ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Μελέτη του ρόλου της πηγής του αζώτου στην ανάπτυξη του στελέχους *Nannochloropsis sp.* και στη σύνθεση ενώσεων εμπορικού ενδιαφέροντος

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΓΚΟΒΑΡΗ

Επιβλέπων καθηγητής: **Φραγκίσκος Κολίσης**

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Μάρτιος 2015

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Ε.Μ.Π. κ. Φραγκίσκο Κολίση, που με συμπεριέλαβε στην εργαστηριακή του ομάδα για την πραγματοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά την υποψήφια διδάκτωρ Μαρία Σαββίδου, για την πολύτιμη βοήθειά της στη διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας καθώς και όλο το ανθρώπινο δυναμικό του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	8
Ι. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ	12
2.1 Γενικά	12
2.2 Γενιές Βιοκαυσίμων	13
2.3 Βιοντίζελ	15
2.3.1 Παραγωγή Βιοντίζελ	16
2.3.2 Πλεονεκτήματα	18
2.3.3 Μειονεκτήματα	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΦΥΚΗ	19
3.1 Γενικά	19
3.2 Ταξινόμηση φυκών	19
3.3 Μικροφύκη	22
3.3.1 Χρήσεις των μικροφυκών	23
3.3.2 Βιοντίζελ από μικροφύκη	25
3.3.2.1 Περιεκτικότητα λιπιδίων σε μικροφύκη	27
3.3.2.2 Πλεονεκτήματα παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη	28
3.3.2.3 Παραγωγή βιοντίζελ από μικροφύκη με περιορισμό ή έλλειψη της πηγής του αζώτου	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ NANNOCHLOROPSIS	31

4.1 Γενικά 31

4.2 Κατηγοριοποίηση στελέχους 32

4.3 Βιοενεργά Συστατικά 33

4.3.1 Χρωστικές 33

4.3.2 Σάκχαρα 34

4.3.3 Αμινοξέα 35

4.3.4 Λιπίδια και Στερόλες 35

4.3.5 Λιπαρά Οξέα 35

4.4 Συνθήκες καλλιέργειας στελέχους 36

ΙΙ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 39

1. Εισαγωγή – Σκοπός 40

2. Όργανα 40

3. Καλλιέργεια στελέχους *Nannochloropsis sp.* (συνθήκες) 40

4. Παρασκευή θρεπτικού μέσου f/2 medium 42

5. Διαδικασία προσδιορισμού σύστασης μικροφύκους 44

5.1 Διαδικασία προσδιορισμού κυτταρικής ανάπτυξης 44

5.2 Διαδικασία προσδιορισμού βιομάζας 44

5.3 Διαδικασία προσδιορισμού συγκέντρωσης χλωροφύλλης 45

5.4 Διαδικασία προσδιορισμού πρωτεϊνών 46

5.5 Διαδικασία προσδιορισμού λιπαρών 47

5.6Διαδικασία προσδιορισμού γλυκόζης – αμύλου με χρήση ειδικού εμπορικού σκευάσματος 49

ΙΙΙ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 51

1. Εισαγωγή – Σκοπός 52

2. Προσδιορισμός βιομάζας του στελέχους *Nannochloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$ 53
3. Προσδιορισμός χλωροφύλλης του στελέχους *Nannochloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$ 55
4. Προσδιορισμός λιπαρών του στελέχους *Nannochloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$ 59
5. Προσδιορισμός πρωτεϊνών του στελέχους *Nannochloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$ 65
6.Προσδιορισμός αμύλου και γλυκόζης του στελέχους *Nannochloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$ 66
7. Συμπεράσματα 68

IV. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ 70

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 74

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροφύκους *Nannochloropsis sp.* σε διάφορες συνθήκες καλλιέργειας και πιο συγκεκριμένα ο ρόλος της πηγής του αζώτου στην καλλιέργεια. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον δόθηκε στον προσδιορισμό ποιοτικών, καθώς και ποσοτικών αποτελεσμάτων μερικών εκ των κυριότερων μεταβολιτών του μικροοργανισμού.

Τα μικροφύκη μεταξύ άλλων, χρησιμοποιούνται τόσο στον τομέα της υγείας, ως συμπληρώματα διατροφής καθώς και στην κοσμετολογία. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια παρουσιάζουν μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον ως πρώτες ύλες παραγωγής βιοκαυσίμων εξαιτίας της μεγάλης περιεκτικότητας τους σε έλαια. Για το λόγο αυτό η μελέτη του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε με περιορισμό της πηγής του αζώτου, που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι το $NaNO_3$, με σκοπό την μεγαλύτερη συσσώρευση λιπιδίων στο κύτταρό του.

Η καλλιέργεια του μικροφύκους πραγματοποιήθηκε σε φωτοαντιδραστήρες, ο φωτισμός ήταν συνεχής και η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή στους 20^oC. Αρχικά μελετήθηκε η κυτταρική ανάπτυξη του στελέχους σε τέσσερεις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$ με τιμές 0.0375g/L, 0.075g/L 0.093g/L 0.1125 g/L. Καθ' όλη τη διάρκεια καλλιέργειας (15 ημέρες) διατηρήθηκαν σταθερές οι συνθήκες καλλιέργειας, δηλαδή η θερμοκρασία, το pH, η ένταση του φωτός και ο αερισμός. Διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής του αζώτου (0,1125g/L $NaNO_3$) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση στην παραγωγή βιομάζας (465 mg DCW L^{-1}) την τελευταία ημέρα της καλλιέργειας, ενώ δεν είχε τον ίδιο αντίκτυπο στην συσσώρευση των λιπαρών.

Επιπλέον, μελετήθηκε η συγκέντρωση χλωροφύλλης η οποία απομονώθηκε και ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση διαλύτη και συγκεκριμένα της μεθανόλης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση χλωροφύλλης παρουσιάζει μέγιστο την $9^η$ ημέρα καλλιέργειας και για τις τέσσερις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Ωστόσο, την μέγιστη συγκέντρωση χλωροφύλλης εκείνη την ημέρα (8,02 mg/mL) είχε η καλλιέργεια με συγκέντρωση 0,075g/L $NaNO_3$.

Ο προσδιορισμός των λιπιδίων πραγματοποιήθηκε με άμεση εκχύλιση με οργανικό διαλύτη, το εξάνιο. Ο περιορισμός του αζώτου στο θρεπτικό μέσο επέφερε και τις μεγαλύτερες

ποσότητες λιπαρών. Πιο συγκεκριμένα, η καλλιέργεια με την μικρότερη συγκέντρωση $NaNO_3$ (0,0375g/L) στο θρεπτικό μέσο ($15^{η}$ ημέρα) συγκέντρωσε ένα ποσοστό λιπιδίων της τάξης του 42,1% επί της ξηρής βιομάζας.

Τέλος, μελετήθηκε η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες σύμφωνα με τη μέθοδο Lowry αλλά και ο προσδιορισμός της γλυκόζης και του αμύλου με χρήση ειδικού εμπορικού σκευάσματος kit D-GLUCOSE-HK Megazyme (Assay Procedure) και kit TOTAL STARCH Megazyme (Assay Procedure) αντίστοιχα. Ο περιορισμός της πηγής του αζώτου στο μέσο καλλιέργειας είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του περιεχομένου τόσο του αμύλου όσο και της γλυκόζης, κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών της καλλιέργειας, με μέγιστη τιμή συγκέντρωσης αμύλου στο υδατοδιαλυτό μέρος 10,5% (επί ξηρού βάρους). Το περιεχόμενο των πρωτεϊνών είχε αυξητική τάση με την αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών αλάτων, φθάνοντας το ποσοστό του 12,4 % (επί ξηρού βάρους) στο τέλος της καλλιέργειας.

ABSTRACT

In this research work, was reported the development of microalgae *Nannochloropsis sp.* in various culture conditions and more particularly the role of the nitrogen source in the culture. More specifically, a particular interest was given in identifying qualitative and quantitative results of some of the major microorganism's metabolites.

Among others, microalgae are used both in the health sector, as dietary supplements and in cosmetics. However, over the years they present a great scientific interest as raw materials of biofuels' production because of their high oils content. For this reason, the study of the microorganism was performed with a limited nitrogen source, which in this case is the NaNO3, aiming for a greater accumulation of lipids in the cell.

The culture of microalgae was held in photoreactor, the lighting was continuous and the temperature remained stable at 20ºC. Initially, we studied the cell growth of the strain at four different concentrations of NaNO3 at values 0,0375g / L, 0,075g / L 0,093g / L 0,1125 g / L. Throughout the duration of the culture (15 days) stable culture conditions were maintained, such as the temperature, pH, the light intensity and the ventilation. It was detected that increasing the concentration of the nitrogen source (0,1125g / L NaNO3) resulted in an increase of biomass's production (465 mg DCW / L) on the last day of culture, while it didn't have the same impact on the accumulation of lipids.

Additionally, it was studied the chlorophyll concentration which was isolated and quantitated using methanol as solvent. The results showed that the chlorophyll concentration peaks at the 9th day of culture along all different culture conditions. However, the maximum concentration of chlorophyll that day (8,02 mg / mL), was noticed by culture with concentration 0,075g / L $NaNO_3$.

The determination of lipids was performed by direct extraction with an organic solvent, which was the hexane. The restriction of the nitrogen in the medium produced the biggest quantities of fat, as expected. More specifically, the culture with the smallest concentration of $NaNO_3$ (0,0375g / L) in the medium (day 6) attracted a proportion of around 43% of the dry biomass lipids.

Finally, what else to be studied was, the content in proteins according to the Lowry method as well as the specification of glucose and starch, using a special commercial formulation kit D-GLUCOSE-HK Megazyme (Assay Procedure) and kit TOTAL STARCH Megazyme (Assay Procedure) respectively. The restriction of the nitrogen source in the culture medium resulted in increase of the content of both the starch and glucose, during the first days of culture, with a maximum concentration value of starch in water-soluble portion of 10.5% (dry cell) . The content of protein was an increasing trend with the increase of the concentration of nitrates, reaching a percentage of 12.4% (dry weight) at the end of the culture.

Ι. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ

Η μεταβολή της σύστασης της ατμόσφαιρας που περιβάλλει τη Γη είναι αρκετά μεγάλη σε σύγκριση με το παρελθόν. Μέχρι και τον 18° αιώνα, το διοξείδιο του άνθρακα που υπήρχε στην ατμόσφαιρα της Γης, ήταν περίπου σταθερό και κυμαινόμενο από 180 έως 290 ppm. Αντίστοιχα, η θερμοκρασία του αέρα κυμαινόταν από 9°-10° C, σχεδόν σε απόλυτη αρμονία με τη διακύμανση της συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα.

Από τον περασμένο αιώνα όμως, οι ανθρώπινες δραστηριότητες επέφεραν σημαντικές μεταβολές στη σύσταση της ατμόσφαιρας. Η χρήση καυσίμων για την παραγωγή ενέργειας είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας της ατμόσφαιρας σε διοξείδιο στο επίπεδο των 355 ppm. Ως συνέπεια αυτού, η αύξηση της συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα, συνοδεύεται από την αύξηση της μέσης θερμοκρασίας της ατμόσφαιρας (Στουρνάς, Λόης, Ζαννίκος 2007).

Η παραγωγή ενέργειας από τα συμβατικά καύσιμα συνδέεται άμεσα με τη ρύπανση του περιβάλλοντος και ιδιαίτερα με τη ρύπανση της ατμόσφαιρας. Η ρύπανση του περιβάλλοντος φαίνεται αναπόφευκτη ως ένα βαθμό, αλλά μπορεί να ελαχιστοποιηθεί και να περιοριστούν σημαντικά οι επιπτώσεις της. Ορισμένα από τα είδη της ρύπανσης που εμφανίζονται είναι τα εξής :

- «Φαινόμενο του θερμοκηπίου». Αποτελεί ένα φαινόμενο σε παγκόσμιο επίπεδο με τις αυξημένες εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου να θεωρούνται υπεύθυνες για την θέρμανση της επιφάνειας της Γής. Η ενέργεια του ήλιου που φτάνει στη γήινη ατμόσφαιρα, αντανακλάται μερικώς στο διάστημα, ενώ η υπόλοιπη απορροφάται και αντανακλάται από τα αέρια του θερμοκηπίου. Τα κυριότερα αέρια του θερμοκηπίου είναι το CO_2, οι υδρατμοί, το μεθάνιο, τα οξείδια του αζώτου, οι χλωροφθοράνθρακες (CFC) και το όζον στην τροπόσφαιρα. Η καύση των ορυκτών καυσίμων (άνθρακας, πετρέλαιο και φυσικό αέριο) για τις ανθρώπινες ανάγκες, είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο μέρος των εκπομπών του διοξειδίου του άνθρακα (http://www.environment.gov.au).
- «Όξινη βροχή». Αναφέρεται σε μείγμα υγρής καθώς και ξηρής εναπόθεσης από την ατμόσφαιρα που οφείλεται στις εκπομπές οξειδίων του θείου και του αζώτου από την καύση του γαιάνθρακα και του πετρελαίου. Φυσικές πηγές υπαίτιες για το σχηματισμό της είναι κυρίως τα ηφαίστεια και η αποσυντιθέμενη βλάστηση. Η όξινη βροχή σχηματίζεται όταν αυτά τα αέρια αντιδρούν στην ατμόσφαιρα με νερό οξυγόνο και άλλες χημικές ενώσεις (http://www.epa.gov).

- Η εμφάνιση σε παγκόσμιο επίπεδο λεπτότερου στρώματος όζοντος, με διαφορετική ένταση από περιοχή σε περιοχή (Hoel 1991).
- Φωτοχημικό νέφος. Δημιουργείται μόνο σε τοπικό επίπεδο και οφείλεται στις εκπομπές των αυτοκινήτων και της βιομηχανίας.
- Ρύπανση των υδάτινων πόρων (π.χ. πυρηνικά ή άλλα υγρά απόβλητα στα υπόγεια νερά, σε τοπικό επίπεδο) και υποβάθμιση ποταμών, λιμνών και ωκεανών.
- Σχηματισμός πετρελαιοκηλίδων στη θάλασσα ή στους ποταμούς και διαρροές σε επιφανειακά νερά.
- Θερμική ρύπανση που οφείλεται σε θερμικά απόβλητα που καταλήγουν στη θάλασσα (παγκόσμια και τοπικά), καθώς και σε άλλους υδάτινους αποδέκτες, όπως είναι η ξηρά και η ατμόσφαιρα (Ανδρίτσος 2008).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ

2.1 Γενικά

Η ενέργεια αποτελούσε πάντα και θα συνεχίσει να αποτελεί μια βασική προϋπόθεση για την οικονομική ευημερία κάθε χώρας. Κάθε τομέας της οικονομίας, συμπεριλαμβανομένων αυτών της γεωργίας, της βιομηχανίας, των μεταφορών καθώς και του εμπορίου, απαιτούν ενέργεια. Για την ακρίβεια, οι απαιτήσεις σε ενέργεια είναι τόσο μεγάλες ώστε σύμφωνα με αναφορά του Τμήματος Πληροφοριών Ενέργειας των ΗΠΑ (United States Energy Information Administratio – EIA), η ολική παγκόσμια κατανάλωση ενέργειας το 2000 ήταν της τάξης των 406 Btu, ενώ προβλέπεται να αγγίζει το ποσό των 769,8 Btu μέχρι το 2035. Αυτή η απρόσμενη αύξηση του 47,25 %, ενδέχεται να πάρει ανοδική πορεία εξαιτίας νέων αναγκών που προκύπτουν συνεχώς (Amit, 2012).

Οι πιθανές διαθέσιμες πηγές ενέργειας είναι ποικίλες και περιλαμβάνουν την αιολική, την υδροηλεκτρική, την πυρηνική, την ηλιακή, τη βιομάζα και τα βιοκαύσιμα. Οποιαδήποτε πηγή ενέργειας και αν χρησιμοποιείται, θα πρέπει να είναι αρχικά βιώσιμη αλλά και όσο το δυνατό πιο ουδέτερη σε ότι αφορά τον άνθρακα (Scragg, 2009).

Τόσο το βιοντίζελ όσο και η βιοαιθανόλη, είναι δύο βιο-ανανεώσιμα υγρά καύσιμα, ικανά να αντικαταστήσουν την βενζίνη και το πετρέλαιο. Η βιοαιθανόλη παράγεται κυρίως

από καλλιέργειες βρώσιμων τροφίμων και αναφέρεται σαν αντικαταστάτης της βενζίνης. Το βιοντίζελ έχει γίνει τον τελευταίο καιρό περισσότερο ελκυστικό σαν καύσιμο εξαιτίας των περιβαλλοντικών του οφελών.

Τα βιοκαύσιμα σαν όρος αναφέρονται ως στερεά, υγρά ή αέρια καύσιμα, τα οποία παράγονται από βιοανανεώσιμες ή από ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Η μεγαλύτερη διαφορά ανάμεσά τους εξάλλου είναι το περιεχόμενο οξυγόνο. Τα υγρά καύσιμα είναι ιδιαίτερα σημαντικά μιας και μπορούν να αντικαταστήσουν το πετρέλαιο. Τα βιοκαύσιμα είναι μη ρυπογόνα, τοπικά διαθέσιμα, αξιόπιστα και προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές (Demirbas, 2008).

2.2 Γενιές Βιοκαυσίμων

Τα βιοκαύσιμα ταξινομούνται σε τέσσερεις γενιές όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Γενιές βιοκαυσίμων (Demirbas A, 2008)

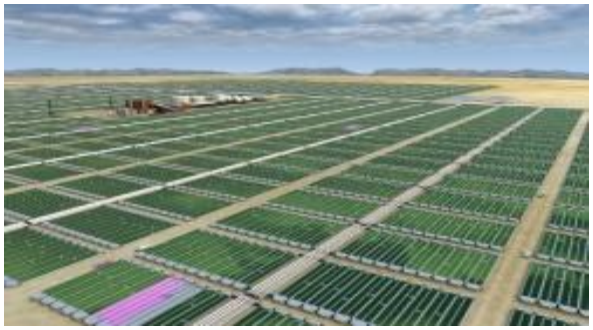
Γενιές	Πρώτες Ύλες	Παράδειγμα
1η γενιά βιοκαυσίμων	Ζάχαρη, άμυλο, φυτικά έλαια ή ζωικά λίπη	Bioalcohols,Biodiesel, biosyngas, biogas
2η γενιά βιοκαυσίμων	Καλλιέργειες μη βρώσιμων τροφίμων, άχυρο σίτου, καλαμπόκι, ξύλο, στερεά απόβλητα, ενεργειακές καλλιέργειες	Bioalcohols, bio-oil, bio-DMF, Biohydrogen, bio-Fischer-Tropsch diesel, wood diesel
3η γενιά βιοκαυσίμων	Άλγη	Biodiesel, Vegetable oil
4η γενιά βιοκαυσίμων	Βιοντίζελ, φυτικά έλαια	Biogasoline

Τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς περιλαμβάνουν το βιοντίζελ που παράγεται από καλλιέργειες βρώσιμων τροφίμων αλλά και από την παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω ζύμωσης. Η βασική πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι το σιτάρι και η ζάχαρη, ενώ για την παραγωγή βιοντίζελ έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική η καλλιέργεια ελαιοκάμβης.

Εικόνα 1: Καλλιέργεια φυτών για την παραγωγή βιοντίζελ

Τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς με τη σειρά τους, έρχονται σαν συνέχεια εκείνων της πρώτης, μιας και αναπτύχθηκαν για να ξεπεράσουν ορισμένους περιορισμούς. Γι' αυτό και απευθύνονται σε καλλιέργειες μη βρώσιμων τροφίμων όπως είναι το ξύλο, τα απόβλητα από τις καλλιέργειες τροφίμων και συγκεκριμένες καλλιέργειες βιομάζας. Ένας από τους βασικούς στόχους της χρήσης των βιοκαυσίμων σχετίζεται με το ανταγωνιστικό κόστος σχετικά με εκείνο των υφιστάμενων ορυκτών καύσιμων.

Η τρίτη γενιά βιοκαυσίμων, εκμεταλλεύεται ειδικά σχεδιασμένες ενεργειακές καλλιέργειες (όπως τα φύκη) για την παραγωγή βιομάζας. Μερικά μόνο από τα πλεονεκτήματα της χρήσης των άλγεων είναι το χαμηλό τους κόστος, οι υψηλές τους αποδόσεις, το γεγονός ότι αποτελούν ανανεώσιμες πρώτες ύλες και το ότι υπόσχονται μεγαλύτερη απόδοση ενέργειας ανά στρέμμα συγκριτικά με τις συμβατικές καλλιέργειες. Εκτός αυτού, τα άλγη έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν και με τη χρήση υδάτων που είναι ακατάλληλα για την παραγωγή τροφίμων, μειώνοντας έτσι την σπατάλη νερού. Τέλος, είναι κατάλληλα σαν πηγή για ένα ευρύ φάσμα καυσίμων όπως η βενζίνη, το πετρέλαιο και τα καύσιμα αεροπλάνων.

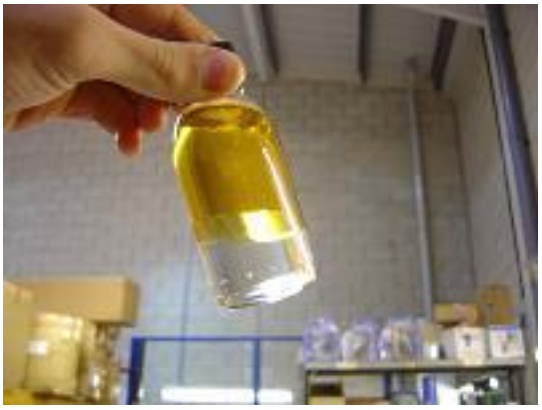

Εικόνα 2: Εκτάσεις καλλιέργειας μικροφυκών

Όσον αφορά στα βιοκαύσιμα τέταρτης γενιάς, έχουν σαν στόχο όχι μόνο την παραγωγή ενέργειας, αλλά και τη δέσμευση και αποθήκευση CO_2. Αυτό που διαφοροποιεί την τέταρτη γενιά σε σχέση με τις άλλες δύο (δεύτερη και τρίτη) είναι ότι σε όλα τα στάδια της παραγωγής, το διοξείδιο του άνθρακα παγιδεύεται με τη μεθόδου καύσης με υψηλή συγκέντρωση O_2 / CO_2 (oxy-fuel combustion).

Εν μέσω της ενεργειακής ανεξαρτησίας και της έντονης ανησυχίας για το περιβάλλον, η αμερικανική κυβέρνηση και η βιομηχανία επένδυσαν σε μεγάλο βαθμό στον τομέα των βιοκαυσίμων. Κατά την χρονική περίοδο 2009-2011, δαπανήθηκαν από την κυβέρνηση των ΗΠΑ 22 δισεκατομμύρια δολάρια για την επιδότηση της παραγωγής και της κατανάλωσης βιοκαυσίμων. Αυτό είχε σαν επακόλουθο, η παραγωγή της αιθανόλης και του βιοντίζελ στις ΗΠΑ να αυξηθεί περισσότερο από 40% μεταξύ του 2008 και του 2011 αλλά και να γίνει η πιο κοινή πηγή ανανεώσιμων πηγών ενέργειας στον τομέα των μεταφορών. Τα βιοκαύσιμα παραμένουν το πιο πολλά υποσχόμενο υποκατάστατο του πετρελαίου, σύμφωνα με τους ερευνητές. Μελέτες των Bolsen and Cook (2008) και Rabe and Borick (2008), προσέγγισαν τον τομέα των βιοκαυσίμων από μια θετική σκοπιά ενώ άλλοι ερευνητές έδειξαν συνεχόμενες ανησυχίες και αμφιβολίες (Belden et al. 2010; Fung et al. 2014).

2.3 Βιοντίζελ

Το βιοντίζελ (μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων) είναι το πρώτο ανανεώσιμο καύσιμο, πλήρως συμβατό με το συμβατικό ντίζελ, παραγόμενο από τις εγχώριες ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Δεν περιέχει πετρέλαιο, αλλά μπορεί να αναμιχθεί με πετρέλαιο ντίζελ για να δημιουργήσει ένα μείγμα βιοντίζελ. Τα μείγματα βιοντίζελ συμβολίζονται ως, "BXX" με το "XX" να αντιπροσωπεύει το ποσοστό του βιοντίζελ που περιέχεται στο μίγμα (π.χ.: το B20 αντιστοιχεί σε 20% βιοντίζελ και 80% ντίζελ πετρελαίου). Διαθέτει ένα διαυγές πορτοκαλοκίτρινο χρώμα με ιξώδες παρόμοιο με εκείνο του απλού πετρελαίου. Είναι απλό στη χρήση, βιοαποικοδομήσιμο, μη τοξικό, εκρηκτικό και εύφλεκτο και απαλλαγμένο από θείο και αρωματικές ενώσεις.



Εικόνα 3: Εργαστηριακή παραγωγή βιοντίζελ

Επιπλέον, προσφέρεται για ασφαλή χρήση σε όλους τους συμβατικούς κινητήρες ντίζελ, αποδίδοντας το ίδιο καλά ενώ ταυτόχρονα συμβάλει στην μείωση των εκπομπών καύσης, τον ορατό καπνό καθώς και τις επιβλαβείς αναθυμιάσεις και οσμές (Bozbas, 2005; http://www.agroenergy.gr ; http://www.biodiesel.org).

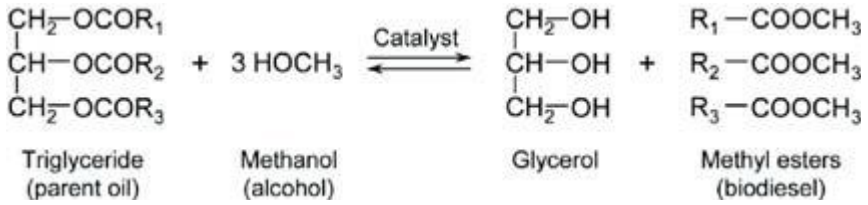
2.3.1 Παραγωγή Βιοντίζελ

Η παραγωγή βιοντίζελ πραγματοποιείται με τη διαδικασία της αλκοόλυσης (μετεστεροποίηση), σε μια διαδικασία όπου τα τριγλυκερίδια (TGs) αντιδρούν με μεθανόλη (αλκοόλη μικρού βάρους) προς σχηματισμό μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (δηλαδή βιοντίζελ και γλυκερόλη) αλλά και της εστεροποίησης των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs). Μεταξύ των αλκοολών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην διαδικασία της μετεστεροποίησης είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη, η προπανόλη, η βουτανόλη και η αμυλική αλκοόλη. Η μεθανόλη και η αιθανόλη χρησιμοποιούνται πιο συχνά και ιδιαίτερα η μεθανόλη εξαιτίας του χαμηλού κόστους και των φυσικών και χημικών της πλεονεκτημάτων (είναι πολική και έχει μικρότερη αλκοολική αλυσίδα). Η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τη χημική μέθοδο (κατάλυση από βάσεις-οξέα) είτε με την ενζυμική μέθοδο (κατάλυση με λιπάση) τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές θερμοκρασίες.

Η αλκαλική κατάλυση είναι περίπου 4000 φορές πιο γρήγορη συγκριτικά με την μετεστεροποίηση με καταλύτη ένα οξύ. Ο καταλύτης είναι συνήθως νάτριο ή υδροξείδιο του καλίου (σε συγκέντρωση περίπου 1% του βάρος ελαίου) το οποίο έχει ήδη αναμειχθεί με την μεθανόλη. Στην περίπτωση της αλκαλικής κατάλυσης μετεστεροποίησης, τα γλυκερίδια και η αλκοόλη θα πρέπει να είναι ουσιαστικά άνυδρα, επειδή το νερό οδηγεί την αντίδραση μερικώς προς σαπωνοποίηση, η οποία παράγει σαπούνι. Γι' αυτό σε αυτή την περίπτωση κατάλυσης απαιτούνται τριγλυκερίδια με χαμηλή περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα. Θειικό οξύ, σουλφονικά οξέα και υδροχλωρικό οξύ συνήθως χρησιμοποιούνται ως καταλύτες οξέων (Chisti 2007 ; Fangrui and Milford 1999). Αν και η απόδοση με την χημική κατάλυση είναι υψηλή, η διαδικασία έχει αρκετά μειονεκτήματα, όπως την υψηλή κατανάλωση ενέργειας, την απομάκρυνση ανόργανων αλάτων αλλά και νερού από το προϊόν και το επιπλέον κόστος που επιφέρει η επεξεργασία των αλκαλικών λυμάτων (Bajaj et al. 2010).

Η χρήση λιπασών για τη διαδικασία της μετεστεροποίησης, έχει προταθεί ως μια εναλλακτική μέθοδος, η οποία προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα συγκριτικά με τη χημική μέθοδο. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση της πρώτης μεθόδου προσφέρει χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, μειωμένη παραγωγή υποπροϊόντων αλλά και αποβλήτων (Xu et al. 2011). Η χρήση βιοκαταλυτών, όπως η λιπάση, επιτρέπουν τη σύνθεση ειδικών αλκυλεστέρων, την εύκολη ανάκτηση της γλυκερίνης και μπορούν να μετεστεροποιήσουν τριγλυκερίδια με υψηλή περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα. Ωστόσο, ορισμένες φορές δεν αποτελεί η ενζυμική μέθοδος την καλύτερη λύση εξαιτίας του υψηλού κόστους του ενζύμου, της χαμηλής απόδοσης, της ανάγκης ύπαρξης οργανικών διαλυτών καθώς και νερού στο μίγμα της αντίδρασης αλλά και το γεγονός ότι αποτελεί μια χρονοβόρα διαδικασία (Bajaj et al. 2010).

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα βηματικά, δηλαδή αρχικά τα τριγλυκερίδια αντιδρούν με την μεθανόλη και μετατρέπονται σε αλκυλεστέρες και διγλυκερίδια (DGs), στη συνέχεια σε αλκυλεστέρες και μονογλυκερίδια (MGs) και τελικά σε αλκυλεστέρες και γλυκερίνη (GL).



Η διαδικασία της μετεστεροποίησης απαιτεί 3 mol αλκοόλης για κάθε mol τριγλυκεριδίου, για την παραγωγή 1 mol γλυκερόλης και 3 mol μεθυλεστέρα (αναλογία 3:1). Πρακτικά, για τις διεργασίες σε βιομηχανικό επίπεδο χρησιμοποιούνται 6 mol αιθανόλης για κάθε mol τριγλυκεριδίου. Αυτή η μεγάλη περίσσεια μεθανόλης είναι που εξασφαλίζει την στρέψη της αντίδρασης προς την κατεύθυνση των μεθυλεστέρων, σε μια μέγιστη απόδοση εστέρα, δηλαδή προς βιοντίζελ (Chisti 2007; Fangrui and Milford 1999).

Η διαδικασία της μετεστεροποίησης διεξάγεται στους 60°C υπό ατμοσφαιρική πίεση (με θερμοκρασία βρασμού της μεθανόλης τους 65°C) και διαρκεί περίπου 90 λεπτά για να ολοκληρωθεί. Αν και είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί σε υψηλότερες θερμοκρασίες, σε συνδυασμό βέβαια με μια ανάλογη αύξηση των πιέσεων, αυτό αποφεύγεται ως επί το πλείστον λόγω του υψηλού κόστους.

Η τεχνολογία για την παραγωγή και χρήση του βιοντίζελ είναι γνωστή για περισσότερα από 50 χρόνια. Οι εμπορικές πηγές για το βιοντίζελ περιλαμβάνουν καθαρά φυτικά έλαια με χαμηλή οξύτητα (<1,5%) όπως ηλιέλαιο, κραμβέλαιο (canola), φοινικέλαιο, σογιέλαιο, βαμβακέλαιο, έλαιο αραβοσίτου, έλαιο Jatropha curcas που συγκαταλέγονται σε αυτές των βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς. Παράγεται από χρησιμοποιημένα λάδια, ζωικό λίπος (υπολειμματικά έλαια σφαγείων) και απόβλητα μαγειρικά έλαια όταν ανήκει στην δεύτερη γενιά βιοκαυσίμων. Το πρόβλημα με την επεξεργασία αυτών των ελαίων και λιπιδίων χαμηλού κόστους είναι ότι συχνά περιέχουν μεγάλες ποσότητες ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA), τα οποία δεν μπορούν να μετατραπούν σε βιοντίζελ με την χρήση ενός αλκαλικού καταλύτη. Ως τρίτης γενιάς βιοκαύσιμο είναι αυτό που παράγεται από έλαια προερχόμενα από τα μικροφύκη. Ωστόσο, μια από τις βασικότερες πρώτες ύλες ιδιαίτερα στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι η σόγια. (Chisti 2007; Demirbas 2002) (http://www.agroenergy.gr)

2.3.2 Πλεονεκτήματα

Το βιοντίζελ είναι ένα καύσιμο που χαρακτηρίζεται από την μικρή του περιεκτικότητα σε θείο και αρωματικά αλλά και το μικρό σημείο ανάφλεξης (423K) συγκρινόμενο με αυτό του απλού πετρελαίου (337K). Είναι επίσης μη τοξικό και εκρηκτικό και διαθέτει μεγάλο αριθμό κετανίου (CN) με αποτέλεσμα να έχει μικρή καθυστέρηση ανάφλεξης. Το βιοντίζελ είναι ένα προϊόν προερχόμενο κυρίως από καλλιέργειες φυτών και περιέχει οξυγόνο στα μόριά του (11% κατά βάρος) με αποτέλεσμα να βελτιώνει τη διαδικασία καύσης και να μειώνει το δυναμικό οξείδωσής του. Η χρήση του σαν καύσιμο μειώνει αισθητά την εκπομπή καυσαερίων (CO_2), αν και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αυξήσει κάποια άλλα. Είναι γενικά ασφαλές στη χρήση του και στους κινητήρες πετρελαίου και δίνει ίδια απόδοση και αντοχή στον κινητήρα. Οι ιδιότητες λίπανσης του είναι τις περισσότερες φορές καλύτερες αν όχι ίδιες με εκείνων των ορυκτών πετρελαίων. Τέλος, είναι ικανό να παρατείνει τη διάρκεια ζωής του κινητήρα ενώ παράλληλα μειώνει την ανάγκη του για συντήρηση (Demirbas 2008; Bozbas 2005).

2.3.3 Μειονεκτήματα

Η άμεση χρήση φυτικών ελαίων ή και μιγμάτων ελαίων θεωρείται μη ικανοποιητική και πρακτική. Εκτός αυτού, το βιοντίζελ είναι πιο ακριβό κατά την διάρκεια της παραγωγής του σε σχέση με το απλό πετρέλαιο. Το υψηλό του ιξώδες, η όξινη σύνθεσή του, η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs) καθώς και ο σχηματισμός κομμιωδών ουσιών που οφείλονται στην οξείδωση και τον πολυμερισμό κατά την αποθήκευση και την καύση, αλλά και οι αποθέσεις άνθρακα είναι προφανή προβλήματα. Διαθέτει επίσης υψηλό σημείο νέφους (CP), σημείο ροής (PP) καθώς και οξείδια αζώτου (NOx). Μερικά ακόμη από τα βασικά μειονεκτήματα είναι ότι μπορεί εύκολα να ψυχθεί σε κρύο καιρό, έχει μειωμένη ενεργειακή πυκνότητα και προκαλείται υποβάθμιση του καυσίμου εάν αποθηκευτεί για παρατεταμένη περίοδο. Τέλος η τιμή του παραμένει υψηλότερη σε σχέση με αυτή των ορυκτών καυσίμων (Demirbas 2008; Bozbas 2005).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΦΥΚΗ

3.1 Γενικά

Τα φύκη, αποτελούν ένα από τα παλαιότερα μέλη του φυτικού βασιλείου, που χρονολογούνται τρία δισεκατομμύρια χρόνια πριν και διανέμονται από πολικές σε τροπικές περιοχές και από πλούσια σε θρεπτικά συστατικά παράκτιες θάλασσες σε ολιγοτροφικά ανοιχτούς ωκεανούς. Είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, που δεν διαθέτουν ρίζες, φύλλα και άλλα όργανα που χαρακτηρίζουν τα κοινά φυτά, ενώ περιέχουν χλωροφύλλη α. (Qin 2012). Εκτιμάται ότι ο αριθμός των διαφορετικών ειδών τους είναι περίπου 30.000 (από τα γνωστά είδη), αν και ο πραγματικός αριθμός τους πιθανότατα υπερβαίνει σημαντικά τον ήδη υπάρχον (Cannell, 1993). Ο όρος «άλγες», ο οποίος διαθέτει λατινική προέλευση, έχει εφαρμοστεί σε όλη τη βλάστηση, την σχετική με το θαλασσινό και αλμυρό νερό (Prescott, 1954).

Τα φύκη ταξινομούνται σύμφωνα με το μέγεθός τους σε δύο κατηγορίες, τα μικροφύκη που αποτελούνται από μικροσκοπικά μεμονωμένα κύτταρα και τα μακροφύκη τα οποία είναι μεγάλα φυτά και έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από 30 μέτρα μήκους. Στο σύνολό τους είναι υπεύθυνες για περίπου το 40% – 50% της φωτοσύνθεσης που συμβαίνει στη Γη κάθε χρόνο. Αποτελούν πηγή άφθονων πολύτιμων ενώσεων για τη χημική βιομηχανία, την ανθρώπινη υγεία συμπεριλαμβανομένων των ελαίων (π.χ. τριγλυκερίδια), των πολυσακχαριτών (π.χ. αλγίνη, άγαρ), των χρωστικών (π.χ. τις phycobiliproteins, καροτενοειδή), καθώς επίσης και νέων φαρμακευτικών ουσιών (Qin 2012).

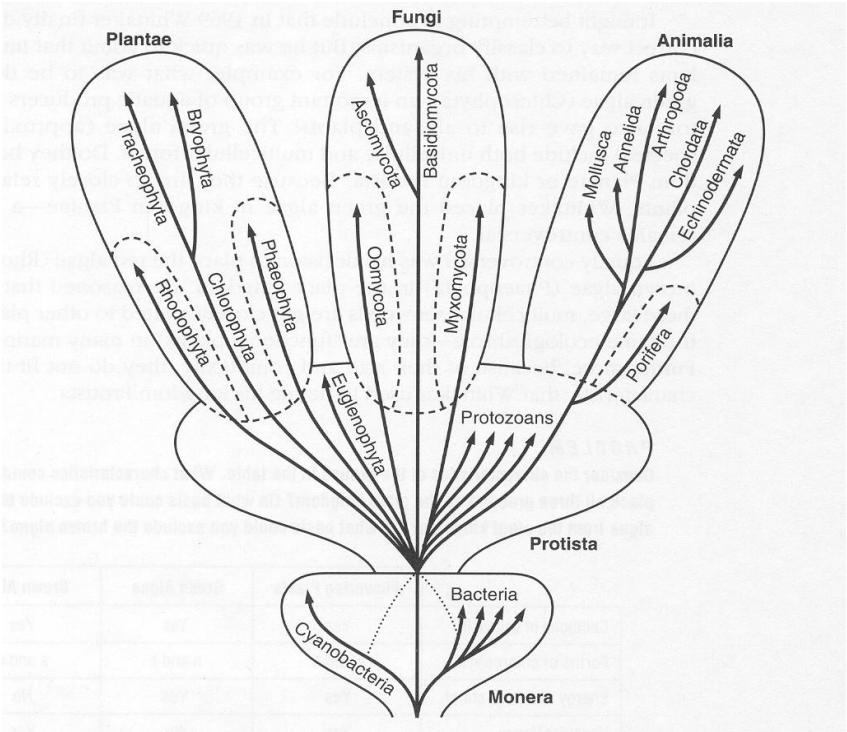
Αποτελούν επίσης φυσική τροφή για τα ψάρια και άλλα υδρόβια ζώα ενώ οι καλλιέργειες των φυκών προωθούνται ενεργά από τους αλιείς και τους υδατοκαλλιεργητές ως μέσο για την αύξηση της παραγωγικότητας (Hasan and Chakrabarti, 2009).

3.2 Ταξινόμηση Φυκών

Η ταξινόμησή των αλγών, βασίζεται σε έναν μεγάλο αριθμό κριτηρίων που αφορά στις ιδιότητες και στα χαρακτηριστικά τους. Κάποια από αυτά τα χαρακτηριστικά είναι η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, η μορφολογία, η σύνθεση των χρωστικών, η φύση των κυτταρικών αποθηκευτικών προϊόντων κ.α. (Cannell, 1993).

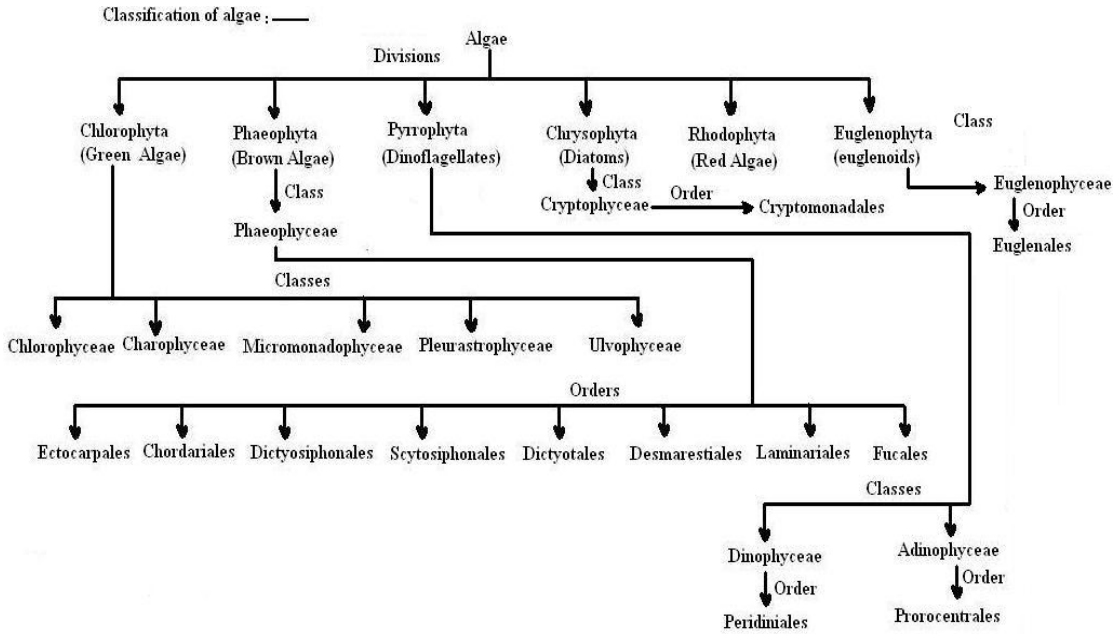
Η ταξινόμηση των αλγών είναι πολύπλοκη και κάπως αμφιλεγόμενη. Το 1959 ο Αμερικανός βιολόγος RH Whittaker περιγράφει ένα σύστημα ταξινόμησης των πέντε

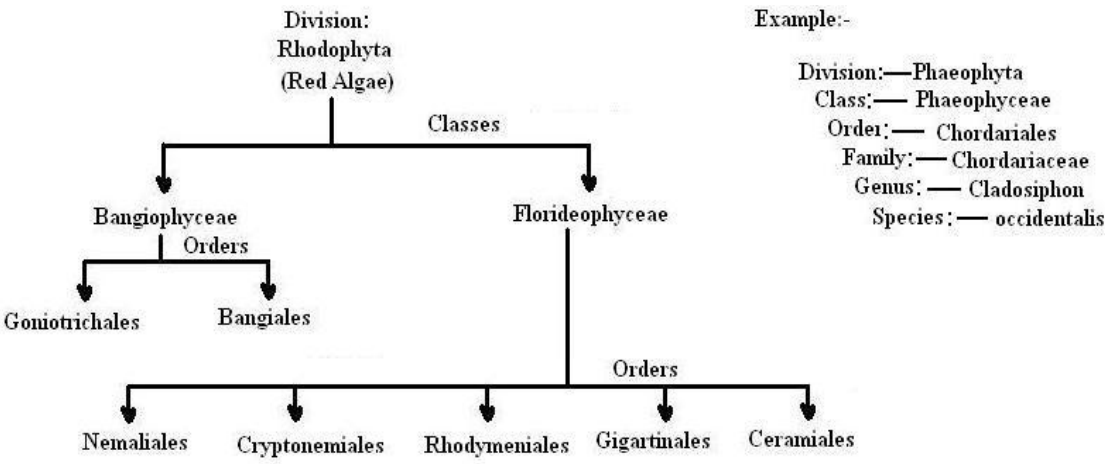
πρωτογενών βασιλείων: φυτά, ζώα, μύκητες, πρώτιστα και βακτήρια. Τα άλγη ανήκουν στον τομέα των Ευκαρυωτών ενώ κατανέμονται μεταξύ δύο διαφορετικών βασιλείων, των Πρωτίστων και των Φυτών. Επειδή το βασίλειο των Πρωτίστων διαφέρει αρκετά ως προς τη μορφή του, η ταξινόμηση μέσα στο ίδιο το βασίλειο έχει αποδειχθεί δύσκολη. Η κατάταξη Πρωτίστων σήμερα βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη δομή και την οργάνωση του κυττάρου, τη παρουσία των οργανιδίων και το μοτίβο των κύκλων αναπαραγωγής (http://www.peoi.org).



Εικόνα 4: Σύστημα των πέντε βασιλείων

Το σύστημα ταξινόμησης των πέντε βασιλείων χωρίζει τα Πρώτιστα σε 27 διακριτά φύλα. Πιο πρόσφατα, ωστόσο, οι ταξινομήσεις που βασίζονται σε συγκρίσεις της φυσιολογίας των κυττάρων και των αλληλουχιών DNA δείχνουν ότι η κατηγορία των Πρωτίστων περιλαμβάνει πολλά διαφορετικά φύλλα, τα οποία ίσως και να μπορούσαν να αποτελούν ένα διαφορετικό βασίλειο. Πιθανές ταξινομήσεις του έμβιου κόσμου συζητούνται στα εξής βασίλεια : Βακτήρια-Monera, Πρώτιστα-Protista, Μύκητες-Fungi, Ζώα-Animalia και Plantae. (http://www.peoi.org/Courses/Coursesen/bot/bot15.html)





Εικόνα 5: Ταξινόμηση φυκών

3.3 Μικροφύκη

Τα μικροφύκη, τα αρχαιότερα φυτά, είναι ένας ανεκμετάλλευτος πόρος με περισσότερα από 50.000 είδη εκ των οποίων μόνο ένας περιορισμένος αριθμός, περίπου 30.000, έχουν μελετηθεί και αναλυθεί ενώ παράλληλα μόνο 15 από αυτά χρησιμοποιούνται για εμπορικές εφαρμογές (*Spirulina, Chlorella, Haematococcus, Dunaliella, Botryococcus, Phaeodactylum* και *Porphyridium*.) Διάφορα άλλα είδη που είναι επίσης εμπορικά καλλιεργήσιμα και αφορούν τον τομέα των υδατοκαλλιεργειών είναι τα εξής: *Chaetoceros, Crypthecodinium, Isochrysis, Nannochloropsis, Nitzschia, Schizochytrium, Tetraselmis,* και *Skeletonema*. Κατά τις τελευταίες δεκαετίες εκτεταμένες συλλογές μικροφυκών έχουν δημιουργηθεί από ερευνητές σε διάφορες χώρες, ενώ η τεχνολογία καλλιέργειας τους παραπέμπει σε μια επιχείρηση λόγω των διαφορετικών πρακτικών εφαρμογών της (Raja et al. 2008, Mata et al. 2010).

Υπάρχουν περίπου 110 εμπορικοί παραγωγοί μικροφυκών στην περιοχή της Ασίας-Ειρηνικού, με ετήσια παραγωγική δυναμικότητα που κυμαίνεται από 3 έως 500 τόνους. Περίπου τα 9/10 των καλλιεργειών βρίσκονται στην περιοχή της Ασίας. Η διαθεσιμότητα των μικροφυκών στο εμπόριο είναι περίπου 5000t/y ξηρής ύλης. Μια από τις χρήσεις της βιομάζας των μικροφυκών είναι η κατανάλωση της σαν συμπλήρωμα διατροφής με μορφή δισκίου ή κάψουλας. Τα άλγη καθώς και τα εκχυλίσματά τους, συμπεριλαμβάνονται στα ζυμαρικά, στο κρασί, στα ποτά, στα δημητριακά καθώς και στα καλλυντικά (Raja et al. 2008, Carlsson et. al 2007).

Τα μικροφύκη είναι μικροσκοπικοί φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που βρίσκονται τόσο σε θαλασσινό όσο και σε περιβάλλον γλυκού νερού. Ο φωτοσυνθετικός τους μηχανισμός είναι παρόμοιος με αυτόν των επίγειων φυτών, αλλά εξαιτίας της απλής κυτταρικής τους δομής και του γεγονότος ότι αναπτύσσονται σε υδατικό περιβάλλον με άμεση - εύκολη πρόσβαση σε νερό, CO_2 και άλλων θρεπτικών συστατικών, μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια σε βιομάζα πιο αποτελεσματικά (Carlsson et. al 2007) Τα μικροφύκη αποτελούν μια μικρογραφία βιοχημικού εργοστασίου, ενώ φωτοσυνθετικά είναι περισσότερο αποτελεσματικά συγκριτικά με τα χερσαία φυτά (Muthukumar et al 2012).

Έχει εκτιμηθεί, ότι τα μικροφύκη παράγουν περίπου το ήμισυ του ατμοσφαιρικού οξυγόνου ενώ χρησιμοποιούν ταυτόχρονα το διοξείδιο του άνθρακα των αερίων του θερμοκηπίου για να αναπτυχθούν φωτο-αυτοτροφικά (Tabatabaei, 2010).

Οι οργανισμοί αυτοί συνιστούν μια πολυφυλετική και πολυποίκιλη ομάδα προκαρυωτικών (δύο τμήματα) και ευκαρυωτικών (εννέα τμήματα) οργανισμών. Η ταξινόμηση σε διαιρέσεις βασίζεται σε διάφορες ιδιότητες όπως η υπερδομή, η φύση των

κυτταρικών αποθηκευτικών προϊόντων, η σύνθεση των χρωστικών, η οργάνωση των φωτοσυνθετικών μεμβρανών και άλλα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μικροφύκη είναι τα εξής: Cyanophyceae (μπλε-πράσινα άλγη), Chlorophyceae (πράσινη άλγη), Bacillariophyceae (συμπεριλαμβανομένων των διατομικών) και Chrysophyceae (συμπεριλαμβανομένων των χρυσών αλγών). Πολλά είδη μικροφυκών μπορούν να στραφούν από φωτοαυτότροφη σε ετερότροφη ανάπτυξη. Η δέσμευση της φωτεινής ενέργειας κατά τη φωτοσύνθεση γίνεται από τη χλωροφύλλη και τις άλλες φωτοσυνθετικές χρωστικές. Με τη βοήθειά τους οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί συνθέτουν υδατάνθρακες (γλυκόζη), χρησιμοποιώντας απλές ανόργανες ενώσεις, όπως το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό, που βρίσκουν άφθονες στο περιβάλλον τους. Ως ετερότροφα, τα άλγη βασίζονται στη γλυκόζη ή άλλες αξιοποιήσιμες πηγές άνθρακα για τον μεταβολισμό και την ενέργεια. Μερικά στελέχη μπορεί επίσης να αναπτυχθούν μιξοτροπικά (Carlsson et al. 2007).

3.3.1 Χρήσεις των μικροφυκών

Η μεγάλης κλίμακας εμπορική παραγωγή των μικροφυκών, ξεκίνησε στις αρχές του 1960 στην Ιαπωνία με την καλλιέργεια του στελέχους *Chlorella* ως πρόσθετη ύλη στα τρόφιμα. Στη συνέχεια η παραγωγή επεκτάθηκε σε παγκόσμιο επίπεδο σε χώρες όπως οι ΗΠΑ, η Ινδία, η Αυστραλία και το Ισραήλ κατά τη διάρκεια της δεκαετίας 1970-1980 (Brennan and Owende 2010).

Καινοτόμες διαδικασίες και προϊόντα έχουν εισαχθεί στη βιοτεχνολογία μικροφυκών με σκοπό την παραγωγή βιταμινών, πρωτεϊνών, καλλυντικών, τροφίμων καθώς και τον τομέα της υγείας. Για τις περισσότερες από αυτές τις εφαρμογές, η αγορά εξακολουθεί να βρίσκεται σε φάση ανάπτυξης και η βιοτεχνολογική χρήση των μικροφυκών θα επεκταθεί σε νέους τομείς. Με την ανάπτυξη εξελιγμένων καλλιεργειών και τεχνικών διαλογής, η βιοτεχνολογία των μικροφυκών μπορεί να ανταποκριθεί στις προκλήσεις-αιτήματα τόσο των βιομηχανιών τροφίμων όσο και των φαρμάκων (Raja et al. 2008).

Όσον αφορά στον τομέα της υγείας, η γενετική εξέλιξη θα μπορούσε επίσης να παίξει σημαντικό ρόλο στην μελλοντική ανάπτυξη βιομηχανιών με καλλιέργειες αλγών. Σύμφωνα με προκαταρκτική έρευνα, αρκετά θεραπευτικά οφέλη μπορεί να επιφέρει η παραγωγή των προϊόντων των μικροφυκών που σχετίζονται με το AIDS, τον καρκίνο και τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Raja et al. 2008). Πιο συγκεκριμένα, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (και πιο συγκεκριμένα τα n-3 PUFA) των μικροφυκών είναι εκείνα για τα οποία έχει αποδειχθεί η αποτελεσματικότητά τους στην πρόσληψη ή ακόμα και στην θεραπεία τέτοιου είδους

παθήσεων αλλά και πολλών άλλων ακόμη όπως: ο διαβήτης τύπου 2, οι διαταραχές φλεγμονώδους εντέρου, το άσθμα, η αρθρίτιδα, οι νεφρικές και οι δερματικές διαταραχές, η κατάθλιψη και η σχιζοφρένεια (Andrich et al. 2005).

Αρκετά είδη μικροφυκών χρησιμοποιούνται στον τομέα της κοσμετικής, όπως τα στελέχη *Arthospira* και *Chlorella.* Τα εκχυλίσματά τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προϊόντα προστασίας και φροντίδας του δέρματος, όπως είναι οι αντί-γηραντικές κρέμες, τα αναζωογονητικά προϊόντα περιποίησης, οι μαλακτικές και οι αντί-ερεθιστικές κρέμες απολέπισης. Δεν είναι μάλιστα λίγοι οι αισθητικοί οι οποίοι έχουν επενδύσει σε δικά τους συστήματα παραγωγής βιομάζας από μικροφύκη. Πρόσφατα, η εταιρεία Pentapharm με έδρα την Ελβετία δρομολόγησε την εμπορευματοποίηση δύο προϊόντων, εκ των οποίων το πρώτο περιέχει ένα συστατικό από το στέλεχος *Nannochloropsis oculata* με εξαιρετικές συσφικτικές ιδιότητες στο δέρμα και το δεύτερο περιέχει εκχύλισμα από το στέλεχος *D. Salina* το οποίο έχει την ικανότητα να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αλλά και να επηρεάζει σημαντικά τον ενεργειακό μεταβολισμό του δέρματος (Spolaore et al. 2006).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι τα μικροφύκη λόγω της ποικιλότητάς τους, καλούνται και ζωντανά 'εργοστάσια των κυττάρων', καθώς παράγουν μια τεράστια ποικιλία ενώσεων υψηλής αξίας για τη χημική βιομηχανία, την ανθρώπινη διατροφή και την ιατρική, όπως καροτενοειδή, αντιοξειδωτικά, λιπαρά οξέα, ένζυμα, πολυμερή, πεπτίδια, τοξίνες και στερόλες (Tabatabaei, 2010). Είναι ήδη σημαντικό το μερίδιο αγοράς που καταλαμβάνει η παραγωγή βιομάζας από τα μικροφύκη ως προς την αγορά τροφίμων (σαν συμπληρώματα διατροφής) και τα οποία λαμβάνονται με τη μορφή δισκίου ή σκόνης. Ορισμένες από τις ουσίες τους μπορούν επίσης να ενσωματωθούν σε ζυμαρικά, σνάκ τρόφιμα, σοκολάτες αλλά και σε ποτά. Μέχρι στιγμής η κατανάλωση της βιομάζας των μικροφυκών από τους ανθρώπους περιορίζεται σε πολύ λίγα είδη (*Chlorella, Spirulina, Dunaliella*), γεγονός που οφείλεται στους αυστηρούς κανονισμούς για την ασφάλεια των τροφίμων, όπως επίσης τους εμπορικούς παράγοντες, τη ζήτηση απο την αγορά καθώς και την ειδική προετοιμασία που απαιτείται (Brennan and Owende 2010; Spolaore et al. 2006).

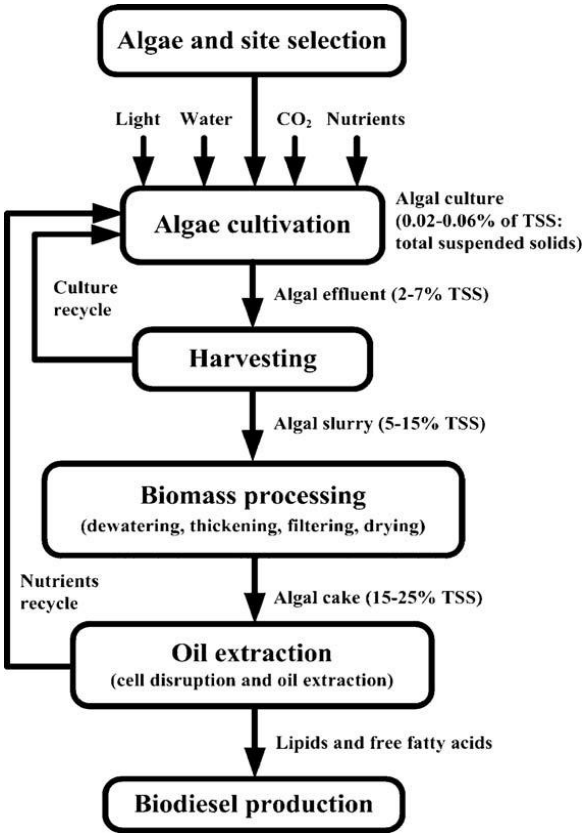
Αρκετά είδη αλγών επίσης είναι ιδανικά για την παρασκευή συμπληρωμάτων ζωοτροφών. Ορισμένα στελέχη μάλιστα, όπως για παράδειγμα η *Chlorella*, το *Scenedesmus* και η *Spirulina,* έχουν ευεργετικές ικανότητες που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα, τη γονιμότητα, τον έλεγχο βάρους, το υγιέστερο δέρμα και το λαμπερό τρίχωμα. Ακόμη και για τις υδατοκαλλιέργειες, τα μικροφύκη αποτελούν μια φυσική πηγή τροφίμων πλούσια σε θρεπτικά συστατικά για διάφορα είδη όπως τα μαλάκια, οι γαρίδες, τα ψάρια κ.α. (Brennan and Owende 2010).

Η βιομάζα των αλγών θεωρείται ως ανανεώσιμη πηγή ενέργειας. Στο εγγύς μέλλον θα ακολουθήσει η εμπορική παραγωγή υδρογονανθράκων, όπως για παράδειγμα η εμπορευματοποίηση του στελέχους *Botryococcus* σε όλο τον κόσμο. Η τεχνολογία αξιοποίησης των μικροφυκών για την παραγωγή βιοενέργειας (βιοντίζελ, βιομεθάνιο, βιουδρογόνο), ή συνδυασμένων εφαρμογών για την παραγωγή βιοκαυσίμων και μετριασμού του CO_2, με την οποία το CO_2 συλλαμβάνεται και αποθηκεύεται, ερευνώνται ακόμα (Raja et al. 2008). Δυνητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομάκρυνση της περίσσειας διοξειδίου του άνθρακα από το περιβάλλον με αναγέννηση του οξυγόνου προερχόμενο από το CO_2 (Godia et al. 2002). Εκτός όμως από τη χρήση τους ως βιοκαύσιμα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την παραγωγή χρήσιμων χημικών ενώσεων όπως είναι οι ρητίνες, τα λιπάσματα, οι διαλύτες και οι αλκοόλες. Στα κυρίαρχα είδη των μικροφυκών που προορίζονται για εμπορική χρήση ανήκουν τα εξής στελέχη: *Isochrysis, Chaetoceros, Chlorella, Arthrospira (Spirulina)* και *Dunaliella* (Raja et al. 2008; Porphy and Farid 2011).

3.3.2 Βιοντίζελ από μικροφύκη

Η αντικατάσταση όλων των καυσίμων παγκοσμίως με βιοντίζελ απαιτεί τεράστια ποσά παραγωγής του ετησίως. Η ιδέα της χρήσης των μικροφυκών ως μια ενδεχόμενη πηγή καυσίμων προτάθηκε για πρώτη φορά στη δεκαετία του 1950, ενώ από τις αρχές του 1970 αρκετά δημόσια χρηματοδοτούμενα ερευνητικά προγράμματα σε χώρες όπως οι ΗΠΑ, η Αυστραλία και η Ιαπωνία ξεκίνησαν έρευνες με σκοπό την καλλιέργεια των μικροφυκών για την παραγωγή υγρών καυσίμων. Παρ' όλα αυτά εξαιτίας του κόστους παραγωγής και των τεχνικών περιορισμών τους, αποθαρρύνθηκε η εμπορική ανάπτυξή τους που είχε ως στόχο την παραγωγή βιοντίζελ. Μεταγενέστερες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του 1980 έδειξαν ότι οι εξελίξεις της έρευνας και της τεχνολογίας επιτρέπουν στο εμπορικό δυναμικό των μικροφυκών να μετατοπιστεί από εκείνο της βιοτεχνολογίας, στην παραγωγή των βιοκαυσίμων (Tabatabaei et al. 2011; Rodolfi et al. 2008). Στις μέρες μας, η ιδέα τις παραγωγής βιοκαυσίμων από μικροφύκη ως εναλλακτική πηγή, αποκτά μεγαλύτερο ενδιαφέρον και προσοχή εξαιτίας της ολοένα αυξανόμενης τιμής του πετρελαίου αλλά και της παγκόσμιας ανησυχίας για την υπερθέρμανση του πλανήτη που συνδέεται με την καύση ορυκτών καυσίμων (Muthukumar et al. 2012). Οι πρώτες ύλες που καλύπτουν το κομμάτι της $1^{ης}$ και $2^{ης}$ γενιάς βιοκαυσίμων, δηλαδή οι ελαιούχοι σπόροι, τα χρησιμοποιημένα μαγειρικά λίπη κ.τ.λ. δεν μπορούν ρεαλιστικά να ικανοποιήσουν τέτοιου είδους ζήτηση στο εγγύς μέλλον. Αυτό το σενάριο όμως μπορεί να αλλάξει δραματικά με τη χρήση των μικροφυκών

για την παραγωγή του βιοντίζελ. Για παράδειγμα, ένα μικρό ποσοστό, της τάξης του 1-3%, των συνολικών καλλιεργήσιμων περιοχών των ΗΠΑ θα ήταν αρκετό για την καλλιέργεια και παραγωγή βιομάζας από μικροφύκη που θα ικανοποιούσαν μέχρι και το 50% των αναγκών για καύσιμα (Chisti, 2007). Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα των μικροφυκών είναι ότι αναπτύσσονται πολύ πιο γρήγορα σε σχέση με άλλες καλλιέργειες και ότι είναι εξαιρετικά πλούσια σε έλαια. Για την ακρίβεια, συνήθως διπλασιάζουν τη βιομάζα τους μέσα σε 24 ώρες, ενώ κατά τη διάρκεια της εκθετική τους φάσης ο χρόνος μπορεί να μειωθεί εξαιρετικά. Τα ταχύτερα αναπτυσσόμενα φυτά στον κόσμο λοιπόν, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν ακόμα και 23,000 λίτρα βιοκαυσίμων ανά στρέμμα καλλιέργειας (Porphy and Farid 2011) Η περιεκτικότητα ελαίων στις μικροάλγες είναι πολλές φορές μεγαλύτερη του 80% κατά βάρος επί της ξηρής βιομάζας, ενώ κάτω από βέλτιστες συνθήκες, ορισμένα είδη μπορεί να παράγουν έως και 90% ελαίου (επί του ξηρού βάρους τους). Το παραπάνω εξαρτάται από τη φύση του μικροφύκους και το ρυθμό ανάπτυξής του (Mata et al. 2010; Porphy and Farid 2011).



Εικόνα 6: Στάδια εξέλιξης παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη (Mata et al. 2010)

3.3.2.1 Περιεκτικότητα λιπιδίων σε μικροφύκη

Μία μεγάλη ποικιλία μικροφυκών είναι ικανά να συσσωρεύσουν σημαντικές ποσότητες λιπιδίων στο κύτταρό τους, κάνοντάς τα όλο και πιο προσιτά για την παραγωγή βιοντίζελ. Σε γενικές γραμμές, η μέση περιεκτικότητα λιπαρών των μικροφυκών κυμαίνεται μεταξύ 20-50% επί του ξηρού βάρους ενώ ορισμένα είδη δύνονται να φτάσουν και το 90% της περιεκτικότητας τους, κάτω από ορισμένες συνθήκες (Spolaore et al. 2006). Κάτω από δυσμενείς και στρεσογόνες περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης, πολλά μικροφύκη, τροποποιούν τα βιοσυνθετικά τους μονοπάτια με κατεύθυνση τη δημιουργία και συσσώρευση κυρίως τριγλυκεριδίων (TAG) (Hu et al. 2008). Παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η ένταση της ακτινοβολίας καθώς και η διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών, δείχνουν να επηρεάζουν τόσο τη λιπιδική σύνθεση των μικροφυκών, όσο και το περιεχόμενο των λιπιδίων τους. Στον πίνακα 2 παρουσιάζεται η περιεκτικότητα σε λιπίδια καθώς και η παραγωγικότητα σε λιπίδια και βιομάζα διαφόρων μικροφυκών (θαλασσινού και γλυκού νερού) (Mata et al. 2010; Rodolfi et al. 2008).

Πίνακας 2: Περιεχόμενο και παραγωγικότητα λιπιδίων για διάφορα είδη μικροφυκών (Mata et al. 2010)

Marine and freshwater microalgae species	Lipid content (% dry weight biomass)	Lipid productivity (mg/L/day)	Volumetric productivity of biomass (g/L/day)	Areal productivity of biomass (g/m^2/day)
Ankistrodesmus sp.	24.0–31.0	–	–	11.5–17.4
Botryococcus braunii	25.0–75.0	–	0.02	3.0
Chaetoceros muelleri	33.6	21.8	0.07	–
Chaetoceros calcitrans	14.6–16.4/39.8	17.6	0.04	–
Chlorella emersonii	25.0–63.0	10.3–50.0	0.036–0.041	0.91–0.97
Chlorella protothecoides	14.6–57.8	1214	2.00–7.70	–
Chlorella sorokiniana	19.0–22.0	44.7	0.23–1.47	–
Chlorella vulgaris	5.0–58.0	11.2–40.0	0.02–0.20	0.57–0.95
Chlorella sp.	10.0–48.0	42.1	0.02–2.5	1.61–16.47/25
Chlorella pyrenoidosa	2.0	–	2.90–3.64	72.5/130
Chlorella	18.0–57.0	18.7	–	3.50–13.90
Chlorococcum sp.	19.3	53.7	0.28	–
Crypthecodinium cohnii	20.0–51.1	–	10	–
Dunaliella salina	6.0–25.0	116.0	0.22–0.34	1.6–3.5/20–38
Dunaliella primolecta	23.1	–	0.09	14
Dunaliella tertiolecta	16.7–71.0	–	0.12	–
Dunaliella sp.	17.5–67.0	33.5	–	–
Ellipsoidion sp.	27.4	47.3	0.17	–
Euglena gracilis	14.0–20.0	–	7.70	–
Haematococcus pluvialis	25.0	–	0.05–0.06	10.2–36.4
Isochrysis galbana	7.0–40.0	–	0.32–1.60	–
Isochrysis sp.	7.1–33	37.8	0.08–0.17	–
Monodus subterraneus	16.0	30.4	0.19	–
Monallanthus salina	20.0–22.0	–	0.08	12
Nannochloris sp.	20.0–56.0	60.9–76.5	0.17–0.51	–
Nannochloropsis oculata	22.7–29.7	84.0–142.0	0.37–0.48	–
Nannochloropsis sp.	12.0–53.0	37.6–90.0	0.17–1.43	1.9–5.3
Neochloris oleoabundans	29.0–65.0	90.0–134.0	–	–
Nitzschia sp.	16.0–47.0			8.8–21.6
Oocystis pusilla	10.5	–	–	40.6–45.8
Pavlova salina	30.9	49.4	0.16	–
Pavlova lutheri	35.5	40.2	0.14	–
Phaeodactylum tricornutum	18.0–57.0	44.8	0.003–1.9	2.4–21
Porphyridium cruentum	9.0–18.8/60.7	34.8	0.36–1.50	25
Scenedesmus obliquus	11.0–55.0	–	0.004–0.74	–

Σύμφωνα με τον πίνακα 2, η περιεκτικότητα σε λιπίδια μπορεί να φτάσει ακόμα και το 75% επί της ξηρής βιομάζας συνοδευόμενη όμως από χαμηλή παραγωγικότητα

(*Botryococcus braunii*). Όσον αφορά τα πιο κοινά είδη μικροαλγών (*Chlorella, Crypthecodinium, Cylindrotheca, Dunaliella, Isochrysis, Nannochloris, Nannochloropsis, Neochloris, Nitzschia, Phaeodactylum, Porphyridium, Schizochytrium, Tetraselmis*) είναι σε θέση να παράγουν λιπίδια σε ποσοστό μεταξύ 20 και 50% έχοντας τη δυνατότητα να πετύχουν υψηλότερα επίπεδα παραγωγικότητας (Mata et al. 2010).

Τα λιπίδια που παράγονται από τα μικροφύκη, μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες, τα λιπίδια αποθήκευσης (μη-πολικά λιπίδια) και τα δομικά λιπίδια (πολικά λιπίδια). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα τριγλυκερίδια τα οποία μπορούν εύκολα να μετεστεροποιηθούν για την παραγωγή βιοντίζελ. Όσον αφορά τα δομικά λιπίδια, έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία αποτελούν απαραίτητα θρεπτικά συστατικά (Sharma,Schuhmann and Scheck 2012). Μεταξύ άλλων, διάφοροι τύποι λιπιδίων όπως φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, μονο-, δι- και τριγλυκερίδια αποτελούν μερικά μόνο από τα παράγωγα των μικροφυκών που εξαρτώνται από το είδος τους αλλά και τις συνθήκες καλλιέργειας που εφαρμόζονται. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα καταλαμβάνουν μόνο ένα ποσοστό (περίπου 1-2%) των λιπιδίων των μικροφυκών σε σχέση με τα μόρια γλυκερόλης που αποτελούν τις ακυγλυκερόλες. Σύμφωνα με το λιπιδικό προφίλ των μικροαλγών, το παλμιτικό οξύ (C16:0) είναι το κυρίαρχο λιπαρό οξύ στα περισσότερα από τα εκχυλίσματα λιπαρών τους (Nascimento et al. 2012).

Η παραγωγή λιπιδίων (% περιεκτικότητα ανά ξηρή βιομάζα) σε συνδυασμό με τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροφυκών, αποτελούν δύο από τις πιο σημαντικές παραμέτρους στον τομέα των βιοκαυσίμων. Σε γενικές γραμμές, ο υψηλός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών εξαρτάται από τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ενώ δεν συνδέεται με την ικανότητα τους για παραγωγή και αποθήκευση λιπιδίων. Η παραγωγή των λιπιδίων παρατηρείται συνήθως κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης, όταν δηλαδή τα κύτταρα αναπτύσσουν περισσότερο τις βιοσυνθετικές τους ικανότητες προς την παραγωγή των τριγλυκεριδίων ή των υδρογονανθρακικών λιπιδίων (Nascimento et al. 2012)

3.3.2.2 Πλεονεκτήματα παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη

Σε γενικές γραμμές τα πλεονεκτήματα της καλλιέργειας των μικροφυκών για την παραγωγή βιοντίζελ συγκρινόμενα με άλλων διαθέσιμων πρώτων υλών είναι πολλά. Η χρήση των μικροφυκών για την παραγωγή βιοντίζελ δεν θέτει σε κίνδυνο την παραγωγή τροφίμων, ζωοτροφών καθώς και άλλων προϊόντων που προέρχονται από καλλιέργειες. Η ανάπτυξή τους είναι βασισμένη στην φωτοσύνθεση όπου η ηλιακή ενέργεια μετατρέπεται σε χημική γι’

αυτό και οι ανάγκες τους για φως είναι μεγάλες. Οι δαπάνες της καλλιέργειάς τους μπορούν να ελαχιστοποιηθούν σημαντικά βασίζοντας την παραγωγή τους στο ελεύθερα διαθέσιμο φως του ήλιου και σε μερικά απλά θρεπτικά συστατικά. Το μέσο ανάπτυξής τους είναι νερό συνήθως ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση αλλά πλούσιο σε ανόργανα στοιχεία, όπως άζωτο (N), φώσφορο (P), σίδηρο και σε μερικές περιπτώσεις πυρίτιο, ενώ είναι σε θέση να καλλιεργηθούν ακόμα και σε περιθωριακά εδάφη για την ανάπτυξή τους (π.χ. έρημο, ημι-άνυδρα εδάφη) τα οποία όμως δεν είναι κατάλληλα για συμβατική γεωργία. Η ανάγκη τους επίσης για διοξείδιο του άνθρακα είναι μεγάλη και σχετίζεται με την παραγωγή βιομάζας. Γι αυτό το λόγο η παραγωγή τους συχνά πραγματοποιείται κοντά σε σταθμούς παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας όπου γίνεται εκμετάλλευση του διοξειδίου του άνθρακα. Διάφορα είδη μικροφυκών μπορούν να προσαρμοστούν και να αναπτύσσονται σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες, γεγονός που δεν είναι εφικτό για άλλες υφιστάμενες πρώτες ύλες (π.χ. σογιέλαιο, ηλιέλαιο και φοινικέλαιο). Επίσης έχουν πολύ υψηλότερα ποσοστά ανάπτυξης και παραγωγικότητας, ενώ απαιτούν λιγότερη έκταση σε σχέση με τις πρώτες ύλες γεωργικής προέλευσης (Mata et al. 2010; Tabatabaei et al. 2011). Σε γενικές γραμμές, η μέση απόδοση της παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη μπορεί να είναι 15 με 20 φορές υψηλότερη ανά εκτάριο σε σχέση με την απόδοση που λαμβάνεται από ελαιούχους σπόρους και φυτικά έλαια (Moazami et al. 2011). Η παραγωγή τους δεν είναι εποχιακή και μπορούν να συλλεχθούν ημερησίως (Gouveia and Oliveira 2009). Η βιομάζα τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή διαφόρων ειδών βιοκαυσίμων και υποπροϊόντων τους όπως βιομεθάνιο και βιουδρογόνο, αλλά και να επεξεργαστεί είτε σαν ζωοτροφή, είτε για χρήση οργανικών λιπασμάτων (υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο και φώσφορο). Εκτός αυτού, μπορούν να παραχθούν παραπροϊόντα ή υποπροϊόντα προστιθέμενης αξίας όπως βιοπολυμερή, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, χρωστικές και H_2. (Mata et al. 2010; Chisti, 2007; Hu et al. 2008)

3.3.2.3 Παραγωγή βιοντίζελ από μικροφύκη με περιορισμό ή έλλειψη της πηγής του αζώτου

Τα μικροφύκη, συγκεντρώνουν μεγάλη προσοχή ως πρώτες ύλες για τη παραγωγή βιοκαυσίμων. Ορισμένα στελέχη μάλιστα συσσωρεύουν μεγάλη ποσότητα λιπιδίων στο κύτταρό τους, αφού προηγηθεί η στέρηση των θρεπτικών συστατικών και συγκεκριμένα του αζώτου (N) (Simionato et al. 2013). Εκτός αυτού, η ανάπτυξη τους σε ακραίες συνθήκες καλλιέργειας όπως είναι οι χαμηλές θερμοκρασίες αλλά και η χαμηλή πυκνότητα ροής φωτονίων που επηρεάζουν σημαντικά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης φαίνεται να

επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή λιπιδίων (Mock and Kroon 2002). Όσον αφορά τον περιορισμό σε άζωτο, έχει σαν αποτέλεσμα τόσο τη βελτίωση της συσσώρευσης λιπιδίων του στελέχους, όσο και την αλλαγή στη λιπιδική του σύνθεση, όπου τα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντικαθίστανται από τριγλυκερίδια (TAG) τα οποία είναι περισσότερο χρήσιμα στην μετατροπή σε βιοντίζελ. Αν και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός περιορίζεται σημαντικά με αυτή τη διαδικασία, ο άνθρακας που συνεχίζει να αφομοιώνεται από τα κύτταρα, μετατρέπεται σε τριγλυκερίδια αυξάνοντας έτσι την συσσώρευση (Brennan and Owende 2010). Ο περιορισμός του αζώτου επιδρά στη φωτοσύνθεση μειώνοντας την απορρόφηση φωτός. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχει μια μείωση στην περιεκτικότητα χλωροφύλλης (Chl), αλλά και στο ποσό των φωτοσυνθετικών συμπλεγμάτων. Εργαστηριακές μελέτες έχουν ήδη αρχίσει να εστιάζουν το ενδιαφέρον τους στους μοριακούς μηχανισμούς αναστολής της φωτοσύνθεσης υπό τη στέρηση θρεπτικών συστατικών (Simionato et al. 2013). Ήδη από τα τα τέλη της δεκαετίας του 1940, όταν οι Spoehr και Milner (1949), απέδειξαν ότι το στέλεχος *Chlorella pyrenoidosa* κατάφερε να συσσωρεύσει μέχρι και 85% λιπιδίων με τον περιορισμό της πηγής του αζώτου, όταν τυπικά κάτω από φυσιολογικές συνθήκες συσσωρεύει περίπου ένα ποσοστό της τάξης του 5%, θεωρήθηκε η μέθοδος αυτή ως η πιο αποτελεσματική προσέγγιση για την αύξηση του λιπιδικού περιεχομένου στα μικροφύκη (Rodolfi et al. 2008). Έχει καταγραφεί ποσοστό μέχρι και 76% αύξηση στην παραγωγή λιπιδίων για συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης όταν συγκριθεί με περισσότερο τυπικές διεργασίες ανάπτυξης. Οι Weldy και Hueseman υποστήριξαν στην έρευνά τους ότι στις μικροάλγες, η περιεκτικότητα σε λιπίδια είναι λιγότερη σημαντική σε σχέση με την μεγιστοποίηση του ρυθμού ανάπτυξης τους. Ακόμη, τα πειραματικά τους αποτελέσματα έδειξαν ότι οι καλλιέργειες οι οποίες ήταν ανεπαρκείς σε νιτρικά συστατικά είχαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπίδια (%) σε σχέση με όσες είχαν επαρκή ποσότητα νιτρικών. Επίσης οι καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν κάτω από έντονο φως παρουσίασαν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λιπίδια. Τέλος, η συγκέντρωση των λιπιδίων καθώς και οι ρυθμοί παραγωγής τους, δείχνουν ότι οι υψηλότερες ποσότητες αυτών συσσωρεύονται κάτω από επαρκείς συνθήκες νιτρικών και υψηλής έντασης φωτισμό λόγω της αύξησης της βιομάζας (Wedley and Huseman, 2007).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - NANNOCHLOROPSIS

4.1 Γενικά

Ο μικροοργανισμός *Nannochloropsis sp*., είναι ένα θαλάσσιο μονοκύτταρο άλγος που ανήκει στην κατηγορία των Eustigmatophyceae (αν και παλαιότερα άνηκε στα Clorophyceae) της ομάδας Heterokontophyta, μια διαφορετική ομάδα αλγών που περιλαμβάνει καφέ και διάτομα άλγη. Ενώ η οικογένεια που κατατάσσεται ονομάζεται Monodopsidaceae. Παλαιότερα ήταν γνωστός ως ‘‘*marine Chlorella* ’’ αλλά ταυτίστηκε με βάση τη δομή του και μετονομάστηκε σε *Nannochloropsis* από τον Maruyama το 1986 (Tredici et al. 2003).

Ο χαρακτηρισμός του στελέχους *Nannochloropsis* ξεκίνησε από τον Ernst Georg Pringsheim. Στις αρχές του 1920, ο ίδιος και οι συνεργάτες του, απομόνωσαν ένα πρώτο απόθεμα καλλιέργειας στο Γερμανικό πανεπιστήμιο της Πράγας. Συνεχιστής του έργου του, ο μεταπτυχιακός του φοιτητής Michael Droop, το 1995 εκμεταλλευόμενος τις τεχνικές και τις γνώσεις του δασκάλου του σχετικά με τη φυκολογία, περιέγραψε ένα μικρό κοκκοειδές άλγος ως *Nannochloris oculata*. (http://www.uni-goettingen.de).

Το στέλεχος *Nannochloropsis* είναι ένα γένος που για πρώτη φορά περιγράφτηκε από τον Hibbered (1981) και μεταφέρθηκε ταυτόχρονα στην κατηγορία Eustigmatophyceae. Το στέλεχος που νωρίτερα ο Droop είχε ονομάσει ως *Nannochloris oculata*, μετονομάστηκε τότε σε *Nannochloropsis oculata* (Hibberd D.J. 1981). Ο προσδιορισμός του γένους αυτού είναι δύσκολος, διότι τα κύτταρά του είναι τόσο μικρά και δυσδιάκριτα σε σχέση με αυτά άλλων χλωροφυκών, που είναι δύσκολο να καθοριστούν ακόμα και με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Cohen, 1999).

Το μέγεθός του κυμαίνεται από 2-5 χιλιοστά και διανέμεται ευρέως σε θαλασσινό, γλυκό και υφάλμυρο νερό (Wang et al. 2013).

Τα στελέχη αυτού του γένους έχουν διερευνηθεί όσον αφορά στη λιπιδική τους σύνθεση αλλά και τη συσσώρευση λιπιδίων. Ακόμη, ιδιαίτερο ενδιαφέρον δείχνουν να έχουν οι επιτυχημένες καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας που χρησιμοποιούν το φυσικό φώς του ήλιου σε εταιρίες όπως οι εξής: Solix Biofuels, Aurora Algae, Seambiotic, Hairong Electric Company/Seambiotic and Proviron (Ma et al. 2014). Επιπλέον, η παραγωγή βιομάζας από το στέλεχος αυτό πραγματοποιείται κάτω από διαφορετικές συνθήκες και μελετάται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια. Λαμβάνοντας υπόψη τις δυνατότητες αυτού του στελέχους ως βιομηχανική πρώτη ύλη και την πρόοδο που έχει σημειωθεί στην ανάπτυξη ομόλογων

γονιδίων αντικατάστασης, διάφορες ερευνητικές ομάδες εργάζονται πάνω στην αλληλουχία του γονιδιώματος των διαφόρων στελεχών του *Nannochloropsis* (Vieler et al. 2012).

4.2 Κατηγοριοποίηση στελέχους

Το στέλεχος *Nannochloropsis sp*., περιλαμβάνει έξι διαφορετικά είδη, τα οποία έχουν περιγραφεί τα τελευταία 30 χρόνια.

- *N. Oceanica* Suda & Miyashita, 2002
- *N. Salina* D.J.Hibberd, 1981
- *N. Gaditana* L.M.Lubián, 1982
- *N. Oculata* (Droop) D.J.Hibberd 1981
- *N. Granulata* B.Karlson & D.Potter, 1996
- *N. limnetica* L.Krienitz, D.Hepperle, H.-B.Stich & W.Weiler 2000

(http://www.algaebase.org)

Αυτοκρατορία	Eukaryota
Βασίλειο	Chromista
Ζωολογική Διαίρεση	Heterokontophyta
Κατηγορία	Eustigmatophyceae
Τάξη	Eustigmatales
Οικογένεια	Monodopsidaceae

Τρία από τα στελέχη *N. salina, N. oculata* και *N. Gaditana* έχουν λάβει την μεγαλύτερη προσοχή λόγω της εξαιρετικής παραγωγής λιπιδίων. Το *N. Gaditana* χαρακτηρίζεται για την υψηλή και ταυτόχρονη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων ενώ ταυτόχρονα μπορεί να αναπτυχθεί σε υψηλές πυκνότητες (> 10 g L^{-1}) και υπό ένα μεγάλο εύρος συνθηκών που αφορά στο pH, στη θερμοκρασία και στην αλατότητα (Radakovits et al. 2012). Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος *N. Oceanica* IMET1 φαίνεται να έχει την πιο γρήγορη ειδική ανάπτυξη, ενώ το στέλεχος *N. Salina* CCMP1176 την υψηλότερη παραγωγή βιομάζας στο τέλος της καλλιέργειας του. Όσον αφορά στην περιεκτικότητα σε λιπίδια, το στέλεχος *N. Granulata* CCMP529 έχει το υψηλότερο ποσοστό (60,35%) την τελευταία ημέρα

καλλιέργειας ενώ συγκρινόμενο με την παραγωγή βιομάζας του, είναι το στέλεχος *N Oceanica* IMET1 εκείνο το οποίο έχει την μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων (158.65 $mgL^{-1}day^{-1}$) (Ma et al. 2014).

4.3 Βιοενεργά Συστατικά

Όπως όλα τα μικροφύκη, έτσι και το στέλεχος *Nannochloropsis* αποτελεί μια φυσική πηγή προϊόντων υψηλής αξίας όπως είναι τα καροτενοειδή, τα λιπαρά οξέα (FAs), τα στεροειδή και τους πολυσακχαρίτες. Τα περισσότερα από τα πολύτιμα συστατικά που παράγονται από τα μικροφύκη είναι δευτερογενής μεταβολίτες, οι οποίοι μπορούν να οριστούν και ως οργανικές ενώσεις οι οποίες δεν συσσωρεύονται και δεν συμμετέχουν άμεσα στην ανάπτυξη ή εξέλιξη των στελεχών, αλλά εμφανίζονται κάτω από συνθήκες στρες. Τα πολυγονιδιακά βιοσυνθετικά μονοπάτια των δευτερογενών μεταβολιτών είναι καθορισμένα για κάθε στέλεχος, υποδεικνύοντας ότι ο ρόλος τους αφορά στην επιβίωση των οργανισμών που τα παράγουν (Recht et al. 2012)

4.3.1 Χρωστικές ουσίες

Μέλη αυτού του γένους χαρακτηρίζονται από την απουσία χλωροφύλλης b, c καθώς και λουτεΐνης, το οποίο αποτελεί κοινό γνώρισμα όσων ανήκουν στην κατηγορία Eustigmatophyceae (Cao et al 2013). Εκτός από τα β-καροτενοειδή, όλα τα είδη του στελέχους *Nannochloropsis* περιέχουν σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις την βιολαξανθίνη (60% του συνόλου των καροτενοειδών) και την βοχεραξανθίνη σαν χρωστικές (Cohen, 1999). Η ζεαξανθίνη και η ασταξανθίνη μπορούν να ανιχνευτούν σαν συστατικά, σε καλλιέργειες που αναπτύσσονται κάτω από φώς υψηλής έντασης (Rebolloso-Fuentes et al. 2001). Μια αύξηση της περιεκτικότητας των εν λόγω καροτενοειδών, σχετίζεται με μια αλλαγή στο χρώμα της καλλιέργειας από πράσινο σε κόκκινο-πορτοκαλί, το οποίο και προμηνύει την γήρανση της καλλιέργειας και κατά συνέπεια την εξάντληση των θρεπτικών ουσιών (Lubian et al 2000). Ειδικότερα, τα συγκεκριμένα καροτενοειδή, έχουν θεωρηθεί ως καθαριστές ελευθέρων ριζών, δηλαδή βοηθούν στην πρόληψη του καρκίνου, ενώ πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο όσον αφορά στην προστασία ενάντια σε έναν μεγάλο αριθμό χρόνιων καταστάσεων υγείας (Nobre et al. 2013).

Η χρωστική σύνθεση του στελέχους *Nannochloropsis*, χαρακτηρίζεται κατά βάση από την χλωροφύλλη α. Εξαιτίας της σταθερής δομής που διαθέτει το συγκεκριμένο στέλεχος

(ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα), μελέτες έδειξαν ότι είναι απαραίτητη η χρήση διαλύτη με μεγάλη δύναμη εκχύλισης, όπως είναι η μεθανόλη, ώστε να επιτρέπεται μια αποτελεσματική ανάκτηση της χλωροφύλλης (Henriques et al. 2007). Κατά την ανάπτυξη του στελέχους κάτω από συνθήκες περιορισμού της πηγής του αζώτου (απόκριση στρες), η περιεκτικότητα της χλωροφύλλης μειώνεται απότομα για το πρώτο 3ήμερο ενώ συνεχίζει με πιο βραδύ ρυθμό για το υπόλοιπο της ανάπτυξης σύμφωνα με έρευνες (Recht et al. 2012). Στον παρακάτω Πίνακα 3, απεικονίζεται το περιεχόμενο των κύριων χρωστικών ουσιών του στελέχους *Nannochloropsis* μετά από καλλιέργειες 10 και 20 ημερών.

Πίνακας 3: Σχετική αναλογία από τα κύρια καροτενοειδή στο σύνολό τους, περιεχόμενη χλωροφύλλη α ανά κύτταρο (ng<106cell>-1), σε διάφορα είδη του στελέχους *Nannochloropsis* μετά από 10 και 20 ημέρες ανάπτυξης καλλιέργειας (Lubian et al 2000)

Χρωστικές	Ημέρα	N.oculata	N.salina	N.gaditana
Violaxanthin	10	48.9	47.7	37.4
	20	32.0	28.0	31.7
Astaxanthin	10	2.6	5.4	6.7
	20	3.4	9.6	12.4
Antheraxanthin	10	0.9	3.4	3.5
	20	5.6	5.2	6.1
Vaucheriaxanthin	10	45.3	32.9	46.9
	20	47.2	26.5	22.8
Zeaxanthin	10	0.8	3.3	1.0
	20	1.8	5.9	4.9
Canthaxanthin	10	1.5	7.3	4.5
	20	4.5	15.9	16.9
***β*-carotene**	10	n.d.	n.d.	n.d.
	20	5.5	8.8	5.2
Chlorophyll *a*	10	116.4	116.8	92.6
	20	168.6	103.8	89.7

4.3.2 Σάκχαρα

Το κυρίαρχο σάκχαρο στη σύνθεση πολυσακχαριτών του στελέχους *Nannochloropsis* είναι η γλυκόζη, που αποτελεί και το 68% αυτών. Περιέχει επίσης φουκόζη, γαλακτόζη, μανόζη, ραμνόζη, ριβόζη και ξυλόζη σε ποσοστό λιγότερο από 10% στη σύστασή του. Γενικά η σύσταση πολυσακχαριτών του γένους αυτού μοιάζει κατά πολύ με αυτή των διατόμων (diatoms), εκτός από το γεγονός ότι δεν περιέχει αραβινόζη (Cohen 1999).

Σε αρκετές μικροβιολογικές μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει μια άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των μεταβολισμών του αζώτου και του άνθρακα σε φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς, όπως είναι και τα μικροφύκη (Pagnanelli et al. 2013). Το 2012 οι Recht et al. έδειξαν ότι υπό συνθήκες έντονου περιορισμού της πηγής του αζώτου, το σύνολο των

υδατανθράκων παραμένει σταθερό σε ποσοστό περίπου 18% επί της ξηρής βιομάζας αν και το σύνολο της παραγωγικότητας τους φάνηκε να έχει μια ήπια αύξηση.

4.3.3 Αμινοξέα

Όσον αφορά στην κατηγορία των αμινοξέων, το στέλεχος περιέχει τις ουσίες μεθιονίνη (methionine), tryptophan, cystine, histidine και hydroxyproline σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε αντίθεση με την aspartate,την glutamate και την προλίνη (proline) που κυριαρχούν σε υψηλά ποσοστά (Cohen 1999).

4.3.4 Λιπίδια και Στερόλες

Μεταξύ των φωσφολιπιδίων, υπάρχουν ορισμένα τα οποία βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στον μικροοργανισμό *Nannochloropsis* όπως phosphatidylcholine (PC) και άλλα σε μικρότερες phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) και phosphatidylinositol (PI). Η παρουσία της diacylglycerol trimethylhomoserine (DGTS) στο στέλεχος *Nannochloropsis* αναφέρθηκε από τους Schneider και Roesler το 1994. Τέλος, αναφορικά με την περιεκτικότητα του στελέχους σε λιπίδια, το μεγαλύτερο ποσοστό της τάξης του 45% των πολικών λιπιδίων καταλαμβάνουν τα εξής δύο : glycerolipids monogalactosyl diacyglycerol (MGDG) και digalactosyl diacylglycerol (DGDG). Η χοληστερόλη αποτελεί τη βασική στερόλη σε όλα τα γένη του στελέχους, ενώ κάποιες ακόμα είναι η φουκοστερόλη και η ισοφουκοστερόλη (Cohen 1999).

4.3.5 Λιπαρά Οξέα

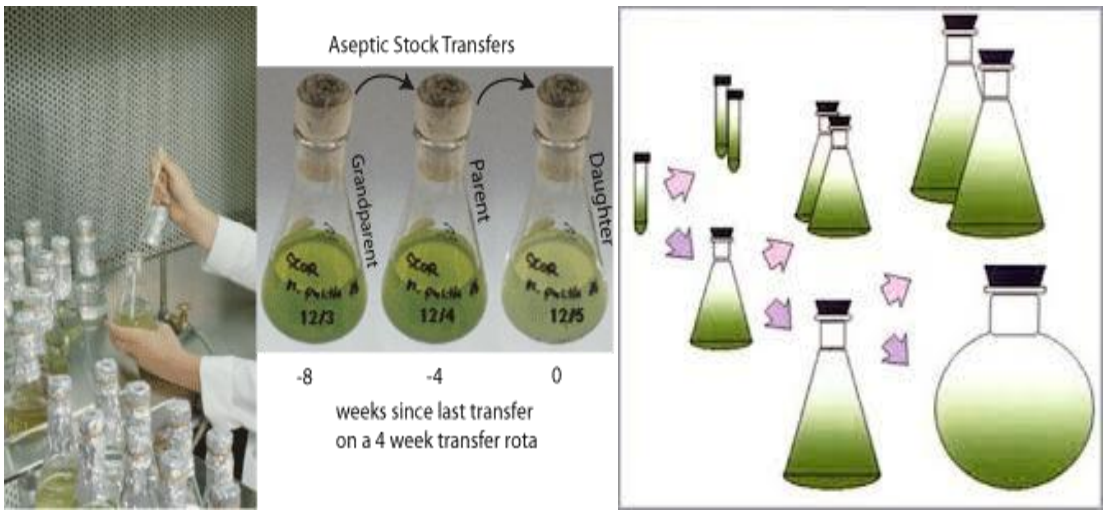
Το κυριότερο κυτταρικό συστατικό του στελέχους *Nannochloropsis* που ενδιαφέρει ιδιαίτερα τους επιστήμονες αλλά και την βιομηχανία, είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Πιο συγκεκριμένα, τα βασικά λιπαρά οξέα του στελέχους είναι τα εξής : 14:0, 16:0, 16:1, 20:4ω6 και 20:ω5, εμφανίζοντας ιδιαίτερα υψηλές τιμές περιεκτικότητας στο εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) (Cohen 1999). Όλα τα είδη του στελέχους *Nannochloropsis* διαθέτουν περιεκτικότητα σε ολικά λιπαρά σε ποσοστό 10-60% επί της ξηρής βιομάζας (Carrero et al. 2010). Το ποσοστό αυτό μπορεί να φτάσει ακόμα και το 70% ανά ξηρό βάρος την $9^{η}$ ημέρα καλλιέργειας του στελέχους, όταν αυτό αναπτυχθεί σε περιβάλλον στέρησης

της πηγής του αζώτου. Αρκετοί ερευνητές ανέφεραν ότι η συσσώρευση λιπιδίων τυπικώς παρατηρείται μετά την εξάντληση ενός θρεπτικού συστατικού στο μέσο ανάπτυξης και συνήθως του αζώτου (Boussiba et al. 1987; Bellou and Aggelis 2012). Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν ότι καλλιέργειες του στελέχους *Nannochloropsis sp.* σε περιβάλλον στέρησης της πηγής του αζώτου, έχουν τη δυνατότητα για ετήσια παραγωγή 20 τόνων λιπιδίων ανά εκτάριο όταν η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε μεσογειακό κλίμα, ενώ ανέρχεται στους 30 τόνους ανά εκτάριο, όταν το στέλεχος καλλιεργείται σε τροπικές περιοχές (Jorquera et al. 2010). Όσον αφορά στις καλλιέργειες του στελέχους *Nannochloropsis* σε εξωτερικούς χώρους, παρατηρήθηκε ένα υψηλότερο επίπεδο λιπιδίων στα κύτταρα του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (21-28%) από ότι το χειμώνα (13-17%).Αν και η θερμοκρασία ως εκ τούτου φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη συσσώρευση σε λιπίδια του μικροοργανισμού, άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η ένταση του φωτός καθώς και η περιεκτικότητα σε αλάτι και σίδηρο δεν μπορούν να αποκλειστούν (Boussiba et al. 1987; Bellou and Aggelis 2012).

Η στέρηση των νιτρικών ουσιών στο μέσο καλλιέργειας, μεταβάλλει σημαντικά τις αναλογίες των ακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η περιεκτικότητα σε ολικά λιπαρά οξέα αυξάνει ταχύτατα, φθάνοντας σχεδόν το 50% της ξηρής τους βιομάζας από μια αρχική περιεκτικότητα της τάξης του 13%. Μάλιστα ενώ η βιομάζα αυξάνεται με σταθερό ρυθμό, τα ολικά λιπαρά οξέα δείχνουν μια συνεχόμενη και απότομη αύξηση. Αντίθετα, η υψηλή ένταση φωτός σε συνδυασμό με την χαμηλή θερμοκρασία φέρουν αντίθετα αποτελέσματα επί του συνόλου των κυττάρων και των λιπιδίων (Boussiba et al. 1987; Recht et al. 2012). Η παραγωγή λιπιδίων του στελέχους *Nannochloropsis sp.* αντιστοιχεί σε περίπου 82mg/L/day, με παραγωγή βιομάζας αντίστοιχα 0,27g/L/day, όπως αναφέρθηκε από τους Porphy and Farid το 2011.

4.4 Συνθήκες καλλιέργειας στελέχους

Οι καλλιέργειες του στελέχους πραγματοποιούνται σύμφωνα με τις διαδικασίες συντήρησής του αλλά και του πρωτοκόλλου μεταφοράς. Ο σκοπός της διατήρησης πλήθους καλλιεργειών είναι για να εξισορροπεί τις ανάγκες αποθέματος υγειών καλλιεργειών. Κάθε στέλεχος διατηρείται για 3 γενιές σε υγρό μέσο σε κωνικές φιάλες και με τοποθέτηση βαμβακιού με αλουμινόχαρτο στην κορυφή για αποφυγή μολύνσεων. Οι 3 γενιές συμβολίζονται ως κόρη (daughter), γονέας (parent) και πρόγονος (grandparent) όπως παρουσιάζονται και στις επόμενες εικόνες.



Εικόνα 7: Ανακαλλιέργειες στελεχών

Οι όγκοι συνήθως είναι 30-40 mL καλλιέργειας σε κωνικές φιάλες των 50 ml, 75 ml καλλιέργειας σε κωνικές φιάλες των 125 mL ή 125 ml καλλιέργειας σε κωνικές φιάλες των 250 ml. Η διαδικασία ανακαλλιέργειας των στελεχών πραγματοποιείται σε διάστημα 4 - 6 εβδομάδων.

Η μαζική παραγωγή του στελέχους *Nannochloropsis,* πραγματοποιείται είτε σε ανοιχτά συστήματα (raceway ponds), είτε σε κλειστούς φωτό-βιοαντιδραστήρες (PBRs). Αν και οι ανοιχτές δεξαμενές αποτελούν το παλαιότερο και απλούστερο σύστημα για την καλλιέργεια μικροφυκών, προκύπτουν και αρκετά μειονεκτήματα συγκριτικά με τους φωτο-βιοαντιδραστήρες. Μερικά από αυτά είναι η κατά πολύ χαμηλή συγκέντρωση βιομάζας, η δυσκολία ανάμειξης των κυττάρων του στελέχους με τα θρεπτικά συστατικά και το CO_2 αλλά και η αναστολή του οξυγόνου. Από την πλευρά, η χρήση φωτο-βιοαντιδραστήρων για την καλλιέργεια μικροφυκών, επιφέρει κατά πολύ μεγαλύτερες δαπάνες για τη λειτουργία τους (Moazami et al. 2012).

Εικόνα 8: Μικρού και μεσαίου μεγέθους ανοιχτά συστήματα καλλιέργειας (raceway ponds) μικροαλγών (http://www.nanovoltaics.com)

Στα εκκολαπτήρια, η καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis,* πραγματοποιείται σε σακούλες πολυαιθυλενίου ή σε διαφανή φιάλες, κατά κύριο λόγο υπό τεχνητό φως. Σε πειραματικό επίπεδο, σε εργαστήριο ή σε πρότυπες εγκαταστάσεις, έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για μαζική παραγωγή της Nannochloropsis, φωτοβιοαντιδραστήρες (πάνελ, σωληνοειδής, δακτυλιοειδής αντιδραστήρες) με υψηλότερη αναλογία επιφάνειας – όγκου υπό τεχνητό ή φυσικό φως (Rodolfi et al. 2003).

Εικόνα 9: Μεγάλης κλίμακας παραγωγή μικροφυκών σε δεξαμενή εσωτερικού χώρου (Moazami et al. 2012)

ΙΙ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή – Σκοπός

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε ο ρόλος της πηγής του αζώτου στην ανάπτυξη του μικροφύκους Nannochloropsis sp. καθώς και στη σύνθεση ενώσεων εμπορικού ενδιαφέροντος. Πιο συγκεκριμένα, δόθηκε ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον προσδιορισμό ποιοτικών, καθώς και ποσοτικών αποτελεσμάτων μερικών από τους κύριους μεταβολίτες του μικροοργανισμού.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος ***Nannochloropsis sp.*** με κωδικό (CCMP1779) από το Provasoli-Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota.

2. Όργανα

- Φωτόμετρο
- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία)
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας
- Επωαστήρας
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Microplate reader (SpectraMax 250, Molecular Devices)
- Διάταξη Λυοφιλίωσης
- Φούρνος υπό κενό
- Φυγόκεντρος

3. Καλλιέργεια στελέχους Nannochloropsis sp. (συνθήκες)

Η καλλιέργεια του στελέχους πραγματοποιήθηκε, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της UTEX (The culture collection of Algae at University of Texas Austin), το οποίο προστάζει κάθε στέλεχος να διατηρείται για 3 γενιές σε υγρό περιβάλλον, σε κωνικές φιάλες με βαμβάκι. Οι συνηθισμένοι όγκοι είναι: 30-40mL καλλιέργειας σε φιάλη των 50mL, 75mL καλλιέργειας σε φιάλη των 125mL ή 125mL καλλιέργειας σε φιάλη των 250mL. Στην παρούσα διπλωματική εργασία το στέλεχος Nannochloropsis sp., διατηρούνταν σε 50mL υγρό περιβάλλον σε κωνικές φιάλες των 100mL, καλυμμένες με βαμβάκι σε επωαστήρα στους 20°C, φωτιζόμενο από λάμπες έντασης 75 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, σε κύκλους φωτός δηλαδή 16 ώρες φώς, 8 ώρες σκοτάδι. Η ποσότητα του εμβολίου αποτελεί το 10-15% του τελικού όγκου

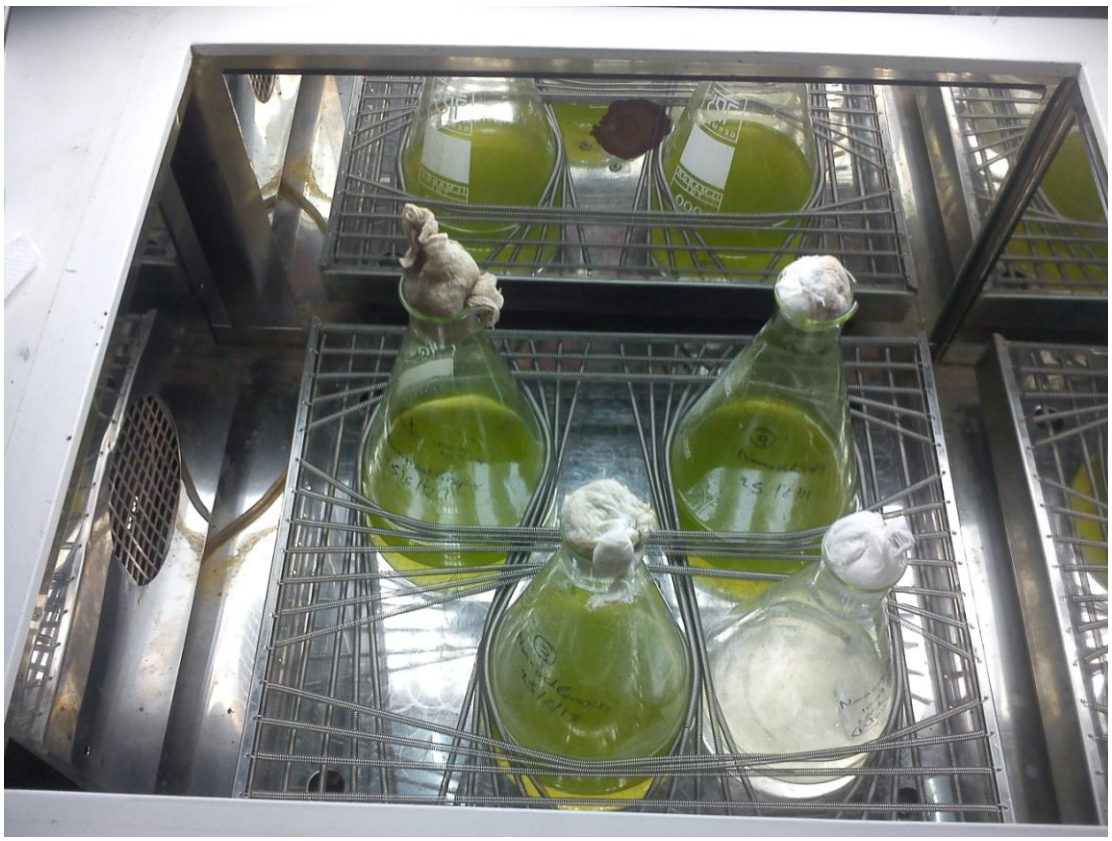
της καλλιέργειας και μεταφέρεται από προκαλλιέργεια των 50mL σε καινούριο θρεπτικό μέσο.

Για τις καλλιέργειες, χρησιμοποιήθηκε θαλασσινό νερό φιλτραρισμένο αρχικά σε διηθητικό χαρτί για την απομάκρυνση των ακαθαρσιών και στη συνέχεια με τη βοήθεια της συσκευής διήθησης υπό κενό και φίλτρο διαμέτρου 0.45μm ακολουθούσε η απομάκρυνση στερεών και μικροοργανισμών. Η πειραματική διαδικασία είχε ως εξής: μεταφέρθηκε 1L θαλασσινού νερού σε κωνική φιάλη των 2L. Στο μέσο ανάπτυξης προστέθηκε Tris-HCl 0,05 M με σκοπό την ρύθμιση του pH στο 8.0, ώστε να αποφευχθούν οι μεγάλες διακυμάνσεις του κατά την διάρκεια της καλλιέργειας. Τέλος, οι κωνικές φιάλες καλύφθηκαν με πώματα από βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και αποστειρώθηκαν σε αυτόκλειστο στους 121 ^{o}C για 20 λεπτά.

Η πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αυξηθεί η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στην αρχή της εκθετικής φάσης είναι 0.5 g/L $NaHCO_3$, το οποίο αποστειρώθηκε πριν τον εμβολιασμό της καλλιέργειας.

Οι καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν για τις ανάγκες του πειράματος διέθεταν σταθερό όγκο ίσο με 1L. Τα 900mL περιείχαν φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό με την προσθήκη των θρεπτικών συστατικών και τα υπόλοιπα 100mL αποτελούσαν το εμβόλιο. Η ποσότητα του εμβολίου ήταν το 10% του τελικού όγκου της καλλιέργειας. Χρησιμοποιήθηκε αξενική αυτοτροφική καλλιέργεια ηλικίας 7 ημερών, ώστε ο μικροοργανισμός να βρίσκεται σε φάση ανάπτυξης.

Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε αποστειρωμένο περιβάλλον (hood) για την αποφυγή μολύνσεων και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε φωτοβιοαντιδραστήρα για ανάπτυξη. Εκεί διέθεταν συνεχώς φωτισμό έντασης 100 μmol. photons m^{-2} s^{-1} και θερμοκρασία σταθερή στους 20 ^{o}C. Ακόμη επιβλήθηκε και μια ήπια ανάδευση στις καλλιέργειες (130 rpm) για την αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης.



Εικόνα 10: Καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp*. σε κωνικές φιάλες σε επωαστήρα

4. Παρασκευή θρεπτικού μέσου f/2 Medium

Με σκοπό την μελέτη ανάπτυξης του στελέχους σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$, παρασκευάστηκε το θρεπτικό μέσο.

Αρχικά δημιουργήθηκε ένα διάλυμα ιχνοστοιχείων (trace metals), όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα, το οποίο αποστειρώθηκε και διατηρήθηκε στο ψυγείο.

Πίνακας 4: Trace metals for the media

	Stock solution	Quantities	concentration
$FeCl_3$ $6H_2O$	---	3.15 g	1.17×10^{-5} M
Na_2EDTA $2H_2O$	---	4.36 g	1.17×10^{-5} M
$CuSO_4$ $5H_2O$	9.8 g/L dH_2O	1 mL	3.93×10^{-8} M
Na_2MoO_4 $2H_2O$	6.3 g/L dH_2O	1 mL	2.60×10^{-8} M
ZnSO4 $7H_2O$	22.0 g/L dH_2O	1 mL	7.65×10^{-8} M
$CoCl_2$ $6H_2O$	10.0 g/L dH_2O	1 mL	4.20×10^{-8} M
$MnCl_2$ $4H_2O$	180.0 g/L dH_2O	1 mL	9.10×10^{-7} M

Επιπλέον, παρασκευάστηκε και το αντίστοιχο διάλυμα βιταμινών το οποίο αποστειρώθηκε με φιλτράκι τοποθετημένο σε σύριγγα και στη συνέχεια διατηρήθηκε σε ependorfs (των 1,5mL) στο ψυγείο. Η σύσταση του διαλύματος φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5: Vitamins for the media

	Stock solution	Quantities	concentration
thiamine HCl (vit. B_1)	---	200 mg	2.96×10^{-7} M
biotin (vit. H)	0.1 g/L dH_2O	10 mL	2.05×10^{-9} M
cyanocobalamin (vit. B_{12})	1.0 g/L dH_2O	1 mL	3.69×10^{-10} M

Η πηγή του αζώτου που χρησιμοποιήθηκε στη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν το NaNO3 σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 6: Content of the media

	Working solution	Quantities	concentration
$NaNO_3$	----------	**1 mL**	8.82×10^{-4} M
$NaH_2PO_4 .2H_2O$	5 g/L dH_2O	**1 mL**	3.62×10^{-5} M
Trace metals	See recipe	**1 mL**	---
vitamins	See recipe	**0.5 mL**	---

Οι συγκεντρώσεις των νιτρικών αλάτων ήταν οι εξής:

1. 0,0375gr/L
2. 0,0750gr/L
3. 0,0930gr/L
4. 0,1125gr/L

Η επιλογή των παραπάνω συγκεντρώσεων των νιτρικών αλάτων έγινε με βάση την κεντρική τιμή (0,075gr/L), η οποία και προτείνεται βιβλιογραφικά από τη σύσταση του θρεπτικού μέσου f/2 medium. Η απόκλιση στις τιμές των συγκεντρώσεων ήταν σε ποσοστό +/- 50% , -20% από την κεντρική τιμή.

5. Διαδικασίες προσδιορισμού σύστασης στελέχους

5.1 Διαδικασία προσδιορισμού κυτταρικής ανάπτυξης

Προκειμένου να προσδιορισθεί η ανάπτυξη του μικροοργανισμού, λαμβάνονταν σχεδόν καθημερινά δείγμα (2mL) από τις καλλιέργειες με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της πηγής αζώτου και μετριόταν η οπτική τους πυκνότητα. Το δείγμα τοποθετούνταν σε κυψελίδα του 1cm και στη συνέχεια σε φασματοφωτόμετρο S-22 UV/VIS Spectrophotometer ώστε να ληφθεί μέτρηση σε μήκος κύματος 750nm (OD750).

5.2 Διαδικασία προσδιορισμού βιομάζας

Ο προσδιορισμός της βιομάζας πραγματοποιείτο μέσω της μέτρησης του ξηρού βάρους. Αρχικά λαμβάνονταν δείγμα 30mL από την καλλιέργεια και ακολουθούσε διήθηση υπό κενό, σε φίλτρο διαμέτρου 0,45μm. Το φίλτρο προζυγιζόταν κάθε φορά ώστε να υπολογίζεται το καθαρό βάρος της βιομάζας. Στη συνέχεια, η βιομάζα με το φίλτρο παρέμενε στη λυοφιλίωση για 24 ώρες (overnight) για να απομακρυνθεί κάθε ίχνος υγρασίας. Στο τέλος της διαδικασίας, το φίλτρο παρέμενε για 10 λεπτά στον ξηραντήρα, για να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα λαμβάνονταν το βάρος του στον αναλυτικό ζυγό.

Εικόνα 11: Συσκευή λυοφιλίωσης

Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής ανάπτυξης στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της θολοσιμετρίας. Μετρήθηκε η απορρόφηση του κυτταρικού αιωρήματος σε μήκος κύματος 750 nm. Η ληφθείσα απορρόφηση μετατράπηκε σε συγκέντρωση κυτταρικής μάζας (mg DCW/ml) με χρήση της αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς. Στα δείγματα προηγήθηκε κατάλληλη αραίωση έτσι ώστε η απορρόφηση να είναι πάντα μικρότερη του 0.5. Η εξίσωση, μέσω της οποίας υπολογίζεται η συγκέντρωση της ξηρής κυτταρικής μάζας είναι:

$$\textbf{Biomass (mgDCW/L)} = 227{,}08 * A_{750}$$

5.3 Διαδικασία προσδιορισμού του περιεχομένου της χλωροφύλλης

Η χλωροφύλλη μετρήθηκε αφού ελήφθη δείγμα των 2 mL από την καλλιέργεια του μικροοργανισμού. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (3000 rpm, 10 min), απόρριψη του υπερκειμένου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 2 mL απεσταγμένου νερού, ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα, τα οποία πιθανώς να συσσωρεύτηκαν με την βιομάζα. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές. Τελικά, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 2 mL μεθανόλης και ακολούθησε έντονη ανάμειξη για 15 sec (vortex). Έπειτα, ακολούθησε φυγοκέντριση των κύτταρων (4000 rpm, 5 min) και η απορρόφηση του υπερκείμενου μετράται σε μήκος κύματος 665 nm. Έπειτα, με την βοήθεια εμπειρικών συσχετίσεων, υπολογίσθηκε η συγκέντρωση της χλωροφύλλης, χρησιμοποιώντας τη μεθανόλη ως τον βασικό διαλύτη. Όπως αναφέρεται βιβλιογραφικά, η επιλογή του συγκεκριμένου ισχυρού διαλύτη στην περίπτωση εκχύλισης, έγινε εξαιτίας της μεγάλης αντίστασης του κυτταρικού τοιχώματος του στελέχους (Henriques, Silva, Rocha 2007). Η συσχέτιση που χρησιμοποιήθηκε ήταν κατά Mackinney (Henriques, Silva, Rocha 2007) ως εξής:

$$\mu g_{\text{χλωροφύλλης}} / mL_{\text{καλλιέργειας}} = (13{,}43\ A^{*}_{665}\ v) / (l\ V)$$

όπου:

$A^{*}_{665} = A_{665} - A_{750}$ έπειτα από την αφαίρεση της απορρόφησης του δείγματος σε μήκος κύματος 750 nm, έναντι ενός τυφλού με διαλύτη (μεθανόλη)

v είναι ο όγκος του διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε (mL)

l είναι το μήκος της κυψελίδας (1 cm)

V είναι ο όγκος του δείγματος (mL)

5.4 Διαδικασία προσδιορισμού πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Lowry (Lowry et al., 1951) όπως παρουσιάζεται στη συνέχεια :

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα απαιτούμενα διαλύματα της μεθόδου:

- A: 1% w/v $CuSO_4\,5H_2O$
- B: 2% w/v sodium potassium tartrate
- C: 0,2M NaOH
- D: 4% w/v sodium carbonate
- F: 10mL Folin + 10mL H_2O

Από τα παραπάνω διαλύματα παρασκευαζόταν κάθε φορά ένα νέο διάλυμα το οποίο διέθετε τις παρακάτω αναλογίες. Το τελικό Ε διάλυμα παρασκευαζόταν σε κάθε πείραμα διότι έπρεπε να αποφευχθούν τυχόν αλλοιώσεις (φρέσκο διάλυμα).

- E: 49mL C + 49mL D + 1mL A + 1mL B

Μετά την ολοκλήρωση των διαλυμάτων ξεκινούσε η διαδικασία προσδιορισμού των πρωτεϊνών.

Πριν την εφαρμογή της μεθόδου Lowry, έγινε καταβύθιση των πρωτεϊνών με (NaOH) ως εξής :

- Αρχικά δείγμα 10mL λήφθηκε απευθείας από την καλλιέργεια, φυγοκεντρήθηκε για 10min και στη συνέχεια έγινε απόχυση του υπερκείμενου υγρού. Το pellet επαναιωρήθηκε σε 2mL NaOH (2N), τοποθετημένο σε γυάλινο vial και μπήκε στο αυτόκλειστο για 1 ώρα στους 100 ^{o}C. Έπειτα το δείγμα φυγοκεντρήθηκε ξανά και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry.

Έτσι, από το υπερκείμενο έγινε ο υπολογισμός ως εξής :

- Δείγμα 0,5mL λήφθηκε (υπερκείμενο υγρό) και αναμίχθηκε καλά με 2,5mL διαλύματος Ε. Το νέο αυτό διάλυμα παρέμεινε σε ηρεμία για 10min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,25mL από το διάλυμα F, αναμιγνύθηκαν καλά στο vortex και το νέο διάλυμα παρέμεινε αυτή τη φορά για 30min. Στο τέλος της διαδικασίας το δείγμα φωτομετρήθηκε στα 750nm. Η εξίσωση, μέσω της οποίας υπολογίστηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του δείγματος είναι :

$$\mathbf{mg_{proteins}\ /mL = 0.596 * A_{750}}$$

Εικόνα 12 : Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry

5.5 Διαδικασία προσδιορισμού λιπαρών

Ο προσδιορισμός των λιπαρών πραγματοποιήθηκε ως εξής :

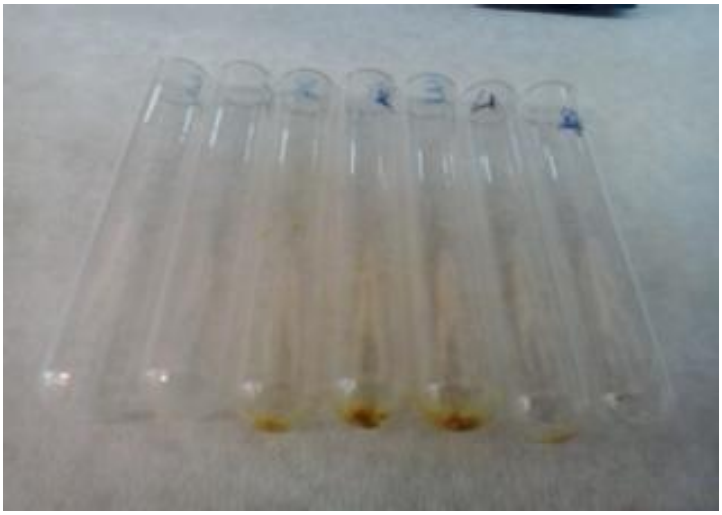
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε φούρνο ξήρανσης θερμοκρασίας 120 ^{o}C για τουλάχιστον 2 ώρες και στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε ξηραντήρα με silica gel για περίπου 30 λεπτά, έτσι ώστε να επέλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χωρίς ίχνος υγρασίας. Έπειτα, ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό και καταγράφηκε το αρχικό τους βάρος. (W_{tubeI})
- Στη συνέχεια σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκε με τη βοήθεια τσιμπίδας φιλτράκι που είχε τοποθετηθεί νωρίτερα στη λυοφιλίωση για τον προσδιορισμό της βιομάζας. Το κάθε σωληνάκι γέμισε με υγρό εξάνιο (τόσο ώστε να καλύπτει το φιλτράκι που διέθετε τη βιομάζα – κύτταρα), καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 69 ^{o}C (θερμοκρασία βρασμού εξανίου) για 4

ώρες. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα , ποσότητα εξανίου προσθέτονταν στα σωληνάκια όταν εκείνο εξατμιζόταν πριν το πέρας του 4ώρου.

Εικόνα 13: Εκχύλιση λιπαρών σε υδατόλουτρο

- Στο τέλος της διαδικασίας και εφόσον είχε πραγματοποιηθεί η εκχύλιση των λιπαρών, γινόταν προσεκτικά αφαίρεση του φίλτρου με τσιμπίδα και το σωληνάκι παρέμενε στο φούρνο για τουλάχιστον 5 ώρες, έως ότου εξατμιστεί κάθε ίχνος εξανίου ή υγρασίας. Έπειτα το σωληνάκι τοποθετούνταν όπως και πριν σε ξηραντήρα για μισή ώρα και ζυγιζόταν εκ νέου το βάρος του. (W_{tubeII}) Από τη διαφορά των δύο μετρήσεων, γίνεται και ο υπολογισμός των ολικών λιπαρών του μικροφύκους.

$g_{lipids}/30mL = W_{tubeII} - W_{tubeI}$



Εικόνα 14: Εκχύλιση λιπαρών για διάφορες μέρες καλλιέργειας

5.6 Διαδικασία προσδιορισμού Γλυκόζης – Αμύλου με χρήση ειδικού εμπορικού σκευάσματος

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του δείγματος σε άμυλο-γλυκόζη, το δείγμα που λαμβανόταν απευθείας από την καλλιέργεια υποβαλλόταν σε μια διαδικασία 'παγώματος' του μεταβολισμού με την εξής διαδικασία :

- Διαδικασία παγώματος μεταβολισμού

  Δείγμα 50mL λαμβανόταν από την καλλιέργεια και ακολουθούσε διήθηση υπό κενό (με φιλτράκι 0,45μm) στο ψυγείο. Τα κύτταρα ξεπλένονται με 10mL NaCl 0.9% και μαζεύονται με σπαθίδα σε γυάλινο vial. Προστίθεται 2,5mL διαλύματος μεθανόλης-νερού συγκέντρωσης 50% v/v (φύλαξη στους -30%). Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80 ^{o}C.

- Διαδικασία απόψυξης δειγμάτων

  Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε 3 κύκλους ψύξης-απόψυξης. Η απόψυξη πραγματοποιήθηκε σε παγόλουτρο. Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 1min και στη συνέχεια πάγωμα στους -80 ^{o}C. Η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμα 2 φορές. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12000-13000rpm για 15min στους -20 ^{o}C και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ποσοτικά στους -80 ^{o}C. Η κυτταρική μάζα καταβυθίστηκε ως ίζημα και επαναιωρήθηκε σε 2,5mL διαλύματος μεθανόλης-νερού, εφαρμόζοντας έντονη ανάδευση για 30sec. Ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 15min στους -20 ^{o}C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ποσοτικά στους -80 ^{o}C και ενώθηκε με το προηγούμενο υπερκείμενο.

Ο προσδιορισμός της **γλυκόζης** έγινε με τη χρήση kit D-GLUCOSE-HK Megazyme (Assay Procedure) ως εξής :

- Ποσότητα 100λ από το υπερκείμενο (που προέκυψε από τη διαδικασία απόψυξης) τοποθετήθηκε σε ependorf και επωάστηκε για 10min στους 90-95 ^{o}C σε δοχείο για να αδρανοποιηθεί η δραστικότητα του ενζύμου. Ακολούθησε φωτομέτρηση μέσω microplate assay όπως αναφέρει το kit.

Ο προσδιορισμός του **αμύλου** έγινε με τη χρήση kit TOTAL STARCH Megazyme (Assay Procedure) ως εξής :

- Ποσότητα 100mg δείγματος (pellet) μεταφέρθηκαν σε ependorf και προστέθηκαν 5mL aqueous ethanol (80%). Το δείγμα παρέμεινε στους 80-85 ^{o}C για 5 λεπτά και αμέσως ανακατεύθηκε με τη βοήθεια vortex και προστέθηκε ξανά η ίδια ποσότητα αιθανόλης (80%). Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10min στις 3000rpm και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Έπειτα προστέθηκαν 2mL KOH (2M) παραμένοντας σε παγόλουτρο για 20min ανακινώντας τα δείγματα τακτικά. Προστέθηκαν 8mL sodium acetate buffer (1.2M) pH 3,8. Αμέσως προστέθηκαν 0,1mL a-amylase (bottle 1) και 0,1 mL AMG (bottle 2), ανακατεύθηκαν καλά και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 50 ^{o}C για 30min. Τέλος, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10min και το υπερκείμενο φωτομετρήθηκε στο microplate (assay) όπως αναφέρει το πρωτόκολλο.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.Εισαγωγή-Σκοπός

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp*. για 15 ημέρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις της πηγής του αζώτου (νιτρικό νάτριο $NaNO_3$). Σε όλη τη διάρκεια ανάπτυξης του στελέχους, οι παράμετροι ένταση φωτός, θερμοκρασία, και pH διατηρήθηκαν σταθερές με τιμές 100μmol photon m^{-2} s^{-1} , 20 ^oC , 8.00, αντίστοιχα. Εφαρμόστηκε μια ήπια ανάδευση στις καλλιέργειες (130rpm) σταθερά καθ' όλη την διάρκεια της επώασης. Προσδιορίστηκε η παραγωγή της βιομάζας, η περιεκτικότητα σε λιπίδια, το περιεχόμενο σε χλωροφύλλη, η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών καθώς και η περιεκτικότητα σε γλυκόζη και άμυλο για τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις της πηγής του αζώτου.

Πίνακας 7: Συγκεντρώσεις $NaNO_3$ που μελετήθηκαν για την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.*

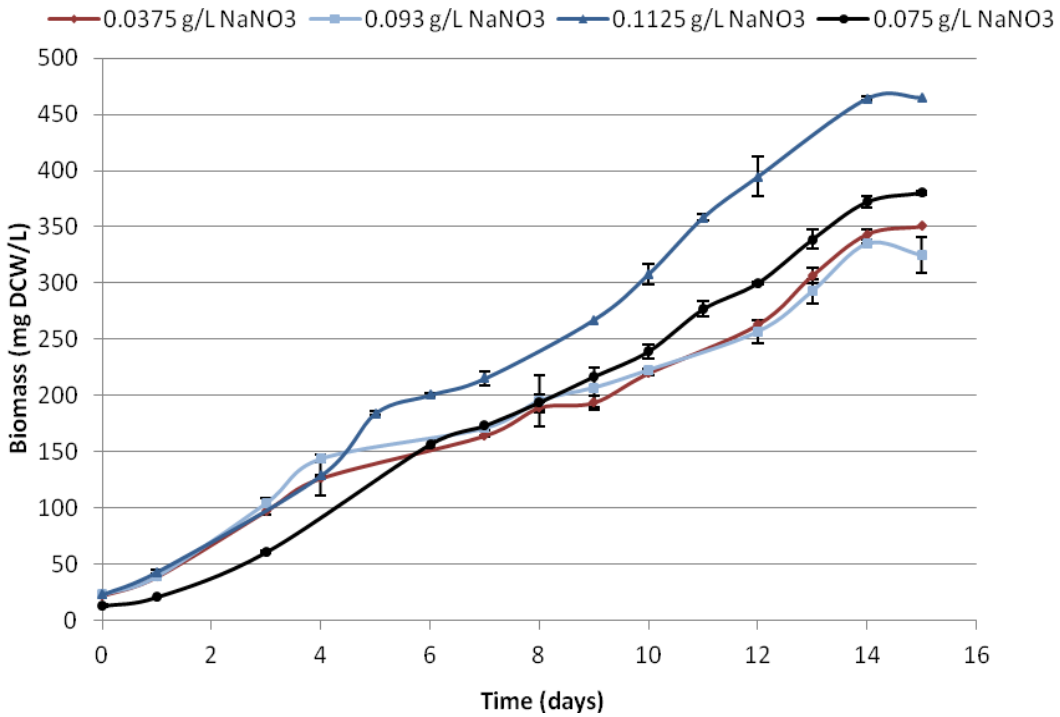
Καλλιέργεια	**Συγκέντρωση (g/L) $NaNO_3$**
1	0.0375
2	0.075
3	0.093
4	0.1125

Να σημειωθεί ότι όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν δυο φορές και στα αποτελέσματα παρουσιάζεται ο μέσος όρος των δυο. Αυτό έγινε με στόχο την ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων και την μεγαλύτερη αξιοπιστία των πειραμάτων. Σε όλα τα διαγράμματα που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων αποτυπώνεται η τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

2. Προσδιορισμός βιομάζας του στελέχους *Nannochloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$.

Για τη μελέτη της επίδρασης της πηγής του αζώτου στην παραγωγή της βιομάζας του στελέχους *Nannochloropsis sp.* , πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες σε φωτοβιοαντιδραστήρα σε τέσσερεις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$: 0,0375g/L, 0,093g/L, 0,1125g/L και 0,075g/L. Οι υπόλοιπες παράμετροι (ένταση φωτός, pH και θερμοκρασία) παρέμειναν σταθερές, όπως αναφέρεται και παραπάνω. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες ανά δύο ημέρες για κάθε καλλιέργεια σε διάστημα 15 ημερών. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές για κάθε καλλιέργεια, για λόγους επαναληψιμότητας.

Στο παρακάτω διάγραμμα, παρουσιάζονται οι καμπύλες παραγωγής βιομάζας για τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$ συναρτήσει του χρόνου.



Διάγραμμα 1: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$, ως πηγή αζώτου

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1, το στέλεχος αναπτύχθηκε για όλες τις διαφορετικές συγκεντρώσεις μέχρι και την $15^{η}$ ημέρα. Η ανάπτυξή του ακολούθησε αρχικά λανθάνουσα φάση για τις 2-3 πρώτες μέρες και στη συνέχεια εκθετική μορφή με ταχύ ρυθμό μέχρι την $6^{η}$ ημέρα , ενώ τις δύο τελευταίες ημέρες παρουσίασε μια πτώση (φάση στασιμότητας). Η καλλιέργεια με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση $NaNO_3$ (0,1125g/L) παρουσίασε και τη μέγιστη τιμή βιομάζας σε σχέση με τις υπόλοιπες την $15^{η}$ ημέρα με τιμή περίπου 465mgDCW/L. Οι υπόλοιπες τρείς καλλιέργειες, δεν παρουσίασαν μεγάλη απόκλιση όσον αφορά στις τιμές των

συγκεντρώσεων βιομάζας οι οποίες κυμαίνονται μεταξύ 334mgDCW/L – 380mgDCW/L τις δύο τελευταίες ημέρες της ανάπτυξης. Όσον αφορά την καλλιέργεια με την κεντρική τιμή συγκέντρωσης $NaNO_3$ (0,075g/L), όπως αυτή αναφέρεται ως σύσταση του θρεπτικού μέσου, παρουσίασε μια αρκετά μεγάλη λανθάνουσα φάση ως προς την ανάπτυξή της και κατ' επέκταση την παραγωγή βιομάζας.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται στον πίνακα 8 οι τιμές της παραγωγικότητας της βιομάζας ($mgL^{-1}d^{-1}$) για κάθε μία από τις τέσσερις διαφορετικές καλλιέργειες, αλλά και η μέγιστη τιμή της βιομάζας (mg DCW/L). Η αύξηση στη συγκέντρωση των νιτρικών αλάτων φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τόσο την παραγωγικότητα, όσο και τη συγκέντρωση της βιομάζας. Εφόσον όσο πλουσιότερο σε θρεπτικά συστατικά είναι το μέσο καλλιέργειας, τόσο περισσότερο επηρεάζεται η ανάπτυξή του και κατά συνέπεια η συσσώρευση της βιομάζας.

Η μέγιστη τιμή συγκέντρωσης της βιομάζας παρουσιάζεται στην καλλιέργεια με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση $NaNO_3$ (0,1125 g/L) και είναι 465,17 (mgDCW/L). Η τιμή αυτή είναι αρκετά κοντά στη βιβλιογραφία όπου αναφέρεται συγκέντρωση της βιομάζας 497 mgDCW/L (Bellou and Aggelis 2012). Για όλες τις καλλιέργειες, η μέγιστη τιμή συγκέντρωσης της βιομάζας, καταγράφηκε την τελευταία ημέρα καλλιέργειας τους δηλαδή την $15^{η}$. Η αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής του αζώτου στο μέσο καλλιέργειας κατά 0,075g/L $NaNO_3$ (από 0,0375g/L σε 0,1125g/L) είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση στη συσσώρευση βιομάζας σε ποσοστό που ανέρχεται στο 33%.

Η παραγωγικότητα της βιομάζας υπολογίστηκε για τις τέσσερις καλλιέργειες με διαφορετική συγκέντρωση αζώτου. Η μέγιστη τιμή παραγωγικότητας αντιστοιχεί σε 31,52 $mgL^{-1}d^{-1}$ και εμφανίζεται στην καλλιέργεια με την υψηλότερη συγκέντρωση νιτρικών αλάτων (0,1125 g/L $NaNO_3$), ενώ οι υπόλοιπες κυμαίνονται μεταξύ 22-26 $mgL^{-1}d^{-1}$. Η αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής του αζώτου στο μέσο καλλιέργειας κατά 0,075g/L $NaNO_3$ επέφερε και μια αύξηση στην παραγωγικότητα της βιομάζας κατά 37,2%.

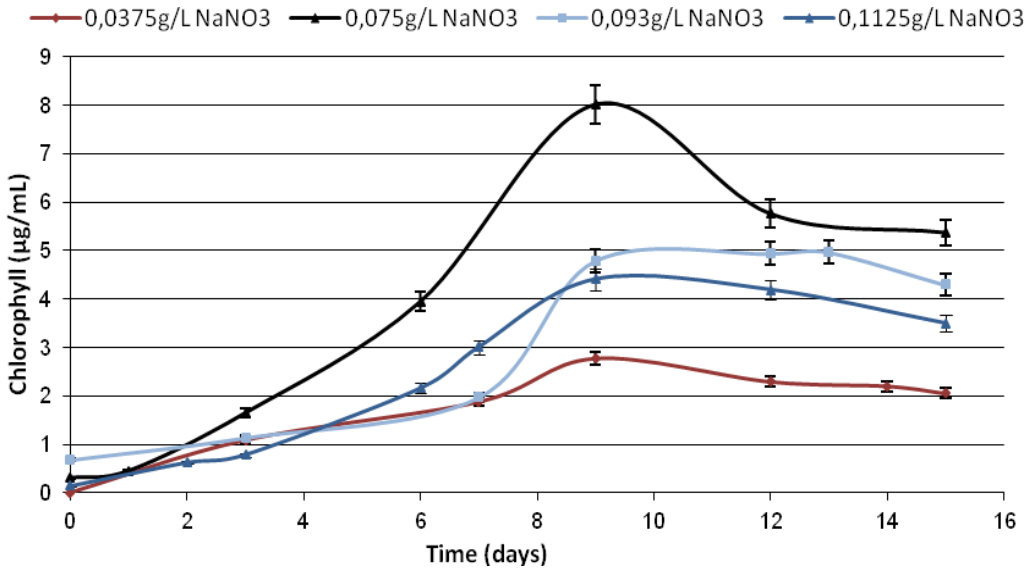
Πίνακας 8: Συγκριτικά αποτελέσματα μέγιστης τιμής συγκέντρωσης βιομάζας (mgDCWL^{-1}) και παραγωγικότητας βιομάζας (mgL^{-1}d^{-1}) για την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$

Συγκέντρωση $NaNO_3$ (g/L)	Μέγιστη τιμή συγκέντρωσης Βιομάζας (mgDCWL^{-1})	Παραγωγικότητα Βιομάζας (mg L^{-1} d^{-1})
0.0375	350,58	22,96
0.075	380,36	25,68
0.093	334,58	22,26
0.1125	465,17	31,52

3. Προσδιορισμός του περιεχομένου σε χλωροφύλλη του στελέχους *Nannochloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$

Για τη μελέτη της επίδρασης της πηγής του αζώτου στον προσδιορισμό της χλωροφύλλης του στελέχους *Nannochloropsis sp.* , πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες σε φωτοβιοαντιδραστήρα σε τέσσερεις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$: 0,0375g/L, 0,093g/L, 0,1125g/L και 0,075g/L. Οι υπόλοιπες παράμετροι (ένταση φωτός, pH και θερμοκρασία) παρέμειναν σταθερές, όπως αναφέρεται και παραπάνω. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες ανά τρείς ημέρες για κάθε καλλιέργεια σε διάστημα 15 ημερών. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές για κάθε καλλιέργεια, για λόγους επαναληψιμότητας.

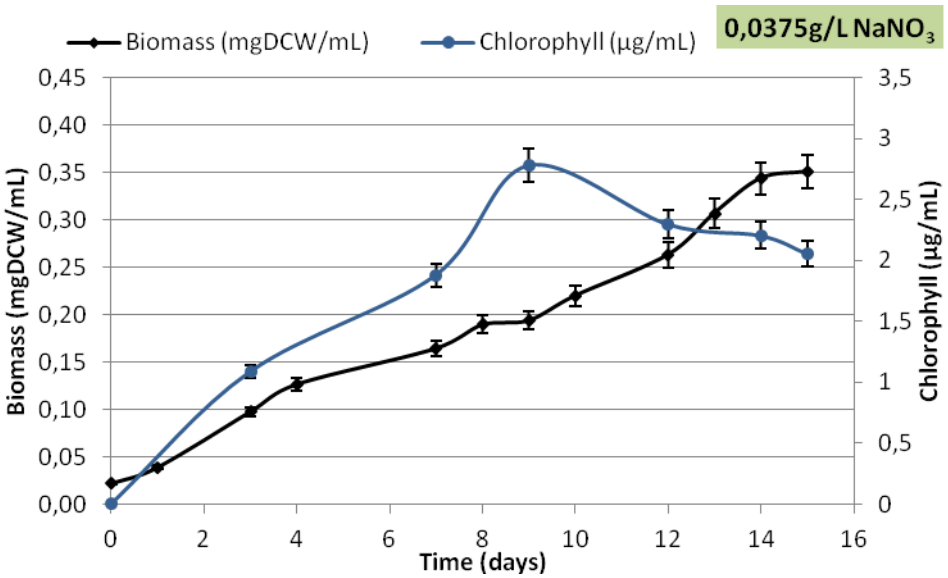
Στο παρακάτω διάγραμμα, παρουσιάζονται οι καμπύλες προσδιορισμού της χλωροφύλλης για τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$ σε σχέση με το χρόνο.



Διάγραμμα 2: Χρονική μεταβολή της χλωροφύλλης (μg/mL) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$, ως πηγή αζώτου

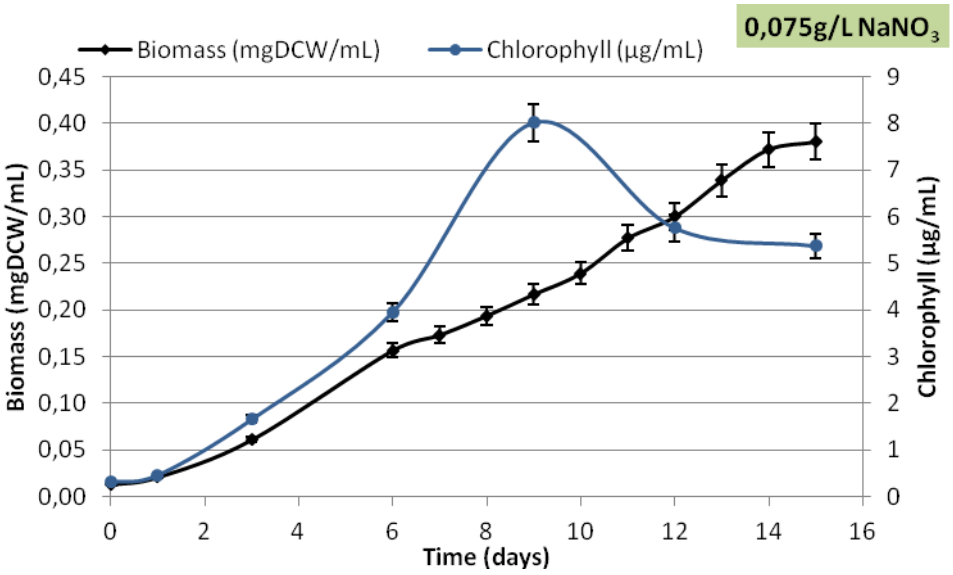
Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 2, μελετήθηκε ο προσδιορισμός της χλωροφύλλης για όλες τις καλλιέργειες διαφορετικών συγκεντρώσεων σε διάστημα 15 ημερών. Η μέγιστη τιμή χλωροφύλλης για όλες τις καλλιέργειες παρουσιάζεται την $9^{η}$ ημέρα, με την υψηλότερη τιμή των 8,02μg/mL να εμφανίζει η καλλιέργεια με συγκέντρωση 0,075g/L $NaNO_3$ (κεντρική τιμή). Όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία, η υψηλή περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη συνοδεύεται από μια μέτρια συγκέντρωση αζώτου στο μέσο καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, σε θρεπτικό μέσο f/2 με 0,075gL^{-1} $NaNO_3$ παρουσιάστηκε και η μέγιστη τιμή χλωροφύλλης (4μg/mL) (Wan, Zhao and Bai 2013). Παρατηρήθηκε επίσης ότι η καλλιέργεια με τη μικρότερη συγκέντρωση $NaNO_3$ παρουσίασε και τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις χλωροφύλλης καθ' όλη τη διάρκεια καλλιέργειάς της σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες. Τέλος, για όλες τις καλλιέργειες ισχύει ότι μετά το πέρας της $9^{ης}$ ημέρας η συγκέντρωση της χλωροφύλλης μειώθηκε σημαντικά μέχρι και την $12^{η}$ ημέρα. Αυτή η μείωση, πιθανόν να οφείλεται στην απουσία αζώτου λόγω της μη σύνθεσης μορίων που περιέχουν άζωτο (Forzan et al. 2007). Διαπιστώνεται ότι τα κύτταρα συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες μορίων χλωροφύλλης όταν η πηγή του αζώτου είναι διαθέσιμη σε αφθονία. Συνεπώς, όταν η εξωτερική πηγή του αζώτου εξαντληθεί, τα κύτταρα αρχίζουν να χρησιμοποιούν τις χλωροφύλλες τους ως μια εσωκυτταρική πηγή αζώτου.

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα διαγράμματα της χρονικής μεταβολής της βιομάζας του στελέχους Nannochloropsis sp. συγκριτικά με το περιεχόμενο σε χλωροφύλλη για τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$.



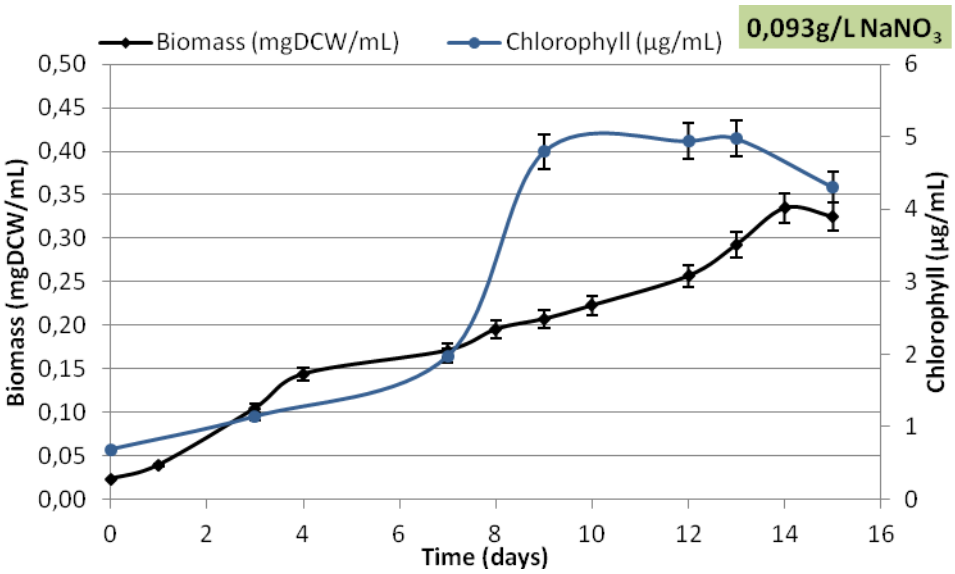
Διάγραμμα 3: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,0375g/L $NaNO_3$

Η καλλιέργεια με τη μικρότερη συγκέντρωση $NaNO_3$ στο μέσο καλλιέργειας (0,0375gL), παρουσίασε τη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης της χλωροφύλλης την $9^{η}$ ημέρα καλλιέργειας με τιμή 2,78 μg/mL. Τις τελευταίες ημέρες καλλιέργειας διατηρήθηκε σχεδόν σταθερή η συγκέντρωση χλωροφύλλης (2μg/mL) σε χαμηλότερα βέβαια επίπεδα συγκριτικά με εκείνα της $9^{ης}$ ημέρας.



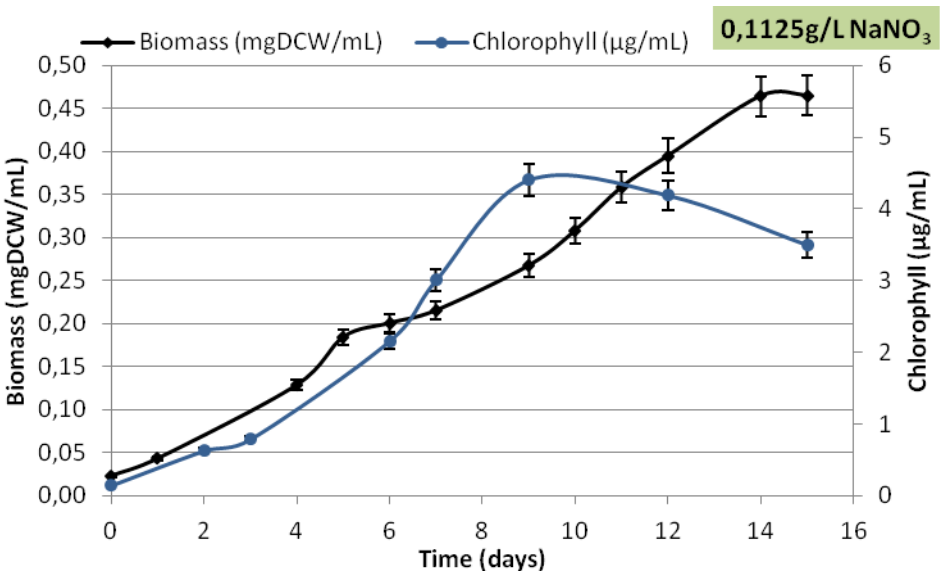
Διάγραμμα 4: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,075g/L $NaNO_3$

Η καλλιέργεια με την κεντρική τιμή συγκέντρωσης $NaNO_3$ (0,075g/L) ήταν και αυτή που παρουσίασε τη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης χλωροφύλλης (8,02μg/mL) συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες την 9η ημέρα καλλιέργειας. Μέχρι και την 6η ημέρα η κινητική εξέλιξης της χλωροφύλλης φάνηκε να πλησίασε αρκετά εκείνη της βιομάζας. Κατά τη διάρκεια 6ης και 9ης ημέρας η συγκέντρωση της χλωροφύλλης αυξήθηκε σε ποσοστό 48%, δηλαδή σχεδόν διπλασιάστηκε. Τις τελευταίες ημέρες καλλιέργειας, η συγκέντρωση χλωροφύλλης παρέμεινε πρακτικά σταθερή με τιμή 5,5μg/mL.



Διάγραμμα 5: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,093g/L $NaNO_3$

Η καλλιέργεια με 0,093g/L $NaNO_3$ εμφάνισε τη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης χλωροφύλλης, (4,97μg/mL) την 13η ημέρα καλλιέργειας. Ωστόσο παρουσίασε μια απότομη αύξηση την 9η ημέρα καλλιέργειας, αφού σχεδόν τριπλασίασε την τιμή συγκέντρωσης της χλωροφύλλης συγκριτικά με εκείνη της 6ης ημέρας. Στο διάστημα 9ης και 13ης ημέρας, η συγκέντρωση της χλωροφύλλης διατηρήθηκε σε σταθερά επίπεδα επιτυγχάνοντας μόνο μια μικρή αύξηση της τάξης του 8%.



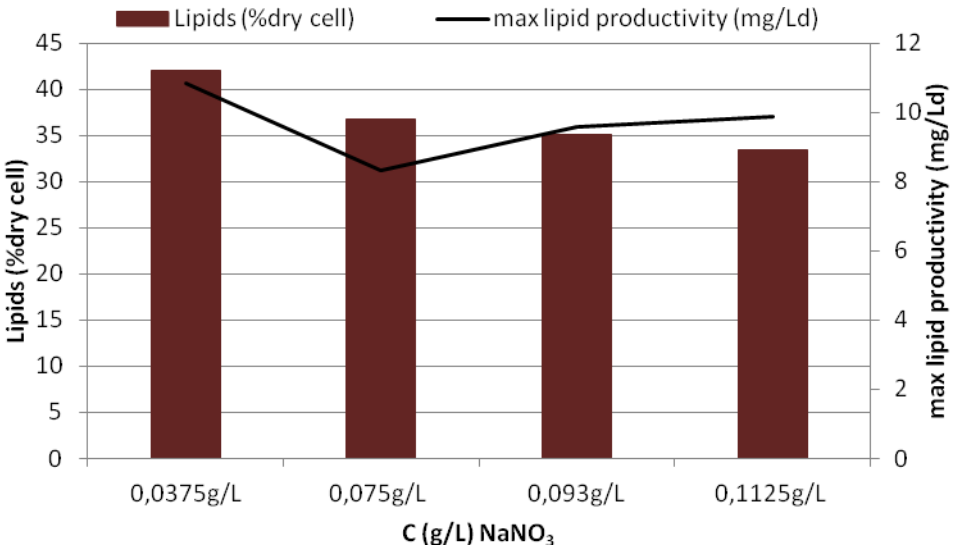
Διάγραμμα 6: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,1125g/L $NaNO_3$

Η καλλιέργεια με τη μέγιστη συγκέντρωση $NaNO_3$, παρουσίασε επίσης τη μέγιστη τιμή της συγκέντρωσης χλωροφύλλης την 9η ημέρα, που ήταν 4,40μg/mL.

4. Προσδιορισμός λιπαρών του στελέχους *Nannocloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$.

Για τη μελέτη της επίδρασης της πηγής του αζώτου στην παραγωγή λιπαρών του στελέχους Nannochloropsis sp. , πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες σε φωτοβιοαντιδραστήρα σε τέσσερεις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$: 0,0375g/L, 0,093g/L, 0,1125g/L και 0,075g/L. Οι υπόλοιπες παράμετροι (ένταση φωτός, pH και θερμοκρασία) παρέμειναν σταθερές, όπως αναφέρεται και παραπάνω. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες ανά τρείς ημέρες για κάθε καλλιέργεια σε διάστημα 15 ημερών. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές για κάθε καλλιέργεια, για λόγους επαναληψιμότητας.

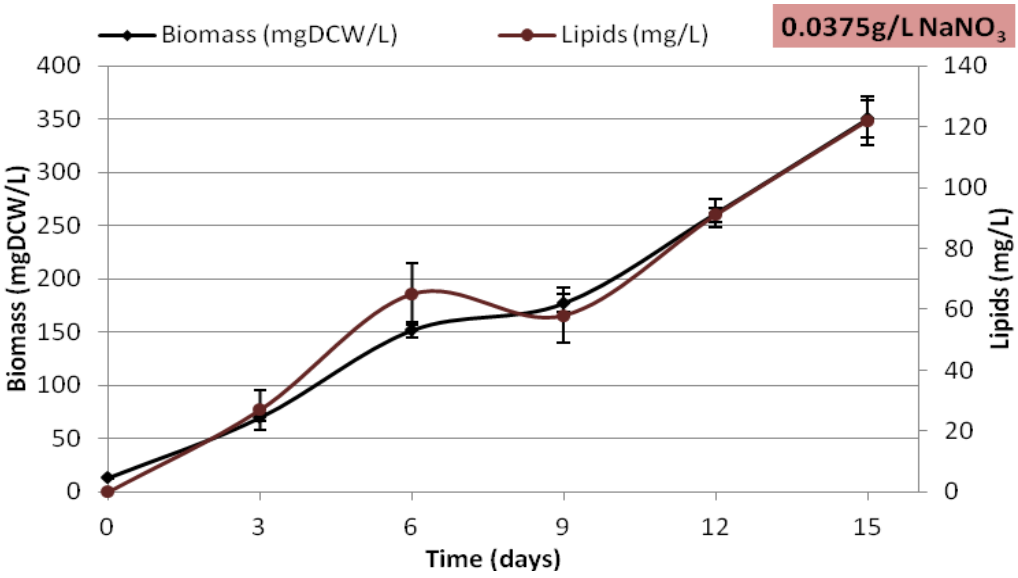
Στο παρακάτω διάγραμμα, παρουσιάζεται το ποσοστό περιεχομένου των λιπιδίων % (επί της ξηρής βιομάζας) αλλά και η μέγιστη τιμή της παραγωγικότητας των λιπιδίων (mg/Ld) για τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$.



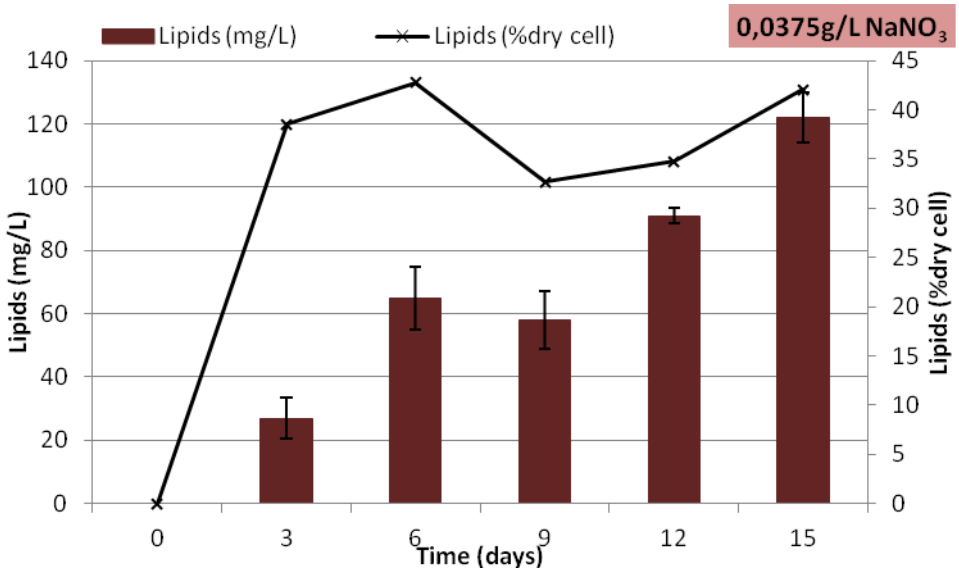
Διάγραμμα 7: Περιεχόμενο λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) την 15η ημέρα ανάπτυξης και μέγιστη τιμή παραγωγικότητας λιπιδίων (mg/Ld) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$, ως πηγή αζώτου

Στο Διάγραμμα 7, παρουσιάζεται η περιεκτικότητα των λιπιδίων (% ποσοστό επί ξηρού βάρους) για όλες τις καλλιέργειες διαφορετικών συγκεντρώσεων για το διάστημα των 15 ημερών. Η μέγιστη τιμή περιεχομένου λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους), ανήκει στην καλλιέργεια με την μικρότερη συγκέντρωση αζώτου (0,0375g/L $NaNO_3$) με τιμή 42,6%. Όσον αφορά τις υπόλοιπες καλλιέργειες, το ποσοστό τους κυμαίνεται περίπου μεταξύ 33-37% (επί ξηρού βάρους), με τις τιμές αυτές να μειώνονται αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του αζώτου. Η περιεκτικότητα των λιπιδίων για όλες τις καλλιέργειες κυμαίνεται σε εύρος τιμών 31%-68%, όπως δίνεται και στη σχετική βιβλιογραφία για την εκχύλιση των λιπαρών του στελέχους Nannochloropsis με χρήση εξανίου (Nobre et al. 2013). Ο περιορισμός του αζώτου στο μέσο καλλιέργειας φάνηκε να έχει σαν αποτέλεσμα και την υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπίδια, όπως αναφέρεται από τους Rodolfi et al. 2009.

Ο περιορισμός της πηγής του αζώτου στις καλλιέργειες είχε και τη μέγιστη τιμή παραγωγικότητας των λιπιδίων (10,8mg/Ld). Οι παραγωγικότητες των υπόλοιπων καλλιεργειών, κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα μεταξύ 8,3-9,5 mg/Ld. Η παραγωγικότητα των λιπαρών φάνηκε να επηρεάστηκε σημαντικά από την έλλειψη του αζώτου στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, γεγονός που συμφωνεί με τις βιβλιογραφικές πηγές (Converti et al. 2009).



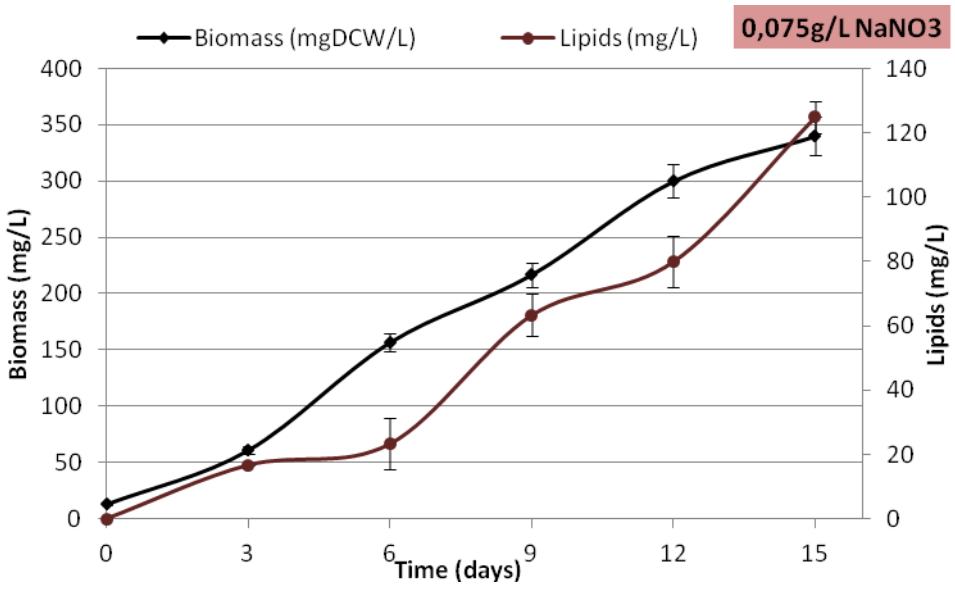
Διάγραμμα 8: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,0375g/L $NaNO_3$



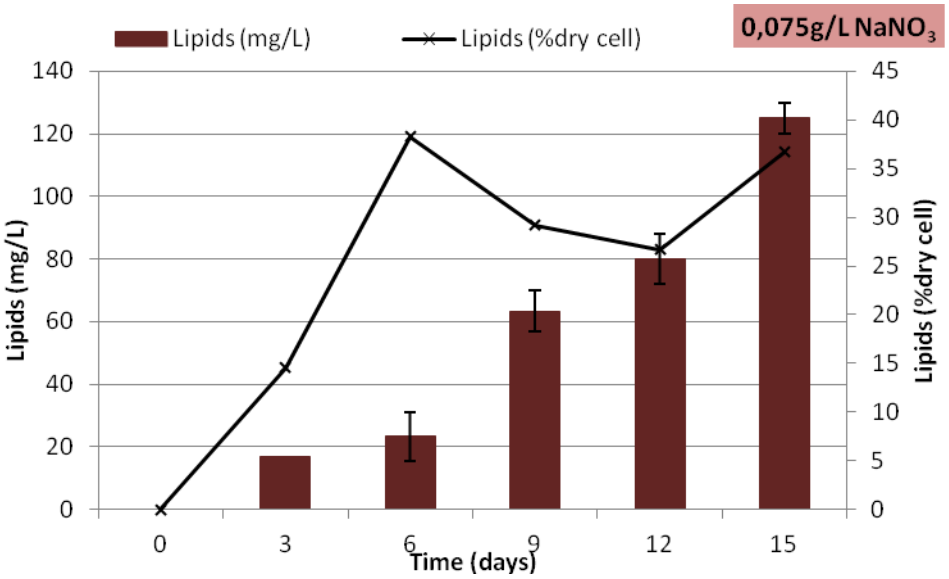
Διάγραμμα 9: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,0375g/L $NaNO_3$

Η καλλιέργεια με τη μεγαλύτερη στέρηση νιτρικών αλάτων (0,0375g/L $NaNO_3$) στο μέσο καλλιέργειας αύξησε κατά πολύ το περιεχόμενο λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) από την πρώτη ημέρα καλλιέργειας, φθάνοντας σχεδόν το ποσοστό του 40% μετά από 3 ημέρες. Αυτή η απότομη αύξηση των τριών πρώτων ημερών στο περιεχόμενο λιπιδίων, αναφέρεται σχετικά και στη βιβλιογραφία (Rodolfi et al. 2009). Η μέγιστη συγκέντρωση λιπαρών στην καλλιέργεια με τη μέγιστη στέρηση αζώτου πραγματοποιήθηκε την $15^{η}$ ημέρα καλλιέργειάς με τιμή 122mg/L. Την ίδια ημέρα φαίνεται να παρουσιάζεται μέγιστη που αφορά τόσο στη

συσσώρευση λιπαρών όσο και στο περιεχόμενο (% επί ξηρού βάρους) με τιμή 42,6% (dry cell).



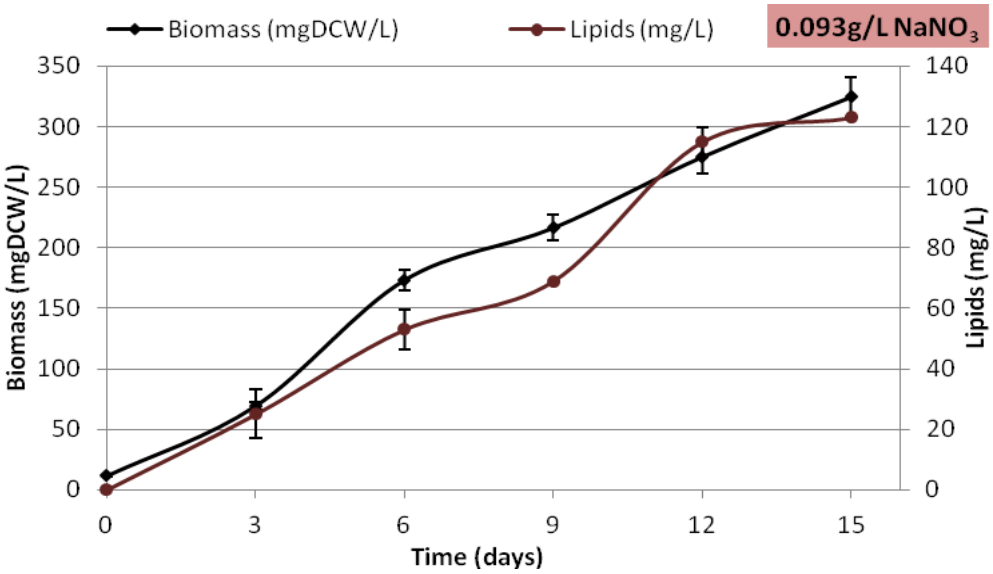
Διάγραμμα 10: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,075g/L $NaNO_3$



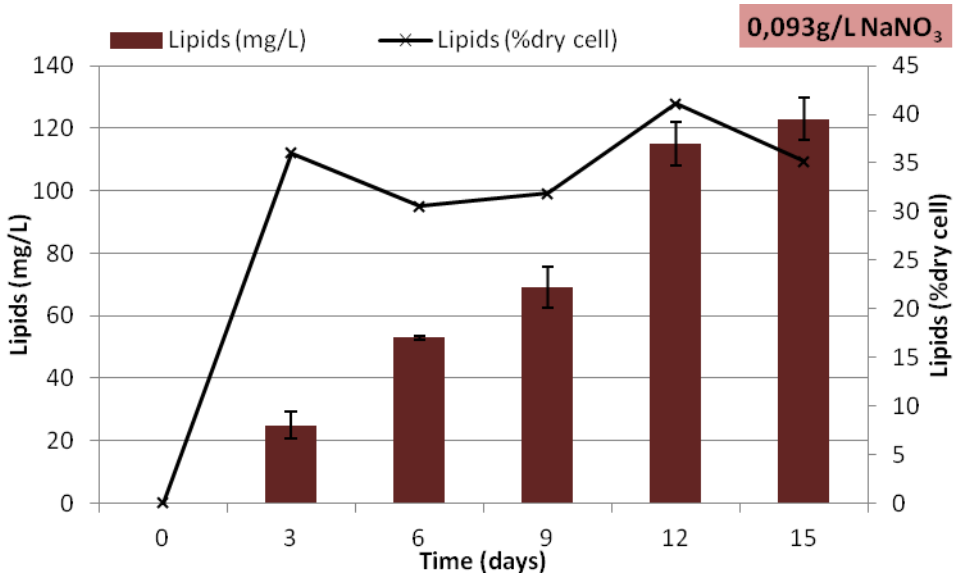
Διάγραμμα 11: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,075g/L $NaNO_3$

Η καλλιέργεια με την προτεινόμενη βιβλιογραφικά ως ιδανική συγκέντρωση αζώτου (0,075g/L $NaNO_3$) παρουσίασε τη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης λιπαρών την τελευταία ημέρα καλλιέργειας με τιμή 125mg/L, ενώ το περιεχόμενο των λιπιδίων για εκείνη την ημέρα αντιστοιχεί σε 36,7% (επί ξηρού βάρους). Η κινητική εξέλιξης των λιπαρών ακολούθησε

εκθετική πορεία ανάλογη με εκείνη της βιομάζας. Παρατηρήθηκε ακόμη, μια απότομη αύξηση στην περιεκτικότητα των λιπιδίων την 6η ημέρα καλλιέργειας, η οποία πλησίασε αρκετά εκείνη της τελευταίας ημέρας.

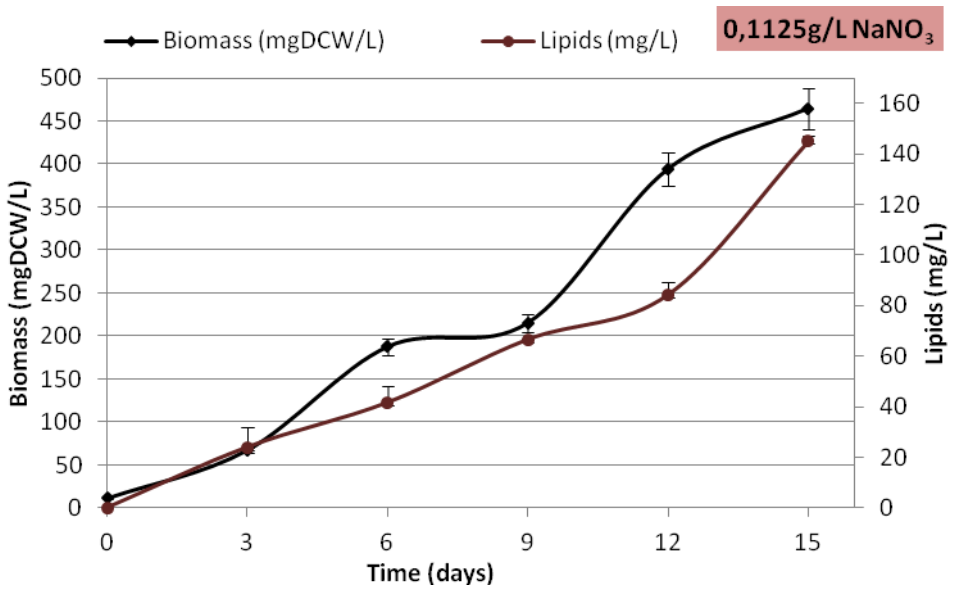


Διάγραμμα 12: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,093g/L $NaNO_3$

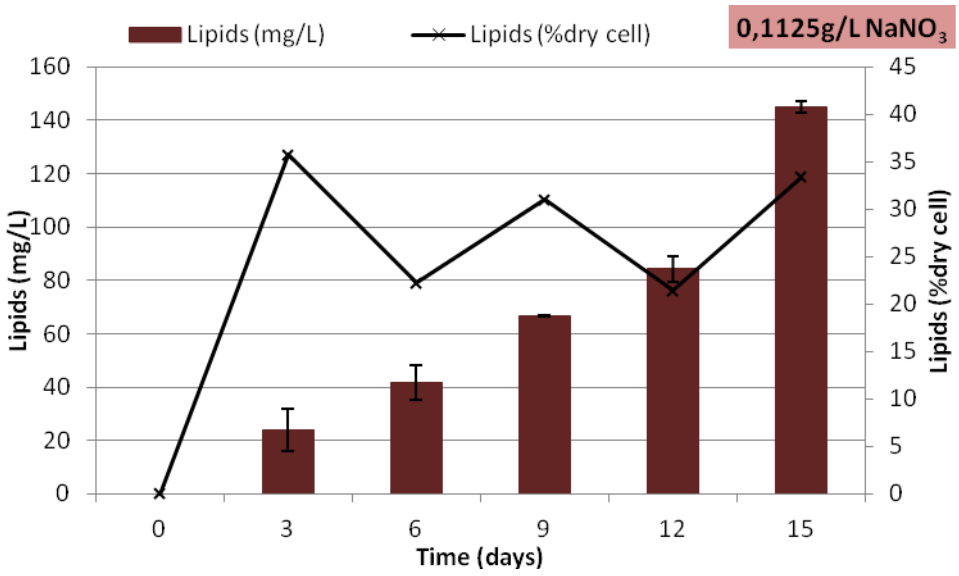


Διάγραμμα 13: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,093g/L $NaNO_3$

Η καλλιέργεια με την αμέσως επόμενη μεγαλύτερη συγκέντρωση αζώτου στο μέσο καλλιέργειας (0,093g/L $NaNO_3$) παρουσίασε την μέγιστη τιμή συγκέντρωσης λιπαρών την 15η ημέρα καλλιέργειας με τιμή 123mg/L. Το περιεχόμενο λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) εμφάνισε μέγιστη τιμή την 12η ημέρα καλλιέργειας με ποσοστό 41,1% (επί ξηρού βάρους), ενώ εκείνο της τελευταίας ημέρας καλλιέργειας ήταν 35,1% (επί ξηρού βάρους).



Διάγραμμα 14: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,1125g/L $NaNO_3$

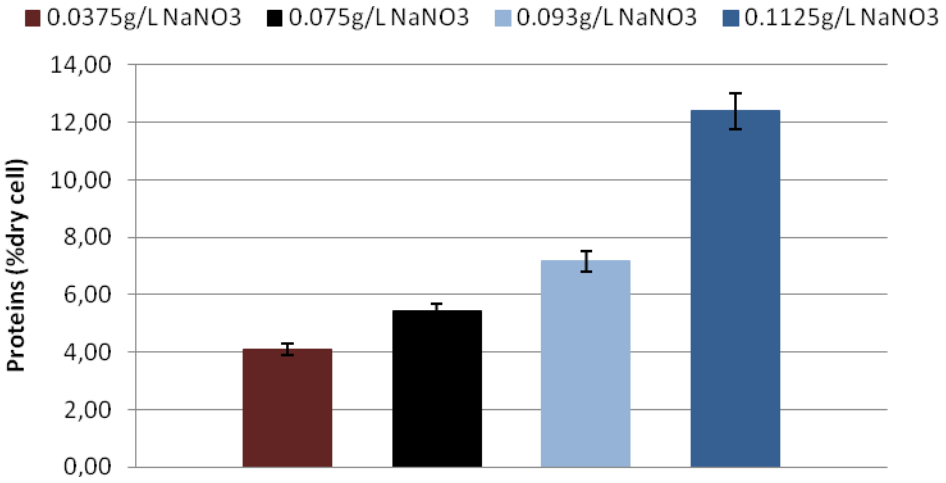


Διάγραμμα 15: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,1125g/L $NaNO_3$

Η καλλιέργεια με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αζώτου στο μέσο ανάπτυξης (0,1125g/L $NaNO_3$) εμφάνισε τη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης λιπιδίων την τελευταία ημέρα καλλιέργειας με τιμή 145mg/L. Όσον αφορά το περιεχόμενο λιπιδίων σε ποσοστό επί ξηρού βάρους, είχε τη μέγιστη τιμή την $3^{η}$ ημέρα καλλιέργειας με ποσοστό 35,7% (% dry cell), ενώ εκείνο της τελευταίας ημέρας ήταν 33,4% (επί ξηρού βάρους).

5. Προσδιορισμός πρωτεϊνών του στελέχους *Nannochloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$.

Για τη μελέτη της επίδρασης της πηγής του αζώτου στην παραγωγή πρωτεϊνών του στελέχους Nannochloropsis sp. , πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες σε φωτοβιοαντιδραστήρα σε τέσσερεις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$: 0,0375g/L, 0,093g/L, 0,1125g/L και 0,075g/L. Οι υπόλοιπες παράμετροι (ένταση φωτός, pH και θερμοκρασία) παρέμειναν σταθερές, όπως αναφέρεται και παραπάνω. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα ποσοστά περιεκτικότητας των πρωτεϊνών (% επί ξηρού βάρους) για όλες τις καλλιέργειες την 15η ημέρα καλλιέργειας. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές για κάθε καλλιέργεια, για λόγους επαναληψιμότητας.



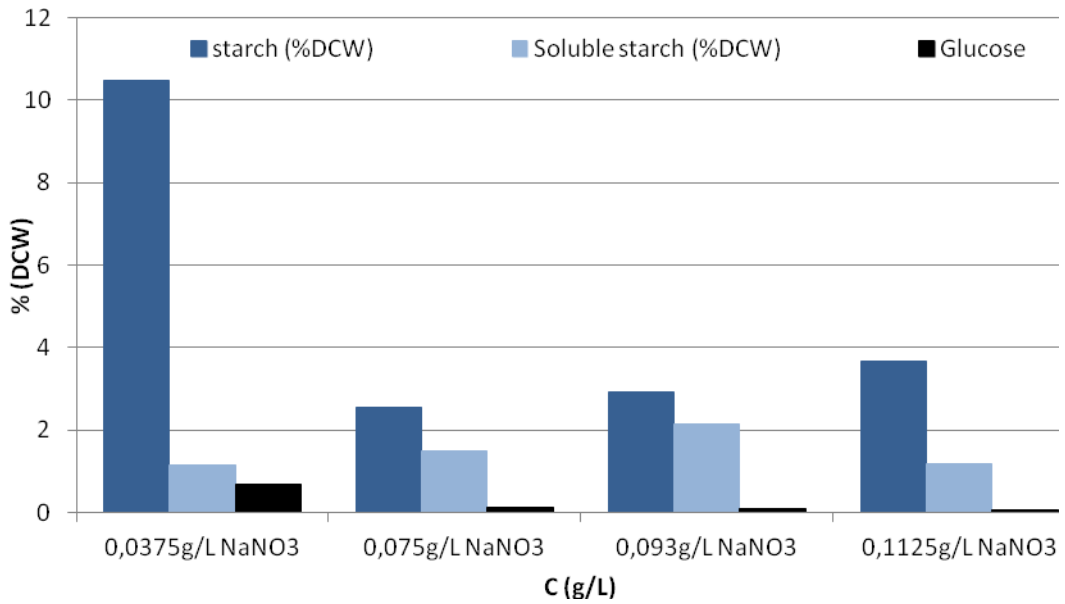
Διάγραμμα 16: Ποσοστό πρωτεϊνών (% επί ξηρού βάρους) την 15η ημέρα καλλιέργειας, κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$, ως πηγή αζώτου

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 16, μελετήθηκε η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών για τις καλλιέργειες με τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$. Η αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής του αζώτου είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας των πρωτεϊνών με μέγιστη τιμή ποσοστού 12,4% (επί ξηρού βάρους) για την καλλιέργεια με συγκέντρωση 0,1125g/L $NaNO_3$. Φαίνεται λοιπόν, η μείωση της πηγής του αζώτου, να παρεμποδίζει την σύνθεση των πρωτεϊνών.

6. Προσδιορισμός αμύλου και γλυκόζης του στελέχους *Nannochloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$.

Για τη μελέτη της επίδρασης της πηγής του αζώτου στον προσδιορισμό του αμύλου και της γλυκόζης του στελέχους *Nannochloropsis sp.* , πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες σε φωτοβιοαντιδραστήρα σε τέσσερεις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$: 0,0375g/L, 0,093g/L, 0,1125g/L και 0,075g/L. Οι υπόλοιπες παράμετροι (ένταση φωτός, pH και θερμοκρασία) παρέμειναν σταθερές, όπως αναφέρεται και παραπάνω. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές για κάθε καλλιέργεια, για λόγους επαναληψιμότητας.

Στο διάγραμμα 17, παρουσιάζεται το ποσοστό του περιεχόμενου αμύλου τόσο στο εσωκυτταρικό υγρό όσο και στα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και η περιεχόμενη γλυκόζη **(% επί** της ξηρής βιομάζας) στις καλλιέργειες με τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$.



Διάγραμμα 17: Ποσοστό περιεχομένου (% επί ξηρού βάρους) του αμύλου στο εσωκυτταρικό υγρό και στα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και της γλυκόζης κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$

Ο περιορισμός της πηγής του αζώτου στο μέσο καλλιέργειας, είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας του αμύλου που βρίσκεται στα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης με μέγιστη τιμή 10,5 % (επί ξηρού βάρους). Η τιμή αυτή της περιεκτικότητας του αμύλου φαίνεται να διαφέρει αρκετά συγκριτικά με των υπολοίπων καλλιεργειών όπου το ποσοστό τους κυμαίνεται μεταξύ 2,5-3,6% (επί ξηρού βάρους). Όσον αφορά στο ποσοστό περιεχομένου του αμύλου στο εσωκυτταρικό υγρό, ήταν αρκετά χαμηλό συγκριτικά με εκείνο που βρίσκεται στο στα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης με ποσοστά και για τις

τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις μεταξύ 1,2-2,2 % (επί ξηρού βάρους). Στα πειραματικά δεδομένα, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση του αμύλου (mg/ml) και στις δύο περιπτώσεις ελαττώθηκε σημαντικά τις τελευταίες ημέρας της καλλιέργειας. Όπως αναφέρεται και βιβλιογραφικά, ο περιορισμός του αζώτου συχνά χρησιμοποιείται προκειμένου να αυξηθεί η παραγωγή του αμύλου (Eriksen et al., 2007; Maeda et al., 2006;Rodolfi et al., 2009). Ένα μειονέκτημα αυτού του περιορισμού αποτελεί η μικρή χρονική διάρκεια αυτής της ικανότητάς τους λόγω της λύσης των κυττάρων που οφείλεται στην αζωτοπενία και είναι σύμφωνη με αποτελέσματα της έρευνας άλλων ερευνητών (Eriksen et al., 2007).

Η περιεκτικότητα της γλυκόζης % (επί ξηρού βάρους) για όλες τις καλλιέργειες ήταν σε χαμηλά επίπεδα τιμών με τη μέγιστη τιμή (0,67% επί ξηρού βάρους) να ανήκει στην καλλιέργεια με τον περιορισμό της πηγής του αζώτου. Παρόλα ταύτα, η μείωση της περιεκτικότητας της γλυκόζης φαίνεται να είναι σημαντική αφού για αύξηση της συγκέντρωσης του $NaNO_3$ κατά 0,075g/L η περιεκτικότητα της γλυκόζης μειώθηκε από 0,67% σε 0,069% (επί ξηρού βάρους). Η αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών αλάτων στο μέσο καλλιέργειας, είχε σαν αποτελέσματα την αναλογική μείωση της περιεκτικότητας της γλυκόζης.

7. Συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου της πηγής του αζώτου στην ανάπτυξη του στελέχους *Nannochloropsis sp.* αλλά και στη σύνθεση ενώσεων εμπορικού ενδιαφέροντος. Αρχικά, μελετήθηκε η ανάπτυξη του στελέχους *Nannochloropsis sp.* σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$ (πηγή αζώτου). Κατά την διάρκεια του περιορισμού της πηγής του αζώτου, η σύνθεση της βιομάζας μειώνεται συγκριτικά με τις καλλιέργειες όπου η συγκέντρωση των νιτρικών αλάτων είναι αυξημένη. Η μέγιστη τιμή βιομάζας (465,17 mgDCW/L), ανήκει στην καλλιέργεια με συγκέντρωση 0,1125g/L $NaNO_3$. Η ίδια αναλογική αύξηση υπήρξε και στην παραγωγικότητα της βιομάζας, η οποία ανήκει στην καλλιέργεια με τη μέγιστη τιμή $NaNO_3$ με τιμή 31,52 $mgL^{-1}d^{-1}$. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε το περιεχόμενο της χλωροφύλλης με τη μέθοδο της εκχύλισης και τη χρήση της μεθανόλης ως διαλύτη. Η επιλογή της συγκέντρωσης $NaNO_3$ (0,075g/L) φάνηκε να έχει και τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά στη συγκέντρωση της χλωροφύλλης. Έτσι η μέγιστη τιμή συγκέντρωσης της χλωροφύλλης (8,02μg/mL) συναντάται στην καλλιέργεια με συγκέντρωσης $NaNO_3$ 0,075g/L. Η μέγιστη τιμή συγκέντρωσης χλωροφύλλης για όλες τις καλλιέργειες διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου βρέθηκε κατά την $9^η$ ημέρα καλλιέργειας.

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των λιπιδίων του στελέχους, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της εκχύλισης και τη χρήση του εξανίου ως διαλύτη. Ο περιορισμός της πηγής του αζώτου φάνηκε να επηρέασε σημαντικά τα αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, η καλλιέργεια με τη μικρότερη συγκέντρωση $NaNO_3$ παρουσίασε και τη μέγιστη τιμή περιεκτικότητας σε λιπαρά με ποσοστό 42,6% (επί ξηρού βάρους), καθώς και παραγωγικότητας των λιπαρών (10,8mg/Ld) στο τέλος της καλλιέργειας. Αν και το περιεχόμενο των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) έδειξε να αυξάνει με τη μείωση του περιεχομένου του αζώτου στο μέσο καλλιέργειας, δεν συνέβη το ίδιο και με την παραγωγή των λιπαρών. Έτσι, η καλλιέργεια με συγκέντρωση 0,1125g/L $NaNO_3$ είχε συσσώρευση λιπαρών την τελευταία ημέρα καλλιέργειας με ποσό 145mg/L. Αυτή η αύξηση της παραγωγής λιπιδίων συγκριτικά με την αύξηση της πηγής του αζώτου, συνδέεται άμεσα με την παραγωγή της βιομάζας. Ωστόσο, ο περιορισμός της πηγής του αζώτου στην καλλιέργεια του στελέχους Nannochloropsis sp., φαίνεται να επηρεάζει περισσότερο τη λιπιδική σύνθεση περιορίζοντας τον αριθμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων και αυξάνοντας εκείνων των τριγλυκεριδίων, που είναι και το ζητούμενο για την παραγωγή βιοντίζελ, όπως αναφέρεται και βιβλιογραφικά (Bondioli et al. 2012)

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των πρωτεϊνών % (επί ξηρού βάρους), πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Lowry για όλες τις καλλιέργειας, εμφανίζοντας την μέγιστη τιμή τους την τελευταία ημέρα της καλλιέργειας. Η αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής του αζώτου είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας πρωτεϊνών με μέγιστη τιμή ποσοστού 12,4% (επί ξηρού βάρους) για την καλλιέργεια με συγκέντρωση 0,1125g/L $NaNO_3$. Το αποτέλεσμα ήταν λογικό, διότι η μείωση του αζώτου στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, οδήγησε στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των κυττάρων και κατ' επέκταση τη σύνθεση των πρωτεϊνών.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του αμύλου, τόσο στο εσωκυτταρικό υγρό όσο και στα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά και της γλυκόζης με τη βοήθεια ειδικού σκευάσματος (kit). Το περιεχόμενο σε άμυλο και γλυκόζη, φάνηκε να αυξάνει τις πρώτες ημέρες καλλιέργειας του μικροοργανισμού κυρίως για το μεμβρανικό κλάσμα. Ο περιορισμός της πηγής του αζώτου στο μέσο καλλιέργειας, είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του περιεχομένου του αμύλου με μέγιστη την τιμή των 10,5% (επί ξηρού βάρους). Όσον αφορά στην περιεκτικότητα της γλυκόζης, βρέθηκε σε μικρότερα ποσοστά (0,07-0,67) % (επί ξηρού βάρους) συγκριτικά με εκείνα του αμύλου για όλες τις καλλιέργειες. Η αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών αλάτων είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της περιεκτικότητας της γλυκόζης στις καλλιέργειες.

Η αρχική απόκριση των κυττάρων στην ελάττωση της συγκέντρωσης του $NaNO_3$ ήταν η σύνθεση του αμύλου κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών καλλιέργειας. Ακολούθως το περιεχόμενο άμυλο μειώνεται ενώ η παραγωγή λιπιδίων δείχνει ανοδική τάση. Πιθανά αυτό συμβαίνει διότι το άμυλο εξυπηρετεί ως μια γρήγορη απόκριση λόγω των συνθηκών στρες (μείωση νιτρικών στοιχείων) ενώ τα λιπίδια χρησιμεύουν ως μια μακροπρόθεσμη αποθήκη ενέργειας. Ο περιορισμός των ιχνοστοιχείων όπως το άζωτο, εμποδίζει την αντιγραφή του DNA, την κυτταρική διαίρεση και την πρωτεϊνική σύνθεση, ενώ η σύνθεση του αμύλου δεν επηρεάζεται ουσιαστικά στις καλλιέργειες όπου υπάρχει έλλειψη νιτρικών στοιχείων (Ballin et al., 1988;Zachleder and Setlık 1988).

IV.ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ

Σελ.

Πίνακας 1: Γενιές βιοκαυσίμων (Demirbas A, 2008) 13

Πίνακας 2: Περιεχόμενο και παραγωγικότητα λιπιδίων για διάφορα είδη μικροφυκών (Mata et al. 2010) 27

Πίνακας 3: Σχετική αναλογία από τα κύρια καροτενοειδή στο σύνολό τους, περιεχόμενη χλωροφύλλη α ανά κύτταρο (ng<106cell>-1), σε διάφορα είδη του στελέχους *Nannochloropsis* μετά από 10 και 20 ημέρες ανάπτυξης καλλιέργειας (Lubian et al 2000) 34

Πίνακας 4: Trace metals for the media 42

Πίνακας 5: Vitamins for the media 43

Πίνακας 6: Content of the media 43

Πίνακας 7: Συγκεντρώσεις $NaNO_3$ που μελετήθηκαν για την καλλιέργεια του στελέχους Nannochloropsis sp 52

Πίνακας 8: Συγκριτικά αποτελέσματα μέγιστης τιμής συγκέντρωσης βιομάζας ($mgDCWL^{-1}$) και παραγωγικότητας βιομάζας ($mgL^{-1}d^{-1}$) για την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp*. με τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$ 55

Εικόνα 1: Καλλιέργεια φυτών για την παραγωγή βιοντίζελ 14

Εικόνα 2: Εκτάσεις καλλιέργειας μικροφυκών 14

Εικόνα 3: Εργαστηριακή παραγωγή βιοντίζελ 15

Εικόνα 4: Σύστημα των πέντε βασιλείων 20

Εικόνα 5: Ταξινόμηση αλγών 20

Εικόνα 6: Στάδια εξέλιξης παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη (Mata et al. 2010) 26

Εικόνα 7: Ανακαλλιέργειες στελεχών 37

Εικόνα 8: Μικρού και μεσαίου μεγέθους ανοιχτά συστήματα καλλιέργειας (raceway ponds) μικροφυκών (http://www.nanovoltaics.com) 37

Εικόνα 9: Μεγάλης κλίμακας παραγωγή μικροφυκών σε δεξαμενή εσωτερικού χώρου (Moazami et al. 2012) 38

Εικόνα 10: Καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp*. σε κωνικές φιάλες σε επωαστήρα 42

Εικόνα 11: Συσκευή λυοφιλίωσης 44

Εικόνα 12 : Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry 47

Εικόνα 13: Εκχύλιση λιπαρών σε υδατόλουτρο 48

Εικόνα 14: Εκχύλιση λιπαρών για διάφορες μέρες καλλιέργειας 49

Διάγραμμα 1: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$, ως πηγή αζώτου 53

Διάγραμμα 2: Χρονική μεταβολή της χλωροφύλλης (μg/mL) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$, ως πηγή αζώτου 56

Διάγραμμα 3: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,0375g/L $NaNO_3$ 57

Διάγραμμα 4: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,075g/L $NaNO_3$ 57

Διάγραμμα 5: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,093g/L $NaNO_3$ 58

Διάγραμμα 6: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,1125g/L $NaNO_3$ 59

Διάγραμμα 7: Περιεχόμενο λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) την $15^{η}$ ημέρα ανάπτυξης και μέγιστη τιμή παραγωγικότητας λιπιδίων (mg/Ld) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$, ως πηγή αζώτου 60

Διάγραμμα 8: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,0375g/L $NaNO_3$ 61

Διάγραμμα 9: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,0375g/L $NaNO_3$ 61

Διάγραμμα 10: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,075g/L $NaNO_3$ 62

Διάγραμμα 11: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,075g/L $NaNO_3$ 62

Διάγραμμα 12: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,093g/L $NaNO_3$ 63

Διάγραμμα 13: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,093g/L $NaNO_3$ 63

Διάγραμμα 14: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,1125g/L $NaNO_3$ 64

Διάγραμμα 15: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με 0,1125g/L $NaNO_3$ 64

Διάγραμμα 16: Ποσοστό πρωτεϊνών (% επί ξηρού βάρους) την $15^{η}$ ημέρα καλλιέργειας, κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$, ως πηγή αζώτου 65

Διάγραμμα 17: Ποσοστό περιεχομένου (% επί ξηρού βάρους) του αμύλου στο υδατοδιαλυτό και στο μεμβρανικό κλάσμα καθώς και της γλυκόζης κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis sp.* με διαφορετικές συγκεντρώσεις $NaNO_3$ 66

IV.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Amit Sarin (2012). Biodiesel: Production and Properties, Royal Society of Chemistry.

Anandarajah Kandiah, Mahendraperumal Guruvaiah, Sommerfeld Milton, Hua Qiang (2012). Characterization of microalga Nannochloropsis sp. mutants for improved production of biofuels, Applied Energy 96:371–377

Andrich Gianpaolo, Nesti Ugo, Venturi Francesca, Zinnai Angela, Fiorentini Roberto (2005). Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalga Nannochloropsis sp. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 107:381-386

Bajaj Akhil, Lohan Purva, Jha Prabhat N., Mehrotra Rajesh (2010). Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62: 9-14

Ballin G., Doucha J., Zachleder, V., Setlik, I. (1988). Macromolecular syntheses and the course of cell cycle events in the chlorococcal alga Scenedesmus quadncauda under nutrient stan'ation: Effects of nitrogen starvation. *Biol. Plant*. 30, 81-91.

Bellou Stamatiou and Aggelis George (2012). Biochemical activities in Chlorella sp. and Nannochloropsis salina during lipid and sugar synthesis in a lab-scale open pond simulating reactor, *Journal of Biotechnology* 164:318-329

Bondioli Paolo, Laura Della Bella, Gabriele Rivolta, Graziella Chini Zittelli, Niccolς Bassi ,Liliana Rodolfi, David Casini, Matteo Prussi, David Chiaramonti, Mario R. Tredici (2012). Oil production by the marine microalgae Nannochloropsis sp. F&M-M24 and Tetraselmis suecica F&M-M33, *Bioresource Technology* 114:567–572

Boussiba Sammy, Vonshak Avigad, Cohen Zvi, Avissar Yael, Richmod Amos (1987). Lipid and Biomass production by the Halotolerant Microalga Nannochloropsis salina, *Biomass* 12:37-47

Bozbas Kahraman (2005). Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 12:542-552

Branyikova Irena, Barbora Marsalkova, Jırı Doucha, Tomas Branyik, Katerina Bisova, Vilem Zachleder, Milada Vıtova (2010). Microalgae—Novel Highly Efficient Starch Producers, *Biotechnology and Bioengineering* 108, 4:766-776

Brennan Liam, Owende Philip (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:557-577

Cannell Richard J. P. (1993). Algae as a Source of Biologically Active Products

Cao Shaona, Zhang Xiaowen, Xu Dong, Fan Xiao, Moub Shanli, Wanga Yitao, Ye Naihao, Wang Wenqi (2013). A transthylakoid proton gradient and inhibitors induce a non-

photochemical fluorescence quenching in unicellular algae Nannochloropsis sp. *Febs Letters* 587:1310-1315, Elsevier

Carrero A., Vicente G., Rodriguez R., Linares M., del Peso G.L. (2010). Hierarchical zeolites as catalysts for biodiesel production from Nannochloropsis microalga oil, Catalysis Today 167:148-153, Elsevier

Carlsson Anders S, Beilen Jan B van , Möller Ralf, Clayton David (2007). Micro- and Macro-Algae utility for industrial applications, Outputs from the EPOBIO project September 2007

Chisti Yusuf (2007). Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances* 25:294-306

Cohen Zvi (1999). *Chemicals from Microalgae***,** CRC Press

Converti Attilio, Casazza A. Alessandro, Ortiz Y. Erika, Perego Patrizia, Borghi del Marco (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, *Chemical Engineering and Processing* 48:1146–1151

Demirbas Ayhan (2008). Biofuels: Securing the Planet's Future Energy Needs, Green Energy and Technology.

Demirbas Ayhan (2002). Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey, *Energy Conversion and Management* 44:2093-2109

Demirbas Ayhan (2008). Biodiesel: A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines, Springer

Eriksen NT, Riisgard FK, Gunther WS, Lønsmann Iversen JJ. (2007). On-line estimation of O(2) production, CO(2) uptake, and growth kinetics of microalgal cultures in a gas-tight photobioreactor. J *Appl Phycol* 19: 161–174

Fangrui Ma, Milford A. Hanna,(1999). Biodiesel production: a review, Bioresource Technology 70:1-15

Fung Timothy K.F., Choi Doo Hun, Sceufele Dietram A., Shaw Bret R. (2014). Public opinion about biofuels: The interplay between party identification and risk/benefit perception, *Energy Police* 73:344-355

Godia F., Albiol J., Montesinos J.L., Perez J., Creus N., Cabello F., Mengual X., Montras A., Lasseur Ch. (2002). MELISSA: a loop of interconnected bioreactors to develop life support in Space, *Journal of Biotechnology* 99:319-330 , Elsevier

Gouveia Luisa, Oliveira Ana Christina (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production, *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:269-274

Hagen Joel B. (1999). Robert Whittaker & the Classification of Kingdoms, Doing Biology, Addison-Wesley

Hasan Mohammad R., Chakrabarti Rina (2009). Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture, Food and agriculture organization of the united nations, Rome

Henriques M, Silva A and Rocha J (2007). Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method, Communicating Current Research and EducationalTopics and Trends in Applied Microbiology 586-593

Hibberd D.J. (1981). Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae), *Botanical Journal of the Linnean Society* 82:93-119

Hoel Michael (1991). Global Environmental Problems: The Effects of Unilateral Actions Taken by One Country, *Journal of environmental economics and management* 20:55-56

Hu Qiang, Sommerfeld Milton, Jarvis Eric, Ghirardi Maria, Posewitz Matthew, Seibert Michael, Darzins Al (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, Harnessing plant biomass for biofuels and biomaterials, *The plant journal* 54:621-639

Jorquera Orlando, Kiperstock Asher, Sales Emerson A., Embirucu Marcelo, Ghirardi Maria L. (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology* 101:1406-1413

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem 193(1): 265-275

Lubian Luis M., Montero Olimpio , Moreno-Garrido Ignacio, Huertas I. Emma, Sobrino Cristina, Gonz´alez-del Valle Manuel, Pares Griselda (2000). Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments, *Journal of Applied Phycology* 12:249-255

Ma Yubin, Wang Zhiyao, Yu Changjiang, Yin Yehu, Zhou Gongke (2014). Evaluation of the potential of 9 Nannochloropsis strains for biodiesel production, *Bioresource Technology* 167:503-509, Elsevier

Maeda I, Seto Y, Ueda S, Cheng Y, Hari J, Kawase M, Miyasaka H, Yagi K. (2006). Simultaneous control of turbidity and dilution rate through adjustment of medium. *Biotechnol Bioeng* 94:722–729.

Mata Teresa M., Martins Antonio A., Caetano Nidia. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217-232

Moazami Nasrin, Ashori Alizera, Ranjbar Reza, Tangestani Mehrnoush, Eghtesadi Roghieh, Nejad Ali Sheykhi (2012). Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of Nannochloropsis, *Biomass and Bioenergy* 39:449-453, Elsevier

Moazami Nasrin, Ranjbar Reza, Ashori Alireza, Tangestani Mehrnoush, Nejad Ali Sheykhi (2011). Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island. *Biomass and Bioenergy* 35:I935-I939, Elsevier

Mock Thomas and Kroon Bernd M.A. (2002). Photosynthetic energy conversion under extreme conditions—I: important role of lipids as structural modulators and energy sink under N-limited growth in Antarctic sea ice diatoms, Pergamon, *Phytochemistry* 61: 41-42

Muthukumar A., Elayaraja S., Ajithkumar T. T., Kumaresan S., Balasubramanian T. (2012). Biodiesel production from marine microalgae Chlorella marina and Nannochloropsis salina, *Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels* Vol. 3(5):58-62

Nascimento Iracema Andrade, Marques Sheyla Santa Izabel, Cabanelas Iago Teles Dominguez, Pereira Solange Andrade, Druzian Janice Isabel, de Souza Carolina Oliveira, Vich Daniele Vital, de Carvalho Gilson Correia, Nascimento Maurício Andrade (2012). Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria, *Bioenergy Research* 6:1-13, Springer

Nobre B.P., Villalobos F., Barragan B.E., Oliveira A.C., Batista A.P., Marques P.A.S.S., Mendes R.L., Sovova H., Palavra A.F., Gouveia L. (2013). A biorefinery from Nannochloropsis sp. microalga – Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass, *Bioresource Technology* 135:128-136, Elsevier

Pagnanelli Francesca, Altimari Pietro, Trabucco Franco, Toro Luigi (2013). Mixotrophic growth of Chlorella vulgaris and Nannochloropsis oculata: interaction between glucose and nitrate, Society of Chemical Industry

Porphy Simon Jegan, Farid Mohammed M. (2011). Feasibility Study for Production of Biofuel and Chemicals from Marine Microalgae Nannochloropsis sp. Based on Basic Mass and Energy Analysis. International Scholarly Research Network ISRN Renewable Energy

Prescott G.W. (1954). How to know the fresh-water algae. WM. C Brown Company, Dubuque, Iowa

Qin S, Lin H., Jiang P. (2012). Advances in genetic engineering of marine algae, *Biotechnology Advances* 30:1602-1613

Raja R., Hemaiswarya S., Kumar N. Ashok, Sridhar S., Rengasamy R. (2008). A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae, Critical Reviews in Microbiology 34:77-88

Rebolloso-Fuentes M. M., Navarro-Perez A., Garcia-Camacho F., Ramos-Miras J. J., Guil-Guerrero J. L. (2001). Biomass Nutrient Profiles of the Microalga Nannochloropsis, J. Agric. Food Chem

Recht Lee, Zarka Aliza, Boussiba Sammy (2012). Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae Haematococcus pluvialis and Nannochloropsis sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:1495-1503, Springer

Rodolfi Liliana, Zittelli Graziella Chini, Barsanti Laura, Rosati Giovanna, Tredici Mario R. (2003). Growth medium recycling in Nannochloropsis sp. Mass cultivation, *Biomolecular Engineering* 20:243-248

Rodolfi Liliana, Zittelli Graziella Chini,BassiNiccolo, Padovani Giulia, Biondi Natascia, Bonini Gimena, Tredici Mario R. (2008). Microalgae for oil: Strain Selection, Induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor, *Biotechnology and Bioengineering* 102:100-112

Scragg Alan H. (2009). Biofuels: Production, Application and Development, Cabi

Sharma Kalpesh K., Schuhmann Holger and Schenk Peer M. (2012). High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production, *energies* , 5:1532-1534

Shunni Zhu, Wei Huang, Jin Xu, Zhongming Wang, Jingliang Xu, Zhenhong Yuan, Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga Chlorella zofingiensis, *Bioresource Technology*, 152: 292-298

Simionato Diana, Block Maryse A. , Rocca Nicoletta La, Jouhet Juliette, Marıchal Eric , Finazzi Giovanni, Morosinotto Tomas (2013). The Response of *Nannochloropsis gaditana* to Nitrogen Starvation Includes *De Novo* Biosynthesis of Triacylglycerols, a Decrease of Chloroplast Galactolipids, and Reorganization of the Photosynthetic Apparatus, *Journal American Society for Microbiology* 12:665-676

Spolaore Pauline, Joannis-Cassan Claire, Duran Elie, Isambert Arsene (2006). Commercial Applications of Microalgae, Review, *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, The Society for Biotechnology, Japan Vol. 101, No. 2, 87–96. 2006

Tabatabaei Meisam , Tohidfara Masoud, Jouzania Gholamreza Salehi, Safarnejada Mohammadreza , Pazoukib Mohammad (2010). Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15:1918-1927

Tredici Mario R., Rodolfi Liliana, Zittelli Graziella Chini, Barsanti Laura, Rosati Giovanna, (2003). Growth medium recycling in Nannochloropsis sp. mass cultivation, *Biomolecular Engineering* 20:243-248

Vieler Astrid, Guangxi Wu, Chia-Hong Tsai, Blair Bullard, Adam J. Cornish, Christopher Harvey, Ida-Barbara Reca, Chelsea Thornburg, Rujira Achawanantakun, Christopher J. Buehl, Michael S. Campbell, David Cavalier, Kevin L. Childs, Teresa J. Clark, Rahul Deshpande, Erika Erickson, Ann Armenia Ferguson, Witawas Handee, Que Kong, Xiaobo Li, Bensheng Liu, Steven Lundback, Cheng Peng, Rebecca L. Roston, Sanjaya, Jeffrey P. Simpson, Allan TerBush, Jaruswan Warakanont, Simone Zauner, Eva M. Farre, Eric L. Hegg, Ning Jiang1, Min-Hao Kuo, Yan Lu, Krishna K. Niyogi, John Ohlrogge, Katherine W. Osteryoung, Yair Shachar-Hill, Barbara B. Sears, Yanni Sun, Hideki Takahashi, Mark Yandell, Shin-Han Shiu, Christoph Benning (2012). Genome, Functional Gene Annotation, and Nuclear Transformation of the Heterokont Oleaginous Alga Nannochloropsis oceanica CCMP1779, *Journal Plos Genetics* 8:1-25

Wang Dongmei, Kang Ning, Jing Li, Jianqiang Hu, Danxiang Han, Hui Wang, Xiaowei Zeng, Xiaoyan Jing, Qian Zhou, Xiaoquan Su, Xingzhi Chang, Anhui Wang, Wei Wang, Jing Jia, Li Wei, Yi Xin, Yinghe Qiao, Ranran Huang, Jie Chen, Bo Han, Kangsup Yoon, Russell T. Hill, Yonathan Zohar, Feng Chen, Qiang Hu, Xu Jian, (2013). Nannochloropsis Genomes Reveal Evolution of Microalgal Oleaginous Traits, *Journal Plos Genetics* 10:1-13

Wedly Chad Share, Hueseman Michael (2007). Lipid Production by Dunaliella salina in Batch Culture: Effects of Nitrogen Limitation and Light Intensity, J*ournal of Undergraduate Research* VII

Xu Yuan, Nordblad Mathias, Nielsen Per M., Brask Jesper, Woodley John M. (2011). In situ visualization and effect of glycerol in lipase-catalyzed ethanolysis of rapeseed oil, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 72:213-214

Zachleder V. and I. Setlik (1988). Distinct controls of DNA replication and of nuclear division in the cell cycles of the chlorococcal alga Scenedesmus quadricauda, *Journal of Cell Science* 91, 531-539

Ανδρίτσος Ν. (2008). Ενέργεια και Περιβάλλον, Διδακτικές Σημειώσεις. Πανέπιστήμιο Θεσσαλίας Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών, Βόλος, Οκτώβριος 2008.

Στουρνάς Σ., Λόης Ε., Ζαννίκος Φ. (2007). Τεχνολογία καυσίμων και λιπαντικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Τεχνολογίας Καυσίμων και Λιπαντικών, Αθήνα 2007

http://www.agroenergy.gr

http://www.algaebase.org

http://www.biodiesel.org

http://www.environment.gov.au/climate-change/climate-science/greenhouse-effect

http://www.epa.gov/acidrain/what

http://www.nanovoltaics.com

http://www.peoi.org/Courses/Coursesen/bot/bot15.html

http://www.uni-goettingen.de