica i povezanost s državnom cestom- brza cesta, lokalnom cestom i željezničkom prugom od značaja za međunarodni promet. Paralelno sa željezničkom prugom za putnički promet u planu je izgradnja željezničke infrastrukture za posebne namjene- industrijski kolosijek.

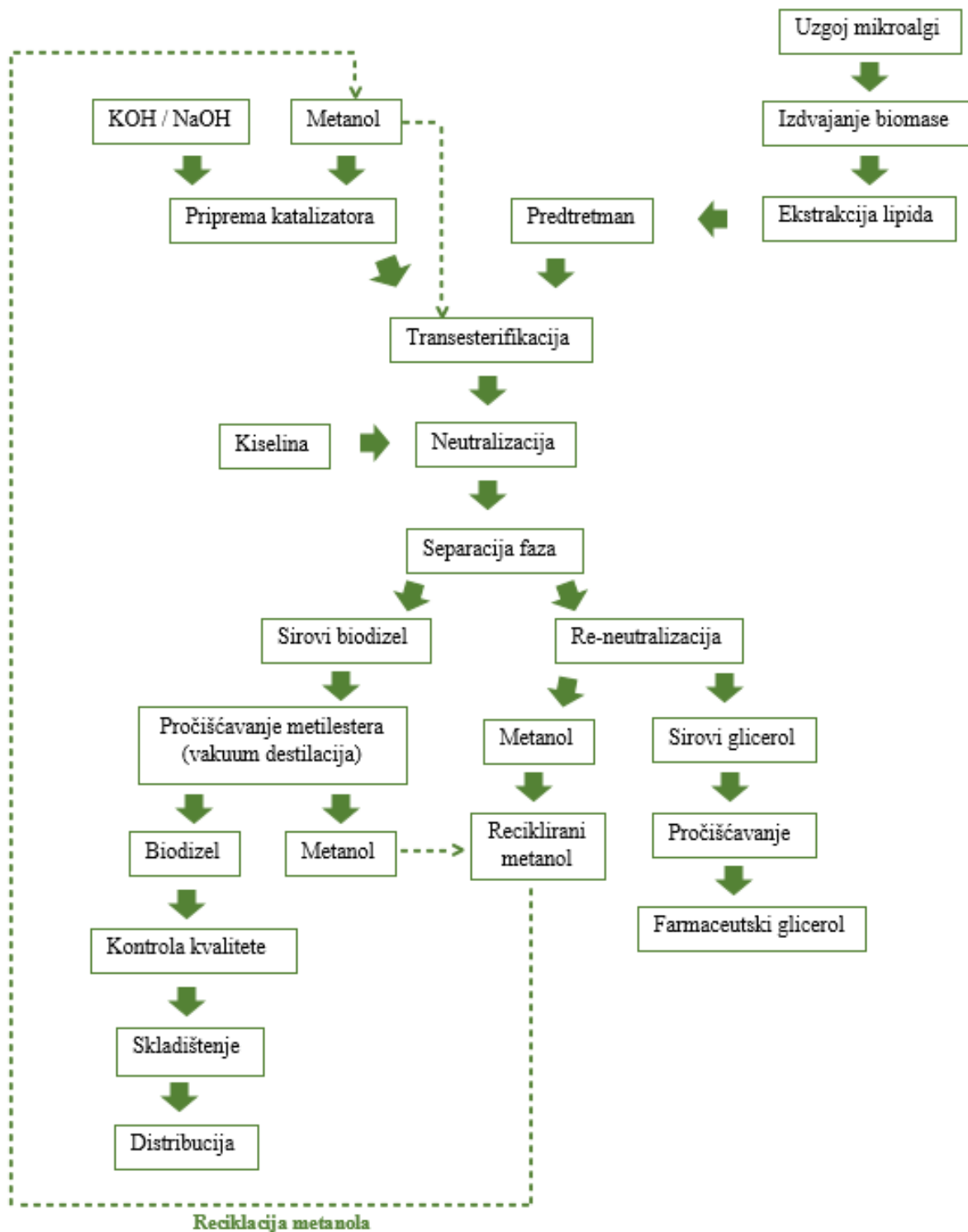
Odabrana parcela se vodi pod brojem katastarske čestice 3019 u katastarskoj općini Lekenik. Površina čestice iznosi 10 361 m<sup>2</sup>.



**Slika 19.** Prikaz katastarske čestice 3019 (a) Prikaz prometne, elektroničko komunikacijske i komunalne infrastrukturne mreže u poduzetničkoj zoni Marof Lekenik (Poduzetnička zona Marof Lekenik, 2020) (b) Izvod iz katastra (Katastar, 2020).

#### 4.2.4. Shematski prikaz operacija tehnološkog procesa proizvodnje biodizela

Na slici 20 prikazana je shema tehnološkog procesa proizvodnje biodizela.



Slika 20. Shema tehnoloških operacija za proizvodnju biodizela (vlastita shema).

#### 4.2.5. Tehnološke jedinice postrojenja (proizvodni i pomoćni objekti)

Glavni tehnološki postupci u proizvodnji biodizela su: prihvata i skladištenje lipida, priprema otopine katalizatora i njeno skladištenje, obrada lipida, proizvodnja biodizela te provođenje analiza u laboratoriju. Pomoćni tehnološki objekti postrojenja su prostori za skladištenje, privremeno skladištenje i rukovanje sirovinama, proizvodima i otpadom kao i uređaj za omekšavanje svježje vode i uređaji za pročišćavanje tehnološke i otpadne vode.

##### 4.2.5.1. Prihvata i skladištenje lipida mikroalgi

Sirovine koje se koriste za proizvodnju biodizela su lipidi mikroalgi. Lipidi se skladište u nadzemnom dvostijenskom spremniku, kapaciteta 60 m<sup>3</sup>. Prostor spremnika za skladištenje lipida, površine 50 m<sup>2</sup>, nalazi se u betonskoj tankvani, neposredno uz zgradu pogona u kojoj je u zasebnom dijelu smješten pogon za pročišćavanje sirovine. Pročišćeni lipidi se zatvorenim sustavom cjevovoda dovode do postrojenja za proizvodnju biodizela.

##### 4.2.5.2. Priprema i skladištenje otopine katalizatora

Za pripremu katalizatora koristi se natrijev hidroksid (NaOH) ili kalijev hidroksid (KOH) koji se dodaje u bezvodni metanol (CH<sub>3</sub>OH). Otapanjem alkalnih hidroksida nastaje natrijev metoksid (NaOCH<sub>3</sub>) ili kalijev metoksid (KOCH<sub>3</sub>) koji se upotrebljavaju kao katalizatori. Priprema se obavlja u reaktoru volumena 1,5 m<sup>3</sup>, a s obzirom na to da je kemijski proces pripreme otopine katalizatora egzoterman, potrebno je reakcijsku otopinu kontinuirano hladiti uz neprestano miješanje čime se postiže pomicanje reakcije u smjeru sinteze katalizatora. Pripremljeni katalizator se iz reaktora zatvorenim sustavom provodi do spremnika za skladištenje iz kojeg se, nakon svake pripreme, uzima uzorak koji se kontrolira u skladu s propisanim metodama.

Metanol za pripremu katalizatora osigurava se upotrebom tzv. povratnog metanola koji se prikuplja iz pojedinih faza proizvodnje, a koji se miješa sa svježim bezvodnim metanolom. Na ovaj način doprinosi se ostvarivanju ekonomične i ekološki prihvatljive proizvodnje biodizela. Izdvojeni metanol se nakon pročišćavanja ponovno vraća u proces uz obaveznu kontrolu kvalitete i sadržaja vode.

#### 4.2.5.3. Obrada lipida mikroalgi

Tehnološka cjelina za obradu lipida sastoji se od procesne jedinice za pročišćavanja sirovine koja uključuje: uklanjanje grubih nečistoća, kondicioniranje te filtriranje. Nakon istovara i vaganja, lipidi se zajedno s bačvom zagrijavaju u kadi za topljenje koja se zagrijava cijevnim grijačem kroz koji struji vruća voda. Sadržaj bačvi se otapa što rezultira smanjenjem viskoznosti sirovine, a potom se zupčastom samousisnom pumpom sirovina prebacuje u međuspremnik s cilindričnim cjevilom na kojem zaostaju grube nečistoće. Pročišćeni lipidi se sustavom cjevovoda i pumpi odvođe na fini metalni filter u rezervoar u kojem se zagrijavaju na 60 °C (Jurac, 2011). U navedenom rezervoaru obavlja se uklanjanje zaostale vode. Izdvojena otpadna voda odlazi na separator ulja i masti, nakon čega voda odlazi u kanalizaciju, a dobiveni pročišćeni lipidi se privremeno skladište do proizvodnje biodizela.

#### 4.2.5.4. Proizvodnja biodizela

Nakon provedene obrade sirovine te dobivanja pročišćenih lipida pogodnih za nastavak tehnološkog procesa, provodi se postupak transesterifikacije s metanolom uz prethodno pripremljen katalizator. Obradena sirovina se iz dvostijenskog spremnika pumpom odvodi u reaktor. U cilju ubrzavanja tehnološkog postupka koji se odvija u reaktoru za transesterifikaciju, ulje prije puštaju u reaktor prolazi kroz predgrijače i grijače koji ga zagrijavaju na temperaturu od 60 °C. Uz intenzivno miješanje u reaktor se dodaje smjesa metanola i kalijevog metoksida, a cijela reakcija se odvija na temperaturi od  $61 \pm 1$  °C i pri atmosferskom tlaku (Jurac, 2011). U prvoj fazi provodi se neutralizacija, odnosno esterifikacija slobodnih masnih kiselina s metanolom pri čemu kao nusproizvodi nastaju glicerol, alkalni sapuni i voda. Nastali nusproizvodi smanjuju čistoću proizvoda i željeno iskorištenje procesa, zato se nakon prve faze iz reaktora izdvaja glicerinska faza s kojom se u velikoj mjeri uklanjaju nastali alkani sapuni i reakcijska voda.

Sumarnu reakciju čini reakcija transesterifikacije masnih kiselina s metanolom i kalijevim metoksidom u metilne estere masnih kiselina, glicerol, sapun (kao talog) i vodu. Nastali metilni esteri čine sirovi biodizel, a glicerol se pojavljuje u obliku lebdećih čestica. Prestankom miješanja, glicerol se istaloži na dnu reaktora nakon čega se odvija separacija faza. Nakon razdvajanja faza, na reaktoru se otvara pneumatski ventil što omogućuje gravitacijsko punjenje rezervoara za glicerol koji se puni smjesom 60 %-tnog glicerola. Ispuštanjem glicerolne faze i zatvaranjem ventila, u reaktoru zaostaje samo biodizel.



#### 4.2.5.5. Pročišćavanje biodizela

Nakon procesa transesterifikacije iz dobivenog biodizela potrebno je otkloniti zaostale količine glicerola, sapuna i metanola.

Vakuum destilacijom uklanjaju se lako hlapljive komponente poput metanola i vode. Prisutnost malih količina vode u svim vrstama goriva za motorna vozila se oduvijek smatralo kao pogoršanje kvalitete goriva, a prisutnost veće količine vode često dovodi i do nemogućnosti upotrebe takvog goriva. Metanol se u biodizelu pojavljuje kao neizreagirani višak reaktanta u reakcijama, a koji je nužan radi pomicanja kemijske reakcije u smjeru sinteze metilnih estera masnih kiselina (Jurac, 2011). Ključni razlozi uklanjanja metanola su njegov utjecaj na pogoršane karakteristike biogoriva:

- Povećana isparivost biogoriva na niskim temperaturama čime se snižava temperatura paljenja što u krajnjem slučaju rezultira poremećajem pravilnog rada dizelskog motora.
- Povećana mogućnost omekšavanja brtvenih materijala koji su u kontaktu s biogorivom što skraćuje vijek trajanja dizelskog motora i visokotlačne pumpe za ubrizgavanje goriva (Jurac, 2011).

Zbog navedenih razloga, prema normi HRN EN 14214 dozvoljeno je maksimalno 0,1 % metanola u konačnom proizvodu. Nakon uparavanja pri 90 °C i vakuumu od oko 30 kPa, provodi se zasebno kondenziranje vode i metanola (Jurac, 2011). Nastale količine metanola se recikliraju i koriste za pripremu katalizatora.

Veliki udio glicerola je izdvojen nakon separacije faza, međutim manji dio uvijek zaostaje u biodizelu i potrebno ga je odvojiti kako bi se biodizel mogao koristiti. Za odvajanje topljivih komponenti, poput kalijevog sapuna i glicerola, koristi se višestupanjska ekstrakcija demineraliziranom vodom u prisustvu deemulgatora. Ekstrakcija se provodi kontinuirano u tri stupnja u tri reaktora pri povišenoj temperaturi od 60 °C do 90 °C, jer topljivost sapuna nije zadovoljavajuća pri temperaturama nižim od 60 °C (Jurac, 2011). U reaktor za prvu ekstrakciju uvodi se ekstrakcijsko sredstvo - vodena emulzija sapuna iz druge faze ekstrakcije. Nakon dodavanja emulzije, uslijed intenzivnog miješanja, dolazi do ispiranja nastale uljne faze i stvaranja veće dodirne površine s vodenom fazom. Sapuni i druge tvari iz uljne prelaze u vodenu fazu. Po završetku miješanja, nastala smjesa tekućih faza uvodi se u gravitacijsku kolonu u kojoj se odvija prva faza ekstrakcije sapuna. Odvajanje se zasniva na principu protustrujnog kretanja faza koje se separiraju s obzirom na razliku u gustoći. Teža, vodena faza odvodi se s dna kolone, a lakša uljna s njenog vrha. Izdvojena uljna faza prebacuje se u drugi

ekstraktor te se proces ponavlja. U drugoj ekstrakciji koristi se vodena emulzija sapuna iz treće ekstrakcije, a u trećoj se koristi čista demineralizirana voda. Iz svake faze ekstrakcije višak nastalog ekstrakt se odvodi u sabirni rezervoar za neprerađenu emulziju koja se tretira dodatkom deemulgatora (limunske kiseline) (Jurac, 2011).

Tako dobiveni biodizel podvrgava se daljnjoj obradi, odnosno aditiviranju radi postizanja zahtjevnih niskotemperaturnih svojstava što je ujedno najkritičnije svojstvo biodizela koji se koristi kao pogonsko gorivo. Aditiv se dodaje u obliku smjese otapala kao sredstvo za poboljšanje tečenja (Jurac, 2011).

#### 4.2.5.6. Laboratorij

U svrhu stalne kontrole kvalitete formiran je kontrolno-analitički laboratorij čiji je primarni zadatak kontrola ulaznih sirovina, kontrola kvalitete proizvodnog procesa kao i konačnih proizvoda. Analitički laboratorij sadrži:

- Uređaj za izvođenje kiselo-baznih, taložnih, redoks, kompleksometrijskih, fotometrijskih titracija te pH i ISE mjerenja. Koristi se za određivanje kiselnog broja uzoraka – sirovine ili gotovog proizvoda odnosno uzoraka kod kojih je teško uočiti promjenu boje indikatora klasičnom kiselo-baznom titracijom (Ferina i sur., 2013).
- Kulometrijski titrator kojim se određuje sadržaj vode Karl-Fisher-ovom kulometrijskom metodom.
- FT-IR spektrometar za određivanje prisutnosti i količine metilnih estera masnih kiselina u biodizelu.
- Uređaj za određivanje plamišta (točke paljenja) goriva.
- Aparatura za destilaciju.
- Uređaj za određivanje kinematičke viskoznosti (Ferina i sur., 2013).
- Kriostat s vakuum pumpom za određivanje niskotemperaturnih svojstava goriva: točka zamućenja (eng. *Cloud Point, CP*) je najviša temperatura pri kojoj dolazi do zamućenja goriva zbog izdvajanja kristala parafina i vode, točka tečenja (eng. *Pour Point, PP*) predstavlja najnižu temperaturu kod koje medij nastavlja teći kada se hlađenje provodi pod određenim uvjetima te točka fleksibilnosti (eng. *Cold Filter Plugging Point, CFPP*) koja predstavlja temperaturu pri kojoj dolazi do začepjenja filtera goriva uslijed kristalizacije više ravnolančanih parafinskih ugljikohidrata (Cerić, 2012).
- Analitička vaga i pH metar.

#### *4.2.5.7. Skladištenje biodizela*

Proizvedeni biodizel skladišti se na vanjskom prostoru u četiri podzemna, dvostijenska spremnika, svaki volumena 60 m<sup>3</sup>. Iz spremnika se biodizel prepumpava u autocisterne kojima se distribuira na tržište Republike Hrvatske i izvozi u susjedne zemlje.

#### *4.2.5.8. Skladištenje glicerola*

U proizvodnji biodizela kao nusproizvod nastaje i sirovi glicerol. Skladištenje glicerola odvija se na vanjskom prostoru u jednom nadzemnom jednostijenskom spremniku, kapaciteta 60 m<sup>3</sup>, koji se nalazi na posebno uređenoj nepropusnoj podlozi i zadovoljava uvjete za skladištenje zapaljivih tekućina koji su propisani zakonskim zahtjevima. Iz spremnika se sirovi glicerol direktno prepumpava u autocisterne i odvozi s lokacije.

#### *4.2.5.9. Skladištenje metanola*

Metanol se skladišti na vanjskom prostoru u jednom podzemnom dvostijenskom spremniku, kapaciteta 60 m<sup>3</sup>, koji je opremljen bocom s inertnim plinom dušikom čime se sprječava stvaranje eksplozivne smjese te su ispunjeni uvjeti za skladištenje zapaljivih tekućina propisani zakonskim uredbama.

#### *4.2.5.10. Skladištenje klorovodične kiseline*

10 %-tna klorovodična kiselina skladišti se u spremniku zapremnine 300 L u natkrivenom prostoru pored pogona, gdje je spremnik smješten u tankvani koja može, u slučaju izlivanja, primiti sav sadržaj spremnika.

#### *4.2.5.11. Privremeno skladištenje komunalnog, opasnog i bezopasnog otpada*

Komunalni otpad odlaže se u metalnom spremniku, kapaciteta 850 L pored pogonske zgrade.

Na lokaciji postrojenja privremeno se skladišti vlastiti opasni otpad koji nastaje pri proizvodnim djelatnostima:

- Ambalaža koja sadrži ostatke opasnih tvari ili je onečišćena opasnim tvarima što su u ovom slučaju polietilenske vreće sa zaostacima granuliranog NaOH i KOH.
- Otpad koji sadrži druge opasne tvari, primjerice ostatke od pročišćavanja sirovine koji sadrži opasne tvari.

Navedeni opasni otpad se privremeno smješta u poseban plastični spremnik, odakle se periodično predaje ovlaštenom sakupljaču i zbrinjavatelju. Ostali opasni otpad koji nastaje radom postrojenja, a ne skladišti se na privremenom skladištu opasnog otpada nego se direktno nakon otpisa predaje ovlaštenom sakupljaču čine odbačena električna i elektronička oprema koja sadrži opasne komponente.

Neopasni otpad je biorazgradivi otpad iz kuhinja i kantina. Privremeno se skladišti u pogonu u bačvama od 100 L i redovito odvozi na zbrinjavanje. Ostali neopasni otpad čine papir, karton i plastična ambalaža koji se skladište na vanjskom skladištu u zasebnim spremnicima i zbrinjavaju predajom ovlaštenom skupljaču.

#### 4.2.6. Potrošnja vode, otpadne vode postrojenja i njihovo pročišćavanje

Svježa voda za sanitarne i tehnološke potrebe dobavlja se iz mreže javne vodoopskrbe općine Lekenik. Voda iz vodoopskrbnog sustava najprije prolazi kroz filter, a potom kroz kolonu ionskog izmjenjivača. Koristi se jako kiseli ionski izmjenjivač koji se sastoji od dvije kolone, od kojih je uvijek samo jedna u funkciji. Kada se kolona zasiti, automatski se zatvara i započinje ciklus regeneracije, a istodobno se uključuje druga kolona. Iz ionskog izmjenjivača izlazi omekšana voda ukupne tvrdoće 0 °Nj. Svježa voda u procesu proizvodnje biodizela se nakon omekšavanja na ionskom izmjenjivaču, koristi u procesu dopune vode sustava za grijanje, hlađenje i vakuum te u procesu ekstrakcije (Ferina i sur., 2013).

U postrojenju za proizvodnju biodizela nastaju sljedeće otpadne vode:

- Tehnološke otpadne vode – su otpadne vode iz procesa proizvodnje. Zbog moguće kiselosti, tehnološke otpadne vode se neutraliziraju u spremniku za neutralizaciju koji je opremljen zasunom za kontrolirano ispuštanje. Nakon neutralizacije, tehnološke otpadne vode se prepumpavaju i ispuštaju preko revizijskog i kontrolnog mjernog okna u sustav javne odvodnje.
- Zauljene otpadne vode – nastaju pranjem zauljene ambalaže na vodonepropusnom betonskom platou u praonici ambalaže koja je smještena u blizini parkirališta autocisterni. Na sredini platoa nalazi se slivnik preko kojeg zauljena voda odlazi na separator ulja i masti. Nakon separatora, voda se preko revizijskog i kontrolnog mjernog okna ispušta u sustav javne odvodnje s sanitarno-fekalnim i tehnološkim otpadnim vodama.
- Sanitarne otpadne vode – su sanitarno-fekalne otpadne vode koje se sakupljaju u sabirnu jamu, odakle se prepumpavaju tlačnim cjevovodom u revizijsko okno i dalje s pročišćenom tehnološkom vodom i vodom s betonskog platoa preko kontrolnog mjernog okna ispuštaju u sustav javne odvodnje.
- Čiste oborinske vode – su slijevne i ostale oborinske vode s krova i prometnih površina koje se ispuštaju u sustav oborinske kanalizacije (Ferina i sur., 2013).

U postrojenju za proizvodnju biodizela, otpadne vode se pročišćavaju na uređajima:

- Spremnik za neutraliziraju tehnoloških otpadnih voda.
- Separator ulja i masti za pročišćavanje zauljene otpadne vode.

U tablici 17 prikazane su granične vrijednosti za ispuštanje pročišćene vode u površinske vode.

**Tablica 17.** Granične vrijednosti emisija onečišćujućih tvari u otpadnim vodama (Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, 2013).

<b>Pokazatelj</b>	<b>Granična vrijednost</b>
pH vrijednost	6,5 – 9,0
Temperatura	≤ 30 °C
Ukupna suspendirana tvar	≤ 35 mg L <sup>-1</sup>
BPK <sub>5</sub>	≤ 25 mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>
KPK <sub>Cr</sub>	≤ 125 mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>
Ukupna ulja i masti	≤ 20 mg L <sup>-1</sup>

#### 4.2.7. Specifikacija i opis opreme

Popis uređaja kojima je opremljen laboratorij postrojenja prikazan je u tablici 18, dok je popis tehnološke opreme pogona za proizvodnju biodizela prikazan u tablici 19 s pozicijama koje su jednake onima na tehnološkoj shemi (slika 21). Svi reaktori, spremnici i pumpe izrađeni su od nehrđajućeg Cr-Ni čelika (DIN 1.4301).

**Tablica 18.** Popis uređaja i opreme kojima je opremljen analitički laboratorij (Ferina i sur, 2013).

<b>Naziv uređaja</b>	<b>Količina</b>
DL 28 Titrator Mettler Toledo	1
DL 39 Karl Fischer kulometrijski titrator	1
FT-IR Spectrometer Perkin Elmer Spectrum 100	1
Pensky Martens Flash Point Tester	1
Herzog aparatura za destilaciju HDA 620	1
Viskozimetrijska kada i Canon Fenske kapilare	1
Julabo kriostat FP 50 i vakuum pumpa	1
Mettler Toledo analitička vaga XS 204/A	1
Mettler Toledo SevenMulti pH metar S40-K	1

**Tablica 19.** Popis opreme i uređaja.

Pozicija	Naziv opreme	Količina	Karakteristika
1	Kada za topljenje s cijevnim grijačem	1	125 °C, 2,2 bara
2	Zupčasta samousisna pumpa	1	6 m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup>
3	IBC spremnik s cilindričnim cjeđilom	1	500 L, pore 1000 μm
4	Centrifugalna pumpa	26	20 m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup>
5	Filter za uklanjanje grubih nečistoća	1	Pore 500 μm
6	Spremnik za lipide	1	60 m <sup>3</sup>
7	Izmjenjivač topline	6	Pločasti protustrujni
8	Reaktor rafinacije ulja	2	2,5 m <sup>3</sup> , 250 o min <sup>-1</sup>
9	Gravitacijski separator rafiniranog ulja	1	25 m <sup>3</sup>
10	Reaktor I. transesterifikacije	1	2,5 m <sup>3</sup> , 250 o min <sup>-1</sup>
11	Spremnik metanola	1	60 m <sup>3</sup>
12	Dozator NaOH	1	
13	Reaktor s turbinskom miješalicom	1	1,5 m <sup>3</sup> , 250 o min <sup>-1</sup>
14	Spremnik za skladištenje katalizatora	1	1,5 m <sup>3</sup>
15	Separator I. transesterifikacije	1	25 m <sup>3</sup>
16	Reaktor II. transesterifikacije	1	2,5 m <sup>3</sup> , 250 o min <sup>-1</sup>
17	Spremnik glicerola	1	60 m <sup>3</sup>
18	Separator II. transesterifikacije	1	25 m <sup>3</sup>
19	Cijevni vakuum isparivač s tekućim filmom	1	
20	Kolona za frakcijsku destilaciju	1	
21	Spremnik za povratni metanol	1	1 m <sup>3</sup>
22	Sabirna posuda za vodu	1	1 m <sup>3</sup>
23	Posuda za demetanolizirani biodizel	1	2,5 m <sup>3</sup>
24	Spremnik klorovodične kiseline	1	300 L, skladište 2 t
25	Sabirni rezervoar neprerađene emulzije	1	5 m <sup>3</sup>
26	Spremnik povratnog ulja	1	1 m <sup>3</sup>
27	Reaktor I. ekstrakcije	1	2,5 m <sup>3</sup> , 250 o min <sup>-1</sup>
28	Gravitacijski separator faza I. ekstrakcije	1	25 m <sup>3</sup>
29	Reaktor II. ekstrakcije	1	2,5 m <sup>3</sup> , 250 o min <sup>-1</sup>
30	Spremnik limunske kiseline	1	900 kg
31	Gravitacijski separator faza II. ekstrakcije	1	25 m <sup>3</sup>

32	Reaktor III. ekstrakcije	1	2,5 m <sup>3</sup> , 250 o min <sup>-1</sup>
33	Gravitacijski separator faza III. ekstrakcije	1	25 m <sup>3</sup>
34	Spremnik kondenzirane vode	1	T <sub>vode</sub> za hlađenje=10 °C
35	Vakuum destilator za sušenje biodizela	1	T <sub>vode</sub> =120 °C, 3 kPa
36	Spremnik za pripremu otopine aditiva	1	1 m <sup>3</sup>
37	Fina filtracija	1	Promjer pora 1 μm
38	Spremnik biodizela	4	Ukupno 240 m <sup>3</sup>
39	Centrifugalna pumpa	2	10 m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup>
40	Ručni ventil	7	Pneumatski ventil

#### 4.2.8. Popis tehnoloških parametara prostorija

Pogon za proizvodnju biodizela projektiran je po principu otvorene gradnje s više zgrada. Ovakav način izgradnje omogućava lakše proširenje i prilagođavanje postrojenja novim tehnologijama. U tablici 20 prikazan je popis tehnoloških parametara svih prostorija. Prilikom projektiranja zgrade pogona predviđen je manipulativni prostor za nesmetan prolaz ljudi i materijala.

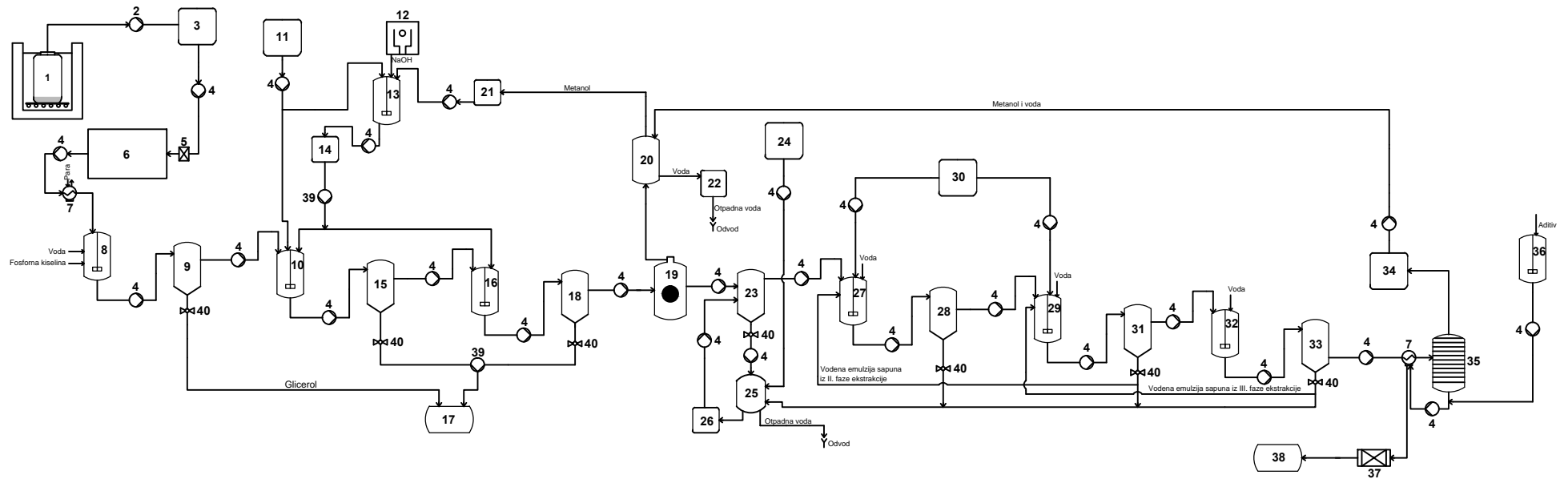
**Tablica 20.** Popis tehnoloških parametara prostorija.

Prostorija	Površina [m <sup>2</sup> ]	Vrsta poda
Prostor za prijem sirovine (nadstrešnica)	96	Vodonepropusni beton
Prostor za skladištenje sirovine	87,61	Nepropusni beton
Toplinska stanica	17,88	Monolit
Prostorija za skladištenje pomoćnog materijala	37,34	Monolit
Laboratorij	63,97	Monolit
Pogon za proizvodnju biodizela	277,75	Monolit
Skladište HCl (natkriveni prostor)	15,36	Nepropusni beton
Pogon za pročišćavanje biodizela	432,53	Monolit
Prostorija za skladištenje glicerola	30,24	Monolit
Kotlovnica	37,23	Monolit
Kontrolna soba	88,09	Parket
Ured rukovoditelja i soba za sastanke	64,28	Parket
Garderoba (muškarci i žene)	21,47	Keramičke pločice
Sanitarni čvor (muškarci i žene)	32,72	Keramičke pločice
Kuhinja, kantina i društveni prostor	91,78	Keramičke pločice



#### 4.2.9. Glavna tehnološka shema

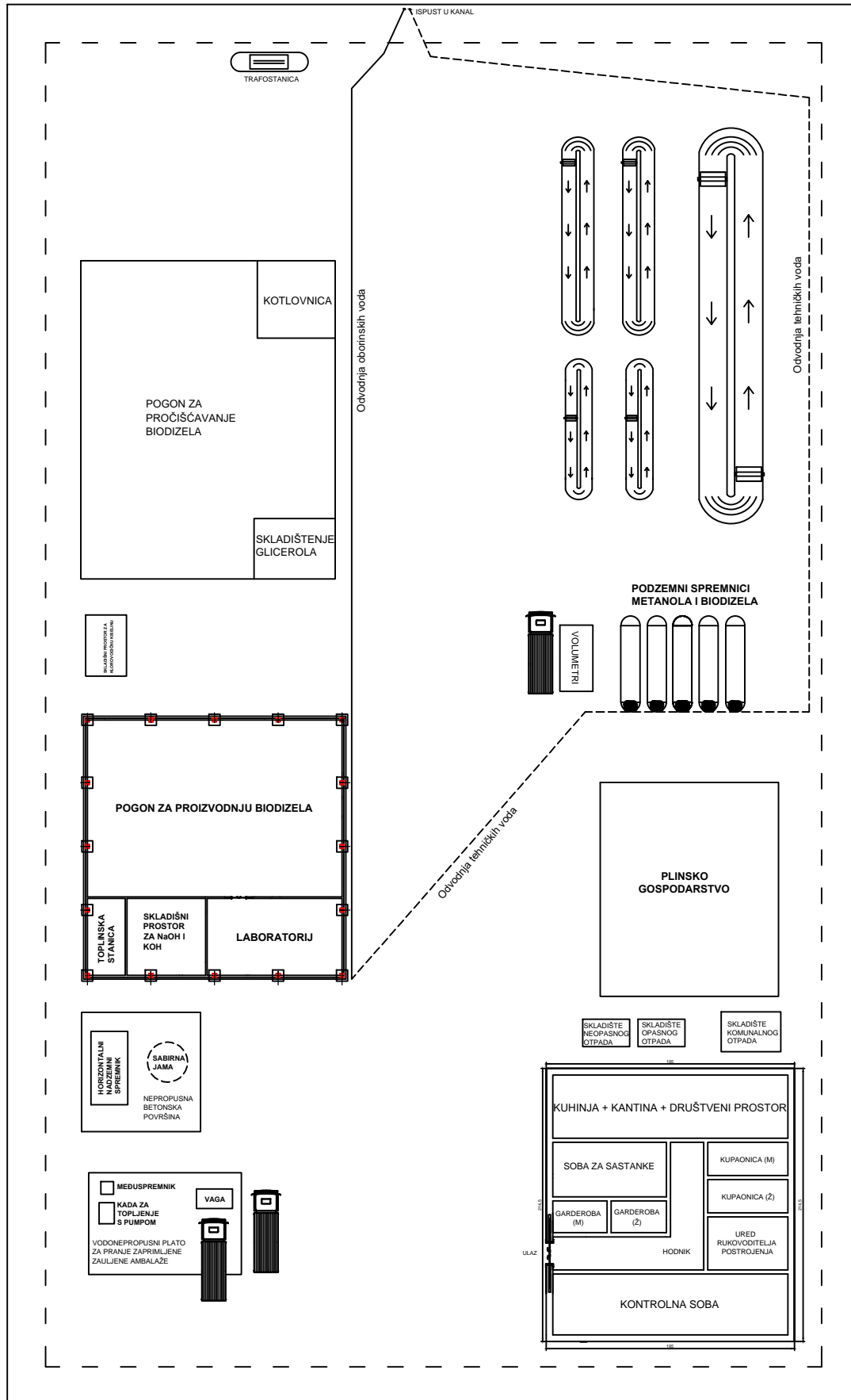
Na slici 21 prikazana je tehnološka shema procesa proizvodnje biodizela.



**Slika 21.** Tehnološka shema (vlastita shema).

#### 4.2.10. Dispozicijsko rješenje postrojenja (tlocrt)

Na slici 22 prikazan je tlocrt pogona za proizvodnju biodizela.



Slika 22. Dispozicijsko rješenje postrojenja (vlastita shema).

***ZAKLJUČCI***

## 5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Uzgojem mikroalge *Nannochloropsis* na izvornoj f/2 podlozi uz dodatak natrijevog bikarbonata kao dodatnog izvora ugljika, postiže se brži rast i veća produktivnost sinteze lipida i proteina u otvorenom bazenu u odnosu na uzgoj na izvornoj f/2 podlozi bez dodatka natrijevog bikarbonata u barbotirajućoj koloni. Šaržnim uzgojem s pritokom supstrata u otvorenom bazenu maksimalna produktivnost biosinteze lipida iznosila je 0,1011 mg L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>, dok je šaržnim uzgojem s pritokom supstrata u barbotirajućoj koloni maksimalna produktivnost biosinteze lipida bila 0,064 mg L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>.
2. Promjena koncentracije fosfora u hranjivoj podlozi utječe na promjenu sastava biomase mikroalgi. Iscrpljivanje fosfora u hranjivoj podlozi pogoduje akumulaciji lipida i ugljikohidrata uz smanjenje sadržaja proteina u biomasi.
3. Najzastupljenije masne kiseline u biomasi mikroalge *Nannochloropsis* sp. su palmitinska (C16:0), linolna (C18:2 cis 9,12) i  $\alpha$ -linolenska kiselina (C18:3 cis 9,12,15).
4. Kemijskom flokulacijom sa željezovim (III) kloridom moguće je uspješno izdvojiti biomasu mikroalgi iz hranjive podloge. Optimalno vrijeme flokulacije je dva sata te dodatno produženje vremena taloženja ne dovodi do značajnijeg povećanja efikasnost izdvajanja biomase.
5. Elaborat tehničko - tehnološkog rješenja pogona za proizvodnju biodizela projektiran je s lipidima mikroalgi kao osnovnom sirovinom. Neophodni su dodatni naponi u optimiranju hranjive podloge i uvjeta uzgoja kako bi se postigao zadovoljavajući prinos biomase s visokim sadržajem lipida koji bi omogućio isplativu proizvodnju biodizela.

***LITERATURA***

## 6. LITERATURA

Antia, N. J., Cheng, J. Y. (1982) The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the Eustigmatophyceae. *Br. phycol. J.* **17**, 39–50.

Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M., Pires, J. C. M. (2015) Harvesting techniques applied to microalgae: a review. *Renew Sust Energ Rev.* **41**, 1489–1500.

Barsanti, L., Coltelli, P., Evangelista, V., Frassanito, A. M., Passarelli, V., Vesentini, N., Gualtieri, P. (2008) Oddities and curiosities in the algal world. U: Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection, (Evangelista, V., Barsanti, L., Frassanito, A. M., Passarelli, V., Gualtieri, P., ured.), Springer, Dordrecht, str. 353–391.

Bellou, S., Aggelis, G. (2013) Biochemical activities in *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis salina* during lipid and sugar synthesis in a lab-scale open pond simulating reactor. *J. Biotechnol.* **164** (2), 318–329.

Bartley, M. L., Boeing, W. J., Corcoran, A. A., Holguin, F. O., Schaub, T. (2013) Effects of salinity on growth and lipid accumulation of biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *Biomass Bioenergy.* **54**, 83–88.

Benemann, J. R., Oswald, W. (1996) Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO<sub>2</sub> to biomass. Unites States Department of Energy, Pittsburgh.

Bitog, J. P., Lee, I. B., Lee, C. G., Kim, K. S., Hwang, H. S., Hong, S. W., Seo, I. H., Kwon, K. S., Mostafa, E. (2011) Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. *Comput Electron Agric.* **76** (2), 131–147.

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

Borowitzka, M. A. (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J. Biotechnol.* **70** (1–3), 313–21.

Brennan, L., Owende, P. (2010) Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **14** (2), 557–577.

- Bux, F. (2013) Biotechnological Applications of Microalgae. Biodiesel and Value-Added Products. *J. Phycol.* **50** (6), 1155–1157.
- Cagliari, A., Margis, R., Dos Santos Maraschin, F., Turchetto-Zolet, A. C., Loss, G., Margis-Pinheiro, M. (2011) Biosynthesis of Triacylglycerols (TAGs) in plants and algae. *Int. J. Plant Biol.* **2** (1), 10.
- Camacho-Rodríguez, J., Cerón-García, M. C., González-López, C. V., Fernández-Sevilla, J. M., Contreras-Gómez, A., Molina-Grima, E. (2013) A low-cost culture medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for aquaculture. *Bioresour. Technol.* **144**, 57–66.
- Carvalho, A., Meireles, L., Malcata, F. (2006) Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* **22**, 1490–1506.
- Cerić, E. (2012) Nafta, procesi i proizvodi, 2. izd., IBC d.o.o., Sarajevo.
- Chatsungnoen, T., Chisti, Y. (2016) Harvesting microalgae by flocculation–sedimentation. *Algal Res.* **13**, 271–283.
- 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** (1), 71–81.
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgal. *Biotechnol. Adv.* **25**, 294–306.
- Christeacka, K., Marquez-Rocha, F. J. (2004) Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnol.* **3**, 21–34.
- Christenson, L., Sims, R. (2011) Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol. Adv.* **29** (6), 686-702.
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., Del Borghi, M. (2009) Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Process.* **48** (6), 1146–1151.

- De Vree, J. H., Bosma, R., Janssen, M., Barbosa, M. J., Wijffels, R. H. (2015) Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors. *Biotechnol. Biofuels.* **8** (1).
- Demirbas, A. (2008) Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy Convers. Manag.* **49** (1), 125–130.
- Dong, H. P., Williams, E., Wang, D. Z., Xie, Z. X., Hsia, R. C., Jenck, A., Halden, R., Li, J., Chen, F., Place, A. R. (2013) Responses of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 to Long-Term Nitrogen Starvation and Recovery. *Plant physiol.* **162** (2), 1110–1126.
- El-Baz, F. K., Baky, H. H. A. E. (2018) Pilot Scale of Microalgal Production Using Photobioreactor. U: Photosynthesis - From Its Evolution to Future Improvements in Photosynthetic Efficiency Using Nanomaterials, (García Cañedo, J. C., López Lizárraga, G. L., ured.), IntechOpen.
- Faé Neto, W. A., Borges Mendes, C. R., Abreu, P. C. (2018) Carotenoid production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* in different low-cost culture media. *Aquac. Res.* **49** (7), 2527–2535.
- Ferina, S., Mumić, K., Anić, I., Rapić, A., Šunjić, H., Čerškov-Klika, M. (2013) Tehničko-tehnološko rješenje postojećeg postrojenja za proizvodnju biodizela tvrtke Biotron d.o.o..
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509.
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H. (2001) Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 405–416.
- Gaurina Srček, V., Radošević, K., Jukić, S., Slivac, I. (2016) Bioreaktori za uzgoj kultura životinjskih stanica, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* **11** (1-2), 18–27.
- Gifuni, I., Pollio, A., Safi, C., Marzocchella, A., Olivieri, G. (2018) Current Bottlenecks and Challenges of the Microalgal Biorefinery. *Trends Biotechnol.*
- Gouveia, L. (2011) Microalgae as a Feedstock for Biofuels, Springer, London, str. 27–30.



- 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.
- Grima, M. E., Belarbi, E. H., Fernandez, F. G. A., Medina, A. R., Chisti Y. (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.* **20**, 491–515.
- Grobbelaar, J. U. (2004) Algal nutrition. U: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, (Richmond, A., ured.), Blackwell, Oxford, str. 97–115.
- Guillard, R. R. L. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. U: Culture of Marine Invertebrate Animals, (Smith, W. L., Chanley, M. H., ured.), Plenum Press, New York, str. 26–60.
- Guiry, M. D. (2012) HOW MANY SPECIES OF ALGAE ARE THERE? *J. Phycol.* **48** (5), 1057–1063.
- Guiry, M. D., Guiry, G. M., Morrison, L., Rindi, F., Valenzuela Miranda, S., Mathieson, A. C., Parker, B. C., Langangen, A., John, M. D., Bárbara, I., Carter, C. F., Kuipers, P., Garbary, D. J. (2014) AlgaeBase: An On-line Resource for Algae. *Cryptogam., Algal.* **35** (2), 105–115.
- Hamed, I. (2016) The evolution and versatility of microalgal biotechnology: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **15** (6), 1104–1123.
- Heasman, M., Diemar, J., O'Connor, W., Sushames, T., Foulkes, L. (2000) Development of extended shelf-life microalgal concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs—a summary. *Aquac. Res.* **31** (8–9), 637–59.
- Heimann, K., Huerlimann R. (2015) Microalgal Classification: Major classes and genera of commercial microalgal species. U: Handbook of marine microalge, (Se-Kwon, K., ured.), Academic press, Cambridge, str. 25–41.
- Hibberd, D. J. (1981) Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Bot. J. Linn. Soc.* **82**, 93–119.

- Hoffmann, M., Marxen, K., Schulz, R., Vanselow, K.H. (2010) TFA and EPA productivities of *Nannochloropsis salina* influenced by temperature and nitrate stimuli in turbidostatic controlled experiments. *Mar. Drugs*. **8**, 2526–2545.
- Huang, Q., Jiang, F., Wang, L., Yang, C. (2017) Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms, *Engineering*. **3**, 318–329.
- Huang, G. H., Chen, F., Wei, D., Zhang, X. W., Chen, G. (2010) Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl. Energy*. **87**, 38–46.
- 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.
- Jiménez, C., Cossío, B. R., Labella, D., Xavier Niell, F. (2003) The feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in southern Spain. *Aquaculture*. **217** (1–4), 179–90.
- Juneja, A., Ceballos, R., Murthy, G. (2013) Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies*. **6** (9), 4607–4638.
- Jurac, Z. (2011) Optimiranje proizvodnje biodizela iz otpadnih jestivih ulja s obzirom na zahtjeve kvalitete (doktorska disertacija), Tehnički fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka.
- Katastar (2020), <<https://www.katastar.hr/#/>>. Pristupljeno 30. rujna 2020.
- Khan, M. I., Shin, J. H., Kim, J. D. (2018) The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb. Cell Fact*. **17**, 36.
- Kim, S. (2015) Handbook of Marine Microalgae Biotechnology Advances, 1. izd., Academic press, New York.
- Knothe, G. (2009) Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy Environ. Sci*. **2** (7), 759.

- Koller, A. P., Wolf, L., Brück, T., Weuster-Botz, D. (2017) Studies on the scale-up of biomass production with *Scenedesmus* spp. in flat-plate gas-lift photobioreactors. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **41** (2), 213–220.
- Koller, M. (2015) Design of Closed Photobioreactors for Algal Cultivation. *Algal Biorefineries*. 133–186.
- Krienitz, L., Wirth, M. (2006) The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. *Limnologica*. **36** (3), 204–210.
- Kunjapur, A. M., Eldridge, R. B. (2010) Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae. *Ind. Eng. Chem. Res.* **49** (8), 3516–3526.
- Lee, Y. K. (2001) Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *J. Appl. Phycol.* **13**, 307–315.
- Li, J., Han, D., Wang, D., Ning, K., Jia, J., Wei, L., Jing, X., Huang, S., Chen, J., Li, Y., Hu, Q., Xu, J. (2014) Choreography of Transcriptomes and Lipidomes of *Nannochloropsis* Reveals the Mechanisms of Oil Synthesis in Microalgae. *Plant Cell*. **26** (4), 1645–1665.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q., Dubois-Calero, N. (2008) Biofuels from microalgae. *Biotechnol. Progr.* **24** (4), 815–20.
- Liang, Y. N., Sarkany, N., Cui, Y. (2009) Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol. Lett.* **31**, 1043–1049.
- Lubián, L. M., Montero, O., Moreno-Garrido, I., Huertas, I. E., Sobrino, C., Gonzalez-del Valle, M., Parés, G. (2000) *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *J. Appl. Phycol.* **12**, 249–255.
- Ma, X. N., Chen, T. P., Yang, B., Liu, J., Chen, F. (2016) Lipid Production from *Nannochloropsis*. *Mar. Drugs*. **14**, 61.
- Ma, Y., Wang, Z., Yu, C., Yin, Y., Zhou, G. (2014) Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production, *Bioresour. Technol.* **167**, 503–509.

- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sust. Energy Rev.* **14**, 217–232.
- Mayers, J. J., Flynn, K. J., Shields, R. J. (2013) Rapid determination of bulk microalgal biochemical composition by Fourier-Transform Infrared spectroscopy. *Bioresour. Technol.* **148**, 215–220.
- Moheimani, N. R. (2005) The culture of Coccolithophorid Algae for carbon dioxide bioremediation (doktorska disertacija), Murdoch University, Perth.
- Mohler, D. T., Wilson, M. H., Fan, Z., Groppo, J. G., Crocker, M. (2019) Beneficial Reuse of Industrial CO<sub>2</sub> Emissions Using a Microalgae Photobioreactor: Waste Heat Utilization Assessment. *Energies.* **12** (13), 2634.
- Mulbry, W., Kangas, P., Kondrad, S. (2010) Toward scrubbing the bay: Nutrient removal using small algal turf scrubbers on Chesapeake Bay tributaries. *Ecol. Eng.* **36** (4), 536–541.
- Murakami, R., Hashimoto, H. (2009) Unusual nuclear division in *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae, Heterokonta) which may ensure faithful transmission of secondary plastids. *Protist.* **160**, 41–49.
- Musa, M., Ayoko, G. A., Ward, A., Rösch, C., Brown, R. J., Rainey, T. J. (2019) Factors Affecting Microalgae Production for Biofuels and the Potentials of Chemometric Methods in Assessing and Optimizing Productivity. *Cells.* **8** (8), 851.
- Muylaert, K., Bastiaens, L., Vandamme, D., Gouveia, L. (2017) Microalgae-based biofuels and bioproducts. U: Harvesting of microalgae: overview of process options and their strengths and drawbacks, (Gonzalez-Fernandez, C., Muñoz, R., ured.), Woodhead Publishing, str. 113–132.
- Mühlroth, A., Winge, P., El Assimi, A., Jouhet, J., Maréchal, E., Hohmann-Marriott, M. F., Vadstein, O., Bones, A. M. (2017) Mechanisms of Phosphorus Acquisition and Lipid Class Remodeling under P Limitation in a Marine Microalga. *Plant Physiol.* **175** (4), 1543–1559.
- Nwe Oo, Y. Y., Su, M. C., Kyaw, K. T. (2017) Extraction And Determination Of Chlorophyll Content From Microalgae. *Int. j. adv. res. publ.* **5** (1), 298–301.
- Ohlrogge, J., Browse, J. (1995) Lipid Biosynthesis. *Plant Cell.* **7** (7), 957–970.

Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S. (2011) The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90** (4), 1429–1441.

Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2020) Narodne novine **26**, Zagreb.

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

Poduzetnička zona Marof Lekenik (2020), <<http://lekenik.hr/poduzetnicka-zona/hr/home/>>. Pristupljeno 30. rujna 2020.

Ranjith Kumar, R., Hanumantha Rao, P., Arumugam, M. (2015) Lipid Extraction Methods from Microalgae: A Comprehensive Review. *Front. Energy Res.* **2**.

Rezić, T., Filipović, J., Šantek, B. (2014) Mikroalge – potencijalni izvor lipida za proizvodnju biodizela. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* **9** (1-2), 26–36.

Richmond, A. (2004) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, 1. izd., Blackwell, Oxford.

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

Rinanti, A., Purwadi, R. (2018) Harvesting of freshwater microalgae biomass by *Scenedesmus* sp. as bioflocculant. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **106**.

Santiago-Santos, Ma. C., Ponce-Noyola, T., Olvera-Ramírez, R., Ortega-López, J., Cañizares Villanueva, R. O. (2004) Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. *Process. Biochem.* **39**, 2047–2052.

Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B. (2008) Second-generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.* **1** (3), 20-43.

Schneider, R. C. S., Bjerk, T. R., Gressler, P. D., Souza, M. P., Corbellini, V. A., Lobo, E. A. (2012) Potential Production of Biofuel from Microalgae Biomass Produced in Wastewater. U: *Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications*, (Fang, Z., ured.), IntechOpen.

- Sforza, E., Simionato, D., Giacometti, G. M., Bertucco, A., Morosinotto, T. (2012) Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. *PLoS ONE*. **7** (6), e38975.
- Shen, Y., Yuan, W., Pei, Z. J., Wu, Q., Mao, E. (2009) Microalgae Mass Production Methods. *Transactions of the ASABE*. **52** (4), 1275–1287.
- Sheng, J., Vannela, R., Rittmann, B. E. (2011) Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803. *Bioresour. Technol.* **102**, 1697–1703.
- Shrestha, N., Dandinpet, K. K., Schneegurt, M. A. (2020) Effects of nitrogen and phosphorus limitation on lipid accumulation by *Chlorella kessleri* str. UTEX 263 grown in darkness. *J. Appl. Phycol.* **32**, 2795–2805.
- Sierra, E., Ación, F. G., Fernández, J. M., García, J. L., González, C., Molina, E. (2008) Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chem. Eng. J.* **138** (1-3), 136–147.
- Singh, G., Patidar, S. (2018) Microalgae harvesting techniques: a review. *J. Environ. Manage.* **217**, 499–508.
- Singh, S. P., Singh, P. (2015) Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review. *Renew. Sust. Energy Rev.* **50**, 431–444.
- Soomro, R. R., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y., Lin, L., Danquah, M. K. (2016) Development of a two-stage microalgae dewatering process—a life cycle assessment approach. *Front. Plant Sci.* **7**, 113.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006a) Optimization of *Nannochloropsis oculata* growth using the response surface method. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**, 1049–1056.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006b) Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **101**, 87–96.
- Su, C. H., Chien, L. J., Gomes, J., Lin, Y. S., Yu, Y. K., Liou, J. S., Syu, R. J. (2010) Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. *J. Appl. Phycol.* **23** (5), 903–908.

Suda, S., Atsumi, M., Miyashita, H. (2002) Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia*. **41**, 273–279.

Sukarni, Sudjito, Hamidi, N., Yanuhar, U., Wardana, I. N. G. (2014) Potential and properties of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* as biomass fuel feedstock. *Int. J. Energy Environ. Eng.* **5** (4), 279–290.

Tan, J. S., Lee, S. Y., Chew, K. W., Lam, M. K., Lim, J. W., Ho, S. H., Show, P. L. (2020) A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*. **11** (1), 116–129.

Torzillo, G., Chini Zittelli, G. (2015) Tubular Photobioreactors. U: Algal Biorefineries, (Prokop, A., Bajpai, R., Zappi, M., ured.), Springer, Cham, str. 187–212.

Ugwu, C. U., Aoyagi, H., Uchiyama, H. (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour. Technol.* **99** (10), 4021–4028.

Uredbu o kakvoći biogoriva (2005) Narodne novine **144**, Zagreb.

Uredba o kategorijama, vrstama i klasifikaciji otpada s katalogom otpada i listom opasnog otpada (2005) Narodne novine **50**, Zagreb.

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.

Wang, B., Lan, C. Q., Horsman, M. (2012) Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnol. Adv.* **30**, 904.

Yang, C., Hua, Q., Shimizu, K. (2000) Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochem. Eng. J.* **6** (2), 87–102.

Zakon o gradnji (2019) Narodne novine **125**, Zagreb.

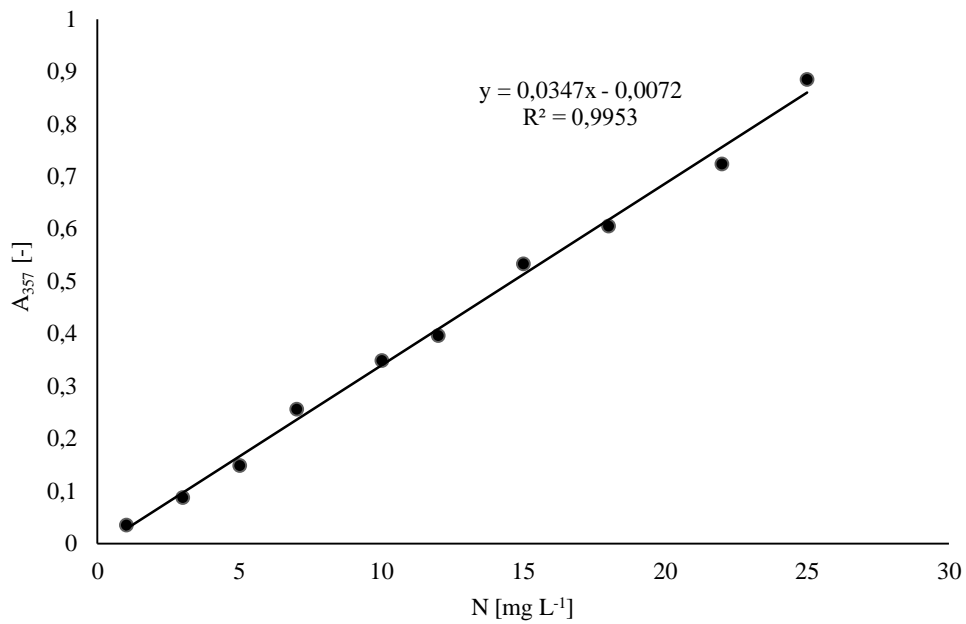
Zakon o održivom gospodarenju otpadom (2019) Narodne novine **98**, Zagreb

***PRILOZI***

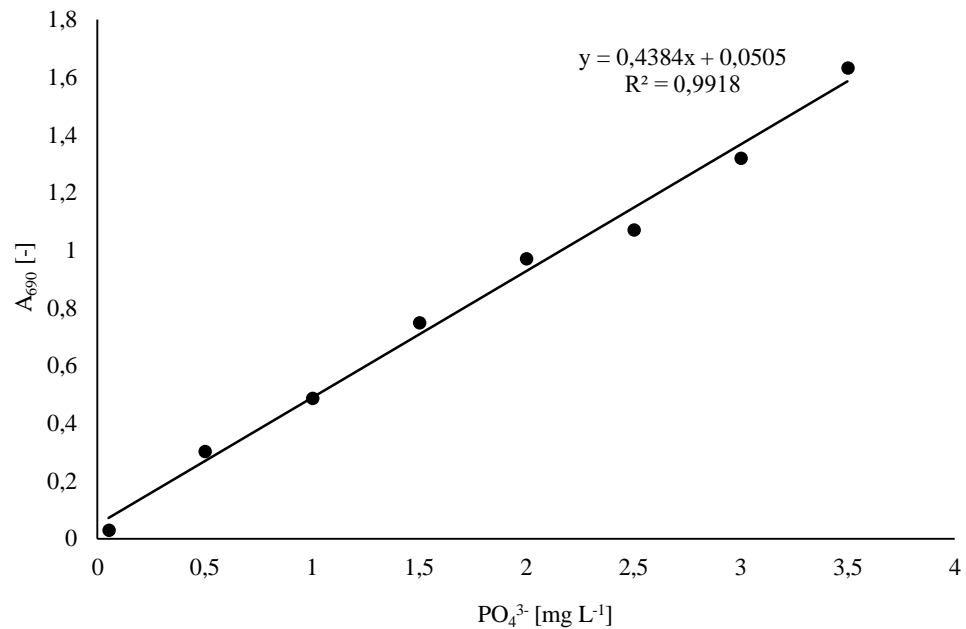


## 7. PRILOZI

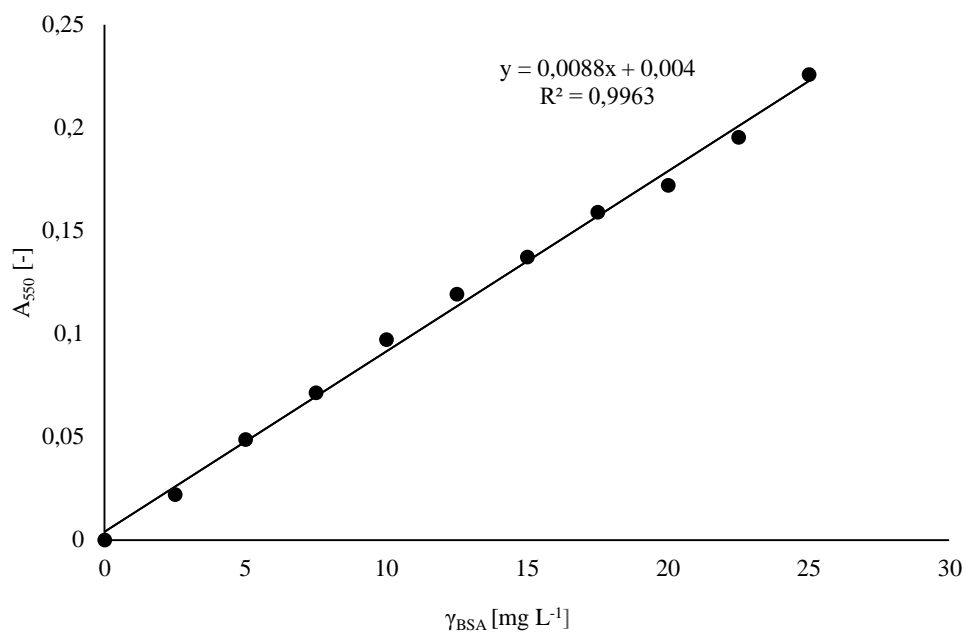
**Prilog 7.1.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije nitrata.



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

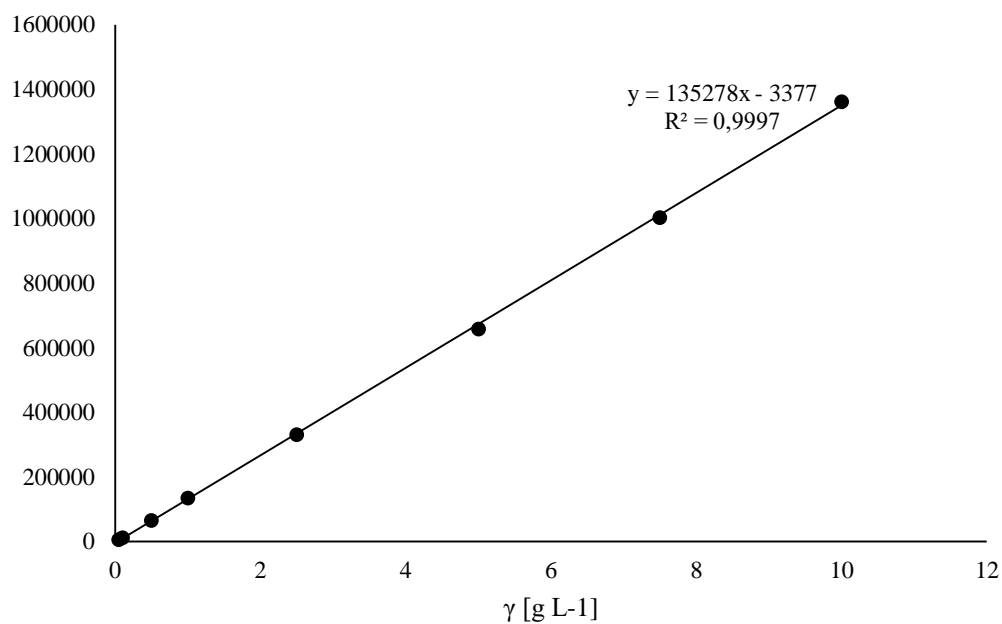


**Prilog 7.3.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-ju.

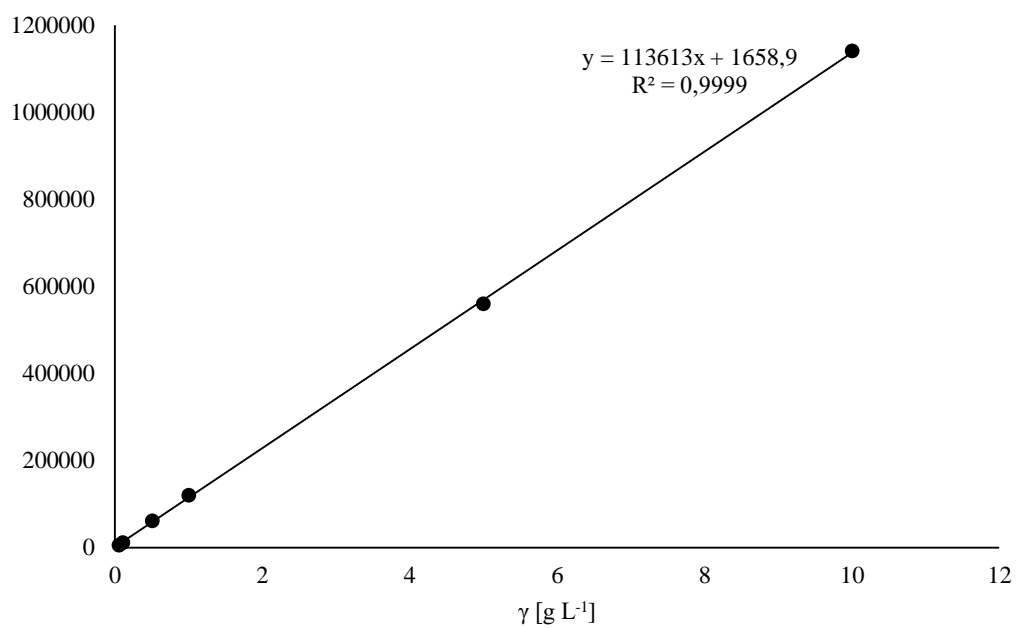


**Prilog 7.4.** Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije ugljikohidrata (UPLC).

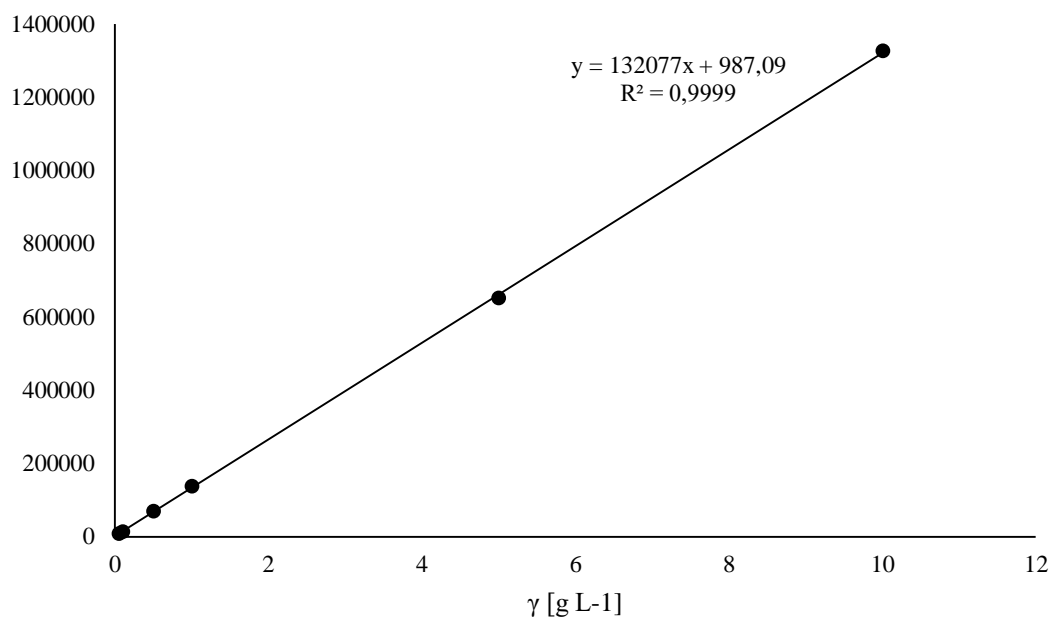
a) glukoza



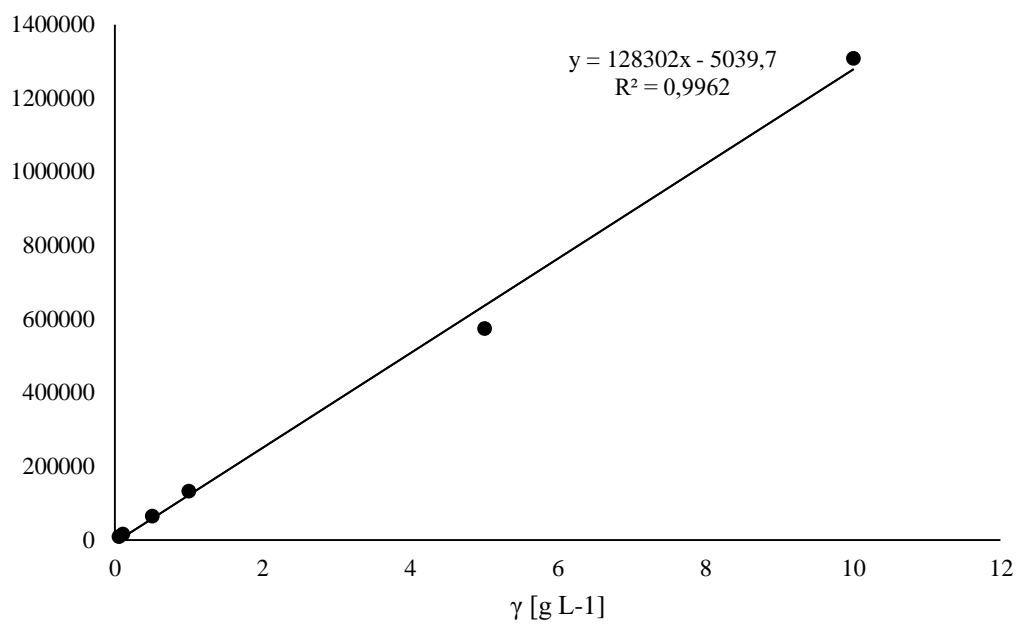
b) maltoza



c) galaktoza



d) fukoza



## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Agnes Dvici

Ime i prezime studenta