

**Biotehnološki potencijal mikroalgi izoliranih iz rijeke
Gacke i Jadranskog mora:
karakterizacija i optimizacija uvjeta uzgoja**

Marina Grubišić, mag.ing.bioproc.
Mentor: prof.dr.sc. Mirela Ivančić Šantek

Projekt: BioProspekting Jadranskog mora
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku
mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada
Zavod za biokemijsko inženjerstvo

UVOD

BIOPROSPEKTING



- organizirano i sistematizirano istraživanje prirodnih izvora malih molekula, makromolekula kao i biokemijskih i genetičkih informacija

biljke,
mikroorganizmi,
i životinje

- komercijalno vrijedni proizvodi s primjenom u poljoprivredi, akvakulturi, bioremedijaciji, kozmetici, nanotehnologiji i farmaceutskoj industriji



JADRANSKO MORE



- morski sustavi pružaju veću biološku raznolikost od kopnenih sustava
- nedovoljna istraženost
- biološka raznolikost pruža bogatstvo bioaktivnih molekula

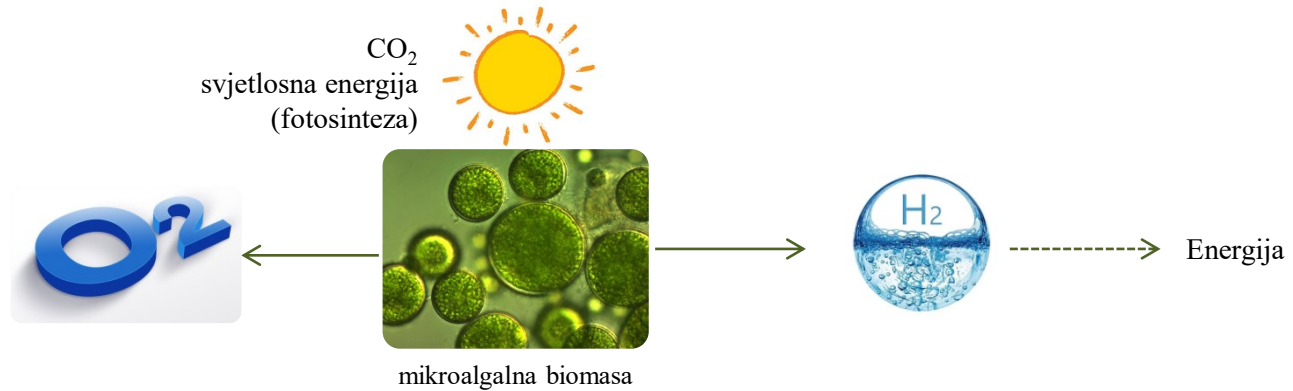
RIJEKA GACKA



- hidrološki fenomen hrvatskog krša- visoke konstantne čistoće, visoka bioekološka vrijednost
- bujno razvijena flora- povoljna temperatura vode, odgovarajući kemijski sastav, muljevito dno i relativno spor tok vode



UVOD



PIGMENTI

klorofili
karotenoidi
fikobilin i

Kolorofil a:
protuupalno,
antikancerogeno

Astaksantin:
antioksidativno
djelovanje, liječenje
Alzheimera i
Parkinsonove bolesti

β -kroten:
imunitet, zdravlje
očiju i kože,
antikancerogeno

LIPIDI

višestruko nezasićene masne kiseline (ω -3, ω -6)

EPA-
prevencija na
kardiovaskularne
bolesti

PROTEINI

- ljudska prehrana
- Prehrambena industrija
- Funkcionalna hrana
- Krmiva i hrana za životinje

BIOPOLIESTERI

polihidroksialkanoati

„zelena plastika”

POLISAHARIDI

*β -1,3-glukan,
karagenan, škrob,
agar, alginat, celuloza*

- ljudska prehrana
- prehrambena industrija
- funkcionalna hrana
- farmaceutske i
terapeutske aplikacije
- proizvodnja energije
- bioetanol

BIOAKTIVNI SPOJEVI

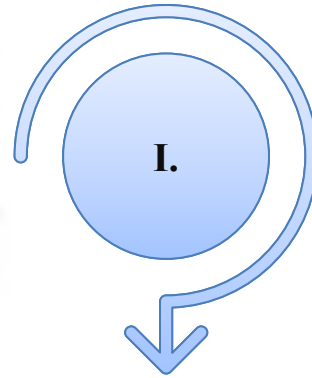
anti-bakterijsko, anti-fungalno, anti-protoza, anti-algalno djelovanje

- antibiotici

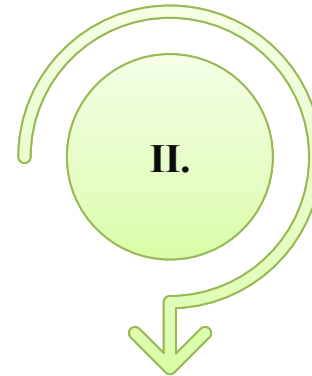




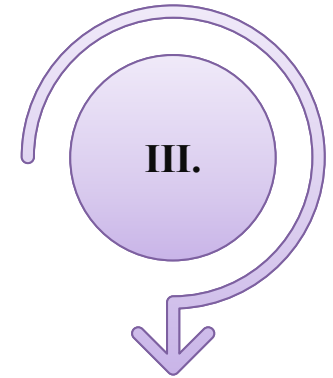
CILJEVI



**Izolacija i
pročišćavanje
slatkovodnih i
morskih mikroalgi
iz uzoraka vode
izuzetih iz
vodotokova rijeke
Gacke i Jadranskog
mora**



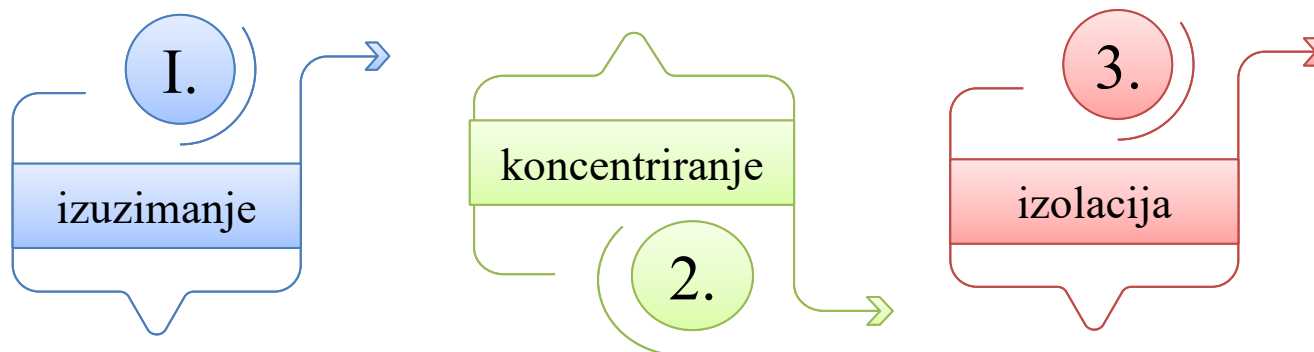
**Identifikacija i
karakterizacija
izoliranih
kseničnih
kultura**

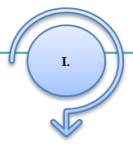


**Optimizacija
procesa proizvodnje
odabranih vrsta
mikroalgi uz
postizanje visoke
koncentracije
biomase određenog
sastava**



METODOLOGIJA

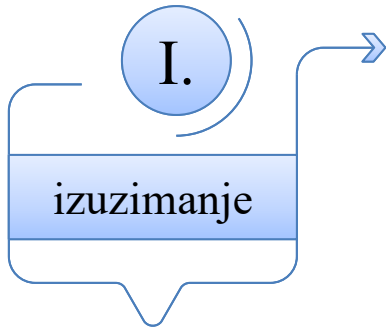




Izolacija i pročišćavanje slatkovodnih i morskih mikroalgi iz uzoraka vode izuzetih iz vodotokova rijeke Gacke i Jadranskog mora

METODOLOGIJA

1. IZOLACIJA I PROČIŠĆAVANJE SLATKOVODNIH I MORSKIH SOJEVA MIKROALGI



Jadransko more



Šibenik- 43.7264° N, 15.8419° E

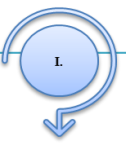
Split- 43° 30' 00" N, 016° 26' 00" E



Rijeka Gacka, Lika

Naziv mjesta	Geografska dužina	Geografska širina
Švičko jezero	44,5213527953	15,1105700234
Zapornica-Šumečića	44,5141994752	15,1250782817
Stari most-SŠC	44,5216034877	15,1401311202
Šatrić	44,5023357844	15,1520224239
Kostelka	44,4852321179	15,1838868898

- uzorkovanje pomoću sterilnih posuda za uzorke i sterilnih boca
- do obrade u laboratoriju uzorci čuvani na hladnom i tamnom mjestu (do +4 °C)

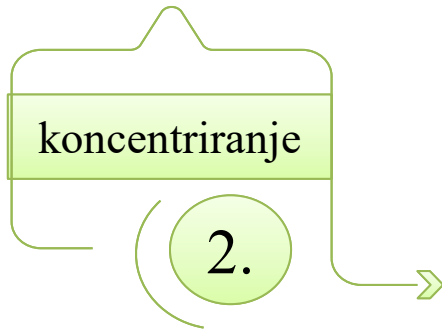


Izolacija i
pročišćavanje
slatkovodnih i
morskih mikroalgi
iz uzoraka vode
izuzetih iz
vodotokova rijeke
Gacke i Jadranskog
mora

METODOLOGIJA

1. IZOLACIJA I PROČIŠĆAVANJE SLATKOVODNIH I MORSKIH SOJEVA MIKROALGI

* zbog niske koncentracija stanica
mikroalgi u uzorcima



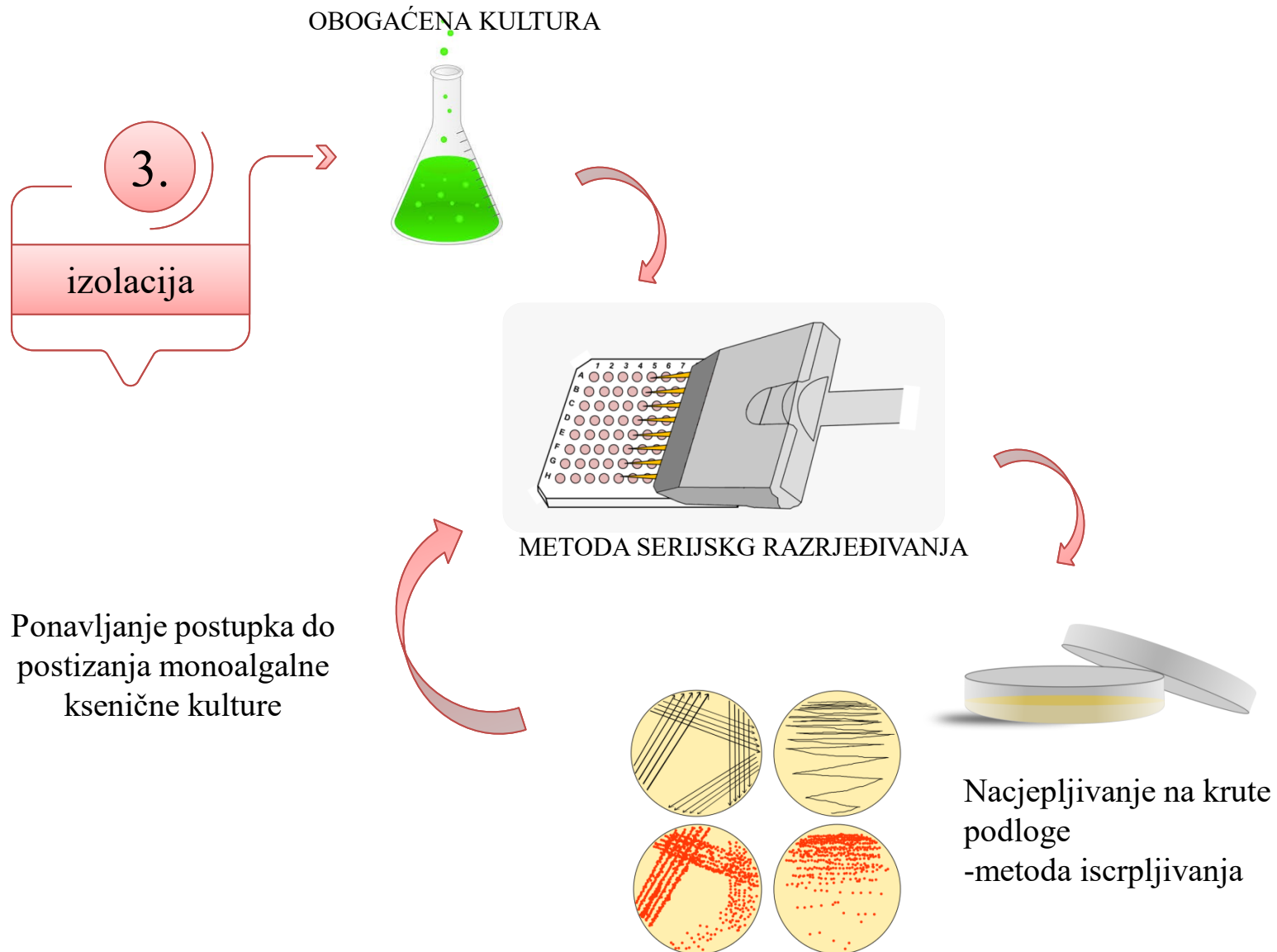
- obogaćivanje u hranjivoj podlozi: f/2 podloga → morske
BBM podloga → slatkovodne
- uzgoj mješovite kulture → sobna T (°C) + prisustvo svjetlosti

- filtracija uzoraka- 0,45 μm
- filter će se uroniti u manji volumen odgovarajuće podloge
- uzgoj mješovite kulture → sobna T (°C) + prisustvo svjetlosti

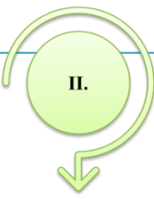
METODOLOGIJA

1. IZOLACIJA I PROČIŠĆAVANJE SLATKOVODNIH I MORSKIH SOJEVA MIKROALGI

Izolacija i pročišćavanje slatkovodnih i morskih mikroalgi iz uzoraka vode izuzetih iz vodotokova rijeke Gacke i Jadranskog mora



METODOLOGIJA



Identifikacija i
karakterizacija
izoliranih
kseničnih
kultura

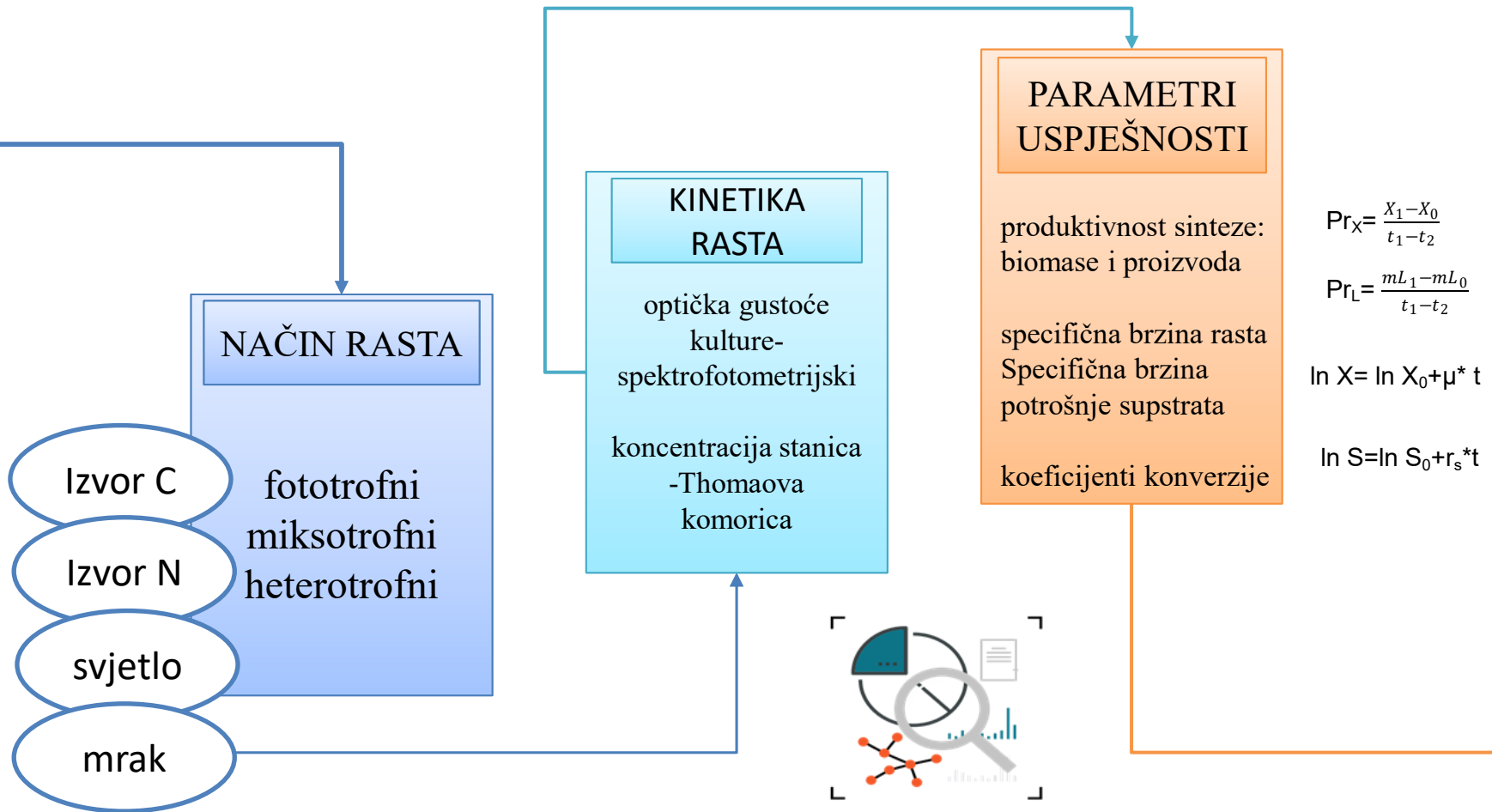
IDENTIFIKACIJA

morfološka obilježja stanice
(svjetlosni mikroskop)

analiza molekularnih biljega
(analiza 18S rRNA i po potrebi ITS, 28S ili plastidne 16S
regije)

METODOLOGIJA

KARAKTERIZACIJA



METODOLOGIJA

LIPIDI

- totalni lipidi
- profil masnih kiselina- plinska kromatografija



Pigmenti

Spektrofotometrijska metoda prema Jeffreyju i Humphreyu -klorofil a, b i c

Tekućinska kromatografija (UPLC/HPLC)



Proteini

Spektrofotometrijska metoda po Lowreyu

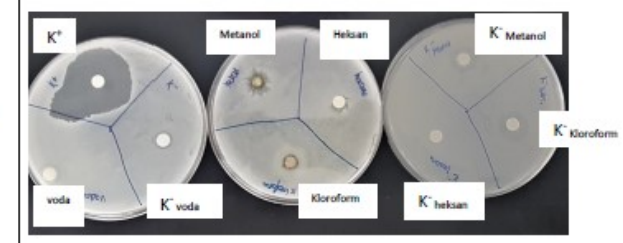
Antimikrobno djelovanje

difuzijska metoda

Ugljikohidrati

NREL metoda za određivanje sastava ugljikohidrata biomase mikroalgi

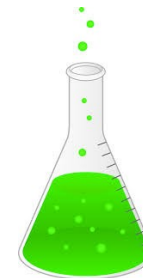
a) *Bacillus subtilis*



METODOLOGIJA

1.
korak

CILJ- postizanje visoke koncentracije biomase (veća produktivnost)



Optimizacija procesa proizvodnje odabranih vrsta mikroalgi uz postizanje visoke koncentracije biomase određenog sastava

Hranjiva podloga

- optimizacija koncentracije nutrijenata
- (dušik, fosfor, silicij, ugljik)

Način rasta

- fototrofni
- mixotrofni
- heterotrofni

Vođenje procesa

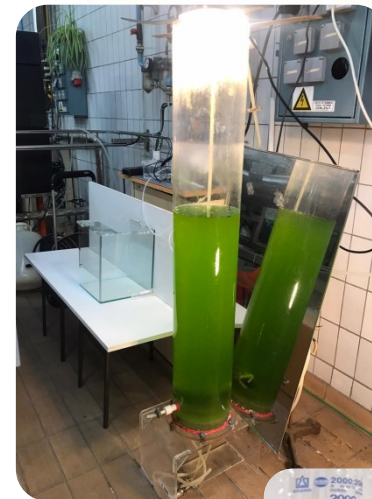
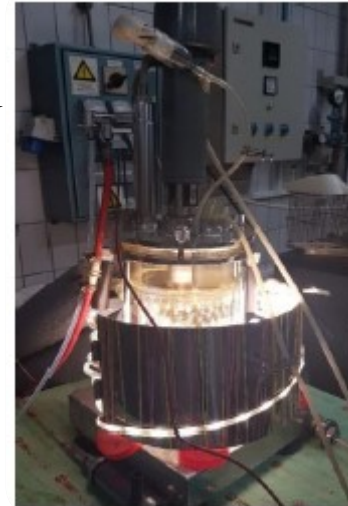
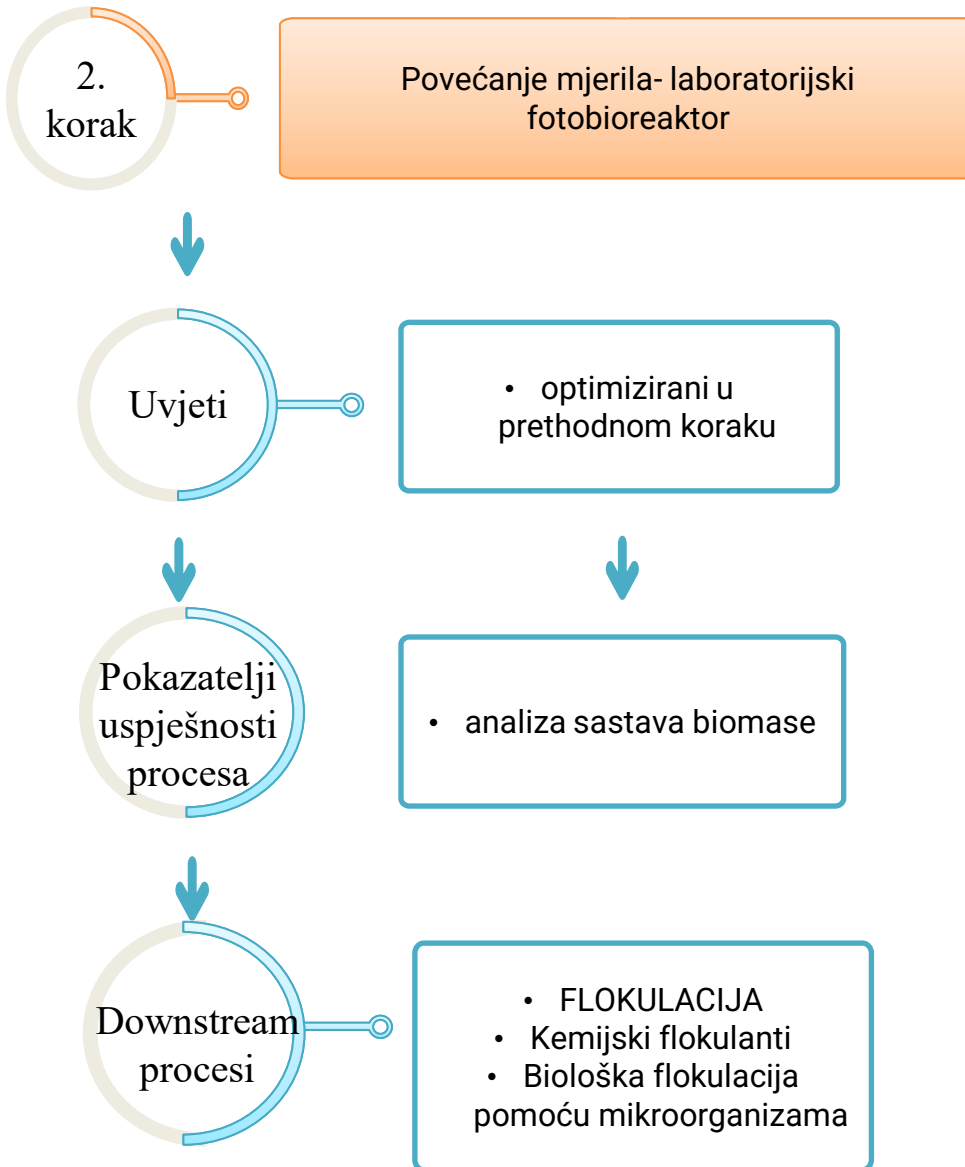
- šaržni uzgoj
- šaržni uzgoj s pritokom supstrata
- polukontinuirani uzgoj

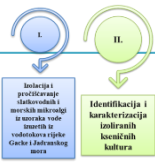
Utjecaj na biomasu

- analiza sastava biomase
- usmjeravanje metabolizma u nakupljanje željenog proizvoda

METODOLOGIJA

3. OPTIMIZACIJA UZGOJA ODABRANIH VRSTA MIKROALGI





MORSKE MIKROALGE

Oznaka soja	MD1*	MD2*	MD 3*	MD 4	MD 6*
Mikroskopska slika					
Domena	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota
Koljeno	Chromista	Chromista	Chromista	Bacillariophyta	Chromista
Razred	Bacillariophyceae	Bacillariophyceae	Bacillariophyceae	Bacillariophyceae	Bacillariophyceae
Red	Naviculales	Naviculales	Naviculales	Fragilariales	Naviculales
Porodica				Staurosiraceae	
Rod				Nanofrustulum or Pseudostaurosira	
Vrsta				shiloi	
Krivulja rasta					
Oznaka soja	MG1	MG 2	MG 4	S5	MD 7*
Mikroskopska slika					
Domena	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota
Koljeno	Chlorophyta	Chlorophyta	Chlorophyta	Bacillariophyta	Chromista
Razred	Chlorodendrophyceae	Trebouxiophyceae	Chlorodendrophyceae	Bacillariophyceae	Bacillariophyceae
Red	Chlorodendrales	Chlorellales	Chlorodendrales	Bacillariales	Naviculales
Porodica	Chlorodendraceae	Chlorellaceae	Chlorodendraceae	Bacillariaceae	
Rod	Tetraselmis	Picochlorum	Tetraselmis	Nitzschia or Psammodictyon	
Vrsta	sp.	sp.	Sp.	sp.	
Krivulja rasta					

Tablica 1. Izolirani sojevi morskih mikroalgi i pripadajuća krivulja rasta

Profil masnih kiselina

oznaka soja	MD1	MD2	MD3	MD4	MD6	MG1	MG 2	MG4	S5	MD7
masna kiselina										
C14:0	2,02±0,19	3,39±0,27	2,21±0,11	0,66±0,34	1,46±0,15		0,38±0,08		10,59±0,32	2,16±0,12
C16:0	22,44±1,36	32,62±1,07	32,11±0,72	30,76±0,27	23,87±0,74	31,63±1,1	28,14±2,61	33,25±1,35	23,19±0,26	30,52±1,31
C16:1 cis 9	29,85±2,3	27,85±1,26	31,30±0,24	41,57±2,18	30,54±1,57	3,54±0,12	1,36±0,03	2,24±0,09	56,12±0,14	33,17±0,72
C17:0	3,46±5,08	3,60±3,0	0,40±0,06	0,57±0,14	0,345±0,02	1,02±0,23	22,23±2,47	2,62±0,03	1,06±0,002	1,34±1,66
C17:1 cis 10		4,29±0,11	5,44±0,08	1,88±0,73	7,93±0,45	0,77±0,31		2,90±0,18	4,75±0,15	5,52±0,20
C18:1 cis 9	0,69±0,35	0,55±0,13	0,36±0,12	0,67±0,17	0,69±0,09	16,56±0,63	2,92±0,65	9,55±0,37		0,54±0,11
C18:2 cis 9,12	0,66±0,17	0,51±0,13	0,31±0,05	1,88±0,55	0,27±0,8	8,5±0,13	33,33±1,76	12,69±0,39		0,43±0,05
C18:3 cis 9,12,15	0,21					22,52±0,46	11,59±0,91	21,75±0,82		
C20:2 cis 11,14	0,79±0,60		2,32±0,10		4,69±0,44					3,13±0,65
C20:4 cis 5,8,11,14	8,05±1,97	3,56±0,13	6,16±0,28	9,29±3,31	8,72±0,69			1,32±0,03		5,12±0,16
C22:1 cis 13	1,73±0,67	1,01±0,08	0,42±0,08		0,27±0,04					0,67±0,04
C20:5 cis 5,8,11,14,17	15,83±2,35	14,54±0,50	14,87±0,81	6,79±1,84	17,23±1,48	8,58±1,05		7,01±3,17	3,48±0,19	13,13±0,92
C24:1 cis 15	0,67±0,08	1,19±0,16	0,46±0,14	0,19±0,05	0,51±0,03					0,88±0,12
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19	1,99±2,42	1,04±0,91	0,74±0,42	0,47±0,37	1,07±0,4	1,97±0,78				0,77±0,61
SFA	36,04±4,07	43,87±3,04	36,12±0,70	32,35±0,85	26,95±0,72	33,81±1,68	52,98±2,33	36,88±1,38	34,84±0,06	35,76±0,86
MUFA	33,61±1,65	36,45±1,58	38,40±0,29	46,08±5,40	40,08±1,82	24,66±0,58	7,74±3,35	18,19±0,61	64,68±0,13	41,38±0,78
PUFA	30,35±2,99	19,67±1,46	25,49±0,84	21,57±6,09	32,97±2,55	41,53±1,11	39,28±3,95	44,93±1,99	3,48±0,19	22,87±0,91
Udio lipida (%)	6,62±0,66	4,42±0,22	13,73±2,1	33,65±4,5	10,59±1,90	4,87±0,03	7,98±1,21	4,77±0,38	7,76±0,32	7,64±0,98

Tablica 3. Profil masnih kiselina lipida izoliranih sojeva morskih mikroalgi

Sastav pigmentata

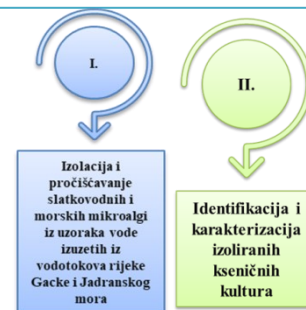
oznaka soja	MD3	MD4	MD6	MD7
pigment	mg/100 g			
fukoksantin	417,16	42,52	276,07	99,02
zeaksantin (der.)			4,34	
β- karoten	0,77	0,355	0,38	0,34
klorofil a	32,6	3,175	79,45	80,7
klorofil b	1791,13	92,775	920,23	622,38

Tablica 4. Sastav pigmentata izoliranih sojeva morskih mikroalgi

II.

Identifikacija i karakterizacija izoliranih kseničnih kultura

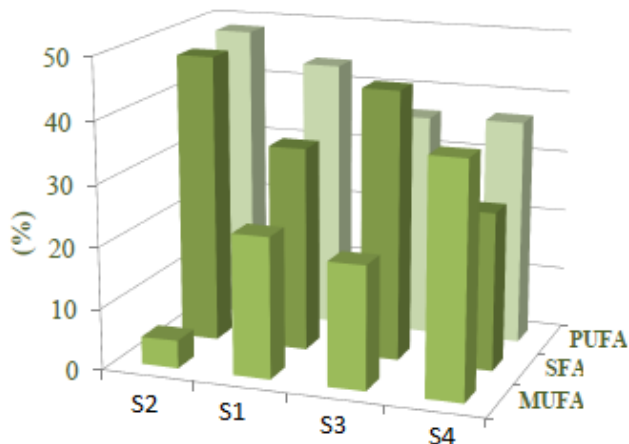
SLATKOVODNE MIKROALGE



Oznaka soja	S1	S2	S3	S4
Mikroskopska slika				
Domena	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota
Koljeno	Chlorophyta	Chlorophyta	Chlorophyta	Chlorophyta
Razred	Chlorophyceae	Trebouxiophyceae	Chlorophyceae	Chlorophyceae
Red	Chlamydomonadales	Chlorellales	Sphaeropleales	Sphaeropleales
Rod	Chlorococcum	Chlorella	Tetrademus	Tetrademus
Vrsta	sp.	vulgaris	obliquus	obliquus

Tablica 5. Izolirani sojevi slatkovodnih mikroalgi

SASTAV MASNIH KISELINA



Graf 1. Udio SFA, MUFA, PUFA u biomasi slatkovodnih mikroalgi

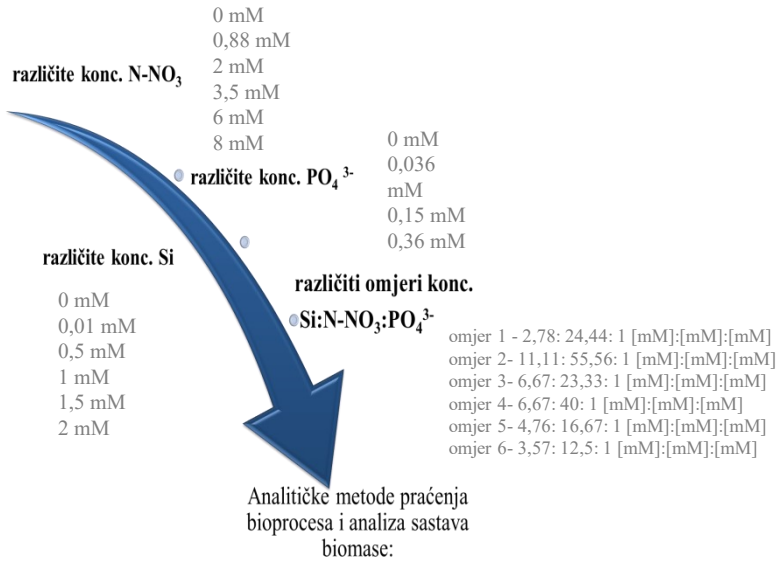
SFA- zasićene masne kiseline
 MUFA- mononezasićene masne kiseline
 PUFA-polinezasićene masne kiseline

ALA- alfa lipoična kiselina

Strain	S2	S1	S3	S4
Fatty acid	(%)			
C16:0	9,53	27,85	29,44	20,82
C17:0	35,98	3,57	6,88	4,2
C17:1 cis 10		0,46		2,01
C18:0		0,63	6,07	0,16
C18:1 trans 9	0,17	0,02		25,57
C18:1 cis 9	3,86	16,93		2,43
C18:2 trans 9,12		10,42		
C18:2 cis 9,12	25,85		19,21	6,48
C18:3 cis 6,9,12	5,9			5,7
C18:3 cis 9,12,15	16,72	33,37	16,42	24,44
C20:0				
C20:1 cis 11		2,23	0,99	5,11
C20:4 cis 5,8,11,14			0,6	
C20:3 cis 11,14,17		0,31		
C22:1 cis 13			3,16	
C22:2 cis 13,16		0,37		
C24:1 cis 15			14,66	

Tablica 6. Profil masnih kiselina lipida izoliranih sojeva slatkovodnih mikroalgi

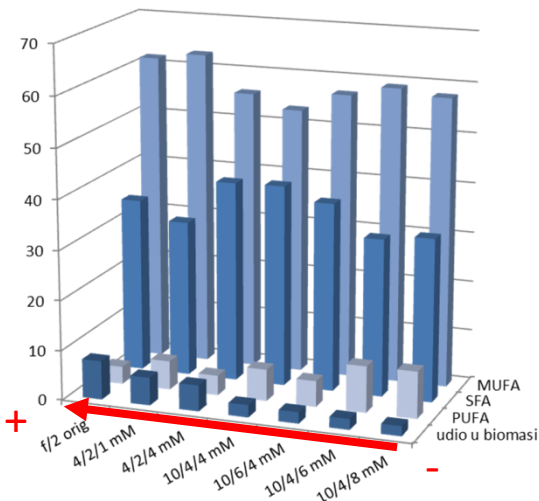
Optimizacija sastava hranjive podloge za fototrofni uzgoj dijatomeje *Nitzschia sp. izolirane* iz Jadranskog mora



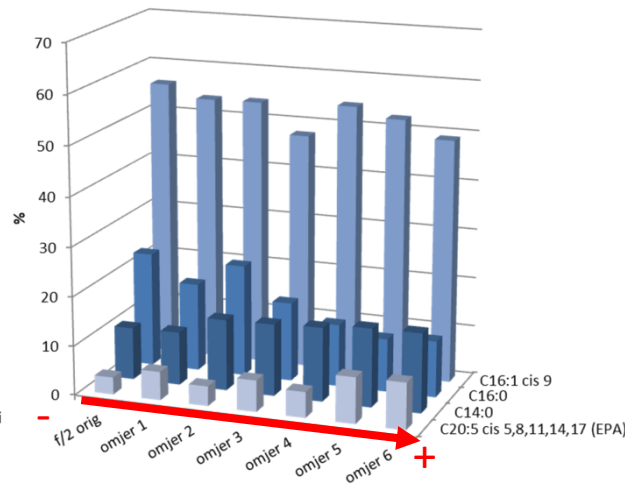
Tablica 7. Pokazatelji uspješnosti bioprocasa pri različitim koncentracijama nutrijenata

nutrijent	koncentracija (mM)	koncentracija biomase (g L ⁻¹)	broj stanica*10 ⁶ mL ⁻¹	Pr _x (mg L ⁻¹ dan ⁻¹)	Udio ukupnih lipida u biomasi (%)
N-NO ₃	0	0,1024	1,6133	8,5333	14,82
	0,88	0,2024	2,0400	16,8667	12,95
	2	0,2402	3,0933	20,0167	10,71
	3,5	0,2317	3,4000	19,3111	9,62
	6	0,2286	2,6333	19,0528	7,92
	8	0,1334	3,0200	19,7983	11,97
Si	0 (plastična tikvica)	0,0499	0,1575	3,8462	/*
	0	0,0964	1,9200	7,9744	8,77
	0,1	0,3082	3,3933	23,3410	9,13
	0,5	0,3836	4,3933	29,5077	13,95
	1	0,4889	3,6000	37,6077	5,67
	1,5	0,2615	2,9400	20,1154	2,27
PO ₄ ³⁻	0	0,1012	1,3467	8,4333	18,83
	0,036	0,3420	3,4133	28,5028	14,16
	0,15	0,2724	3,5000	22,7000	9,3
	0,36	0,2502	3,2978	20,8528	12,4

Optimizacija procesa proizvodnje odabranih vrsta mikroalgi uz postizanje visoke koncentracije biomase određenog sastava



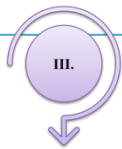
Graf 2. Udio lipida, SFA, MUFA i PUFA pri različitim omjerima koncentracija nutrijenata



Graf 3. Udio najzastupljenijih masnih kiselina u ukupnim lipidima pri različitim omjerima koncentracija nutrijenata

Tablica 8. Pokazatelji uspješnosti bioprocasa pri različitim omjerima koncentracije nutrijenata

omjer	koncentracija biomase (g L ⁻¹)	broj stanica*10 ⁶ mL ⁻¹	Pr _x (mg L ⁻¹ day ⁻¹)
f/2 orig.	0,2764	1,64	19,743
1	0,5087	3,9244	36,3381
2	0,5579	3,9067	39,8548
3	0,7286	5,9289	52,0405
4	0,6619	3,97	45,1548
5	0,5286	3,9000	35,0095
6	0,5143	4,1500	38,6691



Optimizacija
procesa proizvodnje
odabranih vrsta
mikroalgi uz
postizanje visoke
koncentracije
biomase određenog
sastava

Optimizacija sastava hranjive podloge za fototrofni uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. izolirane iz Jadranskog mora

Prema pokazateljima uspješnosti bioprocesa kao najpogodniji omjer za fototrofni uzgoj ovog radnog mikroorganizma pokazao se omjer 3 [Si]:[N-NO₃]:[PO₄³⁻]=6,67 : 23,33 : 1 [mM]:[mM]:[mM]

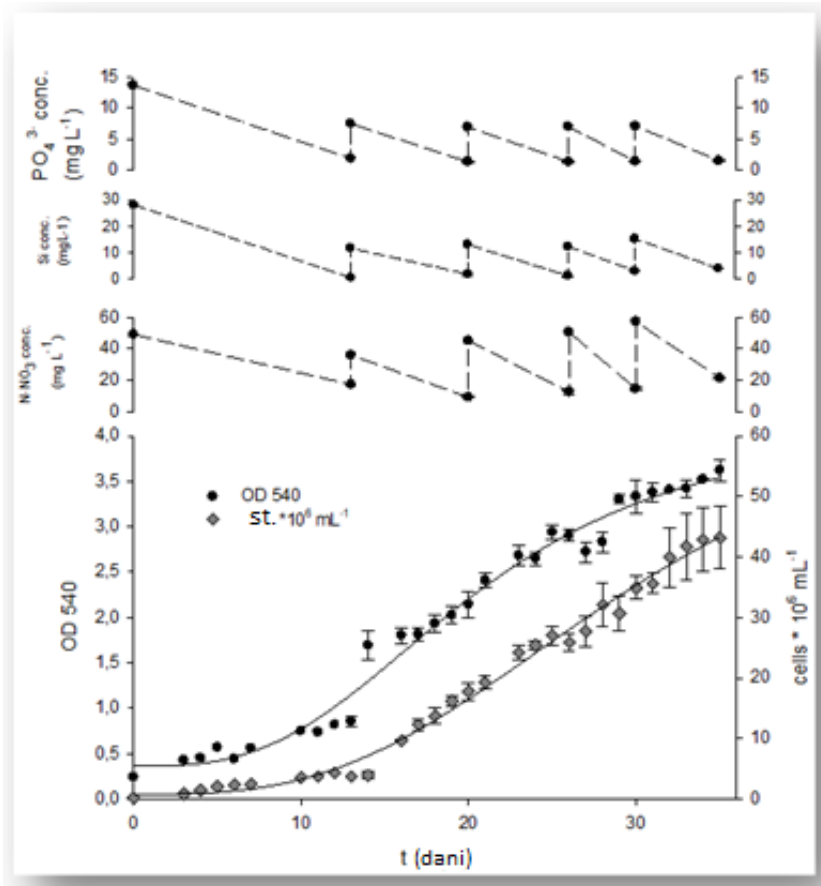
→ rezultirao 2,63 puta većom koncentracijom biomase od one postignute uzgojem na originalnoj f/2 podlozi



Fototrofni šaržni uzgoj s prihranom dijatomeje *Nitzschia* sp. s ciljem povećanja produktivnosti sinteze biomase

Fototrofni šaržni uzgoj s prihranom diatomeje *Nitzschia* sp. s ciljem povećanja produktivnosti sinteze biomase

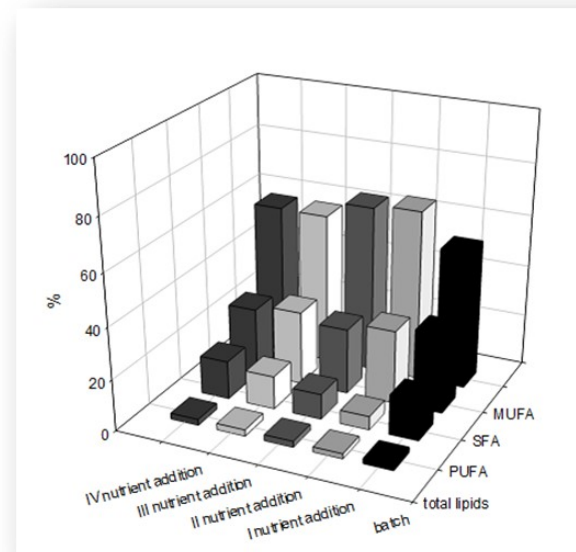
Optimizacija procesa proizvodnje odabranih vrsta mikroalgi uz postizanje visoke koncentracije biomase određenog sastava



Slika 1. Krivulja rasta *Nitzschia* sp.: koncentracija stanica (st mL⁻¹) i optička gustoća (OD 540 nm) tijekom šaržnog uzgoja s prihranom & potrošnja nutrijenata (Si, N-NO₃, PO₄³⁻)

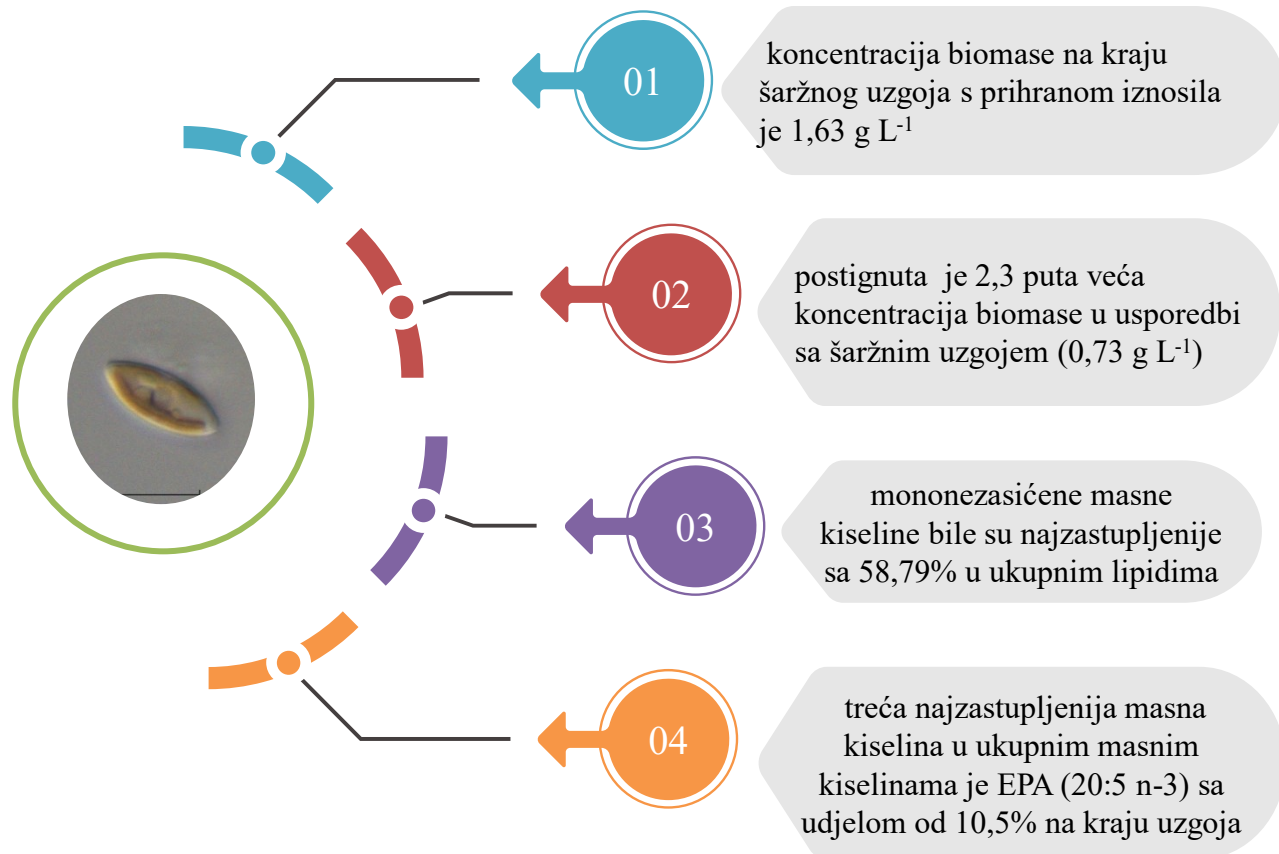
		DW (g L ⁻¹)	μ (day ⁻¹)	Pr _x (mg L ⁻¹ day ⁻¹)	Pr _L (mg L ⁻¹ day ⁻¹)
batch cultivation		0,7286 ± 0,0352	0,1199	60,7139	1,2774
fed batch cultivation	I nutrient addition	1,0319 ± 0,0671	0,1257 ± 0,0052	49,1358 ± 3,1965	0,9550 ± 0,0621
	II nutrient addition	1,2261 ± 0,0395	0,1019 ± 0,0088	45,4115 ± 1,4626	1,0507 ± 0,0338
	III nutrient addition	1,457 ± 0,0411	0,0994 ± 0,0309	48,5679 ± 1,3688	1,1770 ± 0,0332
	IV nutrient addition	1,6311 ± 0,0486	0,0811 ± 0,0459	46,6931 ± 0,5714	1,0605 ± 0,0130

Tablica 9. Koncentracija biomase (g L⁻¹), specifična brzina rasta (dan⁻¹), produktivnost sinteze biomase i lipida (mg L⁻¹ day⁻¹) tijekom šaržnog uzgoja s prihranom



Graf 4. Promjena udjela ukupnih lipida u biomasi i udjela SFA, MUFA i PUFA u ukupnim lipidima tijekom šaržnog uzgoja s prihranom

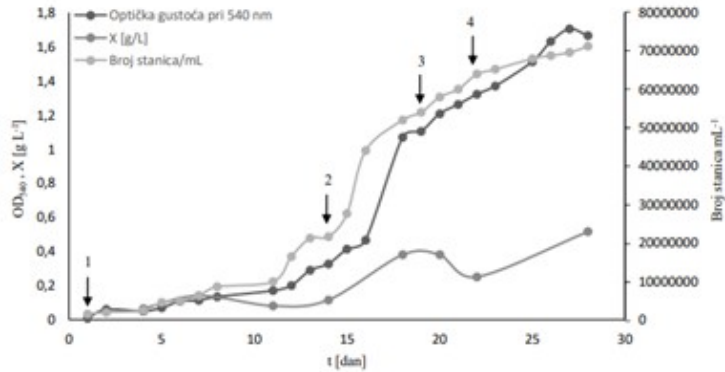
Fototrofni šaržni uzgoj s prihranom diatomeje *Nitzschia* sp. s ciljem povećanja produktivnosti sinteze biomase



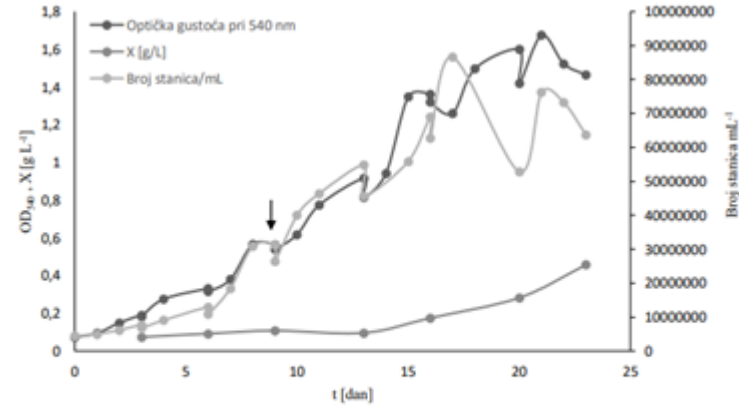
III.
Optimizacija procesa proizvodnje odabranih vrsta mikroalgi uz postizanje visoke koncentracije biomase određenog sastava

Fototrofni šaržni uzgoj s prihranom *Picochlorum* sp. u „open pond” sustavu i barbotirajućoj koloni

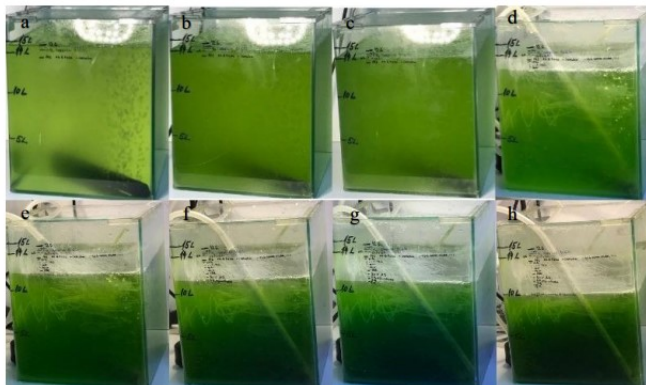
Optimizacija procesa proizvodnje odabranih vrsta mikroalgi uz postizanje visoke koncentracije biomase određenog sastava



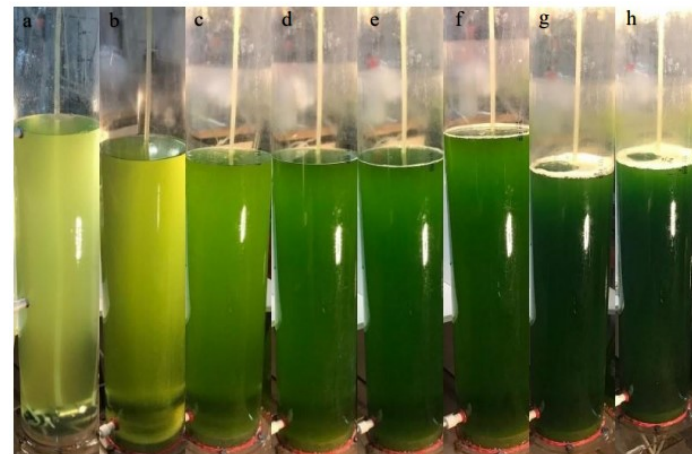
Slika 2. Promjena optičke gustoće, broja stanica i koncentracije suhe tvari biomase tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u otvorenom bazenu. Brojevi predstavljaju prihrane: 1- prihrana s $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, 2- prihrana s $75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$, $5 \text{ g L}^{-1}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



Slika 4. Promjena optičke gustoće, broja stanica i koncentracije suhe tvari biomase tijekom šaržnog uzgoja u barbotirajućoj koloni. Strelicom je prikazana prihrana s $75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ i $5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$.



Slika 3. Uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. u „open pond” sustavu



Slika 5. Uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. u barbotirajućoj koloni –promijena tijekom vremena uzgoja

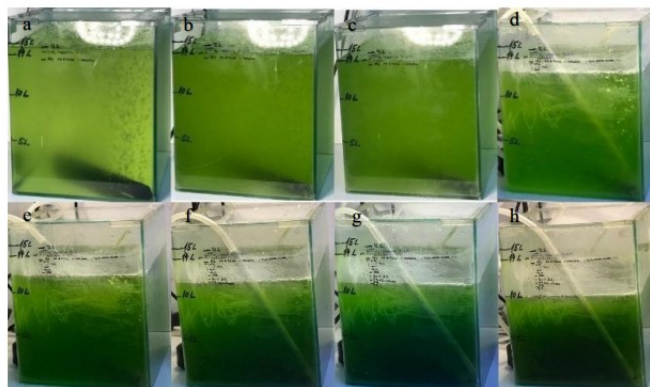
Fototrofni šaržni uzgoj s prihranom *Picochlorum* sp. u „open pond” sustavu i barbotirajućoj koloni

Tablica 10. Prikaz promjene udjela makromolekula u stanicama mikroalgi *Picochlorum* sp. tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u otvorenom bazenu.

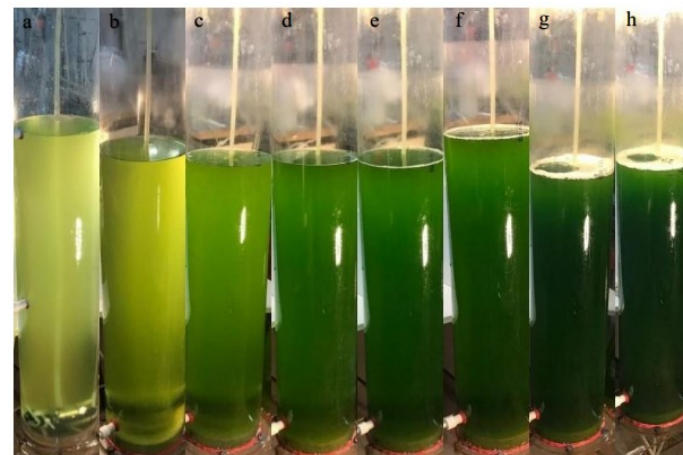
Vrijeme uzgoja [dan]	Proteini [%]	Ugljikohidrati [%]	Lipidi [%]
4	4,701	-	2,583
7	7,597	-	6,001
11	13,991	-	8,037
14	11,551	-	7,238
18	9,831	-	8,368
20	10,795	-	9,478
22	17,761	5,344	9,341
28	12,859	6,603	13,187

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

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



Slika 3. Uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. u „open pond” sustavu

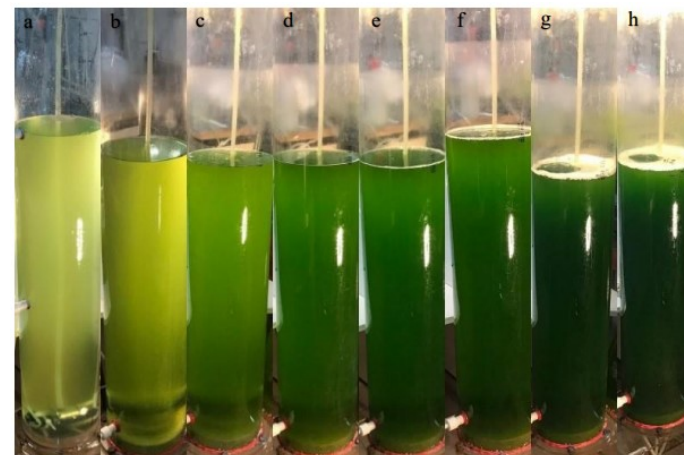


Slika 5. Uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. u barbotirajućoj koloni –promijena tijekom vremena uzgoja

Fototrofni šaržni uzgoj s prihranom *Picochlorum* sp. u „open pond” sustavu i barbotirajućoj koloni

SASTAV MASNIH KISELINA

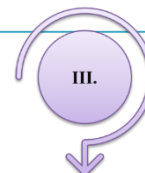
Vrijeme uzgoja [dan]	21
Metil ester masne kiseline	
C6:0, kapronska (heksanska) kiselina	-
C11:0, undekanska kiselina	-
C12:0, laurinska (dodekanska) kiselina	-
C14:0, miristinska (tetradekanska) kiselina	1,510
C14:1 cis 9, miristoleična kiselina	1,609
C15:0, pentadekanska kiselina	0,104
C15:1 cis 10, pentadekanoična kiselina	1,492
C16:0, palmitinska (heksadekanska) kiselina	23,428
C16:1 cis 9, palmitoleinska kiselina	4,776
C17:0, heptadekanska kiselina	20,110
C17:1 cis 10, heptadekanoična kiselina	0,276
C18:0, stearinska (oktadekanska) kiselina	17,389
C18:1 trans 9, elaidinska kiselina	1,425
C18:1 cis 9, oleinska kiselina	*
C18:2 trans 9,12, linolelaidna kiselina	-
C18:2 cis 9,12, linolna kiselina	27,880
C18:3 cis 9,12,15, α-linolenska kiselina	*
SFA ¹	62,542
MUFA ²	9,579
PUFA ³	27,880



Slika 5. Uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. u barbotirajućoj koloni –promijena tijekom vremena uzgoja

Optimizacija procesa proizvodnje odabranih vrsta mikroalgi uz postizanje visoke koncentracije biomase određenog sastava

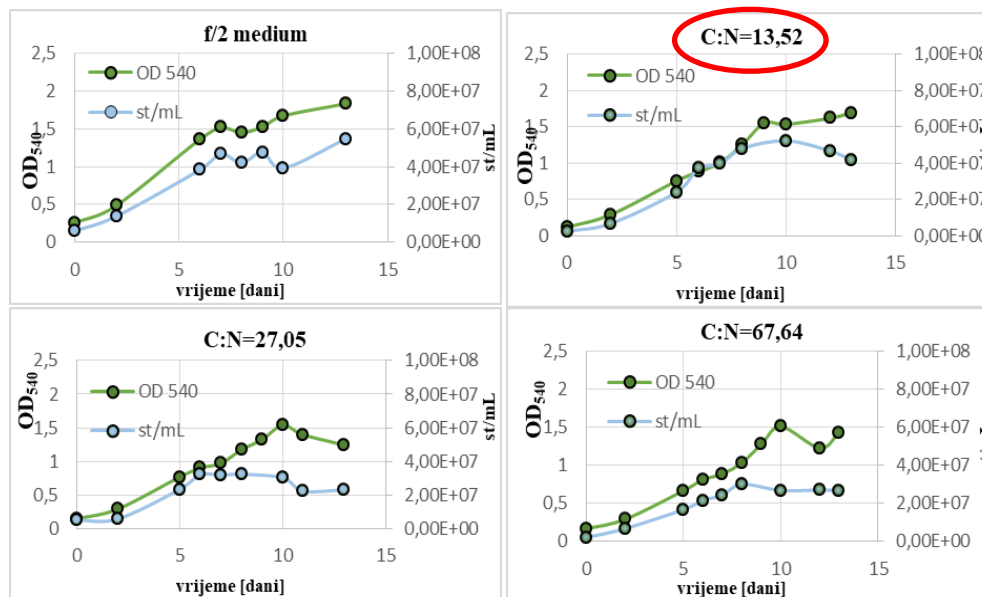
Tablica 12. Sastav masnih kiselina u lipidima mikroalge *Picochlorum* sp.



Optimizacija procesa proizvodnje odabranih vrsta mikroalgi uz postizanje visoke koncentracije biomase određenog sastava

1. KORAK

Utjecaj dodatka anorganskog izvora ugljika (NaHCO₃) i različitog C:N [mol:mol] omjera na rast *Picochlorum* sp. i sastav biomase



Slika 6. Krivulje rasta mikroalge *Picochlorum* sp. na f/2 podlozi sa različitim molarnim omjerima C:N

	X [g L ⁻¹] (±σ)	proteini [%] (±σ)	lipidi [%] (±σ)	UH [%] (±σ)	N-NO ₃ [mg L ⁻¹] (±σ)	PO ₄ ³⁻ [mg L ⁻¹] (±σ)
f/2 medium	0,5583 (±0,18)	47,41 (±8,20)	5,48 (±1,31)	8,00 (±0,09)	2,8425 (±1,74)	1,0186 (±0,40)
C:N=13,52	0,6566 (±0,04)	49,46 (±7,12)	5,37 (±0,49)	6,70 (±0,43)	1,6244 (±1,26)	0,0249 (±0,03)
C:N=27,05	0,7561 (±0,13)	42,12 (±8,72)	3,13 (±0,64)	4,80 (±0,74)	1,5187 (±1,17)	0,4288 (±0,40)
C:N=67,64	0,2839 (±0,03)	75,26 (±4,12)	9,34 (±0,76)	13,77 (±0,71)	1,3700 (±0,93)	0,2991 (±0,15)

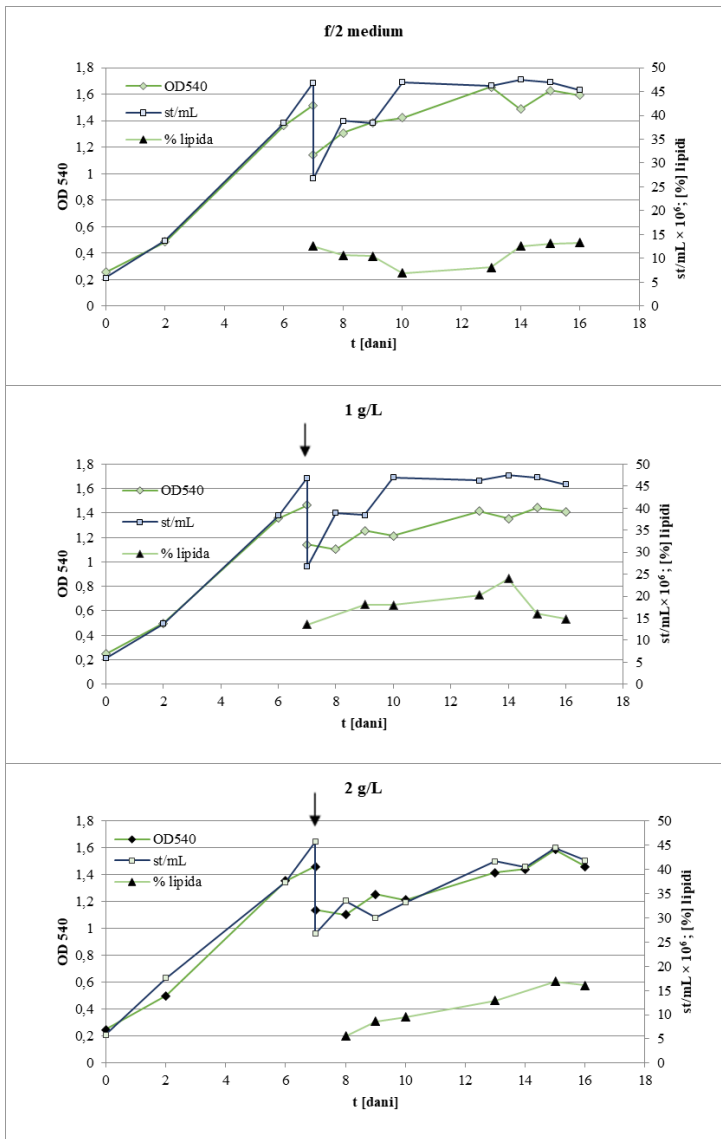
Tablica 13. Koncentracija biomase, i nutrijenata na kraju uzgoja mikroalge *Picochlorum* sp. na f/2 podlozi sa različitim molarnim omjerima C:N i sastav biomase

2. KORAK

Šaržni uzgoj u dvije faze mikroalge *Picochlorum* sp.

Optimizacija procesa proizvodnje odabranih vrsta mikroalgi uz postizanje visoke koncentracije biomase određenog sastava

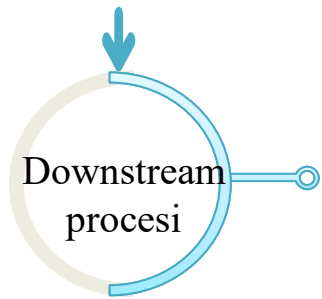
- Faza – podloga s dodanim izvorom dušika (C:N=13,52 [mol:mol])**
- Faza – podloga bez dodatka izvora dušika+dodatak natrijevog bikarbonata 1gL⁻¹ / 2 gL⁻¹**



	X [g/L] ($\pm\sigma$)	proteini [%] ($\pm\sigma$)	lipidi [%] ($\pm\sigma$)	PO ₄ ³⁻ [mg L ⁻¹] ($\pm\sigma$)	N-NO ₃ [mg L ⁻¹] ($\pm\sigma$)
f/2 medium	0,397 ($\pm 0,01$)	53,53 ($\pm 2,73$)	5,20 ($\pm 0,85$)	0,3133 ($\pm 0,36$)	0,5610 ($\pm 0,13$)
1 g L ⁻¹	0,912 ($\pm 0,24$)	46,74 ($\pm 2,68$)	8,12 ($\pm 1,44$)	0,0180 ($\pm 0,01$)	2,1403 ($\pm 1,81$)
2 g L ⁻¹	1,558 ($\pm 0,24$)	31,26 ($\pm 2,83$)	9,39 ($\pm 3,05$)	0,1434 ($\pm 0,14$)	3,3785 ($\pm 1,37$)

Tablica 14. Koncentracija biomase, i nutrijenata na kraju uzgoja mikroalge *Picochlorum* sp. na f/2 podlozi sa različitim molarnim omjerima C:N i sastav biomase

Slika 7. Krivulje rasta mikroalge *Picochlorum* sp. tijekom šaržnog uzgoja u dvije faze u f/2 podlozi, i dodatkom natrijevog bikarbonata u drugoj fazi od 1 gL⁻¹ i 2 gL⁻¹



- FLOKULACIJA
- Kemijski flokulanti
- Biološka flokulacija pomoću mikroorganizama

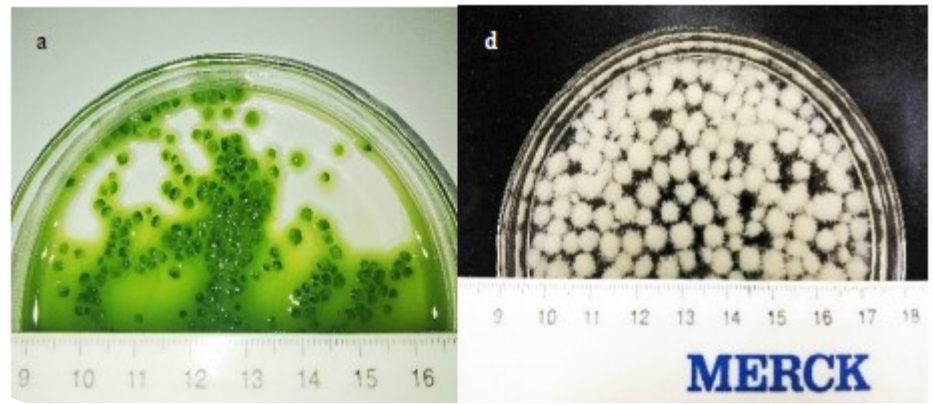
Optimizacija procesa proizvodnje odabranih vrsta mikroalgi uz postizanje visoke koncentracije biomase određenog sastava

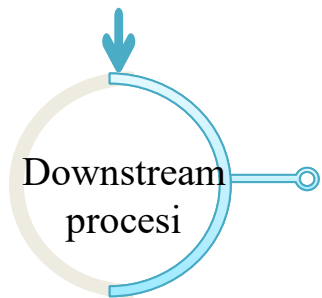
1. Peleti plijesni
Mortierella isabellina

2. pH

3. FeCl_3

4. hitozan

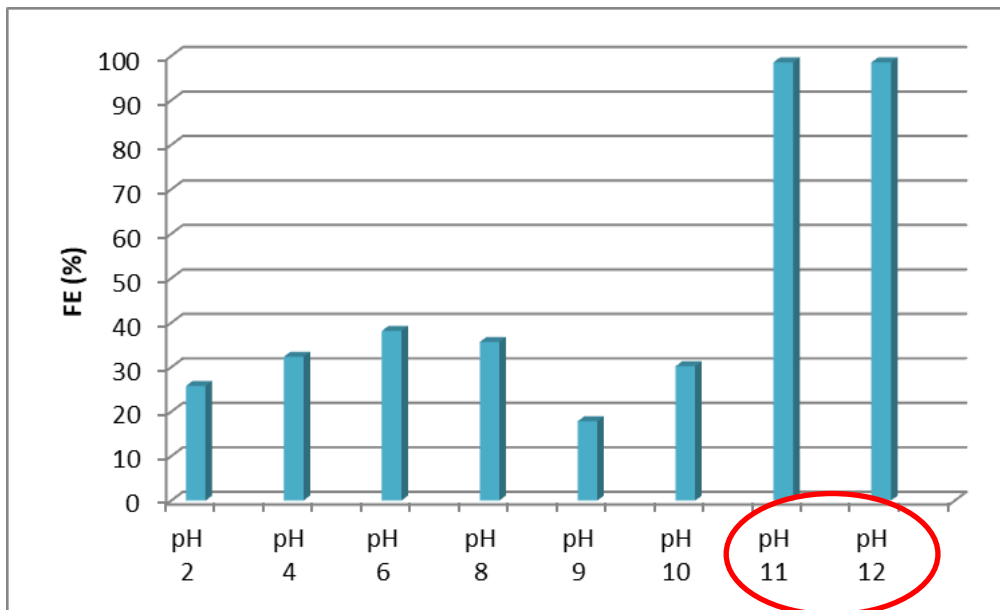




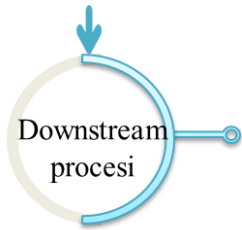
- FLOKULACIJA
- Kemijski flokulanti
- Biološka flokulacija pomoću mikroorganizama

Optimizacija procesa proizvodnje odabranih vrsta mikroalgi uz postizanje visoke koncentracije biomase određenog sastava

2. pH



Graf 5. Efikasnost flokulacije promjenom pH vrijednosti kulture

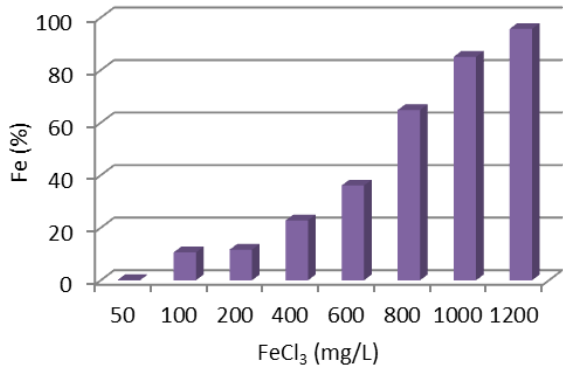


- FLOKULACIJA
- Kemijski flokulanti
- Biološka flokulacija pomoću mikroorganizama

3. FeCl₃

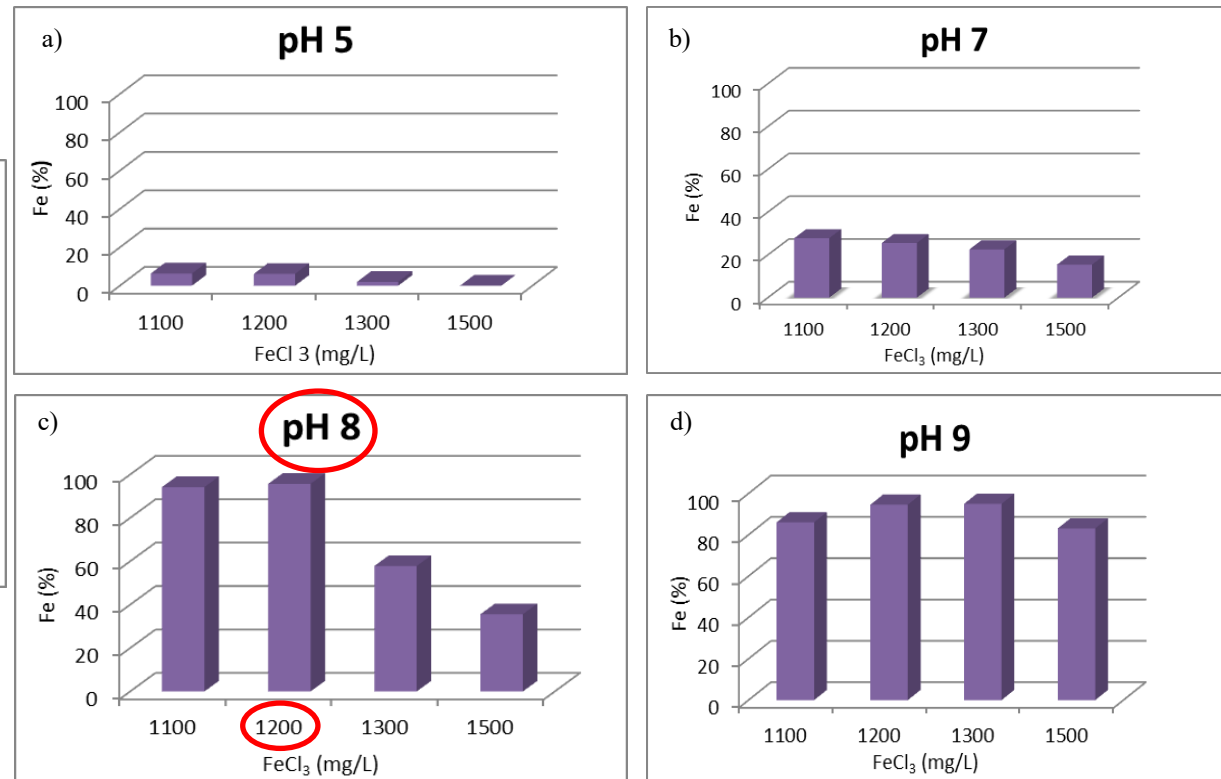
Optimizacija procesa proizvodnje odabranih vrsta mikroalgi uz postizanje visoke koncentracije biomase određenog sastava

1. Ispitivanje utjecaja koncentracije

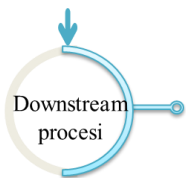


Graf 6. Efikasnost flokulacije pri različitim koncentracijama FeCl₃

2. Ispitivanje utjecaja pH vrijednosti



Graf 7. Efikasnost flokulacije pri različitim koncentracijama FeCl₃ i različitim pH vrijednostima: a) pH 5; b) pH 7; c) pH 8; d) pH 9

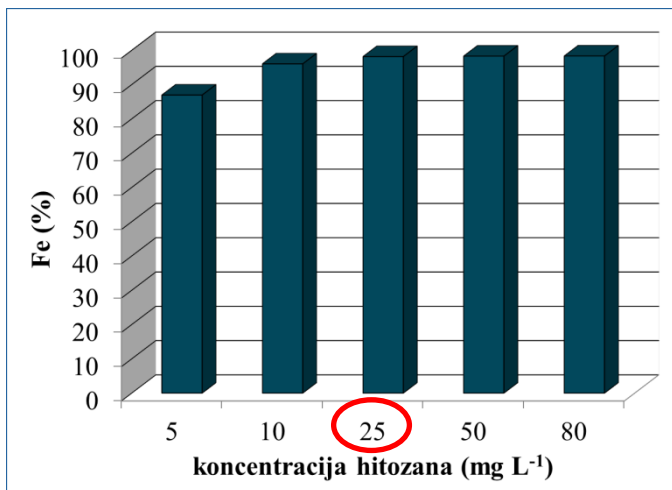


- FLOKULACIJA
- Kemijski flokulanti
- Biološka flokulacija pomoću mikroorganizama

4. hitozan

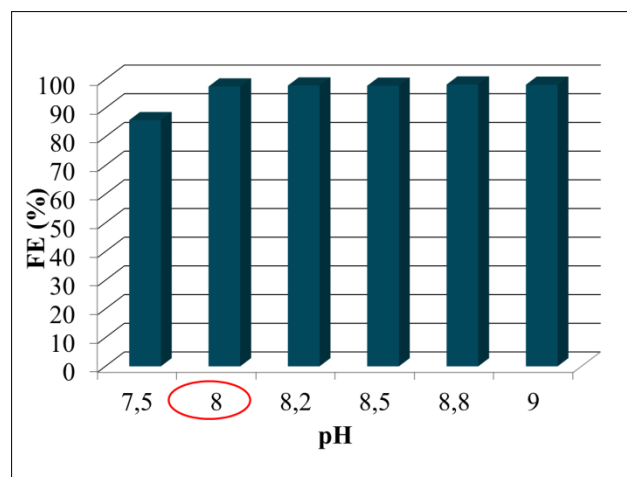
Optimizacija procesa proizvodnje odabranih vrsta mikroalgi uz postizanje visoke koncentracije biomase određenog sastava

1. Ispitivanje utjecaja koncentracije



Graf 8. Efikasnost flokulacije *Picochlorum* sp. pri različitim koncentracijama hitozana

2. Ispitivanje utjecaja pH vrijednosti

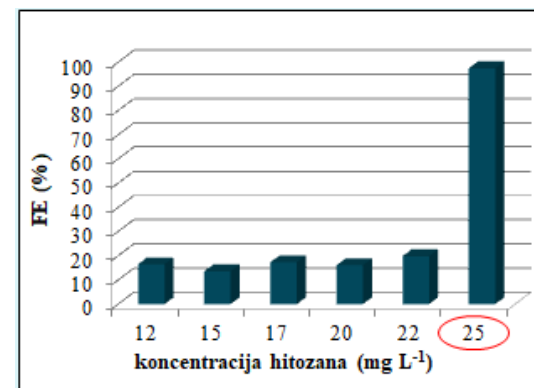


Hitozan 25 mg/L

Graf 9. Efikasnost flokulacije *Picochlorum* sp. pri različitim pH vrijednostima i konc. hitozana od 25 mg/L

3. Dodatna optimizacija koncentracije

pH 8



Graf 10. Efikasnost flokulacije *Picochlorum* sp. pri različitim koncentracijama hitozana



Slika 10. Flokulacija *Picochlorum* sp. hitozanom

ZNANSTVENI DOPRINOS

- Postignuti rezultati ovog istraživanja dat će uvid u potencijal izoliranih morskih i slatkovodnih mikroalgi za primjenu u biotehnološkoj proizvodnji biogoriva odnosno biodizela, visokovrijednih proizvoda kao što su pigmenti i nezasićene masne kiseline za farmaceutske svrhe te kao dodatci prehrani u prehrambenoj industriji, krmivima i u akvakulturi.
- Optimizacijom i razvojem integriranog bioprocenog sustava za uzgoj i dobivanje proizvoda iz biomase mikroalgi doprinjet će se prevladavanju zapreka njihovoj široj industrijskoj primjeni



ZAHVALJUJEM NA PAŽNJI

