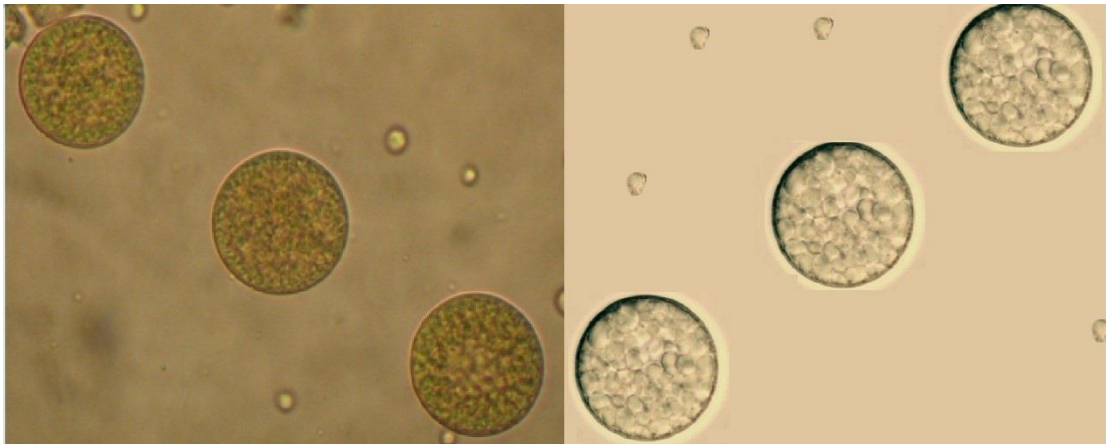




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ VI: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Βελτιστοποίηση της ετερότροφης ανάπτυξης μικροφυκών
και μελέτη της παραγωγής βιοενεργών συστατικών



Φαφούτης Αντώνιος

Επιβλέπων: Τόπακας Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π

ΑΘΗΝΑ 2017

Αφιερωμένη στον αδερφό μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου της Αθήνας, στα πλαίσια της ολοκλήρωσης του κύκλου σπουδών μου στη σχολή. Η εξέλιξή της σε καθημερινό επίπεδο συνδέεται άμεσα ή έμμεσα με συγκεκριμένους ανθρώπους, χωρίς τη συνδρομή των οποίων δε θα είχε ολοκληρωθεί.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή του Ε.Μ.Π και υπεύθυνο καθηγητή του συγκεκριμένου θέματος κύριο Ευάγγελο Τόπακα. Από την ανάθεση της διπλωματικής, μέχρι και την ολοκλήρωσή της αποτέλεσε σημαντική πηγή καθοδήγησης, υποστήριξης και βοήθειας στα όποια επιστημονικά θέματα αντιμετώπιζα. Είναι επίσης αξιόπαινη η διαρκής προσπάθειά του να συγκεντρώνει θέματα επίκαιρα και καινοτόμα, αλλά ακόμη περισσότερο η προθυμία του να τα μοιράζει στους προπτυχιακούς φοιτητές.

Η μεγαλύτερη αναγνώριση ανήκει στην υποψήφια διδάκτορα του Ε.Μ.Π. Αγγελική-Ελένη Χαλιμά, χωρίς τη διαρκή βοήθεια και στήριξη της οποίας, δε θα είχε έρθει εις πέρας η παρούσα εργασία. Της αξίζει ένα μεγάλο «ευχαριστώ» για τη συνεχή και ειλικρινή μετάδοση γνώσεων στο επίπεδο του θέματος, αλλά και για την υπομονή της στα πρώταρχικά στάδια εξοικίωσής μου με τις πειραματικές μεθόδους και σε οποιαδήποτε δυσκολία αντιμετώπιζα. Τέλος, οι παρατηρήσεις και η επιμέλειά της στην πειραματική και συγγραφική εξέλιξη του θέματος βελτίωσαν τις ικανότητες μου ως πειραματιστή και την εικόνα που έχω για τον κλάδο της έρευνας.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» θα ήθελα να δώσω σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας όχι μόνο για τη συμβουλευτική και πρακτική τους συνδρομή όποτε χρειαζόταν, αλλά και για το μοναδικό κλίμα συνεργασίας που έχουν δημιουργήσει, δίνοντας έτσι την ευκαιρία μιας πιο ευχάριστης και αποτελεσματικής πειραματικής εκμάθησης.

Καταληκτικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου για τη διαρκή και πλήρη υποστήριξη που μου προσέφερε όχι μόνο κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας, αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου σπουδών μου.

Αντώνης,

Σεπτέμβριος 2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κεντρικός σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η βελτιστοποίηση της ανάπτυξης του μικροφύκου *Chlorella zofingiensis* υπο ετερότροφες συνθήκες και η εξέταση της παραγωγής των βασικών μεταβολιτών του, δηλαδή της ασταξανθίνης και των λιπαρών οξέων.

Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν, καταρχάς, ετερότροφες καλλιέργειες διαλείποντος έργου, του στελέχους *C.zofingiensis* CCAP 211/14 σε διαφορετικές πηγές άνθρακα, αζώτου και σε διάφορες θερμοκρασίες επώασης, εξετάζοντας κάθε φορά την ανάπτυξη του μικροφύκου. Στα πλαίσια της έρευνας της ανάπτυξης του μικροφύκου πραγματοποιήθηκε και ετερότροφη καλλιέργεια με πηγή άνθρακα, γλυκόζη από ενζυμικά υδρολυμένη λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα υπολλειμμάτων καλαμποκιού. Στη συνέχεια, κύτταρα πιο ανεπτυγμένων καλλιεργειών απομονώθηκαν για να εκχλιστούν η ασταξανθίνη και τα λιπαρά οξέα που βρίσκονται εσωκυτταρικά και ερευνήθηκαν οι συνθήκες παραγωγής τους.

Πιο συγκεκριμένα, ερευνήθηκε η προτιμότερη πηγή άνθρακα ανάμεσα στο οξικό οξύ, τη ξυλόζη και τη γλυκόζη, για διάφορες συγκεντρώσεις αυτών. Βρέθηκε πως με τη γλυκόζη μεγιστοποιήθηκε η κυτταρική παραγωγικότητα (3.33 g/L) και ειδικά για 15 g/L αυτής, ενώ για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (20 g/L και 30 g/L) παρεμποδίστηκε. Συνδυάζοντας επίσης τις πεντόζες (ξυλόζη) και εξόζες (γλυκόζη), για διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτών, δεν παρατηρήθηκε υψηλή ανάπτυξη των κυττάρων του μικροφύκου, πιθανότατα λόγω πίεσης του καταβολισμού τους. Μετέπειτα, διαπιστώθηκε πως η βέλτιστη πηγή αζώτου ήταν το αμμώνιο, ενώ για διάφορες θερμοκρασίες επώασης βρέθηκε πως το μικροφύκος αναπτύσσεται καλύτερα στους 25 °C.

Η εύρεση των συνθηκών βελτιστοποίησης της ανάπτυξης του μικροφύκου, έδωσε το κίνητρο για την καινοτόμα προσπάθεια τροφοδότησης της καλλιέργειας με λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα, πλούσια στην προτιμητέα γλυκόζη. Για το λόγο αυτό, υδρολύθηκαν ενζυμικά υπολλείμματα καλαμποκιού που είχαν υποστεί προκατεργασία με έκρηξη ατμού. Από το προκύπτον υδρόλυμα, απομακρύνθηκαν οι φαινολικές ουσίες και στη συνέχεια το ίδιο τροφοδοτήθηκε στο μικροφύκος, αλλά δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξή του, γεγονός που χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Στο πεδίο ανάλυσης των μεταβολιτών, εξετάστηκε κυρίως ο δευτερογενής μεταβολίτης που παράγεται από το στέλεχος αυτό, δηλαδή η ασταξανθίνη. Η ίδια εκχυλίστηκε και αναλύθηκε με χρωματογραφικό σύστημα HPLC-RID και διαπιστώθηκε στα διάφορα είδη καλλιιεργειών που εξετάστηκαν, πως η αύξηση του λόγου άνθρακα/αζώτου (C/N) στο θρεπτικό υλικό βελτιώνει την παραγωγή της ασταξανθίνης. Στο επίπεδο επώασης του μικροφύκους διαπιστώθηκε πως για θερμοκρασία 30 °C παράγεται η περισσότερη ασταξανθίνη, ως μηχανισμός άμυνας του κυττάρου απέναντι στις οξειδωτικές συνθήκες. Ως η καλύτερη συγκέντρωση γλυκόζης για την παραγωγή ασταξανθίνης, επιλέχθηκε τελικά η τιμή 15 g/L, η οποία αν και δεν ενισχύει τόσο τη παραγωγή ασταξανθίνης ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας, οδηγεί σε πολύ υψηλή παραγωγή κυττάρων, καταλήγοντας τελικά στη μέγιστη παραγωγή ασταξανθίνης ανά λίτρο καλλιέργειας. Σε τελική φάση, εκχυλίστηκαν τα λιπαρά του μικροφύκους, δηλαδή τα C16:0, C18:0, C16:1 και C18:1, που προτείνεται να μετατραπούν σε βιοντήζελ προς τη συνολική εκμετάλλευση του μικροφύκους για παραγωγή βιοενεργών συστατικών.

Κλείνοντας, εκτός των άλλων, πραγματοποιήθηκε ετερότροφη στερεή και υγρή καλλιέργεια του μικροφύκους *Cryptocodinium cohnii*, το οποίο πρόκειται μελλοντικά να εξεταστεί ως προς τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης και παραγωγής των προϊόντων του και συγκεκριμένα των ω-3 λιπαρών οξέων.

ABSTRACT

The center purpose of this diploma thesis was the optimization of the growth of the microalga *Chlorella zofingiensis* under heterotrophic conditions and the examination of the production of its basic metabolites, which are astaxanthin and fatty acids.

First of all, *C.zofingiensis* CCAP 211/14 growth was examined in heterotrophic batch cultivation systems, supported by different organic carbon and nitrogen sources and under different incubation temperatures. Furthermore, glucose derived from the enzymatic hydrolysate of pretreated corn stover, was examined to support the growth of the microalga cells. The most grown cells were harvested, astaxanthin and fatty acids were extracted and their production conditions examined.

More specifically, the most favorable carbon source for the growth of the microalga was examined among acetic acid, xylose and glucose, at different concentrations. Glucose at 15 g/L maximized the microalgal cell productivity (3.33 g/L), whilst higher glucose concentrations (20 g/L and 30 g/L) were proven to be inhibitory. At different concentration combinations of pentoses (xylose) and hexoses (glucose) low cell growth occurred, maybe due to catabolic suppression of microalgal cells. Finally, under stable carbon source concentration, the best nitrogen source was ammonium and the best incubation temperature was 25 °C.

The optimization of the growth conditions of the microalga acted as a motivation for the cultivation of the strain with glucose from enzymatically hydrolyzed steam exploded corn stover. The hydrolysate was detoxified from phenolic compounds and used as carbon source, however cells didn't manage to utilize it for their growth.

As far as the microalgal metabolites were concerned, the basic secondary metabolite of this strain, namely astaxanthin, has been examined. This carotenoid was extracted and analyzed using HPLC-RID, which showed that a high carbon/nitrogen (C/N) ratio in the medium enhances the astaxanthin production. Furthermore, due to cell defense mechanisms under oxidative conditions more astaxanthin production has been observed under the temperature of 30 °C. The best glucose concentration for achieving high astaxanthin productivity was found to be 15 g/L. Although under this concentration the astaxanthin production per gram of dried biomass is not the optimum, the total biomass production is so high as to allow the final astaxanthin production per liter of culture to

reach very high values. Finally, the fatty acids C16:0, C18:0, C16:1 and C18:1 were extracted from the cells and identified. They can be converted into biodiesel, so as to fully exploit these microalga products.

Last but not least, the microalga *Cryptocodinium cohnii* was heterotrophically cultivated in liquid medium, as well as petri plates, whose growth and products and specifically omega-3 fatty acids, should be examined in the future.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1. ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ	4
1.1. Γενικά Στοιχεία	4
1.2. <i>Chlorella</i>	5
1.3. <i>Cryptocodinium cohnii</i>	7
2. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ.....	9
2.1. Λιπαρά οξέα	9
2.2. Καροτενοειδή.....	18
2.3. Οικονομικά δεδομένα προϊόντων.....	23
3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ	24
3.1. Φάσεις Ανάπτυξης.....	24
3.2. Αυτοτροφη-Ετεροτροφη Ανάπτυξη.....	25
3.3. Πλεονεκτήματα Ετερότροφης Ανάπτυξης	25
3.4. Ετερότροφη παραγωγή χρήσιμων μεταβολιτών.....	25
4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	27
4.1. Θερμοκρασία.....	27
4.2. Θρεπτικό Υλικό.....	28
5. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΠΗΓΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ.....	34
5.1. Υδρολυμένη βιομάζα	34
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
1. ΟΡΓΑΝΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....	39
2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....	40
3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	41
4. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	42
4.1. Θρεπτικά Μέσα.....	42
4.2. Καλλιέργεια του στελέχους <i>Chlorella zofingiensis</i>	43
4.3. Καλλιέργεια του στελέχους <i>Chrythecodinium cohnii</i>	44
4.3.1. Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας.....	44
4.4. Καλλιέργεια Μικροφυκών	45
4.4.1. Υγρές ανακαλλιέργειες	46
4.4.2. Στερεές ανακαλλιέργειες.....	47
4.5. Προσδιορισμός κυττάρων μικροφυκών μέσω θολωσιμετρίας.....	48
4.6. Συσχέτιση απορρόφησης με το ξηρό βάρος των μικροφυκών.....	49
4.7. Συλλογή ξηρής βιομάζας μικροφυκών.....	50

4.8.	Αποθήκευση δειγμάτων stock των μικροφυκών στην υπερκατάψυξη.....	51
4.8.1.	<i>Chlorella zofingiensis</i>	51
4.8.2.	<i>Chrythecodinium cohnii</i>	51
4.9.	Προσδιορισμός σακχάρων μικροφυκών	52
4.9.1.	Μέθοδος DNS	52
4.9.2.	Μέθοδος GOD/PAP	52
4.9.3.	Γλυκόζη.....	53
4.9.4.	Ξυλόζη.....	53
4.10.	Εκχύλιση λιπαρών από μικροφύκη	54
4.11.	Εστεροποίηση λιπαρών μικροφυκών	54
4.12.	Απομόνωση ασταξανθίνης.....	54
4.13.	Υδρόλυση ασταξανθίνης.....	55
4.14.	Χρωματογραφική Ανάλυση	56
4.14.1.	Είδη Ανιχνευτών	58
4.14.2.	Λεπτομέρειες Χρωματογραφικών Τεχνικών	60
4.15.	Λιγνινοκυτταρινούχα Βιομάζα.....	61
4.15.1.	Συλλογή και επεξεργασία καλαμποκιού	61
4.15.2.	Προκατεργασία με Steam Explosion	61
4.15.3.	Όξινη υδρόλυση βιομάζας καλαμποκιού	62
4.16.	Μέθοδος πρωτεϊνικού προσδιορισμού Bradford.....	63
4.17.	Ενζυμική υδρόλυση βιομάζας καλαμποκιού.....	64
4.18.	Προσδιορισμός φαινολικών δακτυλίων μέσω του αντιδραστηρίου Folin	65
4.19.	Απομάκρυνση φαινολικών δακτυλίων μέσω προσρόφησης σε ενεργό άνθρακα ...	66
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	67
1.	Ετερότροφη Ανάπτυξη του Μικροφύκου <i>Chlorella zofingiensis</i>	69
2.	Βελτιστοποίηση Παραγωγής Βιομάζας Μικροφυκών	70
	Παράγοντες Ανάπτυξης	70
2.1.	Βέλτιστη Πηγή Άνθρακα	70
2.2.	Βέλτιστη Πηγή Αζώτου	75
2.3.	Βέλτιστη Θερμοκρασία Ανάπτυξης.....	77
3.	Λιγνινοκυτταρινούχα Βιομάζα.....	79
3.1.	Όξινη Υδρόλυση	79
3.2.	Ενζυμική Υδρόλυση.....	80
4.	Παραγωγή Ασταξανθίνης.....	82
4.1.	Υπολογισμός λόγου C/N.....	82
4.2.	Χρωματογράφημα Ασταξανθίνης	82

4.3.	Πηγή Άνθρακα	83
4.4.	Πηγή Αζώτου	85
4.5.	Διάφορες Θερμοκρασίες	86
5.	Παραγωγή Λιπαρών οξέων	87
6.	Οπτική Παρατήρηση Στελέχους <i>Chlorella zofingiensis</i>	89
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ		91
1.	Οπτικές παρατηρήσεις.....	93
2.	Ετερότροφη Ανάπτυξη Μικροφύκους	94
3.	Βελτιστοποίηση Παραγωγής Βιομάζας Μικροφύκους	95
3.1	Βέλτιστη Πηγή Άνθρακα	95
3.2	Βέλτιστη Συγκέντρωση Γλυκόζης	96
3.3	Συνδυασμός Πηγών Άνθρακα	97
3.4	Βέλτιστη Πηγή Αζώτου	97
3.5	Βέλτιστη Θερμοκρασία Ανάπτυξης	98
3.6	Βελτιστες Συνθήκες Ετερότροφης Ανάπτυξης Μικροφύκους <i>Chlorella zofingiensis</i> ..	99
3.7	Υδρόλυμα υπολειμμάτων καλαμποκιού.....	99
4.	Παραγωγή Ασταξανθίνης.....	101
4.1	Πηγή Άνθρακα	101
4.2	Πηγή Αζώτου	102
4.3	Θερμοκρασία επώασης.....	102
4.4	Σχολιασμός Συνθηκών Ετερότροφης Παραγωγής Ασταξανθίνης Μικροφύκους <i>Chlorella zofingiensis</i>	103
5.	Παραγωγή Λιπαρών Οξέων	103
6.	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ	105
	<i>Για το μικροφύκος Chlorella zofingiensis</i>	105
	<i>Για το μικροφύκος Crypthecodinium cohnii</i>	106
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		107
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....		119
Καμπύλες Αναφοράς Μεθόδων		119

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη σύγχρονη εποχή η ανάγκη του ανθρώπου για εύρεση νέων πηγών ενέργειας και αγαθών ώθησε την επιστημονική κοινότητα στην ιδέα αξιοποίησης των μικροφυκών. Αυτό συνέβη λόγω της δυνατότητας των μικροφυκών σε υψηλές συγκεντρώσεις βιομάζας τους να απελευθερώνουν χρήσιμα λιπαρά οξέα, τα οποία υπό την παρουσία καταλύτη και ορισμένων αλκοολών μπορούν να μετεστεροποιηθούν σε βιοντήζελ. Εκτός αυτών, από το 1950 ήταν γνωστά τα εξελικτικά ανώτερα μακροφύκη και συγκεκριμένα τα είδη των *Rhodophyta* και *Phaeophyta*, που ήταν ικανά να παράγουν φυκοκολλοειδή, δηλαδή χρήσιμους πολυσακχαρίτες όπως το άγαρ-άγαρ και η καραγενάνη. Η ικανότητα αυτή, παραγωγής προϊόντων υψηλής αξίας, έστρεψε τις έρευνες τις τελευταίες δεκαετίες, στη μικρότερη σε μέγεθος κατηγορία φυκών, τα μικροφύκη. Εκείνα με τη σειρά τους διαπιστώθηκε πως ποικίλουν από είδος σε είδος και μπορούν να αναπτυχθούν τόσο υπό την παρουσία φωτός, όσο και υπό το σκότος. Υπο κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης αυξάνονται σε μέγεθος παράγοντας τους πρωτογενείς μεταβολίτες, ενώ υπό συνθήκες πίεσης αυξάνουν τη συγκέντρωση των δευτερογενών μεταβολιτών με στόχο την προστασία και επιβίωσή τους. Οι μεταβολίτες αυτοί αποτελούν υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντα για τον άνθρωπο και έχουν δημιουργήσει πολλές βιομηχανίες παραγωγής τους, βρίσκοντας εφαρμογή ως διατροφικά πρόσθετα, ένζυμα, πολυμερή, χρωστικές, φαρμακευτικές ουσίες, τροφοδοσία υδατοκαλλιεργειών και φυσικά βιοκαύσιμα. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη μια έρευνα βελτιστοποίησης τόσο της ανάπτυξης των μικροφυκών υπό κατάλληλες συνθήκες, όσο και της παραγωγής συγκεκριμένων πολύτιμων προϊόντων. [1]–[4]



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής παραγωγικής διαδικασίας καλλιέργειας μικροφυκών μέχρι την τελική εφαρμογή [1]

1. ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

1.1. Γενικά Στοιχεία

Τα μικροφύκη αποτελούν προκαρυωτικούς ή ευκαρυωτικούς φωτοσυνθετικούς και μη μικροοργανισμούς που αξιοποιούν ηλιακή ενέργεια, θρεπτικά συστατικά και διοξείδιο του άνθρακα προς την παραγωγή υδρογονανθράκων, λιπιδίων και άλλων οργανικών ενώσεων. [5]

Ονομάζονται αλλιώς και πράσινα φύκη και μπορούν να βρεθούν είτε ως αποικίες εντός άλλων κυττάρων, συμβάλλοντας τόσο στην ικανοποίηση των προσωπικών τους αναγκών, όσο και του ξενιστή, είτε πάλι ως συμβιωτές ή δομική και πολυσχιδής μονάδες ικανές να φτάσουν μέχρι και μήκος 60 μέτρων.

1.1.1. Κατηγορίες

Η κατανομή των ειδών των μικροφυκών πραγματοποιείται σε 10 κατηγορίες, με τις 6 σημαντικότερες να φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 1: 6 Βασικές κατηγορίες μικροφυκών: *Chlorophyceae* (πράσινα), *Euglenophyceae* (διαφορετική εσωκυτταρική-βιοχημική οργάνωση από *Chlorophyceae*), *Phaeophyceae* (καφέ), *Chrysophyceae* (κίτρινο-πράσινα), *Pyrrophyceae* (δινωμαστιγωτά μικροφύκη) και *Rhodophyceae* (κόκκινα). (Thompson, 1996)

1.1.2. Ιδιότητες

Τα μικροφύκη μπορούν να επιβιώσουν τόσο σε υγρά, όσο και εδαφικά περιβάλλοντα, με τα πρώτα να είναι περισσότερα αποτελεσματικά στο επίπεδο της φωτοσύνθεσης. Παράλληλα, αποτελούμενα από μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες προσαρμόζουν τις κυτταρικές τους ανάγκες στις διάφορες συνθήκες που μπορεί να βρεθούν, κατηγοριοποιώντας ένα τεράστιο φάσμα περίπου 800.000 διαφορετικών μικροφυκών.

Ένα σημαντικότατο πλεονέκτημά τους είναι ότι συνδυάζουν μοναδικά τις δυνατότητες των εξελικτικά ανώτερων φυτών, μαζί με αυτές των μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα, χαρακτηρίζονται από ταχύτερους ρυθμούς ανάπτυξης σε σχέση με τα ανώτερα φυτικά κύτταρα, ενώ ταυτόχρονα έχουν απλές διατροφικές ανάγκες και είναι ικανά να παράγουν πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως οι μικροοργανισμοί. Το οπλοστάσιο όλων αυτών των ιδιοτήτων τα καθιστά ικανά να συνεισφέρουν με τα προϊόντα τους, όχι μόνο στο πεδίο των εναλλακτικών καυσίμων, αλλά και σε αυτά των τροφίμων, της φαρμακευτικής και των καλλυντικών. [5], [6]

1.2. *Chlorella*

Το κεντρικό είδος μικροφύκος που θα αναλυθεί πρώτα είναι το *Chlorella*, που αποτελεί ένα πράσινο φύκος του γλυκού νερού εξοπλισμένο με πρωτεΐνη, σίδηρο, βιταμίνες Β και C και διάφορα αντιοξειδωτικά, ικανό να αναπτυχθεί αυτότροφα, αλλά και σε ορισμένες περιπτώσεις ετερότροφα υπό την τροφοδοσία πηγών άνθρακα και αζώτου. Ειδικότερα, αποτελεί μονοκυτταρικό ευκαρυώτη της ζωολογικής οικογένειας *Chlorophyta* διαμέτρου 2-10 μm με ικανότητες φωτοσύνθεσης που παράγουν χρωστικές χλωροφύλλης a και b, ενώ διαθέτει μηχανισμούς ικανούς να αντιμετωπίσουν βακτήρια, μικροφύκη, όγκους και ιούς. Η ικανότητά του να φωτοσυνθέτει, σε συνδυασμό με την υψηλή του περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και θρεπτικά στοιχεία το καθιστά προτεινόμενη πηγή τροφής και ενέργειας, γι' αυτό και καταναλώνεται σα διατροφικό πρόσθετο.

1.2.1. *Είδη*

CHLORELLA	
<i>autotrophica</i>	<i>rotunda</i>
<i>coloniales</i>	<i>singularis</i>
<i>lewinii</i>	<i>sorokiniana</i>
<i>minutissima</i>	<i>variabilis</i>
<i>pituuta</i>	<i>volutis</i>
<i>pulchelloides</i>	<i>vulgaris</i>
<i>pyrenoidosa</i>	<i>zofingiensis</i>

Εικόνα 2: Είδη του γένους *Chlorella*

1.2.2. Χρησιμότητα

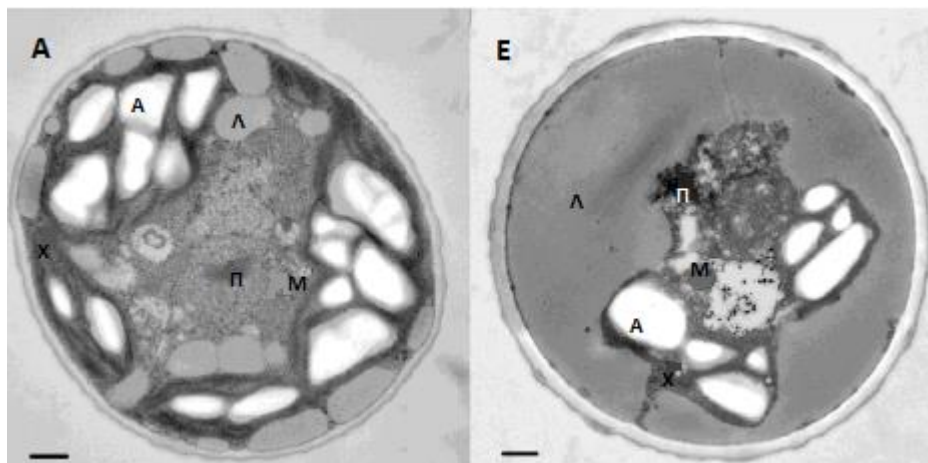
Εκτός των άλλων, το μικροφύκος *Chlorella* αποτελεί άμεσο διατροφικό συστατικό, χρήσιμο σε ανθρώπους που πάσχουν από συγκεκριμένα είδη καρκίνου, ικανό να αυξήσει τη συγκέντρωση των λευκών αιμοσφαιρίων για την αντιμετώπιση του HIV και έχει ερευνηθεί η ωφέλειά του στις γαστρεντερικές και πολλές άλλες παθήσεις όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, η υψηλή χοληστερίνη και οι κρίσεις άσθματος.

1.2.3. *Chlorella zofingiensis*

Το στέλεχος που αναλύθηκε σε πειραματικό επίπεδο είναι το τελευταίο που αναφέρθηκε, το *Chlorella zofingiensis*. Το παρόν μικροφύκος έχει τη δυνατότητα ανάπτυξης άφυλα σε στάδια ανάπτυξης, ωρίμανσης και διαίρεσης, τόσο αυτότροφα, όσο και ετερότροφα σε καθορισμένο θρεπτικό υλικό.

1.2.3.1. Κυτταρική μορφολογία

Μικροβιολογικά το στέλεχος *zofingiensis* υπό συνθήκες φωτός διαθέτει χλωροπλάστες περιφερειακά του κυτταροπλάσματος, διασκορπισμένους κόκκους αμύλου, ίχνη λιποειδών σωματιδίων και ωσειδή μιτοχόνδρια συνεργάσιμα με τους χλωροπλάστες. Στην περίπτωση ετερότροφων συνθηκών όμως, τα λιποειδή σωματίδια διαχέονται σχηματίζοντας ένα περιφερειακό στρώμα καλύπτοντας τους μικρότερου μεγέθους χλωροπλάστες και κόκκους αμύλου.



Εικόνα 3: (A: Αυτότροφα, E: Ετερότροφα)

A: άμυλο, Λ: λιποειδή σωματίδια, M: μιτοχόνδρια, Π: πυρήνας, X: χλωροπλάστες

1.2.3.2. Προϊόντα

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το είδος *C.zofingiensis* διαθέτει τις *chlorophyllis* a και b που συνδράμουν στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, παράγοντας παράλληλα πρωτεύοντα καροτενοειδή (β-καροτίνη, λουτεΐνη και ζεαξανθίνη) στην περιοχή των χλωροπλαστών, ενώ δευτερεύοντα στην περιοχή των λιποειδών σωμάτων. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη βιολογική σύσταση του μικροφύκου οδήγησε στην μελέτη ετερότροφης παραγωγής δευτερευόντων καροτενοειδών και στη μεγιστοποίηση αυτής μέσω του ελέγχου της επίδρασης των παραγόντων ανάπτυξης του *C.zofingiensis*. [7]

1.3. *Crypthecodinium cohnii*

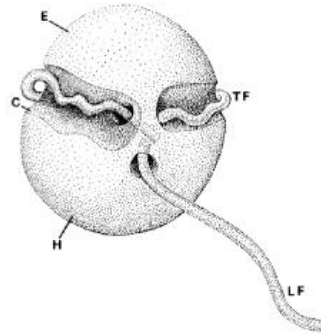
1.3.1. Χαρακτηριστικά

Το δεύτερο κατά σειρά μικροφύκος που εξετάστηκε αποτελεί το ετερότροφο, αλμυρού νερού, δινομαστιγωτό *Crypthecodinium cohnii*. Συγκρινόμενο με πολλούς άλλους μικροοργανισμούς το θαλάσσιο αυτό είδος αναγνωρίζεται ως ένα σύνθετο σύνολο πολλών συγγενικών στελεχών, παρά σαν μια αυτούσια μονάδα. Χαρακτηρίζεται οπτικά ως μαύρου χρώματος κύτταρο, παράκτιο και μέχρι σήμερα έχει απομονωθεί από ξενιστές όπως *Cystoseira*, *Zostera*, *Thalassia*, *Phragmites* και *Acetabularia*. [8]

Πηγές συγκέντρωσης μικροφυκών ομοίων του *C.cohnii* καταγράφονται οι μολυσμένες μαύρες παραλίες, εκβολές ποταμών, θερμοί βάλτοι και κατεψυγμένα λιμάνια. Η ποικιλία αυτή δεν αντικατοπτρίζει πάντοτε το ίδιο στέλεχος, αλλά γενετικά διαφοροποιημένα είδη *C.cohnii*. Εκτός αυτών των συγκεκριμένων πηγών, τα διάφορα συγγενικά είδη του μικροφύκου έχουν εντοπιστεί σε θαλάσσιες περιοχές όπως είναι η Βόρεια θάλασσα, η Μεσόγειος και η Βαλτική. [9]

1.3.2. Κυτταρική δομή

Αλλάζοντας διαρκώς ονόματα από το 1885 ως *Glenodinium cohnii*, μέχρι την κοινή αποδοχή του ως μια ομάδα ειδών μικροφύκους το 1997, ο μικροοργανισμός *Crypthecodinium cohnii* εμφανίζεται δομικά σε δύο μορφές, τα κινητά κύτταρα (swimming cells) και τις κύστες (cysts). Η πρώτη αποτελείται από δύο μαστίγια, ένα με ρόλο εκκίνησης και επιτάχυνσης του κυττάρου και το δεύτερο προσανατολισμού του. Η δεύτερη αποτελείται από μοναχικά και ωοειδή κύτταρα που στοχεύουν στην αναπαραγωγή και στην επιβίωσή τους, παράγοντας τα περισσότερα δυνατά μεταβολικά προϊόντα. [8]



Εικόνα 4: Παρουσίαση κάθετης οπτικής κυττάρου του στελέχους *Crypthecodinium cohnii*, όπου (E: επίσωμα), (C: χώρος πρόσδεσης μαστιγίου), (TF: εγκάρσιο μαστίγιο), (H: υπόσωμα) (LF: διαμήκες μαστίγιο)

1.3.3. Κυτταρική ανάπτυξη

Η ανάπτυξη των κυττάρων του *C. cohnii* πραγματοποιείται τόσο άφυλα, όσο και φυλετικά, με την τελευταία επιλογή να εμφανίζεται σε συνθήκες επιβίωσης υπό τη μείωση θρεπτικών συστατικών. Όσον αφορά τις συνθήκες αυτές, τονίζεται πως ο μικροοργανισμός είναι υποχρεωτικά ετερότροφος και απαιτεί να λάβει τα απαραίτητα ποσά ενέργειας από το κοντινότερο υπόστρωμα πηγής άνθρακα, είτε φυσικά όπως όταν καταναλώνει άλλα μικροφύκη, είτε σε εργαστηριακές καλλιέργειες. Ο τομέας της καλλιέργειάς του έχει αναπτυχθεί τα τελευταία 20 χρόνια και έχει διαπιστωθεί πως μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο σε υγρό, όσο και σε στερεό θρεπτικό υλικό συνοδευόμενο από πηγές άνθρακα και αζώτου. (Laboratories, 1975; Taylor)

1.3.4. Προϊόντα

Το θαλάσσιο μικροφύκος *Crypthecodinium cohnii* αποτελεί βασική πηγή παραγωγής, σε μορφή ελαίου, του ω-3 λιπαρού οξέος, του εικοσιδυοεξανοϊκού οξέος ή αλλιώς DHA (22:6 ω-3), με όλα τα υπόλοιπα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα να εμφανίζονται στο ελάχιστο ποσοστό του 1%. Η δυναμικότητά του προς την παραγωγή του λιπαρού αυτού ποικίλει από 25-60% w/w των συνολικών λιπαρών οξέων και μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα τόσο με το ρυθμό ανάπτυξης της καλλιέργειας, όσο και την ποσότητα της ξηρής βιομάζας κυττάρων. Οι συνθήκες ανάπτυξης παίζουν πρωτεύοντα ρόλο και στα δύο κριτήρια βελτιστοποίησης γι' αυτό και απαιτούν συνεχή και ενδεδειγμένη έρευνα.[12]

2. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

2.1. Λιπαρά οξέα

2.1.1. Γενικά

Με τον όρο λιπαρά οξέα ονομάζουμε τις οργανικές ομάδες ατόμων άνθρακα που διαθέτουν μια αλυσίδα υδρογονανθράκων και μια καρβοξυλική ομάδα στο τέλος αυτής. Ανάλογα με το είδος των ενδιάμεσων δεσμών των ατόμων άνθρακα, χωρίζονται σε κορεσμένα και ακόρεστα. Αν διαθέτουν έναν διπλό δεσμό ονομάζονται μονοακόρεστα, ενώ αν έχουν παραπάνω τότε λέγονται πολυακόρεστα. Στη φύση απαντώνται 40 διαφορετικά λιπαρά οξέα με τα πιο γνωστά να είναι το παλμιτικό (C_{16}) και το στεατικό (C_{18}) στα κορεσμένα, το ελαϊκό και το λινελαϊκό (C_{18}) στα μονοακόρεστα και το εικοσιπενταενοϊκό (C_{20}) και εικοσιδυοεξανοϊκό (C_{22}) οξύ στα πολυακόρεστα.

Τα μικροφύκη για αρκετές δεκαετίες είναι γνωστά για το σύνολο των λιπαρών τους που έχουν πρωτεύοντα ρόλο τόσο στις διατροφικές συνήθειες, όσο και στα καλλυντικά και τα καύσιμα, αναδεικνύοντας τη συνεχή έρευνα για όλο και περισσότερα από αυτά. Μεταβολικά, η βιοσύνθεση αυτών των μορίων είναι ανάλογη αυτής των ανώτερων φυτών, λαμβάνοντας χώρα στους χλωροπλάστες και μπορεί να βελτιωθεί ανάλογα με το στέλεχος που εξετάζεται. Ακολουθώντας τους φυτικούς ιστούς τα λιπαρά οξέα των μικροφυκών περιέχουν κυρίως λιπαρά οξέα ατόμων άνθρακα, C_{16} , C_{18} αλλά και C_{20} . [13]

2.1.2. *Chlorella zofingiensis*

Σύμφωνα με το σύνολο των αποτελεσμάτων σύγκρισης αυτότροφης και ετερότροφης καλλιέργειας του στελέχους *Chlorella zofingiensis* παρατηρήθηκε πως κατά την πρώτη παραγωγική διαδικασία αποδίδεται βασική ποσότητα συνολικών λιπαρών οξέων και ελαϊκού οξέος (C18:1), ενώ κατά τη δεύτερη διαπιστώθηκε σταθερή αύξηση αυτών. Η σύνθεση των λιπαρών, όπως έχει ήδη αναφερθεί, πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες, μέσω συγκεκριμένων ενζύμων τα οποία υπό ετερότροφες συνθήκες παροχής γλυκόζης ως πηγής άνθρακα αυξάνουν την παραγωγή λιπαρών οξέων. [14]

Πίνακας 1: Σύσταση συνολικών λιπαρών και ελεύθερων λιπαρών οξέων στο στέλεχος *Chlorella zofingiensis* για αυτότροφη και ετερότροφη καλλιέργεια [14]

<i>Chlorella zofingiensis</i>				
Λιπαρά οξέα	Αυτότροφα		Ετερότροφα	
	Συνολικά λιπαρά (%)	Ελεύθερα λιπαρά οξέα (%)	Συνολικά λιπαρά (%)	Ελεύθερα λιπαρά οξέα (%)
C16:0	26,6	25,6	22,2	18,9
C16:1	-	2,8	-	2,2
C16:2	7,7	-	8,3	13
C16:3	-	10	-	13,1
C18:0	-	18,8	-	9,1
C18:1	17,3	11,1	35,2	12,3
C18:2	20,8	-	20,2	8,7
C18:3	10,8	-	7,8	14,1
Κορεσμένα	30	44,3	23,6	28
Μονοακόρεστα	20	14	37,4	14,5
Πολυακόρεστα	50	41,7	39,1	57,5

2.1.3. *Cryptocodinium cohnii*

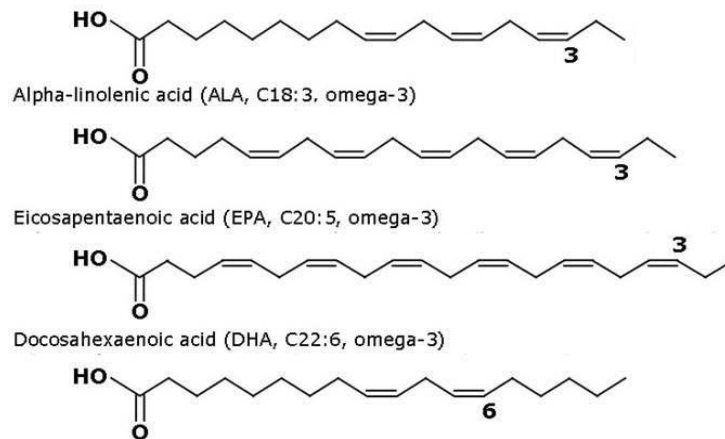
Σύμφωνα με το σύνολο των αποτελεσμάτων μιας ετερότροφης καλλιέργειας του στελέχους *Cryptocodinium cohnii* επιβεβαιώνεται ποσοτικά η παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων και κυρίως εικοσιδυοεξανοϊκού οξέος (DHA), το οποίο αποτελεί το μεγαλύτερο δυνατό ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (51,12%). Ταυτόχρονα, απαιτείται βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης του μικροοργανισμού προς τη συγκέντρωση υψηλότερων ποσοτήτων ακόρεστων λιπαρών οξέων, μέσω τόσο διαφορετικών πηγών ανάπτυξης, όσο και συνθηκών οξύτητας, θερμοκρασίας και οξυγόνου.[15], [16]

Πίνακας 2: Σύσταση συνολικών λιπαρών οξέων στο στέλεχος *Cryptocodinium cohnii* για ετερότροφη καλλιέργεια [15]

<i>Cryptocodinium cohnii</i>	
Λιπαρά οξέα	Ετερότροφα (%)
C12:0	1,58
C14:0	13,04
C16:0	19,81
C18:0	12,82
C18:1	0,81
C22:5	0,81
C22:6 (DHA)	51,12
Κορεσμένα	47,25
Ακόρεστα	52,75

2.1.4. Ω-3 Λιπαρά Οξέα

Σημαντική θέση στον τομέα των λιπαρών οξέων κατέχουν τα ω-3 ή αλλιώς n-3 λιπαρά οξέα, που αποτελούν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, των οποίων ο πρώτος διπλός δεσμός βρίσκεται στο 3^ο άτομο άνθρακα, ξεκινώντας την ονοματολογική αρίθμηση από τον τελευταίο άνθρακα, που ονομάζεται άνθρακας-ωμέγα. Τα πιο γνωστά από αυτά είναι το λινελαϊκό οξύ (linolenic acid, ALA), το εικοσιπεντενοϊκό οξύ (eicosapentaenoic acid, EPA) και το εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (docosahexaenoic acid, DHA).



Εικόνα 5: Μοριακές δομές ω-3 λιπαρών οξέων

Στο επίπεδο των μικροφυκών αναλύεται ενδελεχώς ο ρόλος των EPA και DHA, με το πρώτο να εντοπίζεται κυρίως σε ιχθυέλαια και όσον αφορά τη θαλάσσια πανίδα στους σολομούς, τις σαρδέλες και τον μπακαλιάρο, ενώ το DHA αποτελεί προϊόν μεταβολισμού του EPA. Η φυσική πηγή αυτών των λιπαρών οξέων για την κάλυψη όλου του ανθρώπινου πληθυσμού, έρχεται αντιμέτωπη με τον κίνδυνο της υπεραλίευσης και ταυτόχρονα απαιτεί πολύ χρονοβόρες και κοστοβόρες μεθόδους καθαρισμού ώστε να εκχυλιστεί το απαραίτητο έλαιο και να είναι εδώδιμο. Δε θα πρέπει όμως να παραληφθεί, πως ο ανθρώπινος παράγοντας προσβάλλει το θαλάσσιο οικοσύστημα χωρίς να δίνει πολλά περιθώρια για την πρόσληψη των ουσιών αυτών και μαζί με τα παραπάνω επιτάσσει την έρευνα εναλλακτικών πηγών, όπως είναι τα μικροφύκη. [4]

2.1.4.1.Σημαντικότητα ω-3 λιπαρών οξέων

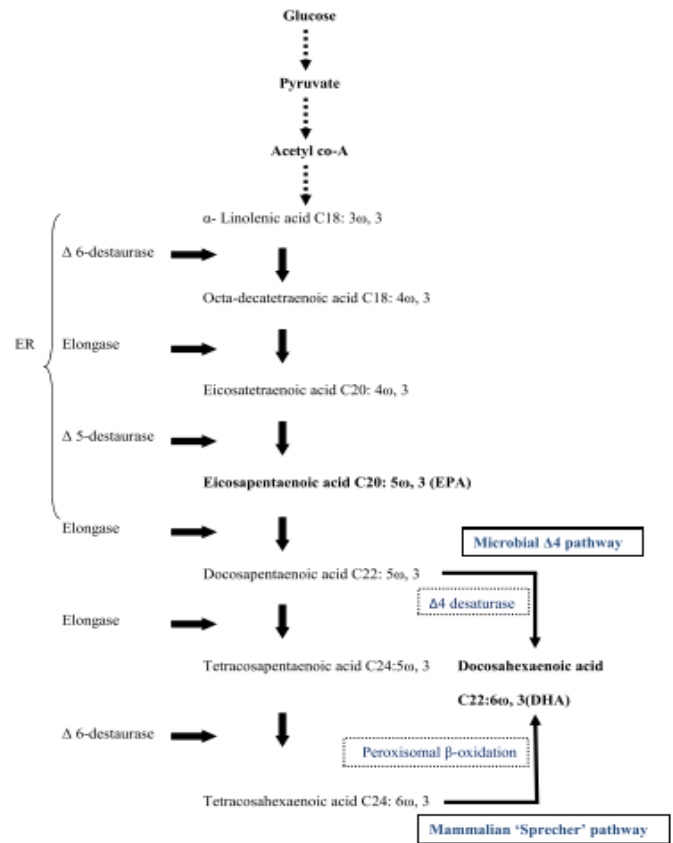
Η απουσία αυτών των ω-3 λιπαρών οξέων από την ανθρώπινη διατροφή και η αντικατάστασή τους με ω-6 λιπαρά οξέα εγκυμονεί κινδύνους εμφάνισης καρκίνου, διαβήτη και καρδιαγγειακών ασθενειών. Συγκεκριμένα το Εθνικό Ερευνητικό Σώμα Υγείας και Φαρμάκων της Αυστραλίας προτείνει την κατανάλωση των παραπάνω ω-3 λιπαρών για τη μείωση των χρόνιων ασθενειών σε ποσότητες του ύψους των 610 mg/ημέρα για τους άντρες και 430 mg/ημέρα για τις γυναίκες. [17], [18]

Γενικότερα, τα ω-3 λιπαρά οξέα προστατεύουν από καρδιακές παθήσεις και μειώνουν το ρίσκο εμφράγματος. Το DHA συγκεκριμένα, αποτελεί το κεντρικό λιπαρό οξύ των φωσφολιπιδίων των νευρικών κυττάρων, ενώ παράλληλα εμφανίζεται σε ιστούς υψηλής αγωγιμότητας. Μερικοί από αυτούς είναι τόσο ο εγκέφαλος, όσο και οι οφθαλμοί, αλλά και οι καρδιαγγειακοί μύες. Η επιβολή στον οργανισμό ακόμα και ελαχίστων ποσοτήτων του DHA μπορεί να βελτιώσει τόσο τη λειτουργία, όσο και την ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων, αλλά και να συμβάλλει στην εγκεφαλική και οπτική ανάπτυξη ,κυρίως στις βρεφικές ηλικίες. Αυτό συμβαίνει, επειδή η παρουσία του λιπαρού οξέως διεγείρει την εγκεφαλική αντοχή ,μέσω της βελτίωσης των μεμβρανών των νευρικών κυττάρων. Τόσο το DHA όσο και το EPA συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό των καρδιαγγειακών μυϊκών κυττάρων και ταυτόχρονα στην άμυνα των αρτηριών του οργανισμού από τη νόσο της αθηροσκλήρωσης. Αποκορύφωμα όλων των παραπάνω, είναι το γεγονός ότι τα ω-3 λιπαρά οξέα είναι πολύ αποτελεσματικά στην καταπολέμηση πολλών περιπτώσεων καρκίνου, ανάμεσα στις οποίες αναφέρεται η επιβράδυνση των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου, γεγονός που συσχετίζεται με τη γονιδιακή επιρροή των οργανικών μορίων σε αυτά. [19]–[22]

2.1.4.2.Βιοσύνθεση DHA

Στα μεταβολικά μονοπάτια παραγωγής του οργανικού λιπαρού οξέος DHA συγκαταλέγονται δύο διακριτές περιπτώσεις, η αερόβια και η αναερόβια.

Το αερόβιο μονοπάτι εμφανίζεται τόσο στα ζώα, όσο και σε κάποιους ευκαρυώτικους μικροοργανισμούς όπως το *Thraustochytrium* και βασίζεται σε διαδοχικά στάδια επιμήκυνσης και δημιουργίας ακόρεστων δεσμών του μορίου C_{18:3}. Συγκεκριμένα, τα ζώα και ο άνθρωπος (Mammalian ‘Sprecher’ pathway), λειτουργούν ανεξάρτητα του ενζύμου που δημιουργεί το δεσμό στη θέση Δ4. Το δικό τους σύστημα δημιουργεί ένα δεσμό στη θέση Δ6, μέσω ενός ενζύμου και πραγματοποιείται μία β-οξείδωση του προϊόντος προς DHA, ενώ ο ευκαρυώτης μαζί με τα μικροφύκη κατασκευάζουν το δεσμό στη θέση Δ4 απευθείας στο μόριο EPA (Microbial Δ4 pathway), όπως φαίνεται στο ανάλογο διάγραμμα. [23]



Εικόνα 6: Αερόβιο μονοπάτι παραγωγής DHA

Το αναερόβιο μονοπάτι, περιλαμβάνει τη χρήση της κετοσυνθάσης (KS), ενός ενζύμου που καταλύει τη συμπύκνωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και μιας ισομεράσης (isomerase) ικανή να αυξήσει τον αριθμό των ατόμων άνθρακα προς την παραγωγή του DHA και εμφανίζεται σε κάποια βακτήρια και σε ευκαρυώτες όπως το *Schizochytrium*. [23]



Εικόνα 7: Αναερόβιο μονοπάτι παραγωγής DHA

2.1.4.3. Πηγές DHA

Αλιεία

Η πιο γνωστή πηγή ω-3 λιπαρών οξέων είναι μέσω της αλιείας, που ποικίλει ανάλογα το είδος του ψαριού και το περιβάλλον ανάπτυξής του. Συγκεκριμένα, στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ποσοτικά οι σχέσεις των ιχθύων με το αντίστοιχο παραγόμενο έλαιο που περιέχει 1g των EPA και DHA, τα οποία και προμηθεύονται μέσω της διατροφικής τους αλυσίδας και τα αφομοιώνουν διαφορετικά από είδος σε είδος.[24]

Πίνακας 3: Σύγκριση Ιχθυρών με την Ημερίσια κατανάλωσή τους για αφομίωση 1 g EPA και DHA [25]

Ιχθυρό	Ημερίσια κατανάλωση για 1 g EPA & DHA
Φρέσκος τόνος	70-360
Σαρδέλα	60-90
Σολομός	60-135
Σκουμπρί	60-250
Ρέγγα	45-60
Ιριδίζουσα πέστροφα	90-105
Ψήσσα	90-225
Γάδος	375-750
Μπακαλιάρος	450
Γατόψαρο	450-600
Πλευρονήκτης	210
Στρείδι (ειρηνικού, ανατολικό, ιχθυοκαλλιέργειας)	75/195/240
Αστακός	225-1275
Καβούρι	255
Γαρίδα	330
Αχιβάδα	375
Χτένι	525

Δυστυχώς, η αύξηση της παγκόσμιας κατανάλωσης τόσο των ιχθυρών, όσο και των αντίστοιχων ελαίων ώστε ο καταναλωτής να προμηθευτεί τις απαιτούμενες διατροφικές ποσότητες DHA, εμφανίζει τον κίνδυνο της υπεραλίευσης. Στατιστικά στοιχεία του FAO (Food and Agriculture Organization) αναφέρουν πως κατά το έτος του 2008 το συνολικό απόθεμα ιχθύων μειώθηκε στο 10% και έχουν επιβεβαιωθεί ως εξαφανισμένα 100 είδη στους ωκεανούς. Εκτός αυτού, η υψηλή κατανάλωση ιχθυρών μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα υγείας, λόγω των περιεχόμενων σε αυτά τοξικών ουσιών, όπως του μεθυλουδραργύρου, των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (PCBs) και των διοξινών. Τα στοιχεία αυτά αυξάνουν την ανάγκη για εναλλακτική παραγωγή ω-3 προϊόντων, αποφεύγοντας τις υπερβολικές αλιευτικές δράσεις. [26]

Ιχθυοκαλλιέργειες

Από τις αρχές του 1970 οι ιχθυοκαλλιέργειες αποτελούν την πιο βελτιωμένη μορφή αλιείας, ενώ ταυτόχρονα είναι προσιτή και παραγωγική σαν βιομηχανία, με έκτοτε ετήσια άνοδο της τάξεως του 8%. Στη συνολική εκτροφή των ιχθύων και κυρίως αυτών που αναφέρονται παραπάνω, το βασικό θρεπτικό υλικό αποτελείται από τις ιχθυοτροφές και τα έλαια, ενώ παίζουν σπουδαίο ρόλο οι θαλάσσιοι οργανισμοί όπως τα κρίλ και τα μικροφύκη, αλλά και οι φυτικές πηγές όπως το σογιέλαιο και το σιτάρι. Το κατάλληλο διατροφικό πρόγραμμα των ιχθύων, σε συνδυασμό με την περίοδο αλιευσής τους μπορεί να αποδώσει τη μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα ω-3 λιπαρών στο παραγόμενο έλαιο. Συνεπώς, μειώνεται ο κίνδυνος της υπεραλιεύσης και βελτιώνεται το τελικό προϊόν, ενώ αντιθέτως δεν αντιμετωπίζεται το πρόβλημα των επιβλαβών ουσιών. [27]

Φυτικές καλλιέργειες

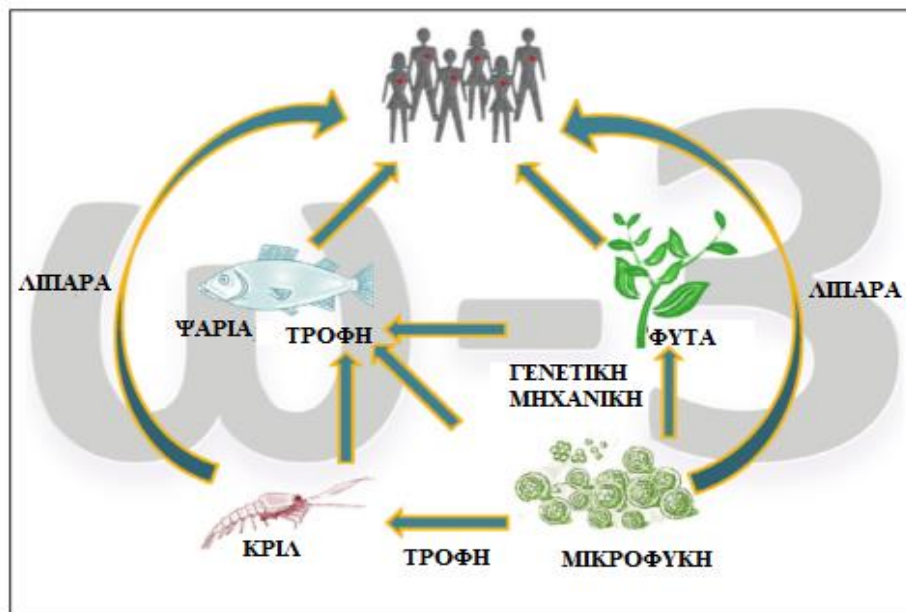
Παρά το γεγονός ότι η παραγωγή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων έχει γίνει αντιληπτή τόσο από τα φυτά, όσο και από τους σπόρους τους, δεν είναι δυνατή να συνθέσει τα μόρια των EPA και DHA, αλλά σταματάει στα μεταβολικά προηγούμενα, δηλαδή το λινελαϊκό οξύ και το α-λινελαϊκό οξύ. Για την εξασφάλιση των βημάτων που απαιτούνται για την παραγωγή του DHA χρησιμοποιήθηκαν οι γνώσεις της μεταβολικής μηχανικής και ειδικότερα απομονώθηκαν από μικροφύκη και βακτήρια το γονίδιο που εκφράζει τα ένζυμα για το Microbial Δ4 Pathway και εκφράστηκε σε φυτικούς ιστούς, δημιουργώντας τα γνωστά ως διαγονιδιακά φυτά. Συγκεκριμένα, οι σπόροι σόγιας και κράμβης ήταν επιδεκτικοί στο να ακολουθήσουν το αερόβιο μονοπάτι προς την παραγωγή του επιθυμητού DHA, με το μειονέκτημα της χαμηλότερης παραγωγής σε σχέση με τις προαναφερόμενες πηγές, απαιτώντας περισσότερη έρευνα. [28], [29]

Κρίλ

Χαρακτηρίζονται και ως γαρίδες των πελάγων, τα κρίλ αποτελούν ένα καρκινοειδές ζωοπλακτόν αλιευμένο κυρίως στον ωκεανό της Ανταρκτικής. Το παραγόμενο από αυτά έλαιο εμπορευματοποιείται ως διατροφικό πρόσθετο και διαπιστώνεται πλούσιο σε αντιοξειδωτικά και ω-3 λιπαρά οξέα. Σύμφωνα με έρευνες τα συνολικά λιπαρά περιέχονται από 12% έως 50% στο συνολικό ξηρό βάρος των κρίλ και έχουν υψηλές συστάσεις EPA και DHA. Ωστόσο, κατά την απομόνωση των κρίλ ελευθερώνονται πρωτεάσες και λιπάσες που αλλοιώνουν τα κύτταρα και τα προϊόντα τους γι' αυτό και απαιτούν λεπτούς χειρισμούς και περαιτέρω ανάλυση. [30], [31]

Μικροφύκη

Η ικανότητα των μικροφυκών να παράγουν ενώσεις κατά την προσαρμογή και επιβίωσή τους σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες αποτελεί το κυριότερο κίνητρο προς τη χρήση τους ως ιχθυοτροφή ή αυτούσια ως μονάδες παραγωγής DHA. Συνδυαζόμενο με το γεγονός ότι τα θαλάσσια στελέχη αποτελούνται από συγκεντρώσεις ελαίων της τάξης του 10-50% w/w, ενώ τα συνολικά λιπαρά οξέα φθάνουν ακόμη και το 70% του ξηρού τους βάρους, σχεδιάζονται διάφορες μελέτες προς την καλλιέργεια και την καλύτερη δυνατή απομόνωση των ουσιών αυτών. Μέχρι σήμερα έχουν διαπιστωθεί ότι τα στελέχη *Phaeodactylum* και *Nannochloropsis* παράγουν έως 40% EPA, ενώ τα *Thraustochytrium* και *Schizochytrium limacinum* παράγουν ετερότροφα DHA σε επίπεδα του 30-40% των συνολικών λιπαρών τους οξέων. Η ποσοστιαία αναλογία αυτή μπορεί να βελτιωθεί με τη ζυγοστάθμιση και βελτιστοποίηση των βασικών παραγόντων της εκάστοτε αυτότροφης και ετερότροφης καλλιέργειας όπως η θερμοκρασία, η οξύτητα ακόμα και η αλατότητα. Συγκεκριμένα, για το στέλεχος *Cryptocodinium cohnii* ATCC 30556 έχει παρατηρηθεί ότι αυξημένη αλατότητα της τάξεως του 9 g/L NaCl οδήγησε σε 57% DHA στο σύνολο των λιπαρών οξέων. [32]

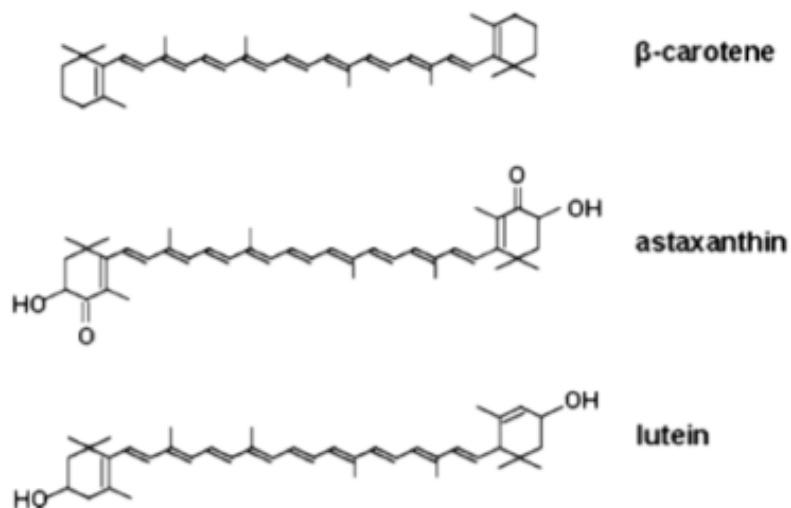


Εικόνα 8: Σύνολο πηγών παραγωγής DHA προς την ανθρώπινη κατανάλωση

2.2. Καροτενοειδή

Τα τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία φυσικών προϊόντων που προέρχονται από μονάδες ισοπρενίου που συνδέονται μεταξύ τους ποικιλοτρόπως. Τα περισσότερα τερπενοειδή έχουν πολυκυκλική δομή και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον βασικό σκελετό. Περίπου το 60% των γνωστών φυσικών προϊόντων ανήκουν στην κατηγορία των τερπενοειδών και παράγονται από φυτά, μύκητες, βακτήρια, ζώα και φύκη. Τα τερπενοειδή που εξάγονται από φυτά χρησιμοποιούνται ευρέως για τις αρωματικές τους ιδιότητες και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως θεραπευτικοί παράγοντες της παραδοσιακής ιατρικής.

Τα καροτενοειδή αντιπροσωπεύουν μια ομάδα από δομικά διαφορετικές τερπενοειδείς χρωστικές με τις περισσότερες να αποτελούνται από αλυσίδα 40 ανθράκων με εναλλασσόμενους διπλούς δεσμούς ή αλλιώς με ένα σύστημα πολυενίων. Η σύνθεσή τους μέσω των μικροφυκών περιλαμβάνει την β-καροτίνη, την ασταξανθίνη και τη λουτεΐνη και είναι δυνατή στον τομέα των χλωροπλαστών ή στο κυτταροδιάλυμα σε συνθήκες κυτταρικού στρες. Παραγόμενες σε τέτοιες περιβαλλοντικές καταστάσεις αυξάνουν την πιθανότητα κυτταρικής επιβίωσης, διότι συνθέτουν τα βασικά λειτουργικά συστατικά της φωτοσύνθεσης στις θυλακωειδείς μεμβράνες, ενώ την ίδια στιγμή προστατεύουν το κύτταρο από φωτο-οξειδωτικούς κινδύνους.[5]



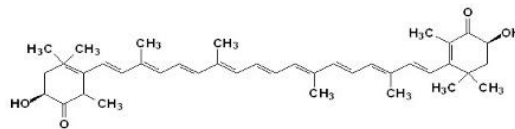
Εικόνα 9: Μοριακές δομές καροτενοειδών

2.2.1. Ασταξανθίνη

Στην ομάδα των καροτενοειδών αναφέρθηκε η ασταξανθίνη, ένα κόκκινο κετονοκαροτενοειδές, που χαρακτηρίζεται υψηλής προστιθέμενης αξίας. Αυτό διαπιστώνεται λόγω της ισχυρής χρωστικής του ικανότητας, της αντιοξειδωτικής του δράσης και των πολλαπλών ωφελειών που προσφέρει στην ανθρώπινη υγεία. [4], [7]

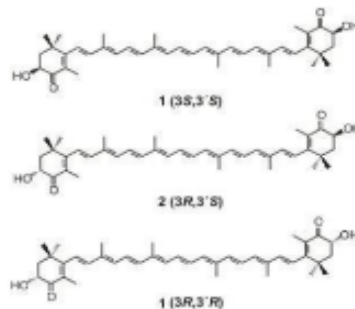
2.2.1.1. Χημεία ασταξανθίνης

Πιο συγκεκριμένα η ασταξανθίνη χαρακτηρίζεται από τον μοριακό τύπο $C_{40}H_{52}O_4$ και μοριακό βάρος 596,86 g/mol με cis και trans ισομερή, με το πρώτο να είναι θερμοδυναμικά ασταθέστερο του δεύτερου, το οποίο και βρίσκεται εξαρχής στη φύση. Η trans ασταξανθίνη έχει τρία είδη στεροϊσομερών: δύο εναντιομερή (3R, 3'R και 3S, 3'S) και ένα μεσομερές (3R, 3'S).[7]



Εικόνα 10: Μοριακή δομή Ασταξανθίνης

Η ασταξανθίνη, που προέρχεται από μικροφύκη, βρίσκεται εστεροποιημένη είτε σε μία είτε και στις δύο υδροξυλομάδες με άλλα λιπαρά οξέα, όπως τα παλμιτικό, ελαϊκό, εστερικό ή λινελαϊκό, ενώ η συνθετική ασταξανθίνη εντοπίζεται χωρίς εστεροποίηση, αλλά χημικώς συνδεδεμένη με πρωτεΐνες ή λίποπρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, η τελευταία αποτελεί ένα πανομοιότυπο μόριο που μπορεί να παραχθεί από ζωντανούς οργανισμούς και χαρακτηρίζεται από το μίγμα των ισομερών 1(3S, 3'S):2(3R,3'S):1(3R, 3'R), με το ισομερές (3S,3'S) να είναι το πιο κοινό στη φύση. Αν και από το 1990 και έπειτα αποτέλεσε τη πιο γνωστή παγκοσμίως ουσία υδατικής καλλιέργειας, λόγω της ζήτησης φυσικών πηγών ασταξανθίνης, σε συνδυασμό με το υψηλό κόστος σύνθεσής της έστρεψε την προσοχή προς νέες έρευνες.[33]



Εικόνα 11: Μίγμα ισομερών ασταξανθίνης που παράγεται από ζωντανούς οργανισμούς

2.2.1.2.Συνθετική Παραγωγή Ασταξανθίνης

Η πιο παλιά χημική παραγωγή ασταξανθίνης βασίζεται στην ανακάλυψη μιας αντίδρασης, από τους Witting και Geissler, που αποτέλεσαι πρώιμο στάδιο παρασκευής των βιταμινών Α και Β, αλλά και της β-καροτένης και στάδιο κλειδί για την χημική παρασκευή της ασταξανθίνης. [34]

2.2.1.3.Παραγωγή Ασταξανθίνης από Μικροφύκη

Η βιομηχανοποίηση της απομόνωσης φυσικής ασταξανθίνης από μικροφύκη , όπως αναφέρθηκε ξεκίνησε τη δεκαετία του 1990 με το μικροοργανισμό *Haematococcus pluvialis*. Το κλειδί στο όλο εγχείρημα ήταν η μεταβολική του ικανότητα να εμφανίζει δύο διαφορετικές κυτταρικές μορφολογίες, μία πράσινη και μία ερυθρή. Η τελευταία γίνεται αισθητή σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες για το φύκος, όπως λίγα θρεπτικά συστατικά, υψηλή φωτεινότητα και άλλα, με αποτέλεσμα να συγκεντρώνει μεγαλύτερες ποσότητες ασταξανθίνης για την προστασία του. [35]

Η βιομηχανική παραγωγή που εκμεταλλεύτηκε αυτό το χαρακτηριστικό του μικροφύκους βασίστηκε στην αρχική ανάπτυξή του σε εσωτερικούς φωτοβιοαντιδραστήρες ,τόσο για γρήγορη ανάπτυξη της βιομάζας του, όσο και για έλεγχο πιθανών μολύνσεων και των συνθηκών της καλλιέργειας. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε λίμνες όπου μπορεί να επιτευχθούν οι συνθήκες υποβάθμισης θρεπτικών συστατικών, υψηλής ακτινοβολίας σε συνδυασμό με υψηλές θερμοκρασίες και μετέπειτα απομονώνεται η ασταξανθίνη με φυγοκέντρηση, ξήρανση και διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων των μικροφυκών. Σε ένα γενικότερο πλαίσιο, μερικοί μικροοργανισμοί ,που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια και μπορούν να παράγουν ασταξανθίνη είναι τα μικροφύκη *Chlorella zofingiensis*, *Chlorococcum sp.*, *Haematococcus pluvialis*, *Phaffia rhodozyma* και το θαλάσσιο *Agrobacterium aurantiacum*. [36]

2.2.1.4.Παραγωγή Ασταξανθίνης με Μυκητιακή Ζύμωση

Εκτός της συνθετικής παραγωγής αλλά και αυτής των μικροφυκών διαπιστώνεται και η παραγωγή ασταξανθίνης μέσω ζύμωσης από τον ετεροβασιδιομυκητα *Phaffia rhodozyma* ή αλλιώς *Xanthophyllomyces dendrorhous* όπου μπορεί να αναπτυχθεί ταχύτατα. Η επιλογή αυτού έγινε βασιζόμενη στην ικανότητά του να παράγει ισοπρενοειδή όπως η ασταξανθίνη σαν απόρροια του μεβαλονικού μεταβολικού μονοπατιού, ενώ ταυτόχρονα έχουν επιχειρηθεί γονιδιακές τροποποιήσεις ώστε να διαπιστωθεί μέγιστη δυνατή παραγωγή ασταξανθίνης. Παρόλο που είναι σαφώς πιο

βελτιωμένη η παραγωγικότητα των γενετικά τροποποιημένων μυκητών, δε μπορεί να ξεπεράσει ποσοτικά αυτή των μικροφυκών.[37]

2.2.1.5. Σύγκριση παραγωγών

Σύμφωνα με έρευνα που στοχεύει στην ανάλυση της βιωσιμότητας της χημικής σύνθεσης, της ζύμωσης και των μικροφυκών, λήφθηκαν υπόψη το κόστος πρώτων υλών, το ενεργειακό ,οι εδαφικές εκτάσεις, αλλά και το περιβαλλοντικό αποτύπωμα των τριών αυτών μεθόδων. Στα συμπεράσματα που αντλήθηκαν συνολικά, συγκαταλέγεται ότι η συνθετική παραγωγή ασταξανθίνης υπερτερεί έναντι των άλλων δύο, με τη ζύμωση να αποτελεί τόσο ενεργειακά, όσο και παραγωγικά τη χειρότερη επιλογή, ενώ τα μικροφύκη να χρειάζονται υψηλότερους παραγωγικούς στόχους. Παρόλη την επικράτηση τόσο οικονομικά, όσο και περιβαλλοντικά της χημικής παρασκευής ασταξανθίνης, η ίδια δε μπορεί να ανταγωνιστεί αυτή των μικροφυκών καθώς έχει το υψηλότερο διατροφικό δείκτη και αυξάνεται συνεχώς η ζήτησή της φαρμακευτικά, καθιστώντας απαραίτητες τις βελτιστοποιήσεις στη βιομηχανική παραγωγή της. [38]

2.2.1.6. Χρήσεις Ασταξανθίνης

Ως Διατροφικό Στοιχείο Ιχθυρών και Καρκινοειδών

Στον υδάτινο κόσμο, η ασταξανθίνη αποτελεί ισχυρό χαρακτηριστικό ποιότητας για τον καταναλωτή, τόσο στα καρκινοειδή όπως ο αστακός, όσο και στα ψάρια όπως ο σολωμός. Ωστόσο, επειδή η σύνθεσή της από αυτούς τους ανώτερους οργανισμούς δεν είναι εφικτή, την προμηθεύονται από τη διατροφή τους. Συγκεκριμένα, τα μικροφύκη ως φυσικοί παραγωγοί, καταναλώνονται από ζωοπλαγκτόν και έντομα ,ενώ μετέπειτα αυτά από ψάρια προσδίδοντάς τους τη φυσική χρωστική. [33]

Γεγονός αποτελεί ακόμη, ότι η ασταξανθίνη απαρτίζει το 84-99% του εξωσκελετού των καρκινοειδών δίνοντάς τους το χαρακτηριστικό προστατευτικό τους χρώμα. Παράλληλα, συνδράμει τόσο στον καλύτερο πολλαπλασιασμό των ιχθύων, όσο και στη βελτίωση του υπατικού συστήματος και των βιοαμυντικών μηχανισμών τους σε περιπτώσεις ισχυρών οξειδωτικών συνθηκών. Συνεπώς, αποτελεί κρίσιμο διατροφικό πρόσθετο κάθε υδατικής καλλιέργειας τόσο για καταναλωτικούς, όσο και για περιβαλλοντικούς λόγους. [39]

Ως Αντιοξειδωτικό

Σε μοριακό επίπεδο η ασταξανθίνη παρατηρείται υπό ενολική μορφή με ένα άτομο υδρογόνου ικανό να εμποδίσει οποιαδήποτε αντίδραση ελεύθερων ριζών (μορίων χωρίς ζεύγη ηλεκτρονίων), όπως τα υδροξύλια και τα υπεροξειδία, τα οποία σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν εσωκυτταρικές αντιδράσεις (οξειδωτικό στρές) καταστρεπτικές για πολλά συστατικά των οργανισμών, όπως οι πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και το DNA. Αυτή η μοριακή ιδιότητά της, την καθιστά ως ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό και η αποτελεσματικότητά της εξαρτάται τόσο δομικά από το μήκος του συστήματος πολυενίων του καροτενοειδούς, όσο και από την πηγή των ελευθέρων ριζών που έχει να αντιμετωπίσει. [38]

Ως Φαρμακευτικό πρόσθετο

Σύμφωνα με τα προαναφερόμενα και κυρίως την αντιοξειδωτική δράση της ασταξανθίνης, δε θα πρέπει να παραληφθεί ότι χρησιμοποιείται σαν πρόσθετο τόσο φαρμακευτικά, όσο και διατροφικά στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως το συμπλήρωμα ασταξανθίνης περιόρισε σημαντικά είδη καρκινογένεσης σε ποντίκια και αρουραίους και ειδικότερα κατέστειλε την ανάπτυξη του όγκου συγκρατώντας το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού ικανό να αντιμετωπίσει το παραγόμενο καρκινικό αντιγόνο, δίνοντας έτσι το έναυσμα για ανθρώπινες θεραπείες. [40]

Στο καρδιαγγειακό επίπεδο, η αντιοξειδωτική δράση της ασταξανθίνης έχει αναφερθεί πως όχι μόνο *in vivo*, αλλά και *ex vivo* περιορίζει τη δράση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) που έχει άμεση σχέση με την αρτηριοσκλήρωση και χρήζει περαιτέρω έρευνας για την παραγωγή ειδικών φαρμάκων. [41]

Καταληκτικά, σε εμπορικό επίπεδο η ασταξανθίνη, αναπτυσσόμενη διαρκώς στο πεδίο της υγείας, χρησιμοποιείται ως πρόσθετο σε ποικίλα φαγητά και ποτά για τη βελτίωση της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού σε αγχωτικές συνθήκες, ενώ ταυτόχρονα η σύνδεσή της με τη θεραπεία αυτοάνοσων ασθενειών σηματοδοτεί για άλλη μια φορά την ανάγκη της συνεχούς παραγωγής της. [42]

2.3. Οικονομικά δεδομένα προϊόντων

Είναι προφανές πως ανάλογα με το είδος του μικροφύκου, εκχυλίζεται διαφορετικό προϊόν, μέσα σε ένα ευρύ φάσμα χρωστικών, πολυσακχαριτών, λιπαρών οξέων, βιταμινών και άλλων ενώσεων. Δε θα μπορούσε να κριθεί ολοκληρωμένη η αναφορά στα μικροφύκη εάν δε συμπεριλαμβανόταν το κόστος εμπορίας των δύο βασικότερων προϊόντων των μικροφυκών *Chlorella zofingiensis* και *Cryptocodinium cohnii*, δηλαδή της ασταξανθίνης και των Ω-3 λιπαρών οξέων αντίστοιχα.

Πίνακας 4: Εμπορικές τιμές καθαρών προϊόντων για τα έτη 2010 στις Η.Π.Α. (Brennan & Owende, 2010)

Προϊόν/Τιμές	(€/kg) Η.Π.Α.
Ασταξανθίνη	7150
Ω-3 Λιπαρά οξέα	0.043

Είναι σημαντικό να τονιστεί πως η τιμή της ασταξανθίνης είναι σε τόσο υψηλά επίπεδα, ώστε να πιστοποιείται η διαρκής ζήτησή της στην καλύτερη δυνατή καθαρότητα. Σύμφωνα επομένως και με τα οικονομικά κίνητρα κρίνεται αναγκαία η βελτιστοποίηση πρώτα των μεθόδων ανάπτυξης των μικροφύκων και μετέπειτα των τρόπων εκχύλισης των επιθυμητών αυτών προϊόντων προς την υψηλότερη καθαρότητα. [4]

3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

3.1. Φάσεις Ανάπτυξης

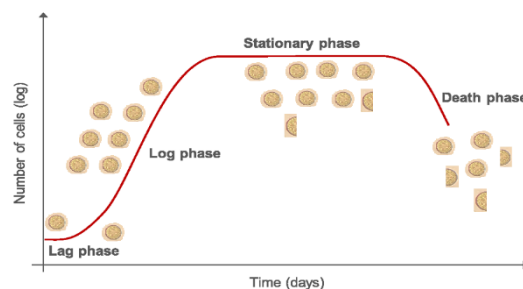
Οι καλλιέργειες ανάπτυξης μικροφυκών συνήθως προσομοιάζουν με αυτές για οποιοδήποτε κύτταρο μικροοργανισμού και αποτελούνται από τις παρακάτω φάσεις: λανθάνουσα, εκθετική, επιβράδυνσης, στασιμότητας, θανάτου.

Πιο συγκεκριμένα, η μεταφορά των μικροφυκών σε διαφορετικά περιβάλλοντα ανάπτυξης απαιτεί μια περίοδο προσαρμογής τους στις καινούργιες συνθήκες, γνώστη και ως φάση υστέρησης ή **λανθάνουσα φάση (lag phase)**. Κατά τη διάρκεια της διαμορφώνονται εσωκυτταρικά τα διάφορα μεταφορικά συστήματα, ικανά να μεταβολίσουν το διαφορετικό υπόστρωμα στις νέες συνθήκες. Στόχος κάθε βελτιστοποίησης κυτταρικής ανάπτυξης είναι η μείωση της λανθάνουσας φάσης που πρακτικά μπορεί να πραγματοποιηθεί με την προσαρμογή των κυττάρων στο θρεπτικό υλικό και να αυξηθεί η ποσότητα του εμβολίου από αυτή την προσαρμογή στη νέα καλλιέργεια. Στην περίπτωση συνδυαστικών υποστρωμάτων το κύτταρο είναι ικανό να επιλέξει το προτιμότερο εξ'αυτών και να ενεργοποιήσει τα ένζυμα διάσπασής του, αδυνατώντας να μεταβολίσει το άλλο.

Η μείωση της πρώτης φάσης επιδιώκεται, διότι ακολουθεί η **εκθετική φάση (log phase)** του κυττάρου κατά την οποία το ίδιο έχοντας προσαρμοστεί στις συνθήκες ανάπτυξης, πολλαπλασιάζεται ταχέως και το σύνολο των κυττάρων αυξάνεται εκθετικά με το χρόνο.

Κατά τη **φάση στασιμότητας (stationary phase)** ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων είναι μηδενικός, λόγω περιβαλλοντικών ή θρεπτικών συνθηκών και έτσι τα κύτταρα που δημιουργούνται είναι ίσα σε αριθμό με τα κύτταρα που πεθαίνουν. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα έχουν σταθερή συγκέντρωση ή υφίστανται λύση ή παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες ή τρέφονται από εσωκυτταρικά στοιχεία λυομένων κυττάρων, ώστε να αυξήσουν τις πιθανότητες επιβίωσής τους.

Όταν τα θρεπτικά συστατικά, αλλά και οποιοσδήποτε διαλυτός μεταβολίτης έχει ελαχιστοποιηθεί ξεκινάει η **φάση θανάτου (death phase)**, μειώνοντας ταχύτατα την κυτταρική πυκνότητα και διαλύοντας το σύνολο της καλλιέργειας, που πλέον αδυνατεί να αναπτυχθεί.[43]



Εικόνα 12: Πορεία κυτταρικής ανάπτυξης μικροφυκών (φωτογραφία κυττάρων *C.zoofingiensis*) με τα βασικά στάδια ανάπτυξής τους

3.2. Αυτοτροφη-Ετεροτροφη Ανάπτυξη

3.2.1. Τύποι Μεταβολισμών

Τα μικροφύκη διαφέρουν από είδος σε είδος, κυρίως ως προς την ικανότητά τους να αναπτύσσονται και να πολλαπλασιάζουν τη βιομάζα τους, δηλαδή ως προς το μεταβολισμό τους. Υπό την ηλιακή ακτινοβολία και εκμεταλλευόμενα το διοξείδιο του άνθρακα, δηλαδή **αυτότροφα**, είναι ικανά να αυξήσουν ταχέως τον αριθμό τους και αναλογικά την παραγωγή ορισμένων προϊόντων τους. Ωστόσο διαπιστώνεται η ύπαρξη μικροφυκών όπου η ανάπτυξή τους πραγματοποιείται υπό συνθήκες σκότους, με την προσθήκη οργανικών ενώσεων ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, δηλαδή **ετερότροφα**. Εκτός αυτών των κατηγοριών, υπάρχουν και τα **αμφίτροφα** μικροφύκη που έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν τόσο αυτότροφα, όσο και ετερότροφα ανάλογα με την ένταση του φωτός και τη συγκέντρωση των οργανικών ενώσεων αντίστοιχα. Δε θα πρέπει να παραληφθεί η **μιξότροφη** ανάπτυξη κατά την οποία αξιοποιείται και η ακτινοβολία του φωτός και υποχρεωτικά οι οργανικές ενώσεις και ο **φωτοετερότροφος** μεταβολισμός, ο οποίος απαιτεί την ύπαρξη φωτός προς την κατανάλωση των οργανικών ενώσεων, για την ανάπτυξή του.[44]

3.3. Πλεονεκτήματα Ετερότροφης Ανάπτυξης

Σύμφωνα με τις προαναφερόμενες κατηγορίες πιο εμφανείς είναι οι δύο πρώτες, με την ετερότροφη ανάπτυξη να προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, μερικά εκ των οποίων είναι τα παρακάτω: [45]:

- I. Υψηλή πυκνότητα βιομάζας, μειώνοντας το κόστος συγκομιδής, σε σχέση με χαμηλής πυκνότητας αυτότροφη βιομάζα που εξαρτάται από τον παράγοντα της ακτινοβολίας του φωτός.
- II. Υψηλότεροι ρυθμοί ανάπτυξης, μειώνοντας το χρόνο καλλιέργειας.
- III. Ιδανικότερες συνθήκες ανάπτυξης, άμεσα ελεγχόμενες και διαχειρισίμες.
- IV. Υψηλότερες ποσότητες λιπαρών, αναδεικνύοντας την εφικτότητα χρησιμοποίησης των μικροφυκών ως πηγές βιοκαυσίμων και χρησίμων βιοενεργών ουσιών.

3.4. Ετερότροφη παραγωγή χρήσιμων μεταβολιτών

Σύμφωνα με την προαναφερόμενη περιγραφή των δομικών στοιχείων ενός κυττάρου μικροφύκου είναι αντιληπτό πως υπό ετερότροφες συνθήκες τα λιπαρά λαμβάνουν πρωτεύοντα ρόλο όχι μόνο ενέργειας, αλλά και προστασίας του ευκαρυώτη.

Δημιουργούν μια μοναδική διαμερισματοποίηση των εσωκυτταρικών οργανιδίων κατασκευάζοντας μία μεμβράνη πλούσια σε λιπαρά στοιχεία, με το καθένα να προσφέρει ένα εξειδικευμένο ρόλο στη βιοσύνθεση του μικροοργανισμού. [46]

Συγκεκριμένα, ύστερα από ανάλυση των λιπαρών οξέων της μεμβράνης αυτής, διαπιστώθηκε πως όπως τα ανώτερα φυτικά κύτταρα, έτσι και τα μικροφύκη αποτελούνται κυρίως από λιπαρά οξέα της οικογένειας των C₁₆ και C₁₈ με υψηλό βαθμό ακορεστότητας. Ωστόσο, αξίζει να τονιστεί πως τα μικροφύκη γλυκού νερού δε χαρακτηρίζονται από υψηλότερα των C₁₈ λιπαρά οξέα, σε αντίθεση με αυτά που πηγάζουν από τη θάλασσα. [46], [47]

Εσωκυτταρικά, η σύνθεση των λιπαρών αυτών οξέων πραγματοποιείται σχεδόν εξολοκλήρου στους χλωροπλάστες, με ορισμένα οξέα όπως το παλμιτικό και το ελαϊκό να χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πιο σύνθετων στοιχείων της ίδιας οικογένειας, είτε στους χλωροπλάστες, είτε στο ενδοπλασματικό δίκτυο. [48] Χαρακτηριστικό παράδειγμα της χρήσης των λιπαρών από τα μικροφύκη αποτελεί αυτό ενός στελέχους *Chlorella* που αυτότροφα παρήγαγε τριγλυκερίδια και ετερότροφα τα κατανάλωνε προς επιβίωση και σύνθεση πολικών λιπιδίων. [13]

Εφόσον, όπως αναφέρθηκε τα λιπαρά οξέα διαδραματίζουν έναν προστατευτικό ρόλο για τη λειτουργία του κυττάρου, έτσι και υπό συνθήκες στρες, όπως κατά τη μείωση κάποιου άλατος ανάπτυξης, τα μικροφύκη έχει διαπιστωθεί πως όχι μόνο παράγουν συνεχώς λιπαρά οξέα, αλλά και σε διπλάσιο βαθμό. Η παραγωγή αυτή, εκτός της διασφάλισης της ανάπτυξης του μικροοργανισμού στις συνθήκες αυτές, αποσκοπεί και στη μείωση των φωτοσυνθετικών λειτουργιών απορροφώντας ικανές ποσότητες φωτός, όπως στην περίπτωση των καροτενοειδών. [49]

Οι δευτερεύοντες αυτοί μεταβολίτες μπορούν να παραχθούν σε ετερότροφες συνθήκες, όπου το μικροφύκος μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί όπως συμβαίνει στην περίπτωση του *Chlorella zofingiensis* το οποίο υπό την παροχή ως θρεπτικό συστατικό τη γλυκόζη είναι ικανό να αποδώσει υψηλές συγκεντρώσεις του καροτενοειδούς. Καταληκτικά, παρόλο που το εσωκυτταρικό ποσοστό της ασταξανθίνης είναι σημαντικά μικρότερο αυτού που αναπτύσσεται υπό αυτότροφη καλλιέργεια, η ετερότροφη ανάπτυξη προσφέρει υψηλής πυκνότητας κύτταρα και κατ'επέκταση παραγωγικότητες βιομάζας που μπορούν να αποδώσουν ασταξανθίνη σε υψηλά επίπεδα. [50], [51]

4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Στις ετερότροφες πρακτικές, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι αναμφισβήτητα απαραίτητη η προσθήκη συγκεκριμένων ουσιών στο θρεπτικό υλικό που θα αντικαταστήσουν την πορεία της φωτοσύνθεσης. Οι ουσίες αυτές διαφέρουν ανάλογα τόσο με το είδος του μικροφύκου, όσο και με το προϊόν το οποίο πρόκειται να παραχθεί. Η πλειοψηφία των καλλιεργειών που αναπτύσσονται τα μικροφύκη βασίζεται σε μια στοιχειομετρική αναλογία βιομάζας και θρεπτικών συστατικών υπό κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Το σύνολο των θρεπτικών συστατικών αυτών αντιπροσωπεύεται από τις πηγές άνθρακα, αζώτου, ενίοτε και φωσφόρου, ενώ παράλληλα οι κυριότερες περιβαλλοντικές συνθήκες της καλλιέργειας των μικροφυκών αποτελούνται από τη θερμοκρασία, το οξυγόνο, την αλατότητα και την οξύτητα και χρίζουν λεπτών χειρισμών προς τη βέλτιστη παραγωγικότητα του συστήματος. Παρακάτω επισημαίνεται το σύνολο των βασικότερων παραγόντων με τις επιμέρους λεπτομέρειές τους.

4.1. Θερμοκρασία

Πρωταρχικό ρόλο στην όλη μεταβολική διεργασία του μικροφύκου διαδραματίζει η θερμοκρασία, που όχι μόνο συμβάλει στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, αλλά και στην παραγωγικότητά του. Σε υψηλές τιμές λειτουργεί παραγωγικά προς την αύξηση των καροτενοειδών, επειδή τείνει να προστατευτεί ο μικροοργανισμός από συνθήκες θερμοοξειδωτικού στρες. Παρόλα αυτά, επιδιώκεται η στόχευση μιας χρηστής τομής καθώς σε πολύ υψηλές τιμές μειώνεται συντριπτικά η παραγωγή βιομάζας μικροφυκών και συνάμα των καροτενοειδών. [52]

Μεταβολικά η θερμοκρασία ρυθμίζει την ενεργότητα και το ρυθμό αντίδρασης των εσωκυτταρικών ενζύμων των μικροφυκών, που επηρεάζουν όχι μόνο την κυτταρική ανάπτυξη, αλλά και την παραγωγικότητα των λιπιδίων προς την επιβίωσή τους. Τα ένζυμα αυτά ποικίλουν από μικροφύκος σε μικροφύκος, γι' αυτό και το σύνολο της θερμοκρασιακής έρευνας απαιτεί συνεχή πειραματισμό και βελτιστοποίηση προς την καλύτερη παραγωγικότητα κυττάρων και προϊόντων. [53]

4.2. Θρεπτικό Υλικό

Η ανάλυση του θρεπτικού υλικού ανάπτυξης ενός μικροφύκου, υπό συνθήκες σκότους χωρίζεται σε δύο υποκατηγορίες: το είδος του και την συγκέντρωσή του.

4.2.1. Πηγές Άνθρακα

4.2.1.1. Γλυκόζη και άλλοι ολιγοσακχαρίτες

Η κυριότερη πηγή άνθρακα που θα μπορούσε να τροφοδοτήσει ετερότροφα τα μικροφύκη είναι η γλυκόζη, η οποία όχι μόνο βελτιώνει την αναπαραγωγή των κυττάρων, αλλά και αυξάνει το ρυθμό ανάπτυξής τους. Συγκεκριμένα, κατέχει το υψηλότερο δυνατό ενεργειακό περιεχόμενο σε σχέση με τα υπόλοιπα υποστρώματα άνθρακα, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τα 2.8 kJ/mol ενέργειας που απελευθερώνει, σε σχέση με 0.8 kJ/mol του οξικού οξέος.[54], [55]

Όσον αφορά στο βιοχημικό επίπεδο, ο καταβολισμός της γλυκόζης στα μικροφύκη γίνεται αερόβια στο κυτταροδιάλυμα με δύο μεταβολικά μονοπάτια, αυτό των Embden-Meyerhof (EMP) και των Φωσφορικών Πεντοζών (ΜΦΠ). Η κατανάλωση της γλυκόζης είναι αισθητή, καθώς μόλις το 1% αυτής παραμένει ελεύθερη, ενώ περισσότερο του 85% μετατρέπεται σε ολιγοσακχαρίτες (κυρίως σουκρόζη) και πολυσακχαρίτες (κυρίως άμυλο).

Η ετερότροφη μετατροπή του μικροφύκου επηρεάζει σαφώς και την κατανάλωση γλυκόζης, όπου μεταβολικά πραγματοποιείται μόνο μέσω του ΜΦΠ, διότι κεντρικές αντιδράσεις του EMP δε λειτουργούν, ενώ άλλες πραγματοποιούνται όπως και στις αυτότροφες συνθήκες. [56], [57]

Όσον αφορά στο γένος της *Chlorella*, διαπιστώνεται ένα επαγωγικό σύστημα εξοζών-πρωτονίων υπεύθυνο για την κατανάλωση γλυκόζης από το θρεπτικό υλικό. Συγκεκριμένα, μεταφέρει μόρια σακχάρων και πρωτονίων, σε αναλογία 1:1 με την κατανάλωση ενός μορίου ATP ανά μόριο σακχάρου και μπορεί να βελτιστοποιηθεί σε pH ανώτερα του 6.[58]

Χαρακτηριστικό παράδειγμα κατανάλωσης γλυκόζης αποτελεί η καλλιέργεια της *Chlorella pyrenoidose* που παρήγαγε περισσότερα μόρια ATP από την ετερότροφη κατανάλωση γλυκόζης, απ'ότι αυτότροφα ή μιξότροφα με τη χρήση φωτός. [59]

Σύμφωνα με την εξέταση διαφορετικών πηγών άνθρακα, όπως η λακτόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, σουκρόζη, φρουκτόζη, μανόζη και γλυκόζη για τη συμπεριφορά της *Chlorella zofingiensis*, πειραματικά διαπιστώθηκε πως σε ίδιες συγκεντρώσεις των πηγών στις καλλιέργειες, η γλυκόζη και η μανόζη κατέχουν την υψηλότερη θέση παραγωγής κυττάρων μικροφύκων υπό ετερότροφες συνθήκες.[50]

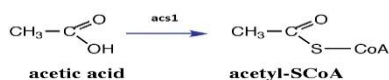
Όσον αφορά στο *C. cohnii*, έχει επισημανθεί πως αναπτύσσεται ταχέως υπό την πηγή άνθρακα της γλυκόζης, με ταυτόχρονη παραγωγή λιπαρών, ενώ έχουν δοκιμαστεί η γλυκερόλη, φρουκτόζη, μαλτόζη, αραβινόζη χωρίς την ίδια επιτυχία. [16]

4.2.1.2. Πτητικά λιπαρά οξέα

Το σύνολο των πτητικών λιπαρών οξέων αποτελούνται κυρίως από μικρής αλυσίδας λιπαρά οξέα 2 έως 6 ατόμων άνθρακα, όπως το οξικό, το βουτυρικό και το προπιονικό οξύ, ικανά να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα πολλών καλλιεργειών μικροοργανισμών. Παράγονται κυρίως με περιβαλλοντικά βλαβερές πετροχημικές διεργασίες, αλλά βρίσκονται στο στόχαστρο και άλλες με κεντρική αυτή της ζύμωσης σαν στάδιο επεξεργασίας αποβλήτων, επιβάλλοντας τη μετέπειτα χρήση τους.[45]

4.2.1.3. Οξικό οξύ

Η βασικότερη ένωση αυτής της κατηγορίας, που αποτελεί και μία από τις πιο κοινές πηγές άνθρακα για αρκετά είδη μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των μικροφυκών, είναι το οξικό οξύ. Βιοχημικά, στις ετερότροφες συνθήκες, η εισαγωγή του στην μεμβράνη του μικροφύκου γίνεται από μια πρωτεΐνη-μεταφορέα και καταναλώνεται παράγοντας το ακετυλο-συνένζυμο Α, μέσω μιας συνθετάσης, με τη χρήση ενός μορίου ATP.



Εικόνα 13: Μεταβολική μετατροπή οξικού οξέος σε ακετυλο-συνένζυμο Α

Προσδεδεμένο στο συνένζυμο μπορεί να οξειδωθεί μεταβολικά σε δύο μονοπάτια [60]:

- ❖ Μέσω του κύκλου της γλυκοξυλικού οξέος προς τη σύνθεση μηλεϊνικού οξέος στα γλυοξυσώματα εντός του κυττάρου
- ❖ Μέσω του κύκλου του τρι-καβροξυλικού οξέος (TCA) προς κιτρικό οξύ στα μιτοχόνδρια, δίνοντας ενέργεια στις βάσεις άνθρακα

Στην περίπτωση του πρώτου κύκλου είναι απαραίτητη η σύνθεση ισοκιτρικής λύασης και μηλεϊνικής συνθετάσης από το μικροφύκος όπου θα ενεργοποιηθούν μόνο υπό την παρουσία οξικού οξέος στο θρεπτικό υλικό. Συγκεκριμένα για την περίπτωση της *Chlorella*, στην ετερότροφη ανάπτυξη με οξικό οξύ ενισχύεται περισσότερο ο πρώτος μεταβολικός κύκλος. (Combres, Lalibert, Reyssac, & de la Noe, 1994)

Η προσθήκη του στο θρεπτικό υλικό απαιτεί την ταυτόχρονη χρήση διαλύματος εξισορρόπησης του pH, καθώς το ίδιο προστίθεται συνήθως υπό τη μορφή οξικού νατρίου (CH_3COONa) και διίσταται σε οξικά ανιόντα (CH_3COO^-) που καταναλώνονται και απελευθερώνουν ανιόντα υδροξυλίου (OH^-), που με τη σειρά τους συνενώνονται προς μόρια καυστικού νατρίου NaOH , αυξάνοντας την οξύτητα του συστήματος της καλλιέργειας, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη των κυττάρων. [16]

Γενικότερα, η χρήση του οξικού οξέος συμβάλλει όχι μόνο στην ανάπτυξη του μικροφύκου, αλλά και στον έλεγχο της οξύτητας του βιοσυστήματος, καθώς η προσθήκη του υπό τη μορφή ενώσεων νατρίου και καλίου αυξάνει το pH. Ωστόσο, δε θα πρέπει να παραληφθεί πως δεν αποτελεί συνεχώς μια πηγή ανάπτυξης, αλλά μπορεί να είναι τοξικογενές για πολλά μικροφύκη, ειδικά σε υψηλές συγκεντρώσεις. Για συστήματα ημιδιαλείποντος έργου με χαρακτηριστικά τα παραδείγματα πολλών μικροφυκών όπως ο *Cryptocodinium cohnii* και η *Chlorella vulgaris*, η χρήση οξικού οξέος σε μικρές ποσότητες, του 1 g/L, κρίνεται ιδανική και συνάμα οικονομική, καθώς προέρχεται από πολλές βιομηχανικές εφαρμογές και είναι άμεσα διαθέσιμη. [62]

4.2.2. Πηγές Αζώτου

Εκτός των πηγών άνθρακα μία πηγή που προσφέρει το δικό της αποτύπωμα στην καλλιέργεια μικροφυκών είναι η πηγή αζώτου με χαρακτηριστικότερες αυτές του νιτρικού οξέος, της αμμωνίου και της ουρίας. Παράλληλα, η χρήση της τρυπτόνης και της γλυκίνης έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της βιομάζας των μικροφυκών, χωρίς πρακτικά να έχουν τις ίδιες αποδόσεις με τις προαναφερόμενες. Είναι γεγονός πως η επιλογή της κατάλληλης πηγής αζώτου ποικίλει ανάλογα το μικροφύκος και ανάλογα το συνδυασμό της με πηγή άνθρακα.[63], [64]

Η επίδραση των πηγών άνθρακα και κυρίως της γλυκόζης μπορεί να είναι αυστηρώς απαραίτητη για την ετερότροφη ανάπτυξη και παραγωγή καροτενοϊδών, αλλά η παροχή αζώτου και κυρίως νιτρικού οξέος συσχετίζεται άμεσα με το μεταβολικό μονοπάτι των προϊόντων αυτών, επηρεάζει την ομαλή κυτταρική ανάπτυξη και μπορεί να επιτείνει την παραγωγή πρωτεϊνών και χρωστικών στα μικροφύκη.[51]

Τα μικροφύκη διαθέτουν γονίδια ειδικά προς την κατανάλωση ορισμένων πηγών αζώτου, όπως την ουρεάση (urease, EC: 3.5.1.5) and και την αμιδολυάση της ουρίας (urea amidolyase, EC: 6.3.4.6) προς τον καταβολισμό αυτής, ενώ στα περισσότερα είδη *Chlorella* διαπιστώνεται έλλειψη των γονιδίων αυτών και ενεργοποίηση της ουαλάσης (UALseEC: 3.5.1.54).[65]

Η περίπτωση του *Cryptocodinium cohnii* με ειδική προτίμηση στην πηγή της ουρίας, αφήνει ανοιχτή τη χρήση εναλλακτικών πηγών αζώτου, που θα συνδράμουν στην οικονομική χαλάρωση μιας παραγωγικής διαδικασίας μέσω του μικροφύκους. [66]

Συγκριτικά για τα περισσότερα είδη των μικροφυκών η διαδοχική σειρά πηγών αζώτου είναι: αμμώνιο>νιτρικό οξύ>νιτρώδες>ουρία και ποικίλουν ανάλογα το είδος και τη συγκέντρωση. Η διαφορά μεταξύ των πηγών αυτών εντοπίζεται στη μορφή του αζώτου και πόσο το δυνατόν είναι μεταβολικά εύκολο για το μικροφύκος να τη λάβει, καθώς βρίσκεται σαν δεσμός $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NH}_3\text{-N}$ ή NH με την πρώτη να είναι η ευκολότερη δυνατή περίπτωση κατανάλωσης από τα μικροφύκη, όπως και προκύπτει στην παραπάνω σύγκριση. [57], [67]

4.2.3. Συγκέντρωση Γλυκόζης

Ωστόσο, η ένταξη της γλυκόζης ως πηγή άνθρακα στα συστήματα των καλλιεργειών δεν αποτελεί πανάκεια, καθώς εμφανίζει διαφορετικά αποτελέσματα τόσο στο μικροφύκος το οποίο θα την καταναλώσει, όσο και στην ποσότητα στην οποία θα προστεθεί. Συγκεκριμένα, η υψηλή ποσότητα γλυκόζης συνδυάζεται μεταβολικά με την περισσότερη μεταφορά πρωτονίων, που συνεπάγεται μεταβολή στην οξύτητα των κυττάρων, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ανάπτυξής τους. Επομένως, από μια ποσότητα γλυκόζης και πάνω έχουμε παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροφυκών, ενώ σε ορισμένες συγκεντρώσεις γλυκόζης διαπιστώνεται βέλτιστη ανάπτυξη.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η βελτιστοποίηση της παραγωγής των παρακάτω μικροφυκών που γίνεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης

Πίνακας 5: Συσχετισμός μικροφυκών-συγκεντρώσεων γλυκόζης για βελτιστοποίηση και παρεμπόδιση ανάπτυξης

Μικροφύκη	Συγκέντρωση Γλυκόζης (g/L)	Ανάπτυξη Μικροφυκών	Πηγή
<i>Scenedesmus acutus</i>	1	Βέλτιστη	[68]
<i>Chlorella saccharophila</i>	2.5	Βέλτιστη	[69]
<i>Chlorella saccharophila</i>	25	Ανω αυτού παρεμπόδιση	[69]
<i>Chlorella sorokiniana</i>	5	Ανω αυτού παρεμπόδιση	[69]
<i>Chlorella vulgaris</i>	10	Βέλτιστη	[68]
<i>Chlorella protothecoides</i>	85	Βέλτιστη	[70]
<i>Galdieria sulphuraria</i>	166	Ανω αυτού παρεμπόδιση	[71]
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20	Βέλτιστη	[72]
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	25	Ανω αυτού παρεμπόδιση	[73]

4.2.4. Συγκέντρωση Αζώτου

Σύμφωνα με τα παραπάνω, γίνει αντιληπτό πως η ποσότητα της πηγής άνθρακα είναι αρκετά σημαντική για την κυτταρική ανάπτυξη. Ωστόσο, δε θα πρέπει να παραληφθεί και η ύπαρξη πηγής αζώτου ως θρεπτικό συστατικό, διότι στην έλλειψή της μειώνεται η κυτταρική ανάπτυξη της βιομάζας, παρόλο που μπορεί να αυξηθεί η συγκέντρωση των παραγόμενων λιπαρών. Το γεγονός αυτό πιστοποιείται και από τα παρακάτω δεδομένα και κρίνεται απαραίτητη μια συνολική συσχέτιση γλυκόζης και αζώτου, ώστε να επιτευχθεί τόσο μια υψηλή ανάπτυξη της βιομάζας των μικροφυκών, όσο και των λιπαρών που παράγονται.[52]

Πίνακας 6: Ποιοτικός συσχετισμός ανάπτυξης μικροφυκών-λιπαρών οξέων με διαφορετικές πηγές αζώτου

Μικροφύκη	Συγκέντρωση Αζώτου (g/L)	Πηγή Αζώτου	Ανάπτυξη Μικροφυκών	Λιπαρά οξέα (mg/L/day)	Πηγή
<i>Chlorella protothecoides</i>	Ελάχιστη	Ουρία	Βέλτιστη	Βέλτιστα	[63]
	Μέγιστη	Νιτρικά	Βέλτιστη	Ελάχιστα	[63]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Μέγιστη	Ουρία	Βέλτιστη	Ελάχιστα	[74]
	Ελάχιστη	Ουρία	Ελάχιστη	Βέλτιστα	[74]

4.2.5. Συνδυασμός θρεπτικών υλικών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ύπαρξη αζώτου αυξάνει την τάση του μικροφύκου προς παραγωγή ορισμένων προϊόντων. Αυτή σε συνδυασμό με την κατάλληλη πηγή άνθρακα μπορεί ετερότροφα να αποδώσει καλύτερες ποσότητες τόσο βιομάζας μικροφυκών, όσο και επιθυμητού προϊόντος. Το συνδυασμό αυτό τον ονομάζουμε λόγο άνθρακα/αζώτου, δηλαδή C/N και ποικίλει τόσο ως προς το είδος των μικροφυκών, όσο και των πηγών ανάπτυξής τους.

5. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΠΗΓΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Η βιομηχανικά ετερότροφη παραγωγή μικροφυκών καταδικάζεται από το υψηλό οικονομικό και περιβαλλοντικό κόστος της γλυκόζης ως πηγή άνθρακα. Το γεγονός αυτό προτρέπει την έρευνα εναλλακτικών πηγών άνθρακα με πιθανές την ξυλόζη, το οξικό οξύ και οι γλυκόζη και ξυλόζη που προκύπτουν από την υδρόλυση βιομάζας, μειώνοντας το κόστος των υποστρωμάτων πηγής άνθρακα.

5.1. Υδρολυμένη βιομάζα

Μια από τις πηγές που αναφέρθηκαν αποτελεί η υδρολυμένη βιομάζα, δηλαδή το επεξεργασμένο κλάσμα μάζας που απομένει από τη μεγαλύτερη σήμερα ανανεώσιμη πηγή ενέργειας, τη λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα. Έχει απομονωθεί ένα ευρύ φάσμα στερεής βιομάζας το οποίο επεξεργάζεται είτε απευθείας από την πηγή της, είτε με μηχανικά, είτε βιοχημικά. Από τις εναλλακτικές που καταγράφονται, το μεγαλύτερο ενεργειακό περιεχόμενο, αλλά και οικολογικό αποτύπωμα διατηρεί η βιοχημική επεξεργασία προς την μεγαλύτερη δυνατή παραγωγικότητα της βιομάζας. Τα δύο αυτά κριτήρια εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την πηγή που θα επεξεργαστεί και συνήθως προτείνονται τμήματα στερεής βιομάζας που δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως εδώδιμα. Στο επίπεδο της επεξεργασίας της επιλεγόμενης βιομάζας συγκαταλέγονται διάφοροι μηχανισμοί, ανάλογα με το επίπεδο ικανότητας του υλικού να διασπαστεί προς τα συστατικά της στοιχεία.[75]

5.1.1. Σύσταση Βιομάζας

Όσον αφορά στη σύστασή της, η βιομάζα αποτελεί ένα συνολικό μείγμα κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης που της δίνουν τον χαρακτηρισμό “λιγνινοκυτταρινούχα” και είναι διαφορετικά ανάλογα την πηγή της. Μοριακά η κυτταρίνη αποτελεί έναν πολυσακχαρίτη της γλυκόζης, η ημικυτταρίνη ένα σύνολο διαφορετικών πεντοζών και εξοζών με κυριότερη τη ξυλόζη, ενώ η λιγνίνη μια ομάδα ποικίλων φαινυλοπροπανίων. Παρακάτω παρουσιάζεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας σύστασης τριών κεντρικών πηγών λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας με τις αντίστοιχες συστάσεις σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη.

Πίνακας 7: Συστάσεις τριών πηγών λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας [76], [77]

<i>Πηγές</i>	Κυτταρίνη (%)	Ημικυτταρίνη (%)	Λιγνίνη (%)
<i>Δασικά κατάλοιπα</i>			
<i>Ευκάλυπτος</i>	50	13	28
<i>Έλατο</i>	43	26	29
<i>Πεύκο</i>	45	20	29
<i>Γεωργικά κατάλοιπα</i>			
<i>Καλαμπόκι</i>	46	35	19
<i>Άχυρο ριζιού</i>	40	18	7
<i>Άχυρο σίτου</i>	30	50	15
<i>Στερεά απόβλητα</i>			
<i>Χαρτικά</i>	47	25	12
<i>Πλαστικά</i>	65	15	7.5
<i>Τροφίμων</i>	45	5.3	13

5.1.2. Προκατεργασία

Η προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας προκαλεί ρωγμές και θραύση στο πρωταρχικό υλικό, υδρολύοντας την ημικυτταρίνη και μεταβάλλοντας δομικά τη λιγνίνη αποδεσμεύοντάς την από την κυτταρίνη. Παράλληλα μειώνεται η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης και ο βαθμός πολυμερισμού της, αυξάνοντας την ενεργή επιφάνεια του υλικού προς τη μετέπειτα υδρόλυση. Η επίτευξη της προκατεργασίας γίνεται με πολλούς τρόπους, όπως αλκαλικά, οξειδωτικά, υδροθερμικά, θερμικά, με έκρηξη ατμού, αμμωνίας, διοξειδίου του άνθρακα και άλλα. Ο καθένας από αυτούς διαθέτει κάποια χαρακτηριστικά, αποτελείται από ορισμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και επιλέγεται ανάλογα με την κάθε περίπτωση αρχικής βιομάζας και τελικού προϊόντος.[75], [78]

5.1.3. Υδρόλυση

Το στάδιο που ακολουθεί την προκατεργασία είναι η υδρόλυση της επεξεργασμένης βιομάζας, κατά την οποία το αδιάλυτο κλάσμα κυρίως κυτταρίνης και των προαναφερόμενων συστατικών, διασπάται στα πρώιμα δομικά του χαρακτηριστικά, δηλαδή σε μεγάλο βαθμό σε γλυκόζη. Οι πιο γνωστές μορφές υδρόλυσης που εφαρμόζονται εργαστηριακά είναι είτε με τη χρήση κάποιου οξέος (όξινη υδρόλυση), είτε κάποιου ενζυμικού σκευάσματος διάσπασης της βιομάζας (ενζυμική υδρόλυση) και αναφέρονται ορισμένα βασικά τους στοιχεία στον παρακάτω πίνακα. [79]

Πίνακας 8: Είδη υδρόλυσης μαζί με τα χαρακτηριστικά, πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα [79]

Είδος Υδρόλυσης	Χαρακτηριστικά	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Όξινη	T>160°C συνεχής ροή για χαμηλές ποσότητες βιομάζας	Υδρόλυση κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης	Διάβρωση εξοπλισμού
	T<160°C διαλείποντος έργου για υψηλές ποσότητες βιομάζας	Δεν απαιτεί προκατεργασία	Τοξικά προϊόντα Καταστροφή ορισμένων πεντοζών και εξοζών
Ενζυμική	Κυτταρινάσες και Β-γλυκοζιδάσες	Υδρόλυση κυτταρίνης, ημικυτταρίνης	Χαμηλός ρυθμός υδρόλυσης
	T=50±5°C και pH=4.5-5	Χαμηλό ενεργειακό κόστος Απαιτεί προκατεργασία	

Ωστόσο, σε διαδικασία η υδρόλυση μπορεί να παράξει κάποιες ουσίες οι οποίες να λειτουργούν παρεμποδιστικά για τη μετέπειτα αξιοποίηση του υδρολύματος ως υπόστρωμα τροφοδοσίας για μικροοργανισμούς όπως τα μικροφύκη. Μερικές από αυτές είναι οι φουρφουράλες, οι φαινολικές ενώσεις και τα τερπένια και πρέπει να ληφθούν υπόψη για την εκμετάλλευση της βιομάζας από τα μικροφύκη.[80]

5.1.4. Λιγνινοκυτταρινούχα Βιομάζα και Μικροφύκη

Η υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ετερότροφη επεξεργασία μικροφυκών, καθώς δύναται να προσφέρει υψηλή ποσότητα γλυκόζης, δηλαδή της ικανότερης μέχρι σήμερα πηγής άνθρακα για τους μικροοργανισμούς αυτούς. Η διεργασία αυτή εξασφαλίζει όχι μόνο την ανακύκλωση της βιομάζας προς την παραγωγή ωφέλιμων προϊόντων, αλλά μειώνει και το κόστος των πρώτων υλών για την καλλιέργεια των μικροφυκών, γιατί και κρίνεται υψηλής σημασίας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΟΡΓΑΝΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- ◆ Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- ◆ Ανακινούμενος Επωαστικός θάλαμος ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)
- ◆ Αποστειρωμένος χώρος εργασίας UNIFLOW UV1200
- ◆ Ζυγοί Mark 2060, Mark 4065 (BEL Engineering) και αναλυτικός ζυγός, ABS 120-4N (KERN & Sohn GmbH)
- ◆ Θερμαινόμενες πλάκες με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης
- ◆ Θερμοστάτης ψυγείου, frigo termostato foc 225d
- ◆ Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο
- ◆ Μαγνητικός-Θερμικός αναδευτήρας, Stirrer Magnetic w HOTPLATE
- ◆ Μετρητής οξύτητας 537, WTW (Γερμανία)
- ◆ Μίκροφυγόκεντρος δοχείων Eppendorf ,Zentrifuge 3200 (Γερμανία)
- ◆ Συσκευή διήθησης υπό κενό
- ◆ Συσκευή λυοφιλίωσης Christ Alpha 1-4 (Γερμανία)
- ◆ Συσκευή υπερήχων Transsonic Digital, Elma (Γερμανία)
- ◆ Συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader, SpecraMax 250 (Molecular Devices)
- ◆ Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού, EMD Millipore Direct-Q (Η.Π.Α.)
- ◆ Φυγόκεντρος Beckman, Model TJ-6 (Η.Π.Α.)
- ◆ Φυγόκεντρος δοκιμαστικών σωλήνων, Vortex-2-Genie
- ◆ Φασματοφωτόμετρο BOECO Spectrophotometer S-20 (Γερμανία)
- ◆ Ψυκτική φυγόκεντρος, Sorvall RC 28S

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν τα τυπικά εργαστηριακά όργανα διαφόρων διαστάσεων, όπως πιπέτες, ογκομετρικοί κύλινδροι, ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες ,γωνιά, τρυβλία, δοχεία eppendorf, πιπέτες paster, γυάλινα μπουκάλια, δοχεία falcon, ρύγχη πιπετών. Τα πλαστικά και γυάλινα αυτά εργαστηριακά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SIMAX (Τσεχία), SCHOTT AG (Γερμανία), BOMEX (Κίνα) και ISO LAB (Γερμανία).

2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Chlorella zofingiensis (Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) 211/14, Ελβετία). Απαιτείται ανακαλλιέργειά του ανά 4-5 εβδομάδες σε κατάλληλο υγρό θρεπτικό υλικό για αυτότροφη ανάπτυξη. Σε στερεές καλλιέργειες προτείνεται η χρήση τρυβλίων με άγαρ, που μπορεί να επιβιώσει το μικροφύκος για ένα χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων.

Cryptocodinium cohnii (American Type Culture Collection (ATCC) 30772™, Ειρηνικός Ωκεανός). Απαιτείται ανακαλλιέργειά του ανά 1-2 εβδομάδες σε αντίστοιχο θρεπτικό υλικό για ετερότροφη ανάπτυξη. Στην περίπτωση στερεής καλλιέργειας χρησιμοποιούνται τρυβλία με άγαρ με χρόνο ζωής του μικροοργανισμού 3-4 εβδομάδων.

3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma – Aldrich (Η.Π.Α.), Panreac (Ισπανία), Applichem (Γερμανία), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και Fisher Scientific (Η.Π.Α), και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού.

Πίνακας 9: Χημικά αντιδραστήρια ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν

Ένζυμα	Ενεργότητα	Χρησιμότητα
Cellic® CTec2 (Novozymes, Δανία)	108.5 mg/mL	Υδρόλυση βιομάζας
Cholesterol Esterase (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.)	950 U/g	Απομόνωση ασταξανθίνης

Πίνακας 10: Χημικά αντιδραστήρια εμπορικών σκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν

Εμπορικά Σκευάσματα	Χρησιμότητα
GOD/PAP (Biosys, Ελλάδα)	Μέτρηση γλυκόζης
Μίγμα λιπαρών οξέων Supelco 37 component FAME MIX (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.)	Καμπύλη αναφοράς GC-MS
Ενεργός Άνθρακας (Chemviron Carbon, Βέλγιο)	Προσρόφηση φαινολικών δακτυλίων

Πίνακας 11: Ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διεργασίες

Ρυθμιστικά διαλύματα	pH	Συγκέντρωση	Σύσταση	Χρησιμότητα
Citrate/Phosphate	5	50 mM	I. Citric Acid (50 mM) II. Sodium Phosphate Dibasic (100 mM)	Ενζυμική υδρόλυση
Potassium Phosphate	6	1 M	I. KH_2PO_4 (1M) II. K_2HPO_4 (1M)	Ρύθμιση pH καλλιιεργειών αζώτου και οξικού οξέος
Tris/HCl	7	1 M	I. Tris Base (0.05 M) II. Πυκνό HCl	Απομόνωση ασταξανθίνης

4. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Θρεπτικά Μέσα

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τις καλλιέργειες παρασκευάστηκαν με διάλυση των αντίστοιχων συστατικών σε υπερκάθαρο νερό και ρύθμιση του pH μεταξύ των προκαθορισμένων τιμών, με προσθήκη πυκνών ρυθμιστικών διαλυμάτων NaOH και HCl (1 M). Μετέπειτα, αποστειρώθηκε το διάλυμα σε αυτόκαυστο θερμοκρασίας $T=121$ °C για χρονικό διάστημα 20 min, σε πίεση 0.1 MPa και το θρεπτικό υλικό ψύχθηκε μέχρι τους 30-40 °C περίπου, ώστε να μην στερεοποιείται στις περιπτώσεις που περιέχει άγαρ. Αξίζει να επισημανθεί ότι:

- ❖ Τα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για κάθε μικροφύκος παρασκευάστηκαν 100 φορές πυκνότερα σε μπουκάλια και από αυτά αραιώθηκαν αντίστοιχες ποσότητες κατά την παρασκευή της εκάστοτε καλλιέργειας.
- ❖ Στα θρεπτικά υλικά που περιέχουν γλυκόζη και ξυλόζη, τα συστατικά αυτά αποστειρώθηκαν ξεχωριστά από το διάλυμα, σε μορφή σκόνης πωματισμένα με υδρόφοβα βαμβάκια και στη συνέχεια προστέθηκε σε αυτά το υγρό θρεπτικό υλικό, υπό στείρες συνθήκες.
- ❖ Στα θρεπτικά υλικά που περιέχουν οξικό οξύ, το ίδιο προστέθηκε σε στερεή μορφή οξικού νατρίου στα υγρά θρεπτικά συστατικά και ρυθμίστηκε η οξύτητα του συνολικού μίγματος, με διάλυμα Potassium Phosphate πριν την αποστείρωση.
- ❖ Στα θρεπτικά υλικά που περιέχουν πηγές αζώτου, η ουρία και η γλυκίνη προστέθηκαν αυτούσιες σε στερεή μορφή, ενώ τα νιτρικά ιόντα και το αμμώνιο, σε στερεή μορφή νιτρικού νατρίου και θειούχου αμμωνίου αντίστοιχα. Στη συνέχεια σε κάθε θρεπτικό υλικό προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Potassium Phosphate για σταθεροποίηση της οξύτητας.
- ❖ Για την παρασκευή των στερεών καλλιεργειών και των δύο μικροφυκών προστέθηκε 1,5 % w/v άγαρ στον όγκο του θρεπτικού υλικού.
- ❖ Τα μικροφύκη χαρακτηρίζονται από χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης, σε σχέση με τα βακτήρια και τους μύκητες και η εφαρμογή διαφόρων συγκεντρώσεων πηγών ανάπτυξης αποτέλεσε πρόκληση, διότι μπορούν πολύ εύκολα να μολυνθούν οι καλλιέργειες. Συνεπώς, σε κάθε κυτταροκαλλιέργεια είναι επιτακτική η διασφάλιση των στειρών συνθηκών δειγματοληψίας και ανάπτυξής της.

4.2. Καλλιέργεια του στελέχους *Chlorella zofingiensis*

4.2.1. Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας

Η διατήρηση και η ανάπτυξη του μικροφύκου *Chlorella zofingiensis* πραγματοποιήθηκε σε τροποποιημένο Bristol's medium (CZ-M1) που περιλαμβάνει:

Πίνακας 12: Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας στελέχους *Chlorella zofingiensis*

Τροποποιημένο Bristol's medium (CZ-M1)	
Θρεπτικό συστατικό	Συγκέντρωση (mg/L)
NaNO ₃	800
KH ₂ PO ₄	175
K ₂ HPO ₄	75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75
CaCl ₂ ·2H ₂ O	25
NaCl	25
FeCl ₃ ·6H ₂ O	5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.287
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.169
H ₃ BO ₃	0.061
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·7H ₂ O	0.00124

4.2.2. Χαρακτηριστικά καλλιέργειας *C.zofingiensis*

Το σύνολο των καλλιεργειών είχε τα ακόλουθα χαρακτηριστικά, εκτός αν αναφερθεί παρακάτω κάτι διαφορετικό. Συγκεκριμένα χαρακτηρίζεται από θρεπτικό υλικό οξύτητας εύρους pH=6,5-6,8 και για την αυτότροφη ανάπτυξη στους 20 °C με φωτισμό από λάμπες φθορισμού Philips TLD 865 18W, έντασης 75 μmol/m²·sec. Όσον αφορά στην ετερότροφη ανάπτυξη το *C.zofingiensis* απαιτήθηκε ανάδευση 160 rpm, προς αποφυγή συσσωματωμάτων και 25 °C που πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό επωαστικό θάλαμο.

4.3. Καλλιέργεια του στελέχους *Chrythecodium cohnii*

4.3.1. Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας

Η διατήρηση και η ανάπτυξη του μικροφύκου *Chrythecodium cohnii* πραγματοποιήθηκε σε ATCC Medium 460 (A2E6) που περιλαμβάνει τα παρακάτω συστατικά:

Πίνακας 13: Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας στελέχους *Chrythecodium cohnii*

A2E6 Medium	
Θρεπτικό συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
NaCl	23.48
MgCl ₂ •6H ₂ O	10.63
Na ₂ SO ₄	3.92
CaCl ₂ (anhydrous)	1.11
KCl	0.66
NaHCO ₃	0.19
KBr	0.1
H ₃ BO ₃	0.03
SrCl ₂ •6H ₂ O	0.04
FeCl ₃ •6H ₂ O	0.01
Na ₂ Glycerophosphate	0.15
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05
Tris Base	3
K ₂ HPO ₄	0.01
Glucose	3
Glutamic Acid	1.5
	Όγκος προσθήκης (mL) σε 1000mL θρεπτικού υλικού
Metal Mixture (Πίνακας 14)	3
Vitamin Solution (Πίνακας 15)	1

Πίνακας 14: Θρεπτικό υλικό Metal Mixture

Metal Mixture	Συγκέντρωση (g/L)
Na ₂ EDTA	0.1
FeCl ₃ •6H ₂ O	0.005
H ₃ BO ₃	0.1
MnCl ₂ •4H ₂ O	0.015
ZnCl ₂	0.001
CoCl ₂ •6H ₂ O	0.0005

Πίνακας 15: Θρεπτικό υλικό Vitamin Solution

Vitamin Solution	Συγκέντρωση (g/L)
Biotin	0.003
Thiamine	1

4.3.2. Χαρακτηριστικά καλλιέργειας *C.cohnii*

Το προαναφερόμενο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας ρυθμίστηκε σε οξύτητα εύρους $pH=6.4-6.6$ και το μικροφύκος αναπτύχθηκε ετερότροφα στους $23-25^{\circ}C$ και με 100 grm, σε σκοτάδι, σε ειδικό επωαστικό θάλαμο.

4.4. Καλλιέργεια Μικροφυκών

Το σύνολο των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκαν στις εκάστοτε συνθήκες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, με τη διαφορά στο μέγιστο χρόνο για πραγματοποίηση ανακαλλιέργειας. Συγκεκριμένα, του μικροφύκου *C.zofingiensis* γινόταν κάθε 10 ημέρες και του *C.cohnii* κάθε 8 ημέρες.

Για το στέλεχος *C.zofingiensis* χρησιμοποιήθηκε αυτότροφη καλλιέργεια για πρωταρχικό εμβόλιο, ενώ για το *C.cohnii* ετερότροφη, ώστε να γίνουν οι αντίστοιχες ετερότροφες καλλιέργειες. Εφόσον πραγματοποιήθηκε μία μόνο τροφοδοσία μικροφυκών στην κάθε κυτταροκαλλιέργεια, το σύστημα θεωρήθηκε διαλείποντος έργου. Καταληκτικά, τα μικροφύκη που εμβολιάζονταν στις νέες ετερότροφες καλλιέργειες ήταν κύτταρα, που βρισκόντουσαν στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους, πράγμα το οποίο ελεγχόταν κάθε φορά με θολωσιμετρία και εμφάνιζε απορρόφηση 0.6 στα 685 nm.

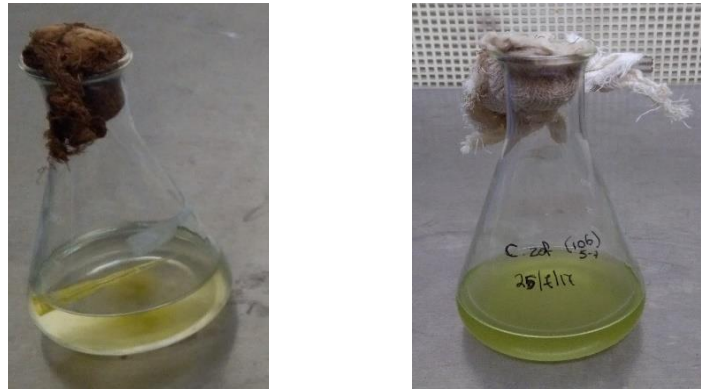
- ◆ Οι υγρές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 mL, πωματισμένες με υδρόφοβο βαμβάκι, με σύνολο 50 mL θρεπτικού υλικού και εμβόλιο μικροφύκου 10% του όγκου του διαλύματος.
- ◆ Οι στερεές καλλιέργειες έλαβαν χώρα σε τριβλία Petri συνολικού όγκου 25 mL θρεπτικού υλικού και αντίστοιχου εμβολίου από υγρή ή στερεή καλλιέργεια.

Σημειώνεται ότι, οι υγρές ετερότροφες καλλιέργειες επιβιώνουν έως 10 ημέρες και επίσης οι καλλιέργειες μικρότερου όγκου δε θα είχαν την ίδια παραγωγή ξηρής βιομάζας μικροφυκών για τη μετέπειτα ανάλυση των μεταβολικών προϊόντων τους.

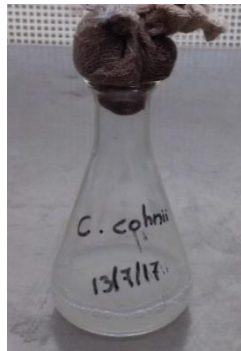
Στοχεύοντας τόσο στη μελέτη της καμπύλης ανάπτυξης των μικροφυκών όσο και στη δευτερογενή παραγωγή μεταβολιτών, πραγματοποιήθηκε καθημερινή δειγματοληψία και θολωσιμετρία των κυτταρικών καλλιεργειών μέχρι τη σταθερότητα των μετρήσεων, δηλαδή τη στάσιμη φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

4.4.1. Υγρές ανακαλλιέργειες

- Στην περίπτωση υγρών ανακαλλιεργειών που έχουν προέλθει από στερεές, προσροφήθηκε μικρή ποσότητα από τις τελευταίες με πιπέτα και εμβολιάζεται εντός της υγρής καλλιέργειας.
- Εάν προέρχονται από υγρές καλλιέργειας τότε εμβολιάστηκε το 10 %v/v των μικροφυκών της προηγούμενης καλλιέργειας στη νέα.



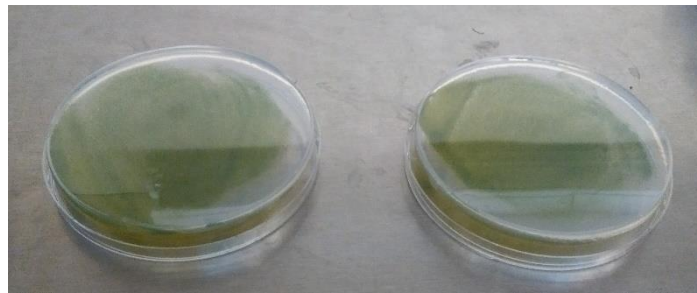
Εικόνα 14: Υγρές αυτότροφες καλλιέργειες *C.zoofingiensis* από στερεή και υγρή ανακαλλιέργεια αντίστοιχα 6 ημερών



Εικόνα 15: Υγρή ετερότροφη καλλιέργεια *C.cohnii* 4 ημερών

4.4.2. Στερεές ανακαλλιέργειες

- Στην περίπτωση στερεών ανακαλλιεργειών από στερεή καλλιέργεια χαράχθηκε ποσότητα του τρυβλίου της στερεής καλλιέργειας στην νέα.
- Εάν η προέλευση του αρχικού εμβολίου είναι υγρή καλλιέργεια, τότε λήφθηκαν 150 μ L από την υγρή καλλιέργεια με τη χρήση πιπέτας και αποχύθηκαν εντός του τρυβλίου με το θρεπτικό υλικό και απλώθηκαν με τη βοήθεια αποστειρωμένης βέργας.



Εικόνα 16: Στερεές αυτότροφες καλλιέργειες *C.zoefingiensis* 7 ημερών



Εικόνα 17: Στερεές ετερότροφες καλλιέργειες *C.cohnii* 8 ημερών

4.5. Προσδιορισμός κυττάρων μικροφυκών μέσω θολωσιμετρίας

Η βελτιστοποίηση της ανάπτυξης του μικροφύκου απαιτεί μία μέθοδο εύρεσης των παραγόμενων κυττάρων σε κάθε διαφορετική συνθήκη καλλιέργειας και έτσι προτάθηκε η μέθοδος της θολωσιμετρίας μέσω του πολυφωτόμετρου.

Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου, κατά τη θολωσιμετρία μετράται η ελάττωση της έντασης μιας ακτινοβολίας που διέρχεται από ένα δείγμα κυττάρων, λόγω σκέδασης.

Συγκεκριμένα, για τη μέτρηση βιομάζας κυττάρων μικροφυκών από οποιαδήποτε καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε πιπέτα και λήφθηκαν 0.6 mL, υπό στείρες συνθήκες και τοποθετήθηκαν σε δοχείο erpendorf του 1.5 mL. Τοποθετήθηκαν 0.25 mL του δείγματος αυτού σε ειδική θέση (well) στη συσκευή μέτρησης του πολυφωτόμετρου (microplate), ενώ παράλληλα φυγοκεντρήθηκε ο υπόλοιπος όγκος για 5 min. Από τις δύο φάσεις που προέκυψαν λήφθηκε η υπερκείμενη και 0.25 mL αυτής τοποθετήθηκαν σε άλλη θέση της συσκευής φωτομέτρησης, ως δείγμα αναφοράς του αρχικού δείγματος. Τέλος, ρυθμίστηκε η συσκευή φωτομέτρησης στα 685 nm, στις αντίστοιχες θέσεις μέτρησης, πραγματοποιήθηκε θολωσιμετρία και καταγράφηκαν τα αποτελέσματα του δείγματος αφαιρώντας το αναφοράς.



Εικόνα 18: Συσκευή και όργανο φωτομέτρησης Microplate Reader

4.6. Συσχέτιση απορρόφησης με το ξηρό βάρος των μικροφυκών

Αναγκαία επίσης κρίνεται η συσχέτιση της απορρόφησης που προέκυψε με την προηγούμενη μέθοδο θολωσιμετρίας, με τη συγκέντρωση των κυττάρων στην καλλιέργεια. Έτσι, ύστερα από κυτταρικές καλλιέργειες διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης πραγματοποιήθηκε κατασκευή καμπύλης αναφοράς που συσχετίζει την απορρόφηση με το ξηρό βάρος κυττάρων, σε συγκεκριμένο όγκο υγρής καλλιέργειας, δηλαδή $OD_{685nm}=f(D.C.W)$.

Ειδικότερα έγινε ανάμειξη των καλλιεργειών και φωτομέτρηση στο πολυφωτόμετρο, της συνολικής απορρόφησης των κυττάρων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του διαλύματος των μικροφυκών που είχε συγκεντρωθεί και κάθε αραιώση τοποθετήθηκε σε δοχεία falcon των 50 mL με τελικό όγκο 30 mL συνολικού δείγματος. Ακολουθήθηκε θολωσιμετρία, στα 685 nm, δειγμάτων 1 mL από κάθε αραιώση, με δείγμα απιονισμένου νερό, ως αναφορά και συγκεντρώνονται τα αποτελέσματα. Τα αρχικά δοχεία falcon φυγοκεντρήθηκαν για 10 min σε 20000 rpm και στη συνέχεια αποχύθηκε η υπερκείμενη φάση. Συμπληρώθηκαν με απιονισμένο νερό με τη βοήθεια ζυγού και επαναλήφθηκε η προαναφερόμενη φυγοκέντρωση και η απόχυση, ενώ στη συνέχεια προστέθηκε μικρή ποσότητα νερού. Ακολουθήθηκε διήθηση υπό κενό του εναπομείναντος διαλύματος σε προζυγισμένα φίλτρα κυτταρίνης 0.45 μm και μετά το πέρας αυτής πραγματοποιήθηκε ξήρανση υπό κενό των φίλτρων αυτών στους 70 °C για 24 h. Καταληκτικά, πραγματοποιήθηκε ζύγιση των φίλτρων αυτών μέχρι σταθερού βάρους, όπου ελέγχθηκε ύστερα από ξήρανση στους 60 °C για 5 min και καταγράφηκαν τα συνολικά αποτελέσματα.

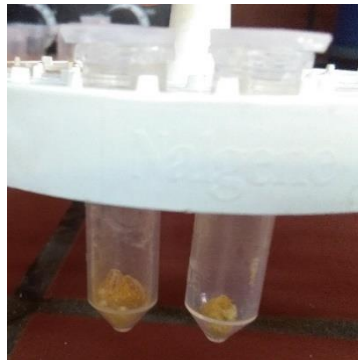


Εικόνα 19: Δείγματα κυττάρων μικροφυκών ύστερα από ξήρανση για τις εκάστοτε αραιώσεις από 1/6 έως 6/6 του αρχικού κυτταροδιαλύματος

4.7. Συλλογή ξηρής βιομάζας μικροφυκών

Τόσο ο έλεγχος της παραγωγικότητας των διαφόρων συνθηκών ανάπτυξης των μικροφυκών, όσο και η μετέπειτα έρευνα των προϊόντων που παράγουν απαιτούν την έκφραση των κυττάρων σε ξηρή βιομάζα.

Η απομόνωση της βιομάζας της εκάστοτε καλλιέργειας ξεκίνησε με τη μεταφορά της σε ξεχωριστά δοχεία falcon και φυγοκέντρησή της για 5 min, με απόχυση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του καθιζήματος σε 5 mL απιονισμένου νερού. Μετά την επανάληψη της φυγοκέντρησης και της απομάκρυνσης του υπερκείμενου, επαναδιαλύθηκαν τα δείγματα σε 3 mL απιονισμένο νερό και αποχύθηκαν σε γυάλινα τριβλία, που αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη, για 10 min στους -20°C . Τέλος, τοποθετήθηκαν στη συσκευή λυωφιλίωσης όπου ξεράθηκαν τα κύτταρα, στους -40°C για 24 h και η ξηρή βιομάζα που προέκυψε συλλέχθηκε σε προζυγισμένα δοχεία erpendorf και καταγράφηκε το βάρος της.



Εικόνα 20: Λυωφιλιωμένα κύτταρα *Chlorella zofingiensis*

4.8. Αποθήκευση δειγμάτων stock των μικροφυκών στην υπερκατάψυξη
Εφόσον επιχειρήθηκε η επεξεργασία ενός μικροοργανισμού όπως τα μικροφύκη, σε συνθήκες υψηλού στρες, απαραίτητη κρίθηκε και η αποθήκευση υγιή δειγμάτων των κυττάρων αυτών σε ασφαλές σημείο. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την εξασφάλιση ζωντανών κυττάρων του μικροοργανισμού για μελλοντικά πειράματα, πρότειναν την παρακάτω μέθοδος υπερκατάψυξης.

4.8.1. *Chlorella zofingiensis*

Συλλέχθηκε δείγμα 20 mL ανεπτυγμένης καλλιέργειας του μικροφύκου σε αποστειρωμένο δοχείο ψυχόμενης φυγοκέντρου. Το δείγμα αυτό φυγοκεντρήθηκε σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4 °C, για κατακάθιση των κυττάρων των μικροφυκών και ύστερα απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό. Στη συνέχεια προστέθηκαν στο δοχείο αυτό 20 mL μίγματος κρυοπροστατευτικών συστατικών και επανεωρήθηκαν τα κύτταρα που είχαν κατακαθίσει. Το μίγμα αυτό αποτελείται από 10 %w/v προλίνη, 10 %v/v διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και 10 %v/v αιθυλενογλυκόλη. Ακολουθήθηκε ψύξη του συνολικού μίγματος σε λεκάνη με πάγο για 45 min. Τέλος, τα δείγματα μοιράστηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία erpendorf των 1,5 mL και αποθηκεύτηκαν στην υπερκατάψυξη στους -80 °C. [81]

4.8.2. *Chrythecodinium cohnii*

Συλλέχθηκε δείγμα 80 mL καλλιέργειας του μικροφύκου που βρισκόταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης του σε αποστειρωμένα δοχεία ψυχόμενης φυγοκέντρου. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στους 4°C στα 15000 rpm για 5 min, όπου απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό. Στη συνέχεια, στα κύτταρα του μικροφύκου που είχαν κατακαθίσει τους προστέθηκαν αποστειρωμένα 8 mL θρεπτικού υλικού και 8 mL μίγματος θρεπτικού υλικού με περιεκτικότητα σε γλυκερόλη 15 %v/v και έγινε επαναιώρηση. Ύστερα διαχωρίστηκε το σύνολο του μίγματος σε 0.5 mL σε δοχεία erpendorf των 1,5 mL, σε λιγότερο από 15 min. Καταληκτικά, τοποθετήθηκαν τα δοχεία στην κατάψυξη στους -20 °C και ύστερα από 20 min στην υπερκατάψυξη στους -80 °C. [82]



Εικόνα 21: Αποθηκευμένα δείγματα stock του *C.zofingiensis* (πάνω αριστερά) και του *C.cohnii* (πάνω δεξιά και κάτω αριστερά)

4.9. Προσδιορισμός σακχάρων μικροφυκών

Οι βασικότερες πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν για την ετερότροφη ανάπτυξη των μικροφυκών αποτέλεσαν η γλυκόζη και η ξυλόζη, οπότε αναλύθηκαν δύο μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού της συγκέντρωσης των σακχάρων αυτών στις κυτταροκαλλιέργειες, για έλεγχο της πορείας κατανάλωσής τους από τις κυτταροκαλλιέργειες.

4.9.1. Μέθοδος DNS

Τόσο η γλυκόζη, όσο και η ξυλόζη αποτελούν αναγωγικά σάκχαρα οπότε προτάθηκε η μέθοδος του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος, που παρασκευάζεται εργαστηριακά και αντιδρά μόνο με τα αναγωγικά σάκχαρα προς το σχηματισμό 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ που απορροφάται στα 540 nm και στην περίπτωση της ξυλόζης στα 630 nm. (Detns et al.)

Για την παρασκευή του DNS, αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα NaOH 8 % w/v που αναμίχθηκε με 500 mL απιονισμένου νερού και 10 g στερεού DNS μέχρι πλήρους διάλυσης των στερεών. Στη συνέχεια, προστέθηκαν με αργό ρυθμό 402.7 g Potassium Sodium Tartate υπό ανάδευση και ήπια θέρμανση. Μετά την πλήρη διάλυση των στερεών προστέθηκε απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000 mL και το διάλυμα αποθηκεύτηκε σε σκουρόχρωμο δοχείο μακριά από πηγές φωτός.

Αξιίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση ανίχνευσης παραπάνω του ενός σακχάρων, όπως μίγματος ξυλόζης και γλυκόζης, η χρήση της μεθόδου του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος δεν είναι εφικτή. Αυτό συμβαίνει διότι το DNS αντιδρά με όλα τα αναγωγικά σάκχαρα, εμφανίζοντας απορρόφηση σε μήκος κύματος 540 nm, χωρίς να είναι δυνατόν να διαχωριστεί πόση είναι η απορρόφηση του κάθε σακχάρου.

4.9.2. Μέθοδος GOD/PAP

Εκτός της μεθόδου αυτής η γλυκόζη μπορεί να ανιχνευθεί μέσω του ενζυμικού σκευάσματος GOD/PAP, το οποίο και περιέχει οξειδάσες και υπεροξειδάσες της γλυκόζης που αντιδρούν με αυτή και σχηματίζουν ερυθρού χρώματος προϊόντα όπου εμφανίζουν απορρόφηση στα 510 nm.

4.9.3. Γλυκόζη

Όσον αφορά στη γλυκόζη, πρακτικά πραγματοποιήθηκαν δύο καμπύλες αναφοράς, μία για μέτρηση μέσω ενζύμου GOD/PAP και μία μέσω του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Οι αραιώσεις που έγιναν στην πρώτη περίπτωση κυμαίνονται από 0-0.8 g/L, ενώ στη δεύτερη από 0-2 g/L.

Ειδικότερα στην περίπτωση του GOD/PAP, ακολουθείται μια διαδικασία για μέτρηση οποιουδήποτε δείγματος που αρχικά χρησιμοποιεί 15 μ L δείγματος στις ειδικές υποδοχές της πλακέτας του μηχανήματος πολυφωτομέτρησης και 240 μ L ενζύμου GOD/PAP σε άλλες θέσεις. Με τη βοήθεια πολυπιπέτας λήφθηκαν 10 μ L του δείγματος από κάθε θέση της πλακέτας και προστέθηκαν στον όγκο του ενζύμου ώστε να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονα η ενζυμική αντίδραση για κάθε δείγμα. Τα δείγματα παρέμειναν εντός του πολυφωτόμετρου στους 37 °C για 15 min όπου και μετρήθηκαν στα 510 nm.

Στην περίπτωση του DNS, προστέθηκαν 0.5 mL των δειγμάτων και 0.5 mL του DNS σε δοκιμαστικούς σωλήνες όπου και πραγματοποιήθηκε βρασμός αυτών, σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 5 min. Στα προκύπτοντα δείγματα προστέθηκαν 4 mL απιονισμένου νερού και τοποθετήθηκαν στις θέσεις του πολυφωτόμετρου για μέτρηση της απορρόφησής τους στα 540 nm.

4.9.4. Ξυλόζη

Όσον αφορά στη ξυλόζη για την καμπύλη αναφοράς πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις που κυμαίνονται 0-1 g/L. Για τη μέτρηση των δειγμάτων αυτών και κάθε δείγματος κυτταρικής καλλιέργειας, σύμφωνα με αντίστοιχη βιβλιογραφία πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη μέθοδος. Αναμίχθηκαν 90 μ L των δειγματος και 90 μ L του αντιδραστηρίου DNS σε υδατόλουτρο στους 90 °C για 15 min. Τα δείγματα στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε πάγο και τους προστέθηκαν 30 μ L Pottasium Sodium Tatrte για διακοπή της αντίδρασης του DNS με την ξυλόζη και μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 630 nm στο πολυφωτόμετρο. [84]



Εικόνα 22: Θέσεις μέτρησης πολυφωτόμετρου, στήλες 1-2 για τη μέθοδο ανίχνευσης GOD/PAP και 3-4 για τη μέθοδο DNS

4.10. Εκχύλιση λιπαρών από μικροφύκη

Εφόσον στοχεύτηκε η ανάλυση βιοενεργών συστατικών από μικροφύκη, είναι αναγκαία και η ανάλυση των λιπαρών οξέων που απαρτίζουν το εσωτερικό του κυττάρου και παρακάτω περιγράφεται η μέθοδος απομόνωσής τους από αυτό.

Αρχικά, για την εκχύλιση των λιπαρών από την ξηρή βιομάζα των μικροφυκών παρασκευάστηκε οργανικό μίγμα αναλογίας (μεθανόλη:χλωροφόρμιο:νερό)=(2:1:0.8) για κάθε δείγμα ξηρού βάρους κυττάρων, υπό την προοπτική των 10 mL μεθανόλης να αντιστοιχούν σε 1 g ξηρών κυττάρων. Στη συνέχεια τα δείγματα που προέκυψαν, ομογενοποιήθηκαν με vortex για 3min, τους προστέθηκε 10 μ L χλωροφόρμιο και ανακινήθηκαν για 1min. Ύστερα έγινε προσθήκη 10 μ L νερό και ανακίνηση για 1 min και συλλέχθηκε η οργανική φάση στην οποία είχαν συγκεντρωθεί τα λιπαρά των μικροφυκών. Στο στάδιο της ομογενοποίησης των 3 min προτάθηκε εναλλακτικά η χρήση συσκευής υπερήχων για 5 min. [85]

4.11. Εστεροποίηση λιπαρών μικροφυκών

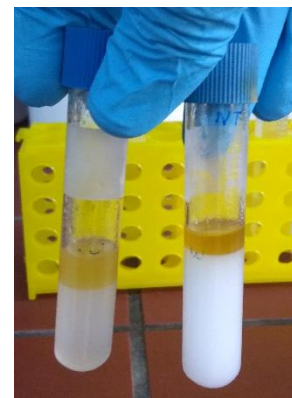
Τα προκύπτοντα λιπαρά οξέα δεν μπορούν να ανιχνευθούν από το σύστημα GC-MS παρά μόνο υπό τη μορφή μεθυλεστέρων και για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε η ακόλουθη μέθοδος εστεροποίησής τους.

Σε δείγματα 1 mL εκχυλισμένων λιπαρών προστέθηκαν 2,5 mL μίγματος 8 % υδροχλωρικού οξέος και 92 % μεθανόλης. Ακολουθήθηκε θέρμανση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 60 °C για 15 min, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση εστεροποίησης. Μετέπειτα προστέθηκαν 2,5 mL διαλύματος 5 % w/v CaCl_2 και ανακινήθηκε το μίγμα, ενώ στη συνέχεια εκχυλίστηκε η υδατική φάση με 4 φορές προσθήκη 1 mL εξανίου.[86], [87]

4.12. Απομόνωση ασταξανθίνης

Το κύριο προϊόν του μικροφύκου *Chlorella zofingiensis* αποτελεί η ασταξανθίνη, η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μπορεί να εκχυλιστεί από το φύκος με την παρακάτω μέθοδο.

Σε 25 mg ξηρών κυττάρων μικροφυκών προστέθηκαν 3 g θρυμματισμένων ύαλων και 5 mL διαλύματος διμεθυλοσουλφοξειδίου (Dimethyl Sulfoxide, DMSO) και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 45-50 °C για 20 min, με τακτική ανάδευση 15 s κάθε 3 min. Ακολουθήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 min στις 8000 rpm, όπου και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Στο κατακαθίμενο προστέθηκαν και επαναιωρήθηκαν 5 mL ακετόνης και επαναλήφθηκε το παραπάνω στάδιο έως πλήρους



Εικόνα 23:
Εστεροποιημένα λιπαρά
μικροφυκών
ομογενοποιημένα με
υπερήχους (αριστερά)
και με vortex (δεξιά)

διαύγειας του υπερκείμενου υγρού του δείγματος. Το δείγμα που συγκεντρώνει τις υπερκείμενες φάσεις των επαναλήψεων πληρώθηκε με ακετόνη μέχρι τα 25 mL και αναμίχθηκε έντονα. [88]

4.13. Υδρόλυση ασταξανθίνης

Η παραγωγή ασταξανθίνης από το μικροφύκος *Chlorella zofingiensis* γίνεται σε εστεροποιημένη μορφή κυρίως μονό ή δι-εστέρων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία της μεθόδου ανίχνευσης ασταξανθίνης, απαιτείται η ίδια να βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και όχι εστεροποιημένη. Στα πλαίσια αυτά εφαρμόστηκε η παρακάτω μέθοδος υδρόλυσης της ασταξανθίνης, όπως αναπτύχθηκε για το μικροφύκος *Haematococcus* και ύστερα η ανίχνευσή της μέσω του χρωματογραφικού συστήματος HPLC-DAD. [7], [89]



Εικόνα 24: Σύσταση καροτενοειδών του μικροφύκου *Haematococcus* [88]

Αρχικά,

λήφθηκαν 3 mL του τελικού δείγματος της απομόνωσης ασταξανθίνης και προστέθηκαν σε αυτά 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl (Πίνακας 11). Στη συνέχεια προστέθηκαν 600 μ L ενζύμου Cholesterol Esterase (3.33 Units/mL) (Πίνακας 9) και τα δείγματα θερμάνθηκαν σε υδατόλουτρο στους 35-37 °C για 45 min, με συχνά διαστήματα ανάδευσης. Ύστερα, προστέθηκαν 0,5 g Na₂SO₄, 2 mL πετρελαϊκού αιθέρα και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για λιγότερο από 30 s. Απομονώθηκε η φάση του αιθέρα (η υπερκείμενη) και επαναλήφθηκαν τα στάδια προσθήκης πετρελαϊκού αιθέρα και φυγοκέντρησης, μέχρι η φάση του αιθέρα να γίνει άχρωμη. Το σκεύος αποθηκεύτηκε ημισφραγισμένο σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h, εντός απαγωγού σε λειτουργία, ώστε να εξατμιστεί όλος ο αιθέρας και να απομείνει στα τοιχώματα η ασταξανθίνη. [89]

4.14. Χρωματογραφική Ανάλυση

Το σύνολο των μεταβολιτών που περιγράφηκαν παραπάνω και απομονώθηκαν από το μικροφύκος, δηλαδή τα λιπαρά οξέα και η ασταξανθίνη, αναλύθηκαν με χρωματογραφικές τεχνικές.

Θεωρητικά αναπτυσσόμενη από τον Tswett το 1906 και πρακτικά σε πολλές εκφάνσεις της, τις επόμενες δεκαετίες, η χρωματογραφική ανάλυση αποτέλεσε το σύνολο διαφορετικών μεθόδων διαχωρισμού ανόργανων, οργανικών ή οργανομεταλλικών ενώσεων.

Χαρακτηριστικά των μεθόδων της είναι ότι ο διαχωρισμός τους εξαρτάται από τη φυσικοχημική συγγένεια των ουσιών του δείγματος με δύο φάσεις: τη στατική, όπου είναι συνήθως στερεή ή υγρή και αποτελεί την ακίνητη φάση και την κινητή φάση, όπου είναι συνήθως υγρή ή αέρια και κινείται κατά μήκος της στατικής φάσης διαχωρίζοντας τα συστατικά του δείγματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν έχουμε σταθερή σύσταση της κινητής φάσης, τότε ονομάζεται ισοκρατική έκλυση (isocratic), ενώ όταν έχουμε μεταβλητή σύσταση αυτής, τότε ονομάζεται βαθμιδωτή έκλυση (gradient).

Το αποτέλεσμα μιας χρωματογραφίας αποτελεί το χρωματογράφημα, δηλαδή η συνάρτηση απόκρισης του εκάστοτε ανιχνευτή με το χρόνο και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό τόσο από τον ανιχνευτή, όσο και από την κινητή φάση. Η εμφάνιση χαρακτηριστικά υψηλών καμπυλών στο χρωματογράφημα συνδέεται με την ποιοτική ύπαρξη μίας ουσίας σε υψηλή συγκέντρωση στο δείγμα και ποσοτικά εξαρτάται από την συμμετρία της κορυφής αυτής, αλλά και τη διαχωριστότητά της από άλλες.[90]

Στη συγκεκριμένη εργαστηριακή ανάλυση χρησιμοποιήθηκε τόσο αέρια όσο και υγρή χρωματογραφία, για την λεπτομερέστερη ανίχνευση ορισμένων ουσιών, και τα βασικά χαρακτηριστικά των μεθόδων που εφαρμόστηκαν περιλαμβάνονται στον παρακάτω πίνακα και ακολουθούν λεπτομερείες του κάθε ανιχνευτή, αλλά και της κάθε μεθόδου.

Πίνακας 16: Χαρακτηριστικά χρωματογραφικής μεθόδου GC-MS για ανίχνευση Μεθυλεστέρων Λιπαρών Οξέων

GC-MS	
Συσκευή GC	Varian 450
Ανιχνευτής MS	Varian 220 MS IT
Στήλη	VF-5ms (30mx0.25mm) ID, DF=0.25 Varian
Φέρον αέριο	He (99,999% καθαρό)
Ροή φέροντος υγρού/αερίου (mL/min)	1
Όγκος δείγματος (μL)	1
Χρόνος μέτρησης (min)	90
Εφαρμογή	Ανάλυση Μεθυλεστέρων Λιπαρών Οξέων

Πίνακας 17: Χαρακτηριστικά χρωματογραφικής μεθόδου HPLC-RID για ανίχνευση Οξικού Οξέος

HPLC-RID	
Συσκευή HPLC	Prominence UFLC
Ανιχνευτής RID	RIO-10A Shimadzu
Στήλη	Biorad Aminex HPX-87H (1.300 x 7.8 mm).
Φέρον υγρό	Υπερκάθαρο νερό με 0.005M H ₂ SO ₄ (isocratic)
Ροή φέροντος υγρού/αερίου (mL/min)	0.6
Όγκος δείγματος (μL)	10
Χρόνος μέτρησης (min)	50
Εφαρμογή	Προσδιορισμός Οξικού Οξέος

Πίνακας 18: Χαρακτηριστικά χρωματογραφικής μεθόδου HPLC-DAD για ανίχνευση Ασταξανθίνης

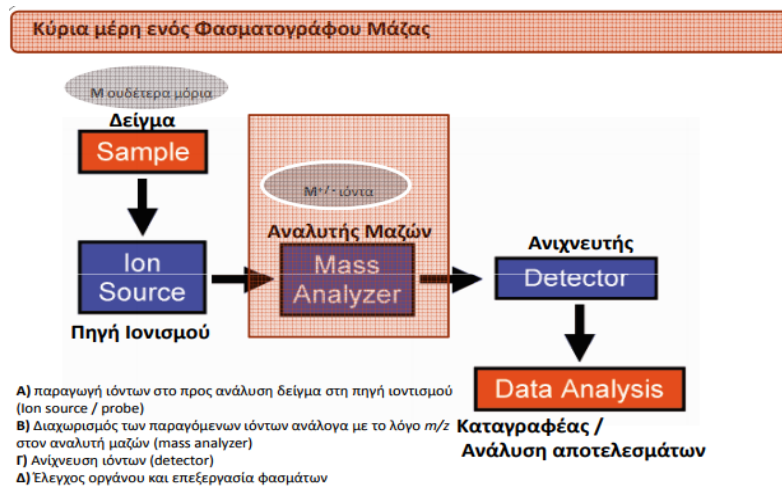
HPLC-DAD	
Συσκευή HPLC	Prominence UFLC
Ανιχνευτής DAD	Diode-array Prostar
Στήλη	LiChrospher 100 RP-18
Φέρον υγρό	Ακετόνη/Νερό=70/100 (gradient)
Ροή φέροντος υγρού/αερίου (mL/min)	1
Όγκος δείγματος (μL)	10
Χρόνος μέτρησης (min)	15
Εφαρμογή	Προσδιορισμός Ασταξανθίνης

Πίνακας 19: Χαρακτηριστικά χρωματογραφικής μεθόδου HPLC-RID για ανίχνευση Σακχάρων

HPLC-RID	
Συσκευή HPLC	Prominence UFLC
Ανιχνευτής RID	RIO-10A Shimadzu
Στήλη	HPX-87P
Προστήλη	Cation-P micro-guard
Φέρον υγρό	Υπερκάθαρο νερό (isocratic)
Ροή φέροντος υγρού/αερίου (mL/min)	0.6
Όγκος δείγματος (μL)	10
Χρόνος μέτρησης (min)	30
Εφαρμογή	Προσδιορισμός Σακχάρων

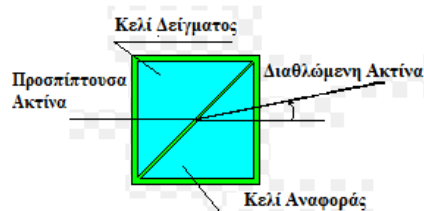
4.14.1. Είδη Ανιχνευτών

Mass Spectrometer (MS): Ο ανιχνευτής φασματομετρίας μάζας περιλαμβάνει την παραγωγή ιόντων σε αέρια φάση από τα μόρια ενός δείγματος και την ανίχνευση των ιόντων αυτών αφού έχουν διαχωριστεί σύμφωνα με το λόγο μάζας m προς φορτίο z (m/z). Από τη μέτρηση της μάζας του ιόντος προκύπτει το μοριακό βάρος και από τα διάφορα θραύσματα του μορίου προκύπτουν βασικά δομικά συμπεράσματα για τη δομή της ένωσης που αναλύεται.[91]



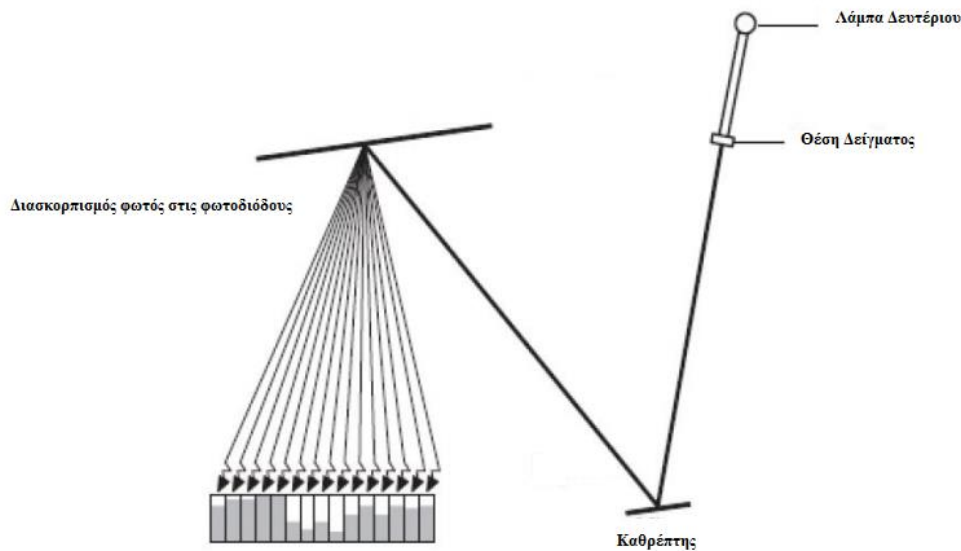
Εικόνα 25: Κύρια μέρη ανιχνευτή Φασματομέτρου Μάζας

Refractive Index Detector (RID): Ο ανιχνευτής δείκτη διάθλασης μετρά την αλλαγή στο δείκτη διάθλασης στο διάλυμα που αναλύεται, έναντι του καθαρού διαλύτη. Αποτελείται από ένα γυάλινο κελί δύο θαλάμων, έναν που εισάγεται το δείγμα και έναν θάλαμο αναφοράς που είναι γεμάτος με την κινητή φάση. Όταν ο θάλαμος δείγματος αποτελείται από την κινητή φάση τότε η προσπίπτουσα δέσμη είναι ευθεία και ο ανιχνευτής εξισοροπημένος. Ωστόσο, όταν ο θάλαμος αυτός γεμίζει με το δείγμα, διαφορετικών συστατικών της κινητής φάσης, τότε η προσπίπτουσα δέσμη κάμπτεται. Η ανάλυση της κάμψης αυτής γίνεται από τον ανιχνευτή και ταυτοποιούνται τα συστατικά του δείγματος.[92]



Εικόνα 26: Μεθοδολογία ανιχνευτή δεικτών διάθλασης

Diode Array Detector (DAD): Ο ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων έχει τη δυνατότητα να εκτελεί φασματοσκοπικές σαρώσεις και ακριβείς αναγνώσεις απορρόφησης σε μια σειρά από μήκη κύματος ταυτόχρονα. Συγκεκριμένα, το φως που εκπέμπει η λάμπα του δείγματος προσπίπτει σε ένα φράγμα περίθλασης που το διαθλά σε δέσμες διαφόρων μηκών κύματος προς διαφορετικές κατευθύνσεις. Αυτές απορροφούνται από 512 φωτοδιόδους που η κάθε μία λειτουργεί σαν πυκνωτής και περιέχει ορισμένη ποσότητα ηλεκτρικού φορτίου. Το ηλεκτρικό φορτίο αυτό ανάλογα την ισχύ της δέσμης που προσπίπτει, αποφορτίζεται και ο ανιχνευτής μετρά την ποσότητα του ηλεκτρικού φορτίου που απαιτείται για να ξαναφορτιστεί η φωτοδίοδος και την απορρόφηση του φωτός σε όλα τα μήκη κύματος ταυτόχρονα. [92]



Εικόνα 27: Διάγραμμα ροής ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων

4.14.2. Λεπτομέρειες Χρωματογραφικών Τεχνικών
Στην ανάλυση GC-MS: [87]

1. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα είναι 270 °C, της γραμμής μεταφοράς 280 °C και της παγίδας ιόντων 150 °C.
2. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου αρχίζει από τους 125 °C και αυξάνεται στους 300 °C με ρυθμό 5 °Cmin⁻¹ (διάρκεια χρωματογραφήματος 35 min).
3. Τα φάσματα μάζας συλλέγονται σε εύρος μαζών 40-450 m/z.

Στην ανάλυση HPLC-RID: [93]

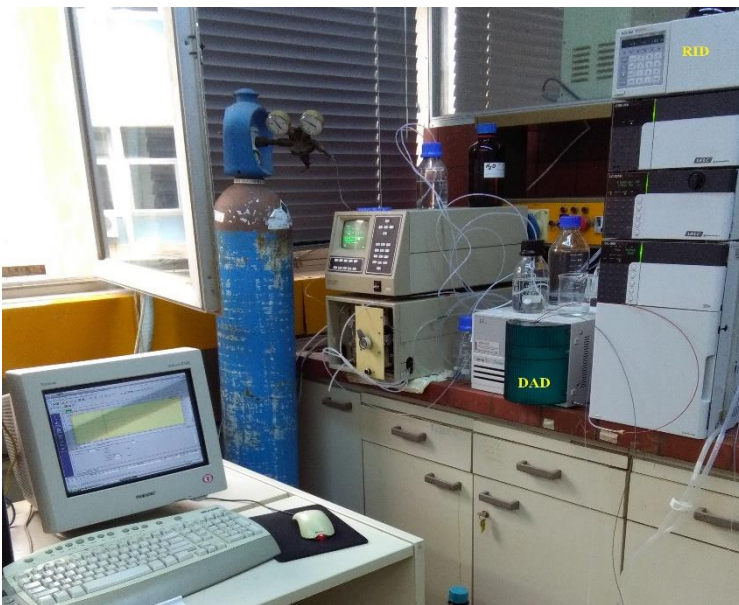
1. Η θερμοκρασία της στήλης και του ανιχνευτή είναι 55-65 °C.

Στην ανάλυση HPLC-DAD: [94]

1. Η θερμοκρασία της στήλης είναι 40 °C.
2. Το μήκος κύματος ανάγνωσης του ανιχνευτή είναι 450 nm

Στην ανάλυση HPLC-RID: [95]

1. Η θερμοκρασία της στήλης και του ανιχνευτή είναι 85 °C.



Εικόνα 29: Σύστημα υγρής χρωματογραφίας (HPLC) με τους αντίστοιχους ανιχνευτές



Εικόνα 28: Σύστημα αέριας χρωματογραφίας (GC) με τον αντίστοιχο ανιχνευτή

4.15. Λιγνινοκυτταρινούχα Βιομάζα

Η λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα προτάθηκε ως εναλλακτική πηγή άνθρακα που μπορεί να καλύψει τις ανάγκες της ετερότροφης ανάπτυξης των μικροφύκων και αποφασίστηκε να είναι τα υπολείμματα καλαμποκιού. Η απόφαση αυτή λήφθηκε βασιζόμενη στο ότι τα υπολείμματα αυτά διαθέτουν υψηλά ποσοστά σε κυτταρίνη, που αποτελεί άμεση πηγή γλυκόζης σε σχέση με την ημικυτταρίνη και την λιγνίνη (Πίνακας 7, Θεωρητικό Μέρος). Παράλληλα, παρουσιάζονται ευρέως στη γεωργική παραγωγή της Ελλάδας, αφού μόνο από το θεσσαλικό κάμπο προκύπτουν το χρόνο 750.000 t προς αξιοποίηση. Έτσι, κρίνεται αναγκαία η κοπή και η προεπεξεργασία τους προς παραγωγή αξιοποιήσιμης βιομάζας, η οποία έλαβε χώρα στο Lulea University of Technology της Σουηδίας και περιγράφεται επιγραμματικά παρακάτω. [96]

4.15.1. Συλλογή και επεξεργασία καλαμποκιού

Το σύνολο του καλαμποκιού αλέστηκε σε κοπτικό μύλο (Retsch SM 3000, Haan, Γερμανία) χρησιμοποιώντας κόσκινο διαστάσεων 1mm x 1mm. Το κατακαθίμενο υλικό ζυγίστηκε και αποθηκεύτηκε σε πλαστικές σακούλες μέχρι την προκατεργασία. [97]

4.15.2. Προκατεργασία με Steam Explosion

Η προκατεργασία που ακολουθήθηκε ήταν έντονη και όξινη, κατά την οποία προστέθηκε ποσότητα 0.2 % H_2SO_4 στους 200 °C για 10 min. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκτόνωση ατμού και πτώση της θερμοκρασίας του υπολείμματος, ενώ μετά έγινε φιλτράρισμα με διήθηση και διαχωρισμός στερεού και υγρού κλάσματος. [97]



Εικόνα 30: Υπολείμματα καλαμποκιού που έχουν υποστεί προκατεργασία με έκρηξη ατμού

Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η υδρόλυση της προκατεργασμένης βιομάζας κατά την οποία αναλύθηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι, η όξινη και η ενζυμική. Κατά την όξινη διαδικασία, η βιομάζα υδρολύθηκε σε σάκχαρα, με τη μέγιστη δυνατή απόδοση και υπολογίστηκαν τα σάκχαρα που προκύπτουν, αλλά και η ποσότητά της σε μη υδρολυμένη λιγνίνη. Παράλληλα, η ενζυμική υδρόλυση, αν και μικρότερης απόδοσης, προτάθηκε κυρίως για την προετοιμασία της βιομάζας για υπόστρωμα καλλιέργειας μικροφυκών. Η άποψη αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η όξινη υδρόλυση δημιουργεί ισχυρούς παρεμποδιστές που μπορούν όχι μόνο να εμποδίσουν την ανάπτυξη, αλλά και να μειώσουν τον πληθυσμό των μικροφυκών. Αντιθέτως, η χρήση ενζυμικά υδρολυμένου υποστρώματος διευκολύνει την ανάπτυξή τους, λόγω φυσικών και λιγότερο ικανών για παρεμπόδιση συστατικών.

4.15.3. Όξινη υδρόλυση βιομάζας καλαμποκιού

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν 300 mg στερεής προκατεργασμένης βιομάζας υπολειμμάτων καλαμποκιού, που τοποθετήθηκαν εντός κωνικής φιάλης 250 mL και τους προστέθηκαν 3 mL πυκνό H_2SO_4 , στους 30 °C για 1 h με τακτική ανάδευση. Στο συνολικό μίγμα προστέθηκαν 84 mL υπερκάθαρο νερό, πωματίστηκε και αποστειρώθηκε στους 121 °C για 1 h και φιλτραρίστηκε σε διηθητικό προζυγισμένο χαρτί. Το διήθημα απομονώθηκε, ενώ το στερεό ίζημα στα διηθητικά φίλτρα, μαζί με προζυγισμένες κάψες ξεράθηκαν υπο κενό στους 60 °C για 24 h. Στη συνέχεια, το στερεό ίζημα ζυγίστηκε και τοποθετήθηκε στις κενές κάψες εντός πυριατηρίου, στους 600 °C για 5 h και καταγράφηκε η τέφρα που προέκυψε, όταν σταθεροποιήθηκε το βάρος της σε αναλυτικό ζυγό. Στο διήθημα έγινε προσθήκη άλατος $CaCO_3$ έως οξύτητα pH=5, για την εξουδετέρωση του πυκνούθειϊκού οξέος και συλλέχθηκε το υπερκείμενο του τελικού διαλύματος που περιείχε το σύνολο των υδρολυμένων σακχάρων.

Το προκύπτον υδρόλυμα αναλύθηκε ποσοτικά με τη μέθοδο χρωματογραφίας HPLC-RID και μέσω μιας καμπύλης αναφοράς καταγράφηκε η σύστασή του σε σάκχαρα.

Η επίτευξη της ενζυμικής υδρόλυσης βασίζεται στη δραστικότητα του ενζυμικού σκευάσματος να υδρολύσει τη βιομάζα που χρησιμοποιείται. Η δραστικότητα αυτή εκφράζεται ως περιεκτικότητα ενζύμου, δηλαδή της πρωτεΐνης που περιέχει. Επομένως, κρίνεται απαραίτητη μια μέθοδος ποσοτικοποίησης της πρωτεΐνης αυτής και λόγω της ευρείας και οικονομικής της εφαρμογής προτιμήθηκε η μέθοδος Bradford.

4.16. Μέθοδος πρωτεϊνικού προσδιορισμού Bradford

Όσον αφορά στην αρχή της μεθόδου, πραγματοποιείται συμπλοκοποίηση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 μαζί με την εκάστοτε πρωτεΐνη και το σύμπλοκο που παράγεται ανιχνεύεται με φωτομέτρηση στα 595 nm. Το δείγμα που εξετάζεται αποκτά μπλέ χρώμα με σταθερότητα μίας ώρας, χωρίς να παρεμποδίζεται από νάτριο, κάλιο και υδατάνθρακες.

Στην παρούσα μέθοδο πραγματοποιήθηκαν αρχικές μετρήσεις καμπύλης αναφοράς για συγκεντρώσεις από 0-1 g/L πρωτεΐνης και ύστερα μετρήθηκε το ένζυμο που θα υδρολύσει τη βιομάζα υπολλειμάτων καλαμποκιού.

Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε διάλυμα 20 mg/mL Bovine Serum Albumin (BSA) και ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Αναμίχθηκαν 1.25 mL BSA και 25 μ L δείγματος, ενώ για μέτρηση δείγματος αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν 25 μ L νερού. Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 3-5 min, μέχρι εμφάνιση βαθέως μπλέ χρώματος και μετράται η απορρόφησή τους στα 595 nm. [98]

4.17. Ενζυμική υδρόλυση βιομάζας καλαμποκιού

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ενζυμική υδρόλυση της προκατεργασμένης βιομάζας υπολλειμάτων καλαμποκιού περιγράφεται παρακάτω και χρησιμοποιείται για την εμφάνιση των γλυκοζών της βιομάζας, που ελέγχθηκαν με τη μέθοδο GOD/PAP.

Κατά την ενζυμική υδρόλυση, χρησιμοποιήθηκαν 2.5 g στερεής προκατεργασμένης βιομάζας υπολλειμάτων καλαμποκιού σε κωνική φιάλη των 250 mL μαζί με 50 mL ρυθμιστικού διαλύματος Citrate/Phosphate (Πίνακας 11) οξύτητας pH=5 και ορισμένος όγκος ενζυμικού σκευάσματος Cellic Ctec. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε αναδεδόμενο επωαστήρα στους 50 °C και 180 rpm για 24 h και ύστερα παραλήφθηκε το προκύπτον διάλυμα σακχάρων.



Εικόνα 31: Ενζυμικά υδρολυμένη βιομάζα υπολλειμάτων καλαμποκιού

Σημειώνεται ότι ο όγκος του ενζυμικού σκευάσματος καθορίστηκε από τα αποτελέσματα της μεθόδου Bradford για τη συνολική του συγκέντρωση. Το προκύπτον υδρόλυμα, μετά το πέρας των 24 h, αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη στους -20 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθεί για καλλιέργεια μικροφυκών.

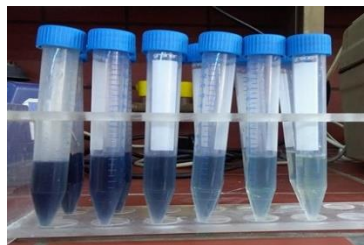
Πρίν την καλλιέργεια αυτή, μετρήθηκε η ποσότητά του σε γλυκόζη, μέσω της προαναφερόμενης της μεθόδου GOD/PAP. Για τη μέτρηση αυτή το υδρόλυμα αραώθηκε αρχικά, ανάλογα με τα αποτελέσματα της όξινης υδρόλυσης που θεωρήθηκε η μέγιστη δυνατή ποσότητα σακχάρων που μπορεί να έχει. Η τιμή της γλυκόζης που προσδιορίστηκε, οδήγησε στην κατάλληλη αραίωση του υδρολύματος με το CZ-M1, έτσι ώστε να προκύψει θρεπτικό υλικό ανάπτυξης της *C.zofingiensis* με συγκέντρωση 7 g/L γλυκόζης.

Η γλυκόζη βρέθηκε σε υγρή μορφή, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 17, γιατί και αποστειρώθηκε μαζί με το υπόλοιπο υγρό θρεπτικό υλικό. Η αποστείρωση στην περίπτωση αυτή δεν πραγματοποιήθηκε στους 121 °C, διότι η υγρή γλυκόζη χάνει την αρχική μορφή της, καθώς καραμελώνεται (αποκτά καφέ χρώμα) και δεν μπορεί να καταναλωθεί εύκολα από τα μικροφύκη. Για το λόγο αυτό μειώθηκε τόσο ο χρόνος, όσο και η θερμοκρασία αποστείρωσης και κατέληξε στους 109 °C για 15 min.

Στο συνολικό στερεό κλάσμα της επεξεργασμένης βιομάζας, συνεπώς και στα υδρολύματα που έχουν προκύψει από όξινη και ενζυμική υδρόλυση διαπιστώνονται ουσίες ικανές να αναστείλουν την ανάπτυξη των μικροφυκών. Η βασικότερη από αυτές είναι η ομάδα φαινολικών ενώσεων, η οποία για να ανιχνευτεί ακολουθήθηκε η παρακάτω προσαρμοσμένη μέθοδος. Το βασικό συστατικό της είναι το αντιδραστήριο φαινόλης Folin-Ciocalteu's που δημιουργεί σύμπλοκα φαινολικών δακτυλίων, τα οποία εμφανίζουν απορρόφηση στα 765 nm. [99], [100]

4.18. Προσδιορισμός φαινολικών δακτυλίων μέσω του αντιδραστηρίου Folin
Συγκεκριμένα αναμίχθηκαν 50 μL δείγματος με 2 mL του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu's phenol 10% v/v και παρέμειναν ακίνητα σε θερμοκρασία δωματίου, για 3 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 mL διαλύματος Na_2CO_3 , αναμίχθηκαν για 30 s και επώαστηκαν στους 45 °C για 15 min. Καταληκτικά, μετρήθηκε και καταγράφηκε η απορρόφηση του δείγματος στα 765 nm, όπου για δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το νερό.

Πριν πραγματοποιηθεί μέτρηση των δειγμάτων της υδρολυμένης βιομάζας κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με δείγμα γαλλικού οξέος συγκεντρώσεων εύρους 0.1-1 mg/mL.



Εικόνα 32: Καμπύλη αναφοράς μεθόδου προσδιορισμού φαινολικών δακτυλίων μέσω αντιδραστηρίου Folin από το πυκνότερο (αριστερά) προς το αραιότερο (δεξιά) δείγμα

Η απομάκρυνση της κεντρικής αυτής ομάδας φαινολικών ενώσεων μπορεί να πραγματοποιηθεί με μία μέθοδο αποτοξικοποίησης που έχει σαν κεντρική βάση τον ενεργό άνθρακα.

4.19. Απομάκρυνση φαινολικών δακτυλίων μέσω προσρόφησης σε ενεργό άνθρακα

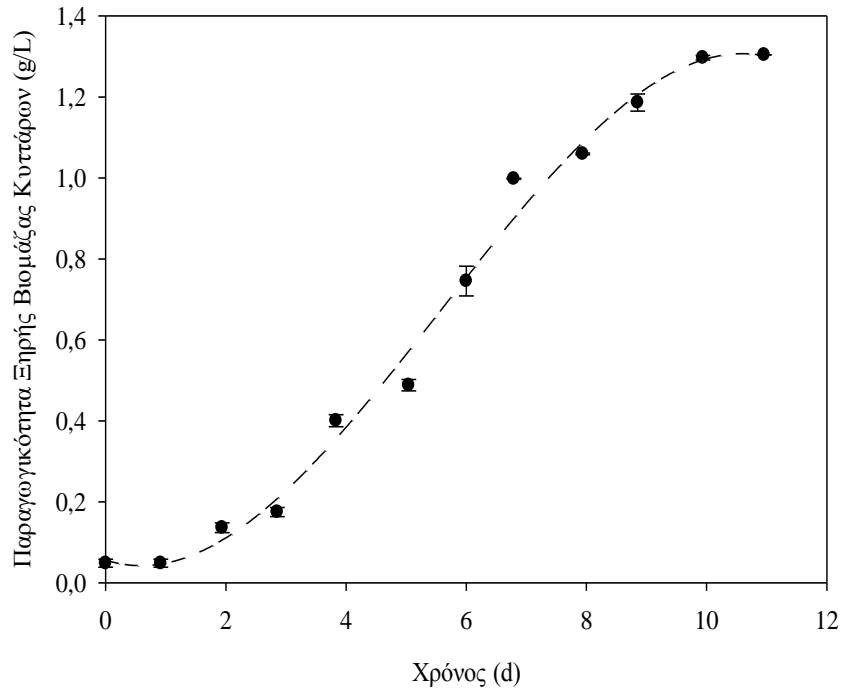
Συγκεκριμένα, αναμίχθηκαν 25 mL υδρολύματος και 1,25 g ενεργού άνθρακα (λόγος ενεργός άνθρακας/υδρόλυμα = 1/24) και επώστηκαν στους 30 °C και ανάδευση 200 rpm για 1 h. Στη συνέχεια, το προκύπτον υδρόλυμα διηθήθηκε και συλλέχθηκε το διήθημα, ως αυτό με τους λιγότερους φαινολικούς δακτυλίους υδρόλυμα, όπου και μετρήθηκε με την παραπάνω μέθοδο προσδιορισμού φαινολικών.

Το επεξεργασμένο αυτό υδρόλυμα κρίθηκε ικανό να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα για την ετερότροφη ανάπτυξη μικροφυκών, καθώς περιέχει μία ικανή συγκέντρωση γλυκόζης και λιγότερες ουσίες παρεμπόδισης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ετερότροφη Ανάπτυξη του Μικροφύκου *Chlorella zofingiensis*

Πρωτίστως, παρουσιάζεται η νοητή πορεία ανάπτυξης της βιομάζας του στελέχους *Chlorella zofingiensis* σε συνθήκες ετερότροφης καλλιέργειας, σε πηγή άνθρακα γλυκόζη, συγκέντρωσης 7 g/L και 25 °C.



Διάγραμμα 2: Χρονική πορεία ανάπτυξης βιομάζας κυττάρων του μικροφύκου *Chlorella zofingiensis* με συγκέντρωση πηγής άνθρακα 7 g/L

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνεται πως ο πληθυσμός παραμένει στάσιμος για μία ημέρα και στη συνέχεια αυξάνεται εκθετικά μέχρι την 9^η ημέρα όπου και στη συνέχεια σταθεροποιείται.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως η πορεία ανάπτυξης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης παρουσίασε αντίστοιχη εικόνα με τη διαφορά πως έφτανε σε διαφορετικές τελικές τιμές παραγωγικότητας, στο ίδιο χρονικό διάστημα.

2. Βελτιστοποίηση Παραγωγής Βιομάζας Μικροφυκών

Σύμφωνα με το θεωρητικό υπόβαθρο της παρούσας εργασίας αναλύθηκαν σε πρώτο στάδιο οι παράγοντες ανάπτυξης του μικροφύκους και συγκεκριμένα οι πηγές άνθρακα, αζώτου και οι διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξής του.

Παράγοντες Ανάπτυξης

2.1.Βέλτιστη Πηγή Άνθρακα

Εξετάστηκαν ως πηγές άνθρακα το οξικό οξύ, η ξυλόζη και η γλυκόζη, τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω. Η επιλογή τους δεν ήταν τυχαία, καθώς το οξικό οξύ αποτελεί ένα παραπροϊόν της πετροχημικής βιομήχανιας και των ζυμώσεων αποβλήτων και είναι αναγκαίο να καταναλωθεί. Ταυτόχρονα, η ξυλόζη είναι ο κεντρικός πολυσακχαρίτης της ημικυτταρίνης και η διάσπασή της θα οφελήσει τη μετέπειτα χρησιμοποίηση της βιομάζας ως πηγή άνθρακα. Καταληκτικά, η γλυκόζη αποτελεί την κατεξοχήν απλούστερη και πιο εφαρμόσιμη πηγή άνθρακα και συνάμα βρίσκεται στην κυτταρίνη κάθε λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας.

2.1.1. Οξικό Οξύ

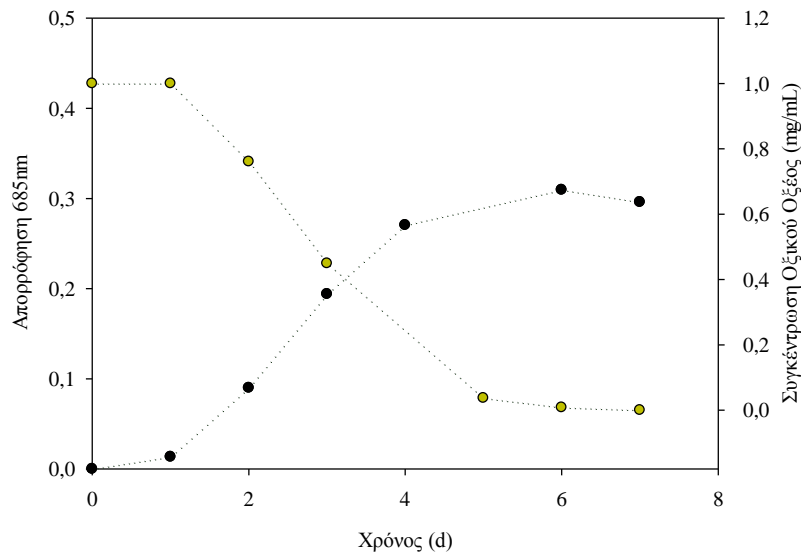
Παρουσιάζεται ένας συνολικός πίνακας των διαφόρων συγκεντρώσεων οξικού οξέος που δοκιμάστηκαν ως αποκλειστική πηγή άνθρακα, μαζί με τις αντίστοιχες παραγωγικότητες κυττάρων.

Πίνακας 20: Συσχέτιση Συγκέντρωσης Οξικού Οξέος με Παραγωγικότητα Κυττάρων

Συγκέντρωση Οξικού Οξέος (g/L)	Παραγωγικότητα Κυττάρων (g/L)
0.5	0.33
1	0.37
2	0.31
3	0.33

Παρατηρήθηκε πως για συγκέντρωση οξικού οξέος 1 g/L εμφανίστηκε η μέγιστη παραγωγικότητα κυττάρων μικροφυκών που ήταν 0.37 g/L.

Παραγωγή Βιομάζας-Κατανάλωση Οξικού Οξέος



Διάγραμμα 3: Συγκριτική ανάπτυξη του μικροφύκου με κατανάλωση οξικού οξέος, για συγκέντρωση αυτού στο 1 g/L

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα εμφανίζεται η ανάπτυξη του μικροφύκου και η παράλληλη κατανάλωση του οξικού οξέος. Παρατηρείται πως για συγκέντρωση οξικού οξέος 1 g/L, η ανάπτυξη της καλλιέργειας σημειώνει μέγιστη απορρόφηση 0.31 στα 685 nm, όπου και η συγκέντρωση του οξικού οξέος μηδενίζεται.

2.1.2. Ξυλόζη

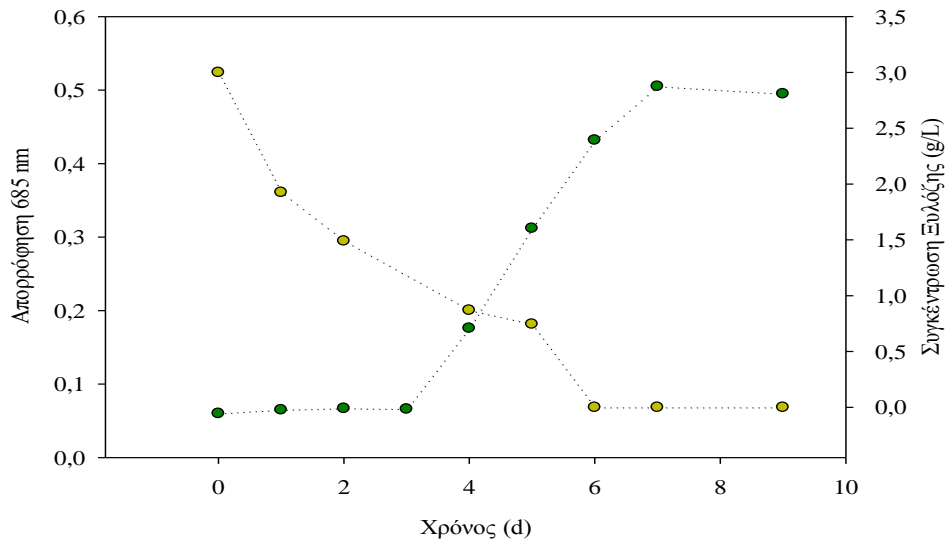
Εκτός του οξικού οξέος, παρουσιάζεται ένας συνολικός πίνακας των διαφόρων συγκεντρώσεων ξυλόζης που δοκιμάστηκαν μαζί με τις αντίστοιχες παραγωγές βιομάζας κυττάρων.

Πίνακας 21: Συσχέτιση Συγκέντρωσης Ξυλόζης με Παραγωγικότητα Κυττάρων

Συγκέντρωση Ξυλόζης (g/L)	Παραγωγικότητα Κυττάρων (g/L)
2	0.16
3	0.60
5	0.12
7	0.12

Στην περίπτωση αυτή είναι προφανές πως για συγκέντρωση ξυλόζης 3 g/L παρατηρείται η μέγιστη παραγωγικότητα κυττάρων 0.60 g/L.

Παραγωγή Βιομάζας-Κατανάλωση Ξυλόζης

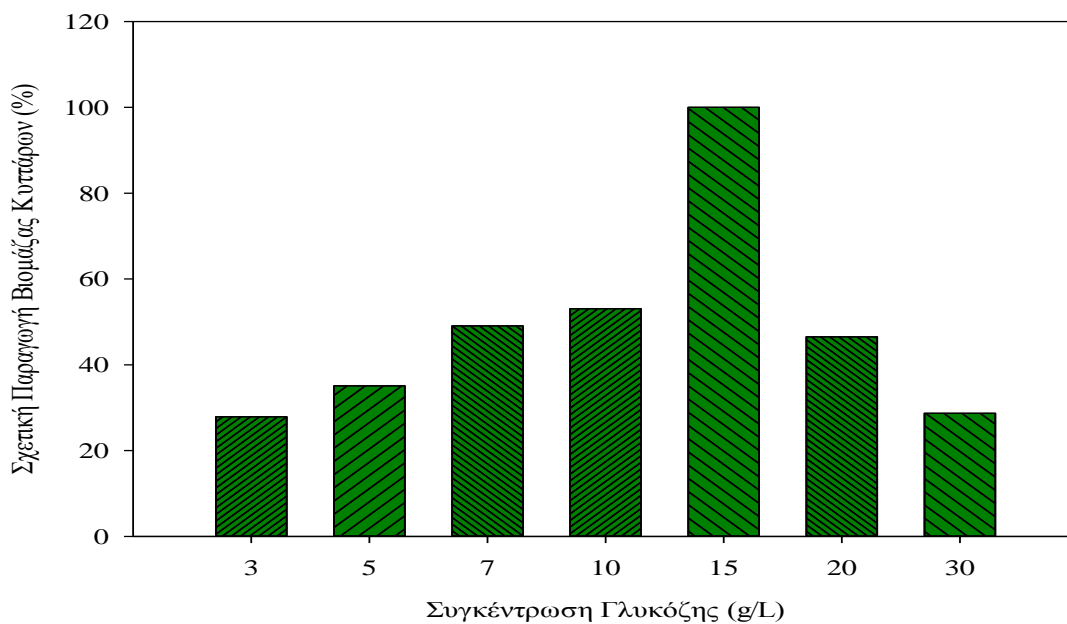


Διάγραμμα 4: Συγκριτική ανάπτυξη του μικροφύκου με κατανάλωση ξυλόζης, για συγκέντρωση αυτής στα 3 g/L

Το παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζει την ανάπτυξη του μικροφύκου μέχρι απορρόφηση 0.505 την 7^η ημέρα και ταυτόχρονο μηδενισμό της συγκέντρωσης ξυλόζης, για αρχική συγκέντρωση αυτής στα 3 g/L.

2.1.3. Γλυκόζη

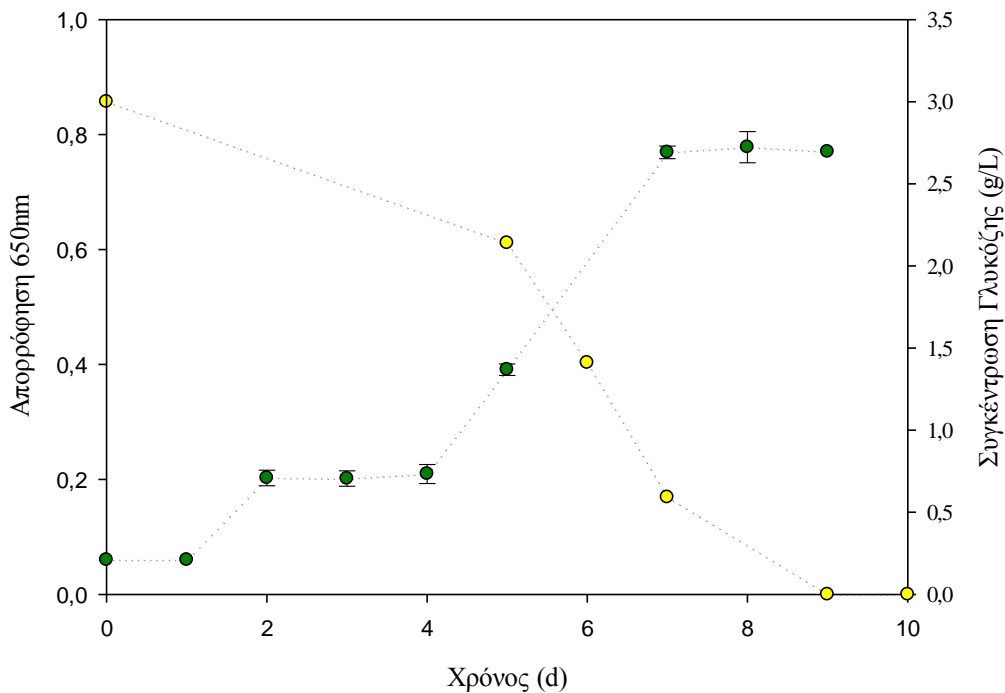
Η τρίτη πηγή άνθρακα που εξετάστηκε είναι η γλυκόζη για την οποία δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις αυτής και συγκεντρώθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα.



Διάγραμμα 5: Συσχέτιση διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης με τη σχετική παραγωγή βιομάζας μικροφυκών

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται μια αύξηση της βιομάζας των κυττάρων από τα 3 g/L γλυκόζης έως τα 15 g/L, όπου και βελτιστοποιείται. Αντίθετα, στα 20 και 30 g/L η ποσότητα βιομάζας μειώνεται. Σημειώνεται πως η μέγιστη παραγωγικότητα βιομάζας κυττάρων ήταν 3.33 g/L για συγκέντρωση γλυκόζης 15 g/L.

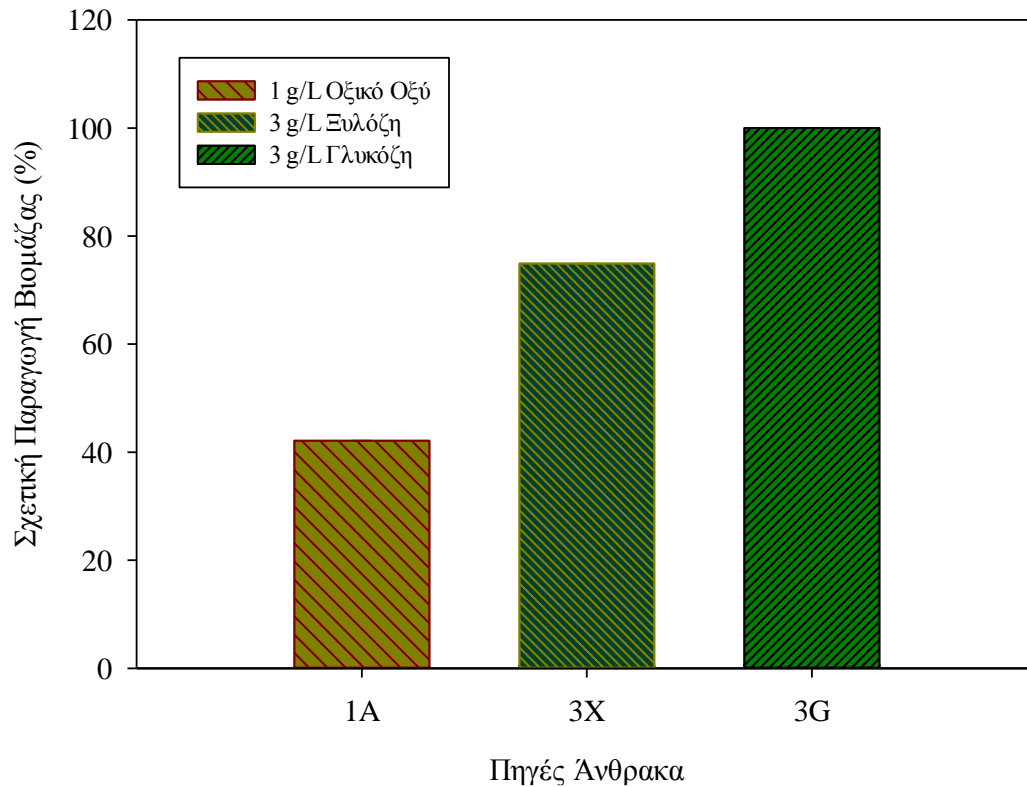
Παραγωγή Βιομάζας-Κατανάλωση Γλυκόζης



Διάγραμμα 6: Συγκριτική ανάπτυξη του μικροφύκου με κατανάλωση γλυκόζης, για συγκέντρωση αυτής στα 3 g/L

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνεται πως η ανάπτυξη του μικροφύκου συνδέεται με τη μείωση της πηγής άνθρακα σε εκθετικό βαθμό. Συγκεκριμένα, για αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 3 g/L η ανάπτυξη του μικροφύκου ακολουθεί τα τρία προαναφερόμενα στάδια (λανθανουσα, εκθετική και στατική φάση) τα οποία συνοδεύονται από αντίστοιχες μεταβολές της κατανάλωσης της γλυκόζης. Στην 9^η ημέρα που καταναλώνεται όλη η γλυκόζη, τότε παύει η εκθετική ανάπτυξη του μικροφύκου.

2.1.4. Συσχέτιση Πηγών Άνθρακα



Διάγραμμα 7: Συσχέτιση διαφορετικών πηγών άνθρακα (οξικό οξύ, ξυλόζη, γλυκόζη) με τη σχετική παραγωγή βιομάζας μικροφυκών

Είναι εμφανές πως η συγκεντρωση γλυκόζης έχει μεγαλύτερη σχετική παραγωγή κυττάρων και ακολουθεί η ξυλόζη και το οξικό οξύ.

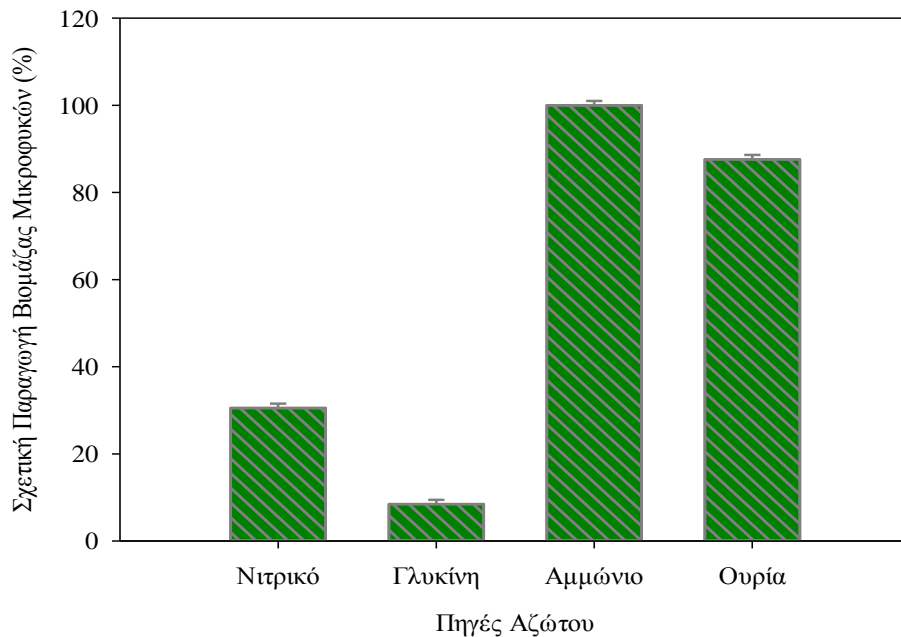
Πέρα από την πειραματική εξέταση καθαρών πηγών άνθρακα, δοκιμάστηκε και συνδυασμός της ξυλόζης με τη γλυκόζη και συγκεκριμένα:

- 3 g/L γλυκόζης-3 g/L ξυλόζης,
- 5 g/L γλυκόζης-3 g/L ξυλόζης
- 7 g/L γλυκόζης- 3 g/L ξυλόζης

Η μέγιστη κυτταρική ανάπτυξη που διαπιστώθηκε ήταν για το συνδυασμό 7 g/L γλυκόζης-3 g/L ξυλόζης και ήταν 0.15 g/L.

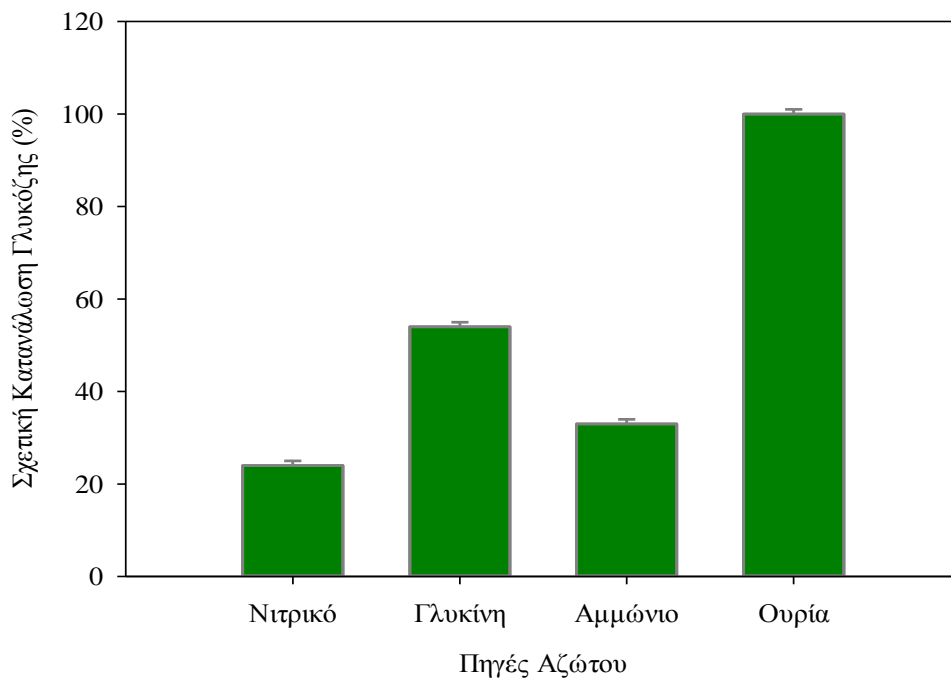
2.2.Βέλτιστη Πηγή Αζώτου

Εκτός των πηγών άνθρακα κρίνεται αναγκαία και η εύρεση της ιδανικότερης πηγής ανάπτυξης του μικροφύκου, όσον αφορά στο άζωτο. Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα που απεικονίζει την εναλλαγή των τιμών της προκύπτουσας βιομάζας κυττάρων ανάλογα με την εκάστοτε πηγή αζώτου, για συγκέντρωση αζώτου στο 1 g/L.



Διάγραμμα 8: Σύγκριση πηγών αζώτου (νιτρικό, γλυκίνη, αμμώνιο, ουρία) με τη σχετική παραγωγή βιομάζας μικροφυκών

Από τις πηγές αζώτου που εξετάστηκαν, σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, διαπιστώνεται πως είναι συγκριτικά μεγαλύτερη η ανάπτυξη του μικροφύκου και η παραγωγή ξηρής βιομάζας στην περίπτωση του αμμωνίου και ακολουθεί κατά σειρά η ουρία, το νιτρικό και η γλυκίνη.

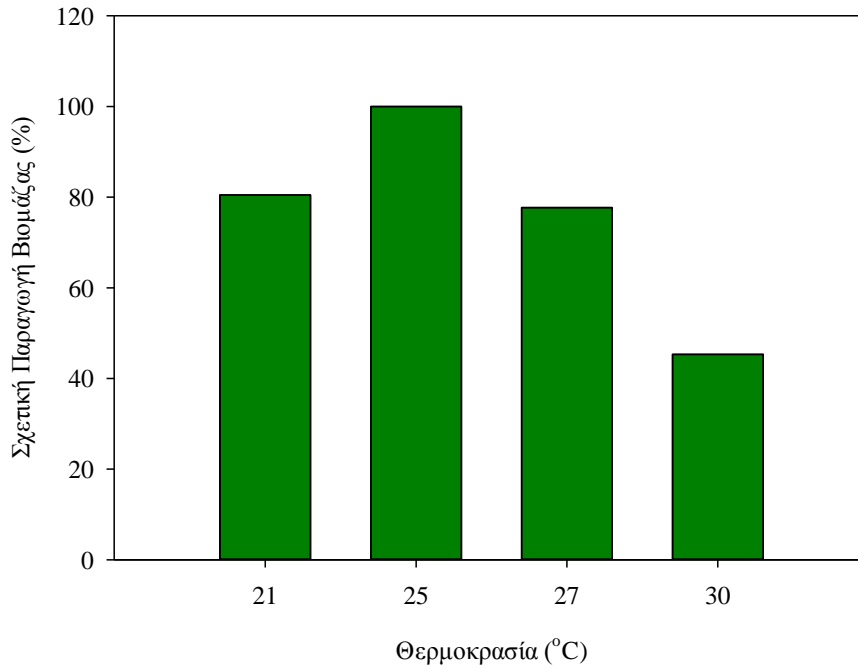


Διάγραμμα 9: Σύγκριση πηγών αζώτου (νιτρικό, γλυκίνη, αμμώνιο, ουρία) με τη σχετική κατανάλωση γλυκόζης

Παρουσιάζεται επίσης και η σχετική κατανάλωση γλυκόζης κάθε πηγής αζώτου που δοκιμάστηκε, για αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 7 g/L και παρατηρείται πως καταναλώνεται περισσότερη στην περίπτωση της ουρίας και της γλυκίνης, ενώ στη συνέχεια του αμμωνίου και των νιτρικών.

2.3.Βέλτιστη Θερμοκρασία Ανάπτυξης

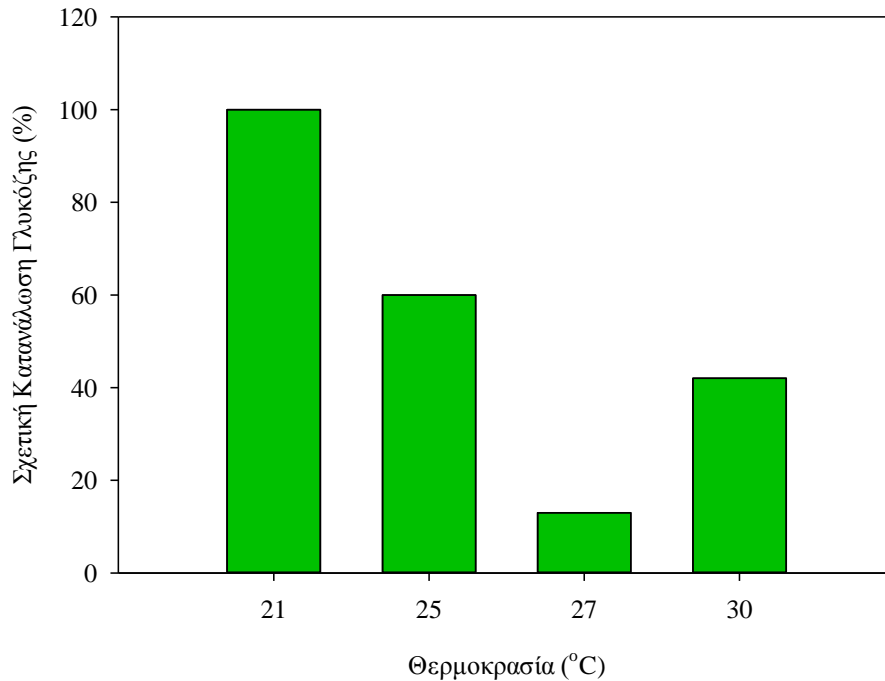
Καταληκτικά, στο πεδίο της βελτιστοποίησης της ανάπτυξης του μικροφύκου και παραγωγής βιομάζας εξετάστηκαν διάφορες θερμοκρασίες επώασης.



Διάγραμμα 10: Σύγκριση θερμοκρασιών με τη σχετική παραγωγή βιομάζας μικροφύκου

Στο εύρος των 4 διαφορετικών θερμοκρασιών που εξετάστηκαν, ανάλογα με τα όρια ανάπτυξης του μικροφύκου είναι εμφανές πως η βέλτιστη θερμοκρασία παραγωγής βιομάζας κυττάρων διαπιστώνεται στους 25 °C. Σχετικά παραπλήσιες είναι οι παραγωγές βιομάζας που εμφανίζουν οι 21 °C και οι 27 °C, ενώ η λιγότερη δυνατή παραγωγή μικροφύκων παρατηρείται στους 30 °C.

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται ένα συλλογικός διάγραμμα των διαφόρων θερμοκρασιών που δοκιμάστηκαν σε σχέση με την σχετική κατανάλωση γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση αυτής 7 g/L.



Διάγραμμα 11: Σύγκριση θερμοκρασιών με σχετική κατανάλωση γλυκόζης

Παρατηρείται πως στην περίπτωση της ακραίας θερμοκρασίας 21 °C καταναλώνεται η περισσότερη γλυκόζη ενώ στη συνέχεια στους 25 °C και 30 °C καταναλώνονται κατά σειρά λιγότερη συγκέντρωση του σακχάρου αυτού, ενώ στους 27 °C το μικροφύκος καταναλώνει την ελάχιστη γλυκόζη για την ανάπτυξή του.

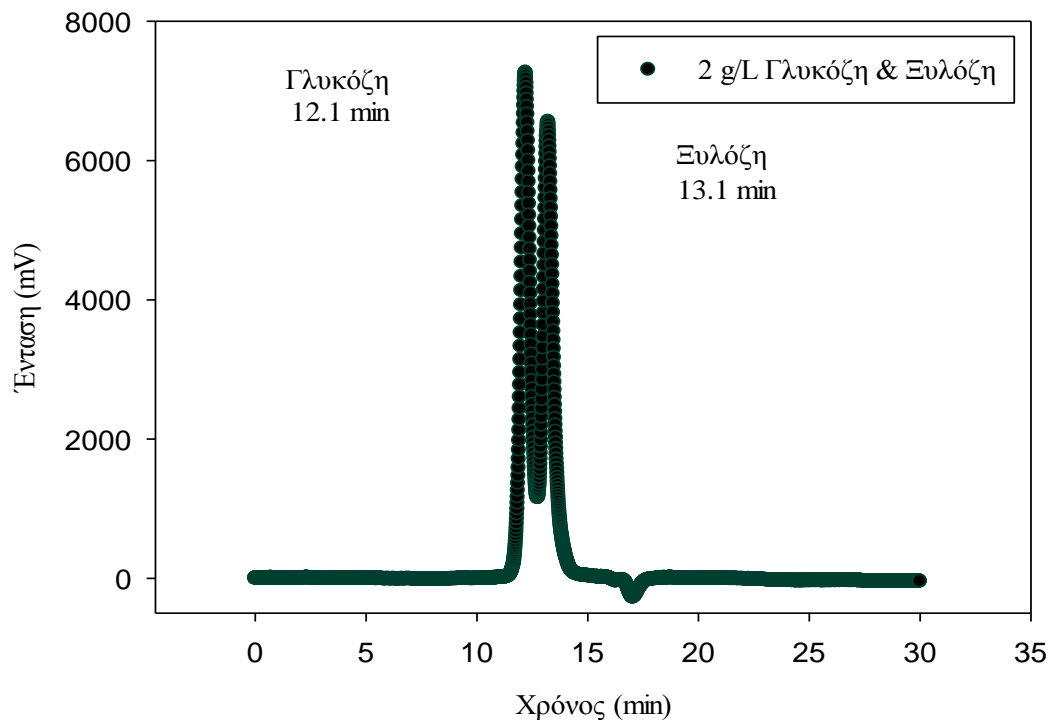
3. Λιγνινοκυτταρινούχα Βιομάζα

Τα υπολείμματα καλαμποκιού που εξετάστηκαν, αφού είχαν υποστεί την προκατεργασία με έκρηξη ατμού, αρχικά υδρολύθηκαν με τη μέθοδο της όξινης και στη συνέχεια με την ενζυμική υδρόλυση.

3.1.Όξινη Υδρόλυση

Τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν ήταν η σύσταση της βιομάζας σε σάκχαρα, λιγνίνη και τέφρα.

Το χρωματογράφημα που προέκυψε με βάση τη μέθοδο της HPLC-RID για την καμπύλη αναφοράς των σακχάρων αποτελείται από δύο κορυφές όπως φαίνεται παρακάτω.



Διάγραμμα 12: Χρωματογράφημα καμπύλης αναφοράς HPLC-RID για 2 g/L γλυκόζης και ξυλόζης

Συγκεκριμένα, κατά την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς στα 2 g/L γλυκόζης και ξυλόζης, παρατηρούνται δύο χρωματογραφικές κορυφές στα 12.1 min για τη γλυκόζη και 13.1 min για τη ξυλόζη. Αναγνωρίζεται η ύπαρξη μιας αλληλοεπικάλυψης των δύο κορυφών, αλλά είναι χαρακτηριστικό της μεθόδου και δεν γνωρίζεται τρόπος διαχωρισμού τους.

Στο αντίστοιχο χρωματογράφημα της βιομάζας καλαμποκιού που υδρολύθηκε με έκρηξη ατμού παρατηρήθηκε μόνο μία κορυφή στα 12.04 min, που αντιστοιχεί σε γλυκόζη και ποσοτικοποιήθηκε από την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς που περιλαμβάνεται στο Παράρτημα Ι. Συνεπώς, το σύνολο των χαρακτηριστικών της βιομάζας ύστερα από την όξινη υδρόλυση είναι:

Πίνακας 22: Σύσταση προκατεργασμένης βιομάζας

Συστατικά	Σύσταση (% w/w)
Γλυκόζη	48.1 ± 0.0058
Λιγνίνη	36 ± 0.0072
Τέφρα	2.6 ± 0.0013

3.2. Ενζυμική Υδρόλυση

Βασικός παράγοντας της ενζυμικής μεθόδου υδρόλυσης της βιομάζας αποτέλεσε η συγκέντρωση του ενζύμου Cellic Ctec που χρησιμοποιήθηκε. Αυτή μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford και ποσοτικοποιήθηκε από την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς.

Συγκέντρωση ενζυμικού σκευάσματος Cellic Ctec: 105.8 mg/mL

Η προκύπτουσα βιομάζα μετά την ενζυμική υδρόλυση περιέχει ένα σύνολο φαινολικών ενώσεων οι οποίες και απομονώθηκαν μέσω της μεθόδου απομάκρυνσης φαινολικών ουσιών με ενεργό άνθρακα, όπως περιγράφεται παραπάνω (παράγραφος 4.19, Υλικά και Μέθοδοι) και καταγράφηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα.

Πίνακας 23: Συγκεντρώσεις ισοδύναμων γαλλικού οξέος πριν και μετά την μέθοδο ενεργού άνθρακα και η αντίστοιχη απόδοση της μεθόδου

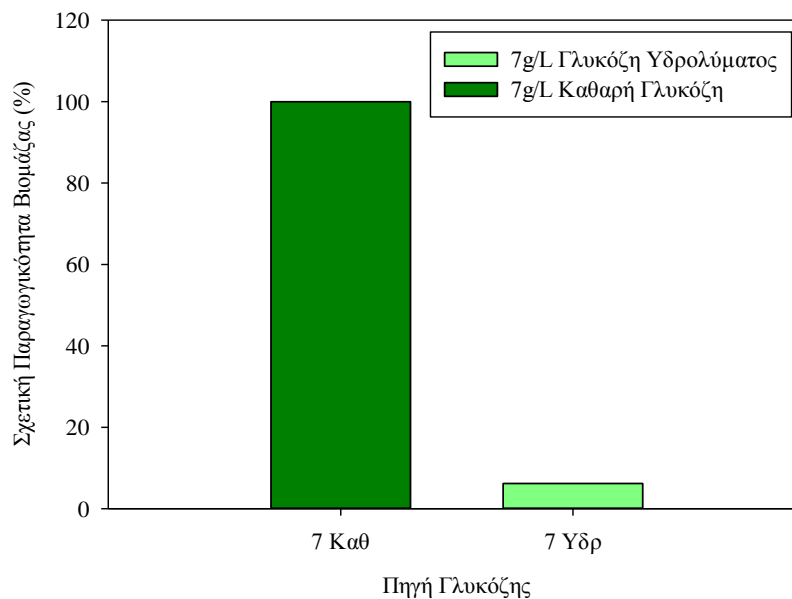
Προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα	Συγκέντρωση ισοδύναμων γαλλικού οξέος (g/L)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)
Πρίν	0.234	31
Μετά	0.086	20.4
Απόδοση	63.4%	34.2%

Αρχικά διαπιστώθηκαν 0.23 mg/mL ισοδύναμων γαλλικού οξέος, ενώ τελικά 0.08 mg/mL. Πρακτικά έγινε μια πλήρης μείωση των φαινολικών δακτυλίων από το σύνολο του υδρολύματος, με αποτέλεσμα αυτό να καταστεί πιο κατάλληλο υπόστρωμα για καλλιέργεια μικροφυκών.

3.2.1. Καλλιέργεια Ενζυμικά Υδρολυμένης Βιομάζας σε Μικροφύκη

Η αποστείρωση της υδρολυμένης βιομάζας που περιέχει γλυκόζη, γίνεται στους 109°C για 15 min και μειώνει την προκύπτουσα γλυκόζη του υδρολύματος κατά 7%. Το γεγονός αυτό λαμβάνεται κάθε φορά υπόψη πριν την αραίωση στις καλλιέργειες με υδρολυμένη βιομάζα.

Η πρώτη προσπάθεια χρησιμοποίησης της ενζυμικά υδρολυμένης βιομάζας, πριν την απομάκρυνση των φαινολικών ενώσεων, για πηγή άνθρακα στα μικροφύκη συγκρίνεται με τη καθαρή γλυκόζη συγκέντρωσης 7 g/L στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 13: Σύγκρισης σχετικής παραγωγικότητας βιομάζας κυττάρων με διαφορετικές πηγές γλυκόζης (7 g/L)

Παρατηρείται πως για κοινή συγκέντρωση γλυκόζης, η παραγωγικότητα των κυττάρων είναι πολύ μικρότερη, όταν η γλυκόζη προερχόταν από το υδρόλυμα. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε 0.11 g/L.

Η καλλιέργεια μικροφυκών με υδρόλυμα φτωχότερο σε φαινολικές ουσίες, οδήγησε από την πλευρά της σε κοινή παραγωγικότητα ύψους 0.11 g/L.

4. Παραγωγή Ασταξανθίνης

4.1. Υπολογισμός λόγου C/N

Ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά των καλλιεργειών μικροφυκών και των προϊόντων που παράγουν, είναι ο λόγος άνθρακα προς άζωτο, που βασίζεται στη σύσταση του θρεπτικού τους υλικού και προσδιορίζεται ως το κλάσμα του άνθρακα προς το άζωτο εκφρασμένα ως προς μάζα ή γραμμομόρια. Ως παράδειγμα υπολογισμού του λόγου C/N δίνεται το παρακάτω:

Για κυτταροκαλλιέργεια 7 g/L γλυκόζης ($C_6H_6O_6$, $Mr_{gluc}=180.16$ g/mol) με 0.8 g/L νιτρικού νατρίου ($NaNO_3$, $Mr=85$ g/mol) προσδιορίζεται ως προς μάζα ως εξής:

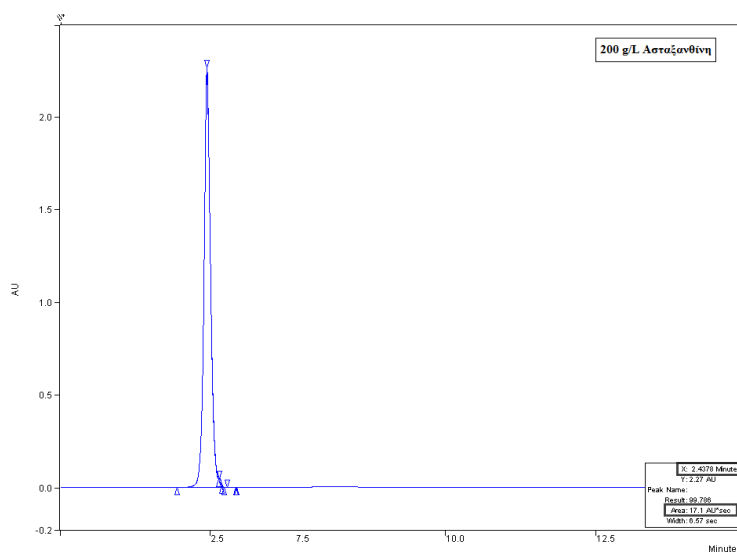
$$1. \text{ Άνθρακας: } \frac{(7 \text{ g/L}) \cdot (6 \cdot Ar_C)}{Mr_{gluc}} = 2.8$$

$$2. \text{ Άζωτο: } \frac{(0.8 \text{ g/L}) \cdot Ar_N}{Mr_{NaNO_3}} = 0.13$$

$$\text{➤ Λόγος Άνθρακας/Άζωτο} = 2.8/0.13 \Leftrightarrow \boxed{\frac{C}{N} = 21.54}$$

4.2. Χρωματογράφημα Ασταξανθίνης

Τα αποτελέσματα της μεθόδου του συστήματος HPLC-DAD προς την εύρεση της παραγωγής ασταξανθίνης ποσοτικοποιούνται από την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. Ένα χρωματογράφημα του πρότυπου δείγματος ασταξανθίνης που χρησιμοποιήθηκε για καμπύλη αναφοράς και συγκέντρωση 200 g/L ασταξανθίνης παρουσιάζεται παρακάτω.



Παρατηρείται πως η κορυφή ασταξανθίνης εμφανίζεται στα 2.4378 min και το αντίστοιχο εμβαδό (Area) αυτής για τα 200 g/L είναι 17.1 AU*s, όπως τονίζεται στο χρωματογράφημα.

Διάγραμμα 14: Χρωματογράφημα Καμπύλης Αναφοράς HPLC-DAD για 200 g/L Ασταξανθίνης

4.3.Πηγή Άνθρακα

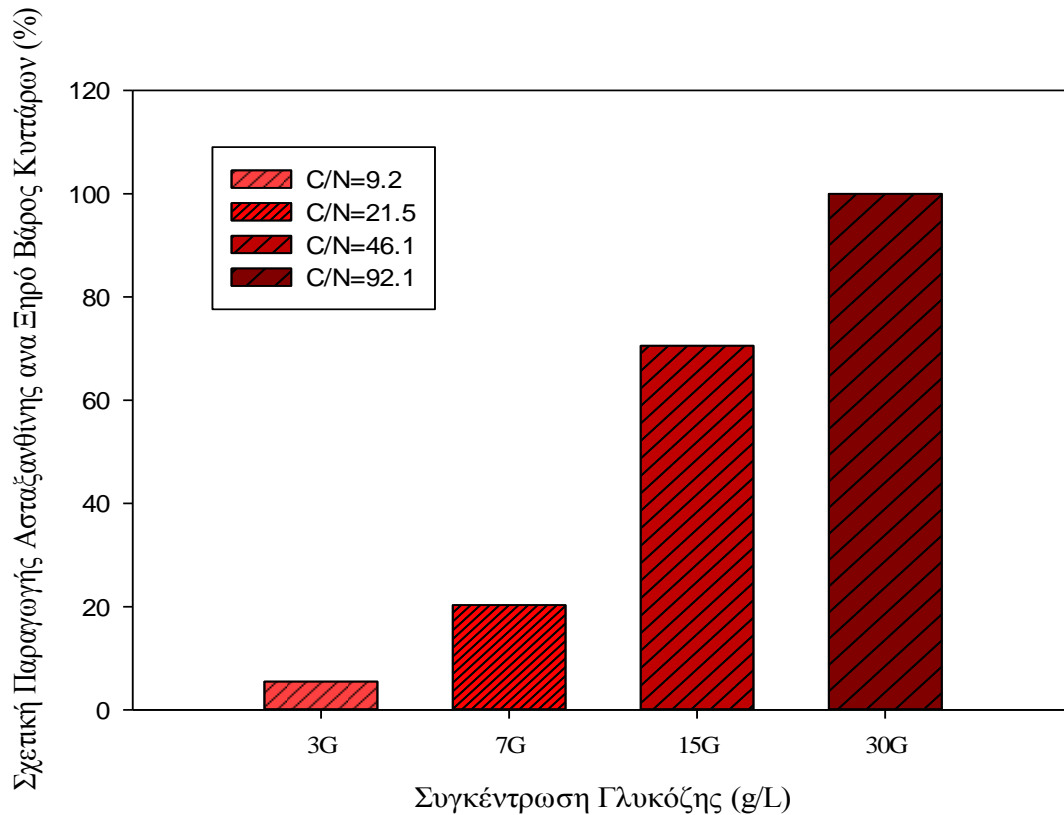
Διαφορετικές πηγές άνθρακα, υψηλής τελικής βιομάζας κυττάρων (ανώτερης του 0.5 g/L) εξετάστηκαν για παραγωγή ασταξανθίνης και έδωσαν τα παρακάτω αποτελέσματα συγκεκριμένα για ξυλόζη και γλυκόζη:

Πίνακας 24: Συγκριτικός πίνακας πηγών άνθρακα με παραγωγή ασταξανθίνης

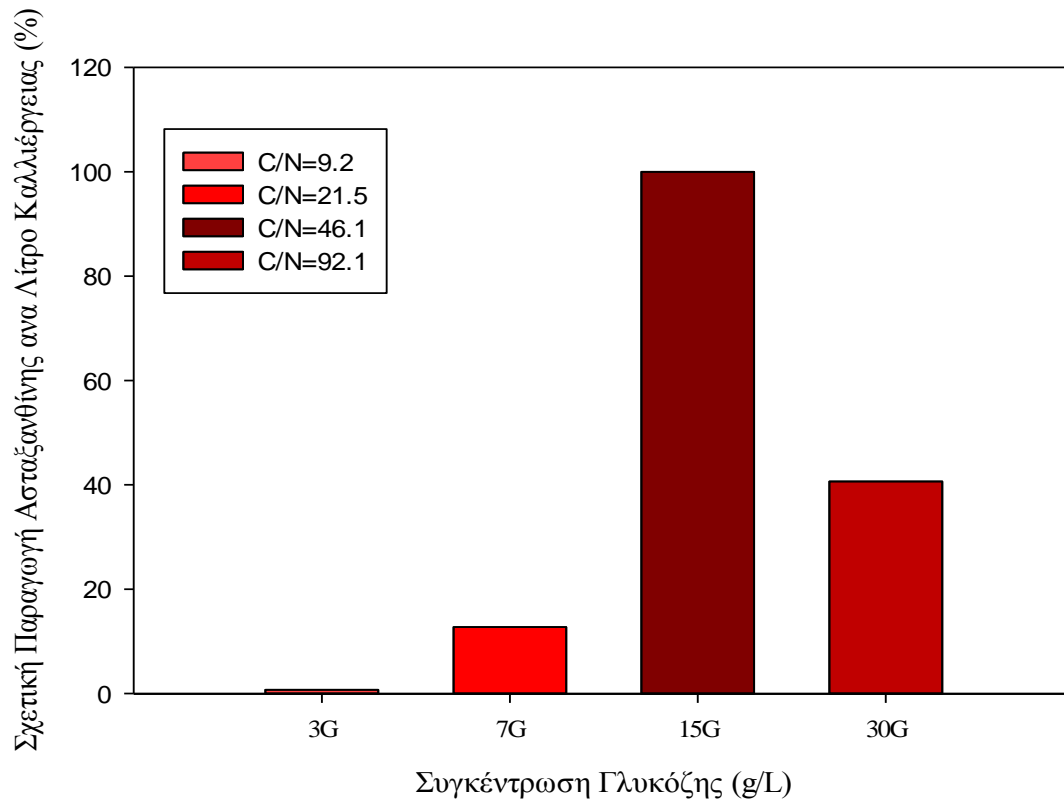
Πηγές Άνθρακα	Συγκέντρωση (g/L)	C/N	Παραγωγή Ασταξανθίνης (mg/g)
Ξυλόζη	3	9.2	0
Γλυκόζη	3	9.2	0.31

Παρατηρείται πως για κοινό λόγο άνθρακα προς άζωτο (C/N) γίνεται παραγωγή ασταξανθίνης μόνο στην περίπτωση των 3 g/L.

Η παραγωγή υψηλής βιομάζας κυττάρων μικροφυκών μέσω της γλυκόζης οδήγησε στην εξέταση της παραγωγής ασταξανθίνης από διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτής στα παρακάτω διαγράμματα.



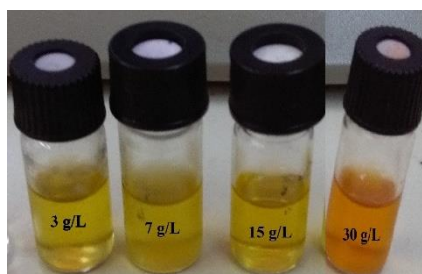
Διάγραμμα 15: Συγκριτικό διάγραμμα διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης και σχετικής παραγωγής ασταξανθίνης ανα ξηρό βάρος κυττάρων



Διάγραμμα 16: Συγκριτικό διάγραμμα διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης και συγκέντρωσης παραγόμενης ασταξανθίνης ανα λίτρο καλλιέργειας

Είναι προφανές πως την καλύτερη παραγωγικότητα σε ασταξανθίνη ανα ξηρό βάρος κυττάρου παρουσιάζουν τα στελέχη που τροφοδοτήθηκαν με 30 g/L γλυκόζη (18.62 mg/g), όπως φαίνεται και στην εικόνα 33 και στη συνέχεια αυτά με 15 g/L, ενώ όλα τα υπόλοιπα έχουν χαμηλότερες παραγωγικότητες.

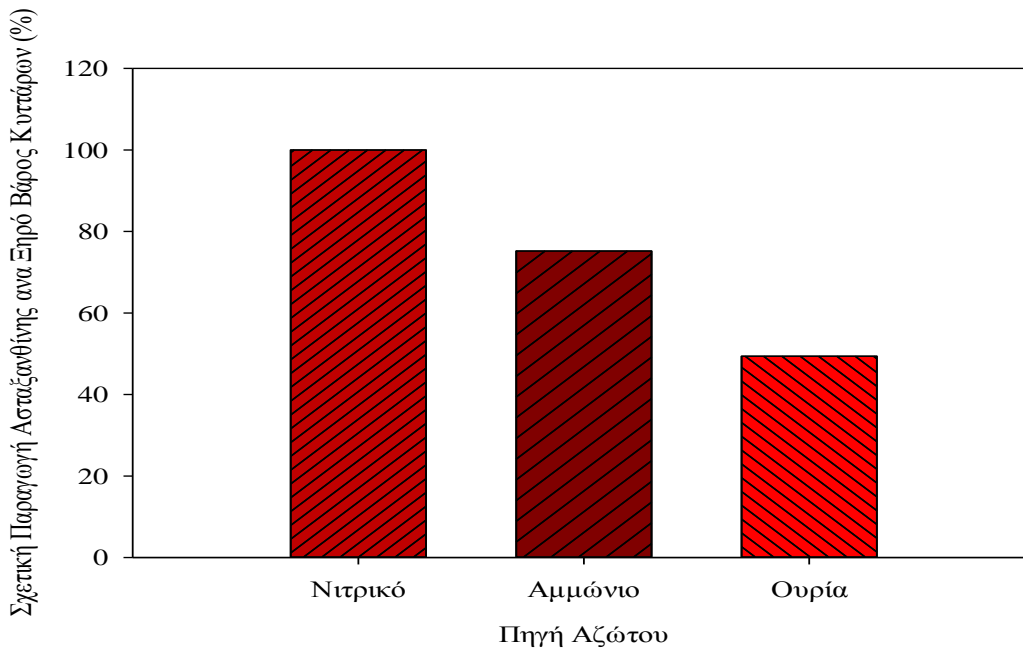
Όσον αφορά στο σύνολο της καλλιέργειας όμως, εκείνες που σαν πηγή άνθρακα είχαν τα 15 g/L γλυκόζης διαπίστωσαν μεγαλύτερη παραγωγικότητα ασταξανθίνης και στη ακολουθούν τα 30 g/L και οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις γλυκόζης.



Εικόνα 33: Φυαλίδια vials για χρωματογραφική ανάλυση ασταξανθίνης, διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης

4.4.Πηγή Αζώτου

Σύμφωνα με τις πηγές αζώτου που εξετάστηκαν στην παραγωγή βιομάζας χρησιμοποιήθηκαν αυτές που περιείχαν αριθμό κυττάρων μεγαλύτερο των 25 mg (παράγραφος 4.12, Υλικά και Μέθοδοι), ώστε να πραγματοποιηθεί η μέθοδος απομόνωσης και εκχύλισης της ασταξανθίνης. Για το λόγο αυτό η γλυκίνη δεν αναλύθηκε ως προς την παραγωγή του καροτενοειδούς.



Διάγραμμα 17: Συσχέτιση παραγωγής ασταξανθίνης ανα ξηρό βάρος κυττάρων με κάθε πηγή αζώτου

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα, τελικά η παραγωγή ασταξανθίνης ανα καλλιέργεια διαμορφώθηκε ως εξής:

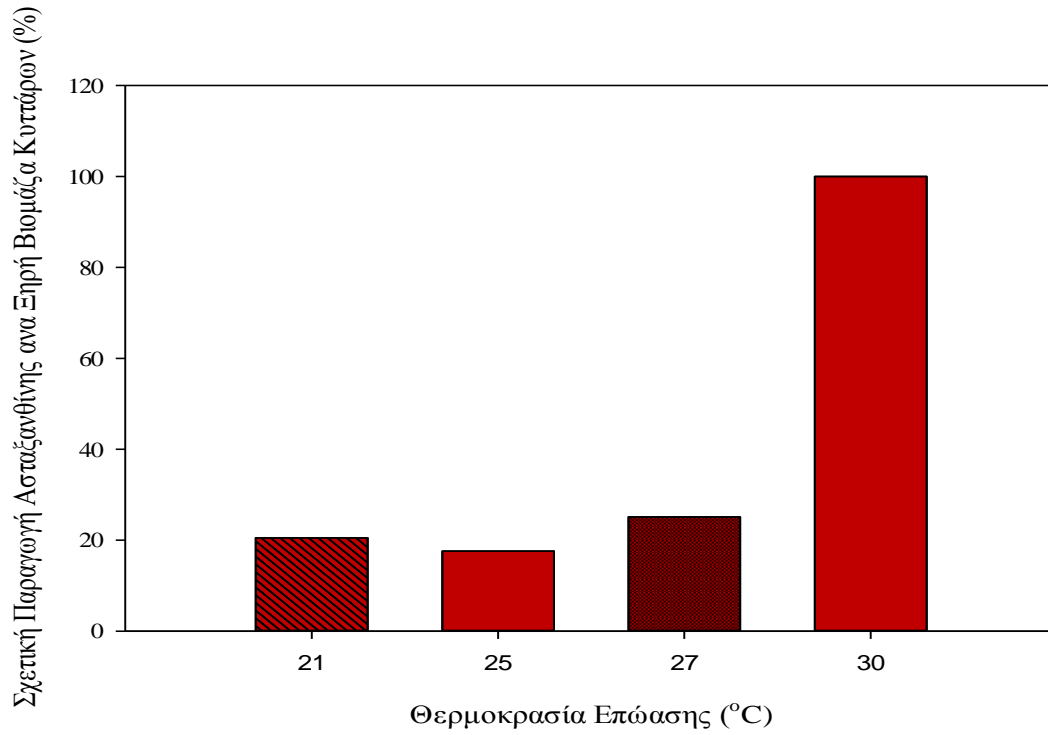
Πίνακας 25: Συγκέντρωση ασταξανθίνης ανα καλλιέργεια για κάθε πηγή αζώτου

Πηγή Αζώτου	Συγκέντρωση Ασταξανθίνης (mg/L)
Νιτρικό	5.59
Αμμώνιο	0.41
Ουρία	0.22

Είναι εμφανές πως στην περίπτωση των νιτρικών, ως πηγής αζώτου, διαπιστώνεται μεγαλύτερη παραγωγή ασταξανθίνης, τόσο ανα κύτταρο, όσο και ανα καλλιέργεια μικροφύκους.

4.5. Διάφορες Θερμοκρασίες

Αντίστοιχα για τις διάφορες θερμοκρασίες επώασης των κυττάρων σημειώθηκαν τα παρακάτω συγκριτικά αποτελέσματα.



Διάγραμμα 18: Συσχέτιση παραγωγής ασταξανθίνης ανα ξηρό βάρος κυττάρων με κάθε θερμοκρασία επώασης

Με βάση το διάγραμμα αυτό, η τελική παραγωγή ασταξανθίνης ανα καλλιέργεια μικροφύκους διαμορφώθηκε ως εξής:

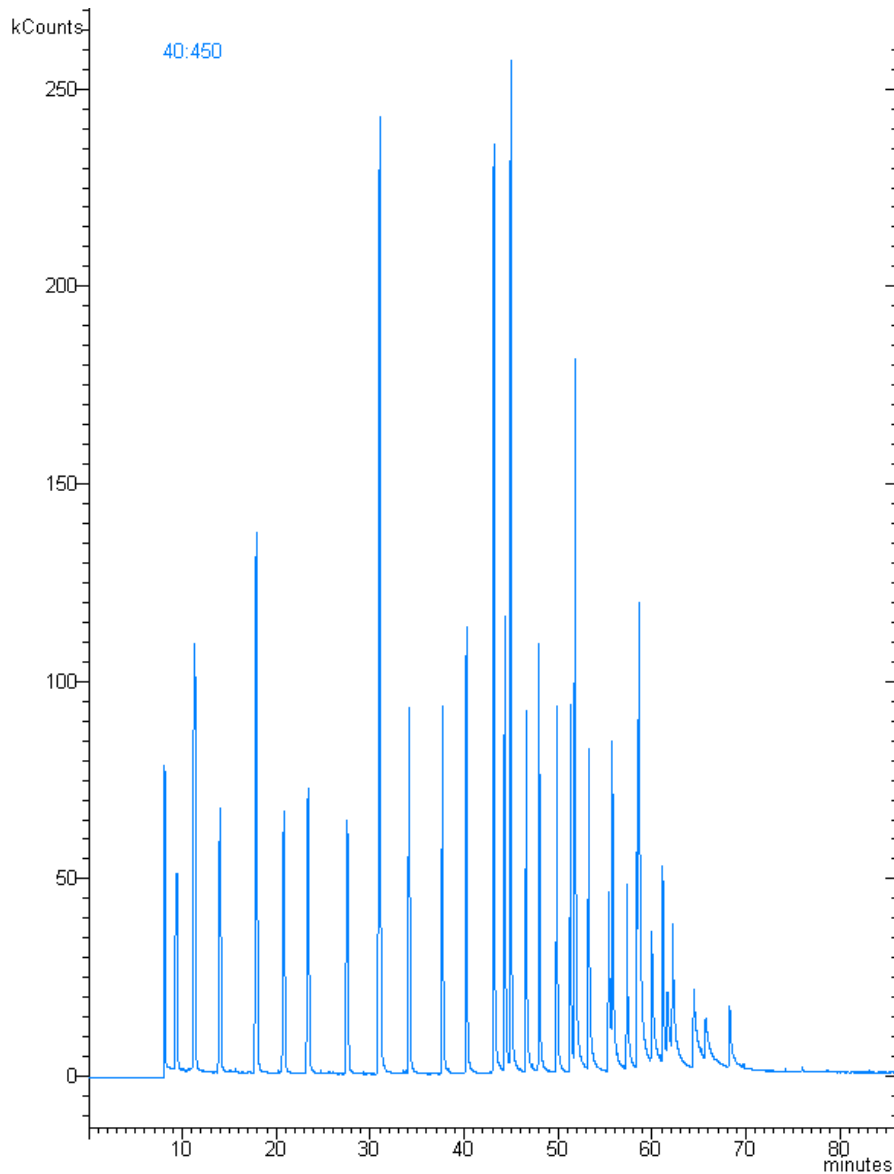
Πίνακας 26: Συγκέντρωση ασταξανθίνης ανα καλλιέργεια για κάθε πηγή αζώτου

Θερμοκρασία (°C)	Συγκέντρωση Ασταξανθίνη (mg/L)
21	0.72
25	0.77
27	0.85
30	1.98

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαπιστώνεται πως παράγεται όχι μόνο ανα κύτταρο, αλλά και ανα λίτρο καλλιέργειας περισσότερη ασταξανθίνη στην περίπτωση των 30 °C. Στη συνέχεια ακολουθούν οι θερμοκρασίες των 21 °C και 27 °C, ενώ τελευταία βρίσκεται η θερμοκρασία των 25 °C, όπου το μικροφύκος παράγει τη λιγότερη συγκριτικά ασταξανθίνη.

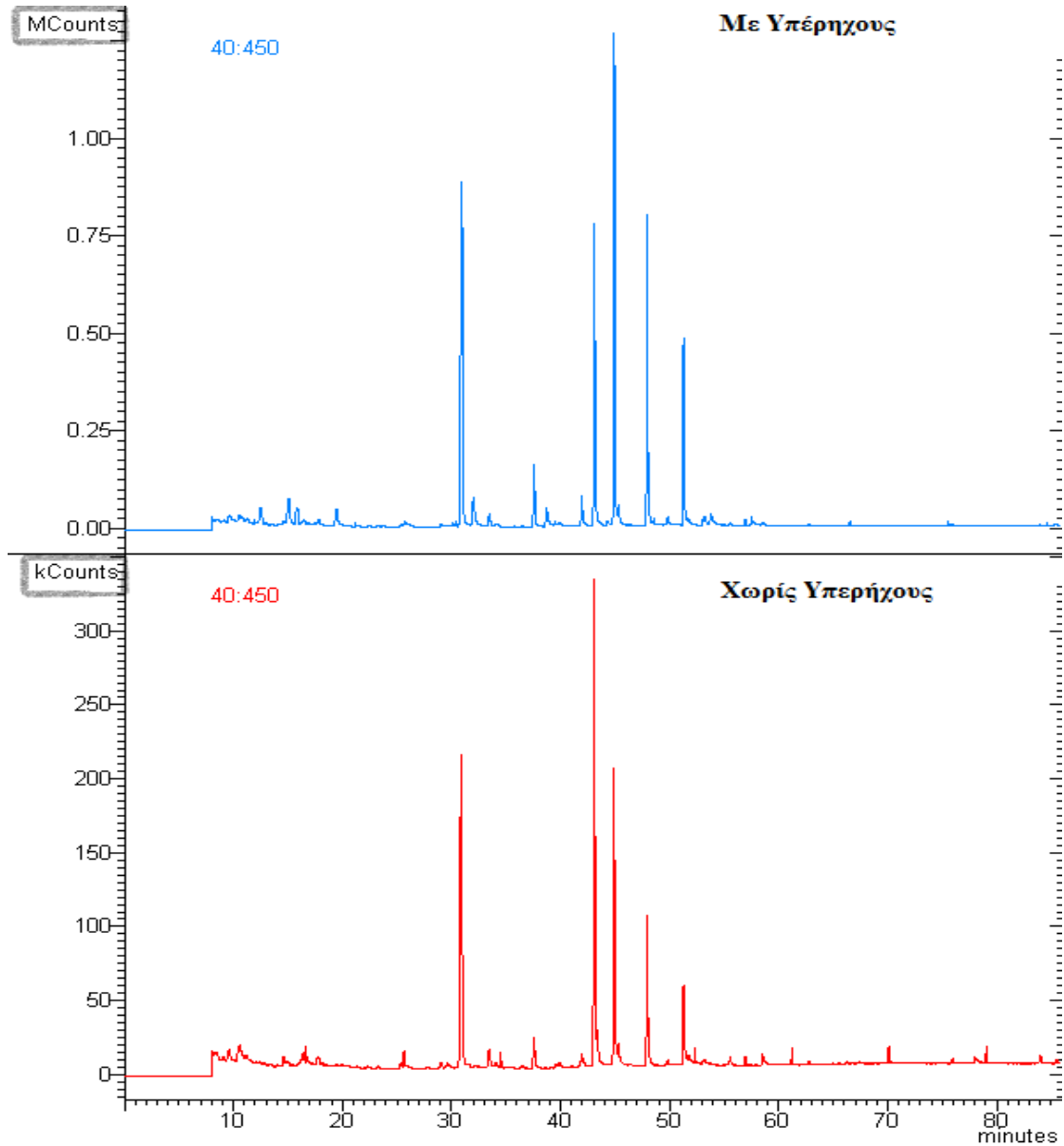
5. Παραγωγή Λιπαρών οξέων

Σύμφωνα με τη μέθοδο για τη χρωματογραφική ανάλυση GC-MS μελετήθηκαν χρωματογραφήματα προτύπων μιγμάτων μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων, που βάση αυτών δημιουργήθηκε η καμπύλη αναφοράς της μεθόδου και ένα εκ των οποίων παρουσιάζεται ενδεικτικά παρακάτω.



Διάγραμμα 19: Χρωματογράφημα GC-MS Καμπύλης Αναφοράς ενός πρότυπου δείγματος Μίγματος Εστεροποιημένων Λιπαρών Οξέων

Εκτός αυτών παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα εκχύλισμενων λιπαρών οξέων από το μικροφύκος *Chlorella zofingiensis* με τη χρήση απλής μηχανικής ανάμιξης μέσω vortex, καθώς και εναλλακτικά με τη χρήση συσκευής υπερήχων για διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος.



Διάγραμμα 20: Χρωματογραφήματα GC-MS εκχυλισμένων μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροφυκών με δύο διαφορετικές μεθόδους ομογενοποίησης των αρχικών συστατικών

Παρατηρείται πως το χρωματογράφημα με χρήση υπερήχων εμφανίζει μεγαλύτερες κορυφές (MCOUNTS), σε σχέση με αυτό χωρίς υπερήχους (kCOUNTS).

Παρατηρείται ότι οι βασικές κορυφές που εμφανίζονται στο χρωματογράφημα της *Chlorella zofingiensis* είναι αυτές των λιπαρών οξέων C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 και C18:3. Η ταυτοποίησή τους πραγματοποιήθηκε από τη βιβλιοθήκη του ανιχνευτή φασματοσκοπίας μάζας, που σύγκρινε τα ιοντικά θραύσματα που προέκυψαν στο διάγραμμα 20.

Συγκριτικά ελέγχθηκαν τα κεντρικά λιπαρά οξέα του μικροφύκου, δηλαδή τα κορεσμένα 16:0 και 18:0, αλλά και τα ακόρεστα 18:1, 18:2, 18:3 και παρατηρήθηκε 35% κατά μέσο όρο αύξησή τους με τη χρησιμοποίηση των υπερήχων, ως επιπρόσθετο στάδιο για τη λύση των κυττάρων, αντί για απλή ανάμειξη με τον οργανικό διαλύτη, ώστε απλά να διαχυθούν και αργότερα να απομονωθούν από αυτόν.

6. Οπτική Παρατήρηση Στελέχους *Chlorella zofingiensis*

Η αυτότροφη καλλιέργεια του μικροφύκου, που χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό εμβόλιο κυττάρων για ετερότροφη καλλιέργεια, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, παρατηρείται ότι αρχικά εμφανίζει πράσινο χρώμα, ενώ για παραπάνω από 10 ημέρες κίτρινο.

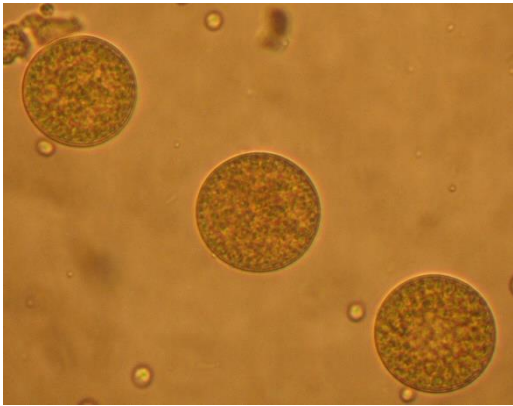


Εικόνα 34: Αυτότροφες καλλιέργειες κυττάρων 3 και 13 ημερών αντίστοιχα

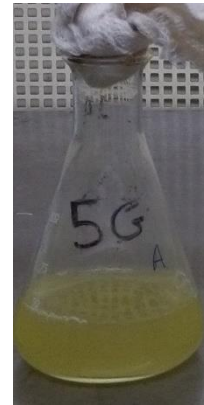
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Οπτικές παρατηρήσεις

Η ετερότροφη ανάπτυξη των κυττάρων του μικροφύκου *Chlorella zofingiensis*, όπως παρατηρήθηκε από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Εικόνα 35), δείχνει τόσο τη σφαιρική και μονοκυτταρική τους δομή, ενώ παρατηρήθηκε από τις ετερότροφες καλλιέργειες (Εικόνα 36) το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα, όπως έχει ήδη αναφερθεί και από τη βιβλιογραφία. [7]



Εικόνα 36: Κύτταρα μικροφύκου *Chlorella zofingiensis* ετερότροφης καλλιέργειας, παρατηρούμενα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο



Εικόνα 35: Ετερότροφη καλλιέργεια μικροφύκου *Chlorella zofingiensis* με πηγή άνθρακα 5 g/L γλυκόζης

Το μικροφύκος αναπτύχθηκε πρωταρχικώς αυτότροφα για 3 ημέρες και απέκτησε το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα, ενώ για περισσότερες των 10 ημερών τα κύτταρα αυτά της αυτότροφης καλλιέργειας γινόντουσαν κίτρινα. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι έγιναν γηραιότερα, όπως παρουσιάστηκε στην Εικόνα 33 και απαιτούσαν άμεση ανακαλλιέργεια σε φρέσκο θρεπτικό υλικό για την επιβίωσή τους. Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώθηκε εκ των υστέρων και από την εταιρεία CCAP που προμήθευσε το μικροφύκος.

2. Ετερότροφη Ανάπτυξη Μικροφύκους

Σύμφωνα με τη χρονική πορεία ανάπτυξης του μικροφύκου σε διάφορες πηγές άνθρακα, που παρουσιάζεται στα Διαγράμματα 2, 3 και 5, επιβεβαιώθηκε, όπως εμφανίστηκε και σε αντίστοιχη δημοσίευση, πως ακολουθείται το πρότυπο ανάπτυξης των μικροοργανισμών με τις φάσεις: λανθάνουσα, εκθετική, στασιμότητας και θανάτου. [14]

Συγκεκριμένα, για ετερότροφη ανάπτυξη σε γλυκόζη, το μικροφύκος εμφανίζει μία λανθάνουσα φάση ανάπτυξης μέχρι 1 ημέρα σε όλα τα διαγράμματα. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν ελάχιστες εξαιρέσεις καλλιέργειών, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν για εμβολιασμό κύτταρα που έτυχε να είναι από παλαιότερη καλλιέργεια, οπότε απαιτούσαν έως και 4 ημέρες χρόνο προσαρμογής (λανθάνουσα φάση) πρώτου περάσουν στην επόμενη φάση.

Στη συνέχεια, εμφανίζεται εκθετική ανάπτυξη όπου στην περίπτωση του οξικού οξέος (Διάγραμμα 2) διαρκεί 5 ημέρες και καταναλώνεται πλήρως. Όσον αφορά στη ξυλόζη (Διάγραμμα 3) τα μικροφύκη την καταναλώνουν γρηγορότερα απότι την γλυκόζη, επειδή για ίδια συγκέντρωση 3 g/L η εκθετική φάση της γλυκόζης (Διάγραμμα 5) διαρκεί 1 ημέρα παραπάνω. Παρά την ταχύτερη κατανάλωση, η ξυλόζη πραγματοποιεί περιέργως μικρότερη κυτταρική παραγωγή, γεγονός που δεν την καθιστά βέλτιστη πηγή άνθρακα. Επίπροσθετα πρέπει να σημειωθεί πως για ίδιο αρχικό εμβόλιο κυττάρων, όπως και στις υπόλοιπες καλλιέργειες διαφορετικών πηγών άνθρακα, εκείνες που περιείχαν ξυλόζη, παρατηρήθηκε λανθάνουσα φάση διάρκειας 4 ημερών (Διάγραμμα 4), πιθανότατα λόγω περισσότερου χρόνου προσαρμογής των κυττάρων σε αυτό το θρεπτικό υλικό.

Μετά το πέρας της φάσης αυτής μηδενίζονται οι εκάστοτε πηγές άνθρακα και επειδή το σύστημα ανάπτυξης του είναι διαλείποντος έργου και δεν του προστίθεται παραπάνω θρεπτικό υλικό, το μικροφύκος διανύει τη στάσιμη φάση ανάπτυξης του. Πρακτικά, κατά τη φάση στασιμότητας, εμφανίζεται σταθερή γραμμή (πλατό) στο κάθε διάγραμμα, οπότε έχει σταματήσει η ανάπτυξη των κυττάρων και διακόπτεται και συλλέγεται η κυτταροκαλλιέργεια, διότι τότε παράγονται οι δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως η ασταξανθίνη. Καταληκτικά, η παράλληλη εμφάνιση της φάσης στασιμότητας με το μηδενισμό της βιομάζας επιβεβαιώνει πως ο λόγος διακοπής της ανάπτυξης των κυττάρων είναι η εξάντληση του θρεπτικού τους υλικού.

3. Βελτιστοποίηση Παραγωγής Βιομάζας Μικροφύκους

3.1 Βέλτιστη Πηγή Άνθρακα

Σε πρώτη φάση οι διαφορετικές πηγές άνθρακα που δοκιμάστηκαν προς την ανάπτυξη του μικροφύκους, όπως φαίνονται στο Διάγραμμα 6 κατέληξαν στο ότι, η καταλληλότερη πηγή άνθρακα είναι η γλυκόζη, όπως έχει ήδη αναφερθεί για το ίδιο μικροφύκος και θρεπτικό υλικό από τη βιβλιογραφία.[50], [51]

Συγκεκριμένα, στο Διάγραμμα 6 είναι εμφανές πως η συγκεντρωση γλυκόζης (3 g/L) με τη μικρότερη παραγωγή μικροφυκών της πηγής άνθρακα αυτής, είναι σαφώς καλύτερη από τις βέλτιστες συγκεντρώσεις ξυλόζης (3 g/L) και οξικού οξέος (1 g/L). Επομένως η καλύτερη πηγή άνθρακα για ανάπτυξη βιομάζας είναι η **γλυκόζη**.

Η αφομοίωση, επίσης, της γλυκόζης από μικροφύκη της οικογένειας *Chlorella* είναι η ιδανικότερη και από μεταβολικής πλευράς. Τα μικροφύκη αυτά, διαθέτουν ένα επαγωγικό σύστημα εξοζών-πρωτονίων, που ανταλλάσει γρήγορα μόρια ATP καταναλώνοντας εξόζες (γλυκόζη) και πρωτόνια, βελτιστοποιώντας έτσι την κατανάλωση γλυκόζης και ανάπτυξης του κυττάρου, στις τιμές οξύτητας (pH=6.5) που αναπτύσσεται το στέλεχος που ερευνάται. [58]

Πιθανότητα λόγω δομής σακχάρων ακολουθεί κατά σειρά η ξυλόζη, αλλά είναι γεγονός πως σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες ή μικρότερες των 3 g/L, όπως φαίνεται στον Πίνακα 21, το μικροφύκος εμφανίζει ελάχιστη ανάπτυξη. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ετερότροφη κατανάλωση ξυλόζης για ανάπτυξη μικροφυκών του γένους *Chlorella* αποτελεί δύσκολο εγχείρημα, ενώ πιστοποιείται επίσης πως παρουσιάζει μικρούς ρυθμούς ανάπτυξης, όπως εμφανίστηκε και στην παρούσα έρευνα. [101], [102]

Όσον αφορά στο οξικό οξύ, η αφομοίωσή του σε συγκεντρώσεις ανώτερες του 1 g/L, αποτέλεσε τροχοπέδη για την ανάπτυξη του *C.zofingiensis*, ενώ για μικρότερες τιμές δε διαπιστώθηκε η υψηλή παραγωγικότητα κυττάρων, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 20. Ειδικότερα, το οξικό οξύ αποτελεί τοξικό συστατικό της καλλιέργειας σε υψηλές συγκεντρώσεις. Εκτός αυτού, μπορεί να επηρεάσει και την οξύτητα της καλλιέργειας, διότι προστίθεται υπό τη μορφή οξικού νατρίου και δίσταται σε CH_3COO^- που καταναλώνεται ως πηγή άνθρακα και Na^+ , ώστε τελικά να αυξάνει το pH της καλλιέργειας και να παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μικροφυκών, όπως αναφέρεται και στην ανάλογη βιβλιογραφία. Ανάμεσα στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν βρέθηκε πως η βέλτιστη συγκέντρωση του οξικού οξέος αποτελεί το 1 g/L, γεγονός που πιστοποιεί

τα παραπάνω, αλλά δεν αρκεί για να ξεπεράσει την παραγωγή βιομάζας των υπόλοιπων πηγών άνθρακα. [62]

3.2 Βέλτιστη Συγκέντρωση Γλυκόζης

Παρατηρώντας το διάγραμμα ανάπτυξης του μικροφύκου σε πηγή γλυκόζης (Διάγραμμα 6) είναι εύλογο να τονιστεί ότι το *C. zofingiensis* εμφανίζει λανθάνουσα φάση 1 ημέρας, εκθετική φάση 7 ημερών και στατική φάση 1 ημέρας. Αν και το χρονικό διάστημα αυτών των σταδίων παραμένει σταθερό, ωστόσο διαπιστώνεται διαφορετικός ρυθμός εκθετικής ανάπτυξης για την εκάστοτε συγκέντρωση γλυκόζης και συνεπώς διαφορετικές παραγωγικότητες βιομάζας μικροφυκών.

Συγκεκριμένα, για τις διάφορες συγκεντρώσεις γλυκόζης που εξετάστηκαν όπως φαίνονται στο Διάγραμμα 4, εξάγεται πως η αύξηση της συγκέντρωσης γλυκόζης στα όρια των 3-15 g/L συνεπάγεται αύξηση της κυτταρικής παραγωγής αλλά και του ρυθμού ανάπτυξης, γεγονός που συσχετίζει άμεσα την παραγωγή βιομάζας των μικροφυκών, με την αύξηση της πηγής άνθρακα. Ωστόσο, είναι γεγονός πως η βέλτιστη συγκέντρωση γλυκόζης είναι **15 g/L**, ενώ για τιμές παραπάνω από αυτή, παρεμποδίζεται η ανάπτυξη του μικροφύκου, όπως φαίνεται από τις παραγωγικότητες των 20 g/L και 30 g/L. Η παρεμπόδιση από τον ίδιο το υπόστρωμα ανάπτυξης, πιστοποιείται και από άλλα είδη *Chlorella* που έχουν δοκιμαστεί, τα οποία εμφανίζουν παρεμπόδιση για συγκέντρωση γλυκόζης μεγαλύτερη των 25 g/L και αποτελεί ένα από τα μειονεκτήματα της ετερότροφης ανάπτυξης. [57], [69]

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, επίσης αξίζει να τονιστεί πως, η βέλτιστη τιμή γλυκόζης για μιξότροφη καλλιέργεια του στελέχους αυτού ήταν 30 g/L, επειδή πιθανότατα η ύπαρξη φωτός παράγει αρχικά περισσότερα κύτταρα με αποτέλεσμα να μπορούν να αφομοιώσουν περισσότερη γλυκόζη και συνεπώς να παράξουν περισσότερη βιομάζα. [103]

3.3 Συνδυασμός Πηγών Άνθρακα

Η μέγιστη κυτταρική παραγωγικότητα (0.15 g/L) που προέκυψε από το συνδυασμό ξυλόζης και γλυκόζης, δηλαδή των δύο πιθανότερων πηγών άνθρακα που μπορούν να βρεθούν σε υδρολυμένη λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα, ήταν μικρότερη από τις βέλτιστες κάθε καθαρής πηγής οξικού οξέος (0.37 g/L), ξυλόζης (0.60 g/L) και γλυκόζης (3.33 g/L). Το γεγονός αυτό είναι λογικό, καθώς στα μικροφύκη του γένους *Chlorella* η ετερότροφη κατανάλωση ξυλόζης για παραγωγή βιομάζας αποτελεί από μόνη της μία δοκιμασία, η οποία δε συγκρίνεται στην ανάπτυξη του κυττάρου με τη γλυκόζη. Έτσι, η κατανάλωση ταυτόχρονα τόσο πεντοζών (ξυλόζη), όσο και εξοζών (γλυκόζη) είχε αμελητέα παραγωγή κυττάρων καθώς είναι πιθανό να προκαλεί μια πίεση στον καταβολισμό των κυττάρων των μικροφυκών με αποτέλεσμα την ελάχιστη ανάπτυξή τους.

3.4 Βέλτιστη Πηγή Αζώτου

Σε δεύτερη φάση εξετάστηκαν διάφορες πηγές αζώτου σε ίδια συγκέντρωση αυτού, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση της γλυκόζης ως πηγή άνθρακα. Σύμφωνα με το Διάγραμμα 7, διαπιστώθηκε πως ιδανικότερη είναι το **αμμώνιο** και στη συνέχεια η ουρία, ενώ το νιτρικό και η γλυκίνη αποτελούν χαμηλότερης παραγωγικότητας θρεπτικά συστατικά. Τα αποτελέσματα αυτά για το στελέχος *C. zofingiensis* έρχονται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, όσον αφορά στο αμμώνιο και το δεσμό $\text{NH}_4\text{-N}$, ως τον πιο εύκολο να αφομοιωθεί από τα μικροφύκη. Η αφομοίωση της ουρίας, ως δεύτερη κατά σειρά καλύτερη πηγή αζώτου, αποτελεί πλεονέκτημα του στελέχους, διότι δε συνηθίζεται από πολλά μικροφύκη και μπορεί να οφείλεται σε ειδικά γονίδια όπως η ουαλάση, που εμφανίζονται μόνο σε στελέχη του μικροφύκου *Chlorella*. [65], [67]

Συγκριτικά με την κατανάλωση γλυκόζης (Διάγραμμα 8) που είναι κοινή (7 g/L) σε όλες τις πηγές αζώτου που δοκιμάστηκαν, είναι αντιληπτό πως το αμμώνιο ενώ μεταβολικά συνεισφέρει στην ανάπτυξη των κυττάρων, δε συμβάλει στην κατανάλωση γλυκόζης σε σχέση με τη γλυκίνη και την ουρία. Αυτό μεταβολικά συμβαίνει, διότι το μικροφύκος προτιμάει την κατανάλωση του αμμωνίου, εφόσον διαθέτει τον εύκολο προς διάσπαση δεσμό $\text{NH}_4\text{-N}$ και δεν έχει άλλα αποθέματα ενέργειας (ATP) για την κατανάλωση της γλυκόζης. Στην περίπτωση της ουρίας, υπάρχει ένας ενδιάμεσος καταβολισμός τόσο ουρίας, όπως αναπτύχθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, όσο και γλυκόζης, αφού το κύτταρο είναι ικανό να δώσει πλέον αποθέματα ενέργειας για αυτή την πηγή άνθρακα. Η γλυκίνη από την πλευρά της επειδή δε διευκολύνει την ανάπτυξη του κυττάρου (Διάγραμμα 7) παραπέμπει το μικροφύκος στο να καταβολίσει κυρίως τη γλυκόζη.

Συνεπώς, είναι αντιληπτό πως οι οργανικές πηγές αζώτου (γλυκίνη και ουρία) συνοδεύονται από μεγαλύτερη κατανάλωση γλυκόζης, σε σχέση με τις υπόλοιπες για το στέλεχος που εξετάζεται, οπότε πρέπει να ληφθούν υπόψη σε μετέπειτα κυτταροκαλλιέργειες.

3.5 Βέλτιστη Θερμοκρασία Ανάπτυξης

Τελευταίο στάδιο της βελτιστοποίησης της φάσης ανάπτυξης της βιομάζας των μικροφυκών αποτέλεσε η σύγκριση των θερμοκρασιών όπως παρουσιάστηκε στο Διάγραμμα 10. Σύμφωνα με αυτό το συγκεκριμένο στέλεχος *C.zofingiensis* αναπτύσσεται εμφανώς καλύτερα στους **25 °C**. Δεν διαπιστώνεται κάποια σύγχρονη βιβλιογραφία σχετικά με την καλύτερη δυνατή θερμοκρασία, παρα μόνο αναφορά για τους 30 °C προς παραγωγή ασταξανθίνης. Επιπροσθέτως, υπάρχουν αναφορές σχετικά με την αυτότροφη ανάπτυξη στους 25 °C και 27 °C και πως η απομάκρυνση από τις τιμές αυτές εμποδίζει την ανάπτυξη του μικροφύκου, πράγμα που πιστοποιήθηκε και από την παρούσα έρευνα.[14], [50], [51]

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 11, είναι αντιληπτό πως οι 21 °C οδηγούν στην κατανάλωση της περισσότερης γλυκόζης και αυτό δικαιολογείται από την ανάγκη του στελέχους για επιβίωση στις δύσκολες συνθήκες ανάπτυξης που απομακρύνονται πολύ από τα φυσιολογικά επίπεδα των 25 °C και αυτό φαίνεται καθώς δεν παράγονται νέα κύτταρα (Διάγραμμα 10). Αντίστοιχα και στους 27 °C που το μικροφύκος εμφανίζει παρόμοια ανάπτυξη με τους 21 °C, αλλά καταναλώνει ελάχιστη ποσότητα γλυκόζης προς τον πολλαπλασιασμό του, γεγονός που δείχνει ότι μπορεί να ανταπεξέλθει πιο εύκολα στη θερμοκρασία αυτή. Ταυτόχρονα, στους 30 °C που το μικροφύκος παρουσιάζει τη χαμηλότερη ανάπτυξη (Διάγραμμα 10) καταναλώνεται περισσότερη γλυκόζη από τους 27 °C επειδή βρίσκεται σε συνθήκες στρες και προσπαθεί να επιβιώσει. Καταληκτικά, είναι γεγονός πως το στέλεχος εμφανίζει τη δεύτερη καλύτερη κατανάλωση γλυκόζης, αλλά και τη βέλτιστη παραγωγή κυττάρων (Διάγραμμα 10) στους 25 °C, διότι το στέλεχος βρίσκεται σε καλύτερες συνθήκες ανάπτυξης και είναι ικανό να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί στα υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με τις άλλες θερμοκρασίες.

Αξίζει να παρατηρηθεί στο σημείο αυτό, πως η κατανάλωση γλυκόζης από το κύτταρο δε μεταφράζεται πάντα σε μεγαλύτερη παραγωγή κυττάρων, καθώς μπορεί να καταναλώνει τη γλυκόζη όταν βρίσκεται σε δυσμενές περιβάλλον για την παραγωγή μεταβολιτών που συμβάλλουν στη επιβίωσή του.

3.6 Βέλτιστες Συνθήκες Ετερότροφης Ανάπτυξης Μικροφύκου *Chlorella zofingiensis*

Σύμφωνα με όσα ειπώθηκαν παραπάνω, ακολουθούν οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης για κάθε εξεταζόμενο παράγοντα του στελέχους *C.zofingiensis* (CCAP 211/14) σε ετερότροφες συνθήκες.

Πίνακας 27: Συγκεντρωτικός πίνακας βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης κυττάρων *C.zofingiensis*

Παράγοντας Ετερότροφης Καλλιέργειας	Βέλτιστη Επιλογή
Πηγή Άνθρακα	Γλυκόζη
Συγκέντρωση γλυκόζης	15 g/L
Πηγή Αζώτου	Αμμώνιο
Θερμοκρασία	25 °C

Σημειώνεται ότι οι παραπάνω επιλογές αποτελούν τις βέλτιστες για κάθε παράγοντα ανάπτυξης βιομάζας ξεχωριστά.

3.7 Υδρόλυμα υπολλειμμάτων καλαμποκιού

Η χρησιμοποίηση της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας αποτελεί καινοτομία για το πεδίο των μικροφυκών, καθώς αποτελεί έναν τρόπο εκμετάλλευσης των αποβλήτων, ενώ στον αντίποδα εγκυμονεί κινδύνους και παρεμποδίσεις για τα κύτταρα αυτά. Πραγματοποιήθηκε μια πρωταρχική μελέτη για το στέλεχος *Chlorella zofingiensis* και για τα υδρολυμένα υπολλείμματα καλαμποκιού, ως πηγή άνθρακα.

Σύμφωνα με το χρωματογράφημα που λήφθηκε, το μοναδικό σάκχαρο, που προκύπτει από την υδρόλυση της προκατεργασμένης βιομάζας, ήταν η γλυκόζη και όπως αναφέρεται στον Πίνακα 22 σε ποσοστό 48 %w/w επί της μάζας της προεπεξεργασμένης βιομάζας.

Η διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης προτάθηκε να είναι οι 24 h, μετά το πέρας των οποίων συλλέχθηκε το προκύπτον υδρόλυμα και προσδιορίστηκε η παραγόμενη γλυκόζη. Ο χρόνος αυτός επιλέχθηκε, διότι για 150 λ ενζύμου, συγκέντρωσης 105.8 mg/mL, παραγόταν σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκόζης σε σχέση με τη βέλτιστη που παρουσιάστηκε προηγουμένως για τα μικροφύκη.

Έτσι, το προκύπτον ενζυμικό υδρόλυμα αραιώθηκε κατάλληλα και αναμίχθηκε με θρεπτικό υλικό προς την κατανάλωσή του από τα μικροφύκη, αλλά τελικώς με ελάχιστη κυτταρική ανάπτυξη (Διάγραμμα 13), επιβάλλοντας την περαιτέρω επεξεργασία του υδρολύματος.

Ουσιαστικά οι ουσίες που εμποδίζουν την κατανάλωση του υδρολύματος αυτού από τα μικροφύκη, ονομάζονται παρεμποδιστές και στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν οι φαινολικές ενώσεις.

Η αφορμή για τη συνέχεια ήταν μία έρευνα για την αποτοξικοποίηση του ενζυμικού υδρολύματος, μέσω προσρόφησης φαινολικών ουσιών σε ενεργό άνθρακα και κατανάλωσης του υδρολύματος αυτού από μύκητες. [80]

Ακολουθώντας τη μέθοδο αυτή το υδρόλυμα απαλλάχθηκε πρακτικά εντελώς από φαινολικές ουσίες, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 23, και επανατροφοδοτήθηκε στα μικροφύκη. Η απομάκρυνση των φαινολικών ενώσεων από το ενζυμικό υδρόλυμα οδήγησε ταυτόχρονα και στη μείωση της συγκέντρωσης γλυκόζης κατά 34.2 %, γεγονός το οποίο δε συμφέρει σύμφωνα με τα παραπάνω, καθώς ελαττώνεται η κεντρική πηγή άνθρακα που μπορεί να τροφοδοτήσει τα μικροφύκη. Καταληκτικά, η καλλιέργεια που προέκυψε από την τροφοδότηση αυτή παρήγαγε πρακτικά την ίδια συγκέντρωση μικροφυκών (0.11 g/L), δείχνοντας πως οι φαινολικές ουσίες δεν αποτελούν παρεμποδιστή της ανάπτυξης των κυττάρων και η όλη διαδικασία αποζητά περαιτέρω μελέτη.

4. Παραγωγή Ασταξανθίνης

4.1 Πηγή Άνθρακα

Η παρούσα ερευνητική εργασία δε στόχευε στη βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας σε ασταξανθίνη.

Ωστόσο, ύστερα από αναλύσεις των δειγμάτων καλλιέργειας που βρισκόντουσαν στη στάσιμη φάση ανάπτυξής τους, και συγκεκριμένα συγκρίνοντας δύο διαφορετικές πηγές άνθρακα ίδιου λόγου άνθρακα προς άζωτο (C/N), όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 24, είναι εμφανές πως η **γλυκόζη** είναι η μόνη που επιτρέπει την παραγωγή ασταξανθίνης από το μικροφύκος. Το γεγονός αυτό δείχνει πως η γλυκόζη είναι η ιδανικότερη πηγή άνθρακα προς παραγωγή του καροτενοειδούς αυτού, όπως επισημαίνεται και στη βιβλιογραφία. [50]

Αντίθετα, για διαφορετικές μεταξύ τους συγκεντρώσεις γλυκόζης και λόγων (C/N), όπως φαίνεται στα Διαγράμματα 15 και 16, παρατηρείται πως όσο αυξάνεται ο λόγος αυτός τόσο βελτιώνεται η παραγωγικότητα κάθε κυττάρου σε ασταξανθίνη και συνεπώς η παραγόμενη ασταξανθίνη σε κάθε κυτταροκαλλιέργεια, πράγμα το οποίο έχει αναφερθεί. [51] Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως για 30 g/L γλυκόζης το μικροφύκος παράγει τη μεγαλύτερη ποσότητα ασταξανθίνης ανά ξηρό κύτταρο, δηλαδή 18.62 mg/g. Αξίζει να τονιστεί στο σημείο αυτό ότι η βέλτιστη συγκέντρωση γλυκόζης για παραγωγή κυττάρων (15 g/L), δε συμπίπτει με αυτή για τη βέλτιστη παραγωγή ασταξανθίνης για το στέλεχος αυτό.

Σχετικά με τη βιβλιογραφία που έχει αναπτυχθεί, ορισμένα ετερότροφα στελέχη *C.zofingiensis*, συστήματος διαλείποντος έργου, εμφανίζουν παραγωγές ασταξανθίνης ανα λίτρο καλλιέργειας, ύψους 10.3 mg/L και 10.5 mg/L, για συγκέντρωση γλυκόζης 50 g/L. [51] [50]

Λαμβάνοντας υπόψη τις μέχρι τώρα δημοσιευμένες παραγωγές ασταξανθίνης παρατηρείται πως η τιμή που προέκυψε είναι αρκετά μεγαλύτερη. Προκειμένου να εξεταστεί αν όντως αυτή η τιμή ανταποκρίνεται μόνο στην ασταξανθίνη, οπότε και έχει επιτευχθεί μία μεγάλη παραγωγή, πρέπει να τεθεί υπό επανεξέταση η μέθοδος ανάλυσης του καροτενοειδούς που εφαρμόστηκε. Μέχρι τότε υπάρχει πιθανότητα, η μέθοδος ανάλυσης της ασταξανθίνης να λαμβάνει υπόψη της όλα τα καροτενοειδή του δείγματος ανάλυσης, καθώς η ακετόνη που προστίθεται, εκχυλίζει όλες τις χρωστικές αυτές, πράγμα το οποίο πρέπει να ελεγχθεί μελλοντικά.

Επομένως, σύμφωνα με όλα τα παραπάνω μπορεί εύλογα να εξαχθεί το συμπέρασμα πως, η καταλληλότερη συγκέντρωση γλυκόζης για παραγωγή ασταξανθίνης, με βάση αυτές που δοκιμάστηκαν για το συγκεκριμένο στέλεχος, είναι τα **15 g/L**. Η απόφαση αυτή λαμβάνεται, διότι αν και δεν οδηγεί το εκάστοτε κύτταρο στην καλύτερη παραγωγή ασταξανθίνης, μπορεί να αυξήσει την βιομάζα κυττάρων βέλτιστα, έτσι ώστε τελικά να ξεπεράσει σε παραγωγή ασταξανθίνης ανα όγκο καλλιέργειας, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 16.

4.2 Πηγή Αζώτου

Όσον αφορά στην παραγωγή ασταξανθίνης με διαφορετική πηγή αζώτου, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 17, για σταθερή συγκέντρωση γλυκόζης στα 7 g/L, παρόλο που αυξάνεται η ανάπτυξη του κυττάρου με το αμμώνιο, η παραγωγή ασταξανθίνης από αυτό είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση του **νιτρικού**. Αυτό γίνεται, επειδή η ύπαρξη νιτρικού ως πηγή αζώτου δυσχεραίνει την αφομίωση αζώτου, σε σχέση με το αμμώνιο και στις συνθήκες αυτές μειωμένου αζώτου ευνοείται η παραγωγή ασταξανθίνης, όπως έχει σημειωθεί και από τη βιβλιογραφία. Τέλος, η περίπτωση της ουρίας ενώ βρίσκεται ενδιάμεσα, όσον αφορά στην παραγωγή κυττάρων, δεν οφείλει την παραγωγή του καροτενοειδούς πιθανότατα επειδή δε αντιμετωπίζει το φύκος δύσκολες συνθήκες ανάπτυξης. [104]

4.3 Θερμοκρασία επώασης

Στο επίπεδο των θερμοκρασιών επώασης του μικροφύκου, σύμφωνα με το Διάγραμμα 18, η παραγωγή ασταξανθίνης ευνοείται για τιμές ανώτερες των 25 °C μέχρι και 30 °C, αφού σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες αυτών δε μπορεί να επιβιώσουν τα κύτταρα, όπως έχει παρατηρηθεί. Συγκεκριμένα, η μέγιστη παραγωγικότητα του καροτενοειδούς στους **30 °C** είναι λογική διότι το *C.zofingiensis* διανύει μία περίοδο δύσκολων συνθηκών ανάπτυξης οπότε για την προστασία και επιβίωσή του από το θερμικό στρες παράγει ασταξανθίνη. Στον αντίποδα, η ανάπτυξη του υπό τη βέλτιστη θερμοκρασία των 25 °C δίνει τη λιγότερη ασταξανθίνη, αφού δεν είναι αναγκαία η παραγωγή καροτενοειδούς. Καταληκτικά, για θερμοκρασία επώασης των μικροφυκών 21 °C δεν παράγεται ασταξανθίνη, σύμφωνα με την παραπάνω βιβλιογραφία, ενώ στην περίπτωση που εξετάστηκε για τους 21 °C και 27 °C, εφόσον βρίσκονται τα κύτταρα σε κοντινές της βέλτιστης, θερμοκρασίες ανάπτυξης, δεν αναγκάζονται να παράγουν υψηλές ποσότητες από το καροτενοειδές. [103]

4.4 Σχολιασμός Συνθηκών Ετερότροφης Παραγωγής Ασταξανθίνης Μικροφύκους *Chlorella zofingiensis*

Σύμφωνα με όσα έχουν ειπωθεί ως τώρα, δεν είναι απολύτως ξεκάθαρες οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής ασταξανθίνης για κάθε εξεταζόμενο παράγοντα του στελέχους *C.zofingiensis* (CCAP 211/14) σε ετερότροφες συνθήκες.

Παρ'όλα αυτά, μπορεί σίγουρα να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα η γλυκόζη σε συγκέντρωση 15 g/L, αποδίδοντας το βέλτιστο αριθμό κυττάρων, που μπορεί να μην παράγουν ανα κύτταρο τη μεγαλύτερη ποσότητα ασταξανθίνης, αλλά ως καλλιέργεια δίνουν το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Με κεντρικό άξονα τη συγκέντρωση αυτή μπορούν να εξεταστούν τόσο η πηγή αζώτου, με προτιμότερη το νιτρικό και οι διάφορες θερμοκρασίες επώασης, με προτιμότερη τους 30 °C.

Επομένως, η ανάδειξη του «σημείου τομής» των δύο παραγωγών ή των συνθηκών κάτω από τις οποίες το *Chlorella zofingiensis* θα παράξει τη βέλτιστη δυνατή βιομάζα κυττάρων, τα οποία θα αποδώσουν την υψηλότερη ποσότητα ασταξανθίνης, αποτελεί το επόμενο βήμα του μεταβολίτη αυτού.

5. Παραγωγή Λιπαρών Οξέων

Στο πεδίο των λιπαρών οξέων δεν πραγματοποιήθηκε κάποια περαιτέρω βελτιστοποίηση, αλλά παρουσιάζεται μια γενική εικόνα των ετερότροφα παραγόμενων λιπαρών οξέων του μικροφύκου.

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 20 και στα δύο χρωματογραφήματα εμφανίζονται κορυφές των κεντρικών λιπαρών οξέων του στελέχους *Chlorella zofingiensis* και συγκεκριμένα των C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 και C18:3 όπως έχει παρατηρηθεί βιβλιογραφικά. Το αποτέλεσμα αυτό είναι φυσιολογικό εφόσον το στέλεχος που αναλύθηκε είναι του γλυκού νερού και ανοίκει στην οικογένεια των πράσινων *Chlorophyta*, τα οποία παράγουν κυρίως λιπαρά οξέα μικρής ανθρακικής αλυσίδας και συγκεκριμένα C₁₆ και C₁₈, τόσο κορεσμένα και ακόρεστα. Τα συγκεκριμένα λιπαρά οξέα δεν έχουν κάποια ιδιαίτερη θρεπτική αξία και έτσι μπορούν να αξιοποιηθούν, για την παραγωγή βιοντήζελ όπως διαπιστώνει και η αντίστοιχη βιβλιογραφία. Ωστόσο, τα λιπαρά οξέα, C18:2 και C18:3, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα τροφίμων, εάν εκχυλιστούν διαφορετικά, διότι στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε το χλωροφόρμιο στην απομόνωσή τους. [13], [14], [105]

Συμπεραίνεται επίσης, πως η χρησιμοποίηση της συσκευής υπερήχων ως επιπρόσθετο στάδιο διάρρηξης του κυτταρικού τοιχώματος των κυττάρων του μικροφύκου αποτελεί το καλύτερο δυνατό βήμα για την διάχυση του εσωκυτταρικού υγρού με το σύνολο των λιπαρών οξέων, ώστε να απομονωθούν και να μελετηθούν, στη συνέχεια της μεθόδου.

6. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ

*Για το μικροφύκος *Chlorella zofingiensis**

Όσον αφορά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού προτείνεται να γίνουν περαιτέρω έρευνες για τα παρακάτω:

- Εγκλιματισμός κυττάρων στις ετερότροφες συνθήκες: Η προσαρμογή των κυττάρων ανάπτυξης του στελέχους *C.zofingiensis* στις ετερότροφες συνθήκες. Συγκεκριμένα, απαιτείται παρασκευή ετερότροφων κυτταρικών καλλιέργειών για αρχικό εμβόλιο σε καλλιέργειες του μικροφύκου *C.zofingiensis*, ώστε να βελτιωθούν οι συνθήκες ανάπτυξης της επόμενης ετερότροφης καλλιέργειας, καθώς το κύτταρο θα είναι πλέον προσαρμοσμένο στις ετερότροφες συνθήκες.
- Αύξηση της παραγωγής βιομάζας κυττάρων μικροφυκών με τη μετατροπή των διαλείποντος έργου σε ημιδιαλείποντος (fed-batch) με τη διαρκή τροφοδότηση με θρεπτικά συστατικά. Η καλλιέργεια αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί σε βιοαντιδραστήρα και ταυτόχρονα να μεταβάλλονται οι συνθήκες ανάπτυξης μετά τις πρώτες ημέρες, όπου θα έχει παραχθεί αρκετή βιομάζα, ώστε να οφεληθεί περισσότερο η ασταξανθίνη.
- Έλεγχος διαφόρων συγκεντρώσεων αμμωνίου και ουρίας για βέλτιστη ανάπτυξη της βιομάζας του στελέχους, αλλά και της ασταξανθίνης.
- Η προσρόφηση των φαινολικών ενώσεων σε ενεργό άνθρακα μειώνει τη συγκέντρωση γλυκόζης του ενζυμικού υδρολύματος (Πίνακας 23), οπότε απαιτείται η έρευνα καλύτερης μεθόδου αποτοξικοποίησης που να μην μειώνει τη γλυκόζη και να επιτρέπει την κατανάλωση του υδρολύματος από τα κύτταρα.
- Χρήση εναλλακτικών μεθόδων προεπεξεργασίας βιομάζας που καταλήγουν σε υδρόλυμα, σύστασης πιο φιλικής προς τα φύκια.
- Ετερότροφη καλλιέργεια του *C.zofingiensis* με συνδυασμένη πηγή άνθρακα οξικό οξύ-γλυκόζη, ώστε να εξεταστεί αν μπορεί να καταναλωθεί το οξικό οξύ που ανοίκει στην οικογένεια των VFA's.
- Μιξότροφη καλλιέργεια με ξυλόζη ως πηγή άνθρακα, που όπως ανέφεραν και οι [101], [106] μπορεί να πραγματοποιηθεί με παρουσία φωτός σε στελέχη της οικογένειας *Chlorella*. Ταυτόχρονα, η κατανάλωση ξυλόζης επιτρέπει την κατανάλωση ημικυτταρίνης, ανοίγοντας νέους δρόμους στην εκμετάλλευση της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας.

Στο επίπεδο των προϊόντων που εξάγονται από το στέλεχος αυτό αξίζει να ερευνηθούν τα παρακάτω:

- Μελέτη μεθόδου διαχωρισμού και ανάλυσης ασταξανθίνης από τα υπόλοιπα καροτενοειδή.
- Βελτιστοποίηση παραγωγής ασταξανθίνης. Προτείνεται η σταθεροποίηση της γλυκόζης στα 15 g/L για μέγιστη κυτταρική παραγωγικότητα και η εναλλαγή της πηγής αζώτου, αλλά και της θερμοκρασίας επώασης, ώστε να αναδειχθούν οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής ασταξανθίνης.
- Ποσοτικοποίηση παραγόμενων λιπαρών οξέων από το μικροφύκος και μετατροπή τους σε βιοντήζελ, ώστε να σχηματιστεί μια συνολική εικόνα εκμετάλλευσης του μικροφύκου προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

*Για το μικροφύκος *Cryptocodinium cohnii**

Το στέλεχος αυτό αναπτύχθηκε μόνο σε προταρχικό στάδιο στερεής και υγρής ετερότροφης καλλιέργειας και προτείνονται ως μελλοντικοί στόχοι τα παρακάτω:

- Βελτιστοποίηση της ανάπτυξης του σε ετερότροφες συνθήκες, με τη δοκιμασία διαφόρων πηγών άνθρακα, μεταξύ των οποίων και ενζυμικά υδρολυμένα βιομάζα, αλλά και η δοκιμή διαφόρων θερμοκρασιών επώασης.
- Εξέταση των βέλτιστων συνθηκών για την παραγωγή των λιπαρών του μικροφύκου και κυρίως των ω-3 λιπαρών οξέων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] G. Markou and E. Nerantzis, “Microalgae for high-value compounds and biofuels production : A review with focus on cultivation under stress conditions A review with focus on cultivation under stress conditions,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 8, pp. 1532–1542, 2014.
- [2] K. Yamaguchi, “Recent advances in microalgal bioscience in Japan , with special reference to utilization of biomass and metabolites : a review,” pp. 487–502, 1997.
- [3] L. Brennan and P. Owende, “Biofuels from microalgae — A review of technologies for production , processing , and extractions of biofuels and co-products,” vol. 14, pp. 557–577, 2010.
- [4] S. P. Cuellar-Bermudez, I. Aguilar-Hernandez, D. L. Cardenas-Chavez, N. Ornelas-Soto, M. A. Romero-Ogawa, and R. Parra-Saldivar, “Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 8, no. 2, pp. 190–209, 2015.
- [5] A. C. Guedes, H. M. Amaro, and F. X. Malcata, “Microalgae as sources of carotenoids,” *Mar. Drugs*, vol. 9, no. 4, pp. 625–644, 2011.
- [6] P. Spolaore, C. Joannis-cassan, E. Duran, A. Isambert, L. De Génie, and E. C. Paris, “Commercial Applications of Microalgae,” vol. 101, no. 2, pp. 87–96, 2006.
- [7] J. Liu, Z. Sun, H. Gerken, Z. Liu, Y. Jiang, and F. Chen, “Chlorella zofingiensis as an alternative microalgal producer of astaxanthin: Biology and industrial potential,” *Mar. Drugs*, vol. 12, no. 6, pp. 3487–3515, 2014.
- [8] D. S. Complex, C. A. Beam, and M. Himes, “Distribution of Members of the,” pp. 8–15, 1982.
- [9] M. Himes and C. A. Beam, “Further Studies,” vol. 5, pp. 378–380, 1978.
- [10] P. Taylor, “A Cryptocodinium cohnii-like dinoflagellate feeding myzocytotically on the unicellular red alga A Cryptocodinium cohnii -like dinoflagellate feeding myzocytotically on the unicellular red alga Porphyridium sp ., no. October 2014, pp. 37–41.

- [11] T. B. Laboratories, "TUT LE LOEBLICH , B12 10-10," vol. 14, pp. 1–8, 1975.
- [12] D. J. Kyle, "Chapter 8 The Large-Scale Production and Use of a Single-Cell Oil Highly Enriched in Docosahexaenoic Acid," no. Figure 1, pp. 92–107, 2001.
- [13] G. A. Thompson, "Lipids and membrane function in green algae," *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.*, vol. 1302, no. 1, pp. 17–45, 1996.
- [14] J. Liu, J. Huang, Z. Sun, Y. Zhong, Y. Jiang, and F. Chen, "Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 1, pp. 106–110, 2011.
- [15] Y. Jiang, F. Chen, and S.-Z. Liang, "Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*," *Process Biochem.*, vol. 34, no. 6, pp. 633–637, 1999.
- [16] L. Sijtsma, A. J. Anderson, and C. Ratledge, "Alternative Carbon Sources for Heterotrophic Production of Docosahexaenoic Acid by the Marine Alga *Cryptothecodinium cohnii*," 2005.
- [17] A. P. Simopoulos, "Evolutionary aspects of diet , the omega-6 / omega-3 ratio and genetic variation : nutritional implications for chronic diseases," vol. 60, pp. 502–507, 2006.
- [18] D. Guidelines and A. Adults, *Dietary Guidelines for Australian Adults*, no. April. 2003.
- [19] A. B. Developmental, "The Oxford-Durham Study : A Randomized , Controlled Trial of Dietary Coordination Disorder," vol. 115, no. 5, 2015.
- [20] H. Kim, "Biochemical and biological functions of docosahexaenoic acid in the nervous system : modulation by ethanol," vol. 153, pp. 34–46, 2008.
- [21] T. Kato *et al.*, "Influence of omega-3 fatty acids on the growth of human colon carcinoma in nude mice," vol. 187, pp. 169–177, 2002.
- [22] E. E. Birch, S. Garfield, Y. Castañeda, D. Hughbanks-wheaton, R. Uauy, and D. Hoffman, "Visual acuity and cognitive outcomes at 4 years of age in a double-blind , randomized trial of long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented infant formula," pp. 279–284, 2007.

- [23] X. Qiu, “two distinct pathways,” vol. 68, pp. 181–186, 2003.
- [24] P. M. Kris-etherton, W. S. Harris, and L. J. Appel, “AHA Scientific Statement,” pp. 2747–2757, 2002.
- [25] O. P. Ward and A. Singh, “Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production,” *Process Biochem.*, vol. 40, no. 12, pp. 3627–3652, 2005.
- [26] C. To, F. Security, and N. F. O. R. All, *THE STATE OF WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE*. 2016.
- [27] D. Klinger and R. Naylor, “Searching for Solutions in Aquaculture : Charting a Sustainable Course.”
- [28] M. Venegas-calerón, O. Sayanova, and J. A. Napier, “Progress in Lipid Research An alternative to fish oils : Metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 49, no. 2, pp. 108–119, 2010.
- [29] P. H. Mo, N. Ruiz-lo, T. Li, J. Bauer, J. A. Napier, and O. Sayanova, “Enhancing the accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in transgenic *Arabidopsis thaliana* via iterative metabolic engineering and genetic crossing,” pp. 1233–1243, 2012.
- [30] J. C. Gigliotti, M. P. Davenport, S. K. Beamer, J. C. Tou, and J. Jaczynski, “Extraction and characterisation of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*),” *Food Chem.*, vol. 125, no. 3, pp. 1028–1036, 2011.
- [31] S. Nicol, J. Foster, and S. Kawaguchi, “The fishery for Antarctic krill – recent developments,” pp. 30–40, 2012.
- [32] T. C. Adarme-Vega, D. K. Y. Lim, M. Timmins, F. Vernen, Y. Li, and P. M. Schenk, “Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production.,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, p. 96, 2012.
- [33] I. Higuera-Ciapara, L. Félix-Valenzuela, and F. M. Goycoolea, “Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 46, no. 2, pp. 185–196, 2006.
- [34] H. Pommer, “The Wittig Reaction in Industrial Practice,” *Angew. Chemie*, vol. 16, no. 7, pp. 423–429, 1977.

- [35] M. Kobayashi, T. Kakizono, N. Nishio, S. Nagai, Y. Kurimura, and Y. Tsuji, “Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 48, no. 3, pp. 351–356, 1997.
- [36] G. R. Lorenz, R.T., Cysewski, “Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin,” *Trends Biotechnol.*, vol. 18, no. 4, pp. 160–167, 2000.
- [37] L. Miao *et al.*, “Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in a *Phaffia rhodozyma* mutant strain,” *FEMS Yeast Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 192–201, 2011.
- [38] K. D. Nguyen, “Astaxanthin : A Comparative Case of Synthetic VS . Natural Production,” *Chem. Biomol. Eng. Publ. Other Work.*, pp. 1–9, 2013.
- [39] E. C. Amar, V. Kiron, S. Satoh, and T. Watanabe, “Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum),” *Aquac. Res.*, vol. 32 Suppl., pp. 162–173, 2001.
- [40] T. Tanaka, Y. Morishita, M. Suzui, T. Kojima, A. Okumura, and H. Mori, “Chemoprevention of Mouse Urinary-Bladder Carcinogenesis By the Naturally-Occurring Carotenoid Astaxanthin,” *Carcinogenesis*, vol. 15, no. 1, pp. 15–19, 1994.
- [41] Y. Kishimoto, H. Yoshida, and K. Kondo, “Potential anti-atherosclerotic properties of astaxanthin,” *Mar. Drugs*, vol. 14, no. 2, pp. 1–13, 2016.
- [42] N. Astaxanthin and S. Florida, “Astaxanthin for Immune System Support,” 1996.
- [43] F. K. Michael L. Shuler, *Μηχανική Βιοδιεργασιών Βασικές Έννοιες*. Ε.Μ.Π., 2005.
- [44] A. Martins, N. S. Caetano, and T. M. Mata, “Microalgae for biodiesel production and other applications : A review,” vol. 14, pp. 217–232, 2010.
- [45] V. Turon, C. Baroukh, E. Trably, E. Latrille, E. Fouilland, and J. P. Steyer, “Use of fermentative metabolites for heterotrophic microalgae growth: Yields and kinetics,” *Bioresour. Technol.*, vol. 175, pp. 342–349, 2015.
- [46] T. Watanabe, C. Kitajima, and S. Fujita, “Nutritional values of live organisms

- used in Japan for mass propagation of fish: A review,” *Aquaculture*, vol. 34, no. 1–2, pp. 115–143, 1983.
- [47] G. Ahlgren, I. B. Gustafsson, and M. Boberg, “Fatty-acid content and chemical-composition of fresh-water microalgae,” *Journal of Phycology*, vol. 28, no. 1. pp. 37–50, 1992.
- [48] J. C. Schneider and P. Roessler, “Radiolabeling Studies of Lipids and Fatty Acids in *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), an Oleaginous Marine Alga,” *Journal of Phycology*, vol. 30, no. 4. pp. 594–598, 1994.
- [49] P. G. Roessler, “Environmental Control of Glycerolipid Metabolism in Microalgae: Commercial Implications and Future Research Directions,” *Journal of Phycology*, vol. 26, no. 3. pp. 393–399, 1990.
- [50] N. Sun, Y. Wang, Y. T. Li, J. C. Huang, and F. Chen, “Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta),” *Process Biochem.*, vol. 43, no. 11, pp. 1288–1292, 2008.
- [51] P. F. Ip and F. Chen, “Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark,” *Process Biochem.*, vol. 40, no. 2, pp. 733–738, 2005.
- [52] A. K. Minhas, P. Hodgson, C. J. Barrow, and A. Adholeya, “A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. MAY, pp. 1–19, 2016.
- [53] X. Tan, “Effects of temperature on recruitment and phytoplankton community composition,” vol. 5, no. 32, pp. 5896–5901, 2011.
- [54] D. J. Griffiths, C. L. Thresher, and H. E. Street, “The heterotrophic nutrition of *Chlorella vulgaris*,” *Annu. Bot.*, vol. 2, no. 24, pp. 1–11, 1960.
- [55] N. R. Boyle and J. A. Morgan, “Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*,” *BMC Syst. Biol.*, vol. 3, no. 1, p. 4, 2009.
- [56] A. H. Neilson and R. A. Lewin, “The uptake and utilization of organic carbon by algae : an essay in comparative biochemistry,” *Phycologia*, vol. 13, no. 3, pp. 227–264, 1974.
- [57] O. Perez-Garcia, F. M. E. Escalante, L. E. de-Bashan, and Y. Bashan,

- “Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products,”
Water Res., vol. 45, no. 1, pp. 11–36, 2011.
- [58] E. Komor, “Proton-coupled hexose transport in *Chlorella vulgaris*,” *FEBS Lett.*, vol. 38, no. 1, pp. 16–18, 1973.
- [59] C. Yang, Q. Hua, and K. Shimizu, “Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 6, no. 2, pp. 87–102, 2000.
- [60] H. Endo, K. Nakajima, R. Chino, and M. Shirota, “Growth Characteristics and Cellular Components of *Chlorella regularis*, Heterotrophic Fast Growing Strain,” *Agric. Biol. Chem.*, vol. 38, no. 1, pp. 9–18, 1974.
- [61] C. Combres, G. Laliberté, J. S. Reyssac, and J. de la Noüe, “Effect of acetate on growth and ammonium uptake in the microalga *Scenedesmus obliquus*,” *Physiol. Plant.*, vol. 91, no. 4, pp. 729–734, 1994.
- [62] R. Vazhappilly and F. Chen, “Vazhappillyetal1998,” pp. 393–397, 1998.
- [63] Y. Shen, W. Yuan, Z. Pei, and E. Mao, “Heterotrophic Culture of *Chlorella protothecoides* in Various Nitrogen Sources for Lipid Production,” pp. 1674–1684, 2010.
- [64] W. Xiong, X. Li, J. Xiang, and Q. Wu, “High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production,” pp. 29–36, 2008.
- [65] A. H. Neilson and T. Larsson, “The utilization of organic nitrogen for growth of algae : physiological aspects,” pp. 542–553, 1980.
- [66] M. A. Borowitzka, “Michael A. Borowitzka,” vol. 824, pp. 509–520, 1995.
- [67] T. Ren, “Primary Factors Affecting Growth of Microalgae Optimal Light Exposure Duration and Frequency,” 2014.
- [68] T. Ogawa and S. Aiba, “Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 23, no. 5, pp. 1121–1132, 1981.

- [69] C. K. . J. Tan M. R., “Fatty-Acid Production by Heterotrophic *Chlorella-Saccharophila*,” *Hydrobiologia*, vol. 215, no. 1, pp. 13–19, 1991.
- [70] X.-M. Shi, H.-J. Liu, X.-W. Zhang, and F. Chen, “Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures,” *Process Biochem.*, vol. 34, no. 4, pp. 341–347, 1999.
- [71] R. A. Schmidt, M. G. Wiebe, and N. T. Eriksen, “Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria*,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 90, no. 1, pp. 77–84, 2005.
- [72] Y. Jiang and F. Chen, “Effects of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptocodinium cohnii*,” vol. 35, pp. 1205–1209, 2000.
- [73] M. E. de Swaaf, T. C. de Rijk, G. Eggink, and L. Sijtsma, “Optimization of docosahexaenoic acid production in batch cultivation by *Cryptocodinium cohnii*,” *Prog. Ind. Microbiol.*, vol. 35, pp. 185–192, 1999.
- [74] C. H. Hsieh and W. T. Wu, “Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation,” *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 17, pp. 3921–3926, 2009.
- [75] Τ. Ε. Χριστακόπουλος Π., *Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων*, Εκδόσεις Ε. Αθήνα, 2016.
- [76] D. P. Ho, H. Hao, and W. Guo, “Bioresource Technology A mini review on renewable sources for biofuel,” *Bioresour. Technol.*, vol. 169, pp. 742–749, 2014.
- [77] Y. Sun and J. Cheng, “Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q,” vol. 83, pp. 1–11, 2002.
- [78] P. Alvira, M. Ballesteros, and M. J. Negro, “Bioresource Technology Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis : A review,” *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 13, pp. 4851–4861, 2010.
- [79] A. Verardi, I. De Bari, E. Ricca, and V. Calabrò, “Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass : Current Status of Processes and Technologies and Future

- Perspectives.”
- [80] I. Roberto, “Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*,” no. April 2014, 2001.
- [81] K. Nakanishi, K. Deuchi, and K. Kuwano, “Cryopreservation of four valuable strains of microalgae , including viability and characteristics during 15 years of cryostorage,” 2012.
- [82] S. Temp, “Crypthecodinium cohnii Live Culture : See Crypthecodinium cohnii,” pp. 1–2, 1977.
- [83] R. C. Detns, S. Taken, F. S. Co, F. Smith, C. Co, and F. Titrim-, “Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar,” no. III.
- [84] G. B. Leite, K. Paranjape, A. E. M. Abdelaziz, and P. C. Hallenbeck, “Bioresource Technology Utilization of biodiesel-derived glycerol or xylose for increased growth and lipid production by indigenous microalgae,” *Bioresour. Technol.*, 2014.
- [85] E. G. Bligh and W. J. Dyer, “Extraction of Lipids in Solution by the Method of Bligh & Dyer,” *Can. J. Biochem. Physiol.*, vol. 2, no. 37, pp. 911–917, 1959.
- [86] B. W. Kail, D. D. Link, and B. D. Morreale, “Determination of Free Fatty Acids and Triglycerides by Gas Chromatography Using Selective Esterification Reactions,” vol. 40, no. 12, pp. 1–6, 2012.
- [87] E. D. Dodds, M. M.R., L. D. Rea, and J. M. Kennish, “Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry.,” *Lipids*, vol. 40, no. 4, pp. 419–428, 2005.
- [88] C. Corporatio, “Analysis s of Natu ral Astax xanthin D erived fro om Haem cus Micro oalgae in Asta axanthin Oleoresi n , Astaxa anthin Ge elcaps , A Astaxanth hin Beadl ets , and Hae matococ ccus Biom For questio ns or comm ments pleas se contact Gerald Ph . D ., Chief f,” pp. 1–22, 2013.
- [89] Lorenz, “HPLC and spectrophotometric analysis of carotenoids from *Haematococcus algae* powder,” pp. 1–10, 1981.
- [90] Π. Α., *Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης*. Ε.Μ.Π., Εκδόσεις, 2004.

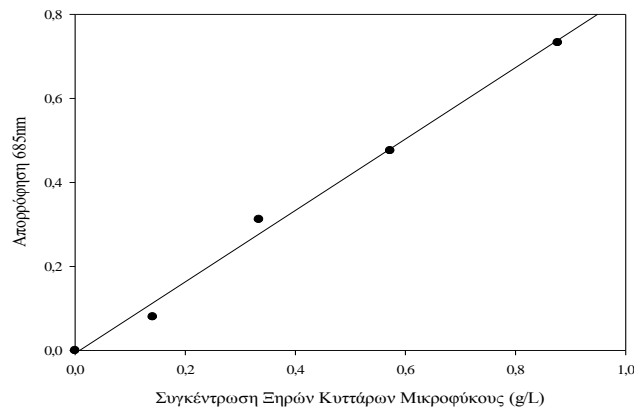
- [91] Μ. Οξενκιουν-Πετροπούλου, *Φασματομετρικές Μέθοδοι*. Αθήνα: Εκδόσεις Συμμετρία, 2012.
- [92] M. Swartz, “Hplc detectors: a brief review,” pp. 1130–1150, 2010.
- [93] a Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, and D. Templeton, “Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 12 / 08 / 2006 Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Proce,” *Lab. Anal. Proced. NREL/TP-510-42623*, no. January, pp. 1–14, 2008.
- [94] R. W. S. Weber, H. Anke, and P. Davoli, “Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi),” *J. Chromatogr. A*, vol. 1145, no. 1–2, pp. 118–122, 2007.
- [95] “HPLC analysis HPLC System configuration How to run an analysis - Protocols.”
- [96] C. P. Pappis and E. C. Petrou, “Bioethanol production from cotton stalks or corn stover ? A comparative study of their sustainability performance,” pp. 156–162.
- [97] A. Karnaouri, U. Rova, and P. Christakopoulos, “Effect of Different Pretreatment Methods on Birch Outer Bark : New Biorefinery Routes,” 2016.
- [98] M. M. Bradford, “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding,” vol. 254, pp. 248–254, 1976.
- [99] L. Qin *et al.*, “Biotechnology for Biofuels Inhibition of lignin - derived phenolic compounds to cellulase,” *Biotechnol. Biofuels*, pp. 1–10, 2016.
- [100] C. Ecology and R. May, “ROLE OF PHENOLIC C O M P O U N D S IN THE A N T I A L G A L ACTIVITY OF BARLEY STRAW,” vol. 20, no. 7, 1994.
- [101] R. L. Hawkins, “Utilization of Xylose for Growth by the Eukaryotic Alga , Chlorella,” vol. 38, pp. 360–361, 1999.
- [102] J. Myers, “the Heterotrophic Growth,” no. 1958, pp. 107–117, 2017.

- [103] P. Ip, K. Wong, and F. Chen, “Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture,” vol. 39, pp. 1761–1766, 2004.
- [104] M. Orosa, E. Torres, P. Fidalgo, and J. Abalde, “Production and analysis of secondary carotenoids in green algae,” 2000.
- [105] S. Venkata Mohan and M. Prathima Devi, “Fatty acid rich effluent from acidogenic biohydrogen reactor as substrate for lipid accumulation in heterotrophic microalgae with simultaneous treatment,” *Bioresour. Technol.*, vol. 123, pp. 627–635, 2012.
- [106] Y. Zheng, X. Yu, T. Li, X. Xiong, and S. Chen, “Induction of D-xylose uptake and expression of NAD (P) H-linked xylose reductase and NADP + -linked xylitol dehydrogenase in the oleaginous microalga *Chlorella sorokiniana*,” vol. 7, no. 1, pp. 1–8, 2014.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

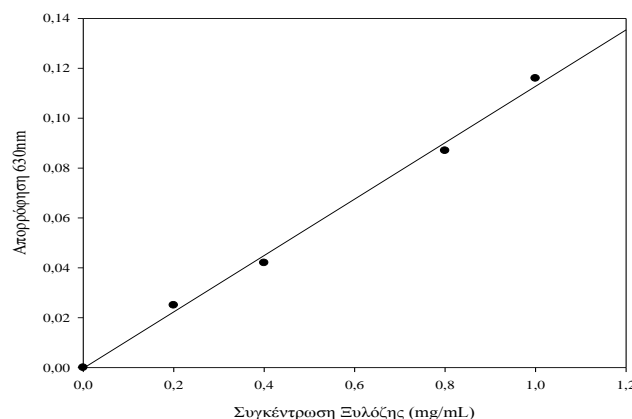
Καμπύλες Αναφοράς Μεθόδων

Οι καμπύλες αναφοράς αποτέλεσαν κεντρικό εργαλείο της πορείας της παρούσας διπλωματικής εργασίας και απαιτήθηκαν για κάθε μέθοδο που εφαρμόστηκε. Επομένως, παραθέτονται παρακάτω οι καμπύλες αναφοράς κάθε μίας και τα βασικά τους χαρακτηριστικά στο γραμμικό τμήμα που διαπιστώνεται.

Μέθοδος: Συσχέτιση Απορρόφησης με Ξηρό Βάρος Μικροφυκών

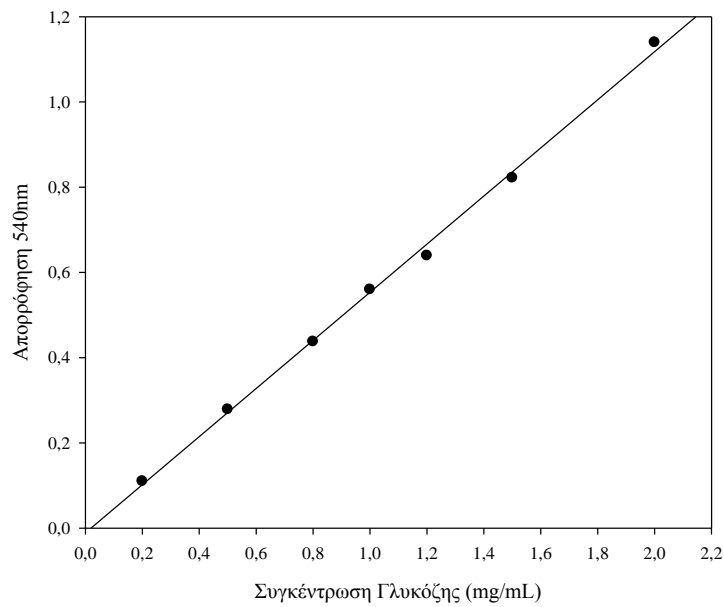
Διάγραμμα 21: Καμπύλη αναφοράς Ξηρού Βάρους Κυττάρων-Απορρόφησης στα 685 nm

Η καμπύλη αναφοράς που προσδιορίστηκε με 6 πειραματικά σημεία είναι $O.D._{685nm}=1.8396*(D.C.W.)$ με $R^2=0.993$

Μέθοδος: Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Ξυλόζης με DNS

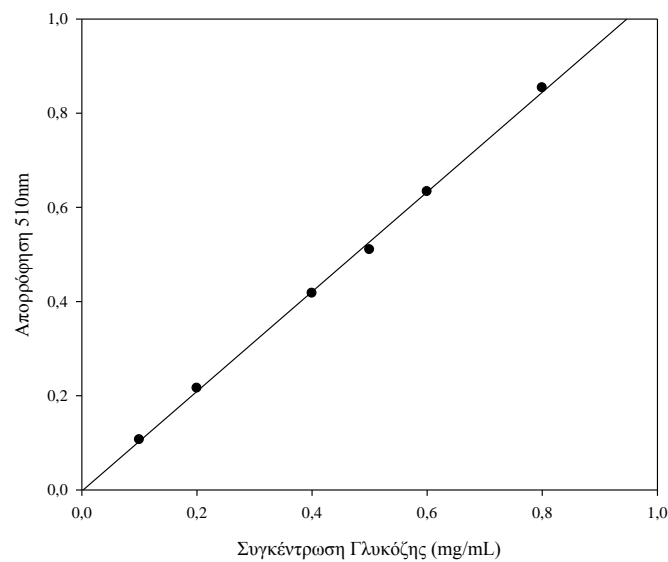
Διάγραμμα 22: Καμπύλη Αναφοράς Ξυλόζης στα 510 nm

Η καμπύλη αναφοράς που προσδιορίστηκε με 5 πειραματικά σημεία είναι $O.D._{510nm}=0.1127*[C_{xylose}]$ με $R^2=0.9959$

Μέθοδος: Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Γλυκόζης με DNS

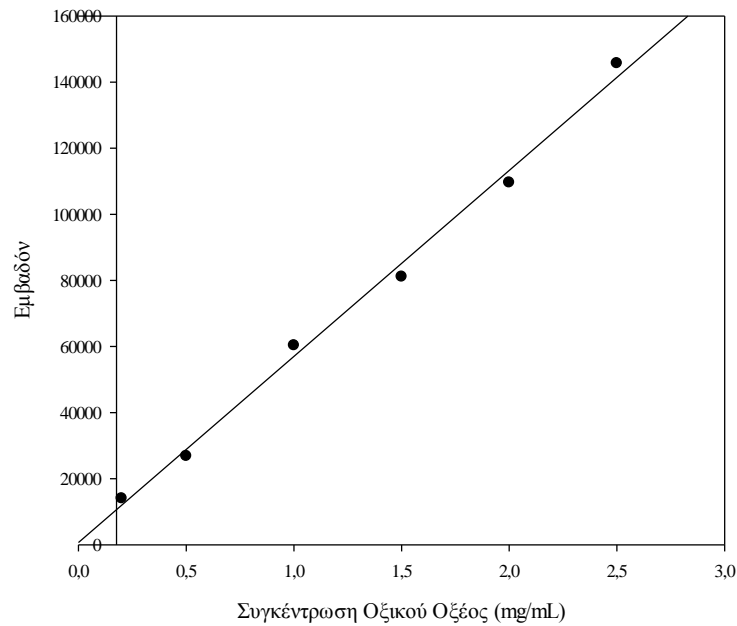
Διάγραμμα 23: Καμπύλη Αναφοράς Γλυκόζης στα 540 nm

Η καμπύλη αναφοράς που προσδιορίστηκε με 8 πειραματικά σημεία είναι $O.D._{540nm}=0.5563*[C_{glucose}]$ με $R^2=0.9975$

Μέθοδος: Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Γλυκόζης με GOD/PAP

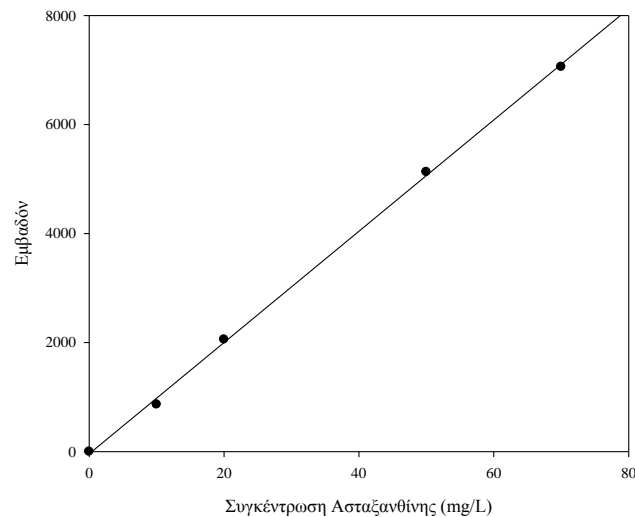
Διάγραμμα 24: Καμπύλη Αναφοράς Γλυκόζης στα 510 nm

Η καμπύλη αναφοράς που προσδιορίστηκε με 7 πειραματικά σημεία είναι $O.D._{510nm}=1.0542*[C_{glucose}]$ με $R^2=0.9988$

Μέθοδος: HPLC-RID

Διάγραμμα 25: Καμπύλη Αναφοράς Οξικού Οξέος-Εμβαδόν

Η καμπύλη αναφοράς που προσδιορίστηκε με 6 πειραματικά σημεία είναι $\text{Area}=56686 \cdot [\text{C}_{\text{acetate}}]$ με $R^2=0.9945$

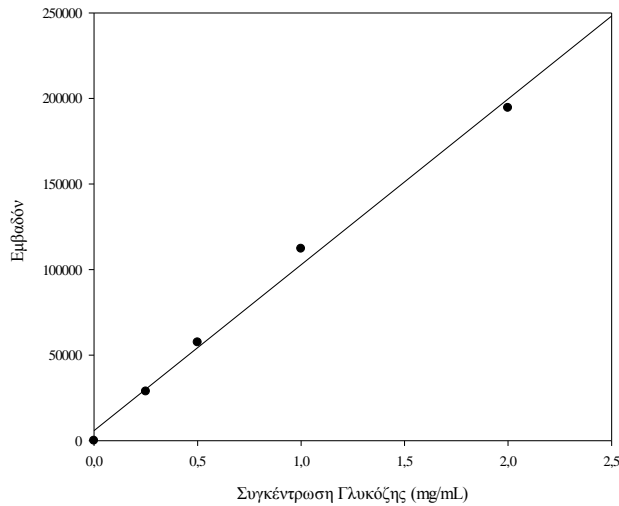
Μέθοδος: HPLC-DAD

Διάγραμμα 26: Καμπύλη Αναφοράς Ασταξανθίνης- Εμβαδόν

Η καμπύλη αναφοράς που προσδιορίστηκε με 5 πειραματικά σημεία είναι $\text{Area}=100.98 \cdot [\text{C}_{\text{astaxanthin}}]$ με $R^2=0.9996$

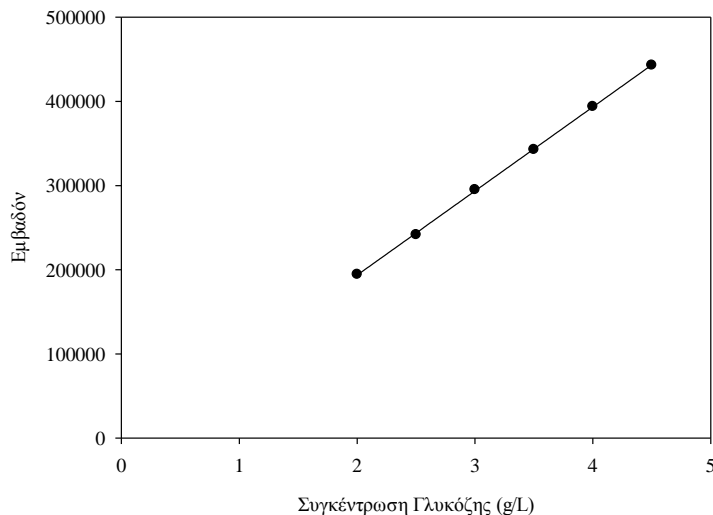
Μέθοδος: HPLC-RID

Το γραμμικό κομμάτι της μεθόδου αυτής διαφέρει σε συγκεντρώσεις γλυκόζης μικρότερες των 2 mg/mL από αυτές που είναι άνω αυτών, γιατί και προτείνονται δύο καμπύλες αναφοράς για όλο το εύρος των συγκεντρώσεων γλυκόζης 0-5 mg/mL.



Διάγραμμα 27: Καμπύλη Αναφοράς Γλυκόζης- Εμβαδόν

Η καμπύλη αναφοράς που προσδιορίστηκε με 5 πειραματικά σημεία είναι $\text{Area}=101085 \cdot [\text{C}_{\text{glucose}}]$ με $R^2=0.9898$

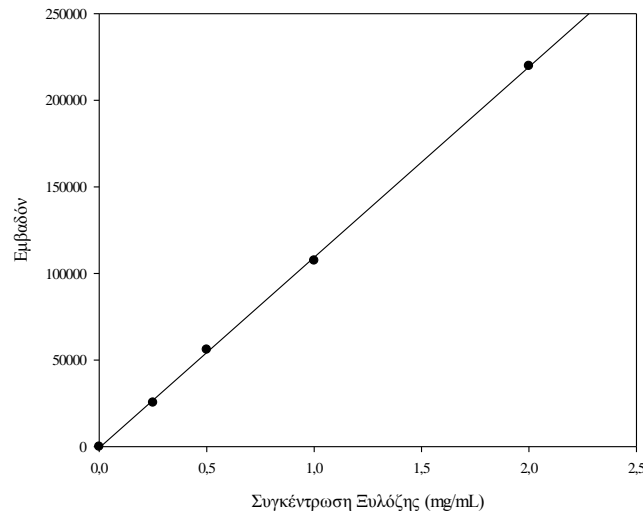


Διάγραμμα 8: Καμπύλη Αναφοράς Γλυκόζης- Εμβαδόν

Η καμπύλη αναφοράς που προσδιορίστηκε με 6 πειραματικά σημεία είναι $\text{Area}=98132 \cdot [\text{C}_{\text{glucose}}]$ με $R^2=0.9995$

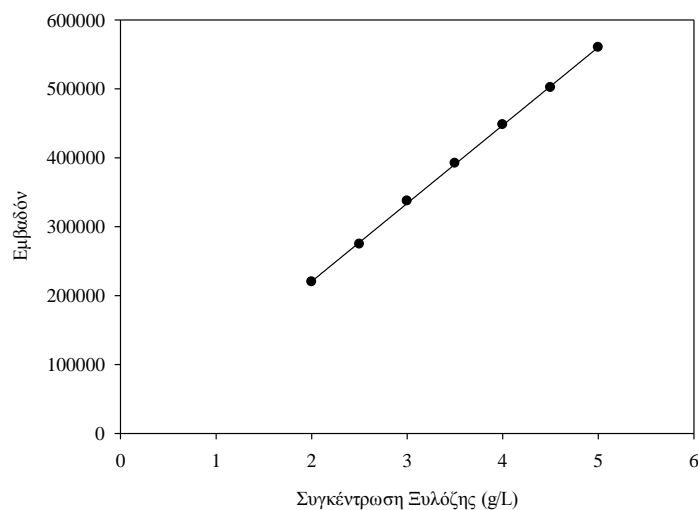
Μέθοδος: HPLC-RID

Αντίστοιχα με την παραπάνω περίπτωση της γλυκόζης, έτσι και στην ξυλόζη διαπιστώνονται δύο καμπύλες αναφοράς για το συνολικό εύρος των συγκεντρώσεων ξυλόζης από 0-5 mg/mL.



Διάγραμμα 9: Καμπύλη Αναφοράς Ξυλόζης- Εμβαδόν

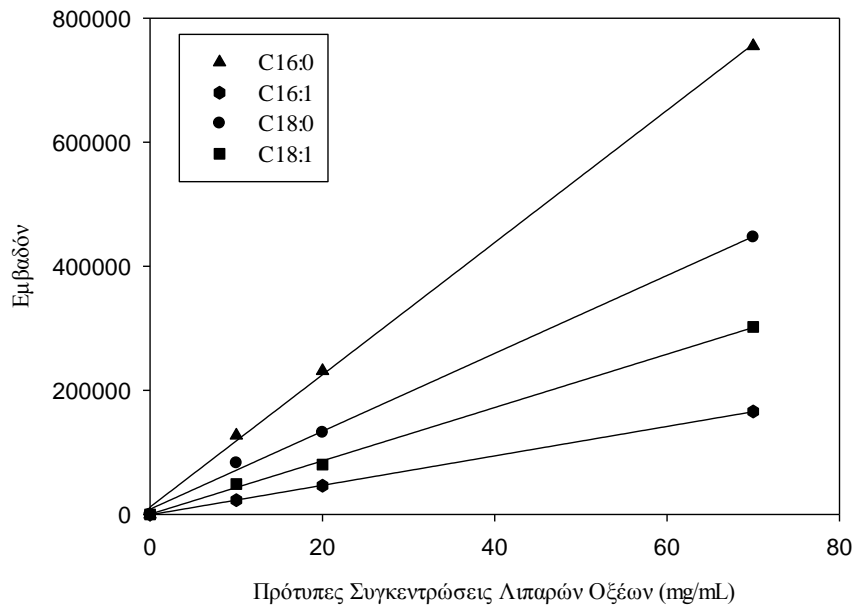
Η καμπύλη αναφοράς που προσδιορίστηκε με 5 πειραματικά σημεία είναι $\text{Area}=109484 \cdot [\text{C}_{\text{xylose}}]$ με $R^2=0.9997$



Διάγραμμα 10: Καμπύλη Αναφοράς Ξυλόζης- Εμβαδόν

Η καμπύλη αναφοράς που προσδιορίστηκε με 7 πειραματικά σημεία είναι $\text{Area}=111704 \cdot [\text{C}_{\text{xylose}}]$ με $R^2=0.9995$

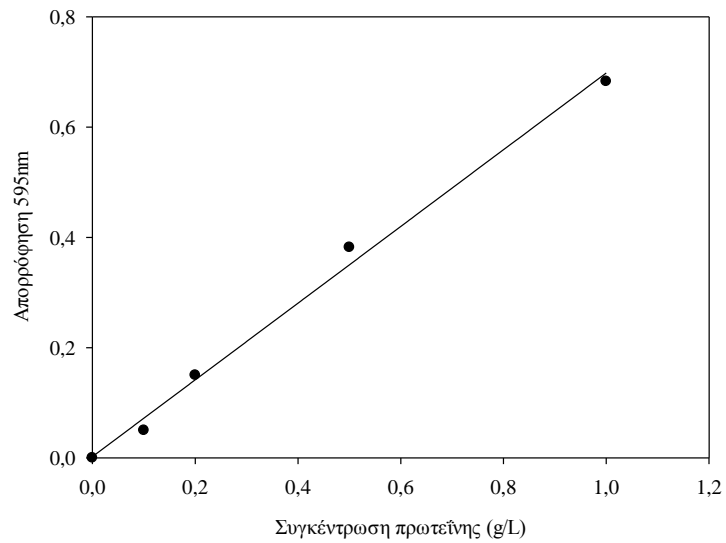
Μέθοδος: GC-MS



Διάγραμμα 28: Καμπύλη Αναφοράς Πρότυπων Συγκεντρώσεων Λιπαρών Οξέων-Εμβεδόν

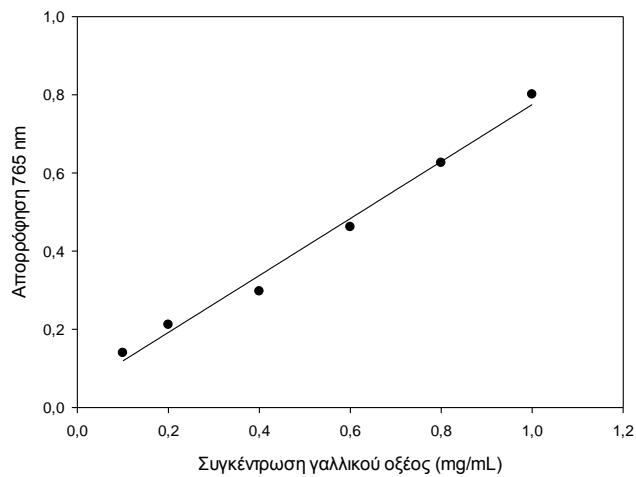
Οι καμπύλες αναφοράς που προσδιορίστηκαν είναι για τα βασικά λιπαρά οξέα που παράγονται από το μικροφύκος *C.zofingiensis* και είναι οι παρακάτω:

- ❖ C16:0 Area=10881*[C_{fattyacids}] με R²=0.9983
- ❖ C16:1 Area=2362.1*[C_{fattyacids}] με R²=0.9999
- ❖ C18:0 Area=6435.4*[C_{fattyacids}] με R²=0.9969
- ❖ C18:1 Area=4305.6*[C_{fattyacids}] με R²=0.9987

Μέθοδος: Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης κατά Bradford

Διάγραμμα 11: Καμπύλη Αναφοράς Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης-Απορρόφηση 595 nm

Η καμπύλη αναφοράς που προσδιορίστηκε με 5 πειραματικά σημεία είναι $O.D._{595nm}=0.6992*[C_{protein}]$ με $R^2=0.9943$

Μέθοδος: Προσδιορισμός φαινολικών δακτυλίων μέσω του αντιδραστηρίου Folin

Διάγραμμα 12: Καμπύλη Αναφοράς Συγκέντρωσης Γαλλικού Οξέος- Απορρόφηση 765 nm

Η καμπύλη αναφοράς που προσδιορίστηκε με 6 πειραματικά σημεία είναι $O.D._{765nm}=0.7936*[C_{gal}]$ με $R^2=0.978$