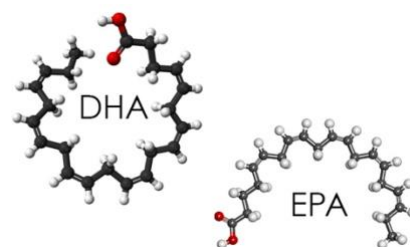
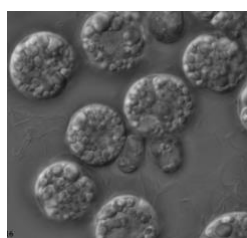
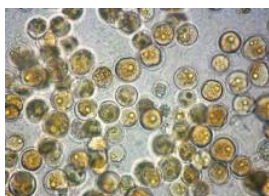




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΑΦΟΜΟΙΩΣΗΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ
ΒΙΟΑΠΟΒΛΗΤΑ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ
Cryptocodinium Cohnii ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ Ω-3
ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ



Αδαμαντία Μαρία Λαζοπούλου

Επιβλέπων Καθηγητής: Ευάγγελος Τόπακας

ΑΘΗΝΑ 2020

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, στα πλαίσια της ολοκλήρωσης του κύκλου σπουδών μου στη σχολή. Με την ολοκλήρωση της θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέλαβαν στην πραγματοποίησή της.

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου κύριο Ευάγγελο Τόπακα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής, καθώς και τη συνεχή καθοδήγηση καθ' όλη την πορεία διεξαγωγής της. Είναι αξιοθαύμαστο το ενδιαφέρον του να αναζητά καινοτόμα θέματα και να μεταδίδει γνώσεις για το πεδίο της Βιοτεχνολογίας και της έρευνας κατά τη διδασκαλία των μαθημάτων του.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα του Ε.Μ.Π. Αγγελική-Ελένη Χαλιμά για τη συνεργασία μας και τη συνεχή καθοδήγηση της σε όλη την πορεία της διπλωματικής μου. Η συμβολή της ήταν σημαντική τόσο κατά την πειραματική διαδικασία όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας όπου τα σχόλια και οι παρατηρήσεις της βελτίωσαν σημαντικά το τελικό αποτέλεσμα. Πέρα από τη μετάδοση γνώσεων και τεχνικών, την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την υπομονή, την ενθάρρυνση και τη γενικότερη υποστήριξη της από την αρχή της συνεργασίας μας.

Ευχαριστώ επίσης όλο το προσωπικό και τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου για το κλίμα συνεργασίας και την προθυμία τους.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη διαρκή στήριξη σε όλη τη διάρκεια των σπουδών.

Μαντώ

Οκτώβριος 2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εξέταση της δυνατότητας του μικροφύκου *Cryptocodinium cohnii* να αφομοιώσει υποστρώματα προερχόμενα από ρεύματα αποβλήτων για την παραγωγή ωμέγα-3 λιπαρών οξέων. Έτσι μελετήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας του μικροφύκου σε άμεσα αφομοιώσιμα υποστρώματα προερχόμενα από τα απόβλητα. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας, της θερμοκρασιακής μεταβολής, της πηγής και συγκέντρωσης αζώτου σε καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου με τροφοδοσία οξικού οξέος, το οποίο είναι το βασικό υπόστρωμα που περιέχεται στο υγρό κλάσμα ζύμωσης βιοαποβλήτων. Παράλληλα για την αξιοποίηση γεωργικών υπολειμμάτων μελετήθηκε η ικανότητα του να παράγει ένζυμα για τη διάσπαση των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων που περιέχονται στα υπολείμματα. Πέρα από την άμεση αξιοποίηση τους ως υποστρώματα διερευνήθηκε και η βέλτιστη μέθοδος παροχής υποστρωμάτων που προκύπτουν ύστερα από υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου.

Αρχικά εξετάστηκε η ικανότητα του στελέχους να εκκρίνει κυτταρινάσες κατά την καλλιέργεια του σε συνθήκες διαλείποντος έργου σε κυτταρινούχα υποστρώματα και θερμοκρασία επώασης 27 °C. Προσδιορίστηκε η ενεργότητα κελλοβιοϋδρολάσης, β-γλυκοζιδάσης και ενδογλουκανάσης σε καθημερινά δείγματα. Ενεργότητα όμως προέκυψε μόνο για την ενδογλουκανάση αλλά σε χαμηλά επίπεδα και πολύ χαμηλή ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης. Επειδή τα ένζυμα αυτά δρουν συνεργιστικά θεωρείται ότι το μικροφύκος δεν έχει τη δυνατότητα να υδρολύσει την κυτταρίνη. Εξετάστηκε ακόμη και η ικανότητα παραγωγής ξυλανάσης αλλά η ενεργότητα βρέθηκε μηδενική.

Εφόσον το μικροφύκος δεν παράγει ένζυμα που υδρολύουν τις κυτταρινούχες ουσίες ώστε να αφομοιώσει τον άνθρακα που περιέχουν για την ανάπτυξη του, μπορεί να αξιοποιήσει τα γεωργικά υπολείμματα μόνο εφόσον έχουν υποστεί υδρόλυση σε απλά σάκχαρα που μπορεί να αφομοιώσει. Διερευνήθηκε λοιπόν η ικανότητα του να αναπτύσσεται σε τροφοδοσία που προσομοιάζει υδρόλυμα βιομάζας. Συγκρίθηκαν καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου με τροφοδοσία γλυκόζη-ξυλόζη και με τροφοδοσία γλυκόζη. Η σύγκριση των καλλιεργειών έγινε με ανάλυση των λιπαρών οξέων που παράγονται από το μικροφύκος ύστερα από εκχύλιση και εστεροποίηση τους. Η απόδοση σε ξηρή βιομάζα του βιοαντιδραστήρα με γλυκόζη-ξυλόζη ήταν αξιοσημείωτα χαμηλότερη σε σύγκριση με το βιοαντιδραστήρα με γλυκόζη αλλά το ποσοστό των λιπιδίων και του δοκοσαεξανοϊκού οξέος (DHA) ήταν παραπλήσιο.

Ανάμεσα στις συνθήκες που εφαρμόζονται στην καλλιέργεια σημαντική επίδραση στην καλλιέργεια έχει η μέθοδος παροχής τροφοδοσίας. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν ως μέθοδοι παροχής τροφοδοσίας γλυκόζης-ξυλόζης η εκθετική παροχή, η παροχή με βάση σιγμοειδή καμπύλη και η παροχή με μέτρηση αναγωγικών σακχάρων. Η πρώτη είναι μη εφαρμόσιμη καθώς αυξήθηκε ο όγκος της καλλιέργειας σε μικρό χρονικό διάστημα. Ανάμεσα στις άλλες δύο μεθόδους η μέθοδος με μέτρηση και προσθήκη αναγωγικών σακχάρων σε καθημερινά δείγματα είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη παραγωγή ξηρής βιομάζας, μεγαλύτερο ποσοστό λιπιδίων και DHA και κατ'επέκταση αυξημένη παραγωγή DHA με τιμή συγκέντρωσης 0,86 g/L.

Όσον αφορά την αξιοποίηση του υγρού κλάσματος ζύμωσης βιοαποβλήτων εξετάστηκε η βελτιστοποίηση των συνθηκών παραγωγής ωμέγα-3. Για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας εφαρμόστηκαν οι θερμοκρασίες των 23 °C και 27 °C και οι μεταβολές από 23 °C σε 27 °C και 23 °C σε 15 °C. Ανάμεσα τους βέλτιστη απόδοση ως προς την παραγωγή βιομάζας και DHA εμφάνισε η θερμοκρασία των 23 °C, με συγκέντρωση DHA 0,75 g/L. Η μεταβολή από 23 σε 15 °C ευνόησε τη συσσώρευση λιπαρών αλλά η τόσο χαμηλή θερμοκρασία εμπόδισε την ανάπτυξη.

Στα πλαίσια αύξησης κλίμακας προγενέστερων μελετών μελετήθηκαν ως πηγές αζώτου για την ανάπτυξη του μικροφύκου εκχύλισμα ζύμης και αμμωνιακά σε καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε σε δύο λόγους C/N, 45,9 και 8,9 για την κάθε πηγή. Στις καλλιέργειες που εξετάστηκαν καλύτερη πηγή αζώτου κρίθηκε το εκχύλισμα ζύμης και καλύτερη τιμή λόγου C/N 8,9 ως προς την απόδοση βιομάζας και την παραγωγή DHA, με τελική συγκέντρωση DHA 1,32 g/L.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε συνδυαστική τροφοδοσία γλυκόζης και οξικού οξέος αποσκοπώντας στην ενίσχυση της παραγωγής λιπαρών με ταυτόχρονη ενεργοποίηση του μεταβολικού μονοπατιού της γλυκόλυσης και της άμεσης παραγωγής ακετυλο-συνενζύμου A από το οξικό. Σε καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου του μικροφύκου μελετήθηκε η προσθήκη ποσότητας γλυκόζης που αντιστοιχούσε στο 6%, 3%, 1,2% και 0,6% επί των συνολικών mol του άνθρακα. Από τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι συνέβη καταστολή του μεταβολισμού του άνθρακα λόγω της παρουσίας της γλυκόζης στα ποσοστά 6 και 3%. Ταυτόχρονη κατανάλωση επιτεύχθηκε στις ποσότητες γλυκόζης 1,2 και 0,6% αλλά δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση της παραγωγής λιπιδίων καθ' όλη την διάρκεια της καλλιέργειας. Σε όλες τις συνδυαστικές καλλιέργειες παρατηρήθηκε αυξημένη τελική παραγωγή βιομάζας λόγω της παρουσίας της γλυκόζης, με εξαίρεση εκείνη με 0,6% γλυκόζη.

ABSTRACT

The purpose of this diploma thesis is the study of the growth of the microalga *Cryptocodinium cohnii* by utilizing substrates from waste streams, for the production of omega-3 fatty acids. Thus, the optimal conditions were examined when the microalga was cultivated with substrates derived from waste. Specifically, the effect of temperature and temperature shift, the nitrogen source and concentration were investigated on fed-batch cultures utilizing acetate as substrate, which is the main component of the liquid fraction of fermented biowaste. At the same time, the study for the valorization of agricultural residues included the examination of its ability to produce enzymes for the breakdown of lignocellulose substrates contained in the agricultural residues. In addition to their immediate use as substrates, the optimal method of supplying substrates, derived from the hydrolysis of lignocellulose biomass under fed-batch cultivation conditions, was examined.

Initially, the ability of the strain to secrete simple sugars during cultivation under batch conditions in cellulosic substrates and at an incubation temperature of 27 °C was examined. The activity of cellobiohydrolase, b-glucosidase and endoglucanase in daily samples has been determined. However, the results indicated activity only for endoglucanase but at low levels and very low activity of b-glucosidase. Since these enzymes act synergistically it is concluded that the microalga does not have the ability to hydrolyze cellulose. The ability to produce xylanases was also examined but the activity was found to be zero.

Since *C. cohnii* is not able to produce enzymes that hydrolyze cellulosic substrates, in order to utilize the carbon they contain for its growth, the exploitation of agricultural residues demands that they have been firstly hydrolyzed into simpler sugars. Therefore, its ability to grow with a feed with the same composition as the hydrolysate of agricultural biomass was examined. Fed-batch cultures fed with glucose-xylose and glucose were compared. The comparison was based on the analysis results after extraction and esterification of the fatty acids produced during cultivation. Comparing those results, the biomass yield was notably lower when the glucose-xylose feed was used but the lipid percentage and the produced docosahexaenoic acid (DHA) was similar.

Among the various conditions affecting the cultivation, the method of supplying the feed has a significant effect. In particular, exponential supply, sigmoidal curve-based supply and reducing sugar measurement, for maintaining a stable sugar concentration, supply were studied as methods of supplying glucose-xylose feed. The first was proven to be inefficient as the volume of the cultivation increased in a short period of time. Comparing the other two methods, the method of measuring reducing sugars in daily samples resulted in higher biomass production, higher lipid percentage and DHA and therefore increased DHA production with a concentration value of 0.86 g/L.

Regarding the utilization of the liquid fraction of fermented biowaste, optimization of the conditions for omega-3 production was examined. Thus, the temperatures of 23 °C and 27 °C and temperature shifts from 23 °C to 27 °C and 23 °C 15 °C were applied in different cultures. Among them the temperature of 23 °C exhibited optimal efficiency in the

production of biomass and DHA with a concentration of 0.75 g/L. The shift from 23 to 15 °C favored the accumulation of fatty acids but such a low temperature prevented growth.

As part of the scale-up study of previous experiments, yeast extract and ammonium were used as nitrogen sources in fed-batch cultures and their effect on growth was assessed. The comparison included two C/N ratios, 45,9 and 8,9 for each source. The results revealed that in terms of biomass yield and DHA production, yeast extract was a better nitrogen source while the better C/N ratio value is 8,9, with a final DHA concentration of 1,32 g/L.

Finally, a cofeeding strategy with supply of glucose and acetic acid was used to enhance the production of fatty acids while activating the metabolic pathway of glycolysis and the direct production of acetyl-coA from acetic assimilation. In fed batch cultures the addition of glucose corresponding to 3%, 1.2% and 0.6% (mol/mol) of total carbon was considered. It is obvious from the results that the phenomenon of carbon catabolic repression occurred due to the presence of glucose at rates of 6 and 3%. Simultaneous consumption of the substrates was achieved in glucose quantities of 1.2 and 0.6% but no increase in lipid production was observed throughout the culture. In all cofeeding cultures, an increase in final biomass production was observed due to the presence of glucose, with the exception of 0.6% glucose.

Περιεχόμενα

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
1. Μικροφύκη	14
2. <i>Cryptocodinium cohnii</i>	15
2.1. Χαρακτηριστικά μικροφύκους.....	15
2.2. Καλλιέργεια <i>C. cohnii</i>	16
3. Παραγωγή Ωμέγα-3 λιπαρών	16
3.1. Λιπαρά οξέα.....	16
3.2. Ωμέγα-3 λιπαρά οξέα.....	17
3.3. Οφέλη ωμέγα-3 λιπαρών.....	18
3.4. Πηγή ωμέγα-3 λιπαρών	19
3.5. Μεταβολικά μονοπάτια για βιοσύνθεση ωμέγα-3 λιπαρών οξέων	20
3.6. Εναλλακτική πηγή ωμέγα-3 λιπαρών	22
4. Ανάπτυξη Μικροφυκών	23
4.1. Είδη Ανάπτυξης.....	23
4.2. Σύγκριση ετερότροφης και αυτότροφης ανάπτυξης.....	24
4.3. Φάσεις Ανάπτυξης	25
5. Πηγές C	26
5.1. Γλυκόζη.....	26
5.2. Οξικό Οξύ	27
5.3. Αιθανόλη	28
5.4. Γλυκερόλη	29
5.5. Συνδυαστική Τροφοδοσία	30
5.6. Εναλλακτικές πηγές	31
6. “Σκοτεινή Ζύμωση” (Dark Fermentation)	32
6.1. Πρώτη ύλη.....	33
6.2. Παραγωγή Υδρογόνου	34
6.3. Παραγωγή VFAs	34
6.4. Σύζευξη Σκοτεινής Ζύμωσης και Μεθόδων αξιοποίησης VFAs.....	35
7. Παράγοντες Ανάπτυξης <i>Cryptocodinium cohnii</i>	37
7.1. Πηγή Αζώτου	37
7.2. Αλατότητα	39
7.3. Συνθήκες Καλλιέργειας.....	41
7.3.1. Θερμοκρασία	41
7.3.2. pH	42
7.3.3. Ανάδευση	42
7.4. Παροχή Οξυγόνου.....	43
8. Οικονομική Αξιολόγηση	43
9. Κυτταρινάσες	45
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	48
1. Όργανα – Συσκευές	50
2. Μικροοργανισμός	51
3. Χημικά Αντιδραστήρια	51
3.1 Εμπορικά Αντιδραστήρια	51
3.2 Θρεπτικό υλικό	51

4.	Έλεγχος έκφρασης και ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινασών από το μικροφύκος <i>C. cohnii</i>	53
4.1	Εμβόλιο καλλιιεργειών διαλείποντος έργου (batch).....	53
4.2	Καλλιέργειες batch.....	53
4.3	Παρασκευή αντιδραστηρίων.....	53
4.4	Εξέταση ενζυμικής ενεργότητας.....	54
4.5	Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων.....	55
4.5.1	Μέθοδος DNS.....	55
4.5.2	Μέθοδος προσδιορισμού γλυκόζης με το εμπορικό σκεύασμα GOD/POD.....	56
5.	Ανάπτυξη <i>C. cohnii</i> σε βιοαντιδραστήρες.....	57
5.1	Καλλιέργειες μικροφύκους για εμβολιασμό βιοαντιδραστήρων.....	57
5.2	Βιοαντιδραστήρες 2 L.....	58
5.2.1	Τροφοδοσία γλυκόζη και γλυκόζη-ξυλόζη.....	60
5.2.2	Τροφοδοσία οξικό οξύ και οξικό οξύ-γλυκόζη.....	60
5.3	Βιοαντιδραστήρες 200 mL.....	61
5.3.1	Μελέτη επίδρασης της μεταβολής θερμοκρασίας στη συσσώρευση λιπιδίων.....	62
5.3.2	Σύγκριση αμμωνιακών και εκχυλίσματος ζύμης ως πηγή αζώτου στην καλλιέργεια.....	63
5.3.3	Παροχή γλυκόζης με διαφορετικό τρόπο τροφοδοσίας.....	64
5.4	Λήψη δειγμάτων και επεξεργασία.....	66
6.	Ανάλυση λιπαρών οξέων.....	67
6.1	Εκχύλιση.....	67
6.2	Εστεροποίηση.....	69
6.3	Χρωματογραφικές Τεχνικές Ανίχνευσης.....	70
6.3.1	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	70
6.3.2	Αέρια Χρωματογραφία (GC).....	70
7.	Επεξεργασία Αποτελεσμάτων.....	71
7.1	Απόδοση Ξηρής Βιομάζας.....	71
7.2	Λιπαρά οξέα.....	71
7.3	Μεθυλεστέρες λιπαρών-GC.....	71
7.4	Σύγκριση παραγωγής DHA.....	71
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....		74
1.	Έλεγχος έκφρασης και ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινασών.....	76
1.1	Avicel.....	76
1.2	CMC, Corn Cob.....	77
2.	Μελέτη χρήσης υδρολύματος σε καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου.....	80
2.1	Συγκριτική μελέτη Fed-batch καλλιιεργειών με τροφοδοσία Γλυκόζη και Γλυκόζη-Ξυλόζη.....	80
2.1.1	Συγκέντρωση Γλυκόζης.....	80
2.1.2	Απόδοση Ξηρής Βιομάζας.....	81
2.1.3	Λιπαρά οξέα-Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων.....	82
2.1.4	Σύγκριση παραγωγής DHA.....	83
2.2	Μέθοδος παροχής γλυκόζης-ξυλόζης.....	84
2.2.1	Ανάπτυξη κυττάρων.....	84
2.2.2	Συγκέντρωση Αναγωγικών σακχάρων.....	84
2.2.3	Απόδοση Ξηρής Βιομάζας.....	85
2.2.4	Λιπαρά οξέα-Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων.....	86
2.2.5	Σύγκριση παραγωγής DHA.....	87
3.	Επίδραση συνθηκών σε καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου για αξιοποίηση βιοαποβλήτων.....	87
3.1	Συνδυαστική τροφοδοσία οξικού οξέος και γλυκόζης.....	87
3.1.1	Συγκέντρωση οξικού οξέος.....	88
3.1.2	Απόδοση Ξηρής Βιομάζας.....	90
3.1.3	Λιπαρά οξέα-Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων.....	93

3.1.4	Σύγκριση παραγωγής DHA.....	96
3.2	Επίδραση θερμοκρασίας	98
A)	Σε καλλιέργειες με οξικό οξύ	98
3.2.1	Ανάπτυξη κυττάρων.....	98
3.2.2	Συγκέντρωση οξικού οξέος	98
3.2.3	Απόδοση Ξηρής Βιομάζας.....	99
3.2.4	Λιπαρά οξέα-Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων.....	100
3.2.5	Σύγκριση παραγωγής DHA.....	101
B)	Επίδραση θερμοκρασίας σε καλλιέργειες με διήθημα υγρού κλάσματος σκοτεινής ζύμωσης βιοαποβλήτων.....	102
3.2.6	Απόδοση Ξηρής Βιομάζας.....	102
3.2.7	Λιπαρά οξέα.....	102
3.3	Συγκριτική μελέτη καλλιεργειών με διαφορετικές πηγές αζώτου.....	104
3.3.1	Ανάπτυξη κυττάρων.....	104
3.3.2	Συγκέντρωση οξικού οξέος	104
3.3.3	Απόδοση Ξηρής Βιομάζας.....	105
3.3.4	Λιπαρά οξέα-Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων.....	106
3.3.5	Σύγκριση παραγωγής DHA.....	107
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ		108
1.	Ενζυμική ενεργότητα κυτταρινασών	110
2.	Μελέτη χρήσης υδρολύματος σε καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου.....	111
2.1	Τροφοδοσία Γλυκόζη-Ξυλόζη	111
2.2	Μέθοδος παροχής γλυκόζης-ξυλόζης.....	112
3.	Επίδραση συνθηκών σε καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου για αξιοποίηση βιοαποβλήτων.....	113
3.1	Συνδυαστική τροφοδοσία οξικού οξέος και γλυκόζης.....	113
3.2	Επίδραση θερμοκρασίας	115
3.3	Επίδραση πηγής Αζώτου και λόγου C/N.....	118
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....		120
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		122
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....		130
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.....		136

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Μικροφύκη

Τα φύκη ή άλγη είναι οργανισμοί με σημαντικό και ευεργετικό ρόλο στα υδατικά περιβάλλοντα. Η σημασία έγκειται στο γεγονός ότι καταναλώνουν διοξείδιο του άνθρακα παράγοντας οξυγόνο και αποτελούν τη βάση της τροφικής αλυσίδας των υδατικών συστημάτων. Ταυτόχρονα αφαιρούν θρεπτικά συστατικά και ρύπους από το νερό. Ο όρος «φύκη» γενικά αναφέρεται σε φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, είτε μικροσκοπικούς είτε μακροσκοπικούς, που ζουν κατά κύριο λόγο σε υδατικά περιβάλλοντα ενώ αναπτύσσονται και σε χερσαία περιβάλλοντα (García-Garibay, Gómez-Ruiz, Cruz-Guerrero, & Bárzana, 2003). Είναι γενικά αποδεκτό ότι έχουν την δυνατότητα να προσαρμόζονται σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες μέσω μηχανισμών σύνθεσης μιας σειράς από διαφορετικές ενώσεις, όπως καρροτενοειδή, πολυφαινόλες, πρωτεΐνες, βιταμίνες, μίας μεγάλης ποικιλίας λιπιδίων και μηχανισμών μεταβολής του λιπιδικού τους προφίλ (Guschina & Harwood, 2006).

Τα φύκη ταξινομούνται ευρέως σε Rhodophyta (κόκκινα), Phaeophyta (καφέ) και Chlorophyta (πράσινα) και ανάλογα με το μέγεθος τους σε μακροφύκη και μικροφύκη. Τα μακροφύκη είναι ορατά με γυμνό οφθαλμό, ενώ τα μικροφύκη αποτελούν μικροσκοπικούς μονοκυττάριους οργανισμούς. Διακρίνονται σε ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς και προκαρυωτικά κυανοβακτήρια ή blue-green algae που αναφέρονται ως μικροάλη αν και σχετίζονται περισσότερο με τα βακτήρια (Venkatesan, Manivasagan, & Kim, 2015; Khan, Shin, & Kim, 2018). Οι κυριότερες κατηγορίες των μικροφυκών με βάση την αφθονία είναι τα πράσινα, τα χρυσά και τα διάτομα άλγη (Christaki, Bonos, & Florou-Paneri, 2015). Από αυτά οι κλάσεις με τη μεγαλύτερη εμπορική σημασία είναι τα Χλωρόφυτα, Ροδόφυτα, Απτόφυτα, Ετεροκοντόφυτα και Δινοφύκη. Από τα δινοφύκη ή δινομαστιγγωτά το στέλεχος *Cryptothecodinium cohnii* κατέχει τη μεγαλύτερη εμπορική σημασία (Heimann & Huerlimann, 2015).

Τα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν σε διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας και να αποτελέσουν μια πλούσια πηγή ενώσεων άνθρακα, με εφαρμογές σε βιοκαύσιμα, συμπληρώματα διατροφής, φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά. Λόγω της απλής δομής τους αναπτύσσονται ταχύτατα και παράγουν διάφορα βιοπροϊόντα συμπεριλαμβανομένων και λιπιδίων, πολυσακχαριτών, χρωστικών ουσιών, βιταμινών και αντιοξειδωτικών. Επίσης, οι χρήσεις τους επεκτείνονται στην επεξεργασία αποβλήτων, το μετριασμό του CO₂ της ατμόσφαιρας και των βιομηχανικών απαερίων. Αν και ο μηχανισμός της φωτοσύνθεσης είναι παρόμοιος με εκείνον των ανώτερων φυτών, η αποδοτικότητα τους στο μετριασμό του διοξειδίου του άνθρακα είναι 10 με 50 φορές μεγαλύτερη από εκείνη των φυτών. Πιο συγκεκριμένα, είναι υπεύθυνα για την εκπομπή περίπου της μισής παραγωγής οξυγόνου μέσω της φωτοσύνθεσης. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη μελέτη των μικροφυκών προέρχεται από τη δυνατότητα τους να χρησιμοποιούνται ως ανανεώσιμη και βιώσιμη πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων που δημιουργεί νέες προοπτικές στον τομέα των βιοδυληστηρίων (Ira A. Levine and Joël Fleurence, 2018; Khan, Shin, & Kim, 2018; Mandal & Mallick, 2014).

Συνεπώς τα μικροάλη παρουσιάζονται ως μια ελπιδοφόρα εναλλακτική για παραγωγή προϊόντων και σε αντίθεση με τα ανώτερα φυτά έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε μη ευνοϊκές συνθήκες για γεωργική καλλιέργεια, όπως σε μη εύφορα ή άγονα εδάφη,

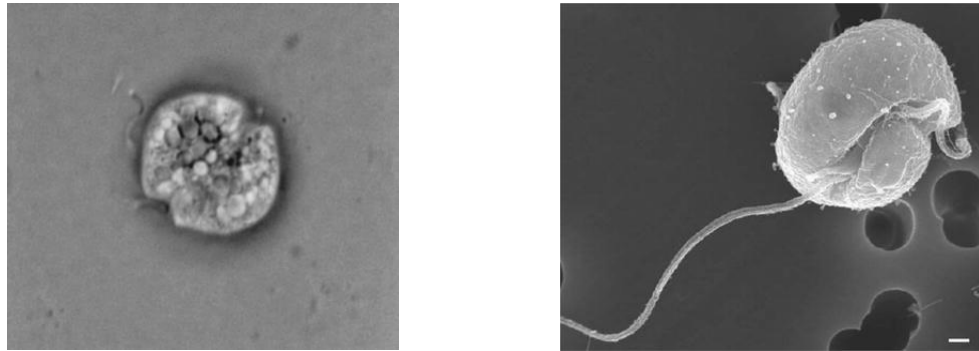
και έτσι δεν ανταγωνίζονται με την παραγωγή τροφής. Για τους λόγους αυτούς η καλλιέργεια μικροφυκών προσελκύει το ενδιαφέρον της έρευνας για να ικανοποιήσει τις αυξανόμενες ανάγκες για βιοπροϊόντα. Ορισμένα μικροφύκη έχουν ήδη εμπορευματοποιηθεί και χρησιμοποιούνται στον τομέα της βιοτεχνολογίας. Η βελτίωση και ενίσχυση των τεχνικών ανάπτυξης και το κόστος τους αποτελούν βασικά εμπόδια για τη βελτίωση των προοπτικών χρήσης τους ως μελλοντική πηγή ανανεώσιμων βιοπροϊόντων (Christaki et al., 2015).

2. *Cryptocodinium cohnii*

2.1. Χαρακτηριστικά μικροφύκους

Προς αυτή την κατεύθυνση διερευνάται η αξιοποίηση διαφόρων ειδών μικροφυκών ανάμεσα στα οποία βρίσκονται και τα Δινομαστιγωτά. Αυτό οφείλεται στο υψηλό λιπιδικό περιεχόμενό τους, όπου περιλαμβάνονται τα πολύτιμα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ωμέγα-3, αν και τα δινομαστιγωτά είναι συνήθως συνδεδεμένα με επιβλαβείς επιπτώσεις κατά την καλλιέργεια τους (harmful algal blooms). Περιλαμβάνουν μονοκύτταρα κυρίως θαλάσσια είδη και κάποια είδη γλυκού νερού ανάμεσα στα οποία περίπου τα μισά από αυτά είναι φωτοσυνθετικά ενώ τα υπόλοιπα δε διαθέτουν χλωροπλάστες (Heimann & Huerlimann, 2015). Παρά την εντυπωσιακή τους παραγωγικότητα και την οικολογική τους σημασία, έχουν περιορισμένη βιοτεχνολογική σημασία, κυρίως λόγω των δυσκολιών που εμφανίζονται κατά την καλλιέργεια τους τόσο σε μέσα συνθετικής καλλιέργειας όσο και σε βιοαντιδραστήρες (Wynn, Behrens, Sundararajan, Hansen, & Apt, 2010).

Ανάμεσα στα δινομαστιγωτά, ο *Cryptocodinium cohnii*, που αποτελεί το αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής, έχει εμπορικό ενδιαφέρον για την ετερότροφη παραγωγή δοκοσαεξανοϊκού οξέος (DHA). Πρόκειται για ένα θαλάσσιο, ετερότροφο, ευκαρυωτικό, άχρωμο δινομαστιγωτό που περιλαμβάνει δύο μαστίγια. Τα κύτταρα του μπορεί να κινούνται ή να είναι ακίνητα, να είναι ωσειδή ή στρογγυλά. Ακόμη, παρατηρήθηκαν δύο μεγέθη σε καλλιέργειες: 5-20 και 8-30 μm, τα οποία μπορεί να αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια του κύκλου ζωής των κυττάρων (Heimann & Huerlimann, 2015). Τα κινούμενα κύτταρα έχουν δύο άνισα μαστίγια, από τα οποία το ένα περιβάλλει πλήρως ή μερικώς το κύτταρο, ενώ το άλλο κατευθύνεται προς τα πίσω και ενεργεί πιθανώς ως προωθητική δύναμη για την κίνηση του (Mendes, Reis, Vasconcelos, Guerra, & Lopes Da Silva, 2009). Τα μεγαλύτερα, ακίνητα κύτταρα θα μπορούσαν να είναι κύστες (Heimann & Huerlimann, 2015). Η γενετική οργάνωση των δινομαστιγωτών είναι ξεχωριστή. Παρά το γεγονός ότι είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, τα χρωμοσώματά τους στερούνται βασικών πρωτεϊνών όπως οι ιστόνες, το γονιδίωμα τους είναι συμπυκνωμένο σε όλο τον κύκλο ζωής τους και περιλαμβάνει περιττές επαναλήψεις τείνοντας να είναι εξαιρετικά μεγάλο (Wynn et al., 2010).



Εικόνα 1: α)Κύτταρο *C. cohnii* πλούσιο σε DHA, με μέγεθος περίπου 10 μm (Wynna, Behrens, Sundararajan, Hansen, & Artb, 2010) και β) Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης του *C. cohnii* (Scanning Electron microscope) (Mendes et al., 2009)

2.2. Καλλιέργεια *C. cohnii*

Το θαλάσσιο, χωρίς χλωροπλάστες, ετερότροφο μικροφύκος *C. cohnii* είναι το μόνο δινοφύκος που καλλιεργείται για εμπορική αξιοποίηση των προϊόντων του μέχρι σήμερα και παρουσιάζει υψηλή περιεκτικότητα σε DHA που χρησιμοποιείται για παραγωγή βρεφικών σκευών. Μέχρι 40% του ξηρού βάρους του *C. cohnii* μπορούν να αποτελούνται από λιπαρά οξέα, εκ των οποίων διαφορετικές πηγές αναφέρουν ποσοστό DHA που μπορεί να είναι από 25 % έως και 60%. Ως ετερότροφο φύκος, ο *C. cohnii* μπορεί να καλλιεργηθεί σε οργανικές πηγές άνθρακα όπως η γλυκόζη, η αιθανόλη ή το οξικό οξύ, χρησιμοποιώντας εκχύλισμα ζύμης ως πηγή αζώτου (Sijtsma, Anderson, & Ratledge, 2010).

Προς το παρόν, με βάση τα αποτελέσματα παραγωγικότητας για ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρες, η παραγωγικότητα της βιομάζας και η περιεκτικότητα σε DHA από καλλιέργεια *C. cohnii* παραμένει μειωμένη. Προκειμένου να ανταγωνιστεί τις παρούσες μεθόδους παραγωγής DHA και τελικά η βιοτεχνολογική παραγωγή να είναι ικανή να καλύψει τις ανάγκες σε ωμέγα-3, απαιτείται βελτίωση της παραγωγικότητας. Παράλληλα, οι τεχνικές γενετικής μηχανικής χρησιμοποιούνται ευρέως για την ενίσχυση της ποσότητας της παραγόμενης βιομάζας φυκών και της περιεκτικότητας της σε λιπίδια. Ωστόσο η έλλειψη ολόκληρης της αλληλουχίας του γονιδιώματος του *C. cohnii* και της ύπαρξης ενός πρωτόκολλου υψηλής απόδοσης συστήματος γενετικού μετασχηματισμού, επίσης περιορίζει την εφαρμογή προσεγγίσεων γενετικής μηχανικής για την απόκτηση μεταλλαγμένων στελεχών *C. cohnii* με στόχο την υψηλότερη παραγωγικότητα σε λιπίδια (Diao et al., 2019).

3. Παραγωγή Ωμέγα-3 λιπαρών

3.1. Λιπαρά οξέα

Η εμπορική σημασία των λιπαρών οξέων ως προϊόν προέρχεται από το γεγονός ότι αποτελούν απαραίτητες ενώσεις για τους οργανισμούς. Τα λιπαρά οξέα (FA) είναι μόρια με μεταβλητό αριθμό ανθράκων στην αλυσίδα που περιλαμβάνουν στο ένα άκρο τους μία μεθυλομάδα και στο άλλο μια καρβοξυλομάδα. Με βάση τον αριθμό των διπλών δεσμών ταξινομούνται σε 3 διαφορετικούς τύπους, κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα διαθέτουν το μέγιστο αριθμό ατόμων υδρογόνου ενώ τα μονοακόρεστα και τα πολυακόρεστα έχουν ένα ή περισσότερους διπλούς δεσμούς

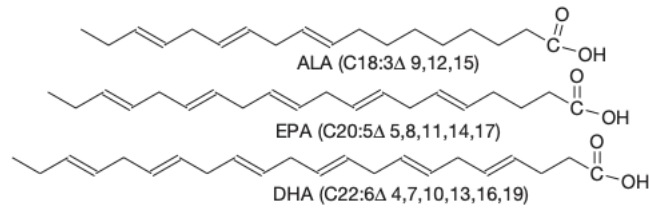
αντίστοιχα (Ander, Dumasquier, Prociuk, & Pierce, 2003). Η βιομηχανία τροφίμων στη συνέχεια πρόσθεσε τα trans λιπαρά που προκύπτουν από το επεξεργασμένο φαγητό. Τα φυσικά λιπαρά οξέα έχουν συνήθως από τέσσερα έως 28 άτομα άνθρακα. Ωστόσο, πολλά από αυτά, ειδικά εκείνα που βρίσκονται στον εγκέφαλο και τον αμφιβληστροειδή έχουν μεγαλύτερη αλυσίδα άνθρακα. Τα λιπαρά οξέα μπορούν να διαιρεθούν, ανάλογα με το μήκος της αλυσίδας άνθρακα, σε τέσσερις βασικές ομάδες:

- i. Λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFAs), που μερικές φορές ονομάζονται πτητικά λιπαρά οξέα (VFAs), περιέχουν από ένα έως έξι άτομα άνθρακα (C1–6) και σχηματίζονται ως αποτέλεσμα της ζύμωσης υδατανθράκων από το έντερο στο πεπτικό σύστημα των θηλαστικών
- ii. Τα λιπαρά οξέα μέσης αλυσίδας (MCFAs), έχουν από 7 έως 12 άτομα άνθρακα (C7–12) ενώ σύμφωνα με άλλες πηγές οκτώ έως 14 άτομα άνθρακα
- iii. Τα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (LCFAs), έχουν από 14 έως 18 άτομα άνθρακα (C14–18) και αποτελούν την πλειονότητα των λιπαρών οξέων που λαμβάνονται με τρόφιμα (διατροφή)
- iv. Τα λιπαρά οξέα πολύ μεγάλης αλυσίδας (VLCFAs), περιέχουν περισσότερα από 20 άτομα άνθρακα ή σύμφωνα με άλλους συγγραφείς τουλάχιστον 20 άτομα άνθρακα ($C \geq 20$) (DeFilippis & Sperling, 2006; Tokuyama & Nakamoto, 2014).

3.2. Ωμέγα-3 λιπαρά οξέα

Τα πολυακόρεστα λιπαρά (Polyunsaturated Fatty Acids PUFAs) χωρίζονται σε δύο επιμέρους κατηγορίες, ωμέγα-3 και ωμέγα-6 ανάλογα με τη θέση του διπλού δεσμού. Τα ωμέγα-3 και ωμέγα-6 είναι απαραίτητα οξέα για τον οργανισμό λόγω των ποικίλων βιολογικών επιδράσεων τους στην υγεία και τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Δηλαδή, η σημαντικότερη, αλλά μικρή, ομάδα λιπαρών οξέων για τον άνθρωπο είναι τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFAs), τα οποία είναι αναγκαία για τη διατήρηση της ομοιόστασης, την παραγωγή ενέργειας, την παραγωγή ορμονών, και δεν μπορούν να συντεθούν επαρκώς από τον ίδιο τον οργανισμό. Για το λόγο αυτό πρέπει να χορηγηθούν στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της τροφής. Ορισμένοι συγγραφείς θεωρούν ότι όλα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας είναι απαραίτητα λιπαρά οξέα για την ανθρώπινη υγεία και καθορίζουν το ωμέγα-6 λινολεϊκό οξύ (LA) και το ωμέγα-3 άλφα-λινολενικό οξύ (ALA) ως τα σημαντικότερα (Tokuyama & Nakamoto, 2014).

Τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, που ονομάζονται n-3 λιπαρά οξέα ή ω-3 λιπαρά οξέα, είναι μια ετερογενής ομάδα λιπαρών οξέων και είναι συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Πιο συγκεκριμένα, τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα είναι πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (C18-C22), με ένα διπλό δεσμό στον τρίτο από το τέλος άνθρακα της ανθρακικής αλυσίδας. Το DHA είναι το μεγαλύτερο και πιο πολύπλοκο από τα θρεπτικά σημαντικά PUFAs με 22 άνθρακες και 6 διπλούς δεσμούς. Το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) έχει 20 άτομα άνθρακα και 5 διπλούς δεσμούς. Το ωμέγα-3 λιπαρό ALA που προέρχεται από φυτικές πηγές είναι πρόδρομη ουσία για τα φυσιολογικά σημαντικά PUFAs μεγαλύτερης αλυσίδας: EPA και DHA (Bultosa, 2016; Colin Ratledge & Lippmeier, 2017; Shahidi, 2011).



Εικόνα 2: Ωμέγα-3 λιπαρά οξέα: ALA, EPA, DHA (Bultosa, 2016)

3.3. Οφέλη ωμέγα-3 λιπαρών

Εκτός από τη σημαντική επίδραση τους στις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, τα ωμέγα-3 έχουν ποικίλες θετικές επιδράσεις για την υγεία του ανθρώπου. Το αρχικό ενδιαφέρον για τα συγκεκριμένα λιπαρά προέκυψε από τον αποδεδειγμένο ρόλο του DHA και άλλων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας στην ανακούφιση των καρδιαγγειακών παθήσεων. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από εκατοντάδες πειράματα *in vivo* και *in vitro* εκτός από αρκετές κλινικές δοκιμές. Τόσο το EPA όσο και το DHA μειώνουν την αρτηριακή πίεση και αποτρέπουν την ανάπτυξη υπέρτασης, που είναι ένας από τους κρίσιμους παράγοντες που οδηγούν σε καρδιαγγειακές παθολογίες όπως η αθηροσκλήρωση ή το εγκεφαλικό επεισόδιο (Mendes et al., 2009).

Επίσης, έχουν αναφερθεί θετικές επιδράσεις σε χρόνιες ασθένειες όπως ο καρκίνος. Πράγματι, μπορούν να εμφανίσουν αντικαρκινική δράση η οποία μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο είτε στην πρόληψη είτε στη θεραπεία του καρκίνου. Βάσει επιδημιολογικών μελετών για τον άνθρωπο, η κατανάλωση λιπαρών ψαριών και ιχθυελαίων έχει συσχετιστεί με την προστασία από της ανάπτυξης ορισμένων τύπων καρκίνου, κυρίως του παχέος εντέρου, του μαστικού και του προστάτη. Τα τελευταία χρόνια, πολλές μελέτες και κλινικές δοκιμές έχουν δείξει ότι τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με μακριά αλυσίδα και κυρίως τα EPA και DHA, διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο και στην απόδοση της νευροψυχιατρικής. Με την αποτελεσματική ρύθμιση της χοληστερόλης του πλάσματος/ορού που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο κατάθλιψης και αυτοκτονίας, τα ω-3 λιπαρά συμβάλουν στην πρόληψη νευροψυχιατρικών διαταραχών (Mendes et al., 2009; Shahidi, 2011).

Ο ρόλος τους περιλαμβάνει ακόμη τη ρύθμιση της ρευστότητας των μεμβρανών, τη σύνδεση συγκεκριμένων ενζύμων στη μεμβράνη και τη συμβολή τους στη μεταφορά σημάτων και στην προώθηση βασικών μεταβολικών διεργασιών. Βάσει ερευνών έχει αποδειχθεί ότι συγκεκριμένα PUFAs μπορούν να βελτιώσουν την ανάπτυξη της όρασης και της μνήμης σε νεογνά και ενήλικες. Ωστόσο σε κάποιες εφαρμογές των ωμέγα-3 και ειδικότερα στη χρήση τους σε νεογνά, η προσθήκη του EPA αντενδείκνυται καθώς σχετίζεται με καθυστέρηση της ανάπτυξης σε νεογνά. Για το λόγο αυτό είναι επιθυμητός ο διαχωρισμός του DHA όταν προέρχεται από ιχθυέλαια που περιέχουν EPA και DHA. Βέβαια, ο διαχωρισμός είναι ακριβός και το DHA προερχόμενο από ιχθυέλαιο μπορεί να μετατραπεί σε EPA. Προς αποφυγήν του παραπάνω φαινομένου προστίθεται ARA μαζί με DHA ή DHA προερχόμενο από φύκη (C. Ratledge, 2013).

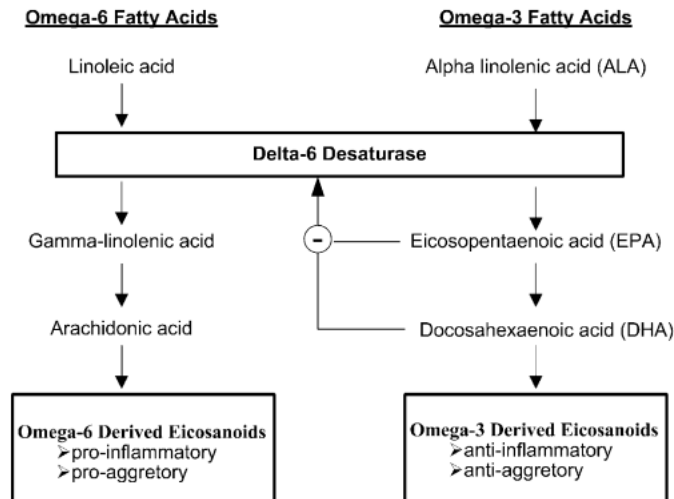
Αντιθέτως τα ωμέγα-6 αν και είναι επίσης απαραίτητα, αυξημένη ποσότητα τους έχει αρνητική επίδραση στην υγεία. Συγκεκριμένα, ενώ τα ωμέγα-3 σχετίζονται με

αντιφλεγμονώδη δράση γιατί είναι πρόδρομες ουσίες αντιφλεγμονωδών ουσιών, το αραχιδονικό οξύ είναι πρόδρομος κυρίως προφλεγμονωδών ενώσεων. Συνδυάζοντας το με το γεγονός ότι εν μέρει ανταγωνίζονται για την κατάληψη των ίδιων ενζύμων, η αυξημένη πρόσληψη ω-6 από φυτικά έλαια παρεμποδίζει την ωφέλιμη δράση για την υγεία των ω-3. Αύξηση της αναλογίας ω-6 προς ω-3 στη διατροφή μετατοπίζει τη φυσιολογική κατάσταση των ιστών προς παθογένεση πολλών ασθενειών (Shahidi, 2011). Αυξημένη πρόσληψη ωμέγα-3 λιπαρών οξέων όπως το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA), ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται για να αντικαταστήσει εν μέρει τα ωμέγα-6 λιπαρά οξέα, αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και μειώνει τα τριγλυκερίδια (Mendelson, 2008).

Συνεπώς, χάρη στη σημαντική επίδραση του DHA στην υγεία, διατίθεται σε διάφορα προϊόντα διατροφής και σκευάσματα φαρμάκων (κάψουλες ιχθυελαίου/φυκιού). Διατίθεται σε εμπορικό γάλα και αυγά τόσο στον αναπτυσσόμενο όσο και στον ανεπτυγμένο κόσμο. Επιπλέον, τα τεράστια οφέλη για την υγεία των βρεφών, έχουν καταστήσει το DHA συστατικό που πρέπει να βρίσκεται σε βρεφικές και παιδικές τροφές. Οι συνιστώμενες ποσότητες DHA σε ενήλικες είναι 200 mg ανά ημέρα από φύκια και 3000 έως 4000 mg τυποποιημένα ιχθυέλαια ανά ημέρα (Ali, Haque, & Khan, 2019).

3.4. Πηγή ωμέγα-3 λιπαρών

Τα κυριότερα ωμέγα-6 λιπαρά οξέα που λαμβάνονται μέσω της τροφής είναι το αραχιδονικό, που βρίσκεται στο ζωικό κρέας, και το λινελαϊκό οξύ, που βρίσκεται σε καρπούς, έλαια λαχανικών και σπόρους. Το λινελαϊκό οξύ μετετρέπεται σε αραχιδονικό με τη δράση ενός ενζύμου. Σε αντίθεση με τα ωμέγα-6 η πρόσληψη ωμέγα-3 είναι επιθυμητή λόγω των ωφέλιμων ιδιοτήτων τους για τον ανθρώπινο οργανισμό. Εφόσον, συντίθενται μόνο σε μικρή ποσότητα από τον οργανισμό είναι απαραίτητη η πρόληψη τους μέσω της τροφής. Σημαντικές διατροφικές πηγές ωμέγα-3 είναι τα ψάρια που περιέχουν εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA) και οι ξηροί καρποί, οι σπόροι και τα έλαια από λαχανικά που περιέχουν α-λινολενικό οξύ (ALA). Αυτό μπορεί να μετατρέπεται σε EPA και στη συνέχεια σε DHA από το ίδιο ένζυμο που μετατρέπει το λινελαϊκό οξύ σε αραχιδονικό οξύ. Η κύρια πηγή ALA είναι ο λιναρόσπορος. Άλλες πηγές είναι η κανόλα, τα έλαια σόγιας, και τα καρύδια. Ωστόσο, σχετική έρευνα με στόχο τη διερεύνηση της μετατροπής αυτής έδειξε ότι η μετατροπή ALA σε EPA ποικίλει από 0.2-21% και σε DHA από 0-9%. Δηλαδή παρατηρήθηκε αύξηση σε EPA αλλά μικρή έως καθόλου σε DHA. Βέβαια, αυτή η μετατροπή επηρεάζεται από διαφορετικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του φύλου και της ανταγωνιστικής αναστολής του ενζύμου (DeFilippis & Sperling, 2006).



Εικόνα 3: Μεταβολική οδός ωμέγα-3 και ωμέγα-6 λιπαρών οξέων (DeFilippis & Sperling, 2006)

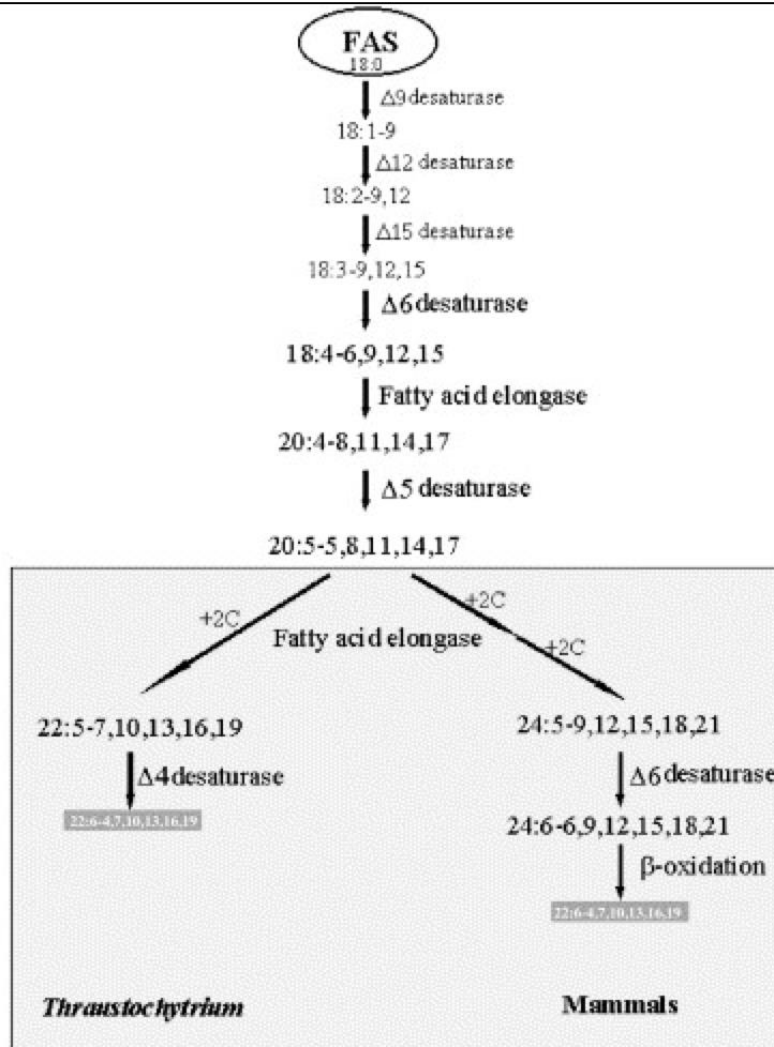
Η κυριότερη πηγή ω-3 λιπαρών οξέων είναι τα λιπαρά ψάρια, όπως ο σολομός ή ο τόνος, τα οποία περιέχουν σημαντικές ποσότητες EPA και DHA, και άλλοι θαλάσσιοι οργανισμοί όπως τα κριλ, τα φύκη, κάποια φυτά και έλαια από καρπούς. Ωστόσο, η χρήση του ιχθυελαίου ως προσθέτου τροφίμων είναι περιορισμένη λόγω προβλημάτων που σχετίζονται με την τυπική μυρωδιά ψαριού, τη δυσάρεστη γεύση και την κακή οξειδωτική σταθερότητα. Ακόμη, η προσφορά ιχθυελαίου είναι δύσκολο να προβλεφθεί, ιδίως μακροπρόθεσμα, λόγω της μείωση των αλιευτικών αποθεμάτων σε πολλούς από τους ωκεανούς του κόσμου. Η Διεθνής Ένωση Κατασκευαστών Ιχθυαλεύρων και Ελαίων εκτιμά ότι η προσθήκη του ιχθυελαίου στις ζωτροφές υδατοκαλλιέργειας θα αυξηθεί και θα μπορούσε να οδηγήσει σε παγκόσμια υποπροσφορά ιχθυελαίου. Επιπλέον, η παρουσία EPA στο ιχθυέλαιο είναι ανεπιθύμητη για εφαρμογή σε βρεφικές τροφές (Mendes et al., 2009; Shahidi, 2011).

Πρέπει να ληφθεί υπόψη και ότι η ρύπανση των υδάτων παραμένει ένα μείζον ζήτημα με σημαντικές επιπτώσεις στο θαλάσσιο οικοσύστημα και κατ' επέκταση στα ψάρια. Έτσι, εξακολουθούν να υπάρχουν σοβαρά ερωτήματα σχετικά με την πιθανή μόλυνση των ιχθυελαίων με βαρέα μέταλλα και άλλους ρύπους. Όταν η κατανάλωση ιχθυελαίου είναι περιορισμένη και η τοξικότητα του μεθυλαργύρου είναι πιθανή, EPA και DHA απαιτείται να παρέχονται από ALA, ακόμη και αν η μετατροπή του ALA σε EPA και DHA είναι γνωστό ότι δεν είναι τόσο αποτελεσματική. Συνεπώς, η ανάγκη για εύρεση εναλλακτικών πηγών ωμέγα-3 που θα μπορέσει να καλύψει την αυξανόμενη αγορά είναι όχι μόνο απαραίτητη αλλά και αναγκαία (Ratledge & Lippmeier, 2017; Bultosa, 2016).

3.5. Μεταβολικά μονοπάτια για βιοσύνθεση ωμέγα-3 λιπαρών οξέων

Η βιοσύνθεση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακριάς αλυσίδας στη φύση περιλαμβάνει δύο διαφορετικά μονοπάτια. Το αερόβιο μονοπάτι ακολουθεί μια εναλλασσόμενη διαδικασία δημιουργίας ακόρεστων δεσμών και επιμήκυνσης της ανθρακικής αλυσίδας και πραγματοποιείται κυρίως σε ζωικούς οργανισμούς και σε ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Το μοριακό οξυγόνο συμμετέχει στο μονοπάτι ως συμπαραγόντας. Η σύνθεση DHA στα θηλαστικά ξεκινά από το α-λινολενικό οξύ (ALA, C18:3n-3) το οποίο υπόκειται σε μία διαδικασία μετατροπής σε DHA μέσω ενός

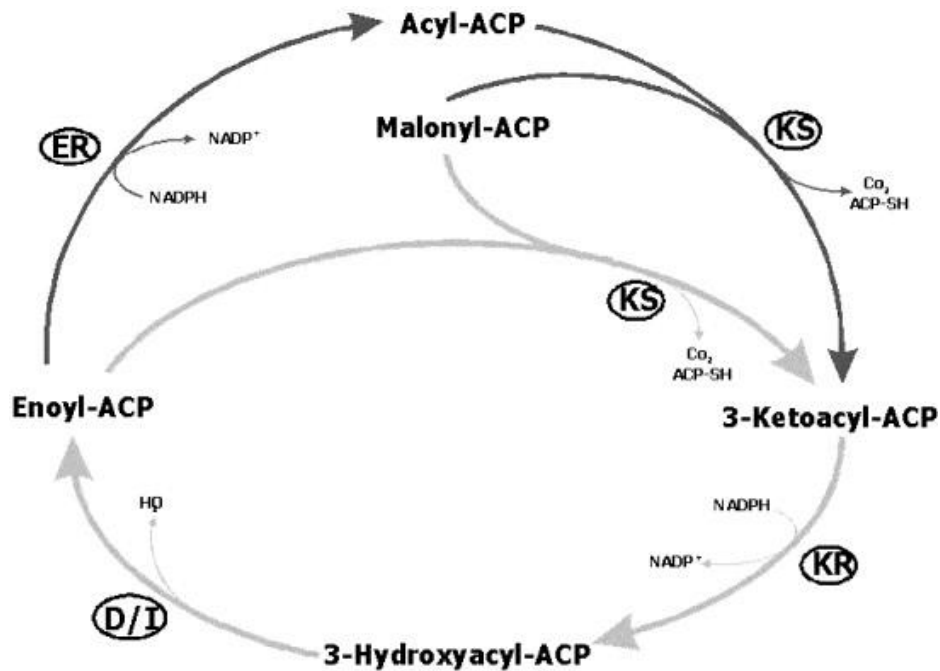
ελεγχόμενου βήματος β-οξείδωσης στο υπεροξείσωμα και μείωσης της αλυσίδας κατά δύο άνθρακες. Παράλληλα στους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς ξεκινά από το στεατικό οξύ (SA, 18:0) και καταλήγει στη δημιουργία ενός ακόρεστου δεσμού στη θέση 4 μέσω του ενζύμου ντεσατουράση (Δ4 desaturase). Στα μικροφύκη πραγματοποιείται βιομετατροπή του EPA σε DHA μέσω του ενζύμου Δ4 ντεσατουράση (Meesarjodsuk & Qiu, 2016; Qiu, 2003).



Εικόνα 4: Το αερόβιο μεταβολικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης DHA στα θηλαστικά και στο μικροφύκος *Thraustochytrium* (Qiu, 2003)

Το αναερόβιο μεταβολικό μονοπάτι λαμβάνει χώρα μόνο σε μικροοργανισμούς και διαφέρει από το αερόβιο καθώς δεν περιλαμβάνει τα οξυγονο-απαιτούμενα ένζυμα ντεσατουράσες που καταλύουν τη δημιουργία ακόρεστων δεσμών με προσθήκη διπλών δεσμών. Σε αυτό το μεταβολικό μονοπάτι οι διπλοί δεσμοί προκύπτουν μέσω της διαδικασίας σύνθεσης των λιπαρών οξέων και υπάρχει μόνο σε ορισμένα είδη θαλάσσιων μικροοργανισμών. Αντιθέτως οι ζωικοί οργανισμοί δεν περιλαμβάνουν ολόκληρο το αναερόβιο μεταβολικό μονοπάτι ώστε να είναι σε θέση να συνθέσουν αυτού του είδους τα λιπαρά οξέα αναερόβια. Το ένζυμο κετοσυνθάση (KS) καταλύει τη συμπύκνωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και συμμετέχει στις αντιδράσεις μετατροπής του αρχικού

ακέτυλο-συνένζυμουΑ (acetyl-CoA) σε πολυακόρεστα οξέα μακριάς αλυσίδας (Meesaryodsuk & Qiu, 2016; Qiu, 2003).



Εικόνα 5: Αναερόβια σύνθεση DHA σε θαλάσσια βακτήρια και ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπως *Schizochytrium* (Meesaryodsuk & Qiu, 2016)

3.6. Εναλλακτική πηγή ωμέγα-3 λιπαρών

Από τους διάφορους οργανισμούς αυξημένο ενδιαφέρον για την εύρεση εναλλακτικών πιθανών πηγών ωμέγα-3 λιπαρών παρουσιάζουν τα μικροφύκη. Η βιομάζα μικροφυκών είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για την εκχύλιση και τον καθαρισμό μεμονωμένων ω-3 πολυακόρεστων λιπιδίων λόγω της σταθερής και αξιόπιστης σύνθεσής της. Επιπλέον, η παραγωγή ωμέγα-3 λιπιδίων από την καλλιέργεια μικροφυκών δεν περιέχουν χοληστερόλη, ρυπογόνες ενώσεις όπως βαριά μέταλλα και παρουσιάζουν βελτιωμένη γεύση. Συγκρίνοντας τα λιπίδια από μικροφύκη με εκείνα προερχόμενα από ιχθυέλαιο, πρόκειται για μια πιο βιώσιμη πηγή που επιβαρύνει λιγότερο το περιβάλλον, καθώς τα αποθέματα ιχθυελαίου εξαντλούνται. Σύμφωνα με έρευνα, συγκρίνοντας τη δράση των ελαίων προερχόμενων από φύκη (συμπεριλαμβανομένου του μικροφύκου *C. cohnii*) και του ιχθυελαίου σε καρκινικά κύτταρα *in vitro* βρέθηκαν παρόμοια αποτελέσματα. Επομένως, τα μικροφύκη παρουσιάζονται ως μια ελπιδοφόρα εναλλακτική πηγή ωμέγα-3 λιπαρών (Daphne, Yi Kai, Hui, & Yuan Kun, 2015; Mendes et al., 2009)

Φυτικές πηγές του DHA αποτελούν φωτοσυνθετικά και ετεροτροφικά μικροφύκη με το φυτικό DHA να παρασκευάζεται από τα μικροφύκη *Cryptocodinium cohnii* και *Schizochytrium sp.* (Ali et al., 2019). Συγκεκριμένα, το DHA που παράγεται από το μικροφύκος *C. cohnii* έχει προστεθεί σε βρεφική φόρμουλα. Όσον αφορά το συγκεκριμένο μικροφύκος, επιλέχθηκε κυρίως λόγω του πολύ απλού προφίλ λιπαρών οξέων, στο οποίο το DHA είναι συχνά το μόνο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ που αποτελεί το 40% ή περισσότερο των συνολικών λιπαρών. Βέβαια λόγω της κίνησης των κυττάρων στο μέσο καλλιέργειας,

καταναλώνει περισσότερη πηγή άνθρακα για την διεκπεραίωση επιπλέον ενεργειών κατά την ανάπτυξη τους (Colin Ratledge & Lippmeier, 2017).

Η λιπιδικική σύνθεση των μικροφυκών εξαρτάται από τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων. Υπό συνθήκες βέλτιστης ανάπτυξης, τα άλγη συνθέτουν λιπαρά οξέα κυρίως για εστεροποίηση σε λιπίδια μεμβράνης με βάση τη γλυκερίνη (πολικά λιπίδια). Ο σχηματισμός των πολικών λιπιδίων προκαλείται επίσης από χαμηλή ένταση φωτός. Σε δυσμενείς περιβαλλοντικές ή ακραίες συνθήκες ανάπτυξης, όπως η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών (περιορισμός του αζώτου ειδικότερα), τα φύκια μεταβάλλουν τις βιοσυνθετικές οδούς των λιπιδίων προς το σχηματισμό και την συσσώρευση των ουδέτερων λιπιδίων. Υπό συνθήκες στρες, η ροή του σταθερού άνθρακα μεταβάλλεται επίσης από σχηματισμό πρωτεϊνών σε παραγωγή λιπιδίων. Αυτό συμβαίνει καθώς λειτουργούν ως αποθήκες ενέργειας παράγοντας κατά την οξείδωση τους περισσότερη ενέργεια με τη μορφή ATP σε σύγκριση με τα σάκχαρα (Daphne et al., 2015).

4. Ανάπτυξη Μικροφυκών

4.1. Είδη Ανάπτυξης

Εκτός από το είδος του μικροοργανισμού, οι συνθήκες ανάπτυξης έχουν επίσης σημαντική επίδραση στο λιπιδικό περιεχόμενο των μικροφυκών. Τα μικροφύκη είναι συνήθως αυτοτρόφοι οργανισμοί που εξαρτώνται από το φως και ανόργανες πηγές άνθρακα για την ανάπτυξή τους. Κατά την αυτότροφη ανάπτυξη καταναλώνεται άμεσα CO₂ μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης, το οποίο θα μπορούσε να προέρχεται από κάποια πηγή εκπομπών, δημιουργώντας έτσι μια αποτελεσματική ευκαιρία δέσμευσης και ανακύκλωσης άνθρακα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι ορισμένα είδη μικροφυκών είναι παρόμοια με τα βακτήρια, δεδομένου ότι μπορούν επίσης να αφομοιώσουν πηγές οργανικού άνθρακα (όπως γλυκόζη, οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ, κ.λπ.) υπό συνθήκες έλλειψης ή παρουσίας φωτός, τα οποία αναφέρονται ως ετερότροφα (Li et al., 2020; Terrado et al., 2017).

Μια άλλη κατηγορία μικροφυκών ως προς την πηγή άνθρακα που καταναλώνουν, είναι τα μιξοτροφικά, τα οποία διαθέτουν και τα δύο μεταβολικά μονοπάτια. Μπορούν λοιπόν να καλύψουν τις απαιτήσεις τους σε θρεπτικά συστατικά και ενέργεια είτε μέσω φωτοσύνθεσης είτε μέσω αφομοίωσης οργανικού άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν είδη που αναπτύσσονται μέσω της φωτοσύνθεσης και υπό έλλειψη φωτός συμπληρώνουν τις ανάγκες τους μέσω ετεροτροφικής ανάπτυξης, ενώ άλλα είναι κυρίως ετερότροφα και αξιοποιούν τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης όταν δεν είναι διαθέσιμες πηγές οργανικού άνθρακα. Αυτή η δυνατότητα μικτής ανάπτυξης αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα ειδικά σε ολιγοτροφικά συστήματα (Terrado et al., 2017). Μερικά κοινά μικροφύκη που μπορούν να καλλιεργηθούν ετεροτροφικά ή μιξοτροφικά περιλαμβάνουν: *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis sp.*, *Haematococcus pluvialis* και *Spirulina sp.* (Li et al., 2020). Ειδικότερα, οι ρυθμοί ανάπτυξης για μιξοτροφικές καλλιέργειες ήταν υψηλότεροι από ότι σε αυτότροφες, οδηγώντας σε έως και 7 φορές υψηλότερη πυκνότητα κυττάρων και παραγωγικότητα βιομάζας (Wang, Zhou, Shao, & Liu, 2017).

Προς το παρόν, θεωρείται ότι οι λόγοι που ορισμένα μικροφύκη δεν μπορούν να επιβιώσουν υπό ετεροτροφικές συνθήκες περιλαμβάνουν: την παρουσία φράγματος μεταφοράς οργανικού άνθρακα εντός των μικροφυκών όπως η έλλειψη διαμεμβρανικών μεταφορέων, η έλλειψη βασικών μεταβολικών ενζύμων και η περιορισμένη ικανότητα αναπνοής με αποτέλεσμα ανεπαρκή παραγωγή ATP. Η παραπάνω υπόθεση δεν είναι ικανή να εξηγήσει όλα τα φαινόμενα που παρατηρούνται για όλα τα είδη και στην πραγματικότητα οι μηχανισμοί μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων ειδών (Li et al., 2020).

4.2. Σύγκριση ετερότροφης και αυτότροφης ανάπτυξης

Κάθε τύπος ανάπτυξης παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Αρχικά για αυτότροφη καλλιέργεια, ο σχεδιασμός των φωτο-βιοαντιδραστήρων μεγιστοποιεί την περιοχή που εκτίθεται σε ελαφρά ακτινοβολία για την διασφάλιση ότι τα κύτταρα των μικροφυκών λαμβάνουν τα απαραίτητα φωτόνια για τη φωτοσύνθεση. Αν και αυτό είναι τεχνολογικά εφικτό, είναι δύσκολο να επιτευχθεί υψηλή πυκνότητα μικροφυκών σε φωτο-βιοαντιδραστήρες. Αυτό συμβαίνει επειδή η διείσδυση του φωτός στο μέσο καλλιέργειας είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση των κυττάρων λόγω της προκαλούμενης σκίασης από τα άλλα κύτταρα. Για το λόγο αυτό η παραγόμενη βιομάζα είναι πολύ χαμηλή, μικρότερη από 10 g/L και συνεπώς υπάρχουν πολύ χαμηλές αποδόσεις των προϊόντων. Η χαμηλή πυκνότητα βιομάζας σε αντιδραστήρα αυξάνει επίσης και το κόστος συλλογής της βιομάζας. Ως αποτέλεσμα, η παραγωγή πολύτιμων προϊόντων από αυτότροφα μικροφύκη χρειάζεται μεγάλο χρόνο ανάπτυξης και τεράστιες επενδύσεις πριν εμπορευματοποιηθούν (Baroukh, Turon, & Bernard, 2017; Perez-Garcia & Bashan, 2015).

Αντίθετα, η ετεροτροφική ανάπτυξη είναι ταχύτερη, μειώνοντας σημαντικά το χρόνο καλλιέργειας. Η εξάλειψη της ανάγκης παρουσίας φωτός στις ετεροτροφικές καλλιέργειες μειώνει το κόστος κατασκευής βιοαντιδραστήρων και επιτρέπει τον καλύτερο έλεγχο της ανάπτυξης των μικροφυκών. Παράλληλα ελαχιστοποιείται η μόλυνση από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς και είναι δυνατή η περιβαλλοντική χρήση των ετεροτροφικών ή μιξοτροφικών καλλιέργειών μικροφυκών για αφαίρεση θρεπτικών συστατικών από υδατικά απόβλητα με υψηλότερη αποδοτικότητα σε σύγκριση με τα αυτότροφες καλλιέργειες. Επιπλέον, μπορεί να επιτευχθεί υψηλή πυκνότητα βιομάζας καθώς δεν διαθέτει τον περιορισμό ανάπτυξης των αυτότροφων και παρουσιάζει υψηλότερη κυτταρική περιεκτικότητα σε λιπίδια (Baroukh et al., 2017; Perez-Garcia & Bashan, 2015).

Συνεπώς, η παραγωγή άφθονης ποσότητας πολύτιμων προϊόντων από μικροφύκη θα πρέπει να επικεντρώνεται στην καλλιέργεια μικροφυκών σε συνθήκες ανάπτυξης ετεροτροφικές ή μιξοτροφικές, χρησιμοποιώντας φθηνά σάκχαρα ή οργανικά οξέα ως τροφοδοσία (Baroukh et al., 2017; Perez-Garcia & Bashan, 2015). Έως σήμερα διάφορα ετεροτροφικά είδη έχουν αναπτυχθεί επιτυχώς σε μεγάλη κλίμακα συμπεριλαμβανομένων των *Schizochytrium limacinum*, *Phaeodactylum tricornutum* και *Chlorella sorokiniana* και *Cryptocodinium cohnii* (Wang et al., 2017).

4.3. Φάσεις Ανάπτυξης

Η ανάπτυξη του πληθυσμού μικροφυκών όπως και γενικότερα των μικροοργανισμών, χωρίζεται σε επιμέρους διακριτές φάσεις. Συγκεκριμένα διακρίνονται οι εξής φάσεις για ένα περιβάλλον στο οποίο δεν πραγματοποιείται επιπλέον προσθήκη θρεπτικών ουσιών: (1) Φάση υστέρησης, (2) Φάση εκθετικής ανάπτυξης, (3) Φάση παρακμής, (4) Στατική φάση και (5) Φάση θανάτου.



Εικόνα 6: Σχηματική περιγραφή των φάσεων ανάπτυξης των μικροοργανισμών

Αρχικά η έκταση της φάση υστέρησης (1) ποικίλει ανάλογα με το είδος των μικροφυκών και μπορεί ακόμα και να είναι ανύπαρκτη, δηλαδή να μεταβαίνει απευθείας στην εκθετική φάση καλλιέργειας (2). Η φάση υστέρησης αποτελεί την περίοδο κατά την οποία τα κύτταρα προσαρμόζονται στο περιβάλλον τους παράγοντας τα απαραίτητα ένζυμα για να αναπτυχθούν υπό τις δεδομένες συνθήκες ενώ αναπτύσσονται αυξάνοντας μόνο το μέγεθος τους. Εφόσον τελειώσει αυτή η φάση τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης όπου ο πληθυσμός των κυττάρων αυξάνεται ταχύτατα λόγω αφθονίας υποστρωμάτων. Καθώς τα θρεπτικά μειώνονται ή παράγεται κάποιο προϊόν που αναστέλλει την εκθετική αύξηση, η καλλιέργεια οδηγείται σε φάση παρακμής (3) και φτάνει στη στατική φάση (4), όπου εξισώνονται ο ρυθμός θνησιμότητας και ο ρυθμός ανάπτυξης. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης δεν παρατηρείται ούτε αύξηση ή μείωση του πληθυσμού ενώ διάφορες λειτουργίες των κυττάρων συνεχίζονται, όπως η βιοσύνθεση και ο μεταβολισμός. Τελικά, ο πληθυσμός εισέρχεται στη φάση θανάτου (5) χαρακτηριζόμενη από έλλειψη θρεπτικών συστατικών για να διατηρηθούν τα κύτταρα (Anil Kommareddy & Dr. Gary Anderson, 2013).

Η φάση ανάπτυξης έχει επίσης αναφερθεί ότι αποτελεί βασικό παράγοντα για τη βέλτιστη παραγωγή των λιπιδίων στα μικροφύκη. Η παραγωγή τους συνδέεται στενά με τη χρονική στιγμή κατά την οποία μία καλλιέργεια μικροφυκών μεταφέρεται από μια φάση με επαρκή θρεπτικά συστατικά σε μια φάση υπό έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Η συγκέντρωση των λιπιδίων παρατηρήθηκε μειωμένη όταν η ανάπτυξη των κυττάρων ήταν εκθετική, αλλά στη

συνέχεια αυξήθηκε εκθετικά όταν η ανάπτυξη ήταν γραμμική λόγω ενός απροσδιόριστου περιορισμού θρεπτικών συστατικών. Φαίνεται επίσης ότι η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε DHA επηρεάζεται από το ρυθμό ανάπτυξης και τη συγκέντρωση των λιπιδίων. Η συγκέντρωση του DHA επηρεάζεται αρνητικά από την αύξηση της συγκέντρωσης των λιπιδίων. Η υψηλότερη περιεκτικότητα λιπιδίων σε DHA αποκτήθηκε όταν η κυτταρική συγκέντρωση και η περιεκτικότητα των κυττάρων σε λιπίδια ήταν οι χαμηλότερες. Η μείωση των κορεσμένων λιπαρών οξέων και η αύξηση της περιεκτικότητας σε DHA παρατηρείται στο τέλος της εκθετικής φάσης ή στην πρώιμη στατική φάση. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η βέλτιστη ανάπτυξη και η μέγιστη συσσώρευση DHA από τα κύτταρα μικροφυκών πραγματοποιούνται σε διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης (Aziz et al., 2020; Mendes et al., 2009).

5. Πηγές C

Στα ετερότροφα μικροφύκη η παραγωγικότητα σε βιομάζα και η παραγωγή προϊόντων επηρεάζονται σημαντικά από την πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται. Γενικά τα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν σε πληθώρα μέσων καλλιέργειας αξιοποιώντας διαφορετικές πηγές άνθρακα για την ανάπτυξη τους και έτσι και το μικροφύκος *C. cohnii*. Αρχικά, καλλιεργήθηκε σε εμπλουτισμένους ζωμούς θαλασσινού νερού αλλά στις περισσότερες από τις εμπορικές διαδικασίες καλλιέργειας, η γλυκόζη χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Ωστόσο, δεν είναι το μόνο υπόστρωμα που μπορεί να αναπτυχθεί. Η χρήση άλλων πηγών άνθρακα όπως το οξικό οξύ και η αιθανόλη αλλά και άλλων υποστρωμάτων είναι δυνατή για την ανάπτυξη των κυττάρων, τη συσσώρευση λιπιδίων, και την παραγωγή DHA κυρίως σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (fed-batch). Σε κάθε περίπτωση είναι απαραίτητη η διερεύνηση αν πάνω από κάποια τιμή συγκέντρωσης του υποστρώματος, δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του μικροφύκου (Mendes et al., 2009; Wynn et al., 2010).

Σύμφωνα με κάποια ερευνητικά αποτελέσματα, ο *C. cohnii* μπορεί να αναπτυχθεί με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη χωρίς να έχει παρατηρηθεί σημαντική ανάπτυξη, ενώ είναι δυνατή η ανάπτυξη σε γαλακτόζη αλλά με μικρότερη περιεκτικότητα σε λιπίδια σε σχέση με τη γλυκόζη. Χρησιμοποιώντας ως πηγές άνθρακα διαφορετικά υποστρώματα όπως τη φρουκτόζη, τη μαλτόζη, την αραβινόζη, την λακτόζη και άλλα, θεωρήθηκε ότι δεν είναι κατάλληλες πηγές άνθρακα για τον *C. cohnii* ενώ σύμφωνα με άλλη έρευνα μπορεί να αναπτυχθεί και σε φρουκτόζη (Mendes et al., 2009). Οι Chalima et al. (2019) απέδειξαν πρώτη φορά ότι το στέλεχος μπορεί να αναπτυχθεί με αποκλειστική πηγή άνθρακα προπιονικό ή βουτυρικό οξύ. Στη συνέχεια αναφέρονται τα υποστρώματα τα οποία έχει αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλα για την ανάπτυξη του *C. cohnii*.

5.1. Γλυκόζη

Η γλυκόζη αποτελεί την πιο κοινή πηγή άνθρακα για ετερότροφη καλλιέργεια μικροφυκών και άλλων μικροοργανισμών. Η χρήση της κατά κανόνα οδηγεί σε μεγαλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης από οποιαδήποτε άλλο υπόστρωμα, όπως σάκχαρα, οξέα ή αλκοόλες. Αυτό πιθανά οφείλεται στο μεγαλύτερο ενεργειακό περιεχόμενο της σε σύγκριση με τα υπόλοιπα. Η γλυκόζη παράγει ενέργεια ίση με 2.8 kJ/mol σε σύγκριση με το οξικό που παράγει 0.8 kJ/mol. Συγκεκριμένα, περισσότερο από το 85% της προστιθέμενης γλυκόζης

αφομοιώνεται και μετατρέπεται σε ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες (Perez-Garcia, Escalante, de-Bashan, & Bashan, 2011). Ακόμη, η γλυκόζη αντιπροσωπεύει μια εύκολα προσβάσιμη πρώτη ύλη για πολλές βιομηχανικές διεργασίες ζύμωσης και συνήθως λαμβάνεται, με τη μορφή σιροπιών γλυκόζης που προκύπτει από υδρόλυση (χημική και ενζυμική). Πρόκειται για ένα φθινό, άμεσα διαθέσιμο υπόστρωμα που μπορεί να αποθηκευτεί ως ένα συμπυκνωμένο διάλυμα, το οποίο είναι σταθερό. Είναι επίσης υδατοδιαλυτό έτσι ώστε τα μέσα ζύμωσης να μπορούν να δημιουργηθούν και να αποστειρωθούν χωρίς δυσκολία και στη συνέχεια να μεταφερθούν στον βιοαντιδραστήρα ως ένα ενιαίο διάλυμα (Wynn et al., 2010).

Οι Jiang et al. (2000a) μελέτησαν την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης στην καλλιέργεια *C. cohnii* και βρέθηκε ότι το ποσοστό DHA σε σχέση με τα ολικά λιπαρά οξέα ήταν το υψηλότερο (53,4%, w/w) σε χαμηλή αρχική συγκέντρωση γλυκόζης και μειώθηκε σημαντικά με την αύξηση της συγκέντρωσης. Βέβαια, χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης μπορεί να ευνοεί το σχηματισμό DHA αλλά συνοδεύεται από χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης. Αντίθετα, η συνολική περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα αυξήθηκε με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης (Mendes et al., 2009; Jiang & Chen, 2000a).

5.2. Οξικό Οξύ

Το οξικό οξύ παράγεται από την πετροχημική βιομηχανία σε πολύ μεγάλη κλίμακα. Σε σύγκριση με τη γλυκόζη, κοστίζει περίπου τρεις φορές περισσότερο ενώ άλλο σημαντικό μειονέκτημα για να χρησιμοποιηθεί σε ζύμωση μεγάλης κλίμακας είναι ότι σε συμπυκνωμένη μορφή απαιτεί προσεκτικό χειρισμό για τυχόν διαρροή ή επαφή με το δέρμα. Ωστόσο, δεν χαρακτηρίζεται ως ένα "ισχυρό" οξύ αφού δεν είναι τόσο επιθετικό όσο ένα ανόργανο οξύ, όπως το HCl ή HNO₃. Συνεπώς, δεν χρειάζεται τις αυστηρές προφυλάξεις που απαιτούνται κατά το χειρισμό μεγάλων ποσοτήτων αυτών των οξέων και ειδικά σε ένα βιοαντιδραστήρα όπου η συγκέντρωσή του θα είναι πολύ αραιωμένη. Έτσι μειώνονται οι κίνδυνοι σε αυτό το επίπεδο της λειτουργίας (Wynn et al., 2010).

Η χρήση του ως πηγή άνθρακα για την εμπορική παραγωγή DHA παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω της δυνατότητας του να μετατρέπεται απευθείας σε ακετυλο-CoA που αποτελεί ένα σημαντικό ενδιάμεσο κατά τη λιπιδική σύνθεση. Το οξικό οξύ όμως είναι τοξικό για πολλούς μικροοργανισμούς όταν η συγκέντρωσή του είναι πάνω από περίπου 5-10 g/L, ενώ λίγοι οργανισμοί θα αναπτυχθούν σε αυτό σε πάνω από 20 g/L, ακόμη και σε ουδέτερες τιμές pH. Ωστόσο η ακριβής εκτίμηση της τοξικότητας του οξικού οξέος για την ανάπτυξη *C. cohnii* είναι δύσκολο να υπολογιστεί δεδομένου ότι το μέσο καλλιέργειας περιέχει και άλλες αξιοποιήσιμες πηγές άνθρακα. Η αύξηση όμως σε οξικό οξύ συνοδεύεται από απότομη αύξηση του pH που εμπόδισε την καλή ανάπτυξη και αποτελεί σημαντικό πρόβλημα.

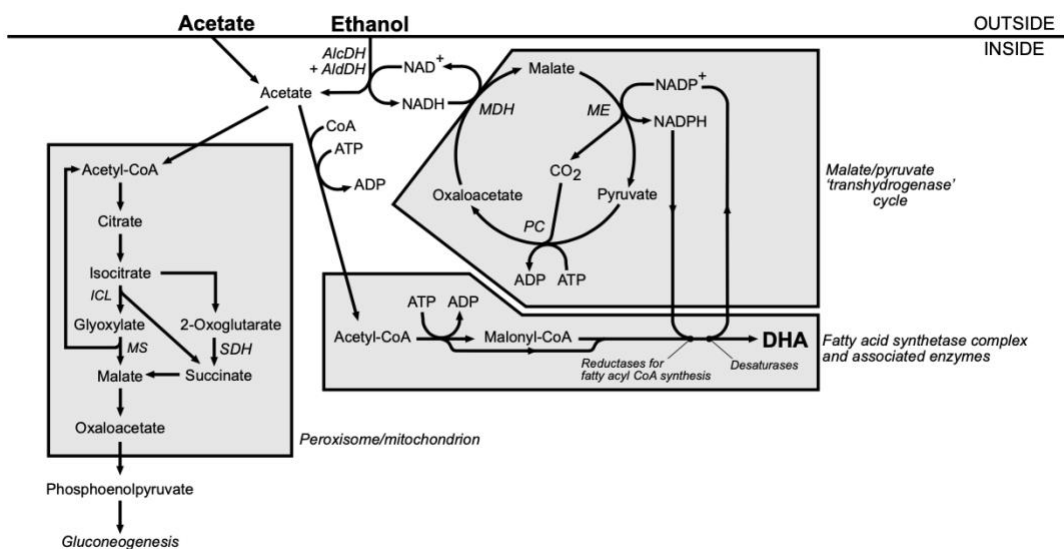
Όταν τα κύτταρα αρχίζουν να αυξάνονται, το οξικό οξύ (CH₃COO⁻) καταναλώνεται και παράγονται ιόντα υδροξυλίου (OH⁻) τα οποία, κατά συνέπεια, προκαλούν την αύξηση του pH. Αυτή η ταχεία αύξηση του pH σταματά την ανάπτυξη των κυττάρων. Συνεπώς, για να αποφευχθεί η αύξηση του pH, πρέπει να προστίθεται οξύ. Έτσι, μια δεξαμενή οξικού οξέος μπορεί να συνδεθεί με το βιοαντιδραστήρα και να συνδεθεί με το μετρητή pH και τη δοσολογική αντλία (pH-auxostat). Όταν η τιμή του pH αποκλίνει από τη βέλτιστη τιμή για

την ανάπτυξη, προστίθεται οξικό οξύ ώστε να μειωθεί το pH. Η κατανάλωση βέβαια του οξικού οξέος αποτελεί και ένδειξη του ρυθμού ανάπτυξης. Ταχεία κατανάλωση υποδηλώνει γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης (Sijtsma et al., 2010).

Συνολικά, το σύστημα αυτό δίνει αποτελέσματα ανώτερα από εκείνα που λαμβάνονται όταν η γλυκόζη χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη οδηγώντας σε έως και 60% αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης, αύξηση 70% στην περιεκτικότητα των κυττάρων σε λιπίδια και αύξηση 50% στην περιεκτικότητα σε DHA στη συνολική ποσότητα ολικών λιπαρών οξέων. Η περιεκτικότητα στα υπόλοιπα λιπίδια που περιέχονται στα κύτταρα είναι περίπου ισοδύναμη μεταξύ των δύο μέσων ανάπτυξης (Colin Ratledge & Lippmeier, 2017; Sijtsma et al., 2010).

5.3. Αιθανόλη

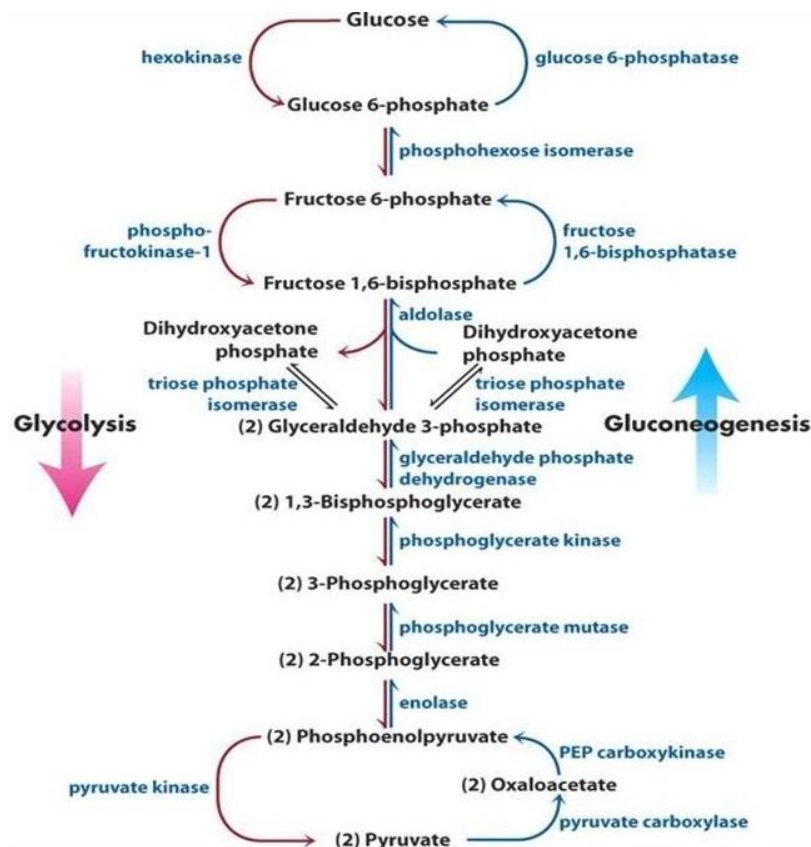
Η αιθανόλη είναι ένα υπόστρωμα που μπορεί να παραχθεί με ζύμωση της γλυκόζης, που προέρχεται από άμυλο καλαμποκιού ή από σακχαρόζη από ζαχαροκάλαμο. Το κύριο μειονέκτημά της χρήσης αιθανόλης είναι η αναφλεξιμότητα της, δημιουργώντας προβλήματα κατά την αποθήκευση και μεταφορά της από τη μονάδα παραγωγής σε αδιάλυτη μορφή. Όπως και τα υπόλοιπα υποστρώματα, είναι υδατοδιαλυτή και, ως εκ τούτου, δεν παρουσιάζονται προβλήματα κατά την ανάμειξη της με το μέσο ζύμωσης. Τα παραγόμενα προϊόντα είναι κατάλληλα για κατανάλωση από τον άνθρωπο καθώς δεν περιέχουν υπολείμματα, μη αντιδρώντα συστατικά και τα τελικά απόβλητα μπορούν να απορριφθούν με ελάχιστη επεξεργασία. Τόσο η αιθανόλη όσο και το οξικό οξύ σαν πρώτες ύλες έχουν το πλεονέκτημα ότι δε χρειάζονται αποστείρωση και μειώνουν τον κίνδυνο μόλυνσης. Αυτό συμβαίνει καθώς και τα δύο υποστρώματα, σε αντίθεση με τη γλυκόζη, είναι τοξικά για πολλούς οργανισμούς για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 1-2% (Wynn et al., 2010).



Εικόνα 7: Πιθανή οδός για τη βιοσύνθεση DHA από οξικό οξύ και αιθανόλη στο μικροφύκος *C. cohnii* (Sijtsma et al., 2010).

5.4. Γλυκερόλη

Η γλυκερόλη αποτελεί ένα βασικό παραπροϊόν των διυλιστηρίων πετρελαίου. Λόγω της τρέχουσας άφθονης και φθηνής προσφοράς ακατέργαστης γλυκερόλης από την παραγωγή βιοντίζελ, υπήρξε ενδιαφέρον για τη χρήση της ως πιθανής πρώτης ύλης ζύμωσης για διάφορες διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης της ως εναλλακτικής πηγής άνθρακα για την παραγωγή ω-3 λιπαρών. Διάφορα στελέχη μικροφυκών έχουν αναφερθεί να την αξιοποιούν ως πηγή C για την παραγωγή λιπιδίων, όπως *Cryptococcus curvatus*, *Schizochytrium Limacinum*, *Schizochytrium spp.* Οι συντελεστές απόδοσης για τη μετατροπή της γλυκόζης σε βιομάζα είναι συνήθως μεταξύ 0,4 και 0,5 g κυτταρικής μάζας/g γλυκόζης και οι αποδόσεις με γλυκερόλη αναμένεται να είναι περίπου οι ίδιες, καθώς μπορεί να χρησιμοποιήσει την κύρια οδό της γλυκονεογένεσης όπου αρχικά μετατρέπεται σε 3-φωσφογλυκερόλη και μετά σε πυροσταφυλικό. Το πυροσταφυλικό που παράγεται από γλυκερίνη μετατρέπεται σε ακετυλο-CoA για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων (Sijtsma et al., 2010). Με βάση σχετικά πειράματα από τους Safdar, Zan και Song (2017) η μέγιστη παραγωγή βιομάζας για ανάπτυξη σε γλυκερόλη βρέθηκε 15.1 g/L σε κανονικές συνθήκες.



Εικόνα 8: Αλληλουχία αντιδράσεων γλυκόλυσης και γλυκονεογένεσης

Υπάρχει, ωστόσο, ένα σημαντικό πρόβλημα, ιδίως με τη χρήση γλυκερόλης προερχόμενης από βιοντίζελ για την παραγωγή λιπιδίων. Υπάρχουν πολλές προσμείξεις συμπεριλαμβανομένων των υπολειμμάτων μεθανόλης και έτσι δεν είναι κατάλληλα για να προστεθούν σε τρόφιμα. Αν και αυτά τα υποστρώματα δεν μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγικότητα σε DHA, η ίδια η παρουσία της μεθανόλης αποτρέπει τη χρήση της γλυκερίνης για την παραγωγή ενός προϊόντος που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση. Επιπλέον, τα λιπίδια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοντίζελ

μπορεί να περιλαμβάνουν χρησιμοποιημένα μαγειρικά έλαια στα οποία ενδέχεται να υπάρχουν διάφοροι καρκινογόνοι παράγοντες. Συνεπώς, η κατεργασμένη γλυκερίνη δεν μπορεί να θεωρηθεί βιώσιμη πρώτη ύλη για την παραγωγή DHA ενώ η ακατέργαστη γλυκερίνη θα ήταν κατάλληλη για την παραγωγή προϊόντος που προορίζεται για κατανάλωση από τον άνθρωπο ή άλλο ζωντανό οργανισμό (Safdar, Zan, & Song, 2017; Sijtsma et al., 2010).

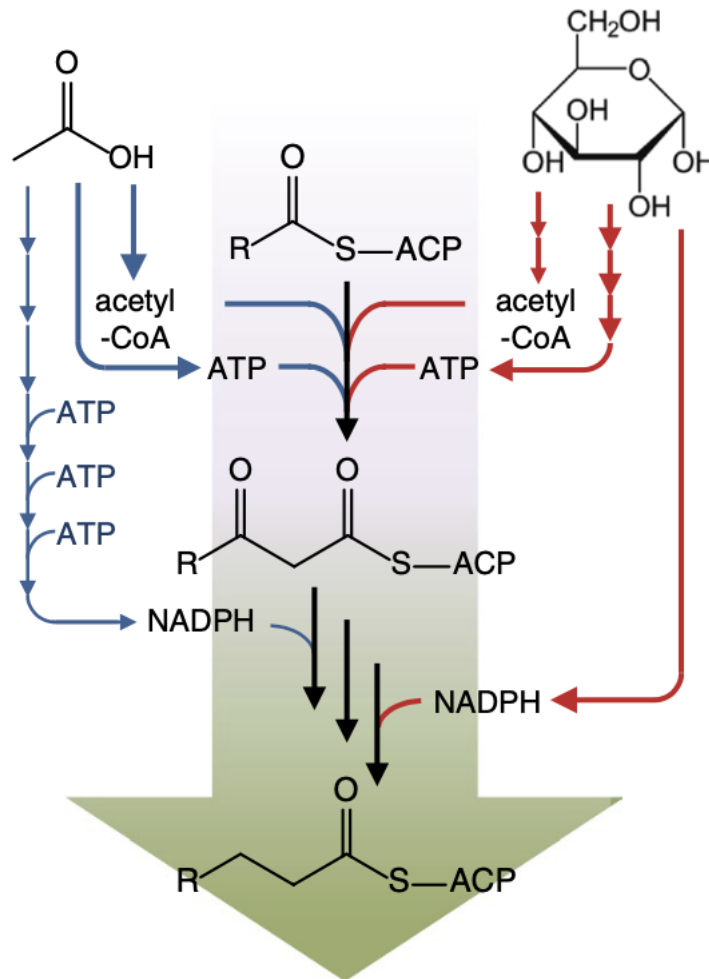
5.5. Συνδυαστική Τροφοδοσία

Γενικότερα, στις καλλιέργειες μικροοργανισμών προτιμάται η χρήση ενός υποστρώματος για την ανάπτυξη τους. Ωστόσο διερευνάται η χρήση πολλαπλών υποστρωμάτων διότι ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών διαφοροποιείται αισθητά όταν στα κύτταρα βρεθούν σε περιβάλλον που υπάρχουν διαφορετικές πηγές άνθρακα αντί για μία πηγή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κάθε θρεπτικό συστατικό αλληλοεπιδρά με πολύπλοκο τρόπο με το μεταβολικό δίκτυο δημιουργώντας ευκαιρίες για βελτιστοποίηση του μεταβολισμού χρησιμοποιώντας διαφορετικές πηγές άνθρακα. Αντιθέτως, ο μεταβολισμός ενός υποστρώματος θέτει φυσικούς στοιχειομετρικούς περιορισμούς στη διαθεσιμότητα του άνθρακα, της ενέργειας και των οξειδοαναγωγικών συμπαραγόντων. Κάθε υπόστρωμα οδηγεί σε διαφορετική απόδοση σε άνθρακα, ενέργεια και συμπαραγόντων και εισέρχεται στο μεταβολισμό σε διαφορετικό βήμα παραλείποντας ίσως κάποια βήματα. Ως αποτέλεσμα η βιοσύνθεση προϊόντων με ένα μόνο υπόστρωμα πραγματοποιείται με μη βέλτιστες αποδόσεις.

Το βασικότερο όμως εμπόδιο με τη χρήση πολλαπλών πηγών έγκειται στο ότι σε διάφορους μικροοργανισμούς συμπεριλαμβανομένου του *C. Cohnii* συμβαίνει ένα φαινόμενο καταστολής του μεταβολισμού του άνθρακα (carbon catabolite repression). Όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικές πηγές, εξαιτίας αυτού του φαινομένου, καταναλώνεται πρώτα η πηγή άνθρακα που προτιμάται από το μικροοργανισμό και κατόπιν καταναλώνονται βάσει προτίμησης οι υπόλοιπες. Δηλαδή όταν υπάρχουν δύο πηγές, η κατανάλωση της δευτερεύουσας πηγής παρεμποδίζεται από την παρουσία του υποστρώματος που προτιμάται. Η αποφυγή του έχει μεγάλη σημασία ιδιαίτερα στην περίπτωση χρήσης εναλλακτικών πηγών άνθρακα όπως κατά την αξιοποίηση αποβλήτων ή τη χρήση υδρολυμάτων βιομάζας αφού ο διαχωρισμός των επιμέρους συστατικών είναι ακριβός. Επιπλέον σε περιπτώσεις βιοεξυγίανσης μπορεί να επιδιώκεται η κατανάλωση του μη προτιμητέου υποστρώματος.

Μια στρατηγική εξάλειψης περιλαμβάνει τη συνεχή τροφοδοσία της καλλιέργειας με ένα υπόστρωμα στο οποίο έχει προστεθεί αμελητέα ποσότητα του προτιμητέου υποστρώματος. Όπως αναφέρθηκε αυτή η προσθήκη μπορεί να αυξήσει τη διαθεσιμότητα άνθρακα, της ενέργειας και των οξειδοαναγωγικών συμπαραγόντων ανάλογα με το υπόστρωμα που προστίθεται. Για παράδειγμα μπορεί να επιτευχθεί ταυτόχρονη ενίσχυση των μεταβολικών μονοπατιών της γλυκόλυσης και της παραγωγής λιπιδίων με την προσθήκη γλυκόζης σε τροφοδοσία οξικού οξέος. Η παραγωγή λιπιδίων απαιτεί μια ισορροπημένη παροχή ακέτυλο συνένζυμο Α (acetyl-CoA), ATP και NADPH με μια αναλογία 1:1:2. Η γλυκόζη και το οξικό οξύ παρέχουν στα κύτταρα και τα τρία για τη σύνθεση λιπιδίων. Ωστόσο η σύνθεση τους από οξικό είναι πιο αργή διαδικασία παρά την απευθείας μετατροπή του σε acetyl-CoA και ATP μέσω του κύκλου του Krebs. Αυτό οφείλεται στο ότι η

κύρια πηγή NADPH απαιτεί μια σειρά αντιδράσεων που απαιτούν ATP. Αντιθέτως με τη γλυκόζη παράγονται NADPH πιο άμεσα μέσω του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών. Συνεπώς η προσθήκη γλυκόζης αποσκοπεί στην ενίσχυση της διαθεσιμότητας NADPH και τελικά στην ενίσχυση της παραγωγής λιπιδίων (N. Liu, Santala, & Stephanopoulos, 2020; Park et al., 2019).



Εικόνα 9: Συνδιαστική τροφοδοσία οξικού και γλυκόζης στη ζύμη *Y. lipolytica*. Η κατανάλωση οξικού οξέος οδηγεί σε παραγωγή ακετύλο συνένζυμο-Α και ATP μέσω του κύκλου του Krebs αλλά η παραγωγή NADPH απαιτεί πολλά ενζυμικά βήματα και ATP. Η γλυκόζη παράγει πιο άμεσα NADPH μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών (Park et al., 2019)

5.6. Εναλλακτικές πηγές

Η ανάγκη για μείωση του κόστους της διεργασίας και ταυτόχρονα η επιτακτική ανάγκη για μείωση των επιπτώσεων που επιφέρουν στο περιβάλλον τα απόβλητα, οδήγησαν την έρευνα να προσανατολιστεί σε εναλλακτικές πηγές άνθρακα. Μια κοινώς προτεινόμενη εφαρμογή για τα αυτοτροφικά καλλιεργούμενα μικροφύκη είναι η επεξεργασία υδατικών λυμάτων. Το κυριότερο πλεονέκτημα αυτής της χρήσης είναι ότι αποτρέπεται η απόθεση πρόσθετου ρυπαντικού φορτίου στο περιβάλλον, ενώ ταυτόχρονα η παραγόμενη βιομάζα αυξάνει την αποτελεσματικότητα της ανακύκλωσης των θρεπτικών συστατικών (Hernandez, De-Bashan, & Bashan, 2006). Όσον αφορά τα ετερότροφα φύκια, έχουν καλλιεργηθεί σε διαφορετικά μέσα, όπως υδρολύματα από αγροτικά υπολείμματα και παρουσία οργανικών πηγών αζώτου. Τα απόβλητα τροφίμων που περιέχουν γλυκόζη, ελεύθερα αμινοξέα και φωσφορικό άλας μπορούν, συνεπώς, να είναι κατάλληλα για

ετεροτροφική καλλιέργεια μικροφυκών, να μειώσουν το κόστος της διεργασίας και να συμβάλουν στην υπερνίκηση ενός από τα σημαντικότερα οικονομικά εμπόδια για εφικτή μεγάλης κλίμακας διεργασία (Pleissner, Lam, Sun, & Lin, 2013).

Όσον αφορά το μικροφύκος *C. cohnii*, έχουν χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικά μέσα ζύμωσης υπολείμματα από παραγωγή αλεύρων από κραμβόσπορο και μελάσα για την παραγωγή του DHA. Τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα με εκείνα που λαμβάνονται από εμπορικά μέσα καλλιέργειας που περιέχουν γλυκόζη και εκχύλισμα ζύμης και συνοδεύονται από υψηλό κόστος. Το συνολικό κόστος της παραγωγής DHA θα μπορούσε να μειωθεί σημαντικά μέσω της ζύμωσης του *C. cohnii* σε αυτό το φθινό και φιλικό προς το περιβάλλον μέσο (Gong et al., 2015). Θεωρείται οικονομικά βιώσιμο να χρησιμοποιηθεί σιρόπι καλαμποκιού για την παραγωγή DHA ενώ ταυτόχρονα οι υδρολύσεις βιομάζας πιστεύεται ότι είναι καλή πρώτη ύλη για την παραγωγή λιπιδίων από τα κύτταρα. Βέβαια αυτή η προσέγγιση αντιμετωπίζει το ίδιο οικονομικό πρόβλημα με την παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, το οποίο είναι η εύρεση τρόπου παραγωγής σακχάρων από τη βιομάζα με επαρκώς χαμηλό κόστος. Ωστόσο, η χρήση οργανικών αποβλήτων παρέχει μια επιλογή για μεγάλη μείωση του κόστους παραγωγής, δεδομένου ότι έχουν αρνητική αξία (Chi, Zheng, Jiang, & Chen, 2011).

Ένα παράδειγμα ανεπιθύμητου προϊόντος στο οποίο έχει αποδειχθεί ότι ο *C. cohnii* μπορεί να αναπτυχθεί είναι τα πτητικά οργανικά οξέα (VFA). Αποτελούν προϊόν επεξεργασίας αποβλήτων και είναι το κύριο παραπροϊόν της σκοτεινής ζύμωσης, η οποία είναι μια ελπιδοφόρα διεργασία για την παραγωγή βιο-υδρογόνου. Πιο συγκεκριμένα, τα VFAs αποτελούνται κυρίως από οξικό οξύ στο οποίο μπορεί να καλλιεργηθεί το μικροφύκος. Συνδυάζοντας αυτή τη δυνατότητα με το αυξημένο ενδιαφέρον για ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, η αξιοποίηση των παραπροϊόντων της σκοτεινής ζύμωσης ως πηγή άνθρακα μπορεί να οδηγήσει σε μία οικονομικά βιώσιμη διεργασία (Chalima et al., 2017; Turon, Trably, Fouilland, & Steyer, 2016).

6. “Σκοτεινή Ζύμωση” (Dark Fermentation)

Η ανάγκη για παραγωγή βιο-υδρογόνου προήλθε από τις αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον λόγω της τρέχουσας εξάρτησης από τα ορυκτά καύσιμα. Αυτό οδήγησε στη διερεύνηση βιώσιμων, βιοαποδομήσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον εναλλακτικών λύσεων για την παραγωγή ενέργειας. Προς αυτή την κατεύθυνση πολλά ερευνητικά προγράμματα επικεντρώνονται στη χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Μεταξύ των βιοκαυσίμων, το υδρογόνο αποτελεί μια ελπιδοφόρα εναλλακτική λύση καθώς κατά τη διάρκεια της καύσης παράγεται νερό αντί για διοξείδιο του άνθρακα που είναι ένας από τους σημαντικότερους αέριους ρύπους (Kumar et al., 2018).

Για την παραγωγή υδρογόνου μπορούν να αξιοποιηθούν διαφορετικές πρώτες ύλες ενώ η βιομάζα και τα απόβλητα μπορούν να μετατραπούν σε υδρογόνο μέσω διαφόρων διεργασιών, όπως η αεριοποίηση, η πυρόλυση, η αναμόρφωση ατμού, η ζύμωση. Ωστόσο όλες οι μέθοδοι έχουν περιορισμένη απόδοση και οι τρέχουσες διεργασίες παραγωγής αποβαίνουν μη οικονομικά αποδοτικές. Μεταξύ αυτών των διεργασιών, η ζύμωση και

ιδιαίτερα η σκοτεινή ζύμωση (DF) αποδεικνύεται η πιο ευνοϊκή μέθοδος όσον αφορά την ενεργειακή απόδοση (Łukajtis et al., 2018).

Ωστόσο, εκτός από το υδρογόνο παράγονται διάφορα παραπροϊόντα που περιορίζουν την απόδοση του υδρογόνου και αυξάνουν το συνολικό κόστος. Ως εκ τούτου, η χρησιμοποίηση αυτών των δευτερευόντων προϊόντων για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας θα μπορούσε να μειώσει το κόστος της διεργασίας. Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία μπορεί να βελτιστοποιηθεί για την παραγωγή πτητικών οργανικών οξέων (VFA) ως το κύριο δευτερεύον προϊόν που μπορεί να αξιοποιηθεί ως πηγή άνθρακα για μικροοργανισμούς για την παραγωγή διαφόρων βιο-προϊόντων (Strazzera, Battista, Garcia, Frison, & Bolzonella, 2018).

6.1. Πρώτη ύλη

Διαφορετικές πρώτες ύλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή υδρογόνου μέσω της σκοτεινής ζύμωσης αλλά παρουσιάζει αυξημένο ενδιαφέρον η αξιοποίηση βιοαποβλήτων. Αυτή η ανάγκη προέρχεται από το γεγονός ότι έως και σήμερα τα απόβλητα δεν μπορούν να ανακυκλωθούν πλήρως και επιβαρύνουν την κοινωνία. Ειδικά τα υπολείμματα τροφίμων (FW) εκτιμάται ότι αντιστοιχούν στο ένα τρίτο της ποσότητας των παραγόμενων τροφίμων ενώ οδηγούν ταυτόχρονα στην απώλεια και άλλων πόρων που έχουν χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια τροφής και σε αξιοσημείωτες εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου. Μπορούν όμως να αποτελέσουν πρώτη ύλη για τη σκοτεινή ζύμωση προς παραγωγή βιο-υδρογόνου. Όλοι οι τύποι βιοαποβλήτων και βιομάζας είναι χρήσιμοι για DF εάν περιέχουν λιπίδια, υδατάνθρακες, κυτταρίνη και πρωτεΐνες, αλλά τα ρεύματα αποβλήτων με υψηλό οργανικό φορτίο είναι προτιμότερα για την ανάπτυξη βακτηρίων. Συγκρίνοντας τη χρήση των αποβλήτων ως τροφοδοσία σε σχέση με τις συμβατικές διεργασίες ζύμωσης που χρησιμοποιούν σάκχαρα, το οργανικό κλάσμα των βιοαποβλήτων μετατρέπεται σε βιώσιμα προϊόντα από ανανεώσιμες πηγή άνθρακα μειώνοντας το συνολικό φορτίο άνθρακα που αποτίθεται στο περιβάλλον (Dahiya et al., 2018; Łukajtis et al., 2018).

Το ευρωπαϊκό πρόγραμμα VOLATILE έχει ως στόχο να μετατρέψει τα αστικά στερεά βιοαπόβλητα και τα βιολογικά απόβλητα προερχόμενα από τις βιομηχανίες σε VFAs και να τα χρησιμοποιήσει ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη βιο-προϊόντων όπως βιοδιασπώμενα πολυμερή (PHA) και ωμέγα-3 λιπαρά οξέα. Ο μακροπρόθεσμος στόχος είναι η εφαρμογή αυτών των διαδικασιών στις υπάρχουσες εγκαταστάσεις αναερόβιας χώνευσης ("Volatile," n.d.). Πρόκειται για ένα υποσχόμενο μοντέλο κυκλικής οικονομίας όπου τα αρνητικής αξίας απόβλητα εισέρχονται στην οικονομική αλυσίδα ως νέα, πολύτιμα προϊόντα. Οι παραπάνω διεργασίες αποτελούν παραδείγματα βιοδιυλιστηρίων όπου τα απόβλητα ή η βιομάζα χρησιμοποιούνται ως ανανεώσιμοι πόροι για την παραγωγή βιοπροϊόντων ή βιοκαυσίμων υψηλής προστιθέμενης αξίας (Strazzera, Battista, Garcia, Frison, & Bolzonella, 2018).

6.2. Παραγωγή Υδρογόνου

Η σκοτεινή ζύμωση (DF) ή οξεογένεση είναι η διαδικασία όπου αναερόβια βακτήρια οδηγούν στην αποσύνθεση του οργανικού άνθρακα ενός υποστρώματος που αποσκοπεί στην παραγωγή υδρογόνου ως προϊόν. Διαφέρει από τη φωτο-ζύμωση λόγω της απουσίας φωτός κατά τη διάρκεια των βιοχημικών αντιδράσεων και προτιμάται λόγω της υψηλότερης αποδοτικότητας και του χαμηλότερου κόστους του εξοπλισμού. Παρουσία οξυγόνου, η δραστηριότητα της υδρογονάσης, του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή υδρογόνου, μειώνεται λόγω άλλων αντιδράσεων που συμβαίνουν ταυτόχρονα και απαιτούν τη μεταφορά ηλεκτρονίων (G. Kumar et al., 2018). Αν και η σκοτεινή ζύμωση είναι παρόμοια με την αναερόβια χώνευση, περιλαμβάνοντας τα στάδια της υδρόλυσης, της οξεογένεσης, ακετογένεσης, το στάδιο της μεθανογένεσης εμποδίζεται προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η παραγωγή μεθανόλης (Strazzera et al., 2018).

Ο κύριος περιοριστικός παράγοντας αυτής της διεργασίας είναι ο μεταβολικός περιορισμός της παραγωγής 4 mol H₂/mol γλυκόζης (Kumar et al., 2018). Επίσης, η αποδοτικότητα της παραγωγής υδρογόνου μειώνεται καθώς σχηματίζονται παράλληλα διάφορα τελικά προϊόντα, όπως μεθανόλη, βουτυρικό, οξικό και προπιονικό οξύ (VFAs), γαλακτικό οξύ. Οι αποδόσεις των προϊόντων εξαρτώνται κυρίως από τη σύσταση της τροφοδοσίας που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι τα υπολείμματα τροφίμων. Η σύσταση επηρεάζεται από την εποχή και το είδος των υλικών που διατίθενται. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τις αποδόσεις είναι το pH, το είδος των μικροοργανισμών, το μέσο ζύμωσης και η μερική πίεση του υδρογόνου. Ένα άλλο εμπόδιο για την υψηλή απόδοση υδρογόνου είναι η ανεπαρκής αποσύνθεση του υποστρώματος λόγω της χρήσης σύνθετων αποβλήτων τροφίμων ως πρώτης ύλης. Κατά συνέπεια, καθίσταται εμφανής η ανάγκη προεπεξεργασίας της πρώτης ύλης καθώς ενισχύεται η απόδοση του υδρογόνου και των VFAs (Dahiya et al., 2018; Łukajtis et al., 2018).

6.3. Παραγωγή VFAs

Τα κύρια δευτερεύοντα προϊόντα της σκοτεινής ζύμωσης είναι τα πτητικά οργανικά οξέα (VFAs) που είναι ανεπιθύμητοι και επίμονοι ρύποι. Ο όρος Πτητικά Οργανικά Οξέα (VFAs) χρησιμοποιείται για λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου, συνήθως αποτελούμενα από δύο έως έξι άτομα άνθρακα, όπως οξικό, βουτυρικό ή προπιονικό οξύ. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βιομηχανία, καθώς αποτελούν πρόδρομες ουσίες αλκοολών, παραφινών και άλλων χημικών ουσιών. Η σύνθεση τους πραγματοποιείται συνήθως μέσω πετροχημικών διεργασιών που όμως συνοδεύονται από επικίνδυνες περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Από την άλλη πλευρά, μπορούν να παραχθούν από απόβλητα τροφίμων, ιλύος και μια ποικιλία βιοαποδομήσιμων οργανικών αποβλήτων μέσω της διαδικασίας της σκοτεινής ζύμωσης, καθιστώντας τη διαδικασία πιο αποτελεσματική και κερδοφόρα τόσο από οικονομική όσο και από περιβαλλοντική άποψη (Chalima et al., 2017) (Noblecourt et al., 2018).

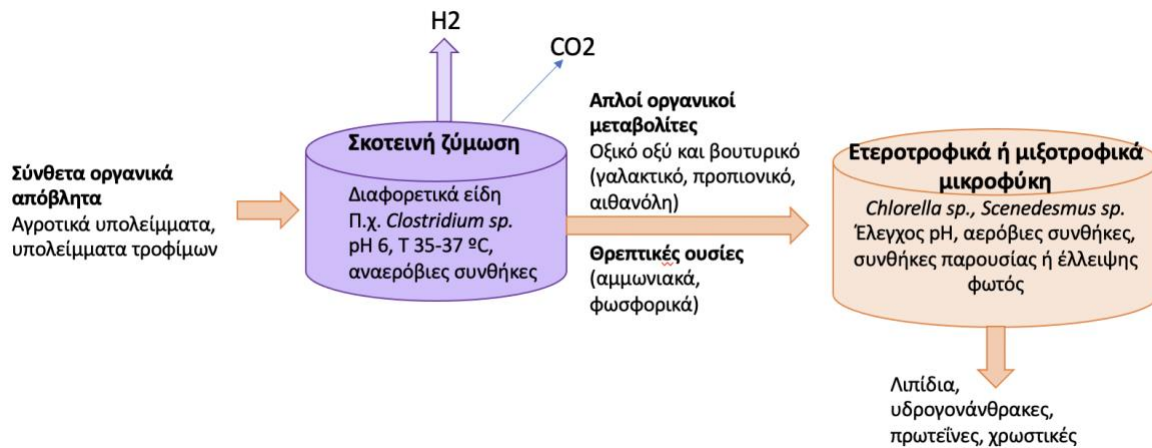
Πιο συγκεκριμένα μπορούν εύκολα να παραχθούν από όλους τους τύπους βιομάζας (χερσαία, θαλάσσια και υδρόβια) και να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοχημικών ενώσεων, προσφέροντας μια λύση για την αποτελεσματική διαχείριση τους (Chalima et al., 2017). Οι τρέχουσες προσπάθειες αξιοποίησης τους περιλαμβάνουν την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας ή υδρογόνου με μικροβιακά κύτταρα ηλεκτρόλυσης και

φωτοζύμωση που όμως απαιτούν εκτεταμένη επεξεργασία των αποβλήτων από DF. Επίσης, η αναερόβια χώνευση των VFAs παράγει μεθάνιο που είναι λιγότερο αποτελεσματική πηγή ενέργειας σε σύγκριση με το υδρογόνο. Ωστόσο, μπορούν να αξιοποιηθούν ως υποστρώματα για βιολογικά συστήματα για τη σύνθεση βιοκαυσίμων, βιοπολυμερών όπως πολύ-υδροξυαλκαλανικών (PHA) για εφαρμογές συσκευασίας και λιπιδίων. Αυτή η εφαρμογή τους παρουσιάζει μια ελπιδοφόρα προοπτική για την επίλυση καίριων περιβαλλοντικών ζητημάτων (Noblecourt et al., 2018).

6.4. Σύζευξη Σκοτεινής Ζύμωσης και Μεθόδων αξιοποίησης VFAs

Βάσει όσων αναφέρθηκαν η σύζευξη της σκοτεινής ζύμωσης με μια μέθοδο αξιοποίησης VFAs είναι απαραίτητη τόσο για οικονομικούς όσο και για περιβαλλοντικούς σκοπούς. Αυτό προκύπτει καθώς για να αποτελέσει μια οικονομικά βιώσιμη διεργασία απαιτείται απόδοση μετατροπής της τάξης του 60-80% που είναι σημαντικά υψηλότερη από την παρούσα απόδοση της. Έτσι, η ενσωμάτωση τεχνολογιών για τη μετατροπή των παραπροϊόντων σε άλλα προϊόντα προστιθέμενης αξίας θα μπορούσε να δικαιολογήσει το υψηλό συνολικό κόστος της διεργασίας. Συγκεκριμένα, τα VFAs μπορούν να μετατραπούν χημικά και βιολογικά σε βιοπροϊόντα, ενώ η ενσωμάτωση τους με ηλεκτρόδια παράγει βιοηλεκτρική ενέργεια (Μικροβιακή Κυψέλη Καυσίμου) (Dahiya et al., 2018; Łukajtis et al., 2018). Η σύζευξη της Σκοτεινής Ζύμωσης με την παραγωγή PHA από βιολογικά απόβλητα είναι ένας ελπιδοφόρος συνδυασμός που παρέχει ταυτόχρονα λύση σε διάφορα περιβαλλοντικά προβλήματα. Η έρευνα επικεντρώνεται επίσης στην ικανότητα των μικροφυκών να συνθέτουν βιοδραστικές χημικές ουσίες με πολλαπλές πιθανές βιομηχανικές χρήσεις όπως τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα (Chalima et al., 2017).

Το παραπάνω είναι εφικτό διότι τα υγρά απόβλητα από DF περιέχουν κυρίως οξικό οξύ και άλλα VFAs που μπορούν να αντικαταστήσουν τα «καθαρά» οργανικά οξέα και να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα για τις μικροαλγικές καλλιέργειες. Σύμφωνα με σχετικές έρευνες, ορισμένα μικροφύκη, ικανά να αναπτυχθούν ετεροτροφικά, μπορούν να χρησιμοποιούν VFAs ως πηγή άνθρακα. Τα μικροφύκη χρησιμοποιούν λιπαρά οξέα βραχείας αλυσού για την παραγωγή μεταβολιτών, όπως ακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσού (π.χ. ωμέγα-3 λιπαρά οξέα ή αραχιδονικό οξύ) ή καροτενοειδή. Στην περίπτωση αυτή, το πρώτο βήμα της διάσπασης των πηγών άνθρακα σε απλά σάκχαρα παραλείπεται, δεδομένου ότι τα VFAs παρέχουν στα μικροφύκη μια αλυσίδα άνθρακα έτοιμη να επιμηκυνθεί σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) (Turon et al., 2016).

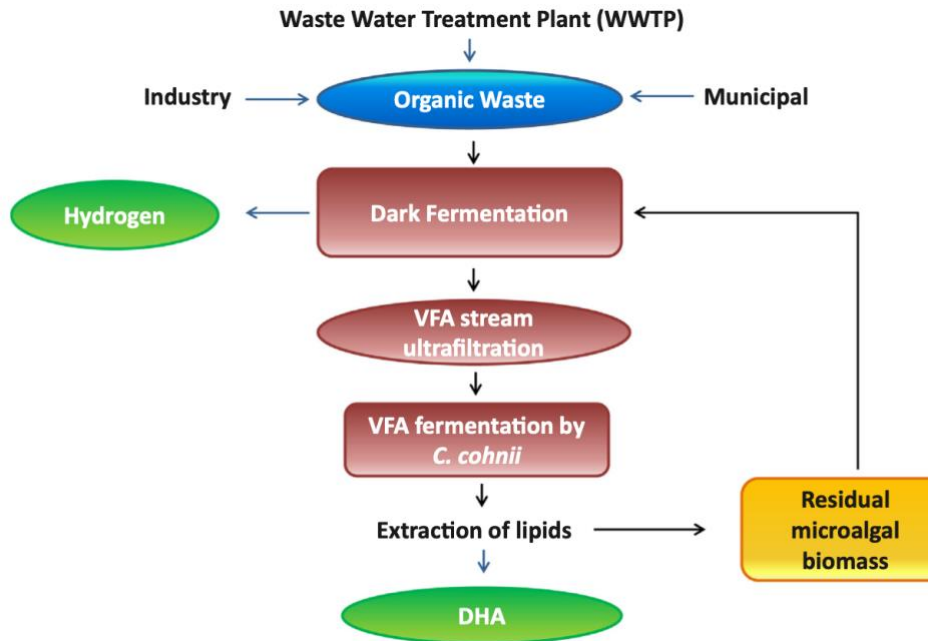


Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της σύζευξης DF με μικροαλγική ανάπτυξη για παραγωγή προϊόντων (Turon et al., 2016)

Αυτή η ικανότητα ορισμένων ειδών μικροαλγών οδηγεί σε προοπτικές βιομηχανικής παραγωγής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, ενώ αξιοποιούνται ως πρώτη ύλη επίμονοι ρυπαντές. Οι κύριοι μεταβολίτες των μικροφυκών είναι τα λιπίδια για την παραγωγή βιοντίζελ, τα μακράς αλυσίδας πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και οι χρωστικές ουσίες. Ανάμεσα στα διάφορα προϊόντα αρκετές χρωστικές ουσίες και PUFAs, όπως ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, είναι πολύτιμα προϊόντα, με σημαντική παρουσία στην αγορά τροφίμων και φαρμάκων. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη κατάλληλων τεχνικών ζύμωσης που χρησιμοποιούν VFAs και όχι μόνο θέτει μια λύση για την εξάλειψη αυτών των ρύπων, αλλά και δημιουργεί προοπτικές για μια οικονομικά προσιτή διαδικασία παραγωγής αυτών των χρήσιμων μεταβολιτών.

Μεταξύ των πολυάριθμων μικροφυκών, ο *C. cohnii* φαίνεται ως η πιο ελπιδοφόρα προοπτική για τη βιομετατροπή των VFAs σε ωμέγα-3, λόγω των υψηλών ρυθμών ανάπτυξης και της υψηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια όταν καλλιεργείται με οξικό οξύ ως υπόστρωμα, δεδομένου ότι τα υπόλοιπα VFAs δε δρουν ανασταλτικά. Οι Chalima et al. (2019) ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν ότι ο *C. Cohnii* θα μπορούσε να χρησιμοποιήσει προπιονικό ή βουτυρικό οξύ ως πηγή άνθρακα σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ άλλα μικροφύκη έχουν δείξει αργή και επιλεκτική συσσώρευση βουτυρικού οξέος. Επίσης, καθώς η συγκέντρωση όλων των οξέων στα λύματα DF είναι χαμηλότερη από τη μέγιστη συγκέντρωση ανάπτυξης που εξετάστηκε εκτιμήθηκε ότι δεν παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης ή παρεμπόδιση από αυτά τα οξέα. Σε όλες τις περιπτώσεις, το οξικό οξύ φαίνεται να είναι το προτιμώμενο υπόστρωμα και μετά από πλήρη εξάντληση του οξικού άλατος, τα μικροφύκη κατανάλωναν τα υπόλοιπα διαθέσιμα οργανικά οξέα στο μέσο καλλιέργειας.

Βέβαια η βελτιστοποίηση των συνολικών συνθηκών ζύμωσης είναι αναγκαία έτσι ώστε η απόδοση των λιπιδίων να μεγιστοποιηθεί. Οι πιο κρίσιμοι παράγοντες που επιδρούν σημαντικά στην απόδοση είναι η θερμοκρασία, το pH και το διαλυμένο οξυγόνο. Επίσης, η δυνατότητα αύξησης κλίμακας της όλης διεργασίας και το ενεργειακό είναι κρίσιμοι παράγοντες για την παραγωγή ωμέγα-3 λιπαρών οξέων από μικροφύκη σε βιομηχανική κλίμακα (Chalima, Hatzidaki, Karnaouri, & Topakas, 2019; Perez-Garcia et al., 2011).



Εικόνα 11: Σύζευξη DF για παραγωγή βιο-υδρογόνου και ζύμωση *C. cohnii* για παραγωγή ωμέγα-3 λιπαρών (Chalima et al., 2019)

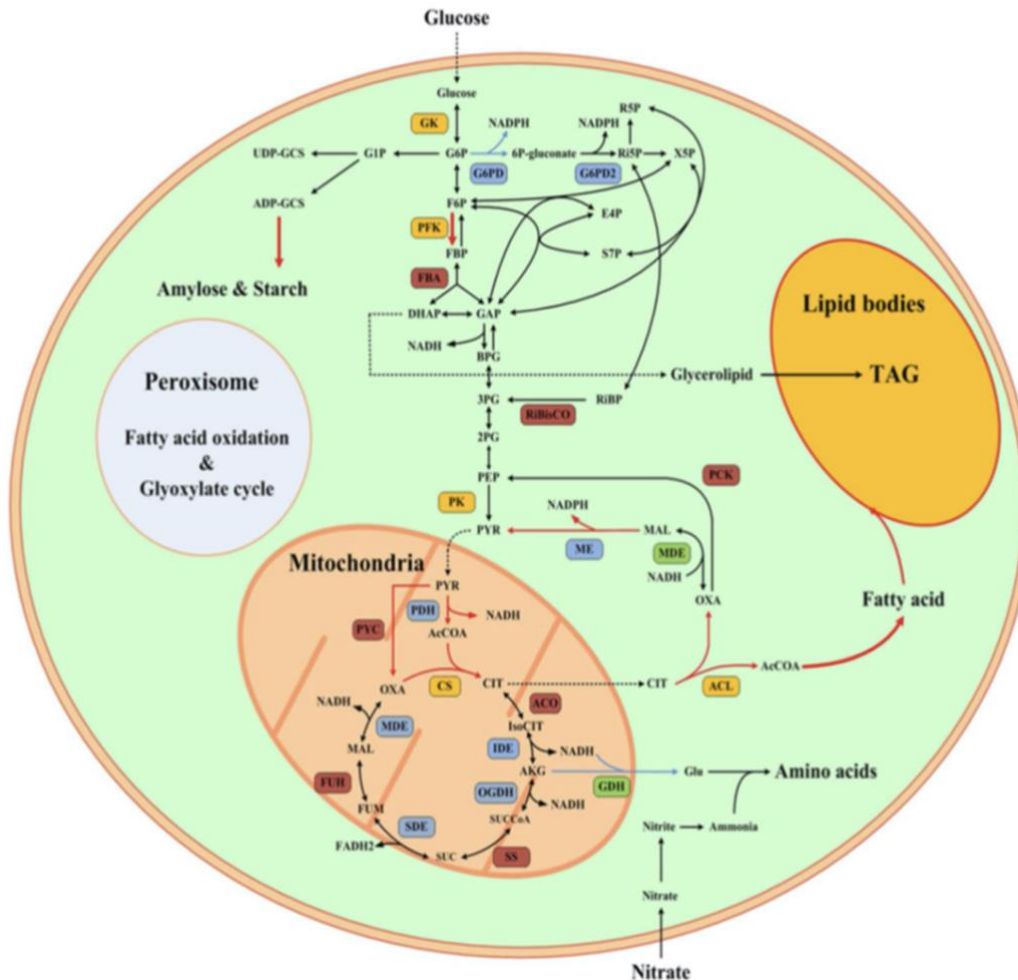
7. Παράγοντες Ανάπτυξης *Cryptocodinium cohnii*

Εκτός από τη σημαντική επίδραση της πηγής άνθρακα στην παραγωγή λιπιδίων και στην περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη των κυττάρων και την παραγωγή λιπιδίων. Αυτοί περιλαμβάνουν τα υπόλοιπα σημαντικά θρεπτικά στοιχεία όπως το άζωτο και η αλατότητα, καθώς και τις συνθήκες ανάπτυξης όπως η θερμοκρασία ανάπτυξης, το pH και η ανάδευση. Έτσι, καθίσταται αναγκαία η διερεύνηση των βέλτιστων συνθηκών καλλιέργειας ώστε να επιτευχθεί μεγιστοποίηση της παραγωγής ωμέγα-3 λιπιδίων από τον *C. cohnii* για να υπάρξει προοπτική για εφαρμογή της διεργασίας σε βιομηχανική κλίμακα.

7.1. Πηγή Αζώτου

Πέρα από τον άνθρακα, το άζωτο αποτελεί σημαντικό στοιχείο για την ανάπτυξη των φυκών συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της βιομάζας και αντιπροσωπεύοντας το 1 έως 10% του ξηρού της βάρους. Στα μικροφύκη ο μεταβολισμός του άνθρακα και του αζώτου δεν είναι ανεξάρτητοι επειδή μοιράζονται τον άνθρακα που παρέχεται στον μικροοργανισμό είτε απευθείας από την αναπνοή σταθερού CO₂ (αυτότροφη ανάπτυξης) είτε από την αφομοίωση οργανικού άνθρακα (ετεροτροφική ανάπτυξη). Επίσης μοιράζονται την ενέργεια που παράγεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος και στη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το άζωτο έχει πρωταρχικό ρόλο στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και αμινοξέων. Η πρωτογενής αφομοίωση του ανόργανου αζώτου (αμμώνιο) για το σχηματισμό αμινοξέων απαιτεί το σχηματισμό αλυσίδων άνθρακα (ανθρακικού σκελετού) με τη μορφή κετο-οξέων (2-οξαλογλουταρικών και οξαλοξικού) και ενέργεια με τη μορφή ATP και NADPH για τη σύνθεση των αμινοξέων. Τόσο στα αυτοτροφικά όσο και

ετεροτροφικά αναπτυσσόμενα κύτταρα, τα κετο-οξέα, το ATP, και το NADPH παρέχονται κυρίως από τον κύκλο του κιτρικού οξέος (Perez-Garcia et al., 2011).



Εικόνα 12: Μεταβολικά μονοπάτια άνθρακα και αζώτου στο μικροφύκος *C. cohnii* (Pei et al., 2017)

Το άζωτο έχει σημαντική θετική επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων και αρνητική επίδραση στη συσσώρευση λιπιδίων. Ακόμη τα ποσοστά αναπνοής φαίνεται να περιορίζονται έμμεσα από την προσθήκη ανόργανου αζώτου όταν ο άνθρακας δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα. Τα μικροφύκη είναι σε θέση να αφομοιώσουν ποικίλες πηγές αζώτου, κυρίως αμμωνία (NH_4^+), νιτρικά άλατα (NO_3^-), και ουρία, καθώς επίσης και εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη, αμινοξέα, και πουρίνες (Perez-Garcia et al., 2011). Για το μικροφύκος *C. cohnii* η υψηλότερη παραγωγικότητα βιομάζας και το υψηλότερο ποσοστό λιπιδίων και DHA παρατηρήθηκε για καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε NaNO_3 συγκρινόμενα με θειικό αμμώνιο, ανθρακικό αμμώνιο και ουρία για καλλιέργειες με πηγή άνθρακα γλυκόζη (Safdar, Shamoosh, et al., 2017).

Το άζωτο φαίνεται να επιδρά σημαντικά στην ανάπτυξη καθώς έλλειψη αζώτου μπορεί να οδηγήσει σε αργή αφομοίωση άνθρακα, σε καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών, σε απώλεια βιομάζας και άλλες αλλαγές στην κυτταρική σύσταση. Παρουσία αζώτου το μικροφύκος τείνει να παράγει ορισμένα προϊόντα ενώ απουσία αζώτου μπορεί να αυξηθεί η παραγωγή άλλων. Στην περίπτωση που το άζωτο είναι επαρκές συντίθενται περισσότερα κορεσμένα λιπαρά ενώ υπό έλλειψη αζώτου σχηματίζονται περισσότερα ακόρεστα. Για

παράδειγμα, η παραγωγή λιπιδίων και ορισμένων μεταβολιτών, όπως τα καροτενοειδή στα μικροφύκη, μπορεί να αυξηθεί υπό συνθήκες που προκαλούν στρες στα κύτταρα. Ο σχηματισμός λιπιδίων ενισχύεται υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου στα μικροφύκη ενώ η μεταβολή της αναλογίας της μάζας του άνθρακα προς του αζώτου C/N στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας μπορεί να αλλάξει το προφίλ των λιπαρών οξέων από κορεσμένο σε ακόρεστο και από τη σύνθεση μεμβρανικών λιπιδίων να παράγονται ουδέτερα λιπαρά. Η επίδραση του λόγου C/N οφείλεται και στο γεγονός ότι επηρεάζει τη δράση του ενζύμου αναγωγή του νιτρικού, σημαντικό ένζυμο του μεταβολικού μονοπατιού του αζώτου (Jiang & Chen, 2000b; Pei et al., 2017; Rumiani, Jalili, & Amrane, 2018).

Για παράδειγμα στην περίπτωση ανάπτυξη του *C. cohnii* σε υπόστρωμα γλυκόζης παρατηρήθηκε ότι ένας χαμηλός δείκτης C/N ευνόησε το σχηματισμό ακόρεστων λιπαρών οξέων. Χαμηλός δείκτης C/N συνεπάγεται χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας. Στα κύτταρα αρχικά η γλυκόζη χρησιμοποιείται σαν πηγή άνθρακα για ανάπτυξη των κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους. Αφού η γλυκόζη περιοριστεί ή εξαντληθεί, η πρόσληψη άνθρακα συνεχίζεται και συσσωρεύεται ως λιπίδια. Σε υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης, δηλαδή σε υψηλότερο λόγο C/N, περιορίστηκε η σύνθεση ενώσεων που περιέχουν άζωτο, όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα. Η ανάπτυξη αναστάλη και τα κύτταρα άρχισαν να συσσωρεύουν λιπίδια. Στο *C. cohnii*, τα λιπίδια που αποθηκεύονται είναι κυρίως κορεσμένα. Από την άλλη πλευρά, σε υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης παρουσιάζονται αυξημένες ανάγκες για οξυγόνο για να καλυφθούν οι ανάγκες ανάπτυξης για το μεγάλο πληθυσμό κυττάρων στην καλλιέργεια (Jiang & Chen, 2000a).

Με βάση αυτή την επίδραση του λόγου C/N στα κύτταρα χρησιμοποιείται συχνά η καλλιέργεια δύο σταδίων για να επιτευχθεί αύξηση των λιπαρών και εν συνεχεία συσσώρευση λιπιδίων. Στο πρώτο στάδιο τα κύτταρα καλλιεργούνται παρουσία επαρκούς ποσότητας της πηγής αζώτου προκειμένου να αναπτυχθεί η βιομάζα. Στη συνέχεια, κατά το δεύτερο στάδιο εφαρμόζονται συνθήκες έλλειψης αζώτου προκειμένου να ευνοηθεί η συσσώρευση λιπιδίων με μεταφορά των κυττάρων σε άλλο θρεπτικό μέσο ή αλλαγή της τροφοδοσίας της καλλιέργειας. Μία εναλλακτική μέθοδος αφορά καλλιέργεια ενός σταδίου όπου προστίθεται η επιθυμητή ποσότητα αζώτου για να αναπτυχθούν αρχικά τα κύτταρα στα επιθυμητά επίπεδα και κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας η ποσότητα αυτή μειώνεται έως να επιτευχθεί η απαιτούμενη συνθήκη έλλειψης αζώτου. Αυτό όμως απαιτεί συνεχή έλεγχο της συγκέντρωσης του αζώτου ώστε να παραμένει αρχικά στα απαιτούμενα επίπεδα για την ανάπτυξη (Minhas, Hodgson, Barrow, & Adholeya, 2016).

7.2. Αλατότητα

Η αλατότητα του μέσου καλλιέργειας επίσης επηρεάζει την ανάπτυξη των φυκών και κατ'επέκταση την απόδοση των επιθυμητών προϊόντων. Γενικότερα, αλλαγές στην αλατότητα επηρεάζουν τους οργανισμούς με τρεις τρόπους: προκαλούν (α) οσμωτικό στρες με άμεσο αντίκτυπο στο κυτταρικό δυναμικό του νερού, β) ιονικό στρες που προκαλείται από την αναπόφευκτη πρόσληψη ή απώλεια ιόντων, η οποία ταυτόχρονα αποτελεί μέρος του μηχανισμού προσαρμογής των κυττάρων και γ) αλλαγές στη συγκέντρωση των ιόντων στα κύτταρα λόγω της επιλεκτικής διαπερατότητας των ιόντων μέσω της κυτταρικής μεμβράνης (Kirst, 1989).

Ο *C. cohnii* ως θαλάσσιο μικροφύκος για να αναπτυχθεί χρειάζεται υψηλή αλατότητα ενώ η συγκέντρωση αλάτων έχει επίδραση στη συσσώρευση λιπιδίων. Πιο συγκεκριμένα στα κύτταρα του *C. cohnii* παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού DHA με την αύξηση της συγκέντρωσης αλάτων (NaCl). Αυτό συμβαίνει μέχρι όμως η τιμή της αλατότητας να φτάσει μία μέγιστη τιμή ενώ περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης δεν οδηγεί σε περαιτέρω αύξηση στο ποσοστό DHA. Αυτό προκύπτει εφόσον η αλατότητα επηρεάζει επίσης φυσιολογικούς και βιοχημικούς μηχανισμούς στα κύτταρα και μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της περιεκτικότητας σε λιπίδια λόγω μεταβολών στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. Δεδομένου ότι τα άγλη προέρχονται κυρίως από υδατικά περιβάλλοντα στα οποία ανάλογα με την περιοχή η αλατότητα ποικίλει, είναι ανθεκτικά σε διαφορετικές συνθήκες αλατότητας. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία στρες στα κύτταρα προκαλώντας την αυξανόμενη συνολική συσσώρευση λιπιδίων ως ενεργειακό απόθεμα έως ότου επανέλθουν οι ευνοϊκές συνθήκες. Επιπλέον έχουν παρατηρηθεί υψηλότερα επίπεδα κορεσμένων λιπαρών οξέων σε υψηλές συνθήκες αλατότητας και μείωση των ακόρεστων ως μακροχρόνιος μηχανισμός προσαρμογής της κυτταρικής μεμβράνης.

Όσο πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσουν παρεμπόδιση της ανάπτυξης (Sibi, Shetty, & Mokashi, 2016). Αυξάνοντας την αλατότητα με την αύξηση της συγκέντρωσης NaCl πάνω από τη βέλτιστη τιμή παρατηρείται μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης και αύξηση της φάσης υστέρησης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ανάγκη προσαρμογής των κυττάρων ως απάντηση στην αυξημένη αλατότητα ή να αποδοθεί στην ύπαρξη υπερβολικών ιόντων στα κύτταρα. Αυτά τα φαινόμενα προσαρμογής έχουν αναφερθεί ότι συνοδεύονται από σταδιακές μεταβολές του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων έως ότου φτάσουν σε μια νέα σταθερή κατάσταση. Η μεγαλύτερη φάση υστέρησης και ο χαμηλότερος ρυθμός ανάπτυξης σε υψηλότερες ή χαμηλότερες συγκεντρώσεις αλάτων μπορεί να οφείλονται σε καθυστέρηση της κυτταρικής διαίρεσης λόγω αναστολής της σύνθεσης του DNA (Jiang & Chen, 2000a; Rumiani et al., 2018).

Όπως και οι υπόλοιπες συνθήκες, η βέλτιστη συγκέντρωση αλάτων είναι διαφορετική για κάθε είδος μικροφύκους. Σύμφωνα με de Swaaf et al. (1999), για βέλτιστη ανάπτυξη *C. cohnii* απαιτείται συγκέντρωση θαλασσινών αλάτων $17,8 \text{ g L}^{-1}$, η οποία είναι περίπου το ήμισυ του μέσου όρου αλατότητα θαλασσινού νερού. Αναστολή της ανάπτυξης τόσο σε χαμηλά όσο και σε υψηλά επίπεδα αλατότητας ($50 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$) έχουν αναφερθεί τόσο σε αναδεδυόμενες όσο και σε στατικές καλλιέργειες του *C. cohnii*. Η παρατήρηση της αναστολής της ανάπτυξης λόγω σημαντικής μεταβολής της αλατότητας είναι σύμφωνη με τα προηγούμενα δεδομένα (Mendes et al., 2009). Σε περίπτωση όμως που πρόκειται για βιομηχανική παραγωγή λιπαρών, η συγκέντρωση άλατος θα πρέπει κατά προτίμηση να είναι όσο το δυνατόν πιο χαμηλή προκειμένου να αποφευχθούν προβλήματα διάβρωσης του εξοπλισμού (Martin E. de Swaaf, de Rijk, Eggink, & Sijtsma, 1999).

7.3. Συνθήκες Καλλιέργειας

7.3.1. Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροφυκών και επηρεάζει άμεσα τις βιοχημικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της φωτοσύνθεσης. Αύξηση της θερμοκρασίας εντός του βέλτιστου εύρους, αυξάνει εκθετικά την ανάπτυξη των φυκών, αλλά η αύξηση ή η μείωση της θερμοκρασίας πέρα από το βέλτιστο σημείο καθυστερεί ή ακόμα και σταματά την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα των φυκών. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης όμως είναι διαφορετική για κάθε είδος με το βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας για τα περισσότερα είδη να είναι ανάμεσα σε 20 - 30 °C. Ανάπτυξη καλλιέργειες σε συνθήκες που δεν είναι οι βέλτιστες συνεπάγεται υψηλές απώλειες βιομάζας και κατ' επέκταση πιθανή απώλεια προϊόντων (Khan, Shin, & Kim, 2018). Για την πλειονότητα των στελεχών, όταν καλλιεργούνται σε θερμοκρασίες κάτω από τα ανώτερα όρια τους και χωρίς περιορισμό θρεπτικών συστατικών, ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης μπορεί να περιγραφεί αποκλειστικά ως συνάρτηση της θερμοκρασίας εφαρμόζοντας μια εξίσωση τύπου Arrhenius. Αυτό υποδηλώνει ότι μια υψηλότερη θερμοκρασία μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης. Έχει αναφερθεί ότι η αύξηση κυττάρων *C. cohnii* αναστέλλεται πλήρως όταν η θερμοκρασία καλλιέργειας είναι κάτω από 14°C ή επάνω από 31°C (Jiang & Chen, 2000b).

Εκτός όμως από την επίδραση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, η θερμοκρασία επιδρά σημαντικά και στο προφίλ των λιπαρών οξέων. Όταν η θερμοκρασία είναι κάτω από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για το μικροφύκος, μεταβολίζονται περισσότερα ακόρεστα λιπαρά οξέα και το αντίστροφο αποτέλεσμα συμβαίνει σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Η μείωση της θερμοκρασίας κατά 10 - 15 °C οδηγεί σε μείωση της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Για να αντισταθμιστεί η μείωση της ρευστότητας, προκαλείται υπερέκφραση των γονιδίων που εκφράζουν τα ένζυμα desaturases που προωθεί τον αποκορεσμό των λιπιδίων της μεμβράνης. Ωστόσο, δεν προκύπτει καμία μεταβολή στη συνολική παραγωγή λιπαρών οξέων (Perez-Garcia et al., 2011).

Όσον αφορά το μικροφύκος *C. cohnii* η βέλτιστη θερμοκρασία για την καλλιέργεια του βρέθηκε εκείνη των 27°C. Οι Jiang και Chen (2000b) μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας στο *C. cohnii* ATCC 30556 και παρατήρησαν ότι το μικροφύκος μεγάλωσε ικανοποιητικά σε όλο το φάσμα των μελετημένων θερμοκρασιών, 15 - 30 °C. Δηλαδή μπορεί να πραγματοποιηθεί καλλιέργεια του σε οποιαδήποτε θερμοκρασία διατήρησης της ζωής των κυττάρων. Γενικά, το μικροάλγος *C. cohnii* αυξάνεται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 15 έως 34 °C. Όμως, τα στελέχη που αναπτύσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες προτιμώνται για βιομηχανικές εφαρμογές λόγω της βελτιωμένης ψυκτικής ικανότητας σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Mendes et al., 2009).

Ωστόσο, κατά τη διατήρηση της καλλιέργειας στους 30 – 34°C, παρατηρήθηκε μια ανώμαλη διαίρεση των κυττάρων και μεγαλύτερος απαιτούμενος χρόνος παραγωγής. Όπως αναμενόταν, ο ρυθμός ανάπτυξης του *C. cohnii* αυξήθηκε καθώς η θερμοκρασία αυξήθηκε εντός του εύρους των θερμοκρασιών που επιτρέπουν την ανάπτυξη του. Η συγκέντρωση βιομάζας αυξήθηκε παράλληλα με τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και επηρεάστηκε από τη θερμοκρασία της καλλιέργειας. Αυτό συνέβη καθώς οι χαμηλές θερμοκρασίες οδήγησαν σε

μείωση της ενζυμικής ενεργότητας κατά τη γλυκόλυση και τον κύκλο του krebs και κατά συνέπεια ο μεταβολισμός των πηγών άνθρακα μειώθηκε. Έτσι για μελέτη με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, επηρεάστηκε τόσο ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος όσο και ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροφύκου (Jiang & Chen, 2000b).

7.3.2. pH

Εφόσον πρόκειται για σύστημα έμβιων οργανισμών πέρα από τη θερμοκρασία η τιμή του pH αποτελεί μία καθοριστική ιδιότητα. Ο λόγος είναι ότι ακραίες μεταβολές pH μπορούν να οδηγήσουν σε μειωμένη δραστηριότητα ενζύμων, μετουσίωση πρωτεϊνών και ακόμα και να επιφέρουν ακόμα και κυτταρικό θάνατο. Το pH του περιβάλλοντος επηρεάζει τις ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης και την κροκίδωση της βιομάζας. Μια τέτοια επίδραση μεταβάλλει επίσης τη διαπερατότητα των ιόντων, των οξέων και των βάσεων στα κύτταρα, έχει επιπτώσεις στο βιοχημικό μεταβολισμό και την αναδίπλωση των μακρομορίων. Επίσης επηρεάζει και τις τιμές k_m που εκφράζουν τη συγγένεια των ενζύμων με το υπόστρωμα. Αλλά η τιμή pH στην οποία τα κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη ανάπτυξη και βέλτιστη αποδοτικότητα είναι διαφορετική για κάθε είδος οργανισμού και ομοίως για κάθε είδος μικροφύκου. Τα περισσότερα φύκη είναι ευαίσθητα στο pH και αυξάνονται ικανοποιητικά σε τιμή pH από 6 έως 8.76 ενώ λίγα είναι ικανά να ανθίστανται σε μεγάλες μεταβολές (Jiang & Chen, 2000a; Khan et al., 2018).

Εκτός όμως από το είδος του μικροφύκου, η τιμή pH της καλλιέργειας και η βέλτιστη τιμή εξαρτάται και από την πηγή άνθρακα του μέσου καλλιέργειας. Σύμφωνα με τους Jiang & Chen, (2000a) για καλλιέργεια *C. cohnii* με υπόστρωμα γλυκόζη παρατηρήθηκε μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης και συγκέντρωση ξηρής μάζας κυττάρων για τιμή pH 7.2 στο μέσο καλλιέργειας. Σε ακραίες τιμές pH (4 και 10) παρουσιάστηκε σημαντικά μειωμένη ανάπτυξη. Για πηγή άνθρακα οξικό οξύ βρέθηκε η τιμή pH 6.6 ως βέλτιστη με το εύρος τιμών 6.0 - 7.0 να είναι το καταλληλότερο για να χρησιμοποιηθεί σε καλλιέργεια που βρίσκεται στην εκθετική φάση (Mendes et al., 2009).

7.3.3. Ανάδευση

Η ανάδευση αποτελεί μια συνθήκη λειτουργίας που είναι σημαντική για την καλλιέργεια μικροοργανισμών σε βιοαντιδραστήρες καθώς επηρεάζει τη μεταφορά οξυγόνου. Αν και έχει αναφερθεί ότι η μηχανική ανάδευση έχει αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη στα δινομαστιγωτά, σχετικά υψηλές ταχύτητες έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για το μικροφύκος *C. cohnii* σε ανακινούμενη φιάλη (150 grm) και σε καλλιέργειες βιοαντιδραστήρων. Η αύξηση της ταχύτητας ανάδευσης συνέβαλλε στη βελτίωση της καλλιέργειας του μικροφύκου. Οι De Swaaf et al. (2003c) ανέφεραν ότι σε υψηλής πυκνότητας αντιδραστήρες ημιδιαλείποντος έργου για την παραγωγή DHA, έντονη ανάδευση είναι απαραίτητη για να διατηρηθεί ένα επαρκές επίπεδο οξυγόνου κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας λόγω υψηλής πυκνότητας κυττάρων (Mendes et al., 2009). Η αυξημένη ανάδευση έχει σαν αποτέλεσμα όχι μόνο επαρκή αερισμό αλλά και ομοιόμορφη κατανομή θρεπτικών συστατικών στα καλλιεργούμενα κύτταρα διευκολύνοντας τη μεταφορά μάζας. Ωστόσο, πολύ υψηλός ρυθμός ανάδευσης μπορεί να προκαλέσει διάρρηξη των κυττάρων (M E De Swaaf, Pronk, & Sijtsma, 2003; Minhas et al., 2016).

7.4. Παροχή Οξυγόνου

Η ανάδευση επηρεάζει μεν τη μεταφορά οξυγόνου αλλά η παροχή οξυγόνου καθορίζει αν η ποσότητα αέρα στον αντιδραστήρα επαρκεί για την ανάπτυξη. Δεδομένου ότι το *C. cohnii* είναι ένας αερόβιος οργανισμός, η καλλιέργεια απαιτεί μια αποτελεσματική μεταφορά οξυγόνου στο υγρό της καλλιέργειας. Τα μικροαλγικά κύτταρα με ενισχυμένη προσφορά O_2 , πολλαπλασιάζονται ταχύτερα από τα κύτταρα που καλλιεργούνται υπό περιορισμένη προσφορά οξυγόνου. Στις καλλιέργειες βιοαντιδραστήρων *C. cohnii*, τα επίπεδα οξυγόνου θα πρέπει να διατηρούνται σε επίπεδο διαλυμένου οξυγόνου τουλάχιστον σε τιμή 10% επί της τιμής κορεσμού του αέρα (Mendes et al., 2009). Για παράδειγμα έχει παρατηρηθεί ότι σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης είναι απαραίτητο περισσότερο οξυγόνο, άρα αυξημένη παροχή οξυγόνου για να καλύψει τις ανάγκες του μεγάλου πληθυσμού κυττάρων στην καλλιέργεια. Κάτω από συνθήκες μειωμένου οξυγόνου η δραστηριότητα του ενζύμου desaturase επηρεάζεται σημαντικά. Όταν το μικροφύκος *C. cohnii* αυξήθηκε σε συνθήκες χαμηλής παροχής οξυγόνου, πραγματοποιήθηκε συσσώρευση μικρής αλυσίδας κορεσμένων λιπαρών οξέων αντί των ακόρεστων λιπαρών οξέων (Jiang & Chen, 2000a).

Βέβαια, η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου (DO) εξαρτάται και από την θερμοκρασία του μέσου καλλιέργειας. Σύμφωνα με τις οδούς βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων, η εισαγωγή ενός διπλού δεσμού είναι μια οξειδωτική διαδικασία που απαιτεί μοριακό οξυγόνο. Είναι γνωστό ότι η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου σε χαμηλότερες θερμοκρασίες είναι υψηλότερη από αυτή σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Μια άλλη εξήγηση για τη θετική επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας στην αύξηση του μοριακού επιπέδου οξυγόνου στα κύτταρα είναι η προώθηση της δραστηριότητας των ντεσατουρασών και ελονγκάσων κατά τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων. Κατά συνέπεια στις χαμηλότερες θερμοκρασίες ένα μεγαλύτερο ποσό μοριακού οξυγόνου είναι διαθέσιμο που επιτρέπει στα οξυγόνο-εξαρτώμενα ένζυμα να καταλύσουν τον αποκορεσμό των λιπαρών οξέων. Η μετατροπή κορεσμένων ή μονοακόρεστων λιπαρών οξέων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι αποτελεσματική εάν η παροχή DO είναι επαρκής. Οι μεταβολές στο ποσοστό DHA μπορεί επίσης να οφείλονται στις μεταβολές της συγκέντρωσης DO (Jiang & Chen, 2000b; Perez-Garcia et al., 2011)

8. Οικονομική Αξιολόγηση

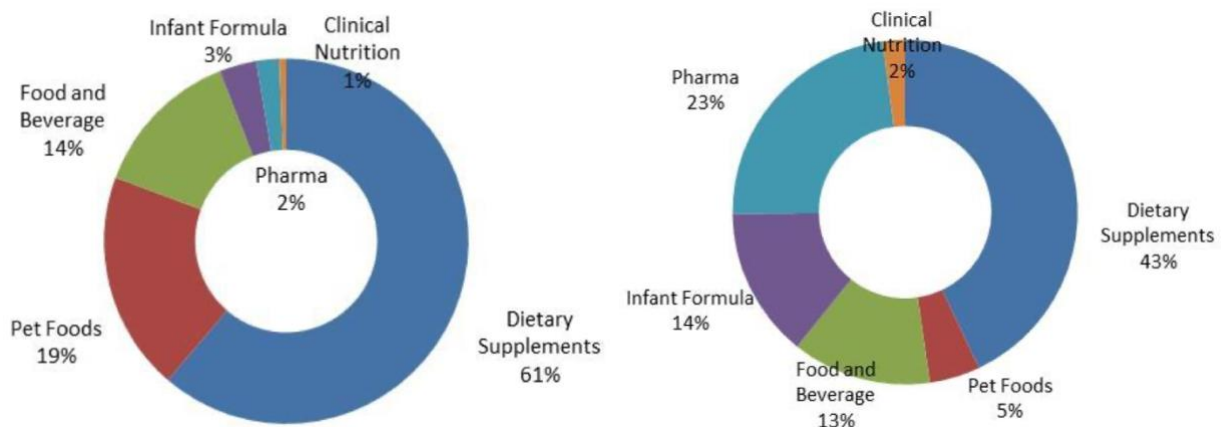
Προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα της παραγωγής ωμέγα-3 λιπαρών οξέων από *C. cohnii* σε μεγάλη κλίμακα, είναι απαραίτητο να αξιολογηθεί οικονομικά η διεργασία. Κατά την παραγωγή προϊόντων προερχόμενων από καλλιέργεια μικροοργανισμών, το κόστος των μέσων καλλιέργειας αποτελεί σημαντικό παράγοντα αύξησης του τελικού κόστους του προϊόντος. Προς το παρόν, η βιομηχανική παραγωγή ετεροτροφικών μικροφυκών παρεμποδίζεται από το υψηλό οικονομικό και περιβαλλοντικό κόστος της γλυκόζης, που χρησιμοποιείται συνήθως ως κύρια πηγή άνθρακα. Το κόστος της ανέρχεται περίπου σε 0,71 €/kg γλυκόζης και το ελάχιστο κόστος του υποστρώματος ανέρχεται σε 1,42 €/ kg μικροφύκους. Το κόστος της αιθανόλης αναμένεται να είναι υψηλότερο από εκείνο της γλυκόζης αφού μπορεί να προέλθει από ζύμωση γλυκόζης. Ακόμη, αιθανόλη προερχόμενη από πρώτη ύλη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή τροφής, η οποία θα ήταν κατάλληλη για την παραγωγή DHA κατάλληλου για τροφή, έχει μεγαλύτερο κόστος από το

οξικό οξύ. Συγκεκριμένα, για ανάπτυξη σε αιθανόλη υπολογίστηκε ότι είναι 3 με 5 φορές ακριβότερο το παραγόμενο DHA από το DHA προερχόμενο από ψάρια.

Ως εκ τούτου, η εύρεση φθηνής πρώτης ύλης με καλή παραγωγικότητα DHA για τη ζύμωση του μικροφύκους παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Η χρήση εναλλακτικών υποστρωμάτων προερχόμενα από απόβλητα ή παραπροϊόντα άλλων διεργασιών όπως τα VFAs, το παραπροϊόν της σκοτεινής ζύμωσης, είναι μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την ανάπτυξη μιας οικονομικά εφικτής διεργασίας και την προώθησης της κυκλικής οικονομίας (Chalima et al., 2017; Rumiani et al., 2018; Voort, Spruijt, Potters, & Elissen, 2017)

Αυτή η προσέγγιση αποσκοπεί στη δημιουργία ενός βιώσιμου βιοδιυλιστηρίου, ωφέλιμο τόσο περιβαλλοντικά όσο και οικονομικά, με την εφαρμογή βιοδιεργασιών για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων από μικροφύκη που αξιοποιούν απόβλητα ή δευτερεύοντα προϊόντα και μειώνουν το κόστος όλης της διαδικασίας. Με τον τρόπο αυτό, το κόστος της συνολικής διαδικασίας μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά χάρη στην ταυτόχρονη παραγωγή βιοενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως τα ωμέγα-3 λιπαρά, τα καροτενοειδή, οι πρωτεΐνες κ.λπ. Στόχος της κυκλικής βιοοικονομίας είναι η μηδενική παραγωγή υπολειμμάτων και η παραγωγή προϊόντων που μπορούν να προσθέσουν μεγαλύτερη αξία στην παραγωγική διαδικασία. Έτσι, οδηγούν σε μια οικονομικά βελτιωμένη διεργασία και έχουν σημαντική αξία σε τέσσερις τομείς της κοινωνίας: την ανθρώπινη υγεία, την ενέργεια χρησιμοποιούμενη στις μεταφορές, την ασφάλεια των τροφίμων και του περιβάλλοντος (da Silva, Moniz, Silva, & Reis, 2019).

Εκτός όμως από το υψηλό κόστος της πηγής άνθρακα σημαντική επίδραση στο κόστος έχει και η πηγή αζώτου που πρέπει να ληφθεί υπόψη στην οικονομική αξιολόγηση της διεργασίας. Από την άλλη πλευρά τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα αποτελούν ένα παράδειγμα προϊόντος προστιθέμενης αξίας με μεγάλη αξία στην παγκόσμια αγορά και με αυξανόμενη ζήτηση. Η παραγωγή DHA από *C. cohnii* ήταν περίπου 240 τη/γ το 2013 ενώ την ίδια χρονιά η ζήτηση στην παγκόσμια αγορά ήταν περίπου 124 χιλ. τόνοι αξίας 2 δισεκατομμυρίων €. Η εκτίμηση για το 2020 είναι ότι θα ανέλθει σε 241 χιλ. τόνους με εκτιμώμενη αξία να φτάσει τα 4.2 δισεκατομμυρίων € λόγω της γρήγορα αναπτυσσόμενης αγοράς για το προϊόν. Οι εφαρμογές του DHA περιλαμβάνουν βρεφικές τροφές, συμπληρώματα διατροφής, ζωικές τροφές, τρόφιμα και αναψυκτικά (Voort et al., 2017).



Εικόνα 13: (Α) Διαμερισμός της αγοράς του DHA με βάση τον όγκο και (Β) με βάση την οικονομική αξία (Voort et al., 2017)

Όσον αφορά τη συγκεκριμένη καλλιέργεια, η διαδικασία συλλογής και απομόνωσης της βιομάζας είναι ένα από τα κύρια εμπόδια για την εμπορευματοποίηση των προϊόντων από μικροφύκη. Για το λόγο αυτό καταβάλλονται προσπάθειες να βελτιωθεί σημαντικά αυτό το βήμα. Οι Mendes et al (2007) ανέπτυξαν μια απλή και οικονομική διαδικασία για τη συγκέντρωση DHA από *C. cohnii*. Ακόμη, πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής DHA του *C. cohnii* με παροχή γλυκόζη. Ωστόσο, εξ όσων γνωρίζουμε, δεν έχει υπάρξει ακόμη μια πλήρης έρευνα σχετικά με τις συνθήκες που βελτιστοποιούν την παραγωγή ωμέγα-3 από μικροφύκη με πηγή άνθρακα τα VFAs. Μια τέτοια έρευνα θα μπορούσε να επιτρέψει τη βέλτιστη μετατροπή του παραπροϊόντος της σκοτεινής ζύμωσης και τη δημιουργία μιας διαδικασίας παραγωγής βιο-υδρογόνου με προσιτό κόστος (Chalima et al., 2019, 2017)

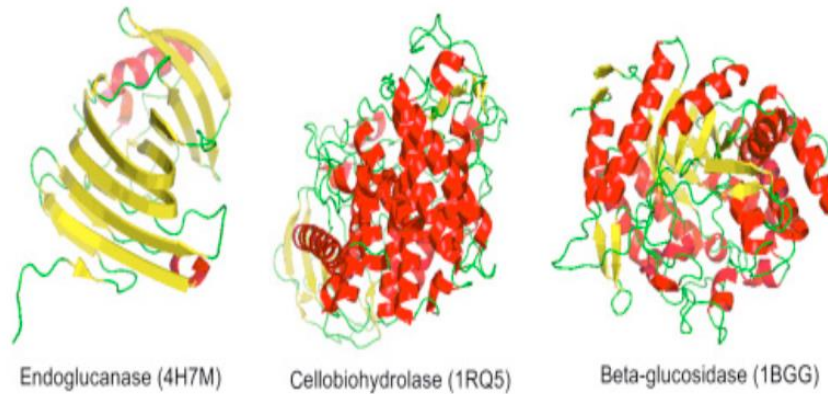
Αξίζει να αναφερθεί ότι μόνο λίγες βιοδραστικές ενώσεις από μικροφύκη εκτός από τα λιπίδια έχουν παραχθεί σε βιομηχανική κλίμακα όπως η ασταξανθίνη και το β-καροτένιο. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας των χαμηλών αποδόσεων παραγωγής στα κύτταρα των μικροφυκών και των δυσκολιών απομόνωσης τους. Όπως και σε πολλά άλλα μικροφύκη, η αποτελεσματικότητα της συσσώρευσης λιπιδίων και η παραγωγικότητα της βιομάζας από κύτταρα *C. cohnii* είναι βασικοί περιοριστικοί παράγοντες που εμποδίζουν την εφαρμογή τους σε βιομηχανική κλίμακα με προσιτό κόστος παραγωγής. Γενικότερα η αύξηση κλίμακας απαιτεί βελτιστοποίηση διαφόρων συνθηκών όπως βελτίωση του μέσου καλλιέργειας, των μεθόδων εκχύλισης των λιπιδίων και τη βελτιστοποίηση του στελέχους. Προς αυτή την κατεύθυνση πραγματοποιείται εκτενής έρευνα για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της καλλιέργειας και τη χρήση γενετικής μηχανικής για τη βελτίωση του στελέχους για να οδηγήσει σε υψηλότερες αποδόσεις βιοδραστικών ενώσεων (Chalima et al., 2017; Diao et al., 2019; Khan et al., 2018)

9. Κυτταρινάσες

Τα μικροφύκη εκτός των άλλων εφαρμογών τους μπορούν να χρησιμοποιούνται ως εργοστάσια παραγωγής ενζύμων διότι συνθέτουν ένζυμα με ποικίλες εφαρμογές στη βιομηχανία. Μια κατηγορία ενζύμων με αυξημένο βιομηχανικό ενδιαφέρον είναι τα λιγνοκυτταρινούχα ένζυμα, δηλαδή τα ένζυμα που είναι ικανά να διασπάσουν τις λιγνοκυτταρινούχες ενώσεις όπως η βιομάζα και να απελευθερώσουν σάκχαρα. Αυτό είναι απόρροια της προσπάθειας αξιοποίηση των ενώσεων αυτών για την παραγωγή προϊόντων όπως τα βιοκαύσιμα. Αν και τεχνολογικά η παραγωγή βιοαιθανόλης είναι δυνατή, έως σήμερα το κόστος και η χαμηλή αποδοτικότητα των ενζυμικών διεργασιών υδρόλυσης της βιομάζας αυξάνουν το συνολικό κόστος της διεργασίας. Συνεπώς αποτελούν εμπόδιο για τη δημιουργία μιας οικονομικά αποδοτικής μεθόδου παραγωγής (Ballesteros, 2010).

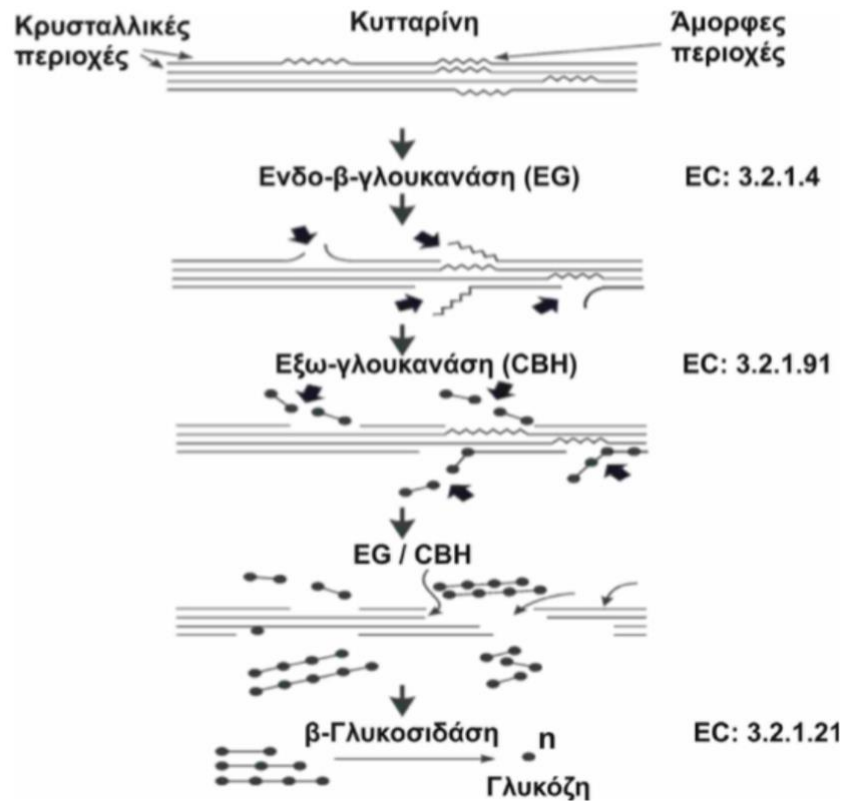
Οι κυτταρινάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν την κυτταρίνη διασπώντας τους γλυκοζιτικούς δεσμούς και απελευθερώνοντας ολιγοσακχαρίτες, κελλοβιόζη και γλυκόζη. Έχουν ιδιαίτερη σημασία τόσο στη βιομηχανία όσο και στη φύση λόγω του ρόλου που έχουν στον κύκλο του άνθρακα αποδομώντας την αδιάλυτη κυτταρίνη σε διαλυτά σάκχαρα. Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικοί τύποι κυτταρινασών ανάλογα με την ενζυμική τους δράση και την εκλεκτικότητά τους σε κάποιο υπόστρωμα. Οι ενδογλουκανάσες υδρολύουν τυχαία εσωτερικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς στο άμορφο μέρος της κυτταρίνης δημιουργώντας ολιγοσακχαρίτες με μη αναγωγικά άκρα. Στη συνέχεια οι εξωγλουκανάσες

ή οι κελλοβιουδρολάσες απελευθερώνουν μικρότερους ολιγοσακχαρίτες αποκλειστικά από τα άκρα της κυτταρίνης. Οι εξωγλουκανάσες χωρίζονται σε δύο τύπους δρώντας είτε στο αναγωγικό είτε στο μη αναγωγικό άκρο απελευθερώνοντας κελλοβιόζη, ένα δισακχαρίτη με δύο μόρια γλυκόζης στο μόριο του. Τέλος οι β-γλυκοζιδάσες απελευθερώνουν D-γλυκόζη από τα μόρια κελλοβιόζης. Αυτά τα ένζυμα δρουν συνεργιστικά ώστε να υδρολύσουν αποτελεσματικά την κρυσταλλική κυτταρίνη (Atalla & Isogai, 2010; X. Liu & Kokare, 2017; Rodrigues, 2016; Xu et al., 2011).



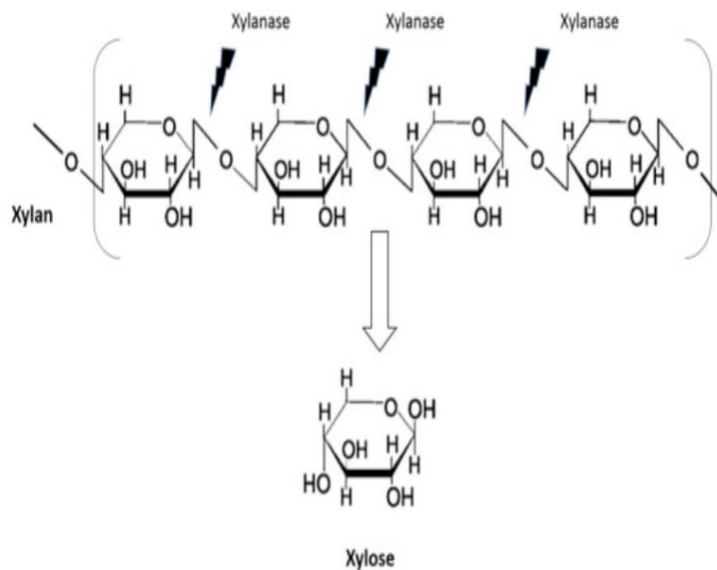
Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση της δομής μικροβιακών ενζύμων α) ενδογλουκανάση, β), κελλοβιουδρολάση και γ) β-γλυκοζιδάση (X. Liu & Kokare, 2017)

Τα ένζυμα αυτά συντίθενται από μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων και των μυκήτων κατά την ανάπτυξη τους σε κυτταρινούχα υποστρώματα. Αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορούν να είναι αερόβιοι ή αναερόβιοι, μεσόφιλοι ή θερμόφιλοι. Ανάμεσα τους τα είδη των *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma*, και *Aspergillus* είναι από τους πιο εκτενώς μελετημένους παραγωγούς κυτταρινασών (X. Liu & Kokare, 2017).



Εικόνα 15: Σχηματική περιγραφή συνεργιστικής δράσης ενδογλουκανάσης, εξω-γλουκανάσης και β-γλυκοσιδάσης κατά την υδρόλυση της κυτταρίνης

Η βιομάζα όμως αποτελείται σε μεγάλο ποσοστό και από ημικυτταρίνη. Καθώς η ξυλάνη είναι σημαντικό συστατικό της ημικυτταρίνης, οι ξυλανάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιομετατροπή της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας σε χρήσιμα προϊόντα. Οι ξυλανάσες διασπούν τους 1-4 δεσμούς της ξυλάνης απελευθερώνοντας μόρια ξυλόζης. Τόσο οι κυτταρινάσες όσο και οι ξυλανάσες είναι δυναμικά ένζυμα των οποίων η έκφραση επάγεται μόνο από την παρουσία συγκεκριμένων υποστρωμάτων ενώ υπό την παρουσία εύκολα αξιοποιούμενων σακχάρων καταστέλλεται (Godoy, Amorim, Barreto, & Freire, 2018; A. Kumar & Naraiian, 2018).



Εικόνα 16: Δράση ξυλανάσης στο υπόστρωμα ξυλάνη (Godoy et al., 2018)

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Όργανα – Συσκευές

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συσκευές και εξοπλισμοί:

- 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
- Βιοαντιδραστήρες HELL, Xplorer HT Parallel Bioprocessing
- 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 θερμοστάτισης και ανάδευσης δοχείων eppendorf Thermomixer comfort eppendorf
- Συσκευή λυοφιλίωσης Christ Alpha 1-4
- Συσκευή παραγωγής απιονισμένου νερού
- Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού Millipore Direct-Q
- Συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader, SpectraMax 250
- Υδατόλουτρο NÜVE, Model BS 30
- Φούρνος κενού Gallenkamp
- Φυγόκεντρος Beckman, Model TJ-6 Centrifuge
- Φυγόκεντρος Beckman, Model J2-21 Centrifuge
- Φυγόκεντρος Hettich, Model Rotanta 460 R
- Φυγόκεντρος δοκιμαστικών σωλήνων Vortex-2-Genie
- Φυγόκεντρος δοχείων Eppendorf Centrifuge 3200
- Φωτόμετρο UV2000, Hitachi
- Χρωματογράφος Υψηλής απόδοσης HPLC Shimadzu apparatus, Kyoto, Japan

Εκτός από τα παραπάνω για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιούνται και εργαστηριακά όργανα διαφορετικών όγκων όπως ογκομετρικοί κύλινδροι, ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες, γυάλινα μπουκάλια, δοκιμαστικοί σωλήνες, γυάλινα χωνιά, πιπέτες, tips πιπετών, δοχεία falcon, πλαστικά δοχεία φυγοκέντρωσης όγκου 2 mL (Eppendorf) καθώς και πλαστικές σύριγγες και μεταλλικές λαβίδες.

2. Μικροοργανισμός

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία είναι ο *Cryptocodinium cohnii*: ATCC 30772TM της American Type Culture Collection. Το ετερότροφο φύκος χρησιμοποιήθηκε τόσο για την παραγωγή ωμέγα-3 λιπαρών οξέων σε διάφορα μέσα όσο και για την εξέταση της ύπαρξης ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινασών. Για τη συντήρηση του απαιτείται συνεχής ανακαλλιέργειά του σε θρεπτικό μέσο που περιέχει τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη του ανά 1 έως 2 εβδομάδες.

3. Χημικά Αντιδραστήρια

3.1 Εμπορικά Αντιδραστήρια

Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιούνται εκχύλισμα ζύμης, συμπυκνωμένο HCl, καρβοξυμέθυλο-κυτταρίνη (CMC), οξικό νάτριο (sodium acetate) και H₂SO₄ από την εταιρία Fluka, άνυδρη γλυκόζη, p-νιτροφαίνυλο-β-D-γλυκοκυρανόζη (pNpG), p-νιτροφαίνυλο-β-D-κελλοβιόζη (pNpC) από τη Fisher Scientific και κρυσταλλική κυτταρίνη Avicel από τη Macherey Nagel and Co. Χρησιμοποιήθηκαν ακόμη υπολείμματα σπάδικα αραβόσιτου (corn cob) και οργανικοί διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο και η μεθανόλη από τη Fisher Scientific και εξάνιο από την Carlo Erba.

3.2 Θρεπτικό υλικό

Για την διατήρηση και την ανάπτυξη του μικροφύκου παρασκευάζεται θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ATCC Medium 460 που περιέχει γλυκόζη, μέταλλα, βιταμίνες και ανόργανα άλατα. Σε αυτό περιλαμβάνονται όλα τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη του μικροφύκου για να αποφευχθεί τυχόν μετάλλαξη του στελέχους ή μεταβολή των χαρακτηριστικών του λόγω έλλειψης κάποιου συστατικού απαραίτητου κατά τις μεταβολικές διεργασίες. Η σύσταση του περιγράφεται παρακάτω:

Πίνακας 1: Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ATCC Medium για το στέλεχος *Cryptocodinium cohnii***ATCC Medium 460 A2E6**

<u>Base Medium</u>	
NaCl	23,48 g
MgCl₂ x 6H₂O	10,63 g
Na₂SO₄	3,92 g
CaCl₂ (άνυδρο)	1,11 g
KCl	0,66 g
NaHCO₃	0,19 g
KBr	0,1 g
H₃BO₃	0,03 g
SrCl₂ x 6H₂O	0,04 g
Metal Mixture (Βλ. παρακάτω)	3,0 mL
FeCl₃ x 6H₂O	0,01 g
Na₂ Glycerophosphate	0,15 g
(NH₄)₂SO₄	0,05 g
Tris Buffer	3,0 g
Vitamin Solution (Βλ. παρακάτω)	1,0 mL
K₂HPO₄	0,01 g
Γλυκόζη	3,0 g
Γλουταμινικό οξύ	1,5 g
Απιονισμένο Νερό	1000 mL
<u>Metal Mixture</u>	
Na₂EDTA	1,0 g
FeCl₃ x 6H₂O	0,05 g
H₃BO₃	1,0 g
MnCl₂ x 4H₂O	0,15 g
ZnCl₂	0,01 g
CoCl₂ x 6H₂O	0,005 g
Απιονισμένο Νερό	100 mL
<u>Vitamin Solution</u>	
Biotin	0,003 g
Thiamine	1,0 g
Απιονισμένο Νερό	1000 mL

Μετά την ανάμιξη των αντιδραστηρίων ρυθμίζεται η τιμή pH του θρεπτικού υλικού ανάμεσα σε 6,4 έως 6,6 και συντηρείται στην κατάψυξη. Για την παρασκευή των καλλιεργειών για διατήρηση αποθέματος κυττάρων (stock) ογκομετρούνται 45 mL από το θρεπτικό υλικό, τοποθετούνται σε κωνικές φιάλες των 100 mL πωματισμένες με βαμβάκια και αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο. Εφόσον αποστειρωθούν στους 121 °C για 20 min, ψύχονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και εμβολιάζονται από την προϋπάρχουσα καλλιέργεια του μικροφύκου. Το εμβόλιο έχει όγκο 5 mL που πρόκειται για το 10% του

συνολικού όγκου της καλλιέργειας. Οι καλλιέργειες διατηρούνται χωρίς ανάδευση σε θερμοκρασία 24 °C.

4. Έλεγχος έκφρασης και ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινασών από το μικροφύκος *C. cohnii*

4.1 Εμβόλιο καλλιιεργειών διαλείποντος έργου (batch)

Προκειμένου να μελετηθεί η ανάπτυξη του μικροφύκους σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου (batch) χρησιμοποιείται εμβόλιο που περιέχει το μικροφύκος και τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης του. Αυτό το εμβόλιο περιέχει γλυκόζη 9 g/L ως πηγή άνθρακα που τοποθετείται σε ξεχωριστή πωματισμένη φιάλη και θρεπτικό που περιλαμβάνει εκχύλισμα ζύμης συγκέντρωσης 2 g/L και μίγμα θαλασσινών αλάτων (sea salt) συγκέντρωσης 18,7 g/L διαλυμένα σε 45 mL απιονισμένου νερού. Απαραίτητο βήμα αποτελεί η ρύθμιση του pH με προσθήκη διαλύματος HCl σε τιμή 6,3- 6,6 που βρίσκεται κοντά στη βέλτιστη τιμή pH για την ανάπτυξη του μικροφύκους ώστε να μην ανασταλεί η ανάπτυξη του. Οι φιάλες αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο σε 121 °C για 20 min και κατόπιν το θρεπτικό αναμειγνύεται με τη γλυκόζη. Αφού ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εμβολιάζονται υπό στείρες συνθήκες και με χρήση αποστειρωμένων tips από την πιο πρόσφατη καλλιέργεια stock που περιέχει το μικροφύκος. Απαιτείται διατήρηση τους σε επωαστήρα χωρίς ανάδευση με θερμοκρασία 24 °C για 3 έως 4 μέρες προτού να είναι κατάλληλες για εμβολιασμό των καλλιιεργειών batch.

4.2 Καλλιέργειες batch

Προκειμένου να εξεταστεί αν το μικροφύκος παράγει κυτταρινολυτικά ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν κυτταρινούχες ουσίες όπως Avicel και corn cob για να διερευνηθεί αν έχει τη δυνατότητα να τα διασπάσει και να παράξει γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα που περιέχει 2 g/L yeast extract, 18,7 g/L sea salt και σε κάθε περίπτωση μια ποσότητα από τις κυτταρινούχες ουσίες που μπορούν να θεωρηθούν πιθανές πηγές άνθρακα. Για το Avicel εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις 15, 25 g/L σε περίπτωση που οι υψηλές συγκεντρώσεις δρουν παρεμποδιστικά. Το CMC και το corn cob εξετάστηκαν σε συγκέντρωση 20 g/L. Για την κάθε ουσία χρησιμοποιήθηκαν διπλές καλλιέργειες. Κατόπιν ρύθμισης του pH του διαλύματος στην περιοχή 6,3 - 6,6 που αποτελεί το βέλτιστο pH για την καλλιέργεια του μικροφύκους, τοποθετούνται 45 mL διαλύματος sea salt και εκχυλίσματος ζύμης και η ποσότητα που ζυγίσθηκε από κάθε ουσία σε κωνικές φιάλες των 100 mL, προστίθεται πώμα στις φιάλες και τοποθετούνται στο αυτόκαυστο για να αποστειρωθούν σε θερμοκρασία 121 °C για 20 min. Εφόσον ψυχθούν εμβολιάζονται με 5 mL από το εμβόλιο που παρασκευάσθηκε. Οι κωνικές τοποθετούνται σε επωαστήρα σε συνθήκες 160 rpm και 27 °C και διατηρούνται εκεί για 7 ημέρες.

4.3 Παρασκευή αντιδραστηρίων

Ρυθμιστικά Διαλύματα (Buffer)

Δημιουργούνται 2 ρυθμιστικά διαλύματα ώστε να ελεγχθεί παράλληλα το βέλτιστο pH για τα κυτταρινολυτικά ένζυμα. Αυτό συμβαίνει καθώς έχει βρεθεί ότι τα ένζυμα που διασπούν

την κυτταρίνη παρουσιάζουν μέγιστη ενεργότητα σε τιμή pH=5 ενώ το μικροφύκος αναπτύσσεται καλύτερα κοντά στην τιμή pH=6.

- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου (sodium acetate) 0,1 M
Προστίθεται οξικό οξύ (CH_3COOH) συγκέντρωσης 0,03 M σε 100 mL διαλύματος οξικού νατρίου (CH_3COONa) 0,07 M έως ότου να επιτευχθεί το επιθυμητό pH.
- Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού (citrate) 0,05 M
Σε 100 mL διαλύματος δίουδρου κιτρικού νατρίου ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,04 M προστίθεται κιτρικό οξύ (μονοένυδρη μορφή) ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,06 M έως ότου να επιτευχθεί το επιθυμητό pH.
- Ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης 0,4 M
Σε 100 mL διαλύματος γλυκίνης 30 g/L ρυθμίζεται το pH με την προσθήκη καυστικού νατρίου (NaOH) ώστε να λάβει την τιμή 10,8.

Υποστρώματα

Για την παρασκευή διαλύματος 2% w/v CMC διαλύεται CMC σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού και κατόπιν θερμαίνεται υπό ανάδευση σε θερμαινόμενη πλάκα ενώ το 1,25% w/v Anicel το αντιδραστήριο έρχεται σε αιώρηση σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου. Για κάθε υπόστρωμα δημιουργούνται δύο διαλύματα, ένα για κάθε ρυθμιστικό διάλυμα διαφορετικού pH. Τα υποστρώματα pNPG, pNPC συγκέντρωσης 5mM διαλύονται σε νερό όπως και η ξυλάνη συγκέντρωσης 2% w/v. Η ξυλάνη για να διαλυθεί απαιτεί αρχικά θέρμανση για 10 min και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 24 h.

4.4 Εξέταση ενζυμικής ενεργότητας

Λήψη δειγμάτων

Λαμβάνονται καθημερινά δείγματα των 2 mL με αποστειρωμένα tips πιπετών 1000 μl υπό στείρες συνθήκες από κάθε καλλιέργεια και τοποθετούνται σε πλαστικά δοχεία φυγοκέντρησης όγκου 2 mL (erppendorf). Κατόπιν τα δείγματα αυτά φυγοκεντρώνονται για 1-2 min ώστε να ληφθεί το υπερκείμενο. Προκειμένου να απενεργοποιηθούν τα προς εξέταση ένζυμα και να παρασκευαστούν τα τυφλά δείγματα λαμβάνεται 0,5 mL από τη μία εκ των δύο διπλών καλλιεργειών για κάθε περίπτωση.

Ανάλυση

Για να διερευνηθεί αν το μικροφύκος παράγει τα ένζυμα εξετάζεται αν στο υπερκείμενο των καλλιεργειών παρουσιάζεται ενζυμική ενεργότητα παρουσία του κατάλληλου υποστρώματος. Συγκεκριμένα, εξετάζεται η ύπαρξη ενδουγλουκανάσης, β-γλυκοζιδάσης, κελλοβιοϋδρολασών και ξυλανασών. Η πειραματική διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις δύο διαφορετικές τιμές pH ώστε ταυτόχρονα να διερευνηθεί αν επιδρά στην ενζυμική ενεργότητα.

a) **Ενδογλουκανάση**

Σε δοχεία erppendorf προστίθεται 0,3 mL διαλύματος CMC και 0,3 mL από το υπερκείμενο του κάθε δείγματος. Στο τυφλό αντί για υπερκείμενο χρησιμοποιείται βρασμένο υπερκείμενο ώστε να μετουσιωθούν τα ένζυμα που τυχόν υπάρχουν. Τα δοχεία κατόπιν επωάζονται σε συνθήκες 50 °C και 900 rpm για 30 min. Με τη μέθοδο DNS μετρώνται τα

αναγωγικά σάκχαρα που υπάρχουν στα δείγματα και μετρείται η απορρόφηση στα 540 nm με microplate. Η τελική απορρόφηση προκύπτει αν αφαιρεθεί η τιμή του τυφλού δείγματος από την κάθε μέτρηση απορρόφησης.

b) Β-γλυκοζιδάση

Λαμβάνονται 0,25 mL από το διάλυμα pNpG και αναμειγνύονται σε 0,45 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου. Αφού προστεθούν 0,05 mL υπερκείμενου από τα δείγματα τοποθετούνται σε συνθήκες 50 °C και 0 rpm για 20 min σε θερμομίξερ ώστε να αντιδράσουν. Στο τυφλό προστίθεται νερό αντί για υπερκείμενο. Μετά το πέρας των 20 min σε κάθε δείγμα απαιτείται 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος γλυκίνης για να σταματήσει η αντίδραση λόγω σημαντική μεταβολής του pH (10,8). Η γλυκίνη χρησιμοποιείται και επειδή η παρανιτροφαινόλη (pNp) που απελευθερώνεται από τη δράση του ενζύμου στο pNpG απορροφά στα 430 εφόσον βρεθεί σε αλκαλικό περιβάλλον. Η μέτρηση της απορρόφησης πραγματοποιείται στη συσκευή φωτομέτρησης στα 430 nm. Η ένδειξη του τυφλού αφαιρείται από κάθε τιμή απορρόφησης.

c) Κελλοβιοϋδρολάσες (Cellobiohydrolases)

Σε erpendorf αναμειγνύονται 0,8 mL διαλύματος Avicel με 0,2 mL από το υπερκείμενο του κάθε δείγματος. Ως τυφλό λαμβάνεται πάλι διάλυμα με βρασμένο υπερκείμενο. Κατόπιν επωάζονται σε συνθήκες 50 °C και 900 rpm για 1 h και μετά την αντίδραση με DNS μετρώνται τα αναγωγικά σάκχαρα στα 540 nm. Εναλλακτικά εξετάζεται αν υπάρχει ενζυμική ενεργότητα παρουσίαση pNpC όπου η δοκιμή ακολουθεί την ίδια διαδικασία με το pNpG.

d) Ξυλανάσες

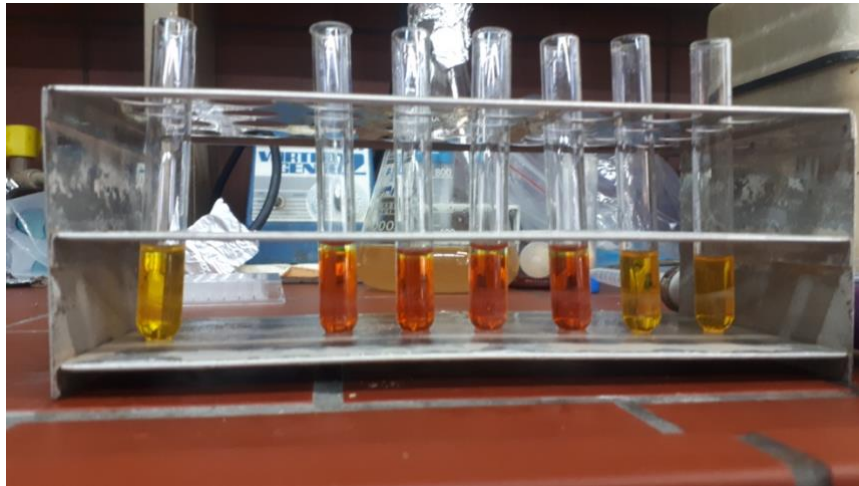
Ποσότητες 0,25 mL ξυλάνης, 0,65 mL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού και 0,1 mL υπερκείμενου τοποθετούνται σε δοχεία erpendorf και επωάζονται για 1 h σε συνθήκες 50 °C και ανάδευση 900 rpm. Ως τυφλό λαμβάνεται επίσης το δείγμα που περιέχει βρασμένο υπερκείμενο. Έπειτα τα δοχεία φυγοκεντρούνται ώστε να μην υπάρξει απορρόφηση που οφείλεται στη θολερότητα της ξυλάνης. Με τη μέθοδο DNS προσδιορίζονται τα αναγωγικά σάκχαρα που περιέχονται στα δείγματα μετρώντας την απορρόφηση τους στα 540 nm μετά την αντίδραση.

4.5 Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων

4.5.1 Μέθοδος DNS

Για να εξεταστεί αν υπάρχει ενζυμική ενεργότητα των ενζύμων όπου η δράση τους οδηγεί σε ενώσεις με αναγωγικά άκρα, που έχουν ελεύθερο το άκρο με το ημιακεταλικό υδροξύλιο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος DNS. Το DNS ή δινιτροσαλικυλικό οξύ αποτελεί μία αρωματική ένωση που αντιδρά με τα αναγωγικά μόρια σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο. Σε 0,5 mL διαλύματος DNS προστίθενται ίση ποσότητα από το προς εξέταση δείγμα. Η οξειδοαναγωγική αυτή αντίδραση πραγματοποιείται στους 100 °C και εμφανίζει σταθερή απορρόφηση για χρόνο μεγαλύτερο ή ίσο με 5 min. Η αντίδραση αυτή οδηγεί σε

μεταβολή του χρώματος του δείγματος όπου η απορρόφηση του σε μήκος κύματος 540 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των σακχάρων με αναγωγικά άκρα. Εφόσον ολοκληρωθεί η αντίδραση συμπληρώνονται 4 mL νερό σε κάθε δείγμα και η απορρόφηση μετρείται στα 540 nm με φωτόμετρο ή microplate συσκευή. Το τυφλό περιέχει νερό αντί για δείγμα και χρησιμοποιείται για να μηδενιστεί το φωτόμετρο ή να αφαιρεθεί η απορρόφηση του τυφλού δείγματος κατά τη μέτρηση σε συσκευή φωτομέτρησης. Κατόπιν μέσω της καμπύλης αναφοράς, η οποία υπολογίζεται με μέτρηση DNS σε πρότυπα δείγματα, υπολογίζεται η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων στο δείγμα.

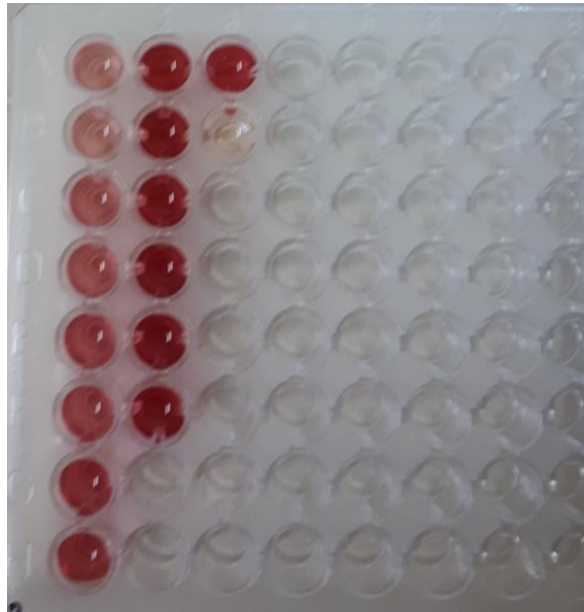


Εικόνα 17: Μέθοδος DNS για εφαρμογή σε δείγματα που περιέχουν γλυκόζη μετά από βρασμό για 5min και την προσθήκη νερού (Τυφλό δείγμα: αριστερά)

4.5.2 Μέθοδος προσδιορισμού γλυκόζης με το εμπορικό σκεύασμα GOD/POD

Η παραπάνω μέθοδος μετρά τη συνολική ποσότητα των αναγωγικών σακχάρων χωρίς να είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση των επιμέρους ουσιών αν περιέχονται πάνω από μία ενώσεις με αναγωγικά σάκχαρα. Στην περίπτωση που η γλυκόζη είναι η ένωση της οποίας η συγκέντρωση επιθυμείται να προσδιοριστεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος glucotest.

Η συγκέντρωση της γλυκόζης προσδιορίζεται αναμειγνύοντας 10 μL από το δείγμα με 240 μL εμπορικού ενζύμου GOD/POD και στο τυφλό αντίστοιχη ποσότητα νερού αντί για δείγμα. Απαιτείται ωστόσο να περιέχεται στο δείγμα συγκέντρωση γλυκόζης έως 1 g/L. Για το λόγο αυτό τα αρχικά δείγματα αραιώνονται επαρκώς. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37 °C για 15 min και η απορρόφηση μετρείται στα 510 nm με τη χρήση microplate.



Εικόνα 18: Εφαρμογή της μεθόδου προσδιορισμού γλυκόζης με το εμπορικό σκεύασμα GOD/POD σε microplate μετά από αντίδραση των δειγμάτων με το ένζυμο

5. Ανάπτυξη *C. cohnii* σε βιοαντιδραστήρες

5.1 Καλλιέργειες μικροφύκους για εμβολιασμό βιοαντιδραστήρων

Αρχικά παρασκευάζονται στατικές καλλιέργειες του μικροφύκου σε κωνικές φιάλες των 100 mL στις οποίες χρησιμοποιείται η γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Αυτές οι καλλιέργειες αποτελούν εμβόλιο για τις καλλιέργειες οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν ως εμβόλιο στον βιοαντιδραστήρα. Οι καλλιέργειες έχουν συνολικό όγκο 50 mL εκχύλισμα ζύμης συγκέντρωσης 2,7 g/L και sea salt συγκέντρωσης 25 g/L. Εφόσον διαλυθούν σε 45 mL απιονισμένο νερό ρυθμίζεται η τιμή pH με πυκνό διάλυμα HCl ώστε να είναι κοντά στη βέλτιστη τιμή ανάπτυξης που είναι κοντά στην τιμή 6,5. Η γλυκόζη έχει συγκέντρωση 9 g/L και όπως αναφέρθηκε προηγουμένως αποστειρώνεται ξεχωριστά σε διαφορετικές κωνικές ώστε να αποφευχθεί απώλεια ποσότητας της. Στις κωνικές αυτές τοποθετούνται πώματα προς αποφυγή μόλυνσης των καλλιεργειών. Οι φιάλες τοποθετούνται στο αυτόκαυστο για να αποστειρωθούν. Μετά την αποστείρωση το υγρό προστίθεται στη γλυκόζη και αφού ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου η καλλιέργεια εμβολιάζεται από καλλιέργεια stock υπό στείρες συνθήκες. Οι καλλιέργειες επωάζονται για 4 μέρες χωρίς ανάδευση στους 24 °C.



Εικόνα 19: Στατικές καλλιέργειες μετά τον εμβολιασμό τους από stock καλλιέργεια

Οι καλλιέργειες με τις οποίες θα εμβολιαστούν οι βιοαντιδραστήρες ονομάζονται αναδευόμενες, έχουν τελικό όγκο 100 mL και διατηρούνται σε κωνικές φιάλες των 250 mL. Ομοίως με τις προηγούμενες, η γλυκόζη τελικής συγκέντρωσης 27 g/L ζυγίζεται και τοποθετείται σε ξεχωριστή φιάλη ενώ το θρεπτικό που έχει όγκο 90 mL περιέχει εκχύλισμα ζύμης με συγκέντρωση 3,8 g/L και sea salt με συγκέντρωση 25 g/L. Το pH ρυθμίζεται σε τιμή 6,3 – 6,6, οι κωνικές αποστειρώνονται και στη γλυκόζη προστίθεται το θρεπτικό. Ο εμβολιασμός λαμβάνει χώρα σε αποστειρωμένο χώρο και ως εμβόλιο λαμβάνονται 10 mL από την πρόσφατη static καλλιέργεια. Η διατήρηση και ανάπτυξη τους γίνεται για 3 ημέρες σε επωαστήρα με συνθήκες θερμοκρασία 27 °C και ανάδευση 160 rpm.



Εικόνα 20: Εμβόλια για εμβολιασμό βιοαντιδραστήρα 72 ωρών

5.2 Βιοαντιδραστήρες 2 L

Η ανάπτυξη του μικροφύκου *C. cohnii* πραγματοποιείται σε βιοαντιδραστήρες ώστε να επιτευχθεί υψηλή πυκνότητα κυττάρων. Μπορεί δηλαδή να αναπτυχθεί σε συνθήκες ημιδιαλείποντος έργου (fed-batch) όπου η επιθυμητή τροφοδοσία συνδέεται με τον αντιδραστήρα και τροφοδοτείται ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Ο

βιοαντιδραστήρας είναι συνδεδεμένος με παροχή νερού, η οποία συνδέεται τόσο με ένα μανδύα στη βάση του βιοαντιδραστήρα για θερμοστάτηση όσο και με το συμπυκνωτήρα, και με παροχή αέρα που συνδέεται με φίλτρο. Μέσω της σύνδεσης με ηλεκτρονική μονάδα πραγματοποιείται ρύθμιση των συνθηκών λειτουργίας της εκάστοτε καλλιέργειας. Διαθέτει επίσης ηλεκτρόδιο μέτρησης pH, οξυγονόμετρο και θερμομέτρο που είναι συνδεδεμένα με τη μονάδα ώστε να καταγράφουν συνεχώς τις συνθήκες που επικρατούν στον κύριο όγκο του αντιδραστήρα. Καθημερινά λαμβάνονται δείγματα από το δειγματολήπτη ενώ η έγχυση υγρών πλην της τροφοδοσίας πραγματοποιείται με βελόνα από septum.

Για τη σωστή ρύθμιση και καταγραφή των συνθηκών απαιτείται βαθμονόμηση των ηλεκτροδίων μέτρησης pH και διαλυμένου οξυγόνου. Τα ηλεκτρόδια του pH βαθμονομούνται με ρυθμιστικά διαλύματα με τιμές pH 4 και 7 και κατόπιν τοποθετούνται στους βιοαντιδραστήρες. Αφού τοποθετηθεί το θρεπτικό μέσο στο εσωτερικό του αντιδραστήρα, τοποθετούνται τα ηλεκτρόδια και έχουν καλυφθεί οι ελεύθερες υποδοχές τους, αποστειρώνεται όλος ο αντιδραστήρας στο αυτόκαυστο. Αυτό συμβαίνει προκειμένου να αποφευχθεί μόλυνση της καλλιέργειας από άλλους ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς. Αντίθετα με τα ηλεκτρόδια μέτρησης του pH, τα οξυγονόμετρα βαθμονομούνται εφόσον έχει αποστειρωθεί και τεθεί σε λειτουργία ο βιοαντιδραστήρας. Η βαθμονόμηση πραγματοποιείται παρέχοντας αέρα έως να σταθεροποιηθεί η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στο υγρό μέσο καλλιέργειας αλλά γίνεται προτού εμβολιαστούν. Τέλος, εφόσον σταθεροποιηθούν οι συνθήκες κάθε βιοαντιδραστήρα πραγματοποιείται εμβολιασμός τους από τις αναδευόμενες καλλιέργειες υπό στείρες συνθήκες και συνδέεται η αποστειρωμένη τροφοδοσία.



Εικόνα 21: α) Βιοαντιδραστήρας 2L σε λειτουργία με θρεπτικό υλικό στο εσωτερικό του, κατόπιν αποστείρωσης β) Καλλιέργεια *C. coli* σε βιοαντιδραστήρα 2L, 24 h λειτουργίας

5.2.1 Τροφοδοσία γλυκόζη και γλυκόζη-ξυλόζη

Αρχικά επιθυμείτε να διερευνηθεί αν θα μπορούσε το υδρόλυμα προερχόμενο από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα να αξιοποιηθεί ως πιθανή πηγή άνθρακα. Η βιομάζα ήταν όξινα προκατεργασμένη με ήπια οξείδωση με μίγμα νερό: αιθανόλη 50:50 σε πίεση 16 bar και θερμοκρασία 175°C για 60 min. Στο υδρόλυμα λοιπόν που προκύπτει από την κατεργασία της βιομάζας εκτός από γλυκόζη, στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί το μικροφύκος, περιέχει και σημαντική ποσότητα ξυλόζης. Για το λόγο αυτό εξετάζεται η επίδραση της ξυλόζης στην καλλιέργεια. Το θρεπτικό υλικό εντός του βιοαντιδραστήρα σε αυτή την περίπτωση αποτελείται από εκχύλισμα ζύμης συγκέντρωσης 7,5 g/L ως πηγή αζώτου και ως δευτερεύουσα πηγή άνθρακα, sea salt συγκέντρωσης 25 g/L και κύρια πηγή άνθρακα γλυκόζη συγκέντρωσης 25 g/L. Οι απαραίτητες ποσότητες ζυγίζονται και παρασκευάζονται δύο διαλύματα των 900 mL με απιονισμένο νερό στα οποία ρυθμίζεται το pH σε τιμή 6,3 – 6,6 με προσθήκη πυκνού HCl και τοποθετούνται στο εσωτερικό των δύο βιοαντιδραστήρων. Κατόπιν αποστειρώνονται οι βιοαντιδραστήρες στους 109 °C για 40 min ώστε να αποφευχθεί απώλεια ποσότητας γλυκόζης. Αποστειρώνονται επίσης οι τροφοδοσίες, η μία εκ των οποίων περιέχει μόνο γλυκόζη με συγκέντρωση 150 g/L και η άλλη γλυκόζη με συγκέντρωση 150 g/L και ξυλόζη με συγκέντρωση 24 g/L. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέγονται ώστε να προσομοιάζει το υδρόλυμα της βιομάζας.

Όταν ψυχθούν επαρκώς συνδέονται οι υποδοχές με τις μονάδες και τις παροχές αέρα και νερού. Από τις ηλεκτρονικές μονάδες ορίζονται ως επιθυμητές συνθήκες θερμοκρασία στους 27 °C, τιμή pH 6,5, παροχή αέρα στο 1 L air / min και αρχική ανάδευση στα 250 rpm ώστε να διατηρείται το διαλυμένο οξυγόνο στα επίπεδα που επιτρέπουν την ανάπτυξη των κυττάρων. Σε περίπτωση που η τιμή του pH αποκλίνει σημαντικά από το 6,5 προστίθεται μικρή ποσότητα υδροχλωρικού οξέος ή καυστικού νατρίου ώστε να ρυθμιστεί το pH. Εφόσον ξεκινήσει η καλλιέργεια λαμβάνονται καθημερινά δείγματα και με βάση τα επίπεδα γλυκόζης προστίθεται η απαραίτητη ποσότητα τροφοδοσίας με σκοπό να παραμένει σταθερά σε συγκέντρωση γλυκόζης 25 g/L. Ο προσδιορισμός των επιπέδων γλυκόζης γίνεται με τη μέθοδο προσδιορισμού γλυκόζης με το εμπορικό σκεύασμα GOD/POD.

5.2.2 Τροφοδοσία οξικό οξύ και οξικό οξύ-γλυκόζη

Χρησιμοποιώντας οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα προκύπτει υψηλότερο ποσοστό DHA σε σύγκριση με τη γλυκόζη η οποία όμως οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή βιομάζας. Παρουσία και των δύο υποστρωμάτων συνήθως προτιμάται η γλυκόζη και μόνο όταν καταναλωθεί όλη η ποσότητα της ξεκινά η κατανάλωση του οξικού οξέος. Αποτελεί σκόπιμο να διερευνηθεί η ποσότητα γλυκόζης που θα μπορούσε να προστεθεί σε τροφοδοσία οξικού οξέος ώστε να μη συμβαίνει το παραπάνω φαινόμενο αλλά να πραγματοποιείται ταυτόχρονη κατανάλωση των δύο υποστρωμάτων. Σε αυτή την περίπτωση ο βιοαντιδραστήρας λειτουργεί και πάλι σε συνθήκες ημι-διαλείποντος έργου αλλά η μονάδα τροφοδοτεί την πηγή άνθρακα ώστε παράλληλα να ρυθμίζεται η τιμή pH του βιοαντιδραστήρα στην επιθυμητή τιμή που είναι η τιμή 6,5.

Κατά τη χρήση οξικού οξέος αντί για γλυκόζη ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται sodium acetate με συγκέντρωση 15 g/L αντί για γλυκόζη στο

θρεπτικό μέσο εντός του βιοαντιδραστήρα. Ως τροφοδοσία χρησιμοποιείται διάλυμα οξικού οξέος στη μία περίπτωση του βιοαντιδραστήρα αναφοράς (control) ενώ στη δεύτερη περίπτωση διάλυμα όπου στην ποσότητα οξικού έχει προστεθεί ποσότητα γλυκόζης σε ποσοστά 6%, 3%, 1,2% και 0,6% επί του ποσοστού των mol του άνθρακα (Παράρτημα Α). Η παραπάνω ποσότητες ζυγίζονται ξεχωριστά και ξεχωριστά αποστειρώνεται η απαραίτητη ποσότητα απιονισμένου νερού στην κάθε περίπτωση ώστε να αποστειρωθούν στους 121 °C για 20 min. Το πυκνό οξικό οξύ δεν απαιτεί αποστείρωση και έτσι προστίθεται αφού αποστειρωθούν τα υπόλοιπα. Οι επιθυμητές συνθήκες είναι θερμοκρασία 27 °C, τιμή pH 6,5, παροχή αέρα στο 1 L air / min και ανάδευση στα 250 rpm.

5.3 Βιοαντιδραστήρες 200 mL

Παρόμοιο τρόπο λειτουργίας με τους παραπάνω βιοαντιδραστήρες παρουσιάζει το σύστημα των μικρότερων βιοαντιδραστήρων της εταιρίας HEL με μέγιστο όγκο 200 mL. Πρόκειται για ένα σύστημα αποτελούμενο από 8 αντιδραστήρες που μπορούν να λειτουργούν παράλληλα έχοντας τη δυνατότητα για παροχή έως και δύο διαφορετικών τροφοδοσιών για όλο το σύστημα των αντιδραστήρων. Κάθε ένας συνδέεται με τη μονάδα μέσω διαφορετικών καλωδίων ενώ διαθέτει θερμομέτρο και δύο ηλεκτρόδια, ένα ηλεκτρόδιο μέτρησης pH και ένα ηλεκτρόδιο μέτρησης διαλυμένου οξυγόνου. Κατά τη λειτουργία τους καταγράφουν τις τιμές των μεταβλητών στον κύριο όγκο του αντιδραστήρα. Τα αέρια φιλτράρονται από αποστειρωμένα φίλτρα για να εισέλθουν στο εσωτερικό του αντιδραστήρα ενώ στην έξοδο τους υπάρχει ψυκτήρας.



Εικόνα 22: α) Βιοαντιδραστήρες 200 mL πριν τεθούν σε λειτουργία και β) αφού τεθούν σε λειτουργία και μετά τον εμβολιασμό τους από κουνιστό εμβόλιο

Η διαδικασία είναι παρόμοια με τη διαδικασία αποστείρωσης και βαθμονόμησης των βιοαντιδραστήρων 2 L. Στο εσωτερικό τους τοποθετείται το θρεπτικό υλικό και παράλληλα όλες οι έξοδοι κλείνονται με κατάλληλα πώματα ώστε να αποστειρωθεί ο κάθε

βιοαντιδραστήρας στο αυτόκαυστο. Τα ηλεκτρόδια του pH βαθμονομούνται με ρυθμιστικά διαλύματα με τιμές 4 και 7 και κατόπιν αποστειρώνονται με τους βιοαντιδραστήρες ενώ του οξυγόνου βαθμονομούνται εφόσον έχει αποστειρωθεί και τεθεί σε λειτουργία ο κάθε αντιδραστήρας. Αρχικά παρέχεται αέριο άζωτο που είναι αδρανές και αποτελεί την ελάχιστη, μηδενική τιμή διαλυμένου οξυγόνου και στη συνέχεια παρέχεται αέρας έως να σταθεροποιηθεί η ένδειξη του. Κατόπιν πραγματοποιείται ο εμβολιασμός και το σύστημα τίθεται σε λειτουργία. Η λήψη των δειγμάτων πραγματοποιείται από δειγματολήπτη με σύριγγα και η έγχυση των υγρών πλην της τροφοδοσίας από κατάλληλη είσοδο με septum.

5.3.1 Μελέτη επίδρασης της μεταβολής θερμοκρασίας στη συσσώρευση λιπιδίων

Η θερμοκρασία αποτελεί μια παράμετρο που έχει αξιοσημείωτη επίδραση στην ανάπτυξη του μικροφύκου και στη συσσώρευση των λιπιδίων. Καθώς οι συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη δεν είναι πάντα ευνοϊκές για την παραγωγή λιπιδίων και το αντίστροφο, αποτελεί σκόπιμο να διερευνηθεί εάν η μεταβολή της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της ποσότητας DHA που είναι το επιθυμητό προϊόν της καλλιέργειας *C. cohnii*.

Το σύστημα των βιοαντιδραστήρων 200 mL επιτρέπει να εξεταστούν παράλληλα οι διάφορες αυτές συνθήκες. Σε κάθε έναν τοποθετείται θρεπτικό στο εσωτερικό του 90 mL με συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων 25 g/L sea salt, 7,5 g/L εκχύλισμα ζύμης και 15 g/L sodium acetate ρυθμισμένα σε τιμή pH 6,3 – 6,5. Ως τροφοδοσία χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα με 33 % v/v οξικό οξύ. Το νερό τοποθετείται σε μπουκάλι αποστείρωσης ώστε να αποστειρωθεί ενώ το οξικό προστίθεται μετά την αποστείρωση με αποστειρωμένο ογκομετρικό κύλινδρο. Κατόπιν βαθμονόμησης των ηλεκτροδίων μέτρησης pH, κλείνονται οι είσοδοι και έξοδοι του κάθε βιοαντιδραστήρα με κατάλληλα πώματα και αποστειρώνονται σε συνθήκες 121 °C για 20 min. Εφόσον ψυχθεί βαθμονομούνται και τα ηλεκτρόδια μέτρησης διαλυμένου οξυγόνου και αφού ρυθμιστεί και η θερμοκρασία τους εμβολιάζονται με 10 mL από εμβόλιο προερχόμενο από υπό ανάδευση καλλιέργεια μέσω septum. Η τροφοδοσία των αντιδραστήρων πραγματοποιείται ώστε η τιμή του pH να παραμένει σταθερά στην τιμή 6,5 που είναι η τιμή που έχει παρατηρηθεί βέλτιστη ανάπτυξη του μικροφύκου. Έτσι το οξικό οξύ αποτελεί όχι μόνο πηγή άνθρακα για την καλλιέργεια αλλά και μέσο ρύθμισης του pH. Συνεπώς η ανάπτυξη γίνεται σε συνθήκες βέλτιστου pH και όχι βέλτιστης συγκέντρωσης οξικού οξέος. Οι συνθήκες ρυθμίζονται ώστε να είναι σταθερά η παροχή αέρα σε τιμή 50 mL air / min και η ανάδευση σε 250 rpm.

Οι θερμοκρασίες που εφαρμόζονται αρχικά είναι θερμοκρασία 23 °C σε τρεις βιοαντιδραστήρες και 27 °C σε έναν. Στη συνέχεια μετά το πέρας 72 h οι δύο αντιδραστήρες συνεχίζουν να παραμένουν σταθερά σε τιμές θερμοκρασίας 23 °C και 27 °C και στους άλλους δύο εφαρμόζεται διαφορετική θερμοκρασία για άλλες 72 h. Στον έναν εφαρμόζεται υψηλότερη και στον άλλο χαμηλότερη θερμοκρασία ώστε να ευνοηθεί η συσσώρευση λιπιδίων. Τέλος για 24 h εφαρμόζονται σε όλους συνθήκες διαλείποντος έργου δηλαδή σταματά η τροφοδοσία οξικού οξέος ώστε να καταναλωθεί όσο το δυνατόν περισσότερη από την ποσότητα υποστρώματος που περιέχεται στους αντιδραστήρες. Οι συνθήκες που εξετάζονται συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2: Συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνος εφαρμογής τους για κάθε βιοαντιδραστήρα

Αντιδραστήρας	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)
R1	27	8640
R2	23	4320
	27	4320
R3	23	8640
R4	23	4320
	15	4320

Το πείραμα επαναλαμβάνεται με τις ίδιες συνθήκες και με το ίδιο θρεπτικό μέσο με τη διαφορά ότι για τροφοδοσία χρησιμοποιείται διήθημα υγρού κλάσματος της σκοτεινής ζύμωσης βιοαποβλήτων. Το διήθημα αυτό περιέχει VFAs σε σύσταση που περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα και είναι οξινισμένο με την προσθήκη HCl ώστε η τιμή του pH του να είναι κοντά στο 4 για να μπορεί παράλληλα να ρυθμίζει και το pH. Η τιμή αυτή επιλέχθηκε ώστε να μην αραιωθεί σημαντικά η πρώτη ύλη και μειωθούν οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων που περιέχονται σε αυτό.

Πίνακας 3: Σύσταση διηθήματος υγρού κλάσματος σκοτεινής ζύμωσης βιοαποβλήτων

VFA	Συγκέντρωση (g/L)
Οξικό οξύ	72,7
Προπιονικό	41,7
Βουτυρικό	33,0
Ισοβουτυρικό	2,0
Βαλερικό	15,9
Ισοβαλερικό	3,3
Καπρονικό	6,3
Σύνολο	174,9

5.3.2 Σύγκριση αμμωνιακών και εκχύλισματος ζύμης ως πηγή αζώτου στην καλλιέργεια

Κατά την ανάπτυξη του μικροφύκου είναι σημαντική η παρουσία τόσο πηγών άνθρακα όσο και πηγών αζώτου. Όπως όμως αναφέρθηκε τα μεταβολικά μονοπάτια τους δεν είναι ανεξάρτητα και έτσι ο λόγος της μάζας του άνθρακα προς του αζώτου (C/N) αποτελεί σημαντική παράμετρο για την επαρκή ανάπτυξη των κυττάρων και τη συσσώρευση λιπιδίων. Το εκχύλισμα ζύμης αν και χρησιμοποιείται ως πηγή αζώτου περιέχει και ποσότητα άνθρακα που πρέπει να ληφθεί υπόψη ώστε να συγκριθεί η επίδραση του σε σύγκριση με διαφορετική πηγή αζώτου. Εφόσον η σύγκριση αφορά πηγές αζώτου θα παραμείνει σταθερή η μάζα του άνθρακα που προστίθεται σε κάθε περίπτωση ώστε να διατηρήσουν παρόμοιες προοπτικές αφομοίωσης του άνθρακα για παραγωγή βιομάζας. Χάρην σύγκρισης με τα αμμωνιακά, το εκχύλισμα ζύμης yeast extract (YE) είναι παράλληλα πηγή βιταμινών και ιχνοστοιχείων. Για αυτό στη μία περίπτωση χρησιμοποιείται ως θρεπτικό μέσο ATCC χωρίς αμμωνιακά και γλυκόζη, που είναι πηγή βιταμινών, μετάλλων

και αλάτων, στο οποίο προστίθενται αμμωνιακά και στην άλλη υδατικό διάλυμα που περιέχει ΥΕ και sea salt. Η πηγή άνθρακα του μέσου καλλιέργειας εντός του βιοαντιδραστήρα παραμένει ίδια σε κάθε περίπτωση και είναι το sodium acetate.

Θεωρείται ότι το Υ.Ε. περιέχει 40% w/w C και 11 % w/w N. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω και σε συνδυασμό ότι ένα τυπικό θρεπτικό μέσο περιέχει 7,5 g/L Υ.Ε. και 15 g/L sodium acetate υπολογίζεται ότι πρόκειται λόγος $\frac{C}{N} = 8,9$ για αυτές τις ποσότητες. Αποσκοπώντας παράλληλα τη σύγκριση των δύο πηγών και για μεγαλύτερο λόγο C/N ελέγχεται ταυτόχρονα και η τιμή του λόγου $\frac{C}{N} = 45,9$. Αυτή η τιμή παρουσίασε βελτιωμένα αποτελέσματα σε σχέση με άλλες τιμές του λόγου C/N σε batch καλλιέργειες. Εξετάζεται λοιπόν αν ισχύει και για σύστημα ημι-διαλείποντος έργου. Με βάση τους υπολογισμούς προκύπτουν οι ποσότητες που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (Παράρτημα Β).

Πίνακας 4: Ποσότητες συστατικών στο θρεπτικό μέσων των βιοαντιδραστήρων

Βιοαντιδραστήρας	R1	R2	R3	R4
Λόγος C/N	45,9	8,9	8,9	45,9
Sea salt (g/L)	-	25	-	25
Yeast extract (g/L)	-	7,5	-	1,38
Sodium acetate (g/L)	20,8	15	20,8	23,4
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	0,1	-	3,2	-

Συγκεκριμένα στους δύο βιοαντιδραστήρες που χρησιμοποιούνται ως πηγή αζώτου τα αμμωνιακά τοποθετούνται στο εσωτερικό τους 90 mL ATCC medium χωρίς αμμωνιακά και γλυκόζη και οι ποσότητες αμμωνιακών και sodium acetate που περιγράφονται στον παραπάνω πίνακα. Στους άλλους δύο τοποθετούνται 90 mL υδατικού διαλύματος με τις ποσότητες που περιγράφονται στον παραπάνω πίνακα sea salt, sodium acetate και yeast extract. Σε όλα τα θρεπτικά υλικά ρυθμίζεται η τιμή pH ώστε να είναι ανάμεσα σε τιμές 6,3 – 6,5. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια που περιγράφεται παραπάνω όπως και ίδια είναι η τροφοδοσία που χρησιμοποιείται. Οι συνθήκες ρυθμίζονται ώστε να είναι σταθερά η παροχή αέρα σε τιμή 50 mL air / min, η θερμοκρασία στους 27 °C, το pH σε τιμή 6,5 και η ανάδευση στα 250 rpm. Το πείραμα διαρκεί 10 ημέρες εκ των οποίων στις 9 πρώτες οι βιοαντιδραστήρες λειτουργούν ως fed-batch συστήματα και την τελευταία μέρα ως batch με σκοπό να καταναλώσουν το υπάρχον υπόστρωμα στον κύριο όγκο του αντιδραστήρα.

5.3.3 Παροχή γλυκόζης με διαφορετικό τρόπο τροφοδοσίας

Σε αντίθεση με την παροχή οξικού οξέος ως τροφοδοσία όπου η παροχή ρυθμίζεται ώστε να παραμένει το pH σταθερό, στην περίπτωση χρήσης γλυκόζης δεν υπάρχει κάποια αντίστοιχη αυτοματοποίηση. Γενικά τροφοδοτούνται οι αντιδραστήρες ώστε να παραμένει στον κύριο όγκο του αντιδραστήρα η συγκέντρωση της γλυκόζης ίση με 25 g/L που έχει βρεθεί ως η βέλτιστη τιμή συγκέντρωσης για την ανάπτυξη του μικροφύκου. Η μέτρηση ωστόσο της συγκέντρωσης πραγματοποιείται λαμβάνοντας δείγμα και είτε μετρώντας τα

αναγωγικά σάκχαρα με τη μέθοδο DNS είτε μετρώντας τη γλυκόζη με τη μέθοδο προσδιορισμού γλυκόζης με το εμπορικό σκεύασμα GOD/POD. Καθίσταται λοιπόν επιθυμητό να βρεθεί μια μέθοδος αυτοματοποιημένης παροχής γλυκόζης προσαρμοσμένη στις ανάγκες της καλλιέργειας *C.cohnii*. Συνδυάζοντας το παραπάνω με την ανάγκη αξιοποίησης του υδρολύματος βιομάζας χρησιμοποιείται γλυκόζη και ξυλόζη ως τροφοδοσία σε ποσότητες αντίστοιχες με αυτές που περιέχονται στο υδρόλυμα.

Αρχικά εξετάζονται τρία μοντέλα τροφοδοσίας. Το ένα αφορά παροχή με βάση ημερήσια μέτρηση DNS ώστε η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων να βρίσκεται σε τιμή 25 g/L που έχει βρεθεί βέλτιστη τιμή για batch καλλιέργειες. Το δεύτερο μοντέλο αφορά παροχή με βάση την εκθετική ανάπτυξη των κυττάρων ενώ το τρίτο με βάση σιγμοειδή εξίσωση. Τα δεδομένα για την εκθετική ανάπτυξη έχουν βασιστεί σε αποτελέσματα πειραμάτων που έχουν πραγματοποιηθεί με πηγή άνθρακα γλυκόζη για ανάπτυξη του μικροφύκου. Η σιγμοειδής εξίσωσης έχει βασιστεί σε προγενέστερα πειράματα βάσει της κατανάλωσης της γλυκόζης που είναι αρχικά χαμηλότερη και στη συνέχεια αυξάνεται (Karnaouri et al., 2020). Για κάθε πείραμα χρησιμοποιούνται παράλληλα δύο αντιδραστήρες με τις ίδιες συνθήκες. Ο τρόπος παροχής τροφοδοσίας περιγράφεται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 5: Μέθοδος παροχής τροφοδοσίας γλυκόζη-ξυλόζη στις καλλιέργειες

Βιοαντιδραστήρες

R2 & R6		R3 & R7		R4 & R8	
Σιγμοειδής εξίσωση	Initial Rate = 0,0012 mL/min	Εκθετική εξίσωση	Required Growth Rate = 0,0081 g/min	Μέτρηση DNS	Προσθήκη ποσότητας τροφοδοσίας ανάλογα με την ημερήσια ένδειξη DNS
	Final Rate = 0,003 mL/min		Conversion Yield = 0,33 g/g υποστρ.		
			Initial Concentration = 0,16 g υποστρ./mL		

Σε κάθε έναν από αυτούς τοποθετείται ως θρεπτικό υλικό στο εσωτερικό του 90 mL υδατικού διαλύματος που περιέχει 25 g/L sea salt, 7,5 g/L εκχυλίσματος ζύμης και 25 g/L γλυκόζη. Ως τροφοδοσία χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα που περιέχει 140 g/L γλυκόζη και 24 g/L ξυλόζη για να προσομοιάζει το υδρόλυμα βιομάζας. Κατόπιν ακολουθεί η διαδικασία που περιεγράφηκε προηγουμένως για την προετοιμασία τους και αποστειρώνονται σε συνθήκες 109 °C για 40 min ώστε να μην υπάρξει απώλεια ποσότητας της διαλυμένης γλυκόζης. Οι συνθήκες ρυθμίζονται ώστε να είναι σταθερά η παροχή αέρα σε τιμή 50 mL air / min, η θερμοκρασία στους 27 °C, η τιμή pH στο 6,5 και η ανάδευση στα 250 rpm. Μετά το πέρασμα 6 ημερών διακόπτεται η παροχή τροφοδοσίας και αφήνονται να καταναλώσουν τα υποστρώματα που βρίσκονται ήδη στο εσωτερικό τους για άλλες 24 h.

Στην περίπτωση της τροφοδοσίας με βάση την ένδειξη του DNS αυτό συνεπάγεται ότι δεν πραγματοποιείται προσθήκη τροφοδοσίας τις τελευταίες δύο ημέρες αλλά λαμβάνεται η ημερήσια μέτρηση DNS.

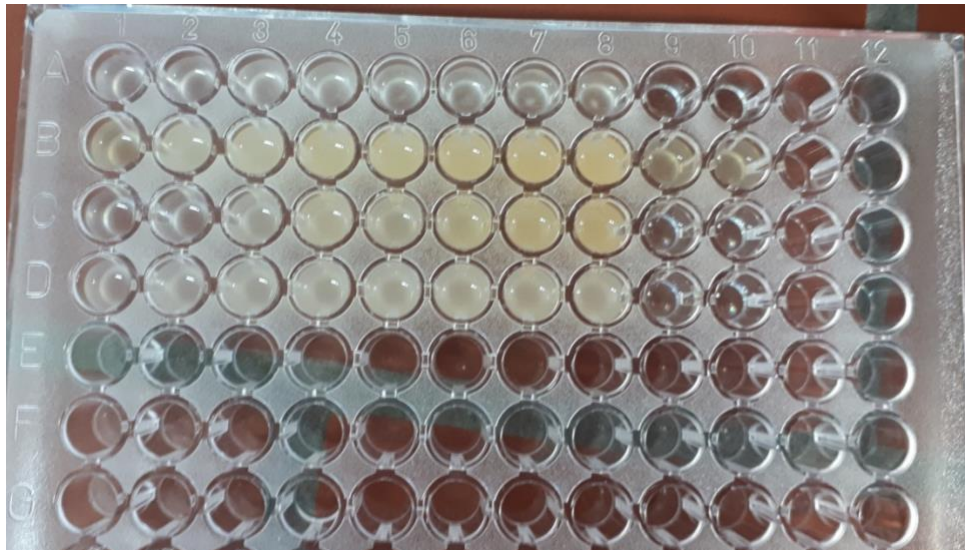
5.4 Λήψη δειγμάτων και επεξεργασία

Καθημερινά λαμβάνονται διπλά δείγματα από κάθε βιοαντιδραστήρα προκειμένου να μελετηθεί η πορεία της καλλιέργειας, η συσσώρευση και το είδος των λιπιδίων με την πάροδο του χρόνου. Για τους βιοαντιδραστήρες των 2L λαμβάνονται δείγματα όγκου 10 έως 14 mL ενώ για τους βιοαντιδραστήρες των 200 mL λαμβάνονται δείγματα 1-2 mL. Αυτό συμβαίνει καθώς για τους μικρότερους αντιδραστήρες ο όγκος τους δεν επαρκεί για να γίνει καθημερινή ανάλυση λιπαρών. Έτσι λαμβάνεται επαρκής όγκος για να γίνεται ανάλυση του υπερκείμενου και να εκτιμάται η κατανάλωση της τροφοδοσίας.

Τόσο τα ημερήσια δείγματα όσο και το θρεπτικό υλικό στο τέλος της καλλιέργειας ογκομετρούνται και κατόπιν φυγοκεντρώνται σε συνθήκες 3800 rpm για 10 min ώστε να παραληφθούν τα κύτταρα. Από το υπερκείμενο λαμβάνεται δείγμα 1 mL για να μετρηθούν οι συγκεντρώσεις των διαφόρων υποστρωμάτων και η μεταβολή τους με την πάροδο του χρόνου. Το υπόλοιπο υγρό αποχύνεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται με 1 mL διαλύματος αλατόνευρο 25% w/v ώστε να αποφευχθεί η αντίστροφη ώσμωση καθώς βρίσκονταν σε περιβάλλον με άλατα. Φυγοκεντρώνται εκ νέου για 5 min και το στερεό συλλέγεται σε πλαστικά δοχεία φυγοκέντρωσης όγκου 15 mL (falcon) και διατηρείται στην κατάψυξη.

Θολωσιμετρία

Η λήψη δειγμάτων αποσκοπεί και στην παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων και στον προσδιορισμό του σταδίου ανάπτυξης που βρίσκεται η καλλιέργεια. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της μεθόδου της θολωσιμετρίας. Η μέθοδος αυτή μετρά τη μείωση της έντασης της ακτινοβολίας στο δείγμα που οφείλεται στο φαινόμενο της σκέδασης. Από κάθε δείγμα λαμβάνονται 0,25 mL και τοποθετούνται σε μία θέση της πλάκας του φωτομέτρου microplate. Στη συνέχεια μετριέται η απορρόφηση στα 685 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται υπερκείμενο από ένα εκ των δειγμάτων το οποίο έχει φυγοκεντρωθεί για 2 min για να καταβυθιστούν τα κύτταρα. Η τελική απορρόφηση προκύπτει αν αφαιρεθεί η ένδειξη του τυφλού από όλα τα δείγματα. Η αύξηση της θολερότητας των δειγμάτων αποτελεί ένδειξη της ανάπτυξης του μικροφύκου ενώ όταν βρίσκεται στη στατική φάση είναι σταθερή.



Εικόνα 23: Εφαρμογή θολοσιμετρίας σε καθημερινά δείγματα βιοαντιδραστήρων

Λυοφιλίωση

Επιθυμείτε η πλήρης απομάκρυνση της υγρασίας ώστε να υπολογιστεί η απόδοση της διεργασίας σε βιομάζα και στη συνέχεια η ποσότητα των λιπαρών που συσσωρεύθηκαν και ειδικά του DHA. Το παραπάνω απαιτεί τον υπολογισμό της ξηρής βιομάζας που συλλέχθηκε αλλά καθώς τα λιπαρά μπορούν να αλλιωθούν σε υψηλή θερμοκρασία ως μέθοδος ξήρανσης εφαρμόζεται η λυοφιλίωση. Τα δείγματα που έχουν διατηρηθεί στην κατάψυξη σε falcon τοποθετούνται στο εσωτερικό της συσκευής λυοφιλίωσης καλυμμένα με αλουμινόχαρτο το οποίο έχει τρυπηθεί ώστε να διαφύγει η υγρασία. Κατά τη διάρκεια της λυοφιλίωσης εφαρμόζεται σύστημα κενού και θερμοκρασία $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ώστε το νερό να απομακρυνθεί από τα δείγματα μέσω εξάχνωσης. Εφόσον περάσουν τουλάχιστον 24 h τα δείγματα ζυγίζονται και η ποσότητα αυτή αντιστοιχεί στην ξηρή βιομάζα (Dry Cell Weight).

6. Ανάλυση λιπαρών οξέων

6.1 Εκχύλιση

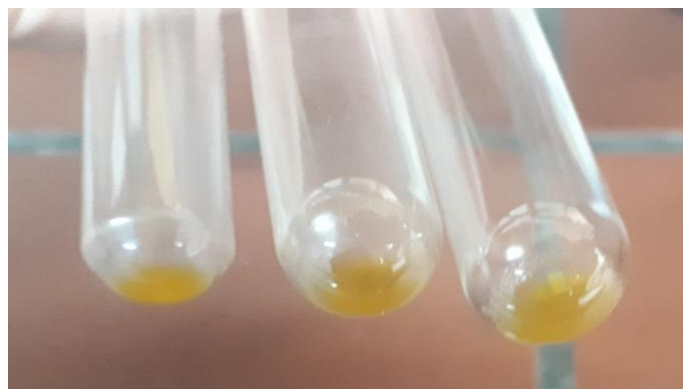
Για να εκτιμηθούν το ποσοστό και το είδος των λιπαρών, τα οποία συσσωρεύονται στα κύτταρα κατά την ανάπτυξη, απαιτείται διάρρηξη των κυττάρων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη οργανικών διαλυτών στους οποίους τα λιπαρά είναι διαλυτά. Λαμβάνεται ποσότητα 30-50 mg από το κάθε προς εξέταση δείγμα σε μορφή σκόνης προκειμένου να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής με το διαλύτη, η παραπάνω ποσότητα τοποθετείται σε falcon και προστίθεται με πιπέτα ποσότητα διαλύτη που αποτελείται από χλωροφόρμιο και μεθανόλη με αναλογία όγκων 2/1. Η ποσότητα αυτή αντιστοιχεί σε 5 mL για κάθε 25 mg βιομάζας. Μετά από ανάδευση τους παραμένουν ολονυχτίς σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υπό ανάδευση.

Την επόμενη μέρα προστίθεται σε κάθε falcon απιονισμένο νερό που αντιστοιχεί στο 20 % v/v του διαλύτη χλωροφόρμιο/μεθανόλη αποσκοπώντας στην απομάκρυνση μέρους της μεθανόλης η οποία παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με την υδατική φάση. Μετά από

ανάδευση τα falcon φυγοκεντρώνται σε 3500 rpm για 5 min και τα κύτταρα καταβυθίζονται. Τα λιπαρά παραμένουν στην οργανική φάση ενώ τα κύτταρα παραμένουν ανάμεσα στις δύο φάσεις. Συνεπώς η κάτω φάση που περιέχει τα λιπαρά τοποθετείται σε διάταξη που αποτελείται από δύο διαχωριστές χοάνες και εκπλένονται διαδοχικά με 1 mL διαλύτη 50 % v/v μεθανόλη/νερό. Ακολουθεί ανάδευση και όταν οι δύο φάσεις διαχωριστούν επαρκώς συλλέγεται η κάτω φάση στη δεύτερη χοάνη και ακολουθεί δεύτερη έκπλυση. Η κάτω φάση τη δεύτερη φορά συλλέγεται σε προζυγισμένο γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Οι εναπομείναντες διαλύτες και κυρίως το χλωροφόρμιο απομακρύνονται με παραμονή σε φούρνο θερμοκρασίας 40 °C υπό κενό για 1 βράδυ. Επιλέγεται πίεση 430 mbar με βάση την πτητικότητα τους ώστε να εξατμιστούν οι διαλύτες. Τελικά ζυγίζονται οι δοκιμαστικοί σωλήνες και υπολογίζεται η συνολική ποσότητα των λιπαρών οξέων που περιέχονταν στο αρχικό δείγμα.



Εικόνα 24: Εκχυλιστική χοάνη για διαχωρισμό και απομόνωση λιπαρών

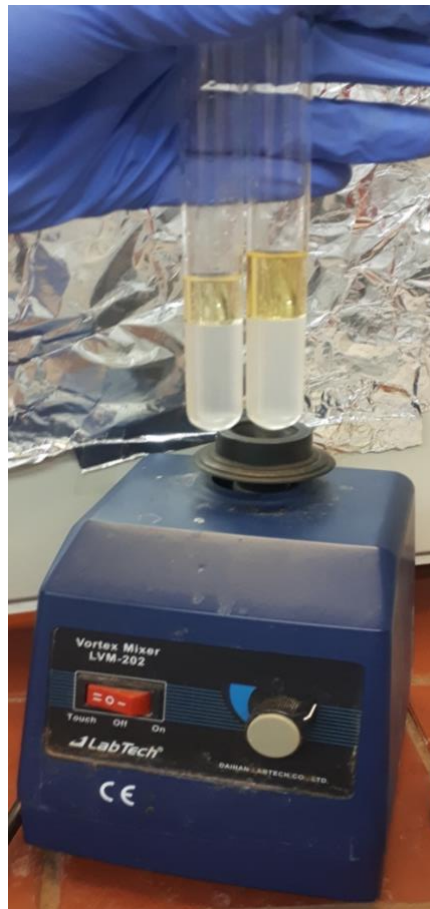


Εικόνα 25: Δοκιμαστικοί σωλήνες που περιέχουν τα λιπαρά μετά την απομάκρυνση του διαλύτη

6.2 Εστεροποίηση

Πέρα από την ποσότητα σημαντικό είναι να προσδιοριστεί και το λιπιδικό προφίλ σε κάθε περίπτωση. Αυτό οδηγεί στον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας DHA που παράγεται σε κάθε διεργασία επιτρέποντας τη σύγκριση της απόδοσης ανάμεσα στους διάφορους αντιδραστήρες. Η ταυτοποίηση των λιπιδίων απαιτεί τη μετατροπή τους σε μεθυλεστέρες οι οποίοι είναι πτητικοί και μπορούν να ανιχνευθούν με αέρια χρωματογραφία (GC). Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται σε αυτό το στάδιο είναι υψηλής καθαρότητας (HPLC grade).

Για το σκοπό αυτό σε κάθε ένα δοκιμαστικό σωλήνα πραγματοποιείται επαναδιάλυση των λιπαρών με 1 mL χλωροφόρμιο και προσθήκη 2,5 mL διαλύματος αποτελούμενο από 8% υδροχλώριο (HCL) και 92% μεθανόλη (MeOH) v/v. Η αντίδραση εστεροποίησης διεξάγεται σε υδατόλουτρο που βρίσκεται σταθερά σε θερμοκρασία 60 °C για 15 min με το υδροχλώριο να αποτελεί τον καταλύτη της αντίδρασης (όξινη κατάλυση). Η αντίδραση σταματά όταν προστίθεται 2,5 mL διαλύματος CaCl_2 5% w/v. Τέλος οι μεθυλεστέρες συλλέγονται με 3 διαδοχικές εκχυλίσεις με 1 mL εξάνιο. Η επάνω σχηματιζόμενη φάση μετά από ανάδευση συλλέγεται κάθε φορά από το σωλήνα και διατηρείται σε falcon. Επειδή οι μεθυλεστέρες είναι πτητικοί τα falcon διατηρούνται στην κατάψυξη.



Εικόνα 26: Εκχύλιση μεθυλεστέρων με προσθήκη εξανίου

6.3 Χρωματογραφικές Τεχνικές Ανίχνευσης

Οι χρωματογραφικές τεχνικές επιτρέπουν την ανίχνευση των ενώσεων που περιέχονται στα προς εξέταση δείγματα. Τα λιπίδια που παράγονται και συλλέγονται από την καλλιέργεια του *C. cohnii* μπορούν να ανιχνευτούν με αέρια χρωματογραφία ενώ με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση των υποστρωμάτων που παρέχονται στο σύστημα. Ανάλογα με το πείραμα εκτιμάται η κατανάλωση των υποστρωμάτων που τροφοδοτούνται, δηλαδή του οξικού οξέος ή στην περίπτωση της χρήσης πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs) των επιμέρους συστατικών.

6.3.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των συστατικών μιγμάτων ουσιών και αξιοποιείται για την ποσοτικοποίηση των διαφόρων συστατικών. Στο εσωτερικό της στήλης βρίσκεται ακινητοποιημένο αδρανές υλικό, στατική φάση, ενώ στη στήλη ρέει συνεχώς ένας ή περισσότεροι διαλύτες, κινητή φάση. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται ανάλογα με τη συγγένεια των ουσιών με τις δύο φάσεις με αποτέλεσμα να εξέρχονται από αυτήν σε διαφορετικό χρόνο.

Στη παρούσα περίπτωση χρησιμοποιείται υγρός χρωματογράφος HPLC (Shimadzu apparatus, Kyoto, Japan) με στήλη Aminex HPX-87H (300x7,8 mm, particle size 9 μm; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) σε σειρά με προστήλη Cation-H Bio-Rad micro-guard column. Η κινητή φάση αποτελείται από διαλύτη 5 mM θειικό οξύ με συνεχή ροή 0,6 mL/min. Η θερμοκρασία της στήλης παραμένει σταθερή στους 65 °C κατά τη διάρκεια της ανάλυσης με τη χρήση φούρνου και κάθε ανάλυση διαρκεί περίπου 20 min. Η ανίχνευση πραγματοποιείται μέσω της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του προς ανάλυση δείγματος σε σχέση με τον καθαρό διαλύτη, Refractive Index ανιχνευτής (RID).

6.3.2 Αέρια Χρωματογραφία (GC)

Ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων είναι δυνατά με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας. Αυτό οφείλεται στην πτητικότητα των μεθυλεστέρων η ανίχνευση των οποίων γίνεται με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (FID).

Η ανάλυση ξεκινά με την ένεση του δείγματος που προέρχεται από την εστεροποίηση των λιπαρών και στη συνέχεια το δείγμα διαχωρίζεται στα επιμέρους συστατικά του. Χρησιμοποιείται split ratio 1:50. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης ρέει He ως φέρον αέριο στη στήλη με ροή 1 mL/min. Η θερμοκρασία της στήλης ξεκινά από 125 °C και αυξάνεται έως τους 240 °C με ρυθμό 5 °C/min, όπου παραμένει για 9 min σταθερή. Με βάση το χρόνο έκλουσης των επιμέρους λιπαρών μπορεί να γίνει ταυτοποίηση τους αν ο χρόνος αυτός έχει προηγουμένως προσδιοριστεί με αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή φασματόμετρο μάζας (MS). Αντιθέτως η ποσοτικοποίηση των συστατικών είναι δυνατή με τη χρήση FID ανιχνευτή. Με βάση το εμβαδόν κάθε κορυφής προκύπτουν οι συγκεντρώσεις των συστατικών χρησιμοποιώντας μια καμπύλη αναφοράς που έχει προκύψει από πρότυπα δείγματα.

7. Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

7.1 Απόδοση Ξηρής Βιομάζας

Σε καθημερινά δείγματα της καλλιέργειας του μικροφύκου για κάθε βιοαντιδραστήρα ζυγίζεται η λυοφιλιωμένη συνολική ξηρή βιομάζα των κυττάρων και προσδιορίζεται ο όγκος του δείγματος. Έτσι προκύπτει η απόδοση σε ξηρή βιομάζα ανά μονάδα όγκου του βιοαντιδραστήρα ως εξής:

$$\text{Απόδοση βιομάζας } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{\text{Συνολική ξηρή βιομάζα}(g)}{\text{Όγκος δείγματος}(L)}$$

Στο σύστημα των μικρότερων βιοαντιδραστήρων όπου δεν υπάρχει η δυνατότητα λήψης καθημερινών δειγμάτων, προσδιορίζεται η απόδοση βιομάζας μόνο στο τέλος της εκάστοτε καλλιέργειας που αντιστοιχεί στην τελική παραγωγή βιομάζας.

7.2 Λιπαρά οξέα

Για κάθε βιοαντιδραστήρα λαμβάνονται δύο διπλά ημερήσια δείγματα και στο κάθε ένα από αυτά ζυγίζεται μία ποσότητα ξηρής βιομάζας που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση. Μετά την εκχύλιση των λιπαρών οξέων και την απομάκρυνση του διαλύτη ζυγίζεται η ποσότητα που έχει απομείνει η οποία αντιστοιχεί στην ποσότητα των λιπαρών οξέων. Το ποσοστό των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

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

7.3 Μεθυλεστέρες λιπαρών-GC

Μετά την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων από τα δείγματα του βιοαντιδραστήρα, αναλύονται τα δείγματα σε αέριο χρωματογράφο. Από το εμβαδόν της κορυφής κάθε λιπαρού οξέος μέσω της καμπύλης αναφοράς προκύπτει το ποσοστό του σε σχέση με το σύνολο των λιπαρών οξέων. Με βάση το ποσοστό των λιπαρών που περιέχονται στην ξηρή βιομάζα υπολογίζονται τα ποσοστά του κάθε λιπαρού οξέος επί της ξηρής βιομάζας (% DCW):

$$\begin{aligned} \text{Ποσοστό λιπαρού οξέος επί της ξηρής βιομάζας (\% DCW)} \\ = \% \text{ λιπαρού οξέος} \\ \cdot \text{Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας (\% DCW)} \end{aligned}$$

7.4 Σύγκριση παραγωγής DHA

Τέλος, χάριν σύγκρισης υπολογίζεται η ποσότητα DHA στους δύο βιοαντιδραστήρες, που αποτελεί το αντικείμενο του ενδιαφέροντος της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η ποσότητα του υπολογίζεται ως εξής:

$$\begin{aligned} \text{Ποσότητα DHA } \left(\frac{g}{L}\right) &= \% \text{ DHA} \cdot \% \text{ λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας (\% DCW)} \\ &\cdot \text{Απόδοση σε ξηρή βιομάζα } \left(\frac{g}{L}\right) \end{aligned}$$

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

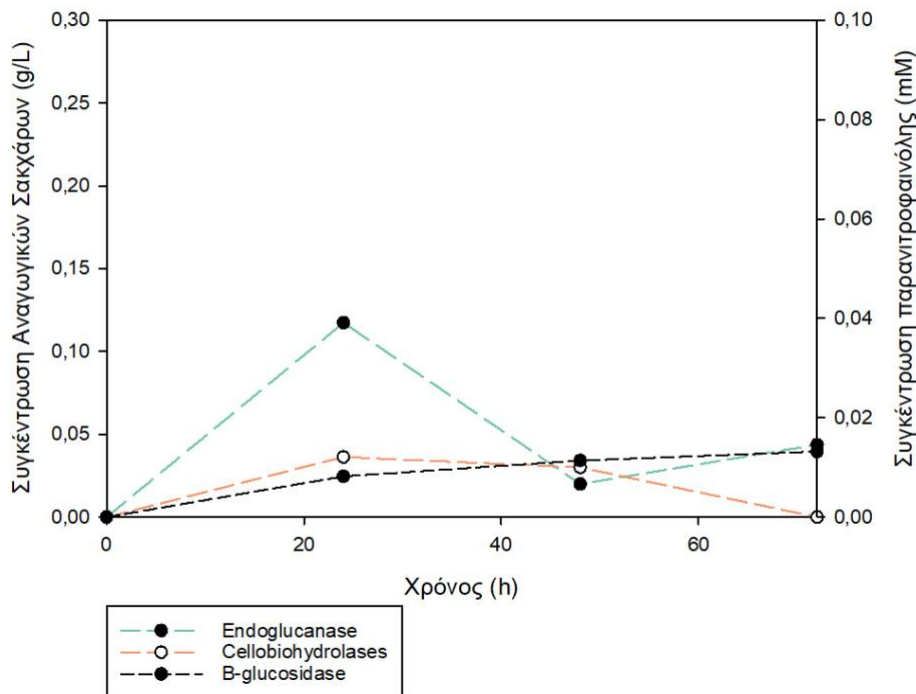
1. Έλεγχος έκφρασης και ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινασών

Για την εξέταση της ενεργότητας των κυτταρινασών δημιουργήθηκαν καλλιέργειες του μικροφύκου σε διαφορετικά υποστρώματα και στην περίπτωση του Avicel εξετάστηκαν και διαφορετικές συγκεντρώσεις. Κάθε μέτρηση προέκυψε ως ο μέσος όρος των απορροφήσεων διπλών καλλιεργειών για κάθε υπόστρωμα. Μετρήθηκε κάθε φορά η απορρόφηση του τυφλού δείγματος και αφαιρέθηκε η τιμή της από την απορρόφηση των δειγμάτων που εξετάστηκαν. Ο έλεγχος της ενεργότητας πραγματοποιήθηκε εξετάζοντας τη συγκέντρωση των προϊόντων που προκύπτουν από την κάθε ενζυμική αντίδραση. Για τα υποστρώματα CMC, Avicel και ξυλάνη υπολογίστηκαν τα αναγωγικά σάκχαρα με τη μέθοδο DNS, ενώ για τα pNpG και pNpC η συγκέντρωση της παρανιτροφαινόλης (pNp). Η απορρόφηση μέσω της καμπύλης αναφοράς για κάθε υπόστρωμα μετατράπηκε σε συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων και της παρανιτροφαινόλης στο διάλυμα αντίστοιχα.

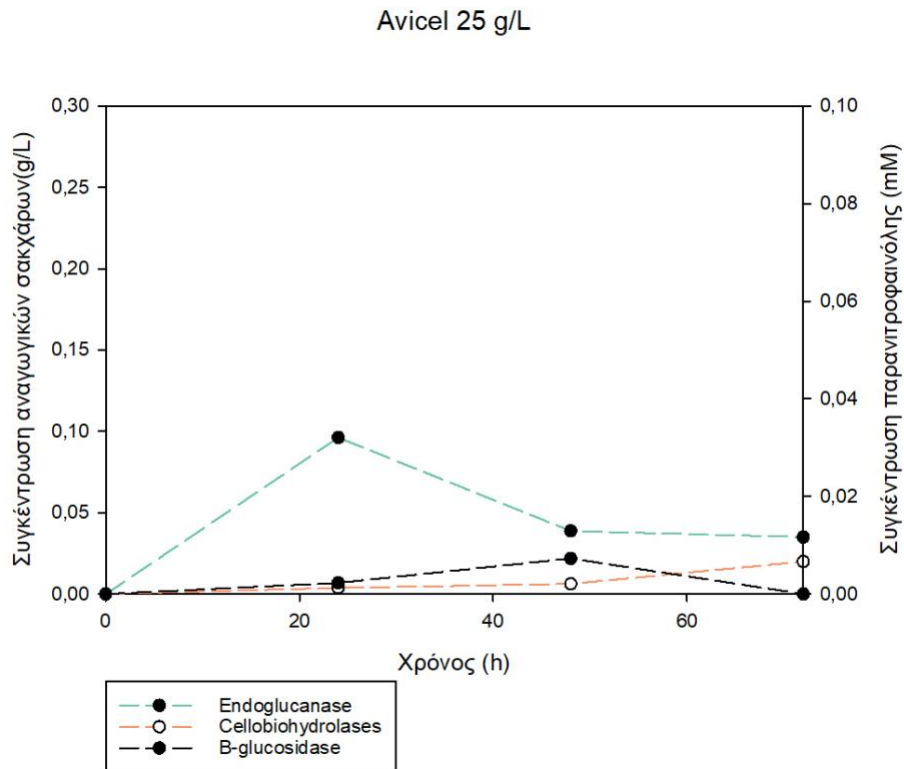
1.1 Avicel

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε καθημερινά δείγματα των καλλιεργειών για εξέταση ενζυμικής ενεργότητας ενδογλουκανάσης σε υπόστρωμα CMC, κελλοβιοϋδρολάσης σε υπόστρωμα Avicel και β-γλυκοζιδάσης σε υπόστρωμα pNpG σε καλλιέργειες Avicel με συγκεντρώσεις 15 και 25 g/L αντίστοιχα.

Avicel 15 g/L



Διάγραμμα 1: Συγκεντρώσεις αναγωγικών σακχάρων (ενδογλουκανάση και κελλοβιοϋδρολάσης) και παρανιτροφαινόλης (β-γλυκοζιδάση) καθημερινών δειγμάτων καλλιεργειών Avicel 15g/L pH=5



Διάγραμμα 2: Συγκεντρώσεις αναγωγικών σακχάρων (ενδογλουκανάση και κελλοβιϋδρολάσες) και παρανιτροφαινόλης (β-γλυκοζιδάση) καθημερινών δειγμάτων καλλιέργειών Avicel 25g/L pH=5

Ταυτόχρονα εξετάστηκε και η επίδραση του pH διεξάγοντας τις αναλύσεις σε τιμές pH 5 και 6. Ωστόσο δεν παρουσιάστηκε ουσιαστική επίδραση. Επειδή οι συγκεντρώσεις στην περίπτωση του Avicel ήταν χαμηλές, οι αναλύσεις διακόπηκαν στις 72h.

1.2 CMC, Corn Cob

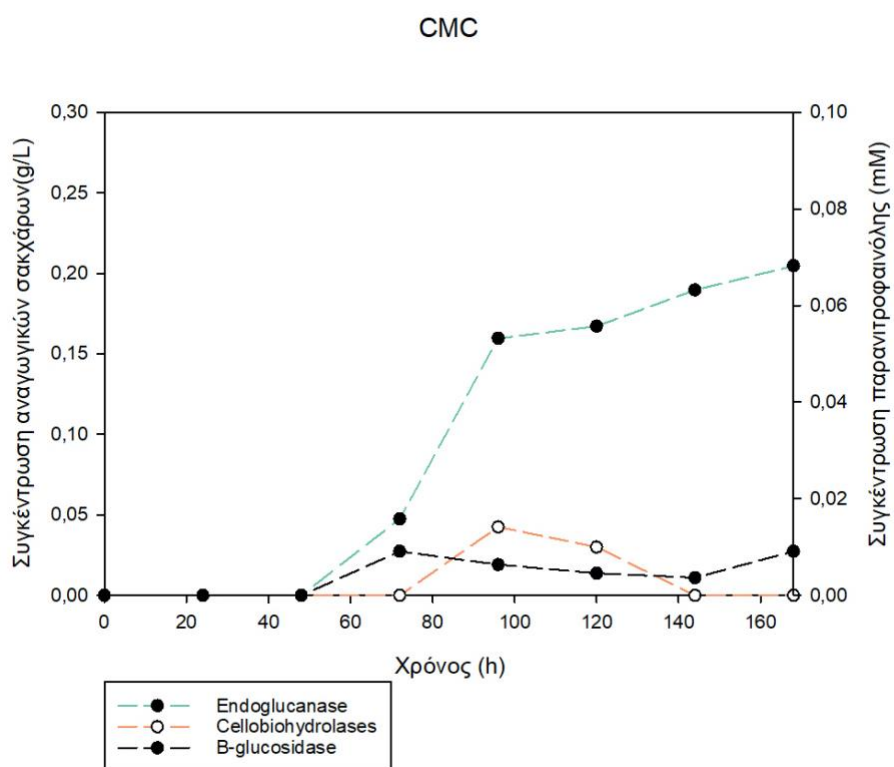
Εφόσον το Avicel εμφάνισε χαμηλές έως αμελητέες τιμές συγκεντρώσεων, στη συνέχεια διερευνήθηκαν καλλιέργειες με υπόστρωμα CMC και Corn Cob, υποστρώματα που παρουσιάζουν χαμηλότερο βαθμό κρυσταλλικότητας. Η εξέταση της ενζυμικής ενεργότητας ενδογλουκανάσης πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα CMC, κελλοβιϋδρολάσης σε υπόστρωμα Avicel και β-γλυκοζιδάσης σε υπόστρωμα pHrG. Οι καλλιέργειες μελετήθηκαν για χρόνο 168 h ενώ κατά την τελευταία μέρα μελετήθηκε παράλληλα και η επίδραση της τιμή του pH. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

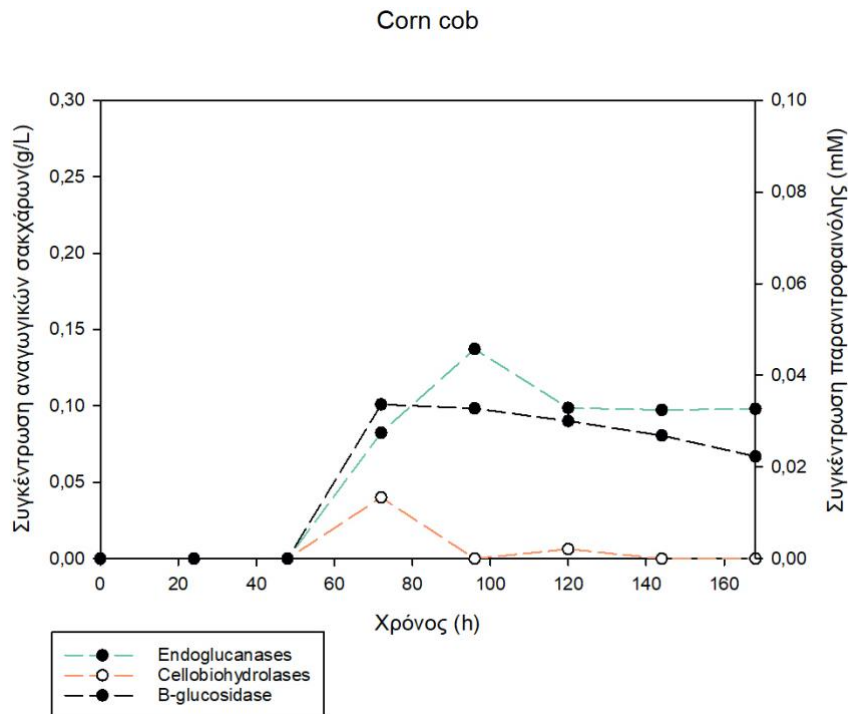
Πίνακας 6: : Συγκεντρώσεις αναγωγικών σακχάρων (ενδογλουκανάση και κελλοβιϋδρολάσες) και παρανιτροφαινόλης (β-γλυκοζιδάση) στις 168 h για τιμές pH 5 και 6 καλλιεργείων CMC, Corn Cob

Συγκεντρώσεις στις 168 h καλλιέργειας

Δείγμα	pH =5			pH =6		
	Αναγωγικών σακχάρων [g/L] (Ενδο-γλουκανάση)	Αναγωγικών σακχάρων [g/L] (Κελλοβιο-ϋδρολάση)	Παρα-νιτροφαινόλης [mM] (B-γλυκοζιδάση)	Αναγωγικών σακχάρων [g/L] (Ενδο-γλουκανάση)	Αναγωγικών σακχάρων [g/L] (Ενδο-γλουκανάση)	Παρα-νιτροφαινόλης [mM] (B-γλυκοζιδάση)
CMC	0,205	0	0,009	0,192	0	0,005
Corn Cob	0,037	0	0,010	0,116	0	0,025

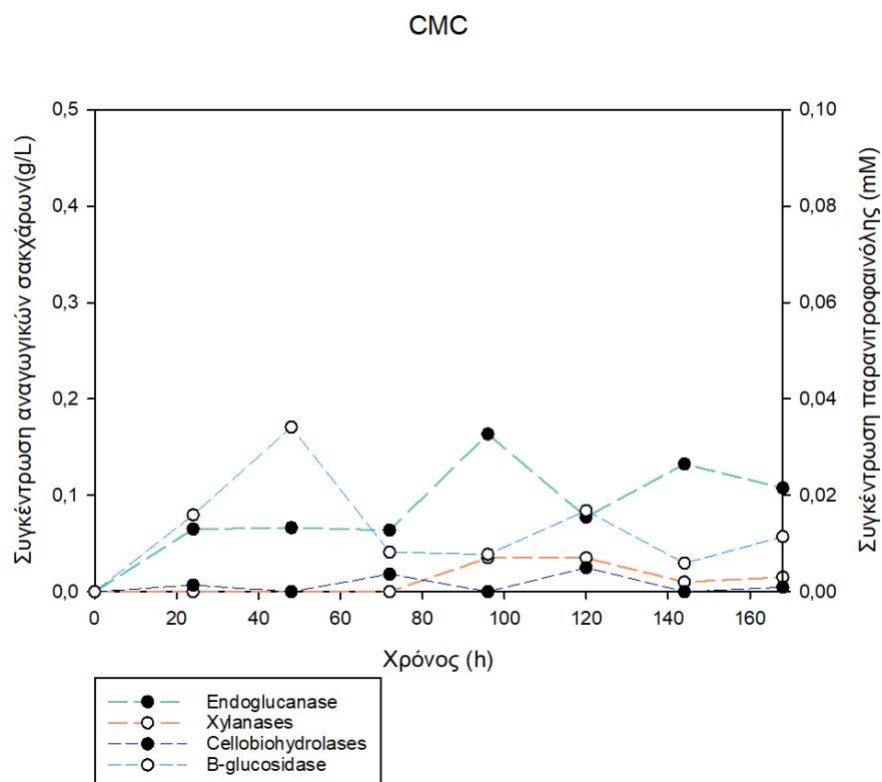


Διάγραμμα 3: Συγκεντρώσεις αναγωγικών σακχάρων (ενδογλουκανάση και κελλοβιϋδρολάσες) και παρανιτροφαινόλης (β-γλυκοζιδάση) καθημερινών δειγμάτων καλλιεργείων CMC 20g/L, pH=5



Διάγραμμα 4: Συγκεντρώσεις αναγωγικών σακχάρων (ενδογλουκανάση και κελλοβιοϋδρολάσες) και παρανιτροφαινόλης (β-γλυκοζιδάση) καθημερινών δειγμάτων καλλιέργειών Corn Cob 20g/L, pH=5

Εφόσον από τα παραπάνω υποστρώματα το CMC εμφάνισε μεγαλύτερη συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων κατά την εξέταση ενζυμικής ενεργότητας ενδογλουκανάσης, αλλά όχι επαρκώς μεγάλη μελετήθηκαν εκ νέου καλλιέργειες. Σε αυτές χρησιμοποιήθηκε δείγμα από την καλλιέργεια που περιέχει και κύτταρα και όχι μόνο υπερκείμενο για να εξεταστεί αν κάποιο από τα ένζυμα βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Παράλληλα έγινε μια επιπλέον ανάλυση για εξέταση ενζυμικής ενεργότητας ξυλανάσων σε υπόστρωμα ξυλάνη ενώ για τις κελλοβιοϋδρολάσες χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα pNpC. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις για την ενδογλουκανάση χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα CMC και για τη β-γλυκοζιδάση pNpG.



Διάγραμμα 5: Συγκεντρώσεις αναγωγικών σακχάρων (ενδογλουκανάση και ξυλανάσων) και παρανιτροφαινόλης (β-γλυκοζιδάση και κελλοβιοϋδρολάση) καθημερινών δειγμάτων καλλιιεργειών CMC 20g/L, pH=5

Είναι φανερό ότι η συγκέντρωση είναι αμελητέα για την την μέθοδο προσδιορισμού ενεργότητας της κελλοβιοϋδρολάσης και των ξυλανάσων ενώ προκύπτει χαμηλή τιμή συγκέντρωσης κατά τον προσδιορισμό της ενδογλουκανάσης και της β-γλυκοζιδάσης.

2. Μελέτη χρήσης υδρολύματος σε καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου

2.1 Συγκριτική μελέτη Fed-batch καλλιιεργειών με τροφοδοσία Γλυκόζη και Γλυκόζη-Ξυλόζη

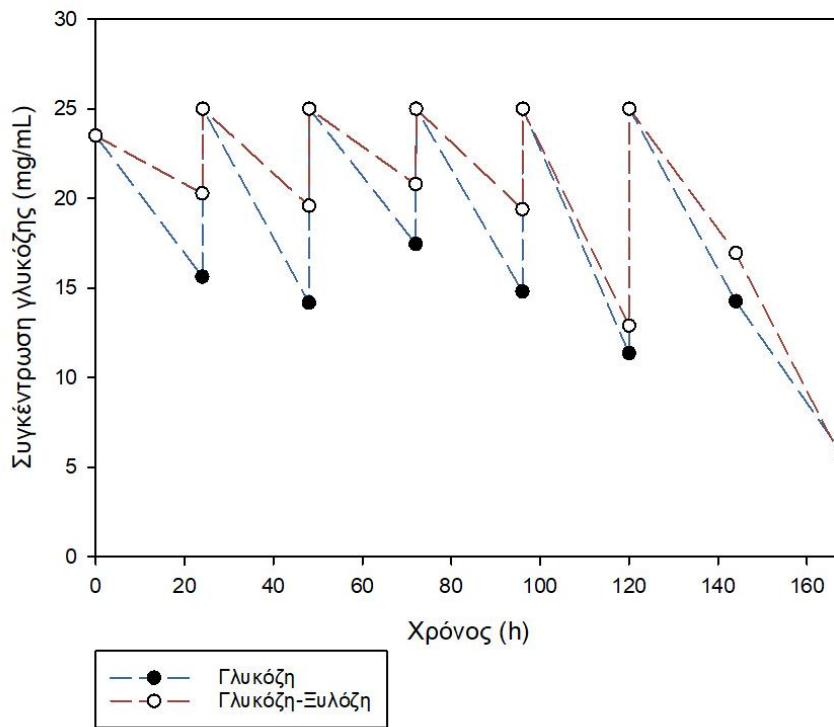
Στα πλαίσια της εύρεσης εναλλακτικών πηγών άνθρακα εξετάζεται η χρήση του υδρολύματος λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Για τη μελέτη της πιθανής χρήσης του υδρολύματος χρησιμοποιήθηκε ως τροφοδοσία των καλλιιεργειών του μικροφύκους στους βιοαντιδραστήρες υδατικό διάλυμα γλυκόζης 140 g/L στη μία περίπτωση και διάλυμα γλυκόζης 140 g/L και ξυλόζης 24 g/L στην άλλη περίπτωση. Η γλυκόζη χρησιμοποιείται ως βιοαντιδραστήρας αναφοράς.

2.1.1 Συγκέντρωση Γλυκόζης

Οι βιοαντιδραστήρες τροφοδοτήθηκαν με τις δύο τροφοδοσίες ώστε η συγκέντρωση της γλυκόζης να παραμένει καθημερινά σε συγκέντρωση κοντά στην τιμή 25 g/L. Αυτό πραγματοποιήθηκε με καθημερινά δείγματα στα οποία η συγκέντρωση της περιεχόμενης γλυκόζης προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο προσδιορισμού γλυκόζης με το εμπορικό σκεύασμα GOD/POD. Στα δείγματα μετρήθηκε η απορρόφηση από την οποία αφαιρέθηκε

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

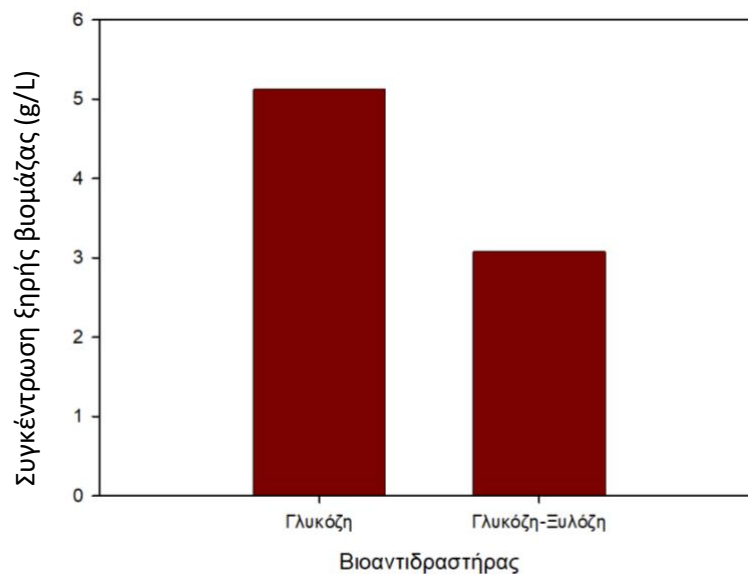
η ένδειξη του τυφλού και βάση της καμπύλης αναφοράς προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της γλυκόζης στους αντιδραστήρες.



Διάγραμμα 6: Μεταβολή συγκέντρωσης γλυκόζης στους βιοαντιδραστήρες με τροφοδοσία γλυκόζης, γλυκόζης – ξυλόζης

2.1.2 Απόδοση Ξηρής Βιομάζας

Μετά το πέρας της καλλιέργειας του μικροφύκου για κάθε βιοαντιδραστήρα προσδιορίζεται η απόδοση σε ξηρή βιομάζα ανά μονάδα όγκου του κάθε βιοαντιδραστήρα.



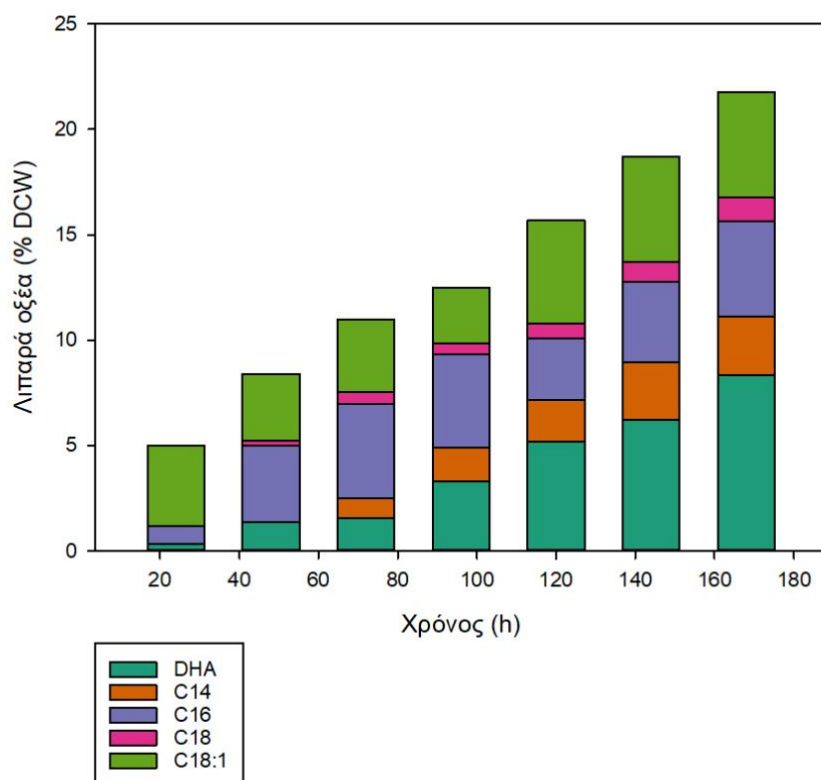
Διάγραμμα 7: Απόδοση ξηρής βιομάζας βιοαντιδραστήρων με τροφοδοσία γλυκόζης, γλυκόζης – ξυλόζης

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

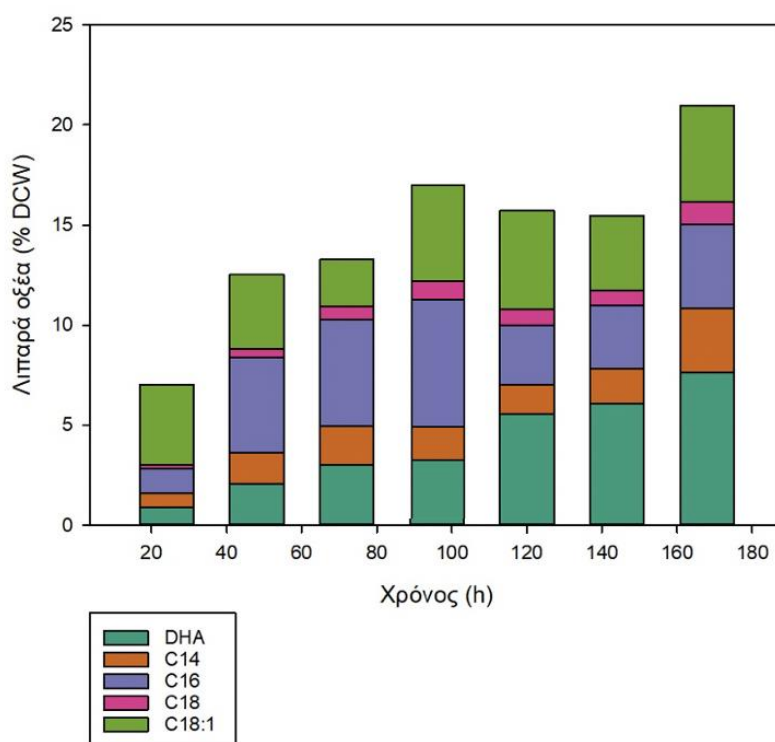
Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα ο βιοαντιδραστήρας με τροφοδοσία γλυκόζη εμφάνισε αυξημένη απόδοση βιομάζας σε σύγκριση με το βιοαντιδραστήρα που τροφοδοτήθηκε με γλυκόζη και ξυλόζη.

2.1.3 Λιπαρά οξέα-Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων

Για κάθε βιοαντιδραστήρα πραγματοποιείται εκχύλιση λιπαρών οξέων από όπου υπολογίζεται η ποσότητα των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας. Μετά την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων από τα δείγματα του βιοαντιδραστήρα, αναλύονται τα δείγματα σε αέριο χρωματογράφο.



Διάγραμμα 8: Προφίλ και ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας κατά τη λειτουργία του βιοαντιδραστήρα γλυκόζης



Διάγραμμα 9: Προφίλ και ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας κατά τη λειτουργία του βιοαντιδραστήρα γλυκόζης – ξυλόζης

Κατά την τροφοδοσία του βιοαντιδραστήρα με γλυκόζη παρατηρήθηκε αύξηση των λιπαρών οξέων με την πάροδο του χρόνου ενώ κατά την τροφοδοσία γλυκόζης-ξυλόζης δεν παρατηρήθηκε η ίδια τάση. Το τελικό ποσοστό των λιπαρών βρίσκεται σε παραπλήσια τιμή για τους δύο βιοαντιδραστήρες.

2.1.4 Σύγκριση παραγωγής DHA

Τέλος, υπολογίζεται η ποσότητα DHA στους δύο βιοαντιδραστήρες ώστε να συγκριθούν ως προς την απόδοσή τους.

Πίνακας 7: Ποσοστό και συγκέντρωση παραγόμενου DHA στους βιοαντιδραστήρες με τροφοδοσία γλυκόζης και γλυκόζης-ξυλόζης στις 168 h καλλιέργειας

Τροφοδοσία	Ποσοστό DHA (% TFA)	Ποσότητα DHA (g/L)
Γλυκόζη	38,36	0,43
Γλυκόζη-Ξυλόζη	36,47	0,24

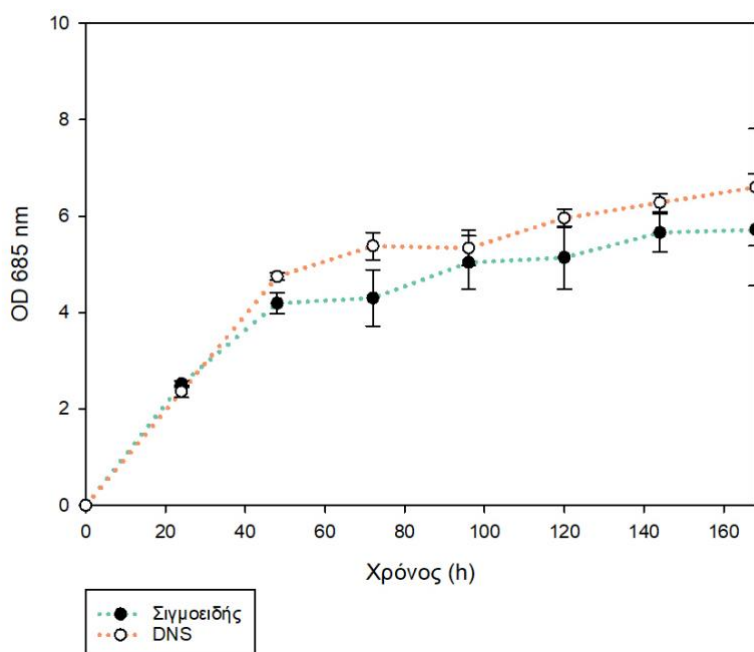
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.2 Μέθοδος παροχής γλυκόζης-ξυλόζης

Εφόσον το μικροφύκος έχει τη δυνατότητα να αναπτυχθεί σε διάλυμα γλυκόζης-ξυλόζης εξετάζεται η βέλτιστη μέθοδος παροχής της συγκεκριμένης τροφοδοσίας.

2.2.1 Ανάπτυξη κυττάρων

Προκειμένου να παρακολουθηθεί η ανάπτυξη των κυττάρων στους βιοαντιδραστήρες 200 mL λήφθηκαν καθημερινά δείγματα τα οποία φωτομετρήθηκαν. Από κάθε τιμή απορρόφησης αφαιρέθηκε η απορρόφηση του τυφλού δείγματος που προέκυψε από το υπερκείμενο του αρχικού δείγματος κάθε βιοαντιδραστήρα κατόπιν φυγοκέντρησης. Κάθε μέτρηση προέκυψε ως ο μέσος όρος των απορροφήσεων από δύο βιοαντιδραστήρες που λειτουργούσαν στις ίδιες συνθήκες παράλληλα και υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση των τιμών.



Διάγραμμα 10: Ανάπτυξη κυττάρων βιοαντιδραστήρων με διαφορετική μέθοδο παροχής τροφοδοσίας γλυκόζης – ξυλόζης

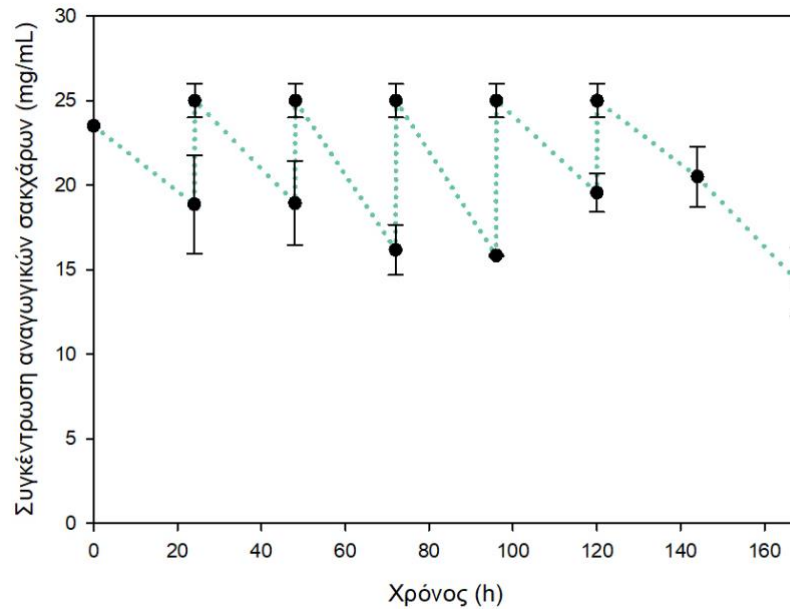
Από το παραπάνω διάγραμμα φανερώνεται ότι τα κύτταρα που τροφοδοτήθηκαν με βάση τη μέθοδο DNS εμφάνισαν αυξημένη απορρόφηση που αποτελεί ένδειξη αυξημένης ανάπτυξης σε σχέση με την άλλη μέθοδο. Κατά την ανάπτυξη των κυττάρων με βάση την εκθετική ανάπτυξη αυξήθηκε σημαντικά ο όγκος των καλλιιεργειών λόγω της προσθήκης μεγάλης ποσότητας τροφοδοσίας από τις πρώτες ημέρες με αποτέλεσμα να κριθεί ακατάλληλη μέθοδος παροχής της τροφοδοσίας.

2.2.2 Συγκέντρωση Αναγωγικών σακχάρων

Οι βιοαντιδραστήρες τροφοδοτήθηκαν με την τροφοδοσία ώστε η συγκέντρωση της αναγωγικών σακχάρων να παραμένει καθημερινά σε συγκέντρωση κοντά στην τιμή 25 g/L. Αυτό πραγματοποιήθηκε με καθημερινά δείγματα στα οποία η συγκέντρωση τους προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο DNS. Αφού προηγήθηκε η αντίδραση για σχηματισμό

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

συμπλόκου, η απορρόφηση μετρήθηκε σε φωτόμετρο στα 540 nm. Από την απορρόφηση των δειγμάτων αφαιρέθηκε η ένδειξη του τυφλού και βάση της καμπύλης αναφοράς προσδιορίστηκε η συγκέντρωση τους στους αντιδραστήρες. Από τους δύο βιοαντιδραστήρες που είχαν τις ίδιες συνθήκες λήφθηκε ως συγκέντρωση ο μέσος όρος.

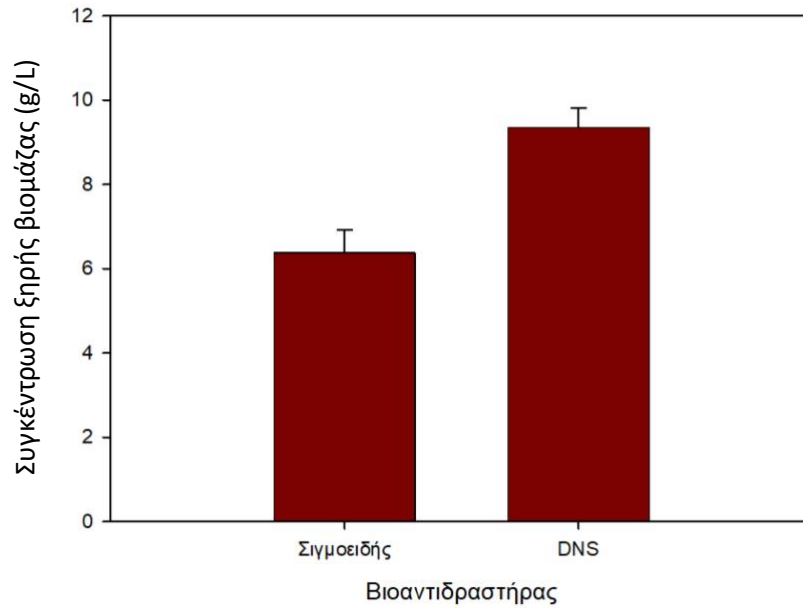


Διάγραμμα 11: Μεταβολή συγκέντρωσης αναγωγικών σακχάρων στους βιοαντιδραστήρες με παροχή τροφοδοσίας γλυκόζης – ζυλόζης με τη μέθοδο DNS

Ομοίως προσδιορίστηκε και η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS σε καθημερινά δείγματα κατά την παροχή τροφοδοσίας με βάση τη σιγμοειδή καμπύλη. Ωστόσο βρέθηκε μηδενική η συγκέντρωσή τους.

2.2.3 Απόδοση Ξηρής Βιομάζας

Μετά το πέρας της καλλιέργειας του μικροφύκου για κάθε βιοαντιδραστήρα υπολογίζεται η απόδοση σε ξηρή βιομάζα ανά μονάδα όγκου του βιοαντιδραστήρα.

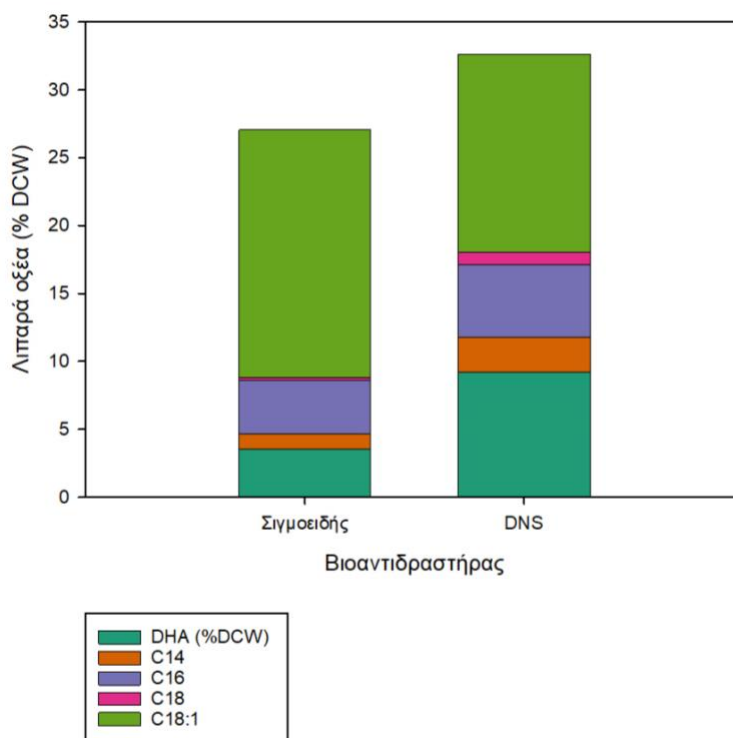


Διάγραμμα 12: Απόδοση ξηρής βιομάζας στους βιοαντιδραστήρες με διαφορετική μέθοδο παροχής τροφοδοσίας γλυκόζης – ζυλόζης

Συγκρίνοντας την παραγωγή βιομάζας στους δύο βιοαντιδραστήρες, η παροχή τροφοδοσίας με τη μέθοδο DNS οδήγησε σε αυξημένη βιομάζα σε σχέση με την παροχή με βάση σιγμοειδή καμπύλη.

2.2.4 Λιπαρά οξέα-Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων

Για κάθε βιοαντιδραστήρα πραγματοποιείται εκχύλιση λιπαρών οξέων από όπου υπολογίζεται η ποσότητα των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας. Μετά την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων από τα δείγματα του βιοαντιδραστήρα, αναλύονται τα δείγματα σε αέριο χρωματογράφο.



Διάγραμμα 13: Προφίλ και ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας σε βιοαντιδραστήρες με διαφορετική μέθοδο παροχής τροφοδοσίας γλυκόζης-ξυλόζης

Το παραπάνω Διάγραμμα καθιστά φανερό ότι κατά την παροχή τροφοδοσίας με τη μέθοδο DNS συσσωρεύονται περισσότερα λιπαρά σε σχέση με την άλλη μέθοδο τροφοδοσίας.

2.2.5 Σύγκριση παραγωγής DHA

Τέλος, υπολογίζεται η ποσότητα DHA στους δύο βιοαντιδραστήρες που είναι το επιθυμητό προϊόν της καλλιέργειας.

Πίνακας 8: Ποσοστό και συγκέντρωση παραγόμενου DHA στους βιοαντιδραστήρες με διαφορετική μέθοδο τροφοδοσίας στις 168 h καλλιέργειας

Μέθοδος παροχής τροφοδοσίας	Ποσοστό DHA (% TFA)	Ποσότητα DHA (g/L)
Σιγμοειδής	12,98	0,22
DNS	28,11	0,86

3. Επίδραση συνθηκών σε καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου για αξιοποίηση βιοαποβλήτων

3.1 Συνδυαστική τροφοδοσία οξικού οξέος και γλυκόζης

Κατά τη χρήση πολλαπλών πηγών άνθρακα καταναλώνεται από το μικροοργανισμό αρχικά το προτιμητέο υπόστρωμα και στη συνέχεια το κάθε υπόστρωμα με βάση τη σειρά προτίμησης του. Έτσι η γλυκόζη προτιμάται ως υπόστρωμα και κατόπιν εξάντλησης της καταναλώνεται το οξικό οξύ. Εξετάστηκε λοιπόν η εύρεση της κατάλληλης ποσότητας γλυκόζης που πρέπει να προστεθεί στην τροφοδοσία οξικού οξέος του βιοαντιδραστήρα

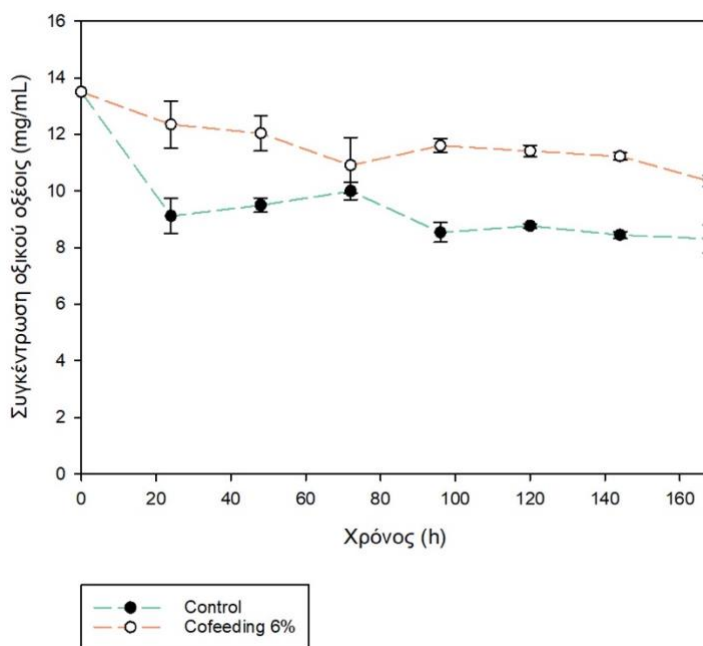
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ώστε να καταναλώνονται ταυτόχρονα τα δύο υποστρώματα. Συγκεκριμένα έγινε προσθήκη γλυκόζη που αντιστοιχούσε σε 6%, 3%, 1,2% και 0,6% επί του ποσοστού των mol του άνθρακα της τροφοδοσίας του βιοαντιδραστήρα και συγκρίθηκε κάθε φορά με τροφοδοσία οξικού οξέος (control).

Επειδή σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός αντιδραστήρας με τροφοδοσία οξικού οξέος (control) για να είναι δυνατή η σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών βιοαντιδραστήρων πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση. Η κανονικοποίηση έγινε βάσει του βιοαντιδραστήρα με τροφοδοσία οξικού οξέος κατά τη σύγκριση του με τη συνδυαστική τροφοδοσία με 6% γλυκόζη.

3.1.1 Συγκέντρωση οξικού οξέος

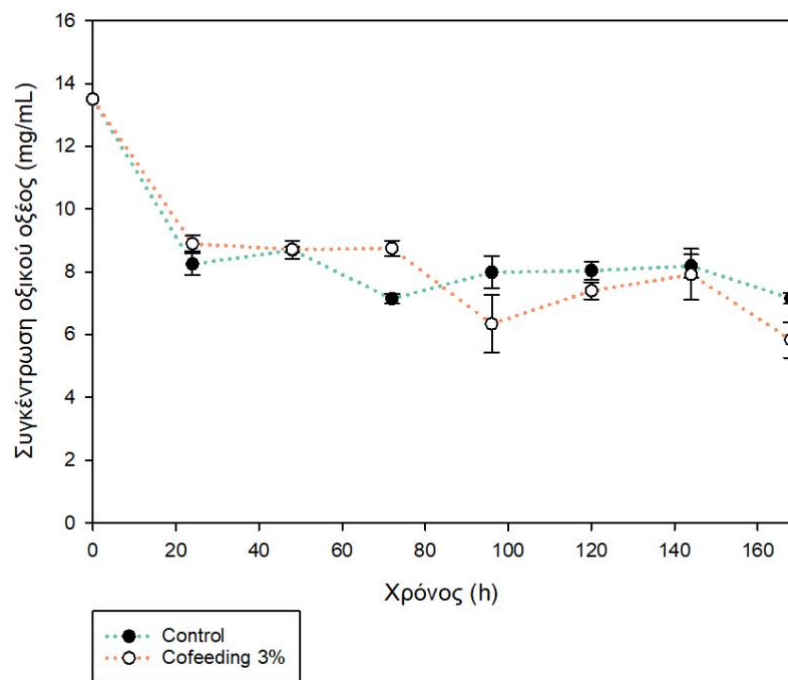
Σε κάθε ημερήσιο δείγμα που λήφθηκε κατά τη λειτουργία του βιοαντιδραστήρα πραγματοποιήθηκε ανάλυση του υπερκείμενου υγρού με υγρή χρωματογραφία. Ο χρόνος έκλουσης του οξικού οξέος είναι τα 14,6 min και η συγκέντρωση του οξικού οξέος προκύπτει από το εμβαδόν της κορυφής με βάση την καμπύλη αναφοράς. Μόνο το οξικό οξύ υπολογίζεται από την χρωματογραφία καθώς η γλυκόζη περιεχόταν στον αντιδραστήρα και κατ' επέκταση στα δείγματα σε αμελητέα ποσότητα. Η αρχική συγκέντρωση του οξικού οξέος, δηλαδή αυτή που περιεχόταν στο υγρό της καλλιέργειας στο εσωτερικό του αντιδραστήρα κατά την έναρξη της καλλιέργειας, αντιστοιχεί σε 13,5 g/L.



Διάγραμμα 14: Μεταβολή συγκέντρωσης οξικού οξέος στους βιοαντιδραστήρες με τροφοδοσία οξικού οξέος, οξικού οξέος – 6% γλυκόζης

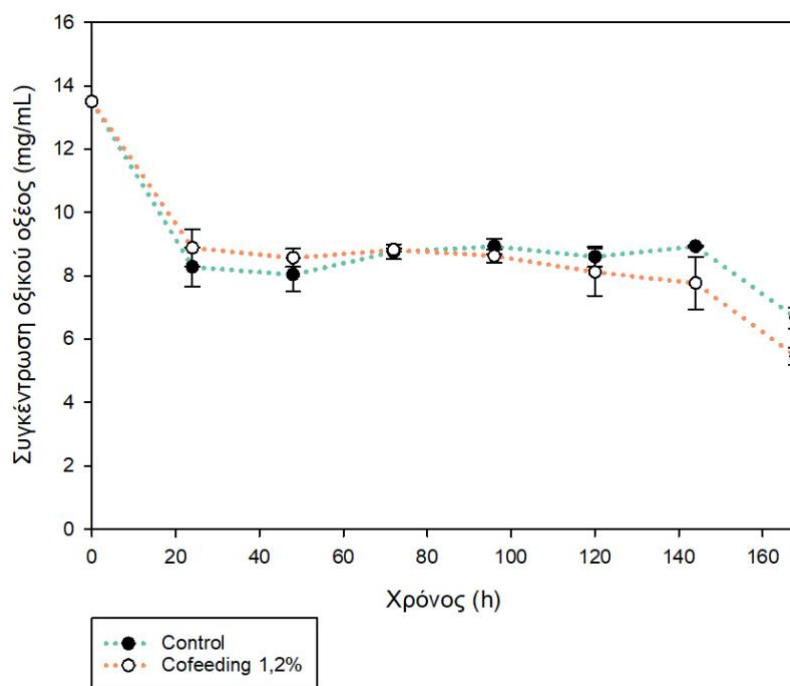
Παρατηρήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση οξικού οξέος κατά τη συνδυαστική τροφοδοσία σε σύγκριση με το βιοαντιδραστήρα που τροφοδοτήθηκε με οξικό οξύ.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



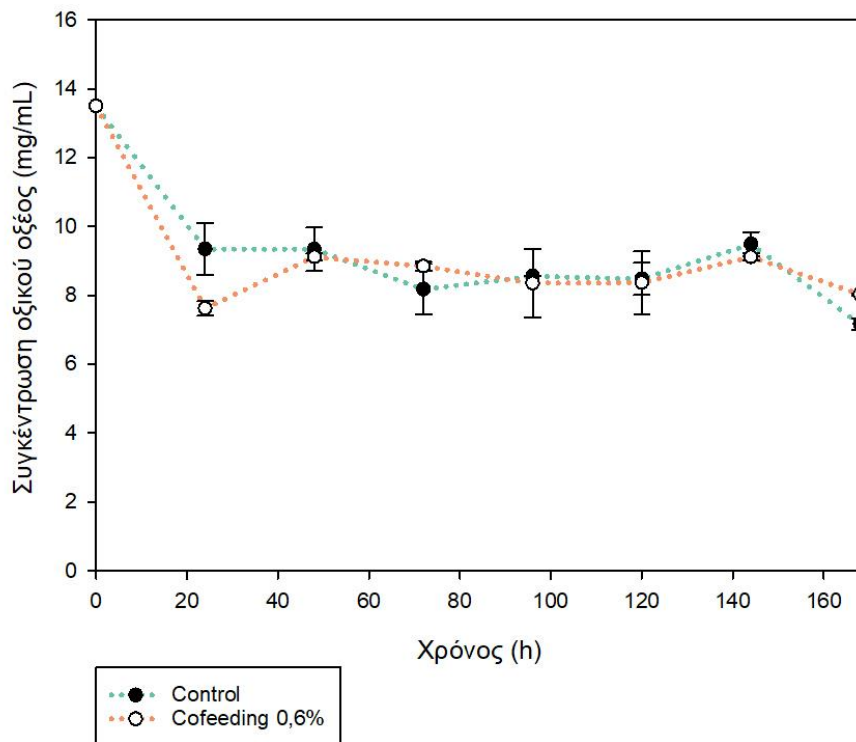
Διάγραμμα 15: Μεταβολή συγκέντρωσης οξικού οξέος στους βιοαντιδραστήρες με τροφοδοσία οξικού οξέος, οξικού οξέος – 3% γλυκόζης

Αντιθέτως σε αυτή την περίπτωση ο βιοαντιδραστήρας με συνδυαστική τροφοδοσία είχε παραπλήσια συγκέντρωση υποστρώματος στους δύο βιοαντιδραστήρες.



Διάγραμμα 16: Μεταβολή συγκέντρωσης οξικού οξέος στους βιοαντιδραστήρες με τροφοδοσία οξικού οξέος, οξικού οξέος – 1,2% γλυκόζης

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



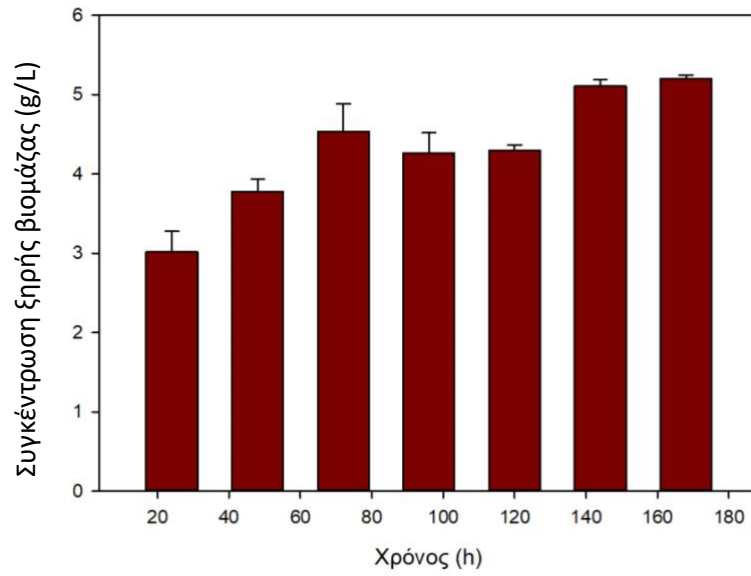
Διάγραμμα 17: Μεταβολή συγκέντρωσης οξικού οξέος στους βιοαντιδραστήρες με τροφοδοσία οξικού οξέος, οξικού οξέος – 0,6% γλυκόζης

Από τα παραπάνω Διαγράμματα φαίνεται ότι οι βιοαντιδραστήρες με παροχή οξικό οξύ και γλυκόζη εμφάνισαν παρόμοια συμπεριφορά ως προς την πτώση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στους αντίστοιχους βιοαντιδραστήρες με παροχή οξικό οξύ.

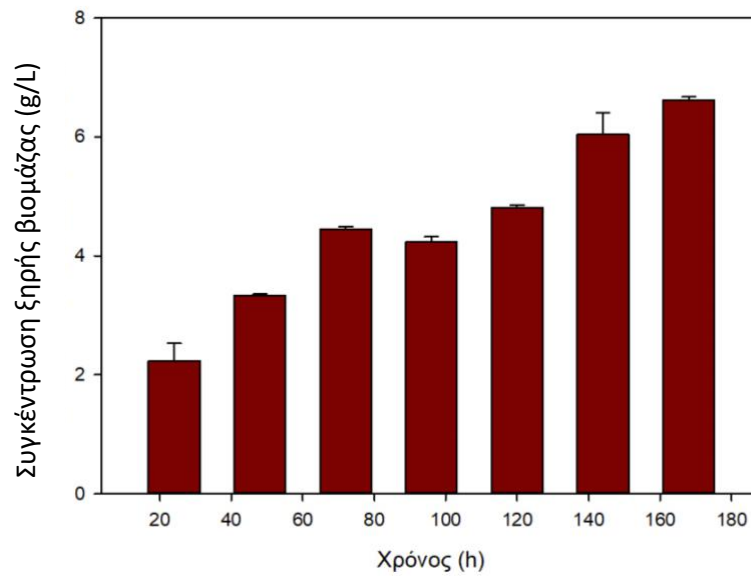
3.1.2 Απόδοση Ξηρής Βιομάζας

Σε καθημερινά δείγματα που λαμβάνονται για κάθε βιοαντιδραστήρα προκύπτει η απόδοση σε ξηρή βιομάζα ανά μονάδα όγκου του βιοαντιδραστήρα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

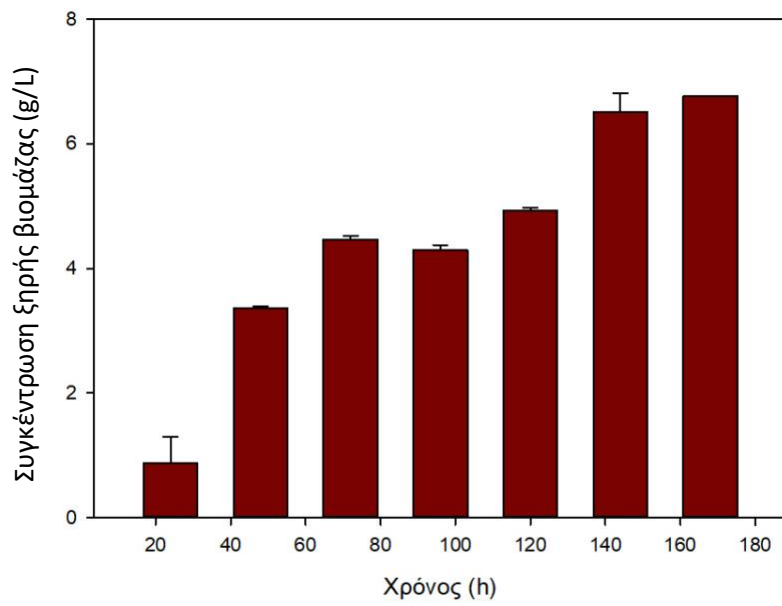


Διάγραμμα 18: Απόδοση ξηρής βιομάζας κατά τη λειτουργία βιοαντιδραστήρα οξικού οξέος (control)

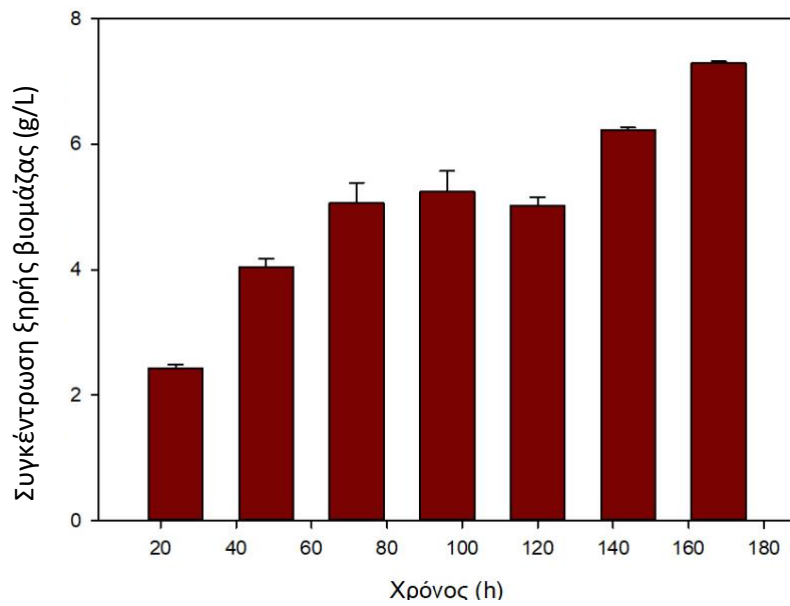


Διάγραμμα 19: Απόδοση ξηρής βιομάζας κατά τη λειτουργία βιοαντιδραστήρα με τροφοδοσία οξικού οξέος – 6% γλυκόζης

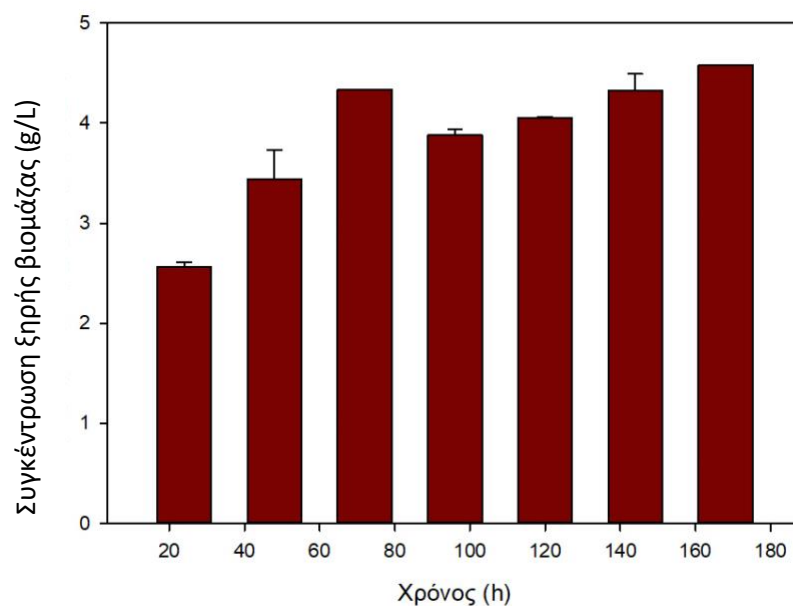
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Διάγραμμα 20: Απόδοση ξηρής βιομάζας κατά τη λειτουργία βιοαντιδραστήρα με τροφοδοσία οξικού οξέος – 3% γλυκόζης



Διάγραμμα 21: Απόδοση ξηρής βιομάζας κατά τη λειτουργία βιοαντιδραστήρα με τροφοδοσία οξικού οξέος – 1,2% γλυκόζης



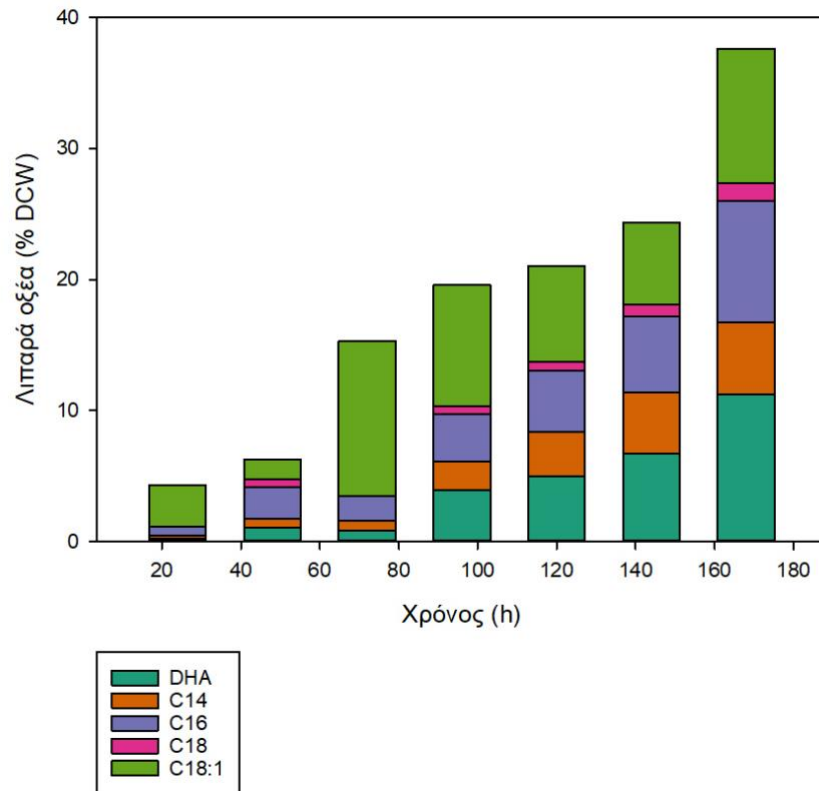
Διάγραμμα 22: Απόδοση ξηρής βιομάζας κατά τη λειτουργία βιοαντιδραστήρα με τροφοδοσία οξικού οξέος – 0,6% γλυκόζης

Βάσει των παραπάνω διαγραμμάτων παρατηρείται αύξηση της παραγωγής ξηρής βιομάζας με την πάροδο του χρόνου σε όλους βιοαντιδραστήρες. Εξαίρεση αποτελεί μία τιμή παραγωγής για κάθε βιοαντιδραστήρα που αντιστοιχεί σε ενδιάμεσο χρόνο. Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από το σφάλμα της εκάστοτε μέτρησης.

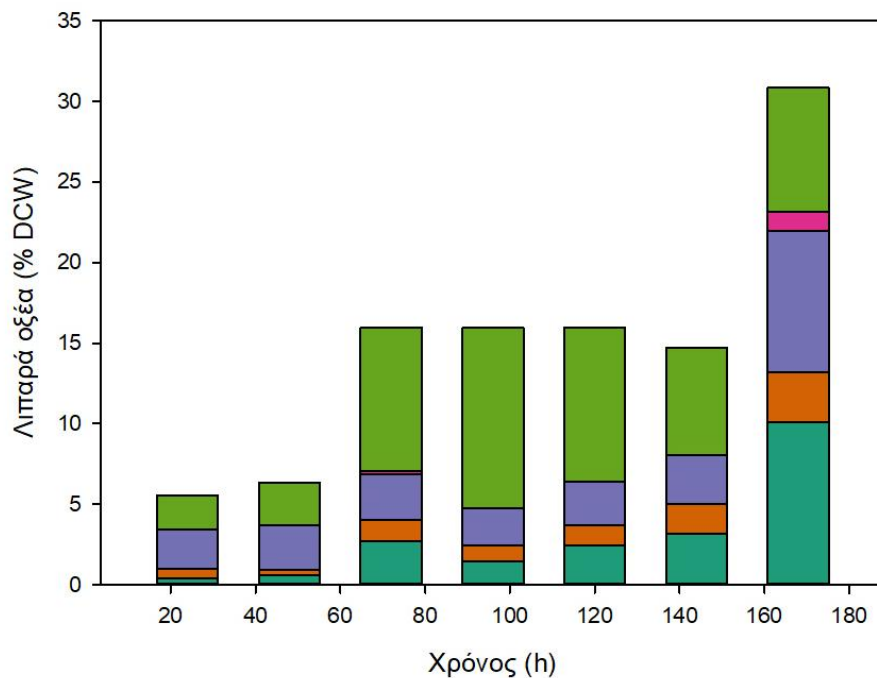
3.1.3 Λιπαρά οξέα-Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων

Για κάθε βιοαντιδραστήρα πραγματοποιείται εκχύλιση λιπαρών οξέων από όπου υπολογίζεται η ποσότητα των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας. Μετά την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων από τα δείγματα του βιοαντιδραστήρα, αναλύονται τα δείγματα σε αέριο χρωματογράφο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

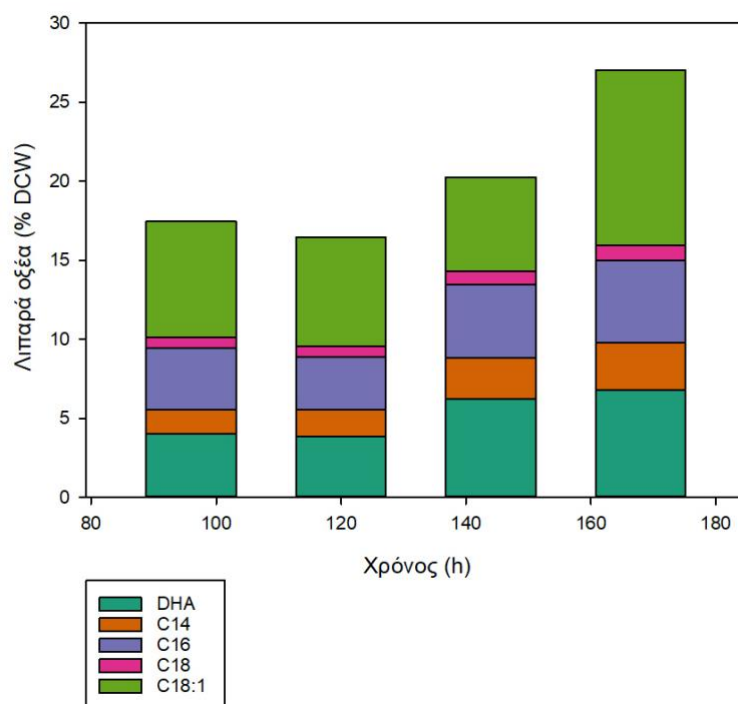


Διάγραμμα 23: Προφίλ και ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας κατά τη λειτουργία του βιοαντιδραστήρα οξικού οξέος (control)



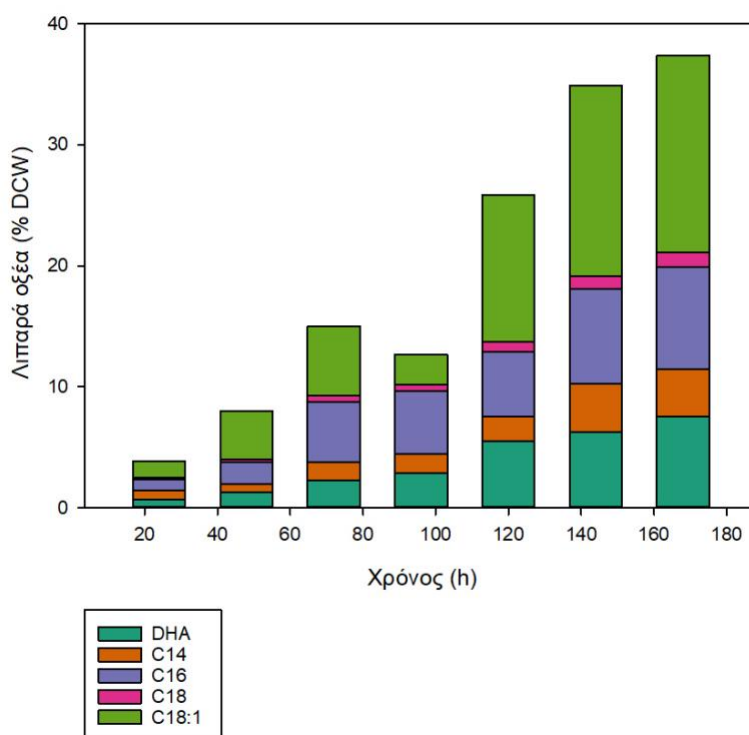
Διάγραμμα 24: Προφίλ και ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας κατά τη λειτουργία του βιοαντιδραστήρα οξικού οξέος – 6% γλυκόζης

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

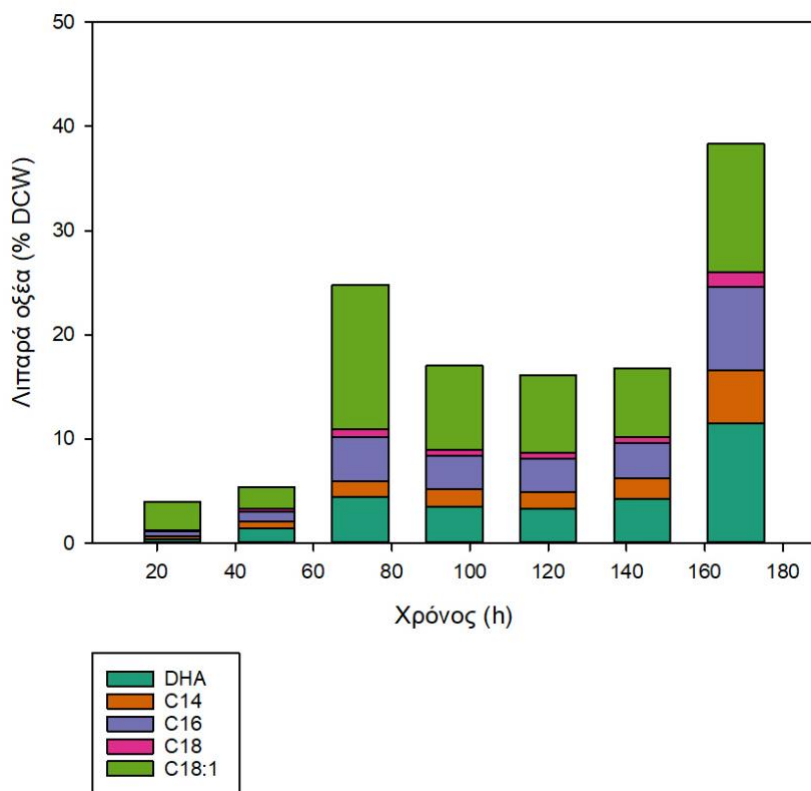


Διάγραμμα 25: Προφίλ και ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας κατά τη λειτουργία του βιοαντιδραστήρα οξικού οξέος – 3% γλυκόζης

Καθώς από τα αποτελέσματα των 96-168 h φαίνεται πως δεν έχει επιτευχθεί η ταυτόχρονη κατανάλωση των υποστρωμάτων και ούτε έχει επιτευχθεί ενίσχυση της παραγωγής λιπιδίων, δεν εξετάστηκαν τα προγενέστερα δείγματα.



Διάγραμμα 26: Προφίλ και ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας κατά τη λειτουργία του βιοαντιδραστήρα οξικού οξέος – 1,2 % γλυκόζης



Διάγραμμα 27: Προφίλ και ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας κατά τη λειτουργία του βιοαντιδραστήρα οξικού οξέος – 0,6% γλυκόζης

Από τα παραπάνω Διαγράμματα προκύπτει ότι ο βιοαντιδραστήρας αναφοράς εμφανίζει αύξηση στο συνολικό ποσοστό των λιπαρών οξέων με την πάροδο του χρόνου ενώ κατά τις συνδυαστικές τροφοδοσίες παρέμεινε σχετικά σταθερό κατά τις 96-144 h. Εξάιρεση αποτελεί ο βιοαντιδραστήρας κατά την προσθήκη 1,2 % γλυκόζης όπου επίσης αυξάνεται.

3.1.4 Σύγκριση παραγωγής DHA

Τέλος, χάριν σύγκρισης υπολογίζεται η ποσότητα DHA στους δύο βιοαντιδραστήρες που είναι το επιθυμητό προϊόν της καλλιέργειας.

Πίνακας 9: Συγκέντρωση παραγόμενου DHA στους βιοαντιδραστήρες με τροφοδοσία οξικό οξύ και οξικό οξύ-6% γλυκόζη

Χρόνος (h)	Οξικό οξύ	Οξικό οξύ-6% γλυκόζη
	Ποσότητα DHA (g/L)	Ποσότητα DHA (g/L)
24	0,02	0,01
48	0,04	0,02
72	0,04	0,12
96	0,17	0,06
120	0,21	0,12
144	0,34	0,19
168	0,58	0,65

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 10: Συγκέντρωση παραγόμενου DHA στους βιοαντιδραστήρες με τροφοδοσία οξικό οξύ και οξικό οξύ-3% γλυκόζη

Χρόνος (h)	Οξικό οξύ	Οξικό οξύ- 3% γλυκόζη
	Ποσότητα DHA (g/L)	Ποσότητα DHA (g/L)
96	0,21	0,19
120	0,36	0,23
144	0,73	0,59
168	0,79	0,55

Πίνακας 11: Συγκέντρωση παραγόμενου DHA στους βιοαντιδραστήρες με τροφοδοσία οξικό οξύ και οξικό οξύ-1,2% γλυκόζη

Χρόνος (h)	Οξικό οξύ	Οξικό οξύ- 1,2% γλυκόζη
	Ποσότητα DHA (g/L)	Ποσότητα DHA (g/L)
24	0,02	0,03
48	0,07	0,10
72	0,23	0,23
96	0,25	0,30
120	0,33	0,55
144	0,51	0,78
168	0,80	1,10

Πίνακας 12: Συγκέντρωση παραγόμενου DHA στους βιοαντιδραστήρες με τροφοδοσία οξικό οξύ και οξικό οξύ-0,6% γλυκόζη

Χρόνος (h)	Οξικό οξύ	Οξικό οξύ- 0,6% γλυκόζη
	Ποσότητα DHA (g/L)	Ποσότητα DHA (g/L)
24	0,01	0,06
48	0,16	0,10
72	0,26	0,22
96	0,32	0,33
120	0,52	0,38
144	0,96	0,59
168	0,93	1,01

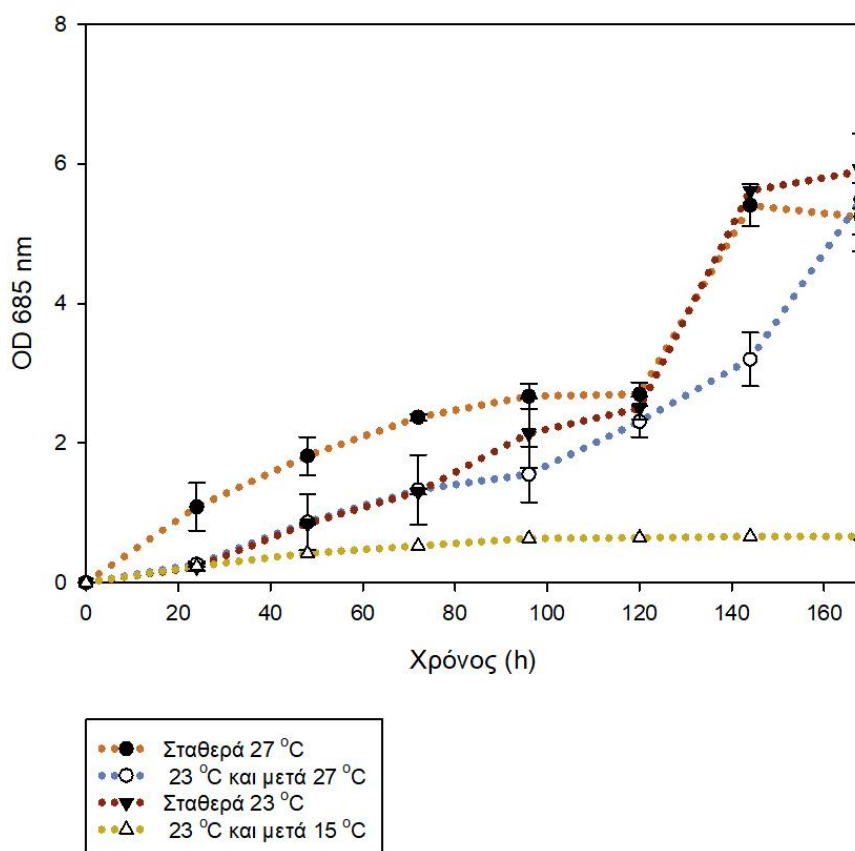
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.2 Επίδραση θερμοκρασίας

A) Σε καλλιέργειες με οξικό οξύ

3.2.1 Ανάπτυξη κυττάρων

Προκειμένου να παρακολουθηθεί η ανάπτυξη των κυττάρων στους βιοαντιδραστήρες 200 mL λήφθηκαν καθημερινά δείγματα τα οποία φωτομετρήθηκαν στα 685 nm. Από κάθε τιμή απορρόφησης αφαιρέθηκε η απορρόφηση του τυφλού δείγματος που προέκυψε από το υπερκείμενο του αρχικού δείγματος κάθε βιοαντιδραστήρα κατόπιν φυγοκέντρησης. Κάθε μέτρηση προέκυψε ως ο μέσος όρος των απορροφήσεων από δύο βιοαντιδραστήρες που λειτουργούσαν στις ίδιες συνθήκες παράλληλα και υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση των τιμών.

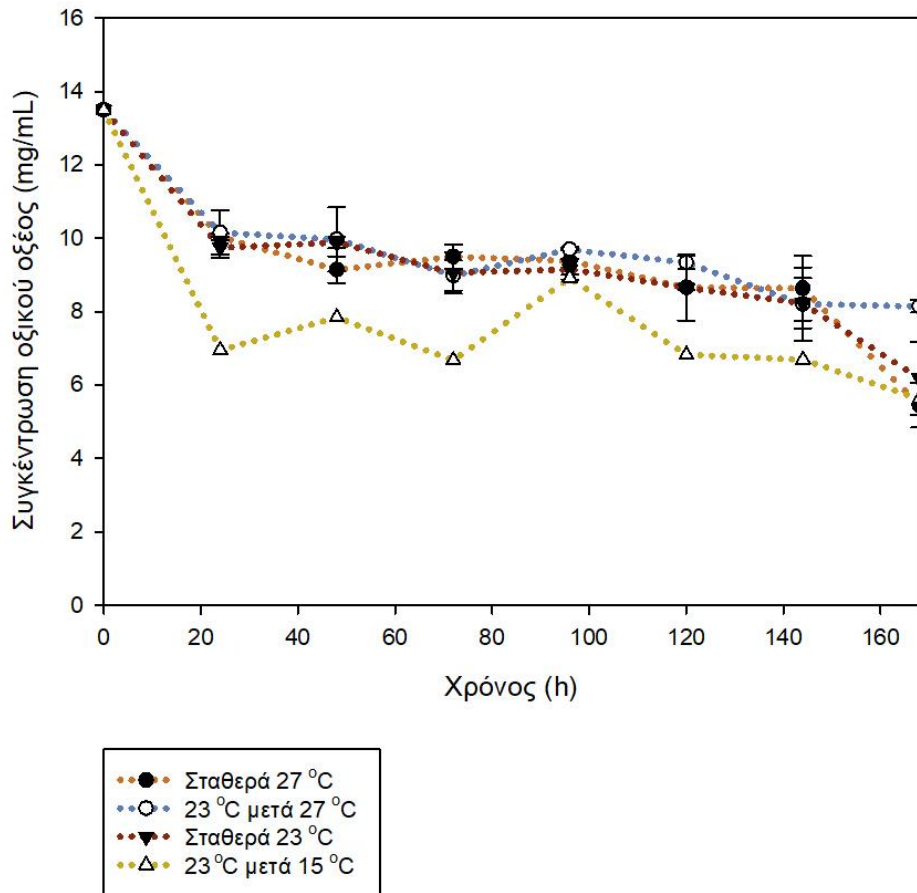


Διάγραμμα 28: Ανάπτυξη κυττάρων βιοαντιδραστήρων με διαφορετική θερμοκρασία και τροφοδοσία οξικού οξέος

3.2.2 Συγκέντρωση οξικού οξέος

Σε κάθε ημερήσιο δείγμα που λήφθηκε κατά τη λειτουργία του βιοαντιδραστήρα πραγματοποιήθηκε ανάλυση του υπερκείμενου υγρού με υγρή χρωματογραφία. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η αρχική συγκέντρωση του οξικού οξέος αντιστοιχεί σε 13,5 g/L.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

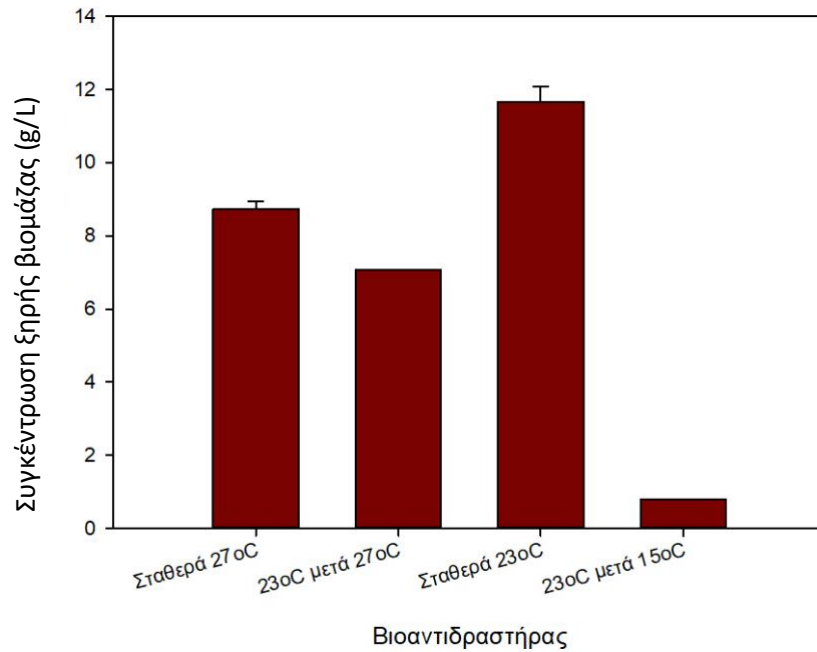


Διάγραμμα 29: Μεταβολή συγκέντρωσης οξικού οξέος στους βιοαντιδραστήρες με διαφορετική θερμοκρασία

3.2.3 Απόδοση Ξηρής Βιομάζας

Μετά το πέρας της καλλιέργειας του μικροφύκους για κάθε βιοαντιδραστήρα υπολογίζεται η απόδοση σε ξηρή βιομάζα ανά μονάδα όγκου του βιοαντιδραστήρα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



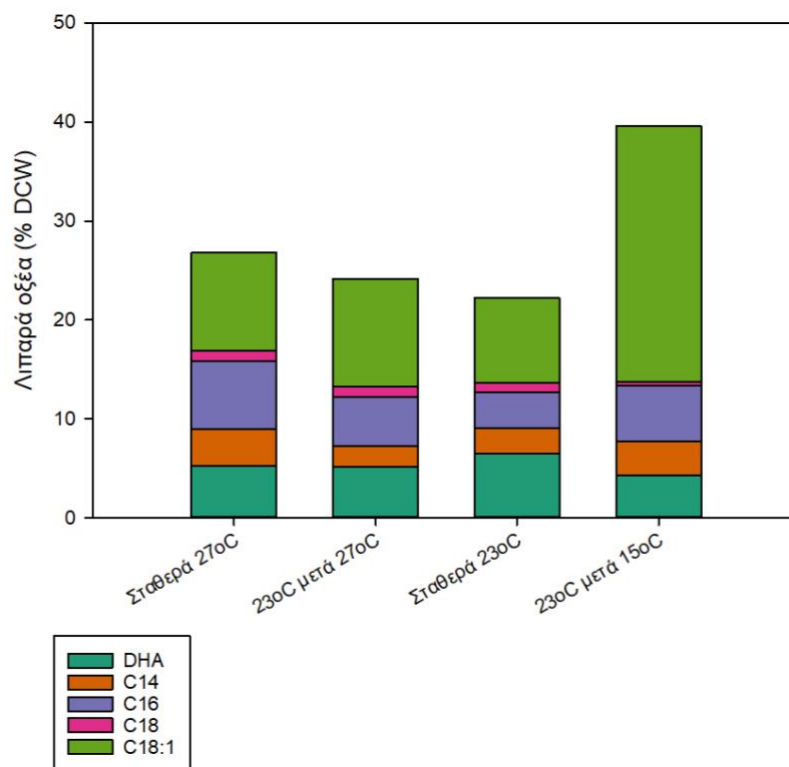
Διάγραμμα 30: Απόδοση ξηρής βιομάζας στους βιοαντιδραστήρες με διαφορετική θερμοκρασία και τροφοδοσία οξικού οξέος

Βάσει του παραπάνω διαγράμματος ο βιοαντιδραστήρας με θερμοκρασία 23 °C εμφάνισε τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας ενώ οι μεταβολές θερμοκρασίας τις χαμηλότερες.

3.2.4 Λιπαρά οξέα-Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων

Για κάθε βιοαντιδραστήρα πραγματοποιείται εκχύλιση λιπαρών οξέων από όπου υπολογίζεται η ποσότητα των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας. Μετά την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων από τα δείγματα του βιοαντιδραστήρα, αναλύονται τα δείγματα σε αέριο χρωματογράφο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Διάγραμμα 31: Προφίλ και ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας σε βιοαντιδραστήρες με διαφορετική θερμοκρασία και τροφοδοσία οξικού οξέος

Από το παραπάνω Διάγραμμα φαίνεται ότι η μεταβολή της θερμοκρασίας από τους 23 στους 15 °C ενίσχυσε τη συσσώρευση λιπιδίων ενώ οι υπόλοιποι βιοαντιδραστήρες εμφάνισαν παραπλήσια ποσοστά λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας.

3.2.5 Σύγκριση παραγωγής DHA

Τέλος, υπολογίζεται η ποσότητα DHA στους δύο βιοαντιδραστήρες που είναι το επιθυμητό προϊόν της καλλιέργειας. Επίσης προσδιορίζεται το συνολικό ποσοστό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ως το άθροισμα των επιμέρους ποσοστών του DHA και του C18:1.

Πίνακας 13: Ποσοστό και συγκέντρωση παραγόμενου DHA και πολυακόρεστων λιπαρών στους βιοαντιδραστήρες με διαφορετική θερμοκρασία στις 168 h καλλιέργειας

Θερμοκρασία (°C)	Ποσοστό DHA (% TFA)	Ποσότητα DHA (g/L)	Ποσοστό πολυακόρεστων (% TFA)
27	19,58	0,46	56,39
23→27	21,36	0,36	66,64
23	29,04	0,75	67,60
23→15	10,99	0,03	76,22

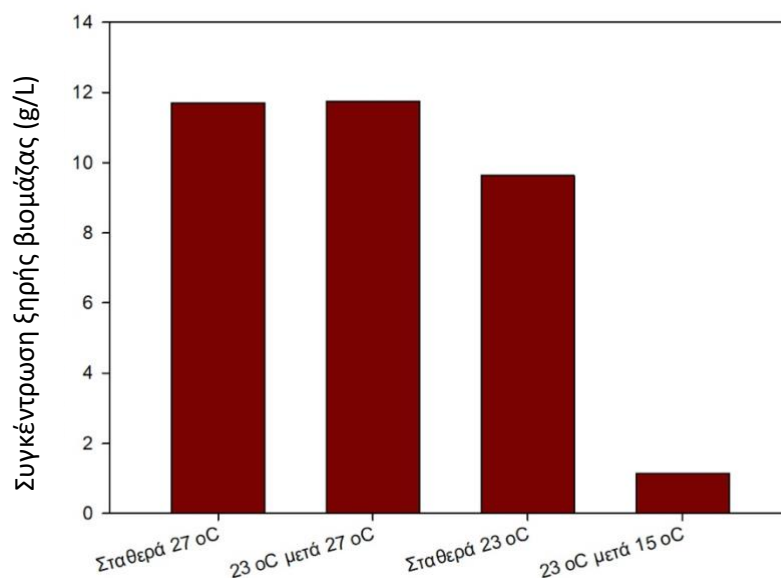
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Β) Επίδραση θερμοκρασίας σε καλλιέργειες με διήθημα υγρού κλάσματος σκοτεινής ζύμωσης βιοαποβλήτων

Πέρα από τη διερεύνηση των συνθηκών που ευνοούν την καλλιέργεια *C. cohnii* και την παραγωγή DHA, αποτελεί σκόπιμο να εξεταστεί και η εφαρμογή τους στην ανάπτυξη του σε διήθημα υγρού κλάσματος σκοτεινής ζύμωσης βιοαποβλήτων, που αποτελεί πρωταρχικό στόχο. Για το λόγο αυτό παρατηρήθηκε η ανάπτυξη του μικροφύκους εφαρμόζοντας τις διαφορετικές συνθήκες με τροφοδοσία το διήθημα ως μια αρχική εκτίμηση της επίδρασης του καθώς και των προβλημάτων κατά τη χρήση του.

3.2.6 Απόδοση Ξηρής Βιομάζας

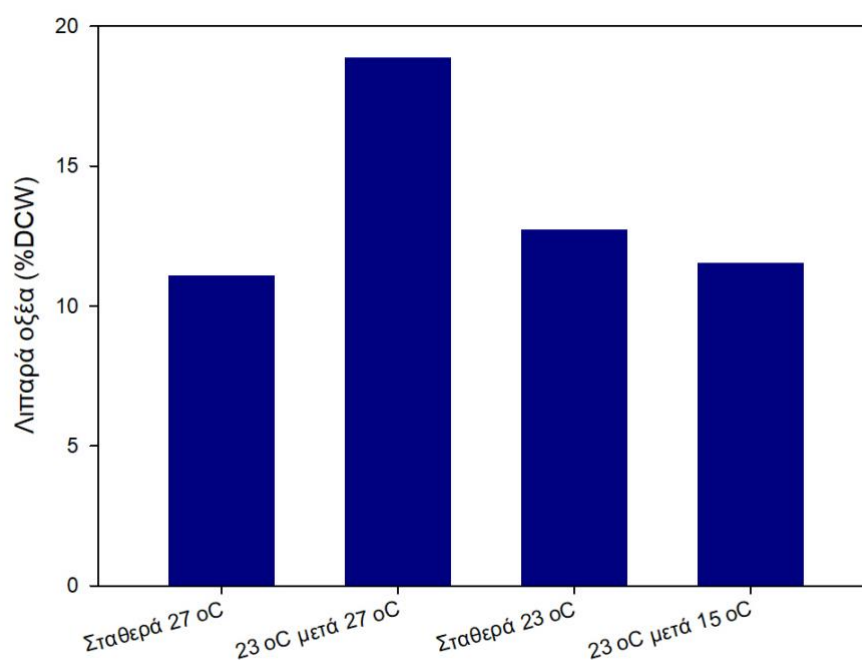
Μετά το πέρας της καλλιέργειας του μικροφύκους για κάθε βιοαντιδραστήρα υπολογίζεται η απόδοση σε ξηρή βιομάζα ανά μονάδα όγκου του βιοαντιδραστήρα.



Διάγραμμα 32: Απόδοση ξηρής βιομάζας στους βιοαντιδραστήρες με διαφορετική θερμοκρασία και τροφοδοσία διήθημα υγρού κλάσματος σκοτεινής ζύμωσης βιοαποβλήτων

3.2.7 Λιπαρά οξέα

Για κάθε βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιούνται δύο δείγματα για την εκχύλιση των λιπαρών οξέων. Σε κάθε ένα από αυτά ζυγίζεται μία ποσότητα ξηρής βιομάζας που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση. Μετά την εκχύλιση των λιπαρών οξέων και την απομάκρυνση του διαλύτη ζυγίζεται η ποσότητα που έχει απομείνει η οποία αντιστοιχεί στην ποσότητα των λιπαρών οξέων. Το ποσοστό των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:



Διάγραμμα 33: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας στους βιοαντιδραστήρες με διαφορετική θερμοκρασία και τροφοδοσία διήθημα υγρού κλάσματος σκοτεινής ζύμωσης βιοαποβλήτων

Καθώς το pH της τροφοδοσίας ήταν κοντά στην τιμή 4, δηλαδή όχι επαρκώς χαμηλό, χρειάστηκε μεγάλη ποσότητα τροφοδοσίας για τη ρύθμιση του pH της εκάστοτε καλλιέργειας. Συνεπώς οι καλλιέργειες έφτασαν στο μέγιστο του όγκου τους πριν τις 144 h όπου θα εφαρμόζονταν συνθήκες διαλείποντος έργου για άλλες 24 h. Συγκεκριμένα η πρώτη καλλιέργεια έφτασε σε μέγιστο όγκο στις 72 h και σταμάτησε η παροχή διηθήματος. Στον δεύτερο στις 72 h μεταβλήθηκε η θερμοκρασία και στις 96 h σταμάτησε η τροφοδοσία. Ο τρίτος στις 120 h έφτασε στο μέγιστο όγκο και στον τελευταίο στις 72 h μεταβλήθηκε η θερμοκρασία και στις 120 h σταμάτησε η τροφοδοσία. Όταν σταμάτησε η τροφοδοσία διηθήματος εφαρμόστηκαν συνθήκες διαλείποντος έργου για άλλες 24 h για να καταναλωθούν περαιτέρω οι πηγές άνθρακα. Για το λόγο αυτό συγκρίθηκαν όχι ως προς τον ίδιο χρόνο αλλά ως προς την κατανάλωση τροφοδοσίας.

Πίνακας 14: Παραγωγή βιομάζας ανά μάζα τροφοδοτούμενου VFA για βιοαντιδραστήρες με διαφορετική θερμοκρασία

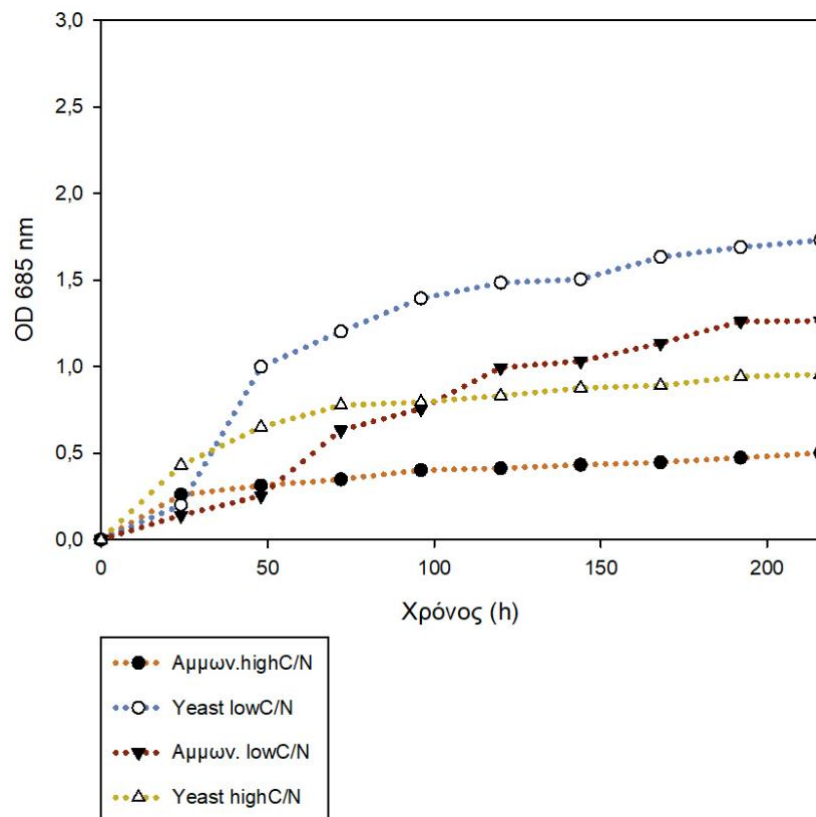
Θερμοκρασία (°C)	Βιομάζα ($\frac{g}{g_{VFA}}$)
27	0,19
23→27	0,21
23	0,17

Επειδή ο τελευταίος βιοαντιδραστήρας κατανάλωσε σημαντικά μικρότερη τροφοδοσία σε σύγκριση με τους υπόλοιπους και κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του δεν έφτασε στον ίδιο όγκο με τους υπόλοιπους δε συμπεριλαμβάνεται στη σύγκριση.

3.3 Συγκριτική μελέτη καλλιιεργειών με διαφορετικές πηγές αζώτου

3.3.1 Ανάπτυξη κυττάρων

Η ανάπτυξη των κυττάρων παρακολουθήθηκε στους βιοαντιδραστήρες με φωτομέτρηση καθημερινών δειγμάτων. Από κάθε τιμή απορρόφησης αφαιρέθηκε η απορρόφηση του τυφλού δείγματος που προέκυψε από το υπερκείμενο του αρχικού δείγματος κάθε βιοαντιδραστήρα κατόπιν φυγοκέντρησης.

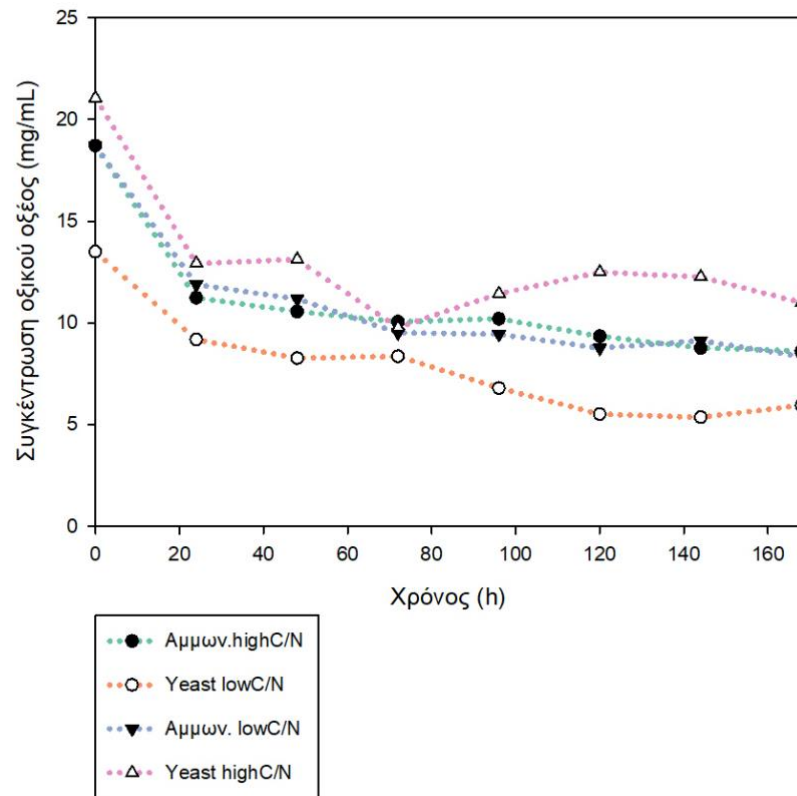


Διάγραμμα 34: Ανάπτυξη κυττάρων βιοαντιδραστήρων με διαφορετική πηγή αζώτου και λόγο C/N

Είναι εμφανές πως οι καλλιέργειες με πηγή αζώτου εκχύλισμα ζύμης παρουσίασαν μεγαλύτερη απορρόφηση στα 685 nm σε σύγκριση με εκείνες με πηγή αμμωνιακά και ίδιο λόγο C/N.

3.3.2 Συγκέντρωση οξικού οξέος

Σε κάθε ημερήσιο δείγμα που λήφθηκε κατά τη λειτουργία του βιοαντιδραστήρα πραγματοποιήθηκε ανάλυση του υπερκείμενου υγρού με υγρή χρωματογραφία. Η αρχική συγκέντρωση του οξικού οξέος αντιστοιχεί σε 13,5 g/L όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

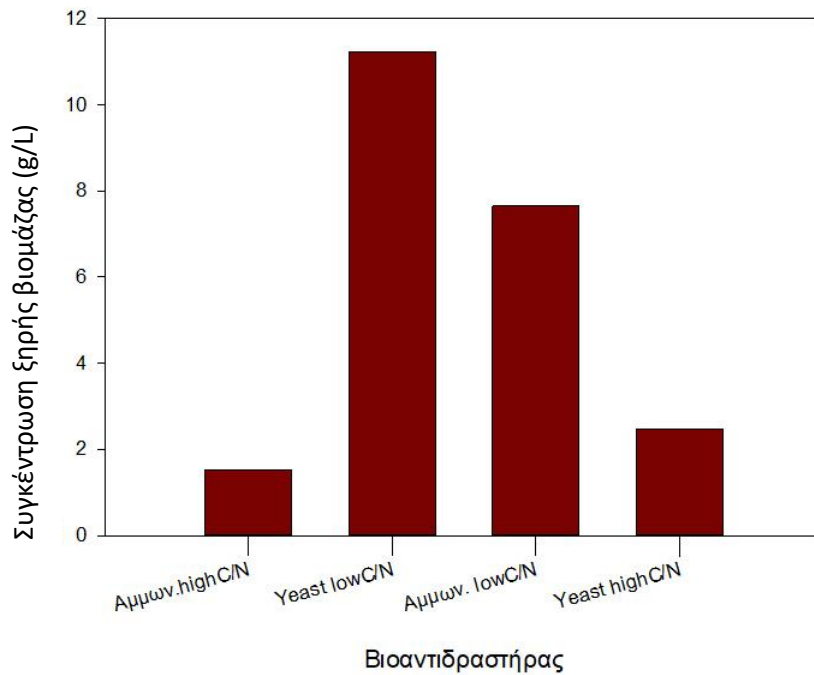


Διάγραμμα 35: Μεταβολή συγκέντρωσης οξικού οξέος στους βιοαντιδραστήρες με διαφορετική πηγή αζώτου και λόγο C/N

Από το Διάγραμμα συγκέντρωσης οξικού οξέος σε σχέση με το χρόνο παρατηρείται ότι η καλλιέργεια με εκχύλισμα ζύμης και χαμηλότερο λόγο C/N εμφάνισε τη μεγαλύτερη κατανάλωση οξικού οξέος.

3.3.3 Απόδοση Ξηρής Βιομάζας

Μετά το πέρας της καλλιέργειας του μικροφύκου για κάθε βιοαντιδραστήρα υπολογίζεται η απόδοση σε ξηρή βιομάζα ανά μονάδα όγκου του βιοαντιδραστήρα.



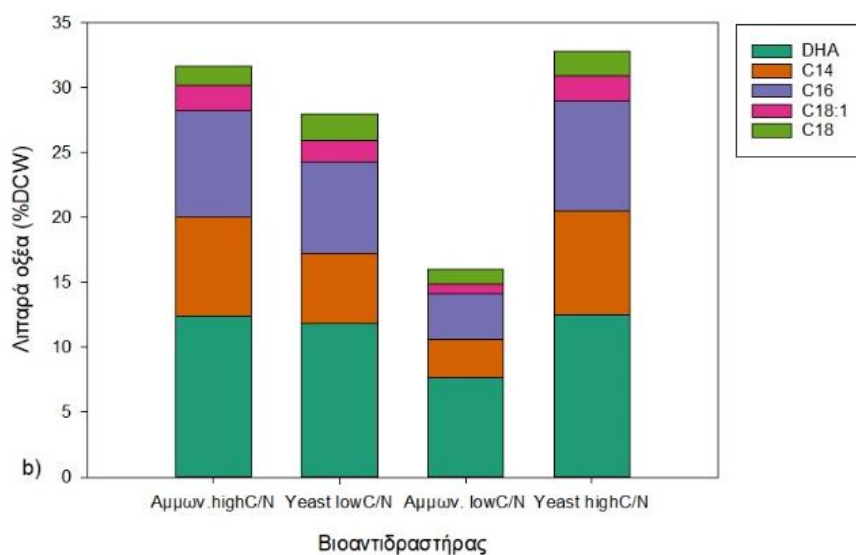
Διάγραμμα 36: Απόδοση ξηρής βιομάζας στους βιοαντιδραστήρες με διαφορετική πηγή αζώτου και λόγο C/N

Βάσει του παραπάνω Διαγράμματος η μεγαλύτερη παραγωγή ξηρής βιομάζας προέκυψε για πηγή αζώτου εκχύλισμα ζύμης και χαμηλό λόγο C/N. Όμως και σε υψηλότερο λόγο ο βιοαντιδραστήρας με εκχύλισμα ζύμης οδήγησε σε μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας σε σύγκριση με εκείνον με πηγή αζώτου αμμωνιακά.

3.3.4 Λιπαρά οξέα-Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων

Για κάθε βιοαντιδραστήρα πραγματοποιείται εκχύλιση λιπαρών οξέων από όπου υπολογίζεται η ποσότητα των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας. Μετά την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων από τα δείγματα του βιοαντιδραστήρα, αναλύονται τα δείγματα σε αέριο χρωματογράφο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Διάγραμμα 37: Προφίλ και ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας σε βιοαντιδραστήρες με διαφορετική πηγή αζώτου και λόγο C/N

Από το Διάγραμμα παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό λιπιδίων προέκυψε για την καλλιέργεια με εκχύλισμα ζύμης και υψηλότερο λόγο C/N ενώ και για την αντίστοιχη καλλιέργεια με αμμωνιακά συσσωρεύτηκε παραπλήσιο ποσοστό λιπαρών επί ξηρής βιομάζας.

3.3.5 Σύγκριση παραγωγής DHA

Τέλος, υπολογίζεται η ποσότητα DHA στους διάφορους βιοαντιδραστήρες που είναι το επιθυμητό προϊόν της καλλιέργειας.

Πίνακας 15: Ποσοστό και μ συγκέντρωση παραγόμενου DHA στους βιοαντιδραστήρες με διαφορετική πηγή αζώτου και λόγο C/N στις 168 h καλλιέργειας

	Ποσοστό DHA (% TFA)	Ποσότητα DHA (g/L)
Αμμωνιακά C/N=45,9	39,11	0,19
Yeast extract C/N=8,9	42,18	1,32
Αμμωνιακά C/N=8,9	48,11	0,59
Yeast extract C/N=45,9	38,13	0,31

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

1. Ενζυμική ενεργότητα κυτταρινασών

Στα πλαίσια αξιοποίησης των λιγνοκυτταρινούχων ενώσεων ήταν επιθυμητό να διερευνηθεί αν το μικροφύκος *C. cohnii* έχει την ικανότητα να παράξει ένζυμα για να υδρολύσει αυτά τα υποστρώματα ώστε να μπορέσει να αφομοιώσει τον άνθρακα που έχουν διαθέσιμο για την ανάπτυξη του. Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η ύπαρξη ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινασών και ξυλανασών όταν το μικροφύκος έχει καλλιεργηθεί σε κυτταρινούχες ουσίες. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν καλλιέργειες του μικροφύκου σε υποστρώματα Avicel, CMC και Corn Cob και παρατηρήθηκε η απορρόφηση των αναλύσεων των υπερκείμενων για ενζυμική ενεργότητα κυτταρινασών σε καθημερινά δείγματα.

Σύμφωνα με τα Διαγράμματα 1-5, ενεργότητα προκύπτει μόνο από τις αναλύσεις της ενδογλουκανάσης και της β-γλυκοζιδάσης. Συγκεκριμένα σε καλλιέργειες με υπόστρωμα Avicel μέγιστη ενεργότητα ενδογλουκανάσης παρατηρήθηκε στις 24 h ενώ με corn cob στις 96 h. Σε υπόστρωμα CMC εμφάνισε ενεργότητα στις 96 h και παρέμεινε σχετικά σταθερή αλλά σε χαμηλά επίπεδα. Η ενδογλουκανάση εμφάνισε μικρή ενεργότητα σε όλες τις καλλιέργειες γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη της σε μικρή ποσότητα στο υπερκείμενο των καλλιεργειών. Ως προς την επίδραση του pH, σε κάθε περίπτωση για τις δύο τιμές pH που εξετάστηκαν, η τιμή του pH δεν είχε ουσιαστική επίδραση στην ενεργότητα. Η ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης εμφανίστηκε μέγιστη στις 24 h καλλιέργειας με CMC και στις 68 h με corn cob. Γενικότερα τείνει να είναι φθίνουσα και παρέμεινε σε χαμηλή τιμή καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Σε καλλιέργειες Avicel βρέθηκε αμελητέα.

Σχετικά με τις αναλύσεις για την κελλοβιοϋδρολάση δεν παρατηρήθηκε ενεργότητα σε κανένα υπόστρωμα και ούτε στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε δείγμα από τις καλλιέργειες που περιείχε κύτταρα. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κελλοβιοϋδρολάση δεν παράγεται ούτε εξωκυτταρικά ούτε βρίσκονται στις μεμβράνες των κυττάρων. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι κυτταρινάσες δρουν συνεργιστικά συμπεραίνουμε ότι τα κύτταρα του *C. cohnii* δεν έχουν τη δυνατότητα να αξιοποιήσουν κυτταρινούχες ουσίες ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη τους. Η ανάλυση για την ενεργότητα ξυλανασών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας υγρό καλλιέργειών που περιείχε κύτταρα και δεν παρατηρήθηκε απορρόφηση. Έτσι προκύπτει το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν ξυλανάσες που παράγονται εξωκυτταρικά ούτε βρίσκονται πάνω στις μεμβράνες των κυττάρων.

Εφόσον τα κύτταρα δεν έχουν την ικανότητα να υδρολύουν την κυτταρίνη, η ενεργότητα των δύο ενζύμων δεν οφείλεται στην προσπάθεια αποικοδόμησης του υποστρώματος προς την παραγωγή γλυκόζης. Δεδομένου ότι το κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων αποτελείται από κυτταρίνη η ενζυμική αυτή δράση μπορεί να συσχετιστεί με την κυτταρική διαίρεση. Συγκεκριμένα, ο ρόλος της β-γλυκοζιδάσης έχει συσχετιστεί με το διαχωρισμό των κυττάρων κατά την κυτταρική διαίρεση σε βακτήρια και κύτταρα *Phyllostachys bambusoides* (Gerken, Donohoe, & Knoshaug, 2013; Ogita, Ohki, Nomura, & Kato, 2012). Ομοίως η δράση της ενδογλουκανάσης βοηθά στην αποικοδόμηση και επέκταση του κυτταρικού τοιχώματος. Η ενεργότητα της έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με τον κύκλο ζωής των κυττάρων του *Chlorella vulgaris* αλλά και του *C. Cohnii* όπου υπάρχουν ενδείξεις ότι βρίσκεται στα τοιχώματα των κυττάρων. Η ενζυμική ενεργότητα παρατηρήθηκε μέσω της

απελευθέρωσης ολιγοσακχαριτών στο μέσο καλλιέργειας κατά την ανάπτυξη τους σε κυτταρινούχα υποστρώματα ενώ ως προτιμώμενο υπόστρωμα παρατηρήθηκε το CMC (Kwok & Wong, 2003; MartíNez & Isabel Orús, 1991).

2. Μελέτη χρήσης υδρολύματος σε καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου

2.1 Τροφοδοσία Γλυκόζη-Ξυλόζη

Στην προσπάθεια μείωσης του συνολικού κόστους παραγωγής των ωμέγα-3 διερευνάται η χρήση εναλλακτικών πηγών άνθρακα ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται το ενδιαφέρον για την αξιοποίηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως τροφοδοσία για καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου του μικροφύκου διάλυμα γλυκόζης-ξυλόζης σε συγκεντρώσεις παραπλήσιες με εκείνες που αντιστοιχούν στο υδρόλυμα βιομάζας. Η τροφοδοσία αυτή συγκρίθηκε με τη χρήση διαλύματος γλυκόζης. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ζύμης και στις δύο περιπτώσεις.

Το μικροφύκος έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να αναπτυχθεί σε πηγή άνθρακα ξυλόζη αλλά με χαμηλή απόδοση σε ξηρή βιομάζα και ποσοστό DHA επί των συνολικών λιπαρών. Βάσει του Διαγράμματος 7, στην περίπτωση χρήσης διαλύματος χαμηλής περιεκτικότητας σε ξυλόζη παρατηρείται σημαντική μείωση της τελικής παραγωγής βιομάζας σε σύγκριση με την τροφοδοσία της γλυκόζης. Βέβαια η μεγάλη διαφορά στην απόδοση μπορεί να οφείλεται και στην προσθήκη τροφοδοσίας ώστε η γλυκόζη να παραμένει στην επιθυμητή συγκέντρωση το οποίο παράλληλα όμως αυξάνει τη συγκέντρωση της ξυλόζης. Υψηλή συγκέντρωσή της θα μπορούσε να δράσει παρεμποδιστικά. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε και μικρότερη κατανάλωση γλυκόζης στην περίπτωση παροχής Γλυκόζης-Ξυλόζη λόγω της χαμηλότερης ανάπτυξης των κυττάρων.

Ως προς τη συσσώρευση των λιπαρών παρατηρήθηκαν παρόμοια ποσοστά λιπιδίων επί ξηρού βάρους για τις δύο καλλιέργειες και παρόμοιο ποσοστό DHA επί των ολικών λιπαρών. Όμως λόγω της χαμηλότερης παραγωγής ξηρής βιομάζας, η συγκέντρωση DHA είναι σημαντικά χαμηλότερη στην περίπτωση χρήσης γλυκόζης-ξυλόζης όπως φανερώνεται από τον Πίνακα 7. Τα αποτελέσματα ως προς τη συσσώρευση λιπαρών και τη μείωση της απόδοσης σε ξηρή βιομάζα με την προσθήκη ξυλόζης έχουν παρατηρηθεί και σε προγενέστερα πειράματα σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου στις οποίες όμως είχε χρησιμοποιηθεί σύσταση τροφοδοσίας 50-50% w/w γλυκόζη-ξυλόζη (Karnaouri et al., 2020, n.d.).

Βάσει όσων αναφέρθηκαν ενθαρρυντικό για την αξιοποίηση του υδρολύματος είναι το γεγονός ότι τα λιπαρά οξέα δεν επηρεάζονται αρνητικά με την παρουσία της ξυλόζης. Έτσι, αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω η χρήση του υδρολύματος για την καλλιέργεια του *C. Cohnii* εφόσον τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν στο διάλυμα που προσομοιάζει τη σύστασή του.

2.2 Μέθοδος παροχής γλυκόζης-ξυλόζης

Ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη των μικροφυκών είναι η μέθοδος παροχής της τροφοδοσίας. Κατά την τροφοδοσία με οξικό οξύ η παροχή του πραγματοποιείται ώστε το pH της καλλιέργειας να παραμένει σταθερό σε τιμή 6,5 (βέλτιστο pH για την ανάπτυξη) ενώ κατά την τροφοδοσία με γλυκόζη ώστε η συγκέντρωση της γλυκόζης στην καλλιέργεια να παραμένει σε τιμή 25 g/L. Στα πλαίσια της βελτιστοποίησης της μεθόδου παροχής εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι τροφοδοσίας. Η πρώτη μέθοδος βασίστηκε σε παροχή τροφοδοσίας εκθετικά βάσει του συντελεστή μετατροπής εφόσον εκθετικά αναπτύσσονται και τα κύτταρα. Η δεύτερη μέθοδος βασίστηκε σε προγενέστερα αποτελέσματα κατανάλωσης της γλυκόζης και προσαρμογή τους σε σιγμοειδή καμπύλη (Karnaouri et al., 2020). Η τελευταία πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων και προσθήκη τροφοδοσίας ώστε η συγκέντρωσή τους να παραμένει σε τιμή 25 g/L σε ημερήσια βάση. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν με θερμοκρασία 27 °C, πηγή άνθρακα διάλυμα γλυκόζης-ξυλόζης με σύσταση παρόμοια με υδρόλυμα βιομάζας και πηγή αζώτου εκχύλισμα ζύμης.

Ανάμεσα στις μεθόδους, η παροχή με βάση την εκθετική ανάπτυξη κρίθηκε ακατάλληλη και οι καλλιέργειες διακόπηκαν. Ο λόγος είναι ότι η προσθήκη τροφοδοσίας εκθετικά έφτασε σε τροφοδοσία μεγάλου όγκου σε σύντομο χρονικό διάστημα. Βάσει των Διαγραμμάτων 10 και 12, παρατηρήθηκε αυξημένη ανάπτυξη κατά την προσθήκη τροφοδοσίας με την καθημερινή μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων το οποίο επιβεβαιώθηκε από την αισθητά αυξημένη παραγωγή βιομάζας. Ταυτόχρονα συσσωρεύτηκαν περισσότερα λιπαρά οξέα στα κύτταρα που περιείχαν μεγαλύτερο ποσοστό DNA. Χωρίς αμφιβολία η παροχή με βάση τη σιγμοειδή καμπύλη οδήγησε σε χαμηλότερη συγκέντρωση πηγών άνθρακα από τη συγκέντρωση που απαιτείται για επαρκή ανάπτυξη των κυττάρων και συσσώρευση λιπιδίων. Δηλαδή έγινε εκτίμηση της κατανάλωσης χαμηλότερη από την απαίτηση των κυττάρων. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τον προσδιορισμό των επιπέδων των αναγωγικών σακχάρων σε καθημερινά δείγματα που ήταν μηδενική.

Αν και τα δύο πειράματα με τροφοδοσία γλυκόζη-ξυλόζη, βιοαντιδραστήρες 2L και 200 mL, δεν πραγματοποιήθηκαν στις ίδιες συνθήκες ώστε να είναι συγκρίσιμα, τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλότερη απόδοση σε βιομάζα από αυτή που αναμενόταν με βάση το προγενέστερο πείραμα. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων που υπήρξε στις πρώτες καλλιέργειες των 2L και θα μπορούσε να δικαιολογήσει τη χαμηλή απόδοση σε βιομάζα. Σε κάθε περίπτωση απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της απαιτούμενης ποσότητας τροφοδοσίας που θα πρέπει να τροφοδοτείται στους βιοαντιδραστήρες αποσκοπώντας στη βελτίωση της μεθόδου παροχής της τροφοδοσίας.

3. Επίδραση συνθηκών σε καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου για αξιοποίηση βιοαποβλήτων

3.1 Συνδυαστική τροφοδοσία οξικού οξέος και γλυκόζης

Η αξιοποίηση εναλλακτικών πηγών άνθρακα, όπως το υδρόλυμα βιομάζας και τα βιοαπόβλητα, συνοδεύεται από κάποιους περιορισμούς. Συγκεκριμένα παρουσία διαφορετικών πηγών άνθρακα σε καλλιέργεια του μικροφύκου *C. Cohnii* συμβαίνει ένα φαινόμενο καταστολής του μεταβολισμού του οξικού οξέος παρουσία γλυκόζης, γιατί προτιμάται ως υπόστρωμα. Ωστόσο η κατανάλωση διαφορετικών πηγών θα μπορούσε να οδηγήσει σε υπέρβαση των στοιχειομετρικών περιορισμών στη διαθεσιμότητα του άνθρακα, της ενέργειας και των οξειδοαναγωγικών συμπαραγόντων. Στόχος λοιπόν αποτελεί η αποφυγή του φαινομένου του καταβολισμού με ταυτόχρονη κατανάλωση οξικού οξέος και γλυκόζης, προτιμητέο υπόστρωμα, καθώς και η ενίσχυση της συσσώρευσης λιπιδίων. Προς αυτή την κατεύθυνση χρησιμοποιήθηκε ως τροφοδοσία για καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου του μικροφύκου οξικό οξύ και διερευνήθηκε η ποσότητα γλυκόζης που πρέπει να προστεθεί προκειμένου να επιτευχθεί το παραπάνω. Η τροφοδοσία αυτή συγκρίθηκε με τροφοδοσία αποκλειστικά οξικού οξέος. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ζύμης και στις δύο περιπτώσεις και θερμοκρασία 27 °C.

Αρχικά προστέθηκε γλυκόζη που αντιστοιχούσε σε 6% των συνολικών mol άνθρακα. Η προσθήκη αυτή οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης σε ξηρή βιομάζα λόγω της παρουσίας της πρόσθετης πηγής άνθρακα, Διαγράμματα 18 και 19. Βάσει όμως του διαγράμματος της συγκέντρωσης οξικού οξέος, σε αυτή την περίπτωση μειώθηκε η κατανάλωση οξικού οξέος που οφείλεται στο φαινόμενο καταστολής του μεταβολισμού του άνθρακα. Σε αυτή την περίπτωση τα λιπαρά που συσσωρεύτηκαν ήταν μειωμένα σε σχέση με το βιοαντιδραστήρα με οξικό οξύ και μάλιστα σταθερά στο διάστημα 72-144 h όπως φαίνεται από τα Διαγράμματα 23 και 24. Και στους δύο παρατηρήθηκε μέγιστο ποσοστό λιπιδίων στις 168 h αλλά μεγαλύτερο για την τροφοδοσία οξικού οξέος. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι συμβαίνει το φαινόμενο του καταβολισμού διότι κατά την κατανάλωση γλυκόζης ως βασική πηγή άνθρακα παράγονται λιγότερα λιπαρά σε σχέση με την κατανάλωση οξικού οξέος. Αυτό οφείλεται στο ότι το οξικό οξύ μετατρέπεται απευθείας σε ακέτυλο-CoA που αποτελεί ένα σημαντικό ενδιάμεσο κατά τη λιπιδική σύνθεση (Colin Ratledge & Lippmeier, 2017; Sijtsma et al., 2010).

Όσον αφορά το ποσοστό του DHA που προέκυψε υπό αυτές τις συνθήκες ήταν χαμηλότερο κατά τη συνδυαστική τροφοδοσία. Εξαιρέση αποτελούν οι 168 h όπου εφαρμόστηκαν συνθήκες διαλείποντος έργου. Σε συνδυασμό και με τη μεγαλύτερη παραγωγή οδήγησε τελικά σε ενίσχυση της ποσότητας DHA για αυτό τον βιοαντιδραστήρα στο τέλος της καλλιέργειας, Πίνακας 9. Γενικότερα παρατηρήθηκε ότι με την παροχή γλυκόζης, η οποία καταναλώνεται στον κύκλο του Krebs, παράγεται περισσότερο C18:1 σε βάρος του DHA και σχεδόν μηδενικό C18. Αν και το μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης DHA δεν έχει προσδιοριστεί για το μικροφύκος, μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η βιοσύνθεση του DHA πραγματοποιείται μέσω του ενζυμικού συμπλόκου κετοσυνθάσης όπου το ακέτυλο-συνένζυμοA (acetyl-CoA) μετατρέπεται σε πολυακόρεστα οξέα μακριάς αλυσίδας (Μονοπάτι αναερόβια σύνθεση DHA). Τα υπόλοιπα λιπαρά παράγονται μέσω του κύκλου του Krebs και συνεπώς ενισχύονται με την παρουσία της γλυκόζης. Αντιθέτως η αερόβια

βιοσύνθεση του περιλαμβάνει μια διαδικασία δημιουργίας ακόρεστων δεσμών και επιμήκυνσης της ανθρακικής αλυσίδας. Συνεπώς σύμφωνα με το παραπάνω μεταβολικό μονοπάτι με την αύξηση του C18:1 θα αναμενόταν και αύξηση και του DHA (Pei et al., 2017).

Καθώς δεν επιτεύχθηκε ούτε ταυτόχρονη κατανάλωση των δύο υποστρωμάτων ούτε ενίσχυση των λιπιδίων εξετάστηκε η προσθήκη ποσότητας που αντιστοιχούσε σε 3% των συνολικών mol άνθρακα. Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε το φαινόμενο της καταστολής του μεταβολισμού του οξικού οξέος αλλά σε μικρότερη έκταση σε σχέση με το 6% το οποίο φαίνεται από το Διάγραμμα 15. Η παρουσία της γλυκόζης οδήγησε και πάλι σε αύξηση της τελικής παραγωγής βιομάζας αλλά σε χαμηλότερο ποσοστό συνολικών λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας βάσει των αντίστοιχων διαγραμμάτων. Λόγω των παραπάνω παρατηρήσεων για το διάστημα 96-168 h θεωρήθηκε ότι δεν επιτεύχθηκε ο στόχος και δεν μελετήθηκαν οι προηγούμενες μέρες. Ταυτόχρονα οι συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας δεν ευνόησαν ούτε την παραγωγή DHA αλλά ευνόησαν την παραγωγή C18:1 σε βάρος του DHA όπως συνέβη και κατά την προηγούμενη συνδυαστική τροφοδοσία. Συνεπώς αυτή η καλλιέργεια εμφάνισε χαμηλότερη ποσότητα DHA σε σχέση με το βιοαντιδραστήρα αναφοράς το οποίο φαίνεται στον Πίνακα 10.

Στη συνέχεια εξετάστηκε χαμηλότερη ποσότητα, 1,2% των συνολικών mol άνθρακα. Υπό αυτές τις συνθήκες έχει επιτευχθεί η ταυτόχρονη κατανάλωση των δύο υποστρωμάτων. Μάλιστα η παρεχόμενη γλυκόζη είχε ως συνέπεια τη βελτίωση της απόδοσης σε ξηρή βιομάζα σε σχέση με τον βιοαντιδραστήρα αναφοράς. Όσον αφορά τα λιπαρά, παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού τους στις 48, 120 και 144 h αλλά όχι σταθερή αύξηση του καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Ομοίως το ποσοστό DHA ενισχύθηκε όχι σε όλη τη διάρκεια αλλά στις περισσότερες μέρες ενώ και σε αυτή την ποσότητα γλυκόζης αυξήθηκε το ποσοστό του C18:1. Τέλος, ο Πίνακας 11 παρουσιάζει την ποσότητα DHA η οποία αυξήθηκε λόγω όσον προαναφέρθηκαν.

Η τελική ποσότητα που προστέθηκε ήταν 0,6 % των συνολικών mol άνθρακα. Από το Διάγραμμα 17 είναι εμφανές ότι η ποσότητα αυτή ήταν τέτοια ώστε να καταναλωθούν ταυτόχρονα τα δύο υποστρώματα. Όμως αυτή είναι η μοναδική από τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν όπου παρατηρείται χαμηλότερη παραγωγή ξηρής βιομάζας. Ως προς τα λιπίδια εμφανίζονται και πάλι σχετικά σταθερά στον ενδιάμεσο χρόνο της καλλιέργειας 72-120 h ενώ στις 168 h το ποσοστό τους ήταν μεγαλύτερο σε σχέση με το βιοαντιδραστήρα αναφοράς. Το ποσοστό του DHA εμφανίζεται μεγαλύτερο κατά τη συνδυαστική τροφοδοσία στις 24 και μετά τις 96 h το οποίο αντισταθμίζει τη χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας και τελικά οδηγεί σε αύξηση της ποσότητας του DHA στις 168 h.

Συνολικά σε όλες τις περιπτώσεις επιβεβαιώνεται ότι η βιοσύνθεση προϊόντων με ένα μόνο υπόστρωμα πραγματοποιείται με μη βέλτιστες αποδόσεις εφόσον ενισχύθηκε η παραγωγή DHA που είναι το επιθυμητό προϊόν. Αντιθέτως, ο μεταβολισμός ενός μόνου υποστρώματος λόγω στοιχειομετρικών περιορισμών παρουσιάζει χαμηλότερη διαθεσιμότητα άνθρακα, ενέργειας και οξειδοαναγωγικών συμπαραγόντων. Ο στόχος ήταν η ταυτόχρονη ενίσχυση των μεταβολικών μονοπατιών της γλυκόλυσης και της παραγωγής λιπιδίων. Θεωρητικά η προσθήκη γλυκόζης αυξάνει τη διαθεσιμότητα NADPH αφού παράγεται πιο άμεσα από το οξικό οξύ μέσω του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών, το

οποίο θα μπορούσε να ενισχύσει την παραγωγή λιπιδίων. Παρατηρήθηκε σε κάποιες περιπτώσεις αύξηση των λιπαρών αλλά όχι συνολικά σε κάποια καλλιέργεια. Η καλλιέργεια με γλυκόζη σε ποσοστό 0,6% των συνολικών mol άνθρακα προτείνεται να μελετηθεί και για μεγαλύτερο χρόνο επειδή εμφάνισε αύξηση την τελευταία μέρα καλλιέργειας. Η συνδυαστική τροφοδοσία έχει επιτευχθεί στους οργανισμούς *Moorella thermoacetica* και *Yarrowia lipolytica*. Στον πρώτο ενισχύθηκε η δέσμευση CO₂ προσθέτοντας γλυκόζη σε οξικό οξύ το οποίο αύξησε τη διαθεσιμότητα του ATP. Στον *Yarrowia lipolytica* η προσθήκη γλυκονικού σε οξικό οξύ ενίσχυσε τη σύνθεση λιπιδίων μέσω της αυξημένης διαθεσιμότητας NADPH (N. Liu et al., 2020; Park et al., 2019).

3.2 Επίδραση θερμοκρασίας

Στα πλαίσια της βελτιστοποίησης των συνθηκών καλλιέργειας του μικροφύκου *C. cohnii* μελετήθηκε ο παράγοντας θερμοκρασία και συγκεκριμένα η επίδραση της μεταβολή της θερμοκρασίας στη συσσώρευση λιπιδίων. Αν και η θερμοκρασία έχει μελετηθεί εκτενώς σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου, για να γίνει αύξηση κλίμακας (scale-up) της παραγωγής DHA από το μικροφύκος *C. Cohnii*, υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω μελέτη σε συνθήκες ημι-διαλείποντος έργου. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η θερμοκρασία των 27 °C αποτελεί τη βέλτιστη θερμοκρασία για την κυτταρική διαίρεση και συνεπώς για την ανάπτυξη του μικροφύκου (Tuttle & Loeblich, 1975). Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη προκύπτει από την επίδραση της στη δραστηριότητα των ενζύμων και στις απαιτήσεις ενέργειας κατά το μεταβολισμό του άνθρακα. Βέβαια, οι συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη δεν ευνοούν απαραίτητα τη συσσώρευση λιπιδίων και των ωμέγα-3 που είναι το επίκεντρο του ενδιαφέροντος σε αυτή την περίπτωση.

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής μελετήθηκε η επίδραση της μεταβολής της θερμοκρασίας σε καλλιέργειες του μικροφύκου με πηγή άνθρακα το οξικό οξύ και πηγή αζώτου εκχύλισμα ζύμης. Οι πηγές αυτές επιλέχθηκαν με βάση τα βελτιωμένα αποτελέσματα τους στη συσσώρευση λιπιδίων και παραγωγή DHA σε σύγκριση με άλλες πηγές άνθρακα και άζωτου. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι θερμοκρασίες 27 και 23 °C καθώς και μεταβολή της θερμοκρασίας από 23 °C σε 15 °C και 27 °C.

Με βάση το Διάγραμμα 28, που περιλαμβάνει τις τιμές απορρόφησης στα 685 nm για κάθε καλλιέργεια ανά ημέρα, μπορεί να παρατηρηθεί η πορεία της ανάπτυξης των κυττάρων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Έως τις 120 h η καμπύλη που αντιστοιχεί στη θερμοκρασία των 27 °C εμφανίζει αυξημένη απορρόφηση σε σχέση με τις υπόλοιπες. Ωστόσο τελικά η θερμοκρασία των 23 °C οδηγεί σε μεγαλύτερη τελική τιμή απορρόφησης το οποίο όμως αντιστοιχεί και σε μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας στις 168 h σύμφωνα με το Διάγραμμα 30. Οι καμπύλες που αντιστοιχούν στις μεταβολές θερμοκρασίας εμφανίζουν μειωμένη ανάπτυξη και ειδικότερα εκείνη των 15 °C που παραμένει καθ' όλη τη διάρκεια πολύ χαμηλή. Σε συνδυασμό και με τη χαμηλή παραγωγή βιομάζας οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας παρεμποδίστηκε η ανάπτυξη των κυττάρων, το οποίο παρατηρήθηκε και κατά τα πειράματα των Song, Kuryatov και Axelsen (2020).

Το παραπάνω ενισχύεται και από το Διάγραμμα 29 που παρουσιάζει την κατανάλωση οξικού οξέος. Παρατηρείται παραπλήσια κατανάλωση οξικού οξέος για τους

βιοαντιδραστήρες με εξαίρεση την καλλιέργεια στην οποία μεταβλήθηκε η θερμοκρασία από 23 σε 15 °C. Αρχικά η πτώση της συγκέντρωσης του υποστρώματος είναι έντονη επιβεβαιώνοντας ότι τα κύτταρα αναπτύσσονται ικανοποιητικά στη θερμοκρασία των 23 °C και μετά παρεμποδίζονται. Αυτή η παρεμπόδιση εξηγείται καθώς η θερμοκρασία των 15 °C είναι κοντά στη θερμοκρασία των 14 °C που έχει παρατηρηθεί ότι το μικροφύκος δε μπορεί να αναπτυχθεί. Ως θερμοκρασιακό εύρος ανάπτυξης του θεωρούνται οι θερμοκρασίες 15-34 °C (Tuttle & Loeblich, 1975). Κατά τη μεταβολή από 23 σε 27 °C παρατηρείται χαμηλότερη ανάπτυξη και τελική παραγωγή βιομάζας βιομάζα σε σύγκριση με τις άλλες δύο θερμοκρασίες (23 °C, 27 °C). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην ανάγκη για προσαρμογής των κυττάρων στις νέες συνθήκες. Βάσει όσων αναφέρθηκαν βέλτιστη ανάπτυξη παρατηρήθηκε στους 23 °C το οποίο παρατηρήθηκε και σε προγενέστερα πειράματα σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου του ίδιου στελέχους (Chalima, Taxeidis, & Torakas, 2020).

Όσον αφορά τη συσσώρευση λιπαρών παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό λιπαρών επί της ξηρής βιομάζας για την καλλιέργεια που μεταβλήθηκε η θερμοκρασία από 23 σε 15 °C, 39,6 % DCW. Επιβεβαιώνεται δηλαδή ότι το θερμοκρασιακό στρες είναι ικανό να οδηγήσει σε αύξηση του λιπιδικού περιεχόμενου αλλά η παραγόμενη βιομάζα βρέθηκε τόσο χαμηλή ώστε να καταστήσει αυτή τη μεταβολή μη αποδοτική για την παραγωγή DHA. Δεύτερη σε ποσοστό λιπιδίων βρέθηκε η καλλιέργεια των 27 °C, με ποσοστό 26,8%, ενώ η μεταβολή της θερμοκρασία από 23 σε 27 °C αυξήθηκε κατά περίπου 2% σε σχέση με την καλλιέργεια των 23 °C. Γίνεται λοιπόν φανερό ότι η θερμοκρασία που ευνοεί την ανάπτυξη δεν είναι η πιο ευνοϊκή για τη συσσώρευση λιπιδίων.

Εκτός όμως από το ποσοστό των λιπιδίων παρατηρήθηκε μεταβολή και στο λιπιδικό προφίλ των καλλιεργειών. Συγκεκριμένα από τον Πίνακα 13 παρατηρείται ότι το ποσοστό του DHA, που αποτελεί το αντικείμενο του ενδιαφέροντος κατά την καλλιέργεια *C. cohnii*, ήταν αυξημένο στην καλλιέργεια των 23 °C σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώ οι μεταβολές θερμοκρασίας παρουσίασαν μείωση στο ποσοστό. Ανάμεσα τους η μεταβολή των 23 °C σε 15 °C παρουσίασε το χαμηλότερο ποσοστό DHA αλλά αυξημένο ποσοστό C18:1. Ακόμη, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συσσώρευση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στη θερμοκρασία των 23 °C έναντι της υψηλότερης των 27 °C. Η αύξηση του DHA και του ποσοστού των πολυακόρεστων λιπαρών με τη μείωση της θερμοκρασίας είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Bell και Henderson (1990) και των Jiang και Chen (2000b).

Τα κύτταρα που καλλιεργούνται σε υψηλότερες θερμοκρασίες προσαρμόστηκαν στη διαφορετική θερμοκρασία ανάπτυξης παράγοντας περισσότερα κορεσμένα λιπαρά οξέα. Αντίθετα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, τα κύτταρα ανταποκρίθηκαν στη θερμοκρασία καλλιέργειας αυξάνοντας το βαθμό ακορεστότητας των λιπαρών οξέων και την αναλογία DHA. Προκειμένου να διατηρηθεί η σωστή ρευστότητα των λιπιδίων μεμβράνης και να λειτουργεί σε χαμηλές θερμοκρασίες, οι αναλογίες των ακόρεστων λιπαρών οξέων, ιδιαίτερα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, αυξάνονται. Υπάρχει δηλαδή μια φαινοτυπική προσαρμογή της σύνθεσης των λιπαρών οξέων ανάλογα με τη θερμοκρασία ανάπτυξης. Η αυξημένη σύνθεση ακόρεστων λιπαρών οξέων σε χαμηλότερες θερμοκρασίες έχει παρατηρηθεί και σε άλλα ευκαρυωτικά φύκια και κυανοβακτήρια.

Εφόσον όμως το επιθυμητό προϊόν είναι το DHA η τελική σύγκριση τους θα πρέπει να γίνει με βάση τη συγκέντρωση DHA. Συνολικά, όπως φαίνεται στον Πίνακα 13, για την καλλιέργεια των 23 °C προέκυψε σημαντικά μεγαλύτερη αποδοτικότητα σε DHA, 0,75 g/L, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες θερμοκρασίες. Τη χαμηλότερη συγκέντρωση παρουσίασε η καλλιέργεια με τη μεταβολή της θερμοκρασίας από τους 23 στους 15 °C. Η μεταβολή ευνόησε τη συσσώρευση λιπιδίων και το ποσοστό των πολυακόρεστων αλλά η αύξηση αυτή δεν συνοδεύτηκε με αυξημένο ποσοστό DHA ώστε να είναι ικανό να αντισταθμίσει τη μειωμένη παραγόμενη βιομάζα που συνεπάγεται αυτή η μεταβολή. Αντιθέτως οι Chiang και Chen (2000b) παρατήρησαν ότι η παραγωγή DHA ήταν παρόμοια για όλες τις καλλιέργειες με θερμοκρασία 15-25 °C αλλά για άλλο στέλεχος του μικροφύκου και για πηγή άνθρακα τη γλυκόζη.

Οι παραπάνω συνθήκες εφαρμόστηκαν και με διήθημα υγρού κλάσματος σκοτεινής ζύμωσης βιοαποβλήτων ως τροφοδοσία ώστε να καταδείξει αν μπορεί να εφαρμοστεί στην καλλιέργεια του μικροφύκου. Κατά τη χρήση του παρουσιάστηκε αδυναμία αποτελεσματικής ρύθμισης του pH της καλλιέργειας. Αυτό προέκυψε καθώς θα χρειαζόταν πολύ μεγάλη ποσότητα HCl για να μειωθεί το pH του διηθήματος σε επίπεδα τέτοια ώστε να ρυθμίζει αποτελεσματικά το pH της καλλιέργειας. Έτσι οι βιοαντιδραστήρες έφτασαν σε μικρό χρονικό διάστημα στο μέγιστο όγκο τους και μάλιστα κάθε ένας σε διαφορετικό χρόνο. Για αυτό η σύγκριση τους δε μπορεί να γίνει ως προς τον ίδιο χρόνο και πραγματοποιήθηκε βάσει της ποσότητας τροφοδοσίας που καταναλώθηκε. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση του τελικού υγρού καλλιέργειας με υγρή χρωματογραφία αλλά θεωρείται ότι καταναλώθηκε όλη η ποσότητα τροφοδοσίας που εισήλθε στους βιοαντιδραστήρες καθώς εφαρμόστηκαν συνθήκες διαλείποντος έργου για άλλες 24 h. Βέβαια οι υψηλές αποδόσεις σε ξηρή βιομάζα σε μικρό χρόνο δίνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τη χρήση του διηθήματος ως τροφοδοσία, Διάγραμμα 32. Η υψηλή αυτή απόδοση οφείλεται στην ύπαρξη πολλαπλών πηγών άνθρακα αλλά και άλλων στοιχείων όπως βιταμίνες που ενισχύουν την ανάπτυξη του μικροφύκου. Ταυτόχρονα σε αυτή την περίπτωση η μεταβολή της θερμοκρασίας από 23 σε 27 °C ευνόησε τη συσσώρευση λιπιδίων σε σχέση με τις υπόλοιπες καλλιέργειες όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 33. Δηλαδή η καλλιέργεια ανταποκρίθηκε στη μεταβολή της θερμοκρασίας με αύξηση των λιπιδίων. Όμως και εδώ στην καλλιέργεια που εφαρμόστηκε μεταβολή από 23 σε 15 °C ανεστάλη η ανάπτυξη του μικροφύκου.

Τα δύο πειράματα δε μπορούν να συγκριθούν καθώς δε μελετήθηκαν ως προς την ίδια παράμετρο, το ένα ως προς τον ίδιο χρόνο και το άλλο ως προς την προστιθέμενη τροφοδοσία. Εκτός αυτού στο διήθημα περιέχονται και άλλες πηγές άνθρακα όπως το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ. Κατά την καλλιέργεια του παρατηρείται σε κάποιες περιπτώσεις μια συμβιωτική σχέση με ένα βακτήριο (Gold & Pollinger, 1971). Ενδεχομένως κάποιο από αυτά τα υποστρώματα ευνοεί την ανάπτυξη του βακτηρίου μεταβάλλοντας τις ισορροπίες.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα έρευνα δείχνουν ότι η θερμοκρασία επηρεάζει σημαντικά την αύξηση των κυττάρων, την περιεκτικότητα σε DHA και τη συσσώρευση λιπιδίων στο μικροφύκος *C. cohnii*. Ως προς την μεταβολή της θερμοκρασίας, εφόσον στη θερμοκρασία των 23 °C ευνοείται η ανάπτυξη βιομάζας, αναμενόταν να αυξηθεί αρχικά η βιομάζα και εν συνεχεία να ευνοηθεί η συσσώρευση

λιπαρών οξέων λόγω της μεταβολής της θερμοκρασίας. Ωστόσο αυτό οδήγησε σε μικρή αύξηση των λιπαρών σε σχέση με την καλλιέργεια των 23 °C και μειωμένη παραγωγή ξηρής βιομάζας.

3.3 Επίδραση πηγής Αζώτου και λόγου C/N

Κατά την καλλιέργεια των μικροφυκών συμπεριλαμβανομένου του *C. cohnii*, τόσο η πηγή αζώτου όσο και ο λόγος C/N έχουν σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη και στη συσσώρευση λιπιδίων. Πιο συγκεκριμένα η παρουσία του αζώτου είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη ενώ η μορφή του αζώτου που βρίσκεται στο μέσο της καλλιέργειας επηρεάζει την πρόσληψη του αζώτου από τα κύτταρα και έτσι τη διαθεσιμότητα του. Ανάμεσα στις διαφορετικές πηγές τα αμμωνιακά και το εκχύλισμα ζύμης εμφανίζουν βελτιωμένα αποτελέσματα στην απόδοση σε ξηρή βιομάζα και στη συσσώρευση λιπιδίων σε σύγκριση με άλλες πηγές. Ωστόσο το εκχύλισμα ζύμης αποτελεί παράλληλα και πηγή άνθρακα και ιχνοστοιχείων το οποίο πρέπει να συμπεριληφθεί κατά τη σύγκριση των δύο πηγών. Για την μελέτη της επίδρασης της πηγής αζώτου στην ανάπτυξη και την παραγωγή λιπαρών οξέων χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου του *Cryptocodinium cohnii* και παρατηρήθηκε η ανάπτυξη των κυττάρων της καλλιέργειας με καθημερινά δείγματα. Οι πηγές αζώτου που μελετήθηκαν είναι το εκχύλισμα ζύμης και το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (αμμωνιακά) ενώ μελετήθηκαν παράλληλα καλλιέργειες με λόγο C/N 8,9 και 45,9. Κατά το πείραμα αυτό διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία των βιοαντιδραστήρων στους 27 °C. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε είναι το οξικό οξύ.

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 34 τα ημερήσια δείγματα των καλλιεργειών με το εκχύλισμα ζύμης ως πηγή αζώτου εμφάνισαν μεγαλύτερη απορρόφηση στα 685 nm και συνεπώς αποτελεί ένδειξη ότι αναπτύχθηκαν περισσότερο σε σύγκριση με εκείνες με πηγή τα αμμωνιακά. Το παραπάνω επιβεβαιώνεται και από το Διάγραμμα 36 καθώς εμφάνισαν μεγαλύτερη τελική παραγωγή βιομάζας. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Mendes et al. οι οποίοι σύγκριναν τις δύο πηγές αζώτου σε καλλιέργειες του *C. cohnii* σε πολύ από χαρούπι. Εκτός όμως από την πηγή άνθρακα από τα δύο αυτά διαγράμματα φανερώνεται και η σημαντική επίδραση του λόγου C/N όπου ο μικρότερος λόγος C/N εμφάνισε σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα το οποίο είναι εμφανές και από την πτώση της συγκέντρωσης οξικού οξέος που φαίνεται από το Διάγραμμα 35. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αποτελεί απαραίτητο συστατικό για την ανάπτυξη των κυττάρων και αυξημένη διαθέσιμη ποσότητα αζώτου έχει θετική επίδραση στην ανάπτυξη. Βέβαια, μεγάλη συγκέντρωση αζώτου αναστέλλει της ανάπτυξη των μικροοργανισμών ενώ κατά την καλλιέργεια του *C. cohnii* έχει παρατηρηθεί μείωση της τελικής παραγωγής βιομάζας και του ποσοστού των λιπιδίων για υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις αζώτου (L. Liu et al., 2018; Mendes et al., 2007).

Το αντίθετο όμως παρατηρήθηκε για το ποσοστό λιπιδίων καθώς ο μεγαλύτερος λόγος C/N ευνόησε τη συσσώρευση λιπιδίων με το εκχύλισμα ζύμης να έχει και πάλι βελτιωμένη απόδοση σε σύγκριση με τα αμμωνιακά, Διάγραμμα 37. Μια υψηλή τιμή του λόγου C/N προέρχεται από μία χαμηλή συγκέντρωση αζώτου το οποίο σταδιακά καταναλώνεται κατά την καλλιέργεια δημιουργώντας τελικά συνθήκες έλλειψης αζώτου. Αυτό έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί στρες στα κύτταρα τα οποία προσαρμόζονται σε αυτή την έλλειψη συσσωρεύοντας λιπίδια (Safdar, Shamooh, et al., 2017). Αξιοσημείωτο ακόμα είναι όμως

ότι κατά την καλλιέργεια με αμμωνιακά για χαμηλότερο λόγο C/N το ποσοστό του DHA ήταν αυξημένο ενώ για τον υψηλότερο λόγο C/N τα ποσοστά ήταν παραπλήσια για τις δύο πηγές. Παρόμοια συμπεριφορά ως προς τα λιπίδια και το ποσοστό DHA έχει παρατηρηθεί και σε προγενέστερα πειράματα σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου (Chalima et al., 2020). Ωστόσο λόγω της σημαντικά χαμηλότερης παραγωγής βιομάζας σε σχέση με την αντίστοιχη καλλιέργεια με εκχύλισμα ζύμης τελικά οδήγησε σε χαμηλότερη συνολική παραγόμενη ποσότητα DHA βάσει του Πίνακα 15. Συνοψίζοντας και οι δύο παράμετροι, πηγή αζώτου και λόγος C/N φαίνεται να έχουν σημαντική επίδραση στην καλλιέργεια *C. Cohnii*. Ανάμεσα στις διάφορες καλλιέργειες, η καλλιέργεια με πηγή άνθρακα το εκχύλισμα ζύμης και λόγο C/N 8,9 παρουσίασε τη μεγαλύτερη τελική παραγωγή ξηρής βιομάζας και DHA.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Βάσει των αποτελεσμάτων και όσων αναφέρθηκαν για την παραγωγή DHA από το μικροφύκος *C.cohnii* προτείνεται να διερευνηθούν τα εξής:

- Από τα αποτελέσματα χρήσης διαλύματος γλυκόζης-ξυλόζης προτείνεται να χρησιμοποιηθεί υδρόλυμα από λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας ως τροφοδοσία της καλλιέργειας.
- Θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν και μελέτες για αξιοποίηση διαφορετικών ειδών βιομηχανικών και αγροτικών αποβλήτων.
- Η μέθοδος παροχής του υδρολύματος απαιτεί περαιτέρω μελέτη ώστε να αυτοματοποιηθεί η παροχή τροφοδοσίας του.
- Εφόσον τα αποτελέσματα για τη συνδυαστική τροφοδοσία με ποσοστό 0,6% εμφάνισαν αύξηση στα λιπαρά την τελευταία ημέρα προτείνεται να επαναληφθεί το πείραμα.
- Απαραίτητο αποτελεί να επαναληφθεί το πείραμα όπου μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας με διήθημα υγρού κλάσματος βιοαποβλήτων ώστε να προκύψουν συγκρίσιμα αποτελέσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ali, M., Haque, R., & Khan, S. A. (2019). Docosahexaenoic Acid (DHA): A Dietary Supplement With Promising Anticancer Potential. In *The Molecular Nutrition of Fats* (Vol. 14, pp. 389–400). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811297-7.00030-5>
- Ander, B. P., Dupasquier, C. M. C., Prociuk, M. A., & Pierce, G. N. (2003). Polyunsaturated fatty acids and their effects on cardiovascular disease. *Experimental and Clinical Cardiology*, Vol. 8, pp. 164–172. Pulsus Group.
- Anil Kommareddy, & Dr. Gary Anderson. (2013, November 15). *Study of Light as a parameter in the growth of algae in a Photo-Bio Reactor (PBR)*. <https://doi.org/10.13031/2013.13868>
- Atalla, R. H., & Isogai, A. (2010). Celluloses. In *Comprehensive Natural Products II* (pp. 493–539). <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00691-2>
- Aziz, M. M. A., Kassim, K. A., Shokravi, Z., Jakarni, F. M., Lieu, H. Y., Zaini, N., ... Shokravi, H. (2020). Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119(December 2019), 109621. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109621>
- Ballesteros, M. (2010). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. In *Bioalcohol Production: Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass* (pp. 159–177). <https://doi.org/10.1533/9781845699611.2.159>
- Baroukh, C., Turon, V., & Bernard, O. (2017). Dynamic metabolic modeling of heterotrophic and mixotrophic microalgal growth on fermentative wastes. *PLoS Computational Biology*, 13(6), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005590>
- Bultosa, G. (2016). Functional Foods: Overview. In *Reference Module in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00071-8>
- Chalima, A., Hatzidaki, A., Karnaouri, A., & Topakas, E. (2019). Integration of a dark fermentation effluent in a microalgal-based biorefinery for the production of high-added value omega-3 fatty acids. *Applied Energy*, 241, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.03.058>
- Chalima, A., Oliver, L., Fernández de Castro, L., Karnaouri, A., Dietrich, T., & Topakas, E. (2017). Utilization of Volatile Fatty Acids from Microalgae for the Production of High Added Value Compounds. *Fermentation*, 3(4), 54. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040054>
- Chalima, A., Taxeidis, G., & Topakas, E. (2020). Optimization of the production of docosahexaenoic fatty acid by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* utilizing a dark fermentation effluent. *Renewable Energy*, 152, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.041>
- Chi, Z., Zheng, Y., Jiang, A., & Chen, S. (2011). Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(2), 442–453. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9263-6>
- Christaki, E., Bonos, E., & Florou-Paneri, P. (2015). Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition. In *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances* (pp. 223–243). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00014-5>
- da Silva, T. L., Moniz, P., Silva, C., & Reis, A. (2019). The dark side of microalgae biotechnology: A heterotrophic biorefinery platform directed to ω -3 rich lipid production. *Microorganisms*, 7(12), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120670>
- Dahiya, S., Kumar, A. N., Shanthi Sravan, J., Chatterjee, S., Sarkar, O., & Mohan, S. V.

- (2018). Food waste biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, 248, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.176>
- Daphne, N., Yi Kai, N., Hui, S., & Yuan Kun, L. (2015). Microalgal Biotechnology: The Way Forward. The Way Forward. In *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances* (pp. 69–80). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00006-6>
- De Swaaf, M E, Pronk, · J T, & Sijtsma, · L. (2003). Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61, 40–43. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1118-1>
- de Swaaf, Martin E., de Rijk, T. C., Eggink, G., & Sijtsma, L. (1999). Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *Progress in Industrial Microbiology*, 35(C), 185–192. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80111-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80111-8)
- DeFilippis, A. P., & Sperling, L. S. (2006, March 1). Understanding omega-3's. *American Heart Journal*, Vol. 151, pp. 564–570. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2005.03.051>
- Diao, J., Song, X., Cui, J., Liu, L., Shi, M., Wang, F., & Zhang, W. (2019). Rewiring metabolic network by chemical modulator based laboratory evolution doubles lipid production in *Cryptocodinium cohnii*. *Metabolic Engineering*, 51, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.10.004>
- García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Cruz-Guerrero, A. E., & Bárzana, E. (2003). *SINGLE-CELL PROTEIN | Algae. Encycloped*, 5269–5276. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01087-7>
- Gerken, H. G., Donohoe, B., & Knoshaug, E. P. (2013). Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta*, 237(1), 239–253. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1765-0>
- Godoy, M. G., Amorim, G. M., Barreto, M. S., & Freire, D. M. G. (2018). Agricultural Residues as Animal Feed. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 235–256). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63990-5.00012-8>
- Gold, K., & Pollinger, U. (1971). OCCURRENCE OF ENDOSYMBIOTIC BACTERIA IN MARINE DINOFLAGELLATES. *Journal of Phycology*, 7(3), 264–265. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1971.tb01513.x>
- Gong, Y., Liu, J., Jiang, M., Liang, Z., Jin, H., Hu, X., ... Hu, C. (2015). Improvement of Omega-3 Docosahexaenoic Acid Production by Marine Dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* Using Rapeseed Meal Hydrolysate and Waste Molasses as Feedstock. *PLOS ONE*, 10(5), e0125368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125368>
- Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 45(2), 160–186. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001>
- Heimann, K., & Huerlimann, R. (2015). Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species. Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species. In *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances* (pp. 25–41). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00003-0>
- Hernandez, J. P., De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2006). Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1–2), 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.005>
- Ira A. Levine and Joël Fleurence. (2018). Algae: A Way of Life and Health. In *Microalgae in Health and Disease Prevention*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00001-3>
- Jiang, Y., & Chen, F. (2000a). Effects of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptocodinium cohnii*. *Process Biochemistry*, 35(10), 1205–1209. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00163-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00163-1)

- Jiang, Y., & Chen, F. (2000b). Effects of Temperature and Temperature Shift on Docosaehaenoic Acid Production by the Marine Microalga *Cryptocodinium cohnii*. *AOCS Press*.
- Karnaouri, A., Chalima, A., Kalogiannis, K. G., Varamogianni-Mamatsi, D., Lappas, A., & Topakas, E. (2020). Utilization of lignocellulosic biomass towards the production of omega-3 fatty acids by the heterotrophic marine microalga *Cryptocodinium cohnii*. *Bioresource Technology*, *303*, 122899. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122899>
- Karnaouri, A., Kostopoulos, P., Chalima, A., Kalogiannis, K., Lappas, A., & Topakas, E. (n.d.). *Utilization of lignocellulosic biomass for the production of omega-3 fatty acids by the marine microalgae Cryptocodinium cohnii*.
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, *17*, 36. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kirst, C. O. (1989). SALINITY TOLERANCE OF EUKARYOTIC MARINE ALGAE. In *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* (Vol. 40). Retrieved from www.annualreviews.org
- Kumar, A., & Narayan, R. (2018). Differential expression of the microbial B-1,4-xylanase, and B-1,4-endoglucanase genes. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Genes Biochemistry and Applications* (pp. 95–111). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63503-7.00006-1>
- Kumar, G., Shobana, S., Nagarajan, D., Lee, D.-J., Lee, K.-S., Lin, C.-Y., ... Chang, J.-S. (2018). Biomass based hydrogen production by dark fermentation — recent trends and opportunities for greener processes. *Current Opinion in Biotechnology*, *50*, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.12.024>
- Kwok, A. C. M., & Wong, J. T. Y. (2003). Cellulose synthesis is coupled to cell cycle progression at G1 in the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Plant Physiology*, *131*(4), 1681–1691. <https://doi.org/10.1104/pp.102.018945>
- Li, T., Yang, F., Xu, J., Wu, H., Mo, J., Dai, L., & Xiang, W. (2020). Evaluating differences in growth, photosynthetic efficiency, and transcriptome of *Asterarcys* sp. SCS-1881 under autotrophic, mixotrophic, and heterotrophic culturing conditions. *Algal Research*, *45*(June 2019), 101753. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101753>
- Liu, L., Wang, F., Yang, J., Li, X., Cui, J., Liu, J., ... Zhang, W. (2018). Nitrogen Feeding Strategies and Metabolomic Analysis to Alleviate High-Nitrogen Inhibition on Docosaehaenoic Acid Production in *Cryptocodinium cohnii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(40), 10640–10650. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03634>
- Liu, N., Santala, S., & Stephanopoulos, G. (2020). Mixed carbon substrates: a necessary nuisance or a missed opportunity? *Current Opinion in Biotechnology*, *62*, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.07.003>
- Liu, X., & Kokare, C. (2017). Microbial Enzymes of Use in Industry. In *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications* (pp. 267–298). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>
- Łukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., & Kamiński, M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *91*, 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>
- Mandal, S., & Mallick, N. (2014). Microalgae: The Tiny Microbes with a Big Impact. In *Bioenergy Research: Advances and Applications* (pp. 171–184). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00011-5>
- Martínez, F., & Isabel Orús, M. (1991). Cell Cycle Alteration and β -1,4 Endoglucanase in

- Heterotrophic *Chlorella vulgaris* UAM 101. *Journal of Plant Physiology*, 138(1), 17–23. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80723-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80723-6)
- Meesapyodsuk, D., & Qiu, X. (2016). Biosynthetic mechanism of very long chain polyunsaturated fatty acids in *Thraustochytrium* sp. 26185. *Journal of Lipid Research*, 57(10), 1854–1864. <https://doi.org/10.1194/jlr.M070136>
- Mendelson, S. D. (2008). FACTORS THAT CONTRIBUTE TO METABOLIC SYNDROME. In *Metabolic Syndrome and Psychiatric Illness* (pp. 11–26). <https://doi.org/10.1016/b978-012374240-7.50004-8>
- Mendes, A., Guerra, P., Madeira, V., Ruano, F., Lopes Da Silva, T., & Reis, A. (2007). Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(9), 1209–1215. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9349-z>
- Mendes, A., Reis, A., Vasconcelos, R., Guerra, P., & Lopes Da Silva, T. (2009). *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: A review. *Journal of Applied Phycology*, 21(2), 199–214. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9351-3>
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00546>
- Ogita, S., Ohki, S., Nomura, T., & Kato, Y. (2012). A β -Glucosidase Activity Potentially Involved in Cell Division and Wall Development of *Phyllostachys* Bamboo Suspension Cells. *American Journal of Plant Sciences*, 03(08), 1066–1072. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.38127>
- Park, J. O., Liu, N., Holinski, K. M., Emerson, D. F., Qiao, K., Woolston, B. M., ... Stephanopoulos, G. (2019). Synergistic substrate cofeeding stimulates reductive metabolism. *Nature Metabolism*, 1(6), 643–651. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0077-0>
- Pei, G., Li, X., Liu, L., Liu, J., Wang, F., Chen, L., & Zhang, W. (2017). De novo transcriptomic and metabolomic analysis of docosahexaenoic acid (DHA)-producing *Cryptocodinium cohnii* during fed-batch fermentation. *Algal Research*, 26, 380–391. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.031>
- Perez-Garcia, O., & Bashan, Y. (2015). Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. In *Algal Biorefineries* (pp. 61–131). https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_3
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011, January 1). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, Vol. 45, pp. 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Pleissner, D., Lam, W. C., Sun, Z., & Lin, C. S. K. (2013). Food waste as nutrient source in heterotrophic microalgae cultivation. *Bioresource Technology*, 137, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.088>
- Qiu, X. (2003, February 1). Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7,10,13,16,19): Two distinct pathways. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, Vol. 68, pp. 181–186. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(02\)00268-5](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(02)00268-5)
- Ratledge, C. (2013). Microbial production of polyunsaturated fatty acids as nutraceuticals. In *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals* (pp. 531–558). <https://doi.org/10.1533/9780857093547.2.531>
- Ratledge, Colin, & Lippmeier, C. (2017). Microbial Production of Fatty Acids. In *Fatty Acids* (pp. 237–278). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809521-8.00006-4>
- Rodrigues, A. G. (2016). Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of

- Aspergillus. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications* (pp. 81–93). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00006-3>
- Rumiani, L. A., Jalili, H., & Amrane, A. (2018). Enhanced docosahexaenoic acid production by *Cryptocodinium cohnii* under combined stress in two-stage cultivation with date syrup based medium. *Algal Research*, *34*, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.010>
- Safdar, W., Shamoan, M., Zan, X., Haider, J., Sharif, H. R., Shoaib, M., & Song, Y. (2017). Growth kinetics, fatty acid composition and metabolic activity changes of *Cryptocodinium cohnii* under different nitrogen source and concentration. *AMB Express*, *7*(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0384-3>
- Safdar, W., Zan, X., & Song, Y. (2017). Synergistic Effects of pH, Temperature and Agitation on Growth Kinetics and Docosahexaenoic Acid Production of *C. cohnii* Cultured on Different Carbon Sources. In *International Journal of Research in Agricultural Sciences* (Vol. 4).
- Shahidi, F. (2011). Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease. In *Omega-3 Oils: Applications in Functional Foods*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-82-0.50004-9>
- Sibi, G., Shetty, V., & Mokashi, K. (2016). Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels – A review. *Journal of the Energy Institute*, *89*(3), 330–334. <https://doi.org/10.1016/j.joei.2015.03.008>
- Sijtsma, L., Anderson, A. J., & Ratledge, C. (2010). Alternative Carbon Sources for Heterotrophic Production of Docosahexaenoic Acid by the Marine Alga *Cryptocodinium cohnii*. In *Single Cell Oils: Microbial and Algal Oils: Second Edition* (pp. 131–149). <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-73-8.50011-6>
- Strazzer, G., Battista, F., Garcia, N. H., Frison, N., & Bolzonella, D. (2018). Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review. *Journal of Environmental Management*, *226*, 278–288. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.039>
- Terrado, R., Pasulka, A. L., Lie, A. A. Y., Orphan, V. J., Heidelberg, K. B., & Caron, D. A. (2017). Autotrophic and heterotrophic acquisition of carbon and nitrogen by a mixotrophic chrysophyte established through stable isotope analysis. *ISME Journal*, *11*(9), 2022–2034. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.68>
- Tokuyama, S., & Nakamoto, K. (2014). Pain as Modified by Polyunsaturated Fatty Acids. In *Omega-3 Fatty Acids in Brain and Neurological Health* (pp. 131–146). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-410527-0.00012-0>
- Turon, V., Trably, E., Fouilland, E., & Steyer, J. P. (2016). Potentialities of dark fermentation effluents as substrates for microalgae growth: A review. *Process Biochemistry*, *51*(11), 1843–1854. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.018>
- Tuttle, R. C., & Loeblich, A. R. (1975). An optimal growth medium for the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Phycologia*, *14*(1), 1–8. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-14-1-1.1>
- Venkatesan, J., Manivasagan, P., & Kim, S. K. (2015). Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances. Present Trends and Future Advances. In *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances* (pp. 1–9). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00001-7>
- Volatile. (n.d.). Retrieved March 16, 2020, from <http://www.volatile-h2020.eu/index.html>
- Voort, M. van der, Spruijt, J., Potters, J., & Elissen, H. (2017). *Socio-economic assessment of Algae-based PUFA production*. Retrieved from www.pufachain.eu
- Wang, H., Zhou, W., Shao, H., & Liu, T. (2017). A comparative analysis of biomass and lipid content in five *Tribonema* sp. strains at autotrophic, heterotrophic and mixotrophic

- cultivation. *Algal Research*, 24(February), 284–289.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.020>
- Wynn, J., Behrens, P., Sundararajan, A., Hansen, J., & Apt, K. (2010). Production of Single Cell Oils by Dinoflagellates. In *Single Cell Oils: Microbial and Algal Oils: Second Edition* (pp. 115–129). <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-73-8.50010-4>
- Wynna, J., Behrens, P., Sundararajan, A., Hansen, J., & Aptb, K. (2010). Chapter 6: Production of Single Cell Oils by Dinoflagellates. In Z. Cohen & C. Ratledge (Eds.), *Single Cell Oils: Microbial and Algal Oils* (2nd ed.). Retrieved from [https://books.google.gr/books?id=Ws9VCgAAQBAJ&pg=PA115&lpg=PA115&dq=Production+of+Single+Cell+Oils+by+Dinoflagellates+James+Wynn,a+Paul+Behrens,b+Anand+Sundararajan,c+Jon+Hansen,c+and+Kirk+Aptb&source=bl&ots=y15gKQIIEb&sig=ACfU3U2VQQUtpXeO-Qd5G62hvNmWEk4NEQ&hl=el&sa=X&ved=2ahUKEwjn9peO-7DoAhUmzoUKHaBoCzsQ6AEwAHoECAEQAQ#v=onepage&q=Production of Single Cell Oils by Dinoflagellates James Wynn%2Ca Paul Behrens%2Cb Anand Sundararajan%2Cc Jon Hansen%2Cc and Kirk Aptb&f=false](https://books.google.gr/books?id=Ws9VCgAAQBAJ&pg=PA115&lpg=PA115&dq=Production+of+Single+Cell+Oils+by+Dinoflagellates+James+Wynn,a+Paul+Behrens,b+Anand+Sundararajan,c+Jon+Hansen,c+and+Kirk+Aptb&source=bl&ots=y15gKQIIEb&sig=ACfU3U2VQQUtpXeO-Qd5G62hvNmWEk4NEQ&hl=el&sa=X&ved=2ahUKEwjn9peO-7DoAhUmzoUKHaBoCzsQ6AEwAHoECAEQAQ#v=onepage&q=Production+of+Single+Cell+Oils+by+Dinoflagellates+James+Wynn%2Ca+Paul+Behrens%2Cb+Anand+Sundararajan%2Cc+Jon+Hansen%2Cc+and+Kirk+Aptb&f=false)
- Xu, Q., Luo, Y., Ding, S. Y., Himmel, M. E., Bu, L., Lamed, R., & Bayer, E. A. (2011). Multifunctional Enzyme Systems for Plant Cell Wall Degradation. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Vol. 3, pp. 15–25). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00167-7>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Τροφοδοσία οξικού οξέος

Για την τροφοδοσία του οξικού οξέος χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 33,3%, δηλαδή 333 mL οξικό/L τροφοδοσίας. Η συγκέντρωση του οξικού πριν την αραιώση είναι:

$$M_{\text{οξικό}} = \frac{n_{\text{οξικό}}}{V_{\text{οξικό}}} = \frac{\rho}{Mr} = \frac{1,05 \text{ g/mL}}{60,052 \text{ g/mol}} = 17,48 \text{ mol/L}$$

Καθώς το οξικό αραιώνεται σε νερό σε αναλογία 1:2 τελικά είναι:

$$M_{\text{οξικό}} = \frac{17,48 \text{ mol/L}}{3} = 5,83 \text{ mol/L}$$

και επειδή περιέχονται δύο άνθρακες στο μόριο του, η ποσότητα άνθρακα υπολογίζεται:

$$M_C = 11,7 \text{ mol/L}$$

Τροφοδοσία οξικού οξέος-6% γλυκόζη

Η συνολική ποσότητα άνθρακα ισούται με την ποσότητα άνθρακα της γλυκόζης και την ποσότητα άνθρακα του οξικού οξέος:

$$M_{\text{Cοξικό}} + M_{\text{Cγλυκόζης}} = M_C = 11,7 \text{ mol/L}$$

Από την παραπάνω ποσότητα όμως το 6% του συνολικού άνθρακα αντιστοιχεί στον άνθρακα της γλυκόζης:

$$M_{\text{Cγλυκόζης}} = 6\% \cdot M_C = 0,7 \text{ mol/L}$$

Αφού η γλυκόζη περιέχει 6 άτομα άνθρακα στο μόριο της προκύπτει:

$$M_{\text{γλυκόζης}} = \frac{M_{\text{Cγλυκόζης}}}{6} = 0,12 \text{ mol/L}$$

$$m_{\text{γλυκόζη}} = M_{\text{γλυκόζης}} \cdot Mr_{\text{γλυκόζη}} = 0,12 \cdot 180,156 = 21,6 \text{ g/L}$$

Αφαιρώντας την ποσότητα του άνθρακα που περιέχεται στη γλυκόζη υπολογίζεται του οξικού οξέος:

$$M_{\text{Cοξικό}} = M_C - M_{\text{Cγλυκόζης}} = 11,7 - 0,12 = 11,58 \text{ mol/L}$$

Το οξικό οξύ περιέχει 2 άτομα άνθρακα στο μόριο του:

$$M_{\text{οξικό}} = \frac{M_{\text{Cοξικό}}}{2} = 5,79 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Η ποσότητα του υπολογίζεται ως εξής:

$$m_{\text{οξικό}} = 5,79 \cdot Mr_{\text{οξικό}} = 347,7 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

$$V_{\text{οξικό}} = \frac{m_{\text{οξικό}}}{\rho} = 331 \text{ mL/L}$$

Τροφοδοσία οξικού οξέος-3% γλυκόζη

Η συνολική ποσότητα άνθρακα ισούται με την ποσότητα άνθρακα της γλυκόζης και την ποσότητα άνθρακα του οξικού οξέος:

$$M_{\text{Cοξικό}} + M_{\text{Cγλυκόζη}} = M_{\text{C}} = 11,7 \text{ mol/L}$$

Από την παραπάνω ποσότητα όμως το 3% του συνολικού άνθρακα αντιστοιχεί στον άνθρακα της γλυκόζης:

$$M_{\text{Cγλυκόζη}} = 3\% \cdot M_{\text{C}} = 0,35 \text{ mol/L}$$

Αφού η γλυκόζη περιέχει 6 άτομα άνθρακα στο μόριο της προκύπτει:

$$M_{\text{γλυκόζη}} = \frac{M_{\text{Cγλυκόζη}}}{6} = 0,059 \text{ mol/L}$$

$$m_{\text{γλυκόζη}} = M_{\text{γλυκόζη}} \cdot Mr_{\text{γλυκόζη}} = 0,059 \cdot 180,156 = 10,8 \text{ g/L}$$

Αφαιρώντας την ποσότητα του άνθρακα που περιέχεται στη γλυκόζη υπολογίζεται του οξικού οξέος:

$$M_{\text{Cοξικό}} = M_{\text{C}} - M_{\text{Cγλυκόζη}} = 11,7 - 0,059 = 11,64 \text{ mol/L}$$

Το οξικό οξύ περιέχει 2 άτομα άνθρακα στο μόριο του:

$$M_{\text{οξικό}} = \frac{M_{\text{Cοξικό}}}{2} = 5,82 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Η ποσότητα του υπολογίζεται ως εξής:

$$m_{\text{οξικό}} = 5,82 \cdot Mr_{\text{οξικό}} = 349,5 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

$$V_{\text{οξικό}} = \frac{m_{\text{οξικό}}}{\rho} = 332,9 \text{ mL/L}$$

Τροφοδοσία οξικού οξέος-1,2% γλυκόζη

Η συνολική ποσότητα άνθρακα ισούται με την ποσότητα άνθρακα της γλυκόζης και την ποσότητα άνθρακα του οξικού οξέος:

$$M_{\text{Cοξικό}} + M_{\text{Cγλυκόζη}} = M_{\text{C}} = 11,7 \text{ mol/L}$$

Από την παραπάνω ποσότητα όμως το 1,2% του συνολικού άνθρακα αντιστοιχεί στον άνθρακα της γλυκόζης:

$$M_{C\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta\varsigma} = 1,2\% \cdot M_C = 0,14 \text{ mol/L}$$

Αφού η γλυκόζη περιέχει 6 άτομα άνθρακα στο μόριο της προκύπτει:

$$M_{\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta\varsigma} = \frac{M_{C\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta\varsigma}}{6} = 0,023 \text{ mol/L}$$

$$m_{\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta} = M_{\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta\varsigma} \cdot Mr_{\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta} = 0,023 \cdot 180,156 = 4,14 \text{ g/L}$$

Αφαιρώντας την ποσότητα του άνθρακα που περιέχεται στη γλυκόζη υπολογίζεται του οξικού οξέος:

$$M_{C\omicron\upsilon\chi\iota\kappa\acute{o}} = M_C - M_{C\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta\varsigma} = 11,7 - 0,023 = 11,68 \text{ mol/L}$$

Το οξικό οξύ περιέχει 2 άτομα άνθρακα στο μόριο του:

$$M_{\omicron\upsilon\chi\iota\kappa\acute{o}} = \frac{M_{C\omicron\upsilon\chi\iota\kappa\acute{o}}}{2} = 5,84 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Η ποσότητα του υπολογίζεται ως εξής:

$$m_{\omicron\upsilon\chi\iota\kappa\acute{o}} = 5,84 \cdot Mr_{\omicron\upsilon\chi\iota\kappa\acute{o}} = 350,7 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

$$V_{\omicron\upsilon\chi\iota\kappa\acute{o}} = \frac{m_{\omicron\upsilon\chi\iota\kappa\acute{o}}}{\rho} = 329,8 \text{ mL/L}$$

Τροφοδοσία οξικού οξέος-0,6% γλυκόζη

Η συνολική ποσότητα άνθρακα ισούται με την ποσότητα άνθρακα της γλυκόζης και την ποσότητα άνθρακα του οξικού οξέος:

$$M_{C\omicron\upsilon\chi\iota\kappa\acute{o}} + M_{C\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta\varsigma} = M_C = 11,7 \text{ mol/L}$$

Από την παραπάνω ποσότητα όμως το 0,6% του συνολικού άνθρακα αντιστοιχεί στον άνθρακα της γλυκόζης:

$$M_{C\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta\varsigma} = 0,6\% \cdot M_C = 0,0702 \text{ mol/L}$$

Αφού η γλυκόζη περιέχει 6 άτομα άνθρακα στο μόριο της προκύπτει:

$$M_{\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta\varsigma} = \frac{M_{C\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta\varsigma}}{6} = 0,018 \text{ mol/L}$$

$$m_{\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta} = M_{\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta\varsigma} \cdot Mr_{\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta} = 0,018 \cdot 180,156 = 2,11 \text{ g/L}$$

Αφαιρώντας την ποσότητα του άνθρακα που περιέχεται στη γλυκόζη υπολογίζεται του οξικού οξέος:

$$M_{C\omicron\upsilon\chi\iota\kappa\acute{o}} = M_C - M_{C\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta\varsigma} = 11,7 - 0,018 = 11,68 \text{ mol/L}$$

Το οξικό οξύ περιέχει 2 άτομα άνθρακα στο μόριο του:

$$M_{\omicron\upsilon\chi\iota\kappa\acute{o}} = \frac{M_{C\omicron\upsilon\chi\iota\kappa\acute{o}}}{2} = 5,84 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Η ποσότητα του υπολογίζεται ως εξής:

$$m_{\text{οξικό}} = 5,84 \cdot Mr_{\text{οξικό}} = 347,7 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$
$$V_{\text{οξικό}} = \frac{m_{\text{οξικό}}}{\rho} = 331,1 \text{ mL/L}$$

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Για τον υπολογισμό του λόγου C/N των καλλιεργειών πρέπει να υπολογιστεί η τιμή του λόγου που αντιστοιχεί στα συστατικά του ATCC medium, χωρίς αμμωνιακά και γλυκόζη, που χρησιμοποιείται στην περίπτωση των αμμωνιακών. Οι πηγές C ή N είναι οι ακόλουθες:

$$\text{NaHCO}_3 \ 0,19 \frac{\text{g}}{\text{L}} \rightarrow x_C = \frac{Ar_C}{Mr_{\text{NaHCO}_3}} \cdot 0,19 \text{g/L} = 0,027 \text{ g/L}$$

$$\text{Na}_2\text{Glycerophosphate} \ 0,15 \frac{\text{g}}{\text{L}} \rightarrow x_C = 3 \cdot \frac{Ar_C}{Mr_{\text{NaHCO}_3}} \cdot 0,15 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 0,025 \text{ g/L}$$

$$\text{Glutamic Acid} \ 1,5 \frac{\text{g}}{\text{L}} \rightarrow x_C = 0,6 \frac{\text{g}}{\text{L}}, x_N = 0,14 \text{ g/L}$$

Άρα υπολογίζεται:

$$\frac{C}{N} = \frac{0,65 \text{ g/L}}{0,14 \text{ g/L}} = 4,7$$

Σε όλες τις καλλιέργειες χρησιμοποιείται $x_C = 7,4 \frac{\text{g}}{\text{L}}$ ώστε να συγκριθούν μόνο ως προς την επίδραση της πηγή αζώτου.

Βιοαντιδραστήρες οξικού οξέος

Λόγος C/N=45,9:

$$\frac{C}{N} = 45,9 \rightarrow \frac{x_{C,\text{yeast}} + x_{C,\text{sodium acetate}}}{x_{N,\text{yeast}}} = 45,9$$

$$x_{C,\text{yeast}} + x_{C,\text{sodium acetate}} = 7,4 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

$$x_{C,\text{yeast}} = 0,4 x_{C,\text{yeast}}$$

$$x_{N,\text{yeast}} = 0,11 x_{C,\text{yeast}}$$

$$x_{\text{yeast extract}} = 1,38 \frac{\text{g}}{\text{L}}, x_{\text{sodium acetate}} = 23,4 \text{ g/L}$$

Λόγος C/N=8,9:

$$\frac{C}{N} = 8,9,9 \rightarrow \frac{x_{C,\text{yeast}} + x_{C,\text{sodium acetate}}}{x_{N,\text{yeast}}} = 8,9$$

$$x_{C,\text{yeast}} + x_{C,\text{sodium acetate}} = 7,4 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

$$x_{C,\text{yeast}} = 0,4 x_{C,\text{yeast}}$$

$$x_{N,\text{yeast}} = 0,11 x_{C,\text{yeast}}$$

$$x_{\text{yeast extract}} = 7,5 \frac{\text{g}}{\text{L}}, x_{\text{sodium acetate}} = 15 \text{ g/L}$$

Βιοαντιδραστήρες με πηγή αζώτου αμμωνιακά

$$x_c = 7,4 \rightarrow x_{C,sodium\ acetate} = 7,4 - x_{ATCC} = 7,4 - 0,65 = 6,75 \frac{g}{L} \rightarrow$$

$$x_{sodium\ acetate} = \frac{x_{C,sodium\ acetate}}{2} \cdot \frac{Mr_{sodium\ acetate}}{Ar_c} = 22,9 \text{ g/L}$$

Λόγος C/N=45,9:

$$\frac{C}{N} = 45,9 \rightarrow \frac{7,4}{x_{N,ATCC} + x_{N,am}} = 45,9 \rightarrow x_{N,am} = 0,02 \frac{g}{L} \rightarrow x_{am} = 0,1 \text{ g/L}$$

Λόγος C/N=8,9:

$$\frac{C}{N} = 9,9 \rightarrow \frac{7,4}{x_{N,ATCC} + x_{N,am}} = 8,9 \rightarrow x_{N,am} = 0,69 \frac{g}{L} \rightarrow x_{am} = 3,2 \text{ g/L}$$

