

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**Ingrida Čeplevičiūtė**

**DUMBLIŲ *CHLORELLA VULGARIS* AUGINIMO  
OPTIMIZAVIMAS IR BIOAKTYVUMO ĮVERTINIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

**Vadovė**

doc. dr. Ilona Jonuškienė

**Kaunas, 2017**



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**  
**CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**DUMBLIŲ *CHLORELLA VULGARIS* AUGINIMO OPTIMIZAVIMAS IR  
BIOAKTYVUMO ĮVERTINIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

**Studijų programa Pramoninė biotechnologija (kodas 612J7004)**

**Vadovė**

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

**Recenzentas**

Dr. Ingrida Tumosienė

**Darbą atliko**

Ingrida Čeplevičiūtė

**Kaunas, 2017**



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Ingrida Čeplevičiūtė

Studijų programa Pramoninė biotechnologija (kodas 612J7004)

Baigiamojo darbo „DUMBLIŲ *CHLORELLA VULGARIS* AUGINIMO  
OPTIMIZAVIMAS IR BIOAKTYVUMO ĮVERTINIMAS“

**AKADEMINIO SAŽINGUMO DEKLARACIJA**

2017 m. birželio mėn. 04 d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano Ingridos Čeplevičiūtės baigiamasis darbas tema

„Dumblių *Chlorella vulgaris* auginimo optimizavimas ir bioaktyvumo įvertinimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena darbo dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymu nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

---

(studento vardas ir pavardė, įrašyti ranka)

---

(parašas)

Čeplevičiūtė, Ingrida. Dumblių *Chlorella vulgaris* auginimo optimizavimas ir bioaktyvumo įvertinimas Magistro Projektas / vadovas doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: Biotechnologija, Technologijos mokslai

Reikšminiai žodžiai: Dumbliai, *Chlorella vulgaris*, mikrodumbliai, optimizavimas.

Kaunas, 2017. 55 p.

#### SANTRAUKA

Šio darbo tikslas buvo biochemiškai ištirti *Chlorella vulgaris* dumblius, taip pat surasti optimaliausią terpę reikalingą dumblių auginimui. Buvo atlikti tokie tyrimai: antioksidacinis aktyvumas prieš DPPH, tirtos redukcinės *Chlorella vulgaris* dumblių savybės, ištirta karotenoidų, chlorofilo a ir b, bei taninų, fenolinių junginių, baltymų kiekiai. Buvo ištirtas optimaliausias NaNO<sub>3</sub> kiekis mitybinėje terpėje.

Čeplevičiūtė, Ingrida. Optimization of algae *Chlorella vulgaris* growth and evaluation of bioactivity: Master's thesis in industrial biotechnology/ supervisor assoc. prof. Ilona Jonuškienė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: Biotechnology, Technology sciences

Key words: Algae, *Chlorella vulgaris*, microalgae, optimization.

Kaunas, 2017. 55 p.

#### SUMMARY

The purpose of this work was to investigate biochemical parameters in *Chlorella vulgaris* algae, although to investigate the growth media of algae, and to choose the best one. It was carried out researches like: associated with antioxidant activity against DPPH, reduction power properties of *Chlorella vulgaris*, amount of carotenoids, chlorophyll a and b, tannins, proteins and phenolic compounds. It was found out the optimal concentration of NaNO<sub>3</sub> in a algae growing media.

# Turinys

Įvadas.....	7
1. Literatūros apžvalga .....	8
1.1 Dumблиų struktūra ir pagrindinės rūšys .....	8
1.2 Dumблиų <i>Chlorella vulgaris</i> apibendrinimas .....	13
1.3 Pridėtinės vertės produktai gaunami iš dumблиų ir jų panaudojimas .....	14
1.4 Karotenoidai .....	15
1.6 Liuteinas ir jo išgryninimas iš mikrodumблиų.....	16
1.7 Dumблиų auginimo sąlygos ir sistemos.....	18
1.7.1 Plokštieji ir vamzdiniai foto – bioreaktoriai.....	20
1.9 Mikrodumблиų auginimo sąlygos .....	21
1.7 Dumблиų biomasės atskyrimas iš mitybinės terpės .....	22
2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....	24
2.1 <i>Chlorella vulgaris</i> dumблиų auginimo schema.....	24
2.2.1 Skirtinga mitybinės terpės sudėtis .....	27
2.2.2 Šviesos sugerties matavimas.....	29
2.2.3 Sausos žaliavos kiekio nustatymas.....	29
2.2 Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotenoidų įvertinimas .....	29
2.3 Antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu.....	30
2.4 Antioksidacinis aktyvumas mikrodumблиuose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną .....	31
2.5 Redukcinių savybių nustatymas <i>C. vulgaris</i> dumблиuose.....	31
2.6 Bendras fenolinių junginių ir taninų nustatymas Folino-Kiokalto metodu .....	32
2.7 Baltymų kiekio nustatymas mikrodumблиuose .....	33
3. Tyrimo rezultatai ir jų aptarimas .....	34
3.1 Tiriamoji medžiaga.....	34
3.2 Mikrodumблиų augimo intensyvumo įvertinimas .....	34
3.3 Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> įvertinimas <i>Chlorella vulgaris</i> mikrodumблиuose.....	38
3.4 Karotenoidų įvertinimas <i>Chlorella vulgaris</i> dumблиuose.....	39

3.5 Antioksidacinio aktyvumo DPPH metodu įvertinimas .....	40
3.6 Antioksidacinis aktyvumo įvertinimas mikrodumbliuose pagal FRAP metodą .....	41
3.7 Bendras fenolinių ir taninų įvertinimas Folino – Kiokalto metodu <i>Chlorella vulgaris</i> mikrodumbliuose .....	43
3.8 Baltymų kiekio įvertinimas .....	46
3.9 Redukcinių savybių nustatymas <i>Chlorella vulgaris</i> mikrodumbliuose.....	47
2. Rekomendacijos .....	49
Išvados .....	52
Literatūros sąrašas .....	53

## Įvadas

*Chlorella vulgaris* dumbliaus buvo pradėta auginti, išsiaiškinus kad jie greitai auga, lengvai kultivuojami, gamina didelius baltymų ir antrinių metabolitų kiekius, tokius kaip omega - 3 riebalų rūgštis ir karotenoidus. Juose gausu antioksidantų, fenolinių junginių, dumbliai pasižymi redukcinėmis ir antimikrobinėmis savybėmis.

Dumbliai šiuo metu yra labai populiarūs žaliava pramonėje, nes gaunamos didelės biomasės išeigos. Jie yra plačiai naudojami daugelyje pramonės šakų: maisto, trąšų, vaistų ir biokuro gamyboje.

### Darbo tikslas

Parinkti ir optimizuoti geriausias *Chlorella vulgaris* mikrodumblių augimo sąlygas ir įvertinti bioaktyvių medžiagų kiekius.

### Darbo uždaviniai

- Ištirti geriausias sąlygas dumblių augimui, ištirti koks  $\text{NaNO}_3$  kiekis mitybinėje terpėje, geriausiai tinka auginti *Chlorella vulgaris* dumbliaus.
- Įvertinti chlorofilo a ir b kiekius mikrodumблиuose.
- Kiekybiškai įvertinti karotenoidų kiekį *Chlorella vulgaris* mikrodumблиuose.
- Įvertinti dumblių antioksidacinį aktyvumą.
- Įvertinti redukcines savybes *Chlorella vulgaris* dumблиuose.
- Sudaryti karotenoidų išskyrimo iš *Chlorella vulgaris* mikrodumблиų technologinę schemą.

# 1. Literatūros apžvalga

## 1.1 Dumблиų struktūra ir pagrindinės rūšys

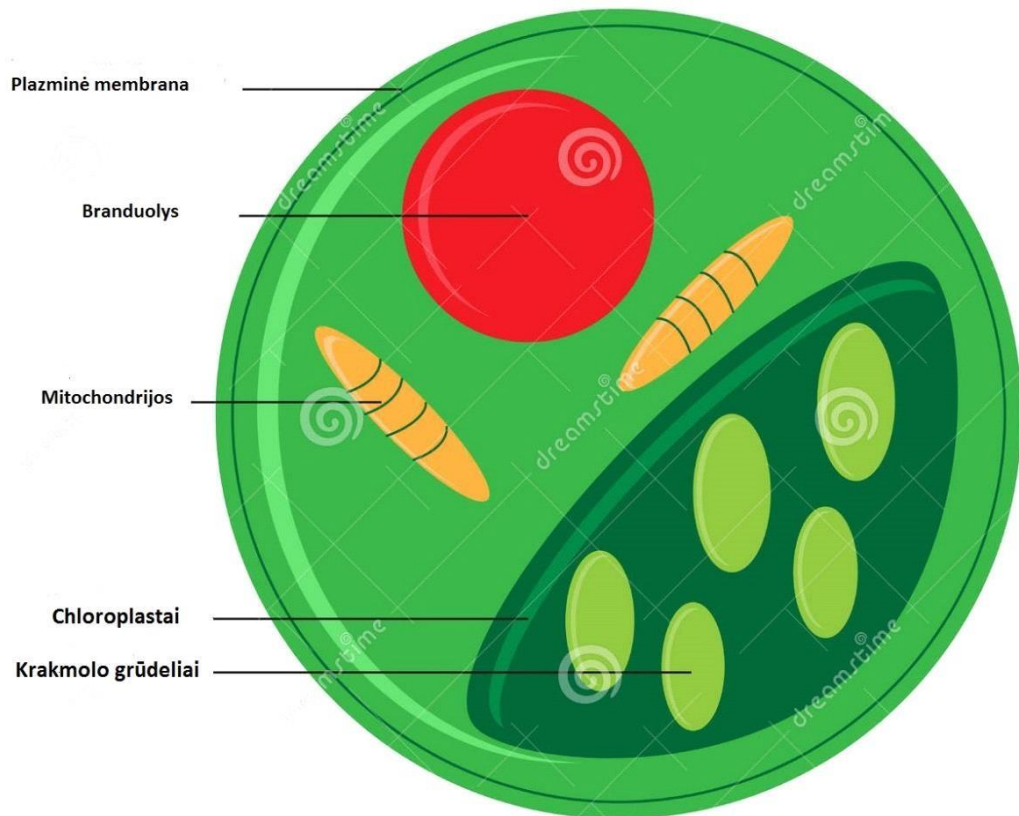
Dumbliai yra vieni seniausių žemėje aptinkamų augalų, bet dėl primityvių gyvenimo sąlygų kai kurie iš jų iki šiol išliko nepakitę. Gamtoje yra aptinkama apie 3500 tūkstančius dumblių rūšių – nuo mikroskopinių iki 60 m ilgio. Dėl to jų struktūra gali būti įvairi: vienaląsčiai, daugialąsčiai. Daugelis jų rūšių esant tinkamoms sąlygoms per dieną gali pasidauginti dvigubai. Dumbliai yra atsakingi už „vandens žydėjimą“.[1]

Dumbliai dar kitaip vadinami fotoplanktonu, todėl, kad jų judėjimą praktiškai veikia tik vanduo, kuriame jie yra. Dumблиų paplitimas gamtoje priklauso nuo įvairių aplinkos veiksnių. Svarbiausi iš jų yra drėgmė, šviesa, temperatūra bei mineralinių medžiagų kiekis. Dumbliai yra svarbiausi organinių medžiagų gamintojai vandenyse, kurių biomasė dešimt kartų didesnė už visų sausumos augalų. Be to, intensyviai vykdydami fotosintezę jie išskiria didelius kiekius deguonies, taip sukurdami palankesnes sąlygas vandens gyvūnams. Vandenyje deguonį naudoja ne tik gyvi organizmai, tačiau jo reikia ir bakterijoms, taip pat jis naudojamas norint suskaidyti negyvus augalus ir gyvūnus.[1 - 2].

Kaip ir kiti žalieji augalai, dumbliai turi branduolį, vieną ar kelis chloroplastus, taip pat keletą kitų organelių tokių kaip mitochondrija, endoplazminis tinklas, vakuolių išsidėsčiusių citoplazmoje. Chlorofilas ir karotenoidai yra chloroplastuose, išorinis citoplazmos sluoksnis yra apgaubtas citoplazmine membrana, o ją gaubia ląstelės sienelė. Ląstelės sienelė daugiausia yra sudaryta iš celiuliozės, tačiau joje yra ir hemiceliuliozės pektino ir kitų sudedamųjų dalių tokių kaip: kalcio karbonato, silicio. Membrana yra sudaryta iš lipidų ir baltymų, kaip ir kituose augaluose. Ji yra labai plona ir elastinga, kad galėtų kontroliuoti maistinių medžiagų pernašą į ląstelę ir iš jos. Branduolio membrana yra dviguba, kurios išorinis sluoksnis jungiasi su endoplazminiu tinklu. Chromosomų skaičius esantis branduolyje priklauso nuo dumblių rūšies jų gali būti nuo 2 iki 592. Prokariotinę struktūrą turinčiuose dumbliuose nėra branduolio membranos. Chloroplastai yra apsupti dvigubos membranos, juose esantys pigmentai priklausomai nuo dumblių rūšies suteikia dumbliams spalvą. Mobilioji fazė chloroplastuose esanti dvisluoksnės membranos viduje yra užpildyta baltymais reikalingais sintezei, taip pat yra krakmolo saugojimo vieta. Chloroplastų viduje yra išsidėstę tilakoidai, kuriose yra chlorofilas. Yra penkios rūšys chlorofilo aptinkamo dumbliuose: a, b, c, d, and e. Kita pigmentų rūšis dumbliuose yra karotenoidai. Dar vieni



pigmentai yra ksantofilai, tokie kaip: liuteinas, violaksantinas ir neoksantinas. Mitochondrijos yra aptinkamos beveik visuose dumbliuose, kurias gaubia dvigubas membranos sluoksnis. Vidinis membranos sluoksnis yra sudarytas iš vandenyje tirpių baltymų ir gliukozės. Endoplazminis tinklas padeda ribosomoms sintetinti baltymus, šiuurkščioji jo pusė yra prie membranos, o švelnioji prie ribosomų Goldžio kompleksas yra visuose dumbliuose išskyrus žaliuosius ir mėlynuosius. Jis aptinkamas tarp endoplazminio tinklo ir ląstelės membranos, jo dėka iš ląstelės yra pašalinamos kenksmingos medžiagos. Dumbliuose yra aptinkamos trijų rūšių vakuolės: paprastosios vakuolės, jos išmeta metabolizmo metu susidariusias atliekas, taip pat reguliuoja vandens kiekį ląstelėje. Kompleksinės vakuolės – reguliuoja osmosinį slėgį ląstelėje. Dujų vakuolės – reguliuoja dujų paskirstymą ląstelėje ir iš jos. Kai kuriuose dumbliuose yra fikobilinų – fikocianino ir fikoeritrinų.[1 - 2; 9 - 10; 11 - 15].

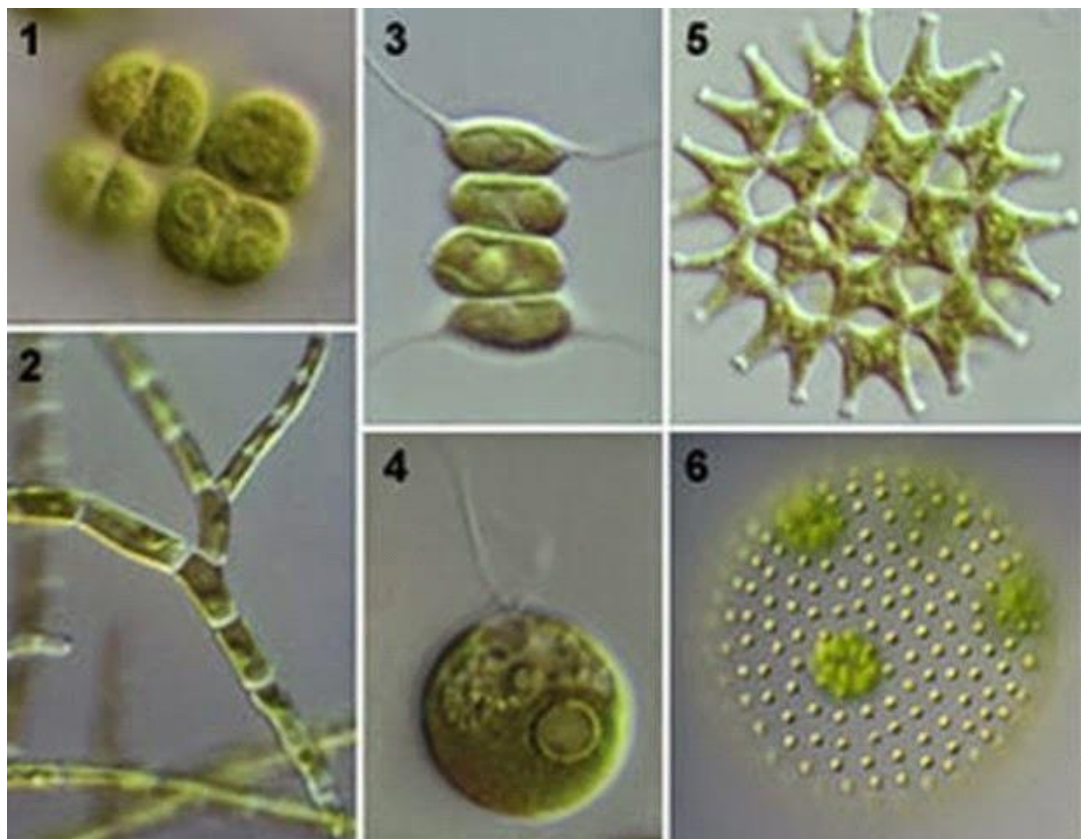


• 1.1 pav. Dumblių ląstelės struktūra

Fotosintetinių pigmentų sudėtis yra vienas iš svarbiausių požymių, pagal kuriuos dumbliai skirstomi į skyrius. Dumbliai dar skirstomi pagal dauginimosi tipą, gyvenamąsias sąlygas, medžiagas iš kurių jie susideda. Įvertinus visus skirtumas dumbliai skirstomi į 11 pagrindinių klasių:

1 klasė yra: *Clorophyceae* (žalieji dumbliai)

Daugiausia paplitę gėlame vandenyje ir kelios rūšys yra aptinkamos jūroje. Pigmentų rūšys: chlorofilas a ir b, bei karotenoidai, kurie kaip maisto šaltinį naudoja krakmolą. Gali būti vienaląsčiai ir daugiąlasčiai, ląstelės sienelė sudaryta iš celiuliozės. Gali daugintis lytiniu ir dalijimosi būdu. Pavyzdžiai: *Chlorella*, *Volvox*, *Pediastrum*. [3 - 5].



1.2.pav. Dumблиų rūšys:

1.*Dismettra*.2.*Stigeoclonium*.3.*Desmodesmus*.4.*Chlamydomonas*.5.*Pediastrum*.6.*Volvox*

2 klasė *Xantophyceae* (Geltonai žalieji dumbliai)

Daugiausia yra aptinkami gėluose vandenyse, bet randami ir jūroje. Pigmentas: Geltonasis ksantofilas. Maisto šaltinis – aliejus. Ląstelės sienelė turi daug pektininių medžiagų ir sudaryta iš dviejų vienodų dalių, kurios galuose persidengia. Dažniausiai dauginasi lytiniu būdu. Pavyzdys: *Vaucheria*. [3 - 5].

### 3 Klasė: *Chrysophyceae*

Daugiausia aptinkami šaltame gėlame vandenyje, vyrauja rudi ir oranžiniai pigmentai, kaip maistinių atsargų šaltiniai yra kaupiami riebalai. Yra vienaląsčiai, šakotos siūlinės struktūros, dauginasi lytiškai izogaminiu būdu.[3 – 5].

### 4 klasė: *Bacillariophyceae*

Dažniausiai aptinkamas įvairiuose vandens telkiniuose: jūroje, ežeruose. Pigmentai, kuriais išsiskiria: yra geltoni arba auksinės spalvos, kaip maisto rezervą naudoja riebalus. Šių dumblių rūšis yra vienaląsčiai arba kolonijiniai, ląstelės sienelėse aptinkama silicio ir pektino darinių. Pavyzdys: *Pinnularia*. [3 - 5]

### 5 klasė: *Cryptophyceae*

Paplitimo vietos yra jūroje ir gėluose vandenyse. Pigmentas: yra žalias turintis rudų atspalvių. Maisto šaltinis angliavandeniai, kartais gali būti ir krakmolas, šie dumbliai apibūdinami kaip judriosios ląstelės dažniausiai yra elipsės formos. Dauginimasis vyksta izogaminiu būdu. Pavyzdys: *Chroomonas*. [3 - 5]

### 6 klasė: *Dinophyceae*

Šie dumbliai dažniausiai aptinkami jūrose, kaip jūrinis planktonas. Pigmentai yra rudi, geltoni, kaip maisto šaltinį naudoja krakmolą ir aliejus. Šie dumbliai yra judrūs vienaląsčiai organizmai. Dauginasi izogaminiu būdu. Pavyzdys: *Ceratium*. [3 - 5]

### 7 klasė: *Chloromonadineae*

Aptinkami tik gėluose vandenyse, juose esantys pigmentai yra ryškiai žalios spalvos, kaip maisto šaltinį naudoja aliejų.

### 8 klasė: *Euglenineae*

Aptinkami tik gėluose vandenyse, pigmentai yra šviesiai žali, kiekviena ląstelė turi po keletą. Maistas kurį naudoja yra polisacharidas. Tai mobilūs dumbliai pasižymintys dideliu vakuolių kompleksu ir pastebimu branduoliu. Dauginasi izogaminiu būdu pavyzdys: *Euglena*. [3 - 5]



1.3 pav. *Euglenineae*

9 klasė: *Phaeophyceae*

Daugiausia aptinkami jūrose. Pigmentai: chlorofilas a ir c, karotenas, *ksantofilas*. Maisto šaltiniu dažniausiai naudoja riebalus, daugialąsčiai organizmai, šakelės formos, kurie gali daugintis lytiniu būdu. Pavyzdys: *Ectocarpus* [3 - 5]

10 klasė *Rhodophyceae*

Keletas rūšių yra aptinkamos gėluose vandenyse, bet daugiausia tai jūriniai dumbliai. Pigmentai yra raudonasis *phokoeritrinas* ir mėlynasis *phikokianinas*, chlorofilas a ir b, karotenoidai. Kaip maisto šaltinį naudoja krakmolą, šie dumbliai yra daugialąsčiai organizmai, judrių formų nėra žinoma. Dauginasi lytiniu būdu, po apvaisinimo susidaro specialiosios sporos. Pavyzdys: *Polysiphonia*. [3 - 5]

11 klasė: *Myxophyceae*

Daugiausia aptinkami jūrose ir gėluose vandenyse. Pigmentai: chlorofilas, karotenai, *ksanthofilas*, gali būti žalios ir mėlynos spalvos. Maisto šaltinis: cukrus ir glikogenas. Susideda iš siūlinių ląstelių, turi branduolį, pigmentus, būna perduodami periferiniu būdu, nejudrūs. Dauginasi nelytiniu būdu. Pavyzdys: *Oscillatoria*, *Nostoc*. [3 - 5]

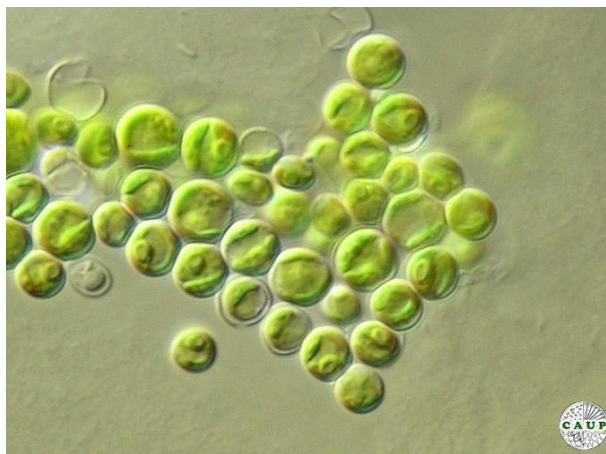


1.4 pav. Dumbliai *Oscillatoria*

## 1.2 Dumblių *Chlorella vulgaris* apibendrinimas

*Chlorella vulgaris* yra vienaląsčiai eukariotiniai, žalieji dumbliai. Tai viena seniausių dumblių rūšių pasaulyje, pagrindinis šio kultūros pranašumas tas, kad ši rūšis sugeba greitai augti. Augimo greitis priklauso nuo šviesos, terpėje esančių ištirpusių medžiagų, temperatūros ir anglies dvideginio kiekio. *C.vulgaris* dumblius buvo pradėta auginti, pastebėjus kad jie greitai auga, lengvai kultivuojami, gamina didelius baltymų ir antrinių metabolitų kiekius, tokius kaip omega - 3 riebalų rūgštis ir karotenoidus.[5,7,8]

*C.vulgaris* yra sudaryta iš nedidelių sferinės formos ląstelių, turi 16 chromosomų. *E.coli* bakterijos genome esanti seka atsakinga už ląstelės dalijimąsi, yra aptinkama ir *C.vulgaris* chloroplastuose, tai parodo, kad šiuose dumbluose yra sekų priklausančių bakterijoms. Šie dumbliai yra fotolitotrofai, jie kaip ir kiti fototrofai vykdo fotosintezę. Paimdami iš aplinkos anglies dvideginį jie fotosintezės metu sintetina riebalų rūgštis, dumbliai negamina nesočiųjų riebalų rūgščių, taip pat šios rūšies dumbliai augdami neorganinėje terpėje sintetina daugiau *lindeno* rūgšties. Daugiausia *C.vulgaris* yra aptinkami gėluose vandenyse, šie dumbliai yra apibūdinami kaip daugiausiai chlorofilo turintys augalai. Šie dumbliai atsparūs daugeliui bakterijų, virusų ir kenksmingųjų grybų. Taip yra todėl, kad jie sugeba labai greitai ištaisyti virusų padaromas DNR klaidas.[7 - 8]



1.5 pav. *Chlorella vulgaris* dumbliai

Buvo atliktas bandymas su *C.vulgaris*, kurio metu buvo tiriama kiek šie dumbliai geba užauginti biomasės ir kiek išskiria mineralinių medžiagų. Eksperimente *C.vulgaris* augimui buvo naudojama standartinė mikrodumblių augimo terpė, gauti duomenys buvo lyginami su pamidorais, kurie buvo auginami daug mikroelementų turinčioje terpėje. Masės prieaugis buvo matuojamas pagal šviesos sugertį esant 405 nm bangos ilgiui. mineralinių medžiagų kiekis buvo stebimas atliekant redukcinių savybių tyrimą, o riebalų rūgštys buvo tiriamos naudojant dujų chromatografiją.[7,8,19]

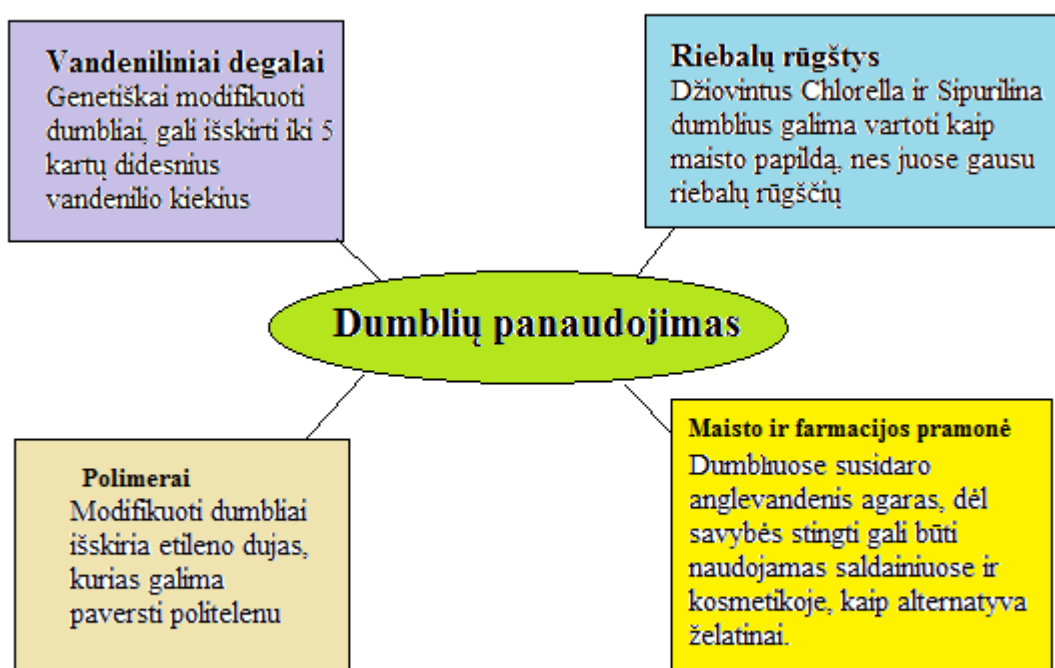
Šio tyrimo metu buvo išsiaiškinta, kad *Chlorella vulgaris*, kurie buvo auginti daug silpnesnėje terpėje (terpėje buvo daug mažiau mikroelementų), pagamino tiek pat makroelementų kaip ir pamidorai, kurie buvo auginami stipresnėje terpėje. Tiriant riebalų rūgštis buvo išsiaiškinta, kad *C.vulgaris* dumbliuose buvo tik trumpųjų nešakotųjų riebalų rūgščių. [7, 8, 19]

### **1.3 Pridėtinės vertės produktai gaunami iš dumblių ir jų panaudojimas**

Daugiausiai iš dumblių yra išskyrinėjami lipidai, Jie gali būti poliniai pvz: fosfogliceridai ir nepoliniai (steroliai, sočiosios riebalų rūgštys, fosfogliceroliai). Steroliai ir fosfogliceroliai įeina į ląstelės membranos sudėtį ir organelių membranos sudėtį, jie dalyvauja maisto medžiagų ir šalinamų medžiagų pernašos procese. Poliniai lipidai dalyvauja tarpiniuose procesuose perduodant maisto medžiagas. Dumblių yra aptinkama įvairiausiose žemės vietose ir priklausomai nuo rūšies jie gali augti net kenksmingomis (toksinėmis) sąlygomis. Daugelis dumblių rūšių daugiausia sukaupia lipidų, ypač nepolinių. Kadangi iš dumblių išgaunama daug aliejaus, jie dažniausiai naudojami biodegalų - biodyzelino gamyboje. Dumbliai plačiai naudojami valyti nuotekas,

nes jie sugeba išlikti toksinėmis sąlygomis, bet svarbiausia, kad iš nuotekų gali pasiimti rekalingų maistinių medžiagų. [5 - 17]

Dumbliai sintetina ir taip vadinamus vertinguosius antrinius metabolitus, tokius kaip: karotenoidus, vitaminus (provitaminą A, vitaminą B12). Taip pat išgaunami naudingieji polisacharidai ir baltymai. Jie panaudojami, daugiausiai farmacijoje gaminant įvairius maisto papildus. [16]



1.6 pav. Dumblių panaudojimas

## 1.4 Karotenoidai

Patys svarbiausi karotenoidai yra  $\beta$  - karotenas ir raudonai oranžinės spalvos C40 - izoprenoidas. Svarbiausia karotenoidų funkcija yra apsauginė, jie apsaugo augalus nuo oksidacijos procesų, apsaugo nuo pavojingų fotocheminių reakcijų, ypač rudenį, kai sumažėja saulės šviesos ir sulėtėja fotosintezės procesai.[4, 5, 6]

Karotenoidai daugiausia yra aptinkami dumbliuose, dar jie aptinkami ir bakterijose (pvz: *E.coli*). Iš *E.coli* biosintetiniu būdu buvo išskirtas stafiloksantinas, jis susijungia su laisvaisiais radikalais, taip apsaugodamas ląsteles nuo oksidacijos.[5]

## 1.6 Liuteinas ir jo išgryninimas iš mikrodumblių

Liuteinas yra karotenoidas, kuris skatina ląstelių atsinaujinimą. Daug liuteino yra aptinkama mikrodumbliuose, kurie dėl savo augimo greičio yra labai patrauklus liuteino gavybos šaltinis. Karotenoidai priklauso terpenoidų pigmentų šeimai su 40 anglies ilgio grandine ir didele konjuguota dvigubųjų ryšių sistema. Liuteinas ir *zeaksantinas* yra vieninteliai karotenoidai, kuriuos grynus ir nedideliais kiekiais iš kraujo pasisavina tinklainė. Jie tinklainėje veikia kaip antioksidantai, taip pat padeda filtruoti mėlyną šviesą.[6]

Pagrindiniai aspektai: masės prieaugis ir liuteino kiekis mikrodumbliuose padarė juos labai patrauklia žaliava. Dėl savo palyginus su kitomis liuteino išgavimo žaliavomis pigų ir paprastų auginimo sąlygų mikrodumbliai tapo viena pagrindinių žaliavų liuteino ir kitų karotenoidų gavyboje. [17 - 4]



1.7 pav. Liuteino auginimo sistemos

Priklausomai nuo maitinimo terpės ir augimo sąlygų galima gauti liuteino nuo 3,6 mg l<sup>-1</sup> per dieną ir 360 mg m<sup>-2</sup> per dieną iki 10 mg l<sup>-1</sup> per dieną and 1,000 mg m<sup>-2</sup> per dieną. Dar viena svarbi priežastis, dėl ko yra pasirenkami mikrodumbliai yra tai, kad jie gali išgyventi stresinėje aplinkoje. Tai reiškia, kad net ir kurį laiką negavę svarbių mikroelementų, ar pasikeitus kitom gyvybiškai svarbiom sąlygom jie nežūsta, o sugrąžinus optimalias sąlygas vėl pradeda daugintis.[5, 6, 28].

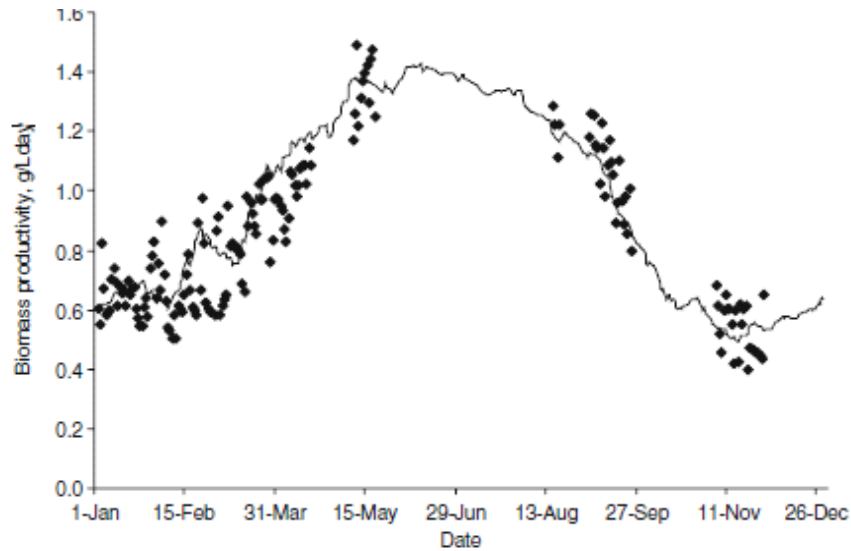
Didžiausi aplinkos veiksniai, kurie turi įtakos liuteino kiekio susidarymui yra: radiacija, dideli pH



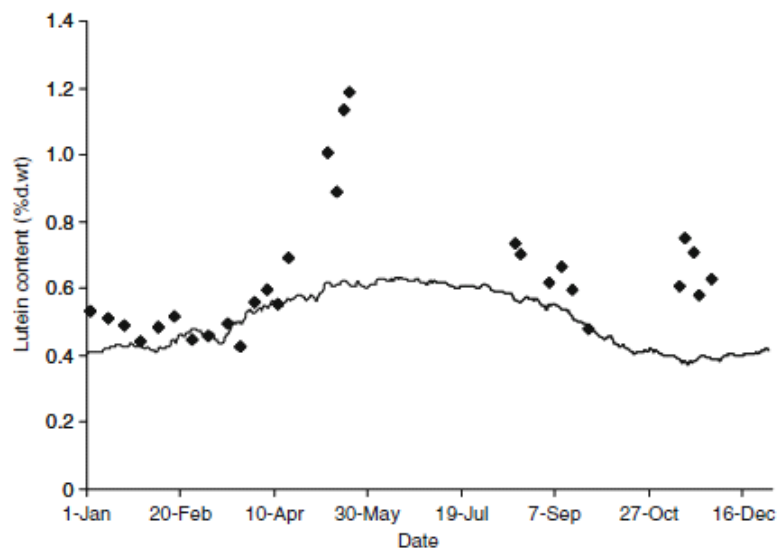
svyravimai, temperatūra, nitratų kiekio ir geležies trūkumas, deguonies sumažėjimas, ir aišku augimo greitis pastarąjį sunku įvertinti nes reikalinga ilgesnė biomasės kultivacija. [5 - 6].

Visa tai turi įtakos ne tik liuteino kiekio susidarymui, bet ir pačios biomasės prieaugiui. Padidėjęs liuteino kiekis nerodo, kad ir biomasės bus priauginta daugiau, šie rodikliai ne visada sutampa. Didesnė temperatūra padidina liuteino kiekį, tačiau didinant ją toliau, temperatūra tampa žalinga biomasei. Radiacija taip pat ne visada yra žalinga, mažesni jos kiekiai ypač auginant dumblius laboratorijose parodė, kad gali būti naudingi nes skatina ląstelių dalijimąsi ir kartu biomasės augimą. [4- 5, 6 – 17].

Taip pat tyrimą atlikęs mokslininkas *Sanchez* nustatė, kad temperatūra ir radiacija kartu gali turėti didesnę poveikį. Siekiant tai išsiaiškinti buvo atliktas eksperimentas. Kuriam panaudojo *S.Almiriensis* kultūrą, kurio metu buvo stebimas liuteino kiekio prieaugis. Eksperimentas vyko lauko ir laboratorijos sąlygomis. Didesnis biomasės prieaugis buvo pastebėtas lauko sąlygomis manoma dėl to, kad lauko sąlygomis yra patiriami didesni temperatūrų ir šviesos skirtumai dienos ir nakties metu, tokios sąlygos nebuvo užtikrintos laboratorijoje. Tokios sąlygos sukėlė stresą kultūrai, kaip atsakas į tokias sąlygas buvo greitesnis masės prieaugis. Greitesnis masės prieaugis taip pat pareikalavo didesnio O<sub>2</sub> suvartojimo kiekio, negu laboratorijoje. Žemiau esančiuose grafikuose (žr. 1.8 pav ir 1.9 pav.) pateikiami duomenys, kiek vidutiniškai gramų per dieną priaugo biomasės ir koks buvo gautas liuteino kiekis. Iš pavyzdžių matyti, kad didžiausias prieaugis buvo nuo gegužės iki rugpjūčio, po to kiekis pradėjo mažėti, tam turėjo įtakos, trumpesnės dienos ir šaltesni orai.[4 - 17].



1.8 pav. Lauko sąlygomis augintos kultūros biomasės prieaugis



1.9 pav. Lauko sąlygomis augintos kultūros liuteino kiekis

Laboratorijoje, vienodos sąlygos yra užtikrinamos visus metus, todėl nors ir biomasės prieaugis yra lėtesnis ir mažesnis, tačiau jo galima tikėtis visus metus.[4,17,30]

## 1.7 Dumблиų auginimo sąlygos ir sistemos

Priklausomai nuo klimato sąlygų, dumbliai gali būti auginami atvirose ir uždaroose sistemose. Atvirose sistemoje yra patogiau auginti dumblius, tačiau jų prieaugis yra mažesnis, be to jie gali užsikrėsti įvairiomis ligomis iš aplinkos. Mūsų klimato sąlygomis toks auginimo tipas taip pat yra netinkamas, nes neužtektų saulės energijos ir negalėtume užtikrinti reikiamą temperatūrą augimo metu.[5 - 18]



1.10 pav. Atvira dumblių auginimo sistema

Uždaros sistemos dar vadinamos foto-bioreaktoriais, kuriuose gali būti užtikrinama optimalios sąlygos dumblių augimo metu. Pastaraisiais metais šios sistemos labai išstobulėjo, dabar jose galima stabiliai išlaikyti net pačius jautriausius parametrus tokius kaip pH, temperatūra ir t.t. Pagrindiniai parametrai, kuriuos reikia užtikrinti dumblių augimo metu yra šie: [5, 13].

- Tolygus maišymas, šviesaus ir tamsaus periodo užtikinimas, kuris turi keistis tiksliai nustatytu laiku.
- Tolygus aprūpinimas CO<sub>2</sub> dienos metu, kad būtų vydoma fotosintezė, ir O<sub>2</sub>, kad ląstelės galėtų naktį augti.
- Temperatūros kontrolė
- pH, CO<sub>2</sub> ir maistingųjų medžiagų koncentracija
- Derliaus nuėmimas, įvertinus, masės prieaugį ir reikalingos medžiagos (liuteino) koncentraciją.

Dabar jau yra sukurta programų, kurios visus šiuos parametrus gali užtikrinti ir atsiradus kenksmingiems išorės parametrams, juos pašalinti. [5 -13, 14 - 18].

### 1.7.1 Plokštieji ir vamzdiniai foto – bioreaktoriai

Plokštieji bioreaktoriai yra patogūs naudoti, dėl to, nes gali būti nukreipiami įvairiu kampu, kad būtų aprūpinama kultūra geresniu apšvietimu. Jie gali būti vertikalūs ir horizontalūs, taip pat juos galima maišyti naudojant orą. Nors ir maišymas naudojant orą yra efektyvesnis, tačiau jis yra ir brangesnis, palyginus su mechaniniu maišymu. Temperatūrai kontroliuoti dažniausiai yra naudojami vandens purkštuvai (vėsinimui), ir šilumokaičiai. [5]

Su plokščiaisiais foto - bioreaktoriais buvo atlikti bandymai, kuriuose buvo panaudoti 3 – 33 l bioreaktoriai, juose buvo auginama įvairių rūšių dumbliai, jie buvo auginami laboratorijos ir lauko sąlygomis. Laboratorijų sąlygomis augintų dumblių koncentracija buvo 10 – 16 g l<sup>-1</sup>, o prieaugis buvo 1,5 g l<sup>-1</sup>, palyginus su atviromis augimo sistemomis tūrio prieaugis vidutiniškai yra apie 0,8 g l<sup>-1</sup>. [5]



1.11 pav. Plokštieji foto - bioreaktoriai

Vamzdiniai foto - bioreaktoriai yra paprastesnės ir pigesnės konstrukcijos, kurie dažniausiai yra gaminami iš stiklo arba plastiko, siurblių pagalba dumblių kultūra yra užpildomi bioreaktoriai, siurblių pagalba jie yra ir maišomi. Neigiama yra tai, kad kultūrą auginant tokiuose bioreaktoriuose sunkiau aprūpinti saulės energija, todėl reikia papildomų energijos šaltinių. [5]

2010 metais Ispanijoje, buvo sukonstruotas 4000l horizontalusis foto - bioreaktorius, jis buvo pagamintas iš *Pleksiglas* medžiagos, vamzdis siekė 400 m ir su 10 cm storio sienelėmis, jis specialiai yra pritaikytas auginti dumbliams, kurie turi didelį liuteino kiekį, tačiau iškilo problema su maišymu, todėl šis foto - bioreaktorius buvo patobulintas. Dabar toks foto - bioreaktorius yra sudarytas iš horizontalių vamzdelių pagamintų iš to pačios medžiagos, jų sienelės

storis siekia 9 cm, tūris buvo po 2,8 m<sup>3</sup>, o ilgis sutrumpėjo iki 20 m, tarpusavyje jie yra sujungti į 3,2 m aukščio vertikalių darinių, todėl galima ne tik užtikrinti maišymą, tačiau ir sumažinti energijos kaštus. Masės prieaugis yra apie 20g l<sup>-1</sup>, o tikslinio produkto apie 0,4 g l<sup>-1</sup> per dieną. [3 - 5].



1.6 pav Vamzdiniai foto – bioreaktoriai

## 1.9 Mikrodumблиų auginimo sąlygos

Pagrindiniai augimo parametrai yra: temperatūra, šviesa, druskų koncentracija, pH, mikroelementai.

Temperatūra ir šviesa yra pagrindiniai augimo parametrai, norint užtikrinti didelį biomasės prieaugį, o taip pat ir vertingųjų produktų esančių dumbliuose susidarymą, reikia nustatyti optimalias augimo sąlygas. Buvo atlikti tyrimai su *Chlorella vulgaris* dumbliu, temperatūra buvo sumažinta nuo 30 iki 12<sup>0</sup>C, buvo pastebėta dideli lipidų ir kitų vertingųjų produktų kiekio sumažėjimai. Tai galima paaiškinti tuo, kad daugelis vertingųjų produktų yra ląstelių membranose, o jos greičiausiai sureaguoja į pasikeitusią aplinką. Tačiau yra ir išimčių, rudieji dumbliai yra prisitaikę augti ir žemesnėse temperatūrose, tačiau ir jų gaunamų vertingųjų produktų kiekis yra mažesnis. Šviesos trūkumas, taip pat kaip ir temperatūros, turi didelį įtaką produktų susidarymui, tačiau ši taisyklė taip pat turi išimtį, nes kaip kurios riebalų rūgštys veikiant stipresnei

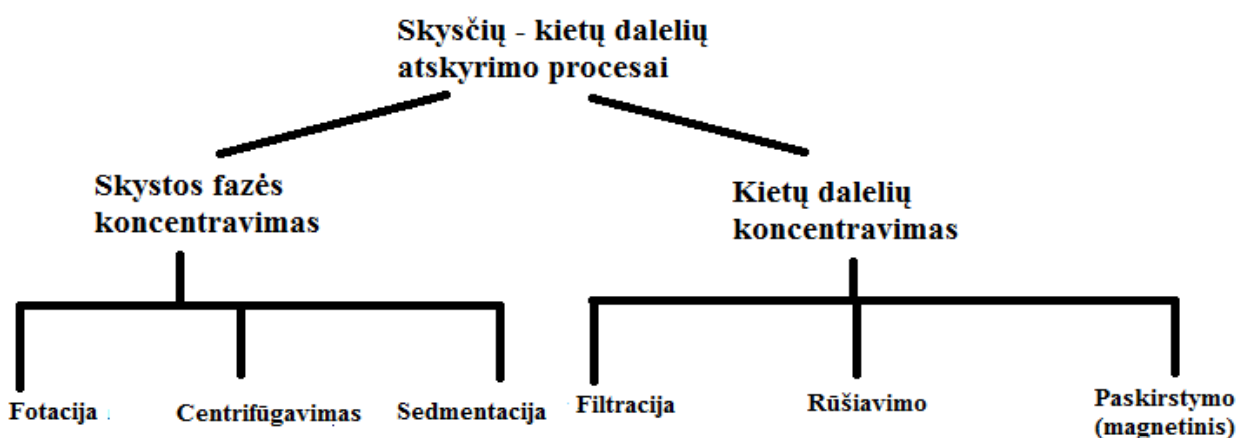
spinduliuotei oksiduojasi. Tačiau tamsusis periodas yra taip pat reikalingas, naudojant 12:12h, D:N režimą, buvo išsiaiškinta, kad toks ciklas sumažina monorūgščių ir nesočiųjų riebalų susidarymą. Tačiau liuteino susidarymui yra reikalinga intensyvesnis ir ilgesnis šviesos periodas, nes jo metu yra skatinama fotosintezė ir karotenoidų sintetinimas. [5 - 14].

Didesnės druskų koncentracijos skatina ląstelių augimą. Padidinus NaCl koncentraciją nuo 0,5M iki 1,0M *Dunaliella tertiolecta* kultūroje, buvo pastebėta biomasės padidėjimas nuo 60 iki 67%, taip pat padidėjo tarpląstelinis lipidų. Norėdami dar labiau padidinti biomasę, tokia druskos koncentracija buvo pridėta 0,5M viduryje log – fazės ir baigiantis kultivavimui buvo pridėta 1,0M NaCl, tai padėjo pasiekti 70 % prieaugį. [5 - 14]

Kitas svarbus parametras yra pH, kuris turi būti silpnai rūgštinis apie 6,5 net ir nedideli svyravimai, gali pradėti denatūruoti ląstelių baltymus. Mikroelementai aprūpina dumblius reikalingomis maisto medžiagomis, svarbiausi iš jų yra nitratai, fosfatai, gliukozės šaltinis. Padidinus gliukozės šaltinių galima gauti daugiau lipidų, kurie yra viena pagrindinių žaliavų gaminant biodyzelį. Tačiau visi mikroelementai yra vienodai svarbūs, svarbu tai, kad kol dar nepasiekta augimo fazė, reikia nedidinti koncentracijų, nes tai gali būti žalinga kultūrai. [5, 12, 14].

### 1.7 Dumблиų biomasės atskyrimas iš mitybinės terpės

Didžiausia problema su kuo susiduriama norint gauti gryną biomasę yra jos nuvandeninimas. Viena didžiausių problemų yra nuvandeninimas nes gaunama labai mažai sausos biomasės nuo 0,1 iki 4 g l<sup>-1</sup>. Norint atskirti biomasę nuo terpės reikia koncentruoti arba skystį, arba biomasę (žr. 1.13 pav.). [5,12].



1.13 pav. Pagrindiniai atskyrimo procesai

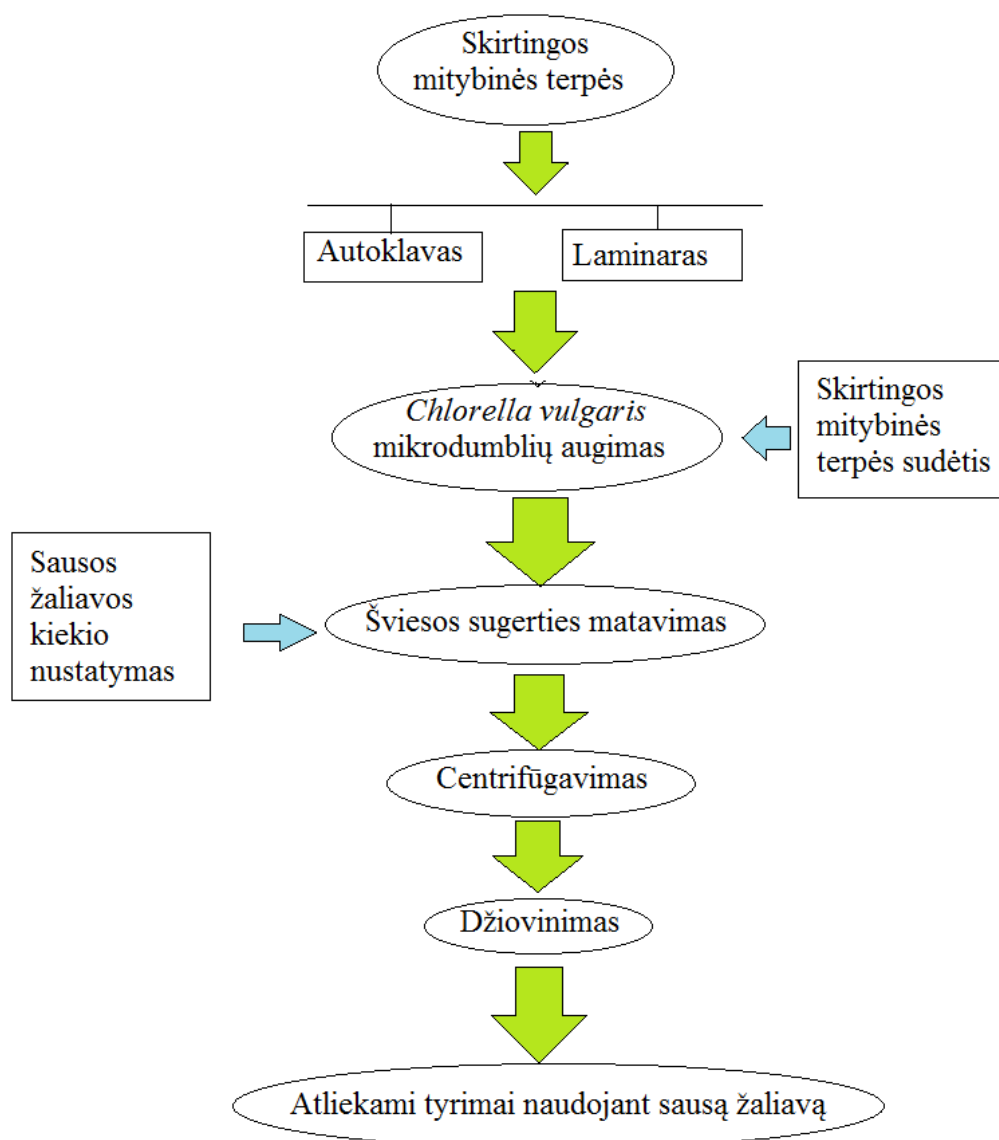
Dumblių gryninimas vyksta keturiomis pagrindinėmis stadijomis:

- Pirminis koncentravimas (išėmimas-surinkimas), jo metu dumblių biomasė yra išimama iš terpės. Gaunamas tirštos konsistencijos dumblas.
- Antra stadija (tirštinimas), šios stadijos metu koncentracija yra keliami iki 2 – 7%, pasirinktu atskyrimo metu (dažnai būna pasirenkama filtracija arba sedimentacija), gautas tirštas dumblas yra perduodamas tolesniam apdirbimui.
- Trečia stadija (nuvandeninimas) šios stadijos metu koncentracija pasiekia 15 – 20%, gaunama pastos konsistencija.
- Ketvirta stadija (džiovinimas), pašalina ir laisvą, ir surištą vandenį, padidina stabilumą, taip pat prailgina galiojimo laiką, po šios stadijos yra gaunamas 90 – 95% koncentratas.

Prieš gryninimą reikia biomasę paruošti, nes kitaip net pats jautriausias atskyrimas nebus naudingas, todėl yra taikoma koaguliacija ir flokuliacija. Koaguliacija apima priemaišų kietųjų dalelių sulipimus į didesnius gabalus, kurie gali būti lengviau pašalinami tolesniuose apdorojimo procesuose. Flokuliacija yra dribsnių ar gniutulų susidarymas dispersinėje fazėje, jo dėka yra stabilizuojamos dalelės, kurias po to lengviau atskirti. Koaguliacija ir flokuliacija galima atlikti: neorganiniu būdu, naudojant neorganines druskas pvz: geležies chloridą, geležies sulfatą. Galima naudoti ir organinius reagentus, dažniausiai naudojami polimerinio pagrindo su karboksilo, amino grupėmis. Tarp mikrodumblių galima ir autoflokuliacija (veikiant išoriniams parametrams savaiminis dalelių sulipimas), kurią dažniausiai įtakoja pasikeitęs pH. Dar galimos ultragarsinė, elektrinė koaguliacija ir flokuliacija. [5, 12, 13, 14].

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

### 2.1 *Chlorella vulgaris* dumblių auginimo schema



*Chlorella vulgaris* dumblių auginimui naudojamos keturios BBM (Bold's Basal Medium), BBM1, BBM2, BBM3 mitybinės terpės, kurių sudėtis skiriasi  $\text{NaNO}_3$  kiekiu (žr. 2.1 lentelė). Didelių įtaką augimui daro ir išorės veiksniai tokie kaip: šviesa, paduodamas oro srautas, maišymas, taip pat ir mitybinėje terpėje esantys azotas ir fosforas.[24,25,26].



2.1 lentelė. Maitinamųjų (Bold's Basal Medium) BBM, BBM1, BBM2. BBM3 terpių sudėtis

Reagentai	Reagentų kiekiai reikalingi 1 l terpės, ml	Koncentracija BBM terpėje, mg/l	Koncentracija BBM1 terpėje, mg/l	Koncentracija BBM2 terpėje, mg/l	Koncentracija BBM3 terpėje, mg/l
Tirpalas A					
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60	75	75	75	75
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		175	175	175	175
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		75	75	75	75
<b>NaNO<sub>3</sub></b>		<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>1500</b>
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O		25	25	25	25
NaCl		25	25	25	25
Tirpalas B					
EDTA	3	50	50	50	50
KOH		31	31	31	31
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		4,98	4,98	4,98	4,98
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> *		11,42	11,42	11,42	11,42
Tirpalas C					
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	1,412	1,412	1,412	1,412
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O		0,232	0,232	0,232	0,232
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O		0,252	0,252	0,252	0,252
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O		0,08	0,08	0,08	0,08
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O		0,192	0,192	0,192	0,192

Kiekvienas tirpalas (A, B, C) yra ruošiami atskirai, po to jų yra įpilama nurodyti kiekiai į 1 l terpės. Tirpalus išautoklavavus galima naudoti ilgą laiką. Paruoštos maitinamosios terpės pH turi būti 6,7, jei pH neatitinka tirpalai yra ruošiami iš naujo.[23 - 25].

## Autoklavas

Autoklavas yra skirtas sterilizuoti, cheminius indus ir reagentus. Autoklavas yra gaminamas iš tvirto metalo, jie būna įvairių tūrių ir diametrų. Juose yra izoliuotos durys arba dangtis, kurių pagalba yra sulaikomi vandens garai, kurie padidina slėgį autoklavo viduje. Autoklavas buvo naudotas mitybinėms terpėms ruošti (žr. 2.1.2 lentelę).

2.2 lentelė. Certoclav techniniai duomenys

Pavadinimas	Certoclav EL 12l
Tūris	12 litrų
Temperatūra / slėgis	140 °C – 2,7 bar 125 °C – 1,4 bar 121 °C – 1,2 bar 115 °C – 0,7 bar
Bandymo slėgis	4,1 bar
Ventiliacija	Nuolatinė, oro
Medžiaga	Aliuminis 3103, atitinka DIN 1725
Saugos įrankiai	Apsauga nuo slėgio
Maitinimo šaltinis	230 VAC, 50/60 Hz
Kaitinimo galia	1900 W
Temperatūros indikatorius	Aukšto tikslumo termometras
Slėgio indikatorius	Aukšto tikslumo monometras
Matmenys:	
Skersmuo	24 cm
Aukštis	40 cm
Įstrižainė	46,5 cm
Svoris	9 kg

Autoklavo ciklą sudaro: šildymas, slėgio susidarymas (apie 3 min.), sterilizacija (15-20 min.), atvėsimas, kuris priklauso nuo sterelinamos medžiagos. Stiklas yra išimamas praėjus maždaug 30 min, po slėgio sumažėjimo, skysčiai po 40 min. Mitybinės terpės buvo atoklavuojamos 2,7 bar slėgyje 140°C temperatūroje, 30 min. po autoklavavimo terpės yra perkeliamos į laminarą.

## Laminaras

Buvo naudotas TELSTAR BV - 100 vertikalaus oro srauto laminaras. Laminare yra naudojami aukšto efektyvumo HEPA filtrai, praėjus pro šiuos filtrus susidaro laminarinis oro srautas, kurio pagalba yra nusodinamos ore esančios dulkės, bakterijos ir kt. jos pašalinamos pro stalviršyje esančias skylutes. Šie laminarai yra gaminami iš aukštos kokybės nerūdijančio plieno, be to jie

gaminami kaip vientisas darinys, nėra sujunginėjami iš atskirų plieno lakštų, nes sujungimuose gali kauptis bakterijos, taip pat yra sunkiau dezinfekuoti. Laminaruose paprastai montuojamos UV lempos, kurios yra įjungiamos prieš darbo pradžią, kad būtų dezinfekuojama darbo aplinka. Laminare esantys instrumentai yra dezinfekuojami 70% etanoliu.

2.3 lentelė Laminaro charakteristikos

Laminaro BV-100 charakteristikos	Vienetai	Duomenys
Išoriniai matmentys	IxPxA	1565x845x1290
Vidiniai matmenys	IxPxA	1535x670x700
Oro debitas / Greitis	m <sup>3</sup> /h – m/s	1300 – 0,40
Galia / Svoris	kW / kg	1,0 / 140
Apšvietimas	lux	> 800
Triukšmo lygis	dB (A)	< 60
Filtrai	HEPA/UPLA H14	Efektyvumas: >99.99 %
Ventiliatoriai		Didelio efektyvumo su greičio regulatoriumi
Maitinimas		220 V – 50 Hz

## 2.2 Mikrodumblių *Chlorella vulgaris* auginimas

### 2.2.1 Skirtinga mitybinės terpės sudėtis

Mikrodumblių auginimui buvo naudotos 200ml ir 1l kolbos. *C. vulgaris* į 200 ml kolbas buvo įdėta 10 ml kultūros, o į 1l kolbas - 50ml. Viso augimo metu buvo pastovi temperatūra ~22°C. Kaip šviesos šaltinis buvo naudojamos liuminescencinės lempos, skirtingų koncentracijų NaNO<sub>3</sub> mitybinės terpės (0,25g/L; 0,5g/L; 1,0g/L; 1,5g/L). Oro srauto tiekimui buvo naudojamos akvariumui skirtos "MOUSE" pompos. 200 ml kolboms buvo tiekiamas ~ 0,15 l/min. oro srautas, o 1L kolboms ~ 0,8 l/min. Oro srauto išvalymui buvo naudojami 0,22 mikrometrų švirkštiniai filtrai. Dumblių auginimas buvo atliekamas 8 savaites, po to visa terpė buvo centrifuguojama ir išgauta biomasė buvo džiovinama 37°C temperatūroje. Iš išdžiovintos biomasės buvo atliekami tyrimai. [25].



2.1 pav. Mikrodumblių auginimo aparatūra



2.2 pav. Mikrodumblių auginimo aparatūra

### 2.2.2 Šviesos sugerties matavimas

Šviesos sugerties matavimui naudojamas spektrofotometras. Šio matavimo tikslas nustatyti dumblių augimo intensyvumą, kiekvieną augimo savaitę buvo imamas mėginys matavimui, kuris matuotas prie 440nm bangos ilgio.

### 2.2.3 Sausos žaliavos kiekio nustatymas

Norint nustatyti sausos dumblių medžiagos kiekį matuojame šviesos sugertį esant 658 nm, matavimui yra naudojamas spektrofotometras. Tarp šviesos sugerties esančios bangos ilgio ir sausos žaliavos biomasės yra tiesinė priklausomybė, pagal kurią galima apskaičiuoti teorinių išdžiovintų mikrodumblių masę (g/l), tam naudojama žemiau pateikta formulė.[27]

$$\text{Sausos žaliavos masė } \left(\frac{g}{l}\right) = 0,4818 \cdot A_{658}; \quad R^2 = 0,9962$$

Čia:  $A_{658}$  – šviesos sugertis prie 658 nm bangos ilgyje;

## 2.2 Chlorofilo *a* ir *b* bei karotenoidų įvertinimas

Chlorofilo *a* ir *b* bei karotenoidų nustatymas dumblių audiniuose yra vertinamas pagal optinį tankį jį matuojant spektrofotometru esant skirtingiems bangos ilgiams:

- Chlorofilui *a* (662 nm);
- Chlorofilui *b* (644 nm);
- Karotenoidams (441 nm).

#### Darbo eiga

Paimama 0,5 g sausos *Chlorella vulgaris* dumblių biomasės ir susmulkinama grūstuvėlyje. Įpilta 1,5 ml 50 %  $C_2H_5OH$ , gerai sumaišome ir filtruojame. Dumblių ekstraktai praskiedžiami etanoliu tol, kol šviesos sugertis yra nuo 0,1 A iki 0,8 A. Filtratai supilami į matavimo kiuvetę ir matavimai atliekami spektrofotometru esant nustatytiems bangų ilgiams. [21]

### Pigmentų koncentracija (mg l<sup>-1</sup>) apskaičiuota pagal formules:

Chlorofilo *a* koncentracija (mg/l<sup>-1</sup>):

$$C_a = 9,784 \cdot D_{662} - 0,99 \cdot D_{644};$$

Chlorofilo *b* koncentracija (mg/l<sup>-1</sup>):

$$C_b = 21,426 \cdot D_{644} - 4,65 \cdot D_{662};$$

$$C_a + C_b = 5,134 \cdot D_{662} + 20,436 \cdot D_{644};$$

Karotinoidų koncentracija (mg/l<sup>-1</sup>):

$$C_{karotinoidai} = 4,695 \cdot D_{441} - 0,268 \cdot (C_a + C_b);$$

**Pigmentų kiekis mg/100g apskaičiuotas:**

$$X = \frac{C \cdot V \cdot V_2 \cdot 100}{n \cdot V_1 \cdot 1000}$$

Čia: C – pigmentų koncentracija, mg/l

V – pradinis ekstrakto tūris, ml

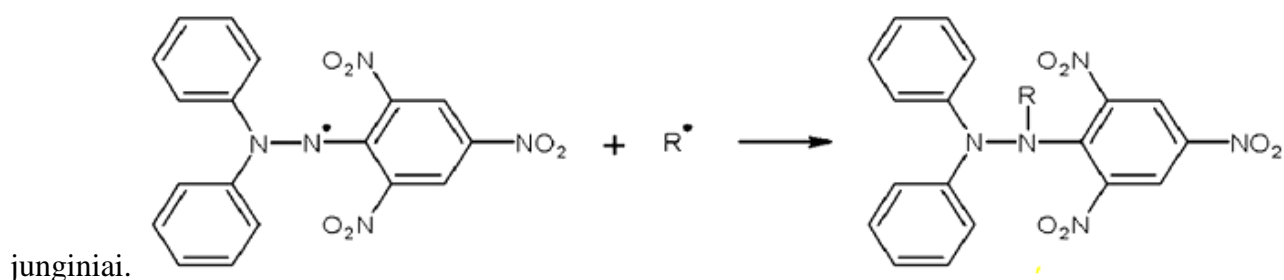
V<sub>1</sub> – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui.

V<sub>2</sub> – praskiesto ekstrakto tūris, ml

n – dumblio masė g .

### 2.3 Antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu

Dumblių antioksidacinis aktyvumas įvertintas matuojant, kiek procentų stabilus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo neutraluoja fenoliniai



2.3 pav. Radikalo DPPH redukcijos reakcija su antioksidantu

Fenoliniams junginiam būdingas antioksidacinis aktyvumas dėl jų gebėjimo išaktyvinti laisvuosius radikalus. Reakcijos metu antioksidantas atiduoda vandenilį ir taip aktyvina laisvuosiu radikalus ir jie tampa stabiliais DPPH – H tipo junginiais.[22]

Ant 0,1 g susmulkintų *Chlorella vulgaris* mikrodublių žaliavos užpilama 1 ml metanolio ir homogenizuota 10 min. Tada viskas centrifuguojama, 9000 aps/min 10 minučių ir supernatantas surinktas. Gautas centrifūgatas sumaišomas ir po 15 minučių laikymo tamsoje pamatuotas spektrofotometru tirpalo šviesos sugertis esant 515 nm bangos ilgiui.[22]

#### Palyginamojo tirpalo ruošimas

Į mėgintuvėlį įpilama 0,077 ml metanolio ir 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Etaloninis DPPH tirpalas paruošiamas 0,0024 g DPPH radikalo tirpinant metanolyje 100 ml talpos matavimo kolbutėje.

*Chlorella vulgaris* dumblių antioksidantų kiekis apskaičiuotas pagal 7 formulę:

$$\% \text{ slopinimas} = \frac{[(A)_B - A_A]}{A_B} \cdot 100$$

Čia:  $A_B$  – palyginamojo tirpalo absorbcijos dydis;

$A_A$  – tiriamojo tirpalo absorbcijos dydis.

### **2.4 Antioksidacinis aktyvumas mikrodumbliuose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną**

Šis metodas nustato junginio redukuojančias savybes, kuris paremtas  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ pavirtimu į  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ (mėlyna spalva) esant 593 nm.

0,1 g sausos dumblių biomasės ekstrahuojama metanolyje (5 ml) 45 °C, 0,5 h. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min ir naudojamas tyrimams. 3 ml FRAP reagento (300 mM acetato buferis (pH=3,6), 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s- triazinas) ištirpinamas 40 mmol/l HCl,  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mmol/l). FRAP reagentas ruošiamas su 25 ml 300 mM acetato buferio, 2,5 ml 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazino) ir 2,5 ml  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mmol/l)) yra sumaišomas su mėginias 100 μL. Reakcijos mišinys matuojamas esant 593 nm spektrofotometriškai pradžioje ir po 6 minučių. [23]

### **2.5 Redukcinių savybių nustatymas *C. vulgaris* dumbliuose**

Išdžiovinta augalinė medžiaga (0,1 g) ekstrahuojama metanolyje (5 ml) 45°C 0,5 h. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min ir naudojamas tyrimams.

Į 1 ml skirtingų koncentracijų ekstraktų mėginius, supilama 2,5 ml 0,2 M fosfatinio buferio bei 2,5 ml  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Sumaišoma ir inkubuojama 50 °C temperatūroje 20 min. Po to pridedama 2,5 ml 10 % trichloracto rūgšties ir sumaišoma. Jei yra nuosėdų, centrifuguojama 10 min.

Viršutinio tirpalo (2,5 ml) sumaišoma su 2,5 ml distiliuotu vandeniu ir 0,5 ml 0,1 %  $FeCl_3$ . Mėginiai išmatuojami esant 700 nm bangos ilgiui. Didesnė šviesos sugertis reiškia didesnes redukcines savybes. [20]

## **2.6 Bendras fenolinių junginių ir taninų nustatymas Folino-Kiokalto metodu**

Sausa, susmulkinta augalinė medžiaga (0,05 g) yra pasveriamą ir įdedama į mėgintuvėlį tada įpilama 10 ml acetono (70 %) ir sumaišoma, termostatuojamajame kratytuve 20 min kambario temperatūroje. Vėliau centrifuguojama 10 min 9000 aps 4 °C. Supernatantas surenkamas ir laikomas lede.[6]

### Fenolinių junginių kiekio nustatymas

Paimama paruošto ekstrakto ir praskiedžiama vandeniu iki 500  $\mu$ l. Pridedama į jį 250  $\mu$ l Folino-Kiokalto reagento ir tada įpilama 1,25 ml natrio karbonato tirpalo. Sumaišoma ir matuojama absorbcija tirpalo, esant 725 nm po 40 min. laikyto tamsoje. Apskaičiuojamas bendras fenolių kiekis pagal tanino rūgštį (pagal kalibravimo kreivę). [6]

### Taninų nustatymas

Pasveriamą 100 mg PVPP stikliniame mėgintuvėlyje. Pridedama 1 ml distiliuoto vandens ir 1 ml pavyzdžio ekstrakto. Maišoma ir laikomas mėgintuvėlis 4<sup>0</sup>C 15 min., maišyti ir centrifuguojama 9000 aps 10 min. Surenkamas supernatantas. Šis supernatantas turi tik paprastus fenolius.

Bendras fenolių kiekis mg/100mg apskaičiuojamas iš formulės:

$$X = aV \times 100/nV_1$$

a – tanino rūgšties koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg;  
V – pradinis ekstrakto tūris ml;  
V<sub>1</sub> – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;  
n – augalinė masė, mg

Netanininiai fenoliai mg/100mg:

$$X = aV \times 100/nV_1$$

a – tanino rūgšties koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg;  
V - pradinis ekstrakto tūris ml;  
V<sub>1</sub>- pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;  
n – augalinė masė, mg



Bendras fenolių kiekis (%) – netaniniai fenoliai (%)=Taninai (%). [6]

## 2.7 Baltymų kiekio nustatymas mikrodumbliuose

Baltymų kiekio nustatymas remiasi Bradfordo metodu. Metodas pagrįstas specifine baltymų sąveika su Kumasi briliantiniu mėliu ir susidariusio komplekso koncentracijos matavimu spektrofotometriškai esant 595 nm bangos ilgiui.

Išdžiovinta mikrodumblių biomasė, pasveriami 0,05 g ir panaudojant buferius išekstrahuojami baltymai. Dumbliai užpilami visais buferiais (1-5) po 1 ml ir maišomi vieną valandą bei po to nucentrifuguojami 9000 aps/min 20 min 4 °C. Po centrifugavimo paimame 100 µl ekstrakto, pridedame Bradfordo reagento (2 ml). Po 2 minučių matuojame šviesos sugertį esant 595 nm bangos ilgiui.

Baltymų išskyrimui naudojami buferiai:

- 1) 0,2 M Glicinas – HCl; pH=2,6
- 2) 0,2 M Natrio acetatas (pH= 4,0)
- 3) 0,2 M Natrio acetatas (pH= 6,0)
- 4) 0,2 M Tris – HCl; pH=8,0
- 5) 0,1 M Natrio boratas; pH=10

Į visus buferius pridedame 0,15 M NaCl.

Bendras baltymų kiekis X (mg/100 mg) apskaičiuojamas iš formulės:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n \cdot V_1}$$

Čia:

a – baltymo koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

V<sub>1</sub> – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

n – augalinė masė, mg.[ 23]

### **3. Tyrimo rezultatai ir jų aptarimas**

#### **3.1 Tiriamoji medžiaga**

Magistrinio darbo tyrimai buvo atlikami Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakultete Biotechnologijos laboratorijoje.

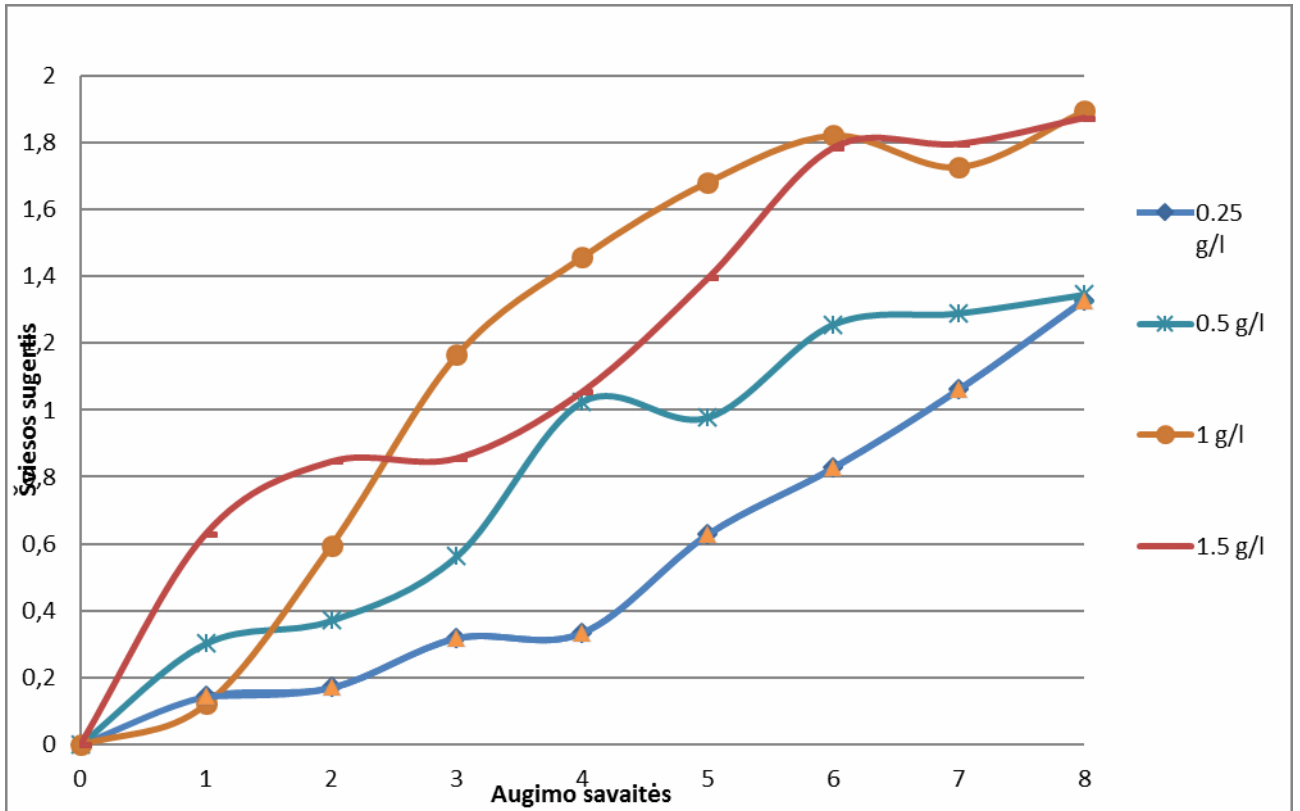
Tiriamoji medžiaga: *Chlorella vulgaris* rūšies mikrodumbliai, kurie buvo gauti iš Vilniaus universiteto. Norint nustatyti geriausias mikrodumblių auginimo sąlygas buvo atliktas tyrimas, naudojant skirtingus nitratų kiekius maitinamoje terpėje.

#### **3.2 Mikrodumblių augimo intensyvumo įvertinimas**

Auginimo intensyvumas buvo nustatinėjamas šviesos sugerties matavimu esant 440 nm bangos ilgiui. Tiriamasis mėginys iš auginimo kolbų buvo paimamas nustatytu laiku. Atliekant tyrimą mikrodumbliai buvo auginami 8 savaites, 0,2l ir 1l kolbose, į jas buvo tiekiamas ~0,15 l/min oro srautas ir naudojama skirtingos NaNO<sub>3</sub> koncentracijas (0,25, 0,5, 1, 1,5 g/l) maitinamojoje terpėje.

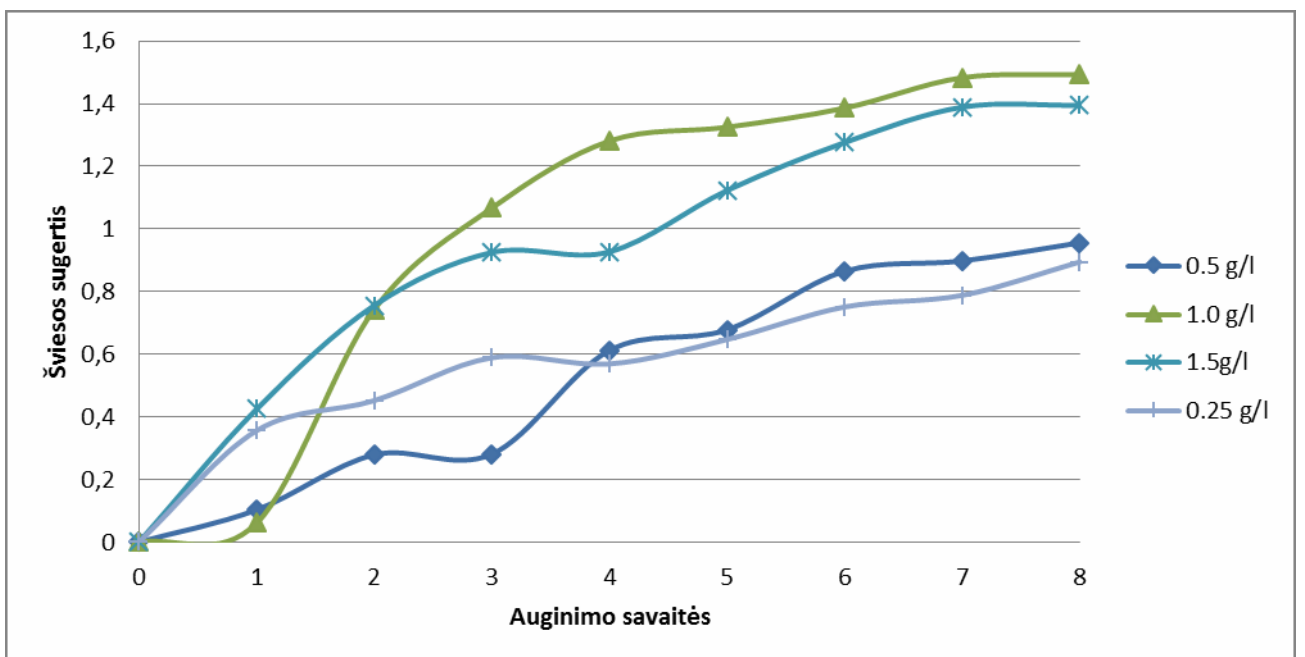
Kiekvieną savaitę, augimo terpė buvo papildoma mitybinių terpių tirpalais ( 0,2l kolbose po 20ml A tirpalo, B - 2ml ir C – 0,2ml, į 1l 100ml A tirpalo, B tirpalo 10ml, C-1ml), taip pat kas dvi savaites buvo papildomos skirtingų koncentracijų terpėmis, į 0,2l kolbas buvo pilama po 30ml terpės į 1l kolbas buvo pilama po 150ml. Tai buvo atliekama, nes tyrimo metu buvo pastebėta, kad sparčiai mažėja *Chlorella vulgaris* dumblių biomasės prieaugis.

Iš grafiko 3.1 pav. matyti, kad didžiausias biomasės prieaugis buvo pasiektas auginant, kai NaNO<sub>3</sub> koncentracija buvo 1 g/l, nedaug skyrėsi ir 1,5 g/l koncentracijos prieaugis, o mažiausias buvo kai koncentracija buvo 0,25 g/l.



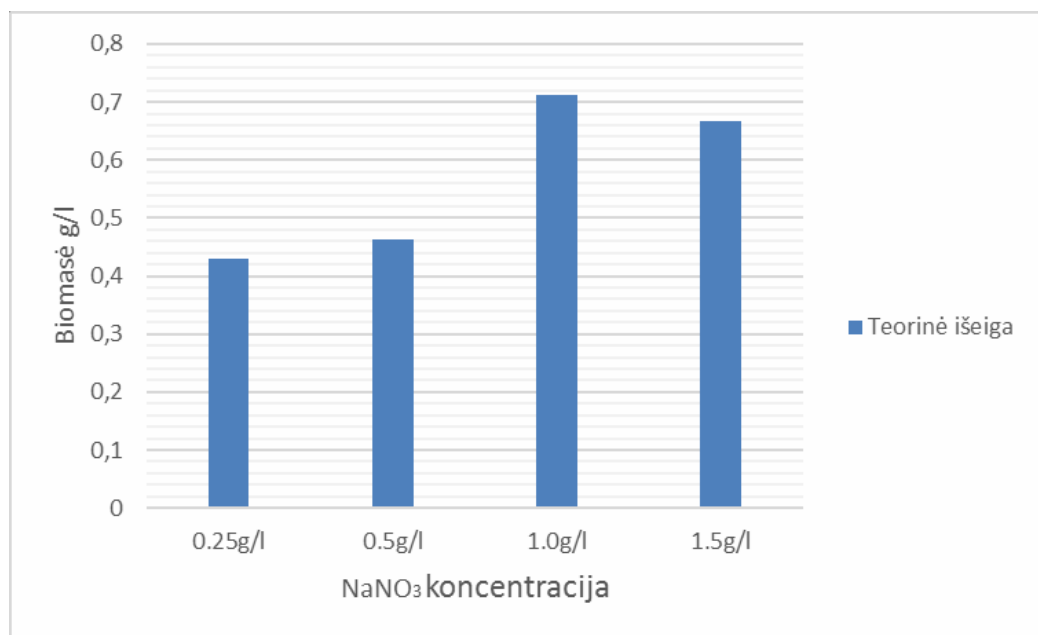
3.1 pav. Teorinis *Chlorella vulgaris* biomasės priaugis auginant juos 8 savaites.

Kaip kito teorinis išdžiovintos biomasės kiekis matuojant šviesos sugertį prie 658 nm, pateikta 3.2 pav. Iš gautų duomenų matyti, kad didžiausias teorinis sausos medžiagos kiekis buvo 1 g/l ( $\text{NaNO}_3$  koncentracijos), o mažiausias prie 0,25 g/l.

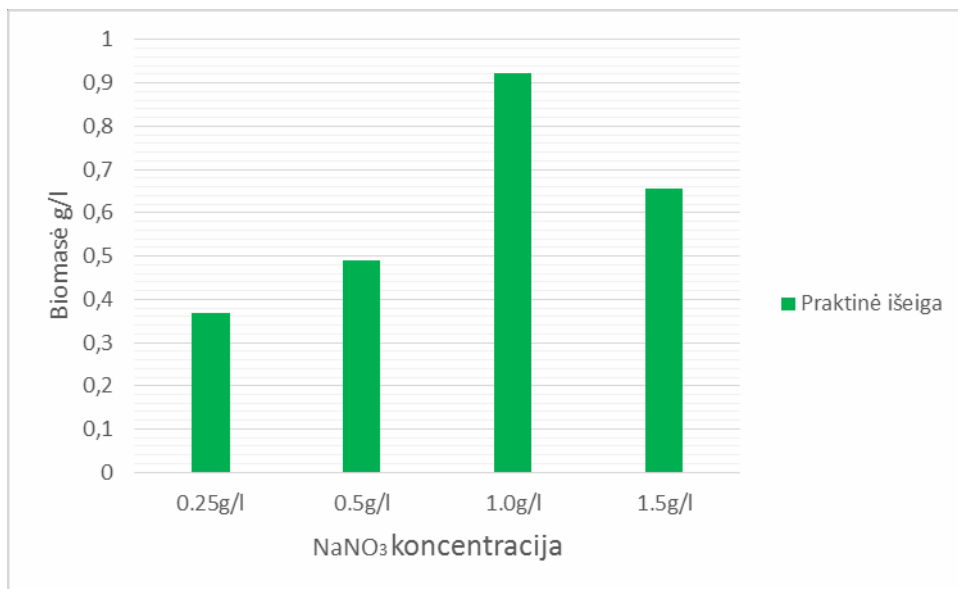


3.2 pav. *Chlorella vulgaris* teorinis sausos žaliavos biomasės priaugis

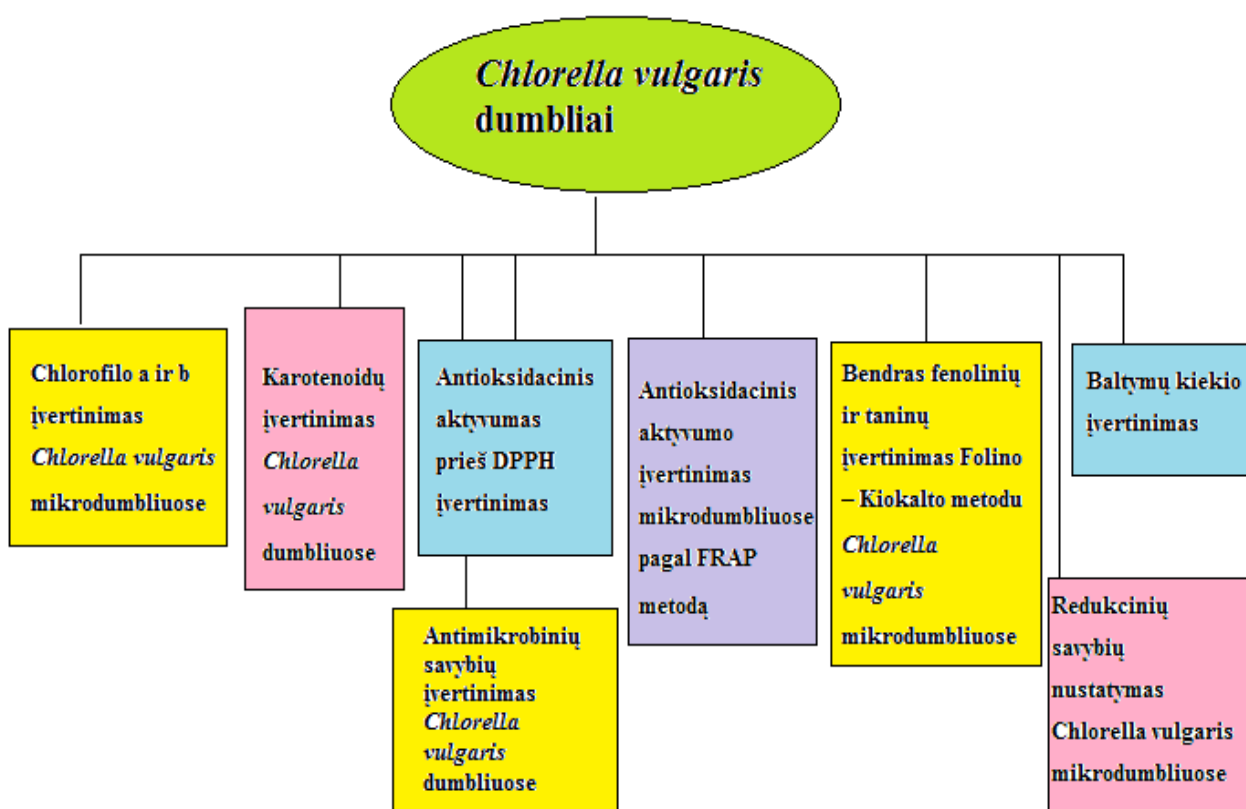
3.3 pav. ir pav 3.4 yra pateikti biomasės kiekio duomenys gauti po 8 savaičių auginimo. Apskaičiuojant juos teoriškai ir pasvėrus jau išdžiovintą biomasę praktiškai. Remiantis duomenimis galime pasakyti, kad didžiausias prieaugis buvo, kai  $\text{NaNO}_3$  koncentracija siekė 1g/l (teorinė išeiga – 0,713g/l, praktinė išeiga – 0,923g/l), o mažiausia kai koncentracija buvo 0,25g/l (0,429g/l – teorinė išeiga, 0,369g/l – praktinė išeiga). Kaip kurių koncentracijų teoriniai skaičiavimai yra mažesni už praktinius, taip atsitiko dėl skaičiavimų paklaidų, teoriniais skaičiavimais pasitikėti negalima (vertinant reikėtų remtis praktiškai gauta biomase), tačiau tokie skaičiavimai padeda analizuoti.



3.3 pav Teorinis biomasės prieaugio palyginimas po 8 augimo savaičių



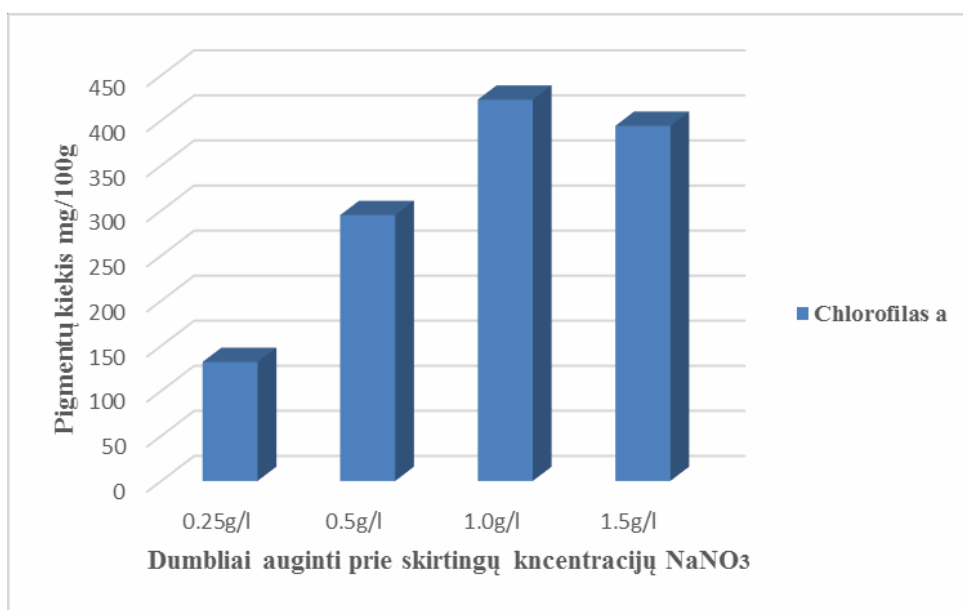
3.4 pav. Praktinis biomasės prieaugio palyginimas po 8 augimo savaičių



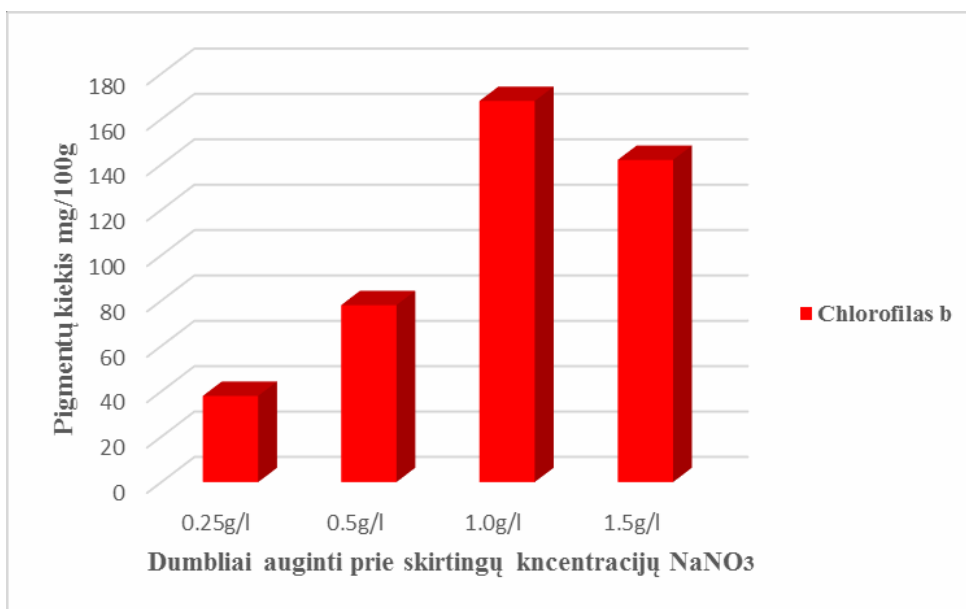
3.5 pav. Atlikti tyrimai naudojant *Chlorella vulgaris* mikrodumbliu

### 3.3 Chlorofilo *a* ir *b* įvertinimas *Chlorella vulgaris* mikrodumблиuose

Tyrimas atliktas po 8 mikrodumблиų augimo savaitių. Tyrimui naudojami *Chlorella vulgaris* išdžiovinta susmulkinta biomasė skirtingų  $\text{NaNO}_3$  koncentracijų mitybinėse terpėse auginti mikrodumблиai. Rezultatai yra pateikiami 3.6 pav ir 3.7 pav.



3.6 pav. Pigmentų kiekis mg/100g



3.7 pav. Pigmentų kiekis mg/100g

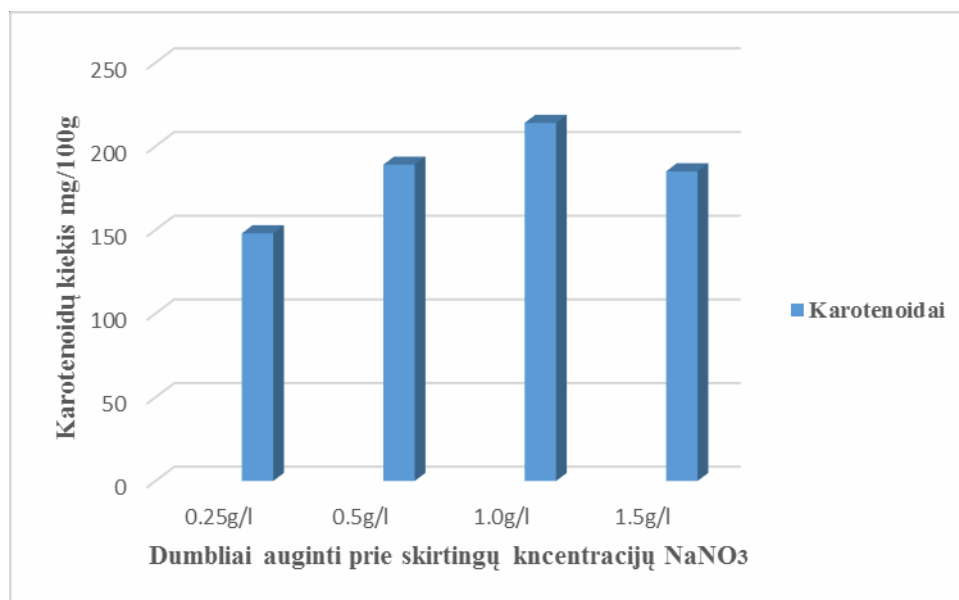
Didžiausiais pigmentų kiekiais pasižymėjo BBM2 mitybinėje terpėje auginti dumблиai (chlorofilas a - 423mg/100g, chlorofilas b – 168mg/100g), o mažiausiais BBM terpėje auginti dumблиai.

### 3.4 Karotenoidų įvertinimas *Chlorella vulgaris* dumbliuose

Tyrimas atliktas po 8 mikrodumblių augimo savaitių. Tyrimui naudojami *Chlorella vulgaris* skirtingų koncentracijų NaNO<sub>3</sub> mitybinėse terpėse auginti dumbliai. Tyrimui buvo paimta po 0,5g dumblių biomasės. Gauti rezultatai pateikiami 3.1 lentelėje ir 3.8 pav.

3.1 lentelė. Gauti karotenoidų kiekiai lentelėje pateikiami mg/100g.

Skirtingos NaNO <sub>3</sub> koncentracijos	Rezultatai
0,25 g/l	38 mg/100g
0,5 g/l	78 mg/100g
1,0 g/l	168 mg/100g
1,5 g/l	142 mg/100g



3.8 pav. Karotenoidų kiekis

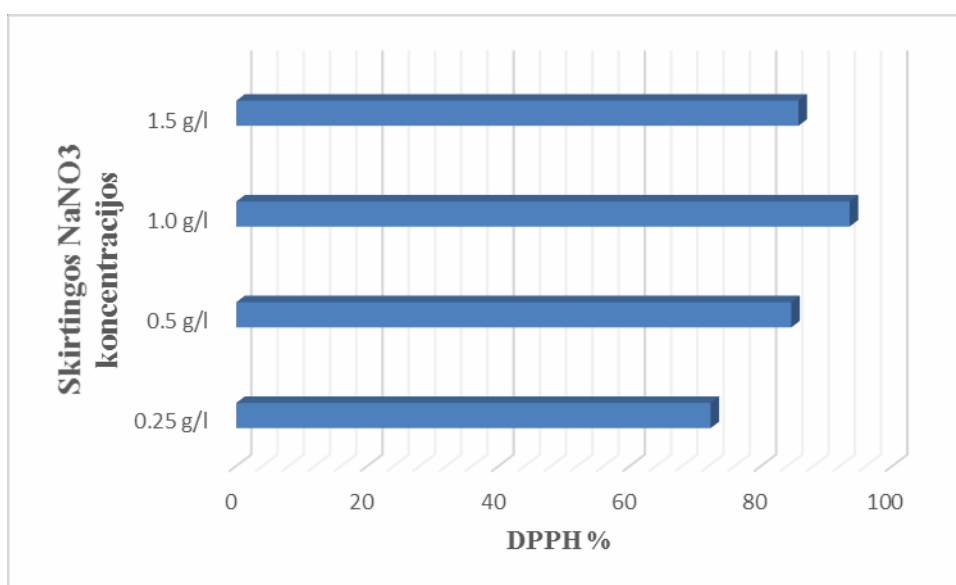
Iš gautų rezultatų matyti, kad didžiausiu karotenoidų kiekiu pasižymėjo dumbliai, kurie buvo auginti 1,0 g/l koncentracijos NaNO<sub>3</sub> mitybinėje terpėje (214 mg/100g), o mažiausiai 0,25g/l koncentracijos mitybinėje terpėje (148 mg/100g).

### 3.5 Antioksidacinio aktyvumo DPPH metodu įvertinimas

Tyrimui buvo paimta po 0.1 g skirtingose  $\text{NaNO}_3$  koncentracijose augintų dumblių išdžiovintos ir susmulkintos biomasės. Po tyrimo buvo išmatuota šviesos sugertis ir pagal formulę apskaičiuota s antioksidantų kiekis.

3.2 lentelė. Apskaičiuotas DPPH slopinimas

Skirtingos $\text{NaNO}_3$ koncentracijos	Rezultatai %
0.25 g/l	72.3
0.5 g/l	84.6
1.0 g/l	93.5
1.5 g/l	85.7



3.9 pav. Apskaičiuotas DPPH % slopinimas, prie skirtingų  $\text{NaNO}_3$  koncentracijų maitinamojoje terpėje

Atlikus tyrimą buvo (žr. 3.2 lentelė ir 3.9 pav) nustatyta, kad didžiausias antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo dumbliai auginti BBM2 terpėje, o mažiausiu BBM terpėje auginti dmbliai.



### 3.6 Antioksidacinis aktyvumo įvertinimas mikrodumbliuose pagal FRAP metodą

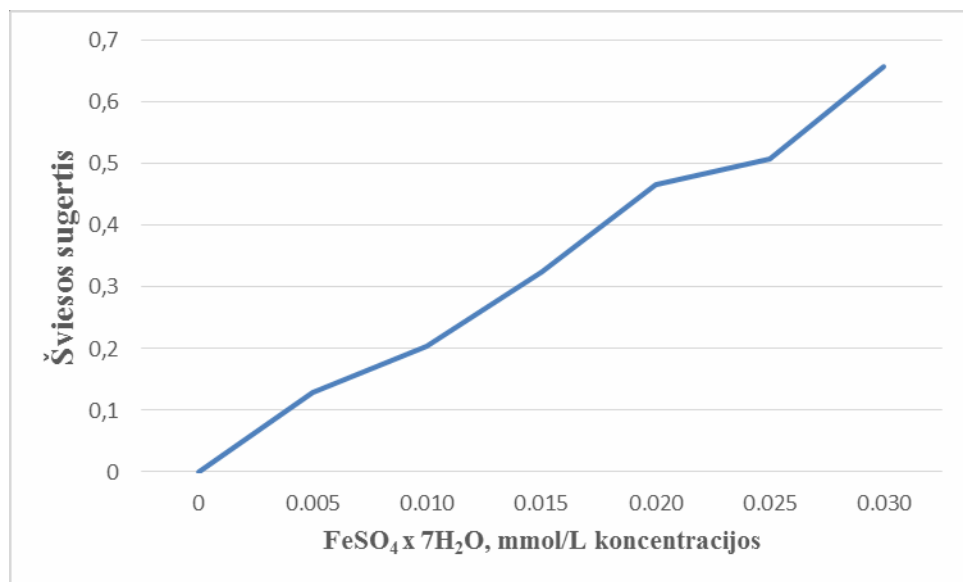
Tyrimui paimta po 0,1 g *Chlorella vulgaris* mikrodumblių išdžiovintos biomasės, augintos su skirtingomis mitybinėmis terpėmis, esant skirtingom  $\text{NaNO}_3$  koncentracijomis.

Atlikus tyrimą pagal kalibracinę kreivę buvo apskaičiuotas antioksidacinis aktyvumas, gauti rezultatai pateikti 3.4 lentelėje ir pavaizduoti 3.11 paveiksle.

Kalibravimo kreivė ruošiama:  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (5, 10, 15, 20; 25  $\mu\text{mol/L}$ ). Reikšmė apskaičiuojama pagal kalibravimo kreivę  $\mu\text{mol/L Fe(II)/L}$ . Į  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  taip pat įpilame FRAP reagento.

3.3 lentelė. Kalibravimo kreivė kreivė skirta, antioksidaciniam aktyvumui įvertinti

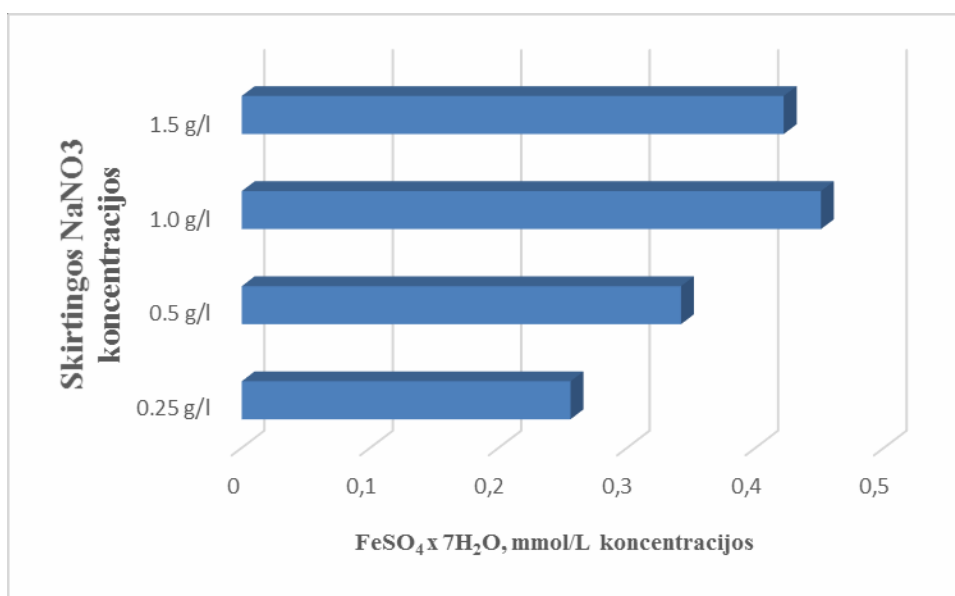
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , mmol/L	0,005	0,010	0,015	0,020	0,025	0,030
Sugertis esant 593nm	0,129	0,205	0,325	0,467	0,508	0,658



3.10 pav Kalibravimo kreivė

3.4 lentelė. Atlikus tyrimą gauti rezultatai.

Skirtingos NaNO <sub>3</sub> koncentracijos	Rezultatai
0,25 g/l	0,256
0,5 g/l	0,342
1,0 g/l	0,451
1,5 g/l	0,422



3.11 pav. Rezultatai gauti atlikus tyrimą FRAP metodu

Iš gautų tyrimo rezultatų matyti, kad didžiausias antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP buvo nustatytas dumbliuose, kurie buvo auginti 1,0 g/l NaNO<sub>3</sub> mitybinėje terpėje, o mažiausias kiekis esant 0,25 g/l koncentracijai

### 3.7 Bendras fenolinių ir taninų įvertinimas Folino – Kiokalto metodu *Chlorella vulgaris* mikrodumbliuose

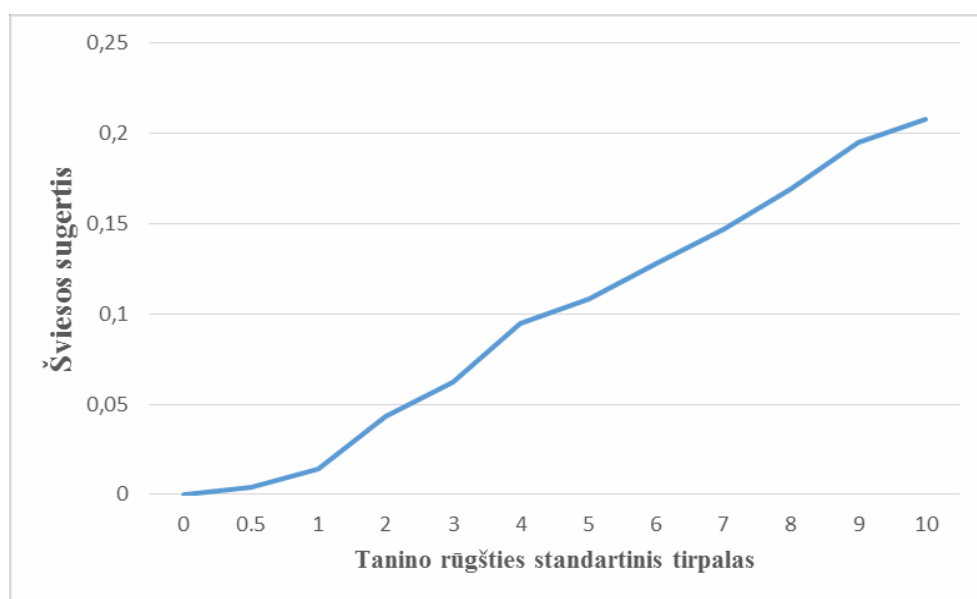
Tyrimui atlikti buvo paimta po 0,1g skirtinguose NaNO<sub>3</sub> koncentracijų mitybinėse terpėse augintų išdžiovintos ir susmulkintos mikrodumblių biomasės. Atlikus tyrimus buvo gauti rezultatai, kurie pateikti 3.6 ir 3.7 lentelėse.

#### Kalibravimo kreivės sudarymas

Paimama 0; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 µl standartinio tanino rūgšties tirpalo, tada įpilame distiliuoto vandens, kad bendras kiekis mėgintuvėliuose būtų 500 µl. Į šį tirpalą įpilame 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml natrio karbonato tirpalo. Sumaišome ir inkubuojame kambario temperatūroje tamsoje. Po 40 min matuojame šviesos sugertį.

3.5 lentelė. Kalibravimo kreivės sudarymas naudojant tanino rūgšties tirpalą ir matuojant šviesos sugertį esant 725 nm bangos ilgiui.

0,5	0,004
1,0	0,014
2,0	0,043
3,0	0,062
4,0	0,095
5,0	0,108
6,0	0,128



3.12 pav Kalibracinė kreivė

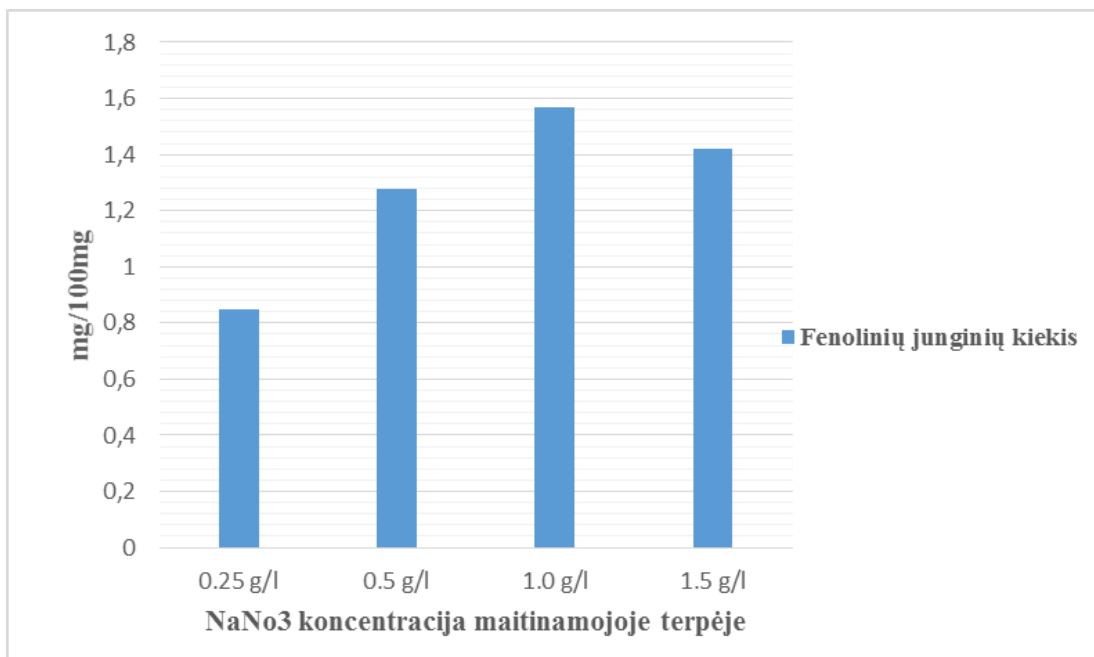
3.6 lentelė. Fenolinių junginių kiekis mg/100mg

Skirtingos NaNO <sub>3</sub> koncentracijos	Rezultatai
0,25 g/l	0,848 mg/100mg
0,5 g/l	1,275 mg/100mg
1,0 g/l	1,569 mg/100mg
1,5 g/l	1,422 mg/100mg

3.7 lentelė. Tanių kiekis mg/100mg

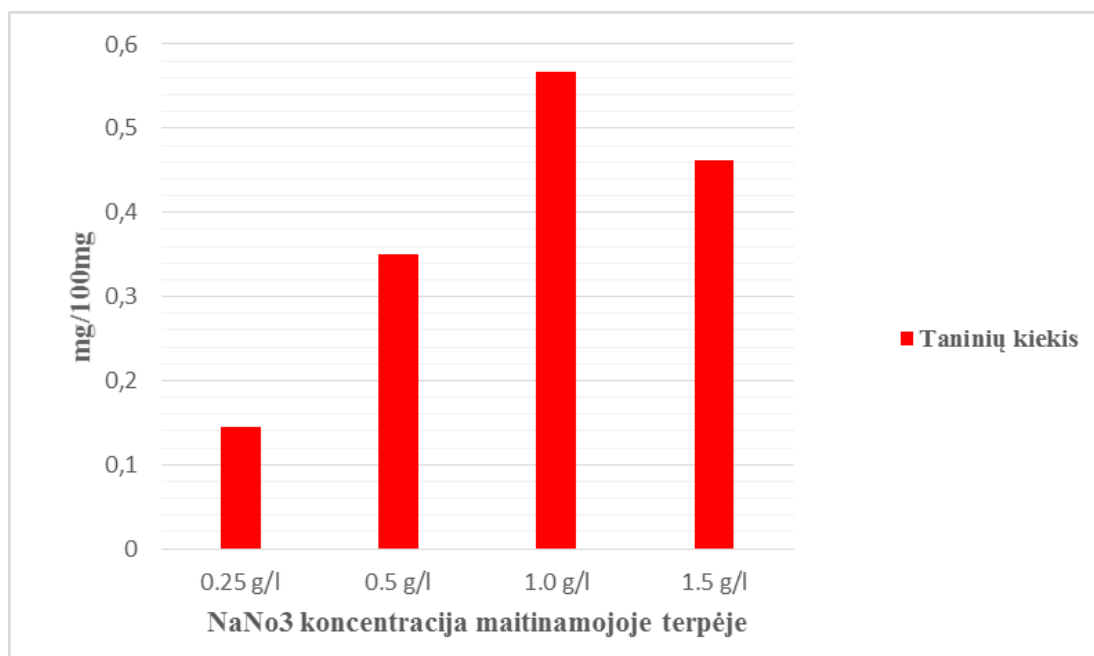
Skirtingos NaNO <sub>3</sub> koncentracijos	Rezultatai
0,25 g/l	0,145 mg/100mg
0,5 g/l	0,351 mg/100mg
1,0 g/l	0,567 mg/100mg
1,5 g/l	0,462 mg/100mg

Iš gautų rezultatų buvo nubraižytos diagramos žr. 3.13 ir 3.14 pav.



3.13 pav. Gautų fenolinių junginių kiekis mg/100mg, gautas iš dumblių augintų skirtingose NaNO<sub>3</sub> koncentracijose

Iš gautų rezultatų matyti, kad didžiausiomis fenolinių junginių ir taninų koncentracijomis pasižymėjo 1 g/l NaNO<sub>3</sub> koncentracijos mitybinėje terpėje auginti mikrodumbliai. Fenolinių junginių – 1.569 mg/100g, o taninų – 0.567 mg/100g.



3.14 pav. Taninų kiekis, gautas iš dumblių augintų skirtingose NaNO<sub>3</sub> koncentracijose

### 3.8 Baltymų kiekio įvertinimas

Baltymų kiekiui įvertinti *Chlorella vulgaris* dumbliuose, buvo paimta po 0.1 g skirtingose NaNO<sub>3</sub> koncentracijose augintų mikrodumblių išdžiovintos ir susulkinto biomasės. Gauti rezultatai pavaizduoti 3.16 pav.

Siekiant tiksliai apskaičiuoti baltymų kiekius esančius mikrodumbliuose, buvo sudaryta standartinė kalibravimo kreivė, kurios rezultatai pateikiami 3.8 lentelėje ir 3.15 pavyzdyje.

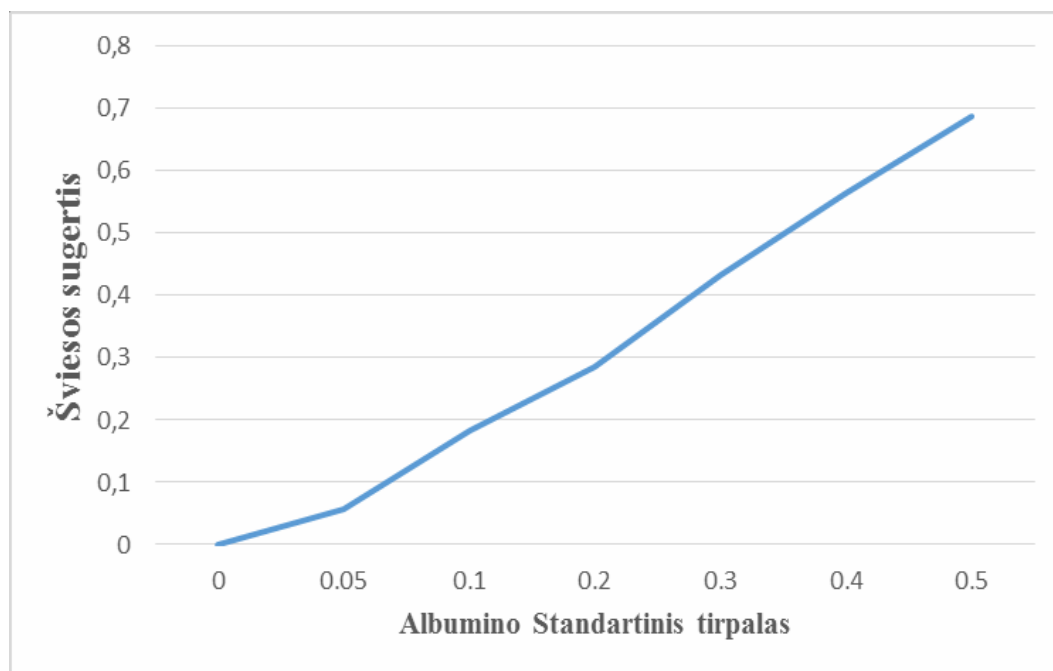
#### Kalibravimo kreivės sudarymas:

Paimame 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 µl standartinio albumino tirpalo (1 mg/ml) ir skiedžiame iki 100 µl vandeniu bei įpilame 2 ml Bradfordo reagento. Mėginiai sumaišomi ir išmatuojame šviesos sugertį esant OD=595 nm. Iš gautų duomenų nubraižoma kalibracinė kreivė.

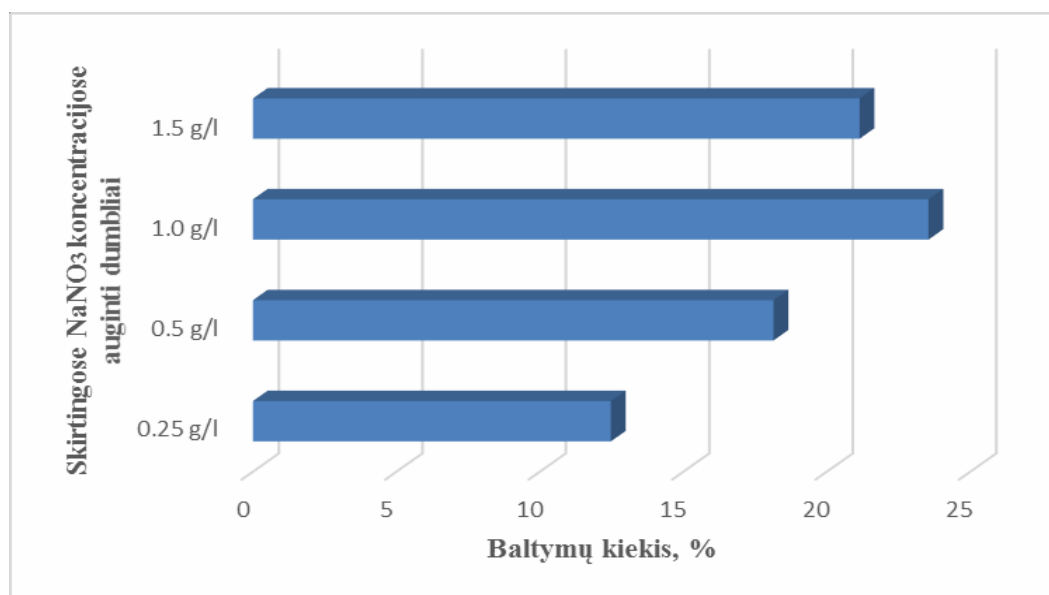
3.8 lentelė. Kalibravimo kreivės sudarymas naudojant albumino tirpalą (1 mg/ml, kiekis µl).

Matuojama šviesos sugertis esant 595 nm bangos ilgiui.

0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
0,056	0,183	0,285	0,432	0,563	0,687	0,784	0,819



3.15 pav. Albumino standartinė kreivė



3.16 pav. Nustatytas baltymų kiekis esantis dumbliuose

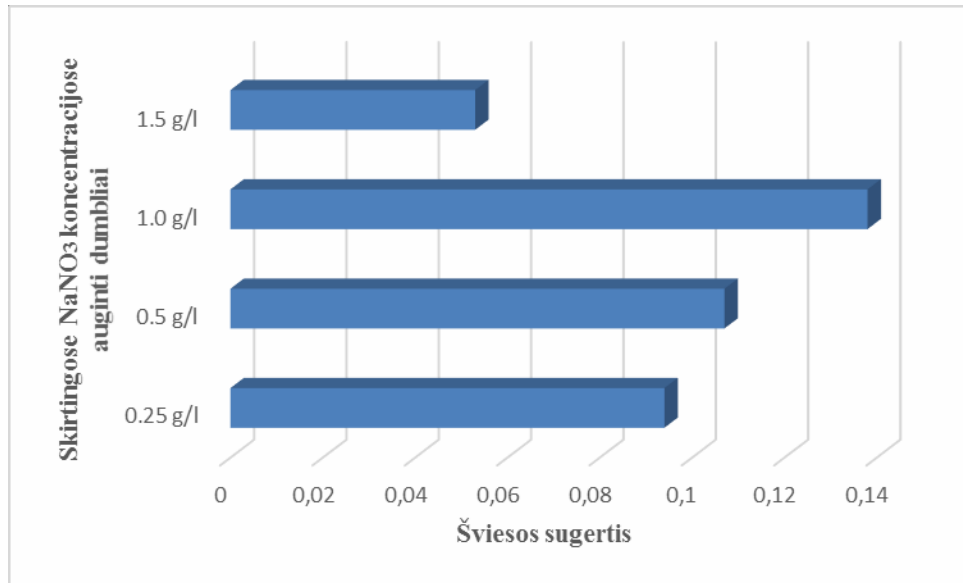
Atlikus tyrimą, buvo nustatyta, kad didžiausia baltymų koncentracija, pasižymėjo dumbliai, kurie buvo auginti BBM2 mitybinėje terpėje (23.54 %), o mažiausias buvo nustatytas esant BBM mitybinėje terpėje (12.47%).

### 3.9 Redukcinių savybių nustatymas *Chlorella vulgaris* mikrodumbliuose

Tyrimui atlikti buvo paimta po 0,1 g sausos dumblių biomasės. Gauti tyrimo rezultatai pateikti 3.9 lentelėje.

3.9 lentelė. Dumblių redukcinių savybių įvertinimas auginant juos skirtingose NaNO<sub>3</sub> koncentracijų mitybinėse terpėse.

Skirtingos NaNO <sub>3</sub> koncentracijos	Šviesos sugertis
0,25 g/l	0,094
0,5 g/l	0,107
1,0 g/l	0,138
1,5 g/l	0,053



3.17 pav. Redukcinių savybių esančių dumbliuose prie skirtingų NaNO<sub>3</sub> koncentracijų.

Iš gautų tyrimo rezultatų matyti, kad didžiausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo dumbliai, kurie buvo auginti 1 g/l NaNO<sub>3</sub> koncentracijos mitybinėje terpėje ( šviesos sugertis – 0,138), o mažiausiomis savybėmis pasižymėjo 0.25 g/l NaNO<sub>3</sub> koncentracijoje auginti mikrodumbliai (šviesos sugertis – 0,094).



## 2. Rekomendacijos

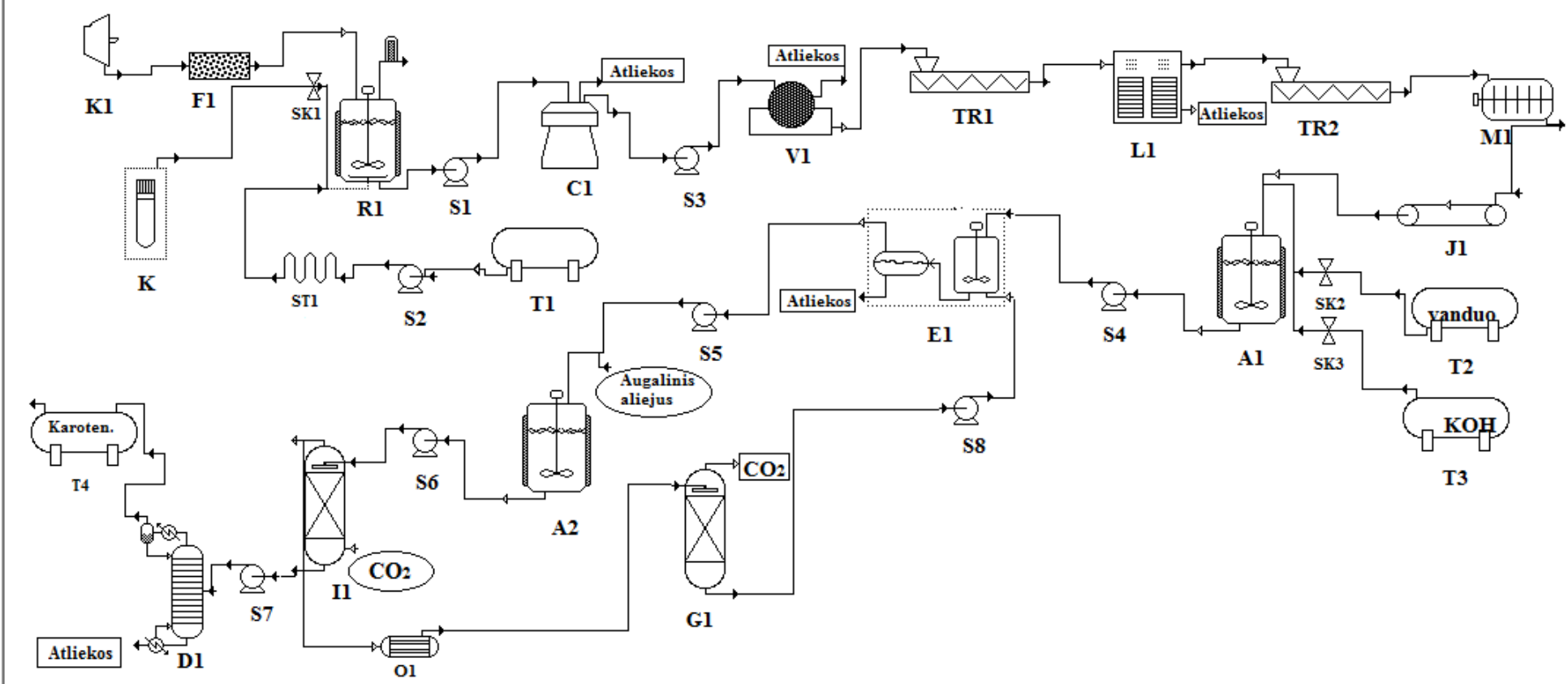
Atlikus tyrimus ištyrėme, kokiomis sąlygomis *Clorella vulgaris* dumbliai augo efektyviausiai, tokias sąlygas galima panaudoti auginant dumblius pramoniniu būdu.

Remiantis atliktais tyrimais, išanalizuota mokslinė literatūra ir kitais šaltiniais. Galima nubraižyti karotenoidų išskyrimą iš dumblių principinę aparatūrinę schemą.

Karotenoidų išskyrimo iš *Chlorella vulgaris* mikrodumblių principinė technologinė schema yra pateikta 4.1 paveiksle, ją sudarančių įrenginių sąrašas pateiktas 4.1 lentelėje. Principinė aparatūrinė schema apima dumblių auginimą ir karotenoidų išskyrimą iš jos.

Į bioreaktorių R1 yra tiekiamas *Chlorella vulgaris* kultūros koncentratas K, pro sklendę SK1, pro oro filtrą F1 kompresoriaus pagalba K1 yra tiekiamas švarus oras, terpė į bioreaktorių iš talpos T1 yra perduodama išcentrinio siurbliu S1 pro sterilizatorių ST1. Iš bioreaktoriaus biomasė išcentrinio siurbliu S2 yra paduodama į centrifugą C1, kur sukonzentruota biomasė, toliau išcentrinio siurbliu S3 yra tiekama į vakuuminį filtrą V1, kuriame biomasė dar labiau sukonzentruojama. Iš vakuuminio filtro, biomasė sraigtniu transporteriu TR1 yra perduodama į liofilizatorių L1, kuriame yra visiškai išdžiovinama. Toliau sraigtniu transporteriu TR2 biomasė yra tiekama į rutulinį malūną M1, kuriame yra smulkiai sumalama. Susmulkinta biomasė juostiniu transporteriu J1 yra tiekama į maišyklę A1, į kurią iš talpų T2 ir T3 sklendžių pagalba SK2 ir SK3 yra tiekiami vanduo ir kalio hidroksidas. Gauta suspensija išcentrinio siurbliu S4 yra tiekama į ekstraktorių E1, į kurį yra įpilamas heksanas, kuris naudojamas kaip ekstrahentas. Vykdomas fazių atskyrimas, kurio metu yra atskiriamas vanduo su kalio hidroksidu ir juose ištirpusiomis medžiagomis, nuo heksano ir karotenoidų mišinio. Toliau heksano ir karotenoidų mišinys išcentrinio siurbliu S5 yra tiekiamas į maišyklę A2, kurioje yra įduodama augalinio aliejaus, kuris pagerina karotenoidų išskyrimą. Gerai išmaišyta suspensija išcentrinio siurbliu S6 yra tiekama į koloną I1, kurioje tiekiant skystą CO<sub>2</sub> yra pašalinamas heksanas. Iš kolonos pašalintas heksano ir CO<sub>2</sub> mišinys patenka į kondensatorių O1 iš kurio išcentrinio siurbliu yra tiekiamas į degazifikacijos koloną G1, kurioje heksanas yra atskiriamas nuo CO<sub>2</sub> iš ten išgrynintas heksanas išcentrinio siurbliu S8 yra tiekiamas į ekstraktorių.

Iš kolonos I1 karotenoidų ir aliejaus mišinys išcentrinio siurbliu S7 yra tiekiamas į distiliacijos koloną D1, iš kurios išskirtas karotenoidų mišinys yra perduodamas į talpą T4. Iš talpos karotenoidai gali būti tiekiami į kitus įrenginius skirtingų karotenoidų išskyrimui.



4.1 Pav. Principinės karotenoidų išskyrimo aparatūrinė schema

4.1 lentelė. Principinės technologinės linijos įrenginių žymėjimas

Žymėjimas	Įrenginio pavadinimas
K1	Oro kompresorius
F1	Oro filtras
K	Dumblių kultūros koncentratas
SK1, SK2, SK3	Sklendės
R1	Biorektorius
T1, T2, T3, T4	Talpos
S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8	Išcentriniai siurbliai
C1	Centrifūga
V1	Vakuuminis filtras
L1	Liofilizatorius
TR1, TR2	Sraigtiniai transporteriai
M1	Rutulinis malūnas
J1	Juostinis transporteris
A1, A2	Maišyklės
E1	Ekstraktorius
I1	Išgarinimo kolona
O1	Kondensatorius
G1	Gazifikacijos kolona
D1	Distiliacijos kolona
ST1	Sterilizatorius

## Išvados

- Įvertinta, kad didžiausias *Chlorella vulgaris* dumblių biomasės prieaugis buvo pasiektas, kai dumbliai buvo auginami mitybinėje terpėje, kurioje buvo 1g/l NaNO<sub>3</sub> koncentracija (praktinė išeiga - 0,923 g/l, o teorinė – 0,713 g/l).
- Iširta, kad didžiausiais Chlorofilo *a ir b* kiekiais pasižymėjo dumbliai, kurie buvo auginami 1g/l NaNO<sub>3</sub> koncentracijos mitybinėje terpėje, atitinkamai 423 mg/100g ir 168 mg/100g.
- Gauta, kad didžiausiu karotenoidų kiekiu taip pat pasižymėjo mikrodumbliai, kurie buvo auginami 1g/l NaNO<sub>3</sub> koncentracijos mitybinėje terpėje 214 mg/100g.
- Atlikus tyrimą su DPPH didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo dumbliai kurie buvo auginami 1g/l NaNO<sub>3</sub> koncentracijos mitybinėje terpėje, jis siekė 93,5 %. Atlikus biocheminį tyrimą su FRAP reagentu, buvo gauta, kad didžiausias antioksidacinis aktyvumas yra 1g/l NaNO<sub>3</sub> koncentracijos mitybinėje terpėje augintuose *Chlorella vulgaris* mikrodumbliuose. Didžiausiu fenolinių junginių ir taninų kiekiu taip pat pasižymėjo dumbliai, kurie buvo auginti 1g/l NaNO<sub>3</sub> koncentracijos mitybinėje terpėje, atitinkamai 1,569 mg/100mg ir 0,567 mg/100mg.
- Atlikus redukcinių savybių įvertinimo tyrimą, buvo gauta, kad didžiausiu redukciniu aktyvumu pasižymėjo dumbliai, kurie buvo auginti 1g/l NaNO<sub>3</sub> koncentracijos mitybinėje terpėje, o mažiausiu 0,25 g/l NaNO<sub>3</sub> koncentracijos mitybinėje terpėje auginti dumbliai.

## Literatūros sąrašas

1. Dumblių klasifikavimas. [Peržiūrėta 2017, kovo 15d.] adresu: <http://www.plantscience4u.com/2014/04/fritsch-classification-of-algae.html#.WLBaIG-LTIU>
2. Dumblių struktūra. [Peržiūrėta 2017, kovo 15d.] adresu: <http://www.biologydiscussion.com/algae/cell-structures-in-algae-with-diagram/46759>
3. SACASA CASTELLANOS, CLAUDIA, "Batch and Continuous Studies of *Chlorella Vulgaris* in Photo-Bioreactors" (2013). University of Western Ontario - Electronic Thesis and Dissertation Repository. Paper 1113.
4. BUTNARIU M, JOURNAL of Ecosystem & Ecography, Methods of Analysis Extraction, Separation, Identification and Quantification of Carotenoids from Natural Products. 2016. 1 – 19 psl.
5. MICHAEL A. BOROWITZKA, NAVID R. MOHEIMANI, Algae for Biofuels and Energy. 2013. 5 – 272 psl.
6. HARINDER P.S. MAKKAR, P. SIDDHURAJU, KLAUS BECKER. Plant Secondary Metabolites. 5 - 129 psl.
7. MATHIAS A. CHIA, ANA T. LOMBARDI ir MARIA DA GRAÇA G. MELÃO. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. 2013. 85 – 97 psl.
8. STINA MANSON. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in nutrient solution from greenhouse tomato production. 2012. 5 – 40psl.
9. NATALIA F. MYKHAYLENKO\* AND ELENA K. ZOLOTAREVA. The Effect of Copper and Selenium Nanocarboxylates on Biomass Accumulation and Photosynthetic Energy Transduction Efficiency of the Green Algae *Chlorella Vulgaris*. 2017. 2 – 8 psl.
10. HOLGER MORSCHETT, LARS FREIER, JANNIS ROHDE, WOLFGANG WIECHERT, ERIC VON LIERES IR MARCO OLDIGES. A framework for accelerated phototrophic bioprocess development: integration of parallelized microscale cultivation, laboratory automation and Kriging-assisted experimental design. 2017. 1 – 13 psl.

11. NING HE, XIAN SUN, YU ZHONG, KAIFENG SUN, WEIJIE LIU IR SHUNSHAN DUAN. Removal and Biodegradation of Nonylphenol by Four Freshwater Microalgae. 2016. 1 – 14 psl.
12. JOHN S. BURLEW. ALGAL CULTURE FROM LABORATORY TO PILOT PLANT. 1976. 5 – 300psl.
13. PETRICA IANCU, VALENTIN PLEȘUA, SANDA VELEAB. Flue Gas CO<sub>2</sub> Capture by Microalgae in Photobioreactor: a Sustainable Technology. 2012. 799 – 805 psl.
14. YASMIN ANUM MOHD YUSOF, JUNAIDA MAIMUNAH HASSAN BASARI, NOR ASHIKEEN MUKTI, RAZALI SABUDDIN, A. RAZAK MUDA, SUHAINA SULAIMAN, SUZANA MAKPOL AND WAN ZURINAH WAN NGAH. Fatty acids composition of microalgae *Chlorella vulgaris* can be modulated by varying carbon dioxide concentration in outdoor culture. 2011. 1 – 7 psl.
15. BELASCO, WARREN. "Algae Burgers for a Hungry World? The Rise and Fall of *Chlorella* Cuisine". Technology and Culture.1997. 38 psl
16. FENG, Y., LI, C., & ZHANG D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. Bioresource Technology. 2011. 101-105 psl.
17. LIEBKE, F. *Chlorella Vulgaris* - Medicinal Food. Klinghart Academy. 2014
18. LIM, S., CHU, W., & PHANG, S. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. Bioresource Technology.2010. 7314-7322 psl.
19. WAKASUGI, T. Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: The existence of genes possibly involved in chloroplast division. Proceedings of the National Academy of Sciences.1997. 5967-5972 psl
20. BHAWYA D, ANILAKUMAR K R. ANTIOXIDANT, DNA DAMAGE PROTECTION AND ANTIBACTERIAL EFFECT OF *PSORALEA CORYLIFOLIA*. ASIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND CLINICAL RESEARCH. 2011. 150-155 psl.
21. Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. 2003. Большой практикум по фотосинтезу. Академия. 256 с.
22. ANDRE LUIS COELHO DA SILVA, CECILIA SULBACHER CARUSO, RENATO DE AZEVEDO MOREIRA, ANA CECILIA HORTA. Growth characteristics and dynamics of

- protein synthesis in Callus cultures from *Glycine wightii* (Wight and Arn.) Verde. 1161 – 1166 psl.
23. M. HAJIMAHMOODI, M. HANIFEH, M. R. OVEISI, N. SADEGHI, B. JANNAT. DETERMINATION OF TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY OF GREEN TEAS BY THE FERRIC REDUCING/ANTIOXIDANT POWER ASSAY. Drug and Food Control Department, Faculty of Pharmacy, Medical Sciences/University of Tehran, Tehran, Iran Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran. 2008 m. 167 – 171 psl.
24. Culturing of *Chlorella vulgaris* – standard operating procedure. [Peržiūrēta 2016, gegužēs 5 d.], adresu:  
[https://www.reading.ac.uk/web/FILES/biosci/Culturing\\_Chlorella\\_156KB.pdf](https://www.reading.ac.uk/web/FILES/biosci/Culturing_Chlorella_156KB.pdf).
25. CONVERTI A., CASAZZA A. A., ORTIZ E. Y., PEREGO P., DEL BORGHI M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. (Bachelor's thesis). Italy, 2009.
26. Dumbliū biotehnologija. [Peržiūrēta 2016, gegužēs 11 d.], adresu:  
<http://www.ecoinstitute.eu/lt/mtep-veikla/dumbliu-biotehnologija>.
27. MING J., CHENG L., ZHANG X. XU, L., CHEN H. // Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. 2010. Vol. 101, N. 17. P. 12 – 20.
28. CARVALHO AP, MEIRELES LA, MALCATA FX. Microalgal reactors: a review of enclosed system design and performances. Biotechnol. 2006 m. 1490 – 1506.
29. CUELLO JL, LEY JW. The accordion photobioreactor for production of algae biofuels and bioproducts. In Fourth annual algae biomass summit. 2010 m.
30. DARZINS A, PIENKOS P, EDYE L. Current status and potential for algal biofuels production. Bioindustry partners and NREL, Bioenergy, Task 39. 2010 m. 131 psl.