

# Izdvajanje mikroalge *Picochlorum* sp. bioflokulacijom pomoću plijesni *Mortierella isabellina*

---

**Strinavić, Marina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:283514>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2021.

Marina Strinavić

**Izdvajanje mikroalge *Picochlorum* sp.  
bioflokulacijom pomoću plijesni  
*Mortierella isabellina***

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

*Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek na pruženoj prilici za izradu ovoga rada kao i danim savjetima te podršci pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala mag. ing. Marini Grubišić na uloženom vremenu, trudu, znanju i strpljenju. Također hvala svim profesorima, a naročito prof. dr. sc. Božidaru Šanteku, koji su me naučili temeljima biotehnologije te usmjerili u mojoj profesionalnoj karijeri.*

*Na kraju, najveća hvala mojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju i podršci koju su mi pružili tijekom izrade ovog diplomskog rada kao i tijekom cijelog obrazovanja.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

### IZDVAJANJE MIKROALGE *Picochlorum* sp. BIOFLOKULACIJOM POMOĆU PLIJESNI *Mortierella isabellina*

*Marina Strinavić*, univ. bacc.ing. biotechn., 0058209174

**Sažetak:** Bioflokulacija predstavlja inovativnu, ekonomičnu i ekološki prihvatljivu metodu izdvajanja biomase mikroalge. U ovome radu provedeni su eksperimenti sa ciljem optimizacije uvjeta bioflokulacije mikroalge *Picochlorum* sp. s peletima plijesni *Mortierella isabellina*. Optimizirana je koncentracija spora plijesni te utjecaj mase plijesni, pH vrijednosti, temperature i omjera masa plijesni i mikroalge. Maksimalna uspješnost bioflokulacije iznosila je 88,47 %, postignuta pri uvjetima: 1,5 g suhe tvari plijesni u omjeru mikroalga:plijesan 1:50, pri pH vrijednosti 2 i temperaturi 30 °C. Također proveden je fototrofni šaržni uzgoj mikroalge uz sukcesivno dodavanje nutrijenata u barbotirajućoj koloni na f/2 podlozi. Uzgoj je proveden kroz fazu uzgoja i fazu nakupljanja lipida uz dodatak natrijevog bikarbonata. Posljednjeg 26. dana uzgoja postignuta koncentracija biomase iznosila je 1,68 g/L. Tijekom uzgoja praćene su promjene udjela proteina, ugljikohidrata i lipida, sastav pigmentata te profil masnih kiselina. Najzastupljenije makromolekule u biomasi bili su proteini (76,09 %), a zatim ugljikohidrati (37,69 %) i lipidi (14,18 %).

**Ključne riječi:** *bioflokulacija, izdvajanje, mikroalga, plijesan*

**Rad sadrži:** 57 stranica, 24 slika, 10 tablica, 52 literaturnih navoda, 6 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

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

**Datum obrane:** 30., studenog 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of biochemical engineering  
Laboratory for biochemical engineering, industrial microbiology and malting and brewing technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

HARVESTING OF MICROALGAE *Picochlorum* sp. BY BIOFLOCCULATION WITH FUNGUS  
*Mortierella isabellina*

*Marina Strinavić*, univ. bacc.ing. biotechn., 0058209174

**Abstract:** Bioflocculation is an innovative, economically and environmentally friendly method of extracting microalgae biomass. In this paper, experiments were performed with the aim of optimizing the bioflocculation conditions for the *Picochlorum* sp. with *Mortierella isabellina* pellets. Concentration of mold spores, influence of mold mass, pH value, temperature and mass ratio of mold and microalgae were optimized. The maximum efficiency of bioflocculation was 88.47 %, achieved under the following conditions: 1.5 g of mold dry matter in the ratio of microalgae: mold 1:50, at pH 2 and temperature 30 ° C. Phototrophic batch culture of microalgae was also performed with successive addition of nutrients in a bubbling column on f/2 medium. Cultivation was carried out through the culture phase and the lipid accumulation phase with the addition of sodium bicarbonate. On the last day of cultivation (26.), the achieved biomass concentration was 1.68 g/L. During cultivation, changes in the content of proteins, carbohydrates and lipids, the composition of pigments and the profile of fatty acids were monitored. The most represented macromolecules in biomass were proteins (76.09 %), followed by carbohydrates (37.69 %) and lipids (14.18 %).

**Keywords:** *bioflocculation, harvesting, microalgae, fungi*

**Thesis contains:** 57 pages, 24 figures, 10 tables, 52 references, 6 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

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

**Reviewers:**

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

**Thesis defended:** November, 30<sup>th</sup>, 2021

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. Plijesan <i>Mortierella isabellina</i> .....	2
2.2. Taksonomija mikroalgi.....	2
2.2.1. Biotehnološka primjena mikroalgi.....	4
2.2.2. Uzgoj mikroalge.....	7
2.2.2.1. Kultivacijski sustavi .....	8
2.3. Izdvajanje biomase mikroalge .....	9
2.3.1. Bioflokulacija .....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>14</b>
3.1. MATERIJALI.....	14
3.1.1. Radni mikroorganizami .....	14
3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjive podloge .....	14
3.1.3. Ostale kemikalije .....	15
3.1.4. Hranjive podloge .....	16
3.1.4.1. Hranjiva podloga za uzgoj kulture mikroalge .....	16
3.1.4.2. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma plijesni.....	17
3.1.4.3. Hranjiva podloga za uzgoj kulture plijesni.....	17
3.1.5. Oprema i aparatura .....	17
3.1.5.1. Laboratorijski bioreaktor .....	17
3.1.5.2. Centrifuge.....	18
3.1.5.3. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (eng. ultra performance liquid chromatography, UPLC).....	18
3.1.5.4. Uređaj za plinsku kromatografiju (eng. gas chromatography, GC) .....	18
3.1.5.5. Ostala oprema.....	18
3.2. METODE .....	19



3.2.1. Uzgoj inokuluma mikroalge .....	19
3.2.2. Šaržni uzgoj mikroalge.....	19
3.2.3. Uzgoj inokuluma plijesni .....	20
3.2.4. Submerzni uzgoj plijesni .....	20
3.2.5. Izdvajanje biomase .....	21
3.2.5.1. Izdvajanje biomase mikroalge pomoću centrifuge.....	21
3.2.5.2. Izdvajanje peleta plijesni .....	21
3.2.5.3. Bioflokulacija .....	21
3.2.6. Analitičke metode.....	23
3.2.6.1. Brojanje stanica .....	23
3.2.6.2. Mjerenje optičke gustoće.....	23
3.2.6.3. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari.....	23
3.2.6.4. Određivanje koncentracije nitrita u podlozi .....	24
3.2.6.5. Određivanje koncentracije fosfata u podlozi.....	25
3.2.6.6. Određivanje udjela proteina u biomasi.....	25
3.2.6.7. Određivanje udjela lipida u biomasi.....	27
3.2.6.8. Određivanje sastava pigmenata u biomasi .....	28
3.2.6.9. Određivanje ugljikohidrata u biomasi .....	28
3.2.6.10. Određivanje sastava masnih kiselina u biomasi .....	29
3.2.6.11. Određivanje pokazatelja uspješnosti procesa .....	30
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>32</b>
4.1. Optimiranje koncentracije inokuluma plijesni .....	33
4.2. Optimizacija bioflokulacije .....	34
4.2.1. Utjecaj mase plijesni na proces bioflokulacije .....	34
4.2.2. Utjecaj pH vrijednosti na proces bioflokulacije .....	36
4.2.3. Utjecaj omjera mase plijesni i mase mikrolage na proces bioflokucije .....	38
4.2.4. Utjecaj temperature na proces bioflokulacije .....	41

4.3. Šaržni Uzgoj mikroalge uz prtok supstrata u barbotirajućoj koloni.....	42
4.3.1. Sastav biomase .....	45
4.3.2. Bioflokulacija mikroalge nakon šaržnog uzgoja .....	49
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>52</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>53</b>

# 1. UVOD

Velik dio potražnje za izvorom energije trenutno zadovoljavaju fosilna goriva, no zbog ograničenih količina fosilnih goriva, poskupljenja nafte, povećane emisije stakleničkih plinova i globalnog zatopljenja razmatraju se alternativni izvori energije. Jedan od njih je biomasa mikroalgi u proizvodnji biodizela koja sadrži visoki udjel lipida u biomasi. Mikroalge posjeduju brojne morfološke, fiziološke i genetičke značajke koje omogućuju proizvodnju različitih biološki aktivnih proizvoda kao što su biogoriva, lijekovi, aditivi u prehrani, kozmetika, sirovine i drugi industrijski visoko vrijedni proizvodi. Glavne komponente biomase algi su ugljikohidrati, pigmenti, lipidi i proteini čija koncentracija ovisi o uvjetima uzgoja, sastavu medija za rast, intenzitetu odnosno trajanju svjetlosti i samom soju mikroalge.

Unatoč visokom udjelu lipida u stanicama mikroalgi i kvaliteti dobivenih masnih kiselina, proizvodnja biodizela, kao i proizvodnja ostalih sirovina iz mikroalgi je ekonomski nepovoljna. Trenutna upotreba mikroalgi u velikom mjerilu je isplativa samo za proizvodnju visokovrijednih proizvoda kao što su farmaceutski pripravci. Energetski i ekonomski najzahtjevniji dio procesa je izdvajanje stanica iz podloge te ovaj korak zahtijeva znatna poboljšanja u svrhu postizanja isplativosti proizvodnje. S obzirom na troškove konvencionalnih tehnika izdvajanja mikroalgi, posljednjih se godina kao alternativna tehnika ističe bioflokulacija. Poseban interes usmjeren je prema uzgoju plijesni zahvaljujući njihovoj prirodnoj sposobnosti formiranja peleta koji se iz podloge mogu izdvojiti jednostavnom filtracijom, a potom iskoristiti za izdvajanje stanica mikroalgi iz hranjive podloge. Bioflokulacija predstavlja obećavajuću metodu izdvajanja stanica mikroalgi iz hranjive podloge zbog svoje visoke učinkovitosti bez upotrebe kemijskih sredstava i ekonomske isplativosti.

Cilj ovog rada bio je istražiti učinkovitost izdvajanja stanica mikroalge pomoću bioflokulacije s peletima plijesni. Provedena je optimizacija uvjeta bioflokulacije, kao što su optimizacija temperature, pH vrijednosti, utjecaj mase plijesni te utjecaj omjera mase plijesni i mikroalge. Osim optimizacije uvjeta bioflokulacije, proveden je uzgoj mikroalge u barbotirajućoj koloni pri čemu se limitacijom nutrijenata i dodatkom natrijevog bikarbonata utjecalo na sadržaj proteina, ugljikohidrata, pigmenata i lipida u biomasi.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PLIJESAN *Mortierella isabellina*

Trenutno se procijenjuje kako postoji oko 1,5 milijun postojećih vrsta koje pripadaju carstvu gljiva koje su glavni organizmi za razgrađivanje u određenim ekosustavima, široko su korišteni u proizvodnji enzima i lijekova te služe kao eksperimentalni organizmi (Hawksworth, 2001). Prema Hibbett i suradnicima (2007), carstvo gljiva se može podijeliti na sedam odjeljaka odnosno 31 razred, a novija literatura dijeli ovo carstvo na čak devetnaest odjeljaka (Wijayawardene i sur., 2020). U ovome radu upotrebljena je plijesan *Mortierella isabellina* koja pripada koljenu Zygomycota. *Mortierella isabellina* je filamentozna plijesan s veličinom spora 5-10  $\mu\text{m}$  (Gao i sur., 2014). Mikroorganizmi koji imaju sposobnost nakupljanja značajnih količina lipida u obliku neutralnih triacilglicerola nazivaju se oleaginozni mikroorganizmi, a jedan od njih je i *Mortierella isabellina*. Oleaignozne vrste plijesni najčešće akumuliraju između 20 i 60 % lipida u suhoj tvari biomase, a za plijesan *Mortierella isabellina* zabilježena je akumulacija lipida do 80 % suhe tvari biomase. Trenutno postoji sve veće zanimanje za proizvodnju biogoriva iz lipida iz plijesni *M. isabellina* uzgojene na lignoceluloznim sirovinama. *M. isabellina* se može uzgajati na glukozu, ksilozi, octenoj kiselini i polisaharidima (Gao i sur., 2014). Optimalna temperatura za rast ove plijesni iznosi 25 °C, a optimalna pH vrijednost podloge 4,5-6,0 (Peng i sur., 2010)

Mehanizam formiranja peleta plijesni opisuje se kroz tri faze rasta. Prva faza uključuje mikromorfološki rast u kojemu spore plijesni kličaju i dolazi do produženja stanica hifa. Zatim se nastavlja makromorfološka faza koja može biti koagulacijska ili nekoagulacijska (Leng i sur., 2021). Koagulacijski tip karakterizira koagulaciju spora tijekom klijanja koje rezultiraju mrežom isprepletenih hifa. U nekoagulacijskom tipu rasta, rastu pojedinačne spore koje kličaju prije stvaranja peleta tako da je broj peleta proporcionalan broju spora u inokulumu (Prajapati i sur., 2014). Kako se uvjeti rasta mijenjaju, peleti prelaze u treću fazu u kojoj dolazi do autolize. Za plijesan *Mortierella isabellina* ključni korak u stvaranju peleta je agregacija spora (Gao i sur., 2014).

### 2.2. TAKSONOMIJA MIKROALGI

Mikroalge su mikroskopski organizmi, jednostavne stanične građe, prisutni u vodi i na kopnu, a za rast su im potrebne tri glavne komponente koje uključuju izvor svjetlosti, vode i

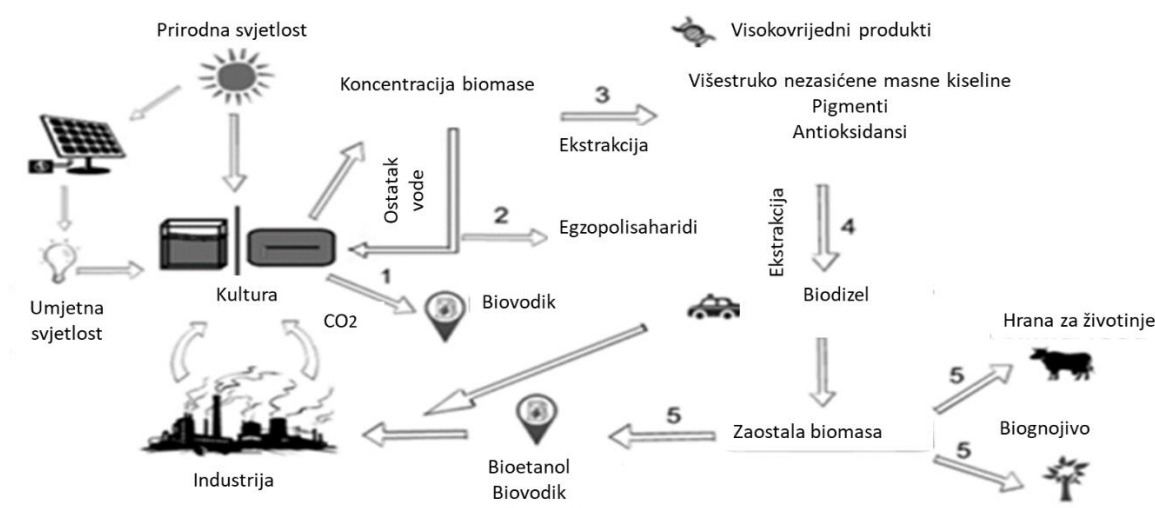
ugljika. Kako mikroalge nisu monofiletskog podrijetla te se ne mogu razvrstati u samo jedno carstvo, razvrstavaju se u ukupno tri carstva, a to su biljke, kromiste i protozoe (Heimann i Huerlimann, 2015). Postoji oko 26 000 vrsta mikroalgi te se od njih samo nekoliko koriste, za sada, u komercijalne svrhe, a to su *Spirulina*, *Chlorella*, *Hematococcus*, *Dunaliella*, *Botryococcus*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Chaetoceros*, *Cryptocodinium*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nitzschia*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis* i *Skeletonema*. Klasificiraju se ovisno o različitim svojstvima mikroalge, sastavu pigmenta, skladištenju rezervnih tvari, obliku, veličini i mnogim drugim svojstvima. Na temelju sastava pigmenta razlikuje se 9 skupina: Chlorophyceae (zelene alge), Phaeophyceae (smeđe alge), Pyrrophyceae (dinoflagelati), Chrysophyceae (zlatno smeđe alge), Bacillariophyceae (dijatomeje) i Rhodophyceae (crvene alge) (Hemaiswarya i sur., 2013). U ovome radu pobliže će se opisati zelene alge iz odjeljka Chlorophyta pošto njima priprada razred Trebouxiophyceae, porodica Chlorellaceae, odnosno rod *Picochlorum* sp. koji je korišten u procesu bioflokulacije u ovome radu.

Mikroalge iz odjeljka Chlorophyta su slatkovodne, morske te kopnene alge koje nastanjuju gotovo svako mjesto na Zemlji do kojega svjetlost i vlaga mogu doprijeti. Uključuju okrugle do elipsoidne jednostanične i višestanične alge koje posjeduju klorofile a i b u jednom kloroplastu okruženog s dvije ovojnice membrane kao i karotenoide uključujući  $\beta$ -karoten i različite ksantofile kao što su astaksantin, kantaksantin, lutein, zeaksantin itd. (Barkia i sur., 2019; Heimann i Huerlimann, 2015). Razred Trebouxiophyceae sadrži najveći broj zelenih mikroalgi i najznačajnije biotehnoški primjenjive rodove, a jedan od njih je i *Picochlorum* sp.

Rod *Picochlorum* sp. prvi je puta klasificiran 2004. godine te se od tada intenzivno istražuje zbog svojih karakteristika kao što je rast pri širokom rasponu temperature (0 do 40 °C), prilagodba na promjene temperature, tolerancija na salinitet, otpornost na veliki intenzitet svjetla i brži rast u odnosu na mikroalge koje se intenzivno koriste u biotehnologiji (*Dunaliella*, *Nannochloropsis*) (Dahlin i sur., 2019; Gonzalez-Esquer i sur., 2019). Mikroalge roda *Picochlorum* nastanjuju se u morskoj vodi te ih čine jednostanični, okrugli organizmi s visokim sadržajem lipida (20-58 % suhe tvari biomase) i proteina koji se istražuju za upotrebu u biotehnoške svrhe kao što je proizvodnja biogoriva (Gonzalez-Esquer i sur., 2019; Krasovec i sur., 2018).

### 2.2.1. Biotehnološka primjena mikroalgi

Upotreba mikroalgi seže u daleku prošlost kada su se ljudi, kako bi preživjeli, hranili mikroalgom *Nostoc*, a komercijalna primjena mikroalgi započela je 1970-tih godina proizvodnjom  $\beta$ -karotena pomoću mikroalge *Dunaliella salina* (Spolaore i sur., 2006). Mikroalge proizvode visoko vrijedne proizvode kao esencijalne amino kiseline, vitamine, minerale, pigmente, nukleinske kiseline, ugljikohidrate, lipide i proteine ovisno o soju, načinu i stadiju uzgoja te biotičkim i abiotičkim čimbenicima (slika 1). Proizvodnjom tih proizvoda omogućena je primjena mikroalgi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.



**Slika 1.** Biorafinerijski koncept uzgoja mikroalge (prema Giraldo-Calderón i sur., 2018)

Proteini imaju važnu ulogu u strukturi kao sastavni dio membrane i sustava za apsorpciju svjetlosti te u metabolizmu stanica mikroalgi u obliku enzima uključenih u fotosintezu (Barkia i sur., 2019). Sadržaj i kvaliteta proteina dobivenih iz mikroalgi može se uspoređivati s proteinima u komercionalnim proizvodima kao povrće, mlijeko ili soja. U mesu govedine nalazi se oko 17 % proteina, u soji oko 36 % proteina u suhoj tvari biomase, a mikroalge, posebice *Chlorella* sp. i *Spirulina* sp. koje su dominantne vrste na tržištu, sadrže i do 70 % proteina u suhoj tvari biomase. Prednost dobivanja proteina iz mikroalgi je što imaju niske zahtjeve za površinu zemlje, u usporedbi sa zemljom potrebnom za uzgoj životinja te zemljom potrebnom za uzgoj biljaka, za njihov uzgoj se može iskoristiti zemljište koje nije pogodno za obradu i potreban je minimalni utrošak vode. Iako sadrže sve esencijalne aminokiseline te visok udio proteina u biomasi mikroalge, biorazgradivost ovakvih proteina je niža od uobičajnih izvora proteina. Celuloza, koja se nalazi u staničnoj stijenci određenih mikroalgi, je za ljude

neprobavljiva, a kako bi se poboljšala biorasploživost proteina unutar biomase potrebno je razbiti staničnu stijenu mljevenjem, drobljenjem ili zagrijavanjem biomase. Mikroalga *Spirulina* ne posjeduje celulozu u staničnoj stijenci tako da ima dobru probavljivost (Alam i sur., 2020).

Do sada najveću komercijalnu primjenu ima proizvodnja lipida iz biomase mikroalgi. Uz potencijalnu proizvodnju biodizela, proizvode se i višestruko nezasićene masne kiseline tj. omega masne kiseline koje ljudski organizam ne može sintetizirati nego ih je potrebno unijeti prehranom, pa stoga imaju veću komercijalnu vrijednost. Višestruko nezasićene masne kiseline su od ključne važnosti za očuvanje zdravlja ljudi poput prevencije srčanih bolesti, razvoja mozga i usporavanje starenja. Omega 3 masne kiseline sastoje se od  $\alpha$ -linolenske kiseline (18:3, n-3), eikosapentaenoične kiseline (20:5, n-3) i dokozaheksanske kiseline (22:6, n-3), a omega 6 masne kiseline uključuju linolnu kiselinu (18:2, n-6),  $\gamma$ -linolensku (18:3, n-6) i arahidonsku kiselinu (20:4 n-6) (Alam i sur., 2020). U stanicama mikroalgi, nezasićene masne kiseline izgrađuju strukturu membrane, a zasićene masne kiseline služe kao rezerva energije (Alam i sur., 2020; Barkia i sur., 2019). Masne kiseline su najčešće C16 i C18 zasićene i nezasićene masne kiseline. Masne kiseline određuju funkcionalna svojstva lipida, a sintetiziraju se ovisno o uvjetima uzgoja. Tako se u eksponencijalnoj fazi akumuliraju polarni lipidi, a u stresnim uvjetima kao što je limitacija nutrijenata, salinitet, intenzitet svjetlosti, temperatura ili pH, triacilgliceroli (Barkia i sur., 2019). Mikroalge akumuliraju do 70 % lipida, a pod specifičnim uvjetima, određeni sojevi, mogu akumulirati i do 90 % što je više u usporedbi sa biljkama (Spolaore i sur., 2006). Za mikroalgu *Picochlorum* sp. u literaturi se mogu pronaći podaci za udio lipida do 59 % u stresnim uvjetima (Dahmen i sur., 2014, Zhu i Dunford, 2013; El-Kassas, 2013). Jedan od specifičnih uvjeta je i dodatak natrijevog bikarbonata kao izvora ugljika. Natrijev bikarbonat se lakše dodaje tijekom uzgoja nego ugljikov dioksid te pozitivno utječe na povećanje produktivnosti biomase i povećanje lipida unutar stanica.

Biodizel se tradicionalno proizvodi transesterifikacijom triglicerida, iz obnovljivih sirovina, koji reagiraju s alkoholom kratkog lanca u prisutnosti baznog ili kiselog katalizatora, dajući alkilne estere biodizela masnih kiselina. Trenutno se koriste lipidi iz soje, uljane repice i afričke palme, ali pošto je to ujedno i hrana, uzrokuju povišenje cijene hrane. Kako bi se proizveo biodizel iz biomase mikroalgi potrebno je izdvojiti biomasu iz suspenzije, potom ju osušiti, razbiti staničnu stijenu i ekstrahirati lipide koji se zatim transesterifikacijom prevode u biodizel. Ekonomski najzahtjevniji dio procesa je izdvajanje biomase, a energetska sušenja

biomase (Giraldo-Calderón i sur., 2018). Trenutno se proučavaju alternativne tehnike za izdvajanje stanica mikroalge, a jedna od njih je i bioflokulacija koja je opisana u ovome radu.

Mikroalge su bogate pigmentima kao što je klorofil, lutein, astaksantin i  $\beta$ -karoten. (Spolaore i sur., 2006). Glavna uloga pigmenata u mikroalgama je apsorpcija svjetla, koja je nužna za fotosintezu. Pigmenti se koriste u prehrambenoj industriji kao bojilo, a u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji su u upotrebi zbog svojih antioksidativnih svojstva i provitamina A. Mikroalga *Picochlorum celeri* sadrži pigmente: klorofil a, klorofil b, lutein, astaksantin,  $\beta$ -karoten, kantaksantin, violaksantin, neoksantin, zeaksantin i anteraksantin (Cano i sur., 2021). *Haematococcus pluvialis* i *Dunaliella salina* su za sada primarni izvor pigmenata astaksantina i  $\beta$ -karotena na tržištu (Giraldo-Calderón i sur., 2018).

Klorofil je jedan od vrijednih bioaktivnih pigmenata koji se može ekstrahirati iz biomase mikroalgi. Postoje dva glavna klorofila, a to su klorofil a i klorofil b, a do sada su istraženi i klorofil c, d i f (da Silva Ferreira i Sant'Anna, 2017). Klorofil a je zeleni pigment koji je najzastupljeniji u biljkama i mikroalgama te je odgovoran za apsorpciju energije svjetlosti i njezino pretvaranje u kemijsku energiju fotosintezom. Klorofil b je drugi klorofil po zastupljenosti u mikroalgama i biljkama. Klorofil c se nalazi u dinoflagelatima, haptofitima, heterokontima i kriptofitima, klorofil d se nalazi u crvenim algama, a klorofil f u određenim cijanobakterijama (Alam i sur., 2020). Molekula klorofila građena je od četiri prstena pirola, a u središtu molekule se nalazi atom magnezija. Svaki pirolni prsten sadrži četiri atoma ugljika i jedan atom dušika. Razlika u strukturi klorofila a i b je u zamjeni metilne skupine klorofila a s formilnom skupinom (Hosikian i sur., 2010). Kako bi se povećao udjel klorofila u biomasi mikroalge utječe se na dostupnost hranjivih tvari, temperaturu, miješanje kulture i intenzitet svjetlosti. Mikroalga *Picochlorum celeri* sadrži oko 13 % pigmenata u suhoj tvari biomase, a od toga 85 % čine klorofili. Također sadrži veći udio luteina nego  $\beta$ -karotena, tako da lutein predstavlja oko 55 % svih karotenoida (Cano i sur., 2021).

Proizvodnja goriva iz mikroalgi usmjerena je na proizvodnju biodizela, ali osim biodizela pomoću mikroalgi može se proizvoditi i bioetanol ili biovodik. Za proizvodnju bioetanola, potreban je visok udjel ugljikohidrata, a mikroalge mogu doseći i do 50 % ugljikohidrata (glikogen, celuloza i škrob) u suhoj tvari biomase. U radu Gonzalez-Esquer i suradnika (2019) dobiveni udio ugljikohidrata u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp. iznosio je 38 % nakon 11 dana uzgoja. Ekstrahirani ugljikohidrati iz biomase se zatim podvrgavaju fermentaciji do proizvodnje bioetanola. Proizvodnja bioetanola ovisi o sastavu ugljikohidrata i



biorazgradivosti stanične stijenke. Kako mikroalge ne proizvode lignin, koji otežava iskorištavanje ugljikohidrata, moguće je dobiti bolje prinose bioetanola iz mikroalgi nego biljaka (Giraldo-Calderón i sur., 2018). Proizvodnja bioetanola iz mikroalgi je povoljnija u usporedbi s proizvodnjom iz biljaka zbog veće brzine rasta, sposobnosti fiksacije CO<sub>2</sub> te lakše hidrolize polisaharida u usporedbi s lignoceluloznim sirovinama. Hidroliza polisaharida provodi se kemijskim i enzimskim putem, pri čemu je kemijska hidroliza jeftinija i brža, ali rezultira razgradnjom važnih komponenti, dok je enzimska hidroliza sporija, ali ekološki prihvatljivija uz nastajanje manje nusprodukata (Alam i sur., 2020). Osim dobivanja bioetanola pomoću hidrolize, provodi se i tamna fermentacija. U fermentaciji uz odsustvo svjetla se uzgajaju stanice autotrofno radi nakupljanja rezervnih spojeva, a fermentacijski metabolizam se zatim preusmjerava na proizvodnju etanola razgradnjom unutarstaničnih rezervi ugljikohidrata i lipida u nedostatku svjetla (Giraldo-Calderón i sur., 2018). Osim u proizvodnji bioetanola, polisaharidi se upotrebljavaju i u kozmetičkoj industriji kao higroskopna sredstva i antioksidansi za lokalnu primjenu te u proizvodnji biorazgradive plastike (Barkia i sur., 2019).

Mikroalge također imaju potencijal za upotrebu u medicini zbog svog protuupalnog, antikoagulacijskog, antivirusnog, antibakterijskog i antifungalnog djelovanja, također za jačanje imuniteta i smanjenje kolesterola u krvi, upotrebu u akvakulturi kroz genetski modificirane mikroalge za primjenu umjesto antibiotika te za upotrebu u agrikulturni za obogaćivanje tla (Alam i sur., 2020). Kako bi se mogle primjenjivati u velikom mjerilu potrebno je izolirati i odabrati sojeve mikroalgi s obzirom na: željeni proizvod, toleranciju na različite temperature te temperaturni stres i rast u različitim hranjivim podlogama (Rizwan i sur., 2018).

### 2.2.2. Uzgoj mikroalge

Mikroalge se mogu uzgajati s obzirom na izvor ugljika i energije (fotoautotrofni, heterotrofni, miksotrofni i fotoheterotrofni) i s obzirom na način uzgoja (otvoreni i zatvoreni sustavi).

Ovisno o dostupnom izvoru ugljika i energije mikroalge mogu mijenjati metabolizam. Najčešće se provodi fotoautotrofna kultivacija koja podrazumijeva korištenje anorganskog izvora ugljika (CO<sub>2</sub>) i svjetlosti kao izvora energije za stvaranje kemijske energije u procesu fotosinteze. Fotoautotrofna kultivacija doprinosi globalnoj redukciji ugljikovog dioksida zbog

sposobnosti korištenja CO<sub>2</sub> iz zraka kao jedinog izvor ugljika za rast stanica. Stoga se potiče uzgoj mikroalgi u blizini tvornica koje ispuštaju veće količine ugljikovog dioksida. Također ovakav način uzgoja ima manju mogućnost kontaminacije te se postižu niže vrijednosti koncentracije biomase nego s uzgojem pomoću drugih metaboličkih puteva (Chew i sur., 2018). Tijekom heterotrofnog uzgoja mikroalge koriste organske spojeve kao izvor ugljika te kao izvor energije. Prednosti heterotrofnog uzgoja su visoka produktivnost, nije potreban izvor svjetlosti te se mogu iskoristiti otpadne sirovine iz industrije kao izvor ugljika (Zuccaro i sur., 2020). Uslijed korištenja različitih izvora ugljika dolazi do potencijalne kontaminacije pa je tako zatvoreni sustav prikladniji za heterotrofni uzgoj nego fotoautotrofni. Također upotrebom organskih spojeva povećavaju se troškovi uzgoja (Chew i sur., 2018). Kada je potreban uz organski izvor ugljika i izvor svjetlosti metabolizam se naziva fotoheterotrofni. Miksotrofni uzgoj mikroalgi podrazumijeva korištenje anorganskih (CO<sub>2</sub>) i organskih tvari kao izvora ugljika za rast. Mikroalge koje mogu rasti u fotoautotrofnim ili u heterotrofnim uvjetima mogu rasti i u miksotrofnim uvjetima ovisno o koncentraciji organskih spojeva i intenzitetu svjetlosti. Ovakvim tipom uzgoja postiže se veća produktivnost lipida i biomase u usporedbi s heterotrofnim uzgojem (Chew i sur., 2018).

#### *2.2.2.1. Kultivacijski sustavi*

S obzirom na način uzgoja razlikuju se otvoreni i zatvoreni sustavi.

Prvi uzgoj mikroalgi započet je u otvorenim sustavima. Glavne prednosti otvorenog sustava uzgoja su minimalni početni troškovi kao i operativni te troškovi održavanja, jednostavnost, mala potrošnja energije i jednostavno povećanje mjerila sustava. No unatoč brojnim prednostima, nedostaci otvorenog sustava prevladavaju zbog nemogućnosti utjecaja na vanjske uvjete, potrebom za velikom površinom zemljišta, gubitaka zbog isparavanja koji posljedično rezultira niskim prinosom te kontaminacijama (Chew i sur., 2018; Narala i sur., 2016).

Otvoreni sustavi se upotrebljavaju za kultivaciju velikih razmjera. Međutim, u svrhu proizvodnje visokovrijednih proizvoda upotrebljavaju se zatvoreni sustavi zbog mogućnosti kontroliranja procesa. Osim kontrole procesa, prednosti zatvorenih sustava, odnosno fotobioreaktora, su veći prinosi biomase, smanjena mogućnost kontaminacije, jednostavno održavanje sustava te bolja dostupnost svjetlosti. Nedostaci zatvorenih sustava su visoki

kapitalni troškovi te opasnost od pregrijavanja (Zuccaro i sur., 2020). Izbor fotobioreaktora ovisi o produktivnosti te krajnjem proizvodu, a izgradnja fotobioreaktora ovisi o svjetlosti, homogenizaciji, prijenosu mase, temperature i materijala (Zuccaro i sur., 2020). Najčešće upotrebljeni fotobioreaktori su barbotirajuće kolone, airlift bioreaktori, vertikalni i horizontalni cijevni fotobioreaktori i ravne ploče (Acién i sur., 2017). U ovome radu proveden je uzgoj u barbotirajućoj koloni. Uzgoj u barbotirajućoj koloni osigurava niske posmične sile, veliki prijenos mase i visoku učinkovitost iskorištenja CO<sub>2</sub>. Velika gustoća stanica unutar barbotirajuće kolone može utjecati na prodor svjetlosti zbog zasjenjivanja stanica međusobno. Problem nedovoljne izloženosti svjetlosti se rješava miješanjem ili propuhivanjem zraka ili CO<sub>2</sub> kroz kolonu pomoću aeratora pričvršćenog na dnu kolone, a u isto vrijeme se osigurava ravnomjernan prijenos topline i hranjivih tvari. Na miješanje utječe oblik i veličina mjehurića u koloni kao i fenomeni povezivanja mjehurića (Zuccaro i sur., 2020).

### **2.3. IZDVAJANJE BIOMASE MIKROALGE**

Mikroalge rastu u tekućim hranjivim podlogama te ih je za njihovu upotrebu potrebno izdvojiti iz hranjive podloge. Zbog male veličine i koncentracije stanica mikroalgi u proizvodnji biodizela, izdvajanje mikroalgi čini 20-30 % ukupnih troškova proizvodnje. Standardne metode izdvajanja biomase su: flitiranje, ultrafiltracija, centrifugiranje, flokulacija (kemijska ili elektro) i taloženje. Metoda koja će se upotrebljavati ovisi o samoj kvaliteti i cijeni konačnog proizvoda. Tako se za proizvode malih vrijednosti upotrebljavaju jeftinije metode kao gravitacijsko taloženje i flokulacija, a za proizvode visoke vrijednosti kontinuirano centrifugiranje. Metoda izdvajanja se također odabire i prema tome koliko vlage, odnosno hranjive podloge smije zaostati pošto je sušenje mikroalgi skuplje nego mehaničko odvodnjavanje (Rizwan i sur., 2018).

Ključni čimbenik koji koči proizvodnju vrijednih proizvoda iz biomase mikroalge je upravo izdvajanje biomase. Za sada je masovna proizvodnja mikroalgi ekonomski isplativa samo u proizvodnji visoko vrijednih proizvoda za farmaceutske potrebe. Tradicionalne metode izdvajanja imaju mnogo nedostataka tako da se ispituju alternativne metode izdvajanja biomase kao što je bioflokulacija.

Među najbržim i najučinkovitijim metodama je centrifugiranje. Centrifugiranje se temelji na različitoj gustoći između stanica algi i hranjive podloge uz upotrebu centrifugalne sile.

Prednosti ovog načina izdvajanja su što se ne koriste dodatne kemikalije, brzina postupka kao i efikasnost izdvajanja preko 95 % stanica mikroalge (Alam i sur., 2020, Zhou i sur., 2013). Nedostaci centrifugiranja su što zahtijeva visoki unos energije pa nije moguća njegova primjena za proizvode male vrijednosti, visoki početni troškovi i stanice se izlažu posmičnim silama koje mogu oštetiti staničnu strukturu (Surendhiran i Vijay, 2014).

Filtracija je metoda razdvajanja smjesa tekućina- čvrsta tvar uz upotrebu polupropusnih membrana različitih veličina pora pa se tako razlikuju makrofiltracija, mikrofiltracija i ultrafiltracija. Pore membrane moraju biti manjeg promjera od promjera čestica kako bi se pod utjecajem tlaka mogla propustiti tekućina kroz membranu, a stanice mikroalge koncentrirati unutar sustava. Korištenje membrana s manjim porama daje veću efikasnost izdvajanja stanica (do 100 %), ali isto tako dolazi do smanjenja brzine filtracije začepeljivanjem pora stanicama mikroalgi zbog čega je potrebno često čišćenje membrane što produljuje vrijeme potrebno za izdvajanje biomase kao i povećanje troškova održavanja (Liber i sur., 2020).

Kao metoda izdvajanja biomase, primjenjuje se i flokulacija. Među mnogim metodama, flokulacija se smatra najučinkovitom i kao prikladan postupak za obradu velikih količina kultura mikroalgi. Najčešće se koristi zajedno s drugim metodama kao što su filtracija, flotacija ili gravitacijsko taloženje kako bi se poboljšala učinkovitost. Kao flokulanti se koriste razni anorganske ili organske tvari koje sadrže polivalentne metalne ione (željezov sulfat, željezov klorid, aluminijev sulfat i aluminijev klorid) (Luo i sur., 2019). Flokulanti moraju biti jeftini, netoksični i učinkoviti pri niskim koncentracijama. Tijekom flokulacije, raspršene stanice mikroalge tvore flokule s flokulantom te se zatim uslijed gravitacije sedimentiraju. Upotrebom kemijskih sredstava dolazi do kontaminacije biomase metalima pa su tako uvedene nove metode: flokulacija sa biorazgradivim flokulantima kao što je hitozan ili flokulacija koristeći drugih mikroorganizama. Biorazgradivi flokulanti su skuplji u usporedbi sa anorganskim flokulantima koji su nerazgradivi i štetni za ekosustav (Luo i sur., 2019). Bioflokulacijska sredstva imaju prednost nad kemijskim flokulantima zbog svoje biorazgradive prirode, visoke učinkovitosti, netoksičnosti, ekološke prihvatljivosti, širokog raspona primjene i nižih doza potrebnih za flokulaciju. Bioflokulanti su sastavljeni od polisaharida koje izlučuju mikroorganizmi kao bakterije, kvasci i gljive (Surendhiran i Vijay, 2014).

### 2.3.1. Bioflokulacija

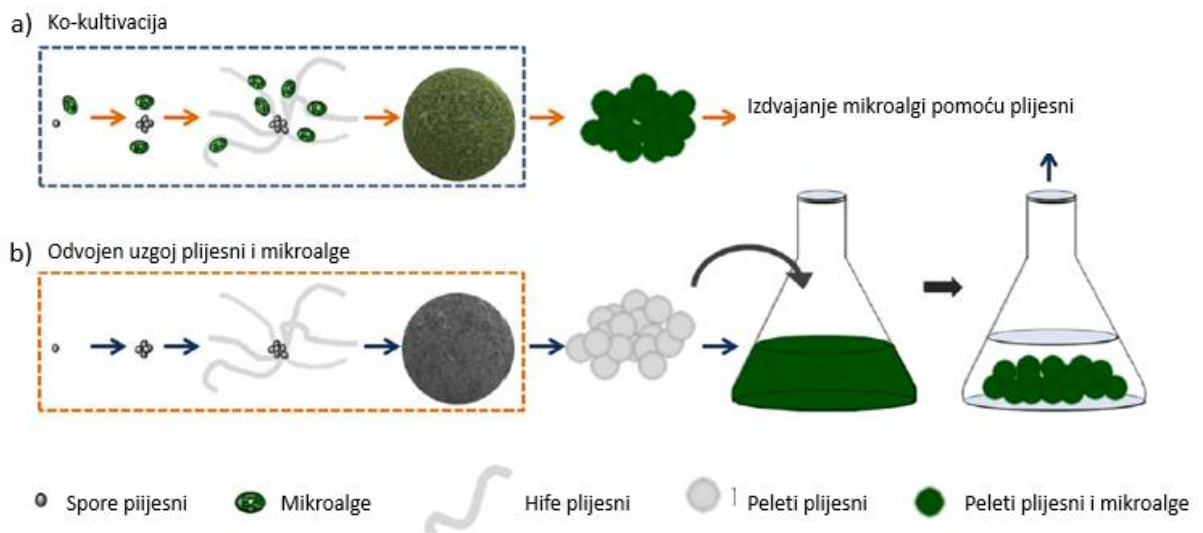
Bioflokulacija je inovativna i ekonomična metoda izdvajanja mikroalgi. Usporedbom sa standardnim metodama izdvajanja biomase mikroalgi, bioflokulacija je ekološki prihvatljiva, jeftina te održiva metoda izdvajanja biomase.

Postoje tri vrste bioflokulacije, a to su autoflokulacija, flokulacija sa bioflokulantima te mikrobna bioflokulacija (Alam i sur., 2020).

Autoflokulacija je proces agregacije i adhezije stanica mikroalgi međusobno u tekućoj podlozi zbog svojstava stanične površine, promjene uvjeta (pH vrijednost, koncentracija nutrijenata, koncentracija otopljenog kisika, koncentracija kalcija i magnezija) ili starenja kulture (Liber i sur., 2020; Ummalya i sur., 2017). Autoflokulacija se javlja kod malog broja algi, spontano, bez dodatka flokulacijskog sredstva. Neke od mikroalgi koje autoflokuliraju su *Ankistrodesmus falcatus*, *Tetraselmis suecica*, *S. obliquus*, *Ettlia texensis*, *Skeletonema marinoi*, *C. vulgaris* i *Chlorococcum* sp.. Nažalost, ti sojevi imaju nižu stopu rasta i akumuliraju niže razine lipida pa nisu adekvatni za proizvodnju biodizela (Malik i sur., 2020). Kiselo i lužnato područje pH vrijednosti su istraženi i utječu na smanjenje negativnog naboja stanica mikroalge zbog čega dolazi do autoflokulacije. U alkalnim uvjetima iznad pH 9, promjene površinskog naboja stanica algi uglavnom se pripisuju značajnom lučenju izvanstaničnih polimera, a u kiselim uvjetima fluktuirajuće disocijacije karboksilnih i amino skupina u staničnoj stijenci algi koje mogu uzrokovati promjene površinskog naboja. Starenjem kulture algi izlučuju se izvanstanične organske tvari za koje se smatra da imaju ulogu u promjeni površinskog naboja stanica i neutralizaciji koja dovodi do autoflokulacije (Matter i sur., 2019). Ovakva metoda ne zahtijeva dodatna ulaganja u flokulante stoga je održiva i jeftina alternativna metoda izdvajanja stanica no trenutno otkrivena samo kod određenih sojeva te pri određenim uvjetima.

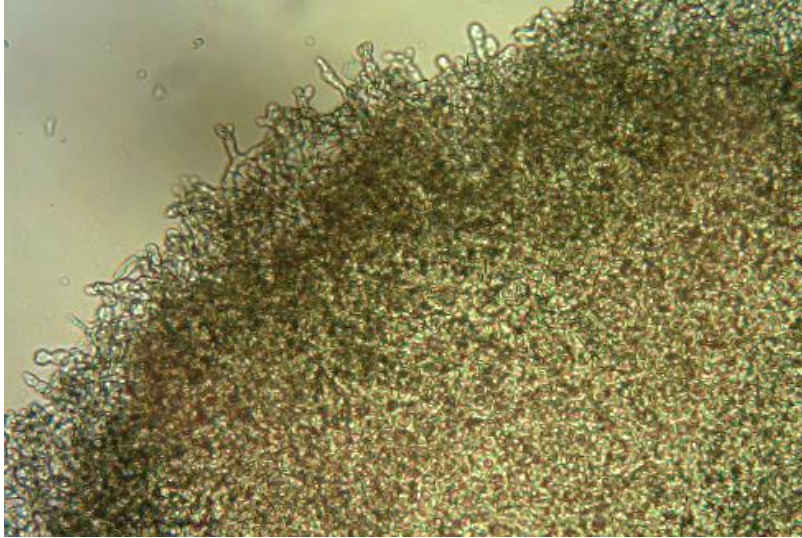
Mikrobna bioflokulacija uključuje korištenje mikrororganizama kao što su bakterije ili plijesni za flokuliranje biomase mikroalgi. Može se provesti kao kokultivacija, odnosno zajedničkim uzgojem plijesni i mikroalge, ili upotrebom prethodno uzgojenih peleta plijesni (slika 2, slika 3). U procesu kokultivacije iskorištava se svojstvo filamentoznih plijesni u stvaranju hifa kojim povezuju mikroalge u veće nakupine. Kod ovakvog postupka problem predstavlja različito vrijeme uzgoja plijesni i mikroalgi te potreba za različitim hranjivim podlogama. Sposobnost filamentoznih plijesni za povezivanje stanica mikroalge ovisi o

njihovoj morfologiji koja će se razlikovati ovisno o soju, miješanju hranjive podloge, pH vrijednosti pa i brzini smicanja medija (Luo i sur., 2019).



**Slika 2.** Primjeri bioflokulacije s plijesnima: a) kokultivacija; b) odvojen uzgoj plijesni i mikroalge (prema Pei i sur., 2021)

Sam mehanizam bioflokulacije nije još do kraja proučen te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se bioflokulacija mogla optimirati za što bolje povezivanje bioflokulanta sa stanicama mikroalge. Jedan od predloženih mehanizama je neutralizacija naboja. Negativni naboj na površini algi posljedica je prisutnosti aminskih ( $-\text{NH}_4$ ), karboksilnih ( $-\text{COOH}$ ) i fosfatnih skupina ( $-\text{PO}_4$ ), a pozitivni naboj na površini plijesni zbog prisutnosti alifatskih amina, fosfata i drugih aromatskih aminskih skupina (Lal i suradnici, 2021). Rezultati elektronske mikroskopije sugeriraju kako su netaknute hife potrebne za povezivanje stanica mikroalge na pelete plijesni (Liber i sur., 2020). Van der Waalove sile i elektrostatska sila odbijanja imaju važnu ulogu u povezivanju stanica. Zeta potencijal je mjera električnog potencijala u posmičnoj ravni električnog dvostrukog sloja, koji daje mjeru prividnog površinskog naboja. Smanjenje zeta potencijala rezultira smanjenjem odbojnih elektrostatičkih sila. Kod kritičnog zeta potencijala, Van der Waalove sile su jače nego elektrostatičke što dovodi do povezivanja stanica (Nazari i sur., 2020). Kako bi pobliže istražili funkcionalne skupine na hifama plijesni, u radu Pei i suradnika (2021), analiziran je spektar fluorescencije uzorka izvanstanične polimerne tvari. Dobiveni pikovi na različitim valnim duljinama ukazuju na prisustvo tirozina i triptofana čije su izoeletrične točke 5,66 odnosno 5,89. Upravo tirozin i triptofan u izvanstaničnom polimeru potencijalni su glavni čimbenici koji utječu na povezivanje hifa plijesni sa stanicama mikroalge (Pei i sur., 2021).



**Slika 3.** Peleti plijesni nakon provedene bioflokulacije (vlastita fotografija)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizami

Radni mikroorganizmi korišteni u izradi ovog rada su mikroalga *Picochlorum* sp. i plijesan *Mortierella isabellina*. *Mortierella isabellina*- soj *DSM 1414* kupljena je iz zbirke mikroorganizama i staničnih kultura Deutche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ; Braunschweig, Njemačka). *Picochlorum* sp. se nalazi u zbirci Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada. Izolirana je iz Jadranskog mora (okolica Šibenika, ožujak 2018. godine) u istom laboratoriju te identificirana do razine roda. Izolacija je provedena analizom sekvence gena 18S rRNA i usporedbom BLAST rezultata s NCBI bazom.

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

Za pripremu hranjive podloge korištene su kemikalije navedene u tablici 1.

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

Naziv kemikalije	Čistoća	Proizvođač
Bakrov sulfat pentahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Biotin	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Njemačka
Cijanokobalamin	≥ 98 %	Sigma-Aldrich, Njemačka
Cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
EDTA dinatrijev dihidrat	p.a.	Carlo Erba, Italija
Glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalcijev klorid dihidrat	p.a.	Merck, Njemačka
Kalijev klorid	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kobaltov (II) klorid heksahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kvašćev ekstrakt	za mikrobiologiju	Liofilchem, Italija
Magnezij klorid heksahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
Magnezij sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Manganov (II) klorid tetrahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska



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

Natrijev hidrogenkarbonat	p.a.	Alkaloid, Sjeverna Makedonija
Natrijev klorid	techn.	Solana Nin, Hrvatska
Natrijev molibdat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev nitrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Tiamin hidroklorid	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Njemačka
Željezov (III) klorid heksahidrat	p.a.	Sigma-Aldrich, Njemačka

## 3.1.3. Ostale kemikalije

Za provedbu eksperimenta korištene su kemikalije navedene u tablici 2.

**Tablica 2.** Popis kemikalija potrebnih za provedbu eksperimentalnog dijela istraživanja

Naziv kemikalije	Čistoća	Proizvođač
Aceton	p.a.	Kemika, Hrvatska
Etanol	p.a., apsolutni	Gram-Mol, Hrvatska
Folin-Ciocalteau reagrens	Standard	Sigma-Aldrich, Švicarska
Fosforna kiselina	≥ 85 %	Sigma-Aldrich, Švicarska
Heksan	p.a.	Carlo Erba, Italija
Kalcijev karobnat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kit za određivanje koncentracije fosfata		Merck, Njemačka
Kit za određivanje koncentracije nitrata		Merck, Njemačka
Kloroform	p.a.	Merck, Njemačka
Klorovodična kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
Metanol	za HPLC	J. T. Baker, SAD
Metil tridekanoat	standard	Sigma-Aldrich, Švicarska
Natrijev bikarbonat	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
Natrijev hidroksid	p.a.	Merck, Njemačka
PDA agar		Difco, USA
Pentadekan	standard	Sigma-Aldrich, Švicarska
Sumporna kiselina	p.a.	Carlo Erba, Italija
Tween 80	p.a.	Merck, Njemačka

### 3.1.4. Hranjive podloge

#### 3.1.4.1. Hranjiva podloga za uzgoj kulture mikroalge

Uzgoj inokuluma i kulture mikroalge *Picochlorum* sp. proveden je u Guillardovoj podlozi (f/2 podloga) (Guillard, 1975). Za pripremu podloge potrebno je pripremiti umjetnu morsku vodu. Umjetna morska voda se priprema otapanjem soli navedih u tablici 3 u destiliranoj vodi, a zatim se dobivena umjetna morska voda sterilizira pri 121 °C te potom ohladi. Tako pripremljenoj umjetnoj morskoj vodi dodaju se otopine soli navedene u tablici 4, a koje su prethodno sterilizirane i ohlađene.

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

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

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

Sastojak	Koncentracija (g/L)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	5,65
NaNO <sub>3</sub>	75
<b>Otopina elemenata u tragovima</b>	<b>Koncentracija (g/L)</b>
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,01
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,01
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	3,15
MnCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,18
Na <sub>2</sub> EDTA	4,16
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,006
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,022

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

Otopina vitamina	Koncentracija (g/L)
Biotin (vitamin H)	0,0005
Cijanokobalamin (vitamin B <sub>12</sub> )	0,0005
Tiamin (vitamin B <sub>1</sub> )	0,1

#### 3.1.4.2. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma plijesni

Čista kultura plijesni *Mortierella isabellina* čuvana je i održavana na kosom agru. Za pripremu spora plijesni korištena je kosa PDA podloga pripremljena otapanjem 20 g/L glukoze i 20 g/L agara u krumpirovom bujonu. Krumpirov bujon dobiva se kuhanjem 150 g sitno narezanog krumpira u 500 mL vode. Nakon što se krumpir raskuhao, bujon je profiltriran kroz gazu, a filtrat korišten za pripremu hranjivih podloga.

#### 3.1.4.3. Hranjiva podloga za uzgoj kulture plijesni

Uzgoj kulture plijesni *Mortierella isabellina* provodi se u f/2 hranjivoj podlozi. Priprema i koncentracije soli u f/2 podlozi navedeni su poglavlju 3.1.4.1. *Hranjiva podloga za uzgoj kulture mikroalge*. Pripremljenoj f/2 podlozi dodaje se određeni volumen prethodno sterilizirane i ohlađene otopine kvašćevog ekstrakta koncentracije 250 g/L i otopina glukoze koncentracije 500 g/L kako bi se u podlozi postigle koncentracije od 5 g/L glukoze i 1 g/L kvašćevog ekstrakta. Sterilizacija je provedena pri 121 °C kroz 20 minuta.

#### 3.1.5. Oprema i aparatura

##### 3.1.5.1. Laboratorijski bioreaktor

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

### 3.1.5.2. Centrifuge

Kako bi se izdvojila biomasa mikroalge *Picochlorum* sp. korištene su centrifuge Beckman J-21B (SAD), ukupnog kapaciteta 6 kiveta, volumena 500 mL te Thermo Scientific SL 8R (SAD), ukupnog kapaciteta 6 kiveta, volumena 15 mL ili 50 mL, dok se za analitičke svrhe koristila centrifuga Eppendorf 5804 R (Njemačka) za centrifugiranje uzoraka u mikroeprijetama volumena 1,5 mL ili 2 mL.

### 3.1.5.3. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (eng. *ultra performance liquid chromatography, UPLC*)

Određivanje ugljikohidrata u biomasi mikroalge provedeno je pomoću UPLC uređaja (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+; 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. Uređaj za plinsku kromatografiju (eng. *gas chromatography, GC*)

Sadržaj pojedinih masnih kiselina u lipidima mikroalgi određen je pomoću uređaja za plinsku kromatografiju GC 2010 Plus AF (Shimadzu, Japan). Uređaj čine automatski uzorkivač (AOC-20s), injektor (AOC-20i), termostatisane kapilarne kolone (Zebron ZBFAME Phenomenex, SAD), plameno - ionizacijski detektor (FID-2010 Plus) i računalni program za obradu podataka (GC Solutions v2.32).

### 3.1.5.5. Ostala oprema

Za provedbu ovog rada korištena je oprema navedena u tablici 5.

**Tablica 5.** Ostala korištena oprema

<b>Oprema</b>	<b>Model i proizvođač</b>
Analitička vaga	ALC210.4; Acculab, SAD
Autoklav	Sutjeska, Jugoslavija

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

Boca plina s dušikom	Messer Croatia Plin, Hrvatska
Brojač stanica	CellDrop, DeNovix, USA
Hladnjak	Gorenje, Slovenija
Laboratorijska tresilica	SHKE2000-1CE; ThermoScientific, SAD
Ledomat	AF-10; Scotsman, Italija
Magnetska miješalica	VMS-C4; VWR International, SAD
Mikroskop	CH20; Olympus, Japan
pH metar, termometar	HI 9125; Hanna Instruments, SAD
Pumpa	MCP V5.17; Ismatec, Švicarska
Sušionik	ST-06; Instrumentaria, Hrvatska
Tehnička vaga	ET-1211; Tehtnica, Slovenija
Termostat-inkubator	BTE-S; Termo-medicinski aparati Bodalec & Havočić, Hrvatska
Tresilica	Certomat RM; B. Braun, Njemačka Enivornmental shaker incubator ES 20/60; Bionsan
UV/Vis spektrofotometar	Cary 100; Agilent Technologies, SAD
Vodena kupelj	VK5ER; InkoLab, Hrvatska
Vortex mikser	VM-10; Witeg, Njemačka
Zamrzivač	ZFC340WBB; Zanussi, Italija

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Uzgoj inokuluma mikroalge

Inokulum mikroalge *Picochlorum* sp. uzgajan je u tekućoj hranjivoj podlozi (f/2 podlozi) čiji su sastav i priprema opisani u poglavlju 3.1.4.1. *Hranjiva podloga za uzgoj kulture mikroalge*. Inokulum je pripremljen postupnim povećanjem volumena kulture. Uzgoj je proveden na tresilici pri 200 rpm, temperaturi 25 °C uz osvjetljenje umjetnim izvorom svjetlosti uz režim svjetlosti tijekom 16 sati, a zatim tame kroz 8 sati.

### 3.2.2. Šaržni uzgoj mikroalge

Uzgoj mikroalge u barbotirajućoj koloni proveden je kao šaržni uzgoj uz sukcesivno dodavanje svježije hranjive podloge. Uzgoj je započet s 8 L svježije hranjive podloge naciepljene

s ukupno 2 L prethodno uzgojenog inokuluma mikroalge. Proveden je fototrofni uzgoj uz korištenje tople bijele svjetlosti te stalnu aeraciju zrakom.

Prva faza uzgoja provedena je s ciljem proizvodnje biomase. Svježa hranjiva podloga dodana je u obrocima po 2,5 L. Prva faza uzgoja trajala je 15 dana do ulaska kulture mikroalge u stacionarnu fazu. U drugoj fazi uzgoja mikroalge, 16. i 21. dana uzgoja dodana je otopina natrijevog bikarbonata koncentracije 1 g/L, dok je 23. dana uzgoja dodana otopina natrijevog bikarbonata koncentracije 0,5 g/L. Natrijev bikarbonat korišten je kako bi se potaklo nakupljanje lipida u stanicama mikroalge. Uzgoj mikroalge u barbotirajućoj koloni proveden je tijekom ukupno 26 dana.

Svakodnevno je određivana koncentracija nutrijenata, odnosno dušika i fosfora, te se prema dobivenim rezultatima izračunala potrebna koncentracija nutrijenata u prihrani. Otopine  $\text{NaNO}_3$  i  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , koje su korištene za prihranu, sterilizirane su u autoklavu pri 121 °C kroz 20 minuta. Kako bi se pratio rast kulture, optička gustoća, veličina stanica, pH vrijednost, temperatura i koncentracije nutrijenata, svaki dan je izuzeto oko 50 mL podloge. Tijekom uzgoja također su uzeti i veći volumeni podloge od 1000 mL kako bi se uz prethodno navedena mjerenja odredila i koncentracija lipida, proteina, pigmenta, ugljikohidrata, gravimetrijsko određivanje suhe tvari i analiza sastava masnih kiselina. Korekcija volumena provodila se dodatkom svježe demineralizirane vode prije izuzimanja uzoraka.

### 3.2.3. Uzgoj inokuluma plijesni

Plijesan *M. isabellina* kultivirana je na kosom PDA agaru, opisanom u poglavlju 3.1.4.2. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma plijesni, kroz sedam dana pri temperaturi 28 °C. U aseptičnim uvjetima, kultivirane spore plijesni su sastrugane i resuspendirane u otopini Tween 80, koncentracije 1 g/L. Potom je dobivena otopina spora filtrirana kroz sterilnu gazu u sterilnu kivetu te čuvana u hladnjaku pri -20°C. Broj spora određen je brojanjem pomoću brojača stanica CellDrop.

### 3.2.4. Submerzni uzgoj plijesni

Kako bi proveli optimizaciju dobivanja peleta odgovarajućih karakteristika, provedena je kultivacija plijesni uz različitu početnu koncentraciju spora u inokulumu. Koncentracije inokuluma iznosile su:  $10^4$  spora/100 mL,  $10^5$  spora/100 mL,  $10^6$  spora/100 mL i  $10^7$  spora/100

mL. Izračunati volumen prethodno pripremljenog inokuluma dodan je u Erlenmayer tikvicu volumena 500 mL koja je sadržavala steriliziranu i ohlađenu podlogu za uzgoj plijesni. Volumen hranjive podloge iznosio je 200 mL te je uzgoj proveden za svaku koncentraciju inokuluma u dvije paralele. Kultivacija je provedena kroz 72 sata na tresilici uz 180 rpm pri 20 °C. Dobiveni peleti su izdvojeni iz hranjive podloge pomoću cjedila, izvagani pomoću analitičke vage, mikroskopirani, uslikani pomoću mikroskopske kamere, izmjeren im je promjer, a zatim napravljeno gravimetrijsko određivanje mase.

### 3.2.5. Izdvajanje biomase

#### 3.2.5.1. *Izdvajanje biomase mikroalge pomoću centrifuge*

Nakon što su izuzeti veći volumeni kulture mikroalge (1000 mL) iz barbotirajuće kolone, biomasa mikroalge izdvojena je iz hranjive podloge primjenom centrifugiranja. Centrifugiranje većih volumena provedeno je koristeći Beckman J-21B (SAD) centrifugu. Kultura je centrifugirana u plastičnim kivetama volumena 500 mL pri 5000 rpm tijekom 15 minuta. Dobivena izdvojena biomasa mikroalge zatim je isprana pomoću destilirane vode kako bi se uklonila zaostala sol iz podloge. Naknadno centrifugiranje provedeno je pomoću Thermo Scientific SL 8R (SAD) centrifuge u plastičnim kivetama volumena 50 mL pri 8000 rpm tijekom 10 minuta.

#### 3.2.5.2. *Izdvajanje peleta plijesni*

Plijesan je uzgajana u Erlenmayer tikvicama volumena 500 mL. Dobiveni peleti plijesni izdvojeni su iz hranjive podloge filtracijom pomoću cjedila u nesterilnim uvjetima, a zatim su korišteni u procesu bioflokulacije.

#### 3.2.5.3. *Bioflokulacija*

Osim centrifugiranjem, biomasa mikroalge izdvojena je iz hranjive podloge pomoću bioflokulacije. Uzgojenoj kulturi mikroalge dodani su prethodno izdvojeni peleti plijesni. Bioflokulacija je provedena uz različiti/u:

- a) omjer suhe tvari plijesni

Bioflokulacija je provedena koristeći pelete plijesni uzgojene u 300 mL hranjive podloge, uz koncentraciju inokuluma  $10^7$  spora/100 mL pri uvjetima na tresilici 20 °C, 180 rpm kroz 48 sati. Volumen kulture mikroalge iznosio je 100 mL u svakoj tikvici, a masa peleta plijesni izračunata je pomoću jednadžbe 1 tako da u konačnici iznosi 1 g, 1,5 g ili 2 g suhe tvari plijesni. Dobiveni omjeri masa mikroalge: plijesan iznosili su 1:404, 1:592 i 1:814 (g/g). Ovim eksperimentom se ispitala mogućnost bioflokulacije između mikroalge *Picochlorum* sp. te plijesni *Mortierella isabellina* stoga je plijesan dodana u suvišku, a u eksperimentu opisanim pod c) optimiran je omjer masa. Tijekom bioflokulacije praćena je optička gustoća uz pH vrijednost 4 kroz 2,5 sata te je, potom, bioflokulacija sljedećih 1,5 sat provedena pri pH vrijednosti 2.

$$\text{masa vlažnog peleta (g)} = \frac{x}{\text{suha tvar (\%)}} \quad (1)$$

pri čemu je:

$x$ - željena suha tvar plijesni (1 g, 1,5 g, 2 g)

#### b) pH vrijednosti

Za optimizaciju pH vrijednosti, bioflokulacija je provedena pri pH vrijednosti 2, 2,5; 3 i 4. pH vrijednost je mjerena pomoću pH metra uz dodatak fosforne kisline ili natrijeve lužine za postizanje željene pH vrijednost kulture mikroalge. Korišteni su peleti plijesni uzgojeni u 300 mL hranjive podloge, uz koncentraciju inokuluma  $10^7$  spora/100 mL pri uvjetima na tresilici 20 °C, 180 rpm kroz 48 sati. Volumen kulture mikroalge iznosio je 100 mL u svakoj tikvici, a masa peleta plijesni izračunata je tako da u konačnici iznosi 1,5 g. Bioflokulacija je provedena kroz 3,5 h, na tresilici pri 20 °C i 180 rpm. Mjerena je optička gustoća uz pripremu odgovarajućih razrijeđenja.

#### c) omjer plijesni i mikroalge

Provedena je bioflokulacija s uzgojenim peletima plijesni početne koncentracije inokuluma  $10^7$  spora/100 mL uzgojenih u 300 mL hranjive podloge pri uvjetima 20 °C, 180 rpm kroz 48 sati. Bioflokulacija je provedena pri pH vrijednosti 2, 2,5 i 3 s različitim omjerima masa plijesan:alga (5:1, 15:1, 25:1, 35:1, 50:1 (g/g)) pri 20 °C i 180 rpm. Za provedbu eksperimenta korišteno je 100 mL kulture mikroalge u dvije paralele za svaki omjer. Promjena optičke gustoće tijekom bioflokulacije praćena je kroz 4 sata bioflokulacije.



#### d) temperaturu

Za provedbu optimizacije temperature bioflokulacije korišteni su peleti plijesni uzgojeni u 300 mL hranjive podloge pri uvjetima 20 °C, 180 rpm kroz 48-60 sati dok se nije postigao zadovoljavajuć izgled plijesni. Bioflokulacija je provedena pri pH vrijednosti 2 i 3, pri različitim temperaturama (20, 25, 30 °C) sa 100 mL kulture mikroalge u tri paralele uzimajući u obzir omjer mase mikroalga:plijesan 1:50 (g/g). Tijek procesa bioflokulacije praćen je mjerenjem promjene optičke gustoće kroz 3,5 sata.

### 3.2.6. Analitičke metode

#### 3.2.6.1. Brojanje stanica

Koncentracija stanica po mililitru određena je pomoću brojača stanica CellDrop (DeNovix, SAD). Za određivanje broja stanica korišten je program Brightfield. Kada je uređaj spreman za korištenje, mjerenje se započinje pipetiranjem 10 µL uzorka poznatog razrijeđenja. U programu je potrebno podesiti postavke za poznato razrijeđenje i fokusirati sliku kako bi uređaj prepoznao stanice. Pomoću brojača stanica CellDrop dobivena je vrijednost koncentracije stanica po mililitru i prosječni promjer stanica.

#### 3.2.6.2. Mjerenje optičke gustoće

Pomoću mjerenja optičke gustoće praćeno je povećanje koncentracije biomase mikroalge te uspješnost bioflokulacije. UV/VIS spektrofotometrom izmjerena je optička gustoća pri 540 nm uz korištenje semi-mikro plastičnih kiveta (Kartell, SAD) volumena 1,5 mL i 2 mL. Kako bi izmjerena optička gustoća bila u intervalu između 0 i 1, odnosno u području linearne ovisnosti apsorbancije o koncentraciji stanica, napravljena su odgovarajuća razrijeđenja korištenjem destilirane vode.

#### 3.2.6.3. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari

U uzorcima plijesni određena je suha tvar biomase tako da je na masnom papiru izvagan uzorak plijesni, a zatim je staklena posudica sa uzorkom osušena u sušioniku do konstantne mase pri 100 °C. Nakon hlađenja u eksikatoru, masni papir s osušenom biomasom plijesni je izvagan. Suha tvar biomase izračuna se prema jednadžbi 2.

Za uzorke kulture mikroalge, u prethodno osušenu i izvaganu plastičnu kivetu dodan je definirani volumen podloge. Kivete s uzorcima su centrifugirane pri 8000 rpm tijekom 10 minuta. Supernatant je dekantiran, a zaostali talog biomase resuspendiran u destiliranoj vodi kako bi se uklonili ostaci podloge i soli. Nakon ponovnog centrifugiranja, supernatant se također oddekantira, a zaostali talog biomase se osuši u sušioniku pri 100°C do konstantne mase. Poslije hlađenja u eksikatoru, kiveta s osušenim talogom je izvagana. Koncentracija suhe tvari biomase mikroalge određena je prema jednadžbi 3.

$$X = \frac{m_2}{m_1} \cdot 100 \% \quad (2)$$

pri čemu je:

X- suha tvar biomase (%)

m<sub>1</sub>- masa vlažne biomase plijesni (g)

m<sub>2</sub>- masa osušene biomase plijesni (g)

$$X = \frac{m_2 - m_1}{V_p} \quad (3)$$

pri čemu je:

X- koncentracija suhe tvari biomase (g/L)

m<sub>1</sub>- masa prazne osušene kivete (g)

m<sub>2</sub>- masa sa osušenom biomasom (g)

V<sub>p</sub>- volumen podloge uzet za analizu (L)

#### 3.2.6.4. *Određivanje koncentracije nitrita u podlozi*

Koncentracija nitrita u podlozi određena je koristeći kit (Merck, Njemačka) koji sadrži reagense NO<sub>3</sub>-1 i NO<sub>3</sub>-2. Tijekom ove metode dolazi do reakcije nitritnih iona u otopini sumporne i fosforne kiseline s 2,6-dimetilfenolom (DMP) pri čemu nastaje 4-nitro-2,6-dimetilfenol koji se detektira spektrofotometrijski. Nitriti se određuju u uzorcima supernatanta dobivenog nakon centrifugiranja uzorka kulture mikroalge. U suhu kivetu volumena 15 mL otpipetirano je 2 mL reagensa NO<sub>3</sub>-1, 250 μL uzorka (5 - 25 °C) i 250 μL reagensa NO<sub>3</sub>-2. Sadržaj je vorteksiran 30 sekundi. Miješanjem dolazi do kemijske reakcije što se primjećuje po promjeni boje i oslobađanju topline. Nakon 10 minuta izmjeri se apsorbancija pri valnoj duljini

od 357 nm pomoću kvarcne kivete (Agilent Technologies, SAD). Za slijepu probu dodana je demineralizirana voda umjesto uzorka.

Kako bi se odredila koncentracija nitrita, izrađen je baždarni dijagram. Standardi su pripremljeni razrijeđivanjem otopine natrijevog nitrita koncentracije 1 g/L s demineraliziranom vodom kako bi se dobila koncentracija nitrita između 0 i 25 mg/L. Pripremljenim standardima izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 357 nm. Baždarni dijagram je prikazan u prilogu 1.

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

Koncentracija fosfata u podlozi određena je koristeći kit (Merck, Njemačka) koji sadrži reagens PO<sub>4</sub>-1 i PO<sub>4</sub>-2. Tijekom ove metode dolazi do reakcije ortofosfatnih iona u otopini sumporne kiseline s molibdenovim ionima pri čemu nastaje fosfomolibdenska kiselina. Askorbinska kiselina reducira nastali produkt u fosfomolibden plavo (PMB) koji daje plavo obojenje. Fosfati su određeni u uzorcima supernatanta dobivenog nakon centrifugiranja uzorka kulture mikroalge. U suhu kivetu volumena 15 mL otpipetira se 5 mL uzorka (15 – 35 °C), doda 5 kapi reagensa PO<sub>4</sub>-1 i jedna mikrožličica reagensa PO<sub>4</sub>-2. Sadržaj se zatim vorteksira. Nakon 5 minuta izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 690 nm pomoću kvarcne kivete (Agilent Technologies, SAD). U slijepoj probi se doda demineralizirana voda umjesto uzorka.

Kako bi se mogla odrediti koncentracija fosfata, izrađen je baždarni dijagram. Standardi su pripremljeni razrijeđivanjem otopine natrijevog dihidrogenfosfata monohidrata koncentracije 1 g/L s demineraliziranom vodom kako bi se dobila koncentracija fosfata između 0,05 i 3,5 mg/L. Pripremljenim standardima izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 357 nm. Baždarni dijagram je prikazan u prilogu 2.

#### *3.2.6.6. Određivanje udjela proteina u biomasi*

Udio proteina u biomasi mikroalge određen je metodom po Lowry-ju. Tijekom Biuret reakcije dolazi do reagiranja Cu<sup>2+</sup> iona i peptidne veze u lužnatom mediju pri čemu se razvija tamnoplavo obojenje zbog redukcije Cu<sup>2+</sup> iona do Cu<sup>+</sup> iona. U nastalu otopinu se zatim dodaje Folin-Ciocalteu reagens (otopina fosfovolframat-fosfomolibdata) pri čemu smjesa anorganskih soli reagira s pobočnim lancem tirozina i triptofana što rezultira plavim obojenjem.

U plastičnu epruvetu s 0,5 mL destilirane vode dodaje se volumen podloge koji sadrži 100 µg suhe tvari biomase mikroalgi. Zatim se u resuspendirane stanice dodaje 0,5 mL otopine 1M NaOH. Epruveta je začepljena te stavljena u vodenu kupelj pri 85 °C kroz 5 minuta. Poslije hlađenja sadržaja u epruveti na sobnu temperaturu, sadržaju se dodaje 2,5 mL otopine C (tablica 6). Nakon 10 minuta se naglo doda 0,5 mL otopine D (tablica 6) uz vorteksiranje. Slijepa proba sadržava destiliranu vodu umjesto uzorka. Sadržaj epruveta ostavljen je u tami kroz 40 minuta, na sobnoj temperaturi, a potom se uzorku izmjeri apsorbanacija pri valnoj duljini 550 nm. Pomoću baždarnog dijagrama se izračuna koncentracija proteina u uzorku (prilog 3). Standardi za izradu baždarnog pravca pripremljeni su razrjeđivanjem 1 g/L otopine albumina goveđeg seruma s destiliranom vodom kako bi koncentracije iznosile od 0 do 100 mg/L. Masa proteina je izračunata pomoću jednadžbe 4, udio proteina u biomasi izračunat je pomoću jednadžbe 5.

$$m_p = \gamma_p \cdot V_k \quad (4)$$

$$w_p = \frac{m_p}{m_x} \cdot 100 \% \quad (5)$$

pri čemu je:

$m_p$  – masa proteina (mg)

$\gamma_p$  – koncentracija proteina (mg/L)

$V_k$  – volumen reakcijske smjese (mL)

$w_p$  – udio proteina u biomasi (%)

$m_x$  – masa biomase dodana u reakcijsku smjesu (mg)

**Tablica 6.** Sastav otopina

Otopina	Sastav otopine
Otopina A	5 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Otopina B	0,5 % CuSO <sub>4</sub> u 1 % K, Na-tartaratu
Otopina C	Pomiješa se otopina A i B u omjeru 50:1
Otopina D	Razrijeđeni Folin-Ciocalteu reagens s destiliranom vodom u omjeru 1:1

### 3.2.6.7. Određivanje udjela lipida u biomasi

Udio lipida u biomasi određen je pomoću vanilin metode, a izračunat preko jednadžbe 6. Prije analize potrebno je pripremiti vanilin reagens. 0,6 g vanilina otopljen je u 10 mL apsolutnog etanola i 90 mL destilirane vode, uz kontinuirano miješanje. U nastalu otopinu dodano je 400 mL koncentrirane fosforne kiseline (85 %). Tako pripremljeni reagens potrebno je čuvati u tami do primjene.

Analiza je provedena tako da se 2-4 mL kulture odcentrifugiralo, supernatant je dekantiran, a talog je resuspendiran u 100  $\mu$ L destilirane vode. Resuspendiranom talogu zatim je dodano 2 mL 98 % otopine  $H_2SO_4$ . Epruvete s uzorcima stavljene su u vodenu kupelj pri 100 °C kroz 10 minuta, a potom ohlađene 5 minuta na ledu. Ohlađenoj otopini se dodano je 5 mL vanilin reagensa te ostavi stajati kroz 15 minuta na temperaturi 37 °C. Nakon 15 minuta izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini 530 nm. U slijepoj probi je dodana demineralizirana voda umjesto uzorka.

Pomoću baždarnog dijagrama je izračunata koncentracija lipida u uzorku (prilog 4). Za pripremu baždarnog dijagrama je 10 mg ulja uljane repice otopljeno u 10 mL kloroforma koncentracije 1 mg/mL. Pomoću dobivene otopine pripremljene su otopine koncentracije 10 do 150  $\mu$ g. Uzorci su zatim inkubirani kroz 10 minuta pri 90 °C kako bi ispario kloroform. Uzorku je dodano 100  $\mu$ L destilirane vode i 2 mL koncentrirane sumporne kiseline te su uzorci zagrijani kroz 15 minuta na 90 °C. Nakon hlađenja u ledu kroz 5 min, dodano je 5 mL fosfovanilin reagensa te nakon 10 min pri 37 °C se razvila boja, a potom je izmjerena apsorbancija na 530 nm.

$$w_l = \frac{m_l}{m_x} \cdot 100 \% \quad (6)$$

pri čemu je:

$m_l$  – masa lipida (mg)

$m_x$  – masa biomase (mg)

$w_l$  – udio lipida u biomasi (%)

### 3.2.6.8. *Određivanje sastava pigmenata u biomasi*

Kako bi se odredili pigmenti u biomasi, potrebno ih je pomoću 90 % otopine acetona ekstrahirati iz vlažne biomase. Kivete u kojima se provodi analiza potrebno je zaštititi aluminijskom folijom radi sprječavanja raspada fotosenzitivnih pigmenata uslijed izlaganja svjetlosti. 14 mL kulture mikroalge centrifugirano je pri 8000 rpm tijekom 10 minuta. Supernatant je dekantiran, a talog resuspendiran u destiliranoj vodi te ponovno centrifugiran kako bi se uklonili ostaci podloge i soli. Dobivenom čistom talogu biomase dodano je 2 grama staklenih kuglica (B. Braun Biotech International GmbH, Njemačka) i 2 mL 90 % (v/v) acetona. Kivetu je potrebno vorteksirati nekoliko puta po 30 sekundi s hlađenjem na ledu između svakog vorteksiranja. Zatim je provedeno centrifugiranje kroz 10 minuta pri 5000 rpm. Supernatant je izdvojen u čistu kivetu obloženu aluminijskom folijom, a preostali talog biomase je ponovno podvrgnut ekstrakciji do potpunog obezbojenja biomase. Nakon svakog postupka ekstrakcije supernatant je izdvojen u kivetu koja sadrži supernatant prethodne ekstrakcije.

Dobivenom supernatantu se spektrofotometrijski određuje koncentracija klorofila a, b i c pri valnim duljinama 630 nm, 647 nm, 664 nm i 750 nm. Koncentracija klorofila a, b i c izračunata je prema izrazima 7, 8 i 9:

$$\text{Klorofil } a = \frac{(11,85 \cdot (\text{OD}_{664} - \text{OD}_{750}) - 1,54 \cdot (\text{OD}_{647} - \text{OD}_{750}) - 0,08 \cdot (\text{OD}_{630} - \text{OD}_{750})) \cdot V_e}{L \cdot V_f} \quad (7)$$

$$\text{Klorofil } b = \frac{(-5,43 \cdot (\text{OD}_{664} - \text{OD}_{750}) + 21,03 \cdot (\text{OD}_{647} - \text{OD}_{750}) - 2,66 \cdot (\text{OD}_{630} - \text{OD}_{750})) \cdot V_e}{L \cdot V_f} \quad (8)$$

$$\text{Klorofil } c = \frac{(-1,67 \cdot (\text{OD}_{664} - \text{OD}_{750}) + 7,6 \cdot (\text{OD}_{647} - \text{OD}_{750}) + 24,52 \cdot (\text{OD}_{630} - \text{OD}_{750})) \cdot V_e}{L \cdot V_f} \quad (9)$$

pri čemu je:

L – duljina puta svjetlosti kroz uzorak (cm)

$V_e$  – ukupan volumen ekstrakta (mL)

$V_f$  – volumen stanične kulture koji je centrifugiran (L)

### 3.2.6.9. *Određivanje ugljikohidrata u biomasi*

Određivanje ugljikohidrata provedeno je pomoću NREL metode (National Renewable Energy Laboratory, USA). U staklene vijalice odvažuje se 10-25 mg osušene i usitnjene biomase mikroalgi te doda 250  $\mu$ L 72 % sumporne kiseline. Sadržaj u vijalici se lagano promješa kako

bi se osigurao kontakt biomase i kiseline. Vijalice su zatim inkubirane sat vremena pri 30 °C uz povremeno miješanje. Nakon inkubacije se doda 7 mL destilirane vode u vijalice te autoklavira 1 sat pri 121 °C zatvorene gumenim čepom koji je dodatno učvešćen aluminijskim poklopcem. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, izuzet je alikvot od 3 mL kojemu je podešena pH vrijednost na 5 dodatkom kalcij klorida. Uzorci se zatim profiltriraju kroz filter pora velične 0,22 µm u vijalicu za UPLC analizu. Koncentracija ugljikohidrata određena je UPLC analizom preko baždarnih dijagrama, a udio monosaharida se izračuna prema jednadžbi 10.

$$w_{UH} = \frac{m_{UH}}{m_x} \cdot 100 \% \quad (10)$$

pri čemu je:

$m_{UH}$  – masa ugljikohidrata (mg)

$m_x$  – masa biomase (mg)

$w_{UH}$  – udio ugljikohidrata u biomasi (%)

#### 3.2.6.10. Određivanje sastava masnih kiselina u biomasi

Tranesterifikacija masnih kiselina provedena je prema NREL protokolu (National Renewable Energy Laboratory, USA) za određivanje ukupnih lipida. Za provođenje prema navedenom protokolu potrebno je pripremiti otopine standarda. Standard metil tridekanoata (C13:0ME), koncentracije 10 mg/mL, pripremljen je otapanjem 100 mg metil tridekanoata u 10 mL heksana. Drugi standard priređen je vaganjem 10 mg pentadekana koji je otopljen u 1 mL heksana. Dobiveni standard potom je razrijeđen s heksanom u omjeru 1:10 (100 µL pripremljenog standarda i 900 µL heksana). Otopine standarda se čuvaju u zamrzivaču pri -20 °C u staklenim vijalama volumena 1,5 mL.

U staklene vijale se izvaže 5-10 mg osušene i usitnjene biomase mikroalge. Biomasi se doda 20 µL standarda metil tridekanoata, 200 µL otopine kloroform:metanol (2:1, v/v) i 300 µL 0,6 M otopine HCl u metanolu. Staklene vijale se začepi, vorteksiraju, a zatim inkubiraju u vodenoj kupelji kroz sat vremena pri 85 °C. Ohlađenim uzorcima se zatim dodaje 1 mL heksana, uzorak se vorteksira te ostavi stajati na sobnoj temperaturi kroz sat vremena kako bi se faze razdijelile. Gornja, heksanska faza, sadrži estere masnih kiselina te se koristi za daljnju

analizu. U vijalicu se odvoji 400  $\mu\text{L}$  gornje faze i 10  $\mu\text{L}$  standarda pentadekana. Uzorci su analizirani plinskim kromatografom opremljenim masenim detektorom (FID). 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:

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

$$w_{\text{Ci/s.tv.}} = \frac{m_{\text{FAME}_{\text{C13 norm}}}}{m_{\text{s.tv.}}} \cdot 100 \quad (\%) \quad (12)$$

pri čemu je:

$m_{\text{FAME}_{\text{C13 norm}}}$  – masa standarda C13:0ME (mg)

$\gamma_{\text{Ci}}$  – koncentracija metilnog estera masne kiseline (mg/L)

$\gamma_{\text{C13}}$  – koncentracija standarda metil tridekanoata (C13) (mg/L)

$m_{\text{C13}}$  – masa dodanog standarda metil tridekanoata (C13) (mg)

$w_{\text{Ci/s.tv.}}$  – maseni udio metilnih estera masnih kiselina u suhoj tvari biomase (%)

$m_{\text{s. tv.}}$  – masa suhe tvari biomase (g)

### 3.2.6.11. Određivanje pokazatelja uspješnosti procesa

Parametri uspješnosti bioprocesa određeni su prema jednadžbama (13) i (14).

$$P_r = \frac{X}{t_{\text{uzgoj}}} \quad (13)$$

pri čemu je:

$P_r$ - produktivnost sinteze biomase (g/L dan)

$X$ - koncentracija biomase (g/L)

$t_{\text{uzgoj}}$  – vrijeme uzgoja (dan)

$$P_r = \frac{w_t}{t_{\text{uzgoj}}} \quad (14)$$

pri čemu je:



Pr- produktivnost sinteze lipida (g/L dan)

$w_1$ - koncentracija lipida (g/L)

$t_{uzgoj}$  – vrijeme uzgoja (dan)

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je optimizacija uvjeta bioflokulacije te je istražena uspješnost bioflokulacije kao alternativne tehnike izdvajanja stanica mikroalgi iz hranjive podloge. Zbog male veličine i koncentracije stanica mikroalge (3-30  $\mu\text{m}$ ), izdvajanje stanica iz hranjive podloge predstavlja važan čimbenik u troškovima proizvodnje biomase mikroalge ili spojeva pomoću mikroalge. U proizvodnji biodizela izdvajanje stanica čini 20-30 % ukupnih troškova proizvodnje. Do sada su istražene mogućnosti izdvajanja stanica mikroalgi pomoću centrifugiranja, flokulacije i sedimentacije, no svaki od tih procesa ima nedostatke koji utječu na ekonomičnost procesa. Prednost bioflokulacije nad kemijskim sredstvima je u biorazgradivosti, visokoj učinkovitosti, netoksičnosti i ekološkoj prihvatljivosti tehnike izdvajanja stanica (Surendhiran i Vijay, 2014).

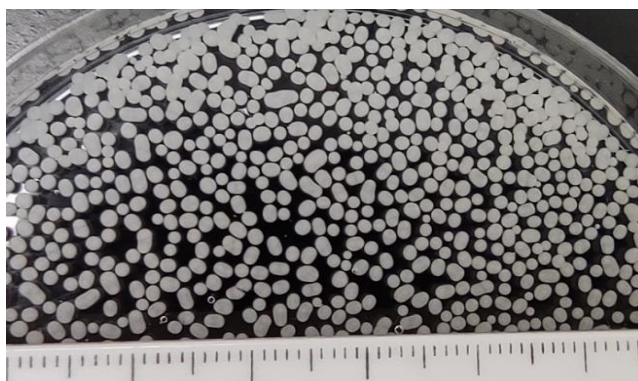
Plijesan *Mortierella isabellina* istražena je zbog svoje mogućnosti nakupljanja velikog udjela lipida (do 80 % suhe tvari plijesni) koji se mogu iskoristiti u proizvodnji biodizela, a u ovome radu istražuje se mogućnost korištenja ove plijesni u procesu bioflokulacije morske mikroalge *Picochlorum* sp. Prije provedbe bioflokulacije istražena je optimalna koncentracija inokuluma plijesni koja je zatim upotrebljena za istraživanje optimalnih uvjeta bioflokulacije s obzirom na različit omjer suhe tvari plijesni, pH vrijednost, omjer plijesni i mikroalge te temperature.

Do sada nije istražena mogućnost izdvajanja stanica *Picochlorum* sp. pomoću peleta plijesni. Osim sa upotrebom peleta plijesni, bioflokulacija se može provesti i kokultivacijom mikroalge i plijesni pri čemu su zabilježene inhibicije rasta plijesni zbog visoke pH vrijednosti kulture mikroalge, potrebe za izvorom ugljika te duljem vremenu kultivacije. Iz tog razloga u ovom istraživanju ispitana je samo bioflokulacija mikroalge pomoću peleta plijesni.

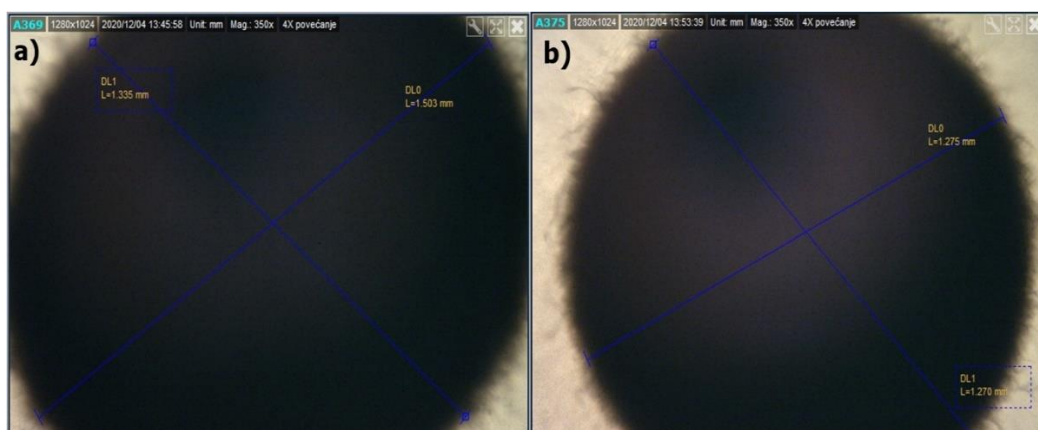
Osim same bioflokulacije, ispitan je tijek rasta biomase mikroalge tijekom šaržnog uzgoja uz sukcesivno povećanje volumena kulture i dodatak nutrijenata tijekom 26 dana uzgoja kao i sastav biomase, odnosno udjel lipida, proteina, pigmenata i ugljikohidrata. Tijekom uzgoja u nekoliko prihrana dodan je i natrijev bikarbonat s ciljem poticanja sinteze i nakupljanja lipida u stanicama mikroalgi.

#### 4.1. OPTIMIRANJE KONCENTRACIJE INOKULUMA PLIJESNI

Nakon provedenog uzgoja inokuluma, prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.3. *Uzgoj inokuluma plijesni*, započet je submerzni uzgoj plijesni. Prije same provedbe bioflokulacije potrebno je odrediti koncentraciju inokuluma plijesni tj. spora uz koju će se dobiti peleti plijesni zadovoljavajuće veličine. Provedba eksperimenta opisana je u poglavlju 3.2.4. *Submerzni uzgoj plijesni*. Eksperiment je proveden s koncentracijama inokuluma:  $10^4$  spora/100 mL,  $10^5$  spora/100 mL,  $10^6$  spora/100 mL i  $10^7$  spora/100 mL uz kultivaciju tijekom 72 sata.



**Slika 4.** Peleti plijesni *Mortierella isabellina* (koncentracija inokuluma  $10^7$  spora/100 mL) (vlastita fotografija)



**Slika 5.** Mjerenje promjera (koncentracija inokuluma  $10^7$  spora/100 mL) a) 1. paralela, b) 2. paralela (vlastita fotografija)

Promjer peleta mjereno je pomoću mikroskopske kamere (DinoLite Captur) uz povećanje 4 puta (slika 5). Za koncentraciju inokuluma  $10^4$  spora/100 mL, zbog promjera većeg od slike kamere, nije izračunat promjer dobivenih peleta. Izuzev koncentracije inokuluma  $10^4$

spora/100 mL, povećanjem koncentracije spora u inokulumu povećavao se promjer dobivenih peleta (tablica 7). Promjer je rastao od 0,7889 mm dobivenih kod koncentracije o  $10^5$  spora/100 mL do 1,3155 mm zabilježenih kod konc,  $10^7$  spora/100mL. Na slici 4 prikazani su peleti dobiveni korištenjem koncentracije inokuluma  $10^7$  spora/100 mL koji su izabrani kao optimalni s obzirom na veličinu, ujednačenost veličine peleta i broj dobivenih peleta. U radu Gao i suradnika (2014), uz korištenu koncentraciju inokuluma  $1-2 \cdot 10^6$  spora/250 mL kultivacijom kroz 48 sati pri 160 rpm, dobiveni su peleti većeg promjera u usporedbi s provedenim eksperimentom, oko 2 milimetra. Moguće objašnjenje je u tome što na formiranje peleta, osim koncentracije spora, utječe i način kultivacije, a jedan od načina je da se povećanjem broja okretaja tresilice formiraju kompaktniji peleti manjeg promjera (Fujita i sur., 1993, Zhou i sur., 2013).

**Tablica 7.** Promjer peleta plijesni *Mortierella isabellina*

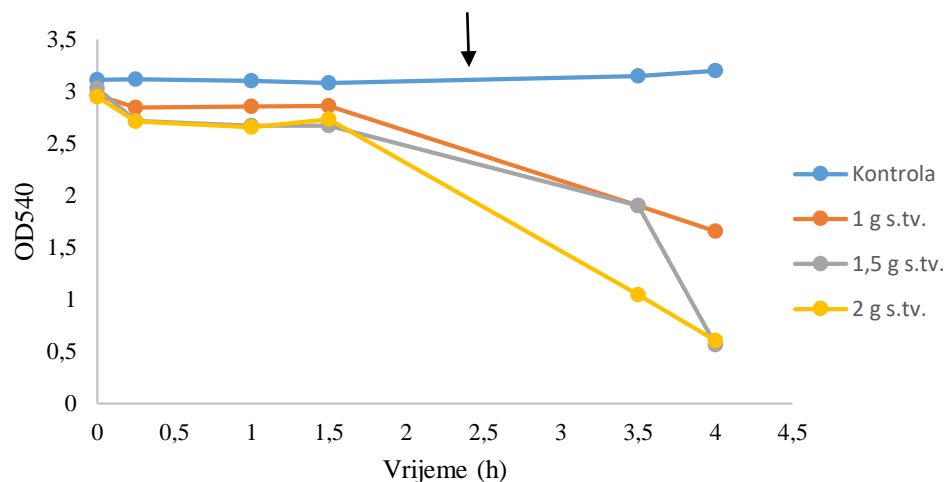
Koncentracija inokuluma	$10^5$ spora/100 mL	$10^6$ spora/100 mL	$10^7$ spora/100 mL
Aritmetička sredina (mm) $\pm$ SD*	0,7889 ( $\pm$ 0,1121)	1,2845 ( $\pm$ 0,0085)	1,3155 ( $\pm$ 0,0635)

\*SD- standardna devijacija

## 4.2. OPTIMIZACIJA BIOFLOKULACIJE

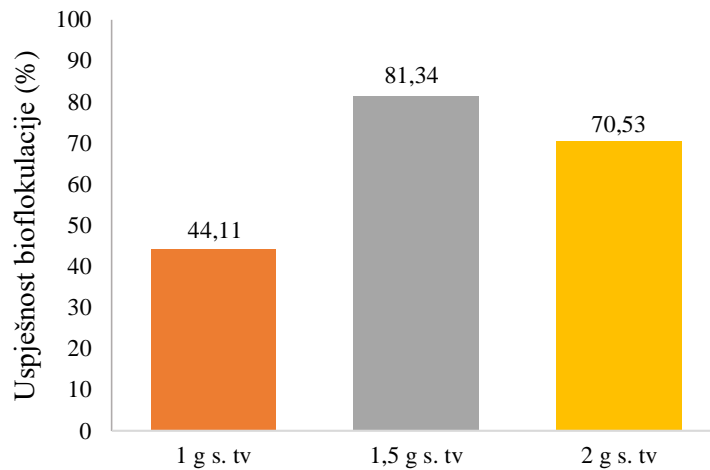
### 4.2.1. Utjecaj mase plijesni na proces bioflokulacije

Optimizacija bioflokulacije provedena je uz različite vrijednosti suhe tvari plijesni. Uzorcima plijesni gravimetrijski je određena koncentracija suhe tvari prema jednadžbi 2 te ona iznosi 5,635 %. Pomoću jednadžbe 3 određeno je, za tri paralele uzoraka mikroalge, koncentracija suhe tvari biomase koja je iznosila 0,478 mg/mL, 0,458 mg/mL i 0,466 mg/mL. Bioflokulacija je provedena dodatkom različite mase plijesni, tako da u konačnici ona iznosi 1 g, 1,5 g i 2 g suhe tvari plijesni, na 100 mL kulture mikroalge koncentracije 0,4626 mg/mL, odnosno 46,26 mg biomase mikroalgi, tijekom 4 sata u dvije paralele. Dobiveni omjeri masa mikroalge: plijesan iznosili su 1:404, 1:592 i 1:814 (g/g).



**Slika 6.** Učinak razičite mase plijesni na samnjenje OD<sub>540</sub> (strelicom je označena promjena pH vrijednosti)

Bioflokulacija je provedena pri pH vrijednosti  $4 \pm 0,1$  tijekom prvih 2,5 sata. Budući da daljnjim protjecom vremena nije dolazilo do daljnjeg povezivanja stanica mikroalgi na pelete plijesni, što je bilo vidljivo iz rezultata mjerenja optičke gustoće kulture koja se nije značajno smanjivala, promjenjena je pH vrijednost kulture (Luo i sur., 2019). Zakiseljavanjem kulture na pH 2 optička gustoća kulture krenula je opadati kao što je vidljivo na slici 6. Najniža vrijednost optičke gustoće po isteku vremena bioflokulacije od četiri sata iznosila je 0,5652 i bila je zabilježena kod bioflokulacije sa 1,5 g suhe tvari plijesni. Uslijed smanjenja optičke gustoće, upotrebom 1,5 g suhe tvari plijesni između 3,5. i 4. sata bioflokulacije, dobivena je veća uspješnost bioflokulacije nego upotrebom 2 g suhe tvari plijesni (70,53 %). Najveća uspješnost bioflokulacije dobivena je upotrebom 1,5 g suhe tvari plijesni (81,34 %) pri čemu se početna masa mikroalge smanjila s početnih 46,26 mg na 3,83 mg. Najmanja uspješnost bioflokulacije od 44,11 % zabilježena je kod bioflokulacije s 1 g suhe tvari plijesni (44,11 %) (slika 7). Iako su prema grafu na slici 6 dobivene optičke gustoće kod bioflokulacije s 1,5 i 2 g suhe tvari plijesni slične, zbog najveće dobivene uspješnosti upotrebom 1,5 g suhe tvari plijesni te zbog značajno manje biomase plijesni potrebne kako bi se u konačnici postigla slična vrijednost optičke gustoće, za daljnje eksperimente odabrana je niža vrijednost (1,5 g suhe tvari plijesni).

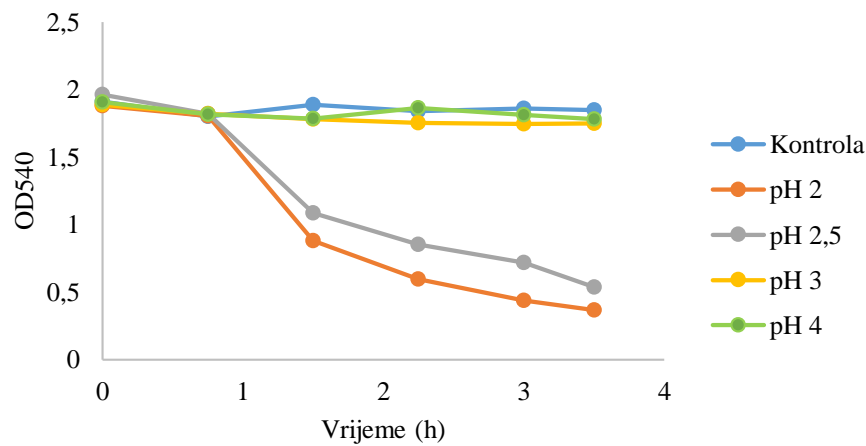


**Slika 7.** Uspješnost bioflokulacije dobivena korištenjem različite mase plijesni

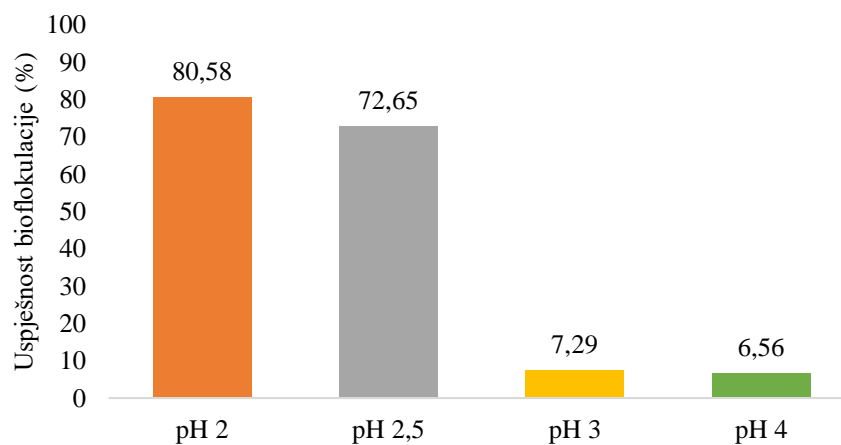
#### 4.2.2. Utjecaj pH vrijednosti na proces bioflokulacije

Tijekom eksperimenta s različitim vrijednostima suhe tvari plijesni uočeno je kako promjena pH vrijednosti utječe na uspješnost bioflokulacije. Proveden je eksperiment pri pH vrijednostima 2, 2,5; 3 i 4. Za bioflokulaciju su upotrebljeni peleti promjera 1,1776 mm. S obzirom na prethodno dobivene rezultate za bioflokulaciju je korištena masa peleta od 1,5 g suhe tvari plijesni. Bioflokulacija je provedena u dvije paralele za svaku pH vrijednost koristeći 100 mL kulture mikrolage koncentracije  $7,43 \cdot 10^7$  stanica/mL. Kao što je vidljivo na grafovima na slikama 8 i 9, najveći pad optičke gustoće, odnosno najveća uspješnost bioflokulacije od 80,58 % zabilježena je su kod pH vrijednosti 2. Nešto manja uspješnost od 72,65 % zabilježena je kod pH vrijednosti 2,5. Kod ostalih ispitivanih pH vrijednosti zabilježeno je neznatno smanjenje optičke gustoće, a dobivena uspješnost bioflokulacije iznosila je 7,29 % (pH 3) i 6,56 % (pH 4). Osim kod navedenih pH vrijednosti, bioflokulacija je provedena i pri pH vrijednostima 8, 9 i 10 pri kojima nije došlo do bioflokulacije odnosno smanjenja optičke gustoće (rezultati nisu prikazani). U radu Luo i suradnika (2019) bioflokulacija između mikroalge *Chlorella* sp. i plijesni *Pleurotus ostreatus* provedena je pri pH vrijednostima između 3 i 6 te je dobivena najbolja uspješnost bioflokulacije pri najnižoj ispitivanoj pH vrijednosti 3. pH vrijednost utječe na površinska svojstva stanica kao što su raspodjela naboja i izlučivanje ekstracelularnih spojeva koji mogu utjecati na učinkovitost flokulacije. Površina peleta plijesni je pozitivno nabijena, a površina većine mikroalgi negativno nabijena zbog prisustva karboksilnih, amino i fosfatnih skupina čime je omogućeno njihovo povezivanje. Zeta potencijal teži neutralnom u uvjetima nižih pH vrijednosti što dovodi do smanjenja

elektrostatskog odbijanja i prevladavanja Van der Walsovih sila. Također niže pH vrijednosti su pogodnije za rast plijesni te ubrzavaju njihovu agregaciju (Leng i sur., 2021).

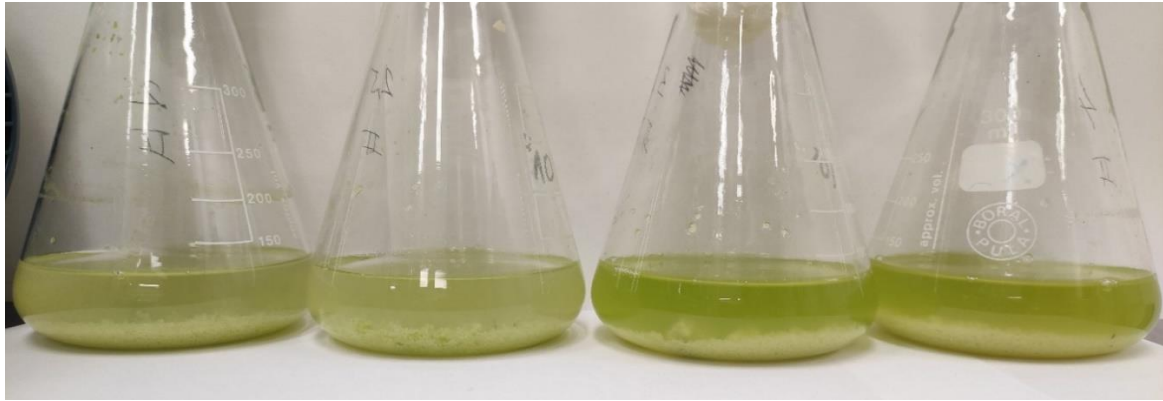


**Slika 8.** Učinak pH vrijednosti na smanjenje OD<sub>540</sub>

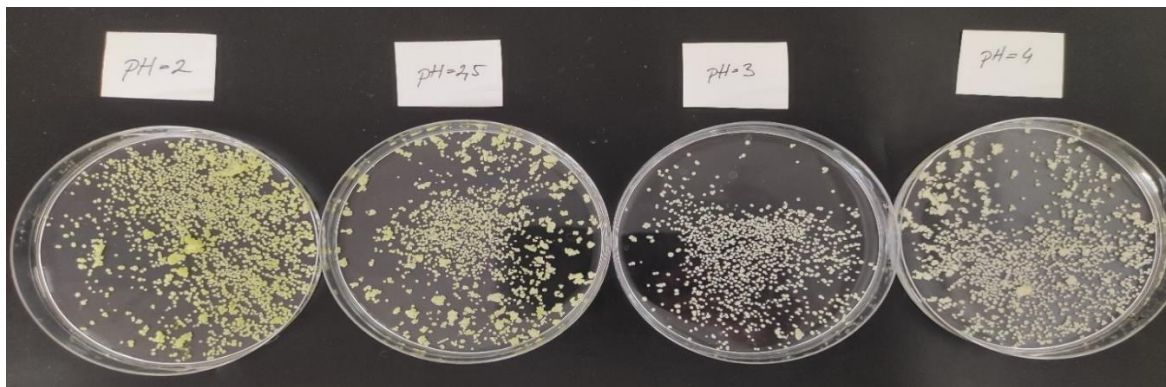


**Slika 9.** Uspješnost bioflokulacije

Na slici 10, vidljivo je kako je boja supernatanta, odnosno kulture iznad istaloženih peleta plijesni najsvjetlija kod pH vrijednosti 2, što također pokazuje kako je bioflokulacija najuspješnija pri navedenoj pH vrijednosti, kao i prema boji peleta plijesni nakon bioflokulacije (slika 11). Prema boji kulture mikroalge iznad peleta plijesni i prema boji peleta plijesni sa vezanim stanicama mikroalge, također se može zaključiti kako je pri pH vrijednosti 2 bioflokulacija najuspješnija zbog najsvjetlije boje otopine kulture mikroalge (slika 10) te prema boji peleta nakon bioflokulacije zbog vezanih stanica mikroalge na površinu peleta plijesni (slika 11).



**Slika 10.** Bioflokulacija: pH 2, pH 2,5, pH 3, pH 4 (vlastita fotografija)

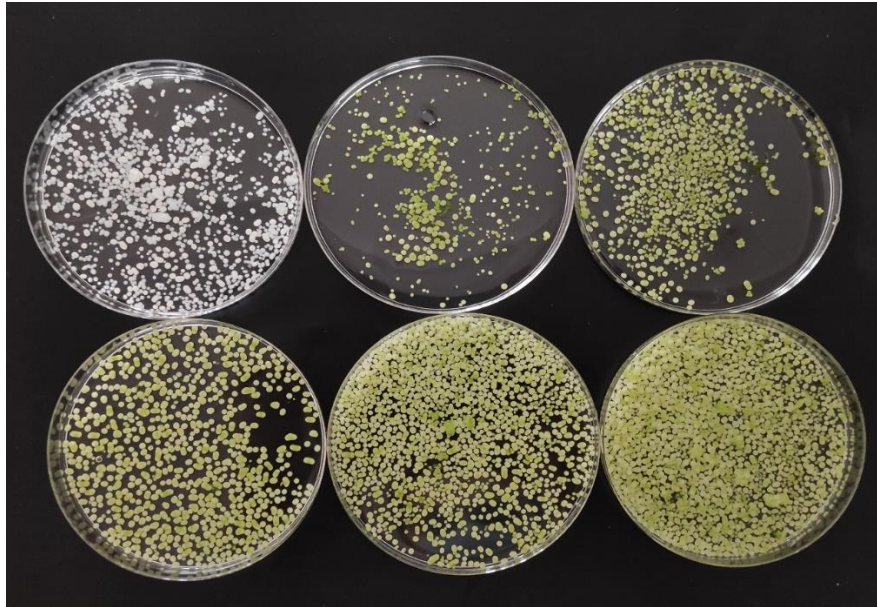


**Slika 11.** Peleti plijesni i stanice mikroalge nakon bioflokulacije: pH 2, pH 2,5, pH 3, pH 4 (vlastita fotografija)

#### 4.2.3. Utjecaj omjera mase plijesni i mase mikroalge na proces bioflokulacije

U prethodnom eksperimentu pH vrijednost 2 ustanovljena je kao najpogodnija za provedbu bioflokulacije, no zbog utjecaja niske pH vrijednost na procesnu opremu u industrijskom pogonu i korozije opreme tijekom vremena, ekperiment s različitim omjerom plijesni i mikroalge proveden je i pri višim pH vrijednostima 2,5 i 3. Za provedbu bioflokulacije korišteni su različiti omjeri mase mikroalge:plijesan (1:5, 1:15, 1:25, 1:35, 1:50 (g/g)). Volumen mikroalge bio je konstantan te je iznosio 100 mL što odgovara masi mikroalge 7,45 mg. Na slici 12 prikazani su peleti prije bioflokulacije (bijele boje) te peleti nakon provedene bioflokulacije (zelena boja), a kultura mikroalge nakon bioflokulacije prikazana je na slici 13. U svakoj posudici se nalazi točna masa plijesni korištena kod svake bioflokulacije koja se povećava se s povećanjem omjera. Na svim ispitivanim pH vrijednostima, najveća razlika između konačne i početne vrijednosti optičke gustoće je postignuta kod omjera mikroalge i plijesni 1:50 (g/g) (slika 14).

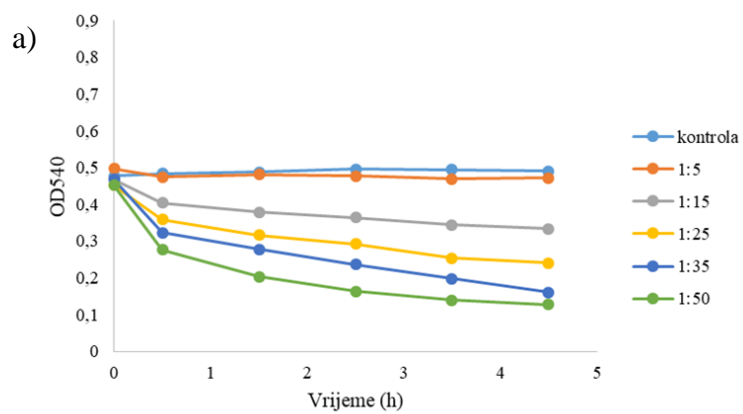


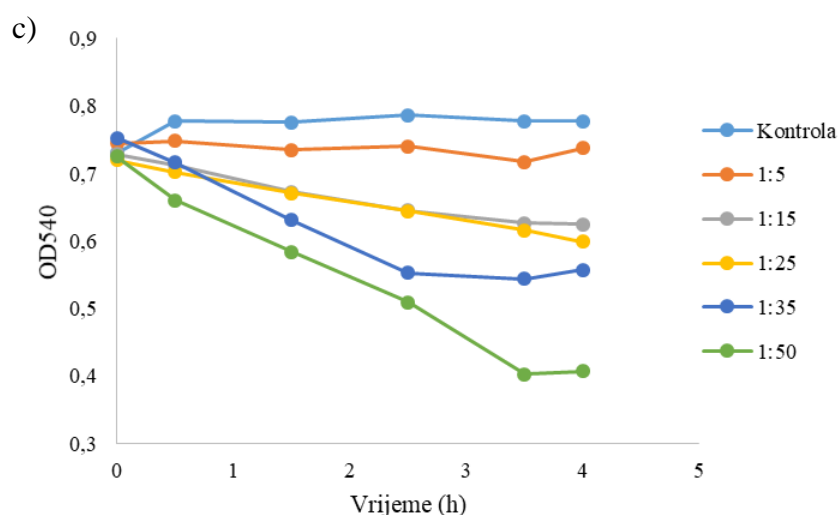
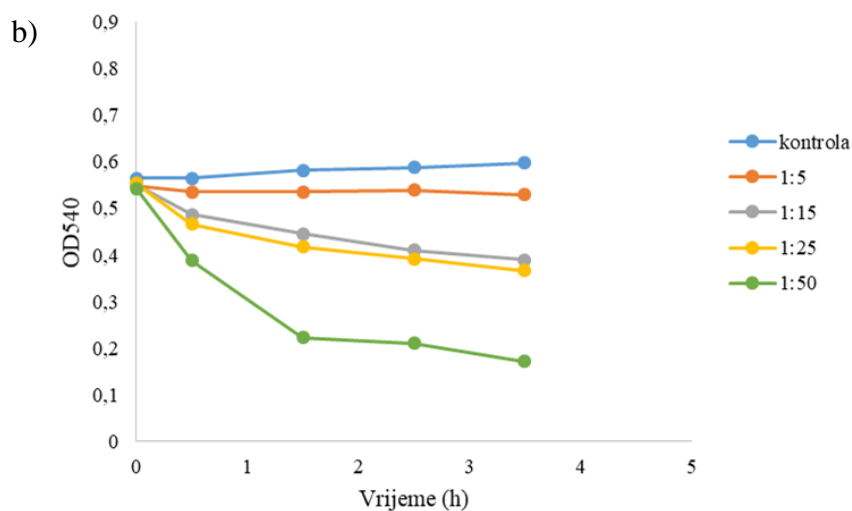


**Slika 12.** Peleti nakon bioflokulacije: plijesan, s lijeva na desno: peleti plijesni, 5:1, 15:1, 25:1, 35:1, 50:1 (g/g) ; pH vrijednost 3 (vlastita fotografija)



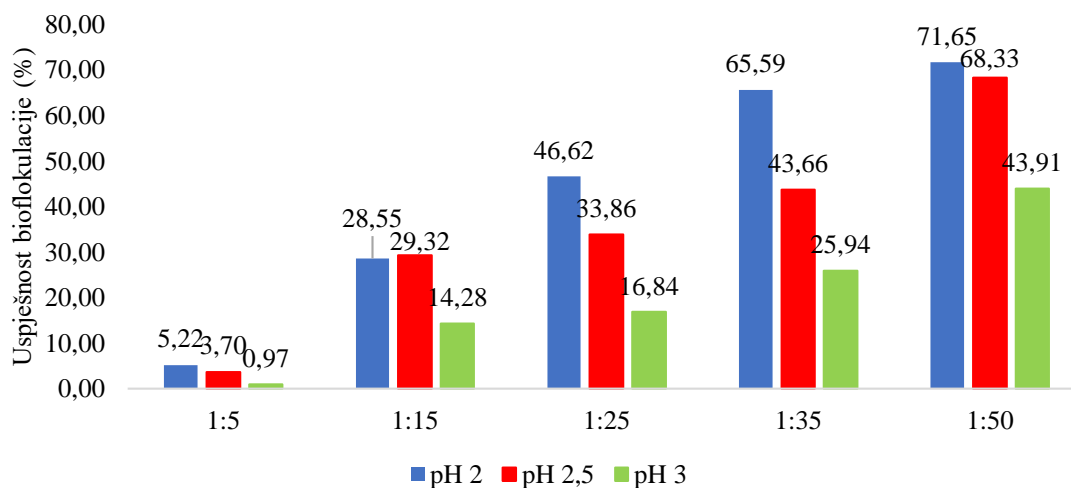
**Slika 13.** Kultura mikroalge nakon bioflokulacije (pH 2,5) (vlastita fotografija)





**Slika 14.** Ovisnost optičke gustoće o vremenu: a) pH 2, b) pH 2,5, c) pH 3

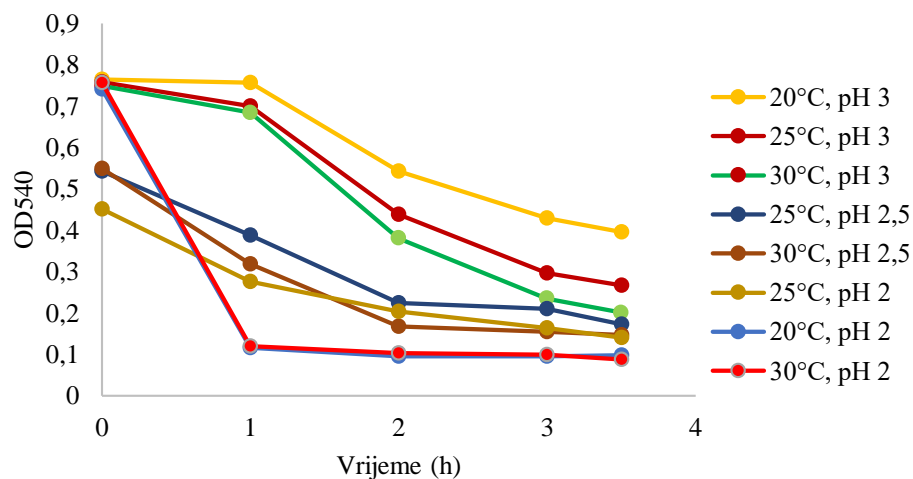
Na slici 15 prikazani su svi omjeri pri istraženim pH vrijednostima. Najbolja uspješnost bioflokulacije dobivena je pri omjeru mase mikroalga:plijesan 1:50 (g/g) pri pH vrijednosti 2, što je vidljivo i na grafu ovisnosti optičke gustoće o vremenu. U ekperimentu sa omjerom mase 1:50 dobivena je za 3,32 % veća uspješnost pri pH vrijednosti 2 nego kod vrijednosti 2,5 te za 27,74 % veća uspješnost nego pri pH vrijednosti 3. Povećanjem omjera, odnosno povećanjem mase peleta plijesni, povećava se i uspješnost bioflokulacije pa je tako kod omjera 1:35 zabilježeno za 6,06 % manja uspješnost nego kod omjera mase 1:50.



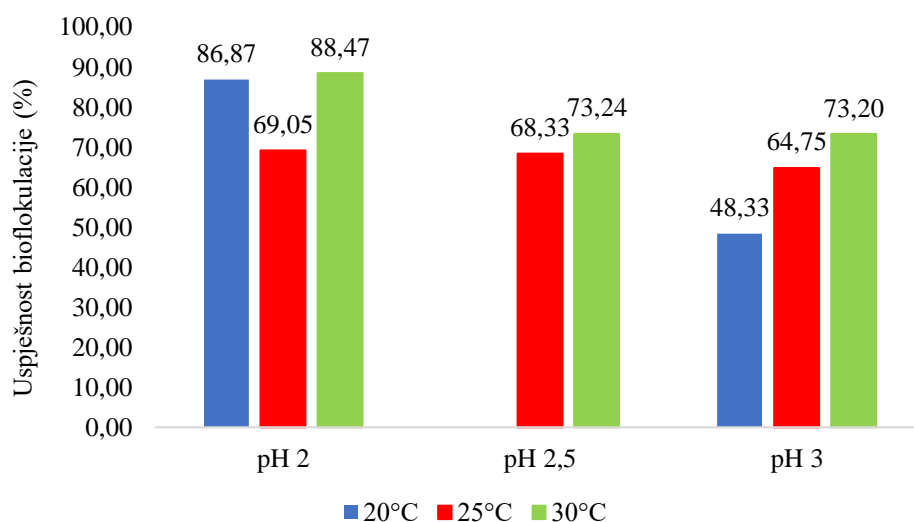
**Slika 15.** Uspješnost bioflokulacije kod različitih omjera mikroalga:plijesan i pH vrijednosti

#### 4.2.4. Utjecaj temperature na proces bioflokulacije

Optimizacija procesa bioflokulacije nastavljena je ispitivanjem utjecaja temperature na proces bioflokulacije. Prema rezultatima dobivenim u prethodnom eksperimentu za nastavak istraživanja odabran je omjer mase mikroalga: plijesan 1:50 (g/g) pri kojem je postignuta najveća uspješnost bioflokulacije. Bioflokulacija je provedena pri pH vrijednostima 2 i 3 te pri različitim temperaturama (20, 25, 30 °C). Najveći pad optičke gustoće odnosno najveća uspješnost bioflokulacije izmjerena je pri pH vrijednosti 2 uz temperaturu 30 °C što je ujedno i optimalna temperatura za rast mikroalge *Picochlorum* sp. (slika 16, 17) (De la Vega i sur., 2011). Pri temperaturi 30 °C dobivena je za 1,60 % veća uspješnost bioflokulacije nego kod ekperimenta pri 20 °C (pH vrijednost 2). Za provođenje bioflokulacije pri 30 °C potrebno je utrošiti dodatnu energiju za zagrijavanje sustava dok za provođenje pri 20 °C, odnosno pri sobnoj temperaturi, nije potrebno dodatno ulaganje za zagrijavanje što daje prednost i održivost provedbe bioflokulacije pri sobnoj temperaturi, a uspješnost bioflokulacije je neznatno veća.



**Slika 16.** Učinak temperature na bioflokulaciju uz maseni omjer mikroalga:plijesan 1:50 (g/g)

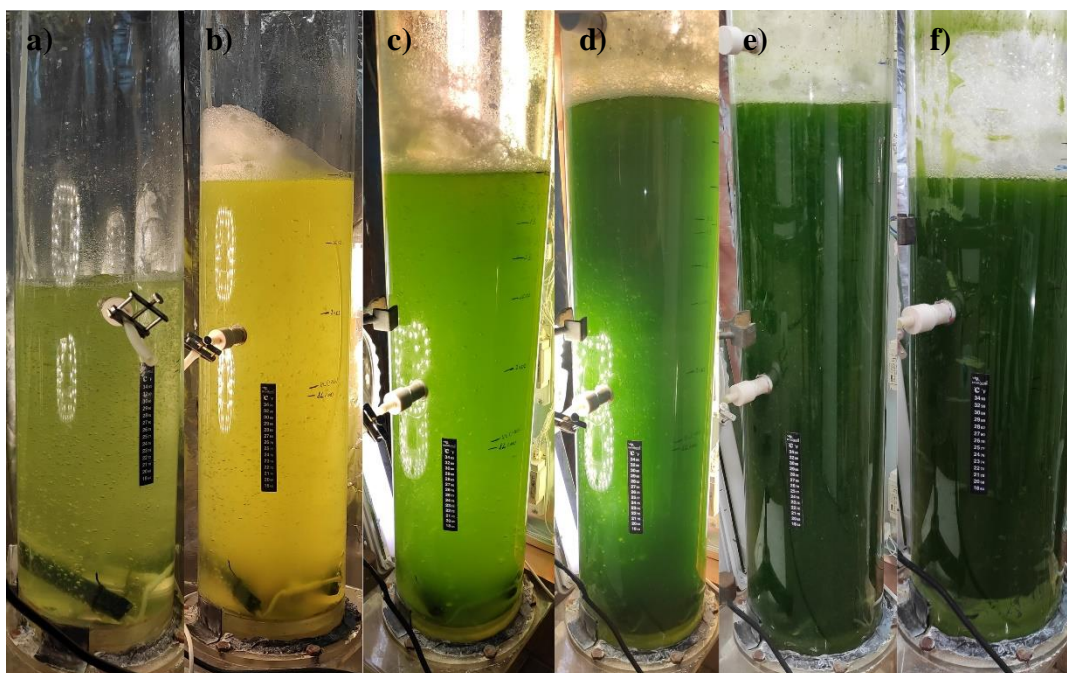


**Slika 17.** Uspješnost bioflokulacije kod pH vrijednosti 2, 2,5 i 3 uz maseni omjer mikroalga:plijesan 1:50 (g/g)

#### 4.3. ŠARŽNI UZGOJ MIKROALGE UZ PRITOK SUPSTRATA U BARBOTIRAJUĆOJ KOLONI

Šaržni uzgoj mikroalge uz sukcesivno dodavanje svježe hranjive podloge opisan je u poglavlju 3.2.2. *Šaržni uzgoj mikroalge*. Tijekom ukupno 26 dana proveden je uzgoj mikroalge u barbotirajućoj koloni kroz dvije faze. Cilj prve faze rasta mikroalge bila je proizvodnja

biomase, a druge faze usmjeravanje metabolizma u smjeru nakupljanja lipida u stanicama mikroalge uz dodatak otopine natrijevog bikarbonata (slika 18).

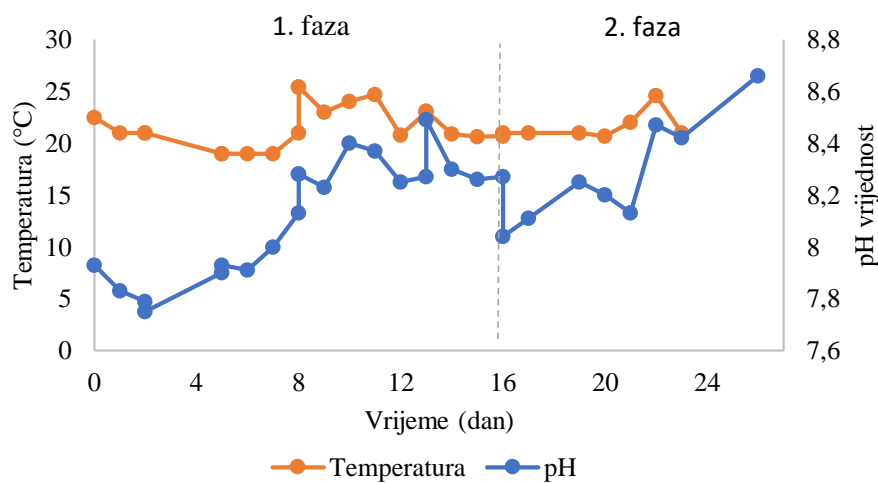


**Slika 18.** Praćenje tijekom rasta mikroalge *Picochlorum* sp.u barbotirajućoj koloni (a) 1. dan uzgoja, (b) 6. dan uzgoja, (c) 9. dan uzgoja, (d) 13. dan uzgoja, (e) 16. dan uzgoja, (f) 23. dan uzgoja (vlastita fotografija)

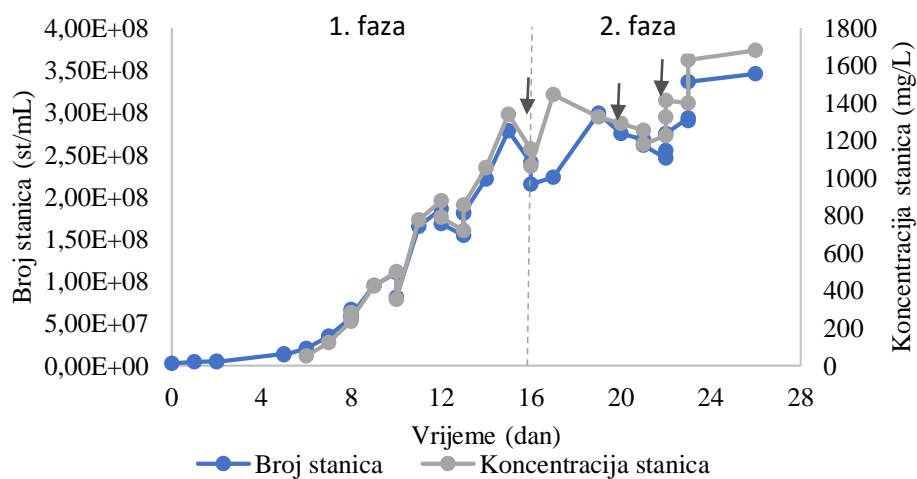
Temperatura podloge tijekom uzgoja iznosila je između 19 i 25,4 °C, a pH vrijednost između 7,75 i 8,66 (slika 19). Temperatura podloge se polako povećavala zbog primljene topline koja proizlazi iz svjetla postavljenog uz barbotirajuću kolonu, a pad temperature podloge se dogodio zbog sukcesivnog dodavanja 2,5 L svježije hranjive podloge. Uzgoj je vođen do kraja eksponencijalne faze i ulaska kulture u stacionarnu fazu rasta. Početna koncentracija broja stanica mikroalge iznosila je  $2,6 \cdot 10^6$  stanica/mL, a najveća, 26. dana uzgoja,  $3,46 \cdot 10^8$  stanica/mL. Pad broja stanica 10., 12., 16., 20. i 22. dana uzgoja dogodio se zbog odumiranja stanica uslijed nedostatka prihrane izvorom ugljika i fosfora. Koncentracija stanica izračunata je pomoću baždarnih dijagrama prikazanih u prilogu 5 i 6. Posljednjeg dana šaržnog uzgoja postignuta je maksimalna koncentracija biomase od 1,68 g/L, a maksimalna produktivnost iznosila je 0,0646 g/L dan (slika 20).

U radu Zhu i Dunforda (2013) uzgojem mikroalge *Picochlorum oklahomensis* u uvjetima rasta svjetlo:tama 12:12 h pri temperaturi 23 °C dobivena je maksimalna koncentracija biomase 2,1 g/L nakon 18 dana uzgoja. Također, zaključili su kako se koncentracija biomase smanjuje

kada dosegne maksimum te je potrebno odmah izdvojiti stanice mikrolage kako bi se dobila najveća produktivnost. Dokazano je kako upotrebom zvuka različitih frekvencija se utječe pozitivno na povećanje koncentracije biomase mikroalge. Prema radu Cai i suradnika (2016) dobivena je maksimalna koncentracija biomase mikroalge *Picochlorum oklahomensis* oko 2,2 g/L nakon 26 dana uzgoja korištenjem zvuka frekvencije 2200 Hz, dok je bez korištenja dodatnog izvora zvuka, nakon 30 dana, postignut maksimum koncentracije biomase koji iznosi 1,6 g/L, a upravo je toliko iznosila maksimalna koncentracija stanica dobivena u ovome radu. Povećanje koncentracije mikroalge, u ispitivanim uvjetima u ovome radu, moguće je postići aeriranjem podloge s CO<sub>2</sub> umjesto zraka te upotrebom zvukova različitih frekvencija.

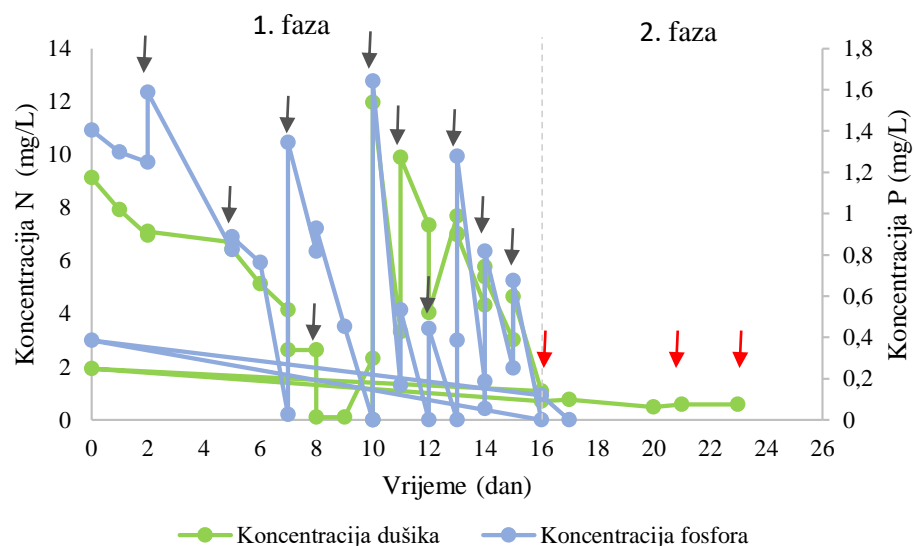


**Slika 19.** Ovisnost temperature i pH vrijednosti tijekom uzgoja



**Slika 20.** Promjena broja i koncentracije stanica tijekom uzgoja (strelicom je naznačen dodatak natrijevog bikarbonata)

Tijekom uzgoja dolazi do pada koncentracije dušika i fosfora u podlozi uslijed rasta kulture (slika 21). Prihrana s otopinom dušika (75 g/L NaNO<sub>3</sub>) i otopinom fosfora (5 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) dodavana je tijekom uzgoja ovisno o koncentraciji nutrijenata u podlozi. Nedostatak fosfora i dušika u podlozi limitira rast biomase mikroalge. Rastu mikroalge pogoduju koncentracije dušika iznad 10 mg/L te fosfora iznad 0,1 mg/L (Fried i sur., 2003). Maksimalna koncentracija dušika u podlozi iznosila je 11,96 mg/L, a fosfora 1,64 mg/L. Dušik je neophodan sastavni dio svih strukturnih i funkcionalnih proteina te lipida dok fosfor ima ključnu ulogu u prijenosu metaboličke energije i čini dio strukture nukleotida i molekula fosfolipida (El-Kassas, 2013). Promjene udjela makromolekula unutar mikroalge posljedica su promjene koncentracije dušika i fosfora u podlozi, odnosno uzgoj pri niskim koncentracijama nutrijenata.



**Slika 21.** Koncentracija dušika i fosfora u podlozi tijekom šaržnog uzgoja uz pritek supstrata (crnom strelicom je naznačen dodatak nutrijenata, crvenom strelicom je naznačen dodatak natrijevog bikarbonata)

#### 4.3.1. Sastav biomase

Tijekom uzgoja kulture mikroalge određen je makromolekulski sastav biomase na kojega utječu uvjeti kultivacije poput temperature, pH, svjetla te koncentracije nutrijenata. Najzastupljenije makromolekule u biomasi mikroalge čine lipidi, proteini i ugljikohidrati. Također praćen je i udio klorofila te profil masnih kiselina.

**Tablica 8.** Maseni udio makromolekula u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp.

Dan uzgoja	Udio (%)		
	Ugljikohidrati	Proteini	Lipidi
9	13,97	76,09	/
12	13,71	42,39	14,18
16	24,41	64,14	6,38
19	11,81	54,49	10,95
21	34,23	45,44	10,86
23	/	44,09	/
26	37,69	43,53	8,28

Kao što je već opisano, dušik je bitan element za sintezu proteina i nukleinskih kiselina. Limitacijom nutrijenata dolazi do smanjenja udjela proteina. Najveći udio proteina u biomasi mikroalge, izmjeren je 9. dan uzgoja, 76,08 % kada nije postojala limitacija izvorom dušika te zatim pada smanjenjem koncentracije dostupnog dušika. S daljnjim rastom biomase mikroalgi dolazi do opadanja udjela proteina u biomasi na 42,38 % zabilježenih 12. dan zbog iscrpljivanja podloge nutrijentima. Ponovnom prihranom otopinom dušika, nakon 12. dana uzgoja dolazi do povećanja udjela proteina. Šesnaestog dana uzgoja izračunati udjel proteina u biomasi mikroalge iznosi 64,14 %, a zatim pada do udjela 43,53 % na zadnji dan uzgoja (tablica 8). El-Kassas (2013) dokazao je kako u mikrolagi *Piochlorum* sp., smanjenjem koncentracije dušika za 50 % i 100 %, u usporedbi sa kontrolom, dolazi do smanjenja udjela proteina za 54 % odnosno za 69,7 % te smanjenjem koncentracije fosfora smanjuje se udjel proteina za 24,5 % kod 50 % manje koncentracije fosfora te za 37,3 % kod smanjenja od 100 %.

Nedovoljne količine nutrijenata utječu na smanjenje brzine diobe stanica te na nakupljanje rezervnog staničnog materijala u obliku ugljikohidrata ili lipida kako bi stanice osigurale energiju za preživljenje (Ikaran i sur., 2015). Ugljikohidrati se dijele na strukturne koji se nalaze uglavnom u staničnoj stijenci, te skladišne koji se akumuliraju unutar stanice. Udio ugljikohidrata u biomasi direktno je povezan sa koncentracijom fosfora, pa se tako pri nižoj koncentraciji fosfora nakuplja se veći udio ugljikohidrata. Devetog dana uzgoja određena je koncentracija ugljikohidrata od 13,97 %, a zatim se s vremenom njihov udio povećava do krajnje koncentracije 37,69 % kada u podlozi više nije bilo dostupnog fosfora (tablica 8). U radu Seyed i suradnika (2021) dobiveni udio ugljikohidrata, tijekom 21. dana uzgoja u stanicama mikroalge *Picochlorum* D-8, iznosio je 27 % dok je u radu Gonzalez-Esquer i suradnika (2019) dobiveni udio iznosio 38 % nakon 11 dana uzgoja, a zatim se smanjio tijekom stacionarne faze. Škrob i celuloza su najzastupljeniji ugljikohidrati u stanicama mikroalge pa



se biomasa mikroalge može koristiti u proizvodnji bioetanolu (Seyed i sur., 2021). U skladu s tim, u kiselinskom hidrolizatu biomase ove mikroalge kao najzastupljeniji monosaharid zabilježena je glukoza, a zatim ksiloza i fukoza (tablica 9).

**Tablica 9.** Sastav ugljikohidrata u biomasi mikroalge

Ugljikohidrati	Vrijeme (dan)					
	9	12	16	19	21	26
Glukoza	32,93	33,10	54,67	31,94	69,09	73,82
Ksiloza	44,53	45,36	32,24	47,36	22,94	19,33
Fukoza	22,54	21,54	13,09	20,69	7,97	6,85

Pomoću vanilin metode, opisane u poglavlju 3.2.6.7. *Određivanje udjela lipida u biomasi*, pratio se trend povećanja udjela lipida, a stvarni udio lipida u biomasi i sastav masnih kiselina određen je pomoću NREL protokola i uređaja za plinsku kromatografiju. Osim limitacijom nutrijentima, nakupljanje lipida može se potaknuti dodatkom natrijevog bikarbonata. Natrijev bikarbonat dodan je u koncentraciji od 1 g/L, 16. i 21. dan uzgoja te u koncentraciji 0,5 g/L, 23. dan uzgoja. Prema podacima navedenim u tablici 8 vidljiva je promjena udjela lipida tijekom uzgoja mikroalge. Početni udio lipida u biomasi 12. dan uzgoja iznosio je 14,18 % što ujedno daje i maksimalnu produktivnost od 112, 37 mg/Ldan, a zatim na 16. dan uzgoja izmjeren udio lipida iznosio je 6,38 % dok je 3 dana poslije dodatka natrijevog bikarbonata ponovno došlo do porasta udjela lipida do 10,95 %. U danima nakon dodatka natrijevog bikarbonata došlo je do smanjenja udjela lipida na 8,28 % zadnji dan uzgoja i produktivnost od 17,28 mg/L dan. Stacionarna faza pogoduje nakupljanju lipida pa se potencijalno veći udio lipida mogao dobiti duljim zadržavanjem stanica mikroalge u stacionarnoj fazi. Za mikroalgu *Picochlorum* sp. u literaturi se mogu pronaći podaci o nakupljanju lipida i do udjela od 59 % u stresnim uvjetima (Dahmen i sur., 2014; Zhu i Dunford, 2013; El-Kassas, 2013). Usporedbom podataka s podacima dostupnim u literaturi, vidljivo je kako se unatoč dodatku natrijevog bikarbonata u koncentraciji 0,5 g/L i 1 g/L dobio manji udio ukupnih lipida. Povećanje udjela lipida izmjereno je nakon prvog dodatka natrijevog bikarbonata dok nakon dodatka 21. i 23. dana uzgoja došlo je do smanjenja udjela lipida. Stanice preferiraju jedan put sinteze rezervnih tvari tako da je limitacija nutrijentima u danim uvjetima pogodovala akumulaciji ugljikohidrata do maksimalno izmjerenih 37,69 %. Kako bi se povećao udio lipida u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp., u radu Dahmen i suradnika (2014), istražen je udio lipida uz dodatak natrij karbonata, glukoze, natrij klorida, i ugljikovog dioksida te uz limitaciju nutrijenata dušika i fosfora. Bez stresnih uvjeta za mikroalgu dobiveni udio lipida iznosio je 16,3 %. Najveći udio

lipida dobili su dodatkom 1 g/L natrijevog karbonata, 58,5 %, a zatim s limitacijom izvora fosfora 57,4 %. Bioflokulacijom mikroalge *Picochlorum* sp. s plijesni *Mortierella isabellina*, osim što se olakšava njeno izdvajanje, moguće je dobiti veći udio lipida pošto plijesan *Mortierella isabellina* nakuplja do 80 % lipida u suhoj tvari biomase (Gao i sur., 2014).

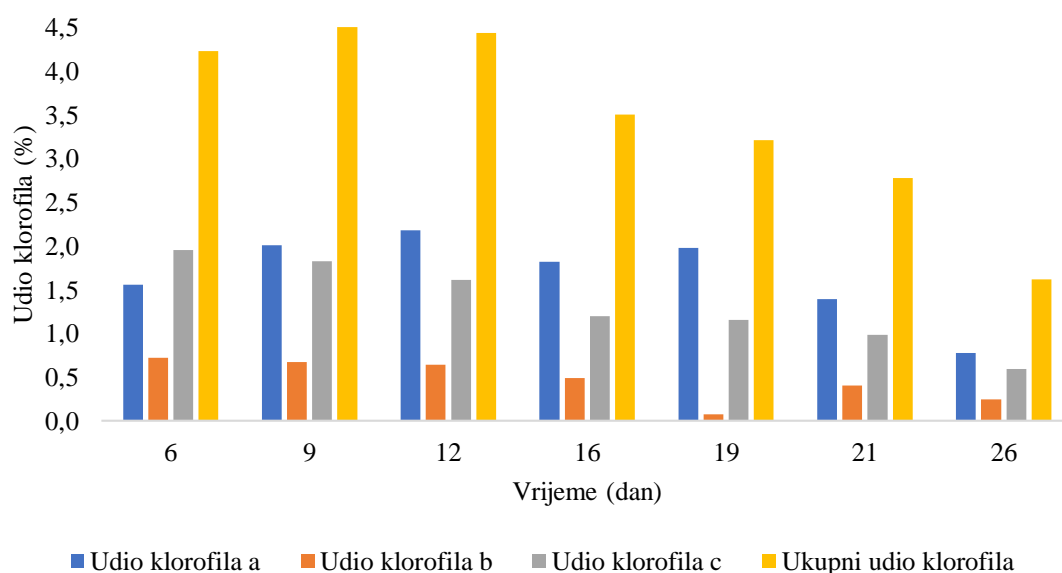
Udio lipida i pojedinih masnih kiselina ovisi o uvjetima i načinu uzgoja te koncentraciji nutrijenata u podlozi. Najzastupljenije masne kiseline tijekom uzgoja su: C16:0 (palmitinska kiselina), C17:0 (heptadekanska kiselina) te višestruko nezasićene masne kiseline C18:2 cis 9,12 (linolna kiselina) i C18:3 cis 9,12,15 ( $\alpha$ -linolenska kiselina) (tablica 10). Navedene masne kiseline čine preko 88 % ukupnih masnih kiselina pri čemu linolna i  $\alpha$ -linolenska kiselina čine između 36 i 55 %, što je također dobiveno u radu Zhu i Dunford (2013), a to ih čini dobrim izvorima esencijalnih masnih kiselina. Osim navedenih masnih kiselina, u manjim udjelima su prisutne i C11:0 (undekanska kiselina), C14:1 cis 9 (miristoleična kiselina), C15:1 cis 10 (pentadekanoična kiselina) i C16:1 cis 9 (palmitoleinska kiselina). Visok udio palmitinske, linolne i oleinske (55-82 %) čini ovu mikroalgu pogodnu za proizvodnju kvalitetnog biodizela pošto upravo one čine većinu masnih kiselina biodizela (Dahmen i sur., 2014).

**Tablica 10.** Profil masnih kiselina u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp.

Vrijeme (dan)	12	16	19	21	26
Metil ester masne kiseline	Udio (%)				
C11:0, undekanska kiselina	0,16	0,38	0,22	0,14	0,43
C14:1 cis 9, miristoleična kiselina	0,67	0,57	0,06	0,00	/
C15:1 cis 10, pentadekanoična kiselina	0,08	/	/	/	/
C16:0, palmitinska kiselina	29,20	27,47	22,97	26,26	36,58
C16:1 cis 9, palmitoleinska kiselina	5,88	3,97	1,66	1,26	0,51
C17:0, heptadekanska kiselina	20,47	28,30	16,79	15,28	16,36
C18:1 cis 9, oleinska kiselina	3,84	0,13	2,80	4,37	9,99
C18:2 cis 9,12, linolna kiselina	39,16	39,14	28,62	27,42	36,11
C18:3 cis 9,12,15, $\alpha$ -linolenska kiselina	/	/	26,84	25,22	/
C24:0, lignocerična kiselina	0,49	/	/	/	/

Klorofil je zeleni pigment odgovoran za apsorpciju svjetlosne energije i pretvaranje u kemijsku energiju fotosintezom u biljkama i algama. Upotrebljava se u kozmetici te prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Klorofil a je nazastupljeniji klorofil te je prekursor za sinezu klorofila b.

Slika 22 prikazuje promjenu udjela klorofila a, b i c, kao i ukupnog klorofila u biomasi tijekom šaržnog uzgoja uz sukcesivno dodavanje nutrijenata. Najveći udio klorofila dobiven je 9. dan uzgoja te iznosi 4,51 %, a potom se smanjuje na udio 1,62 %, zadnji dan uzgoja pri čemu klorofil a čini najveći udio u ukupnom udjelu klorofila. Istraživanjem Cano i suradnika (2021) dobiveni su podaci slični dobivenim u ovome radu. U mikroalgi *Picochlorum celeri* identificirali su pigmente: klorofil a, klorofil b, lutein,  $\beta$ -karoten, kantaksantin, violaksantin, neoksantin, zeaksantin i anteraksantin. Ustanovili su kako 85 % pigmenta čine upravo klorofili s ukupnim udjelom 4-5 % u biomasi mikroalge tijekom visokog intenziteta osvjetljenja, a limitacijom osvjetljenja dobili su 13 % klorofila u biomasi. Osim limitacijom osvjetljenja odnosno optimiranjem ciklusa svjetlo:tama, povećanje udjela klorofila u biomasi postiže se povećanjem temperature te upotrebom crvenog izvora svjetlosti (da Silva Ferreira i Sant'Anna, 2017). Smanjenjem koncentracije nutrijenta, posebice dušika koji je dio molekule klorofila, dolazi do pada udjela ukupnih klorofila što je vidljivo kod uzoraka nakon 9. dana uzgoja (slika 22). Također pad udjela pigmenta tijekom uzgoja je moguć zbog ugušćivanja kulture te nedovoljne izmješanosti i osvjetljenja. Kod svih analiza uočeno je da je udio klorofila a bio najveći, a udio klorofila b najmanji.



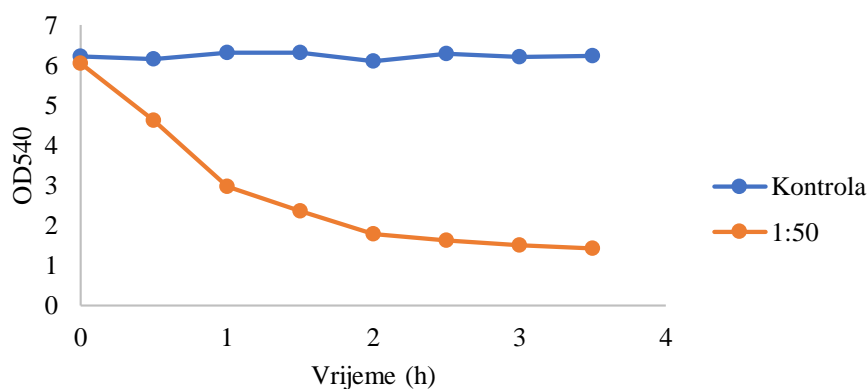
**Slika 22.** Udio klorofila u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp.

#### 4.3.2. Bioflokulacija mikroalge nakon šaržnog uzgoja

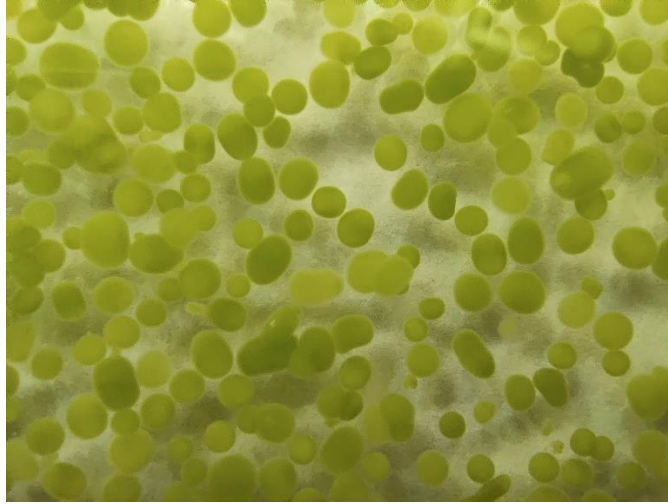
Nakon ulaska mikroalge u stacionarnu fazu rasta, 26. dana uzgoja, dio kulture mikroalge iskorišten je za bioflokulaciju, a ostatak za provedbu istraživanja sastava biomase.

Bioflokulacija je provedena s 2 L kulture mikroalge koncentracije  $3,46 \cdot 10^8$  stanica/mL što odgovara 3,36 g biomase mikrolage i 286 g biomase plijesni pri pH vrijednosti 2,5 i 23 °C (slika 24). Tijekom bioflokulacije došlo je do smanjenja optičke gustoće uz uspješnost bioflokulacije 80,81 % (Slika 23). Do sada nije provedena bioflokulacija mikroalge *Picochlorum* sp. s plijesni. U radu Díaz-Santos i suradnika (2015) uspješnost bioflokulacije mikroalge *Picochlorum* sp. uz kvasac *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* iznosila je 75 %. Osim bioflokulacije, s mikroalgom *Picochlorum* sp. provedene su flokulacije koristeći hitozan, natrijev alginat, aluminij sulfat te elektroflokulacija. Koristeći flokulante dobivena je uspješnost izdvajanja biomase >95 % (Augustine i sur., 2017; Zhu i sur., 2014).

Korištenje kemijskih tvari najčešće uključuje flokulante koji su toksični u koncentracijama potrebnim za provedbu flokulacije te su nerazgradivi, a centrifugiranje zahtjeva velik unos energije i visoke troškove izdvajanja. Iako se flokulacijom kao i centrifugiranjem dobiva nešto veća uspješnost izdvajanja biomase, nego što prikazuju rezultati dobiveni izdvajanjem biomase bioflokulacijom u ovome radu, daljnjim optimiranjem bioflokulacije može se poboljšati uspješnost izdvajanja biomase te bioflokulacija ima velik potencijal u izdvajanju biomase zbog visoke učinkovitosti, netoksičnosti i ekološke prihvatljivosti.



**Slika 23.** Ovisnost optičke gustoće o vremenu



**Slika 24.** Peleti plijesni s biomasom mikroalge nakon provedene bioflokulacije (vlastita fotografija)

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata eksperimenta može se zaključiti sljedeće:

1. Optimalna veličina peleta plijesni *Mortierella isabellina* od  $1,3155 \pm 0,0635$  mm postignuta je uz koncentraciju inokuluma (spora) od  $1 \cdot 10^7$  spora/100 mL.
2. Bioflokulacijom sa peletima plijesni *Mortierella isabellina* uspješno je izdvojena biomasa mikroalge *Picochlorum* sp. iz hranjive podloge. Maksimalna uspješnost bioflokulacije od 88,47 %, postignuta je pri masenom omjeru mikroalga:plijesan 1:50 g/g, pH vrijednosti 2 i temperaturi 30 °C.
3. Šaržnim uzgojem biomase uz prtok supstrata postignuta je koncentracija stanica mikroalge *Picochlorum* sp. od 1,68 g/L uz produktivnost od 0,0646 g/L dan. Limitacijom rasta s izvorom dušika i fosfora uz prihranu natrijevim bikarbonatom tijekom druge faze uzgoja dobivena je masa mikroalge s 14,18 % lipida, 37,69 % ugljikohidrata, 53,53 % proteina i 1,62 % klorofila. Uzgoj u uvjetima limitacije dušikom i fosforom uz dodatak anorganskog ugljika utječe na smanjenje udjela proteina i lipida uz povećanje udjela ugljikohidrata kao glavnog rezervnog izvora energije.
4. Najzastupljenije masne kiseline u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp. 21. dan uzgoja iznosile su 26,27 % palmitinska (C16:0), 27,42 % linolna (C18:2 cis 9,12), 25,23 %  $\alpha$ -linolenska kiselina (C18:3 cis 9,12,15) i 15,29 % heptadekanska kiselina (C17:0).

## 6. LITERATURA

Acién FG, Molina E, Reis A, Torzillo G, Zittelli GC, Sepúlveda C, i sur. (2017) Microalgae-based biofuels and bioproducts, 1. izd., Elsevier, Ujedinjeno Kraljevstvo, 1-44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00001-7>

Alam MA, Xu JL, Wang Z (2020) Microalgae biotechnology for food, health and high value products, 1. izd., Springer, Singapore, str. 39-450.

Augustine A, Kumaran J, Puthumana J, Sabu S, Singh IB, Joseph V (2017) Multifactorial interactions and optimization in biomass harvesting of marine picoalga *Picochlorum maculatum* MACC3 with different flocculants, *Aquaculture* **474**, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.020>

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

Cai W, Dunford NT, Wang N, Zhu S, He H (2016) Audible sound treatment of the microalgae *Picochlorum oklahomensis* for enhancing biomass productivity. *Bioresource technology* **202**, 226-230. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.019>

Cano M, Karns DA, Weissman JC, Heinnickel ML, Posewitz MC (2021) Pigment modulation in response to irradiance intensity in the fast-growing alga *Picochlorum celeri*. *Algal Research* **58**, 102370. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102370>

Chen J, Leng L, Ye C, Lu Q, Addy M, Wang J, i sur. (2018) A comparative study between fungal pellet-and spore-assisted microalgae harvesting methods for algae bioflocculation. *Bioresource technology* **259**, 181-190. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.040>

Chew KW, Chia SR, Show PL, Yap YJ, Ling TC, Chang JS (2018) Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: a review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **91**, 332-344. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.05.039>

da Silva Ferreira V, Sant'Anna C (2017) Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **33**, 1-8. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-016-2181-6>

- Dahlin LR, Gerritsen AT, Henard CA, Van Wychen S, Linger JG, Kunde Y, i sur. (2019) Development of a high-productivity, halophilic, thermotolerant microalga *Picochlorum renovo*. *Communications biology* **2**, 1-9. <https://www.nature.com/articles/s42003-019-0620-2>
- Dahmen I, Chtourou H, Jebali A, Daassi D, Karray F, Hassairi I, i sur. (2014) Optimisation of the critical medium components for better growth of *Picochlorum* sp. and the role of stressful environments for higher lipid production. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**, 1628-1638. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6470>
- De la Vega M, Díaz E, Vila M, León R (2011) Isolation of a new strain of *Picochlorum* sp. and characterization of its potential biotechnological applications. *Biotechnology Progress* **27**, 1535-1543. <https://doi.org/10.1002/btpr.686>
- Díaz-Santos E, Vila M, de la Vega M, León R, Vígara J (2015) Study of bioflocculation induced by *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* and flocculating protein factors in microalgae. *Algal research* **8**, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.013>
- El-Kassas HY (2013) Growth and fatty acid profile of the marine microalga *Picochlorum* sp. grown under nutrient stress conditions. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* **39**, 233-239. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2013.12.007>
- Fried S, Mackie B, Nothwehr E (2003) Nitrate and phosphate levels positively affect the growth of algae species found in Perry Pond. *Tillers* **4**, 21-24. <https://ojs.grinnell.edu/index.php/tillers/article/view/33>
- Fujita M, Iwahori K, Yamakawa K (1993) Pellet formation of fungi and its application to starch wastewater treatment. *Water Sci. Technol* **28**, 267–274. <https://doi.org/10.2166/wst.1993.0118>
- Gao D, Zeng J, Yu X, Dong T, Chen S (2014) Improved lipid accumulation by morphology engineering of oleaginous fungus *Mortierella isabellina*. *Biotechnology and bioengineering* **111**, 1758-1766. <https://doi.org/10.1002/bit.25242>
- Giraldo-Calderón ND, Romo-Buchelly RJ, Arbeláez-Pérez AA, Echeverri-Hincapié D, Atehortúa-Garcés L (2018) Microalgae biorefineries: applications and emerging technologies. *Dyna* **85**, 219-233. <https://doi.org/10.15446/dyna.v85n205.68780>
- Gonzalez-Esquer CR, Wright KT, Sudasinghe N, Carr CK, Sanders CK, Turmo A, i sur. (2019) Demonstration of the potential of *Picochlorum soloecismus* as a microalgal platform for the



production of renewable fuels. *Algal Research* **43**, 101658.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101658>

Guillard RRL (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. U: Smith WL, Chanley MH (ured.) Culture of Marine Invertebrate Animals, 1. izd., Plenum Press, New York. str. 26–60.

Hawksworth DL (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* **105**, 1422–1432.  
<https://doi.org/10.1017/S0953756201004725>

Heimann K, Huerlimann R (2015) Microalgal classification: major classes and genera of commercial microalgal species. U: Kim SK, (ured.) Handbook of marine microalgae, 1. izd., Academic Press, str. 25-41

Hemaiswarya S, Raja R, Ravikumar R, Carvalho IS (2013) Microalgae taxonomy and breeding. U: Singh, BP (ured.) Biofuel crops: production, physiology and genetics, 1. izd., CABI. str. 44-50

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, i sur. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research* **111**, 509-547.  
<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>

Hosikian A, Lim S, Halim R, Danquah MK (2010) Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. *International journal of chemical engineering* **2010**, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2010/391632>

Ikaran Z, Suárez-Alvarez S, Urreta I, Castañón S (2015) The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. *Algal Res* **10**, 134-144.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.023>

Krasovec M, Vancaester E, Rombauts S, Bucchini F, Yau S, Hemon C, i sur. (2018) Genome analyses of the microalga *Picochlorum* provide insights into the evolution of thermotolerance in the green lineage. *Genome biology and evolution* **10**, 2347-2365.  
<https://doi.org/10.1093/gbe/evy167>

Lal A, Banerjee S, Das D (2021) *Aspergillus* sp assisted bioflocculation of *Chlorella* MJ 11/11 for the production of biofuel from the algal-fungal co-pellet. *Separation and Purification Technology* **272**, 118320. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118320>

- Leng L, Li W, Chen J, Leng S, Chen J, Wei L, i sur. (2021) Co-culture of fungi-microalgae consortium for wastewater treatment: A review. *Bioresource Technology* **330**, 125008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125008>
- Liber JA, Bryson AE, Bonito G, Du ZY (2020) Harvesting microalgae for food and energy products. *Small Methods* **4**, 2000349. <https://doi.org/10.1002/smt.202000349>
- Luo S, Wu X, Jiang H, Yu M, Liu Y, Min A, i sur. (2019) Edible fungi-assisted harvesting system for efficient microalgae bio-flocculation. *Bioresource technology* **282**, 325-330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.033>
- Malik S, Khan F, Atta Z, Habib N, Haider MN, Wang N, i sur. (2020) Microalgal flocculation: Global research progress and prospects for algal biorefinery. *Biotechnology and applied biochemistry* **67**, 52-60. <https://doi.org/10.1002/bab.1828>
- Matter IA, Bui VKH, Jung M, Seo JY, Kim YE, Lee YC, i sur. (2019) Flocculation harvesting techniques for microalgae: A review. *Applied Sciences* **9**, 3069. <https://doi.org/10.3390/app9153069>
- Narala RR, Garg S, Sharma KK, Thomas-Hall SR, Deme M, Li Y, i sur. (2016) Comparison of microalgae cultivation in photobioreactor, open raceway pond, and a two-stage hybrid system. *Frontiers in Energy Research* **4**, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2016.00029>
- Nazari MT, Freitag JF, Cavanhi VAF, Colla LM (2020) Microalgae harvesting by fungal-assisted bioflocculation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **19**, 369-388. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11157-020-09528-y>
- Pei XY, Ren Y, Liu BF (2021) Flocculation performance and mechanism of fungal pellets on harvesting of microalgal biomass. *Bioresource Technology* **321**, 124463. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124463>
- Peng C, Huang H, Ji X, Liu X, You J, Lu J, i sur. (2010) A temperature-shift strategy for efficient arachidonic acid fermentation by *Mortierella alpina* in batch culture. *Biochemical engineering journal* **53**, 92-96. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.09.014>
- Prajapati K, Kumar P, Malik A, Choudhary P (2014) Exploring pellet forming filamentous fungi as tool for harvesting non-flocculating unicellular microalgae. *BioEnergy Research* **7**, 1430-1440. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12155-014-9481-1>

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

Seyed Jafari Olia M, Azin M, Sepahi AA, Moazami N (2021) Screening of microalgal isolates of the Persian Gulf and evaluation of their potential as the promising bioethanol feedstock. *International Journal of Green Energy* **8**, 1-8. <https://doi.org/10.1080/15435075.2021.1968872>

Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering* **101**, 87-96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>

Surendhiran D, Vijay M (2014) Exploration on bioflocculation of *Nannochloropsis oculata* using response surface methodology for biodiesel production. *The Scientific World Journal* **2014**, 1-4. <https://doi.org/10.1155/2014/202659>

Ummalyma SB, Gnansounou E, Sukumaran RK, Sindhu R, Pandey A, Sahoo D (2017) Bioflocculation: an alternative strategy for harvesting of microalgae—an overview. *Bioresource technology* **242**, 227-235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.097>

Wijayawardene NN, Hyde KD, Al-Ani LKT (2020) Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere* **11**, 1060–1456. <https://biblio.ugent.be/publication/8660838>

Zhou W, Min M, Hu B, Ma X, Liu Y, Wang Q, i sur. (2013) Filamentous fungi assisted bio-flocculation: a novel alternative technique for harvesting heterotrophic and autotrophic microalgal cells. *Separation and Purification Technology* **107**, 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.01.030>

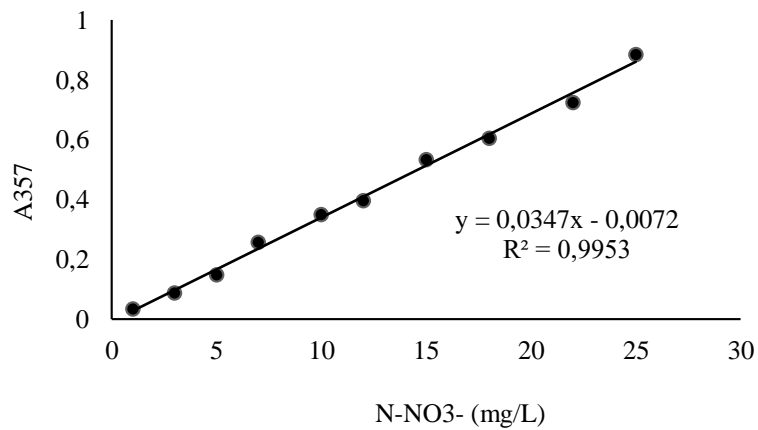
Zhu Y, Dunford NT (2013) Growth and biomass characteristics of *Picochlorum oklahomensis* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **90**, 841-849. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2225-0>

Zhu Y, Dunford NT, Goad C (2014) Effect of processing parameters on flocculation of *Picochlorum oklahomensis*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **91**, 317-324. <https://link.springer.com/article/10.1007%252Fs11746-013-2371-4>

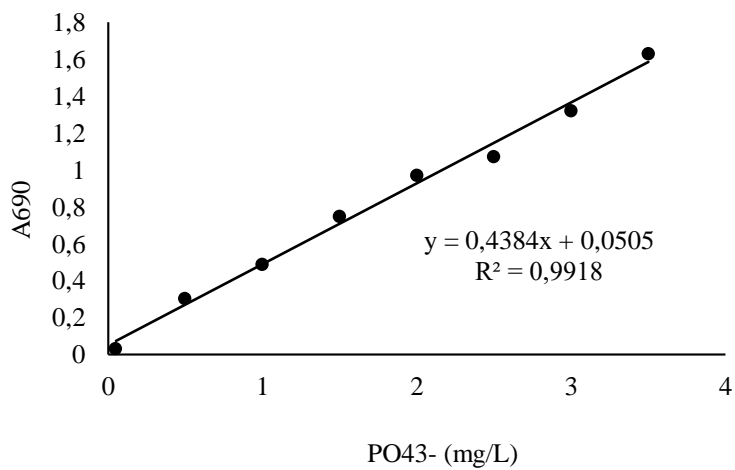
Zuccaro G, Yousuf A, Pollio A, Steyer JP (2020) Microalgae cultivation for biofuels production, 1. izd., Academic Press, London/United Kingdom/Unites States, str. 11-29

## 7. PRILOZI

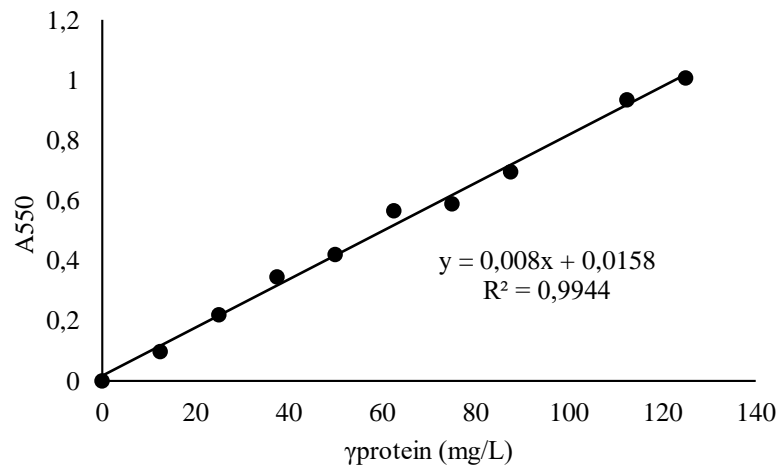
Prilog 1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije nitrita u uzorku.



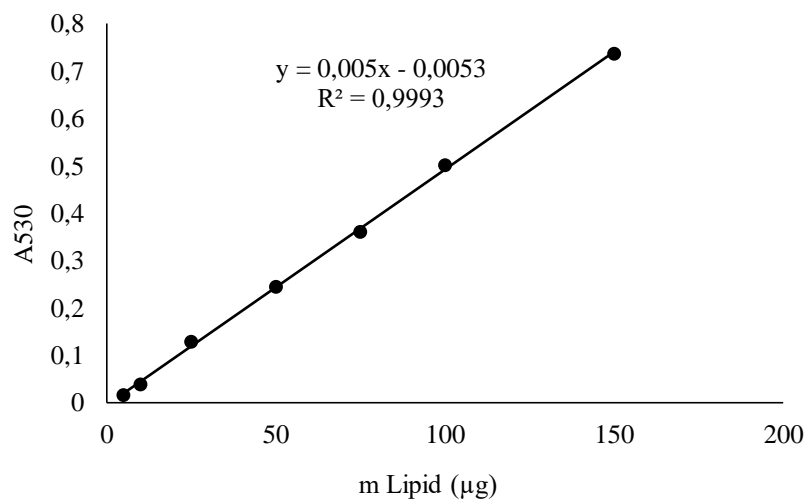
Prilog 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije fosfata u uzorku.



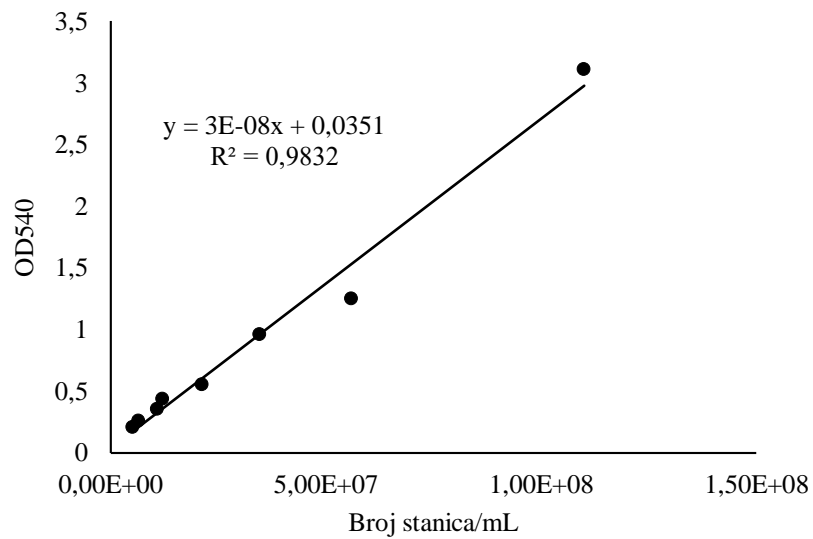
Prilog 3. Baždarni dijagram za određivanje proteina u biomasi.



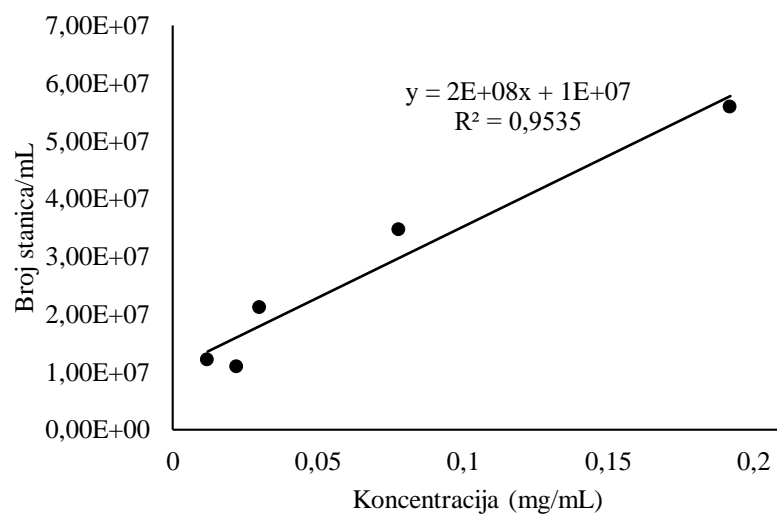
Prilog 4. Baždarni dijagram za određivanje lipida u biomasi.



Prilog 5. Ovisnost optičke gustoće o broju stanica mikroalge.



Prilog 6. Ovisnost broja stanica o koncentraciji mikroalge.



## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Marina Strinavić

Vlastoručni potpis