

ORIGINALNI ZNANSTVENI RAD / ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

Optimizacija uvjeta uzgoja alge *Euglena gracilis* s ciljem proizvodnje vitamina A i vitamina E

Optimisation of algae *Euglena gracilis* cultivation conditions for vitamin A and vitamin E production

Tonči Rezić^{1*}, Marina Bujić¹, Božidar Šantek¹¹ Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb 10000

Summary

In this research, cultivation of algae *Euglena gracilis* was studied in order to produce vitamin A and vitamin E. The optimization of medium composition and cultivation conditions, in Erlenmeyer flasks on laboratory shaker; was done to define the most appropriate parameters for vitamin production in the stirred tank bioreactor. During cultivation of *E. gracilis* in the stirred tank bioreactor two-step process was examined. In the first step photoheterotrophic cultivation on the Hutner medium was done and in the second step photomixotrophically cultivation on the limited carbon source medium. In the two step process following bioprocess efficiency parameters were observed: productivity for vitamin A (PrA = 0.07 mg/Lh) and vitamin E (PrE = 0.27 mg/Lh) production as well as vitamin A (YA = 6.53 mg/L) and vitamin E (YE = 26.26 mg/L) yield. High vitamin E yield indicate potential of two-step processes for this vitamin industrial scale production.

Key words: *Euglena gracilis*, vitamin A, vitamin E, photomixotrophic cultivation

Sažetak

U ovom istraživanju proveden je uzgoj alge *Euglena gracilis* s ciljem proizvodnje vitamina A i vitamina E. U svrhu određivanja najpovoljnijih parametara za proizvodnju vitamina u bioreaktoru s mješalom provedena je optimizacija sastava hranjive podloge i uvjeta uzgoja *E. gracilis*, u Erlenmeyer tikvicama na laboratorijskoj tresilici. Tijekom uzgoja alge *E. gracilis* u bioreaktoru s mješalom primijenjen je dvostupanjski uzgoj. U prvom stupnju proveden je fotoheterotrofni uzgoj na Hutner-ovoj podlozi, a u drugom stupnju mikсотрофни uzgoj na podlozi s ograničenim izvorom ugljika. Primjena dvostupanjskog procesa osigurala je relativno visoku produktivnost proizvodnje vitamina A (PrA = 0,07 mg/Lh) i vitamina E (PrE = 0,27 mg/Lh), a prinosi su iznosili vitamina A (YA = 6,53 mg/L) odnosno vitamina E (YE = 26,26 mg/L). Visoki prinosi vitamina E ukazuju na mogućnost primjene dvostupanjskog procesa njegove proizvodnje u industrijskom mjerilu.

Ključne riječi: *Euglena gracilis*; vitamin A; vitamin E; fotomikсотрофни uzgoj

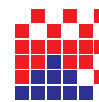
1. Uvod

Stanice alge *E. gracilis* mogu rasti kao obligatni fotoautotrofi, fotoheterotrofi ili kao obligatni heterotrofi (Osafune i sur., 1990), te imaju veliki potencijal za proizvodnju različitih metabolita. Biomasa *E. gracilis* potencijalni je izvor proteina (Hosotani i sur., 1988), zasićenih masnih kiselina, nezasićenih masnih kiselina (Barsanti i Gualtieri, 2006), estera te antioksidansa kao što su β-karoten, vitamin C, vitamin E (Takeyama i sur., 1997) i paramilona (Barsanti i Gualtieri, 2006).

Rezultati istraživanja provedenih na kvascima, plijesnim, bakterijama i mikroalgama pokazali su da jedino mikroalge tijekom rasta sintetiziraju vitamine s antioksidativnom aktivnošću u značajnim količinama (Taketomi i sur., 1983, Tani i Tsumura, 1989, Sandmann, 1994). Najviše koncentracije vitamina od 71 mg β-karoten/L i 30,1 mg α-tokoferola/L (Shigeoka i sur., 1992; Takeyama i sur., 1997) ostvarene su tijekom uzgoja mikroalge *E. gracilis* (El-Sayed, 2010). β-karoten i vitamin E uklanjaju slobodne radikale iz stanica i tkiva (Devasagayam i sur., 2004) tj. djeluju kao antioksidansi. Slobodni ra-

dikali izazivaju različita oksidativna oštećenja tkiva koja mogu dovesti do kardiovaskularnih oboljenja (Agarwal i sur., 2012) i drugih bolesti. Upravo iz tih razloga antioksidansi imaju sve širu medicinsku primjenu u prevenciji takvih i sličnih bolesti. Zbog visokih prinosa i visoke čistoće vitamina dobivenih pomoću alge *E. gracilis* takva je proizvodnja mnogo prikladnija od kemijske sinteze ili pročišćavanja smjese tokoferola ekstrahiranih iz biljnih ulja koja sadrže samo do 3 mg α-tokoferola/g. Za proizvodnju vitamina predložen je dvostupanjski sustav gdje se stanice najprije uzgajaju fotoheterotrofno, a onda se prebacuju na fotoautotrofni rast (Takeyama i sur., 1997). U prvom stupnju heterotrofnim uzgojem postiže se visoka koncentracija stanica koje sadrže nisku koncentraciju vitamina. U drugom stupnju prebacivanjem na fotoautotrofni uzgoj prinos biomase je nizak, ali se povećava koncentracija vitamina unutar postojećih stanica (Shigeoka i sur., 1986; Hosotani i sur., 1988). *E. gracilis* može koristiti za rast mnoge organske tvari kao što su acetat, glukoza, glutamat, sukcinat, piruvat i etanol sa i bez prisustva svjetlosti. Također se pokazalo da *E. gracilis* tijekom rasta može metabolizirati veliki broj masnih kiselina,

*Corresponding author: trezic@pbf.hr



alkohola i šećera (Hosotani i sur., 1988). Korištenje masnih kiselina i alkohola ovisno je o intenzitetu svjetlosti. *E. gracilis* ne može koristiti nitrat kao izvor dušika i ugljika, ali može koristiti amonijak i druge vrste organskog dušika te različite aminokiseline (Li i sur., 2008). *E. gracilis* dobro raste na glukozi ili fruktozi, a istraživanja koja su provedena na galaktozi, manozu, glicerolu i manitolu nisu pokazala značajan rast (Barsanti i Gualtieri, 2006). Osim škroba i paramilona nije poznati niti jedan drugi polimerni ugljikohidrat koji bi se mogao koristiti za rast (Hutner i Provasoli, 1951). Otpadna voda također se pokazala pogodnom hranjivom podlogom za uzgoj alge *E. gracilis*. Na prinos i sastav biomase *E. gracilis* tijekom uzgoja u otvorenim bazenima na otpadnoj vodi bitno utječu promjene organskog opterećenja i ciklusa dan / noć (fotomiksotrofno / heterotrofno). Kinetička istraživanja raznih fotosintetskih kultura u fotoheterotrofnim uvjetima, kao *Chlorella*, *Spirulina*, *Scenedesmus* i *Haematococcus* pokazala su da brzina rasta ovisi o vrsti i intenzitetu svjetlosti (Barsanti i Gualtieri, 2006).

Cilj ovog istraživanja je definiranje optimalnih uvjeta miksotrofnog uzgoja alge *E. gracilis* i proizvodnje vitamina A i E. Tijekom uzgoja u bioreaktoru s mješalom istražit će se fotoheterotrofni i fotomiksotrofni uzgoj alge *E. gracilis* na kemijski definiranoj (modificirana Hutnerova hranjiva podloga) i kompleksnoj podlozi industrijskih nusprodukata (kukuruzna močevina, eng. corn steep liquor-CSL). Na osnovu dobivenih rezultata izabrat će se optimalni uvjeti za uzgoj alge *E. gracilis* i proizvodnje vitamina u bioreaktoru s mješalom.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Radni mikroorganizam

Korišteni radni mikroorganizam je kultura mikroalge *Euglena gracilis* dobivene iz zbirke Sammlung von Algenkulturen Göttingen, 1224-5/25.

2.2. Hranjive podloge za uzgoj alge *E. gracilis*

U ovom istraživanju za heterotrofni uzgoj korištena je Hutnerova podloga (Hutner i Provasoli, 1951) i podloge za miksotrofni uzgoj. Sastav podloge za miksotrofni uzgoj prikazan je u tablici 1. Kukuruzna močevina (CSL) koja je nusprodukt industrijskog postupka dobivanja škroba iz kukuruza korištena je kao zamjena za kemijski definiranu Hutnerovu podlogu. Podloga od kukuruzne močevine sastojala se: od 20 g/L CSL + 20 g/L glukoze.

Tablica 1. Sastav podloge za miksotrofni uzgoj *E. gracilis*
Table 1. Composition of feeding medium for mixotrophic cultivation of *E. gracilis*

Otopine / Solutions	Koncentracija (g/L) / Concentration (g/L)
Urea / Urea	0,4
D, L - asparaginska kiselina / R, L - asparagine acid	2,0
Glicin / Glycine	2,5
Na-sukcinat / Na-succinate	0,1
CaCO ₃	0,14
MgCO ₃	0,4

2.3. Uzgoj alge *E. gracilis* na laboratorijskoj tresilici

U ovom istraživanju provedeno je pet dvostupanjskih, miksotrofnih uzgoja alge *E. gracilis* u Erlenmeyer tikvicama (500 mL) na laboratorijskoj tresilici (150 okr/min) prema shemi prikazanoj u tablici 2. Volumen podloge u prvom stupnju uzgoja *E. gracilis* iznosio je 150 mL. Na početku drugog stupnja dodano je još 100 mL podloge za miksotrofni uzgoj (tablica 2.) tako da je ukupni volumen podloge u drugom stupnju iznosio 250 mL. Izuzetak je uzgoj 4, na kompleksnoj podlozi s CSL-om, kod kojeg nije dodana podloga za miksotrofni uzgoj već samo 250 mL kompleksne podloge na početku uzgoja. Volumen inokuluma iznosio je 10 % (v/v) podloge. Uzgoji su provedeni u termostatiranoj komori (28 °C) kroz 8 dana, a uzorci su uzimani svakih 24 h. Uzgoji na svjetlu (fotoheterotrofni i fotomiksotrofni) provedeni su uz osvjetljenje lampama (Sunglo lampe Hagen-Deutschland, Japan, 15 W, lux 80, 4500 K).

2.4. Uzgoj alge *E. gracilis* u bioreaktoru s mješalom

Odabran je fotoheterotrofni uzgoj na podlozi s 20 g/L CSL-a i 20 g/L glukoze. Početne vrijednosti procesnih parametara bile su sljedeće: temperatura uzgoja 28 °C, pH 3,5, broj okretaja mješala 300 okr/min, aeracija od 40% skale rotametra i korisni volumen bioreaktora 5 L. Uzgoj je proveden na svjetlu (fotoheterotrofno). Veći intenzitet svjetlosti postignut je pričvršćivanjem lampi na posudu bioreaktora. Uzgoj je trajao 8 dana, a uzorci su uzimani svakih 24 h tijekom bioprocesa.

2.5. Praćenje uzgoja alge *E. gracilis*

Tijekom uzgoja alge *E. gracilis* u bioreaktoru s mješalom praćene su sljedeće promjene: suhe tvari biomase, broja stanica u hranjivoj podlozi i koncentracije šećera (Pavlečić i sur., 2010), te paramilona (Šantek i sur., 2009). Koncentracije vitamina A, vitamina E i klorofila određene su spektrofotometrijskim metodama (Afiukwa i Ogbonna 2007; Takeyama i sur., 1997).

Pokazatelji uspješnosti bioprocesa izračunati su kao prinosi i produktivnosti proizvodnje vitamina i klorofila prema sljedećim jednadžbama:

$$Y_p = P - P_0 \quad [\text{g/L}] \quad [1]$$

Gdje je Y_p - prinos vitamina [g/L], P - koncentracija proizvoda nakon određenog vremena uzgoja [g/L] i P_0 - koncentracija proizvoda na početku trajanja uzgoja [g/L].

$$Y_{x/s} = (X - X_0) / (S_0 - S) \quad [\text{g/g}] \quad [2]$$

Gdje je $Y_{x/s}$ - ktupanj konverzije supstrata u biomasu [g/g], S - koncentracija supstrata nakon određenog vremena uzgoja [g/L], S_0 - koncentracija supstrata na početku trajanja uzgoja [g/L], X - koncentracija biomase nakon određenog vremena uzgoja [g/L], X_0 - Koncentracija biomase na početku trajanja uzgoja [g/L].

$$Pr = (P - P_0) / t \quad [\text{g/L h}] \quad [3]$$

Gdje je Pr - produktivnost proizvodnje vitamina [g/L h], t - vrijeme trajanja uzgoja.

Tablica 2. Raspored istraživanja na laboratorijskoj tresilici
Table 2. Overview of experiments on the rotary shaker

Broj uzgoja / Number of cultivation	I. stupanj / I. step	II. stupanj / II. step	Vrsta podloge / Medium composition	
UZGOJ 1 <i>CULTIVATION 1</i>	Heterotrofno <i>heterotrophically</i>	Miksotrofno <i>mixotrophically</i>	I. st	Modificirana Hutnerova <i>Modified Hutner medium</i>
			II. st	Podloga za miksotrofni uzgoj <i>Medium for mixotrophic cultivation</i>
UZGOJ 2 <i>CULTIVATION 2</i>	Heterotrofno <i>heterotrophically</i>	Fotomiksotrofno <i>photomixotrophically</i>	I. st	Modificirana Hutnerova <i>Modified Hutner medium</i>
			II. st	Podloga za miksotrofni uzgoj <i>Medium for mixotrophic cultivation</i>
UZGOJ 3 <i>CULTIVATION 3</i>	Fotoheterotrofno <i>photoheterotrophically</i>	Fotomiksotrofno <i>photomixotrophically</i>	I. st	Modificirana Hutnerova <i>Modified Hutner medium</i>
			II. st	Podloga za miksotrofni uzgoj <i>Medium for mixotrophic cultivation</i>
UZGOJ 4 <i>CULTIVATION 4</i>	Fotoheterotrofno <i>photoheterotrophically</i>	/	/	20 g/L CSL-a + 20 g/L glukoze / <i>glucose</i>
UZGOJ 5 <i>CULTIVATION 5</i>	Fotoheterotrofno <i>photoheterotrophically</i>	Fotomiksotrofno <i>photomixotrophically</i>	I. st	20 g/L CSL-a + 20 g/L glukoze / <i>glucose</i>
			II. st	Podloga za miksotrofni uzgoj <i>Medium for mixotrophic cultivation</i>

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Uzgoj alge *E. gracilis* na laboratorijskoj tresilici

Kako bi se odredili optimalni uvjeti uzgoja *E. gracilis* i proizvodnje vitamina provedeno je pet uzgoja (Tablica 2) u Erlenmayer tikvicama na laboratorijskoj tresilici pri čemu su mijenjani sastavi podloga (Hutnerova podloga, podloga za miksotrofni uzgoj i kompleksna podloga s CSL) te uvjeti uzgoja. Uzgoji su provedeni u dva stupnja (osim uzgoja broj 4). U prvom stupnju korištena je podloga za heterotrofni uzgoj, a u drugom stupnju podloga za miksotrofni uzgoj. Uzgoj 4 i 5 provedeni su korištenjem kompleksne hranjive podloge (kukuruzne močevine). Prinosi i stupnjevi konverzije biomase, vitamina i klorofila prikazani su tablici 3 za svaki od provedenih uzgoja. Uzgoj 1 proveden je u tami pri čemu su zabilježeni prinosi vitamina značajno niži (deset puta) od prinosa vitamina ostvarenih tijekom uzgoja na svjetlu. Razlike u prinosu vitamina tijekom uzgoja na svjetlu i tami u skladu su s već zabilježenim utjecajem svijetla na sintezu vitamina pri čemu su uzgojem na svjetlu ostvareni značajno viši prinosi vitamina (Takeyama i sur., 1997). Ipak, utjecaj uvjeta uzgoja na sintezu vitamina nije do kraja razjašnjen. Nastajanje i razvoj plastidi u kojima se odvija sinteza vitamina regulirana je izmjenom perioda svjetla i tame. Kada stanice algi rastu heterotrofno bez izvora svjetla u tami, nastaju plastidi bogati ugljikohidratima (škrob, β -glukan) bez zelenog pigmenta klorofila. Provedenim eksperimentom u tami potvrđena je pretpostavka da ključnu ulogu u sintezi vitamina imaju kloroplasti i da nije moguće potaknuti sintezu vitamina u plastidima mikroalge *E. gracilis* u tami (Barsanti i Gualtieri, 2006).

Stoga je u drugom uzgoju korišten umjetni izvor svjetlosti. Korišteni izvor svjetlosti izabran je kako bi osigurao optimalne uvjete za fototrofni rast *E. gracilis* i potaknuo sintezu vitamina. Istraživanja biokemijskih mehanizama sinteze vitamina u stanicama mikroalgi pokazala su da sinteza vitamina u plastidima mikroalgi ovisi o svojstvima (valnoj duljini i inten-

zitetu svjetlosti). Nadalje, sinteza plastida odnosno formiranje staničnih organela kloroplasta i organela s rezervnim tvarima također su regulirani izvorom svjetlosti. Poznato je da nastajanje kloroplasta pozitivno regulira sunčeva svjetlost pri čemu se simulira sinteza klorofila i vitamina na tilakoidnim membranama kloroplasta gdje se proizvode organske tvari i kisik u nizu biokemijskih reakcija fotosustava I i II. Dva foto sustava su međusobno povezana kroz transport elektrona i protona, koji posreduje u stvaranju protonskog gradijenta preko tilakoidne membrane i sinteze ATP - a. Nastali NADPH i ATP sudjeluju u sintezi ugljikohidrata iz CO_2 . Fiksacija CO_2 i sinteza ugljikohidrata provodi se u nizu reakcija bez sudjelovanja svjetlosti (Calvinov ciklus). Reakcije se odvijaju u stromi kloroplasta (Stryer, 1991). Korištenjem "Sun Glo" neonskog izvora svjetlosti s maksimalnom emisijom; $\lambda_{\text{max}}=643$ nm i spektrom emitirane svjetlosti u granicama između 380 do 740 nm osigurani su dobri uvjeti za stimulaciju fotosustava I i II, te proizvodnju klorofila i vitamina tijekom drugog fotomiksotrofnog stupnja ($Y_E=3,75$ mg/g; $Y_A=0,69$ mg/g; $Y_K=13,12$ $\mu\text{g/g}$). Stoga je treći uzgoj od početka do kraja proveden fototrofno u prvom stupnju na Hutnerovoj hranjivoj podlozi s glukozom kao izvorom ugljika, a u drugom stupnju na podlozi za miksotrofni uzgoj bez glukoze i jabučne kiseline. U prvom stupnju ostvareni su visoki prinosi biomase $Y_X=9,8$ g/L. Drugi stupanj (miksotrofni uzgoj) pogodovao je sintezi vitamina i klorofila, te se prinos vitamina i klorofila značajno povećao ($Y_E=4,05$ mg/g; $Y_A=0,99$ mg/g; $Y_K=24,97$ $\mu\text{g/g}$). Korištenje podloge osiromašene s izvorima ugljika i dušika pokazalo se učinkovitim rješenjem pri povećanju sinteze metabolita mikroalgi (El-Sayed, 2010). Nažalost tijekom trećeg uzgoja u drugom stupnju prinos biomase smanjio se na 6,6 g/L (Tablica 3).

Korištenjem kompleksne hranjive podloge (uzgoj 4 i 5) pokušao se ukloniti negativni utjecaj osiromašene podloge na rast i prinos biomase *E. gracilis*. Korištena je kompleksna hranjiva podloga s 20 g/L glukoze i 20 g/L CSL-a. CSL je jeftin nus-produkt proizvodnje škroba. Korištenjem CSL tijekom heterotrofnog uzgoja biomase mikroalgi ostvareni su zadovolja-



Tablica 3. Pokazatelji uspješnosti uzgoja *E. gracilis* na laboratorijskoj tresilici
Table 3. Bioprocess efficiency parameters of *E. gracilis* cultivation on the rotary schaker

Broj uzgoja Number of cultivation	Stupanj Step	t [h]	Y_X [g/L]	$Y_{X/S}$ [g/g]	Y_E [mg/g]	Y_A [mg/g]	Y_K [μg/ml]
UZGOJ 1 CULTIVATION 1	I. st	72	8,2	0,44	0,25	0,01	3,33
	II. st	144	3,6	0,19	0,51	0,04	4,65
UZGOJ 2 CULTIVATION 2	I. st	72	9,1	0,46	0,43	0,03	2,09
	II. st	144	5,3	0,27	3,75	0,69	13,12
UZGOJ 3 CULTIVATION 3	I. st	72	9,8	0,49	0,83	0,45	9,57
	II. st	144	6,6	0,33	4,05	0,99	24,97
UZGOJ 4 CULTIVATION 4	I. st	72	0,5	0,03	0,91	0,18	4,47
	II. st	144	1,2	0,08	2,95	0,44	6,95
UZGOJ 5 CULTIVATION 5	I. st	72	1,3	0,10	1,49	0,29	4,56
	II. st	144	0,3	0,02	2,44	0,31	6,77

vajući prinosi biomase (Šantek i sur., 2009). Fotoheterotrofni i fotomiksotrofni uzgoji provedeni tijekom ovog istraživanja ukazuju da je primjena CSL-a ograničena za uzgoj alge *E. gracilis* na svjetlu. Smeđe obojavanje hranjive podloge dodatkom CSL-a uzrokovalo je ograničenu dopremu svjetlosti do stanica mikroalgi i smanjenje prinosa klorofila i vitamina ($Y_E=2,95$ mg/g; $Y_A=0,44$ mg/g; $Y_K=6,95$ μg/g). Fototrofni uzgoj alge *E. gracilis* na kompleksnoj hranjivoj podlozi s CSL-om nije pogodovao ni povećanju prinosa biomasa (Tablica 3). Stoga su zabilježeni značajno manji prinosi biomase u odnosu na fototrofni uzgoj na kemijski definiranoj podlozi. Ipak, primjenom kompleksne hranjive podloge na bazi kukuruzne močevine (CSL-a) bitno se smanjuje cijena podloge i pojednostavljuje njena priprema u odnosu na kemijski definiranu podlogu (Hutnerovu i podlogu za miksotrofni uzgoj). Zbog toga kompleksna podloga s CSL-om kao takva ima veliki potencijal za primjenu u industrijskom mjerilu (Šantek i sur., 2009).

3.2. Fotomiksotrofni uzgoj alge *E. gracilis* u bioreaktoru s mješalom

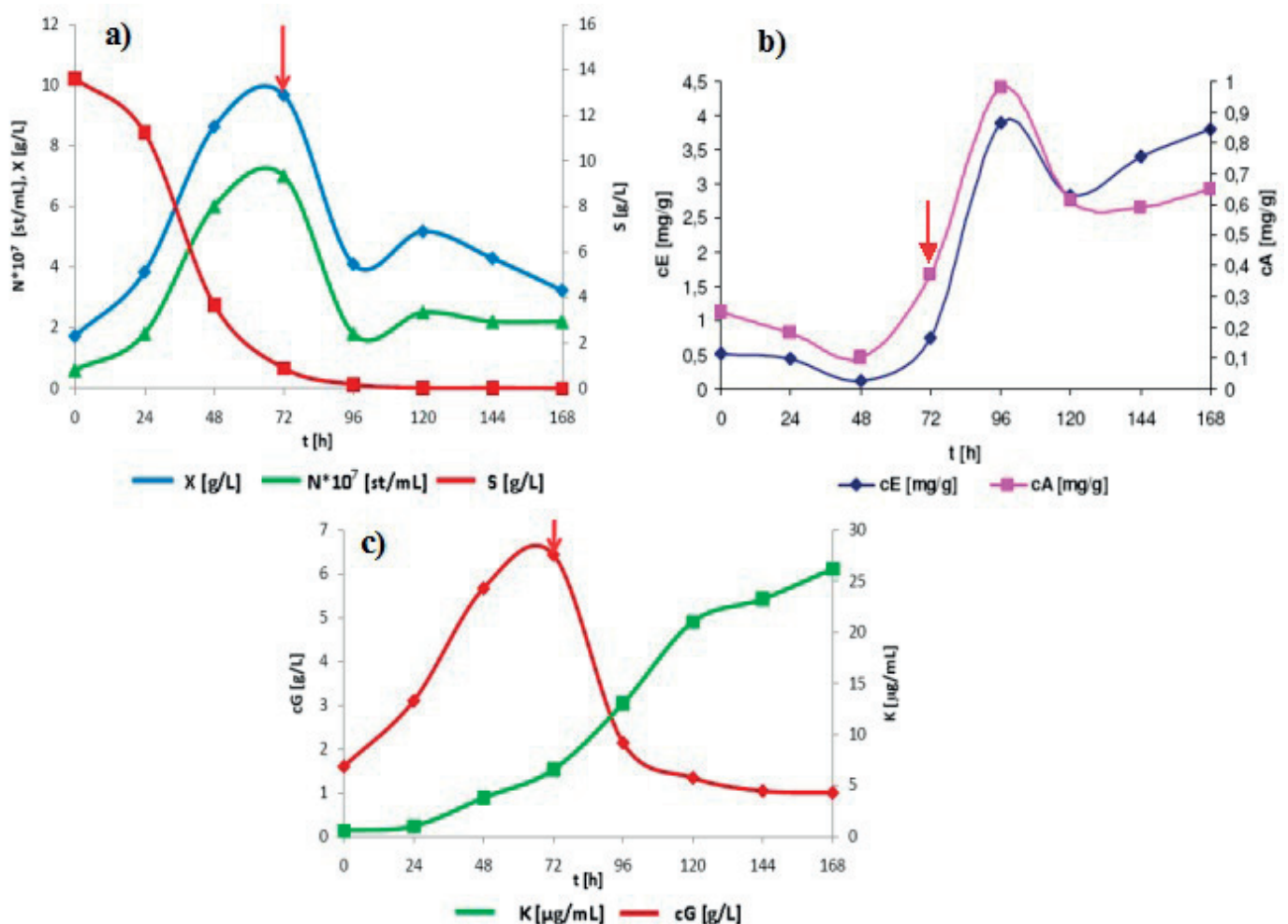
Nakon uzgoja na laboratorijskoj tresilici, i definiranja optimalnih uvjeta uzgoja i proizvodnje vitamina A i E, izabran je dvostupanjski uzgoj (Hutnerova podloga u prvom stupnju i podloga za miksotrofni uzgoj u drugom stupnju). Stoga je uzgoj alge *E. gracilis* u laboratorijskom bioreaktoru s mješalom proveden u dva stupnja na svjetlu. Uzgoj je započet na Hutnerovoj podlozi, a nastavljen na podlozi za miksotrofni uzgoj (Tablica 1) koja je dodana u pritoku nakon 72 h fotoheterotrofnog uzgoja. Rezultati uzgoja u bioreaktoru s mješalom prikazani su na slici 1. Na slici 1a prikazane su promjene koncentracije suhe tvari biomase (X), koncentracije supstrata (S) i broja stanica (N) u vremenu (t). Broj stanica (N) i koncentracija suhe tvari biomase (X) alge *E. gracilis* se znatno povećala od 0 h do 72 h fotoheterotrofnog uzgoja. Do 72 h uzgoja potrošena je gotovo sva glukoza ($S=0,89$ g/L) te su stvoreni uvjeti za miksotrofni uzgoj alge *E. gracilis*. Nakon dodatka podloge za miksotrofni uzgoj, u 72 h uzgoja *E. gracilis*, dolazi do naglog pada koncentracije suhe tvari biomase i broja stanica zbog razrjeđenja i nedostatka glukoze. Glukoza iz hranjive podloge potpuno je potrošena nakon 96 h. Blagi porast koncentracije suhe tvari biomase i broja stanica od 96 h do 120 h vjerojat-

no je posljedica trošenja ostalih sastojaka podloge i rezervnog izvora ugljika, paramilona. Nakon 120 h uzgoja dioba stanica *E. gracilis* prestaje pa se smanjuje njihov broj i koncentracija suhe tvari biomase. Na slici 1b prikazane su promjene koncentracije vitamina A (c_A) i vitamina E (c_E) u vremenu (t). Tijekom fotoheterotrofnog uzgoja alge *E. gracilis*, tj. u prvih 72 h, koncentracija vitamina u stanicama stagnira. Nakon 72 h započinje intenzivna sinteza vitamina čije koncentracije dosežu maksimalnu vrijednost nakon 96 h uzgoja ($c_A=0,98$ mg/g; $c_E=3,75$ mg/g). Budući da je uzgoj od početka vođen na svjetlu plastidi u stanicama *E. gracilis* su se formirali već tijekom fotoheterotrofnog uzgoja. Tijekom fotomiksotrofnog uzgoja sinteza vitamina je bila značajna (slika 1b), a većina antioksidativnih vitamina locirana je u tilakoidnim membranama plastida i ovisi o intenzitetu svjetlosti. Novija istraživanja ukazuju da se vitamini u prisustvu svjetlosti mogu sintetizirati neovisno o postojanju kloroplasta, a razlog tome je što se njihova sinteza osim u kloroplastima odvija i u mitohondriju (Richmond, 2004). Na slici 1c prikazane su promjene koncentracije paramilona (c_G) i koncentracije klorofila (c_K). Fotoheterotrofni uvjeti uzgoja u prvih 72 h povoljni su za sintezu paramilona pa se njegova koncentracija povećava do maksimalne vrijednosti ($c_G=6,64$ g/L; 72 h). Nakon 72 h uzgoja, zbog nedostatka izvora ugljika u podlozi, stanice *E. gracilis* troše paramilon, stoga se koncentracija paramilona smanjuje sve do kraja uzgoja. Iz prijašnjih istraživanja poznato je da prebacivanje *E. gracilis* s heterotrofnog uzgoja na fotomiksotrofni uzgoj pospješuje trošenje paramilona i stvaranje plastida s klorofilom (kloroplasta) (Barsanti i Gualtieri, 2006). Koncentracija klorofila doseže maksimum u 168 h uzgoja i iznosi $C_K=26,20$ μg/mL (slika 1c).

Prednosti korištenja bioreaktora s mješalom za uzgoj mikroorganizama u odnosu na uzgoj u Elrenmayerovoj tikvici na laboratorijskoj tresilici su bolja kontrola uvjeta uzgoja (pH, pO_2 , temperature), te ravnomjerna doprema svjetlosti do stanica mikroalgi. Zahvaljujući efikasnom miješanju u bioreaktoru s mješalom ostvaruje se jednolika doprema svjetlosti do stanica mikroalgi te stoga i optimalni uvjeti za fotomiksotrofni uzgoj. Ipak, potrebno je naglasiti da fotobioreaktori mogu imati i nedostatke zbog svojih konstrukcijskih karakteristika tj. nepovoljnog omjera volumena posude i unutrašnje površine bioreaktora, te utjecaja mehaničkog mješala na rast mikroal-

gi. Poznato je da cijevni fotobioreaktori s miješanjem pomoću pumpe mogu ostvariti veće prinose biomase mikroalgi. Glavni nedostatak cijevnih fotobioreaktora otežano je uvećanje mjerila bioreaktora i rast algi na unutarnjim stijenkama bioreaktorske posude (Barsanti i Gualtieri, 2006). Tijekom mikstotrofnog uzgoja alge *E. gracilis* u fotobioreaktoru s mješalom došlo je do isplivanja algi na površinu hranjive podloge pri čemu je formiran nepokretni sloj mikroalgi na površini hranjive podloge. Nepokretni sloj mikroalgi spriječavao je dopremu svjetlosti do površine mikroalgi u formiranom sloju te negativno utjecao na proizvodnju vitamina. Pojava flotacije mikroalgi česta je pojava tijekom njihova uzgoja. Da bi se onemogućilo isplivanje mikroalgi i pojava flotacije potrebno je prilagoditi sastav

hranjive podloge dodatkom aluminijskih i željeznih soli. Pojava flotacije, može se spriječiti i promjenom konstrukcijskih karakteristika bioreaktora kao i optimizacijom hidrodinamičkih uvjeta (Brennan i Owende 2010). Primjenom matematičkih ovisnosti mogu se odrediti bezdimenzijske značajke koje određuju optimalan broj okretaja mješala za uspostavljanje zadovoljavajuće izmješnanosti u bioreaktoru. Međutim, primjena bezdimenzijskih ovisnosti uz nepoznavanje mase i naboja površine stanice mikroalge može prouzročiti značajna odstupanja između modelnih i eksperimentalnih rezultata. Međutim, sposobnost flotacije stanica *E. gracilis* može se uspješno iskoristiti u postupku izdvajanja stanica *E. gracilis* nakon uzgoja.



Slika 1. Promjena:

- a) suhe tvari biomase (X; ♦), koncentracije supstrata (S; ■) i broja stanica (N; ▲)
 - b) koncentracije vitamina A (cA; ■) i koncentracije vitamina E (cE; ♦)
 - c) koncentracije klorofil (cK; ■) i paramilona (cG; ♦)
- u vremenu tijekom fotomiksotrofnog uzgoja alge *E. gracilis* u bioreaktoru s mješalom.
 Napomena: Strjelica označava dodatak podloge za mikstotrofni uzgoj

Figure 1. Changes of:

- a) dry biomass concentration (X; ♦), substrate concentration (S; ■) and viable cell number (N; ▲)
 - b) vitamins A (cA; ■) and vitamins E (cE; ♦)
 - c) chlorophyll (cK; ■) and paramylon concentration (cG; ♦)
- during photomixotrophic *E. gracilis* cultivation in the stirred tank bioreactor



4. ZAKLJUČAK

Modificirana Hutnerova podloga sa glukozom kao izvorom ugljika povoljnija je za fotoheterotrofni uzgoj biomase alge *E. gracilis* od kompleksne hranjive podloge koja se sastoji od kukuruzne močevine i glukoze. Tijekom fotomiksotrofnog uzgoja alge *E. gracilis* na kemijski definiranoj podlozi (modificirana Hutnerova podloga + podloga za miksotrofni uzgoj) koncentracija vitamina u biomasi bila je deset puta veća od koncentracije vitamina dobivene tijekom miksotrofnog uzgoja (bez svjetla). Tijekom dvostupanjskog fotomiksotrofnog uzgoja alge *E. gracilis* u biorektoru s mješalom na kemijski definiranoj podlozi zabilježene su produktivnosti proizvodnje vitamina A ($Pr_A = 0,07$ mg/Lh) odnosno E ($Pr_E = 0,27$ mg/Lh), uz prinose vitamina A ($Y_A = 6,53$ mg/L) odnosno E ($Y_E = 26,26$ mg/L). Dobiveni prinosi vitamina A i E u razini su s literaturnim prinosima ostvarenim tijekom procesa proizvodnje vitamina iz mikroalgi.

5. LITERATURA

Agarwal M., Parameswari R. P., Vasanthi H. R., Das D. K. (2012) Dynamic action of carotenoids in cardioprotection and maintenance of cardiac health. *Molecules*, 17, 4755-4769.

Afiukwa C. A., Ogbonna J. C. (2007) Effects of mixed substrates on growth and vitamin production by *Euglena gracilis*. *African Journal of Biotechnology*, 6, 2612-2615.

Barsanti L., Gualtieri P. (2006) Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology, CRC Press, USA.

Brennan L., Owende P. (2010) Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 14, 557-577.

Devasagayam, T. P. A., Tilak J.C., Boloor K. K., Ketaki S. S., Ghaskadbi S. S., Lele R. D. (2004) Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, 52, 794-804.

El-Sayed A. B. (2010) Carotenoids accumulation in the green alga *Scenedesmus sp.* incubated with industrial citrate waste and different induction stresses. *Nature and Science*, 8, 34-40.

Hosotani K., Ohkochi T., Inui H., Yokota A., Nakano Y., Kitaoka S. (1988) Photoassimilation of fatty acids, fatty alcohols and sugars by *Euglena gracilis* Z. *Journal of General Microbiology*, 134, 61-66.

Hutner S. H., Provasoli L. (1951) Biochemistry and Physiology of Protozoa, Vol. 1, Academic Press, New York.

Li Y., Wang B., Wu N., Lan C.Q. (2008) Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid production of *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 629-636.

Osafune T., Sumida S., Ehara T., Ueno N., Hase E., Schiff J. A. (1990) Lipid (wax) and paramylum as sources of carbon and energy for the early development of proplastids in dark-grown *Euglena gracilis* cells transferred to an inorganic medium. *Journal of Electron Microscopy*, 39, 372-381.

Pavlečić M., Vrana I., Vibovec K., Ivančić Šantek M., Horvat P., Šantek B. (2010) Ethanol production on different intermediates of sugar beet processing. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 362-367

Richmond A. (2004) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology Blackwell Science Ltd., UK.

Sandmann G. (1994) Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *European Journal of Biochemistry*, 223, 7-24.

Shigeoka S., Onishi T., Nakano Y., Kitaoka S. (1986) The contents and subcellular distribution of tocopherols in *Euglena gracilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50, 1063-1065.

Shigeoka S., Ishiko H., Nakano Y., Mitsunaga T. (1992) Isolation and properties of gamma-tocopherol methyltransferase in *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1128, 220-226.

Stryer L. (1991) Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, Hrvatska.

Šantek B., Felski M., Frichs K., Lotz M., Flaschel E. (2009) Production of paramylon, a beta-1, 3-glucan, by heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* on a synthetic medium. *Engineering in Life Sciences*, 9, 23-28.

Taketomi H., Soda K., Katsui G. (1983) Results of screening test in tocopherol in microbial realm. *Vitamins (Japan)*, 57, 133-138.

Takeyama H., Kanamaru A., Yoshino Y., Kakuta H., Kawamura Y., Matsunaga T. (1997) Production of antioxidant vitamins, β -carotene, vitamin C, vitamin E, by twostep culture of *Euglena gracilis* Z. *Biotechnology and Bioengineering*, 53, 185-190.

Tani Y., Tsumura H. (1989) Screening for tocopherol-producing microorganisms and α -tocopherol production by *Euglena gracilis* Z. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 305-312.