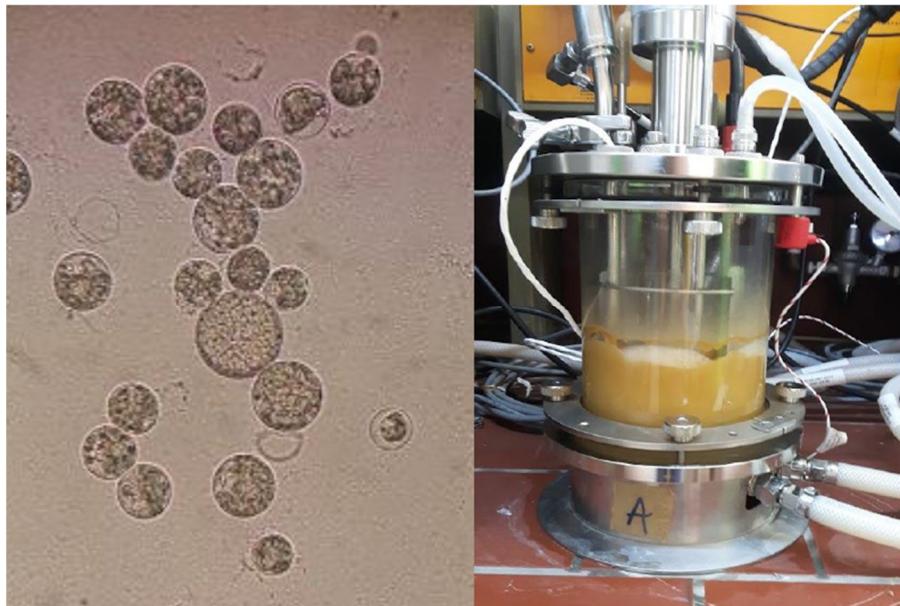




**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΓΡΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΖΥΜΩΣΗΣ
ΒΙΟΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ω -3
ΛΙΠΑΡΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ
*Cryptocodinium cohnii***



Χατζηδάκη Αγγελική

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

ΑΘΗΝΑ 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου στα πλαίσια της ολοκλήρωσης του κύκλου σπουδών μου, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου καθηγητή κυρίου Ευάγγελου Τόπακα.

Με την ευκαιρία της ολοκλήρωσης αυτής της προσπάθειάς μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους αυτούς που συνέβαλαν με ποικίλους τρόπους στο έργο αυτό. Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου κύριο Ευάγγελο Τόπακα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, το οποίο ανήκει στο πεδίο ενδιαφέροντός μου, και τη συνεχή στήριξή του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου. Η εκτίμησή μου αυτή προς τον καθηγητή μου στηρίζεται τόσο στην προσωπική μου εμπειρία, που απέκτησα κατά την διάρκεια της διδασκαλίας των μαθημάτων του, όσο και στην προσπάθειά του να συγκεντρώνει καινοτόμα επιστημονικά θέματα με αντίκτυπο στην σημερινή βιομηχανία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει και στην υποψήφια διδάκτορα του Ε.Μ.Π. Αγγελική-Ελένη Χαλιμά για την συνεχή και αδιάκοπη καθοδήγηση που μου παρείχε από την πρώτη έως την τελευταία μέρα. Η συνεχής μετάδοση γνώσεων τόσο στο θεωρητικό υπόβαθρο του θέματος όσο και στις πειραματικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν και οι παρατηρήσεις της κατά τη συγγραφή της διπλωματικής μου βελτίωσαν το τελικό αποτέλεσμα. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την προθυμία, την ενθάρρυνση, την ψυχολογική της υποστήριξη και το εξαιρετικό κλίμα που δημιούργησε στη μεταξύ μας συνεργασία. Η συνεργασία μας υπήρξε άψογη και συνεισέφερε σε μεγάλο ποσοστό στην επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κυρία Κωνσταντίνα Τζιά, που μας επέτρεψε να χρησιμοποιήσουμε τη συσκευή Kjeldahl για τα πειράματά μας. Ιδιαίτερα, όμως, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για τη φιλική ατμόσφαιρα που διαμόρφωναν σε καθημερινή βάση και τη βοήθειά τους στην προσαρμογή μου στο χώρο του εργαστηρίου.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου που με έχουν στηρίξει καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Αγγελική Χατζηδάκη,

Φεβρουάριος 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη του μικροφύκου *Cryptocodium cohnii* υπό ετερότροφες συνθήκες σε διήθημα από το υγρό κλάσμα ζύμωσης αποβλήτων για την παραγωγή ουσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας, καθώς και η μελέτη των κατάλληλων συνθηκών της ετερότροφης αυτής καλλιέργειας και συγκεκριμένα της θερμοκρασίας και των πηγών αζώτου. Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν πτητικά οργανικά οξέα και διήθημα από το υγρό κλάσμα ζύμωσης αποβλήτων κήπου και τροφίμων. Οι μεταβολίτες που εξετάζονται είναι τα λιπαρά οξέα και κυρίως το εικοσιδιεξανοϊκό (DHA).

Το στέλεχος του μικροφύκου που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα είναι το *Cryptocodium cohnii* ATCC® 30772™. Καταρχάς, μελετήθηκαν διαφορετικές πηγές άνθρακα για την ανάπτυξη του μικροφύκου, με πηγή αζώτου το yeast extract και θερμοκρασία επώασης τους 27 °C. Σε πρώτο επίπεδο εξετάστηκαν καλλιέργειες διαλείποντος έργου (batch) με πτητικά οργανικά οξέα (VFAs), συγκεκριμένα το βουτυρικό οξύ, το προπιονικό οξύ και το οξικό οξύ (σε μορφή οξικού ανιόντος), σε συγκεντρώσεις 5 g/L-30 g/L και επιπλέον 50g/L για την περίπτωση του οξικού. Η επιλογή των οξέων που εξετάστηκαν οφείλεται στο ότι αυτά αποτελούν προϊόντα της ζύμωσης αποβλήτου. Στη συνέχεια, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη των πηγών άνθρακα σε μεγαλύτερη κλίμακα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν βιοαντιδραστήρες ημιδιαλείποντος έργου (fed-batch) με παροχή τροφοδοσίας τις πηγές άνθρακα. Πέρα από τις καθαρές πηγές άνθρακα, οξικό, βουτυρικό και προπιονικό οξύ, μελετήθηκε διήθημα από το υγρό κλάσμα ζύμωσης του αποβλήτου, επεξεργασμένο με σκοτεινή ζύμωση (dark fermentation), και συνθετικό διάλυμα οξέων, ίδιας σύστασης οξέων με το διήθημα. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πτητικών οργανικών οξέων πραγματοποιήθηκε ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Για τα δείγματα των βιοαντιδραστήρων μετρήθηκε η μεταβολή της συγκέντρωσης αζώτου με τη μέθοδο Kjeldahl. Για την βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης του μικροφύκου *C. cohnii* παρασκευάστηκαν batch καλλιέργειες με διαφορετικές πηγές αζώτου και με διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης με πηγή άνθρακα το ανιόντα οξικού. Στο πλαίσιο ανάλυσης των λιπαρών οξέων και κυρίως του DHA που παράγονται από το μικροφύκος, η βιομάζα εκχυλίστηκε και απομονώθηκαν τα λιπαρά οξέα. Έπειτα, από εστεροποίηση των λιπαρών πραγματοποιήθηκε ανάλυση με αέριο χρωματογράφο GC-FID. Στο χρωματογράφημα παρατηρούνται κορυφές των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων για το C14, C16, C18, C18:1 και για το DHA με χρόνο έκλουσης 28,8 min.

Στις καλλιέργειες διαλείποντος έργου, όπου εξετάστηκαν τα οργανικά οξέα ως πηγές άνθρακα, προέκυψε ότι το μικροφύκος δύναται να καταναλώσει όλα τα οξέα που μελετήθηκαν. Καλύτερη πηγή άνθρακα τόσο ως προς την απόδοση βιομάζας όσο και ως προς την παραγωγή DHA αποτελεί το οξικό νάτριο σε συγκέντρωση 30 g/L με τιμή συγκέντρωσης DHA στην τελικό όγκο της καλλιέργειας στα 0,60 mg/mL. Το οξικό νάτριο του θρεπτικού μέσου προτιμήθηκε από το μικροφύκος και καταναλώθηκε πρώτο στους αντιδραστήρες προπιονικού και βουτυρικού. Μεγαλύτερη απόδοση τελικής βιομάζας και ποσοστού λιπαρών υπολογίστηκε για τον βιοαντιδραστήρα με οξικό οξύ στα 22,14 mg/mL και 49,8% της ξηρής βιομάζας αντίστοιχα. Από την χρωματογραφική ανάλυση προέκυψε ότι υψηλότερο ποσοστό DHA επί των ολικών λιπαρών παράγεται στον αντιδραστήρα προπιονικού οξέος με τιμή 35,8% των ολικών λιπαρών οξέων.

Όσον αφορά το βιοαντιδραστήρα με τροφοδοσία το διήθημα του υγρού κλάσματος ζύμωσης αποβλήτου προέκυψε ότι το μικροφύκος δύναται να αναπτυχθεί και να παράξει τον επιθυμητό μεταβολίτη. Συγκρίνοντας τους βιοαντιδραστήρες με διαλύματα οργανικών οξέων ως πηγή άνθρακα, υψηλότερη είναι η τελική απόδοση βιομάζας όταν χρησιμοποιείται το διήθημα. Ίδια συμπεριφορά παρατηρείται και στην περίπτωση του ποσοστού λιπαρών και του παραγόμενου DHA με τιμές για το διήθημα στα 24,6% της ξηρής βιομάζας και 29,8% των ολικών λιπαρών αντίστοιχα. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις οξέων στο απόβλητο και στο συνθετικό διάλυμα οξέων δεν συνέβαλαν στην ανάπτυξη υψηλής συγκέντρωσης βιομάζας. Απαραίτητο κρίνεται να συμπυκνωθεί το διήθημα αυξάνοντας τη συγκέντρωση των πηγών άνθρακα. Τέλος, η μέθοδος Kjeldahl έδειξε έντονη μείωση της συγκέντρωσης αζώτου σε όλους τους βιοαντιδραστήρες στις πρώτες 48 h. Επομένως, το μικροφύκος αναπτύσσεται σε συνθήκες έλλειψης αζώτου.

Στις καλλιέργειες με διαφορετικές πηγές αζώτου και σταθερό λόγο C/N 83, μέγιστη τιμή απόδοσης βιομάζας κυττάρων εμφανίζεται στην περίπτωση χρήσης του $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ενώ μικρότερη απόδοση βιομάζας στη καλλιέργεια του NaNO_3 . Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις DHA προκύπτει ότι η υψηλότερη συγκέντρωση DHA αντιστοιχεί στο εκχύλισμα μαγιάς (yeast extract). Υψηλές συγκεντρώσεις DHA εμφανίζουν, επίσης, το θειϊκό αμμώνιο και η ουρία. Τέλος, για τις καλλιέργειες με διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης, υψηλότερη συγκέντρωση DHA υπολογίζεται για την καλλιέργεια με θερμοκρασία 27 °C. Στο μικρό αυτό εύρος θερμοκρασιών δεν παρατηρήθηκε μεγάλη απόκλιση στην τελική απόδοση βιομάζας.

ABSTRACT

The purpose of this diploma thesis is the growth of the microalgae *Cryptocodinium cohnii* under heterotrophic conditions by using the permeate from a dark fermentation effluent for the production of high added-value products, as well as the examination of the cultivation conditions including temperature and nitrogen sources. For this study, volatile organic acids were used, as well as the permeate from the liquid fraction of fermented vegetable-garden-food wastes (VGF). The metabolites examined are fatty acids and mostly docosahexaenoic acid (DHA).

The microalga strain used in the experiments is *Cryptocodinium cohnii* ATCC® 30772™. First of all, different carbon sources for the microalga cultivation were examined in batch cultures, with yeast extract as the nitrogen source and 27 °C as the incubation temperature. Volatile fatty acids (VFAs), propionic acid, butyric acid and acetic acid (acetate anions), were added in the batch cultures with concentrations from 5 g/L to 30 g/L, as well as 50g/L for the acetate. The choice of the acids examined was due to their presence as products of the dark fermentation process. It was considered necessary to study the carbon sources in a bigger scale and therefore fed-batch bioreactors were used. As bioreactor feed, clean carbon sources were selected, such as acetic, butyric and propionic acid, but also the permeate from a dark fermentation effluent of VGF biowaste and a synthetic mixture of acids with the same acid composition as the permeate. The concentration of VFAs was calculated with HPLC analysis. The variation of the nitrogen concentration in bioreactor samples was calculated with the Kjeldahl method. Furthermore, for the optimization of the growth conditions of microalgae *C.cohnii*, batch cultures with different nitrogen sources or different incubation temperatures were examined. The carbon source used was the acetate. As far as the analysis of fatty acids produced by the microalga cells is concerned, the biomass was extracted and the fatty acids were isolated, followed by their esterification and analysis using a gas chromatographer GC-FID. In the chromatogram, peaks were noticed for the methyl esters of the fatty acids C14, C16, C18, C18:1 and DHA.

In the batch cultures, where carbon sources were tested, it was concluded that the microalga is able to consume all the acids examined. The best carbon source, considering the dry biomass yield and the DHA production, was sodium acetate 30g/L with a concentration of DHA at the end of the cultivation at 0,60 mg/mL. The culture medium contained sodium acetate, which was the primary choice of the microalga and was consumed first at bioreactors fed with butyric and propionic acid. Higher biomass yield at the end of the cultivation and percentage of lipids produced by the cells was calculated for the acetic acid bioreactor at 22,14 mg/mL and 49,8% of dry biomass respectively. From the chromatographic analysis was noticed that a higher percentage of DHA is produced by the propionic acid bioreactor with a value of 35,8% of total fatty acids. In addition, in relation to the bioreactor with the permeate, it was concluded that the microalga was able to assimilate the permeate and produce the desired metabolite. Comparing the bioreactors with a mixture of organic acids as carbon source, the biomass yield was higher when the permeate was used. The same behavior was also observed for the lipid percentage and the produced DHA with values for the permeate bioreactor at 24,6% of dry biomass and 29,8% of total fatty acids respectively. The low concentrations of acid in the permeate from the liquid fraction of fermented wastes and the synthetic mixture of acids prevented the biomass growth. It is considered necessary

to condense the permeate in order to increase the concentration of the carbon sources. The nitrogen concentration, according to the results of the Kjeldahl method presented an intense reduction during the first 48 h for all the bioreactors examined. Therefore, the microalga is grown in a limited nitrogen environment.

As for the batch cultures with different nitrogen sources and a ratio C/N at 83, the highest dry biomass yield was calculated for the culture with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, while the lowest for the NaNO_3 culture. The culture with yeast extract had the highest DHA concentration. High concentration of DHA, was also observed when ammonium and urea were used as a nitrogen source. Last but not least, for the batch cultures with different incubation temperatures, higher DHA concentration was calculated for the one at 27 °C. At this temperature range, no significant variation was observed in the final biomass yield.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
1. ΜΙΚΡΟΑΛΓΗ.....	7
1.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΛΟΜΟΡΦΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ	7
1.2 ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ	8
2. ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ <i>Cryptocodinium cohnii</i>	9
3. ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	11
3.1 ω-3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ.....	11
3.2 ΛΙΠΑΡΑ ΣΤΟ <i>Cryptocodinium cohnii</i>	14
3.3 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΔΗΑ	14
3.4 ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟΝ <i>Cryptocodinium cohnii</i>	16
3.5 ΠΗΓΕΣ ΔΗΑ	17
3.5.1 ΑΛΙΕΙΑ	17
3.5.2 ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ.....	18
4. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ	19
4.1 ΦΑΣΕΙΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	19
4.2 ΑΥΤΟΤΡΟΦΗ – ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ.....	20
4.2.1 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	21
4.2.2 ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΧΡΗΣΙΜΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ	21
5. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ...	22
5.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	22
5.1.1 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	22
5.1.2 ΑΝΑΔΕΥΣΗ	23
5.2 ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ.....	24
5.2.1 ΓΛΥΚΟΖΗ.....	24
5.3 ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	26
5.4 ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ-ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ	28
5.4.1 ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ (ACETIC ACID).....	28
5.4.2 ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ (BUTYRIC ACID).....	29
5.4.3 ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟ ΟΞΥ (PROPIONIC ACID)	30
5.4.4 ΠΕΝΤΑΝΟΪΚΟ ΟΞΥ (VALERIC ACID).....	30
5.4.5 ΕΞΑΝΟΪΚΟ ΟΞΥ (CAPROIC ACID)	31

6. ‘ΣΚΟΤΕΙΝΗ’ ΖΥΜΩΣΗ (DARK FERMENTATION).....	32
6.1 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ VFAs.....	34
7. ΗΜΙΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ (FED-BATCH) ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ <i>Cryptocodinium Cohnii</i>	36
8. ΚΟΙΝΩΝΙΚΟΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ.....	37
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	39
1. ΟΡΓΑΝΑ – ΣΥΣΚΕΥΕΣ	40
2. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	40
3. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ.....	41
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ	41
4.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ - ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ.....	41
4.1.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ATCC 460	41
4.1.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΜΕ ΓΛΥΚΟΖΗ – ΣΤΑΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	42
4.1.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΟΞΕΑ ΩΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ.....	43
4.1.4 ΣΤΕΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	44
4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΜΕΣΩ ΘΟΛΩΣΙΜΕΤΡΙΑΣ	45
4.3 ΥΓΡΟ ΚΛΑΣΜΑ ΖΥΜΩΣΗΣ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ VEGETABLE GARDEN FOOD	46
4.3.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ	46
4.3.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	47
4.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ ΣΕ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ.....	48
4.4.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΕΜΒΟΛΙΟ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ	48
4.4.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ	48
4.4.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ.....	51
4.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ	52
4.5.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ.....	52
4.5.3 ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ	54
4.6 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	55
4.6.1 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC).....	55
4.6.2 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΦΡΑΦΙΑ (GC).....	56
4.7 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	58
4.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΖΩΤΟΥ	59
4.8.1 ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	59
4.8.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚJELDAHL	59

5. ΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ.....	61
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	62
1. BATCH ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ-ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ	63
1.1 ΟΞΙΚΟ ΝΑΤΡΙΟ	63
1.1.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΟΞΙΚΟΥ	63
1.1.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	67
1.1.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ.....	68
1.1.4 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ - GC.....	69
1.2 ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	70
1.2.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ	70
1.2.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	73
1.2.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ.....	74
1.2.4 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC	75
1.3 ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟ ΟΞΥ	77
1.3.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟΥ	77
1.3.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	80
1.3.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ.....	81
1.3.4 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC	82
1.4 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ BATCH ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ	84
1.4.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	84
1.4.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	87
1.4.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ.....	90
1.4.4 ΔΗΑ.....	92
2. ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ.....	94
2.1 ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	94
2.1.1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΟΞΕΟΣ	94
2.1.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	95
2.1.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ.....	96
2.1.4 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC	96
2.2 ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	98
2.2.1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΟΞΕΟΣ	98
2.2.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	99

2.2.3	ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ.....	100
2.2.4	ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC.....	100
2.3	ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟ ΟΞΥ.....	102
2.3.1	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΟΞΕΟΣ.....	102
2.3.2	ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	103
2.3.3	ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ.....	103
2.3.4	ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC.....	104
2.4	ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΟΞΕΩΝ.....	106
2.4.1	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΟΞΕΟΣ.....	106
2.4.2	ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	107
2.4.3	ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ.....	108
2.4.4	ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC.....	108
2.5	ΔΙΗΘΗΜΑ ΥΓΡΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ VGF.....	110
2.5.1	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΟΞΕΟΣ.....	110
2.5.2	ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	111
2.5.3	ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ.....	111
2.5.4	ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC.....	112
2.6	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ.....	114
2.6.1	ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	114
2.6.2	ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ.....	114
2.6.3	ΔΗΑ.....	115
2.7	ΜΕΘΟΔΟΣ Kjeldahl.....	116
3.	ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ.....	117
3.1	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	117
3.2	ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	118
3.3	ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ.....	119
3.4	ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC.....	120
4.	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ.....	123
4.1	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	123
4.2	ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	124
4.3	ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ.....	124
4.4	ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC.....	125
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ.....	128

1. ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ.....	129
1.1 BATCH ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	129
1.2 ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ.....	132
2. ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ.....	138
3. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ.....	140
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΣΥΖΗΤΗΣΕΙΣ.....	142
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	144
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	149
1. ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ATCC.....	149
2. ΠΤΗΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ	151
3. ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	151

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

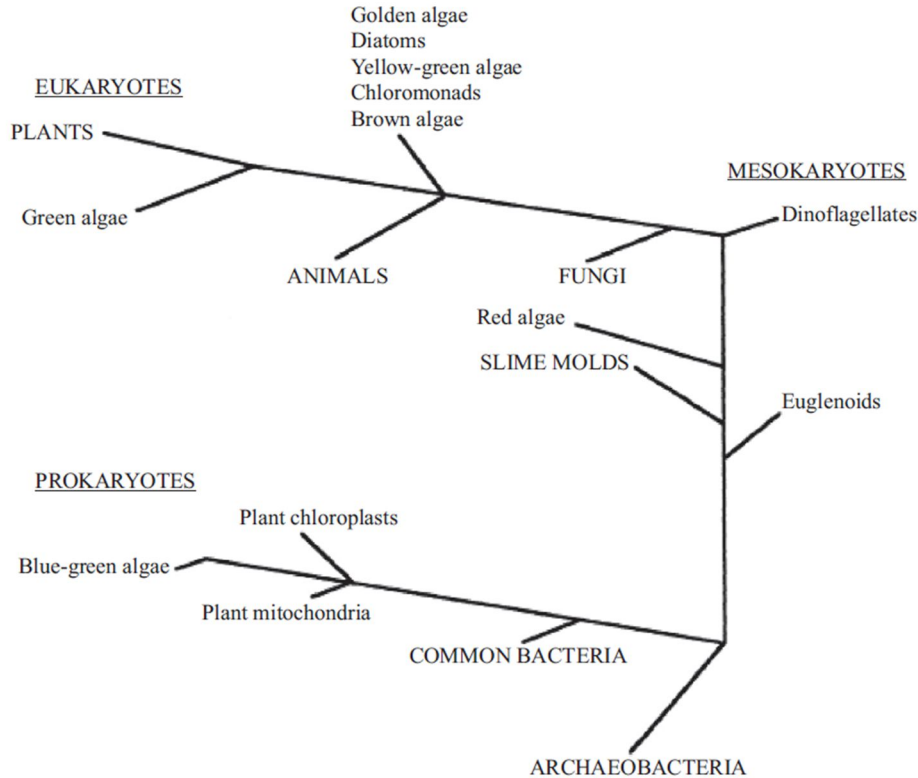
1.ΜΙΚΡΟΑΛΓΗ

Οι κυριότεροι παραγωγοί οξυγόνου στο υδάτινο περιβάλλον είναι τα άλγη και ειδικότερα τα μικροάλγη. Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι ευρέως διαδεδομένοι στη φύση και έχουν προσαρμοστεί σε διαφορετικά περιβάλλοντα με ποικιλομορφία όσον αφορά το μέγεθος, τη μορφολογία, τον κύκλο ζωής και το μεταβολισμό. Περίπου το ήμισυ της παγκόσμιας φωτοσυνθετικής ικανότητας και της παραγωγής οξυγόνου πραγματοποιείται από θαλάσσια μικροφύκη, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση του διοξειδίου του άνθρακα. [1]

Τα μικροφύκη είναι μονοκύτταροι οργανισμοί, που συχνά συναντώνται σε αλμυρά και γλυκά νερά, με μεγέθη που κυμαίνονται από μερικά μm μέχρι μερικές εκατοντάδες μm. Έχει εκτιμηθεί ότι υπάρχουν $2 \cdot 10^5$ με $8 \cdot 10^5$ είδη μικροφυκών. Τα μικροφύκη είναι μια πολλά υποσχόμενη πηγή για διάφορα βιοενεργά συστατικά, όπως λιπαρά οξέα, καροτενοειδή, στερόλες και πεπτίδια. Είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα σε εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένων αυτών στην ανθρώπινη διατροφή, στα καλλυντικά, στη φαρμακευτική και στην παραγωγή ενέργειας.[2], [3]

1.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Τα μικροφύκη είναι σε μεγάλο βαθμό μια ποικιλόμορφη ομάδα μικροοργανισμών που περιλαμβάνουν τα ευκαρυωτικά φωτοαυτότροφα πρότιστα, τα ευκαρυωτικά ετερότροφα και τα προκαρυωτικά κυανοβακτήρια. Στα υδάτινα αυτά περιβάλλοντα κάποια μικροφύκη μεγαλώνουν σε μερικές εκατοντάδες μm στρώματος νερού, άλλα μεγαλώνουν στα όρια της ζώνης φωτός και ορισμένα σε 'πλούσια' εδάφη. Διακρίνονται σε παραπάνω από 12 κύριες κατηγορίες βάσει της σύστασης χρωστικών, της αποθήκευσης των προϊόντων και των δομικών τους χαρακτηριστικών.



Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο με βάση την ανάλυση της αλληλουχίας του ριβοσωμικού RNA

Τα blue-green άλγη, ή αλλιώς κυανοβακτήρια, είναι προκαρυώτες και συνδέονται με πολλά κοινά βακτήρια. Τα πράσινα άλγη είναι στενά 'συγγενικά' με τα φυτά. Οι μεσοκαρυώτες (dinoflagellates και euglenoids) έχουν χαρακτηριστικά ενδιάμεσα των προκαρυωτών και των ευκαρυωτών.

Οι βασικές κλάσεις των εμπορικών αλγών είναι τα: chlorophyta, rhodophyta, haptophyta, stramenopiles και dinophyta. Η κλάση των dinophyta περιλαμβάνει μονοκύτταρα και κυρίως θαλάσσια άλγη. Το 50% τους είναι ετερότροφα μικροφύκη χωρίς χλωροπλάστες. Το μικροφύκος *Cryptocodinium cohnii* είναι αυτό με το μεγαλύτερο εμπορικό ενδιαφέρον, το οποίο αποτελεί και το αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας.[4]

1.2 ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

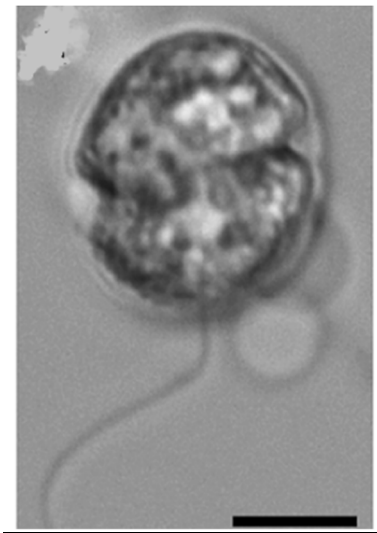
Τα μικροάλγη είναι μικροοργανισμοί που μπορούν να εντοπιστούν σε διαφορετικά υδάτινα περιβάλλοντα. Όπως όλοι οι ευκαρυώτες, τα κυττάρα των μικροφυκών διαθέτουν οργανίδια με μεμβράνες συμπεριλαμβανομένου πυρήνα που περιέχει την γενετική πληροφορία. Κάθε κύτταρο μπορεί να διατηρείται μόνο του διαθέτοντας άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα, δομή που περιβάλλει το κύτταρο, αποτελούμενο από πολυσακχαρίτες. Το κυτταρικό τοίχωμα επιτρέπει την μεταφορά ουσιών δρώντας ταυτόχρονα και ως εκλεκτικό σύνορο του κυττάρου με το περιβάλλον του. Τα μικροφύκη διαθέτουν επίσης λιπιδωμάτια αποθηκεύοντας ενέργεια, σύμπλεγμα Golgi και μιτοχόνδρια. Σε αντίθεση με τα φυτά, τα περισσότερα άλγη αναπαράγονται με διαχωρισμό των κυττάρων τους.[4]

2. ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ *Crypthecodinium cohnii*

Το μικροφύκος που εξετάζεται στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι το ετερότροφο, αλμυρού νερού *Crypthecodinium cohnii*. Το εμπορικό του ενδιαφέρον στηρίζεται στην παραγωγή του ω-3 λιπαρού οξέος εικοσιδιεξανοϊκό (DHA).

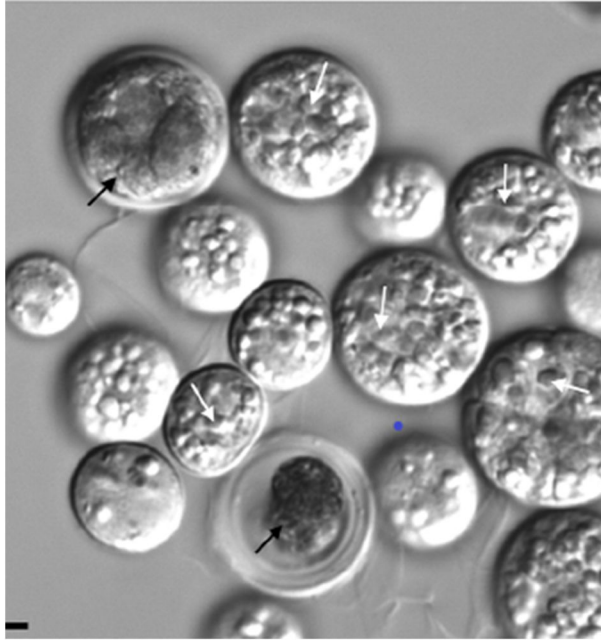
Το μικροφύκος *Crypthecodinium cohnii* αρχικά ονομαζόταν *Glenodinium cohnii* και μετά την ταξινόμηση του στο γένος *Gyrodinium* μετονομάστηκε σε *Gyrodinium cohnii* παίρνοντας εν τέλει την σημερινή του ονομασία. Η μορφολογική παρατήρηση του μικροφύκου αποκάλυψε ότι όλα τα στελέχη του διαθέτουν παρόμοια μορφολογία. Το πυρηνικό DNA των κυττάρων εκτιμάται στα 7,3 pg ανά πυρήνα σύμφωνα με τους Allen et al. και ο αριθμός των χρωμοσωμάτων υπολογίζεται στα 100. Ο κύκλος ζωής των κυττάρων του μικροφύκου χαρακτηρίζεται από την παραγωγή δύο, τεσσάρων και οκτώ κυττάρων – απογόνων μετά από 10, 16 και 24 ώρες ανάπτυξης αντίστοιχα.[5]

Ο μικροοργανισμός *Crypthecodinium cohnii* εμφανίζεται δομικά σε δύο μορφές, τα κινητά κύτταρα (swimming cells) και τις κύστες (cysts). Τα κινούμενα κύτταρα είναι ‘θωρακισμένα’ με μονό ή διπλό μαστίγιο, το ένα με ρόλο κίνησης και επιτάχυνσης του κυττάρου και το δεύτερο προσανατολισμού του.



Εικόνα 2: Κινούμενο κύτταρο *Crypthecodinium Cohnii* με μικροσκοπία φωτός

Η δεύτερη μορφή των κυττάρων είναι οι μη κινούμενες κύστες, οι οποίες μπορούν να περιέχουν περισσότερα από δύο κύτταρα-απογόνους μέσα σε ένα εμφανές κυτταρικό τοίχωμα.



Εικόνα 3: Κύστες *Crypthecodinium cohnii* με μικροσκοπία φωτός

Και οι δύο μορφές των κυττάρων του μικροφύκου εμφανίζουν διαφοροποιήσεις ως προς το μέγεθος και το σχήμα ακόμα και στην ίδια καλλιέργεια. Τα μεγέθη κυμαίνονται από μικρά κύτταρα των 5-20 μm έως και μεγάλα των 8-30 μm . Η διαφοροποίηση αυτή στο μέγεθος μπορεί να υποδεικνύει το διαφορετικό στάδιο του κύκλου ζωής κατά τον οποίο τα μικρά κύτταρα αποτελούν νέους απογόνους ενώ τα μεγάλα βρίσκονται στο 'ενήλικο' στάδιο της ζωής τους.

Τα στελέχη του *Crypthecodinium cohnii* μπορούν να απομονωθούν από διάφορες φυσικές πηγές όπως δείγματα μακροφυκιών, μολυσμένα μαύρα ύδατα, βάλτους και εκβολές ποταμών.[6]

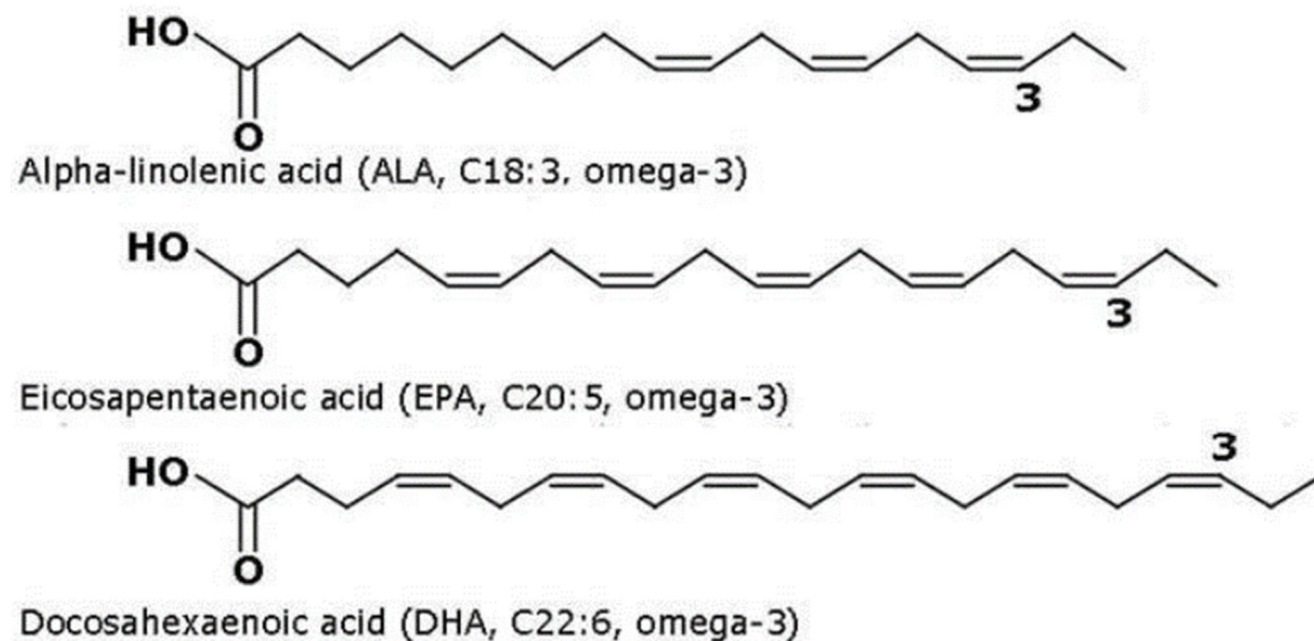
3. ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Με τον όρο λιπαρά οξέα ονομάζονται οι 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. [7]

Παρατηρείται μια μεγάλη ποικιλία από φυσικά λιπαρά οξέα, πάνω από 1000, που αποτελούν συστατικά σε λίπη, έλαια και κηρούς. Τα λιπαρά οξέα διαθέτουν 8 με 80 άτομα άνθρακα. Χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές τροφίμων, σε ελαιοχημικές βιομηχανίες και στα καλλυντικά. Από τα λιπαρά αυτά οξέα, μόνο 20-25 βρίσκονται ευρέως στη φύση και έχουν εμπορικό ενδιαφέρον. Αυτά τα λιπαρά οξέα διαθέτουν 10 με 22 άτομα άνθρακα και προέρχονται σε μεγάλες ποσότητες από φυτικά έλαια και ζωικά λίπη. Από τα φυτικά έλαια τα κυριότερα λιπαρά οξέα είναι το αλφικικό και το παλμιτικό, ενώ από τα ζωικά λίπη είναι το στεατικό, το εικοσιπενταενοϊκό (C20:5) και το εικοσιδιεξαενοϊκό (C22:6). [8]

3.1 ω-3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

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 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) είναι απαραίτητα συστατικά για τους ανώτερους ευκαρυώτες. Προσφέρουν ευελιξία, ρευστότητα και επιλεκτική διαπερατότητα στις μεμβράνες.



Εικόνα 4: ω-3 λιπαρά οξέα

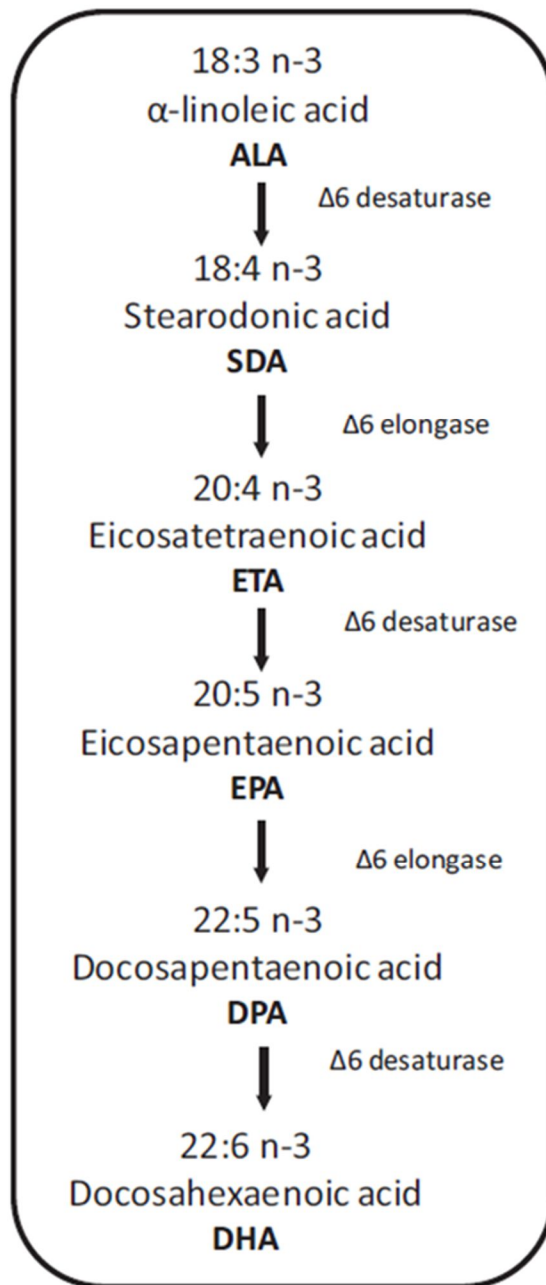
Τα βασικότερα PUFAs είναι το λινελαϊκό οξύ (linolenic acid, ALA), το εικοσιπεντανοϊκό οξύ (eicosapentaenoic acid, EPA) και το εικοσιδιεξαενοϊκό (docosahexaenoic acid, DHA). Ο ανθρώπινος εγκέφαλος διαθέτει μεγάλες ποσότητες από το εικοσιδιοεξανοϊκό, ενώ το εικοσιπεντανοϊκό οξύ έχει ωφέλιμα αποτελέσματα για το καρδιαγγειακό σύστημα. Ως αποτέλεσμα τα PUFAs χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτικές εφαρμογές.[9]

3.1.1 ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ω-3 ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ

Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα ω-3 λιπαρά οξέα μειώνουν τον κίνδυνο των καρδιαγγειακών ασθενειών είναι ευρέως μελετημένοι. Εκτιμάται ότι οι πληθυσμοί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης τέτοιων ασθενειών καταναλώνουν 0,5-0,7 g/day DHA σε αντίθεση με τους πληθυσμούς που ακολουθούν την αμερικανική διατροφή καταναλώνοντας 0,1-0,2 g/day DHA και EPA. Η δυτική διατροφή που παρουσιάζει υψηλά επίπεδα σε ω-6 λιπαρά και χαμηλά σε ω-3 χαρακτηρίζεται από έλλειψη ισορροπίας. [10]

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. Επιπρόσθετα, 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.[11]

Πρέπει να σημειωθεί ότι το DHA είναι ευρέως διαδεδομένο στα φωσφολιπίδια των νευρικών κυττάρων έχοντας σημαντικό ρόλο στην υγεία του εγκεφάλου και στις νευρολογικές αθένειες. Το DHA δεν μπορεί να παραχθεί *de novo* στα θηλαστικά, με αποτέλεσμα να πρέπει να προσληφθεί μέσα από την διατροφή ή να συντεθεί από άλλα λιπαρά οξέα, όπως το α-λινολενικό (ALA). [12]



Εικόνα 5: Μεταβολικό μονοπάτι για την βιοσύνθεση ω-3 λιπαρών[13]

Καθώς, η μετατροπή του λινολενικού σε εικοσιδιοεξανοϊκό δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική, θεωρείται αναγκαία η πρόσληψη του DHA διατροφικά. Η έρευνα για το DHA έχει εστιαστεί στο νευρικό σύστημα, καθώς θεωρείται ότι προσφέρει προστασία κατά της γήρανσης και των ασθενειών των νευρώνων και συμβάλλει στην καλή λειτουργία και υγεία του εγκεφάλου.

Η φυσική πηγή των λιπαρών που καταναλώνουν οι άνθρωποι είναι κυρίως τα λίπη των ψαριών (fish oils). Όμως, τα λίπη που προέρχονται από ψάρια είναι ανεπαρκής πηγή για την εμπορική παραγωγή των λιπαρών οξέων. Η ποιότητα των λιπών από ψάρια εξαρτάται από το είδος των

ψαριών, την εποχή και το κλίμα, την γεωγραφική περιοχή των σημείων αλιείας και την ποιότητα της τροφής που καταναλώνεται από το ίδιο το ψάρι. Επιπλέον, τα λίπη από ψάρια δεν είναι αποδεκτά από τους χορτοφάγους και υπάρχει πάντα και ο κίνδυνος από περιβαλλοντικούς ρύπους που είναι διαλυτοί στα λιπαρά.

Οι παραπάνω λόγοι οδήγησαν στην αναζήτηση εναλλακτικών πηγών λιπαρών οξέων, όπως είναι τα μικροφύκη. Η αγορά και οι καταναλωτές δείχνουν αυξανόμενο ενδιαφέρον στα φυσικά και υγιεινά προϊόντα. Αυτό οδηγεί τους ερευνητές και τις βιομηχανίες να αναπτύξουν καινούρια προϊόντα με ωφέλιμα συστατικά. Τα μικροάλγη έχουν αναγνωρισθεί ως πηγή ενεργών συστατικών με θετικά αποτελέσματα για την υγεία, καθώς αυτοί οι μικροοργανισμοί παράγουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, πολυσακχαρίτες, φυτικά πήγματα και πεπτίδια. Πιο συγκεκριμένα, ανάλογα με το είδος των μικροφυκών τα συνολικά λιπαρά που παράγουν αντιπροσωπεύει το 20-50% της συνολικής ξηρής βιομάζας τους.[14]

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των PUFAs πρέπει να είναι γενετικά σταθεροί, ώστε να μην χάνουν την δυνατότητα παραγωγής των επιθυμητών λιπαρών.

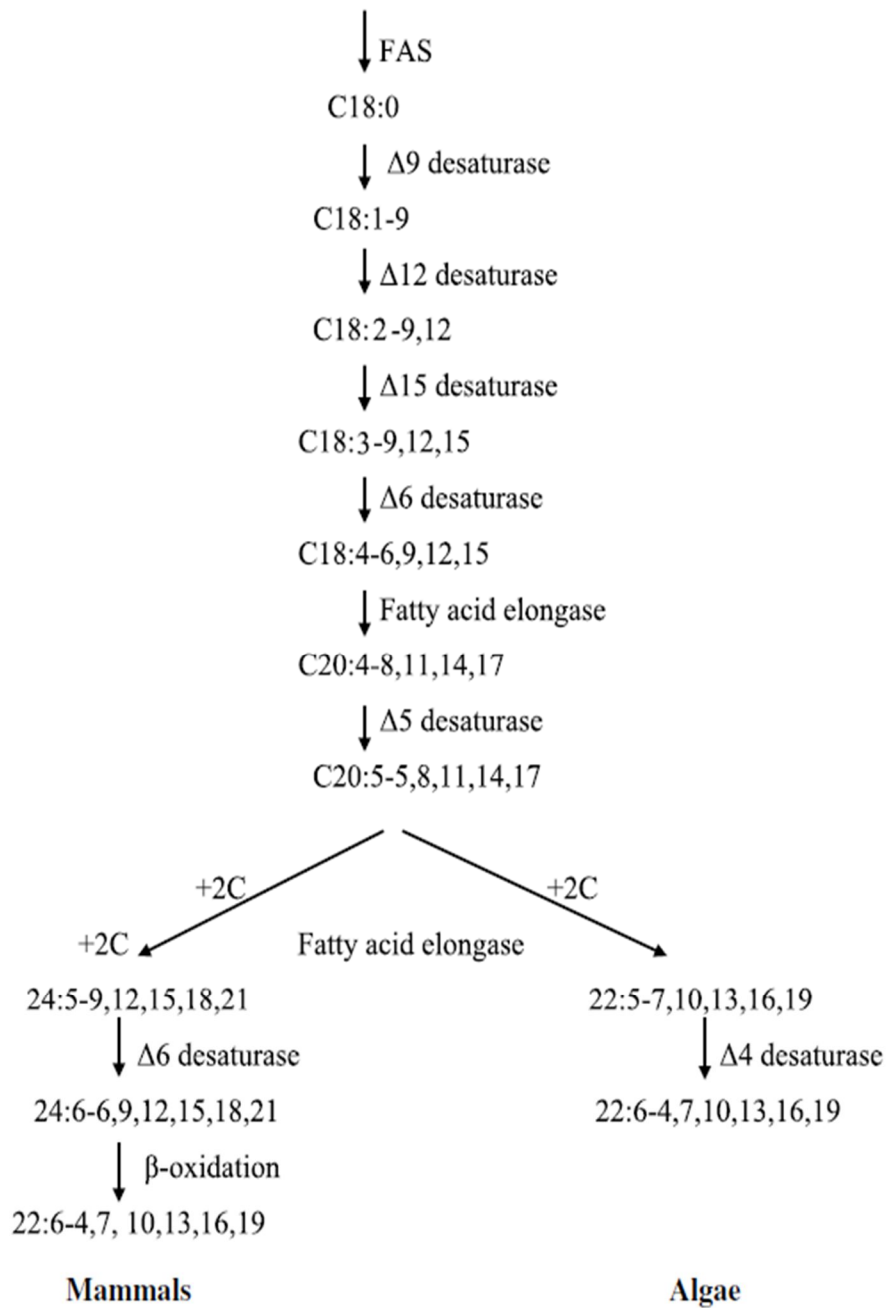
3.2 ΛΙΠΑΡΑ ΣΤΟ *Cryptocodinium cohnii*

Το ετερότροφο μικροφύκος *Cryptocodinium Cohnii* έχει προταθεί και εμπορευματοποιηθεί ως πηγή του DHA (C22:6 n-3). Το μικροφύκος αυτό παράγει υψηλές ποσότητες λιπαρών και έχει ιδιαίτερη σύνθεση των λιπαρών του οξέων. Τα επίπεδα DHA του μικροφύκου κυμαίνονται στο 30-50% των συνολικών λιπαρών οξέων, χωρίς την ύπαρξη άλλων ω-3 λιπαρών πάνω από ποσοστό 1%. [15]

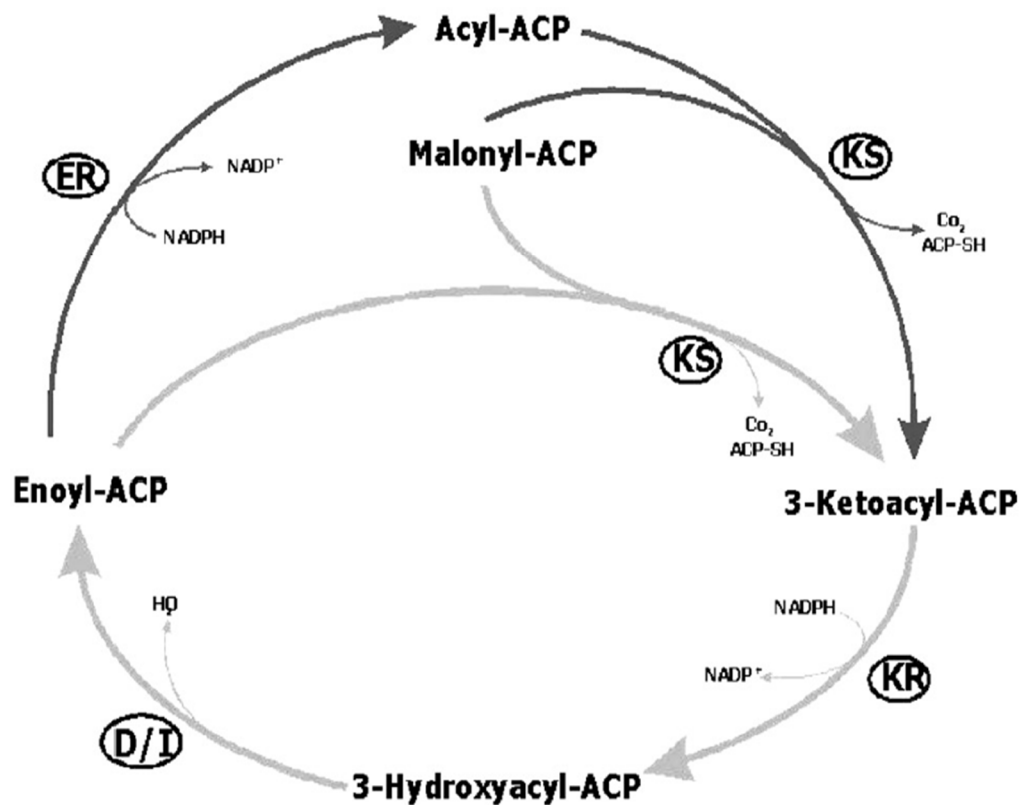
3.3 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ DHA

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

Το αερόβιο μονοπάτι εμφανίζεται τόσο στα ζώα, όσο και σε κάποιους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, όπως το *Thraustochytrium* sp., και βασίζεται σε διαδοχικά στάδια επιμήκυνσης και δημιουργίας ακόρεστων δεσμών του μορίου C18:3. 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 του ενζύμου Δ6-desaturase, και έπειτα πραγματοποιείται μία β-οξείδωση του προϊόντος προς DHA. Αντίθετα, τα μικροφύκη κατασκευάζουν το δεσμό στη θέση Δ4 απευθείας στο μόριο του EPA (Δ4 pathway).



Εικόνα 6: Αερόβιο μονοπάτι για τη βιοσύνθεση DHA στα θηλαστικά και στα μικροφύκη



Εικόνα 7: Αναερόβιο μονοπάτι για την σύνθεση του 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. Εμφανίζεται σε κάποια βακτήρια και σε ευκαρυώτες όπως το *Schizochytrium*. Το μονοπάτι αυτό μπορεί να παρατηρηθεί και κάτω από αερόβιες συνθήκες, αλλά ονομάζεται αναερόβιο καθώς δεν απαιτείται η χρήση μοριακού οξυγόνου. [16]

3.4 ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟΝ *Cryptocodinium cohnii*

Το μικροφύκος αυτό, όπως και τα υπόλοιπα είδη που ανήκουν στην κατηγορία των dinoflagellates, παρουσιάζει κάποιες ενδιάμεσες ιδιότητες ανάμεσα στους προκαρυώτες και στους ευκαρυώτες. Το σύμπλοκο της συνθάσης βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του *Cryptocodinium cohnii*, όπως συμβαίνει και για τα περισσότερα συστήματα ενζύμων των ευκαρυωτών που συνθέτουν λιπαρά οξέα. Η συνθετάση του *C. Cohnii* είναι ένα σύμπλεγμα ενζύμων τύπου I με μοριακό βάρος 400000 και αποτελείται από δύο υπομονάδες ίδιου μοριακού βάρους. Το κύριο προϊόν της βιοσύνθεσης είναι το παλμιτικό οξύ. Το βέλτιστο pH για την ενεργότητα του είναι 8,3 και απαιτείται η παρουσία και του NADH₂ και του NADPH₂ για την μέγιστη ενεργότητα, όπως παρατηρείται και σε άλλες συνθάσες ευκαρυωτικών μικροοργανισμών. [13]

3.5 ΠΗΓΕΣ DHA

3.5.1 ΑΛΙΕΙΑ

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 παρουσιάζεται η ποσότητα που πρέπει να καταναλωθεί από διαφορετικά ψάρια και θαλασσινά την ημέρα, με σκοπό να διατηρηθεί μια διατροφή με ημερήσια πρόσληψη 1 g EPA και DHA.

Πίνακας 1: Απαιτούμενη ημερήσια κατανάλωση ψαριών

ΨΑΡΙΑ/ ΘΑΛΑΣΣΙΝΑ	ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ (g)
ΦΡΕΣΚΟΣ ΤΟΝΟΣ	70-360
ΣΑΡΔΕΛΕΣ	60-90
ΣΟΛΩΜΟΣ	60-135
ΣΚΟΥΜΠΡΙ	60-250
ΡΕΓΓΑ	45-60
ΠΕΣΤΡΟΦΑ (RAINBOW)	90-105
ΨΗΣΣΑ (ΕΙΔΟΣ ΒΑΚΑΛΛΟΥ)	90-225
ΒΑΚΑΛΛΟΣ	450
ΓΑΤΟΨΑΡΟ	450-600
ΣΤΡΕΙΔΙ (ΕΙΡΗΝΙΚΟΥ/ΑΝΑΤΟΛΙΚΟ/ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΙΑΣ)	75/195/240
ΑΣΤΑΚΟΣ	225-1275
ΚΑΒΟΥΡΙ (ALASKAN KING)	255
ΓΑΡΙΔΑ	330
ΜΥΔΙ	375
ΧΤΕΝΙ	525

Η αύξηση της παγκόσμιας κατανάλωσης τόσο των ιχθύων, όσο και των αντίστοιχων ελαίων τους, ώστε ο καταναλωτής να προμηθευτεί τις απαιτούμενες διατροφικές ποσότητες DHA, εμφανίζει τον κίνδυνο της υπεραλίευσης.[9]

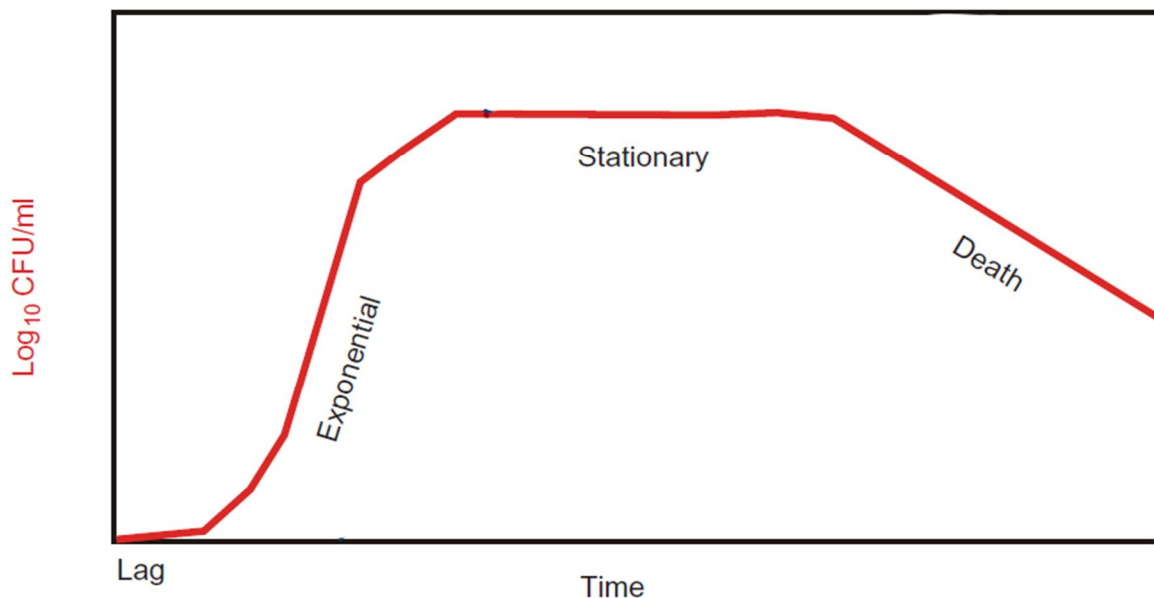
3.5.2 ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

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. Το ετερότροφο θαλάσσιο μικροφύκος *Cryptocodinium cohnii* με το μικροφύκος *Schizochytrium* sp. αντιπροσωπεύουν τις εμπορικά πιο ενδιαφέρουσες πηγές DHA. Συγκεκριμένα, το μικροφύκος *C.cohnii* μπορεί να δημιουργήσει ένα υψηλό ποσοστό DHA (25-60% των συνολικών λιπαρών οξέων).

4. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

4.1 ΦΑΣΕΙΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Οι φάσεις ανάπτυξης μικροφυκών συνήθως προσομοιάζουν αυτές για οποιοδήποτε κύτταρο μικροοργανισμού και αποτελούνται από τις παρακάτω φάσεις: λανθάνουσα, εκθετική, στασιμότητας, θανάτου. Κάθε μια από αυτές τις φάσεις αντιπροσωπεύει μια συγκεκριμένη περίοδο ανάπτυξης που σχετίζεται με φυσιολογικές αλλαγές στα κύτταρα της καλλιέργειας.



Εικόνα 8: Φάσεις ανάπτυξης μικροφυκών μιας καλλιέργειας

Η πρώτη φάση που παρατηρείται κατά την ανάπτυξη κυττάρων καλλιέργειας είναι η φάση υστέρησης ή λανθάνουσα φάση (lag phase). Σε αυτή την φάση ο ρυθμός ανάπτυξης είναι αρχικά μηδέν και η ανάπτυξη αρχίζει μετά από αυτή τη φάση. Η ύπαρξη της φάσης αυτής οφείλεται στην ανάγκη προσαρμογής των κυττάρων στις συνθήκες της καλλιέργειας. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει έναν απαιτούμενο χρόνο για την επαγωγή συγκεκριμένων αγγελιοφόρων RNA (mRNA) και την σύνθεση πρωτεϊνών για να ανταπεξέλθουν τα κύτταρα στις νέες συνθήκες. Η λανθάνουσα φάση μπορεί να οφείλεται και στις χαμηλές αρχικές πυκνότητες των μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα η ανάπτυξη των κυττάρων και η διαίρεση τους να καθυστερείται. Η φάση αυτή μπορεί να διαρκέσει από λεπτά μέχρι κάποιες ώρες. Στόχος κάθε βελτιστοποίησης της 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 στη νέα καλλιέργεια.

Η 2^η φάση της ανάπτυξης είναι η εκθετική φάση (exponential phase). Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από την ταχεία ανάπτυξη των κυττάρων στις υπάρχουσες συνθήκες της καλλιέργειας. Ο ρυθμός

ανάπτυξης είναι ανάλογος του αριθμού των κυττάρων σε ένα συγκεκριμένο χρόνο. Ωστόσο, καθώς τα κύτταρα συσσωρεύονται μετά από αρκετές γενιές, ο αριθμός των νέων κυττάρων με κάθε κυτταρική διαίρεση αυξάνεται δραματικά.

Η φάση που ακολουθεί την εκθετική είναι η στατική φάση (stationary phase), που χαρακτηρίζεται από απουσία 'καθαρής' ανάπτυξης κυττάρων. Τα κύτταρα συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να διαιρούνται. Η ανάπτυξη εξισορροπείται από έναν αριθμό κυττάρων που πεθαίνουν. Ένας από τους λόγους για τους οποίους μια καλλιέργεια οδηγείται στη φάση στασιμότητας είναι ο περιορισμός της πηγής άνθρακα και ενέργειας ή κάποιου άλλου απαραίτητου θρεπτικού συστατικού. Επιπρόσθετα, η αύξηση της ποσότητας των αποβλήτων των κυττάρων παρεμποδίζει την περαιτέρω ανάπτυξη της καλλιέργειας.

Τέλος, ακολουθεί η φάση θανάτου (death phase). Στην φάση αυτή μπορεί να υπάρχουν ορισμένα κύτταρα που μεταβολίζονται και διαιρούνται, αλλά τα περισσότερα κύτταρα έχουν καταστραφεί, με αποτέλεσμα η καλλιέργεια να μην μπορεί να αναπτυχθεί πια.[17]

4.2 ΑΥΤΟΤΡΟΦΗ – ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

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. Τα μικροφύκη που μεγαλώνουν αυτότροφα αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας την ηλιακή ενέργεια και μια ανόργανη πηγή άνθρακα, το CO₂. Σε αυτή την περίπτωση, όπως συμβαίνει και στα φυτά, τα μικροφύκη φωτοσυνθέτουν και χαρακτηρίζονται ως φωτοαυτότροφα.

Αντίθετα, υπάρχουν και είδη μικροφυκών που αναπτύσσονται ετεροτροφικά, με οργανικές πηγές άνθρακα, όπως είναι η γλυκόζη. Αυτά τα είδη δεν χρειάζονται φως ως πηγή ενέργειας. Η ετερότροφη ανάπτυξη είναι μια αερόβια διαδικασία κατά την οποία η αφομοίωση των οργανικών υποστρωμάτων παράγει ενέργεια μέσα από το μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορλίωσης με ταυτόχρονη κατανάλωση οξυγόνου, που αποτελεί και τον τελικό αποδέκτη των ηλεκτρονίων.

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. Στην περίπτωση συνδυασμού ετερότροφης και αυτότροφης ανάπτυξης η καλλιέργεια χαρακτηρίζεται ως μιξότροφη. Κατά τη μιξότροφη καλλιέργεια, τα μικροφύκη καταναλώνουν ταυτόχρονα ανόργανο διοξείδιο του άνθρακα και οργανικές πηγές άνθρακα παρουσία φωτός. Το CO₂ ρυθμίζεται με την φωτοσύνθεση και τα οργανικά συστατικά αφομοιώνονται με την κυτταρική αναπνοή.[18]

Η αυτότροφη ανάπτυξη των μικροφυκών περιορίζεται από την κατανομή του φωτός στα κύτταρα, κρατώντας τη συγκέντρωση των κυττάρων χαμηλότερα από 10g/L (για τα πιο πυκνά συστήματα καλλιέργειών). Όταν είναι υψηλές οι κυτταρικές συγκεντρώσεις σε μια αυτότροφη καλλιέργεια το πρόβλημα εντείνεται, καθώς τα κατώτερα στρώματα δεν έχουν πρόσβαση στο ηλιακό φως λόγω της διάθλασης ή της απορρόφησής του από τα ανώτερα στρώματα των καλλιέργειών. [19] Αντίθετα, η ετερότροφη καλλιέργεια δεν επηρεάζεται από αυτόν τον περιοριστικό παράγοντα οδηγώντας σε υψηλότερη πυκνότητα βιομάζας.

4.2.1 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Τα πλεονεκτήματα της ετερότροφης καλλιέργειας μικροφυκών σε σχέση με την φωτοαυτότροφη είναι:

- υψηλότερος ρυθμός ανάπτυξης της βιομάζας
- μεγαλύτερη παραγωγικότητα βιομάζας
- υψηλότερο λιπιδικό περιεχόμενο ανά ξηρή βιομάζα κυττάρων
- φτηνότερος και πιο απλός σχεδιασμός βιοαντιδραστήρα
- ευκολότερο scaling-up
- ευκολότερη μεταχείριση της βιομάζας αλλάζοντας τα υποστρώματα που καθορίζουν τα μεταβολικά μονοπάτια

Η παραγωγή από μικροφύκη κάτω από ετεροτροφικές συνθήκες είναι μια επιτυχημένη διεργασία για εμπορευματοποίηση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως τα φαρμακευτικά και διατροφικά σκευάσματα. Η υψηλή πυκνότητα της καλλιέργειας μπορεί να φτάσει τα 20 – 100 g/L σε αντιδραστήρες με έλλειψη φωτός. Με την απουσία της πηγής φωτός μειώνεται το κόστος της κατασκευής του βιοαντιδραστήρα. Επιπρόσθετα, με την καλλιέργεια μικροφυκών σε ετεροτροφικές συνθήκες υπάρχουν και περιβαλλοντικά οφέλη, καθώς γίνεται επιτυχής απομάκρυνση θρεπτικών (N, P) από αγροτικά και βιομηχανικά υγρά απόβλητα. [20]

4.2.2 ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΧΡΗΣΙΜΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

Με την προαναφερόμενη περιγραφή των δομικών στοιχείων ενός κυττάρου μικροφύκου είναι αντιληπτό πως υπό ετερότροφες συνθήκες τα λιπαρά επιτελούν πρωτεύοντα ρόλο όχι μόνο ενέργειας, αλλά και προστασίας του ευκαρυώτη. Αποτελούν βασικό συστατικό των μεμβρανών των οργανιδίων. Έτσι, 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. 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. [21]

5. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Στις ετερότροφες πρακτικές 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 όπου αναπτύσσονται τα μικροφύκη βασίζεται σε μια στοιχειομετρική αναλογία βιομάζας και θρεπτικών συστατικών υπό κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Το σύνολο των θρεπτικών συστατικών αυτών περιλαμβάνει 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. Παρακάτω επισημαίνεται το σύνολο των βασικότερων παραγόντων με τις επιμέρους λεπτομέρειές τους.

5.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Το pH της καλλιέργειας είναι ένας σημαντικός παράγοντας. Έχει παρατηρηθεί ότι ελέγχοντας το pH της διαδικασίας, η καλλιέργεια καταλήγει σε υψηλότερη απόδοση βιομάζας και επιθυμητού προϊόντος σε σχέση με μια ανάπτυξη όπου το pH μεταβάλλεται αυτόνομα. Η βέλτιστη θερμοκρασία για τα μικροφύκη μπορεί να ενισχύσει την ενεργότητα των ενζύμων και να ελαττώσει τις απαιτήσεις ενέργειας. Παρ'όλα αυτά, κάποιες φορές χαμηλότερες θερμοκρασίες μπορούν να βελτιώσουν την παραγωγή ενός συγκεκριμένου μεταβολίτη λόγω συνθηκών stress που επιβάλλονται στα κύτταρα της καλλιέργειας. Άλλος ένας σημαντικός παράγοντας είναι η πηγή του αζώτου. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η υψηλή αναλογία άνθρακα-αζώτου C/N μπορεί να οδηγήσει στην συσσώρευση μεταβολιτών, όπως είναι τα καροτενοειδή και τα λιπαρά οξέα, ως αποτέλεσμα συνθηκών stress. Επομένως, για την βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας του προϊόντος υιοθετούνται συνθήκες έλλειψης αζώτου.

5.1.1 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Πιο συγκεκριμένα, πρωταρχικό ρόλο στην όλη μεταβολική διεργασία του μικροφύκου διαδραματίζει η θερμοκρασία, που όχι μόνο συμβάλει στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, αλλά και στην παραγωγικότητά του. Μεγαλύτερος ρυθμός ανάπτυξης των μικροφυκών επιτυγχάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας στο βέλτιστο επίπεδο. Μελέτες σε έναν μεγάλο αριθμό μικροφυκών έχουν δείξει ότι και υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες μπορούν να υποβοηθήσουν την παραγωγικότητα των λιπαρών, καθώς δημιουργούν «συνθήκες στρες» του κυττάρου. [22] Το επίπεδο της ακορεστότητας στα λιπαρά οξέα αυξάνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ τα κορεσμένα λιπαρά οξέα παρατηρούνται σε μεγαλύτερη ποσότητα σε υψηλές θερμοκρασίες. [23]

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.

Συγκεκριμένα, για το μικροφύκος *Cryptocodinium cohnii* η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι 27 °C. Από την θερμοκρασία ανάπτυξης της καλλιέργειας επηρεάζεται όχι μόνο το λιπιδικό περιεχόμενο αλλά και το ποσοστό του DHA στο σύνολο των λιπαρών.[24]

5.1.2 ΑΝΑΔΕΥΣΗ

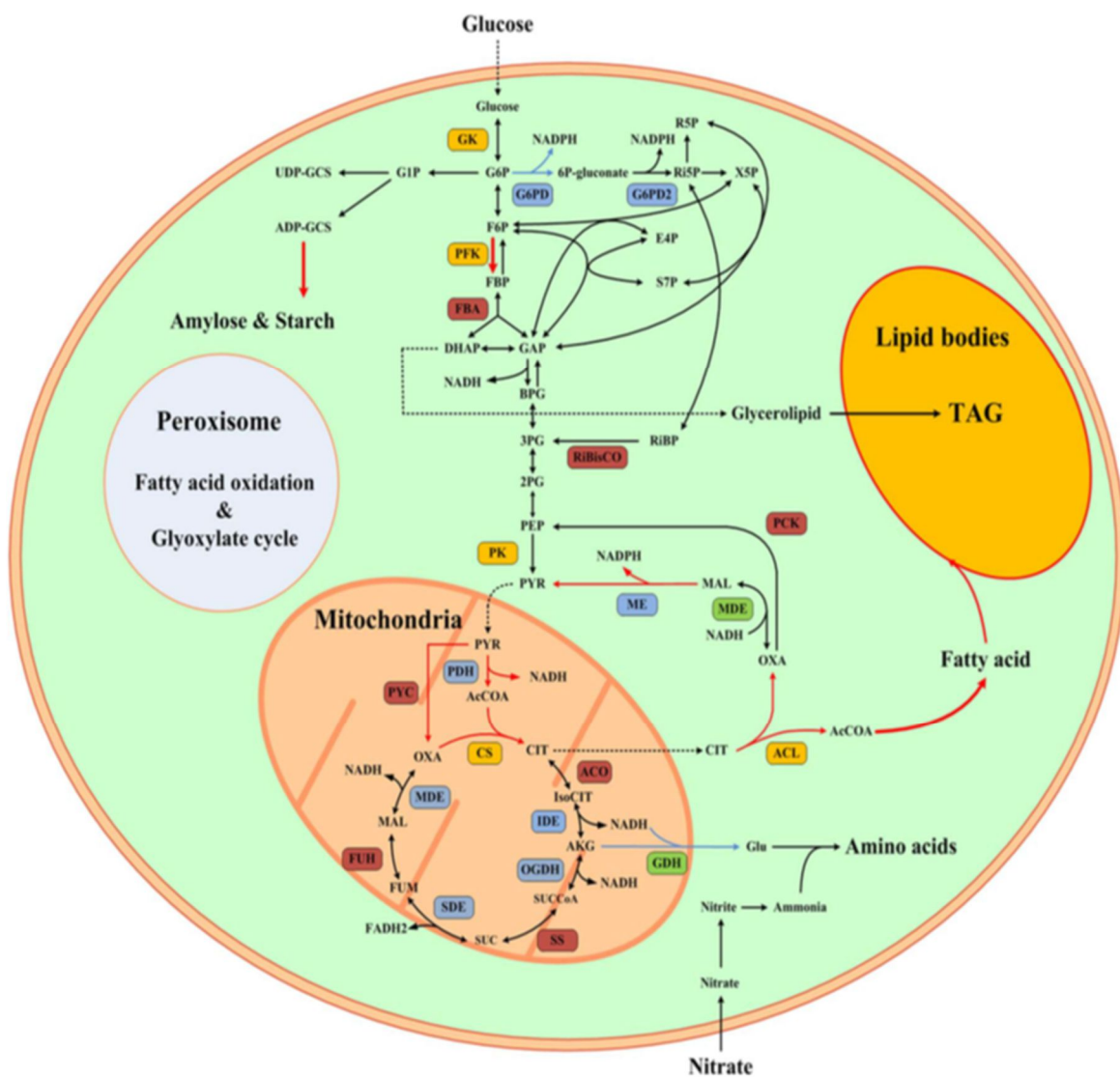
Η ανάπτυξη του *Cryptocodinium cohnii* σε batch καλλιέργειες βελτιώνεται σημαντικά ενισχύοντας την ταχύτητα ανάδευσης από 50 σε 100 rpm, λόγω της αύξησης της παροχής οξυγόνου. Ταυτόχρονα με την αύξηση της ανάδευσης βελτιώνεται και η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών στα κύτταρα του μικροφύκου, οδηγώντας και σε μεγαλύτερη ανάπτυξης της καλλιέργειας. Βέβαια, πρέπει να σημειωθεί ότι σε υψηλούς ρυθμούς ανάδευσης υπάρχει κίνδυνος να προκληθεί διάρρηξη των κυττάρων επηρεάζοντας την πορεία της καλλιέργειας. [25]

5.2 ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

5.2.1 ΓΛΥΚΟΖΗ

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.

Βέβαια, η κατανάλωση του άνθρακα εξαρτάται άμεσα από το πόσο αποτελεσματικά μεταβολίζεται και μεταφέρεται μέσα από τις μεμβράνες των κυττάρων. Κάτω από ετερότροφες συνθήκες, η γλυκόζη χρησιμοποιείται στα κύτταρα μέσα από το μεταβολικό μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών.[26]



Εικόνα 9: Μεταβολισμός του άνθρακα και του αζώτου στο μικροφύκος *Crypthecodinium cohnii*[27]

Ωστόσο, η ένταξη της γλυκόζης ως πηγή άνθρακα στα συστήματα των καλλιεργειών εμφανίζει διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με το μικροφύκος το οποίο θα την καταναλώσει και την 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 παρατηρείται παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροφυκών, ενώ σε ορισμένες συγκεντρώσεις γλυκόζης διαπιστώνεται βέλτιστη ανάπτυξη. Για το μικροφύκος *Cryptocodinium cohnii* ο ρυθμός ανάπτυξης της καλλιέργειας ελαττώνεται για συγκεντρώσεις γλυκόζης μεγαλύτερες από 25 g/L.[26]

Αντίθετα, σε έρευνες των Jiang & Chen σε εύρος συγκέντρωσης γλυκόζης από 5-40 g/L ο υψηλότερος βαθμός ανάπτυξης και η υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας παρατηρούνται για συγκέντρωση γλυκόζης 20 g/L.[28]

5.3 ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ

Σύμφωνα με τα παραπάνω, γίνεται 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. [27]

Από όλα τα μακροθρεπτικά συστατικά στο θρεπτικό υλικό το άζωτο, το οποίο αντιστοιχεί στο 1 - 10% της ξηρής βιομάζας των μικροφυκών, είναι το σημαντικότερο συστατικό επηρεάζοντας την ανάπτυξη και την αφομοίωση λιπαρών σε πολλά μικροφύκη. Το άζωτο εμφανίζεται σε διάφορες μορφές όπως είναι το αμμώνιο, τα νιτρικά, το εκχύλισμα μαγιάς (yeast extract), η πεπτόνη και η ουρία, και αλλάζει σημαντικά τον μεταβολισμό των κυττάρων.[23] Η έλλειψη αζώτου θεωρείται ένας κρίσιμος παράγοντας που επηρεάζει την παραγωγή λιπαρών από τα μικροφύκη, μετατρέποντας την λιπιδική σύνθεση από σύνθεση λιπαρών μεμβράνης σε ουδέτερα λιπαρά (ως επί το πλείστον τριγλυκερίδια). Η λειτουργία του ενζύμου αναγωγάση του νιτρικού (nitrate reductase) συμμετέχει στον μεταβολισμό του αζώτου και στην παραγωγή των λιπαρών και καθορίζεται από το λόγο C/N.[27]

Είναι πλέον αποδεκτό πως η έλλειψη αζώτου προκαλεί συσσώρευση λιπαρών από τα κύτταρα μικροφυκών

. Έχουν διαπιστωθεί δύο στρατηγικές έλλειψης αζώτου για την ενίσχυση της παραγωγής λιπαρών. Η πρώτη είναι μια στρατηγική δύο σταδίων κατά την οποία τα κύτταρα μεγαλώνουν σε συνθήκες πλούσιες σε άζωτο με σκοπό να υποβοηθηθεί η ανάπτυξη της βιομάζας. Έπειτα, κατά το δεύτερο στάδιο, τα κύτταρα μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο με έλλειψη αζώτου για την παραγωγή λιπαρών. Όσον αφορά την δεύτερη στρατηγική, η καλλιέργεια αποτελείται από ένα μόνο στάδιο στο οποίο το θρεπτικό περιέχει την επιθυμητή συγκέντρωση του αζώτου και καθώς η καλλιέργεια μεγαλώνει το άζωτο μειώνεται μέχρι την επίτευξη συνθηκών απουσίας αζώτου. Επομένως, τα επίπεδα αζώτου πρέπει να υπόκεινται σε έλεγχο καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας για να μπορούν να διατηρούνται τα επίπεδα του σταθερά στο θρεπτικό υλικό και αποφεύγοντας κατά συνέπεια την καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών, την απώλεια βιομάζας και άλλες αλλαγές στην κυτταρική σύσταση. [23]

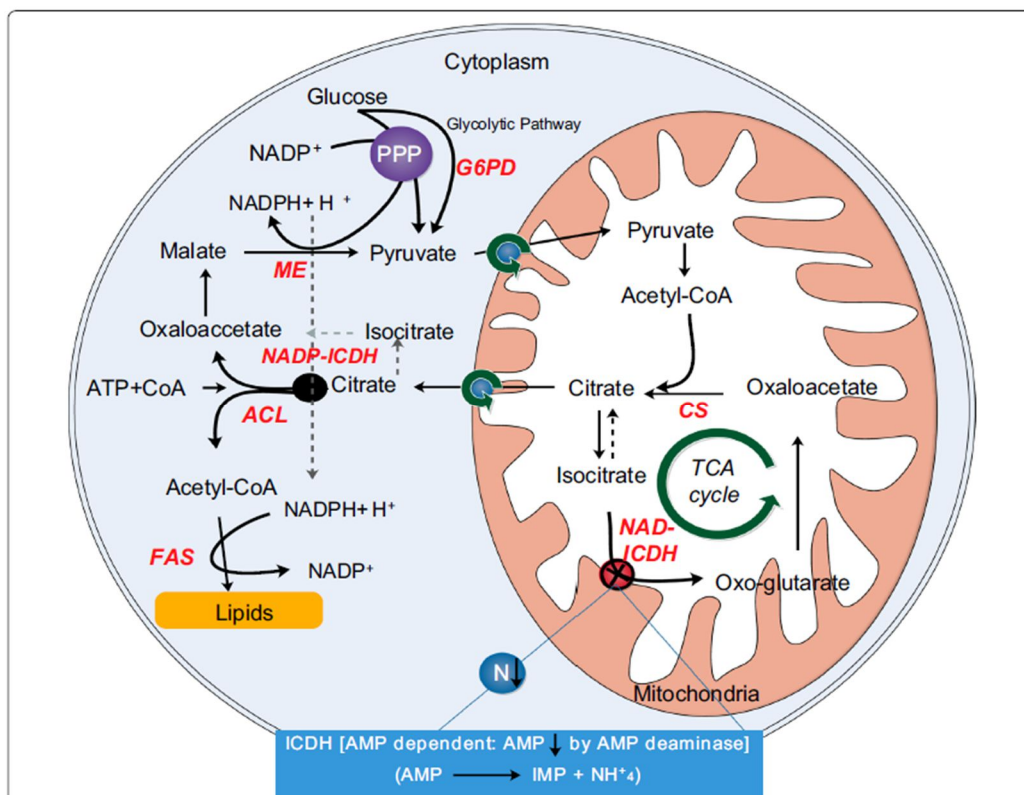
Συγκριτικά, για τα περισσότερα είδη των μικροφυκών η διαδοχική σειρά πηγών αζώτου είναι: αμμώνιο>νιτρικό οξύ>νιτρώδες>ουρία και ποικίλουν ανάλογα το είδος και τη συγκέντρωση. Η διαφορά μεταξύ των πηγών αυτών εντοπίζεται στη μορφή του αζώτου και πόσο το δυνατόν είναι μεταβολικά εύκολο για το μικροφύκος να τη λάβει, καθώς βρίσκεται σαν δεσμός NH_4^- N, NH_3^- N ή NH, με την πρώτη να είναι η ευκολότερη δυνατή περίπτωση κατανάλωσης από τα μικροφύκη, όπως προκύπτει στην παραπάνω σύγκριση.[29]

Στις καλλιέργειες του μικροφύκου *Cryptocodinium Cohnii* προτεινόμενες πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα των W. Safadr, M. Shammon και X. Zan είναι το θειικό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, η ουρία $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, το ανθρακικό αμμώνιο NH_4HCO_3 και το νιτρικό νάτριο NaNO_3 . Σε καλλιέργειες 7 ημερών με ίδια αρχική συγκέντρωση πηγής αζώτου, η ανάπτυξη των μικροφυκών παρατηρήθηκε το πρώτο 48 h, κατά το οποίο υπήρχε επαρκής ποσότητα αζώτου και γλυκόζης ως πηγή άνθρακα. Αυτή η φάση χαρακτηρίστηκε ως cell growth stage. Συγκρίνοντας το

θεικό αμμώνιο, το ανθρακικό αμμώνιο και την ουρία, η βιομάζα (DCW) των καλλιέργειών μετά τις 48h με το νιτρικό νάτριο ήταν υψηλότερη.

Μετά τις 48h τα λιπαρά ξεκίνησαν να συσσωρεύονται στα κύτταρα και η καλλιέργεια βρίσκεται στην φάση lipid accumulation stage. Το υψηλότερο ποσοστό των συνολικών λιπαρών και σε αυτή τη φάση παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με νιτρικό νάτριο. Επομένως, η μεγαλύτερη παραγωγικότητα βιομάζας και λιπαρών μετρήθηκε για πηγή αζώτου το NaNO_3 . Όσον αφορά την σύσταση των λιπαρών οξέων το υψηλότερο ποσοστό DHA παράγεται στην περίπτωση του NaNO_3 , ενώ δεν υπάρχει ιδιαίτερη διαφοροποίηση στις διαφορετικές καλλιέργειες για την περίπτωση των λιπαρών οξέων C16 και C18.[30]

Σχετικά με την μεταβολική δραστηριότητα κατά την συσσώρευση λιπαρών και την επιρροή των διαφορετικών πηγών αζώτου στα βασικότερα ένζυμα του μεταβολισμού παρατηρείται ότι μειώνονται οι λειτουργίες των ενζύμων glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) και malic enzyme (ME) κατά την μετάβαση από την φάση ανάπτυξη στη φάση συσσώρευσης των λιπαρών. Αντίθετα, τα ένζυμα της συνθάσης των λιπαρών οξέων (FAS) και της ATP λύσης (ACL) αυξάνουν τη λειτουργία τους κατά το στάδιο συσσώρευσης των λιπαρών και εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα στην περίπτωση του νιτρικού νατρίου, όπου παρατηρείται και η υψηλότερη παραγωγή λιπαρών.



Εικόνα 10: Μεταβολικό μονοπάτι της συσσώρευσης λιπαρών σε μικροοργανισμούς και τα συχετιζόμενα ένζυμα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ύπαρξη αζώτου αυξάνει την τάση του μικροφύκους 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.

5.4 ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ-ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ

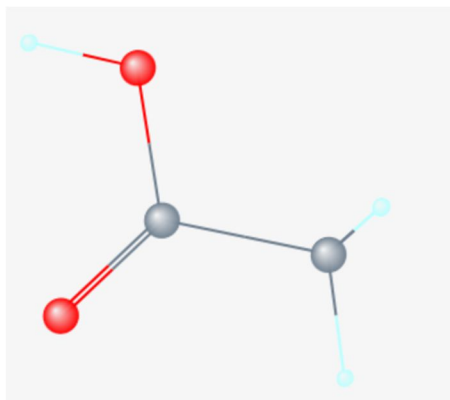
Τα τελευταία χρόνια το όλο και μεγαλύτερο αντίκτυπο της υπερθέρμανσης του πλανήτη έχει ενθαρρύνει την ιδέα του βιοδιωλιστηρίου (biorefinery). Η έννοια αυτή αντιπροσωπεύει μια πρωτοπόρα προσέγγιση της περιβαλλοντικής διαχείρισης, κατά την οποία τα προϊόντα στο τέλος της ζωής τους ή τα απόβλητα θεωρούνται ως πολύτιμες πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοπροϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας και βιοκαυσίμων. Μεταξύ αυτών, τα απόβλητα τροφίμων αντιπροσωπεύουν την βέλτιστη πρώτη ύλη για την διαδικασία αυτή. Ο οργανισμός τροφίμων και γεωργίας (FAO food and agriculture organization) εκτιμά ότι το ένα τρίτο της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων χάνεται ή σπαταλάται κατά την αλυσίδα διανομής τροφίμων. Τα μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης παρήγαγαν περίπου 89 εκατομμύρια τόνους αποβλήτων τροφίμων το 2012. Πολύ συχνά αυτά τα απόβλητα συμμετέχουν με την καύση τους στις υψηλές εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου και στην αύξηση των επιπέδων τοξικών συστατικών στην ατμόσφαιρα. Μια βιώσιμη εναλλακτική είναι η εκμετάλλευση των αποβλήτων τροφίμων για την παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs volatile fatty acids). Τα οξέα αυτά είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στη χημική και βιοτεχνολογική βιομηχανία. Σήμερα, τα VFAs παράγονται κυρίως μέσω οξείδωσης ή καρβοξυλίωσης άλλων χημικών ουσιών όπως είναι οι αλδεΐδες και τα αλκένια. Η βιοτεχνολογική οπτική για την παραγωγή τους εμπεριέχει την διαδικασία της ζύμωσης είτε από καλλιέργειες ενός στελέχους αναερόβιων βακτηριακών είτε από καλλιέργειες πολλών στελεχών (mixed microbial cultures).[31]

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.

5.4.1 ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ (ACETIC ACID)

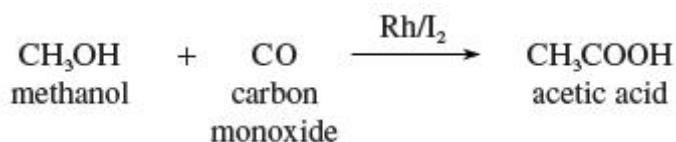
Η βασικότερη ένωση αυτής της κατηγορίας, που αποτελεί και μία από τις πιο κοινές πηγές άνθρακα για αρκετά είδη μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των μικροφυκών, είναι το οξικό οξύ. Βιοχημικά, στις ετερότροφες συνθήκες, η εισαγωγή του οξέος στην μεμβράνη του μικροφύκου γίνεται από μια πρωτεΐνη-μεταφορέα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

Το οξικό οξύ είναι ένα από τα απλούστερα καρβοξυλικά οξέα. Είναι ένα σημαντικό χημικό αντιδραστήριο και βιομηχανική χημική ουσία, που χρησιμοποιείται στην παραγωγή πλαστικών μπουκαλιών αναψυκτικών και φωτογραφικών μεμβρανών, ως μέσο καθαρισμού και ως ρυθμιστής οξύτητας.



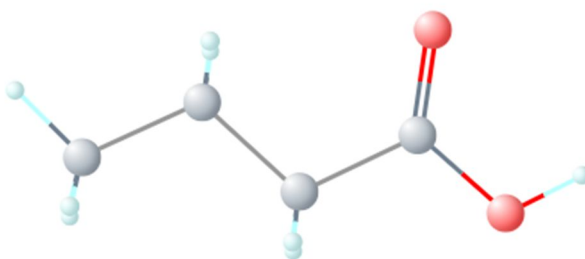
Εικόνα 11: Οξικό οξύ

Το οξικό οξύ είναι ένα διαυγές άχρωμο υγρό με ισχυρή οσμή μοριακού βάρους 60.052 g/mol με σημείο ανάφλεξης τα 104 °F και σημείο βρασμού τους 118 °C. Το οξικό οξύ μπορεί να παρασκευαστεί σε βιομηχανική κλίμακα με οξείδωση ακεταλδεΐδης ή μεθανόλης ή βουτανίου και βουτενίου.



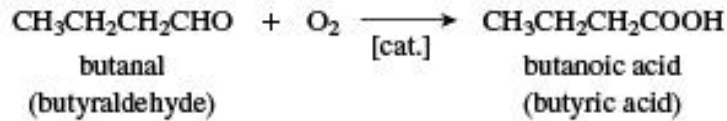
5.4.2 ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ (BUTYRIC ACID)

Το βουτυρικό οξύ, ένα οξύ με τέσσερα άτομα άνθρακα, εμφανίζεται με τη μορφή εστέρων σε ζωικά λίπη και σε φυτικά έλαια. Το οξύ αυτό έχει εμπορική σημασία για τη χρήση του στην παρασκευή εστέρων κατώτερων αλκοολών. Ο ανυδρίτης του χρησιμοποιείται για την παραγωγή πλαστικού.



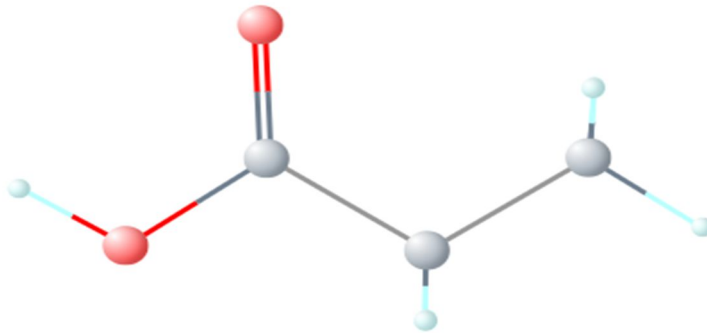
Εικόνα 12: Βουτυρικό οξύ

Το βουτυρικό οξύ είναι ένα διαυγές άχρωμο υγρό μοριακού βάρους 88,106 g/mol με σημείο ανάφλεξης τα 170 °F και σημείο βρασμού τους 164 °C. Το βουτυρικό οξύ παράγεται από καταλυτική οξείδωση της βουτανάλης.



5.4.3 ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟ ΟΞΥ (PROPIONIC ACID)

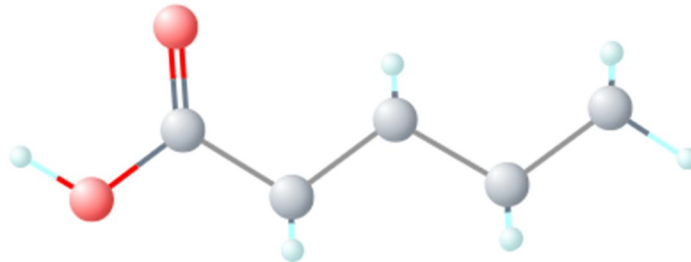
Το προπιονικό οξύ είναι ένα άχρωμο υγρό με έντονη οσμή που αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν για την παραγωγή άλλων χημικών ουσιών, όπως είναι τα πολυμερή. Το προπιονικό οξύ έχει μοριακό βάρος 74.079 g/mol με σημείο ανάφλεξης τα 130 °F και σημείο βρασμού τους 141 °C. Βιομηχανικά παρασκευάζεται κυρίως είτε από καρβοξυλίωση του αιθυλενίου χρησιμοποιώντας ως καταλύτη το καρβονύλιο του νικελίου είτε με την οξείδωση της προπανάλης.



Εικόνα 13: Προπιονικό οξύ

5.4.4 ΠΕΝΤΑΝΟΪΚΟ ΟΞΥ (VALERIC ACID)

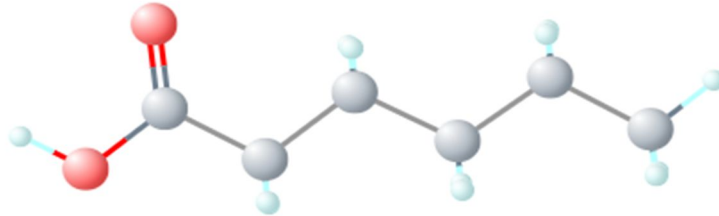
Το βαλερικό οξύ είναι ένα αλκυλοκαρβοξυλικό οξύ ευθείας αλυσίδας με πέντε άτομα άνθρακα. Όπως και τα άλλα χαμηλού μοριακού βάρους καρβοξυλικά οξέα έχει δυσάρεστη οσμή. Η κύρια χρήση του είναι στην σύνθεση εστέρων, οι οποίοι απαντώνται στη βιομηχανία αρωμάτων και καλλυντικών. Το βαλερικό οξύ έχει μοριακό βάρος 102.133 g/mol με σημείο ανάφλεξης τα 192°F και σημείο βρασμού τους 186 °C.



Εικόνα 14: Βαλερικό οξύ

5.4.5 ΕΞΑΝΟΪΚΟ ΟΞΥ (CAPROIC ACID)

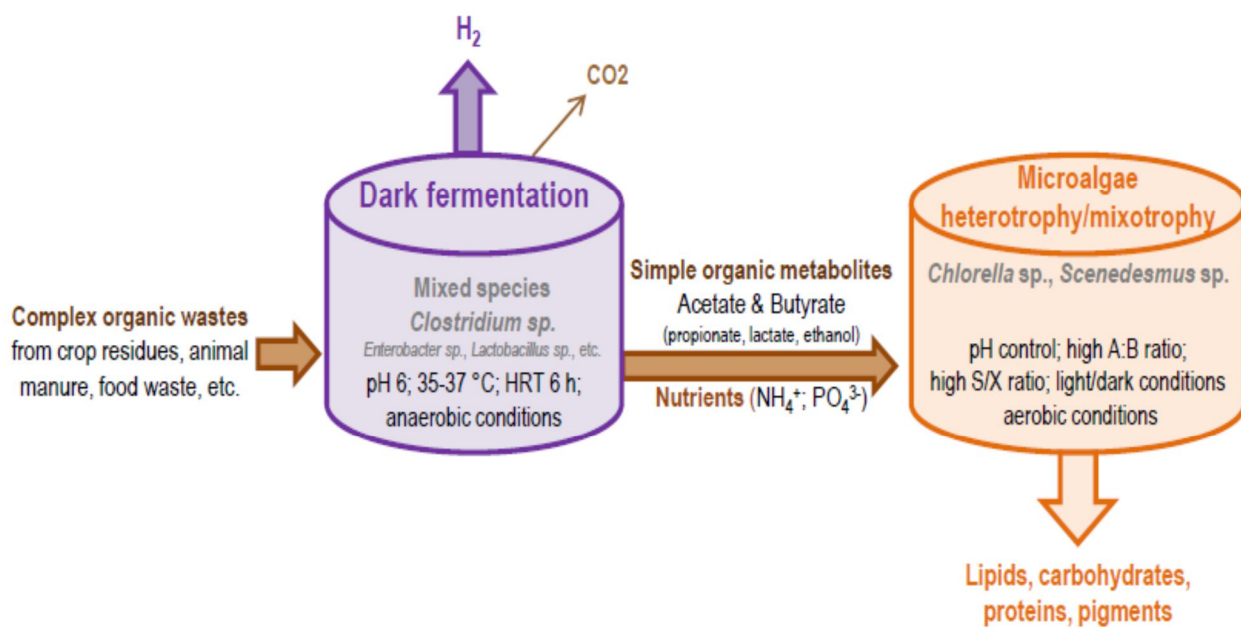
Το καπροϊκό οξύ είναι ένα κορεσμένο λιπαρό οξύ με έξι άτομα άνθρακα. Είναι ένα μέσης αλυσίδας τριγλυκερίδιο. Απαντάται φυσικά σε διάφορα φυτικά και ζωικά λίπη και έλαια. Το προπιονικό οξύ έχει μοριακό βάρος 116.16 g/mol με σημείο ανάφλεξης τα 220 °F και σημείο βρασμού τους 205 °C. Χρησιμοποιείται σε βοιμηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. [32]



Εικόνα 15: Καπροϊκό οξύ

6. ‘ΣΚΟΤΕΙΝΗ’ ΖΥΜΩΣΗ (DARK FERMENTATION)

Τα πτητικά λιπαρά οξέα και το υδρογόνο παραδοσιακά παράγονται μέσω χημικών οδών που στηρίζονται άμεσα ή έμμεσα στα ορυκτά καύσιμα. Τα τελευταία χρόνια, γίνεται συνδυασμός dark fermentation με βακτήρια, όπου παράγονται υδρογόνο και VFAs, με ετερότροφη καλλιέργεια μικροφυκών, διαδικασία από την οποία προκύπτουν τα λιπαρά. Η διεργασία του dark fermentation ή αλλιώς ‘σκοτεινή’ ζύμωση αποτελεί μια διαδικασία αναερόβιας χώνευσης βιοαποβλήτων χωρίς το 4^ο στάδιο της μεθανογένεσης. Η όλη διαδικασία είναι μια ιδιαίτερα βιώσιμη προσέγγιση. Η dark fermentation μετατρέπει ένα μεγάλο εύρος αποβλήτων σε υδρογόνο κάτω από αναερόβιες συνθήκες στις οποίες τα βακτήρια διασπούν σύνθετες οργανικές ουσίες σε οργανικά οξέα. Το οξικό και το βουτυρικό οξύ είναι τα δύο κύρια τελικά προϊόντα της ζύμωσης και χρησιμοποιούνται μετέπειτα ως πηγές άνθρακα χαμηλού κόστους για να διατηρήσουν την ανάπτυξη ετερότροφων μικροφυκών. [33]

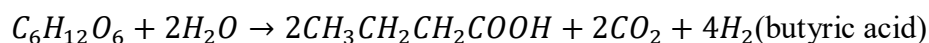


Εικόνα 16: Διεργασίες dark fermentation σε συνδυασμό με την ανάπτυξη μικροφυκών

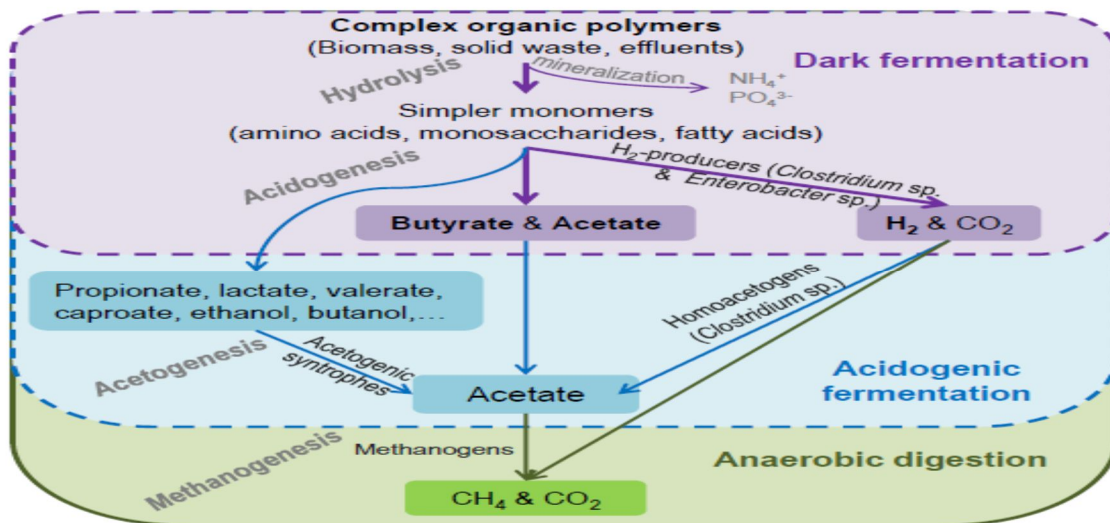
Η διαδικασία του dark fermentation είναι κομμάτι της αναερόβιας ζύμωσης που καταλήγει στην παραγωγή των πτητικών λιπαρών οξέων και του υδρογόνου μέσα από αναερόβια βακτήρια. Με την χρήση ρευμάτων αποβλήτων οι μικτές καλλιέργειες έχουν διαθέσιμο ένα μεγάλο εύρος μη αποστειρωμένων υποστρωμάτων χαμηλώνοντας το συνολικό κόστος της διαδικασίας, καθώς δεν απαιτούνται στείρες συνθήκες. Όλα τα είδη βιομάζας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα αρκεί να περιέχουν υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπαρά, κυτταρίνη και ημικυτταρίνες ως κύρια συστατικά, προωθώντας έτσι την έννοια του βιοδυλιστηρίου που αναφέρθηκε προηγουμένως.

Οι ροές αποβλήτων που θεωρούνται κατάλληλες για την παραγωγή VFAs πρέπει να έχουν υψηλό οργανικό φορτίο που μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη των βακτηρίων. Ανάμεσα στα πιο δημοφιλή είναι τα απόβλητα από βιομηχανίες χάρτου και τα απόβλητα τροφίμων.[34] Πιο συγκεκριμένα, τα απόβλητα τροφίμων προέρχονται από νοικοκυριά, εστιατόρια, σουπερμάρκετ και βιομηχανίες τροφίμων. Χαρακτηρίζονται από την ετερογενή φύση τους παρά την κοινή προέλευσή τους. Βέβαια, όλα αυτά τα ρεύματα αποβλήτων τροφίμων έχουν κοινά χαρακτηριστικά, όπως είναι το υψηλό οργανικό φορτίο, οι υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου και φωσφόρου και τα αδιάλυτα συστατικά για τα μεταβολικά μονοπάτια των μικροοργανισμών.[31]

Στις μικτές καλλιέργειες, τα κύρια μονοπάτια παραγωγής υδρογόνου κατά την διάρκεια της χώνευσης είναι το μονοπάτι του οξικού και του βουτυρικού οξέος, όπως παρουσιάζεται θεωρητικά από τις παρακάτω εξισώσεις:



Θεωρητικά, το 66,7% και το 83% από το COD της γλυκόζης των αποβλήτων μετατρέπεται σε οξικό και σε βουτυρικό αντίστοιχα. Από τις εξισώσεις οι συγκεντρώσεις των οξέων που προκύπτουν από την γλυκόζη είναι 6,7 g/L για το οξικό και 4,9 g/L για το βουτυρικό οξύ.



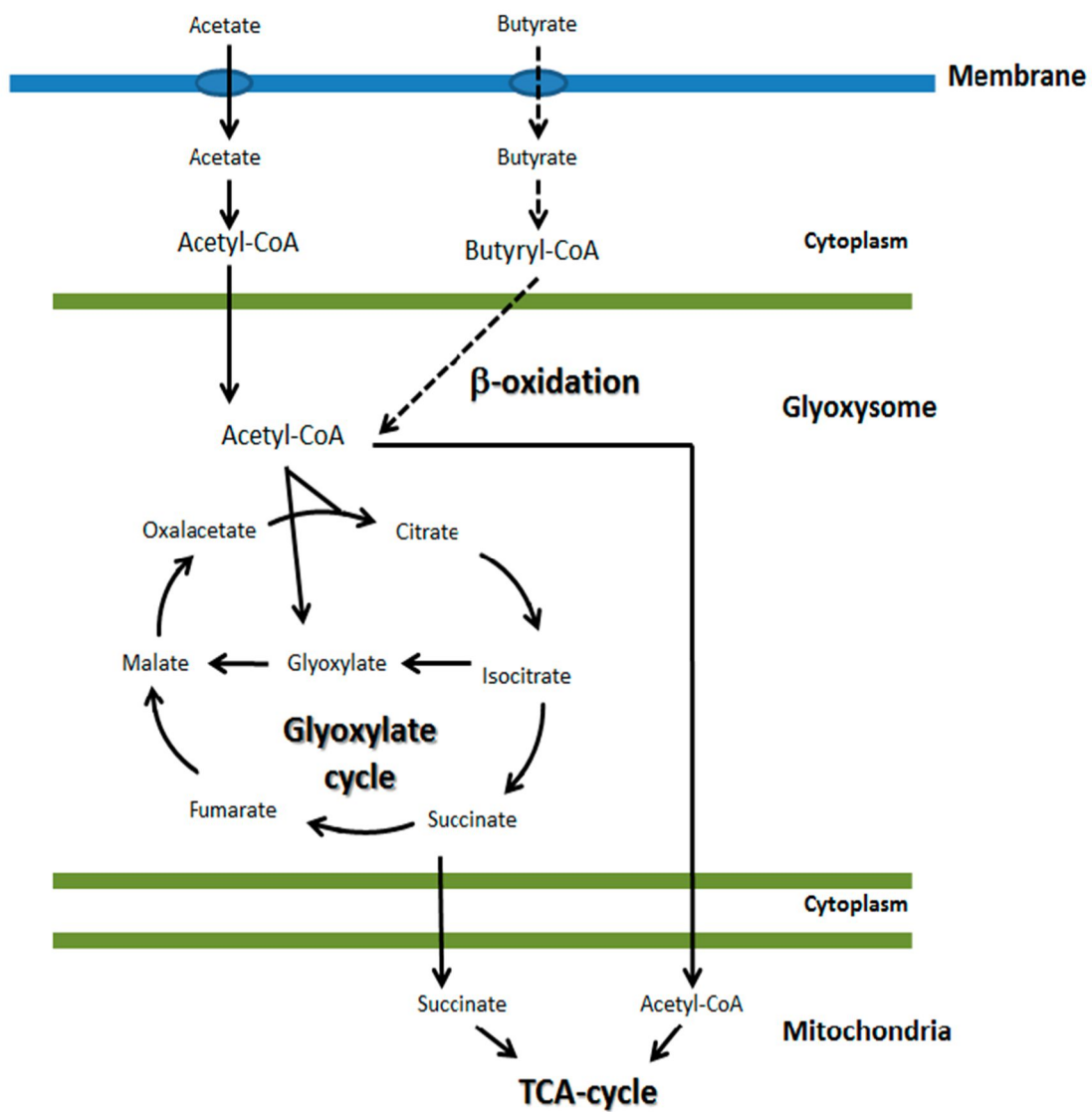
Εικόνα 17: Διαργασίες κατά την Dark fermentation

Κάτω από τις αναερόβιες συνθήκες η γλυκόζη μεταβολίζεται αρχικά σε πυροσταφυλικό οξύ και στη συνέχεια μετατρέπεται σε μια σειρά τελικών προϊόντων που είναι το λακτικό οξύ, το οξικό οξύ, η αιθανόλη, το διοξείδιο του άνθρακα και το υδρογόνο. Μέσω της ρύθμισης του pH είτε της προσθήκης παρεμποδιστών της μεθανογένεσης τα πτητικά λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας (C2-C4) μπορούν να μετατραπούν σε μεσαίας αλυσίδας (C5-C8) με επιμήκυνση. Ουσιαστικά, η διαδικασία δημιουργίας μεγαλύτερης αλυσίδας μπορεί να γίνει μέσω της διαδικασίας επιμήκυνσής τους. Οι

μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα VFAs ως αποδέκτες ηλεκτρονίων και το υδρογόνο ή την αιθανόλη ως δότες ηλεκτρονίων, προκειμένου να παράξουν μέσης αλυσίδας VFAs, όπως είναι το βαλερικό και το καπροϊκό οξύ. [33]

6.1 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ VFAs

Τα μικροφύκη είναι μικροοργανισμοί που σε συνθήκες σκότους μπορούν να καταναλώσουν πηγές άνθρακα και να μεγαλώσουν παράγοντας διάφορους μεταβολίτες, όπως λιπαρά. Εκτός από καθαρές πηγές άνθρακα ορισμένα μικροφύκη, στα οποία ανήκει και το μικροφύκος *Cryptocodinium Cohnii*, μπορούν να καταναλώσουν και VFAs προερχόμενα από την διαδικασία της dark fermentation. Με αυτό τον τρόπο τα μικροφύκη αποτελούν ένα μέσο βιομετατροπής των αποβλήτων σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας.



Εικόνα 18: Μεταβολικά μονοπάτια για την αφομοίωση του οξικού και του βουτυρικού οξέος

Το οξικό οξύ (acetate) είναι ενδιάμεσο της αναερόβιας χώνευσης και μπορεί να μετατραπεί από τα μικροφύκη σε ακετυλο-CoA, που αποτελεί την κύρια πρόδρομη ένωση για την λιπιδική σύνθεση. Οι ευκαρυώτες μικροοργανισμοί είναι ικανοί να αφομοιώσουν το οξικό οξύ μέσω μιας μονοκαρβοξυλικής πρωτεΐνης-μεταφορέα που συμβάλλει στην μεταφορά μονοκαρβοξυλικών μορίων μέσω της μεμβράνης. Το μεταφερόμενο οξικό οξύ χρησιμοποιείται από την ακετυλο-CoA συνθετάση για να ακετυλιώσει το συνένζυμο A χρησιμοποιώντας ένα μόριο ATP. Η μεταβολική οξείδωση του ακετυλο-CoA χρησιμοποιεί δύο μονοπάτια, είτε τον glyoxylate cycle, ο οποίος μετατρέπει το ακετυλο-CoA σε μηλεϊνικό (malate), είτε τον tricarboxylic acid cycle (TCA), που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια.

Το βουτυρικό οξύ είναι ένα άλλο παραπροϊόν της dark fermentation. Έχοντας υψηλότερο μοριακό βάρος απαιτεί περισσότερα βήματα για την μετατροπή του σε ακετυλο-CoA. Το βουτυρικό μετατρέπεται σε ακετυλο-CoA μέσω της β-οξείδωσης[34].

Συνήθως, οι πηγές άνθρακα μελετώνται ως υπόστρωμα ξεχωριστά. Στην περίπτωση αποβλήτων υπάρχουν πολλές διαφορετικές πηγές άνθρακα για να διατηρήσουν την ανάπτυξη των μικροφυκών. Σε αντίθεση με το οξικό οξύ που μπορεί αποτελεσματικά να μετατραπεί σε λιπαρά, η κατανάλωση βουτυρικού από τα μικροφύκη είναι πολύ πιο αργή και μπορεί να μειώσει και την ανάπτυξή τους όταν και τα δύο VFAs είναι παρόντα. Οι αποδόσεις βιομάζας που μετριοούνται με πηγή άνθρακα το οξικό και το βουτυρικό οξύ είναι παρόμοιες. [33]Επιπρόσθετα, η πρόσληψη βουτυρικού και προπιονικού οξέος επιταχύνεται όταν το οξικό οξύ εξαντλείται. Αρχικά, μόνο το υπόστρωμα που οδηγεί στον υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης χρησιμοποιείται από τα μικροφύκη, ενώ η κατανάλωση των υπολοίπων καταστέλεται. Μόνο μετά την πλήρη κατανάλωση του υποστρώματος που προτιμάται, το μικροφύκος αρχίζει να μεταβολίζει τις άλλες πηγές άνθρακα. Για αυτό τον λόγο, η υψηλή συγκέντρωση του οξικού μπορεί να εξασφαλίσει ότι αρχικά θα παραχθούν αρκετά κύτταρα ώστε μετέπειτα να καταναλώσουν και τα υπόλοιπα υποστρώματα.[34] Έχει παρατηρηθεί, επίσης, ότι το προπιονικό οξύ βελτιώνει την κυτταρική ανάπτυξη με ταυτόχρονη χρήση του οξικού οξέως. Αυτό οφείλεται στο ότι το προπιονικό προσφέρει επιπλέον μεταβολίτες για την σύνθεση των συστατικών των κυττάρων και βελτιώνει την μεταβολική ισορροπία σε σχέση με την ισορροπία σε συνθήκες ανάπτυξης μόνο με οξικό.[35]

7. ΗΜΙΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ (FED-BATCH) ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ *Cryptocodinium Cohnii*

Κατά την χρήση εναλλακτικών πηγών άνθρακα, όπως είναι τα οργανικά οξέα, για την ανάπτυξη καλλιεργειών πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι αυτές οι ουσίες μπορεί να είναι τοξικές σε υψηλές συγκεντρώσεις για τα μικροφύκη. Η πιθανότητα αυτή μπορεί να αποφευχθεί με την πραγματοποίηση μιας καλλιέργειας σε fed-batch συνθήκες (συνθήκες ημιδιαλείποντος έργου).

Ο αντιδραστήρας ημιδιαλείποντος έργου (fed batch bioreactor) χρησιμοποιείται όταν είναι επιθυμητή η προσθήκη κάποιου θρεπτικού μέσου κατά την διάρκεια της καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται χρήση του fed batch bioreactor σε περίπτωση προσθήκης κάποιων συστατικών αφού έχει επιτευχθεί σημαντική συγκέντρωση βιομάζας, σε περίπτωση επιθυμητής διατήρησης χαμηλής συγκέντρωσης υποστρώματος για να αποφευχθεί η παρεμπόδιση από υπόστρωμα, σε περίπτωση προσθήκης ρυθμιστικών για την διατήρηση του pH στη βέλτιστη τιμή και για παρατεταμένη λειτουργία στην στάσιμη φάση. Σε αυτό το είδος αντιδραστήρα ο όγκος δεν παραμένει σταθερός.[36]

Όταν χρησιμοποιείται ως τροφοδοσία (feedstock) το οξικό οξύ, παρατηρείται αύξηση του pH με την ανάπτυξη του *Cryptocodinium cohnii*. Όταν τα κύτταρα του μικροφύκου μεγαλώνουν, παραμένουν στο διάλυμα τα ιόντα Na^+ , το CH_3COO^- καταναλώνεται και αντικαθίσταται από ιόντα OH^- αυξάνοντας την τιμή του pH. Γι αυτό, το οξικό προστίθεται στον fed-batch αντιδραστήρα σταδιακά, ώστε να καταναλώνεται η αρχική ποσότητα και με την αύξηση του pH να προστίθεται εκ νέου ποσότητα επιστρέφοντας την τιμή του στην βέλτιστη τιμή για την ανάπτυξη του μικροφύκου. Με αυτό τον τρόπο ο μικροοργανισμός μεγαλώνει στο βέλτιστο ρυθμό ανάπτυξης. Το σύστημα αυτό δίνει καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα με τη γλυκόζη ως τροφοδοσία οδηγώντας σε μεγαλύτερο παραγόμενο ποσοστό DHA.[35]

8. ΚΟΙΝΩΝΙΚΟΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Τα τελευταία χρόνια τα μικροφύκη αποτελούν αντικείμενο ενδιαφέροντος της βιομηχανίας χάρη στις ενδιαφέρουσες προοπτικές στον τομέα της ενέργειας και των τροφίμων. Τα μικροφύκη χαρακτηρίζονται ως ευέλικτα συστήματα για υψηλή παραγωγικότητα βιομάζας και προϊόντων υψηλής αξίας. Παρόλα αυτά, η ανάπτυξη των τεχνολογιών καλλιέργειας μικροφυκών σε εμπορική κλίμακα είναι περιορισμένη και αφορά κυρίως την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, των οποίων η υψηλή τιμή μπορεί να εγγυηθεί την επιστροφή της επένδυσης. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες προορίζονται κυρίως για την αγορά των φαρμακευτικών προϊόντων και των τροφίμων.

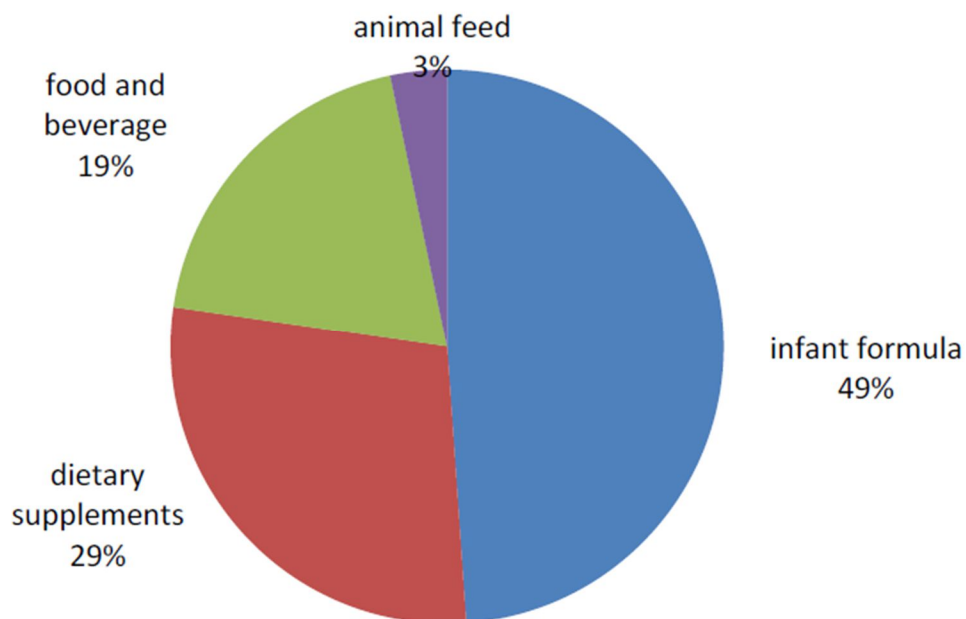
Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της παραγωγής βιομάζας από μικροφύκη είναι ο μικρός κύκλος ζωής τους. Τα μικροφύκη μπορούν να μεγαλώσουν γρήγορα οδηγώντας σε μεγαλύτερη παραγωγικότητα σε σύγκριση με τα φυτά. Όμως, καθώς τα μικροφύκη παράγουν προϊόντα σε μικρές ποσότητες μόνο τα υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντα, όπως είναι τα PUFA, θεωρούνται μια οικονομικά βιώσιμη προοπτική.

Το κόστος κεφαλαίου της διαδικασίας περιλαμβάνει τα κτίρια, τις εγκαταστάσεις καλλιέργειας και παραγωγής, ενώ η ενέργεια περιλαμβάνει κυρίως την κατανάλωση ηλεκτρικού ρεύματος. Τα αναλώσιμα αφορούν κυρίως τις πρώτες ύλες του θρεπτικού μέσου, το νερό, το CO₂ και τα θρεπτικά συστατικά, όπως άζωτο και φωσφόρο. Στην περίπτωση που η βιομηχανία τροφίμων είναι ο αποδέκτης των προϊόντων των μικροφυκών, ο κύριος παράγοντας κόστους είναι τα αναλώσιμα (46%), ενώ αντίστοιχα το 61% αφορά την περίπτωση της φαρμακοβιομηχανίας. Το κόστος ενέργειας σε αυτές τις περιπτώσεις θεωρείται μικρότερης σημασίας. Επομένως, οι εφαρμογές των μικροφυκών σε αυτούς τους τομείς θεωρούνται βιώσιμες. [37]

Από τα λιπαρά οξέα το DHA και το EPA είναι βασικά θρεπτικά συστατικά που προέρχονται από τα ψάρια. Έχει παρατηρηθεί τα τελευταία χρόνια μια παγκόσμια έλλειψη σε λίπη από ψάρια (fish oils), καθώς ελαττώνεται η διαθεσιμότητα των ψαριών και αυξάνεται η ζήτηση από την αναδυόμενη αγορά των ω-3 λιπαρών. Η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ προσφοράς και ζήτησης οδήγησε την τιμή των fish oils μέχρι και 2000 \$/ton το 2014. Αυτή η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση για τα PUFAs έχει στρέψει το ενδιαφέρον στα μικροφύκη, όπως είναι το *Cryptocodinium Cohnii*, σαν εναλλακτική πηγή. Με την βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας και των μηχανικών παραμέτρων, το κόστος παραγωγής των EPA και DHA λιπαρών οξέων αναμένεται να μειωθεί σε 11,9 \$/kg. [38]

Με βάση τα δεδομένα της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το 2013, η χώρα με την μεγαλύτερη παραγωγή *Cryptocodinium Cohnii* είναι οι ΗΠΑ, με 240 tn/yr DHA. Συγκρίνοντας με τα αυτότροφα μικροφύκη, τα ετερότροφα, όπου ανήκει και ο *C.cohnii* εμφανίζουν υψηλότερη παραγωγικότητα σε λιπαρά και συγκεκριμένα σε PUFA μέχρι και 2,5 φορές. Όμως, 2-3 kg γλυκόζης απαιτούνται για την παραγωγή ενός kg βιομάζας μικροφυκών. Η γλυκόζη αντιπροσωπεύει ένα μεγάλο κομμάτι του κόστους και καθώς 1 kg γλυκόζης κοστίζει περίπου 0,71 €/kg το ελάχιστο κόστος του υποστρώματος ανά kg μικροφύκους είναι τουλάχιστον 1,42 €. Επομένως, η χρήση εναλλακτικών πηγών άνθρακα μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του κόστους.

Η αξία της παγκόσμιας αγοράς για το ω-3 λιπαρά για το 2014 ήταν περίπου 320 εκατομμύρια €. Η μεγαλύτερη εφαρμογή του DHA αφορά τα προϊόντα για τα βρέφη, ακολουθούμενη από τα συμπληρώματα διατροφής, τα φαγητά και τα αναψυκτικά, και την τροφή των ζώων. [39]



Εικόνα 19: Παγκόσμιος διαμερισμός της αγοράς του DHA

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΟΡΓΑΝΑ – ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Αέριος χρωματογράφος GC 17 A Shimadzu apparatus, Kyoto, Japan
- Ανακινούμενος επωαστικός θάλαμος ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd
- Αποστειρωμένος χώρος εργασίας UNIFLOW UV1200
- Αυτόκλειστος θάλαμος αποστείρωσης Labo Autoclave
- Βιοαντιδραστήρας New Brunswick Scientific-BioFlo 310 Benchtop Fermentor
- Ζυγοί Mark 2060, Mark 4065 (BEL Engineering) και αναλυτικός ζυγός, ABS 120-4N (KERN & Sohn GmbH)
- Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο
- Θερμαινόμενες πλάκες με μαγνητική ανάδευση
- Μετρητής pH
- Οπτικό μικροσκόπιο
- Συσκευή λυοφιλίωσης Christ Alpha 1-4
- Συσκευή παραγωγής απιονισμένου νερού
- Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού Millipore Direct-Q
- Συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader, SpectraMax 250 (Molecular devices)
- Φούρνος κενού Gallenkamp
- Φυγόκεντρος Beckman, Model TJ-6 Centrifuge
- Φυγόκεντρος Beckman, Model J2-21 Centrifuge
- Φυγόκεντρος δοκιμαστικών σωλήνων Vortex-2-Genie
- Φυγόκεντρος δοχείων Eppendorf Centrifuge 3200
- Φωτόμετρο UV2000, Hitatsi
- Χρωματογράφος Υψηλής απόδοσης HPLC Shimadzu apparatus, Kyoto, Japan

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιούνται τυπικά εργαστηριακά όργανα, όπως είναι πιπέτες διαφορετικών όγκων, ογκομετρικοί κύλινδροι, ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες, χωνιά, τρυβλία, μεταλλικές λαβίδες, δοκιμαστικοί σωλήνες, δοχεία Eppendorf, γυάλινα μπουκάλια, tips πιπετών και δοχεία falcon. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν πλαστικοί σωλήνες και πλαστικές σύριγγες.

2. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα χημικά αντιδραστήρια για την παρασκευή του θρεπτικού ανάπτυξης καλλιέργειας προέρχονται από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (οξικό νάτριο, βάση Tris, ανόργανα άλατα, πτητικά οργανικά οξέα VFAs), Fluka (yeast extract, συμπυκνωμένο HCl and H₂SO₄) και Fisher Scientific (άνυδρη γλυκόζη), ενώ οι οργανικοί διαλύτες για τα πειράματα προέρχονται από την Fisher Scientific (χλωροφόρμιο, μεθανόλη) ή την Carlo Erba (εξάνιο).

3. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ

Crypthecodinium cohnii: ATCC® 30772™ American Type Culture Collection.

Απαιτείται ανακαλλιέργειά του ανά 1-2 εβδομάδες σε αντίστοιχο θρεπτικό υλικό για ετερότροφη ανάπτυξη.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ - ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τις καλλιέργειες παρασκευάζονται με διάλυση των αντίστοιχων συστατικών σε απιονισμένο νερό. Η ρύθμιση του pH μεταξύ των προκαθορισμένων τιμών πραγματοποιείται με προσθήκη πυκνών ρυθμιστικών διαλυμάτων καυστικού νατρίου NaOH και υδροχλωρικού οξέος HCl. Τα διαλύματα αποστειρώνονται σε αυτόκλειστο δοχείο θερμοκρασίας T=121 °C για χρονικό διάστημα 20 min, σε πίεση 0,1 Μpa.

Αξίζει να επισημανθεί ότι στα θρεπτικά μέσα που περιέχουν γλυκόζη, αυτή αποστειρώνεται ξεχωριστά από τα υπόλοιπα συστατικά του διαλύματος, σε μορφή σκόνης σε φιάλες πωματισμένες με υδρόφοβα βαμβάκια και στη συνέχεια προστίθεται σε αυτή το υγρό θρεπτικό υλικό, υπό στείρες συνθήκες. Τα μικροφύκη χαρακτηρίζονται από χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης, σε σχέση με τα βακτήρια και τους μύκητες. Συνεπώς, σε κάθε κυτταροκαλλιέργεια είναι επιτακτική η διασφάλιση των στείρων συνθηκών δειγματοληψίας και ανάπτυξής της.

4.1.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ATCC 460

Η διατήρηση και η ανάπτυξη του μικροφύκου *Crypthecodinium cohnii* πραγματοποιείται σε ATCC Medium 460 (A2E6). Τα συστατικά του θρεπτικού ATCC παρουσιάζονται στο παράρτημα.

Πρέπει να σημειωθεί ότι τα θρεπτικά συστατικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του θρεπτικού αυτού μέσου για την ανάπτυξη και διατήρηση του μικροφύκου *Crypthecodinium cohnii* παρασκευάζονται 100 φορές πυκνότερα σε μπουκάλια και μετέπειτα αραιώνονται στις επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις της εκάστοτε καλλιέργειας. Το θρεπτικό υλικό ATCC διατηρείται στην κατάψυξη.

Το θρεπτικό μέσο ογκομετρείται στα 45 mL, προστίθεται σε κωνικές φιάλες των 100 mL, ρυθμίζεται το pH του στο εύρος τιμών 6,3 – 6,6 και έπειτα αποστειρώνεται σε αυτόκλειστο. Στη συνέχεια, αφήνεται να ψυχθεί μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και εμβολιάζεται με 5 mL από υπάρχουσα αναπτυγμένη καλλιέργεια του μικροφύκου. Το εμβόλιο έχει όγκο 5 mL, καθώς πρέπει να αντιστοιχεί στο 10% v/v του συνολικού όγκου της τελικής καλλιέργειας. Οι καλλιέργειες διατηρούνται στους 23 °C για 4 ημέρες χωρίς ανάδευση. Οι καλλιέργειες stock περιλαμβάνουν ATCC medium για να αποφευχθεί εγκλιματισμός του μικροφύκου σε λιγότερα πλούσια θρεπτικά μέσα μεταβάλλοντας τα βιολογικά του χαρακτηριστικά.[19]

4.1.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΜΕ ΓΛΥΚΟΖΗ – ΣΤΑΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Η ανάπτυξη του *Cryptocodinium Cohnii* με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη γίνεται σε κωνικές φιάλες των 100 mL με συνολικό όγκο καλλιέργειας τα 50 mL. Το εμβόλιο που προστίθεται με πιπέτα υπολογίζεται στα 5 mL και προέρχεται από ήδη αναπτυγμένη καλλιέργεια του μικροφύκου, που βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξής του. Στον τελικό όγκο της καλλιέργειας η γλυκόζη έχει συγκέντρωση 9 g/L και ζυγίζεται σε ξεχωριστή κωνική φιάλη.

Το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας αποτελείται από yeast extract συγκέντρωσης 2 g/L και sea salt συγκέντρωσης 18,7 g/L. Τα δύο αυτά συστατικά του θρεπτικού μέσου ζυγίζονται και προστίθεται σε αυτά απιονισμένο νερό όγκου 45 mL. Το pH ρυθμίζεται με διάλυμα υδροχλωρίου στο 6,3 - 6,6. Οι κωνικές φιάλες αποστειρώνονται στο αυτόκλειστο και έπειτα προστίθεται το θρεπτικό μέσο στη γλυκόζη. Αφού κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου πραγματοποιείται ο εμβολιασμός σε ειδικό αποστειρωμένο χώρο. Τέλος, οι καλλιέργειες διατηρούνται σε επωαστήρα χωρίς ανάδευση στους 23 °C και αναπτύσσονται υπό σκότος για 3 με 4 μέρες.



Εικόνα 20: Υγρή ετερότροφη καλλιέργεια *Cryptocodinium Cohnii* με γλυκόζη

4.1.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΟΞΕΑ ΩΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

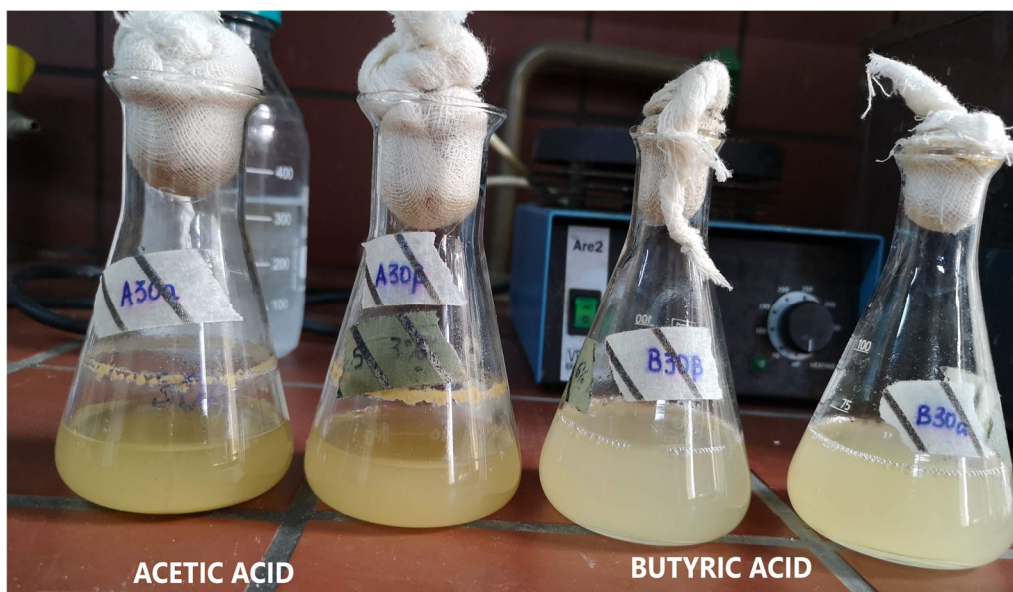
Για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ανάπτυξης του μικροφύκου *Cryptocodium cohnii* σε διαφορετικές πηγές άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν το οξικό οξύ, το βουτυρικό οξύ και το προπιονικό οξύ. Οι συγκεντρώσεις των οξέων που μελετήθηκαν ήταν 5, 10, 15, 20 και 30 g/L.

Το θρεπτικό μέσο για όλες τις καλλιέργειες είναι ίδιο και αποτελείται από yeast extract συγκέντρωσης 2,8 g/L και sea salt συγκέντρωσης 18,7 g/L. Για να διατηρείται το pH στην επιθυμητή τιμή κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών με πηγή άνθρακα κάποιο οργανικό οξύ, παρατείνοντας την διάρκεια ζωής της καλλιέργειας, χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl. Συγκεκριμένα, ζυγίζεται η επιθυμητή ποσότητα του συστατικού Trizma base, ώστε η τελική συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος που θα προκύψει να είναι 100 mM. Μετά την προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας νερού το pH ρυθμίζεται με χρήση υδροχλωρίου στο εύρος 6,3 – 6,6.

Το θρεπτικό μοιράζεται στις κωνικές φιάλες με όγκο διαλύματος σε κάθε μία τα 45 mL. Στην περίπτωση που η πηγή άνθρακα είναι το οξικό οξύ, προστίθεται στην επιθυμητή τελική συγκέντρωση η πηγή άνθρακα με την μορφή άλατος οξικού νατρίου. Στην περίπτωση που πηγή άνθρακα είναι το προπιονικό ή το βουτυρικό οξύ, τα οξέα προστίθενται στο θρεπτικό μέσο με χρήση πιπέτας, καθώς είναι σε υγρή μορφή και όχι μορφή άλατος. Στη συνέχεια, πρέπει να ρυθμιστεί εκ νέου το pH στα 6,3 – 6,6 με την προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου NaOH.

Οι κωνικές φιάλες πωματίζονται με βαμβάκια και αποστειρώνονται στο αυτόκλειστο. Αφού κρυώσουν εμβολιάζονται με προκαλλιέργεια ATCC 4 ημερών. Κατά το πείραμα αυτό παρασκευάζεται και μια κωνική φιάλη που δεν περιέχει κάποια πηγή άνθρακα, αλλά μόνο το θρεπτικό μέσο και το εμβόλιο, λειτουργώντας σαν control για την ανάπτυξη της καλλιέργειας.

Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε επωαστήρες με θερμοκρασία τους 27 °C και ρυθμό ανάδευσης τα 160 rpm. Κάθε μέρα λαμβάνεται δείγμα από κάθε καλλιέργεια σε στείρες συνθήκες. Μέρος του δείγματος φωτομετρείται στη συσκευή Microplate σε μήκος κύματος 685 nm προκειμένου να μπορεί να ελεγχθεί η ανάπτυξη της καλλιέργειας μέσω θολοσιμετρίας.



Εικόνα 21: Στατικές καλλιέργειες *C. Cohnii* με πηγή άνθρακα οξικό και βουτυρικό οξύ

4.1.4 ΣΤΕΡΕΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Το μικροφύκος μπορεί να αναπτυχθεί σε στερεή καλλιέργεια σε δοκιμαστικό σωλήνα, agar slant. Ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιείται το ATCC 460 (βλ.Παράρτημα). Για την σταθεροποίηση του θρεπτικού υλικού στο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται και 2% w/v άγαρ – άγαρ. Μετά την αποστείρωση, προτού κρυώσει το διάλυμα, προστίθεται ποσότητα του μέσου στο σωλήνα σε πλάγια θέση προκειμένου να αυξηθεί η ελεύθερη επιφάνεια ανάπτυξης του μικροφύκους και αφήνεται να σταθεροποιηθεί. Τέλος, γίνεται εμβολιασμός από υγρή καλλιέργεια του μικροφύκους με ποσότητα 150 μ L.



Εικόνα 22: Στερεή καλλιέργεια *C.cohnii* - Agar slant

4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΜΕΣΩ ΘΩΛΩΣΙΜΕΤΡΙΑΣ

Για την μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων του μικροφύκου χρησιμοποιείται η μέθοδος της θωλωσιμετρίας μέσω του πολυφωτόμετρου Microplate. Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου, κατά τη θωλωσιμετρία μετράται η ελάττωση της έντασης μιας ακτινοβολίας που διέρχεται από το δείγμα κυττάρων λόγω σκέδασης.

Συγκεκριμένα, για τη μέτρηση της βιομάζας κυττάρων μικροφυκών από μια καλλιέργεια χρησιμοποιείται πιπέτα και λαμβάνεται δείγμα του 1 mL, υπό στείρες συνθήκες, το οποίο τοποθετείται σε δοχείο erpendorf του 1,5 mL. Από αυτό το δείγμα που λαμβάνεται, τα 0,25 mL αυτού τοποθετούνται σε ειδική θέση (well), εντός ειδικής πλάκας, στη συσκευή μέτρησης του πολυφωτόμετρου (microplate). Για κάθε ένα από τα διπλά δείγματα που φωτομετρούνται λαμβάνεται μια ποσότητα, η οποία φυγοκεντρείται για 2 - 3 min. Από τις δύο φάσεις που προκύπτουν λαμβάνεται η υπερκείμενη, η οποία δεν περιέχει κύτταρα μικροφύκους, και 0,25 mL αυτής τοποθετούνται σε άλλη θέση της συσκευής φωτομέτρησης, ως δείγμα αναφοράς (τυφλό) του αρχικού δείγματος. Τέλος, ρυθμίζεται η συσκευή φωτομέτρησης στα 685 nm, μετράται η απορρόφηση και καταγράφονται τα αποτελέσματα του δείγματος αφαιρώντας κάθε φορά την απορρόφηση του τυφλού δείγματος.



Εικόνα 23: Συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader

4.3 ΥΓΡΟ ΚΛΑΣΜΑ ΖΥΜΩΣΗΣ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ VEGETABLE GARDEN FOOD

Το απόβλητο που χρησιμοποιείται στα πειράματα είναι Vegetable garden food (VGF). Το απόβλητο αυτό παρέχεται από την εταιρεία Organic Waste Systems NV (OWS, Βέλγιο) και έχει επεξεργαστεί από την Tecnalía Research & Innovation (Ισπανία). Για την επεξεργασία του αποβλήτου χρησιμοποιήθηκε ultra-filtration μεμβράνη μήκους 1200 nm και διαμέτρου πόρων 70 nm. Το επεξεργασμένο απόβλητο περιέχει πτητικά οργανικά οξέα (VFAs), τα οποία αποτελούν πηγή άνθρακα για το μικροφύκος *Cryptocodinium Cohnii*.

Τα οργανικά οξέα βρίσκονται στις τροφοδοσίες των βιοαντιδραστήρων και στο απόβλητο στη σύσταση που παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Σύσταση οργανικών οξέων VFAs σε g/L

Τροφοδοσία VFAs	Οξικό οξύ	Προπιονικό οξύ	Βουτυρικό οξύ	Βαλερικό οξύ	Καπροϊκό οξύ
Οξικό 33% (v/v)	350	-	-	-	-
Προπιονικό 25% (v/v)	-	247,5	-	-	-
Βουτυρικό 25% (v/v)	-	-	237,5	-	-
Επεξεργασμένο απόβλητο / Συνθετικό διάλυμα οξέων	5,1	2,7	3,5	0,92	1

4.3.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

Η συνηθέστερη πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη καλλιεργειών μικροφυκών είναι η γλυκόζη. Η ύπαρξη της γλυκόζης στα απόβλητα VGF ελέγχεται με την μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS).

Η φωτομετρική μέθοδος του δινιτροσαλικυλικού οξέος χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων, στα οποία ανήκει και η γλυκόζη. Ως αναγωγικό σάκχαρο ορίζεται το σάκχαρο που έχει ελεύθερο το ημιακεταλικό υδροξύλιο. Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα στο υδροξύλιο και τα δινιτροσαλικυλικό οξύ κατά τη θέρμανση σε θερμοκρασία πάνω από τους 70 °C. Το σύμπλοκο αυτό εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 540nm.

Πιο συγκεκριμένα, σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 0,5 mL διαλύματος δινιτροσαλικυλικού οξέος και 0,5 mL από το απόβλητο VGF. Σε ένα διαφορετικό δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 0,5 mL διαλύματος δινιτροσαλικυλικού οξέος και 0,5 mL απιονισμένο νερό. Το δείγμα αυτό αποτελεί το τυφλό. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε νερό που βράζει ώστε να σχηματιστεί το σύμπλοκο ανάμεσα στα αναγωγικά σάκχαρα και το δινιτροσαλικυλικό οξύ. Μετά από 5 min απομακρύνονται οι δοκιμαστικοί σωλήνες από το νερό και προστίθεται σε καθένα από αυτούς 4 mL απιονισμένο νερό. Στο φωτόμετρο επιλέγεται μήκος κύματος τα 540

nm. Το όργανο μηδενίζεται με το τυφλό και έπειτα μετράται η απορρόφηση του δείγματος με το απόβλητο. [40]

4.3.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η μέθοδος Bradford για τη μέτρηση πρωτεΐνης ανήκει στην κατηγορία των τεχνικών πρόσδεσης χρωστικής και βασίζεται στην παρατήρηση ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 εμφανίζεται με δύο διαφορετικές έγχρωμες μορφές. Κατά την πρόσδεση της πρωτεΐνης στη χρωστική, η ερυθρή μορφή μετατρέπεται στη γαλάζια προκαλώντας μετατόπιση της απορρόφησης από τα 465 nm στα 595 nm.

Πιο συγκεκριμένα, σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 2,5 mL διαλύματος Bradford και 0,25 mL από το απόβλητο, ενώ σε έναν δεύτερο αντί για το απόβλητο προστίθεται νερό. Επιλέγεται στο φωτόμετρο το μήκος κύματος των 595 nm, μηδενίζεται το όργανο με το τυφλό δείγμα και μετριέται η απορρόφηση του αποβλήτου. [40], [41]

4.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ ΣΕ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

4.4.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΕΜΒΟΛΙΟ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

Αρχικά παρασκευάζονται καλλιέργειες μικροφύκους στατικές με πηγή άνθρακα την γλυκόζη σε κωνικές φιάλες των 100 mL. Στον τελικό όγκο της καλλιέργειας η γλυκόζη έχει συγκέντρωση 9g/L και ζυγίζεται σε ξεχωριστή κωνική φιάλη. Το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας αποτελείται από yeast extract συγκέντρωσης 2 g/L και sea salt συγκέντρωσης 25 g/L. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι καλλιέργειες αυτές αναπτύσσονται για 4 ημέρες και αποτελούν το εμβόλιο για τις καλλιέργειες του 2^{ου} σταδίου προετοιμασίας του αντιδραστήρα.

Το εμβόλιο του βιοαντιδραστήρα προέρχεται από καλλιέργειες του μικροφύκου όγκου 100 mL που αναπτύσσονται σε κωνικές φιάλες των 250 mL. Πιο συγκεκριμένα, ζυγίζεται η γλυκόζη σε ξεχωριστή κωνική φιάλη, ώστε η τελική της συγκέντρωση στην καλλιέργεια να είναι 27 g/L. Σε μια διαφορετική κωνική φιάλη ζυγίζονται το yeast extract με συγκέντρωση 3,8 g/L και το sea salt με συγκέντρωση 25 g/L, προστίθεται απιονισμένο νερό όγκου 90 mL και ρυθμίζεται το pH στα 6,3 – 6,6. Ο όγκος του θρεπτικού μέσου είναι 90 mL, καθώς το εμβόλιο πρέπει να είναι το 10% v/v του συνολικού όγκου της καλλιέργειας. Οι κωνικές φιάλες αποστειρώνονται στο αυτόκλειστο και έπειτα προστίθεται το θρεπτικό μέσο στη γλυκόζη. Αφού κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου πραγματοποιείται ο εμβολιασμός σε ειδικό αποστειρωμένο χώρο. Τέλος, οι καλλιέργειες διατηρούνται σε επωαστήρα με ανάδευση 160 rpm στους 27 °C και αναπτύσσονται για 3 μέρες υπό σκότος.

4.4.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

Ο βιοαντιδραστήρας που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των καλλιεργειών του μικροφύκου *Cryptocodinium cohnii* είναι συνδεδεμένος με παροχές νερού και αέρα και διαθέτει σύνδεση με μια ηλεκτρονική μονάδα, στην οποία ρυθμίζονται οι συνθήκες λειτουργίας και παρατηρούνται σε διαγράμματα οι μεταβολές τους. Στις υποδοχές του βιοαντιδραστήρα συνδέονται διάφορα όργανα μέτρησης όπως το θερμομέτρο, το pH-μετρο και το οξυγονόμετρο. Επιπλέον, συνδέεται με τον κύριο όγκο του αντιδραστήρα ένας συμπυκνωτήρας, στο ελεύθερο άκρο του οποίου τοποθετείται ένα αντιμικροβιακό φίλτρο, και ένας δειγματολήπτης.



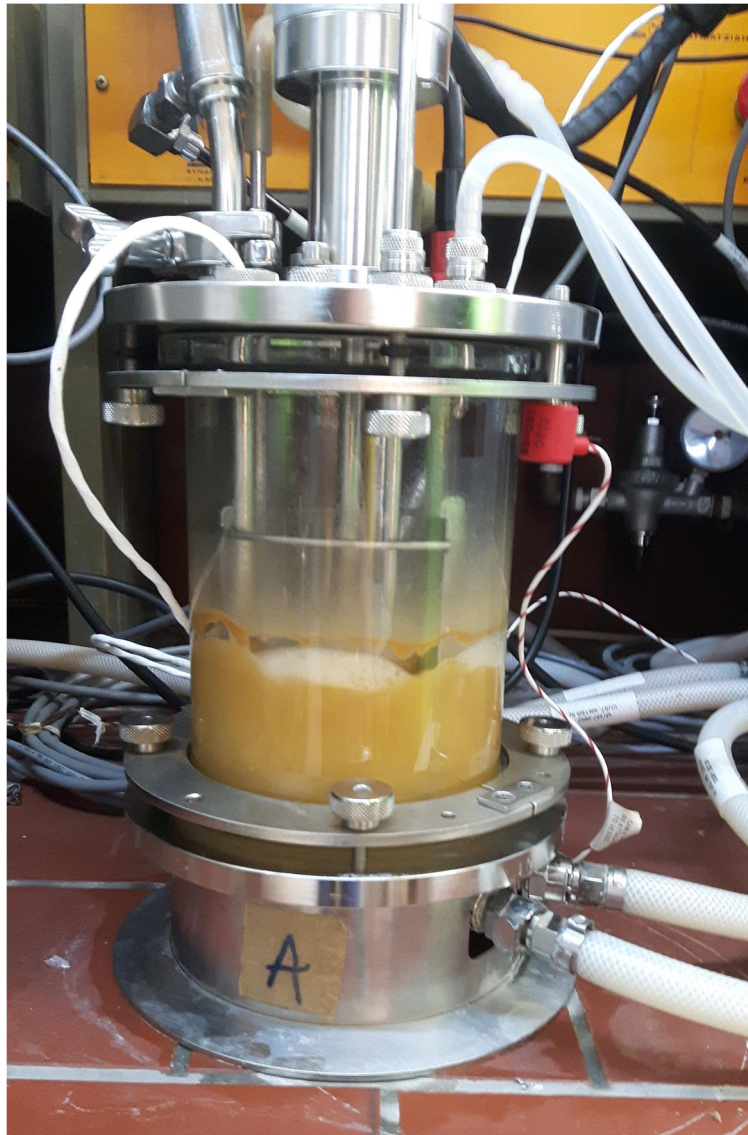
Εικόνα 24: Βιοαντιδραστήρας New Brunswick Scientific-BioFlo 310 Benchtop Fermentor

Το θρεπτικό υλικό στο βιοαντιδραστήρα αποτελείται από το yeast extract για πηγή αζώτου με συγκέντρωση 7,5 g/L, το sea salt με 25 g/L και το οξικό νάτριο (sodium acetate) με συγκέντρωση 15 g/L. Όλα τα υλικά ζυγίζονται και προστίθεται απιονισμένο νερό σε όγκο που αντιστοιχεί στο 90% v/v του συνολικού όγκου της καλλιέργειας. Ρυθμίζεται το pH στα 6,3 – 6,6 με υδροχλωρίο. Οι ελεύθερες υποδοχές του βιοαντιδραστήρα καλύπτονται. Ο βιοαντιδραστήρας με το θρεπτικό μέσο αποστειρώνεται στο αυτόκλειστο. Αφού κρυώσει ο βιοαντιδραστήρας συνδέονται τα καλώδια των οργάνων και οι παροχές νερού, εισόδου και εξόδου του αέρα και τίθεται σε λειτουργία η ανάδευση. Η θερμοκρασία ορίζεται στους 27 °C, το pH στην τιμή των 6,5, η παροχή αέρα στο 1 vol air/ vol medium/ min (vvm) και η ανάδευση κυμαίνεται στα 300-500 rpm διατηρώντας το διαλυμένο οξυγόνο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20% της τιμής κορεσμού.

Μετά την σταθεροποίηση των επιθυμητών συνθηκών λειτουργίας πραγματοποιείται ο εμβολιασμός με τις καλλιέργειες *Cryptocodinium cohnii* που μεγαλώνουν στους επωαστήρες και έχουν φτάσει σε επίπεδο απορρόφησης $OD_{685}=3-3,3$. Τέλος, συνδέεται ο σωλήνας παροχής της πηγής άνθρακα μέσω περιστροφικής αντλίας στον αντιδραστήρα. Όλες οι διεργασίες γίνονται υπό στείρες συνθήκες. Πρέπει να σημειωθεί ότι πραγματοποιείται κάθε φορά calibration στα όργανα του pH και του οξυγόνου. Συγκεκριμένα, στο pHμετρο πραγματοποιείται calibration πριν την αποστείρωσή του χρησιμοποιώντας δύο διαλύματα σταθερού pH με τιμές 4 και 7. Αντίθετα, το οξυγονόμετρο πρέπει να υποστεί calibration μετά την αποστείρωση όταν έχει τεθεί σε λειτουργία ο βιοαντιδραστήρας και έχει εξισορροπηθεί το οξυγόνο, αλλά προτού πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός με την καλλιέργεια μικροφυκών.

Ο βιοαντιδραστήρας λειτουργεί ως αντιδραστήρας ημι – διαλείποντος έργου. Η πηγή άνθρακα του μικροφύκους προστίθεται μέσω αντλίας, ώστε το pH στο εσωτερικό του αντιδραστήρα να διατηρείται σταθερό στην επιθυμητή τιμή, η οποία είναι 6,5. Η καλλιέργεια αυτή χαρακτηρίζεται ως pH-auxostat culture.[42] Για την πηγή άνθρακα χρησιμοποιούνται οργανικά πτητικά οξέα τα οποία αραιώνονται σε απιονισμένο νερό που έχει αποστειρωθεί. Οι τροφοδοσίες που μελετώνται

αποτελούν καθαρές πηγές οργανικών οξέων σε ποσοστά 33% (v/v) για το οξικό οξύ, 25% (v/v) για το βουτυρικό οξύ, 25% (v/v) για το προπιονικό οξύ. Ως τροφοδοσίες μελετούνται, επίσης, απόβλητο VGF μετά από dark fermentation οξινισμένο με HCl σε τελικό pH 2,5 και οξινισμένο συνθετικό μέσο με σύσταση σε οργανικά οξέα ίδια με του αποβλήτου. Το συνθετικό μέσο αποτελείται μόνο από τα πτητικά οργανικά οξέα και απιονισμένο νερό. Το επεξεργασμένο απόβλητο αποστειρώνεται προτού χρησιμοποιηθεί ως τροφοδοσία για τον αντιδραστήρα.



Εικόνα 25: Καλλιέργεια *C. cohnii* σε βιοαντιδραστήρα fed - batch

4.4.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

Καθημερινά διπλά δείγματα των 7 – 15 mL συλλέγονται και μετριέται η απορρόφησή τους στα 685 nm (OD₆₈₅).



Εικόνα 26: Δείγματα βιομάζας του μικροφύκου *C. cohnii* από βιοαντιδραστήρα

Όταν τα κύτταρα του μικροφύκου φτάσουν στη φάση στασιμότητας σταματά η λειτουργία του αντιδραστήρα. Το θρεπτικό μέσο με τα κύτταρα συλλέγεται και ογκομετρείται. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται σε μεγάλα δοχεία. Το υπερκείμενο υγρό αποχύνεται, τα κύτταρα επαναιωρούνται με διάλυμα αλατόνερου 25% w/v και μεταφέρονται σε falcon. Μετά από εκ νέου φυγοκέντρηση αποχύνεται η υπερκείμενη φάση και στα κύτταρα προστίθεται 1 mL διαλύματος αλατόνερου. Το δοχείο που περιέχει το αραιωμένο διάλυμα της πηγής άνθρακα ογκομετρείται.

4.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ

4.5.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

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

Η απομόνωση της βιομάζας της εκάστοτε καλλιέργειας πραγματοποιείται αρχικά με τη μεταφορά της σε ξεχωριστά δοχεία falcon. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 5 με 7 min και έπειτα αποχύνεται η υπερκείμενη φάση. Τα κύτταρα του μικροφύκου που έχουν καταβυθιστεί στον πάτο του falcon επαναδιαλυτοποιούνται με την προσθήκη 5mL διαλύματος αλατόνευρου. Το διάλυμα αυτό έχει συγκέντρωση 25% w/v sea salt, ίδια με αυτή στις καλλιέργειες προκειμένου να αποφευχθεί η διάρρηξη τη μεμβράνης από φαινόμενα ώσμωσης. Μετά την επανάληψη της φυγοκέντρωσης και της απομάκρυνσης του υπερκείμενου υγρού, τα δείγματα επαναδιαλυτοποιούνται σε 1 mL διαλύματος sea salt και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -20 °C. Τέλος, αφού έχουν καταψυχθεί, τα δείγματα καλύπτονται με αλουμινόχαρτο τρυπημένο και τοποθετούνται στη συσκευή λυοφιλίωσης, για να απομακρυνθεί το νερό των κυττάρων, στους -40 °C για μία ή δύο μέρες. Η ξηρή βιομάζα που προκύπτει συλλέγεται και ζυγίζεται το βάρος της. Διατηρείται στην κατάψυξη σε δοχεία falcon.

4.5.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ

Για την ανάλυση των λιπαρών οξέων και του DHA που εμφανίζονται στα κύτταρα του μικροφύκου *C.cohnii* πρέπει αρχικά τα λιπαρά οξέα να απομονωθούν από το εσωτερικό των κυττάρων της καλλιέργειας.

Αρχικά, παρασκευάζονται δύο διαλύτες που θα χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία της εκχύλισης. Συγκεκριμένα, ο πρώτος διαλύτης παρασκευάζεται από την ανάμιξη χλωροφορμίου και μεθανόλης σε αναλογία 2:1 και ο δεύτερος με ανάμιξη μεθανόλης με απιονισμένο νερό με αναλογία 1:1. Ζυγίζεται η βιομάζα του δείγματος μικροφυκών που έχουν λυοφιλωθεί, συνήθως κυμαίνεται στα 25 - 65 mg, και προστίθεται ο πρώτος διαλύτης. Σε κάθε 25 mg βιομάζας αντιστοιχούν 5 mL του διαλύτη. Το falcon αναδεύεται με συσκευή vortex και αφήνεται για 24 h με τον διαλύτη αυτόν. Την επόμενη μέρα προστίθεται απιονισμένο νερό σε κάθε δείγμα, που αποτελεί το 20% v/v του διαλύτη χλωροφορμίου – μεθανόλης. Πραγματοποιείται ανάδευση με vortex και φυγόκεντρωση για 5 – 7 min σε στροφές 3000 rpm, όπου διαχωρίζεται η οργανική φάση που περιέχει τα λιπαρά από την υδάτινη φάση. Η φάση των λιπαρών οξέων μεταφέρεται σε μια διαχωριστική χοάνη.



Εικόνα 27: Χοάνες για τον διαχωρισμό φάσεων και απομόνωση φάσης λιπαρών

Στη χοάνη προστίθεται και 1 mL από το διαλύτη μεθανόλης – νερού και το μίγμα αναδεύεται. Μετά αφήνεται το σύστημα να ‘ηρεμήσει’ και να διαχωριστούν οι φάσεις. Συλλέγεται η κάτω φάση και μεταφέρεται σε μια δεύτερη διαχωριστική χοάνη, όπου επαναλαμβάνεται η διαδικασία.[43] Η κάτω φάση συλλέγεται σε προζυγισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι καλύπτονται με αλουμινοχαρτό για να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπαρών. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες με τα λιπαρά τοποθετούνται σε φούρνο κενού για να εξατμιστούν. Μετά την εξάτμιση ζυγίζονται τα λιπαρά στους δοκιμαστικούς σωλήνες και υπολογίζεται η μάζα των λιπαρών.



Εικόνα 28: Λιπαρά οξέα μετά την απομάκρυνση του διαλύτη

4.5.3 ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ

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

Τα λιπαρά στους δοκιμαστικούς σωλήνες επαναιωρούνται σε 1 mL χλωροφόρμιο HPLC grade και αναδεύονται με vortex. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται μίγμα με 8% v/v υδροχλώριο και 92% v/v μεθανόλη και προστίθενται 2,5 mL από το μίγμα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Οι σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο και θερμαίνονται για 15 min σε θερμοκρασία 60 °C, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της μετεστεροποίησης. Έπειτα παρασκευάζεται διάλυμα 5% w/v χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) και προστίθενται 2,5 mL σε κάθε σωλήνα για να σταματήσει η αντίδραση, και ανακινείται το μίγμα. Τέλος, γίνεται εκχύλιση των δειγμάτων 4 φορές με την προσθήκη 1 mL εξανίου HPLC grade και την εκάστοτε φορά συλλέγεται η πάνω φάση που περιέχει τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. [44]



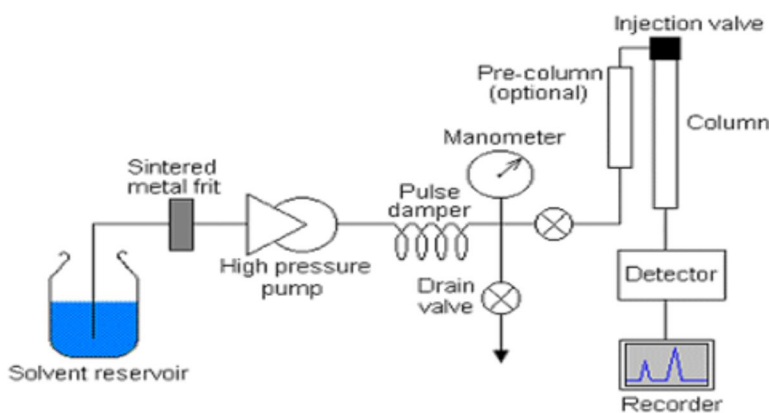
Εικόνα 29: Εστεροποίηση λιπαρών οξέων

4.6 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Οι μεταβολίτες που παράγονται και απομονώνονται από μικροφύκη, όπως συμβαίνει και για τα λιπαρά οξέα από το μικροφύκος *Cryptocodium Cohnii*, αναλύονται με χρωματογραφικές τεχνικές.

4.6.1 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

Η πιο διαδεδομένη τεχνική για την ποσοτικοποίηση και τον διαχωρισμό ενός μίγματος στα συστατικά του είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Στην HPLC χρησιμοποιούνται αποκλειστικά δείγματα σε υγρή μορφή. Χαρακτηριστικό των μεθόδων χρωματογραφίας 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).[45]



Εικόνα 30: Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πτητικών λιπαρών οξέων VFAs στο μέσο της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε HPLC (Shimadzu apparatus, Kyoto, Japan) με Aminex HPX-87H (300x7,8 mm, particle size 9 μm; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) στήλη σε σειρά με μια προστήλη Cation-H Bio-Rad micro-guard column. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 65 °C, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση 5 mM θειικό οξύ με συνεχή ροή 0,6 mL/min. [46] Ο χρόνος ανάλυσης για το κάθε δείγμα είναι 50 min. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρείται σταθερή με φούρνο θέρμανσης της στήλης (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική είναι Refractive Index (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 στον οποίο εισάγεται το δείγμα και έναν θάλαμο αναφοράς που είναι γεμάτος με την κινητή φάση. 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. Αυτό το είδος ανιχνευτή βρίσκει εφαρμογή σε μη ιοντικές ενώσεις με επιτυχία ανίχνευσης στα σάκχαρα, τα τριγλυκερίδια και τα οργανικά οξέα.[47], [48]



Εικόνα 31: Σύστημα HPLC με τον ανιχνευτή RID

4.6.2 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΦΡΑΦΙΑ (GC)

Η ανάλυση και ο προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (FAME) με αέρια χρωματογραφία είναι μια κοινή ανάλυση στην έρευνα των λιπαρών. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των FAME συνήθως γίνεται με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (FID).

Η συνολική διαδικασία ανάλυσης των FAME αποτελείται από τα εξής στάδια: την εστεροποίηση των λιπαρών, την ένεση του δείγματος (injection), το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των FAMEs. Σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας της αέριας χρωματογραφίας, το δείγμα εισάγεται στη συσκευή, εξαερώνεται και παρασύρεται από το φέρον αέριο που οδηγεί το δείγμα στη στήλη όπου διαχωρίζεται στα συστατικά του. Τα συστατικά του δείγματος διέρχονται από τον ανιχνευτή, που στην παρούσα διπλωματική είναι ο FID. Κατά την εισαγωγή του δείγματος στη συσκευή χρησιμοποιείται συνήθως η ένεση με διαχωρισμό (split injection). Το στάδιο εισαγωγής του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο απαιτεί ιδιαίτερη ακρίβεια, καθώς ευθύνεται για τα περισσότερα σφάλματα των αποτελεσμάτων. Οι Bannon et al παρατήρησαν ότι μεγάλη ακρίβεια μπορεί να επιτευχθεί σε αυτό το στάδιο υπό την προϋπόθεση ότι το δείγμα εξατμίζεται γρήγορα και το εξατμισθέν δείγμα είναι πλήρως ανεμειγμένο με το φέρον αέριο. Η ταυτοποίηση των FAMEs στα δείγματα μπορεί να γίνει με την σύγκριση του χρόνου έκλουσης τους (retention time) με εμπορικά πρότυπα δείγματα. Τέλος, η ποσοτικοποίηση των συστατικών και ο υπολογισμός των συγκεντρώσεών τους στα δείγματα μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (FID). Η επιφάνεια των κορυφών (peak area) που προκύπτουν στο

χρωματογράφημα υπολογίζονται και με την χρήση μιας καμπύλης αναφοράς από πρότυπα δείγματα και μετατρέπονται σε συγκεντρώσεις. [49]

Πρέπει να σημειωθεί ότι για την ταυτοποίηση των κορυφών των συστατικών ενός σύνθετου δείγματος χρησιμοποιείται συνήθως ως ανιχνευτής το φασματοόμετρο μάζας (MS). Η φασματομετρία μάζας είναι μια μέθοδος που περιλαμβάνει την παραγωγή ιόντων σε αέρια φάση από τα μόρια του δείγματος, στη συνέχεια το διαχωρισμό τους σύμφωνα με τον λόγο μάζας m με το φορτίο z και τέλος την ανίχνευση των ιόντων αυτών. Από την 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. [50], [51]

Στην παρούσα διπλωματική εργασία η ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε με την χρήση ενός συστήματος GC – MS με μία Agilent J&W HP-5 Intuvo GC στήλη. Η θερμοκρασία της injection τέθηκε στους 270 °C, η ροή του φέροντος αερίου, που ήταν ήλιο (He), ρυθμίστηκε στο 1 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης αυξανόταν από 125 °C σε 240 °C με ρυθμό αύξησης 5 °C/min, όπου παρέμεινε σταθερή για 9 min πριν από το τέλος της ανάλυσης. Τα δείγματα εισάγονται με λόγο split 1:50. Η ποσοτικοποίηση των FAME πραγματοποιήθηκε στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας σε σύστημα GC – FID με Equity 5 Capillary GC στήλη. Σαν πρότυπο δείγμα για την καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιείται το Supelco 37 Component FAME Mix.



Εικόνα 32: Αέριος χρωματογράφος GC

4.7 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Τα πτητικά οργανικά οξέα που αποτελούν πηγή άνθρακα για το μικροφύκος *Cryptocodinium cohnii* στα πειράματα της παρούσας διπλωματικής είναι το οξικό, το βουτυρικό, το προπιονικό, το βαλερικό και το καπροϊκό οξύ. Κρίνεται αναγκαία η μελέτη της πορείας της συγκέντρωσής τους σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά την διάρκεια ανάπτυξης του μικροφύκου. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτή η μελέτη, πρέπει να πραγματοποιηθεί συσχέτιση του εμβαδού των κορυφών που εμφανίζουν τα οξέα αυτά κατά την ανάλυσή τους με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα των πτητικών αυτών οργανικών οξέων σε διαφορετικές αραιώσεις. Οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν επιλέχθηκαν έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις των πτητικών οργανικών οξέων να βρίσκονται στη γραμμική περιοχή της καμπύλης αναφοράς κατά την συσχέτισή τους με το εμβαδόν κορυφής και να περιλαμβάνουν την συγκέντρωση του εκάστοτε οξέος που απαντάται στο επεξεργασμένο απόβλητο. Έπειτα, πραγματοποιείται υγρή χρωματογραφία με στήλη ανίχνευσης οργανικών οξέων, ταυτοποιούνται οι κορυφές των οξέων και υπολογίζεται το εμβαδόν κάθε κορυφής. Αντιστοιχίζοντας τα εμβαδά με τις συγκεντρώσεις εντοπίζεται η γραμμική περιοχή και σχεδιάζεται η καμπύλη αναφοράς.

4.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΖΩΤΟΥ

4.8.1 ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ

Για την ανάπτυξη του μικροφύκου *Cryptocodinium cohnii* χρησιμοποιείται σαν θρεπτικό μέσο το ATCC 460 με την διαφοροποίηση ότι παραλείπεται η πηγή αζώτου, που είναι το θειϊκό αμμώνιο, και η πηγή άνθρακα που είναι η γλυκόζη (βλ. Παράρτημα). Πρέπει να σημειωθεί ότι στο θρεπτικό μέσο ATCC, πηγή αζώτου αποτελεί και το γλουταμινικό οξύ. Το συγκεκριμένο συστατικό δεν αφαιρείται, καθώς έχει αποδειχθεί ότι δεν επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη της καλλιέργειας μικροφύκου. [30]

Για τις καλλιέργειες με διαφορετικές πηγές αζώτου χρησιμοποιούνται κωνικές φιάλες των 100 mL στις οποίες ογκομετρούνται 45 mL τροποποιημένου θρεπτικού μέσου ATCC. Σε κάθε μια από τις φιάλες προστίθεται οξικό νάτριο CH_3COONa , που αποτελεί την πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη των κυττάρων της καλλιέργειας, με συγκέντρωση 30 g/L στον τελικό όγκο της batch καλλιέργειας των 50 mL.

Στις φιάλες προστίθεται και η πηγή αζώτου, οι οποίες είναι το yeast extract με συγκέντρωση 0,15g/L, το νιτρικό νάτριο NaNO_3 με 0,67 g/L, το θειϊκό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ με 0,52 g/L, το νιτρικό αμμώνιο NH_4NO_3 με 0,31 g/L και η ουρία με συγκέντρωση 0,24 g/L. Οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις των διαφορετικών πηγών αζώτου επιλέγονται έτσι ώστε ο λόγος άνθρακα αζώτου (C/N) σε κάθε καλλιέργεια να είναι 83. Ρυθμίζεται το pH στο 6,3 – 6,6 και οι φιάλες αποστειρώνονται στο αυτόκλειστο. Τέλος, εμβολιάζονται με 5 mL υπάρχουσας αναπτυγμένης καλλιέργειας του μικροφύκου με θρεπτικό ATCC. Οι καλλιέργειες τοποθετούνται σε επωαστήρα στους 27 °C και ανάδευση 160 rpm.

4.8.2 ΜΕΘΟΔΟΣ KJELDAHL

Η αρχή της μεθόδου είναι η καύση του δείγματος με περίσσεια πυκνού θειϊκού οξέος H_2SO_4 παρουσία μεταλλικών καταλυτών και αλάτων καλίου ή νατρίου. Από το όξινο θειϊκό αμμώνιο που σχηματίζεται ελευθερώνονται ιόντα αμμωνίου. Τα ιόντα αμμωνίου μετατρέπονται σε αμμωνία σε αλκαλικό περιβάλλον. Η αμμωνία στη συνέχεια αποστάζεται και παγιδεύεται σε ποσότητα αραιού οξέος. Ακολουθεί τιτλοδότηση με τυποποιημένο αλκαλικό διάλυμα για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε άζωτο του δείγματος.[52]

Η μέθοδος Kjeldahl έγινε με βάση το πρότυπο AOAC 984.13 method Kjendahl. Τα δείγματα, στα οποία εφαρμόζεται η μέθοδος Kjeldahl, είναι όγκου 5 – 7 mL και προέρχονται από τις πρώτες δύο μέρες λειτουργίας των βιοαντιδραστήρων. Τα δείγματα μεταφέρονται σε προζυγισμένους περιέκτες και λυοφιλιώνονται για δύο ημέρες. Μετά την λυοφιλίωση ζυγίζεται η μάζα του περιέκτη με το λυοφιλιωμένο δείγμα. Σε ειδικό σωλήνα καύσης μεταφέρεται η αναγκαία ποσότητα δείγματος, 10 g θειϊκού καλίου, 1 g ένυδρου θειϊκού χαλκού και 25 mL πυκνού θειϊκού οξέος (95-98%) και πυρήνες βρασμού. Ο σωλήνας τοποθετείται στην ειδική συσκευή καύσης Kjeldahl, όπου θερμαίνεται αρχικά ήπια για 20 min, έως ότου αρχίσει ο αφρισμός, ακολούθως σε συνθήκες ήπιου βρασμού για τουλάχιστον 15 min μέχρις ότου διαυγαστεί το περιεχόμενό του, και τελικώς σε συνθήκες έντονου βρασμού για 30 min.



Εικόνα 33: Συσκευή χώνευσης Kjeldahl

Ο σωλήνας αφήνεται να ψυχθεί, προσαρμόζεται στην ειδική συσκευή απόσταξης Kjeldahl όπου προστίθενται 75 mL νερού και 125 mL διαλύματος καυστικού νατρίου 32% w/w και υποβάλλεται σε απόσταξη, ενώ το απόσταγμα διαβιβάζεται σε 50 mL διαλύματος 0,5 N θειικού οξέος. Μετά τη συλλογή περίπου 200 mL αποστάγματος στον υποδοχέα, τιτλοδοτείται το υπολειπόμενο θειικό οξύ με διάλυμα καυστικού νατρίου 0,5 N και δείκτη ερυθρό μεθυλίου-μπλε μεθυλενίου. Παράλληλα εκτελείται και λευκός προσδιορισμός. Τέλος, ζυγίζεται η μάζα του περιέκτη και του δείγματος που απέμεινε. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση του αζώτου είναι Kjeldhal Büchi 321 Distillation unit, Flawwil, Switzerland.

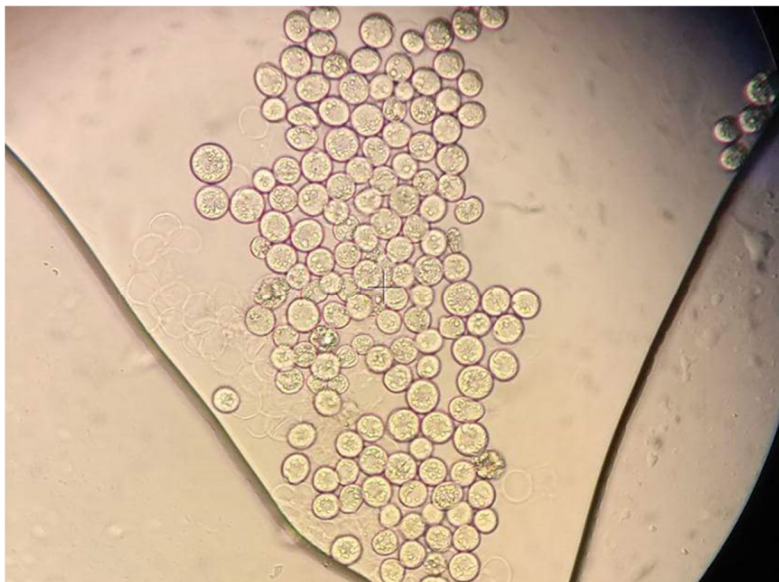
5. ΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ

Κατά την διάρκεια της ετερότροφης ανάπτυξης του μικροφύκου *Cryptocodinium cohnii* τα καθημερινά δείγματα που λαμβάνονται παρατηρούνται σε οπτικό μικροσκόπιο. Αυτή η μελέτη έχει ως στόχο την παρακολούθηση της φάσης ανάπτυξης στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα του μικροφύκου, τα διαφορετικά μεγέθη των κυττάρων με τα εσωκυτταρικά τους οργανίδια και την πιθανή ύπαρξη κάποια επιμόλυνσης της καλλιέργειας.



Εικόνα 34: Κύτταρα μικροφύκου *C.cohnii*

Στην περίπτωση δειγμάτων από τους βιοαντιδραστήρες όπου χρησιμοποιούνται ως τροφοδοσία τα οργανικά οξέα βουτυρικό ή προπιονικό οξύ παρατηρείται ότι δημιουργούνται συσσωματώματα κυττάρων.



Εικόνα 35: Συσσωματώματα κυττάρων μικροφύκου

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. BATCH ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ-ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

Το εμβόλιο καλλιέργειας *C. cohnii* που προστέθηκε στις batch καλλιέργειες είχε απορρόφηση στο πολυφωτόμετρο microplate 0,375 σε μήκος κύματος 685 nm.

Κατά το πείραμα αυτό μελετήθηκε και μια καλλιέργεια control χωρίς πηγή άνθρακα. Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης της καλλιέργειας αυτής παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3: Απορρόφηση δείγματος control

ΧΡΟΝΟΣ (h)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ CONTROL
24	0.068
48	0.105
72	0.107
96	0.105
120	0.164
144	0.141

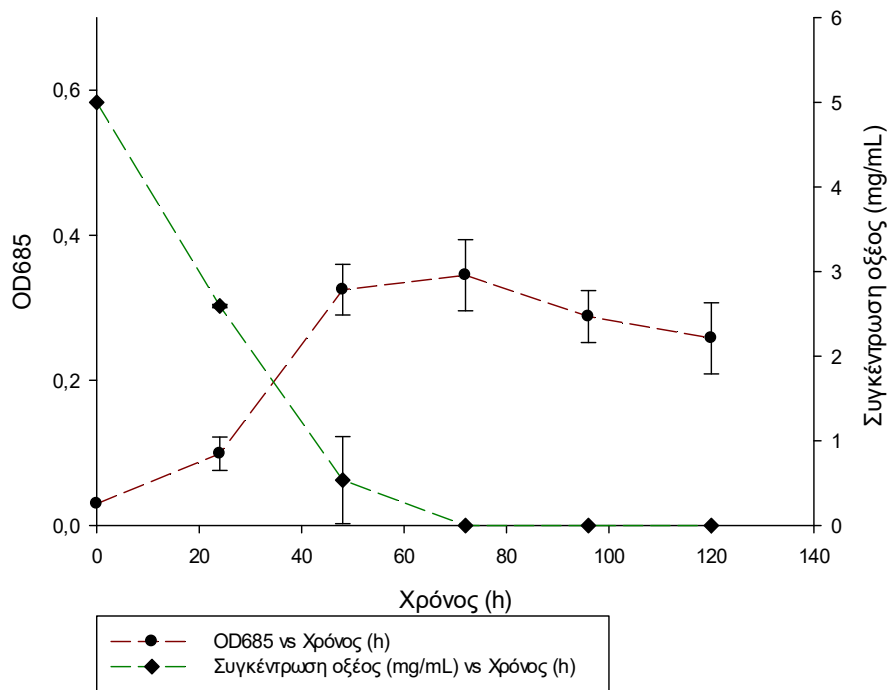
Από τον πίνακα παρατηρείται ότι τα κύτταρα της καλλιέργειας control παρουσιάζουν χαμηλές τιμές απορρόφησης. Η συγκεκριμένη καλλιέργεια δεν περιείχε πηγή άνθρακα, παρά μόνο το θρεπτικό μέσο και το εμβόλιο. Η μικρή αυτή ανάπτυξη οφείλεται στο yeast extract που χρησιμοποιήθηκε, το οποίο περιέχει συστατικά με άνθρακα και άζωτο.

1.1 ΟΞΙΚΟ ΝΑΤΡΙΟ

1.1.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΟΞΙΚΟΥ

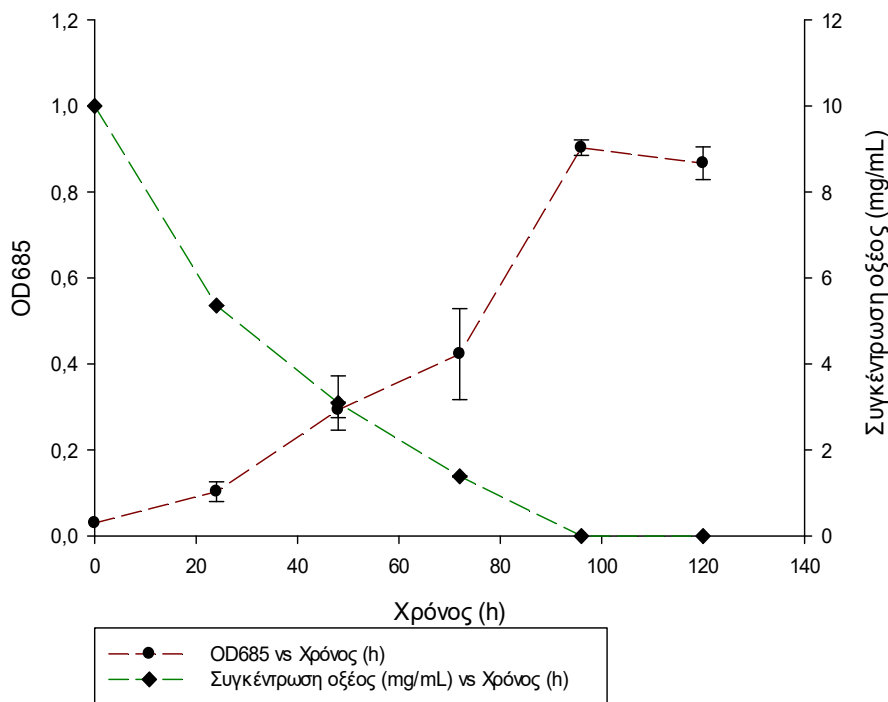
Για πηγή άνθρακα της καλλιέργειας των μικροφυκών το οξικό νάτριο, μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 5, 10, 15, 20 και 30 g/L και παρατηρήθηκε η ανάπτυξη των κυττάρων της καλλιέργειας με καθημερινά δείγματα, τα οποία φωτομετρήθηκαν στο πολυφωτόμετρο Microplate στα 685 nm. Κάθε μέτρηση προκύπτει ως ο μέσος όρος των απορροφήσεων διπλών δειγμάτων για κάθε συγκέντρωση. Επιπρόσθετα, υπολογίστηκε και η τυπική απόκλιση των τιμών απορρόφησης. Μετράται κάθε φορά η απορρόφηση του τυφλού δείγματος και αφαιρείται η τιμή της από την απορρόφηση των δειγμάτων που εξετάζονται.

Οξικό 5g/L



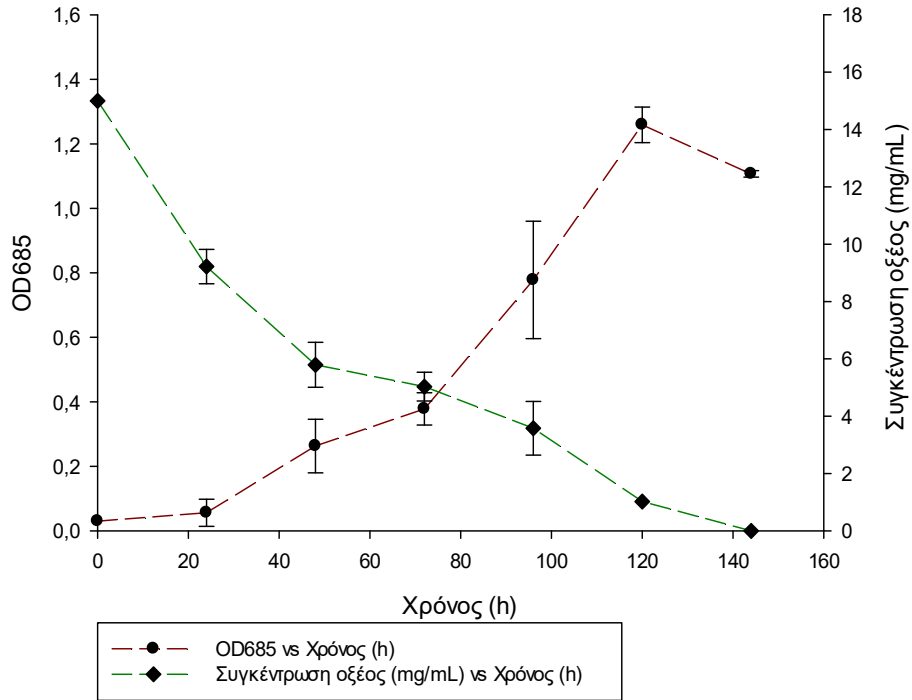
Διάγραμμα 1: Ανάπτυξη κυττάρων και μεταβολή συγκέντρωσης οξικού οξέος για την καλλιέργεια με συγκέντρωση οξικού 5 g/L

Οξικό 10g/L



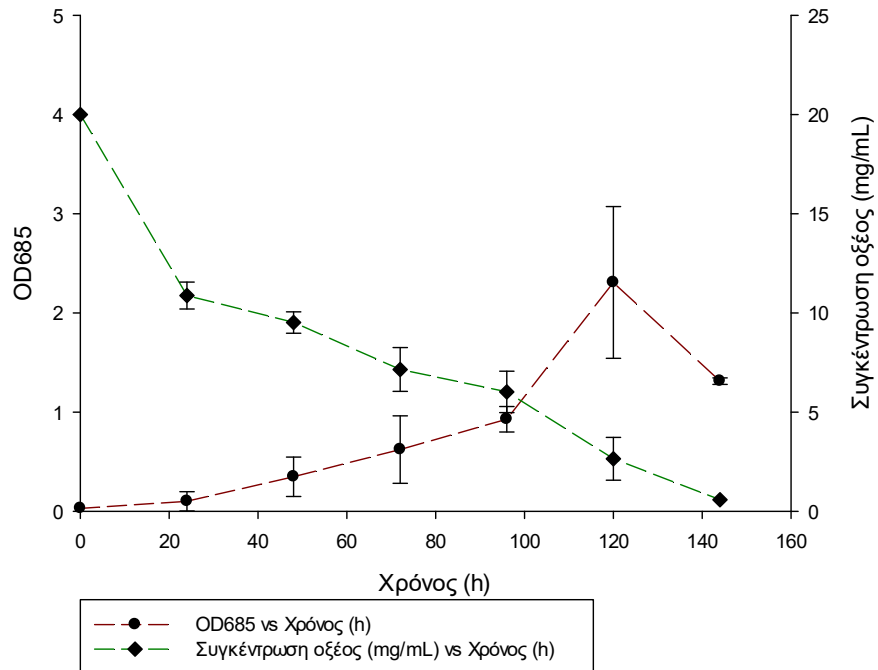
Διάγραμμα 2: Ανάπτυξη κυττάρων και μεταβολή συγκέντρωσης οξικού οξέος για την καλλιέργεια με συγκέντρωση οξικού 10 g/L

Οξικό 15g/L



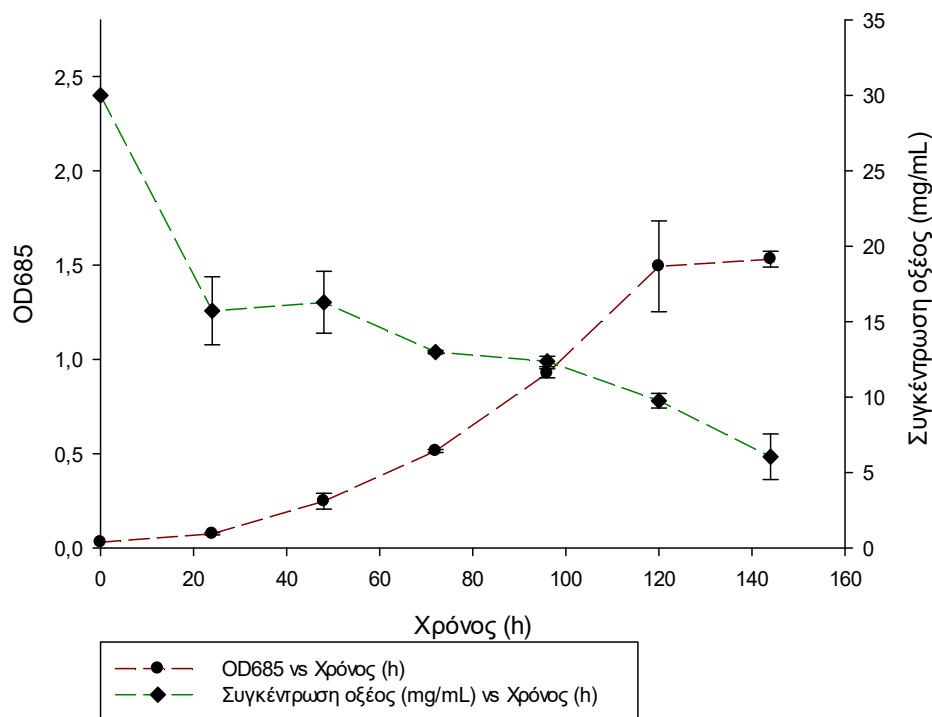
Διάγραμμα 3: Ανάπτυξη κυττάρων και μεταβολή συγκέντρωσης οξικού οξέος για την καλλιέργεια με συγκέντρωση οξικού 15 g/L

Οξικό 20g/L



Διάγραμμα 4: Ανάπτυξη κυττάρων και μεταβολή συγκέντρωσης οξικού οξέος για την καλλιέργεια με συγκέντρωση οξικού 20 g/L

Οξικό 30g/L



Διάγραμμα 5: Ανάπτυξη κυττάρων και μεταβολή συγκέντρωσης οξικού οξέος για την καλλιέργεια με συγκέντρωση οξικού 30 g/L

Οι καλλιέργειες με συγκέντρωση οξικού νατρίου τα 5 και 10 g/L μελετήθηκαν για 120 h, καθώς παρατηρήθηκε διάρρηξη σε πολλά από τα κύτταρα τους. Επομένως, η καλλιέργεια κυττάρων σταμάτησε να αναπτύσσεται. Όλες οι υπόλοιπες καλλιέργειες οξικού νατρίου μελετήθηκαν για 144 h. Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι με την ανάπτυξη της καλλιέργειας και την αύξηση της απορρόφησης στα 685 nm η συγκέντρωση του οξικού ελαττώνεται.

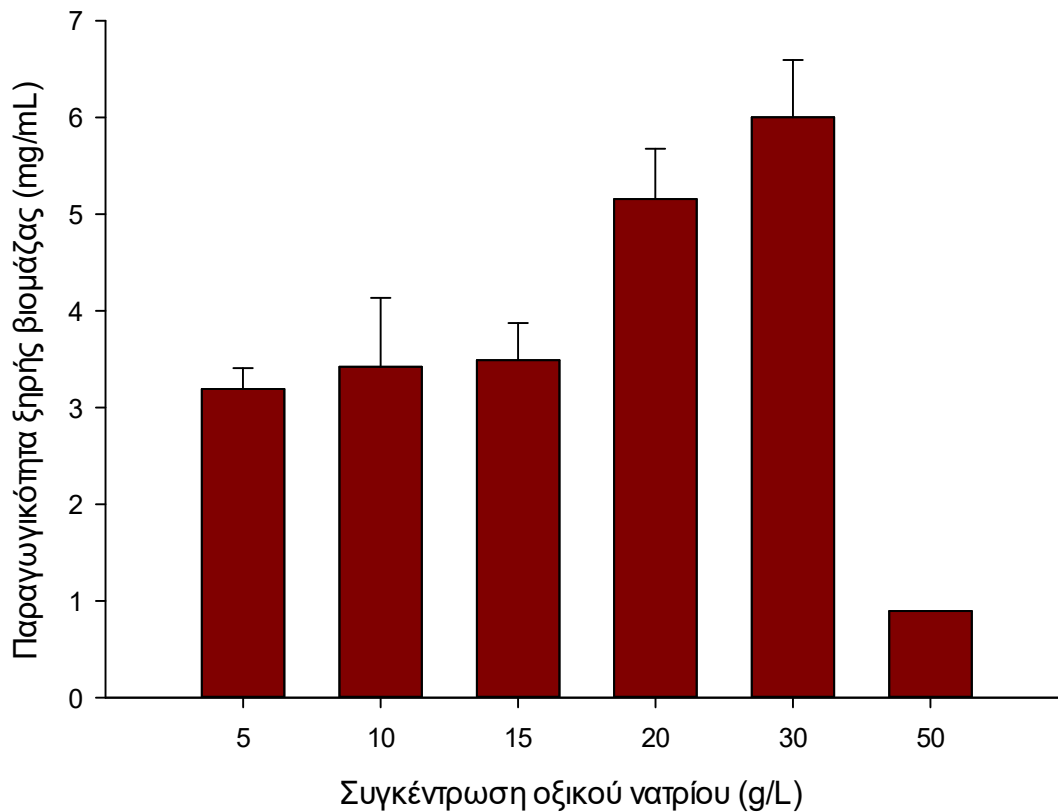
Το μικροφύκος *Cryptocodium cohnii* αναπτύχθηκε σημαντικά σε συγκέντρωση οξικού νατρίου 30 g/L. Προκειμένου να εξεταστεί η μέγιστη συγκέντρωση οξικού νατρίου μετά από την οποία αρχίζει να παρεμποδίζεται η ομαλή ανάπτυξη της καλλιέργειας του μικροφύκου, παρασκευάστηκαν καλλιέργειες συγκέντρωσης 50, 70, 100 και 150 g/L σε οξικό νάτριο. Οι καλλιέργειες με συγκέντρωση οξικού τα 150 g/L μελετήθηκαν για 120 h. Όλες οι υπόλοιπες καλλιέργειες οξικού μελετήθηκαν για 168 h. Από την απορρόφηση των δειγμάτων και την οπτική παρατήρηση των καλλιεργειών προκύπτει ότι τα κύτταρα του μικροφύκου δεν μπόρεσαν να αναπτυχθούν στις υψηλές συγκεντρώσεις οξικού νατρίου των 70, 100 και 150 g/L.

1.1.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Για κάθε καλλιέργεια του μικροφύκου με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο ζυγίζεται η λυοφιλωμένη συνολική ξηρή βιομάζα των κυττάρων, μετράται το pH της καλλιέργειας και προσδιορίζεται ο όγκος της. Η απόδοση σε ξηρή βιομάζα ανά μονάδα όγκου για κάθε τελική καλλιέργεια με διαφορετική αρχική συγκέντρωση οξικού υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Απόδοση βιομάζας (mg/mL)} = \frac{\text{Συνολική ξηρή βιομάζα (mg)}}{\text{Όγκος τελικής καλλιέργειας (mL)}}$$

Οξικό νάτριο



Διάγραμμα 6: Απόδοση ξηρής βιομάζας για διαφορετικές συγκεντρώσεις οξικού

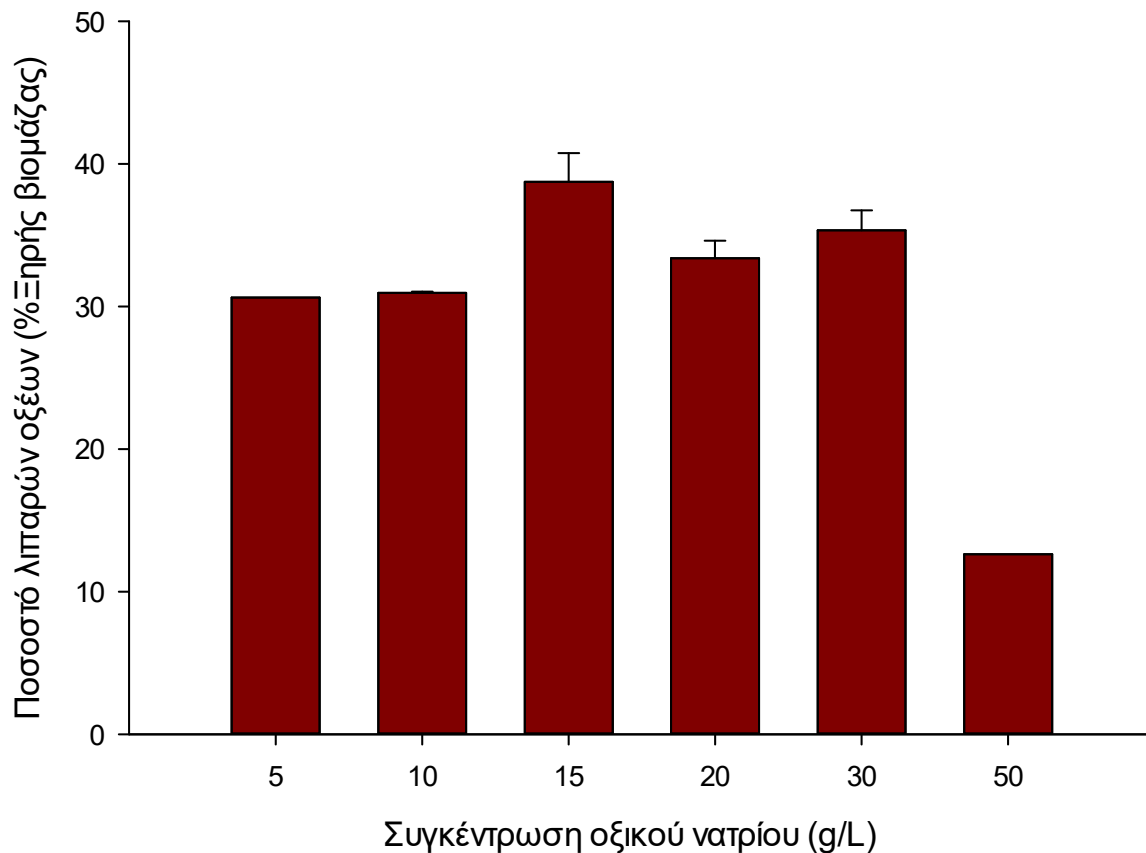
Συγκρίνοντας τις batch καλλιέργειες με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο, μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρή βιομάζα κυττάρων του μικροφύκου παρατηρείται όταν το οξικό νάτριο προστίθεται σε συγκέντρωση 20 και 30 g/L. Γενικότερα, από το παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανής η αύξηση της απόδοσης ξηρής βιομάζας με την αύξηση της συγκέντρωσης οξικού. Πρέπει να σημειωθεί ότι για συγκέντρωση οξικού νατρίου 50 g/L η απόδοση βιομάζας εμφανίζει μια απότομη μείωση στην τιμή της.

1.1.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Για κάθε καλλιέργεια του *Cryptocodium cohni* ζυγίζονται η χρησιμοποιούμενη στην εκχύλιση ξηρή βιομάζα κυττάρων και τα λιπαρά οξέα μετά την εξάτμιση του διαλύτη. Το ποσοστό των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας} = \frac{\text{λιπαρά οξέα (mg)}}{\text{Ξηρή βιομάζα (mg)}} \cdot 100\%$$

Οξικό νάτριο



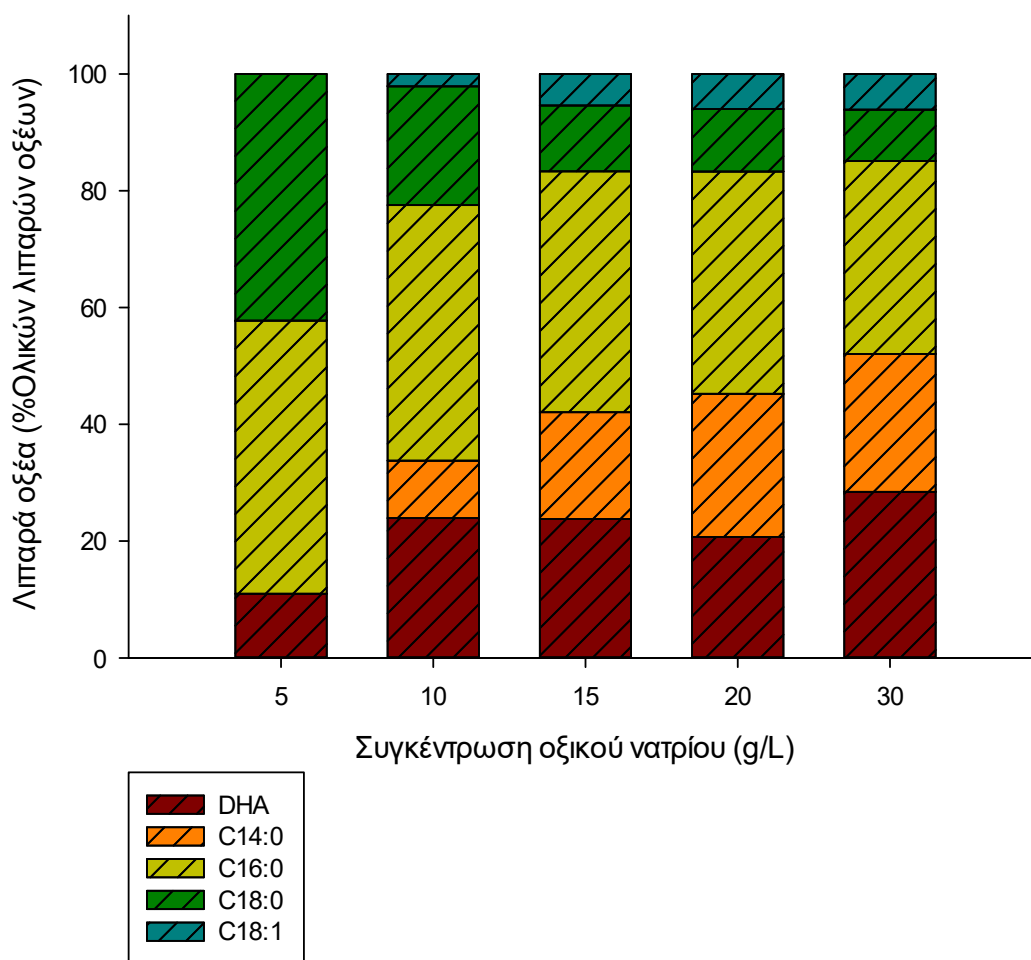
Διάγραμμα 7: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας για διαφορετικές συγκεντρώσεις οξικού

Συγκρίνοντας τα ποσοστά των λιπαρών οξέων που παράγονται από τις batch καλλιέργειες δεν παρατηρούνται μεγάλες διακυμάνσεις στις τιμές που προέκυψαν πειραματικά. Μεγαλύτερο ποσοστό λιπαρών οξέων εμφανίζει η καλλιέργεια με συγκέντρωση 15 g/L. Σημειώνεται ότι το ποσοστό λιπαρών στην καλλιέργεια των 50 g/L είναι πολύ μικρότερο συγκρίνοντάς το με τις υπόλοιπες καλλιέργειες.

1.1.4 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ - GC

Τα δείγματα οξικού νατρίου, των οποίων τα λιπαρά έχουν εστεροποιηθεί, αναλύονται σε αέριο χρωματογράφο. Στο χρωματογράφημα παρατηρούνται κορυφές των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων στα 13,7 min για το C14, στα 17,7 min για το C16, στα 21,5 min για το C18, στα 21,2 min για το C18:1 και στα 28,8 min για το DHA. Με βάση την καμπύλη αναφοράς για το εκάστοτε λιπαρό οξύ μετατρέπεται το εμβαδόν των κορυφών σε συγκέντρωση. Το προφίλ των λιπαρών οξέων σε κάθε δείγμα υπολογίζεται σε ποσοστό του συνόλου των λιπαρών οξέων. Για τα δείγματα διαφορετικών συγκεντρώσεων του οξικού κατασκευάζεται το παρακάτω διάγραμμα:

Οξικό νάτριο



Διάγραμμα 8: Προφίλ λιπαρών οξέων για τα δείγματα οξικού διαφορετικών συγκεντρώσεων

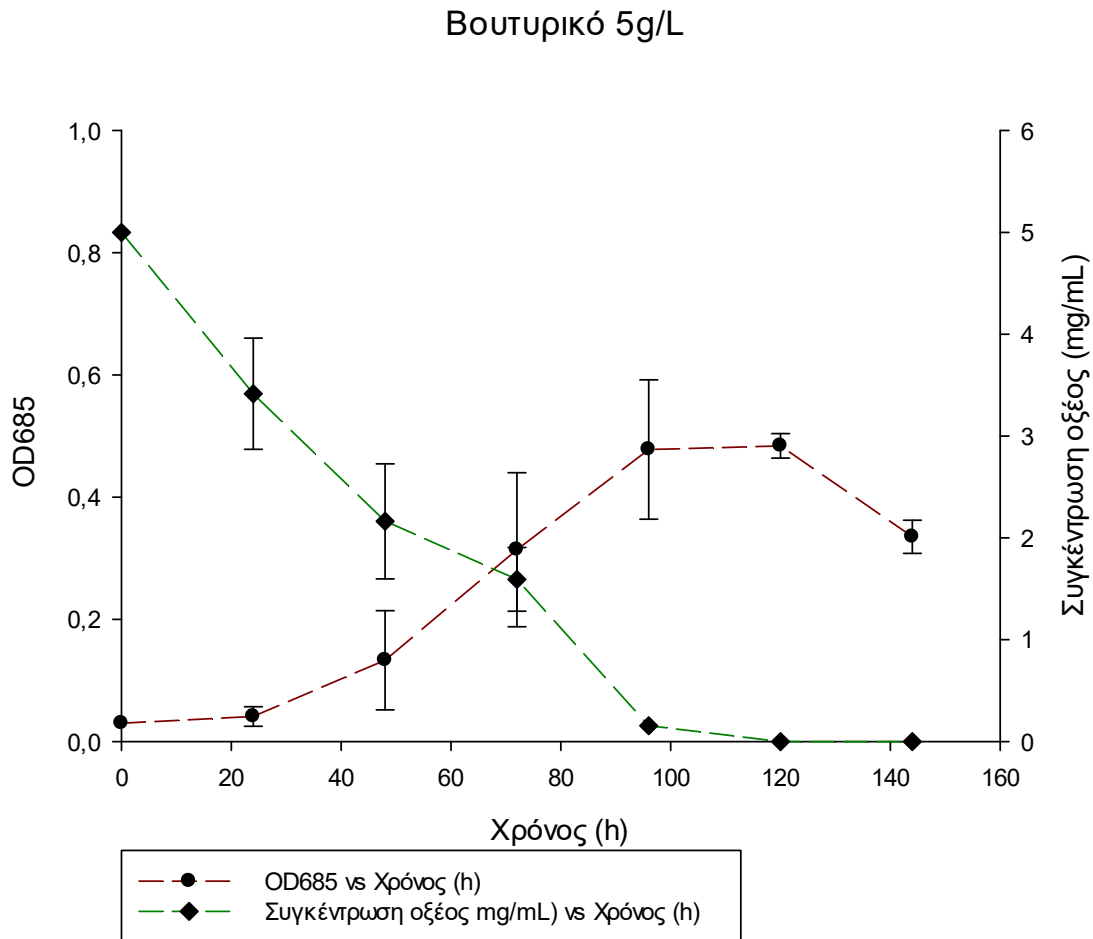
Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα παράγεται DHA σε όλες τις συγκεντρώσεις οξικού νατρίου από 5 έως 30 g/L. Μεγαλύτερο ποσοστό DHA παρατηρείται στην περίπτωση συγκέντρωσης οξικού 30 g/L.

1.2 ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ

1.2.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ

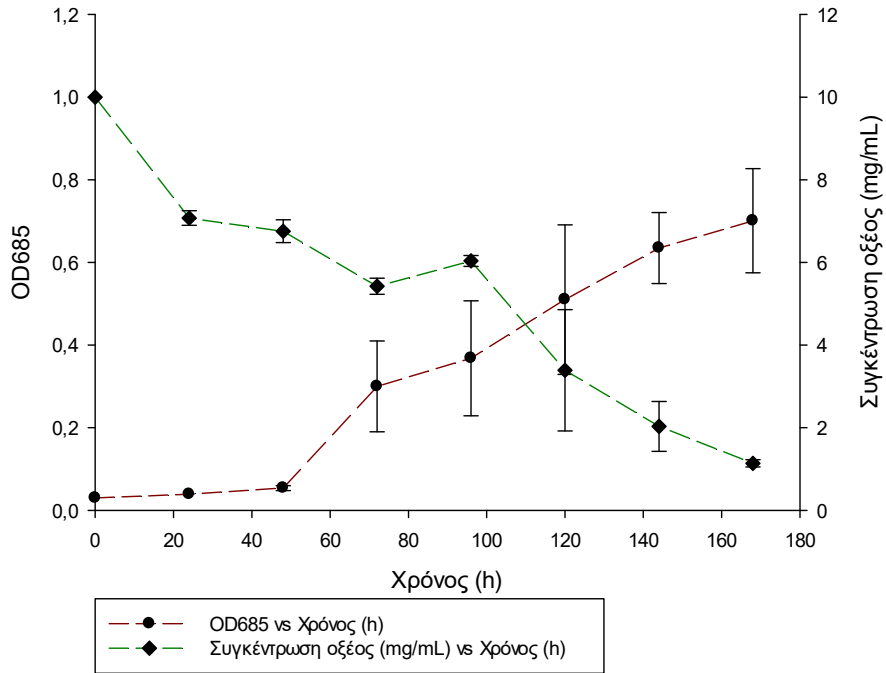
Για πηγή άνθρακα της καλλιέργειας των μικροφυκών το βουτυρικό οξύ μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 5, 10, 15, 20 και 30 g/L.

Οι καλλιέργειες με συγκέντρωση βουτυρικού οξέος τα 5, 20 και 30 g/L μελετήθηκαν για 144 h, καθώς παρατηρήθηκε διάρρηξη σε πολλά από τα κύτταρα τους και αναστολή της ανάπτυξής τους.



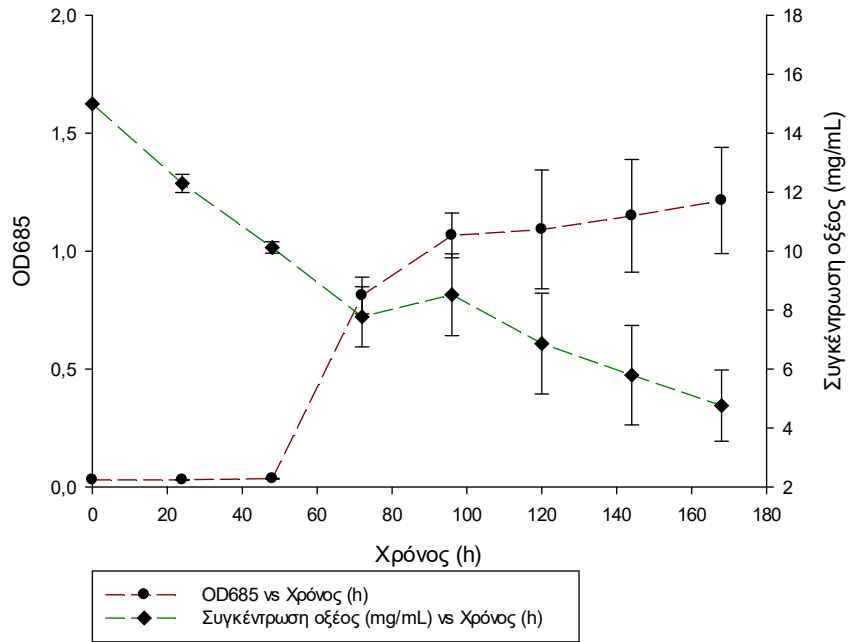
Διάγραμμα 9: Ανάπτυξη κυττάρων και μεταβολή συγκέντρωσης βουτυρικού οξέος για την καλλιέργεια με συγκέντρωση βουτυρικού 5g/L

Βουτυρικό 10g/L



Διάγραμμα 10: Ανάπτυξη κυττάρων και μεταβολή συγκέντρωσης βουτυρικού οξέος για την καλλιέργεια με συγκέντρωση βουτυρικού 10 g/L

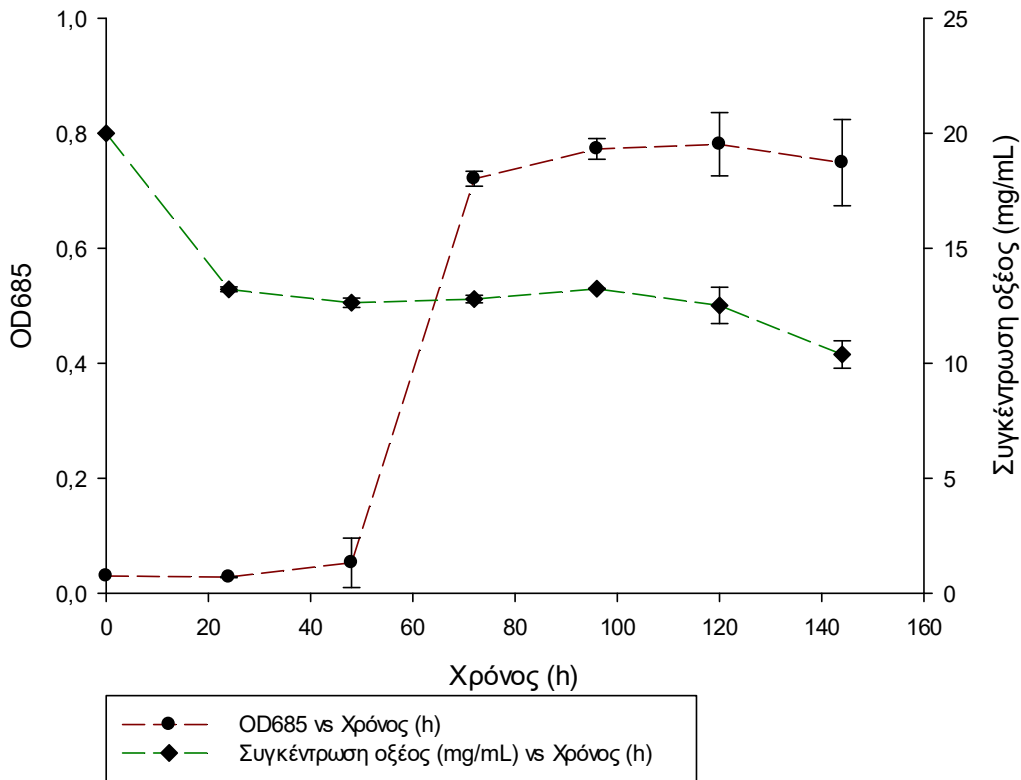
Βουτυρικό 15g/L



Διάγραμμα 11: Ανάπτυξη κυττάρων και μεταβολή συγκέντρωσης βουτυρικού οξέος για την καλλιέργεια με συγκέντρωση βουτυρικού 15 g/L

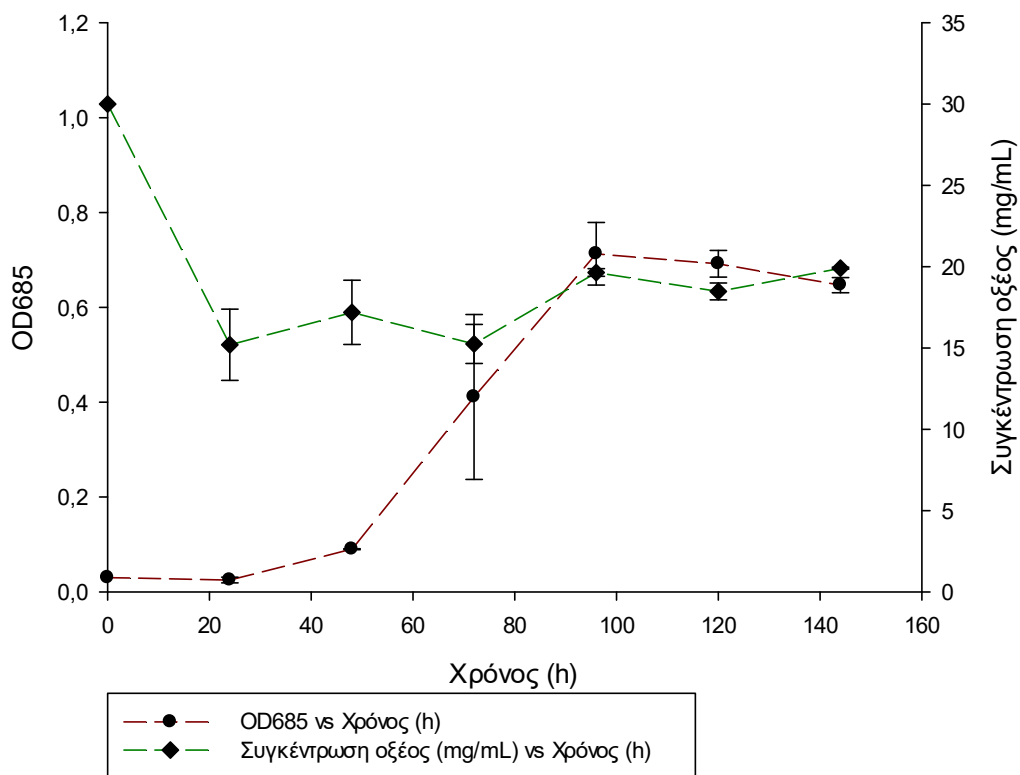
Στις καλλιέργειες με συγκέντρωση βουτυρικού οξέος 5, 10 και 15 g/L είναι εμφανής η μείωση της συγκέντρωσης του οξέος με την ανάπτυξη των κυττάρων του μικροφύκου. Επιπρόσθετα, στα διαγράμματα αυτά μπορεί να παρατηρηθούν και οι φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων της καλλιέργειας, ξεκινώντας από την φάση υστέρησης για την προσαρμογή των κυττάρων στο οξύ και προχωρώντας στην εκθετική φάση ανάπτυξης και τη φάση στασιμότητας.

Βουτυρικό 20g/L



Διάγραμμα 12: Ανάπτυξη κυττάρων και μεταβολή συγκέντρωσης βουτυρικού οξέος για την καλλιέργεια με συγκέντρωση βουτυρικού 20 g/L

Βουτυρικό 30g/L



Διάγραμμα 13: Ανάπτυξη κυττάρων και μεταβολή συγκέντρωσης βουτυρικού οξέος για την καλλιέργεια με συγκέντρωση βουτυρικού 30 g/L

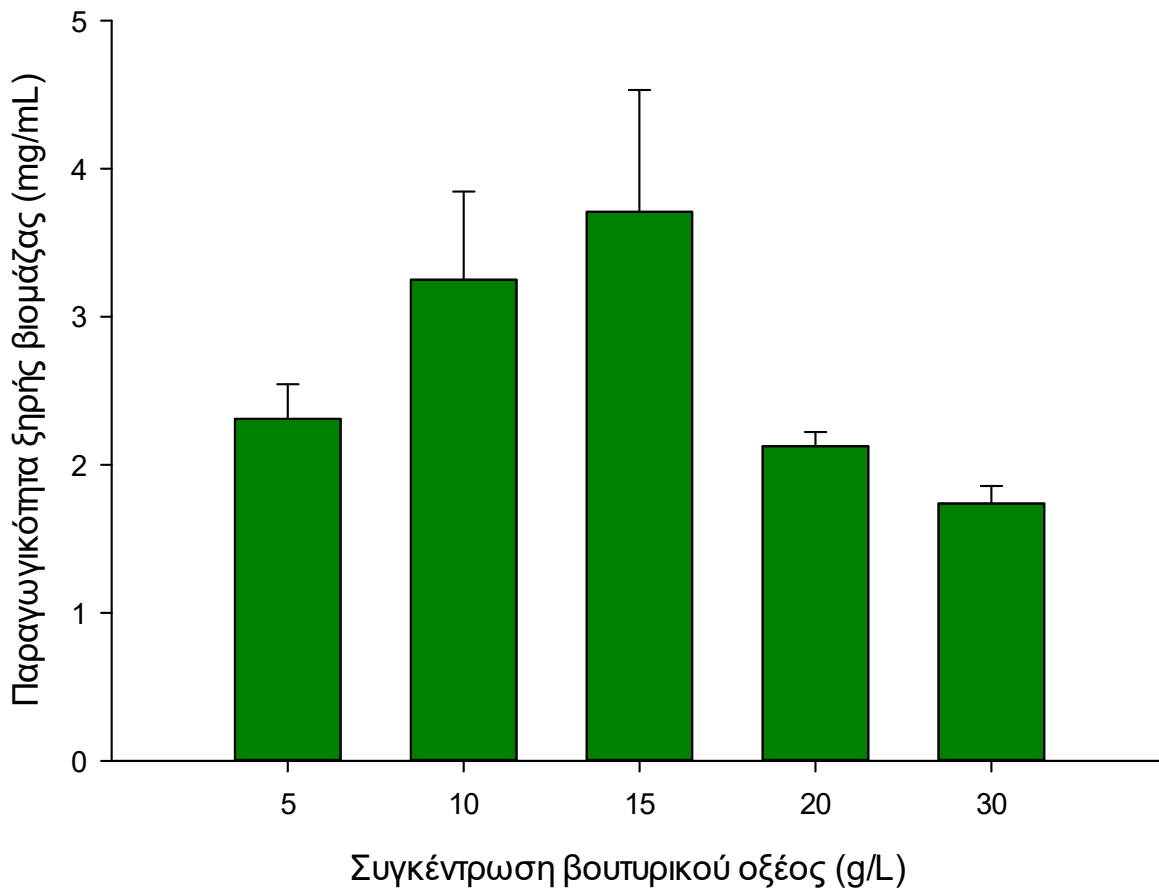
Από τα διαγράμματα των καλλιεργειών βουτυρικού οξέος με συγκέντρωση της πηγής άνθρακα στα 20 και 30 g/L δεν παρατηρείται έντονη μείωση της συγκέντρωσης του οξέος μετά τις πρώτες 40 h ανάπτυξης της καλλιέργειας. Αντίθετα, η συγκέντρωση του οξέος φαίνεται να σταθεροποιείται σε μια τιμή.

1.2.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Η απόδοση σε ξηρή βιομάζα ανά μονάδα όγκου για κάθε τελική καλλιέργεια με διαφορετική συγκέντρωση βουτυρικού οξέος υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Απόδοση βιομάζας (mg/mL)} = \frac{\text{Συνολική ξηρή βιομάζα (mg)}}{\text{Όγκος τελικής καλλιέργειας (mL)}}$$

Βουτυρικό οξύ



Διάγραμμα 14: Απόδοση ξηρής βιομάζας για διαφορετικές συγκεντρώσεις βουτυρικού

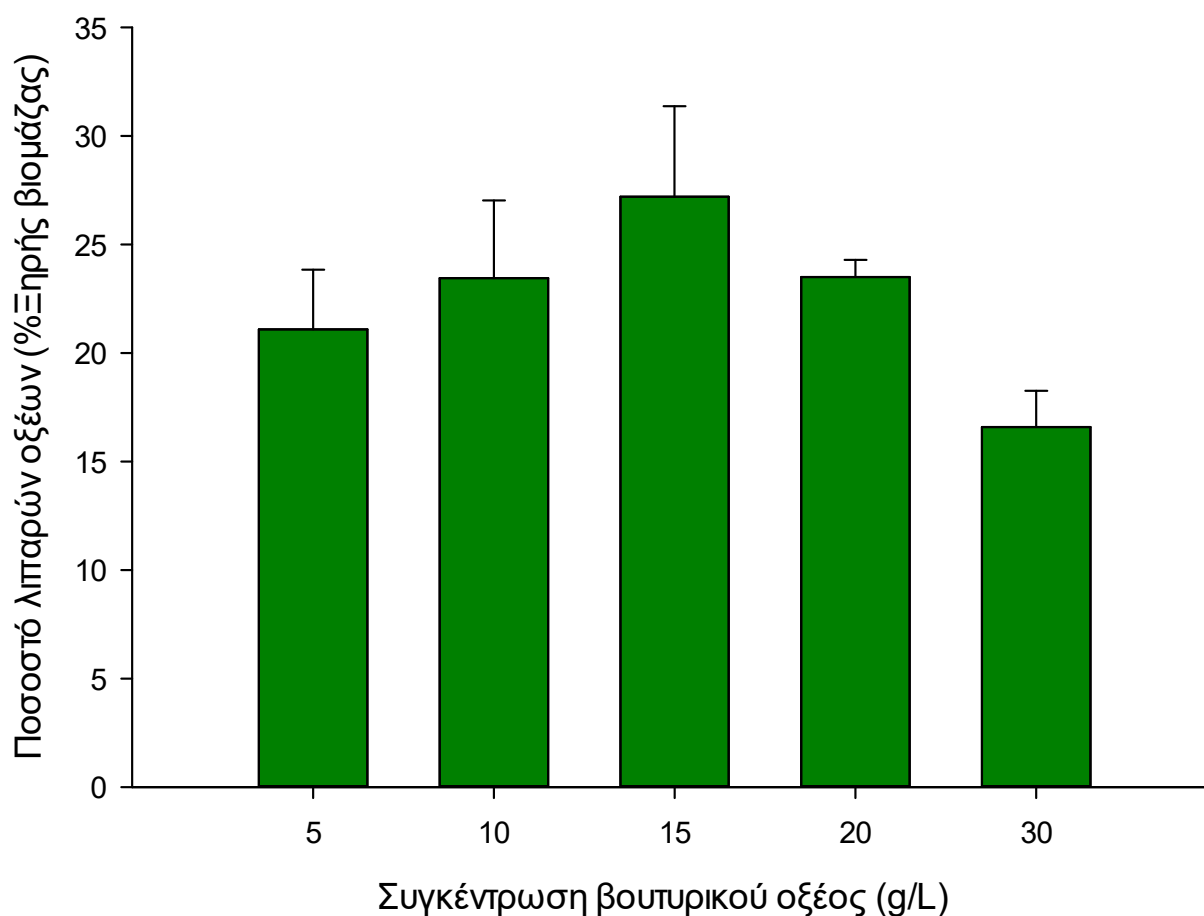
Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται μεγαλύτερη απόδοση ξηρής βιομάζας κυττάρων στις καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση βουτυρικού οξέος 10 και 15 g/L.

1.2.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Για κάθε καλλιέργεια του *Cryptocodinium cohnii* ζυγίζονται η χρησιμοποιούμενη στην εκχύλιση ξηρή βιομάζα κυττάρων και τα λιπαρά οξέα μετά την εξάτμιση του διαλύτη. Το ποσοστό των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας} = \frac{\text{λιπαρά οξέα (mg)}}{\text{Ξηρή βιομάζα (mg)}} \cdot 100\%$$

Βουτυρικό οξύ



Διάγραμμα 15: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας για διαφορετικές συγκεντρώσεις βουτυρικού οξέος

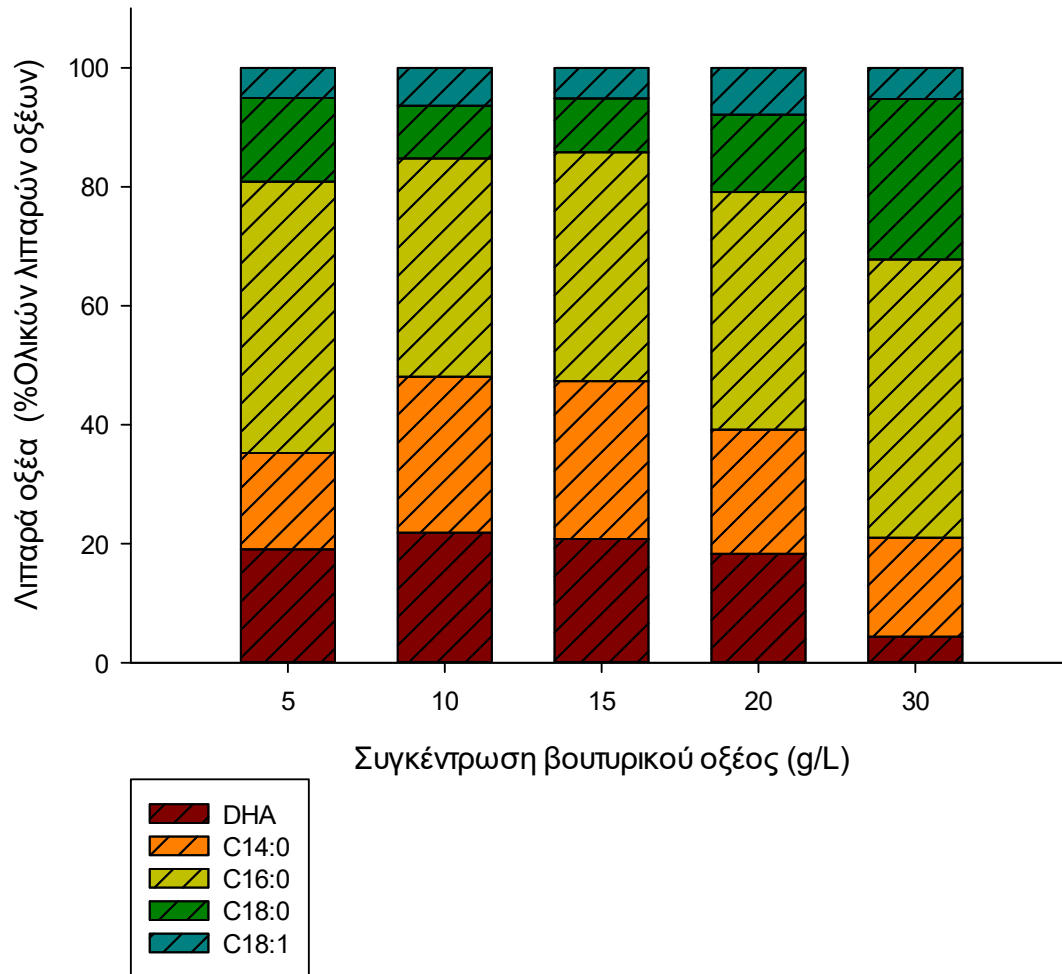
Όσον αφορά το ποσοστό λιπαρών οξέων που παράγεται στην εκάστοτε καλλιέργεια δεν παρατηρούνται έντονες διακυμάνσεις με υψηλότερο ποσοστό να παρατηρείται σε συγκέντρωση 15 g/L και με μικρότερο ποσοστό στα 30 g/L.

1.2.4 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC

Τα δείγματα βουτυρικού οξέος, των οποίων τα λιπαρά έχουν εστεροποιηθεί, αναλύονται σε αέριο χρωματογράφο. Το προφίλ των λιπαρών οξέων σε κάθε δείγμα υπολογίζεται σε ποσοστό του συνόλου των λιπαρών οξέων.

Για τα δείγματα διαφορετικών συγκεντρώσεων του βουτυρικού οξέος κατασκευάζεται το παρακάτω διάγραμμα:

Βουτυρικό οξύ



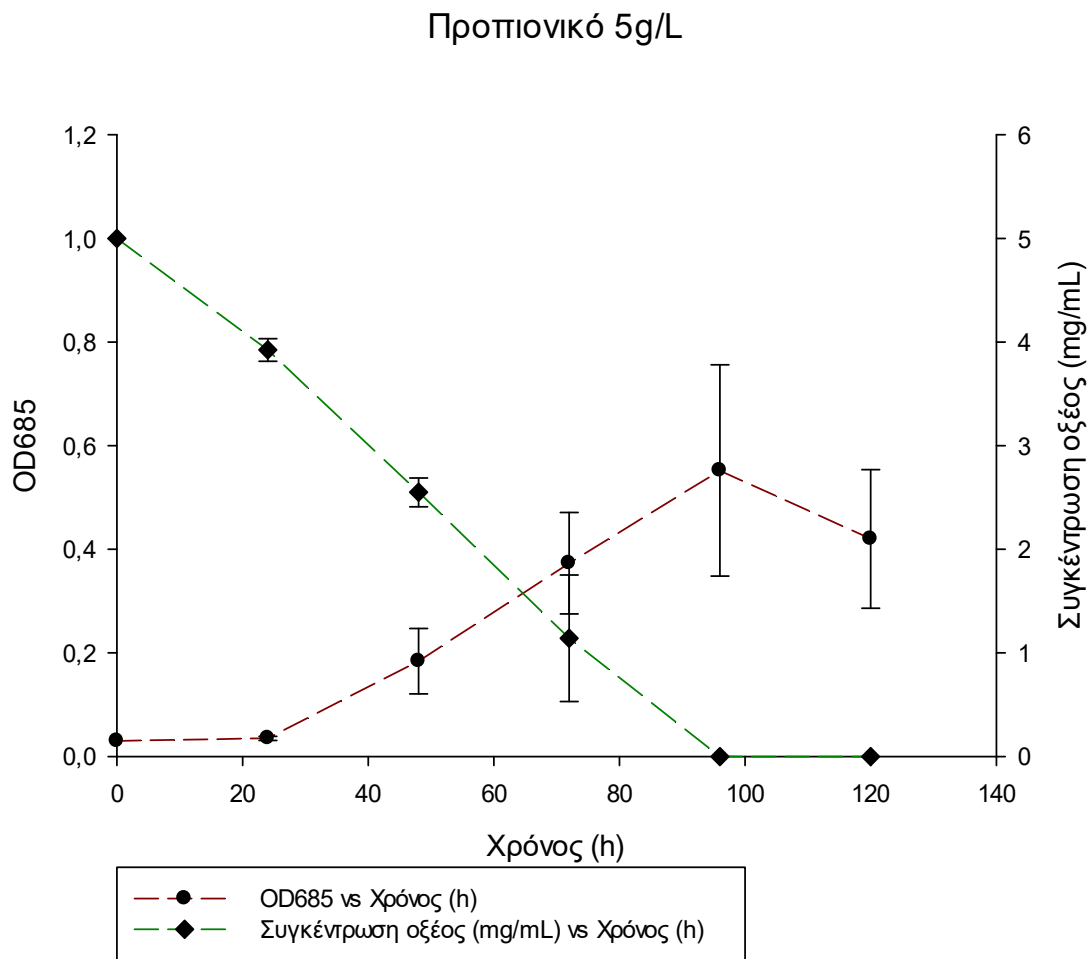
Διάγραμμα 16: Προφίλ λιπαρών οξέων για τα δείγματα βουτυρικού διαφορετικών συγκεντρώσεων

Βάσει του παραπάνω διαγράμματος, DHA παράγεται σε κάθε συγκέντρωση βουτυρικού οξέος που μελετήθηκε ως πηγή άνθρακα. Πρέπει να σημειωθεί ότι για συγκέντρωση 30 g/L το ποσοστό του DHA είναι αισθητά χαμηλότερο σε σύγκριση με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις βουτυρικού οξέος.

1.3 ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟ ΟΞΥ

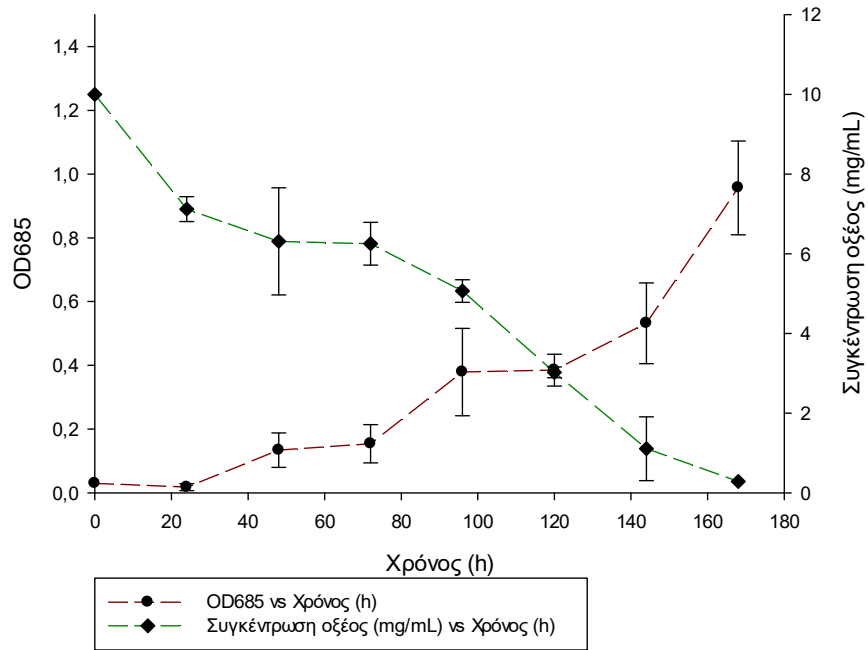
1.3.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟΥ

Για πηγή άνθρακα της καλλιέργειας των μικροφυκών το προπιονικό οξύ μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 5, 10, 15, 20 και 30 g/L και παρατηρήθηκε η ανάπτυξη των κυττάρων της καλλιέργειας με καθημερινά δείγματα.



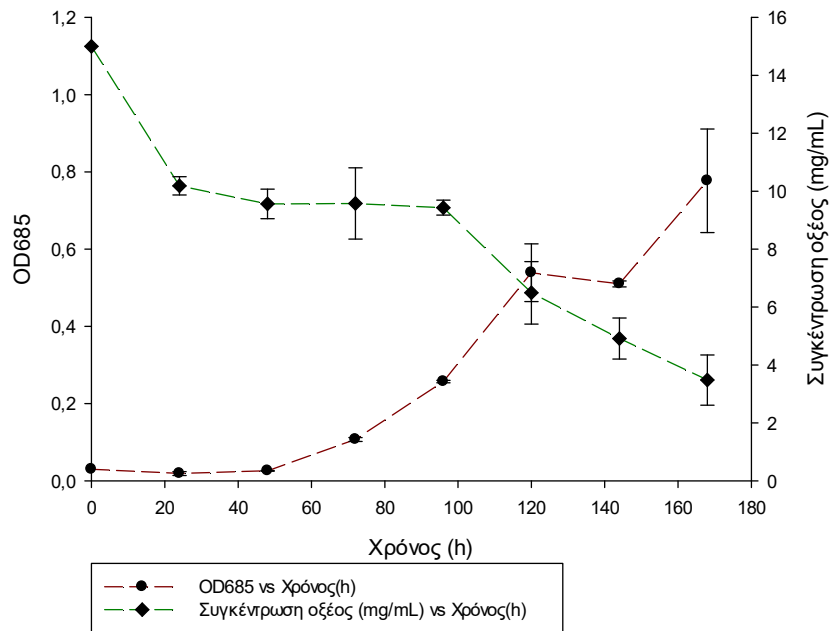
Διάγραμμα 17: Ανάπτυξη κυττάρων και μεταβολή συγκέντρωσης προπιονικού οξέος για την καλλιέργεια με συγκέντρωση προπιονικού 5 g/L

Προπιονικό 10g/L



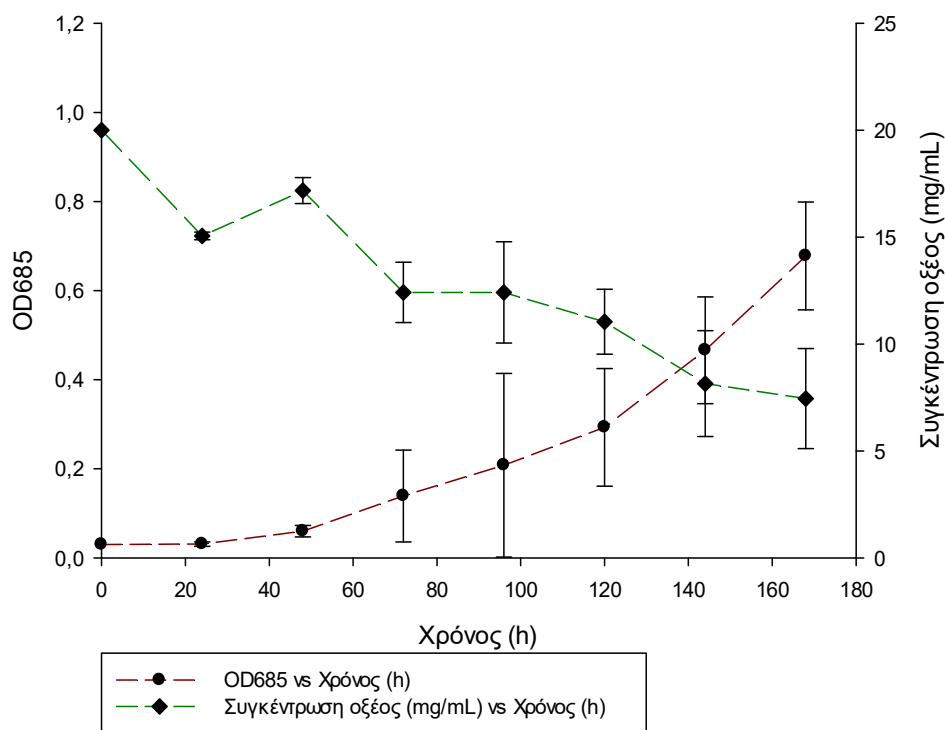
Διάγραμμα 18: Ανάπτυξη κυττάρων και μεταβολή συγκέντρωσης προπιονικού οξέος για την καλλιέργεια με συγκέντρωση προπιονικού 10 g/L

Προπιονικό 15g/L



Διάγραμμα 19: Ανάπτυξη κυττάρων και μεταβολή συγκέντρωσης προπιονικού οξέος για την καλλιέργεια με συγκέντρωση προπιονικού 15 g/L

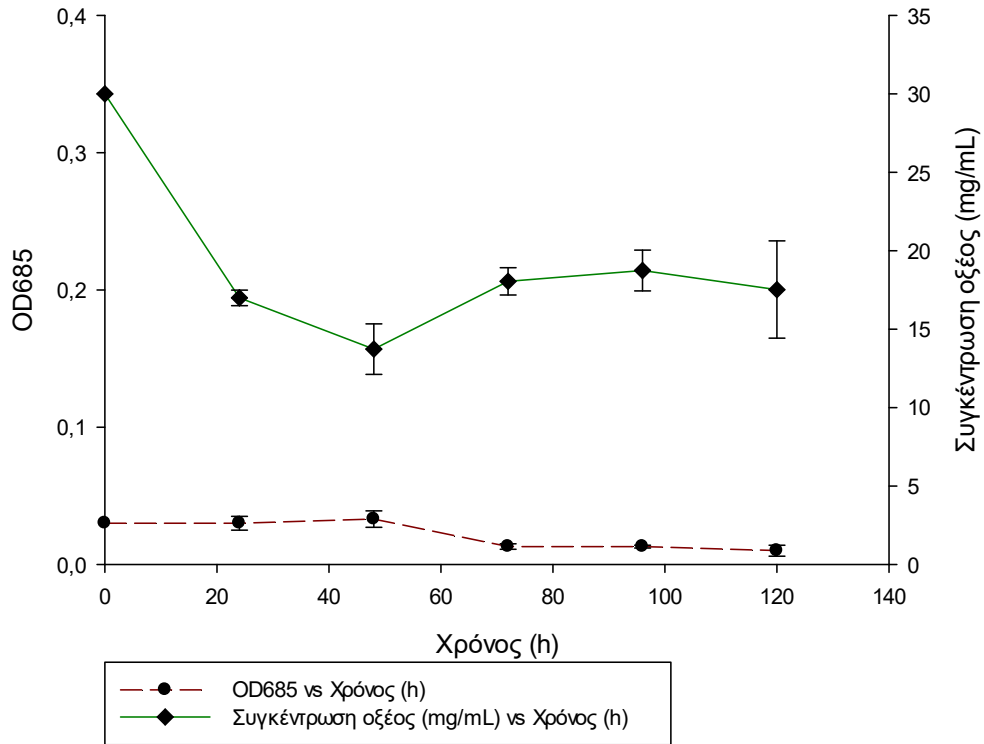
Προπιονικό 20g/L



Διάγραμμα 20: Ανάπτυξη κυττάρων και μεταβολή συγκέντρωσης προπιονικού οξέος για την καλλιέργεια με συγκέντρωση προπιονικού 20 g/L

Στις καλλιέργειες μικροφύκους με συγκέντρωση προπιονικού οξέος 5, 10, 15 και 20 g/L παρατηρείται ελάττωση της συγκέντρωσης του οξέος με την αύξηση των κυττάρων της καλλιέργειας και κατ'επέκταση της τιμής της απορρόφησης.

Προπιονικό 30g/L



Διάγραμμα 21: Ανάπτυξη κυττάρων και μεταβολή συγκέντρωσης προπιονικού οξέος για την καλλιέργεια με συγκέντρωση προπιονικού 30 g/L

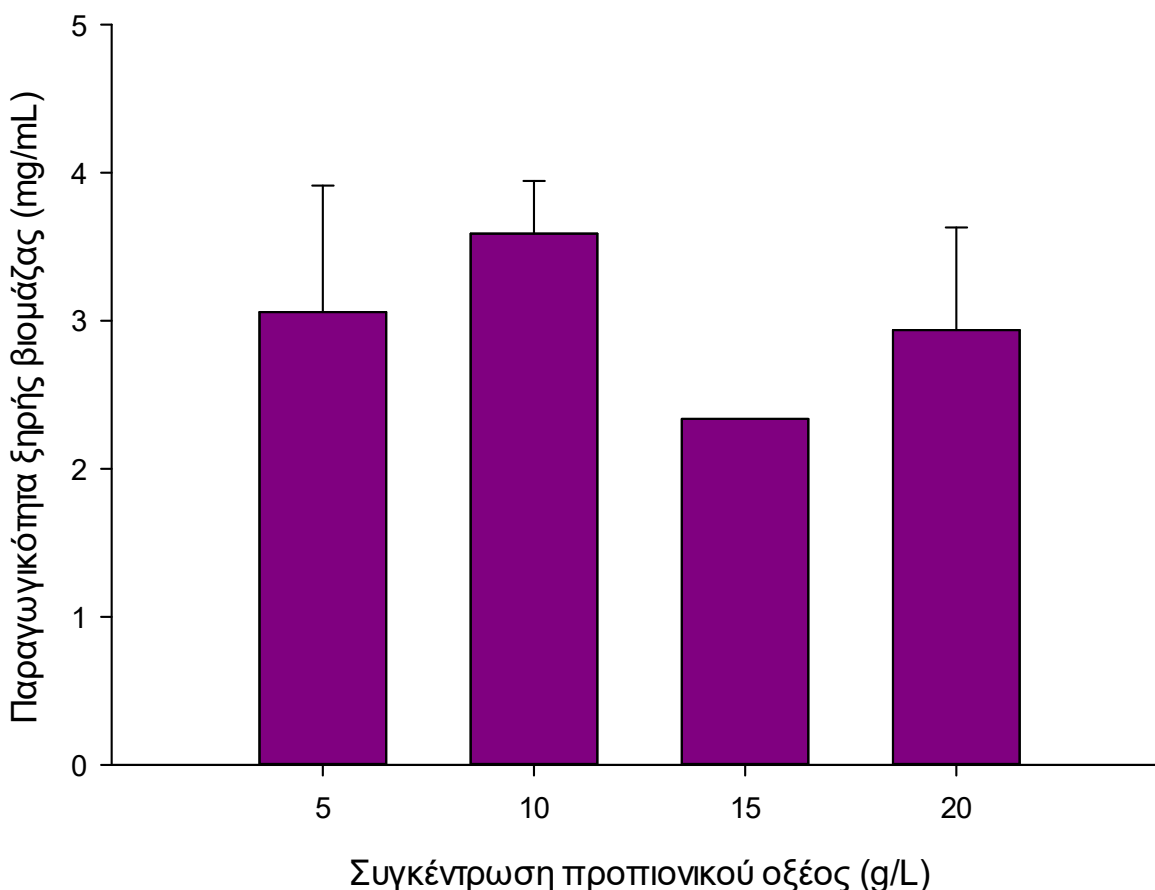
Οι καλλιέργειες με συγκέντρωση προπιονικού οξέος τα 5 και 30 g/L μελετήθηκαν για 144 h, καθώς παρατηρήθηκε διάρρηξη σε πολλά από τα κύτταρα τους. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στις καλλιέργειες το προπιονικού οξέος με συγκέντρωση 30 g/L, όπως επιβεβαιώνεται και από τις χαμηλές και σταθερές τιμές της απορρόφησης. Η μείωση συγκέντρωσης που παρουσιάζεται από την ανάλυση HPLC μπορεί να οφείλεται σε σφάλματα του δείγματος.

1.3.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Η απόδοση σε ξηρή βιομάζα ανά μονάδα όγκου για κάθε τελική καλλιέργεια με διαφορετική συγκέντρωση προπιονικού οξέος υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Απόδοση βιομάζας (mg/mL)} = \frac{\text{Συνολική ξηρή βιομάζα (mg)}}{\text{Όγκος τελικής καλλιέργειας (mL)}}$$

Προπιονικό οξύ



Διάγραμμα 22: Απόδοση ξηρής βιομάζας για διαφορετικές συγκεντρώσεις προπιονικού

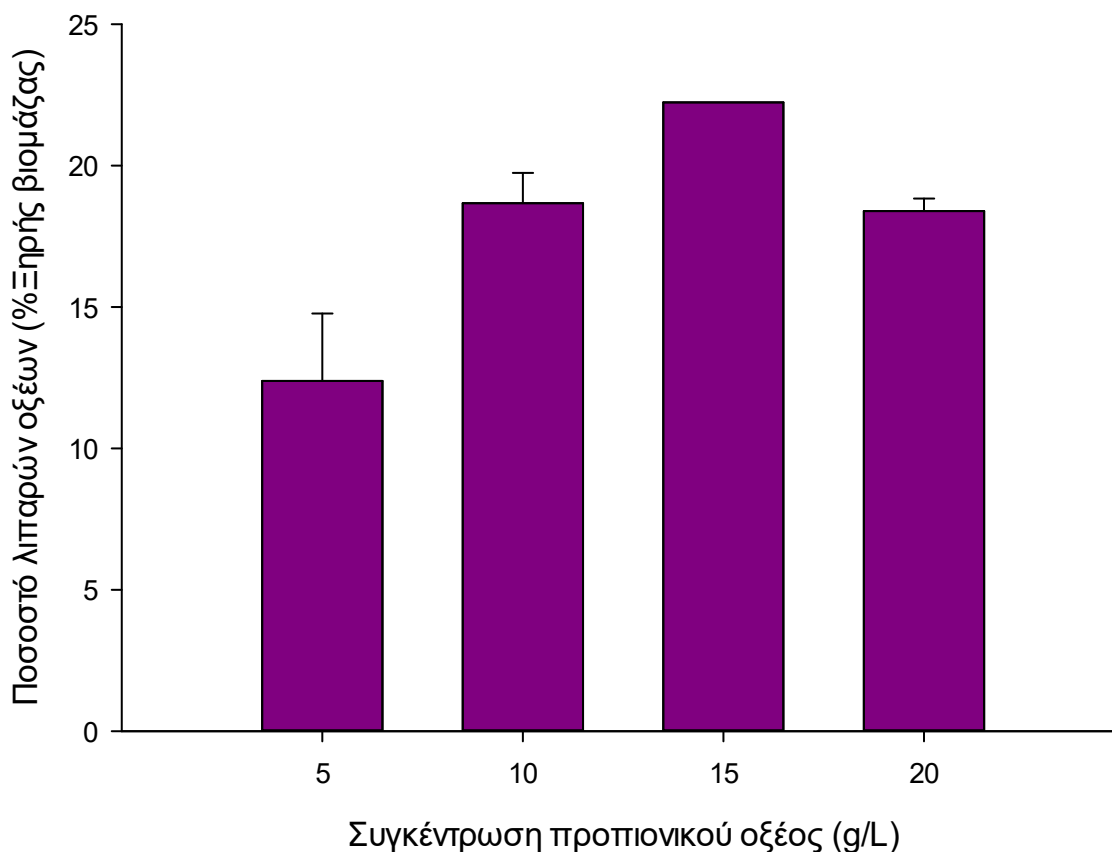
Από το παραπάνω διάγραμμα μεγαλύτερη απόδοση ξηρής βιομάζας παρατηρείται σε συγκέντρωση προπιονικού οξέος 10 g/L. Να σημειωθεί ότι για τις καλλιέργειες των 30 g/L προπιονικού οξέος δεν μελετήθηκε η απόδοση βιομάζας λόγω ανεπαρκούς ανάπτυξης των κυττάρων σε αυτή τη συγκέντρωση οξέος.

1.3.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Για κάθε καλλιέργεια ζυγίζονται η χρησιμοποιούμενη στην εκχύλιση ξηρή βιομάζα κυττάρων και τα λιπαρά οξέα μετά την εξάτμιση του διαλύτη. Το ποσοστό των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας} = \frac{\text{λιπαρά οξέα (mg)}}{\text{Ξηρή βιομάζα (mg)}} \cdot 100\%$$

Προπιονικό οξύ



Διάγραμμα 23: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας για διαφορετικές συγκεντρώσεις προπιονικού

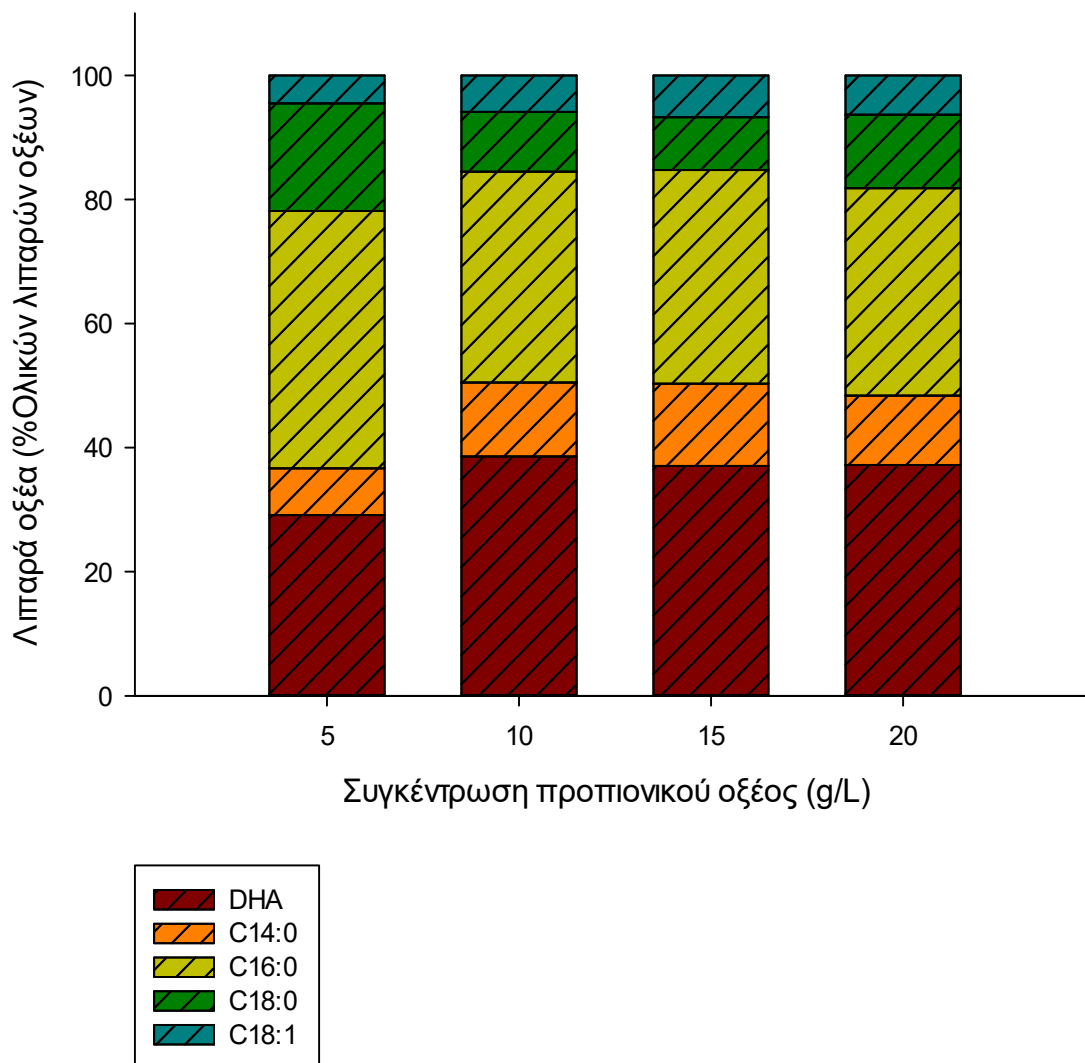
Βασιζόμενοι στο παραπάνω διάγραμμα, υψηλότερο ποσοστό λιπαρών οξέων παρατηρείται για την καλλιέργεια με 15 g/L προπιονικού οξέος. Βέβαια, κοντινές τιμές στο ποσοστό των λιπαρών παρατηρούνται και για καλλιέργειες με συγκέντρωση της πηγής άνθρακα 10 και 20 g/L. Να σημειωθεί ότι για τις καλλιέργειες των 30 g/L προπιονικού οξέος δεν μελετήθηκαν τα ολικά λιπαρά λόγω ανεπαρκούς ανάπτυξης των κυττάρων σε αυτή τη συγκέντρωση οξέος.

1.3.4 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC

Τα δείγματα προπιονικού οξέος, των οποίων τα λιπαρά έχουν εστεροποιηθεί, αναλύονται σε αέριο χρωματογράφο. Το προφίλ των λιπαρών οξέων σε κάθε δείγμα υπολογίζεται σε ποσοστό του συνόλου των λιπαρών οξέων.

Για τα δείγματα διαφορετικών συγκεντρώσεων του προπιονικού κατασκευάζεται το παρακάτω διάγραμμα:

Προπιονικό οξύ



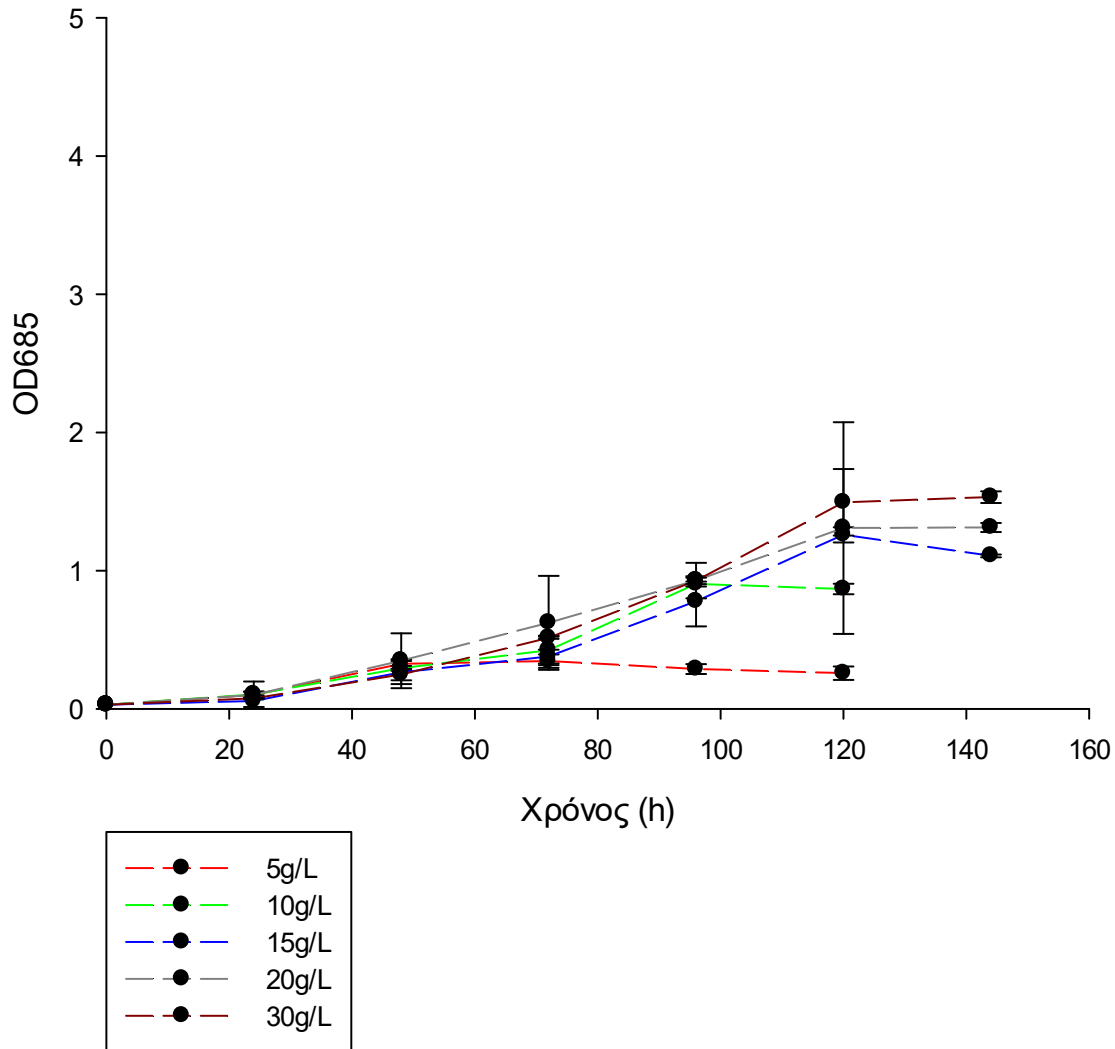
Διάγραμμα 24: Προφίλ λιπαρών οξέων για τα δείγματα προπιονικού διαφορετικών συγκεντρώσεων

Παραγωγή DHA παρατηρείται σε όλες τις συγκεντρώσεις προπιονικού οξέος και μάλιστα σε κοντινά ποσοστά επί των συνολικών λιπαρών οξέων.

1.4 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ BATCH ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

1.4.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

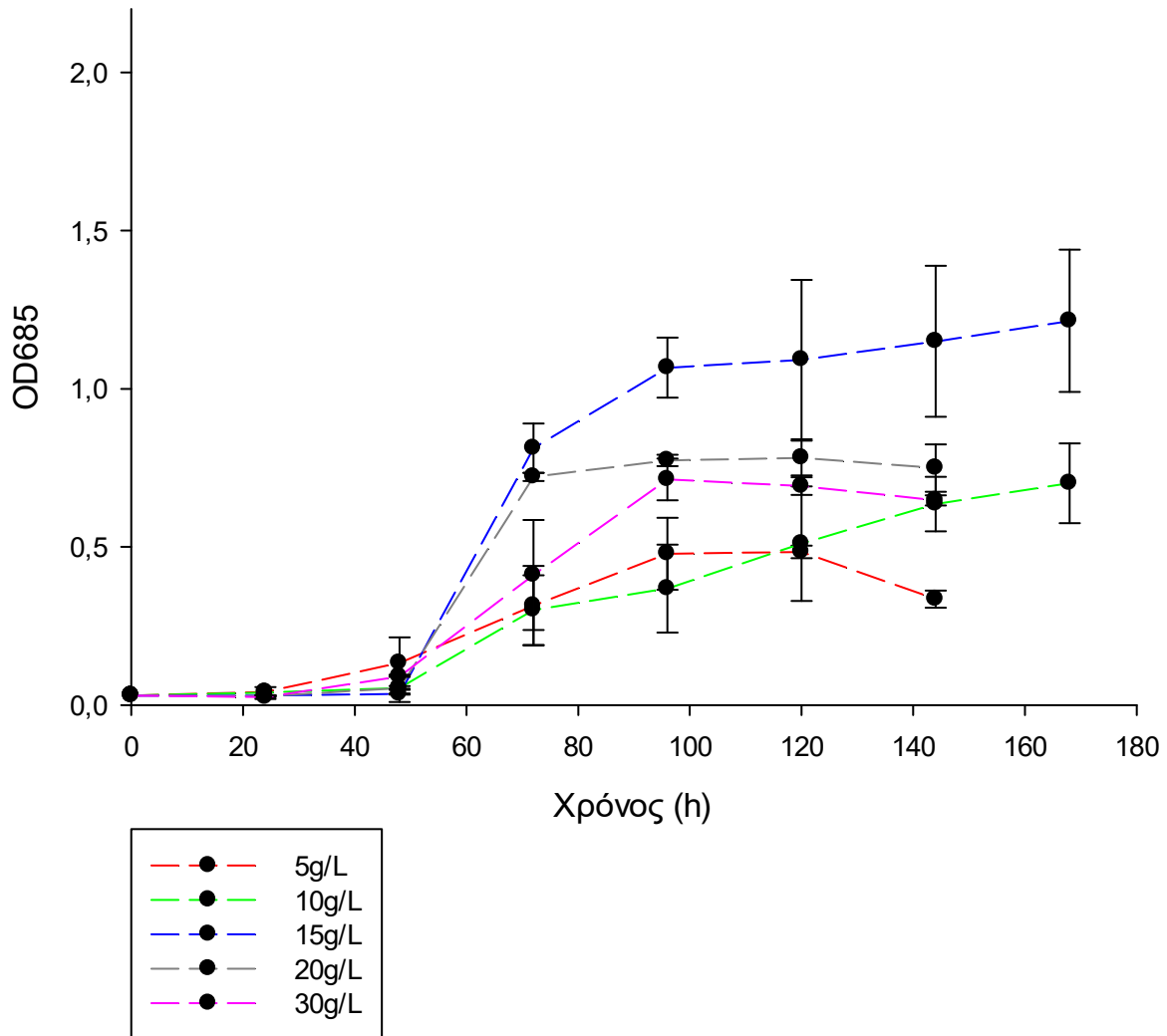
Οξικό οξύ



Διάγραμμα 25: Ανάπτυξη κυττάρων καλλιέργειών με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο

Για τις καλλιέργειες με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο παρατηρείται ότι με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του οξικού αυξάνεται και η τιμή της απορρόφησης και κατ'επέκταση η ανάπτυξη της καλλιέργειας για την ίδια χρονική στιγμή που λαμβάνεται το δείγμα.

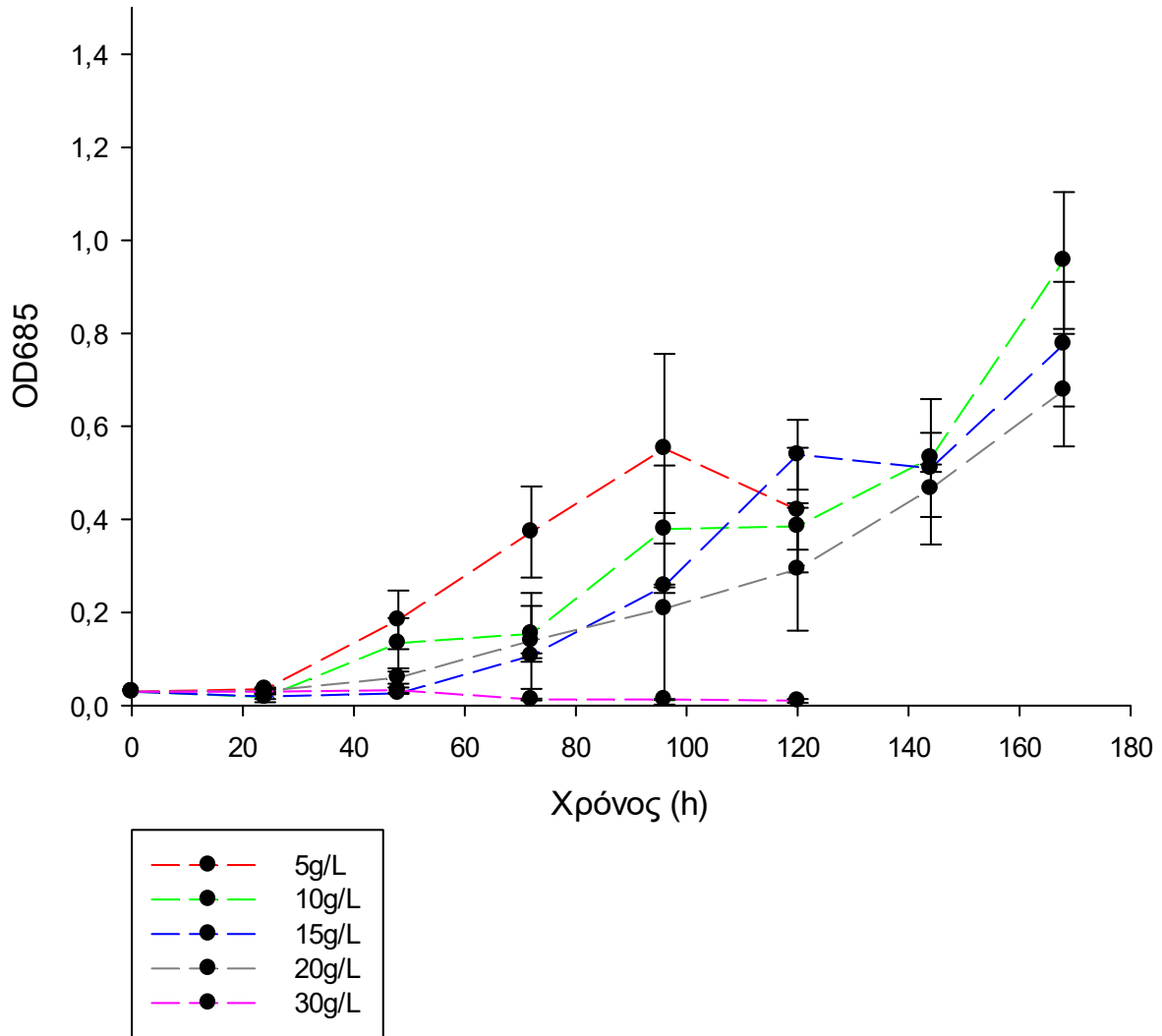
Βουτυρικό οξύ



Διάγραμμα 26: Ανάπτυξη κυττάρων καλλιέργειών με πηγή άνθρακα βουτυρικό οξύ

Στις batch καλλιέργειες με πηγή άνθρακα το βουτυρικό οξύ παρατηρείται ότι μεγαλύτερη ανάπτυξη κυττάρων του μικροφύκου εμφανίζεται στην περίπτωση που η αρχική συγκέντρωση βουτυρικού είναι 15 g/L. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του οξέος παρατηρείται μικρότερη ανάπτυξη της καλλιέργειας.

Προπιονικό οξύ

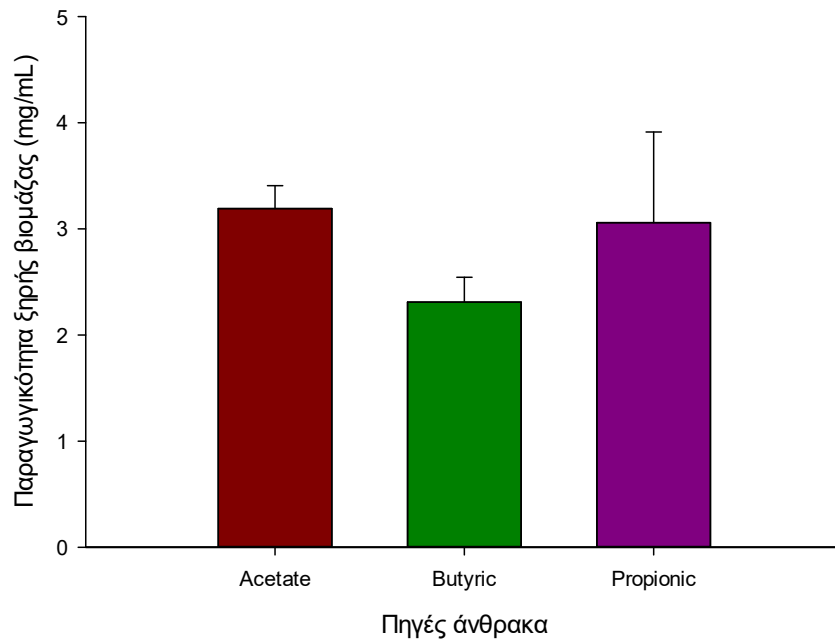


Διάγραμμα 27: Ανάπτυξη κυττάρων καλλιεργείων με πηγή άνθρακα το προπιονικό οξύ

Στην περίπτωση των καλλιεργείων με πηγή άνθρακα το προπιονικό οξύ μεγαλύτερη ανάπτυξη παρουσιάζεται στις συγκεντρώσεις με 5, 10 και 15 g/L.

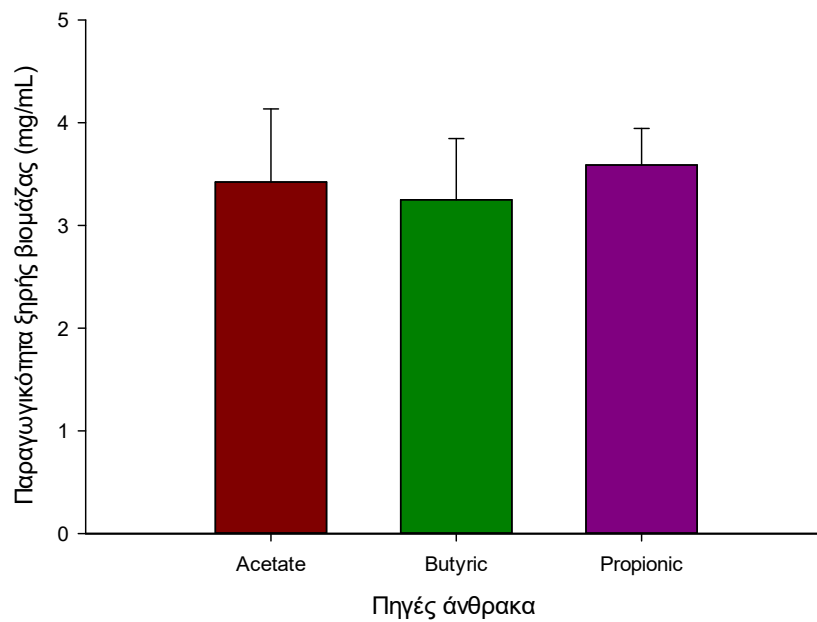
1.4.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Συγκέντρωση 5g/L



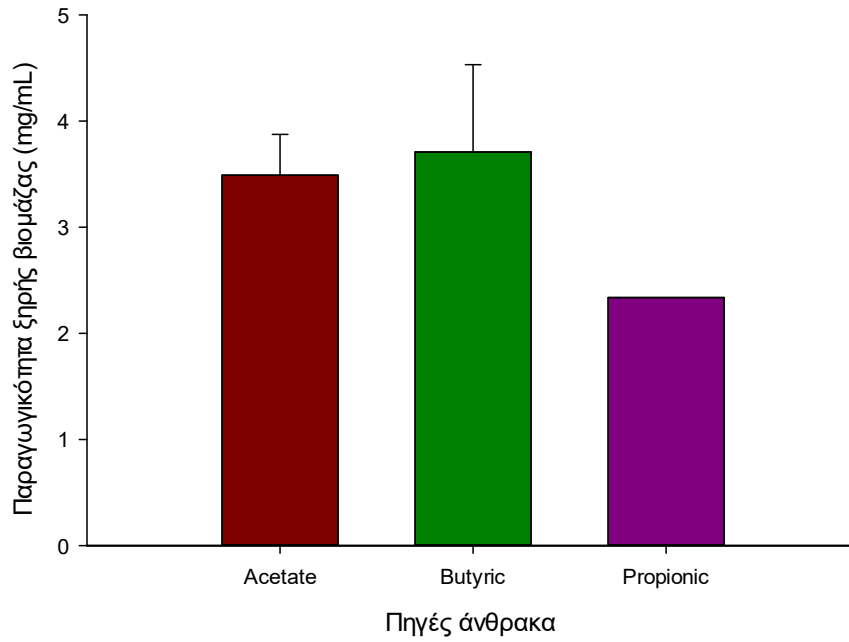
Διάγραμμα 28: Απόδοση ξηρής βιομάζας διαφορετικών πηγών άνθρακα με συγκέντρωση 5 g/L

Συγκέντρωση 10g/L



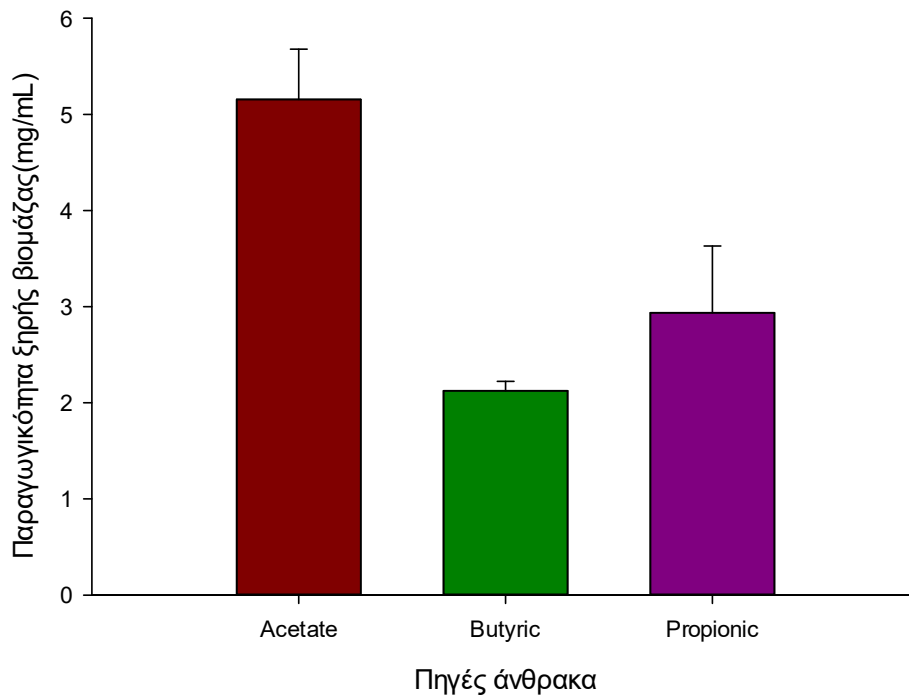
Διάγραμμα 29: Απόδοση ξηρής βιομάζας διαφορετικών πηγών άνθρακα με συγκέντρωση 10 g/L

Συγκέντρωση 15g/L



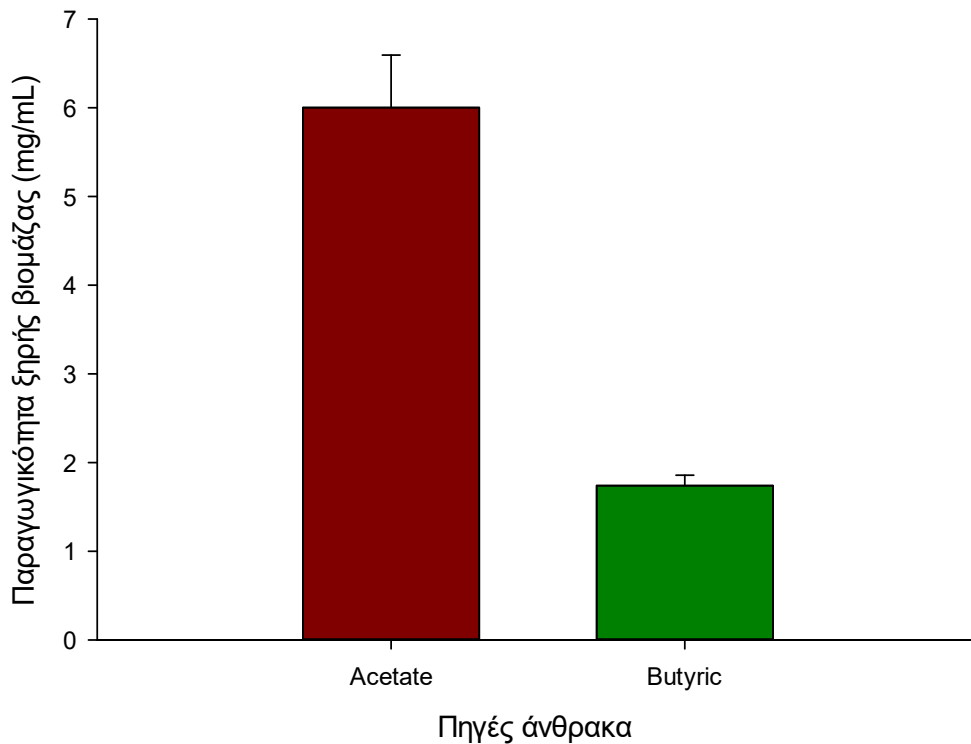
Διάγραμμα 30: Απόδοση ξηρής βιομάζας διαφορετικών πηγών άνθρακα με συγκέντρωση 15 g/L

Συγκέντρωση 20g/L



Διάγραμμα 31: Απόδοση ξηρής βιομάζας διαφορετικών πηγών άνθρακα με συγκέντρωση 20 g/L

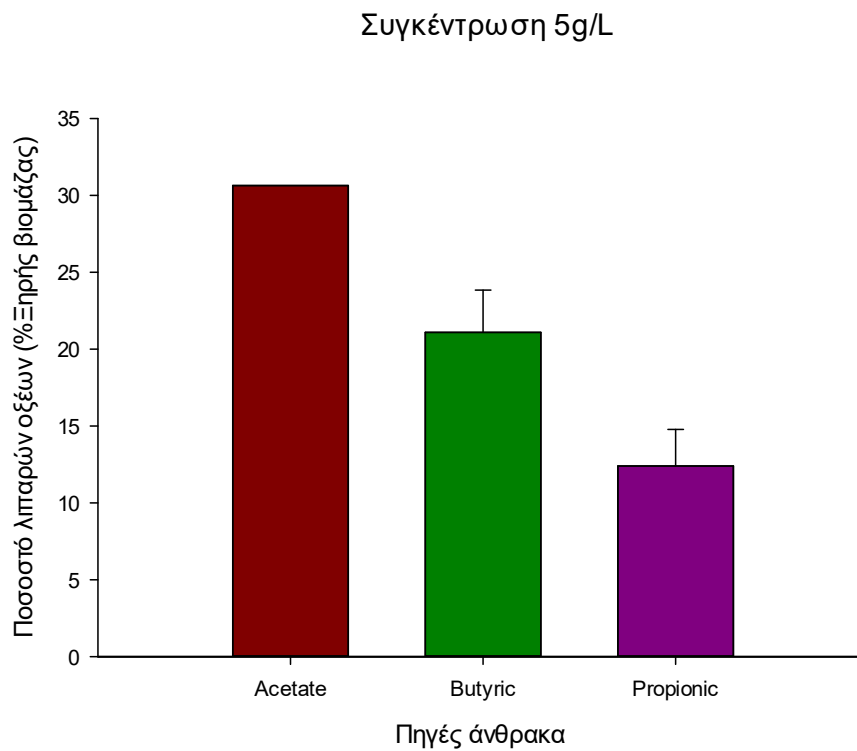
Συγκέντρωση 30g/L



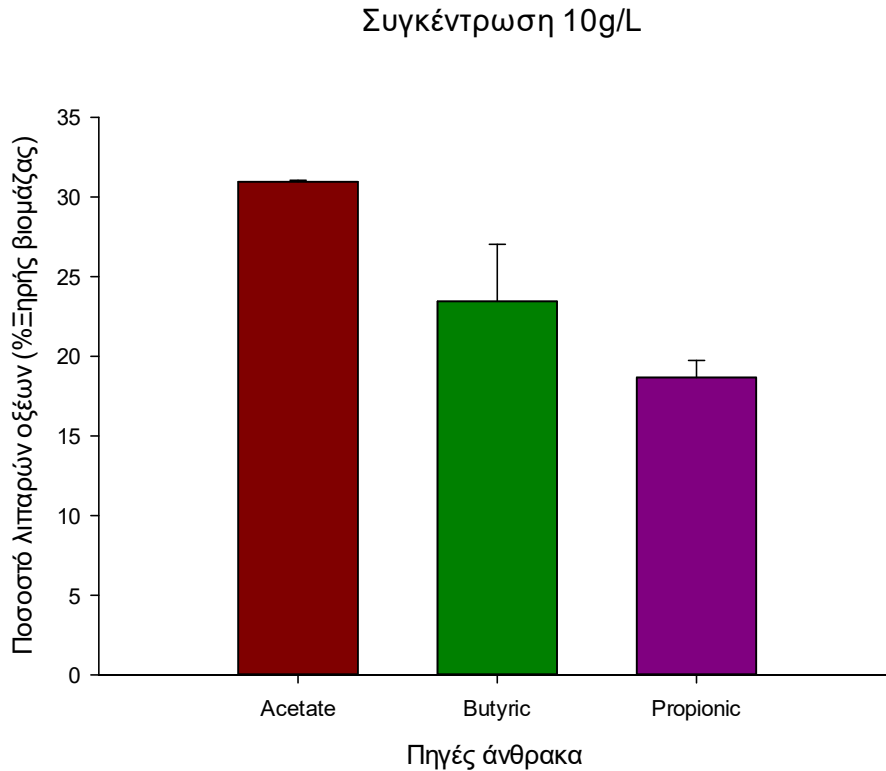
Διάγραμμα 32: Απόδοση ξηρής βιομάζας διαφορετικών πηγών άνθρακα με συγκέντρωση 30 g/L

Συγκρίνοντας την απόδοση της ξηρής βιομάζας των κυττάρων για διαφορετικές πηγές άνθρακα παρατηρείται ότι σε συγκεντρώσεις οξέων 5 και 10 g/L δεν είναι αισθητά έντονες οι διακυμάνσεις των τιμών. Αντίθετα, με την αύξηση της συγκέντρωσης στα 15 και 20 g/L ελαττώνεται η απόδοση βιομάζας των καλλιεργειών προπιονικού οξέος και αυξάνεται του οξικού. Τέλος, σε συγκέντρωση 30 g/L είναι εμφανής η απουσία βιομάζας για το προπιονικό οξύ, η μείωση της απόδοσης βιομάζας για το βουτυρικό οξύ και η αύξηση της απόδοσης του οξικού.

1.4.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

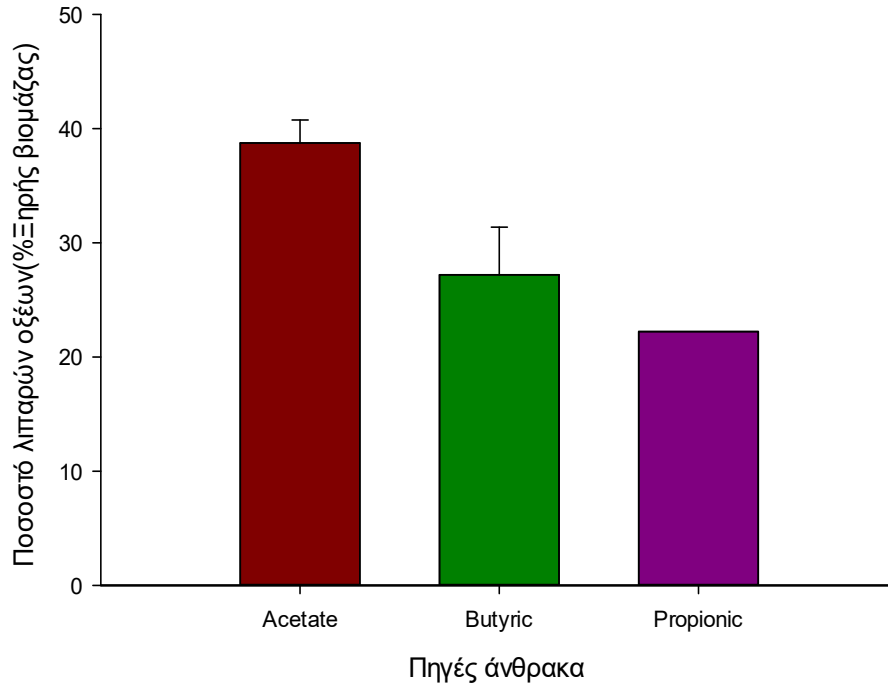


Διάγραμμα 33: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας για διαφορετικές πηγές άνθρακα με συγκέντρωση 5 g/L



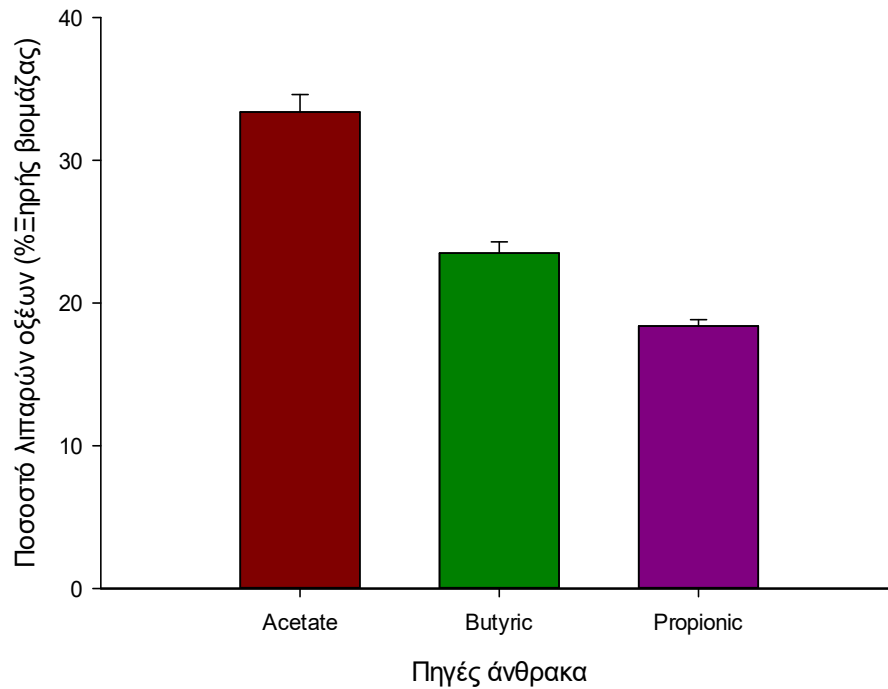
Διάγραμμα 34: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας για διαφορετικές πηγές άνθρακα με συγκέντρωση 10 g/L

Συγκέντρωση 15g/L



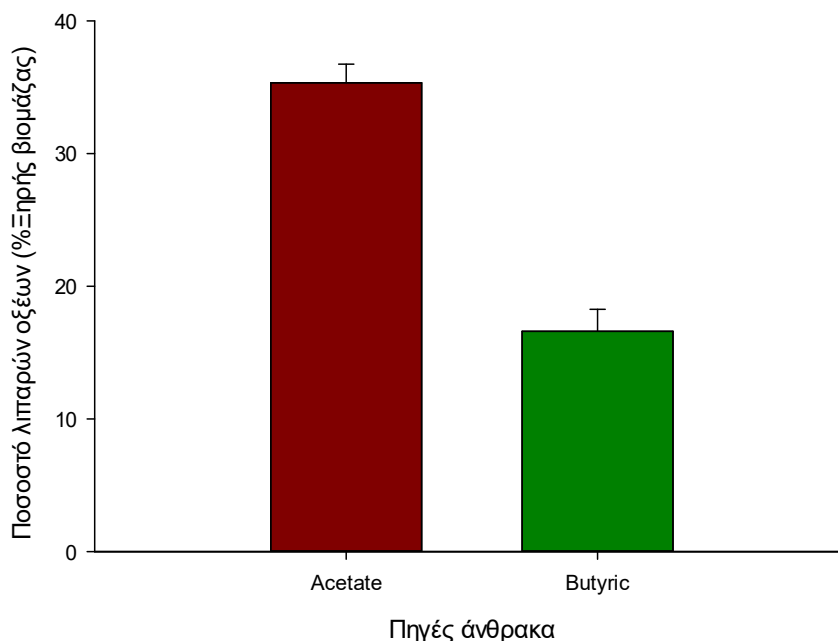
Διάγραμμα 35: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας για διαφορετικές πηγές άνθρακα με συγκέντρωση 15 g/L

Συγκέντρωση 20g/L



Διάγραμμα 36: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας για διαφορετικές πηγές άνθρακα με συγκέντρωση 20 g/L

Συγκέντρωση 30g/L



Διάγραμμα 37: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας για διαφορετικές πηγές άνθρακα με συγκέντρωση 30 g/L

Συγκρίνοντας τα ποσοστά των παραγόμενων λιπαρών οξέων για διαφορετικές πηγές άνθρακα, παρατηρείται μια κοινή τάση του ποσοστού σε κάθε συγκέντρωση που μελετάται. Συγκεκριμένα, το ποσοστό που αντιστοιχεί στις καλλιέργειες του οξικού είναι μεγαλύτερο, ενώ το μικρότερο ποσοστό εμφανίζεται στις καλλιέργειες του προπιονικού.

1.4.4 DHA

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα ποσοστά του DHA ως προς των ολικών λιπαρών οξέων για διαφορετικές συγκεντρώσεις του οξικού νατρίου, του βουτυρικού και του προπιονικού οξέος.

Πίνακας 4: Ποσοστό DHA για τις batch καλλιέργειες οξικού, βουτυρικού και προπιονικού οξέος

Συγκέντρωση (g/L)	Οξικό νάτριο		Βουτυρικό οξύ		Προπιονικό οξύ	
	DHA (%TFA)	std	DHA (%TFA)	std	DHA (%TFA)	std
5	10.98	0.91	19.06	1.85	29.10	3.05
10	23.94	3.90	21.86	1.79	38.57	1.12
15	23.79	3.74	20.81	1.96	37.04	2.94
20	20.71	2.57	18.31	1.43	37.19	4.23
30	28.44	3.15	4.39	1.10	-	-

Μεγαλύτερο ποσοστό DHA παρατηρείται στις καλλιέργειες του προπιονικού οξέος για τις συγκεντρώσεις 5, 10, 15 και 20 g/L σε σύγκριση με τις άλλες δύο πηγές άνθρακα.

Η συγκέντρωση του DHA που παράχθηκε στην εκάστοτε καλλιέργεια μπορεί να υπολογιστεί με τον παρακάτω τύπο:

$$DHA(mg/mL) = \text{Παραγωγικότητα βιομάζας} \left(\frac{mg}{mL} \right) \cdot \% \text{ ολικών λιπαρών} \cdot \% DHA$$

Πίνακας 5: Συγκέντρωση παραγόμενου DHA (mg/mL) στις καλλιέργειες με διαφορετική πηγή άνθρακα

Συγκέντρωση(g/L)	DHA (mg/mL)		
	Οξικό νάτριο	Βουτυρικό οξύ	Προπιονικό οξύ
5	0.11	0.09	0.11
10	0.25	0.17	0.26
15	0.32	0.21	0.19
20	0.36	0.09	0.20
30	0.60	0.01	-

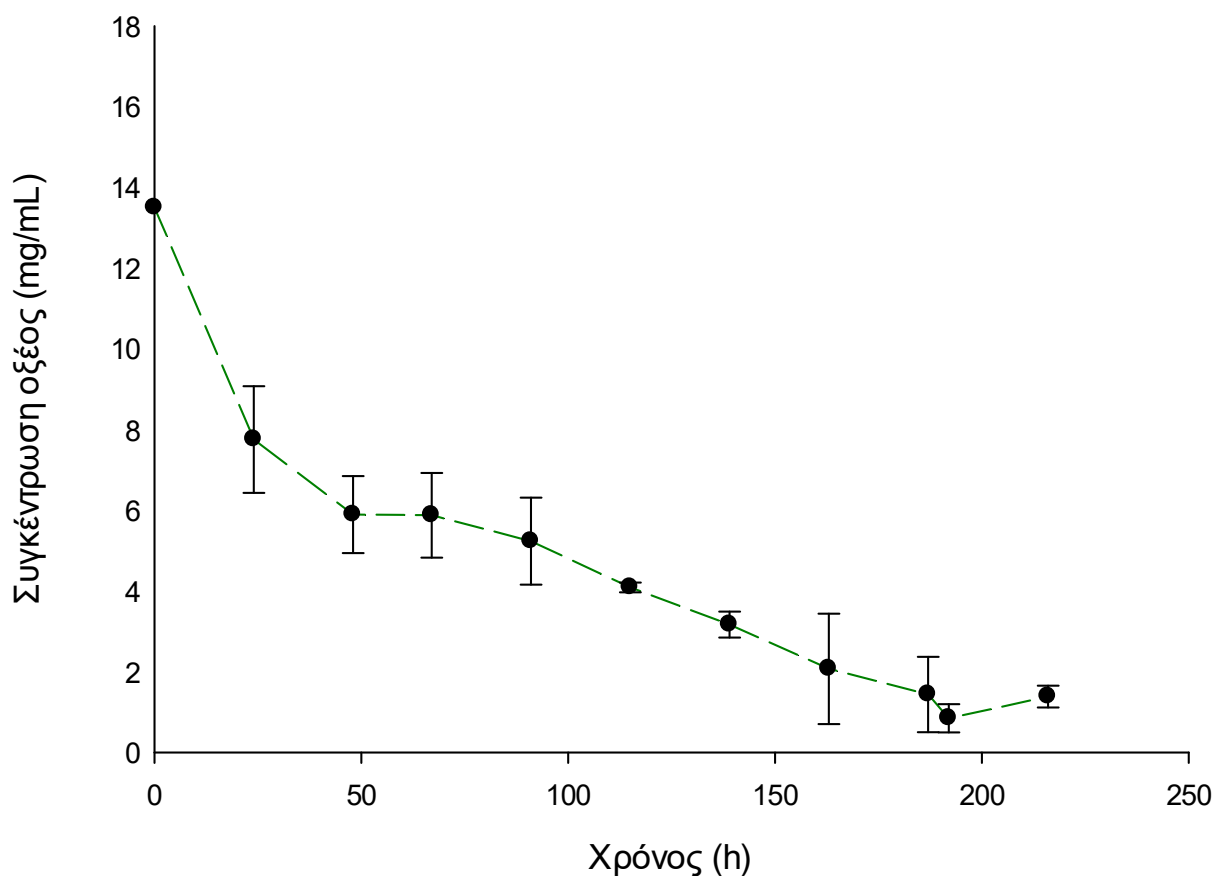
2. ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ

2.1 ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ

2.1.1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΟΞΕΟΣ

Σε κάθε δείγμα που λαμβάνεται κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα πραγματοποιείται ανάλυση με υγρή χρωματογραφία για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των οξέων που αποτελούν την τροφοδοσία του βιοαντιδραστήρα και πηγή άνθρακα για το μικροφύκος.

Βιοαντιδραστήρας οξικού οξέος



Διάγραμμα 38: Μεταβολή συγκέντρωσης οξικού οξέος στο βιοαντιδραστήρα

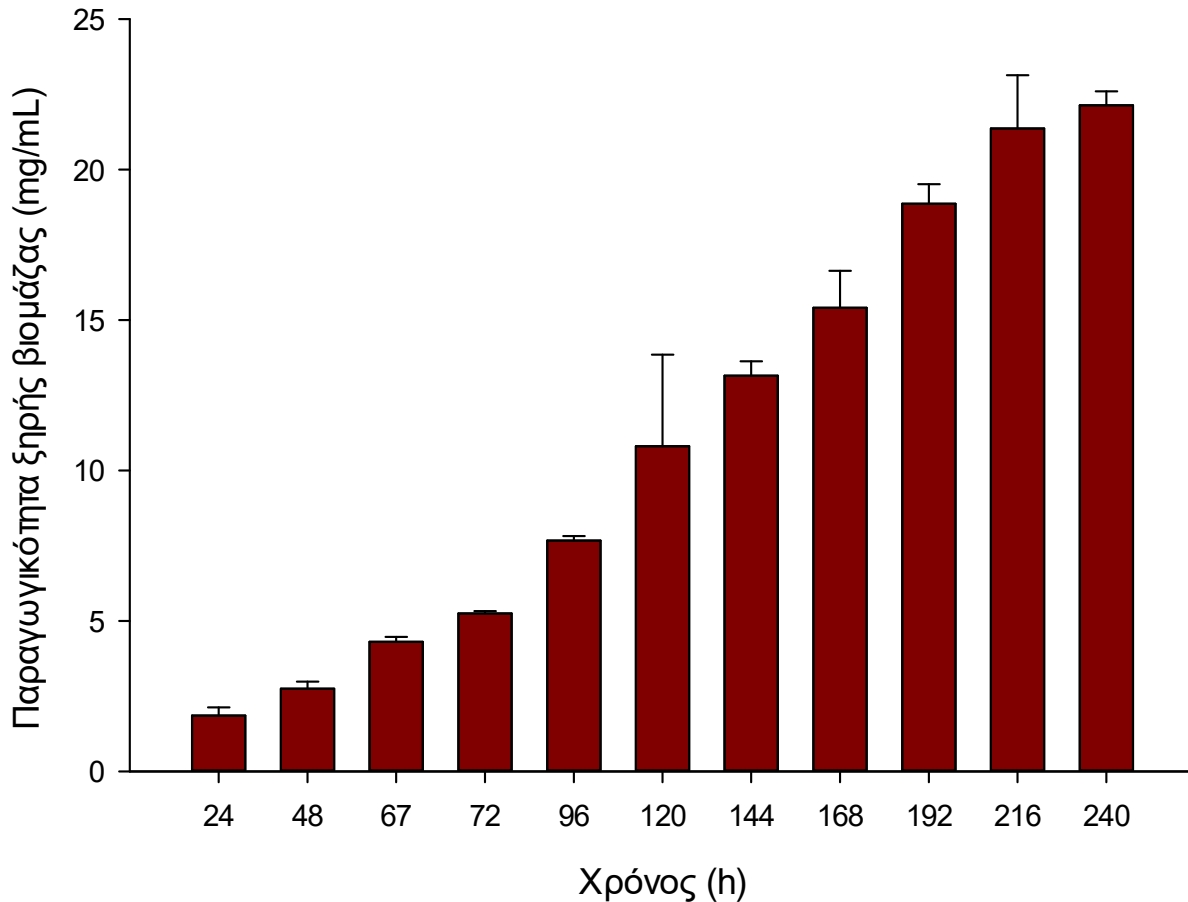
Το μόνο οξύ στην συγκεκριμένη περίπτωση βιοαντιδραστήρα είναι το οξικό οξύ που έχει χρόνο έκλουσης στην υγρή χρωματογραφία τα 14,6 min. Η αρχική συγκέντρωση του οξικού στην αρχή της λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα, που είναι η στιγμή αμέσως μετά τον εμβολιασμό, είναι 13,5g/L και προέρχεται από το οξικό νάτριο στο θρεπτικό υλικό. Με την πάροδο του χρόνου λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα είναι εμφανής η ελάττωση της συγκέντρωσης του οξικού.

2.1.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Για κάθε δείγμα βιοαντιδραστήρα του μικροφύκου με πηγή άνθρακα το οξικό οξύ ζυγίζεται η λυοφιλωμένη συνολική ξηρή βιομάζα των κυττάρων και προσδιορίζεται ο όγκος του δείγματος. Η απόδοση σε ξηρή βιομάζα ανά μονάδα όγκου για κάθε δείγμα που λαμβάνεται σε διαφορετική χρονική στιγμή λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Απόδοση βιομάζας (mg/mL)} = \frac{\text{Συνολική ξηρή βιομάζα (mg)}}{\text{Όγκος δείγματος (mL)}}$$

Βιοαντιδραστήρας οξικού οξέος



Διάγραμμα 39: Απόδοση ξηρής βιομάζας κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα οξικού οξέος

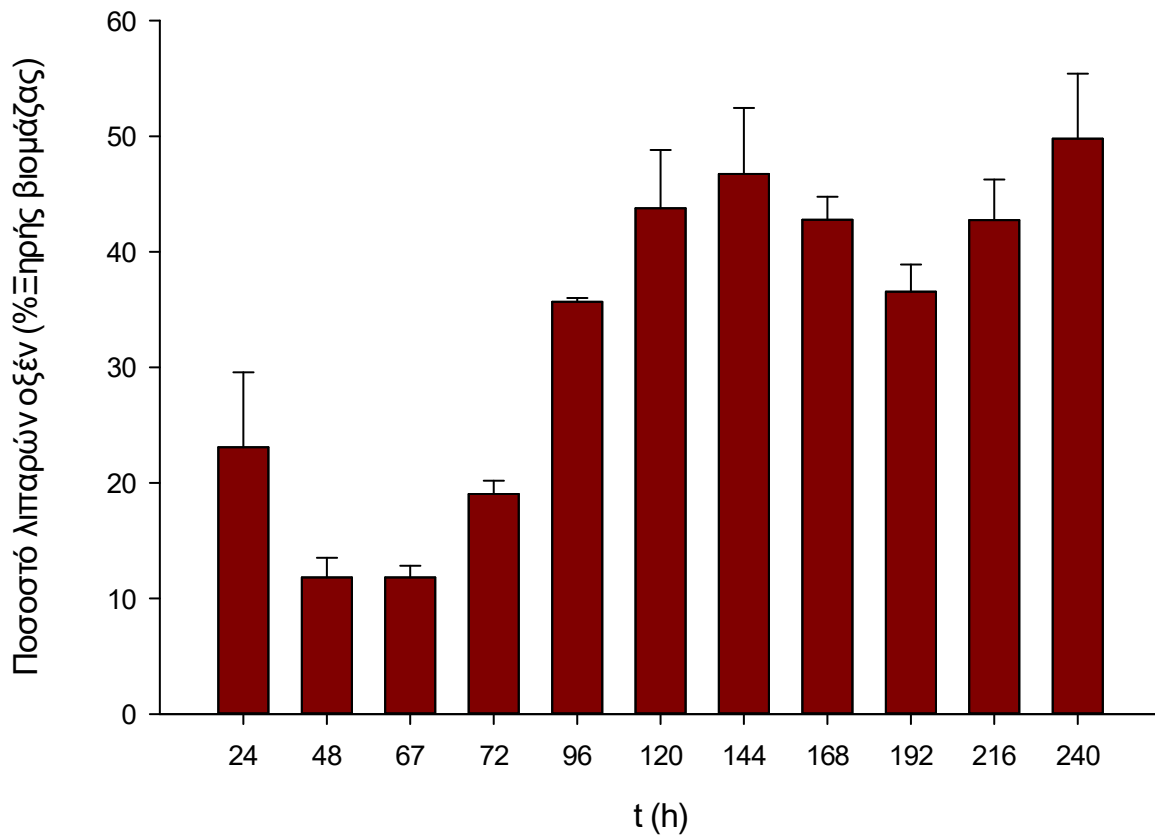
Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανής μια ανοδική τάση της τιμής της απόδοσης ξηρής βιομάζας των κυττάρων του μικροφύκου με την πάροδο των ωρών λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα.

2.1.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Για κάθε δείγμα βιοαντιδραστήρα του *Cryptocodinium cohnii* ζυγίζονται η χρησιμοποιούμενη στην εκχύλιση ξηρή βιομάζα κυττάρων και τα λιπαρά οξέα μετά την εξάτμιση του διαλύτη. Το ποσοστό των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας} = \frac{\text{λιπαρά οξέα (mg)}}{\text{Ξηρή βιομάζα (mg)}} \cdot 100\%$$

Βιοαντιδραστήρας οξικού οξέος



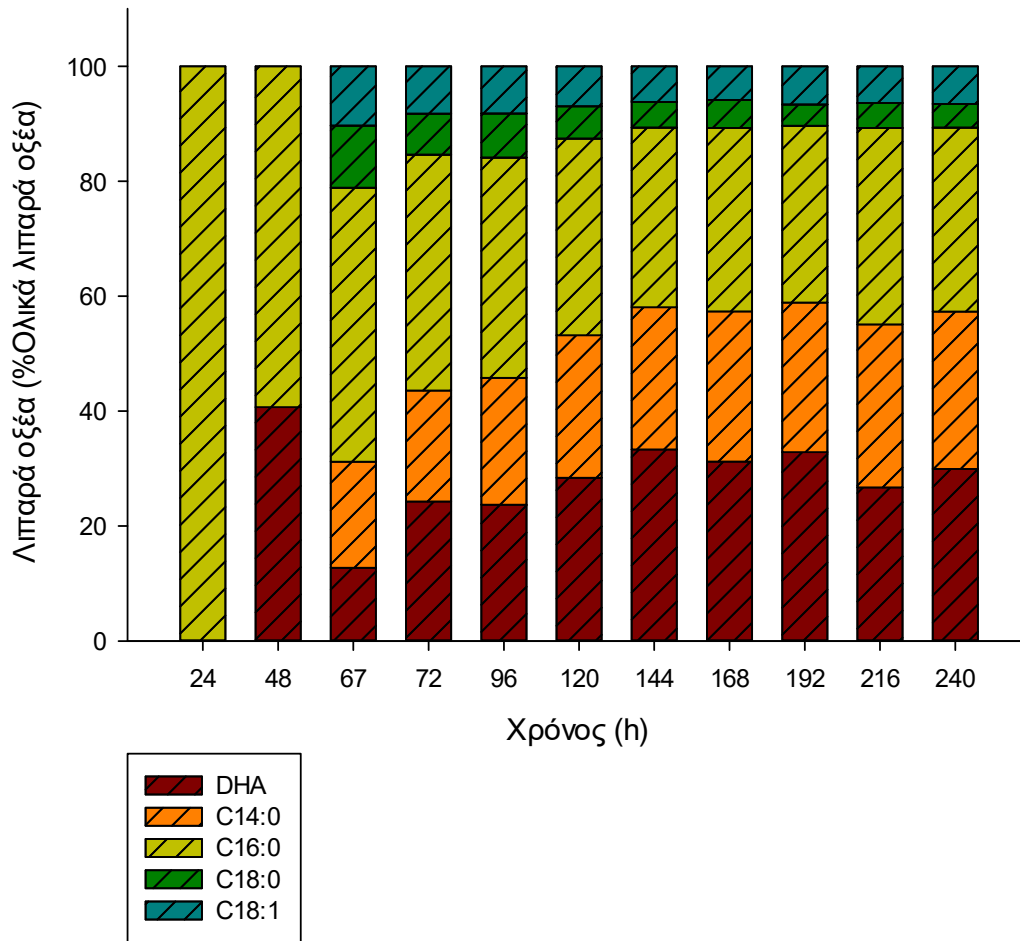
Διάγραμμα 40: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα οξικού οξέος

Σε μεγαλύτερη διάρκεια λειτουργίας του αντιδραστήρα παρατηρείται υψηλότερο ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας. Η τιμή στις 24 h λειτουργίας είναι εσφαλμένη, όπως αποδεικνύεται και από τη μεγάλη τυπική απόκλιση που εμφανίζει, καθώς ήταν μικρή η ποσότητα της βιομάζας που εξετάστηκε.

2.1.4 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC

Τα δείγματα οξικού οξέος, των οποίων τα λιπαρά έχουν εστεροποιηθεί, αναλύονται σε αέριο χρωματογράφο. Το προφίλ των λιπαρών οξέων σε κάθε δείγμα υπολογίζεται σε ποσοστό του συνόλου των λιπαρών οξέων. Για τα δείγματα του βιοαντιδραστήρα οξικού οξέος κατασκευάζεται το παρακάτω διάγραμμα:

Βιοαντιδραστήρας οξικού οξέος



Διάγραμμα 41: Προφίλ λιπαρών οξέων κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα οξικού οξέος

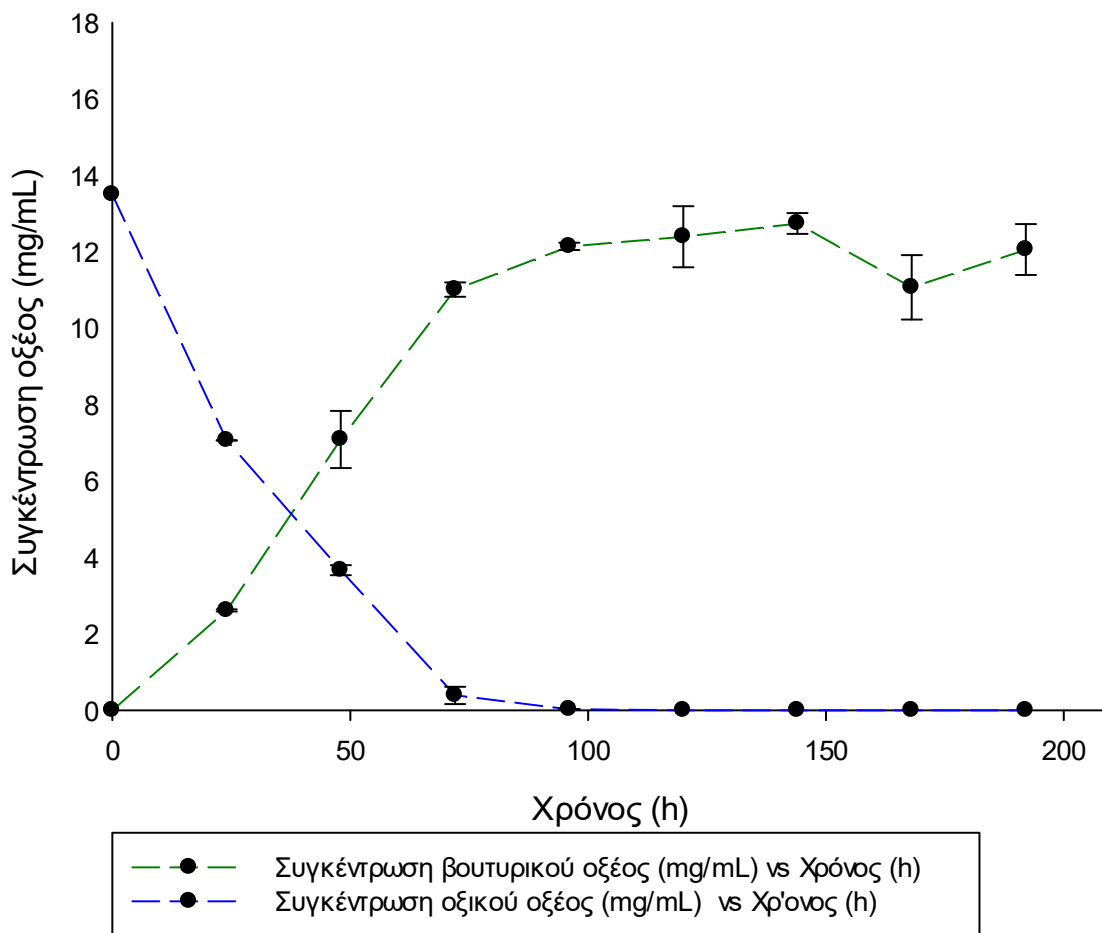
Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι το ποσοστό του DHA αυξάνεται μέχρι τις 144 h λειτουργίας και έπειτα επέρχεται μικρή μείωση της τιμής του. Το ποσοστό DHA στις 48 h είναι πιθανότητα εσφαλμένο, καθώς είναι πολύ μεγάλη η τιμή του σε πολύ αρχικό χρόνο λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα. Επίσης, εσφαλμένο είναι και το προφίλ λιπαρών που αντιστοιχεί στις 24 h.

2.2 ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ

2.2.1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΟΞΕΟΣ

Σε κάθε δείγμα που λαμβάνεται κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα πραγματοποιείται ανάλυση με υγρή χρωματογραφία για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των οξέων που αποτελούν την τροφοδοσία του βιοαντιδραστήρα.

Βιοαντιδραστήρας βουτυρικού οξέος



Διάγραμμα 42: Μεταβολή συγκέντρωσης οξέων κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα βουτυρικού οξέος

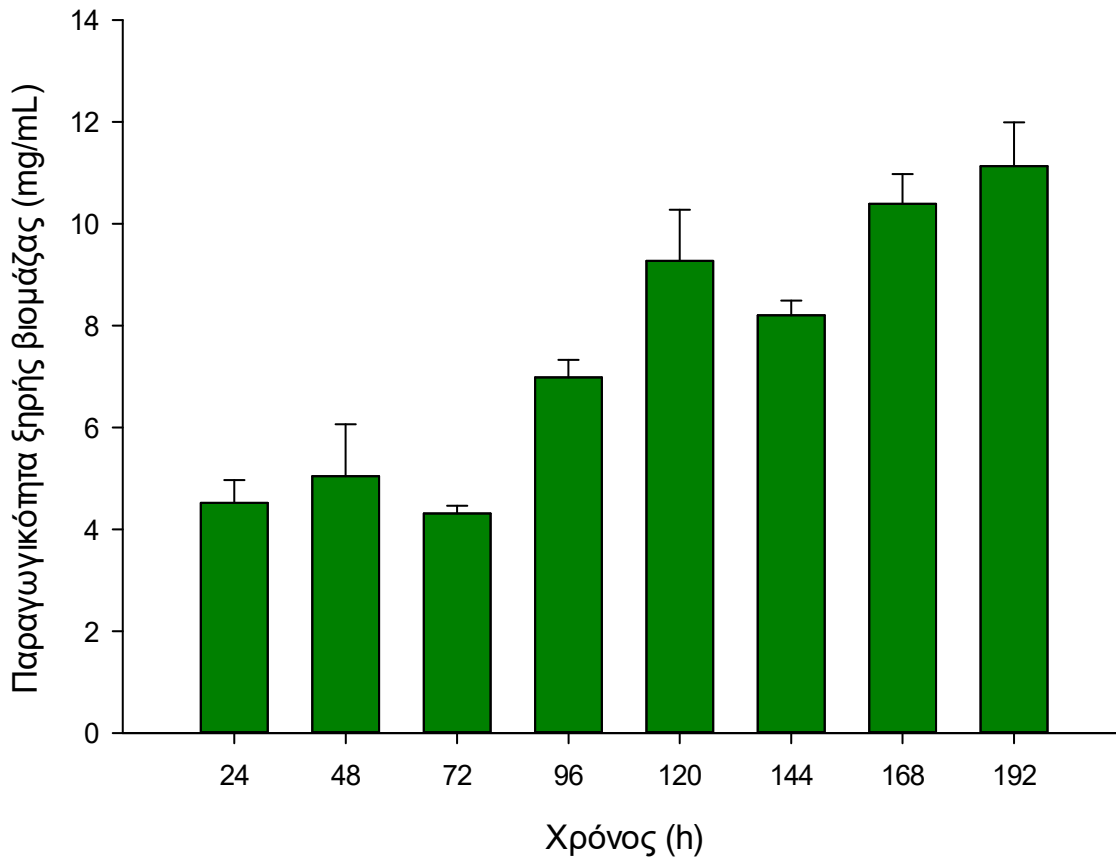
Στον βιοαντιδραστήρα με τροφοδοσία βουτυρικό οξύ εμφανίζονται κορυφές δύο διαφορετικών οξέων στο χρωματογράφημα, του οξικού στα 14,6 min και του βουτυρικού στα 20,5 min. Το οξικό οξύ που ανιχνεύεται στο χρωματογράφημα προέρχεται από το οξικό νάτριο που έχει προστεθεί στο θρεπτικό υλικό, ενώ το βουτυρικό από την τροφοδοσία. Από το διάγραμμα παρατηρείται ότι το οξικό οξύ ελαττώνεται μέχρι μηδενισμού της συγκέντρωσής του. Αντίθετα, η τιμή του βουτυρικού οξέος αυξάνεται αρχικά και έπειτα σταθεροποιείται με τον ταυτόχρονο μηδενισμό της συγκέντρωσης του οξικού.

2.2.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Η απόδοση σε ξηρή βιομάζα ανά μονάδα όγκου για κάθε δείγμα που λαμβάνεται σε διαφορετική χρονική στιγμή λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Απόδοση βιομάζας (mg/mL)} = \frac{\text{Συνολική ξηρή βιομάζα (mg)}}{\text{Όγκος δείγματος (mL)}}$$

Βιοαντιδραστήρας βουτυρικού οξέος



Διάγραμμα 43: Απόδοση ξηρής βιομάζας κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα βουτυρικού οξέος

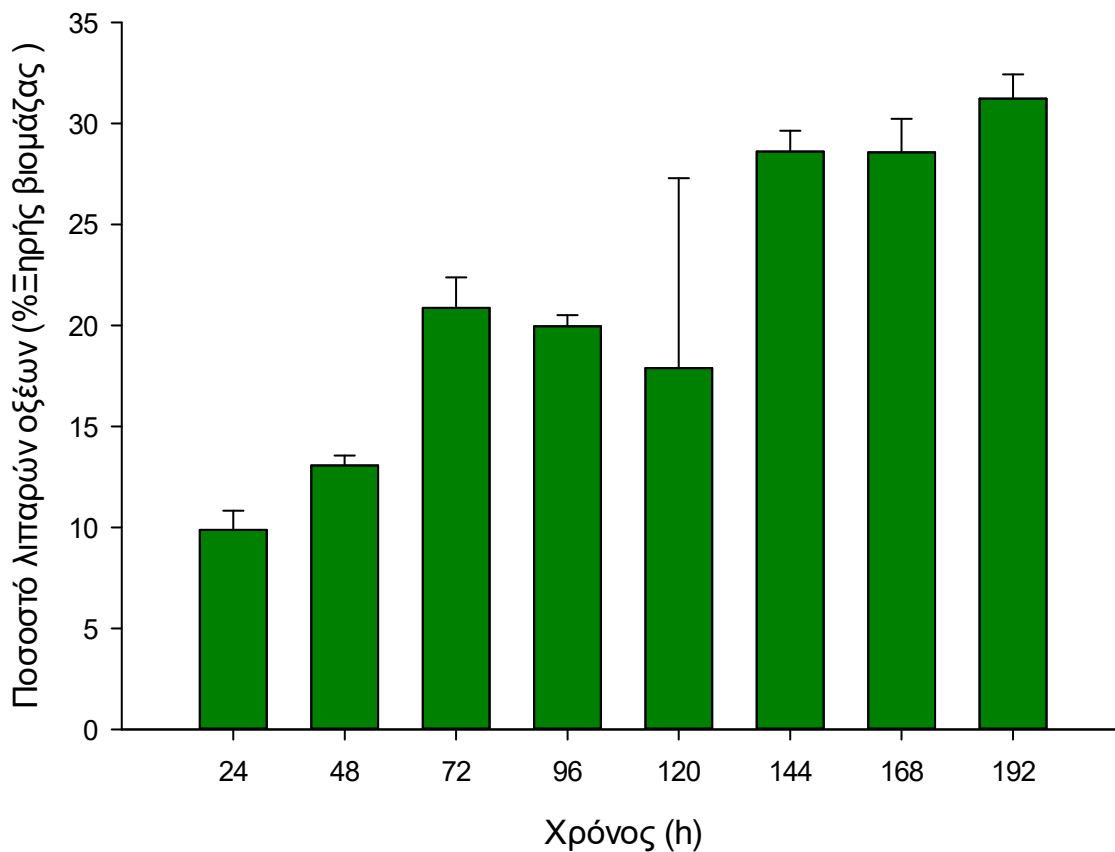
Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι αυξάνεται η απόδοση της ξηρής βιομάζας των κυττάρων με την αύξηση των ωρών λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα με τροφοδοσία βουτυρικού οξέος.

2.2.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Για κάθε δείγμα βιοαντιδραστήρα ζυγίζονται η χρησιμοποιούμενη στην εκχύλιση ξηρή βιομάζα κυττάρων και τα λιπαρά οξέα μετά την εξάτμιση του διαλύτη. Το ποσοστό των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας} = \frac{\text{λιπαρά οξέα (mg)}}{\text{Ξηρή βιομάζα (mg)}} \cdot 100\%$$

Βιοαντιδραστήρας βουτυρικού οξέος



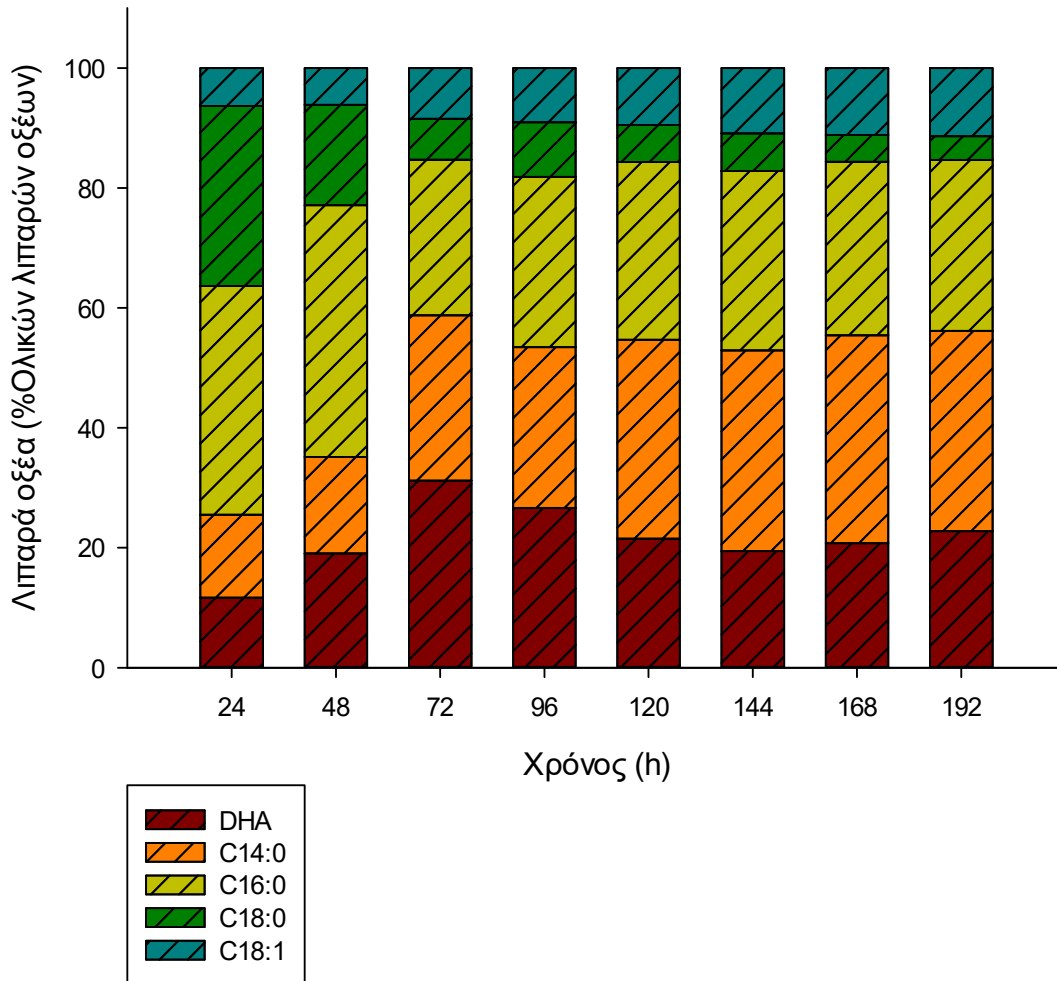
Διάγραμμα 44: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα βουτυρικού οξέος

Σε μεγαλύτερη διάρκεια λειτουργίας του αντιδραστήρα παρατηρείται υψηλότερο ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας.

2.2.4 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC

Τα δείγματα βουτυρικού οξέος, των οποίων τα λιπαρά έχουν εστεροποιηθεί, αναλύονται σε αέριο χρωματογράφο. Το προφίλ των λιπαρών οξέων σε κάθε δείγμα υπολογίζεται σε ποσοστό του συνόλου των λιπαρών οξέων. Για τα δείγματα του βιοαντιδραστήρα βουτυρικού οξέος κατασκευάζεται το παρακάτω διάγραμμα:

Βιοαντιδραστήρας βουτυρικού οξέος



Διάγραμμα 45: Προφίλ λιπαρών οξέων κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα βουτυρικού οξέος

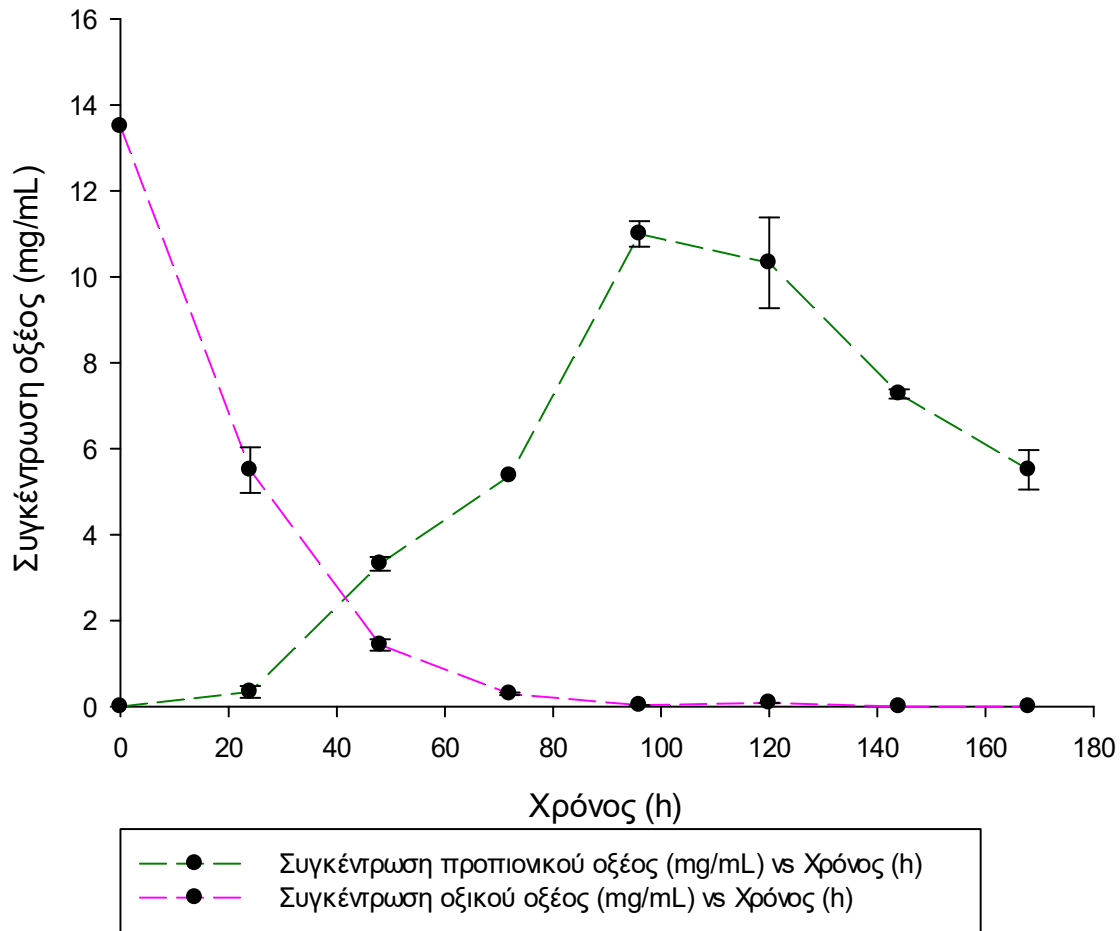
Με βάση το διάγραμμα του προφίλ των λιπαρών οξέων παρατηρείται μια αύξηση του ποσοστού DHA επί των ολικών λιπαρών μέχρι τις 72 h. Έπειτα, το ποσοστό DHA εμφανίζει μια μικρή μείωση και σταθεροποιείται στο τέλος.

2.3 ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟ ΟΞΥ

2.3.1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΟΞΕΟΣ

Σε κάθε δείγμα που λαμβάνεται κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα πραγματοποιείται ανάλυση με υγρή χρωματογραφία.

Βιοαντιδραστήρας προπιονικού οξέος



Διάγραμμα 46: Μεταβολή συγέντρωσης οξέων κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα προπιονικού οξέος

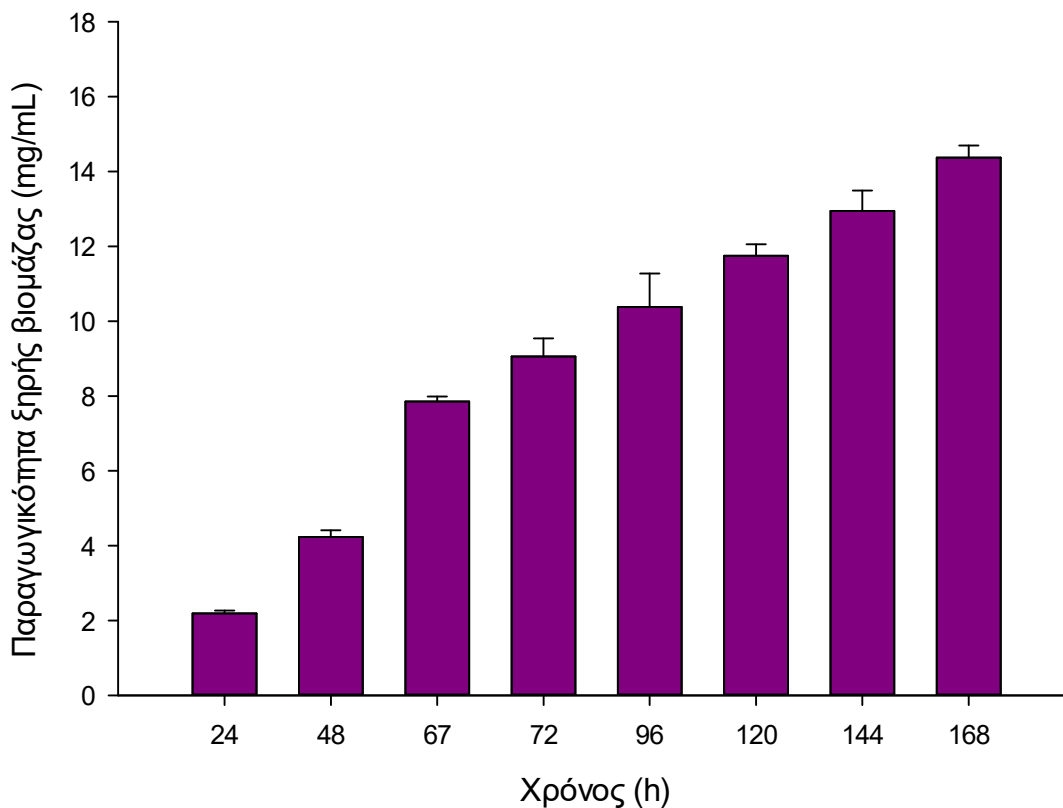
Στον βιοαντιδραστήρα με τροφοδοσία προπιονικό οξύ εμφανίζονται κορυφές δύο διαφορετικών οξέων στο χρωματογράφημα, του οξικού στα 14,6 min και του προπιονικού στα 17 min. Το οξικό οξύ που ανιχνεύεται στο χρωματογράφημα προέρχεται από το οξικό νάτριο που έχει προστεθεί στο θρεπτικό υλικό ενώ το προπιονικό από την τροφοδοσία. Από το διάγραμμα παρατηρείται ότι το οξικό οξύ ελαττώνεται μέχρι μηδενισμού της συγέντρωσής του και η τιμή του προπιονικού αυξάνεται αρχικά και έπειτα ελαττώνεται.

2.3.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Η απόδοση σε ξηρή βιομάζα ανά μονάδα όγκου για κάθε δείγμα που λαμβάνεται σε διαφορετική χρονική από τον βιοαντιδραστήρα προπιονικού οξέος υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Απόδοση βιομάζας (mg/mL)} = \frac{\text{Συνολική ξηρή βιομάζα (mg)}}{\text{Όγκος δείγματος (mL)}}$$

Βιοαντιδραστήρας προπιονικού οξέος



Διάγραμμα 47: Απόδοση ξηρης βιομάζας κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα προπιονικού οξέος

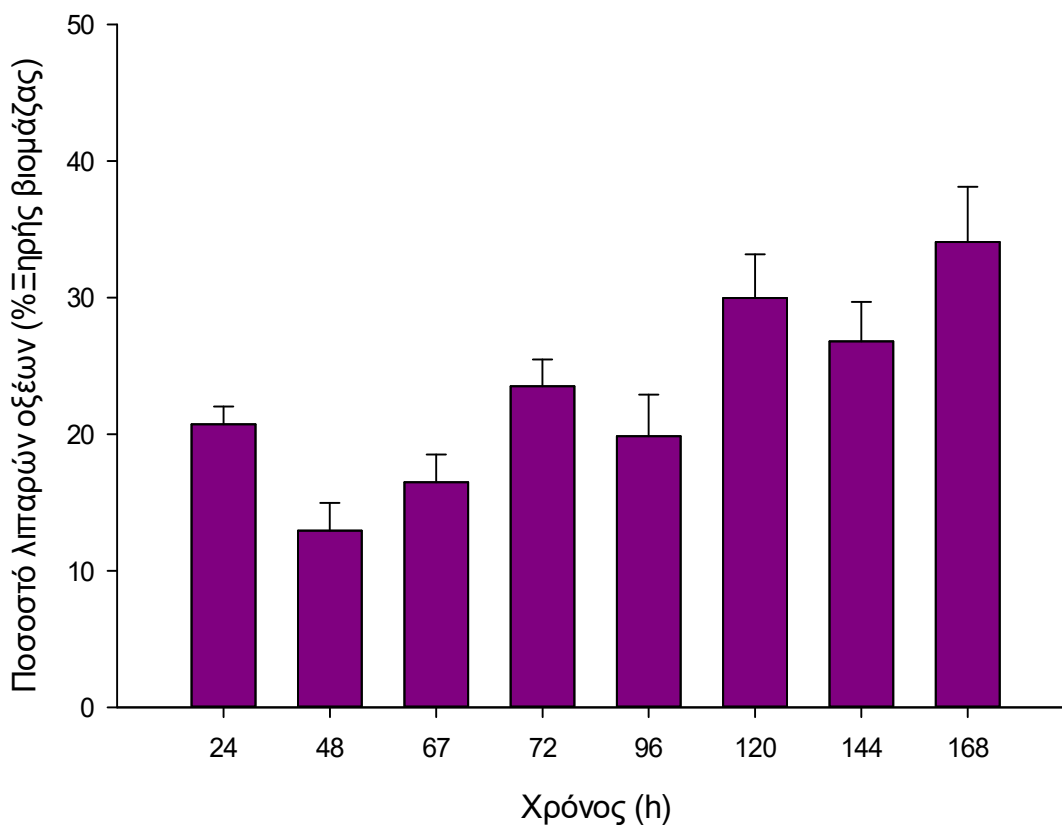
Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανής μια ανοδική τάση της τιμής της απόδοσης ξηρής βιομάζας των κυττάρων του μικροφύκου με την πάροδο των ωρών λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα.

2.3.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Για κάθε δείγμα βιοαντιδραστήρα προπιονικού οξέος, το ποσοστό των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας} = \frac{\text{λιπαρά οξέα (mg)}}{\text{Ξηρή βιομάζα (mg)}} \cdot 100\%$$

Βιοαντιδραστήρας προπιονικού οξέος



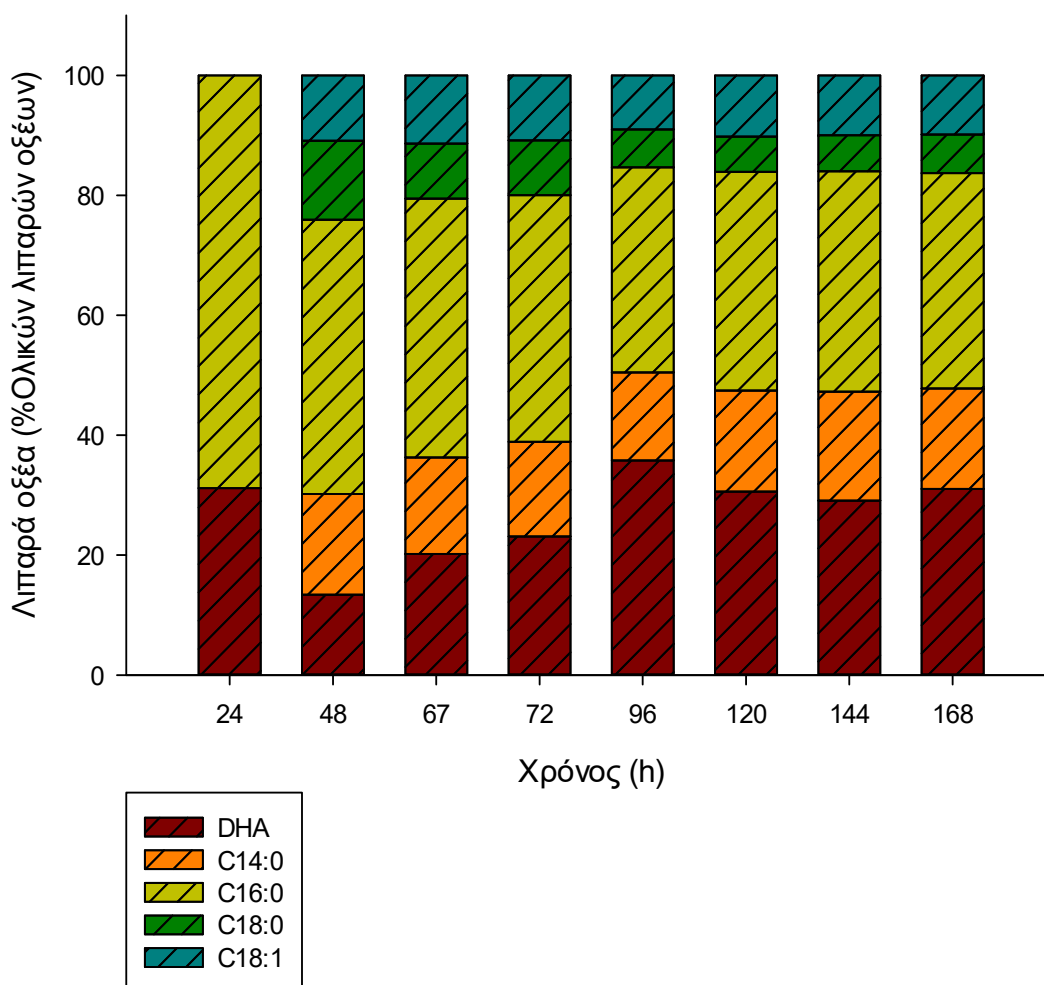
Διάγραμμα 48: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα προπιονικού οξέος

Σε μεγαλύτερη διάρκεια λειτουργίας του αντιδραστήρα παρατηρείται υψηλότερο ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας, χωρίς όμως αυτή η ανοδική πορεία των λιπαρών να είναι σταθερή.

2.3.4 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC

Τα δείγματα προπιονικού οξέος, των οποίων τα λιπαρά έχουν εστεροποιηθεί, αναλύονται σε αέριο χρωματογράφο. Για τα δείγματα του βιοαντιδραστήρα του προπιονικού οξέος κατασκευάζεται το παρακάτω διάγραμμα:

Βιοαντιδραστήρας προπιονικού οξέος



Διάγραμμα 49: Προφίλ λιπαρών οξέων κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα προπιονικού οξέος

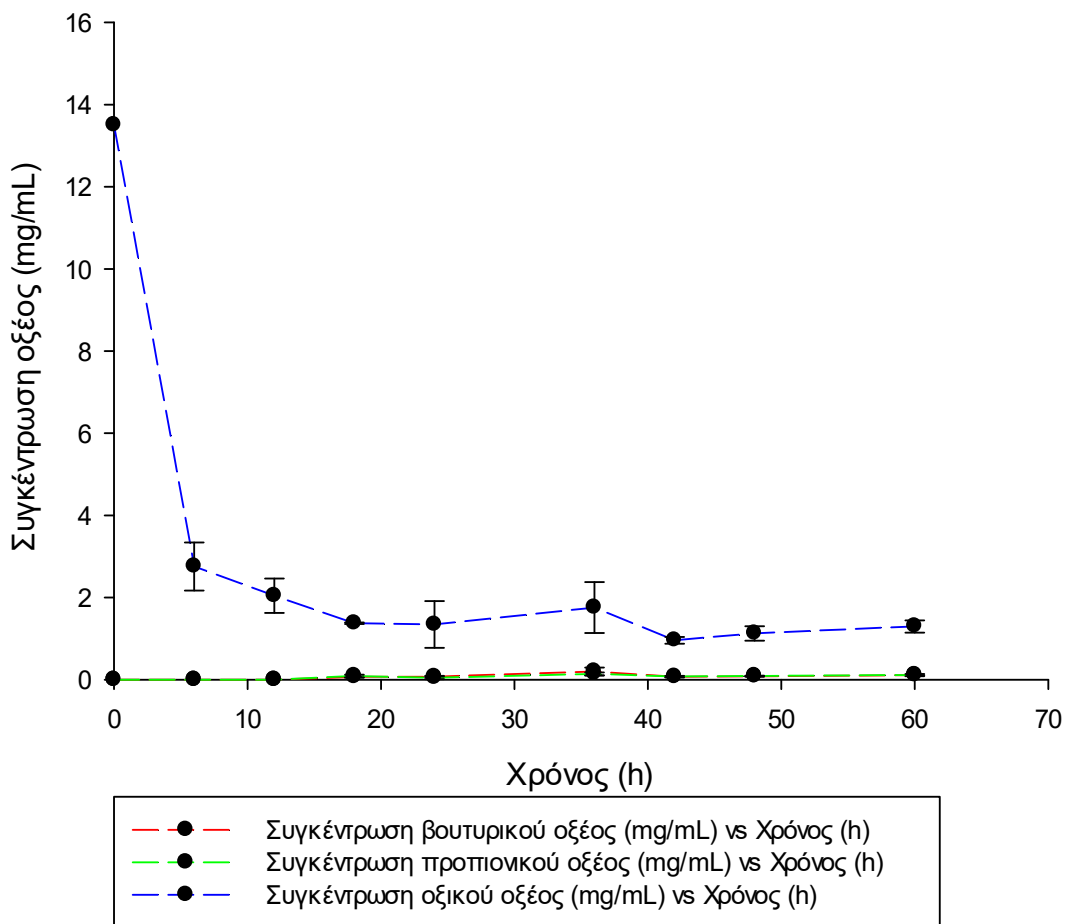
Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι το ποσοστό του DHA αυξάνεται μέχρι τις 96 h λειτουργίας και έπειτα επέρχεται μικρή μείωση της τιμής του. Το ποσοστό DHA στις 24 h είναι πιθανότητα εσφαλμένο, καθώς είναι πολύ μεγάλη η τιμή του σε πολύ αρχικό χρόνο λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα.

2.4 ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΟΞΕΩΝ

2.4.1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΟΞΕΟΣ

Σε κάθε δείγμα που λαμβάνεται κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα πραγματοποιείται ανάλυση με υγρή χρωματογραφία για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των οξέων που αποτελούν την τροφοδοσία του βιοαντιδραστήρα. Τα οξέα που αποτελούν το διάλυμα τροφοδοσίας είναι το οξικό, το προπιονικό, το βουτυρικό, το βαλερικό και το καπροϊκό οξύ.

Βιοαντιδραστήρας συνθετικού διαλύματος οξέων



Διάγραμμα 50: Μεταβολή της συγκέντρωσης οξέων κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρων συνθετικού διαλύματος οξέων

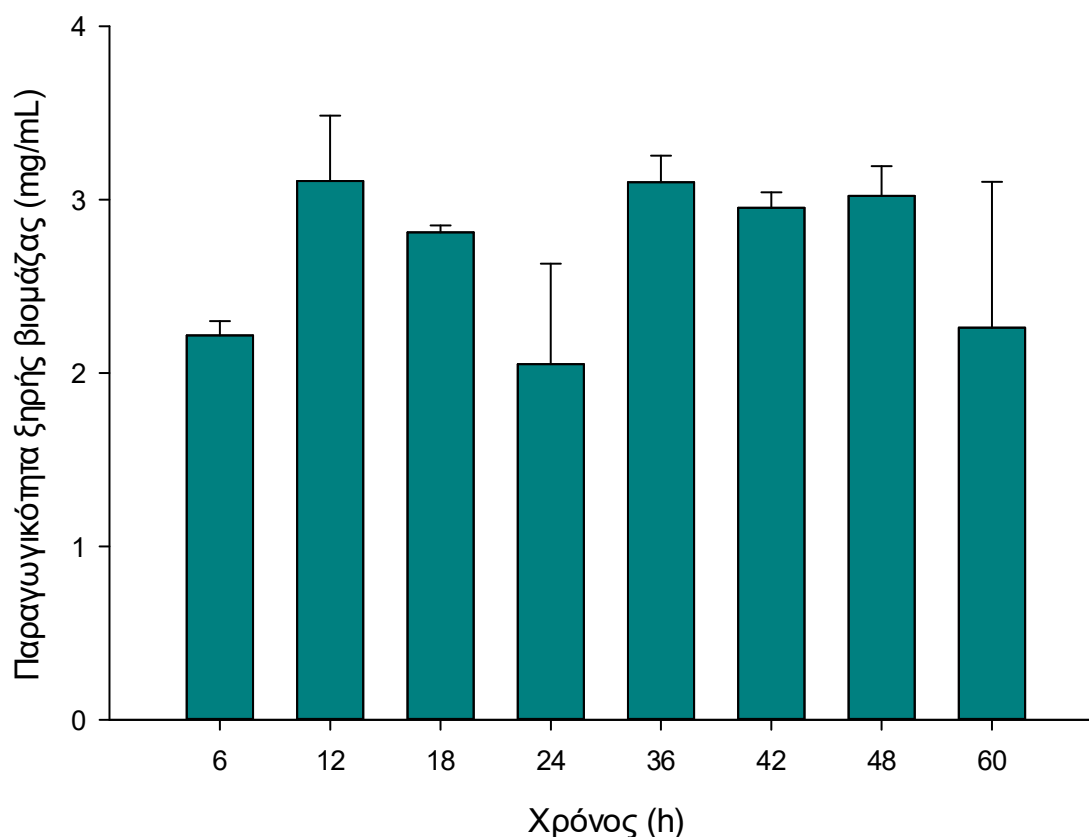
Στον βιοαντιδραστήρα με τροφοδοσία το συνθετικό διάλυμα οξέων εμφανίζονται κορυφές τριών διαφορετικών οξέων στο χρωματογράφημα, του οξικού στα 14,6 min, του προπιονικού στα 17min και του βουτυρικού στα 20,6 min. Το οξικό οξύ που ανιχνεύεται στο χρωματογράφημα προέρχεται από το οξικό νάτριο που έχει προστεθεί στο θρεπτικό υλικό και από την τροφοδοσία, ενώ το προπιονικό και το βουτυρικό μόνο από την τροφοδοσία. Από το διάγραμμα παρατηρείται ότι το οξικό οξύ ελαττώνεται μέχρι μια χαμηλή συγκέντρωση. Οι συγκεντρώσεις για το προπιονικό και το βουτυρικό κυμαίνονται σταθερά σε σχεδόν μηδενικές τιμές. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν ανιχνεύονται στα δείγματα του βιοαντιδραστήρα το καπροϊκό και το βαλερικό οξύ.

2.4.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Για κάθε δείγμα βιοαντιδραστήρα του μικροφύκους με πηγή άνθρακα τα οξέα στο συνθετικό διάλυμα οξέων ζυγίζεται η λυοφιλωμένη συνολική ξηρή βιομάζα των κυττάρων και προσδιορίζεται ο όγκος του δείγματος. Η απόδοση σε ξηρή βιομάζα για κάθε δείγμα του βιοαντιδραστήρα υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Απόδοση βιομάζας (mg/mL)} = \frac{\text{Συνολική ξηρή βιομάζα (mg)}}{\text{Όγκος δείγματος (mL)}}$$

Βιοαντιδραστήρας συνθετικού διαλύματος οξέων



Διάγραμμα 51: Απόδοση ξηρής βιομάζας κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα συνθετικού διαλύματος οξέων

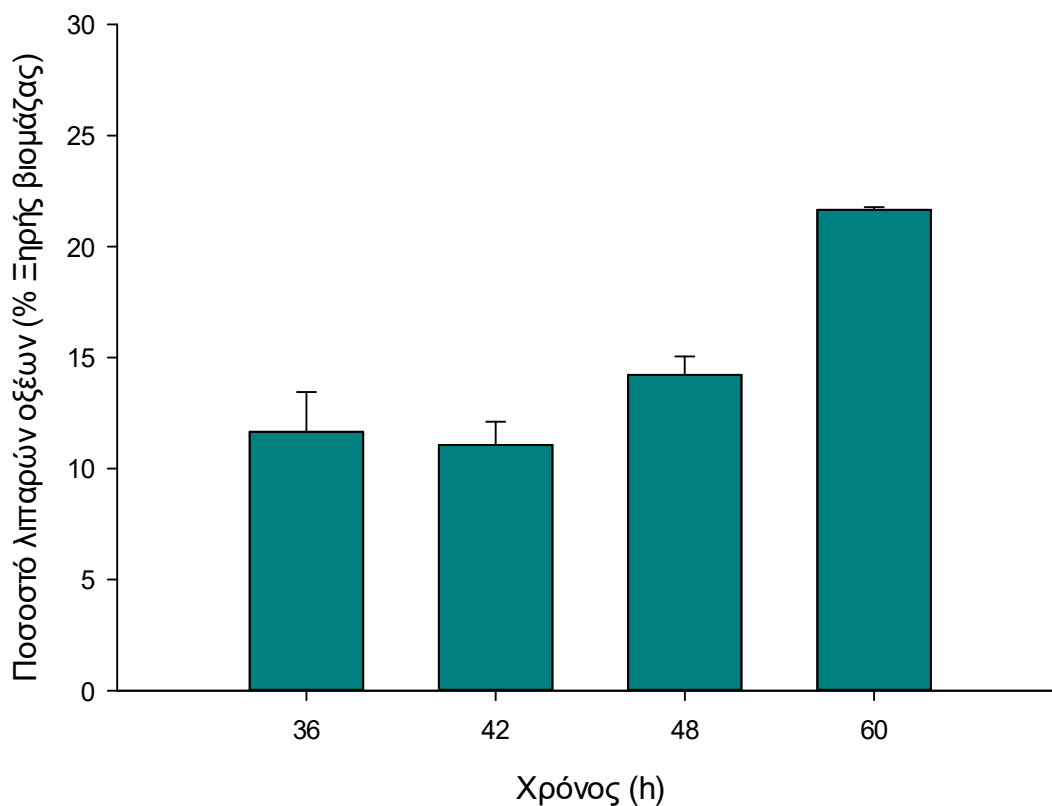
Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα η τιμή της απόδοσης της ξηρής βιομάζας κυττάρων διατηρείται σε σχεδόν σταθερά επίπεδα στο χρονικό διάστημα 36 με 48 h. Πρέπει να σημειωθεί ότι για τις τιμές στις 24 h και 60 h παρατηρείται απότομη μείωση της απόδοσης βιομάζας πιθανότητα από σφάλμα δειγματοληψίας. Σημειώνεται ότι, καθώς η συγκέντρωση των οξέων στην τροφοδοσία ήταν μικρή, γίνονταν συνεχώς προσθήκη όγκου αυξάνοντας την αραιώση στο εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι τιμές της απόδοσης βιομάζας των δειγμάτων να μην είναι απόλυτα αντιπροσωπευτικές.

2.4.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Το ποσοστό των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας} = \frac{\text{λιπαρά οξέα (mg)}}{\text{Ξηρή βιομάζα (mg)}} \cdot 100\%$$

Βιοαντιδραστήρας συνθετικού διαλύματος οξέων



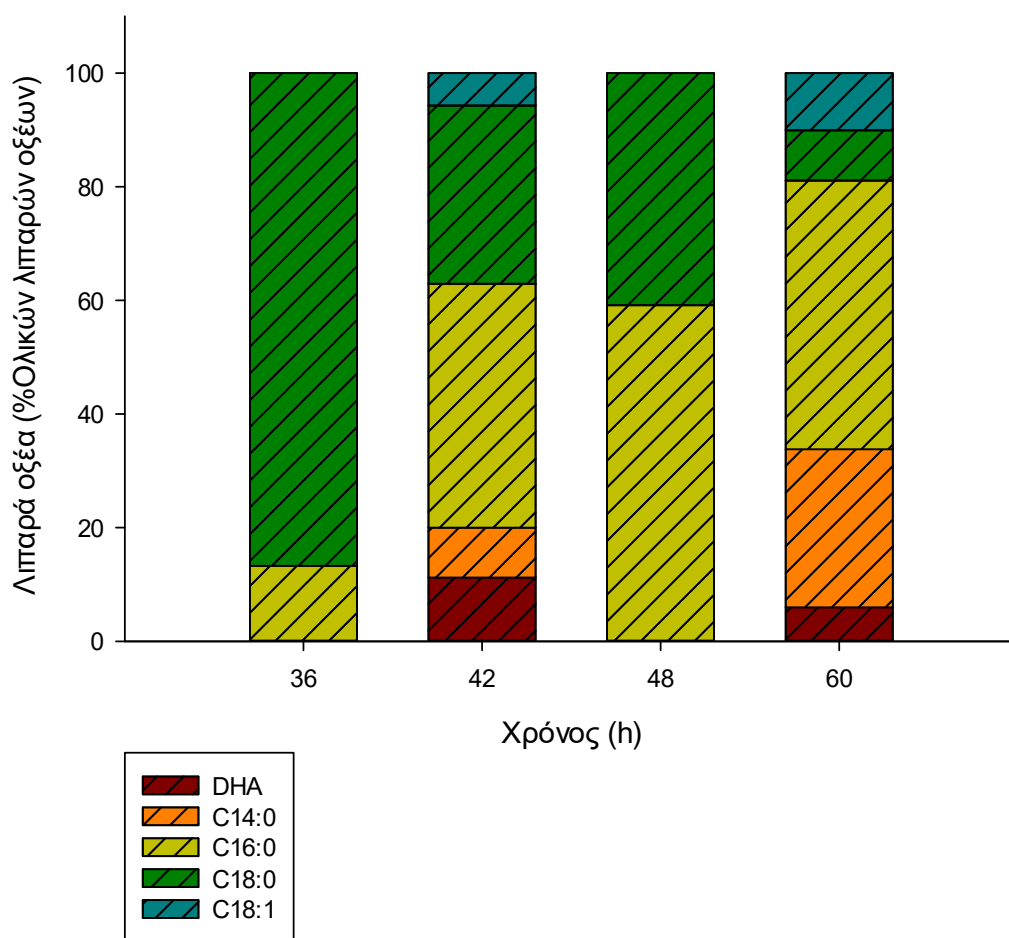
Διάγραμμα 52: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα συνθετικού διαλύματος οξέων

Σε περισσότερη διάρκεια λειτουργίας του αντιδραστήρα παρατηρείται υψηλότερο ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας.

2.4.4 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC

Τα δείγματα του βιοαντιδραστήρα, των οποίων τα λιπαρά έχουν εστεροποιηθεί, αναλύονται σε αέριο χρωματογράφο. Το προφίλ των λιπαρών οξέων σε κάθε δείγμα υπολογίζεται σε ποσοστό του συνόλου των λιπαρών οξέων. Για τα δείγματα του βιοαντιδραστήρα κατασκευάζεται το παρακάτω διάγραμμα:

Βιοαντιδραστήρας συνθετικού διαλύματος οξέων



Διάγραμμα 53: Προφίλ λιπαρών οξέων κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα συνθετικού διαλύματος οξέων

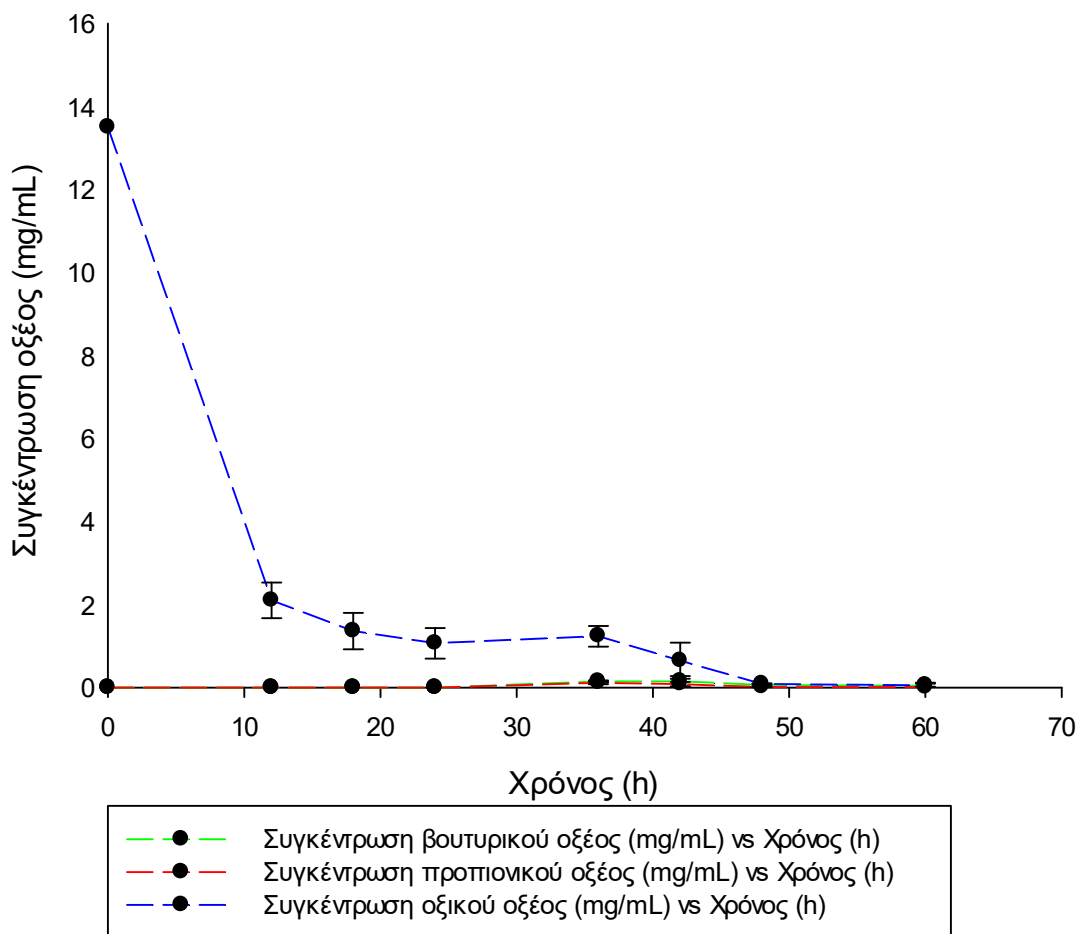
Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι παράγεται DHA στις 42 h και στις 60 h με μεγαλύτερο ποσοστό του DHA επί των ολικών λιπαρών να απαντάται στις 42 h. Αντίθετα, στις 36 και 48 h δεν παράγεται καμία ποσότητα DHA. Η έλλειψη DHA στις 48 h οφείλεται πιθανότατα σε πειραματικό σφάλμα κατά την χρωματογραφική ανάλυση.

2.5 ΔΙΗΘΗΜΑ ΥΓΡΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ VGF

2.5.1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΟΞΕΟΣ

Σε κάθε δείγμα που λαμβάνεται κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα πραγματοποιείται ανάλυση με υγρή χρωματογραφία για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των οξέων που αποτελούν την τροφοδοσία του βιοαντιδραστήρα και πηγή άνθρακα για το μικροφύκος.

Βιοαντιδραστήρας διηθήματος αποβλήτου



Διάγραμμα 54: Μεταβολή συγκέντρωσης οξέων κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα με διήθημα αποβλήτου VGF

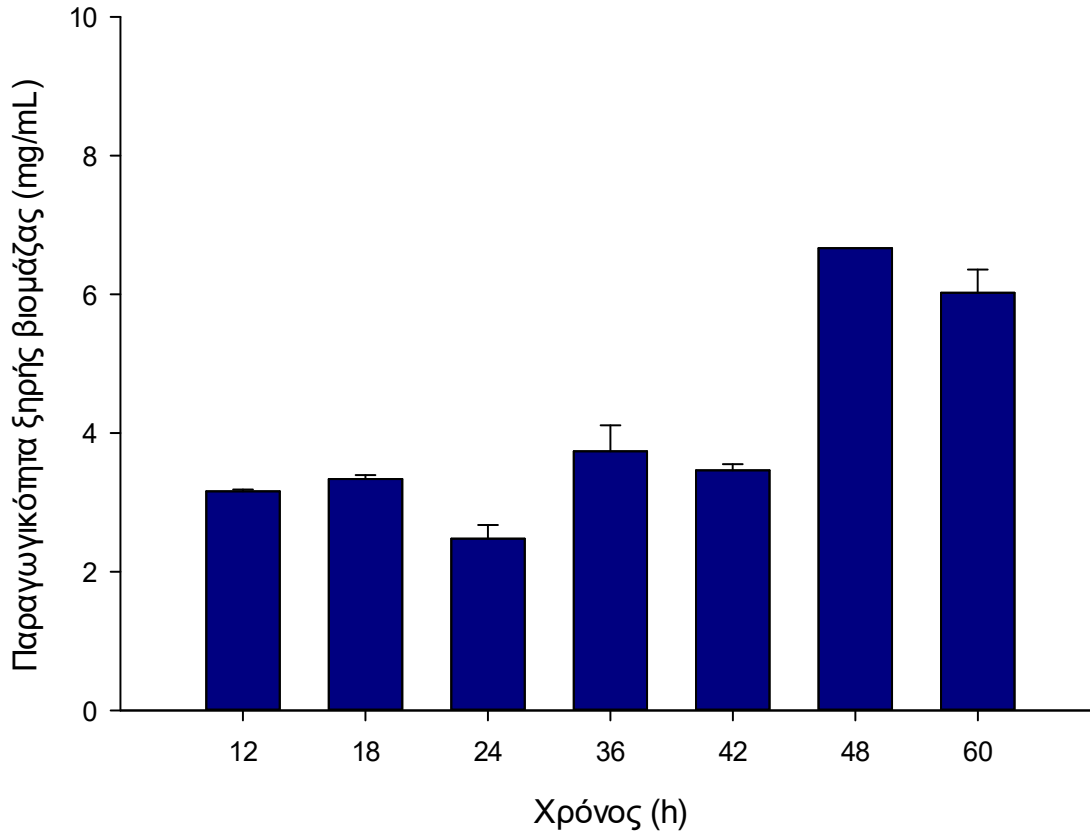
Το οξικό οξύ που ανιχνεύεται στο χρωματογράφημα προέρχεται από το οξικό νάτριο που έχει προστεθεί στο θρεπτικό υλικό και από την τροφοδοσία, ενώ το προπιονικό και το βουτυρικό μόνο από την τροφοδοσία. Από το διάγραμμα παρατηρείται ότι το οξικό οξύ ελαττώνεται μέχρι μηδενισμού του. Οι συγκεντρώσεις για το προπιονικό και το βουτυρικό κυμαίνονται σταθερά σε σχεδόν μηδενικές τιμές. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν ανιχνεύονται στα δείγματα του βιοαντιδραστήρα το καπροϊκό και το βαλερικό οξύ.

2.5.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Για κάθε δείγμα βιοαντιδραστήρα του μικροφύκου με πηγή άνθρακα το διήθημα αποβλήτου (permeate) η απόδοση σε ξηρή βιομάζα ανά μονάδα όγκου υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Απόδοση βιομάζας (mg/mL)} = \frac{\text{Συνολική ξηρή βιομάζα (mg)}}{\text{Όγκος δείγματος (mL)}}$$

Βιοαντιδραστήρας διηθήματος αποβλήτου



Διάγραμμα 55: Απόδοση ξηρής βιομάζας κατά την λειτουργία βιοαντιδραστήρα με διήθημα αποβλήτου VGF

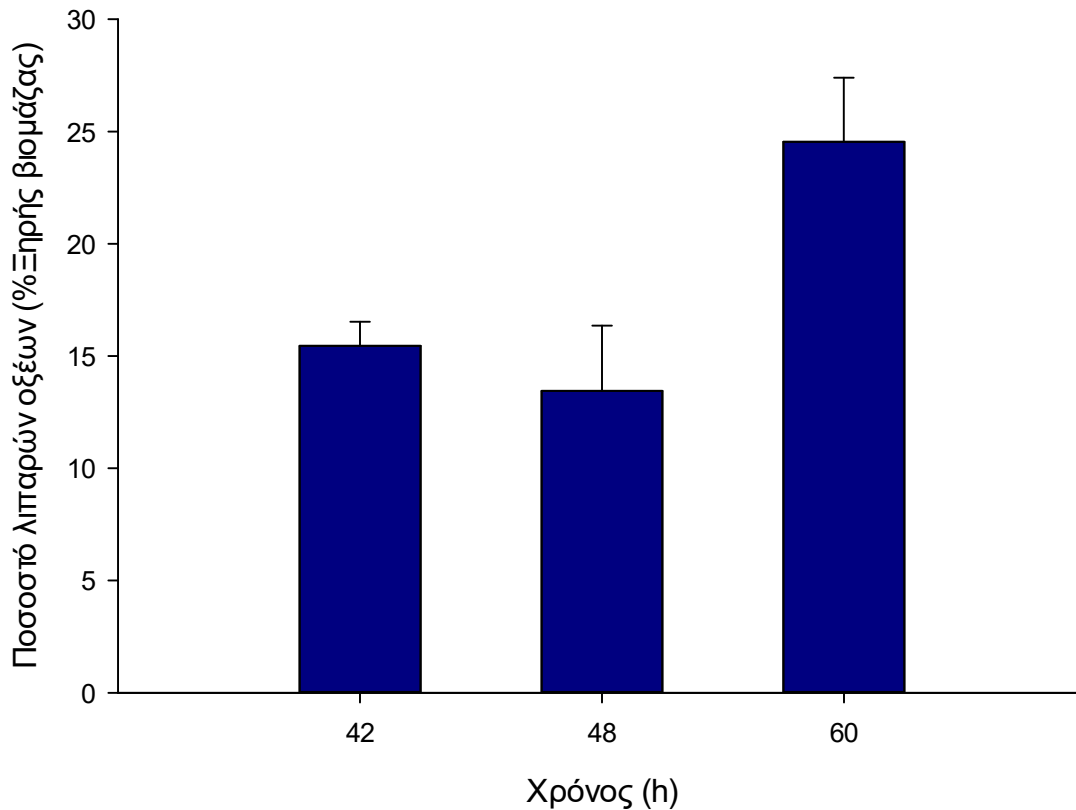
Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι η απόδοση ξηρής βιομάζας κυμαίνεται αρχικά σε σταθερά επίπεδα και αυξάνεται απότομα μετά τις 48 h λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα. Οι τιμές δεν είναι απόλυτα ενδεικτικές λόγω συνεχούς αραίωσης της καλλιέργειας από το διάλυμα τροφοδοσίας.

2.5.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Το ποσοστό των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας} = \frac{\text{λιπαρά οξέα (mg)}}{\text{Ξηρή βιομάζα (mg)}} \cdot 100\%$$

Βιοαντιδραστήρας διηθήματος αποβλήτου



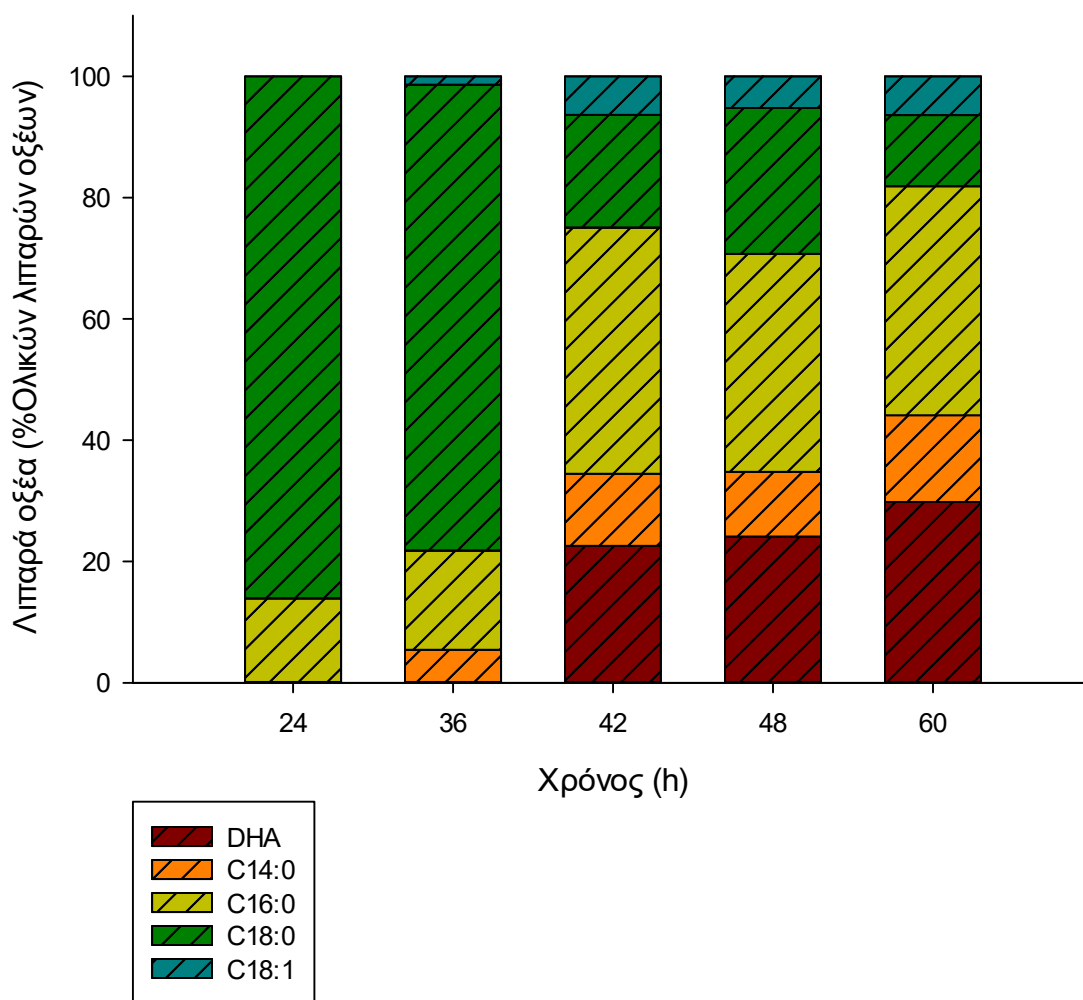
Διάγραμμα 56: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας κατά την λειτουργία βιοαντιδραστήρα με διήθημα αποβλήτου VGF

Σύμφωνα με το διάγραμμα των παραγόμενων λιπαρών οξέων είναι εμφανής η αύξηση του ποσοστού των ολικών λιπαρών στις 60 h λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα σε σύγκριση με τα άλλα δύο δείγματα από νωρίτερες χρονικές στιγμές.

2.5.4 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC

Τα δείγματα του βιοαντιδραστήρα, των οποίων τα λιπαρά έχουν εστεροποιηθεί, αναλύονται σε αέριο χρωματογράφο. Στο χρωματογράφημα παρατηρούνται κορυφές των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων στα 13,7 min για το C14, στα 17,7 min για το C16, στα 21,5 min για το C18, στα 21,2 min για το C18:1 και στα 28,8 min για το DHA. Για τα δείγματα του βιοαντιδραστήρα κατασκευάζεται το παρακάτω διάγραμμα:

Βιοαντιδραστήρας διηθήματος αποβλήτου



Διάγραμμα 57: Προφίλ λιπαρών οξέων κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα με διήθημα αποβλήτου VGF

Με βάση το διάγραμμα του προφίλ των λιπαρών οξέων παρατηρείται μια αύξηση του ποσοστού DHA επί των ολικών λιπαρών με την αύξηση των ωρών λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα. Πρέπει να σημειωθεί ότι στις 24 h και 36 h δεν διαπιστώνεται παραγωγή DHA από τα κύτταρα του μικροφύκου.

2.6 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

2.6.1 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι τιμές της απόδοσης ξηρής βιομάζας για τους βιοαντιδραστήρες με διαφορετικές πηγές άνθρακα:

Πίνακας 6: Απόδοση ξηρής βιομάζας (mg/mL) για τους βιοαντιδραστήρες καθαρών πηγών άνθρακα

ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ	ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ (mg/mL)	std
ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	22.14	0.46
ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	11.13	0.86
ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟ ΟΞΥ	14.37	0.33

Πίνακας 7: Απόδοση ξηρής βιομάζας (mg/mL) για τους βιοαντιδραστήρες με μίγματα πηγών άνθρακα

ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ	ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ (mg/mL)	std
ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΟΞΕΩΝ	2.26	0.84
ΔΙΗΘΗΜΑ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ	6.03	0.33

Από τους πίνακες της απόδοσης ξηρής βιομάζας παρατηρείται ότι για τους αντιδραστήρες με καθαρές πηγές άνθρακα στην τροφοδοσία μεγαλύτερη τιμή εμφανίζει ο βιοαντιδραστήρας του οξικού οξέος. Συγκρίνοντας τους βιοαντιδραστήρες με διαλύματα πηγών άνθρακα μεγαλύτερη απόδοση βιομάζας παρατηρείται στην περίπτωση του διηθήματος αποβλήτου.

2.6.2 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι τιμές του ποσοστού των λιπαρών οξέων για τους βιοαντιδραστήρες με διαφορετικές πηγές άνθρακα:

Πίνακας 8: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας για τους βιοαντιδραστήρες καθαρών πηγών άνθρακα

ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΛΙΠΑΡΩΝ ΕΠΙ ΤΗΣ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ (%)	std
ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	49.78	5.63
ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	31.24	1.20
ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟ ΟΞΥ	34.07	4.04

Πίνακας 9: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας για τους βιοαντιδραστήρες με μίγματα πηγών άνθρακα

ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΛΙΠΑΡΩΝ ΕΠΙ ΤΗΣ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ (%)	std
ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΟΞΕΩΝ	21.65	0.12
ΔΙΗΘΗΜΑ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ	24.55	2.86

Από τους πίνακες των ολικών λιπαρών παρατηρείται ότι για τους αντιδραστήρες με καθαρές πηγές άνθρακα στην τροφοδοσία μεγαλύτερη τιμή εμφανίζει ο βιοαντιδραστήρας του οξικού οξέος. Συγκρίνοντας τους βιοαντιδραστήρες με διαλύματα πηγών άνθρακα μεγαλύτερο ποσοστό λιπαρών παράγεται στην περίπτωση του διηθήματος αποβλήτου.

2.6.3 DHA

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται η μέγιστη τιμή του DHA επί των ολικών παραγόμενων λιπαρών οξέων για τους βιοαντιδραστήρες με διαφορετικές πηγές άνθρακα:

Πίνακας 10: Μέγιστο ποσοστό DHA (%TFA) σε διαφορετικούς βιοαντιδραστήρες

ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ	Max DHA (%TFA)	std
ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	33.33	0.19
ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	31.18	1.04
ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟ ΟΞΥ	35.78	0.57
ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΟΞΕΩΝ	11.24	2.79
ΔΙΗΘΗΜΑ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ	29.81	1.71

Όσον αφορά το DHA υψηλότερο ποσοστό επί των ολικών λιπαρών παράγεται στον βιοαντιδραστήρα με τροφοδοσία προπιονικό οξύ.

Η μέγιστη συγκέντρωση του DHA που παράχθηκε σε μια χρονική στιγμή κατά την λειτουργία του βιοαντιδραστήρα μπορεί να υπολογιστεί με τον παρακάτω τύπο:

$$DHA(mg/mL) = \text{Παραγωγικότητα βιομάζας}(mg/mL) \cdot \% \text{ ολικών λιπαρών} \cdot \% DHA$$

Πίνακας 11: Μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενου DHA (mg/mL) στους βιοαντιδραστήρες

ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ	Max DHA (mg/mL)
ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	2.05
ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	0.28
ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟ ΟΞΥ	0.74
ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΟΞΕΩΝ	0.04
ΔΙΗΘΗΜΑ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ	0.44

2.7 ΜΕΘΟΔΟΣ Kjeldahl

Για να υπολογιστεί η περιεκτικότητα ενός δείγματος σε άζωτο χρησιμοποιείται η μέθοδος Kjeldahl. Τα δείγματα που μετριοούνται προέρχονται από τους αντιδραστήρες οξικού, βουτυρικού και προπιονικού οξέος και πάρθηκαν σε χρόνο 24 h και 48 h μετά την αρχή της λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα. Επίσης, μελετήθηκαν δείγματα από αντιδραστήρα με τροφοδοσία διήθημα τυπυ υγρού κλάσματος ζύμωσης αποβλήτου VGF στις 12 h λειτουργίας του. Τέλος, μετρήθηκε το άζωτο σε δείγμα αντιδραστήρα την χρονική στιγμή t=0.

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε άζωτο υπολογίζεται με τον παρακάτω τύπο:

$$N\% = 1,4007 \cdot \frac{(V_1 - V_2) \cdot N}{\beta}$$

Όπου V_1 και V_2 είναι οι καταναλωθέντες όγκοι του πρότυπου διαλύματος καυστικού νατρίου κατά τον κυρίως και το λευκό προσδιορισμό αντιστοίχως, N η κανονικότητα του διαλύματος καυστικού νατρίου, με $N=0,5$, και β το βάρος του δείγματος.

Από την περιεκτικότητα του αζώτου υπολογίζεται η συγκέντρωση του αζώτου στα δείγματα των βιοαντιδραστήρων πολλαπλασιάζοντας την περιεκτικότητα με το βάρος της λυοφιλωμένης βιομάζας και διαιρώντας με τον όγκο του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 12: Συγκέντρωση αζώτου στα δείγματα βιοαντιδραστήρων

ΔΕΙΓΜΑ	ΧΡΟΝΟΣ (h)	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΖΩΤΟΥ (mg/mL)
	0	4.76
ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	24	1.94
	48	0.59
ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	24	2.69
	48	0
ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟ ΟΞΥ	24	1.90
	48	1.41
ΔΙΗΘΗΜΑ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ	12	3.54

Από τον παραπάνω πίνακα είναι εμφανής η μείωση της συγκέντρωσης του αζώτου κατά τις πρώτες 48 h λειτουργίας του αντιδραστήρα ανεξαρτήτως της πηγής άνθρακα στο διάλυμα τροφοδοσίας.

3. ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ

3.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για την μελέτη της επίδρασης της πηγής αζώτου στην ανάπτυξη και την παραγωγή λιπαρών οξέων παρασκευάστηκαν καλλιέργειες *Cryptocodinium cohnii* με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο σε συγκέντρωση 30 g/L και παρατηρήθηκε η ανάπτυξη των κυττάρων της καλλιέργειας με καθημερινά δείγματα.

Οι πηγές αζώτου που μελετήθηκαν είναι το yeast extract, το NaNO₃, το (NH₄)₂SO₄, το NH₄NO₃ και η ουρία (NH₂)₂CO. Με βάση τη βιβλιογραφία η βέλτιστη ανάπτυξη του μικροφύκου παρατηρήθηκε για συγκέντρωση γλυκόζης 27 g/L και πηγής αζώτου νιτρικό νάτριο 0,8 g/L.[30]

Από τις συγκεντρώσεις αυτές προκύπτει ο λόγος άνθρακα αζώτου (C/N) σε κάθε καλλιέργεια ως εξής:

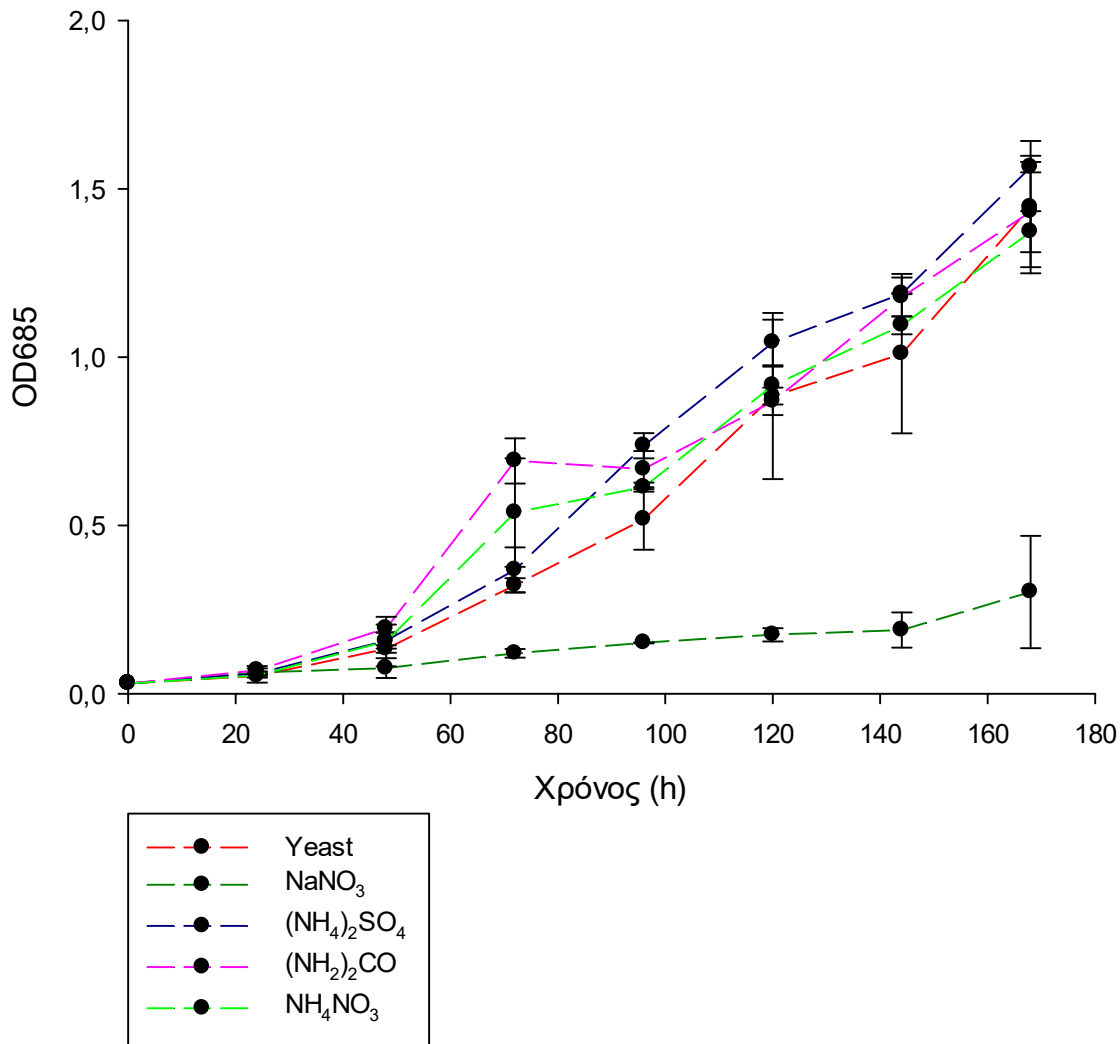
$$\text{ΑΝΘΡΑΚΑΣ: } \frac{C_{glucose} \cdot 6Ar_C}{MB_{glucose}} = \frac{27 \cdot 72}{180,16} = 10,79$$

$$\text{ΑΖΩΤΟ: } \frac{C_{NaNO_3} \cdot Ar_N}{MB_{NaNO_3}} = \frac{0,8 \cdot 14}{85} = 0,13$$

$$\text{ΛΟΓΟΣ ΑΝΘΡΑΚΑΣ/ΑΖΩΤΟ: } C/N = 83$$

Χρησιμοποιώντας το λόγο άνθρακα-άζωτο υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των πηγών αζώτου και συγκεκριμένα το yeast extract προστίθεται στην καλλιέργεια σε συγκέντρωση 0,15 g/L, το νιτρικό νάτριο NaNO₃ σε 0,67 g/L, το θειικό αμμώνιο (NH₄)₂SO₄ σε 0,52 g/L, το νιτρικό αμμώνιο NH₄NO₃ σε 0,31 g/L και η ουρία σε συγκέντρωση 0,24 g/L.

Πηγές αζώτου



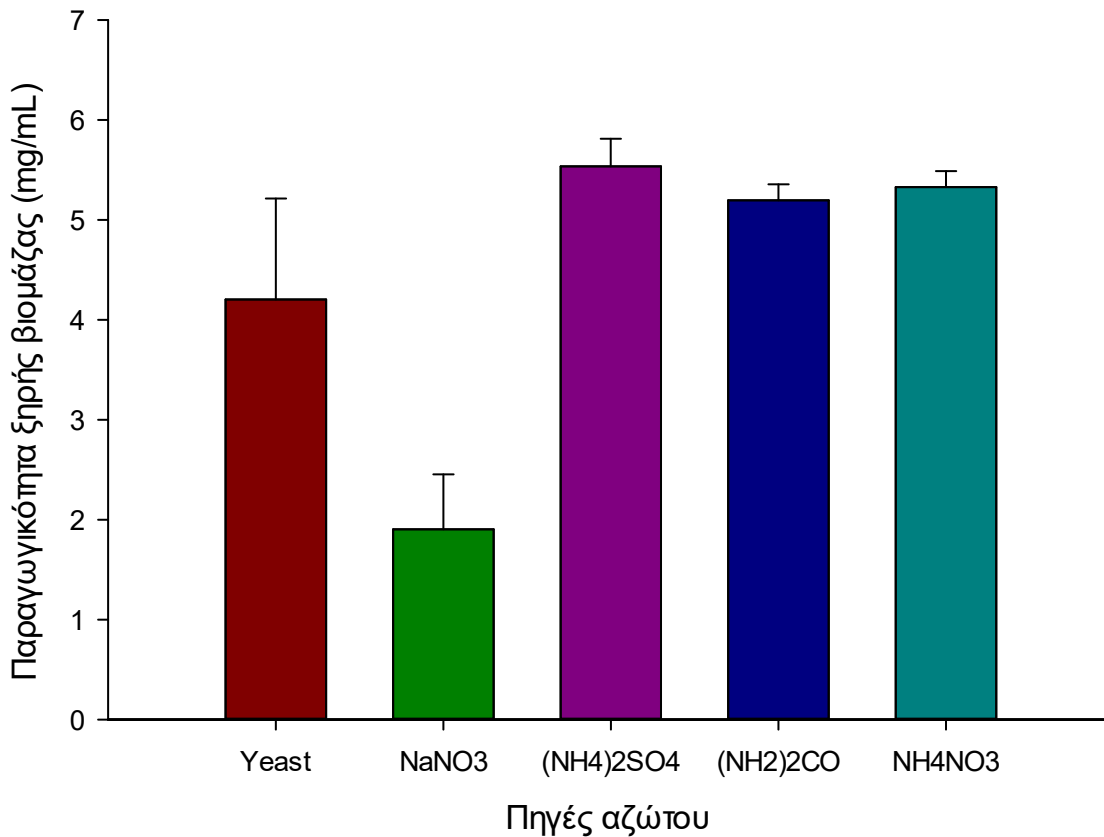
Διάγραμμα 58: Ανάπτυξη κυττάρων για καλλιέργειες με διαφορετικές πηγές αζώτου

Από το διάγραμμα ανάπτυξης των κυττάρων παρατηρείται ότι με όλες οι πηγές αζώτου που μελετήθηκαν, αναπτύχθηκαν εξίσου οι καλλιέργειες. Εξαίρεση αποτελεί το νιτρικό νάτριο, στα δείγματα του οποίου οι απορροφήσεις στα 685 nm ήταν συγκριτικά χαμηλότερες των άλλων πηγών αζώτου.

3.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Για κάθε καλλιέργεια του μικροφύκου με διαφορετική πηγή αζώτου στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ζυγίζεται η λυοφιλωμένη συνολική ξηρή βιομάζα των κυττάρων, μετρείται το pH της καλλιέργειας, προσδιορίζεται ο όγκος της και υπολογίζεται η απόδοση σε ξηρή βιομάζα ως εξής:

$$\text{Απόδοση βιομάζας (mg/mL)} = \frac{\text{Συνολική ξηρή βιομάζα (mg)}}{\text{Όγκος τελικής καλλιέργειας (mL)}}$$



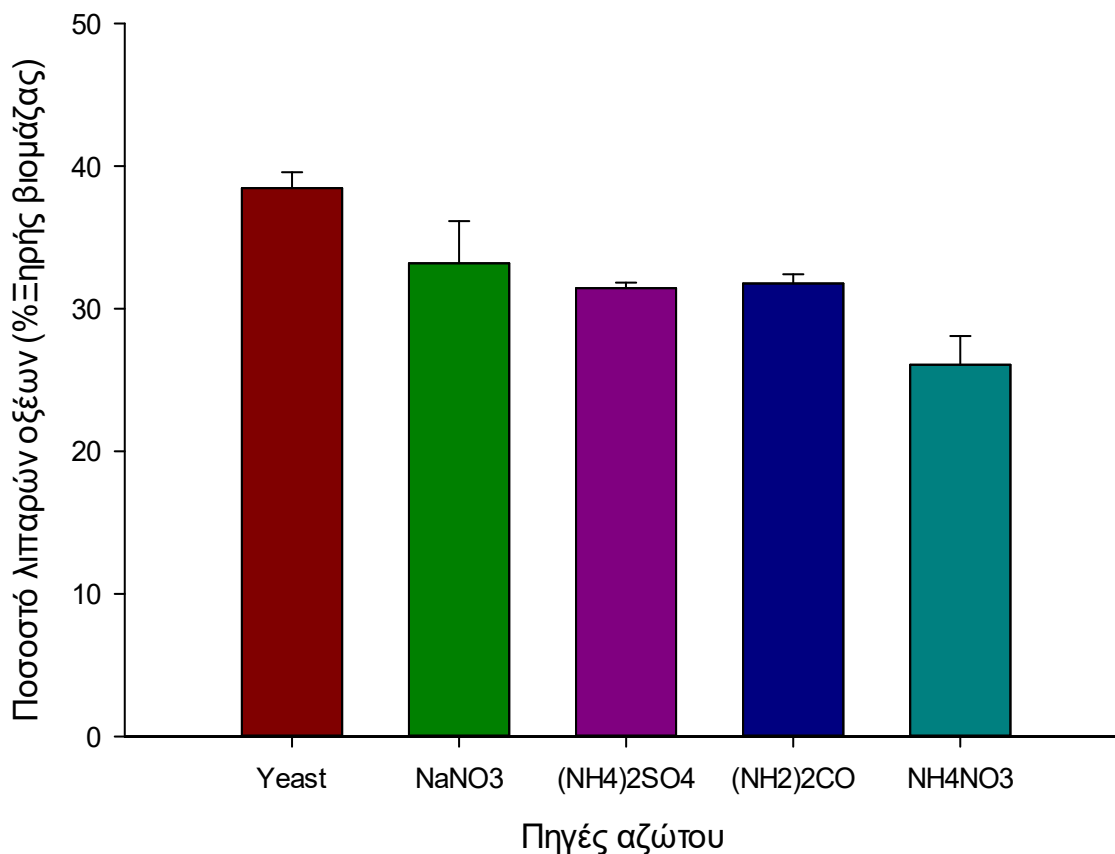
Διάγραμμα 59: Απόδοση ξηρής βιομάζας για διαφορετικές πηγές αζώτου

Βάσει του παραπάνω διαγράμματος μεγαλύτερη απόδοση ξηρής βιομάζας εμφανίζουν οι καλλιέργειες με πηγή αζώτου την ουρία, το θειϊκό αμμώνιο και το νιτρικό αμμώνιο. Όπως φαίνεται και από την πορεία των τιμών απορρόφησης, η απόδοση βιομάζας για το νιτρικό νάτριο είναι η χαμηλότερη.

3.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Για κάθε καλλιέργεια του *Cryptocodinium cohnii* το ποσοστό των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας} = \frac{\text{λιπαρά οξέα (mg)}}{\text{Ξηρή βιομάζα (mg)}} \cdot 100\%$$

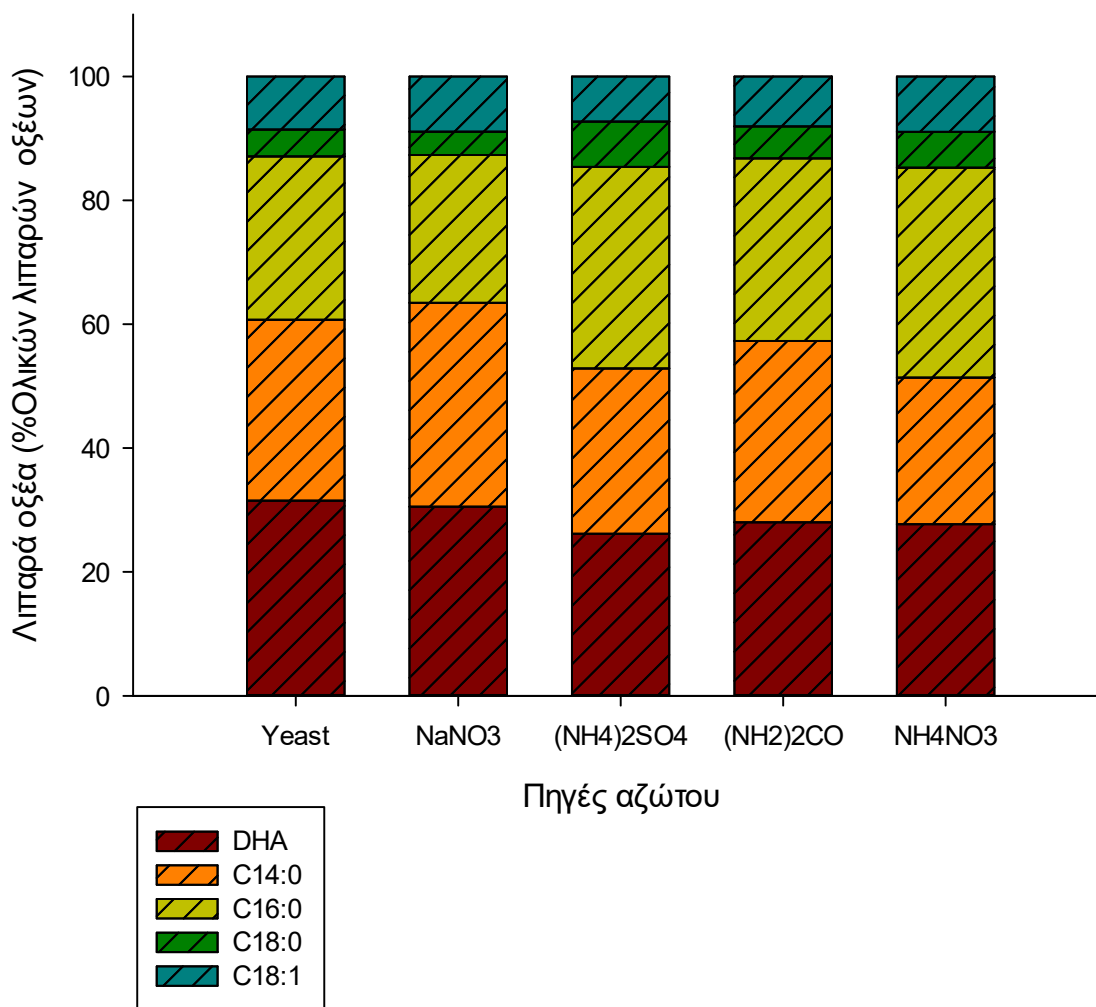


Διάγραμμα 60: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας για διαφορετικές πηγές αζώτου

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα υψηλότερο ποσοστό λιπαρών οξέων παράγεται στην καλλιέργεια με πηγή αζώτου το yeast extract. Οι υπόλοιπες πηγές αζώτου εμφανίζουν χαμηλότερες αλλά κοντινές μεταξύ τους τιμές παραγόμενων λιπαρών με μικρότερο το ποσοστό των λιπαρών του νιτρικού αμμωνίου.

3.4 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC

Τα δείγματα, των οποίων τα λιπαρά έχουν εστεροποιηθεί, αναλύονται σε αέριο χρωματογράφο. Στο χρωματογράφημα παρατηρούνται κορυφές των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων στα 13,7 min για το C14, στα 17,7 min για το C16, στα 21,5 min για το C18, στα 21,2 min για το C18:1 και στα 28,8 min για το DHA. Για τα δείγματα διαφορετικών πηγών αζώτου κατασκευάζεται το παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 61: Προφίλ λιπαρών οξέων για καλλιέργειες με διαφορετικές πηγές αζώτου

Πίνακας 13: Ποσοστό DHA επί των ολικών λιπαρών οξέων για τις καλλιέργειες με διαφορετικές πηγές αζώτου

ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	DHA (%TFA)	std
Yeast extract	31.49	3.81
NaNO ₃	30.53	2.25
(NH ₄) ₂ SO ₄	26.16	0.31
(NH ₂) ₂ CO	28.03	0.49
NH ₄ NO ₃	27.69	3.27

Από το παραπάνω διάγραμμα και τον πίνακα παρατηρείται ότι το ποσοστό του DHA επί των ολικών λιπαρών οξέων που παράγεται στις καλλιέργειες με διαφορετικές πηγές αζώτου είναι σε κοντινά επίπεδα.

Η συγκέντρωση του DHA που παράχθηκε στην εκάστοτε καλλιέργεια μπορεί να υπολογιστεί με τον παρακάτω τύπο:

$$DHA(mg/mL) = \text{Παραγωγικότητα βιομάζας} \left(\frac{mg}{mL} \right) \cdot \% \text{ ολικών λιπαρών} \cdot \% DHA$$

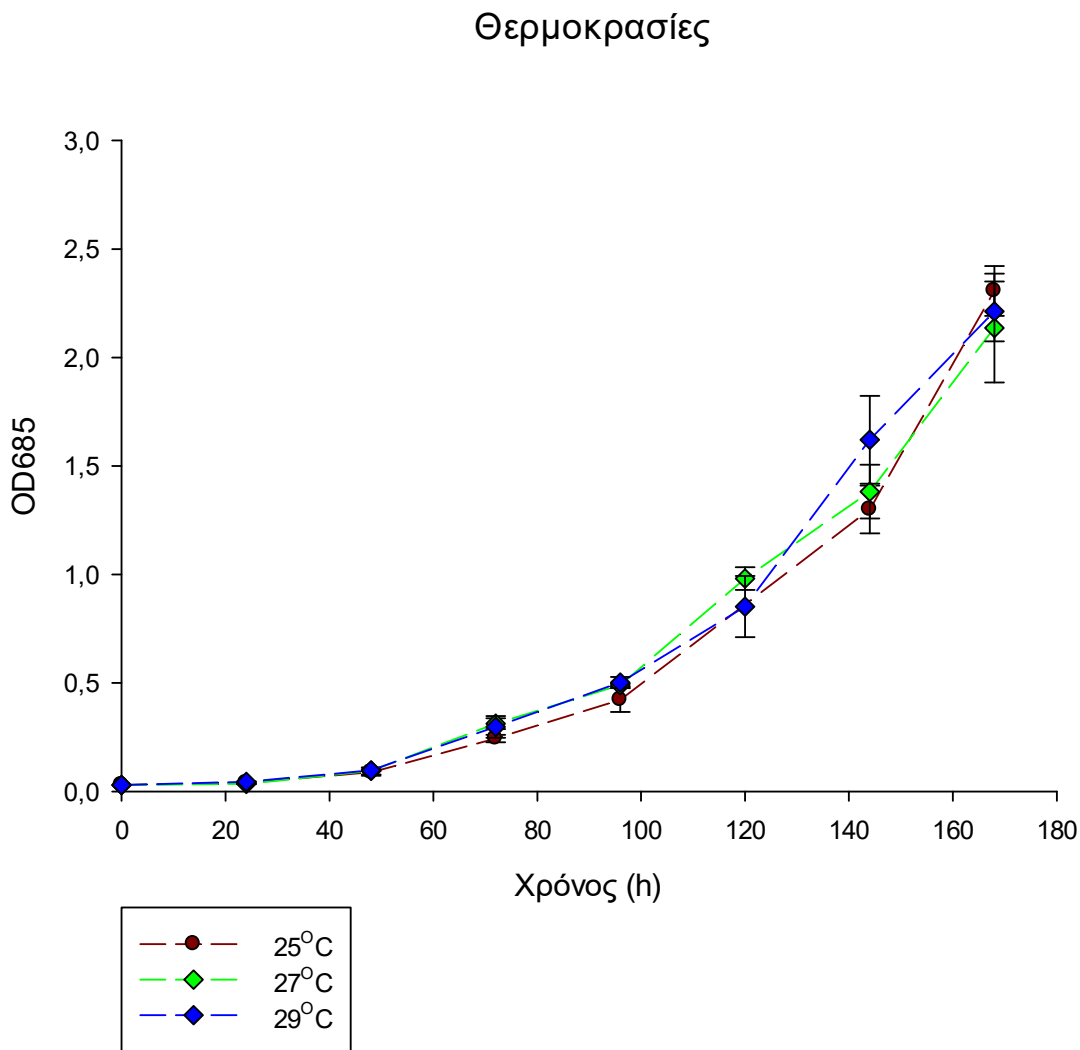
Πίνακας 14: Συγκέντρωση παραγόμενου DHA (mg/mL) στις καλλιέργειες με διαφορετική πηγή αζώτου

ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	DHA (mg/mL)
Yeast extract	0.51
NaNO ₃	0.19
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.46
(NH ₂) ₂ CO	0.46
NH ₄ NO ₃	0.38

4. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ

4.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για την μελέτη του παράγοντα θερμοκρασία παρασκευάστηκαν καλλιέργειες *Cryptocodium cohnii* με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο σε συγκέντρωση 30 g/L και παρατηρήθηκε η ανάπτυξη των κυττάρων της καλλιέργειας με καθημερινά δείγματα. Οι θερμοκρασίες που μελετήθηκαν είναι 25, 27 και 29 °C.



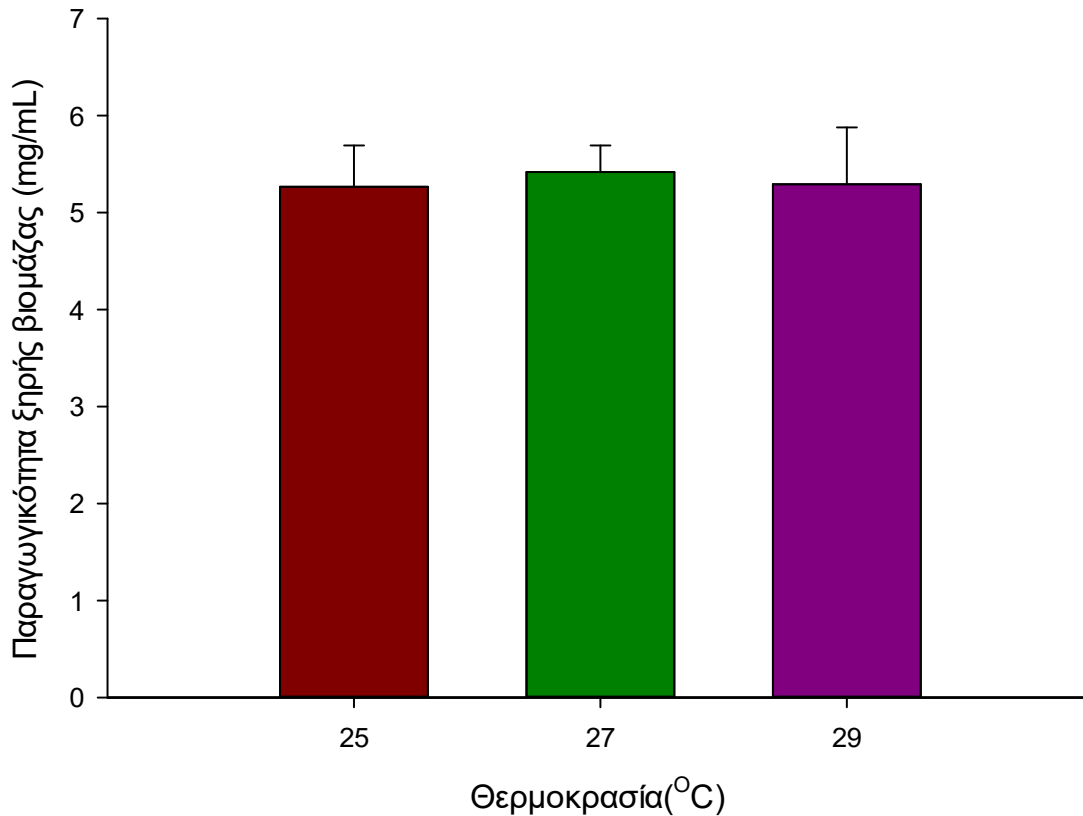
Διάγραμμα 62: Ανάπτυξη κυττάρων καλλιέργειών σε διαφορετικές θερμοκρασίες

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα η ανάπτυξη των καλλιέργειών δεν επηρεάστηκε από την θερμοκρασία στο συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών που μελετήθηκε.

4.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Για κάθε καλλιέργεια του μικροφύκου με διαφορετική θερμοκρασία ανάπτυξης ζυγίζεται η λυοφιλωμένη συνολική ξηρή βιομάζα των κυττάρων, μετρίεται το pH της καλλιέργειας και προσδιορίζεται ο όγκος της. Η απόδοση σε ξηρή βιομάζα υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Απόδοση βιομάζας (mg/mL)} = \frac{\text{Συνολική ξηρή βιομάζα (mg)}}{\text{Όγκος τελικής καλλιέργειας (mL)}}$$



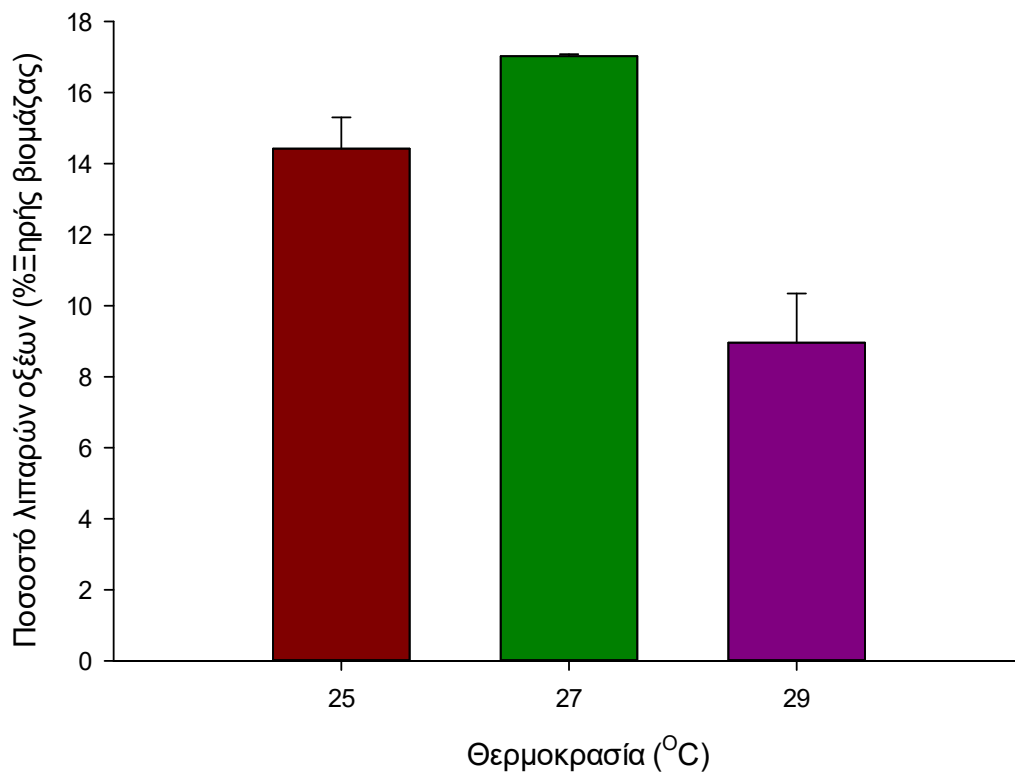
Διάγραμμα 63: Απόδοση ξηρής βιομάζας για διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα οι αποδόσεις ξηρής βιομάζας για τις καλλιέργειες εμφανίζουν κοντινές τιμές στις θερμοκρασίες των 25, 27 και 29 °C.

4.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Για κάθε καλλιέργεια του *Cryptocodinium cohnii* το ποσοστό των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας} = \frac{\text{λιπαρά οξέα (mg)}}{\text{Ξηρή βιομάζα (mg)}} \cdot 100\%$$

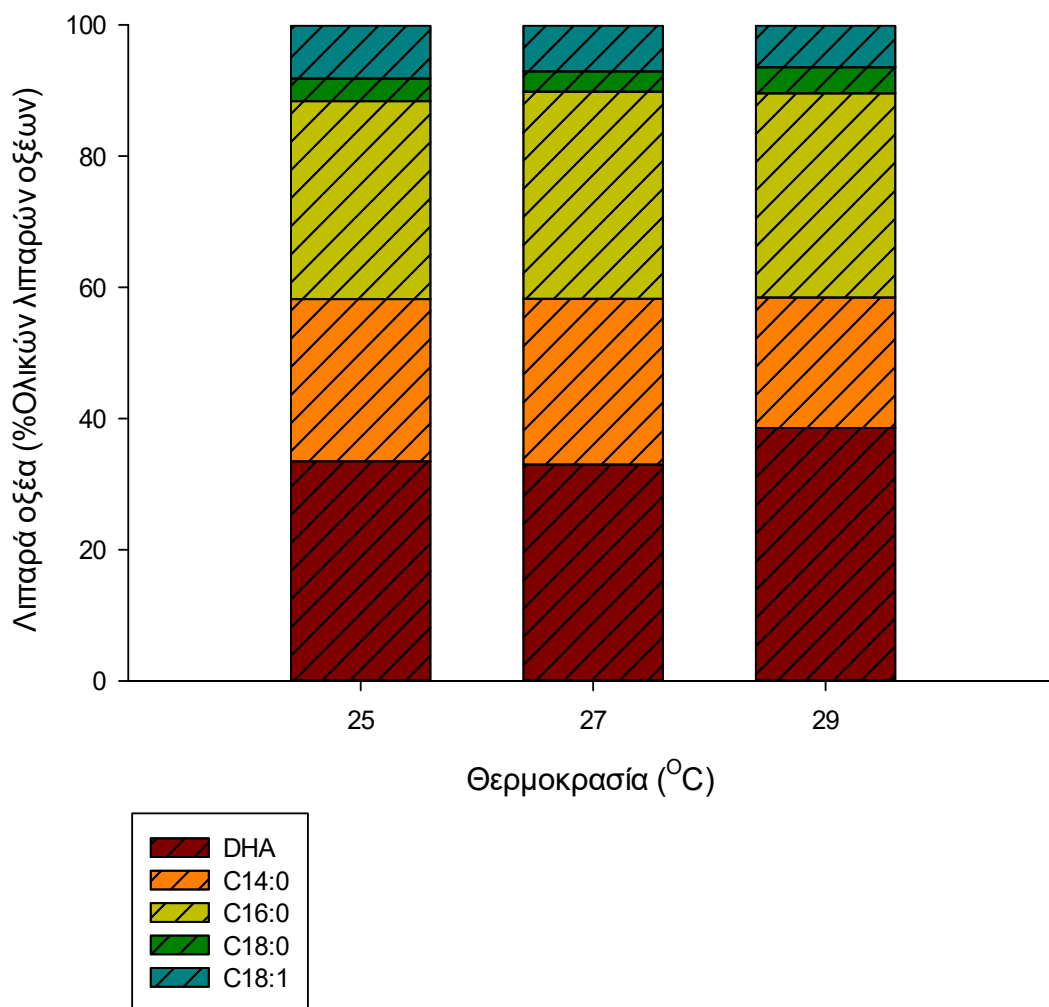


Διάγραμμα 64: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας για διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα υψηλότερο ποσοστό ολικών λιπαρών παράγεται στην καλλιέργεια που αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 27 °C.

4.4 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ – GC

Τα δείγματα, των οποίων τα λιπαρά έχουν εστεροποιηθεί, αναλύονται σε αέριο χρωματογράφο. Το προφίλ των λιπαρών οξέων σε κάθε δείγμα υπολογίζεται σε ποσοστό του συνόλου των λιπαρών οξέων. Για τα δείγματα διαφορετικών θερμοκρασιών ανάπτυξης κατασκευάζεται το παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 65: Προφίλ λιπαρών οξέων για τα δείγματα διαφορετικών θερμοκρασιών ανάπτυξης καλλιέργειας

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται το ποσοστό του DHA επί των ολικών λιπαρών οξέων για τις καλλιέργειες με διαφορετική θερμοκρασία ανάπτυξης:

Πίνακας 15: Ποσοστό DHA για τις καλλιέργειες με διαφορετική θερμοκρασία ανάπτυξης

T (°C)	DHA (%TFA)	std
25	33.48	3.90
27	32.99	2.06
29	38.56	4.12

Με βάση το διάγραμμα και τον πίνακα παρατηρείται ότι και στις τρεις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν παράχθηκε DHA και μάλιστα σε κοντινά ποσοστά επί των ολικών λιπαρών. Μεγαλύτερο ποσοστό DHA εμφανίζεται στις καλλιέργειες με θερμοκρασία ανάπτυξης 29 °C.

Η συγκέντρωση του DHA που παράχθηκε στην εκάστοτε καλλιέργεια μπορεί να υπολογιστεί με τον παρακάτω τύπο:

$$DHA(mg/mL) = \text{Παραγωγικότητα βιομάζας} \left(\frac{mg}{mL} \right) \cdot \% \text{ ολικών λιπαρών} \cdot \% DHA$$

Πίνακας 16: Συγκέντρωση παραγόμενου DHA (mg/mL) στις καλλιέργειες με διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης

T (°C)	DHA (mg/mL)
25	0.25
27	0.30
29	0.18

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

1. ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

1.1 BATCH ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Για το μικροφύκος *Cryptocodinium cohnii* μελετήθηκε η ανάπτυξη του σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου (batch) με διαφορετικές πηγές άνθρακα και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Σε όλες τις καλλιέργειες κοινοί παράγοντες ανάπτυξης ήταν η θερμοκρασία που ρυθμίστηκε στη βέλτιστη για το μικροφύκος, τους 27 °C,[24] και η πηγή αζώτου που ήταν το yeast extract. Κατά την χρονική πορεία ανάπτυξης του μικροφύκου σε διαφορετικές πηγές άνθρακα επιβεβαιώθηκε το πρότυπο ανάπτυξης των μικροοργανισμών που περιλαμβάνει την λανθάνουσα και την εκθετική φάση, τη φάση στασιμότητα και τη φάση θανάτου.

Η πρώτη πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε προς αντικατάσταση της γλυκόζης είναι το οξικό νάτριο. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, για το μικροφύκος *C. cohnii* όταν οι καλλιέργειες μεγαλώνουν με γλυκόζη το λιπιδικό περιεχόμενο κυμαίνεται στο 10–20%, ενώ στην περίπτωση που χρησιμοποιείται το οξικό οξύ μπορεί να φτάσει μέχρι και 40% επί της ξηρής βιομάζας.[53] Σύμφωνα με το συγκριτικό διάγραμμα ανάπτυξης των κυττάρων με πηγή άνθρακα το οξικό (διάγραμμα 25) παρατηρείται κοινή λανθάνουσα φάση που διαρκεί περίπου 24 h ανεξαρτήτου της αρχικής συγκέντρωσης οξικού. Στη λανθάνουσα αυτή φάση τα κύτταρα του μικροφύκου προσπαθούν να προσαρμοστούν στις συνθήκες, στην πηγή άνθρακα και στο θρεπτικό μέσο της καινούργιας καλλιέργειας, με αποτέλεσμα να καθυστερεί η ανάπτυξη τους. Μεγαλύτερη τιμή απορρόφησης και κατ' επέκταση μεγαλύτερη ανάπτυξη εμφανίζει η καλλιέργεια με συγκέντρωση 30 g/L. Από την πορεία της ανάπτυξης, μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης εμφανίζει αρχικά η καλλιέργεια με 20 g/L και στη συνέχεια η καλλιέργεια των 30 g/L. Για την καλλιέργεια με συγκέντρωση 5 g/L παρουσιάζεται η νωρίτερη μείωση της απορρόφησης. Αυτό οφείλεται στη γρήγορη κατανάλωση του οξέος, το οποίο βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση. Η κατανάλωση αυτή προκαλεί την απώλεια της πηγής άνθρακα αποτρέποντας την περαιτέρω ανάπτυξη της καλλιέργειας. Όσον αφορά την καλλιέργεια των 30 g/L, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 5, τα κύτταρα φτάνουν στη φάση στασιμότητας παρόλο που δεν έχει εξαντληθεί πλήρως το οξικό νάτριο. Η συμπεριφορά αυτή της καλλιέργειας οφείλεται στην αύξηση του pH σε τιμή αρκετά μεγαλύτερη από το 6,5, η οποία είναι η βέλτιστη τιμή για τα κύτταρα του μικροφύκου, και στην ύπαρξη τοξικών ουσιών παραγόμενων από τα ίδια τα κύτταρα του μικροφύκου.

Όσον αφορά τη συγκέντρωση του οξικού που μετράται με ανάλυση σε HPLC, σε όλα τα διαγράμματα 1-5 είναι εμφανής η μείωση της συγκέντρωσης με την ανάπτυξη των κυττάρων της καλλιέργειας, συμπεραίνοντας ότι το μικροφύκος έχει τη δυνατότητα να καταναλώσει το οξικό νάτριο. Όταν η συγκέντρωση βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα αρχίζει η φάση στασιμότητας της καλλιέργειας. Στο τέλος ανάπτυξης των καλλιεργειών οξικού υπολογίζεται η απόδοση σε ξηρή βιομάζα. Μεγαλύτερη τιμή εμφανίζει η καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση οξικού 30 g/L. Γενικότερα, παρατηρείται μια ανοδική πορεία στην απόδοση βιομάζας με την αύξηση της συγκέντρωσης με πιο απότομη μεταβολή μετά τα 15 g/L. Η μεταβολή της αρχικής συγκέντρωσης του οξικού νατρίου στο εύρος 5 με 15 g/L δεν επηρεάζει την τελική απόδοση βιομάζας για τις καλλιέργειες. Αντίθετα, μεταβολή της αρχικής συγκέντρωσης οξικού από 5 σε 30 g/L έχει μεγάλη επίπτωση στην απόδοση με διπλασιασμό της τιμής της. Πρέπει να σημειωθεί ότι η απόδοση βιομάζας για συγκέντρωση 50 g/L είναι πολύ μικρότερη από όλες τις υπόλοιπες, ενώ σε

υψηλότερες συγκεντρώσεις των 70, 100 και 150 g/L το μικροφύκος δεν αναπτύχθηκε καθόλου. Επομένως, τα 50 g/L είναι η συγκέντρωση από την οποία και μετά αρχίζει η παρεμπόδιση ανάπτυξης από το υπόστρωμα, το οξικό, καθώς η υψηλή αρχική συγκέντρωση είναι τοξική για το μικροφύκος.

Μελετώντας τα λιπαρά οξέα που συλλέγονται από την εκχύλιση της λυοφιλιωμένης τελικής βιομάζας της εκάστοτε καλλιέργειας παρατηρείται υψηλότερο ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας για την καλλιέργεια με συγκέντρωση 15 g/L, στα 38,7%. Ακολουθούν οι συγκεντρώσεις των 20 και 30 g/L με 33,4 και 35,3% και έπειτα των 5 και 10 g/L με περίπου 31%. Από το διάγραμμα 8 προκύπτει ότι υψηλότερο ποσοστό DHA επί των ολικών λιπαρών, 28,4%, παράγεται στις καλλιέργειες με συγκέντρωση οξικού νατρίου 30 g/L, ακολουθούμενο από τις καλλιέργειες συγκέντρωσης οξικού 10 και 15 g/L. Όσον αφορά την συγκέντρωση του παραγόμενου DHA, υψηλότερη τιμή που υπολογίζεται είναι 0,60 mg/mL για συγκέντρωση οξικού 30 g/L. Συνοψίζοντας καλύτερη συγκέντρωση τόσο ως προς την απόδοση βιομάζας όσο και ως προς την παραγωγή του DHA αποτελούν τα 30 g/L για το οξικό.

Η επόμενη πηγή άνθρακα που εξετάστηκε είναι το βουτυρικό οξύ. Σύμφωνα με το συγκριτικό διάγραμμα ανάπτυξης των κυττάρων με πηγή άνθρακα το βουτυρικό (διάγραμμα 26) παρατηρείται κοινή λανθάνουσα φάση που διαρκεί περίπου 48 h ανεξαρτήτου της αρχικής συγκέντρωσης οξέος. Συγκρίνοντας το χρονικό διάστημα που διαρκεί η λανθάνουσα φάση για τις καλλιέργειες βουτυρικού με το αντίστοιχο για τις καλλιέργειες του οξικού, προκύπτει ότι το μικροφύκος χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να προσαρμοστεί σε καλλιέργεια με πηγή άνθρακα το βουτυρικό πριν ξεκινήσει την ανάπτυξή του, καθώς το μόριο του βουτυρικού αφομοιώνεται δυσκολότερα από το μικροφύκος. Μεγαλύτερες τιμές απορρόφησης και κατ' επέκταση μεγαλύτερη ανάπτυξη εμφανίζει η καλλιέργεια με συγκέντρωση 15 g/L, ακολουθούμενη από την 20 g/L. Από την πορεία της ανάπτυξης, μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης εμφανίζουν αρχικά οι ίδιες καλλιέργειες με 15 και 20 g/L, όπως διαπιστώνεται από την απότομη κλίση της καμπύλης ανάπτυξής τους. Όσον αφορά τη συγκέντρωση του βουτυρικού που μετράται με ανάλυση σε HPLC, στα διαγράμματα των συγκεντρώσεων 5, 10, 15 και 20 g/L είναι εμφανής η μείωση της συγκέντρωσης με την ανάπτυξη των κυττάρων της καλλιέργειας. Στην περίπτωση της καλλιέργειας με βουτυρικό οξύ αρχικής συγκέντρωσης 30 g/L, η συγκέντρωση του οξέος, όπως ανιχνεύεται από την HPLC, παρουσιάζει αρχικά μια μείωση και μετά διατηρείται σταθερή παρά την ανάπτυξη των κυττάρων. Η απουσία της αναμενόμενης μείωσης της συγκέντρωσης, αφού η καλλιέργεια συνεχίζει να αναπτύσσεται, πιθανότητα οφείλεται σε πειραματικά σφάλματα. Στο τέλος ανάπτυξης των καλλιεργειών βουτυρικού υπολογίζεται η απόδοση σε ξηρή βιομάζα. Υψηλότερη τιμή απόδοσης βιομάζας εμφανίζει η καλλιέργεια των 15 g/L με 3,71 mg/mL. Με αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα από 5 σε 15 g/L η πορεία της απόδοσης βιομάζας είναι ανοδική, ενώ μετά τα 15 g/L παρατηρείται απότομη μείωση της τιμής της. Επομένως, υψηλότερη σύγκριση βουτυρικού οξέος από τα 15 g/L παρεμποδίζει την ομαλή ανάπτυξη της καλλιέργειας.

Μελετώντας τα λιπαρά οξέα που συλλέγονται από την εκχύλιση της λυοφιλιωμένης τελικής βιομάζας παρατηρείται υψηλότερο ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας για την καλλιέργεια με συγκέντρωση 15 g/L, στα 27,2%. Ακολουθούν οι συγκεντρώσεις των 10 και 20 g/L με 23,5%.

Από το διάγραμμα 16 προκύπτει ότι υψηλότερο ποσοστό DHA επί των ολικών λιπαρών εμφανίζεται στην περίπτωση που η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα είναι 10 g/L. Κοντινή τιμή στα ποσοστά του DHA παρατηρείται και για την καλλιέργεια των 15 g/L, η οποία εμφανίζει και την μεγαλύτερη απόδοση σε βιομάζα. Όσον αφορά την συγκέντρωση του DHA στον όγκο της τελικής καλλιέργειας μεγαλύτερη είναι η τιμή για συγκέντρωση οξέος 15 g/L στα 0,21 mg/mL. Αντίθετα, η συγκέντρωση DHA για τις καλλιέργειες των 5, 20 και 30 g/L είναι πολύ μικρή φτάνοντας τα 0,01 mg/mL. Με βάση τους παράγοντες αυτούς καλύτερη συγκέντρωση βουτυρικού οξέος τόσο ως προς την απόδοση βιομάζας όσο και ως προς την παραγωγή του DHA αποτελούν τα 15 g/L.

Η τελευταία πηγή άνθρακα που εξετάστηκε είναι το προπιονικό οξύ. Μεγαλύτερες τιμές απορρόφησης και κατ' επέκταση μεγαλύτερη ανάπτυξη εμφανίζουν οι καλλιέργειες με συγκέντρωση 10 και 15 g/L. Μετά την λανθάνουσα φάση μεγαλύτερος είναι ο ρυθμός ανάπτυξης για την καλλιέργεια με 5 g/L βουτυρικό οξύ. Όμως, λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα η καλλιέργεια οδηγείται γρήγορα σε σχέση με τις άλλες σε φάση θανάτου. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις προπιονικού οξέος, η καλλιέργεια με 30 g/L εμφανίζει μηδενική ανάπτυξη. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι από αυτή την συγκέντρωση οξέος και έπειτα το μικροφύκος παρεμποδίζεται από το υπόστρωμα.

Όσον αφορά τη συγκέντρωση του προπιονικού οξέος που μετράται με ανάλυση σε HPLC, είναι εμφανής η μείωση της συγκέντρωσης με την ανάπτυξη των κυττάρων της καλλιέργειας. Κατά συνέπεια, το μικροφύκος *C.cohnii* έχει την δυνατότητα να μεταβολίσει την συγκεκριμένη πηγή άνθρακα. Όταν η συγκέντρωση βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα αρχίζει η φάση στασιμότητας της καλλιέργειας. Αυτή η πορεία ακολουθείται σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός από τα 30 g/L, όπου η συγκέντρωση του οξέος μετά από μια μείωση διατηρείται σταθερή, καθώς τα κύτταρα του μικροφύκου δεν αναπτύσσονται. Στο τέλος ανάπτυξης των καλλιεργειών προπιονικού οξέος υπολογίζεται η απόδοση σε ξηρή βιομάζα. Υψηλότερη τιμή απόδοσης βιομάζας εμφανίζει η καλλιέργεια των 10 g/L με 3,59 mg/mL.

Όσον αφορά τα ολικά λιπαρά οξέα που παράγονται επί της ξηρής βιομάζας παρατηρείται ότι το ποσοστό τους αυξάνεται αρχικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του προπιονικού. Η μέγιστη τιμή υπολογίζεται 22,2% και αντιστοιχεί στις καλλιέργειες με συγκέντρωση 15 g/L. Μετά από αυτή τη συγκέντρωση ελαττώνεται το ποσοστό λιπαρών που παράγουν τα κύτταρα του μικροφύκου. Πρέπει να σημειωθεί ότι η καλλιέργεια προπιονικού που εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας (10 g/L οξύ) δεν παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό λιπαρών, το οποίο παρατηρείται για τα 15 g/L οξύ, σε αντίθεση με τις καλλιέργειες με βουτυρικό στις οποίες οι μέγιστες τιμές βιομάζας και λιπαρών αντιστοιχούν στην ίδια καλλιέργεια των 15 g/L. Από το διάγραμμα 24 παρατηρείται ότι μεγαλύτερο ποσοστό DHA επί των ολικών λιπαρών παράγεται από τα κύτταρα που μεγαλώνουν σε συγκέντρωση 10 g/L προπιονικού οξέος με τιμή 38,6%. Κοντινά ποσοστά DHA παρουσιάζονται και από την ανάλυση GC στις συγκεντρώσεις 15 και 20g/L. Ανάγοντας το ποσοστό DHA σε συγκέντρωση στον τελικό όγκο της καλλιέργειας προκύπτει μεγαλύτερη συγκέντρωση, 0,26 mg/mL, για τις καλλιέργειες με 10 g/L οξύ. Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψιν την απόδοση βιομάζας και την τελική συγκέντρωση του επιθυμητού μεταβολίτη DHA η βέλτιστη συγκέντρωση του προπιονικού οξέος είναι 10 g/L.

Βέβαια, είναι απαραίτητο να γίνει σύγκριση και των διαφορετικών πηγών άνθρακα όταν η αρχική συγκέντρωση που εξετάζεται είναι η ίδια και για τα τρία οξέα. Αρχικά, συσχετίζεται η απόδοση βιομάζας σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση για το προπιονικό, το βουτυρικό οξύ και το οξικό νάτριο. Σχεδόν σε όλες τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν, εκτός από τα 15g/L, μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρή βιομάζα κυττάρων του *C.cohnii* παρουσιάζουν οι καλλιέργειες που αναπτύσσονται με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο. Αυτή η συμπεριφορά είναι αναμενόμενη, καθώς το οξικό σε σύγκριση με τα άλλα οξέα που χρησιμοποιήθηκαν είναι ένα πιο απλό μόριο δομικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αφομοιώνεται ευκολότερα από τα κύτταρα των μικροφύκων για την ανάπτυξη τους. Η ευκολότερη προσαρμογή του μικροφύκου σε καλλιέργεια οξικού είναι εμφανής και από την μικρότερη διάρκεια που έχει η λανθάνουσα φάση σε σύγκριση με τα άλλα οξέα που εξετάστηκαν. Επιπρόσθετα, το οξικό έχοντας μικρότερο μοριακό βάρος απαιτεί λιγότερα βήματα κατά την μετατροπή του σε ακετυλο-CoA κατά το μεταβολικό του μονοπάτι προς παραγωγή ενέργειας ATP για τα κύτταρα του μικροφύκου.[34] Όσον αφορά τα ολικά λιπαρά οξέα που παράγονται κατά την καλλιέργεια των μικροφύκων παρατηρείται ότι το υψηλότερο ποσοστό αντιστοιχεί σε πηγή άνθρακα το οξικό ανεξαρτήτου αρχικής συγκέντρωσης, ενώ μικρότερο ποσοστό λιπαρών παράγεται στην περίπτωση του προπιονικού. Σημειώνεται ότι το οξικό οξύ εμφανίζει ταυτόχρονα υψηλότερη απόδοση βιομάζας, αλλά και μεγαλύτερο ποσοστό λιπαρών που παράγεται στα κύτταρα του μικροφύκου. Τέλος, η συγκέντρωση DHA για αρχικές συγκεντρώσεις οξέος 5 και 10 g/L είναι ίδια για το προπιονικό οξύ και το οξικό νάτριο. Αντίθετα, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις το οξικό παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση DHA. Έτσι, ως προτιμότερη πηγή άνθρακα επιλέγεται το οξικό νάτριο σε συγκέντρωση 30 g/L.

1.2 ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ

Αφού μελετήθηκε η ανάπτυξη των καλλιεργειών του μικροφύκου *Cryptocodinium cohnii* και η παραγωγή του εικοσιδιεξανοϊκού (DHA) σε batch καλλιέργειες, κρίθηκε απαραίτητη και η μελέτη των παραμέτρων αυτών σε μεγαλύτερη κλίμακα (scale up). Επιπρόσθετα, η αδυναμία του μικροφύκου να αναπτύσσεται σε πυκνά διαλύματα οργανικών οξέων οδήγησε στην ανάγκη αναζήτησης συστημάτων που προσθέτουν σταδιακά την πηγή άνθρακα στην καλλιέργεια. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν βιοαντιδραστήρες ημιδιαλείποντος έργου (fed-batch), στους οποίους η προσθήκη του εξεταζόμενου οξέος ή διαλύματος οξέων έγινε με παροχή τροφοδοσίας στο βιοαντιδραστήρα ρυθμίζοντας το pH του μέσου, (pH-auxostat). Οι καθαρές πηγές οργανικών οξέων που χρησιμοποιήθηκαν είναι το οξικό, το βουτυρικό και το προπιονικό οξύ. Πειράματα πραγματοποιήθηκαν και με βιοαντιδραστήρα με τροφοδοσία διήθημα από το υγρό κλάσμα ζύμωσης αποβλήτου VGF. Η σύγκριση αυτής της φυσικής πηγής άνθρακα έγινε με βιοαντιδραστήρα με τροφοδοσία συνθετικό διάλυμα οξέων ίδιας συγκέντρωσης με το απόβλητο.

Ο πρώτος βιοαντιδραστήρας που μελετήθηκε είχε ως πηγή άνθρακα το οξικό οξύ, καθώς υπάρχουν και άλλες βιβλιογραφικές πηγές για την χρήση του οξικού στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροφύκου. [42] Η ανάπτυξη του μικροφύκου ακολουθεί το πρότυπο ανάπτυξης των μικροοργανισμών, με μια λανθάνουσα φάση γύρω στις 24 h. Ταυτόχρονα με την αύξηση της απορρόφησης των καθημερινών δειγμάτων που λαμβάνονταν, παρατηρήθηκε ελάττωση της συγκέντρωσης οξικού οξέος στο υγρό της καλλιέργειας, όπως αυτή προσδιορίστηκε με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας. Επομένως, όπως συμβαίνει και στις batch καλλιέργειες, το μικροφύκος καταναλώνει τη συγκεκριμένη πηγή άνθρακα. Όσον αφορά την

απόδοση σε ξηρή βιομάζα που μετράται στα δείγματα, είναι εμφανές ότι ακολουθεί μια ανοδική πορεία με την αύξηση των ωρών λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα. Η υψηλότερη τιμή υπολογίζεται στις 240 h και είναι 22,14 mg/mL. Επειδή το οξύ προστίθεται σταδιακά μέσα στον αντιδραστήρα δεν παρατηρείται κάποια παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μικροφύκους, παρόλο που η συγκέντρωση οξικού οξέος στο διάλυμα τροφοδοσίας είναι 350 g/L. Αντίθετα, το μικροφύκος αναπτύσσεται για μεγάλο χρονικό διάστημα προτού φτάσει σε φάση στασιμότητας.

Τα λιπαρά οξέα που παράγονται από τα κύτταρα του μικροφύκους δεν παρουσιάζουν ξεκάθαρη τάση, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της απόδοσης βιομάζας. Τα υψηλότερα ποσοστά λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση τους από τα κύτταρα του μικροφύκους υπολογίζονται μετά τις 120 h λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα. Συγκρίνοντας τις τιμές αυτές των λιπαρών με την ανάπτυξη των κυττάρων παρατηρείται ότι η καλλιέργεια αυξάνει τη βιομάζα της με χαμηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης. Στο χρονικό διάστημα αυτό το μικροφύκος περιορίζει την ανάπτυξη του και στρέφει τα μεταβολικά του μονοπάτια στην παραγωγή και αποθήκευση λιπαρών. Στα δείγματα αυτά το ποσοστό των ολικών λιπαρών είναι μεγαλύτερο από 40%. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία και την έρευνα των Martin et al. ένας βιοαντιδραστήρας με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη οδηγεί σε λιπιδικό περιεχόμενο που κυμαίνεται στα 36,5-43,6%. [26] Συγκρίνοντας τους δύο βιοαντιδραστήρες, παρατηρείται ότι το οξικό οξύ οδηγεί σε κοντινό λιπιδικό ποσοστό με το αντίστοιχο της γλυκόζης, ενώ αποτελεί μια πιο φτηνή πηγή άνθρακα από την γλυκόζη. Το οξικό οξύ αποτελεί παραπροϊόν της πετροχημικής βιομηχανίας και των ζυμώσεων αποβλήτων. Τέλος, υψηλότερο ποσοστό DHA επί των ολικών λιπαρών που παράγονται από το μικροφύκος παρατηρείται στις 144 h και είναι 33,3%. Με εξαίρεση την τιμή του DHA στις 48 h που είναι εσφαλμένη, το ποσοστό του DHA αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα μέχρι τις 144 h. Μετά από την ώρα αυτή παρατηρείται μια μικρή μείωση του ποσοστού αυτού. Αυτή η μικρή μείωση μπορεί να οφείλεται στην κατανάλωση των ω-3 λιπαρών οξέων από το ίδιο το μικροφύκος. Βέβαια, μετά τις 144 h παρατηρείται στο μικροσκόπιο διάρρηξη ορισμένων κυττάρων της καλλιέργειας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να απελευθερώνονται στο υγρό του βιοαντιδραστήρα τα εσωκυτταρικά οργάνια, καθώς και πρωτεΐνες, προκαλώντας μια μικρή αύξηση της συγκέντρωσης του αζώτου στον βιοαντιδραστήρα. Καθώς επομένως αυξάνεται σε μικρό βαθμό το διαθέσιμο άζωτο, επηρεάζονται οι συνθήκες στέρισης αζώτου που επικρατούσαν έως τότε στον βιοαντιδραστήρα και τα κύτταρα που δεν έχουν υποστεί διάρρηξη μεταβάλλουν το μεταβολισμό τους που αφορά τη λιπιδική σύνθεση ελαττώνοντας την παραγωγή του ω-3 λιπαρού οξέος DHA.[54]

Ο επόμενος βιοαντιδραστήρας που μελετήθηκε είχε ως πηγή άνθρακα στην τροφοδοσία το προπιονικό οξύ. Πέρα από το προπιονικό οξύ που προστίθεται για την ρύθμιση του pH αποτελώντας ταυτόχρονα πηγή άνθρακα για τα κύτταρα, στο θρεπτικό μέσο του βιοαντιδραστήρα έχει προστεθεί και οξικό νάτριο σε τελική συγκέντρωση 13,5 g/L. Όπως γίνεται αντιληπτό από το διάγραμμα 46 το μικροφύκος αρχικά καταναλώνει το οξικό, του οποίου η συγκέντρωση ελαττώνεται συνεχώς μέχρι να μηδενιστεί μετά τις 100 h λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα. Ταυτόχρονα, η συγκέντρωση του προπιονικού οξέος στην καλλιέργεια συνεχώς αυξάνεται, καθώς δεν καταναλώνεται από το μικροφύκος. Η τιμή της συγκέντρωσης αρχίζει να ελαττώνεται μετά τις 100 h, όπου τα κύτταρα αρχίζουν να καταναλώνουν το προπιονικό για την περαιτέρω ανάπτυξή τους. Η ύπαρξη του οξικού που αφομοιώνεται ευκολότερα από τα κύτταρα βοηθά στην αρχή της

ανάπτυξης της καλλιέργειας και στην ευκολότερη προσαρμογή του μικροφύκου από πηγή άνθρακα τη γλυκόζη στις προκαλλιέργειες, σε ένα οργανικό οξύ όπως το προπιονικό. Είναι, λοιπόν, εμφανής η επιλογή του μικροφύκου προς την πηγή άνθρακα οξικό νάτριο. Όσον αφορά την απόδοση της ξηρής βιομάζας όπως υπολογίζεται από τα δείγματα που λαμβάνονται καθημερινά, είναι εμφανές ότι ακολουθεί μια ανοδική πορεία φτάνοντας την μέγιστη τιμή των 14,4 mg/mL στις 168 h. Η προσθήκη του προπιονικού οξέος δεν παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μικροφύκου, σε αντίθεση με τις batch, καθώς γίνεται σταδιακά.

Σε αντίθεση με την απόδοση ξηρής βιομάζας το λιπιδικό περιεχόμενο των κυττάρων δεν ακολουθεί τόσο ξεκάθαρη πορεία. Συγκεκριμένα, μεγαλύτερο ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας εμφανίζεται στις 168 h λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα και υπολογίζεται στο 34,1%. Τέλος, παρατηρώντας το διάγραμμα 49 του προφίλ λιπαρών οξέων για τον βιοαντιδραστήρα προπιονικού οξέος παρουσιάζεται αύξηση του ποσοστού DHA μέχρι τις 96 h, στην οποία παράγεται το μεγαλύτερο ποσοστό DHA στα κύτταρα. Έπειτα από τα 35,8% DHA (96 h) υπάρχει μια μικρή μείωση της τιμής του και σταθεροποίηση του μέχρι το τέλος λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα. Σημειώνεται ότι η τιμή του DHA στις πρώτες 24 h είναι πολύ υψηλή και λανθασμένη, καθώς είναι μικρή η ποσότητα βιομάζας που έχει παραχθεί μέχρι εκείνη την χρονική στιγμή στον βιοαντιδραστήρα. Επομένως, η χρονική στιγμή με μέγιστη τιμή απόδοσης βιομάζας και ποσοστού λιπαρών οξέων δεν συνάδει στην περίπτωση του προπιονικού με το μεγαλύτερο ποσοστό DHA.

Η τελευταία καθαρή πηγή άνθρακα που εξετάστηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι το βουτυρικό οξύ. Όπως γίνεται αντιληπτό από το διάγραμμα 42 το μικροφύκος αρχικά καταναλώνει το οξικό, του οποίου η συγκέντρωση ελαττώνεται συνεχώς μέχρι να μηδενιστεί μετά τις 90h λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα. Όσον αφορά το βουτυρικό οξύ, αρχικά προστίθεται στην καλλιέργεια με σκοπό την ρύθμιση του pH και, καθώς δεν καταναλώνεται από τα μικροφύκη, η συγκέντρωσή του συνεχώς αυξάνεται. Μετά την εξάλειψη του οξικού από το θρεπτικό τα κύτταρα του μικροφύκου αρχίζουν να καταναλώνουν το βουτυρικό. Η συγκέντρωση του διατηρείται σε σχεδόν σταθερή τιμή, καθώς ποσότητα προστίθεται από την τροφοδοσία και ταυτόχρονα ποσότητα αφομοιώνεται για την ανάπτυξη της καλλιέργειας. Συμπερασματικά, το μικροφύκος *C.cohnii* δύναται να καταναλώσει το βουτυρικό οξύ, όμως δείχνει προτίμηση στο οξικό οξύ όταν είναι και τα δύο παρόντα. Όπως συμβαίνει και με τους βιοαντιδραστήρες των υπόλοιπων καθαρών πηγών άνθρακα που εξετάστηκαν, η απόδοση ξηρής βιομάζας για τον βιοαντιδραστήρα βουτυρικού οξέος παρουσιάζει σχετικά ανοδική τάση με την πάροδο του χρόνου λειτουργίας του. Η υψηλότερη τιμή της απόδοσης βιομάζας υπολογίζεται στα 11,13 mg/mL στις 192 h.

Πέρα από την απόδοση σε βιομάζα του βιοαντιδραστήρα εξετάζεται το λιπιδικό περιεχόμενο των κυττάρων. Το ποσοστό των ολικών λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας αυξάνεται με την αύξηση των ωρών λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα. Εξάριση αποτελεί το δείγμα στις 120 h, το οποίο όμως εμφανίζει μεγάλη τυπική απόκλιση. Μέγιστο ποσοστό ολικών λιπαρών παράγεται στις 192 h και υπολογίζεται στο 31,2%. Εστιάζοντας στο DHA, σύμφωνα με το διάγραμμα 45, το ποσοστό του επί των ολικών λιπαρών που παράγονται από τα κύτταρα αρχικά αυξάνεται φτάνοντας την μέγιστη τιμή του, 31,2% στις 72 h ώρες λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα. Μετά από αυτή την τιμή

παρουσιάζεται μια σταδιακή μείωση μέχρι την σταθεροποίηση της τιμής του DHA μετά τις 144 h.

Συγκρίνοντας τους βιοαντιδραστήρες που έχουν καθαρές πηγές άνθρακα για τροφοδοσία της καλλιέργειας, το οξικό οξύ παρουσιάζεται ως η προτιμότερη επιλογή. Συγκεκριμένα, στους βιοαντιδραστήρες του βουτυρικού και προπιονικού οξέος που περιέχουν οξικό νάτριο στο θρεπτικό τους μέσο, παρατηρείται ότι τα κύτταρα προτιμούν να καταναλώσουν πρώτα το οξικό και μετέπειτα στρέφονται προς τις άλλες πηγές άνθρακα. Αυτή η επιλογή είναι εύλογη, καθώς το οξικό οξύ αποτελεί ένα πιο απλό δομικά μόριο σε σχέση με τα άλλα, απαιτώντας λιγότερη ενεργειακή συνεισφορά από το μικροφύκος για να το αποδομήσει κατά τα μεταβολικά του μονοπάτια. Η απόδοση ξηρής βιομάζας στο τέλος της λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα εμφανίζει υψηλότερη τιμή για το οξικό οξύ στα 22,14 mg/mL, ακολουθούμενη από το προπιονικό στα 14,37 mg/mL και το βουτυρικό στα 11,13 mg/mL. Όπως φαίνεται, η απόδοση σε βιομάζα αυξάνεται με την ελάττωση του μοριακού βάρους και της πολυπλοκότητας το μορίου που αποτελεί την πηγή άνθρακα. Το τελικό ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας εμφανίζει υψηλότερη τιμή για το οξικό στα 49,8%, ενώ για το προπιονικό και το βουτυρικό οι τιμές που προκύπτουν είναι κοντινές στα 34,1% και 31,2% αντίστοιχα. Τα λιπαρά οξέα που αναλύονται με την αέρια χρωματογραφία στα δείγματα των λιπαρών των βιοαντιδραστήρων είναι το μυριστικό οξύ C14:0, το παλμιτικό C16:0, το στεατικό C18:0, το ολεϊκό οξύ C18:1 και το εικοσιδιεξανοϊκό C22:6 (DHA). Από αυτά, τα λιπαρά οξέα με μικρότερη ανθρακική αλυσίδα δεν έχουν ιδιαίτερη θρεπτική αξία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοντίζελ. Αντίθετα, το DHA, που μελετάται στην παρούσα διπλωματική εργασία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο στην τροφή ζώων, εάν βέβαια εκχυλιστεί με άλλο διαλύτη και όχι με χλωροφόρμιο. Για το ποσοστό DHA συγκρίνονται οι μέγιστες τιμές για κάθε βιοαντιδραστήρα. Τα ποσοστά DHA επί των ολικών λιπαρών είναι πάνω από 30% για όλες τις πηγές άνθρακα με υψηλότερη τιμή να υπολογίζεται για το προπιονικό οξύ στα 35,8%. Μεγαλύτερη όμως παραγωγή DHA στον τελικό όγκο της καλλιέργειας υπολογίζεται για το οξικό οξύ στα 2,05 mg/mL, ενώ για το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ είναι 0,74 mg/mL και 0,28mg/mL. Επισημαίνεται ότι και για τα τρία οξέα το ποσοστό DHA ακολουθεί κοινή πορεία, με αρχική αύξηση της τιμής του, ακολουθούμενη από μεγιστοποίησής της και έπειτα από μικρή μείωση. Παρόλο που το οξικό οξύ σαν πηγή άνθρακα οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις βιομάζας και DHA, είναι σημαντικό ότι το μικροφύκος *Cryptocodinium cohnii* μπορεί να χρησιμοποιήσει ως πηγή άνθρακα και άλλα οργανικά οξέα που αποτελούν παραπροϊόντα της ζύμωσης αποβλήτων.

Μετά την μελέτη καθαρών πηγών πραγματοποιήθηκαν πειράματα με βιοαντιδραστήρες στους οποίους η τροφοδοσία αποτελείται από διάλυμα οργανικών οξέων και συγκεκριμένα του οξικού, βουτυρικού, προπιονικού, βαλερικού και καπροϊκού οξέος. Κατά τα πειράματα, τέθηκαν σε λειτουργία δύο βιοαντιδραστήρες, ο ένας με συνθετικό διάλυμα οξέων και ο άλλος με διήθημα υγρού κλάσματος ζύμωσης αποβλήτου VGF. Και στα δύο πειράματα διατηρήθηκαν κοινοί οι παράγοντες της θερμοκρασίας, στους 27 °C, της πηγής αζώτου, yeast extract, και των πηγών άνθρακα τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά.

Αρχικά, μελετάται ο βιοαντιδραστήρας με συνθετικό διάλυμα οξέων. Όπως παρουσιάζεται και στο διάγραμμα 54 το βουτυρικό και το προπιονικό οξύ που προστίθενται εμφανίζουν πολύ

χαμηλές τιμές συγκέντρωσης στην ανάλυση HPLC, καθώς βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση στο διάλυμα τροφοδοσίας, 3,5 και 2,7 g/L αντίστοιχα. Η συγκέντρωσή τους στο υγρό του βιοαντιδραστήρα μειώνεται ακόμη περισσότερο με την συνεχή προσθήκη του διαλύματος τροφοδοσίας για την ρύθμιση του pH. Το οξικό οξύ προστίθεται και αυτό σε μικρή συγκέντρωση στον βιοαντιδραστήρα. Πρέπει να σημειωθεί ότι το θρεπτικό μέσο του βιοαντιδραστήρα μετά τον εμβολιασμό του περιλαμβάνει οξικό νάτριο σε συγκέντρωση 13,5 g/L. Η μείωση του οξικού οξέος είναι απότομη φτάνοντας τις πρώτες ώρες λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση. Το βαλερικό και το καπροϊκό οξύ δεν εμφανίζουν κορυφές κατά την ανάλυση με HPLC. Η συγκέντρωσή τους στον βιοαντιδραστήρα βρίσκεται εκτός των ορίων ευαισθησίας του οργάνου, λόγω της πολύ χαμηλής τους τιμής. Όσον αφορά τη απόδοση ξηρής βιομάζας μεγαλύτερη τιμή παρατηρείται στις 36 με 48 h λειτουργίας που κυμαίνεται γύρω στα 3 mg/mL. Το δείγμα που λήφθηκε στις 60 h είναι πιθανότητα εσφαλμένο λόγω κακής δειγματοληψίας, καθώς η απόδοση βιομάζας εμφάνισε έντονη μείωση. Σημειώνεται ότι, καθώς η συγκέντρωση των οξέων στην τροφοδοσία ήταν μικρή, γινόταν συνεχώς προσθήκη όγκου αυξάνοντας την αραιώση στο εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι τιμές της απόδοσης βιομάζας των δειγμάτων να μην είναι απόλυτα αντιπροσωπευτικές. Για το ποσοστό των ολικών λιπαρών χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα στις 36, 42 και 48 h και η τελική βιομάζα του βιοαντιδραστήρα στο τέλος λειτουργίας του, 60 h, καθώς τα υπόλοιπα δείγματα αντιστοιχούσαν σε μικρή απόδοση βιομάζας και δεν ήταν δυνατή η επανάληψή τους. Πιθανές αποκλίσεις και εσφαλμένα δείγματα οφείλονται και στην μικρή ποσότητα βιομάζας που παράχθηκε στον βιοαντιδραστήρα στις αντίστοιχες ώρες δειγματοληψίας. Από το διάγραμμα 52 υψηλότερο ποσοστό λιπαρών υπολογίζεται για τις 60 h στα 21,7%. Όσον αφορά το ποσοστό του DHA επί των ολικών λιπαρών οξέων που παρήχθησαν υψηλότερη τιμή έχει στις 42 h με 11,2%.

Ο βιοαντιδραστήρας με διήθημα υγρού κλάσματος ζύμωσης αποβλήτου VGF εξετάζεται στις ίδιες συνθήκες με το συνθετικό διάλυμα. Σύμφωνα με το διάγραμμα 54 το βουτυρικό και το προπιονικό οξύ παρουσιάζουν σχεδόν μηδενικές τιμές συγκέντρωσης στην ανάλυση HPLC. Η μείωση του οξικού οξέος είναι απότομη φτάνοντας τις πρώτες ώρες λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση και στη συνέχεια μηδενίζεται και αυτό. Το βαλερικό και το καπροϊκό οξύ δεν εμφανίζουν κορυφές κατά την ανάλυση με HPLC, καθώς βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στον βιοαντιδραστήρα και επηρεάζονται από την συνεχή αραιώση του υγρού του βιοαντιδραστήρα με την προσθήκη της τροφοδοσίας του διηθήματος. Η απόδοση ξηρής βιομάζας και κατ'επέκταση η ανάπτυξη των κυττάρων του μικροφύκου παρουσιάζει κοντινές τιμές για τις πρώτες 42 h λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα, καθώς το μικροφύκος προσαρμόζεται στις νέες συνθήκες καλλιέργειας. Αντίθετα, παρατηρείται απότομη αύξηση της τιμής της στις 48 και 60h με απόδοση βιομάζας 6,7 και 6,0 mg/mL. Για το ποσοστό των ολικών λιπαρών χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα στις 42, 48 και 60 h. Υψηλότερο ποσοστό λιπιδικού περιεχομένου επί της συνολικής ξηρής βιομάζας υπολογίζεται στις 60 h και είναι στο 24,5%. Τέλος, από το διάγραμμα 57 παρατηρείται ότι DHA αρχίζει να παράγεται μετά τις 42 h και η τιμή του ακολουθεί αυξητική πορεία. Μέγιστο ποσοστό DHA επί των ολικών λιπαρών που παράγονται από τα κύτταρα εμφανίζεται στις 60 h με τιμή 29,8%. Επομένως, το μικροφύκος δύναται να αναπτυχθεί και να παράξει τον επιθυμητό μεταβολίτη.

Συγκρίνοντας τους βιοαντιδραστήρες με διάλυμα διαφορετικών οργανικών οξέων ως πηγή άνθρακα είτε προερχόμενο από φυσική πηγή είτε παρασκευασμένο συνθετικά, παρατηρείται ότι τα κύτταρα αναπτύσσονται περισσότερο στην περίπτωση του διήθηματος. Συγκεκριμένα, η τελική απόδοση σε ξηρή βιομάζα κυττάρων είναι 6,03mg/mL για το διήθημα σε αντίθεση με 2,26 mg/mL για το συνθετικό διάλυμα οξέων. Όσον αφορά το ολικό λιπιδικό περιεχόμενο επί της ξηρής βιομάζας τα ποσοστά είναι κοντινά και για τους δύο βιοαντιδραστήρες με μεγαλύτερο του διηθήματος στα 24,6%. Καλύτερα αποτελέσματα παρουσιάζονται για το διήθημα και στην περίπτωση του ποσοστού DHA με τιμή 29,8% για το διήθημα έναντι 11,2% για το συνθετικό διάλυμα. Τέλος, η μέγιστη συγκέντρωση του παραγόμενου DHA είναι 0,44 mg/mL για το διήθημα και 0,04 mg/mL για το συνθετικό διάλυμα οξέων. Συνοψίζοντας, ανάμεσα στα δύο διαλύματα οξέων φυσικής και συνθετικής προέλευσης, καλύτερη επιλογή αποτελεί το διήθημα του υγρού κλάσματος από τη διεργασία ζύμωσης του αποβλήτου οδηγώντας σε υψηλότερη βιομάζα αλλά και μεγαλύτερη συγκέντρωση παραγόμενου DHA. Η μεγαλύτερη αυτή ανάπτυξη του μικροφύκου οφείλεται στην παρουσία και άλλου οργανικού φορτίου που υποβοηθά την περαιτέρω ανάπτυξη του στον συγκεκριμένο βιοαντιδραστήρα. Όπως επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια από τον οργανισμό Tecnia Research & Innovation, το διήθημα που χρησιμοποιήθηκε ως τροφοδοσία του βιοαντιδραστήρα περιελάμβανε εκτός από τα οργανικά οξέα, και άλλη πηγή άνθρακα με οργανικό φορτίο στα 5,76 g/L.

Πρέπει, βέβαια, να σημειωθεί ότι οι βιοαντιδραστήρες αυτοί μελετήθηκαν για πολύ λιγότερες ώρες σε σύγκριση με τους βιοαντιδραστήρες καθαρών πηγών. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις οξέων στο απόβλητο και στο συνθετικό διάλυμα οξέων δεν βοήθησαν στην ανάπτυξη υψηλής συγκέντρωσης βιομάζας. Απαραίτητο, λοιπόν, κρίνεται να συμπυκνωθεί το διήθημα αποβλήτου αυξάνοντας την συγκέντρωση των διαφορετικών πηγών άνθρακα. Τέλος, για όλους τους βιοαντιδραστήρες μελετήθηκε η συγκέντρωση του αζώτου κατά τις πρώτες ώρες λειτουργίας τους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου Kjeldahl, σε όλους τους βιοαντιδραστήρες παρατηρήθηκε έντονη μείωση της συγκέντρωσης αζώτου στις πρώτες 48 h. Επομένως, το μικροφύκος αναπτύσσεται κατά τη μεγαλύτερη διάρκεια λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα σε συνθήκες έλλειψης αζώτου.

2. ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ

Για την μελέτη της επίδρασης της πηγής αζώτου στην ανάπτυξη και την παραγωγή λιπαρών οξέων παρασκευάστηκαν καλλιέργειες *Cryptocodinium cohnii* και παρατηρήθηκε η ανάπτυξη των κυττάρων της καλλιέργειας με καθημερινά δείγματα. Οι πηγές αζώτου που μελετήθηκαν είναι το yeast extract, το NaNO_3 , το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, το NH_4NO_3 και η ουρία $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$. Κατά το πείραμα αυτό διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία επώασης στους 27 °C. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε είναι το οξικό οξύ σε συγκέντρωση 30 g/L γιατί εμφάνισε καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την ανάπτυξη και την παραγωγή σε λιπαρά σε σύγκριση με άλλες πηγές άνθρακα, όπως η γλυκόζη και τα άλλα οργανικά οξέα, τόσο στα πειράματα της παρούσας διπλωματικής όσο και στη βιβλιογραφία.[35], [55]

Σύμφωνα με το διάγραμμα 58, μικρότερη ανάπτυξη βιομάζας παρατηρείται στην καλλιέργεια με πηγή αζώτου το NaNO_3 . Για τις υπόλοιπες πηγές αζώτου που εξετάστηκαν ακολουθείται κοντινή πορεία όσον αφορά την τιμή των απορροφήσεων που μετρήθηκαν στο micropate. Μεγαλύτερος ρυθμός στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την ανάπτυξη της καλλιέργειας παρατηρείται όταν χρησιμοποιείται ως πηγή αζώτου το θειϊκό αμμώνιο. Αντίθετα, ο ρυθμός ανάπτυξης της καλλιέργειας με πηγή αζώτου το νιτρικό νάτριο είναι πολύ μικρός, σχεδόν μηδενικός, με αποτέλεσμα οι απορρόφησεις των δειγμάτων της καλλιέργειας να έχουν τιμές κάτω του 0,5.

Η τελική ανάπτυξη των καλλιεργειών, καθώς και το αντίκτυπο της επιλογής της πηγής αζώτου, αντικατοπτρίζεται από την απόδοση ξηρής βιομάζας στο τέλος της καλλιέργειας. Στο τέλος της καλλιέργειας του μικροφύκου για 168 h υπολογίζεται η απόδοση της ξηρής βιομάζας των κυττάρων. Μέγιστη τιμή απόδοσης βιομάζας κυττάρων εμφανίζεται στην περίπτωση χρήσης του θειϊκού αμμωνίου με τιμή 5,54 mg/mL. Κοντινές τιμές απόδοσης βιομάζας υπολογίζονται και για το νιτρικό αμμώνιο και την ουρία. Μικρότερη απόδοση βιομάζας με έντονη διαφορά έχει η καλλιέργεια του νιτρικού νατρίου στα 1,90 mg/mL. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το άζωτο είναι απαραίτητο συστατικό για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Η αυξημένη ποσότητα περιεχόμενου αζώτου στην καλλιέργεια θα συμβάλλει θετικά στην ανάπτυξη. Η μορφή του αζώτου μπορεί να επηρεάσει επίσης την ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, το αμμώνιο και ο δεσμός $\text{NH}_4\text{-N}$ είναι ο πιο εύκολος να αφομοιωθεί από τα μικροφύκη, όπως επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη. [29] Για αυτόν το λόγο, η τιμή της απόδοσης βιομάζας στην περίπτωση της καλλιέργειας NH_4NO_3 , το οποίο περιέχει ιόντα αμμωνιακά και νιτρικά, είναι μικρότερη σε σύγκριση με το θειϊκό αμμώνιο, του οποίου η πηγή αζώτου προέρχεται μόνο από ιόντα αμμωνίου.

Οι καλλιέργειες με διαφορετικές πηγές αζώτου στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης μελετήθηκαν όχι μόνο ως προς την απόδοση βιομάζας τους αλλά και ως προς την παραγωγή του βασικού μεταβολίτη του μικροφύκου, το οποίο είναι το εικοσιδιεξανοϊκό (DHA). Από το διάγραμμα 60 γίνεται αντιληπτό ότι οι καλλιέργειες με πηγή αζώτου το yeast extract και το νιτρικό νάτριο εμφανίζουν τα υψηλότερα ποσοστά λιπαρών με 38,5 και 33,2% αντίστοιχα. Σύμφωνα με την έρευνα των Safdar et al., οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση της μορφής του αζώτου στην παραγωγή λιπαρών οξέων σε καλλιέργειες με πηγή αζώτου τα NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ και NH_4HCO_3 , υψηλότερο ποσοστό ολικών λιπαρών παρουσιάζει η πηγή αζώτου νιτρικό νάτριο με τιμή 26,9% επί της ξηρής βιομάζας. [30] Βέβαια, οι καλλιέργειες στην βιβλιογραφία μεγαλώνουν με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και όχι το οξικό οξύ, όπως συμβαίνει στην παρούσα διπλωματική

εργασία. Πρέπει να σημειωθεί ότι, ενώ οι καλλιέργειες με yeast extract και νιτρικό νάτριο δεν είχαν την μεγαλύτερη απόδοση βιομάζας, εμφανίζουν το υψηλότερο ποσοστό ολικών λιπαρών επί τη ξηρής βιομάζας. Στην περίπτωση του νιτρικού νατρίου αυτό γίνεται καθώς η χρήση της συγκεκριμένης πηγής αζώτου δυσχεραίνει την αφομοίωση του αζώτου και την έντονη ανάπτυξη του μικροφύκου. Οι συνθήκες ανάπτυξης μειωμένου αζώτου οδηγούν σε συνθήκες stress τα κύτταρα αυξάνοντας την παραγωγή των λιπαρών. Πιθανή είναι βέβαια και η ύπαρξη πειραματικού σφάλματος λόγω της μικρής ποσότητας βιομάζας που παράχθηκε. Όσον αφορά το ποσοστό του DHA επί των ολικών λιπαρών, οι τιμές του κυμαίνονται σε κοντινά επίπεδα για τις διαφορετικές πηγές αζώτου με υψηλότερα τα ποσοστά για το yeast extract και το νιτρικό νάτριο στα 31,5 και 30,5% αντίστοιχα. Μικρότερο ποσοστό επί των ολικών λιπαρών υπολογίζεται για το θειικό αμμώνιο, το οποίο καθώς αφομοιώνεται ευκολότερα από τα κύτταρα της καλλιέργειας δεν οδηγεί το μικροφύκος σε συνθήκες stress ώστε να παρατηρηθεί συσσώρευση λίπους.

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις DHA στις καλλιέργειες διαφορετικών πηγών αζώτου από τον πίνακα 14 προκύπτει ότι η υψηλότερη συγκέντρωση DHA αντιστοιχεί στο yeast extract με 0,51mg/mL. Υψηλές συγκεντρώσεις, με μικρή απόκλιση από το yeast extract, εμφανίζουν το θειικό αμμώνιο και η ουρία με 0,46 mg/mL DHA. Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε αντίθεση με την έρευνα των Safdar et al., οι οποίοι υπολόγισαν υψηλότερη συγκέντρωση DHA, 0,99 mg/mL, για την καλλιέργεια με πηγή αζώτου το νιτρικό νάτριο.

Πρέπει να σημειωθεί ότι πέρα από το yeast extract που είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο ως πηγή αζώτου σε ένα θρεπτικό μέσο, μπορεί να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά το θειικό αμμώνιο και η ουρία. Οι δύο αυτές πηγές αζώτου εμφανίζουν την υψηλότερη απόδοση βιομάζας, υψηλά ποσοστά ολικών λιπαρών και την υψηλότερη συγκέντρωση DHA σε σύγκριση με το νιτρικό νάτριο και το νιτρικό αμμώνιο. Συνοψίζοντας, καθώς υπάρχουν εναλλακτικές πηγές αζώτου που οδηγούν σε κοντινά επίπεδα παραγωγής DHA με το yeast extract, η επιλογή της πηγής αζώτου που θα χρησιμοποιηθεί μπορεί να γίνει και με άλλα κριτήρια, όπως το κόστος και η διαθεσιμότητά της.

3. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ

Για την βελτιστοποίηση της ανάπτυξης καλλιέργειας του μικροφύκου *Cryptocodinium cohnii* μελετήθηκε ο παράγοντας της θερμοκρασίας ανάπτυξης. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για το συγκεκριμένο μικροφύκος είναι οι 27 °C.[24] Η βέλτιστη θερμοκρασία για το μικροφύκος μπορεί να ενισχύσει την δραστηριότητα των ενζύμων και να ελαττώσει τις απαιτήσεις ενέργειας. Οι θερμοκρασίες που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν 25, 27 και 29 °C. Σε όλες τις καλλιέργειες η πηγή άνθρακα ήταν το οξικό νάτριο σε συγκέντρωση 30 g/L και πηγή αζώτου το yeast extract. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε είναι το οξικό οξύ γιατί εμφάνισε καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την ανάπτυξη και την παραγωγή σε λιπαρά σε σύγκριση με άλλες πηγές άνθρακα, όπως η γλυκόζη και τα άλλα οργανικά οξέα, τόσο στα πειράματα της παρούσας διπλωματικής όσο και στη βιβλιογραφία.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 62 που παρουσιάζει τις τιμές της απορρόφησης στα 685 nm κατά την πορεία ανάπτυξης των κυττάρων του μικροφύκου, οι τρεις καλλιέργειες δεν εμφανίζουν μεγάλη απόκλιση στις τιμές της απορρόφησης και κατ' επέκταση στην ανάπτυξή τους σε μια συγκεκριμένη στιγμή δειγματοληψίας για το θερμοκρασιακό εύρος που μελετήθηκε. Και στις τρεις περιπτώσεις θερμοκρασίας, παρατηρείται η φάση υστέρησης τις πρώτες 24 h, που ακολουθείται έπειτα από την εκθετική φάση ανάπτυξης, σύμφωνα με το πρότυπο ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Στο τέλος της καλλιέργειας του μικροφύκου για 168 h υπολογίζεται η απόδοση της ξηρής βιομάζας των κυττάρων και προκύπτει ότι κυμαίνεται στα 5 mg/mL και για τις τρεις θερμοκρασίες με ελαφρώς μεγαλύτερη αυτή στους 27 °C. Το γεγονός ότι οι τελικές αποδόσεις βιομάζας δεν εμφάνισαν έντονες διακυμάνσεις δείχνει ότι το μικροφύκος *C.cohnii* δεν είναι τόσο ευαίσθητο σε μεταβολές θερμοκρασίας με μικρή απόκλιση από την βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξή του. Απαραίτητη κρίνεται η μελέτη της ανάπτυξης του μικροφύκου σε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών για να εξακριβωθούν τα θερμοκρασιακά όρια ανάπτυξης του που οδηγούν το μικροφύκος σε συνθήκες stress. Βέβαια, πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν μελέτες σύμφωνα με την βιβλιογραφία κατά τις οποίες το εύρος ανάπτυξης του *C.cohnii* είναι μεγάλο και κυμαίνεται από 15 έως 34 °C.[56]

Οι καλλιέργειες με διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης μελετήθηκαν όχι μόνο ως προς την αποδόση βιομάζας τους αλλά και ως προς την ποσότητα παραγωγής του χρησιμότερου μεταβολίτη του μικροφύκου, το οποίο είναι το εικοσιδιεξανοϊκό (DHA). Από το διάγραμμα 64 είναι εμφανής η διαφοροποίηση του ποσοστού των ολικών λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας της καλλιέργειας. Μεγαλύτερο ποσοστό λιπαρών υπολογίζεται για την καλλιέργεια των 27 °C, στην οποία αντιστοιχεί και η μέγιστη απόδοση βιομάζας, με τιμή στα 17% επί της ξηρής βιομάζας. Όσον αφορά το DHA, που είναι και ο επιθυμητός μεταβολίτης που μελετάται, το ποσοστό του DHA επί των συνολικών λιπαρών έχει κοντινές τιμές και στις τρεις καλλιέργειες με μεγαλύτερη τιμή στους 29 °C. Η τιμή του DHA στην καλλιέργεια με θερμοκρασία ανάπτυξης τους 29 °C είναι 38,56%. Για να επιλεχθεί, όμως, η καλλιέργεια που οδήγησε στην υψηλότερη παραγωγή DHA πρέπει να αναχθεί η τιμή του από ποσοστό των ολικών λιπαρών σε συγκέντρωση στον τελικό όγκο της καλλιέργειας.

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις DHA από τον πίνακα 16 προκύπτει ότι υψηλότερη συγκέντρωση υπολογίζεται για την καλλιέργεια με θερμοκρασία ανάπτυξης τους 27 °C σε 0,30 mg/mL. Συνοψίζοντας, για το συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών ανάπτυξης βέλτιστη θερμοκρασία για μεγαλύτερη απόδοση ξηρής βιομάζας αλλά και DHA αποτελούν οι 27 °C. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το επίπεδο της ακορεστότητας στα λιπαρά οξέα αυξάνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ τα κορεσμένα λιπαρά οξέα παρατηρούνται σε μεγαλύτερη ποσότητα σε υψηλές θερμοκρασίες.[23] Αυτό δεν είναι εμφανές στα αποτελέσματα των καλλιεργειών, καθώς το θερμοκρασιακό εύρος που μελετήθηκε ήταν μικρό. Επομένως, είναι απαραίτητη η μελέτη μεγαλύτερου εύρους θερμοκρασίας για το συγκεκριμένο φύκος προκειμένου να είναι εμφανής η μεταβολή του επιπέδου ακορεστότητας.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΣΥΖΗΤΗΣΕΙΣ

Όσον αφορά την ανάπτυξη του μικροφύκου *Cryptocodium cohnii* και την παραγωγή του εικοσιδιεξανοϊκού (DHA) προτείνεται να γίνουν έρευνες για τα παρακάτω:

- Το απόβλητο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία αποτελούταν από απόβλητα κήπου και τροφίμων (VGF). Για την περαιτέρω μελέτη ενός βιοαντιδραστήρα του μικροφύκου με πηγή άνθρακα το διήθημα από το συγκεκριμένο απόβλητο, κρίνεται απαραίτητη η συμπύκνωσή του. Αύξηση της συγκέντρωσης των πτητικών οργανικών οξέων που απαντώνται στο διήθημα θα οδηγήσει σε υψηλότερες αποδόσεις βιομάζας και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής του βιοαντιδραστήρα.
- Σαν εναλλακτική για το απόβλητο που χρησιμοποιήθηκε μπορούν να γίνουν δοκιμές με άλλα είδη αποβλήτων. Τα ρεύματα αποβλήτων που είναι κατάλληλα για την παραγωγή πτητικών οργανικών οξέων (VFAs) μέσα από την διεργασία της σκοτεινής ζύμωσης (dark fermentation) πρέπει να έχουν υψηλό οργανικό φορτίο. Τέτοια ρεύματα αποβλήτων είναι οι διάφοροι τύποι ιλύος και τα απόβλητα από αγροτικές βιομηχανίες και βιομηχανίες χάρτου. Σημαντική είναι η μελέτη βιομηχανικών αποβλήτων από κλάδους που δραστηριοποιούνται στον ελληνικό χώρο. Επιπρόσθετα, μεταβάλλοντας τα ποσοστά από διαφορετικά απόβλητα που χρησιμοποιούνται στην τροφοδοσία της ζύμωσης μπορεί να μελετηθεί η μεταβολή της παραγωγής VFAs. [57]
- Όσον αφορά τη διεργασία της ζύμωσης, η 'σκοτεινή ζύμωση' μπορεί να αντικατασταθεί με την οξεογόνο ζύμωση (acidogenic fermentation). Κατά το είδος αυτό της ζύμωσης, το υδρογόνο που παράγεται μετατρέπεται από βακτήρια, όπως το *Clostridium aceticum*, σε οξικό μεγιστοποιώντας την παραγωγή των VFAs.[33]
- Για την παραγωγή DHA από το μικροφύκος *C.cohnii* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα γλυκόζη και ξυλόζη από υδρολυμένη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα.
- Για την επιλογή της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης του μικροφύκου τόσο με κριτήριο την παραγωγή βιομάζας όσο και την παραγωγή DHA, πρέπει να πραγματοποιηθούν πειράματα σε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών επώασης.
- Στο βιοαντιδραστήρα fed-batch μπορεί να μελετηθεί η μεταβολή των παραγόντων ανάπτυξης του μικροφύκου, όπως είναι η θερμοκρασία και η πηγή αζώτου. Μια καλλιέργεια δύο σταδίων θα οδηγήσει σε αρχική αύξηση της απόδοσης σε βιομάζα και μετέπειτα η μεταβολή της θερμοκρασίας ή της συγκέντρωσης της πηγής αζώτου θα προκαλέσουν συνθήκες stress με υψηλότερη παραγωγή των ω-3 λιπαρών.
- Απαραίτητος είναι ο έλεγχος συγκεντρώσεων των πηγών αζώτου αμμώνιο και ουρία, για την βέλτιστη ανάπτυξη του στελέχους αλλά και τη βέλτιστη παραγωγή DHA.
- Η εκχύλιση των λιπαρών οξέων και η απομόνωσή τους από τα κύτταρα πρέπει να γίνει με διαφορετικούς διαλύτες αντί για χλωροφόρμιο, ώστε να είναι κατάλληλα για τη χρήση τους ως πρόσθετα στην τροφή των ζώων εισάγοντάς τα στην τροφική αλυσίδα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] T. Matsunaga and T. Hideki, "Marine Microalgae," no. August, pp. 165–188, 2005.
- [2] K. H. M. Cardozo, T. Guaratini, M. P. Barros, V. R. Falcão, A. P. Tonon, N. P. Lopes, S. Campos, M. A. Torres, A. O. Souza, P. Colepicolo, and E. Pinto, "Metabolites from algae with economical impact," vol. 146, pp. 60–78, 2007.
- [3] T. A. Norton, M. Melkonian, and R. A. Andersen, "Algal biodiversity," vol. 35, pp. 308–326, 1996.
- [4] S. Kim, *HANDBOOK OF MARINE MICROALGAE*. 2015.
- [5] Y. Bhaud and J. Salmon, "The complex cell cycle of the dinoflagellate protoctist *Cryptocodinium cohnii* as studied in vivo and by cytofluorimetry," *Cell Sci.*, 1991.
- [6] D. A. Prabowo, O. Hiraishi, and S. Suda, "DIVERSITY OF *Cryptocodinium* spp . (DINOPHYCEAE) FROM OKINAWA PREFECTURE, JAPAN," vol. 21, pp. 181–191, 2013.
- [7] G. A. Thompson, "Lipids and membrane function in green algae," *Biochim. Biophys.*, vol. 1302, pp. 18–42, 1996.
- [8] Moghis U. Ahmad, Ed., *FATTY ACIDS Chemistry, Synthesis and Applications*. 2017.
- [9] O. P. Ward and A. Singh, "Omega-3 / 6 fatty acids : Alternative sources of production," *Process Biochem.*, vol. 40, pp. 3627–3652, 2005.
- [10] P. M. Kris-etherton, W. S. Harris, and L. J. Appel, "Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease," pp. 2747–2757, 2012.
- [11] C. H. Jakobsen, G. L. Størvold, H. Bremseth, T. Follestad, K. Sand, M. Mack, K. S. Olsen, A. G. Lundemo, J. G. Iversen, H. E. Krokan, and S. A. Schønberg, "DHA induces ER stress and growth arrest in human colon cancer cells : associations with cholesterol and calcium homeostasis," *J. Lipid Res.*, vol. 49, 2008.
- [12] G. Y. Sun, A. Simonyi, K. L. Fritsche, D. Y. Chuang, M. Hannink, Z. Gu, M. Greenlief, J. K. Yao, J. C. Lee, and D. Q. Beversdorf, "Docosahexaenoic acid (DHA): an essential nutrient and a nutraceutical for brain health and diseases," *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*, 2017.
- [13] E. B. Press, "PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE FATTY ACID SYNTHETASE COMPLEX FROM *CRYPTHOCODINIUM COHNII*," *Biochim. Biophys.*, vol. 712, pp. 523–534, 1982.
- [14] S. P. Cuellar-bermudez, I. Aguilar-hernandez, D. L. Cardenas-chavez, N. Ornelas-soto, M. A. Romero-ogawa, and N. Leon, "Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae : essential lipids , astaxanthin and phycobiliproteins," *Microb. Biotechnol.*, pp. 190–209, 2015.
- [15] I. A. Guschina and J. L. Harwood, "Progress in Lipid Research Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae," *Prog. Lipid Res.*, vol. 45, pp. 160–186, 2006.
- [16] X. Qiu, "Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7,10,13,16,19): two distinct pathways Xiao," *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 68, pp. 181–186, 2003.
- [17] I. L. Pepper, C. P. Gerba, and T. J. Gentry, *Introduction to Environmental Microbiology*. 2015.
- [18] C. Baroukh, V. Turon, and O. Bernard, "Dynamic metabolic modeling of heterotrophic and mixotrophic microalgal growth on fermentative wastes," *Comput. Biol.*, pp. 1–18, 2017.
- [19] R. A. Andersen, Ed., *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, 2005.

- [20] O. Perez-garcia and Y. Bashan, *Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics*. Auckland, New Zealand, 2015.
- [21] T. WATANABE, C. KITAJIMA, and S. FUJITA, “Nutritional values of live organisms mass propagation of fish: a review used in japan for,” vol. 34, pp. 115–143, 1983.
- [22] A. Converti, A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego, and M. Del Borghi, “Process Intensification Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production,” *Chem. Eng. Process.*, vol. 48, pp. 1146–1151, 2009.
- [23] 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.
- [24] Y. Ishida, “Physiological Studies on Evolution of Dimethyl Sulfide from Unicellular Marine Algae,” 1972.
- [25] W. H. Thomas and C. H. Gibson, “Effects of small-scale turbulence on microalgae,” no. August 1989, pp. 71–77, 1990.
- [26] M. E. De Swaaf, T. C. De de Rijk, G. Eggink, and L. Sijtsma, “Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*,” *J. Biotechnol.*, vol. 70, pp. 185–192, 1999.
- [27] G. Pei, X. Li, L. Liu, J. Liu, and F. Wang, “De novo transcriptomic and metabolomic analysis of docosahexaenoic acid (DHA) -producing *Cryptocodinium cohnii* during fed-batch fermentation,” *Algal Res.*, no. July, 2017.
- [28] Y. Jiang and F. Chen, “Effects of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptocodinium cohnii*,” *Process Biochem.*, vol. 35, pp. 1205–1209, 2000.
- [29] T. Ren, “Primary Factors Affecting Growth of Microalgae Optimal Light Exposure Duration and Frequency,” Iowa State University, 2014.
- [30] W. Safdar, M. Shamoan, X. Zan, J. Haider, H. R. Sharif, M. Shoaib, and Y. Song, “Growth kinetics, fatty acid composition and metabolic activity changes of *Cryptocodinium cohnii* under different nitrogen source and concentration,” *AMB Express*, 2017.
- [31] G. Strazzera, F. Battista, N. H. Garcia, N. Frison, and D. Bolzonella, “Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review,” *J. Environ. Manage.*, vol. 226, no. May, pp. 278–288, 2018.
- [32] “PubChem OPEN CHEMISTRY DATABASE.”
- [33] V. Turon, E. Trably, E. Fouilland, and J. Steyer, “Potentialities of dark fermentation effluent as substrates for microalgae growth: A review,” *Process Biochem.*, 2016.
- [34] A. Chalima, L. Oliver, L. Fern, A. Karnaouri, T. Dietrich, and E. Topakas, “Utilization of Volatile Fatty Acids from Microalgae for the Production of High Added Value Compounds,” *Fermentation*, pp. 1–17, 2017.
- [35] L. Sijtsma, A. J. Anderson, and C. Ratledge, “Alternative Carbon Sources for Heterotrophic Production of Docosahexaenoic Acid by the Marine Alga,” pp. 131–149, 2001.
- [36] Γ. ΛΥΜΠΕΡΑΤΟΣ and Σ. ΠΑΥΛΟΥ, *ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ*, 1η ΕΚΔΟΣΗ. ΤΖΙΟΛΑΣ, 2010.

- [37] L. Barsanti and P. Gualtieri, “Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable?,” *Algal Res.*, vol. 31, no. October 2017, pp. 107–115, 2018.
- [38] M. Chauton, M. S. Chauton, K. Inge, N. Henrik, R. Tveterås, and H. T. Kleivdal, “A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: Research challenges and possibilities A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source,” *Aquaculture*, no. November, 2017.
- [39] V. V. Af, G. R. Ifeu, H. K. Ifeu, T. F. Göttingen, S. Natex, M. Stehr, I. O. I. Oleo, S. Reyer, and I. O. I. Oleo, “Socio-economic assessment of Algae-based PUFA production Socio-economic assessment of Algae-based PUFA production Contents,” no. 613303, 2017.
- [40] “ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ,” *ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΕΜΠ*, 2013.
- [41] 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.
- [42] C. Ratledge, K. Kanagachandran, A. J. Anderson, D. J. Grantham, and J. C. Stephenson, “Production of Docosahexaenoic Acid by *Cryptocodinium cohnii* Grown in a pH-Auxostat Culture with Acetic Acid as Principal Carbon Source,” *Lipids*, vol. 36, no. 11, pp. 7–12, 2001.
- [43] E. G. Bligh and W. . Dyer, “A rapid method for total lipid extraction and purification,” *J. Biochem. Physiol.*, vol. 2, p. 1959, 1959.
- [44] 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.
- [45] Α. Παππά, *ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ*. ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ, 2004.
- [46] “NREL, Laboratory analytical procedure (LAP),” 2004. [Online]. Available: http://www.nrel.gov/biomass/%0Aanalytical_procedures.html.
- [47] R. Article, A. Sunil, G. Anju, and V. Rajat, “HPLC Detectors , Their Types and Use : A Review,” vol. 6, no. 5, pp. 3–6, 2018.
- [48] P. Taylor and M. Swartz, “Journal of Liquid Chromatography & HPLC DETECTORS : A BRIEF REVIEW,” no. July 2012, pp. 37–41, 2010.
- [49] K. Eder, “Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters,” vol. 671, pp. 113–131, 1995.
- [50] E. D. Dodds, M. R. Mccoy, L. D. Rea, and J. M. Kennish, “Gas Chromatographic Quantification of Fatty Acid Methyl Esters : Flame Ionization Detection vs . Electron Impact Mass Spectrometry,” vol. 40, no. 4, pp. 419–428, 2005.
- [51] Μ. Οξενκιουν-Πετροπούλου, *ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ - ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ*, Γ’ ΕΚΔΟΣΗ. ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΣΥΜΜΕΤΡΙΑ, 2006.
- [52] P. Taylor, P. Sáez-plaza, T. Micha, M. J. Navas, A. García, and T. Michałowski, “Critical Reviews in Analytical Chemistry An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination . Part I . Early History , Chemistry of the Procedure , and Titrimetric Finish An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination . Part I . Ea,” no. July 2013, pp. 37–41.

- [53] D. Pleissner and N. T. Eriksen, "Effects of Phosphorous , Nitrogen , and Carbon Limitation on Biomass Composition in Batch and Continuous Flow Cultures of the Heterotrophic Dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*," *Biotechnol. Bioeng.*, pp. 1–12, 2012.
- [54] J. W. Allen, C. C. Dirusso, and P. N. Black, "Triacylglycerol synthesis during nitrogen stress involves the prokaryotic lipid synthesis pathway and acyl chain remodeling in the microalgae *Coccomyxa subellipsoidea*," *Algal Res.*, vol. 10, pp. 110–120, 2015.
- [55] D. Pleissner and N. T. Eriksen, "Effects of Phosphorous , Nitrogen , and Carbon Limitation on Biomass Composition in Batch and Continuous Flow Cultures of the Heterotrophic Dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. xxx, no. xxx, pp. 1–12, 2012.
- [56] A. Mendes, A. Reis, and R. Vasconcelos, "Cryptocodinium cohnii with emphasis on DHA production : a review," *J. Appl. Phycol.*, no. 21, pp. 199–214, 2009.
- [57] A. Zhou, Z. Guo, C. Yang, F. Kong, W. Liu, and A. Wang, "Volatile fatty acids productivity by anaerobic co-digesting waste activated sludge and corn straw : Effect of feedstock proportion," vol. 168, pp. 234–239, 2013.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ATCC

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα συστατικά του θρεπτικού μέσου ATCC 460, το οποίο χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια του μικροφύκου *Cryptocodinium cohnii*.

Πίνακας 17: Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας στελέχους *Cryptocodinium cohnii*

ATCC 460	
ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (/L)
NaCl	23,48 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	10,63 g
Na ₂ SO ₄	3,92 g
CaCl ₂ (anhydrous)	1,11 g
KCl	0,66 g
NaHCO ₃	0,19 g
KBr	0,1 g
H ₃ BO ₃	0,03 g
SrCl ₂ x 6H ₂ O	0,04 g
FeCl ₃ x 6H ₂ O	0,01 g
Na ₂ Glycerophosphate	0,15 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,05 g
Tris Buffer	3,0 g
K ₂ HPO ₄	0,01 g
Glucose	3,0 g
Glutamic acid	1,5 g
DI water	1000 mL
Metal mixture	3,0 mL
Vitamin solution	1,0 mL

Πίνακας 18: Θρεπτικό υλικό Metal Mixture

Metal Mixture	
ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (g/L)
Na ₂ EDTA	1,0
FeCl ₃ x 6H ₂ O	0,05
H ₃ BO ₃	1,0
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,15
ZnCl ₂	0,01
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,005
DI Water	100 mL

Πίνακας 19: Θρεπτικό υλικό Vitamin Solution

Vitamin Solution	
ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (g/L)
Biotin	0,003
Thiamine	1,0
DI Water	1000 mL

2. ΠΗΤΗΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ

Για κάθε ένα από τα πτητικά οργανικά οξέα, και συγκεκριμένα το οξικό, το βουτυρικό, το προπιονικό, το βαλερικό και το καπροϊκό οξύ, παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές αραιώσεις και κατασκευάζεται μια καμπύλη αναφοράς. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 20: Καμπύλες αναφοράς για τα πτητικά οργανικά οξέα VFAs

ΟΡΓΑΝΙΚΟ ΟΞΥ	ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ
ΟΞΙΚΟ	$[C_A] = 7 \cdot 10^{-6} \cdot [Area] \text{ με } R^2 = 0,9974$
ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ	$[C_B] = 5 \cdot 10^{-6} \cdot [Area] \text{ με } R^2 = 0,9984$
ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟ	$[C_P] = 6 \cdot 10^{-6} \cdot [Area] \text{ με } R^2 = 0,9894$
ΒΑΛΕΡΙΚΟ	$[C_V] = 2 \cdot 10^{-5} \cdot [Area] \text{ με } R^2 = 0,9989$
ΚΑΠΡΟΪΚΟ	$[C_C] = 7 \cdot 10^{-6} \cdot [Area] \text{ με } R^2 = 0,9936$

Σημειώνεται ότι οι συγκεντρώσεις των οργανικών οξέων υπολογίζονται σε mg/mL.

3. ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Για κάθε ένα από τα λιπαρά οξέα, και συγκεκριμένα τα C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 και το εικοσιδιεξανοϊκό (DHA) κατασκευάζεται μια καμπύλη αναφοράς με βάση τις μετρήσεις του συστήματος GC - MS. Σημειώνεται ότι οι συγκεντρώσεις των οργανικών οξέων υπολογίζονται σε mg/mL. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 21: Καμπύλες αναφοράς για τα λιπαρά οξέα

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ	ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ
C 14:0	$[C_{C14:0}] = 3 \cdot 10^{-6} \cdot [Area] \text{ με } R^2 = 0,9732$
C16:0	$[C_{C16:0}] = 4 \cdot 10^{-6} \cdot [Area] \text{ με } R^2 = 0,9947$
C18:0	$[C_{C18:0}] = 5 \cdot 10^{-6} \cdot [Area] \text{ με } R^2 = 0,9965$
C18:1	$[C_{C18:1}] = 3 \cdot 10^{-6} \cdot [Area] \text{ με } R^2 = 0,9883$
DHA	$[C_{DHA}] = 5 \cdot 10^{-6} \cdot [Area] \text{ με } R^2 = 0,9867$