

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Marija Kuzmić

**Optimizacija f/2 hranjive podloge za fototrofni šaržni
uzgoj s pritokom supstrata dijatomeje *Nitzschia* sp.**

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod vodstvom prof. dr. sc. Mirele Ivančić Šantek i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019/2020.

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Mikroalge..... | 1 |
| 1.1.1. Opće karakteristike i klasifikacija..... | 1 |
| 1.1.2. Načini ishrane i pridobivanja energije..... | 2 |
| 1.2. Dijatomeje..... | 3 |
| 1.2.1. Opće karakteristike i podjela..... | 3 |
| 1.2.2. Fotosinteza..... | 6 |
| 1.2.3. Biosinteza lipida..... | 7 |
| 1.2.4. Transport i metabolizam silicija..... | 11 |
| 1.2.5. Utjecaj makronutrijenata silicija, dušika i fosfora na biosintezu lipida..... | 11 |
| 1.2.6. Primjena..... | 12 |
| 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 15 |
| 3.1. Materijali..... | 15 |
| 3.1.1. Radni mikroorganizam..... | 15 |
| 3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga..... | 15 |
| 3.1.3. Ostale kemikalije..... | 16 |
| 3.1.4. Hranjive podloge..... | 16 |
| 3.1.4.1. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma i održavanje kulture..... | 16 |
| 3.1.4.2. Hranjive podloge za optimiranje omjera silicija, dušika i fosfora..... | 18 |
| 3.1.4.3. Hranjiva podloga za šaržni uzgoj s pritokom supstrata..... | 21 |
| 3.1.5. Oprema i aparatura..... | 22 |
| 3.1.5.1. Centrifuge..... | 22 |
| 3.1.5.2. Uređaj za plinsku kromatografiju (GC)..... | 22 |
| 3.1.5.3. Ostala oprema i aparatura..... | 22 |
| 3.2. Metode..... | 23 |
| 3.2.1. Uzgoj inokuluma..... | 23 |
| 3.2.2. Optimizacija sastava hranjive podloge..... | 23 |
| 3.2.3. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata..... | 24 |
| 3.2.4. Analitičke metode..... | 24 |
| 3.2.4.1. Brojanje stanica u Thomaovoj komorici..... | 24 |
| 3.2.4.2. Mjerenje optičke gustoće kulture..... | 25 |
| 3.2.4.3. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase..... | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.4.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije klorofila..... | 25 |
| 3.2.4.5. Određivanje koncentracije silicija..... | 26 |
| 3.2.4.6. Određivanje koncentracije dušika..... | 27 |
| 3.2.4.7. Određivanje koncentracije fosfata..... | 27 |
| 3.2.4.8. Određivanje profila masnih kiselina..... | 28 |
| 3.2.4.9. Određivanje koncentracije proteina..... | 29 |
| 3.2.4.10. Određivanje koncentracije ugljikohidrata..... | 30 |
| 4. REZULTATI..... | 31 |
| 4.1. Optimizacija sastava hranjive podloge..... | 31 |
| 4.2. Utjecaj sastava modificirane f/2 hranjive podloge na sastav biomase i sastav masnih kiselina..... | 35 |
| 4.3. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata..... | 38 |
| 4.4. Utjecaj šaržnog uzgoja s pritokom supstrata na sastav biomase i sastav masnih kiselina..... | 41 |
| 5. RASPRAVA..... | 44 |
| 5.1. Optimizacija sastava hranjive podloge..... | 44 |
| 5.2. Utjecaj sastava modificirane f/2 hranjive podloge na sastav biomase i sastav masnih kiselina..... | 46 |
| 5.3. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata..... | 49 |
| 5.4. Utjecaj šaržnog uzgoja s pritokom supstrata na sastav biomase i sastav masnih kiselina..... | 52 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 54 |
| 7. ZAHVALE..... | 55 |
| 8. POPIS LITERATURE..... | 56 |
| 9. SAŽETAK..... | 61 |
| 10. SUMMARY..... | 62 |
| 11. PRILOZI..... | |

1. UVOD

1.1. MIKROALGE

1.1.1. Opće karakteristike i klasifikacija

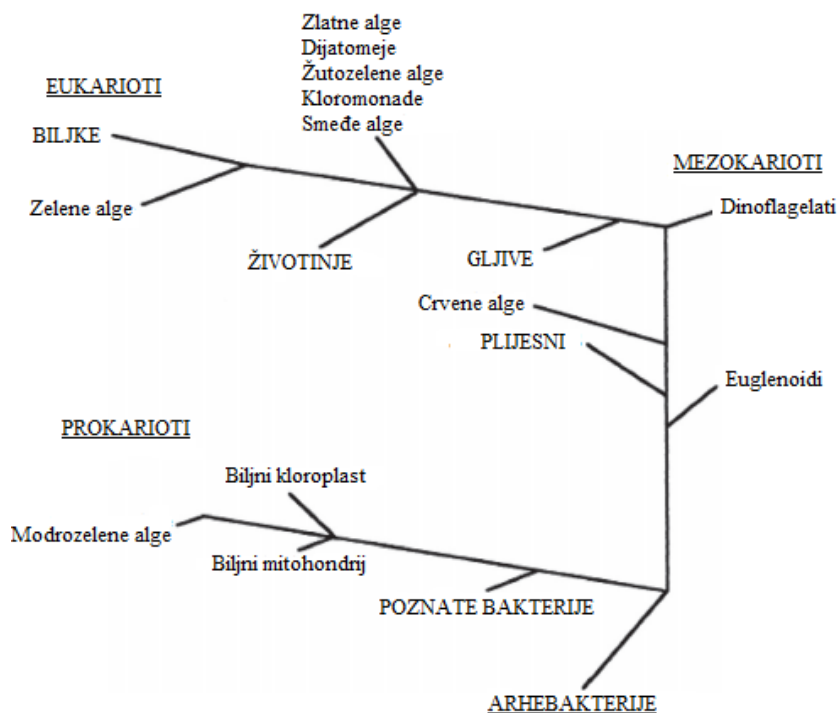
Mikroalge čine skupinu genetski raznovrsnih prokariotskih i eukariotskih fotosintetskih mikroorganizama jednostavne stanične građe. Pretežno su jednostanični mikroorganizmi odgovorni za polovicu globalne proizvodnje kisika, a producenti su brojnih važnih bioaktivnih tvari poput polimera, peptida, masnih kiselina, karotenoida, toksina i sterola (Singh i Saxena, 2015; Venkatesan i sur., 2015). Mogu rasti pojedinačno, u nakupinama ili u zajednici s drugim organizmima (npr. u formi lišajeva). Naseljavaju raznovrsna, nerijetko ekstremna staništa. Nalazimo ih u slatkim i slanim vodama, međutim neke vrste mogu se naći u staništima u kojima vladaju izuzetno nepovoljni uvjeti za rast, npr. ekstremno slanim staništima (npr. Veliko slano jezero u SAD-u ili Mrtvo more u Izraelu), staništima s ograničenim dotokom svjetlosti (200-300 metara ispod površine mora), na pustinjском pijesku, kamenju, krznu životinja (npr. krzno ljenjivaca i polarnih medvjeda), zidovima građevina, ispod leda na Antarktiku, u zraku na visini od 2000 metara i drugdje (Singh i Saxena, 2015). Veličina stanica mikroalgi kreće se od nekoliko mikrometara do nekoliko stotina mikrometara, ovisno o vrsti. Znanstvenici pretpostavljaju da postoji između $2 \cdot 10^5$ i $8 \cdot 10^5$ vrsta mikroalgi (Venkatesan i sur., 2015), međutim samo oko $5 \cdot 10^4$ vrsta je do sada izolirano i klasificirano, od čega većina pripada porodici zelenih mikroalgi (77 %), odnosno cijanobakterija (8 %) (Rezić i sur., 2014). Najbrojniji razredi mikroalgi važni za industrijsku primjenu su dijatomeje (*Bacillariophyceae*), zelene alge (*Chlorophyceae*) i zlatne alge (*Chrysophyceae*) (Venkatesan i sur., 2015).

Zbog velikih genotipskih i fenotipskih razlika među vrstama, u literaturi ne postoje univerzalno definirane taksonomske kategorije mikroalgi. Tradicionalna klasifikacija temeljena je uglavnom na fenotipskim obilježjima. Međutim, razvojem molekularne biologije utvrđeni su filogenetski odnosi unutar pojedinih skupina mikroalgi s drugim taksonomskim grupama. Rezultati takvih istraživanja pokazali su neslaganja s tradicionalnom klasifikacijom. Slika 1 prikazuje zanimljive rezultate spomenutih istraživanja, koja ukazuju na heterogenost algi na molekularnom nivou (Singh i Saxena, 2015).

Modrozeleno alge prokariotski su mikroorganizmi, zbog čega se na filogenetskom stablu nalaze najbliže bakterijama, a smatraju se i progenitorima kloroplasta i mitohondrija nekih algi i viših biljaka. Dinoflagelati i euglenoidi posredna su veza između prokariota i eukariota, odnosno ubrajaju se u mezokariote, a povezani su s crvenim algama i plijesnima, nego s ostalim

taksonomskim grupama. Zelene alge očekivano pokazuju veću sličnost s višim biljkama, dok su dijatomeje i srodne mikroalge zbog svoje specifičnosti najinteresantnija skupina (Singh i Saxena, 2015). Sekvencioniranjem genoma različitih vrsta dijatomeja dokazano je da sadrže brojne biljne, životinjske i bakterijske gene što objašnjava njihovu izuzetnu prilagodljivost vanjskim uvjetima (Goss i sur., 2020). Navedene karakteristike svrstavaju ih u carstvo protista unutar domene eukariota.

Iako se filogenetski odnosi između pojedinih skupina još utvrđuju, mikroalge je moguće grubo podijeliti u 11 koljena: Cyanophyta, Chlorophyta, Rhodophyta, Glaucophyta, Euglenophyta, Chlorarachiniophyta, Charophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Heterokontophyta i Dinoflagellata (Barkia i sur., 2019). Podaci o aktualnom nazivlju poznatih vrsta dostupni su u taksonomskoj bazi podataka *AlgaeBase*.



Slika 1. Filogena shema bazirana na analizi ribosomalnih RNA sekvenci (modificirano prema Singh i Saxena, 2015).

1.1.2. Načini ishrane i pridobivanja energije

Iako se mikroalge općenito smatraju fotoautotrofnim vrstama, neke je moguće uzgajati i u heterotrofnim, miksotrofnim ili fotoheterotrofnim uvjetima. Način uzgoja mikroalgi, odnosno izvor energije i izvor ugljika za rast, utječe na brzinu rasta i sastav stanice, a posebno na produktivnost biomase i lipida (Chew i sur., 2018).

Fotoautotrofni rast mikroalgi podrazumijeva korištenje svjetlosne energije i anorganskog izvora ugljika, najčešće u obliku CO₂ u procesu fotosinteze. Udio lipida u biomasi uzgojenoj na ovakav način može biti između 5 % i 68 %, ovisno o vrsti (Chen i sur., 2011).

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

Kod miksotrofnog uzgoja mikroalge koriste svjetlost kao glavni izvor energije uz simultano trošenje anorganskog (CO₂) i organskog izvora ugljika za rast. Energija potrebna za obavljanje staničnih funkcija pridobiva se fotosintezom, ali i razgradnjom asimiliranih organskih izvora ugljika, što znači da svjetlosna energija ne ograničava rast miksotrofnih vrsta (Mohan i sur., 2014).

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

Fotoautotrofan način rasta najčešće se koristi pri uzgoju mikroalgi jer značajno doprinosi fiksaciji CO₂ iz atmosfere i rijetko je podložan kontaminacijama. Međutim, takvim uzgojem dobivaju se niske produktivnosti biomase i lipida. S druge strane, heterotrofnim uzgojem postiže se visoka produktivnost biomase i lipida, ali se vrlo često pojavljuju kontaminacije zbog prisutnosti organskog izvora ugljika (najčešće jednostavni šećeri, npr. glukoza i saharoza). Miksotrofna i fotoheterotrofna kultivacija rijetko se primjenjuju zbog različitih tehnoloških nedostataka dostupnih fotobioreaktorskih sustava (Chew i sur., 2018).

1.2. DIJATOMEJE

1.2.1. Opće karakteristike i podjela

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

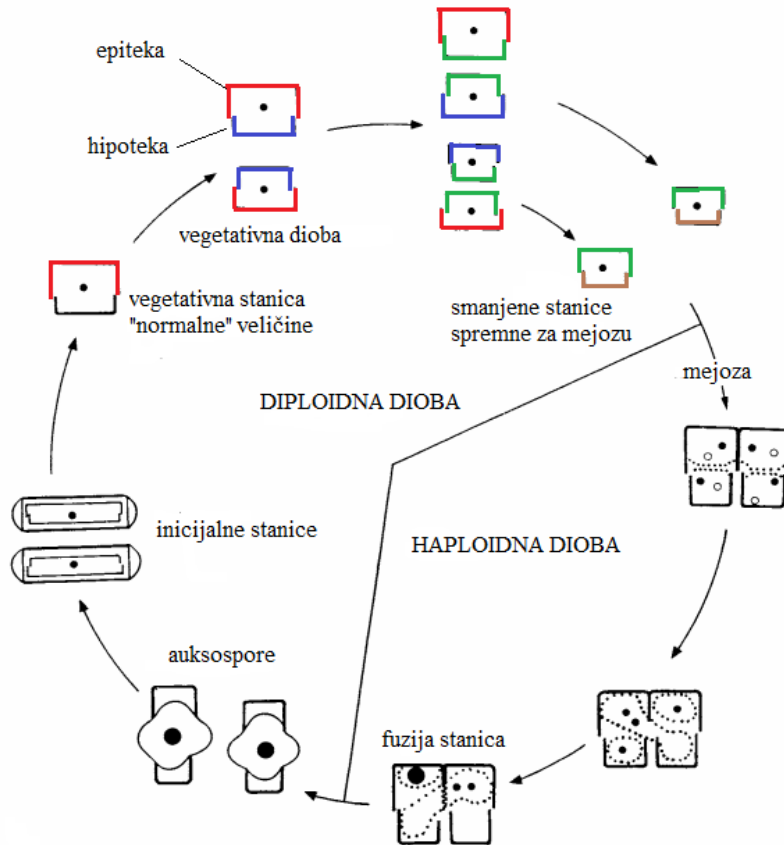
Smatra se da postoji između $2 \cdot 10^4$ i $2 \cdot 10^5$ vrsta dijatomeja, od čega je preko 8 000 vrsta detaljno istraženo (d'Ippolito i sur., 2015). Čine više od 70 % ukupnog morskog planktona i odgovorne su za 40 – 50 % ukupne proizvodnje O_2 u oceanima (Adams i Bugbee, 2013; d'Ippolito i sur., 2015). Daleko su najproduktivnije i ekološki najprilagodljive eukariotske mikroalge na svijetu. Nazivaju se i biološkim pumpama jer imaju sposobnost fiksiranja CO_2 , čime smanjuju koncentraciju istog u atmosferskom zraku. Odgovorne su za otprilike 20 % fiksacije ugljika na Zemlji (Gao i sur., 2019). Njihovim ugibanjem formira se dijatomejska zemlja kojoj je svojstvena golema moć apsorpcije, zbog čega se često koristi kao filtracijsko sredstvo i insekticid.

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

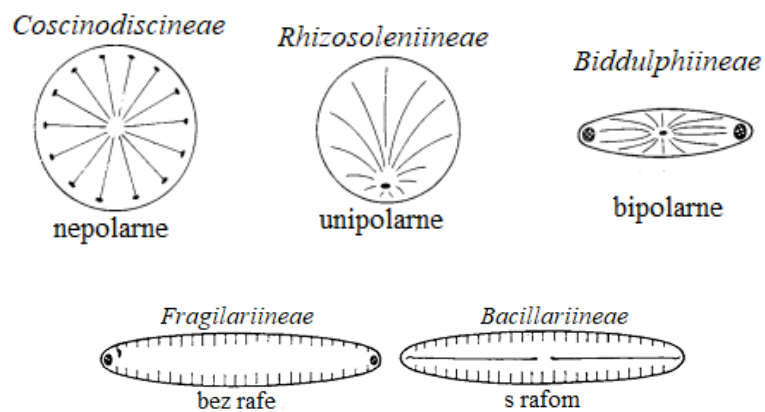
Karakterizira ih stanična ljušturica građena od kremenata (SiO_2), tzv. frustula, koja nije prisutna kod drugih razreda mikroalgi. Frustula je čvrsta struktura koja stanicama pruža mehaničku potporu, a istovremeno zbog njezine poroznosti omogućava unos nutrijenata u stanicu (Hildebrand i Lerch, 2015).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

Razmnožavati se mogu vegetativno i spolno (Slika 2). Vegetativnim načinom razmnožavanja iz stanice majke nastaju dvije stanice kćeri. Karakteristika ovakvog načina razmnožavanja je postepeno smanjenje veličine stanica kroz generacije. Kada stanice dosegnu kritičnu veličinu nakon nekoliko generacija, počinju se razmnožavati spolnim načinom kako bi izbjegle smrt (Hildebrand i Lerch, 2015).

Tradicionalno se dijele u dva reda, prema evolucijskim i strukturalnim razlikama na: (1) centrice ili *Centrales* koje su radijalno simetrične s obzirom na središte stanice i (2) penate tj. *Pennales* sa svojstvom bilateralne simetrije stanica. Unutar reda *Centrales* postoji podjela na polarne i nepolarne rodove, dok se brojniji red *Pennales* grana na *Bacillariophyceae* (rodovi s izraženom rafom) i *Fragilariophyceae* (rodovi koji nemaju rafu) (d'Ippolito i sur., 2015). Slika 3 prikazuje stanice dijatomeja iz redova *Centrales* i *Pennales*.



Slika 2. Shematski prikaz vegetativnog i spolnog načina razmnožavanja penatnih dijatomeja (modificirano prema Hasle i Syvertsen, 1996).



Slika 3. Podredovi unutar reda *Centrales* (*Coscinodiscineae*, *Rhizosoleniineae* i *Biddulphiineae*) i reda *Pennales* (*Fragilariineae* i *Bacillariineae*) (modificirano prema Hasle i Syvertsen, 1996).

1.2.2. Fotosinteza

Fotosinteza je proces kojim fototrofni organizmi koristeći energiju fotona svjetlosti fiksiraju CO₂ u ugljikohidrate, otpuštajući O₂ kao nusproizvod. Podrazumijeva niz reakcija na tilakoidnim membranama (fotokemijske reakcije) i u stromi kloroplasta (ugljik - fiksirajuće i redukcijske reakcije Calvinovog ciklusa) (Batista-Silva i sur., 2020).

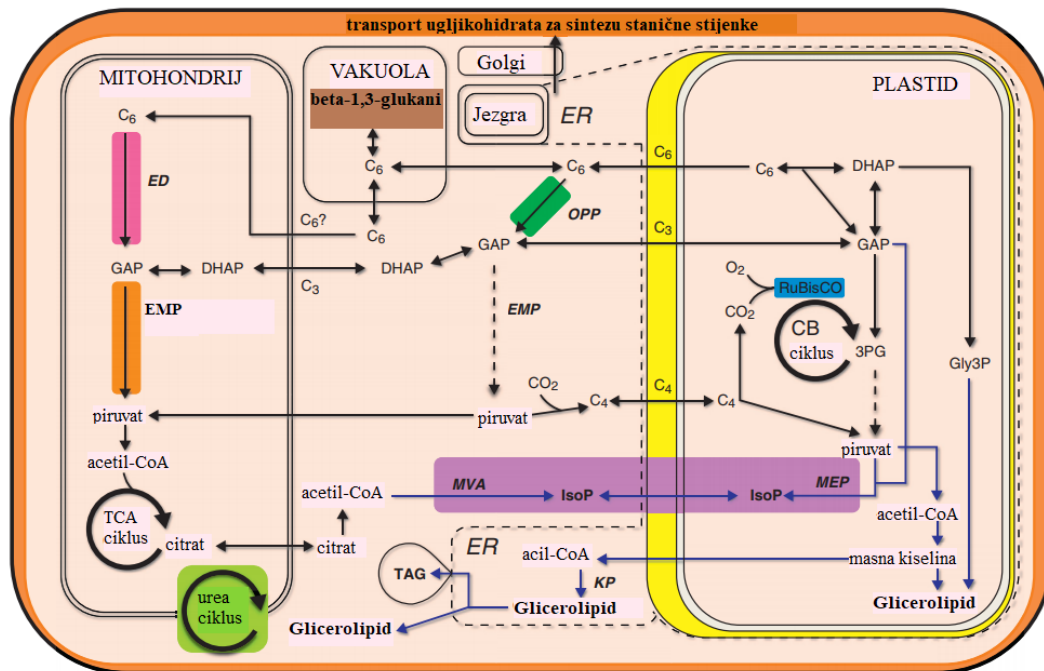
Fotokemijske reakcije provode se na komponentama fotosintetskog aparata smještenog u tilakoidima kloroplasta. Spomenute komponente obuhvaćaju: fotosustav II, fotosustav I, citokrom b₆/f i ATP sintazu (Masojídek i sur., 2013). Fotosustav II apsorbira fotone vidljivog dijela spektra, aktivira ih i prenosi do fotosustava I preko citokroma b₆/f. Otpuštene elektrone fotosustav II nadomješta fotolizom vode, pri čemu uz elektrone nastaje i O₂. Prijenos elektrona kroz fotosustav II generira transmembranski gradijent protona koji služi kao pokretačka sila za fosforilaciju ADP u ATP uz ATP sintazu. U fotosustavu I se elektroni ponovno aktiviraju i koriste za redukciju nosača elektrona NADP⁺ u NADPH (Batista-Silva i sur., 2020).

Visokoenergetski spojevi nastali fotokemijskim reakcijama (ATP i NADPH) služe kao pokretačka sila Calvinovog ciklusa koji se odvija u stromi kloroplasta. U tom procesu se asimilira i reducira CO₂ u trioza-fosfate koji dalje ulaze u biosintetske puteve ugljikohidrata, lipida, proteina i sekundarnih metabolita (Batista-Silva i sur., 2020). Navedeni mehanizam fotosinteze vrijedi generalno za sve fototrofne vrste, a u daljnjem tekstu biti će navedene neke posebnosti fotosinteze dijatomeja u odnosu na druge vrste.

Glavni produkt fotosinteze dijatomeja je β-1,3-glukan krizolaminarin. Krizolaminarin se pohranjuje u citosolu kao rezervni izvor energije. Većina ostalih fototrofnih organizama kao rezervu skladišti škrob (polimer glukoznih jedinica povezanih α-1,4-glikozidnom vezom) u plastidima (Hildebrand i sur., 2013; Goss i sur., 2020). Slika 4 prikazuje intracelularnu organizaciju fiksacije CO₂ i skladištenja ugljikohidrata u stanicama dijatomeja.

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

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



Slika 4. Shema metabolizma ugljika u stanicama dijatomeja. Organele- ER: endoplazmatski retikulum. Metabolički putevi- CB: Calvin-Benson; ED: Entner-Doudoroffov put; EMP: Embden–Meyerhoff-Parnasov put; KP: Kennedyev put; MEP: put 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfata; MVA: mevalonat izoprenoidni put; OPP: oksidativni pentoza fosfatni put; TCA: ciklus limunske kiseline. Metabolit/enzim- 3PG: 3-fosfoglicerat; DHAP: dihidroxiaceton fosfat; GAP: gliceraldehid-3-fosfat; Gly3P: glicerol-3-fosfat; IsoP: izoprenoid; RuBisCO: ribuloza-bisfosfat karboksilaza oksigenaza; TAG: triacilglicerol (modificirano prema Hildebrand i sur., 2013).

1.2.3. Biosinteza lipida

Lipide mikroalgi dijelimo u dvije skupine: polarne i neutralne. Polarni lipidi uključuju fosfolipide i glikolipide, dok u neutralne lipide spadaju acilgliceridi (tri-, di- i monogliceridi) i masne kiseline. Neutralni lipidi pretežno služe kao izvori energije, dok polarni lipidi izgrađuju

stanične membrane. Masne kiseline su karboksilne kiseline s lancima duljine 4 - 36 atoma ugljika. Među njima razlikujemo zasićene masne kiseline (eng. Saturated Fatty Acid, SFA), masne kiseline s jednom nezasićenom vezom u lancu (eng. Monounsaturated Fatty Acid, MUFA), masne kiseline s dvije nezasićene veze u lancu (eng. Di-unsaturated Fatty Acid, DUFA), masne kiseline s tri nezasićene veze u lancu (eng. Tri-unsaturated Fatty Acid, TUFA) i masne kiseline s više od tri nezasićene veze u lancu (eng. Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA). Prosječna duljina lanca u mikroalgama je od C14:0 do C22:6 pri čemu prevladavaju zasićene i mononezasićene masne kiseline (najčešće su C16:0, C18:0, C16:1, C18:1, C16:2, C18:2 i C18:3). Vrlo rijetko su prisutne masne kiseline s više od šest nezasićenih veza u lancu (D'Alessandro i Antoniosi Filho, 2016).

Mikroalge pohranjuju acilgliceride tijekom dana u procesu fotosinteze, a troše ih noću respiracijom za potrebe održavanja stanica i njihovu diobu. Nekoliko faktora inducira akumulaciju lipida u uvjetima stresa: različite koncentracije nutrijenata (dušik, fosfor, željezo), visok salinitet, visoka temperatura, intenzitet svjetlosti i alternativni izvori ugljika (Sayanova i sur., 2017). Važno je naglasiti da, iako stres pozitivno utječe na nakupljanje lipida u mikroalgama, on negativno utječe na rast stanica što u konačnosti može smanjiti produktivnost lipida.

Sinteza lipida u stanici odvija se u sljedećim odjeljcima: sinteza masnih kiselina u kloroplastu, a sinteza triacilglicerida (TAG) u endoplazmatskom retikulumu i tilakoidima (Slika 5).

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

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

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

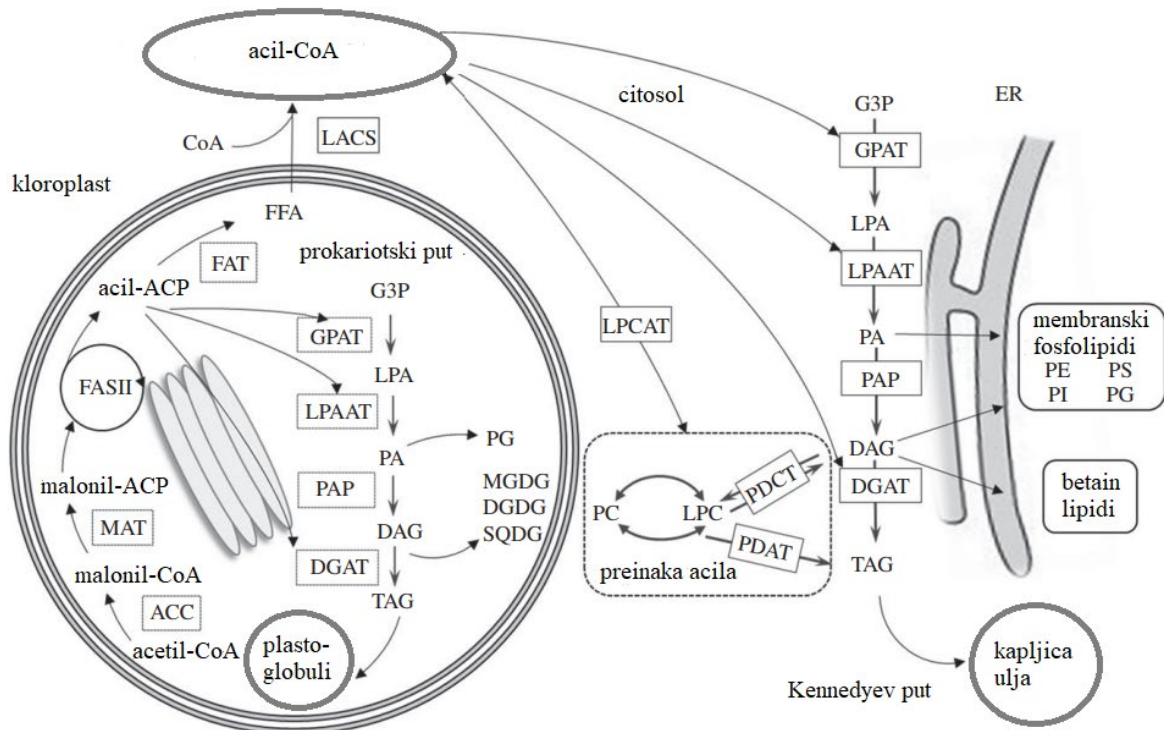
(2) difundiraju u citosol gdje sudjeluju u sintezi fosfolipida i TAG (eukariotski Kennedyev put).

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

Prije ulaska u eukariotski put sinteze TAG, acil-ACP se u kloroplastu oslobodaju proteina nosača acila (eng. acyl carrier protein, ACP) pomoću acil-ACP tioesteraze (eng. fatty acyl-ACP thioesterase, FAT) pa difundiraju u citosol u formi slobodnih masnih kiselina (eng. free fatty acid, FFA). U citosolu se esterificiraju u acil-CoA pomoću acil-CoA sintaze (eng. long-chain acyl-CoA synthase, LACS) lokalizirane na vanjskoj strani membrane kloroplasta. Acil-CoA su prekursori sinteze TAG Kennedyevim putem na endoplazmatskom retikulumu. Osim toga, mogu ući u acil-modificirajući ciklus, vežući se umjesto masne kiseline na sn-2 poziciji fosfatidilkolina (PC) pomoću lizofosfatidilkolin aciltransferaze (eng. lysophosphatidylcholine acyltransferase, LPCAT). Modifikacijama na PC nastaju nezasićene masne kiseline, osobito PUFA, koje se dalje ugrađuju u stanične lipide (Sayanova i sur., 2017).

U eukariotima se TAG sintetiziraju Kennedyevim putem postepenom esterifikacijom glicerol-3-fosfata (G3P), najvjerojatnije na endoplazmatskom retikulumu. Transfer masne kiseline s acil-CoA na sn-1 poziciju G3P je prvi korak ovog puta kataliziran glicerol-3-fosfat aciltransferazom (eng. glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT) koji rezultira stvaranjem lizofosfatidne kiseline (eng. lysophosphatic acid, LPA). Aciltransferaza lizofosfatidne kiseline (eng. lysophosphatic acid acyltransferase, LPAAT) katalizira esterifikaciju LPA na sn-2 poziciji glicerolne okosnice, pri čemu nastaje fosfatidna kiselina (eng. phosphatic acid, PA). Defosforilaciju na sn-3 poziciji PA provodi fosfataza fosfatidne kiseline (eng. phosphatic acid phosphatase, PAP) pri čemu nastaje DAG. PA i DAG su prekursori za sintezu TAG i membranskih fosfolipida (Sayanova i sur., 2017).

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



Slika 5. Shematski prikaz biosinteze lipida u mikroalgama. ACC: acetil-CoA karboksilaza; DAG: diacilglicerol; DGAT: diacilglicerol aciltransferaza; DGDG: digalaktozil diacilglicerol; ER: endoplazmatski retikulum; FAT: acil-ACP tioesteraza; FAS: sintaza masnih kiselina; FFA: slobodna masna kiselina; G3P: glicerol-3-fosfat; GPAT: glicerol-3-fosfat aciltransferaza; LACS: acil-CoA sintaza; LPAAT: aciltransferaza lizofosfatidne kiseline; LPA: lizofosfatidna kiselina; LPCAT: lizofosfatidilkolin aciltransferaza; MAT: malonil transferaza; MGDG: monogalaktozil diacilglicerol; PA: fosfatidna kiselina; PAP: fosfataza fosfatidne kiseline; PC: fosfatidilkolin; PDAT: fosfolipid diacilglicerol aciltransferaza; PDCT: fosfokolin transferaza; PE: fosfatidiletanolamin; PG: fosfatidilglicerol; PI: fosfatidilinozitol; PS: fosfatidilserin; SQDG: sulfokinovozil diacilglicerol; TAG: triacilglicerol (modificirano prema Sayanova i sur., 2017).

1.2.4. Transport i metabolizam silicija

Silicij je makroelement neophodan za formiranje stanične ljušturice, odnosno frustule (u obliku netopljivog SiO_2) u procesu diobe stanica (Jeffryes i sur., 2013). Dijatomeje su najveći svjetski doprinositelji biosilicifikaciji, procesu kojim se anorganski silicij ugrađuje u žive organizme u formi silicijevog dioksida (Martin-Jezequel i sur., 2000). Biosilicifikacija podrazumijeva slijedeće korake: unos otopljenog silicija iz okoline u stanicu, taloženje istog u obliku amornog SiO_2 i konačno, formiranje frustule (Jeffryes i sur., 2013). Iako točan mehanizam nije razjašnjen, poznato je da su transport i metabolizam silicija usko povezani s staničnim ciklusom dijatomeja (Martin-Jezequel i sur., 2000; Adams i Bugbee, 2013). Transport otopljenog silicija u formi ortosilicijeve kiseline, $\text{Si}(\text{OH})_4$, iz okoline stanice u citoplazmu događa se u periodu između citokineze i odvajanja stanica kćeri. Kada su stanice u fazi prepreme za diobu, $\text{Si}(\text{OH})_4$ se transportira kroz staničnu stijenku u unutarstanični prostor. Pri vrlo visokim koncentracijama u okolini stanice, otopljeni silicij se u stanicu transportira difuzijom, a kod nižih koncentracija ($\leq 30 \mu\text{M}$) pomoću transportnih proteina ovisnih o natriju (Adams i Bugbee, 2013). Dalje se $\text{Si}(\text{OH})_4$ transportira u vezikulu gdje polimerizira u čvrsti amorfni silicijev dioksid koji izbija na površinu stanice tvoreći dvije nove teke stanica kćeri. Sintezom teka stanica kćeri, omogućena je dioba stanice majke (Jeffryes i sur., 2013). Martin-Jezequel i sur. (2000) predlažu da bi transport silicija mogao biti uvjetovan kontroliranom ekspresijom i lokalizacijom transportnih proteina za silicij, kao i udjelom silicija inkorporiranog u frustulu.

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

1.2.5. Utjecaj makronutrijenata silicija, dušika i fosfora na biosintezu lipida

Metabolizam silicija utječe na diobu stanica i formiranje frustule, ali i na neke druge metaboličke puteve u dijatomeja. Posebno je zanimljiv utjecaj na metabolizam triacilglicerida (TAG), koji mogu poslužiti kao alternativna sirovina za proizvodnju biodizela treće generacije.

Sinteza TAG stimulirana je kada silicij limitira rast stanica (Adams i Bugbee, 2013). Konkretno, niske koncentracije silicija u stanici aktiviraju transkripciju gena koji kodiraju acetyl-CoA karboksilazu. Navedeni enzim katalizira reakciju sinteze malonil-CoA iz acetyl-CoA, odnosno prvi korak u sintezi masnih kiselina. Osim toga, isti enzim katalizira sintezu triacilglicerida (TAG) u glicerol-3-fosfatnom putu (Jeffries i sur., 2013).

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

Dušik je važan nutrijent koji sudjeluje u sintezi proteina, nukleinskih kiselina i klorofila u stanici. U uvjetima limitacije dušikom, metabolizam ugljika preusmjerava se sa sinteze krizolaminarina na sintezu lipida, osobito triacilglicerida (TAG). Istovremeno se de novo sinteza masnih kiselina neometano odvija pri čemu nastaju potencijalni prekursori sinteze TAG. Osim navedenog, limitacija rezultira aktiviranjem fosfolipaza i galaktolipaza, enzima koji degradiraju fosfolipide i galaktolipide u masne kiseline iz kojih se sintetiziraju TAG (Zulu i sur., 2018).

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

1.2.6. Primjena

Čitave stanice dijatomeja, njihove frustule i vrijedne biomolekule imaju široku primjenu u biotehnologiji i drugim znanstvenim područjima. Uvelike se koriste u nanotehnologiji, biosenzorici, forenzičkoj imunologiji, filtraciji i purifikaciji vode, akvakulturi, bioremedijaciji i drugdje. U biotehnologiji se najviše koriste za dobivanje vrijednih proizvoda i biodizela. Neki od najvrijednih proizvoda dijatomeja su eikozapentaenoična kiselina (EPA), fukoksantin i krizolaminarin.

Eikozapentaenoična kiselina (EPA) bitna je komponenta polarnih lipida koji izgrađuju membrane stanica dijatomeja, uključujući tilakoide. Sintetizira se uglavnom u eksponencijalnoj fazi rasta stanica. To je ω -3 polinezasićena kiselina, koja ima vrlo povoljan utjecaj na ljudsko

zdravlje. Konkretno, učinkovita je u sprječavanju hipertenzije, tromboze, aritmije i infarkta miokarda zbog čega se često koristi kao suplement hrani (Kiran Marella i Tiwari, 2020).

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

Krizolaminarin, glavni skladišni polisaharid dijatomeja, još je jedan metabolit koji ima iznimno pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi. Zbog sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala, koristi se za liječenje teških i ozbiljnih bolesti, uključujući karcinom (Xia i sur., 2018)

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Mikroalge su važan izvor makromolekula (proteina, lipida, ugljikohidrata, pigmenata) te niza metabolita s biološkom aktivnošću (antibiotici, fungicidi, antimikotici, citostatici) od kojih se neki već koriste u proizvodnji različitih prehrambenih, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda, stočne hrane, lijekova i nutraceutika. Također se istražuje mogućnost primjene mikroalgi u proizvodnji biogoriva, obradi otpadnih voda te bioremedijaciji. Važan korak u razvoju biotehnoške primjene ovih mikroorganizama je optimizacija hranjive podloge u cilju postizanja visoke koncentracije stanica i produktivnosti procesa. Limitirajući supstrati u najčešće korištenoj f/2 hranjivoj podlozi za fototrofni uzgoj dijatomeje su silicij, dušik i fosfor. Opći cilj ovog rada bio je optimirati koncentraciju ovih mikroelemenata u cilju postizanja visoke produktivnosti procesa i broja stanica u šaržnom fototrofnom uzgoju. Također je istražen učinak šaržnog uzgoja s pritokom supstrata na produktivnost procesa.

Specifični ciljevi ovog rada bili su:

1. Optimirati koncentracije silicija, dušika i fosfora u f/2 hranjivoj podlozi za fototrofni uzgoj šaržnim postupkom.
2. Učinak sastava hranjive podloge (Si, N, P) na udjel i sastav pigmenata (klorofil a i c), makromolekulski sastav (udjel proteina i lipida) i sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima u biomasi na kraju šaržnog procesa.
3. Usporedba šaržnog uzgoja i šaržnog uzgoja s pritokom supstrata na rast broja stanica i produktivnost procesa.
4. Učinak šaržnog uzgoja s pritokom supstrata na udjel i sastav pigmenata (klorofil a i c), makromolekulski sastav (udjel proteina, ugljikohidrata i lipida) i sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima u biomasi.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizam

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

3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga

Popis kemikalija korištenih za pripremu hranjivih podloga nalazi se u Tablici 1.

Tablica 1. Kemikalije korištene za pripremu hranjivih podloga.

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

3.1.3. Ostale kemikalije

Popis svih ostalih kemikalija korištenih u eksperimentu, izuzev kemikalija koje su sastavni dio hranjivih podloga, dan je u Tablici 2.

Tablica 2. Popis ostalih kemikalija korištenih tijekom eksperimenta.

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

3.1.4. Hranjive podloge

3.1.4.1. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma i održavanje kulture

Za uzgoj inokuluma i održavanje kulture korištena je f/2 hranjiva podloga, koja se u ranijim istraživanjima pokazala pogodnom za uzgoj mikroalgi, osobito dijatomeja (Guillard, 1975). Priprema hranjive podloge započinje otapanjem soli navedenih u Tablici 3 u destiliranoj vodi, čime se dobiva umjetna morska voda. Umjetnoj morskoj vodi, nakon sterilizacije i hlađenja,

dodaju se sastojci f/2 podloge (Tablica 4). Sastav otopine vitamina dan je u Tablici 5, a otopine elemenata u tragovima u Tablici 6.

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

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

Tablica 4. Sastav f/2 podloge.

| Sastojak f/2 podloge | Koncentracija izvorne standardne otopine [g L ⁻¹] | Volumen izvorne standardne otopine po jedinici volumena hranjive podloge [mL L ⁻¹] | Molarna koncentracija u hranjivoj podlozi [mol L ⁻¹] |
|--|--|---|--|
| Na ₂ SiO ₃ × 9H ₂ O | 30 | 1 | 1,06 · 10 ⁻⁴ |
| NaNO ₃ | 75 | 1 | 8,82 · 10 ⁻⁴ |
| NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O | 5 | 1 | 3,62 · 10 ⁻⁵ |
| Vitamini | (vidi Tablicu 5) | 0,5 | (vidi Tablicu 5) |
| Elementi u tragovima | (vidi Tablicu 6) | 1 | (vidi Tablicu 6) |

Tablica 5. Sastav otopine vitamina.

| Sastojak otopine vitamina | Koncentracija izvorne standardne otopine [g L ⁻¹] | Volumen izvorne standardne otopine po jedinici volumena otopine vitamina [mL L ⁻¹] | Masa tvari po jedinici volumena otopine vitamina [mg L ⁻¹] | Molarna koncentracija u hranjivoj podlozi [mol L ⁻¹] |
|------------------------------|---|---|---|--|
| Tiamin HCl | - | - | 200 | 2,96 · 10 ⁻⁷ |
| Biotin | 1 | 1 | - | 2,05 · 10 ⁻⁹ |
| Cijanokobalamin | 1 | 1 | - | 3,69 · 10 ⁻¹⁰ |

Tablica 6. Sastav otopine elemenata u tragovima.

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

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

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

Priprema podloge započinje pripremom umjetne morske vode (Tablica 3), kojoj se, nakon sterilizacije i hlađenja, dodaju sastojci navedeni u Tablici 7. Molarne koncentracije svih sastojaka hranjive podloge navedene su u Tablici 8.

Podlogama je pridružen trobrojni naziv pri čemu prvi broj označava dodani volumen 30 g L⁻¹ Na₂SiO₃ × 9H₂O po volumenu podloge [mL L⁻¹], drugi broj označava dodani volumen 75 g L⁻¹ NaNO₃ po volumenu podloge [mL L⁻¹], dok se treći broj odnosi na dodatak 5 g L⁻¹ NaH₂PO₄ × H₂O u podlogu [mL L⁻¹].

Tablica 7. Volumeni izvornih standardnih otopina dodanih po jedinici volumena izvorne i modificirane f/2 hranjive podloge.

| | Volumen izvorne standardne otopine po jedinici volumena hranjive podloge [mL L ⁻¹] | | | | | | |
|---|--|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | f/2 | 4xSi/2xN/1xP | 4xSi/2xN/4xP | 10xSi/4xN/4xP | 10xSi/6xN/4xP | 10xSi/4xN/6xP | 10xSi/4xN/8xP |
| Na ₂ SiO ₃ × 9H ₂ O (30 g L ⁻¹) | 1 | 4 | 4 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| NaNO ₃ (75 g L ⁻¹) | 1 | 2 | 2 | 4 | 6 | 4 | 4 |
| NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O (5 g L ⁻¹) | 1 | 1 | 4 | 4 | 4 | 6 | 8 |
| Otopina vitamina | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Otopina elemenata u tragovima | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Tablica 8. Molarne koncentracije tvari hranjive podloge za izvornu i modificirane f/2 podloge.

| | Molarna koncentracija tvari u hranjivoj podlozi [mol L ⁻¹] | | | | | | |
|--|--|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | f/2 | 4xSi/2xN/1xP | 4xSi/2xN/4xP | 10xSi/4xN/4xP | 10xSi/6xN/4xP | 10xSi/4xN/6xP | 10xSi/4xN/8xP |
| Na ₂ SiO ₃ × 9H ₂ O | 1,06·10 ⁻⁴ | 4,24·10 ⁻⁴ | 4,24·10 ⁻⁴ | 1,06·10 ⁻³ | 1,06·10 ⁻³ | 1,06·10 ⁻³ | 1,06·10 ⁻³ |
| NaNO ₃ | 8,82·10 ⁻⁴ | 1,764·10 ⁻³ | 1,764·10 ⁻³ | 3,528·10 ⁻³ | 5,292·10 ⁻³ | 3,528·10 ⁻³ | 3,528·10 ⁻³ |
| NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O | 3,62·10 ⁻⁵ | 3,62·10 ⁻⁵ | 1,448·10 ⁻⁴ | 1,448·10 ⁻⁴ | 1,448·10 ⁻⁴ | 2,172·10 ⁻⁴ | 2,896·10 ⁻⁴ |
| FeCl ₃ × 6H ₂ O | 1,17·10 ⁻⁵ | 1,17·10 ⁻⁵ | 1,17·10 ⁻⁵ | 1,17·10 ⁻⁵ | 1,17·10 ⁻⁵ | 1,17·10 ⁻⁵ | 1,17·10 ⁻⁵ |
| Na ₂ EDTA× 2H ₂ O | 1,17·10 ⁻⁵ | 1,17·10 ⁻⁵ | 1,17·10 ⁻⁵ | 1,17·10 ⁻⁵ | 1,17·10 ⁻⁵ | 1,17·10 ⁻⁵ | 1,17·10 ⁻⁵ |
| CuSO ₄ × 5 H ₂ O | 3,93·10 ⁻⁸ | 3,93·10 ⁻⁸ | 3,93·10 ⁻⁸ | 3,93·10 ⁻⁸ | 3,93 · 10 ⁻⁸ | 3,93 · 10 ⁻⁸ | 3,93 · 10 ⁻⁸ |
| Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O | 2,60·10 ⁻⁸ | 2,60·10 ⁻⁸ | 2,60·10 ⁻⁸ | 2,60·10 ⁻⁸ | 2,60·10 ⁻⁸ | 2,60·10 ⁻⁸ | 2,60·10 ⁻⁸ |
| ZnSO ₄ × 7H ₂ O | 7,65·10 ⁻⁸ | 7,65·10 ⁻⁸ | 7,65·10 ⁻⁸ | 7,65·10 ⁻⁸ | 7,65·10 ⁻⁸ | 7,65·10 ⁻⁸ | 7,65·10 ⁻⁸ |
| CoCl ₂ × 6H ₂ O | 4,20·10 ⁻⁸ | 4,20·10 ⁻⁸ | 4,20·10 ⁻⁸ | 4,20·10 ⁻⁸ | 4,20·10 ⁻⁸ | 4,20·10 ⁻⁸ | 4,20·10 ⁻⁸ |
| MnCl ₂ × 4H ₂ O | 9,10·10 ⁻⁷ | 9,10·10 ⁻⁷ | 9,10·10 ⁻⁷ | 9,10·10 ⁻⁷ | 9,10·10 ⁻⁷ | 9,10·10 ⁻⁷ | 9,10·10 ⁻⁷ |
| Tiamin HCl | 2,96·10 ⁻⁷ | 2,96·10 ⁻⁷ | 2,96·10 ⁻⁷ | 2,96·10 ⁻⁷ | 2,96·10 ⁻⁷ | 2,96·10 ⁻⁷ | 2,96·10 ⁻⁷ |
| Biotin | 2,05·10 ⁻⁹ | 2,05·10 ⁻⁹ | 2,05·10 ⁻⁹ | 2,05·10 ⁻⁹ | 2,05·10 ⁻⁹ | 2,05·10 ⁻⁹ | 2,05·10 ⁻⁹ |
| Cijanokobalamin | 3,69·10 ⁻¹⁰ | 3,69·10 ⁻¹⁰ | 3,69·10 ⁻¹⁰ | 3,69·10 ⁻¹⁰ | 3,69·10 ⁻¹⁰ | 3,69·10 ⁻¹⁰ | 3,69·10 ⁻¹⁰ |

3.1.4.3. Hranjiva podloga za šaržni uzgoj s pritokom supstrata

Za šaržni dio uzgoja dijatomeje u tikvicama korištena je modificirana f/2 hranjiva podloga 10xSi/4xN/4xP (naziv hranjive podloge i njena priprema objašnjeni su u Poglavlju 3.1.4.2).

Tijekom uzgoja izvršene su 4 prihrane (13-ti, 20-ti, 26-ti i 30-ti dan uzgoja). Prvom prihranom u svaku tikvicu je dodano 4 mL L⁻¹ otopine Na₂SiO₃ × 9H₂O (30 g L⁻¹); 1,3 mL L⁻¹ otopine NaNO₃ (75 g L⁻¹); 1,5 mL L⁻¹ otopine NaH₂PO₄ × H₂O (5 g L⁻¹); 1 mL L⁻¹ otopine elemenata u tragovima te 0,5 ml L⁻¹ otopine vitamina. U sljedeće 3 prihrane također su dodani jednaki volumeni anorganskih soli, dok otopina elemenata u tragovima i otopina vitamina više nisu dodavane do kraja uzgoja (Tablica 9).

Tablica 9. Volumeni izvornih standardnih otopina dodanih po jedinici volumena hranjive podloge na početku uzgoja i u prihranama tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u tikvicama.

| Volumen izvorne standardne otopine po jedinici volumena hranjive podloge [mL L ⁻¹] | | | | | |
|---|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 0-ti dan | 13-ti dan | 20-ti dan | 26-ti dan | 30-ti dan |
| Na ₂ SiO ₃ × 9H ₂ O (30 g L ⁻¹) | 10 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| NaNO ₃ (75 g L ⁻¹) | 4 | 1,3 | 1,3 | 1,3 | 1,3 |
| NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O (5 g L ⁻¹) | 4 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| Otopina vitamina | 0,5 | 0,5 | - | - | - |
| Otopina elemenata u tragovima | 1 | 1 | - | - | - |

3.1.5. Oprema i aparatura

3.1.5.1. Centrifuge

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

3.1.5.2. Uređaj za plinsku kromatografiju (GC)

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

3.1.5.3. Ostala oprema i aparatura

Uz osnovno laboratorijsko posuđe i pribor, u izradi ovog rada korištena je i oprema navedena u Tablici 10.

Tablica 10. Ostala oprema i aparatura korištena tijekom eksperimenta.

| Oprema | Proizvođač i model |
|---------------------------|--|
| Autoklav | Sutjeska, Jugoslavija, 1987., serijski broj:401592 |
| Analitička vaga | Acculab, SAD, ALC210.4 |
| Hladnjak | Gorenje, Slovenija, serijski broj:4002388 |
| Ledomat | Scotsman, USA, AF-10 |
| Sušionici | Instrumentaria, Hrvatska, ST-05 i ST-06 |
| Svjetlosni mikroskop | Olympus, Japan, CH2O |
| Tehnička vaga | Tehtnica, Slovenija, ET-1211 |
| Tresilica | Thermo Scientific, SAD, SHKE2000-1CE |
| Ultrazvučni homogenizator | Bandelin, Njemačka, Sonoplus HD 2200 |
| UV/Vis spektrofotometar | Agilent Technologies, SAD, Cary 100 |
| Vodena kupelj | InkoLab, Hrvatska, VK5ER |
| Vrtložna mješalica | Witeg, Njemačka, VM-10 |
| Zamrzivač | Zanussi, Italija, serijski broj:4002409 |

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj inokuluma

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

3.2.2. Optimizacija sastava hranjive podloge

Prilikom optimizacije sastava hranjive podloge za fototrofni rast dijatomeje korištena je f/2 izvorna i 6 modificiranih f/2 hranjivih podloga (Poglavlje 3.1.4.2.). Uzgoj je proveden u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL, korisnog volumena 200 mL. Rast je u hranjivim podlogama f/2, 4xSi/2xN/1xP, 4xSi/2xN/4xP, 10xSi/4xN/4xP i 10xSi/6xN/4xP praćen u tri paralele tikvica, a u hranjivim podlogama 10xSi/4xN/6xP i 10xSi/4xN/8xP u jednoj paraleli. U 180 mL prethodno sterilizirane ($121 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 min, autoklav) i ohlađene hranjive podloge dodano je, u aseptičnim uvjetima, 20 mL inokuluma čiji je uzgoj opisan u Poglavlju 3.2.1. Uzgoj je trajao 14 dana, a provodio se šaržno na tresilici uz uvjete navedene u Poglavlju 3.2.1. Uzgoj je praćen dnevnim izuzimanjem 1,5 mL uzorka u kojemu je, nakon tretmana ultrazvukom u svrhu razbijanja nakupina stanica, određen broj stanica po mililitru suspenzije brojanjem stanica u Thomaovoj komorici (Poglavlje 3.2.4.1.) i optička gustoća podloge pri 540 nm (Poglavlje 3.2.4.2.). Po završetku uzgoja, čitavi volumen prevrele hranjive podloge najprije je podvrgnut djelovanju ultrazvučnih valova u ultrazvučnom homogenizatoru, kako bi se razbile nakupine stanica i olakšale daljnje analize. Potom je uzet alikvot od 1 mL kulture u svrhu određivanja koncentracije proteina (Poglavlje 3.2.4.9.), zatim alikvot od 10 mL za određivanje koncentracije pigmenata (Poglavlje 3.2.4.4.) i 3 paralele po 15 mL uzoraka za gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase (Poglavlje 3.2.4.3.). U uzorcima za određivanje koncentracije pigmenata i gravimetrijsko određivanje biomase, biomasa je izdvojena centrifugiranjem 15 minuta pri 8000 rpm, pri čemu je supernatant odbačen. Preostali volumen kulture centrifugiran je 15 minuta pri 5000 rpm. Supernatant je pohranjen u zamrzivač na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do analize koncentracije nutrijenata (Poglavlja 3.2.4.5., 3.2.4.6. i 3.2.4.7.), a biomasa je

isprana destiliranom vodom i još jednom centrifugirana u jednakim uvjetima, a potom je sušena na 50 °C preko noći. Suha biomasa korištena je za određivanje ukupnih lipida i profila masnih kiselina u biomasi (Poglavlje 3.2.4.8.).

3.2.3. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata

Hranjiva podloga koja se koristila za šaržni dio procesa i sastav pojedinih prihrana tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u tikvicama opisani su u Poglavlju 3.1.4.3. Uzgoj je započet u 12 Erlenmeyerovih tikvica od 500 mL, korisnog volumena 200 mL. U 180 mL prethodno sterilizirane (121 °C, 20 min, autoklav) i ohlađene hranjive podloge dodano je, u aseptičnim uvjetima, 20 mL inokuluma čiji je uzgoj opisan u Poglavlju 3.2.1. Uzgoj se provodio na tresilici u uvjetima opisanim u Poglavlju 3.2.1. i trajao je ukupno 35 dana. Šaržni dio uzgoja trajao je 13 dana, nakon čega je prekinut uzgoj u jednoj tikvici radi daljnjih analiza, a u preostalih 11 tikvica dodana je prva prihrana. Druga prihrana dodana je 20-og dana uzgoja u 8 tikvica, a u preostale 3 tikvice uzgoj je vođen još 24 sata, nakon čega je prekinut. Treća prihrana dodana je 26-og dana uzgoja u 5 tikvica, a u preostale 3 tikvice uzgoj je vođen još 24 sata, nakon čega je prekinut. Posljednja, četvrta prihrana dodana je 30-og dana uzgoja u 2 tikvice, a u preostale 3 tikvice uzgoj je prekinut istog dana. Uzgoj je završio 35-og dana nakon inokulacije u 2 tikvice. Uzgoj je praćen dnevnim određivanjem broja stanica po mililitru suspenzije brojanjem u Thomaovoj komorici (Poglavlje 3.2.4.1.) te određivanjem optičke gustoće podloge pri 540 nm (Poglavlje 3.2.4.2.). Analize nakon svake faze uzgoja obuhvaćale su: gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase (Poglavlje 3.2.4.3.), određivanje udjela proteina (Poglavlje 3.2.4.9.), lipida (Poglavlje 3.2.4.8.) i klorofila (Poglavlje 3.2.4.4.) u biomasi te određivanje koncentracije nutrijenata (Poglavlja 3.2.4.5., 3.2.4.6. i 3.2.4.7.) u podlozi.

3.2.4. Analitičke metode

3.2.4.1. Brojanje stanica u Thomaovoj komorici

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

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

pri čemu je:

n – ukupan broj stanica u 16 velikih kvadrata

d – razrjeđenje suspenzije stanica.

3.2.4.2. Mjerenje optičke gustoće kulture

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

3.2.4.3. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase

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

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

pri čemu je:

m_1 - masa prazne kivete [g]

m_2 - masa kivete s osušenom biomasom [g]

V_p - volumen kulture [L].

3.2.4.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije klorofila

Spektrofotometrijskom određivanju klorofila a i c prethodila je ekstrakcija pigmentata iz vlažne biomase 90 %-tnim (v/v) acetonom. 10 mL kulture centrifugirano je pri 8000 rpm tijekom 15

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

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

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

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

pri čemu je:

V_e - ukupni volumen ekstrakta [mL]

V_f - volumen kulture uzet za ekstrakciju [L]

L - debljina kvarcne kivete [cm].

3.2.4.5. Određivanje koncentracije silicija

Za određivanje koncentracije silicija u hranjivoj podlozi korišten je silikatni kit (Merck KGaA, Njemačka) koji sadrži reagense Si-1, Si-2 i Si-3. U plastičnu epruvetu otpipetirano je 5 mL uzorka hranjive podloge (supernatanta dobivenog centrifugiranjem prevrele komine) temperature između 20 i 40 °C kojem su dodane 3 kapi reagensa Si-1. Suspenzija je dobro promiješana i provjerena je pH vrijednost. pH vrijednost reakcijske smjese mora biti u području 1,2 – 1,6 pa se prema potrebi korigirala. Reakcijska smjesa ostavljena je na sobnoj temperaturi 3 minute. Zatim su dodane 3 kapi reagensa Si-2 i suspenzija je dobro izmiješana. Naposljetku je dodano 0,5 mL reagensa Si-3 i suspenzija je izmiješana. Nakon 10 minuta potrebnih za

provođenje kemijske reakcije, izmjerena je apsorbanija uzorka pri valnoj duljini od 810 nm. Slijepa proba sadržavala je dvostruko destiliranu vodu umjesto uzorka. Koncentracija silicija u uzorku izračunata je prema jednadžbi baždarnog pravca (Prilog 1).

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

3.2.4.6. Određivanje koncentracije dušika

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

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

3.2.4.7. Određivanje koncentracije fosfata

Za određivanje koncentracije fosfata u hranjivoj podlozi korišten je fosfatni kit (Merck KGaA, Njemačka) koji sadrži reagens $\text{PO}_4\text{-1}$ i $\text{PO}_4\text{-2}$. U plastičnu kivetu otpipetirano je 5 mL uzorka hranjive podloge (supernatanta dobivenog centrifugiranjem prevrele komine) kojem je dodano pet kapi reagensa $\text{PO}_4\text{-1}$ te je suspenzija promiješana. Zatim je dodana jedna mikrožličica reagensa $\text{PO}_4\text{-2}$ nakon čega je suspenzija dobro izmiješana na vrtničnoj miješalici da se reagens potpuno otopi. Po isteku 5 minuta potrebnih za provođenje kemijske reakcije, izmjerena je

apsorbancija uzorka pri valnoj duljini od 690 nm. Slijepa proba sadržavala je dvostruko destiliranu vodu umjesto uzorka. Koncentracija fosfatnih iona (PO_4^{3-}) izračunata je prema jednadžbi baždarnog pravca (Prilog 3) te je preračunata na koncentraciju fosfora (P) u uzorku.

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

3.2.4.8. Određivanje profila masnih kiselina

Analizi sadržaja masnih kiselina u lipidima dijatomeja prethodila je in situ transesterifikacija masnih kiselina prema NREL-ovom protokolu za određivanje ukupnih lipida (Van Wycken i Laurens, 2013b). U staklene viala izvagano je $5 - 10 \text{ mg}$ biomase osušene preko noći na $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Biomasi je dodano $20 \text{ }\mu\text{L}$ surogat standarda metil tridekanoata ($\text{C}_{13:0} \text{ ME}$, $\gamma = 10 \text{ mg mL}^{-1}$), $200 \text{ }\mu\text{L}$ otopine kloroform:metanol ($2:1$, v/v) i $300 \text{ }\mu\text{L}$ $0,6 \text{ M}$ otopine HCl u metanolu. Reakcijska smjesa je vorteksirana, a potom inkubirana u vodenoj kupelji na $85 \text{ }^\circ\text{C}$ kroz sat vremena. Istekom vremena reakcije uzorak je hlađen 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodan 1 mL heksana te je smjesa dobro promiješana i ostavljena na sobnoj temperaturi najmanje 60 minuta do razdvajanja faza. Gornja heksanska faza izdvojena je u čistu vialu radi daljnjih analiza. Heksanskoj fazi dodan je određeni volumen internog standarda pentadekana koncentracije 1 mg mL^{-1} ($5 \text{ }\mu\text{L}$ na $200 \text{ }\mu\text{L}$ uzorka). Uzorak je analiziran na plinskom kromatografu GC – 2010 Plus (Shimadzu, Japan) opremljenom masenim detektorom (FID). Količina injektiranog uzorka bila je $2 \text{ }\mu\text{L}$. Kao mobilna faza korišten je helij s protokom od $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. 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 $\text{C}_{13:0} \text{ ME}$ i izražene masenim udjelom u suhoj tvari biomase [%]:

$$m_{x, \text{norm.}} = \frac{\gamma_x}{\gamma_{\text{C}_{13}}} \cdot m_{\text{C}_{13}} \quad [5]$$

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

pri čemu je:

γ_x - koncentracija metilnog estera masne kiseline [mg L^{-1}]

γ_{C13} - koncentracija standarda metil tridekanoata [mg L^{-1}]

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

m_u - masa suhe biomase [mg].

3.2.4.9. Određivanje koncentracije proteina

Određivanje ukupnih proteina u biomasi provedeno je metodom po Lowry-ju. U plastičnu epruvetu dodan je izračunati volumen prevrele podloge (V_{pp}) koji sadrži 0,1 mg biomase. Uzorku je dodano 0,5 mL demineralizirane vode u svrhu resuspendiranja stanica, a zatim 0,5 mL 1 M NaOH. Uzorak je inkubiran u vodenoj kupelji na 95 °C kroz 10 minuta. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, dodano je 2,5 mL otopine C (Tablica 11). 10 minuta kasnije, naglo je dodano 0,5 mL otopine D (Tablica 11) uz miješanje na vrtložnoj miješalici. Uzorak je ostavljen u tami na sobnoj temperaturi kroz 40 minuta. Istekom vremena reakcije, mjerena je apsorbancija pri 550 nm. Slijepa proba sadržavala je demineraliziranu vodu umjesto uzorka. Koncentracija proteina u reakcijskoj smjesi [mg L^{-1}] određena je preko jednadžbe baždarnog pravca (Prilog 4), koja je zatim preračunata na masu proteina u reakcijskoj smjesi [mg]. Iz mase proteina [mg] i mase biomase dodane u reakcijsku smjesu (0,1 mg) izračunat je udio proteina u biomasi [%]:

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

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

pri čemu je:

m_p - masa proteina u reakcijskoj smjesi [mg]

m_x - masa biomase dodana u reakcijsku smjesu [mg]

γ_p - koncentracija proteina u reakcijskoj smjesi [mg L^{-1}]

V_k - ukupni volumen reakcijske smjese [mL]

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

Standardi za izradu baždarnog pravca pripremljeni su razrjeđivanjem 1 g L^{-1} otopine albumina goveđeg seruma (eng. Bowine Serum Albumin, BSA). Koncentracije BSA u razrjeđenjima bile

su u rasponu 0 - 100 mg L⁻¹. U 1 mL razrjeđenja BSA dodano je 2,5 mL otopine C (Tablica 11), a nakon 10 minuta dodano je 0,5 mL otopine D (Tablica 11). Nakon stajanja uzoraka 40 minuta u tami na sobnoj temperaturi, izmjerena je apsorbancija pri 550 nm. Iz eksperimentalnih podataka nacrtana je ovisnost apsorbancije o koncentraciji BSA, tj. baždarni pravac iz kojeg je izračunata pripadajuća jednadžba. Koncentracije BSA u reakcijskoj smjesi ($V_k = 4$ mL) iznosile su 0 - 25 mg L⁻¹ (Prilog 4).

Tablica 11. Sastav otopina korištenih u provođenju metode po Lowry-ju.

| | |
|-----------|--|
| otopina A | 5 % Na ₂ CO ₃ |
| otopina B | 0,5 % CuSO ₄ u 1 %-tnom K, Na-tartaratu |
| otopina C | otopina A:otopina B (50:1, v:v) |
| otopina D | Folin-Ciocalteu reagens razrijeđen destiliranom vodom (1:1, v:v) |

3.2.4.10. Određivanje koncentracije ugljikohidrata

Određivanje sastava monosaharida i udjela ugljikohidrata u biomasi mikroalgi provedeno je prema metodi NREL-a (eng. National Renewable Energy Laboratory, USA) (Van Wychen i Laurens, 2013a). U Pirex staklene epruvete odvagano je 25 mg prethodno osušene biomase mikroalgi te je dodano 250 µL 72 % (w/w) sumporne kiseline. Sadržaj epruvete je polagano miješan kako ne bi došlo do lijepljenja biomase za stjenke epruvete te se ostvario što bolji kontakt biomase sa kiselinom. Epruvete su zatim kroz sat vremena inkubirane u termostatu na 30 °C, uz miješanje sadržaja svakih 5 – 10 minuta. Nakon sat vremena u epruvete je dodano 7 mL deionizirane vode te je smjesa pažljivo promiješana. Zatim je smjesa zagrijana na 121 °C kroz sat vremena u autoklavu. Nakon hlađenja uzorka na sobnu temperaturu, iz svake epruvete je uzet alikvot od 3 mL. Dodatkom kalcijeva karbonata je podešena pH vrijednost na 5. Neutralizirani uzorci profiltrirani su kroz najlonski filter pora veličine 0,22 µm u vijalicu za HPLC/UPLC analizu. HPLC metodom analizirani su kiselinski hidrolizati biomase mikroalgi. Kao mobilna faza korištena je 0,1 %vol/vol otopina H₃PO₄ u redestiliranoj vodi, čija je vodljivost manja od 1 µS. Injektirano je po 20 µL svakog uzorka na kromatografsku kolonu. Temperatura pećnice iznosila je 55 °C, a brzina protoka mobilne faze podešena je na 0,5 mL min⁻¹. Podaci su analizirani pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10. Jednadžbe baždarnih pravaca prikazuju ovisnost površine ispod krivulje pika o koncentraciji šećera [g L⁻¹] za najzastupljenije monosaharide u hidrolizatima biomase mikroalgi (Prilog 5).

4. REZULTATI

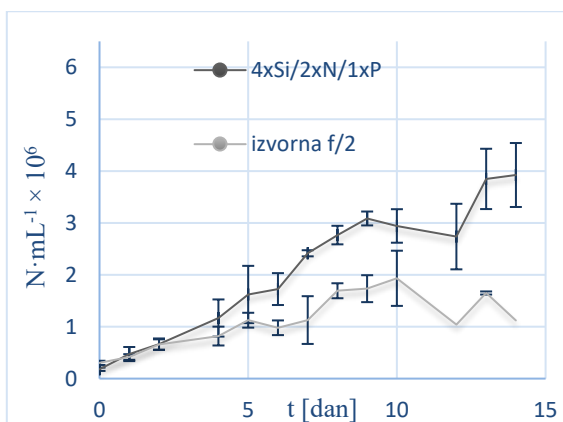
Cilj ovog istraživanja bila je optimizacija fototrofnog uzgoja dijatomeje izolirane iz Jadranskog mora u okolici Šibenika. Fototrofni rast podrazumijeva korištenje svjetlosne energije i anorganskog izvora ugljika u procesu fotosinteze. U ovom radu korišten je umjetni izvor toplobijele svjetlosti (2000 K) prema režimu 12 sati svjetlo-12 sati tama. Hranjive podloge bile su otopine anorganskih soli, pri čemu je natrijev bikarbonat bio izvor ugljika.

U prvom dijelu istraživanja optimizirana je f/2 hranjiva podloga za fototrofni rast u šaržnom uzgoju dijatomeje kroz 14 dana. Istražen je i utjecaj sastava modificirane f/2 hranjive podloge na sastav biomase i sastav masnih kiselina. Na temelju rezultata prvog dijela istraživanja, odabrana je hranjiva podloga za drugi dio istraživanja koji se odnosio na šaržni uzgoj s pritokom supstrata u trajanju od 35 dana s ciljem dobivanja većih koncentracija biomase. Istražen je utjecaj šaržnog uzgoja s pritokom na sastav biomase i sastav masnih kiselina.

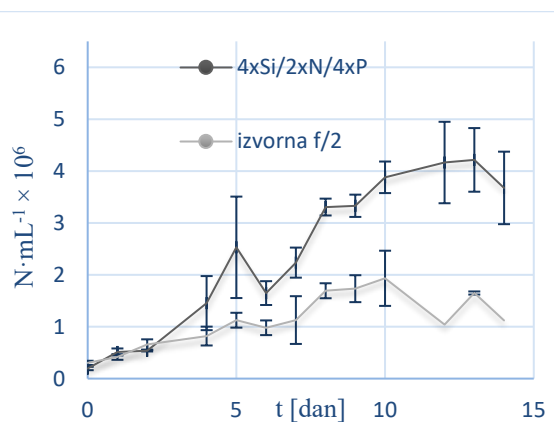
4.1. Optimizacija sastava hranjive podloge

Provedena je optimizacija sastava f/2 hranjive podloge za tri makroelementa (silicij, dušik i fosfor) koji značajno utječu na rast dijatomeja. Priprema hranjivih podloga za ovaj dio eksperimenta opisana je u Poglavlju 3.1.4.2., a korištene metode u Poglavlju 3.2.2. Rast biomase je praćen dnevnim određivanjem ukupnog broja stanica po mililitru podloge (Slika 6) i mjerenjem optičke gustoće (Slika 7) te određivanjem koncentracije suhe tvari biomase na kraju uzgoja (Slika 8).

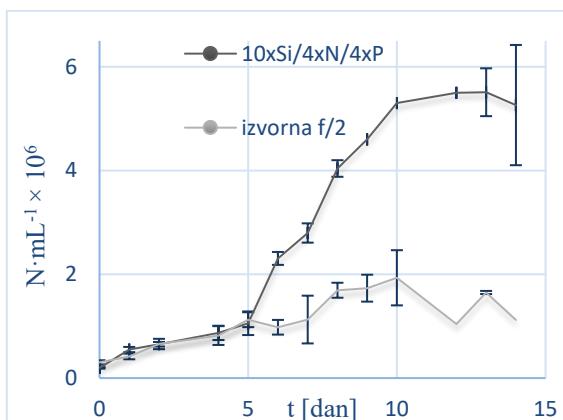
a)



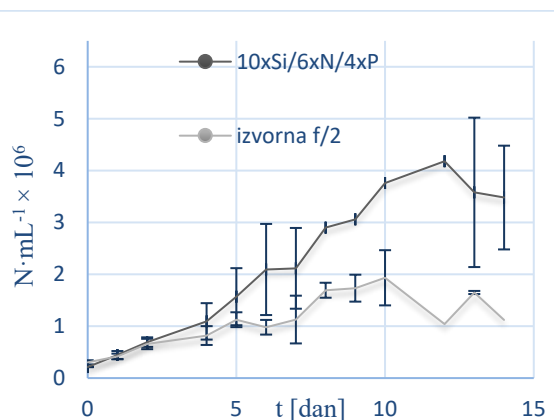
b)



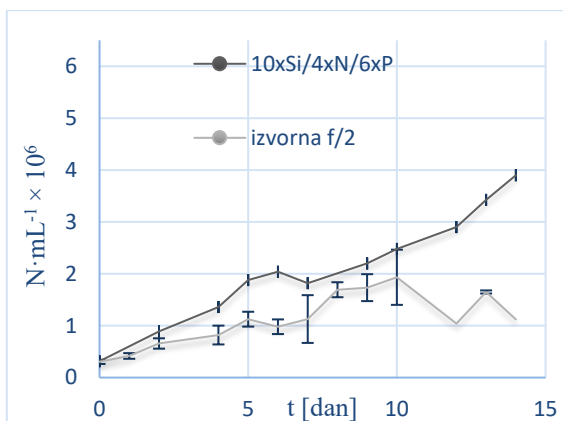
c)



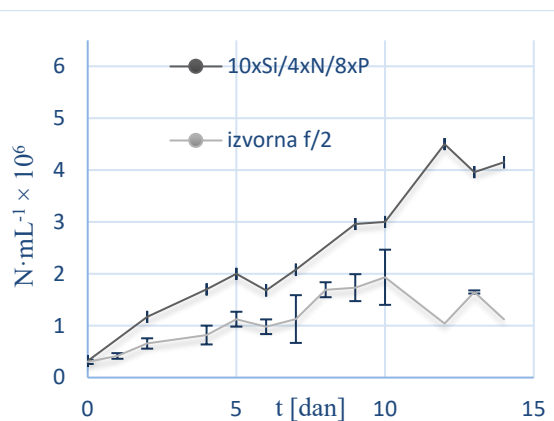
d)



e)

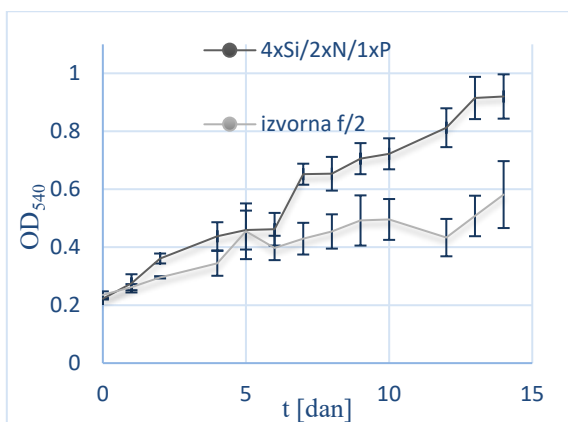


f)

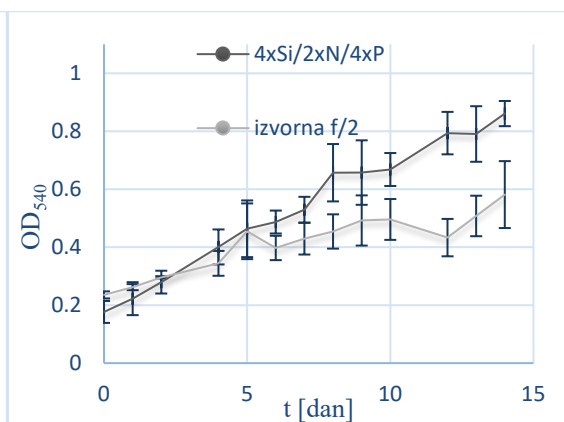


Slika 6. Promjena ukupnog broja stanica po mililitru podloge (N) tijekom šaržnog uzgoja u izvornoj $f/2$ i modificiranim $f/2$ hranjivim podlogama. Modificirane $f/2$ hranjive podloge sadržavale su različite količine silicija, dušika i fosfora: a) 4xSi/2xN/1xP, b) 4xSi/2xN/4xP, c) 10xSi/4xN/4xP, d) 10xSi/6xN/4xP, e) 10xSi/4xN/6xP, f) 10xSi/4xN/8xP.

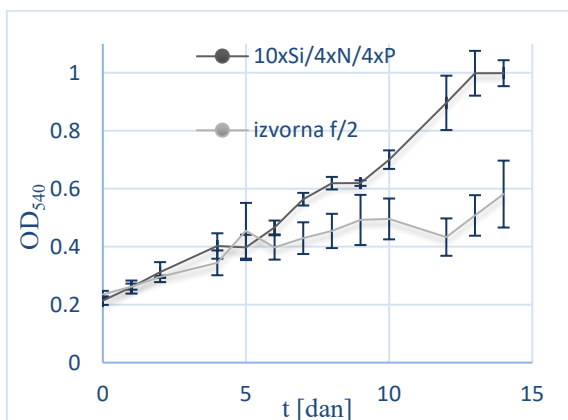
a)



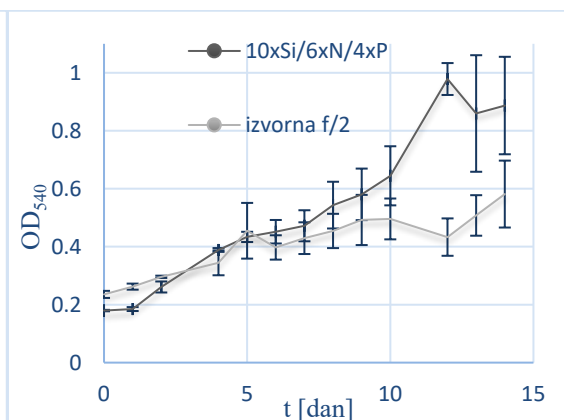
b)



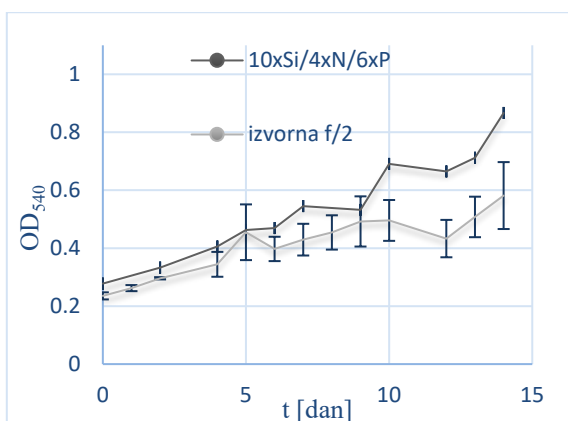
c)



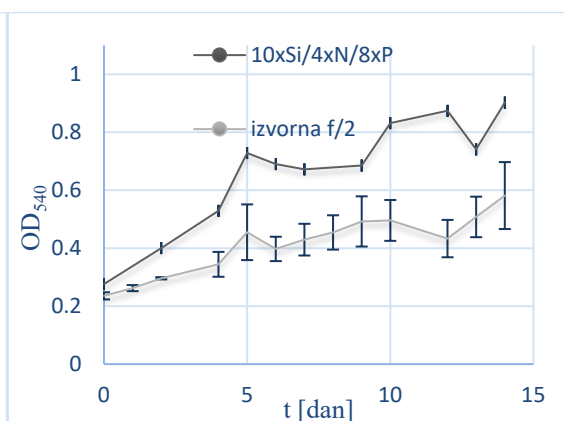
d)



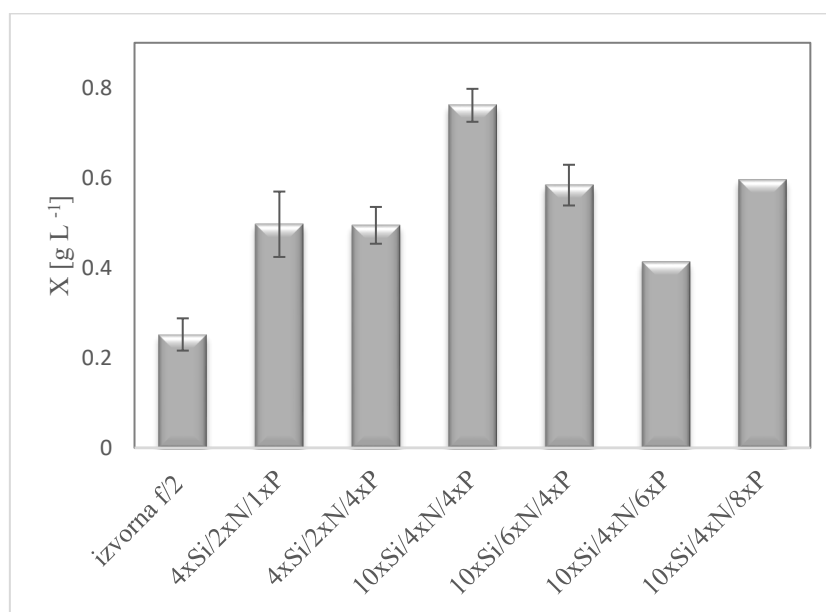
e)



f)



Slika 7. Promjena optičke gustoće tijekom šaržnog uzgoja u izvornoj f/2 i modificiranim f/2 hranjivim podlogama. Modificirane f/2 hranjive podloge sadržavale su različite količine silicija, dušika i fosfora: a) 4xSi/2xN/1xP, b) 4xSi/2xN/4xP, c) 10xSi/4xN/4xP, d) 10xSi/6xN/4xP, e) 10xSi/4xN/6xP, f) 10xSi/4xN/8xP.



Slika 8. Koncentracija suhe tvari biomase na kraju šaržnog uzgoja u izvornoj f/2 i modificiranim f/2 hranjivim podlogama. Modificirane f/2 hranjive podloge sadržavale su različite količine silicija, dušika i fosfora: 4xSi/2xN/1xP, 4xSi/2xN/4xP, 10xSi/4xN/4xP, 10xSi/6xN/4xP, 10xSi/4xN/6xP, 10xSi/4xN/8xP.

Na kraju šaržnog uzgoja određena je koncentracija neutrošenog silicija, dušika i fosfora te je izračunat postotak utrošenog pojedinog makroelementa s obzirom na njegovu početnu koncentraciju u f/2 izvornoj i modificiranim f/2 hranjivim podlogama (Tablica 12).

Tablica 12. Početne koncentracije silicija, dušika i fosfora i njihov utrošak na kraju šaržnog uzgoja u izvornoj f/2 i modificiranim f/2 hranjivim podlogama. Modificirane f/2 hranjive podloge sadržavale su različite količine silicija, dušika i fosfora: 4xSi/2xN/1xP, 4xSi/2xN/4xP, 10xSi/4xN/4xP, 10xSi/6xN/4xP, 10xSi/4xN/6xP, 10xSi/4xN/8xP.

| Podloga | γ_{Si} [mg L ⁻¹] | utrošak Si [%] | γ_N [mg L ⁻¹] | utrošak N [%] | γ_P [mg L ⁻¹] | utrošak P [%] |
|---------------|--|-------------------|-------------------------------------|------------------|-------------------------------------|------------------|
| izvorna f/2 | 2,96 | 94,17 | 12,35 | 64,55 | 1,12 | 88,71 |
| 4xSi/2xN/1xP | 11,84 | 97,68 | 24,70 | 79,01 | 1,12 | 94,62 |
| 4xSi/2xN/4xP | 11,84 | 98,79 | 24,70 | 77,09 | 4,49 | 93,87 |
| 10xSi/4xN/4xP | 29,60 | 98,16 | 49,40 | 73,83 | 4,49 | 99,16 |
| 10xSi/6xN/4xP | 29,60 | 98,17 | 74,10 | 63,01 | 4,49 | 98,79 |
| 10xSi/4xN/6xP | 29,60 | 98,83 | 49,40 | 40,54 | 6,74 | 96,87 |
| 10xSi/4xN/8xP | 29,60 | 99,41 | 49,40 | 55,71 | 8,98 | 97,08 |

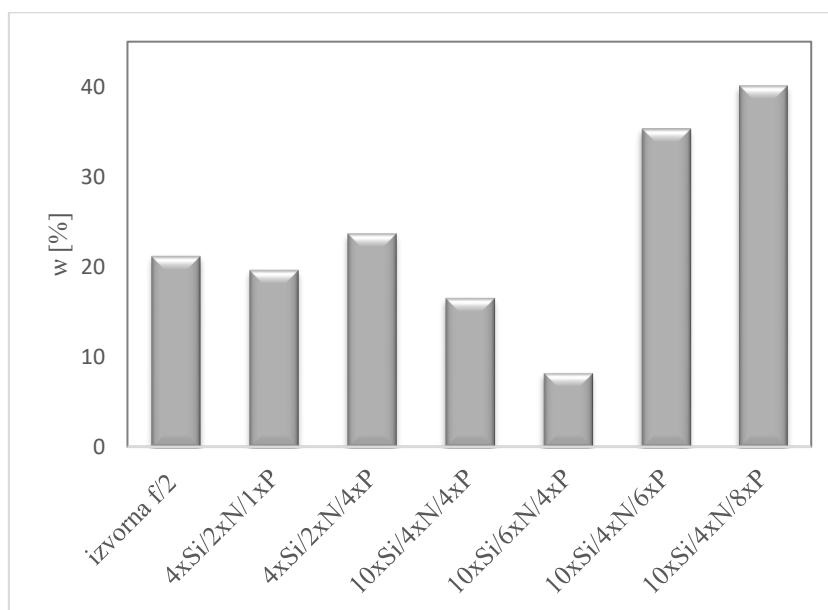
Također, određena je specifična brzina rasta dijatomeje s obzirom na promjenu ukupnog broja stanica u kulturi u izvornoj f/2 i modificiranim f/2 hranjivim podlogama (Tablica 13).

Tablica 13. Specifična brzina rasta dijatomeje tijekom šaržnog uzgoja u izvornoj f/2 i modificiranim f/2 hranjivim podlogama. Modificirane f/2 hranjive podloge sadržavale su različite količine silicija, dušika i fosfora: 4xSi/2xN/1xP, 4xSi/2xN/4xP, 10xSi/4xN/4xP, 10xSi/6xN/4xP, 10xSi/4xN/6xP, 10xSi/4xN/8xP.

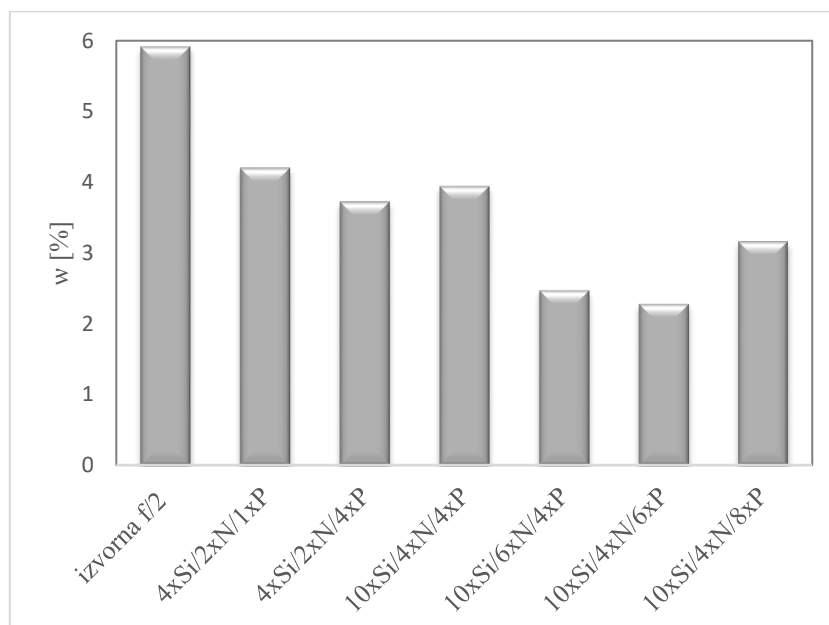
| Podloga | μ [dan ⁻¹] |
|---------------|----------------------------|
| izvorna f/2 | 0,1575 |
| 4xSi/2xN/1xP | 0,2374 |
| 4xSi/2xN/4xP | 0,2315 |
| 10xSi/4xN/4xP | 0,2803 |
| 10xSi/6xN/4xP | 0,2301 |
| 10xSi/4xN/6xP | 0,1032 |
| 10xSi/4xN/8xP | 0,1083 |

4.2. Utjecaj sastava modificirane f/2 hranjive podloge na sastav biomase i sastav masnih kiselina

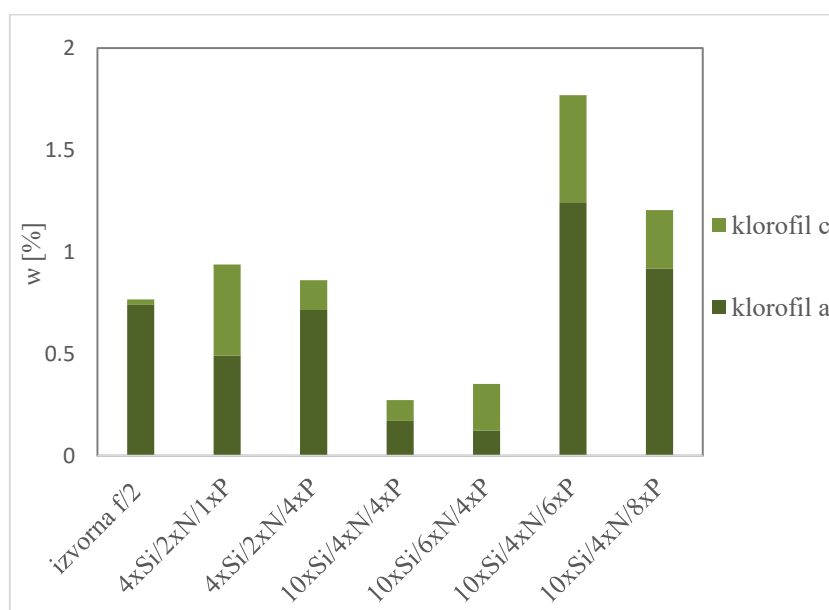
Na kraju šaržnog uzgoja u izvornoj f/2 i modificiranim f/2 hranjivim podlogama određen je makromolekulski sastav biomase dijatomeje, odnosno ukupni proteini (Slika 9) i lipidi (Slika 10). Kako je uzgoj vođen u malom mjerilu, prinos biomase nije bio dostatan za određivanje treće skupine važnih makromolekula, odnosno ugljikohidrata. Osim toga, određen je udjel klorofila a i c u biomasi te sastav masnih kiselina u ukupnim staničnim lipidima (Tablica 14).



Slika 9. Udjel proteina u suhoj tvari biomase dijatomeje na kraju šaržnog uzgoja u izvornoj f/2 i modificiranim f/2 hranjivim podlogama. Modificirane f/2 hranjive podloge sadržavale su različite količine silicija, dušika i fosfora: 4xSi/2xN/1xP, 4xSi/2xN/4xP, 10xSi/4xN/4xP, 10xSi/6xN/4xP, 10xSi/4xN/6xP, 10xSi/4xN/8xP.



Slika 10. Udjel lipida u suhoj tvari biomase dijatomeje na kraju šaržnog uzgoja u izvornoj f/2 i modificiranim f/2 hranjivim podlogama. Modificirane f/2 hranjive podloge sadržavale su različite količine silicija, dušika i fosfora: 4xSi/2xN/1xP, 4xSi/2xN/4xP, 10xSi/4xN/4xP, 10xSi/6xN/4xP, 10xSi/4xN/6xP, 10xSi/4xN/8xP.



Slika 11. Udjel klorofila a i c u biomasi dijatomeje na kraju šaržnog uzgoja u izvornoj f/2 i modificiranim f/2 hranjivim podlogama. Modificirane f/2 hranjive podloge sadržavale su različite količine silicija, dušika i fosfora: 4xSi/2xN/1xP, 4xSi/2xN/4xP, 10xSi/4xN/4xP, 10xSi/6xN/4xP, 10xSi/4xN/6xP, 10xSi/4xN/8xP.

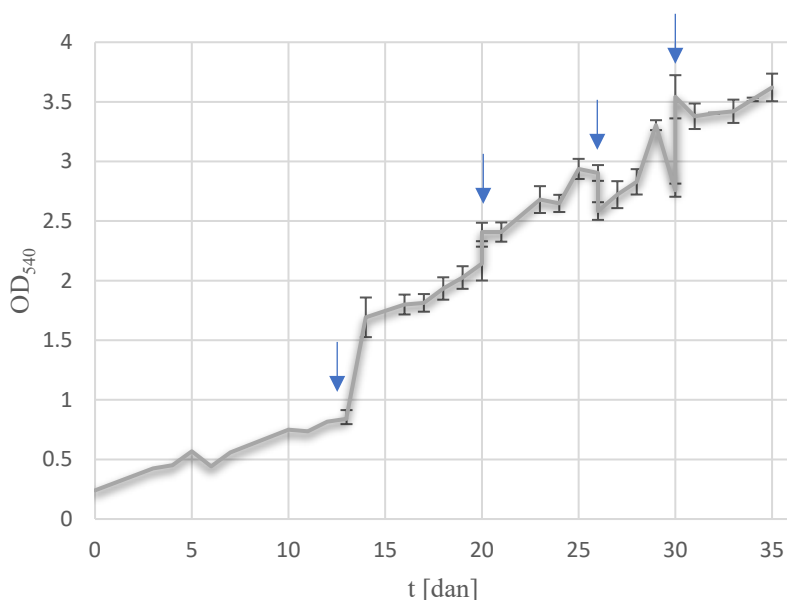
Tablica 14. Profil masnih kiselina izražen kao udio u ukupnim lipidima na kraju šaržnog uzgoja u izvornoj f/2 i modificiranim f/2 hranjivim podlogama. Modificirane f/2 hranjive podloge sadržavale su različite količine silicija, dušika i fosfora: 4xSi/2xN/1xP, 4xSi/2xN/4xP, 10xSi/4xN/4xP, 10xSi/6xN/4xP, 10xSi/4xN/6xP, 10xSi/4xN/8xP.

| | izvorna f/2 | 4xSi/2xN/1xP | 4xSi/2xN/4xP | 10xSi/4xN/4xP | 10xSi/6xN/4xP | 10xSi/4xN/6xP | 10xSi/4xN/8xP |
|--|-----------------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| masna kiselina | udio u ukupnim lipidima [%] | | | | | | |
| 14:0, miristinska | 10,83 | 12,36 | 14,06 | 11,20 | 12,76 | 14,79 | 12,75 |
| 14:1 (Δ^9), miristoleinska | - | 1,46 | 1,76 | 0,67 | - | - | 0,73 |
| 15:1 (Δ^{10}), cis-10-pentadekanska | - | 0,56 | - | - | - | - | - |
| 16:0, palmitinska | 21,03 | 12,02 | 9,04 | 14,70 | - | - | 1,35 |
| 16:1 (Δ^9), palmitoleinska | 60,85 | 46,76 | 48,47 | 37,00 | 64,20 | 57,09 | 59,15 |
| 17:0, heptadekanska | - | 1,47 | 1,88 | 5,92 | 5,49 | 2,06 | 5,70 |
| 17:1 (Δ^{10}), cis-10-heptadekanska | 1,00 | 13,67 | 15,87 | 4,43 | 4,73 | 8,85 | 8,47 |
| 18:1 (Δ^9), oleinska | - | - | - | 13,09 | - | - | - |
| 20:5 ($\Delta^{5,8,11,14,17}$), EPA* | 2,07 | 11,39 | 8,92 | 11,65 | 12,82 | 17,21 | 11,85 |
| 24:0, lignocerinska | - | - | - | 1,34 | - | - | - |
| 24:1 (Δ^{15}), nervonska | 4,25 | 0,31 | - | - | - | - | - |
| SFA* | 31,86 | 25,84 | 24,98 | 33,16 | 18,25 | 16,85 | 19,80 |
| MUFA* | 66,10 | 62,76 | 66,10 | 55,19 | 68,93 | 65,94 | 68,35 |
| PUFA* | 2,07 | 11,39 | 8,92 | 11,65 | 12,82 | 17,21 | 11,85 |
| udjel ukupnih lipida u biomasi [%] | 5,91 | 4,20 | 3,72 | 3,94 | 2,47 | 2,28 | 3,16 |

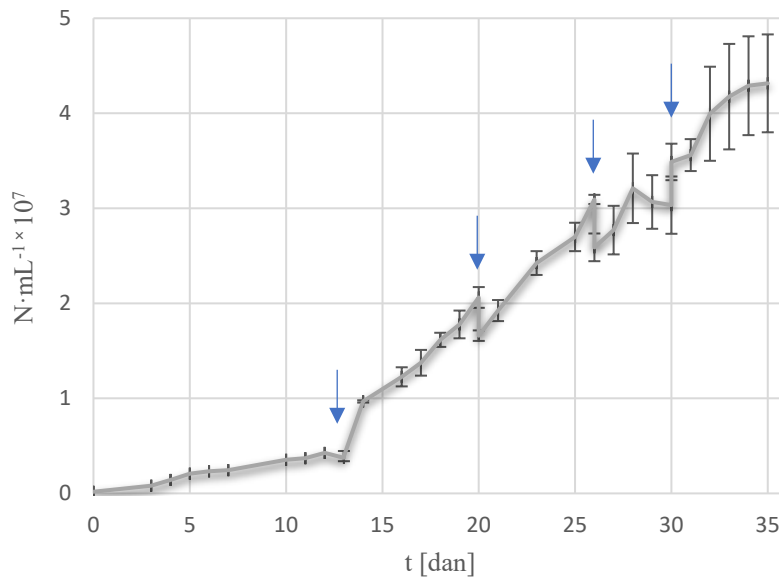
*EPA = eikozapentaenska kiselina; SFA = zasićene masne kiseline (eng. Saturated Fatty Acid); MUFA = jednostruko nezasićene masne kiseline (eng. Monounsaturated Fatty Acid); PUFA = višestruko nezasićene masne kiseline (eng. Polyunsaturated Fatty Acid).

4.3. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata

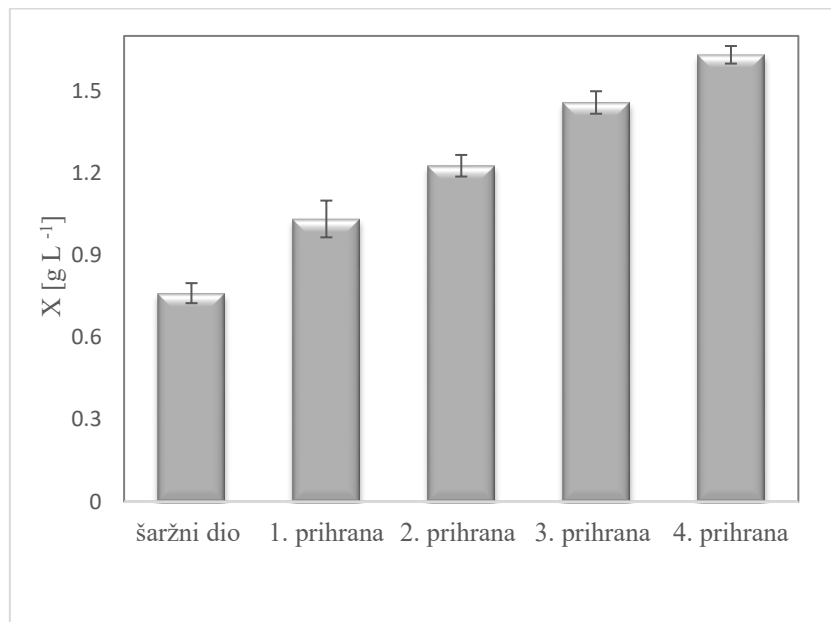
Proveden je šaržni uzgoj s pritokom supstrata u tikvicama. Priprema hranjive podloge za šaržni dio uzgoja i sastav pojedinih prihrana opisani su u Poglavlju 3.1.4.3., a korištene metode u Poglavlju 3.2.3. Rast biomase je praćen dnevnom određivanjem optičke gustoće (Slika 12) i ukupnog broja stanica po mililitru podloge (Slika 13) te određivanjem koncentracije suhe tvari biomase na kraju svake faze uzgoja (Slika 14).



Slika 12. Promjena optičke gustoće tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata (strelice označavaju dodatak svježe hranjive podloge).



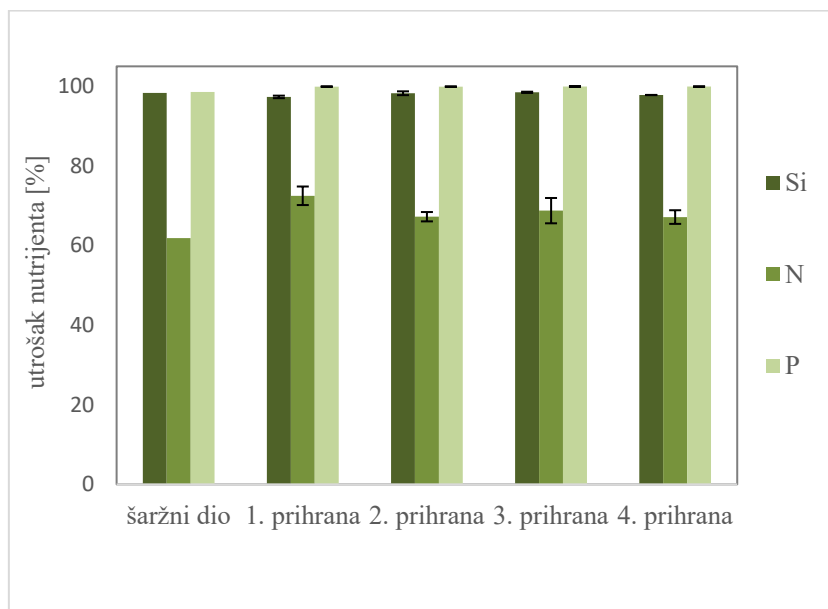
Slika 13. Promjena ukupnog broja stanica po mililitru podloge (N) tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata (strelice označavaju dodatak svježe hranjive podloge).



Slika 14. Koncentracija suhe tvari biomase na kraju svake faze šaržnog uzgoja s pritokom supstrata *

- *„Šaržni dio“ podrazumijeva period od 0-og do 13-og dana uzgoja.
- „1. prihrana“ odnosi se na period od 0-og do 21-og dana uzgoja.
- „2. prihrana“ odnosi se na period od 0-og do 27-og dana uzgoja.
- „3. prihrana“ odnosi se na period od 0-og do 30-og dana uzgoja.
- „4. prihrana“ odnosi se na period od 0-og do 35-og dana uzgoja.

Na kraju svake faze šaržnog uzgoja s pritokom supstrata određena je koncentracija neutrošenog silicija, dušika i fosfora te je izračunat postotak utrošenog pojedinog makroelementa s obzirom na njegovu ukupno dodanu koncentraciju.



Slika 15. Utrošak nutrijenata silicija, dušika i fosfora (maseni udio ukupno dodane koncentracije pojedinog nutrijenta) za pojedine faze šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

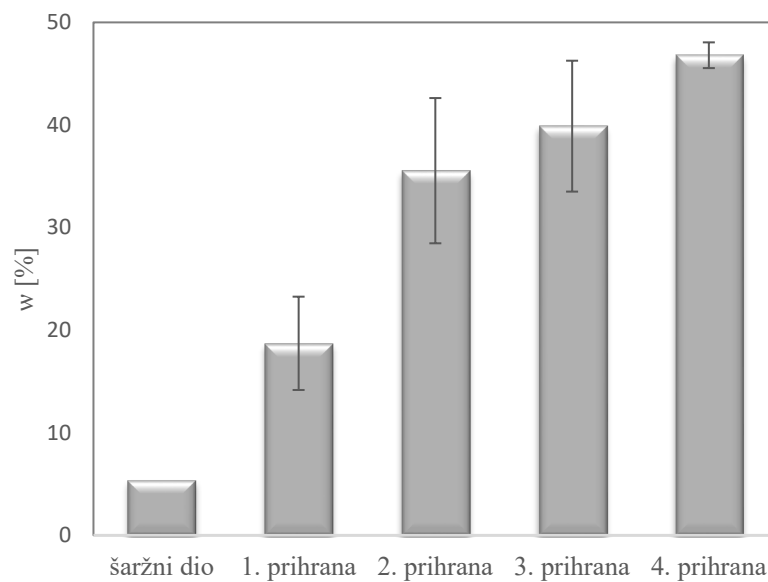
Također, određena je specifična brzina rasta dijatomeje s obzirom na promjenu ukupnog broja stanica u kulturi u pojedinim fazama šaržnog uzgoja s pritokom supstrata (Tablica 15).

Tablica 15. Specifična brzina rasta dijatomeje tijekom pojedinih faza šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

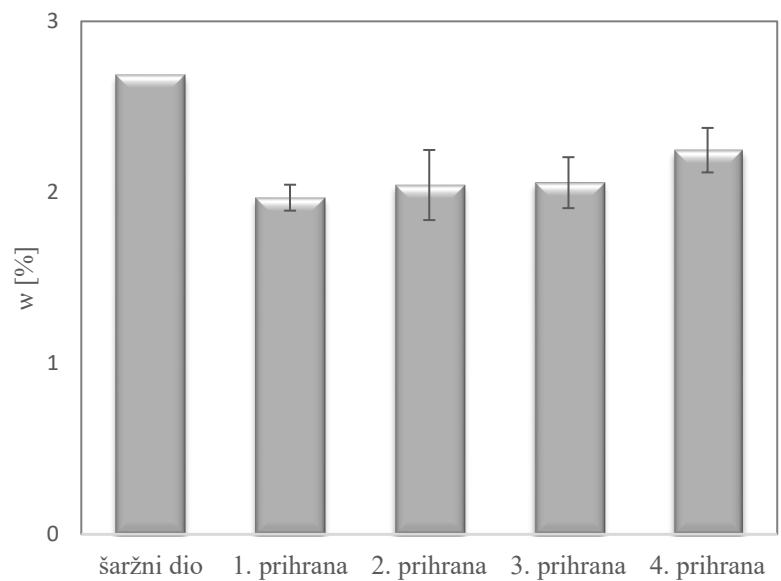
| Faza uzgoja | μ [dan ⁻¹] |
|-------------|----------------------------|
| šaržni dio | 0,1207 |
| 1. prihrana | 0,1260 |
| 2. prihrana | 0,0894 |
| 3. prihrana | 1,9145 |
| 4. prihrana | 0,0258 |

4.4. Utjecaj šaržnog uzgoja s pritokom supstrata na sastav biomase i sastav masnih kiselina

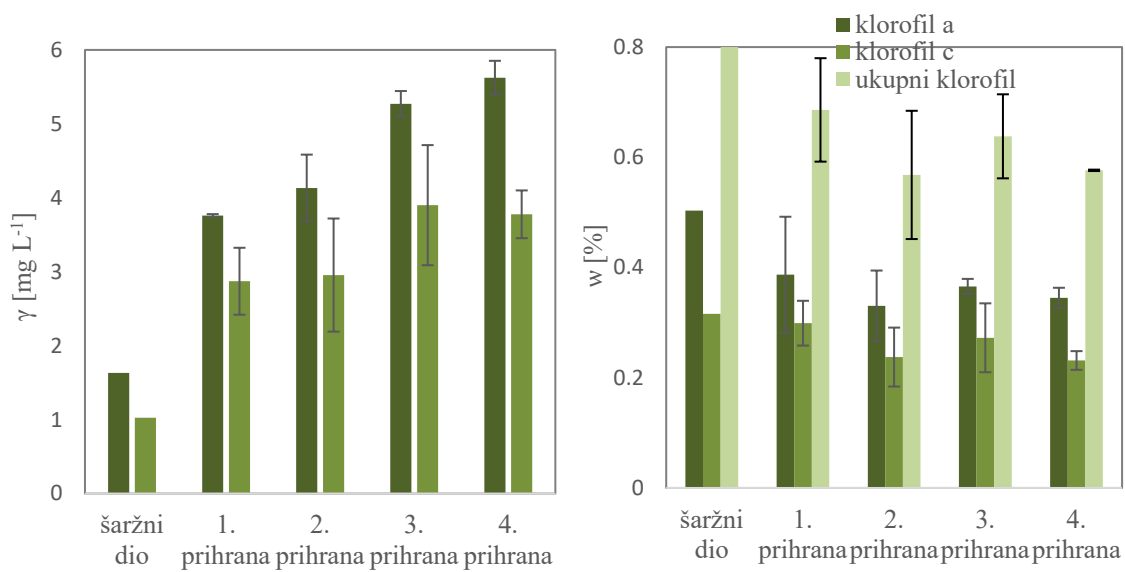
Na kraju svake faze šaržnog uzgoja s pritokom supstrata određen je makromolekulski sastav biomase dijatomeje, odnosno ukupni proteini (Slika 16) i lipidi (Slika 17), zatim udjel klorofila a i c u biomasi (Slika 18) te sastav masnih kiselina u ukupnim staničnim lipidima (Tablica 15).



Slika 16. Udjel proteina u suhoj tvari biomase na kraju svake faze šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.



Slika 17. Udjel lipida u suhoj tvari biomase na kraju svake faze šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.



Slika 18. Koncentracija i udjel klorofila a i c u suhoj tvari biomase na kraju svake faze šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

Tablica 16. Profil masnih kiselina izražen kao udio u ukupnim lipidima na kraju svake faze šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

| | šaržni dio | 1. prihrana | 2. prihrana | 3. prihrana | 4. prihrana |
|--|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| masna kiselina | udio u ukupnim lipidima [%] | | | | |
| 14:0, miristinska | 19,4914 | 10,1570 | 10,3796 | 9,8408 | 4,1546 |
| 14:1 (Δ^9), miristoleinska | 0,8463 | 1,3852 | 1,3890 | 1,5329 | 1,4269 |
| 15:0, pentadekanska | - | 0,0031 | 0,0799 | 0,1091 | 0,3590 |
| 15:1 (Δ^{10}), cis-10-pentadekanska | - | 0,0513 | 0,1104 | 0,1355 | 0,2795 |
| 16:0, palmitinska | 11,4584 | 8,5492 | 8,8313 | 9,0002 | 10,0534 |
| 16:1 (Δ^9), palmitoleinska | 52,6100 | 54,8425 | 56,3379 | 56,8225 | 56,0266 |
| 17:0, heptadekanska | - | 9,8624 | 6,9756 | 9,7192 | 10,8999 |
| 17:1 (Δ^{10}), cis-10-heptadekanska | - | 9,9021 | 5,6155 | - | - |
| 18:2 ($\Delta^{9,12}$), linolna | - | - | 0,0630 | 0,4700 | 1,2603 |
| 18:3 ($\Delta^{6,9,12}$), γ -linolenska | - | - | - | - | 0,0205 |
| 20:4 ($\Delta^{5,8,11,14}$), arahidonska | - | 0,0970 | 0,8163 | 1,6516 | 3,2801 |
| 20:5 ($\Delta^{5,8,11,14,17}$), EPA* | 15,5940 | 5,1502 | 9,4015 | 10,7182 | 12,1296 |
| 24:0, lignocerinska | - | - | - | - | 0,1114 |
| SFA* | 30,9498 | 28,5717 | 26,2664 | 28,6693 | 25,5783 |
| MUFA* | 53,4562 | 66,1811 | 63,4528 | 58,4909 | 57,7330 |
| PUFA* | 15,5940 | 5,2472 | 10,2808 | 12,8398 | 16,6905 |
| udio ukupnih lipida u biomasi [%] | 2,69 | 1,97 | 2,04 | 2,06 | 2,25 |

*EPA = eikozapentaenoična kiselina; SFA = zasićene masne kiseline (eng. Saturated Fatty Acid); MUFA = jednostruko nezasićene masne kiseline (eng. Monounsaturated Fatty Acid); PUFA = višestruko nezasićene masne kiseline (eng. Polyunsaturated Fatty Acid).

5. RASPRAVA

5.1. Optimizacija sastava hranjive podloge

Mikroalge su izvor široke lepeze tvari s potencijalnom primjenom u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, marikulturi, proizvodnji energije i biogoriva, te zaštiti okoliša. Komercijalna primjena ovih fotosintetskih mikroorganizama ovisi o produktivnosti i prinosu biomase čije su vrijednosti i do nekoliko puta manje nego kod heterotrofnih mikroorganizama koji se koriste u biotehnološkoj proizvodnji. Osim temperature i intenziteta svjetlosti, na rast mikroalgi presudno utječe sastav hranjive podloge tj. otopljeni makronutrijenti (npr. silicij, dušik, fosfor), mikroelementi (npr. kobalt, željezo, mangan) i vitamini (npr. tiamin, biotin, kobalamin). Cilj ovog rada bio je optimirati sastav hranjive podloge f/2, koja se najčešće koristi za uzgoj morskih mikroalgi, u cilju postizanja visoke produktivnosti i prinosa biomase dijatomeje *Nitzschia* sp. Tri makronutrijenta koji najčešće limitiraju rast dijatomeja u ovoj podlozi su silicij, fosfor i dušik. Silicij je potreban za izgradnju frustule, a metabolizam silicija je blisko povezan s staničnim ciklusom i respiracijom (Jeffryes i sur., 2013; Hildebrand i Lerch, 2015; Gao i sur., 2019). Dušik je potreban za sintezu aminokiselina, nukleinskih kiselina, lipida i ugljikohidrata (Zulu i sur., 2018; Gao i sur., 2019). Fosfor je važan za pohranjivanje i prijenos metaboličke energije, te sintezu nukleinskih kiselina, fosfolipida i drugih fosforiliranih tvari (Adams i Bugbee, 2013; Zulu i sur., 2018).

Prethodna istraživanja pokazala su da se povećanjem koncentracije svih nutrijenata u f/2 hranjivoj podlozi povećava prinos biomase i specifična brzina rasta dijatomeje (Brajković, 2019). U ovom radu istražen je rast dijatomeje u podlogama s različitom kombinacijom početnih koncentracija Si (2,96 mg L⁻¹; 11,84 mg L⁻¹; 29,60 mg L⁻¹), N (12,35 mg L⁻¹; 24,70 mg L⁻¹; 49,40 mg L⁻¹; 74,10 mg L⁻¹) i P (1,12 mg L⁻¹; 4,49 mg L⁻¹; 6,74 mg L⁻¹; 8,98 mg L⁻¹) kako bi se pronašao odgovarajući omjer ova tri nutrijenta u svrhu daljnje optimizacije. Kompletan sastav hranjivih podloga prikazan je u Poglavlju 3.1.4.2.

U svim modificiranim f/2 hranjivim podlogama je zamijećen rast optičke gustoće, broja stanica po mililitru hranjive podloge i koncentracije biomase u odnosu na izvornu f/2 hranjivu podlogu (Slike 6, 7 i 8).

Krivulje rasta mikroorganizma na Slici 6 pokazuju karakteristične faze: eksponencijalna bez prethodne lag faze, stacionarna te u nekim hranjivim podlogama i faza odumiranja (Wen i Chen, 2014). Najkraći eksponencijalni rast uočen je u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi i trajao je svega

8 dana, nakon čega je uslijedio pad broja stanica (faza odumiranja). Kod ostalih modificiranih f/2 hranjivih podloga, eksponencijalni rast trajao je duže (10-12 dana).

Koncentracija silicija imala je značajniji učinak na kinetiku rasta dijatomeje u odnosu na ostala dva makronutrijenta. Porastom koncentracije silicija (11,84 mg L⁻¹, Slike 6. a) i b); odnosno 29,6 mg L⁻¹, Slike 6. c) d) e) f)) raste broj stanica po mililitru, optička gustoća te koncentracija biomase (Slike 6, 7 i 8). Najveći prinos biomase postignut je u podlozi s 29,6 mg L⁻¹ silicija (10xSi/4xN/4xP). Daljnim povećanjem koncentracija dušika (10xSi/6xN/4xP), odnosno fosfora (10xSi/4xN/6xP i 10xSi/4xN/8xP) postignute su niže koncentracije suhe tvari biomase u odnosu na hranjivu podlogu 10xSi/4xN/4xP (Slika 8). Može se zaključiti da navedeni makronutrijenti inhibiraju rast pri koncentracijama većim od 74,10 mg L⁻¹ dušika, odnosno 6,74 mg L⁻¹ fosfora. Inhibicijski učinak izvora dušika i fosfora na rast zapažen je i kod drugih dijatomeja (Li i Campbell, 2015; Yang i sur., 2014).

Postignuta koncentracija biomase na kraju uzgoja bila je najmanja u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi ($X = 0,2520 \text{ g L}^{-1}$; Slika 8), koja je sadržavala najmanju koncentraciju nutrijenata (Tablica 12). Povećanje koncentracije fosfora u modificiranoj hranjivoj podlozi nije značajnije utjecalo na rast dijatomeje. Četverostrukim povećanjem koncentracije fosfora u modificiranoj hranjivoj podlozi (podloge 4xSi/2xN/1xP i 4xSi/2xN/4xP) koncentracija biomase ostala je nepromijenjena (oko 0,5 g L⁻¹).

Eksperimentalno određene specifične brzine rasta (Tablica 13) u skladu su sa prethodno iznesenim zapažanjima. Najveća specifična brzina rasta određena je za modificiranu f/2 hranjivu podlogu 10xSi/4xN/4xP i iznosila je 0,2803 dan⁻¹, što je dvostruko veće od izvorne f/2 hranjive podloge (0,1575 dan⁻¹). Najniže specifične brzine rasta izmjerene su za modificirane f/2 hranjive podloge 10xSi/4xN/6xP i 10xSi/4xN/8xP što potvrđuje inhibicijski učinak fosfora i dušika na rast.

Iz do sad navedenog se može zaključiti da izvorna f/2 podloga nije pogodna za uzgoj ispitivanog soja dijatomeje jer je u toj hranjivoj podlozi postignut najmanji broj stanica po mililitru podloge ($N = 1,12 * 10^6 \text{ st mL}^{-1}$), optička gustoća pri 540 nm ($OD_{540} = 0,5816$) i koncentracija biomase ($X = 0,2520 \text{ g L}^{-1}$) na kraju uzgoja. Osim toga, stanice su u tim uvjetima rasle malom specifičnom brzinom rasta (0,1575 dan⁻¹). Najpogodnija za rast istraživane dijatomeje bila je modificirana f/2 hranjiva podloga 10xSi/4xN/4xP, pri čemu je postignut najveći broj stanica ($N = 5,76 * 10^6 \text{ st mL}^{-1}$), optička gustoća ($OD_{540} = 0,9987$) i koncentracija biomase ($X = 0,7611 \text{ g L}^{-1}$) na kraju uzgoja, te najveća specifična brzina rasta ($\mu = 0,2803 \text{ dan}^{-1}$).

Na kraju uzgoja u hranjivim podlogama određena je koncentracija i postotak utrošenog makronutrijenta.

Dok su silicij (utrošak između 94,17 % i 99,41 %) i fosfor (utrošak između 88,71 % i 99,16 %) bili gotovo potpuno utrošeni, značajne količine neutrošenog dušika ostale su u hranjivim podlogama (utrošak dušika je bio između 40,54 % i 79,01 %) što ukazuje da je ovaj makronutrijent bio u suvišku (Tablica 12). Neovisno o početnoj koncentraciji, dijatomeje su utrošile gotovo sav silicij u svim hranjivim podlogama. Ipak, nešto niži utrošak određen je u hranjivoj podlozi s najmanjom početnom koncentracijom od 2,96 mg L⁻¹ (94,17 %) u odnosu na veće početne koncentracije silicija od 11,84 mg L⁻¹ i 29,6 mg L⁻¹ (97,68 % – 99,40 %). Veće početne koncentracije silicija (11,84 mg L⁻¹ i 29,60 mg L⁻¹) pogoduju rastu stanica što se može vidjeti na Slici 6, a što potvrđuje i utrošak nutrijenta.

Rast dijatomeje nije bio limitiran izvorom dušika, a njegov utrošak ovisio je o početnoj koncentraciji. Zanimljivo je primijetiti da je utrošak dušika bio gotovo jednak u podlogama s najmanjom (12,35 mg L⁻¹), odnosno najvećom (74,10 mg L⁻¹) početnom koncentracijom i iznosio je oko 64 %. Utrošak dušika početne koncentracije 49,49 mg L⁻¹ ovisio je o koncentraciji fosfora. Utrošku su pogodovale manje koncentracije fosfora (4,49 mg L⁻¹) u usporedbi s većima (6,74 mg L⁻¹ i 8,98 mg L⁻¹), odnosno utrošak je iznosio redom 73,83 %, 40,54 % i 55,71. Najveći utrošak dušika izmjeren je u podlozi početne koncentracije 24,70 mg L⁻¹ i iznosio je oko 78 %, neovisno o koncentraciji fosfora (1,12 mg L⁻¹ i 4,49 mg L⁻¹).

Visok utrošak fosfora (>91,67 %) izmjeren je u svim hranjivim podlogama, neovisno o početnoj koncentraciji. Ipak, nešto manji utrošak primijećen je kod najniže početne koncentracije (1,12 mg L⁻¹), i to u uvjetima niske koncentracije preostalih nutrijenata (izvorna f/2 hranjiva podloga), u usporedbi s ostalim koncentracijama (4,49 mg L⁻¹, 6,74 mg L⁻¹ i 8,98 mg L⁻¹).

5.2. Utjecaj sastava modificirane f/2 hranjive podloge na sastav biomase i sastav masnih kiselina

Na kraju šaržnog uzgoja na izvornoj f/2 i modificiranim f/2 hranjivim podlogama određen je udjel proteina, lipida i klorofila a i c u biomasi dijatomeje, te sastav masnih kiselina u ukupnim staničnim lipidima.

Na slici 9 prikazane su vrijednosti udjela proteina određene na kraju uzgoja. U prisutnosti izvora ugljika, rast stanice u hranjivim podlogama najčešće ovisi o dostupnom izvoru dušika koji je nužan za sintezu aminokiselina, proteina i nukleinskih kiselina (Zulu i sur., 2018). Koncentracije preostalog dušika u izvornoj i modificiranim f/2 hranjivim podlogama na kraju uzgoja (Tablica 12) potvrdile su da rast biomase nije bio limitiran ovim makronutrijentom. Unatoč tome udjel proteina u biomasi narasloj u modificiranim f/2 hranjivim podlogama nije bio očekivano visok. U izvornoj f/2, te 4xSi/2xN/1xP, 4xSi/2xN/4xP i 10xSi/4x/4x modificiranim f/2 hranjivim podlogama udio proteina bio je podjednak i iznosio je između 16,59 % i 23,74 %. Veći udjeli proteina određeni su u biomasi narasloj na f/2 hranjivim podlogama 10xSi/4xN/6xP (35,33 %) i 10xSi/4xN/8xP (40,12%). Naime visoke koncentracije fosfora (6,74 mg L⁻¹, odnosno 8,98 mg L⁻¹) u ovim hranjivim podlogama imale su pozitivan učinak na rast biomase što se može objasniti ulogom fosfora u prijenosu metaboličke energije i sintezi nekih makromolekula (nukleinske kiseline, fosforilirani lipidi i ugljikohidrati) u stanici (Zulu i sur., 2018). Visoki udjeli proteina u skladu su s literaturom gdje se navodi kako su upravo proteini najzastupljenije makromolekule u biomasi dijatomeje *Nitzschia* sp. uzgojenoj na izvornoj f/2 hranjivoj podlozi (Rodríguez-Núñez i Toledo-Agüero, 2017). Suprotno očekivanjima, u hranjivoj podlozi 10xSi/6xN/4xP s najvećom koncentracijom dušika određen najmanji udio proteina. To bi se moglo objasniti limitacijom rasta silicijem i/ili fosforom, koji su na kraju uzgoja gotovo potpuno iscrpljeni iz podloge (Tablica 12).

Na slici 11 prikazani su udjeli klorofila a i klorofila c u biomasi dijatomeje. Udio ukupnog klorofila (klorofil a + klorofil c) u biomasi uzgojenoj u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi iznosio je 0,77 %. Udjel klorofila a u ukupnom klorofilu iznosio je visokih 96,1 % dok je udjel klorofila c bio samo 3,9 %. Ukupni klorofil u većini modificiranih f/2 hranjivih podloga bio je veći u usporedbi s izvornom f/2. Izuzetak su hranjive podloge 10xSi/4xN/4xP i 10xSi/6xN/4xP. U svim modificiranim podlogama povećao se udio klorofila c u ukupnom klorofilu, u odnosu na izvornu f/2. Martin-Jezequel (2015) navodi da ukupna koncentracija pigmenta u dijatomejama, kao i njihov profil najviše ovise o valnoj duljini primijenjene svjetlosti, ali i o limitaciji nutrijentima. Budući da je u svim uzgojima korišten isti izvor svjetlosti, može se zaključiti da je na udio ukupnog klorofila, kao i njegov sastav (klorofil a i klorofil c) utjecao sastav hranjive podloge, odnosno sastav tri makronutrijenta. Uspoređujući rast na različitim hranjivim podlogama može se utvrditi da je koncentracija fosfora presudno utjecala na udjel ukupnih klorofila i njihov sastav. Biomasa narasla u hranjivoj podlozi 10xSi/4xN/6xP imala je najveći udjel ukupnih klorofila. Također je zapažen porast udjela klorofila c u odnosu na

klorofil a. Udjeli ukupnog klorofila u skladu su s literaturom prema kojoj ukupni klorofil čini 0,5 % - 1,5 % suhe tvari biomase mikroalgi (Becker, 2013). Sličan učinak fosfora na rast udjela klorofila a zamijećen je kod dijatomeja *Stephanodiscus minutulus* i *Nitzschia acicularis*. Limitacija rasta fosforom smanjuje udjel klorofila a, dok suvišak ovog makronutrijenta povećava udjel ovog pigmenta u biomasi (Shatwell i sur., 2014).

Dostupnost nutrijenata, a posebice silicija, dušika i fosfora značajno utječe na ukupan stanični metabolizam pa time i na sintezu lipida u stanicama dijatomeja. Konkretno, sinteza neutralnih lipida (TAG) stimulirana je kada neki od spomenutih nutrijenata limitira rast stanica (Jeffreys i sur., 2013; Adams i Bugbee, 2013; Zulu i sur., 2018). Istraživanja su pokazala da stanice brže reagiraju na nedostatak silicija, nego nedostatak preostala dva spomenuta makronutrijenta nakupljajući pri tome veće koncentracije lipida (Adams i Bugbee, 2013). Slika 10 prikazuje maseni udio ukupnih lipida izraženih kao metilni esteri masnih kiselina određenih po završetku uzgoja. Vidljivo je kako je najveći udio lipida (5,91 %) određen u stanicama uzgojenim u izvornoj f/2 podlozi, što se može objasniti limitacijom rasta koja je jasno vidljiva na Slici 6. Nutrijent koji najznačajnije limitira rast, a posljedično rezultira većim udjelom lipida u biomasi je silicij (Jeffreys i sur., 2013). Međutim, moguće je da je prilikom uzgoja u izvornoj f/2 podlozi nakupljanju lipida doprinijela i istovremena limitacija rasta sa fosforom, koji je preostao u malim koncentracijama u hranjivoj podlozi na kraju uzgoja (Tablica 12; izvorna f/2). Iako i limitacija dušikom može značajno povećati udio lipida (Gao i sur., 2019), to u ovom eksperimentu nije bio slučaj budući da je dušik dodan u suvišku u hranjivu podlogu što potvrđuje njegov utrošak od 64,55 % (Tablica 12).

U modificiranim f/2 hranjivim podlogama veće koncentracije nutrijenata omogućile su brži rast dijatomeje. U danim uvjetima izvor ugljika usmjeravan je u metaboličke puteve vezane za izgradnju stanične biomase, umjesto sinteze rezervi energije tj. lipida. Udio lipida u biomasi uzgojenoj na f/2 modificiranim hranjivim podlogama iznosio je između 2,28 % i 4,20 % što je vrlo slično literaturnim podacima za ovu vrstu dijatomeje (D'Alessandro i Antoniosi Filho, 2016).

Rezultati određivanja sastava masnih kiselina u ukupnim staničnim lipidima (Tablica 14) pokazuju da jednostruko nezasićene masne kiseline (MUFA) čine najveći udio u ukupnim lipidima (između 55,19 % i 68,93 %), od kojih je daleko najzastupljenija palmitoleinska (16:1), čiji je udio u ukupnim lipidima između 46,76 % i 64,20 %. Udio zasićenih masnih kiselina (SFA) iznosi između 16,85 % i 31,86 %, a najzastupljenije su miristinska (C14:0) i palmitinska (C16:0) kiselina s udjelima od 10,83-14,79 %, odnosno 1,35-21,03%. Od višestruko

nezasićenih masnih kiselina (PUFA) prisutna je samo eikozapentaenoična kiselina (C20:5; EPA) čiji je udio između 2,07% i 17,21%. Rezultati analize (Tablica 14) pokazuju da sastav hranjive podloge značajno utječe na sadržaj zasićenih i višestruko nezasićenih masnih kiselina (C20:5, EPA). Profil masnih kiselina u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi najviše se razlikuje od ostalih, što je posljedica limitacije silicijem. Primijećen je značajno manji udio PUFA (2,07 %) i cis-10-heptadekanske kiseline (C17:1) u usporedbi s modificiranim f/2 hranjivim podlogama. Gao i sur. (2019) također su primijetili da se udio PUFA smanjuje za više od 50 % u uvjetima limitacije rasta silicijem. Osim toga, navode da se pri tome povećava udio SFA, dok udio MUFA ostaje gotovo identičan, što se djelomično poklapa s rezultatima ovog istraživanja. Naime, najveći udio SFA (31,86 %) određen je upravo u podlozi u kojoj je najizraženija limitacija rasta silicijem, odnosno u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi, dok se udio MUFA nije značajno mijenjao u svim hranjivim podlogama.

Zanimljivo je primijetiti da je palmitinska kiselina (C16:0) zastupljenija u hranjivim podlogama s manjim koncentracijama nutrijenata (9,04% - 21,03 %), dok je u hranjivim podlogama s većim koncentracijama makronutrijenata ispod granice kvantifikacije ili je zastupljena u vrlo malom postotku (1,35 %). Adams i Bugbee (2013) navode da upravo limitacija rasta silicijem pogoduje sintezi C16 masnih kiselina pa tako i palmitinske kiseline (C16:0).

Povoljni uvjeti za rast, odnosno suvišak nutrijenata, potiču sintezu višestruko zasićenih masnih kiselina (PUFA) i pogoduju višim udjelima eikozapentaenoične (C20:5; EPA), dokozaheksaenoične (C22:6, DHA) i arahidonske (C20:4, ARA) kiseline u ukupnim masnim kiselinama (Yang i sur., 2013). Sastav masnih kiselina za sve istraživane uvjete u skladu je s literaturnim podacima gdje se navodi da su upravo miristinska (C14:0), palmitinska (C16:0) i palmitoleinska (C16:1) te eikozapentaenoična kiselina (C20:5, EPA) najzastupljenije masne kiseline u dijatomejama (Yi i sur., 2017; Zulu i sur., 2018). Ono što dijatomeje, a tako i istraživani soj čini zanimljivim radnim mikroorganizmom je upravo eikozapentaenoična kiselina (C20:5, EPA), koja je po udjelima vrlo slična miristinskoj kiselini (C14:0) s kojom čini treću najzastupljeniju masnu kiselinu u ukupnim lipidima (Tablica 14).

5.3. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata

U drugom dijelu istraživanja, proveden je šaržni uzgoj s pritokom supstrata s ciljem dobivanja većih prinosa biomase. Naime, šaržnim se uzgojem ne dobivaju visoki prinosi biomase, a samim time ni makromolekula koje su njezin sastav. Osim toga, ako se za šaržni uzgoj koristi hranjiva podloga bogata solima, lako može doći do njihovog taloženja čime postaju nedostupni

stanicama za asimilaciju. To je primijećeno kod Brajković (2019) gdje se koristila deset puta veća koncentracija svih otopljenih tvari u odnosu na izvornu f/2 hranjivu podlogu. Topljivost bitnog nutrijenta za rast dijatomeja, silicija, iznosi svega 1,5-1,7 mM na 25 °C u morskoj vodi (Ozkan i Rorrer, 2017). Stoga se mnogi autori odlučuju za periodičko doziranje nutrijenata (Ozkan i Rorrer, 2017), šaržni uzgoj s pritokom supstrata (Jeffryes i sur., 2013) ili pak polukontinuirani i kontinuirani načina uzgoja. Tim načinima uzgoja postižu se značajno veće koncentracije biomase, a time i veće produktivnosti sinteze biomase u odnosu na šaržni uzgoj.

Za šaržni dio uzgoja odabrana je modificirana f/2 hranjiva podloga 10xSi/4xN/4xP, koja je prilikom optimizacije sastava hranjive podloge omogućila najveći rast radnog mikroorganizma (broj stanica $N = 5,76 * 10^6$ st mL^{-1} , optička gustoća $OD_{540} = 0,9987$, koncentracija suhe tvari biomase $X = 0,7611$ g L^{-1} i specifična brzina rasta $\mu = 0,2803$ dan⁻¹). Tijekom uzgoja kultura je prihranjivana u trenutku kada bi brzina rasta, procijenjena s obzirom na rast optičke gustoće kroz 24 sata, počela opadati. Cilj je bio prihraniti kulturu dok su stanice u eksponencijalnoj fazi rasta, kako bi dobile dovoljno nutrijenata za neometan rast. Poznato je da dovoljne količine nutrijenata (silicija, dušika, fosfora i dr.) u hranjivoj podlozi pogoduju rastu stanica, dok limitacija istima preusmjerava metabolizam ka sintezi rezervnih tvari (ugljikohidrati, lipidi, prvenstveno TAG). Rast dijatomeje prekida se iscrpljivanjem silicija jer bez ovog makronutrijenta stanice ne mogu tvoriti frustule te se ne mogu dijeliti. Međutim, u ovim uvjetima u stanici se tok ugljika umjesto na sintezu staničnih komponenti usmjerava na sintezu lipida, akumulirajući veće količine lipida (Jeffryes i sur., 2013; Adams i Bugbee, 2013; Taguchi i sur., 1987; Zulu i sur., 2018).

Na Slikama 12 i 13 može se uočiti 6 faza uzgoja. Prva faza je šaržni uzgoj koji je trajao 13 dana (lag faza 3 dana, eksponencijalna faza narednih 9 dana i stacionarna faza zadnjeg dana). Specifična brzina rasta određena u eksponencijalnoj fazi šaržnog dijela uzgoja iznosila je $\mu = 0,1207$ dan⁻¹ te su na kraju faze postignute koncentracija stanica od $N = 3,74 * 10^6$ mL^{-1} , optička gustoća $OD_{540} = 0,8408$ i koncentracija biomase $X = 0,7611$ g L^{-1} (Slike 12, 13 i 14). Naredna faza je faza između prve i druge prihrane (13-ti do 20-ti dan uzgoja). Fazu karakterizira eksponencijalna faza tijekom svih 7 dana uzgoja. Postignuta je specifična brzina rasta od $\mu = 0,126$ dan⁻¹, koncentracija stanica $N = 2,06 * 10^7$ mL^{-1} , optička gustoća $OD_{540} = 2,1459$ te koncentracija biomase $X = 1,0319$ g L^{-1} (Slike 12, 13 i 14). Sljedeća faza je faza između druge i treće prihrane gdje se vidi eksponencijalni rast stanica tijekom 6 dana (20-ti do 26-ti dan). Specifična brzina rasta iznosila je $\mu = 0,1174$ dan⁻¹, koncentracija stanica $N = 3,09 * 10^7$ mL^{-1} , optička gustoća $OD_{540} = 2,7227$ te koncentracija biomase $X = 1,2261$ g L^{-1} (Slike 12,13 i 14).

Slijedi ju faza između treće i četvrte prihrane (26-ti do 30-ti dan). Stanice su u toj fazi samo 2 dana bile u eksponencijalnom rastu i s najvećom specifičnom brzinom rasta tijekom uzgoja $\mu = 1,9145 \text{ dan}^{-1}$. Nakon toga su ušle u stacionarnu fazu rasta sljedeća 2 dana. Na kraju faze postignute su koncentracija stanica $N = 3,03 * 10^7 \text{ mL}^{-1}$, optička gustoća $OD_{540} = 2,7588$ te koncentracija biomase $X = 1,457 \text{ g L}^{-1}$ (Slike 12, 13 i 14). Posljednja faza šaržnog uzgoja s pritokom supstrata je faza od četvrte prihrane pa do kraja uzgoja (30-ti dan do 35-ti dan). Prvi dan je uočena lag faza, nakon koje je slijedio eksponencijalni rast koji se pri kraju uzgoja usporavao. Specifična brzina rasta određena u eksponencijalnoj fazi iznosila je $\mu = 0,0258 \text{ dan}^{-1}$ te su na kraju uzgoja postignute koncentracija stanica od $N = 4,32 * 10^7 \text{ mL}^{-1}$, optička gustoća $OD_{540} = 3,6208$ i koncentracija biomase $X = 1,6311 \text{ g L}^{-1}$.

Slika 15 prikazuje utrošak nutrijenata silicija, dušika i fosfora od početka uzgoja do završetka pojedine faze uzgoja. Vidljivo je da su silicij (utrošak od 97,33 % do 98,47 %) i fosfor (utrošak od 98,58 % do 99,94 %) gotovo u potpunosti utrošeni na kraju svake faze uzgoja. Dušik je trošen u manjoj mjeri (utrošak od 61,85 % do 72,49 %), kao što je bio slučaj i u šaržnom uzgoju dijatomeje (Tablica 12; Poglavlje 4.1.). Navedeno ukazuje na to da je dušik bio dodavan u suvišku tijekom uzgoja, dok su silicij i fosfor ograničavali rast na kraju svake od pojedinih faza.

Iz Slika 12, 13 i 14 jasno se vidi da se šaržnim uzgojem s pritokom supstrata povećao prinos biomase u odnosu na šaržni dio uzgoja. Povećanje koncentracije biomase *Cyclotella* sp. tehnikom impulsnog ili kontinuiranog dodatka silicija primijetili su i Jeffries i sur. (2013).

Dakle, broj stanica, optička gustoća i koncentracija biomase povećavale su se tijekom cijelog uzgoja. S druge strane, specifična brzina rasta je varirala (Tablica 15). Najmanja specifična brzina rasta određena je u posljednjoj fazi uzgoja. Do limitacije rasta moglo je doći zbog neadekvatne raspodjele svjetlosti svim stanicama zbog gustoće kulture i/ili nedovoljne količine ugljika za opskrbu velikog broja stanica (Sayanova i sur., 2017; Lebeau i Robert, 2003). Osim toga, dijatomeje karakterizira smanjenje stanica kroz generacije vegetativnim načinom razmnožavanja do kritične veličine, nakon čega se počinju dijeliti spolnim načinom kako bi izbjegle smrt (Hildebrand i Lerch, 2015; Mann i sur., 2017). Stoga je moguće objašnjenje slabijeg rasta u zadnjoj fazi uzgoja približavanje kritičnoj veličini stanica, nakon koje vegetativni način razmnožavanja više nije moguć.

5.4. Utjecaj šaržnog uzgoja s pritokom supstrata na sastav biomase i sastav masnih kiselina

Na kraju svake faze šaržnog uzgoja s pritokom supstrata određen je udjel proteina, lipida i klorofila a i c u biomasi dijatomeje, te sastav masnih kiselina u ukupnim staničnim lipidima.

Na slici 16 prikazane su vrijednosti udjela proteina određene na kraju svake faze uzgoja. Iz slike se može vidjeti znatno povećanje udjela proteina u biomasi (od 5,40 % na kraju prve faze pa sve do 49,80 % na kraju uzgoja). Naime, stanice su tijekom uzgoja bile opskrbljene s dovoljno nutrijenata za rast pa tako i sintezu proteina. Osim izvora ugljika, sintezi proteina pogoduju i veće koncentracije dušika u hranjivoj podlozi (Zulu i sur., 2018; Machado i sur., 2016). Na Slici 15 može se vidjeti kako je dušik bio u suvišku tijekom cijelog uzgoja, odnosno nije limitirao rast stanica i sintezu proteina. Osim toga, ni jedan drugi nutrijent nije značajnije limitirao rast što potvrđuje održavanje stanica u eksponencijalnoj fazi rasta većim dijelom uzgoja (Slike 12 i 13). Ovim načinom uzgoja u konačnici (nakon 35 dana uzgoja) je postignut veći udjel proteina nego šaržnim uzgojem na svim modificiranim f/2 hranjivim podlogama tijekom 14 dana uzgoja (Slika 9, Poglavlje 4.2.). Alzahrani i sur. (2017) su u svojem istraživanju pokazali da dijatomeja *Nitzschia laevis* proizvodi bioaktivne proteine i peptide koji pokazuju izrazitu antioksidativnu aktivnost. Upravo šaržni uzgoj s pritokom supstrata dijatomeje *Nitzschia* sp. mogao bi se koristiti za komercijalnu proizvodnju bioaktivnih proteina, budući da je rezultirao visokim udjelom istih u biomasi.

Udio ukupnih lipida na kraju svake faze uzgoja prikazan je na Slici 17. Na kraju šaržnog dijela uzgoja dobiven je udio lipida u biomasi od 2,69 %, što je nešto niža vrijednost nego u šaržnom uzgoju na istoj hranjivoj podlozi u prethodnom eksperimentu gdje je taj udio iznosio 3,94 % (Slika 10). To je posljedica faze rasta u kojoj je uzgoj prekinut. Konkretno, u prethodnom eksperimentu stanice su duže bile u stacionarnoj fazi rasta (Slika 6 c)), odnosno u fazi koja pogoduje sintezi i nakupljanju lipida (d'Ippolito i sur., 2015; Sayanova i sur., 2017). Isto se može primijetiti i uspoređujući udjele lipida nakon prihrana u ovom eksperimentu. Naime, nakon četvrte prihrane udjel lipida je porastao u odnosu na prethodne prihrane jer su stanice pri kraju te faze bile duže vrijeme u stacionarnoj fazi, što se vidi na Slikama 12 i 13. Udio lipida u biomasi neznatno je rastao od 1,97% na kraju prve prihrane do 2,25 % na kraju četvrte prihrane, tj. na kraju uzgoja.

Slika 18 prikazuje promjenu koncentracije i udjela klorofila a i c, kao i ukupnog klorofila u biomasi tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata. Na grafu koji prikazuje koncentraciju

klorofila vidi se da koncentracija u pravilu raste tijekom uzgoja, što je očekivano jer raste i koncentracija biomase (Slika 14). Na sintezu klorofila najveći utjecaj ima intenzitet i valna duljina svjetlosti (Kuczynska i sur., 2015). Međutim, istraživanja su pokazala da i sastav hranjive podloge može značajno utjecati na sintezu klorofila, odnosno da se koncentracija ukupnog klorofila povećava u hranjivim podlogama bogatim na dušiku i/ili fosforu (Machado i sur., 2016; Shatwell i sur., 2014). Kako su se u ovom uzgoju svakom prihranom dodavali izvori dušika i fosfora, može se pretpostaviti da su pogodovali sintezi klorofila. Ipak, kada se pogleda graf koji prikazuje udjele klorofila na kraju svake faze uzgoja, može se uočiti da udjeli nisu rasli. Moguće je da zbog ugušćivanja kulture tijekom uzgoja, dotok svjetlosti nije bio adekvatan.

Profil masnih kiselina (Tablica 16) nije se mnogo mijenjao tijekom uzgoja i u skladu je s profilom dobivenim u prethodnom eksperimentu. Tako su najzastupljenije masne kiseline i u ovom slučaju C16:1 palmitoleinska (52,61%-56,82%), C14:0 miristinska (4,15%-19,49%), C16:0 palmitinska (8,55%-11,46%), te C20:5 eikozapentanoična kiselina (5,15%-15,59%). Mononezasićene masne kiseline bile su najzastupljenije u ukupnim lipidima nakon svake faze uzgoja (53,46%-66,18%). Udjel polinezasićenih masnih kiselina pao je u drugoj fazi uzgoja s 15,59% na 5,25%. Nakon druge faze uzgoja, udjel PUFA se povećavao do konačnih 16,69% na kraju uzgoja. Gao i sur. (2019) primijetili su da povećanje udjela SFA prati smanjenje udjela PUFA i obratno, dok udio MUFA pri tome ostaje gotovo nepromijenjen. U ovom eksperimentu povećanje udjela PUFA nekad je bilo praćeno smanjenjem udjela SFA, a nekad udjela MUFA. Povećanju PUFA tijekom uzgoja pogoduju povoljni uvjeti u smislu dovoljne količine nutrijenata (Yang i sur., 2013). Jasno je da je u ovom eksperimentu došlo do povećanja udjela PUFA zbog prihrana bogatim nutrijentima. Kao i kod šaržnog uzgoja (Tablica 14, Poglavlje 4.2.), najveći udio u polinezasićenim masnim kiselinama činila je visokovrijedna masna kiselina, eikozapentanoična kiselina koja je važna u prehrani ljudi jer doprinosi zdravlju srca i krvožilnog sustava, a postoje istraživanja koja pokazuju i njeno antikancerogeno djelovanje (Kiran Marella i Tiwari, 2020).

Važno je primijetiti da ukupni stanični lipidi i proteini ne čine niti 50 % suhe tvari biomase u svim fazama uzgoja. Koncentracija ugljikohidrata bila je ispod granice detekcije za korištenu metodu (Poglavlje 3.2.4.10.). Brajković (2019) navodi da je udjel ugljikohidrata za isti soj oko 5 %. Zaključuje se da *Nitzschia* sp. soj 5.4. u svojem sastavu ima visoke udjele mineralnih tvari, što je i potvrđeno u istraživanju Brajković (2019) gdje je određen udio mineralnih tvari u biomasi oko 44 %.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih eksperimenata može se zaključiti sljedeće:

1. Povećanjem koncentracija tri makronutrijenta (silicija, dušika i fosfora) u odnosu na njihove koncentracije u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi postiže se značajno veći rast biomase dijatomeje *Nitzschia* sp. Najpogodnijom za rast pokazala se modificirana f/2 hranjiva podloga 10xSi/4xN/4xP s početnim koncentracijama od 29,6 mg L⁻¹ silicija, 49,4 mg L⁻¹ dušika i 4,49 mg L⁻¹ fosfora na kojoj se postiže tri puta veća koncentracija biomase u odnosu na izvornu f/2 hranjivu podlogu.
2. Način vođenja procesa značajno utječe na prinos biomase dijatomeje *Nitzschia* sp. Šaržnim uzgojem s pritokom supstrata postignut je dvanaest puta veći broj stanica po mililitru podloge ($4,2 \cdot 10^7$) u odnosu na koncentraciju postignutu u šaržnom dijelu uzgoja (13. dan uzgoja, $5,5 \cdot 10^6$).
3. Najzastupljenije makromolekule u stanicama dijatomeje *Nitzschia* sp. su proteini. Visoki postoci od preko 40 % suhe tvari biomase dobiveni su šaržnim uzgojem u f/2 hranjivoj podlozi 10xSi/4xN/8xP (početne koncentracije od 29,6 mg L⁻¹ silicija; 49,4 mg L⁻¹ dušika i 8,98 mg L⁻¹ fosfora) i preko 46 % na hranjivoj podlozi 10xSi/4xN/4xP (početne koncentracije od 29,6 mg L⁻¹ silicija; 49,4 mg L⁻¹ dušika i 4,49 mg L⁻¹) šaržnim uzgojem s pritokom supstrata.
4. Stanični lipidi dijatomeje *Nitzschia* sp. bogati su na eikozapentaenoičnoj kiselini (ω -3; C20:5; EPA) koja može doseći vrijednosti do preko 15 % u ukupnim lipidima.

7. ZAHVALE

Najveću zahvalu upućujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek koja me stručno i strpljivo vodila kroz sve faze izrade ovog rada te mi je bila velika pomoć i podrška.

Također, zahvaljujem se mag. ing. Marini Grubišić na nesebičnoj pomoći tijekom provođenja istraživanja i prilikom pisanja rada.

Hvala i svim ostalim članovima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na susretljivosti i ugodnoj atmosferi.

8. POPIS LITERATURE

- Adams, C., Bugbee, B. (2013) Enhancing lipid production of the marine diatom *Chaetoceros gracilis*: synergistic interactions of sodium chloride and silicon. *J Appl Phycol* **26(3)**, 1351–1357.
- Alzahrani, M. A. J., Perera, C. O., Hemar, Y. (2017) Production of bioactive proteins and peptides from the diatom *Nitzschia laevis* and comparison of their in vitro antioxidant activities with those from *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Food Science & Technology* **53(3)**, 676–682.
- Batista-Silva, W., da Fonseca-Pereira, P., Martins, A. O., Zsögön, A., Nunes-Nesi, A., Araújo, W. L. (2020) Engineering Improved Photosynthesis in the Era of Synthetic Biology. *Plant Communications*, 100032. doi:10.1016/j.xplc.2020.100032
- Barkia, I., Saari, N., Manning, S. R. (2019) Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. *Marine Drugs* **17(5)**, 304. doi:10.3390/md17050304
- Becker, E. W. (2013) Microalgae for aquaculture: nutritional aspects. U: Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology, 2. izd., (Richmond, A., Qiang Hu, ured.), Wiley-Blackwell, str. 671-691.
- Bína, D., Herbstová, M., Gardian, Z., Vácha, F., Litvín, R. (2016) Novel structural aspect of the diatom thylakoid membrane: lateral segregation of photosystem I under red-enhanced illumination. *Scientific Reports*, **6(1)**. doi:10.1038/srep25583
- Brajković, A. (2019) Optimizacija uvjeta fototrofnog uzgoja i karakterizacija dijatomeje izolirane iz Jadranskog mora. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnoški fakultet.
- Chen, G.Q., Jiang, Y., Chen, F. (2008) Salt-Induced Alterations in Lipid Composition of Diatom *Nitzschia laevis* (Bacillariophyceae) Under Heterotrophic Culture Condition I. *Journal of Phycology* **44**, 1309–1314.
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., Chang, J.-S. (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, **102(1)**, 71–81.
- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., Chang, J.-S. (2018) Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. doi:10.1016/j.jtice.2018.05.039

- Cuvelier, M., Simmons, M. (2009) Keller (K) medium in artificial seawater (Keller et al., 1987). *Worlden Lab* [online], < <https://www.mbari.org/wp-content/uploads/2015/11/KASW.pdf>>. Pristupljeno 18. kolovoza, 2020.
- D'Alessandro, E. B., Antoniosi Filho, N. R. (2016) Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renew Sust Energ Rev* **58**, 832–841.
- d' Ippolito, G., Sardo, A., Paris, D., Vella, F., Adelfi, M., Botte, P., Gallo, C., Fontana, A. (2015) Potential of lipid metabolism in marine diatoms for biofuel production. *Biotechnol Biofuels* **8(1)**, 28-37.
- Gao, G., Wu, M., Fu, Q., Li, X., Xu, J. (2019) A two-stage model with nitrogen and silicon limitation enhances lipid productivity and biodiesel features of the marine bloom-forming diatom *Skeletonema costatum*. *Bioresource Technology*, **289**, 121717.
- Goss, R., Wilhelm, C., Jakob, T. (2020) Photosynthesis in diatoms. *Handbook of Algal Science, Technology and Medicine*, 217–229. doi:10.1016/b978-0-12-818305-2.00013-9
- Guillard, R.R.L. (1975) Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. U: Culture of Marine Invertebrates Animals (Smith, M.L., Chanley, M.H., ured.), Plenum Press, New York, 26-60.
- Hasle, G. R., Syvertsen, E. E. (1997). Marine Diatoms. *Identifying Marine Phytoplankton*, 5–385. doi:10.1016/b978-012693018-4/50004-5
- Hildebrand, M., Abbriano, R. M., Polle, J. E., Traller, J. C., Trentacoste, E. M., Smith, S. R., Davis, A. K. (2013) Metabolic and cellular organization in evolutionarily diverse microalgae as related to biofuels production. *Current Opinion in Chemical Biology*, **17(3)**, 506–514.
- Hildebrand, M., Lerch, SJL (2015) Diatom Silica Biomineralization: Parallel Development of Approaches and Understanding, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.06.007>
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F. (1975) New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanzen*, **167**: 191-194.
- Jeffryes, C., Rosenberger, J., Rorrer, G. L. (2013) Fed-batch cultivation and bioprocess modeling of *Cyclotella* sp. for enhanced fatty acid production by controlled silicon limitation. *Algal Research* **2(1)**, 16–27.

- Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K. (2015) Photosynthetic Pigments in Diatoms. *Marine Drugs*, **13(9)**, 5847–5881.
- Kiran Marella, T., Tiwari, A. (2020) Marine diatom *Thalassiosira weissflogii* based biorefinery for co-production of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin. *Bioresource Technology*, 123245. doi:10.1016/j.biortech.2020.123245
- Lebeau, T., Robert J.M. (2003) Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 612-623.
- Li, G., Campbell, D. A. (2015) Interactive effects of and light on growth rates and RUBISCO content of small and large centric diatoms. *Biogeosciences Discussions*, **12(20)**.
- Machado, M., Bromke, M., Domingues Júnior, A. P., Marçal Vieira Vaz, M. G., Rosa, R. M., Vinson, C. C., Sabir, J. S., Rocha, D. I., Martins, M. A., Araújo, W. L., Willmitzer, L., Szymanski, J., Nunes-Nesi, A. (2016) Comprehensive metabolic reprogramming in freshwater *Nitzschia palea* strains undergoing nitrogen starvation is likely associated with its ecological origin. *Algal Research* **18**, 116–126.
- Mann, D., G., Crawford, R., M., Round, F., E. (2017) Bacillariophyta. U: Handbook of the Protists, 2. izd. (Archibald, J., M., Simpson, A., G., B., Slamovits, C., H., Margulis, L., Melkonian, M., Chapman, D., J., Corliss, J., O., ured.), Springer, Cham, str. 1-49.
- Martin-Jezequel, V., Hildebrand, M., Brzezinski, M. A. (2000) SILICON METABOLISM IN DIATOMS: IMPLICATIONS FOR GROWTH *Journal of Phycology*, **36(5)**, 821–840.
- Masojídek, J., Torzillo, G., Koblížek, M. (2013) Photosynthesis in Microalgae. U: Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, 2. izd. (Richmond, A., Hu, Q., ured.), John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, str. 21–37.
- Mohan, S. V., Devi, M. P., Subhash, G. V., Chandra, R. (2014) Algae oils as fuels. U: Biofuels from Algae (Pandey, A., Lee, D. J., Chisti, Y., Soccol, C. R., ured.) Elsevier, Burlington, str. 155-187.
- Ozkan, A., Rorrer, G.L. (2017) Lipid and chitin nanofiber production during cultivation of the marine diatom *Cyclotella* sp. to high cell density with multistage addition of silicon and nitrate. *J Appl Phycol* **29**, 1811–1818.
- Rezić, T., Filipović, J., Šantek, B. (2014) Mikroalge – potencijalni izvor lipida za proizvodnju biodizela. *Croatian journal of food technology, biotechnology and nutrition* **9(1-2)**, 26-36.

- Rodríguez-Núñez, K., Toledo-Agüero, P. (2017) Fatty acid profile and nutritional composition of two tropical diatoms from the Costa Rican Pacific Coast. *Grasas Aceites* **68(3)**: 1-8.
- Sayanova, O., Mimouni, V., Ulmann, L., Morant-Manceau, A., Pasquet, V., Schoefs, B., Napier, J. A. (2017) Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms. *Phil Trans R Soc B* **372(1728)**, 20160407.
- Shatwell, T., Köhler, J., Nicklisch, A. (2013) Temperature and photoperiod interactions with silicon-limited growth and competition of two diatoms. *Journal of Plankton Research* **35(5)**, 957–971.
- Singh, J., Saxena, R. C. (2015) An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. U: Handbook of Marine Microalgae (Kim, S.-K., ured.), Elsevier, Amsterdam, 11–24.
- Taguchi, S., Hirata, J. A., Laws, E. A. (1987) SILICATE DEFICIENCY AND LIPID SYNTHESIS OF MARINE DIATOMS. *Journal of Phycology* **23(2)**, 260–267.
- Van Wychen, S., Laurens, L. M. L. (2013a) Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass: laboratory analytical procedure (LAP), issue date December 2, 2013. Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory.
- Van Wychen, S., Laurens, L. M. L. (2013b) Determination of total lipids as fatty acid methyl esters (FAME) by in situ transesterification : laboratory analytical procedure (LAP), issue date December 2, 2013. Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory.
- Venkatesan, J., Manivasagan, P., Kim, S.-K. (2015) Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances. U: Handbook of Marine Microalgae (Kim, S.-K., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 1–9.
- Wen, Z. Y., Chen, F. (2000) Heterotrophic production of eicosapentaenoid acid by the diatom *Nitzschia laevis*: Effects of silicate and glucose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **25(4)**, 218-224.
- Xia, S., Gao, B., Fu, J., Xiong, J., Zhang, C. (2018) Production of fucoxanthin, chrysolaminarin, and eicosapentaenoic acid by *Odontella aurita* under different nitrogen supply regimes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. doi:10.1016/j.jbiosc.2018.06.002
- Yang, Z.K, Niu, Y.F., Ma, Y.H., Xue, J., Zhang, M.H., Yang, W.D., Liu, J.S., Lu, S.H., Guan, Y., Li, H.Y. (2013) Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. *BiotechnolBiofuels*, 6:67. doi:10.1186/1754-6834-6-67.

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

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

Zulu, N. N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., Feussner, I. (2018) Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Progress in Lipid Research* **70**, 1–16.

9. SAŽETAK

Optimizacija f/2 hranjive podloge za fototrofni šaržni uzgoj s pritokom supstrata dijatomeje *Nitzschia* sp.

Marija Kuzmić

Dijatomeje su najbrojnija i najraznovrsnija skupina morskih mikroalgi koje sintetiziraju različite prirodne proizvode. Stanična biomasa bogata je proteinima, ugljikohidratima i lipidima te sadrži visokovrijedne proizvode kao što su pigmenti, steroli, izoprenoidi, višestruko nezasićene masne kiseline i molekule male molekulske mase s potencijalnom biološkom aktivnošću. Glavni problem u biotehnološkoj primjeni dijatomeja i njihovih proizvoda je niska produktivnost i prinos biomase pri fototrofnom uzgoju. Cilj ovog rada bila je optimizacija f/2 hranjive podloge za fototrofni uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. promjenom koncentracije tri makronutrijenta, silicija, dušika i fosfora. Deseterostruko povećanje koncentracije silicija te četverostruko povećanje koncentracija dušika i fosfora u modificiranim hranjivim podlogama rezultirali su dvostruko većom specifičnom brzinom rasta ($0,28 \text{ dan}^{-1}$) i trostruko većom koncentracijom biomase ($0,76 \text{ g L}^{-1}$) u odnosu na izvornu f/2 hranjivu podlogu. Potom je proveden šaržni uzgoj s pritokom supstrata na optimiranoj f/2 hranjivoj podlozi s četiri prihrane koje su sadržavale koncentrirane otopine silicija, dušika i fosfora. Maksimalna koncentracija biomase od $1,6311 \text{ g L}^{-1}$ i broj stanica od $4,3 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$ postignute su nakon 35 dana uzgoja, što predstavlja dvostruko povećanje koncentracije biomase i dvanaesterostruko povećanje broja stanica. Najveći utjecaj na rast stanica imao je silicij, a potom fosfor. Preostala koncentracija dušika u hranjivoj podlozi na kraju uzgoja ukazuje na to da rast nije bio limitiran ovim makronutrijentom. Modificirana f/2 hranjiva podloga pogodovala je akumulaciji proteina u stanicama (46,80 %), dok je nakupljanje lipida bilo značajno smanjeno (2,25 %). Najzastupljenije masne kiseline u staničnim lipidima bile su: miristinska, palmitinska, palmitoleinska i eikozapentaenoična. Navedeni rezultati daju nam bolji uvid u potrebe za rast morske dijatomeje i predstavljaju važan korak u poboljšanju produktivnosti biomase i ekonomičnosti procesa.

Ključne riječi: dijatomeje, šaržni uzgoj s pritokom supstrata, silicij, fototrofni uzgoj, f/2 hranjiva podloga

10. SUMMARY

Optimisation of f/2 growth medium for phototrophic fed-batch cultivation of diatom *Nitzschia* sp.

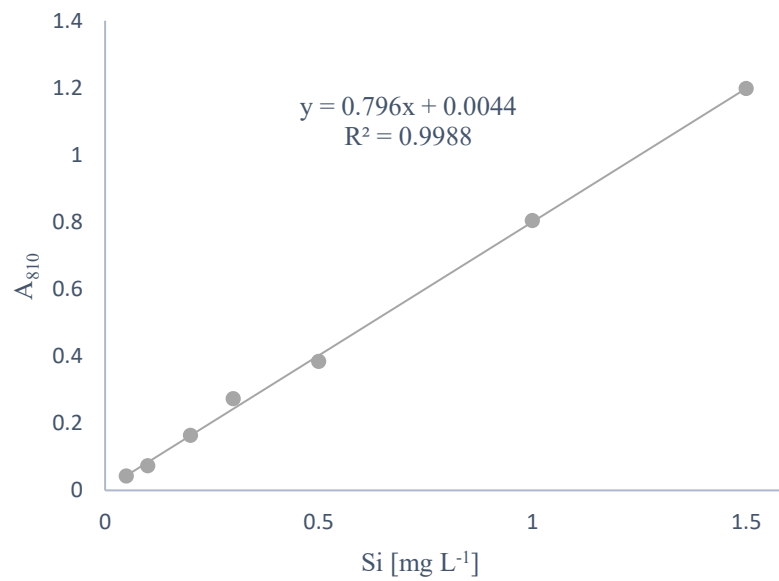
Marija Kuzmić

Diatoms are the most abundant and diverse group of microalgae in marine environment that biosynthesize various natural products. Cell biomass is rich in proteins, carbohydrates and lipids, and contains highly valuable products such as pigments, sterols, isoprenoids, polyunsaturated fatty acids, and low-molecular-weight molecules with potential biological activity. The major barrier to biotechnological applications of diatoms and their new products are low productivity and biomass yield of phototrophic cultivation. The aim of this work was to optimize the composition of f/2 growth medium for phototrophic cultivation of diatom *Nitzschia* sp. by changing the concentration of three macronutrients, silica, nitrogen and phosphate. A tenfold increase of silica concentration and fourfold increase of nitrogen and phosphate concentration in modified medium doubled the specific growth rate ($0,28 \text{ day}^{-1}$) and tripled the biomass concentration ($0,76 \text{ g L}^{-1}$) compare to original f/2 medium. Next, fed-batch cultivation of diatom was conduct using optimized f/2 medium with four feeds with concentrated solutions of silica, nitrogen and phosphate. The maximum biomass concentration of $1,6311 \text{ g L}^{-1}$ and cell number of $4,3 * 10^7 \text{ mL}^{-1}$ was achieved after 35 days of cultivation, which represented twofold and twelfold improvement in the cell mass concentration and cell number, respectively. Silica had the most significant effect on the growth of diatom, followed by phosphate. Excess of nitrogen in f/2 medium at the end of cultivation suggests that this macronutrient did not limit growth. The enriched f/2 medium stimulated the protein accumulation in cell biomass (46,80 %), while lipid accumulation was drastically reduced (2,25 %). The major fatty acids in cell lipids were myristic, palmitic, palmitoleic and eicosapentaenoic. This results give us a new insight into the growth requirements of marine diatom and represents an important step for improvement biomass production and process economics.

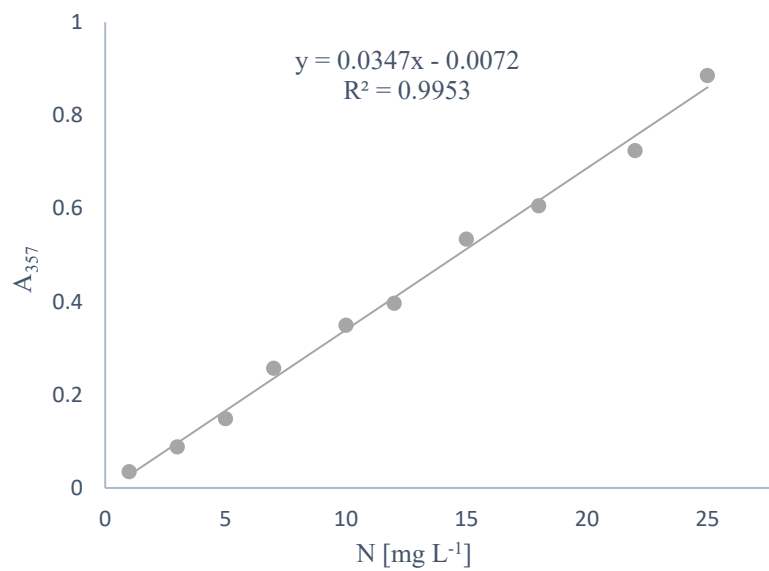
Keywords: diatoms, fed-batch cultivation, silica, phototrophic growth, f/2 growth medium

11. PRILOZI

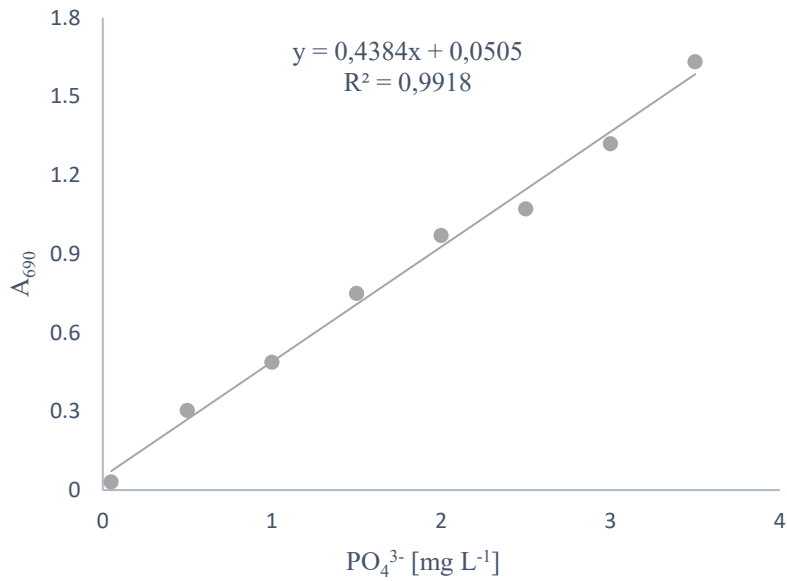
Prilog 1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije silicija u uzorku.



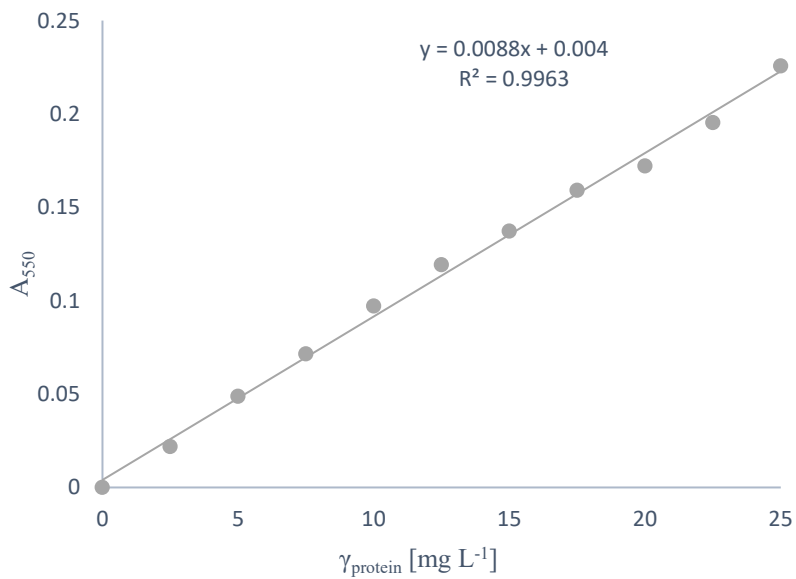
Prilog 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije dušika u uzorku.



Prilog 3. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije fosfatnih iona u uzorku.



Prilog 4. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-ju.



Prilog 5. Popis monosaharida i odgovarajućih jednačbi baždarnih pravaca.

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