



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

*Τομέας IV: Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών*

*Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας*

---

**Βελτιστοποίηση της παραγωγής δοκοσαεξαενοϊκού οξέος από το  
μικροφύκος *Cryptocodinium cohnii* με αξιοποίηση του υγρού  
κλάσματος σκοτεινής ζύμωσης βιοαποβλήτων**

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ευάγγελος Τόπακας

Συγγραφέας:

Ταξείδης Γεώργιος

**ΑΘΗΝΑ  
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2019**



## Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας θεώρησα απαραίτητο να ευχαριστήσω κάποιους πολύ σημαντικούς ανθρώπους, για την βοήθεια που μου προσέφεραν. Οι άνθρωποι αυτοί αποτέλεσαν την εναρκτήριο δύναμη για την διαδρομή που ακολούθησα και μου έδωσαν τις γνώσεις τους απλόχερα.

Αρχικά, ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στον επιβλέποντα καθηγητή, κύριο Ευάγγελο Τόπακα, ο οποίος με παρακίνησε να ασχοληθώ με ένα θέμα όπως τα μικροφύκη. Με την καθοδήγησή του, με ώθησε να ασχοληθώ με ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον αντικείμενο, που τα τελευταία χρόνια απασχολεί την επιστημονική κοινότητα και σχετίζεται με την αξιοποίηση βιοαποβλήτων και την μετατροπή τους σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Αγγελική-Ελένη Χαλιμά, η οποία και στάθηκε αρωγός στο έργο μου, παρέχοντας μου πολύτιμη βοήθεια, υλικό, αλλά και γνώσεις που ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωση και την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Δεν θα ήταν σωστό να παραλείψω, όλους όσους εργάζονται στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας για την ανιδιοτελή υποστήριξη και βοήθειά τους.

Εν κατακλείδι, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου καθώς και σε άτομα του στενού συγγενικού μου κύκλου που με στήριξαν και με βοήθησαν σε αυτή μου την προσπάθεια.

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΤΑΞΕΙΔΗΣ

ΑΘΗΝΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2019



## Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική μελέτη, έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης των συνθηκών ανάπτυξης του μικροφύκου *Cryptocodinium cohnii* ATCC® 30772™ με στόχο την αύξηση του παραγόμενου ποσοστού δοκοσαεξαενοϊκού οξέος (DHA). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες διαλείποντος έργου υπό διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Παράλληλα, έγινε καλλιέργεια του μικροφύκου σε δυο στάδια, σε βιοαντιδραστήρες μικρής κλίμακας, επιβεβαιώνοντας έτσι την δυνατότητα καλλιέργειας του μικροφύκου στα πλαίσια μιας βιομηχανικής διεργασίας. Επιπλέον, στα πλαίσια της βελτιστοποίησης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές που αφορούσαν τη κατανάλωση διήθηματος υγρού κλάσματος σκοτεινής ζύμωσης βιοαποβλήτου, με διαφορετικές συγκεντρώσεις πτητικών οργανικών οξέων (VFAs).

Σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν, υπολογίστηκε κάθε φορά η τελική παραγωγή Ω-3 λιπαρών οξέων. Σε κάθε περίπτωση, για τον προσδιορισμό των παραγομένων λιπαρών, μετά την συλλογή της βιομάζας, εφαρμοστήκαν τεχνικές που αφορούσαν την λυοφιλίωση των κυττάρων, την εκχύλιση των λιπαρών με οργανικούς διαλύτες σύμφωνα με μία τροποποιημένη μέθοδο Folch, την εξάτμιση των διαλυτών υπό κενό, την εστεροποίηση των λιπαρών και τέλος την ανάλυση τους με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας. Η πρόοδος των καλλιεργειών εξετάστηκε τόσο φωτομετρικά με μέτρηση της απορρόφησης της βιομάζας, όσο και με μέτρηση της κατανάλωσης της πηγής άνθρακα με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας.

Από την διεξαγωγή των πειραμάτων προέκυψε ότι οι ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη του μικροφύκου, περιλαμβάνουν τη χρήση θεικού αμμωνίου ως πηγή αζώτου, ανάμεσα σε πηγές όπως εκχύλισμα ζύμης (yeast extract, YE), νιτρικό νάτριο ( $\text{NaNO}_3$ ), νιτρικό αμμώνιο ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) και ουρία. Η ιδανική συγκέντρωση θεικού αμμωνίου για τη μεγιστοποίηση της ποσότητας DHA βρέθηκε πως αντιστοιχεί σε λόγο άνθρακα προς άζωτο C/N=110 (w/w). Σε αυτή τη συγκέντρωση επιτυγχάνεται ποσοστό λιπαρών που αντιστοιχεί στο 25% της συνολικής παραχθείσας βιομάζας. Παράλληλα, η ιδανική θερμοκρασία καλλιέργειας με σκοπό την μεγιστοποίηση του DHA εντοπίζεται στους 23 °C. Υπό αυτές τις συνθήκες η συγκέντρωση του DHA προσεγγίζει τα 0.5 mg/mL. Επιπλέον, για την επαγωγή της σύνθεσης των λιπαρών σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου εξετάστηκαν οι χημικοί επαγωγοί αιθανολαμίνη σε συνδυασμό με σαλικυλικό οξύ, χωρίς όμως κάποιο αξιολογικό αποτέλεσμα στην τελική συγκέντρωση της βιομάζας και των λιπαρών. Από τα αποτελέσματα της μελέτης ανάπτυξης του στελέχους σε βιοαντιδραστήρες, προέκυψε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των πτητικών οργανικών οξέων στο διήθημα είναι ευεργετική για την καλλιέργεια. Πιο συγκεκριμένα εξασφαλίζει την παροχή περισσότερου ποσοστού άνθρακα και συνεπώς τη διατήρηση της καλλιέργειας για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Ωστόσο η άγνωστη συνολική σύσταση του διηθήματος δυσχεραίνει τον ξεκάθαρο προσδιορισμό της επίδρασης της

μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης των οξέων. Όσον αφορά την καλλιέργεια σε δυο στάδια, στόχο είχε την εφαρμογή συνθηκών στρες, κατάσταση που οδηγεί σε αύξηση της σύνθεσης των λιπαρών. Οι συνθήκες στρες επιτυγχάνονται, στερώντας πηγή αζώτου από την καλλιέργεια. Από την ανάλυση εξάγεται το συμπέρασμα, ότι η καλλιέργεια δύο σταδίων συντελεί στην αύξηση της κυτταρικής συγκέντρωσης, με τελική τιμή που φτάνει τα 24 g/L. Όσον αφορά τη σύνθεση των λιπαρών στην περίπτωση της καλλιέργειας των δυο σταδίων, εκείνη ξεπερνά τα 4.3 g/L με ποσοστό μεγαλύτερο του 40% να αντιστοιχεί στο DHA.

## Abstract

In this research work it is attempted to optimize the growth conditions of microalga *Cryptocodinium cohnii* ATCC® 30772™ in order to produce higher level of docosahexaenoic acid (DHA). For this purpose, batch cultures under different conditions are carried out. Thereinafter the efficiency of a two-stage fermentation in small scale bioreactors is estimated, as well as the ability of the strain to consume different permeates from the liquid fraction of a fermented vegetable-garden-food waste stream. The permeates that are examined have a different total concentration of volatile fatty acids (VFAs).

In every case the final production of Omega-3 fatty acids is determined. At the end of the fermentation process the biomass is harvested and the cells are freeze-dried. Subsequently, the lipids are extracted from the biomass using organic solvents, according to a modified Folch method and then the solvents are evaporated in a vacuum oven. Finally the dried lipids are esterified and quantified with gas chromatography. The cell growth is estimated by measuring the optical density of the samples as well as calculating the VFA consumption in the culture medium with high performance liquid chromatography. The ideal conditions for the optimal growth of microalga *C. cohnii* include the use of ammonium sulfate as nitrogen source. Other nitrogen sources tested were yeast extract, sodium nitrate, ammonium nitrate and urea. Furthermore, the concentration of ammonium sulfate that maximizes the DHA production is determined. This concentration corresponds to a carbon to nitrogen ratio equal to 110 (w/w), where the total lipids constitute the 25% of the produced biomass. In addition, the temperature for the highest DHA concentration is determined to be 23°C, where the related value exceeds 0.5 g/L. For the induction of lipid's accumulation chemical modulators are examined. The combination of the chemical substances of ethylamine and salicylic acid seem to have no effect in the increase of the lipid's percentage. When examining the different permeates, it appears that the increased concentration of volatile fatty acids in the dark fermentation effluent allows the extension of fermentation time. However the unknown total composition of the permeates doesn't allow for clear conclusions. Referring to the twostage fermentation, this method has as a result the induction of stress conditions, where the cells tend to accumulate lipid. The stress conditions are achieved through nitrogen starvation. The two-stage culture has as a result the overall increase of cell production, which exceeds 24 g/L. In two-stage fermentation the lipid's concentration surpasses 4.3 g/L, while almost 40% of this concentration corresponds to DHA.





## Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες .....	i
Περίληψη.....	ii
Abstract .....	iv
Κατάλογος Πινάκων.....	3
Εισαγωγή.....	4
Ενότητα 1 <sup>η</sup> : Θεωρητική επισκόπηση του θέματος.....	5
1. Γενικές Πληροφορίες.....	6
1.1 Μικροφύκη.....	6
1.2 Μικροφύκος <i>Cryptocodinium cohnii</i> .....	6
2. Ανάπτυξη μικροφυκών .....	8
2.1 Συνθήκες ανάπτυξης του <i>Cryptocodinium cohnii</i> .....	8
2.2 Καμπύλη και στάδια ανάπτυξης των μικροοργανισμών.....	10
2.3 Καλλιέργεια δύο σταδίων .....	11
3.1 Λιπαρά Οξέα .....	13
3.2 Αφομοίωση πτητικών οργανικών οξέων από το μικροφύκος <i>Cryptocodinium cohnii</i> 15	
3.3 Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και DHA από το <i>C. cohnii</i> .....	16
1. Υγρό κλάσμα σκοτεινής ζύμωσης βιοαποβλήτου – Dark fermentation.....	19
2. Διατροφικές πηγές πρόσληψης DHA και η συνεισφορά του στην ανθρώπινη υγεία	21
Ενότητα 2 <sup>η</sup> : Ανάλυση των πειραματικών σταδίων και μεθόδων.....	24
1. Όργανα και συσκευές .....	25
2. Διεξαγωγή Έρευνας.....	26
2.1 Μελέτη περίπτωσης (Case Study).....	26
2.2 Διαγραμματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας .....	26
3. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης του μικροφύκου <i>C. cohnii</i> .....	28
3.1 Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του μικροφύκου (ATCC 460) .....	28
3.2 Ανάπτυξη του <i>Cryptocodinium cohnii</i> στο βασικό μέσο ανάπτυξης (standard batch) 28	
3.3 Ανάπτυξη του <i>Cryptocodinium cohnii</i> σε θρεπτικό υλικό με γλυκόζη – Στατικές και αναδευόμενες καλλιέργειες.....	29

4	Στάδια επεξεργασίας.....	30
4.1	Μέτρηση απορρόφησης βιομάζας.....	30
4.2	Λυοφιλίωση των κυττάρων.....	31
4.3	Εκχύλιση των λιπαρών από το μικροφύκος <i>Cryptheconidium cohnii</i> και εξάτμιση των διαλυτών.....	32
4.4	Εστεροποίηση των λιπαρών και ανάλυση του λιπιδικού προφίλ με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας (GC).....	33
4.5	Ανάλυση της κατανάλωσης των πτητικών οργανικών οξέων με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας (HPLC).....	35
5.	Προετοιμασία καλλιεργειών για εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης ...	36
5.1	Εύρεση βέλτιστης πηγής αζώτου.....	36
5.2	Εύρεση βέλτιστης συγκέντρωσης πηγής αζώτου στη καλλιέργεια.....	37
5.3	Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης.....	38
6.	Χρήση χημικών επαγωγών για την αύξηση της παραγωγικότητας των λιπαρών .	39
7.	Βιοαντιδραστήρες ημί-διαλείποντος έργου.....	39
7.1	Προετοιμασία και συνθήκες λειτουργίας βιοαντιδραστήρα ημί-διαλείποντος έργου	39
7.2	Καλλιέργεια δύο σταδίων σε βιοαντιδραστήρες ημί-διαλείποντος έργου.....	41
7.3	Μεταβολή κρίσιμων παραμέτρων και επίδρασή τους στην ανάπτυξη της βιομάζας και τη σύνθεση των λιπαρών.....	43
7.3.1	Συμπύκνωση διηθήματος του υγρού κλάσματος των βιοαποβλήτων.....	43
7.3.2	Αντικατάσταση του αρχικού υποστρώματος του βιοαντιδραστήρα.....	43
Ενότητα 3 <sup>η</sup> : Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της πειραματικής μελέτης.....		44
1.	Εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης του μικροφύκου <i>Cryptheconidium cohnii</i> .....	45
1.1	Πηγή αζώτου.....	45
1.2	Συγκέντρωση αμμωνιακών ιόντων.....	48
1.3	Επιλογή θερμοκρασίας ανάπτυξης.....	54
2.	Προσθήκη χημικών ουσιών για την επαγωγή της παραγωγής λιπαρών από το μικροφύκος <i>Cryptheconidium cohnii</i> .....	57
3.	Καλλιέργεια δυο σταδίων σε βιοαντιδραστήρα ημί-διαλείποντος έργου (fed-batch)	60
4.	Μελέτη της αποδοτικότητας την διεργασίας με μεταβολή κρίσιμων παραμέτρων	66

4.1	Διαφορετικής επεξεργασίας διήθημα υγρού κλάσματος βιοαποβλήτου.....	66
4.2	Αντικατάσταση του αρχικού υποστρώματος του βιοαντιδραστήρα .....	69
	Ενότητα 4 <sup>η</sup> : Συμπεράσματα & Μελλοντικές Προτάσεις .....	70
1.	Πηγή αζώτου.....	71
2.	Συγκέντρωση θειικού αμμωνίου ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ).....	72
3.	Βέλτιστη θερμοκρασία επώασης .....	74
4.	Επαγωγή της σύνθεσης λιπαρών με χρήση χημικών επαγωγών.....	75
5.	Καλλιέργεια δυο σταδίων .....	76
6.	Επίδραση κρίσιμων παραμέτρων στην ανάπτυξη του μικροφύκου σε βιοαντιδραστήρα ημί-διαλείποντος έργου .....	77
	Προτάσεις για μελλοντική έρευνα .....	79
	Βιβλιογραφία.....	81
	Παράρτημα.....	84
	Θρεπτικό Μέσο ATCC 460 .....	86
	Πτητικά Οργανικά Οξέα .....	87
	Λιπαρά Οξέα .....	87

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1	Οι 10 πιο πλούσιες τροφές σε Ω-3 λιπαρά οξέα [27].....	22
Πίνακας 2	Συγκεντρώσεις των πηγών αζώτου που αντιστοιχούν σε λόγο C/N=83.....	36
Πίνακας 3	Συγκέντρωση θειικού αμμωνίου βάση των διαφορετικών λόγων C/N.....	37
Πίνακας 4	Συγκεντρώσεις λιπαρών και DHA ανά mL καλλιέργειας σε διαφορετικές πηγές αζώτου .....	47
Πίνακας 5	Συγκεντρώσεις λιπαρών και DHA ανά mL καλλιέργειας σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης.....	56
Πίνακας 6	Συγκεντρώσεις βιομάζας, λιπαρών και DHA ανά mL καλλιέργειας με και χωρίς χρήση χημικών επαγωγών .....	59
Πίνακας 7	Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την επεξεργασία της βιομάζας και την εκχύλιση των λιπαρών στους δυο βιοαντιδραστήρες .....	65
Πίνακας 8	Σύσταση των συμπυκνωμένων διηθημάτων σε πτητικά οργανικά οξέα.....	66
Πίνακας 9	Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την επεξεργασία της βιομάζας και την εκχύλιση των λιπαρών στα διαφορετικής συμπύκνωσης διηθήματα .....	66
Πίνακας 10	ATCC Medium: 460 A <sub>2</sub> E <sub>6</sub> Medium .....	86
Πίνακας 11	Εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς για τα πτητικά οργανικά οξέα .....	87
Πίνακας 12	Εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς για τα λιπαρά οξέα .....	87



## Εισαγωγή

Οι περιβαλλοντικές αλλαγές ήδη από τις αρχές του 21<sup>ου</sup> αιώνα έχουν προκαλέσει την ανησυχία της επιστημονικής κοινότητας, η οποία αναζητά εναγωνίως λύσεις για την αντιστροφή του φαινομένου. Ένα από τα βασικότερα προβλήματα που καλείται να επιλύσει, αποτελεί η οικολογική διαχείριση και η, κατά το δυνατόν, καλύτερη εκμετάλλευση των αποβλήτων.

Τα υγρά βιομηχανικά και αστικά απόβλητα αποτελούν κρίσιμοι παράγοντες μόλυνσης, ενώ ταυτόχρονα διαθέτουν ένα σημαντικό οργανικό φορτίο, που μπορεί εύκολα να εκμεταλλευτεί και να αξιοποιηθεί.

Προς αυτή τη κατεύθυνση, τα τελευταία χρόνια οι επιστήμονες εκμεταλλεύτηκαν την ικανότητα των μικροφυκών να παράγουν μεγάλη ποικιλία μεταβολικών προϊόντων, όπως λίπη, σάκχαρα και λειτουργικά βιοενεργές ενώσεις, ακόμα και αέρια και υγρά βιοκαύσιμα υψηλής ενέργειας.

Τα μικροάλλη ή μικροφύκη μπορούν να καλλιεργηθούν κάτω από δύσκολες κλιματικές συνθήκες, ενώ η καλλιέργεια τους έχει πολύ μικρές οικονομικές απαιτήσεις. Το μέγεθός τους, της τάξης των νανομέτρων, και ο σύντομος κύκλος ζωής, καθιστά εφικτή την έρευνα και την ανάπτυξη τους υπό εργαστηριακές συνθήκες και επιτρέπει την γενετική επέμβαση των ερευνητών, συγκριτικά με τα ανώτερα φυτά.

Συγκεκριμένα, το μικροφύκος *Cryptocodinium cohnii*, έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, καθώς εμφανίζει υψηλά ποσοστά παραγωγής δοκοσαεξανοϊκού οξέος (DHA), προϊόν με πολλαπλά οφέλη στην υγεία του ανθρώπου. Παράλληλα, το ίδιο μικροφύκος μπορεί να αναπτύσσεται ετερότροφα καταναλώνοντας ποικίλες πηγές άνθρακα.

Η ανακάλυψη αυτή μπορεί να επιφέρει σημαντικά περιβαλλοντικά, αλλά και οικονομικά οφέλη, αφού δύναται η εκμετάλλευση των υγρών αποβλήτων για την ανάπτυξη του μικροφύκους, με ταυτόχρονη παραγωγή ενός προϊόντος με μεγάλη εμπορική αξία.

Με στόχο πάντα την προστασία του περιβάλλοντος, αλλά και την εκμετάλλευση του «πλούτου» που κρύβεται στα βιομηχανικά και αστικά απόβλητα πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων, στοχεύοντας στην εφαρμογή τους σε βιομηχανική κλίμακα, γεγονός που θα επιφέρει τεράστια οικονομικά, περιβαλλοντικά και κοινωνικά οφέλη.



## **Ενότητα 1<sup>η</sup>:**

---

**Θεωρητική επισκόπηση του θέματος**





## 1. Γενικές Πληροφορίες

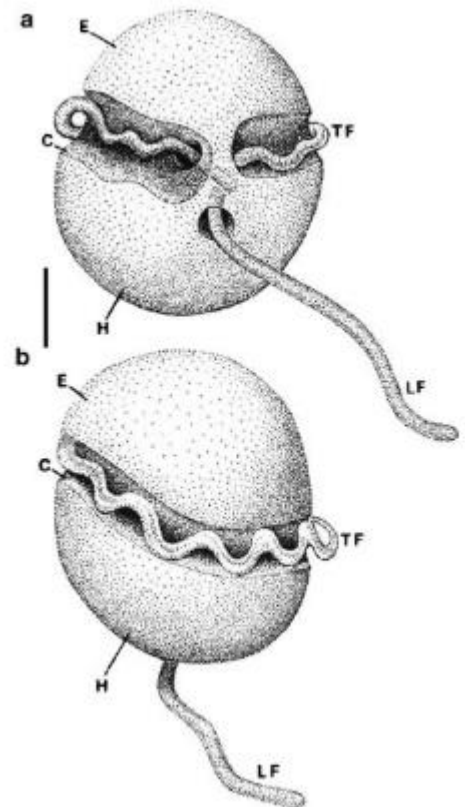
### 1.1 Μικροφύκη

Τα άλγη είναι μια ευρεία κατηγορία, στην οποία συγκαταλέγονται απλοί, μονοκύτταροι οργανισμοί, πολλοί από τους οποίους είναι αυτότροφοι, δηλαδή καλύπτουν τις ενεργειακές τους ανάγκες φωτοσυνθέτοντας και παράγοντας οξυγόνο. Τα μικροφύκη συγκαταλέγονται στα άλγη και συναντώνται στα υδάτινα οικοσυστήματα. Πρόκειται για μονοκύτταρους οργανισμούς, οι οποίοι είτε ζουν ανεξάρτητοι είτε σχηματίζουν αλυσίδες ή αποικίες. Ανάλογα με το είδος στο οποίο ανήκουν, το μέγεθος τους ποικίλει από μερικές δεκάδες, σε μερικές εκατοντάδες μικρόμετρα ( $\mu\text{m}$ ) [1]. Σε αντίθεση με τα ανώτερα φυτά, τα μικροφύκη δεν διαθέτουν ρίζες, φύλλα, ή κορμό. Η βιοποικιλότητα των μικροφυκών είναι ιδιαίτερος μεγάλη. Από τα 200-800 χιλιάδες είδη που πιθανόν να υπάρχουν μόνο τα 15 χιλιάδες έχουν ταυτοποιηθεί. Το επιστημονικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται τα τελευταία χρόνια στα μικροφύκη, καθώς πολλά από αυτά έχουν την ικανότητα να παράγουν βιοενεργά συστατικά, όπως καροτενοειδή, αντιοξειδωτικά, λιπαρά οξέα, ένζυμα, πολυμερή, πεπτίδια κ.α, τα οποία εμφανίζουν πολλές βιομηχανικές και κλινικές εφαρμογές.[2].

### 1.2 Μικροφύκος *Crypthecodinium cohnii*

Το *Crypthecodinium cohnii* φαίνεται να είναι ένα σύνθετο είδος μιας και διαθέτει πολλές ομοιότητες με άλλα απομονωμένα είδη. Το μικροφύκος *Crypthecodinium cohnii* συναντάται σε υφάλμυρα νερά, της νηριτικής ζώνης (τμήμα των θαλασσών που ξεκινά από την ακτή και φτάνει μέχρι το βάθος των 200 μέτρων). Πολύ συχνά εκείνο εντοπίζεται κοντά σε μακρόφυτα όπως το *Fucus* spp., ή ακόμα και σε θαλάσσια φύκια, που αποσυντίθενται. Επιπλέον, έχει απομονωθεί και από ξενιστές όπως *Macrocystis*, *Sargassum* κ.α. Τα θαλάσσια περιβάλλοντα από τα οποία απομονώνεται το μικροφύκος υποδεικνύουν ότι αναπτύσσεται σε εύκρατα και τροπικά υδάτινα οικοσυστήματα και σε μικρά βάθη, όπου η θερμοκρασία τους παραμένει σχετικά σταθερή.

Όσον αφορά την ταξινομική βαθμίδα το *C. cohnii* συγκαταλέγεται στα δινωμαστιγωτά μικροφύκη. Πρόκειται για ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι όμως διατήρησαν πολλά προκαρυωτικά



Εικόνα 1 Σχηματική αναπαράσταση του *C. Cohnii* στην πλάγια όψη. Πηγή [3]

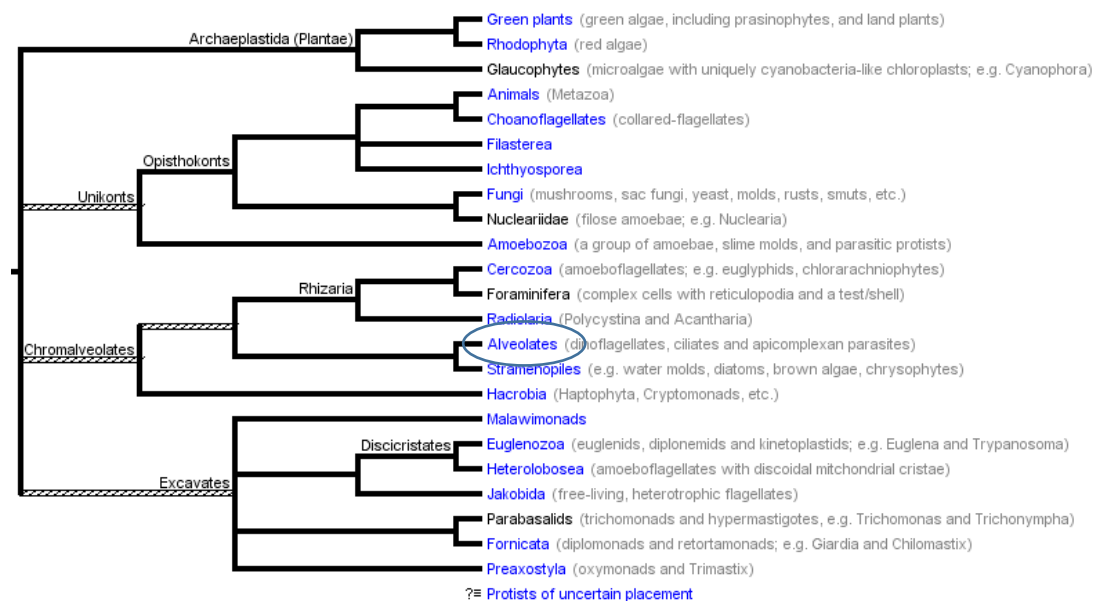
χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, εκείνα διαθέτουν μόνιμο πυρηνικό περίβλημα, χρωμοσώματα, αλλά στερούνται ιστονών και νουκλεοσωμάτων.

Επί του παρόντος, οι δινομαστιγωτοί οργανισμοί ταξινομούνται στα κυψελιδωτά (*Alveolates*), που αποτελούν μονοκύτταρα πρώτιστα [1].

Όσον αφορά τη μορφολογία του, ο *C. cohnii* εμφανίζεται σε δυο μορφές, τα ελεύθερα κύτταρα και τις κύστες. Τα ελεύθερα κύτταρα είναι πιο ευκίνητα με μικρές ταχύτητες μετακίνησης. Η μετακίνηση τους επιτυγχάνεται με δύο μαστίγια, εκ των οποίων το ένα περιβάλλει το κύτταρο και συμβάλλει στην περιστροφή του και το δεύτερο βρίσκεται στο οπίσθιο μέρος του κυττάρου και βοηθά στην ώθηση του. Αντίθετα, οι κύστες είναι μεγαλύτερες σε μέγεθος σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα, έχουν ωοειδές σχήμα, ενώ μπορεί να παραμένουν αδρανείς ή να αρχίσουν να διαιρούνται [3].

Σύμφωνα με μελέτες οι κύστες εμφανίζονται με μεγαλύτερο ποσοστό λιπαρών, συμπεριλαμβανομένου και του δοκοσαεξαενοϊκού οξέος (DHA), σε σχέση με τις κινούμενες μορφές του μικροφύκου [4].

Αναφερόμενοι στην αναπαραγωγή του μικροφύκου, εκείνη επιτυγχάνεται με δυο τρόπους. Στην περίπτωση των κινούμενων κυττάρων εκείνα αποβάλλουν τα μαστίγια τους και μετατρέπονται σε κύστες. Στη συνέχεια οι κύστες εκτελούν τις υπόλοιπες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (αντιγραφή του DNA και μίτωση) δίνοντας νέα κύτταρα [5]. Άλλες αναφορές επισημαίνουν πως η αναπαραγωγή του *C. cohnii* πραγματοποιείται εξωκυτταρικά μέσω σύντηξης των γαμετών, από όπου και δημιουργείται το πρώτο κύτταρο, το ζυγωτό. Το ζυγωτό εμφανίζεται αρχικά με τη μορφή κύστης και στη συνέχεια διαφοροποιείται και πιθανόν να εμφανίσει μαστίγια [6].



Εικόνα 2 Δενδροδιάγραμμα με την προέλευση των δινομαστιγωτών μικροοργανισμών

## 2. Ανάπτυξη μικροφυκών

### 2.1 Συνθήκες ανάπτυξης του *Cryptocodinium cohnii*

Τα μικροφύκη έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσονται είτε αυτότροφα είτε ετερότροφα. Κατά την αυτότροφη ανάπτυξη, οι μικροοργανισμοί γενικότερα, εκμεταλλεύονται την ηλιακή ενέργεια και κάποια ανόργανη μορφή άνθρακα, όπως το CO<sub>2</sub>, και συνθέτουν τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους. Στην περίπτωση αυτή, τα μικροφύκη φωτοσυνθέτουν και χαρακτηρίζονται φωτοαυτότροφα [7]. Ωστόσο υπάρχουν και μικροοργανισμοί, οι οποίοι για να εξασφαλίσουν τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη και την επιβίωση τους, χρειάζονται μια εξωτερική πηγή άνθρακα και μια πηγή θρεπτικών συστατικών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί χαρακτηρίζονται ως ετερότροφοι. Εκτός της αυτότροφης και ετερότροφης ανάπτυξης, υπάρχουν μικροοργανισμοί, οι οποίοι ανάλογα από τη συγκέντρωση των διαθέσιμων οργανικών ενώσεων και της έντασης του φωτός, αναπτύσσονται είτε αυτότροφα, είτε ετερότροφα [8]. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ονομάζονται μιξότροφοι και καλύπτουν τις ενεργειακές τους απαιτήσεις καταναλώνοντας παράλληλα το CO<sub>2</sub> της ατμόσφαιρας παρουσία φωτός, καθώς και τις διαθέσιμες πηγές άνθρακα μέσω της κυτταρικής αναπνοής [9].

Το μικροφύκος *C. cohnii* είναι ένας αμιγώς ετερότροφος θαλάσσιος μικροοργανισμός, δηλαδή εξασφαλίζει την επιβίωση του μεταβολίζοντας κάποιο οργανικό υπόστρωμα και αφομοιώνοντας από το περιβάλλον τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά.

Βιβλιογραφικές μελέτες έδειξαν πως το μικροφύκος *C. cohnii* έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται σε οργανικά υποστρώματα όπως η γλυκόζη, η αιθανόλη, το οξικό οξύ και το οξικό νάτριο [3]. Αντιφατικές είναι ωστόσο οι έρευνες για την ικανότητα του μικροφύκου να αναπτύσσεται σε πηγές άνθρακα όπως η γλυκερόλη, η γαλακτόζη, το γαλακτικό οξύ, η μαλτόζη και η αλδόζη [10][11], ενώ ερευνητές υποστηρίζουν ότι το ίδιο αναπτύσσεται καλώς σε θρεπτικά μέσα όπως το ιχθυέλαιο και το σογιέλαιο [12].

Εκτός από μια πηγή άνθρακα, είναι αναγκαίο να παρέχεται στο μέσο καλλιέργειας μια πηγή αζώτου όπως για παράδειγμα πεπτόνη, εκχύλισμα ζυμομύκητα (YE), εκχύλισμα κρέατος, γλουταμικό οξύ, , KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, ουρία, υδρολυμένη καζεΐνη κρέατος ή (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Το άζωτο αποτελεί βασικό χημικό στοιχείο για την επιβίωση του μικροφύκου, αφού αποτελεί δομικός λίθος των πρωτεϊνών [3]. Όσον αφορά τα ανόργανα άλατα, το φυσικό θαλασσινό νερό μπορεί να είναι το καλύτερο μέσο, αλλά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι τεχνητού θαλασσινού νερού, καθώς και διάφορα άλατα νατρίου, φωσφορικά άλατα, άλατα μαγνησίου, καλίου, βορικών και ανθρακικών άλατα. Επίσης, χρήσιμα είναι ίχνη βαρέων μετάλλων όπως άλατα σιδήρου, μαγανίου, κοβαλτίου, ψευδαργύρου, ενώσεις χλωρίου και ενώσεις βρωμίου [13]. Ως εκ τούτου, ο *C. cohnii* μπορεί να αναπτυχθεί σε μέσα καλλιέργειας

που περιέχουν φθηνά θρεπτικά συστατικά, τα οποία μπορούν να παραληφθούν από βιομηχανικές βιολογικές διαδικασίες.

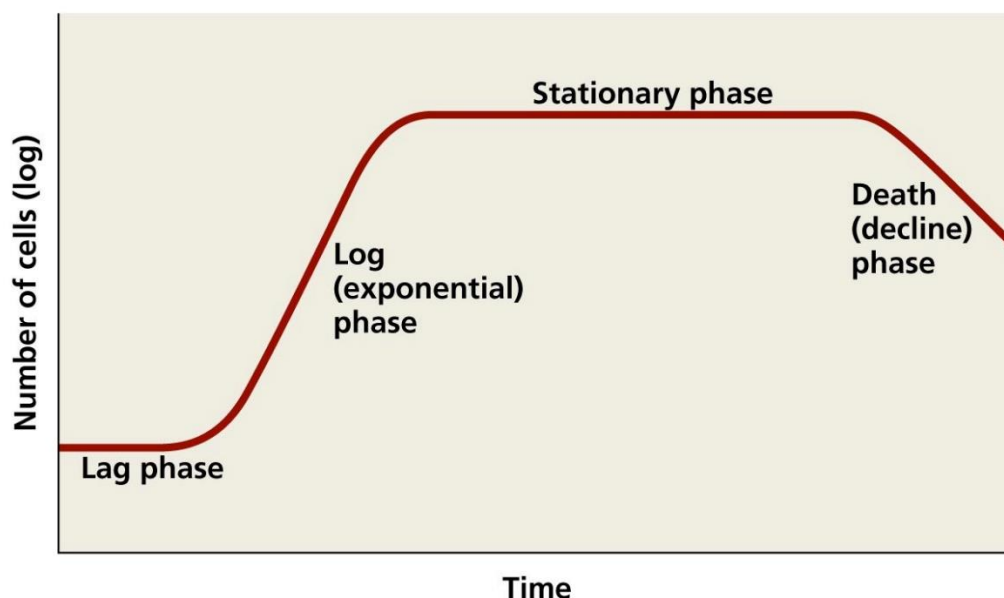
Όσον αφορά τη θερμοκρασία ο *C. cohnii* αναπτύσσεται στο θερμοκρασιακό εύρος από 15 έως 34°C, ενώ η οξύτητα του μέσου ανάπτυξης μπορεί να ποικίλει από pH 5,2 έως 7,0 [3]. Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι το ιδανικό pH ανάπτυξης του μικροφύκου είναι το 6,6 και η βέλτιστη θερμοκρασία 27 °C [12]. Το pH και η θερμοκρασία είναι ίσως οι κρίσιμότεροι παράγοντες για την ανάπτυξη του φύκου. Αυτό δικαιολογείται, αφού αυτές οι παράμετροι ρυθμίζουν την ενεργότητα και τον ρυθμό των ενδοκυτταρικών ενζυμικών αντιδράσεων. Με τον τρόπο αυτό επηρεάζεται όχι μόνο η ανάπτυξη του μικροφύκου, αλλά και η παραγωγικότητα των λιπαρών, που είναι κρίσιμα για τη επιβίωση τους.

Μελετώντας την αλατότητα του διαλύματος ανάπτυξης, το μικροφύκος *C. cohnii* απαιτεί ελάχιστη συγκέντρωση αλάτων 17,8 g/L σε θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ της κατά μέσου όρου συγκέντρωσης αλάτων στο θαλασσίνο νερό. Συγκεντρώσεις μικρότερες από 5 g/L και μεγαλύτερες από 50 g/L λειτουργούν παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού [14]. Στην περίπτωση ανάπτυξης του μικροφύκου σε καλλιέργειες με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο, μια τυπική βιβλιογραφική τιμή για την συγκέντρωση των αλάτων είναι 25g/L[15].

Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι το μικροφύκος έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται και να αναπαράγεται στο σκοτάδι [3]. Παράλληλα, επειδή πρόκειται για αερόβιο μικροοργανισμό, για την ομαλή ανάπτυξη του σε συνθήκες batch καλλιέργειας είναι αναγκαία η μεταφορά οξυγόνου από την αέρια φάση στο διάλυμα. Συγκεκριμένα η αύξηση της ανάδευσης από 50 σε 100 rpm βελτιώνει σημαντικά τον ρυθμό ανάπτυξης του φύκου, ενώ ταυτόχρονα εξασφαλίζεται και η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών στα κύτταρα, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε ταχύτερη ρυθμούς αναπαραγωγής. Ωστόσο, υψηλές τιμές ανάδευσης μπορούν να οδηγήσουν σε διάρρηξη των κυττάρων και στην αστοχία της καλλιέργειας [16].

## 2.2 Καμπύλη και στάδια ανάπτυξης των μικροοργανισμών

Η μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης εκφράζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια επώσης σε μια ασυνεχή καλλιέργεια (κλειστό σύστημα).



Εικόνα 3 Καμπύλη ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Πηγή: Prince George Community College

Η καμπύλη ανάπτυξης χωρίζεται σε 4 διακριτές φάσεις.

1. Τη λανθάνουσα φάση
2. Την εκθετική ή λογαριθμική φάση
3. Τη στατική φάση και
4. Τη φάση θανάτου

Κατά τη λανθάνουσα φάση, ο μικροοργανισμός προσαρμόζεται στις νέες παραμέτρους και συνθήκες της καλλιέργειας. Στη λανθάνουσα φάση ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων είναι σχεδόν μηδενικός, καθώς το κύτταρο ενεργοποιεί νέα μεταβολικά μονοπάτια για να μπορέσει να εξασφαλίσει την απαραίτητη ενέργεια από την αφομοίωση των πηγών άνθρακα του θρεπτικού υλικού. Το πρώτο αυτό στάδιο μπορεί να διαρκέσει από μερικές ώρες έως και ημέρες. Για τη μείωση της λανθάνουσας φάσης, συνίσταται το εμβόλιο της καλλιέργειας να βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης και ο όγκος του να αποτελεί το 5-10% του συνολικού όγκου της καλλιέργειας. Συχνά, είναι αναγκαία και η βελτιστοποίηση του θρεπτικού μέσου, ώστε να μεταβληθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη [17].

Συνεχίζοντας, ακολουθεί η εκθετική ή λογαριθμική φάση ανάπτυξης, όπου τα προσαρμοσμένα πλέον κύτταρα, πολλαπλασιάζονται και αυξάνονται εκθετικά με το χρόνο. Όσο τα θρεπτικά συστατικά είναι διαθέσιμα και δεν έχει πραγματοποιηθεί συσσώρευση διαφόρων τοξικών παραπροϊόντων του κυτταρικού μεταβολισμού, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στη φάση αυτή είναι μέγιστη [17].

Ακολουθως, την εκθετική φάση διαδέχεται η στατική φάση, όπου ο καθαρός ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων είναι μηδενικός. Αυτό πρακτικά υποδηλώνει είτε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης ισούται με τον ρυθμό θανάτου των κυττάρων είτε ότι τα κύτταρα παύουν να διαιρούνται. Παράλληλα κατά τη φάση αυτή, παράγονται πολλοί πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες, ενώ στην περίπτωση του *C. cohnii*, κατά τη στατική φάση παράγονται τα επιθυμητά λιπαρά [18]. Η στατική φάση οφείλεται στην εξάντληση της πηγής άνθρακα ή στη συσσώρευση τοξικών παραπροϊόντων του κυτταρικού μεταβολισμού, που τελικώς προκαλεί το θάνατο των κυττάρων [17].

Τέλος, η φάση θανάτου ακολουθεί τη στατική φάση. Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα λύνονται και τα εσωκυτταρικά προϊόντα απελευθερώνονται στο θρεπτικό μέσο. Πολλές φορές τα εσωκυτταρικά προϊόντα χρησιμοποιούνται από τους ζωντανούς οργανισμούς που βρίσκονται στη φάση στασιμότητας [17].

### 2.3 Καλλιέργεια δύο σταδίων

Για την αύξηση της παραγωγής των λιπαρών, μια αποτελεσματική μέθοδος είναι η δημιουργία «συνθηκών stress» για το κύτταρο. Η μεταβολή παραμέτρων του περιβάλλοντος, όπως η θερμοκρασία, και η συγκέντρωση απαραίτητων συστατικών στο διάλυμα, όπως του αζώτου, μπορούν να επάγουν την παραγωγή μεταβολιτών όπως αντιοξειδωτικά, ορμόνες, αντιβιοτικές ουσίες, χρωστικές και λιπαρά.

Αναλυτικότερα, σε ακραίες αβιοτικές συνθήκες καλλιέργειας οι μικροοργανισμοί, και συνεπώς και τα μικροφύκη, μεταβάλλουν τον μεταβολισμό τους με σκοπό την προσαρμογή στις νέες παραμέτρους. Οι μεταβολές αυτές αφενός μειώνουν την παραγωγικότητα της βιομάζας, επηρεάζοντας την συνολική κυτταρική ανάπτυξη, αφετέρου προάγουν τη σύνθεση των προαναφερθέντων μεταβολιτών, σαν μια προσπάθεια των μικροοργανισμών να επιβιώσουν και να προσαρμοστούν στις νέες συνθήκες. Επιπλέον, αξίζει στο σημείο αυτό να αναφερθεί, πως η παραγωγικότητα ενός μεταβολίτη συχνά δεν μεγιστοποιείται υπό φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας. Για το λόγο αυτό, προτείνεται η εφαρμογή της καλλιέργειας σε δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο εφαρμόζονται βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας και επιτυγχάνεται μέγιστη κυτταρική ανάπτυξη, ενώ σε δεύτερο χρόνο εφαρμόζονται «συνθήκες στρες», οι οποίες συμβάλλουν στην παραγωγή των επιθυμητών μεταβολιτών [19].

Για την περίπτωση του *C. cohnii*, οι συνθήκες στρες εφαρμόζονται με σκοπό την μεγιστοποίηση της παραγωγικότητας των λιπαρών. Σε ακραίες συνθήκες, διαταράσσεται η ομαλή λειτουργία του κυττάρου και η επικοινωνία του με το εξωκυτταρικό του περιβάλλον. Κύριος αποδέκτης αυτής της διαταραχής αποτελεί η κυτταρική μεμβράνη, βασικό όργανο για την επιβίωση και ανάπτυξη του φύκου.

Στο σημείο αυτό, είναι απαραίτητο να αναφερθεί πως η κυτταρική μεμβράνη συγκροτείται σε μεγάλο ποσοστό από φωσφολιπίδια. Τα φωσφολιπίδια αποτελούνται από ένα μόριο γλυκερόλης, δύο μόρια λιπαρών οξέων, ένα μόριο φωσφορικού οξέος

και ένα ακόμη μικρότερο μόριο, γνωστό ως πολικό μόριο. Τα λιπαρά οξέα αποτελούν την ουρά του μορίου, που είναι υδρόφοβη, ενώ η κεφαλή του μορίου είναι υδρόφιλη [20].

Για να ανταπεξέλθει στη διαταραχή του περιβάλλοντος και να αντιμετωπίσει τις επιπτώσεις των δυσμενών συνθηκών, το μικροφύκος *C. cohnii* προάγει την παραγωγή λιπαρών, με σκοπό την αποκατάσταση της ρευστότητας και λειτουργικότητας της κυτταρικής μεμβράνης [21].

Όσον αφορά τη θερμοκρασία, η ρύθμιση της σε χαμηλότερες τιμές από την βέλτιστη επάγει την παραγωγή των λιπαρών στην περίπτωση του *C. cohnii*. Αντιθέτως, η επιλογή υψηλότερων θερμοκρασιών από τη βέλτιστη δεν συνίσταται, καθώς διαταράσσεται η ενζυμική ενεργότητα των ενδοκυτταρικών αντιδράσεων [22].

Αντίστοιχα, η αναλογία άνθρακα/αζώτου (C/N) στο διάλυμα, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να δημιουργήσει «συνθήκες στρες» στα μικροφύκη. Η μείωση της συγκέντρωσης αζώτου, επιβραδύνει την κυτταρική ανάπτυξη, αλλά επιταχύνει την παραγωγή των λιπαρών. Για τον λόγο αυτό σε μια fed-batch καλλιέργεια, ενδείκνυται η μείωση του λόγου C/N στην τροφοδοσία, κατά τη περίοδο της στατικής φάσης ανάπτυξης, όπου και παράγονται τα επιθυμητά λιπαρά, για τη περίπτωση του *C. cohnii* [18]. Στο σημείο αυτό να τονισθεί ότι για τα περισσότερα είδη μικροφυκών, το αμμώνιο φαίνεται να είναι η ιδανική πηγή αζώτου, αφού μπορεί εύκολα να αποδομηθεί και να αφομοιωθεί. Μετά το αμμώνιο, η ουρία και η γλυκίνη, φαίνονται να είναι οι καταλληλότερες πηγές αζώτου σε σύγκριση με άλλες ανόργανες [22].

### 3.1 Λιπαρά Οξέα

Τα λιπίδια είναι θρεπτικά συστατικά που αποτελούνται από άτομα άνθρακα, οξυγόνου και υδρογόνου, διαθέτουν υψηλή ενέργεια και μεταφέρουν λιποδιαλυτές βιταμίνες όπως vitA, D, E, και K. Τα λιπίδια είναι επίσης σημαντικές πηγές πρόσληψης απαραίτητων λιπαρών οξέων που δεν μπορούν να συντεθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό. Τα απαραίτητα λιπαρά οξέα περιλαμβάνουν το λινολεϊκό οξύ (C18:2, n-6) και το άλφα λινολεϊκό οξύ (C18:3, n-3) και είναι σημαντικά για την φυσιολογική ανάπτυξη του σώματος και την υγεία του οργανισμού.

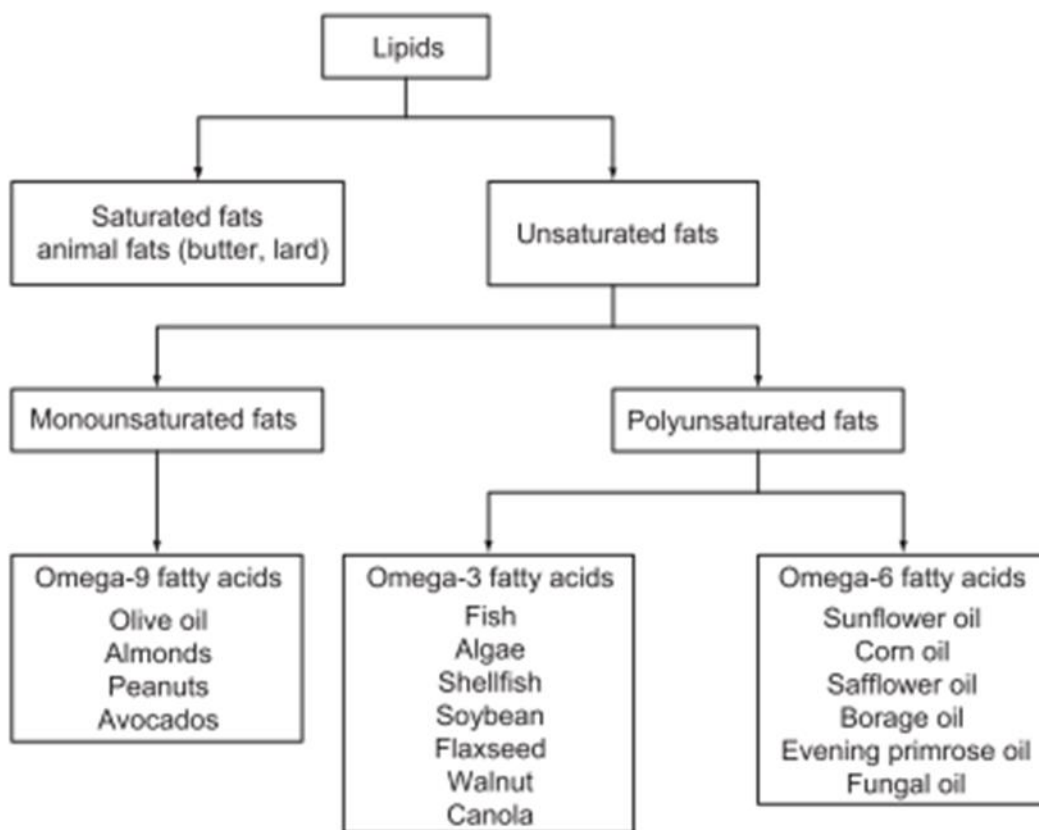
Τα λιπαρά οξέα είναι μονοκαρβοξυλικά οξέα, δηλαδή αποτελούνται από μεγάλο μήκος ανθρακικές αλυσίδες με μια καρβοξυλική ομάδα και αποτελούν τις βασικές δομικές μονάδες των λιπιδίων. Τα λιπαρά οξέα διακρίνονται σε κορεσμένα και ακόρεστα, με τα τελευταία να υποδιαιρούνται περαιτέρω σε μονοακόρεστα (MUFA) και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) [23].

Αναφερόμενοι στη χημική δομή, τα κορεσμένα λιπαρά συνιστούν ανθρακικές αλυσίδες με τα άτομα του άνθρακα να συνδέονται μεταξύ τους με απλούς δεσμούς. Τα πιο κοινά λιπαρά οξέα, που συναντώνται στους φυτικούς και ζωικούς ιστούς, σχηματίζουν ευθύγραμμη αλυσίδα και αποτελούνται από 12, 14, 16 και 18 άτομα άνθρακα. Η κυριότερη διατροφική πηγή πρόσληψης κορεσμένων λιπαρών οξέων για τον άνθρωπο είναι τόσο τα γαλακτοκομικά προϊόντα, όσο και τα φυτικά έλαια. Παρότι τα κορεσμένα λιπαρά είναι σημαντική πηγή ενέργειας και βασικοί δομικοί λίθοι των κυτταρικών μεμβρανών, δεν συγκαταλέγονται στα «απαραίτητα» λιπαρά, αφού το ανθρώπινο σώμα μπορεί να τα συνθέσει.

Από την άλλη πλευρά, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα διαθέτουν ένα ή και περισσότερους διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα. Όταν τα λιπαρά οξέα διαθέτουν μόνο ένα διπλό δεσμό στην αλειφατική αλυσίδα, τότε ονομάζονται μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA). Κυριότερη πηγή πρόσληψης μονοακόρεστων λιπαρών είναι το ελαιϊκό οξύ που συναντάται σε μεγάλο ποσοστό στο ελαιόλαδο.

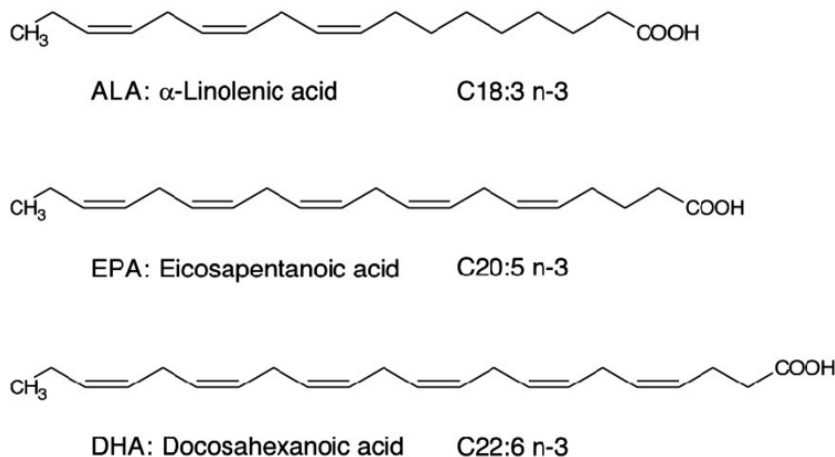
Στην περίπτωση, που στην αλειφατική αλυσίδα των λιπαρών οξέων υπάρχουν δυο ή και περισσότεροι δεσμοί άνθρακα-άνθρακα, τότε τα λιπαρά οξέα συγκαταλέγονται στα πολυακόρεστα λιπαρά (PUFA). Τα Ω-3 λιπαρά οξέα ανήκουν στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και διαφέρουν από τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα, εξαιτίας της θέσης του πρώτου διπλού δεσμού στον τρίτο κατά σειρά άνθρακα στην ανθρακική αλυσίδα [23].





Εικόνα 4 Ταξινόμηση των λιπιδίων και λιπαρών οξέων

Τα Ω-3 λιπαρά οξέα, τα οποία είναι τα σημαντικότερα για την διατροφή και την υγεία του ανθρώπου είναι τα άλφα-λινολεϊκό οξύ (ALA), εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA). Ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να συνθέσει τα παραπάνω λιπαρά πάρα μόνο σε ελάχιστο ποσοστό, και τα οποία προσλαμβάνονται κατά βάση μόνο μέσω της διατροφής και φαίνεται να διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην διατήρηση της καλής υγείας του ανθρώπινου οργανισμού σε όλα τα στάδια της ζωής του.



Εικόνα 5 Ω-3 Λιπαρά οξέα

### 3.2 Αφομοίωση πτητικών οργανικών οξέων από το μικροφύκος *Cryptocodinium cohnii*

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα το μικροφύκος *C. cohnii*, είναι ένας ετερότροφος μικροοργανισμός. Όπως πολλά από τα είδη των μικροφυκών, έτσι και το *C. cohnii*, αναπτύσσεται καταναλώνοντας καρβοξυλικά οξέα όπως το οξικό οξύ, το κιτρικό, το λακτικό, το μηλικό το πυροσταφυλικό και το ηλεκτρικό (ή σουκινικό) οξύ. Παρόλα αυτά, έρευνες αποδεικνύουν πως το οξικό οξύ, βασικό προϊόν της σκοτεινής ζύμωσης, η οποία θα αναφερθεί παρακάτω, αποτελεί το ιδανικότερο υπόστρωμα για την ανάπτυξη των ετερότροφων μικροφυκών, χάρη στην εύκολη μετατροπή του σε ακετυλο-CoA (acetyl-CoA), πρόδρομη ένωση για την παραγωγή λιπιδίων[24].

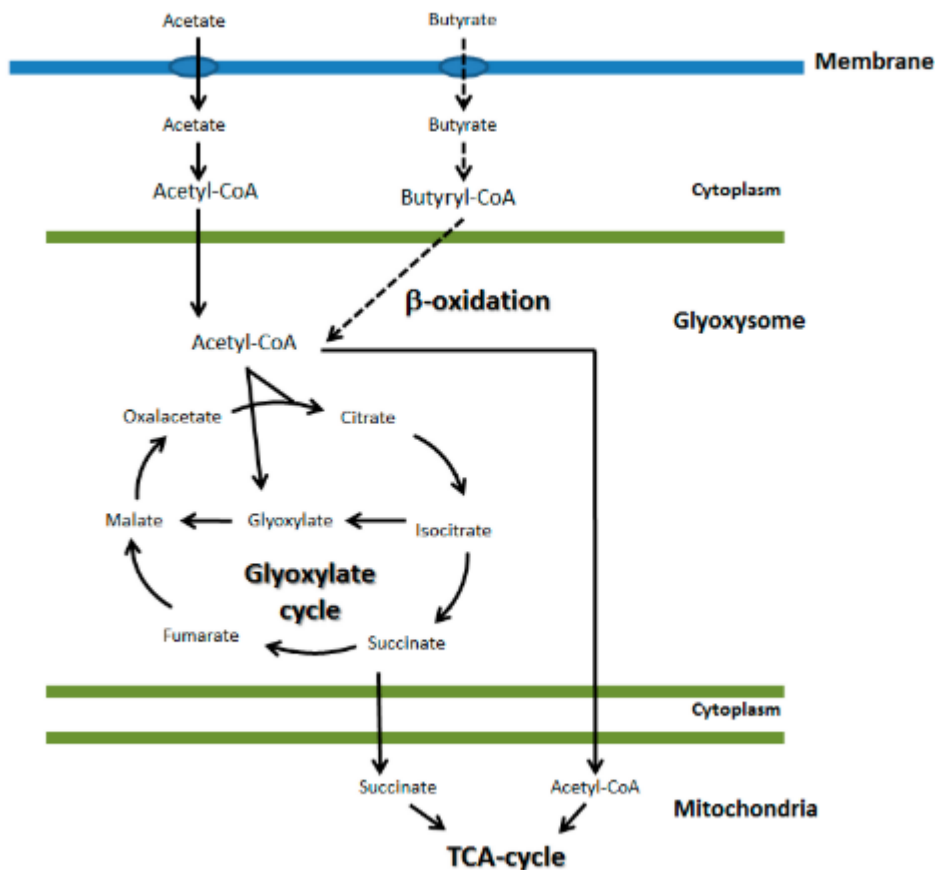
Στην περίπτωση των ευκαρυωτικών οργανισμών, εκείνοι είναι ικανοί να αφομοιώνουν το οξικό οξύ, μέσω μιας μονοκαρβοξυλικής πρωτεΐνης-μεταφορέα που συμβάλλει στην μεταφορά μονοκαρβοξυλικών μορίων μέσω της μεμβράνης.

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. Σε αυτά ανήκουν είτε ο κύκλος του γλυοξυλικού οξέος (glyoxylate cycle), ο οποίος μετατρέπει το ακετυλο-CoA σε μηλεϊνικό οξύ (malate), είτε ο κύκλος του κιτρικού οξέος (κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) ή κύκλος του Krebs), που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια [22].

Το βουτυρικό οξύ, που είναι ένα άλλο ένα προϊόν της σκοτεινής ζύμωσης (dark fermentation) απαιτεί περισσότερα βήματα για την μετατροπή του σε ακετυλο-CoA λόγω του υψηλότερου μοριακού βάρους. Το βουτυρικό μετατρέπεται σε ακετυλο-CoA μέσω της β-οξείδωσης[22].

Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι το ακετυλο-CoA χρησιμοποιείται μερικώς στον κύκλο του γλυοξυλικού οξέος για βιοσύνθεση, όπως και στον κύκλο του Krebs για παραγωγή ενέργειας. Και οι δυο μεταβολικοί κύκλοι, χρησιμοποιούν το ακετυλο-CoA σαν πρόδρομο μόριο, η σύνθεση του οποίου γίνεται από την β-οξείδωση. Αν και το οξικό μπορεί να μετατραπεί αποτελεσματικά σε λιπίδια, η αφομοίωση βουτυρικού οξέος από μικροφύκη είναι πολύ πιο αργή και μπορεί να μειώσει την ανάπτυξη των μικροφυκών όταν υπάρχουν και τα δύο υποστρώματα [22].

Μέσα από τον καταβολισμό των οργανικών υποστρωμάτων στην περίπτωση του *C. cohnii* προκύπτει μια σειρά από λιπαρά οξέα, με το DHA να παράγεται στο μεγαλύτερο ποσοστό.



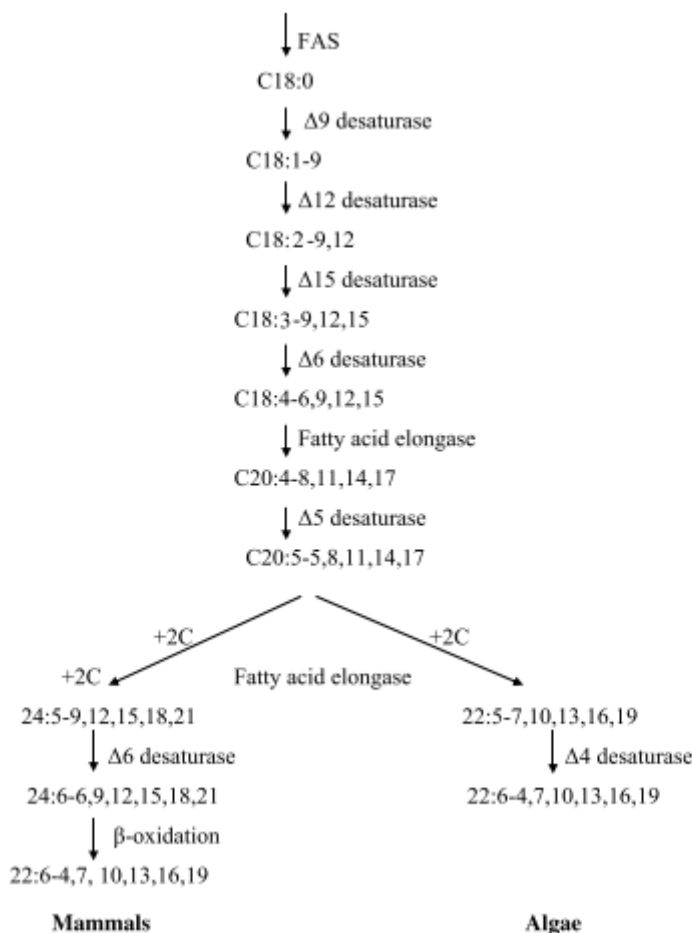
Εικόνα 6 Σχηματική αναπαράσταση του μεταβολικού μονοπατιού για την αφομοίωση του οξικού και βουτυρικού οξέος

### 3.3 Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και DHA από το *C. cohnii*

Το θαλάσσιο μικροφύκος *C. cohnii* προτείνεται και χρησιμοποιείται εμπορικά για την παραγωγή Ω-3 λιπαρών οξέων και συγκεκριμένα DHA. Αυτό δικαιολογείται, αφού το συγκεκριμένο είδος μπορεί να παράγει μεγάλες ποσότητες λιπαρών που φτάνουν έως το 20% της συνολικής βιομάζας. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα του DHA αγγίζουν το 30-50% των συνολικά παραγόμενων λιπαρών οξέων, με κανένα από τα ενδιάμεσα προϊόντα στις αντιδράσεις επιμήκυνσης και αποκορεσμού, να βρίσκεται πάνω από 1% [25]. Αυτή η ανακάλυψη οδήγησε στη διαπίστωση πως το μονοπάτι παραγωγής DHA είναι αυστηρώς ρυθμισμένο για την απόλυτη μετατροπή όλων των ενδιάμεσων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Η παραγωγή των λιπαρών στο μικροφύκος *C. cohnii* ξεκινά από την παραγωγή κορεσμένων λιπαρών, συνεχίζει στην μετατροπή των κορεσμένων λιπαρών οξέων σε μονοακόρεστα λιπαρά και τέλος καταλήγει στην de novo σύνθεση του DHA [25].

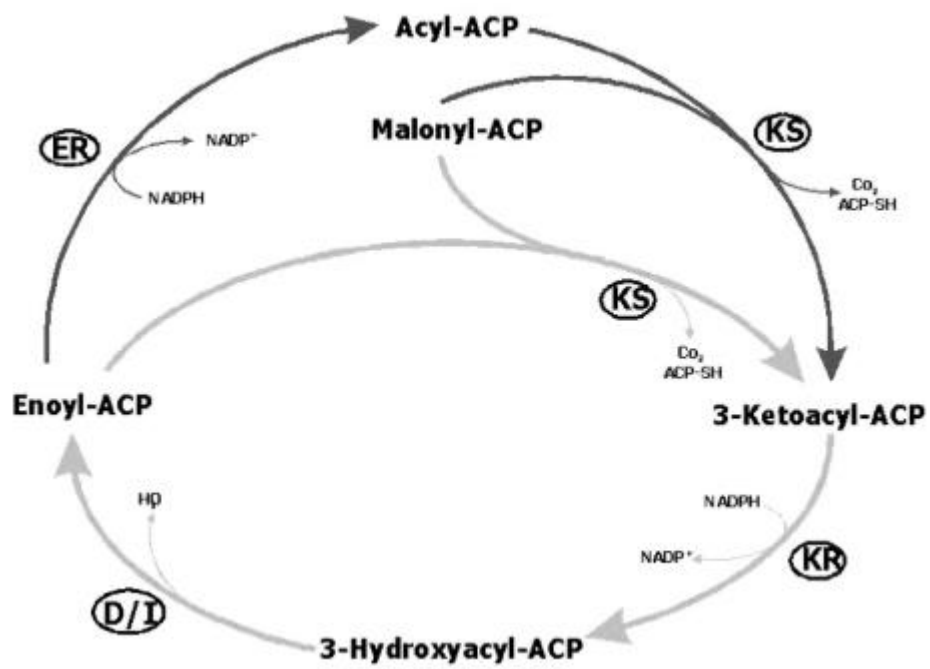
Η βιοσύνθεση του DHA μπορεί να γίνει είτε υπό αερόβιες, είτε υπό αναερόβιες συνθήκες. Η αερόβια παραγωγή του DHA περιλαμβάνει τον αποκορεσμό και την επιμήκυνση του C18:0 με τη συνέργεια ενζύμων όπως η ντεσατουράσες και οι ελονκάσες. Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης είναι ιδιαίτερα περίπλοκο και παραμένει για πολλούς μικροοργανισμούς κρυπτογραφημένο [25].



Εικόνα 7 Διαγραμματική απεικόνιση της παραγωγής DHA στα μικροφύκη και στα θηλαστικά

Όσον αφορά την αναερόβια παραγωγή, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί υπό αερόβιες συνθήκες απλά δεν απαιτεί την παρουσία μοριακού οξυγόνου, καταλύεται από το ένζυμο πολυκετιδική συνθάση (polyketide syntase). Ο μηχανισμός αυτός ταυτοποιήθηκε από το μικροοργανισμό *Schizochytrium*, που ανήκει στην οικογένεια των *Traustochytriidae* [26]. Αυτό το μονοπάτι για παραγωγή DHA διαφέρει από το προηγούμενο που περιλαμβάνει αντιδράσεις επιμήκυνσης και αποκορεσμού, καθώς οι διπλοί δεσμοί εισάγονται κατά τη σύνθεση των λιπαρών οξέων.

Ωστόσο, για να μπορέσουμε να αποδώσουμε με ακρίβεια τον τρόπο και τη μέθοδο σύνθεσης του DHA από το *C. cohnii* χρειάζεται περισσότερη έρευνα, που να περιλαμβάνει την αποκρυπτογράφηση του γονιδιώματος και τη σήμανση των ατόμων άνθρακα, με σκοπό να ταυτοποιηθούν οι αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν.

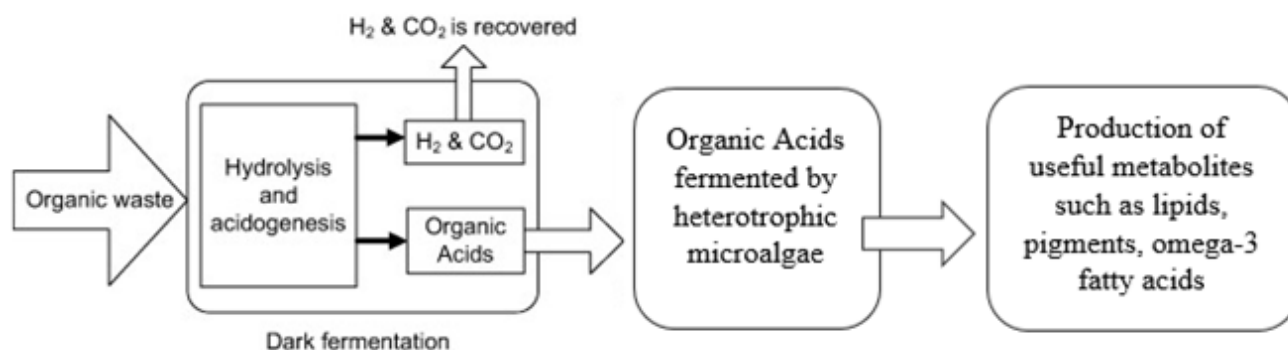


Εικόνα 8 Το αναερόβιο μονοπάτι για τη σύνθεση του DHA με τη βοήθεια της πολυκετιδικής συνθάσης ACP: ακυλο- πρωτεΐνη μεταφορέας, KS: 3-κετοακυλο-ACP συνθάση, KR: 3-υδροάκυλο-ACP ρεντακτάση, D/I: αφυδρο/ισομεράση, ER: ενολική-ACP ρεντακτάση

#### 4. Υγρό κλάσμα σκοτεινής ζύμωσης βιοαποβλήτου – Dark fermentation

Στη παρούσα ερευνητική μελέτη εξετάστηκε η δυνατότητα ανάπτυξης του μικροφύκου *Cryptosporidium cohnii* σε διήθημα υγρού κλάσματος σκοτεινής ζύμωσης βιοαποβλήτου. Η σκοτεινή ζύμωση (dark fermentation – DF) των βιοαποβλήτων από βακτήρια, αποτελεί μια αναερόβια διεργασία, χωρίς το τελευταίο στάδιο της μεθανογένεσης. Το στάδιο της μεθανογένεσης διακόπτεται είτε με θερμική προκατεργασία του ρεύματος των αποβλήτων για την καταστροφή των μεθανογόνων βακτηρίων, είτε διατηρώντας το pH σε τιμές υψηλότερες του 9, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξή τους ή με χρήση παρεμποδιστών, όπως το ιωδοφόρμιο.

Πιο συγκεκριμένα, τα βακτήρια με την σκοτεινή ζύμωση των βιοαποβλήτων διασπών, αρχικά, μέσω ενζυμικής υδρόλυσης τα οργανικά μακρομόρια σε απλούστερα μονομερή, όπως σάκχαρα, αμινοξέα και λιπαρά οξέα. Στη συνέχεια, οι μικροοργανισμοί μέσω της οξεογένεσης ζυμώνουν τα παραπάνω μονομερή προς μικρού μοριακού βάρους οργανικά οξέα. Τα κυριότερα οξέα που θα παραχθούν είναι το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ και σε μικρότερες ποσότητες βαλερικό, ισοβαλερικό και καπροϊκό. Στο αμέσως επόμενο στάδιο, αυτό της ακετογένεσης, τα πτητικά οργανικά οξέα διασπώνται κατά βάση προς οξικό οξύ, ενώ παράγεται και αέριο μίγμα υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα, ολοκληρώνοντας έτσι τη διεργασία της σκοτεινής ζύμωσης των βιοαποβλήτων, μιας και το τελικό στάδιο της μεθανογένεσης έχει παρεμποδιστεί [21]. Το υδρογόνο από το στάδιο της ακετογένεσης συλλέγεται και αξιοποιείται ως αέριο καύσιμο, ενώ το οξικό οξύ θεωρείται ένα από τα παραπροϊόντα της σκοτεινής ζύμωσης.



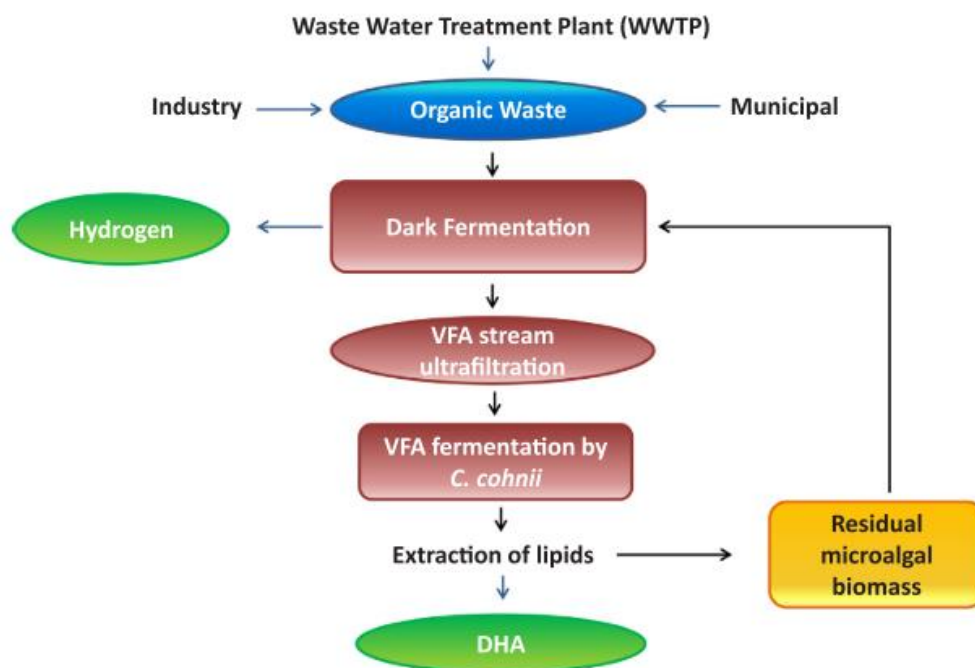
Εικόνα 9 Διεργασία dark fermentation σε συνδυασμό με την ανάπτυξη μικροφυκών

Αναφερόμενοι στο οξικό οξύ, το ίδιο αποτελεί μια οικονομική πηγή άνθρακα, η οποία δύναται να χρησιμοποιηθεί για την ετερότροφη ανάπτυξη των μικροφυκών. Η εκμετάλλευσή του, ως προϊόν της σκοτεινής ζύμωσης είναι απαραίτητη, αφού το ίδιο θεωρείται επικίνδυνος περιβαλλοντικός ρυπαντής, με σημαντικό περιβαλλοντικό αντίκτυπο, αφού η απόρριψη του στο περιβάλλον μολύνει τον υδροφόρο ορίζοντα και δύναται να καταστρέψει τα υδάτινα οικοσυστήματα.

Στο σημείο αυτό να αναφερθεί, ότι το διήθημα του υγρού κλάσματος της σκοτεινής ζύμωσης, εκτός από τα μικρού μοριακού βάρους πτητικά οργανικά οξέα (VFAs), είναι επίσης εμπλουτισμένο με σημαντικές ποσότητες αζώτου και φωσφόρου, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροφυκών [24].

Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της σκοτεινής ζύμωσης είναι ότι το βιοαπόβλητο ζυμώνεται από μικτές καλλιέργειες μικροοργανισμών που υπάρχουν στην ιλύ υπό αναερόβιες συνθήκες και στη συνέχεια έπειτα από υπερδιήθηση, το υγρό κλάσμα της ζύμωσης διατίθεται για την ετερότροφη ανάπτυξη των μικροφυκών, από όπου και προκύπτουν τα λιπαρά [24]. Η διεργασία της σκοτεινής ζύμωσης, δεν απαιτεί στείρες συνθήκες και αποστειρωμένα υποστρώματα, γεγονός που χαμηλώνει το συνολικό κόστος της διεργασίας. Επιπλέον, μετά την εκχύλιση των λιπαρών, είναι δυνατή η ανακυκλοφορία των υπολειμμάτων της παραχθείσας βιομάζας των μικροφυκών, ως υπόστρωμα για αναερόβια ζύμωση, καθώς τα ίδια αποτελούν μια σημαντική πηγή άνθρακα και χημικών στοιχείων, όπως φώσφορο και άζωτο.

Η διαδικασία της σκοτεινής ζύμωσης αποτελεί μια βιώσιμη και οικολογική εκδοχή διαχείρισης των αποβλήτων, που κατά βάση στόχο έχει να παράγει αέρια καύσιμα (βιοϋδρογόνο). Τα παραπροϊόντα από τη ζύμωση των αποβλήτων συνιστούν ιδανικό μέσο για την ανάπτυξη των μικροφυκών, συμβάλλοντας στην δημιουργία ενός βιοδιυλιστηρίου, επιτυγχάνοντας με τον τρόπο αυτό τη πλήρη εκμετάλλευση όλων των επιμέρους ροών.



Εικόνα 10 Διαγραμματική απεικόνιση της διεργασίας της σκοτεινής ζύμωσης προς παραγωγή Ω-3 λιπαρών οξέων. Πηγή [21]

## 5. Διατροφικές πηγές πρόσληψης DHA και η συνεισφορά του στην ανθρώπινη υγεία

Τα Ω-3 λιπαρά οξέα ανήκουν στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και είναι γνωστά για τις ευεργετικές ιδιότητες τους, στην υγεία των ανθρώπων, αλλά και των ζώων. Τα Ω-3 είναι λιπαρά οξέα διακρίνονται:

- Στο α-λινολενικό οξύ (ALA), που το βρίσκουμε σε φυτικά τρόφιμα, όπως ο λιναρόσπορος και το μπρόκολο.
- Στο εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA)
- Το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA), που περιέχονται σε ψάρια και θαλασσινά.

Οι 10 πιο πλούσιες σε Ω-3 λιπαρά οξέα τροφές που μπορεί κανείς να συμπεριλάβει στην διατροφή του είναι:



Πίνακας 1 Οι 10 πιο πλούσιες τροφές σε Ω-3 λιπαρά οξέα [27]

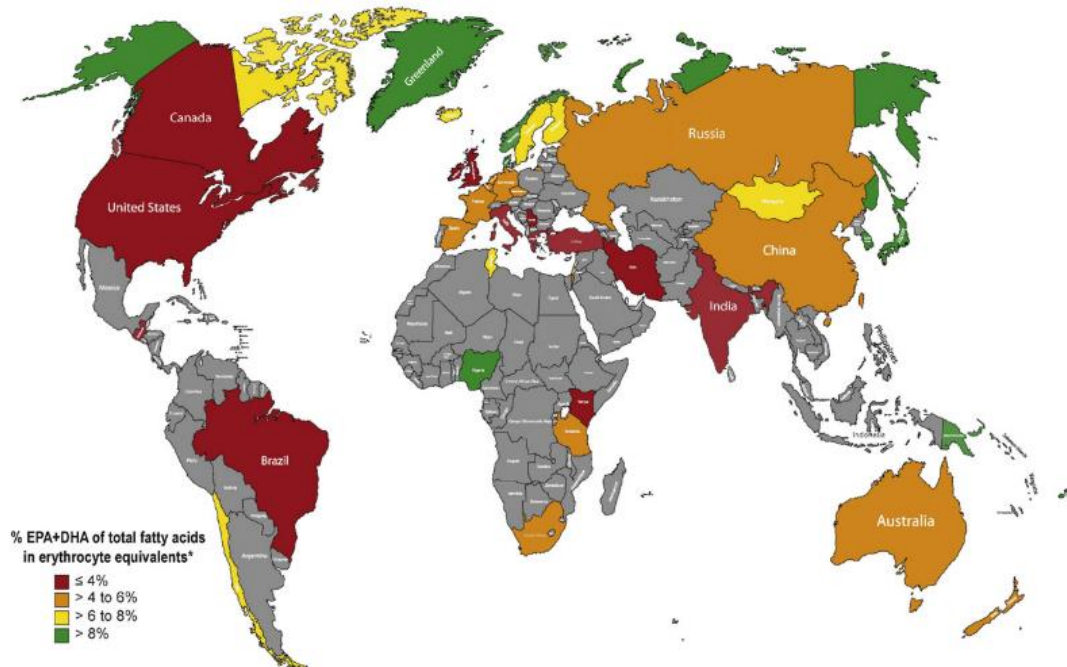
Τρόφιμο	Περιεκτικότητα σε Ω-3 (γρ.)
Λιναρόσπορος (2 κουταλιές)	3,5 γρ.
Καρύδια (1/4 φλιτζανιού)	2,27 γρ.
Σολομός (120 γρ.)	2,56 γρ.
Σκουμπρί (120 γρ.)	1,65 γρ.
Πέστροφα ιχθυοτροφείου (120 γρ.)	1,4 γρ.
Σαρδέλες σε λάδι (120 γρ.)	1,36 γρ.
Ξιφίας (120 γρ.)	1,2 γρ.
Τόνος ψάρι (120 γρ.)	0,8 γρ.
Πέρκα (120 γρ.)	0,55 γρ.
Γαρίδες μαγειρεμένες (120 γρ.)	0,4 γρ.

Σύμφωνα με ιατρικές έρευνες, τα Ω-3 λιπαρά οξέα επιδρούν θετικά στο οπτικό και νευρικό σύστημα, ενώ η κατανάλωση τους σχετίζεται με μείωση της εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων. Επιπλέον, η κατανάλωση των Ω-3 λιπαρών οξέων συνδέεται με μείωση της καρδιαγγειακής πίεσης, του άγχους, και του πόνου, ενώ μελέτες τους αποδίδουν αντικαρκινική και ευεργετική δράση έναντι νοσημάτων, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα [28].

Ωστόσο, παρά την πληθώρα των πλεονεκτημάτων των Ω-3 λιπαρών οξέων μεγάλο ποσοστό των παγκόσμιου πληθυσμού εμφανίζει μειωμένα ποσοστά πρόσληψης Ω-3 λιπαρών οξέων. Στις βασικότερες αιτίες, που δικαιολογούν το γεγονός αυτό, συγκαταλέγονται[28] :

- Η έλλειψη της διατροφικής εκπαίδευσης που οδηγεί στην μειωμένη κατανάλωση ψαριών και θαλασσινών πλούσιων σε Ω-3 λιπαρών οξέων,
- Η μείωση του περιεχομένου ποσοστού EPA και DHA στα ψάρια και κυρίως εκείνων που προέρχονται από ιχθυοκαλλιέργειες, λόγω της χαμηλής ποιότητας των ζωοτροφών

- Το μαγείρεμα των τροφών σε μικροκύματα, η κονσερβοποίηση και το τηγάνισμα είναι διεργασίες που συμβάλλουν στην καταστροφή μεγάλου ποσοστού των Ω-3 λιπαρών οξέων.



Εικόνα 11 Παγκόσμιος χάρτης έλλειψης Ω-3 λιπαρών οξέων Πηγή: [4]

Για τους παραπάνω λόγους, κρίνεται απαραίτητη η πρόσληψη συμπληρωμάτων Ω-3 λιπαρών οξέων. Στο σημείο αυτό, κρίνεται αναγκαίο να αναφερθεί, ότι η παραλαβή των λιπαρών με εκχύλιση από τους ζωικούς ιστούς των ψαριών συμπαρασύρει και βαρέα μέταλλα, τα οποία συναντώνται στο τελικό προϊόν και συσσωρεύονται στον ανθρώπινο οργανισμό. Ο καθαρισμός των βαρέων μετάλλων είναι διεργασία ιδιαίτερα προβληματική και ακριβή, ενώ τα λιπαρά από τα ψάρια δεν εμφανίζουν σταθερότητα και έχουν ιδιόμορφη γεύση και οσμή [29].

Επιπροσθέτως, για την κάλυψη της ολοένα και αυξανόμενης ζήτησης σε Ω-3 λιπαρά οξέα πραγματοποιείται υπεραλίευση των ψαριών από τους ωκεανούς. Για τους παραπάνω λόγους, μια πιο φιλική προς το περιβάλλον ματιά επιβάλλει την πρόσληψη Ω-3 λιπαρών από εναλλακτικές πηγές, που μπορούν να παράγουν μεγάλες ποσότητες Ω-3 λιπαρών, όπως τα μικροφύκη, αφήνοντας πίσω την σημερινή τεχνοτροπία. Άλλωστε, τα Ω-3 λιπαρά, που παράγονται κατ' αποκλειστικότητα από το φυτοπλαγκτόν μεταφέρονται μέσω της τροφικής αλυσίδας στο ζωοπλαγκτόν, που με τη σειρά του αποτελεί τροφή για τα ψάρια

## **Ενότητα 2<sup>η</sup>:**

---

### **Ανάλυση των πειραματικών σταδίων και μεθόδων**



## 1. Όργανα και συσκευές

- 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, Hitachi
- Χρωματογράφος Υψηλής απόδοσης HPLC Shimadzu apparatus, Kyoto, Japan

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιούνται τυπικά εργαστηριακά όργανα, όπως οι 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.

Το μικροφύκος που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων είναι το *Cryptocodium cohnii* ATCC® 30772™, που προμηθεύτηκε από το American Type Culture Collection (ATCC)

## 2. Διεξαγωγή Έρευνας

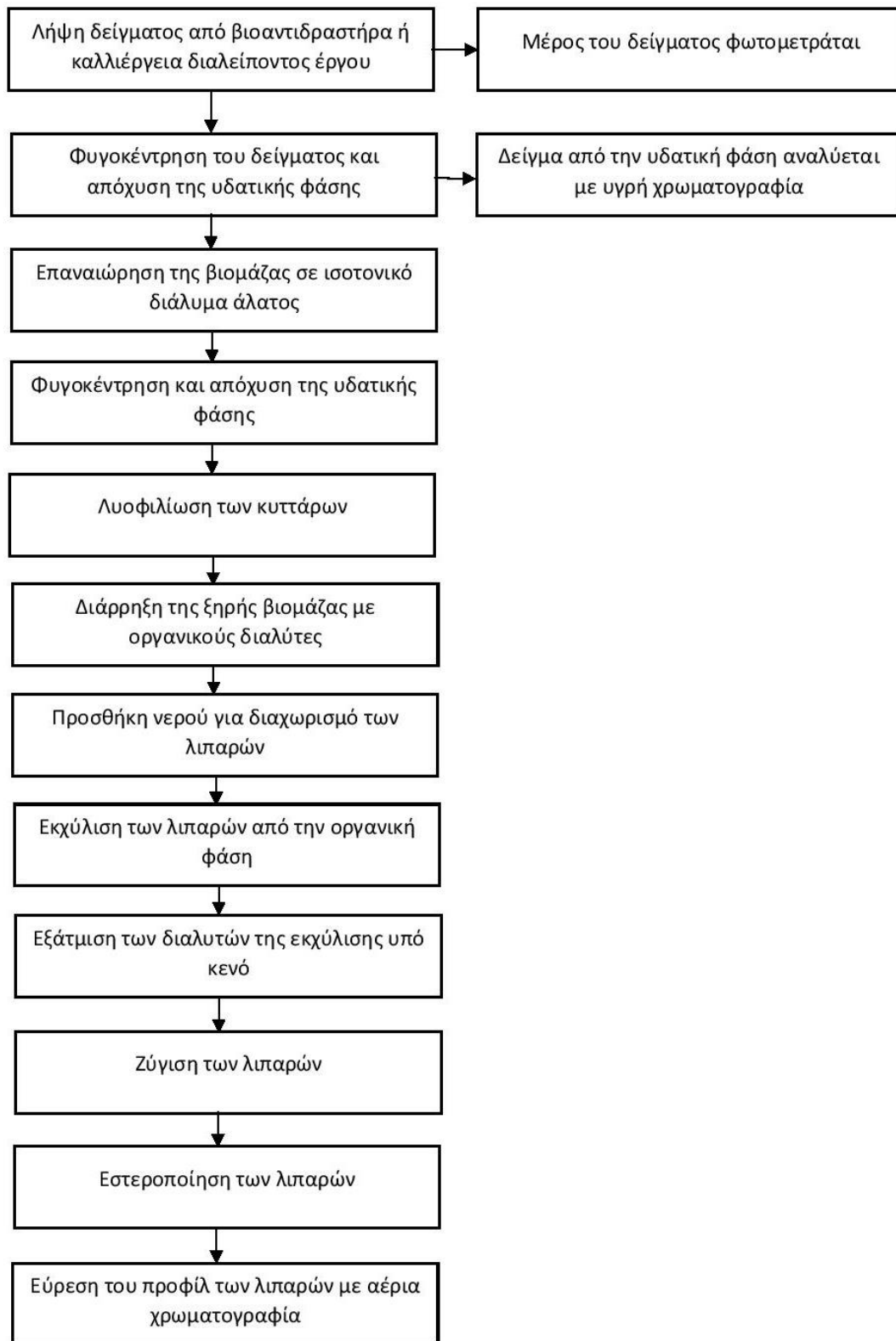
### 2.1 Μελέτη περίπτωσης (Case Study)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε ερευνητική μελέτη, που αφορούσε αρχικά την βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης του μικροφύκου *C. cohnii*, με σκοπό τη μεγιστοποίηση της παραγωγής του δοκοσαεξανοϊκού οξέος (DHA). Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης βρέθηκαν έπειτα από ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου διαφορετικών συνθηκών. Σε κάθε περίπτωση μεταβάλλονταν οι συγκεντρώσεις κρίσιμων, για την ανάπτυξη του μικροφύκου, παραγόντων, όπως για παράδειγμα οι συγκεντρώσεις των αμμωνιακών ιόντων. Επιπλέον, εξετάστηκε η χρήση χημικών ρυθμιστών (chemical modulator), που βιβλιογραφικά αναφέρεται πως έχουν την ικανότητα να επάγουν την σύνθεση Ω-3 λιπαρών οξέων.

Εν συνεχεία, οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης εφαρμόστηκαν σε καλλιέργειες μεγαλύτερης κλίμακας ημισυνεχούς λειτουργίας, και εξετάστηκε η επίδραση της καλλιέργειας δυο σταδίων στην παραγωγή Ω-3 λιπαρών οξέων. Επιπλέον, στα πλαίσια της βελτιστοποίησης πραγματοποιήθηκαν δοκιμές που αφορούσαν την χρήση διήθηματος υγρού κλάσματος σκοτεινής ζύμωσης βιοαποβλήτου, με διαφορετικές συγκεντρώσεις πτητικών οργανικών οξέων (VFAs) και υπολογίστηκε στη συγκεκριμένη περίπτωση η παραγωγή των λιπαρών οξέων.

### 2.2 Διαγραμματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας

Σε κάθε περίπτωση για τον υπολογισμό της παραγόμενης ποσότητας λιπαρών, πραγματοποιήθηκε μια σειρά από ενέργειες οι οποίες συνοπτικά παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα ροής.



Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης παρουσιάζονται στις ενότητες που ακολουθούν.

### **3. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης του μικροφύκου *C. cohnii***

#### **3.1 Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του μικροφύκου (ATCC 460)**

Σε όλα τα πειράματα που θα αναφερθούν παρακάτω χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο μικροφύκος, το οποίο έχει αναπτυχθεί στο θρεπτικό μέσο ATCC 460 (A2E6). Το μικροφύκος που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων είναι το *C. cohnii* ATCC® 30772™, που προμηθεύτηκε από το American Type Culture Collection (ATCC) Οι καλλιέργειες διαλείποντος έργου, τελικού όγκου 50mL αναπτύσσονται σε κωνικές φιάλες (Erlenmeyer flasks) και διατηρούνται σε θερμοστατούμενο θάλαμο έως και 15 ημέρες στους 23 °C, χωρίς ανάδευση. Η χρήση του συγκεκριμένου θρεπτικού μέσου, για τις καλλιέργειες που προορίζονται για αποθήκευση, είναι απαραίτητη για την αποφυγή της προσαρμογής του φύκου σε μέσα μη επαρκή σε όλα τα θρεπτικά στοιχεία. Το γεγονός αυτό, θα μπορούσε να επιφέρει πιθανώς την αδρανοποίηση μεταβολικών οδών και συνεπώς την μεταβολή των βιολογικών χαρακτηριστικών του φύκου. Τα συστατικά του θρεπτικού μέσου ATCC 460 παρουσιάζονται στον Πίνακα 10 ATCC Medium: 460 A<sub>2</sub>E<sub>6</sub> Medium στο Παράρτημα του εγγράφου.

Όλες οι ενέργειες που αφορούσαν τον εμβολιασμό των θρεπτικών μέσων και την ανακαλλιέργεια του μικροφύκου γίνονταν υπό στείρες συνθήκες, σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο εργασίας. Η εξασφάλιση στείρων συνθηκών είναι αναγκαία για την επιτυχημένη πρόοδο των καλλιεργειών, καθώς το μικροφύκος είναι ευάλωτο σε βακτηριακές μολύνσεις ιδίως στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του. Πιθανή είναι επίσης και η προσβολή των καλλιεργειών από μύκητα, κυρίως μετά την εξάντληση των θρεπτικών συστατικών κατά το τελικό στάδιο ζωής των καλλιεργειών.

#### **3.2 Ανάπτυξη του *Cryptheconidium cohnii* στο βασικό μέσο ανάπτυξης (standard batch)**

Σε προηγούμενη μελέτη [30] βρέθηκε πως η βέλτιστη συγκέντρωση άλατος οξικού οξέος για την ανάπτυξη του μικροφύκου είναι 30 g/L. Για την παρασκευή μέσου ανάπτυξης με την παραπάνω συγκέντρωση οξικού, προστίθεται 2,8 g/L εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), που συνιστά για την καλλιέργεια την απαραίτητη πηγή αζώτου, καθώς και πηγή σημαντικών θρεπτικών συστατικών όπως οι βιταμίνες. Εκτός των παραπάνω, προστίθενται 18,7 g/L εμπορικό σκεύασμα θαλάσσιου άλατος (sea salts) και 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος Tris /HCl, Το ρυθμιστικό διάλυμα συμβάλλει στην διατήρηση σταθερού pH στην καλλιέργεια, το οποίο ρυθμίζεται στην τιμή 6.5. Η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος είναι απαραίτητη, αφού με κατανάλωση του οξικού οξέος από το φύκος το pH της καλλιέργειας αυξάνεται.



Κατόπιν οι καλλιέργειες αποστειρώνονται σε αυτόκλειστο διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 121°C για 20 λεπτά και πίεση 0,1MPa και αμέσως μετά εμβολιάζονται. Οι καλλιέργειες αυτές έχουν συνολικό όγκο 50 mL και το εμβόλιο αποτελεί 10 % του συνολικού όγκου.

### **3.3 Ανάπτυξη του *Cryptosporidium parvum* σε θρεπτικό υλικό με γλυκόζη – Στατικές και αναδεδυόμενες καλλιέργειες**

Για τον εμβολιασμό των βιοαντιδραστήρων ακολουθείται διαφορετική προετοιμασία του εμβολίου από αυτή που αναλύθηκε παραπάνω.

Αρχικά, προετοιμάζονται στατικές προκαλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό με 9 g/L, γλυκόζη, 25 g/L θαλασσινό αλάτι και 2 g/L εκχύλισμα μαγιάς. Οι προκαλλιέργειες εμβολιάζονται από καλλιέργειες μικροφύκους 4 ημερών σε θρεπτικό μέσο ATCC 460 (A2E6) και διατηρούνται στους 23°C για 4 ημέρες. Οι καλλιέργειες αυτές έχουν συνολικό όγκο 50 mL και το εμβόλιο αποτελεί 10% του συνολικού όγκου.

Στη συνέχεια, οι στατικές προκαλλιέργειες αποτελούν το εμβόλιο για την παρασκευή αναδεδυόμενων καλλιεργείων συνολικού όγκου 100 mL. Το εμβόλιο αποτελεί όπως και προηγουμένως το 10% το συνολικού όγκου. Οι καλλιέργειες αυτές διατηρούνται υπό ανάδευση για 3 ημέρες στα 160rpm. Το θρεπτικό μέσο των αναδεδυόμενων καλλιεργείων αποτελείται από 27 g/l γλυκόζη, 25 g/l θαλασσινό αλάτι και 3,8 g/l εκχύλισμα μαγιάς.

Το pH και στις δυο παραπάνω περιπτώσεις ρυθμίζεται πριν την αποστείρωση στην τιμή 6.5. Με την παρασκευή των θρεπτικών μέσων και πριν τον εμβολιασμό, τα υποστρώματα αποστειρώθηκαν σε αυτόκλειστο διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 121°C για 20 λεπτά και πίεση 0,1MPa.

## 4 Στάδια επεξεργασίας

### 4.1 Μέτρηση απορρόφησης βιομάζας

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων είτε σε batch καλλιέργειες, όπου εξετάστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, είτε στην περίπτωση των καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρες ημί-διαλείποντος έργου, λαμβάνονταν καθημερινά δείγματα κυττάρων. Τα δείγματα φωτομετρούνταν στη συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader, SpectraMax 250 (Molecular devices), όπου και λαμβάνονταν οι τιμές απορρόφησης.

Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται στα 685 nm, αφού πρώτα τα δείγματα ανακινούνται για 8 sec. Όπου ήταν απαραίτητο, και ιδίως μετά από 120h από την έναρξη των καλλιεργειών, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις των δειγμάτων, ούτως ώστε η ένδειξη της απορρόφησης του οργάνου να είναι συνεχώς μικρότερη της μονάδας. Εκτός της φωτομέτρησης της βιομάζας πραγματοποιείται και μέτρηση της απορρόφησης του θρεπτικού μέσου. Αυτή επιτυγχάνεται έπειτα από φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 1.5 min και λαμβάνοντας δείγμα από το υπερκείμενο υδατικό διάλυμα. Η καταβύθιση των κυττάρων έπειτα από φυγοκέντρηση του δείγματος και η μέτρηση της απορρόφησης του θρεπτικού μέσου συνιστά το τυφλό δείγμα. Ο όγκος του δείγματος που φωτομετράται ήταν σε κάθε περίπτωση 250 μl.

Σκοπός της φωτομέτρησης είναι η κατασκευή της καμπύλης ανάπτυξης των κυττάρων όπως αυτή παρουσιάστηκε στην παραπάνω ενότητα. Για την κατασκευή της καμπύλης αφαιρείται η απορρόφηση του θρεπτικού μέσου από την απορρόφηση του δείγματος, αποτέλεσμα που αντιστοιχεί στην απορρόφηση της βιομάζας. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι, η απορρόφηση στο συγκεκριμένο μήκος κύματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της βιομάζας στο μέσο καλλιέργειας, γι' αυτό και τα αποτελέσματα χρησιμοποιούνται για τη κατασκευή καμπύλης ανάπτυξης.

Από την κατασκευή της καμπύλης, όταν τα κύτταρα βρίσκονται στην στατική φάση, διακόπτεται η καλλιέργεια και πραγματοποιούνται τα επόμενα στάδια επεξεργασίας, που στόχο έχουν την απομόνωση των λιπαρών.



Εικόνα 12 Συσσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader

## 4.2 Λυοφιλίωση των κυττάρων

Μετά το πέρας της ζύμωσης των κυττάρων, είτε σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου, είτε στην περίπτωση των αντιδραστήρων ημί-διαλείποντος έργου, ογκομετρείται η ποσότητα της καλλιέργειας και ίσο-μοιράζεται σε πλαστικούς σωλήνες με πάμα όγκου 50 mL (falcon). Τα falcon στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 7 min στα 650 g. Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται και η καταβυθισμένη βιομάζα επαναιωρείται σε περίπου 5 mL διάλυμα θαλασσινού μίγματος αλάτων με συγκέντρωση παρόμοια με εκείνη των καλλιεργειών, με σκοπό να αποφευχθεί πιθανή διάρρηξη των κυττάρων λόγω φαινομένων ώσμωσης. Με τον τρόπο αυτό, εκπλένονται επίσης τυχόν ανεπιθύμητες ουσίες του διαλύματος της καλλιέργειας που καταβυθίστηκαν μαζί με τα κύτταρα. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται ακόμα μια φορά στις ίδιες συνθήκες και απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό.

Στη συνέχεια τα κύτταρα, επαναιωρούνται σε 1 mL απιονισμένου νερού και καταψύχονται στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Μετά την κατάψυξη των κυττάρων, τα falcon τοποθετούνται στη συσκευή λυοφιλίωσης. Η λυοφιλίωση των κυττάρων γίνεται υπό κενό στους  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  έως πλήρους ξήρανσης των δειγμάτων. Η ξήρανση των δειγμάτων πραγματοποιείται συνήθως σε διάστημα 24 h.

Στο σημείο αυτό να αναφερθεί, ότι στην περίπτωση των βιοαντιδραστήρων, εκτός της λυοφιλίωσης της συνολικής βιομάζας στο τέλος της ζύμωσης, λαμβάνονται καθημερινά διπλά δείγματα όγκου 7-15 mL. Τα δείγματα αυτά λυοφιλιώνονται ακολουθώντας τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω με σκοπό την ανάλυση του λιπιδικού προφίλ σε καθημερινή βάση.

### 4.3 Εκχύλιση των λιπαρών από το μικροφύκος *Cryptheconidium cohnii* και εξάτμιση των διαλυτών

Έπειτα από την ξήρανση των κυττάρων υπό κενό, ζυγίζεται η συνολική παραχθείσα βιομάζα και λαμβάνεται από αυτή ένα μέρος. Η ποσότητα αυτή χρησιμοποιείται για εκχύλιση των λιπαρών. Η εκχύλιση πραγματοποιείται σύμφωνα με τη μέθοδο Folch, η οποία ωστόσο τροποποιήθηκε μερικώς [31].

Αναλυτικότερα, 30-50mg της συνολικής βιομάζας κάθε δείγματος τοποθετείται οι σε πλαστικούς σωλήνες με πάμα όγκου 15mL και αναμιγνύεται με διαλύτη χλωροφόρμιο-μεθανόλη, σε αναλογία 2:1 v/v. Μετά την προσθήκη του διαλύτη, τα δείγματα αφήνονται για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση στα 160rpm. Η ποσότητα του διαλύτη που προστίθεται υπολογίζεται κατά τα εξής. Για κάθε 25 mg βιομάζας, προστίθεται 5 ml διαλύματος. Μετά το πέρας 24 h, όπου έχει πραγματοποιηθεί η εκχύλιση των λιπαρών, προστίθεται απιονισμένο νερό σε ποσότητα ίση με το 20% του όγκου του οργανικού διαλύματος.

Μετά την προσθήκη του νερού, πραγματοποιείται ανάδευση σε συσκευή vortex για την καλύτερη ανάμιξη των δυο φάσεων και κατόπιν οι πλαστικοί σωλήνες με πάμα όγκου 15mL φυγοκεντρώνται για 7 min στα 650 g. Μετά την φυγοκέντρηση, λαμβάνεται η κάτω οργανική φάση και εκπλένεται δυο φορές με 1 ml διαλύματος MeOH:HO σε αναλογία ίση με 1:1 v/v. Η άνω υδατική φάση απορρίπτεται.



Εικόνα 13 Εκχύλιση λιπαρών

Κατά το επόμενο στάδιο, το τελικό εκχύλισμα τοποθετείται σε προζυγισμένους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες και οδηγείται για εξάτμιση των διαλυτών. Η εξάτμιση πραγματοποιείται σε φούρνο κενού στους 40 °C σε πίεση ίση με 450 mbar.

Μετά την εξάτμιση των διαλυτών, περίπου μετά από 24 h, οι δοκιμαστικοί σωλήνες ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό. Τα συνολικά εκχυλισμένα λιπαρά υπολογίζονται μετά την αφαίρεση του βάρους των δοκιμαστικών σωλήνων που έχει μετρηθεί εξ' αρχής.



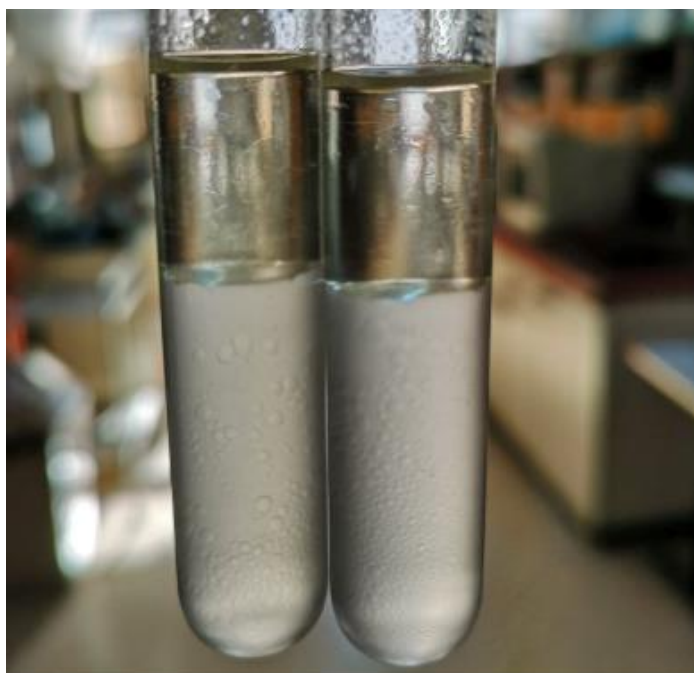
*Εικόνα 14 Λιπαρά οξέα μετά την απομάκρυνση του διαλύτη*

#### **4.4 Εστεροποίηση των λιπαρών και ανάλυση του λιπιδικού προφίλ με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας (GC)**

Μετά την εξάτμιση των διαλυτών, πραγματοποιείται εστεροποίηση των λιπαρών που έχουν απομονωθεί προς παραγωγή μεθυλεστέρων.

Συγκεκριμένα, τα ξηρά λιπαρά διαλύονται σε 1 mL χλωροφόρμιο (HPLC grade) και προστίθεται επιπλέον 2,5 ml MeOH:HCl, σε αναλογία 92:8% (v/v). Το διάλυμα του HCl λειτουργεί σαν όξινος καταλύτης, που επιταχύνει τον ρυθμό της αντίδρασης. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες καλύπτονται για την αποφυγή εξάτμισης των πτητικών οργανικών διαλυτών και κατόπιν τοποθετούνται σε υδατόλουτρο, θερμοκρασίας 60 °C για 15 min.

Μετά από 15 min, οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφαιρούνται από το υδατόλουτρο και προστίθεται σε αυτούς 2,5 mL CaCl<sub>2</sub> συγκέντρωσης 5% (w/v). Το χλωριούχο ασβέστιο τερματίζει την αντίδραση.



*Εικόνα 15 Εστεροποίηση των λιπαρών οξέων*

Για την απομόνωση των μεθυλεστέρων πραγματοποιείται εκχύλιση με 1mL εξανίου (HPLC grade), που επαναλαμβάνεται 3 φορές. Η ποσοτικοποίηση και η σύσταση των μεθυλεστέρων έγινε βάση του πρωτοκόλλου ανάλυσης που χρησιμοποιείται για το GC-FID σύστημα με χρωματογραφική στήλη Equity 5 Capillary GC. Η θερμοκρασία εισαγωγής του δείγματος είναι 270°C, ενώ ως φέρον αέριο επιλέχθηκε το ήλιο με ροή 1 mL/min. Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίζεται βάσει θερμοπρογράμματος και αυξάνεται από 125°C έως 240°C, με ρυθμό 5°C / min, ενώ για τα τελευταία 9 min παρέμεινε σταθερή. Τα δείγματα εισάγονται στη στήλη και ορίζεται split ratio 50:1.



*Εικόνα 16 Αέριος χρωματογράφος*

#### 4.5 Ανάλυση της κατανάλωσης των πτητικών οργανικών οξέων με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας (HPLC)

Η ημερήσια μείωση της συγκέντρωσης των πτητικών οργανικών οξέων (VFA) εντοπίζεται με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Aminex HPX-87H (300×7.8 mm, particle size 9 μm; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) συνδεδεμένη με τη προστήλη Cation-H Bio-Rad. Για την ανίχνευση των οργανικών οξέων χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (RID). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο NREL, που ακολουθήθηκε, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στους 65 °C χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση υδατικό διάλυμα θεικού οξέος 5 mM με ροή 0,6 mL/min. Ο χρόνος ανάλυσης είναι 50 min. Η θερμοκρασία της στήλης παρέμενε σταθερή στους 65 °C, με τη βοήθεια φούρνου στήλης (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

Όσον αφορά τον ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Refractive Index-RID), εκείνος μετρά την αλλαγή στο δείκτη διάθλασης στο διάλυμα που αναλύεται, έναντι του καθαρού διαλύτη. Αποτελείται από ένα γυάλινο κελί δύο θαλάμων, έναν θάλαμο στον οποίο εισάγεται το δείγμα και έναν θάλαμο αναφοράς που είναι γεμάτος με την κινητή φάση. Όταν ο πρώτος θάλαμος γεμίζει με το δείγμα, λόγω των διαφορετικών συστατικών από τη κινητή φάση, η προσπίπτουσα δέσμη υφίσταται διάθλαση. Η ανάλυση της διάθλασης 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 [32].

Η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος έγινε με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς, η οποία παρουσιάζεται στο παράρτημα του εγγράφου.



Εικόνα 17 Συσσκευή υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή RID



## 5. Προετοιμασία καλλιέργειών για εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης

### 5.1 Εύρεση βέλτιστης πηγής αζώτου

Για την εύρεση της βέλτιστης πηγής αζώτου παρασκευάζονται καλλιέργειες με ATCC, ως μέσο ανάπτυξης. Κατά παρέκκλιση της δοσμένης σύστασης του ATCC, χρησιμοποιείται σαν πηγή άνθρακα οξικό νάτριο  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , με συγκέντρωση 30 g/L, τιμή που επιτυγχάνει τη καλύτερη ανάπτυξη του μικροφύκου [21] και ως πηγή αζώτου μια από τις παρακάτω.

Για την εύρεση της ιδανικότερης πηγής χρησιμοποιούνται εκχύλισμα ζύμης (yeast extract, YE), νιτρικό νάτριο ( $\text{NaNO}_3$ ), θειικό αμμώνιο ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), νιτρικό αμμώνιο ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) και ουρία. Οι συγκεντρώσεις των αμμωνιακών αντιστοιχούν σε λόγο άνθρακα προς άζωτο ίσο με 83 (C/N=83). Ο λόγος αυτός επιλέχθηκε, αφού βιβλιογραφικά αναφέρεται πως εμφανίζει την υψηλότερη παραγωγικότητα σε λιπαρά [33].

Αναλυτικότερα, οι συγκεντρώσεις των πηγών αζώτου που εξετάστηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 2 Συγκεντρώσεις των πηγών αζώτου που αντιστοιχούν σε λόγο C/N=83

Εκχύλισμα Ζύμης (YE)	$C_{\text{YE}} = 0.15 \text{ g/L}$
Νιτρικό νάτριο ( $\text{NaNO}_3$ )	$C_{\text{NaNO}_3} = 0.67 \text{ g/L}$
Θειικό αμμώνιο ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	$C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} = 0.50 \text{ g/L}$
Νιτρικό αμμώνιο ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	$C_{\text{NH}_4\text{NO}_3} = 0.31 \text{ g/L}$
Ουρία ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ )	$C_{\text{ΟΥΡΙΑΣ}} = 0.24 \text{ g/L}$

Στη συνέχεια, προστίθενται σε κωνικές φιάλες των 100 ml, 45 ml θρεπτικού υλικού και ρυθμίζεται το pH στο 6.3 – 6.6. Οι φιάλες κατόπιν αποστειρώνονται στο αυτόκλειστο διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 121°C για 20 λεπτά και πίεση 0,1MPa. Τέλος, γίνεται εμβολιασμός του θρεπτικού μέσου με 5 mL από καλλιέργειες 4 ημερών του *C. cohnii*, που είχε αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο ATCC. Με τον τρόπο αυτό το εμβόλιο αποτελεί το 10% v/v του τελικού όγκου της καλλιέργειας (50 ml). Οι καλλιέργειες τοποθετούνται σε επωαστήρα στους 27°C και ανάδευση 160 rpm. Μετά από 7 ημέρες παραμονής της σε επωαστήρα, η καλλιέργεια των κυττάρων σταματά και ξεκινά η εκχύλιση των λιπαρών.



## 5.2 Εύρεση βέλτιστης συγκέντρωσης πηγής αζώτου στη καλλιέργεια

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων στην παραγωγή βιομάζας, αλλά και στην συγκέντρωση των Ω-3 λιπαρών οξέων. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάστηκαν καλλιέργειες με διαφορετική συγκέντρωση αμμωνιακών ιόντων, χρησιμοποιώντας σαν πηγή το θειικό αμμώνιο ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ενώ σαν πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε το οξικό νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa). Η επιλογή του θειικού αμμωνίου ως πηγή αζώτου στηρίζεται στο γεγονός ότι εκείνο από προηγούμενο πείραμα αποδείχθηκε αποτελεσματικότερο, όσον αφορά την τελική συγκέντρωση λιπαρών και DHA. Η συγκέντρωση του οξικού νατρίου με την οποία επιτυγχάνεται καλύτερη ανάπτυξη του μικροφύκου είναι 30 g/L [21]. Βασιζόμενοι στην βέλτιστη συγκέντρωση του οξικού νατρίου, υπολογίστηκαν οι διαφορετικές συγκεντρώσεις των αμμωνιακών ιόντων, εξετάζοντας διαφορετικούς λόγους C/N. Ενδεικτικά, παρουσιάζεται ένα παράδειγμα υπολογισμού της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων στις καλλιέργειες.

Η συγκέντρωση του οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa) 30g/L με μοριακό βάρος  $M_{rCH_3COONa}=82$  αντιστοιχεί σε συγκέντρωση άνθρακα ( $M_{rC}=12$ ) 8.78 g/L. Με λόγο άνθρακα προς άζωτο C/N=10, η αντίστοιχη συγκέντρωση αζώτου στο διάλυμα είναι 0.878 g/L. Με δεδομένο το μοριακό βάρος του θειικού αμμωνίου ( $M_{r(NH_4)_2SO_4}=132.14$ ) και του αζώτου ( $M_{rN}=28$ ) υπολογίζεται αναλογικά η συγκέντρωση των αμμωνιακών σε 4.14 g/L.

Με βάση τους παραπάνω υπολογισμούς εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις των αμμωνιακών για διαφορετικούς λόγους C/N.

Πίνακας 3 Συγκέντρωση θειικού αμμωνίου βάση των διαφορετικών λόγων C/N

<b>C/N=10</b>	$C_{(NH_4)_2SO_4}= 4.14$ g/L
<b>C/N=20</b>	$C_{(NH_4)_2SO_4}= 2.07$ g/L
<b>C/N=50</b>	$C_{(NH_4)_2SO_4}= 0.83$ g/L
<b>C/N=60</b>	$C_{(NH_4)_2SO_4}= 0.69$ g/L
<b>C/N=83</b>	$C_{(NH_4)_2SO_4}= 0.50$ g/L
<b>C/N=100</b>	$C_{(NH_4)_2SO_4}= 0.41$ g/L
<b>C/N=110</b>	$C_{(NH_4)_2SO_4}= 0.38$ g/L
<b>C/N=120</b>	$C_{(NH_4)_2SO_4}= 0.35$ g/L
<b>C/N=140</b>	$C_{(NH_4)_2SO_4}= 0.30$ g/L

Για την έναρξη των πειραμάτων κατασκευάστηκαν καλλιέργειες διαλείποντος έργου όγκου 50 mL με θρεπτικό μέσο ATCC 460, στο οποίο κατά παρέκκλιση της δοσμένης σύστασης, σαν πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε οξικό νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa) σε συγκέντρωση 30g/L, και σαν πηγή αζώτου προστέθηκε θειικό

αμμώνιο σε συγκεντρώσεις όπως αυτές παρουσιάζονται στον παραπάνω πίνακα. Στη συνέχεια, γίνεται ρύθμιση του pH στο 6.3 – 6.6, με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl. Η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος, λόγω αύξησης του pH από την κατανάλωση του οξικού οξέος, κατά παρέκκλιση της δοσμένης σύστασης, ορίζεται στα 100 mM. Μετά την αποστείρωση των καλλιέργειών σε αυτόκλειστο διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 121°C για 20 λεπτά και πίεση 0.1MPa, εμβολιάστηκαν από καλλιέργειες 4 ημερών του *C. cohnii*, που είχε αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο ATCC 460. Το εμβόλιο αποτέλεσε το 10% v/v του συνολικού όγκου της καλλιέργειας.

Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν υπό ανάδευση στα 160rpm, 6 ημέρες (144h) σε επωαστήρα διατηρώντας σταθερή τη θερμοκρασία στους 27.0 °C.

Καθημερινά λαμβάνονται δείγματα των καλλιέργειών τα οποία φωτομετρούνται και υπολογίζεται η απορρόφηση τους. Από την καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων εξάγονται συμπεράσματα για την πορεία της καλλιέργειας. Όταν τα κύτταρα φτάσουν στη στατική φάση ανάπτυξης, η καλλιέργεια τους σταματά και ξεκινά άμεσα η εκχύλιση των λιπαρών.

### 5.3 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης

Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροφύκου βρέθηκε βιβλιογραφικά στους 27°C [21]. Για την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης και της θερμοκρασίας που επιτυγχάνεται μέγιστη παραγωγικότητα λιπαρών κατασκευάζονται καλλιέργειες με βασικό μέσο ανάπτυξης. Το pH του μέσου ανάπτυξης ρυθμίζεται στο 6.3-6.6.

Στη συνέχεια, ακολουθεί η αποστείρωση του θρεπτικού μέσου σε αυτόκλειστο διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 121°C για 20 λεπτά και πίεση 0,1MPa. Οι καλλιέργειες όπως και παραπάνω έχουν τελικό όγκο 50 ml, εκ των οποίων το 10% v/v αποτελεί εμβόλιο καλλιέργειας 4 ημερών του *C. cohnii*, που είχε αναπτυχθεί σε βασικό μέσο ανάπτυξης (standard batch).

Οι διαφορετικές θερμοκρασίες που εξετάζονται είναι 15 °C, 17 °C, 20 °C, 23 °C, 27 °C και 30°C. Οι καλλιέργειες επωάζονται υπό ανάδευση στα 160rpm στις παραπάνω θερμοκρασίες.

## **6. Χρήση χημικών επαγωγών για την αύξηση της παραγωγικότητας των λιπαρών**

Για την επαγωγή της παραγωγής των λιπαρών εξετάστηκε η προσθήκη χημικών μορίων. Συγκεκριμένα, βρέθηκε βιβλιογραφικά πως ο συνδυασμός σαλικυλικού οξέος (SA) και αιθανολαμίνης (ETA) μπορεί να αυξήσει την παραγωγικότητα των λιπαρών έως και 22% [34].

Για τον λόγο αυτό, προετοιμάστηκε το θρεπτικό υλικό για standard batch καλλιέργειες, αποστειρώθηκε και κατόπιν εμβολιάστηκε. Πριν την αποστείρωση ρυθμίζεται το pH στο 6.3 – 6.6. Η αποστείρωση πραγματοποιείται σε αυτόκλειστο διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 121°C για 20 λεπτά και πίεση 0,1MPa. Ο όγκος των καλλιεργειών ήταν 50 mL, εκ των οποίων τα 45 ml αποτέλεσαν το θρεπτικό μέσο και τα υπόλοιπα 5 ml το εμβόλιο. Το εμβόλιο προήλθε από καλλιέργειες 4 ημερών του *C. cohnii*, που είχε αναπτυχθεί σε βασικό μέσο ανάπτυξης (standard batch).

Για την επαγωγή των λιπαρών, προστέθηκαν σε δυο καλλιέργειες από 1.0 mg/ L SA και 152.7 mg/L ETA, ενώ μια τρίτη καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε σαν καλλιέργεια ελέγχου (control). Η προσθήκη των επαγωγών έγινε υπό στείρες συνθήκες 24h μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών όπου τα κύτταρα είχαν προσαρμοσθεί στις νέες συνθήκες καλλιέργειας. Η αποστείρωση των ουσιών (ETA, SA) έγινε μετά από φιλτράρισμα χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο φίλτρο 0.22 micron. Μετά από 7 ημέρες παραμονής του σε επωαστήρα υπό ανάδευση στα 160 rpm, διατηρώντας σταθερή τη θερμοκρασία στους 27.0°C, η καλλιέργεια των κυττάρων σταματά και ξεκινά η εκχύλιση των λιπαρών.

## **7. Βιοαντιδραστήρες ημί-διαλείποντος έργου**

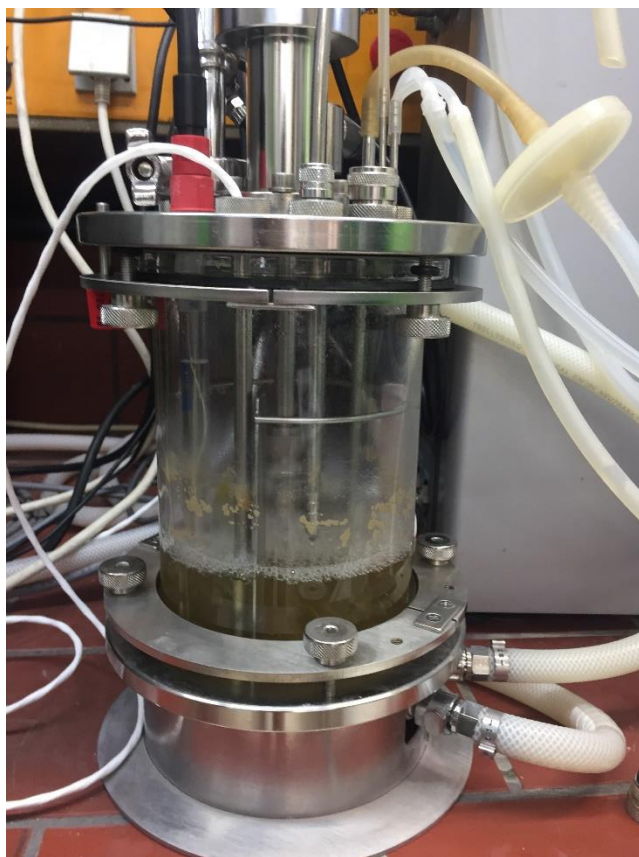
### **7.1 Προετοιμασία και συνθήκες λειτουργίας βιοαντιδραστήρα ημί-διαλείποντος έργου**

Στην περίπτωση καλλιέργειας των κυττάρων σε βιοαντιδραστήρα ημί-διαλείποντος έργου όγκου 2 L, παρασκευάζεται αρχικώς το υπόστρωμα το οποίο αποτελείται από 15 g/L οξικό νάτριο (sodium acetate-CH<sub>3</sub>COONa), 25 g/L θαλασσινό αλάτι και 7,5 g/L εκχύλισμα μαγιάς, συνολικού όγκου 900 mL. Κατόπιν ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6.5 με προσθήκη μικρής ποσότητας πυκνού HCl. Το υπόστρωμα τοποθετείται στον βιοαντιδραστήρα και παράλληλα γίνεται βαθμονόμηση του μετρητή pH. Αυτή επιτυγχάνεται με εισαγωγή του μετρητή σε ρυθμιστικά διαλύματα pH=7 και pH=4. Οι αντίστοιχες τιμές σήματος του ηλεκτροδίου αντιστοιχούνται στα παραπάνω pH. Κατόπιν συνδέονται τα φίλτρα αέρα, ο ψυκτήρας, το οξυγονόμετρο και ταπώνονται όλες οι είσοδοι και έξοδοι του βιοαντιδραστήρα με ανεπεξέργαστο βαμβάκι και

αλουμινόχαρτο. Το σύστημα τοποθετείται στο αυτόκλειστο και αποστειρώνεται διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 121°C για 20 λεπτά και πίεση 0,1MPa. Στην αποστείρωση τοποθετείται και η τροφοδοσία του βιοαντιδραστήρα, μέσα σε μπουκάλια αποστείρωσης.

Μετά την αποστείρωση, ξεκινά η ανάδευση του υποστρώματος και αρχίζει η εισαγωγή αέρα στο βιοαντιδραστήρα με ρυθμό 1 L/min. Ο αέρας πριν την εισαγωγή του στο σύστημα αποστειρώνεται έπειτα από φιλτράρισμα με φίλτρο 0.22 micron. Κατόπιν βαθμονομείται το οξυγονόμετρο, αντιστοιχώντας την τιμή του μετρούμενου οξυγόνου στο θρεπτικό μέσο στην τιμή 100%, ενώ στην τιμή 0 αντιστοιχίζεται η τιμή απώλειας σήματος που επιτυγχάνεται με αφαίρεση του οξυγονόμετρου από το σύστημα. Αφού συνδεθεί το σύστημα ψύξης και ρυθμιστεί η θερμοκρασία του θρεπτικού στους 27°C πραγματοποιείται ο εμβολιασμός του βιοαντιδραστήρα υπό στείρες συνθήκες και ξεκινά η προσθήκη της τροφοδοσίας. Η ταχύτητα ανάδευσης του βιοαντιδραστήρα μεταβάλλεται χειροκίνητα λαμβάνοντας τιμές από 300-550 rpm, με σκοπό την διατήρηση του διαλυμένου οξυγόνου σε τιμές μεγαλύτερες του 20% της τιμής κορεσμού.

Λόγω κατανάλωσης του οξικού οξέος στο υπόστρωμα, το pH της καλλιέργειας αυξάνεται. Η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με εισαγωγή της τροφοδοσίας, η οποία είτε θα είναι οξικό οξύ ή το υγρό κλάσμα της σκοτεινής ζύμωσης των αποβλήτων. Λόγω του όξινου pH των διαλυμάτων, επιτυγχάνεται από τη μια η διατήρηση του pH στην τιμή 6.5, ενώ παράλληλα το σύστημα τροφοδοτείται με μια πηγή άνθρακα απαραίτητη για την ανάπτυξη των κυττάρων. Η διατήρηση σταθερού pH αποτελεί ρυθμιστική παράμετρος του συστήματος και πραγματοποιείται αυτόματα από τον βιοαντιδραστήρα. Όταν η τιμή του pH αυξάνεται, ο βιοαντιδραστήρας εισάγει τροφοδοσία στο σύστημα επιτυγχάνοντας διττό αποτέλεσμα.



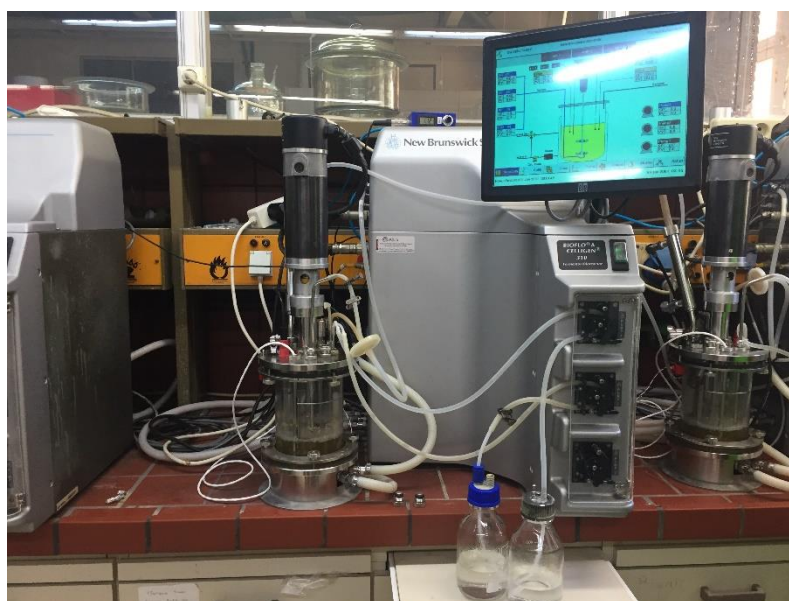
Εικόνα 18 Καλλιέργεια *C.cohnii* σε βιοαντιδραστήρα *fed - batch*

## 7.2 Καλλιέργεια δύο σταδίων σε βιοαντιδραστήρες ημί-διαλείποντος έργου

Για την καλλιέργεια του μικροφύκου σε δύο στάδια, προετοιμάζονται οι βιοαντιδραστήρες όπως αναφέρεται παραπάνω στην παράγραφο 7.1. Στην περίπτωση αυτή, ο πρώτος βιοαντιδραστήρας αποτελεί το πείραμα αναφοράς, όπου η τροφοδοσία αποτελείται μόνο από διάλυμα οξικού οξέος 33% v/v.

Στο δεύτερο βιοαντιδραστήρα, εκτός της παραπάνω τροφοδοσίας παρασκευάζεται και μία δεύτερη, που αποτελείται από διάλυμα οξικού οξέος 33% v/v, με την επιπλέον προσθήκη θειικού αμμωνίου. Η συγκέντρωση του θειικού αμμωνίου αντιστοιχεί σε λόγο άνθρακα προς άζωτο (C/N) ίσο με 110. Η επιλογή της πηγής αζώτου και η συγκέντρωσή της βασίζεται στα πειράματα βελτιστοποίησης, τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω.

Οι τροφοδοσίες τοποθετούνται σε μπουκάλια αποστείρωσης των 500 mL και αποστειρώνονται σε αυτόκλειστο διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 121°C για 20 λεπτά και πίεση 0,1MPa.



Εικόνα 19 Βιοαντιδραστήρας όπου πραγματοποιείται καλλιέργεια *C.cohnii* σε δυο στάδια

Από τη καθημερινή λήψη δειγμάτων, κατασκευάζεται η καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων. Έπειτα από 168 ώρες λειτουργίας των βιοαντιδραστήρων και καλλιέργειας των κυττάρων, μόνο στη περίπτωση του δεύτερου βιοαντιδραστήρα, διακόπτεται η παροχή που περιέχει αμμωνιακά ιόντα και ξεκινά η τροφοδοσία του δεύτερου διαλύματος που στερείται πηγής αζώτου, δημιουργώντας συνθήκες στρες για το κύτταρο.

Η λειτουργία των βιοαντιδραστήρων διακόπτεται στις 288 h, αφού έχει προηγηθεί παύση της τροφοδοσίας του οξικού οξέος στις 264 h . Αυτό συνέβη, αφού ο υπολειπόμενος όγκος καλλιέργειας ήταν αρκετά μικρός, γεγονός που δικαιολογείται από την μικρή ποσότητα προσθήκης του οξικού οξέος, μιας και το ίδιο επιτυγχάνει ικανή ρύθμιση του pH της καλλιέργειας. Επιπλέον, η έντονη ανάδευση του μικρού όγκου της καλλιέργειας πιθανώς να προκαλούσε διάρρηξη των κυττάρων και απώλεια των λιπαρών στο υγρό της καλλιέργειας. Μετά το πέρας της καλλιέργειας τα κύτταρα επεξεργάζονται με σκοπό τον υπολογισμό των παραγόμενων λιπαρών και της ταυτοποίησης του λιπιδικού προφίλ τους.

## **7.3 Μεταβολή κρίσιμων παραμέτρων και επίδρασή τους στην ανάπτυξη της βιομάζας και τη σύνθεση των λιπαρών**

### **7.3.1 Συμπύκνωση διηθήματος του υγρού κλάσματος των βιοαποβλήτων**

Στα πλαίσια της βελτιστοποίησης εξετάζεται η τροφοδοσία των βιοαντιδραστήρων με το διήθημα του υγρού κλάσματος της ζύμωσης των βιοαποβλήτων. Το διήθημα υφίσταται επεξεργασία από την προμηθευτρια εταιρεία Tecnalía, με αποτέλεσμα καθένα από αυτά να έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση πτητικών οργανικών οξέων.

Τα διηθήματα διακρίνονται με σειρά αυξανόμενων πτητικών οργανικών οξέων σε Effluent #1, Effluent #2 και Effluent #3.

Κάθε διήθημα διαφορετικής συγκέντρωσης πτητικών οργανικών οξέων, χρησιμοποιείται για την τροφοδοσία των βιοαντιδραστήρων και εξετάζεται η επίδρασή τους στη σύνθεση των λιπαρών και την ανάπτυξη της βιομάζας. Το αρχικό υπόστρωμα των βιοαντιδραστήρων αποτελείται από εκχύλισμα ζύμης, μίγμα θαλάσσιων αλάτων και οξικό νάτριο σε συγκεντρώσεις όπως αναφέρεται στην παράγραφο «Προετοιμασία και συνθήκες λειτουργίας βιοαντιδραστήρα ημί-διαλείποντες έργου».

Τα διαφορετικά διηθήματα τοποθετούνται σε μπουκάλια αποστείρωσης των 500 mL και ρυθμίζεται το pH τους στην τιμή 2.5 με προσθήκη μη ζυμώσιμου πυκνού HCl, για να μπορούν να μειώνουν αποτελεσματικά την οξύτητα της καλλιέργειας του βιοαντιδραστήρα. Καταληκτικά, τα διηθήματα αποστειρώνονται σε αυτόκλειστο διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 121°C για 20 λεπτά και πίεση 0,1MPa.

### **7.3.2 Αντικατάσταση του αρχικού υποστρώματος του βιοαντιδραστήρα**

Στα πλαίσια σχεδιασμού μιας οικονομικότερης διεργασίας, έγινε απόπειρα αντικατάστασης του αρχικού υποστρώματος καθαρών πηγών από το διήθημα του υγρού κλάσματος της ζύμωσης των βιοαποβλήτων.

Αναλυτικότερα ο βιοαντιδραστήρας πληρώνεται με 900mL διηθήματος υγρού κλάσματος Effluent #3, ενώ το ίδιο διάλυμα χρησιμοποιείται και για την τροφοδοσία του βιοαντιδραστήρα.

Η τροφοδοσία τοποθετείται σε μπουκάλι αποστείρωσης των 500ml και μαζί με τον βιοαντιδραστήρα αποστειρώνονται σε αυτόκλειστο διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 121°C για 20 λεπτά και πίεση 0,1MPa.





## **Ενότητα 3<sup>η</sup>:**

---

**Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της  
πειραματικής μελέτης**

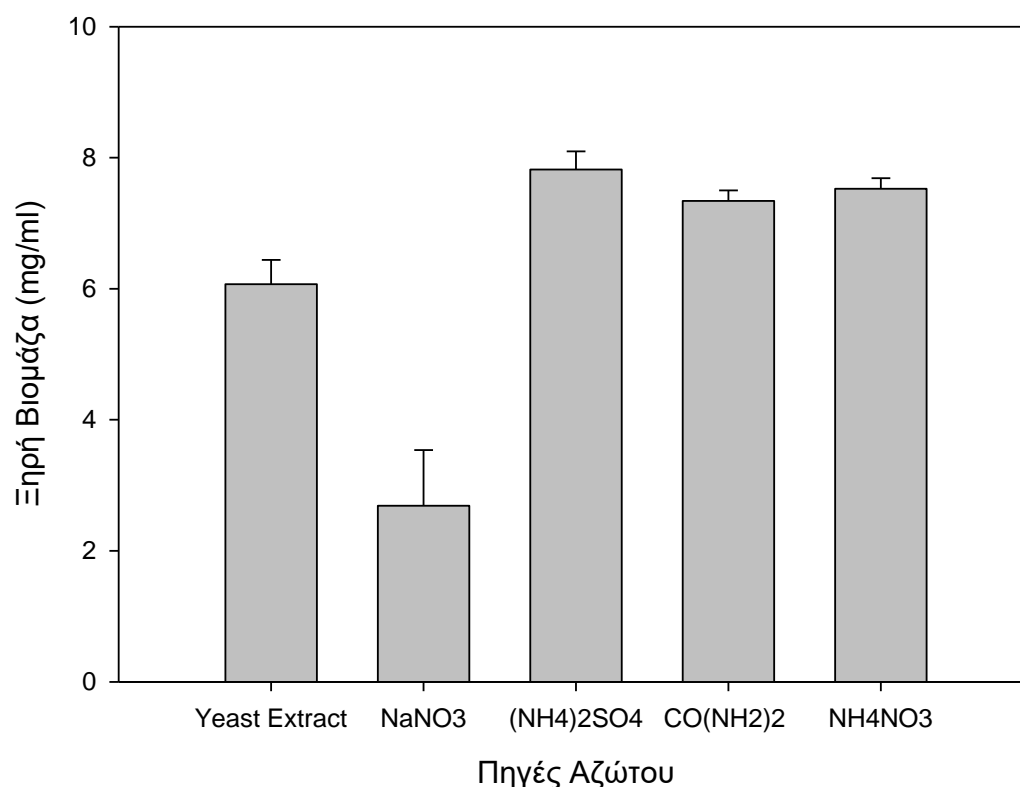


# 1. Εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης του μικροφύκου *Cryptheconidium cohnii*

## 1.1 Πηγή αζώτου

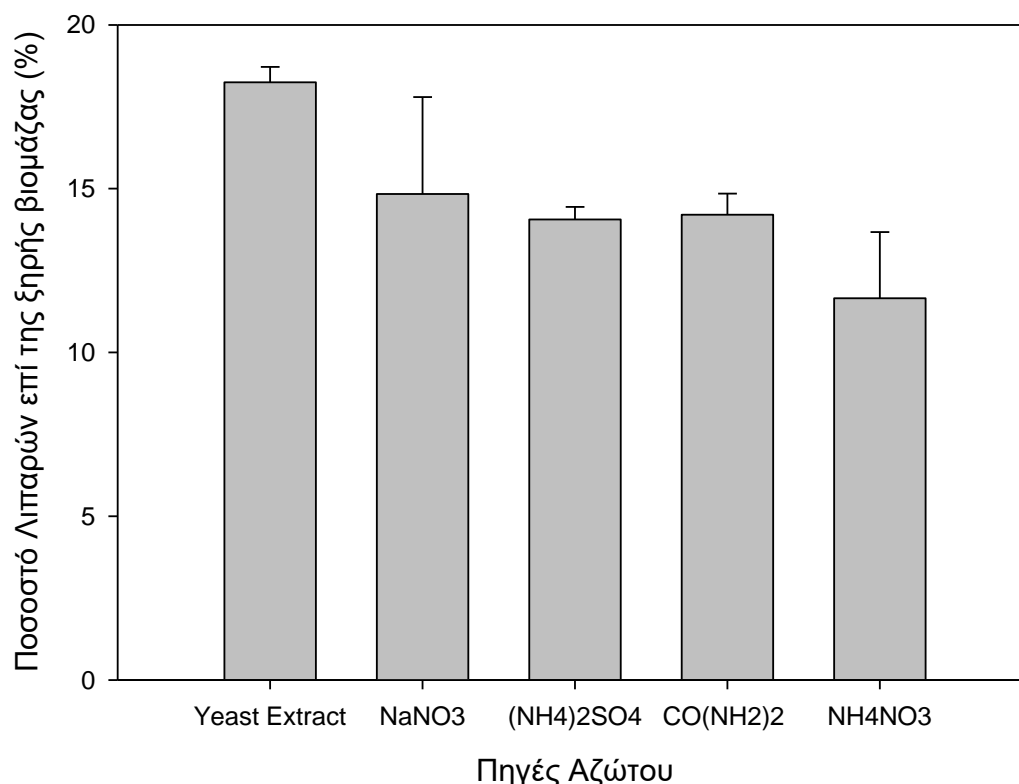
Μετά από 168h από την έναρξη των καλλιεργειών, τα κύτταρα βρίσκονται στην στατική φάση ανάπτυξης, επομένως διακόπτεται η καλλιέργεια τους. Οι καλλιέργειες με τις διαφορετικές πηγές αζώτου επεξεργάζονται με τις μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω και γίνεται ο υπολογισμός και η ανάλυση των παραγόμενων λιπαρών.

Από τον υπολογισμό της ξηρής βιομάζας, γίνεται αντιληπτό ότι η επιλογή του θειικού αμμωνίου ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) συμβάλλει στην μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας. Εξίσου καλή πηγή αζώτου, φαίνεται να είναι η ουρία ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ), καθώς και το νιτρικό αμμώνιο ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), ενώ η ανάπτυξη των μικροφυκών σε νιτρικό νάτριο ( $\text{NaNO}_3$ ), είχε σαν αποτέλεσμα την μικρότερη παραγωγή βιομάζας με συγκέντρωση μικρότερη από 3mg/mL καλλιέργειας.



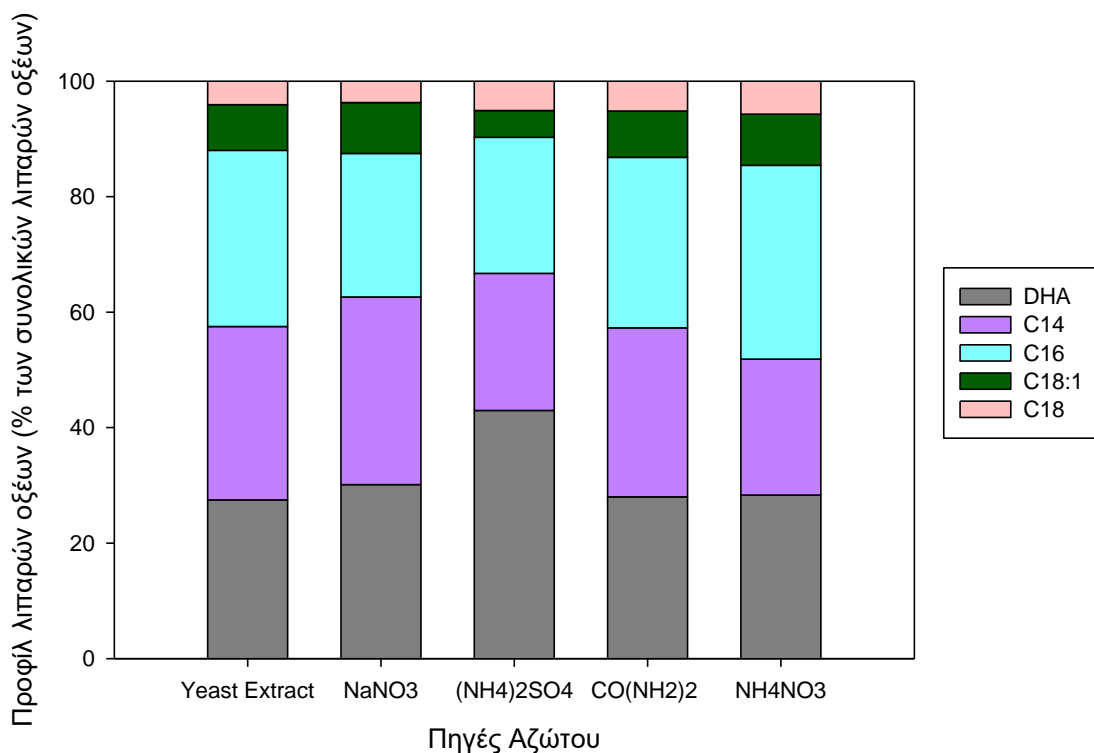
Διάγραμμα 1 Συγκέντρωση ξηρής βιομάζας σε διαφορετικές πηγές αζώτου

Συνεχίζοντας, από τον υπολογισμό του ποσοστού των παραγόμενων λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας, φαίνεται πως το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) συμβάλλει στην σύνθεση υψηλού ποσοστού λιπαρών που προσεγγίζει το 18% της ξηρής βιομάζας. Αντιστοίχως, από την ανάλυση σε πηγές αζώτου όπως το θειικό αμμώνιο ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), την ουρία (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) και το νιτρικό νάτριο (NaNO<sub>3</sub>) βρέθηκε πως το ποσοστό των λιπαρών κυμαίνεται στο 14% της ξηρής βιομάζας σε αντίθεση με το νιτρικό αμμώνιο (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) που το αντίστοιχο ποσοστό δεν ξεπερνά το 12%.



Διάγραμμα 2 Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας (%) σε διαφορετικές πηγές αζώτου

Επιπλέον, σε επόμενα στάδια της ανάλυσης διαμορφώνεται το προφίλ των παραγόμενων λιπαρών. Από την ανάλυση προέκυψε ότι το θειικό αμμώνιο ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) συντελεί στο σχηματισμό υψηλού ποσοστού DHA, που φτάνει το 42% των συνολικών παραγόμενων λιπαρών. Από τις υπόλοιπες πηγές αζώτου το αντίστοιχο ποσοστό διαμορφώνεται από 27-30%. Όσον αφορά τα λιπαρά οξέα C14 και C16 σε όλες τις περιπτώσεις το ποσοστό τους είναι μεγαλύτερο του 25% των συνολικών παραγόμενων λιπαρών.



Διάγραμμα 3 Προφίλ λιπαρών οξέων (% των συνολικών λιπαρών οξέων) σε διαφορετικές πηγές αζώτου

Ωστόσο, για να εξαχθεί ένα ασφαλές αποτέλεσμα για την βέλτιστη πηγή αζώτου, παρατίθεται ο παρακάτω πίνακας. Στα αποτελέσματα που ακολουθούν, υπολογίζεται η συγκέντρωση των λιπαρών ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας, καθώς και η συγκέντρωση του DHA που αντιστοιχεί στα παραγόμενα λιπαρά.

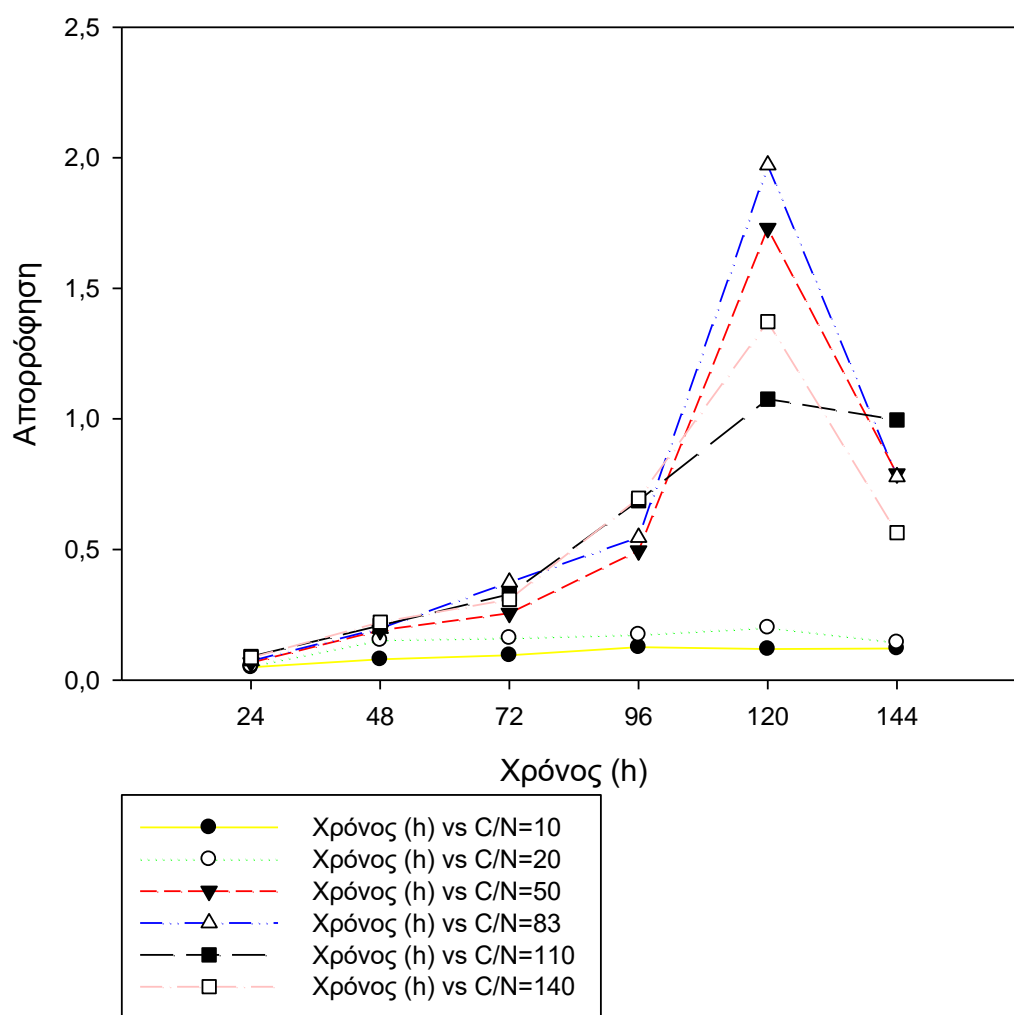
Από τους υπολογισμούς, προέκυψε ότι η βέλτιστη πηγή αζώτου είναι το θειικό αμμώνιο ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), στο οποίο η συγκέντρωση των λιπαρών υπερβαίνει τα 2.4 mg/ml καλλιέργειας, με το DHA να αποτελεί σχεδόν το 50% της παραπάνω συγκέντρωσης. Εξίσου υψηλή συγκέντρωση λιπαρών προκύπτει και από το εκχύλισμα ζύμης, η οποία πηγή όμως δεν προωθεί τη σύνθεση του DHA σε υψηλό ποσοστό.

Πίνακας 4 Συγκεντρώσεις λιπαρών και DHA ανά mL καλλιέργειας σε διαφορετικές πηγές αζώτου

Πηγές Αζώτου	Συγκέντρωση λιπαρών (mg/mL)	Συγκέντρωση DHA (mg/mL)
Εκχύλισμα Ζύμης (YE)	2.416	0.664
Νιτρικό νάτριο (NaNO <sub>3</sub> )	0.892	0.269
Θειικό αμμώνιο ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	2.460	1.057
Ουρία (CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> )	2.332	0.653
Νιτρικό αμμώνιο (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1.962	0.556

## 1.2 Συγκέντρωση αμμωνιακών ιόντων

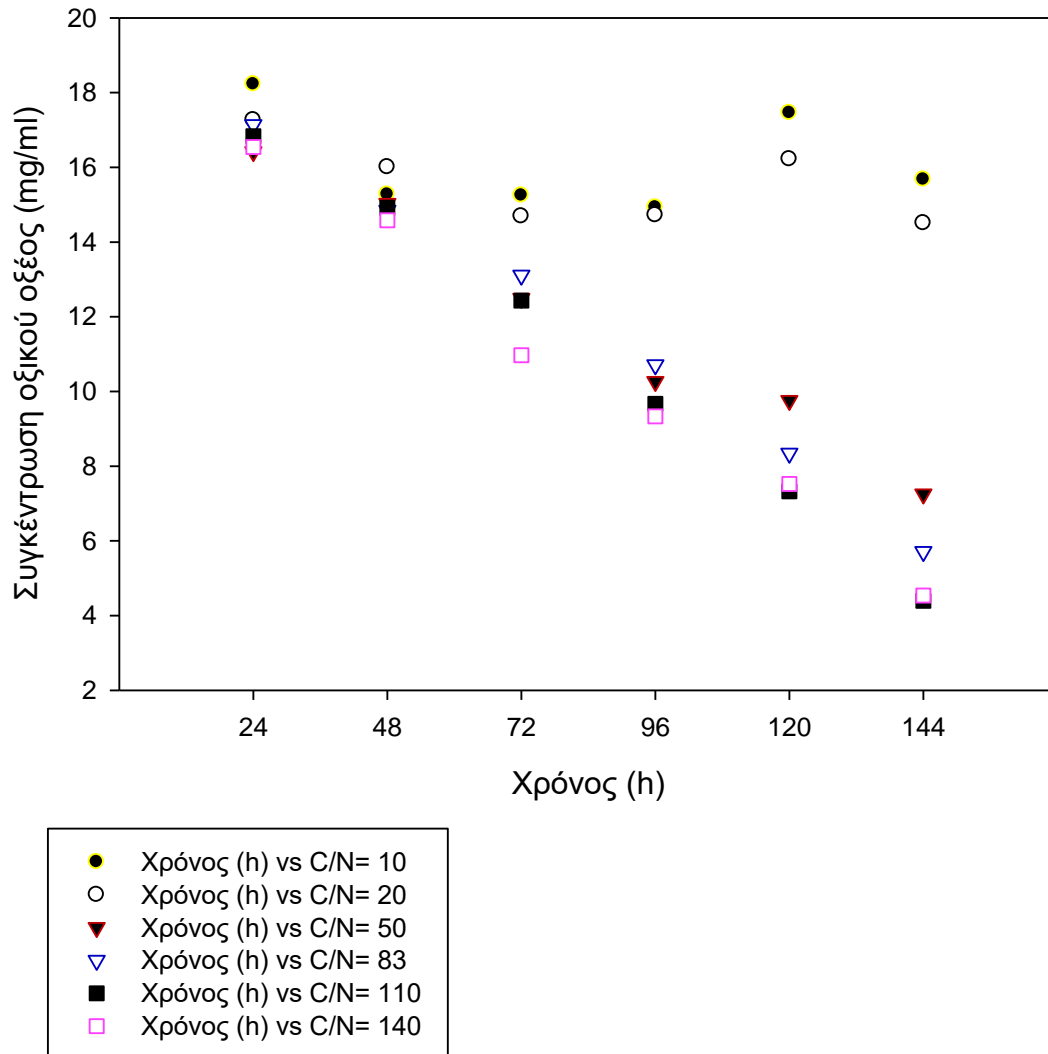
Μετά την ολοκλήρωση των 144h από την έναρξη της καλλιέργειας φαίνεται από το διάγραμμα που ακολουθεί, πως τα κύτταρα έχουν μεταβεί από τη στατική φάση ανάπτυξης στη φάση θανάτου και συνεπώς οι καλλιέργεια των μικροφυκών σταματά και ξεκινά η εκχύλιση των λιπαρών.



Διάγραμμα 4 Καμπύλη ανάπτυξης μικροφυκών σε καλλιέργειών με διαφορετικό λόγο C/N

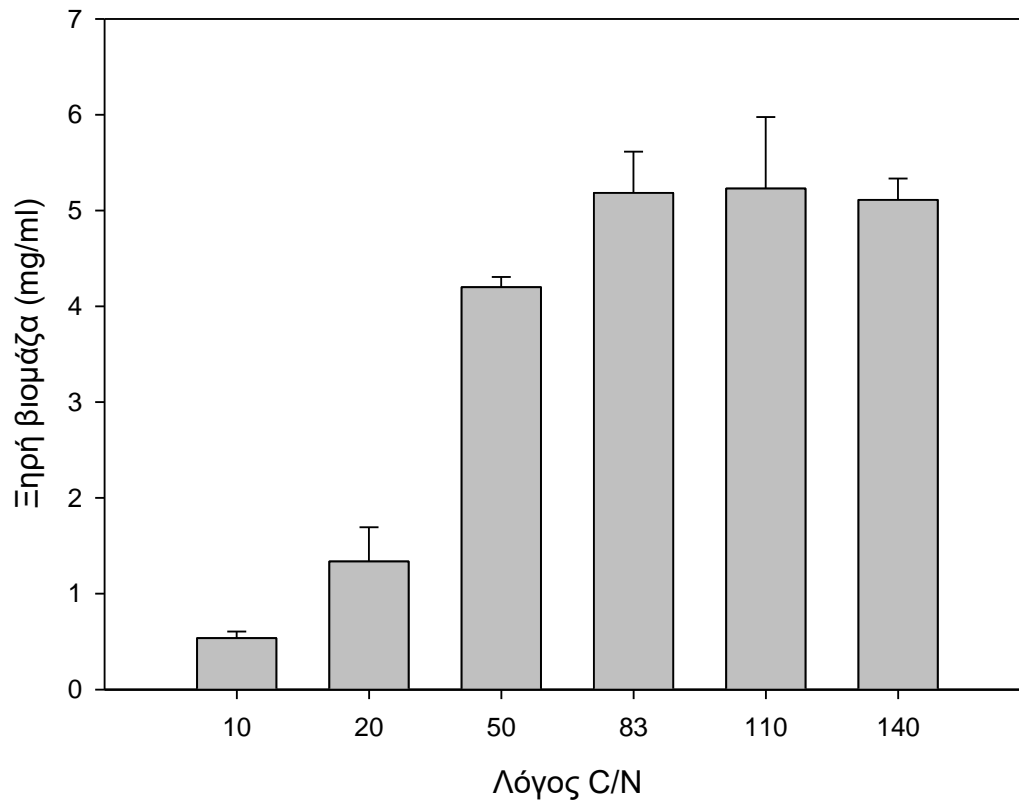
Με το πέρας της επώασης των κυττάρων υπολογίζεται και η εναπομένουσα συγκέντρωση οξικού οξέος στη καλλιέργεια. Όπως αναφέρεται και παραπάνω, αυτή

μετράται με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας και γίνεται φανερό ότι μετά το πέρας των 144h η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα για την πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι μικρότερη των 8 mg/mL. Ωστόσο, η καλλιέργεια των κυττάρων θα μπορούσε να συνεχισθεί για ακόμα μία ημέρα, και να ολοκληρωθεί επομένως στις 168 h, με σκοπό η συγκέντρωση του υπολειπόμενου οξικού να μειωθεί περαιτέρω.



Διάγραμμα 5 Συγκέντρωση υπολειπόμενου οξικού οξέος σε καλλιέργειες με διαφορετικό λόγο C/N

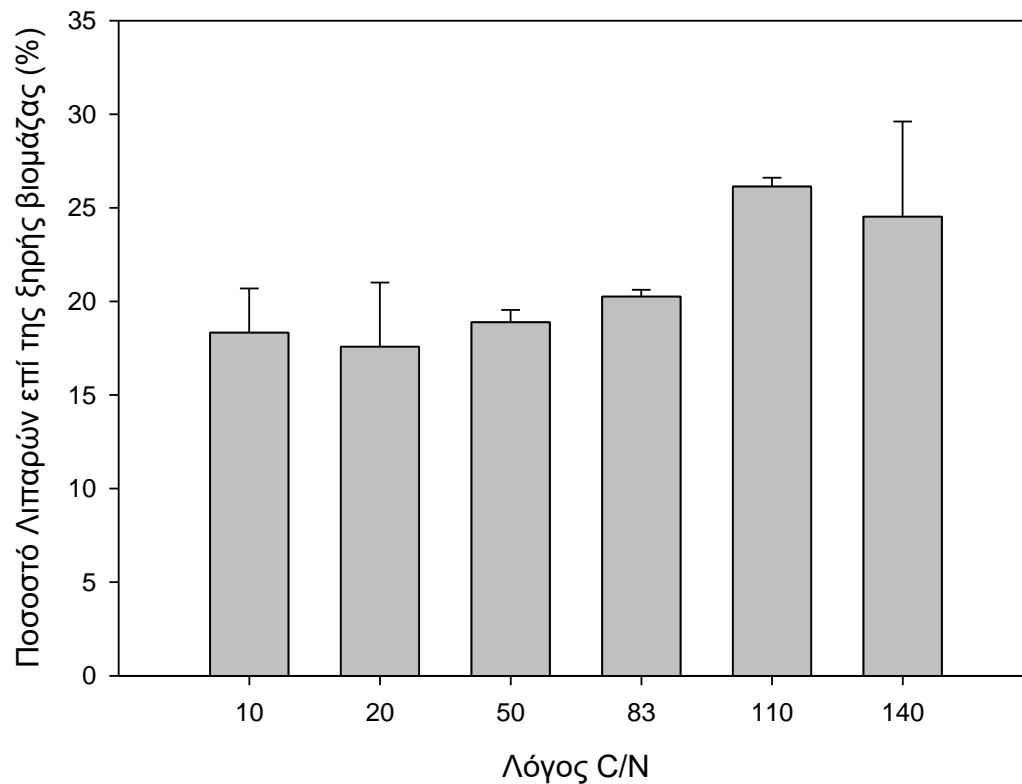
Ακολούθως, υπολογίζεται η συγκέντρωση της ξηρής βιομάζας ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως οριακά μεγαλύτερη ανάπτυξη των κυττάρων επιτυγχάνεται σε λόγο C/N=110. Εξίσου υψηλή είναι η συγκέντρωση της βιομάζας σε λόγο C/N=83. Σε λόγους άνθρακα προς άζωτο 10 και 20 η ανάπτυξη των κυττάρων είναι ιδιαίτερος μικρή, ενώ σε αναλογία C/N=140 η ανάπτυξη των κυττάρων είναι ικανοποιητική.



Διάγραμμα 6 Συγκέντρωση ξηρής βιομάζας σε καλλιέργειες με διαφορετικό λόγο C/N



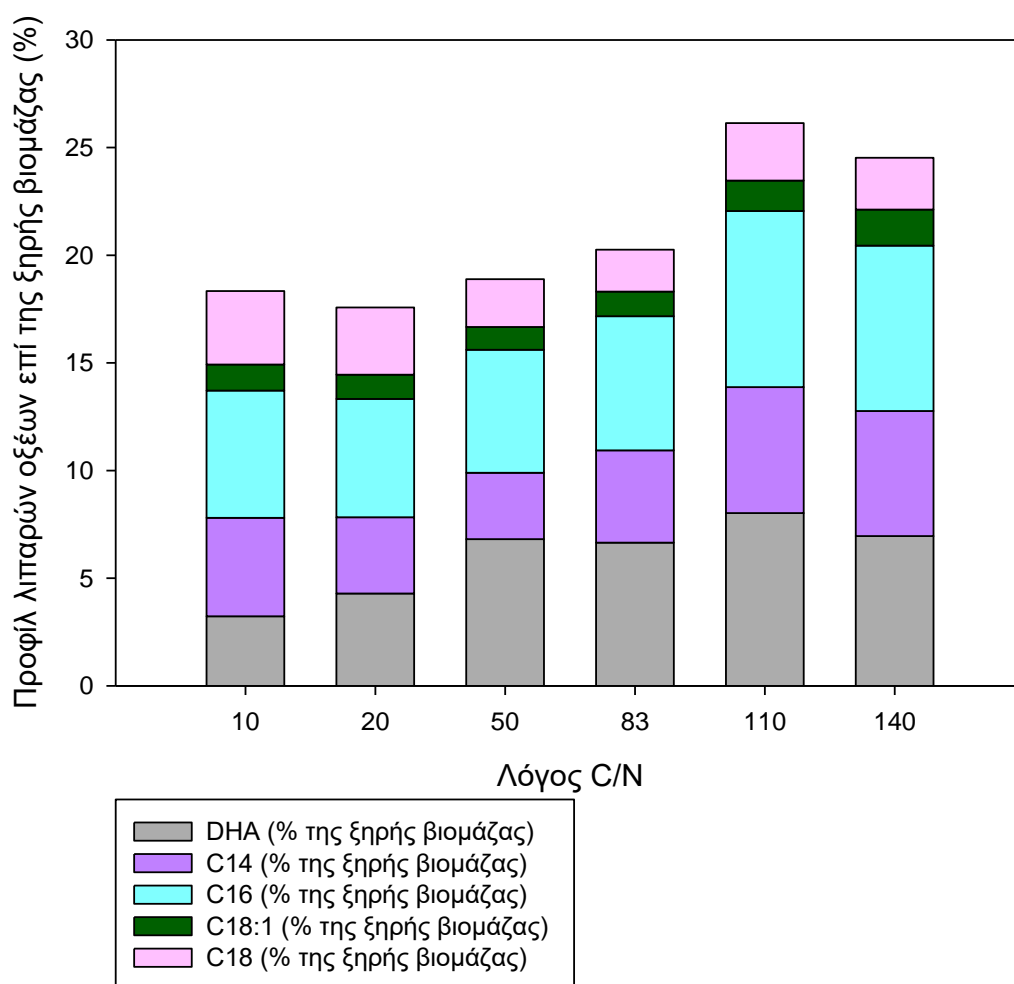
Όσον αφορά τη σύνθεση των λιπαρών, σε αναλογία C/N=110 τα λιπαρά αποτελούν ποσοστό μεγαλύτερο του 25% της ξηρής βιομάζας. Σε αυτή την αναλογία φαίνεται ότι η παραγωγή των λιπαρών μεγιστοποιείται, ενώ εξίσου υψηλά ποσοστά λιπαρών επιτυγχάνονται σε αναλογίες όπως 10, 50, 83 και 140. Ωστόσο, στο σημείο αυτό είναι πρέπον να αναφερθεί, ότι το υψηλό ποσοστό αβεβαιότητας στο λόγο C/N=140, επιβάλλει την επανάληψη των πειραμάτων.



Διάγραμμα 7 Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας (%) σε καλλιέργειες με διαφορετικό λόγο C/N

Για την ταυτοποίηση της ιδανικότερης συγκέντρωσης αμμωνιακών στη καλλιέργεια εξετάζεται το λιπιδικό προφίλ των λιπαρών. Οριακά το μεγαλύτερο ποσοστό DHA ως επί τοις εκατό της ξηρής βιομάζας παράγεται σε αναλογία C/N=110. Σε αναλογίες μικρότερες των 50 εμφανίζεται μείωση της σύνθεσης του ποσοστού DHA συγκριτικά με τα υπόλοιπα λιπαρά. Όσον αφορά τα λιπαρά οξέα C14, C16 αυτά εμφανίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, δηλαδή σε αναλογία C/N=110 και 140.

Η επιλογή του λόγου C/N=50 απέδωσε καλύτερα αποτελέσματα, όσον αφορά το ποσοστό του DHA ανά ολικά λιπαρά. Ωστόσο, η μικρή κυτταρική συγκέντρωση δεν ευνοεί τελικά την παραγωγή λιπαρών και DHA, με αποτέλεσμα ο λόγος C/N να κρίνεται ως ιδανικότερος.



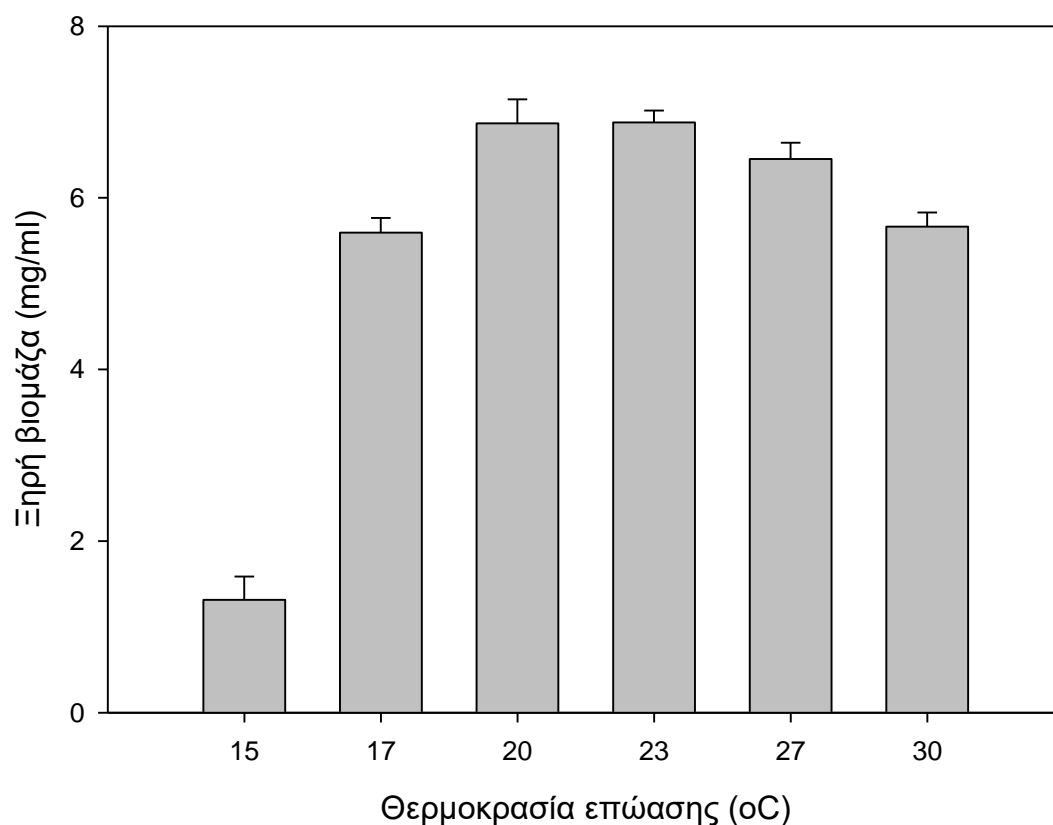
Διάγραμμα 8 Προφίλ λιπαρών οξέων (% της ξηρής βιομάζας) σε καλλιέργειες με διαφορετικό λόγο C/N

Από τα αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό ότι η αναλογία C/N=110 αντιπροσωπεύει την βέλτιστη συγκέντρωση αμμωνιακών ιόντων στη καλλιέργεια. Το συμπέρασμα αυτό εξάγεται, αφού γνωρίζουμε από τα παραπάνω, πως η μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση επιτυγχάνεται έστω και με μικρή διαφορά στην αναλογία άνθρακα/άζωτο C/N=110. Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα 7 & 8, το υψηλότερο ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας επιτυγχάνεται στην ίδια αναλογία με τιμή που ξεπερνά το 26%. Από τον υπολογισμό του προφίλ των λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας το DHA μεγιστοποιείται σε ποσοστό 8% της ξηρής βιομάζας σε λόγο C/N=110, τιμή που αντιστοιχεί σχεδόν στο 1/3 του ποσοστού των συνολικά παραγόμενων λιπαρών. Επιπλέον, να τονισθεί ότι εξίσου υψηλό ποσοστό λιπαρών εμφανίζεται σε λόγο C/N=140, με μικρότερη όμως συγκέντρωση παραγόμενου DHA. Σε λόγους C/N 10, 20, 50 και 83 το ποσοστό των παραγόμενων λιπαρών δεν ξεπερνά το 20% της ξηρής βιομάζας.

### 1.3 Επιλογή θερμοκρασίας ανάπτυξης

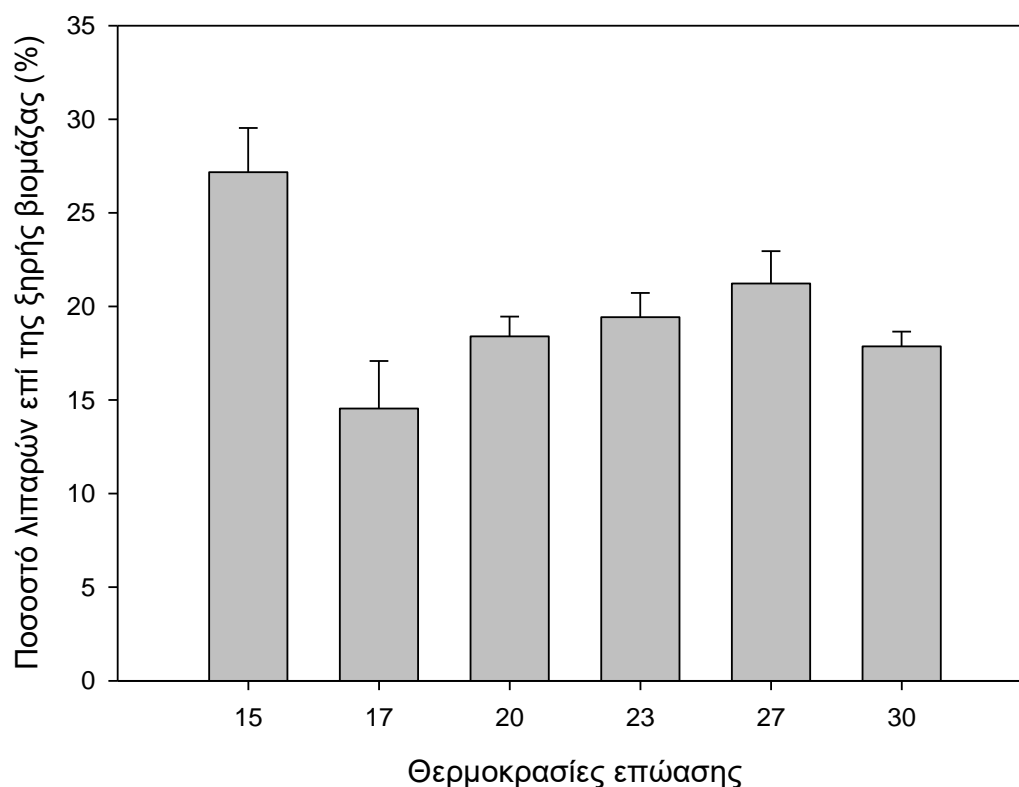
Μετά το πέρας 168 h από την έναρξη της καλλιέργειας, γίνεται επεξεργασία της βιομάζας, με τις μεθόδους που αναφέρονται στην παραπάνω ενότητα. Τα αποτελέσματα από τη καλλιέργεια του μικροφύκου σε διαφορετική θερμοκρασία παρουσιάζονται παρακάτω.

Από το διάγραμμα την ξηρής βιομάζας ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας, όπως αυτό παρατίθεται παρακάτω, είναι εμφανές ότι οι 20 και 23°C είναι ιδανικές θερμοκρασίες για την βέλτιστη ανάπτυξη των κυττάρων. Αντιθέτως στους 15°C, η ανάπτυξη των κυττάρων είναι μικρότερη των 2 mg/mL καλλιέργειας.



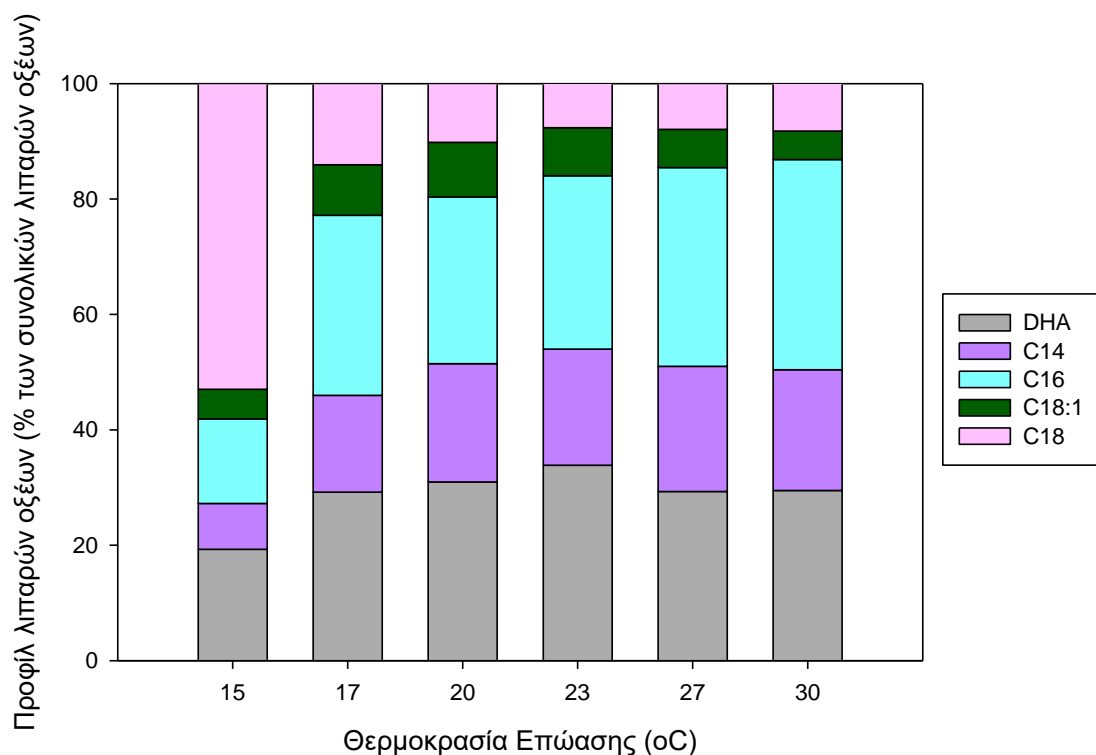
Διάγραμμα 9 Συγκέντρωση ξηρής βιομάζας σε καλλιέργειες με διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης

Συνεχίζοντας, εξετάζοντας το ποσοστό των λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας, φαίνεται και από το διάγραμμα που ακολουθεί πως οι 15°C είναι η ιδανικότερη θερμοκρασία για την επίτευξη βιομάζας πλούσιας σε λιπαρά. Στη συνέχεια, κατά σειρά αυξανόμενου ποσοστού ενδείκνυνται οι 27 και 23°C, αντίστοιχα. Στο σημείο αυτό, να τονισθεί οι 15°C λειτουργούν ως παράγοντας στρες για το κύτταρο, με αποτέλεσμα εκείνο υπό αυτές τις συνθήκες να συνθέτει υψηλή ποσότητα λιπαρών.



Διάγραμμα 10 Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας (%) σε καλλιέργειες με διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης

Από την ανάλυση του προφίλ των λιπαρών φαίνεται ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για την αυξημένη παραγωγή DHA είναι οι 23°C. Σε αυτή τη θερμοκρασία η σύνθεση του DHA αγγίζει το 33% των συνολικών παραγόμενων λιπαρών. Επίσης διαπιστώνεται ότι η θερμοκρασία των 20°C, εμφανίζει εξίσου καλά αποτελέσματα όσον αφορά το ποσοστό σύνθεσης του DHA, το οποίο προσεγγίζει το 30%. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί, πως η θερμοκρασία των 15°C εμφανίζει υψηλή συγκέντρωση σε παραγωγή C18 λιπαρού οξέος. Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί την αύξηση της παραγωγικότητας σε κορεσμένα λιπαρά.



Διάγραμμα 11 Προφίλ λιπαρών οξέων (% των συνολικών λιπαρών οξέων) σε καλλιέργειες με διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης

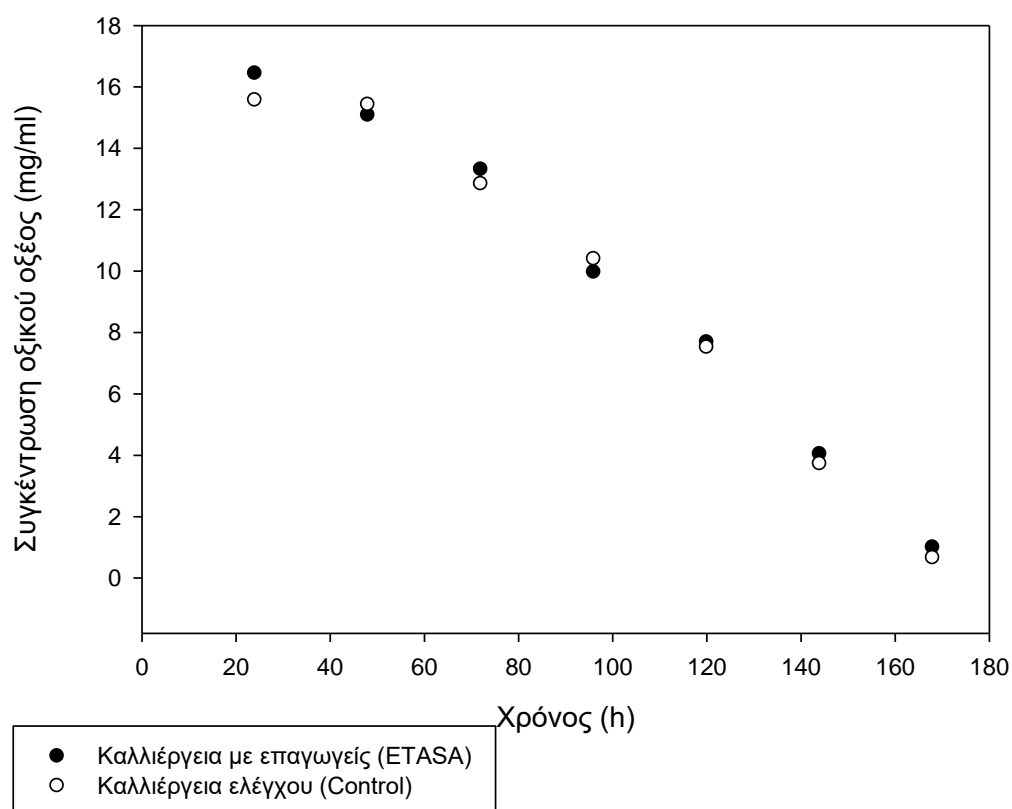
Καταληκτικά, όπως είναι εμφανές και από τον πίνακα που ακολουθεί, η ιδανικότερη θερμοκρασία για την αυξημένη παραγωγή DHA είναι οι 23°C. Παρότι, ακόμα και στους 15 °C η αναλογία των λιπαρών ως προς την ξηρή βιομάζα είναι υψηλή, δεν προτείνεται η συγκεκριμένη θερμοκρασία λόγω της μικρής κυτταρικής ανάπτυξης. Στους 23 °C η συγκέντρωση του DHA προσεγγίζει το 0,5 mg/mL καλλιέργειας

Πίνακας 5 Συγκεντρώσεις λιπαρών και DHA ανά mL καλλιέργειας σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης

Θερμοκρασίες επώασης (°C)	Συγκέντρωση λιπαρών (mg/mL)	Συγκέντρωση DHA (mg/mL)
15	0.357	0.069
17	0.814	0.238
20	1.263	0.391
23	1.336	0.452
27	1.369	0.401
30	1.012	0.298

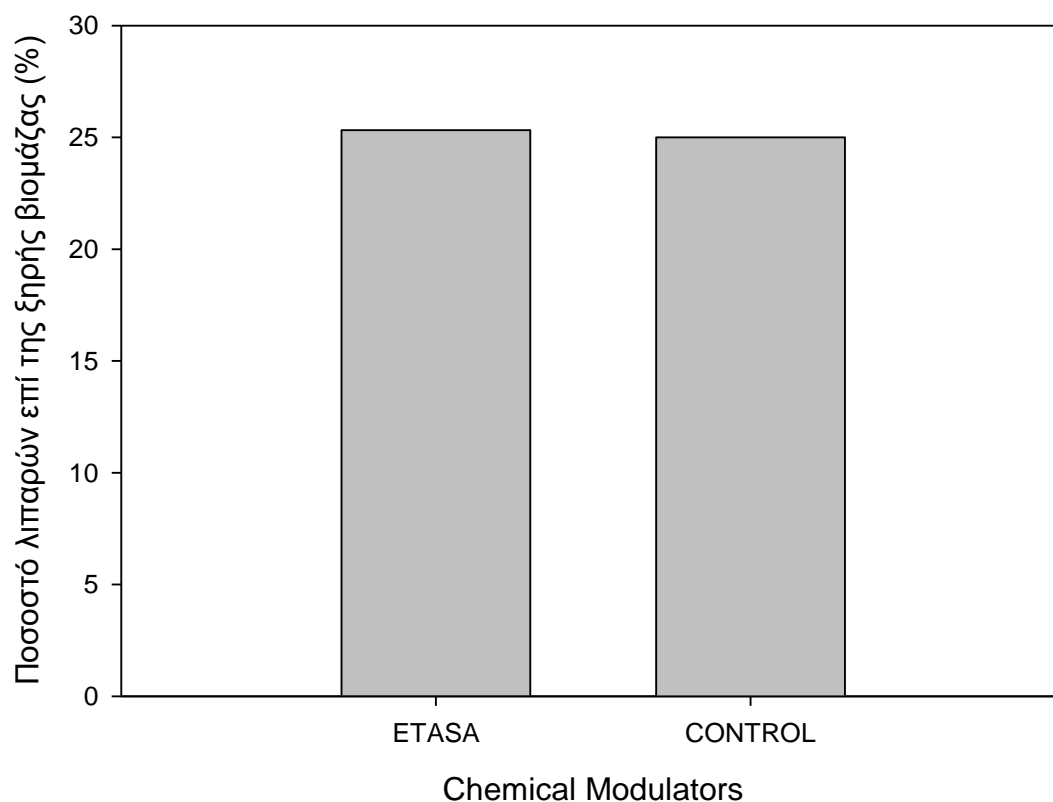
## 2. Προσθήκη χημικών ουσιών για την επαγωγή της παραγωγής λιπαρών από το μικροφύκος *Cryptheconidium cohnii*

Η ολοκλήρωση του χρόνου της καλλιέργειας, εκτός της καμπύλης ανάπτυξης, επιβεβαιώνεται και από τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του οργανικού υποστρώματος (οξικό οξύ) που υπολογίστηκε με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας. Το διάγραμμα που προέκυψε παρουσιάζεται παρακάτω.



Διάγραμμα 12 Υπολογισμός της υπολειπόμενης συγκέντρωσης οξικού οξέος σε καλλιέργειες με και χωρίς χρήση χημικών επαγωγών

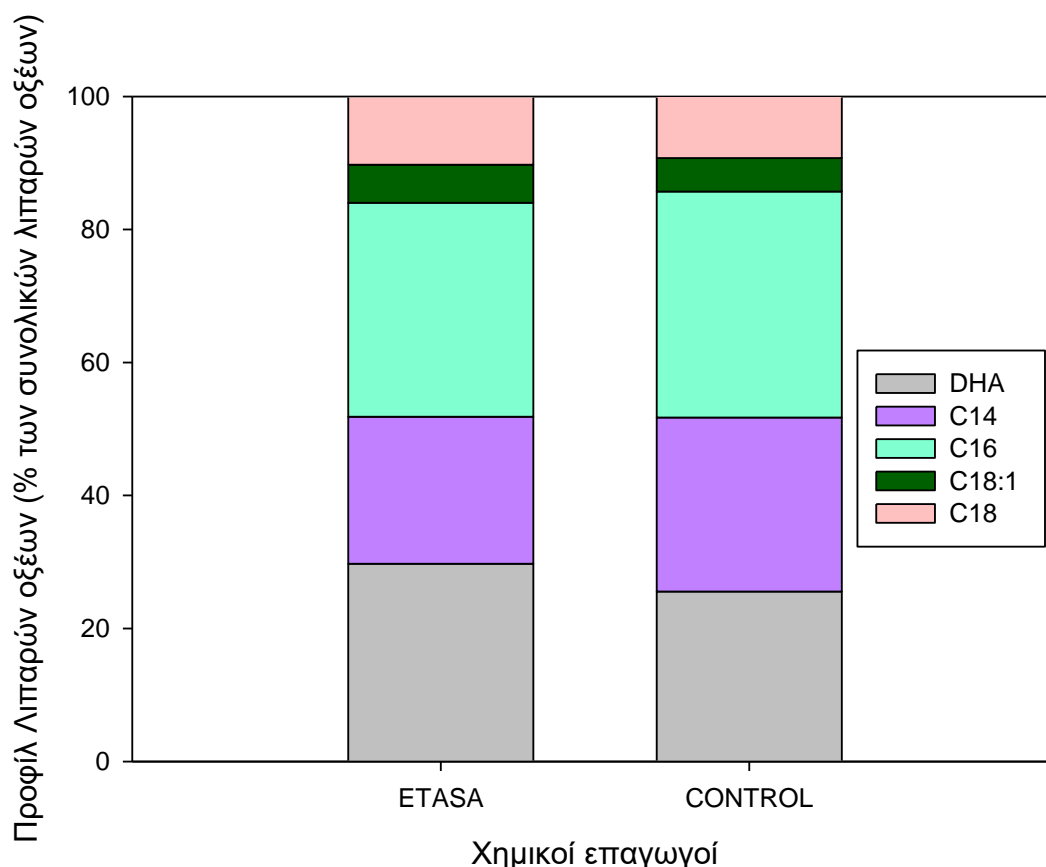
Από την εκχύλιση των λιπαρών, προέκυψαν τα παρακάτω διαγράμματα. Αρχικά, μελετώντας το ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας, φαίνεται πως η προσθήκη των χημικών επαγωγών δεν μεταβάλλει τη σύνθεση των λιπαρών, αφού εκείνη παραμένει πρακτικά σταθερή σε ποσοστό 25% της ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 13 Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας (%) σε καλλιέργειες με και χωρίς τη χρήση χημικών επαγωγών

Συνεχίζοντας, πραγματοποιείται ανάλυση του προφίλ των λιπαρών για να εξακριβωθεί ένα υπάρχει αυξητική τάση στη σύνθεση του DHA. Και σε αυτή την περίπτωση, τα αποτελέσματα έδειξαν πως η σύνθεση του DHA αυξάνεται στην περίπτωση των επαγωγών κατά 16%, αύξηση που δικαιολογείται λόγω της αμελητέας αύξησης της βιομάζας και του ποσοστού των λιπαρών.





Διάγραμμα 14 Προφίλ λιπαρών οξέων (% των συνολικών λιπαρών οξέων) σε καλλιέργειες με και χωρίς χρήση χημικών επαγωγών

Από το λιπιδικό προφίλ φαίνεται πως στην περίπτωση των επαγωγών, σε μικρότερη ποσότητα παράγεται το λιπαρό C18:1, και ακολουθούν κατά αυξανόμενη σειρά τα λιπαρά C18, C14, DHA και C16. Συγκριτικά, με την περίπτωση της καλλιέργειας ελέγχου υπάρχει μια αυξητική τάση παραγωγής στην πλειοψηφία των λιπαρών, δίχως όμως αυτή να είναι ιδιαίτερα σημαντική.

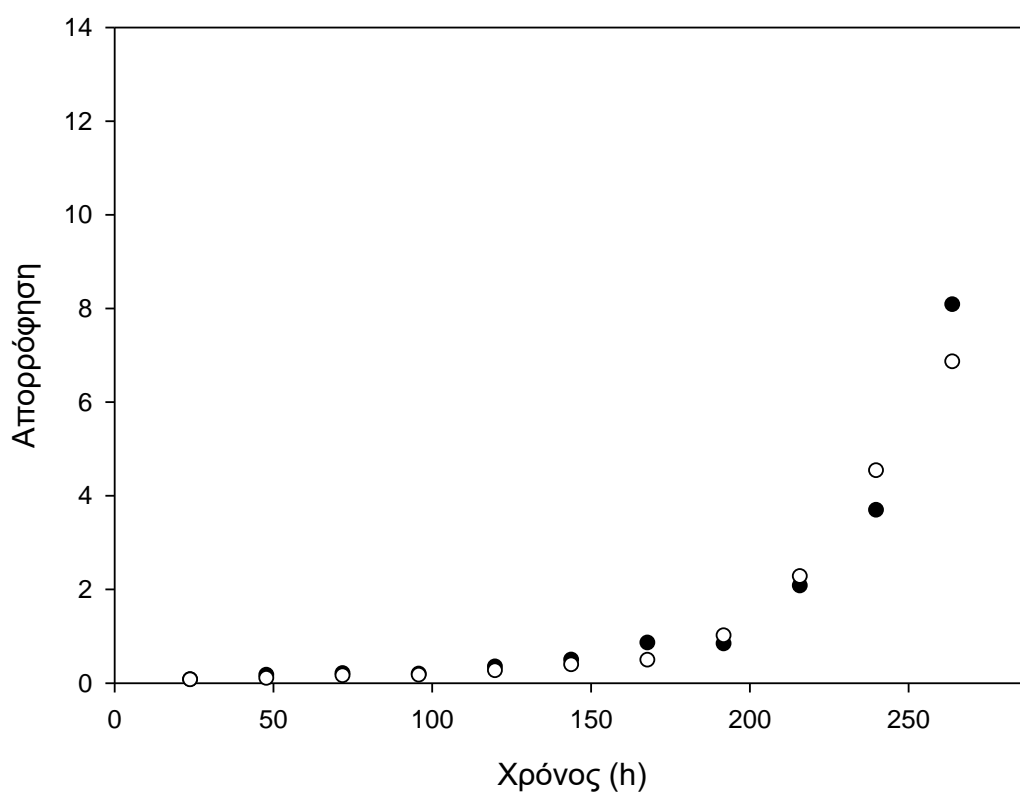
Η συγκέντρωση των παραγόμενων λιπαρών παρουσιάζεται στον πίνακα που ακολουθεί. Η χρήση χημικών επαγωγών αυξάνει την συγκέντρωση των λιπαρών στον υγρό όγκο της καλλιέργειας σε ποσοστό μικρότερο του 2.5%, ενώ παραπλήσιες είναι και οι τελικές συγκεντρώσεις του δοκοσαεξανοϊκού οξέος. Την ίδια συμπεριφορά παρουσιάζει και η συγκέντρωση της βιομάζας η οποία με την χρήση των χημικών επαγωγών, εμφάνισε αμελητέα αύξηση της τάξης του 1%.

Πίνακας 6 Συγκεντρώσεις βιομάζας, λιπαρών και DHA ανά mL καλλιέργειας με και χωρίς χρήση χημικών επαγωγών

Επαγωγή λιπαρών	Συγκέντρωση βιομάζας (mg/mL)	Συγκέντρωση λιπαρών (mg/mL)	Συγκέντρωση DHA (mg/mL)
ETASA	6.72	1.701	0.506
Control	6.65	1.663	0.425

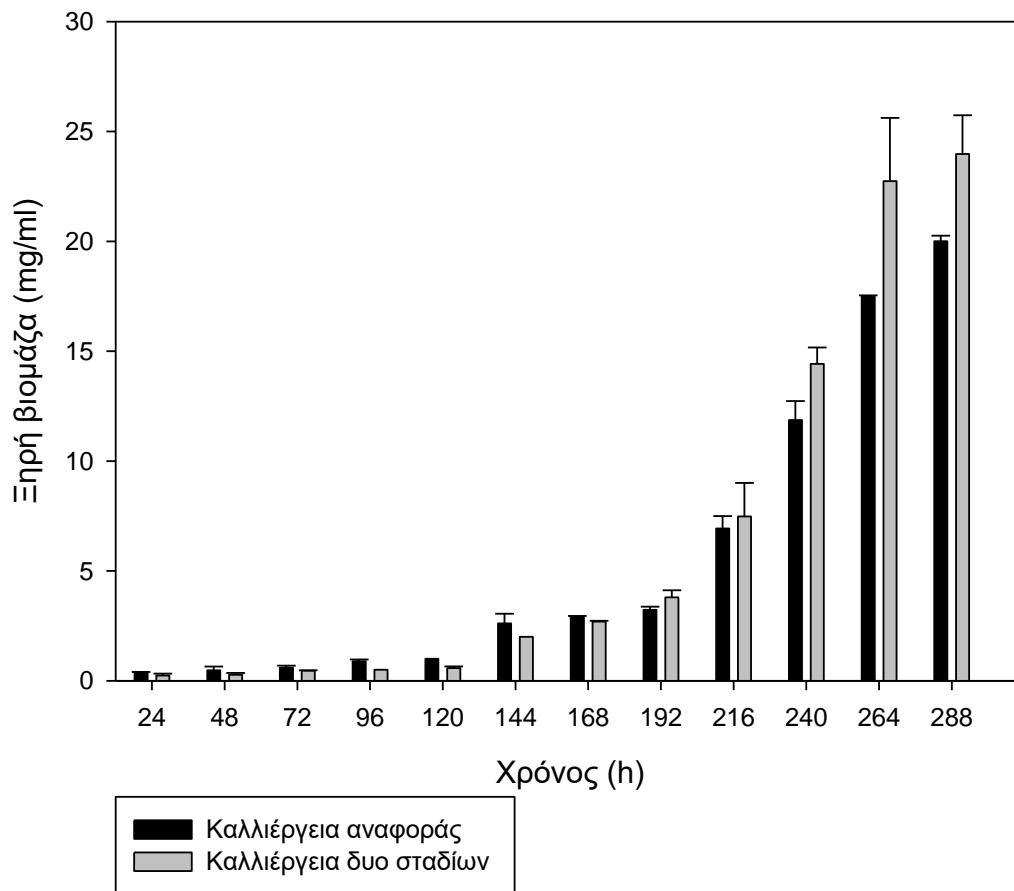
### 3. Καλλιέργεια δυο σταδίων σε βιοαντιδραστήρα ημί-διαλείποντος έργου (fed-batch)

Μετά το πέρας 264 h διακόπτεται η τροφοδοσία των βιοαντιδραστήρων ημί-διαλείποντος έργου (fed-batch) με σκοπό το κύτταρα να εισέλθουν στην στατική φάση και στις 288 h διακόπτεται η καλλιέργεια, συλλέγεται η βιομάζα και επεξεργάζεται με τις μεθόδους που αναφέρονται παραπάνω.



Διάγραμμα 15 Καμπύλη ανάπτυξης μικροφυκών σε καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου. Με μαύρες τελείες παριστάνεται η απορρόφηση της βιομάζας στην καλλιέργεια αναφοράς, ενώ στις λευκές τελείες αντιστοιχεί η απορρόφηση της καλλιέργειας δυο σταδίων.

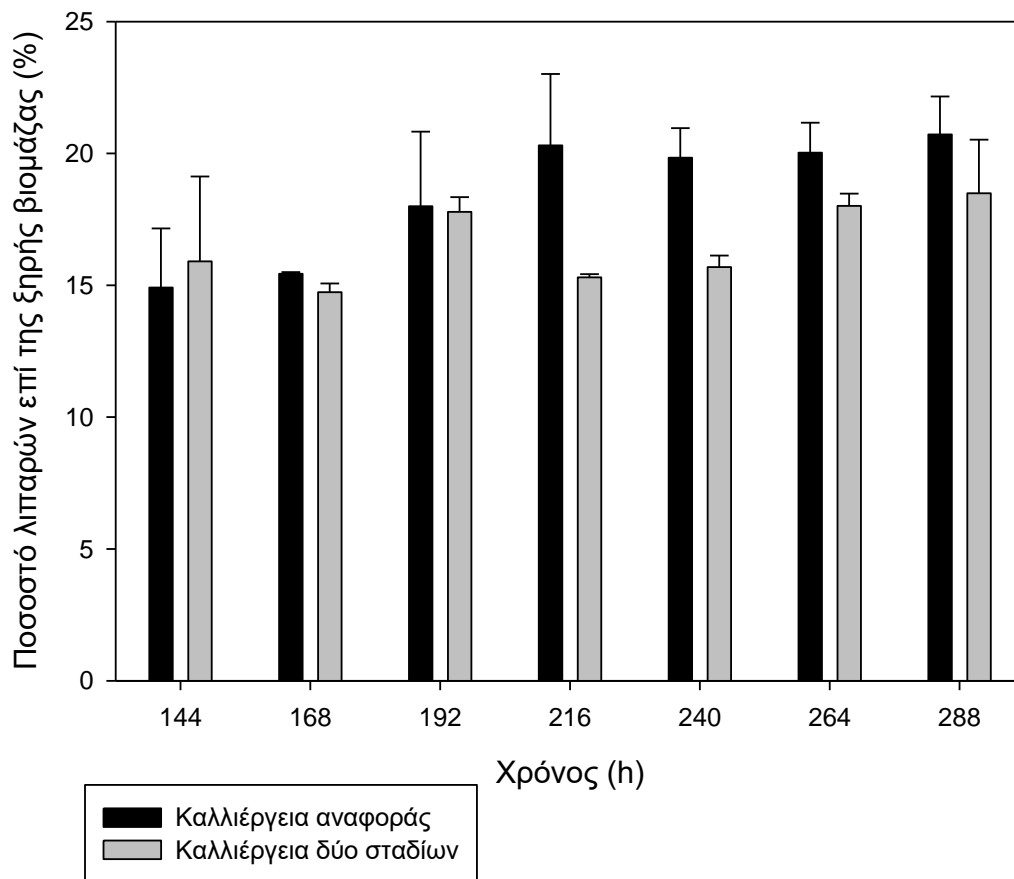
Αρχικά, υπολογίζεται η κυτταρική συγκέντρωση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν συναρτήσει του χρόνου. Όπως φαίνεται και από το ανάλογο διάγραμμα που ακολουθεί, η καλλιέργεια δυο σταδίων μέχρι τις 168 ώρες εμφανίζει μικρότερη κυτταρική ανάπτυξη σε σύγκριση με την καλλιέργεια αναφοράς. Ωστόσο, μετά τις 168 ώρες, όπου διακόπτεται η εμπλουτισμένη με αμμωνιακά τροφοδοσία, η καλλιέργεια δυο σταδίων εμφανίζει ραγδαία ανάπτυξη. Στις 288 ώρες η ίδια καλλιέργεια εμφανίζει συγκέντρωση ξηρής βιομάζας περί τα 24 mg/mL, τιμή 20% αυξημένη από τη καλλιέργεια αναφοράς.



Διάγραμμα 16 Συγκέντρωση ξηρής βιομάζας σε καλλιέργειες ημί-διαλείποντος έργου

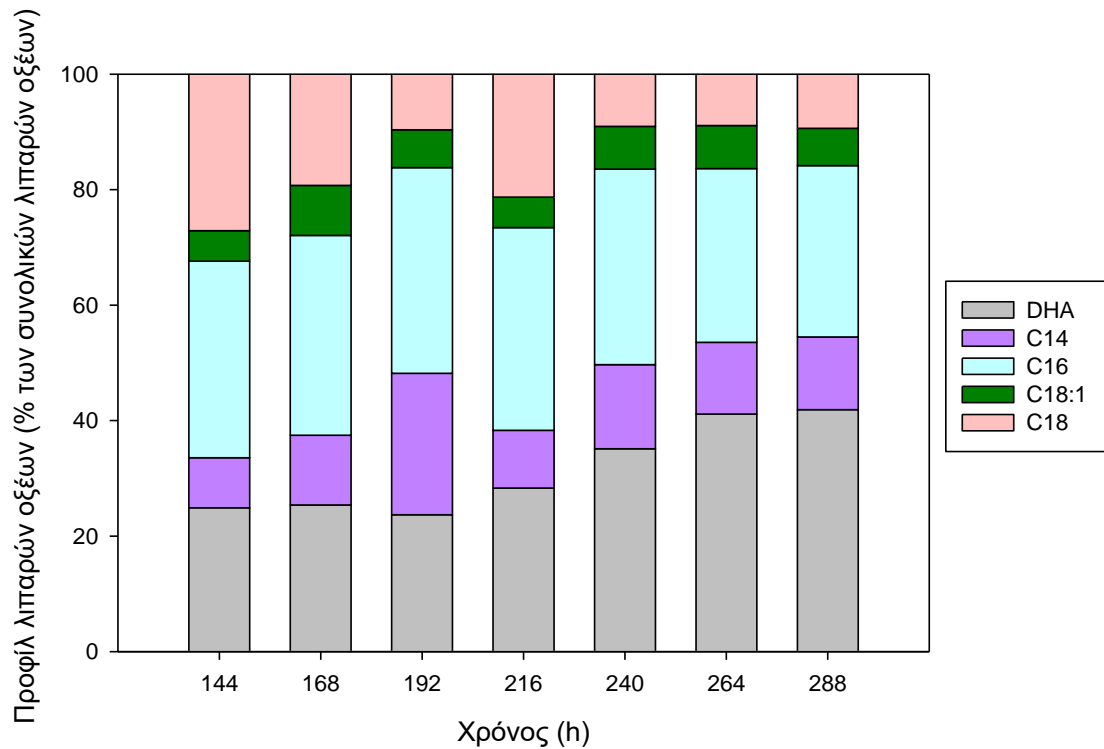
Συνεχίζοντας, από τον υπολογισμό των λιπαρών προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί, πως λόγω της μικρής ποσότητας βιομάζας που συλλέγεται τις πρώτες 120 ώρες, δεν πραγματοποιείται εκχύλιση των δειγμάτων, καθώς τα αποτελέσματα θα ήταν μειωμένης αξιοπιστίας.

Από τα αποτελέσματα, γίνεται αντιληπτό πως η έλλειψη των αμμωνιακών ιόντων, που συμβαίνει στην καλλιέργεια αναφοράς, οδήγησε σε αυξημένο ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας. Στο πέρας της καλλιέργειας, το ποσοστό των λιπαρών στα κύτταρα του βιοαντιδραστήρα αναφοράς προσεγγίζει το 21%, έναντι του 19% που υπολογίζεται στα κύτταρα του βιοαντιδραστήρα των δύο σταδίων, σημειώνοντας αύξηση περίπου 10%.



Διάγραμμα 17 Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας (%) σε καλλιέργειες ημί-διαλείποντος έργου

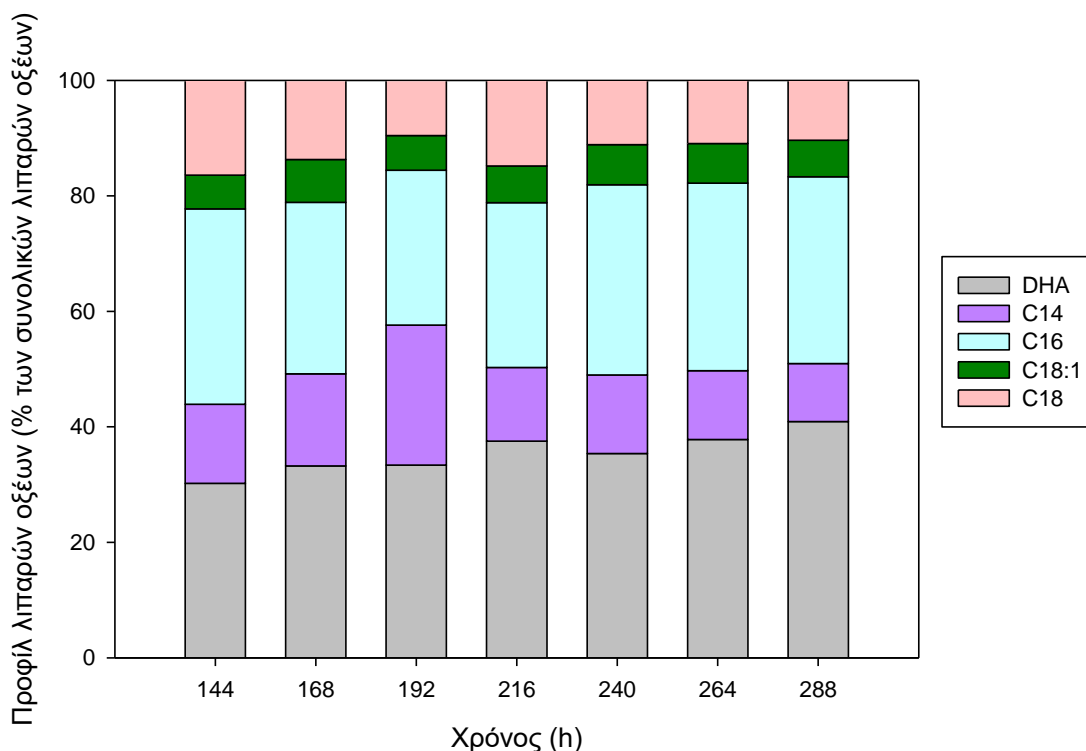
Στη συνέχεια, υπολογίζεται το λιπιδικό προφίλ των εκχυλιζόμενων λιπαρών με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας.



Διάγραμμα 18 Προφίλ λιπαρών οξέων (% των συνολικών λιπαρών οξέων) στη καλλιέργεια αναφοράς σε βιοαντιδραστήρα ημί-διαλείποντος έργου

Στη καλλιέργεια αναφοράς, παρατηρείται στο χρονικό διάστημα που εξετάστηκε πως το ποσοστό του DHA, ως επί τοις εκατό των συνολικών λιπαρών, υφίσταται μια σταδιακή αύξηση που φτάνει το 41% των συνολικά παραγόμενων λιπαρών. Παράλληλα, παρατηρείται μείωση του αντίστοιχου ποσοστού που αφορά τα κορεσμένα λιπαρά C16 και C18. Αντίθετα, το κορεσμένο λιπαρό C14, με μια διακύμανση στις 192 h, που μπορεί να οφείλεται και στη φάση του κύκλου ζωής των κυττάρων του δείγματος, παραμένει σχετικά σταθερό στο 11%.

Όσον αφορά τη καλλιέργεια δυο σταδίων, παρατηρείται και εδώ αύξηση του ποσοστού του DHA, ως επί τοις εκατό των συνολικών λιπαρών, που προσεγγίζει και αυτή τη φορά το 42% των συνολικά παραγόμενων λιπαρών. Συνεχίζοντας, το αντίστοιχο ποσοστό που αφορά τα κορεσμένα λιπαρά C16 και C18:1 παραμένει πρακτικά σταθερό στη τιμή 31% και 6.5%, αντίστοιχα. Όπως και παραπάνω, το κορεσμένο λιπαρό C14, εμφανίζει μια διακύμανση στις 192 h, αλλά το ποσοστό του συγκριτικά με τα υπόλοιπα λιπαρά παραμένει σχετικά σταθερό στο 13%.



Διάγραμμα 19 Προφίλ λιπαρών οξέων (% των συνολικών λιπαρών οξέων) στη καλλιέργεια δύο σταδίων σε βιοαντιδραστήρα ημί-διαλείποντος έργου

Συγκρίνοντας, τα δυο παραπάνω διαγράμματα, συμπεραίνεται ότι και στις δυο περιπτώσεις το ποσοστό του DHA είναι τελικώς το ίδιο. Το λιπαρό που εμφανίζει μεγάλη απόκλιση είναι το C18 λιπαρό οξύ. Στην περίπτωση της καλλιέργειας αναφοράς το ποσοστό του μέχρι τις 168 ώρες προσεγγίζει το 25%, σε αντίθεση με την καλλιέργεια δυο σταδίων που τροφοδοτείται μέχρι εκείνη την στιγμή με αμμωνιακά, όπου το αντίστοιχο ποσοστό δεν ξεπερνά το 16%. Μετά τις 168h το ποσοστό του C18 λιπαρού οξέος κυμαίνεται από 10-11% και στις δυο καλλιέργειες.

Για να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα, που να αφορά την απόδοση των καλλιέργειών, συνυπολογίζοντας και την κυτταρική ανάπτυξη κατασκευάζεται ο παρακάτω πίνακας. Από τις τιμές των συγκεντρώσεων των λιπαρών οξέων και του DHA, είναι χωρίς αμφιβολία αποδεκτό, ότι η καλλιέργεια των κυττάρων σε δυο στάδια είναι αποδοτικότερη. Η τελική συγκέντρωση DHA ανά μονάδα όγκου υγρής καλλιέργειας στην περίπτωση του βιοαντιδραστήρα δύο σταδίων, ξεπερνά το 1.8 mg/mL τιμή κατά 4% αυξημένη σε σύγκριση με την καλλιέργεια ελέγχου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός, πως και στις δυο περιπτώσεις, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το ποσοστό του DHA αποτελεί περίπου το 41% των συνολικών εκχυλιζόμενων λιπαρών.

Το αντίστοιχο ποσοστό των λιπαρών υπολογίζεται προσαυξημένο κατά 7% στην καλλιέργεια των δυο σταδίων.

*Πίνακας 7 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την επεξεργασία της βιομάζας και την εκχύλιση των λιπαρών στους δυο βιοαντιδραστήρες*

Βιοαντιδραστήρας	Συγκέντρωση βιομάζας (g/L)	Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας (%)	Συγκέντρωση λιπαρών στη καλλιέργεια (mg/mL)	Συγκέντρωση DHA στη καλλιέργεια (mg/mL)
Ελέγχου	20.01	20.72	4.145	1.737
Δύο Σταδίων	23.97	18.49	4.434	1.814

## 4. Μελέτη της αποδοτικότητας την διεργασίας με μεταβολή κρίσιμων παραμέτρων

### 4.1 Διαφορετικής επεξεργασίας διήθημα υγρού κλάσματος βιοαποβλήτου

Οι συγκεντρώσεις των διηθημάτων διαφορετικής επεξεργασίας παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 8 Σύσταση των συμπυκνωμένων διηθημάτων σε πτητικά οργανικά οξέα

Effluent #	Ημερομηνία παράδοσης	Οξικό οξύ (g/L)	Προπιονικό οξύ (g/L)	Βουτυρικό οξύ (g/L)	Ισοβουτυρικό οξύ (g/L)	Βαλερικό οξύ (g/L)	Ισοβαλερικό οξύ (g/L)	Καπροικό οξύ (g/L)
Effluent #1	4/18	5.1	2.7	3.5	0.2	0.9	0.3	1.0
Effluent #2	2/19	6.7	4.2	3.7	0.2	2.8	0.3	1.5
Effluent #3	5/19	9.3	6.5	3.8	0.2	3.1	0.4	1.4

Η λειτουργία των βιοαντιδραστήρων με τροφοδοσία το Effluent #1, Effluent #2 και Effluent #3 διήρκησε 48, 114 και 60h αντίστοιχα. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί, πως μόνο σε αυτή τη σειρά πειραμάτων η λειτουργία των βιοαντιδραστήρων διακόπτεται με την πλήρη κατανάλωση της τροφοδοσίας και όχι κατά τη στατική φάση ανάπτυξης, όπως συνέβαινε στα παραπάνω πειράματα.

Από την επεξεργασία της βιομάζας και την εκχύλιση των λιπαρών προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα.

Πίνακας 9 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την επεξεργασία της βιομάζας και την εκχύλιση των λιπαρών στα διαφορετικής συμπύκνωσης διηθήματα

Effluent #	Συγκέντρωση βιομάζας (g/L)	Ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας (%)	Συγκέντρωση λιπαρών στη καλλιέργεια (mg/mL)	Συγκέντρωση DHA στη καλλιέργεια (mg/mL)
Effluent #1	1.18	14.24	0.167	0.054
Effluent #2	3.85	13.98	0.538	0.219
Effluent #3	1.63	22.71	0.370	0.140

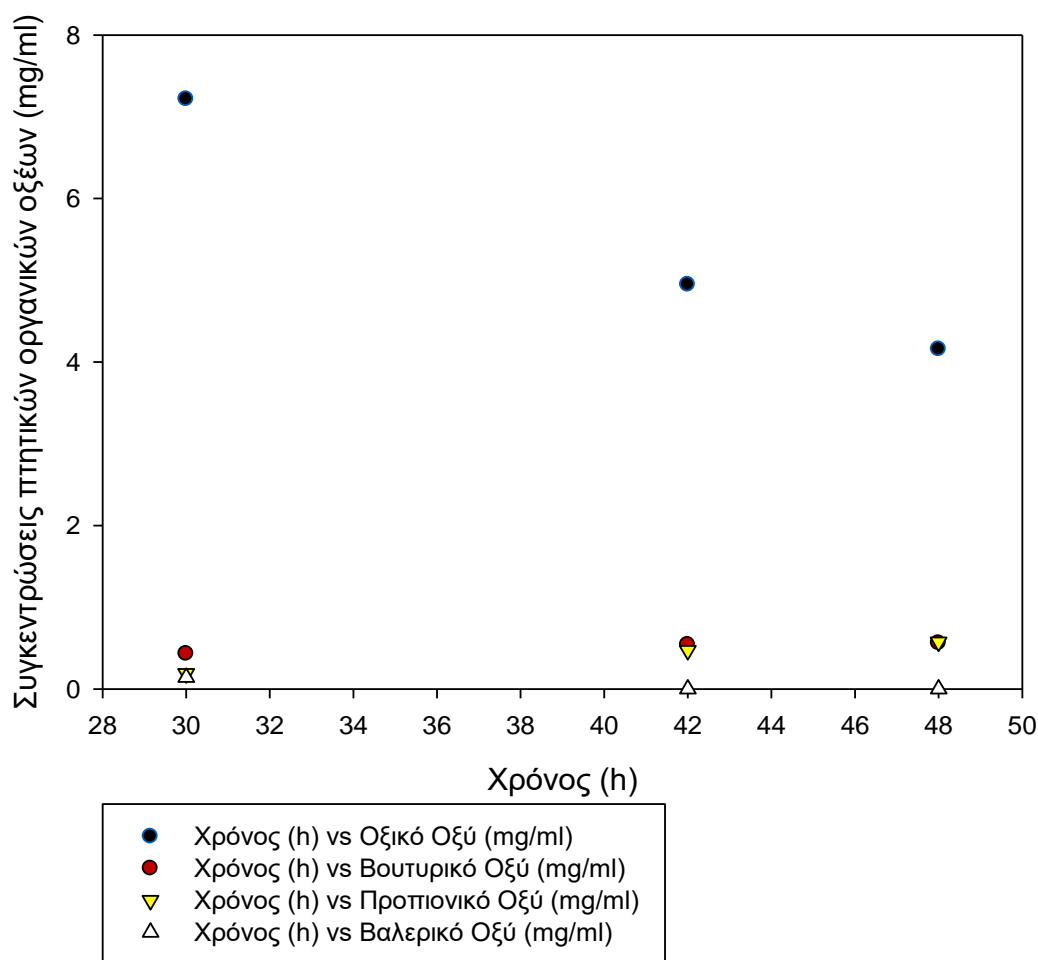


Από τα αποτελέσματα της μελέτης γίνεται εμφανές ότι υψηλότερη κυτταρική συγκέντρωση επιτυγχάνεται με την κατανάλωση του διηθήματος Effluent #2. Η κυτταρική συγκέντρωση του διηθήματος Effluent #2 είναι παραπάνω από διπλάσια σε σύγκριση με αυτή του διηθήματος Effluent #3, ενώ στην περίπτωση του διηθήματος Effluent #1 η συγκέντρωση είναι 3.2 φορές μεγαλύτερη.

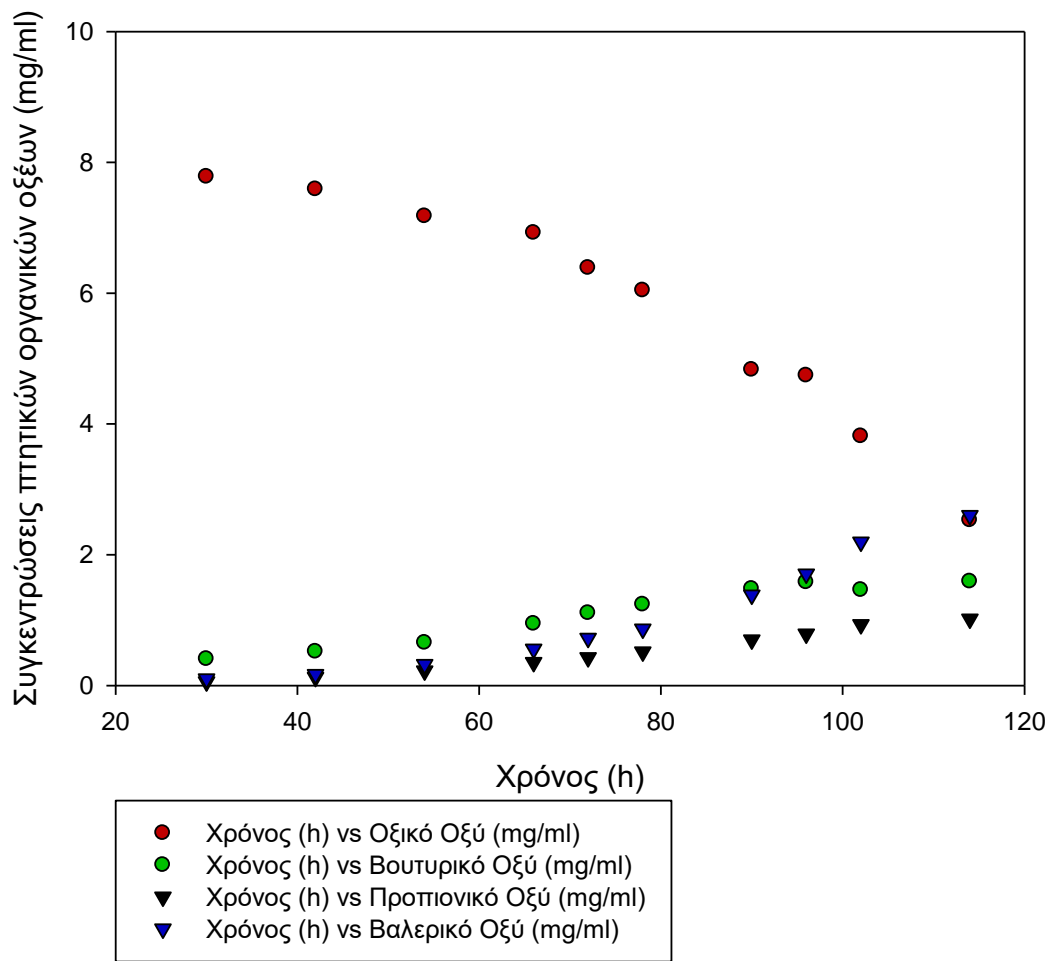
Όσον αφορά τα λιπαρά και το DHA, τα υψηλότερα ποσοστά συγκεντρώσεων παρατηρούνται στην περίπτωση του διηθήματος Effluent #2. Η αύξηση της συγκέντρωσης τριπλασιάστηκε με αλλαγή του διηθήματος Effluent #1 σε Effluent #2, ενώ στην περίπτωση του DHA η υψηλότερη συγκέντρωση επιτυγχάνεται κατά την κατανάλωση του διηθήματος Effluent #2, με την τιμή της να ξεπερνά τα 0.2 mg/ml.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό ανάλυση της κατανάλωσης των διηθημάτων σε ημερήσια βάση.

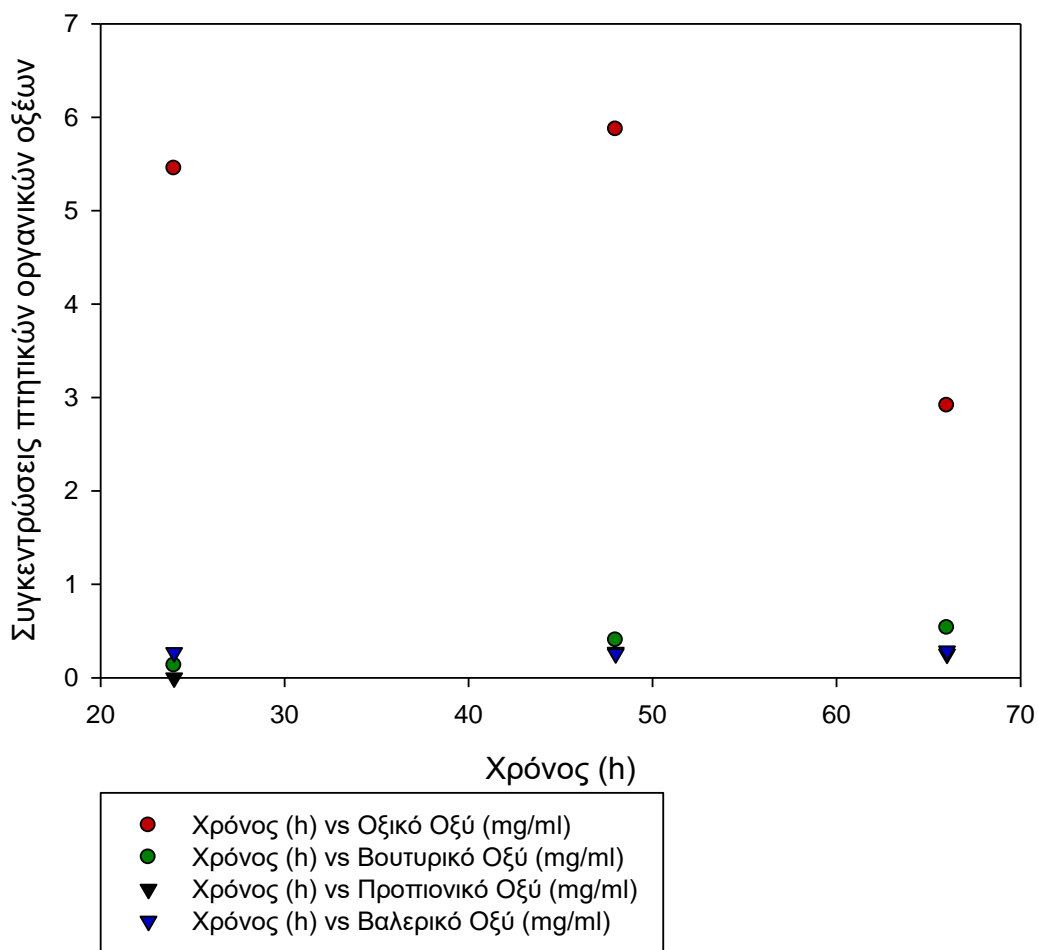
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα διαγράμματα που ακολουθούν.



Διάγραμμα 20 Συγκεντρώσεις πτητικών οργανικών οξέων κατά την κατανάλωση του διηθήματος Effluent#1



Διάγραμμα 21 Συγκεντρώσεις πτητικών οργανικών οξέων κατά την κατανάλωση του διηθήματος Effluent#2



Διάγραμμα 22 Συγκεντρώσεις πτητικών οργανικών οξέων κατά την κατανάλωση του διηθήματος Effluent#3

Από τα διαγράμματα γίνεται εμφανές ότι καταναλώνεται μόνο το οξικό οξύ, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται στην καλλιέργεια τα υπόλοιπα πτητικά οργανικά οξέα, όπως το βουτυρικό, το προπιονικό και το βαλερικό οξύ.

#### 4.2 Αντικατάσταση του αρχικού υποστρώματος του βιοαντιδραστήρα

Η προσπάθεια αντικατάστασης του αρχικού υποστρώματος με το διήθημα του υγρού κλάσματος των βιοαποβλήτων δεν επέφερε επιτυχές αποτέλεσμα. Η ανάπτυξη του μικροφύκου ήταν μηδαμινή ακόμα και μετά από 72 h από τον εμβολιασμό. Σαν αποτέλεσμα δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση των λιπαρών και επεξεργασία της βιομάζας αφού μια τέτοια πρακτική δεν θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε μεγαλύτερη κλίμακα λόγω της χαμηλής αποδοτικότητας της.



## **Ενότητα 4<sup>η</sup>:**

---

### **Συμπεράσματα & Μελλοντικές Προτάσεις**



## 1. Πηγή αζώτου

Από την πειραματική μελέτη διαπιστώνεται ότι η βέλτιστη πηγή αζώτου, όσον αφορά τη παραγωγή των λιπαρών, τη σύνθεση του DHA και την ανάπτυξη της βιομάζας, είναι το θειικό αμμώνιο.

Γενικά, αξίζει να σημειωθεί πως το άζωτο είναι απαραίτητο συστατικό για την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων σε μια καλλιέργεια, αφού αποτελεί δομικός λίθος των πρωτεϊνών, αλλά και βασικών μορίων όπως τα φωσφολιπιδίων [35].

Στο σημείο αυτό να αναφερθεί, πως σε αντίθεση με το θειικό αμμώνιο, το εκχύλισμα ζύμης ως πηγή αζώτου συμβάλλει στην μεγιστοποίηση του ποσοστού των λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας. Παρότι το ίδιο σημειώνει μικρότερη παραγωγή βιομάζας, παρατηρήθηκε παραπλήσια συγκέντρωση στα συνολικά εκχυλιζόμενα λιπαρά με πολύ μικρότερη όμως συγκέντρωση DHA. Η υψηλή συγκέντρωση λιπαρών μπορεί να αιτιολογηθεί και από το γεγονός ότι το εκχύλισμα ζύμης περιέχει και άλλα θρεπτικά συστατικά που προωθούν και διευκολύνουν τη σύνθεση των λιπαρών.

Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι η μορφή της πηγής αζώτου διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αφομοίωση της και στην σύνθεση των λιπαρών. Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι οι διαφορετικές πηγές αζώτου επηρεάζουν την ενεργότητα καθοριστικών ενζύμων, όπως η ακυλοτρανσφεράση (ACL) που συμμετέχει στον κύκλο του κιτρικού οξέος και συμβάλλουν στην σύνθεση των λιπιδίων [33].

Επίσης, η έρευνα των Safdar et al. αναφέρει πως η βέλτιστη πηγή αζώτου, που συμβάλλει τόσο στη μέγιστη κυτταρική ανάπτυξη, όσο και στη σύνθεση του DHA είναι το νιτρικό νάτριο ( $\text{NaNO}_3$ ), χρησιμοποιώντας όμως σαν πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και όχι το οξικό οξύ όπως γίνεται στην παρούσα εργασία. Το νιτρικό νάτριο οδήγησε στην σύνθεση λιπαρών που προσεγγίζουν το 26.9% της ξηρής βιομάζας με συγκέντρωση DHA 0.99 mg/mL [33]. Αντίθετα, η παρούσα ερευνητική μελέτη αντιτίθεται σε αυτό το αποτέλεσμα, με το θειικό αμμώνιο να σημειώνει υψηλή ανάπτυξη βιομάζας με σχετικά υψηλό ποσοστό λιπαρών, που προσεγγίζει το 15% της ξηρής βιομάζας. Συνεργατικά, η επιλογή του θειικού αμμωνίου και του οξικού νατρίου συμβάλλουν στην εκχύλιση υψηλών συγκεντρώσεων λιπαρών που προσεγγίζει τα 2.5 mg/mL με το DHA να ξεπερνά το 1 mg/mL.

Μελετώντας και τις υπόλοιπες πηγές αζώτου, μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι γίνεται καλύτερη αφομοίωση του αζώτου όταν αυτό προέρχεται από τα αμμωνιακά ιόντα γεγονός που επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά. Συγκεκριμένα, ο δεσμός  $\text{NH}_4\text{-N}$  αφομοιώνεται καλύτερα από τα μικροφύκη σε σχέση με τους δεσμούς  $\text{NH}_3\text{-N}$  και  $\text{NH-N}$ . Η κατανάλωση του  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , όπως επιβεβαιώνεται και από το παρόν πείραμα, οδηγεί σε υψηλές συγκεντρώσεις βιομάζας που προσεγγίζουν τα 8 mg/ml, τιμή παραπλήσια με αυτή του θειικού αμμωνίου [36]. Ωστόσο, παρά την υψηλή κυτταρική

συγκέντρωση, το ποσοστό των λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας είναι το μικρότερο από όλες τις πηγές αζώτου που εξετάστηκαν, με τιμή μικρότερη του 12%.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση των πηγών αζώτου  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  και  $\text{NaNO}_3$ . Και δυο πηγές στο μόριο τους αποτελούνται από νιτρικά ιόντα. Το νιτρικό αμμώνιο ωστόσο, όπως αναφέρεται και παραπάνω, αφομοιώνεται αποτελεσματικότερα λόγω του δεσμού  $\text{NH}_4\text{-N}$  με αποτέλεσμα να εμφανίζει σχεδόν τριπλάσια κυτταρική συγκέντρωση συγκριτικά με το  $\text{NaNO}_3$ . Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της ξηρής βιομάζας, το ποσοστό των λιπαρών είναι ιδιαίτερα αυξημένο στην περίπτωση του  $\text{NaNO}_3$ , που όμως λόγω της μικρής κυτταρικής ανάπτυξης η τελική συγκέντρωση λιπαρών και DHA είναι αισθητά μικρότερη.

Καταληκτικά, εξετάζοντας τις τελικές συγκεντρώσεις των λιπαρών εκτός του θεικού αμμωνίου, το εκχύλισμα ζύμης (YE), η ουρία ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) και το νιτρικό αμμώνιο ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές αζώτου, με μικρότερη βέβαια απόδοση. Καθοριστικός παράγοντας για την επιλογή της πηγής σε μια μεγαλύτερης κλίμακας διεργασία αποτελεί εκτός της απόδοσης, η διαθεσιμότητα των πόρων και το κόστος των πρώτων υλών.

## 2. Συγκέντρωση θεικού αμμωνίου ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων συμπεραίνεται ότι η βέλτιστη συγκέντρωση θεικού αμμωνίου είναι 0.38 g/L, τιμή που αντιστοιχεί σε λόγο άνθρακα προς άζωτο  $\text{C/N}=110$ . Στη συγκέντρωση αυτή επιτυγχάνεται όχι μόνο υψηλή παραγωγή βιομάζας, αλλά και λιπαρών. Επιπλέον, στο λόγο  $\text{C/N}=110$  η εκχυλιζόμενη ποσότητα του DHA μεγιστοποιείται. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των λιπαρών είναι 26% της ξηρής βιομάζας και το αντίστοιχο ποσοστό του DHA ξεπερνά το 8%.

Εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα στη συγκέντρωση ξηρής βιομάζας και παραπλήσια της αναλογίας  $\text{C/N}=110$  εμφανίζονται στους λόγους  $\text{C/N}$  83 και 140. Ωστόσο στις τελευταίες τιμές το ποσοστό των παραγόμενων λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας είναι αρκετά μικρότερο, με αποτέλεσμα η συνολική ποσότητα των λιπαρών που εκχυλίζεται να είναι αρκετά μικρότερη της βέλτιστης. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί πως στη αναλογία  $\text{C/N}=140$  το σφάλμα του αποτελέσματος είναι αρκετά υψηλό. Για τον λόγο αυτό το πείραμα επαναλήφθηκε και εκκρεμούν τα αποτελέσματα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προξενεί η χαμηλή παραγωγή βιομάζας σε υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνιακών ιόντων. Το αποτέλεσμα αυτό δικαιολογείται και βιβλιογραφικά, αφού σε υψηλές τιμές αμμωνιακών ιόντων αυξάνεται η ενεργότητα εκείνων των ενζύμων που διασπών και αποδομούν τα αμμωνιακά ιόντα σε άλλες απλούστερες ενώσεις. Η συσσώρευση προϊόντων όπως η αμμωνία λειτουργούν ως τοξικοί παράγοντες που δυσχεραίνουν την ανάπτυξη των μικροφυκών [33].



Επίσης όπως αναφέρεται σε βιβλιογραφικές πηγές, υψηλή κυτταρική ανάπτυξη και σύνθεση λιπιδίων επιτυγχάνεται σε μέσες τιμές συγκέντρωσης αζώτου. Ανάλογα πειράματα που επιβεβαιώνουν αυτό τον ισχυρισμό πραγματοποιήθηκαν στα μικροφύκη *N.oculata* H. και *C. vulgaris* CCAP 211, μικροοργανισμοί που επίσης επιλέχθηκαν για την ικανότητα τους να παράγουν υψηλά ποσοστά λιπαρών. Στα πειράματα αυτά, χρησιμοποιήθηκε ως πηγή αζώτου το νιτρικό νάτριο ( $\text{NaNO}_3$ ) [37]. Αντίστοιχες μελέτες με ανάλογα αποτελέσματα προκύπτουν και από τα πειράματα των Safdar et al.. Η έρευνα που πραγματοποιήθηκε εξέταζε τις βέλτιστες συγκεντρώσεις του  $\text{NaNO}_3$  ως πηγή αζώτου, χρησιμοποιώντας το στέλεχος *Cryptocodinium cohnii* (ATCC 30555) σε καλλιέργειες ATCC με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη. Και σε αυτή τη περίπτωση οι μέσες συγκεντρώσεις αζώτου, ήταν εκείνες που επέφεραν το υψηλότερο ποσοστό σε λιπαρά [33].

Όπως παρατηρήθηκε και από τα αποτελέσματα του πειράματος σε λόγο C/N=110 παρατηρείται αύξηση του ποσοστού των κορεσμένων λιπαρών ως επί τοις εκατό των συνολικών λιπαρών οξέων. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι εξίσου υψηλό ποσοστό DHA ως επί τοις εκατό της ξηρής βιομάζας εμφανίζεται σε λόγο C/N=50, τιμή που δεν εμφανίζει όμως υψηλή παραγωγή βιομάζας με αποτέλεσμα η τελική συγκέντρωση των λιπαρών να είναι αρκετά μικρότερη. Μια πιθανή εξήγηση για το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να αποτελεί η ίδια η διαθεσιμότητα του αζώτου. Πιο αναλυτικά, στο λόγο C/N=50, όπου υπάρχει διαθεσιμότητα αζώτου, ενισχύεται η σύνθεση πρωτεϊνών και κατ' επέκταση ενζύμων. Τα ένζυμα μεταξύ των οποίων οι ελονγκάσες και οι ντεσατουράσες, συμβάλλουν στην επιμήκυνση των λιπαρών οξέων και τη δημιουργία διπλών δεσμών συνθέτοντας σε μεγάλο ποσοστό DHA. Αντίθετα, σε συνθήκες έλλειψης αζώτου αυξάνεται το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών μικρότερης ανθρακικής αλυσίδας.

Μια ακόμα παρατήρηση που προξενεί ενδιαφέρον είναι η διαφορά στη μεγιστοποίηση του DHA, που επιτυγχάνεται, όπως αναφέρθηκε παραπάνω σε λόγο C/N=50, σε αντιδιαστολή με τη μεγιστοποίηση των συνολικών λιπαρών, που εμφανίζεται σε C/N=110.

Αντίθετα, σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης αζώτου, τα κύτταρα αποδομούν τις πρωτεΐνες τους και γενικά τα πλούσια σε άζωτο συστατικά με σκοπό να αυξήσουν τα αποθεματικά τους και να διατηρήσουν την κυτταρική τους ανάπτυξη [38]. Πλούσια σε άζωτο μόρια συναντώνται και στη κυτταρική μεμβράνη, τα οποία είναι ενωμένα με λιπαρά οξέα και άλλες οργανικές ενώσεις (π.χ. φωσφολιπίδια).

Παράλληλα, ο ρυθμός της κυτταρικής διαίρεσης μειώνεται, με αποτέλεσμα τα λιπαρά που συντίθεται, αλλά και αυτά που προκύπτουν από την αποδόμηση διαφόρων μορίων να συσσωρεύονται στο εσωτερικό των κυττάρων, τα οποία και τείνουν να διογκώνονται. Ερευνητές αναφέρουν ότι μέσω αυτής της διαδικασίας το ποσοστό των λιπαρών στο εσωτερικό των κυτταρικών μπορεί έως και να διπλασιαστεί [39].

### 3. Βέλτιστη θερμοκρασία επώασης

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται αντιληπτό, πως η βέλτιστη θερμοκρασία για τη παραγωγή των συνολικών λιπαρών είναι οι 27°C, ενώ για τη μεγιστοποίηση του DHA ενδείκνυνται οι 23°C. Ωστόσο, η απόκλιση στα τελικά αποτελέσματα είναι αμελητέα και ενδεχομένως οφείλονται και στην αβεβαιότητα των μετρήσεων, αφού τα συνολικά λιπαρά αυξάνονται μόνο κατά 2.5% στην θερμοκρασία των 27°C συγκριτικά με αυτή των 23°C.

Ωστόσο, αδιαμφισβήτητη είναι η επίδραση της θερμοκρασίας στην επαγωγή της σύνθεσης των λιπαρών. Παρότι κάθε μικροφύκος συμπεριφέρεται διαφορετικά στις αυξομειώσεις τις θερμοκρασίας, επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά ότι οι βέλτιστες θερμοκρασίες για αύξησή των παραγόμενων λιπαρών κυμαίνονται από 20 σε 27°C [40].

Στην περίπτωση του μικροφύκους *C. cohnii*, πηγές που χρησιμοποίησαν το στέλεχος *Cryptocodinium cohnii* ATCC 30556 αναφέρουν πως η βέλτιστη θερμοκρασία επώασης είναι οι 27°C [18]. Η θερμοκρασία αυτή επιβεβαιώνεται και από το πείραμα της παρούσας εργασίας, αφού όσον αφορά τη συγκέντρωση των λιπαρών αυτή μεγιστοποιείται στην αντίστοιχη θερμοκρασία. Παρόλα αυτά, διαφορές εντοπίζονται στη συγκέντρωση της βιομάζας, αφού πειραματικά αυτή εντοπίζεται στους 23 °C, ενώ βιβλιογραφικά επισημαίνεται πως αύξηση της θερμοκρασίας επιφέρει την αύξηση της συγκέντρωσης της βιομάζας, με τη μέγιστη να επιτυγχάνεται στους 30 °C [18]. Ωστόσο, να αναφερθεί επίσης ότι στην αντίστοιχη βιβλιογραφική αναφορά στο θρεπτικό μέσο χρησιμοποιείται σαν πηγή άνθρακα η γλυκόζη και όχι το οξικό οξύ, όπως συμβαίνει στην παρούσα εργασία. Αυτή η αλλαγή στην επιλογή του θρεπτικού μέσου, επηρεάζει χωρίς αμφιβολία τα μεταβολικά μονοπάτια και τα ένζυμα που ενεργοποιούνται. Η ενεργότητα των ενζύμων που συμμετέχουν στην αφομοίωση της γλυκόζης, ίσως μεγιστοποιείται σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, σε αντίθεση με τα ένζυμα που βοηθούν στη διάσπαση και αφομοίωση του οξικού οξέος.

Συνεχίζοντας, παρατηρείται πως οι χαμηλές θερμοκρασίες καλλιέργειας έχουν σαν αποτέλεσμα μειωμένη παραγωγή βιομάζας. Αυτό δικαιολογείται και βιβλιογραφικά, διότι σε χαμηλές θερμοκρασίες μειώνεται η ενεργότητα των ενζύμων που συμμετέχουν στην γλυκόλυση και τον κύκλο του Krebs, με αποτέλεσμα τη μειωμένη αφομοίωση της πηγής άνθρακα [41].

Στο σημείο αυτό κρίνεται απαραίτητο να αναφερθεί πως, η χαμηλή παραγωγικότητα της βιομάζας, υποδηλώνει πως η καλλιέργεια, και ιδιαίτερα αν αυτή γίνει σε μεγάλη κλίμακα, είναι ευάλωτη σε μολύνσεις επομένως και δυσχεραίνεται η εφαρμογή των στείρων συνθηκών

Όσον αφορά τη παραγωγή λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας, στους 15°C παρατηρείται μεγιστοποίηση του ποσοστού. Το γεγονός αυτό μπορεί να αιτιολογηθεί, αφού η χαμηλή θερμοκρασία λειτουργεί σα συνθήκη στρες για το κύτταρο. Η χαμηλή

θερμοκρασία επηρεάζει τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Για να διατηρηθεί η ρευστότητα και λειτουργικότητα της, το κύτταρο προάγει την παραγωγή λιπαρών, γεγονός που συμβάλλει στην αντιμετώπιση των νέων ακραίων συνθηκών [21]. Η μικρή συγκέντρωση της βιομάζας στους 15°C, καθιστά την θερμοκρασία ακατάλληλη για καλλιέργεια, αφού η τελική συγκέντρωση λιπαρών και DHA είναι ιδιαίτερα μειωμένη.

Επιπροσθέτως, μελετώντας το λιπιδικό προφίλ, πηγές αναφέρουν πως το ποσοστό των ακόρεστων λιπαρών στο μικροφύκος *C. cohnii* αυξάνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες με σκοπό την διατήρηση της ρευστότητας των κυτταρικών μεμβρανών, όπως αναφέρεται και παραπάνω. Η αναφορά αυτή δεν συνάδει με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αφού το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών στη θερμοκρασία των 15 °C προσεγγίζει το 75%, τιμή η οποία μειώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας [18].

Επίσης, είναι γνωστό ότι ο αποκορεσμός είναι μια οξειδωτική αντίδραση και απαιτεί την παρουσία οξυγόνου. Σε χαμηλές θερμοκρασίες λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου στην καλλιέργεια, οι αντιδράσεις του αποκορεσμού των λιπαρών ενισχύονται. Συνεπώς, αναμένεται σε χαμηλές θερμοκρασίες να αυξάνεται το ποσοστό των ακόρεστων λιπαρών οξέων, συμπεριλαμβανομένου και του DHA. Το αποτέλεσμα της έρευνας εμφάνισε υψηλότερα ποσοστά DHA στη θερμοκρασία των 23 °C σε αντίθεση με αυτή των 15 °C, όπως ήταν αναμενόμενο [18].

#### **4. Επαγωγή της σύνθεσης λιπαρών με χρήση χημικών επαγωγών**

Στη παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε η χρήση των χημικών μορίων αιθυλαμίνη και σαλικυλικό οξύ (ETA-SA) στην επαγωγή την σύνθεσης των λιπαρών.

Ο τρόπος δράσης των χημικών μορίων – επαγωγών εντοπίζεται μέσω μεταβολομικών αναλύσεων και πραγματοποιείται έμμεσα. Συγκεκριμένα, οι επαγωγοί ενισχύουν την σύνθεση των λιπαρών, αφού πρώτα έχουν αυξήσει τη σύνθεση καθοριστικών μορίων, όπως το ακετυλο-συνένζυμο Α (Ac-CoA) και το οξαλο-ακετικό οξύ. Τα μόρια αυτά συμμετέχουν στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (κύκλος του Krebs) και το γλυοξυλικό κύκλο, μεταβολικοί οδοί που καταλήγουν στην σύνθεση των λιπαρών [34].

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, όσον αφορά τη συγκέντρωση της βιομάζας, αυτή δεν εμφανίζει αύξηση στις δυο καλλιέργειες, γεγονός που σηματοδοτεί ότι τα χημικά μόρια δεν επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων.

Μελετώντας τη σύνθεση των λιπαρών, σύμφωνα με τους Jinghan Li et al., η χρήση των παραπάνω μορίων αυξάνει την παραγωγή των λιπαρών στο μικροφύκος *C. cohnii*

ATCC 30556 έως και 22.45%. Στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της ερευνητικής εργασίας, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην παραγωγή των λιπαρών, καθώς η καλλιέργεια αναφοράς είχε μόλις 1% μικρότερο ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας σε σύγκριση με την καλλιέργεια, όπου είχε γίνει προσθήκη των επαγωγών. Ωστόσο μεγάλη διαφορά παρατηρήθηκε στην ανάλυση του προφίλ των λιπαρών στις δυο καλλιέργειες. Στην καλλιέργεια όπου προστέθηκαν τα χημικά μόρια ETA και SA, το ποσοστό του DHA αυξήθηκε κατά 16% συγκριτικά με την καλλιέργεια αναφοράς, ενώ επίσης αυξητική τάση εμφανίζουν τα λιπαρά C18:1 και C18.

## 5. Καλλιέργεια δυο σταδίων

Για την αύξηση της τελικής συγκέντρωσης των λιπαρών επιχειρήθηκε η καλλιέργεια των κυττάρων σε δυο στάδια. Σκοπός του πειράματος αυτού είναι να γίνει εκμετάλλευση των συνθηκών στρες σε μια καλλιέργεια που έχει επιτύχει υψηλή κυτταρική συγκέντρωση.

Από τα αποτελέσματα του πειράματος, πράγματι η καλλιέργεια που η τροφοδοσία της ήταν εμπλουτισμένη με αμμωνιακά ιόντα εμφάνισε τελικώς συγκέντρωση βιομάζας 24 mg/mL, τιμή 20% προσ αυξημένο από την αντίστοιχη καλλιέργεια αναφοράς.

Σε διαφορετικά αποτελέσματα κατέληξε ανάλογο πείραμα, που επιχειρήθηκε η καλλιέργεια δυο σταδίων. Συγκεκριμένα, το πείραμα της βιβλιογραφίας χρησιμοποίησε το μικροφύκος *C. cohnii* ATCC 30556, ενώ διέφεραν και οι πηγές άνθρακα και αζώτου, με τις οποίες τροφοδοτούνταν η καλλιέργεια. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε σιρόπι χουρμά και σαν πηγή αζώτου εκχύλισμα ζύμης. Το pH στο πείραμα της βιβλιογραφίας ρυθμίστηκε στην τιμή 7 και η συγκέντρωση των αλάτων στο βιοαντιδραστήρα στα 20g/L. Το πείραμα των δυο σταδίων της βιβλιογραφίας κατέληξε σε 35% μικρότερη κυτταρική συγκέντρωση από την αντίστοιχη καλλιέργεια ελέγχου, η οποία σημείωσε κυτταρική συγκέντρωση ίση με 42 g/L [42].

Όσον αφορά την παραγωγή των λιπαρών μετά την ολοκλήρωση της καλλιέργειας στη παρούσα εργασία, βρέθηκε πως η καλλιέργεια δυο σταδίων εμφανίζει μεγαλύτερη συγκέντρωση λιπαρών σε ποσοστό υψηλότερο κατά 7%.

Από την ανάλυση του προφίλ των λιπαρών από το παρόν πείραμα δεν βρέθηκε κάποια ιδιαίτερη προσαύξηση συγκρίνοντας τις δυο καλλιέργειες. Και στις δυο περιπτώσεις το DHA αποτελούσε παραπάνω από το 40% των συνολικά παραγόμενων λιπαρών. Πληροφορίες από την παραπάνω βιβλιογραφία αναφέρουν, πως η έλλειψη αζώτου σε μια καλλιέργεια δυο σταδίων είχε σαν αποτέλεσμα τελική συγκέντρωση DHA λίγο μικρότερη από 5 g/L, σε αντίθεση με την παρούσα έρευνα, όπου η συγκέντρωση του DHA δεν ξεπέρασε τα 2 g/L.

Σε αυτή τη σημαντική απόκλιση, καθοριστικό ρόλο εκτός του διαφορετικού στελέχους που χρησιμοποιείται διαδραματίζουν οι συνθήκες καλλιέργειας. Ιδίως το σιρόπι χουρμά εμπεριέχει σημαντικό ποσοστό αζώτου και θρεπτικών συστατικών, που ίσως συμβάλλουν στην αποδοτικότερη ανάπτυξη των κυττάρων και στη σύνθεση των λιπαρών.

Στο σημείο αυτό είναι απαραίτητο να προστεθεί, πως η δυναμική μιας καλλιέργειας ημί-διαλείποντος έργου είναι αρκετά διαφορετική από την αντίστοιχη καλλιέργεια σε συνθήκες διαλείποντος έργου. Συγκεκριμένα, μια λογική και πιθανή θεώρηση για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του πειράματος αποτελεί ο χρόνος προσαρμογής του φύκους στις νέες συνθήκες. Αναλυτικότερα, με τον εμβολιασμό των βιοαντιδραστήρων τα μικροφύκη προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες καλλιέργειας, οι οποίες διαθέτουν σαν πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης. Μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, όπου το pH στον βιοαντιδραστήρα αυξάνεται, ξεκινά η τροφοδοσία του οξικού οξέος. Στην περίπτωση που η τροφοδοσία είναι εμπλουτισμένη με αμμωνιακά ιόντα, τα μικροφύκη αναπροσαρμόζουν τον μεταβολισμό τους με σκοπό την αφομοίωση του θειικού αμμωνίου. Το γεγονός αυτό, καθυστερεί την ανάπτυξη τους και πιθανόν δικαιολογεί τη διαφορά στη κυτταρική συγκέντρωση τις πρώτες 168h, μιας και το αναμενόμενο θα ήταν η καλλιέργεια δυο σταδίων να εμφάνιζε την υψηλότερη βιομάζα. Ωστόσο, το τελικό αποτέλεσμα επιβεβαιώνει και τα πειράματα βελτιστοποίησης («Εύρεση βέλτιστης πηγής αζώτου»), που υποδεικνύουν ότι υψηλότερη βιομάζα επιτυγχάνεται με την τροφοδοσία των κυττάρων με ιόντα θειικού αμμωνίου.

Μετά τη διακοπή της εμπλουτισμένης με αμμωνιακά τροφοδοσίας, στην καλλιέργεια δυο σταδίων, ξεκινά η αφομοίωση του εκχυλίσματος ζύμης, που υπήρχε αρχικώς στον βιοαντιδραστήρα. Παράλληλα, η καλλιέργεια αναφοράς, που από την έναρξη της βασίζεται στο εκχύλισμα ζύμης εμφανίζει υψηλότερο ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας, αποτέλεσμα επίσης αποδεκτό και σύμφωνο με τα αντίστοιχα πείραμα βελτιστοποίησης.

## **6. Επίδραση κρίσιμων παραμέτρων στην ανάπτυξη του μικροφύκους σε βιοαντιδραστήρα ημί-διαλείποντος έργου**

Η επεξεργασία του διηθήματος του υγρού κλάσματος της ζύμωσης των βιοαποβλήτων, επέδρασε διαφορετικά στην ανάπτυξη της βιομάζας και στη σύνθεση των λιπαρών. Η αύξηση της συγκέντρωσης των οργανικών οξέων, ωστόσο, οδήγησε σε αύξηση του χρόνου καλλιέργειας, αφού εξασφάλισε μεγαλύτερο ποσοστό άνθρακα.

Το διήθημα με τη μικρότερη συγκέντρωση πτητικών οργανικών οξέων καταναλώνεται άμεσα, εντός 48h, και οδηγεί σε μικρή παραγωγή βιομάζας, καθώς

και σε μειωμένη συγκέντρωση λιπαρών και DHA. Εξίσου χαμηλή κυτταρική ανάπτυξη προκύπτει και από το διήθημα Effluent #3, που εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση πτητικών οργανικών οξέων και η καλλιέργεια διήρησε μόλις 60h. Σε αντιδιαστολή με τα παραπάνω, η κατανάλωση του διηθήματος Effluent#2 επέφερε σχεδόν διπλάσια ή και μεγαλύτερη κυτταρική συγκέντρωση συγκριτικά με τα υπόλοιπα δυο. Σημαντικό ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα αυτής της περίπτωσης διαδραμάτισε και η αύξηση του χρόνου καλλιέργειας στις 114h.

Όσον αφορά τη σύνθεση των λιπαρών, και σε αυτή την περίπτωση το διήθημα Effluent#2, φαίνεται πως αποτέλεσε την ιδανικότερη επιλογή για μεγιστοποίηση της συγκέντρωσης των λιπαρών, αλλά και του DHA. Συγκεκριμένα, οι τιμές συγκέντρωσης των λιπαρών και του DHA έφτασαν τα 0.538 g/L και 0.219 g/L, αντίστοιχα.

Η μειωμένη απόδοση των Effluent#1 και Effluent#3 πιθανώς να οφείλεται στις συγκεντρώσεις των πτητικών λιπαρών οξέων, αλλά και άλλων συστατικών, που αγνοούμε, και η ανάλυση τους ίσως να διαλεύκανε το ζήτημα. Ωστόσο, πειραματικά γίνεται εμφανές ότι η χρήση του διηθήματος Effluent#1, δεν αποδίδει τα αναμενόμενα αποτελέσματα, λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης των πτητικών οργανικών οξέων και άλλων θρεπτικών συστατικών. Αντιθέτως, η επεξεργασία που οδήγησε στο διήθημα Effluent#3, επέφερε συμπίκνωση των οργανικών οξέων και άλλων θρεπτικών συστατικών, με αποτέλεσμα να απαιτείται λιγότερος όγκος διηθήματος για την ανάπτυξη της καλλιέργειας. Όμως, αυτό που δεν είναι γνωστό, είναι η πιθανή συμπίκνωση και άλλων συστατικών που λειτουργούν ανασταλτικά στην ομαλή ανάπτυξη και πορεία της καλλιέργειας, με αποτέλεσμα τη χαμηλή κυτταρική συγκέντρωση και τις μειωμένες ποσότητες λιπαρών και DHA.

Επιπλέον, στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι η ανάλυση της κατανάλωσης του υποστρώματος με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας, έδειξε πως και στα τρία διηθήματα του υγρού κλάσματος της ζύμωσης των βιοαποβλήτων, γίνεται κατανάλωση μόνο του οξικού οξέος από το μικροφύκος. Το γεγονός αυτό, έχει σαν αποτέλεσμα τα υπόλοιπα πτητικά οργανικά οξέα, όπως το προπιονικό, βουτυρικό και βαλερικό να συσσωρεύονται στην καλλιέργεια. Η προτίμηση του μικροφύκου στο οξικό οξύ, μπορεί να οφείλεται αρχικά στην εύκολη αφομοίωση του οξέος λόγω της μικρής του ανθρακικής αλυσίδας. Η κατανάλωση των υπόλοιπων οργανικών οξέων, ίσως απαιτεί παράλληλα την ενεργοποίηση άλλων μεταβολικών μονοπατιών και ενζύμων, τα οποία όμως πιθανών να λειτουργούν βέλτιστα σε άλλες συνθήκες ανάπτυξης. Αδιαμφισβήτητα όμως, σε μια πιθανή διακοπή της τροφοδοσίας, το μικροφύκος θα αναπροσάρμοζε τον μεταβολισμό του με στόχο την αφομοίωση των υπόλοιπων οργανικών οξέων, καθώς σύμφωνα με αναφορές έχει αποδειχθεί ότι το ίδιο είναι ικανό να μεταβολίσει και τα υπόλοιπα οξέα [30].

## Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Για να μπορέσει η παρούσα ερευνητική μελέτη να εφαρμοστεί σε βιομηχανική κλίμακα και να αποτελεί μια βιώσιμη διεργασία, είναι σημαντικό να πραγματοποιηθούν επιπλέον έρευνες για να γίνει περαιτέρω βελτίωση της παραγωγής λιπαρών από το μικροφύκος.

Ξεκινώντας, όπως έγινε αντιληπτό από τη παρούσα διπλωματική εργασία, παραπάνω από ένας παράγοντες μπορούν να επάγουν την παραγωγή των λιπαρών. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν η θερμοκρασία και η συγκέντρωση των αμμωνιακών σαν ανεξάρτητες συνιστώσες δημιουργίας συνθηκών στρες. Για τον λόγο αυτό προτείνεται για μελλοντική εργασία, να εξεταστεί η ταυτόχρονη επιβολή των δύο παραγόντων και η συνέργεια τους στη σύνθεση των λιπαρών.

Παράλληλα, ενδείκνυται η τροποποίηση του αρχικού υποστρώματος των βιοαντιδραστήρων, με σκοπό την αντικατάσταση του εκχυλίσματος ζύμης με άλλη πηγή αζώτου. Τα αμμωνιακά ως πηγή αζώτου θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν το εκχύλισμα ζύμης σε συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε λόγο C/N=110, αφού η τιμή αυτή λειτουργεί ευεργετικά στη σύνθεση των λιπαρών.

Επιπροσθέτως, ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον συνιστά η καλλιέργεια του μικροφύκου υπό την έλλειψη φωσφόρου. Το γεγονός αυτό, αποτελεί έναν ακόμα παράγοντα στρες που θα μπορούσε να εφαρμοστεί καθότι βιβλιογραφικά αναφέρεται πως επιδρά σημαντικά στην αύξηση της σύνθεσης των ολικών λιπαρών [39].

Εκτός των συνθηκών στρες, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν νέα χημικά μόρια-επαγωγείς για τη αύξηση της σύνθεσης των λιπαρών. Συγκεκριμένα, για το μικροφύκος *Schizochytrium* sp. S31, είδος που εμφανίζει επίσης υψηλό ποσοστό σύνθεσης DHA, μόρια όπως το ναφθοξυακετικό οξύ (naphthoxyacetic acid - BNOA) ή το γιασμονικό οξύ (jasmonic acid - JA), συμβάλλουν στην αύξηση των λιπαρών σε ποσοστό έως και 16% [43]. Για τον ίδιο σκοπό, ακόμα μια αποτελεσματική μέθοδος, αποτελεί η γενετική τροποποίηση του μικροφύκου, μελέτη που δυστυχώς απαιτεί χρόνο και υψηλό κόστος.

Συνεχίζοντας, για να γίνουν κατανοητά ο τρόπος λειτουργίας και τα μεταβολικά μονοπάτια, προτείνεται η ανάλυση του γονιδιώματος και η ιχνηθέτηση των γονιδίων που εκφράζονται. Μια τέτοια μελέτη σκοπό έχει κατά βάση την ανακάλυψη των ενζύμων που συμμετέχουν στις διεργασίες σύνθεσης των λιπαρών, ιδίως υπό τις συνθήκες στρες.

Ακόμα, με τις παραπάνω μεθόδους γενετικής μηχανικής μπορεί να διαπιστωθεί η ωφελιμότητα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως τα Ω-3, στη λειτουργία του κυττάρου. Αν αυτό επιτευχθεί, τότε είναι δυνατόν να επηρεάσουμε παραμέτρους και παράγοντες που αυξάνουν τη σύνθεση των Ω-3 λιπαρών οξέων, αυξάνοντας την απόδοση της διεργασίας σε ωφέλιμα προϊόντα.

Όσον αφορά, το διήθημα του υγρού κλάσματος της ζύμωσης των βιοαποβλήτων, είναι χωρίς αμφιβολία αναγκαίο, να γίνει αναλυτικότερη μοριακή ανάλυση των περιεχόμενων συστατικών του. Αυτό θα μπορούσε να εμφανίσει τυχόν παράγοντες που συμβάλλουν στην επαγωγή ή τη καταστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και κατ' επέκταση της σύνθεσης των λιπαρών.

Παράλληλα, για να μπορέσει η διεργασία να εφαρμοστεί σε βιομηχανικό επίπεδο και να προκύψει ένα φαρμακευτικό προϊόν όπως τα Ω-3 λιπαρά οξέα, πρέπει να γίνει αναπροσαρμογή των μεθόδων εκχύλισης των λιπαρών, αφού με τη παρούσα μέθοδο χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες, που τυχόν ίχνη τους στο τελικό προϊόν μπορούν να θέσουν σε σοβαρό κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία.

Καταληκτικά, για την βιομηχανική εφαρμογή είναι απαραίτητο η διεργασία να λειτουργεί συνεχώς. Νέες καινοτόμες μέθοδοι, όπως η άμελξη των κυττάρων, καθιστούν αυτό το σενάριο εφικτό. Η άμελξη των κυττάρων πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την κυτταρική ανάπτυξη χρησιμοποιώντας χαμηλής τοξικότητας οργανικούς διαλύτες, όπως το δεκάνιο και το δωδεκάνιο. Ωστόσο, όπως αναφέρεται και από βιβλιογραφικές πηγές οι μέθοδοι αυτοί εμφανίζουν χαμηλότερη απόδοση, όσον αφορά την τελική «συγκομιδή» λιπαρών [44].



## **Βιβλιογραφία**

---



- [1] K. Heimann and R. Huerlimann, "Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species," pp. 25–41, 2015.
- [2] K. H. M. Cardozo *et al.*, "Metabolites from algae with economical impact ☆," vol. 146, pp. 60–78, 2007.
- [3] A. Mendes, A. Reis, R. Vasconcelos, P. Guerra, and T. Lopes Da Silva, "Crypthecodinium cohnii with emphasis on DHA production: A review," *J. Appl. Phycol.*, vol. 21, no. 2, pp. 199–214, 2009.
- [4] M. E. De Swaaf, L. Sijtsma, and J. T. Pronk, "High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Crypthecodinium cohnii*," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 81, no. 6, pp. 666–672, 2003.
- [5] Y. Bhaud and M. Barbier, "*Cwothecodinium cohnii*," vol. 41, no. 5, pp. 519–526, 1994.
- [6] Y. Bhaud, D. Guillebault, J. F. Lennon, H. Defacque, M. O. Soyer-Gobillard, and H. Moreau, "Morphology and behaviour of dinoflagellate chromosomes during the cell cycle and mitosis," *J. Cell Sci.*, vol. 113, no. 7, pp. 1231–1239, 2000.
- [7] Y. Liang, Æ. N. Sarkany, and Æ. Y. Cui, "Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions," pp. 1043–1049, 2009.
- [8] C. Baroukh, V. Turon, and O. Bernard, "Dynamic metabolic modeling of heterotrophic and mixotrophic microalgal growth on fermentative wastes," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 13, no. 6, pp. 1–18, 2017.
- [9] K. Chojnacka and A. Noworyta, "Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 34, no. 5, pp. 461–465, 2004.
- [10] D. A. Prabowo, O. Hiraishi, and S. Suda, "Diversity of *Crypthecodinium* SPP. (Dinophyceae) from Okinawa prefecture, Japan," *J. Mar. Sci. Technol.*, vol. 21, no. SUPPL, pp. 181–191, 2013.
- [11] D. S. Complex, C. A. Beam, and M. Himes, "Distribution of Members of the," pp. 8–15, 1982.
- [12] T. B. Laboratories, "Tut Le Loeblich, B12 10-10," vol. 14, pp. 1–8, 1975.
- [13] L. Sijtsma and M. E. De Swaaf, "Biotechnological production and applications of the  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 64, no. 2, pp. 146–153, 2004.
- [14] M. E. De Swaaf, T. C. De Rijk, G. Eggink, L. Sijtsma, M. E. De Swaaf, and T. C. De Rijk, "*Crypthecodinium cohnii*," *J. Biotechnol.*, vol. 70, no. 1–3, pp. 185–192, 1999.
- [15] C. Ratledge, K. Kanagachandran, A. J. Anderson, D. J. Grantham, and J. C. Stephenson, "Production of docosahexaenoic acid by *Crypthecodinium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source," *Lipids*, vol. 36, no. 11, pp. 1241–1246, 2001.

- [16] W. H. Thomas and C. H. Gibson, "Effects of small-scale turbulence on microalgae," *J. Appl. Phycol.*, vol. 2, no. 1, pp. 71–77, 1990.
- [17] I. L. Pepper, C. P. Gerba, and T. J. Gentry, *Introduction to Environmental Microbiology*. Elsevier Inc., 2014.
- [18] Y. Jiang and F. Chen, "Effects of Temperature and Temperature Shift on Docosahexaenoic Acid Production by the Marine Microalga *Cryptocodinium cohnii*," pp. 613–617, 2000.
- [19] G. Markou and E. Nerantzis, "Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions," *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 8, pp. 1532–1542, 2013.
- [20] L. Hooper, *Lipid biochemistry*, vol. 15, no. 6. 2002.
- [21] A. Chalima, A. Hatzidaki, A. Karnaouri, and E. Topakas, "Integration of a dark fermentation effluent in a microalgal-based biorefinery for the production of high-added value omega-3 fatty acids," *Appl. Energy*, vol. 241, no. February, pp. 130–138, 2019.
- [22] A. Chalima, L. Oliver, L. Fernández de Castro, A. Karnaouri, T. Dietrich, and E. Topakas, "Utilization of Volatile Fatty Acids from Microalgae for the Production of High Added Value Compounds," *Fermentation*, vol. 3, no. 4, p. 54, 2017.
- [23] M. H. Moghadasian and F. Shahidi, *Fatty Acids*, Second Edi., vol. 3, no. Cvd. Elsevier, 2016.
- [24] V. Turon, E. Trably, A. Fayet, E. Fouilland, and J. P. Steyer, "Raw dark fermentation effluent to support heterotrophic microalgae growth: Microalgae successfully outcompete bacteria for acetate," *Algal Res.*, vol. 12, pp. 119–125, 2015.
- [25] I. A. Guschina and J. L. Harwood, "Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae," *Prog. Lipid Res.*, vol. 45, no. 2, pp. 160–186, 2006.
- [26] X. Qiu, "Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7,10,13,16,19): Two distinct pathways," *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 68, no. 2, pp. 181–186, 2003.
- [27] B. J. Meyer, N. J. Mann, J. L. Lewis, G. C. Milligan, A. J. Sinclair, and P. R. C. Howe, "Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids," *Lipids*, vol. 38, no. 4, pp. 391–398, 2003.
- [28] K. D. Stark, M. E. Van Elswyk, M. R. Higgins, C. A. Weatherford, and N. Salem, "Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults," *Progress in Lipid Research*. 2016.
- [29] Y. Jiang, F. Chen, and S. Liang, "Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dino agellate," *Process Biochem.*, vol. 34, pp. 633–637, 1999.
- [30] "ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΓΡΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΒΙΟΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ω-3 ΛΙΠΑΡΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ ΤΟ

- ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ *Cryptocodinium cohnii*,” 2019.
- [31] G. H. . Folch, Jordi; Lees, M.; Sloane Stanley and W. J. Bligh, E. G.; Dyer, “A simple Method for the Isolation and purification of total lipides from animal tissues; A rapid method of total lipid extraction and purification,” *Can. J. Biochem. Physiol.*, vol. 37, no. 8, pp. 497–509, 1959.
- [32] M. Swartz, “HPLC detectors: A brief review,” *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 33, no. 9–12, pp. 1130–1150, 2010.
- [33] W. Safdar *et al.*, “Growth kinetics, fatty acid composition and metabolic activity changes of *Cryptocodinium cohnii* under different nitrogen source and concentration,” *AMB Express*, vol. 7, no. 1, 2017.
- [34] J. Li *et al.*, “Identification and metabolomic analysis of chemical modulators for lipid accumulation in *Cryptocodinium cohnii*,” *Bioresour. Technol.*, vol. 191, 2015.
- [35] V. M. Dembitsky, “AND FATTY ACIDS OF BROWN SPECIES ALGAE The fatty acid composition of marine brown algae , in-,” vol. 29, no. 11, pp. 3417–3421, 1990.
- [36] T. Ren, “Primary Factors Affecting Growth of Microalgae Optimal Light Exposure Duration and Frequency,” *Grad. Theses Diss.*, p. Paper 13793, 2014.
- [37] A. Converti, A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego, and M. Del Borghi, “Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production,” *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 48, no. 6, pp. 1146–1151, 2009.
- [38] Z. Ikaran, S. Suárez-Alvarez, I. Urreta, and S. Castañón, “The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *chlorella vulgaris* var L3,” *Algal Res.*, vol. 10, pp. 134–144, 2015.
- [39] A. E. Solovchenko, “Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses,” *Russ. J. Plant Physiol.*, vol. 59, no. 2, pp. 167–176, 2012.
- [40] L. D. Zhu, Z. H. Li, and E. Hiltunen, “Strategies for Lipid Production Improvement in Microalgae as a Biodiesel Feedstock,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2016, pp. 7–9, 2016.
- [41] G. H. J. Krüger and J. N. Eloff, “The effect of temperature on specific growth rate and activation energy of microcystis and synechococcus isolates relevant to the onset of natural blooms,” *J. Limnol. Soc. South. Africa*, vol. 4, no. 1, pp. 9–20, 1978.
- [42] L. A. Rumiani, H. Jalili, and A. Amrane, “Enhanced docosaheaxaenoic acid production by *Cryptocodinium cohnii* under combined stress in two-stage cultivation with date syrup based medium,” *Algal Res.*, vol. 34, no. May, pp. 75–81, 2018.
- [43] K. Wang *et al.*, “Screening of chemical modulators for lipid accumulation in *Schizochytrium* sp. S31,” *Bioresour. Technol.*, vol. 260, pp. 124–129, 2018.
- [44] K. Miazek *et al.*, “Effect of organic solvents on microalgae growth, metabolism

and industrial bioproduct extraction: A review,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 7, 2017.

# Παράρτημα

---





## Θρεπτικό Μέσο ATCC 460

Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου ATCC Medium: 460 A2E6 Medium το οποίο χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια του μικροφύκου *C.ohnii* χρησιμοποιούνται τα παρακάτω αντιδραστήρια.

Πίνακας 10 ATCC Medium: 460 A2E6 Medium

Base Medium	
NaCl	23.48g
MgCl <sub>2</sub>	10.63 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.92 g
CaCl <sub>2</sub> (anhydrous)	1.11 g
KCl	0.66 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.19 g
KBr	0.1 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.03 g
SrCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0.04 g
Metal Mixture	3.0 mL
FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0.01 g
Na <sub>2</sub> Glycerophosphate	0.15 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.05 g
Tris Buffer	3.0 g
Vitamin Solution	1.0 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.01 g
Glucose	3.0 g
Glutamic Acid	1.5 g
DI Water	1000 mL
Metal Mixture	
Na <sub>2</sub> EDTA	1.0 g
FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0.05 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.0 g
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0.15 g
ZnCl <sub>2</sub>	0.01 g
CoCl <sub>2</sub>	0.005 g
DI Water	100 mL
Vitamin Solution	
Biotin	0.003g
Thiamine	1.0 g
DI Water	1000 mL

## Πτητικά Οργανικά Οξέα

Η μετατροπή του εμβαδού των κορυφών σε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια καμπυλών αναφοράς. Οι καμπύλες αναφοράς κατασκευάστηκαν με την ανάλυση διαλυμάτων των οργανικών οξέων σε διαφορετικές αραιώσεις. Τα πτητικά οργανικά οξέα που αναλύθηκαν είναι το οξικό, το βουτυρικό, το βαλερικό και το προπιονικό.

Πίνακας 11 Εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς για τα πτητικά οργανικά οξέα

Πτητικά Οργανικά Οξέα	Εξίσωση
Οξικό Οξύ	$[C_{\text{acetic acid}}] = 7 \cdot 10^{-6} \cdot [\text{Area}]$ με $R^2 = 0,9974$
Βουτυρικό Οξύ	$[C_{\text{butyric acid}}] = 5 \cdot 10^{-6} \cdot [\text{Area}]$ με $R^2 = 0,9984$
Προπιονικό Οξύ	$[C_{\text{propionic acid}}] = 6 \cdot 10^{-6} \cdot [\text{Area}]$ με $R^2 = 0,9894$
Βαλερικό Οξύ	$[C_{\text{valeric acid}}] = 2 \cdot 10^{-5} \cdot [\text{Area}]$ με $R^2 = 0,9989$

## Λιπαρά Οξέα

Η ποσοτικοποίηση των λιπαρών οξέων C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 και εικοσιδιεξανοϊκό (DHA) πραγματοποιείται με καμπύλες αναφοράς βάση των μετρήσεων του συστήματος GC - MS. Σημειώνεται ότι οι συγκεντρώσεις των οργανικών οξέων υπολογίζονται σε mg/mL. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα

Πίνακας 12 Εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς για τα λιπαρά οξέα

Λιπαρό Οξύ	Εξίσωση
DHA	$[C_{\text{DHA}}] = 5 \cdot 10^{-6} \cdot [\text{Area}]$ με $R^2 = 0,9867$
C14	$[C_{\text{C14}}] = 3 \cdot 10^{-6} \cdot [\text{Area}]$ με $R^2 = 0,9732$
C16	$[C_{\text{C16}}] = 4 \cdot 10^{-6} \cdot [\text{Area}]$ με $R^2 = 0,9947$
C18:0	$[C_{\text{C18:0}}] = 5 \cdot 10^{-6} \cdot [\text{Area}]$ με $R^2 = 0,9883$
C18:1	$[C_{\text{C18:1}}] = 3 \cdot 10^{-6} \cdot [\text{Area}]$ με $R^2 = 0,9965$