

# Fototrofni uzgoj dijatomeje Nitzschia sp.

---

**Kuzmić, Marija**

**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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:383111>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-05**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2020.

Marija Kuzmić

1168/BPI

**FOTOTROFNI UZGOJ  
DIJATOMEJE *NITZSCHIA* SP.**

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

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).

## **ZAHVALA**

Najveću zahvalu upućujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek koja mi je pružila priliku za izradu ovog rada, a pri tome mi je bila velika pomoć i podrška.

Također, najljepše se zahvaljujem mag. ing. Marini Grubišić koja je imala strpljenja za sve moje upite tijekom izrade ovog rada i nesebično mi pomagala.

Hvala i Igoru Livadi, tehničkom suradniku Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada, kao i svim ostalim članovima laboratorija na susretljivosti i ugodnoj radnoj atmosferi.

Na kraju, želim se zahvaliti svojoj obitelji i dragim prijateljima koji su mi bili velika podrška tijekom izrade diplomskog rada, ali i tijekom čitavog studija.

## 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 DIJATOMEJE *NITZSCHIA* SP.

*Marija Kuzmić, 1168/BPI*

#### Sažetak:

Dijatomeje su eukariotski jednostanični mikroorganizmi koji sintetiziraju različite bioaktivne tvari i proizvode s dodanom vrijednošću, kao i lipide koji se mogu koristiti kao alternativna sirovina za proizvodnju biodizela. Većina morskih dijatomeja može rasti samo fototrofno pri čemu koriste svjetlosnu energiju i asimiliraju CO<sub>2</sub>. Međutim produktivnost i koncentracija biomase fototrofno uzgojene kulture je vrlo mala. U ovom istraživanju, optimirana je hranjiva podloga f/2 za uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. tako da su mijenjane koncentracije tri limitirajuća makroelemenata (silicij, dušik i fosfor). Najveći prinos biomase od 0,7611 g L<sup>-1</sup> i produktivnost od 0,0544 g L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup> postignuti su na modificiranoj f/2 hranjivoj podlozi s deseterostruko većom koncentracijom silicija, te četverostruko većom koncentracijom dušika i fosfora u odnosu na izvornu f/2 hranjivu podlogu. Također je istražen utjecaj sastava modificirane f/2 hranjive podloge na sastav biomase. Stanična biomasa sadržavala je povećanu količinu proteina i višestruko nezasićenih masnih kiselina. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata proveden je u f/2 optimiranoj hranjivoj podlozi. Najveća produktivnost biomase od 0,7150 g L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup> zabilježena je između 7. i 8. dana uzgoja. Najzastupljenije makromolekule u biomasi su bili proteini, a zatim ugljikohidrati i lipidi.

**Ključne riječi:** *Nitzschia* sp., f/2 hranjiva podloga, fototrofni uzgoj, proteini, lipidi

**Rad sadrži:** 72 stranice, 33 slike, 19 tablica, 71 literaturni navod

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

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

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Ksenija Markov
2. Prof.dr.sc. Mirela Ivančić Šantek
3. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
4. Prof.dr.sc. Jasna Novak (zamjena)

**Datum obrane:** 06. studenog 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 and Malting and Brewing Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### PHOTOTROPHIC CULTIVATION OF DIATOM *NITZSCHIA* SP.

*Marija Kuzmić, 1168/BPI*

#### **Abstract:**

Diatoms are eukaryotic unicellular microorganisms which produce a variety of bioactive compounds and value-added products as well as lipids which can be used as an alternative feedstock for the production of biodiesel. Most of the marine diatoms grow only phototrophically by harvesting sunlight and assimilating CO<sub>2</sub>. However, the productivity and biomass concentration in phototrophically grown culture is very low. In this research, growth medium f/2 for the cultivation of diatom *Nitzschia* sp. was optimized by changing concentrations of three limiting macroelements (silica, nitrogen and phosphorus). The highest biomass yield of 0,7611 g L<sup>-1</sup> and productivity of 0,0544 g L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> was achieved with modified f/2 growth medium, which had a tenfold higher concentration of silica and fourfold higher concentrations of nitrogen and phosphorus, compare to original f/2 medium. Effect of modified f/2 growth medium on the composition of cell biomass was also determined. Cell biomass contained increased content of proteins and polyunsaturated fatty acids. Phototrophic fed-batch cultivation was conducted using optimized f/2 growth media. The highest biomass productivity of 0,7150 g L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> was accomplished between 7. and 8. day of cultivation. The most abundant macromolecule in cell biomass were proteins, followed by carbohydrate and lipid.

**Keywords:** *Nitzschia* sp., f/2 growth medium, phototrophic cultivation, proteins, lipids

**Thesis contains:** 72 pages, 33 figures, 19 tables, 71 references

**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. Ksenija Markov, Full professor
2. PhD. Mirela Ivančić Šantek, Full professor
3. PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Full professor
4. PhD. Jasna Novak, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 6 October 2020



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. Opće karakteristike i podjela dijatomeja.....	2
2.2. Biotehnološka primjena dijatomeja .....	3
2.3. Najvažniji metabolički procesi u stanicama dijatomeja.....	7
2.3.1. Načini ishrane i pridobivanja energije.....	7
2.3.2. Fotosinteza .....	8
2.3.3. Transport i metabolizam silicija .....	10
2.3.4. Biosinteza lipida.....	11
2.3.4.1. Utjecaj makronutrijenata silicija, dušika i fosfora na biosintezu lipida.....	14
2.4. Bioreaktori za uzgoj mikroalgi .....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>20</b>
3.1. Materijali.....	20
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	20
3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga.....	20
3.1.3. Ostale kemikalije.....	21
3.1.4. Hranjive podloge .....	22
3.1.4.1. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma i održavanje kulture.....	22
3.1.4.2. Hranjive podloge za optimiranje omjera silicija, dušika i fosfora.....	24
3.1.4.3. Hranjiva podloga za fototrofni šaržni uzgoj s pritokom u fotobiorektoru .....	27
3.1.5. Oprema i aparatura .....	27
3.1.5.1. Centrifuge .....	27
3.1.5.2. Uređaj za plinsku kromatografiju (GC) .....	27
3.1.5.3. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC).....	27
3.1.5.4. Laboratorijski bioreaktor s miješalom.....	28
3.1.5.5. Ostala oprema i aparatura.....	29
3.2. Metode .....	29
3.2.1. Uzgoj inokuluma.....	29
3.2.2. Ugušćivanje inokuluma za uzgoj u fotobiorektoru.....	30
3.2.3. Optimizacija sastava hranjive podloge.....	30
3.2.4. Fototrofni šaržni uzgoj s pritokom u fotobiorektoru .....	31
3.2.5. Analitičke metode .....	32
3.2.5.1. Brojanje stanica u Thomaovoj komorici .....	32
3.2.5.2. Mjerenje optičke gustoće kulture .....	32
3.2.5.3. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari biomase.....	32
3.2.5.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije klorofila u biomasi .....	33
3.2.5.5. Određivanje koncentracije silicija.....	34
3.2.5.6. Određivanje koncentracije dušika .....	35
3.2.5.7. Određivanje koncentracije fosfata.....	36

3.2.5.8. Određivanje profila masnih kiselina u biomasi .....	37
3.2.5.9. Određivanje udjela proteina u biomasi .....	38
3.2.5.10. Određivanje koncentracije ugljikohidrata .....	40
3.2.5.11. Određivanje pokazatelja uspješnosti bioprocesa .....	41
3.2.5.12. Određivanje volumena stanica .....	41
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>42</b>
4.1. Optimizacija sastava hranjive podloge .....	43
4.1.1. Sastav biomase .....	49
4.1.1.1. Proteini .....	49
4.1.1.2. Lipidi .....	50
4.1.1.3. Ugljikohidrati .....	52
4.1.1.3. Klorofil .....	53
4.2. Uzgoj u fotobioreaktoru .....	54
4.2.1. Određivanje volumena stanice .....	57
4.2.2. Sastav biomase .....	60
4.2.2.1. Proteini .....	61
4.2.2.2. Lipidi .....	62
4.2.2.3. Ugljikohidrati .....	64
4.2.2.4. Klorofil .....	65
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>66</b>
<b>6. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>67</b>

# 1. UVOD

Dijatomeje su jednostanične mikroalge koje imaju važnu ulogu u kruženju ugljika i silicija u morima i oceanima. Fototrofi su, odnosno koriste svjetlosnu energiju i anorganski izvor ugljika za rast (Chen i sur., 2011). Koriste se u proizvodnji prehrambenih, kozmetičkih i farmaceutskih proizvoda jer su važan izvor makromolekula (proteina, ugljikohidrata, lipida) i niza metabolita s biološkom aktivnošću. Također se intenzivno istražuje njihova primjena u proizvodnji biogoriva, fitoremedijaciji i nanotehnologiji (Bozarth i sur., 2009). Biotehnološku primjenu imaju uglavnom u laboratorijskom mjerilu, a komercijalnu primjenu u većem mjerilu našle su u akvakulturi zahvaljujući visokim udjelima aminokiselina i lipida u biomasi. Od intracelularnih metabolita s važnom primjenom u farmaceutskoj industriji svakako se ističe eikozapentaenoična kiselina (EPA),  $\omega$ -3 masna kiselina koja ima povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje (Lebeau i Robert, 2003a).

U industriji se najveći napori ulažu u optimiranje uvjeta uzgoja kako bi se postigli visoki prinosi i produktivnost biomase željenog sastava. Najvažniji parametri koji utječu na rast dijatomeja su: vrsta i koncentracija nutrijenata, svjetlost, pH, miješanje, salinitet i temperatura (Lebeau i Robert, 2003b). Zahtijevaju nekoliko makronutrijenata (silicij, dušik, fosfor), mikronutrijenata (pretežito otopljeno željezo) i vitamina (tiamin, cijanokobalamin i u nekim slučajevima biotin) za rast (Lebeau i Robert, 2003b). Limitirajući supstrati za rast u najčešće korištenoj f/2 hranjivoj podlozi za fototrofni uzgoj su upravo silicij, dušik i fosfor. U uvjetima limitacije nutrijentima, stanice akumuliraju lipide, prvenstveno triacilglicerole.

Cilj ovog rada bio je optimirati koncentracije silicija, dušika i fosfora u f/2 hranjivoj podlozi za fototrofni uzgoj šaržnim postupkom u svrhu povećanja produktivnosti biomase. Također, istražen je utjecaj sastava modificirane f/2 hranjive podloge na makromolekulski sastav biomase (ukupni lipidi, ugljikohidrati i proteini), sastav pigmentata (klorofil a i c), sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima te sastav monosaharida u ukupnim ugljikohidratima na kraju šaržnog uzgoja. U nastavku istraživanja proveden je šaržni uzgoj s pritokom supstrata u bioreaktoru s ciljem povećanja koncentracije biomase i važnih staničnih makromolekula. Tijekom uzgoja praćen je makromolekulski sastav biomase (ukupni lipidi, proteini i ugljikohidrati), sastav pigmentata (klorofil a i c), sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima te sastav monosaharida u ukupnim ugljikohidratima.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. OPĆE KARAKTERISTIKE I PODJELA DIJATOMEJA

Razred dijatomeja (*Bacillariophyta*) spada u koljeno Heterokontophyta, a čine ga jednostanične fotosintetske vrste zlatno ili smeđe pigmentiranih mikroalgi različite morfologije. Rastu pojedinačno ili u kolonijama, najčešće u morima i jezerima (d'Ippolito i sur., 2015).

Smatra se da postoji između  $2 \cdot 10^4$  i  $2 \cdot 10^5$  vrsta dijatomeja, od čega je preko  $8 \cdot 10^3$  vrsta detaljno istraženo (d'Ippolito i sur., 2015). Čine više od 70 % ukupnog morskog planktona i odgovorne su za 40 – 50 % ukupne proizvodnje  $O_2$  u oceanima (Adams i Bugbee, 2013; d'Ippolito i sur., 2015). Daleko su najproduktivnije i ekološki najprilagodljive eukariotske mikroalge na svijetu. Nazivaju se i biološkim pumpama jer imaju sposobnost fiksiranja  $CO_2$ , čime smanjuju koncentraciju istog u atmosferskom zraku. Odgovorne su za otprilike 20 % fiksacije ugljika na Zemlji (Gao i sur., 2019). Njihovim ugibanjem formira se dijatomejska zemlja kojoj je svojstvena golema moć apsorpcije, zbog čega se često koristi kao filtracijsko sredstvo i insekticid.

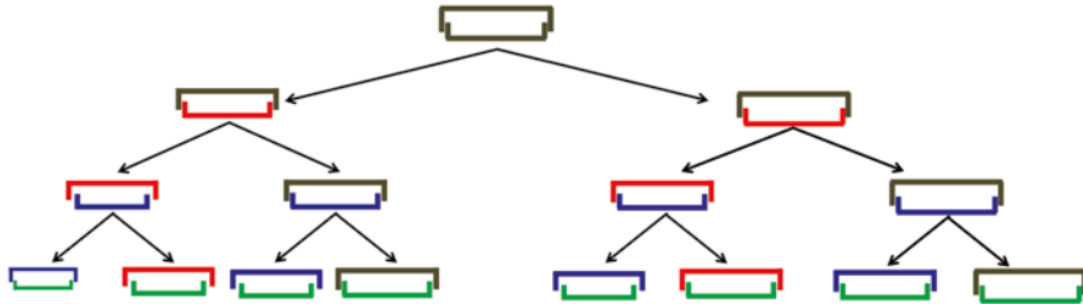
Nastale su sekundarnom endosimbiozom crvene alge i eukariotskog domaćina. Posljedično, njihov kloroplast okružuju četiri membrane, za razliku od zelenih mikroalgi čiji je kloroplast okružen dvjema membranama (Goss i sur., 2020).

Karakterizira ih stanična ljušturica građena od kremenata ( $SiO_2$ ), tzv. frustula, koja nije prisutna kod drugih razreda mikroalgi. Frustula je čvrsta struktura koja stanicama pruža mehaničku potporu, a istovremeno zbog njezine poroznosti omogućava unos nutrijenata u stanicu (Hildebrand i Lerch, 2015). U literaturi uspoređuju izgled ljušturice s kutijom ili Petrijevom zdjelicom, jer se sastoji od gornjeg dijela (epiteke) koji poput poklopca zatvara donji dio (hipoteku). Na samim krajevima hipoteke i epiteke nalaze se valve, a na oblim dijelovima stanice mnoštvo preklapajućih pojaseva. Neke vrste imaju i rafu, odnosno procjep duž ljušturice kroz koji se izlučuje ljepljiva sluz koja omogućuje svojevrsno kretanje stanica (Hildebrand i Lerch, 2015).

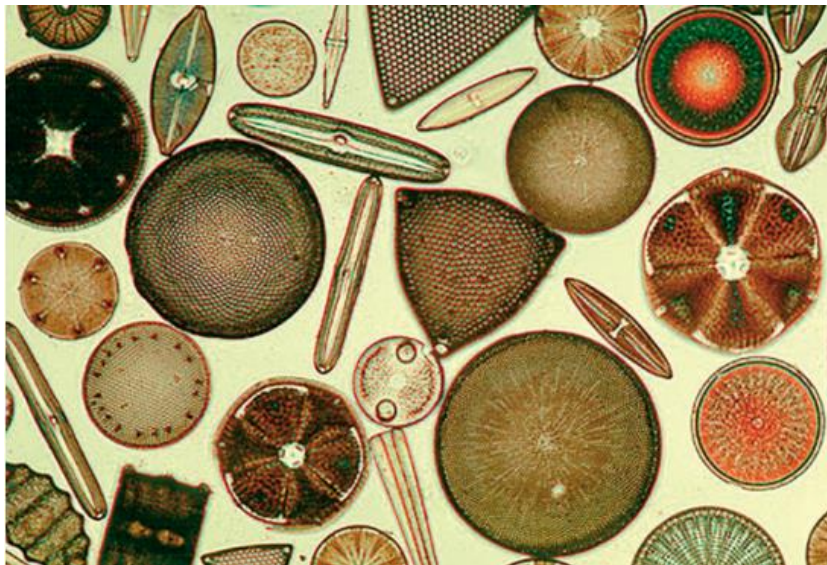
Razmnožavati se mogu vegetativno i spolno. Vegetativnim načinom razmnožavanja iz stanice majke nastaju dvije stanice kćeri. Karakteristika ovakvog načina razmnožavanja je postepeno smanjenje veličine stanica kroz generacije (slika 1). Kada stanice dosegnu kritičnu veličinu nakon nekoliko generacija, počinju se razmnožavati spolnim načinom kako bi izbjegle smrt (Hildebrand i Lerch, 2015).

Tradicionalno se dijele u dva reda, prema evolucijskim i strukturalnim razlikama na: (1) centrice ili *Centrales* koje su radijalno simetrične s obzirom na središte stanice i (2) penate tj.

*Pennales* sa svojom bilateralnom simetrijom stanica. Unutar reda *Centrales* postoji podjela na polarne i nepolarne rodove, dok se brojniji red *Pennales* grana na *Bacillariophyceae* (rodovi s izraženom rafom) i *Fragilariophyceae* (rodovi koji nemaju rafu) (d'Ippolito i sur., 2015). Slika 2 prikazuje stanice dijatomeja iz redova *Centrales* i *Pennales*.



Slika 1. Kontinuirano smanjenje veličine stanica dijatomeja tijekom vegetativnog razmnožavanja (Kumar i sur., 2015).



Slika 2. Raznovrsnost dijatomeja iz redova *Centrales* i *Pennales* (Abrantes i Gil, 2013).

## 2.2. BIOTEHNOLOŠKA PRIMJENA DIJATOMEJA

Čitave stanice dijatomeja, njihove frustule i vrijedne biomolekule imaju široku primjenu u biotehnologiji i drugim znanstvenim područjima (tablica 1). Uvelike se koriste u nanotehnologiji, biosenzorici, forenzičkoj imunologiji, filtraciji i purifikaciji vode, akvakulturi, bioremedijaciji i drugdje (Bozarth i sur., 2009). Visokovrijedni proizvodi uključujući vitamine, esencijalne nezasićene masne kiseline, aminokiseline i pigmente neki su od industrijski važnih proizvoda dijatomeja (Becker, 2007).

Najvažnije nutritivno vrijedne biomolekule dijatomeja su nezasićene masne kiseline poput eikozapentaenoične kiseline (EPA), arahidonske kiseline (ARA), dokozaheksaenoične kiseline i drugih  $\omega$ -3 masnih kiselina. Navedene masne kiseline učinkovite su u suzbijanju kardiovaskularnih bolesti, prekursori su važnih tkivnih hormona i smatra se da imaju antikancerogenu aktivnost (Bozarth i sur., 2009). EPA je bitna komponenta polarnih lipida koji izgrađuju membrane stanica dijatomeja, uključujući tilakoide. Sintetizira se uglavnom u eksponencijalnoj fazi rasta stanica. Ova  $\omega$ -3 polinezasićena kiselina ima vrlo povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje. Konkretno, učinkovita je u sprječavanju hipertenzije, tromboze, aritmije i infarkta miokarda zbog čega se često koristi kao suplement hrani (Kiran Marella i Tiwari, 2020). Može dosegnuti do 30 % ukupnih masnih kiselina dijatomeja (Lebeau i Robert, 2003b).

Makromolekule dijatomeja važne za industrijsku primjenu su ugljikohidrati, proteini i lipidi (Barkia i sur., 2019; Singh i sur., 2015). Ugljikohidrati se koriste prvenstveno za proizvodnju etanola fermentacijom, proteini za proizvodnju metana anaerobnom gasifikacijom, a lipidi za proizvodnju biodizela (Bozarth i sur., 2009). Sastav biomase pojedinih vrsta mikroalgi ovisi o svjetlosti, temperaturi, salinitetu, C/N i C/P omjeru i vremenu žetve (Cesário i sur., 2018). Tablica 2 prikazuje različitost makromolekularnog sastava mikroalgi.

Maseni udjel proteina u biomasi morskih mikroalgi može doseći 52 % (Renaud i sur., 1999; Brown i sur., 1997). Brown i sur. (1997) istraživali su sastav proteina 40 vrsta mikroalgi raspoređenih u 7 razreda. Uočili su da sve vrste imaju sličan sastav aminokiselina s znatnim udjelom esencijalnih aminokiselina, što ih čini vrijednim izvorom proteina. Proteini mikroalgi imaju primjenu u proizvodnji životinjske i ljudske hrane, u tehnologiji rekombinantnih proteina te proizvodnji biogoriva (Slocombe i sur., 2013).

Najzastupljeniji polisaharidi mikroalgi su celuloza (građevna jedinica stanične stijenke) i škrob (rezervni materijal). Dijatomeje umjesto škroba pohranjuju krizolaminarin kao glavni rezervni materijal. Zbog sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala, krizolaminarin se koristi za liječenje teških i ozbiljnih bolesti, uključujući karcinom (Xia i sur., 2018). Najzastupljeniji monosaharid mikroalgi je glukoza (21 % do 87 % ukupnih ugljikohidrata) (Renaud i sur., 1999; Brown i sur., 1997). Ostali monosaharidi podrazumijevaju galaktozu, ksilozu, manozu, ramnozu, fukozu i nekoliko metilnih šećera (de Jesus Raposo i sur., 2015). Ugljikohidrati mikroalgi koriste se kao izvor ugljika u proizvodnji biogoriva, osobito bioetanola (Cesário i sur., 2018).

Lipidi, osobito triacilgliceridi (TAG) su glavno skladište ugljika u dijatomejama. Maseni udjel ukupnih masnih kiselina u optimalnim uvjetima uzgoja iznosi između 15 % i 25 % suhe tvari biomase (Levitan i sur., 2014). Istraživanje Horst i sur. (2012) također je pokazalo da

dijatomeje sadrže prosječno 25 % lipida u suhoj tvari biomase u eksponencijalnoj fazi rasta, što je 8 % više u odnosu na zelene alge. Sposobnost nakupljanja visokih udjela lipida čini dijatomeje pogodnim mikroorganizmima za proizvodnju biodizela. Najzastupljenije masne kiseline dijatomeja iz roda *Nitzschia* sp. su palmitinska (C16:0), palmitoleinska (C16:1) i eikozapentaenoična kiselina (EPA; C20:5) s masenim udjelima većim od 10 % u ukupnim masnim kiselinama (Levitan i sur., 2014).

Fukoksantin je najzastupljeniji pigment dijatomeja. U prosjeku ga ima 0,2 – 2 % suhe tvari biomase, što je sto puta više u odnosu na udio u smeđim algama. Na sintezu navedenog produkta najveći utjecaj ima intenzitet i valna duljina svjetlosti. Smatra se vrlo vrijednim proizvodom jer pokazuje antioksidativna, antiinflamatorna i antihipertenzijska svojstva (Kiran Marella i Tiwari, 2020).

Tablica 1. Neke vrste dijatomeja i njihova potencijalna primjena u biotehnologiji (modificirano prema Bayu i sur., 2020).

Vrsta dijatomeje	Važna komponenta biomase*	Primjena
<i>Chaetoceros gracilis</i>	Lipidi (30 - 70 %)	Hrana u akvakulturi Proizvodnja biogoriva
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Fukoksantin (5,2 mg g <sup>-1</sup> )	Proizvodnja fukoksantina
<i>Thalassiosira</i> sp.	Lipidi (24 - 39 %)	Akvakultura
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	EPA (2,2 - 3,9 %)	Funkcionalna hrana Proizvodnja lipida
<i>Nitzschia</i> sp.	EPA (1,9 - 4,7 %) ARA (0,6 - 4,7 %)	Suplement hrani
<i>Coscinodiscus</i> sp.	Nanoporozni silicij	Biosenzori
<i>Skeletonema costatus</i>	Bioaktivne komponente	Antipatogeni sekundarni metaboliti
<i>Cyclotella</i> sp.	Lipidi (42 %)	Biogoriva

\*Postotak označava maseni udjel makromolekule u suhoj tvari biomase.

Tablica 2. Makromolekularni sastav različitih koljena mikroalgi; <sup>a</sup> udjel makromolekule u suhoj tvari biomase [%], <sup>b</sup> 95 %-tni interval medijana [%], <sup>c</sup> broj mjerenja na temelju kojih je napravljen izračun (modificirano prema Finkel i sur., 2016).

	Proteini	Lipidi	Ugljikohidrati	Pepeo	RNA	Klorofil a	DNA
Cyanobacteria	<b>43,1<sup>a</sup></b> (36,8 - 49,3) <sup>b</sup> 25 <sup>c</sup>	<b>11,7<sup>a</sup></b> (8,23 - 16,2) <sup>b</sup> 33 <sup>c</sup>	<b>21,8<sup>a</sup></b> (16,7 - 26,2) <sup>b</sup> 22 <sup>c</sup>	<b>8,12<sup>a</sup></b> (4,88 - 10,9) <sup>b</sup> 13 <sup>c</sup>	<b>8,7<sup>a</sup></b> (7,28 - 10,1) <sup>b</sup> 16 <sup>c</sup>	<b>1,06<sup>a</sup></b> (0,54 - 1,4) <sup>b</sup> 3 <sup>c</sup>	<b>0,82<sup>a</sup></b> (0,63 - 4,7) <sup>b</sup> 16 <sup>c</sup>
Chlorophyta	<b>32,7<sup>a</sup></b> (29,4 - 36,1) <sup>b</sup> 75 <sup>c</sup>	<b>16,3<sup>a</sup></b> (14,5 - 18,2) <sup>b</sup> 98 <sup>c</sup>	<b>14,4<sup>a</sup></b> (11,5 - 16,8) <sup>b</sup> 71 <sup>c</sup>	<b>12,1<sup>a</sup></b> (6,45 - 14,2) <sup>b</sup> 33 <sup>c</sup>	<b>5,11<sup>a</sup></b> (2,79 - 8,22) <sup>b</sup> 3 <sup>c</sup>	<b>1,15<sup>a</sup></b> (0,9 - 1,5) <sup>b</sup> 26 <sup>c</sup>	<b>0,81<sup>a</sup></b> (0,4 - 6,2) <sup>b</sup> 3 <sup>c</sup>
Cryptophyta	<b>38,5<sup>a</sup></b> (30,8 - 45,8) <sup>b</sup> 16 <sup>c</sup>	<b>16,1<sup>a</sup></b> (11,2 - 20,3) <sup>b</sup> 18 <sup>c</sup>	<b>12,5<sup>a</sup></b> (7,03 - 17,8) <sup>b</sup> 16 <sup>c</sup>	<b>16,1<sup>a</sup></b> (10,2 - 19,5) <sup>b</sup> 13 <sup>c</sup>	- - -	<b>1,18<sup>a</sup></b> (0,85 - 1,6) <sup>b</sup> 8 <sup>c</sup>	- - -
Bacillariophyta	<b>27,4<sup>a</sup></b> (23,9 - 30,8) <sup>b</sup> 82 <sup>c</sup>	<b>18,8<sup>a</sup></b> (16,9 - 20,8) <sup>b</sup> 92 <sup>c</sup>	<b>12,2<sup>a</sup></b> (9,57 - 15) <sup>b</sup> 82 <sup>c</sup>	<b>27,5<sup>a</sup></b> (24,1 - 29,3) <sup>b</sup> 63 <sup>c</sup>	- - -	<b>1,12<sup>a</sup></b> (0,84 - 1,4) <sup>b</sup> 23 <sup>c</sup>	- - -
Haptophyta	<b>32,1<sup>a</sup></b> (27,5 - 36,8) <sup>b</sup> 76 <sup>c</sup>	<b>18,6<sup>a</sup></b> (15,7 - 21,3) <sup>b</sup> 81 <sup>c</sup>	<b>16,9<sup>a</sup></b> (11,4 - 20,2) <sup>b</sup> 73 <sup>c</sup>	<b>13,7<sup>a</sup></b> (11,3 - 17,5) <sup>b</sup> 51 <sup>c</sup>	<b>4,78<sup>a</sup></b> (0 - 10,7) <sup>b</sup> 1 <sup>c</sup>	<b>1,16<sup>a</sup></b> (0,89 - 1,5) <sup>b</sup> 34 <sup>c</sup>	<b>1,01<sup>a</sup></b> (0,19 - 1,6) <sup>b</sup> 1 <sup>c</sup>
Ochrophyta	<b>32,6<sup>a</sup></b> (25,2 - 39,5) <sup>b</sup> 19 <sup>c</sup>	<b>21,3<sup>a</sup></b> (17,1 - 26,1) <sup>b</sup> 26 <sup>c</sup>	<b>14,4<sup>a</sup></b> (8,62 - 20) <sup>b</sup> 19 <sup>c</sup>	<b>19,6<sup>a</sup></b> (10,7 - 22,8) <sup>b</sup> 8 <sup>c</sup>	<b>0,55<sup>a</sup></b> (0 - 3,86) <sup>b</sup> 4 <sup>c</sup>	<b>1,1<sup>a</sup></b> (0,7 - 1,5) <sup>b</sup> 10 <sup>c</sup>	- - -
Dinophyta	<b>27,4<sup>a</sup></b> (19,4 - 35) <sup>b</sup> 22 <sup>c</sup>	<b>15,8<sup>a</sup></b> (12,4 - 20,2) <sup>b</sup> 25 <sup>c</sup>	<b>23<sup>a</sup></b> (15,6 - 29,8) <sup>b</sup> 23 <sup>c</sup>	<b>11,6<sup>a</sup></b> (4,16 - 19,9) <sup>b</sup> 2 <sup>c</sup>	- - -	- - -	- - -



## 2.3. NAJVAŽNIJI METABOLIČKI PROCESI U STANICAMA DIJATOMEJA

### 2.3.1. Način ishrane i pridobivanja energije

Iako se mikroalge općenito smatraju fotoautotrofima, neke je moguće uzgajati i heterotrofno, miksotrofno ili fotoheterotrofno. Način uzgoja mikroalgi, odnosno izvor energije i izvor ugljika za rast, utječe na brzinu rasta i sastav stanice, a posebno na produktivnost biomase i lipida (Chew i sur., 2018).

Fotoautotrofni rast mikroalgi podrazumijeva korištenje svjetlosne energije i anorganskog izvora ugljika, najčešće u obliku CO<sub>2</sub> u procesu fotosinteze. Udio lipida u biomasi uzgojenoj na ovakav način može biti između 5 % i 68 %, ovisno o vrsti (Chen i sur., 2011).

Pri heterotrofnom uzgoju, mikroalge koriste organske tvari kao izvor energije i ugljika, bez prisustva svjetlosti. Najčešće korišteni izvori ugljika u heterotrofnom uzgoju su: saharoza, glukoza, laktoza, galaktoza, glicerol i fruktoza. Neke vrste mogu rasti i fototrofno i heterotrofno, pri čemu heterotrofni način uzgoja daje veće produktivnosti biomase i lipida (Chew i sur., 2018).

Kod miksotrofnog uzgoja mikroalge koriste svjetlost kao glavni izvor energije uz simultano trošenje anorganskog (CO<sub>2</sub>) i organskog izvora ugljika za rast. Energija potrebna za obavljanje staničnih funkcija pridobiva se fotosintezom, ali i razgradnjom asimiliranih organskih izvora ugljika, što znači da svjetlosna energija ne ograničava rast miksotrofnih vrsta (Mohan i sur., 2014).

Fotoheterotrofne vrste zahtijevaju istovremenu dostupnost svjetlosti kao izvora energije i organskog izvora ugljika za rast. Ovakav način rasta svojstven je malom broju vrsta i nedovoljno je istražen pa se rijetko koristi u industrijskoj proizvodnji. Pogodan je za dobivanje specifičnih metabolita, ali se za proizvodnju lipida rijetko koristi (Chew i sur., 2018).

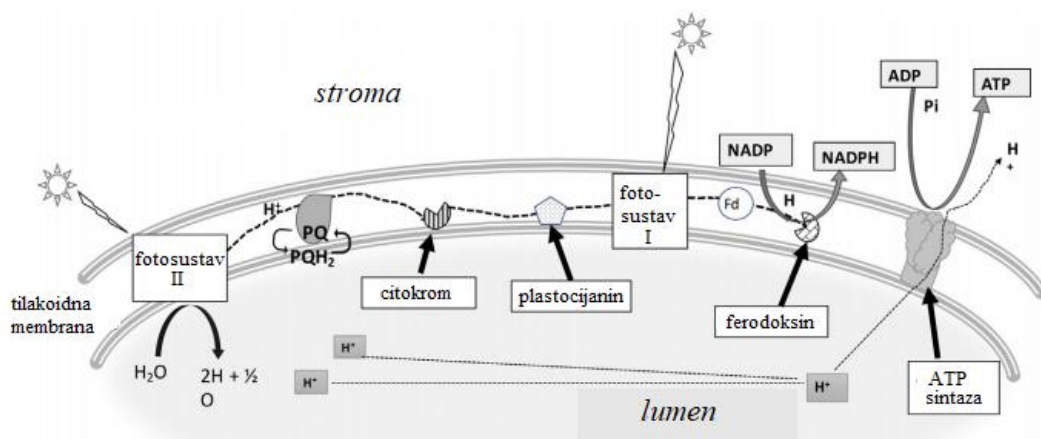
Fotoautotrofan način rasta najčešće se koristi pri uzgoju mikroalgi jer omogućuje rast na dostupnom izvoru ugljika (CO<sub>2</sub> iz zraka ili otpadnih plinova) i rijetko je podložan kontaminacijama. Međutim, takvim uzgojem dobivaju se niske produktivnosti biomase i lipida. S druge strane, heterotrofnim uzgojem postiže se visoka produktivnost biomase i lipida, ali se vrlo često pojavljuju kontaminacije zbog prisutnosti organskog izvora ugljika (najčešće jednostavni šećeri, npr. glukoza i saharoza). Miksotrofna i fotoheterotrofna kultivacija rijetko se primjenjuju zbog različitih tehnoloških nedostataka dostupnih fotobioreaktorskih sustava (Chew i sur., 2018).

### 2.3.2. Fotosinteza

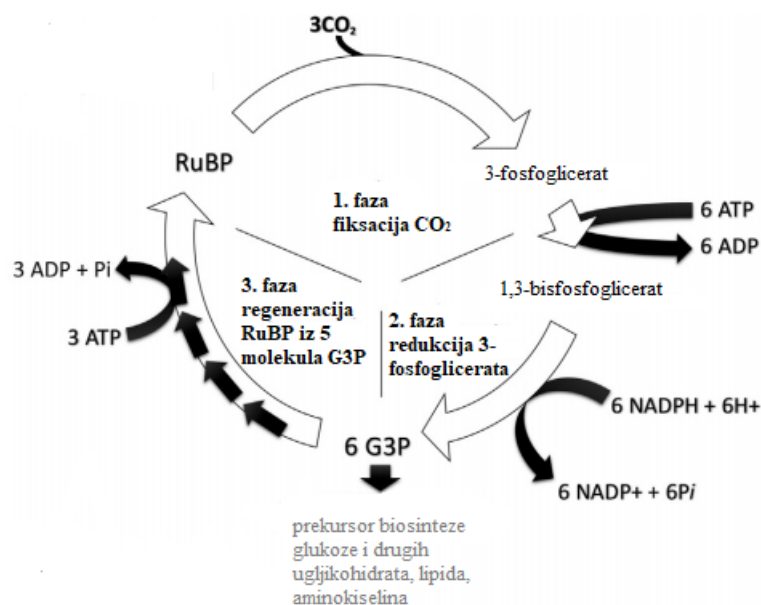
Fotosinteza je proces kojim fototrofni organizmi koristeći energiju fotona svjetlosti fiksiraju CO<sub>2</sub> u ugljikohidrate, otpuštajući O<sub>2</sub> kao nusproizvod. Podrazumijeva niz reakcija na tilakoidnim membranama (fotokemijske reakcije) i u stromi kloroplasta (ugljik - fiksirajuće i reduksijske reakcije Calvinovog ciklusa) (Batista-Silva i sur., 2020). Fotokemijske reakcije prikazane su na slici 3, a reakcije Calvinovog ciklusa na slici 4.

Fotokemijske reakcije provode se na komponentama fotosintetskog aparata smještenog u tilakoidima kloroplasta. Spomenute komponente obuhvaćaju: fotosustav II, fotosustav I, citokrom b<sub>6</sub>/f i ATP sintazu (Masojidek i sur., 2013). Fotosustav II apsorbira fotone vidljivog dijela spektra, aktivira ih i prenosi do fotosustava I preko citokroma b<sub>6</sub>/f. Otpuštene elektrone fotosustav II nadomješta fotolizom vode, pri čemu uz elektrone nastaje i O<sub>2</sub>. Prijenos elektrona kroz fotosustav II generira transmembranski gradijent protona koji služi kao pokretačka sila za fosforilaciju ADP u ATP uz ATP sintazu. U fotosustavu I se elektroni ponovno aktiviraju i koriste za redukciju nosača elektrona NADP<sup>+</sup> u NADPH (Batista-Silva i sur., 2020).

Visokoenergetski spojevi nastali fotokemijskim reakcijama (ATP i NADPH) služe kao pokretačka sila Calvinovog ciklusa koji se odvija u stromi kloroplasta. U tom procesu se asimilira i reducira CO<sub>2</sub> u trioza-fosfate koji dalje ulaze u biosintetske puteve ugljikohidrata, lipida, proteina i sekundarnih metabolita (Batista-Silva i sur., 2020). Navedeni mehanizam fotosinteze vrijedi generalno za sve fototrofne vrste, a u daljnjem tekstu biti će navedene neke posebnosti fotosinteze dijatomeja u odnosu na druge vrste.



Slika 3. Fotosintetske reakcije ovisne o svjetlu (modificirano prema Yahia i sur., 2019).



Slika 4. Fiksacija ugljikovog dioksida; Calvin-Benson ciklus  
(modificirano prema Yahia i sur., 2019).

Glavni produkt fotosinteze dijatomeja je  $\beta$ -1,3-glukan krizolaminarin. Krizolaminarin se pohranjuje u citosolu kao rezervni izvor energije. Većina ostalih fototrofnih organizama kao rezervu skladišti škrob (polimer glukoznih jedinica povezanih  $\alpha$ -1,4-glikozidnom vezom) u plastidima (Hildebrand i sur., 2013; Goss i sur., 2020).

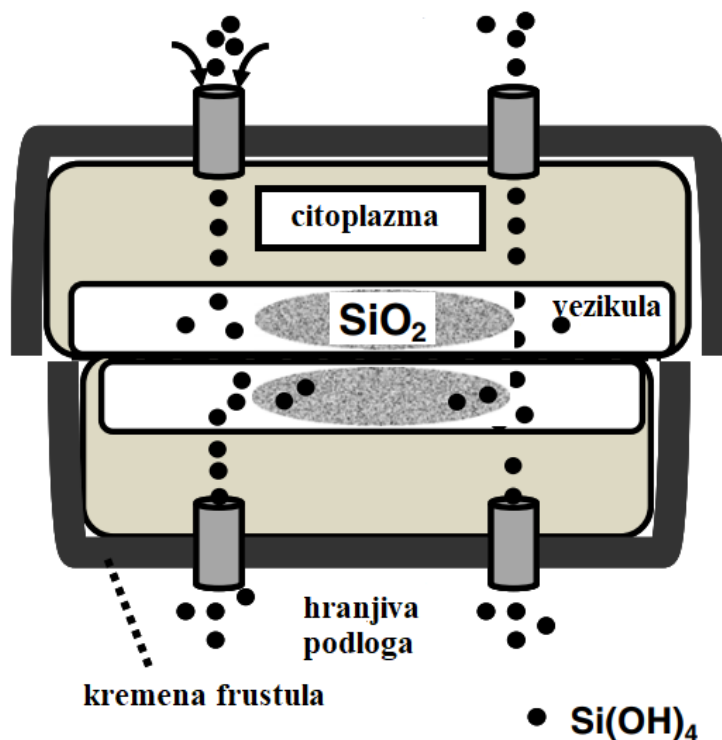
Druga posebnost dijatomeja je u pigmentaciji fotosintetskog aparata. Osim klorofila koji nalazimo kod većine mikroalgi kao najzastupljeniji pigment, dijatomeje sadrže jednake ili čak veće količine fukoksantina. Pigmenti se u kompleksu s specifičnim proteinima vežu na fotosustav II i imaju značajnu ulogu u fotokemijskim reakcijama. Taj kompleks se kod dijatomeja naziva fukoksantin-klorofil a/c protein (eng. Fucoxanthin-Chlorophyll a/c Proteins, FCP) (Goss i sur., 2020). Glavni pigment za apsorpciju fotona svjetlosti je fukoksantin, međutim samo klorofil a koji se nalazi u reakcijskom centru može pretvarati svjetlosnu energiju u kemijsku (Kuczynska i sur., 2015).

Nadalje, kloroplasti dijatomeja posjeduju specifične tilakoidne membrane raspoređene u tri skupine lamela koje se protežu cijelom dužinom kloroplasta. Struktura membrana tilakoida nije podložna promjenama uzrokovanim primjenjenom svjetlošću, neovisno o intenzitetu. Moguće ju je narušiti jedino primjenom dalekog infracrvenog zračenja (Bina i sur., 2016). Navedeno svojstvo čini fotosintetski aparat dijatomeja vrlo adaptivnim i efikasnim (Goss i sur., 2020).

### 2.3.3. Transport i metabolizam silicija

Silicij je makroelement neophodan za formiranje stanične ljušturice, odnosno frustule (u obliku netopljivog  $\text{SiO}_2$ ) u procesu diobe stanica (Jeffryes i sur., 2013). Dijatomeje su najveći svjetski doprinositelji biosilicifikaciji, procesu kojim se anorganski silicij ugrađuje u žive organizme u formi silicijevog dioksida (Martin-Jezequel i sur., 2000). Biosilicifikacija podrazumijeva slijedeće korake: unos otopljenog silicija iz okoline u stanicu, taloženje istog u obliku amorfnog  $\text{SiO}_2$  i konačno, formiranje frustule (Jeffryes i sur., 2013). Proces biosilicifikacije shematski je prikazan na slici 5. Iako točan mehanizam nije razjašnjen, poznato je da su transport i metabolizam silicija usko povezani s staničnim ciklusom diatomeja (Martin-Jezequel i sur., 2000; Adams i Bugbee, 2013). Transport otopljenog silicija u formi ortosilicijeve kiseline,  $\text{Si}(\text{OH})_4$ , iz okoline stanice u citoplazmu događa se u periodu između citokineze i odvajanja stanica kćeri. Kada su stanice u fazi pripreme za diobu,  $\text{Si}(\text{OH})_4$  se transportira kroz staničnu stijenku u unutarstanični prostor. Pri vrlo visokim koncentracijama u okolini stanice, otopljeni silicij se u stanicu transportira difuzijom, a kod nižih koncentracija ( $\leq 30 \mu\text{M}$ ) pomoću transportnih proteina ovisnih o natriju (Adams i Bugbee, 2013). Dalje se  $\text{Si}(\text{OH})_4$  transportira u vezikulu gdje polimerizira u čvrsti amorfnu silicijev dioksid koji izbija na površinu stanice tvoreći dvije nove teke stanica. Martin-Jezequel i sur. (2000) predlažu da bi transport silicija mogao biti uvjetovan kontroliranom ekspresijom i lokalizacijom transportnih proteina za silicij, kao i udjelom silicija inkorporiranog u frustulu.

Neke studije pokazuju da na metabolizam silicija unutar stanice utječe salinitet, odnosno koncentracija otopljenog  $\text{NaCl}$  u okolini stanice. U uvjetima niskog saliniteta, povećava se ukupna koncentracija silicija u diatomejama, s većim udjelom otopljenog silicija u odnosu na mineralizirani. Drugim riječima, ispod kritične koncentracije  $\text{NaCl}$  u okolini stanice, inhibira se mineralizacija silicija, a posljedično i stvaranje frustule, odnosno dioba stanica. Premda točan mehanizam nije razjašnjen, Adams i Bugbee (2013) navode da salinitet hranjive podloge utječe ili na intracelularni transport silicija u vezikule ili na sam proces mineralizacije u vezikulama. S druge strane, niski salinitet pogoduje nakupljanju lipida u diatomejama, npr. *Chaetoceros gracilus* (Adams i Bugbee, 2013).



Slika 5. Struktura frustule dijatomeja te unos i transport silicijeve kiseline (modificirano prema Jeffryes i sur., 2013).

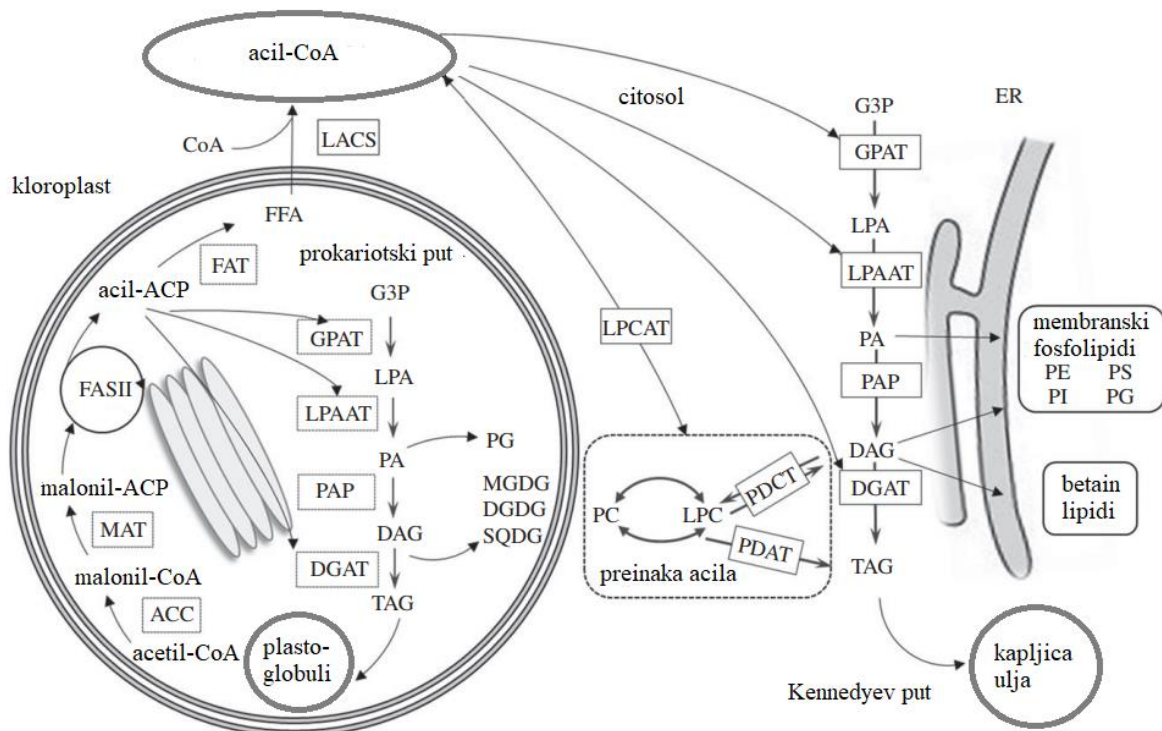
#### 2.3.4. Biosinteza lipida

Lipide mikroalgi dijelimo u dvije skupine: polarne i neutralne. Polarni lipidi uključuju fosfolipide i glikolipide, dok u neutralne lipide spadaju acilgliceridi (tri-, di- i monogliceridi) i masne kiseline. Neutralni lipidi pretežno služe kao izvori energije, dok polarni lipidi izgrađuju stanične membrane. Masne kiseline su karboksilne kiseline s lancima duljine 4 - 36 atoma ugljika. Među njima razlikujemo zasićene masne kiseline (eng. Saturated Fatty Acid, SFA), masne kiseline s jednom nezasićenom vezom u lancu (eng. Monounaturated Fatty Acid, MUFA), masne kiseline s dvije nezasićene veze u lancu (eng. Di-unaturated Fatty Acid, DUFA), masne kiseline s tri nezasićene veze u lancu (eng. Tri-unaturated Fatty Acid, TUFA) i masne kiseline s više od tri nezasićene veze u lancu (eng. Polyunaturated Fatty Acid, PUFA). Prosječna duljina lanca u mikroalgama je od C14:0 do C22:6 pri čemu prevladavaju zasićene i mononezasićene masne kiseline (najčešće su C16:0, C18:0, C16:1, C18:1, C16:2, C18:2 i C18:3). Vrlo rijetko su prisutne masne kiseline s više od šest nezasićenih veza u lancu (D'Alessandro i Antoniosi Filho, 2016).

Mikroalge pohranjuju acilgliceride tijekom dana u procesu fotosinteze, a troše ih noću respiracijom za potrebe održavanja stanica i njihovu diobu. Nekoliko faktora inducira akumulaciju lipida u uvjetima stresa: različite koncentracije nutrijenata (dušik, fosfor, željezo),

visok salinitet, visoka temperatura, intenzitet svjetlosti i alternativni izvori ugljika (Sayanova i sur., 2017). Važno je naglasiti da, iako stres pozitivno utječe na nakupljanje lipida u mikroalgama, on negativno utječe na rast stanica što u konačnosti može smanjiti produktivnost lipida.

Sinteza lipida u stanici odvija se u sljedećim odjeljcima: sinteza masnih kiselina u kloroplastu, a sinteza triacilglicerida (TAG) u endoplazmatskom retikulumu i tilakoidima (slika 6).



Slika 6. Shematski prikaz biosinteze lipida u mikroalgama. ACC: acetil-CoA karboksilaza; DAG: diacilglicerol; DGAT: diacilglicerol aciltransferaza; DGDG: digalaktozil diacilglicerol; ER: endoplazmatski retikulum; FAT: acil-ACP tioesteraza; FAS: sintaza masnih kiselina; FFA: slobodna masna kiselina; G3P: glicerol-3-fosfat; GPAT: glicerol-3-fosfat aciltransferaza; LACS: acil-CoA sintaza; LPAAT: aciltransferaza lizofosfatidne kiseline; LPA: lizofosfatidna kiselina; LPCAT: lizofosfatidilkolin aciltransferaza; MAT: malonil transferaza; MGDG: monogalaktozil diacilglicerol; PA: fosfatidna kiselina; PAP: fosfataza fosfatidne kiseline; PC: fosfatidilkolin; PDAT: fosfolipid diacilglicerol aciltransferaza; PDCT: fosfokolin transferaza; PE: fosfatidiletanolamin; PG: fosfatidilglicerol; PI: fosfatidilinozitol; PS: fosfatidilserin; SQDG: sulfokinovozil diacilglicerol; TAG: triacilglicerol (modificirano prema Sayanova i sur., 2017).

U de novo sintezi, prva reakcija sinteze masnih kiselina je konverzija acetyl-CoA u malonil-CoA pomoću enzima acetyl-CoA karboksilaze (eng. acetyl-CoA carboxylase, ACC). Drugi korak je konverzija malonil-CoA u malonil-ACP pomoću malonil-transferaze (eng. malonyltransferase, MAT) čime počinje ciklus masnih kiselina na multienzimskom kompleksu sintazi masnih kiselina (eng. fatty acid synthase, FAS). Elongacija acilnog lanca obuhvaća ponavljajući ciklus od četiri reakcije u nizu: kondenzacija, redukcija, dehidratacija i redukcija pri čemu se lanac produljuje za 2 C-atoma u svakom ciklusu (D'Alessandro i Antoniosi Filho, 2016, Sayanova i sur., 2017).

Masne kiseline nakon sinteze (koja najčešće završava s C16:0-ACP ili C18:0-ACP) imaju dvije sudbine:

(1) ostaju u kloroplastu gdje se pomoću aciltransferaza prevode u TAG i galaktolipide (tzv. prokariotski biosintetski put) ili

(2) difundiraju u citosol gdje sudjeluju u sintezi fosfolipida i TAG (eukariotski Kennedyev put).

U kloroplastu u prokariotskom putu nastaju: fosfatidna kiselina (eng. phosphatic acid, PA), diacilglicerol (eng. diacylglycerol, DAG), monogalaktozil diacilglicerol (eng. monogalactosyldiacylglycerol, MGDG), digalaktozil diacilglicerol (eng. digalactosyldiacylglycerol, DGDG), sulfokinovozil diacilglicerol (eng. sulfoquinovosyldiacylglycerol, SQDG) i fosfatidilglicerol (eng. phosphatidylglycerol, PG). Karakterizira ih C16 acilna skupina na sn-2 poziciji glicerolne okosnice (Sayanova i sur., 2017). U membranama tilakoida dijatomeja, osim spomenutih lipida nastaju i značajnije koncentracije fosfatidilkolina (eng. phosphatidylcholine, PC), u odnosu na druge vrste. Za razliku od zelenih algi i viših biljaka u kojima dominiraju MGDG i DGDG, kod dijatomeja su zastupljeniji anionski lipidi (SQDG i PG) koji čine 40 – 50 % ukupnih membranskih lipida (Goss i sur., 2020).

Prije ulaska u eukariotski put sinteze TAG, acil-ACP se u kloroplastu oslobodaju proteina nosača acila (eng. acyl carrier protein, ACP) pomoću acil-ACP tioesteraze (eng. fatty acyl-ACP thioesterase, FAT) pa difundiraju u citosol u formi slobodnih masnih kiselina (eng. free fatty acid, FFA). U citosolu se esterificiraju u acil-CoA pomoću acil-CoA sintaze (eng. long-chain acyl-CoA synthase, LACS) lokalizirane na vanjskoj strani membrane kloroplasta. Acil-CoA su prekursori sinteze TAG Kennedyevim putem na endoplazmatskom retikulumu. Osim toga, mogu ući u acil-modificirajući ciklus, vežući se umjesto masne kiseline na sn-2 poziciji fosfatidilkolina (PC) pomoću lizofosfatidilkolin aciltransferaze (eng. lysophosphatidylcholine

acyltransferase, LPCAT). Modifikacijama na PC nastaju nezasićene masne kiseline, osobito PUFA, koje se dalje ugrađuju u stanične lipide (Sayanova i sur., 2017).

U eukariotima se TAG sintetiziraju Kennedyevim putem postepenom esterifikacijom glicerol-3-fosfata (G3P), najvjerojatnije na endoplazmatskom retikulumu. Transfer masne kiseline s acil-CoA na sn-1 poziciju G3P je prvi korak ovog puta kataliziran glicerol-3-fosfat aciltransferazom (eng. glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT) koji rezultira stvaranjem lizofosfatidne kiseline (eng. lysophosphatic acid, LPA). Aciltransferaza lizofosfatidne kiseline (eng. lysophosphatic acid acyltransferase, LPAAT) katalizira esterifikaciju LPA na sn-2 poziciji glicerolne okosnice, pri čemu nastaje fosfatidna kiselina (eng. phosphatic acid, PA).

Defosforilaciju na sn-3 poziciji PA provodi fosfataza fosfatidne kiseline (eng. phosphatic acid phosphatase, PAP) pri čemu nastaje DAG. PA i DAG su prekursori za sintezu TAG i membranskih fosfolipida (Sayanova i sur., 2017).

Dijatomeje proizvode i nefosforne glicerolipide, betain lipide (BL), koji nisu nađeni kod viših biljaka. BL imaju polarnu amino-acil grupu vezanu eterskom vezom na sn-3 poziciju glicerolne okosnice (D'Alessandro i Antoniosi Filho, 2016; Sayanova i sur., 2017).

#### 2.3.4.1. Utjecaj makronutrijenata silicija, dušika i fosfora na biosintezu lipida

Metabolizam silicija utječe na diobu stanica i formiranje frustule, ali i na neke druge metaboličke puteve u dijatomeja. Posebno je zanimljiv utjecaj na metabolizam triacilglicerida (TAG), koji mogu poslužiti kao alternativna sirovina za proizvodnju biodizela treće generacije. Sinteza TAG stimulirana je kada silicij limitira rast stanica (Adams i Bugbee, 2013). Konkretno, niske koncentracije silicija u stanici aktiviraju transkripciju gena koji kodiraju acetyl-CoA karboksilazu. Navedeni enzim katalizira reakciju sinteze malonil-CoA iz acetyl-CoA, odnosno prvi korak u sintezi masnih kiselina. Osim toga, isti enzim katalizira sintezu triacilglicerida (TAG) u glicerol-3-fosfatnom putu (Jeffryes i sur., 2013).

Limitacija rasta nekim drugim makronutrijentima, kao što su dušik i fosfor također dovodi do akumulacije lipida u dijatomejama, ali nakupljanje je znatno sporije i rezultira manjim udjelom lipida u biomasi u usporedbi s limitacijom silicijem (Adams i Bugbee, 2013). Dijatomeje brže reagiraju na nedostatak silicija nego nekog drugog makronutrijenta, jer se bez njega ne mogu dijeliti (Taguchi i sur., 1987).

Dušik je važan nutrijent koji sudjeluje u sintezi proteina, nukleinskih kiselina i klorofila u stanici. U uvjetima limitacije dušikom, metabolizam ugljika preusmjerava se sa sinteze krizolaminarina na sintezu lipida, osobito triacilglicerida (TAG). Istovremeno se de novo sinteza masnih kiselina neometano odvija pri čemu nastaju potencijalni prekursori sinteze TAG.



Osim navedenog, limitacija rezultira aktiviranjem fosfolipaza i galaktolipaza, enzima koji degradiraju fosfolipide i galaktolipide u masne kiseline iz kojih se sintetiziraju TAG (Zulu i sur., 2018).

Fosfor se u stanicama nalazi u formi fosfolipida i nukleinskih kiselina. U uvjetima limitacije fosforom eksprimiraju se geni koji kodiraju acetyl-CoA karboksilazu, ključni enzim u sintezi masnih kiselina, što za posljedicu ima akumulaciju TAG u stanici (Zulu i sur., 2018).

## **2.4. BIOREAKTORI ZA UZGOJ MIKROALGI**

Uzgoj mikroalgi provodi se u različitim otvorenim i zatvorenim sustavima. Iako se otvoreni sustavi najčešće koriste za uzgoj mikroalgi, uzgoj dijatomeja se zbog njihove podložnosti kontaminacijama najčešće provodi u zatvorenim sustavima (Lebeau i Robert, 2003b). U zatvorene sustave ubrajaju se fotobioreaktori različitih izvedbi: vertikalni cijevni, horizontalni cijevni, pločasti, fotobioreaktor s miješalom (Chew i sur., 2018).

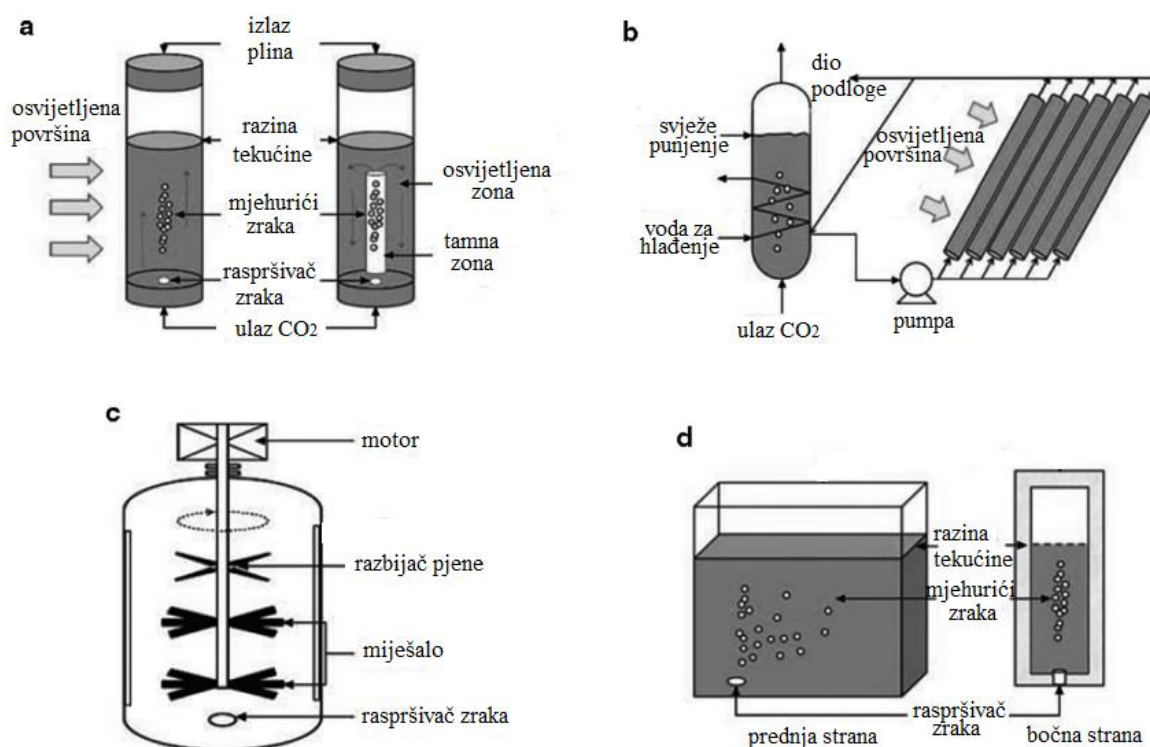
U vertikalne cijevne fotobioreaktore ubrajaju se barbotirajuća kolona i *air-lift* fotobioreaktori (slika 7a). Imaju raspršivač zraka na dnu reaktora koji generira mjehuriće zraka važne za miješanje stanica s hranjivom podlogom. Barbotirajuća kolona je cilindrična posuda bez unutrašnje strukture u kojoj je hranjiva podloga miješana mjehurićima zraka. Karakterizira ju dobar prijenos mase i veliki omjer površine i volumena. Visina reaktora je dva puta veća od promjera. Najčešće se koristi umjetni izvor svjetlosti. Miješanjem podloge alge cirkuliraju između svijetlih i tamnih zona, što je bitno za odvijanje fotosinteze. *Air-lift* bioreaktori su izvedbe barbotirajućih kolona s dvije zone, zonom uspona (tamna zona) i zonom pada (svijetla zona) između kojih cirkulira hranjiva podloga. Karakteristike takvih tipova reaktora su: dobro miješanje uz male sile smicanja i učinkovit prijenos mase pogodan za primjenu imobiliziranih stanica (Chew i sur., 2018). Vertikalni fotobioreaktori su jeftini i lako ih je održavati (Tan i sur., 2017).

Horizontalni cijevni fotobioreaktori (slika 7b) prvi su se počeli koristiti za uzgoj mikroalgi. Sastoje se od dugačkih cijevi koje su postavljene horizontalno, vertikalno, ukošeno ili zavojito (Chew i sur., 2018; Tan i sur., 2017). Pogodni su za uzgoj samo nekih vrsta mikroalgi uz sunčevu svjetlost kao izvor energije. Hranjiva podloga cirkulira u cijevima i izlaže se svjetlosti, te se vraća u spremnik pomoću pumpe. Važno je postići turbulentno strujanje u cijevima, kako bi se izbjegla flokulacija mikroalgi. Postoje izvedbe koje koriste umjetni izvor svjetlosti pri čemu se dobiva više različitih proizvoda (Chew i sur., 2018).

Za uzgoj mikroalgi često se koriste i klasični bioreaktori s miješalom (slika 7c) opremljeni izvorom svjetlosti. Mehaničko miješalo omogućava optimalnu temperaturu i prijenos mase.

Ovakva vrsta reaktora ima mali omjer površine i volumena, što smanjuje efikasnost fotosinteze. Većinom se koriste u laboratorijskom mjerilu, jer se kod većih volumena bioreaktora pojavljuje problem nedostatne dopreme svjetlosti (Chew i sur., 2018).

Pločasti fotobioreaktori (slika 7d) najčešće se koriste za uzgoj mikroalgi. Jednostavne su izvedbe, odnosno sastoje se od vertikalnih panela osvijetljenih s obje strane u kojima se miješanje postiže aeracijom. Karakteristike ovog tipa reaktora su efikasno osvijetljavanje stanica i dobro miješanje, te dobro otapanje CO<sub>2</sub> i istiskivanje O<sub>2</sub>. Zbog navedenih prednosti, u pločastim fotobioreaktorima postižu se visoke produktivnosti biomase. Ipak, jedan od nedostataka ovih bioreaktora je značajan hidrodinamički stres uzrokovan aeracijom. Nadalje, adhezija stanica na stijenke bioreaktora može uzrokovati zasjenjenje i smanjiti dotok svjetla (Chew i sur., 2018).

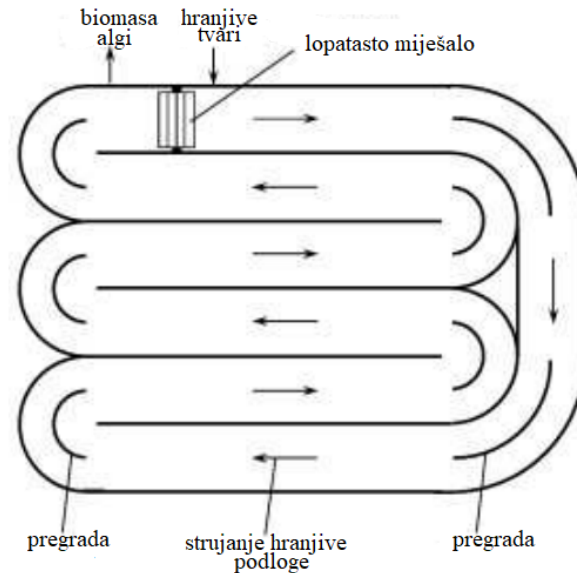


Slika 7. Fotobioreaktori za uzgoj mikroalgi (a) vertikalni cijevni fotobioreaktor: (lijevo) barbotirajuća kolona, (desno) air-lift kolona; (b) horizontalni cijevni fotobioreaktor; (c) bioreaktor s miješalom; (d) pločasti fotobioreaktor (modificirano prema Chew i sur., 2018).

U otvorene sustave za uzgoj mikroalgi spadaju različite izvedbe bazena bez miješanja ili češće s recirkulacijom podloge (eng. *raceway pond*) (Yousuf, 2020; Tan i sur., 2017). Jedna od mogućih izvedbi je shematski prikazana na slici 8. Međutim, kao što je ranije spomenuto, otvoreni sustavi nisu prikladni za uzgoj dijatomeja zbog čestih kontaminacija. U ovakvim

sustavima uspješno se uzgajaju mikroalge iz rodova *Spirulina*, *Dunaliella*, *Chlorella* i *Haematococcus* (Chew i sur., 2018).

Tablica 3 prikazuje karakteristike otvorenih i zatvorenih sustava za uzgoj mikroalgi.



Slika 8. Otvoreni bazen s recirkulacijom podloge (modificirano prema Tan i sur., 2017).

Glavni faktori rasta mikroalgi mogu se podijeliti u 3 skupine: okolišni (pH, nutrijenti, temperatura), procesni (miješanje i intenzitet svjetlosti) i biotički (invazivne vrste i predatori) (Yousuf, 2020).

Mikroalge se najčešće uzgajaju pri fotoautotrofnim uvjetima. Ipak, za uzgoj se mogu primijeniti heterotrofni ili miksotrofni uvjeti, koji pogoduju nekim vrstama mikroalgi (npr. *Chlorella* sp. i *Spirulina* sp.). Način vođenja procesa može biti šaržni, polukontinuirani ili kontinuirani (Tan i sur., 2017).

Tablica 3. Usporedba otvorenih i zatvorenih sustava za uzgoj mikroalgi (modificirano prema Yousuf, 2020; Chew i sur., 2018).

Tipovi reaktora	Prednosti	Ograničenja
Otvoreni bazeni	<ul style="list-style-type: none"> <li>* niski kapitalni troškovi</li> <li>* lako se čiste i održavaju</li> <li>* smješteni su na nepoljoprivrednom zemljištu</li> <li>* troše malo energije</li> <li>* pogodni su za masovni uzgoj</li> <li>* sile smicanja nisu izražene (lagano miješanje)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* niska produktivnost biomase</li> <li>* zauzimaju veliku površinu zemljišta</li> <li>* uzgoj ovisi o vremenskim uvjetima</li> <li>* kulture su podložne kontaminaciji               <ul style="list-style-type: none"> <li>* niska kvaliteta proizvoda</li> </ul> </li> <li>* poteškoće pri dugoročnom uzgoju</li> <li>* uzgoj je pogodan samo za neke vrste               <ul style="list-style-type: none"> <li>* otežana je kontrola procesa</li> </ul> </li> <li>* visoki troškovi izdvajanja biomase</li> <li>* loše miješanje te iskorištenje svjetlosti i CO<sub>2</sub> <ul style="list-style-type: none"> <li>* izraženo je isparavanje vode</li> </ul> </li> </ul>
Cijevni fotobioreaktori	<ul style="list-style-type: none"> <li>* dobro iskorištenje svjetlosti</li> <li>* pogodni su za uzgoj na otvorenom               <ul style="list-style-type: none"> <li>* relativno su jeftini</li> </ul> </li> <li>* visoka produktivnost biomase</li> <li>* visoka kvaliteta proizvoda</li> <li>* moguć je uzgoj gotovo svih vrsta               <ul style="list-style-type: none"> <li>* niska razina kontaminacije</li> </ul> </li> <li>* neznatan gubitak vode i CO<sub>2</sub></li> <li>* mogućnost kontrole procesa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* tendencija rasta algi na stijenkama reaktora               <ul style="list-style-type: none"> <li>* poteškoće prilikom čišćenja</li> </ul> </li> <li>* zauzimaju veliku površinu zemljišta</li> <li>* stvara se gradijent pH, O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub> duž cijevi               <ul style="list-style-type: none"> <li>* visoki kapitalni i operativni troškovi</li> </ul> </li> </ul>

<p>Pločasti-<i>airlift</i> reaktori</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* visoka produktivnost biomase</li> <li>* visoka kvaliteta proizvoda</li> <li>* moguć je uzgoj gotovo svih vrsta <ul style="list-style-type: none"> <li>* jednostavna sterilizacija</li> <li>* dobro iskorištenje svjetlosti</li> <li>* relativno su jeftini</li> <li>* lako se čiste i održavaju</li> </ul> </li> <li>* pogodni su za uzgoj na otvorenom <ul style="list-style-type: none"> <li>* niska razina kontaminacije</li> <li>* neznatan gubitak vode i CO<sub>2</sub></li> <li>* mogućnost kontrole procesa</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* zahtjevna izvedba bioreaktora</li> <li>* zahtjevna kontrola temperature</li> <li>* mali stupanj hidrodinamičkog stresa</li> <li>* tendencija rasta algi na stijenkama reaktora</li> <li>* visoki kapitalni i operativni troškovi</li> </ul>
<p>Kolonski fotobioreaktori</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* dobar prijenos mase</li> <li>* visoka produktivnost biomase</li> <li>* visoka kvaliteta proizvoda</li> <li>* moguć je uzgoj gotovo svih vrsta <ul style="list-style-type: none"> <li>* troše malo energije</li> <li>* dobro miješanje</li> <li>* jednostavna sterilizacija</li> <li>* dobro iskorištenje svjetlosti</li> <li>* jednostavno uvećanje mjerila</li> </ul> </li> <li>* pogodni su za imobilizaciju algi</li> <li>* smanjena je fotoinhibicija i fotooksidacija <ul style="list-style-type: none"> <li>* niska razina kontaminacije</li> <li>* neznatan gubitak vode i CO<sub>2</sub></li> <li>* mogućnost kontrole procesa</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* mala površina osvjetljenja <ul style="list-style-type: none"> <li>* relativno su skupi</li> <li>* pojava sila smicanja</li> <li>* sofisticirana konstrukcija</li> </ul> </li> <li>* smanjuje se površina osvjetljenja pri povećanju mjerila <ul style="list-style-type: none"> <li>* visoki kapitalni i operativni troškovi</li> </ul> </li> </ul>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

Mikroorganizam korišten u eksperimentu je dijatomeja *Nitzschia* sp. soj 5.4., izolirana iz Jadranskog mora u okolici Šibenika (ožujak, 2018).

##### 3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga

Popis kemikalija korištenih za pripremu hranjivih podloga nalazi se u tablici 4.

Tablica 4. Kemikalije korištene za pripremu hranjivih podloga.

Kemikalija	Proizvođač	Čistoća
Bakrov sulfat pentahidrat	Kemika, Hrvatska	p.a.
Biotin	Sigma-Aldrich, Njemačka	≥ 99 %
Cijanokobalamin	Sigma-Aldrich, Njemačka	≥ 98 %
Cinkov sulfat heptahidrat	Kemika, Hrvatska	p.a.
EDTA dinatrijev dihidrat	Carlo Erba, Italija	p.a.
Kalcijev klorid dihidrat	Merck KGaA, Njemačka	p.a.
Kalijev klorid	Kemika, Hrvatska	p.a.
Kobaltov (II) klorid heksahidrat	Kemika, Hrvatska	p.a.
Magnezijev (II) klorid heksahidrat	Merck KGaA, Njemačka	p.a.
Magnezijev sulfat heptahidrat	Kemika, Hrvatska	p.a.
Manganov (II) klorid tetrahidrat	Kemika, Hrvatska	p.a.
Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat	Kemika, Hrvatska	p.a.
Natrijev hidrogenkarbonat	Gram-mol, Hrvatska	p.a.
Natrijev klorid	Solana Nin, Hrvatska	99,1 %
Natrijev metasilikat nanohidrat	Kemika, Hrvatska	p.a.
Natrijev molibdat dihidrat	Kemika, Hrvatska	p.a.
Natrijev nitrat	Kemika, Hrvatska	p.a.
Tiamin hidroklorid	Sigma-Aldrich, Njemačka	≥ 99 %
Željezov (III) klorid heksahidrat	Kemika, Hrvatska	p.a.

### 3.1.3. Ostale kemikalije

Popis svih ostalih kemikalija korištenih u eksperimentu, izuzev kemikalija koje su sastavni dio hranjivih podloga, dan je u tablici 5.

Tablica 5. Popis ostalih kemikalija korištenih tijekom eksperimenta.

Kemikalija	Proizvođač	Čistoća
Aceton	Kemika, Hrvatska	p.a.
Albumin goveđeg seruma	Sigma-Aldrich, Njemačka	≥ 96 %
Etanol	Gram-Mol, Hrvatska	p.a., apsolutni
Folin-Ciocalteu reagens	Sigma-Aldrich, Njemačka	2 M (s obzirom na kiselinu)
Heksan	Carlo Erba, Italija	za GC, ≥ 97 %
Kalcijev karbonat	Kemika, Hrvatska	p.a.
Kalijev natrijev tartarat tetrahidrat	Kemika, Hrvatska	p.a.
Kit za određivanje koncentracije fosfata	Merck KGaA, Njemačka	
Kit za određivanje koncentracije nitrata	Merck KGaA, Njemačka	
Kit za određivanje koncentracije silicija	Merck KGaA, Njemačka	
Kloroform	Merck KGaA, Njemačka	p.a.
Klorovodična kiselina	Kemika, Hrvatska	p.a., 36%
Metanol	J. T. Baker, SAD	za HPLC i UPLC
Metil tridekanoat	Sigma-Aldrich, Njemačka	standard
Natrijev hidroksid	Merck, Njemačka	p.a.
Natrijev karbonat	Gram-Mol, Hrvatska	p.a.
Pentadekan	Sigma-Aldrich, Njemačka	standard
Smjesa F.A.M.E. (C4-C24)	Sigma-Aldrich, Njemačka	standard
Sumporna kiselina	Carlo Erba, Italija	p.a., 96 %

### 3.1.4. Hranjive podloge

#### 3.1.4.1. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma i održavanje kulture

Za uzgoj inokuluma i održavanje kulture korištena je f/2 hranjiva podloga, koja se u ranijim istraživanjima pokazala pogodnom za uzgoj dijatomeja (Guillard, 1975). Priprema podloge započinje otapanjem soli navedenih u tablici 6 u destiliranoj vodi, čime se dobiva umjetna morska voda. Umjetnoj morskoj vodi, nakon sterilizacije i hlađenja, dodaju se sastojci f/2 podloge (tablica 7). Sastav otopine vitamina i elemenata u tragovima dan je u tablicama 8 i 9.

Tablica 6. Sastav umjetne morske vode (Cuvelier i Simmons, 2009).

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

Tablica 7. Sastav f/2 podloge.

Sastojak f/2 podloge	Koncentracija izvorne standardne otopine [g L <sup>-1</sup> ]	Volumen izvorne standardne otopine po jedinici volumena hranjive podloge [mL L <sup>-1</sup> ]	Molarna koncentracija u hranjivoj podlozi [mol L <sup>-1</sup> ]
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> × 9H <sub>2</sub> O	30	1	1,06 · 10 <sup>-4</sup>
NaNO <sub>3</sub>	75	1	8,82 · 10 <sup>-4</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	5	1	3,62 · 10 <sup>-5</sup>
Vitamini	(vidi Tablicu 8)	0,5	(vidi Tablicu 8)
Elementi u tragovima	(vidi Tablicu 9)	1	(vidi Tablicu 9)



Tablica 8. Sastav otopine vitamina.

Sastojak otopine vitamina	Koncentracija izvorne standardne otopine [g L <sup>-1</sup> ]	Volumen izvorne standardne otopine po jedinici volumena otopine vitamina [mL L <sup>-1</sup> ]	Masa tvari po jedinici volumena otopine vitamina [mg L <sup>-1</sup> ]	Molarna koncentracija u hranjivoj podlozi [mol L <sup>-1</sup> ]
Tiamin HCl	-	-	200	$2,96 \cdot 10^{-7}$
Biotin	1	1	-	$2,05 \cdot 10^{-9}$
Cijanokobalamin	1	1	-	$3,69 \cdot 10^{-10}$

Tablica 9. Sastav otopine elemenata u tragovima.

Sastojak otopine elemenata u tragovima	Koncentracija izvorne standardne otopine [g L <sup>-1</sup> ]	Volumen izvorne standardne otopine po jedinici volumena otopine elemenata u tragovima [mL L <sup>-1</sup> ]	Masa tvari po jedinici volumena otopine elemenata u tragovima [g L <sup>-1</sup> ]	Molarna koncentracija u hranjivoj podlozi [mol L <sup>-1</sup> ]
FeCl <sub>3</sub> × 6H <sub>2</sub> O	-	-	3,15	$1,17 \cdot 10^{-5}$
Na <sub>2</sub> EDTA × 2H <sub>2</sub> O	-	-	4,36	$1,17 \cdot 10^{-5}$
CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	9,8	1	-	$3,93 \cdot 10^{-8}$
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	6,3	1	-	$2,60 \cdot 10^{-8}$
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	22	1	-	$7,65 \cdot 10^{-8}$
CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	10	1	-	$4,20 \cdot 10^{-8}$
MnCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O	180	1	-	$9,1 \cdot 10^{-7}$

### 3.1.4.2. Hranjive podloge za optimiranje omjera silicija, dušika i fosfora

U svrhu optimizacije sastava hranjive podloge korišteno je 6 različitih modificiranih f/2 podloga, uz izvornu f/2 podlogu koja je služila kao kontrola. Modificirane hranjive podloge sadržavale su promijenjene molarne omjere supstrata (izvori silicija, dušika i fosfora) za koje je smatrano da ograničavaju rast dijatomeje u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi. Koncentracije ostalih sastojaka hranjive podloge bile su jednake koncentracijama u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi.

Priprema podloge započinje pripremom umjetne morske vode (tablica 6), kojoj se, nakon sterilizacije i hlađenja, dodaju sastojci navedeni u tablici 10. Molarne koncentracije svih sastojaka hranjive podloge navedene su u tablici 11.

Podlogama je pridružen trobrojni naziv pri čemu prvi broj označava dodani volumen  $30 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$  po volumenu podloge [ $\text{mL L}^{-1}$ ], drugi broj označava dodani volumen  $75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  po volumenu podloge [ $\text{mL L}^{-1}$ ], dok se treći broj odnosi na dodatak  $5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  u podlogu [ $\text{mL L}^{-1}$ ].

Tablica 10. Volumeni izvornih standardnih otopina dodanih po jedinici volumena izvorne i modificirane f/2 hranjive podloge [mL L<sup>-1</sup>].

	f/2	4xSi/2xN/1xP	4xSi/2xN/4xP	10xSi/4xN/4xP	10xSi/6xN/4xP	10xSi/4xN/6xP	10xSi/4xN/8xP
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> × 9H <sub>2</sub> O (30 g L <sup>-1</sup> )	1	4	4	10	10	10	10
NaNO <sub>3</sub> (75 g L <sup>-1</sup> )	1	2	2	4	6	4	4
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O (5 g L <sup>-1</sup> )	1	1	4	4	4	6	8
Otopina vitamina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Otopina elemenata u tragovima	1	1	1	1	1	1	1

Tablica 11. Molarne koncentracije tvari hranjive podloge za izvornu i modificirane f/2 podloge [mol L<sup>-1</sup>].

	f/2	4xSi/2xN/1xP	4xSi/2xN/4xP	10xSi/4xN/4xP	10xSi/6xN/4xP	10xSi/4xN/6xP	10xSi/4xN/8xP
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> × 9H <sub>2</sub> O	1,06 · 10 <sup>-4</sup>	4,24 · 10 <sup>-4</sup>	4,24 · 10 <sup>-4</sup>	1,06 · 10 <sup>-3</sup>	1,06 · 10 <sup>-3</sup>	1,06 · 10 <sup>-3</sup>	1,06 · 10 <sup>-3</sup>
NaNO <sub>3</sub>	8,82 · 10 <sup>-4</sup>	1,764 · 10 <sup>-3</sup>	1,764 · 10 <sup>-3</sup>	3,528 · 10 <sup>-3</sup>	5,292 · 10 <sup>-3</sup>	3,528 · 10 <sup>-3</sup>	3,528 · 10 <sup>-3</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	3,62 · 10 <sup>-5</sup>	3,62 · 10 <sup>-5</sup>	1,448 · 10 <sup>-4</sup>	1,448 · 10 <sup>-4</sup>	1,448 · 10 <sup>-4</sup>	2,172 · 10 <sup>-4</sup>	2,896 · 10 <sup>-4</sup>
FeCl <sub>3</sub> × 6H <sub>2</sub> O	1,17 · 10 <sup>-5</sup>	1,17 · 10 <sup>-5</sup>	1,17 · 10 <sup>-5</sup>	1,17 · 10 <sup>-5</sup>	1,17 · 10 <sup>-5</sup>	1,17 · 10 <sup>-5</sup>	1,17 · 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA × 2H <sub>2</sub> O	1,17 · 10 <sup>-5</sup>	1,17 · 10 <sup>-5</sup>	1,17 · 10 <sup>-5</sup>	1,17 · 10 <sup>-5</sup>	1,17 · 10 <sup>-5</sup>	1,17 · 10 <sup>-5</sup>	1,17 · 10 <sup>-5</sup>
CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	3,93 · 10 <sup>-8</sup>	3,93 · 10 <sup>-8</sup>	3,93 · 10 <sup>-8</sup>	3,93 · 10 <sup>-8</sup>	3,93 · 10 <sup>-8</sup>	3,93 · 10 <sup>-8</sup>	3,93 · 10 <sup>-8</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	2,60 · 10 <sup>-8</sup>	2,60 · 10 <sup>-8</sup>	2,60 · 10 <sup>-8</sup>	2,60 · 10 <sup>-8</sup>	2,60 · 10 <sup>-8</sup>	2,60 · 10 <sup>-8</sup>	2,60 · 10 <sup>-8</sup>
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	7,65 · 10 <sup>-8</sup>	7,65 · 10 <sup>-8</sup>	7,65 · 10 <sup>-8</sup>	7,65 · 10 <sup>-8</sup>	7,65 · 10 <sup>-8</sup>	7,65 · 10 <sup>-8</sup>	7,65 · 10 <sup>-8</sup>
CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	4,20 · 10 <sup>-8</sup>	4,20 · 10 <sup>-8</sup>	4,20 · 10 <sup>-8</sup>	4,20 · 10 <sup>-8</sup>	4,20 · 10 <sup>-8</sup>	4,20 · 10 <sup>-8</sup>	4,20 · 10 <sup>-8</sup>
MnCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O	9,10 · 10 <sup>-7</sup>	9,10 · 10 <sup>-7</sup>	9,10 · 10 <sup>-7</sup>	9,10 · 10 <sup>-7</sup>	9,10 · 10 <sup>-7</sup>	9,10 · 10 <sup>-7</sup>	9,10 · 10 <sup>-7</sup>
Tiamin HCl	2,96 · 10 <sup>-7</sup>	2,96 · 10 <sup>-7</sup>	2,96 · 10 <sup>-7</sup>	2,96 · 10 <sup>-7</sup>	2,96 · 10 <sup>-7</sup>	2,96 · 10 <sup>-7</sup>	2,96 · 10 <sup>-7</sup>
Biotin	2,05 · 10 <sup>-9</sup>	2,05 · 10 <sup>-9</sup>	2,05 · 10 <sup>-9</sup>	2,05 · 10 <sup>-9</sup>	2,05 · 10 <sup>-9</sup>	2,05 · 10 <sup>-9</sup>	2,05 · 10 <sup>-9</sup>
Cijanokobalamin	3,69 · 10 <sup>-10</sup>	3,69 · 10 <sup>-10</sup>	3,69 · 10 <sup>-10</sup>	3,69 · 10 <sup>-10</sup>	3,69 · 10 <sup>-10</sup>	3,69 · 10 <sup>-10</sup>	3,69 · 10 <sup>-10</sup>

### 3.1.4.3. Hranjiva podloga za fototrofni šaržni uzgoj s pritokom u fotobioreктору

Za šaržni dio uzgoja odabrana je podloga 10xSi/4xN/4xP, koja se pokazala najpogodnijom za rast prilikom optimizacije sastava hranjive podloge. Priprema hranjive podloge navedena je u poglavlju 3.1.4.2. Petog dana uzgoja kultura je prihranjena s 0,87 mL L<sup>-1</sup> otopine NaNO<sub>3</sub> (75 g L<sup>-1</sup>) i 1,16 mL L<sup>-1</sup> otopine NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O (5 g L<sup>-1</sup>). Sedmog dana uzgoja kultura je prihranjena s 3,88 mL L<sup>-1</sup> otopine Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> × 9H<sub>2</sub>O (30 g L<sup>-1</sup>). Desetog dana uzgoja kultura je prihranjena s 5 mL L<sup>-1</sup> otopine NaHCO<sub>3</sub> (100 g L<sup>-1</sup>).

### 3.1.5. Oprema i aparatura

#### 3.1.5.1. Centrifuge

Za izdvajanje biomase iz hranjive podloge korištena je centrifuga Beckman J-21B (SAD) čiji je kapacitet 6 plastičnih kiveta volumena 500 mL i Thermo Scientific SL 8R (SAD) s kapacitetom od 6 plastičnih kiveta volumena 15 mL ili 50 mL.

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

Sastav masnih kiselina u biomasi određen je pomoću uređaja za plinsku kromatografiju GC 2010 Plus AF (Shimadzu, Japan). Sustav se sastoji od automatskog uzorkivača (AOC-20s), injektora (AOC-20i), termostatirane kapilarne kolone (Zebron ZBFAME Phenomenex, SAD), plameno - ionizacijskog detektora (FID-2010 Plus) i računalnog programa za obradu podataka (GC Solutions v2.32).

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

Za analizu najzastupljenijih monosaharida u hidrolizatu biomase mikroalgi korišten je UPLC uređaj 1290 Infinity II, (Agilent Technologies, SAD). Uređaj se sastoji od pumpe (G7104A), automatskog injektora (G7167B), termostata (G7116B), analitičke kolone (ionskoizmjenjivačka kolona Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup>; Phenomenex, SAD) s pretkolumnom, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID), modula za kontrolu sustava i računalnog programa za obradu podataka (OpenLAB CDS).

#### 3.1.5.4. Laboratorijski bioreaktor s miješalom

Fototrofni uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. proveden je u staklenom bioreaktoru s dvostrukim plaštom (M2, B. Braun, Njemačka) ukupnog volumena 2 L dodatno opremljenim umjetnim izvorom toplo-bijele svjetlosti (slika 9). U sklopu bioreaktora nalazi se sustav za kontrolu i regulaciju procesnih parametara (MD, B. Braun, Njemačka). Bioreaktor je opremljen s dvije Rushtonove turbine, pH elektrodom i sondom za mjerenje temperature (Pt100). Na poklopcu bioreaktora nalazi se sustav za uzorkovanje te priključci za punjenje, inokulaciju i korekciju pH-vrijednosti podloge. Sustav za aeraciju sastoji se od cijevi za dovod i odvod zraka na koje su spojeni filteri za sterilizaciju zraka. Protok zraka reguliran je pomoću rotametra. Broj okretaja miješala podešen je upotrebom analognog regulatora (Marus-Atm, Hrvatska).



Slika 9. Laboratorijski bioreaktor s vanjskim umjetnim izvorom toplo-bijele svjetlosti

(vlastita fotografija).

### 3.1.5.5. Ostala oprema i aparatura

Uz osnovno laboratorijsko posuđe i pribor, u izradi ovog rada korištena je i oprema navedena u tablici 12.

Tablica 12. Ostala oprema i aparatura korištena tijekom eksperimenta.

Oprema	Proizvođač i model
Autoklav	Sutjeska, Jugoslavija, 1987., serijski broj:401592
Analitička vaga	Acculab, SAD, ALC210.4
Hladnjak	Gorenje, Slovenija, serijski broj:4002388
Ledomat	Scotsman, USA, AF-10
Sušionici	Instrumentaria, Hrvatska, ST-05 i ST-06
Svjetlosni mikroskop	Olympus, Japan, CH20
Tehnička vaga	Tehtnica, Slovenija, ET-1211
Tresilica	Thermo Scientific, SAD, SHKE2000-1CE
Ultrazvučni homogenizator	Bandelin, Njemačka, Sonoplus HD 2200
UV/Vis spektrofotometar	Agilent Technologies, SAD, Cary 100
Vodena kupelj	InkoLab, Hrvatska, VK5ER
Vrtložna mješalica	Witeg, Njemačka, VM-10
Zamrzivač	Zanussi, Italija, serijski broj:4002409

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Uzgoj inokuluma

Inokulum je uzgajan u f/2 hranjivoj podlozi čiji je sastav opisan u poglavlju 3.1.4.1. Uzgoj je započeo aseptičnom inokulacijom 50 mL sterilne hranjive podloge s 5 mL kulture uzgojene u tekućoj hranjivoj podlozi. Provodio se kroz 7 dana na tresilici pri 200 o min<sup>-1</sup> na temperaturi od 25 °C. Za osvjetljenje je korištena toplo-bijela svjetlost (2000 K) prema režimu 12 sata svjetlo-12 sati tama. Potom je 20 mL tako uzgojene kulture inokulirano u aseptičnim uvjetima u 180 mL sterilne podloge jednakog sastava te je inokulum uzgajan kroz 7 dana u prethodno opisanim uvjetima.

### 3.2.2. Ugušćivanje inokuluma za uzgoj u fotobioreaktoru

Uzgojene su 2 L inokuluma na način opisan u poglavlju 3.2.1. Potom je izdvojena biomasa centrifugiranjem čitavog volumena inokuluma u sterilnim kivetama pri 5000 rpm kroz 15 minuta. Supernatant je odbačen, a biomasa je resuspendirana u 200 mL sterilne umjetne morske vode (tablica 6). Tako pripremljena ugušćena kultura koristila se kao inokulum za bioreaktor (slika 10).



Slika 10. Inokulum za biorektor (vlastita fotografija).

### 3.2.3. Optimizacija sastava hranjive podloge

Prilikom optimizacije sastava hranjive podloge za fototrofni rast dijatomeje korištena je f/2 izvorna i 6 modificiranih f/2 hranjivih podloga (poglavlje 3.1.4.2.). Uzgoj je proveden u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL, korisnog volumena 200 mL. Uzgoj je u hranjivim podlogama f/2, 4xSi/2xN/1xP, 4xSi/2xN/4xP, 10xSi/4xN/4xP i 10xSi/6xN/4xP praćen u tri paralele tikvica (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost), a u hranjivim podlogama 10xSi/4xN/6xP i 10xSi/4xN/8xP u jednoj paraleli. U 180 mL prethodno sterilizirane (121 °C, 20 min, autoklav) i ohlađene hranjive podloge dodano je 20 mL inokuluma čiji je uzgoj opisan u poglavlju 3.2.1. Uzgoj je trajao 14 dana, a provodio se šaržno na tresilici uz uvjete navedene u poglavlju 3.2.1. Uzgoj je praćen dnevnim izuzimanjem 1,5 mL uzorka u kojemu je, nakon tretmana ultrazvukom u svrhu razbijanja nakupina stanica, određen broj stanica po mililitru suspenzije brojanjem stanica u Thomaovoj komorici i optička gustoća podloge pri 540 nm. Po



završetku uzgoja, čitavi volumen prevrele hranjive podloge najprije je podvrgnut djelovanju ultrazvučnih valova u ultrazvučnom homogenizatoru, kako bi se razbile nakupine stanica i olakšale daljnje analize. Potom je uzet alikvot od 1 mL kulture u svrhu određivanja koncentracije proteina, zatim alikvot od 10 mL za određivanje koncentracije pigmenata i uzorci za gravimetrijsko određivanje biomase (3 paralele po 15 mL). U uzorcima za određivanje koncentracije pigmenata i gravimetrijsko određivanje biomase, biomasa je izdvojena centrifugiranjem 15 minuta pri 8000 rpm, pri čemu je supernatant odbačen. Preostali volumen kulture centrifugiran je 15 minuta pri 5000 rpm. Supernatant je pohranjen u zamrzivač na -20 °C do analize, a biomasa je isprana destiliranom vodom i još jednom centrifugirana u jednakim uvjetima, a potom je sušena na 50 °C preko noći.

#### 3.2.4. Fototrofni šaržni uzgoj s pritokom u fotobioreaktoru

Hranjiva podloga koja se koristila za šaržni dio procesa i sastav pojedinih prihrana tijekom uzgoja u fotobioreaktoru opisani su u poglavlju 3.1.4.3. Bioreaktor i svi potrebni priključci sterilizirani su u autoklavu pri temperaturi od 121 °C tijekom 20 minuta. Hranjiva podloga te otopine za korekciju pH vrijednosti (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 1 M NaOH) sterilizirane su na isti način. Bioreaktor je napunjen hranjivom podlogom pomoću peristaltičke pumpe. Početni volumen hranjive podloge iznosio je 1,7 L. Podloga je inokulirana s 200 mL ugušćene kulture (poglavlje 3.2.2.). Uzgoj se provodio pri temperaturi oko 28 °C, pH oko 7,4 te broj okretaja miješala 190 rpm. Protok zraka iznosio je 2,5 L min<sup>-1</sup>. Korišten je umjetni izvor toplo-bijele svjetlosti uz režim 12 sati svjetlo-12 sati tama. Uzorci su izuzimani svakodnevno (10-ak mL) te je praćen rast biomase brojanjem stanica u Thomaovoj komorici i mjerenjem optičke gustoće podloge. Svakodnevno je praćena i potrošnja silicija, dušika i fosfora u hranjivoj podlozi. Svakih nekoliko dana izuzimani su veći volumeni uzorka (oko 300 mL) u svrhu određivanja koncentracije suhe tvari biomase i sastava biomase. Šaržni dio uzgoja trajao je 5 dana, a potom je dodana prva prihrana s ciljem održavanja stanica u eksponencijalnoj fazi rasta. Prihrane su bile izvori važnih makronutrijenata za rast dijatomeje (silicij, dušik i fosfor). Prva prihrana sastojala se od otopina NaNO<sub>3</sub> i NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O (poglavlje 3.1.4.3.). Druga prihrana dodana je 7. dan uzgoja, a sastojala se samo od otopine Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> × 9H<sub>2</sub>O (poglavlje 3.1.4.3.). Desetog dana uzgoja dodana je otopina NaHCO<sub>3</sub> (poglavlje 3.1.4.3.). Proces je vođen ukupno 13 dana, nakon čega je biomasa izdvojena centrifugiranjem 15 minuta pri 5000 rpm. Talog je sušen u sušioniku pri 50 °C, a supernatant je pohranjen na -20 °C do analize.

### 3.2.5. Analitičke metode

#### 3.2.5.1. Brojanje stanica u Thomaovoj komorici

Uzgoj dijatomeja je praćen brojanjem stanica u Thomaovoj komorici. Komorica je najprije isprana destiliranom vodom i etanolom te dobro osušena. Potom je kap suspenzije stanica prenesena na površinu ugravirane mrežice i prekrivena pokrovnicom. Nakon što je pokrovnica fiksirana (pojavi su se Newtonovi kolobari s obje strane pokrovnice), pripravak je promatran pod mikroskopom pri ukupnom povećanju 400 puta. Ukoliko je brojanje stanica otežano zbog formiranja nakupina stanica, suspenzija stanica je tretirana ultrazvukom, a po potrebi i razrijeđena. Ukupan broj stanica po mililitru suspenzije (N) izračunat je prema izrazu:

$$N = \frac{n \cdot d}{10^{-4}} \quad [1]$$

pri čemu je:

n – ukupan broj stanica u 16 velikih kvadrata

d – razrjeđenje suspenzije stanica.

#### 3.2.5.2. Mjerenje optičke gustoće kulture

Tijekom uzgoja dijatomeja, mjerena je optička gustoća kulture pri valnoj duljini od 540 nm. Uzorci su prije mjerenja optičke gustoće tretirani ultrazvukom radi razbijanja nakupina stanica, a po potrebi i razrijeđeni destiliranom vodom (područje linearne ovisnosti apsorbancije o koncentraciji stanica; područje apsorbancije od 0,1 do 1,0).

#### 3.2.5.3. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari biomase

Koncentracija suhe tvari biomase određena je gravimetrijski. Za svaki uzorak rađene su po 3 paralele. Po 15 mL kulture centrifugirano je u prethodno osušanim i izvaganim plastičnim kivetama ( $m_1$ ) pri 8000 rpm tijekom 15 minuta. Supernatant je odbačen, a biomasa je isprana demineraliziranom vodom radi uklanjanja ostataka anorganskih soli iz hranjive podloge i još jednom centrifugirana u istim uvjetima. Supernatant je ponovo odbačen, dok je talog biomase sušen u sušioniku na 100 °C do konstantne mase. Nakon hlađenja u eksikatoru, izvagana je kiveta s osušenom biomasom ( $m_2$ ) te je određena koncentracija suhe tvari biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ] prema izrazu:

$$X = \frac{m_2 - m_1}{V_p} \quad [2]$$

pri čemu je:

$m_1$  - masa prazne kivete [g]

$m_2$  - masa kivete s osušenom biomasom [g]

$V_p$  - volumen kulture [L].

#### 3.2.5.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije klorofila u biomasi

Spektrofotometrijskom određivanju klorofila a i c prethodila je ekstrakcija pigmenata iz vlažne biomase 90 %-tnim (v/v) acetonom. 10 mL kulture centrifugirano je pri 8000 rpm tijekom 15 minuta. Supernatant je odbačen, a talogu biomase dodan je 1 g staklenih kuglica u svrhu mehaničkog razbijanja stanične stijenke dijatomeje i 2 mL 90 %-tnog (v/v) acetona. Kivete su zaštićene aluminijskom folijom kako bi se spriječio raspad fotosenzibilnih pigmenata uslijed izlaganja svjetlosti. Suspenzija je dva do tri puta miješana na vrtložnoj miješalici pri maksimalnoj brzini rotacije po 30 sekundi uz hlađenje na ledu. Nakon što se biomasa potpuno obezbojila, u ekstraktu je određena koncentracija klorofila. Ukoliko nije bilo postignuto potpuno obezbojenje biomase, ekstrakt dobiven u prvom koraku ekstrakcije izdvojen je u čistu epruvetu, a biomasa je podvrgnuta 2. koraku ekstrakcije dodatkom 2 mL 90 %-tnog acetona. Po potrebi je provedeno više koraka ekstrakcije, a ekstrakti dobiveni nakon svakog koraka sakupljani su u istu epruvetu.

Koncentracija klorofila a i klorofila c ekstrahiranih iz biomase određena je spektrofotometrijski. Dobivenim ekstraktima izmjerena je apsorbancija pri valnim duljinama od 630 nm, 647 nm, 664 nm i 750 nm. Koncentracija klorofila a i klorofila c [ $\text{mg m}^{-3}$ ] izračunata je prema jednadžbama Jeffrey i Humphreya (1975):

$$\text{Klorofil a} = \frac{11,85 \cdot (\text{OD}_{664} - \text{OD}_{750}) - 1,54 \cdot (\text{OD}_{647} - \text{OD}_{750}) - 0,08 \cdot (\text{OD}_{630} - \text{OD}_{750}) \cdot V_e}{L \cdot V_f} \quad [3]$$

$$\text{Klorofil c} = \frac{-1,67 \cdot (\text{OD}_{664} - \text{OD}_{750}) - 7,6 \cdot (\text{OD}_{647} - \text{OD}_{750}) + 24,52 \cdot (\text{OD}_{630} - \text{OD}_{750}) \cdot V_e}{L \cdot V_f} \quad [4]$$

pri čemu je:

$V_e$  - ukupni volumen ekstrakta [mL]

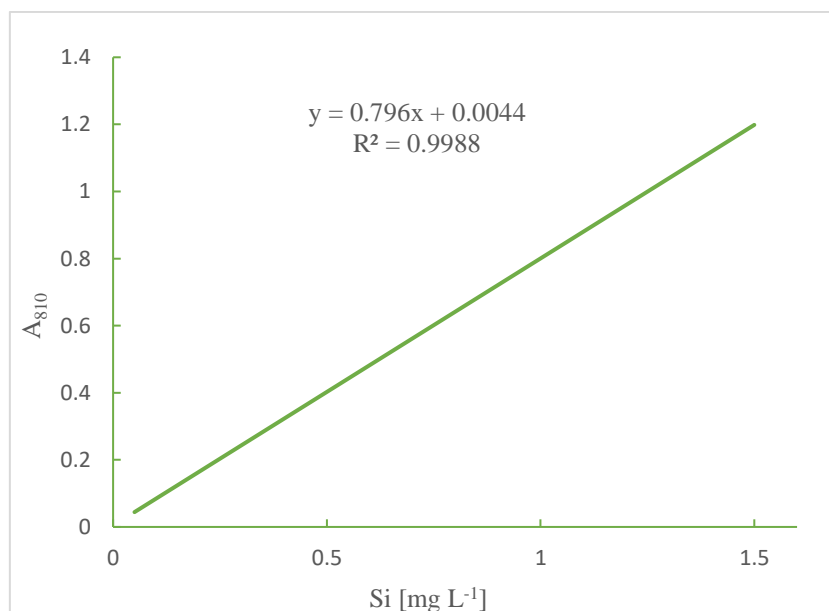
$V_f$  - volumen kulture uzet za ekstrakciju [L]

L - debljina kvarcne kivete [cm].

### 3.2.5.5. Određivanje koncentracije silicija

Za određivanje koncentracije silicija u hranjivoj podlozi korišten je silikatni kit (Merck KGaA, Njemačka) koji sadrži reagense Si-1, Si-2 i Si-3. U plastičnu epruvetu otpipetirano je 5 mL uzorka hranjive podloge (supernatanta dobivenog centrifugiranjem prevrele komine) temperature između 20 i 40 °C kojem su dodane 3 kapi reagensa Si-1. Suspenzija je dobro promiješana i provjerena je pH vrijednost. pH vrijednost reakcijske smjese mora biti u području 1,2 – 1,6 pa se prema potrebi korigirala. Reakcijska smjesa ostavljena je na sobnoj temperaturi 3 minute. Zatim su dodane 3 kapi reagensa Si-2 i suspenzija je dobro izmiješana. Naposljetku je dodano 0,5 mL reagensa Si-3 i suspenzija je izmiješana. Nakon 10 minuta potrebnih za provođenje kemijske reakcije, izmjerena je apsorbancija uzorka pri valnoj duljini od 810 nm. Slijepa proba sadržavala je dvostruko destiliranu vodu umjesto uzorka. Koncentracija silicija u uzorku izračunata je prema jednadžbi baždarnog pravca (slika 11).

Standardi za izradu baždarnog pravca priređeni su razrjeđivanjem 1 g L<sup>-1</sup> otopine natrijevog metasilikata nanohidrata s dvostruko destiliranom vodom kako bi se dobile otopine s koncentracijama silicija u rasponu od 0 do 1,5 mg L<sup>-1</sup>. Otopinama poznatih koncentracija silicija izmjerena je apsorbancija pri 810 nm. Iz eksperimentalnih podataka nacrtana je ovisnost apsorbancije o koncentraciji silicija, odnosno baždarni pravac i izračunata je jednadžba baždarnog pravca.

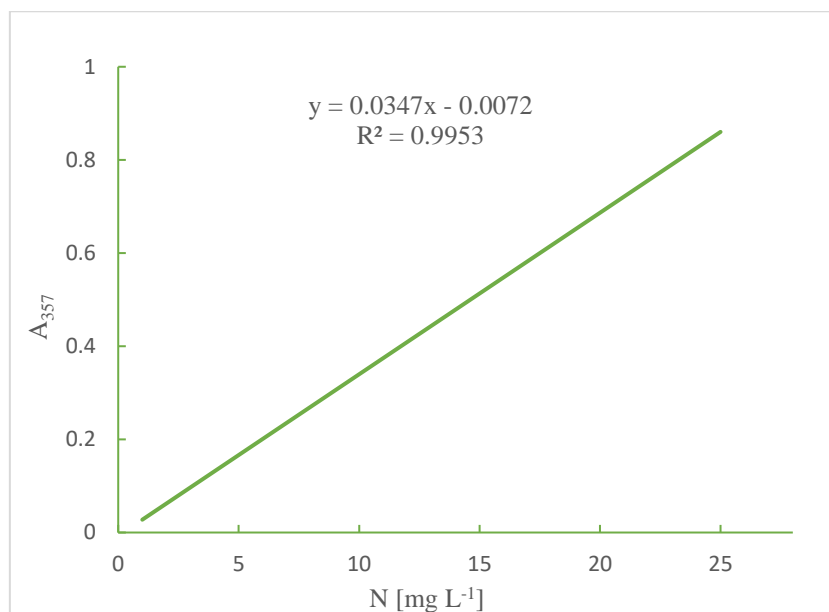


Slika 11. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije silicija u uzorku.

### 3.2.5.6. Određivanje koncentracije dušika

Za određivanje koncentracije dušika u hranjivoj podlozi korišten je nitratni kit (Merck KGaA, Njemačka) koji sadrži reagens  $\text{NO}_3\text{-1}$  i  $\text{NO}_3\text{-2}$ . U suhu plastičnu epruvetu otpipetirano je 4 mL reagens  $\text{NO}_3\text{-1}$  kojem je dodano 0,5 mL uzorka hranjive podloge (supernatanta dobivenog centrifugiranjem prevrele komine) temperature između 5 i 25 °C i 0,5 mL reagens  $\text{NO}_3\text{-2}$ . Suspenzija je lagano promiješana držeći vrh epruvete, jer je nastala kemijska reakcija izrazito egzotermna. Kemijska reakcija provedena je tijekom 10 minuta, nakon čega je izmjerena apsorbancija uzorka pri valnoj duljini od 357 nm. Slijepa proba sadržavala je dvostruko destiliranu vodu umjesto uzorka. Koncentracija dušika u uzorku određena je preko jednadžbe baždarnog pravca (slika 12).

Standardi za izradu baždarnog pravca priređeni su razrjeđivanjem 1 g L<sup>-1</sup> otopine natrijevog nitrata s dvostruko destiliranom vodom kako bi se dobile koncentracije dušika u uzorcima u rasponu 0 - 25 mg L<sup>-1</sup>. Otopinama je izmjerena apsorbancija pri 357 nm. Iz eksperimentalnih podataka nacrtana je ovisnost apsorbancije o koncentraciji dušika, odnosno baždarni pravac i određena je njegova jednadžba.

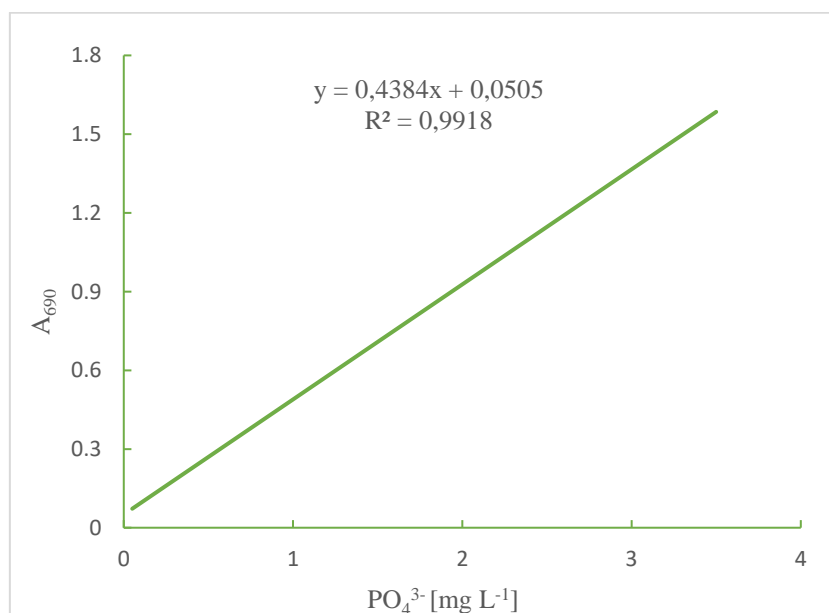


Slika 12. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije dušika u uzorku.

### 3.2.5.7. Određivanje koncentracije fosfata

Za određivanje koncentracije fosfata u hranjivoj podlozi korišten je fosfatni kit (Merck KGaA, Njemačka) koji sadrži reagens PO<sub>4</sub>-1 i PO<sub>4</sub>-2. U plastičnu kivetu otpipetirano je 5 mL uzorka hranjive podloge (supernatanta dobivenog centrifugiranjem prevrele komine) kojem je dodano pet kapi reagensa PO<sub>4</sub>-1 te je suspenzija promiješana. Zatim je dodana jedna mikrožličica reagensa PO<sub>4</sub>-2 nakon čega je suspenzija dobro izmiješana na vrtložnoj miješalici da se reagens potpuno otopi. Po isteku 5 minuta potrebnih za provođenje kemijske reakcije, izmjerena je apsorbancija uzorka pri valnoj duljini od 690 nm. Slijepa proba sadržavala je dvostruko destiliranu vodu umjesto uzorka. Koncentracija fosfatnih iona (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) izračunata je prema jednadžbi baždarnog pravca (slika 13) te je preračunata na koncentraciju fosfora (P) u uzorku.

Standardi za izradu baždarnog pravca priređeni su razrjeđivanjem 1 g L<sup>-1</sup> otopine natrijevog dihidrogenfosfata monohidrata s dvostruko destiliranom vodom tako da su koncentracije fosfatnih iona u uzorcima bile u rasponu 0 - 3,5 mg L<sup>-1</sup>. Otopinama poznatih koncentracija fosfatnih iona izmjerena je apsorbancija pri 690 nm. Iz eksperimentalnih podataka nacrtana je ovisnost apsorbancije o koncentraciji fosfata, odnosno baždarni pravac kojem je određena pripadajuća jednadžba.



Slika 13. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije fosfatnih iona u uzorku.

### 3.2.5.8. Određivanje profila masnih kiselina u biomasi

Analizi sadržaja masnih kiselina u lipidima dijatomeja prethodila je *in situ* transesterifikacija masnih kiselina prema NREL-ovom protokolu za određivanje ukupnih lipida (Van Wychen i Laurens, 2013a). U staklene viala izvagano je 5 - 10 mg biomase osušene preko noći na 50 °C. Biomasi je dodano 20 µL surogat standarda metil tridekanoata (C13:0 ME,  $\gamma = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ), 200 µL otopine kloroform:metanol (2:1, v/v) i 300 µL 0,6 M otopine HCl u metanolu. Reakcijska smjesa je vorteksirana, a potom inkubirana u vodenoj kupelji na 85 °C kroz sat vremena. Istekom vremena reakcije, uzorak je hlađen 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodan 1 mL heksana te je smjesa dobro promiješana i ostavljena na sobnoj temperaturi najmanje 60 minuta do razdvajanja faza. Gornja heksanska faza izdvojena je u čistu vialu radi daljnjih analiza. Heksanskoj fazi dodan je određeni volumen internog standarda pentadekana koncentracije  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  (5 µL na 200 µL uzorka). Uzorak je analiziran na plinskom kromatografu GC – 2010 Plus (Shimadzu, Japan) opremljenom masenim detektorom (FID). Uvjeti rada uređaja za plinsku kromatografiju prikazani su u tablici 13. Identifikacija masnih kiselina u uzorcima provedena je usporedbom vremena zadržavanja njihovih metilnih estera s vremenima zadržavanja metilnih estera standardne smjese 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 - C24) analiziranih u istim uvjetima. Dobivene koncentracije metilnih estera masnih kiselina normalizirane su prema količini standarda C13:0 ME i izražene masenim udjelom u suhoj tvari biomase [%]:

$$m_{x, \text{norm.}} = \frac{\gamma_x}{\gamma_{C13}} \cdot m_{C13} \quad [5]$$

$$w_x = \frac{m_{x, \text{norm.}}}{m_u} \cdot 100 \quad [6]$$

pri čemu je:

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

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

$m_{C13}$  – masa standarda metil tridekanoata dodanog u reakcijsku smjesu [mg]

$m_u$  - masa suhe biomase [mg].

Tablica 13. Uvjeti rada na uređaju za plinsku kromatografiju.

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

### 3.2.5.9. Određivanje udjela proteina u biomasi

Određivanje ukupnih proteina u biomasi provedeno je metodom po Lowry-ju. U plastičnu epruvetu dodan je izračunati volumen prevrele podloge ( $V_{pp}$ ) koji sadrži 0,1 mg biomase. Uzorku je dodano 0,5 mL demineralizirane vode u svrhu resuspendiranja stanica, a zatim 0,5 mL 1 M NaOH. Uzorak je inkubiran u vodenoj kupelji na 95 °C kroz 10 minuta. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, dodano je 2,5 mL otopine C (tablica 14). 10 minuta kasnije, naglo je dodano 0,5 mL otopine D (tablica 14) uz miješanje na vrtložnoj miješalici. Uzorak je ostavljen u tami na sobnoj temperaturi kroz 40 minuta. Istekom vremena reakcije, mjerena je apsorbanacija pri 550 nm. Slijepa proba sadržavala je demineraliziranu vodu umjesto uzorka. Koncentracija proteina u reakcijskoj smjesi [ $\text{mg L}^{-1}$ ] određena je preko jednadžbe baždarnog pravca (slika 14), koja je zatim preračunata na masu proteina u reakcijskoj smjesi [mg]. Iz mase proteina [mg] i mase biomase dodane u reakcijsku smjesu (0,1 mg) izračunat je udio proteina u biomasi [%]:

$$m_p = \gamma_p \cdot V_k = \gamma_p \cdot (4 + V_{pp}) \quad [7]$$

$$w_p = (m_p/m_x) \cdot 100 \quad [8]$$

pri čemu je:

$m_p$  - masa proteina u reakcijskoj smjesi [mg]

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



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

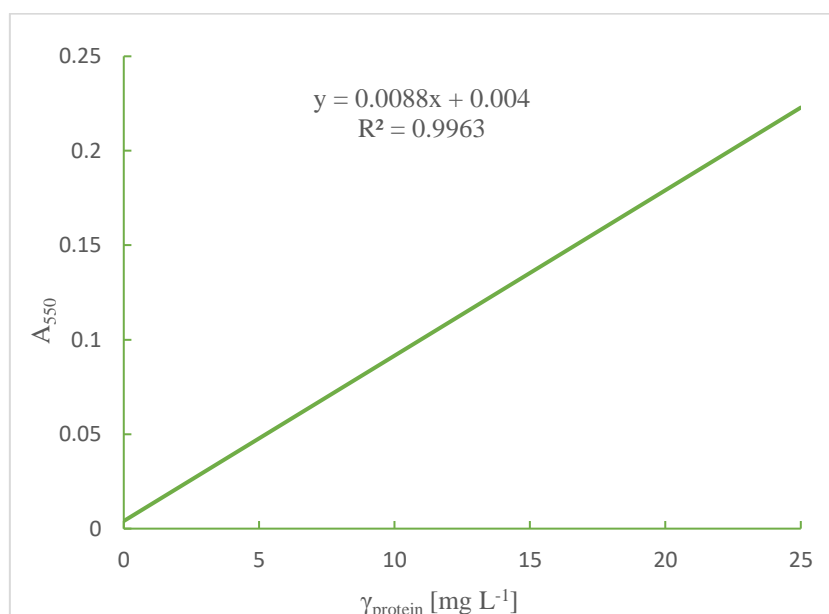
$V_k$  - ukupni volumen reakcijske smjese [mL]

$V_{pp}$  - volumen prevrele podloge dodan u reakcijsku smjesu [mL].

Standardi za izradu baždarnog pravca pripremljeni su razrjeđivanjem  $1 \text{ g L}^{-1}$  otopine albumina goveđeg seruma (eng. Bowine Serum Albumin, BSA). Koncentracije BSA u razrjeđenjima bile su u rasponu  $0 - 100 \text{ mg L}^{-1}$ . U  $1 \text{ mL}$  razrjeđenja BSA dodano je  $2,5 \text{ mL}$  otopine C (tablica 14), a nakon 10 minuta dodano je  $0,5 \text{ mL}$  otopine D (tablica 14). Nakon stajanja uzoraka 40 minuta u tami na sobnoj temperaturi, izmjerena je apsorbancija pri  $550 \text{ nm}$ . Iz eksperimentalnih podataka nacrtana je ovisnost apsorbancije o koncentraciji BSA, tj. baždarni pravac iz kojeg je izračunata pripadajuća jednadžba. Koncentracije BSA u reakcijskoj smjesi ( $V_k = 4 \text{ mL}$ ) iznosile su  $0 - 25 \text{ mg L}^{-1}$  (slika 14).

Tablica 14. Sastav otopina korištenih u provođenju metode po Lowry-ju.

otopina A	$5 \% \text{ Na}_2\text{CO}_3$
otopina B	$0,5 \% \text{ CuSO}_4$ u $1 \%$ -tnom K, Na-tartaratu
otopina C	otopina A:otopina B ( $50:1, \text{ v:v}$ )
otopina D	Folin-Ciocalteu reagens razrijeđen destiliranom vodom ( $1:1, \text{ v:v}$ )



Slika 14. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-ju.

### 3.2.5.10. Određivanje koncentracije ugljikohidrata

Određivanje sastava monosaharida i udjela ugljikohidrata u biomasi mikroalgi provedeno je prema metodi NREL-a (eng. National Renewable Energy Laboratory, USA) (Van Wycken i Laurens, 2013b). U Pirex staklene epruvete odvagano je 25 mg prethodno osušene biomase mikroalgi te je dodano 250  $\mu\text{L}$  72 % (w/w) sumporne kiseline. Sadržaj epruvete je polagano miješan kako ne bi došlo do lijepljenja biomase za stjenke epruvete te se ostvario što bolji kontakt biomase sa kiselinom. Epruvete su zatim kroz sat vremena inkubirane u termostatu na 30 °C, uz miješanje sadržaja svakih 5–10 minuta. Nakon sat vremena u epruvete je dodano 7 mL deionizirane vode te je smjesa pažljivo promiješana. Zatim je smjesa zagrijana na 121 °C kroz sat vremena u autoklavu. Nakon hlađenja uzorka na sobnu temperaturu, iz svake epruvete je uzet alikvot od 3 mL. Dodatkom kalcijeva karbonata je podešena pH vrijednost na 5. Neutralizirani uzorci profiltrirani su kroz najlonski filter pora veličine 0,22  $\mu\text{m}$  u vijalicu za HPLC/UPLC analizu. HPLC metodom analizirani su kiselinski hidrolizati biomase mikroalgi. Kao mobilna faza korištena je 0,1 % vol/vol otopina  $\text{H}_3\text{PO}_4$  u redestiliranoj vodi, čija je vodljivost manja od 1  $\mu\text{S}$ . Injektirano je po 20  $\mu\text{L}$  svakog uzorka na kromatografsku kolonu. Temperatura pećnice iznosila je 55 °C, a brzina protoka mobilne faze podešena je na 0,5 mL  $\text{min}^{-1}$ . Podaci su analizirani pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10. Jednadžbe baždarnih pravaca (tablica 13) prikazuju ovisnost površine ispod krivulje pika o koncentraciji šećera [ $\text{g L}^{-1}$ ] za najzastupljenije monosaharide u hidrolizatima biomase mikroalgi.

Tablica 15. Najzastupljeniji monosaharidi u biomasi s pripadajućim retencijskim vremenima i jednadžbama pravca.

Monosaharid	Rt [min]	Jednadžba pravca
Glukoza	4,182	$y = 135278x - 3377$
Galaktoza	5,138	$y = 132077x + 987,09$
Fukoza	5,952	$y = 136441x - 2965,8$

### 3.2.5.11. Određivanje pokazatelja uspješnosti bioprocesa

Pokazatelji uspješnosti bioprocesa određeni su prema jednadžbama [9], [10], [11] i [12].

$$Y_X = X - X_0 \quad [9]$$

$Y_X$  – prinos biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$X$  – koncentracija biomase na kraju uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ]

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

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \cdot \ln \frac{X}{X_0} \quad [10]$$

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

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

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

$\Delta t$  – interval vremena ( $t_n - t_0$ ).

$$t_g = \ln 2 \cdot \frac{\Delta t}{\ln \frac{N}{N_0}} \quad [11]$$

$t_g$  – generacijsko vrijeme [h]

$\Delta t$  – interval vremena ( $t_n - t_0$ )

$N$  – broj stanica u vremenu  $t_n$

$N_0$  – broj stanica u vremenu  $t_0$ .

$$Pr_X = \frac{X}{t_u} \quad [12]$$

$Pr_X$  – 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].

### 3.2.5.12. Određivanje volumena stanica

Računalnim programom određene su dimenzije stanica promatranih pod svjetlosnim mikroskopom pri ukupnom povećanju 400x. Volumen stanica [ $\mu\text{m}^3$ ] izračunat je prema jednadžbi:

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot \frac{L^2}{4} \cdot d \cdot 4 \quad [13]$$

$L$  – duljina stanice [ $\mu\text{m}$ ]

$d$  – promjer stanice [ $\mu\text{m}$ ].

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

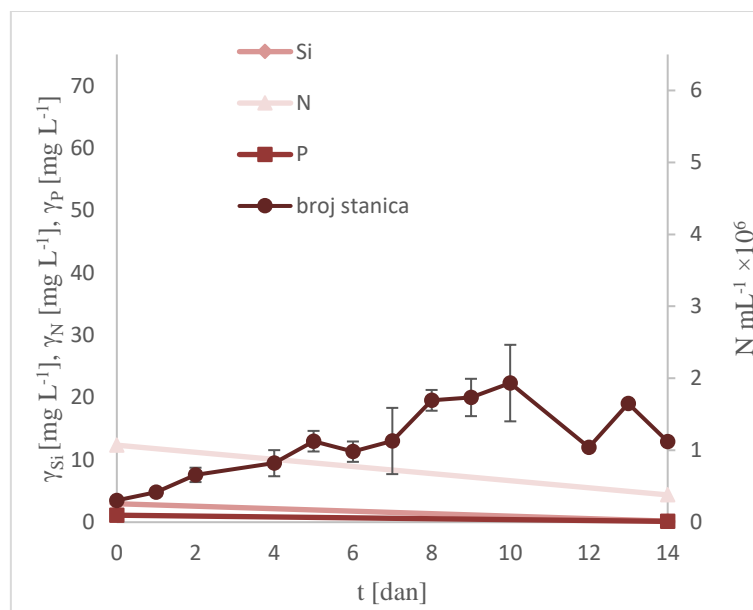
Dijatomeje su fotosintetski mikroorganizmi, što znači da koriste anorganski izvor ugljika i energiju svjetlosti za rast. Biomasa dijatomeja i njezini visokovrijedni proizvodi imaju primjenu u različitim industrijama (prehrambena, kozmetička, farmaceutska itd.). Glavni problem fototrofnog uzgoja dijatomeja predstavljaju relativno niski prinosi i produktivnosti biomase. Cilj ovog istraživanja bila je optimizacija fototrofnog uzgoja dijatomeje *Nitzschia* sp. izolirane iz Jadranskog mora u okolici Šibenika. U ovom radu korišten je umjetni izvor svjetlosti tople bijele boje (2000 K) prema režimu 12 sati svjetlo-12 sati tama. Hranjive podloge bile su otopine anorganskih soli, pri čemu je natrijev bikarbonat bio izvor ugljika.

U prvom dijelu istraživanja optimirana je f/2 hranjiva podloga za fototrofni rast u šaržnom uzgoju dijatomeje kroz 14 dana mijenjajući koncentracije makronutrijenata za koje se smatra da limitiraju rast ispitivanog soja (silicij, dušik i fosfor). Silicij je potreban za izgradnju frustule, a metabolizam silicija je blisko povezan s staničnim ciklusom i respiracijom (Jeffryes i sur., 2013; Hildebrand i Lerch, 2015; Gao i sur., 2019). Dušik je potreban za sintezu aminokiselina, nukleinskih kiselina, lipida i ugljikohidrata (Zulu i sur., 2018; Gao i sur., 2019). Fosfor je važan za pohranjivanje i prijenos metaboličke energije te sintezu nukleinskih kiselina, fosfolipida i drugih fosforiliranih tvari (Adams i Bugbee, 2013; Zulu i sur., 2018). Istražen je i utjecaj sastava modificirane f/2 hranjive podloge na sastav biomase i sastav masnih kiselina. Uzimajući u obzir prethodna saznanja o rastu dijatomeje *Nitzschia* sp., proveden je fototrofni šaržni uzgoj s pritokom supstrata dijatomeje *Nitzschia* sp. u fotobioreктору kroz 13 dana, s ciljem dobivanja većih koncentracija biomase. Istražen je utjecaj šaržnog uzgoja s pritokom supstrata na sastav biomase i sastav masnih kiselina. Tijekom eksperimenata rast stanica praćen je brojanjem u Thomaovoj komorici i mjerenjem optičke gustoće pri 540 nm. Koncentracija biomase i njezin sastav određeni su na kraju uzgoja (šaržni uzgoj), odnosno više puta tijekom uzgoja (šaržni uzgoj s pritokom supstrata u fotobioreктору).

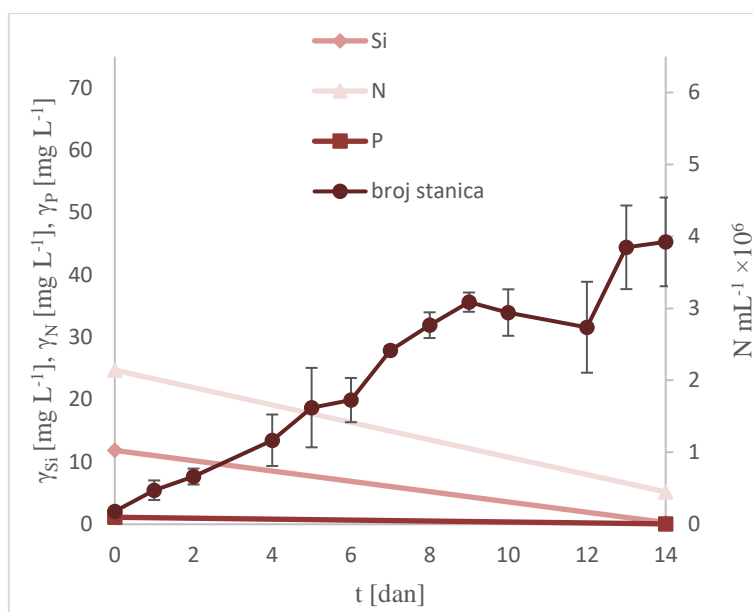
#### 4.1. Optimizacija sastava hranjive podloge

Najčešće korištena hranjiva podloga za fototrofni uzgoj dijatomeja je f/2 hranjiva podloga (Guillard, 1975) čiji se sastav nalazi u tablici 7. Prethodna istraživanja pokazala su da se povećanjem koncentracije svih nutrijenata u f/2 hranjivoj podlozi povećava prinos biomase i specifična brzina rasta ispitivanog soja (Brajković, 2019). U ovom radu istražen je rast dijatomeje *Nitzschia* sp. u hranjivim podlogama s različitim kombinacijom početnih koncentracija silicija ( $2,96 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $11,84 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $29,60 \text{ mg L}^{-1}$ ), dušika ( $12,35 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $24,70 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $49,40 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $74,10 \text{ mg L}^{-1}$ ) i fosfora ( $1,12 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $4,49 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $6,74 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $8,98 \text{ mg L}^{-1}$ ) kako bi se pronašao odgovarajući omjer ova tri nutrijenta u svrhu daljnje optimizacije. Kompletan sastav hranjivih podloga prikazan je u poglavlju 3.1.4.2., a korištene metode u poglavlju 3.2.3.

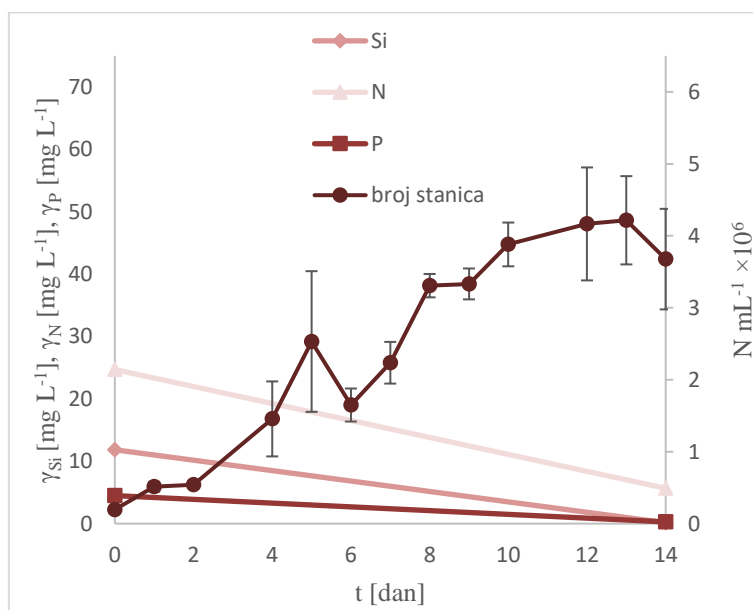
Na slikama 15 – 21 prikazane su krivulje rasta na izvornoj f/2 i modificiranim f/2 hranjivim podlogama. Krivulje rasta mikroorganizma pokazuju karakteristične faze: eksponencijalna bez prethodne lag faze, stacionarna te u nekim hranjivim podlogama i faza odumiranja (Wen i Chen, 2000). Najkraći eksponencijalni rast uočen je u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi i trajao je svega 8 dana, nakon čega je uslijedio pad broja stanica (faza odumiranja). Kod ostalih modificiranih f/2 hranjivih podloga, eksponencijalni rast trajao je duže (10-12 dana).



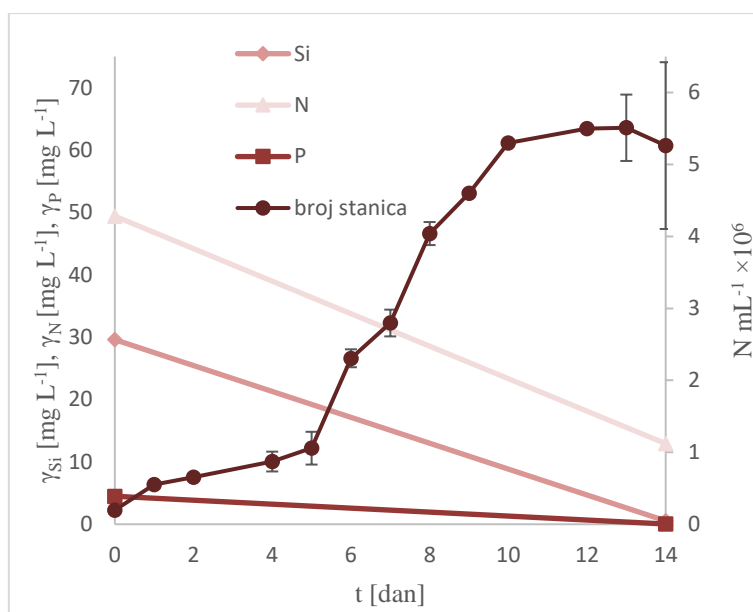
Slika 15. Krivulja rasta dijatomeje *Nitzschia* sp. na izvornoj f/2 hranjivoj podlozi i koncentracije silicija, dušika i fosfora na početku i na kraju uzgoja.



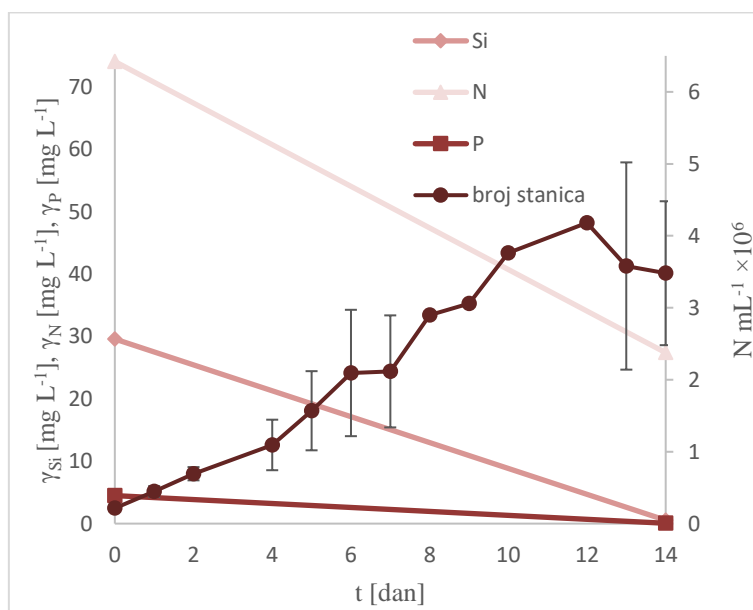
Slika 16. Krivulja rasta dijatomeje *Nitzschia* sp. na 4xSi/2xN/1xP hranjivoj podlozi i koncentracije silicija, dušika i fosfora na početku i na kraju uzgoja.



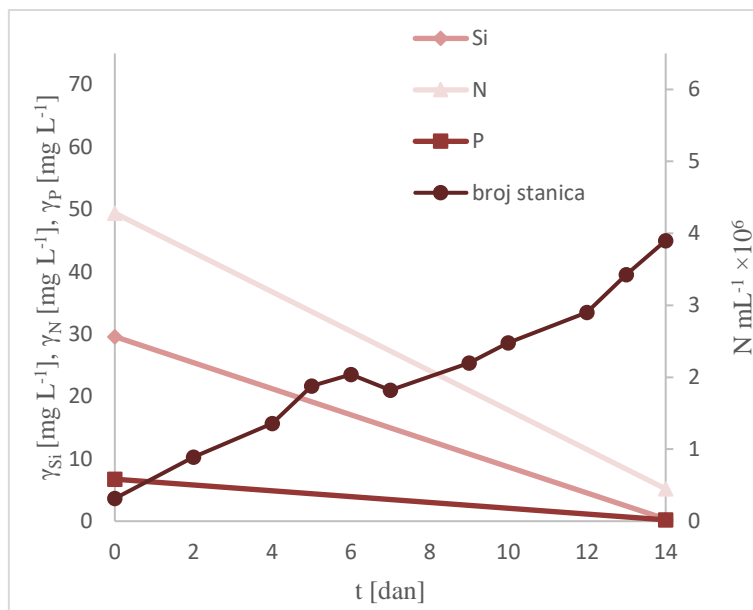
Slika 17. Krivulja rasta dijatomeje *Nitzschia* sp. na 4xSi/2xN/4xP hranjivoj podlozi i koncentracije silicija, dušika i fosfora na početku i na kraju uzgoja.



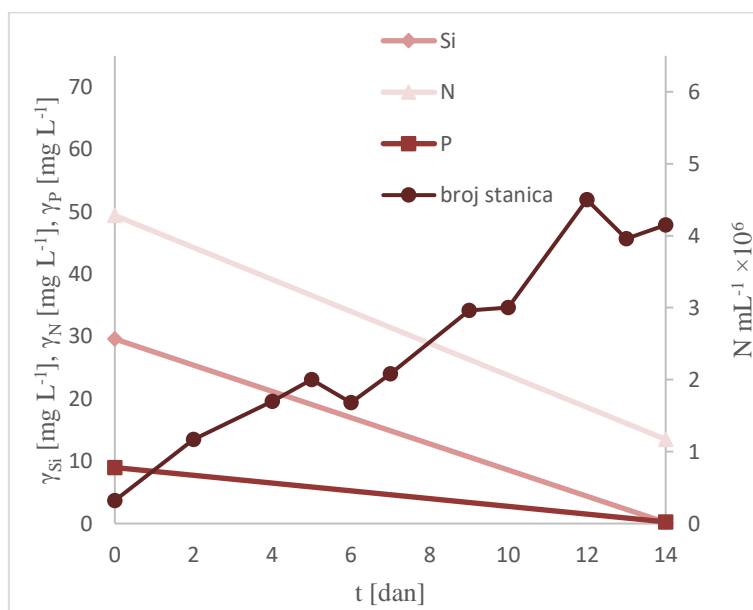
Slika 18. Krivulja rasta dijatomeje *Nitzschia* sp. na 10xSi/4xN/4xP hranjivoj podlozi i koncentracije silicija, dušika i fosfora na početku i na kraju uzgoja.



Slika 19. Krivulja rasta dijatomeje *Nitzschia* sp. na 10xSi/6xN/4xP hranjivoj podlozi i koncentracije silicija, dušika i fosfora na početku i na kraju uzgoja.



Slika 20. Krivulja rasta dijatomeje *Nitzschia* sp. na 10xSi/4xN/6xP hranjivoj podlozi i koncentracije silicija, dušika i fosfora na početku i na kraju uzgoja.



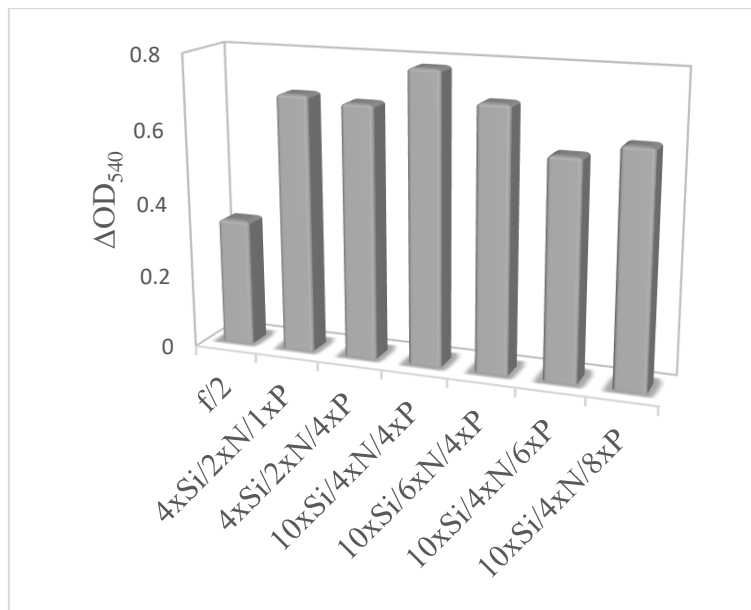
Slika 21. Krivulja rasta dijatomeje *Nitzschia* sp. na 10xSi/4xN/8xP hranjivoj podlozi i koncentracije silicija, dušika i fosfora na početku i na kraju uzgoja.

Iz krivulja rasta je vidljivo da radnom mikroorganizmu pogoduju veće početne koncentracije silicija, dušika i fosfora, u odnosu na koncentracije u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi. Naime, rast u svim modificiranim hranjivim podlogama rezultirao je većim brojem stanica tijekom svih 14 dana uzgoja, u odnosu na izvornu f/2 hranjivu podlogu. Najveći broj



stanica po mililitru podloge određen je na kraju uzgoja u 10xSi/4xN/4xP hranjivoj podlozi ( $N = (5,262 \pm 1,1589) \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ).

Slika 22 prikazuje prirast optičke gustoće podloge tijekom uzgoja na izvornoj f/2 i modificiranim f/2 hranjivim podlogama. Prirast optičke gustoće odgovara prirastu broja stanica tijekom uzgoja. Odnosno, znatno veći prirast optičke gustoće određen je u modificiranim f/2 hranjivim podlogama, u odnosu na izvornu f/2 hranjivu podlogu. Najveći prirast optičke gustoće određen je na kraju uzgoja u 10xSi/4xN/4xP hranjivoj podlozi ( $\Delta OD_{540} = 0,7848$ ).



Slika 22. Prirast optičke gustoće podloge ( $\Delta OD_{540}$ ) nakon 14 dana uzgoja u izvornoj f/2 i modificiranim f/2 hranjivim podlogama.

Tablica 16. Pokazatelji uspješnosti procesa optimizacije f/2 hranjive podloge.

	$Y_X$ [ $\text{g L}^{-1}$ ]	$Pr_X$ [ $\text{g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ]	$\mu$ [ $\text{dan}^{-1}$ ]	$t_g$ [dan]
izvorna f/2	0,2520	0,0180	0,1575	6,3492
4xSi/2xN/1xP	0,4969	0,0355	0,2374	4,2123
4xSi/2xN/4xP	0,4945	0,0353	0,2315	4,3197
10xSi/4xN/4xP	0,7611	0,0544	0,2803	3,5676
10xSi/6xN/4xP	0,5838	0,0417	0,2301	4,3459
10xSi/4xN/6xP	0,4133	0,0295	0,1032	9,6899
10xSi/4xN/8xP	0,5956	0,0425	0,1083	9,2336

Pokazatelji uspješnosti uzgoja prikazani su u tablici 16. Najveći prinos suhe tvari biomase i produktivnost sinteze suhe tvari biomase određen je na hranjivoj podlozi 10xSi/4xN/4xP. Osim toga, stanice su se pri tim uvjetima najbrže dijelile, što pokazuje najveća specifična brzina rasta, odnosno najkraće generacijsko vrijeme.

Koncentracija silicija imala je značajniji učinak na kinetiku rasta dijatomeje u odnosu na ostala dva makronutrijenta. Rast na hranjivoj podlozi početne koncentracije silicija od 2,96 mg L<sup>-1</sup> (izvorna f/2) rezultirao je najmanjim brojem stanica po mililitru podloge (slika 15), te najmanjim prirastom optičke gustoće (slika 22) i prirastom suhe tvari biomase (tablica 16). Rast na hranjivim podlogama s četverostrukim povećanjem početne koncentracije silicija od 11,84 mg L<sup>-1</sup> (4xSi/2xN/1xP i 4xSi/2xN/4xP hranjive podloge) rezultirao je gotovo četverostrukim povećanjem broja stanica (slike 16 i 17) te dvostrukim povećanjem prinosa optičke gustoće (slika 22) i koncentracije suhe tvari biomase (tablica 16), u odnosu na izvornu f/2 hranjivu podlogu.

Uspješnost uzgoja na hranjivim podlogama s deseterostrukim povećanjem početne koncentracije silicija od 29,6 mg L<sup>-1</sup> (10xSi/4xN/4xP; 10xSi/6xN/4xP; 10xSi/4xN/6xP i 10xSi/4xN/8xP hranjive podloge) ovisila je o koncentracijama preostala dva makronutrijenta. Uzgoju su pogodovale niže koncentracije dušika i fosfora (10xSi/4xN/4xP hranjiva podloga), što se vidi iz slika 18 i 22 te tablice 16. Pri tim uvjetima ostvareno je peterostruko povećanje broja stanica te trostruko povećanje prinosa suhe tvari biomase, u odnosu na izvornu f/2 hranjivu podlogu. Daljnjim povećanjem koncentracija dušika (10xSi/6xN/4xP hranjiva podloga), odnosno fosfora (10xSi/4xN/6xP i 10xSi/4xN/8xP hranjive podloge), uzgoj je bio manje uspješan, što potvrđuju slike 19, 20, 21 22 te tablica 16. Može se zaključiti da navedeni makronutrijenti inhibiraju rast pri koncentracijama većim od 74,10 mg L<sup>-1</sup> dušika, odnosno 6,74 mg L<sup>-1</sup> fosfora. Inhibicijski učinak izvora dušika i fosfora na rast zapažen je i kod drugih dijatomeja (Li i Campbell, 2017; Yang i sur., 2014).

Zaključuje se da izvorna f/2 podloga nije pogodna za uzgoj ispitivanog soja jer je u toj hranjivoj podlozi postignut najmanji broj stanica po mililitru podloge ( $N = 1,12 \times 10^6$  st mL<sup>-1</sup>), prirast optičke gustoće ( $\Delta OD_{540} = 0,3462$ ) i prirast koncentracije suhe tvari biomase ( $Y_X = 0,2520$  g L<sup>-1</sup>) na kraju uzgoja. Povećanjem početnih koncentracija silicija, dušika i fosfora u hranjivim podlogama, postižu se bolji prinosi i produktivnost biomase. Najpogodnija za rast bila je modificirana f/2 hranjiva podloga 10xSi/4xN/4xP, pri čemu je postignut najveći broj stanica ( $N = 5,76 \times 10^6$  st mL<sup>-1</sup>), prirast optičke gustoće ( $\Delta OD_{540} = 0,7848$ ) i prirast koncentracije suhe tvari biomase ( $Y_X = 0,7611$  g L<sup>-1</sup>) na kraju uzgoja.

Na slikama 15 – 21 vidi se da su stanice trošile silicij i fosfor u većoj mjeri nego dušik. Utrošak silicija je u svim hranjivim podlogama bio između 94,17 % i 99,41 %, a fosfora između 88,71 % i 99,16 %. Utrošak dušika je bio znatno manji (između 40,54 % i 79,01 %), odnosno bio je dodan u suvišku. Utrošak dušika ovisio je o njegovoj početnoj koncentraciji. Bio je

gotovo jednak u podlogama s najmanjom ( $12,35 \text{ mg L}^{-1}$ ; slika 15), odnosno najvećom ( $74,10 \text{ mg L}^{-1}$ ; slika 19) početnom koncentracijom dušika i iznosio je oko 64 %. Utrošak dušika početne koncentracije  $49,49 \text{ mg L}^{-1}$  ovisio je o koncentraciji fosfora. Utrošku su pogodovale niže koncentracije fosfora ( $4,49 \text{ mg L}^{-1}$ ; slika 18) u usporedbi s većima ( $6,74 \text{ mg L}^{-1}$ ; slika 20 i  $8,98 \text{ mg L}^{-1}$ ; slika 21), odnosno utrošak je iznosio redom 73,83 %, 40,54 % i 55,71 %. Najveći utrošak dušika određen je u hranjivoj podlozi početne koncentracije  $24,70 \text{ mg L}^{-1}$ , neovisno o koncentraciji fosfora ( $1,12 \text{ mg L}^{-1}$ ; slika 16 i  $4,49 \text{ mg L}^{-1}$ ; slika 17), a iznosio je oko 78 %.

#### 4.1.1. Sastav biomase

Na kraju šaržnog uzgoja u izvornoj f/2 i modificiranim f/2 hranjivim podlogama određen je makromolekulski sastav biomase, odnosno ukupni proteini, lipidi, ugljikohidrati i klorofil. Osim toga, određen je sastav masnih kiselina u ukupnim staničnim lipidima te sastav ugljikohidrata.

##### 4.1.1.1. Proteini

U prisutnosti suviška izvora ugljika, rast stanice u hranjivim podlogama najčešće ovisi o dostupnom izvoru dušika koji je nužan za sintezu aminokiselina, proteina i nukleinskih kiselina (Zulu i sur., 2018). Koncentracije preostalog dušika u izvornoj i modificiranim f/2 hranjivim podlogama na kraju uzgoja (slike 15 – 21) pokazuju da rast biomase nije bio limitiran ovim makronutrijentom. U izvornoj f/2, te  $4xSi/2xN/1xP$ ,  $4xSi/2xN/4xP$  i  $10xSi/4x/4x$  modificiranim f/2 hranjivim podlogama, udjel proteina bio je sličan i iznosio je između 16,59 % i 23,74 %. Veći udjeli proteina određeni su u biomasi narasloj na f/2 hranjivim podlogama  $10xSi/4xN/6xP$  i  $10xSi/4xN/8xP$ . Naime, visoke koncentracije fosfora ( $6,74 \text{ mg L}^{-1}$ , odnosno  $8,98 \text{ mg L}^{-1}$ ) u ovim hranjivim podlogama imale su pozitivan učinak na rast biomase što se može objasniti ulogom fosfora u prijenosu metaboličke energije i sintezi nekih makromolekula (nukleinske kiseline, fosforilirani lipidi i ugljikohidrati) u stanici (Zulu i sur., 2018). Suprotno očekivanjima, u hranjivoj podlozi  $10xSi/6xN/4xP$  s najvećom koncentracijom dušika, određen je najmanji udjel proteina. Moguće objašnjenje je limitacija rasta silicijem i/ili fosforom, koji su na kraju uzgoja gotovo potpuno iscrpljeni iz podloge (slika 19). Iako morske mikroalge mogu sadržavati do 52 % proteina u suhoj tvari biomase, udjel je za koljeno Bacillariophyta najčešće u rasponu 23,9 % - 30,8 %, što je u skladu s ovim istraživanjem (Finkel i sur., 2016; Renaud i sur., 1999). I drugi autori su pokazali da su najzastupljenije makromolekule dijatomeja iz roda *Nitzschia* sp. uzgojenih na f/2 hranjivoj podlozi upravo proteini (Rodríguez-Núñez i Toledo-Agüero, 2017).

Tablica 17. Makromolekularni sastav biomase na kraju šaržnog uzgoja na izvornoj i modificiranim f/2 hranjivim podlogama.

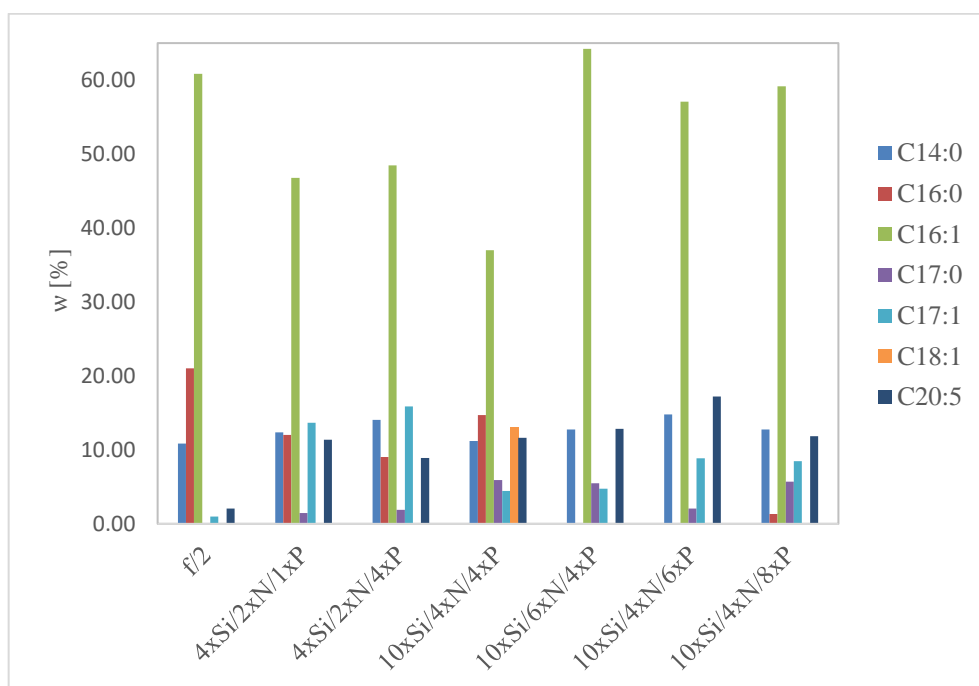
Hranjiva podloga	Proteini [%]	Lipidi [%]	Ugljikohidrati [%]	Ukupni klorofil [%]	Klorofil a [%]	Klorofil c [%]
izvorna f/2	21,23	5,91	19,73	0,7668	0,7402	0,0266
4xSi/2xN/1xP	19,68	4,2	11,54	0,9382	0,4915	0,4467
4xSi/2xN/4xP	23,74	3,72	7,08	0,8611	0,715	0,1461
10xSi/4xN/4xP	16,59	3,94	8,04	0,2731	0,1709	0,1022
10xSi/6xN/4xP	8,27	2,47	9,58	0,3519	0,1236	0,2283
10xSi/4xN/6xP	35,33	2,28	4,52	1,7687	1,2438	0,5249
10xSi/4xN/8xP	40,12	3,16	4,19	1,2053	0,9181	0,2872

#### 4.1.1.2. Lipidi

Dostupnost nutrijenata, a posebice silicija, dušika i fosfora značajno utječe na ukupan stanični metabolizam pa time i na sintezu lipida u stanicama dijatomeja. Konkretno, sinteza neutralnih lipida (TAG) stimulirana je kada neki od spomenutih nutrijenata limitira rast stanica (Jeffryes i sur., 2013; Adams i Bugbee, 2013; Zulu i sur., 2018). Istraživanja su pokazala da stanice brže reagiraju na nedostatak silicija, nego nedostatak preostala dva spomenuta makronutrijenta nakupljajući pri tome veće koncentracije lipida (Adams i Bugbee, 2013). Iz tablice 17 vidljivo je kako je najveći udjel lipida (5,91 %) određen u stanicama uzgojenim u izvornoj f/2 podlozi, što se može objasniti limitacijom rasta silicijem (i fosforom) koja se jasno vidi na slici 15. Iako i limitacija dušikom može značajno povećati udjel lipida u stanicama (Gao i sur., 2019), to u ovom eksperimentu nije bio slučaj budući da je dušik dodan u suvišku u sve hranjive podloge (slike 15 – 21). U modificiranim f/2 hranjivim podlogama, veće koncentracije nutrijenata omogućile su brži rast stanica. U danim uvjetima izvor ugljika usmjeravan je u metaboličke puteve vezane za izgradnju stanične biomase, umjesto sinteze rezervi energije tj. lipida. Udjel lipida u biomasi uzgojenoj na f/2 modificiranim hranjivim podlogama iznosio je između 2,28 % i 4,20 %, što je vrlo slično literaturnim podacima za ovu vrstu dijatomeje (D'Alessandro i Antoniosi Filho, 2016).

Rezultati određivanja sastava masnih kiselina u ukupnim staničnim lipidima (slika 23) pokazuju da jednostruko nezasićene masne kiseline (MUFA) čine najveći udjel u ukupnim staničnim lipidima (između 55,19 % i 68,93 %), od kojih je daleko najzastupljenija palmitoleinska (C16:1) s udjelom između 37,00 % i 64,20 %. Druga najzastupljenija MUFA je *cis*-10-heptadekanska s udjelima između 1,00 % i 15,87 %. Oleinska kiselina (C18:1) kvantificirana je samo u biomasi uzgojenoj na 10xSi/4xN/4xP hranjivoj podlozi i iznosi 13,09

% . Udjel zasićenih masnih kiselina (SFA) iznosi između 16,85 % i 31,86 %, a najzastupljenije su miristinska (C14:0) i palmitinska (C16:0) s udjelima od 10,83 % - 14,79 %, odnosno 0 % - 21,03 %. Treća po zastupljenosti SFA je heptadekanska (C17:0) s udjelima 0 % - 5,92 %. Od višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA) prisutna je samo eikozapentaenoična; EPA (C20:5) čiji je udjel između 2,07 % i 17,21 %. Ostale masne kiseline koje nisu prikazane na slici 23, nađene u maloj koncentraciji u samo nekim uzorcima su miristoleinska (C14:1), *cis*-10-pentadekanska (C15:1), lignocerinska (C24:0) i nervonska (C24:1). Njihov ukupni udjel u staničnim lipidima ne prelazi 4 %.



Slika 23. Profil masnih kiselina izražen kao udjel u ukupnim staničnim lipidima dijatomeje uzgojenoj na izvornoj i modificiranim f/2 hranjivim podlogama.

Profil masnih kiselina u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi najviše se razlikuje od ostalih, što je posljedica limitacije silicijem (slika 15). Primijećen je znatno manji udjel eikozapentaenoične (C20:5) i *cis*-10-heptadekanske kiseline (C17:1) u usporedbi s modificiranim f/2 hranjivim podlogama. Gao i sur. (2019) također su primijetili da se udjel EPA (C20:5) smanjuje za više od 50 % u uvjetima limitacije rasta silicijem. S druge strane, palmitinska kiselina (C16:0) zastupljenija je u hranjivim podlogama s manjim koncentracijama nutrijenata, dok je u hranjivim podlogama s većim koncentracijama makronutrijenata ispod granice kvantifikacije ili je zastupljena u vrlo malom postotku. Adams i Bugbee (2013) navode da upravo limitacija rasta silicijem pogoduje sintezi C16 masnih kiselina pa tako i palmitinske kiseline (C16:0).

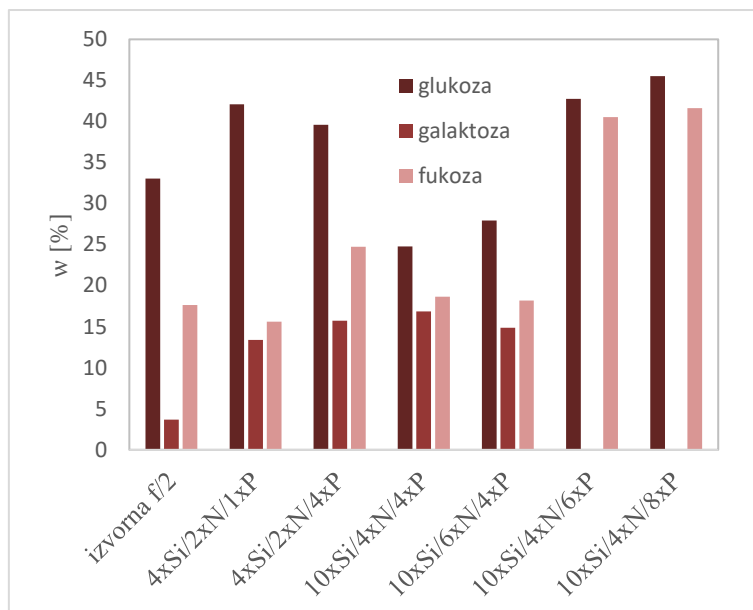
Povoljni uvjeti za rast, odnosno suvišak nutrijenata pogoduju sintezi PUFA što je slučaj i u ovom istraživanju (Yang i sur., 2013).

Sastav masnih kiselina za sve istraživane uvjete u skladu je s literaturnim podacima gdje se navodi da su upravo miristinska (C14:0), palmitinska (C16:0), palmitoleinska (C16:1) te eikozapentaenoična kiselina (C20:5) najzastupljenije u stanicama dijatomeja (Yi i sur., 2017; Zulu i sur., 2018).

#### 4.1.1.3. Ugljikohidrati

Mikroalge mogu akumulirati visoke koncentracije ugljikohidrata putem fotosinteze. Glavni rezervni polisaharid dijatomeja je krizolaminarin, odnosno  $\beta$ -1,3-glukan (Hildebrandt i sur., 2013). Finkel i sur. (2016) navode da je udjel ugljikohidrata u stanicama dijatomeja koje pripadaju koljenu Bacillariophyta između 9,57 % i 15 %. U tablici 17 može se vidjeti da su rezultati ovog istraživanja vrlo bliski podacima u literaturi. Iznimka su stanice uzgojene na hranjivim podlogama 10xSi/4xN/6xP i 10xSi/4xN/8xP, gdje se metabolizam nije preusmjerio ka sintezi ugljikohidrata, već proteina. Stanice uzgojene na izvornoj f/2 hranjivoj podlozi sadrže čak i veći udjel ugljikohidrata nego što navodi literatura (19,73 %). Naime, poznato je da stanice akumuliraju rezervne tvari u stresnim uvjetima (Zulu i sur., 2018). U ovom slučaju to je limitacija rasta silicijem (i fosforom) koja se vidi na slici 15. Povećanje koncentracije ugljikohidrata u stanicama dijatomeje *Nitzschia curvilineata* pri uvjetima limitacije fosforom primijetili su i Sutherland i sur. (1998).

Analizom sastava ugljikohidrata (slika 24) utvrđeno je da je najzastupljeniji monosaharid glukoza, što je očekivano jer je glukoza sastavni dio krizolaminarina. Glukoza je općenito najzastupljeniji monosaharid mikroalgi. Ovisno o vrsti može činiti 21 % - 87 % ukupnih staničnih ugljikohidrata (Renaud i sur., 1999; Brown i sur., 1997). Od ostalih monosaharida značajne udjele pokazuju galaktoza i fukoza, koje se i u literaturi navode kao često zastupljene u biomasi mikroalgi (de Jesus Raposo i sur., 2015). Profil monosaharida za hranjive podloge 10xSi/4xN/6xP i 10xSi/4xN/8xP razlikuje se od ostalih. Naime, u tim uzorcima koncentracije galaktoze bile su ispod granice kvantifikacije, dok su glukoza i fukoza činile više od 80 % ukupnih ugljikohidrata.



Slika 24. Sastav ugljikohidrata izražen kao udjel u ukupnim staničnim ugljikohidratima dijatomeje uzgojenoj na izvornoj i modificiranim f/2 hranjivim podlogama.

#### 4.1.1.4. Klorofil

Ukupna koncentracija pigmenata dijatomeja, kao i njihov profil, najviše ovise o valnoj duljini primijenjene svjetlosti i koncentraciji nutrijenata u hranjivoj podlozi (Martin-Jezequel, 2015). U ovom istraživanju valna duljina svjetlosti nije bila varijabilna. Stoga se može zaključiti da je na udjel ukupnog klorofila (odnosno na udjele klorofila a i klorofila c) utjecao sastav hranjive podloge, tj. koncentracije silicija, dušika i fosfora. Iz tablice 17 vidi se da je udjel ukupnog klorofila u biomasi uzgojenoj u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi iznosio 0,7668 % s znatno većim udjelom klorofila a u odnosu na klorofil c. Udjel ukupnog klorofila u većini modificiranih f/2 hranjivih podloga bio je veći u usporedbi s udjelom u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi. Izuzetak su hranjive podloge 10xSi/4xN/4xP i 10xSi/6xN/4xP. U svim modificiranim hranjivim podlogama povećao se udjel klorofila c u odnosu na udjel u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi. Uspoređujući rast na različitim hranjivim podlogama može se utvrditi da je koncentracija fosfora presudno utjecala na udjel ukupnog klorofila i njegov sastav. Konkretno, biomasa narasla u hranjivoj podlozi s visokom početnom koncentracijom fosfora (10xSi/4xN/6xP) imala je najveći udjel ukupnog klorofila. Visoke koncentracije fosfora (10xSi/4xN/6xP i 10xSi/4xN/8xP hranjive podloge) pogodovale su sintezi klorofila a više od sinteze klorofila c. Sličan učinak fosfora na rast udjela klorofila a zamijećen je kod dijatomeja *Stephanodiscus minutulus* i *Nitzschia acicularis*. Suvišak ovog makronutrijenta povećava udjel

klorofila a u biomasi (Shatwell i sur., 2014). Udjeli ukupnog klorofila u skladu su s literaturom prema kojoj ukupni klorofil čini 0,5 % - 1,5 % suhe tvari biomase mikroalgi (Becker, 2013).

## 4.2. Uzgoj u fotobioreaktoru

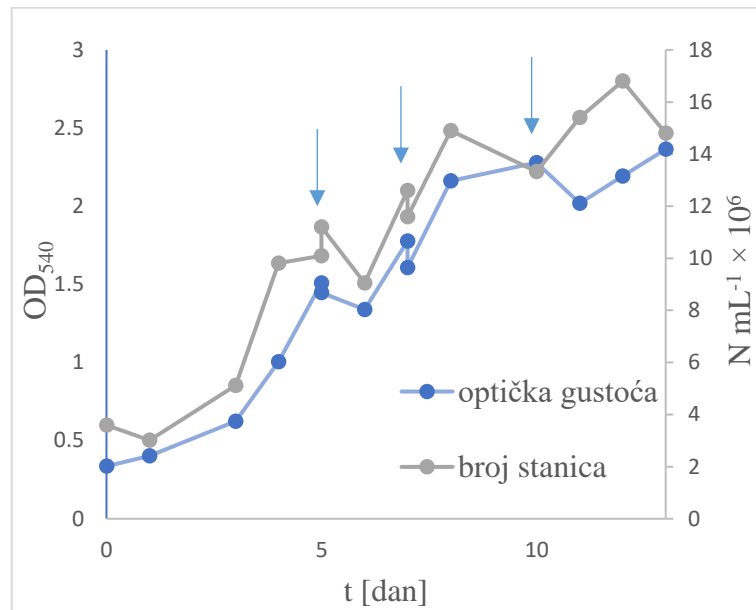
U drugom dijelu istraživanja proveden je fototrofni šaržni uzgoj s pritokom supstrata dijatomeje *Nitzschia* sp. u fotobioreaktoru s ciljem dobivanja većih prinosa biomase. Naime, šaržnim se uzgojem ne dobivaju visoki prinosi biomase, a samim time ni visoki prinosi makromolekula koje je izgrađuju. Dodatak makronutrijenata u većoj koncentraciji mogao bi pogodovati bržem rastu biomase, ali bi zasigurno potakao taloženje anorganskih soli u hranjivoj podlozi, posebice silicijevih soli. To je primijećeno kod Brajković (2019) gdje se koristila deset puta veća koncentracija svih otopljenih tvari u odnosu na izvornu f/2 hranjivu podlogu. Topljivost bitnog nutrijenta za rast dijatomeja, silicija, iznosi svega 1,5 - 1,7 mM na 25 °C u morskoj vodi (Ozkan i Rorrer, 2017). Stoga se mnogi autori odlučuju za prihranjivanje ovim nutrijentom tijekom šaržnog uzgoja (Ozkan i Rorrer, 2017), šaržni uzgoj s pritokom supstrata (Jeffryes i sur., 2013) ili pak polukontinuirani i kontinuirani načina uzgoja. Tim načinima uzgoja postižu se značajno veće koncentracije biomase, a time i veće produktivnosti sinteze biomase u odnosu na šaržni uzgoj.

Sastav hranjive podloge za šaržni dio uzgoja, kao i sastav pojedinih prihrana prikazan je u poglavlju 3.1.4.3. Metode korištene u ovom eksperimentu opisane su u poglavlju 3.2.4. Tijekom uzgoja rast biomase je praćen određivanjem ukupnog broja stanica po mililitru podloge i optičke gustoće podloge (slika 25) te određivanjem koncentracije suhe tvari biomase (slika 26). Također, tijekom uzgoja je određivana koncentracija neutrošenog silicija, dušika i fosfora u hranjivoj podlozi (slika 27).

Za šaržni dio uzgoja odabrana je modificirana f/2 hranjiva podloga 10xSi/4xN/4xP, koja je prilikom optimizacije sastava hranjive podloge omogućila najveći rast radnog mikroorganizma (broj stanica  $N = (5,2622 \pm 1,1589) \times 10^6$  st mL<sup>-1</sup>, optička gustoća  $OD_{540} = 0,9987 \pm 0,0448$  i prinos suhe tvari biomase  $Y_X = 0,7611$  g L<sup>-1</sup>). Cilj je bio prihraniti kulturu dok su stanice u eksponencijalnoj fazi rasta, kako bi dobile dovoljno nutrijenata za neometan rast. Poznato je da dovoljne količine nutrijenata (silicija, dušika, fosfora i dr.) u hranjivoj podlozi pogoduju rastu stanica, dok limitacija istima preusmjerava metabolizam ka sintezi rezervnih tvari (ugljikohidrati, lipidi, prvenstveno TAG). Rast dijatomeje prekida se iscrpljivanjem silicija jer bez ovog makronutrijenta stanice ne mogu tvoriti frustule te se ne mogu dijeliti. Međutim, u tim uvjetima u stanici se tok ugljika umjesto na sintezu staničnih



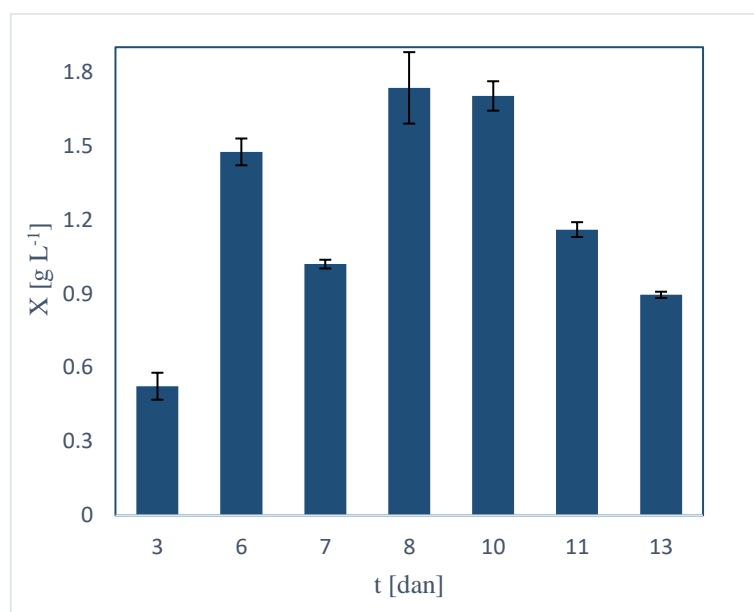
komponenti usmjerava na sintezu lipida (Jeffryes i sur., 2013; Adams i Bugbee, 2013; Taguchi i sur., 1987; Zulu i sur., 2018).



Slika 25. Promjena broja stanica po mililitru podloge i optičke gustoće tijekom fototrofnog šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u fotobioreaktoru (strelice označavaju prihrane).

Na slici 25 mogu se uočiti 4 faze uzgoja. Prva faza je šaržni uzgoj koji je trajao 5 dana, nakon čega je dodana prva prihrana u obliku koncentriranih otopina  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  i  $\text{NaNO}_3$ . Naredna faza je faza između prve i druge prihrane (od 5. do 7. dana uzgoja), nakon čega je dodana prihrana u obliku otopine  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ . Sljedeća faza je faza između druge i treće prihrane (od 7. do 10. dana uzgoja), nakon čega je dodana prihrana u obliku otopine  $\text{NaHCO}_3$ . Posljednja faza je faza od treće prihrane pa do kraja uzgoja (od 10. do 13. dana uzgoja). Na kraju uzgoja postignute su koncentracija stanica od  $N = 1,48 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  i optička gustoća  $\text{OD}_{540} = 2,3645$ . Cilj prihrane je bilo održavanje stanica u eksponencijalnoj fazi rasta koju karakterizira intenzivna dioba stanica. Pred kraj uzgoja stanice su održavane u stacionarnoj fazi rasta, a prihrana u obliku  $\text{NaHCO}_3$  dodana je u svrhu akumulacije lipida. Naime, poznato je da se metabolizam dijatomeja u uvjetima prisutnosti izvora ugljika, a limitacije nekim drugim makronutrijentom (npr. silicij, dušik, fosfor) preusmjerava na akumulaciju rezervnih tvari, najčešće su obliku TAG (Adams i Bugbee, 2013; Jeffryes i sur., 2013). Dodatak natrijevog bikarbonata ( $\text{NaHCO}_3$ ) može rezultirati povećanjem udjela lipida u suhoj tvari biomase (Gardner i sur., 2012).

Slika 26 prikazuje promjenu koncentracije suhe tvari biomase tijekom uzgoja. Najveća koncentracija suhe tvari biomase određena je 8. dan uzgoja i iznosila je  $1,7350 \text{ g L}^{-1}$ . Nakon 10. dana uzgoja koncentracija biomase značajnije opada. Razlog tome je limitacija rasta nutrijentima, prvenstveno silicijem koji je gotovo u potpunosti iscrpljen iz podloge u posljednjim danima uzgoja (slika 27). Pad koncentracije suhe tvari biomase uočen je i 7. dan uzgoja, neposredno prije druge prihrane, što se također može objasniti limitacijom silicijem koji je već 5. dan uzgoja gotovo u potpunosti utrošen (slika 27).



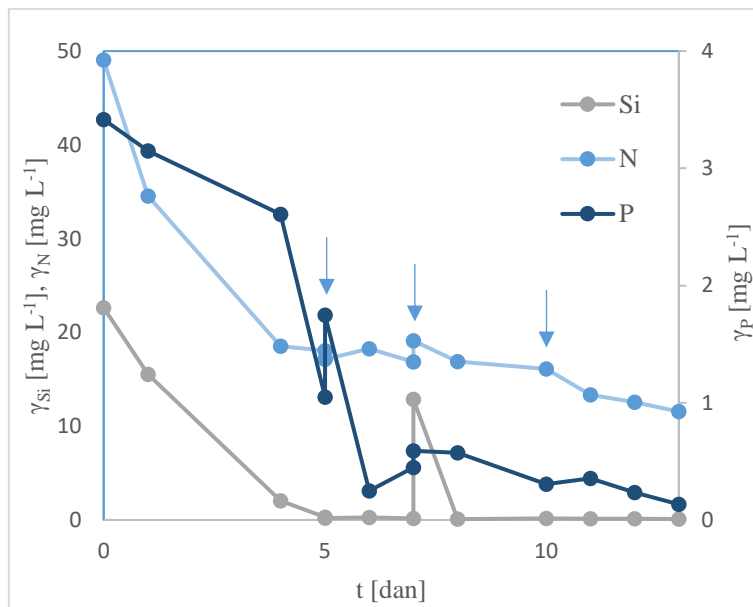
Slika 26. Promjena koncentracije suhe tvari biomase tijekom fototrofnog šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u fotobioreaktoru.

Na slici 27 prikazan je utrošak nutrijenata silicija, dušika i fosfora tijekom uzgoja. Vidljivo je da su stanice najbrže asimilirale silicij, nutrijent koji je neophodan za diobu stanica dijatomeja (Taguchi i sur., 1987). U većoj mjeri trošen je i fosfor, dok je dušik bio prisutan u suvišku, kao što je bio slučaj i u šaržnom uzgoju dijatomeje (slike 15 - 21; poglavlje 4.1.).

Ovim uzgojem, u odnosu na šaržni uzgoj na početnoj podlozi jednakog sastava u tikvicama ( $10 \times \text{Si}/4 \times \text{N}/4 \times \text{P}$ ; slika 15 i slika 22) dobiveni su 2 - 3 puta veći broj stanica po mililitru podloge i optička gustoća podloge na kraju uzgoja ( $N = 1,48 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ,  $\text{OD}_{540} = 2,3645$ ).

Koncentracija biomase određena 8. dana uzgoja u fotobioreaktoru bila je više no dvostruko veća od koncentracije biomase u tikvici nakon svih 14 dana uzgoja ( $X = 1,735 \text{ g L}^{-1}$ ). Povećanje koncentracije biomase *Cyclotella* sp. tehnikom impulsnog ili kontinuiranog dodatka silicija primijetili su i Jeffryes i sur. (2013). Međutim, kao što je već spomenuto,

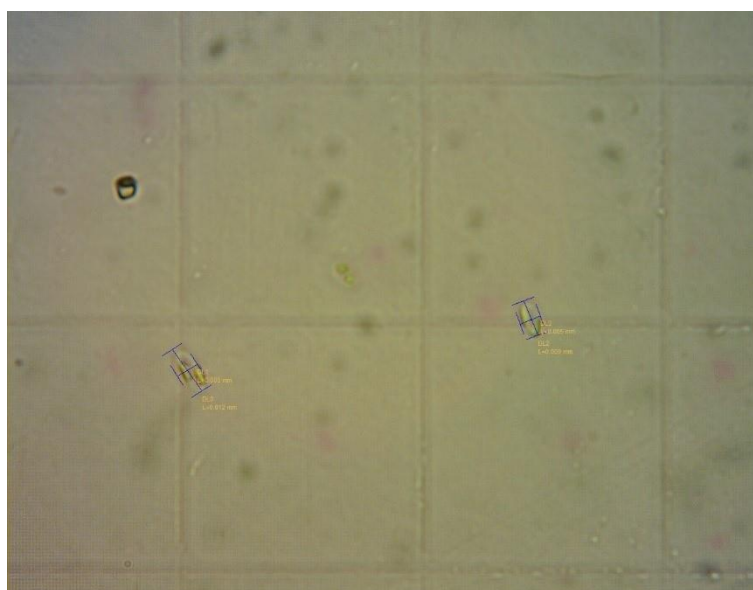
koncentracija biomase je u ovom uzgoju padala nakon 10. dana (slika 26) zbog limitacije rasta silicijem (slika 27) te na kraju uzgoja nije bila znatno veća od one u tikvicama ( $X = 0,8952 \text{ g L}^{-1}$ , u odnosu na  $X = 0,7611 \text{ g L}^{-1}$ ). Iz navedenog se može zaključiti da je prihranom dodana premala količina silicija, odnosno stanice su ga trošile brže no što se očekivalo (slika 27).



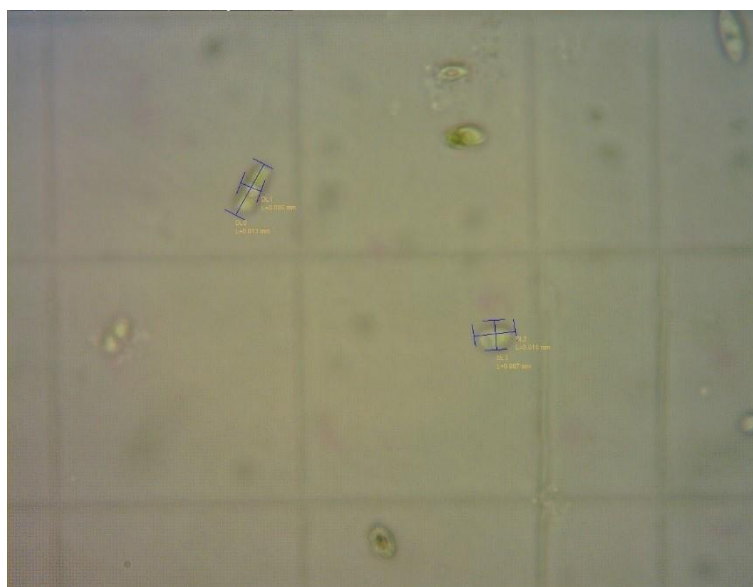
Slika 27. Promjena koncentracija nutrijenata silicija, dušika i fosfora tijekom fototrofnog šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u fotobioreaktoru (strelice označavaju prihrane).

#### 4.2.1. Određivanje volumena stanica

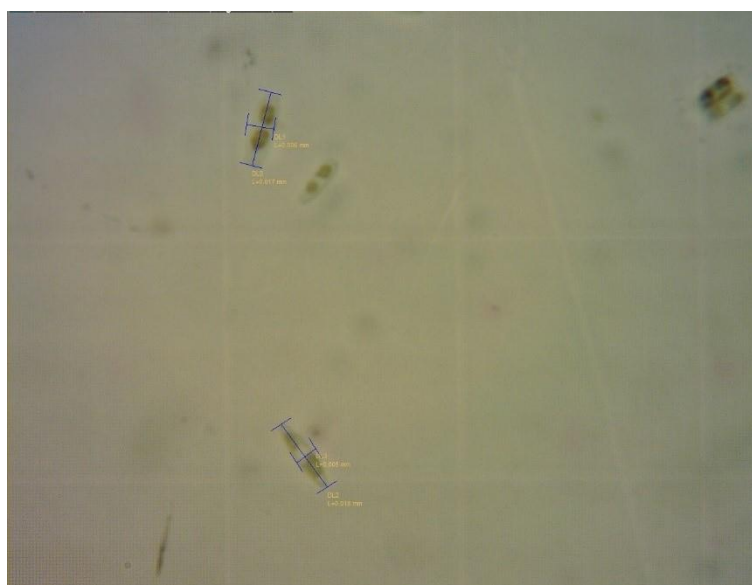
Na slikama 28 – 31 prikazane su dimenzije stanica dijatomeja iz roda *Nitzschia* sp. tijekom uzgoja u fotobioreaktoru. U tablici 18 prikazana je promjena volumena stanica tijekom uzgoja. Volumen stanica izračunat je prema jednadžbi [13], poglavlje 3.2.5.12.



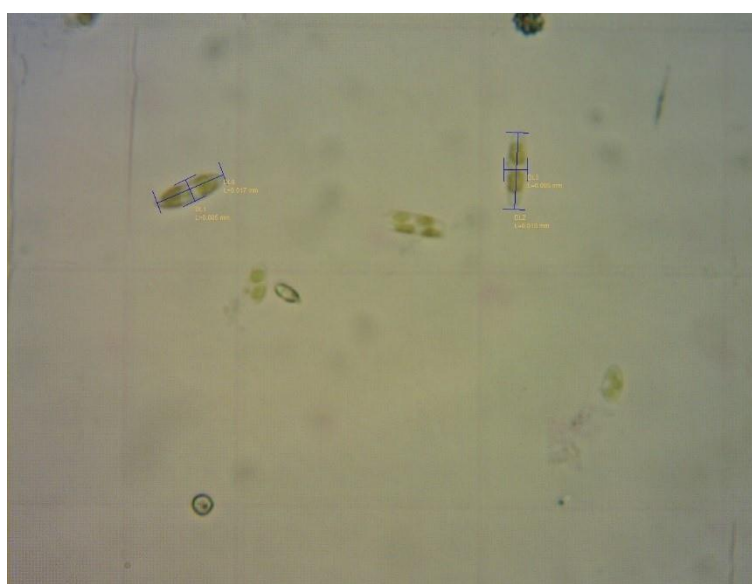
Slika 28. Mikroskopska slika kulture 0. dan uzgoja (1x razrjeđenje)  
(vlastita fotografija).



Slika 29. Mikroskopska slika kulture 10. dan uzgoja (5x razrjeđenje)  
(vlastita fotografija).



Slika 30. Mikroskopska slika kulture 12. dan uzgoja (5x razrjeđenje)  
(vlastita fotografija).



Slika 31. Mikroskopska slika kulture 13. dan uzgoja (5x razrjeđenje)  
(vlastita fotografija).

Tablica 18. Promjena volumena stanica tijekom uzgoja.

dan uzgoja	L [ $\mu\text{m}$ ]	d [ $\mu\text{m}$ ]	V [ $\mu\text{m}^3$ ]
0	10,5	5	288,634
10	11,5	6	415,476
12	17,5	5,5	881,937
13	17,5	5	801,760

Iz slika 28 – 31 te tablice 18 može se uočiti znatno povećanje volumena stanica tijekom uzgoja u fotobioreaktoru. Nakon prvih 10 dana uzgoja volumen stanica se povećao za gotovo 1,5 puta. Nakon dodatka  $\text{NaHCO}_3$  (10. dan uzgoja) volumen stanica se udvostručio za svega 2 dana. Promjer stanica odgovara literaturnim podacima, dok je duljina znatno manja od većine dijatomeja iz rodova *Nitzschia* i *Pseudonitzschia* (Lim i sur., 2012; Knattrup i sur., 2007). Npr., stanice dijatomeje *Nitzschia sigmoidea* su prosječne duljine oko 350  $\mu\text{m}$  (Knattrup i sur., 2007).

#### 4.2.2. Sastav biomase

U tablici 19 prikazana je promjena makromolekulskog sastava biomase tijekom uzgoja. Važno je primijetiti da suma svih makromolekula rijetko prelazi 20 % suhe tvari biomase. Karakteristika ovog soja je visok udjel mineralnih tvari u suhoj tvari biomase, gotovo 50 % (Brajković, 2019). Visok udjel mineralnih tvari karakterističan je za vrste mikroalgi s ljušturicom građenom od silicija (Whyte, 1987; Parsons i sur., 1961). Od ostalih komponenata biomase, čiji udjel nije eksperimentalno određen, najzastupljenije bi trebale biti nukleinske kiseline, međutim njihov udio ne prelazi 10 % (Finkel i sur., 2016). Razlog niskim udjelima makromolekula mogu biti neefikasna ekstrakcija i gubitci tijekom eksperimenta. Naime, dijatomeje karakterizira čvrsta ljuštura, tzv. frustula građena od silicijevog dioksida (Hildebrand i Lerch, 2015) koja može predstavljati probleme prilikom razbijanja stanica. Osim toga, smatra se da bioreaktori s miješalom nisu pogodni za kultivaciju mikroalgi s obzirom na osjetljivost stanica na smična naprezanja, posebice na krajevima lopatica (Wang i Lan, 2018; Contreras i sur., 1998). Još jedno od mogućih objašnjenja je nedovoljna opskrba stanica nutrijentima (slika 27) zbog čega autoliziraju i gube stanični sadržaj.

Tablica 19. Promjena sastava biomase tijekom uzgoja u fotobioreaktoru.

dan uzgoja	Proteini [%]	Lipidi [%]	Ugljikohidrati [%]	Ukupni Klorofil [%]	Klorofil a [%]	Klorofil c [%]
3	21,8106	1,1048	-	0,0294	0,0131	0,0157
7	10,3848	1,166	1,5603	0,2103	0,1103	0,0997
8	-	1,6608	-	-	-	-
10	10,0546	1,1693	1,9748	0,0499	0,0397	0,0100
12	-	1,4192	3,2091	-	-	-
13	7,3901	1,3908	2,1409	0,0303	0,0138	0,0164

Kao što je već ranije spomenuto, silicij je najznačajnije limitirao rast stanica što pokazuje njegova niska koncentracija tijekom uzgoja koja je u posljednjim danima iznosila blizu 0 mg L<sup>-1</sup> (slika 27). Limitacija silicijem i niske koncentracije anorganskog izvora ugljika (u obliku otopljenog NaHCO<sub>3</sub> i CO<sub>2</sub> iz zraka) nisu pogodovale sintezi proteina, unatoč visokim koncentracijama dušika u podlozi, koji je bitan makronutrijent za njihovu sintezu (Zulu i sur., 2018). Na isti način mogu se objasniti i niski udjeli ugljikohidrata i klorofila u biomasi. Naime, dostatna dobava izvora ugljika nužna je za sintezu rezervnih makromolekula (Zulu i sur., 2018). Smatralo se da će se udjel lipida dodatkom NaHCO<sub>3</sub> (10. dan uzgoja) u biomasi povećati, budući da uvjeti limitacije nekim makronutrijentom (u ovom slučaju silicijem) uz prisutnost izvora ugljika pogoduju akumulaciji lipida, prvenstveno TAG u stanicama dijatomeja (Adams i Bugbee, 2013; Jeffryes i sur., 2013). Iz tablice 19 vidi se da navedena pretpostavka nije ostvarena. To se također može objasniti odumiranjem stanica i oštećenjem stanica uslijed velikih sila smicanja (uz miješalo).

#### 4.2.2.1. Proteini

Udjel proteina u biomasi padao je tijekom uzgoja s 21,81 % određenih 3. dan uzgoja do 7,39 % na kraju uzgoja (13. dan). Prema literaturi, stanice dijatomeja iz roda *Nitzschia* mogu sadržavati 30 – 50 % ukupnih proteina u suhoj tvari biomase (Rodríguez-Núñez i Toledo-Agüero, 2017; Brown i Jeffrey, 1995). Međutim, neka istraživanja pokazuju da pojedine vrste mogu sadržavati i znatno niže udjele proteina. Npr. Alzahrani i sur. (2017) su u svojem istraživanju pokazali da dijatomeja *Nitzschia laevis* sadrži 23,42 ± 0,65 % proteina u suhoj tvari biomase, što se podudara s udjelom proteina određenim 3. dana uzgoja u fotobioreaktoru u ovom istraživanju. Smanjenje udjela proteina tijekom uzgoja može se objasniti nedovoljnom

opskrbom stanica nutrijentima. Naime, sintezi proteina pogoduju visoke koncentracije ugljika i dušika u podlozi (Zulu i sur., 2018). Na slici 27 vidljivo je da dušik nije limitirao rast. S druge strane, moguće je da stanice nisu bile dovoljno opskrbljene izvorom ugljika koji je u niskim koncentracijama dodavan u obliku otopine  $\text{NaHCO}_3$  i propuhivanjem sa zrakom. Osim toga, na slici 27 se jasno vidi da su koncentracije silicija i fosfora tijekom uzgoja bile vrlo niske, što je također negativno utjecalo na rast stanica i sintezu proteina.

#### 4.2.2.2. Lipidi

Udjel lipida se nije značajnije mijenjao tijekom uzgoja, odnosno iznosio je između 1,10 % i 1,66 % suhe tvari biomase. Dobiveni udjeli znatno su manji u usporedbi s literaturom. Prema literaturi, udjel lipida znatno varira između pojedinih vrsta iz roda *Nitzschia*. Tako Brown i Jeffrey (1995) navode da je udjel lipida u stanicama *Nitzschia closterium* 18 %, dok Sayanova i sur. (2017) navode da stanice dijatomeja *Nitzschia laevis* akumuliraju 25 - 69 % lipida u suhoj tvari biomase. S druge strane, D'Alessandro i Antoniosi Filho (2016) navode da udjel lipida u stanicama dijatomeja *Nitzschia* spp. iznosi svega 3,68 %. Osim o vrsti dijatomeja, udjel lipida u biomasi uvelike ovisi o uvjetima uzgoja. U optimalnim uvjetima uzgoja udjel lipida iznosi 10 - 20 % na kraju logaritamske faze uzgoja. U stacionarnoj fazi, odnosno fazi limitacije nutrijentima, udjel lipida može se udvostručiti. Rodríguez-Núñez i Toledo-Agüero (2017) zabilježili su povećanje udjela lipida s 18,36 % na 28,31 % prelaskom s logaritamske u stacionarnu fazu uzgoja dijatomeje *Nitzschia* sp. Limitacija sa silicijem, fosforom i/ ili dušikom značajno smanjuje brzinu rasta stanica, a stimulira sintezu neutralnih lipida (TAG) (Jeffryes i sur., 2013; Adams i Bugbee, 2013; Zulu i sur., 2018). Slika 27 pokazuje da su silicij i fosfor limitirali rast, što nije bio slučaj za dušik. Limitacijom nutrijentima pred kraj uzgoja te dodatkom  $\text{NaHCO}_3$  10. dana uzgoja nastojalo se preusmjeriti metabolizam na akumulaciju lipida. Iz tablice 19 vidi se da se udjel lipida tek neznatno povećao s 1,17 % na 1,42 % 2 dana nakon dodatka  $\text{NaHCO}_3$ .

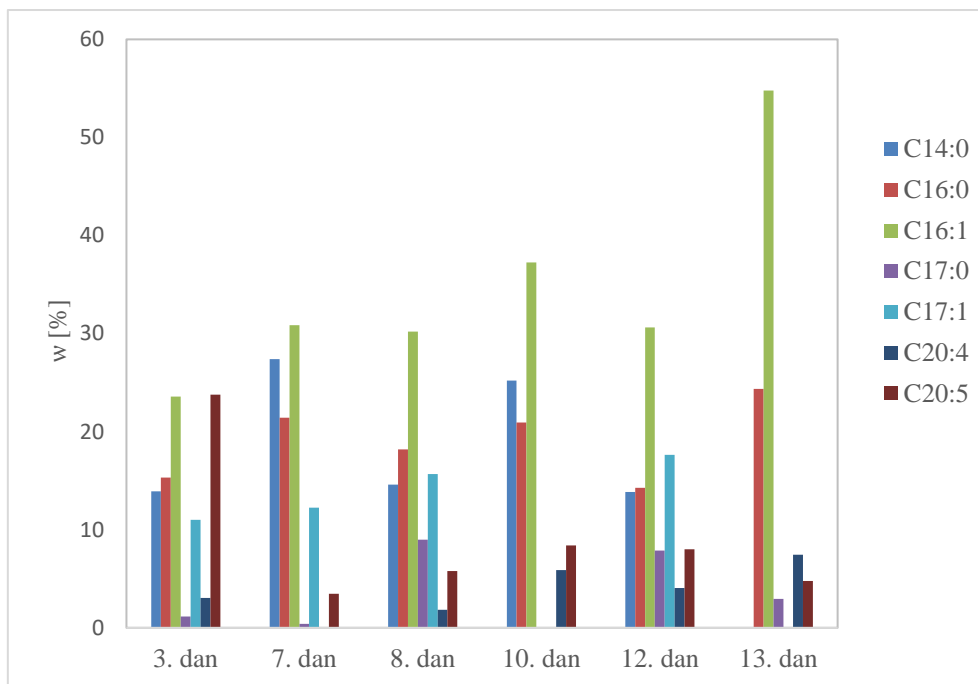
Profil masnih kiselina (slika 32) mijenjao se tijekom uzgoja. Treći dan uzgoja određeno je 32,00 % SFA; 40,13 % MUFA i najviši udjel PUFA u ukupnim lipidima tijekom uzgoja (26,81 %). Udjel ukupnih lipida u biomasi je bio najmanji tog dana (1,10 % suhe tvari biomase). Yang i sur. (2013) navode da sintezi PUFA pogoduju povoljni uvjeti uzgoja u smislu dovoljne opskrbe nutrijentima, što je bio slučaj trećeg dana uzgoja u ovom eksperimentu (slika 27). Prihranama su dodani izvori dušika i fosfora 5. dan uzgoja, odnosno izvor silicija 7. dan uzgoja. Ipak, koncentracije nutrijentata su tada bile znatno niže nego na početku uzgoja (slika 27), odnosno rast je bio limitiran, a metabolizam se preusmjeravao na akumulaciju lipida (Jeffryes



i sur., 2013). Tako su 7. i 8. dan uzgoja određeni nešto veći udjeli ukupnih lipida u biomasi (1,17 - 1,66 %). Međutim, udjel PUFA se smanjio (3,50 - 7,65 %), a udjeli SFA (41,79 - 49,20 %) i MUFA (47,30 - 50,56 %) su se povećali. Dodatkom NaHCO<sub>3</sub> 10. dana uzgoja značajnije se povećao udjel PUFA koji je zadnjih 3 dana uzgoja iznosio između 12,04 % i 14,27 %. Od PUFA najzastupljenija je EPA, ω-3 masna kiselina važna za ljudsko zdravlje (Kiran Marella i Tiwari, 2020, Wen, 2001).

Prema literaturi, najzastupljenije masne kiseline dijatomeja iz roda *Nitzschia* su palmitinska (C16:0), palmitoleinska (C16:1) i eikozapentaenoična (C20:5) što je u skladu s ovim istraživanjem (Rodríguez-Núñez i Toledo-Agüero, 2017; Levitan i sur., 2014). Ispitivani soj sadrži i značajnije udjele miristinske (C14:0) i *cis*-10-heptadekanske kiseline (C17:1). Od PUFA, osim već spomenute EPA (C20:5), soj sadrži i nezanemarive udjele arahidonske kiseline (C20:4).

Lipidi mikroalgi potencijalne su sirovine za proizvodnju biodizela. Na kakvoću biodizela veliki utjecaj ima sastav masnih kiselina, konkretno duljina lanaca masnih kiselina i njihova (ne)zasićenost (Levitan i sur., 2014). Lipidi s visokim udjelima MUFA (prvenstveno palmitoleinska kiselina; C16:1 i oleinska kiselina; C18:1), a niskim udjelima SFA i PUFA pogodovati će sintezi biodizela s gotovo optimalnim karakteristikama (Levitan i sur., 2014). S obzirom da je uzgoj ispitivanog soja rezultirao niskim udjelima lipida koji sadrže visoke udjele SFA i PUFA, zaključuje se da soj nije pogodan za akumulaciju lipida u svrhu proizvodnje biodizela. S druge strane, mogao bi se koristiti za dobivanje visokovrijednih PUFA (arahidonska kiselina; C20:4 i EPA; C20:5). U svrhu postizanja većih prinosa EPA mogla bi se koristiti heterotrofna kultivacija, umjesto fototrofne. Istraživanja su pokazala da su dijatomeje iz roda *Nitzschia* dobri producenti EPA rastući na glukozi (Tan i Johns, 1996). Na hranjivoj podlozi s koncentracijom glukoze od 20 g L<sup>-1</sup> dobivene su visoke koncentracije biomase s visokim udjelima EPA u istraživanju Wen i Chen (2000). Hranjive podloge obogaćene acetatom također daju veće prinose u odnosu na fototrofni uzgoj dijatomeje *Nitzschia inconspicua* (Chu i sur., 1996).



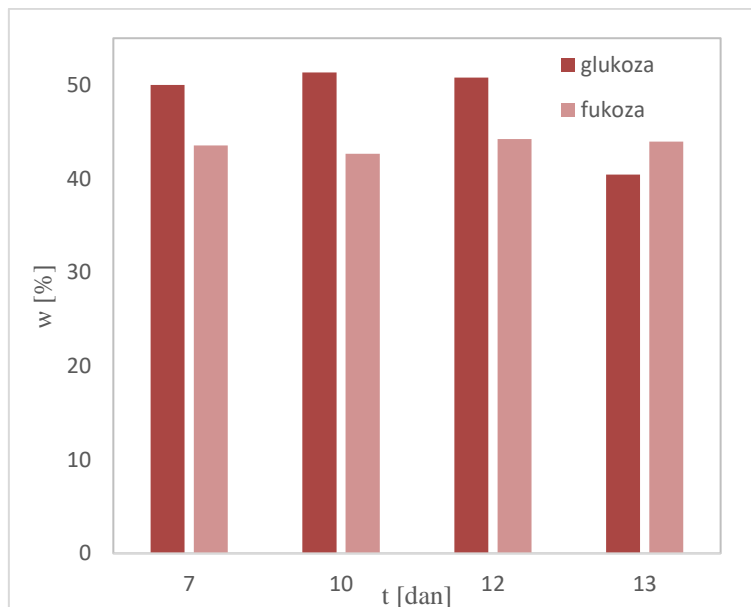
Slika 32. Promjena profila masnih kiselina izražena kao udjel u ukupnim staničnim lipidima tijekom uzgoja u fotobioreaktoru\*.

\*C14:0, C16:0 i C17:0 su zasićene masne kiseline (eng. Saturated Fatty Acid, SFA); C16:1 i C17:1 su masne kiseline s jednom nezasićenom vezom u lancu (eng. Monounsaturated Fatty Acid, MUFA); C20:4 i C20:5 su polinezasićene masne kiseline (eng. Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA).

#### 4.2.2.3. Ugljikohidrati

Udjel ukupnih ugljikohidrata bio je vrlo nizak tijekom uzgoja. Varirao je između 1,56 % i 3,73 %. Eksperimentalni podaci su znatno niži od onih u literaturi gdje se navodi da stanice mikroalgi sadrže 10 % - 20 % ugljikohidrata (Finkel i sur., 2016). Također, udjeli su manji od onih određenih uzgojem u tikvicama (tablica 17; poglavlje 4.1.1.). Uvjeti limitacije nutrijentima, koji su ostvareni u ovom uzgoju, pogoduju akumulaciji rezervnih tvari. Ipak, preduvjet akumulaciji ugljikohidrata je prisutnost bogatog izvora ugljika koji fototrofne vrste asimiliraju u procesu fotosinteze (Sayanova i sur., 2017). U svrhu akumulacije ugljikohidrata u stanicama, trebale bi se koristiti veće koncentracije anorganskog izvora ugljika u fototrofnom uzgoju (u ovom istraživanju to su otopina  $\text{NaHCO}_3$  i  $\text{CO}_2$  iz zraka). Neki autori također navode niske udjele ugljikohidrata u stanicama dijatomeja iz roda *Nitzschia*. Npr., Brown i Jeffrey (1995) navode da *Nitzschia closterium* sadrži svega 5,3 % ukupnih ugljikohidrata u suhoj tvari biomase.

Na slici 33 prikazani su najzastupljeniji monosaharidi radnog mikroorganizma. Jasno je da se stanični ugljikohidrati sastoje uglavnom od glukoze i fukoze, koje čine preko 90 % jednostavnih šećera. Za razliku od uzgoja u tikvicama, koncentracije galaktoze su u svim uzorcima bile ispod granice kvantifikacije.



Slika 33. Profil monosaharida izražen kao udjel u ukupnim staničnim ugljikohidratima tijekom uzgoja u fotobioreaktoru.

#### 4.2.2.4. Klorofil

Ukupni klorofil dijatomeja čine klorofil a i klorofil c (Kuczynska i sur., 2015). Udjel ukupnog klorofila se kretao između 0,0294 % i 0,2103 % te je bio najveći 7. dan uzgoja (tablica 19). To su nešto niži udjeli no što navodi literatura (Becker, 2013). Iz tablice 19 vidi se da su klorofil a i klorofil c podjednako zastupljeni u ukupnom klorofilu. Poznato je da klorofil u svojoj strukturi sadrži dušik, zbog čega ga stanice razgrađuju u uvjetima limitacije istim (Li i sur., 2008). Međutim, smanjenje udjela klorofila nakon 7. dana uzgoja ne može se pripisati iscrpljivanju dušika iz hranjive podloge jer je njegova koncentracija bila veća od limitirajuće koncentracije za rast mikroalgi. Najvjerojatniji razlog smanjenju udjela klorofila je starenje stanice i/ili limitacija rasta izvorom ugljika. U danim uvjetima klorofil se razgrađuje što dovodi do ubrzane smrti stanice. Smanjenje brzine rasta uslijed limitacije rasta izvorom anorganskog ugljika zapažene su kod imobiliziranih stanica mikroalge roda *Chlorella* (Guolan i sur., 2000).

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih eksperimenata može se zaključiti sljedeće:

1. Povećanjem koncentracija tri makronutrijenta (silicija, dušika i fosfora) u odnosu na njihove koncentracije u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi postiže se značajno veći rast biomase dijatomeje *Nitzschia* sp. Najpogodnijom za rast pokazala se modificirana f/2 hranjiva podloga 10xSi/4xN/4xP s početnim koncentracijama od 29,6 mg L<sup>-1</sup> silicija, 49,4 mg L<sup>-1</sup> dušika i 4,49 mg L<sup>-1</sup> fosfora na kojoj se postiže tri puta veća koncentracija biomase u odnosu na izvornu f/2 hranjivu podlogu.
2. Najzastupljenije makromolekule u stanicama dijatomeje *Nitzschia* sp. su proteini. Visoki postoci od preko 40 % suhe tvari biomase dobiveni su šaržnim uzgojem u f/2 hranjivoj podlozi 10xSi/4xN/8xP (početne koncentracije od 29,6 mg L<sup>-1</sup> silicija; 49,4 mg L<sup>-1</sup> dušika i 8,98 mg L<sup>-1</sup> fosfora).
3. Druga najzastupljenija makromolekula u stanici dijatomeje *Nitzschia* sp. su ugljikohidrati koji su pretežito građeni od monosaharida glukoze i fukoze. Niže koncentracije makronutrijenata u hranjivoj podlozi pogoduju nakupljanju ugljikohidrata u biomasi.
4. Stanični lipidi dijatomeje *Nitzschia* sp. čine manje od 6 % suhe tvari biomase. Bogati su na eikozapentaenoičnoj kiselini ( $\omega$ -3; C20:5; EPA) koja može doseći vrijednosti preko 23 % u ukupnim staničnim lipidima.
5. Šaržnim uzgojem s pritokom supstrata mogu se postići veći prinosi biomase dijatomeje *Nitzschia* sp. u odnosu na šaržni uzgoj. Na kraju šaržnog uzgoja s pritokom supstrata volumen stanica je utrostručen u odnosu na početni volumen.

## 6. POPIS LITERATURE

Abrantes, F., Gil, I. M. (2013) Marine Diatoms. U: Encyclopedia of Quaternary Science, (Elias, S. A., ured.), Royal Holloway, London, str. 817.

Adams, C., Bugbee, B. (2013) Enhancing lipid production of the marine diatom *Chaetoceros gracilis*: synergistic interactions of sodium chloride and silicon. *J Appl Phycol* **26(3)**, 1351–1357.

Alzahrani, M. A. J., Perera, C. O., Hemar, Y. (2017) Production of bioactive proteins and peptides from the diatom *Nitzschia laevis* and comparison of their in vitro antioxidant activities with those from *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris*. *Int. J. Food Sci. Technol.* **53(3)**, 676–682.

Batista-Silva, W., da Fonseca-Pereira, P., Martins, A. O., Zsögön, A., Nunes-Nesi, A., Araújo, W. L. (2020) Engineering Improved Photosynthesis in the Era of Synthetic Biology. *Plant Comm.* **1(2)**, 100032. doi:10.1016/j.xplc.2020.100032

Barkia, I., Saari, N., Manning, S. R. (2019) Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. *Mar. Drugs* **17(5)**, 304. doi:10.3390/md17050304

Bayu, A., Rachman, A., Noerdjito, D. R., Putra, M. Y., Widayatno, W. B. (2020) High-value chemicals from marine diatoms: a biorefinery approach. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **460**, 012012. doi:10.1088/1755-1315/460/1/012012

Becker E. W. (2007) Micro-algae as source of protein. *Biotechnol. Adv.* **25(2)**, 207-210.

Becker, E. W. (2013) Microalgae for aquaculture: nutritional aspects. U: Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology, 2. izd., (Richmond, A., Hu, Q., ured.), Wiley-Blackwell, str. 671-691.

Bína, D., Herbstová, M., Gardian, Z., Vácha, F., Litvín, R. (2016) Novel structural aspect of the diatom thylakoid membrane: lateral segregation of photosystem I under red-enhanced illumination. *Sci. Rep* **6(1)**, 25583. doi:10.1038/srep25583

Bozarth, A., Maier, U.-G., Zauner, S. (2009) Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82(2)**, 195–201.

Brajković, A. (2019) Optimizacija uvjeta fototrofnog uzgoja i karakterizacija dijatomeje izolirane iz Jadranskog mora (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Brown, M.R., Jeffrey, S.W. (1995) The amino acid and gross composition of marine diatoms potentially useful for mariculture. *J Appl Phycol* **7**, 521–527.

- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., Dunstan, G. (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* **151(1-4)**, 315–331.
- Cesário, M. T., da Fonseca, M. M. R., Marques, M. M., de Almeida, M. C. M. D. (2018) Marine algal carbohydrates as carbon sources for the production of biochemicals and biomaterials. *Biotechnol. Adv.* **36(3)**, 798–817.
- 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.
- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., Chang, J.-S. (2018) Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* doi:10.1016/j.jtice.2018.05.039
- Chu, W., Phang, S., Goh, S. (1996) Environmental effects on growth and biochemical composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow *J Appl Phycol* **8**, 389–396.
- Contreras, A., García, F., Molina, E., Merchuk, J. C. (1998) Interaction between CO<sub>2</sub>-mass transfer, light availability, and hydrodynamic stress in the growth of *Phaeodactylum tricornutum* in a concentric tube airlift photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **60(3)**, 317–325.
- Cuvelier, M., Simmons, M. (2009) Keller (K) medium in artificial seawater. *Worlden Lab* [online], < <https://www.mbari.org/wp-content/uploads/2015/11/KASW.pdf>>. Pristupljeno 28. listopada, 2020.
- D'Alessandro, E. B., Antoniosi Filho, N. R. (2016) Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **58**, 832–841.
- De Jesus Raposo, M., de Morais, A., de Morais, R. (2015) Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. *Mar. Drugs* **13(5)**, 2967–3028.
- d' Ippolito, G., Sardo, A., Paris, D., Vella, F., Adelfi, M., Botte, P., Gallo, C., Fontana, A. (2015) Potential of lipid metabolism in marine diatoms for biofuel production. *Biotechnol. Biofuels* **8(1)**, 28-37.
- Finkel, Z. V., Follows, M. J., Liefer, J. D., Brown, C. M., Benner, I., Irwin, A. J. (2016) Phylogenetic diversity in the macromolecular composition of microalgae. *PLoS One* **11(5)**: e0155977. doi:10.1371/journal.pone.0155977
- Gao, G., Wu, M., Fu, Q., Li, X., Xu, J. (2019) A two-stage model with nitrogen and silicon limitation enhances lipid productivity and biodiesel features of the marine bloom-forming diatom *Skeletonema costatum*. *Bioresour. Technol.* **289**, 121717. doi:10.1016/j.biortech.2019.121717

- Gardner, R. D., Cooksey, K. E., Mus, F., Macur, R., Moll, K., Eustance, E., Peyton, B. M. (2012) Use of sodium bicarbonate to stimulate triacylglycerol accumulation in the chlorophyte *Scenedesmus* sp. and the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J Appl Phycol* **24(5)**, 1311–1320.
- Goss, R., Wilhelm, C., Jakob, T. (2020) Photosynthesis in diatoms. U: Handbook of Algal Science, Technology and Medicine (Konur, O., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 217–229.
- Guillard, R. R. L. (1975) Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. U: Culture of Marine Invertebrates Animals (Smith, M. L., Chanley, M. H., ured.), Plenum Press, New York, str. 26-60.
- Guolan, H., Hongwen, S., Li, C. L. (2000) Study on the physiology and degradation of dye with immobilized algae. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **28(4)**, 347-363.
- Hildebrand, M., Abbriano, R. M., Polle, J. E., Traller, J. C., Trentacoste, E. M., Smith, S. R., Davis, A. K. (2013) Metabolic and cellular organization in evolutionarily diverse microalgae as related to biofuels production. *Curr Opin Chem Biol* **17(3)**, 506–514.
- Hildebrand, M., Lerch, S. J. L. (2015) Diatom Silica Biomineralization: Parallel Development of Approaches and Understanding. *Semin Cell Dev Biol* **46**, 27-35.
- Horst, I., Parker, B. M., Dennis, J. S., Howe, C. J., Scott, S. A., Smith, A. G. (2012) Treatment of *Phaeodactylum tricornutum* cells with papain facilitates lipid extraction. *J. Biotechnol.* **162(1)**, 40–49.
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F. (1975) New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c<sub>1</sub> and c<sub>2</sub> in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanzen* **167**, 191-194.
- Jeffryes, C., Rosenberger, J., Rorrer, G. L. (2013) Fed-batch cultivation and bioprocess modeling of *Cyclotella* sp. for enhanced fatty acid production by controlled silicon limitation. *Algal Res.* **2(1)**, 16–27.
- Kiran Marella, T., Tiwari, A. (2020) Marine diatom *Thalassiosira weissflogii* based biorefinery for co-production of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin. *Bioresour. Technol.* **307**, 123245. doi:10.1016/j.biortech.2020.123245
- Knattrup, A., Yde, M., Lundholm, N., Ellegaard, M. (2007) A detailed description of a Danish strain of *Nitzshia sigmaidea*, the type species of *Nitzschia*, providing a reference for future morphological and phylogenetic studies of the genus. *Diatom Res.* **22(1)**, 105–116.
- Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K. (2015) Photosynthetic Pigments in Diatoms. *Mar. Drugs* **13(9)**, 5847–5881.

- Kumar, S., Baweja, P., Sahoo, D. (2015) Diatoms: Yellow or Golden Brown Algae. U: The Algae World (Sahoo, D., Seckbach, J., ured.), Springer, Cham, str. 235-258.
- Lebeau, T., Robert J. M. (2003a) Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60(6)**, 612-623.
- Lebeau, T., Robert, J. M. (2003b) Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60(6)**, 624-632.
- Levitan, O., Dinamarca, J., Hochman, G., Falkowski, P. G. (2014) Diatoms: a fossil fuel of the future. *Trends Biotechnol.* **32(3)**, 117-124.
- Li, G., Campbell, D. A. (2017) Interactive effects of nitrogen and light on growth rates and RUBISCO content of small and large centric diatoms. *Photosynth Res* **131**, 93-103.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C. Q. (2008) Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81(4)**, 629-636.
- Lim, H.-C., Leaw, C.-P., Su, S. N.-P., Teng, S.-T., Usup, G., Mohammad-Noor, N., Lundholm, N., Kotaki, Y., Lim, P.-T. (2012) MORPHOLOGY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *PSEUDO-NITZSCHIA* (BACILLARIOPHYCEAE) FROM MALAYSIAN BORNEO, INCLUDING THE NEW SPECIES *PSEUDO-NITZSCHIA CIRCUMPORA* SP. NOV. *J. Phycol.* **48(5)**, 1232-1247.
- Martin-Jezequel, V., Hildebrand, M., Brzezinski, M. A. (2000) SILICON METABOLISM IN DIATOMS: IMPLICATIONS FOR GROWTH. *J. Phycol.* **36(5)**, 821-840.
- Masojídek, J., Torzillo, G., Koblížek, M. (2013) Photosynthesis in Microalgae. U: Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, 2. izd. (Richmond, A., Hu, Q., ured.), John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, str. 21-37.
- Mohan, S. V., Devi, M. P., Subhash, G. V., Chandra, R. (2014) Algae oils as fuels. U: Biofuels from Algae (Pandey, A., Lee, D. J., Chisti, Y., Soccol, C. R., ured.) Elsevier, Burlington, str. 155-187.
- Ozkan, A., Rorrer, G. L. (2017) Lipid and chitin nanofiber production during cultivation of the marine diatom *Cyclotella* sp. to high cell density with multistage addition of silicon and nitrate. *J. Appl. Phycol.* **29**, 1811-1818.
- Parsons T. R., Stephens K., Strickland J. D. H. (1961) On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J Fish Res Board Can* **18**, 1001-1016.



Renaud, S. M., Thinh, L.-V., Parry, D. L. (1999) The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture* **170(2)**, 147–159.

Rodríguez-Núñez, K., Toledo-Agüero, P. (2017) Fatty acid profile and nutritional composition of two tropical diatoms from the Costa Rican Pacific Coast. *Grasas Aceites* **68(3)**, 1-8.

Sayanova, O., Mimouni, V., Ulmann, L., Morant-Manceau, A., Pasquet, V., Schoefs, B., Napier, J. A. (2017) Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* **372(1728)**, 20160407. doi:10.1098/rstb.2016.0407

Shatwell, T., Köhler, J., Nicklisch, A. (2014) Temperature and photoperiod interactions with silicon-limited growth and competition of two diatoms. *J. Plankton Res.* **35(5)**, 957–971.

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

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

Sutherland, T. F., Grant, J., Amos, C. L. (1998) The effect of carbohydrate production by the diatom *Nitzschia curvilineata* on the erodibility of sediment. *Limnol. Oceanogr.* **43(1)**, 65–72.

Taguchi, S., Hirata, J. A., Laws, E. A. (1987) SILICATE DEFICIENCY AND LIPID SYNTHESIS OF MARINE DIATOMS. *J. Phycol.* **23(2)**, 260–267.

Tan, C. K., Johns, M. R. (1996) Screening of diatoms for heterotrophic eicosapentaenoic acid production. *J. Appl. Phycol.* **8(1)**, 59–64.

Tan, X. B., Lam, M. K., Uemura, Y., Lim, J. W., Wong, C. Y., Lee, K. T. (2017) Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. *Chin. J. Chem. Eng.* **26(1)**, 17–30.

Van Wychen, S., Laurens, L. M. L. (2013a) 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.

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

Wang, C., Lan, C. Q. (2018) Effects of shear stress on microalgae – A review. *Biotechnol. Adv.* **36**, 986-1002.

Wen, Z. Y., Chen, F. (2000) Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*: Effects of silicate and glucose. *J Ind Microbiol Biotechnol* **25**(4), 218-224.

Wen Z. Y. (2001) A high yield and productivity strategy for eicopentaenoic acid production by the diatom *Nitzschia laevis* in heterotrophic culture. PhD thesis, University of Hong Kong, Hong Kong.

Whyte, J. N. C. (1987) Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* **60**(3-4), 231–241.

Xia, S., Gao, B., Fu, J., Xiong, J., Zhang, C. (2018) Production of fucoxanthin, chrysolaminarin, and eicosapentaenoic acid by *Odontella aurita* under different nitrogen supply regimes. *J. Biosci. Bioeng.* **126**(6), 723-729.

Yahia, E. M., Carrillo-López, A., Barrera, G. M., Suzán-Azpiri, H., Bolaños, M. Q. (2019) Photosynthesis. U: Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables (Yahia, E., Carrillo-Lopez, A., ured.), Elsevier, Edinburg, str. 47–72.

Yang, Z.K, Niu, Y.F., Ma, Y.H., Xue, J., Zhang, M.H., Yang, W.D., Liu, J.S., Lu, S.H., Guan, Y., Li, H.Y. (2013) Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. *Biotechnol. Biofuels.* 4;6(1):67. doi:10.1186/1754-6834-6-67.

Yang, M., Zhao, W., Xie, X. (2014) Effects of nitrogen, phosphorus, iron and silicon on growth of five species of marine benthic diatoms. *Acta ecologica sinica* **34**(6), 311-319.

Yi, Z., Xu, M., Di, X., Brynjolfsson, S., Fu, W. (2017) Exploring Valuable Lipids in Diatoms. *Front. Mar. Sci.* **4**:17. doi: 10.3389/fmars.2017.00017

Yousuf, A. (2020) Fundamentals of Microalgae Cultivation. U: Microalgae Cultivation for Biofuels Production (Yousuf, A., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 1–9.

Zulu, N. N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., Feussner, I. (2018) Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Prog. Lipid Res.* **70**, 1–1

## 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.

Manja Kuzmic'