



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Αξιοποίηση οργανικών υγρών αποβλήτων με τη χρήση βιοδιωλιστηρίου
μικροφυκών μέσω ετερότροφης και μικτότροφης καλλιέργειας
για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας

Ευαγγελίνα Ε. Κορόζη

Επιβλέπων καθηγητής:

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Καθηγητής ΓΠΑ

Ζερβάκης Γεώργιος, Καθηγητής ΓΠΑ

Μάρκου Γεώργιος, Ερευνητής ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ



**ΑΘΗΝΑ
2023**

«Η υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψηφίους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας»



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Αξιοποίηση οργανικών υγρών αποβλήτων με τη χρήση βιοδιωλιστηρίου μικροφυκών μέσω ετερότροφης και μικτότροφης καλλιέργειας για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας

Evaluation of organic liquid waste using microalgae bio distillery through heterotrophy and mixotrophy for the production of high added value products

Ευαγγελίνα Ε. Κορόζη

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Ζερβάκης Γεώργιος, Καθηγητής ΓΠΑ

Μάρκου Γεώργιος, Ερευνητής ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ

Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Καθηγητής ΓΠΑ

Καρναούρη Ανθή, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Τόπακας Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ

Ταμπακάκη Αναστασία, Καθηγήτρια Μεσογειακό Πανεπιστήμιο

Αξιοποίηση οργανικών υγρών αποβλήτων με τη χρήση βιοδιυλιστηρίου μικροφυκών μέσω ετερότροφης και μικτότροφης καλλιέργειας για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας

*Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη σημερινή εποχή η βιοτεχνολογία μικροφυκών έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής και βιομηχανικής κοινότητας ως πρωτογενής βιολογικός πόρος για την παραγωγή ενός μεγάλου εύρους προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (αντιοξειδωτικά, πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, βιταμίνες, φυσικές χρωστικές κλπ.), τα οποία βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων, ενέργειας, υγείας κλπ.. Τα μικροφύκη θεωρούνται ένας σημαντικός πυλώνας της κυκλικής βιοοικονομίας γιατί θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στο πλαίσιο της διαχείρισης οργανικών αποβλήτων για τη παραγωγή βιομάζας υψηλής οικονομικής αξίας. Τυπικά, είναι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί αλλά μπορούν παράλληλα να αναπτυχθούν αξιοποιώντας οργανικό άνθρακα όπως, σάκχαρα, γλυκερόλη, οξικό οξύ κλπ. Παρόλο που στην πλειονότητα τους είναι αυτότροφοι μικροοργανισμοί, βιομηχανικά μπορούν αξιοποιηθούν σε ετερότροφα και μικτότροφα συστήματα καλλιέργειών.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει ως κύριο αντικείμενο την αξιοποίηση βιομηχανικής γλυκερόλης (παραπροϊόν βιοντίζελ) και τη βιομετατροπή της σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω βιοδιυλιστηρίου μικροφυκών. Η αξιοποίηση της ακατέργαστης γλυκερόλης έγινε μέσω βιοδοκιμών με τις οποίες αξιολογήθηκαν διάφορα είδη μικροφυκών γλυκού νερού: *Chlorella vulgaris*, *Auxenochlorella protothecoides*, *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus quadricauda* καθώς και ένα θαλάσσιο μικροφύκος το *Tetraselmis chuii*. Όλες οι πειραματικές δοκιμές είχαν ως στόχο τη διερεύνηση της δυναμικότητας του κάθε είδους μικροφύκους σε περιβάλλοντα ανάπτυξης με κύρια πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, το βιοχημικό προφίλ των μικροφυκών (περιεκτικότητα σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες) επηρεάζεται από τις καλλιεργητικές παραμέτρους που επιλέγονται κάθε φορά και μπορεί συνεπώς να επιτευχθεί αύξηση της συγκέντρωσης ορισμένων μεταβολιτών στόχων (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια και χρωστικές) μεταβάλλοντας την ένταση και την ποιότητα (μήκος κύματος) του φωτός που παρέχεται στην καλλιέργεια ή με την απουσία συγκεκριμένων θρεπτικών στοιχείων (π.χ. το άζωτο) από το υπόστρωμα.

Η παρούσα μελέτη εστίασε στη διερεύνηση αξιοποίησης των παραπάνω μικροφυκών τόσο μέσω ετερότροφων, όσο και μικτότροφων συστημάτων καλλιέργειας, με δοκιμές σε διαλείποντος έργου και ημιδιαλείποντος έργου συστήματα καλλιέργειας και ακολούθως σε συνεχή συστήματα (με τη χρήση βιοαντιδραστήρα) για πιο ασφαλή συμπεράσματα ως προς την παραγωγικότητα σε βιομηχανικό επίπεδο. Κατά τις πειραματικές δοκιμές που έγιναν χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ακατέργαστης γλυκερόλης με σκοπό τη μελέτη της επίδρασής της στον μεταβολισμό των μικροφυκών. Δοκιμάστηκαν επίσης, διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός σε μικτότροφα συστήματα καλλιέργειας, τα οποία όπως αποδείχθηκε ενεργοποιούν διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια και οδηγούν σε παραγωγή διαφορετικών μεταβολικών

προϊόντων. Μελετήθηκε επίσης, η επίδραση του φωτισμού στον φαινότυπο των υπό εξέταση μικροφυκών., καθώς και της έλλειψης αζώτου από το θρεπτικό μέσο στην παραγωγικότητα λιπιδίων ορισμένων ειδών μικροφυκών.

Στο ετερότροφο σύστημα καλλιέργειας παρατηρήθηκε η υψηλότερη παραγωγή σε βιομάζα, (18.4 g/L ξηρής βιομάζας), καθώς και η υψηλότερη απόδοση βιομάζας ως προς την κατανάλωση της ακατέργαστης γλυκερόλης ($Y_{x/s}=0.23\text{g/g}$), κατά την ανάπτυξη του *A. protothecoides*, σε υπόστρωμα με 80 g/L συγκέντρωση ακατέργαστης γλυκερόλης. Ετερότροφα, σε ικανοποιητικό βαθμό, αλλά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ακατέργαστης γλυκερόλης αναπτύχθηκαν και τα στελέχη *C. vulgaris* (με μέγιστη παραγωγή βιομάζας ίση με 0.79 g/L και με απόδοση $Y_{x/s}=0.07\text{g/g}$) και *S. quadricauda* (με 1.47 g/L παραχθείσα βιομάζα, $Y_{x/s}=0.16$ σε 10 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στο υπόστρωμα). Το *S. obliquus* αποκλείστηκε από περαιτέρω δοκιμές λόγω χαμηλής ποσότητας παραχθείσας βιομάζας και το *T. chuii* λόγω αδυναμίας ανάπτυξης με πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη στο υπόστρωμα.

Η απόδοση σε βιομάζα, ο μέγιστος ρυθμός αύξησης και η συσσώρευση των λιπιδίων ήταν μεγαλύτερη κατά την μικτότροφη συγκριτικά με την ετερότροφη ανάπτυξη για τα στελέχη *S. quadricauda* και *C. vulgaris*, σε αντίθεση με το *A. protothecoides* που έδωσε καλύτερα αποτελέσματα κατά την ετερότροφη ανάπτυξη. Σε μικτοτροφικές συνθήκες, για 10 g/L αρχική συγκέντρωση ακατέργαστης γλυκερόλης στο υπόστρωμα η παραγωγή βιομάζας του *S. quadricauda* ήταν υψηλότερη (1.86 g/L) στο πορτοκαλί φως. Το *C. vulgaris* έδωσε την μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας (1.68 g/L) στο μπλε φως σε 20 g/L αρχική συγκέντρωση ακατέργαστης γλυκερόλης στο υπόστρωμα. Το μήκος κύματος του φωτός επηρέασε σημαντικά τη μορφολογία και τον φαινότυπο των κυττάρων, τον ρυθμό αύξησης και την παραγωγή βιομάζας και μεταβολιτών και για τα δύο μικροφύκη, δυνητικά ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα διαφορετικών μεταβολικών οδών.

Τα δεδομένα που προέκυψαν κατά τις δοκιμές σε ημιδιαλείποντος έργου συστήματα καλλιέργειας έδωσαν ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση της πηγής αζώτου στην ανάπτυξη των μικροφυκών. Η διαθεσιμότητα αζώτου ασκεί ισχυρή επίδραση στη βιοχημική σύνθεση των μικροφυκών. Πράγματι, υπό συνθήκες επάρκειας αζώτου στο θρεπτικό μέσο υπήρχε μια τάση για συσσώρευση πρωτεϊνών, ενώ υπό συνθήκες πενίας αζώτου η βιομάζα ήταν πλούσια σε λιπίδια.

Το σύστημα συνεχούς καλλιέργειας ήταν μια αποτελεσματική μέθοδος για τη μελέτη της κινητικής αύξησης, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολιτών υψηλής αξίας του *A. protothecoides* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ακατέργαστης γλυκερόλης (30 g/L και 50 g/L) και του *C. vulgaris* σε συγκεντρώσεις (20g/L και 30 g/L), υπό ετερότροφες και μικτότροφες συνθήκες. Για το *A. protothecoides*, η αυξημένη αρχική συγκέντρωση ακατέργαστης γλυκερόλης στην ετερότροφη καλλιέργεια προκάλεσε μειωμένη παραγωγικότητα βιομάζας και αυξημένη συγκέντρωση εναπομένουσας γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο που δεν καταναλώθηκε, ενεργώντας πιθανότατα ως περιοριστικός για την αύξηση παράγοντας. Το *A. protothecoides*, σε αντίθεση με άλλα είδη *Chlorella*, εμφάνισε καλύτερες παραμέτρους ανάπτυξης σε ετερότροφες συνθήκες σε σύγκριση με τις μικτότροφες, όπως προσδιορίστηκε από την υψηλότερη παραγωγικότητα του συστήματος (P_{max}), τον υψηλότερο ρυθμό αύξησης,, πράγμα που σημαίνει ότι το συγκεκριμένο μικροφύκος μπορεί να αναπτυχθεί καλύτερα και γρηγορότερα, αξιοποιώντας πιο αποτελεσματικά το υπόστρωμα. Φαίνεται λοιπόν ότι το *A. protothecoides* αποδίδει καλύτερα

υπό ετερότροφες συνθήκες. Η ετεροτροφία είχε επίσης θετικό αντίκτυπο στην παραγωγή λιπιδίων, πρωτεϊνών και υδατανθράκων, αλλά όχι σημαντική επίδραση στα προφίλ λιπαρών και αμινοξέων.

Αντίστοιχα για το *C. vulgaris* το συμπέρασμα που προέκυψε, ήταν ότι τα διαφορετικά μήκη φωτός οδηγούν σε ενεργοποίηση διαφορετικών μεταβολικών μονοπατιών βιοσύνθεσης και συσσώρευσης διαφορετικών μεταβολικών προϊόντων, πράγμα που δεν είχε μελετηθεί επαρκώς έως τώρα και χρίζει περαιτέρω διερεύνησης σε μελλοντικές ερευνητικές δραστηριότητες με σκοπό διερεύνηση του μεταβολικού φαινοτύπου το μικροοργανισμού και πως αντιδρά στις διαφορετικές καλλιεργητικές στρατηγικές. Τέλος, κατά την ανάπτυξη του μικροφύκου σε συνεχές σύστημα καλλιέργειας, τόσο υπό ετερότροφες όσο και υπό μικτότροφες συνθήκες, διαπιστώθηκε ότι μικτότροφα, η αύξηση και η παραγωγή μεταβολιτών ήταν πολύ υψηλότερη συγκριτικά με την ετερότροφη ανάπτυξη, ενώ και η ακατέργαστη γλυκερόλη αφομοιώθηκε πιο αποδοτικά.

Συμπερασματικά, η παρούσα διδακτορική έρευνα έδωσε νέες γνώσεις σχετικά με την εφαρμογή των μικροφυκών στην αξιοποίηση ακατέργαστης γλυκερόλης, εστιάζοντας στην παραγωγικότητα βιομάζας, τη βιοσύνθεση μεταβολιτών καθώς και το βιοχημικό προφίλ της βιομάζας, ενώ διερευνήθηκαν οι καλλιεργητικές παράμετροι, ώστε να προσδιοριστούν οι άριστες συνθήκες γι' αυτό το σκοπό.

Επιστημονική περιοχή: βιοδιωληστήριο μικροφυκών

Λέξεις κλειδιά: Μικροφύκη, Γλυκερόλη, Μικτοτροφία, Ετεροτροφία, Βιοδιωλιστήριο

Evaluation of organic liquid waste using microalgae biodistillery through heterotrophy and mixotrophy for the production of high added value products

Faculty of Crop Science

Laboratory of General & Agricultural Microbiology

ABSTRACT

In the recent years, microalgae biotechnology has attracted the interest of the scientific and industrial communities as a primary biological resource for the production of a wide range of high-value-added products (antioxidants, proteins, fatty acids, vitamins, natural colorants, etc.). These products find broad applications in industries such as animal feed, food, energy, health, and more. Microalgae are considered to be a significant pillar of circular bioeconomy as they can be engaged in the valorization of organic wastes and the production of high-value biomass.

Typically, microalgae are photosynthetic microorganisms, but they can also grow using available in the growth environments carbon sources such as sugars, glycerol, oxalic acid, etc. While they are primarily autotrophic microorganisms, they have been industrially employed in heterotrophic and mixotrophic cultivation systems but utilizing the organic carbon provided in their growth substrate. Crude glycerol is a byproduct of the biodiesel industry, which often becomes waste with a negative impact on the environment due to its excessive, unused quantities.

This doctoral research focuses on the utilization of industrial glycerol and its bioconversion into high-value-added products through microalgae biorefineries. For the utilization of crude glycerol several species of freshwater microalgae, i.e. *Chlorella vulgaris*, *Auxenochlorella protothecoides*, *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus quadricauda*, and a marine microalga, *Tetraselmis chuii* were tested. All species were examined for their potential to grow in environments where crude glycerol was the primary carbon source, in different concentrations..

In all the experiments series conducted, it was observed that the biochemical profile of the produced biomass (content of primary and secondary metabolites) was influenced by the selected cultivation parameters, including light intensity and the absence of nutrients such as nitrogen. Consequently, this study focused on investigating novel ways of cultivating these microalgal species in both heterotrophic and mixotrophic cultivation modes. Experiments were conducted in batch and semi-continuous cultures in flasks,, followed -in some cases- by continuous cultures in bioreactors in order to obtain more robust conclusions regarding productivity at an industrial scale. The experiments involved different concentrations of crude glycerol to study its impact on microalgal metabolism. Additionally, various monochromatic light sources were tested in mixotrophic cultivation systems, which were found to activate different metabolic pathways and lead to the production of distinct metabolic products. Furthermore, the present study examined the influence of lighting conditions on the phenotype of the microalgae. One more parameter examined was the impact of nitrogen deficiency in the growth medium on the lipid productivity of certain microalgal species. Overall, this doctoral research explores the potential of utilizing crude glycerol as a carbon source for microalgae cultivation and demonstrates the way in which various cultivation parameters can influence the biochemical composition of the microalgal biomass, ultimately aiming to optimize productivity for industrial applications.

In the heterotrophic cultivation systems, the highest biomass production (18.4 g/L dry biomass) was observed, along with the highest biomass yield concerning the consumption of crude glycerol ($Y_{x/s}=0.23$ g/g), during the growth of *A. protothecoides* on a substrate with an initial glycerol concentration of 80 g/L. Heterotrophic growth was also achieved at lower concentrations of untreated glycerol for the strains *C. vulgaris*, which produced (0.79 g/L dry biomass with a biomass yield $Y_{x/s}=0.07$ g/g) at an initial crude glycerol concentration of 10 g/L, and *S. quadricauda*, which produced (1.47 g/L biomass with $Y_{x/s}=0.16$ g/g) at an initial glycerol concentration of 10 g/L in the substrate. *S. obliquus* was excluded from further tests due to the low quality of the produced biomass, while *T. chuii* was excluded as well due to its inability to grow using untreated glycerol as the carbon source in the substrate.

Biomass yields, maximum growth rates, and lipid biosynthesis were higher in mixotrophic conditions compared to heterotrophic growth for the strains *S. quadricauda* and *C. vulgaris*, whereas *A. protothecoides* showed better results in heterotrophic growth. Under mixotrophic conditions, with an initial glycerol concentration of 10 g/L in the substrate, *S. quadricauda* exhibited higher biomass production (1.86 g/L) in orange light. *C. vulgaris* showed the best biomass production (1.68 g/L) in blue light with an initial glycerol concentration of 20 g/L in the substrate. The wavelength of light significantly affected cell morphology, phenotype, growth rate, biomass production, and metabolite production for both microalgae, potentially regulating different metabolic pathways.

The data obtained during experiments in semi-continuous cultivation systems provided secure conclusions regarding the impact of nitrogen source availability on microalgae growth. Nitrogen availability had a strong effect on the biochemical composition of the microalgae. Under conditions of nitrogen sufficiency in the growth medium, there was a tendency to accumulate proteins, whereas under nitrogen deficiency conditions, biomass was rich in lipids.

The continuous cultivation system proved to be an effective method for studying the growth kinetics, the substrate assimilation, and the production of high-value metabolites in both *A. protothecoides* and *C. vulgaris* at different concentrations of untreated glycerol (30 and 50 g/L for *A. protothecoides* and 20 and 30 g/L for *C. vulgaris*) under heterotrophic and mixotrophic conditions.

A. protothecoides, unlike other *Chlorella* species, exhibited better growth parameters under heterotrophic conditions compared to mixotrophic conditions, as evidenced by the higher productivity of the system (P_{max}), the higher growth rate, and the lower K_S values, indicating that this specific microalga can grow better and faster, utilizing the substrate more efficiently under these conditions. However, increased initial concentration of untreated glycerol in heterotrophic conditions led to reduced biomass productivity and increased accumulation of residual glycerol in the medium, acting as a limiting factor for growth. Overall, *A. protothecoides* appears to perform better as a heterotrophic organism. Heterotrophy also had a positive impact on lipid, protein, and carbohydrate production in microalgal cells, but no significant effect on fatty acid and amino acid profiles, and hence, lipid and protein composition.

Similarly, for *C. vulgaris*, the conclusion drawn was that different light wavelengths lead to the activation of different metabolic pathways and the accumulation of different metabolic products. This aspect had not been sufficiently studied until now and requires further investigation

in future aiming at analyzing the metabolic phenotype of the microalga under the influence of light and how different cultivating strategies could influence its metabolic pathways to produce target metabolites. Finally, during the growth of the microorganism in a continuous system, it was observed that in mixotrophic conditions, growth and metabolites production were much higher and crude glycerol was assimilated more efficiently, compared to heterotrophic growth.

In conclusion, this doctoral research has provided new insights into the application of microalgae for the utilization of crude glycerol, focusing on biomass productivity, metabolite synthesis, and their biochemical profiles. Cultivation parameters were also explored to determine the optimal conditions for this purpose.

Scientific area: microalgae biorefinery

Keywords: Microalgae, Glycerol, Mixotrophy, Heterotrophy, Biorefinery

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ιορδάνη Χατζηπαυλίδη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Ιορδάνη Χατζηπαυλίδη που με εισήγαγε στον θαυμαστό κόσμο των μικροφυκών και μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και πολυσχιδές αντικείμενο όπως μια διδακτορική έρευνα. Η συνεργασία μαζί του αποτέλεσε σταθμό ζωής, ιδιαίτερα καθοριστικό που μπορεί να έχει την τύχη κάποιος να συναντήσει, με εμπειρίες και μαθήματα καθημερινής πρακτικής, οι οποίες θα αποτελέσουν βάσεις για τη μελλοντική μου πορεία σε επιστημονικό και επαγγελματικό επίπεδο.

Ευχαριστώ τον κύριο Γεώργιο Μάρκου και τον κύριο Γεώργιο Ζερβάκη που μου έδωσαν όλα τα χρόνια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής μου τα απαραίτητα εφόδια και την κατεύθυνση τους ως, όπως και την εταιρία Πέττας ΑΕΒΕ, προς την επίτευξη των στόχων μου και την επιτυχή ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας.

Και βεβαίως ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στην κυρία Ηώ Κεφαλογιάννη, η συμβολή της οποίας ήταν καθοριστική σε όλη την πορεία της διδακτορικής μου διατριβής καθώς μου έχει σταθεί σαν μητέρα και η συμβολή της στην ολοκλήρωση μου ως επιστημονική οντότητα ήταν καθοριστική και ανεκτίμητη.

Τέλος δεν μπορώ να μην αναφέρω την πολύτιμη βοήθεια των συναδέλφων εντός των εργαστηρίων όπου εκπονήθηκε η Διδακτορική μου Διατριβή, της Επίκουρης Καθηγήτριας ΓΠΑ Ανθής Καρναούρη, της Δρ. Βασιλικής Τσάγκου, του Μεταδιδάκτορα Δρ. Δημήτριου Κοντογιαννάτου και του Μεταδιδάκτορα Δρ. Χαλήλ Τζαιμπάλλα.

Κλείνοντας, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη μητέρα και τη γιαγιά μου που με στηρίζουν, όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και στους φίλους μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	1
ΣΤΟΧΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1. ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ	9
1.2 Φυσιολογία και Ταξινόμηση Φυκών	12
1.3 Φυσιολογία του Χλωροπλάστη και του κυτταρικού τοιχώματος.....	16
1.4. Μεταβολισμός Μικροφυκών	18
1.4.1 Ακραιές συνθήκες ανάπτυξης.....	19
1.5 Εξέλιξη των μικροφυκών	20
2. ΕΙΔΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ	23
2.1 Πράσινα Φύκη (Chlorophyta και Charophyta).....	23
2.2.1. Το γένος <i>Chlorella spp.</i>	23
2.2.2 Το γένος <i>Scenedesmus spp.</i>	27
2.2.3 Το γένος <i>Tetraselmis spp.</i>	30
3. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ	32
3.1 Επεξεργασία αποβλήτων	34
3.1.1 Αξιοποίηση της ακατέργαστης Γλυκερόλης στην Καλλιέργεια Μικροφυκών	36
3.1.2 Χρήση Ακατέργαστης Γλυκερόλης της Βιομηχανίας βιοντίζελ ως πηγή άνθρακα για την καλλιέργεια μικροφυκών	37
3.1.3 Μεταβολισμός της απόβλητης Γλυκερόλης μέσω της Καλλιέργειας Μικροφυκών. ..	39
3.2 Παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας.....	40
3.2.1 Λιπαρά Οξέα.....	40
3.2.2 Πρωτεΐνες	43
3.2.3 Υδατάνθρακες.....	45
3.2.4 Χρωστικές Ουσίες	46
3.2.5 Βιομάζα Μικροφυκών	47
4. ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΙΑΘΕΣΙΜΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΠΟ ΤΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ	49
4.1.1 β-καροτένιο.....	49
4.1.2 Ασταξανθίνη.....	49
4.1.3 Εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA)	50
4.1.4 Ζωοτροφές.....	51

4.1.5 Καλλυντικά.....	52
4.2 Νέες καινοτομίες στη βιομηχανία παραγωγής προϊόντων	53
4.2.2 Βιοπλαστικά και βιοπολυμερή	54
5. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ	56
5.1 Παράγοντες που Επηρεάζουν την Ανάπτυξη	56
5.1.1 Θερμοκρασία	56
5.1.2_ Φωτισμός.....	57
5.1.2.1 Χρήση Μονοχρωματικών Πηγών Φωτισμού	58
5.1.3 Θρεπτικό Υπόστρωμα	60
5.1.3.1 Άνθρακας.....	60
5.1.3.2 Άζωτο	61
5.1.3.3 Φώσφορος.....	63
5.1.3.5 Αλατότητα	64
5.3.1.6 pH	65
5.3.1.7 Συγκέντρωση Διαλυμένου O ₂	66
5.3.1.8 Ανάδευση.....	67
6. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	68
6.1 Καλλιεργητικά συστήματα ανοιχτού τύπου	69
6.2 Καλλιεργητικά συστήματα κλειστού τύπου	72
7. ΑΣΥΝΕΧΗΣ/ΣΥΝΕΧΗΣ/ΗΜΙΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	75
7.1 Ασυνεχής Καλλιέργεια	75
7.2 Συνεχής Καλλιέργεια (Continuous Cultures)	75
7.3 Καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (Semi-Continuous, Fed-Batch Cultures)	76
8. ΦΑΣΕΙΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	77
8.1 Φάση Υστέρησης (Lag Phase)	77
8.2 Εκθετική Φάση Αύξησης (Exponential Phase)	77
8.3 Φάση Επιβραδυνόμενης Αύξησης (Phase of Declining Relative Growth)	78
8.4 Στάσιμη Φάση (Stationary Phase).....	78
8.5 Φάση Θανάτου (Death Phase).....	78
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	79
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:	79
1. Στελέχη των μικροφυκών	79

1.2 Θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια μικροφυκών	79
1.3 Παραγωγή προεμβολίων.....	80
1.4 Εκτίμηση της βιομάζας.....	80
1.4.1 Υπολογισμοί για την εκτίμηση της βιομάζας.....	81
1.5. Αξιολόγηση της Μορφολογίας των Κυττάρων	83
1.6 Υπολογισμός της εναπομείνουσας συγκέντρωσης γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο.....	83
1.7 Βιοχημικές αναλύσεις.....	84
1.7.1 Υπολογισμός πρωτεϊνών:	84
1.7.2 Υπολογισμός Υδατανθράκων	85
1.7.3 Υπολογισμός Λιπιδίων:	85
1.7.4 Υπολογισμός Χρωστικών:.....	86
1.7.5 Ανάλυση του λιπιδιακού προφίλ και του προφίλ των αμινοξέων	86
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ:	88
2.1 Ετερότροφες και Μικτότροφες Καλλιέργειες Διαλείποντος έργου/Ασυνεχούς Συστήματος ανάπτυξης (Batch).....	88
2.2 Ετερότροφες και Μικτότροφες καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου συστήματος καλλιέργειας	92
2.3 Ετερότροφες και Μικτότροφες καλλιέργειες σε συνεχές σύστημα ανάπτυξης με χρήση βιοαντιδραστήρα (Continuous cultures).....	94
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	96
1. Διαλείποντος έργου καλλιέργειες μικροφυκών (Batch cultures)	96
1.1 ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	96
1.1.1 Ετερότροφες καλλιέργειες διαλείποντος έργου του μικροφύκου <i>C. vulgaris</i> (Batch):	96
1.1.2 Ετερότροφες καλλιέργειες διαλείποντος έργου του μικροφύκου <i>S. obliquus</i> (Batch)	116
1.1.3 Ετερότροφες καλλιέργειες του μικροφύκου <i>Tetraselmis chuii</i>	121
1.1.4 Ετερότροφες καλλιέργειες του μικροφύκου <i>Auxenochlorella protothecoides</i> σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ακατέργαστης γλυκερόλης	123
1.1.5 Ετερότροφες καλλιέργειες του μικροφύκου <i>Auxenochlorella protothecoides</i> σε υψηλές(ακραίες) συγκεντρώσεις ακατέργαστης γλυκερόλης	132
1.1.6 Ετερότροφες καλλιέργειες διαλείποντος έργου του <i>S. quadricauda</i>	136
1.2 ΜΙΚΤΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	139
1.2.1 Μικτότροφες καλλιέργειες του μικροφύκου <i>C. vulgaris</i> (Batch):.....	139

1.2.2 Μικτότροφες καλλιέργειες διαλείποντος έργου του μικροφύκου <i>C. vulgaris</i> (Batch) με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός.....	141
1.2.3 Επίδραση μονοχρωματικής πηγής φωτός διαφορετικών χρωμάτων στην αύξηση του <i>A. protothecoides</i> καλλιέργειες διαλείποντος έργου.....	148
1.2.4 Μικτότροφη ανάπτυξη σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου με διαφορετική φωτοπερίοδο και εντάσεις φωτισμού του <i>Auxenochlorella protothecoides</i>	153
1.2.5 Μικτότροφες καλλιέργειες του <i>S. quadricauda</i> με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός.....	158
1.3 Συγκριτικά αποτελέσματα των υπό μελέτη στελεχών μικροφυκών σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου και αξιολόγηση της δυναμικότητας τους για περαιτέρω δοκιμές.	169
1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΗΜΙΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ	175
1.1 Ετερότροφες ημιδιαλείποντος έργου καλλιέργειες του μικροφύκου <i>C. vulgaris</i> (Semi-Continuous system):	175
2.2 Ετερότροφη ανάπτυξη του <i>A. protothecoides</i> σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα καλλιέργειας (Fed Batch)	184
2.2 Ετερότροφη ανάπτυξη του <i>A. protothecoides</i> σε σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (Semi continuous) με διαφορετικές συγκεντρώσεις C/N.....	187
2.4 Μικτότροφη ανάπτυξη του <i>Auxenochlorella protothecoides</i> σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (fed-batch) με χρήση διαφορετικών μονοχρωματικών πηγών φωτός.	194
2.5 Μικτότροφη ανάπτυξη του <i>A. protothecoides</i> σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (Semi- Continuous) με διαφορετικές συγκεντρώσεις πεπτόνης.....	200
2.6 Συγκριτικά αποτελέσματα των καλλιεργειών ημιδιαλείποντος έργου και αξιολόγηση της δυναμικότητας τους.	207
3. ΣΥΝΕΧΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ (CONTINUOUS).....	212
3.1.1 Ετερότροφες συνεχείς καλλιέργειες του μικροφύκου <i>C. vulgaris</i> με χρήση βιοαντιδραστήρα.....	212
3.2 Μικτότροφες συνεχείς καλλιέργειες του μικροφύκου <i>C. vulgaris</i> με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός σε βιοαντιδραστήρα:	216
3.2.1 Συνεχές σύστημα καλλιέργειας του μικροφύκου <i>C. vulgaris</i> με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L σε μονοχρωματική πηγή μπλε φωτός.....	217
3.2.2 Συνεχές σύστημα καλλιέργειας του μικροφύκου <i>C. vulgaris</i> με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L σε μονοχρωματική πηγή κόκκινου φωτός.	220
3.3 Ετερότροφη ανάπτυξη του <i>A. protothecoides</i> σε συνεχές χημειοστατικό σύστημα	224
3.3.1 Ετερότροφες συνεχείς καλλιέργειες του μικροφύκου <i>A. protothecoides</i> με χρήση βιοαντιδραστήρα σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ίση με 30 g/L.	224

3.3.2 Ετερότροφες συνεχείς καλλιέργειες του μικροφύκου <i>A. protothecoides</i> με χρήση βιοαντιδραστήρα σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ίση με 50 g/L.	227
3.3.3 Μικτότροφη συνεχής καλλιέργεια του μικροφύκου <i>A. protothecoides</i> με χρήση βιοαντιδραστήρα σε μονοχρωματική πηγή φωτός κόκκινου χρώματος με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ίση με 30 g/L.....	232
3.4 Συγκριτικά αποτελέσματα της αύξησης σε συστήματα συνεχούς καλλιέργειας με τη χρήση βιοαντιδραστήρα	236
4. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΕ ΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	242
4.1 <i>C. vulgaris</i> :	242
4.2 <i>S. quadricauda</i>	243
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	246
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	268
Παράρτημα Ι. Φωτογραφικό υλικό	275
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	281
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΕΓΙΝΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΤΡΕΧΟΥΣΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ	298

ΣΤΟΧΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

Ο κύριος στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι να διερευνηθεί η δυνατότητα της χρήσης ακατέργαστης γλυκερόλης ως πηγή οργανικού άνθρακα σε υπόστρωμα ανάπτυξης μικροφυκών και η αξιοποίηση της με σκοπό την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας.

Για το σκοπό αυτό ο πειραματικός σχεδιασμός της διδακτορικής διατριβής ακολούθησε τα παρακάτω βήματα:

- Μελετήθηκε η αξιοποίηση της ακατέργαστης γλυκερόλης ως υπόστρωμα ανάπτυξης των μικροφυκών. Η επιλογή της έγινε με σκοπό να διερευνηθεί ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζεται η ανάπτυξη των μικροφυκών η παραγωγή μεταβολιτών και κυρίως η παραγωγή λιπιδίων καθώς αποτελεί πρόδρομο της παραγωγής λιπιδίων TAG (triacylglyceride) τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν στην παραγωγή βιοκαυσίμων αλλά και στην ανθρώπινη διατροφή.
- Έγινε επιλογή των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής. Αρχικά το *Tetraselmis chuii* και το *Chlorella vulgaris* ανήκουν στα μικροφύκη που έχουν εγκριθεί από τον EFSA για ανθρώπινη κατανάλωση οπότε η παραγωγή βιομάζας από τα συγκεκριμένα στελέχη θα μπορούσε να αξιοποιηθεί βιομηχανικά στον χώρο των τροφίμων. Ενώ αντίστοιχα τα στελέχη *Auxenochlorella protothecoides*, *Scenedesmus obliquus* και *Scenedesmus quadricauda* είναι στελέχη που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι υψηλού βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος και χρίζουν περαιτέρω διερεύνησης για την παραγωγή βιομάζας και μεταβολιτών.
- Μελετήθηκε ο τρόπος που επηρεάζει η πηγή αζώτου την αφομοίωση της γλυκερόλης από τα μικροφύκη με τη χρήση οργανικών και ανόργανων πηγών αζώτου στο υπόστρωμα σε διαφορετικές αναλογίες του λόγου άνθρακα προς άζωτο. Κύριος επίσης στόχος ήταν να επιβεβαιωθεί ότι σε περιβάλλον τροφοπενίας ή έλλειψης αζώτου ενεργοποιείται η βιοσύνθεση λιπιδίων λόγω στρες, ενώ αντίστοιχα σε περίσσεια αζώτου αυξάνεται η βιοσύνθεση πρωτεϊνών.
- Μελετήθηκε η επίδραση της ποιότητας του φωτός στην καλλιέργεια καθώς και ο τρόπος με τον οποίο ο φωτισμός επηρεάζει το μεταβολικό φαινότυπο των μικροφυκών και την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων.

- Μελετήθηκε η παραγωγικότητα των στελεχών σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου (batch) και επιλέχθηκαν τα στελέχη που σημείωσαν την μέγιστη παραγωγικότητα. Στη συνέχεια δοκιμάστηκε η ανάπτυξη τους σε ημιδιαλείποντος έργου συστήματα καλλιέργειας (semi-continuous και Fed-batch) με κύριο σκοπό τη διερεύνηση της παραγωγικότητας και σταδιακής προσαρμογής σε ημί-σταθερές συνθήκες ανάπτυξης. Τέλος για τα στελέχη με την καλύτερη παραγωγικότητα μελετήθηκε η ανάπτυξη τους σε συνεχές σύστημα καλλιέργειας με χρήση βιοαντιδραστήρα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

Ο όρος μικροφύκη “*microalgae*” (ενικός= “microalga”), δεν είναι ταξινομικός όρος αλλά μία ονομασία που έχει δοθεί για κυτταρικούς μικροοργανισμούς που έχουν την ικανότητα να φωτοσυνθέτουν (περιέχουν χλωροφύλλη και έχουν την ικανότητα να παράγουν οξυγόνο (Borowitzka, 2016). Πριν από 500 εκατομμύρια χρόνια, κατά την Κάμβρια περίοδο, η ατμόσφαιρα της Γης περιείχε περίπου 7000 ppm CO₂ και ήταν αναερόβια. Σήμερα, η συγκέντρωση του ατμοσφαιρικού CO₂ έχει μειωθεί και ανέρχεται σε 400 ppm. Η πρώτη μορφή ζωής που παρατηρήθηκε στον πλανήτη ήταν τα κυανοβακτήρια. Αυτοί οι προκαρυωτικοί φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν την ηλιακή ενέργεια μέσω της φωτοσύνθεσης για να παράγουν βιομάζα και ενέργεια και οξυγόνο. Τα μικροφύκη υπάρχουν στον πλανήτη περίπου 3.4 δισεκατομμύρια χρόνια πριν (κυανοβακτήρια) τα οποία έχουν εντοπιστεί ως απολιθώματα, η μορφολογία τους μέχρι και σήμερα δεν έχει αλλάξει και παρά το γεγονός ότι είναι προϊστορικοί μικροοργανισμοί παρουσιάζουν ιδιαίτερα περίπλοκους μηχανισμούς και αντιπροσωπεύουν μια εξαιρετικά οργανωμένη μορφή ζωής. Έτσι οι επιστήμονες έχουν θεωρήσει ότι αποτελούν τους πρόγονους των φυτών χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων.

Η αξιοποίηση των μικροφυκών ως μέσο παραγωγής βιοενέργειας ξεκίνησε ως ιδέα 50 χρόνια πριν (Katiyar *et al.*, 2017). Το 1890 ξεκίνησαν οι πρώτες καθαρές καλλιέργειες μικροφυκών (*C. vulgaris*). Μετά το 1948, στις Ηνωμένες Πολιτείες, Ιαπωνία και Γερμανία ξεκίνησε η παραγωγή μικροφυκών για χρήση τους στον αγροδιατροφικό τομέα με σκοπό την παραγωγή τροφίμων. Κατά τη δεκαετία του 1960 έγινε η πρώτη βιομηχανική παραγωγή βιομάζας *Chlorella* στην Ιαπωνία. Παράλληλα διερευνήθηκαν διάφορες τεχνικές μαζικής καλλιέργειας με σκοπό την εξεύρεση των βέλτιστων συνθηκών παραγωγής βιομάζας, οι οποίες διερευνώνται μέχρι και σήμερα. Αυτό, είχε ως αποτέλεσμα την ίδρυση του «Chlorella health food industry». Αντίστοιχα κατά τη δεκαετία του 1970 στο Μεξικό αναπτύχθηκε η παραγωγή *Spirulina* και στην Αυστραλία η παραγωγή *Dunaliella* κατά τη δεκαετία του '80. Το 1980 και μετά χρηματοδοτήθηκε για πρώτη φορά το Aquatic Species Program από τις ΗΠΑ με στόχο την παραγωγή ελαίων και βιοκαυσίμων από μικροφύκη. Η διερεύνηση αξιοποίησης αποβλήτων μέσω ενός βιοδιυλιστηρίου μικροφυκών

και η παραγωγή βιοενέργειας είναι ένα καίριο ζήτημα που απασχολεί την ερευνητική κοινότητα μέχρι σήμερα και έχει ως βασικό στόχο τη δημιουργία μιας οικονομικά αποδοτικής και κλιμακούμενης επεξεργασίας μικροφυκών για την παραγωγή βιοκαυσίμων και αγροδιατροφικών προϊόντων, (Dixon and Wilken, 2018). Το ενδιαφέρον για την καλλιέργειά τους έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερα τις τελευταίες δύο δεκαετίες και ο βασικός λόγος είναι η ικανότητα τους να παράγουν ένα μεγάλο εύρος προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (αντιοξειδωτικά, πρωτεΐνες, λιπίδια, λιπαρά οξέα, βιταμίνες, κλπ), τα οποία βρίσκουν εφαρμογή στους τομείς της κοσμετολογίας, γεωργίας, φαρμακολογίας και στις επιστήμες υγείας (Johansen, 2012). Στις ιχθυοκαλλιέργειες η χρήση τους αφορά στην διατροφή των ψαριών καθώς χρησιμοποιούνται ως τροφή για τις προνύμφες των οστρακόδερμων, μαλακίων και ψαριών (Muller-Feuga, 2013, **Πίνακας 1**)

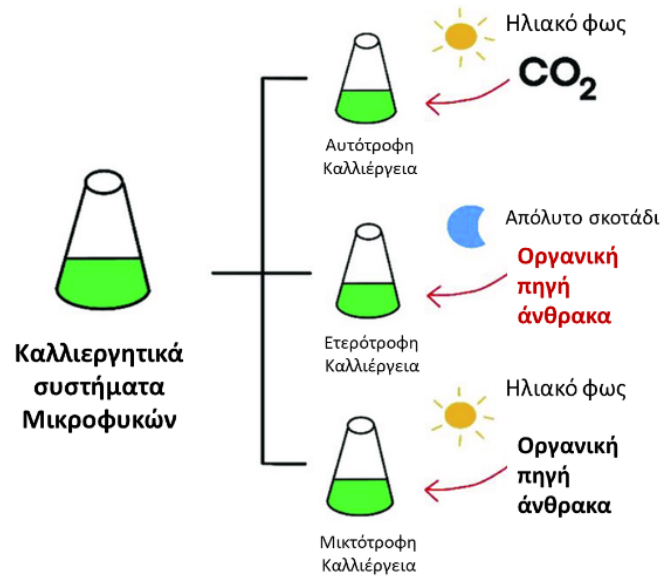
Αρκετά είδη χρησιμοποιούνται σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες για παραγωγή διατροφικών συμπληρωμάτων γιατί παράγουν υψηλής ποιότητας χημικές ουσίες όπως β-καροτένιο, ασταξανθίνη και ακόρεστα λιπαρά οξέα (Borowitzka, 2016). Αρκετά είδη μικροφυκών χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιομάζας λόγω της περιεκτικότητάς τους σε υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης, λιπαρών οξέων (εικοσαπενταενοϊκού οξέος-EPA, δοκοσαεξαενοϊκού οξέως-DHA, γ-λινολενικού οξέος-GLA κλπ), βιταμινών, ανόργανων στοιχείων κλπ. Η παραγωγή των προϊόντων αυτών έχει εφαρμογή στην ανθρώπινη διατροφή, στην διατροφή ζώων, ψαριών κλπ. Πολλοί από τους παραγόμενους μεταβολίτες των φυκών έχουν φαρμακευτική αξία, είτε επειδή είναι αντιοξειδωτικά, είτε επειδή ενισχύουν το ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων, είτε επειδή έχουν ιστατική δράση. Τα κυριότερα είδη που καλλιεργούνται για τους σκοπούς αυτούς ανήκουν στα γένη *Chlorella*, *Dunaliella*, *Arthrospira*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Haematococcus* και *Schizochytrium* (Brennan and Owende, 2010; Harun, *et al.*, 2009; Pulz and Gross, 2004). Στην πλειονότητα τους τα μικροφύκη τυπικά είναι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί. Όμως μπορούν να αναπτυχθούν επίσης αξιοποιώντας την ενέργεια που περιέχεται σε οργανικές ουσίες (γλυκερόλη, γλυκόζη, οξικό οξύ κλπ.). (**Εικόνα 1**)

Έτσι μπορούν να αναπτυχθούν:

(α) ετεροτροφικά (σε συνθήκες σκότους) αξιοποιώντας ως πηγή άνθρακα και ενέργειας διάφορες οργανικές ενώσεις

(β) μικτοτροφικά με ταυτόχρονη αξιοποίηση της ενέργειας των οργανικών ουσιών και του φωτός (Borowitzka, 1999).

(γ) Αυτότροφα



Εικόνα 1: Καλλιέργειες μικροφυκών, (Πηγή: Jareonsin and Pumas, 2021)

Πίνακας 1: Παγκόσμια Παραγωγή Προϊόντων Μικροφυκών (Markou et al., 2013)

Μικροφύκος	Ετήσια παραγωγή	Παραγωγός χώρα	Χρήση	Τιμή (€)
<i>Arthrospira (Spirulina)</i>	3000 τόνοι ξηρού βάρους	Κίνα, Ινδία, ΗΠΑ, Μιανμάρη, Ιαπωνία	Διατροφή, Κοσμετολογία, Φυκοπρωτεΐνες	36 kg ⁻¹ , 11 mg ⁻¹
<i>Chlorella</i>	2000 τόνοι ξηρού βάρους	Ταϊβάν, Γερμανία, Ιαπωνία	Διατροφή, Κοσμετολογία, Ιχθυοκαλλιέργεια	36 kg ⁻¹ , 50 l ⁻¹
<i>Dunaliella</i>	1200 τόνοι ξηρού βάρους	Αυστραλία, Ισραήλ, Ιαπωνία	Διατροφή, Κοσμετολογία, Β-καροτίνη	215-2150 kg ⁻¹
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	500 τόνοι ξηρού βάρους	ΗΠΑ	Διατροφή	
<i>Haematococcus</i>	300 τόνοι ξηρού βάρους	Ισραήλ, Ινδία	ΗΠΑ, Ιχθυοκαλλιέργεια	50 l ⁻¹
<i>Cryptocodinium</i>	240 τόνοι ξηρού βάρους	ΗΠΑ	Λιπαρά οξέα (DHA)	43 g ⁻¹
<i>Schizochytrium</i>	10 τόνοι ξηρού βάρους	ΗΠΑ	Λιπαρά οξέα (DHA)	43 g ⁻¹

1.2 Φυσιολογία και Ταξινόμηση Φυκών

Τα φύκη (λατινικά alga. πλ. algae) είναι μια μεγάλη κατηγορία μονοκύτταρων ευκαρυωτικών ή προκαρυωτικών μικροοργανισμών είτε πολυκύτταρων οργανισμών, με ποικίλα χαρακτηριστικά ανάλογα με το είδος τους. Πρόκειται για φωτοσυνθετικούς φυτικούς οργανισμούς που δεν έχουν βλαστούς, φύλλα, ρίζες, δεν σχηματίζουν σπέρματα, άνθη ή καρπούς, όπως τα ανώτερα φυτά. Αντίθετα, έχουν πολύ απλή οργάνωση στις κατώτερες ταξινομικά ομάδες, πιο πολύπλοκη στις ανώτερες. Τα φύκη χωρίζονται σε δύο μεγάλες κύριες μορφολογικές κατηγορίες με βάση το μέγεθός τους: τα μακροφύκη (macroalgae ή κοινώς seaweeds), που αφορούν συνήθως θαλάσσια είδη, και τα μικροφύκη (microalgae). Τα μακροφύκη έχουν συνήθως μήκος μερικών εκατοστών, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις το μήκος τους μπορεί να φτάσει και πολλά μέτρα (50-70 m), όπως για παράδειγμα τα γιγάντια φαιοφύκη (καφέ φύκη).

Το μέγεθος των μικροφυκών ποικίλει ανάλογα με το είδος από μερικά μικρόμετρα (μm) σε μερικά mm, Σύμφωνα με το μέγεθος τους μπορούν να κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις ομάδες: μικροπλαγκτόν ($20\text{--}1000 \mu\text{m}$), νανοπλαγκτόν ($2\text{--}100 \mu\text{m}$), ουλτραπλαγκτόν ($0.5\text{--}15 \mu\text{m}$), και πικοπλαγκτόν ($0.2\text{--}2 \mu\text{m}$). Η πλειοψηφία των μικροφυκών είναι ευκαριωτικά και ο πυρήνας τους μοιάζει με των ανώτερων φυτών, στα οργανίδια τους υπάρχουν χλωροπλάστες, όπου είναι το βασικό οργανίδιο της φωτοσύνθεσης. Ο χλωροπλάστης διαφέρει ανάλογα με το είδος του μικροφύκου τόσο στο σχήμα όσο και στους διαφορετικούς συνδυασμούς των ειδών χλωροφύλλης και από αυτές εξαρτάται το χρώμα των μικροφυκών (Hemaiswarya *et al.*, 2013)

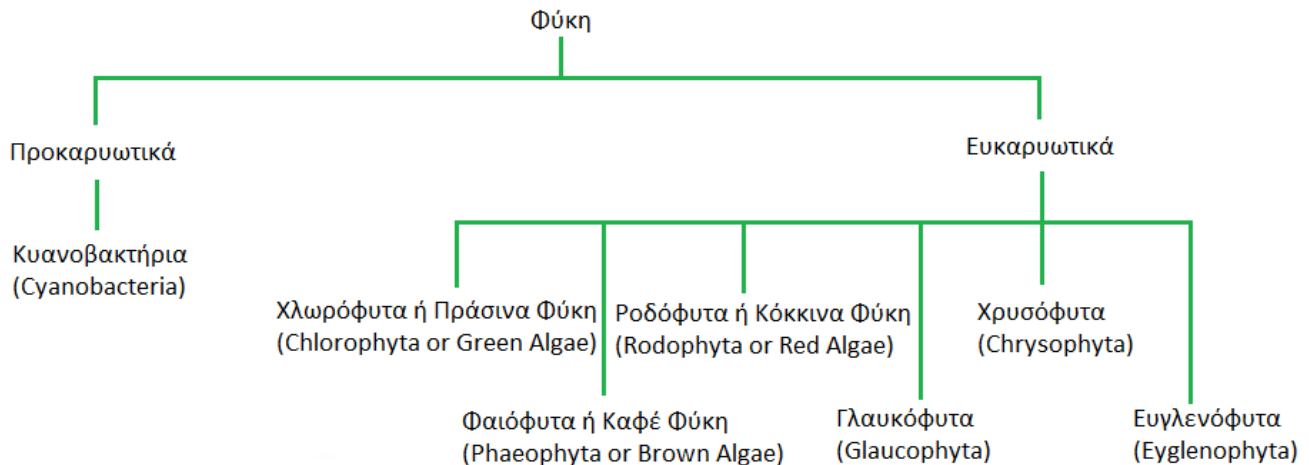
Τα μικροφύκη απαντώνται σε όλα τα οικοσυστήματα της γης, όχι μόνο στα υδρόβια, αλλά και στα χερσαία. Ως εκ τούτου, περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία ειδών που ζουν σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών. Τα μακροφύκη που διαβιούν στη θάλασσα μαζί με το φυτοπλαγκτόν και τα βενθικά μικροφύκη του εύφωτου πυθμένα, αποτελούν τους κύριους (ή και τους μοναδικούς) πρωτογενείς παραγωγούς στη θάλασσα (Falkowski, 1980), (Reynolds, 2006) καθώς και σε ακραία περιβάλλοντα όπως σε θερμοπηγές (Brock, 1985) και παγετώνες (Bunt and Wood, 1963). Η βιοποικιλότητα των μικροφυκών είναι τεράστια και από 200.000-800.000 είδη που έχουν εκτιμηθεί ότι βρίσκονται στο περιβάλλον έχουν ταυτοποιηθεί μόνο τα 50.000.

Κάποια είδη μικροφυκών μπορούν να αναπτύξουν συμβιωτικές σχέσεις με ζώα, φυτά ή μύκητες, ακόμα και με άλλα φύκη. Για παράδειγμα η επιτυχία των σκληρακτινικών κοραλλιών να διαμορφώνουν βιότοπους γνωστούς ως κοραλλιογενείς ύφαλοι οφείλεται στην ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ του δινομαστιγωτού είδους *Symbiodinium spp.* (γνωστό και ως “zooxanthellae”) και τα κοιλεντερωτά κοράλλια (Baker, 2003).

Η βασική κατηγοριοποίηση γίνεται με βάση την παρουσία διακριτού πυρήνα, το είδος των φωτοσυνθετικών χρωστικών, τον τύπο μεταβολισμού, τη χημική σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης, την ύπαρξη μαστιγίων και τον τρόπο αναπαραγωγής τους (Sajjadi *et al.*, 2018). Περισσότερα από 15.000 χημικές ενώσεις που έχουν εντοπιστεί στα μικροφύκη έχουν χαρακτηριστεί βιοχημικά. Σε αυτά περιλαμβάνονται: καρτενοειδή, αντιοξειδωτικά, λιπίδια, ένζυμα, πολυμερή, πεπτίδια, τοξίνες και στερόλες.

Λόγω της κυτταρικής τους δομής τα μικροφύκη χωρίζονται σε 2 υπερβασίλεια (Ευκαρυώτες και Προκαρυώτες). Στους ευκαρυώτες ανήκουν τα «supergroups» Archaeplastida

(Glaucophyta, Rhodophyceae, Chloroplastida), Chromalveolata (Cryptophyceae, Haptophyta, Stramenopiles, Alveolata), Rhizaria (Chlorachniophyta), και Excavata (Euglenozoa) (Adl *et al.*, 2005; Ruggiero *et al.*, 2015). (Εικόνα 2)

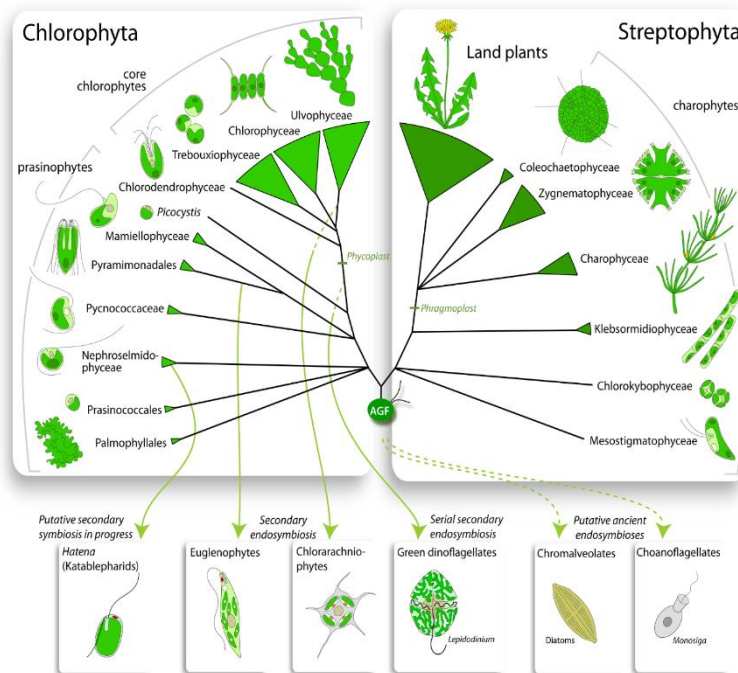


Εικόνα 2.: Φυλογενετικό δέντρο της ταξινόμησης των μικροφυκών

Τα ευκαρυωτικά μικροφύκη κατηγοριοποιούνται με βάση τις χρωστικές ουσίες συλλογής φωτός που διαθέτουν και περιλαμβάνει τα εξής είδη: Χλωροφύτα, Ροδόφυτα, Χρυσόφυτα και Φαιόφυτα (Masojdek *et al.*, 2003). Οι δύο μεγάλες κατηγορίες, τα χλωρόφυτα (πράσινα φύκη) και τα ροδόφυτα (κόκκινα φύκη), εμφανίζουν έντονη μορφολογική ποικιλότητα με διαφορετικό μέγεθος, από μικροσκοπικά έως μακροσκοπικά είδη. Τα χλωρόφυτα περιλαμβάνουν χρωστικές όπως η χλωροφύλλη α και β όπως και διάφορα καροτενοειδή, τα οποία μπορούν να συντίθενται και να αποθηκεύονται εκτός των χλωροπλάστων όταν υπάρχει έλλειψη αζώτου (Tomaselli, 2004). Τα χλωρόφυτα μπορούν να αναπτύσσονται σε οικοσυστήματα γλυκού νερού, θαλάσσια και χερσαία. Ορισμένα από τα πιο μελετημένα είδη περιλαμβάνουν τα *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* και *Haematococcus pluvialis*, καθώς έχουν μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον για την παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής (Heimann and Huerlimann, 2015). Μια άλλη τάξη των ευκαρυωτικών φυκών αποτελούν τα Ροδόφυτα (κόκκινα φύκη) που κυρίως εμφανίζονται με πολυκύτταρες και νηματοειδείς μορφές, ενώ σπανιότερα παρατηρούνται ως μονοκύτταροι οργανισμοί. Τα εν λόγω μικροφύκη διαθέτουν φυκοερυθρίνη, φυκοκυανίνη και αλλοφυκοκυανίνη ως φωτοσυνθετικές χρωστικές. Τα Ροδόφυτα αποτελούν τα κυρίαρχα φύκη στις εύκρατες και

τροπικές περιοχές (Tomaselli, 2004). Το πιο μελετημένο είδος αυτής της τάξης είναι το *Porphyridium cruentum*, που καλλιεργείται κυρίως για την παραγωγή φυκοβιλινών και πολυσακχαριτών (Heimann and Huerlimann, 2015) (Εικόνα 3).

Αναφορικά με τους προκαρυώτες, δηλαδή τα κυανοβακτήρια, αποτελούν φωτοσυνθετικούς οργανισμούς που περιέχουν χλωροφύλλη α και ονομάζονται επίσης κυανόφυτα. Το αρχικό τους όνομα ήταν κυανοφύκη (μπλε-πράσινα φύκη) λόγω της παρουσίας φυκοκυανίνης, φυκοερυθρίνης και φυκοβιλίνης, ουσίες που βρίσκονται επίσης στα ερυθρά φύκη (red algae) (Andersen, 2013). Τα κυανοβακτήρια εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία και μπορούν να επιβιώσουν σε διάφορα περιβάλλοντα, όπως αλμυρό ή γλυκό νερό, υγρά εδάφη και βράχους, και ακόμα και ως συμβιωτικοί οργανισμοί (Tomaselli, 2004). Παρουσιάζουν ομοιότητες με τα φυτά, καθώς μπορούν να εκτελούν φωτοσύνθεση, αλλά και με τα βακτήρια, καθώς έχουν κοινά χαρακτηριστικά στο κυτταρολογικό και βιοχημικό επίπεδο (Anderson and Koc, 2013; Masojdek et al., 2003; Andersen, 2013). Ορισμένα είδη, όπως το *Arthrospira platensis*, το *Arthrospira maxima*, *Aphanizomenon flos-aquae* έχουν εμπορική αξία και χρησιμοποιούνται ευρέως ως συμπληρώματα διατροφής (Andersen, 2013).



Εικόνα 3:: Ταξινόμηση στα Chlorophyta

Τα μικροφύκη ως προς τη βιολογία τους λόγω της φωτοσυνθετικής τους ιδιότητας αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους οργανισμούς στον πλανήτη καθώς παράγουν παραπάνω από το 50% του ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Τα μικροφύκη παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο και στον κύκλο του ατμοσφαιρικού αζώτου (Fowler *et al.*, 2013). Όλα τα ετεροκυστικά και τα μη ετεροκυστικά (heterocystous) και μη (nonheterocystous) κυανοβακτήρια μετατρέπουν το N₂ σε οργανικό άζωτο και είναι ο βασικός ρυθμιστής της αζωτοδέσμευσης στον πλανήτη. Το είδος με τη μεγαλύτερη συμμετοχή στην αζωτοδέσμευση είναι το μη ετεροκυστικό κυανοβακτήριο *Trichodesmium* (Berman-Frank *et al.*, 2003; Bergman *et al.*, 2013).

Τα μικροφύκη λόγω της μεγάλης βιοποικιλότητας τους μπορούν να αναπτυχθούν επιπλέοντα (planktonic) ή να αναπτυχθούν προσκολλημένα πάνω σε επιφάνειες σχηματίζοντας αποικίες πάνω σε φυτά ή μακροφύκη (επιφυτικά), βράχους (episammic) ή σε ιζήματα (epipellic). Τα μικροφύκη παρουσιάζουν τεράστιο εύρος ως προς τη μορφολογία και το μέγεθος τους, με τα μικρότερα που έχουν χαρακτηριστεί να είναι τα πράσινα μικροφύκη *Ostreococcus tauri*, με μέσο μέγεθος τα 0.8 μm (Chrétiennot-Dinet *et al.*, 1995). Συνήθως απαντώνται ως μονοκύτταροι, πολυκύτταροι οργανισμοί ή σε αποικίες. Κάποια δεν διαθέτουν κινητικά οργανίδια και μετακινούνται παθητικά με τη ροή του νερού ενώ άλλα διαθέτουν, π.χ. μαστίγια ή άλλα μέσα

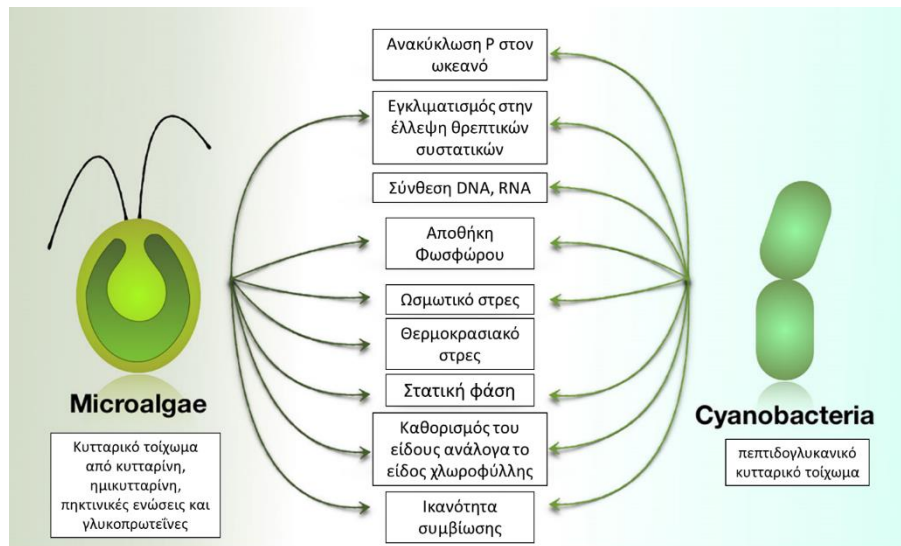
1.3 Φυσιολογία του Χλωροπλάστη και του κυτταρικού τοιχώματος

Τα μικροφύκη ως μονοκύτταροι και απλοί πολυκύτταροι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί έχουν μήκος μερικά μικρόμετρα, είτε ως προκαρυωτικοί οργανισμοί (κυανοβακτήρια) είτε ως ευκαρυωτικοί. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, λόγω της απλής δομής τους, έχουν υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης και υψηλή φωτοσυνθετική απόδοση. Μόνο τα πράσινα φύκη έχουν παρατηρηθεί ότι συσσωρεύουν τις φωτοσυνθετικές τους ουσίες εντός του χλωροπλάστη. Συνεπάγεται, ότι τα πράσινα φύκη περιέχουν άμυλο μέσα στο πλαστίδιο, ενώ όλα τα άλλα είδη μικροφυκών αποθηκεύουν τους υδατάνθρακες τους και τα λιπίδια τους στο κυτταρόπλασμα (Barsanti and Gualtieri, 2006).

Το κυτταρικό τοίχωμα είναι μια ισχυρή δομή που περιβάλλει την πλασματική μεμβράνη και δίνει στο κύτταρο τη δυνατότητα να διατηρεί την ωσμωτική ισορροπία του με το περιβάλλον, δηλαδή να μπορεί να αυξάνει την πίεση σπαργής του χωρίς να προκαλείται διάρρηξη του. Η

βιοχημική σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων διαφέρει ανάλογα με το είδος του φύκου. Τα κυανοβακτήρια διαθέτουν πεπτιδογλυκανικό τοίχωμα, το οποίο αποτελεί πηγή πρωτεϊνών. Μια αξιοσημείωτη εμπορική εφαρμογή αυτής της ιδιότητας είναι το κυανοβακτήριο *Arthrospira* το οποίο χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς της σε πρωτεΐνες. Στα ευκαρυωτικά μικροφύκη, το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτινικές ενώσεις και γλυκοπρωτεΐνες (Andersen, 2013). Στο κυτταρικό τους τοίχωμα συσσωρεύονται έλαια και πολυσακχαρίτες, εκ των οποίων κυριότερος πολυσακχαρίτης είναι η χρυσολαμιναρίνη (Chrysolaminarin) (β-1.3-γλυκάνη) μικρής αλυσίδας, που κατατάσσεται στους αποθηκευτικούς πολυσακχαρίτες (Enamala *et al.* 2018).

Τα διαφορετικά είδη μικροφυκών και κυανοβακτηρίων αναπτύσσονται σε αποικίες διαφορετικών μορφών, όπως συσσωματώματα, και σχήματος όπως: καψιδικού, κοκκοειδούς, παλμελοειδούς, νηματώδους, παρεγχυματώδους.



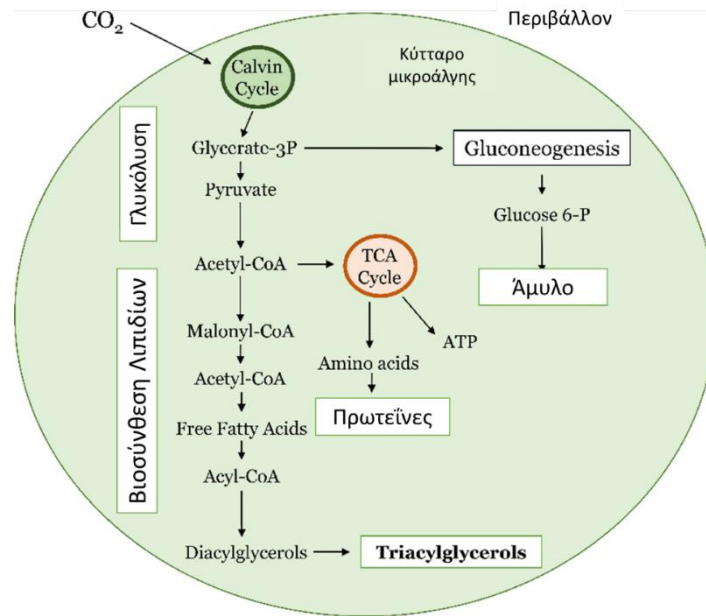
Εικόνα: 3: Διαφορές και ομοιότητες ενός κυττάρου κυανοβακτηρίου και ενός ευκαρυωτικού μικροφύκου
 Πηγή: Bhaya *et al.*, 2020

1.4. Μεταβολισμός Μικροφυκών

Ο μεταβολισμός των μικροφυκών είναι σχεδόν παρόμοιος με τον μεταβολισμό όλων των φωτοσυνθετικών οργανισμών. Ο κύριος στόχος είναι να απορροφούν διατροφικά στοιχεία από το περιβάλλον μέσω βιοχημικών και μεταφορικών διεργασιών. Σημαντικά στοιχεία του φωτοσυνθετικού μεταβολισμού είναι ο άνθρακας και το άζωτο (Enamala et al., 2018). Τα ιχνοστοιχεία, όπως ο σίδηρος, είναι επίσης απαραίτητα και προέρχονται από την οργανική ύλη, αλλά υψηλές συγκεντρώσεις τους μπορούν να έχουν τοξικές επιπτώσεις (Razzak et al., 2017).

Ο κύκλος Calvin, επίσης γνωστός ως ο κύκλος Calvin-Benson ή ο κύκλος C₃, είναι η κύρια βιοχημική οδός που λαμβάνει χώρα στους χλωροπλάστες των μικροφυκών αλλά και των υπόλοιπων φωτοσυνθετικών οργανισμών. Είναι μια σειρά από ενζυμικές αντιδράσεις που είναι υπεύθυνες για τη μετατροπή του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) σε γλυκόζη και άλλους υδατάνθρακες, παρέχοντας τελικά την κύρια πηγή οργανικού άνθρακα για τον οργανισμό. Ο κύκλος Calvin ξεκινά όταν το CO₂ από την ατμόσφαιρα δεσμεύεται από ένα ένζυμο που ονομάζεται ριβουλόζη-1,5-διφωσφορική καρβοξυλάση/οξυγενάση (RuBisCO). Στα μικροφύκη, η RuBisCO καταλύει την αντίδραση μεταξύ του CO₂ και μιας ένωσης με πέντε άνθρακες που ονομάζεται 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη (RuBP). Η αντίδραση μεταξύ CO₂ και RuBP παράγει δύο μόρια 3-PGA, μια ένωση τρία μόρια άνθρακα. Το ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) και το NADPH (νικοτιναμίδιο αδενο δινουκλεοτιδικό φωσφορικό) που παράγονται κατά τη διάρκεια των εξαρτώμενων από το φως αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης παρέχουν ενέργεια και ισχύ για τον Κύκλο του Calvin. Τα μόρια 3-PGA φωσφορυλιώνονται και ανάγονται, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός σακχάρου τριών ανθράκων που ονομάζεται 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη (G3P). Μερικά από τα μόρια G3P που παράγονται στη φάση αναγωγής χρησιμοποιούνται για την αναγέννηση του RuBP. Αυτό είναι απαραίτητο για τη διατήρηση του κύκλου σε λειτουργία, καθώς απαιτείται η RuBP για τη δέμευση του άνθρακα. Η φάση της αναγέννησης περιλαμβάνει μια σειρά από ενζυματικές αντιδράσεις που αναδιατάσσουν και τροποποιούν τα μόρια G3P σε RuBP χρησιμοποιώντας ATP. Ενώ ορισμένα μόρια G3P χρησιμοποιούνται για την αναγέννηση της RuBP, άλλα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γλυκόζης και άλλων υδατανθράκων. Απαιτούνται πολλαπλοί γύροι του Κύκλου Calvin για τη σύνθεση ενός μορίου γλυκόζης. Ο κύκλος Calvin συνεχίζει να λειτουργεί όσο το ATP και το NADPH παρέχονται από τις εξαρτώμενες από το φως αντιδράσεις. Τα τελικά προϊόντα του κύκλου περιλαμβάνουν γλυκόζη

και άλλα σάκχαρα, τα οποία μπορούν να αποθηκευτούν ως ενεργειακό απόθεμα ή να χρησιμοποιηθούν για ανάπτυξη και συντήρηση εντός των μικροφυκών στα πλαστίδια ή στα χυμοτόπια. Ο Κύκλος του Calvin παίζει καθοριστικό ρόλο στον φωτοσυνθετικό μεταβολισμό των μικροφυκών, καθώς όχι μόνο τους παρέχει την ενέργεια που χρειάζονται, αλλά χρησιμεύει και ως μέσο δέσμευσης του άνθρακα από την ατμόσφαιρα. (Ferro, 2019) (Εικόνα 4)



Εικόνα 4. Μεταβολισμός των μικροφυκών, Κύκλος Calvin ή Κύκλος C3, (Πηγή: Ferro, 2019)

1.4.1 Ακραίες συνθήκες ανάπτυξης

Τα μικροφύκη αποτελούν κάποιους από τους πιο ακραιόφιλους μικροοργανισμούς στον πλανήτη. Για παράδειγμα το πράσινο μικροφύκος *Dunaliella salina* μπορεί να αναπτυχθεί σε περιβάλλον με αλατότητα 1.5 φορές μεγαλύτερη από του θαλασσινού νερού, αλλά και σε περιβάλλον πλήρες κορεσμένο από NaCl (~5M NaCl=~11× θαλασσινό νερό), καθώς επίσης και σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από 0°C μέχρι $35^{\circ}\text{C}</math> (Borowitzka, 1999). Άλλα είδη μπορούν να αναπτυχθούν σε περιβάλλοντα με ακραίες τιμές pH, για παράδειγμα το *Dunaliella acidophila* μεγαλώνει σε pH 1, ενώ τα χλωρόφυτα *Coccomyxa onubensis* παρουσιάζει μεγάλη αντοχή σε ακραίες τιμές pH (εύρος τιμών από 2.5 μέχρι 9) (Fuentes *et al.*, 2016). Όσον αφορά τη θερμοκρασία υπάρχουν είδη όπως το κυανοβακτήριο *Mastigocladus laminosus* και το$

Synechococcus elognatus που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 70°C. Άλλα ακραιόφιλα είδη είναι το *Chloromonas nivalis* και *Raphidonema nivale* (Leya *et al.*, 2009) που έχουν απαντηθεί σε πάγο και σε χιόνι ενώ τα κόκκινα φύκη *Galdiera sulphuraria* (Cyanidiophyceae) αναπτύσσονται σε pH μεταξύ 0.5 και 3.0 και θερμοκρασίες μέχρι 56°C (Ciniglia *et al.*, 2004; Thangaraj *et al.*, 2011).

1.5 Εξέλιξη των μικροφυκών

Οι σχέσεις μεταξύ των διαφόρων ομάδων φυκών γίνονται κατανοητές μέσω της εξέλιξης των φωτοσυνθετικών οργανιδίων, τους χλωροπλαστες. Η φωτοσύνθεση αποτελεί το κοινό χαρακτηριστικό όλων των φυκών. Η κύρια φωτοσυνθετική ουσία όλων είναι η χλωροφύλλη a, αλλά η πλαστιδιακή δομή σε σχέση με τις φωτοσυνθετικές ουσίες ποικίλει μεταξύ των διαφόρων ομάδων φυκών (Larkum and Vesk, 2003).

Είναι πλέον γνωστό ότι η εξέλιξη των φυκών έχει επέλθει από διάφορα γεγονότα ενδοσυμβίωσης και αφορά κυρίως στα πλαστίδια, όμως είναι ακόμα υπό διερεύνηση καθώς νέα δεδομένα που αφορούν στο γονιδίωμα για μικροβιακούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς έρχονται στο φως. Επιπλέον, η ανακάλυψη νέων ειδών συχνά οδηγεί σε εκ νέου ερμηνεία των ήδη γνωστών δεδομένων σήμερα (Burki *et al.*, 2016).

Οι πρώτοι οργανισμοί στον πλανήτη που ανέπτυξαν το μηχανισμό της φωτοσύνθεσης ήταν τα κυανοβακτήρια, όπου και θεωρούνται οι πρόγονοι των ευκαρυωτικών μικροφυκών, το συμπέρασμα αυτό προήλθε χάριν της ενδοσυμβίωσης που προέκυψε από ένα κυανοβακτήριο με ένα πρότιστο (Keeling, 2013). Όλα τα κυανοβακτήρια περιέχουν εκτός της χλωροφύλλης a και φυκοπρωτείνες ως φωτοσυνθετικές ουσίες. Το 1975 ο Ralph Lewin ανακάλυψε έναν μονοκύτταρο θαλάσσιο προκαρυώτη *Prochloron didemnid* που ζούσε μέσα σε ένα ασκίδιο διπλού υμένα, ο οποίος περιείχε χλωροφύλλη a και β αλλά δεν περιείχε φυκοπρωτείνες ως φωτοσυνθετικές ουσίες (Lewin and Withers, 1975). Νέες έρευνες έχουν επικεντρωθεί σε νέες φωτοσυνθετικές ουσίες που αφορούν στη χλωροφύλλη d και f οι οποίες απαντήθηκαν σε κυανοβακτήρια και η ιδιότητα τους αφορούσε σε επέκταση του φάσματος απορρόφησης του φωτός στο κόκκινο. Προς το παρόν είναι ακόμα υπό διερεύνηση η ποικιλότητα των φωτοσυνθετικών ουσιών, ιδιαίτερα στα είδη της χλωροφύλλης στα κυανοφύκη.

Η συμβιωτική σχέση που προέκυψε εξελικτικά από έναν ευκαρυώτη με ένα πρώτιστο είχε ως κατάληξη την εξέλιξη του πρωκαρυώτη σε πλαστίδιο, ένα οργανίδιο με διπλή μεμβράνη που περιελάμβανε τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό, δηλαδή, τον χλωροπλάστη. Η ενδοσυμβίωση με κυανοβακτήρια (πρωταρχική ενδοσυμβίωση) προέκυψε με φαγοκυττάρωση ενός κυανοβακτηρίου από ένα πρώτιστο και οδήγησε στη διάκριση του φύλου Archaeplastida. Τα δευτερογενή και τριτογενή συμβιωτικά γεγονότα προέκυψαν με φαγοκυττάρωση ενός άλλου ευκαρυωτικού κυττάρου που περιείχε ήδη έναν πρωτογενή χλωροπλάστη. Το δευτερογενές ενδοσυμβιωτικό γεγονός είχε ως αποτέλεσμα την ενσωμάτωση ενός φωτοσυνθετικού ευκαρυώτη ως πλαστιδίου (χλωροπλάστης) στο προγονικό μικροφύκος. Με βάση την παρουσία συγκεκριμένων λιπιδίων και μεμβρανικών πρωτεϊνών (όπως πχ. η πρωτεΐνη Toc75) είναι πιθανό οι δύο μεμβράνες των πλαστιδίων να αντιστοιχούν στο αρχικά αρνητικό κατά Gram κύτταρο του κυανοβακτηρίου (Cavalier-Smith, 1974). Κατά την καθιέρωση και την εξέλιξη της ενδοσυμβίωσης και της μετατροπής του κυανοβακτηρίου σε οργανίδιο, το πλαστίδιο, γονίδια μεταφέρθηκαν μέσω του συμβιωτή στον πυρήνα του ξενιστή, ενώ κάποια γονίδια σταδιακά χάθηκαν από τον ξενιστή. Αυτό το μοναδικό γεγονός ενδοσυμβίωσης, ώθησε στην δημιουργία των σύγχρονων φύλων διάκρισης ευκαρυωτικών κυττάρων που περιέχουν πρωτογενές πλαστίδιο: Γλαυκόφυτα, Ροδόφυτα και Χλωρόφυτα (γνωστά και ως Archaeplastida). Όλοι οι υπόλοιποι διαχωρισμοί των φυκών σε φύλα αφορούν σε περαιτέρω δευτερογενή και τριτογενή συμβιωτικά γεγονότα (Keeling, 2013). Το παραπάνω μοντέλο ταξινόμησης και εξέλιξης των πλαστιδίων αποκαλείται μονοφυλική υπόθεση και δηλώνει ότι υπήρξαν αρκετά γεγονότα ενδοσυμβίωσης, και η δικτυωτή εξέλιξη που συνέβη μετά από πολλά χρόνια οδήγησε στη δημιουργία των σημερινών φύλων με πρωταρχικά πλαστίδια (Howe *et al.*, 2008). Η υποστήριξη της υπόθεσης αυτής έρχεται από ευρήματα ότι η κυανοβακτηριακή ενδοσυμβίωση έχει προκύψει πολύ πιο πρόσφατα από την δημιουργία των πρωταρχικών πλαστιδίων και την ενδοσυμβιωτική μεταφορά γονιδίων. Για παράδειγμα, το *Paulinella*, περιέχει δύο φωτοσυνθετικά ενεργά «χρωματοφόρα» κυανοβακτηριακής προέλευσης (Nowack and Grossman, 2012). Τα χρωματοφόρα είναι σαν πλαστίδια και η λειτουργία τους αφορά στη μεταφορά φωτοσυνθετάσης στο κυτταρόπλασμα (Kies and Kremer, 1979). Τα χρωματοφόρα έχουν εξαιρετικά μικρό γονιδίωμα (~1 ζεύγη γονιδιακών βάσεων) (Nowack and Grossman, 2012). **(Εικόνα 5)**

Τα **Archaeplastida (Glaucophyta, Rhodophyta, Chlorophyta)** θεωρούνται ότι αποτελούν τα αποτελέσματα της πρώτης ενδοσυμβίωσης που οδήγησε και στην εξέλιξη των πλαστιδίων. Τα πλαστίδια στα **Glaucophyta** έχουν δύο εξωτερικές μεμβράνες όπως και ένα υποτυπώδες στρώμα πεπτιδογλυκάνων που βρίσκεται ανάμεσα τους. Αυτό το στρώμα πεπτιδογλυκάνων θεωρείται ότι είναι απομεινάρι του άλλοτε κυτταρικού τοιχώματος το οποίο εξαλείφθηκε εξελικτικά με την καθιέρωση της ενδοσυμβιωτικής σχέσης. Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός των Γλαυκόφυτων είναι αρκετά όμοιος με των κυανοβακτηρίων. Περιέχουν μόνο χλωροφύλλη a και φυκοπρωτεΐνες ως κύριες φωτοσυνθετικές ουσίες (Nozaki et al., 2009).

Τα **Rhodophyta** ταξινομικά διαθέτουν στα πλαστίδια τους επίσης δύο εξωτερικές μεμβράνες. Ως φωτοσυνθετικές ουσίες περιέχουν χλωροφύλλη a και b καθώς και φυκοπρωτεΐνες, όπου υπάρχει μία επιπλέον ομάδα χρωστικών, οι γ-φυκοπρωτεΐνες. Σε αντίθεση με τα Glaucophyta περιέχουν επίσης μία πρωτεΐνη πρόσδεσης (chlorophyll a/b binding protein, CAB) στη χλωροφύλλη a/b που έχει συγγένεια με τις CAB πρωτεΐνες της πράσινων φυκών και με τα φύκη που περιέχουν χλωροφύλλη c. Όπως και στα κυανοβακτήρια, τα θυλακοειδή είναι μονά με φυκοδιοσώματα στην επιφάνεια τους. Τα πλαστίδια περιέχουν μια ειδική μορφή αμύλου (Floridean starch) (Larkum, 2016).

Τα **Chlorophyta** αντίστοιχα διαθέτουν πλαστίδια εγκλεισμένα σε δύο μεμβράνες με πολλά θυλακοειδή που είναι συσχετισμένα μεταξύ τους (συμπιεσμένα). Οι κύριες φωτοσυνθετικές ουσίες είναι η χλωροφύλλη a και b και ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός βασίζεται στις μεμβρανικές αναπόσπαστες πρωτεΐνες του συμπλέγματος CAB. Τα πλαστίδια περιέχουν κυρίως άμυλο (Larkum, 2016).

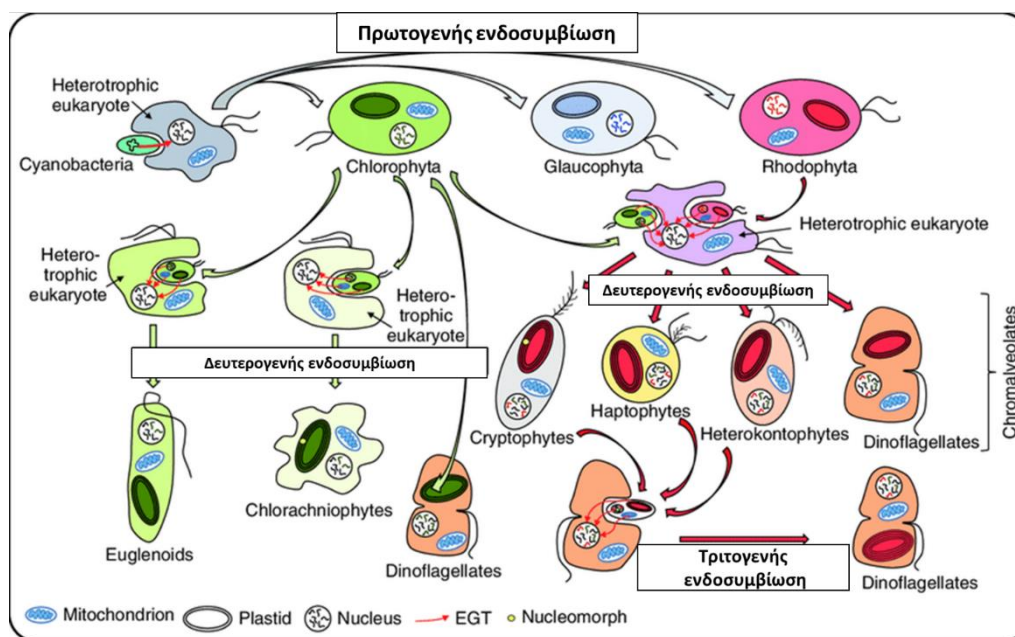


Εικόνα 5: Εξέλιξη των φυκών σύμφωνα με πρωτογενή, δευτερογενή και τριτογενή ενδοσυμβιωτικά συμβάντα. EGT, ενδοσυμβιωτική γονιδιακή μεταφορά.

2. ΕΙΔΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

2.1 Πράσινα Φύκη (Chlorophyta και Charophyta)

Τα Viriplantae περιλαμβάνουν δύο φύλα φυκών τα Chlorophyta και τα Charophyta, τα οποία γενικά αναφέρονται ως πράσινα φύκη. Τα πράσινα φύκη είναι άφθονα και παρουσιάζουν μεγάλη βιοποικιλότητα στα υδάτινα οικοσυστήματα. Συγκεκριμένα, στα θαλάσσια οικοσυστήματα υπάρχουν μόνο δύο ομάδες που έχουν χαρακτηριστεί πλήρως: τα πράσινα φύκη (Ulnophyceae) και τα πλαγκτονικά Chlorophyta (**Εικόνα 6**). Στα πράσινα φύκη περιλαμβάνονται πολλά ακραιόφιλα είδη, όπως τα ψυχρόφιλα *Chlamydomonas nivalis*, *Chloromonas rubroleosa*, *Coccomyxa subellipsoidea*, *Mesotaenium berggrenii*, τα αλατόφιλα *Dunaliella salina*, *Dunaliella viridis*, *Dunaliella bioculata*, *Tetraselmis sp.* και τα οξεόφιλα *Dunaliella acidophila*, *Coccomyxa onubensis*, *Pseudochlorella sp.* (Friedl, T. 1997).



Εικόνα 6: Είδη από Chlorophyta, Πηγή MindTheGraph.com

2.2.1. Το γένος *Chlorella spp.*

(Chlorophyta, Trebouxiophyceae, Chlorellales)

Το γένος *Chlorella* ήταν από τα πρώτα μικροφύκη που ταυτοποιήθηκαν από τον Beijerinck (1890), για καλλιεργητικούς σκοπούς, καθώς επίσης και οι πρώτοι μικροοργανισμοί στους

οποίους μελετήθηκε ο μηχανισμός της φωτοσύνθεσης αρχικά από τον Warburg (1919) και αργότερα από τους Calvin and Benson με τη μελέτη τους για την αφομοίωση του διοξειδίου του άνθρακα στα φυτά (Calvin, 1962). Το *Chlorella* ήταν το πρώτο γένος που χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή βιομάζας και παράχθηκε για εμπορικούς σκοπούς (Guiry *et al.*, 2014; Kitada *et al.*, 2009a). Αρχικά επιλέχθηκε ως τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη αλλά και για την παραγωγή βιοκαυσίμου (Harder and Witsch, 1942). Το γένος *Chlorella* απαντάται κυρίως σε οικοσυστήματα γλυκού νερού κυρίως σε πηγές πλούσιες σε θρεπτικά συστατικά. Λίγα θαλάσσια είδη είναι γνωστά. Το γένος αυτό αποτελείται από μικρά, σφαιρικά έως ωοειδή, μη κινητικά, μονοκύτταρα ή σε αποικίες κύτταρα με έναν μόνο χλωροπλάστη με πυρηνοειδές. Μερικά είδη μπορούν να παράγουν μεγάλες ποσότητες βλέννας. Είναι μονοκύτταρος οργανισμός που τα κύτταρα του αναπαράγονται αγενώς με μίτωση, συνήθως σχηματίζοντας τέσσερα θυγατρικά κύτταρα εντός του γονικού κυττάρου (Yamamoto *et al.*, 2004). Μόλις τα θυγατρικά αυτά κύτταρα ωριμάσουν διαρρηγνύεται το κυτταρικό τοίχωμα του γονικού κυττάρου και ελευθερώνονται. Προς το παρόν 44 είδη του γένους *Chlorella* έχουν ταυτοποιηθεί (Guiry *et al.*, 2014).

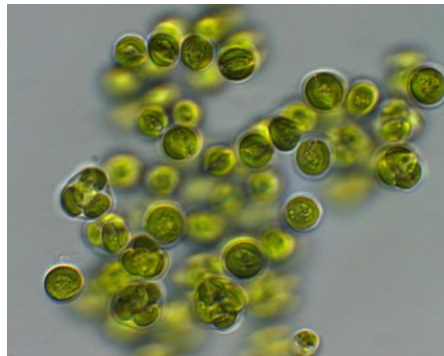
Τα είδη που μελετήθηκαν είναι:

- i) Είδος *Auxenochlorella protothecoides* (Trebouxiophyceae, Chlorellales, Chlorellaceae., *Chlorella*)

Το μικροφύκος *Auxenochlorella protothecoides* (παλαιότερα γνωστό και ως *Chlorella protothecoides*) είναι μονοκύτταρο πράσινο φύκος, το οποίο μελετήθηκε για πρώτη φορά από τον Krüger το 1894. Το *A. protothecoides* έχει διάμετρο 2-10 μm και σχήμα κοκκοειδές. Σε κυτταρικό επίπεδο φαίνεται να περιέχει πολλά μιτοχόνδρια, ένα χλωροπλάστη με σχήμα κυπέλλου, άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα και απουσία μαστιγίων. Σε αντίθεση με τα περισσότερα πράσινα φύκη που αναπτύσσονται αποκλειστικά αυτότροφα, το *A. protothecoides* μπορεί επίσης να αξιοποιήσει οργανικά συστατικά απευθείας από το περιβάλλον για ετερότροφη ή μικτότροφη ανάπτυξη. Τα συγκεκριμένα μικροφύκη έχουν αποδειχθεί ότι μπορούν να αξιοποιήσουν τον οργανικό άνθρακα που βρίσκεται στο υπόστρωμα τους, συμπεριλαμβανομένης της γλυκερόλης, της γλυκόζης και του οξικού οξέος (Gao *et al.*, 2014). Γενικά, θεωρείται ως ένα από τα ιδανικότερα είδη για παραγωγή βιοκαυσίμων λόγω της ικανότητάς του να συσσωρεύει μεγάλη ποσότητα λιπιδίων μέσα στο κύτταρο (Gao *et al.*, 2014). Σε σύγκριση με τα αυτότροφα κύτταρα, η

ενδοκυτταρική δομή και σύνθεση υφίσταται μεγάλες αλλαγές στα ετερότροφα κύτταρα καθώς έχει την τάση να συσσωρεύει μεγαλύτερη και καλύτερη ποσότητα μεταβολικών προϊόντων όπως λιπίδια (Gao *et al.*, 2014). Υψηλότερη παραγωγή βιομάζας μπορεί να επιτευχθεί με ετερότροφη ή μικτότροφη ανάπτυξη (Zhou *et al.*, 2012). Ωστόσο, η περιεκτικότητα σε λιπίδια μπορεί να είναι χαμηλότερη με τη χρήση αποβλήτων ως θρεπτικό μέσο σε σχέση με απλούστερα οργανικά μόρια άνθρακα όπως η γλυκόζη και το οξικό οξύ. Επίσης, μελέτες αποκαλύπτουν ότι ακόμα και τα απόβλητα των βιομηχανιών μπορεί να αποτελέσουν πηγή θρεπτικών ουσιών για καλλιέργεια αυτού του φύκου, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο μια φιλική προς το περιβάλλον διαδικασία ανακύκλωσης για τα υποπροϊόντα των βιομηχανικών μονάδων (Zhou *et al.*, 2012). Στο είδος *A. protothecoides*, η πρόσληψη και ο μεταβολισμός του οργανικού άνθρακα μπορεί να ανασταλούν με την παρουσία φωτός, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση της ανάπτυξης βιομάζας και της συσσώρευσης λιπιδίων (Xiao *et al.* 2020). Έτσι, απαιτούνται αναλύσεις κόστους-οφέλους για να καθοριστεί εάν απαιτείται προσθήκη θρεπτικών συστατικών και τότε αυτή είναι ευεργετική για την ενίσχυση της ανάπτυξης φυκών. Η βιομάζα που παράγεται από το μικροφύκος *A. protothecoides* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλές λειτουργίες: π.χ. για παραγωγή βιοαερίου, ως βιολίπασμα, για παραγωγή βιοανθράκων (μορφή ξυλάνθρακα) και ως συστατικό σε ζωοτροφές (Zhou *et al.* 2012).

(Εικόνα 7)

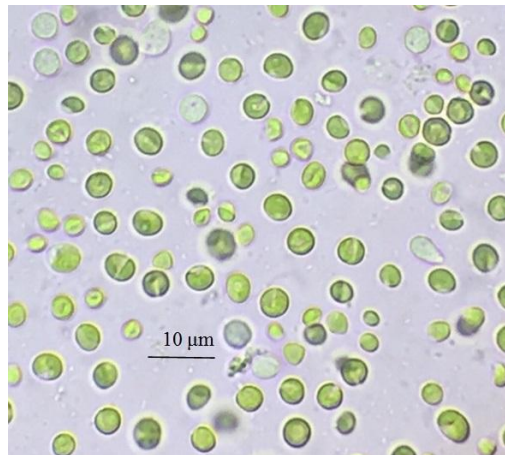


Εικόνα 7: Το είδος *A. protothecoides*, Πηγή: CCAP

ii) ***Chlorella vulgaris*** (Trebouxiophyceae, Chlorellales, Chlorellaceae, *Chlorella*)

Είναι ένας μονοκύτταρος οργανισμός που αναπτύσσεται κατά εξοχήν σε οικοσυστήματα γλυκού νερού και βρίσκεται στον πλανήτη από την προ Κάμβρια περίοδο 2.5 δισεκατομμύρια χρόνια πριν, ενώ η γενετική του σύσταση δεν έχει αλλάξει. Από το 1900 οι πρωτεΐνες του (>55% του ξηρού βάρους) απέσπασαν το ενδιαφέρον των Γερμανών ερευνητών ως μία αντισυμβατική πηγή τροφής. Στη σημερινή εποχή η Ιαπωνία αποτελεί τον παγκόσμιο ηγέτη στην αξιοποίηση της ως προς την κατανάλωση και τη χρήση της για ιατροφαρμακευτικούς σκοπούς καθώς αποτελέσματα διαφόρων ερευνών έδειξαν ότι έχει ανοσοτροποποιητικές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Kitada *et al.*, 2009b). Παράλληλα το *C. vulgaris* είναι επίσης ικανό να παράγει μια σημαντική ποσότητα λιπιδίων, ιδιαίτερα σε περιβάλλον τροφοπενίας αζώτου, με τα παραγόμενα λιπίδια να είναι κατάλληλα για παραγωγή βιοντίζελ (Converti *et al.*, 2009). Το *C. vulgaris* είναι ένα σφαιρικό μικροσκοπικό κύτταρο με διάμετρο 2–10 μm και παρουσιάζει πολλές μορφολογικές ομοιότητες με τα φυτικά κύτταρα. Σε περιβάλλον τροφοπενίας αζώτου, τα λιπίδια σχηματίζονται στο κυτόπλασμα του χλωροπλάστη. (Rizwan *et al.*, 2018). Το είδος αυτό χαρακτηρίζεται από γρήγορους ρυθμούς ανάπτυξης και ανταποκρίνεται σε διάφορες συνθήκες ανάπτυξης και υποστρώματα καθώς και χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικό στέλεχος σε ακραίες συνθήκες αύξησης καθώς και σε ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς.).

(Εικόνα 8)



Εικόνα 8: Είδος *C. vulgaris*, Πηγή: Ramaraj *et al.*, 2016

2.2.2 Το γένος *Scenedesmus* spp.

(Chlorophyta, Chlorophyceae, Sphaeropleales, Scenedesmaceae)

Έως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 74 είδη τα οποία ταξινομικά ανήκουν στο γένος *Scenedesmus*. Στα φυσικά ενδιαιτήματα απαντώνται ως μονοκύτταροι οργανισμοί, ωστόσο πολλές φορές απαντώνται ως ομάδες κυττάρων των τεσσάρων ή οχτώ κυττάρων μέσα σε ένα μητρικό κυτταρικό τοίχωμα. Έχουν περιγραφεί διάφορα χαρακτηριστικά στα οποία διαφέρει η μορφή των συγκεκριμένων ομάδων κυττάρων (κοινόβιο) που διαμορφώνονται ως αποικίες, συμπεριλαμβανομένων γραμμικών, κοστουλατοειδών, ακανόνιστων, εναλλασσόμενων ή δακτυλοκοκκοειδών μοτίβων. Η δημιουργία τους εξαρτάται από πλήθος παραγόντων. Σε συνθήκες που προάγεται η γρήγορη ανάπτυξη των μικροοργανισμών πχ. σε υψηλές εντάσεις φωτισμού και υψηλότερες θερμοκρασίες παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό μονοκύτταρων μικροοργανισμών επομένως συμπεραίνεται ότι σε υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης προτιμούν να μην σχηματίζουν ομάδες (κοινόβια) και να απαντώνται ως μονάδες. Κατά το σχηματισμό αποικίας έχει παρατηρηθεί ότι οι μεγαλύτερες αποικίες έχουν μικρότερη αναλογία επιφάνειας προς όγκο, γεγονός που περιορίζει την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και τη συλλογή φωτός, ενώ η μεγάλη μάζα ευνοεί τη βύθιση. Κατά την αναπαραγωγή το μητρικό κύτταρο διογκώνεται και γίνεται πολυπύρηνο μετά από πολλαπλές διαιρέσεις. Το κυτταρόπλασμα διασπάται σε μονοπύρηννα θυγατρικά κύτταρα, όπου συνήθως αναπτύσσονται ως μη κινητικά μεμονωμένα κύτταρα. Τυπικά τα θυγατρικά αυτά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους και δημιουργούν αποικία μέσα στο μητρικό κύτταρο. Τελικά το μητρικό κύτταρο διαρρηγνύεται και απελευθερώνει σπόρια που δημιουργούν μια φυσιολογική κυτταρική μορφή. Τα ακραία κύτταρα του κοινόβιου διαφέρουν μορφολογικά από τα εκείνα στο κέντρο. Ο τρόπος που το ένα κύτταρο προσκολλάται στο άλλο κατά την ανάπτυξη τους είναι ακόμα υπό διερεύνηση, αλλά είναι γνωστό ότι ένα τριλαμινικό περίβλημα (TLS), αποτελούμενο από αλγίνη, είναι η πρώτη εξωτερική μορφολογία που δημιουργείται, και αναπτύσσεται σε πακέτα πριν αναπτυχθούν για να συνδεθούν σε ένα συνεχές στρώμα.

Το *Scenedesmus* έχει την ικανότητα να παράγει βιομάζα η οποία όπως και στα περισσότερα είδη μικροφυκών μπορεί να χρησιμοποιεί σε ευρεία ποικιλία βιοκαυσίμων μέσω της διαδικασίας ζύμωσης της παραχθείσας βιομάζας για παραγωγή βιο-αιθανόλης και βιοντίζελ. Όπως σε όλα τα συστήματα παραγωγής μικροφυκών, η μεγάλη πρόκληση είναι η επιτυχία των καλλιεργειών

μεγάλης κλίμακας. Το *Scenedesmus* είναι γνωστό για την μεγάλη του παραγωγικότητα και την υψηλή του απόδοση σε βιομάζα και έχει μελετηθεί κυρίως για τη χρήση του σε παραγωγή βιοντίζελ. Η μικτότροφη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων σε ιδανικές συνθήκες έχει αποδεχθεί ότι είναι περισσότερο αποδοτική σε σχέση με την αυτότροφη ανάπτυξη. Πολλές μελέτες έχουν εστιάσει στη βελτιστοποίηση της περιεκτικότητας σε λιπίδια καθώς και της παραγωγικότητας σε βιομάζα μέσω της προσθήκης διαφόρων θρεπτικών συστατικών σε διάφορα υποστρώματα. Η περιεκτικότητα λιπιδίων του *Scenedesmus* σε ιδανικές συνθήκες έχει παρατηρηθεί σε συγκεντρώσεις έως περίπου 60% του ξηρού κυτταρικού βάρους. Ωστόσο ως προς τις φωτοσυνθετικές του ιδιότητες το στέλεχος θεωρείται ιδιαίτερα αποτελεσματικό. Όπως πολλά στελέχη μικροφυκών έτσι και το *Scenedesmus* ευνοεί την παραγωγή λιπιδίων όταν βρίσκεται σε περιβάλλον τροφοπενίας αζώτου. Μια σημαντική βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης ως προς την παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε όταν προστέθηκε αιθανόλη στο θρεπτικό υπόστρωμα με 12 ώρες φωτοπερίοδο (Mandal and Mallick, 2009). Η σημαντικότερη βελτίωση στην παραγωγή λιπιδίων επιτεύχθηκε όταν οι καλλιέργειες σταθερής φάσης μεταφέρθηκαν σε περιβάλλον τροφοπενίας αζώτου για 7 ημέρες σε τροφοπενία φωσφόρου για 3 ημέρες, αντίστοιχα. (Mandal and Mallick, 2009).

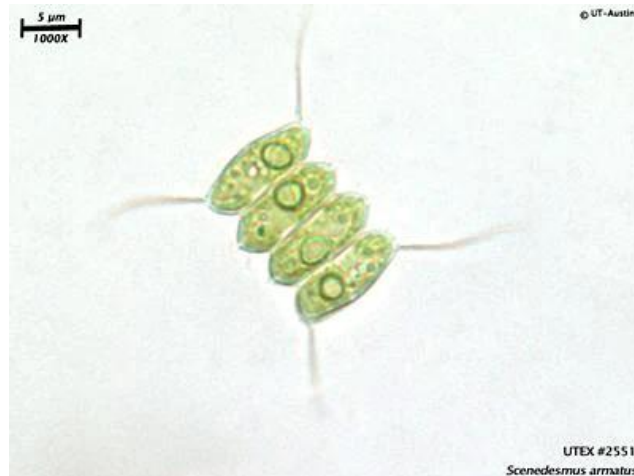
- i) Το είδος *Scenedesmus obliquus* είναι ένα είδος πράσινου μικροφύκου από την κλάση των Χλωροφύτων. Είναι ένα μονοκύτταρο μικροφύκος με μήκος περίπου 10-20 μm και πλάτος περίπου 4-8 μm. Έχει μία χαρακτηριστική εμφάνιση με μικρά κυκλικά κύτταρα που είναι συνήθως σε συμπαγείς αλυσίδες. Έχει δύο απαλλαγμένους από κυτταρόπλασμα χλωροπλάστες, οι οποίοι περιέχουν χλωροφύλλη a, b και καροτενοειδή, τα οποία επιτρέπουν στο μικρόφυκος να απορροφά φως κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης. Είναι ένα είδος που βρίσκεται σε λιμνοθάλασσες, λίμνες και ρυάκια και αναπτύσσεται κυρίως σε υδατικά περιβάλλοντα με υψηλή συγκέντρωση αζώτου και φωσφόρου. Οι συνθήκες που επιτρέπουν τη βέλτιστη ανάπτυξη του *S. obliquus* είναι η θερμοκρασία του νερού στους 20-25 °C και η διαθεσιμότητα των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων, όπως άζωτο και φώσφορο. Μπορεί επίσης να αναπαράγεται γρήγορα και αποτελεσματικά. Έχει μελετηθεί για τη χρήση του ως πηγή πρωτεϊνών και λιπαρών οξέων στη διατροφή ανθρώπων και ζώων αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για παραγωγή βιοκαυσίμων, όπως βιοντίζελ, και για την απομάκρυνση αζώτου και φωσφόρου από υδάτινα

περιβάλλοντα σε διαδικασίες βιολογικού καθαρισμού. (Mandal and Mallick, 2009; Ho *et al.*, 2013). **(Εικόνα 9)**



Εικόνα 9: Είδος *S. obliquus*, Πηγή: algotherm

- ii) Το είδος *Scenedesmus quadricauda*, είναι ένα πράσινο φύκος, που χρησιμοποιείται σε εφαρμογές βιοεξυγείανσης. Είναι ένα μονοκύτταρο μικροφύκος με σφαιρικό σχήμα και τέσσερις κεραίες που προεκτείνονται από το κυτταρικό σώμα. Οι κεραίες του *S. quadricauda* είναι αρκετά μακριές σε σχέση με το μήκος του κυττάρου και αυτό το κάνει ξεχωριστό από άλλα είδη του γένους *Scenedesmus*. Είναι ένα εξαιρετικό παράδειγμα τυπικού πλαγκτονικού μικροφύκου, είναι μη κινητικό και αποτελείται από 2 έως 4 κύτταρα τοποθετημένα σε μια σειρά. Ζει σε γλυκά νερά και αναπτύσσεται καλά σε περιβάλλοντα με ευτροφισμό. Μπορεί να αναπαράγεται με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένης της διαίρεσης κυττάρων και της απόσπασης κεραιών που μπορούν να αναγεννηθούν ως νέα κύτταρα. Η βιοχημική σύνθεση του *S. quadricauda* περιλαμβάνει πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι έχει ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα Ω-3, τα οποία έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου (Fuentes *et al.*, 2016). **(Εικόνα 10)**



Εικόνα 10: Το είδος *S. quadricauda*, Πηγή: UTEX Culture Collection of Algae)

2.2.3 Το γένος *Tetraselmis* spp.

(Chlorophyta, Chlorodendrophyceae, Chlorodendraceae)

Το είδος *Tetraselmis* spp. αποτελείται από μονοκύτταρα, μαστιγωτά με ελλειπτικό σχήμα σχεδόν σφαιρικά και ελαφρώς πεπλατυσμένα κύτταρα με μία προεκβλάστηση στο πρόσθιο άκρο από την οποία εκφύονται 4 ίσου μήκους μαστίγια σε 2 αντίθετα ζεύγη. Τα μαστίγια καλύπτονται από τετράγωνα/αδαμάντινα λέπια σε 24 σειρές, τα οποία επικαλύπτονται από άλλες 24 διπλές σειρές λεπιών. Απαντάται σε θαλάσσια και γλυκού νερού οικοσυστήματα. Ορισμένα είδη του γένους *Tetraselmis* απαντούν στο πλαγκτόν, άλλα είναι βενθικά, αποικίζοντας την άμμο ενώ μερικά απαντούν ως ενδοσυμβιόντα σε μεταζωοειδή, για παράδειγμα, στο ακελικό στροβιλώδες πλατύσκουλο *Symsagittifera* (=Convoluta) (Serôdio *et al.*, 2011). Το γένος *Tetraselmis* είναι εύκολο στην καλλιέργεια και αρκετά είδη, όπως το *T. chui*, το *T. suecica* και το *T. tetrahele*, χρησιμοποιούνται ευρέως ως τροφή στις ιχθυοκαλλιέργειες (Domozych, 2016). Πιο πρόσφατα, τα ευρυαλικά στελέχη του γένους *Tetraselmis* που μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα πολύ μεγάλο εύρος αλατότητας έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον ως δυνητικές, βιώσιμες πηγές λιπιδίων για βιοκαύσιμα (Fon-Sing and Borowitzka, 2016). (**Εικόνα 11**)



Εικόνα 11: Είδος *T. chuii*, Πηγή: UTEX Culture Collection of Algae

3. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Οι καλλιέργειες των μικροφυκών σε παγκόσμια κλίμακα αποκτούν ολοένα και πιο σημαίνουσα αξία, λόγω του μεγάλου οικονομικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζει η καλλιέργεια τους όσον αφορά στην παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Οι πολλαπλές χρήσεις και εφαρμογές τους έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων και των βιομηχανιών, με αποτέλεσμα, τα τελευταία χρόνια η έρευνα στον τομέα των μικροφυκών να έχει εντατικοποιηθεί.

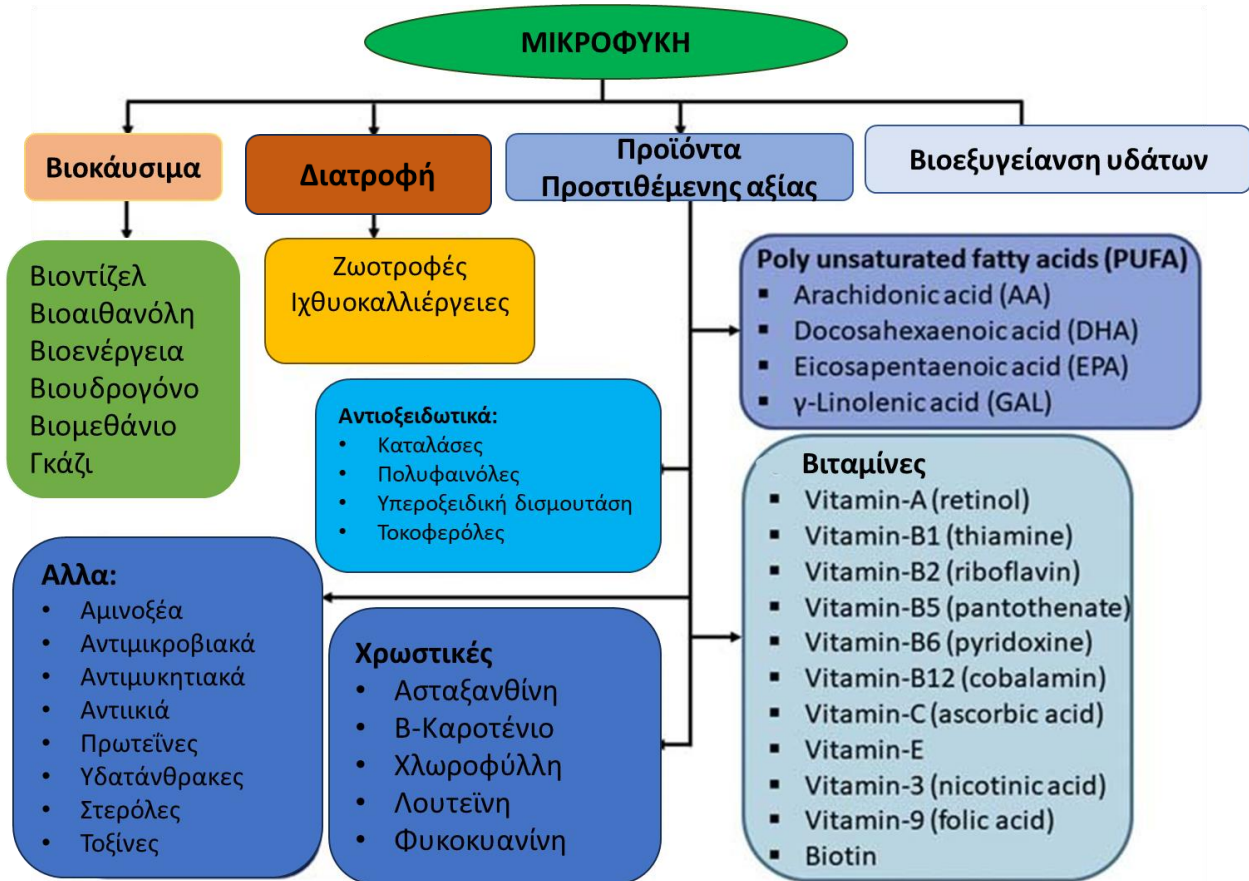
Είναι γνωστό ότι μία μεγάλη σειρά προϊόντων καθημερινής χρήσης όπως προϊόντα υγιεινής και περιποίησης (οδοντόκρεμες, καλλυντικά, κλπ.) περιέχουν παράγωγα μικροφυκών, ενώ γνωστές είναι επίσης και οι εφαρμογές της χρήσης των μικροφυκών στην ιατρική και τη φαρμακευτική. Οι μεταβολίτες των μικροφυκών παρουσιάζουν σημαντική φαρμακευτική αξία, καθώς μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιοξειδωτικά, να ενισχύουν το ανοσοποιητικό και νευρικό σύστημα τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα, και να εμφανίζουν ιοστατική δράση.

Τα μικροφύκη, επιπλέον, καλλιεργούνται και για την παραγωγή ποικίλων προϊόντων για γενική βιομηχανική χρήση. Τα σημαντικότερα εξ αυτών προϊόντα είναι χρωστικές ουσίες, όπως η χλωροφύλλη, η φυκοκυανίνη, τα καροτενοειδή (π.χ. ασταξανθίνη, β-καροτένιο) και άλλες. Μια άλλη σημαντική χρήση των μικροφυκών, είναι η παραγωγή λιπασμάτων και εδαφοβελτιωτικών σκευασμάτων. Η βιομάζα των μικροφυκών διαθέτει την ικανότητα να κατακρατά μεγάλες ποσότητες νερού και να βελτιώνει τα δομικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά του εδάφους. Επίσης, τα μικροφύκη μπορούν να αποτελέσουν λιπάσματα αργής αποδέσμευσης (slow release) και μάλιστα ορισμένα γένη όπως το *Anabaena* και το *Nostoc*, τα οποία είναι αζωτοδευσμετικά (nitrogen-fixing) δρουν πολύ αποτελεσματικά, καθώς δεσμεύουν το άζωτο από την ατμόσφαιρα και το μετατρέπουν σε οργανική μορφή. Ως αποτέλεσμα, της χρήσης των μικροφυκών για την παραγωγή λιπασμάτων είναι η μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων από την παραγωγή αζωτούχων λιπασμάτων. (Pulz and Gross, 2004) (Spolaore et al. 2006a). **(Πίνακας 2) (Εικόνα 12)**

Η συμβολή τους στην προστασία του περιβάλλοντος μέσω της διαχείρισης υγρών αποβλήτων είναι ιδιαίτερα σημαντική, ενώ παράλληλα αποτελούν βιοδείκτες της οικολογικής κατάστασης του υδάτινου περιβάλλοντος. Τα τελευταία χρόνια, ένας νέος κλάδος αξιοποίησης των μικροφυκών έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ειδικών. Πρόκειται για την παραγωγή βιοενέργειας με στόχο την αντιμετώπιση των περιβαλλοντικών προβλημάτων που προκύπτουν

από την αυξανόμενη χρήση ορυκτών καυσίμων για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών και την επαγομένη συσσώρευση CO₂ στην ατμόσφαιρα (Markou *et al.* 2013).

Πίνακας 2: Οι πιθανές εφαρμογές μικροφυκών για παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας





Εικόνα 12: Γραφική απεικόνιση της παραγωγής προϊόντων μικροφυκών (Βιολιπάσματα, Υδρογονάνθρακες, Βιοντίζελ, Φάρμακα, Συμπληρώματα διατροφής, Βιοδραστικά συστατικά) Πηγή: Kandasamy et. al., 2022

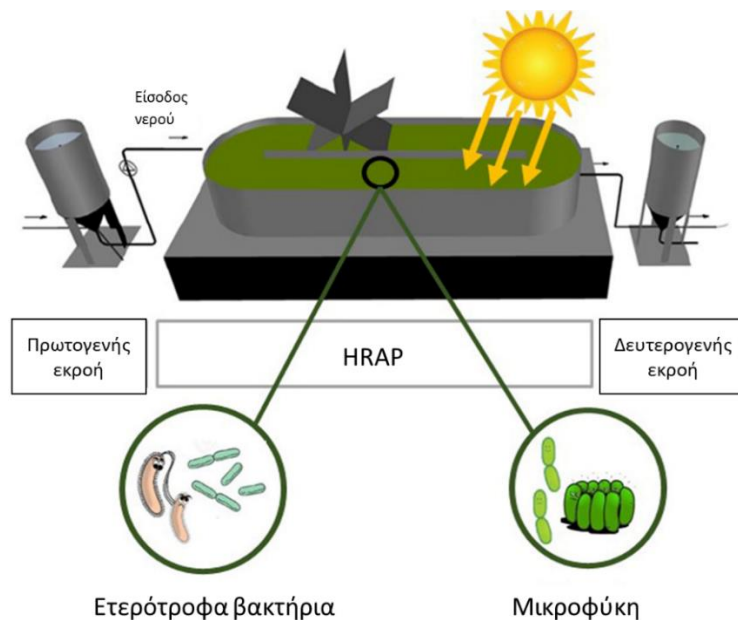
3.1 Επεξεργασία αποβλήτων

Τα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να προσροφούν βαρέα μέταλλα, οργανικές ενώσεις, φωσφορούχες και αζωτούχες ενώσεις οι οποίες υπάρχουν στα εργοστασιακά λύματα, ως εκ τούτου συμβάλουν σημαντικά στη βιοεξυγείανση του περιβάλλοντος. Αυτό τους επιτρέπει να αυξήσουν τη βιομάζα τους και να βοηθήσουν στην καταπολέμηση του φαινομένου του ευτροφισμού. Η καλλιέργεια τους σε δεξαμενές υψηλής απόδοσης (High-rate algal ponds, HRAP) (**Εικόνα 13**), που αποτελούν ανοιχτά συστήματα καλλιέργειας, αποτελεί αποτελεσματική μέθοδο επεξεργασίας των αποβλήτων. Η παραγόμενη βιομάζα αυτών των συστημάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοκαυσίμων και άλλων προϊόντων, αλλά δεν προορίζεται ως τρόφιμο. Μερικά

παραδείγματα εφαρμογής σε βιομηχανική κλίμακα περιλαμβάνουν την καλλιέργεια της *S. platensis* σε HRAP για την απομάκρυνση των φωσφορικών από τις εκροές του αναερόβιου χωνευτή εργοστασίου αμυλοβιομηχανίας καθώς η χρήση του μικροφύκου *C. vulgaris* με τη μέθοδο της ακινητοποίησης σε αλγινικές κλίνες για την απομάκρυνση χρωστικών από τα απόβλητα της κλωστοϋφαντουργίας.

Η επεξεργασία αποβλήτων μπορεί να επιτευχθεί μέσω συνδυασμού διαφόρων ειδών, προκειμένου να επιτευχθούν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, η επιτυχής απομάκρυνση φωσφόρου και αζώτου από οικιακά λύματα μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη συνεργασία κυττάρων του *C. vulgaris* και του *S. obliquus*. Κατά τη φωτοσύνθεση των μικροφυκών, παράγεται οξυγόνο το οποίο χρησιμοποιείται από άλλους αερόβιους ετερότροφους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στα λύματα. Αυτό μειώνει τις ανάγκες αερισμού (οικονομία ενέργειας) και συμβάλλει στην αποδόμηση των οργανικών ρύπων, καθώς και στην απομάκρυνση οργανικών ουσιών από τα λύματα.

Τα τελευταία χρόνια, για την αξιολόγηση της ποιότητας του νερού χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί δείκτες, είδη μικροφυκών όπως είναι: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, και είδη του γένους *Chlorella*. Για την αξιολόγηση των επιπέδων φωσφόρου χρησιμοποιούνται τα είδη *Ankistrodesmus convolutes*, *Chlorella vulgaris* και *Scenedesmus quadricauda* (Rizwan et al., 2018).

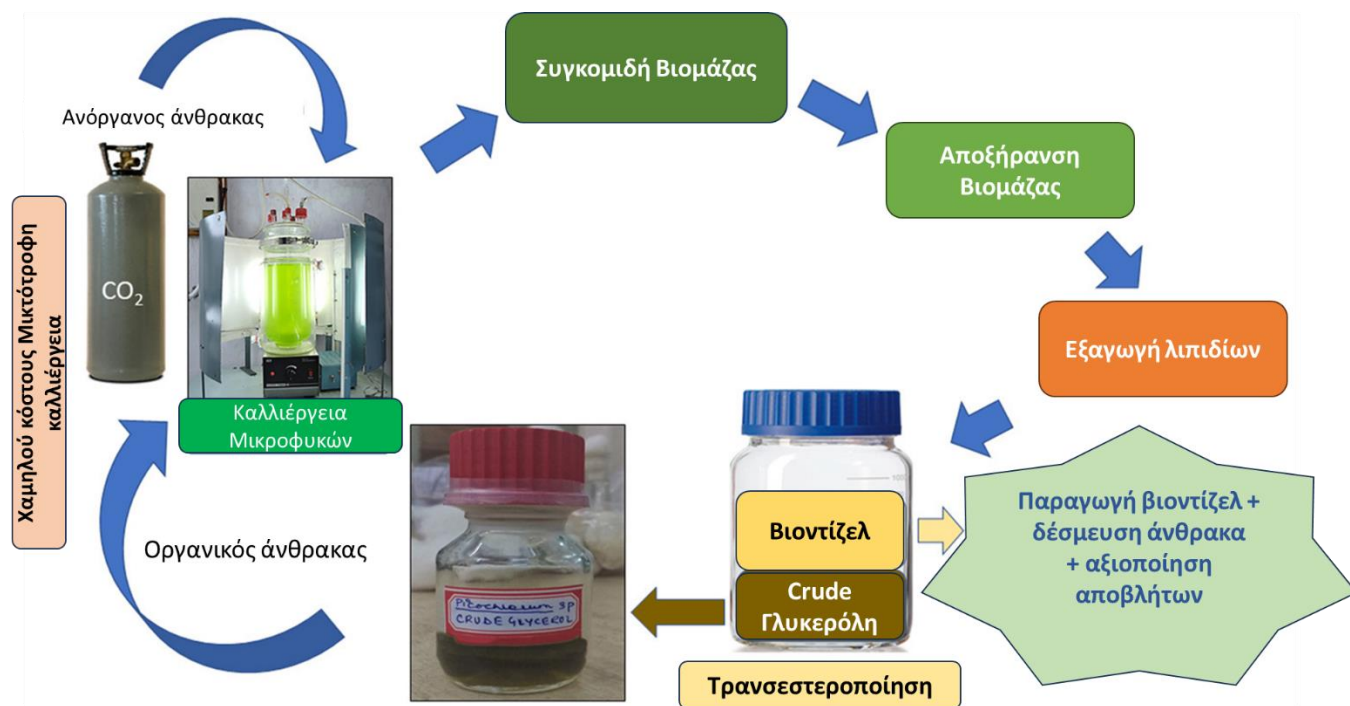


Εικόνα 13. Δεξαμενή τύπου HRAP Πηγή: High rate algal ponds (HRAPs), Pavitr.net

3.1.1 Αξιοποίηση της ακατέργαστης Γλυκερόλης στην Καλλιέργεια Μικροφυκών

Όσον αφορά τη διαχείριση οργανικών υγρών αποβλήτων μέσω της καλλιέργειας μικροφυκών, μία καινοτόμα εφαρμογή θεωρείται η αξιοποίηση της απόβλητης γλυκερόλης που παράγεται ως παραπροϊόν της βιομηχανίας βιοκαυσίμων ως θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας μικροφυκών. Η παραγωγή βιοντίζελ την τελευταία δεκαετία παρουσιάζει ιδιαίτερη ανάπτυξη στην Ευρώπη, η οποία είναι και ο κύριος παραγωγός βιοντίζελ παγκοσμίως. Η ετήσια παραγωγή στην Ελλάδα ανέρχεται σε 130.000-140.000 m³. Η ακατέργαστη γλυκερόλη (crude glycerol) αποτελεί το κύριο παραπροϊόν της βιομηχανίας παραγωγής βιοντίζελ μέσω της διεργασίας της μετεστεροποίησης. Για κάθε τόνο παραγόμενου βιοντίζελ παράγονται 100 kg ακατέργαστης γλυκερόλης η οποία δεν είναι οικονομικά αξιοποιήσιμη και απορρίπτεται ως απόβλητο. Στην Ελλάδα ετησίως παράγονται περίπου 13.000-14.000 τόνοι ενώ σε Ευρωπαϊκό επίπεδο 600.000 τόνοι (Yang *et al.*, 2012).

Οι ποσότητες της ακατέργαστης γλυκερόλης που παράγονται είναι εξαιρετικά υψηλές, κάτι που καθιστά τη συνολική απορρόφησή της από την αγορά αδύνατη, ενώ παράλληλα η τιμή της σημειώνει σημαντική πτώση, ως συνέπεια της υπεραφθονίας του διαθέσιμου προϊόντος. Η αξιοποίηση της βρίσκει εφαρμογή στους κλάδους της κοσμετολογίας, της βιομηχανίας τροφίμων, της φαρμακολογίας και της βιομηχανίας υλικών (σάπωνες, βερνίκια κλπ). Παρόλα αυτά υπάρχουν μεγάλες ποσότητες οι οποίες δεν αξιοποιούνται και απορρίπτονται ως απόβλητα. Μία από τις καινοτόμες εφαρμογές για την αξιοποίηση της γλυκερόλης είναι η χρήση της ως υπόστρωμα ανάπτυξης μικροφυκών με στόχο της παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, (λιπαρά οξέα Ω₃, πρωτεΐνες, φυσικές χρωστικές ουσίες όπως καροτένιο, χλωροφύλλη και φυκοκυανίνη). Η αξιοποίηση των προϊόντων αυτών μπορεί να γίνει από την βιομηχανία τροφίμων και τη βιομηχανία ζωοτροφών και ιχθυοκαλλιεργειών (Konstantinovic *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016). Ως εκ τούτου τα καθιστά μια σημαντική πηγή ανανεώσιμης ενέργειας με ένα τεράστιο εύρος εφαρμογών. (Markou, *et al.*, 2012). Παραδείγματα μικροφυκών που αξιοποιούν την ακατέργαστη γλυκερόλη για παραγωγή βιομηχανικά αξιοποιήσιμων προϊόντων αποτελούν: το *Schizochytrium limacinum* όπου μέσω ζύμωσης παράγονται λιπίδια πλούσια σε Ω₃ Docosahexaenoic acid (DHA) (Chi *et al.*, 2007) και το *Scenedesmus obliquus* για παραγωγή βιοαιθανόλης και βιοντίζελ (Xu *et al.*, 2019). **(Εικόνα 14)**



Εικόνα 14: Αξιοποίηση γλυκερόλης από μικροφύκη, Πηγή: Chakravarty *et al.*, 2022

3.1.2. Χρήση Ακατέργαστης Γλυκερόλης της Βιομηχανίας βιοντίζελ ως πηγή άνθρακα για την καλλιέργεια μικροφυκών

Τα τελευταία χρόνια η ακατέργαστη γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροφυκών. Η χρήση της ως πηγή μπορεί να έχει θετικές και αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των μικροφυκών και να επηρεάσει την ταχύτητα ανάπτυξης. Η ακατέργαστη γλυκερόλη στο υπόστρωμα αύξησης των μικροφυκών μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη με διάφορους τρόπους, Η σύσταση της ακατέργαστης γλυκερόλης παρουσιάζεται στον **(Πίνακα 3)**:

Άνθρακας και πηγή ενέργειας: Η ακατέργαστη γλυκερόλη παρέχει μια άμεσα διαθέσιμη πηγή άνθρακα για τα μικροφύκη, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη των κυττάρων και την παραγωγή διαφόρων μεταβολιτών. Χρησιμεύει ως ένα πλούσιο σε ενέργεια υπόστρωμα που μπορεί να υποστηρίξει τις μεταβολικές απαιτήσεις των μικροφυκών.

Ενισχυμένος ρυθμός ανάπτυξης: Όταν παρέχεται σε κατάλληλες συγκεντρώσεις, η ακατέργαστη γλυκερόλη μπορεί να προωθήσει την ανάπτυξη μικροφυκών παρέχοντας επιπλέον

άνθρακα για την παραγωγή βιομάζας. Μπορεί να ενισχύσει τον ρυθμό ανάπτυξης, να αυξήσει την κυτταρική πυκνότητα και να βελτιώσει τη συνολική παραγωγικότητα.

Μεταβολικές προσαρμογές: Η έκθεση στην ακατέργαστη γλυκερόλη μπορεί να προκαλέσει μεταβολικές προσαρμογές στα μικροφύκη. Αυτό περιλαμβάνει αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων και των ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκερόλης, στη βιοσύνθεση των λιπιδίων και στις οδούς χρήσης του άνθρακα. Αυτές οι προσαρμογές μπορούν να βελτιστοποιήσουν την ικανότητα των μικροφυκών να χρησιμοποιούν τη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα. (Katiyar *et al.*, 2017).

Αναστολή σε υψηλές συγκεντρώσεις: Αν και η γλυκερόλη μπορεί να είναι ευεργετική για την ανάπτυξη μικροφυκών, οι υψηλές συγκεντρώσεις ακατέργαστης γλυκερόλης μπορεί να έχουν ανασταλτικά αποτελέσματα. Τα αυξημένα επίπεδα γλυκερόλης μπορούν να ασκήσουν ωσμωτική πίεση στα κύτταρα μικροφυκών, να διαταράξουν τις κυτταρικές διεργασίες και να εμποδίσουν την ανάπτυξη. Είναι σημαντικό να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση γλυκερόλης που υποστηρίζει την ανάπτυξη χωρίς να προκαλεί τοξικότητα. (Tan, *et al.*, 2013)

Προσμίξεις, πρόσθετα και ανασταλτικές ουσίες: Η ακατέργαστη γλυκερόλη που λαμβάνεται από την βιομηχανία βιοντίζελ μπορεί να περιέχει ανεπιθύμητες ενώσεις, όπως υπολειμματική μεθανόλη ή λιπαρά οξέα, τα οποία μπορεί να είναι επιζήμια για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να επιδράσουν τοξικά και να αναστείλουν τις μεταβολικές διεργασίες στα μικροφύκη.

Για να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά η ακατέργαστη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα για τα μικροφύκη, είναι σημαντικό να βελτιστοποιηθούν η συγκέντρωση, η καθαρότητα και οι συνθήκες καλλιέργειας. Κάθε είδος μικροφύκους μπορεί να έχει συγκεκριμένες απαιτήσεις και ανοχές, επομένως είναι απαραίτητο να καθοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση γλυκερόλης και οι συνθήκες ανάπτυξης μέσω πειραματισμού και διαδικασιών βελτιστοποίησης. (Hee-Jeong Choi & Sung-Whan Yu, 2015; Tan, *et al.*, 2013; Katiyar *et al.*, 2017).

3.1.3 Μεταβολισμός απόβλητης Γλυκερόλης μέσω Καλλιέργειας Μικροφυκών.

Τα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν και να χρησιμοποιούν τη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Ο μεταβολισμός της ακατέργαστης γλυκερόλης στα μικροφύκη περιλαμβάνει διάφορα στάδια:

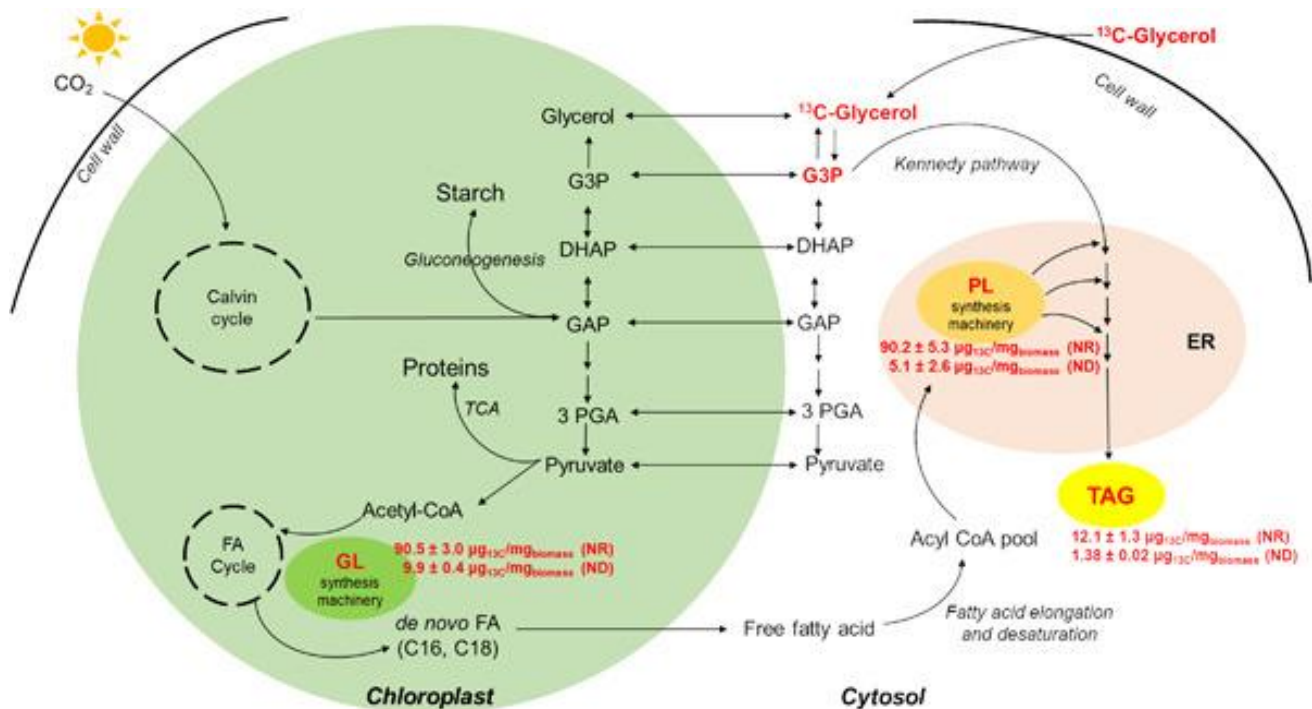
Πρόσληψη: Τα μικροφύκη προσλαμβάνουν ακατέργαστη γλυκερόλη από το περιβάλλον, μέσω μεταφορέων που υπάρχουν στις κυτταρικές τους μεμβράνες. Ο μηχανισμός πρόσληψης ποικίλλει ανάλογα με το είδος των μικροφυκών.

Μετατροπή σε 3-φωσφορική γλυκερόλη: Μέσα στα κύτταρα των μικροφυκών, η ακατέργαστη γλυκερόλη μετατρέπεται αρχικά σε 3-φωσφορική γλυκερόλη μέσω του ενζύμου κινάση γλυκερόλης. Η κινάση της γλυκερόλης φωσφορυλιώνει τη γλυκερόλη χρησιμοποιώντας ATP, με αποτέλεσμα το σχηματισμό 3-φωσφορικής γλυκερόλης.

Ενσωμάτωση σε μεταβολικές οδούς: Η 3-φωσφορική γλυκερόλη στη συνέχεια ενσωματώνεται σε διάφορες μεταβολικές οδούς των μικροφυκών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στη γλυκόλυση, στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) (**Εικόνα 15**) ή στη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, ανάλογα με τις απαιτήσεις ενέργειας και άνθρακα των μικροφυκών.

Χρήση ενέργειας και άνθρακα: Η 3-φωσφορική γλυκερόλη μεταβολίζεται περαιτέρω για να βιοσυνθέσει ATP και αναγωγικά ισοδύναμα (όπως NADH και NADPH) που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροφυκών και τις κυτταρικές διεργασίες. Ο σκελετός άνθρακα της 3-φωσφορικής γλυκερόλης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση λιπιδίων, πρωτεϊνών και άλλων κυτταρικών συστατικών.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι συγκεκριμένες μεταβολικές οδοί και τα ένζυμα που εμπλέκονται στη χρήση της ακατέργαστης γλυκερόλης μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών ειδών μικροφυκών. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα της χρήσης της γλυκερόλης μπορεί να εξαρτάται από τη συγκέντρωση και την καθαρότητα της, καθώς και από τις συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας μικροφυκών. (Garlapati *et al.*, 2016; Chen and Walker, 2011)



Εικόνα 15: Κύκλος TCA, Πηγή: Poddar *et al.*, 2020

3.2 Παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας

3.2.1 Λιπαρά Οξέα

Η βιομάζα των καλλιεργούμενων μικροφυκών είναι γνωστό ότι είναι πλούσια σε λιπαρά οξέα τα οποία είναι αξιοποιήσιμα στη βιομηχανία για την παραγωγή βιοκαυσίμων, πχ το *A. protothecoides* και το *S. obliquus* τα οποία παράγουν λιπαρά οξέα σε ποσότητες 30-40% της ξηρής βιομάζας τους και αξιοποιούνται για την παραγωγή βιοντίζελ. Επίσης τα είδη *S. quadricauda* και *C. cohnii* που παράγουν Ω₃ λιπαρά οξέα σε ποσοστό 30-40%. Τα Ω₃ λιπαρά οξέα αποτελούν απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία τα οποία ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να συνθέσει μόνος του και συνεπώς πρέπει να τα προσλαμβάνει μέσω της τροφής. Οι τροφές οι οποίες είναι πλούσιες σε Ω₃ λιπαρά οξέα είναι τα ψάρια και τα προϊόντα τους (ιχθυέλαια), καθώς και η σόγια. οι καρποί ελαιοκράμβης και οι ξηροί καρποί. Η παγκόσμια αγορά Ω₃ λιπαρών οξέων ανέρχεται στα 3 δισεκατομμύρια ευρώ (Konstantinovic *et al.* 2016). Όμως οι υπάρχουσες απαιτήσεις δεν μπορούν

να καλυφθούν πλήρως και ως εκ τούτου είναι αναγκαία η εξεύρεση νέων εναλλακτικών πηγών παραγωγής τους.

Ειδικότερα υπάρχουν είδη μικροφυκών που παράγουν κυρίως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (poly unsaturated fatty acids, PUFA), όπως το εικοσιδυεξανοϊκό οξύ (DHA), το εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA), το λινολενικό οξύ και το αραχιδονικό οξύ (AA). Τα είδη μικροφυκών που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία παραγωγής Ω3 είναι: *Chlorella*, *Spirulina*, *Porphyridium cruentum*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Pavlova lutheri* και το *Arthrospira platensis*. Η χρήση τους αφορά στην ιατρική για την παραγωγή φαρμάκων αλλά και στην ανθρώπινη διατροφή. Επίσης πολλά είδη μικροφυκών έχουν την ικανότητα να παράγουν λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας ωμέγα-3 και ωμέγα-6 (LC-PUFA) σε τεράστιες ποσότητες. Για την ανθρώπινη διατροφή και υγεία τα κυριότερα είναι τα LC-PUFA ως συμπληρώματα γιατί προάγουν την ανάπτυξη και λειτουργία του εγκεφάλου, την ενίσχυση του ανοσοποιητικού και προλαμβάνουν τις καρδιοαναπνευστικές παθήσεις. Τα τελευταία χρόνια, με την εισαγωγή και των προβιοτικών συμπληρωμάτων, στη διατροφή διερευνώνται εντατικότερα τα μικροφύκη σε σχέση με τα οφέλη για την υγεία του ανθρώπου. Πολύ σημαντικές θεωρούνται και οι στερόλες οι οποίες χρησιμοποιούνται για την πρόληψη και τη θεραπεία των καρδιαγγειακών παθήσεων. Συγκεκριμένα η *Spirulina* παράγει κλιοναστερόλης η οποία βοηθά στην πρόληψη αγγειακών νοσημάτων (Trautwein, 2001) Επιπλέον, σε αντίθεση με τα ιχθυέλαια, η χρήση τους αποτρέπει την εντατικοποίηση της αλιείας και αποκλείει την πιθανότητα παρουσίας τοξικών μη μεταβολιζόμενων χημικών ουσιών όπως διοξίνες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια και βαρέα μέταλλα. Αναφορικά με τα λιπίδια ενδιαφέροντος, τα μικροφύκη προτιμώνται για την παραγωγή των τριακυλογλυκερολών (TAG), το οποίο είναι ένας τύπος λιπιδίου που βρίσκεται συνήθως σε μικροφύκη, φυτά και ζώα. Οι τριακυλογλυκερόλες είναι επίσης γνωστές ως τριγλυκερίδια και αποτελούνται από τρία μόρια λιπαρών οξέων εστεροποιημένα σε ένα μόριο γλυκερόλης.

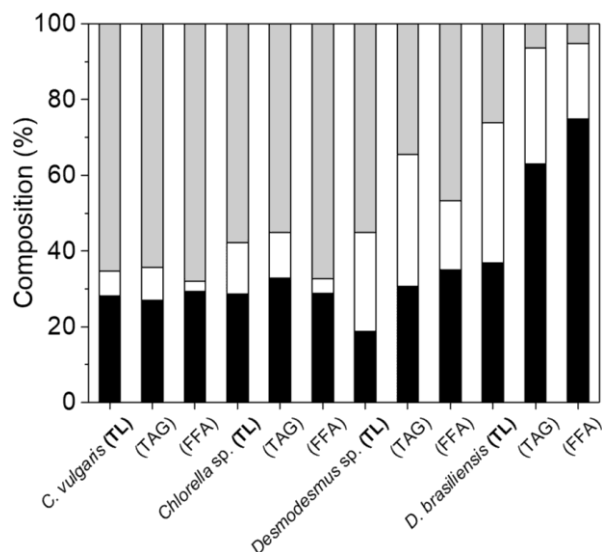
- Το EPA είναι ένα πολυακόρεστο ωμέγα-3 λιπαρό οξύ με 20 άτομα άνθρακα και 5 διπλούς δεσμούς.
- Το DHA είναι ένα πολυακόρεστο ωμέγα-3 λιπαρό οξύ με 22 άτομα άνθρακα και 6 διπλούς δεσμούς.

Σε μερικά μικροφύκη, όπως τα *C. vulgaris*, *S. quadricauda* και *A. protothecoides*, παράγονται κυρίως τα TAG λιπίδια τα οποία χρησιμεύουν ως ένωση αποθήκευσης ενέργειας. Κατά τη διάρκεια ευνοϊκών συνθηκών ανάπτυξης, τα μικροφύκη συσσωρεύουν TAGs ως τρόπο αποθήκευσης περίσσειας άνθρακα και ενέργειας. Τα TAG μπορούν να αποθηκευτούν σε σταγονίδια λιπιδίων μέσα στα κύτταρα των μικροφυκών και μπορούν να αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό μέρος της κυτταρικής βιομάζας. Τα λιπαρά οξέα που συνθέτουν τα TAG μπορεί να ποικίλλουν ως προς το μήκος της αλυσίδας και τον βαθμό κορεσμού. Μερικά λιπαρά οξέα που βρίσκονται συνήθως σε TAGs μικροφυκών και παρατηρήθηκαν σε σημαντικά ποσοστά στο κλάσμα των λιπιδίων: (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Σύσταση TAG λιπιδίων

Παλμιτικό οξύ (C16:0):	Κορεσμένο λιπαρό οξύ με 16 άτομα άνθρακα
Ελαϊκό οξύ (C18:1)	Μονοακόρεστο λιπαρό οξύ με 18 άτομα άνθρακα και έναν διπλό δεσμό
Λινολεϊκό οξύ (C18:2)	Πολυακόρεστο λιπαρό οξύ με 18 άτομα άνθρακα και δύο διπλούς δεσμούς.
Άλφα-λινολενικό οξύ (C18:3)	Πολυακόρεστο λιπαρό οξύ με 18 άτομα άνθρακα και τρεις διπλούς δεσμούς.
Στεατικό οξύ (C18:0)	Κορεσμένο λιπαρό οξύ με 18 άτομα άνθρακα

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ειδική σύνθεση λιπαρών οξέων των TAGs στα μικροφύκη ποικίλλει ανάλογα με το στέλεχος, τις συνθήκες ανάπτυξης και τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών. Διαφορετικά είδη μικροφυκών, συμπεριλαμβανομένων των ειδών που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μπορεί να έχουν μοναδικά προφίλ λιπαρών οξέων στα TAG τους, τα οποία επηρεάζουν την παραγωγή βιοντίζελ όσο και την παραγωγή προϊόντων που προέρχονται από λιπίδια (Sengmee *et al.*, 2017). (Διάγραμμα 1)



Διάγραμμα 1: Σύνθεση των ολικών λιπιδίων των μικροφυκών κατά την αυτότροφη ανάπτυξη των μικροφυκών *C. vulgaris*, *Chlorella sp.*, *Desmodesmus sp.*, *D. Brasiliensis*. Ολικά λιπίδια (TL), των τριακυλογλυκερολών (TAG) και των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs), χωρισμένη σε (■) Κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA), (□) Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) και (▒) Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Πηγή: Ferreira *et al.*, 2022

3.2.2 Πρωτεΐνες

Η βιομάζα των μικροφυκών περιέχει υψηλότερης ποιότητας πρωτεΐνη από τις πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης, αλλά χαμηλότερης από της ζωικής προέλευσης. Η παραγωγή πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης στην Ευρωπαϊκή Ένωση παρουσιάζει ένα τεράστιο έλλειμμα της τάξης του 70-80%, το οποίο αναγκαστικά καλύπτεται από εισαγωγές. Κύρια πηγή φυτικών πρωτεϊνών θεωρείται η σόγια όπου οι ετήσιες εισαγωγές ανέρχονται σε 30 εκατομμύρια τόνους, εκ των οποίων η Ελλάδα εισάγει 0.5-0.6 τόνους (αντιστοιχούν σε 250 εκατομμύρια ευρώ). Για την αντιμετώπιση του προβλήματος δύναται να αυξηθεί η καλλιέργεια φυτών πλούσια σε πρωτεΐνες ώστε να αποφευχθεί η εισαγωγή τους από τρίτες χώρες. Για την κάλυψη ωστόσο των αναγκών στην Ευρώπη θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί το 20% της καλλιεργήσιμης γης πράγμα που είναι μη δυνατό (Visser *et al.*, 2014). Έτσι καθίσταται αναγκαία η εξεύρεση εναλλακτικών πηγών παραγωγής πρωτεΐνης. Τα μικροφύκη αποτελούν μια εξαιρετική πηγή παραγωγής πρωτεϊνών καθώς μπορούν να περιέχουν συγκεντρώσεις (40-65%) με εξαιρετικό προφίλ αμινοξέων και έτσι μπορούν να αντικαταστήσουν εξ ολοκλήρου τη σόγια (Vigani *et al.* 2015) καθώς και να χρησιμοποιούνται και ως διατροφικά συμπληρώματα (Spiegel, *et al.*, 2013).

Οι πρωτεΐνες αποτελούν βιοπολυμερή αμινοξέων, ορισμένα εκ των οποίων προσλαμβάνονται αποκλειστικά μέσω της τροφής γιατί δεν βιοσυντίθενται από τον ανθρώπινο οργανισμό. Κάποιες πρωτεΐνες, εκτός από τα θρεπτικά τους οφέλη παρουσιάζουν κάποια χαρακτηριστικά επωφελή για την ανθρώπινη υγεία. Ειδικότερα όσες προέρχονται από μικροφύκη διαθέτουν ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις ζωικές και τις φυτικές πρωτεΐνες καθώς δεν προκαλούν τις διαταραχές όπως υποχοληστεριναιμικές και υπογλυκεριδεμικές παρενέργειες και συχνά ελαττώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων (Amiot J., 2001).

Τα σημαντικότερα γένη μικροφυκών που χρησιμοποιούνται για εμπορικούς σκοπούς στην παραγωγή πρωτεϊνών είναι τα *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Nannochloropsis*, *Chlorella* και *Chlamydomonas* και το κυανοβακτήριο *Spirulina*. Τα δύο ευρέως καλλιεργούμενα είδη *Spirulina maxima* και *Spirulina platensis*, έχουν παρατηρηθεί ότι συμβάλλουν στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και επιδρούν θετικά στη θεραπεία εκφυλιστικών νόσων όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτης, καρκίνος και αναιμία. Υψηλής περιεκτικότητας βιομάζα σε πρωτεΐνες παράγει το μικροφύκος του γένους *Chlorella* (51-58% επί ξηρού βάρους), και έχει διαδοθεί ευρέως η καλλιέργεια για την παραγωγή πρωτεϊνικών συμπληρωμάτων. **(Πίνακας 4)**

Πίνακας 4: Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες σε διάφορες πηγές τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των μικροφυκών. Πηγή: Koyande *et al.*, 2019

Τρόφιμο	Περιεκτικότητα Πρωτεΐνης (%)
Μοσχάρι	17.4
Ψάρι	19.2–20.6
Κοτόπουλο	19-24
Φυστίκια	26
Σιτάρι	27
Παρμεζάνα	36
Σκόνη Γάλακτος	36
Αλεύρι Σόγιας	36
Μαγιά Μπύρας	45
Αυγό	47
<i>Chlorella sp.</i>	50–60
<i>Spirulina sp.</i>	60–70

3.2.3 Υδατάνθρακες

Η διατροφική αξία των μικροφυκών είναι σημαντική καθώς είναι πηγή ωφέλιμων υδατανθράκων όπως το άμυλο, η κυτταρίνη, τα σάκχαρα και άλλοι πολυσακχαρίτες. Ανάλογα το είδος των μικροφυκών διαφέρει και το είδος των υδατανθράκων που παράγονται. Τα κόκκινα φύκια συνθέτουν έναν ειδικό τύπο αμύλου (floridean starch) το οποίο συχνά μοιάζει με τη δομή της αμυλοπηκτίνης. Τα κυανοβακτήρια συνθέτουν γλυκογόνο (α -1.4 συνδεδεμένη γλυκάνη) και τα πράσινα φύκη πολυσακχαρίτες τύπου αμυλοπηκτίνης (Markou, *et al.*, 2012). Από σχετικές έρευνες έχει διαπιστωθεί ότι το *C. vulgaris* μπορεί να συσσωρεύσει μεγάλη ποσότητα υδατανθράκων, έως και 37–55% της ξηρής βιομάζας του. Για παράδειγμα, μετά από 14 ημέρες καλλιέργειας σε περιβάλλον χαμηλής περιεκτικότητας σε άζωτο, η συγκέντρωση βιομάζας με περιεκτικότητα 55 % σε υδατάνθρακες του *C. vulgaris* μπορεί να φτάσει τα 0,52 g (ξηρό βάρος κυττάρων, DCW)/L και 55%, αντίστοιχα (Illman *et al.*, 2000). Τα *Chlamydomonas reinhardtii* και *S. obliquus* έχουν επίσης τη δυνατότητα να χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε υδατάνθρακες 45-60%. Σε καλλιέργεια του *C. reinhardtii*, η συγκέντρωση βιομάζας και η περιεκτικότητα σε άμυλο βρέθηκαν να είναι 1,45 g DCW/L και 53%, αντίστοιχα, μετά από καλλιέργεια 3 ημερών (Kim *et al.*, 2006). Επιπλέον, η συγκέντρωση βιομάζας και η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες του *S. obliquus* θα μπορούσε να φτάσει τα 4,96 g DCW/L και το 51,8%. **(Πίνακας 5)**. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες, κύρια χρήση τους είναι η κτηνοτροφία κυρίως στην ορνιθοκαλλιέργεια και ιχθυοκαλλιέργεια. Η χρήση των υδατανθράκων των μικροφυκών θα μπορούσε να συμπληρώσει πολλές ελλείψεις των κλάδων της φαρμακευτικής, της γεωπονίας, και της διατροφολογίας, καθώς και άλλων τομέων που χρειάζεται να επικεντρωθούν σε εναλλακτικές προσεγγίσεις για να ικανοποιήσουν τις ανάγκες της διατροφικής βιομηχανίας. (Priscilla de Souza *et al.* 2020).

Πίνακας 5: Περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες ή άμυλο των πράσινων μικροφυκών. (Πηγή: Chen *et al.*, 2013)

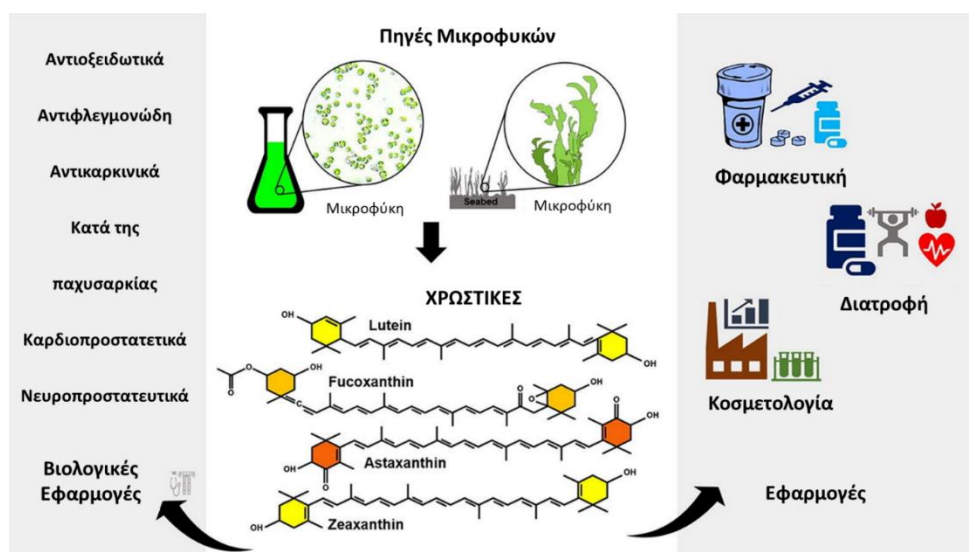
Είδη Μικροφυκών	Περιεκτικότητα Αμύλου ή Υδατανθράκων (%)	Πηγές
<i>Chlorella vulgaris</i> IAM C-534	37.0 (Άμυλο)	Hirano <i>et al.</i> , 1997
<i>C. vulgaris</i> CCAP 211/11B	55.0	Illman <i>et al.</i> , 2000
<i>C. vulgaris</i> P12	41.0 (Άμυλο)	Dragone <i>et al.</i> , 2011
<i>C. vulgaris</i>	55.0 (Άμυλο)	Illman <i>et al.</i> , 2000
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90	60.0	Brennan <i>et al.</i> , 2010
<i>C. reinhardtii</i> IAM C-238	55.0 (Άμυλο)	Hirano <i>et al.</i> , 1997
<i>Chlorococum</i> sp.	32.5	Kim <i>et al.</i> , 2006
<i>Chlorococum</i> sp. TISTR8583	26.0 (Άμυλο)	Ike <i>et al.</i> , 1997
<i>S. acutiformis</i> TISTR 8495	16.4 (Άμυλο)	Harun <i>et al.</i> , 2011
<i>S. obliquus</i> CNW-N	51.8	Spolaore <i>et al.</i> , 2006
<i>Tetraselmis</i> sp.CS-362	26.0	Brown <i>et al.</i> , 1998

3.2.4 Χρωστικές Ουσίες

Η παραγωγή φυσικών χρωστικών από τα μικροφύκη είναι σημαντική για την αγορά και οι φυσικές χρωστικές των μικροφυκών χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: φυκοβιλιπρωτεΐνες (phycobiliproteins) και καροτενοειδή (carotenoids). Τα καροτενοειδή περιλαμβάνουν το β-καροτένιο (β-carotene), η ασταξανθίνη (astaxanthin) και η λουτεΐνη (lutein). Οι χρωστικές αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως στη βιομηχανία των τροφίμων και στην παραγωγή ζωοτροφών αλλά και ως διατροφικά συμπληρώματα. Οι φυκοβιλιπρωτεΐνες παράγονται κυρίως από κυανοβακτήρια αλλά και από ορισμένα κόκκινα φύκη και κρυπτομονάδες. Διακρίνονται σε φυκοκυανοβιλίνες (phycocyanobilins) που έχουν μπλε χρώμα, φυκοερυθροβιλίνες (phycoerythrobilins) με κόκκινο χρώμα, φυκοροβιλίνες (phycourobilins) με κίτρινο χρώμα και φυκοβιβιολίνες (phycobiviolins) με μωβ χρώμα. Η χρήση τους είναι αντίστοιχη με αυτή των καροτενοειδών (φυσικές βαφές,

χρωστικές και ως φθορίζοντα μέσα) ενώ τελευταίες έρευνες απέδειξαν ότι προσφέρουν σημαντικά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία (Spolaore *et al.* 2006b). (Εικόνα 16)

Η χρήση των φυσικών χρωστικών στην βιομηχανία των τροφίμων έχει μεγάλη σημασία καθώς έχουν στόχο τη βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων τους και τα κάνουν πιο ελκυστικά προς τον καταναλωτή. Οι φυσικές χρωστικές θεωρούνται ασφαλείς σε σχέση με τις συνθετικές χρωστικές. Ο στόχος της βιομηχανίας τροφίμων είναι η εύρεση φυσικών πηγών χρωστικών καθώς η παγκόσμια αγορά υπολογίζεται ότι υπερβαίνει το 1.5 εκατομμύριο ευρώ με αυξητική τάση (Saeid *et al.* 2016).



Εικόνα 16: Χρωστικές των Μικροφυκών και χρήση τους, Πηγή: Patel *et al.*, 2022

3.2.5 Βιομάζα Μικροφυκών

Η παραχθείσα ξηρή βιομάζα μικροφυκών αποτελεί επίσης αξιοποιήσιμο εμπορικό προϊόν. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή ή συμπλήρωμα διατροφής για τον άνθρωπο. Έρευνες έχουν δείξει ότι η προσθήκη της βιομάζας σε σιτηρέσια αγελάδων, χοίρων και πτηνών αυξάνει τη θρεπτική τους αξία. Η προσθήκη βιομάζας μικροφυκών σε μορφή σκόνης στα σιτηρέσια των πτηνών, παρουσίασε θετική επίδραση στον χρωματισμό του κρέατος και στον κρόκο των αυγών, ενώ έχει παρατηρηθεί βελτίωση της κατάστασης της υγείας των πτηνών τα οποία σημείωσαν αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης και μειωμένη θνησιμότητα.

Αξιοσημείωτο ήταν ότι τα παραχθέντα προϊόντα πχ. τα αυγά, σημείωσαν μειωμένη περιεκτικότητα σε χοληστερόλη και αυξημένη σε λινολενικό και αραχιδονικό οξύ, ενώ το πιο σκούρο χρώμα των κρόκων δηλώνει αυξημένη περιεκτικότητα σε ασταξανθίνη και καροτενοειδή. Αντίστοιχα στην κτηνοτροφία και σε άλλους κλάδους έχουν επίσης παρατηρηθεί θετικά αποτελέσματα (Saeid *et al.* 2016; Lemahieu *et al.* 2014; 2013; Tsiplakou *et al.* 2018) Στην ανθρώπινη διατροφή χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα σε διάφορες μορφές πχ. κάψουλες, δισκία και υγρά διαλύματα ή ενσωματώνονται σε διάφορες τροφές όπως σνακ, ζυμαρικά, σοκολάτες, τσίγλες κλπ. (Spolaore *et al.* 2006b). **(Εικόνα 17)**



Εικόνα 17: Παραγωγή βιομάζας και εφαρμογές της, Πηγή: Yaakob *et al.*, 2021

4. ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΙΑΘΕΣΙΜΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΠΟ ΤΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

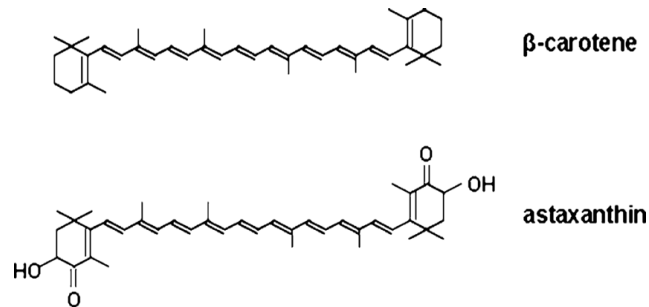
4.1.1 β-καροτένιο

Το β-καροτένιο αποτελεί την πρόδρομο της βιοσύνθεσης της βιταμίνης Α. Η χρήση του γίνεται με την προσθήκη ως φυσική χρωστική ουσία στα τρόφιμα και ως διατροφικό συστατικό. Στα οφέλη του είναι κυρίως οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Το β-καροτένιο είναι μία ουσία μη πολική, λιπόφιλη και αδιάλυτη στο νερό, στα οξέα και στα αλκάλια. Καθίσταται διαλυτό σε ουσίες όπως το βενζόλιο, το χλωροφόρμιο και στα διθειανθρακικά. Η μέγιστη παραγωγή β-καροτενίου σε παγκόσμια κλίμακα οφείλεται στο αλκαλόφιλο είδος *Dunaliella salina*. Η συνολική αξία της παγκόσμιας παραγωγής φτάνει τα 334 εκατομμύρια δολάρια ενώ το μεγαλύτερο μερίδιο της αγοράς κατέχει η Κίνα, το Ισραήλ, η Ινδία και η Αυστραλία (Dixon and Wilken 2018).

4.1.2 Ασταξανθίνη

Μεγάλης εμπορικής σημασίας είναι η ασταξανθίνη (**Εικόνα 18**) η οποία είναι ένα καροτενοειδές που χρησιμοποιείται ως φυσική χρωστική και ως αντιοξειδωτικό. Σε παγκόσμιο επίπεδο η αγορά προβλέπεται να ξεπεράσει τα 1.1 δισεκατομμύρια δολάρια καθώς έχει μεγάλη χρήση στην ιατροφαρμακευτική κοινότητα για τη θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων, του μελανώματος καθώς και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Όπως και το β-καροτένιο, η ασταξανθίνη είναι μια ουσία πολική, λιπόφιλη και διαλυτή σε χλωροφόρμιο, ακετόνη, οξικό οξύ και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Πολλά είδη μικροφυκών έχουν παρατηρηθεί ότι συσσωρεύουν ασταξανθίνη, μεταξύ των οποίων και διάφορα είδη του γένους *Chlorella*. Ωστόσο, το *Haematococcus pluvialis* θεωρείται το κυρίαρχο στέλεχος για την εμπορική παραγωγή ασταξανθίνης, και καλλιεργείται σε συστήματα (photobioreactor) PBR ή υβριδικών PBR εσωτερικών και εξωτερικών χώρων για τον έλεγχο των μολύνσεων (Dixon and Wilken 2018). Στα κύτταρά του *H. pluvialis*, συσσωρεύεται η υψηλότερη ποσότητα ασταξανθίνης, η οποία αποτελεί το 90% όλων των καροτενοειδών του και μπορεί να φτάσει στο 7% επί ξηρής βιομάζας (Rammuni *et al.* 2019). Η τεχνητή σύνθεση ασταξανθίνης γίνεται με τη χρήση πετροχημικών πρώτων υλών, πράγμα που την καθιστά απαγορευτική από τον FDA για ανθρώπινη

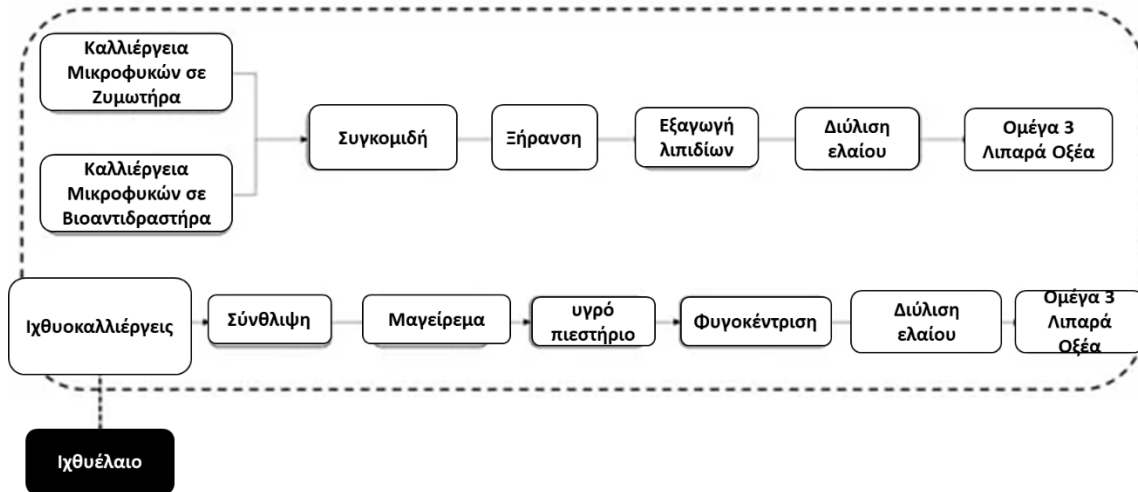
κατανάλωση. Αυτό καθιστά αναγκαία την αναζήτηση φυσικών πηγών, καθώς υπάρχει αύξηση στην αγοραστική ζήτηση για ασταξανθίνη, όπως και για το β-καροτένιο. Τα μικροφύκη *H. pluvialis* και *D. salina* θεωρούνται τα δυναμικότερα στελέχη ως προς την παραγωγή καροτενοειδών (Rammuni *et al.* 2019).



Εικόνα 18: Χημική δομή β-καροτενίου και ασταξανθίνης, Πηγή: Campo *et al.*, 2000

4.1.3 Εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA)

Το εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA) ανήκει στα ωμέγα-3 λιπαρά και έχει αποδειχθεί ότι είναι ευεργετικό για την υγεία του ανθρώπου. Το 2016, η παγκόσμια αγορά των ωμέγα-3 λιπαρών ανήλθε στα 34.7 δισεκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ. Η κύρια πηγή του EPA είναι κυρίως τα ιχθυέλαια, ενώ αναφορικά με τα μικροφύκη, τα είδη του γένους *Nannochloropsis* αποτελούν πολλά υποσχόμενοι εναλλακτικοί παραγωγοί, καθώς μπορούν να παράγουν EPA σε επίπεδα 1.1-12% επί ξηρού βάρους βιομάζας, ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας. Σε εμπορική κλίμακα, τα *Nannochloropsis sp.* καλλιεργούνται σε αυτότροφα συστήματα, χρησιμοποιώντας φυσικό φως και CO₂ σε βιομηχανικές μονάδες. Επίσης, σε πιλοτικό ή μικρής έκτασης μονάδες, μπορούν να καλλιεργηθούν και ετερότροφα ή μικτοτροφικά (Dixon and Wilken 2018). **(Εικόνα 19)**

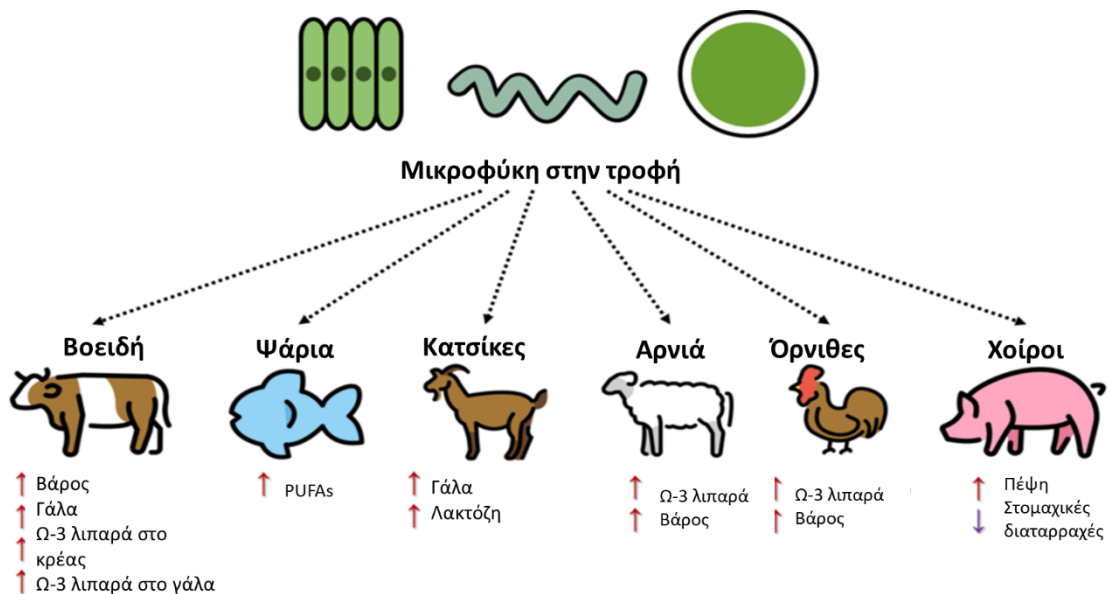


Εικόνα 19: Επισκόπηση της παραγωγής Ω-3 ελαίων από μικροφύκη και εκτρεφόμενα ψάρια.

4.1.4 Ζωοτροφές

Η χρήση των μικροφυκών στην κτηνοτροφία αλλά και στην ιχθυοτροφία έχει διαδοθεί ευρέως τα τελευταία χρόνια. Το γένος *Arthrospira* χρησιμοποιείται κυρίως διότι έχει ευεργετική δράση στη φυσιολογία των ζώων αλλά και των ψαριών. Η χρήση τους είναι διαδεδομένη και στην πτηνοτροφία ως αλλά όχι για μεγάλα χρονικά διαστήματα και ούτε σε αυξημένες συγκεντρώσεις γιατί παρουσιάζονται παρενέργειες ως προς το χρώμα του δέρματος των πτηνών και του κρόκου των αυγών.

Οι κυριότεροι παραγωγοί είναι οι Ηνωμένες Πολιτείες, η Κίνα, η Ινδία και η Χιλή όπου οι ποσότητες παραγωγής αγγίζουν τους 5000 τόνους ετησίως. Η παραγωγή *Spirulina* αποτελεί το 50% της παγκόσμιας παραγωγής φυκών και κυρίως χρησιμοποιείται για την παραγωγή συμπληρωμάτων ζωοτροφών. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς της σε πρωτεΐνες (60-70% επί ξηρού βάρους), βιταμίνες και ανόργανα άλατα. Η καλλιέργεια της *Spirulina* γίνεται σε αλκαλικά περιβάλλοντα με υψηλή αλατότητα. Αφού συγκομιστεί η βιομάζα, υποβάλλεται σε επεξεργασία για να ενταχθεί σε σκευάσματα ζωοτροφών, και αξιοποιείται κυρίως για εμπορικούς σκοπούς. Η *Spirulina* προσφέρει μια πολύτιμη πηγή θρεπτικών ουσιών και αποτελεί σημαντικό στοιχείο στην βιομηχανία των ζωοτροφών (Dixon and Wilken 2018). (Εικόνα 20)



Εικόνα 20: Μικροφύκη που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση των ζωοτροφών και η επίδρασή τους στη διατροφή διαφορετικών ζώων, Πηγή: Amorim *et al.*, 2020

4.1.5 Καλλυντικά

Η χρήση των μικροφυκών είναι ευρέως διαδεδομένη στην βιομηχανία καλλυντικών για την παρασκευή καλλυντικών. Η παρασκευή τους γίνεται κυρίως από εκχυλίσματα βιομάζας των μικροφυκών που ανήκουν στα γένη *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella* και *Nannochloropsis*. Στην κοσμετολογία το ενδιαφέρον εστιάζεται στα καροτενοειδή (ασταξανθίνη, β-καροτένιο και λουτεΐνη) τα οποία προστίθενται σε αντηλιακά προϊόντα καθώς προστατεύουν το ανθρώπινο δέρμα από τον υπερ-χρωματισμό και το φιλτράρισμα και την βλαβερή υπεριώδης ακτινοβολία. Αντίστοιχα χρησιμοποιούνται πολυσακχαρίτες που προέρχονται από τα πράσινα μικροφύκη λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης τους (Dixon and Wilken 2018).

Τα μικροφύκη από τα οποία παράγονται εκχυλίσματα είναι: **(Εικόνα 21)**

- ***Arthrospira*:** το εκχύλισμα του είναι πλούσιο σε πρωτεΐνη (Protulines), χρησιμοποιείται ως παράγοντας αντιγήρανσης και παρασκευάζεται από την εταιρεία Exsymol S.A.M.. Monaco (Μόναχο).

- ***Chlorella vulgaris***: το εκχύλισμα πολυσακχαριτών που παράγεται (*Dermochlorella*) διεγείρει την παραγωγή κολλαγόνου στο δέρμα, την αναγέννηση των ιστών και συμβάλλει στη μείωση του σχηματισμού ρυτίδων. Χρησιμοποιείται από την γαλλική εταιρεία καλλυντικών Codif (Γαλλία).
- ***Nannochloropsis oculata***: Το καινοτόμο προϊόν Repha-Tight που χρησιμοποιήθηκε ως αντιοξειδωτικό και παρουσίασε εξαιρετικές επιδερμικές ιδιότητες. Η χρήση του γίνεται από την εταιρεία Pentapharm (Βασιλεία., Ελβετία).
- ***Dunaliella salina***: Το προϊόν Repha-Ctive. η ιδιότητα του είναι ότι προάγει σημαντικά την ανάπτυξη των κυττάρων και ενισχύει τον ενεργειακό μεταβολισμό του δέρματος και κυκλοφόρησε από την ίδια εταιρία Pentapharm. (Rizwan et al. 2018)



Εικόνα 21: Δυνατότητα χρήσης των μικροφυκών για την παραγωγή φυσικών καλλυντικών, Πηγή: Yarkent et al., 2020

4.2 Νέες καινοτομίες στη βιομηχανία παραγωγής προϊόντων

Η ευρεία χρήση των μικροφυκών και οι συνεχείς έρευνες για την αξιοποίηση τους έχει οδηγήσει στην δημιουργία νέων καινοτόμων προϊόντων και νέες ευκαιρίες αξιοποίησης τους. Οι ερευνητικές δραστηριότητες τα τελευταία χρόνια έχουν εστιάσει στην ανάπτυξη μεθόδων βιοσύνθεσης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και παραγωγής βιοπολυμερών.

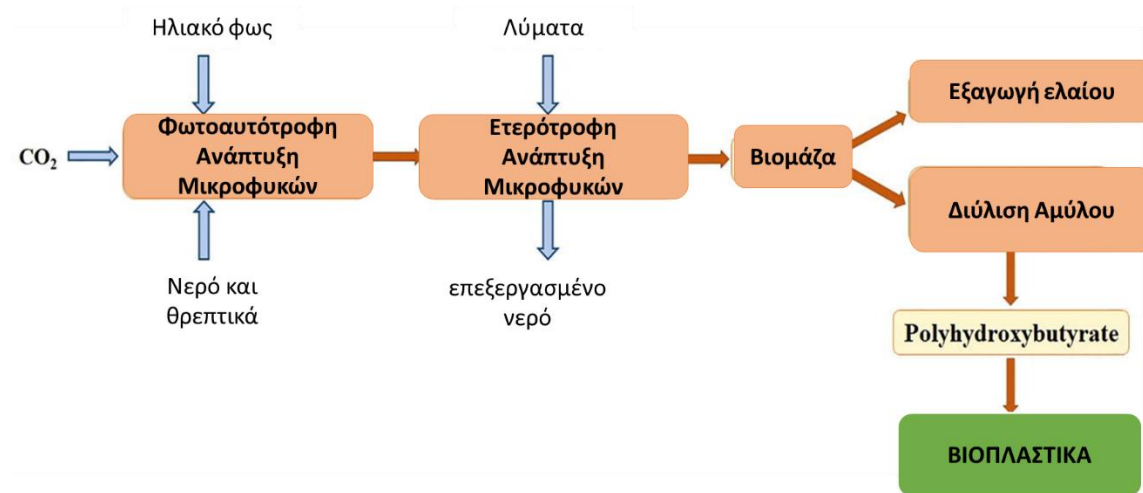
4.2.2 Βιοπλαστικά και βιοπολυμερή

Ως βιοπλαστικά ορίζονται βιοδιασπώμενα πλαστικά που προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές και προβλέπεται ότι θα κατακτήσουν την αγορά τα επόμενα χρόνια. Η δημιουργία τους προέρχεται από την συγχώνευση βιομάζας μικροοργανισμών και πολυμερών συνδυαστικά με άλλα πρόσθετα ώστε να προσδώσουν την τελική τους μορφή. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η αναφορά γίνεται για τα μικροφύκη. Η χρήση τους αφορά στη βιομηχανία πλαστικών και κατατάσσονται ως υβριδικά πλαστικά, πλαστικά με βάση την κυτταρίνη, βιοπολυαιθυλένιο και πολυγαλακτικό οξύ. Τα γένη μικροφυκών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοπλαστικών είναι η *Spirulina* και η *Chlorella* λόγω της υψηλής παραγωγής πρωτεϊνών και του μικρού μεγέθους κυττάρων τους που επιτρέπει τη βιομετατροπή τους χωρίς προκατεργασία. Η βιομετατροπή γίνεται μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει μετουσίωση, συγχώνευση βιομάζας μικροφυκών, πλαστικοποίηση, ανάμειξη και σύνθεση. Σε σχέση με τα βιοπλαστικά που προέρχονται από άλλες πρώτες ύλες όπως σόγια, χρειάζονται πιο απλές διεργασίες για τη βιομετατροπή τους. Κύριος στόχος των μελλοντικών ερευνών είναι η βελτίωση των λειτουργικών ιδιοτήτων των μικροφυκών και η απομάκρυνση πτητικών ουσιών που προσδίδουν έντονη οσμή (Dixon and Wilken, 2018).

Η παγκόσμια αγορά βιοπλαστικών παρουσιάζει σταδιακά μεγάλη άνοδο. Πρωταγωνιστικό ρόλο στα βιοδιασπώμενα πολυμερή κατέχει το πολυγαλακτικό οξύ (PLA). Οι ιδιότητες του είναι παρόμοιες με συμβατικά πολυμερή που προέρχονται από ορυκτά καύσιμα όπως το πολυεστυρένιο και το πολυπροπυλένιο με αποτέλεσμα να βρίσκει εφαρμογή σε ένα τεράστιο εύρος προϊόντων. (Bussa *et al.* 2019).

Μία άλλη πηγή για την παραγωγή βιοπλαστικών αποτελεί το άμυλο καθώς λόγω αφθονίας συνδυάζει το πλεονέκτημα του χαμηλού κόστους και της βιοαποικοδόμησης με αποτέλεσμα την παραγωγή του θερμοπλαστικού (TPS) (βιοπολυμερές παρασκευασμένο από φυσικό άμυλο), σε αντίθεση με τα πλαστικά που παράγονται από ορυκτά καύσιμα. Οι μέχρι τώρα έρευνες έχουν δείξει ότι τα μικροφύκη λόγω της μεγάλης προσαρμοστικότητας τους σε διάφορα περιβάλλοντα και ειδικότερα σε συνθήκες στρες έχουν την ιδιότητα να συσσωρεύουν βιοπολυμερή, ιδιαίτερα άμυλο και άλλους πολυσακχαρίτες. Έρευνες έχουν δείξει ότι το στρες όταν προκαλείται από συνθήκες τροφοπενίας βασικών στοιχείων όπως φώσφορο, άζωτο και θείο επάγεται η συσσώρευση και την αποθήκευση βιοπολυμερών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι στρατηγικής

σημασίας καθώς οι παραγόμενοι πολυσακχαρίτες εκτός από την χρήση τους για την παραγωγή βιοπλαστικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως υπόστρωμα για την παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω ζύμωσης (Mathiot *et al.*, 2019) (Εικόνα 22)



Εικόνα 22: Παραγωγή βιοπλαστικών από μικροφύκη, Πηγή: Rajroot *et al.*, 2022

5. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

5.1 Παράγοντες που Επηρεάζουν την Ανάπτυξη

Τα μικροφύκη είναι μικροοργανισμοί με τεράστιο εύρος ανάπτυξης και μπορούν να μεγαλώσουν σε ποικίλα περιβάλλοντα. Η ανάπτυξη τους επηρεάζεται από ποικιλία βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη είναι: η θερμοκρασία, ο φωτισμός, το θρεπτικό υπόστρωμα, το pH, η αλατότητα, η συγκέντρωση του διαλυτοποιημένου O₂ και η ανάδευση (Markou *et al.*, 2013).

5.1.1 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Η πλειοψηφία των ειδών αναπτύσσεται σε εύρος θερμοκρασιών 20-30 °C, βέβαια έχει παρατηρηθεί και ανάπτυξη σε θερμοκρασίες μικρότερες των 15 °C αλλά με πολύ αργούς ρυθμούς ανάπτυξης. Αντίστοιχα θερμοκρασίες υψηλότερες των 30 °C οδηγούν σε θάνατο, με εξαίρεση τα θερμοφιλά είδη τα οποία ευδοκιμούν σε θερμοκρασίες 40-42 °C (Markou *et al.*, 2013). Σε εξωτερικά συστήματα καλλιέργειας η αλλαγή της θερμοκρασίας στο πέρας της ημέρας (εναλλαγή θερμοκρασίας ημέρας-νύχτας) έχει αρνητική επίδραση στην παραγωγικότητα της βιομάζας. Μάλιστα η συνεχής έκθεση σε μη ιδανική θερμοκρασία μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη δομή του κυττάρου και να επηρεάσει τη δυναμική του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Teoh *et al.*, 2004)

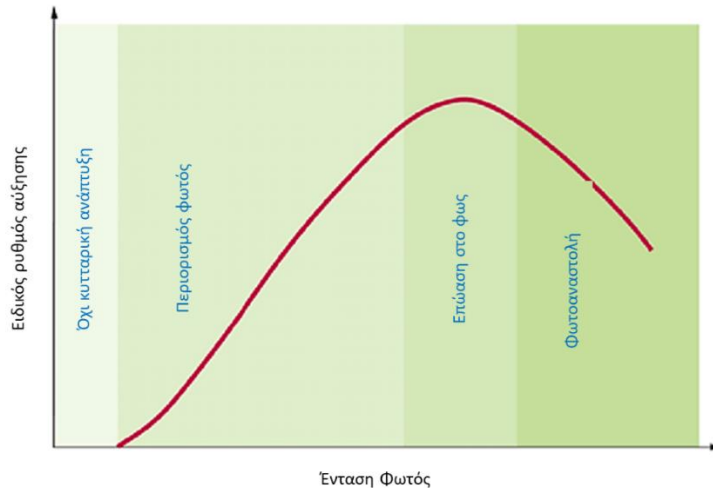
Ύστερα από μακροχρόνιες έρευνες έχει διαπιστωθεί ότι η καλλιέργεια των μικροφυκών σε υψηλή θερμοκρασία οδηγεί σε σημαντική μείωση της βιοσύνθεσης πρωτεϊνών ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται η βιοσύνθεση των λιπιδίων και των υδατανθράκων (Oliveira *et al.*, 1999). Η θερμοκρασία επιδρά και στα είδη των λιπαρών οξέων που παράγονται στα κύτταρα των μικροφυκών (Ackman *et al.*, 1968) Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες αυξάνεται η αναλογία ακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά οξέα (Oliveira *et al.*, 1999) Αντίστοιχα επηρεάζεται και ο όγκος των κυττάρων καθώς σε υψηλότερες θερμοκρασίες ο όγκος των κυττάρων μειώνεται. Το κάθε είδος μικροφυκών παρουσιάζει διαφορετική χημική απόκριση σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Renaud *et al.*, 2002). Συνεργιστικά με τη θερμοκρασία λειτουργεί και ο φωτισμός καθώς πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες μειώνεται το σημείο έντασης του φωτισμού και δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη ενώ μπορεί να

προκαλέσει και φωτοοξειδωση. Φαίνεται λοιπόν ότι σε ψυχρές περιοχές ή περιόδους του έτους παρατηρείται εντονότερο και συχνότερο το φαινόμενο της φωτοοξειδωσης (Carvalho *et al.*, 2011; Richmond 2004)

5.1.2 Φωτισμός

Η φωτοπερίοδος, η ποιότητα και η ένταση του φωτός αποτελούν πολύ σημαντική παράμετρο για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Η βέλτιστη ανάπτυξη προϋποθέτει την κατάλληλη επιλογή της έντασης και της φωτοπεριόδου. Ανάλογα το είδος των μικροφυκών διαφέρουν οι συγκεντρώσεις και οι αναλογίες των χρωστικών ουσιών που παράγονται μέσω της φωτοσύνθεσης (χλωροφύλλη a, b, c, d, καροτένιο και φυκοκυανίνη). Επομένως φαίνεται το κάθε είδος αξιοποιεί διαφορετικά το κάθε μήκος κύματος. Η ενεργή φωτοσυνθετική ακτινοβολία photosynthetically active radiation (PAR) την οποία μπορούν να αξιοποιήσουν τα μικροφύκη για την κάλυψη των φωτοσυνθετικών τους αναγκών κυμαίνεται μεταξύ 400-700 nm και ανάλογα το είδος των μικροφυκών. Ανάλογα λοιπόν το είδος μικροφύκους γίνεται η επιλογή του αντίστοιχου μήκους κύματος.(Razzak *et al.* 2013)

Η φωτοπερίοδος επηρεάζει έντονα την ανάπτυξη, (κύκλοι φωτός και σκότους). Στα εξωτερικά συστήματα καλλιέργειας όπως και στα φυσικά ενδιαιτήματα το φυσικό φως μεταβάλλεται ανάλογα την ώρα της ημέρας, τις καιρικές συνθήκες, την εποχή και τη γεωγραφία. Στα εξωτερικά συστήματα καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρες που λειτουργούν με φυσικό φως έχει παρατηρηθεί ότι κατά τη διάρκεια της νύχτας η παραγωγή βιομάζας σε έλλειψη φωτός μειώνεται έως και 25%. Για την αντιμετώπιση του φαινομένου αυτού γίνεται χρήση συμπληρωματικής ή κύριας πηγής φωτός ή χρήση διόδων εκπομπής φωτός (LED – Light-emitting diodes). Ο τεχνητός φωτισμός παρέχει σταθερές και ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού, ως εκ τούτου συνίσταται η χρήση του σε βιομηχανική κλίμακα όταν θέλουν να επιτευχθεί η μέγιστη παραγωγικότητα και η διατήρηση σταθερών συνθηκών κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Η χρήση λαμπτήρων LED νέας τεχνολογίας βοηθά αντίστοιχα και στη μείωση του ενεργειακού κόστους καθώς προσφέρουν υψηλή απόδοση και εμφανίζουν μικρή κατανάλωση ενέργειας (Wang *et al.*, 2007; Chen *et al.* 2011). Σε σχέση με τα φυσικά συστήματα το λειτουργικό κόστος της χρήσης λαμπτήρων LED είναι αυξημένο αλλά αντισταθμίζεται από την υψηλή παραγωγικότητα (Ho *et al.* 2013; Razzak *et al.* 2013). **(Εικόνα 23)**



Εικόνα 23: Επίδραση της έντασης του φωτός στην ανάπτυξη μικροφυκών σε αυτότροφη καλλιέργεια (Ogbonna and Tanaka, 2000), Πηγή: Zhang, 2015

5.1.2.1 Χρήση Μονοχρωματικών Πηγών Φωτισμού

Η χρήση των μονοχρωματικών πηγών φωτός γίνεται με σκοπό να διερευνηθεί ο τρόπος με τον οποίο το φως μπορεί να επηρεάσει τις μεταβολικές διαδικασίες των μικροφυκών. Συγκεκριμένα, το φως γίνεται αντιληπτό με διαφορετικό τρόπο από φυτά και αναφέρεται ως φωτοσυνθετικά ενεργή ακτινοβολία (PAR). Η ποσότητα του φωτός που φτάνει σε μια επιφάνεια π.χ. τα φύλλα των φυτών, μετρείται σε PPF (Photosynthetic photon flux density), Το PPF μετρά όλα τα φωτόνια (σωματίδια φωτός) μεταξύ του φάσματος PAR σε $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Δηλαδή σημαίνει ότι το PPF ειδικότερα μετρά το διαθέσιμο φωτοσυνθετικά φως το οποίο επηρεάζει την ανάπτυξη τους. (Pattanaik *et al.*, 2018) **(Εικόνα 24)**

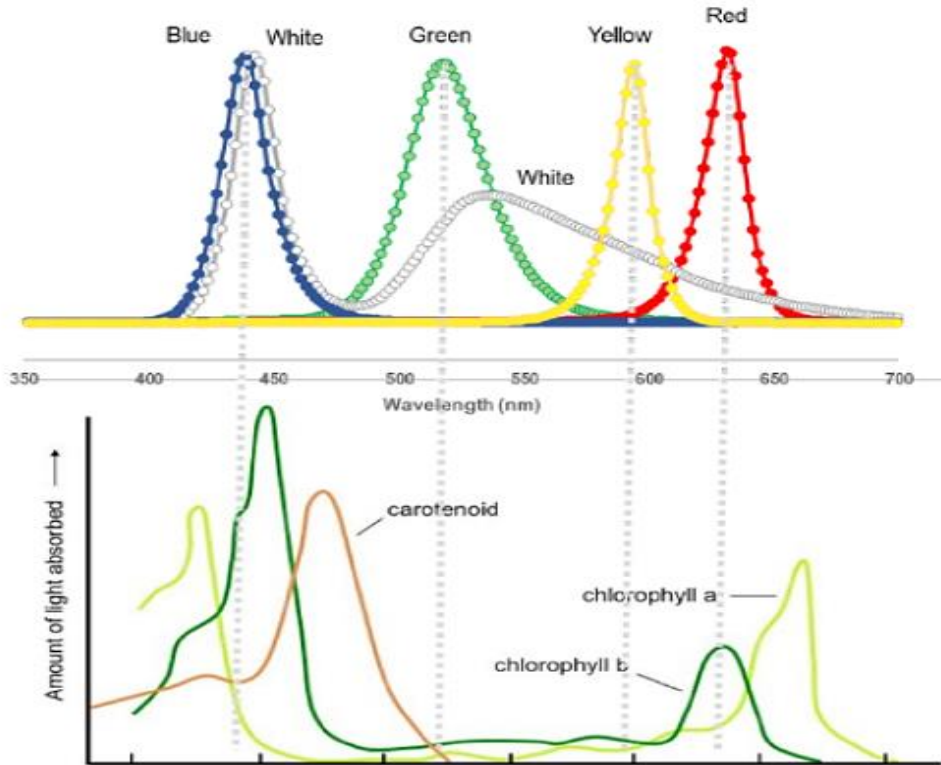
Σύμφωνα με τους Atta *et al.*, 2013 αναφέρεται ότι οι μονοχρωματικές πηγές φωτός (μπλε, πορτοκαλί και κόκκινο φως) επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο την παραγωγή λιπιδίων και διαφοροποιούν το μεταβολισμό τους. Τα οφέλη που προκύπτουν από την χρήση μονοχρωματικών πηγών φωτός είναι:

1. Δυνατότητα καθορισμού συγκεκριμένης ποιότητας φωτός: Οι μονοχρωματικές πηγές φωτός παρέχουν συγκεκριμένα μήκη κύματος που μπορούν να επηρεάσουν διαφορετικές φυσιολογικές διεργασίες στα μικροφύκη. Για παράδειγμα, το μπλε φως είναι γνωστό ότι

ενισχύει τη συσσώρευση λιπιδίων και προάγει την παραγωγικότητα της βιομάζας, ενώ το κόκκινο φως προωθεί τη σύνθεση χλωροφύλλης και την ανάπτυξη της βιομάζας.

2. Αύξηση της συσσώρευσης λιπιδίων: Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκθεση της *Chlorella vulgaris* σε συγκεκριμένα μήκη κύματος φωτός μπορεί να διεγείρει τη συσσώρευση λιπιδίων. Το μπλε φως, συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι ενισχύει την περιεκτικότητα σε λιπίδια στα μικροφύκη, το οποίο επιβεβαιώθηκε και στη συγκεκριμένη διατριβή.
3. Αύξηση της παραγωγής μεταβολιτών: Η ποιότητα του φωτός μπορεί επίσης να επηρεάσει την παραγωγή άλλων πολύτιμων μεταβολιτών στα μικροφύκη. Για παράδειγμα, συγκεκριμένα μήκη κύματος φωτός μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή χρωστικών, αντιοξειδωτικών και άλλων βιοδραστικών ενώσεων. Μέσω της δυνατότητας της επιλογής συγκεκριμένου φάσματος φωτός, είναι δυνατό να ρυθμιστούν οι μεταβολικές οδοί και να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή των επιθυμητών μεταβολιτών.
4. Αύξηση του μεταβολισμού της πηγής άνθρακα σε μικτότροφες καλλιέργειες: Η παρουσία μιας οργανικής πηγής άνθρακα, (μικτοτροφική ανάπτυξη), μπορεί να επηρεάσει το μεταβολισμό του άνθρακα από τα μικροφύκη. Όταν αναπτύσσονται μικτοτροφικά, τα μικροφύκη μπορούν να χρησιμοποιήσουν τόσο το φως όσο και το παρεχόμενο υπόστρωμα άνθρακα (π.χ. γλυκόζη, οξικό άλας ή γλυκερόλη) για αφομοίωση ενέργειας και άνθρακα. Αυτή η διαθεσιμότητα διπλής πηγής άνθρακα μπορεί να επηρεάσει τις μεταβολικές οδούς και ενδεχομένως να ενισχύσει τη σύνθεση λιπιδίων ή μεταβολιτών.

Συνοψίζοντας, η ανάπτυξη των μικροφυκών μικτότροφα με μονοχρωματικές πηγές φωτισμού προσφέρει τη δυνατότητα χειρισμού της ποιότητας φωτός και βελτιστοποίησης των συνθηκών για τη συσσώρευση λιπιδίων και την παραγωγή μεταβολιτών στη μικτότροφη ανάπτυξη επηρεάζεται ο μεταβολισμός του άνθρακα από το διαθέσιμο υπόστρωμα. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα συγκεκριμένα αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το στέλεχος του μικροφύκου, την ένταση και τη διάρκεια του φωτός και τη συγκέντρωση της χρησιμοποιούμενης πηγής οργανικού άνθρακα. (Atta *et al.*, 2013)



Εικόνα 24: Φάσματα των LED που χρησιμοποιούνται για τον φωτισμό των καλλιεργειών του *A. protothecoides* και τη σχετική απορρόφηση των φωτοσυνθετικά ενεργών χρωστικών (χλωροφύλλη α, χλωροφύλλη b και καροτενοειδή), Πηγή: Markou *et al.*, 2021

5.1.3 Θρεπτικό Υπόστρωμα

Η σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανάπτυξη των μικροφυκών αφού από το υπόστρωμα προσλαμβάνει ο μικροοργανισμός τα απαραίτητα θρεπτικά για να αναπτυχθεί και να επιτελέσει τις μεταβολικές του λειτουργίες. Τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία διαχωρίζονται σε μακροστοιχεία όπως ο άνθρακας, ο φώσφορος, το άζωτο και το κάλιο, και σε μικροστοιχεία όπως το μαγνήσιο, το θείο, το ασβέστιο και ο σίδηρος. (Richmond, 2004)

5.1.3.1 Άνθρακας

Κατά την αυτότροφη ανάπτυξη τους τα μικροφύκη, μέσω της φωτοσυνθετικής λειτουργίας προσλαμβάνουν το CO₂ ως υπόλειμμα της αντίδρασης οξείδωσης του νερού και αξιοποιώντας το

ηλιακό φως διασπάται για την παραγωγή ενέργειας ATP. Ορισμένα είδη μικροφυκών αξιοποιούν ταυτόχρονα με το CO₂ και τα ιόντα HCO₃⁻ ενώ άλλα είδη αξιοποιούν αυστηρά μόνο το CO₂ ή τα HCO₃⁻ για την κάλυψη των αναγκών τους σε άνθρακα (Vargas *et al.*, 2005). Η καλλιέργεια αυτότροφων μικροφυκών σε περιβάλλον βιοαντιδραστήρα γίνεται με την έγχυση αερίου CO₂ στο υδατικό διάλυμα ή με προσθήκη ανθρακικών στο υπόστρωμα (Ifrim *et al.*, 2014). Το περισσότερα είδη (εξαιρούνται τα ροδόφυτα) διαθέτουν ειδικούς μηχανισμούς που επιτρέπουν στον διαθέσιμο άνθρακα να συγκεντρώνεται γύρω από το κύτταρο και να απορροφάται στη συνέχεια ως διτανθρακική ρίζα ή ως CO₂ μέσω ενζύμων όπως η ανθρακική ανυδράση (carbon concentrating mechanism) (Giordano *et al.*, 2005). Αντίστοιχα κάποια άλλα είδη μικροφυκών έχουν την ικανότητα να αξιοποιούν τον οργανικό άνθρακα αλλά και ποικιλία οργανικών ουσιών μέσω εξειδικευμένων μηχανισμών. Η απορρόφηση της γλυκόζης και άλλων σακχάρων γίνεται μετά από φωσφορυλίωση. Η γλυκερόλη απορροφάται από το υπόστρωμα μέσω απλής διάχυσης και τα οργανικά οξέα με τη χρήση πρωτεϊνών μεταφορέων των μεμβρανών (Perez-Garcia *et al.*, 2011). Τα ανθρακικά που συνήθως προστίθενται στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας είναι συνήθως το όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO₃) και το ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃) (Ifrim *et al.*, 2014).

(Εικόνα 25)

5.1.3.2 Άζωτο

Το άζωτο αποτελεί απαραίτητο θρεπτικό στοιχείο για την αύξηση της βιομάζας των μικροφυκών. Βρίσκεται σε αφθονία στη φύση μαζί με τον άνθρακα και το οξυγόνο και αντιπροσωπεύει το 7-10% του ξηρού βάρους των κυττάρων ενώ συνιστά βασικό συστατικό όλων των δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών. Παράλληλα συμμετέχει στη σύνθεση σημαντικών μακρομορίων όπως το RNA και το DNA (Hu, 2004). Το άζωτο μπορεί να προσληφθεί από τα κύτταρα είτε σε οργανική είτε σε ανόργανη μορφή με τη μορφή διαφόρων ενώσεων όπως νιτρικά άλατα, νιτρώδη άλατα, ουρία, πεπτόνη, αμμωνιακά άλατα, εκχύλισμα ζύμης κ.α.. Μετά από πολλές μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι τα μικροφύκη αξιοποιούν καλύτερα το άζωτο που βρίσκεται διαθέσιμο σε αμμωνιακή μορφή. (Boussiba *et al.*, 1992; Richmond 2004). Σε βιομηχανική κλίμακα οι καλλιέργειες συνήθως τροφοδοτούνται με νιτρικό νάτριο, κάλιο ή ασβέστιο γιατί οι μεγάλες συγκεντρώσεις αμμωνιακών στο θρεπτικό υπόστρωμα μπορούν να προκαλέσουν

φαινόμενα τοξικότητας και να καταστείλουν την ανάπτυξη των μικροφυκών. Αντίστοιχα τα νιτρικά άλατα έχουν δείξει καλύτερα αποτελέσματα ως προς την παραγωγικότητα (Crofcheck *et al.*, 2012).

Οι βιοχημικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι τα μικροφύκη αξιοποιούν αποτελεσματικά τις διαφορετικές πηγές αζώτου αλλά μέσω διαφορετικών μεταβολικών οδών (Glass *et al.*, 2009). Τα NO_3^- αφομοιώνονται μέσω του ενζύμου της αναγωγής των νιτρικών και νιτρωδών που δρα ως καταλύτης στην αντίδραση της αναγωγής σε αμμωνιακά. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι έχουν γίνει προσπάθειες αντικατάστασης των νιτρικών λόγω υψηλού κόστους με φθηνότερα υλικά σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας προκειμένου να μειωθεί το κόστος παραγωγής. Για παράδειγμα σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας έχει γίνει χρήση ουρίας στο θρεπτικό υπόστρωμα ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) ως οργανική πηγή αζώτου η οποία υδρολύεται προς αμμώνιο (Glass *et al.*, 2009). Κατά αυτόν τον τρόπο η ουρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως πηγή άνθρακα αλλά και ως πηγή αζώτου από τον μικροοργανισμό. Το μειονέκτημα βέβαια της χρήσης της αποτελεί το γεγονός ότι το παραγόμενο αμμωνιακό άζωτο ιδιαίτερα σε αλκαλικά περιβάλλοντα βρίσκεται στην ελεύθερη μορφή (NH_3) και διαφεύγει και χάνεται στην ατμόσφαιρα (Danesi *et al.*, 2002).

Όσον αφορά το μεταβολισμό του αζώτου, συνδέεται με το μεταβολισμό του άνθρακα ενώ το ένζυμο που καταλύει τη σύνθεση αζωτούχων είναι η συνθάση της γλουταμίνης (Enamala *et al.*, 2018).

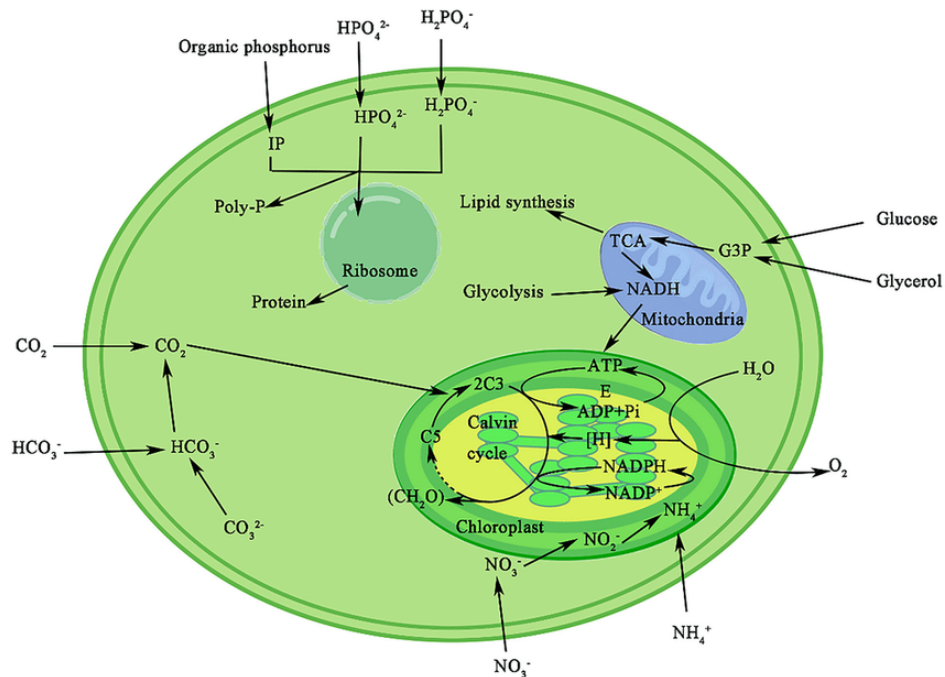
Γενικότερα σε συνθήκες επάρκειας αζώτου στο υπόστρωμα τα μικροφύκη έχουν παρουσιάσει μειωμένη ικανότητα παραγωγής συστατικών συσσώρευσης αζώτου, πλην των κυανοβακτηρίων που διαθέτουν φυκοκυανίνη (ουσία που συμβάλλει στην αποθήκευση του αζώτου) (Liotenberg *et al.*, 1996). Σε συνθήκες τροφοπενίας αζώτου έχει παρατηρηθεί ότι λαμβάνει χώρα η ενεργή και ειδική αποικοδόμηση των φυκοβιλοσωμάτων (σύμπλοκα) (Collier and Grossman 1992). Η φωτοσύνθεση συνεχίζει να εκτελείται με μειωμένους ρυθμούς έως ότου η συγκέντρωση του αζώτου πέσει κάτω από ένα συγκεκριμένο όριο. Στις συνθήκες αυτές ο άνθρακας δεσμεύεται μέσω της φωτοσύνθεσης και εκτρέπεται από την πρωτεϊνική σύνθεση στα μεταβολικά μονοπάτια για τη βιοσύνθεση λιπιδίων (Li *et al.*, 2003). Έχει αποδειχθεί ότι σε συνθήκες στρες κατά την τροφοπενία αζώτου τα κύτταρα τείνουν να βιοσυνθέτουν και να συσσωρεύουν ουδέτερα λιπίδια με τη μορφή τριακυγλυκερολών σε αντίθεση με τις συνθήκες επάρκειας αζώτου που τείνουν να συσσωρεύουν πολικά λιπίδια (Li *et al.*, 2003; Hu, 2004;

Thompson, 1996). Αντιστοίχως κάποια στελέχη έχει παρατηρηθεί ότι σε συνθήκες στρες τείνουν να συσσωρεύουν υδατάνθρακες και όχι λιπίδια (Borowitzka, 1988). Ενώ εννοείται η συσσώρευση δευτερογενών καροτενοειδών και η μείωση των επιπέδων χλωροφύλλης στα κύτταρα (Park *et al.*, 2013). (Εικόνα 25)

5.1.3.3 Φώσφορος

Ο φώσφορος είναι πολύ σημαντικός για την ανάπτυξη των μικροφυκών γιατί συμμετέχει στο σχηματισμό μακρομορίων όπως το αδενοσινωτριφωσφορικό οξύ (ATP) προς παραγωγή ενέργειας και φωσφολιπιδίων (Markou *et al.*, 2013). Η χορήγηση στο θρεπτικό μέσο γίνεται με τη μορφή φωσφορικού καλίου, δισόξινων φωσφορικών αλάτων ή φωσφορικού δινατρίου που λειτουργούν και ως ρυθμιστικοί παράγοντες του του pH (Crofcheck *et al.*, 2012) Σε συνθήκες ετερότροφης ανάπτυξης που το φως αποτελεί περιοριστικό παράγοντα ανάπτυξης όταν στο θρεπτικό μέσο υπάρχει επάρκεια θρεπτικών στοιχείων. τα μικροφύκη παρουσιάζουν σταθερότητα στην συσσώρευση φωσφόρου στα κύτταρα τους του οποίου η συγκέντρωση ανέρχεται στο 1% του ξηρού βάρους τους (Goldman *et al.*, 1980). Σε συνθήκες τροφοπενίας φωσφόρου έχουν παρατηρηθεί φαινόμενα που είναι αντίστοιχα με τις συνθήκες τροφοπενίας αζώτου, συγκεκριμένα η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη α τείνει να μειωθεί ενώ η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες αυξάνεται (Healey, 1982). Έρευνες έχουν δείξει ότι σε συνθήκες πλήρης τροφοπενίας αζώτου και φωσφόρου έχουν θετική επίδραση στη συσσώρευση β-καροτενίου στο γένος *Dunaliella* (Avron and Ben-Amotz 1992) και ασταξανθίνης στο γένος *Haematococcus* (Boussiba *et al.*, 1992). Παράλληλα η έλλειψη φωσφόρου έχει συνδυαστεί με τη συσσώρευση λιπιδίων στα κύτταρα και τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων. Η μείωση της συγκέντρωσης φωσφορικών από 175 έως 0 μM (K_2HPO_4) προκαλεί σημαντική μείωση των φωσφολιπιδίων, της μονογαλακτοσυλδιασυλογλυκερόλης (MGDG), καθώς και του εισοσαπεντανοϊκού οξέος, ενώ τα ουδέτερα (τριακυγλυκερόλες), και πολικά λιπίδια (διγαλακτοσυλ-διασυλογλυκερόλες, DGDG και διακυλογλυκεροτριμεθυλο-ομοσερίνες, DGTS) παρουσιάζουν έντονη αύξηση στο γένος *Monodus sp.* (Khozingoldberg and Cohen 2006). Η πρόσληψη γίνεται με τη μορφή ορθοφωσφορικής ρίζας (PO_4^{3-}). Η διαλυτότητα επηρεάζεται έντονα από την παρουσία ιόντων (Mg^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) και κυρίως από το ιόν του ασβεστίου (Ca^{2+}) με το οποίο ο φώσφορος σχηματίζει

το σχεδόν αδιάλυτο σύμπλοκο υδροξυαπατίτη ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Η διαλυτότητα του του φωσφόρου επιτελείται μέσω μικροβιακής δραστηριότητας. Όταν βρίσκεται σε οργανική μορφή η βιομετατροπή του σε ορθοφωσφορική ρίζα γίνεται μέσω ενζύμων τις φωσφατάσες. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ορθοφωσφορικού φωσφόρου απαντώνται υψηλότερες συγκεντρώσεις φωσφατασών. Έτσι σε συνθήκες τροφοπενίας έχει παρατηρηθεί η βιοσυσσώρευση του φωσφόρου σε μεγαλύτερες ποσότητες από τις αναγκαίες. Η αποθήκευση γίνεται υπό μορφή πολυφωσφορικών κόκκων και μπορεί καλύψει τις ανάγκες δύο ή ακόμα και τριών κύκλων διαίρεσης (Markou *et al.*, 2013).



Εικόνα 25: Μεταβολισμός άνθρακα, αζώτου και φωσφόρου στο κύτταρο μικροφύκους Πηγή: Wang *et al.*, 2022

5.1.3.5 Αλατότητα

Η αλατότητα και συγκεκριμένα η συγκέντρωση του NaCl επιδρά στις μεταβολικές διεργασίες της κυτταρικής αναπνοής, του φωτοσυνθετικού ρυθμού, του ωσμωτικού δυναμικού των μεμβρανών και της κατανομής των θρεπτικών στοιχείων (Sudhir and Murthy, 2004). Έρευνες έχουν υποστηρίξει ότι η αύξηση της αλατότητας στο υπόστρωμα μπορεί να οδηγήσει σε μια ελαφρά αύξηση της βιοσύνθεσης λιπιδίων (Hu 2004; Avron and Ben-Amotz 1992). Ορισμένα

αλκαλόφιλα είδη όπως η *D. salina* αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας. Άλλα γένη όπως τα *Chlorella*, *Arthrospira*, *Porphyridium*, παρουσιάζουν ανεκτικότητα σε μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων χωρίς να αποτελεί προϋπόθεση για την ομαλή ανάπτυξη τους. Η φυσιολογική συγκέντρωση των αλάτων για τα είδη αυτά κυμαίνεται μεταξύ 20-24 g/L. Αν και η βέλτιστη τιμή διαφέρει ανά είδος (Markou *et al.*, 2013). Αντίστοιχα υπάρχουν και στελέχη που παρουσιάζουν μηδενική ανοχή στην αλατότητα και στο υπόστρωμα δεν πρέπει να ξεπερνούν τα 4 g/L. Εξαιρεση αποτελεί το είδος *Stichococcus bacillaris* που αναπτύσσεται τόσο σε περιβάλλον γλυκού όσο και θαλασσινού νερού, πράγμα που το καθιστά ιδιαίτερα σημαντικό ως προς την καλλιέργεια του με χρήση πηγών νερού που θεωρούνται ακατάλληλες για ανθρώπινη και γεωργική χρήση (Bardone *et al.*, 2012).

Συνοψίζοντας η αλατότητα έχει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των μικροφυκών καθώς διαφορετικά είδη έχουν διαφορετική προσαρμοστικότητα και ανοχή στην αλατότητα. Όπως είναι φυσικό τα θαλάσσια είδη μικροφυκών έχουν μεγαλύτερη ανοχή σε υψηλότερες συνθήκες αλατότητας όπως είναι φυσικό σε σύγκριση με τα μικροφύκη των οικοσυστημάτων γλυκού νερού. Σε συνθήκες αν επάρκειας αλατότητας σε σχέση με τις απαιτούμενες τιμές, υπάρχει δυνατότητα προσθήκης NaCl και Na₂SO₄ με στόχο την βελτιστοποίηση της ανάπτυξης. Ωστόσο σε αντίθετη περίπτωση η υψηλή αλατότητα (> 6 g/L) σε μη ανεκτικά είδη μπορεί να επιδράσει δυσμενώς στην ανάπτυξη τους.

5.3.1.6 pH

Η ιδανική τιμή pH ανάπτυξης των μικροφυκών κυμαίνονται μεταξύ 7 και 9. Υπάρχουν φυσικά είδη οξύφιλα όπως το *Chlamydomonas acidophila* και αλκαλόφιλα όπως το *Arthrospira*. Σε αλκαλικές συνθήκες ευνοείται η δέσμευση του ατμοσφαιρικού CO₂ και ως αποτέλεσμα είναι η αύξηση της βιομάζας των μικροφυκών. Αντίθετα σε όξινα περιβάλλοντα η δέσμευση του ατμοσφαιρικού CO₂ δεν ευνοείται (όταν το pH είναι <5). Η απότομη αλλαγή στο pH μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες στην ανάπτυξη των μικροφυκών καθώς επηρεάζει την περατότητα των μεμβρανών των κυττάρων και την μορφή των ανόργανων αλάτων και τις αντιδράσεις μεταξύ τους. Ο τακτικός έλεγχος του pH είναι επιβεβλημένος στα καλλιεργητικά συστήματα και επιτυγχάνεται με την έγχυση αερίου CO₂ εντός του αντιδραστήρα. Η αλλαγή του pH στην

καλλιέργεια δημιουργείται λόγω της αλκαλίωσης που προκύπτει από την φωτοσύνθεση και τη δέσμευση του CO₂. Αντίστοιχα αλλαγή προκύπτει και λόγω οξείδωσης από την απελευθέρωση CO₂ μέσω της κυτταρικής αναπνοής σε ετερότροφα σύστημα με πλήρη απουσία φωτός. Σε ακραία αλκαλικά pH πάνω από το όριο μπορεί να προκληθεί κυτταρόλυση ενώ στην αντίθετη περίπτωση όταν χρησιμοποιείται στο υπόστρωμα NH₃ ως πηγή αζώτου, κατά την πρόληψη τους από τα μικροφύκη απελευθερώνονται ιόντα H⁺, που προκαλούν οξίνιση στο μέσο. Σε αλκαλικά pH αντίστοιχα ευνοείται η καθίζηση και στερεοποίηση του φωσφόρου με συνέπεια την καλή ανάπτυξη των μικροφυκών (Borowitzka and Borowitzka 1988; Richmond 2004). Τα ιόντα αμμωνίου που υπάρχουν στο υπόστρωμα (NH₄⁺) του θρεπτικού μέσου, τα οποία βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία με τη μοριακή αμμωνία (NH₃) τείνουν να επηρεάζουν τις τιμές του pH. Η αναλογία τους εξαρτάται από το pH, και η αμμωνία επικρατεί σε διαλύματα με pH μεγαλύτερο του 9.3. Η αμμωνία επίσης δρα παρεμβατικά στα ιόντα HCO₃⁻ του διαλύματος και σχηματίζει καρβαμικό (NH₂COO⁻). Το σύνολο των συγκεντρώσεων NH₃, NH₄⁺, και NH₂COO⁻ ονομάζεται συνολικό ανόργανο άζωτο (Total Inorganic Nitrogen – TIN) (Ifrim *et al.* 2014).

5.3.1.7 Συγκέντρωση Διαλυμένου O₂

Η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στο υπόστρωμα αποτελεί καθοριστικό παράγοντα ανάπτυξης και βιωσιμότητας του μικροφύκους στο καλλιεργητικό σύστημα. Η παροχή του οξυγόνου στην καλλιέργεια συνήθως γίνεται με αντλία παροχής ατμοσφαιρικού αέρα παράλληλα με την φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου από τα κύτταρα. Η πρώτη παράμετρος θεωρείται σταθερή, ενώ πιθανή αύξηση της παραγωγής οξυγόνου στα καλλιεργητικά συστήματα μπορεί να παρατηρηθεί από την αύξηση του φωτοσυνθετικού ρυθμού. Αντίστοιχα η εξαιρετικά υψηλή συγκέντρωση του οξυγόνου στο υπόστρωμα μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα όπως η διάχυση της ενέργειας του φωτός μέσω της φωτοαναπνοής, η αναστολή των ενζύμων των φωτοσυνθετικών οδών και η πρόκληση βλάβης στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό και στις δομές των μεμβρανών του DNA καθώς και σε άλλα κυτταρικά συστατικά (Santabarbara *et al.*, 2007; Marquez *et al.*, 1995). Η σοβαρότητα των συνεπειών μιας μη κατάλληλης συγκέντρωσης οξυγόνου επηρεάζεται από τις γενικότερες παραμέτρους που επικρατούν στην καλλιέργεια όπως η ένταση του φωτός, η θερμοκρασία και το pH και μπορεί να προκαλεί από μείωση της

παραγωγικότητας μέχρι κυτταρικό θάνατο. (Sousa *et al.*, 2012; Norsker *et al.*, 2011; Osmond 1981). Η ανοχή στα επίπεδα οξυγόνου στο υπόστρωμα διαφέρει ανάλογα το είδος (Peng *et al.*, 2013).

5.3.1.8 Ανάδευση

Η ανάδευση στα καλλιεργητικά συστήματα είναι βασικός παράγοντας για την βελτιστοποίηση της ανάπτυξης καθώς αποτρέπει την καθίζηση και τη συσσωμάτωση της βιομάζας (Stengel, 1970). Η διατήρηση του εναιωρήματος σε κίνηση επιτρέπει την αποτελεσματικότερη μεταφορά θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου στα μικροφύκη (Schumacher and Whitford, 1965). Μέσω της ανάδευσης διεγείρονται οι μεταβολικές διεργασίες των μικροφυκών και απορροφάται καλύτερα το διαθέσιμο φως. Τέλος μέσω της ανάδευσης διευκολύνεται και η απομάκρυνση των κυτταρικών αποβλήτων. Φυσικά η ανάδευση πρέπει να γίνεται εντός ορίων ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος πρόκλησης μηχανικής βλάβης και καταστροφής των κυττάρων.

6. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Οι καλλιέργειες μικροφυκών σε παγκόσμιο επίπεδο ταξινομούνται σε δύο βασικές κατηγορίες όταν αφορούν καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας για βιομηχανική χρήση. Συγκεκριμένα υπάρχουν τα ανοιχτά ή εξωτερικά καλλιεργητικά συστήματα και αντίστοιχα τα διαλείποντος έργου ή εσωτερικά συστήματα. Ο βασικός ρυθμιστικός παράγοντας αύξησης των καλλιεργειών αυτών αποτελεί η πηγή και η ένταση φωτός. Στα ανοιχτά καλλιεργητικά συστήματα η πηγή φωτός είναι ο ήλιος ενώ στα διαλείποντος έργου συστήματα χρησιμοποιούνται τεχνητές πηγές φωτός όπως λαμπτήρες LED και οπτικές ίνες. Στα ανοιχτά καλλιεργητικά συστήματα συνήθως χρησιμοποιούνται ως δεξαμενές φυσικοί ή τεχνητοί περιέκτες, νερόλακκοι, λίμνες κλπ. Αντίστοιχα στα διαλείποντος έργου συστήματα η καλλιέργεια γίνεται σε συστήματα που ονομάζονται φωτοβιοαντιδραστήρες και δεν επιτρέπουν την άμεση επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον με αποτέλεσμα οι καλλιέργειες να προστατεύονται από εξωγενείς παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν επιμολύνσεις και επιτρέπουν τη διατήρηση σταθερών συνθηκών στην καλλιέργεια (Oncel 2015; Richmond 1992). Σε αντίθετη περίπτωση στα ανοιχτά υπαίθρια συστήματα καλλιέργειας οι επικρατούσες συνθήκες δεν μπορούν να ελεγχθούν αποτελεσματικά. Βέβαια, και στα δύο συστήματα όταν η φωτοσυνθετικά ενεργός ηλιακή ακτινοβολία (PAR) είναι πάνω από το όριο κορεσμού είναι πιθανό να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη και να προκληθεί μείωση της παραγωγικότητας (Mathimani *et al.* 2019). **(Εικόνα 26)**



Closed cultivation systems for cultivation of microalgae; left: sleeve-bag photobioreactor; right: tubular photobioreactor

Εικόνα 26: Διαφορετικά συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών, Πηγή: Sharma, 2017

6.1 Καλλιερητικά συστήματα ανοιχτού τύπου

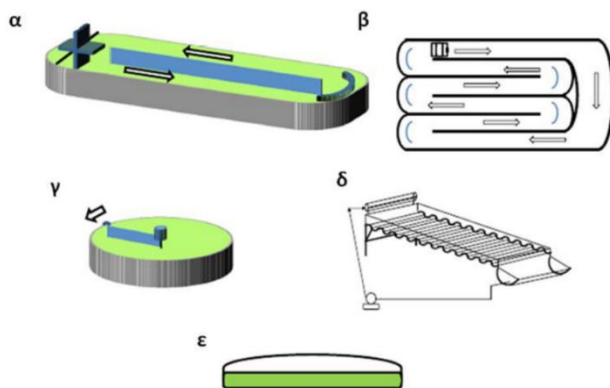
Τα συστήματα ανοιχτού τύπου έχουν μικρότερο κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας καθώς δεν χρειάζεται η χρήση εξειδικευμένου εξοπλισμού ή συστημάτων αλλά χρησιμοποιούνται απλές κατασκευές που αφήνονται σε φυσικό φωτισμό. Επίσης έχουν τη δυνατότητα να υποστηρίζουν καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου σε σχέση με τα διαλείποντος έργου συστήματα καλλιέργειας (Markou *et al.*, 2013). Τα συστήματα αυτά χρησιμοποιούνται για την μαζική παραγωγή βιομάζας μικροφυκών με το μικρότερο δυνατό οικονομική κόστος και χρησιμοποιούνται για ανθεκτικά συνήθως στελέχη όπως αυτά του γένους *Spirulina*, *Dunaliella* και *Chlorella*. (Oncel, 2015).

Όπως προαναφέρθηκε τέτοια συστήματα καλλιέργειας αξιοποιούν κυρίως το φυσικό φως από τον ήλιο οπότε εξαρτώνται πλήρως από τις εκάστοτε καιρικές συνθήκες. Οι ανοιχτού τύπου

καλλιέργειες τροφοδοτούνται συνεχώς και με σταθερό ρυθμό από φρέσκο θρεπτικό υπόστρωμα, ενώ παράλληλα απομακρύνεται αντίστοιχη ποσότητα μικροφυκών. Οι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την κατασκευή συστημάτων ανοιχτού τύπου καλλιέργειας είναι η εγκατάσταση τροφοδοσίας και συγκομιδής, η επιτυχής ανάμιξη του καλλιεργητικού μέσου, η είσοδος διοξειδίου του άνθρακα, η αποστράγγιση, η υπερχειλίση και ο καθαρισμός.

Τα ανοικτά συστήματα καλλιέργειας ταξινομούνται στις εξής πέντε κατηγορίες (**Εικόνα 27**)

1. Δεξαμενή τύπου raceway (Raceway type)
2. Λιμνοδεξαμενή πολλών πλεγμάτων (multi-grid raceway)
3. Κυκλικές Δεξαμενές (circular type)
4. Λεπού στρώματος με κυματοειδή βάση (thin layer with undulating base)
5. εκαλυμμένες δεξαμενές (covered pond)



Εικόνα 27: α) Δεξαμενή τύπου raceway, β) Λιμνοδεξαμενή πολλών πλεγμάτων, γ) Κυκλικές Δεξαμενές, δ) Κεκλιμένα Συστήματα και ε) Κεκαλυμμένες δεξαμενές. (Oncel, 2015)

Οι πιο διαδεδομένες κατασκευές για ανοιχτού τύπου καλλιεργητικά συστήματα που χρησιμοποιούνται για την εμπορική αξιοποίηση και καλλιέργεια μικροφυκών είναι οι λιμνοδεξαμενές, κατασκευές οι οποίες αποτελούν τον πρωταρχικό και απλούστερο τρόπο για την κατασκευή ενός συστήματος ανοιχτού τύπου. Το βάθος κατασκευής φτάνει τα 30 cm και δεν συνιστάται να κατασκευάζονται με μεγαλύτερο βάθος έτσι ώστε οι ηλιακές ακτίνες να διεισδύουν σε όλο το βάθος της κατασκευής. (Chisti, 2008). Αντίστοιχα η έκθεση των μικροφυκών σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες προκαλεί επιμολύνσεις από διάφορα άλλα είδη

μικροφυκών, βακτηρίων ή άλλους μικροοργανισμούς, οι οποίες αλλοιώνουν την σύσταση των καλλιεργειών και δυσχεραίνουν την εφαρμογή της μονοκαλλιέργειας. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε έντονες επιμολύνσεις και τελικά μείωση της παραγωγής ή ακόμα και κατάρρευση της καλλιέργειας είτε λόγω παθογόνων μικροοργανισμών είτε λόγω επικράτησης άλλων. (Widin, 2021).

Στα μειονεκτήματα που καταλογίζονται στα ανοιχτά συστήματα καλλιέργειας είναι το φαινόμενο της εξάτμισης του υδάτινου όγκου που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικών ποσοτήτων νερού η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση αλάτων, που αν ξεπεράσουν τα επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης μπορούν να επιδράσουν ανασταλτικά στην αύξηση των μικροφυκών. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ανάγκη αναπλήρωσης του όγκου του νερού που εξατμίζεται και συνεπώς οδηγεί στην κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων νερού. Ανάλογα πάντα με το είδος των μικροφυκών που καλλιεργούνται δημιουργείται το πλεονέκτημα ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί υφάλμυρο ή θαλασσινό νερό για την κάλυψη των αναγκών των καλλιεργειών ανάλογα φυσικά με την ανεκτικότητα του μικροοργανισμού (Bilanovic *et al.*, 2009). Κατά αυτό τον τρόπο καθίσταται δυνατή η αξιοποίηση μη πόσιμου ή και μη αρδεύσιμου νερού από διάφορες πηγές.

Στα ανοιχτού τύπου καλλιεργητικά συστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν όπως και στα διαλείποντος έργου συστήματα πρώτες ύλες από απόβλητα τα οποία περιέχουν τα απαραίτητα θρεπτικά για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (άζωτο, φώσφορο, κάλιο κλπ). (Mathimani *et al.*, 2019). Επιπρόσθετα έχει παρατηρηθεί ότι η αναλογία της παραγωγής ανά μονάδα επιφάνειας είναι μικρότερη συγκριτικά με του διαλείποντος έργου καλλιεργητικά συστήματα με αποτέλεσμα να έχει σημειωθεί ότι το κόστος συγκομιδής είναι πολύ μεγαλύτερο και η συγκέντρωση βιομάζας σχετικά χαμηλή (Norsker *et al.*, 2011). Σε ορισμένες περιοχές λόγω των έντονων καιρικών μεταβολών όπως η θερμοκρασία και η ηλιοφάνεια οι περίοδοι καλλιέργειας είναι περιορισμένες. Για τον λόγο αυτό χώρες με μεγαλύτερη διάρκεια και ένταση ηλιοφάνειας όπως η Ελλάδα παρουσιάζουν συγκριτικό πλεονέκτημα στην εγκατάσταση και αξιοποίηση των ανοιχτών συστημάτων καλλιέργειας καθώς η παραγωγή βιομάζας έχει σημειωθεί έως και δέκα φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με περιοχές με μικρότερη ένταση και διάρκεια ηλιοφάνειας (Brányiková *et al.*, 2011).

Συμπερασματικά, τα βασικότερα μειονεκτήματα των ανοικτών συστημάτων καλλιέργειας είναι οι απώλειες λόγω εξάτμισης, οι θερμοκρασιακές μεταβολές, η μικρή αποτελεσματικότητα στην αξιοποίηση του CO₂, η αναποτελεσματική ανάδευση του υποστρώματος και η ελλιπής αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας (Brennan and Owende 2010). (Εικόνα 28)



Εικόνα 28: Ανοιχτού Τύπου Καλλιέργειες Μικροφυκών.

6.2 Καλλιεργητικά συστήματα κλειστού τύπου

Κλειστού τύπου συστήματα καλλιέργειας αποτελούν οι καλλιέργειες οι οποίες αναπτύσσονται σε φωτοβιοαντιδραστήρες (PBRs) με παροχή της απαραίτητης φωτεινής ενέργειας για την ανάπτυξη μικροφυκών (Richmond, 2003) (Richmond, 2004). Στα κλειστού τύπου συστήματα, η καλλιέργεια μικροφυκών μπορεί να πραγματοποιείται μερικώς ή πλήρως απομονωμένη από το εξωτερικό περιβάλλον. Υπάρχουν επίσης συστήματα που μπορούν να εγκατασταθούν σε εξωτερικούς χώρους με σκοπό την ανταλλαγή θερμότητας και την αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας (Onceel, 2015). Οι φωτοβιοαντιδραστήρες χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον σχεδιασμό και τη λειτουργία τους. Σε σχέση με τον σχεδιασμό, οι κύριες κατηγορίες περιλαμβάνουν τους βιοαντιδραστήρες επίπεδης πλάκας, τους αυλώτους και τους κατακόρυφους στήλης. Επιπλέον, υπάρχουν οι αντιδραστήρες δύο φάσεων, όπου το αέριο και το υγρό βρίσκονται μαζί και η συνεχής μεταφορά μάζας πραγματοποιείται στον ίδιο αντιδραστήρα. Το υλικό κατασκευής των αντιδραστήρων αποτελεί ένα περαιτέρω κριτήριο κατηγοριοποίησης, με βάση το οποίο οι αντιδραστήρες κατηγοριοποιούνται σε αντιδραστήρες από γυαλί ή πλαστικό (Richmond, 2004).

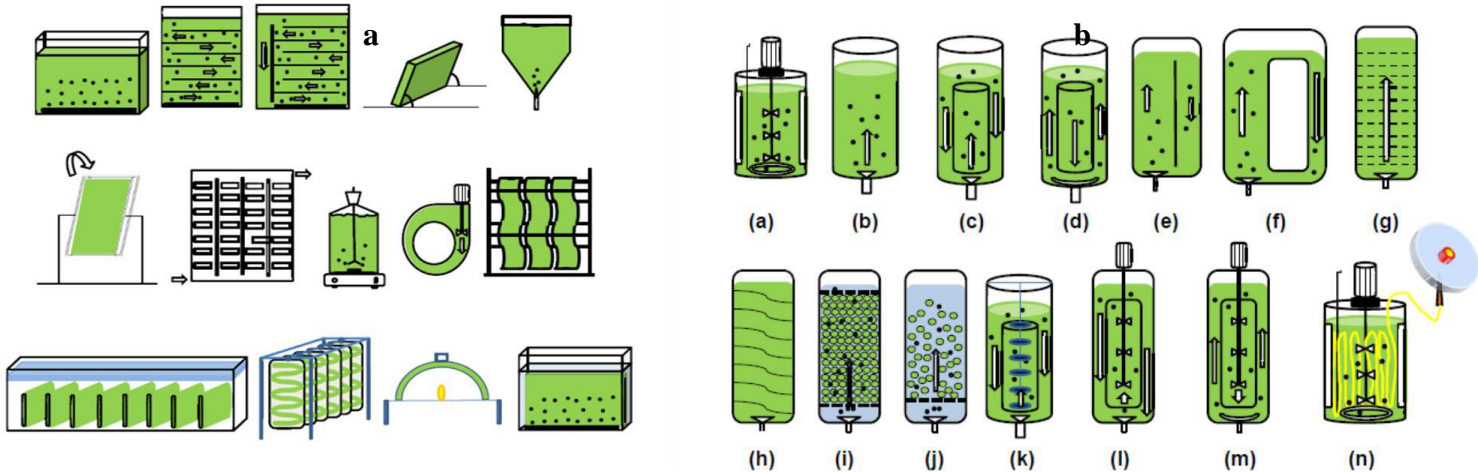
Τα παραγωγικότερα συστήματα που έχουν σημειώσει και την υψηλότερη απόδοση θεωρούνται οι επίπεδοι αυλωτοί βιοαντιδραστήρες, καθώς παρέχουν προστασία στον μικροοργανισμό από άλλους μολυσματικούς μικροοργανισμούς. Ο επιτυχής σχεδιασμός ενός φωτοβιοαντιδραστήρα έχει ως απαραίτητη προϋπόθεση την καλή γνώση των διαφόρων φυσικών και βιολογικών φαινομένων ώστε να επιτευχθεί επιμελής σχεδιασμός του υποστηρικτικού εξοπλισμού τους. Επιγραμματικά, τα κυριότερα υποσυστήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι τα εξής: 1) το σύστημα φωτισμού, 2) το σύστημα εμπλουτισμού με CO₂, 3) το σύστημα ανάδευσης, 4) το σύστημα απομάκρυνσης O₂ και διαχωρισμού αερίων, 5) το σύστημα θέρμανσης/ψύξης και 6) το σύστημα τροφοδοσίας θρεπτικού υλικού (Chisti and Jauregui-Haza 2002; Brennan and Owende 2010; Molina *et al.*, 2001).

Η επιλογή του συστήματος καλλιέργειας με φωτοβιοαντιδραστήρες παρουσιάζει πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα. Αρχικά καθίσταται εύκολη η ρύθμιση των παραμέτρων των καλλιεργητικών συνθηκών καθώς και ο έλεγχος της παροχέτευσης και της κίνησης των αερίων.

Η αξιοποίηση του διοξειδίου του άνθρακα είναι αποτελεσματικότερη σε κλειστού τύπου συστήματα καλλιέργειας αφού στα ανοιχτού τύπου συστήματα το μεγαλύτερο μέρος του διαχέεται CO₂ στην ατμόσφαιρα. Επίσης γίνεται καλύτερη κατανομή της θερμότητας στο υπόστρωμα ενώ περιορίζεται και το βασικό πρόβλημα των ανοιχτών συστημάτων που είναι η εξάτμιση του νερού. Ο λόγος της επιφάνειας προς τον όγκο καλλιέργειας είναι μεγαλύτερος και η καλλιέργεια προστατεύεται από επιμολύνσεις αφού το σύστημα του βιοαντιδραστήρα δεν έρχεται σε επικοινωνία με το εξωτερικό περιβάλλον. Οι αποδόσεις της καλλιέργειας είναι υψηλότερες από τις εκείνες των ανοιχτών δεξαμενών ενώ δίνεται η δυνατότητα καλλιέργειας τόσο με μικτότροφα όσο και σε ετερότροφα (Markou *et al.*, 2013).

Πλην των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει η χρήση βιοαντιδραστήρων σε κλειστού τύπου συστήματα καλλιέργειας είναι γεγονός ότι αυτού του τύπου τα συστήματα αυξάνουν σημαντικά το κόστος εγκατάστασης και συντήρησης. Η διαχείριση του οξυγόνου μέσω συστήματος παροχής αέρα είναι εξίσου σημαντική καθώς απαιτείται ειδικό σύστημα απαέρωσης, ενώ δεν είναι δυνατή η κατασκευή μεγάλης κλίμακας εγκαταστάσεων γιατί καθιστούν αδύνατο τον έλεγχο της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου στο θρεπτικό υπόστρωμα. Λόγω της φωτοσύνθεσης το διαλυμένο οξυγόνο στο υπόστρωμα μπορεί να συσσωρευτεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις που να είναι τοξικές για το μικροφύκος (φωτοοξειδωση) για αυτό καθίσταται

επιτακτικός ο έλεγχος του. Για το λόγο αυτό, το μήκος των αγωγών δεν πρέπει να ξεπερνά τα 80m (Molina *et al.*, 2001). Βέβαια, οι διαστάσεις των βιοαντιδραστήρων επηρεάζονται και από άλλους παράγοντες όπως η ένταση του φωτισμού, η συγκέντρωση της βιομάζας ο ρυθμός ροής του υγρού κ.α (Markou *et al.*, 2013). **(Εικόνα 29)**



Εικόνα 29: (a) Διαφορετικοί τύποι Φωτοβιοαντιδραστήρων επίπεδης πλάκας (Oncel, 2015), (b) Διαφορετικοί τύποι αυλωτών Φωτοβιοαντιδραστήρων (Oncel, 2015).

7. ΑΣΥΝΕΧΗΣ/ΣΥΝΕΧΗΣ/ΗΜΙΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

7.1 Ασυνεχής Καλλιέργεια

Ασυνεχείς καλλιέργειες διαλείποντος έργου (Batch Culture) είναι οι καλλιέργειες που αποτελούνται από συγκεκριμένη ποσότητα θρεπτικού υποστρώματος και συγκεκριμένη ποσότητα εμβολίου (στέλεχος μικροοργανισμού). Ο όγκος του εμβολίου που χρησιμοποιείται είναι συνήθως 2-10% του ενεργού όγκου και υπολογίζεται ανάλογα την δυναμικότητα και την ταχύτητα ανάπτυξης του στελέχους. Οι καλλιέργειες αυτές αφήνονται στη συνέχεια να επωαστούν χωρίς επιπλέον προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος. Αφού ο πληθυσμός του μικροοργανισμού φτάσει τη μέγιστη πυκνότητα στην έναρξη της στάσιμης φάσης ανάπτυξης συγκομίζονται. Η επιτυχία της ανάπτυξης σε διαλείποντος έργου διαλείποντος έργου καλλιέργειες έγκειται στην σταθερότητα των αβιοτικών παραμέτρων και την αρχική πυκνότητα του κυτταρικού πληθυσμού. Τα συστήματα ασυνεχούς καλλιέργειας θεωρούνται απλά και ευέλικτα ως προς την χρήση τους. Το πλεονέκτημα τους είναι ότι επιτρέπεται η εύκολη εναλλαγή των καλλιεργούμενων ειδών. Αν και συχνά θεωρούνται ως η πλέον βασική και αξιόπιστη μέθοδος για βιολογικές δοκιμές δεν είναι η πιο αποτελεσματική γιατί η ποιότητα των συγκομιζόμενων κυττάρων δεν είναι προβλέψιμη ούτε ελεγχόμενη σε σύγκριση με τα συστήματα συνεχούς καλλιέργειας και επηρεάζεται από την φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και τη χρονική στιγμή που επιλέγεται ως η κατάλληλη για συγκομιδή.

7.2 Συνεχής Καλλιέργεια (Continuous Cultures)

Στις συνεχούς τύπου καλλιέργειες το θρεπτικό μέσο ανανεώνεται συνεχώς, ενώ ταυτόχρονα η περίσσεια της καλλιέργειας εκπλένεται και συγκομίζεται η βιομάζα. Σε αυτού του τύπου τις καλλιέργειες επιτυγχάνεται η διατήρηση του σταθερού όγκου καλλιέργειας χωρίς απώλειες όγκου από την εξάτμιση και διατηρούνται σταθερές οι παράμετροι ανάπτυξης καθ' όλη τη διάρκεια των δοκιμών. Κατά αυτόν τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί δυναμική ισορροπία και να μελετηθεί ο οργανισμός σε σταθερές συνθήκες ανάπτυξης. Το πλεονέκτημα της συνεχούς καλλιέργειας είναι η πρόβλεψη της κατάλληλης ποιότητας των παραγόμενων κυττάρων και η χρήση τεχνολογικού

ελέγχου και αυτοματισμού που αυξάνει την αξιοπιστία του συστήματος ανάπτυξης. Ως προς την εγκατάσταση το σύστημα συνεχούς καλλιέργειας θεωρείται ένα σύστημα υψηλού κόστους και πολυπλοκότητας. Διαρκώς υπάρχουν απαιτήσεις για σταθερό φωτισμό και θερμοκρασία και επί το πλείστον τα συστήματα αυτά επιλέγονται να εγκατασταθούν σε εσωτερικούς χώρους για ευκολότερη διαχείριση.

7.3 Καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (Semi-Continuous, Fed-Batch Cultures)

Τα ημιδιαλείποντος έργου συστήματα, είναι συστήματα στα οποία ένα μέρος του όγκου της καλλιέργειας ανανεώνεται συνεχώς με διαφορετικούς ρυθμούς. Οι καλλιέργειες σε πρώτη φάση εμβολιάζονται με σταθερό όγκο προκειμένου να αποκτήσουν μια επαρκή πυκνότητα από τον μικροβιακό πληθυσμό και ένα μέρος σταδιακά αρχίζει να ανανεώνεται με φρέσκο θρεπτικό υλικό σε ημερήσια βάση. Όταν η καλλιέργεια εισέλθει σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας το προστιθέμενο θρεπτικό υλικό έχει μετατραπεί σε βιομάζα και η συγκέντρωση του μικροβιακού πληθυσμού στο δοχείο καλλιέργειας είναι ίση με αυτή της προηγούμενης συγκομιδής.

8. ΦΑΣΕΙΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Ο βιολογικός κύκλος ανάπτυξης του μικροβιακού πληθυσμού διακρίνεται σε πέντε επιμέρους φάσεις στα ασυνεχή συστήματα ανάπτυξης, τη λανθάνουσα φάση (ή φάση υστέρησης), την εκθετική φάση, την επιβραδυνόμενη φάση (ή φάση επιβράδυνσης), τη στάσιμη φάση και τη φάση θανάτου (Anil Kommareddy and Dr. Gary Anderson 2003)

8.1 Φάση Υστέρησης (Lag Phase)

Στην φάση υστέρησης ο μικροοργανισμός βρίσκεται σε φάση λήθαργου και προσαρμογής στο νέο θρεπτικό υπόστρωμα που έχει εμβολιαστεί. Παρατηρείται πολύ μικρή αύξηση του πληθυσμού και η διάρκεια της φάσης αυτής ποικίλει ανάλογα με τις νέες συνθήκες ανάπτυξης και τη δυναμικότητα του στελέχους. Η επαγωγή της αύξησης προκύπτει από τη φυσιολογική προσαρμογή του κυτταρικού μεταβολισμού στην ανάπτυξη, όπως στην αύξηση των επιπέδων των ενζύμων και των μεταβολιτών που εμπλέκονται στην κυτταρική διαίρεση (Anil Kommareddy and Dr. Gary Anderson 2003)

8.2 Εκθετική Φάση Αύξησης (Exponential Phase)

Μετά τη φάση υστέρησης ο μικροοργανισμός εισέρχεται στην εκθετική φάση όπου ο αριθμός του πληθυσμού αυξάνεται με εκθετικούς ρυθμούς. Η πυκνότητα των κυττάρων μεταβάλλεται αναλογικά σε συνάρτηση με τον χρόνο και η σχέση αυτή εκφράζεται από την ακόλουθη συνάρτηση: $C_t = C_0 \cdot e^{\mu t}$ όπου:

C_t : Η συγκέντρωση των κυττάρων μια χρονική στιγμή t

C_0 : Η χρονική στιγμή 0

μ : ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, ο οποίος εξαρτάται κυρίως από τα είδη των φυκών, την ένταση του φωτός, και τη θερμοκρασία (Anil Kommareddy and Dr. Gary Anderson 2003)

8.3 Φάση Επιβραδυνόμενης Αύξησης (Phase of Declining Relative Growth)

Σταδιακά τα θρεπτικά συστατικά εξαντλούνται από το θρεπτικό υπόστρωμα και ορισμένα προϊόντα του μεταβολισμού του μικροοργανισμού συσσωρεύονται, γεγονός που δρα ανασταλτικά και τερματίζει την εκθετική αύξηση. Έτσι, η καλλιέργεια εισέρχεται στη φάση παρακμής, όπου η διαίρεση των κυττάρων επιβραδύνεται, καθώς φυσικοί και χημικοί παράγοντες όπως τα θρεπτικά συστατικά, το φως, το pH, το διοξείδιο του άνθρακα και άλλοι δεν ευνοούν την ανάπτυξη της καλλιέργειας (Anil Kommareddy and Dr. Gary Anderson 2003).

8.4 Στάσιμη Φάση (Stationary Phase)

Σε αυτή τη φάση η πυκνότητα των κυττάρων είναι σταθερή και δεν παρατηρείται αύξηση ή μείωση του πληθυσμού, καθώς ο ρυθμός ανάπτυξης και θνησιμότητας των φυκών είναι σταθερός. Πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο ενεργειακός μεταβολισμός και κάποιες βιοσυνθετικές λειτουργίες συνεχίζονται και βρίσκονται σε ισορροπία (Anil Kommareddy and Dr. Gary Anderson 2003).

8.5 Φάση Θανάτου (Death Phase)

Η καλλιέργεια εισέρχεται, στη φάση θανάτου λόγω της εξάντλησης του θρεπτικού μέσου. Όταν η καλλιέργεια βρίσκεται μετά τη φάση επιβράδυνσης, η θρεπτική αξία των παραγόμενων φυκών μειώνεται, λόγω της μειωμένης ικανότητας να αφομοιώνουν το υπόστρωμα, της ανεπαρκούς σύνθεσης, και της πιθανής παραγωγής τοξικών μεταβολιτών (Anil Kommareddy and Dr. Gary Anderson 2003)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:

1. Στελέχη των μικροφυκών

Τα στελέχη των μικροφυκών που μελετήθηκαν είναι: *Auxenochlorella protothecoides* (CCAP 211/8D), *Tetracelmis chuii* (CCAP 8/6) και *Scenedesmus quadricauda* (276/21 CCAP) τα οποία προήλθαν από την συλλογή Μικροφυκών και Πρωτόζωων του SAMS Limited Scottish Marine Institute, ενώ τα μικροφύκη *Chlorella vulgaris* και *Scenedesmus obliquus* προήλθαν από τη συλλογή μικροφυκών του Πανεπιστημίου του Goetingen.

1.2 Θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια μικροφυκών

Για την ανάπτυξη του *C. vulgaris* και του *S. obliquus*, και *S. quadricauda* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Bold's Basal Medium (BBM, Bischoff & Bold, 1963) (0.075 g/L KH_2PO_4 , 25 mg/L CaCl_2 , 0.175 g/L K_2HPO_4 , 0.075 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.025 NaCl g/L, 10 mg/L NaFeEDTA, and 1.0 ml/L διαλύματος ιχνοστοιχείων. Η σύσταση του διαλύματος ιχνοστοιχείων ήταν 8.82 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.44 g/L MnCl_2 , 0.71 g/L MoO_3 , 1.57 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, and 0.49 g/L $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. με αρχικό pH 7.2 και πηγή ακατέργαστη (94% καθαρότητας) γλυκερόλη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις από την εταιρεία Πέττας ΑΕΒΕ.

Για την ανάπτυξη του *A. protothecoides* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα BBM Modified Basal Medium, με τριπλάσια ποσότητα N και βιταμίνες (3N-BBM+Vitamins B12, B1 200 ml/L από πυκνό διάλυμα σύστασης B12: 1 ml από διάλυμα 0,001 gr Cyanobalamin/100 ml H_2O , B1: 0.12 gr Thiamynhydrochlore σε 100 ml H_2O) με αρχικό pH 7.2 και πηγή άνθρακα ακατέργαστη (94% καθαρότητας) γλυκερόλη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Για την ανάπτυξη του *T. chuii* χρησιμοποιήθηκε f/2 medium (Guillard 1975) με αρχικό pH 7.2 και πηγή ακατέργαστη (94% καθαρότητας) γλυκερόλη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

1.3 Παραγωγή προεμβολίων

Η παραγωγή των προεμβολίων έγινε ως εξής: Φιάλες όγκου 200 ml με το κατάλληλο για κάθε μικροφύκος υπόστρωμα εμπλουτισμένο με 10g/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα και εκχύλισμα ζύμης ή πεπτόνη (2 g/L) ως πηγή αζώτου εμβολιάστηκαν με εναιώρημα μικροφυκών, σε αναλογία 10% του ενεργού όγκου της προκαλλιέργειας. Στη συνέχεια η επώαση των καλλιιεργειών γινόταν σε οριζόντια ανακινούμενη τράπεζα με σταθερό ρυθμό ανάδευσης (150 rpm) σε θερμοκρασία $T=25\pm 1^{\circ}\text{C}$, σε συνθήκες αυτότροφης ανάπτυξης (με 24 h φως) Όταν οι προκαλλιέργειες ήταν στην εκθετική φάση αύξησης, χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των καλλιιεργειών (**Εικόνα 1.1**)



Εικόνα 1.1: Εμβολιασμός της Καλλιέργειας.

1.4 Εκτίμηση της βιομάζας

Η εκτίμηση της παραγόμενης βιομάζας γινόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέσω οπτικής δειγματοληψίας. Σε κάθε δείγμα μετριόταν η οπτική πυκνότητα (OD) στα 750 nm. Με τη βοήθεια πρότυπων καμπυλών συσχετισμού OD με το ξηρό βάρος κυττάρων που πραγματοποιούνταν σε αντίστοιχες συνθήκες για το κάθε μικροφύκος, γινόταν συσχέτιση της τιμής της οπτικής πυκνότητας με το ξηρό βάρος της βιομάζας (g/L). Για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους της βιομάζας λαμβάνονταν δείγματα συγκεκριμένου όγκου (5 ml), τα οποία φυγοκεντρώνταν για 15 min σε 13000 rpm και ξεπλένονταν δύο φορές με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονταν σε προζυγισμένα δισκία και ξηραίνονταν σε φούρνο θερμοκρασίας 80 °C μέχρι σταθερού βάρους.

1.4.1 Υπολογισμοί για την εκτίμηση της βιομάζας

Καλλιέργειες διαλείποντος έργου:

Για να εκτιμηθεί ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (μ_{\max} , d^{-1}) κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, εφαρμόστηκε η παρακάτω εξίσωση:

$$x = x_0 * e(\mu_{\max} \times t) \text{ (1)},$$

η οποία μετατράπηκε σε γραμμική εξίσωση

$$\ln x = \ln x_0 + \mu_{\max} \times t \text{ (2)}.$$

Ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας στη γλυκερόλη ($Y_{x/s}$) εκτιμήθηκε με την παρακάτω εξίσωση:

$$Y_{x/s} = (x_{\max} - x_0)/(S_0 - S_R) \text{ (3)}$$

όπου το x_0 (g/L) και το x_{\max} (g/L) αντιπροσωπεύουν την αρχική και τη μέγιστη βιομάζα αντίστοιχα, το t υποδηλώνει τον χρόνο ανάπτυξης εκφρασμένο σε ημέρες (d), ενώ τα S_R και S_0 αντιπροσωπεύουν τις συγκεντρώσεις της υπολειπόμενης και της αρχικής γλυκερόλης στο μέσο ανάπτυξης, δοθείσες ως (g/L). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν τριπλά, και όλες οι τιμές που παρατίθενται σε αυτή τη μελέτη είναι μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση (SD).

Καλλιέργειες ημιαλείποντος έργου:

Η παραγωγικότητα της βιομάζας των μικροφυκών (P_x) καθορίστηκε χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση (1):

P_x (g/Ld⁻¹) = (DW2 - DW1)/(t2 - t1) (1) , όπου DW2 και DW1 αντιπροσωπεύουν, αντίστοιχα, τις συγκεντρώσεις της βιομάζας (g/L) στα χρονικά σημεία t2 και t1 (ημέρα).

Ο ειδικός ρυθμός αύξησης που επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια της εκθετικής ανάπτυξης καθορίστηκε χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση (2):

$\mu_{\max} = (\ln DW2 - \ln DW1)/(t2 - t1)$ (2), όπου μ_{\max} είναι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (d^{-1}), και DW2 και DW1 αντιπροσωπεύουν, αντίστοιχα, τις συγκεντρώσεις της βιομάζας (g/L) στα χρονικά σημεία t2 και t1 (ημέρες).

Η παραγωγικότητα των λιπιδίων (P_L) καθορίστηκε χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση **(3)**:
 $P_L \text{ (g/Ld}^{-1}\text{)} = P_x \text{ (g/ Ld}^{-1}\text{)} \times L_c \text{ (\%)} \text{ (3)}$, όπου P_x είναι η παραγωγικότητα της βιομάζας και L_c είναι το ποσοστό των λιπιδίων επί του ξηρού βάρους της βιομάζας.

Η παραγωγικότητα των πρωτεϊνών (P_{pr}) καθορίστηκε χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση **(4)**:

$P_{pr} \text{ (g/Ld}^{-1}\text{)} = P_x \text{ (g/ Ld}^{-1}\text{)} \times P_c \text{ (\%)} \text{ (3)}$, όπου P_x είναι η παραγωγικότητα της βιομάζας και P_c είναι το ποσοστό των πρωτεϊνών επί του ξηρού βάρους της βιομάζας.

Η παραγωγικότητα των υδατανθράκων (P_c) καθορίστηκε χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση **(5)**:

$P_c \text{ (g/Ld}^{-1}\text{)} = P_x \text{ (g/ Ld}^{-1}\text{)} \times C_c \text{ (\%)} \text{ (3)}$, όπου P_x είναι η παραγωγικότητα της βιομάζας και C_c είναι το ποσοστό των πρωτεϊνών επί του ξηρού βάρους της βιομάζας.

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν τριπλά, και όλες οι τιμές που παρατίθενται σε αυτή τη μελέτη είναι μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση (SD).

Συνεχή συστήματα καλλιέργειας με χρήση βιοαντιδραστήρα:

Η παραγωγικότητα της βιομάζας και των μεταβολιτών με τη χρήση βιοαντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας εξετάστηκαν βάσει του μοντέλου του Monod, το οποίο λαμβάνει υπόψη ότι η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι ο καθοριστικός παράγοντας της κυτταρικής αύξησης. Οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν βάσει του μοντέλου του Monod ήταν:

$$\mu = \mu_{\max} * S / (K_S + S) \text{ (1)},$$

όπου, S είναι η συγκέντρωση του περιοριστικού παράγοντα στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας στο βιοαντιδραστήρα, ο οποίος καθορίζει τον ειδικό ρυθμό αύξησης (μ) και επίσης τον μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης (μ_{\max}), ενώ το K_S είναι η σταθερά που υποδηλώνει τη συγκέντρωση του υποστρώματος S που υποστηρίζει ένα ρυθμό αύξησης ίσο με $\mu = \mu_{\max}/2$. Με άλλα λόγια, το K_S είναι η παράμετρος που υποδηλώνει πόσο γρήγορα επιτυγχάνεται ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης.

Η παραγωγικότητα της βιομάζας (P_x) αντιπροσωπεύει την μεταβολή της συγκέντρωσης της βιομάζας με τον χρόνο. Σε συνεχείς διεργασίες όπου η αύξηση διατηρείται εκθετική σε έναν συγκεκριμένο ειδικό ρυθμό αύξησης ίσος με τον ρυθμό αραίωσης, η παραγωγικότητα της βιομάζας εκφράζεται ως:

$$P_x = \mu * x = D * x \quad (2)$$

όπου x είναι το ξηρό βάρος της βιομάζας.

Οι παραγωγικότητες (P_m) για όλους τους παραγόμενα μεταβολίτες (metabolites) (λιπίδια, πρωτεΐνες ή υδατάνθρακες) υπολογίστηκαν ως:

$P_m = D * m$ (3), όπου m είναι το ξηρό βάρος του μεταβολίτη.

1.5. Αξιολόγηση της Μορφολογίας των Κυττάρων

Δείγματα προσλήφθηκαν από τις καλλιέργειες καθημερινά για την αξιολόγηση της μορφολογίας των κυττάρων και τον εντοπισμό οποιασδήποτε δυνητικής μόλυνσης (δεν παρατηρήθηκε καμία μόλυνση κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας). Το μέγεθος και η μορφολογία των μικροφυκών κατά τη στάσιμη φάση εκτιμήθηκε με χρήση οπτικού μικροσκοπίου (OLYMPUS DP74) σε 100× μεγέθυνση. Κάθε παρατήρηση βασίστηκε στη μέτρηση 50 κυττάρων.

1.6 Υπολογισμός εναπομείνουσας συγκέντρωσης γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο

Το υπερκείμενο υγρό μετά τη φυγοκέντριση και την απομάκρυνση των μικροβιακών κυττάρων χρησιμοποιούνταν για τη μέτρηση της εναπομείνουσας γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο με τη βοήθεια ειδικού κιτ μέτρησης Megazyme Glycerol assay (Megazyme K-GCROL kit (© 2020)).

Το kit βασίζεται στην APXH:

Η γλυκερόλη φωσφορηνύεται από την αδενοσίνη-5'-τριφωσφατάση (ATP) σε L-γλυκερόλη-5'-φωσφατάση στην αντίδραση που καταλύεται από τη γλυκεροκιναση (GK). Κατά την αντίδραση $\text{Γλυκερόλη} + \text{ATP} \rightarrow \text{L-Γλυκερόλη-3-φωσφατάση} + \text{ADP}$, η αδενοσίνη-

5'διφωσφατάση (ADP) που παράγεται στην αντίδραση αναστρέφεται από τη φωσφοενολπυροσταφυλικό (PEP) με τη βοήθεια της πυροσταφυλικής κινάσης (PK) σε ATP με τον σχηματισμό πυροσταφυλικού οξέος. $ADP + PEP \rightarrow ATP + \text{πυροσταφυλικό οξύ}$. Στην παρουσία του ενζύμου L-λακτικής απενδρογενάσης (L-LDH), το πυροσταφυλικό οξύ εξακολουθεί να ανάγεται σε L-λακτικό οξύ από τη αναγωγή νικοτιναμίδη-αδενίνη-δινουκλεοτίδη (NADH) με την παραγωγή του NAD^+ (L-LDH). $\text{Πυροσταφυλικό οξύ} + NADH + H^+ \rightarrow \text{L-λακτικό οξύ} + NAD^+$. Η ποσότητα του NAD^+ που παράγεται στο παραπάνω μονοπάτι αντιδράσεων είναι στοιχειομετρικά αντίστοιχη με την ποσότητα της γλυκερόλης. Η κατανάλωση του NADH είναι αυτή που θα μετρηθεί με απορρόφηση στα 340 nm.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στο κιτ είναι το Buffer (20 ml, pH 7.4) συν αζίδιο του νατρίου (0.02% w/v) ως συντηρητικό. Το 2^ο διάλυμα NADH plus ATP and PEP. Το 3^ο διάλυμα Pyruvate kinase plus L-lactate dehydrogenase. Το 4^ο διάλυμα γλυκεροκινάσης, και το 5^ο διάλυμα με καθαρή γλυκερόλη ως στάνταρ διάλυμα.

1.7 Βιοχημικές αναλύσεις

Όταν πλέον οι καλλιέργειες είχαν εισέλθει στη φάση στασιμότητας ή σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας (για τις συνεχείς καλλιέργειες) γινόταν συλλογή συγκεκριμένης ποσότητα καλλιέργειας που φυγοκεντρούταν (13000 rpm για 20 min), στη συνέχεια γινόταν έκπλυση δυο φορές με απιονισμένο νερό και χρησιμοποιούταν για τις αναλύσεις της βιοχημικής σύστασης της βιομάζας.

1.7.1 Υπολογισμός πρωτεϊνών:

Για τον υπολογισμό των παραγόμενων πρωτεϊνών χρησιμοποιούταν η μέθοδος Lowry (Lowry et al. 1951). Η μέθοδος Lowry βασίζεται στην αντίδραση του Cu^+ , που παράγεται από την οξείδωση των πεπτιδικών δεσμών, με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (μίγμα φωσφοβολφραμικού οξέος και φωσφομολυβδικού οξέος στην αντίδραση Folin-Ciocalteu). Ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν είναι καλά κατανοητός, αλλά περιλαμβάνει μείωση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και οξείδωση αρωματικών υπολειμμάτων (κυρίως τρυπτοφάνης,

επίσης τυροσίνης). Το αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης είναι ένα έντονο μπλε μόριο γνωστό ως μπλε του ετεροπολυμολυβδαινίου. Ως αποτέλεσμα, η συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης στο δείγμα μπορεί να συναχθεί από τη συγκέντρωση των υπολειμμάτων τρυπτοφάνης και τυροσίνης που μειώνουν το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Μετά την εκχύλιση τους σε διάλυμα κανονικότητας 0.5 N NaOH. Συγκεκριμένα σε βιομάζα κυττάρων που είχαν προέλθει από 2 ml καλλιέργειας προστέθηκε αρχικά 1.5 ml NaOH κανονικότητας 0.5N και αφέθηκαν να επωαστούν στους 100 °C για 15 λεπτά με σκοπό να γίνει διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων. Στη συνέχεια προστέθηκε 0.9 ml αντιδραστήριου σε αναλογία 48:1:1 από τα διαλύματα (Na₂CO₃ 2g σε 100 ml 0.1N NaOH),(CuSO₄·5H₂O 0.5 gr σε 100 ml H₂O) και (NaK tartate 1%, 1g σε 100 ml H₂O) σε 0.1 ml από την επωασμένη καλλιέργεια. Αφήνονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) και στη συνέχεια προστίθεται 0.1 ml Folin 1:1, τα δείγματα ανακινούνται και αφήνονται σε σκοτάδι 30-60 λεπτά. Η μέτρηση γίνεται σε φασματοφωτόμετρο σε 750 nm και οι μετρήσεις συσχετίζονται με πρότυπη καμπύλη αναφοράς που έχει υπολογιστεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις αλβουμίνης.

1.7.2 Υπολογισμός Υδατανθράκων

Οι ενδοκυτταρικοί υδατάνθρακες προσδιορίζονται μέσω τροποποιημένης phenol-sulfuric acid μεθόδου (Dubois et al., 1956). Συγκεκριμένα, σε 0,5 ml κυτταρικού εναιωρήματος, που περιείχε 10-50 mg/L υδατανθράκων προστίθεται 10μL φαινολικού διαλύματος 90% και έπειτα από ανάδευση ακολουθούσε προσθήκη 1,25 ml πυκνού θεικού οξέος (96%). Μετά από 30 λεπτά αναμονής μετρίοταν η οπτική απορρόφηση στα 485 nm και με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης (με D-Γλυκόζη) προσδιοριζόταν η συγκέντρωση των υδατανθράκων.

1.7.3 Υπολογισμός Λιπιδίων:

Η συγκέντρωση των λιπιδίων προσδιορίζεται με τροποποίηση της sulpho-phospho-vanillin μεθόδου (Park et al., 2016). Εν συντομία, μετά την εκχύλιση των λιπιδίων με 2:1:0,2 χλωροφόρμιου:μεθανόλης:νερού, 20 ml του εκχυλίσματος που περιείχαν 200-500 mg/L λιπιδίων επώαζονταν σε 80°C για την εξάτμιση του χλωροφόρμιου. Στη συνέχεια προστίθεντο 0,4 ml θεικού οξέος 96%. Τα δείγματα τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο για 10 λεπτά και ακολούθως

αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου να κρυώσουν για 15 λεπτά. Έπειτα προστίθετο 1 ml διαλύματος φωσφορικού οξέος/βανιλίνης (από διάλυμα 0,12 g βανιλίνης σε 20ml απιονισμένου νερού και σε 80ml φωσφορικού οξέος 85%). Τα δείγματα επωάζονταν σε 37 °C για 15 λεπτά, μετρίονταν η οπτική απορρόφηση στα 530 nm και με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης (με έλαιο ελαιοκράμβης) προσδιοριζόταν η συγκέντρωση των λιπιδίων.

1.7.4 Υπολογισμός Χρωστικών:

Ο προσδιορισμός χλωροφυλλών και καροτενοειδών γινόταν μετά την εκχύλιση των δειγμάτων σε διάλυμα 90% μεθανόλης και στη συνέχεια γινόταν επώαση τους στους 70 °C για 5 λεπτά. Οι συγκεντρώσεις των χρωστικών υπολογίζονταν από τις εξισώσεις τους, που δίνονται από τον Lichtenthaler (1987). Οι απορροφήσεις των χρωστικών μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο σε OD: 652 nm, 665 nm και 470 nm. Όπου A στις εξισώσεις είναι η αντίστοιχη απορρόφηση.

$$Ca = 16.82 * A_{652} - 9.28 * A_{665}$$

$$Cb = 36.92 * A_{652} - 16.54 * A_{665}$$

$$Ca + b = 0.28 * A_{665} + 27.64 * A_{652}$$

$$Cx + c = 1000 * A_{470} - 1.91 * Ca - 95.15 * Cb$$

1.7.5 Ανάλυση του λιπιδιακού προφίλ και του προφίλ των αμινοξέων

Στα δείγματα από την καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα έγιναν αναλύσεις για την εκτίμηση του προφίλ των λιπαρών οξέων και οι αναλύσεις έγιναν με τη μέθοδο AOCS Official Method Ce 1c-89 σε χρωματογράφο SHIMADJU GC-2010. Αυτή η μέθοδος είναι για τον προσδιορισμό της σύστασης λιπαρών οξέων υδρογονωμένων και μη υδρογονωμένων φυτικών λιπών και ελαίων με χρωματογραφία αερίου-υγρού (GLC), χρησιμοποιώντας στήλη SP-2340.

Οι αναλύσεις για το προφίλ αμινοξέων έγιναν μετά την υδρόλυσή και την παραγωγοποίηση με AccQ-Tag™ Ultra σύμφωνα με τη μέθοδο ανάλυσης αμινοξέων Water Corporation, Milford, MA, USA. Ως standard χρησιμοποιήθηκε DL-Nορβαλίνη 2,5 mM. Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) εξοπλισμένη με ανιχνευτή PDA (μήκος κύματος ανίχνευσης: 260 nm) και στήλη BEH C18 (Waters). Τρυπτοφάνη δεν

μπόρεσε να υπολογιστεί εξαιτίας της ευαισθησίας του αμινοξέος κατά τη διαδικασία της υδρόλυσης.

1.7.6 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης ANOVA (μονοδιευθυντικές συγκρίσεις) με τη χρήση του λογισμικού SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). Όλα τα δεδομένα δοκιμάστηκαν για κανονικότητα (δοκιμασία Shapiro-Wilk) και για ομοιότητα διακύμανσης μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων. Η στατιστική ανάλυση βασίστηκε στη διαδικασία της πολλαπλής σύγκρισης ζευγών μεταβλητών του Duncan.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ:

Τα πέντε στελέχη που προαναφέρθηκαν, μελετήθηκαν αρχικά σε διαλείποντος έργου καλλιέργειες μικροφυκών σε ετερότροφες και σε μικτότροφες συνθήκες ανάπτυξης σε διαφορετικούς λόγους άνθρακα, αζώτου (C/N) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ακατέργαστης γλυκερόλης στο υπόστρωμα ανάπτυξης, με σκοπό τη διερεύνηση της δυναμικότητας του κάθε στελέχους και των ιδανικών συνθηκών ανάπτυξης τους για την παραγωγή βιομάζας και μεταβολικών προϊόντων υψηλής αξίας. Τα στελέχη που κρίθηκαν πιο δυναμικά και αποδοτικά στη συνέχεια δοκιμάστηκαν σε ημιδιαλείποντος έργου συστήματα καλλιέργειας (Fed-Batch) σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης. Τέλος, η μελέτη τους επικεντρώθηκε σε συνεχή συστήματα καλλιέργειών με χρήση βιοαντιδραστήρα για την μελέτη των μικροοργανισμών σε συνθήκες δυναμικής ισορροπίας για να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα στην προοπτική βιομηχανικής τους αξιοποίησης.

2.1 Ετερότροφες και Μικτότροφες Καλλιέργειες Διαλείποντος έργου/Ασυνεχούς Συστήματος ανάπτυξης (Batch)

Για την ετερότροφη καλλιέργεια διαλείποντος έργου χρησιμοποιήθηκαν φιάλες των 300 ml, με συνεχή παροχή αποστειρωμένου αέρα μέσω φίλτρων (0.2μm, ο οποίος εξασφαλίζει παράλληλα και τη διαρκή ανάδευση των καλλιεργειών σε pH=7 και θερμοκρασία $T=25\pm 1$ °C. Στο θρεπτικό μέσο ως οργανική πηγή άνθρακα προστέθηκε η ακατέργαστη γλυκερόλη σε διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις (από 5 έως 90 g/L) ανάλογα με την ικανότητα αύξησης του κάθε στελέχους. Δοκιμάστηκε η χρήση διαφορετικών ανόργανων και οργανικών πηγών αζώτου (NH₄Cl, NaNO₃, ουρία, πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)), οι οποίες προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο σε 3 διαφορετικούς λόγους C/N (1/1, 10/1 ή 20/1). Στα θρεπτικά υποστρώματα επίσης προστέθηκε κάθε φορά ασηπτικά διάλυμα βιταμινών B12 (0.003 mg συγκέντρωση στο θρεπτικό), B1 (0.36 mg συγκέντρωση στο θρεπτικό) και διάλυμα αντιβιοτικού χλωραμφαινικόλης για τον περιορισμό πιθανών βακτηριακών επιμολύνσεων (11.25 mg συγκέντρωση στο θρεπτικό). Μετά τον εμβολιασμό του εκάστοτε στελέχους στο αντίστοιχο θρεπτικό του υπόστρωμα (σε ποσοστό 10% του ενεργού τους όγκου), ακολούθησε επώαση των καλλιεργειών σε πλήρες σκότος για την ετερότροφη ανάπτυξη τους, σε θερμοκρασία 25 °C. **(Φωτογραφία 1, Παράρτημα I).**

Για τη μικτότροφη ανάπτυξη διαλείποντος έργου μικτότροφα χρησιμοποιήθηκαν φιάλες των 300 ml, με συνεχή παροχή αέρα που εξασφάλιζε τη διαρκή ανάδευση των καλλιεργειών σε

ίδιες συνθήκες καλλιέργειας Στο θρεπτικό μέσο ως οργανική πηγή άνθρακα προστέθηκε η ακατέργαστη γλυκερόλη σε διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις (από 5 έως 50 g/L) ανάλογα με την ικανότητα αύξησης του κάθε στελέχους. Για τα μικτότροφα συστήματα καλλιέργειας επιλέχθηκε η χρήση ως πηγής αζώτου στο υπόστρωμα η πεπτόνη ή το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) σε αναλογία C/N=20 επειδή τα στελέχη στα ετερότροφα συστήματα έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα παρουσία οργανικής πηγής αζώτου σε αναλογία C/N=20. Στο *S. quadricauda* έγιναν και δοκιμές με την προσθήκη ανόργανης πηγής αζώτου NH_4Cl σε αναλογία C/N=20. Στα θρεπτικά υποστρώματα επίσης προστέθηκε κάθε φορά ασηπτικά διάλυμα βιταμινών B12 (0.003 mg συγκέντρωση στα 200 ml θρεπτικό υπόστρωμα), B1 (0.36 mg συγκέντρωση στα 200 ml θρεπτικό υπόστρωμα) και διάλυμα αντιβιοτικού χλωραμφαινικόλης για τον περιορισμό πιθανών επιμολύνσεων (11.25 mg συγκέντρωση στα 200 ml θρεπτικό υπόστρωμα). Μετά τον εμβολιασμό του κάθε στελέχους στο αντίστοιχο θρεπτικό του υπόστρωμα (σε ποσοστό 10% του ενεργού τους όγκου) ακολούθησε επώαση των καλλιεργειών είτε με λευκό φως (control), (λαμπτήρες λευκού φωτός συνολικής έντασης 3000 Lux) με φωτοπερίοδο φωτός/σκότους ίση με 16/8 ώρες, είτε με μονοχρωματικές πηγές φωτός για την αξιολόγηση της επίδρασης του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός στην ανάπτυξη των μικροφυκών.

Η επίδραση του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός στην ανάπτυξη των μικροφυκών με χρήση λαμπτήρων LED μονοχρωματικής πηγής φωτός (χρώματος: κόκκινου, μπλε και πορτοκαλί σε σύγκριση με το λευκό φως – control) (illumination LED light–SMD type, 14.4 W per meter, 60 SMD LEDs per meter) έγινε για τα στελέχη *A. protothecoides*, *S. quadricauda* και *C. vulgaris*. Μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών ακολουθούσε επώαση σε τέσσερις διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός (κόκκινο - έντασης 2950 Lux, πορτοκαλί- έντασης 3349 Lux, μπλε-έντασης 6714 Lux και λευκό-έντασης 6200 Lux) με φωτοπερίοδο φωτός/σκότους ίση με 16/8 ώρες , υπό συνεχή αερισμό (αποστειρωμένος αέρας), σε θερμοκρασία 25 °C μέχρι να εισέλθει ο μικροοργανισμός στη στάσιμη φάση.). Η ποσότητα του φωτός που φτάνει σε μια επιφάνεια π.χ. τα φύλλα των φυτών, μετριέται σε PPF (Photosynthetic photon flux density), Το PPF μετρά όλα τα φωτόνια (σωματίδια φωτός) μεταξύ του φάσματος PAR (100-110) σε $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Δηλαδή σημαίνει ότι το PPF ειδικότερα μετρά το διαθέσιμο φωτοσυνθετικά φως το οποίο επηρεάζει την ανάπτυξη τους έτσι οι εντάσεις φωτός είναι διαφορετικές αλλά τα μικροφύκη αντιλαμβάνονται το

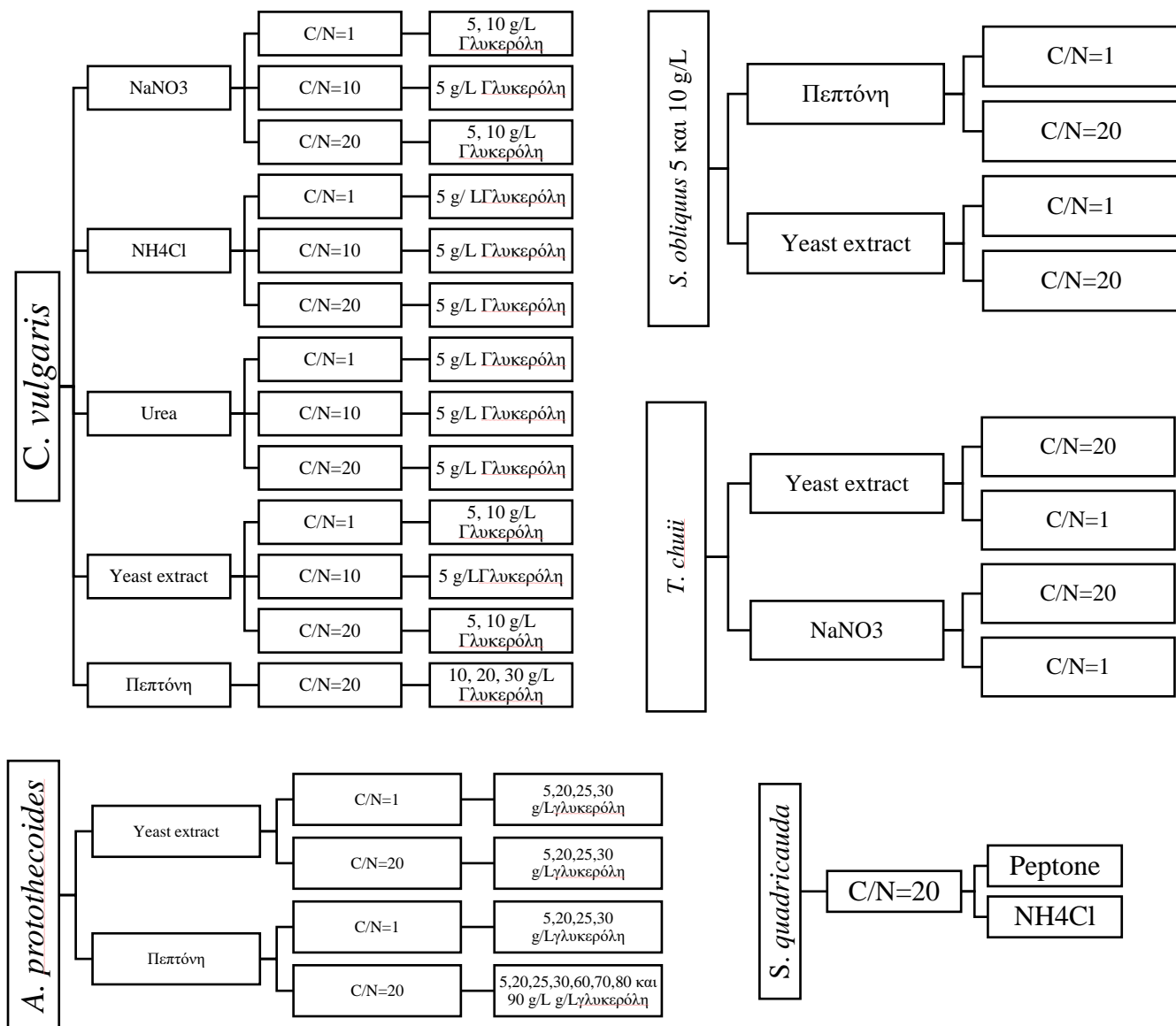
ίδιο PAR στην εκάστοτε ένταση τους οπότε και μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους. **(Φωτογραφία 6 και 7, Παράρτημα Ι)**

Η επίδραση του φωτισμού μελετήθηκε κυρίως στο μικροφύκος *A. protothecoides* όπου δοκιμάστηκε σε διαφορετικούς συνδιασμούς φωτοπεριόδου και έντασης φωτισμού ώστε να αξιολογηθεί η δυναμικότητα του συγκριτικά με την ετερότροφη ανάπτυξη του. (2.500 Lux με φωτοπερίοδο 20:4h φως:σκοτάδι και 12:12h φως:σκοτάδι) (4.500 Lux με φωτοπερίοδο 20:4h φως:σκοτάδι και 12:12h φως:σκοτάδι) σε θρεπτικό υπόστρωμα με 20 και 30 g/L ακατέργαστη γλυκερόλη και οργανική πηγή αζώτου πεπτόνη σε αναλογία C/N=20/1.

Στις καλλιέργειες διαλείποντος έργου που πραγματοποιήθηκαν, γίνονταν καθημερινά δειγματοληψία ασηπτικά με σκοπό τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των καλλιεργειών, φασματοφωτομετρικά στα 750 nm για την παρακολούθηση του ρυθμού αύξησής τους, ενώ παράλληλα μέσω του Megazyme kit, στο υπερκείμενο υπολογιζόταν η συγκέντρωση της γλυκερόλης για την αξιολόγηση της πορείας κατανάλωσης του άνθρακα από το υπόστρωμα. Όταν η καλλιέργεια έφτανε στη φάση της στασιμότητας γινόταν δειγματοληψία προκειμένου να υπολογιστούν οι ποσότητες της ολικής βιομάζας και των παραγόμενων πρωτεϊνών, λιπιδίων, υδατανθράκων και χρωστικών (χλωροφύλλη, καροτενοειδή). **(Εικόνα 2.1.1, 2.1.2, 2.13)**

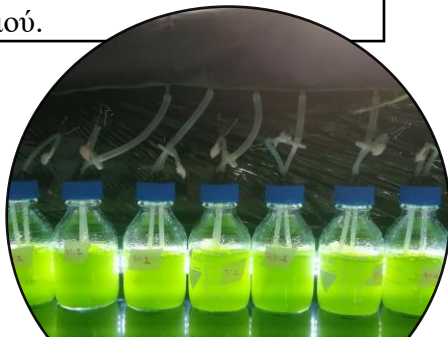
Στο (Διάγραμμα 1) παρουσιάζεται η διαγραμματική απεικόνιση του πειραματικού σχεδιασμού στις διαλείποντος έργου καλλιέργειες μικροφυκών τόσο ετερότροφα όσο και μικτότροφα σε διαφορετικές αναλογίες C/N και πηγές οργανικού και ανόργανου αζώτου με σκοπό την διερεύνηση των καλύτερων συνθηκών ανάπτυξης σε περιβάλλον με πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη.

Όλοι οι χειρισμοί των καλλιεργειών διαλείποντος έργου (ετερότροφη και μικτότροφη ανάπτυξη) διενεργήθηκαν σε 3 επαναλήψεις.

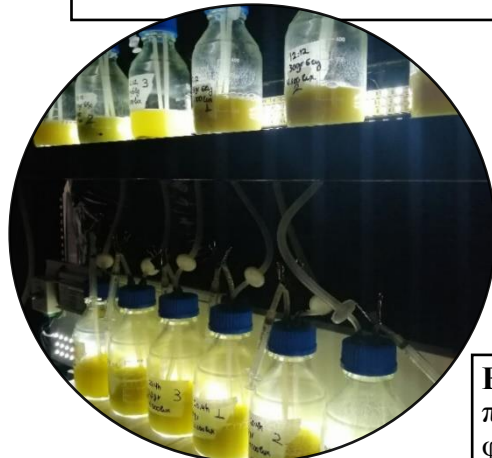


Διάγραμμα 1: Διαγραμματική απεικόνιση του πειραματικού σχεδιασμού στις διαλείποντος έργου καλλιεργείες μικροφυκών τόσο ετερότροφα όσο και μικτότροφα σε διαφορετικές αναλογίες C/N και πηγές οργανικού και ανόργανου αζώτου με σκοπό την διερεύνηση των καλύτερων συνθηκών ανάπτυξης σε περιβάλλον με πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη.

Εικόνα 2.1.1: Καλλιέργεια την ημέρα του εμβολιασμού.



Εικόνα 2.1.2: Καλλιέργεια 1 εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό.



Εικόνα 2.1.3: Καλλιέργεια πριν τη συλλογή των φυκών.

▣

2.2 Ετερότροφες και Μικτότροφες καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου συστήματος καλλιέργειας

Από τα πέντε στελέχη μικροφυκών που μελετήθηκαν το *A. protothecoides* και το *C. vulgaris* ήταν τα πλέον αποδοτικά και δοκιμάστηκαν σε ημιδιαλείποντος έργου συστήματα καλλιέργειας δύο τύπων:

Σύστημα *Semi-continuous*:

Στα ημιδιαλείποντος έργου συστήματα τύπου *semi-continuous* αφού εμβολιάζονταν οι καλλιέργειες με προεμβόλια (ποσότητας ίσης με το 10% του ενεργού τους όγκου), αφήνονταν να

πυκνώσουν σε συνθήκες διαλείποντος αύξησης, σε θερμοκρασία 25 °C και υπό συνθήκες συνεχούς αερισμού (με αποστειρωμένο αέρα μέσω φίλτρου 0.2 μm) και στη συνέχεια γινόταν καθημερινά προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υποστρώματος μετά την αφαίρεση 20 ml υποστρώματος από την αναπτυσσόμενη καλλιέργεια με σκοπό τη διατήρηση ημι-σταθερών συνθηκών ανάπτυξης. Η επώαση έγινε σε ενεργό όγκο καλλιέργειας 200 ml. Καθημερινά γινόταν δειγματοληψία με σκοπό την εκτίμηση της παραγόμενης βιομάζας και της κατανάλωσης της πηγής άνθρακα από το υπόστρωμα.

Το στέλεχος *C. vulgaris* αναπτύχθηκε ετερότροφα σε BBM με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη σε συγκέντρωση 20 g/L σε BBM και πηγή αζώτου εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) και NaNO₃ σε αναλογία C/N=20 και C/N=1.

Το στέλεχος *A. protothecoides* αναπτύχθηκε ετερότροφα και μικτότροφα σε υπόστρωμα σε BBM modified με πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη σε συγκέντρωση 30 g/L και διαφορετικές συγκεντρώσεις αζώτου (5, 4, 3, 2, 1 και 0.5 g/L πεπτόνη) στο υπόστρωμα με σκοπό τη μελέτη της δυναμικότητας του στελέχους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αζώτου και πως αυτές επηρεάζουν την παραγωγή μεταβολιτών.

Σύστημα Fed-Batch:

Σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα αναπτύχθηκε το στέλεχος *A. protothecoides* ετερότροφα και μικτότροφα με χρήση μονοχρωματικών πηγών φωτός (λευκό- control, μπλε, κόκκινο και πορτοκαλί φως) σε BBM modified με πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 5 g/L και καθημερινή προσθήκη πυκνού διαλύματος ακατέργαστης γλυκερόλης και πεπτόνης (για τη διατήρηση της αναλογίας C/N=20) στο υπόστρωμα με στόχο τη τελική συγκέντρωση των 20, 30 και 50 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης. Η επώαση έγινε σε ενεργό όγκο φιάλες των 200 ml. Η θερμοκρασία διατηρούνταν T=25±1 °C, το pH=7 σε συνεχή αερισμό ώστε να εξασφαλιστεί η συνεχής ανάδευση της καλλιέργειας. Καθημερινά γινόταν δειγματοληψία με σκοπό την εκτίμηση παραγωγής βιομάζας και αντίστοιχα του υπολογισμού κατανάλωσης της πηγής άνθρακα από το υπόστρωμα ώστε να προστεθεί κατάλληλη συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος και να υπάρχει αυξητική τάση συσσώρευσης γλυκερόλης στο υπόστρωμα.

2.3 Ετερότροφες και Μικτότροφες καλλιέργειες σε συνεχές σύστημα ανάπτυξης με χρήση βιοαντιδραστήρα (Continuous cultures)

Οι χημειοστατικές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα τύπου New Brunswick Bioflo C30 με ενεργό όγκο καλλιέργειας ίσο με 350 ml ο οποίος διαθέτει στροφέιο ανάδευσης τεσσάρων πτερυγίων. Για την ετερότροφη ανάπτυξη δημιουργήθηκε ειδική κατασκευή προκειμένου να εξασφαλίζει 24h πλήρες σκοτάδι ενώ για τη μικτότροφη ανάπτυξη χρησιμοποιήθηκαν λαμπτήρες τύπου LED μονοχρωματικής πηγής φωτός με φωτοπερίοδο 16:8 ώρες φως:σκοτάδι. Η ένταση των φωτός των μονοχρωματικών πηγών φωτός είναι μπλε-6714 Lux και κόκκινο 2950 Lux)

Η αποστείρωση του δοχείου καλλιέργειας γινόταν σε αυτόκαυστο (121 °C για 45 min). Στη συνέχεια διοχετεύονταν εντός του δοχείου καλλιέργειας 315 ml θρεπτικού υλικού (αντίστοιχο του καλλιεργούμενου στελέχους). Στη συνέχεια, ο βιοαντιδραστήρας εμβολιαζόταν με 35 ml (10% του ενεργού όγκου) ασηπτικά από προκαλλιέργεια του μικροοργανισμού που βρισκόταν στην εκθετική φάση αύξησης. Η καλλιέργεια αρχικά αφηνόταν να αναπτυχθεί υπό συνθήκες καλλιέργειας διαλείποντος έργου για 4-5 μέρες σε σταθερή θερμοκρασία $T=25\pm 1$ °C με ρυθμό ανάδευσης 150 rpm και συνεχή αερισμό που αποστειρωνόταν μέσω φίλτρου 0.2 μm. Καθ' όλη τη διάρκεια της συνεχούς λειτουργίας του ο βιοαντιδραστήρας εφοδιαζόταν με φρέσκο θρεπτικό υλικό μέσω περισταλτικής αντλίας (Ole Dich Instrumentmakers Aps) με σταθερό ρυθμό που καθοριζόταν κάθε φορά με τον ειδικό ρυθμό αραίωσης της καλλιέργειας (D). Η απομάκρυνση της καλλιέργειας από το δοχείο πραγματοποιούταν με φυσική εκροή μέσω εξόδου που βρισκόταν στα πλαϊνά τοιχώματα του βιοαντιδραστήρα, έτσι ώστε ο ενεργός όγκος της καλλιέργειας να διατηρείται σταθερός και ίσος με 350 ml. Για την επίτευξη καταστάσεων δυναμικής ισορροπίας προηγούνταν η διέλευση ποσότητας θρεπτικού υλικού τουλάχιστον πενταπλάσιας του ενεργού όγκου ποσότητας και για να επιβεβαιωθεί η κατάσταση δυναμικής ισορροπίας λαμβάνονταν δείγματα (55 ml) καθημερινά από το βιοαντιδραστήρα και πραγματοποιούνταν εκτίμηση της συγκέντρωσης της βιομάζας και της ακατέργαστης γλυκερόλης του υποστρώματος, μέχρι να διαπιστωθεί η σταθεροποίησή τους. Στη συνέχεια και πριν τη ρύθμιση της επόμενης ροής λαμβανόταν δείγματα για τον υπολογισμό της παραγόμενης βιομάζας, των παραχθέντων μεταβολιτών και της υπολειπόμενης γλυκερόλης. **(Φωτογραφία 2, 3,4 και 5, Παράρτημα I)**

Το στέλεχος *C. vulgaris* αναπτύχθηκε σε βιοαντιδραστήρα ετερότροφου και μικτότροφου συστήματος ανάπτυξης. Ετερότροφα αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα BBM, με αρχική συγκέντρωση 30 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης και πηγή αζώτου πεπτόνη σε αναλογία C/N=20. Μικτότροφα αναπτύχθηκε με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός μπλε και κόκκινου χρώματος. Σε μπλε φωτισμό με φωτοπερίοδο 16:8h αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα BBM, με συγκέντρωση 20 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης και πηγή αζώτου πεπτόνη σε αναλογία C/N=20. Σε κόκκινο φωτισμό με φωτοπερίοδο 16:8h αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα BBM, με συγκέντρωση 30 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης και πηγή αζώτου πεπτόνη σε αναλογία C/N=20.

Επίσης και το στέλεχος *A. protothecoides* αναπτύχθηκε σε βιοαντιδραστήρα ετερότροφα και μικτότροφα συστήματος ανάπτυξης. Ετερότροφα αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα BBM modified, με αρχική συγκέντρωση 30 g/L και 50 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης και πηγή αζώτου πεπτόνη σε αναλογία C/N=20. Μικτότροφα αναπτύχθηκε με χρήση μονοχρωματικής πηγής κόκκινου χρώματος με φωτοπερίοδο 16:8h σε θρεπτικό υπόστρωμα BBM modified, με συγκέντρωση 30 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης και πηγή αζώτου πεπτόνη σε αναλογία C/N=20.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Διαλείποντος έργου καλλιέργειες μικροφυκών (Batch cultures)

1.1 ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Σκοπός των δοκιμών σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου ήταν η διερεύνηση της ικανότητας ανάπτυξης του εκάστοτε στελέχους που δοκιμάστηκε αρχικά κατά την πλήρη απουσία φωτός σε ετερότροφες συνθήκες, όταν η πηγή άνθρακα στο υπόστρωμα ήταν η ακατέργαστη γλυκερόλη. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές πηγές αζώτου (οργανικές και ανόργανες) ώστε παράλληλα να μελετηθεί πως η πηγή αζώτου επηρεάζει αντίστοιχα την ανάπτυξη. Οι παράμετροι λοιπόν που ελέγχθηκαν ήταν το φως, ο άνθρακας και το άζωτο.

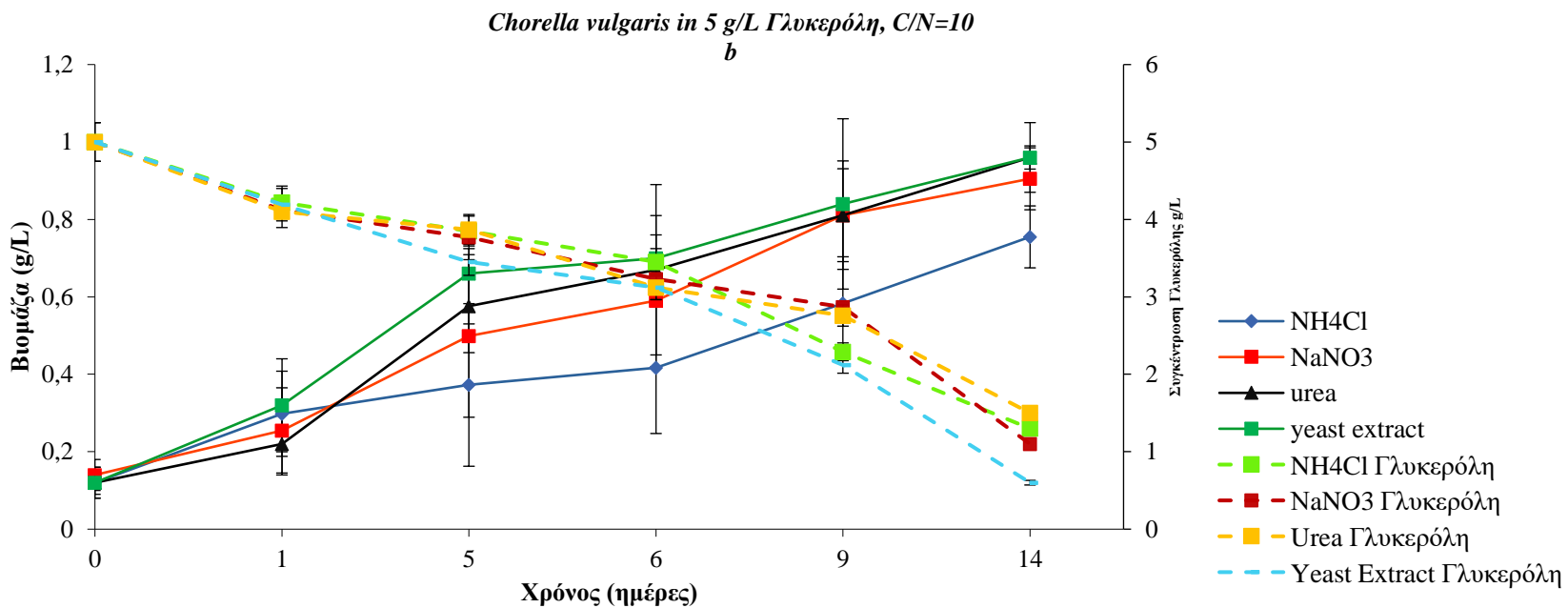
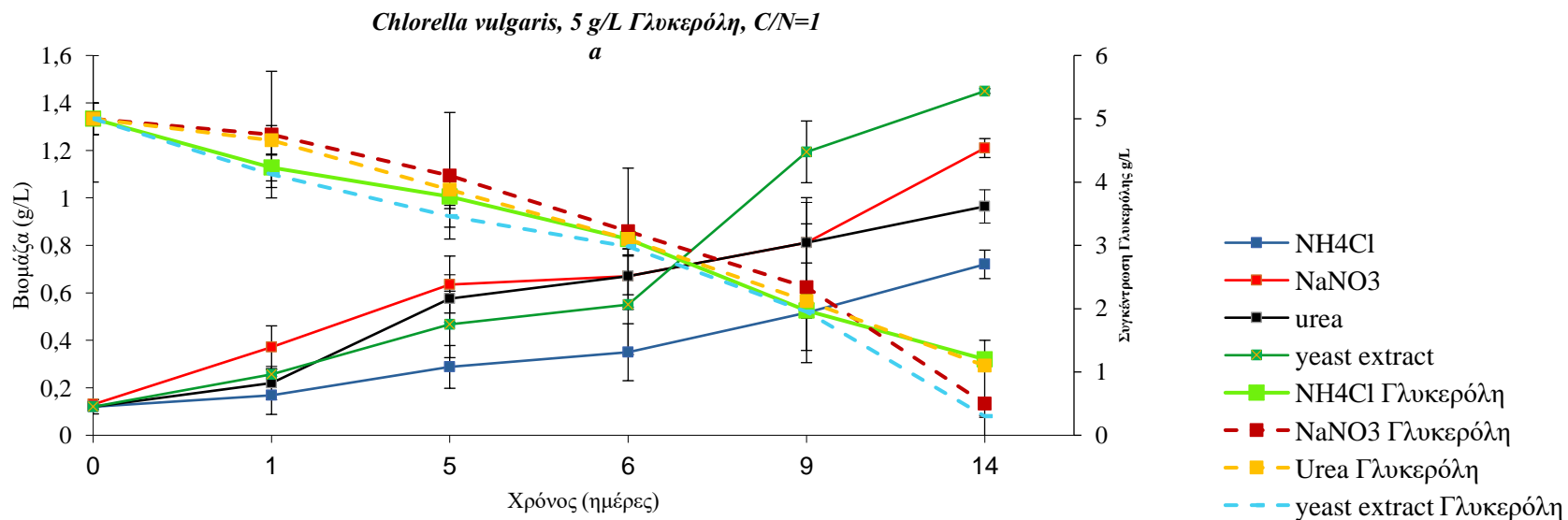
1.1.1 Ετερότροφες καλλιέργειες διαλείποντος έργου του μικροφύκου *C. vulgaris* (Batch):

Το μικροφύκος *C. vulgaris* αρχικά δοκιμάστηκε σε ετερότροφα διαλείποντος έργου συστήματα καλλιέργειας όπου στο θρεπτικό μέσο η κύρια πηγή άνθρακα ήταν η ακατέργαστη γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση 5g/L. Σκοπός των δοκιμών ήταν η δυνατότητα ανάπτυξης σε διαφορετικές πηγές αζώτου ετερότροφα. Οι πηγές αζώτου που επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν δοκιμαστικά ήταν δυο ανόργανες πηγές και (NH_4Cl , NaNO_3) και δυο οργανικές (ουρία και εκχύλισμα ζύμης) σε δύο διαφορετικούς λόγους C/N (1/1 και 20/1). Η διάρκεια των καλλιεργειών που έλαβαν χώρα ήταν 14 ημέρες και ολοκληρώθηκαν με την είσοδο του μικροοργανισμού στη στάσιμη φάση και αφού καταναλώθηκε πλήρως η γλυκερόλη στο υπόστρωμα. Το μικροφύκος παρουσίασε καλύτερη ανάπτυξη στον λόγο C/N=1/1 (με παραγόμενη βιομάζα 1.21 g/L \pm 0.04 σε NaNO_3 και 1.45g/L \pm 0.01 σε εκχύλισμα ζύμης (**Πίνακας 1**). Κατά την ανάπτυξη με ουρία και NH_4Cl ο ρυθμός ανάπτυξης και κατά επέκταση η παραγωγή βιομάζας δεν επηρεάστηκαν από τον λόγο C/N (**Γράφημα 1**). Μετά από τις δοκιμές σε τέσσερις διαφορετικές πηγές αζώτου με τρεις διαφορετικούς λόγους C/N το συμπέρασμα ήταν ότι το στέλεχος ευδοκίμει καλύτερα παρουσία οργανικής πηγής αζώτου στο υπόστρωμα εκχυλισμα ζύμης και σε ανόργανη πηγή αζώτου (NaNO_3) σε λόγο C/N=1, όπου παρατηρήθηκε και ο καλύτερος ρυθμός ανάπτυξης με την υψηλότερη παραγωγή βιομάζας με ειδικό αριθμό αύξησης (μ) να είναι ίσος με 0.14 και 0.10 h⁻¹,

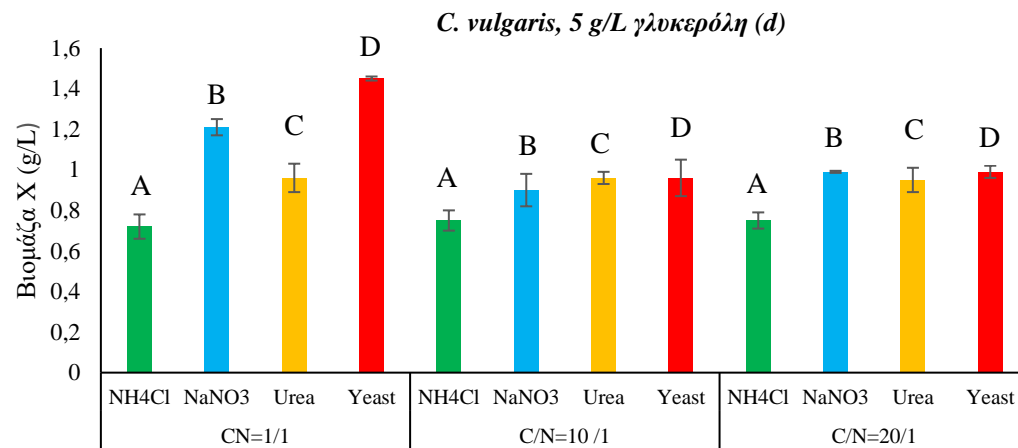
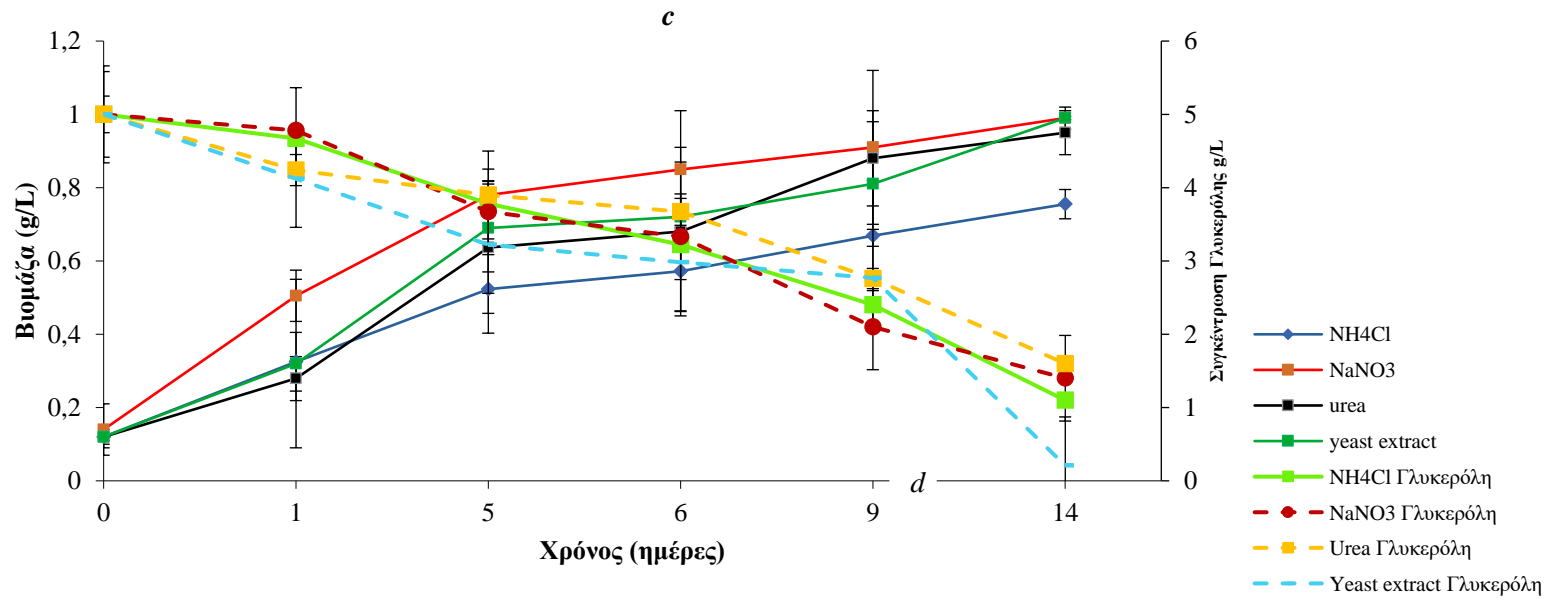
αντίστοιχα. Η παραγωγικότητα του συστήματος σημειώθηκε χαμηλή με πιο αυξημένες τιμές στην οργανική πηγή αζώτου εκχύλισμα ζύμης σε αναλογία C/N=1 ($Y_x/s = 0.3 \text{ g/g}$). Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με one way ANOVA ($p < 0.05$) για τη βιομάζα, με συγκρίσεις που έγιναν για κάθε λόγο ξεχωριστά μεταξύ των διαφορετικών πηγών αζώτου, προέκυψε ότι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν στον λόγο C/N=1 όπου η παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένη στις πηγές αζώτου NaNO_3 και εκχύλισμα ζύμης. Στις υπόλοιπες δοκιμές δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. (**Γράφημα 1, d**).

Μετά την ανάλυση της βιοχημικής σύστασης της βιομάζας που παράχθηκε **Πίνακας 1**, παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη περιεκτικότητα της βιομάζας σε πρωτεΐνη σημειώθηκε κατά την ανάπτυξη παρουσίας οργανικών πηγών αζώτου στο υπόστρωμα σε αναλογία C/N=1 (0.282 g/L , ή 19.92%) σε εκχύλισμα ζύμης. Αντίστοιχα όταν αναπτυσσόταν σε ανόργανη πηγή αζώτου στο υπόστρωμα υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξη σε NaNO_3 με λόγο C/N=10/1 (0.217 g/L , ή $24.55\%^A$), είναι γνωστό ότι όταν υπάρχει πηγή οργανικού αζώτου στο υπόστρωμα η παραγωγή πρωτεϊνών είναι υψηλότερη (Azma et al., 2011) συμπέρασμα που θα διαπιστωθεί στα επόμενα πειράματα. Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με one way ANOVA ($p < 0.05$) για την παραγωγή των πρωτεϊνών προέκυψε ότι όσον αφορά την παραγωγικότητα τους δεν υπήρχε σημαντικά στατιστική διαφορά. Όσον αφορά το ποσοστό επί τις % της ξηρής βιομάζας μεταξύ των δοκιμών προέκυψε ότι στατιστικά σημαντική διαφορά σημειώθηκε μεταξύ των δοκιμών στο λόγο C/N=10 κατά την ανάπτυξη με εκχύλισμα ζύμης και στο λόγο C/N=20 κατά την ανάπτυξη με NaNO_3 (**Γράφημα 1.1**)

Η παραγωγή χρωστικών κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα λόγω της ετερότροφης ανάπτυξης. Όσον αφορά την παραγωγή της χλωροφύλλης a (Ca) η μέγιστη απόδοση παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα με NH_4Cl και C/N=10/1 (0.21%) ενώ σε NaNO_3 με C/N=10/1 (0.204%). Ακολούθως η παραγωγή της χλωροφύλλης b (Cb) η απόδοση που παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξη σε υπόστρωμα με ουρία και λόγο C/N=10/1 ($0.36\%^A$) και ακολούθως σε υπόστρωμα με NaNO_3 με C/N=1/1 ($0.33\%^A$). Η μέγιστη παραγωγή ολικής χλωροφύλλης (Ca+b) σημειώθηκε κατά την ανάπτυξη με ουρία στον λόγο C/N=10/1 (0.531%) και C/N=20/1 (0.492%). Η μέγιστη παραγωγή ολικών καροτενοειδών (Cx+c) παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξη με πηγή αζώτου εκχύλισμα ζύμης) και C/N=1/1 (1.9%) και σε υπόστρωμα με NH_4Cl σε λόγο C/N=10/1 (0.062%). Στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν ως προς την παραγωγή χρωστικών παρά μόνο κατά τον λόγο C/N=10 όπως φαίνεται και στον (**Πίνακα 1.2**).



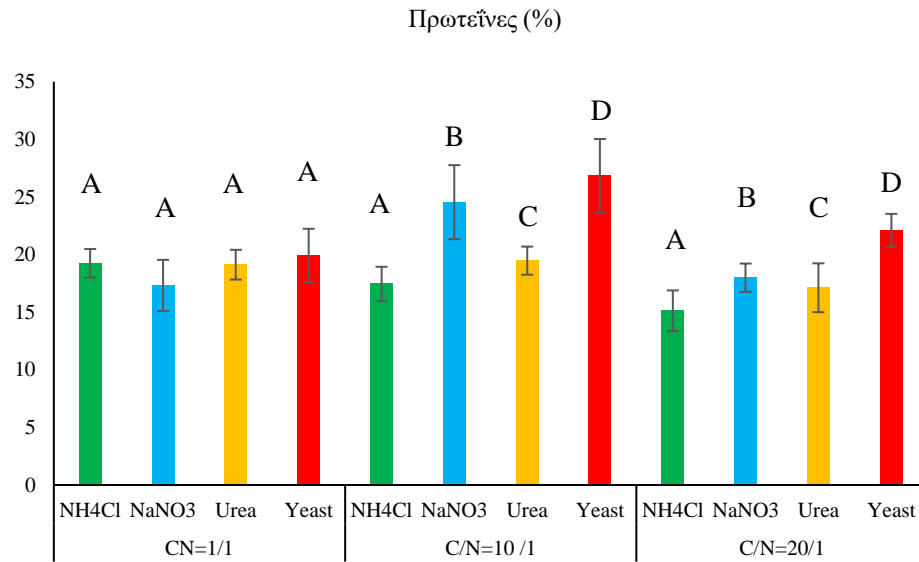
Chlorella vulgaris in 5 g/L Γλυκερόλη, C/N=20



Γράφημα 1 Κινητική αύξησης του μικροφύκου και της κατανάλωσης του άνθρακα στο υπόστρωμα στο μικροφύκος *C. vulgaris* σε διαλείποντος έργου ετερότροφη καλλιέργεια με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη (5 g/L) τέσσερις διαφορετικές πηγές αζώτου (NaNO₃, NH₄Cl, ουρία και εκχύλισμα ζύμης) και για a) C/N 1/1, b) C/N 10/1 και c) C/N 20/1 (D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας, g/L.) Στο γράφημα φαίνεται το SD των τριών βιολογικών επαναλήψεων που διεξήχθησαν οι δοκιμές n=3. d) Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, p < 0,05 των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών πηγών αζώτου. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (NH₄Cl, NaNO₃, ουρία και εκχύλισμα ζύμης). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 1.: Η συγκέντρωση της παραγόμενης βιομάζας (X g/L), ο ρυθμός αύξησης (μ_{\max} d⁻¹), η παραγωγικότητα του συστήματος (Yx/s) και η συγκέντρωση πρωτεΐνης (g/L) του μικροφύκου *C. vulgaris* υπό συνθήκες ετερότροφης ανάπτυξης (φάση στασιμότητας) σε υπόστρωμα με 5 g/L ζ γλυκερόλης (crude), σε λόγους C/N 1/1, 10/1, 20/1 και για τέσσερις πηγές αζώτου οργανικού και ανόργανου. Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε πρωτεΐνη ως ποσοστό %. Η αποδοτικότητα του συστήματος δίνεται σε παραγόμενη ξηρή βιομάζα (D.W. g/L). Η τυπική απόκλιση δίνεται από το SD (\pm) από τον αριθμό των επαναλήψεων $n=3$ βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών πηγών αζώτου. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (NH_4Cl , NaNO_3 , ουρία και εκχύλισμα ζύμης). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πηγή αζώτου	C/N=1				C/N=10/1				C/N=20/1			
	X (g/L)	μ_{\max} (d ⁻¹)	Yx/s	Πρωτεΐνες (g/L)	X (g/L)	μ_{\max} (d ⁻¹)	Yx/s	Πρωτεΐνες (g/L)	X (g/L)	μ_{\max} (d ⁻¹)	Yx/s	Πρωτεΐνες (g/L)
NH₄Cl	0.72 ± 0.06 ^A	0.14	0.03	0.144 ± 0.08 ^A	0.75 ± 0.05 ^A	0.05	0.16	0.128 ± 0.04 ^A	0.75 ± 0.04 ^A	0.11	0.18	0.113 ± 0.04 ^A
NaNO₃	1.21 ± 0.04 ^B	0.12	0.25	0.212 ± 0.09 ^A	0.9 ± 0.08 ^B	0.03	0.2	0.217 ± 0.3 ^A	0.99 ± 0.005 ^B	0.11	0.23	0.171 ± 0.03 ^A
urea	0.96 ± 0.07 ^C	0.22	0.2	0.183 ± 0.06 ^A	0.96 ± 0.03 ^C	0.08	0.21	0.183 ± 0.09 ^A	0.95 ± 0.06 ^C	0.08	0.22	0.164 ± 0.09 ^A
Yeast extract	1.45 ± 0.01 ^D	0.25	0.3	0.282 ± 0.07 ^A	0.96 ± 0.09 ^D	0.04	0.21	0.247 ± 0.07 ^A	0.99 ± 0.03 ^D	0.06	0.23	0.214 ± 0.08 ^A



Γράφημα 1.1 Ποσοστό παραγωγής πρωτεϊνών του μικροφύκου *C. vulgaris* σε διαλείποντος έργου ετερότροφο σύστημα ανάπτυξης με διαφορετικές πηγές αζώτου (NH₄Cl, NaNO₃, ουρία και εκχύλισμα ζύμης) και για C/N 1/1, C/N 10/1 και C/N 20/1. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών πηγών αζώτου. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (NH₄Cl, NaNO₃, ουρία και εκχύλισμα ζύμης). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 1.2 Η συγκέντρωση των παραγόμενων χρωστικών (mg/g βιομάζας), του μικροφύκου *C. vulgaris* υπό συνθήκες ετερότροφης ανάπτυξης (φάση στασιμότητας) σε υπόστρωμα με 5 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης (crude), σε λόγους C/N 1/1, 10/1 και 20/1 και σε διάφορες πηγές αζώτου. Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε χρωστικές ως ποσοστό %. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών πηγών αζώτου. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (NH_4Cl , NaNO_3 , ουρία και εκχύλισμα ζύμης). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

	Χλωροφύλλη α (Ca)		Χλωροφύλλη β (Cb)		Ολική χλωροφύλλη (Ca+b)		Ολικά καροτενοειδή (Cx+c)	
C/N=1								
	(mg/g)	% DW	(mg/g)	mg/g D.W. (%)	(mg/g)	% DW	(mg/g)	% DW
NH_4Cl	1.74 ^A	0.18% ^A	2.78 ^A	0.289% ^A	4.53 ^A	0.47% ^A	0	0
NaNO_3	1.55 ^A	0.128% ^A	4.04 ^B	0.33% ^A	5.59 ^A	0.462% ^A	0	0
Yeast extract	1.01 ^A	0.07% ^B	0.73 ^C	0.051% ^B	1.74 ^B	0.12% ^B	27.584	1.9%
Urea	1.65 ^A	0.172% ^A	3.43 ^B	0.36% ^A	5.09 ^A	0.531% ^A	0	0
C/N=10								
NaNO_3	1.84 ^A	0.204% ^A	1.70 ^A	0.188% ^A	3.55 ^A	0.392% ^A	0	0
Yeast extract	1.60 ^A	0.167% ^A	1.86 ^A	0.194% ^A	3.47 ^A	0.361% ^A	0	0
NH_4Cl	1.58 ^A	0.21% ^A	1.16 ^A	0.155% ^A	2.75 ^A	0.365% ^A	0.467	0.062%
C/N=20								
Urea	1.66 ^A	0.175% ^A	3.0 ^A	0.317% ^A	4.67 ^A	0.492% ^A	0	0
NaNO_3	1.77 ^A	0.179% ^A	2.9 ^A	0.294% ^A	4.67 ^A	0.473% ^A	0	0
NH_4Cl	1.67 ^A	0.222% ^A	3.31 ^A	0.439% ^A	4.98 ^A	0.661% ^B	0	0
Yeast extract	1.69 ^A	0.177% ^A	3.12 ^A	0.314% ^A	4.89 ^A	0.543% ^A	0	0

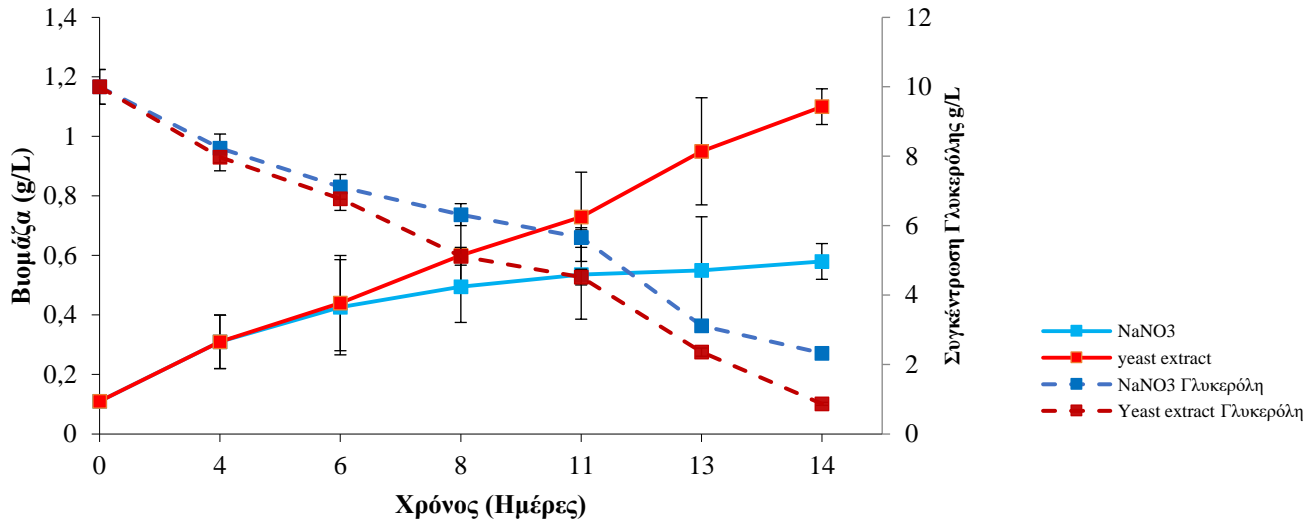
Στη συνέχεια των πειραματικών δοκιμών για τη διερεύνηση της δυναμικότητας του *C. vulgaris* και την ικανότητα του να αναπτυχθεί ετερότροφα, η συγκέντρωση της γλυκερόλης αυξήθηκε στα 10 g/L χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά ως πηγή αζώτου NaNO_3 και εκχύλισμα ζύμης που έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα στα 5 g/L σε αναλογίες C/N=1 και C/N=20. Σκοπός ήταν η αξιολόγηση της δυναμικότητας σε μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκερόλης ετερότροφα σε μία ανόργανη και μια οργανική πηγή αζώτου (**Γράφημα 2**). Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα της κινητικής αύξησης του μικροφύκου, ο ρυθμός ανάπτυξης και η παραγωγή βιομάζας ευνοήθηκε κατά την ύπαρξη οργανικής πηγής αζώτου στο υπόστρωμα εκχύλισμα ζύμης και στις δύο αναλογίες C/N. Παρουσία NaNO_3 ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροφύκου δεν ευνοήθηκε αντίστοιχα και παρουσίασε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες τιμές σε σχέση με την ανάπτυξη σε εκχύλισμα ζύμης. Επίσης παρατηρήθηκε ότι ενώ αυξήθηκε η διαθέσιμη ποσότητα άνθρακα στο υπόστρωμα στα 10 g/L (από τα 5 g/L) η παραχθείσα βιομάζα ήταν 1.1 g/L και ο ρυθμός ανάπτυξης μ_{\max} μειώθηκε από 0.14 σε 0.1 και 0.11 d^{-1} (στη μεγαλύτερη συγκέντρωση πηγής αζώτου C/N=1 και στη μικρότερη αντίστοιχα C/N=20). Αντίστοιχα οι παραγωγικότητα του συστήματος σημείωσε τη μέγιστη τιμή όταν το μικροφύκος αναπτύχθηκε σε περιβάλλον με οργανική πηγή αζώτου τόσο σε αναλογία C/N=10 όσο και C/N=1 με $Y_{x/s}=0.15$ g/g.

Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζεται η βιοχημική σύσταση της βιομάζας και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, λιπίδια και υδατάνθρακες που προήλθε από τις δοκιμές της ετερότροφης ανάπτυξης με 10 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης στο υπόστρωμα και πηγή αζώτου NaNO_3 ή εκχύλισμα ζύμης για λόγο C/N 1/1 και 20/1. Η μέγιστη παραγωγή πρωτεϊνών παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα όπου η πηγή αζώτου ήταν το εκχύλισμα ζύμης (19-20.6%) όπως ήταν αναμενόμενο όταν στο θρεπτικό υπόστρωμα υπάρχει οργανική πηγή αζώτου. Η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα ανάπτυξης με πηγή αζώτου NaNO_3 σε λόγο C/N=20/1, όπως επισημαίνεται και βιβλιογραφικά όταν το μικροφύκος αναπτύσσεται σε συνθήκες τροφωπενίας αζώτου τείνει να παράγει περισσότερα λιπίδια, πράγμα το οποίο θα σχολιαστεί εκτενέστερα και με δεδομένα των επόμενων πειραμάτων στη συζήτηση. Η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες σε θρεπτικό υπόστρωμα με εκχύλισμα ζύμης άγγιξε σε ποσοστό το 9.9-10.8% ενώ η μέγιστη παραγωγή (12.4%) σε υπόστρωμα με πηγή αζώτου NaNO_3 και λόγο C/N=20/1. Στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν σε καμία δοκιμή με μεταξύ τους σύγκριση των αποτελεσμάτων. Όπως φαίνεται και στο **Γράφημα 2.1 (a)**. Αντίστοιχα η περιεκτικότητα της

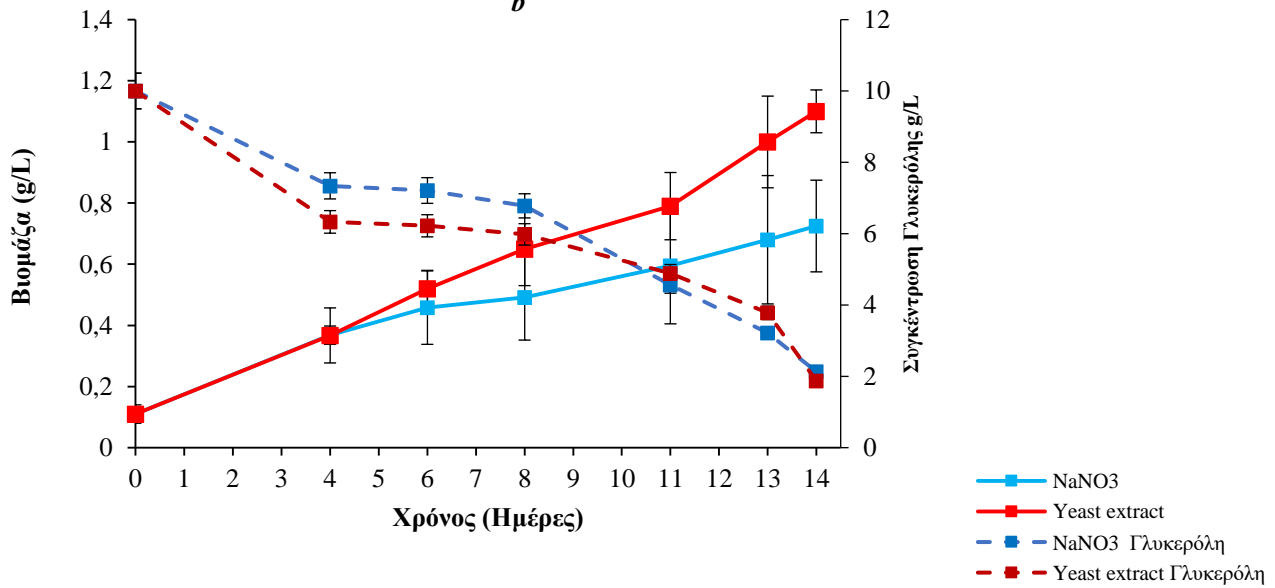
βιομάζας σε χρωστικές κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα **Πίνακας 2** όπως ήταν αναμενόμενο σε συνθήκες ετερότροφης ανάπτυξης. Η υψηλότερη περιεκτικότητα της βιομάζας σε χλωροφύλλη a (0.15%), χλωροφύλλη b (0.27%) και ολική χλωροφύλλη (0.43%) παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης σε υπόστρωμα με πηγή αζώτου NaNO_3 και για λόγο C/N=1/1. Υπάρχει η υπόθεση ότι συνυπολογίστηκαν οι χρωστικές που προϋπήρχαν κατά την ανάπτυξη του προεμβολίου καθώς η παραγωγή της βιομάζας κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα (0.58 g/L). Οι συγκρίσεις για την παραγωγή χλωροφυλλών έγιναν σε δύο επίπεδα. Αρχικά παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών λόγων C/N που δοκιμάστηκαν στα πειράματα και παρατηρήθηκε ότι σε λόγο C/N=20 δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ NaNO_3 ενώ αντίστοιχα στο εκχύλισμα ζύμης σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για την παραγωγή χλωροφύλλης b και ολικών χλωροφυλλών. (**Γράφημα 2.1 (b)**). Εν αντιθέσει σε σύγκριση που έγινε μεταξύ των διαφορετικών πηγών αζώτου χωρίς να ληφθεί υπόψιν η αναλογία C/N παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή χρωστικών σε περιβάλλον ανάπτυξης με NaNO_3 ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την ανάπτυξη σε θρεπτικό με εκχύλισμα ζύμης.

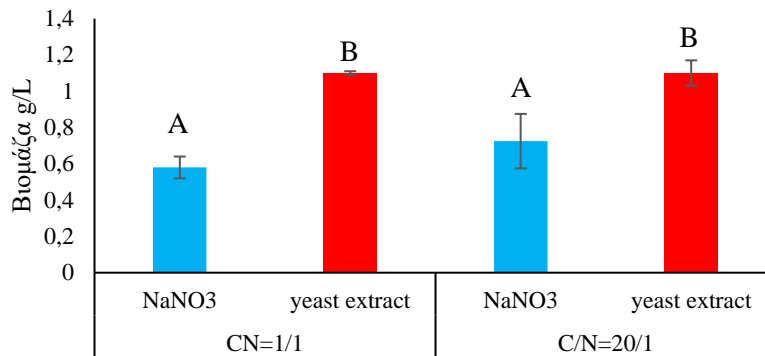
Μπορεί λοιπόν να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι κατά την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στο υπόστρωμα παρεμποδίζεται η ανάπτυξη του μικροφύκου. Εν κατακλείδι το *C. vulgaris* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται ετερότροφα όσο η συγκέντρωση του διαθέσιμου άνθρακα στο υπόστρωμα δεν ξεπερνά τα επίπεδα που μπορούν να προκαλέσουν παρεμπόδιση της ανάπτυξης και ενδεχόμενη τοξικότητα, βέβαια έγιναν αντίστοιχα περισσότερες δοκιμές για τη διερεύνηση της παραγωγικότητας των λιπιδίων σε περιβάλλον που το στέλεχος βιώνει συνθήκες στρες.

Chlorella vulgaris, 10 g/L Γλυκερόλη, C/N=1
α



Chlorella vulgaris, 10 g/L Γλυκερόλη, C/N=20
β



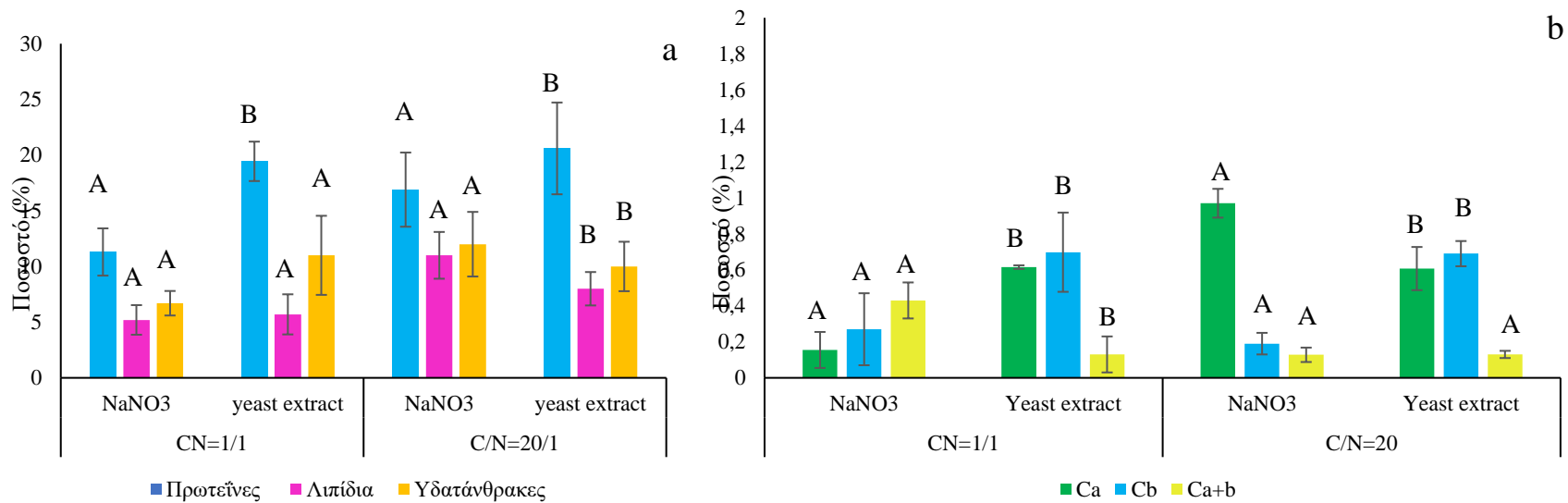


Γράφημα 2 Κινητική αύξησης της κατανάλωσης του άνθρακα του μικροφύκου *C. vulgaris* σε διαλείποντος έργου ετερότροφη καλλιέργεια με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη (10 g/L) για διαφορετικές πηγές αζώτου (NaNO₃ και εκχύλισμα ζύμης και για a) C/N=1/1 και b) C/N=20/1. (D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας) Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών πηγών αζώτου. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (NaNO₃ και Εκχύλισμα ζύμης). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 2: Οι συγκεντρώσεις σε πρωτεΐνη (g/L), λιπίδια (g/L), υδατάνθρακες (g/L) και χρωστικών (mg/g) της βιομάζας του μικροφύκου *C. vulgaris* υπό συνθήκες ετερότροφης ανάπτυξης (φάση στασιμότητας) σε υπόστρωμα με 10 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης (crude), σε λόγους C/N 1 και 20 και σε δυο πηγές αζώτου. Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας στον κάθε μεταβολίτη ως ποσοστό επί %. Η αποδοτικότητα του συστήματος δίνεται σε παραγόμενη ξηρή βιομάζα (X g/L). Η τυπική απόκλιση δίνεται από το SD (\pm) από τον αριθμό των επαναλήψεων n=3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών πηγών αζώτου. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (NaNO_3 και εκχύλισμα ζύμης). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πηγή αζώτου	X (g/L)	μ_{\max} (d^{-1})	Yx/s	Πρωτεΐνες (g/L)	Λιπίδια (g/L)	Υδατάνθρακες (g/L)
C/N=1						
NaNO₃	0.58 ± 0.06^A	0.045	0.08	0.066 ± 0.001^A	0.04 ± 0.002^A	0.039 ± 0.002^A
Yeast extract	1.1 ± 0.01^A	0.1	0.15	0.209 ± 0.08^A	0.063 ± 0.007^A	0.118 ± 0.004^A
C/N=20						
NaNO₃	0.725 ± 0.15^A	0.06	0.1	0.122 ± 0.05^A	0.081 ± 0.003^A	0.09 ± 0.009^A
Yeast extract	1.1 ± 0.07^A	0.1	0.15	0.227 ± 0.05^A	0.088 ± 0.0001^A	0.109 ± 0.01^A

	Χλωροφύλλη α (Ca)	Χλωροφύλλη β (Cb)	Ολική Χλωροφύλλη (Ca+b)	Ολικά καροτενοειδή (Cx+c)
	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
C/N= 1				
NaNO3	9.12 ^A	15.88 ^A	25.0 ^A	0
Yeast extract	6.76 ^A	7.67 ^A	14.44 ^A	0
C/N=20				
NaNO3	7.03 ^A	13.83 ^A	20.87 ^A	0
Yeast extract	6.68 ^A	7.630 ^B	14.31 ^A	0

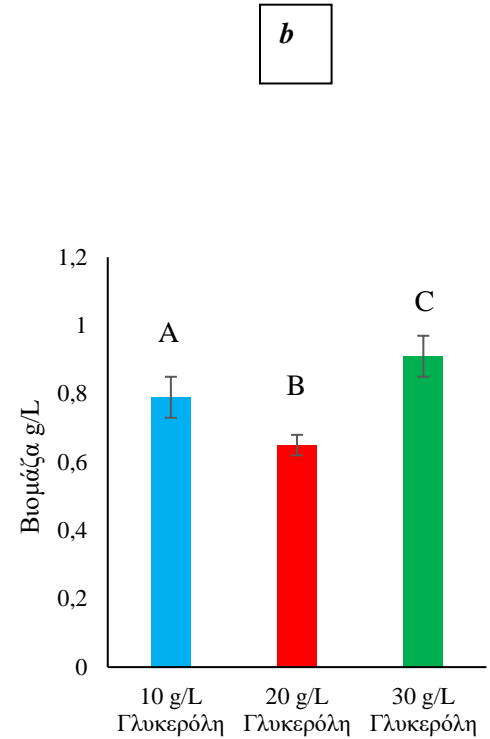
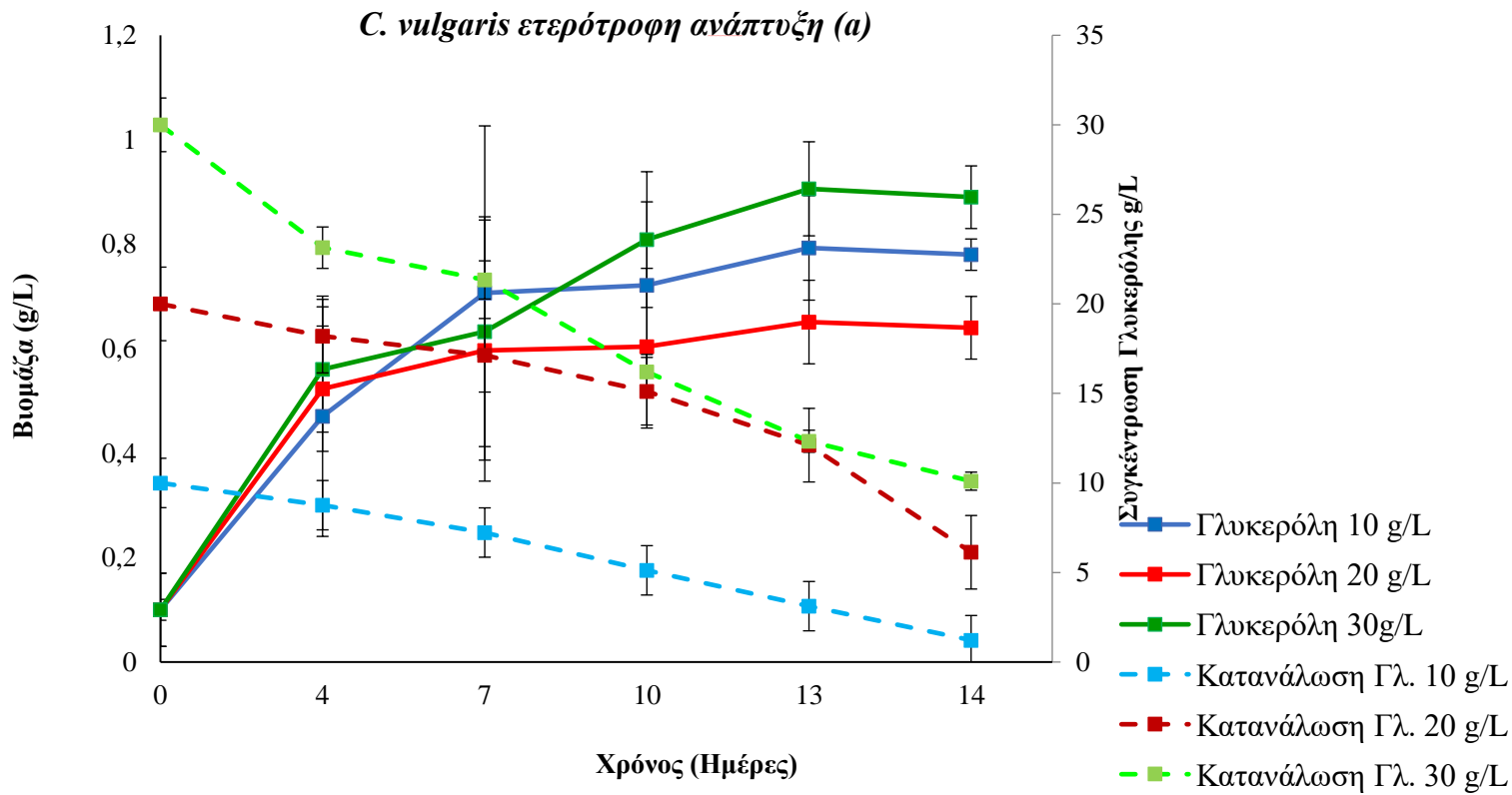


Γράφημα 2.1 Ποσοστό παραγωγής μεταβολιτών (a) και χρωστικών (b) του μικροφύκου *C. vulgaris* σε διαλείποντος έργου ετερότροφο σύστημα ανάπτυξης με διαφορετικές πηγές αζώτου (NaNO₃ και εκχύλισμα ζύμης για C/N 1/1 και C/N 20/1. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών λόγων άνθρακα/αζώτου για κάθε πηγή αζώτου. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (C/N=1, C/N=20). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Παρά το γεγονός ότι παρατηρήθηκε παρεμπόδιση της αύξησης του μικροφύκου κατά την ανάπτυξη σε συγκέντρωση πάνω από 10 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο έγιναν επιπλέον δοκιμές σε ετερότροφο τρόπο ανάπτυξης με 10 g/L, 20 g/L και 30 g/L με αυτή τη φορά να χρησιμοποιείται ως πηγή αζώτου η πεπτόνη σε αναλογία C/N=20, η πεπτόνη επιλέχθηκε στις συγκεκριμένες δοκιμές λόγω προκαταρκτικών πειραμάτων σε προεμβόλια που έδειξαν να αναπτύσσονται ταχύτερα σε σχέση με το εκχύλισμα ζύμης, που έδειξαν μια μικρή αύξηση ως προς την παραγωγή βιομάζας αλλά με μικρές διαφορές καθώς η πεπτόνη σε σχέση με το εκχύλισμα ζύμης έχουν παρόμοιο ποσοστό σε περιεκτικότητα αζώτου. Ο λόγος που οδήγησε σε αυτές τις δοκιμές προέκυψε από την βιβλιογραφία (Gao et al., 2013) όπου υποστηρίζεται ότι σε περιβάλλον στρες το μικροφύκος τείνει να συσσωρεύει περισσότερα λιπίδια σε σχέση με το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται υπό ιδανικές συνθήκες, βέβαια όπως θα διαπιστωθεί συγκριτικά με τη μικτότροφη ανάπτυξη, σε συνθήκες απουσίας φωτός η παραγωγή μεταβολιτών και βιομάζας δεν ευνοείται και κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα. Η αποδοτικότητα ως προς την παραγωγή βιομάζας άγγιξε στα 30 g/L τα 0.91 g/L. Ενώ μικρότερη σημειώθηκε η παραγωγικότητα σε σχέση με τα 5 g/L αρχικής συγκέντρωσης των προηγούμενων δοκιμών.

Ανάμεσα στις τιμές της βιομάζας που προέκυψαν κατά την ανάπτυξη σε 10g/L και 20 g/L δεν παρουσιάστηκε κάποια σημαντική στατιστική διαφορά και αυτό οφείλεται στις υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης που είναι γνωστό ότι παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (**Γράφημα 3**). Η παραγόμενη βιομάζα κατά την ανάπτυξη σε 10, 20 και 30 g/L με πεπτόνη ως πηγή αζώτου σε C/N=20 παρατηρήθηκε ότι ήταν πλούσια σε λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Η παραγωγή των πρωτεϊνών άγγιξε τα 0.65 g/L (66%) στα 20 g/L, τα λιπίδια 0.146 g/L (16%) σε 30 g/L και 0.071 g/L (9%) οι υδατάνθρακες σε 10 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης. Από τα αποτελέσματα επιβεβαιώνεται ότι παρόλη τη μικρή παραγωγή βιομάζας η παραγωγή λιπιδίων κυμάνθηκε σε θεμιτά επίπεδα, χαμηλότερα από αυτήν που αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Αντίστοιχα οι χρωστικές κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα με εξαίρεση την παραγωγή καροτενοειδών που άγγιξε τα 69.34 mg/g. (**Πίνακας 3**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι δεν υπάρχει στατικά σημαντική διαφορά της παραγόμενης βιομάζας μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης. Αντίστοιχα όμως για την παραγωγή μεταβολιτών παρατηρήθηκε ότι σημαντική στατιστική διαφορά παρουσίασε η παραγωγή λιπιδίων στα 30 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης, ενώ η παραγωγή πρωτεϊνών και

υδατανθράκων δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές. Σημαντικές στατιστικές διαφορές σημειώθηκαν, ως προς το περιεχόμενο της βιομάζας σε μεταβόλιτες. Συγκεκριμένα τα ποσοστά των πρωτεϊνών έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές και στις 3 συγκεντρώσεις γλυκερόλης, τα λιπίδια σημείωσαν σημαντική διαφορά στα 30 g/L σε σχέση με τις άλλες δύο συγκεντρώσεις και οι υδατάνθρακες αντίστοιχα των λιπιδίων (**Γράφημα 3.1**). Η παραγωγή των χρωστικών σημείωσε σε αρκετά σημεία στατιστικά σημαντικές διαφορές όπως αντίστοιχα φαίνεται και στο (**Γράφημα 3.1**). Οι σημαντικότερες διαφορές παρατηρήθηκαν ως προς την παραγωγικότητα και τα ποσοστά ως προς την ξηρή βιομάζα στην παραγωγή ολικών χλωροφυλλών αλλά και των καροτενοειδών.

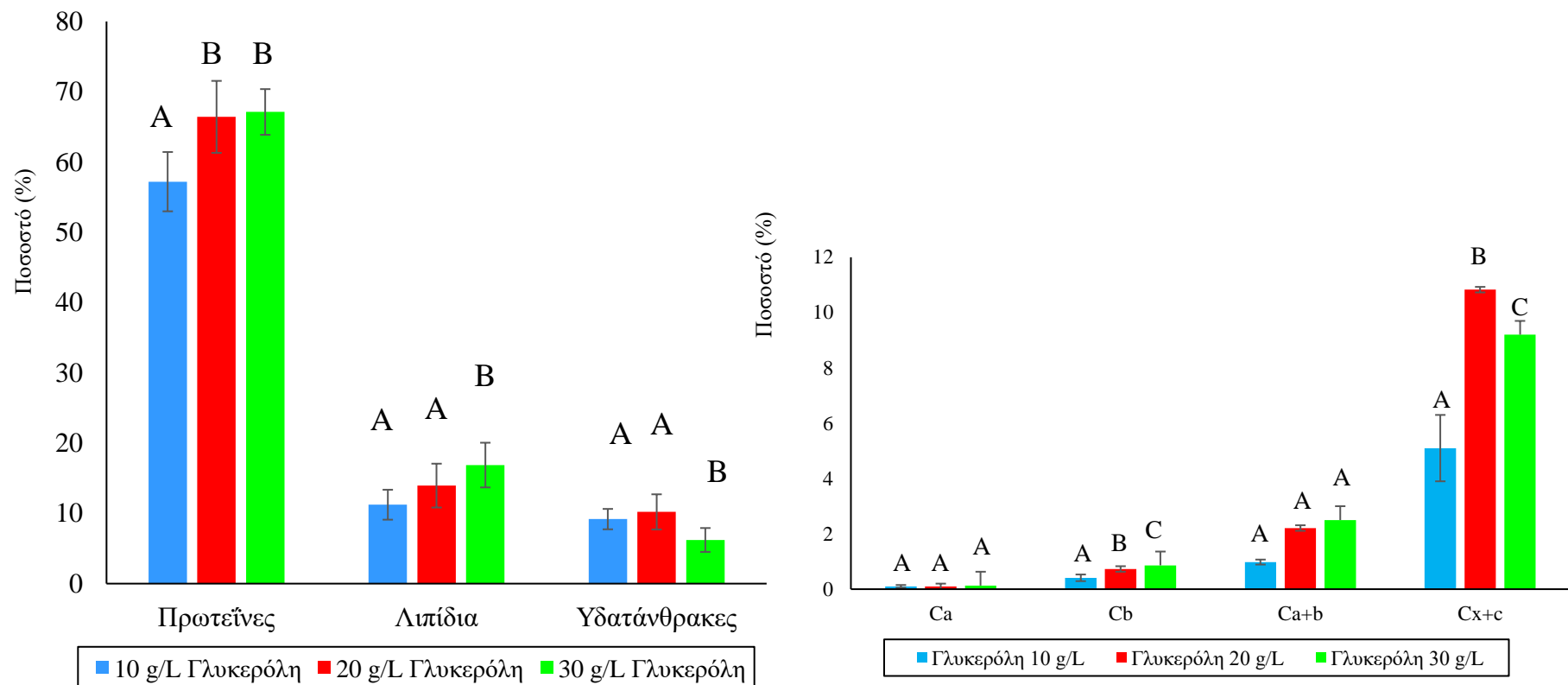


Γράφημα 3: Κινητική αύξησης και κατανάλωσης του άνθρακα του μικροφύκου *C. vulgaris* σε διαλείποντος έργου ετερότροφη καλλιέργεια με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη (10, 20 και 30 g/L) με πηγή αζώτου πεπτόνη σε αναλογία C/N 20/1 (D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας g/L) (a). Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (10, 20 και 30 g/L Γλυκερόλη). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές. (b)

Πίνακας 3: Οι συγκεντρώσεις σε πρωτεΐνη (g/L), λιπίδια (g/L), υδατάνθρακες (g/L) και χρωστικών (mg/g) της βιομάζας του μικροφύκου *C. vulgaris* υπό συνθήκες ετερότροφης ανάπτυξης (φάση στασιμότητας) σε υπόστρωμα με 10 g/L, 20 και 30 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης (crude), σε λόγο 20 και με πηγή αζώτου πεπτόνη. Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας στον κάθε μεταβολίτη ως ποσοστό επί %. Η αποδοτικότητα του συστήματος δίνεται σε παραγόμενη ξηρή βιομάζα (X g/L). Η τυπική απόκλιση δίνεται από το SD (\pm) από τον αριθμό των επαναλήψεων n=3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (10, 20 και 30 g/L). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Ετερότροφη καλλιέργεια <i>Chlorella vulgaris</i> C/N = 20/1																	
10 gr/l Γλυκερόλη						20 gr/l Γλυκερόλη						30 gr/l Γλυκερόλη					
μ_{\max} (d ⁻¹)	X (g/L)	$Y_{X/S}$	Pr (g/L)	Li (g/L)	Ca (g/L)	μ_{\max} (d ⁻¹)	X (g/L)	$Y_{X/S}$	Pr (g/L)	Li (g/L)	Ca (g/L)	μ_{\max} (d ⁻¹)	X (g/L)	$Y_{X/S}$	Pr (g/L)	Li (g/L)	Ca (g/L)
0.39	0.79 \pm 0.06 ^A	0.07	0.45 \pm 0.08 ^A	0.087 \pm 0.008 ^A	0.071 \pm 0.014 ^A	0.41	0.65 \pm 0.03 ^B	0.03	0.43 \pm 0.02 ^A	0.085 \pm 0.001 ^A	0.062 \pm 0.002 ^A	0.43	0.91 \pm 0.06 ^C	0.03	0.61 \pm 0.04 ^A	0.146 \pm 0.002 ^B	0.055 \pm 0.003 ^A

Χρωστικές	10g/L Γλυκερόλη	20 g/L γλυκερόλη	30 g/L Γλυκερόλη
	mg/g	mg/g	mg/g
Χλωροφύλλη α (Ca)	0.735 ^A	0.69 ^A	1.23 ^B
Χλωροφύλλη b (Cb)	3.214 ^A	4.731 ^B	7.706 ^C
Ολική χρωλοφύλλη	7.699 ^A	14.174 ^B	22.302 ^C
Ολικά καροτενοειδη	40 ^A	69.34 ^B	82.13 ^C



Γράφημα 3.1 Ποσοστό παραγωγής μεταβολιτών (α) και χρωστικών (β) του μικροφύκου *C. vulgaris* σε διαλείποντος έργου ετερότροφο σύστημα ανάπτυξης με πηγή αζώτου πεπτόνη σε αναλογία C/N=20 και συγκεντρώσεις Γλυκερόλης 10, 20 και 30 g/L. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων Γλυκερόλης. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (10, 20 και 30 g/L Γλυκερόλη). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

1.1.2 Ετερότροφες καλλιέργειες διαλείποντος έργου του μικροφύκου *S. obliquus* (Batch)

Σε ετερότροφες καλλιέργειες διαλείποντος έργου διερευνήθηκε η δυναμικότητα του μικροφύκου *S. obliquus* με πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη στο υπόστρωμα σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (5 και 10 g/L) παρουσία δύο διαφορετικών πηγών αζώτου (πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης σε λόγους C/N (1/1 και 20/1). Η παραγωγικότητα του στελέχους ευνοείται από την παρουσία οργανικής πηγής αζώτου στο υπόστρωμα σε σχέση με την ανόργανη πηγή αζώτου που δοκιμάστηκε αντίστοιχα σε μικτότροφες καλλιέργειες (τα αποτελέσματα των οποίων παρατάσσονται παρακάτω). Η επιλογή λοιπόν της χρήσης οργανικών πηγών αζώτου για τις πειραματικές διαδικασίες που αφορούν στις ετερότροφες καλλιέργειες οφείλονται σε αυτό το συμπέρασμα. Σε συγκεντρώσεις γλυκερόλης 5 g/L παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της βιομάζας η οποία παράχθηκε ήταν μεγαλύτερη σε περιβάλλον με C/N=1 με εκχύλισμα ζύμης από ότι σε αναλογία με C/N=20. η αποδοτικότητα της βιομάζας άγγιξε τα 1.25 g/L. Αντίστοιχα ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροφύκου παρουσίασε μείωση όταν στο υπόστρωμα η πηγή αζώτου ήταν η πεπτόνη και το ίδιο παρατηρήθηκε όταν η αναλογία ήταν C/N=20 όπου παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα παραγωγής βιομάζας (0.644-0.675 g/L) (**Γράφημα 4**).

Στη συνέχεια έγινε αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της ακατέργαστης γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο στα 10 g/L. Η αποδοτικότητα του στελέχους αυξήθηκε σε σχέση με τα 5 g/L με τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας να σημειώνεται στον λόγο C/N=1 με πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης (2.505 g/L) ενώ αντίστοιχα υψηλή παραγωγικότητα βιομάζας παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξη με πηγή αζώτου την πεπτόνη σε αναλογία C/N=1 (2.219-2.229 g/L) (**Γράφημα 4**). Η ικανότητα του *S. obliquus* ως στέλεχος παρουσίασε καλύτερη ανάπτυξη ετερότροφα σε περιβάλλον με ακατέργαστη γλυκερόλη ως εναλλακτική πηγή άνθρακα σε σχέση με το *C. vulgaris* παρόλα αυτά η απόδοση της βιομάζας σε μεταβολίτες δεν ήταν ιδιαίτερα υψηλή και για το λόγο αυτό δεν διενεργήθηκαν επιπλέον δοκιμές σε ετερότροφα συστήματα καλλιέργειας.

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4** από την βιοχημική ανάλυση της βιομάζας η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και λιπίδια κατά την ετερότροφη ανάπτυξη παρατηρήθηκε στη μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης στο υπόστρωμα με (10 g/L) σε λόγο C/N=20/1, σε θρεπτικό μέσο με λόγο C/N=1. Όπως και στην *C. vulgaris* έτσι και το *S. obliquus* δεν παρατηρήθηκε κατά την

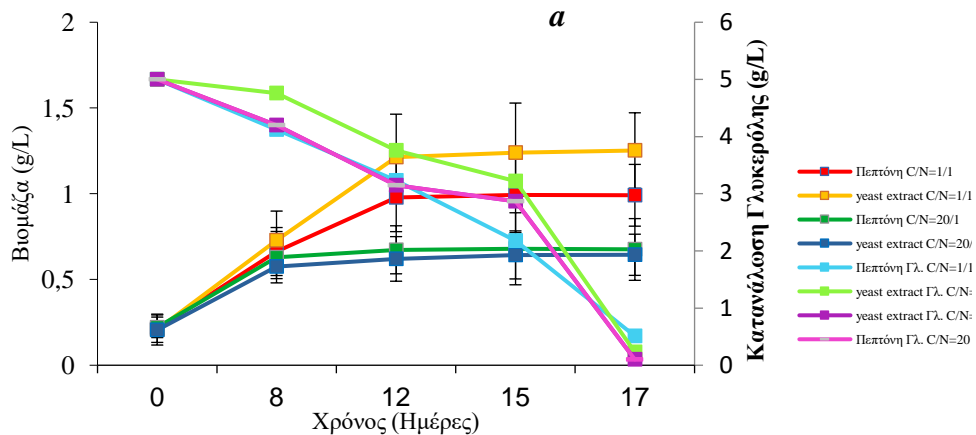
ετερότροφη αύξηση του σημαντική παραγωγή λιπιδίων. Όσον αφορά τους υδατάνθρακες η παραγωγή τους κυμάνθηκε σε ποσοστό 10-21%.

Η περιεκτικότητα της βιομάζας του *S. obliquus* σε χρωστικές δίνεται στον **Πίνακα 4** Κατά την ετερότροφη ανάπτυξη του μικροφύκου η παραγωγή χλωροφυλλών ήταν χαμηλή, ενώ καταγράφηκε σημαντικότερη παραγωγή καροτενοειδών. Σε υπόστρωμα με 5 g/L γλυκερόλη, πηγή αζώτου εκχύλισμα εκχυλισμα ζύμης και C/N = 20/1, παρατηρήθηκε η μέγιστη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη a (1,05%), χλωροφύλλη b (0,62%), ολική χλωροφύλλη (1,67%) και ολικά καροτενοειδή (0.76%). Στα 10 g/L γλυκερόλη η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χρωστικές σημειώθηκε σε πεπτόνη για C/N = 1/1, με ποσοστά χλωροφύλλης a 0,166%, χλωροφύλλης b 0,21%, ολικής χλωροφύλλης 0,376%, ενώ η μέγιστη απόδοση σε ολικά καροτενοειδή (1,629%) παρατηρήθηκε σε εκχύλισμα ζύμης για C/N = 1/1.

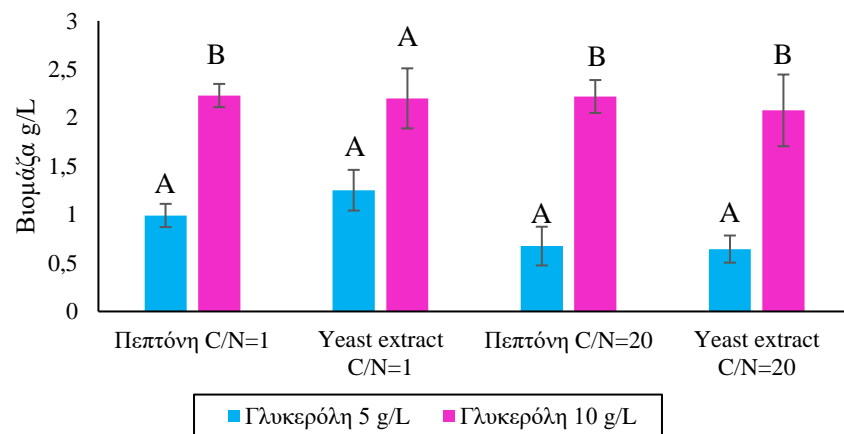
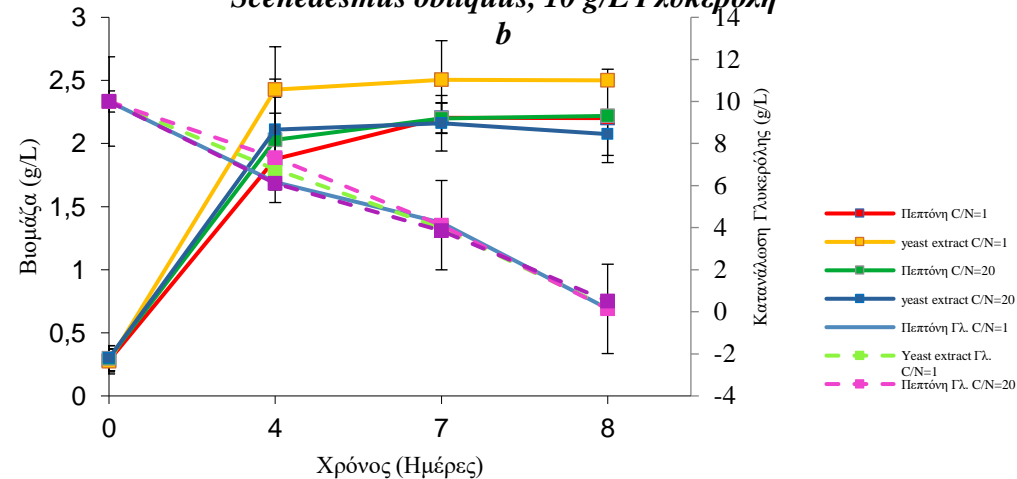
Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4** με συγκρίσεις μεταξύ των δύο διαφορετικών πηγών αζώτου δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές και αυτό οφείλεται και στην παρόμοια σύσταση των δύο οργανικών πηγών αζώτου εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνης. Αντίστοιχα συγκρίθηκε η παραγωγή μεταβολιτών στις δύο αναλογίες C/N στις δύο αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης στο υπόστρωμα. Ειδικότερα σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές κυρίως κατά την ανάπτυξη σε C/N=20 ανάμεσα στα 5 g/L και 10 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης, υποδεικνύοντας ότι το μικροφύκος πλην της παραγωγής πρωτεϊνών παρουσίασε καλύτερη απόδοση σε λιπίδια και υδατάνθρακες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης τα 5g/L. (**Γράφημα 4.1**)

Το *S. obliquus* στη συνέχεια των δοκιμών σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ακατέργαστης γλυκερόλης παρουσίασε αδυναμία ανάπτυξης και το στέλεχος ενώ είχε προοπτικές και παρουσίαζε υψηλή δυναμικότητα δεν αναπτύχθηκε και παρατηρήθηκε εκφυλισμός του.

Scenedesmus obliquus, 5 g/L Γλυκερόλη



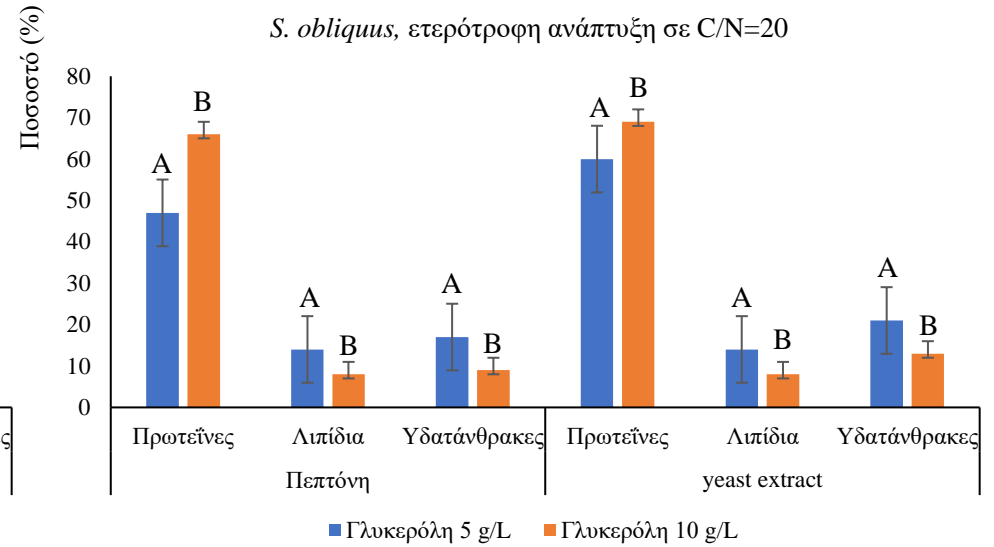
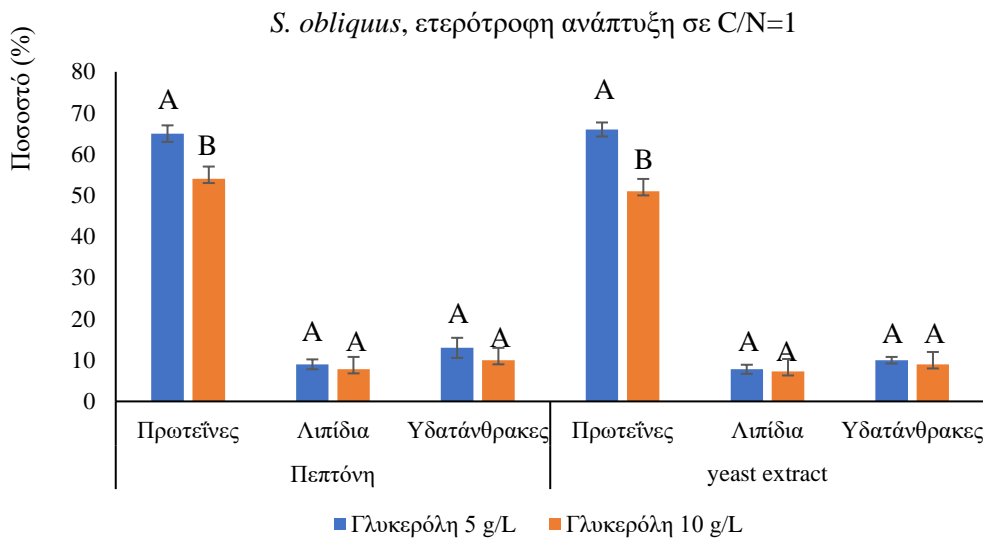
Scenedesmus obliquus, 10 g/L Γλυκερόλη



Γράφημα 4: Κινητική αύξηση του μικροφύκου *S. obliquus* και κατανάλωσης της πηγής άνθρακα σε διαλείποντος έργου ετερότροφη καλλιέργεια με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη α) 5 g/L. β) 10 g/L. για δυο διαφορετικές πηγές αζώτου (πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης και για C/N 1/1 και C/N 20/1. (D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας). Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων Γλυκερόλης. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (5 και 10 g/L Γλυκερόλη). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 4: Οι συγκεντρώσεις σε πρωτεΐνη (g/L), λιπίδια (g/L), υδατάνθρακες (g/L) και χρωστικών (mg/g) της βιομάζας του μικροφύκου *S. obliquus* υπό συνθήκες ετερότροφης ανάπτυξης (φάση στασιμότητας) σε υπόστρωμα με 5 g/L και 10 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης (crude), σε λόγο 20 και με πηγή αζώτου πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης. Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας στον κάθε μεταβολίτη ως ποσοστό επί %. Η αποδοτικότητα του συστήματος δίνεται σε παραγόμενη ξηρή βιομάζα (g/L). Η τυπική απόκλιση δίνεται από το SD (\pm) από τον αριθμό των επαναλήψεων n=3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών πηγών αζώτου. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνη g/L). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

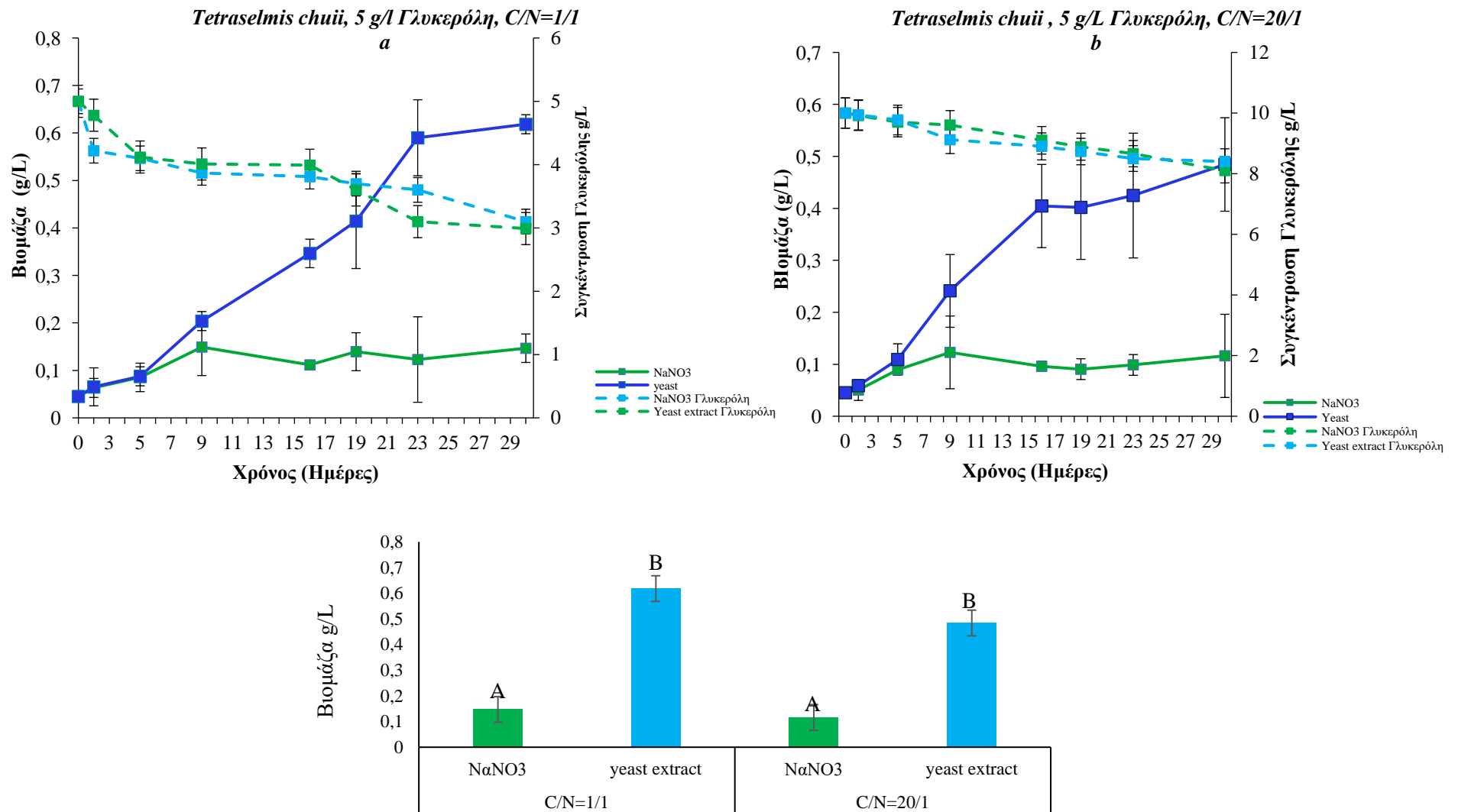
5 gr /l Γλυκερόλη					
	Βιομάζα g/L	Yx/s g/g	Πρωτεΐνη (g/L)	Λιπίδια (g/L)	Υδατάνθρακες (g/L)
C/N=1					
Πεπτόνη	0.991 ^A \pm 0.09	0.12	0.65 ^A \pm 0.023	0.096 ^A \pm 0.02	0.124 ^A \pm 0.003
yeast extract	1.252 ^A \pm 0.1	0.13	0.8 ^B \pm 0.012	0.096 ^A \pm 0.02	0.126 ^A \pm 0.004
C/N=20					
Πεπτόνη	0.675 ^A \pm 0.08	0.11	0.32 ^A \pm 0.3	0.095 ^A \pm 0.01	0.12 ^A \pm 0.006
yeast extract	0.644 ^A \pm 0.07	0.12	0.39 ^B \pm 0.17	0.125 ^A \pm 0.02	0.14 ^A \pm 0.002
10 gr/l Γλυκερόλη					
C/N=1					
Πεπτόνη	2.2 \pm 0.7	0.16	1.19 \pm 0.002	0.172 \pm 0.001	0.23 \pm 0.0001
yeast extract	2.2 \pm 0.4	0.18	1.138 \pm 0.007	0.162 \pm 0.002	0.2 \pm 0.0002
C/N=20					
Πεπτόνη	2.2 \pm 0.34	0.17	1.46 \pm 0.008	0.193 ^A \pm 0.003	0.21 \pm 0.0007
yeast extract	2 \pm 0.22	0.13	1.39 \pm 0.009	0.166 ^A \pm 0.005	0.263 \pm 0.0008



Γράφημα 4.1 Ποσοστό παραγωγής μεταβολιτών επί της ξηρής βιομάζας σε λόγους C/N=1 (a) και C/N=20 (b) του μικροφύκου *S. obliquus* σε διαλείποντος έργου ετερότροφο σύστημα ανάπτυξης με πηγή αζώτου πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης σε συγκέντρωση γλυκερόλης 5 και 10 g/L. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων Γλυκερόλης. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (5 και 10 g/L Γλυκερόλη). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

1.1.3 Ετερότροφες καλλιέργειες του μικροφύκου *Tetraselmis chuii*

Έγιναν δοκιμές ανάπτυξης του στελέχους *T. chuii* σε διαλείποντος έργου καλλιέργεια με εναλλακτική πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη (αρχική συγκέντρωση 5 g/L) σε δύο διαφορετικές πηγές αζώτου (μία ανόργανη - NaNO_3 και μια οργανική - εκχύλισμα ζύμης σε δύο διαφορετικούς λόγους C/N = 1/1 και C/N=20/1 (**Γράφημα 5**). Η καλλιέργεια παρουσίασε μεγάλο χρόνο προσαρμογής (φάση υστέρησης) αλλά έκανε και ιδιαίτερα πολύ χρόνο να φτάσει έως τη στάσιμη φάση (μετά το πέρας 30 ημερών). Η βιομάζα που παράχθηκε δεν ξεπέρασε τα 0.618 g/L και αυτό παρουσία εκχυλισμα ζύμης στην υψηλότερη συγκέντρωση (λόγος C/N=1/1). Στη συνέχεια έγινε μια δεύτερη δοκιμή με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης τα 10 g/L στο θρεπτικό υπόστρωμα. Το στέλεχος παρουσίασε πολύ μεγάλη περίοδο προσαρμογής και στο τέλος εκφυλισμό στο πέρας μίας εβδομάδας ανάπτυξης με μέσο όρο μ_{\max} 0.01 g/g. Εξαιτίας αυτών των δεδομένων το *T. chuii* κρίθηκε χαμηλού βιολογικού ενδιαφέροντος και δεν διενεργήθηκαν περαιτέρω αναλύσεις. Βιοχημική ανάλυση της βιομάζας δεν διενεργήθηκε καθώς δεν θεωρήθηκε σκόπιμο, λόγω εξαιρετικά χαμηλής απόδοσης.



Γράφημα 5. Κινητική αύξησης και κατανάλωσης του άνθρακα του μικροφύκου *T. chuii* σε διαλείποντος έργου ετερότροφη καλλιέργεια με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη 5 g/L. για δυο διαφορετικές πηγές αζώτου (NaNO₃ και εκχύλισμα ζύμης και για a) C/N 1 και b) C/N 20. D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών πηγών αζώτου. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνη. Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

1.1.4 Ετερότροφες καλλιέργειες του μικροφύκου *Auxenochlorella protothecoides* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ακατέργαστης γλυκερόλης

Το στέλεχος *A. protothecoides* καλλιεργήθηκε αρχικά σε ετερότροφα διαλείποντος έργου συστήματα καλλιέργειας με πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη στο υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση τα 5 g/L και διαφορετικές πηγές αζώτου πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης σε αναλογίες C/N=1 και C/N=20 (**Γράφημα 6**). Οι δοκιμές έγιναν μόνο με οργανικές πηγές αζώτου γιατί βάσει της βιβλιογραφίας και προκαταρκτικών πειραμάτων που έχουν διεξαχθεί το μικροφύκος παρουσιάζει καλύτερη ανάπτυξη παρουσία οργανικής πηγής αζώτου σε σύγκριση με ανόργανες πηγές αζώτου. Η παραγόμενη βιομάζα σημειώθηκε μεγαλύτερη όταν ο λόγος ήταν C/N=1 παρουσία εκχύλισμα ζύμης (4.35 g/L). Οι συγκεντρώσεις της βιομάζας σε όλες τις συνθήκες καλλιέργειας που δοκιμάστηκαν ήταν σημαντικά αυξημένες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές που παράχθηκαν από τα άλλα στελέχη μικροφυκών στις αντίστοιχες συνθήκες.

Στη συνέχεια των πειραματικών δοκιμών η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης αυξήθηκε στα 20 g/L σε δοκιμές σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου με πηγή άνθρακα πεπτόνη σε αναλογίες C/N=1 και C/N=20. (**Γράφημα 6**). Το στέλεχος εισήλθε στη στάσιμη φάση μετά το πέρας 18 ημερών όπου η συγκέντρωση της παραχθείσας βιομάζας σημειώθηκε αυξημένη στις δοκιμές με πηγή αζώτου την πεπτόνη (το μέγιστο ήταν τα 6 g/L σε C/N=1 και 5.75 σε C/N=20). Παρουσία εκχύλισμα ζύμης ως πηγή αζώτου στο υπόστρωμα παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση στον ρυθμό αύξησης ιδιαίτερα παρουσία C/N=1 πράγμα που υποδηλώνει ότι σε μεγάλες συγκεντρώσεις αζώτου στο θρεπτικό μέσο, τείνει να προκαλεί παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Λόγω της υψηλής δυναμικής του στελέχους έγιναν περαιτέρω δοκιμές με σκοπό τη διερεύνηση της ικανότητας αύξησης του *A. protothecoides* σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης. Έτσι στη συνέχεια των δοκιμών πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες διαλείποντος έργου διαλείποντος έργου παρουσία 25 και 30 g/L γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα στο υπόστρωμα (**Γράφημα 6 c και d**).

Η αποδοτικότητα του στελέχους έδωσε εξαιρετικά αποτελέσματα και στις δύο δοκιμές αφού έδωσε μεγαλύτερες ποσότητες βιομάζας και σημείωσε μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης, καλύτερη ανάπτυξη μάλιστα παρατηρήθηκε κατά την καλλιέργεια σε περιβάλλον με πηγή αζώτου την πεπτόνη σε αναλογία C/N=20 και για τα 25 g/L παρήγαγε 8.8 g/L (**Γράφημα 6c**).

Όσον αφορά τα 30 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης η απόδοση σε βιομάζα παρατηρήθηκε αρκετά αυξημένη σε αναλογία C/N=20 με πηγή αζώτου την πεπτόνη στο υπόστρωμα. και ήταν ίση με 12.173 g/L (**Γράφημα 6d**). Η αποδοτικότητα του στελέχους σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης έδωσε εξαιρετικά αποτελέσματα ως προς την παραγωγικότητα του ιδιαίτερα σε περιβάλλον με οργανική πηγή αζώτου.

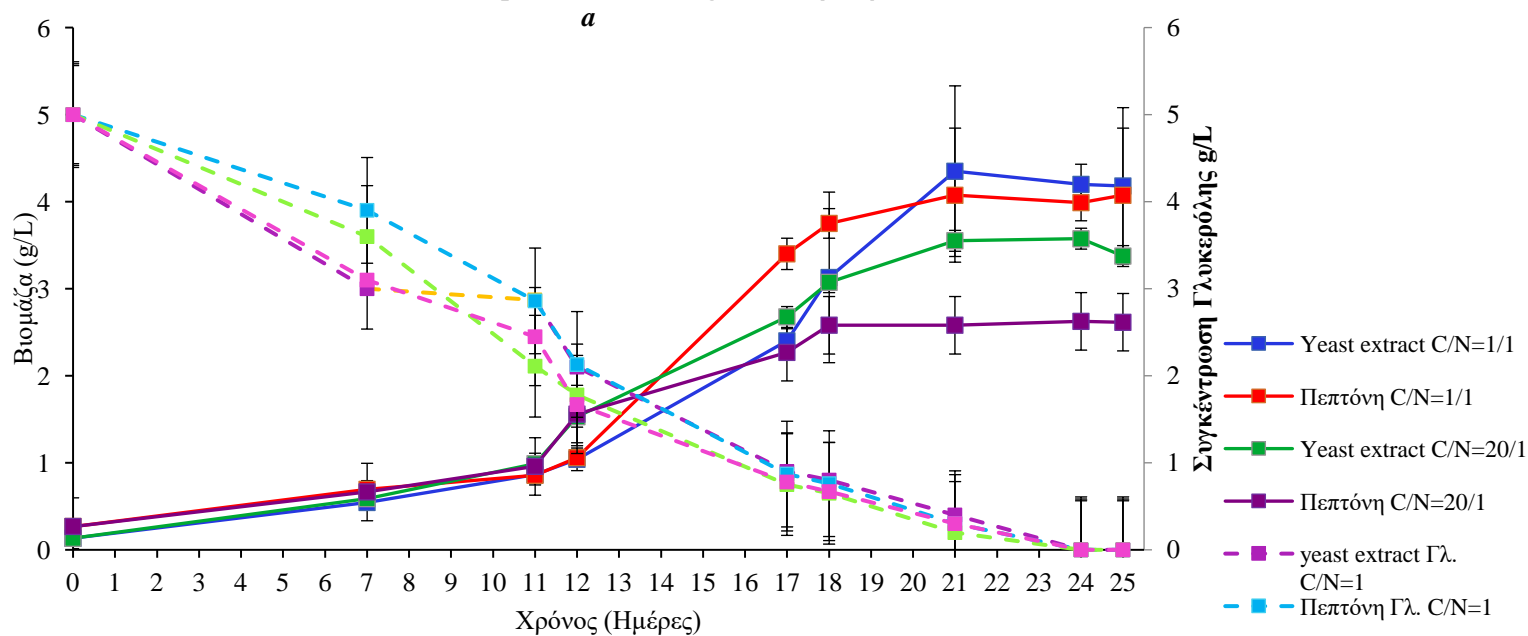
Η βιοχημική ανάλυση της βιομάζας (**Πίνακας 5**), έδειξε ότι αυτή ήταν πλούσια σε πρωτεΐνες. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών κινήθηκαν σε υψηλές τιμές σε όλες τις δοκιμές αγγίζοντας το 22-59% της συνολικής βιομάζας, ιδιαίτερα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης. Αντίστοιχα όσον αφορά την ύπαρξη της πηγής αζώτου στο υπόστρωμα δεν οδήγησε σε σαφή συμπεράσματα ως προς το πως επηρεάζει η πεπτόνη ή το εκχύλισμα ζύμης την παραγωγή μεταβολιτών στη βιομάζα, καθώς η παραγωγή πρωτεϊνών στις περισσότερες περιπτώσεις φάνηκε να ευνοείται ανεξάρτητα την πηγή και την συγκέντρωση του αζώτου (σε λόγο δηλαδή C/N =1/1, έναντι του 20/1).

Αναφορικά με την παραγωγή λιπιδίων, παρατηρήθηκε ότι δεν σημείωσε υψηλές τιμές κατά την διάρκεια όλων των συνθηκών που δοκιμάστηκαν με μέση περιεκτικότητα βιομάζας (0.5-3.3%). Το μεγαλύτερο ποσοστό παραγωγής λιπιδίων σημειώθηκε κατά την ανάπτυξη σε 5 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στο υπόστρωμα πηγή αζώτου πεπτόνη σε αναλογία C/N=20. Υψηλότερες τιμές από τα λιπίδια σημείωσαν οι υδατάνθρακες σε ποσοστό (0.57-7.66%) με την μεγαλύτερη παραγωγικότητα να παρατηρείται σε συνθήκες με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αρχικής ακατέργαστης γλυκερόλης και ειδικά στα 30 g/L με τη μέγιστη παραγωγή.

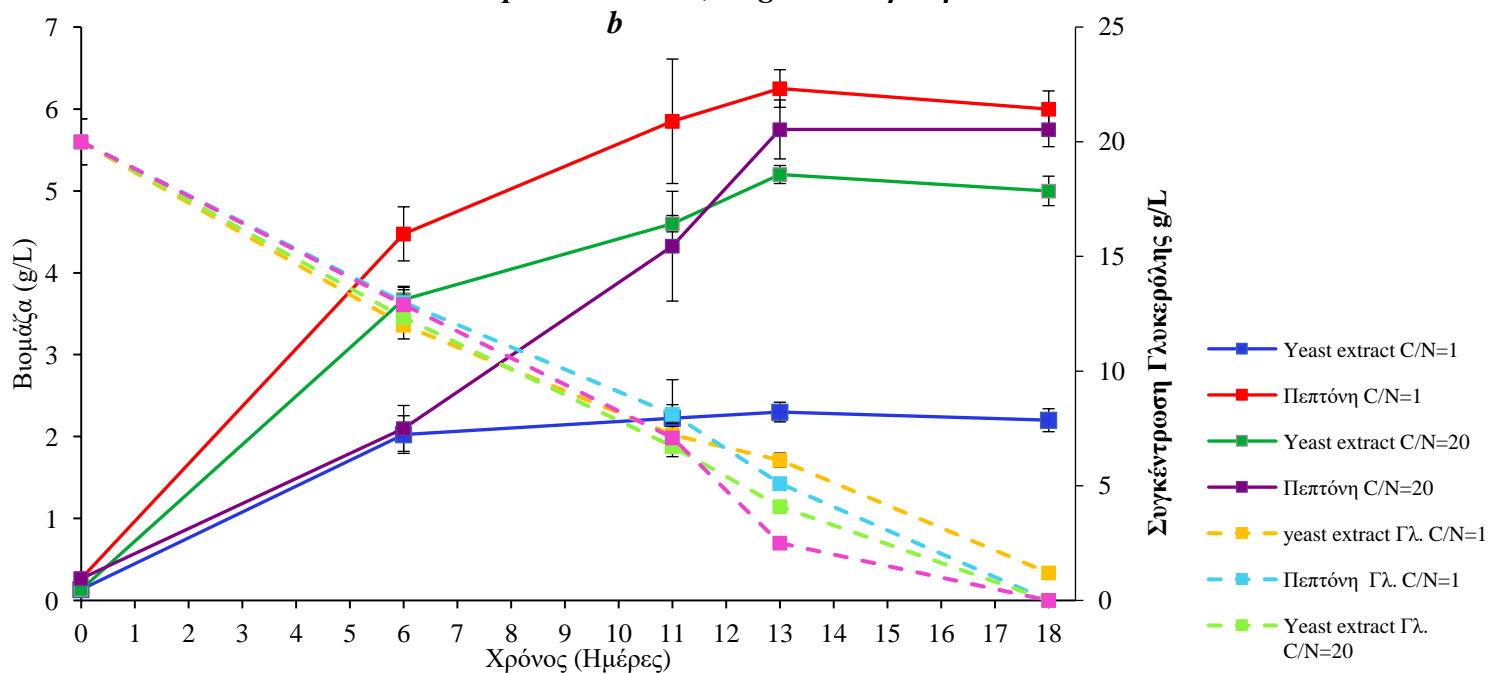
Αντίστοιχα όσον αφορά την περιεκτικότητα της βιομάζας σε χρωστικές όπως αναγράφονται στον **Πίνακα 5**, η μεγαλύτερη παραγωγή σε χλωροφύλλη a παρατηρήθηκε σε συνθήκες με 5 g/L γλυκερόλη στο υπόστρωμα με πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης σε αναλογία C/N=20 (0.51%). Η μέγιστη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη b παρατηρήθηκε σε 5g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης όταν η πηγή αζώτου ήταν η πεπτόνη σε αναλογία C/N=20 (0.86%) και σε καροτενοειδή με πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης σε αναλογία C/N=1 (0.07%). Με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στα 20 g/L η μέγιστη περιεκτικότητα σε χρωστικές σημειώθηκε όταν η πηγή αζώτου ήταν το εκχύλισμα ζύμης σε αναλογία C/N=1 σε ποσοστά: 0.55% χλωροφύλλη a, 0.4% χλωροφύλλη b, 0.95% ολική χλωροφύλλη και 0.07% για τα

καροτενοειδή. Όσον αφορά τα καροτενοειδή παρατηρήθηκε η ίδια περιεκτικότητα και για C/N=20. Σε αύξηση του υποστρώματος στα 25 g/L αρχικής γλυκερόλης η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη a παρατηρήθηκε σε συνθήκες με πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης σε αναλογία C/N=1 (0.5%) και αντίστοιχα σε χλωροφύλλη b (0.5%) και ολική χλωροφύλλη (0.99%) με πεπτόνη σε C/N=1. Τα καροτενοειδή (1.32%) σημείωσαν τη μέγιστη παραγωγή τους σε εκχύλισμα ζύμης με αναλογία C/N=20.

Auxenochlorella protothecoides, 5 g/L Γλυκερόλη

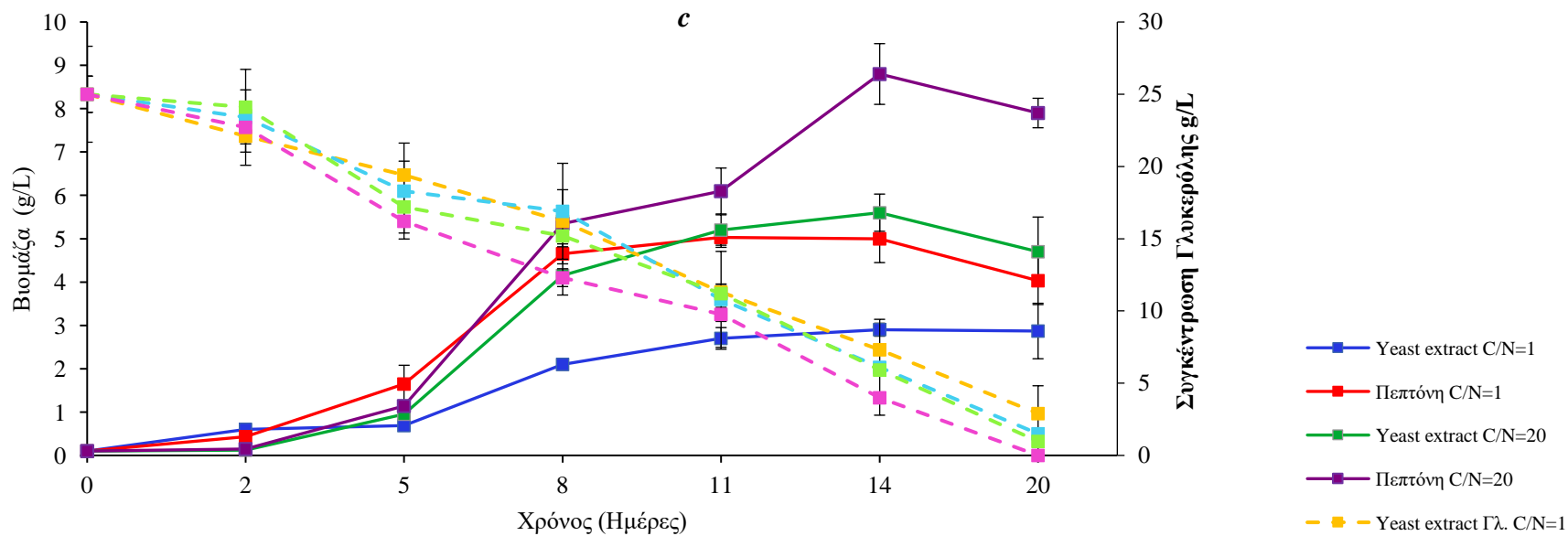


Auxenochlorella protothecoides, 20 g/L Γλυκερόλη



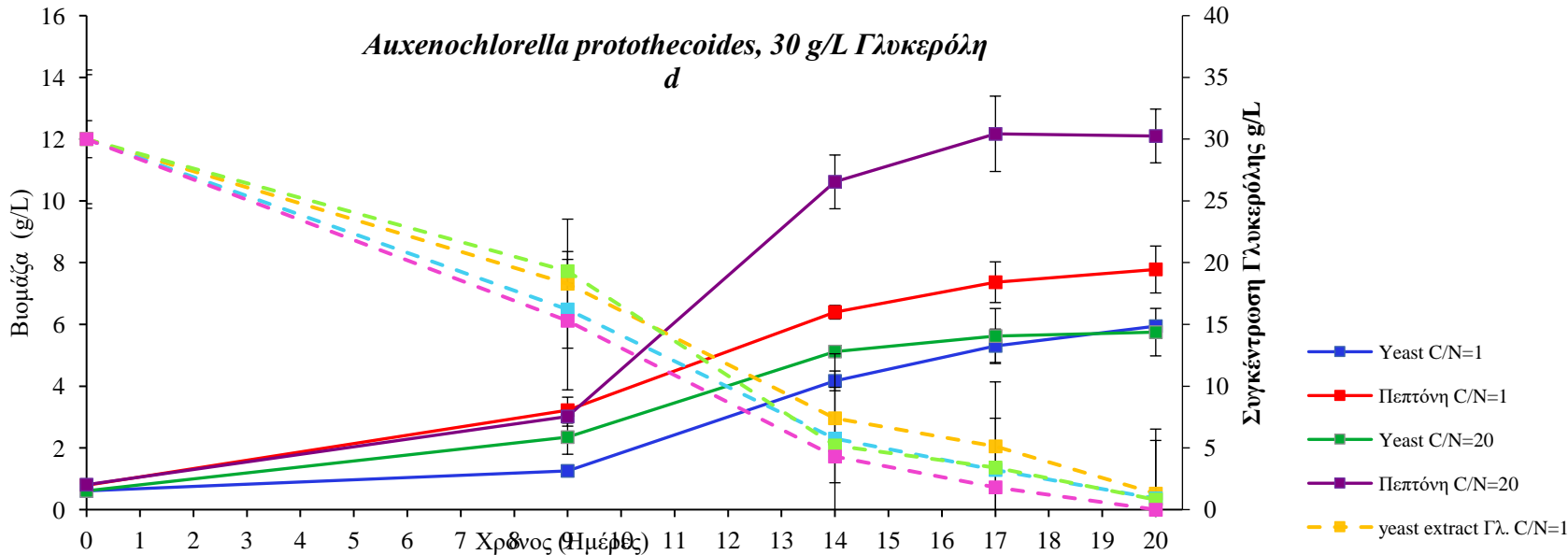
Auxenochlorella protothecoides, 25 g/L Γλυκερόλη

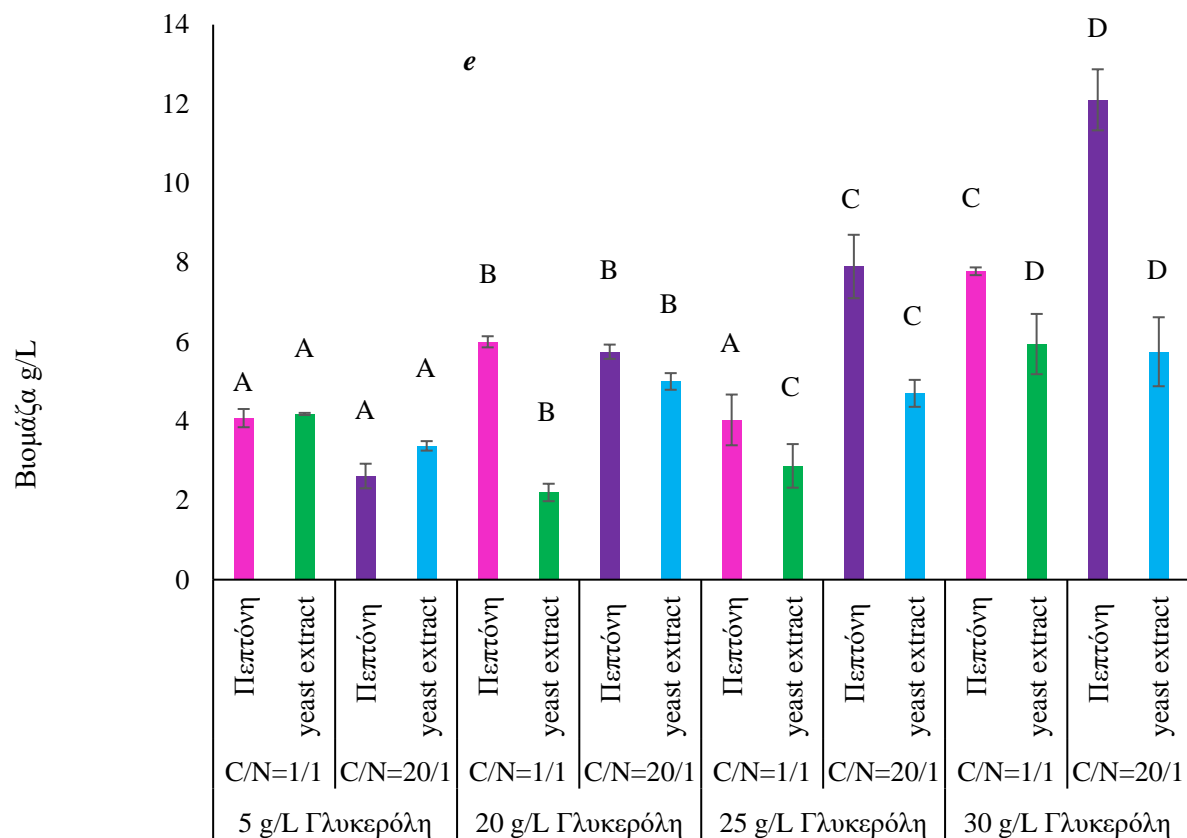
c



Auxenochlorella protothecoides, 30 g/L Γλυκερόλη

d



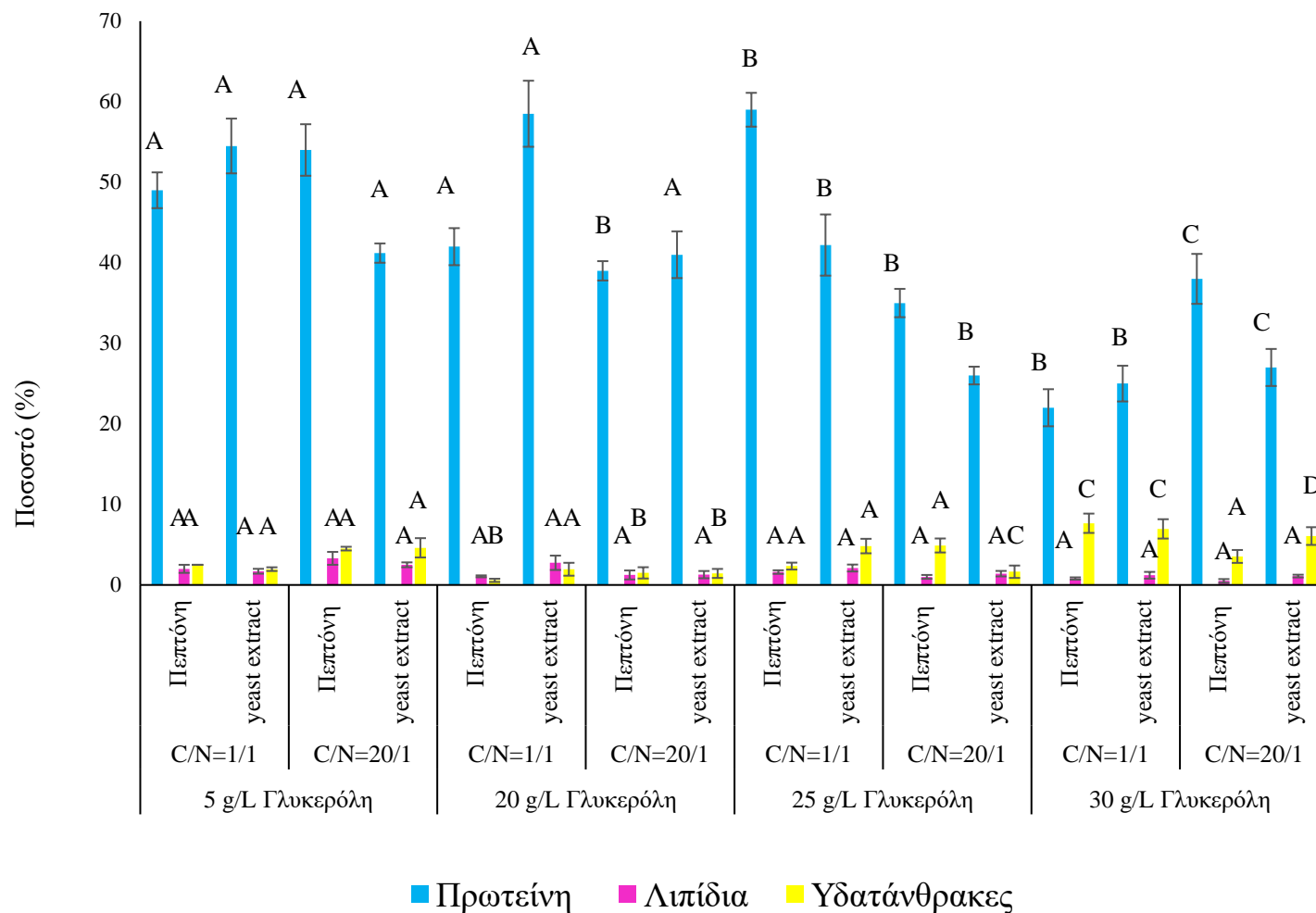


Γράφημα 6 Κινητική αύξησης και κατανάλωσης του άνθρακα του μικροφύκου *A. protothecoides* σε διαλείποντος έργου ετερότροφη καλλιέργεια με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη α) 5 g/L. β) 20 g/L. γ) 25 g/L και δ) 30 g/L για δυο διαφορετικές πηγές αζώτου (πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης και για C/N ίσο με 1/1 και 20/1 (D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας). Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης. (e) Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (5, 20, 25 και 30 g/L Γλυκερόλης) Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές

Πίνακας 5. Οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης (g/L), λιπιδίων (g/L) και υδατανθράκων (g/L) και χρωστικών (mg/g) του μικροφύκου *A. protothecoides* υπό συνθήκες ετερότροφης ανάπτυξης (φάση στασιμότητας) σε υπόστρωμα με 5, 20, 25 και 30 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης (crude), σε λόγους C/N 1, και 20 και σε δυο πηγές αζώτου (πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης). Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε μεταβολίτες ως ποσοστό (%). Η τυπική απόκλιση δίνεται από το SD (\pm) από τον αριθμό των επαναλήψεων $n=3$ βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (5, 20, 25 και 30 g/L). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές. **Ca: Χλωροφύλλη α, Cb: Χλωροφύλλη β, Ca+b: Ολική Χλωροφύλλη, Cx+c: Ολικά καροτενοειδή**

	5 g/L γλυκερόλης crude				20 g/L γλυκερόλης crude				25 g/L γλυκερόλης crude				30 g/L γλυκερόλης crude			
	C/N 1/1		C/N 20/1		C/N 1/1		C/N 20/1		C/N 1/1		C/N 20/1		C/N 1/1		C/N 20/1	
Μεταβολίτες	πεπτόνη	Yeast extract	πεπτόνη	Yeast extract	πεπτόνη	Yeast extract	πεπτόνη	Yeast extract	πεπτόνη	Yeast extract	πεπτόνη	Yeast extract	πεπτόνη	Yeast extract	πεπτόνη	Yeast extract
Βιομάζα (g/L)	4.075 ^A ±0.23	4.18 ^A ±0.027	2.615 ^A ±0.31	3.375 ^A ±0.12	6 ^B ±0.14	2.2 ^B ±0.22	5.75 ^B ±0.18	5 ^A ±0.21	4.03 ^A ±0.64	2.87 ^C ±0.55	7.9 ^C ±0.8	4.7 ^B ±0.34	7.77 ^C ±0.098	5.94 ^D ±0.76	12.1 ^D ±0.77	5.74 ^C ±0.87
μ_{max} (d ⁻¹)	0.3	0.21	0.21	0.59	0.32	0.21	0.22	0.43	0.34	0.24	0.51	0.43	0.25	0.19	0.4	0.19
Yx/s	0.81	0.83	0.52	0.66	0.33	0.11	0.28	0.25	0.16	0.11	0.32	0.19	0.32	0.24	0.46	0.22
Πρωτεΐνη (g/L) (%)	1.995 ^A (49.0%) ^A	2.278 ^A (54.5%) ^A	1.413 ^A (54.0%) ^A	1.391 ^A (41.2%) ^A	2.518 ^B (42%) ^A	1.287 ^A (58.5%) ^A	2.228 ^B (39%) ^B	2.035 ^B (41%) ^A	2.378 ^C (59%) ^B	1.214 ^A (42.2%) ^B	2.728 ^C (35%) ^B	1.222 ^A (26%) ^B	1.726 ^A (22%) ^B	1.461 ^A (25%) ^B	4.599 ^D (38%) ^C	1.534 ^C (27%) ^C
Λιπίδια (g/L) (%)	0.07953 ^A (2.0%) ^A	0.070125 ^A (1.7%) ^A	0.08609 ^A (3.3%) ^A	0.0834 ^A (2.5%) ^A	0.0642 ^A (1.07%) ^A	0.0606 ^A (2.75%) ^A	0.0713 ^A (1.24%) ^A	0.0641 ^A (1.28%) ^A	0.066 ^A (1.6%) ^A	0.062 ^A (2.1%) ^A	0.075 ^A (1.0%) ^A	0.065 ^A (1.4%) ^A	0.064 ^A (0.8%) ^A	0.072 ^A (1.2%) ^A	0.062 ^A (0.5%) ^A	0.062 ^A (1.1%) ^A
Υδατάνθρακες (g/L) (%)	0.1017 ^A (2.5%) ^A	0.081968 ^A (1.96%) ^A	0.118 ^A (4.51%) ^A	0.1557 ^A (4.61%) ^A	0.0342 ^B (0.57%) ^B	0.0430 ^A (1.95%) ^A	0.0863 ^A (1.5%) ^B	0.071 ^A (1.43%) ^B	0.094 ^A (2.34%) ^A	0.139 ^A (4.83%) ^B	0.387 ^B (4.9%) ^A	0.077 ^A (1.64%) ^C	0.595 ^B (7.66%) ^C	0.413 ^B (6.96%) ^C	0.428 ^C (3.54%) ^A	0.348 ^B (6.07%) ^D

	5 g/L γλυκερόλη				20 g/L γλυκερόλη				25 g/L γλυκερόλη				30 g/L γλυκερόλη			
	C/N=1/1		C/N=20/1		C/N=1/1		C/N=20/1		C/N=1/1		C/N=20/1		C/N=1/1		C/N=20/1	
Χρωστικές (mg/g)	Πεπτόνη	Yeast extract	Πεπτόνη	Yeast extract	Πεπτόνη	Yeast extract	Πεπτόνη	Yeast extract	Πεπτόνη	Yeast extract	Πεπτόνη	Yeast extract	Πεπτόνη	Yeast extract	Πεπτόνη	Yeast extract
Ca	3.63 ^A (0.09%) A	10.60 ^A (0.25%) A	10.63 ^A (0.41%) A	17.05 ^A (0.51%) A	9.4 ^B (0.16%) A	12.20 ^A (0.55%) B	7.27 ^A (0.13%) A	8.96 ^B (0.18%) B	19.80 ^C (0.49%) B	14.43 ^B (0.5%) C	3.95 ^B (0.05%) B	5.77 ^C (0.12%) C	19.15 ^D (0.25%) C	13.3 ^C (0.23%) A	7.86 ^A (0.05%) C	5.82 ^D (0.10%) D
Cb	1.8 ^A (0.04%) A	5.64 ^A (0.13%) A	9,56 ^A (0.36%) A	11.86 ^A (0.35%) A	8.68 ^B (0.14%) B	8.62 ^B (0.4%) B	3.11 ^B (0.05%) B	2.63 ^B (0.05%) B	20.21 ^C (0.50%) C	10.2 ^C (0.36%) C	2.98 ^C (0.04%) C	5.77 ^C (0.12%) C	27.49 ^D (0.35%) D	16.12 ^D (0.27%) D	5.14 ^D (0.04%) D	4.13 ^D (0.07%) D
Ca+b	5.43 ^A (0.13%) A	16.24 ^A (0.39%) A	20.19 ^A (0.77%) A	28.91 ^A (0.86%) A	18.07 ^B (0.3%) ^B B	20.83 ^B (0.95%) B	10.38 ^B (0.18%) B	11.59 ^B (0.23%) B	40.01 ^C (0.99%) C	24.64 ^C (0.86%) C	6.93 ^C (0.09%) C	11.54 ^C (0.24%) C	46.63 ^D (0.6%) ^D D	29.65 ^D (0.5%) A	13.00 ^D (0.10%) D	9.95 ^D (0.17%) D
Cx+c	2.71 ^A (0.07%) A	2.86 ^A (0.07%) A	1.31 ^A (0.05%) A	0.28 ^A (0.083%) A	1.19 ^A (0.02%) B	1.8 ^A (0.07%) A	3.18 ^B (0.05%) A	3.39 ^B (0.07%) B	0 ^B	1.26 ^A (0.04%) A	645.82 ^C (0.17%) B	1.6 ^A (0.03%) C	0 ^C	0 ^B	4.749 ^D (0.4%) ^C D	6.975 ^C (1.32%) D

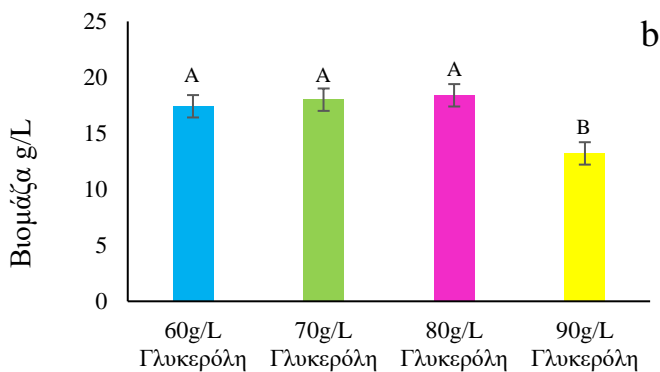
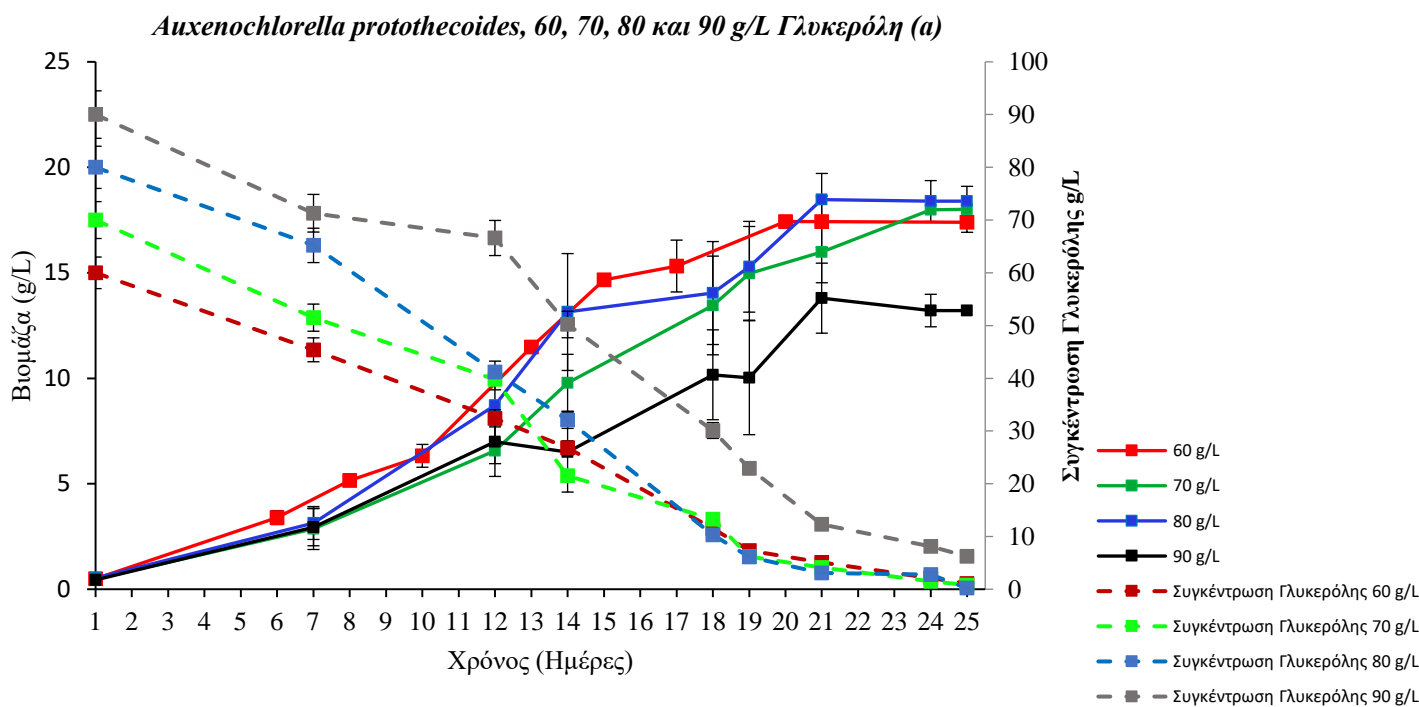


Γράφημα 6.1 Ποσοστό παραγωγής μεταβολιτών επί της ξηρής βιομάζας σε λόγους C/N=1 και C/N=20 του μικροφύκου *A. protothecoides* σε διαλείποντος έργου ετερότροφο σύστημα ανάπτυξης με πηγή αζώτου πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης σε Γλυκερόλης 5, 10, 20, 25 και 30 g/L. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων Γλυκερόλης. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (5, 10, 20, 25 και 30 g/L Γλυκερόλη). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

1.1.5 Ετερότροφες καλλιέργειες του μικροφύκου *Auxenochlorella protothecoides* σε υψηλές (ακραίες) συγκεντρώσεις ακατέργαστης γλυκερόλης

Ένεκα της υψηλής δυναμικότητας που παρουσίασε το στέλεχος ετερότροφα, συνεχίστηκαν οι δοκιμές σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης με σκοπό τη διερεύνηση της αντοχής του στελέχους και της δυναμικότητας του σε υψηλές συγκεντρώσεις που μπορούν να θεωρηθούν ακραίες για την ανάπτυξη του μικροφύκου. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν ετερότροφα σε διαλείποντος έργου συστήματα με πηγή αζώτου πεπτόνη σε αναλογία C/N=20 σε αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης τα 60, 70, 80 και 90 g/L. (**Γράφημα 7**). Η υψηλότερη απόδοση σε βιομάζα σημειώθηκε κατά την ανάπτυξη σε 80 g/L με παραγωγή 18.4 g/L ξηρής βιομάζας. Ενώ κατά την αύξηση του υποστρώματος στα 90 g/L γλυκερόλης παρατηρήθηκε παρεμπόδιση της ανάπτυξης και το στέλεχος παρουσίασε μεγάλο χρόνο προσαρμογής ενώ παρήγαγε 13 g/L ξηρή βιομάζα. Το *A. protothecoides* παρουσίασε τη μέγιστη αποδοτικότητα σαν στέλεχος σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα που δοκιμάστηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης.

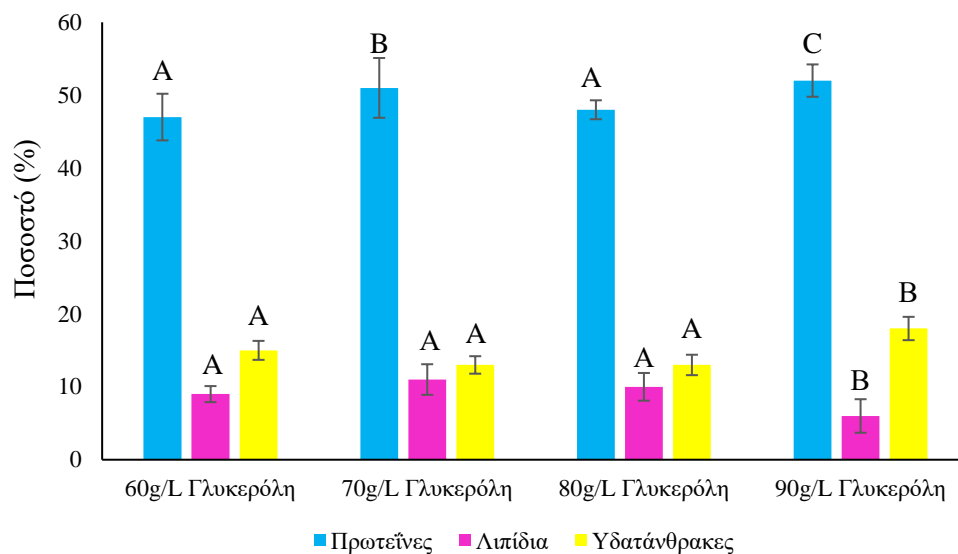
Η παραγωγή μεταβολικών προϊόντων ακολούθησε την πορεία παραγωγής βιομάζας. Συγκεκριμένα η παραγωγή των πρωτεϊνών όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 6**, ήταν παρόμοια με την παραγωγή στα 30 g/L και παρουσιάστηκε ελαφρά αυξημένη (λόγω αύξησης της βιομάζας) κυμάνθηκε στα ίδια ποσοστά επί του ξηρού βάρους. Μάλιστα η μέγιστη παραγωγικότητα σημειώθηκε στα 70 g/L με παραγωγή 9.3 g/L (42%). Όσον αφορά τα λιπίδια η μέγιστη παραγωγή άγγιξε τα 1.98 g/L (11%) κατά την ανάπτυξη σε 70 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν όσον αφορά τις πρωτεΐνες κατά την ανάπτυξη σε υπόστρωμα με 70 g/L αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης όπως και στα 90 g/L όπου η παραγωγή άρχισε να μειώνεται. Σε σχέση με προηγούμενες δοκιμές η συσσώρευση των λιπιδίων παρουσιάστηκε αυξημένη γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί ότι ήταν και αυξημένη η παραγωγή της βιομάζας, αλλά και από το γεγονός ότι το μικροφύκος σε υψηλές συγκεντρώσεις άνθρακα συνδυαστικά με τις χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου βιοσυσσώρευσε περισσότερα λιπίδια. Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν σε όλες τις δοκιμές με μέγιστη απόδοση τα 11% επί ξηρού βάρους βιομάζας. Τέλος οι υδατάνθρακες κυμάνθηκαν σε ποσοστά των τάξεων 13-18%. Οι χρωστικές δεν παρουσιάζονται στα αποτελέσματα καθώς σημειώθηκαν πολύ χαμηλές τιμές και δεν αξιολογήθηκαν ως αξιοσημείωτες.



Γράφημα 7. Κινητική αύξησης και της κατανάλωσης του άνθρακα του μικροφύκου *A. protothecoides* σε διαλείποντος έργου ετερότροφη καλλιέργεια με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη 60, 70, 80 και 90 g/L σε πηγή αζώτου πεπτόνη για C/N =20 (D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας). (a) Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων Γλυκερόλης. (b) Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (60, 70, 80 και 90 g/L Γλυκερόλη). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 6. Οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης (g/L), λιπιδίων (g/L) και υδατανθράκων (g/L) του μικροφύκου *A. protothecoides* υπό συνθήκες ετερότροφης ανάπτυξης (φάση στασιμότητας) σε υπόστρωμα με 60, 70, 80 και 90 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης (crude), σε λόγο C/N 20 με πεπτόνη. Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε μεταβολίτες ως ποσοστό %. Η τυπική απόκλιση δίνεται από το SD (\pm) από τον αριθμό των επαναλήψεων n=3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή.

<i>Auxenochlorella protothecoides</i> σε 60, 70, 80 και 90 g/L Γλυκερόλη, C/N=20 πεπτόνη									
	Βιομάζα (g/L)	μ_{max} (d ⁻¹)	Yx/s	Πρωτεΐνες g/L	%	Λιπίδια g/L	%	Υδατάνθρακες g/L	%
60 g/L	17.42 ^A \pm 1.22	0.12	0.3	8.22 ^A \pm 0.88	47 ^A	1.6 ^A \pm 0.02	9 ^A	2.6 ^A \pm 0.01	15 ^A
70 g/L	18.01 ^A \pm 1.09	0.1	0.26	9.3 ^B \pm 0.46	51 ^B	1.98 ^B \pm 0.04	11 ^A	2.36 ^A \pm 0.05	13 ^A
80 g/L	18.4 ^A \pm 0.97	0.1	0.23	8.72 ^A \pm 0.99	48 ^A	1.9 ^C \pm 0.002	10 ^A	2.46 ^A \pm 0.06	13 ^A
90 g/L	13.21 ^B \pm 0.77	0.16	0.16	6.79 ^C \pm 0.66	52 ^C	0.89 ^D \pm 0.07	6 ^B	2.39 ^A \pm 0.002	18 ^B



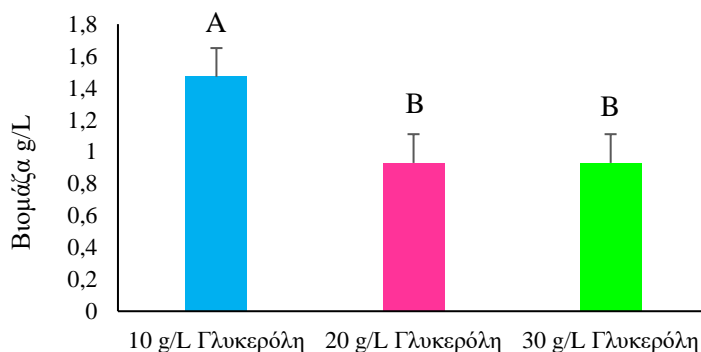
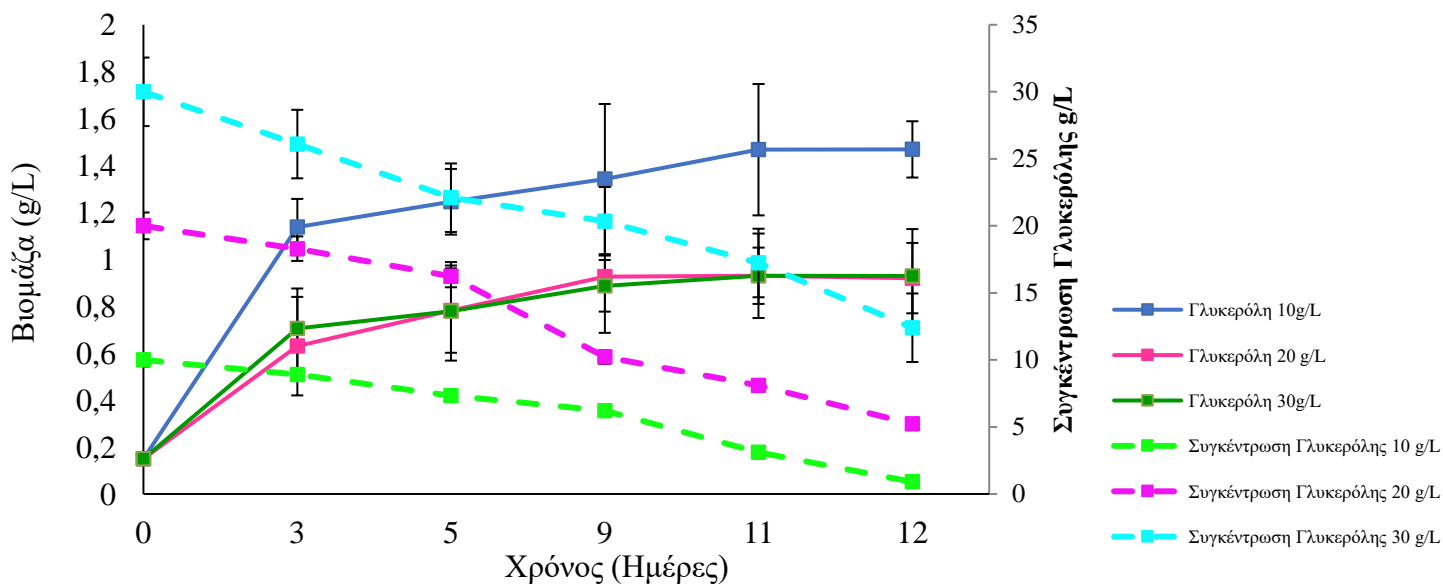
Γράφημα 7.1 Ποσοστό παραγωγής μεταβολιτών του μικροφύκου *A. protothecoides* σε διαλείποντος έργου ετερότροφο σύστημα ανάπτυξης με πηγή αζώτου πεπτόνη C/N=20, σε Γλυκερόλης 60, 70, 80 και 90 g/L. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων Γλυκερόλης. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (60, 70, 80 και 90 g/L Γλυκερόλη). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

1.1.6 Ετερότροφες καλλιέργειες διαλείποντος έργου του *S. quadricauda*

Στο διάγραμμα της κινητικής αύξησης του στελέχους *S. quadricauda* (**Γράφημα 8**) φαίνεται η δυναμικότητα του στελέχους κατά την ανάπτυξη του σε περιβάλλον με πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη. Συγκεκριμένα έγιναν δοκιμές σε 10g/L, 20 g/L και 30 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στο υπόστρωμα με χρήση ως πηγή αζώτου πεπτόνη σε αναλογία C/N=20 όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Η μέγιστη αποδοτικότητα του στελέχους παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξη σε 10 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης με παραγωγή 1.27 g/L. Σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκερόλης 20 και 30 g/L φαίνεται να έδρασε παρεμποδιστικά ως προς την ανάπτυξη του στελέχους.

Στον **Πίνακα 7** όσον αφορά τη βιοχημική ανάλυση της βιομάζας τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέγιστη παραγωγικότητα των πρωτεϊνών σημειώθηκε κατά την ανάπτυξη σε 10 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης με 0.65 g/L ή 45% της παραχθείσας βιομάζας. Η παραγωγή αντίστοιχα λιπιδίων παρατηρήθηκε υψηλότερη στα 10 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης με παραγωγή 0.047 g/L ή 4%. Γενικότερα η παραγωγή λιπιδίων διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα. Αναφορικά με τους υδατάνθρακες η μέγιστη παραγωγή τους επίσης σημειώθηκε κατά την ανάπτυξη σε 10 g/L με ποσοστό 19% της βιομάζας.

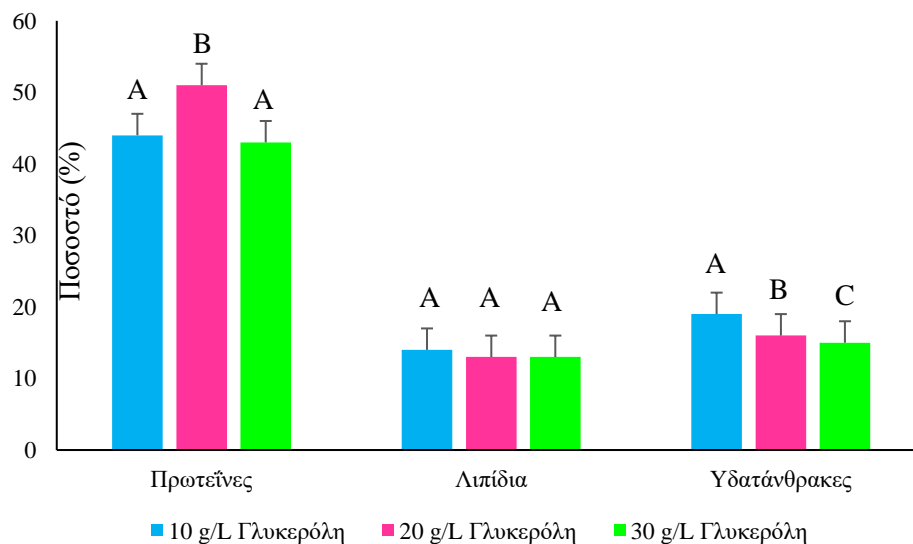
S. quadricauda ετερότροφη ανάπτυξη



Γράφημα 8. Κινητική της ετερότροφης αύξησης και της κατανάλωσης του άνθρακα του μικροφύκου *S. quadricauda* σε διαλείποντος έργου καλλιέργεια με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη 10 g/L, 20 g/L και 30 g/L, με πηγή αζώτου πεπτόνη και C/N=20/1. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων Γλυκερόλης. (b) Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (60, 70, 80 και 90 g/L Γλυκερόλη). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές

Πίνακας 7 Συγκεντρώσεις πρωτεϊνών (g/L), λιπιδίων (g/L) και υδατανθράκων (g/L) της βιομάζας του μικροφύκου *S. quadricauda* υπό συνθήκες ετερότροφης ανάπτυξης σε διαλείποντος έργου ετερότροφο σύστημα με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη (crude) συγκέντρωσης 10g/L, 20 g/L και 30 g/L και πηγή αζώτου πεπτόνη σε αναλογία C/N=20. Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε μεταβολίτες ως ποσοστό %. Η τυπική απόκλιση δίνεται από το SD (\pm) από τον αριθμό των επαναλήψεων n=3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων Γλυκερόλης. (b) Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (10, 20 και 30 g/L Γλυκερόλη). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Ετερότροφη ανάπτυξη με πεπτόνη C/N = 20/1																	
10 gr/l Γλυκερόλη						20 gr/l Γλυκερόλη						30 gr/l Γλυκερόλη					
μ_{max} (d ⁻¹)	X (g/L)	Y _{X/S}	Pr (g/L)	Li (g/L)	Ca (g/L)	μ_{max} (d ⁻¹)	X (g/L)	Y _{X/S}	Pr (g/L)	Li (g/L)	Ca (g/L)	μ_{max} (d ⁻¹)	X (g/L)	Y _{X/S}	Pr (g/L)	Li (g/L)	Ca (g/L)
0.68	1.47 ^A ± 0.14	0.16	0.65 ^A ± 0.0	0.206 ^A ± 0.001	0.280 ^A ± 0.003	0.48	0.93 ^B ± 0.24	0.05	0.47 ^B ± 0.066	0.121 ^B ± 0.003	0.149 ^B ± 0.002	0.52	0.93 ^C ± 0.32	0.04	0.40 ^C ± 0.012	0.121 ^C ± 0.002	0.140 ^C ± 0.001



Γράφημα 8.1 Ποσοστό παραγωγής μεταβολιτών του μικροφύκου *S. quadricauda* σε διαλείποντος έργου ετερότροφο σύστημα ανάπτυξης με πηγή αζώτου πεπτόνη C/N=20, σε Γλυκερόλης 10, 20 και 30 g/L. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων Γλυκερόλης. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών 10, 20 και 30 g/L Γλυκερόλη). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

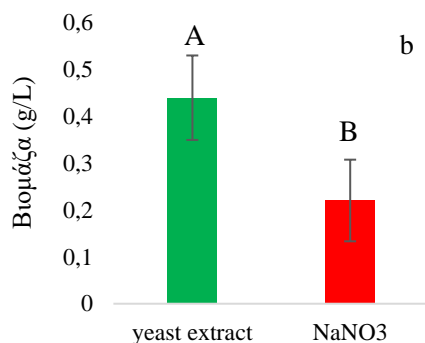
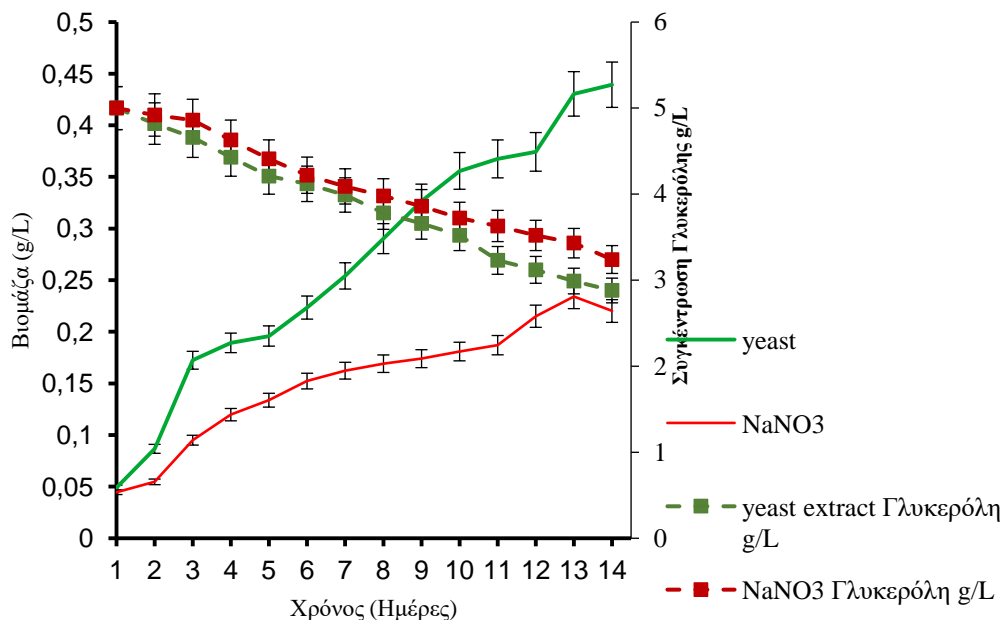
1.2 ΜΙΚΤΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

1.2.1 Μικτότροφες καλλιέργειες του μικροφύκου *C. vulgaris* (Batch):

Αντίστοιχες συγκεντρώσεις γλυκερόλης χρησιμοποιήθηκαν και σε μικτότροφες καλλιέργειες με σκοπό την σύγκριση της δυναμικότητας του στελέχους σε ετερότροφες και μικτότροφες συνθήκες ανάπτυξης. Στις αρχικές δοκιμές για το μικροφύκος *C. vulgaris* σε μικτότροφες καλλιέργειες με λευκό φως με φωτοπερίοδο, 16 ώρες φως και 8 σκοτάδι χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση ακατέργαστης (crude) γλυκερόλης 5 g/L και πηγή αζώτου εκχύλισμα ζύμης και NaNO_3 σε αναλογία C/N=20. Παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός αύξησης ήταν μεγαλύτερος με πηγή αζώτου εκχύλισμα ζύμης ενώ η παραγόμενη βιομάζα (0.439 g/L) ήταν διπλάσια από ότι σε θρεπτικό υλικό με NaNO_3 0.220 g/L. Ο ρυθμός αύξησης μ_{\max} επίσης παρατηρήθηκε διπλάσιος (d^{-1}) κατά την ανάπτυξη με πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης σε σχέση με το NaNO_3 όπως αντίστοιχα υπέδειξαν και τα αποτελέσματα των ετερότροφων καλλιιεργειών ότι το μικροφύκος αναπτύσσεται καλύτερα σε περιβάλλον όπου υπάρχει οργανική πηγή αζώτου. **(Γράφημα 9).**

Η παραγωγή μεταβολιτών του συστήματος ήταν αντίστοιχη με την παραγωγή βιομάζας, παρατηρώντας όμως μικρές διαφορές ως προς την συγκέντρωσή τους. Ειδικότερα λόγω της ύπαρξης οργανικής πηγής αζώτου υψηλότερη παραγωγή πρωτεϊνών παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξη με εκχύλισμα ζύμης 0.16 g/L ενώ επίσης η παραγωγή των λιπιδίων ήταν υψηλότερη 0.05 g/L συγκριτικά με την ανάπτυξη σε NaNO_3 . Το μικροφύκος έδωσε καλύτερα αποτελέσματα. Αντίστοιχα οι χρωστικές παρά την ανάπτυξη μικτότροφα δεν παρουσίασαν υψηλές συγκεντρώσεις. **(Πίνακας 8).**

Chlorella vulgaris, 5g/L Γλυκερόλη C/N=20, a



Γράφημα 9: Κινητική αύξησης και κατανάλωσης άνθρακα του μικροφύκου *C. vulgaris* σε σύστημα μικτότροφης ανάπτυξης με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη (5 g/L) με πηγή αζώτου εκχύλισμα ζύμης και NaNO₃ σε αναλογία C/N=20/1. (D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας g/L). Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών πηγών αζώτου. (b) Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (εκχύλισμα ζύμης, NaNO₃). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές

Πίνακας 8: Οι συγκεντρώσεις σε πρωτεΐνη (g/L), λιπίδια (g/L) και χρωστικών (mg/g) της βιομάζας του μικροφύκου *C. vulgaris* υπό συνθήκες μικτότροφης ανάπτυξης (φάση στασιμότητας) σε υπόστρωμα με 5 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης (crude), σε λόγο C/N=20 και πηγή αζώτου το εκχυλίσμα ζύμης). Δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε μεταβολίτες ως ποσοστό %. Η αποδοτικότητα του συστήματος δίνεται σε παραγόμενη ξηρή βιομάζα (D.W. g/L). Η τυπική απόκλιση δίνεται από το SD (\pm) από τον αριθμό των επαναλήψεων n=3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών πηγών αζώτου. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών εκχυλίσμα ζύμης, NaNO_3). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές

<i>Chlorella vulgaris</i> 5g/L Γλυκερόλη, C/N=20		
	Yeast extract	NaNO ₃
Βιομάζα (g/L)	0.431 ^A \pm 0.09	0.22 ^{AB} \pm 0.087
μ_{\max} (d ⁻¹)	0.098	0.025
Y _x /s	0.1	0.05
Πρωτεΐνες g/L (%)	0.16 ^A \pm 0.06 (38% ^A)	0.075 ^{AB} \pm 0.01 (34% ^A)
Λιπίδια g/L (%)	0.05 ^A \pm 0.002 (13% ^A)	0.034 ^B \pm 0.008 (16% ^A)
Ολική Χλωροφύλλη(mg/g)	0.22 ^A	0.36 ^A
Ολικά καροτενοειδή (mg/g)	0.51 ^A	0.7 ^A

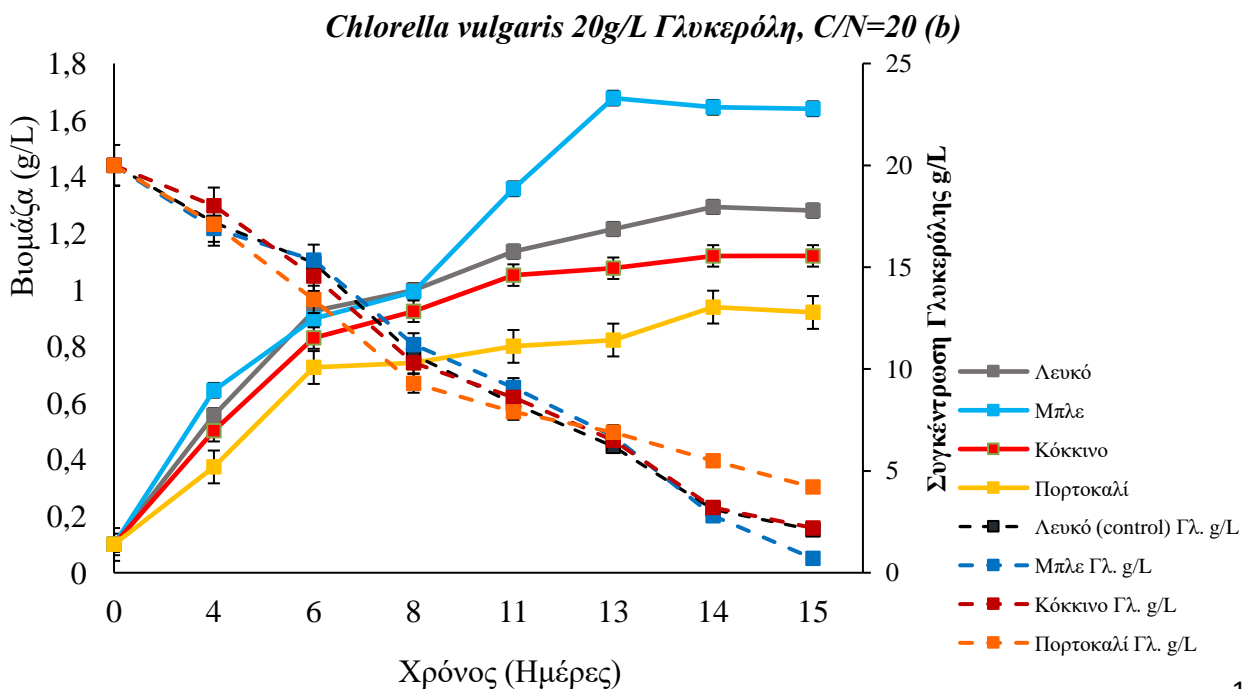
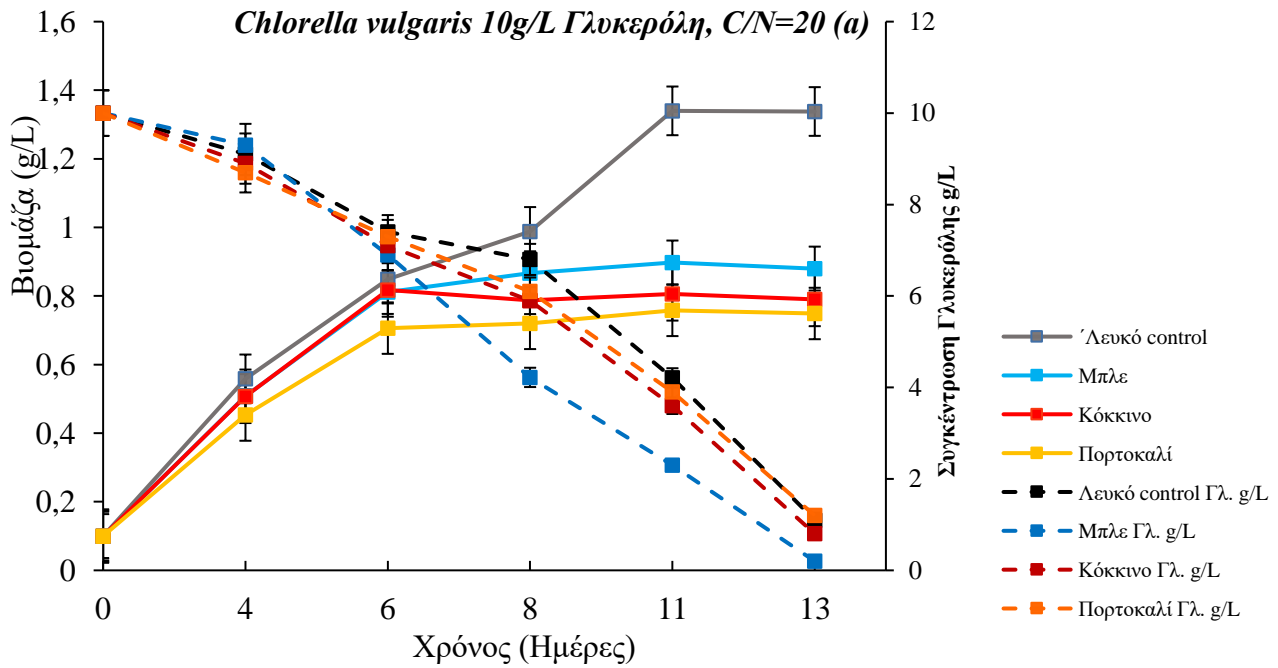
1.2.2 Μικτότροφες καλλιέργειες διαλείποντος έργου του μικροφύκου *C. vulgaris* (Batch) με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός

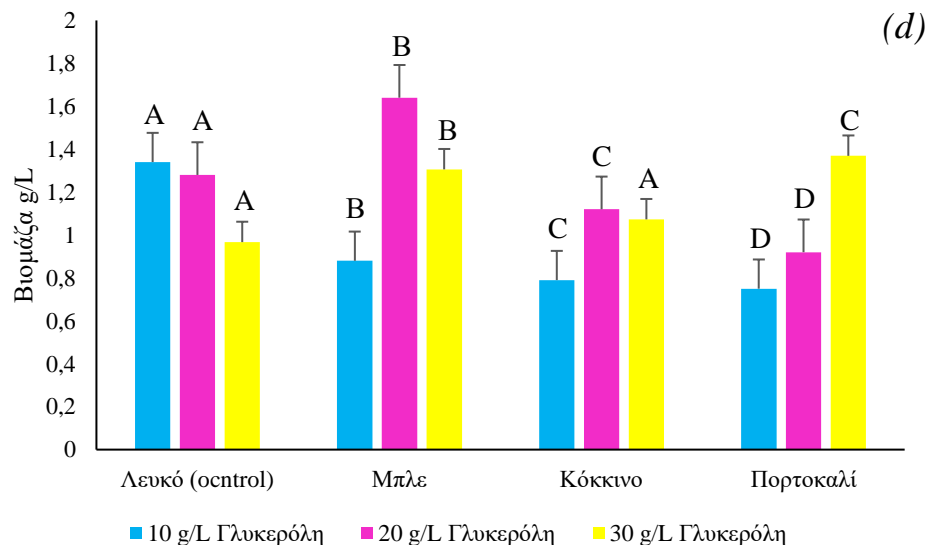
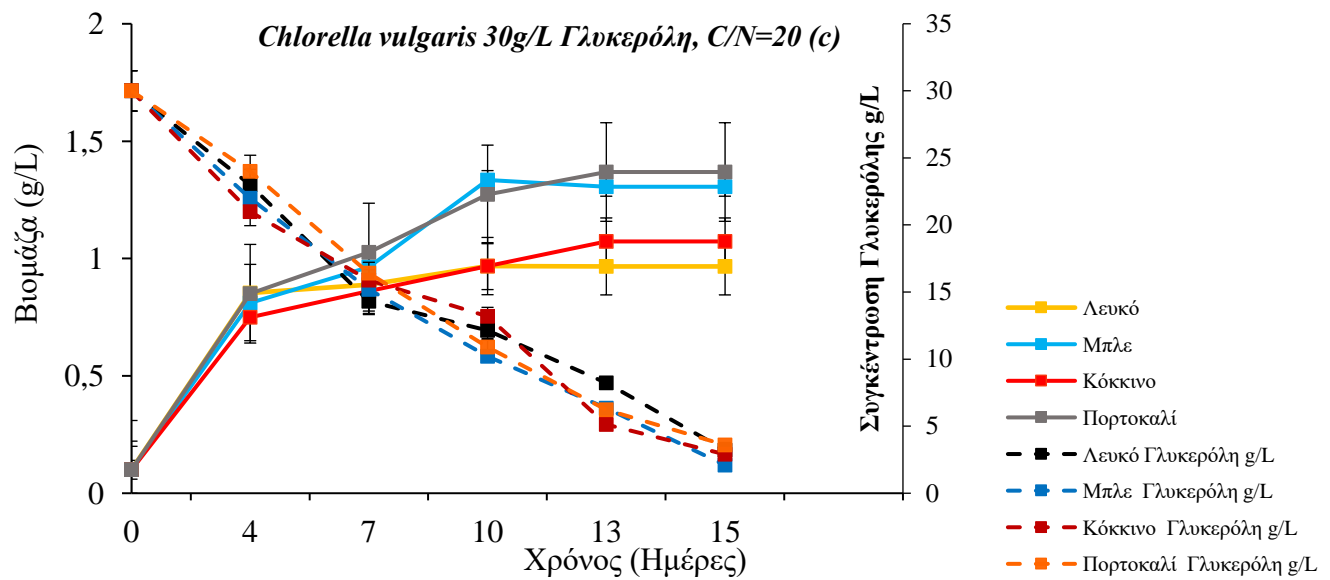
Τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το μικροφύκος αναπτύσσεται καλύτερα σε μικτότροφες συνθήκες ανάπτυξης. Στη συνέχεια των δοκιμών για τις μικτότροφες καλλιέργειες του *C. vulgaris* χρησιμοποιήθηκαν μονοχρωματικές πηγές φωτός χρώματος κόκκινο, μπλε, πορτοκαλί και λευκό φως ως μάρτυρα για να γίνει σύγκριση της δυναμικότητας κατά την ανάπτυξη σε διαφορετικού χρώματος φως σε σχέση με το κλασικό λευκό φως που χρησιμοποιείται στις μικτότροφες καλλιέργειες. Μέχρι τώρα βιβλιογραφικά το *C. vulgaris* είχε δοκιμαστεί σε μονοχρωματικές πηγές μπλε και πράσινου φωτός με διαφορετικές πηγές άνθρακα. Ο σκοπός ήταν να διερευνηθεί πως το κάθε χρώμα επηρεάζει διαφορετικά την παραγωγή βιομάζας και μεταβολιτών ως προς την κατανάλωση γλυκερόλης στη συγκεκριμένη

έρευνα. Οι δοκιμές έγιναν σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 10, 20 και 30 g/L με πηγή αζώτου την πεπτόνη σε αναλογία C/N=20 όπως είχε δοκιμαστεί σε προκαταρκτικά πειράματα και σχολιάστηκε στο κεφάλαιο με τις ετερότροφες καλλιέργειες . Η πηγή αζώτου που επιλέχθηκε στις παρακάτω δοκιμές βασίστηκε σε αποτελέσματα προηγούμενων πειραμάτων, που περιγράφονται στο κεφάλαιο των ετερότροφων καλλιεργειών, όπου η πηγή αζώτου που με την οποία σημειώθηκε η καλύτερη απόδοση ήταν το εκχύλισμα ζύμης. Συνδυαστικά με αποτελέσματα από τη βιβλιογραφία και τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα επιλέχθηκε έναντι του εκχύλισμα ζύμης να χρησιμοποιηθεί πεπτόνη. Ειδικότερα, τα αποτελέσματα των καλλιεργειών σημείωσαν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης έδρασε παρεμποδιστικά ως προς την αύξηση της βιομάζας και την ανάπτυξη μετά τα 20 g/L όπως ήταν αναμενόμενο και από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις ετερότροφες καλλιέργειες. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στην ανάπτυξη με μπλε φως με παραγόμενη ποσότητα τα 1.68 g/L. Ενώ αντίστοιχα υψηλή παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε και κατά την ανάπτυξη σε πορτοκαλί φως σε 30 g/L γλυκερόλη στο υπόστρωμα με 1.37 g/L. **(Γράφημα 10)**. Όσον αφορά την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, η συγκέντρωση των λιπιδίων παρατηρήθηκε αυξημένη κατά την ανάπτυξη σε μπλε φως με παραγωγή 0.218 g/L (13%) της παραχθείσας βιομάζας. Αντίστοιχα παρατηρήθηκε και η παραγωγή πρωτεϊνών σε πορτοκαλί φως με 30 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης με παραγωγή 0.86 g/L (63%) εξίσου υψηλά ποσοστά παραγωγής σημειώθηκαν και κατά την ανάπτυξη σε μπλε φως στα 20 g/L 0.82 g/L (49%). Τέλος όσον αφορά την παραγωγή υδατανθράκων η μέγιστη παραγωγή τους παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξη του μικροφύκους σε κόκκινο και πορτοκαλί φως σε 20 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης με παραγωγή 0.19 g/L και 0.16 g/L (17% και 27% της βιομάζας αντίστοιχα.) **(Πίνακας 9)**

Αναφορικά με την παραγωγικότητα των χρωστικών η οποία χρίζει ιδιαίτερης σημασίας στη βιομηχανία, η παραγωγή τους παρουσιάστηκε χαμηλή αλλά όχι ασήμαντη. Μάλιστα, όλες οι χρωστικές μετρήθηκαν ελαφρά αυξημένες στις δοκιμές που αφορούσαν το υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης τα 30 g/L. Ειδικότερα αυξημένη παραγωγή της χλωροφύλλης α παρατηρήθηκε σε κόκκινο φως ενώ μεγαλύτερη από την χλωροφύλλη α (0.19%) ήταν η παραγωγή της χλωροφύλλης β (0.95%) συνολικά και συγκεκριμένα ευνοήθηκε από το λευκό φως. Οι ολικές χλωροφύλλες σημειώθηκαν αυξημένες αντίστοιχα σε λευκό φως ενώ τα καροτενοειδή που είναι

και η χρωστική που ενδιαφέρει τη βιομηχανία τροφίμων αυξήθηκαν σε μπλε φωτισμό (1.13%).
(Πίνακας 9.1)





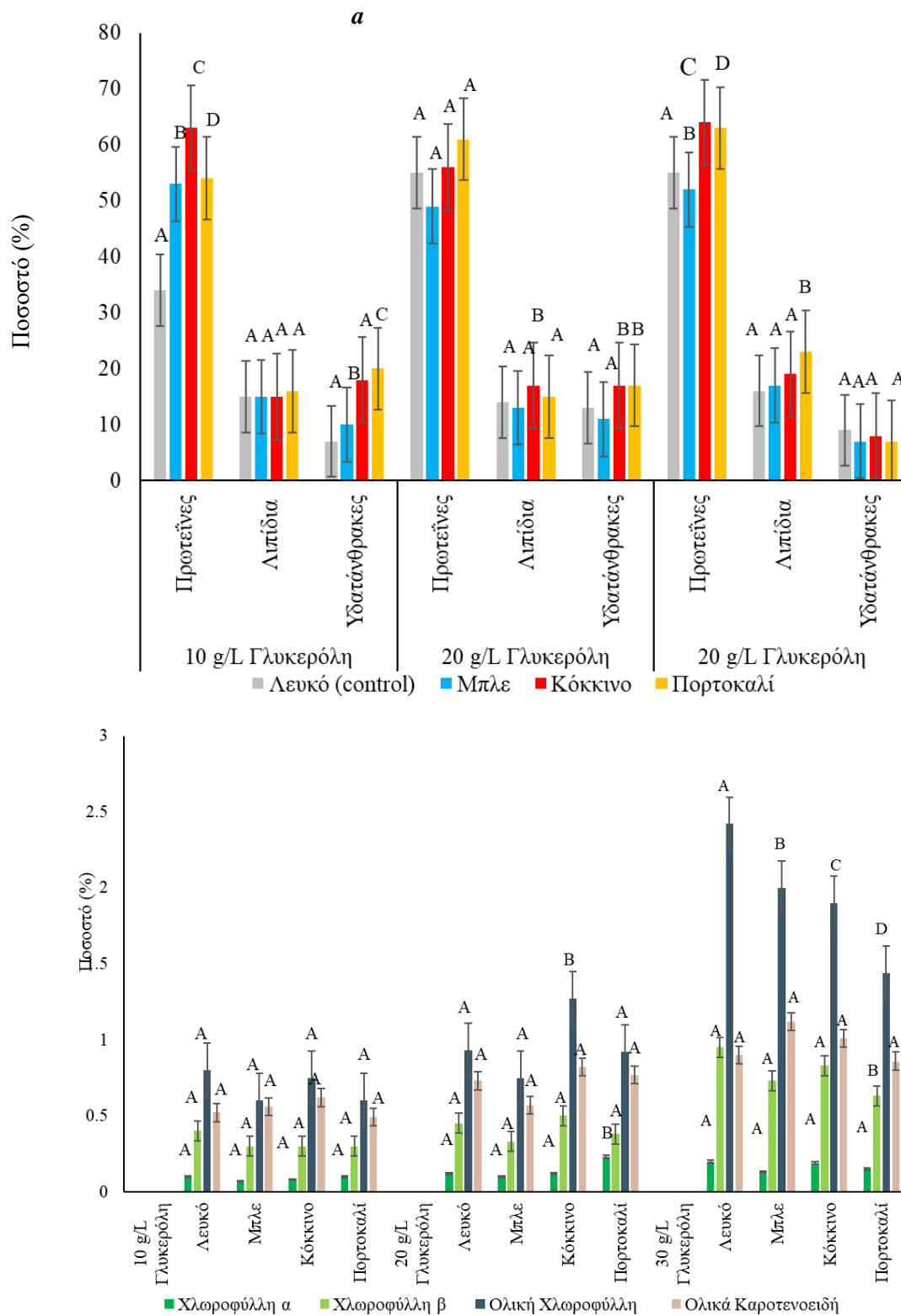
Γράφημα 10 Κινητική αύξησης και της κατανάλωσης άνθρακα του μικροφύκου *C. vulgaris* σε διαλείποντος έργου μικτότροφη καλλιέργεια με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός με πηγή αζώτου πεπτόνη σε αναλογία C/N=20 και υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη α) 10 g/L, β) 20 g/L και γ) 30 g/L (D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας, g/L). Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών μονοχρωματικών πηγών φωτός. (d) Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (λευκό (control), μπλε, κόκκινο και πορτοκαλί φως). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές

Πίνακας 9: Οι συγκεντρώσεις σε πρωτεΐνη (g/L), λιπίδια (g/L) και υδατανθράκων (g/L) της βιομάζας του μικροφύκου *C. vulgaris* υπό συνθήκες μικτότροφης ανάπτυξης με χρήση μονοχρωματικών πηγών φωτός, (φάση στασιμότητας) σε υπόστρωμα με 10, 20 και 30 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης (crude), σε λόγο C/N=20 με πηγή αζώτου πεπτόνη. Δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε μεταβολίτες ως ποσοστό %. Η αποδοτικότητα του συστήματος δίνεται σε παραγόμενη ξηρή βιομάζα (D.W. g/L). Η τυπική απόκλιση δίνεται από το SD (\pm) από τον αριθμό των επαναλήψεων n=3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών μονοχρωματικών πηγών φωτός. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (Λευκό (control), μπλε, κόκκινο και πορτοκαλί φως). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές

Μικτότροφη καλλιέργεια με Πεπτόνη C/N = 20/1																		
	10 gr/l glycerol						20 gr/l glycerol						30 gr/l glycerol					
Πηγή Φωτός	μ_{max} (d ⁻¹)	X (g/L)	Y _{X/S}	Pr (g/L)	Li (g/L)	Ca (g/L)	μ_{max} (d ⁻¹)	X (g/L)	Y _{X/S}	Pr (g/L)	Li (g/L)	Ca (g/L)	μ_{max} (d ⁻¹)	X (g/L)	Y _{X/S}	Pr (g/L)	Li (g/L)	Ca (g/L)
Λευκό (Cont.)	0.43	1.34 ^A \pm 0.07	0.13	0.46 ^A \pm 0.09	0.201 ^A \pm 0.003	0.094 ^A \pm 0.001	0.43	1.29 ^A \pm 0.025	0.07	0.71 ^A \pm 0.038	0.181 ^A \pm 0.001	0.168 ^A \pm 0.002	0.54	0.97 ^A \pm 0.12	0.04	0.53 ^A \pm 0.09	0.116 ^A \pm 0.006	0.060 ^A \pm 0.003
Μπλε	0.41	0.90 ^B \pm 0.06	0.08	0.48 ^A \pm 0.015	0.235 ^B \pm 0.006	0.090 ^A \pm 0.003	0.47	1.68 ^B \pm 0.026	0.09	0.82 ^A \pm 0.08	0.218 ^B \pm 0.001	0.185 ^B \pm 0.001	0.52	1.30 ^B \pm 0.04	0.05	0.67 ^A \pm 0.05	0.143 ^A \pm 0.003	0.064 ^B \pm 0.001
Κόκκ.	0.41	0.82 ^C \pm 0.078	0.07	0.52 ^A \pm 0.06	0.123 ^C \pm 0.003	0.148 ^B \pm 0.001	0.40	1.12 ^A \pm 0.038	0.06	0.63 ^A \pm 0.049	0.190 ^A \pm 0.0004	0.190 ^B \pm 0.001	0.50	1.07 ^A \pm 0.1	0.04	0.68 ^A \pm 0.01	0.139 ^A \pm 0.011	0.063 ^B \pm 0.001
Πορτ.	0.38	0.76 ^D \pm 0.075	0.07	0.41 ^A \pm 0.03	0.122 ^D \pm 0.001	0.152 ^C \pm 0.002	0.33	0.94 ^C \pm 0.058	0.05	0.57 ^B \pm 0.035	0.141 ^C \pm 0.0016	0.160 ^A \pm 0.001	0.54	1.37 ^C \pm 0.2	0.05	0.86 ^B \pm 0.02	0.151 ^B \pm 0.003	0.063 ^B \pm 0.002

Πίνακας 9.1. Η Παραγωγικότητα των χρωστικών (mg/g) του μικροφύκου *C. vulgaris* σε διαλείποντος έργου μικτότροφο καλλιεργητικό σύστημα με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (10g/L, 20 g/L και 30 g/L) με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός λευκού (Control), κόκκινου, μπλε και πορτοκαλί χρώματος. Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας στον κάθε μεταβολίτη ως ποσοστό επί %.

Πηγές φωτός	Χλωροφύλλη a	Χλωροφύλλη b	Ολική Χλωροφύλλη	Ολικά Καροτενοειδή
10 g/L Γλυκερόλη				
Λευκό	1.36 ^A ± 0.04	5.08 ^A ± 0.02	10.71 ^A ± 0.05	6.95 ^A ± 0.02
Μπλε	0.59 ^B ± 0.02	2.33 ^B ± 0.09	5.1 ^B ± 0.05	4.99 ^B ± 0.03
Κόκκινο	0.65 ^C ± 0.01	2.65 ^C ± 0.02	5.9 ^C ± 0.02	4.92 ^C ± 0.02
Πορτοκαλί	0.65 ^D ± 0.02	2.29 ^D ± 0.011	4.54 ^D ± 0.04	3.7 ^D ± 0.08
20 g/L Γλυκερόλη				
Λευκό	1.58 ^A ± 0.01	5.79 ^A ± 0.08	11.97 ^A ± 0.09	9.43 ^A ± 0.09
Μπλε	1.39 ^A ± 0.03	5.43 ^A ± 0.01	11.8 ^A ± 0.1	9.39 ^A ± 0.07
Κόκκινο	1.35 ^A ± 0.04	5.6 ^A ± 0.03	13.21 ^B ± 0.12	9.19 ^A ± 0.09
Πορτοκαλί	0.81 ^B ± 0.02	3.5 ^B ± 0.05	8.5 ^C ± 0.09	7.11 ^B ± 0.06
30 g/L Γλυκερόλη				
Λευκό	1.93 ^A ± 0.01	9.24 ^A ± 0.08	23.47 ^A ± 0.23	9.27 ^A ± 0.07
Μπλε	1.75 ^A ± 0.02	9.6 ^A ± 0.07	26.23 ^A ± 0.12	14.81 ^B ± 0.12
Κόκκινο	2.07 ^A ± 0.01	8.89 ^A ± 0.08	21.01 ^A ± 0.14	10.88 ^A ± 0.11
Πορτοκαλί	2.14 ^A ± 0.06 (0.15%) ^A	8.73 ^A ± 0.02	19.83 ^A ± 0.19	11.83 ^A ± 0.1



Γράφημα 10.1 Ποσοστό παραγωγής μεταβολιτών (a) και χρωστικών (b) του μικροφύκου *C. vulgaris* σε διαλείποντος έργου μικτότροφο σύστημα ανάπτυξης με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός και πηγή αζώτου πεπτόνη C/N=20, σε Γλυκερόλη 10, 20 και 30 g/L. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών μονοχρωματικών πηγών φωτός σε σχέση με το λευκό (control). Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (Λευκό, μπλε, κόκκινο και πορτοκαλί φως). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

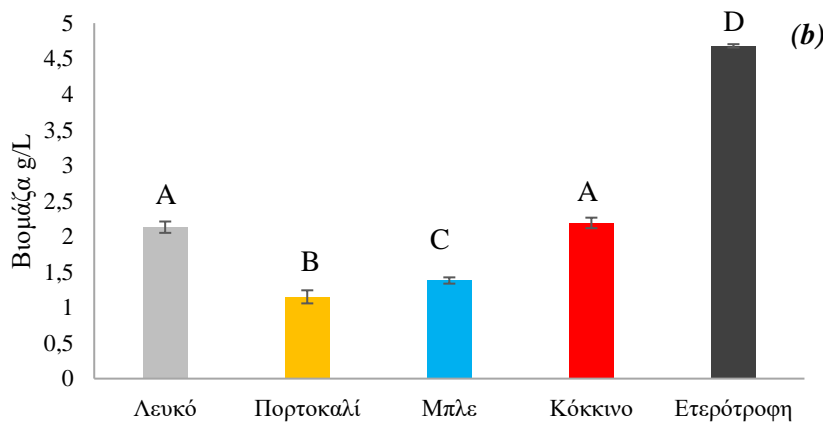
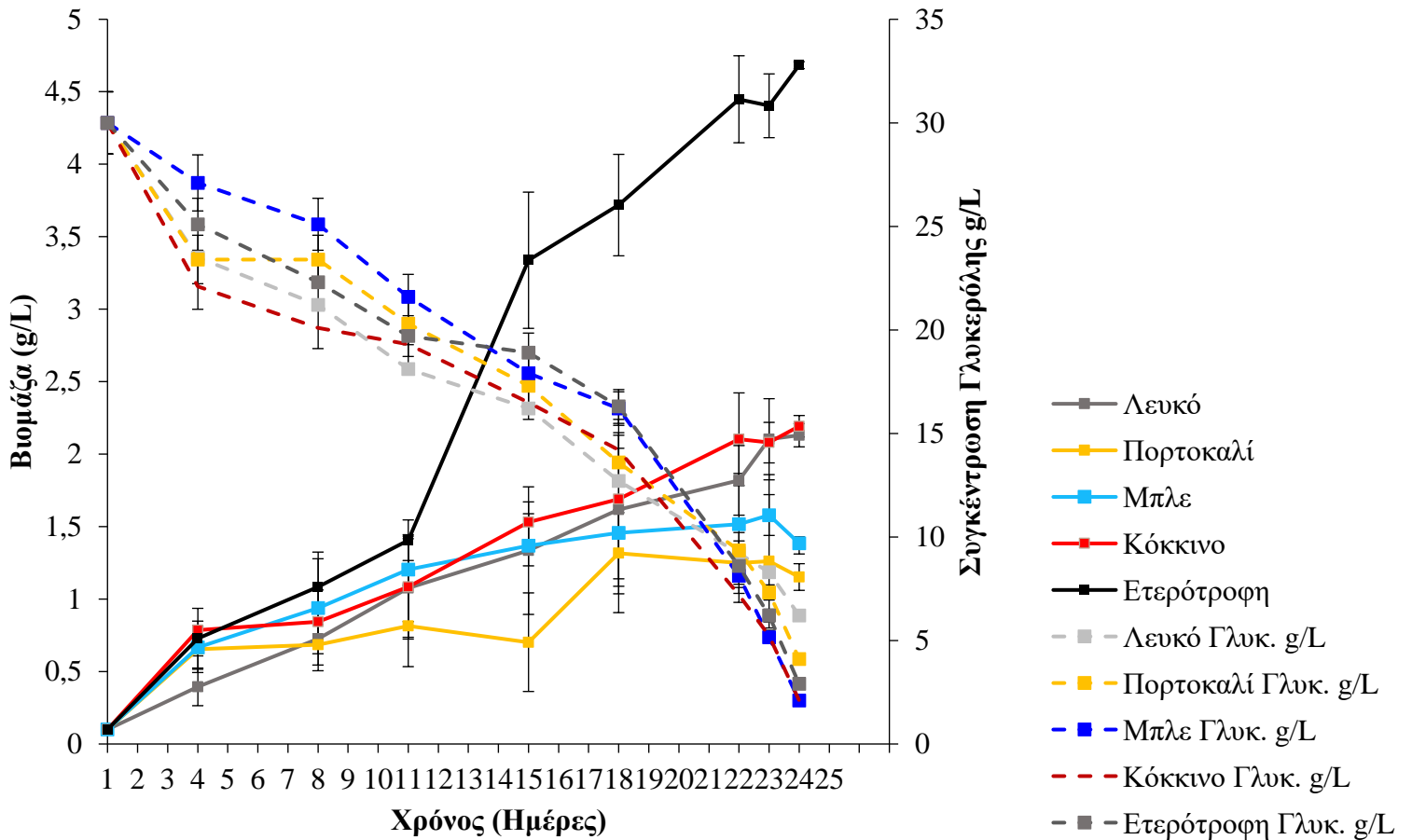
1.2.3 Επίδραση μονοχρωματικής πηγής φωτός διαφορετικών χρωμάτων στην αύξηση του *A. protothecoides* καλλιέργειες διαλείποντος έργου.

Στις μικτότροφες δοκιμές αρχικά σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου για το *A. protothecoides* καλλιεργήθηκε σε τέσσερις διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός (κόκκινο, μπλε, πορτοκαλί και λευκό χρώμα) συγκριτικά με ετερότροφη καλλιέργεια που θεωρήθηκε ως μάρτυρας. Στο υπόστρωμα ανάπτυξης προστέθηκε ακατέργαστη γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωση 30 g/L και ως κύρια πηγή αζώτου πεπτόνη σε αναλογία C/N=20, καθώς έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα σε προηγούμενες δοκιμές. Η παραγωγή βιομάζας ήταν μεγαλύτερη κατά την ετερότροφη ανάπτυξη (4.6 g/L βιομάζα) σε σχέση με την μικτότροφη. Όσον αφορά στη μικτότροφη ανάπτυξη η καλλιέργεια σε μονοχρωματική πηγή φωτός κόκκινου χρώματος παρουσίασε ελαφρά καλύτερη απόδοση σε σύγκριση με τις άλλες μονοχρωματικές πηγές φωτός (2.1 g/L) (**Γράφημα 11**). Η απότομη διακοπή της εκθετικής φάσης αύξησης της ετερότροφης καλλιέργειας και αυτής που αναπτύχθηκε υπό το λευκό φως, οφειλόταν στην πλήρη κατανάλωση της γλυκερόλης από το υπόστρωμα αφού ύστερα από μέτρηση στο πέρας των 25 ημερών είχε καταναλωθεί πλήρως.

Αναφορικά με την βιοχημική ανάλυση της βιομάζας, όπως αναγράφεται και στον **Πίνακα 10** η αποδοτικότητα της βιομάζας του στελέχους ήταν αναφορικά μεγαλύτερη κατά την ετερότροφη ανάπτυξη (control) σε υπόστρωμα με 30 g/L γλυκερόλης (ίση με 4.68 g/L). Στις μικτότροφες αντίστοιχα καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν μέγιστες παραγωγές βιομάζας παρατηρήθηκαν κατά την ανάπτυξη σε μονοχρωματική πηγή κόκκινου φωτός (2.19 g/L) και σε λευκό φως (2.13 g/L). Η απόδοση ως προς την παραγωγή μεταβολιτών αναφορικά σημειώθηκε αρκετά υψηλή στην μικτότροφη ανάπτυξη όσον αφορά την παραγωγή πρωτεϊνών (54-79%) με την υψηλότερη τιμή να σημειώνεται στο λευκό φως. Η αποδοτικότητα σε λιπίδια σημειώθηκε αυξημένη μικτότροφα σε σχέση με την ετερότροφη ανάπτυξη με το μέγιστο ποσοστό να παράγεται σε πορτοκαλί φως (5.2%). Η παραγωγή υδατανθράκων κυμάνθηκε σε ίδια επίπεδα τόσο στο μικτότροφο όσο και στο ετερότροφο σύστημα καλλιέργειας αλλά με μία μικρή αύξηση κατά την μικτότροφη ανάπτυξη σε πορτοκαλί φως, ενώ στο λευκό φάνηκε να υπάρχει κάποιου είδους παρεμπόδιση (2.5%). Η παραγωγή χρωστικών (**Πίνακας 10**) σημείωσε τη μέγιστη παραγωγή κατά την ανάπτυξη σε μπλε φως με ποσοστά χλωροφύλλη a=0,26%, χλωροφύλλη b=0,8% και ολική χλωροφύλλη=1,06%. Τέλος τα καροτενοειδή σημείωσαν μέγιστη απόδοση

στο πορτοκαλί φως με 1.18%, όμως κυμάνθηκαν παρά τον μικτότροφο τρόπο ανάπτυξης του μικροφύκους σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα. Αν και στην ετερότροφη ανάπτυξη το μικροφύκος δεν φωτοσυνθέτει, καθώς αναπτύσσεται σε περιβάλλον απόλυτου σκότους, παρήχθησαν χρωστικές, γεγονός που ερμηνεύεται ενδεχομένως από την υψηλότερη παραγωγή βιομάζας σε σχέση με την μικτότροφη ανάπτυξη.

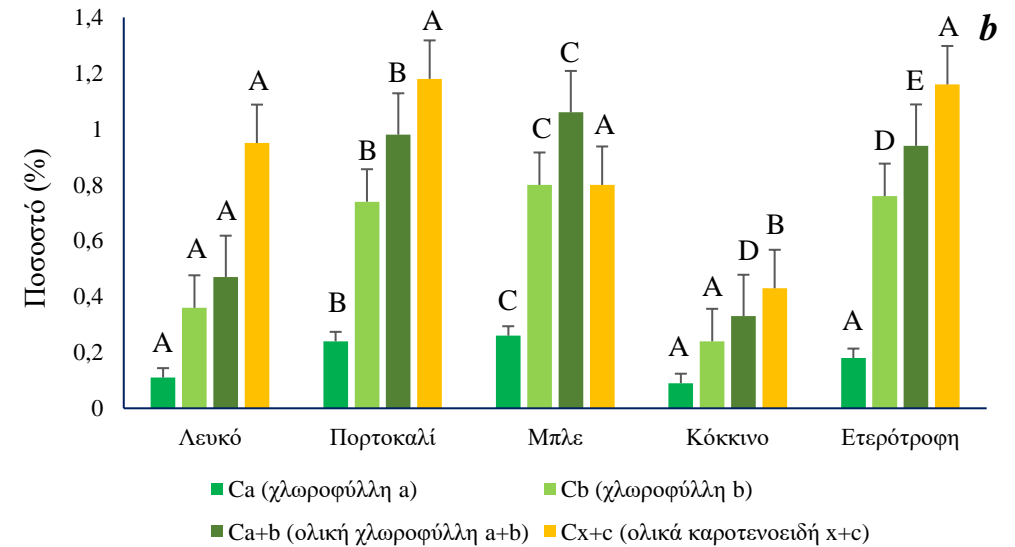
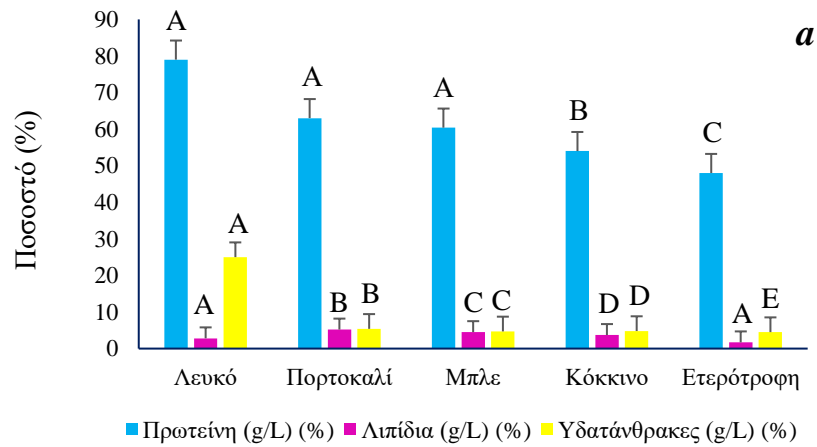
Μικτότροφη καλλιέργεια *Auxenochlorella protothecoides* (a)



Γράφημα 11. (a) Κινητική της μικτότροφης αύξησης του μικροφύκου *A. protothecoides* σε διαλείποντος έργου καλλιέργεια με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη 30 g/L, με πηγή αζώτου πεπτόνη και C/N=20/1, σε τέσσερις διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός (λευκό, πορτοκαλί, μπλε και κόκκινο) συγκριτικά με ετερότροφη καλλιέργεια (μάρτυρας) (D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας). (b) Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών μονοχρωματικών πηγών φωτός σε σχέση με το λευκό (control). Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (Λευκό, μπλε, κόκκινο και πορτοκαλί φως). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 10. Οι συγκεντρώσεις σε πρωτεΐνες (g/L), λιπίδια (g/L), υδατάνθρακες (g/L) και χρωστικές (mg/g) στη βιομάζα του μικροφύκου *A. protothecoides* σε διαλείποντος έργου μικτότροφη καλλιέργεια με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη 30 g/L με πηγή αζώτου πεπτόνη και C/N 20/1, σε τέσσερις διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός (λευκό, πορτοκαλί, μπλε και κόκκινο) συγκριτικά με ετερότροφη καλλιέργεια του μικροφύκου στις ίδιες συνθήκες. Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε μεταβολίτες ως ποσοστό %. Η τυπική απόκλιση δίνεται από το SD (\pm) από τον αριθμό των επαναλήψεων n=3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών μονοχρωματικών πηγών φωτός σε σχέση με το λευκό (control). Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (Λευκό, μπλε, κόκκινο και πορτοκαλί φως). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Μεταβολίτες	Λευκό	Πορτοκαλί	Μπλε	Κόκκινο	Ετερότροφη
Βιομάζα (g/L)	2.13 ^A \pm 0.08	1.15 ^B \pm 0.092	1.38 ^A \pm 0.044	2.19 ^A \pm 0.074	4.68 ^D \pm 0.024
Υx/s (g/g)	0.21	0.18	0.09	0.24	0.22
Πρωτεΐνη (g/L) (%)	1.68 ^A \pm 0.028	0.72 ^B \pm 0.032	0.83 ^C \pm 0.033	1.18 ^D \pm 0.08	2.26 ^D \pm 0.032
Λιπίδια (g/L) (%)	0.06	0.06 ^A	0.062 ^A	0.08 ^A	0.08 ^A
Υδατάνθρακες (g/L) (%)	0.053 ^A	0.06 ^A	0.066 ^A	0.106 ^B	0.210 ^C



Γράφημα 11.1 Ποσοστό παραγωγής μεταβολιτών (a) και χρωστικών (b) του μικροφύκου *A. protothecoides* σε διαλείποντος έργου μικτότροφο σύστημα ανάπτυξης με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός και πηγή αζώτου πεπτόνη C/N=20, σε Γλυκερόλη 10, 20 και 30 g/L. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών μονοχρωματικών πηγών φωτός και της ετερότροφης ανάπτυξης σε σχέση με το λευκό (μάρτυρας). Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (Λευκό, μπλε, κόκκινο, πορτοκαλί φως και ετερότροφη ανάπτυξη). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

1.2.4 Μικτότροφη ανάπτυξη σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου με διαφορετική φωτοπερίοδο και εντάσεις φωτισμού του *Auxenochlorella protothecoides*.

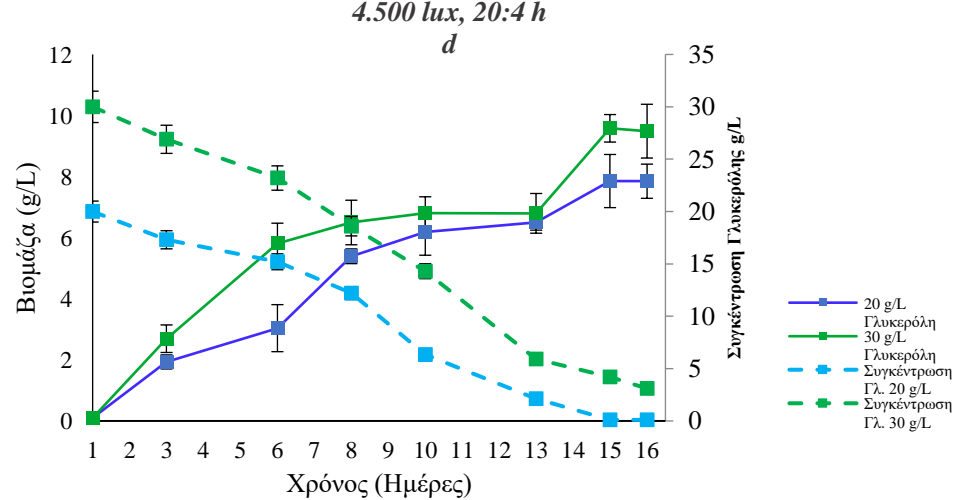
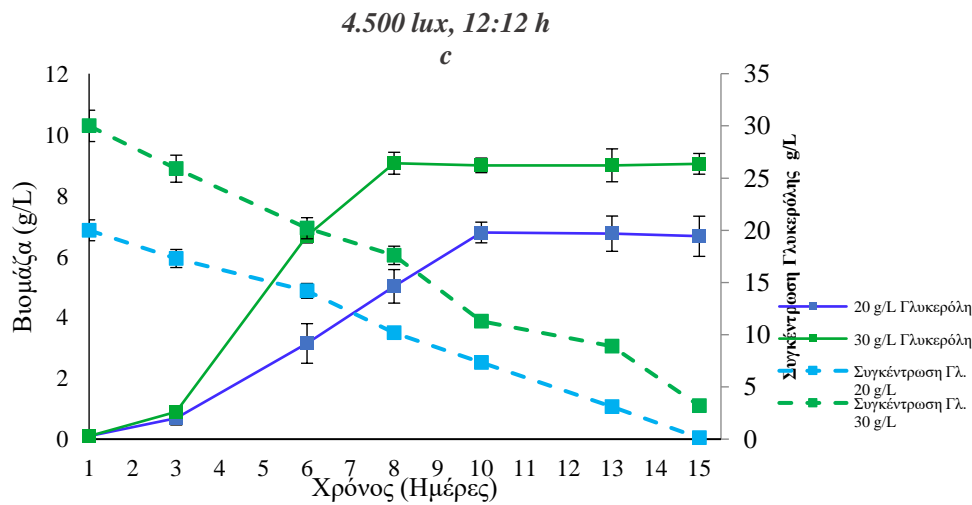
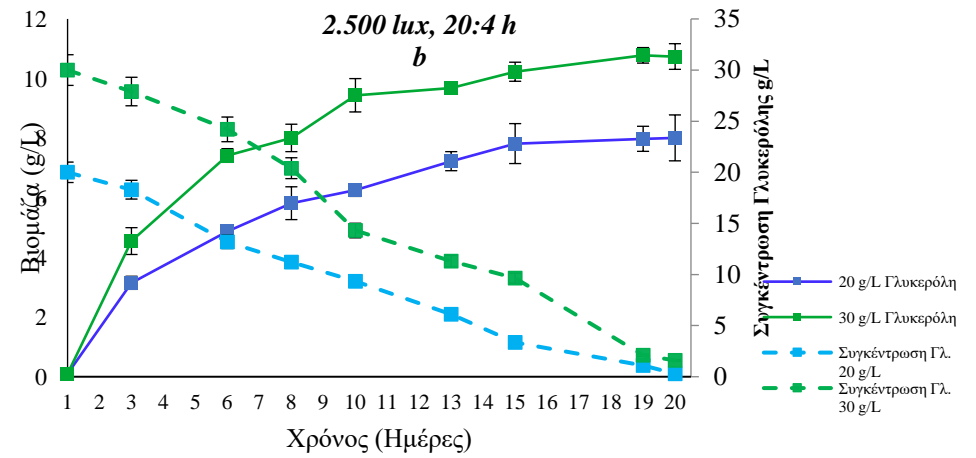
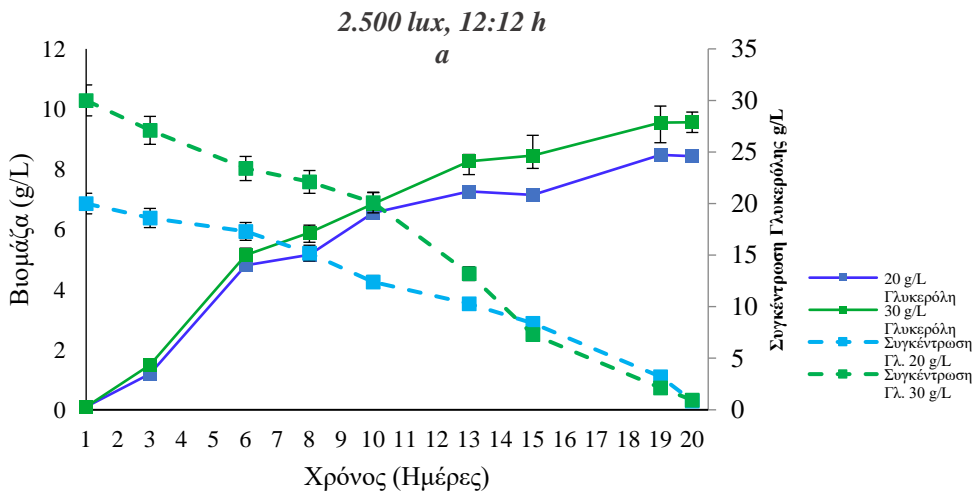
Οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν είχαν στόχο τη συγκριτική μελέτη της διαφορετικής φωτοπεριόδου και της εντάσεως φωτισμού στην μικτότροφη ανάπτυξη του μικροφύκου. Συγκεκριμένα ο στόχος της έρευνας ήταν η μελέτη της επίδρασης δύο εντάσεων φωτός, 2.500 lux και στα 4.500 lux και δύο φωτοπεριόδων, 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι και 20 ώρες φως και 4 ώρες σκοτάδι, αντίστοιχα. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση τα 20 και 30 g/L γλυκερόλης και με πηγή αζώτου πεπτόνη σε αναλογία C/N=20. **(Πίνακας 11, Γράφημα 12).**

Η παραγωγή βιομάζας με ένταση φωτός τα 2.500 Lux και φωτοπερίοδο 12:12h ήταν υψηλή με παραγωγή βιομάζας στα 20 g/L γλυκερόλη τα 8.36 g/L ενώ με αρχική συγκέντρωση τα 30 g/L η παραγωγή ήταν 9.58 g/L αντίστοιχα. Στην ίδια ένταση φωτός με φωτοπερίοδο 20 h φως και 4 h σκοτάδι η καλλιέργεια έφτασε πιο γρήγορα στην εκθετική φάση και παρουσίασε μικρότερο χρόνο προσαρμογής. Η παραγωγή βιομάζας άγγιξε τα 10.74 g/L που ήρθε σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που επικρατούν για το μικτότροφο τρόπο ανάπτυξης στο *A. protothecoides* και φαίνεται να οφείλεται στην πολύ μικρή ένταση φωτισμού. Αντίστοιχα με την αύξηση της έντασης στα 4.500 lux και με φωτοπερίοδο 12h φως:12h σκοτάδι η παραγωγή βιομάζας άγγιξε τα 6.66 g/L για αρχική συγκέντρωση τα 20 g/L γλυκερόλης, ενώ με αρχική συγκέντρωση τα 30 g/L η παραγωγή βιομάζας άγγιξε τα 9.04 g/L, ενώ οι καλλιέργειες εισήλθαν νωρίτερα στη στάσιμη φάση σε αυτή την ένταση φωτισμού.

Συγκριτικά οι καλλιέργειες σε ένταση φωτισμού 4.500 και φωτοπερίοδο 20h φως:4h σκοτάδι παρουσίασαν ελαφρώς μικρότερη παραγωγικότητα σε σχέση με την αντίστοιχη φωτοπερίοδο στα 2.500 lux. Συγκεκριμένα, στο σύστημα με αρχική συγκέντρωση τα 20 g/L γλυκερόλης η υψηλότερη παραγωγή βιομάζας άγγιξε τα 7.85 g/L ενώ στα 30 g/L ήταν ίση με 9.49 g/L. Η διαφορά σημειώθηκε κυρίως στη μεγαλύτερη διάρκεια της εκθετικής φάσης. **(Γράφημα 12, Πίνακας 11).** Η διάρκεια των πειραματικών δοκιμών διήρκεσε 20 ημέρες σε ένταση φωτισμού τα 2.500 lux και 15 ημέρες αντίστοιχα για τα 4.500 lux, καθώς οι καλλιέργειες με υψηλότερη ένταση φωτός εισήλθαν γρηγορότερα στη στάσιμη φάση.

Η βιοχημική ανάλυση της βιομάζας έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό παραγωγής πρωτεϊνών ήταν 76.5% και παρατηρήθηκε σε συνθήκες με ένταση φωτός τα 2.500 lux και φωτοπερίοδο 12 ώρες φως: 12h σκοτάδι σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης τα 20 g/L. Όσον αφορά τα λιπίδια η μέγιστη παραγωγικότητα σημειώθηκε στα 4.500 lux σε φωτοπερίοδο 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι με παραγωγή 19.69%. Οι υδατάνθρακες παρουσιάζονται ως οι μεταβολίτες με παραγωγή, σε ποσοστό ίσο με 6.81% που αντιστοιχεί σε καλλιέργεια που αναπτύχθηκε σε 2.500 lux ένταση φωτός, φωτοπερίοδο 20 ώρες φως:4 ώρες και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20g/L.

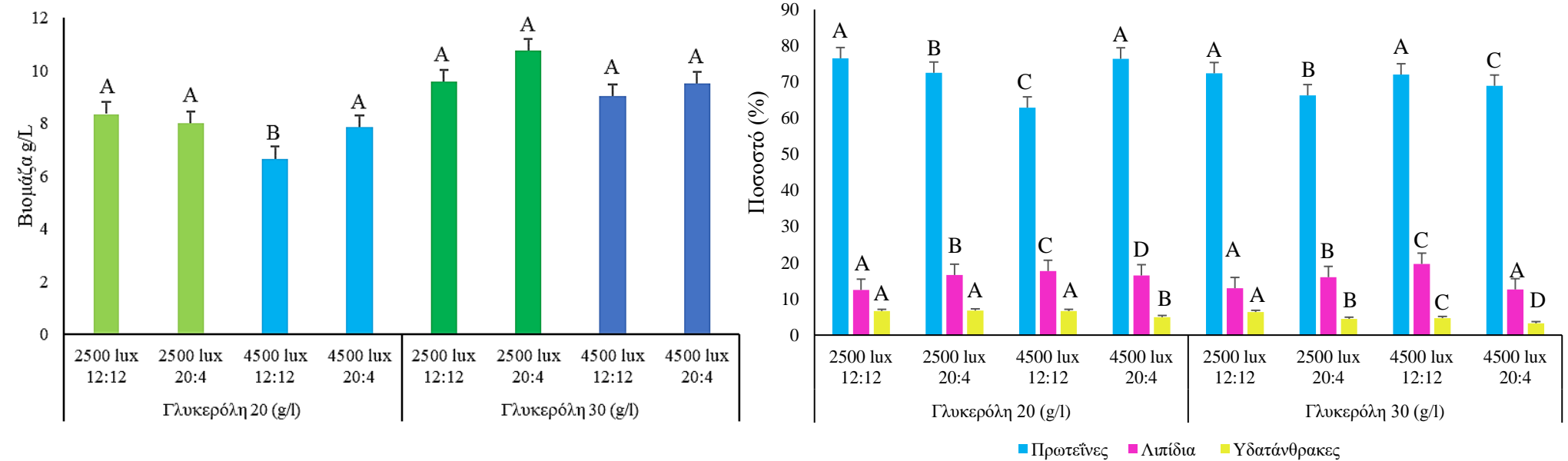
Συγκριτικά με τις δοκιμές οι οποίες έγιναν σε μικτότροφη ανάπτυξη σε φωτοπερίοδο 16:8 παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή μεταβολιτών όπως και βιομάζας ήταν πιο αυξημένη κατά την ανάπτυξη σε φωτοπεριόδους 20:4 και 12:12. Η παραγωγή μεταβολιτών κυμάνθηκε ως εξής: Κατά την ανάπτυξη σε φωτοπερίοδο 12:12 (2.500 lux) η συσσώρευση των πρωτεϊνών ήταν αντίστοιχη με την παραγωγή σε Λευκό φως (control) 16:8, με ποσοστό περί τα 76% επί του ξηρού βάρους βιομάζας. Η παραγωγή λιπιδίων παρατηρήθηκε αρκετά αυξημένη με 2.8% σε 16:8 και αντίστοιχα να αγγίζει το 19% επί της ξηρής βιομάζας σε φωτοπερίοδο 12:12 (4.500 lux) όπως και το 16% σε (20:4) 2.500 lux. Τέλος οι υδατάνθρακες κυμάνθηκαν σε υψηλότερα επίσης επίπεδα όπως και οι πρωτεΐνες με ανώτερο το 6.67% σε 12:12 (2.500 lux) σε σχέση με τη φωτοπερίοδο 16:8 που η παραγωγή άγγιξε το 2.5% επί ξηρού βάρους βιομάζας.



Γράφημα 12. Κινητική της μικτότροφης αύξησης και της κατανάλωσης άνθρακα του μικροφύκου *A. protothecoides* σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού και φωτοπεριόδους με ανάπτυξη σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη 20 και 30 g/L, με πηγή αζώτου πεπτόνη και C/N=20, (D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας).

Πίνακας 11: Απόδοση και βιοχημική σύσταση της μικτότροφης αύξησης του μικροφύκου *A. protothecoides* σε διαλείποντος έργου καλλιέργεια με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη 20 και 30 g/L, με πηγή αζώτου πεπτόνη σε C/N 20/1, σε διαφορετική φωτοπερίοδο (12:12 και 20:4) κι εντάσεις φωτισμού (2.500 και 4.500 lux), D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας. Η τυπική απόκλιση δίνεται από το SD (\pm) από τον αριθμό των επαναλήψεων n=3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή. Η αποδοτικότητα του συστήματος δίνεται σε παραγόμενη ξηρή βιομάζα (D.W. g/L). Ο ρυθμός αύξησης δίνεται από το μ (max) (d^{-1}) Οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και οι υδατάνθρακες σε ποσοστό % ως προς την παραχθείσα ξηρή βιομάζα.

Ένταση Φωτός (lux)	(h)	Γλυκερόλη (g/L)	Βιομάζα (g/L)	Y (x/s) (g/g)	μ_{max} (d^{-1})	Πρωτεΐνες %	Λιπίδια %	Υδατάνθρακες %
2.500	12:12	20	8.36 ^A \pm 0.02	0.42	0.2790	76.50% ^A	12.46% ^A	6.67% ^A
2.500	12:12	30	9.58 ^A \pm 0.04	0.33	0.3458	72.40% ^A	12.96% ^A	6.36% ^A
2.500	20:4	20	8.01 ^A \pm 0.09	0.40	0.3166	62.50% ^B	16.63% ^B	6.81% ^A
2.500	20:4	30	10.74 ^A \pm 0.1	0.36	0.3116	66.30% ^B	16.02% ^B	4.50% ^B
4.500	12:12	20	6.66 ^B \pm 0.05	0.35	0.8746	62.91% ^C	17.72% ^C	6.63% ^A
4.500	12:12	30	9.04 ^A \pm 0.07	0.30	1.6562	72.05% ^A	19.69% ^C	4.67% ^C
4.500	20:4	20	7.85 ^A \pm 0.02	0.38	0.4558	76.42% ^A	16.48% ^D	4.94% ^B
4.500	20:4	30	9.49 ^A \pm 0.12	0.33	0.3363	68.90% ^C	12.61% ^A	3.24% ^D



Γράφημα 12.1 Η παραγόμενη βιομάζα (a) και το ποσοστό παραγωγής μεταβολιτών (b) του μικροφύκου *A. protothecoides* σε καλλιέργεια διαλείποντος έργου με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη 20 και 30 g/L, με πηγή αζώτου πεπτόνη σε C/N 20/1, σε διαφορετική φωτοπερίοδο (12:12 και 20:4) και εντάσεις φωτισμού (2.500 και 4.500 lux). Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών εντάσεων φωτισμού και φωτοπεριόδου για κάθε συγκέντρωση γλυκερόλης. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (φωτοπεριόδος και ένταση φωτός). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

1.2.5 Μικτότροφες καλλιέργειες *S. quadricauda* με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός.

Το μικροφύκος *S. quadricauda* μετά τις ετερότροφες δοκιμές, δοκιμάστηκε μικτότροφα για την αξιολόγηση της ανάπτυξής του σε μονοχρωματική πηγή φωτός, το στέλεχος δοκιμάστηκε αρχικά σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης 5, 10 και 20 g/L με πηγή αζώτου το NH₄Cl. Η αποδοτικότητα του στελέχους μικτότροφα σημειώθηκε μεγαλύτερη από ότι στην ανάπτυξη ετερότροφα. Συγκεκριμένα σε περιβάλλον ανάπτυξης με ανόργανη πηγή αζώτου το στέλεχος παρουσίασε την μέγιστη αποδοτικότητα του σε ανάπτυξη με κόκκινο φως 0.74 g/L σε αρχική συγκέντρωση 5 g/L. Η παραγωγή βιομάζας στα 10 g/L αντίστοιχα σημειώθηκε μειωμένη με 0.5 g/L ως προς το μπλε φως ενώ στα 20 g/L άγγιξε τα 0.68 g/L στο κόκκινο φως. Το συμπέρασμα ήταν ότι η αύξηση της γλυκερόλης στο υπόστρωμα δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού ενώ παράλληλα η ανόργανη πηγή αζώτου δεν προωθεί την ανάπτυξη του (**Γράφημα 13**).

Αναφορικά με την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων το *S. quadricauda* παράγαγε περισσότερους μεταβολίτες όπως είναι αναμενόμενο κατά την ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο με πηγή αζώτου την πεπτόνη. Η μέγιστη ποσότητα πρωτεϊνών κατά την ανάπτυξη σε 30 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης σε πορτοκαλί φωτισμό. Σε γενικότερο πλαίσιο η συγκέντρωση των πρωτεϊνών δεν παρουσίασε μεγάλες διαφορές ως προς την συγκέντρωση στις διάφορες δοκιμές. Όσον αφορά την παραγωγή λιπιδίων το μέγιστο ποσοστό σημειώθηκε σε 10 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης με 0.35 g/L (20%), ενώ αμέσως ακολούθησε το πορτοκαλί φως με 0.31 g/L (17%). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης η παραγωγή των λιπιδίων μειώθηκε σημαντικά όμως αυξήθηκε ως ποσοστό επί της παραγόμενης ξηρής βιομάζας. Οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η αύξηση της πηγής άνθρακα σε σημείο που προκαλεί παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού δημιουργεί συνθήκες στρες και εντείνει τη βιοσυσσώρευση των λιπιδίων. Τέλος η παραγωγή των υδατανθράκων ευνοήθηκε περισσότερο στα 10 g/L με μέσο όρο παραγόμενων υδατανθράκων 16% επί του ξηρού βάρους. Οι διαφορές στην συγκέντρωση των υδατανθράκων δεν παρουσίασε ιδιαίτερες διακυμάνσεις και κυμάνθηκαν σε ίδια επίπεδα για όλες τις δοκιμές αναλογικά φυσικά με την παραχθείσα βιομάζα. **Πίνακας 12**

Οι παραγόμενες χρωστικές κινήθηκαν σε χαμηλά επίπεδα. Μόνη εξαίρεση αποτέλεσε η παραγωγή καροτενοειδών στα 5 και 10 g/L γλυκερόλης και ιδιαίτερα στο λευκό και μπλε φως με

μέσο όρο 3.5% της βιομάζας. Η παραγωγή χλωροφύλλης α και β αλλά και ολικών χλωροφυλλών έδειξε προτίμηση κατά την ανάπτυξη σε κόκκινο φως όπως φαίνεται στον πίνακα **Πίνακας 12**

Οι μικτότροφες καλλιέργειες ακολούθησαν το ίδιο μοτίβο με τις διαλείποντος έργου ετερότροφες καλλιέργειες σε περιβάλλον με NH_4Cl ως πηγή αζώτου στο υπόστρωμα σε αναλογία C/N=20. Συγκεκριμένα οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν έγιναν σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης 10g/L, 20 g/L και 30 g/L σε μονοχρωματικές πηγές φωτός με χρήση πεπτόνης σε αναλογία C/N=20 ως πηγή αζώτου στο υπόστρωμα. Το γενικό αρχικό συμπέρασμα είναι ότι σε περιβάλλον με οργανική πηγή αζώτου το μικροφύκος παρουσιάζει καλύτερη και ταχύτερη ανάπτυξη και συγκεκριμένα στα 10 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης η παραγωγή βιομάζας άγγιξε τα 1.85 g/L κατά την ανάπτυξη σε πορτοκαλί φως ενώ ακολούθησε σχεδόν στην ίδια συγκέντρωση και στο κόκκινο φως με 1.79 g/L. Η ανάπτυξη σε λευκό και μπλε φως δεν ευνόησαν την παραγωγικότητα του στελέχους και σημείωσαν 0.97 g/L και 0.89 g/L αντίστοιχα.

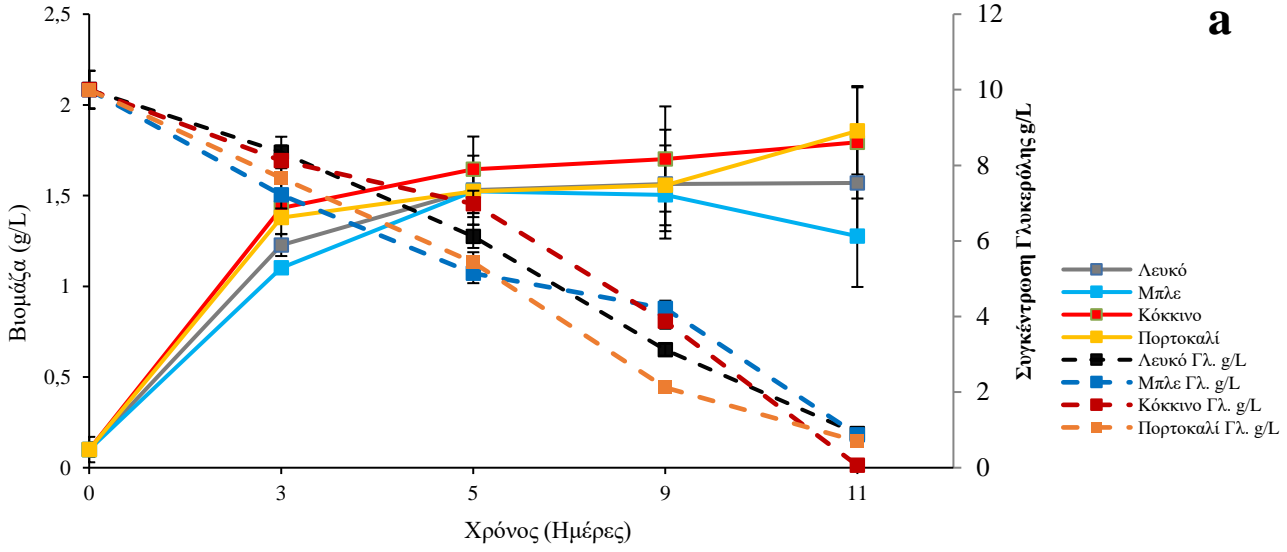
Η αύξηση της συγκέντρωσης γλυκερόλης δεν είχε θετικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη του *S. quadricauda* καθώς παρατηρήθηκε παρεμπόδιση στην ανάπτυξη και μείωση της παραγωγικότητας. Μάλιστα η μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε κατά την ανάπτυξη σε μπλε φως με 0.52 g/L πολύ χαμηλή σε σχέση με την ανάπτυξη σε κόκκινο φως στα 10 g/L αρχικής συγκέντρωσης. Αντίστοιχα χαμηλές συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν και στα 30 g/L με ελάχιστες διαφορές ως προς την παραγωγή βιομάζας μεταξύ των μονοχρωματικών πηγών. Ελάχιστη διαφορά παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξη σε κόκκινο φως με 0.68 g/L. **Πίνακας 12, Γράφημα 13**

Η βιοχημική ανάλυση της βιομάζας έδειξε ότι η παραγωγή μεταβολιτών ήταν υψηλότερη σε περιβάλλον με πεπτόνη ως πηγή αζώτου στο υπόστρωμα σε 10 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης σε σχέση με την παραγωγικότητα που σημειώθηκε σε ανάπτυξη με NH_4Cl . Τα διαφορετικά μήκη κύματος φωτός έδειξαν να επηρεάζουν διαφορετικά την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων από το στέλεχος. Συγκεκριμένα η παραγωγή πρωτεϊνών έδειξε να ευνοείται κατά την ανάπτυξη σε πορτοκαλί φως και σημείωσε παραγωγή 1.28 g/L. (69%). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην παραγωγή πρωτεϊνών κατά την ανάπτυξη στα υπόλοιπα μήκη κύματος φωτός με αρχική συγκέντρωση τα 10 g/L γλυκερόλη. Η ολική παραγωγή υδατανθράκων παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξη σε μπλε φως πράγμα που συμφωνεί με την

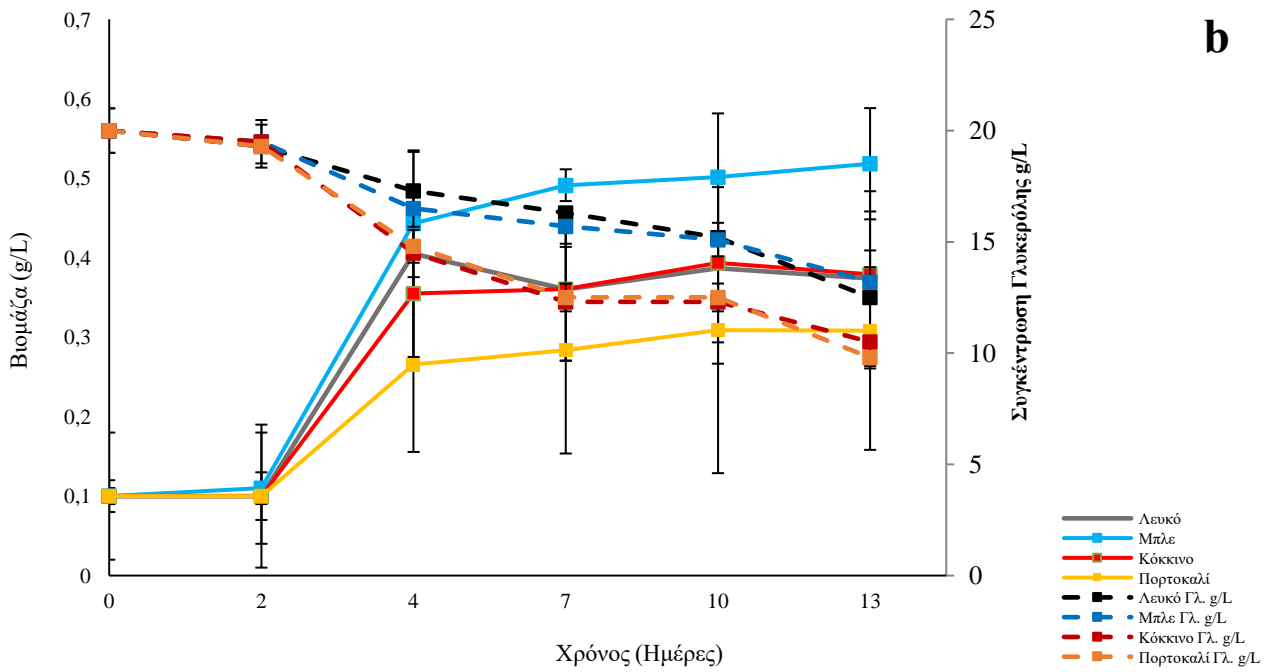
υπόθεση ότι η παρεμπόδιση που προκαλείται λόγω του φωτός οδηγεί το μικροφύκος στην βιοσυσσώρευση υδατανθράκων και την αξιοποίηση του υποστρώματος για ενεργειακούς σκοπούς. Αναφορικά με την παραγωγή λιπιδίων η βιοσύνθεση τους ευνοήθηκε από το κόκκινο φως με παραγωγή 0.179 g/L σε 10 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης. **Πίνακας 12.**

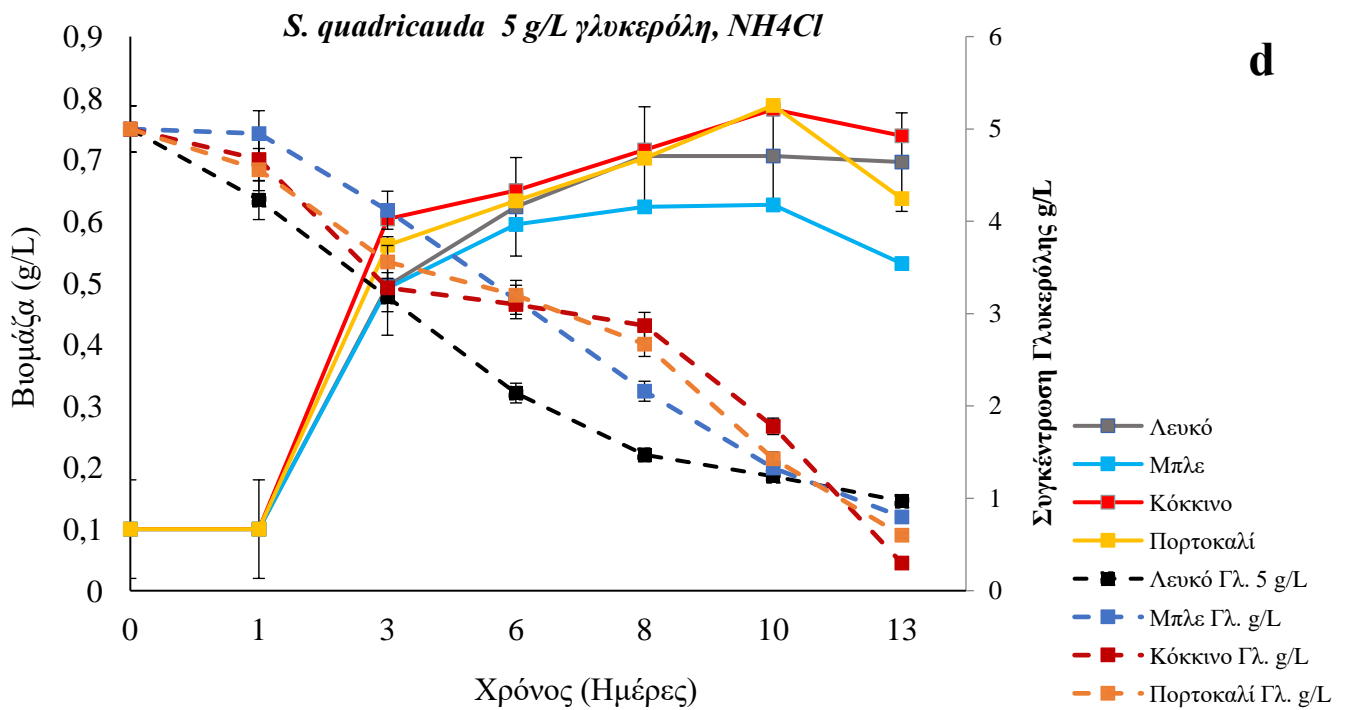
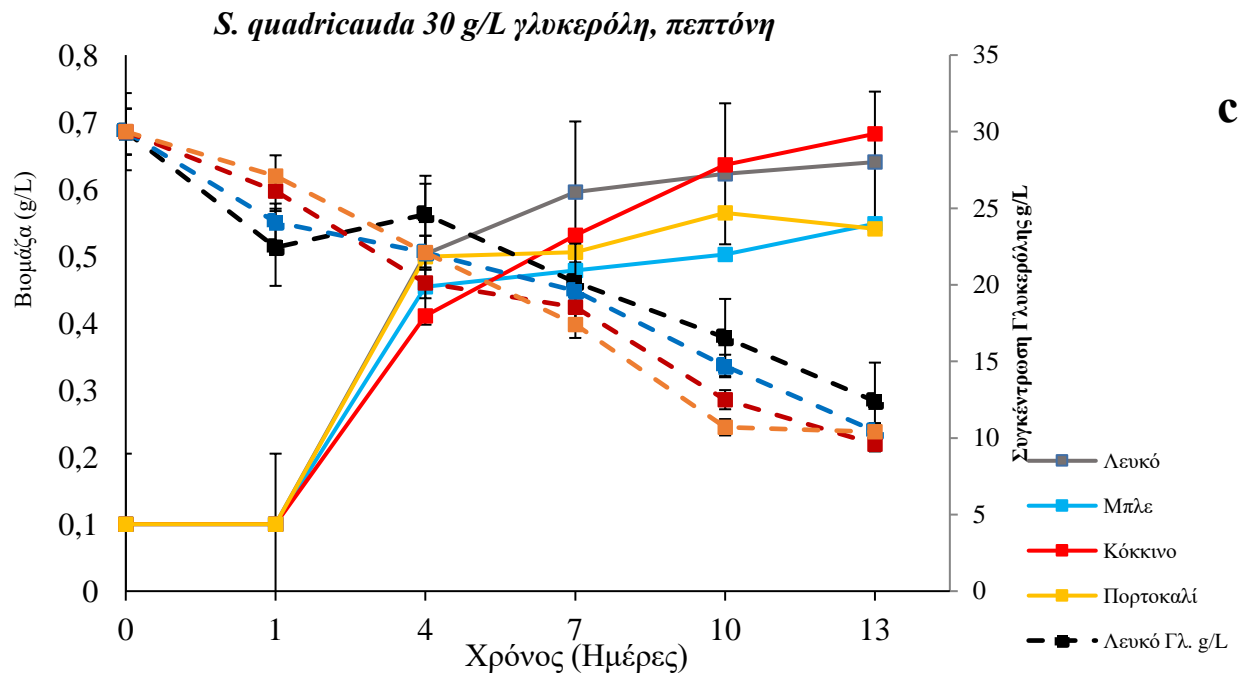
Αντίστοιχα η παραγωγή χρωστικών παρά το γεγονός ότι οι καλλιέργειες ήταν μικτότροφες παρουσίασαν μικρές συγκεντρώσεις σε σχέση με τη βιομάζα. Στις δοκιμές οι συγκεντρώσεις παρέμειναν σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα, συγκεκριμένα στα 20 g/L η παραγωγή καροτενοειδών ήταν μηδενική ενώ στα 30 g/L μόνο στο κόκκινο φως παρουσίασε μία αύξηση αγγίζοντας το 2.2%. Οι χλωροφύλλες a και b αλλά και η ολική χλωροφύλλη σημείωσαν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε όλες τις δοκιμές. **Πίνακας 12.1**

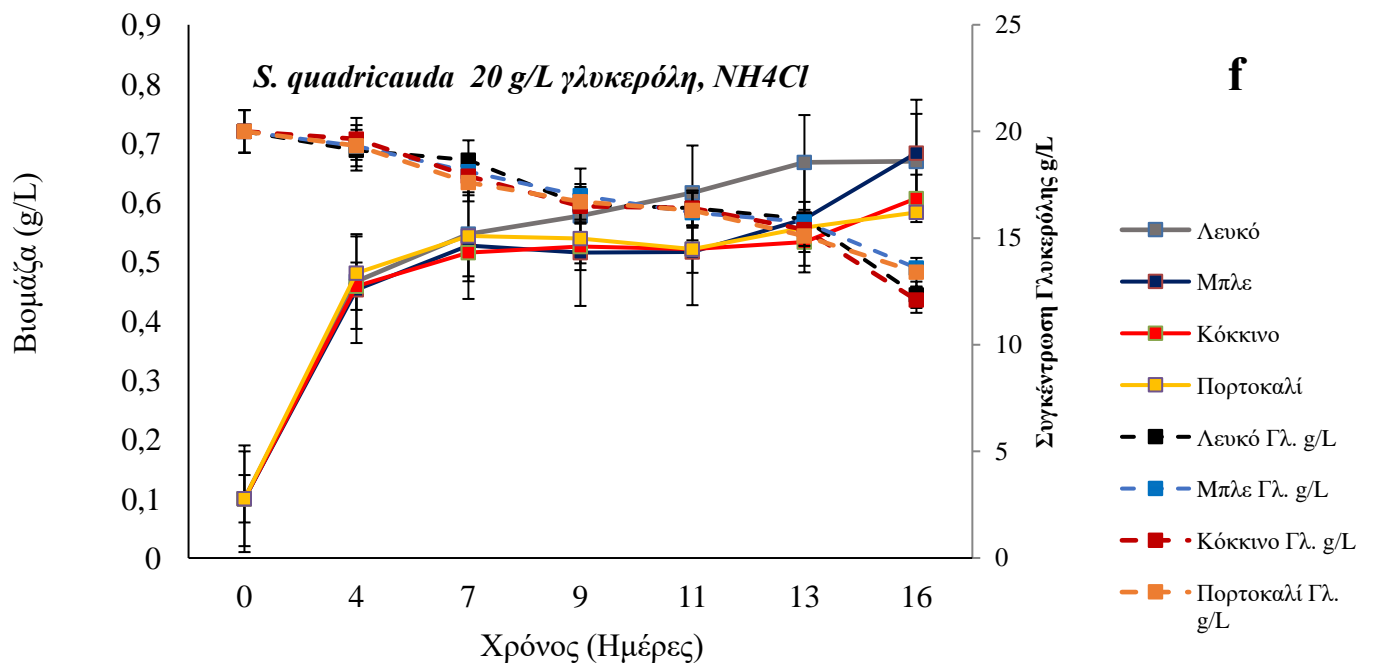
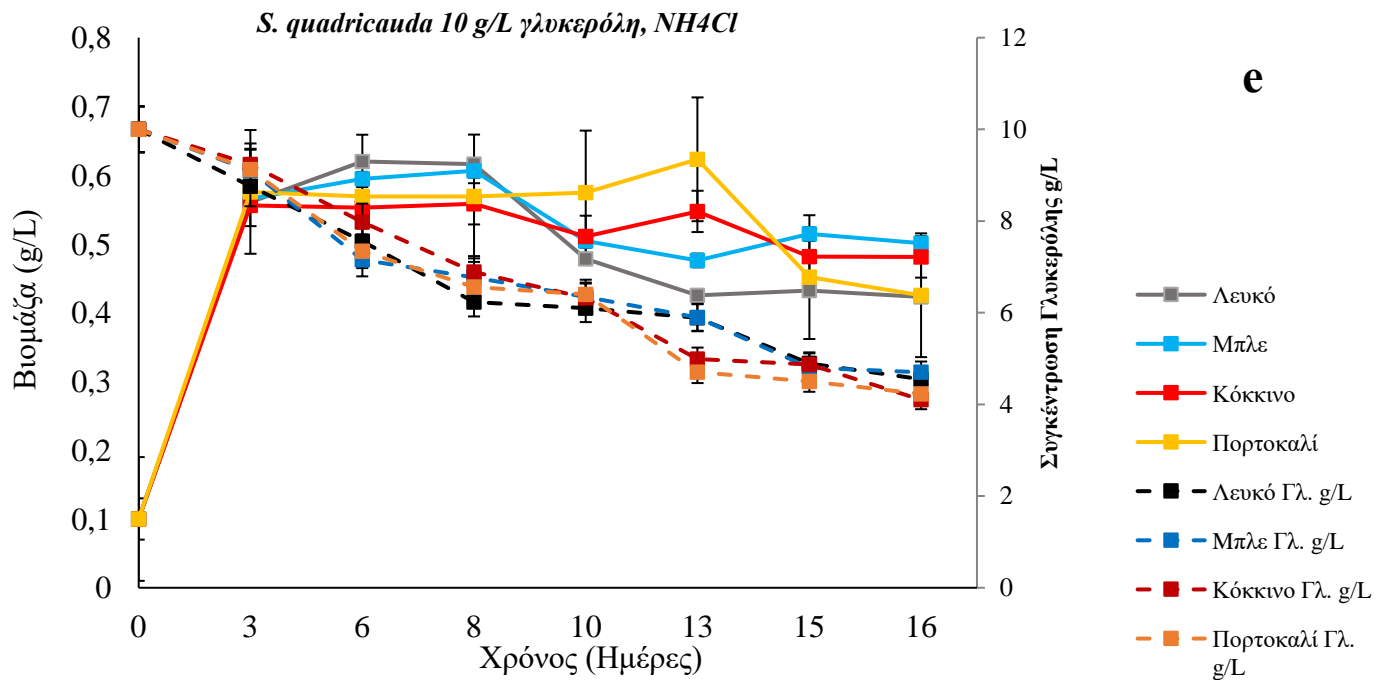
S. quadricauda 10g/L γλυκερόλη, πεπτόνη



S. quadricauda 20 g/L γλυκερόλη, πεπτόνη







Γράφημα 13 Κινητική της μικτότροφης αύξησης και της κατανάλωσης άνθρακα του μικροφύκου *S. quadricauda* σε διαλείποντος έργου σύστημα με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης α) 10 g/L, β) 20 g/L και γ) 30 g/L, με πηγή αζώτου Πεπτόνη και δ) 5 g/L ε) 10 g/L και ς) 20 g/L με πηγή αζώτου NH₄Cl και σε C/N 20/1, σε τέσσερις διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός.

Πίνακας 12. Συγκεντρώσεις πρωτεϊνών (g/L), λιπιδίων (g/L) και υδατανθράκων (g/L) της βιομάζας του μικροφύκου *S. quadricauda* υπό συνθήκες μικτότροφης ανάπτυξης με μονοχρωματικές πηγές φωτός (κόκκινου, μπλε, πορτοκαλί και λευκού (control) φωτός) με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη (crude) συγκέντρωσης 5g/L, 10 g/L και 20 g/L, με πεπτόνη σε αναλογία C/N=20 και NH₄Cl και Πεπτόνη σε αναλογία C/N=20. Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε μεταβολίτες ως ποσοστό %. Η τυπική απόκλιση δίνεται από το SD (\pm) από τον αριθμό των επαναλήψεων n=3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των μονοχρωματικών πηγών φωτός σε σχέση με το Λευκό (control) για κάθε συγκέντρωση γλυκερόλης. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (λευκό (control), κόκκινο, μπλε και πορτοκαλί φως). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

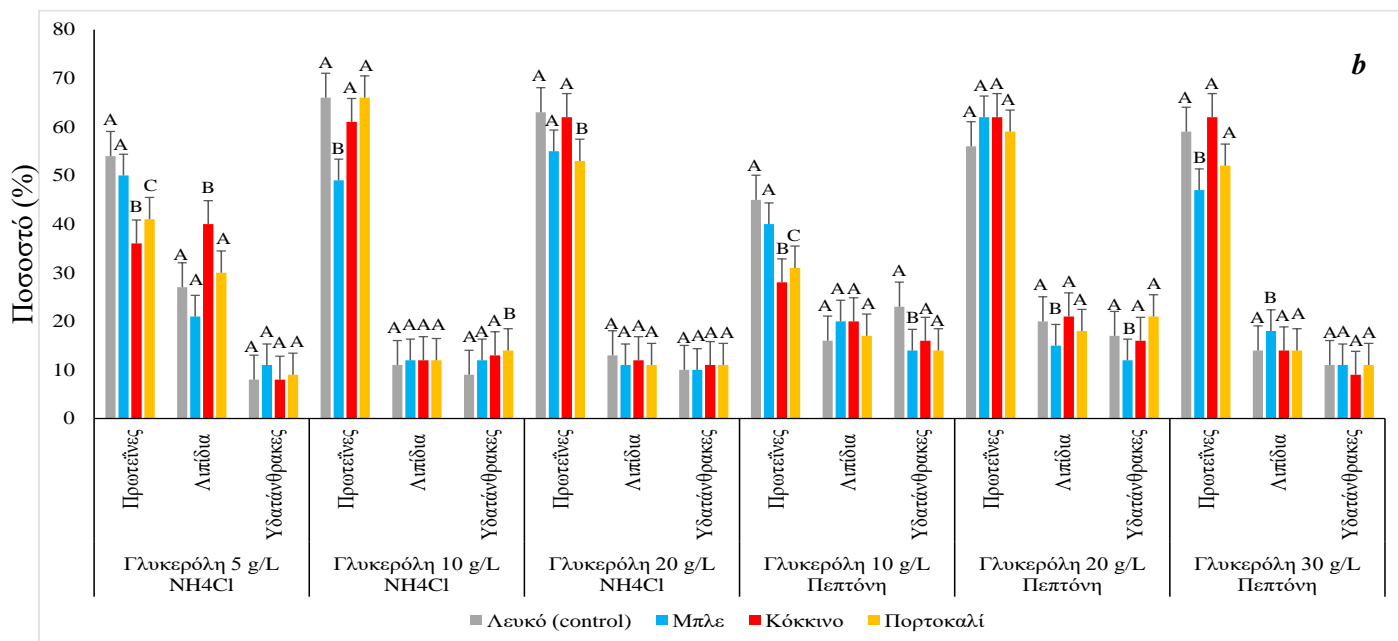
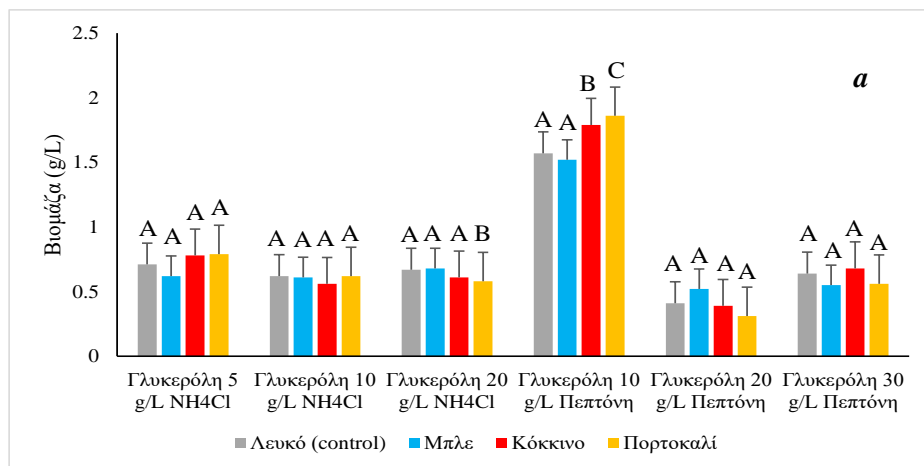
	Μικτότροφη καλλιέργεια με Πεπτόνη C/N=20																	
	10 gr/l glycerol						20 gr/l glycerol						30 gr/l glycerol					
	μ_{max} (d ⁻¹)	X (g/L)	Y _{x/s}	Pr (g/L)	Li (g/L)	Ca (g/L)	μ_{max} (d ⁻¹)	X (g/L)	Y _{x/s}	Pr (g/L)	Li (g/L)	Ca (g/L)	μ_{max} (d ⁻¹)	X (g/L)	Y _{x/s}	Pr (g/L)	Li (g/L)	Ca (g/L)
Λευκό (cont)	0.84	1.57 ^A \pm 0.02	0.16	0.71 ^A \pm 0.06	0.251 ^A \pm 0.001	0.361 ^A \pm 0.003	0.70	0.41 ^A \pm 0.07	0.02	0.23 ^A \pm 0.03	0.082 ^A \pm 0.004	0.070 ^A \pm 0.003	0.54	0.64 ^A \pm 0.01	0.03	0.38 ^A \pm 0.03	0.090 ^A \pm 0.008	0.070 ^A \pm 0.010
Μπλε	0.80	1.52 ^A \pm 0.04	0.15	0.60 ^A \pm 0.04	0.304 ^B \pm 0.011	0.213 ^B \pm 0.001	0.70	0.52 ^A \pm 0.03	0.03	0.32 ^B \pm 0.07	0.078 ^A \pm 0.009	0.064 ^A \pm 0.006	0.50	0.55 ^A \pm 0.01	0.03	0.26 ^B \pm 0.02	0.099 ^A \pm 0.017	0.062 ^A \pm 0.003
Κόκκινο	0.89	1.79 ^B \pm 0.03	0.17	0.5 ^B \pm 0.06	0.358 ^C \pm 0.010	0.286 ^C \pm 0.001	0.63	0.39 ^A \pm 0.02	0.02	0.24 ^A \pm 0.06	0.082 ^A \pm 0.001	0.062 ^A \pm 0.004	0.47	0.68 ^A \pm 0.02	0.03	0.42 ^A \pm 0.02	0.095 ^A \pm 0.012	0.061 ^A \pm 0.004
Πορτοκ.	0.87	1.86 ^C \pm 0.01	0.18	0.58 ^C \pm 0.01	0.316 ^D \pm 0.016	0.260 ^D \pm 0.001	0.49	0.31 ^A \pm 0.02	0.01	0.18 ^A \pm 0.09	0.056 ^B \pm 0.009	0.065 ^A \pm 0.002	0.54	0.56 ^A \pm 0.09	0.03	0.29 ^A \pm 0.01	0.078 ^B \pm 0.014	0.062 ^A \pm 0.007

Μικτότροφη καλλιέργεια με NH ₄ Cl C/N = 20/1																		
	5 gr/l glycerol						10 gr/l glycerol						20 gr/l glycerol					
	μ _{max} (d ⁻¹)	X (g/L)	Y _{X/S}	Pr (g/L)	Li (g/L)	Ca (g/L)	μ _{max} (d ⁻¹)	X (g/L)	Y _{X/S}	Pr (g/L)	Li (g/L)	Ca (g/L)	μ _{max} (d ⁻¹)	X (g/L)	Y _{X/S}	Pr (g/L)	Li (g/L)	Ca (g/L)
Λευκό (cont)	0.80	0.71 ^A ± 0.09	0.15	0.38 ^A ± 0.08	0.192 ^A ± 0.003	0.057 ^A ± 0.002	0.57	0.62 ^A ± 0.05	0.08	0.41 ^A ± 0.02	0.068 ^A ± 0.002	0.056 ^A ± 0.003	0.39	0.67 ^A ± 0.08	0,05	0.42 ^A ± 0.07	0.087 ^A ± 0.003	0.065 ^A ± 0.004
Μπλε	0.80	0.62 ^A ± 0.01	0.13	0.31 ^A ± 0.05	0.130 ^A ± 0.002	0.068 ^A ± 0.001	0.58	0.61 ^A ± 0.01	0.09	0.30 ^B ± 0.01	0.073 ^A ± 0.005	0.073 ^B ± 0.003	0.38	0.68 ^A ± 0.04	0,06	0.37 ^A ± 0.14	0.075 ^A ± 0.014	0.067 ^A ± 0.002
Κόκκινο	0.90	0.78 ^A ± 0.01	0.15	0.28 ^B ± 0.08	0.312 ^B ± 0.001	0.062 ^A ± 0.003	0.57	0.56 ^A ± 0.03	0.06	0.34 ^A ± 0.02	0.067 ^A ± 0.002	0.073 ^B ± 0.002	0.38	0.61 ^A ± 0.04	0,05	0.38 ^A ± 0.15	0.073 ^A ± 0.003	0.065 ^A ± 0.002
Πορτοκ.	0.86	0.79 ^A ± 0.07	0.17	0.32 ^A ± 0.02	0.237 ^C ± 0.005	0.071 ^B ± 0.002	0.58	0.62 ^A ± 0.19	0.07	0.41 ^A ± 0.01	0.074 ^A ± 0.002	0.089 ^C ± 0.05	0.39	0.58 ^B ± 0.04	0,05	0.31 ^A ± 0.06	0.064 ^B ± 0.001	0.063 ^A ± 0.001

Πίνακας 12.1 Η συγκέντρωση χρωστικών (mg/g), του μικροφύκου *S. quadricauda* σε διαλείποντος έργου σύστημα καλλιέργειας με υπόστρωμα 5g/L, 10 g/L και 20 g/L ακατέργαστης (crude) γλυκερόλης, με πηγή αζώτου πεπτόνη και NH₄Cl σε λόγο C/N=20/1, σε τέσσερις διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός (λευκό, πορτοκαλί, μπλε και κόκκινο). Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε χρωστική ως ποσοστό %. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των μονοχρωματικών πηγών φωτός σε σχέση με το Λευκό (control) για κάθε συγκέντρωση γλυκερόλης. Το ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (λευκό (control), κόκκινο, μπλε και πορτοκαλί φως). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

mg/g	Χλωροφύλλη a	Χλωροφύλλη b	Ολική Χλωροφύλλη	Ολικά Καροτενοειδή
5 g/L Γλυκερόλη NH₄Cl C/N=20				
Λευκό	0.999 ^A (0.14%) ^A	4.31 ^A (0.61%) ^A	10.22 ^A (1.46%) ^A	245.65 ^A (0.35%) ^A
Μπλε	0.745 ^B (0.14%) ^A	3.11 ^A (0.58%) ^A	7.23 ^B (1.36%) ^A	195.93 ^B (0.36%) ^A
Κόκκινο	0.669 ^C (0.1%) ^A	2.54 ^B (0.34%) ^B	5.46 ^C (0.73%) ^B	73.456 ^C (0.1%) ^B
Πορτοκαλί	0.861 ^A (0.13%) ^A	3.27 ^C (0.51%) ^A	7.01 ^D (1.09%) ^A	76.478 ^D (0.12%) ^C
10 g/L Γλυκερόλη NH₄Cl C/N=20				
Λευκό	0.478 ^A (0.11%) ^A	2.077 ^A (0.5%) ^A	4.948 ^A (1.17%) ^A	186.077 ^A (0.44%) ^A
Μπλε	0.099 ^B (0.02%) ^B	0.261 ^B (0.05%) ^B	0.334 ^B (0.07%) ^B	15.965 ^B (0.32%) ^B
Κόκκινο	0.461 ^A (0.1%) ^A	1.758 ^C (0.36%) ^C	3.786 ^C (0.8%) ^C	38.426 ^C (0.8%) ^C
Πορτοκαλί	0.415 ^A (0.09%) ^A	1.661 ^D (0.4%) ^D	3.721 ^D (0.9%) ^A	48.426 ^D (0.11%) ^D
20 g/L Γλυκερόλη NH₄Cl C/N=20				
Λευκό	0.460 ^A (0.07%) ^A	0.905 ^A (0.13%) ^A	1.454 ^A (0.21%) ^A	12.16 ^A (0.2%) ^A
Μπλε	0.029 ^B (0.042%) ^B	0.156 ^B (0.02%) ^B	0.421 ^B (0.06%) ^B	64.02 ^B (0.1%) ^B
Κόκκινο	0.403 ^A (0.06%) ^A	1.405 ^C (0.23%) ^C	2.77 ^C (0.46%) ^C	120.395 ^C (0.2%) ^C
Πορτοκαλί	0.325 ^C (0.05%) ^C	1.045 ^D (0.2%) ^D	1.876 ^D (0.32%) ^A	39.547 ^D (0.7%) ^D

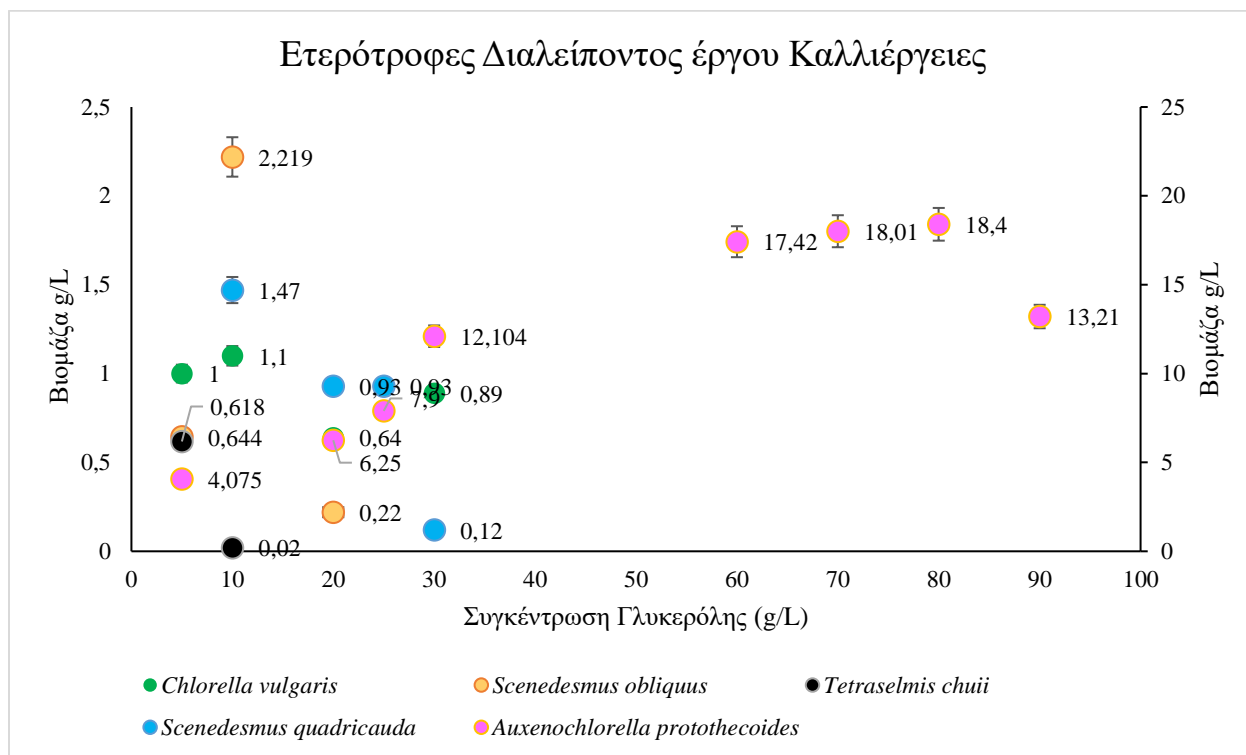
10 g/L Γλυκερόλη Πεπτόνη C/N=20				
Λευκό	1.49 ^A (0.1%) ^A	6.13 ^A (0.4%) ^A	2.46 ^A (0.15%) ^A	1.006.99 ^A (6.4%) ^A
Μπλε	1.46 ^A (0.11%) ^A	4.37 ^A (0.3%) ^A	0.39 ^B (0.03%) ^B	62.50 ^B (0.5%) ^B
Κόκκινο	2.30 ^B (0.12%) ^A	9.15 ^A (0.5%) ^A	20.42 ^C (1.1%) ^C	384.73 ^C (2.14%) ^C
Πορτοκαλί	2.44 ^C (0.13%) ^A	6.48 ^A (0.35%) ^A	26.60 ^D (1.4%) ^D	332.75 ^A (1.8%) ^D
20 g/L Γλυκερόλη Πεπτόνη C/N=20				
Λευκό	0.89 ^A (0.32%) ^A	2.00 ^A (0.74%) ^A	1.68 ^A (0.62%) ^A	97.66 ^A (6.2%) ^A
Μπλε	0.31 ^B (0.06%) ^B	0.82 ^B (0.15%) ^B	1.06 ^B (0.2%) ^B	65.9 ^B (1%) ^B
Κόκκινο	0.30 ^C (0.08%) ^C	0.76 ^C (0.2%) ^C	0.76 ^C (0.2%) ^C	145.665 ^C (2.12%) ^C
Πορτοκαλί	0.29 ^D (0.09%) ^D	0.96 ^A (0.3%) ^D	0.96 ^D (0.3%) ^D	55.66 ^D (1%) ^D
30 g/L Γλυκερόλη Πεπτόνη C/N=20				
white	0.32 ^A (0.05%) ^A	0.84 ^A (0.13%) ^A	1.12 ^A (0.2%) ^A	88.88 ^A (1.4%) ^A
blue	0.28 ^A (0.05%) ^A	0.64 ^A (0.11%) ^A	0.59 ^B (0.1%) ^B	122.55 ^B (2.2%) ^B
red	0.74 ^B (0.1%) ^B	2.04 ^B (0.3%) ^B	2.92 ^C (0.42%) ^C	130.66 ^C (2%) ^C
orange	0.27 ^A (0.05%) ^A	0.77 ^A (0.14%) ^A	1.16 ^A (0.21%) ^A	54.70 ^D (1%) ^A



Γράφημα 13.1 Η παραγόμενη βιομάζα (a) και το ποσοστό παραγωγής μεταβολιτών (b) του μικροφύκου *S. quadricauda* σε καλλιέργεια διαλείποντος έργου με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη συγκέντρωσης 5, 10, 20 και 30 g/L, με πηγή αζώτου πεπτόνη και NH₄Cl σε C/N 20/1, σε διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτισμού. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών πηγών φωτισμού ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (Λευκό (control), μπλε, κόκκινο και πορτοκαλί φως). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές

1.3 Συγκριτικά αποτελέσματα των υπό μελέτη στελεχών μικροφυκών σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου και αξιολόγηση της δυναμικότητάς τους για περαιτέρω δοκιμές.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που παρατέθηκαν στα προηγούμενα πειράματα έδωσαν σημαντικές πληροφορίες αναφορικά με τη δυνατότητα των στελεχών να αναπτύσσονται σε ακατέργαστη γλυκερόλη και να παράγουν χρήσιμους μεταβολίτες, αλλά και τη χρήση τους σε περαιτέρω δοκιμές για την διασφάλιση ορθών συμπερασμάτων. Συγκεκριμένα αναφορικά με τις δοκιμές των στελεχών σε διαλείποντος έργου ετερότροφα συστήματα καλλιέργειας το στέλεχος με τη μέγιστη δυναμικότητα ήταν το *A. protothecoides* όπου ανταποκρίθηκε και σε συστήματα στα οποία η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο υπόστρωμα άγγιξε τα 90 g/L οπότε και άρχισε να παρατηρείται παρεμπόδιση της ανάπτυξης του στελέχους. Τα στελέχη *C. vulgaris* και *S. quadricauda* δεν αναπτύχθηκαν με τόση επιτυχία ετερότροφα και η τοξικότητα των υψηλών συγκεντρώσεων γλυκερόλης άρχισαν να δρουν παρεμποδιστικά από τα 20 g/L αρχικής συγκέντρωσης στο υπόστρωμα. Βέβαια τα στελέχη αυτά έδωσαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα σε σχέση την παραγωγή μεταβολιτών οπότε και επιλέχθηκαν για περαιτέρω δοκιμές κυρίως ως προς την παραγωγή λιπιδίων και πρωτεϊνών. **(Γράφημα 14)**. Αντίστοιχα το *T. chuii* όπως σχολιάστηκε και ανωτέρω δεν αξιολογήθηκε ως στέλεχος που χρίζει περαιτέρω διερεύνησης λόγω αδυναμίας ανάπτυξης όπως και το *S. obliquus* που έδωσε μια αξιολογη συγκέντρωση βιομάζας και ήταν πλούσιο σε μεταβολικά προϊόντα σταδιακά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης το στέλεχος παρουσίασε εξασθένηση σε αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στα 10 g/L όπου εκφυλίστηκε και έτσι δεν αξιοποιήθηκε παραπάνω. Όπως σχολιάστηκε το *A. protothecoides* παρουσίασε το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη του ετερότροφα τόσο λόγω της υψηλής του δυναμικότητας που υπερβαίνει τις δυνατότητες των άλλων στελεχών αλλά και ως προς την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και κυρίως πρωτεΐνης που ξεπερνά σε ποσότητα κατά πολύ τα άλλα στελέχη.



Γράφημα 14: Απεικόνιση των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν σε ετερότροφες καλλιέργειες διαλείποντος έργου με σκοπό την αξιολόγηση της δυναμικότητάς τους. Επιλέχθηκαν να παρουσιαστούν οι εκάστοτε βέλτιστες συνθήκες που παρατηρήθηκαν για τα στελέχη (*A. protothecoides*, *C. vulgaris*, *T. chuii*, *S. quadricauda* και *S. obliquus*). Η αξιολόγηση της δυναμικότητας παρουσιάζεται ως η παραγωγή της βιομάζας κάθε στελέχους συναρτήσει της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στο εκάστοτε σύστημα.

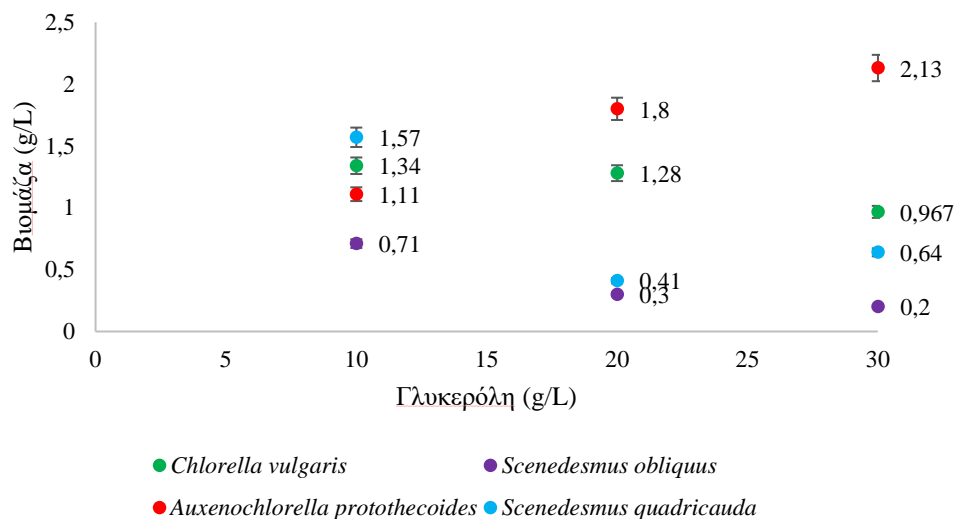
Τα πειράματα των μικτότροφων καλλιιεργειών έδωσαν αποτελέσματα σχετικά με την ικανότητα των μικροφυκών να αναπτύσσονται σε περιβάλλον όπου η πηγή άνθρακα στο υπόστρωμα είναι η ακατέργαστη γλυκερόλη παρουσία φωτός. Αρχικά το στέλεχος *A. protothecoides* που έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα κατά την ετερότροφη ανάπτυξη, αναπτύχθηκε σε περιβάλλον έως 30 g/L γλυκερόλης στο υπόστρωμα. Παρατηρήθηκε παρεμπόδιση της ανάπτυξης που μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το στέλεχος έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται καλύτερα ετερότροφα σε σχέση με την μικτότροφη ανάπτυξη. Παράλληλα το *C. vulgaris* και το *S. quadricauda* αναπτύχθηκαν καλύτερα παρουσία φωτός σε σχέση με την ετερότροφη ανάπτυξη σε περιβάλλον με οργανική πηγή αζώτου (πεπτόνη). Το σύνολο των δοκιμών έδειξε ότι τα θρεπτικά υποστρώματα στα οποία το άζωτο προέρχεται από οργανική πηγή (κυρίως πεπτόνη) ευνοεί την πρόσληψη της ακατέργαστης γλυκερόλης. Παράλληλα

στο σύνολο των δοκιμών παρατηρήθηκε η διαφορετική συμπεριφορά των στελεχών όταν καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το κάθε στέλεχος αντιδρά διαφορετικά και ενεργοποιούνται ταυτόχρονα διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια. Συγκεκριμένα όπως φαίνεται και στο **Γράφημα 15.1** κάθε στέλεχος παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά σε διαφορετικό φως σε σχέση με το Λευκό που χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας. Συγκεκριμένα, αρχικά για το *C. vulgaris* ενώ στο Λευκό φως η ανάπτυξη του άρχισε να μειώνεται ήδη από τα 10 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης, στο Μπλε φως η ανάπτυξη ευνοήθηκε στα 20 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης ενώ σε κόκκινο και πορτοκαλί φως η ανάπτυξη κυμάνθηκε σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα. Αντίστοιχα για το *A. protothecoides* η ανάπτυξη σε κόκκινο φως σε σχέση με το λευκό έδωσε ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα ως προς την παραγωγή βιομάζας. Βέβαια όπως προαναφέρθηκε είναι ένα μικροφύκος που αναπτύσσεται κυρίως ετερότροφα και παρουσία φωτός παρατηρείται αδυναμία αξιοποίησης της πηγής άνθρακα από το υπόστρωμα. Αντίστοιχα το *S. quadricauda* αναπτύχθηκε καλύτερα σε περιβάλλον με αρχική συγκέντρωση τα 10 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε παρεμπόδιση. Καλύτερη απόδοση ως προς τη βιομάζα σημειώθηκε σε πορτοκαλί φωτισμό σε σχέση με το λευκό φως που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Τα στελέχη *C. vulgaris* και *A. protothecoides* επιλέχθηκαν για περαιτέρω δοκιμές σε ημιδιαλείποντος έργου και συνεχή συστήματα καλλιέργειας ενώ το *S. quadricauda* λόγω του χαμηλού ρυθμού ανάπτυξης σε περιβάλλον γλυκερόλης δεν δοκιμάστηκε σε περαιτέρω συστήματα ανάπτυξης οπότε οι βιολογικές αναλύσεις αφορούν στα διαλείποντος έργου συστήματα καλλιέργειας.

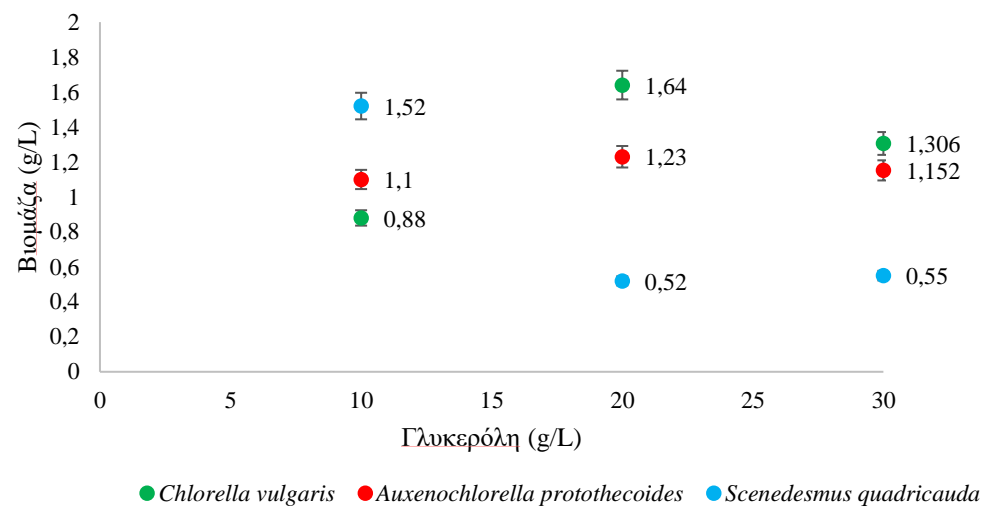
Ως προς την παραγωγή μεταβολιτών στα διαλείποντος έργου συστήματα καλλιέργειας παρατηρήθηκαν διαφορές οι οποίες συσχετίζονται με το φως. Για το εκάστοτε στέλεχος ελέγχθηκαν συλλογικά στις διαφορετικές πηγές φωτός η παραγωγικότητα των μεταβολιτών και επιλέχθηκαν οι συνθήκες που παρουσίασαν τη μέγιστη δυναμικότητα. Συγκεκριμένα, για το *C. vulgaris* μικτότροφα παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή βιομάζας όταν η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης στο υπόστρωμα ήταν τα 20 g/L. Η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων 13% όπως και πρωτεΐνης 49% επί της ξηρής βιομάζας σημειώθηκε στο μπλε φως ενώ η μέγιστη παραγωγή υδατανθράκων 17% επί της ξηρής βιομάζας σημειώθηκε κατά την ανάπτυξη σε κόκκινο φως. Αντίστοιχα για το *S. quadricauda* η μέγιστη απόδοση σε βιομάζα σημειώθηκε σε 10 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης όπου η μέγιστη παραγωγή πρωτεϊνών 45% και υδατανθράκων 23% επί της ξηρής βιομάζας παρατηρήθηκε σε λευκό φως ενώ η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων 20% επί της ξηρής βιομάζας σημειώθηκε σε κόκκινο φως, καθιστώντας το

πιο δυναμικό στέλεχος για την παραγωγή λιπιδίων. Τέλος το *A. protothecoides* δεν άγγιξε τα ποσοστά παραγωγής μεταβολιτών που μέχρι τώρα είχαν σημειωθεί στις ετερότροφες καλλιέργειες αλλά σημειώθηκε διαφορά ως προς τη μεταβολική του παραγωγή καθώς το μέγιστο ποσοστό πρωτεϊνών 79% σημειώθηκε στο λευκό φως, ενώ η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων 3.7% και υδατανθράκων 4.8% επί της ξηρής βιομάζας στο πορτοκαλί φως. Τα παραπάνω μπορούν να οδηγήσουν στο συμπέρασμα ότι τα διαφορετικά μήκη κύματος έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιούν διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια και να ενεργοποιούν τη βιοσυσσώρευση διαφορετικών μεταβολιτών κάθε φορά.

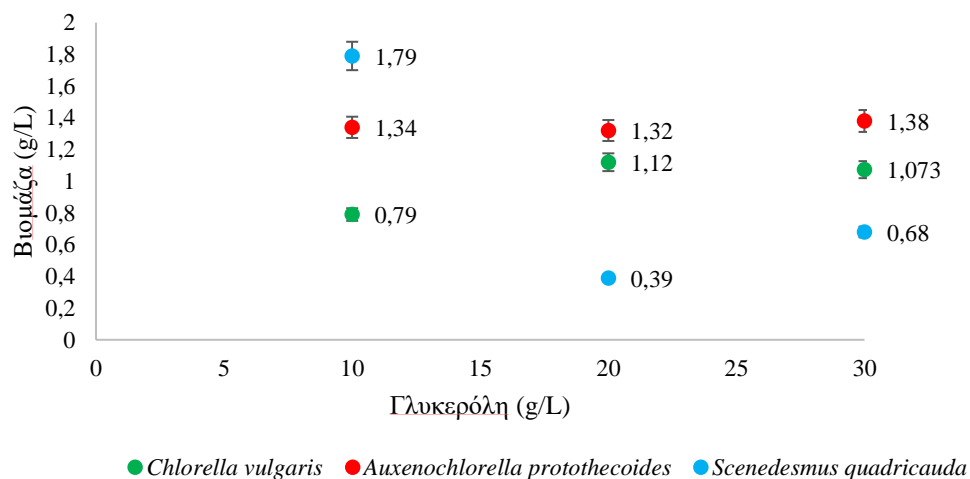
Λευκός Φωτισμός (Control) (a)



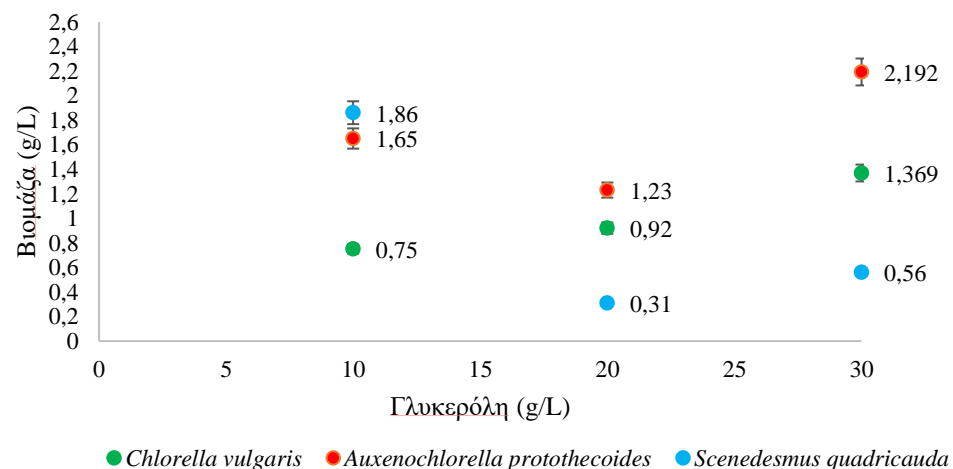
Μπλε φωτισμός (b)



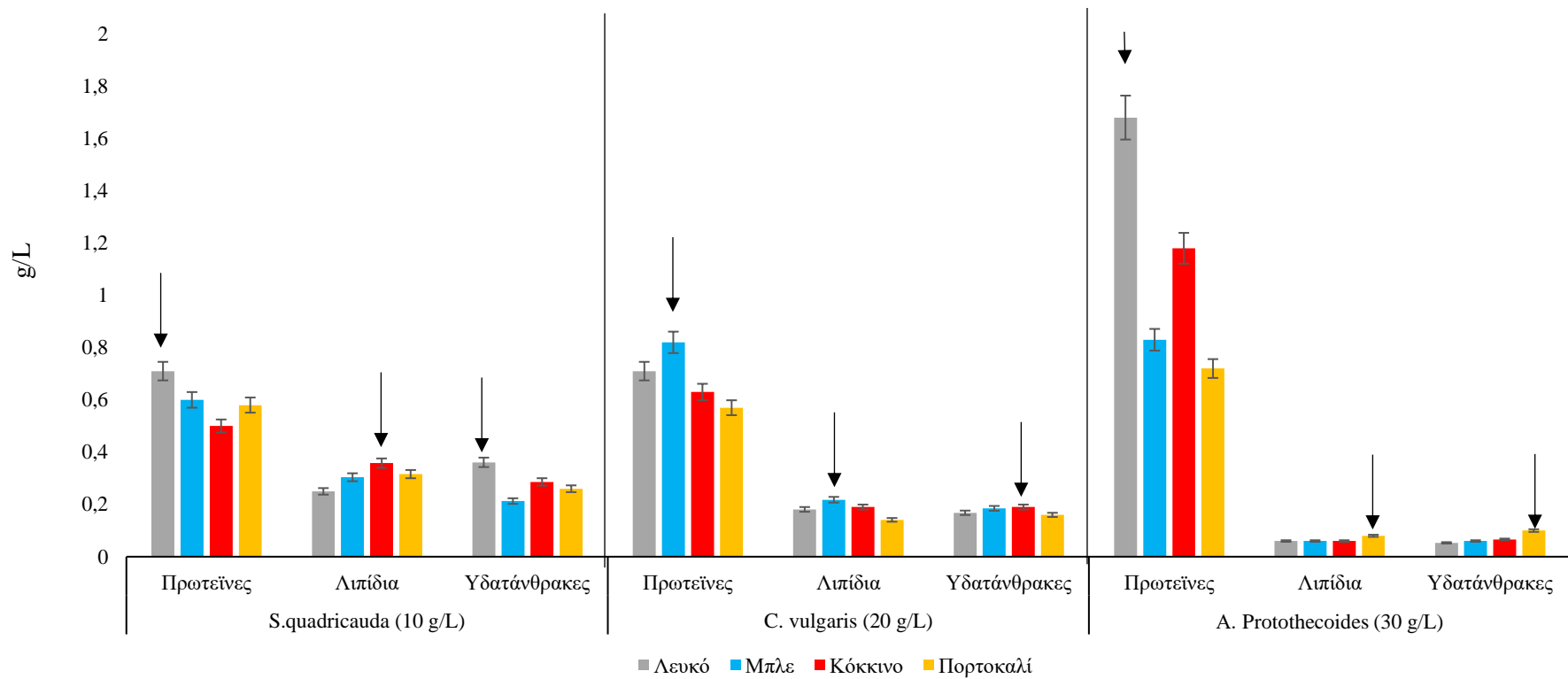
Κόκκινος Φωτισμός (c)



Πορτοκαλί Φωτισμός (d)



Γράφημα 15.1: Απεικόνιση των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν σε μικτότροφες καλλιέργειες διαλείποντος έργου σε διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός με σκοπό την αξιολόγηση της δυναμικότητας τους. Επιλέχθηκαν να παρουσιαστούν οι εκάστοτε βέλτιστες συνθήκες που παρατηρήθηκαν για τα στελέχη (*A. protothecoides*, *C. vulgaris*, *S. quadricauda*). Η αξιολόγηση της δυναμικότητας παρουσιάζεται ως η παραγωγή της βιομάζας κάθε στελέχους συναρτήσει της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στο εκάστοτε σύστημα.



Γράφημα 15.2: Απεικόνιση των παραγόμενων μεταβολιτών των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν σε μικτότροφες καλλιέργειες διαλείποντος έργου σε διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός με σκοπό την αξιολόγηση των βέλτιστων συνθηκών για την παραγωγή των μεταβολιτών στόχων. Παρουσιάζονται τα στελέχη *A. protothecoides*, *C. vulgaris*, *S. quadricauda* στις διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης που παρουσίασαν και την αντίστοιχη μέγιστη δυναμικότητα συναρτήσεως της παραγωγής των μεταβολιτών σε g/L.

1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΗΜΙΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ

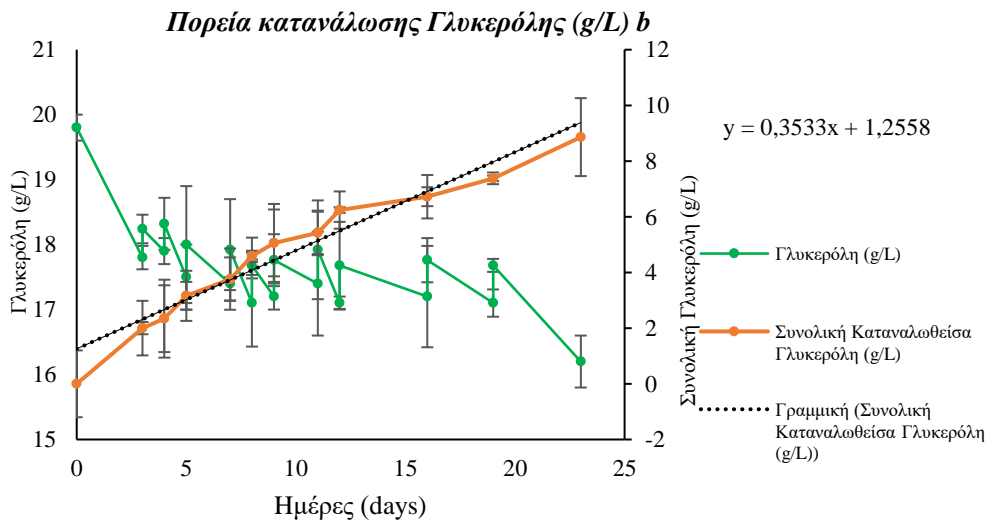
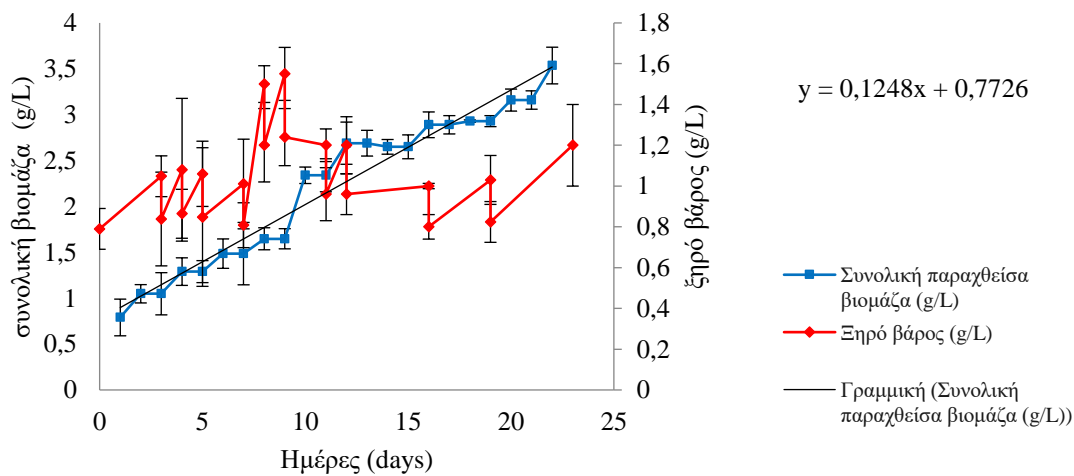
1.1 Ετερότροφες ημιδιαλείποντος έργου καλλιέργειες του μικροφύκου *C. vulgaris* (Semi-Continuous system):

Μετά από τις δοκιμές σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου τύπου Batch έγινε διερεύνηση σε ετερότροφη ανάπτυξη του *C. vulgaris* σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα καλλιέργειας με αρχική συγκέντρωση crude γλυκερόλης 20 g/L ως πηγή άνθρακα και σε δύο πηγές αζώτου (NaNO_3 και εκχύλισμα ζύμης) σε αντίστοιχους λόγους C/N=20 και C/N=1. Ο σκοπός του πειράματος ήταν η διερεύνηση της δυναμικότητας του στελέχους όταν καταναλώνεται μία ποσότητα άνθρακα στο υπόστρωμα να ανατροφοδοτείται ώστε να είναι στην ίδια αρχική συγκέντρωση. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα της κινητικής αύξησης του μικροφύκου παρουσία εκχυλίσματος ζύμης ως πηγή αζώτου η παραγωγικότητα ως προς τη βιομάζα του μικροοργανισμού σημειώθηκε μεγαλύτερη με μέγιστο ρυθμό αύξησης σε αναλογία C/N=1 στο πέρας των 23 ημερών ανάπτυξης με καθημερινή προσθήκη 20 mL φρέσκου θρεπτικού υλικού με συγκέντρωση γλυκερόλης τα 20 g/L και αφαίρεση αντίστοιχα 20 ml από την καλλιέργεια για 12 ημέρες και στη συνέχεια η καλλιέργεια αφέθηκε να φτάσει στην στάσιμη φάση. Κατά την ανάπτυξη σε πηγή αζώτου με βάση τα διαγράμματα σε συνάρτηση με το χρόνο, από την εξίσωση της ευθείας $y=ax+b$ προκύπτει ότι κατά την ανάπτυξη του *C. vulgaris* σε περιβάλλον με 20 g/L αρχικής συγκέντρωσης ακατέργαστης γλυκερόλης, το μικροφύκος κατανάλωσε συνολικά 8.8 g ακατέργαστης γλυκερόλης και παρήγαγε 3.53 g ξηρής βιομάζας. Η συνολική απόδοση σημειώθηκε ($Y_{x/s} = 0.36 \text{ g/g}$) ενώ η παραγωγικότητα του στελέχους άγγιξε $P_x=0.124 \text{ g/Ld}^{-1}$. Ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος ήταν $K_s=0.35\text{g/d}^{-1}$. Αναφορικά με το NaNO_3 στο υπόστρωμα σε αναλογία C/N=1 η συνολική απόδοση παρατηρήθηκε μειωμένη $Y_{x/s}= 0.28 \text{ g/g}$ όπως και η παραγωγικότητα του στελέχους που σημειώθηκε $P_x=0.064 \text{ g/Ld}^{-1}$. Ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος ήταν $K_s=0.26\text{g/d}^{-1}$.

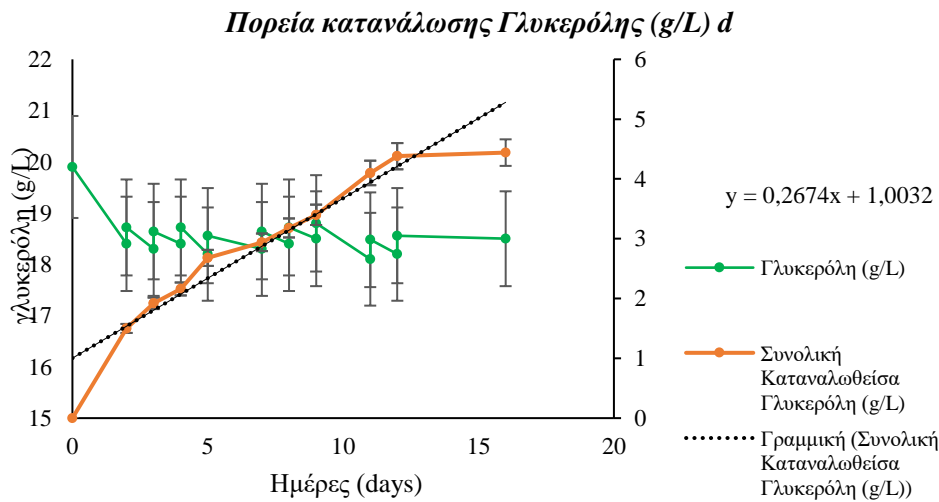
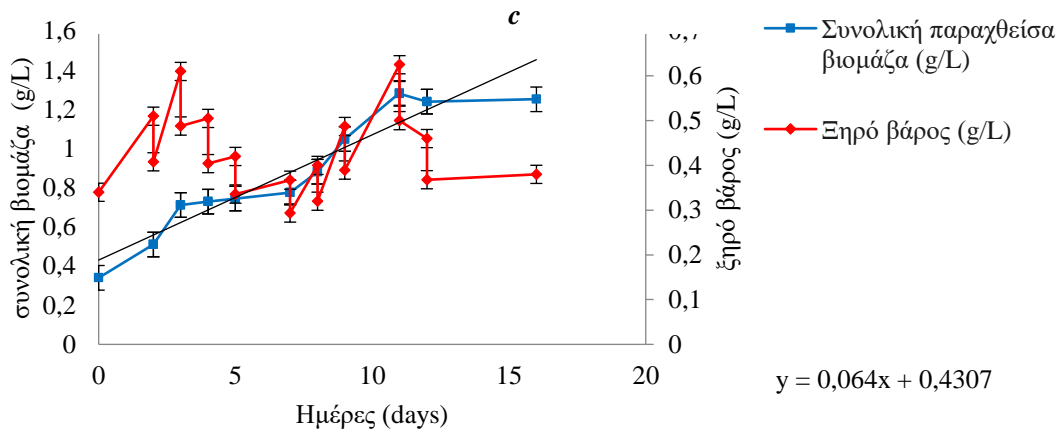
Καλύτερα αποτελέσματα έδωσε το μικροφύκος όταν η ανάπτυξη του έγινε σε αναλογία C/N=20/1 και για τις δύο πηγές αζώτου σε σχέση με την ανάπτυξη σε C/N=1. Συγκεκριμένα το μικροφύκος σημείωσε καλύτερη συνολική απόδοση κατά την ανάπτυξη σε εκχύλισμα ζύμης σε C/N=20 ($Y_{x/s} = 0.65 \text{ g/g}$) ενώ η παραγωγικότητα του στελέχους άγγιξε $P_x=0.138 \text{ g/Ld}^{-1}$. Ο ρυθμός

κατανάλωσης του υποστρώματος ήταν $K_s=0.21\text{g/d}^{-1}$ και σημείωσε χαμηλότερες τιμές από την αναλογία C/N=1. Αντίστοιχα όταν η πηγή αζώτου στο υπόστρωμα ήταν το NaNO_3 η συνολική απόδοση ήταν χαμηλότερη ($Y_{x/s}=0.51 \text{ g/g}$) σε σχέση με το εκχύλισμα ζύμης ενώ η παραγωγικότητα του συστήματος άγγιξε τα $P_x=0.12 \text{ g/Ld}^{-1}$, αντίστοιχα το $K_s=0.23\text{g/d}^{-1}$ ήταν εξίσου μειωμένο σε σχέση με το λόγο C/N=1.

**Ημιδιαλείποντος έργου Σύστημα *C. vulgaris* 20 g/L Γλυκερόλη, C/N=1/1
yeast extract**
a

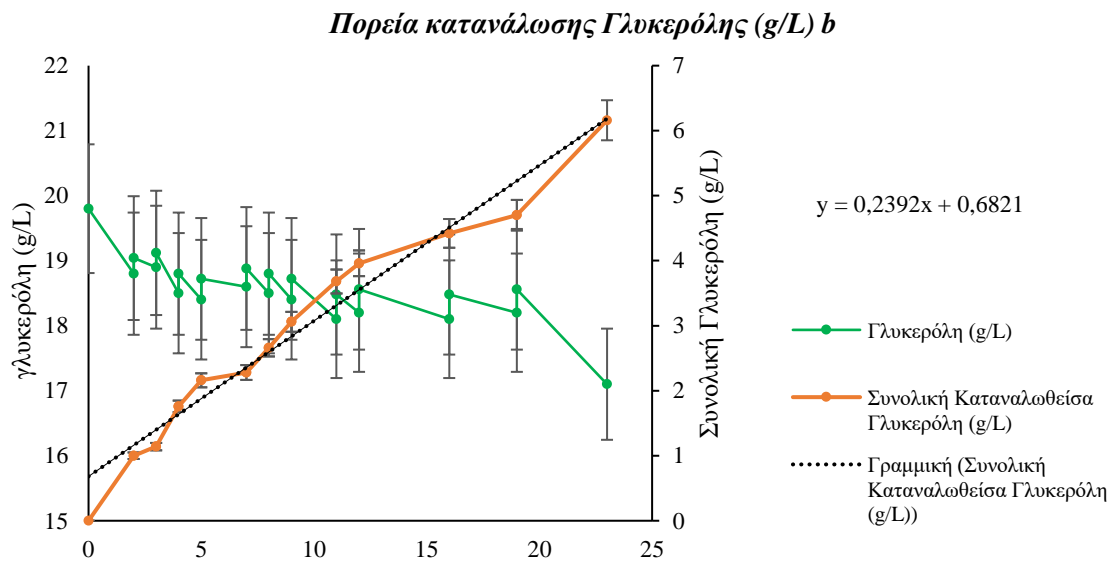
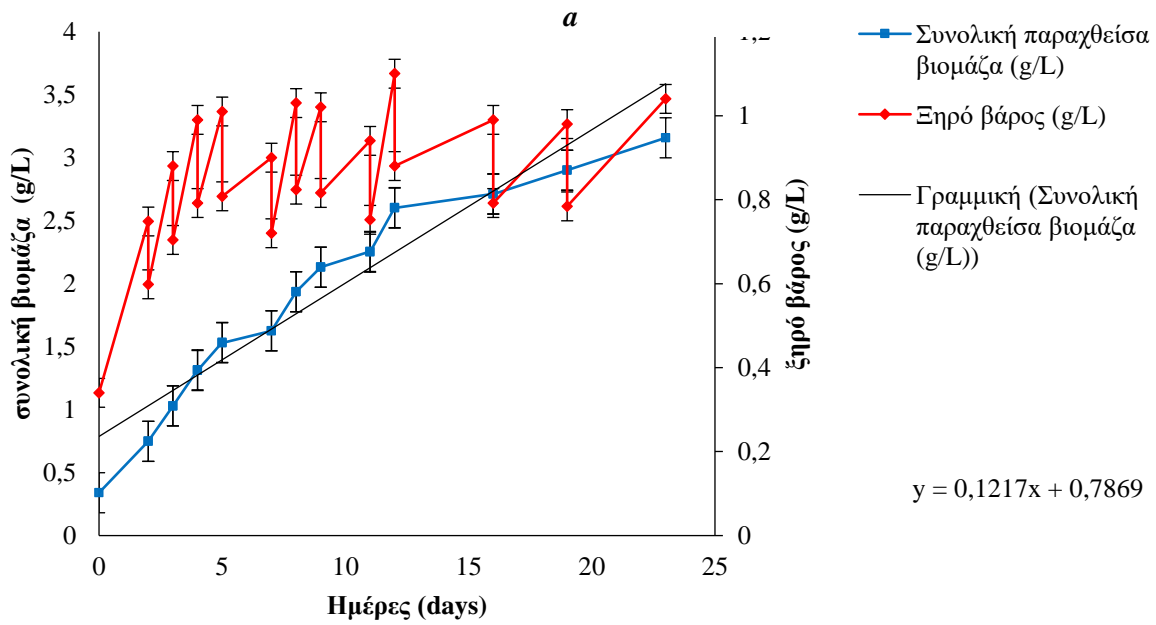


**Ημιδιαλείποντος έργου Σύστημα *C. vulgaris* 20 g/L Γλυκερόλη, C/N=1/1
NaNO₃**

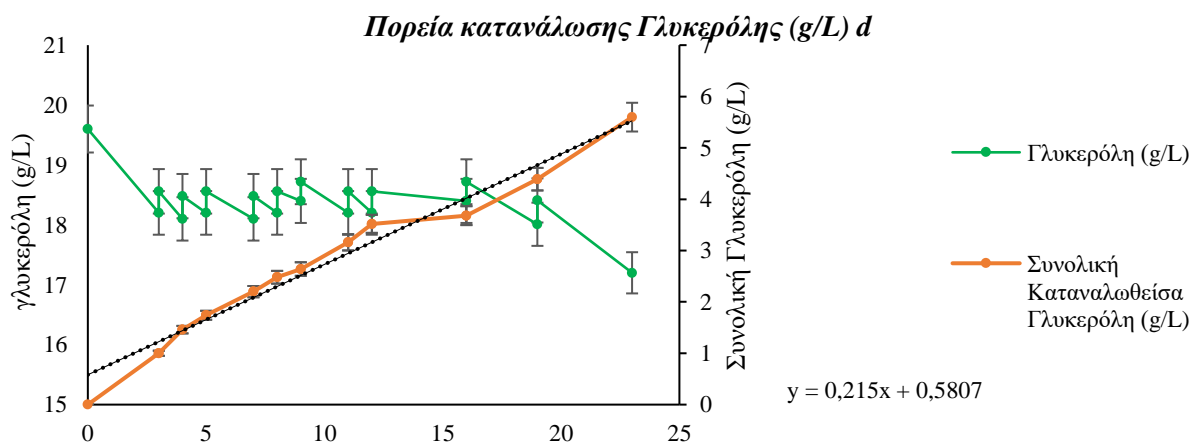
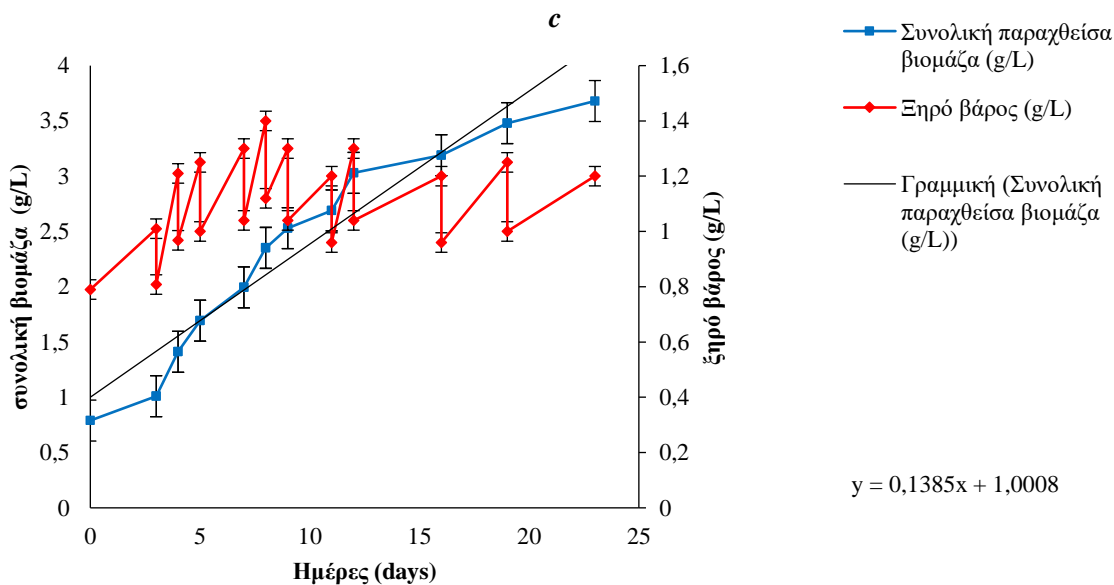


Γράφημα 16.1: Καλλιέργειες ημιδιαλείποντος του μικροφύκου *C. vulgaris* σε σύστημα ετερότροφης καλλιέργειας με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη (20 g/L) με πηγή αζώτου εκχύλισμα ζύμης (a) και NaNO₃ (b) και η αντίστοιχη πορεία κατανάλωσης τους στο υπόστρωμα με πηγή αζώτου εκχύλισμα ζύμης (c) και NaNO₃ (d) (D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας g/L).

**Ημιδιαλείποντος έργου Σύστημα *C. vulgaris* 20 g/L Γλυκερόλη, C/N=20/1
NaNO₃**



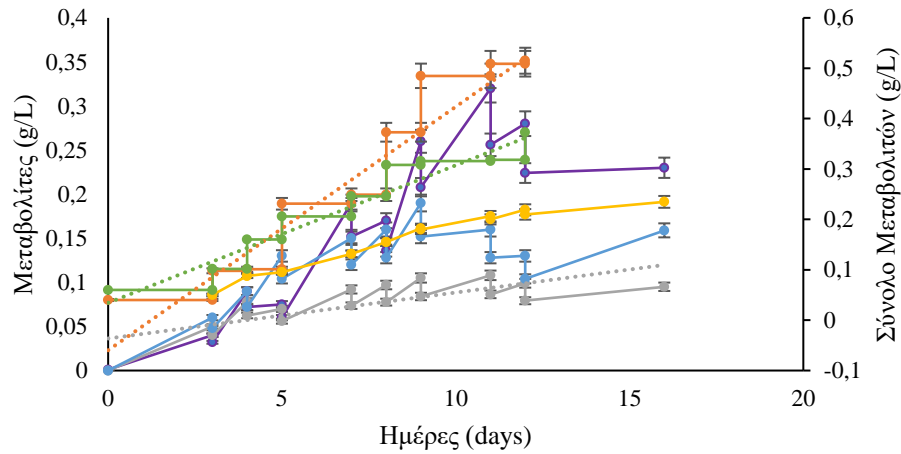
**Ημιδιαλείποντος έργου Σύστημα *C. vulgaris* 20 g/L Γλυκερόλη, C/N=20/1
yeast extract**



Γράφημα 16.2: Καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου του μικροφύκου *C. vulgaris* σε σύστημα ετερότροφης καλλιέργειας με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη (20 g/L) με πηγή αζώτου NaNO_3 (a) και εκχύλισμα ζύμης (b) σε αναλογία C/N=20/1 και η αντίστοιχη πορεία κατανάλωσης τους στο υπόστρωμα με πηγή αζώτου NaNO_3 (c) και εκχύλισμα ζύμης (d) (D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας g/L).

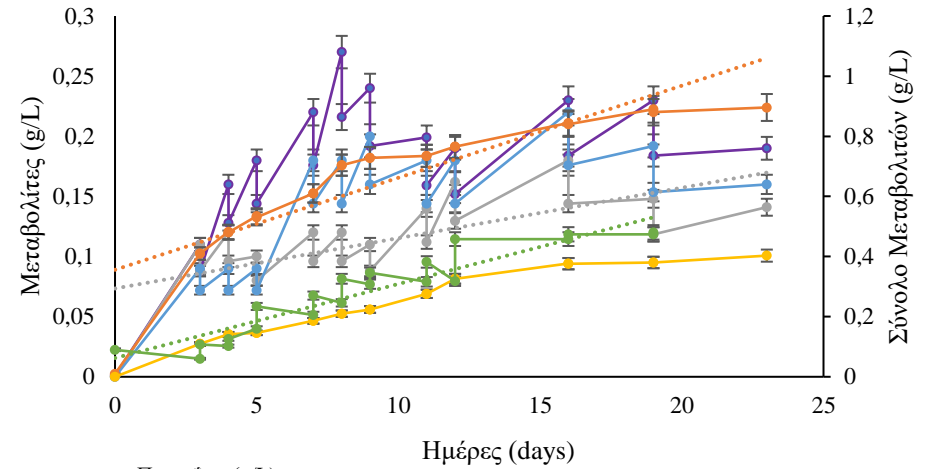
Στο **Γράφημα 16.3** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παραγωγικότητας των μεταβολιτών στο πέρας των ημερών που διήρκησε η καλλιέργεια και η πορεία παραγωγής τους συγκριτικά με τις διαφορετικές αναλογίες C/N=1 και C/N=20 στις διαφορετικές πηγές αζώτου, δηλαδή εκχύλισμα ζύμης και NaNO₃. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις παραπάνω δοκιμές έδωσαν σημαντικά δεδομένα για την καλλιέργεια του στελέχους *C. vulgaris*. Ειδικότερα η μέγιστη παραγωγικότητα πρωτεϊνών σημειώθηκε σε συνθήκες C/N=20 με εκχύλισμα ζύμης ($P_{pr}=0.091 \text{ g/Ld}^{-1}$), η μέγιστη παραγωγικότητα υδατανθράκων $P_c=0.0052 \text{ g/Ld}^{-1}$ σε C/N=1 με NaNO₃, γενικότερα όμως σε όλες τις δοκιμές κυμάνθηκαν σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα. Τέλος, η παραγωγικότητα λιπιδίων σημείωσε υψηλές τιμές επίσης σε λόγο C/N=1 στο υπόστρωμα ($P_L=0.048 \text{ g/Ld}^{-1}$). (**Πίνακας 16**) Η παραγωγικότητα των χρωστικών κυμάνθηκε σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα. Πιο αυξημένες τιμές σημειώθηκαν κατά την έναρξη της καλλιέργειας ενώ μετά το πέρας των ημερών οι συγκεντρώσεις των χρωστικών μειώθηκαν οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι συνυπολογίστηκαν οι χρωστικές που προϋπήρχαν στο προεμβόλιο και διακυμάνθηκαν σε ποσοστά 0.05%-0.2%. Συγκριτικά με τις διαλείποντος έργου καλλιέργειες μικροφυκών οι ημιδιαλείποντος έργου καλλιέργειες παρουσίασαν υψηλότερη απόδοση βιομάζας Y_{x/s}. Συγκεκριμένα στα διαλείποντος έργου συστήματα η απόδοση σε ίδιες συνθήκες 20 g/L γλυκερόλη άγγιξε το 0.03 g/g ενώ σε 5 g/L αρχικής συγκέντρωσης η απόδοση έφτασε σε λόγο C/N=1 NaNO₃ 0.25 g/g και συνολική παραχθείσα βιομάζα 1.21 g/L και σε εκχύλισμα ζύμης 0.25 g/g και 1.45 g/L βιομάζα αντίστοιχα. Αναφορικά με τα ημιδιαλείποντος έργου συστήματα, έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα από τις καλλιέργειες διαλείποντος έργου σε ανάλογα C/N=20 και σημαντικά υψηλότερη απόδοση Y_{x/s}=0.65 g/g

Ημιδιαλείπωντος έργου Καλλιέργεια, NaNO₃, C/N=1 (a)



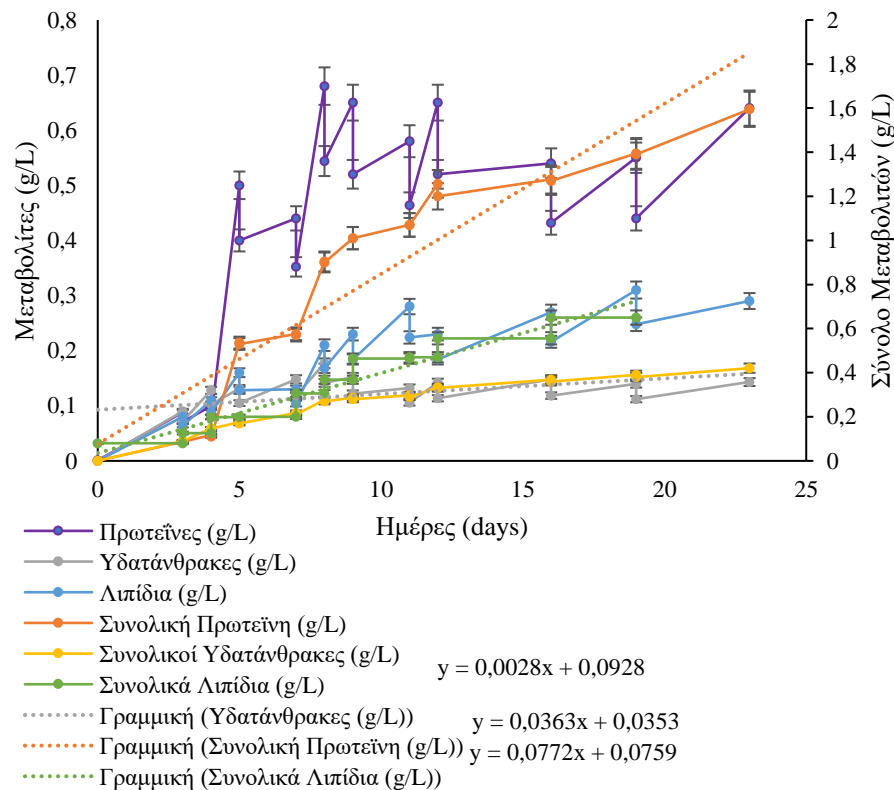
- Πρωτεΐνες (g/L)
- Υδατάνθρακες (g/L)
- Λιπίδια (g/L)
- Συνολική Πρωτεΐνη (g/L) $y = 0,0273x + 0,0343$
- Συνολικοί Υδατάνθρακες (g/L) $y = 0,0052x + 0,0364$
- Συνολικά Λιπίδια (g/L) $y = 0,0483x - 0,0598$
- Γραμμική (Υδατάνθρακες (g/L))
- Γραμμική (Συνολική Πρωτεΐνη (g/L))
- Γραμμική (Συνολικά Λιπίδια (g/L))

Ημιδιαλείπωντος έργου Καλλιέργεια, Yeast extract, C/N=1 (b)

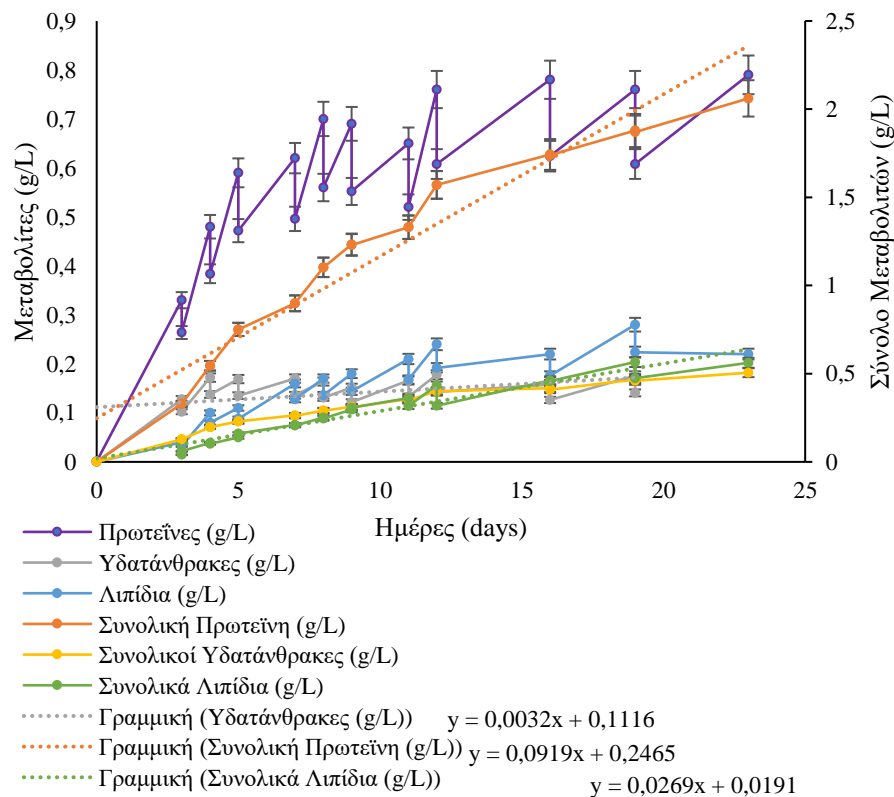


- Πρωτεΐνες (g/L)
- Υδατάνθρακες (g/L)
- Λιπίδια (g/L)
- Συνολική Πρωτεΐνη (g/L)
- Συνολικοί Υδατάνθρακες (g/L)
- Συνολικά Λιπίδια (g/L) $y = 0,0042x + 0,0734$
- Γραμμική (Υδατάνθρακες (g/L))
- Γραμμική (Συνολική Πρωτεΐνη (g/L)) $y = 0,0306x + 0,3559$
- Γραμμική (Συνολικά Λιπίδια (g/L)) $y = 0,0246x + 0,0624$

Ημιδιαλείπωντος έργου ς Καλλιέργεια, NaNO₃, C/N=20 (c)



Ημιδιαλείπωντος έργου Καλλιέργεια, yeast extract, C/N=20 (d)



Γράφημα 16.3: Παραγωγικότητα των μεταβολιτών σε ημιδιαλείπωντος έργου σύστημα του μικροφύκου *C. vulgaris* σε σύστημα ετερότροφης καλλιέργειας με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη (20 g/L) με πηγή αζώτου NaNO₃ (a) και εκχύλισμα ζύμης (b) σε αναλογία C/N=1/1, NaNO₃ (c) και εκχύλισμα ζύμης (d) σε αναλογία C/N=20 και η αντίστοιχη πορεία παραγωγής τους στο πέρας των ημερών.

Πίνακας 16: Η παραγωγικότητα των μεταβολιτών (g/Ld^{-1}) και το ποσοστό των συνολικών μεταβολιτών ως προς την συνολική παραγωγή βιομάζας σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα (Semi-Continuous) του μικροφύκου *C. vulgaris* σε ετερότροφο με 20 g/L συγκέντρωση γλυκερόλης, σε δύο αναλογίες C/N=1 και C/N=20 με 2 πηγές αζώτου NaNO_3 και εκχύλισμα ζύμης (yeast extract). Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών πηγών αζώτου ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (NaNO_3 και yeast extract). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

	C/N=1				C/N=20			
	NANO3		Yeast extract		NANO3		Yeast extract	
	Pr (g/Ld^{-1})	Συνολική Βιομάζα %	Pr (g/Ld^{-1})	Συνολική Βιομάζα %	Pr (g/Ld^{-1})	Συνολική Βιομάζα %	Pr (g/Ld^{-1})	Συνολική Βιομάζα %
Πρωτεΐνες	0.027 ^A	41% ^A	0.03 ^A	55% ^B	0.077 ^B	50% ^C	0.091 ^C	60% ^D
Λιπίδια	0.048 ^A	30% ^A	0.0024 ^B	12% ^B	0.036 ^A	13% ^C	0.0032 ^B	14% ^D
Υδατάνθρακες	0.0052 ^A	20% ^A	0.0042 ^A	12% ^B	0.0028 ^B	22% ^A	0.026 ^C	15% ^C

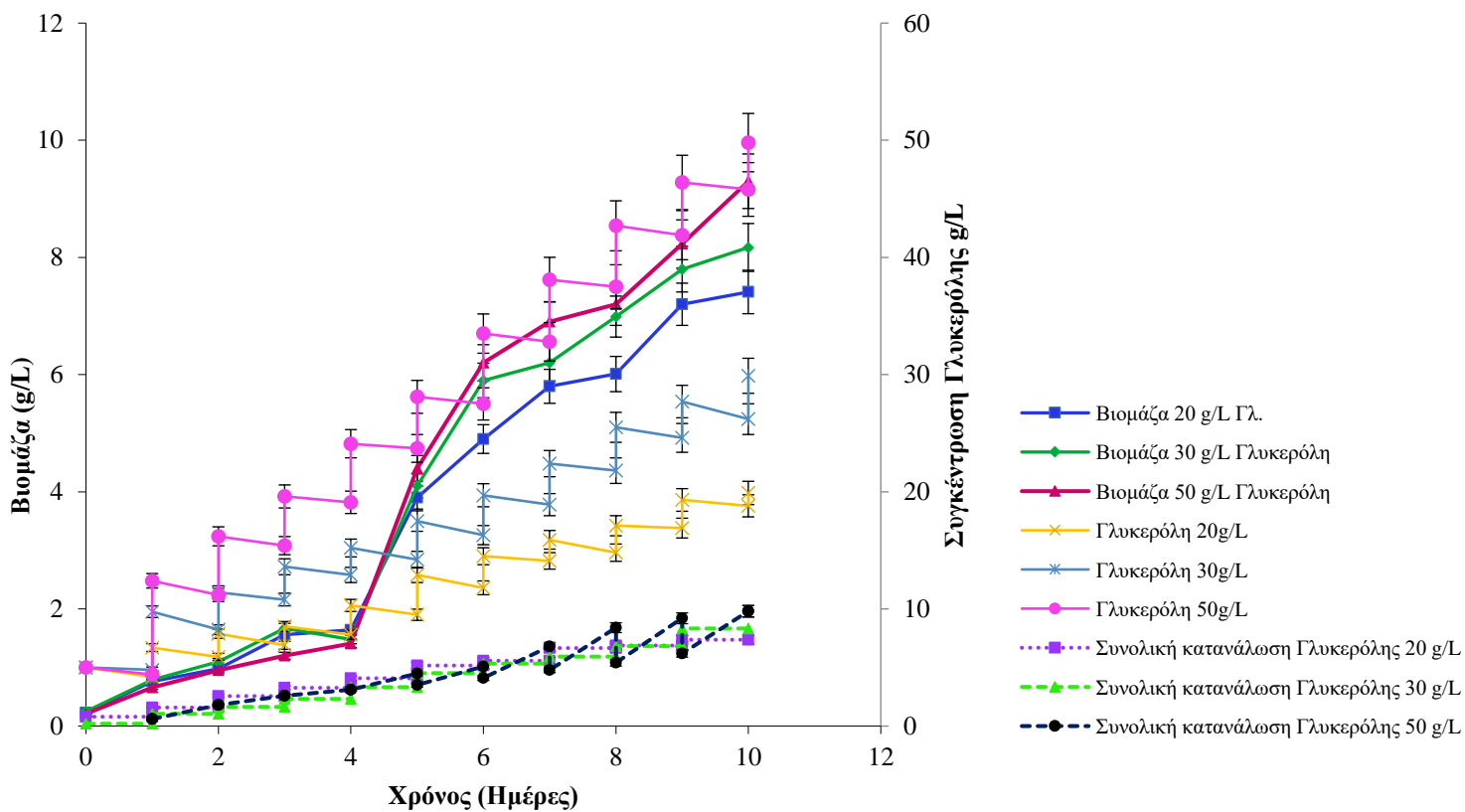
2.2 Ετερότροφη ανάπτυξη του *A. protothecoides* σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα καλλιέργειας (Fed Batch)

Μετά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των διαλείποντος καλλιεργειών του *A. protothecoides* πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες ετερότροφες σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα (Fed Batch) σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 5 g/L και καθημερινή προσθήκη συμπυκνωμένου θρεπτικού (η συμπύκνωση ήταν σε βαθμό που να υπερνικά την καθημερινή κατανάλωση της γλυκερόλης από το υπόστρωμα) με σκοπό η συγκέντρωση της γλυκερόλης να φτάσει το θρεπτικό μέσο το επίπεδο των 20, 30 και 50 g/L αντίστοιχα και να προσαρμοστεί σταδιακά ο μικροοργανισμός στις αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκερόλης στο υπόστρωμα. Στο **Γράφημα 17** φαίνεται ότι σε υπόστρωμα με τελική συγκέντρωση γλυκερόλης στα 20 g/L, η παραγωγή βιομάζας άγγιξε τα 7.41 g/L, αντιστοίχως στα 30 g/L αυξήθηκε στα 8.17 g/L και τέλος στα 50 g/L αυξήθηκε περαιτέρω στα 9.3 g/L.

Μετά από την ανάλυση της βιοχημικής σύστασης της βιομάζας όπως φαίνεται στον **Πίνακα 14**, η συγκέντρωση των πρωτεϊνών ήταν και στις 3 δοκιμές παρόμοια και διακυμάνθηκε στο 66-67%. Παρόμοιο μοτίβο παρατηρήθηκε και για τα παραγόμενα λιπίδια όπου η παραγωγή τους σημειώθηκε αυξημένη σε σύγκριση με τις προηγούμενες καλλιέργειες διαλείποντος έργου που διενεργήθηκαν αγγίζοντας το ποσοστό των 10-12% της παραχθείσας βιομάζας. Όσον αφορά τους υδατάνθρακες η μέγιστη παραγωγή τους σημειώθηκε στα 50 g/L γλυκερόλης με 4.48% απόδοση.

Ως προς τις χρωστικές, η μεγαλύτερη περιεκτικότητα της βιομάζας σε χλωροφύλλη a (0,14%), χλωροφύλλη b (0,23%), ολική χλωροφύλλη (0,37%) και ολικά καροτενοειδή (0,88%) παρατηρήθηκε στα 50 g/L γλυκερόλης (**Πίνακας 14**). Γενικά, η περιεκτικότητα της βιομάζας σε χρωστικές κατά την ετερότροφη ανάπτυξη είναι πολύ μικρή, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και στις συγκεκριμένες καλλιέργειες. Αντίστοιχα με τα αποτελέσματα των διαλείποντος έργου καλλιεργειών η απόδοση $Y_{x/s}$ παρατηρήθηκε αρκετά αυξημένη ενώ και η παραγωγή μεταβολιτών σημείωσε υψηλότερες τιμές οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η σταδιακή προσαρμογή των μικροφυκών σε υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης αυξάνει την αποδοτικότητα και την παραγωγή μεταβολιτών στόχων.

Ημιδιαλείποντος έργου σύστημα *Auxenochlorella protothecoides*



Γράφημα 17. Ετερότροφη αύξηση του μικροφύκου *A. protothecoides* σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα (fed-batch) με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη από 5 g/L σε 20 g/L, 30 g/L και 50 g/L

Πίνακας 14. Συγκεντρώσεις πρωτεϊνών (g/L), λιπιδίων (g/L), υδατανθράκων (g/L) της βιομάζας του μικροφύκου *A. protothecoides* υπό συνθήκες ετερότροφης ανάπτυξης σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα (fed-batch) ε με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη (crude) τελικής συγκέντρωσης 20, 30 και 50 g/L, πεπτόνη και C/N 20/1. Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε μεταβολίτες ως ποσοστό %. Η τυπική απόκλιση δίνεται από το SD (\pm) από τον αριθμό των επαναλήψεων n=3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή. Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε μεταβολίτες ως ποσοστό %.

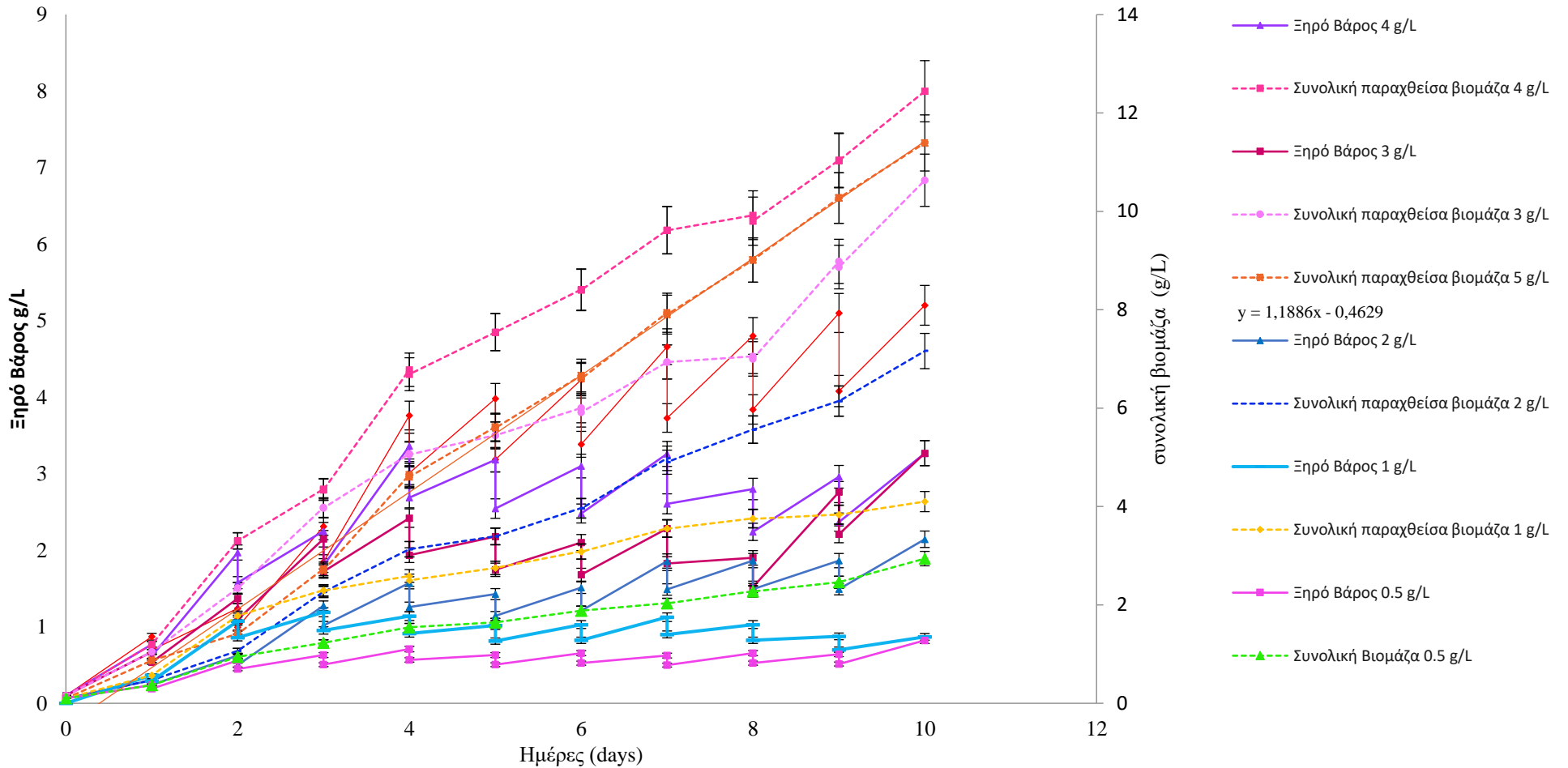
<i>A. protothecoides</i> ημιδιαλείποντος έργου Σύστημα (20, 30 και 50 g/L Γλυκερόλη), C/N= 20 πεπτόνη									
	Βιομάζα (g/L)	Yx/s (g/g)	Πρωτεΐνες (g/L)	%	Λιπίδια (g/L)	%	Υδατάνθρακες (g/L)	%	Ολική γλυκερόλη (g/L)
20 g/L	7.41 \pm 0.74	0.99	4.965 \pm 0.067	66	0.92 \pm 0.029	12	0.14 \pm 0.041	2	7.37
30 g/L	8.17 \pm 0.99	0.98	5.21 \pm 0.088	63	0.94 \pm 0.022	11	0.19 \pm 0.028	2.3	8.33
50 g/L	9.3 \pm 0.83	0.94	5.42 \pm 0.032	58	0.95 \pm 0.24	10	0.41 \pm 0.034	4.5	9.8

2.2 Ετερότροφη ανάπτυξη του *A. protothecoides* σε σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (Semi continuous) με διαφορετικές συγκεντρώσεις C/N.

Τα αποτελέσματα των καλλιεργειών διαλείποντος έργου κατά την ετερότροφη ανάπτυξη με χρήση διαφορετικών πηγών αζώτου έδειξαν ότι το στέλεχος δείχνει προτίμηση σε οργανικές πηγές αζώτου για την ανάπτυξη του και κυρίως στην πεπτόνη. Όταν ο λόγος ήταν C/N=1 παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού, ενώ η μέγιστη ανάπτυξη σημειώθηκε όταν ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε C/N=20. Ως εκ τούτου διενεργήθηκαν δοκιμές με χρήση πεπτόνης ως πηγή αζώτου σε 30 g/L γλυκερόλης στο υπόστρωμα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αζώτου (5, 4, 3, 2, 1, και 0.5 g/L). Κατά τη διάρκεια 10 ημερών επώασης κάθε μέρα αφαιρούνταν 20 mL θρεπτικό και προστέθηκε αντίστοιχα 20 mL φρέσκο θρεπτικό υπόστρωμα αντίστοιχης σύστασης. (**Γράφημα 18.1**). Η καλύτερη απόδοση σημειώθηκε στην συγκέντρωση με 5g/L συγκέντρωση πεπτόνης αντίστοιχα, όπου η συνολική παραχθείσα βιομάζα άγγιξε τα 11.39 g/L με παραγωγικότητα 1.188 g/Ld⁻¹. Σχετικά με τις ετερότροφες καλλιέργειες που διενεργήθηκαν η απόδοση και η παραγωγικότητα σε όλες τις δοκιμές παρουσιάστηκε σημαντικά αυξημένη. Η υψηλότερη απόδοση σημειώθηκε κατά την ανάπτυξη σε 2 g/L πεπτόνη ως πηγή αζώτου στο υπόστρωμα με Y_{x/s}=1 g/g και ακολούθησε η απόδοση σε 3 g/L πεπτόνη με Y_{x/s}=0.97 g/g. Η κατανάλωση της γλυκερόλης παρουσιάζεται στο (**Γράφημα 18.2**).

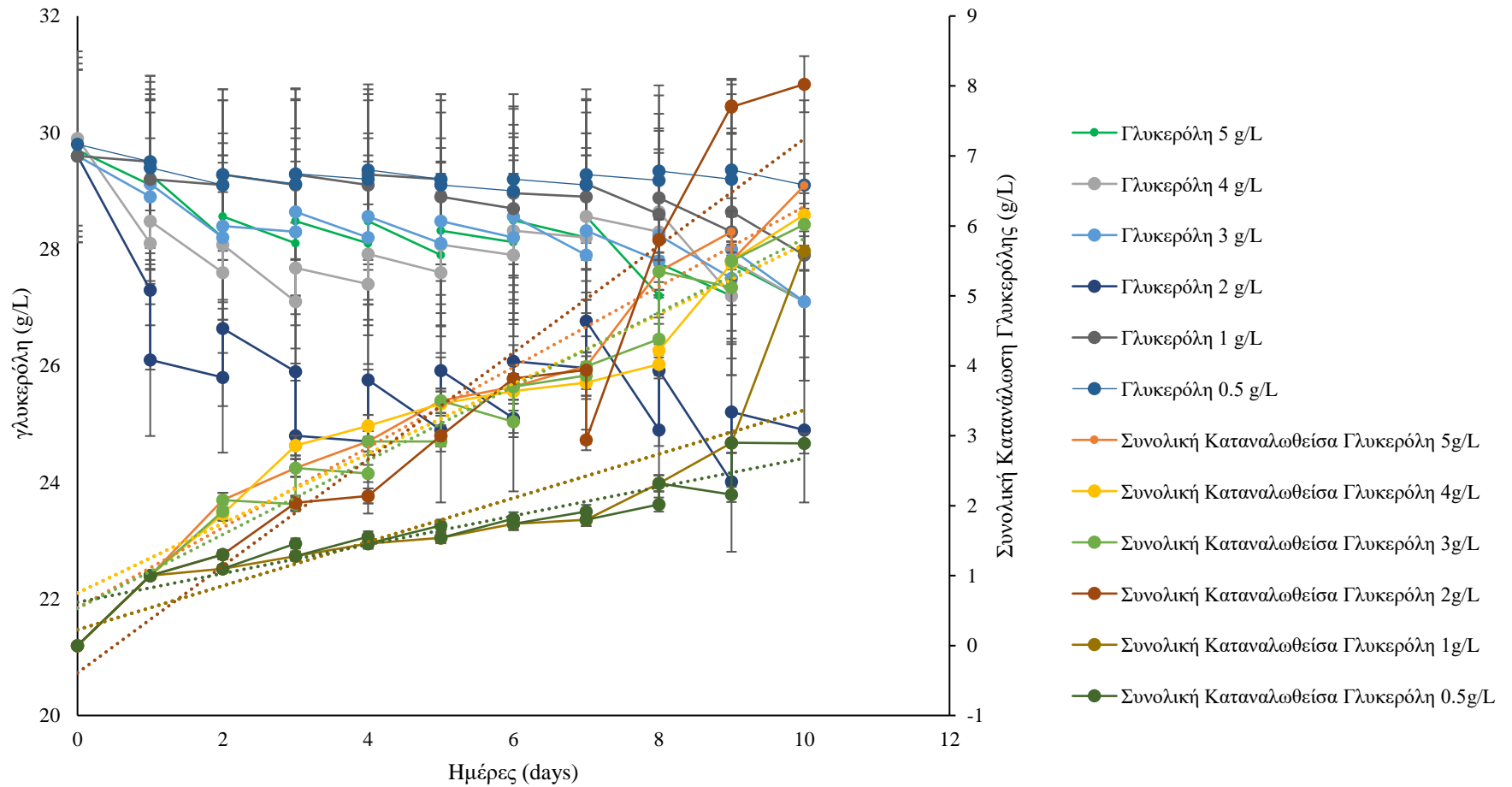
Η παραγωγή μεταβολιτών δεν έδωσε υψηλή παραγωγικότητα. Η υψηλότερη παραγωγικότητα σημειώθηκε για τις πρωτεΐνες σε 5 g/L πεπτόνη (P_{pr}=0.54 g/Ld⁻¹) και με τη μείωση της πηγής αζώτου στο υπόστρωμα η παραγωγικότητα συνέχισε να μειώνεται εκθετικά. Η παραγωγή λιπιδίων διακυμάνθηκε σε ικανοποιητικά επίπεδα με υψηλότερη την παραγωγή σε 5 g/L πεπτόνη (P_L=0.309 g/Ld⁻¹). Τέλος η παραγωγικότητα των υδατανθράκων παρατηρήθηκε αυξημένη σε ανάπτυξη με 4 g/L πεπτόνης, όπου P_c=0.014 g/Ld⁻¹

Ημιδιαλείποντος έργου Σύστημα *A. protothecoides*, 30 g/L Γλυκερόλη,
5g/L πεπτόνη
α



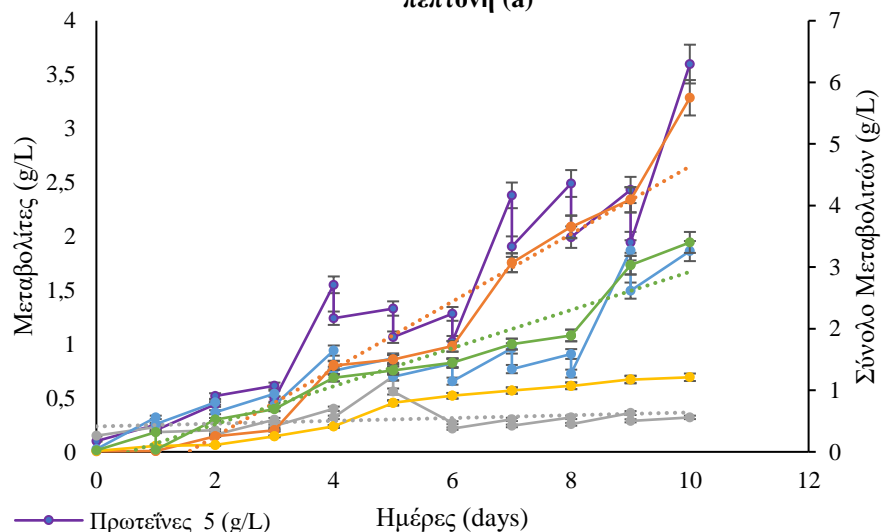
Γράφημα 18.1 Ετερότροφη αύξηση του μικροφύκου *A. protothecoides* σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (semi-continuous) με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη 30 g/L σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πεπτόνης 5, 4, 3, 2, 1 και 0.5 g/L στο πέρας 10 ημερών.

Πορεία κατανάλωσης Γλυκερόλης (g/L)



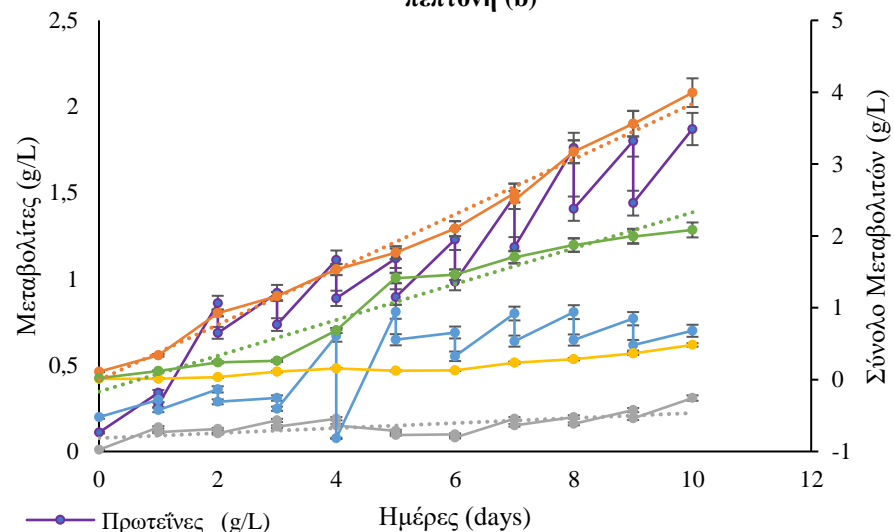
Γράφημα 18.2 Πορεία συγκέντρωσης και κατανάλωσης γλυκερόλης σε ετερότροφη αύξηση του μικροφύκου *A. protothecoides* σε καλλιέργειες ημιαλειπόντος έργου (semi-continuous) με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη 30 g/L σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πεπτόνης 5, 4, 3, 2, 1 και 0.5 g/L στο πέρας 10 ημερών.

Ημιδιαλείποντος έργου Καλλιέργεια, 30 g/L Γλυκερόλη, 5 g πεπτόνη (a)



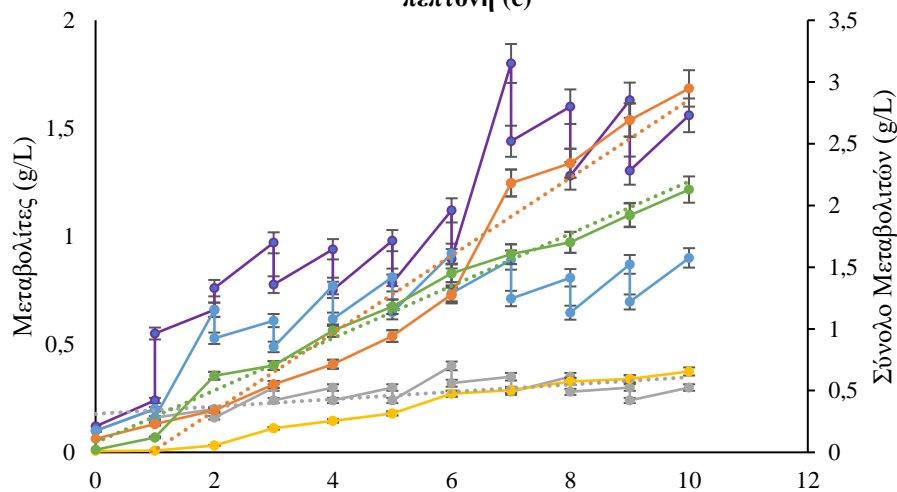
- Πρωτεΐνες 5 (g/L)
- Υδατάνθρακες 5 (g/L)
- Λιπίδια 5 (g/L)
- Συνολική Πρωτεΐνη 5 (g/L)
- Συνολικοί Υδατάνθρακες 5 (g/L)
- Συνολικά Λιπίδια 5 (g/L) $y = 0,3095x - 0,1724$
- Γραμμική (Υδατάνθρακες 5 (g/L)) $y = 0,013x + 0,236$
- Γραμμική (Συνολική Πρωτεΐνη 5 (g/L))
- Γραμμική (Συνολικά Λιπίδια 5 (g/L)) $y = 0,5483x - 0,8483$

Ημιδιαλείποντος έργου Καλλιέργεια, 30 g/L Γλυκερόλη, 4 g πεπτόνη (b)



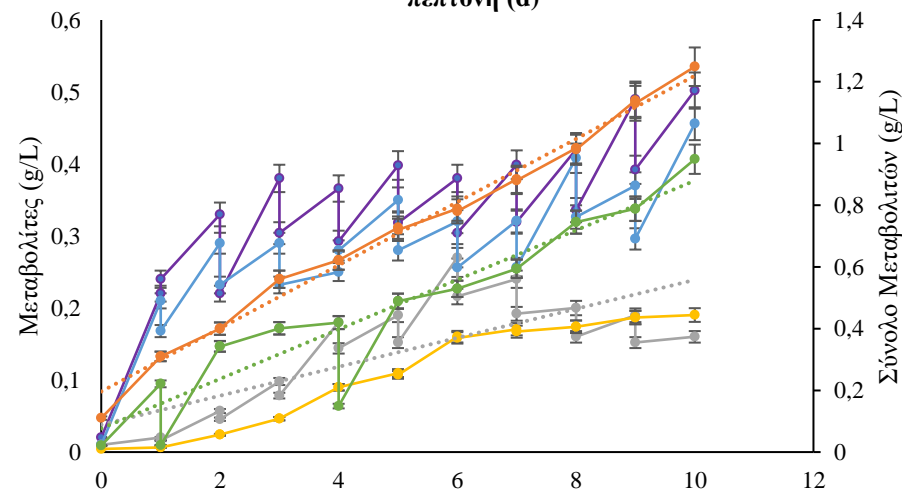
- Πρωτεΐνες (g/L)
- Υδατάνθρακες (g/L)
- Λιπίδια (g/L)
- Συνολική Πρωτεΐνη (g/L)
- Συνολικοί Υδατάνθρακες (g/L) $y = 0,2496x - 0,1677$
- Συνολικά Λιπίδια (g/L)
- Γραμμική (Υδατάνθρακες (g/L)) $y = 0,0145x + 0,0774$
- Γραμμική (Συνολική Πρωτεΐνη (g/L))
- Γραμμική (Συνολικά Λιπίδια (g/L)) $y = 0,3844x - 0,006$

Ημιδιαλείποντος έργου Καλλιέργεια, 30 g/L Γλυκερόλη, 3 g πεπτόνη (c)

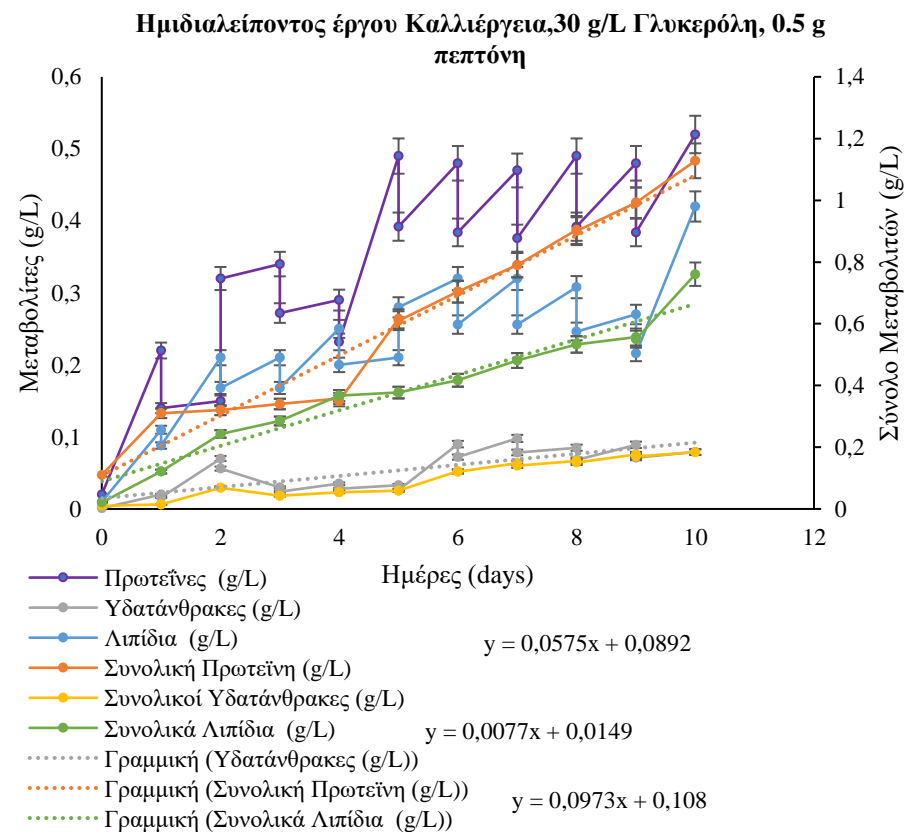
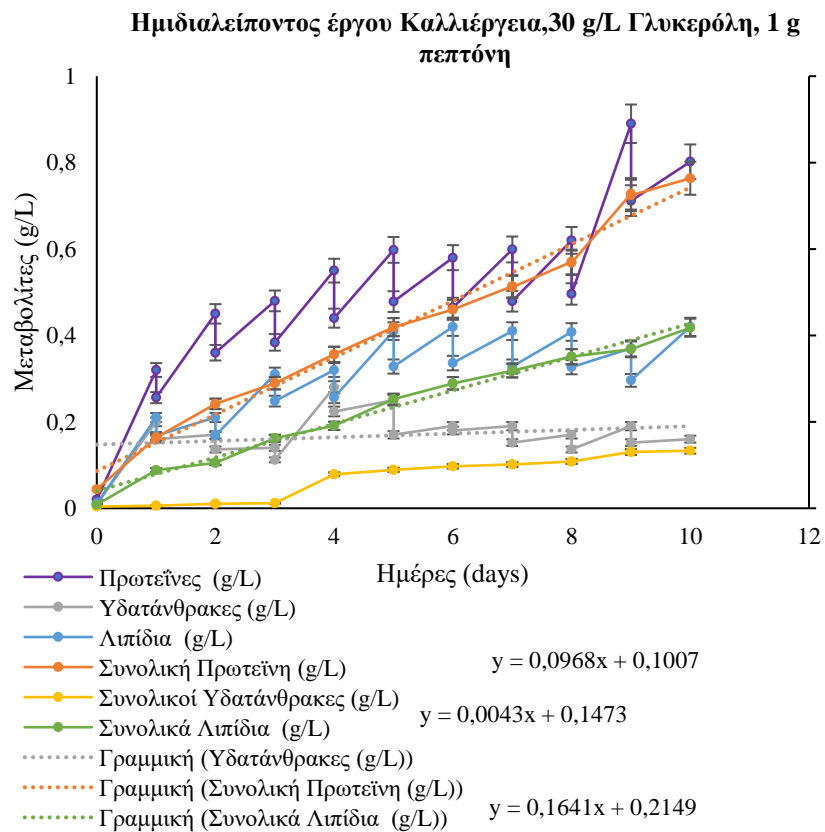


- Πρωτεΐνες (g/L)
 - Υδατάνθρακες (g/L)
 - Λιπίδια (g/L)
 - Συνολική Πρωτεΐνη (g/L)
 - Συνολικοί Υδατάνθρακες (g/L)
 - Συνολικά Λιπίδια (g/L)
 - Γραμμική (Υδατάνθρακες (g/L))
 - Γραμμική (Συνολική Πρωτεΐνη (g/L))
 - Γραμμική (Συνολικά Λιπίδια (g/L))
- $y = 0,2116x + 0,0784$
- $y = 0,017x + 0,178$
- $y = 0,315x - 0,2954$

Ημιδιαλείποντος έργου Καλλιέργεια, 30 g/L Γλυκερόλη, 2 g πεπτόνη (d)



- Πρωτεΐνες 2 (g/L)
 - Υδατάνθρακες 2 (g/L)
 - Λιπίδια 2 (g/L)
 - Συνολική Πρωτεΐνη 2 (g/L)
 - Συνολικοί Υδατάνθρακες 2 (g/L)
 - Συνολικά Λιπίδια 2 (g/L)
 - Γραμμική (Υδατάνθρακες 2 (g/L))
 - Γραμμική (Συνολική Πρωτεΐνη 2 (g/L))
 - Γραμμική (Συνολικά Λιπίδια 2 (g/L))
- $y = 0,0201x + 0,038$
- $y = 0,0803x + 0,0764$
- $y = 0,1023x + 0,1962$



Γράφημα 18.3: Παραγωγικότητα των μεταβολιτών σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου του μικροφύκου *A. protothecoides* σε σύστημα ετερότροφης καλλιέργειας με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη (30 g/L) με πηγή αζώτου πεπτόνη σε συγκεντρώσεις 5 (a), 4 (b), 3 (c), 2 (d), 1 (e) και 0.5 (f) g/L.

Πίνακας 15 Παραγωγικότητα των παραγόμενων μεταβολιτών (πρωτεϊνών (P_{pr}), λιπιδίων (P_L) και υδατανθράκων (P_c)) και της βιομάζας (P_x) καθώς και η απόδοση ($Y_{x/s}$) του μικροφύκου *A. protothecoides* υπό συνθήκες ετερότροφης ανάπτυξης σε σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου κατά την ετερότροφη ανάπτυξη με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη (crude) συγκέντρωσης 30 g/L, πεπτόνη και διαφορετικές συγκεντρώσεις αζώτου στο υπόστρωμα.

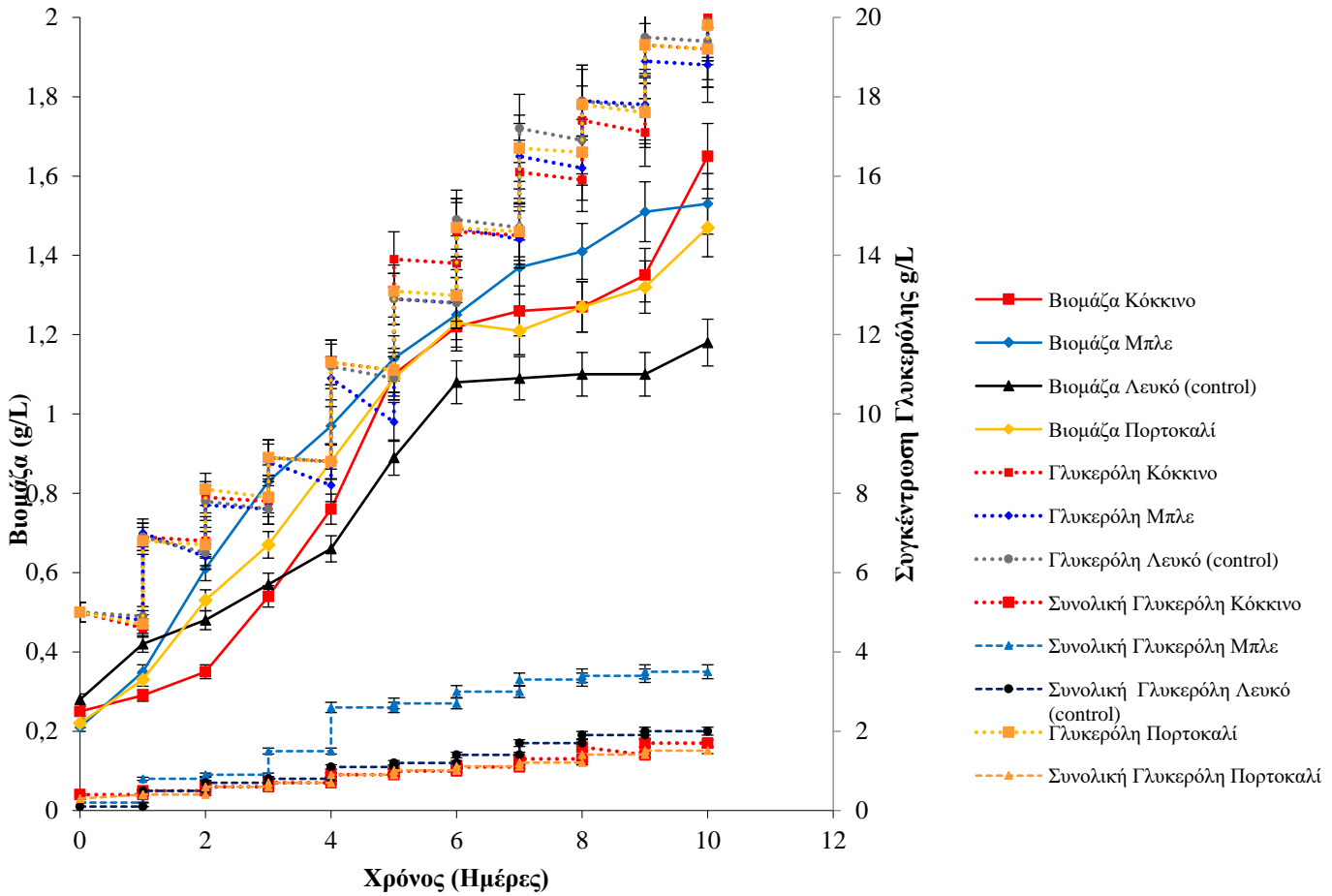
Συγκέντρωση Πεπτόνης	$Y_{x/s}$ (g/g)	P_x (g/Ld ⁻¹)	P_{pr} (g/Ld ⁻¹)	P_L (g/Ld ⁻¹)	P_c (g/Ld ⁻¹)
5	0.57	1.188	0.54	0.309	0.013
4	0.77	0.77	0.38	0.249	0.014
3	0.97	0.59	0.325	0.21	0.017
2	1	0.706	0.13	0.095	0.0043
1	0.74	0.37	0.1	0.065	0.0077
0.5	0.88	0.251	0.097	0.057	0.02

2.4 Μικτότροφη ανάπτυξη του *Auxenochlorella protothecoides* σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (fed-batch) με χρήση διαφορετικών μονοχρωματικών πηγών φωτός.

Κατά την ανάπτυξη του μικροφύκου *A. protothecoides* σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου γινόταν καθημερινά προσθήκη κατάλληλα συμπηκνωμένου θρεπτικού υποστρώματος με σκοπό να αυξηθεί σταδιακά η συγκέντρωση της γλυκερόλης από τα 5 g/L στα 20 g/L συνυπολογίζοντας την αντίστοιχη κατανάλωση της γλυκερόλης σε καθημερινή βάση για να υπάρχει σταθερή αύξηση της συγκέντρωσης. Χρησιμοποιήθηκε οργανική πηγή αζώτου (πεπτόνη) και οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν μικτότροφα σε τέσσερις διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός. Οι δοκιμές με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός συνεχίστηκαν και σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα καλλιέργειας fed-batch όπου από αρχική συγκέντρωση ακατέργαστης γλυκερόλης 5 g/L κατέληξε σε τελική συγκέντρωση τα 20 g/L στο πέρας των 10 ημερών και πηγή αζώτου στο υπόστρωμα την πεπτόνη σε αναλογία C/N=20. Η μέγιστη απόδοση σε βιομάζα σημειώθηκε κατά την ανάπτυξη σε κόκκινο φως (1.65 g/L). **(Γράφημα 19)**

Όσον αφορά την παραγωγή μεταβολιτών η μέγιστη παραγωγή πρωτεϊνών παράχθηκε κατά την ανάπτυξη σε κόκκινο φως (53%) αλλά και σε λευκό φως (53%), χωρίς να σημειώνεται σημαντική διαφορά με τα υπόλοιπα χρώματα. Η μέγιστη παραγωγικότητα σε λιπίδια σημειώθηκε σε κόκκινο και λευκό φως με 23% και 22% παραγωγή αντίστοιχα, χωρίς επίσης να σημειώνεται μεγάλη διαφορά και στα άλλα μήκη κύματος. Τέλος το ποσοστό των υδατανθράκων κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα με ελαφρά διαφοροποίηση στο πορτοκαλί φως με ποσοστό 13% **(Πίνακας 16)**. Συγκριτικά με το αντίστοιχο ετερότροφο σύστημα η συνολική ποσότητα βιομάζας και μεταβολιτών παρατηρείται μειωμένη με διαφορά την αύξηση του ποσοστού της συνολικής παραγωγής των λιπιδίων επί της παραχθείσας ξηρή βιομάζα.

Ημιδιαλείποντος έργου σύστημα *Auxenochlorella protothecoides*



Γράφημα 19 Μικτότροφη αύξηση του μικροφύκου *A. protothecoides* και η πορεία της αύξησης της γλυκερόλης στο υπόστρωμα σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (fed-batch) με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη τελικής συγκέντρωσης 20 g/L, με πηγή αζώτου πεπτόνη και C/N 20/1, σε τέσσερις διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός (λευκό, πορτοκαλί, μπλε και κόκκινο), (D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας).

Πίνακας 16 Οι συγκεντρώσεις σε πρωτεΐνες (g/L), λιπίδια (g/L), υδατάνθρακες (g/L) και χρωστικές (g/g), του μικροφύκου *A. protothecoides* σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (fed-batch) με υπόστρωμα 20 g/L ακατέργαστης (crude) γλυκερόλης, με πηγή αζώτου πεπτόνη και λόγο C/N=20/1, σε τέσσερις διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός (λευκό, πορτοκαλί, μπλε και κόκκινο). Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε χρωστική ως ποσοστό %. Η τυπική απόκλιση δίνεται από το SD (\pm) από τον αριθμό των επαναλήψεων n=3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών μονοχρωματικών πηγών φωτός ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (Λευκό, Μπλε, Κόκκινο, Πορτοκαλί). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

<i>A. protothecoides fed-batch 20 g/L γλυκερόλη</i>				
	Λευκό (control)	Κόκκινο	Μπλε	Πορτοκαλί
Βιομάζα	1.18 ^A \pm 0.3	1.65 ^B \pm 0.05	1.53 ^C \pm 0.26	1.47 ^D \pm 0.6
Yx/s (g/g)	0.59	0.97	0.43	0.97
Πρωτεΐνες (g/L)	0.63 ^A \pm 0.1	0.88 ^B \pm 0.01	0.57 ^C \pm 0.07	0.67 ^A \pm 0.04
(%)	53 ^A	53 ^A	41 ^B	48 ^C
Λιπίδια (g/L)	0.28 ^A \pm 0.1	0.37 ^B \pm 0.03	0.14 ^C \pm 0.02	0.27 ^A \pm 0.02
(%)	23 ^A	22 ^A	9 ^B	18 ^C
Υδατάνθρακες (g/L)	0.13 ^A \pm 0.03	0.14 ^A \pm 0.02	0.17 ^B \pm 0.01	0.2 ^C \pm 0.01
(%)	11 ^A	8 ^B	11 ^A	13 ^C

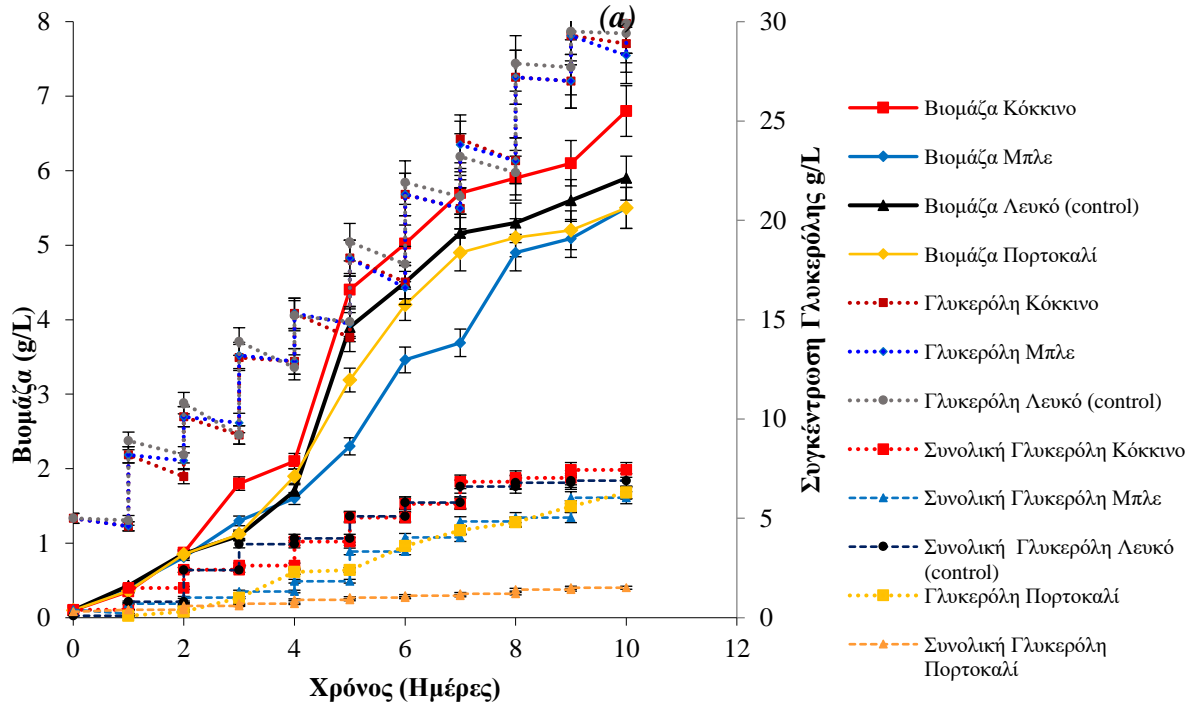
Ακολούθως αναπτύχθηκε μικτότροφα το *A. protothecoides* σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου με καθημερινή προσθήκη συμπυκνωμένου διαλύματος ακατέργαστης γλυκερόλης και πεπτόνης για τη διατήρηση σταθερού λόγου C/N=20 στην καλλιέργεια και να αυξηθεί σταδιακά η συγκέντρωση της γλυκερόλης από τα 5 g/L στα 30 g/L στο πέρας των 10 ημερών. Χρησιμοποιήθηκε οργανική πηγή αζώτου (πεπτόνη) σε αναλογία C/N=20 και οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν μικτότροφα στις τέσσερις μονοχρωματικές πηγές φωτός. Η υψηλότερη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξη σε κόκκινο φως (6.863 g/L) (**Πίνακας 17**). Ακολούθως, οι καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν υπό το φως μπλε χρώματος έδωσαν μέσω υψηλότερη συγκέντρωση σε βιομάζα (5.961 g/L), ενώ το λευκό και το πορτοκαλί παρουσίασαν παραπλήσια επίδραση στην αύξηση του μικροφύκου.

Ακολούθως αναπτύχθηκε μικτότροφα το *A. protothecoides* σε σύστημα ημιδιαλείποντος έργου λειτουργίας με καθημερινή προσθήκη συμπυκνωμένου διαλύματος ακατέργαστης γλυκερόλης και πεπτόνης για τη διατήρηση σταθερού λόγου C/N=20 στην καλλιέργεια και να αυξηθεί σταδιακά η συγκέντρωση της γλυκερόλης από τα 5 g/L στα 50 g/L στο πέρας των 10 ημερών. Στον **Πίνακα 17** και στο **Γράφημα 20** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της παραχθείσας βιομάζας κατά την μικτότροφη ανάπτυξη σε μονοχρωματικές πηγές φωτός. Όπως και στις προηγούμενες δοκιμές η ανάπτυξη του μικροφύκους παρουσίασε μείωση σε αυξανόμενη συγκέντρωση γλυκερόλης υποδηλώνοντας ότι η αύξηση της συγκέντρωσης στο θρεπτικό μέσο παρουσία φωτός δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του μικροφύκους. Στην προκειμένη περίπτωση το μήκος κύματος του φωτός δεν φάνηκε να έχει κάποιο σημαντικό ρόλο. Η μέγιστη παραγωγικότητα σε βιομάζα καταγράφηκε παρουσία λευκού χρώματος φωτισμού (2.54 g/L) και σε πορτοκαλί με (2.52 g/L), όπου σημείωσαν παρόμοια επίδραση ως προς την αύξηση του στελέχους.

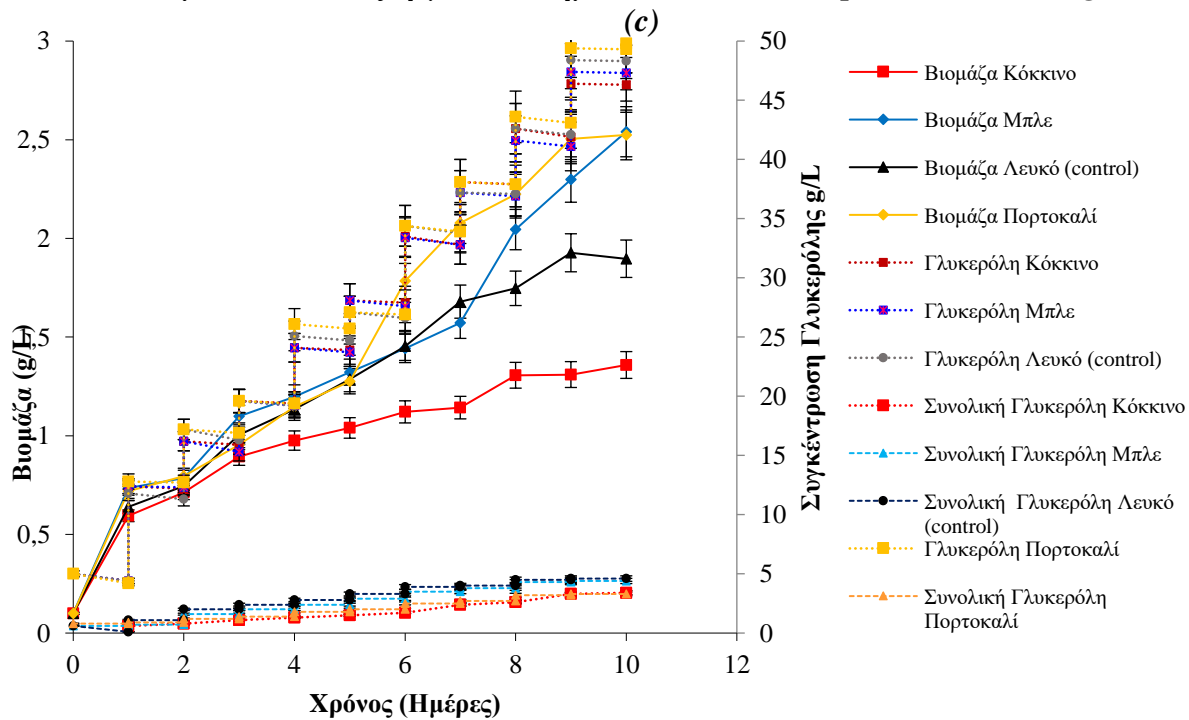
Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας του μικροφύκους *A. protothecoides* σε μικτότροφη fed batch καλλιέργεια με 30 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης στο υπόστρωμα, σημειώθηκε στο κόκκινο φως με 6.86 g/L βιομάζας, ενώ αντίστοιχα σε 50 g/L ήταν χαμηλότερες με 1.35-2.54 g/L. Αναφορικά με τη βιοχημική σύσταση της βιομάζας, οι αποδόσεις σε πρωτεΐνη σημειώθηκαν μεγαλύτερες στα 50 g/L γλυκερόλης (43-59%), σε σχέση με τα 30 g/L και διακυμάνθηκαν σε ποσοστά (38-47%).

Η παραγωγικότητα των λιπιδίων σημειώθηκε αυξημένη στο κόκκινο φως και στις δύο δοκιμές, σε ποσοστά: 21% ε κατά την ανάπτυξη σε κόκκινο φως και σε συγκέντρωση 30 g/L γλυκερόλης και 29% στα 50 g/L γλυκερόλης. Η παραγωγή των υδατανθράκων κυμάνθηκε ποσοστά (3-15%) και ευνοήθηκε κατά την ανάπτυξη σε πορτοκαλί φως και στις δύο συγκεντρώσεις γλυκερόλης. (**Πίνακας 17**). Η περιεκτικότητα της βιομάζας σε χλωροφύλλες ήταν ιδιαίτερα χαμηλή στις συνθήκες αυτές ($\leq 1\%$), ενώ τα καροτενοειδή παρήχθησαν σε μεγαλύτερα ποσοστά κυρίως στα 50 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης, όπου σε λευκό φως έφτασαν το 6.33%. Υψηλότερη παραγωγικότητα σημείωσε το σύστημα στα 30 g/L σε σχέση με τα 20 g/L ενώ η παραγωγή μεταβολιτών και κυρίως λιπιδίων ευνοήθηκε από την παρουσία φωτός (κόκκινου) σε σχέση με τις ετερότροφες καλλιέργειες.

Ημιδιαλείποντος έργου σύστημα *Auxenochlorella protothecoides* 30 g/L



Ημιδιαλείποντος έργου σύστημα *Auxenochlorella protothecoides* 50 g/L



Γράφημα 20. Κινητική της μικτότροφης αύξησης και της πορείας αύξησης του υποστρώματος με καθημερινή προσθήκη στο θρεπτικό συμπληκνωμένου διαλύματος κατάλληλης συγκέντρωσης, του

μικροφύκους *A. protothecoides* σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (fed-batch) με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη τελικής συγκέντρωσης α) 30 g/L, β) 50 g/L, με πηγή αζώτου πεπτόνη και C/N 20/1, σε τέσσερις διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός (λευκό, πορτοκαλί, μπλε και κόκκινο), (D.W. = ξηρό βάρος βιομάζας).

Πίνακας 17 Η συγκέντρωση σε πρωτεΐνη (g/L), λιπίδια (g/L) και υδατάνθρακες (g/L) στη βιομάζας του μικροφύκους *A. protothecoides* σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (fed-batch) με υπόστρωμα 30 g/L και 50 g/L ακατέργαστης (crude) γλυκερόλης, με πηγή αζώτου πεπτόνη και λόγο C/N=20/1, σε τέσσερις διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός (λευκό, πορτοκαλί, μπλε και κόκκινο). Σε παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε μεταβολίτες ως ποσοστό %. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών μονοχρωματικών πηγών φωτός ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (Λευκό, Μπλε, Κόκκινο, Πορτοκαλί). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

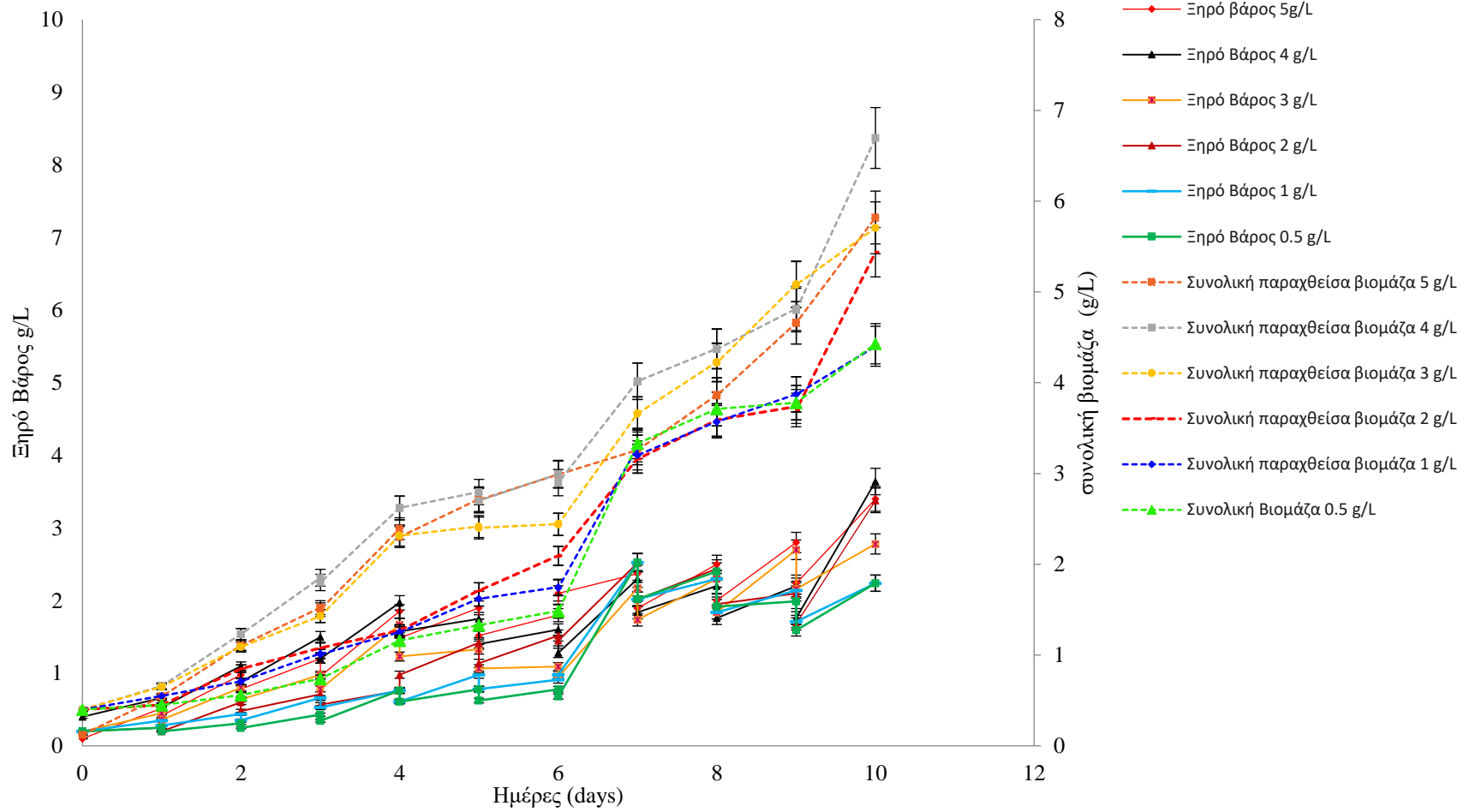
<i>A. protothecoides fed-batch 30 g/L γλυκερόλη</i>				
	Λευκό (control)	Κόκκινο	Μπλε	Πορτοκαλί
Βιομάζα	5.51 ^A ±0.3	6.86 ^B ±0.05	5.96 ^A ±0.26	5.51 ^A ±0.6
Yx/s (g/g)	0.74	0.93	0.85	0.87
Πρωτεΐνες (g/L)	2.45 ^A ±0.1	2.63 ^A ±0.01	2.64 ^A ±0.07	2.6 ^A ±0.04
(%)	44 ^A	38 ^B	44 ^A	47 ^A
Λιπίδια (g/L)	0.64 ^A ±0.1	1.48 ^B ±0.03	0.69 ^A ±0.02	0.74 ^A ±0.02
(%)	11 ^A	21 ^B	11 ^A	13 ^A
Υδατάνθρακες (g/L)	0.7 ^A ±0.03	0.6 ^A ±0.02	0.73 ^A ±0.01	0.8 ^A ±0.01
(%)	12 ^A	8.8 ^B	12 ^A	14 ^A
<i>A. protothecoides fed-batch 50 g/L γλυκερόλη</i>				
	Λευκό (control)	Κόκκινο	Μπλε	Πορτοκαλί
Βιομάζα	2.54 ^A ±0.3	1.35 ^A ±0.05	1.89 ^A ±0.26	2.52 ^A ±0.6
Yx/s (g/g)	0.74	0.22	0.41	0.76
Πρωτεΐνες (g/L)	1.2 ^A ±0.1	0.8 ^B ±0.01	1.04 ^A ±0.07	1.1 ^A ±0.04
(%)	47 ^A	59 ^B	55 ^C	43 ^A
Λιπίδια (g/L)	0.62 ^A ±0.1	0.4 ^B ±0.03	0.19 ^C ±0.02	0.64 ^A ±0.02
(%)	24 ^A	29 ^B	10 ^C	25 ^A
Υδατάνθρακες (g/L)	0.1 ^A ±0.03	0.09 ^A ±0.02	0.07 ^A ±0.01	0.4 ^B ±0.01
(%)	4 ^A	6 ^B	3 ^A	15 ^C

2.5 Μικτότροφη ανάπτυξη του *A. protothecoides* σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (Semi- Continuous) με διαφορετικές συγκεντρώσεις πεπτόνης.

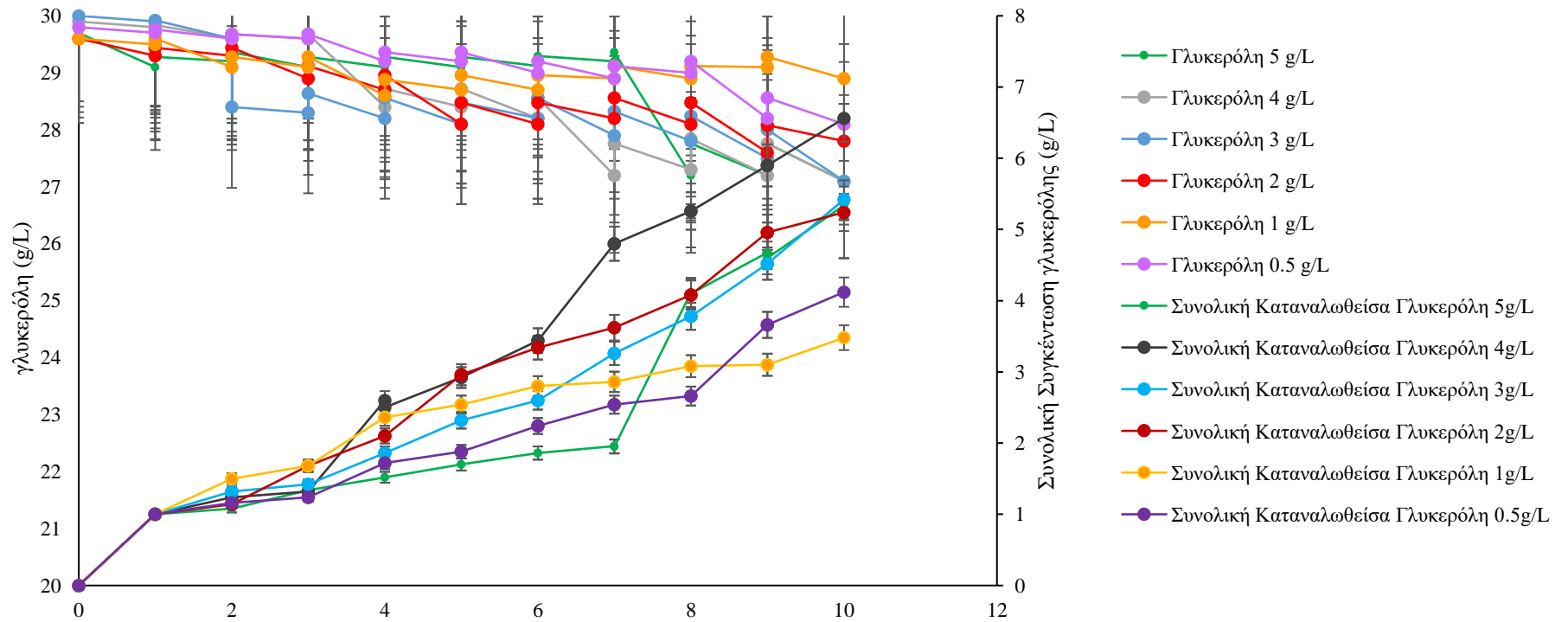
Τα αποτελέσματα των μικτότροφων καλλιεργειών με χρήση διαφορετικών πηγών αζώτου έδειξαν ότι το στέλεχος δείχνει προτίμηση σε οργανικές πηγές αζώτου για την ανάπτυξη του και κυρίως στην πεπτόνη. Όταν ο λόγος ήταν C/N=1 παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού, ενώ η μέγιστη ανάπτυξη σημειώθηκε όταν ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε C/N=20. Ως εκ τούτου διενεργήθηκαν δοκιμές με χρήση πεπτόνης ως πηγή αζώτου σε 30 g/L γλυκερόλης στο υπόστρωμα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αζώτου (5, 4, 3, 2, 1, και 0.5 g/L). Στο πέρας 10 ημερών επώασης κάθε μέρα αφαιρούνταν 20 mL θρεπτικό και προστέθηκε αντίστοιχα 20 mL φρέσκο θρεπτικό υπόστρωμα αντίστοιχης σύστασης. (Γράφημα 21.1) και η πορεία κατανάλωσης της γλυκερόλης στο υπόστρωμα (Γράφημα 21.2). Η μέγιστη απόδοση παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 4 g/L πεπτόνης όπου η παραγωγή άγγιξε $Y_{x/s}=1$ g/g. Η μέγιστη παραγωγικότητα του συστήματος άγγιξε τα $P_x=0.54$ g/Ld⁻¹ επίσης κατά την ανάπτυξη σε 4 g/L πεπτόνη. Σε σχέση με την ετερότροφη ανάπτυξη η παραγωγικότητα των συστημάτων παρατηρήθηκε πιο μειωμένη και ο λόγος οφείλεται στην αναστολή που προκαλεί το φως.

Με βάση τα αποτελέσματα από την ανάλυση της βιομάζας η παραγωγικότητα των μεταβολιτών περιγράφεται στο (Γράφημα 21.3, Πίνακας 18). Η μέγιστη παραγωγή πρωτεϊνών σημειώθηκε κατά την ανάπτυξη σε συγκέντρωση 5 g/L με $P_{pr}=0.14$ g/Ld⁻¹. Όσον αφορά τα λιπίδια σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις αζώτου στο υπόστρωμα η παραγωγή παρατηρήθηκε χαμηλή με μέγιστη τιμή κατά την ανάπτυξη σε 3 g/L πεπτόνη και $P_L=0.0132$ g/Ld⁻¹. Η παραγωγή των υδατανθράκων κυμάνθηκε σε παρόμοια επίπεδα σε όλες τις δοκιμές με μικροδιαφορές ως προς την παραγωγή τους, και σημείωσαν εξαιρετικά χαμηλές τιμές. $P_c=0.0087$ g/Ld⁻¹. Στην ετερότροφη ανάπτυξη οι παραγωγικότητες των μεταβολιτών σημειώθηκαν διπλάσιες για όλες τις δοκιμές αντίστοιχα.

Ημιδιαλείπontos έργου Σύστημα *A. protothecoides*, 30 g/L Γλυκερόλη,
α

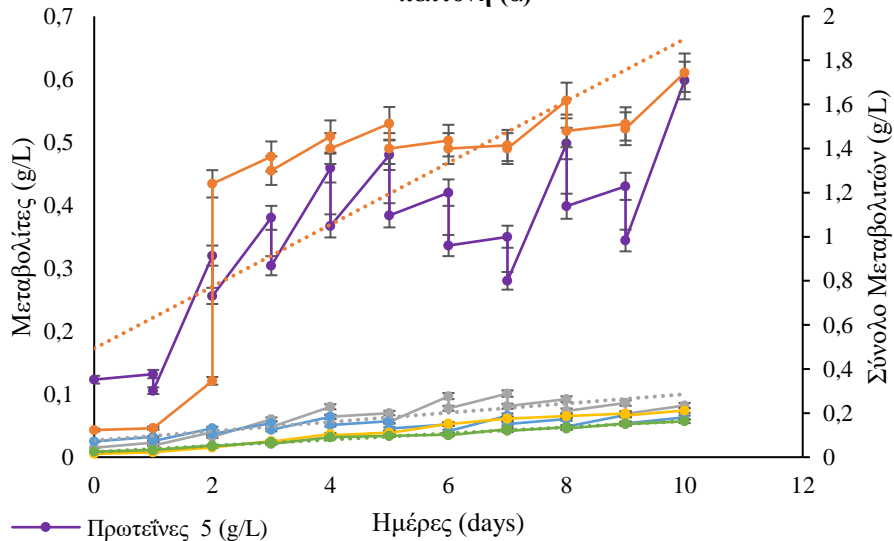


Πορεία κατανάλωσης Γλυκερόλης (g/L)



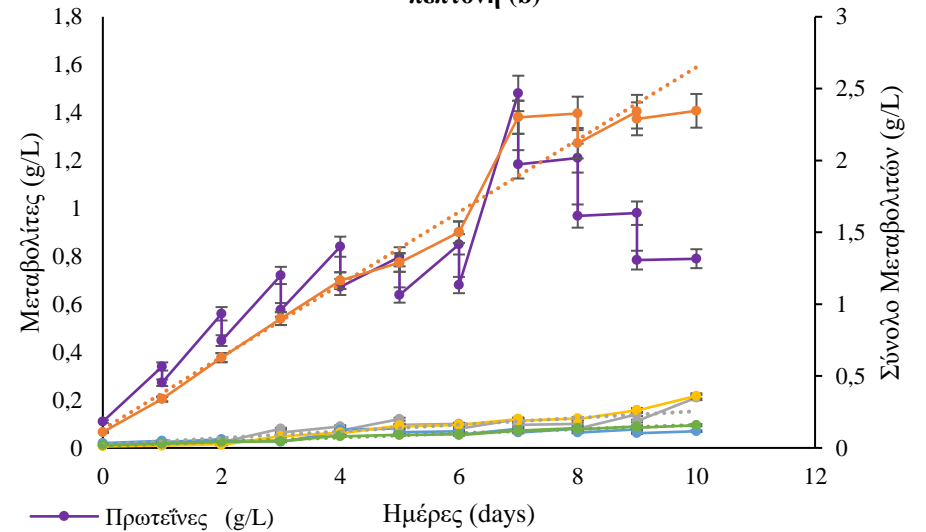
Γράφημα 21.2 Πορεία της συγκέντρωσης γλυκερόλης σε μικτότροφη αύξηση του μικροφύκου *A. protothecoides* σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα (semi-continuous) με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη 30 g/L σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πεπτόνης 5, 4, 3, 2, 1 και 0.5 g/L κατά τη διάρκεια των 10 ημερών.

Ημιδιαλείπωντος έργου Καλλιέργεια, 30 g/L Γλυκερόλη, 5 g πεπτόνη (α)



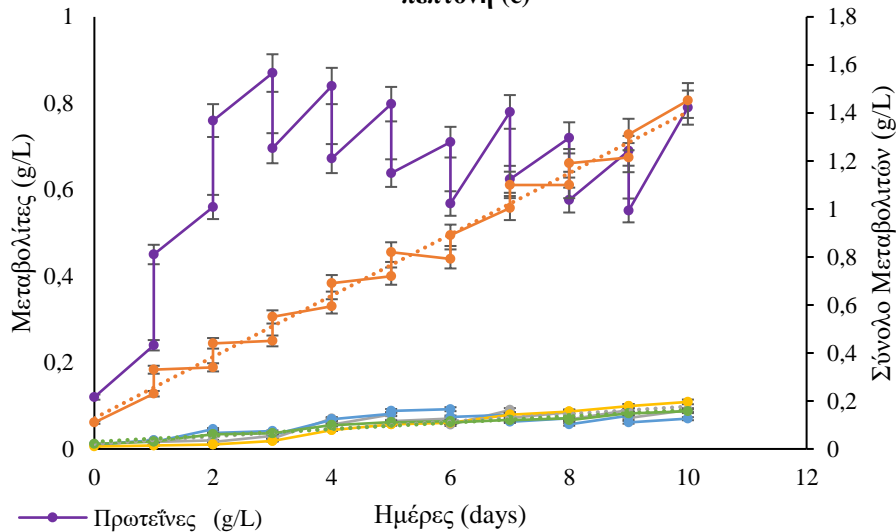
- Πρωτεΐνες 5 (g/L)
- Υδατάνθρακες 5 (g/L)
- Λιπίδια 5 (g/L)
- Συνολική Πρωτεΐνη 5 (g/L)
- Συνολικοί Υδατάνθρακες 5 (g/L)
- Συνολικά Λιπίδια 5 (g/L) $y = 0,0073x + 0,0266$
- Γραμμική (Υδατάνθρακες 5 (g/L))
- Γραμμική (Συνολική Πρωτεΐνη 5 (g/L)) $y = 0,1404x + 0,4928$
- Γραμμική (Συνολικά Λιπίδια 5 (g/L)) $y = 0,0141x + 0,0234$

Ημιδιαλείπωντος έργου Καλλιέργεια, 30 g/L Γλυκερόλη, 4 g πεπτόνη (β)



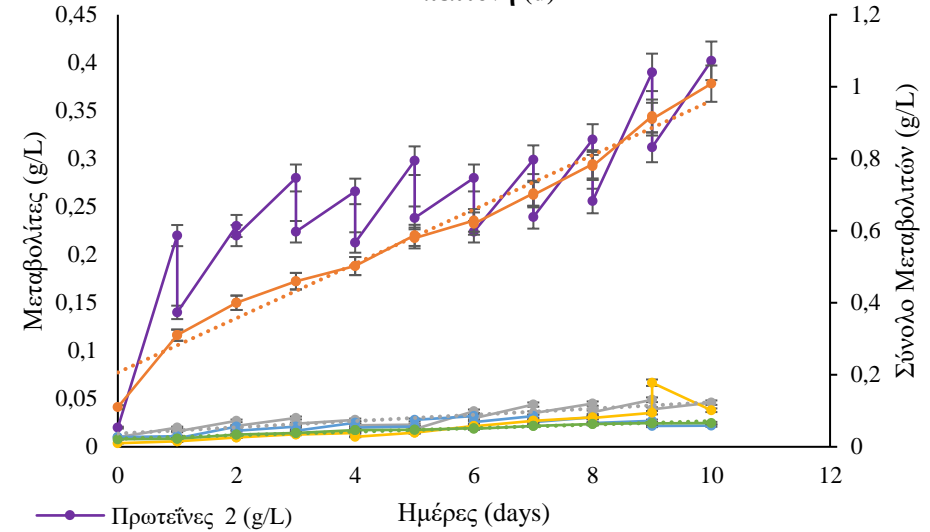
- Πρωτεΐνες (g/L)
- Υδατάνθρακες (g/L)
- Λιπίδια (g/L)
- Συνολική Πρωτεΐνη (g/L)
- Συνολικοί Υδατάνθρακες (g/L)
- Συνολικά Λιπίδια (g/L)
- Γραμμική (Υδατάνθρακες (g/L)) $y = 0,014x + 0,0135$
- Γραμμική (Συνολική Πρωτεΐνη (g/L)) $y = 0,2519x + 0,1294$
- Γραμμική (Συνολικά Λιπίδια (g/L)) $y = 0,0146x + 0,0141$

Ημιδιαλείποντος έργου Καλλιέργεια, 30 g/L Γλυκερόλη, 3 g πεπτόνη (c)

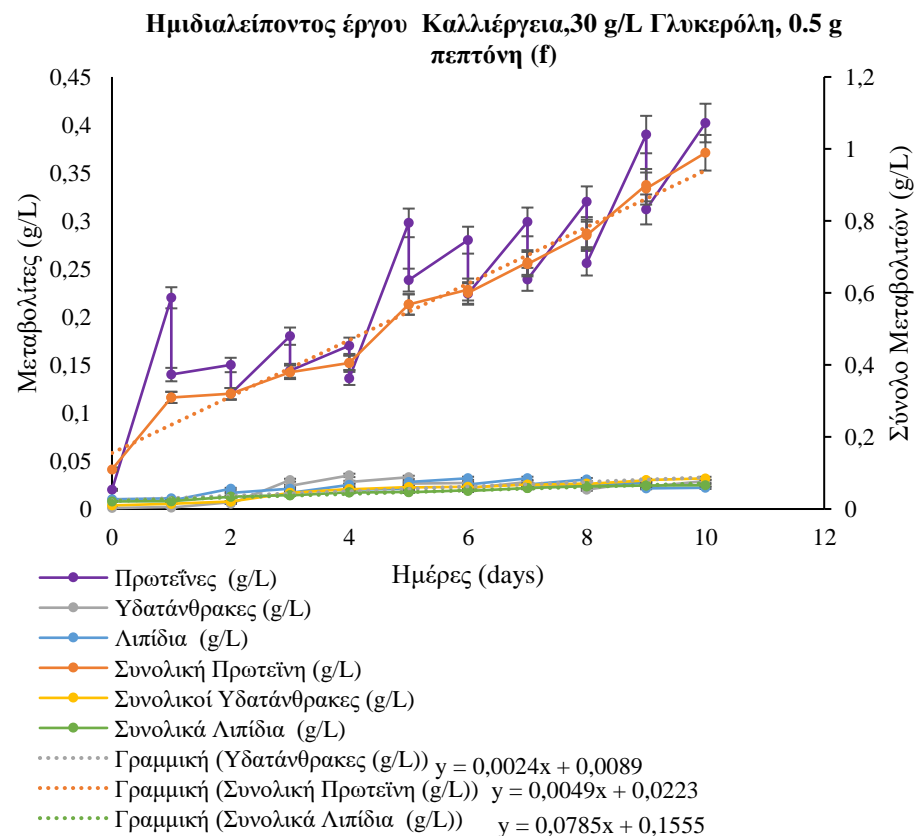
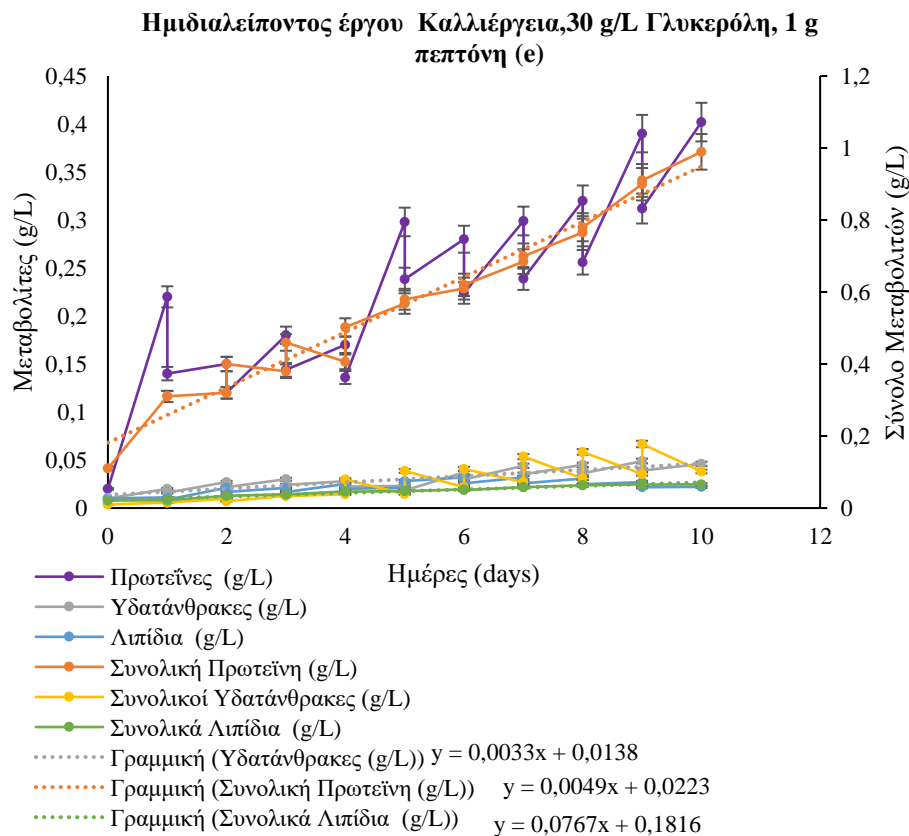


- Πρωτεΐνες (g/L)
- Υδατάνθρακες (g/L)
- Λιπίδια (g/L)
- Συνολική Πρωτεΐνη (g/L)
- Συνολικοί Υδατάνθρακες (g/L)
- Συνολικά Λιπίδια (g/L)
- Γραμμική (Υδατάνθρακες (g/L)) $y = 0,0087x + 0,0117$
- Γραμμική (Συνολική Πρωτεΐνη (g/L)) $y = 0,0132x + 0,0299$
- Γραμμική (Συνολικά Λιπίδια (g/L)) $y = 0,1276x + 0,1281$

Ημιδιαλείποντος έργου Καλλιέργεια, 30 g/L Γλυκερόλη, 2 g πεπτόνη (d)



- Πρωτεΐνες 2 (g/L)
- Υδατάνθρακες 2 (g/L)
- Λιπίδια 2 (g/L)
- Συνολική Πρωτεΐνη 2 (g/L)
- Συνολικοί Υδατάνθρακες 2 (g/L)
- Συνολικά Λιπίδια 2 (g/L)
- Γραμμική (Υδατάνθρακες 2 (g/L)) $y = 0,0033x + 0,0138$
- Γραμμική (Συνολική Πρωτεΐνη 2 (g/L)) $y = 0,0049x + 0,0223$
- Γραμμική (Συνολικά Λιπίδια 2 (g/L)) $y = 0,0755x + 0,2063$



Γράφημα 21.3: Παραγωγικότητα των μεταβολιτών σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα του μικροφύκου *A. protothecoides* σε σύστημα μικτότροφης καλλιέργειας με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη (30 g/L) με πηγή αζώτου πεπτόνη σε συγκεντρώσεις 5 (a), 4 (b), 3 (c), 2 (d), 1 (e) και 0.5 (f) g/L.

Πίνακας 18. Παραγωγικότητα των παραγόμενων μεταβολιτών (πρωτεϊνών (P_{pr}), λιπιδίων (P_L) και υδατανθράκων (P_c)), της παραγομενης βιομάζας (P_x) και η απόδοση ($Y_{x/s}$) του μικροφύκου *A. protothecoides* σε συνθήκες μικτότροφης ανάπτυξης σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου με υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη (crude) συγκέντρωσης 30 g/L, με πηγή αζώτου πεπτόνη και διαφορετικές συγκεντρώσεις αζώτου στο υπόστρωμα.

Συγκέντρωση Πεπτόνης	$Y_{x/s}$ (g/g)	P_x (g/Ld ⁻¹)	P_{pr} (g/Ld ⁻¹)	P_L (g/Ld ⁻¹)	P_c (g/Ld ⁻¹)
5	0.91	0.507	0.1	0.0141	0.0073
4	1	0.54	0.25	0.014	0.014
3	0.95	0.53	0.127	0.0132	0.0087
2	0.97	0.45	0.075	0.049	0.003
1	0.9	0.43	0.076	0.049	0.0033
0.5	0.93	0.45	0.078	0.024	0.024

2.6 Συγκριτικά αποτελέσματα των καλλιέργειών ημιδιαλείποντος έργου και αξιολόγηση της δυναμικότητάς τους.

Στο κεφάλαιο αυτό εξετάστηκαν δύο συστήματα ημιδιαλείποντος έργου καλλιέργειας. Στο πρώτο σύστημα (Semi-continuous) εξετάστηκε η δυναμικότητα των στελεχών *C. vulgaris* και *A. protothecoides* σε σύστημα με ημι-σταθερές συνθήκες. Συγκεκριμένα γινόταν προσθήκη φρέσκου θρεπτικού καθημερινά και αφαίρεση του (20%) με σκοπό τη διατήρηση της συγκέντρωσης του άνθρακα και των άλλων θρεπτικών στο υπόστρωμα σε σταθερά επίπεδα. Το *C. vulgaris* εξετάστηκε σε ετεροτροφο σύστημα ανάπτυξης που χρησιμοποιούσε μια ανόργανη (NaNO_3) και μια οργανική πηγή αζώτου (εκχύλισμα ζύμης) σε δύο διαφορετικές αναλογίες C/N=20 και C/N=1. Το *A. protothecoides* εξετάστηκε σε σύστημα ανάπτυξης που χρησιμοποιούσε ως σταθερά την αρχική συγκέντρωση των 30 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης και δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις οργανικού αζώτου στο υπόστρωμα (5,4,3,2,1 και 0.5 g/L πεπτόνης) σε ετερότροφο και μικτότροφο σύστημα με μονοχρωματικές πηγές

Το δεύτερο σύστημα ημιδιαλείποντος έργου καλλιέργειας (Fed-Batch) που εξετάστηκε είχε ως κύριο στόχο τη μελέτη της προσαρμογής του μικροφύκου *A. protothecoides* σε σταδιακή άυξηση της συγκέντρωσης της ακατέργαστης γλυκερόλης στο υπόστρωμα ανάπτυξης, το οποίο επιτεύχθηκε με καθημερινή προσθήκη συμπυκνωμένου διαλύματος ακατέργαστης γλυκερόλης. Το *A. protothecoides* δοκιμάστηκε σε τρεις συγκεντρώσεις 20, 30 και 50 g/L σε ετερότροφο και μικτότροφο σύστημα με χρήση μονοχρωματικών πηγών φωτισμού (λευκό, κόκκινο, μπλε και πορτοκαλί φως)

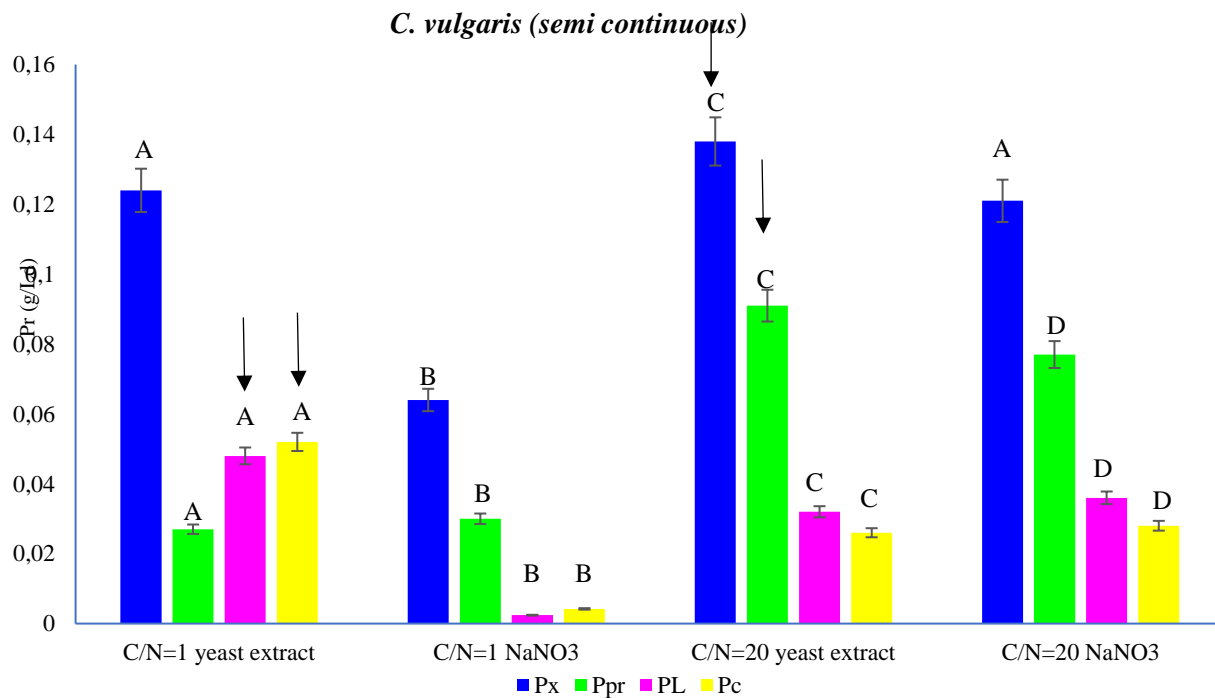
Ανακεφαλαιώνοντας τα παραπάνω πειράματα ύστερα από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψαν τα παρακάτω δεδομένα. Το *C. vulgaris* σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα (semi-continuous) αναπτύσσεται καλύτερα και σημειώνει υψηλότερες παραγωγικότητες τόσο ως προς την παραγωγή βιομάζας όσο και ως προς την παραγωγικότητα των μεταβολιτών όταν στο υπόστρωμα υπάρχει οργανική πηγή αζώτου (εκχύλισμα ζύμης) σε σχέση με ανόργανη πηγή αζώτου. Συγκεκριμένα αναφορικά με τους λόγους C/N=1 και C/N=20, η παραγωγικότητα ως προς τη βιομάζα ήταν υψηλότερη σε C/N=20 όπως και η παραγωγικότητα των πρωτεϊνών ($P_x=0.138 \text{ g/Ld}^{-1}$ και $P_{pr}=0.091 \text{ g/Ld}^{-1}$). Σε λόγο C/N=1 παρατηρήθηκε υψηλότερη η

παραγωγικότητα των υδατανθράκων αλλά και των λιπιδίων. ($P_L=0.048 \text{ g/Ld}^{-1}$ και $P_c=0.052 \text{ g/Ld}^{-1}$) (Γράφημα 22.1).

Το *A. protothecoides* κατά την ανάπτυξη του τόσο ετερότροφα όσο και μικτότροφα σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα (semi-continuous) με διαφορετικές συγκεντρώσεις πεπτόνης στο υπόστρωμα ανάπτυξης (5, 4, 3, 2, 1 και 0,5 g/L), όπως και στις προηγούμενες καλλιέργειες διαλείποντος έργου που είχαν διενεργηθεί έδωσε καλύτερα αποτελέσματα ετερότροφα, ενώ συγκριτικά με τα διαλείποντος έργου συστήματα καλλιέργειας η απόδοση σε βιομάζα διακυμάνθηκε σε πολύ υψηλότερα επίπεδα. Μάλιστα στο ημιδιαλείποντος έργου σύστημα το μικροφύκος έδωσε στατιστικά σημαντικά καλύτερη παραγωγικότητα τόσο ως προς την παραγωγή βιομάζας όσο και ως προς την παραγωγή μεταβολιτών ετερότροφα σε σχέση με την μικτότροφη ανάπτυξη. Στην ετερότροφη ανάπτυξη οι υψηλότερες παραγωγικότητες σημειώθηκαν σε 5 g/L πεπτόνη στο υπόστρωμα. Αναφορικά με τη μικτότροφη παρά το γεγονός ότι οι παραγωγικότητες ήταν πολύ μειωμένες σε σχέση με την ετερότροφη, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση της παραγωγικότητας των μεταβολιτών σε σχέση με τη συγκέντρωση αζώτου στο υπόστρωμα. Συγκεκριμένα η υψηλότερη παραγωγικότητα βιομάζας και πρωτεϊνών σημειώθηκε κατά την ανάπτυξη σε 4 g/L πεπτόνη ($P_x=0.54 \text{ g/Ld}^{-1}$ και $P_{pr}=0.25 \text{ g/Ld}^{-1}$), ενώ η παραγωγικότητα των λιπιδίων σε 2 g/L πεπτόνη ($P_L=0.049 \text{ g/Ld}^{-1}$). (Γράφημα 22.2)

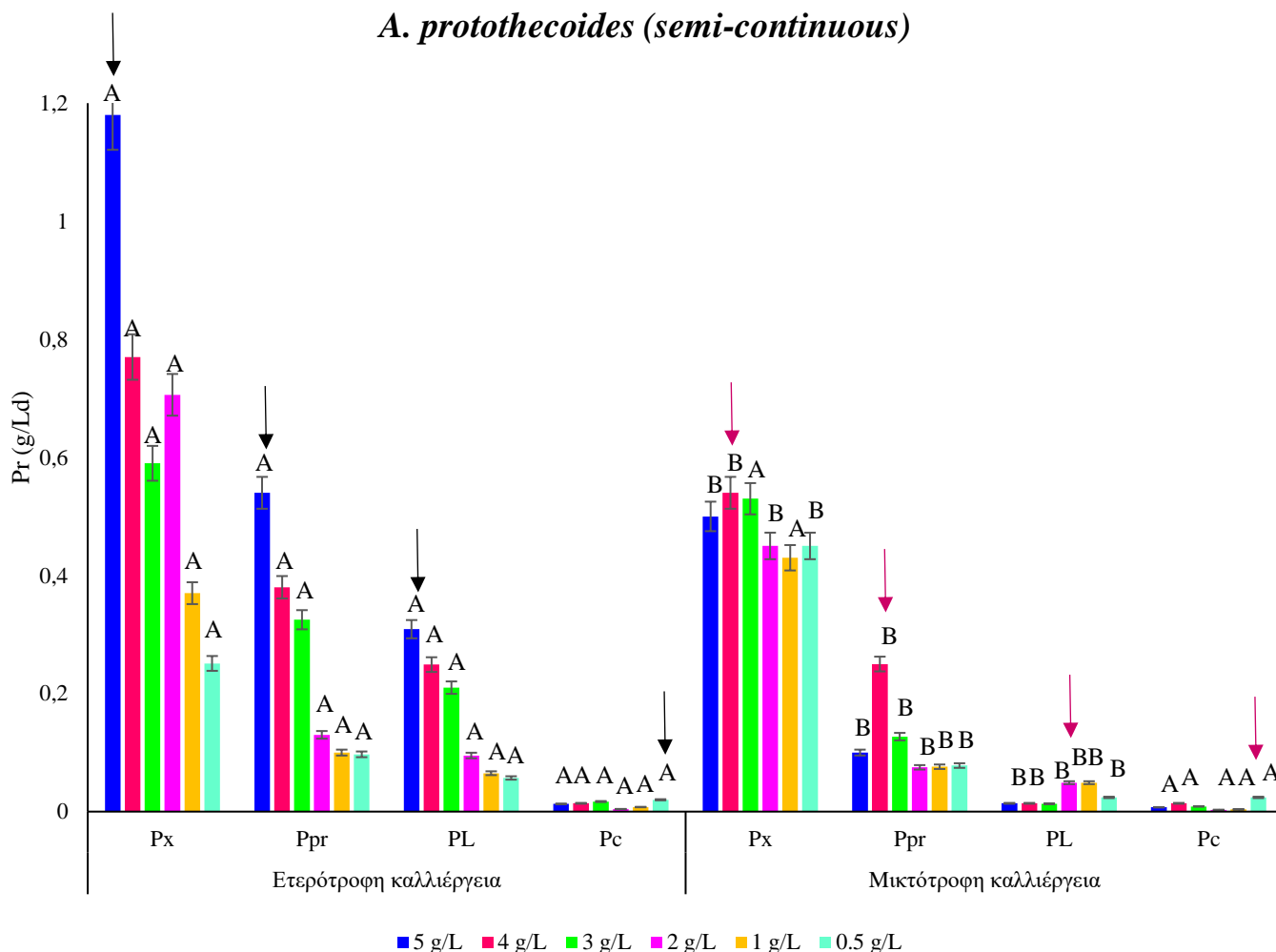
Οι δοκιμές του *A. protothecoides* σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα (Fed-Batch) με τελική συγκέντρωση γλυκερόλης στο υπόστρωμα τα 20, 30 και 50 g/L, τόσο μικτότροφα με χρήση μονοχρωματικών πηγών φωτός όσο και ετερότροφα έδωσαν σημαντικά δεδομένα για τη δυναμικότητα και την ικανότητα ανάπτυξης του μικροφύκου. Σε γενικές γραμμές το μικροφύκος σημείωσε υψηλότερη απόδοση κατά την ετερότροφη ανάπτυξη σε 30 g/L σε σχέση με τις υπόλοιπες δοκιμές ενώ η υψηλότερη απόδοση βιομάζας όπως και η παραγωγή βιομάζας (0.99 g/g) σημειώθηκε κατά την ετερότροφη ανάπτυξη σε 50 g/L (9.3 g/L). Αντίστοιχα στα 50 g/L σημειώθηκε και η μέγιστη παραγωγή πρωτεϊνών με (5.42 g/L). Αναφορικά με τα μικτότροφα συστήματα καλλιέργειας εξίσου υψηλές αποδόσεις έδωσαν τα συστήματα σε 20 και 30 g/L γλυκερόλης σε κόκκινο φως ($Y_{x/s}=0.97$ και 0.93 g/g) αντίστοιχα και πορτοκαλί φως ($Y_{x/s}=0.97$ g/g) συγκριτικά με την ετερότροφη ανάπτυξη. Η παραγωγή λιπιδίων άγγιξε κατά την ανάπτυξη σε 30 g/L γλυκερόλη σε κόκκινο φως τα 1.48 g/L ποσότητα που δεν έχει σημειωθεί μέχρι τώρα ούτε στις ετερότροφες διαλείποντος έργου καλλιέργειες. Άρα μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι

το κόκκινο φως στο μικροφύκος μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση λιπιδίων. Τέλος υψηλή παραγωγή υδατανθράκων σε σχέση με τα μέχρι τώρα δεδομένα έδωσαν οι δοκιμές με μπλε φως κατά την ανάπτυξη σε 30 g/L γλυκερόλη. Συγκρίσεις με το λευκό (control) φως έγιναν και έδειξαν ότι η παραγωγικότητα βιομάζας και μεταβολιτών ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με το κόκκινο και πορτοκαλί φωτισμό. Τέλος, στα 50 g/L οι αποδόσεις αλλά και η βιομάζα σημειώθηκαν στο μικτότροφο σύστημα ανάπτυξης εξαιρετικά μειωμένες και συνδέεται με το γεγονός ότι το μικροφύκος δεν μπορεί να αξιοποιήσει κατάλληλα τη διαθέσιμη πηγή άνθρακα από το υπόστρωμα όταν αναπτύσσεται παρουσία φωτός. (Γράφημα 22.3)

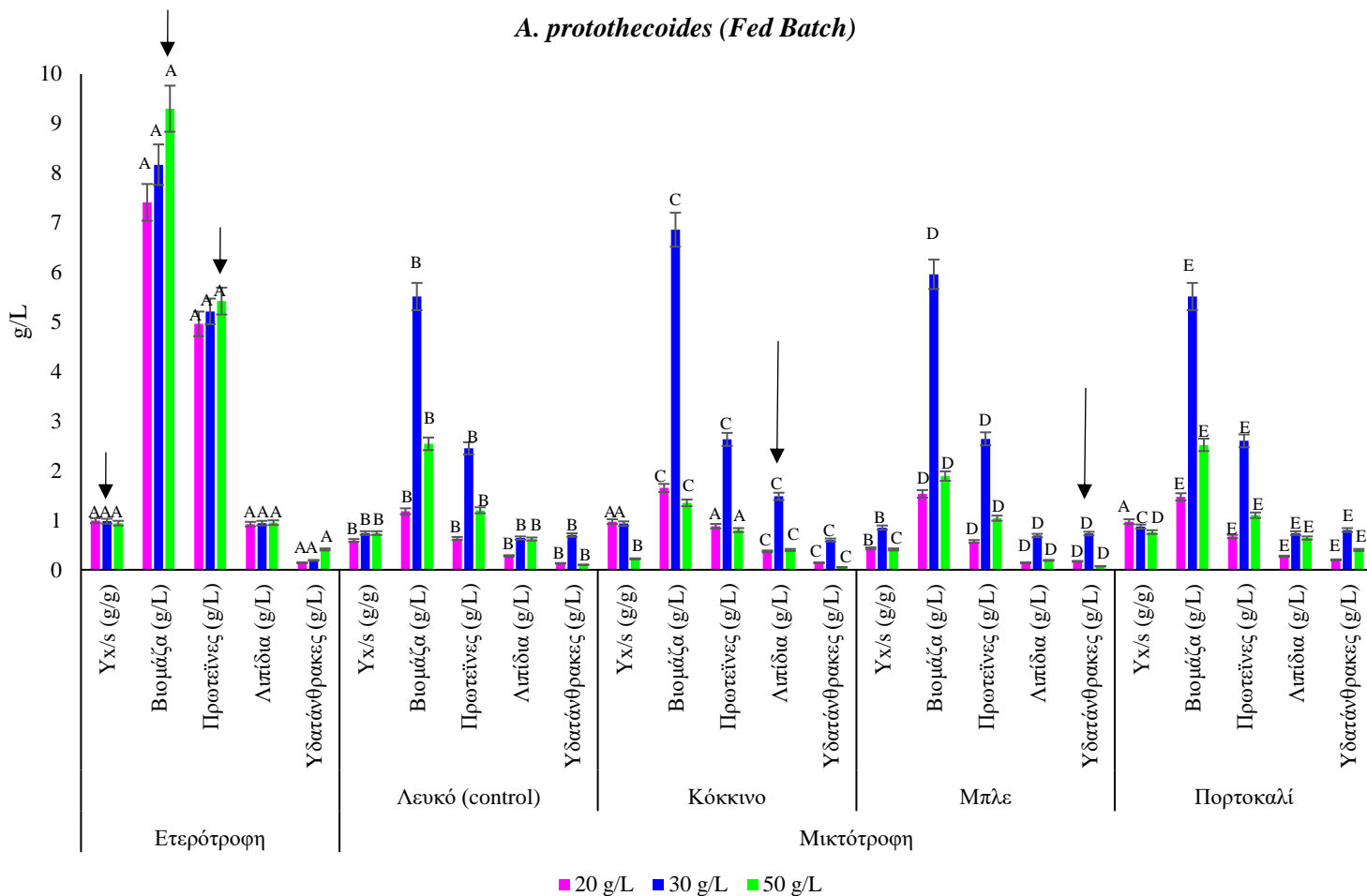


Γράφημα 22.1: Συγκριτικά αποτελέσματα του μικροφύκου *C. vulgaris* σε ετερότροφο και μικτότροφο σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (Semi-continuous) με 20 g/L αρχικής συγκέντρωσης ακατέργαστης γλυκερόλης στο υπόστρωμα σε δύο διαφορετικές πηγές αζώτου (εκχύλισμα ζύμης και NaNO₃) σε λόγους C/N=20 και C/N=1 αντίστοιχα. Στο γράφημα παρουσιάζεται η συνολική παραγωγικότητα βιομάζας και μεταβολιτών του συστήματος (Px=παραγωγικότητα βιομάζας, Ppr= παραγωγικότητα πρωτεϊνών, PL: παραγωγικότητα λιπιδίων και Pc: παραγωγικότητα υδατανθράκων) Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ ετερότροφου και μικτότροφου συστήματος ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (ετερότροφο, μικτότροφο). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

A. protothecoides (semi-continuous)



Γράφημα 22.2: Συγκριτικά αποτελέσματα του μικροφύκου *A. protothecoides* σε ετερότροφο και μικτότροφο σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (Semi-continuous) με 30 g/L αρχικής συγκέντρωσης ακατέργαστης γλυκερόλης στο υπόστρωμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πεπτόνης (5,4,3,2,1 και 0.5 g/L). Στο γράφημα παρουσιάζεται η συνολική παραγωγικότητα βιομάζας και μεταβολιτών του συστήματος (Px=παραγωγικότητα βιομάζας, Ppr= παραγωγικότητα πρωτεϊνών, PL: παραγωγικότητα λιπιδίων και Pc: παραγωγικότητα υδατανθράκων) Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ ετερότροφου και μικτότροφου συστήματος ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (ετερότροφο, μικτότροφο). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.



Γράφημα 22.3: Συγκριτικά αποτελέσματα του μικροφύκου *A. protothecoides* σε ετερότροφο και μικτότροφο σε καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου (Fed-Batch) με 50 g/L αρχικής συγκέντρωσης ακατέργαστης γλυκερόλης στο υπόστρωμα και με καθημερινή προσθήκη διαλύματος συγκεκριμένης συγκέντρωσης έφτασε στο πέρας των 10 ημερών τα 20, 30 και 50 g/L αντίστοιχα. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με ANOVA, $p < 0,05$ των ζευγών συγκρίσεων μεταξύ ετερότροφου και μικτότροφου συστήματος ίδιο κεφαλαίο γράμμα υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων ζευγών συγκρίσεων των μεταβλητών (ετερότροφο, μικτότροφο). Η διαφορά στα κεφαλαία γράμματα δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές

3. ΣΥΝΕΧΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ (CONTINUOUS)

3.1.1 Ετερότροφες συνεχείς καλλιέργειες του μικροφύκου *C. vulgaris* με χρήση βιοαντιδραστήρα

Η ετερότροφη αύξηση του *C. vulgaris* σε χημειοστάτη συνεχούς λειτουργίας εξετάστηκε σε θρεπτικό μέσο με 30 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης σε διαφορετικές τιμές του ειδικού ρυθμού αραίωσης αλλά οδηγήθηκε στην έκπλυση μετά το πρώτο $D=0.0142 \text{ h}^{-1}$. Η χρήση συνεχούς συστήματος καλλιέργειας έγινε για να εξασφαλιστούν πιο ασφαλή συμπεράσματα σε σχέση με τα αποτελέσματα από τις διαλείποντος έργου καλλιέργειες. Γενικότερα η υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο σε συνδυασμό με τις ετερότροφες συνθήκες ανάπτυξης δεν ευνόησε την ανάπτυξη του μικροφύκου αφού δρα παρεμποδιστικά και η καλλιέργεια εκπλύθηκε σε πολύ χαμηλό D . Ο σκοπός της συγκεκριμένης δοκιμής ήταν να διαπιστωθεί αν σε συνθήκες στρες σε σταθερές συνθήκες ανάπτυξης ο μικροοργανισμός τείνει να παράγει περισσότερα λιπίδια. Η ικανότητα αύξησης του μικροφύκου εκτιμήθηκε μέσω του συντελεστή απόδοσης της βιομάζας ($Y_{x/S}$) και της παραγωγικότητας του συστήματος σε βιομάζα (P_x) που υπολογίζεται όταν το σύστημα βρίσκεται σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, δηλαδή η αύξηση του μικροοργανισμού και η κατανάλωση του υποστρώματος στο συγκεκριμένο D έχουν σταθεροποιηθεί. Σε ένα σύστημα λοιπόν συνεχούς λειτουργίας που βρίσκεται σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, ο μ ισούται με τον D και η P_x εκφράζεται από τη σχέση:

$$P_x = \mu \cdot x = D \cdot x$$

$$P_x = D \cdot x$$

Παραγωγικότητα της βιομάζας.

$$P_m = D \cdot m$$

$$Y_{x/S} = x/S_{\text{assimilated}}$$

(S = υπόστρωμα-γλυκερόλη)

Οι βιοχημικές αναλύσεις της παραχθείσας βιομάζας στα δείγματα από τις μικτότροφες χημειοστατικές καλλιέργειες του *C. vulgaris* σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L παρουσιάζονται στον **Πίνακα 19**. Για τον υπολογισμό της παραγωγικότητας των μεταβολικών προϊόντων χρησιμοποιούνται οι παρακάτω σχέσεις:

$$P_{Pi} = P_x \cdot Y_{PR}$$

όπου P_{PR} και Y_{PR} είναι η παραγωγικότητα σε πρωτεΐνες και το ποσοστό (% w/w) των πρωτεϊνών στην παραχθείσα βιομάζα.

$$P_L = P_x \cdot Y_L$$

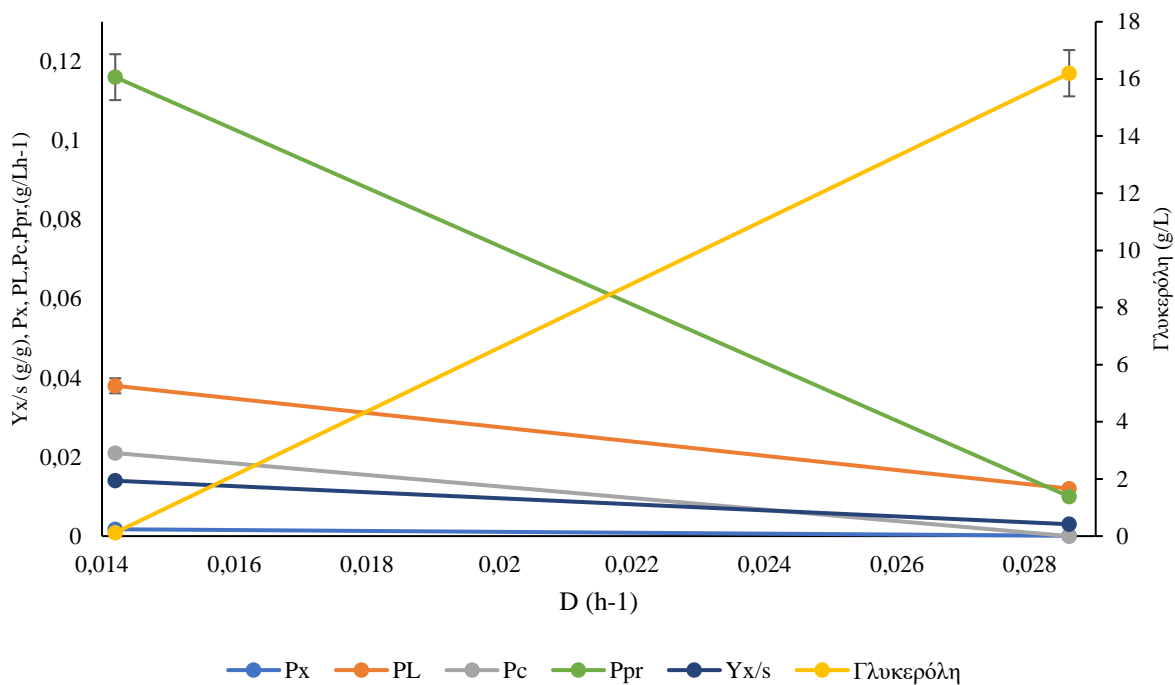
όπου P_L και Y_L είναι η παραγωγικότητα σε λιπίδια και το ποσοστό (% w/w) των λιπιδίων στην παραχθείσα βιομάζα, αντίστοιχα.

$$P_c = P_x \cdot Y_c$$

όπου P_c και Y_c είναι η παραγωγικότητα σε υδατάνθρακες και το ποσοστό (% w/w) των υδατανθράκων στην παραχθείσα βιομάζα, αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 23** στις συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας ο $Y_{x/S}$ και η P_x μειώθηκαν καθώς οι τιμές του D αυξήθηκαν από 0.0142 σε 0.028 h^{-1} και η μέγιστη τιμή P_x (ίση με 0.0017 $g\ l^{-1}h^{-1}$) παρατηρήθηκε στο μικρότερο D . Η καλλιέργεια άρχισε να εκπλένεται όταν το D πήρε τιμή 0.028 h^{-1} . Υπό τις συνθήκες αυτές καλλιέργειας η P_L του συστήματος, σε αντίθεση με την παραγωγικότητα των μεταβολιτών στους υπόλοιπους ρυθμούς αραίωσης που μειώθηκαν αυξανόμενου του D . Παρόλα αυτά η παραγωγικότητα του συστήματος σε πρωτεΐνες (P_{pr}), έλαβε τις υψηλότερες τιμές σε σχέση με τους υπόλοιπους μεταβολίτες. Η σύνθεση λιπαρών οξέων του *C. vulgaris* σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας παρουσιάζεται στον **Πίνακα 19**. Τα λιπίδια που συλλέχθηκαν από τα κύτταρα του μικροφύκου στις περιπτώσεις αυτές ήταν κυρίως ολεϊκό (C18:1, σε ποσοστό 45.41%), λινολεϊκό (C18:2, σε ποσοστό 15.2 %) και παλμιτικό οξύ (C16:0, σε ποσοστό 14.3 %).

Chlorella vulgaris, 30 g/L Γλυκερόλη, C/N=20 Πεπτόνη
Ετερότροφη ανάπτυξη



Γράφημα 23 Κινητική της ετερότροφης αύξησης του *C. vulgaris* σε χημειοστάτη συνεχούς λειτουργίας, σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο 30g/L και πεπτόνη με λόγο C/N=20:1 (•: παραγωγικότητα του συστήματος σε βιομάζα P_x (g L⁻¹ h⁻¹), : συγκέντρωση γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο (g/L), ■: Συντελεστής απόδοσης της βιομάζας Y_{x/s} (g/g)).

Πίνακας 19. Βασικοί παράμετροι κινητικής της ετερότροφης αύξησης του *C. vulgaris* σε χημειοστάτη συνεχούς λειτουργίας με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L. Ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων (% επί της συνολικής μάζας των λιπιδίων) των κυτταρικών λιπιδίων του *C. vulgaris* στις καταστάσεις δυναμικής ισορροπίας της ετερότροφης καλλιέργειάς του σε σύστημα συνεχούς λειτουργίας

	Γλυκερόλη	Βιομάζα	Λιπίδια		Πρωτεΐνες		μ_{max}
h-1	g/L	g/L	g/L	%DW	g/L	%DW	
0.0142	0.122	1.22	0.27	22	0.81	67	0.17
P_x (g l⁻¹ h⁻¹)	P_L (g l⁻¹ h⁻¹)	P_p (g l⁻¹ h⁻¹)	P_c (g l⁻¹ h⁻¹)	Y_L (% w/w)	Y_p (% w/w)	Y_c (% w/w)	$Y_{x/s}$ /Glycons (% w/w)
0.00174	0.038	0.116	00.021	0.14%	0.40%	0.06%	2.40%
P_{chl} (g l⁻¹ h⁻¹)	P_{car} (g l⁻¹ h⁻¹)	Y_{chl} (% w/w)	Y_{car} (% w/w)	K_s	q_s		
0.012	0.018	0.06%	0.09%	11.2	0.365		

Λιπαρά οξέα	D (h-1)
	0.0142
C:12	0.67%
C:14	-
C:16	14.39%
C:16:1	1.66%
C:17	4.40%
C:17:1	2.80%
C18:0	1.70%
C18:1	45.41%
C18:2	15.87%
C18:3	1.11%
C:20	10.65%

3.2 Μικτότροφες συνεχείς καλλιέργειες του μικροφύκου *C. vulgaris* με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός σε βιοαντιδραστήρα:

Στη συνέχεια των πειραματικών δοκιμών για να εξαχθούν ασφαλέστερα αποτελέσματα ως προς την δυναμικότητα του στελέχους κατά την μικτότροφη ανάπτυξη σε μονοχρωματικές πηγές φωτός, το *C. vulgaris* καλλιεργήθηκε σε χημειοστάτη συνεχούς λειτουργίας σε θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη.

3.2.1 Συνεχές σύστημα καλλιέργειας του μικροφύκου *C. vulgaris* με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L σε μονοχρωματική πηγή μπλε φωτός.

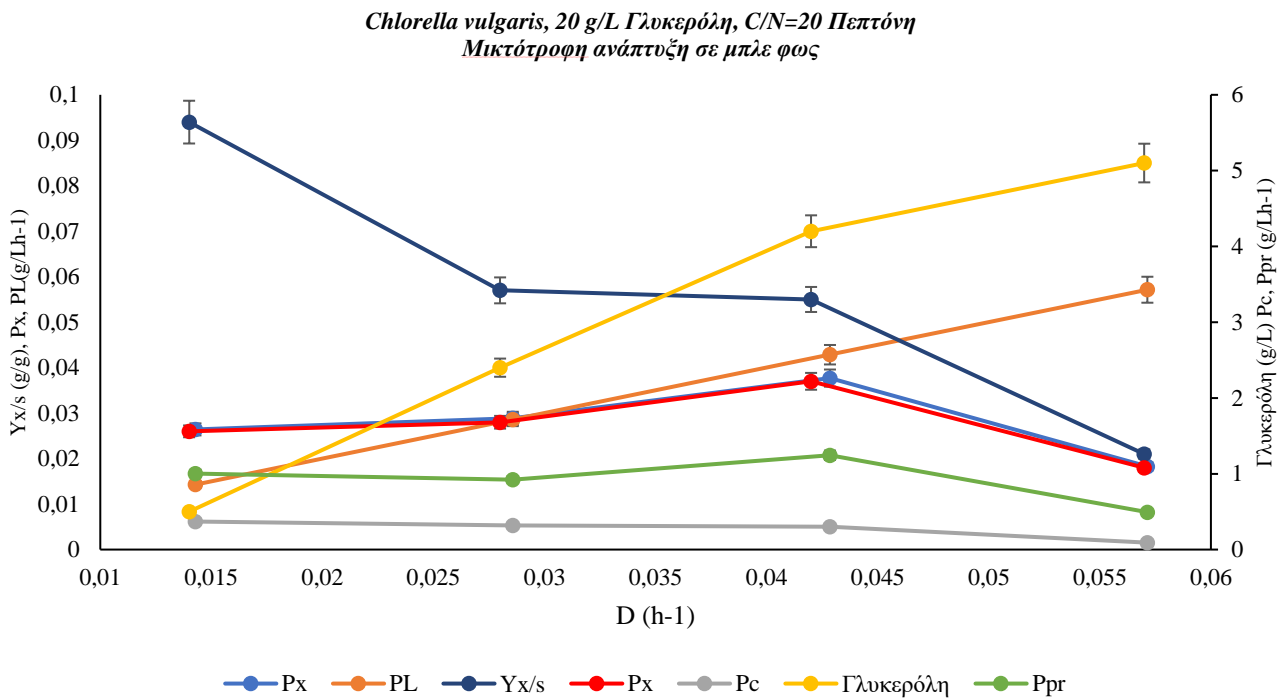
Το *C. vulgaris* καλλιεργήθηκε μικτότροφα σε χημειοστάτη συνεχούς λειτουργίας σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L και πεπτόνη σε λόγο C/N=20/1 με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός χρώματος μπλε που έδειξε και τα καλύτερα αποτελέσματα στις διαλείποντος έργου καλλιέργειες. Οι βασικοί παράμετροι της κυτταρικής αύξησης εκτιμήθηκαν όταν η καλλιέργεια βρισκόταν σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας σε διαφορετικά D (0,014-0,057 h⁻¹).

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 24** ο συντελεστής $Y_{x/s}$ και η P_x του συστήματος διατηρήθηκαν σχεδόν σταθερά στα χαμηλότερα D (0,027-0,08 h⁻¹) και μειώθηκαν δραστικά για μεγαλύτερα D όποτε και η καλλιέργεια οδηγήθηκε σταδιακά σε έκπλυση. Η P_x του συστήματος είχε χαμηλές σχετικά τιμές σε όλα τα D που εφαρμόστηκαν, ενώ η συγκέντρωση της εναπομείνουσας γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο στην κατάσταση δυναμικής ισορροπίας ήταν σε γενικές γραμμές χαμηλή σε σχέση με τα 30 g/L που παρατίθενται παρακάτω, υποδεικνύοντας ότι παρουσία μπλε φωτισμού το μικροφύκος αποκτά τη μέγιστη δυναμικότητα του και μάλιστα στα 20 g/L η γλυκερόλη δεν δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη και δεν προκαλεί τοξικότητα στο μικροοργανισμό. Αντίστοιχα ο συντελεστής $Y_{x/s}$ παρατηρήθηκε υψηλότερος στα χαμηλότερα D συγκριτικά με τον συντελεστή P_x που κυμάνθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα. Το μικτότροφο σύστημα σαφώς έδωσε καλύτερα αποτελέσματα από το ετερότροφο ως προς την παραγωγικότητα και την απόδοση της βιομάζας που ισχύει για όλα τα συστήματα ανάπτυξης στα οποία δοκιμάστηκε το *C. vulgaris*.

Η βιοχημική ανάλυση φαίνεται στον **(Πίνακα 20)**. Το σύστημα παρουσίασε υψηλή απόδοση σε λιπίδια σε σχέση με το ετερότροφο σύστημα που ήταν και το κύριο ενδιαφέρον της συγκεκριμένης δοκιμής. Συγκεκριμένα η μέγιστη παραγωγικότητα των λιπιδίων άγγιξε το $PL=1.183$ (g l⁻¹h⁻¹). Ίδια υψηλά επίπεδα παραγωγικότητας ακολούθησαν και η παραγωγικότητα των πρωτεϊνών αλλά και η παραγωγή υδατανθράκων όπου συγκριτικά με την ετερότροφη παρήχθησαν σχεδόν διπλάσιες ποσότητες.

Η σύνθεση λιπαρών οξέων του *C. vulgaris* σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας στην πρώτη ροή $D=0.0142$ h⁻¹ παρουσιάζεται στον **Πίνακα 20.1**. Τα λιπίδια που συλλέχθηκαν από τα κύτταρα του μικροφύκου στις περιπτώσεις αυτές ήταν κυρίως ολεϊκό (C18:1, σε ποσοστό 50%),

λινολεϊκό (C18:2, σε ποσοστό 12.3%) και παλμιτικό οξύ (C16:0, σε ποσοστό 13.7%). Συγκριτικά με την ετερότροφη ανάπτυξη όπου η παραγωγικότητα των λιπιδίων ήταν σχεδόν η μισή και το ποσοστό των λιπιδίων βιομηχανικού ενδιαφέροντος όπως το C16:0 και το C18:2 τα οποία αξιοποιούνται για την παραγωγή βιοντίζελ, ήταν αυξημένη ενώ απουσίαζε πλήρως η παραγωγή του C20:0. Αναλογικά με την παραγωγικότητα της βιομάζας η μικτότροφη καλλιέργεια είχε υψηλότερη αποδοτικότητα σε κάθε τομέα.



Γράφημα 24: Κινητική αύξησης του *C. vulgaris* κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός μπλε χρώματος σε χημειοστάτη συνεχούς λειτουργίας, σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο 20 g/L και πεπτόνη με λόγο C/N=20:1 (παραγωγικότητα του συστήματος σε βιομάζα ■ P_x (g L⁻¹ h⁻¹), ▲ συγκέντρωση γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο (g/L), Συντελεστής απόδοσης της βιομάζας • $Y_{x/s}$ (g/g).*: παραγωγικότητα σε υδατάνθρακες (P_c) •: παραγωγικότητα σε πρωτεΐνες (P_{pr}) • παραγωγικότητα σε λιπίδια (PL).

Πίνακας 20 Βασικοί παράμετροι της κινητικής κατά τη μικτότροφης αύξησης του *C. vulgaris* σε χημειοστάτη συνεχούς λειτουργίας με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L με χρήση μονοχρωματική πηγής φωτός χρώματος μπλε.

D (h ⁻¹)	Βιομάζα		Γλυκερόλη	Λιπίδια		Πρωτεΐνες		Υδατάνθρακες	
	g/L		g/L	g/L	%DW	g/L	%DW	g/L	%DW
0.01	1.85		0.5	0.814	44	0.703	38	0.259	14
0.03	1.01		2.4	0.411	41	0.323	32	0.111	11
0.04	0.88		4.2	0.281	32	0.29	33	0.07	8
0.06	0.32		5.1	0.035	11	0.086	27	0.016	5
D (h ⁻¹)	Px (g l ⁻¹ h ⁻¹)	PL (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Pp (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Pc (g l ⁻¹ h ⁻¹)	YL (%) (w/w)	Yp (%) (w/w)	Yc (%) (w/w)	Yx/s/Glyc	qs
0.01	0.026428571	1.162	1.004	0.37	4.17%	3.6%	1.3%	0.48%	4.59
0.03	0.028857143	1.183	0.923	0.317	2.3%	1.8%	0.6%	0.32%	7.59
0.04	0.037708	1.2	1.244	0.301	1.7%	1.8%	0.4%	0.35%	7.82
0.06	0.0182848	0.2	0.49	0.091	0.2%	0.5%	0.1%	0.14%	20.3
D (h ⁻¹)	Pchlorophyles	Pcar		Ychl	Year	μmax	Ks		
0.01	0.1	0.192		0.5%	0.9%	0.436	107.07		
0.03	0.07	0.092		0.36%	0.5%				
0.04	0.01	0.021		0.07%	0.1%				
0.06	0.01	0.011		0.05%	0.07%				

Πίνακας 20.1 Ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων (% επί της συνολικής ποσότητας των λιπιδίων) των κυτταρικών λιπιδίων του *C. vulgaris* στην κατάσταση δυναμικής ισορροπίας ($D=0.0142 \text{ h}^{-1}$) κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη του μικροφύκου σε σύστημα συνεχούς λειτουργίας με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης στο υπόστρωμα 20 g/L και μονοχρωματική πηγή φωτός χρώματος μπλε.

Λιπαρά οξέα	Ποσοστό
C:12	0.9 %
C:16	13.57 %
C:17	3.03 %
C:17:1	4.4 %
C18:0	2 %
C18:1	50 %
C18:2	12 %
C18:3	13 %

3.2.2 Συνεχές σύστημα καλλιέργειας του μικροφύκου *C. vulgaris* με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L σε μονοχρωματική πηγή κόκκινου φωτός.

Στη συνέχεια το *C. vulgaris* μελετήθηκε σε σύστημα μικτότροφης ανάπτυξης με χρήση χημειοστάτη συνεχούς λειτουργίας σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L και πεπτόνη έτσι ώστε ο λόγος C/N=20/1. Εξετάστηκαν οι βασικοί παράμετροι της κυτταρικής αύξησης όταν η καλλιέργεια βρισκόταν σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας σε διαφορετικές ροές D (0,014-0,057 h^{-1}).

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 25** ο συντελεστής $Y_{x/s}$ και η P_x του συστήματος διατηρήθηκαν σχεδόν σταθερά στα χαμηλότερα D (0,027-0,08 h^{-1}) και μειώθηκαν δραστικά για $D > 0.04 \text{ h}^{-1}$, όποτε και η καλλιέργεια οδηγήθηκε σταδιακά σε έκπλυση. Η P_x του συστήματος είχε σημαντικά χαμηλότερες τιμές σε σχέση σε όλα τα D που εφαρμόστηκαν, ενώ η συγκέντρωση της εναπομείνουσας γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο στην κατάσταση δυναμικής ισορροπίας ήταν αυξημένη (>10%). Συγκριτικά με την ετερότροφη καλλιέργεια η μικτότροφη, παρά την ύπαρξη

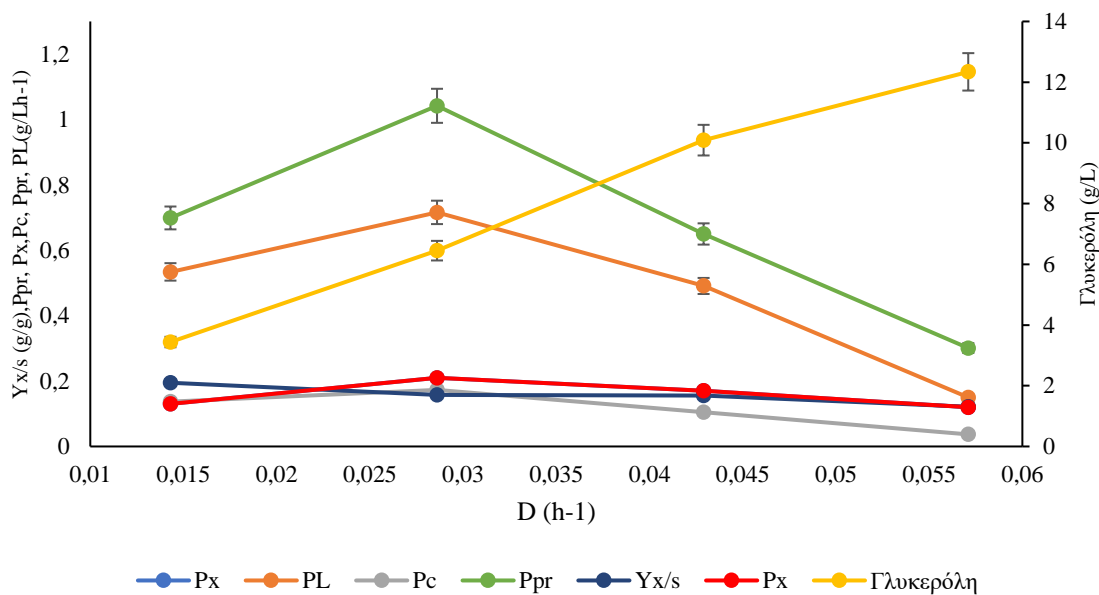
της υψηλής συγκέντρωσης γλυκερόλης στο υπόστρωμα (κοινή παράμετρος τα 30 g/L) παρουσίασε καλύτερη παραγωγικότητα και απόδοση βιομάζας. Βέβαια αν τα αποτελέσματα αυτά συγκριθούν αντίστοιχα με εκείνα που σημειώθηκαν κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη με μπλε φως σε συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L φαίνεται ότι η αποδοτικότητα και η παραγωγή βιομάζας στα 30 g/L συγκέντρωση γλυκερόλης ήταν χαμηλότερη. Αυτό διαπιστώθηκε και από την μειωμένη κατανάλωση της γλυκερόλης στο υπόστρωμα.

Οι βιοχημικές αναλύσεις της παραχθείσας βιομάζας στα δείγματα από τις μικτότροφες χημειοστατικές καλλιέργειες του *C. vulgaris* σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L και χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός χρώματος κόκκινου παρουσιάζονται στον **Πίνακα 21**.

Η συγκέντρωση των μεταβολιτών (λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, χρωστικές) στην παραχθείσα βιομάζα ήταν μειωμένη συγκριτικά με εκείνη από το συνεχές μικτότροφο σύστημα ανάπτυξης σε μπλε φως σε συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L.

Η σύνθεση των λιπαρών οξέων του *C. vulgaris* σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας στις δύο πρώτες ροές $D=0.0142-0.028 \text{ h}^{-1}$ που εφαρμόστηκαν παρουσιάζεται στον **Πίνακα 21.1**. Τα λιπίδια που συλλέχθηκαν από τα κύτταρα του μικροφύκου στις περιπτώσεις αυτές ήταν κυρίως ολεϊκό (C18:1, σε ποσοστό 37-45%), λινολεϊκό (C18:2, σε ποσοστό 8-15) και παλμιτικό οξύ (C16:0, σε ποσοστό 14-28%). Ενδιαφέρον παρουσίασε, όπως και στην ετερότροφη ανάπτυξη η παραγωγή C:20 (9.8%).

Chlorella vulgaris, 30 g/L Γλυκερόλη, C/N=20 Πεπτόνη
Μικτότροφη ανάπτυξη σε κόκκινο φως



Γράφημα 25: Κινητική αύξησης του *C. vulgaris* κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός κόκκινου χρώματος σε χημειοστάτη συνεχούς λειτουργίας, σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο 30 g/L και πεπτόνη με λόγο C/N=20:1 (παραγωγικότητα του συστήματος σε βιομάζα ■ P_x (g L⁻¹ h⁻¹), ▲ συγκέντρωση γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο (g/L), Συντελεστής απόδοσης της βιομάζας • Y_{x/s} (g/g) • παραγωγικότητα σε λιπίδια (PL), •: παραγωγικότητα σε πρωτεΐνες (P_{pr}), •: παραγωγικότητα σε υδατάνθρακες (P_c))

Πίνακας 21. Βασικοί παράμετροι της κινητικής αύξησης κατά τη μικτότροφης ανάπτυξη του *C. vulgaris* σε χημειοστάτη συνεχούς λειτουργίας με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L σε κόκκινο φως.

D	Βιομάζα	Γλυκερόλη	Λιπίδια		Πρωτεΐνες		Υδατάνθρακες	
(h-1)	g/L	g/L	g/L	%DW	g/L	%DW	g/L	%DW
0.0143	0.96	3.44	0.371	39	0.48	51	0.096	10
0.0286	0.76	6.45	0.25	33	0.364	48	0.06	8
0.0429	0.41	10.09	0.11	28	0.151	37	0.024	6
0.0571	0.22	12.34	0.026	12	0.052	24	0.006	3
Παράμετροι παραγωγής βιομάζας								
Px	PL	Pp	Pc	YL	Yp	Yc	Yx/s/Glyc	qs
0.013	0.534	0.699	0.137	1.3%	1.7%	0.3%	0.1%	12.51
0.021	0.716	1.042	0.173	1%	1.5%	0.2%	0.1%	13.51
0.017	0.491	0.650	0.105	0.5%	0.7%	0.1%	0.1%	21.17
0.012	0.150	0.301	0.037	0.1%	0.3%	0.03%	0.07%	34.99
Παράμετροι παραγωγής προϊόντων								
Pchl	Pcar	Ychl	Ycar	μmax	Ks			
0.092	0.112	0.3%	0.4%	0.436	108.01			
0.0450	0.0890	0.4%	0.3%					
0.0220	0.0410	0.2%	0.2%					
0.0110	0.0120	0.07%	0.07%					

Πίνακας 21.1 Ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων (% επί της συνολικής ποσότητας των λιπιδίων) των κυτταρικών λιπιδίων του *C. vulgaris* στις δύο καταστάσεις δυναμικής ισορροπίας της μικτότροφης καλλιέργειας του σε σύστημα συνεχούς λειτουργίας με χρήση βιοαντιδραστήρα ($D_1=0.0142$, $D_2=0.028$).

Λιπαρά οξέα	D (h-1)	
	0.0142	0.028
C:12	0.25%	9.04 %
C:14	-	2.17%
C:16	14.63%	28.8%
C:16:1	1.59%	-
C:17	5.16%	9.93%
C:17:1	2.18%	-
C18:0	2.09%	4.4%
C18:1	45.42%	37.27%
C18:2	15.27%	8.36%
C18:3	0.96%	-
C:20	9.8	-

3.3 Ετερότροφη ανάπτυξη του *A. protothecoides* σε συνεχές χημειοστατικό σύστημα

3.3.1 Ετερότροφες συνεχείς καλλιέργειες του μικροφύκου *A. protothecoides* με χρήση βιοαντιδραστήρα σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ίση με 30 g/L.

Η ετερότροφη αύξηση του *A. protothecoides* σε χημειοστάτη αρχικά εξετάστηκε σε διαφορετικές τιμές του ειδικού ρυθμού αραίωσης σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ίση με 30 g/L. Η ικανότητα αύξησης του μικροφύκου εκτιμήθηκε μέσω του συντελεστή απόδοσης της βιομάζας ($Y_{x/s}$) και της παραγωγικότητας του συστήματος σε βιομάζα (P_x) που υπολογίζεται όταν το σύστημα βρίσκεται σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, δηλαδή

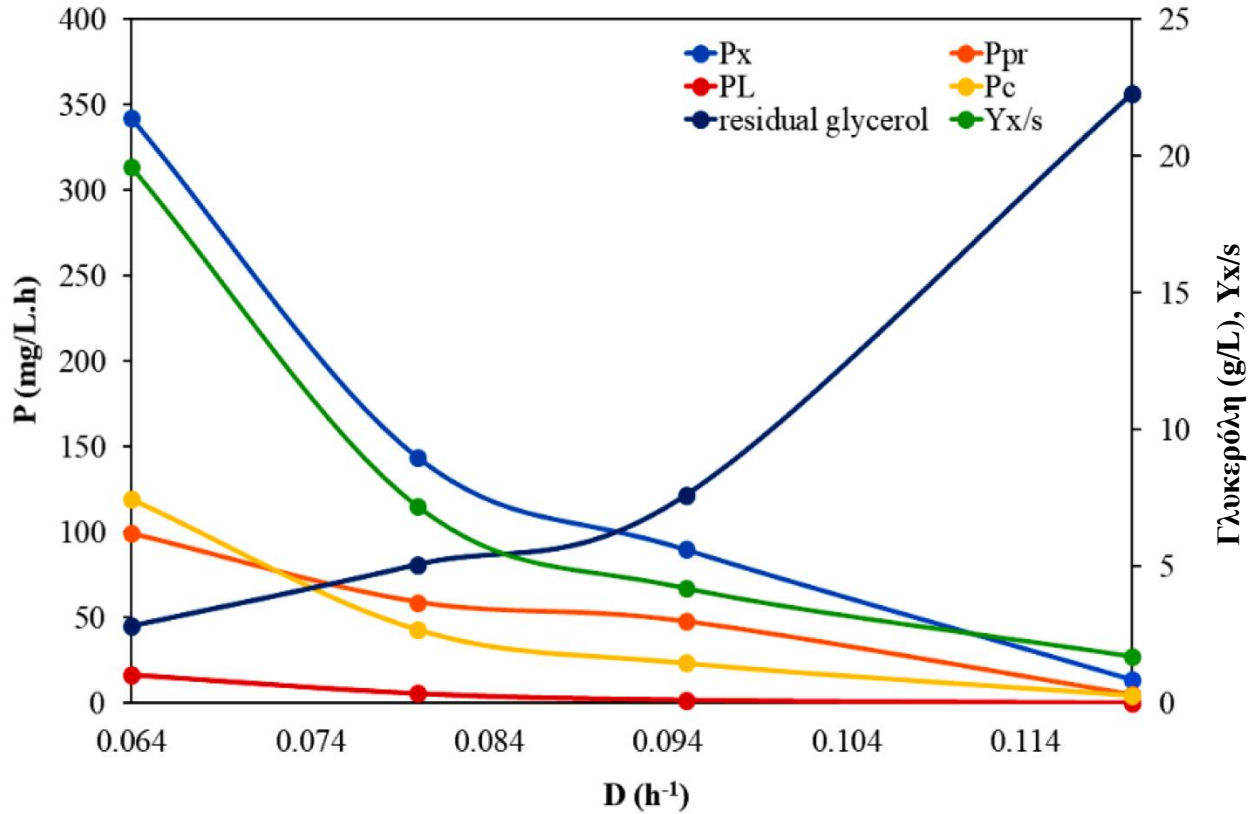
η αύξηση του μικροοργανισμού και η κατανάλωση στου υποστρώματος στο συγκεκριμένο D έχουν σταθεροποιηθεί.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 26** στις συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας ο $Y_{x/s}$ και η P_x μειώθηκαν καθώς οι τιμές του D αυξήθηκαν από 0.064 σε 0.11 h^{-1} και η μέγιστη τιμή P_x (ίση με $0.24 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$) παρατηρήθηκε στο μικρότερο D . Η καλλιέργεια άρχισε να εκπλύνεται όταν το D πήρε τιμές μεγαλύτερες από 0.15 h^{-1} .

Οι βιοχημικές αναλύσεις της παραχθείσας βιομάζας στα δείγματα από τις ετερότροφες χημειοστατικές καλλιέργειες του *A. protothecoides* σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L παρουσιάζονται στον **Πίνακα 22**.

Υπό τις συνθήκες αυτές καλλιέργειας η P_L του συστήματος, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες παραγωγικότητες που μειώθηκαν εξ αρχής αυξανόμενου του D , διατηρήθηκε σχεδόν σταθερή για $D=0,064-0,095 \text{ h}^{-1}$ και μειώθηκε αμέσως μετά δραστικά. Παρόλα αυτά η παραγωγικότητα του συστήματος σε πρωτεΐνες (P_{pr}), αν και μειούμενη με την αύξηση του D , έλαβε τις υψηλότερες τιμές σε σχέση με τους υπόλοιπους μεταβολίτες.

Ετερότροφη Καλλιέργεια 30 g/L Γλυκερόλη



Γράφημα 26. Επίδραση του ρυθμού αραίωσης (D) στην ανάπτυξη του *A. protothecoides* σε ετερότροφες συνθήκες ανάπτυξης με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L. Παρουσιάζεται η πορεία της παραγωγικότητας της βιομάζας (P_x , mg/L·h), της παραγωγικότητα των λιπιδίων (P_L , mg/L·h), παραγωγικότητα πρωτεϊνών (P_{Pr} , mg/L·h), παραγωγικότητα υδατανθράκων (P_C , mg/L·h) καθώς και της εναπομένουσας γλυκερόλης και ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας ($Y_{x/s}$), συναρτήσει του ρυθμού αραίωσης. Το $Y_{x/s}$ έχει εκατονταπλασιαστεί (100 g/g).

Πίνακας 22 Βασικοί παράμετροι κινητικής της ετερότροφης αύξησης του *A. protothecoides* σε χημειοστάτη συνεχούς λειτουργίας με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L

Ετερότροφη Ανάπτυξη σε 30 g/L Γλυκερόλη												
D (h^{-1})	Βιομάζα (x) ¹ (d.w. g/L)	Πρωτεΐνες (g/L)	Πρωτεΐνες ² (% d.w.)	Λιπίδια (g/L)	Λιπίδια ² (% d.w.)	Υδατάνθρακες (g/L)	Υδατάνθρακες ² (% d.w.)	$Y_{x/s}$	P_x (mg/L·h)	P_{Pr} (mg/L·h)	P_L (mg/L·h)	P_c (mg/L·h)
0.064	5.341 ± 0.689	1.549 ± 0.175	29	0.2560 ± 0.0478	4.8	1.8694 ± 0.137	35	0.196	342	99.14	16.38	119.64
0.080	1.800 ± 0.236	0.738 ± 0.159	41	0.0710 ± 0.0210	3.9	0.5400 ± 0.080	30	0.072	144	59.04	5.62	43.2
0.095	0.950 ± 0.122	0.500 ± 0.089	53	0.0193 ± 0.0023	2.0	0.2470 ± 0.061	26	0.042	90	47.7	1.80	23.47
0.120	0.130 ± 0.022	0.046 ± 0.013	35	0.0010 ± 0.0006	0.8	0.0377 ± 0.014	29	0.017	14	4.9	0.10	4.52

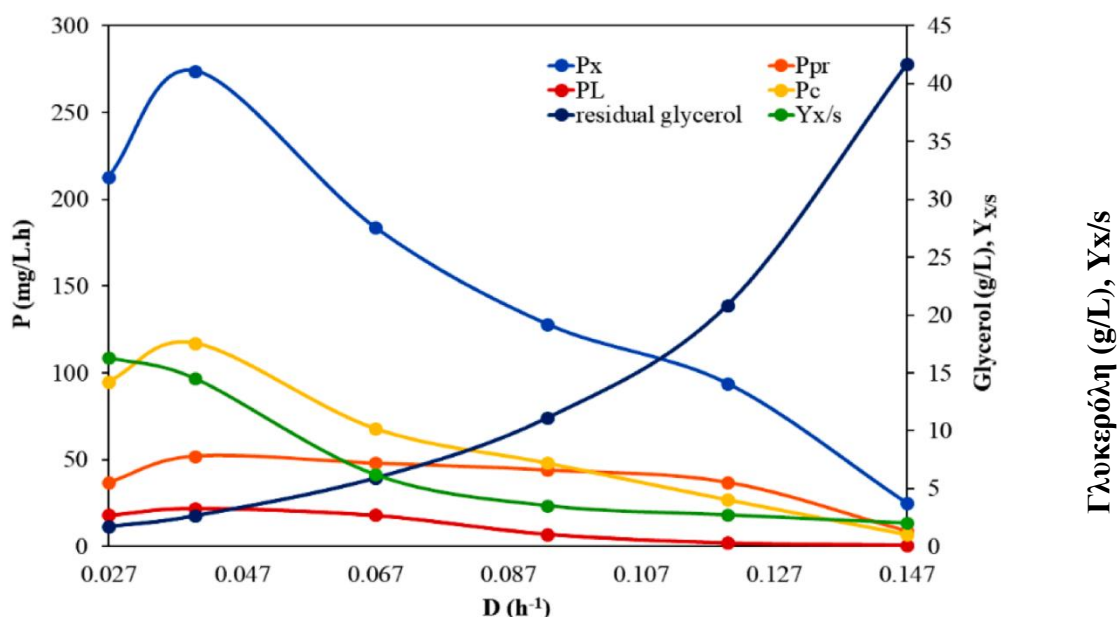
3.3.2 Ετερότροφες συνεχείς καλλιέργειες του μικροφύκου *A. protothecoides* με χρήση βιοαντιδραστήρα σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ίση με 50 g/L.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις ετερότροφες καλλιέργειες διαλείποντος έργου/διαλείποντος έργου του *A. protothecoides* έδειξαν ότι το μικροφύκος μπορεί να αυξάνεται σε θρεπτικό μέσο με μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, Στη συνέχεια ακολούθησε ετερότροφη καλλιέργεια σε χημειοστάτη συνεχούς λειτουργίας με υπόστρωμα 50 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης και πηγή αζώτου πεπτόνη σε λόγο C/N=20. Μελετήθηκε η κινητική της αύξησης του μικροφύκου σε καταστάσεις δυναμικής ισορροπίας που επιτεύχθηκαν σε διαφορετικούς ειδικούς ρυθμούς αραίωσης (από 0.027 ως 0.17 h^{-1} , οπότε και η καλλιέργεια εκπλύθηκε) (**Γράφημα 27**). Ο $Y_{x/s}$ στα χαμηλότερα D (0.027 – 0.040 h^{-1}) ήταν υψηλότερος, ενώ άρχισε να μειώνεται καθώς το D αυξήθηκε πάνω από 0.040 h^{-1} . Σε χαμηλά D καταγράφηκαν και οι μεγαλύτερες τιμές της P_x με την P_{xmax} του συστήματος (ίση με 0.274 $g\ l^{-1}h^{-1}$) να καταγράφεται σε D=0.047 h^{-1} .

Στα δείγματα που ελήφθησαν στις καταστάσεις δυναμικής ισορροπίας στην ετερότροφη χημειοστατική καλλιέργεια συνεχούς λειτουργίας του *A. protothecoides* πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές αναλύσεις της βιομάζας και τα αποτελέσματα δίνονται στον **Πίνακα 23**. Η σύνθεση λιπαρών οξέων του *A. protothecoides* σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας στα διάφορα D που εφαρμόστηκαν παρουσιάζεται στον **Πίνακα 23.1**. Τα λιπίδια που συλλέχθηκαν από τα κύτταρα του μικροφύκου στις περιπτώσεις αυτές ήταν κυρίως ολεϊκό (C18:1, σε ποσοστό 46,1 - 66,7 %), λινολεϊκό (C18:2, σε ποσοστό 14,0-23,7 %) και παλμιτικό οξύ (C16:0, σε ποσοστό 11,8 -15,9 %).

Για την εκτίμηση της ποιότητας των κυτταρικών πρωτεϊνών του μικροφύκου πραγματοποιήθηκε ανάλυση του προφίλ των αμινοξέων των πρωτεϊνών σε όλες τις καταστάσεις δυναμικής ισορροπίας της καλλιέργειας ($D_1=0.027 \text{ h}^{-1}$, $D_2=0.040 \text{ h}^{-1}$, $D_3=0.067 \text{ h}^{-1}$, $D_4=0.093 \text{ h}^{-1}$, $D_5= 0.120 \text{ h}^{-1}$ $D_6=0.147 \text{ h}^{-1}$) (**Πίνακας 23.2**). Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν βρέθηκαν αυξημένες ποσότητες αργινίνης (6,7-21,3%) και γλουταμινικού οξέος (10,8-17,4%), αλανίνης (6,3-10,7%), λυσίνης (4,1-11,8%), ασπαραγινικού οξέος (5,4-10,2%) και λευκίνης (6,2-9,9%). Σε μικρότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν η σερίνη, γλυκίνη, θρεονίνη, προλίνη, βαλίνη, ισολευκίνη και φαινυλαλανίνη, υδροξυπρολίνη, ιστιδίνη, τυροσίνη, μεθειονίνη και κυστεΐνη. Οι διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων των διαφόρων αμινοξέων στα κύτταρα του *A. protothecoides* αυξανόμενου του D δεν ήταν σημαντικές, εκτός από την περίπτωση της αργινίνης η συγκέντρωση της οποίας αυξήθηκε στα μεγαλύτερα D , ενώ ήταν μεγαλύτερη στο ρυθμό αραίωσης $D=0.120 \text{ h}^{-1}$.

Ετερότροφη Καλλιέργεια 50 g/L Γλυκερόλη



Γράφημα 27. Επίδραση του ρυθμού αραίωσης (D) στην ανάπτυξη του *A. protothecoides* σε ετερότροφες συνθήκες ανάπτυξης με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L. Παρουσιάζεται η πορεία της παραγωγικότητας της βιομάζας (P_x , mg/L·h), της παραγωγικότητας των λιπιδίων (P_L , mg/L·h), παραγωγικότητα πρωτεϊνών (P_{Pr} , mg/L·h), παραγωγικότητα υδατανθράκων (P_c , mg/L·h) καθώς και της εναπομένουσας γλυκερόλης και ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας ($Y_{x/s}$), συναρτήσει του ρυθμού αραίωσης. Το $Y_{x/s}$ έχει εκατονταπλασιαστεί (100 g/g).

Πίνακας 23 Βασικοί παράμετροι κινητικής της ετερότροφης αύξησης του *A. protothecoides* σε χημειοστάτη συνεχούς λειτουργίας με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L

Ετερότροφη ανάπτυξη 50 g/L Γλυκερόλη												
D (h ⁻¹)	Βιομάζα (×) ¹ (d.w. g/L)	Πρωτεΐνες (g/L)	Πρωτεΐνες ² (% d.w.)	λιπίδι (g/L)	λιπίδια ² (% d.w.)	Υδατάνθρακ. (g/L)	Υδατάνθρακ. ² (% d.w.)	$Y_{x/s}$	P_x (mg/L·h)	P_{Pr} (mg/L·h)	P_L (mg/L·h)	P_c (mg/L·h)
0.027	7.888 ± 1.072	1.36 ± 0.13	17.2	0.670 ± 0.088	3.5	3.518 ± 0.206	44.6	0.163	212.98	36.72	18.09	94.99
0.040	6.850 ± 1.168	1.31 ± 0.16	19.1	0.548 ± 0.077	4.5	2.925 ± 0.241	42.7	0.144	274.00	52.40	21.92	117.00
0.067	2.750 ± 0.923	0.72 ± 0.15	26.2	0.270 ± 0.042	9.8	1.015 ± 0.175	36.9	0.062	184.25	48.24	18.09	68.00
0.093	1.380 ± 0.259	0.47 ± 0.12	34.4	0.080 ± 0.016	5.8	0.520 ± 0.147	37.7	0.035	128.34	43.71	7.44	48.36
0.120	0.780 ± 0.085	0.31 ± 0.07	40.0	0.017 ± 0.005	2.2	0.229 ± 0.041	29.4	0.027	93.60	37.20	2.04	27.48
0.147	0.167 ± 0.020	0.06 ± 0.01	35.0	0.004 ± 0.001	2.4	0.050 ± 0.013	30.2	0.020	24.55	8.82	0.59	7.35

Πίνακας 23.1. Ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων (% ποσοστό των παραγόμενων λιπιδίων) των κυτταρικών λιπιδίων του *A. protothecoides* στις καταστάσεις δυναμικής ισορροπίας της ετερότροφης καλλιέργειάς του σε σύστημα συνεχούς λειτουργίας.

Λιπαρά οξέα	D (h ⁻¹)					
	0.027	0.040	0.067	0.093	0.120	0.147
C8:0	-	-	-	1.8	-	-
C10:0	-	-	0.2	2.5	-	-
C12:0	-	-	0.2	1.9	-	-
C14:0	1.5	1.7	1.4	1.5	1.8	1.7
C16:0	12.0	13.4	12.3	11.8	12.6	15.9
C16:1	0.6	0.6	1.2	0.6	-	5,5
C17:0	-	-	-	0,6	-	2,0
C18:0	2.7	3.2	2.7	2.0	2.3	2.3
C18:1	66.7	59.7	61.5	46.1	55.2	47.6
C18:2	14.0	19.9	18.1	17.3	23.7	22.4
C18:3	1.2	0.8	1.0	6.2	4.4	2.6
C20:0	0.7	0.5	1.0	1.7	-	-
C20:1	0.4	0.2	0.2	6.0	-	-
C22:0	0.2	-	0.2	-	-	-

Πίνακας 23.2. Ανάλυση του προφίλ των αμινοξέων (% ποσοστό των παραγόμενων των πρωτεϊνών) των κυτταρικών πρωτεϊνών του *A. protothecoides* στις καταστάσεις δυναμικής ισορροπίας της ετερότροφης καλλιέργειας του σε σύστημα συνεχούς λειτουργίας.

Αμινοξέα	D (h ⁻¹)					
	0.027	0.040	0.067	0.093	0.120	0.147
HyPro	1.3	1.1	1.1	0.9	0.6	0.2
His	2.2	2.3	2.4	2.1	1.6	2.1
Tau	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ser	4.9	5.1	4.7	4.4	2.9	3.6
Arg	6.7	6.8	7.9	10.6	21.3	16.2
Gly	7.2	6.8	6.8	6.2	4.6	5.8
Asp	10.2	9.5	9.5	8.6	5.4	8.5
Glu	12.5	12.1	11.6	10.8	15.9	17.4
Thr	5.6	6.2	5.3	4.8	3.2	4.1
Ala	9.7	10.7	9.3	8.7	6.3	7.7
Pro	5.9	6.1	6.2	6.2	4.7	4.3
Cys	0.3	0.3	0.2	0.4	0.2	0.2
Lys	4.1	5.1	7.2	9.5	11.8	6.1
Tyr	2.6	2.5	2.7	2.9	3.2	2.2
Met	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1.6
Val	7.2	6.5	6.5	6.6	4.1	5.3
Ile	4.4	4.1	4.1	3.7	2.6	3.6
Leu	9.9	9.7	9.3	8.6	6.2	7.6
Phe	4.4	4.2	4.3	4.1	4.5	3.5

3.3.3 Μικτότροφη συνεχής καλλιέργεια του μικροφύκου *A. protothecoides* με χρήση βιοαντιδραστήρα σε μονοχρωματική πηγή φωτός κόκκινου χρώματος με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ίση με 30 g/L.

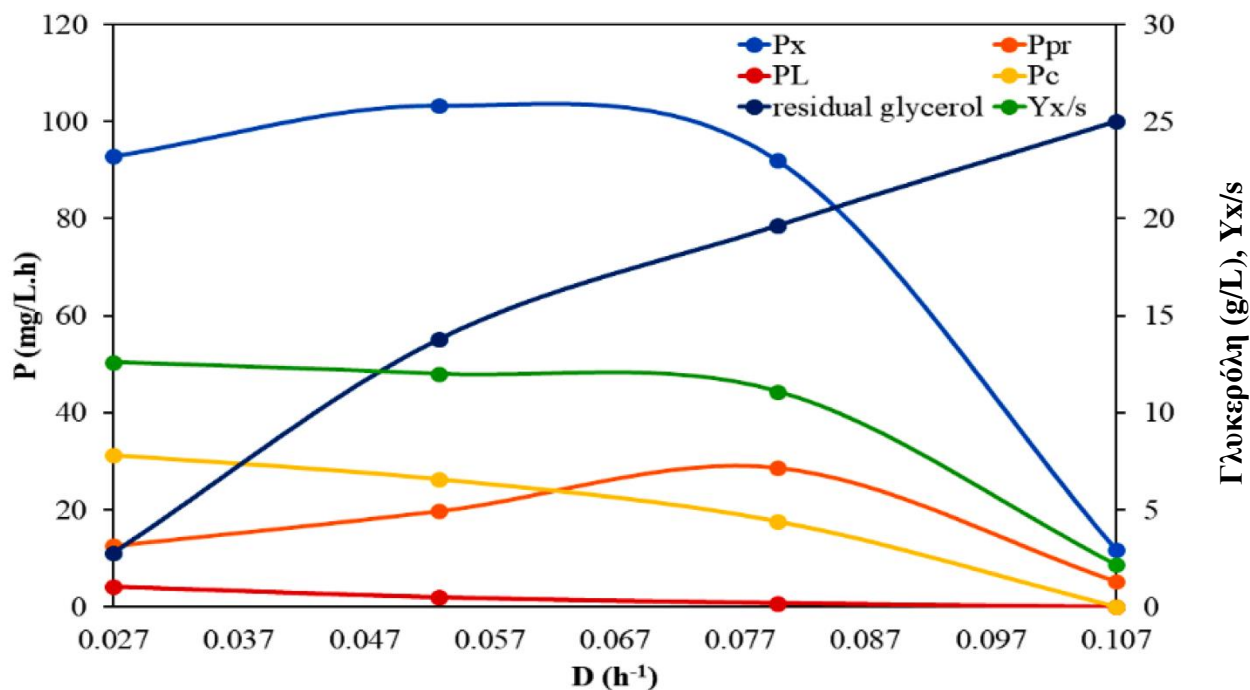
Με βάση τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν κατά την ανάπτυξη του μικροφύκου *A. protothecoides* στα προηγούμενα διαλείποντος και ημιδιαλείποντος έργου, το *A. protothecoides* καλλιεργήθηκε σε χημειοστάτη μικτότροφης ανάπτυξης με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός κόκκινου χρώματος σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L και πεπτόνη σε λόγο C/N=20. Βασικοί παράμετροι της κυτταρικής αύξησης εξετάστηκαν όταν η καλλιέργεια βρισκόταν σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας σε διαφορετικά D (0.27-0.107 h⁻¹). Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 28** ο συντελεστής $Y_{x/s}$ και η P_x του συστήματος διατηρήθηκαν σχεδόν σταθερά στα χαμηλότερα D (0.027-0.08 h⁻¹) και μειώθηκαν δραστικά για D>0.08 h⁻¹, όποτε και η καλλιέργεια οδηγήθηκε σταδιακά σε έκπλυση. Η P_x του συστήματος είχε σημαντικά χαμηλότερες τιμές σε σχέση με την αντίστοιχη της ετερότροφης καλλιέργειας του μικροφύκου στην ίδια αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης σε όλα τα D που εφαρμόστηκαν, ενώ η συγκέντρωση της εναπομένουσας γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο στην κατάσταση δυναμικής ισορροπίας ήταν σε γενικές γραμμές αυξημένη (>10%). Βασικοί παράμετροι της κυτταρικής αύξησης και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων εξετάστηκαν όταν η καλλιέργεια βρισκόταν σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας σε διαφορετικά D (0.27-0.107 h⁻¹).

Κατά την αύξηση του *A. protothecoides* υπό συνθήκες μικτότροφης αύξησης παρατηρήθηκε μείωση των τιμών παραγωγικότητας του συστήματος για τους παραγόμενους μεταβολίτες που μετρήθηκαν, (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια), όπως και για την P_x . Συγκεκριμένα για την P_{Pr} , παρατηρήθηκε αύξησή της αυξανόμενου του D όταν αυτό βρισκόταν σε εύρος 0.027-0.08 h⁻¹, έλαβε μάλιστα μέγιστη τιμή (2,8 g L⁻¹ h⁻¹) σε D=0,08 h⁻¹, πέρα από το οποίο ξεκίνησε να μειώνεται. Με δεδομένο ότι οι πρωτεΐνες αποτελούν πρωτογενή μεταβολίτη άρρηκτα συνδεδεμένο με την κυτταρική αύξηση, η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με το γεγονός ότι και η P_x , διατηρήθηκε σχεδόν σταθερή μέχρι το συγκεκριμένο D.

Το προφίλ των λιπαρών οξέων στις καταστάσεις δυναμικής ισορροπίας στα διάφορα D που εφαρμόστηκαν στη μικτότροφη αυτή χημειοστατική καλλιέργεια ήταν παρόμοιο με εκείνο που υπολογίστηκε όταν το μικροφύκος καλλιεργήθηκε ετερότροφα σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ίση με 50 g/L (**Πίνακας 24.1**). Έτσι, και στην περίπτωση αυτή τα λιπίδια που προσδιορίστηκαν σε μεγαλύτερα ποσοστά ήταν κυρίως το ολεϊκό (46.5-69%) και το λινολεϊκό (14.7-24.3%) και το παλμιτικό (10.9-12.7%).

Αναλύοντας το προφίλ των αμινοξέων στο πρωτεϊνικό κλάσμα του *A. protothecoides* παρατηρούμε ότι και στην περίπτωση των αμινοξέων ο διαφορετικός τρόπος μεταβολισμού του μικροφύκους δεν φαίνεται να επηρεάζει το είδος των αμινοξέων που συντίθενται (**Πίνακας 24.2**). Και στην περίπτωση της μικτότροφης ανάπτυξης απαντώνται σε ίδια ποσοστά τα αντίστοιχα αμινοξέα που καταγράφηκαν και στην ετερότροφη ανάπτυξη του μικροφύκους. Οι ποσότητες που καταγράφηκαν αργινίνης (6.5-23.2%), γλουταμινικού οξέος (11.4-17.4%), αλανίνη (6.1-9.7%), λυσίνη (3.5-10.2%), ασπαραγινικό οξύ (5.8-10%) , λευκίνη (7.1-10.1%), και σε μειωμένα ποσοστά σερίνη, γλυκίνη, θρεονίνη, προλίνη, βαλίνη, ισολευκίνη, φαινυλαλανίνη, υδροξυπρολίνη, ιστιδίνη, τυροσίνη, μεθειονίνη και κυστεΐνη. Υπό συνθήκες μικτότροφης αύξησης τα ποσοστά των διαφόρων αμινοξέων δεν διέφεραν σημαντικά στα διάφορα D που εφαρμόστηκαν εκτός από την περίπτωση της αργινίνης, η οποία σε μεγαλύτερα D και ειδικά σε $D=0.107\text{h}^{-1}$ μετρήθηκε σε ποσοστό 23.2% στο πρωτεϊνικό κλάσμα.

Μικτότροφη Καλλιέργεια 30 g/L Γλυκερόλη



Γράφημα 28: Επίδραση του ρυθμού αραιώσης (D) στην ανάπτυξη του *A. protothecoides* σε μικτότροφες συνθήκες ανάπτυξης σε μονοχρωματική πηγή φωτός κόκκινου χρώματος με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L. Παρουσιάζεται η πορεία της παραγωγικότητας της βιομάζας (•P_x, mg/L·h), της παραγωγικότητας των λιπιδίων (•P_L, mg/L·h), παραγωγικότητα πρωτεϊνών (•P_{pr}, mg/L·h), παραγωγικότητα υδατανθράκων (•P_c, mg/L·h) καθώς και της • εναπομένουσας γλυκερόλης και ο

συντελεστής απόδοσης βιομάζας • ($Y_{x/s}$), συναρτήσει του ρυθμού αραίωσης. Το $Y_{x/s}$ έχει εκατονταπλασιαστεί (100 g/g).

Πίνακας 24. Βασικές παράμετροι κινητικής της μικτότροφης αύξησης με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός κόκκινου χρώματος του *A. protothecoides* σε χημειοστάτη συνεχούς λειτουργίας με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L

Mixotrophic Growth 30 g/L glycerol												
D (h ⁻¹)	Βιομάζα (×) ¹ (d.w. g/L)	Πρωτεΐνες (g/L)	Πρωτεΐνες ² (% d.w.)	Λιπίδια (g/L)	Λιπίδια ² (% d.w.)	Υδατάνθρακες (g/L)	Υδατάνθρακες ² (% d.w.)	$Y_{x/s}$	P_x (mg/L·h)	P_{Pr} (mg/L·h)	P_L (mg/L·h)	P_c (mg/L·h)
0.027	3.44 ± 0.397	0.46440 ± 0.0352	13.50	0.15136 ± 0.0367	4.40	1.162 ± 0.158	33.78	0.126	92.88	12.54	4.09	31.37
0.053	1.95 ± 0.132	0.37226 ± 0.02665	19.09	0.03705 ± 0.01078	1.90	0.498 ± 0.173	25.54	0.120	103.35	19.73	1.96	26.39
0.080	1.15 ± 0.229	0.35892 ± 0.02692	31.21	0.00978 ± 0.00238	0.85	0.221 ± 0.033	19.26	0.111	92.00	28.71	0.78	17.68
0.107	0.11 ± 0.035	0.04890 ± 0.00593	44.45	0.00018 ± 0.00005	0.16	0	0	0.022	11.77	5.23	0.019	

Πίνακας 24.1. Ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων (% επί της συνολικής συγκέντρωσης των λιπιδίων) των κυτταρικών λιπιδίων του *A. protothecoides* στις καταστάσεις δυναμικής ισορροπίας της μικτότροφης καλλιέργειας με κόκκινο φως σε σύστημα συνεχούς λειτουργίας.

Λιπαρά οξέα	D (h ⁻¹)			
	0.027	0.053	0.080	0.107
C 8:0	-	-	-	-
C 10:0	-	-	-	-
C 12:0	-	-	-	1.8
C 14:0	1.2	1.4	1.1	3.8
C 16:0	10.9	11.0	11.0	12.7
C 16:1	0.4	0.4	0.4	1.5
C 17:0	-	-	-	1.2
C 18:0	1.5	1.4	2.8	2.7
C 18:1	69.0	64.1	65.1	46.5
C 18:2	14.7	18.8	17.4	24.3
C 18:3	1.7	2.3	2.2	5.5
C 20:0	0.3	0.3	-	-
C 20:1	0.2	0.2	-	-
C 22:0	0.1	-	-	-

Πίνακας 24.2. Ανάλυση του προφίλ των αμινοξέων (% επί της συνολικής συγκέντρωσης των πρωτεϊνών) των κυτταρικών πρωτεϊνών του *A. protothecoides* στις καταστάσεις δυναμικής ισορροπίας της μικτότροφης καλλιέργειάς του με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός κόκκινου χρώματος σε σύστημα συνεχούς λειτουργίας.

Αμινοξέα	D (h ⁻¹)			
	0.027	0.053	0.080	0.107
HyPro	1.2	1.0	0.9	0.5
His	2.3	2.3	1.9	1.5
Tau	ND	ND	ND	ND
Ser	5.0	4.8	3.7	2.7
Arg	6.5	8.4	15.6	23.2
Gly	6.9	6.6	5.7	4.2
Asp	10.0	9.3	7.4	5.8
Glu	12.7	11.4	11.6	17.4
Thr	5.8	5.3	4.1	3.1
Ala	9.7	9.2	8.1	6.1
Pro	5.8	5.9	5.6	4.3
Cys	0.2	0.3	0.3	0.2
Lys	3.5	7.1	10.2	8.8
Tyr	2.7	2.8	3.1	2.6
Met	1.2	1.0	1.1	1.1
Val	7.3	6.9	5.4	4.2
Ile	4.6	4.1	3.2	2.8
Leu	10.1	9.4	7.7	7.1
Phe	4.5	4.2	4.4	4.4

3.4 Συγκριτικά αποτελέσματα της αύξησης σε συστήματα συνεχούς καλλιέργειας με τη χρήση βιοαντιδραστήρα

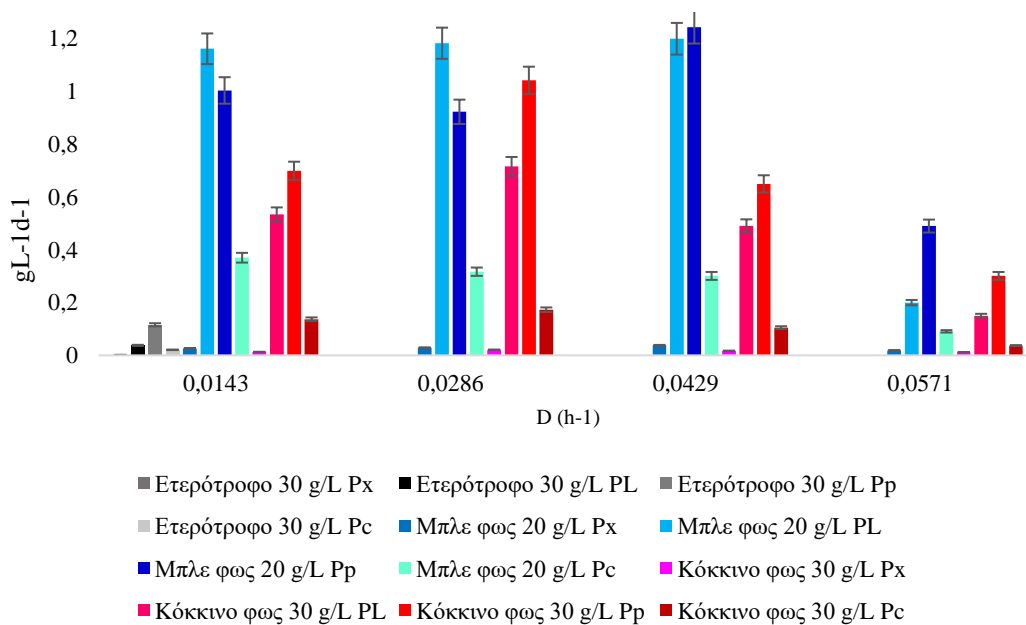
Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν σχετικά, με την ανάπτυξη των μικροφυκών *A. protothecoides* και *C. vulgaris* σε ετερότροφες και μικτότροφες συνθήκες ανάπτυξης με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα.

Το *C. vulgaris* αναπτύχθηκε αποτελεσματικότερα σε αρχική συγκέντρωση 20 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη με χρήση μονοχρωματικής πηγής μπλε φωτός σε σχέση με την μικτότροφη ανάπτυξη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/L γλυκερόλης με

μονοχρωματική πηγή φωτός κόκκινου φωτός και σε σχέση με την ετερότροφη ανάπτυξη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/L ακατέργαστη γλυκερόλη. Στο (Γράφημα 29.1) παρουσιάζονται οι παραγωγικότητες της βιομάζας και των παραγόμενων μεταβολιτών σε σύγκριση μεταξύ του ετερότροφου και των μικτότοφων συστημάτων ανάπτυξης και (Γράφημα 29.2) παρουσιάζεται συγκριτικά το ποσοστό της περιεκτικότητας των λιπαρών οξέων στο κλάσμα των παραγόμενων λιπιδίων σε σύγκριση μεταξύ του ετερότροφου και των μικτότοφων συστημάτων ανάπτυξης.

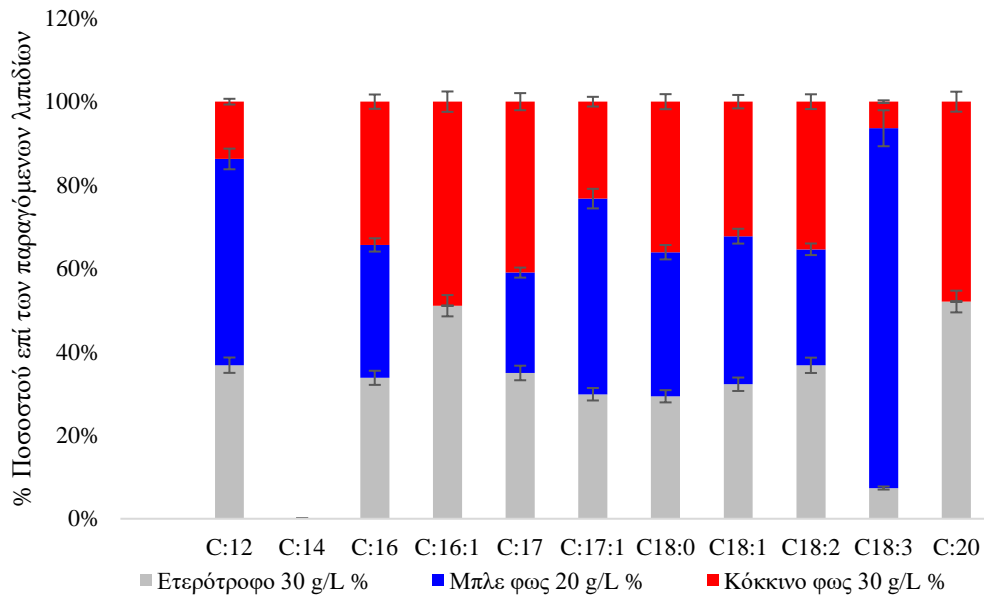
Στο (Γράφημα 29.3) φαίνεται το σύνολο της παραγωγικότητας του μικροφύκου *A. protothecoides* σε συνεχές σύστημα καλλιέργειας όπου παρουσιάζεται η συνολική παραγωγικότητα των μεταβολιτών σε συνθήκες ετερότροφης και μικτότροφης ανάπτυξης. Στο (Γράφημα 29.4) παρουσιάζεται το ποσοστό της παραγωγής των αμινοξέων στο κλάσμα της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που παράχθηκαν σε συνθήκες ετερότροφης και μικτότροφης ανάπτυξης. Στο (Γράφημα 29.5) παρουσιάζεται συγκριτικά το ποσοστό της περιεκτικότητας των λιπαρών οξέων στο κλάσμα των παραγόμενων λιπιδίων σε συνθήκες ετερότροφης και μικτότροφης ανάπτυξης.

C. vulgaris Παραγωγικότητες συστημάτων



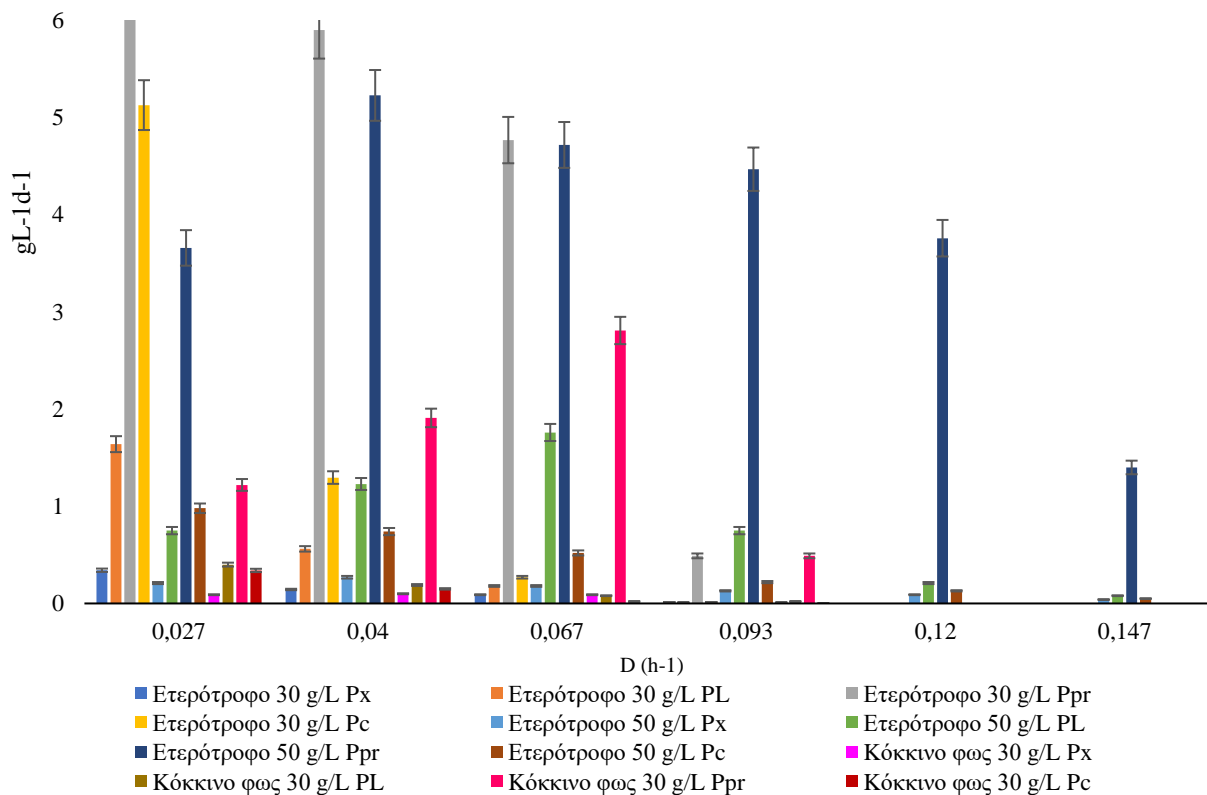
Γράφημα 29.1 Συνολική παραγωγικότητα των συνεχών συστημάτων του μικροφύκου *C. vulgaris* με τη χρήση βιοαντιδραστήρα κατά την ετερότροφη ανάπτυξη με συγκέντρωση 30 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης και τη μικτότροφο ανάπτυξη του μικροφύκου με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός μπλε χρώματος σε συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L και κόκκινου χρώματος σε συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L.

Σύσταση Λιπαρών οξέων



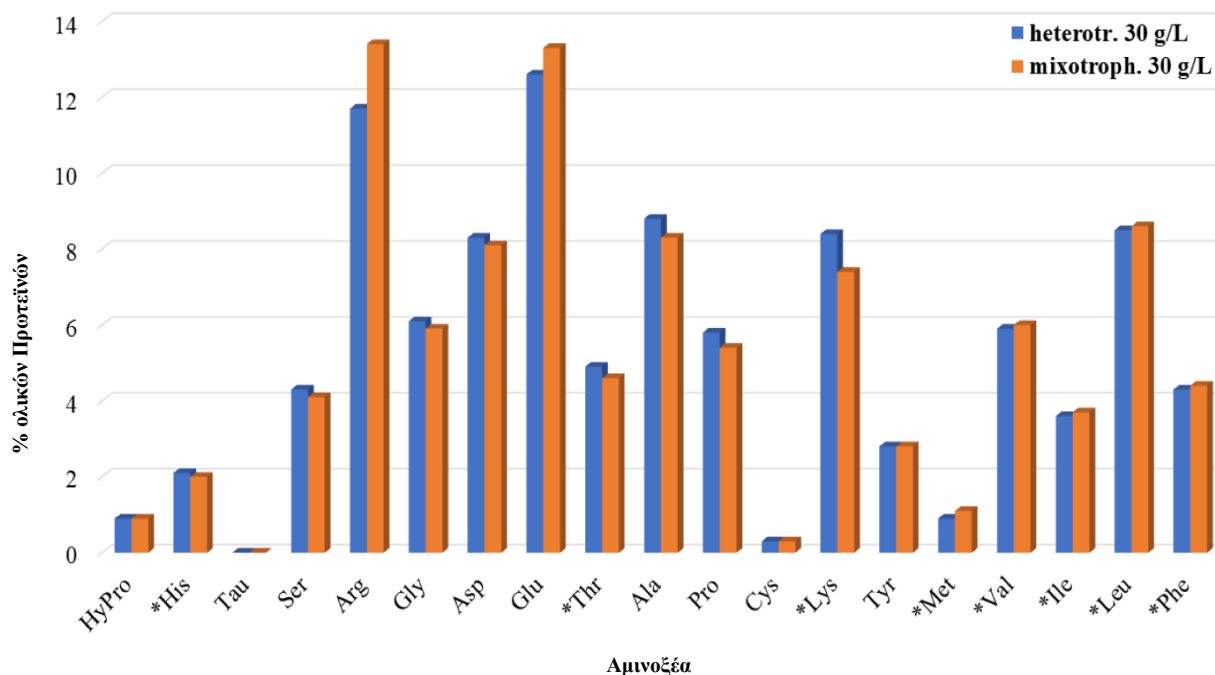
Γράφημα 29.1 Ανάλυση του ποσοστού του προφίλ των λιπιδίων στο κλάσμα των παραγομένων λιπιδίων του μικροφύκου *C. vulgaris* με βιοαντιδραστήρα κατά την ετερότροφη ανάπτυξη με συγκέντρωση 30 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης και τη μικτότροφη ανάπτυξη του μικροφύκου με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός μπλε χρώματος σε συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L και κόκκινου χρώματος σε συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L.

A. protothecoides Παραγωγικότητες συστημάτων

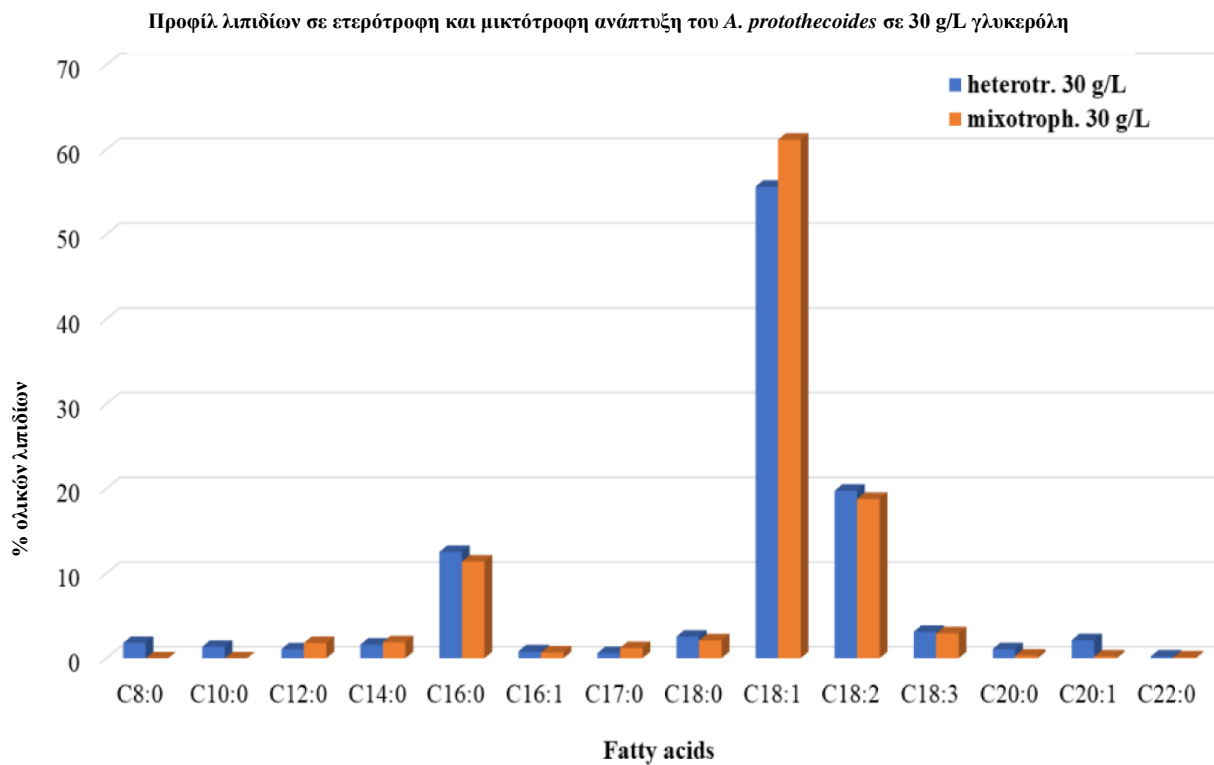


Γράφημα 29.3 Συνολική παραγωγικότητα των συνεχών συστημάτων του μικροφύκου *A. protothecoides* με τη χρήση βιοαντιδραστήρα κατά την ετερότροφη ανάπτυξη με συγκέντρωση 30 g/L και 50 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης και τη μικτότροφοση ανάπτυξη του μικροφύκου με χρήση μονοχρωματικής κόκκινου χρώματος σε συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L.

Προφίλ Αμινοξέων σε ετερότροφη και μικτότροφη ανάπτυξη του *A. protothecoides* σε 30 g/L γλυκερόλη



Γράφημα 29.4 Ανάλυση του ποσοστού του προφίλ των αμινοξέων στο κλάσμα των παραγομενων πρωτεϊνών του μικροφύκου *A. protothecoides* με βιοαντιδραστήρα κατά την ετερότροφη ανάπτυξη με συγκέντρωση 30 g/L και 50 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης και τη μικτότροφοφη ανάπτυξη του μικρόφικου με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός κόκκινου χρώματος σε συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L. Τα απαραίτητα αμινοξέα για τη διατροφή του ανθρώπου υποδεικνύονται με έναν αστερίσκο.

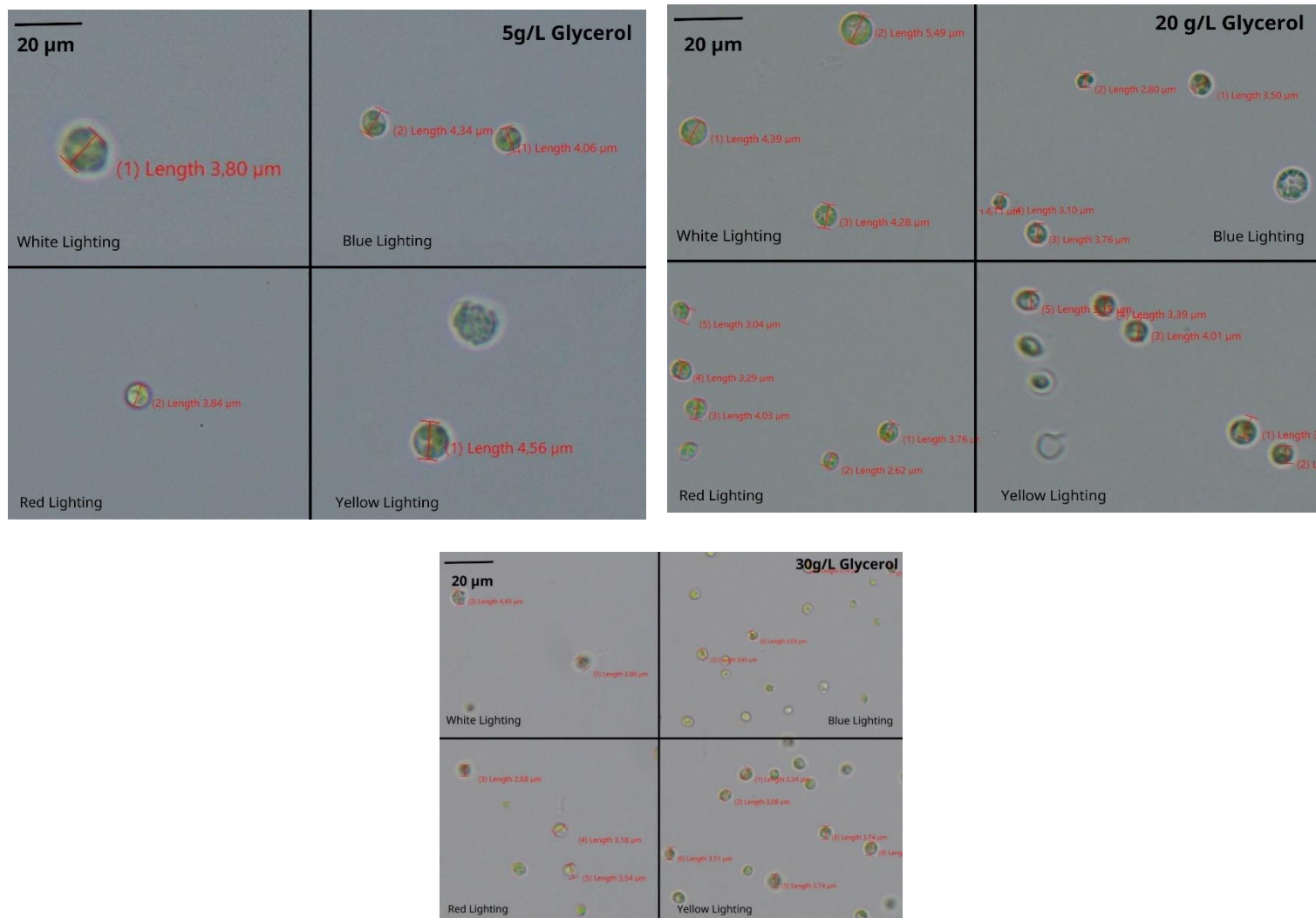


Γράφημα 29.5 Ανάλυση του ποσοστού του προφίλ των λιπαρών οξέων στο κλάσμα των παραγομενων λιπιδίων του μικροφύκου *A. protothecoides* με βιοαντιδραστήρα κατά την ετερότροφη ανάπτυξη με συγκέντρωση 30 g/L και 50 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης και τη μικτότροφοφη ανάπτυξη του μικρόφύκου με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός κόκκινου χρώματος σε συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L.

4. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΕ ΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

4.1 *C. vulgaris*:

Το *C. vulgaris* σαν γένος αποτελείται μονά κοκκοειδή αυτοσπορικά κύτταρα και η ταξινόμηση βασίζεται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά (σχήμα χλωροπλαστών, αριθμός πυρηνοειδών, κλπ.). Η κατάταξη βασίζεται κυρίως στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και τη δομή του. Η παρατήρηση έγινε σε x100 μεγέθυνση. Στην **Εικόνα 1** σε κλίμακα 20 μm παρουσιάζονται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των μικροφυκών (οι διαστάσεις των κυττάρων και η προσαρμογή του φαινότυπου σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (10, 20 και 30 g/L) και σε διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός). Συγκεκριμένα το μέσο μέγεθος των κυττάρων κυμαίνεται από 5-10 μm. Κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση σημειώθηκαν μικροδιαφορές ως προς το μέγεθος των κυττάρων καθώς το *C. vulgaris* δεν χαρακτηρίζεται από την ευπλαστότητα στη μορφολογία του. Συγκεκριμένα τα κύτταρα παρατηρήθηκαν μικρότερα από όσο αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Από τα αποτελέσματα της βιοχημικής σύστασης του μικροοργανισμού παρατηρήθηκε ότι η αλλαγή του μήκους κύματος φωτός μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση διαφορετικών μεταβολικών μονοπατιών και παρεμπόδιση άλλων. Έτσι μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα κύτταρα παρατηρούνται μικρότερα εξαιτίας του στρες που προκλήθηκε από την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στο υπόστρωμα και η συσσώρευση των λιπιδίων ενεργοποιήθηκε από την επώαση σε κόκκινο φως. Μεγαλύτερα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε λευκό φως (5.49μm) και μικρότερα κύτταρα σημειώθηκαν σε ανάπτυξη με μπλε φωτισμό 3.62μm.

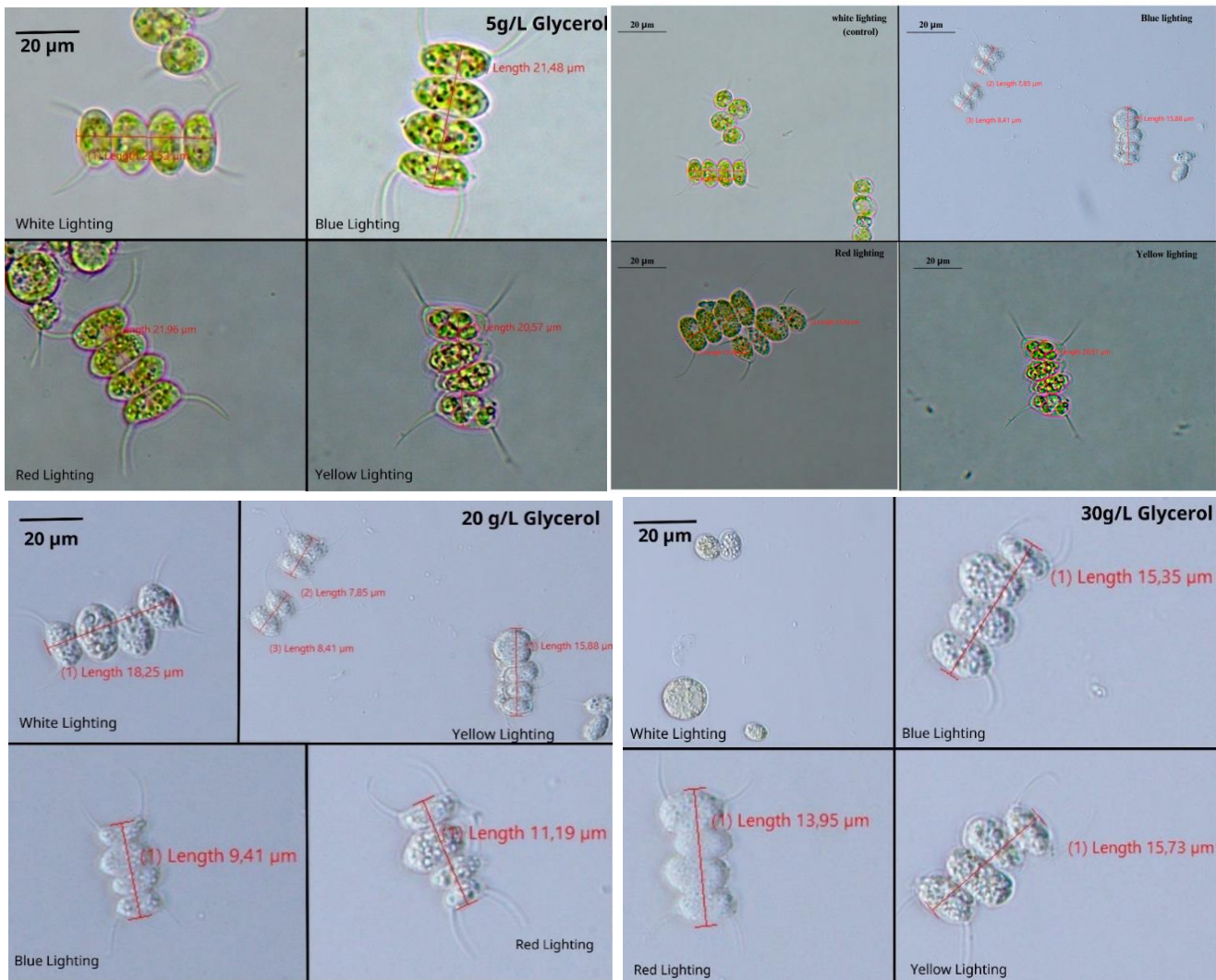


Εικόνα 1. Μορφολογικές διαφορές κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση του μικροφύκου *C. vulgaris* όταν αναπτύχθηκε σε διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός σε μικτότροφες συνθήκες ανάπτυξης με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ακατέργαστης γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα στο υπόστρωμα. Η παρατήρηση έγινε με x100 μεγέθυνση.

4.2 *S. quadricauda*

Το *S. quadricauda* ανήκει στα Scenedesmaceae που χαρακτηρίζεται από την εξαιρετικά μεγάλη ποικιλομορφία που παρουσιάζεται στο φαινότυπο τους. Συνήθως τα *Scenedesmus* αποτελούνται από 4,8,16,32 κύτταρα τα οποία στοιβάζονται σε σειρές. Συγκεκριμένα το *S. quadricauda* διαμορφώνεται σε πακέτα των τεσσάρων κυττάρων σε σειρά. Τα κύτταρα είναι μη κινητικά και έχουν 4 ακανθώδεις απολήξεις. Μετά από μικροσκοπική παρατήρηση σε μεγέθυνση

x100 τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε χαμηλή συγκέντρωση γλυκερόλης 5 και 10 g/L σε διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός δεν επηρεάστηκαν ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (20 και 30 g/L) παρατηρήθηκαν σημαντικές φαινοτυπικές διαφορές. Σχετικά με την ταξινόμηση των κυττάρων σε πακέτα των τεσσάρων που είναι η πρωταρχική δομή του είδους, το μέσο μέγεθος της αποικιακής δομής ανάμεσα στις διαφορετικές αποικιακές δομές διαφέρει. Μεγαλύτερου μεγέθους αποικιακές δομές μετρήθηκαν κατά την ανάπτυξη στις μικρότερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης. Στα 10 g/L το μέγεθος της αποικιακής δομής μετρήθηκε 25.78 μm ενώ μειώθηκε σταδιακά με την αύξηση της γλυκερόλης με το μικρότερο μέγεθος να καταγράφεται στα 20 g/L (9.21 μm). Στα 30 g/L γλυκερόλης η μορφολογία δεν μπορούσε να συγκριθεί σε επίπεδο αποικιακής δομής καθώς τα κύτταρα παρουσιάζονταν κυρίως μεμονωμένα και δημιούργησαν αποικίες των δύο κυττάρων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν όσον αφορά την επίδραση του φωτός ήταν ότι στο φως μπλε χρώματος τα κύτταρα έτειναν να δημιουργούν αποικίες των δύο κυττάρων με μικρότερο μέγεθος. Επίσης το χρώμα των κυττάρων σε μπλε φως δεν ήταν τόσο πράσινο όσο στο λευκό φως. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε πορτοκαλί φως ήταν πιο πράσινα και πιο μεγάλα σε σύγκριση με την ανάπτυξη σε λευκό φως ενώ δημιουργούσαν αποικίες τεσσάρων κυττάρων όπως αυτά του αγρίου τύπου. **(Εικόνα 2)**



Εικόνα 2. Μορφολογικές διαφορές από μικροσκοπική παρατήρηση του μικροφύκου *S. quadricauda* κατά την ανάπτυξη σε διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός σε συνθήκες ανάπτυξης με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ακατέργαστης γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα στο υπόστρωμα. Η παρατήρηση έγινε με x100 μεγέθυνση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα στελέχη των μικροφυκών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιλέχθηκαν λόγω του υψηλού βιοτεχνολογικού τους ενδιαφέροντος παράλληλα με την ικανότητα τους να αναπτύσσονται σε περιβάλλον με πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη (κάποια εκ των οποίων βιβλιογραφικά είχαν δοκιμαστεί μόνο σε καθαρή γλυκερόλη για το λόγο αυτό παρατηρήθηκε και η αδυναμία περαιτέρω βιολογικών διεργασιών). Τα καλλιεργητικά συστήματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν έγιναν με σκοπό την διεξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων και τον ακριβή έλεγχο της δυναμικότητας του εκάστοτε στελέχους. Οι συγκριτικές αναφορές αφορούν τόσο τα καλλιεργητικά συστήματα και την διερεύνηση των ιδανικών συνθηκών ώστε να προταθεί ένα καινοτόμο μοντέλο καλλιέργειας που να καλύπτει τα σημερινά οικονομικά βιομηχανικά πρότυπα παραγωγής βιομάζας μικροφυκών, καθώς και την διερεύνηση εναλλακτικών τρόπων προσέγγισης των καλλιεργητικών τεχνικών.

Ως προς τις μικτότροφες καλλιέργειες, έγιναν δοκιμές σε διαλείποντος έργου συστήματα με λευκό φως και μια σταθερή φωτοπερίοδο 12 ώρες φως 8 ώρες σκοτάδι. Σε επιπλέον δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν μονοχρωματικές πηγές φωτός.

1. *Chlorella vulgaris*:

Το στέλεχος *C. vulgaris* θεωρείται ένα στέλεχος υψηλού βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος χάρη στην πληθώρα εφαρμογών που έχει χρησιμοποιηθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Ο βασικός λόγος που επιλέχθηκε για τη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή ήταν η ικανότητα του να αναπτύσσεται σε υπόστρωμα με κύρια πηγή άνθρακα την ακατέργαστη (crude) γλυκερόλη. Βιοτεχνολογικά τα χαρακτηριστικά του στελέχους που απασχολούν κυρίως την επιστημονική κοινότητα είναι ότι η παρουσία γλυκερόλης στο υπόστρωμα επηρεάζει σημαντικά τη βιοσύνθεση λιπιδίων (Chiu et al., 2017; Diana Lopes et al. 2023).

Στην τρέχουσα διδακτορική διατριβή το μικροφύκος δοκιμάστηκε σε μικτότροφα και ετερότροφα συστήματα ανάπτυξης. Το στέλεχος δοκιμάστηκε σε διαλείποντος έργου και συνεχή ετερότροφα συστήματα καλλιέργειας με αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης τα 10 g/L, 20 g/L και 30 g/L. Το μικροφύκος παράγαγε 0.9 g/L μέγιστη ποσότητα ξηρής βιομάζας σε συγκέντρωση

γλυκερόλης 30 g/L. Άλλες έρευνες χρησιμοποίησαν 5% και 10% συγκεντρώσεις γλυκερόλης και δεν παρατήρησαν στα αποτελέσματα τους ιδιαίτερη διαφορά στην παραγωγή βιομάζας. Σε δόσεις γλυκερόλης 1% και 2% στο υπόστρωμα παρήχθησαν 0.7 και 0.68 gr ξηρής βιομάζας αντίστοιχα ενώ σε μεγαλύτερες δόσεις 5% και 10% παρήχθη 0.1 gr ξηρής βιομάζας και στις δύο περιπτώσεις. Στην συγκεκριμένη έρευνα τα συστήματα ήταν μικτότροφα και η πηγή αζώτου ήταν 1 g/L πεπτόνη (Liang *et al.* 2009). Πρόσφατες έρευνες επίσης εξέτασαν τη δυναμικότητα του στελέχους κατά την ανάπτυξη σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης αλλά και γλυκόζης κατά την διάρκεια της ετερότροφης ανάπτυξης αναφέρουν ότι παρατηρείται παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μικροφύκους. Η αρνητική επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης γλυκόζης εμφανίστηκε μόνο κατά τις 3 πρώτες ημέρες της καλλιέργειας. Μετά από αυτό το διάστημα, υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης παρήγαγε υψηλότερη παραγωγικότητα βιομάζας σε 9 ημέρες (Xiong *et al.* 2008).

Το *C. vulgaris* ενώ έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε ετερότροφα συστήματα ανάπτυξης όταν η πηγή άνθρακα είναι η ακατέργαστη γλυκερόλη, η υψηλή συγκέντρωση της γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο φαίνεται να δρα παρεμποδιστικά στην αύξηση του μικροφύκους καθώς οι αποδόσεις σε βιομάζα ήταν πολύ χαμηλές. Το μικροφύκος *C. vulgaris* στη τρέχουσα διδακτορική διατριβή παρουσίασε την ικανότητα να αναπτύσσεται σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη. Μετά από την αύξηση των συγκεντρώσεων στο υπόστρωμα φαίνεται ότι η περίσσεια άνθρακα έδρασε παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του στελέχους. Οι κύριοι λόγοι που η περίσσεια άνθρακα δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του μικροφύκους είναι οι αλλαγές που προκαλούνται στο pH του θρεπτικού υποστρώματος (Kong *et al.*, 2020) όπου αναφέρεται ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις άνθρακα το pH γίνεται πιο όξινο, στέλεχος δείχνει μια προτίμηση στα αλκαλικά pH για την ανάπτυξη τους και όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία το όξινο pH μπορεί να καταστείλει το μεταβολισμό των κυττάρων και τις εσωτερικές διεργασίες του κυττάρου με αποτέλεσμα να επηρεαστεί η ανάπτυξη του. Ευρήματα της έρευνας από τους Shelp *et al.*, 1980 στο *C. pyrenoidosa* αναφέρουν ότι γενικότερα στα μικροφύκη οι υψηλές συγκεντρώσεις άνθρακα στο υπόστρωμα ανάπτυξης οδηγούν σε αυξημένη κυτταρική αναπνοή και ο μικροοργανισμός αδυνατεί να ανταπεξέλθει ακόμα και σε καλλιέργειες όπου υπάρχει συνεχής αερισμός του υποστρώματος. Άλλα δεδομένα από τους Schwab *et al.*, 2013 αναφέρουν ότι η οργανική πηγή άνθρακα μπορεί να περιέχει τοξικά παραπροϊόντα κατά την αποικοδόμηση της, συγκεκριμένα η

ακατέργαστη γλυκερόλη περιέχει αιθανόλη και άλλα παραπροϊόντα που μπορούν να δράσουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού πάνω από ορισμένες συγκεντρώσεις.

Προηγούμενες μελέτες στο *C. vulgaris* με 0.5 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης στο υπόστρωμα κατά την ετερότροφη ανάπτυξη ανέφεραν ότι δεν παρατηρήθηκε σημαντική ανάπτυξη του μικροφύκου, παρά την κατανάλωση των πηγών αζώτου και άνθρακα στην καλλιέργεια (Poddar *et al.*, 2018). Πιο συγκεκριμένα, οι συγγραφείς ανέφεραν ότι η βιομάζα που παρήχθη υπό ετερότροφες συνθήκες ήταν 0.176 g/L σε επάρκεια αζώτου και 0,1506 g/L σε έλλειψη αζώτου, ενώ σε μικτότροφες συνθήκες, η βιομάζα ήταν υψηλότερη, φτάνοντας τα 0,37 και 0,238 g/L με επάρκεια αζώτου και ανεπάρκεια αζώτου, αντίστοιχα (Poddar *et al.*, 2018). Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι το μικροφύκος αναπτύσσεται κατά τους Poddar *et al.*, 2018 καλύτερα σε μικτότροφες συνθήκες ανάπτυξης και η αύξηση του ευνοείται από την ύπαρξη πηγής αζώτου στο υπόστρωμα ανάπτυξης. Η υψηλότερη συγκέντρωση κυττάρων που παρατηρείται σε μικτότροφες συνθήκες ανάπτυξης είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα που σημειώθηκαν στην παρούσα διατριβή. Οι Mou *et al.* (2022) έλαβαν παρόμοια ευρήματα, αποδεικνύοντας ότι η ανάπτυξη των μικροφυκών ήταν καλύτερη σε μικτότροφο σύστημα ανάπτυξης παρά στο ετερότροφο σύστημα. Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη μπορεί να βελτιωθεί η πρόσληψη βασικών θρεπτικών συστατικών, καθώς τα μικροφύκη μπορούν να χρησιμοποιήσουν την ενέργεια που προέρχεται από τη φωτοσύνθεση για να διευκολύνουν τη μεταφορά και την αφομοίωση των θρεπτικών ουσιών του υποστρώματος πιο αποτελεσματικά.

Σε άλλες σχετικές έρευνες παρουσιάστηκε ότι οι μεταβολικοί ρυθμοί εξαρτώνται απόλυτα από την αναλογία C/N στο υπόστρωμα. Η συγκέντρωση λιπιδίων παρουσιάστηκε ανάλογη της αναλογίας C/N ενώ η συγκέντρωση των πρωτεϊνών παρουσιάζεται αντιστρόφως ανάλογη της αναλογίας C/N (Gougoulas *et al.* 2019). Ο διαθέσιμος άνθρακας του υποστρώματος χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πρωτεϊνών και για τη λιπιδιακή σύνθεση, ενώ το διαθέσιμο άζωτο χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάπτυξη. Επομένως, η πρωτεϊνική σύνθεση περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα αζώτου, ενώ η περίσσεια άνθρακα προάγει τη σύνθεση λιπιδίων. (Metsoviti *et al.*, 2020) Στην παρούσα μελέτη μετά από τις δοκιμές σε ανόργανες και οργανικές πηγές αζώτου όπου επιλέχθηκε η πεπτόνη και έγιναν δοκιμές όπου η αναλογία C/N=20 διατηρήθηκε σταθερή με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της διαφορετικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στην ανάπτυξη του μικροφύκου κατά την απουσία φωτός. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στη συγκέντρωση 30 g/L

ακατέργαστης γλυκερόλης κατά την ετερότροφη ανάπτυξη το μικροφύκος χρειάστηκε μεγαλύτερη περίοδο προσαρμογής και παρουσίασε μειωμένη αύξηση (6.42 g/L εναπομένουσα ποσότητα).

Το *C. vulgaris* που αναπτύχθηκε ετερότροφα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης παρουσίασε υψηλότερη παραγωγή λιπιδίων σε σχέση με τις αυτότροφες καλλιέργειες που έχουν δοκιμαστεί σε άλλες μελέτες κατά τη διάρκεια τροφοπενίας αζώτου στο υπόστρωμα. Στις συγκεκριμένες μελέτες έδειξαν ότι όταν δεν προστέθηκαν νιτρικά στο μέσο, η ανάπτυξη του *C. vulgaris* μειώθηκε αλλά όχι σε σημαντικό βαθμό σε σύγκριση με την ανάπτυξη παρουσία νιτρικών, όμως, η περιεκτικότητα σε κυτταρικά λιπίδια αυξήθηκε από 33% σε 38% λόγω έλλειψης αζώτου. Επίσης η προσθήκη οργανικής πηγής αζώτου (πεπτόνης) οδήγησε σε μικρή αύξηση στη συγκέντρωση των λιπιδίων (Liang et al., 2009). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται επίσης ότι η αυτότροφη ανάπτυξη έδωσε υψηλότερη περιεκτικότητα σε κυτταρικά λιπίδια (38%), ενώ η παραγωγικότητα των λιπιδίων ήταν πολύ χαμηλότερη κατά την ετερότροφη ανάπτυξη με οξικό οξύ, γλυκόζη ή γλυκερόλη. Η βέλτιστη κυτταρική ανάπτυξη (2 g/L) και η παραγωγικότητα λιπιδίων (54 mg/L) επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας γλυκόζη σε συγκέντρωση 1% (w/v) ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν ανασταλτικές. Η ανάπτυξη του *C. vulgaris* στη γλυκερόλη είχε παρόμοια αποτελέσματα απόδοσης με την ανάπτυξη στη γλυκόζη. Συμπερασματικά οι Liang et al., 2009 ανέφεραν ότι το *C. vulgaris* είναι μικτοτροφικό μικροφύκος και έχει τη δυνατότητα μέσω της κυτταρικής αναπνοής να μεταβολίζει καλύτερα το διαθέσιμο άνθρακα που βρίσκεται στο υπόστρωμα ανάπτυξης.

Η ανάπτυξη σε διαφορετικές πηγές άνθρακα, όπως η γλυκερόλη και η γλυκόζη, μπορεί να επηρεαστεί από την παρουσία φωτός καθώς η παρουσία, η ένταση φωτός αλλά και η φωτοπερίοδος επιδρά στα μεταβολικά μονοπάτια του μικροοργανισμού. Μέχρι στιγμής, υπήρξαν αναφορές που δείχνουν δεδομένα από άλλα στελέχη της *Chlorella* τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν μόνο κατά την απουσία φωτός σε συστήματα ετερότροφης καλλιέργειας (Karlander and Krauss 1966). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή το στέλεχος δοκιμάστηκε τόσο σε μικτότροφα όσο και ετερότροφα συστήματα καλλιέργειας και το συμπέρασμα που διεξήχθη ήταν ότι μπορεί να αναπτυχθεί και στις δύο συνθήκες, κάτι το οποίο υποστηρίζουν και οι (Estep and Hoering 1981). Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής συμφωνούν με την παρατήρηση των Patino et al. 2007 ότι

η ύπαρξη φωτός κατά την καλλιέργεια των μικροφυκών ενισχύει την παραγωγή λιπιδίων και τον ρυθμό ανάπτυξης του μικροφύκου.

Με βάση τα δεδομένα των Patino *et al.*, 2007 και της αντίστοιχης πρόσφατης βιβλιογραφίας (Samani *et al.*, 2022), επιλέχθηκε παράλληλα με το λευκό φως στις μικτότροφες καλλιέργειες να δοκιμαστεί η χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός. Μέχρι τώρα υπάρχουν δεδομένα που αφορούν στην μικτότροφη ανάπτυξη με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός που χρησιμοποιούν στο υπόστρωμα καθαρές πηγές άνθρακα όπως οξικό οξύ, γλυκόζη και κιτρικό και μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές πηγές φωτός με μήκη κύματος 450, 550 και 650 nm, που αντιστοιχούν σε μπλε, πράσινο και κόκκινο φως. Η μέση παραγωγή βιομάζας ήταν 0.855 g/L στο μπλε και στον κόκκινο φωτισμό και οφείλεται στο γεγονός ότι τα συγκεκριμένα φάσματα φωτός απορροφούνται από τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς η χλωροφύλλη a, απορροφά το φως πιο έντονα στις μπλε (περίπου 430-450 νανόμετρα) και κόκκινες (περίπου 640-680 νανόμετρα) περιοχές του φάσματος ενώ η χλωροφύλλη b απορροφά κυρίως το φως στις μπλε (περίπου 450-470 νανόμετρα) και κόκκινο-πορτοκαλί (περίπου 640-660 νανόμετρα) περιοχές. Η χλωροφύλλη-β βοηθά στη σύλληψη της φωτεινής ενέργειας και στη μεταφορά της στη χλωροφύλλη-α. (Yun *et al.*, 2001).

Τα μικτότροφα συστήματα καλλιέργειας μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, καθώς βιβλιογραφικά τα συστήματα αυτά έχουν δώσει καλύτερα αποτελέσματα ως προς την παραγωγικότητα βιομάζας και μεταβολιτών σε σχέση με τα ετερότροφα και παρέχουν τη δυνατότητα στο μικροοργανισμό να αξιοποιεί τόσο τον διαθέσιμο άνθρακα από το υπόστρωμα όσο και την ενέργεια του φωτός που του παρέχεται μέσω της φωτοσύνθεσης. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν μονοχρωματικές πηγές φωτός με βάση τα μέχρι πρότινος δεδομένα από έρευνες (Anyanwu *et al.*, 2022; Atta *et al.*, 2013).

Μονοχρωματικός φωτισμός: Σε πρόσφατη έρευνα σε μικτότροφο διαλείποντος έργου σύστημα ανάπτυξης του *C. vulgaris* με χρήση μονοχρωματικής πηγής μπλε φωτός σε υπόστρωμα με εκχύλισμα εδάφους βρέθηκε μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (1.26 d^{-1}), ξηρό βάρος κυττάρων (2.730 g/L) και περιεκτικότητα σε λιπίδια (23,5%) με ένταση φωτός μπλε LED $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ και φωτοπερίοδο 12:12 h L:D μετά από 8 ημέρες καλλιέργειας. (Atta *et al.* 2013). Στην παρούσα έρευνα κατά την ανάπτυξη του *C vulgaris* με ακατέργαστη γλυκερόλη με φωτοπερίοδο 16:8 με

μπλε φως ο μέγιστος ρυθμός αύξησης ήταν (0.47 d^{-1}) και η παραγωγή των λιπιδίων άγγιξε το 13% επί της ξηρής βιομάζας.

Μελέτη που διεξήχθη με συνδυασμό των *C. vulgaris* και *S. obliquus* σε μικτότροφο σύστημα ανάπτυξης κάτω από διαφορετικά μήκη κύματος φωτός έδειξε ότι στο ψυχρό λευκό φως η παραγόμενη ποσότητα βιομάζας και ο ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν υψηλότερος (673 mg/L , 0.75 day^{-1}) συγκριτικά με την ανάπτυξη σε μπλε φως (500 mg/L , 0.73 day^{-1}). (Gatamaneni *et al.*, 2020). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή κατά την ανάπτυξη του *C. vulgaris* σε υπόστρωμα γλυκερόλης (10 g/L) σε λευκό φως (0.43 d^{-1} , 1.34 g/L) και σε μπλε φως (0.41 d^{-1} , 0.9 g/L). Οι Khalili *et al.*, 2015 αναφέρουν ότι το θερμό λευκό φως με ένταση $80 \text{ mol/m}^2/\text{s}$ είναι το ιδανικό φως για τη σύνθεση βιομάζας του *C. vulgaris* σε θρεπτικό υπόστρωμα με ως πηγή αζώτου ουρία (1.37 g/L βιομάζα). Στα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής φάνηκε ότι η ουρία δεν ευνοεί την ετερότροφη ανάπτυξη του μικροφύκου (0.89 g/L βιομάζα).

Ωστόσο, ο συνδυασμός χρήσης μονοχρωματικού φωτισμού και ακατέργαστης γλυκερόλης ως πηγής άνθρακα για το *C. vulgaris* δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Ορισμένες μελέτες έχουν διερευνήσει αυτούς τους παράγοντες μεμονωμένα αλλά όχι σε συνδυασμό. Στην παρούσα μελέτη κατά την καλλιέργεια σε μονοχρωματικές πηγές φωτός, οι δοκιμές επικεντρώθηκαν στην επίδραση του φωτός κατά την ανάπτυξη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης στο υπόστρωμα ενώ η πηγή αζώτου και ο λόγος C/N διατηρήθηκαν σταθερά. Η ανάπτυξη παρουσία φωτός έδωσε μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων σε σχέση με τα ετερότροφα συστήματα καλλιέργειας. Παρόλο ότι παρεμποδίστηκε η ανάπτυξη του μικροφύκου λόγω της υψηλής συγκέντρωσης γλυκερόλης στα (20 g/L και στα 30 g/L) η παραγωγή λιπιδίων έφτασε τα 0.218 g/L σε μπλε φωτισμό σε 20 g/L .

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν σημειωθεί σε μικτότροφη καλλιέργεια του *Nannochloropsis* με πηγή άνθρακα την καθαρή γλυκερόλη σε συγκέντρωση 2 g/L , που έδειξε μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης 0.66 d^{-1} σε κύκλους φωτός και σκότους 12:12 h σε μπλε φως μήκους κύματος 470 nm (Das *et al.*, 2011). Αντίστοιχες έρευνες έχουν δείξει ότι σε μπλε φως τα *Chlorella sp.* όταν αναπτύσσονται σε μήκος κύματος 500 nm (μπλε φως) παρουσιάζουν μέγιστη περιεκτικότητα σε λιπίδια 0.778 g/L σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μήκος κύματος 700 nm (κόκκινο φως) όπου η περιεκτικότητα σε λιπίδια έφτασε έως και 0.653 g/L σε φωτοπερίοδο 16:8 h L :D. (Perez-Pazoz and Fernandez-Izquierdo, 2011). Το *Isochrysis galbana* εμφανίζει μέγιστη

περιεκτικότητα σε λιπίδια 155 mg/L όταν αναπτύσσεται κάτω από διαλείπον φως μπλε LED για 12 ημέρες (Yoshioka et al., 2012). Η διφωσφορική καρβοξυλάση/οξυγενάση της ριβουλόζης (Rubisco) και η καρβονική ανυδράση είναι τα ένζυμα που επηρεάζουν τους ρυθμούς διοξειδίου του άνθρακα στα μικροφύκη. Αυτά τα ένζυμα είναι βασικά υπό τον έλεγχο του μπλε φωτός. Όσο υψηλότερη είναι η δραστηριότητα του ενζύμου, τόσο μεγαλύτερη είναι η συσσώρευση τριγλυκεριδίων κάτω από το μπλε φως LED. Όταν υπάρχει πηγή οργανικού άνθρακα διαθέσιμη στη μικτότροφη ανάπτυξη, οι μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν εναλλακτικές οδούς για τη στερέωση του άνθρακα. Η δραστηριότητα του Rubisco μπορεί να μειωθεί καθώς οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν κατά προτίμηση τις οργανικές πηγές άνθρακα που είναι διαθέσιμες στο υπόστρωμα. Η παρουσία οργανικού άνθρακα μειώνει την ανάγκη για δραστηριότητα του Rubisco.

Η παρούσα έρευνα εστιάζεται στη δοκιμή της μικτότροφης ανάπτυξης του στελέχους *C. vulgaris* εκτός του λευκού φωτισμού που λειτουργεί ως μάρτυρας σε μονοχρωματικές πηγές φωτός κόκκινου, πορτοκαλί και μπλε χρώματος τόσο σε διαλείποντος έργου όσο και σε συνεχή συστήματα καλλιέργειας με χρήση βιοαντιδραστήρα και στην ανάλυση του λιπιδιακού προφίλ του στελέχους. Σε συνεχή συστήματα καλλιέργειας με χρήση βιοαντιδραστήρα το στέλεχος δοκιμάστηκε σε ετερότροφο σύστημα ανάπτυξης σε υπόστρωμα με γλυκερόλη (30 g/L) και σε μικτότροφο σύστημα ανάπτυξης σε υπόστρωμα με γλυκερόλη (20 g/L με χρήση μπλε φωτός και 30 g/L με χρήση κόκκινου φωτός). Κατά την ετερότροφη ανάπτυξη η παραγωγή βιομάζας στην χαμηλότερη ροή ($D=0.0142h^{-1}$) ήταν 1.22 g/L ενώ στο μικτότροφο σύστημα ανάπτυξης με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός ήταν 1.85 g/L. Παρόμοια αποτελέσματα με χρήση βιοαντιδραστήρα και γλυκερόλης ως κύρια πηγή άνθρακα σε πρόσφατη έρευνα έδωσε η σύγκριση αυτότροφου και μικτότροφου συστήματος ανάπτυξης όπου σε συνθήκες μικτότροφης ανάπτυξης σημειώθηκε υψηλότερη παραγωγή βιομάζας (0.72g/L) σε συγκέντρωση γλυκερόλης 2-5g/L. (Ge, et al., 2018).

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και κατά την ανάπτυξη του θαλάσσιου είδους *Nannochloropsis sp.* Όταν αυτή αναπτύχθηκε σε διαφορετικά μήκη κύματος φωτός, συγκεκριμένα πράσινου χρώματος και παρήγαγε ένα ποσοστό λιπιδίων της τάξης 11.5% (w/w). Η βιομάζα αλλά και η παραγωγή λιπιδίων στα μικροφύκη έχουν μέχρι τώρα συσχετιστεί με τα διαφορετικά μήκη κύματος φωτισμού στην καλλιέργεια και να οδηγήσει σε περαιτέρω συσσώρευση λιπιδίων (Das et al., 2011). Έκθεση του *Nannochloropsis sp.* σε μια μονοχρωματική πηγή μπλε φωτός οδήγησε σε

παραγωγή υψηλότερης ποσότητας βιομάζας από την έκθεση σε πράσινο ή κόκκινο φως, καθώς και από την έκθεση σε λευκό φως πολλαπλών χρωματισμών. Αυτή η μελέτη έδειξε επίσης ότι η ένταση φωτός που χρησιμοποιείται για τα μικροφύκη δεν πρέπει να είναι σταθερή σε όλη τη διάρκεια της περιόδου ανάπτυξης καθώς αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την φωτοαναστολή και φωτοξείδωση του μικροοργανισμού. (Das *et al.*, 2011).

Το *C. vulgaris* ως μικτότροφο μικροφύκος έχει τη δυνατότητα να μεγιστοποιεί την βιοσυσσώρευση λιπιδίων (σε ένα μέγιστο 35-45%) (Feng *et al.*, 2011; Griffiths *et al.*, 2014; Lv *et al.*, 2010) σε περιβάλλον βιομηχανικής κλίμακας με την προϋπόθεση ότι το θρεπτικό μέσο και ο φωτισμός που παρέχεται κατά την ανάπτυξη βελτιστοποιεί τον ρυθμό ανάπτυξης. Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή τείνει να συμπεριφέρεται διαφορετικά κατά την ανάπτυξη του σε διαφορετικά χρώματα φωτισμού. Συγκεκριμένα από τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρατηρήθηκε ότι σε διαφορετικά χρώματα φωτισμού βιοσυσσωρεύονται διαφορετικές συγκεντρώσεις ορισμένων μεταβολιτών σε σχέση με άλλους. Δηλαδή παρατηρήθηκε μέγιστη συγκέντρωση λιπιδίων στο μπλε φως (0.235 g/L), πρωτεϊνών στο πορτοκαλί (0.86 g/L) και υδατανθράκων στο κόκκινο (0.19 g/L). Τόσο οι πηγές αζώτου και άνθρακα όσο και ο λόγος C/N=20 παρέμειναν σταθερές. Οι Kong *et al.*, 2012 δοκίμασαν διαφορετικές πηγές αζώτου για τη μελέτη της βιοσύνθεσης πρωτεϊνών και υδατανθράκων.

Η διαφορετική αντίδραση στο μπλε φως του *C. vulgaris* που παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξη του στην παρούσα μελέτη σε σχέση με τη βιβλιογραφία, μπορούν να αποδοθούν στο γεγονός ότι τα μικρότερα μήκη κύματος, όπως του μπλε φωτός, παρέχουν περισσότερη ενέργεια για φωτοσύνθεση. Έχει ήδη αναφερθεί ότι το μπλε φως αυξάνει τη συγκέντρωση των χλωροφυλλών στα κύτταρα μικροφυκών, τα οποία αναδιατάσσονται, προκειμένου να ενισχυθεί η παρουσία τους στο σύμπλεγμα συλλογής φωτός και στα κέντρα αντίδρασης, αυξάνοντας έτσι το μέγεθος του φωτοσυστήματος II (PSII). Η προσαρμογή των μικροφυκών στις συνθήκες φωτός συνεπάγεται τη λειτουργία φωτοϋποδοχέων, οι οποίοι προσαρμόζουν αυτές τις επιδράσεις. Ωστόσο, συχνά μπορεί να προκαλέσουν φωτο-αναστολή (Chen *et al.*, 2020). Αντίθετα, το κόκκινο φως έχει μεγαλύτερο μήκος κύματος, το οποίο μπορεί να μετριάσει την επίδραση της φωτοαναστολής. Επιπλέον, το γεγονός ότι διαφορετικές χλωροφύλλες και σχετικές χρωστικές που βρίσκονται στα μικροφύκη εμφανίζουν τις υψηλότερες κορυφές απορρόφησης τους είτε στις κόκκινες είτε στις μπλε περιοχές του φάσματος φωτός μπορεί επίσης να εξηγήσει τις διαφορές

μεταξύ των διαφόρων στελεχών σε απόκριση στα διαφορετικά μήκη κύματος φωτός. Τελευταίο αλλά εξίσου σημαντικό, είναι ότι η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη στο *C. vulgaris* εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μήκος κύματος του φωτός (το μπλε και το κόκκινο φως, για παράδειγμα, μπορούν να ενεργοποιήσουν την παραγωγή υψηλών και χαμηλών επιπέδων χλωροφύλλης, αντίστοιχα), επιβεβαιώνοντας την άποψη ότι κάθε μήκος κύματος έχει ένα ελάχιστο όριο έντασης το οποίο επηρεάζει την ανάπτυξη (Fettah *et al.*, 2022).

Αναφορικά με τη σύσταση των λιπαρών οξέων που αναλύθηκαν στα συνεχή συστήματα ανάπτυξης παρατηρήθηκε ότι υψηλότερα ποσοστά λιπαρών οξέων παρήχθησαν κατά την ετερότροφη ανάπτυξη τα (C16= 13.57%, C18:1= 50%, C18:2=12%, C:18:3=13% και C:20=10%) κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη με μονοχρωματική πηγή φωτός μπλε παρήχθησαν: (C16=13.5%, C18:1= 50%, C18:2= 15.27% και C:20=9.8%). Στη μικτότροφη ανάπτυξη με κόκκινο φως παρήχθησαν τα: (C16= 14.63%, C18:1= 45.4%, C18:2= 12% και C18:3=13%). Στη βιβλιογραφία κατά την ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα σε συγκεντρώσεις γλυκερόλης 2 και 5 g/L κατά την ετερότροφη ανάπτυξη έχουν παραχθεί C16:0=10% ενώ σε μικτότροφες συνθήκες παρήχθησαν C16:0 (20,6-29,6%) και C18:1 (14,5-21,2%). (Ge *et al.*, 2018). Αναφέρεται ότι τα πιο επιθυμητά λιπαρά οξέα για την παραγωγή βιοντίζελ είναι τα C16:0 και C18:1, καθώς αυτά παράγουν υψηλές τιμές κετανίου (δείκτης για χαμηλότερες εκπομπές οξειδίων του αζώτου κατά την ανάφλεξη) και αυτά βρέθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στο *C. vulgaris* που αναπτύχθηκε υπό ετερότροφες μικτότροφες συνθήκες (Zendejas *et al.*, 2012). Γενικά τα στελέχη *Chlorella* είναι πιο κατάλληλα για την παραγωγή βιοντίζελ, επειδή το προφίλ λιπαρών οξέων παράγονται είναι κυρίως C16:0 (31%), C18:0 (20%), C18:2 (12%) και C18:3 (6%). ολικά λιπίδια. (Petkov and Garcia, 2007).

Συμπερασματικά μπορεί να αναφερθεί ότι τα διαφορετικά μήκη φωτός οδηγούν σε ενεργοποίηση διαφορετικών μεταβολικών μονοπατιών και βιοσυσσώρευση διαφορετικών μεταβολικών προϊόντων. Στα συνεχή συστήματα καλλιέργειας που δοκιμάστηκε ο μικροοργανισμός τόσο σε ετερότροφες όσο και σε μικτότροφες συνθήκες ανάπτυξης φάνηκε ότι κατά την μικτότροφη ανάπτυξη η παραγωγικότητα του είναι πολύ υψηλότερη σε σχέση με την ετερότροφη ανάπτυξη και μάλιστα μεταβολίζει καλύτερα τη διαθέσιμη γλυκερόλη στο υπόστρωμα. Συγκεκριμένα όπως και φάνηκε στα διαλείποντος έργου συστήματα καλλιέργειας η χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός μπλε χρώματος ευνοεί την παραγωγικότητα και αυξάνει την δυναμικότητα του στελέχους σε σχέση με τη χρήση λευκού φωτισμού (μάρτυρας), από τα

αποτελέσματα επιβεβαιώνεται ότι η χρήση εναλλακτικών πηγών φωτισμού επηρεάζει το μεταβολισμό των μικροφυκών.

Μορφολογικές διαφορές:

Το μικροφύκος *C. vulgaris* δεν χαρακτηρίζεται από την ευπλαστότητα στη μορφολογία του ενώ το μέσο μέγεθος των κυττάρων είναι 5-10 μm (Seiji Takeda 1991). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η επίδραση του φωτισμού και της συγκέντρωσης γλυκερόλης στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων του μικροφύκου. Κατά την επίδραση διαφορετικών πηγών μονοχρωματικής πηγής φωτισμού παρατηρήθηκαν μικρές διαφορές στο φαινότυπο. Τα κύτταρα εμφανίστηκαν μικρότερα από το μέσο μέγεθος που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (5-10 μm).

Εκτός από το μικτότροφο τρόπο ανάπτυξης, η επίδραση των πηγών φωτός διαφορετικού μήκους κύματος έχει επίσης διερευνηθεί σε συνθήκες αυτότροφης καλλιέργειας του *C. vulgaris* (Kim *et al.*, 2014), καταδεικνύοντας ότι η μετατόπιση του μήκους κύματος από κόκκινο σε μπλε είχε ως αποτέλεσμα 30% αύξηση στο ξηρό βάρος ανά κύτταρο *C. vulgaris*. Το μπλε φως αύξησε πολύ το μέγεθος των κυττάρων, αλλά το κόκκινο φως είχε ως αποτέλεσμα να παραχθούν μικρά κύτταρα μέσω ενεργών διαιρέσεων (Kim *et al.*, 2014), κάτι που είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όπου τα κύτταρα του *C. vulgaris* με ανάπτυξη σε μπλε φως ήταν μεγαλύτερα από εκείνα που αναπτύχθηκαν σε κόκκινο φως.

2. *Scenedesmus obliquus* και *Tetraselmis chuii*.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη των στελεχών *S. obliquus* και *T. chuii* δεν ήταν ενθαρρυντικά και τα στελέχη δεν κρίθηκαν κατάλληλα για την διενέργεια πειραμάτων προς περαιτέρω διερεύνηση. Τα πειράματα που έγιναν ήταν σε θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη (σε συγκέντρωση τα 5 g/L και 10 g/L) με προσθήκη οργανικής πηγής αζώτου (εκχύλισμα ζύμης) στο θρεπτικό μέσο σε λόγους C/N=1 και C/N=20 σε συνθήκες μικτότροφης για το *S. obliquus* και ετερότροφης ανάπτυξης για τα δύο στελέχη.

Συγκριτικά η ανάπτυξη των μικροφυκών σε ετερότροφες και μικτότροφες συνθήκες έδειξε ότι τα στελέχη αναπτύσσονται καλύτερα ετερότροφα χωρίς ωστόσο να παρουσιάζουν την αναμενόμενη παραγωγικότητα βιομάζας. Για το *S. obliquus* ο ρυθμός αύξησης που σημειώθηκε ήταν μεγαλύτερος από το ρυθμό αύξησης του *S. quadricauda* αλλά και από του *C. vulgaris* ενώ

στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως ένα υποσχόμενο μικροφύκος για την παραγωγικότητα του. Ωστόσο μετά τις πρώτες δοκιμές το στέλεχος έδειξε αδυναμία κατανάλωσης της ακατέργαστης γλυκερόλης όταν δοκιμάστηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (20 και 30 g/L) τόσο κατά την ετερότροφη όσο και κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη, οπότε και δεν μελετήθηκε περαιτέρω.

Το θαλάσσιο μικροφύκος *T. chuii* παρουσίασε μεγάλη φάση υστέρησης (32 ημέρες) με μικρή παραγωγή βιομάζας συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια της διδακτορικής έρευνας. Επομένως, κρίθηκε ότι και τα δύο μικροφύκη τα οποία μελετήθηκαν έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε ακατέργαστη γλυκερόλη δεν παρουσιάζουν όμως υψηλά επίπεδα παραγωγής βιομάζας, ως εκ τούτου δεν συνεχίστηκε η μελέτη τους.

3. *Auxenochlorella protothecoides*

Από τη μελέτη της αύξησης σε διαλείποντος έργου σύστημα καλλιέργειας των 5 στελεχών μικροφυκών (*C. vulgaris*, *T. chuii*, *S. obliquus*, *S. quadricauda* και *A. protothecoides*) την ταχύτερη ανάπτυξη (μεγαλύτερο μ_{max}) και την υψηλότερη ποσότητα βιομάζας παρήγαγε το *A. protothecoides*. Το μικροφύκος αυτό έδειξε ότι έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (ως και 90 g/L).

Από σχετικές μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι το μικροφύκος αναπτύσσεται μόνο παρουσία οργανικού αζώτου στο υπόστρωμα ενώ παρουσία ανόργανων πηγών (νιτρικά και αμμωνία) η ανάπτυξη ήταν ιδιαίτερα χαμηλή. Ειδικότερα η παρουσία πεπτόνης στο θρεπτικό υπόστρωμα ενίσχυσε την ικανότητα του στελέχους να καταναλώνει την ακατέργαστη γλυκερόλη με αποτέλεσμα να αυξηθεί η παραγωγή βιομάζας. Η προτίμηση του *A. protothecoides* σε οργανικές πηγές αζώτου οφείλεται στο γεγονός ότι πέρα από την κάλυψη των αναγκών της καλλιέργειας σε άζωτο ενισχύουν την αύξηση μέσω της ταυτόχρονης τροφοδοσίας του μικροοργανισμού με αμινοξέα, βιταμίνες και παράγοντες που ευνοούν την αύξηση (Shi et al. 2010; Gonzalez-Bashan et al. 2000; Craggs, et al., 2012)

Στα συνεχή συστήματα καλλιέργειών μελετήθηκε η επίδραση στην αύξηση του ειδικού ρυθμού αραίωσης (D) των διαφορετικών συγκεντρώσεων της γλυκερόλης στο υπόστρωμα. Κατά την ετερότροφη ανάπτυξη του *A. protothecoides* σε συνεχή συστήματα με χρήση βιοαντιδραστήρα σε συγκέντρωση 30 και 50 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης στο υπόστρωμα και πηγή αζώτου

πεπτόνη σε αναλογία C/N=20 παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή βιομάζας ήταν αντιστρόφως ανάλογη του ρυθμού αραίωσης. Σε συγκέντρωση 50 g/L γλυκερόλης η βιομάζα που παράχθηκε έφτασε τα 7.89 g/L ενώ σε συγκέντρωση 30 g/L γλυκερόλης η παραγόμενη βιομάζα έφτασε τα 5.3 g/L. Η απόδοση βιομάζας $Y_{x/s}$ καθώς και η παραγωγικότητα βιομάζας P_x βιομάζας μειώνεται αντιστρόφως ανάλογα του ρυθμού αραίωσης καθώς ο μικροοργανισμός δεν προλαβαίνει να αφομοιώσει στο υπόστρωμα.

Οι Diderich *et al.* 1999 αναφέρουν ότι η συγκέντρωση της γλυκερόλης που παραμένει στο υπόστρωμα σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας αυξάνεται με την αύξηση του ρυθμού αραίωσης. Για παράδειγμα στο στέλεχος της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* η υψηλότερη παραγωγή βιομάζας 3.88 g/L ανά ημέρα σημειώθηκε σε ρυθμό αραίωσης ($D = 0.3d^{-1}$) όταν η ανάπτυξη γινόταν σε υπόστρωμα με συγκέντρωση γλυκερόλης 60 g/L. Με σταδιακή αύξηση του ρυθμού αραίωσης η εναπομένουσα γλυκερόλη στο σύστημα άρχισε να αυξάνεται συναρτήσει του χρόνου, και ο μικροοργανισμός παρατηρήθηκε ότι δεν προλάβαινε να την αφομοιώσει κατάλληλα. (Ethier *et al.* 2011). Όταν το *S. cerevisiae* αναπτύχθηκε σε συνθήκες ζυμωτικού μεταβολισμού, η εναπομείνουσα πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο παρατηρήθηκε ασυνήθιστα υψηλή και στις δύο συγκεντρώσεις γλυκερόλης που χρησιμοποιήθηκαν (60 και 90 g/L) σε υψηλούς ρυθμούς αραίωσης. Η συγκέντρωση της βιομάζας μειώθηκε κατά την αύξηση του ρυθμού αραίωσης και η απόδοση σημειώθηκε χαμηλότερη από 10 g/L την ημέρα. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Ethier *et al.* 2011 σχετικά με το *Schizochytrium limacinum* και οι Aguirre-Ezkauriatza *et al.* 2010 για τη ζύμη *Pichia angusta* όταν καλλιεργήθηκαν σε σύστημα συνεχούς λειτουργίας. Οι Wen *et al.*, 2002 ανέφεραν παρόμοια αποτελέσματα για το *Nitzschia laevis* όταν αναπτύχθηκε σε υψηλούς ρυθμούς αραίωσης $D > 0.3 \text{ day}^{-1}$ κατά την ανάπτυξη σε υπόστρωμα με γλυκόζη συγκέντρωσης ($> 20 \text{ g/L}$). Σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας η εναπομένουσα γλυκόζη στο θρεπτικό υπόστρωμα δεν καταναλώθηκε από το *N. laevis* όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης αυξήθηκε πάνω από 30 g/L. Κατά τον Xiong *et al.* για το μικροφύκος *A. protothecoides* όταν στο υπόστρωμα η πηγή άνθρακα είναι η γλυκόζη προτάθηκε η στρατηγική της παροχής υποστρώματος σε χαμηλούς ρυθμούς αραίωσης στα συνεχή συστήματα καλλιέργειας καθώς έχει παρατηρηθεί ικανοποιητικότερη αξιοποίηση της γλυκόζης.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή η εκτενής μελέτη του μικροφύκου *A. protothecoides* σε ετερότροφα και μικτότροφα συστήματα ανάπτυξης έχει δείξει επανειλημμένως ότι η παρουσία φωτός κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη του μικροοργανισμού δρα παρεμποδιστικά στην κατανάλωση του άνθρακα στο υπόστρωμα.

Παρόμοια αποτελέσματα κατέγραψαν οι Xiao et al. (2020) όταν κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη του *A. protothecoides* σε θρεπτικό υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, ο μεταβολισμός της γλυκόζης παρεμποδίζεται από την παρουσία φωτός, οδηγώντας σε μείωση της παραγωγής βιομάζας και λιπιδίων. Η παραγωγικότητα παρατηρήθηκε $P_x = 0.0257 \text{ g/Lh}^{-1}$ στην ετερότροφη ανάπτυξη και αντίστοιχα $P_x = 0.0028 \text{ g/Lh}^{-1}$ στην μικτότροφη ανάπτυξη. Συγκριτικά με τις παραγωγικότητες που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη όπου κατά την ετερότροφη ανάπτυξη του μικροφύκου *A. protothecoides* σε συνεχές σύστημα ανάπτυξης σε 30 g/L και 50 g/L συγκέντρωση γλυκερόλης η παραγωγικότητες της παραχθείσας βιομάζας ήταν $P_x = 0.342 \text{ g/Lh}^{-1}$ και $P_x = 0.213 \text{ g/Lh}^{-1}$ αντίστοιχα και η παραγωγικότητα κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη σε κόκκινο φως σε 30 g/L γλυκερόλη ήταν 0.092 g/Lh^{-1} . Κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη τα είδη *Phaeodactylum tricomutum*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum sp.* παράγουν υψηλότερες ποσότητες βιομάζας ως συνδυαστικό αποτέλεσμα της φωτοσύνθεσης και της αξιοποίησης του οργανικού άνθρακα (Adesanya et al. 2014), (T. Li et al. 2013). Συνεπώς, ο μεταβολικός φαινότυπος για το *A. protothecoides* που παρουσιάζει περιορισμένη αύξηση και κατανάλωση οργανικού άνθρακα υπό συνθήκες φωτός διαφέρει σε σχέση με τα υπόλοιπα μικροφύκη.

Μεταξύ των διαφορετικών οργανικών ενώσεων που βρίσκονται στη βιομάζα των μικροφυκών, οι πιο πλούσιες ενεργειακά ομάδες είναι τα λιπίδια (37,6 kJ/g), οι πρωτεΐνες (16,7 kJ/g) οι υδατάνθρακες (15,7 kJ/g) (Wilhelm and Jako, 2011). Παρόλο που οι υδατάνθρακες αντιπροσωπεύουν το χαμηλότερο ενεργειακό περιεχόμενο, αποτελούν σημαντικό υπόστρωμα για την παραγωγή πολλών σημαντικών βιοκαυσίμων (όπως βιοαιθανόλη, βιοβουτανόλη, βιοϋδρογόνο κ.λπ.) μέσω τεχνολογιών βιοτεχνολογικής μετατροπής (Markou, et al., 2012). Η παραγωγή υδατανθράκων έχει διπλό ρόλο στο κύτταρο των μικροφυκών. Οι υδατάνθρακες είναι δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος καθώς και ενώσεις αποθήκευσης μέσα στο κύτταρο, παρέχοντας ενέργεια για μεταβολικές διεργασίες. Τα διαφορετικά συστήματα ανάπτυξης, και οι

διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης, βρέθηκε ότι επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των υδατανθράκων. Σε ετερότροφες συνθήκες ανάπτυξης, η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες στα κύτταρα των μικροφυκών αυξήθηκε σημαντικά. Στην περίπτωση 50 g/L συγκέντρωσης γλυκερόλης στο υπόστρωμα, καταγράφηκε μέγιστη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες σε ποσοστό 44% επί της ξηρής βιομάζας σε ρυθμό αραίωσης $D = 0,027 \text{ h}^{-1}$. Παρόμοιες τιμές παρατηρήθηκαν στον ίδιο ρυθμό αραίωσης κατά την ετερότροφη ανάπτυξη σε 30 g/L και 50 g/L, υποδεικνύοντας ότι η διαφορετική συγκέντρωση γλυκερόλης δεν είχε επίδραση στο κλάσμα υδατανθράκων. Η πηγή άνθρακα δεν προκάλεσε αυξημένη αφομοίωση του υποστρώματος μέσω των οδών βιοσύνθεσης υδατανθράκων. Λαμβάνοντας υπόψη τη συσσώρευση υδατανθράκων που σημειώθηκε κάτω από ορισμένες ετερότροφες συνθήκες ανάπτυξης, σε συνδυασμό με μελέτες με παρόμοια αποτελέσματα που έχουν ήδη αναφερθεί, το *A. protothecoides* μπορεί να συμπεριληφθεί στα είδη μικροφυκών που συνήθως εμφανίζουν υψηλή εγγενή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες υπό ορισμένες συνθήκες και, επομένως, μπορεί να αποτελέσει μια καλή πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Bohutskyi *et al.*, 2015 ; Markou *et al.*, 2021).

Παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγικότητα των πρωτεϊνών σε όλα τα πειράματα που διενεργήθηκαν με παραγωγή έως και 40% επί της ξηρής βιομάζας. Κατά την ετερότροφη ανάπτυξη η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης οδήγησε σε μείωση της παραγωγικότητας πρωτεΐνης (P_{Pr}) ενώ παρόμοια μείωση παρατηρήθηκε και κατά την αύξηση του ρυθμού αραίωσης D . Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι πρωτεΐνες είναι πρωτογενείς μεταβολίτες και ακολουθούν το πρότυπο αύξησης του μικροοργανισμού, οι καλλιέργειες των μικροφυκών με υψηλότερο ρυθμό αύξησης τείνουν να παράγουν περισσότερη πρωτεΐνη (García *et al.*, 2012) Κατά τους Markou *et al.*, 2019 το *Arthrospira platensis* όταν αναπτύσσεται σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στη βιομάζα των μικροφυκών αυξήθηκε εκθετικά με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης, λόγω κάποιας μεταβολικής της αφομοίωσης που διευκόλυνε την πρωτεϊνοσύνθεση. Μεταξύ ετερότροφου και μικτότροφου συστήματος ανάπτυξης, το πρωτεϊνικό κλάσμα ενισχύθηκε υπό ετερότροφες συνθήκες, όπου ευνοήθηκε και η αύξηση των μικροφυκών.

Αναλύσεις του προφίλ αμινοξέων των κυτταρικών πρωτεϊνών που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν αυξημένες ποσότητες αργινίνης (6,7-21,3%), γλουταμινικού οξέος (10,8-17,4%), αλανίνης (6,3-10,7%), λυσίνης (4,1-11,8%), ασπαραγινικού οξέος (5,4-10,2%) και λευκίνης (6,2-9,9%). Οι διακυμάνσεις των ποσοστών των διαφόρων αμινοξέων στα κύτταρα του *A. protothecoides* αυξανόμενου του ρυθμού αραίωσης D δεν ήταν σημαντικές, εκτός από την περίπτωση της αργινίνης όπου το ποσοστό της αυξήθηκε στους μεγαλύτερους ρυθμούς αραίωσης D. Το μεγαλύτερο ποσοστό αργινίνης στο πρωτεϊνικό κλάσμα παρατηρήθηκε σε ρυθμό αραίωσης $D=0.120 \text{ h}^{-1}$. Οι Lane *et al.* 2017 κατέγραψαν ένα παρόμοιο προφίλ αμινοξέων με τα αποτελέσματά της παρούσας διατριβής στα κύτταρα του *A. protothecoides* κατά την ετερότροφη ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Οι διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας (αυτότροφη και ετερότροφη ανάπτυξη) είχαν σημαντική επίδραση στο ποσοστό κάθε αμινοξέος στο πρωτεϊνικό κλάσμα και στο συνολικό περιεχόμενο παραχθείσας πρωτεΐνης επί της παραγόμενης βιομάζας κατά την αυτότροφη ανάπτυξη παρουσιάστηκαν υψηλότερες τιμές παραχθείσας πρωτεΐνης. Οι χειρισμοί που χρησιμοποιούνται σε κατάλληλες καλλιεργητικές συνθήκες ανάπτυξης κατευθύνουν το μεταβολισμό των μικροφυκών στην παραγωγή συγκεκριμένων μεταβολιτών όπως στην βιοσύνθεση λιπιδίων έναντι της βιοσύνθεσης πρωτεϊνών.

Η παραγωγή των λιπιδίων στο μικροφύκος *A. protothecoides* παρουσίασε ενδιαφέρον καθώς τα κύτταρα του μικροφύκου συσσωρεύουν λιπίδια με ακανόνιστο τρόπο, ανεξάρτητα από την πορεία της παραγωγής βιομάζας. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπίδια παρατηρήθηκε κατά την ετερότροφη ανάπτυξη σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης στο υπόστρωμα και ήταν ισοδύναμη με 9.8% επί της παραχθείσας βιομάζας. Οι τιμές της παραγωγικότητας των λιπιδίων P_L υπό αυτές τις συνθήκες ενισχύθηκαν. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν από τους Heredia-Arroyo *et al.*, 2010 σχετικά με το μικροφύκος *A. protothecoides*, όπου παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων ήταν αντιστρόφως ανάλογος αυξανόμενης της συγκέντρωσης γλυκόζης στο υπόστρωμα με την περιεκτικότητα σε λιπίδια που το ποσοστό τους αυξήθηκε στο 23% της παραγόμενης βιομάζας. Η γλυκερόλη, αποτελεί δομικό συστατικό σε πολλά λιπίδια (τριάγλυκερόλες) και η κατανάλωση της από το μικροοργανισμό αφομοιώνεται στην μεταβολική οδό βιοσύνθεσης των λιπιδίων, κατά την ανάπτυξη του μικροφύκου σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη και ενισχύεται η συνολική περιεκτικότητα σε λιπίδια. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματά μας για την περιεκτικότητα της βιομάζας σε λιπίδια με αυτά που λαμβάνονται για

το κλάσμα πρωτεϊνών υπό ετερότροφες συνθήκες ανάπτυξης, φαίνεται ότι το *A. protothecoides* αφομοιώνει τη γλυκερόλη από το υπόστρωμα πρώτα για τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και, όταν η γλυκερόλη είναι σε περίσσεια στο υπόστρωμα, τότε διοχετεύεται στα μεταβολικά μονοπάτια βιοσύνθεσης λιπιδίων. Οι García *et al.*, 2012 ανέφεραν ότι κατά την ανάπτυξη του *A. platensis* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη παρατηρείται το ίδιο φαινόμενο.

Η περιεκτικότητα σε λιπίδια καθώς και η παραγωγικότητα των λιπιδίων μειώθηκαν, σε αυξανόμενους ρυθμούς αραίωσης. Η αλλαγή της περιεκτικότητας σε λιπίδια συναρτίζεται του ρυθμού αραίωσης έχει παρατηρηθεί για αρκετά είδη μικροφυκών, όπως *C. vulgaris* και *Chlorella pyrenoidosa* (Coelho *et al.*, 2014; Wen *et al.*, 2014). Οι χαμηλότεροι ρυθμοί αραίωσης ευνοούν το σχηματισμό λιπιδίων άρα τα κύτταρα των μικροφυκών πρέπει να παραμείνουν στον βιοαντιδραστήρα για αρκετό χρόνο, ώστε να αφομοιώσουν το διαθέσιμο άζωτο και στη συνέχεια να μετατρέψουν την υπόλοιπη πηγή άνθρακα σε λιπίδια. Σε άλλες ημιδιαλείποντος έργου καλλιέργειες μικτότροφης ανάπτυξης, έχει παρατηρηθεί ότι η βιοσύνθεση λιπιδίων συνδέεται άρρηκτα με την αύξηση του μικροοργανισμού και λαμβάνει χώρα στην εκθετική φάση ανάπτυξης και στη στατική φάση ανάπτυξης (Bekirogullari *et al.*, 2020).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας των Heredia-Arroyo *et al.*, 2010 το *A. protothecoides* έχει αναφερθεί ότι συσσωρεύει έως και 70% συνολική ποσότητα λιπιδίων σε σχέση με το ξηρό βάρος του σε βιομάζα. Στην παρούσα διατριβή το ποσοστό λιπιδίων που παράχθηκε ήταν σημαντικά χαμηλότερο. Αυτή η ανόμοια συμπεριφορά βιοσυσσώρευσης λιπιδίων αποδίδεται στις συνθήκες ανάπτυξης. Υπάρχουν καλλιεργητικές και περιβαλλοντικές παράμετροι που επηρεάζουν τη βιοσυσσώρευση λιπιδίων στα κύτταρα των μικροφυκών, μεταξύ των οποίων είναι η πηγή αζώτου και η συγκέντρωση του στο θρεπτικό υπόστρωμα (Heredia-Arroyo *et al.*, 2010). Στην παρούσα έρευνα, τα επίπεδα αζώτου στο υπόστρωμα ήταν υψηλά και συνδιαστικά με την επιλογή της πεπτόνης ως κύρια πηγή αζώτου δεν ήταν αποτελεσματική για να προκαλέσει τη μεταβολική αλλαγή και να κατευθύνει τις μεταβολικές οδούς στη βιοσύνθεση λιπιδίων. Υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η συσσώρευση λιπιδίων δεν οφείλεται μόνο στην εξάντληση των θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος, αλλά είναι αποτέλεσμα της περίσσειας άνθρακα στο μέσο ανάπτυξης (Chen *et al.*, 1991; Safdar *et al.*, 2017), μια καλλιεργητική συνθήκη η οποία ακολουθήθηκε και στην παρούσα έρευνα. Στην περίπτωσή μας, υπήρχε έλλειψη ενός παράγοντα

στρες ικανού να αναστείλει την κυτταρική αύξηση ενεργοποιώντας το μεταβολισμό βιοσύνθεσης λιπιδίων. Η περιεκτικότητα της παραχθείσας βιομάζας σε λιπίδια επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία φωτός στο μικτότροφο σύστημα καλλιέργειας. Μειωμένη περιεκτικότητα λιπιδίων και μειωμένη παραγωγικότητα λιπιδίων καταγράφηκαν υπό μικτότροφες συνθήκες ανάπτυξης σε σύγκριση με την ετερότροφη ανάπτυξη. Σύμφωνα με τα ευρήματα των Markou *et al.*, 2019 κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη του *A. protothecoides* σε διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη στο υπόστρωμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πεπτόνης παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα αυτά με της παρούσας διατριβής. Η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της χλωροφύλλης, της φωτοσύνθεσης και της βιοσύνθεσης καροτενοειδών μειώνεται κατά την ετερότροφη ανάπτυξη των μικροφυκών, ενώ τα γονίδια για τη γλυκόλυση, του κύκλου TCA και για τη σύνθεση λιπαρών οξέων ενισχύονται (Gao *et al.*, 2014)

Αρκετά είδη μικροφυκών είναι ευρέως γνωστά για την παραγωγή λιπαρών οξέων μέσω της ρύθμισης των παραμέτρων ανάπτυξης κατά την καλλιέργειά τους. Στα κύτταρα του *A. protothecoides*, οι τριακυλογλυκερόλες συνήθως συντίθενται από C14 έως C28 όταν καλλιεργούνται σε συστήματα ετερότροφης ανάπτυξης (Patel *et al.*, 2018).

Δεκατέσσερις διαφορετικοί τύποι λιπαρών οξέων, συμπεριλαμβανομένων των κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων, ανιχνεύθηκαν κατά την ετερότροφη ανάπτυξη του *A. protothecoides*. Το ελαϊκό οξύ (C18:1 έως 55,6%), το λινολεϊκό (C18:2 έως 19,8%) και το παλμιτικό οξύ (C16:0 έως 12,5%) ήταν τα κύρια συστατικά και των παραγόμενων λιπιδίων και αποτελούν περίπου το 85% του συνόλου των λιπαρών οξέων. Παρόμοια αποτελέσματα για τη βιοσύνθεση λιπιδίων παρατηρήθηκαν από τους Rismani-Yazdi *et al.* 2014, κατά την ετερότροφη ανάπτυξη *A. protothecoides* σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα καλλιέργειας με πηγή άνθρακα στο υπόστρωμα τη γλυκόζη. Στην παρούσα μελέτη, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο προφίλ των λιπαρών οξέων μεταξύ ετερότροφης και μικτότροφης ανάπτυξης. Σε μικτοτροφικές συνθήκες ανάπτυξης, τα ποσοστά των κύριων λιπαρών οξέων που παράχθηκαν ήταν: 61.2% για το ελαϊκό, 18.8% για το λινολεϊκό και 11.4% για το παλμιτικό οξύ. Οι Rismani-Yazdi *et al.* 2014, αντίθετα, παρατήρησαν διαφορετικές συνθέσεις λιπαρών οξέων μεταξύ της αυτότροφης και της ετερότροφης ανάπτυξης του *A. protothecoides*. Αυτή η παρατήρηση, σε συνδυασμό με τα

αποτελέσματά μας, αποτελεί ένδειξη ότι το *A. protothecoides*, με ταυτόχρονη παρουσία φωτός και πηγής άνθρακα στο υπόστρωμα, προτιμά να δρα ως ετερότροφος μικροοργανισμός. Η πλειοψηφία των λιπαρών οξέων που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Οι μεθυλεστέρες των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων θεωρούνται καλή πηγή για την παραγωγή βιοντίζελ, σε σύγκριση με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, λόγω του υψηλότερου αριθμού οκτανίων που έχουν.

Οι διαλείποντος έργου καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν με διαφορετική φωτοπερίοδο και εντάσεις φωτισμού οδήγησαν σε συμπεράσματα σχετικά με τις συνθήκες που ευνοούν τη μικτότροφη ανάπτυξη του μικροφύκου *A. protothecoides*, καθώς και την παραγωγή μεταβολιτών ενδιαφέροντος (πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες, χρωστικές). Οι αυξημένες αρχικές συγκεντρώσεις της γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο όχι μόνο δεν μπορούν να καταβολιστούν επαρκώς, αλλά δρουν παρεμποδιστικά ως ένα βαθμό στην κυτταρική αύξηση. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για το *A. protothecoides* κατά την καλλιέργειά του σε γλυκερόλη (Korozi *et al.* 2022), καθώς και κατά την καλλιέργειά του σε γλυκόζη (Heredia-Arroyo, Wei, and Hu 2010). Το φως υψηλής έντασης, ειδικά παρουσία οξυγόνου, μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) όπως ρίζες υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Αυτά τα ROS μπορούν να βλάψουν τα κύτταρα και τα βιοσυνθετικά τους μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τις μεταβολικές διεργασίες.

Αναφορικά με την ένταση του φωτός, ο μέγιστος ρυθμός αύξησης της βιομάζας ($\mu=1.65 \text{ h}^{-1}$) παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με υψηλότερη ένταση φωτός (4.500 lux). Στην υψηλή ένταση φωτός (4.500 lux) ευνοήθηκε η παραγωγή λιπιδίων και πρωτεϊνών. Θετική επίδραση στην παραγωγή βιομάζας και στην παραγωγή των υδατανθράκων είχε η μικρή φωτοπερίοδος (12:12h). Παρατηρήθηκε, ότι το μικροφύκος *A. protothecoides*, αναπτύσσεται καλύτερα σε υψηλή ένταση φωτός (4.500 lux) και μικρότερη φωτοπερίοδο (12:12h). Λαμβάνοντας υπόψη και τα αντίστοιχα αποτελέσματα που έχουν δημοσιευθεί για τα συνεχή συστήματα καλλιεργειών (Korozi *et al.* 2022; Markou *et al.* 2021), όπου υποστηρίζεται η θεωρία ότι η ανάπτυξη του μικροφύκου *A. protothecoides* κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη υστερεί σε απόδοση βιομάζας σε σύγκριση την ετερότροφη ανάπτυξη, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η μικρή φωτοπερίοδος ευνόησε την

ανάπτυξη του μικροφύκου, καθώς όσο λιγότερη η έκθεσή του στο φως τόσο υψηλότερη σημειώθηκε η αύξηση του. Ένα από τα εντυπωσιακά αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν είναι το υψηλό ποσοστό παραγωγής πρωτεϊνών (60% της παραχθείσας βιομάζας) σε όλες τις συνθήκες φωτισμού και διάρκειας φωτοπεριόδου, καθώς και η παραγωγή λιπιδίων σε σύγκριση με προηγούμενα πειράματα που έχουν διεξαχθεί στο *A. protothecoides*. (Korozi et al. 2022; Markou et al. 2021).

4. *Scenedesmus quadricauda*:

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την ετερότροφη και τη μικτότροφη ανάπτυξη του *S. quadricauda* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη σε δύο διαφορετικές πηγές αζώτου μια ανόργανη (NH_4Cl) και μία οργανική πεπτόνη σε αναλογία C/N=20 έδωσαν νέα δεδομένα για τον τρόπο καλλιέργειας του. Κατά την ετερότροφη ανάπτυξη το μικροφύκος αναπτύχθηκε σε περιβάλλον με 10 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στο υπόστρωμα με πεπτόνη ως πηγή αζώτου. Σύμφωνα με ευρήματα των Song and Pei, 2018 σε διαλείποντος έργου συστήματα ετερότροφης ανάπτυξης με χρήση ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, η βέλτιστη συγκέντρωση άνθρακα στο υπόστρωμα ήταν τα 4 g/L με παραγωγή 0.44 g/L βιομάζα, στη διάρκεια 8 ημερών. Στην παρούσα έρευνα κατά την ετερότροφη ανάπτυξη με 10 g/L συγκέντρωση ακατέργαστης γλυκερόλης η παραγωγή βιομάζας ήταν 1.47 g/L. Οι Rai et al. (2016) καλλιέργησαν το *Scenedesmus sp.* σε μικτοτροφικές συνθήκες ανάπτυξης χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα γλυκερόλη σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1% έως 5% (v/v), παρατηρώντας υψηλότερη παραγωγή βιομάζας και συσσώρευσης λιπιδίων. Η παραχθείσα βιομάζα του *Scenedesmus sp.* άγγιξε τα 0.414 g/L κατά την ανάπτυξη σε 10 g/L γλυκερόλης, διπλάσια τιμή από την αυτότροφη ανάπτυξη (0.223 g/L) (Rai et al., 2016).

Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι τα μικροφύκη μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη ξυλόζη ως πηγή άνθρακα κατά την ετερότροφη ανάπτυξη (Leite et al. 2015). Κατά την ετερότροφη ανάπτυξη του μικροφύκου *S. quadricauda* παρατηρήθηκε μείωση της παραγωγής των λιπιδίων, και φαίνεται ότι παρουσία φωτός ευνοείται η πρόσληψη της πηγής άνθρακα που υπάρχει στο υπόστρωμα (Perez-Garcia et al. 2011).

Το *S. quadricauda* κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη του στελέχους δοκιμάστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης και σε διαφορετικές μονοχρωματικές πηγές φωτός. Οι δοκιμές έγιναν σε ανόργανη και οργανική πηγή αζώτου και το στέλεχος έδειξε προτίμηση στην ανάπτυξη παρουσία οργανικής πηγής με πεπτόνη σε αναλογία C/N=20. Το *S. quadricauda* έδειξε καλύτερη αύξηση στο πορτοκαλί και στο κόκκινο φως ενώ στο μπλε φως δεν μεγάλωσε ικανοποιητικά. Το στέλεχος παρουσίασε ικανοποιητική αύξηση σε χαμηλή συγκέντρωση γλυκερόλης 10 g/L στο υπόστρωμα, ενώ με την αύξηση της συγκέντρωσης στα 20 g/L και 30 g/L παρατηρήθηκε παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μικροφύκου. Έχει αναφερθεί ότι το *C. vulgaris* στο μπλε φως αυξάνει τη συγκέντρωση των χλωροφυλλών στα κύτταρα μικροφυκών, τα οποία αναδιατάσσονται προκειμένου να ενισχυθεί η παρουσία τους στο σύμπλεγμα συλλογής φωτός και στα κέντρα αντίδρασης, αυξάνοντας έτσι το μέγεθος του φωτοσυστήματος II (PSII). Η προσαρμογή των μικροφυκών στις συνθήκες φωτός συνεπάγεται τη λειτουργία φωτοϋποδοχέων, οι οποίοι προσαρμόζουν αυτές τις επιδράσεις. Διαφορετικοί φωτοϋποδοχείς (κρυπτόχρωμα) δρουν στην περιοχή του μπλε ορατού φάσματος στα μικροφύκη. Αυτός ο τύπος φωτοϋποδοχέα στο είδος *Scenedesmus obliquus* λειτουργεί ενεργοποιώντας τη σύνθεση χλωροφυλλών ως απόκριση στην ένταση και το προφίλ της ακτινοβολίας που λαμβάνεται από τα κύτταρα (Hermsmeier *et al.*, 1991; Humbeck *et al.*, 1988). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι το μπλε φως ενίσχυσε τη συσσώρευση λιπιδίων στο *S. quadricauda*. Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι το λευκό και το κόκκινο φως ενιχύουν το ρυθμό αύξησης και της παραγωγικότητας βιομάζας τόσο στο *C. vulgaris* όσο και στο *S. quadricauda* (Anyanwu *et al.*, 2022). Αντίθετα, το μπλε φως αναφέρεται ότι οδηγεί σε υψηλότερο ρυθμό παραγωγής βιομάζας από το κόκκινο και το κίτρινο φως του *S. quadricauda* (Niizawa *et al.*, 2017), κάτι το οποίο δεν έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η σύνθεση της παραγόμενης βιομάζας ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με το στέλεχος των μικροφυκών και τις συνθήκες καλλιέργειας (π.χ. καλλιεργητικές παράμετροι, ανεπάρκεια αζώτου, ένταση φωτός και φάσμα φωτός, θερμοκρασία κ.λπ.). Για τα στελέχη *Scenedesmus* η βιοσύνθεση της βιομάζας έχει υπολογιστεί ότι περιέχει 17 έως 50% πρωτεΐνες, 12 έως 50% λιπίδια και 6 έως 52% υδατάνθρακες (Lavasseeu *et al.*, 2020). Οι συγκεντρώσεις είναι σύμφωνες με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι το *S. quadricauda* είναι σε θέση να αλλάζει τις βιοχημικές οδούς του και, επομένως,

να οδηγεί το μεταβολισμό του στη συσσώρευση μεταβολιτών σε απόκριση στο διαφορετικό μήκος κύματος φωτός. Το *S. quadricauda* κατά την μικτότροφη ανάπτυξη σε συγκέντρωση 10 g/L γλυκερόλης σημείωσε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στο λευκό φως, την υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπίδια στο μπλε και το κόκκινο φως και την υψηλότερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες στο λευκό φως.

Σύμφωνα με τους Markou et al. 2021 τα *A. protothecoides* και *Auxenochlorella pyrenoidosa* έδειξαν ότι η παραγωγικότητα βιομάζας σε μπλε φωτός αυξήθηκε κατά 7,3%, 9,7%, 15% και 16% σε σύγκριση με το λευκό, το κόκκινο, το κίτρινο και το πράσινο φως, αντίστοιχα. Κατά τους Chen and Su 2020 το κόκκινο φως οδήγησε σε μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας από τα άλλα μήκη κύματος φωτός όταν η ένταση του φωτός ήταν μεγαλύτερη από $110 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Η χρήση διαφορετικού μήκους κύματος έδωσε παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση του φωτισμού στα στελέχη. Παρατηρήθηκε ότι σε μπλε φωτισμό σημειώθηκε χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας σε σύγκριση με τον κόκκινο και τον λευκό φωτισμό. Ο μπλε φωτισμός παρέχει μικρότερα μήκη κύματος και υψηλότερη ενέργεια και οδηγεί σε φωτο-αναστολή (Chen and Su 2020). Η μέγιστη αποδοτικότητα ως προς τη μεταβολική παραγωγικότητα παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξη σε κόκκινο φως με μέγιστη την παραγωγή λιπιδίων ενώ αντίστοιχα η μέγιστη παραγωγή πρωτεϊνών και υδατανθράκων σημειώθηκε στο λευκό φως πράγμα που ενισχύει και πάλι τη θεωρία ότι το διαφορετικό μήκος κύματος φωτός επηρεάζει διαφορετικά τις μεταβολικές διεργασίες του μικροοργανισμού. Έως τώρα δεν είχε μελετηθεί το συγκεκριμένο στέλεχος περαιτέρω για αξιοποίηση σε εναλλακτικές πηγές άνθρακα όπως η ακατέργαστη γλυκερόλη και αφήνει ανοιχτό το ενδεχόμενο για μελλοντικές δοκιμές σε περιβάλλοντα με γλυκερόλη και την αξιοποίηση των λιπιδίων που παράγονται ιδιαίτερα σε μικτότροφα συστήματα.

Μορφολογικές διαφορές:

Η επίδραση του φωτισμού ήταν εμφανής στις παρατηρούμενες μορφολογικές διαφορές, ιδιαίτερα στο *S. quadricauda*, το οποίο εμφάνισε διαφορετικό φαινότυπο ως απόκριση σε διάφορες πηγές φωτός. Το *Scenedesmus sp.* παρουσιάζει υψηλή ευπλαστότητα και επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες ανάπτυξης. Η ιδιότητα αυτή έδωσε τη δυνατότητα να αξιολογηθεί η διαφορετική συμπεριφορά των κυττάρων ανάλογα με το μήκος κύματος του φωτός. Τα αποτελέσματα είναι πολύ σημαντικά, καθώς, μέχρι τώρα, τα υπάρχοντα δεδομένα

σχετικά με τους διαφορετικούς φαινοτύπους προκύπταν από την ποικιλία των περιβαλλοντικών συνθηκών (δηλαδή, ένταση φωτός, θερμοκρασία) (Baudelet *et al.*, 2017).

Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε ότι μόνο κατά την ανάπτυξη σε μπλε φως τα κύτταρα δημιούργησαν κοινόβια δύο κυττάρων μικρότερου μεγέθους από τα αγρίου τύπου, ενώ σε λευκό, πορτοκαλί και κόκκινο φωτισμό σχηματίστηκαν μεγαλύτερα κύτταρα που δημιούργησαν κοινόβια των τεσσάρων κυττάρων. Οι διαφορές στον αριθμό των κυττάρων που παρατηρούνται στο κοινόβιο των μικροφυκών μπορεί να εξαρτώνται από πολλούς διαφορετικούς παράγοντες και είναι ενδεικτικές των διακριτών μεταβολικών οδών που χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα όταν αναπτύσσονται κάτω από διαφορετικά μήκη κύματος φωτός (Sutherland *et al.*, 2021). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται, ότι η επίδραση των καλλιεργητικών παραμέτρων, όπως για παράδειγμα το είδος της πηγής άνθρακα, στον σχηματισμό κοινοβίων δεν είναι απόλυτα κατανοητός για το γένος *Scenedesmus* και, ως εκ τούτου, δεν είναι εύκολο να εξηγηθεί με βεβαιότητα. Δεδομένου ότι έχει προταθεί ότι κατά τον σχηματισμό του κοινοβίου, απαιτούνται αυξημένοι ενεργειακοί πόροι από τα κύτταρα, μπορεί να θεωρηθεί ότι το λευκό, το πορτοκαλί και το κόκκινο φως προάγουν την ταχύτερη κυτταρική διαίρεση συγκριτικά με το μπλε φως. Δηλαδή το μπλε φως προκαλεί χαμηλότερο ρυθμό αύξησης και παραγωγικότητας βιομάζας, κάτι που παρατηρήθηκε και στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο κύριος στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η αξιοποίηση της ακατέργαστης (crude) γλυκερόλης, που αποτελεί παραπροϊόν της βιομηχανίας παραγωγής βιοντίζελ, ως πηγή άνθρακα για την καλλιέργεια μικροφυκών, με σκοπό την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Αρχικά, διερευνήθηκε η δυνατότητα διαφόρων στελεχών μικροφυκών να αναπτύσσονται ετερότροφα ή μικτότροφα σε υπόστρωμα ακατέργαστης γλυκερόλης. Τα στελέχη που είχαν τη δυνατότητα να αξιοποιούν την ακατέργαστη γλυκερόλη, καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες (όπως σταδιακή αύξηση των συγκεντρώσεων γλυκερόλης, παρουσία ή όχι φωτός, φωτισμός με διαφορετικό μήκος κύματος, είδος πηγής αζώτου, διαφορετικός λόγος C/N, διαφορετική ένταση φωτός και φωτοπερίοδος) και συστήματα καλλιέργειας (όπως διαλείποντος έργου, ημιδιαλείποντος έργου, συνεχές), ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για τις άριστες συνθήκες αύξησης των επιλεγμένων στελεχών, αλλά και για την αποδοτικότερη παραγωγή βιομάζας και χρήσιμων μεταβολιτών (πρωτεΐνες, λιπίδια, υδαάνθρακες και χρωστικές). Επιπλέον, επισημάνθηκαν οι συνθήκες καλλιέργειας που θα πρέπει να εφαρμόζονται κατά περίπτωση, ώστε να καθοδηγείται ο μεταβολισμός του μικροφύκου στην παραγωγή συγκεκριμένων μεταβολιτών κατά προτεραιότητα. Τέλος, έγιναν μικροσκοπικές παρατηρήσεις για να διαπιστωθούν οι μεταβολές που συμβαίνουν στο φαινότυπο σε κυτταρικό επίπεδο, ανάλογα με τις καλλιεργητικές συνθήκες.

Ανακεφαλαιώνοντας τα δεδομένα που προέκυψαν από την διεξαγωγή της παρούσας διδακτορικής έρευνας απαντήθηκαν τα επιστημονικά ερωτήματα και επιτεύχθηκαν οι στόχοι που είχαν τεθεί προς διερεύνηση. Τα δεδομένα που προέκυψαν οδηγούν στην πρόταση νέων στρατηγικών καλλιέργειας για την παραγωγή προϊόντων και μεταβολιτών υψηλής προστιθέμενης αξίας χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την ακατέργαστη γλυκερόλη. Συγκεκριμένα από πειράματα που έγιναν σε συστήματα διαλείποντος, ημιδιαλείποντος έργου και συνεχούς καλλιέργειας με τη χρήση βιοαντιδραστήρα ελέγχοντας τις κύριες παραμέτρους που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών, όπως το φως (ετερότροφες καλλιέργειες και μικτότροφες με χρήση μονοχρωματικών πηγών φωτός), η πηγή αζώτου (οργανική και ανόργανη) και η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα, εξήχθησαν τα εξής ειδικά συμπεράσματα:

- Η συγκριτική και συστηματική μελέτη των πέντε στελεχών μικροφυκών (*A. protothecoides*, *C. vulgaris*, *S. quadricauda*, *S. obliquus* και *T. chuii*) κρίθηκαν υψηλού βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος τα στελέχη *A. protothecoides*, *C. vulgaris* και *S. quadricauda* λόγω της ικανότητας τους να ανταποκρίνονται με επιτυχία στις διάφορες καλλιεργητικές στρατηγικές που εφαρμόστηκαν ώστε να αξιοποιούν επιτυχώς την ακατέργαστη γλυκερόλη από το υπόστρωμα ανάπτυξης τους. Τα στελέχη μικροφυκών *T. chuii* καθώς και το *S. obliquus* παρουσίασαν αδυναμία ανάπτυξης στις διάφορες καλλιεργητικές στρατηγικές που εφαρμόστηκαν οπότε δεν κρίθηκαν υψηλού βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος στην παρούσα μελέτη.
- Το στέλεχος *A. protothecoides* παρουσίασε τη μέγιστη δυναμικότητα ως προς την ικανότητα του να καταναλώνει την ακατέργαστη γλυκερόλη στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης ως κύρια πηγή άνθρακα κατά τον ετερότροφο μεταβολισμό. Κατά την ετερότροφη ανάπτυξη σε διαλείποντος έργου καλλιέργειες παρατηρήθηκε η ικανότητα του να αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις που αγγίζουν τα 80 g/L και να παράγει ξηρή βιομάζα σε ποσότητες έως και 18.4 g/L με απόδοση βιομάζας $Y_{x/s}=0.23$ g/g. Κατά την ετερότροφη ανάπτυξη σε 30 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στο υπόστρωμα παρατηρήθηκε μειωμένη παραγωγή βιομάζας (παραχθείσα ξηρή βιομάζα 2.19 g/L και απόδοση $Y_{x/s}=0.06$ g/g). Επομένως το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι το φως δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη του μικροφύκου και προκαλεί παρεμπόδιση της κατανάλωσης του άνθρακα από το υπόστρωμα.
- Το στέλεχος *C. vulgaris* παρουσίασε τη μέγιστη δυναμικότητα ως προς την ικανότητα του να καταναλώνει την ακατέργαστη γλυκερόλη στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης ως κύρια πηγή άνθρακα κατά την μικότροφη ανάπτυξη σε διαλείποντος έργου καλλιέργειες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης έως 20 g/L σε σύγκριση με την ετερότροφη ανάπτυξη, όπου η μέγιστη συγκέντρωση γλυκερόλης στην οποία αναπτύχθηκε επιτυχώς ήταν 10 g/L. Τα ευρήματα που προέκυψαν αναφορικά με τις διαλείποντος έργου καλλιέργειες με τη χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός χρώματος μπλε, έδειξαν ότι το μπλε χρώμα ευνοεί την παραγωγή βιομάζας και την παραγωγικότητα βιομάζας ανά

γραμμάριο καταναλωθείσας γλυκερόλης (1.68 g/L, $Y_{x/s}= 0.09$ g/g) συγκριτικά με την ανάπτυξη σε λευκό φωτισμό (μάρτυρας) ($Y_{x/s}= 0.07$ g/g και παραχθείσα βιομάζα 1.29 g/L), ενώ η παραγωγή λιπιδίων άγγιξε τα 0.218 g/L. Επομένως το στέλεχος *C. vulgaris* το οποίο αποτελεί ένα μικροφύκος υψηλού βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος, παρουσιάζει μια γενική αύξηση των παραγόμενων μεταβολιτών στόχων και κυρίως των λιπιδίων.

- Το στέλεχος *S. quadricauda* είναι ένα μικροφύκος που παρουσίασε ικανότητα κατανάλωσης της ακατέργαστης γλυκερόλης κατά τον ετερότροφο μεταβολισμό σε συγκέντρωση έως 10 g/L αλλά και κατά το μικτότροφο μεταβολισμό στην ίδια συγκέντρωση. Καλύτερη απόδοση παρατηρήθηκε κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη σε διαλείποντος έργου καλλιέργειες, με τη χρήση μονοχρωματικών πηγών φωτός όπου το μικροφύκος αναπτύσσεται καλύτερα σε διαφορετικά μήκη κύματος φωτός σε σχέση με το μάρτυρα (λευκό). Ειδικότερα σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε σε πορτοκαλί φως (1.86 g/L και $Y_{x/s}=0.18$ g/g), τιμές συγκριτικά υψηλότερες από εκείνες του λευκού φωτός (μάρτυρας) (1.57 g/L και $Y_{x/s}=0.16$ g/g), ενώ η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων παρατηρήθηκε σε κόκκινο φως (0.358 g/L).
- Η πηγή αζώτου αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στη βιοχημική σύσταση της βιομάζας. Έπειτα από δοκιμές με διαφορετικές πηγές αζώτου τόσο σε ανόργανες όσο και σε οργανικές πηγές, σε όλα τα στελέχη παρατηρήθηκε υψηλότερη απόδοση σε βιομάζα όταν η πηγή αζώτου στα υποστρώματα ανάπτυξης ήταν οργανική. Μάλιστα, σε διάφορες αναλογίες C/N κυρίως 1:1 και 20:1 παρατηρήθηκε ότι όταν υπάρχει υπερεπάρκεια αζώτου στο υπόστρωμα ευνοείται η βιοσύνθεση πρωτεϊνών, ενώ αντίθετα σε έλλειψη αζώτου τα στελέχη έτειναν να παράγουν περισσότερα λιπίδια
- Τα αποτελέσματα από τα ημιδιαλείποντος έργου συστήματα (semi-continuous) καλλιέργειας στο μικροφύκος *C. vulgaris* κατά την ετερότροφη ανάπτυξη υπέδειξαν ότι αυτό αναπτύσσεται καλύτερα σε οργανική πηγή αζώτου (εκχύλισμα ζύμης) σε σχέση με την ανάπτυξη του σε NaNO_3 . Οι παραγωγικότητες συστήματος τόσο ως προς τη βιομάζα όσο και ως προς τους μεταβολίτες κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα χωρίς να δώσουν

κάποιο νέο δεδομένο συγκριτικά με τα δεδομένα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ($P_x=0.138 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, $P_L=0.048 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, $P_c=0.052 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, $P_{pr}=0.091 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$)

- Αναφορικά με τα αποτελέσματα της αύξησης του *A. protothecoides* στα ημιδιαλείποντος έργου συστήματα (semi-continuous) σε ετερότροφη και μικτότροφη ανάπτυξη με τη δοκιμή διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου στο θρεπτικό μέσο (πεπτόνη σε συγκεντρώσεις 5, 4, 3, 2, 1 και 0.5g/L) και σταθερή συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L στο υπόστρωμα, διαπιστώθηκε ότι το μικροφύκος παρουσιάζει πολύ υψηλότερη παραγωγικότητα κατά την ετερότροφη ανάπτυξη σε σχέση με τη μικτότροφη ($P_x=1.18 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, $P_x=0.54 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$). Η παραγωγικότητα των μεταβολιτών κατά την ετερότροφη ανάπτυξη ήταν υψηλότερη από τη μικτότροφη, με μέγιστη την παραγωγικότητα των λιπιδίων ($P_L=0.309 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$). Σχετικά με τις πηγές αζώτου κατά την ετερότροφη ανάπτυξη, η υψηλότερη παραγωγικότητα του συστήματος σε βιομάζα και μεταβολίτες παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 5 g/L πεπτόνη ενώ κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη η μέγιστη παραγωγικότητα της βιομάζας και των πρωτεϊνών παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 4 g/L πεπτόνη ($P_x=0.54 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ και $P_{pr}=0.25 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$) ενώ η μέγιστη παραγωγικότητα λιπιδίων παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 3 g/L πεπτόνη ($P_L=0.049 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$). Επομένως οι αποδόσεις του μικροφύκου κατά την ετερότροφη ανάπτυξη του σε ημιδιαλείποντος έργου σύστημα είναι πολύ υψηλές.
- Μετά τη διενέργεια πειραμάτων σε ημιδιαλείποντος έργου συστήματα καλλιέργειας (Fed-Batch) για το στέλεχος *A. protothecoides* με σταδιακή προσαρμογή του μικροοργανισμού σε συγκεντρώσεις γλυκερόλης 20, 30 και 50 g/L στο υπόστρωμα κατά την ετερότροφη και μικτότροφη ανάπτυξη με χρήση μονοχρωματικών πηγών φωτός συλλέχθηκαν σημαντικά δεδομένα για τις συνθήκες καλλιέργειάς του. Τα δεδομένα που αφορούσαν την απόδοση της βιομάζας σε όλες τις συγκεντρώσεις γλυκερόλης τόσο κατά την ετερότροφη όσο και κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη του μικροφύκου έδωσαν κατά μέσο όρο απόδοση βιομάζας $Y_{x/s}=0.97 \text{ g/g}$. Εξάιρεση αποτέλεσε η μείωση της απόδοσης βιομάζας ($Y_{x/s}=0.35 \text{ g/g}$) που σημειώθηκε κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη του μικροφύκου σε 50 g/L συγκέντρωση γλυκερόλης. Η μείωση αυτή αποδόθηκε στο φαινόμενο της φωτοαναστολής που έχει

παρατηρηθεί στο μικροφύκος *A. protothecoides*, όπου παρουσία φωτός το στέλεχος αδυνατεί να αφομοιώσει με την ίδια αποδοτικότητα την διαθέσιμη πηγή άνθρακα από το υπόστρωμα ανάπτυξης του. Η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων παρατηρήθηκε κατά τη μικτότροφη ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε 30 g/L συγκέντρωση γλυκερόλης (1.48 g/L, δηλαδή το 22% επί της παραχθείσας βιομάζας). Η μέγιστη παραγωγή πρωτεϊνών παρατηρήθηκε κατά την ετερότροφη ανάπτυξη σε 50 g/L γλυκερόλης (5.42 g/L πρωτεΐνη, δηλαδή το 55% επί της παραχθείσας βιομάζας). Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω δεδομένα μπορεί να προταθεί σαν καλλιεργητική στρατηγική η σταδιακή προσαρμογή του μικροφύκους σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης, σε ετερότροφη ή μικτότροφη καλλιέργεια αναλόγως με την επιθυμητή κατεύθυνση των μεταβολικών οδών του μικροοργανισμού. Η μικτότροφη ανάπτυξη με χρήση κόκκινου φωτός μπορεί να προταθεί για τη στοχευμένη βιοσύνθεση λιπιδίων ενώ η ετερότροφη ανάπτυξη μπορεί να προταθεί για τη στοχευμένη παραγωγή πρωτεϊνών.

- Η διερεύνηση της ανάπτυξης του στελέχους *C. vulgaris* σε συνθήκες ετερότροφης και μικτότροφης ανάπτυξης με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός κόκκινου και μπλε χρώματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης σε συνεχή συστήματα καλλιέργειας με τη χρήση βιοαντιδραστήρα έδωσαν νέα δεδομένα για τις στρατηγικές καλλιέργειας που μπορούν να εφαρμοστούν στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του μικροοργανισμού παρατηρήθηκαν κατά την μικτότροφη ανάπτυξη με μονοχρωματική πηγή φωτός μπλε χρώματος σε βιοαντιδραστήρα με συγκέντρωση γλυκερόλης στο υπόστρωμα 20 g/L. Στους χαμηλότερους ρυθμούς αραίωσης ($D < 0.014 \text{h}^{-1}$), η παραγωγή βιομάζας ήταν 1.85 g/L με παραγωγικότητα $P_x = 0.026 \text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ και η παραγωγή του κύριου μεταβολίτη στόχου που είναι τα λιπίδια, ήταν (0.814 g/L δηλαδή το 40% επί της παραχθείσας βιομάζας), και παραγωγικότητα $P_L = 1.16 \text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$.
- Η διερεύνηση της ανάπτυξης του στελέχους *A. protothecoides* σε συνθήκες ετερότροφης και μικτότροφης ανάπτυξης με χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός κόκκινου χρώματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης σε συνεχή συστήματα καλλιέργειας με τη

χρήση βιοαντιδραστήρα έδωσαν νέα δεδομένα για τις στρατηγικές κατεύθυνσης του μεταβολικού φαινοτύπου του μικροοργανισμού προς την παραγωγή συγκεκριμένων μεταβολιτών στόχων βιοτεχνολογικού και εμπορικού ενδιαφέροντος. Κατά τον ετερότροφο μεταβολισμό του το μικροφύκος έχει την ικανότητα να αφομοιώνει υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης από το υπόστρωμα και παράγει σημαντικές ποσότητες βιομάζας (7.89 g/L βιομάζα σε 50 g/L γλυκερόλη) σε χαμηλούς ρυθμούς αραίωσης ($D < 0.04h^{-1}$). Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν σχετικά με την παραγωγή των μεταβολιτών προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο μεταβολικός φαινότυπος του μικροφύκου μπορεί να αλλάξει ανάλογα με το ρυθμό αραίωσης D . Το μικροφύκος έχει την ιδιότητα σε χαμηλότερους ρυθμούς αραίωσης να διοχετεύει τον άνθρακα που κατανάλωσε από το υπόστρωμα προς τη βιοσύνθεση αρχικά πρωτεϊνών και όταν βρίσκεται σε περίσσεια κατευθύνεται προς τα μεταβολικά μονοπάτια βιοσύνθεσης λιπιδίων. Επμένως η καλλιέργεια του *A. protothecoides* σε διαφορετικές καλλιεργητικές στρατηγικές μπορεί να εφαρμοστεί σε βιομηχανικής κλίμακας μονάδες προς παραγωγή πρωτεϊνών υψηλού ενδιαφέροντος προς την ανθρώπινη διατροφή καθώς και προς την παραγωγή λιπιδίων για την παραγωγή βιοντίζελ.

- Η ανάλυση του βιοχημικού προφίλ λιπιδίων στα είδη *A. protothecoides* και *C. vulgaris* οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η χρήση της γλυκερόλης ως κύρια πηγή άνθρακα στο θρεπτικό υπόστρωμα συνδυαστικά με τους παράγοντες αύξησης που προτάθηκαν πριμοδότησε τη βιοσύνθεση των TAG λιπιδίων και κυρίως του ολεϊκού (45-50%) το οποίο χρησιμοποιείται στη φαρμακοβιομηχανία για παραγωγή καλλυντικών, του λινολεϊκού (15-8%) που χρησιμοποιείται στον αγροδιατροφικό τομέα και του παλμιτικού (14-28%) που αξιοποιείται για την παραγωγή βιοντίζελ.

Γενικά συμπεράσματα: Τα ευρήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής έδωσαν νέα δεδομένα ως προς τον τρόπο που μπορούν να αξιοποιηθούν στελέχη μικροφυκών υψηλού βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος και να εφαρμοστούν νέες καλλιεργητικές στρατηγικές αξιοποίησης τους τόσο εργαστηριακά ως προς την βιοτεχνολογική τους αξιολόγηση όσο και σε καλλιέργειες βιομηχανικής κλίμακας. Η καινοτομία στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγκειται

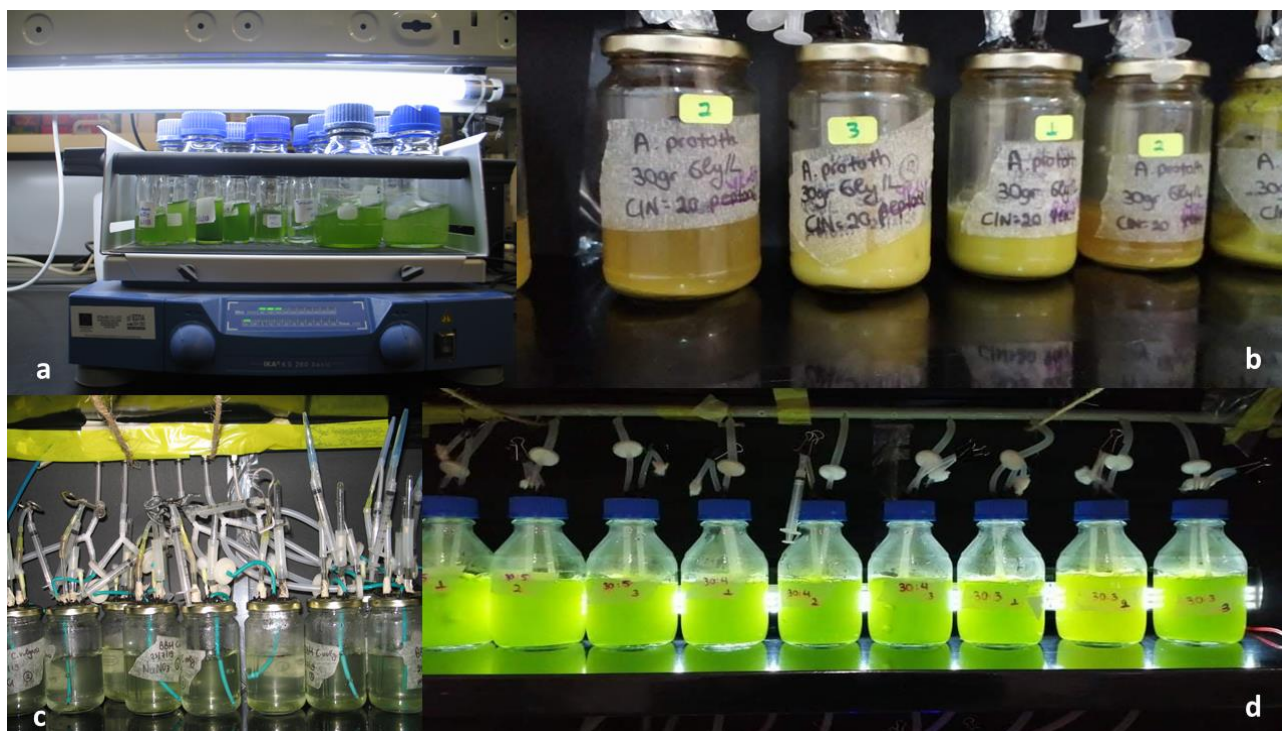
στη συγκριτική συστηματική μελέτη πέντε στελεχών μικροφυκών (*A. protothecoides*, *C. vulgaris*, *S. quadricauda*, *S. obliquus* και *T. chuii*) σε διαφορετικές συνθήκες ετερότροφης και μικτότροφης καλλιέργειας, σε τρία διαφορετικά συστήματα ανάπτυξης (διαλείποντος έργου, ημιδιαλείποντος έργου και συνεχούς καλλιέργειας) με στόχο την αξιολόγηση της δυναμικότητας παραγωγής βιομάζας και μεταβολιτών. Οι συνδυαστικές καλλιεργητικές παράμετροι που εφαρμόστηκαν στην παρούσα έρευνα έδειξαν τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζουν οι εκάστοτε συνθήκες το μεταβολικό φαινότυπο των μικροφυκών και να κατευθύνουν τα μεταβολικά μονοπάτια του μικροοργανισμού προς τη βιοσύνθεση συγκεκριμένων μεταβολιτών στόχων.

Το πεδίο της έρευνας για το συγκεκριμένο θέμα μπορεί να επεκταθεί μελλοντικά στην αξιοποίηση φθινών πηγών οργανικού αζώτου, όπως απόβλητα από πτηνοτροφικές μονάδες ή και απόνερα από καλλιέργειες θερμοκηπίων που είναι πλούσια σε άζωτο και φώσφορο σε συνδυασμό με ακατέργαστη γλυκερόλη ως κύρια πηγή άνθρακα. Τέλος, ένα νέο πεδίο που αξίζει να διερευνηθεί είναι η συγκαλλιέργεια κυανοβακτηρίων τα οποία έχουν την ικανότητα αζωτοδέσμευσης με άλλα στελέχη μικροφυκών έτσι ώστε να διερευνηθεί η δυνατότητα της πλήρους απεξάρτησης από την προσθήκη οργανικής πηγής αζώτου στο υπόστρωμα. Μία τέτοια επιτυχής εφαρμογή θα μπορούσε μελλοντικά να δημιουργήσει προοπτικές βιομηχανικής αξιοποίησης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

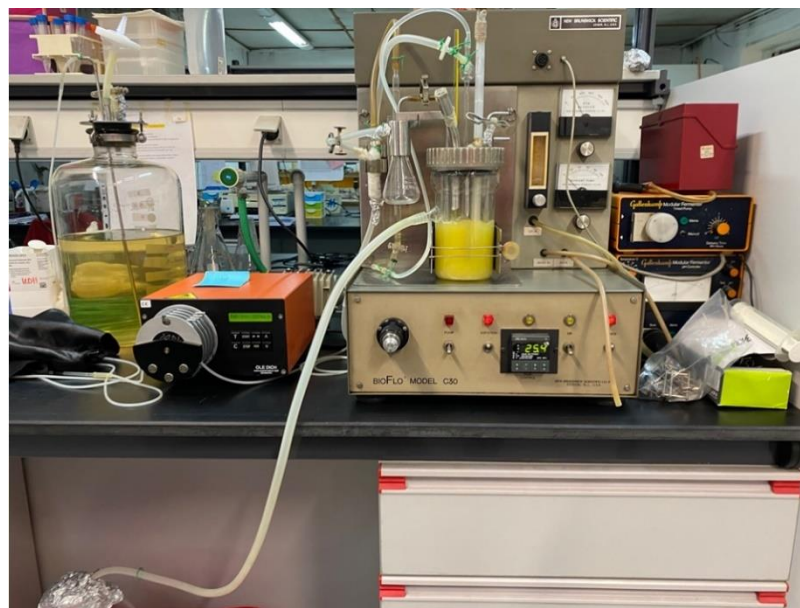
Παρατίθενται φωτογραφίες από τις καλλιέργειες μικροφυκών που πραγματοποιήθηκαν.



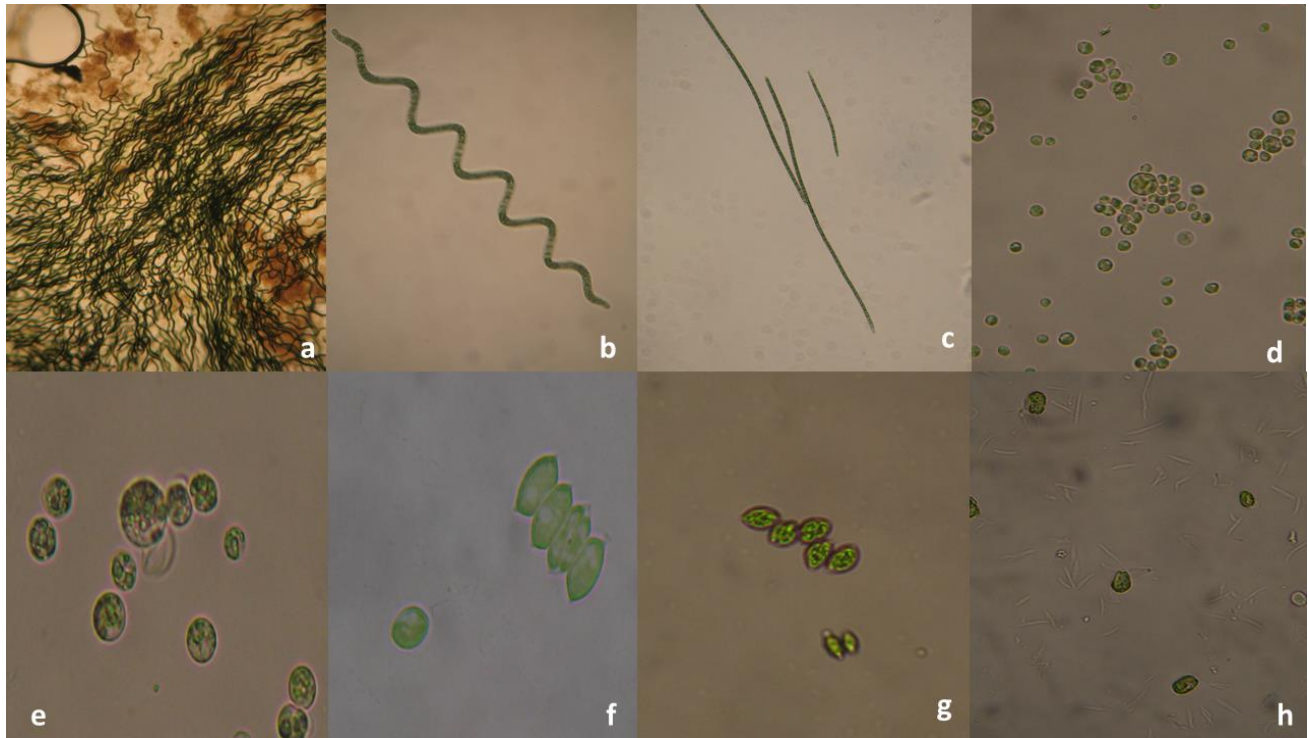
Φωτογραφία 1. Καλλιέργειες των μικροφυκών a) Ανάπτυξη προεμβολίων υπό μικτότροφες συνθήκες σε αναδευτήρα b) Ετερότροφη καλλιέργεια *C. vulgaris* σε υπόστρωμα με διαφορετικές πηγές αζώτου c) Ετερότροφη ανάπτυξη *A. protothecoides* σε διαλείποντος έργου καλλιέργεια με διαφορετικές συγκεντρώσεις ακατέργαστης (crude) γλυκερόλης στο υπόστρωμα.



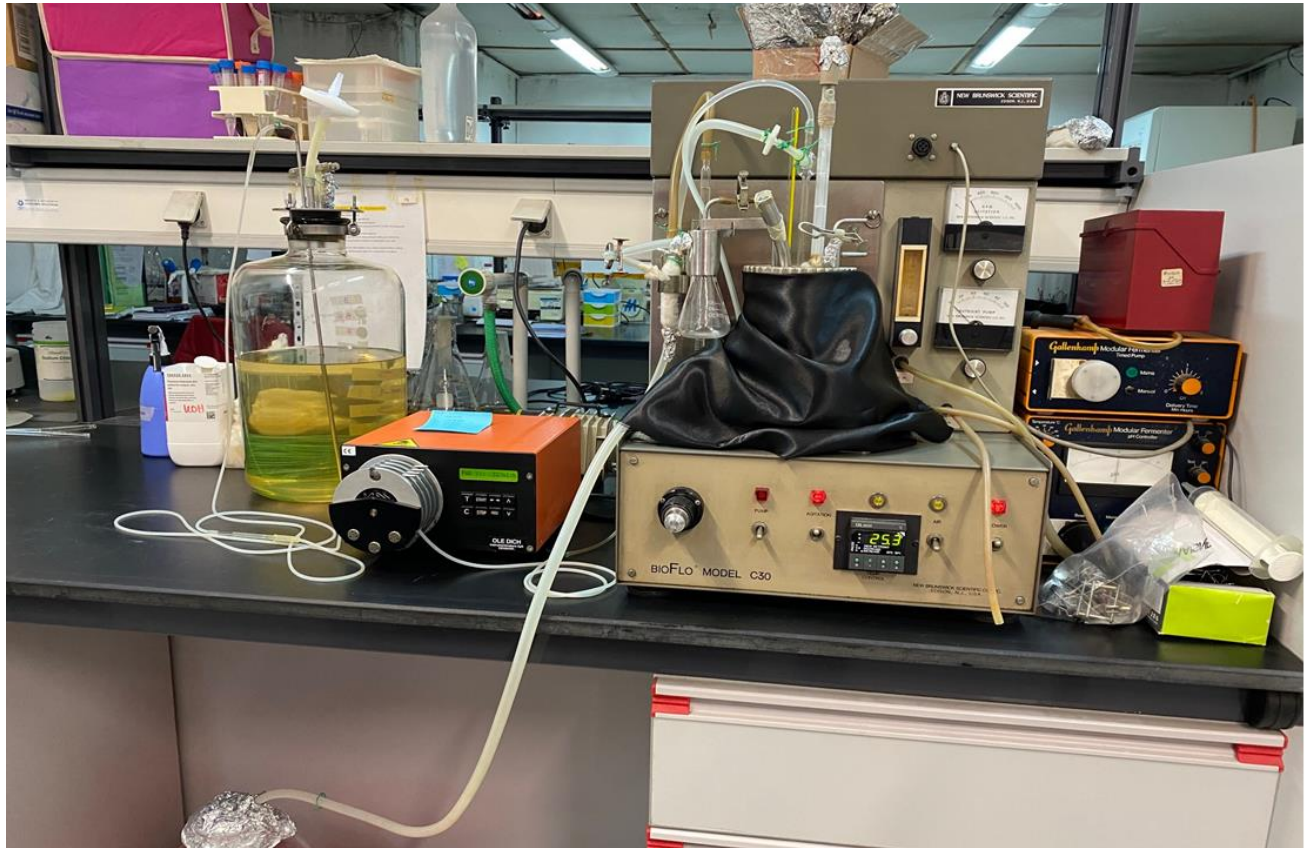
Φωτογραφία 2. Τμήμα του χημειοστάτη αποτελεί η φιάλη συγκέντρωσης του υγρού που συνεχώς απορρέει από το δοχείο καλλιέργειας.



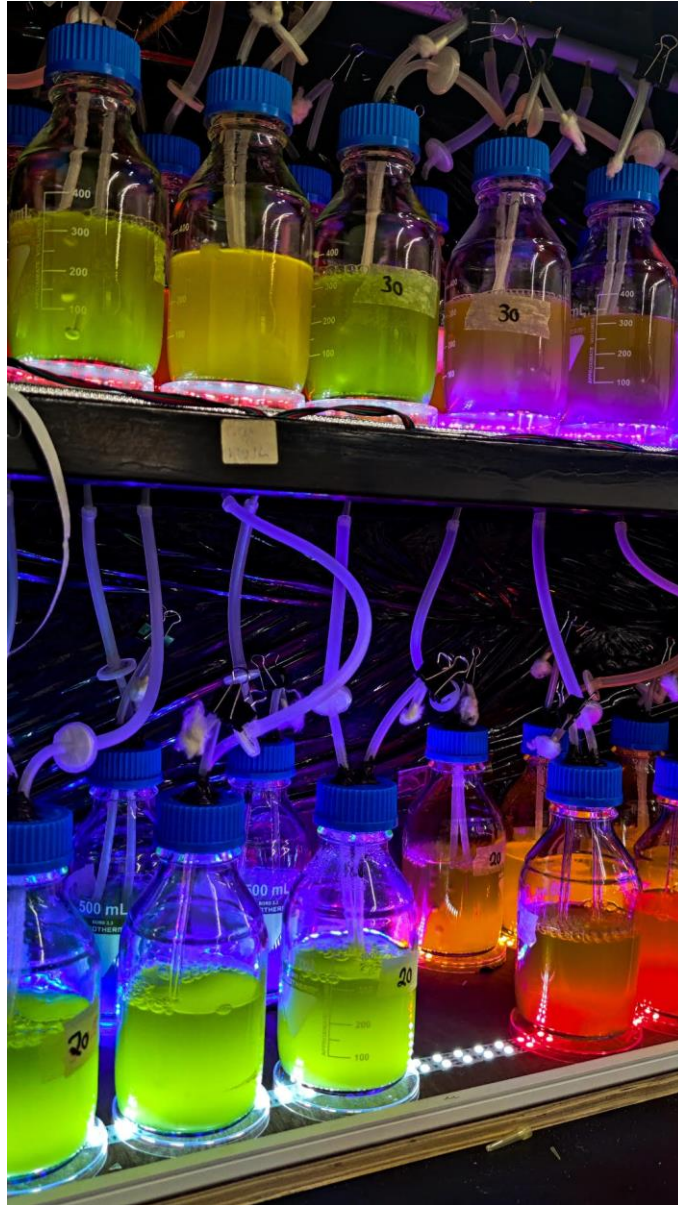
Φωτογραφία 3. Ετερότροφη καλλιέργεια σε χημειοστάτη συνεχούς λειτουργίας του *A. protothecoides* με 30 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης, ετερότροφα. Η καλλιέργεια έχει κίτρινο χρώμα λόγω της χαμηλής παραγωγής χρωστικών, εκτός ίσως από καροτενοειδή που συνεχίζουν να παράγονται.



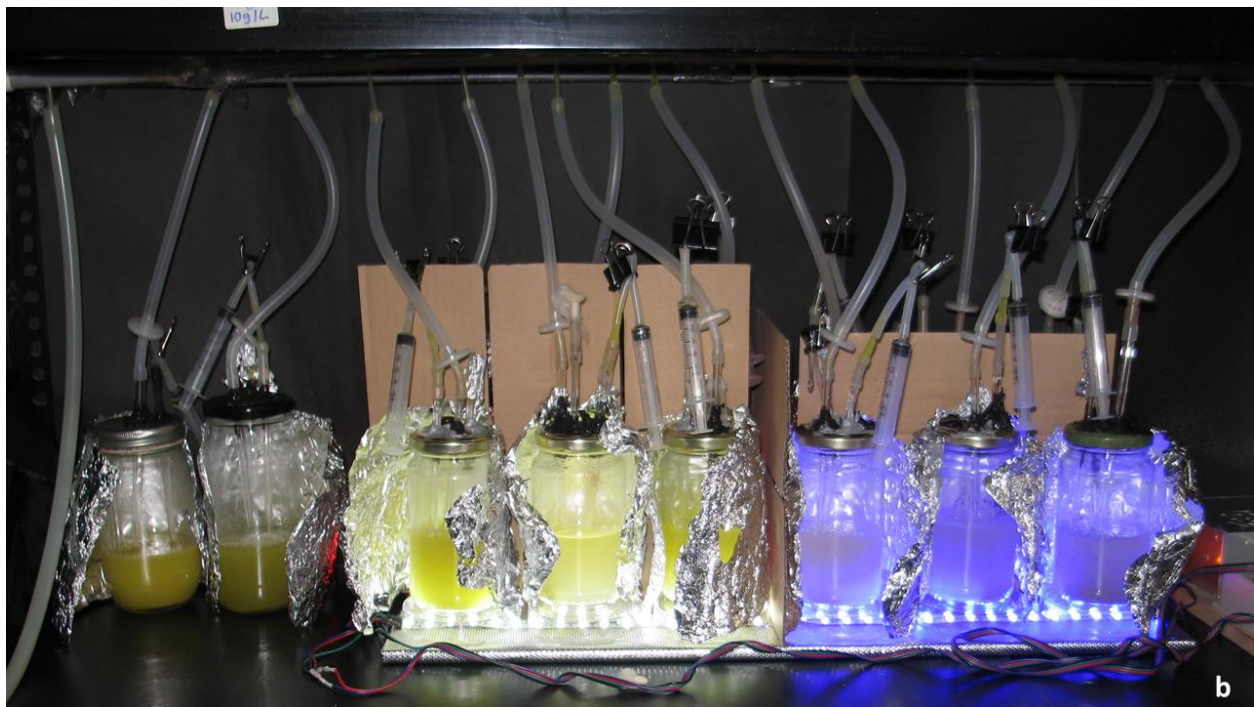
Φωτογραφία 4. Μικροσκοπικά παρασκευάσματα των μικροφυκών που μελετήθηκαν a) *Arthrospira maxima*, b) *Arthrospira maxima* c) *Arthrospira platensis* (Spirulina), d) *Auxenochlorella protothecoides*, e) *Chlorella vulgaris*, f) *Scenedesmus obliquus*, g) *Scenedesmus almeriensis*, h) *Tetraselmis chuii*



Φωτογραφία 5. Ετερότροφη ανάπτυξη σε χημειοστάτη του μικροφύκου *A. protothecoides* με 30 g/L ακατέργαστη γλυκερόλη. Το δοχείο καλλιέργειας είναι σκεπασμένο για να εξασφαλίζεται η ανάπτυξη του μικροφύκου στο σκοτάδι.



Φωτογραφία 6. Μικτότροφες καλλιέργειες μικροφυκών με τη χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός.



Φωτογραφία 7: Καλλιέργειες μικροφυκών α) μικτότροφη ανάπτυξη διαφόρων μικροφυκών σε λευκό φως β) μικτότροφη ανάπτυξη του *A protothecoides* με λευκό και μπλε φως. Αριστερά φαίνεται η ετερότροφη ανάπτυξη

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Abad, Sergi, and Xavier Turon. "Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids." *Biotechnology advances* 30.3 (2012): 733-741
- Abomohra, A. E.-F., Shang, H., El-Sheekh, M., Eladel, H., Ebaid, R., Wang, S., & Wang, Q. (2019). *Night illumination using monochromatic light-emitting diodes for enhanced microalgal growth and biodiesel production. Bioresource Technology*, 121514. doi:10.1016/j.biortech.2019.121514
10.1016/j.biortech.2019.121514 downloaded on **2019-07-18**
- Ackman, R. G., C. S. Tocher, and J. McLachlan. 1968. "Marine Phytoplankter Fatty Acids." *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 25 (8): 1603–20. <https://doi.org/10.1139/f68-145>.
- Adesanya, Victoria O., Matthew P. Davey, Stuart A. Scott, and Alison G. Smith. 2014. "Kinetic Modelling of Growth and Storage Molecule Production in Microalgae under Mixotrophic and Autotrophic Conditions." *Bioresource Technology* 157 (April): 293–304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.032>.
- Adl, Sina M., Alastair G. B. Simpson, Mark A. Farmer, Robert A. Andersen, O. Roger Anderson, John R. Barta, Samuel S. Bowser, et al. 2005. "The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists." *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 52 (5): 399–451. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x>.
- Aguirre-Ezkauriatza, E.J., J.M. Aguilar-Yáñez, A. Ramírez-Medrano, and M.M. Alvarez. 2010. "Production of Probiotic Biomass (*Lactobacillus Casei*) in Goat Milk Whey: Comparison of Batch, Continuous and Fed-Batch Cultures." *Bioresource Technology* 101 (8): 2837–44. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.047>.
- Amiot J. 2001. "Proteins, Peptides and Amino Acids. In: Morais R, Editor. Functional Foods: An Introductory Course."
- Andersen, Robert A. 2013. "The Microalgal Cell." In *Handbook of Microalgal Culture*, edited by Amos Richmond and Qiang Hu, 1–20. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch1>.
- Anil Kommareddy and Dr. Gary Anderson. 2003. "Study of Light as a Parameter in the Growth of Algae in a Photo-Bio Reactor (PBR)." In *2003, Las Vegas, NV July 27-30, 2003*. American Society of Agricultural and Biological Engineers. <https://doi.org/10.13031/2013.13868>.
- Avron, Mordhay, and Ami Ben-Amotz, eds. 1992. *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*. Boca Raton: CRC Press.
- Anyanwu, R.C.; Rodriguez, C.; Durrant, A.; Olabi, A.G. Evaluation of growth rate and biomass productivity of *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris* under different LED wavelengths and photoperiods. *Sustainability* **2022**, *14*, 6108.
- Atta, M., Idris, A., Bukhari, A., & Wahidin, S. (2013). Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 148, 373–378. doi:10.1016/j.biortech.2013.08.162
10.1016/j.biortech.2013.08.162
- Azma, M., Mohamed, M. S., Mohamad, R., Rahim, R. A., & Ariff, A. B. (2011). Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 53(2), 187–195. doi:10.1016/j.bej.2010.10.010
10.1016/j.bej.2010.10.010

- Baker, Andrew C. 2003. "Flexibility and Specificity in Coral-Algal Symbiosis: Diversity, Ecology, and Biogeography of *Symbiodinium*." *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34 (1): 661–89. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132417>.
- Bardone, Enrico, and Associazione Italiana di Ingegneria Chimica, eds. 2012. *IBIC 2012, 3rd International Conference on Industrial Biotechnology: 24 - 27 June 2012, Palermo, Italy*. 1. ed. Chemical Engineering Transactions 27. Milano: AIDIC.
- Barsanti L. and Gualtieri P. 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. New York, CRC Taylor and Francis.
- Baudelet, Paul-Hubert, Guillaume Ricochon, Michel Linder, and Lionel Muniglia. 2017. "A New Insight into Cell Walls of Chlorophyta." *Algal Research* 25 (July): 333–71.
- Bhaya, D., & Grossman, A. R. (2020). Polyphosphate: A Multifunctional Metabolite in Cyanobacteria and Algae. *Frontiers in Plant Science*, 11, 557161. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00938>
- Beardall, John, and John A. Raven. 2016. "Carbon Acquisition by Microalgae." In *The Physiology of Microalgae*, edited by Michael A. Borowitzka, John Beardall, and John A. Raven, 89–99. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_4.
- Behrenfeld, Michael J., and Allen J. Milligan. 2013. "Photophysiological Expressions of Iron Stress in Phytoplankton." *Annual Review of Marine Science* 5 (1): 217–46.
- Bekirogullari, M.; Bekirogullari, M.; Torres, G.M.F.; Torres, G.M.F.; Pittman, J.K.; Pittman, J.K.; Theodoropoulos, C.; Theodoropoulos, C. Models of microalgal cultivation for added-value products-A review. *Biotechnol. Adv.* **2020**, *44*, 107609.
- Bergman, Birgitta, Gustaf Sandh, Senjie Lin, John Larsson, and Edward J. Carpenter. 2013. "Trichodesmium – a Widespread Marine Cyanobacterium with Unusual Nitrogen Fixation Properties." *FEMS Microbiology Reviews* 37 (3): 286–302. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00352.x>.
- Berman-Frank, Ilana, Pernilla Lundgren, and Paul Falkowski. 2003. "Nitrogen Fixation and Photosynthetic Oxygen Evolution in Cyanobacteria." *Research in Microbiology* 154 (3): 157–64. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00029-9).
- Berman-Frank, Ilana, Antonietta Quigg, Zoe V. Finkel, Andrew J. Irwin, and Liti Haramaty. 2007. "Nitrogen-Fixation Strategies and Fe Requirements in Cyanobacteria." *Limnology and Oceanography* 52 (5): 2260–69. <https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.5.2260>.
- Bertrand, Jean. 2008. "MOUVEMENTS DES DIATOMÉES VIII: SYNTHÈSE ET HYPOTHÈSE." *Diatom Research* 23 (1): 19–29. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2008.9705734>.
- Bibby, Thomas S., Jon Nield, and James Barber. 2001. "Iron Deficiency Induces the Formation of an Antenna Ring around Trimeric Photosystem I in Cyanobacteria." *Nature* 412 (6848): 743–45. <https://doi.org/10.1038/35089098>.
- Bilanovic, Dragoljub, Arsema Andargatchew, Tim Kroeger, and Gedaliahu Shelef. 2009. "Freshwater and Marine Microalgae Sequestering of CO₂ at Different C and N Concentrations – Response Surface Methodology Analysis." *Energy Conversion and Management* 50 (2): 262–67. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2008.09.024>.
- Bohutskiy, Pavlo, Ben Ketter, Steven Chow, Kameron J. Adams, Michael J. Betenbaugh, F.C. Thomas Allnut, and Edward J. Bouwer. 2015. "Anaerobic Digestion of Lipid-Extracted Auxenochlorella Protothecoides Biomass for Methane Generation and Nutrient Recovery." *Bioresource Technology* 183 (May): 229–39.
- Borowitzka, Michael A. 1999. "Commercial Production of Microalgae: Ponds, Tanks, Tubes and Fermenters." *Journal of Biotechnology* 70 (1–3): 313–21. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8).
- Borowitzka, Michael A., and Lesley J. Borowitzka, eds. 1988. *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge [Cambridgeshire]; New York: Cambridge University Press.

- Boussiba, Sammy, Lu Fan, and Avigad Vonshak. 1992. “[36] Enhancement and Determination of Astaxanthin Accumulation in Green Alga *Haematococcus Pluvialis*.” In *Methods in Enzymology*, 213:386–91. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(92\)13140-S](https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)13140-S).
- Brányiková, Irena, Barbora Maršálková, Jiří Doucha, Tomáš Brányik, Kateřina Bišová, Vilém Zachleder, and Milada Vítová. 2011. “Microalgae—Novel Highly Efficient Starch Producers.” *Biotechnology and Bioengineering* 108 (4): 766–76. <https://doi.org/10.1002/bit.23016>.
- Brennan, Liam, and Philip Owende. 2010. “Biofuels from Microalgae—A Review of Technologies for Production, Processing, and Extractions of Biofuels and Co-Products.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2): 557–77. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>.
- Brock, T. D. 1985. “Life at High Temperatures.” *Science* 230 (4722): 132–38. <https://doi.org/10.1126/science.230.4722.132>.
- Brown, M.A. McCausland, K. Kowalski The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spatAquaculture, 165 (1998), pp. 281-293
- Brzezinski, Mark A., Stephen B. Baines, William M. Balch, Charlotte P. Beucher, Fei Chai, Richard C. Dugdale, Jeffrey W. Krause, et al. 2011. “Co-Limitation of Diatoms by Iron and Silicic Acid in the Equatorial Pacific.” *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 58 (3–4): 493–511. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2010.08.005>.
- Bunt, J. S., and E. J. F. Wood. 1963. “Microbiology of Antarctic Sea-Ice: Microalgae and Antarctic Sea-Ice.” *Nature* 199 (4900): 1254–55. <https://doi.org/10.1038/1991254a0>.
- Burki, Fabien, Maia Kaplan, Denis V. Tikhonenkov, Vasily Zlatogursky, Bui Quang Minh, Liudmila V. Radaykina, Alexey Smirnov, Alexander P. Mylnikov, and Patrick J. Keeling. 2016. “Untangling the Early Diversification of Eukaryotes: A Phylogenomic Study of the Evolutionary Origins of Centrohelida, Haptophyta and Cryptista.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283 (1823): 20152802. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2802>.
- Bussa, Maresa, Anna Eisen, Cordt Zollfrank, and Hubert Röder. 2019. “Life Cycle Assessment of Microalgae Products: State of the Art and Their Potential for the Production of Polylactid Acid.” *Journal of Cleaner Production* 213 (March): 1299–1312. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.12.048>.
- C. S. Reynolds. 2006. *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Çakirsoy, I., Miyamoto, T., & Ohtake, N. (2022). Physiology of microalgae and their application to sustainable agriculture: A mini-review. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1005991. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1005991>
- Calvin, Melvin. 1962. “The Path of Carbon in Photosynthesis: The Carbon Cycle Is a Tool for Exploring Chemical Biodynamics and the Mechanism of Quantum Conversion.” *Science* 135 (3507): 879–89. <https://doi.org/10.1126/science.135.3507.879>.
- Camiro-Vargas, Tania K., J. Martín Hernández-Ayón, Enrique Valenzuela-Espinoza, Francisco Delgadillo-Hinojosa, and Ramón Cajal-Medrano. 2005. “Dissolved Inorganic Carbon Uptake by *Rhodomonas* Sp. and *Isochrysis* Aff. *Galbana* Determined by a Potentiometric Technique.” *Aquacultural Engineering* 33 (2): 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.10.001>.
- Carvalho, Ana P., Susana O. Silva, José M. Baptista, and F. Xavier Malcata. 2011. “Light Requirements in Microalgal Photobioreactors: An Overview of Biophotonic Aspects.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (5): 1275–88. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3047-8>.
- Cavalier-Smith, T. 1974. “Basal Body and Flagellar Development During the Vegetative Cell Cycle and the Sexual Cycle of *Chlamydomonas Reinhardtii*.” *Journal of Cell Science* 16 (3): 529–56. <https://doi.org/10.1242/jcs.16.3.529>.
- Chen, F.; Johns, M.R. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *J. Appl. Phycol.* **1991**, 3, 203–209

- Chen, Chun-Yen, Kuei-Ling Yeh, Rifka Aisyah, Duu-Jong Lee, and Jo-Shu Chang. 2011. "Cultivation, Photobioreactor Design and Harvesting of Microalgae for Biodiesel Production: A Critical Review." *Bioresource Technology* 102 (1): 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>.
- Chen, Yen-Hui, and Terry H. Walker. "Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol." *Biotechnology letters* 33 (2011): 1973–1983
- Chen, Zhijie, and Bosheng Su. 2020. "Influence of Medium Frequency Light/Dark Cycles on the Cultivation of *Auxenochlorella Pyrenoidosa*." *Applied Sciences* 10 (15): 5093. <https://doi.org/10.3390/app10155093>.
- Chisti, Yusuf. 2008. "Biodiesel from Microalgae Beats Bioethanol." *Trends in Biotechnology* 26 (3): 126–31. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002>.
- Chisti, Yusuf, and Ulises J. Jauregui-Haza. 2002. "Oxygen Transfer and Mixing in Mechanically Agitated Airlift Bioreactors." *Biochemical Engineering Journal* 10 (2): 143–53. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00174-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00174-7).
- Chi, Z., Pyle, D., Wen, Z., Frear, C., & Chen, S. (2007). A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochemistry*, 42(11), 1537-1545. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.08.008>
- Chrétiennot-Dinet, M-J., C. Courties, A. Vaquer, J. Neveux, H. Claustre, J. Lautier, and M. C. Machado. 1995. "A New Marine Picoeucaryote: *Ostreococcus Tauri* Gen. et Sp. Nov. (Chlorophyta, Prasinophyceae)." *Phycologia* 34 (4): 285–92. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-34-4-285.1>.
- Ciniglia, Claudia, Hwan Su Yoon, Antonino Pollio, Gabriele Pinto, and Debashish Bhattacharya. 2004. "Hidden Biodiversity of the Extremophilic Cyanidiales Red Algae: CYANIDIALES BIODIVERSITY." *Molecular Ecology* 13 (7): 1827–38.
- Coelho, R.S.; Vidotti, A.D.S.; Reis, E.M.; Franco, T.T. High cell density cultures of microalgae under fed-batch and continuous growth. *Chem. Eng. Transact.* **2014**, 38, 313–318.
- Collier, J L, and A R Grossman. 1992. "Chlorosis Induced by Nutrient Deprivation in *Synechococcus* Sp. Strain PCC 7942: Not All Bleaching Is the Same." *Journal of Bacteriology* 174 (14): 4718–26. <https://doi.org/10.1128/jb.174.14.4718-4726.1992>.
- Converti, Attilio, Alessandro A. Casazza, Erika Y. Ortiz, Patrizia Perego, and Marco Del Borghi. 2009. "Effect of Temperature and Nitrogen Concentration on the Growth and Lipid Content of *Nannochloropsis Oculata* and *Chlorella Vulgaris* for Biodiesel Production." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48 (6): 1146–51. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006>.
- Craggs, Rupert, Donna Sutherland, and Helena Campbell. 2012. "Hectare-Scale Demonstration of High Rate Algal Ponds for Enhanced Wastewater Treatment and Biofuel Production." *Journal of Applied Phycology* 24 (3): 329–37. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9810-8>.
- Croft, Martin T., Martin J. Warren, and Alison G. Smith. 2006. "Algae Need Their Vitamins." *Eukaryotic Cell* 5 (8): 1175–83. <https://doi.org/10.1128/EC.00097-06>.
- Czarena L Crofcheck, Michael Monstross, Xinyi E, Aubrey P Shea, Mark Crocker, and Rodney Andrews. 2012. "Influence of Media Composition on the Growth Rate of *Chlorella Vulgaris* and *Scenedesmus Acutus* Utilized for CO₂ Mitigation." In *2012 Dallas, Texas, July 29 - August 1, 2012*. American Society of Agricultural and Biological Engineers. <https://doi.org/10.13031/2013.41734>.
- Danesi, E.D.G, C de O. Rangel-Yagui, J.C.M de Carvalho, and S Sato. 2002. "An Investigation of Effect of Replacing Nitrate by Urea in the Growth and Production of Chlorophyll by *Spirulina Platensis*." *Biomass and Bioenergy* 23 (4): 261–69.
- Das, Probir, Wang Lei, Siti Sarah Aziz, and Jeffrey Philip Obbard. 2011. "Enhanced Algae Growth in Both Phototrophic and Mixotrophic Culture under Blue Light." *Bioresource Technology* 102 (4): 3883–87.

- De Philippis R, Sili C, Vincenzini M (1992) Glycogen and poly- β -hydroxybutyrate synthesis in *Spirulina maxima*. *J Gen Microbiol* 138(8):1623–1628.
- Diao, Jinjin, Xingrui Li, Guangsheng Pei, Liangsen Liu, and Lei Chen. 2018. “Comparative Metabolomic Analysis of *Cryptocodinium Cohnii* in Response to Different Dissolved Oxygen Levels during Docosaehaenoic Acid Fermentation.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 499 (4): 941–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.024>.
- Diderich, Jasper A., Mike Schepper, Pim van Hoek, Marijke A.H. Luttk, Johannes P. van Dijken, Jack T. Pronk, Paul Klaassen, et al. 1999. “Glucose Uptake Kinetics and Transcription of HXT Genes in Chemostat Cultures of *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (22): 15350–59. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15350>.
- Dixon, Chelsea, and Lisa R. Wilken. 2018. “Green Microalgae Biomolecule Separations and Recovery.” *Bioresources and Bioprocessing* 5 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0199-3>.
- Dragone, B.D. Fernandes, A.P. Abreu, A.A. Vicente, J.A. Teixeira Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae *Appl. Energy*, 88 (2011), pp. 3331-3335
- Domozych, David S. 2016. “Biosynthesis of the Cell Walls of the Algae.” In *The Physiology of Microalgae*, edited by Michael A. Borowitzka, John Beardall, and John A. Raven, 47–63. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_2.
- Domozych, D.S., K.D. Stewart, and K.R. Mattox. 1981. “Development of the Cell Wall in *Tetraselmis*: Role of the Golgi Apparatus and Extracellular Wall Assembly.” *Journal of Cell Science* 52 (1): 351–71. <https://doi.org/10.1242/jcs.52.1.351>.
- Dyrhman, Sonya T. 2016. “Nutrients and Their Acquisition: Phosphorus Physiology in Microalgae.” In *The Physiology of Microalgae*, edited by Michael A. Borowitzka, John Beardall, and John A. Raven, 155–83. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_8.
- Enamala, Manoj Kumar, Swapnika Enamala, Murthy Chavali, Jagadish Donepudi, Rajasri Yadavalli, Bhulakshmi Kolapalli, Tirumala Vasu Aradhyula, Jeevitha Velpuri, and Chandrasekhar Kuppam. 2018. “Production of Biofuels from Microalgae - A Review on Cultivation, Harvesting, Lipid Extraction, and Numerous Applications of Microalgae.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 94 (October): 49–68. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.012>.
- Esser, K., U. Lüttge, W. Beyschlag, and J. Murata. 2004. *Progress in Botany: Genetics Physiology Systematics Ecology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Estep, Marilyn F., and Thomas C. Hoering. 1981. “Stable Hydrogen Isotope Fractionations during Autotrophic and Mixotrophic Growth of Microalgae.” *Plant Physiology* 67 (3): 474–77. <https://doi.org/10.1104/pp.67.3.474>.
- Ethier, Shannon, Kevin Woisard, David Vaughan, and Zhiyou Wen. 2011. “Continuous Culture of the Microalgae *Schizochytrium Limacinum* on Biodiesel-Derived Crude Glycerol for Producing Docosaehaenoic Acid.” *Bioresource Technology* 102 (1): 88–93.
- F.J. Zendejas, P.I. Benke, P.D. Lane, B.A. Simmons, T.W. Lane
Characterization of the acylglycerols and resulting biodiesel derived from vegetable oil and microalgae (*Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum*) *Biotechnol. Bioeng.*, 109 (2012), pp. 1146-1154
- Falkowski, Paul G.. n.d. *Primary Productivity in the Sea*. Cham: Springer International Publishing.
- Feng, Yujie, Chao Li, and Dawei Zhang. "Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium." *Bioresource technology* 102.1 (2011): 101-105.
- Fettah, N.; Derakhshandeh, M.; Un, U.T.; Mahmoudi, L. Effect of light on growth of green microalgae *Scenedesmus quadricauda*: Influence of light intensity, light wavelength and photoperiods. *Int. J. Energy Environ. Eng.* **2022**, *13*, 703–712.
- Flynn, Kevin J., Diane K. Stoecker, Aditee Mitra, John A. Raven, Patricia M. Glibert, Per Juel Hansen, Edna Granéli, and Joann M. Burkholder. 2013. “Misuse of the Phytoplankton–Zooplankton

- Dichotomy: The Need to Assign Organisms as Mixotrophs within Plankton Functional Types.” *Journal of Plankton Research* 35 (1): 3–11. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbs062>.
- Fon-Sing, S., and M. A. Borowitzka. 2016. “Isolation and Screening of Euryhaline Tetraselmis Spp. Suitable for Large-Scale Outdoor Culture in Hypersaline Media for Biofuels.” *Journal of Applied Phycology* 28 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0560-2>.
- Fowler, David, Mhairi Coyle, Ute Skiba, Mark A. Sutton, J. Neil Cape, Stefan Reis, Lucy J. Sheppard, et al. 2013. “The Global Nitrogen Cycle in the Twenty-First Century.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368 (1621): 20130164. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>.
- Friedman O, Dubinsky Z, Arad S (1991) Effect of light intensity on growth and polysaccharide production in red and blue-green rhodophyta unicells. *Bioresour Technol* 38(2–3):105–110.
- Friedl, T. (1997). The evolution of the Green Algae. In: Bhattacharya, D. (eds) Origins of Algae and their Plastids. Plant Systematics and Evolution, vol 11. Springer, Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6542-3_4
- Fuentes, Juan L., Volker A. R. Huss, Zaida Montero, Rafael Torronteras, María Cuaresma, Inés Garbayo, and Carlos Vilchez. 2016. “Phylogenetic Characterization and Morphological and Physiological Aspects of a Novel Acidotolerant and Halotolerant Microalga *Coccomyxa Onubensis* Sp. Nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).” *Journal of Applied Phycology* 28 (6): 3269–79. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0887-3>.
- Garlapati, Vijay Kumar, Uttara Shankar, and Amrita Budhiraja. "Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products." *Biotechnology Reports* 9 (2016): 9-14.
- García, J.R.; Fernández, F.A.; Sevilla, J.M.F. Development of a process for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* **2012**, *112*, 164–170.
- Gao, Chunfang, Yun Wang, Yue Shen, Dong Yan, Xi He, Junbiao Dai, and Qingyu Wu. 2014. “Oil Accumulation Mechanisms of the Oleaginous Microalga *Chlorella Protothecoides* Revealed through Its Genome, Transcriptomes, and Proteomes.” *BMC Genomics* 15 (1): 582. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-582>.
- Gary A. Anderson, Kommareddy, and Caner Koc. 2013. “Use of Red and Blue Light-Emitting Diodes (LED) and Fluorescent Lamps to Grow Microalgae in a Photobioreactor.” *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 65.
- Gatamaneni Loganathan, Bhalamurugan, et al. "A comprehensive study on the effect of light quality imparted by light-emitting diodes (LEDs) on the physiological and biochemical properties of the microalgal consortia of *Chlorella variabilis* and *Scenedesmus obliquus* cultivated in dairy wastewater." *Bioprocess and biosystems engineering* 43.8 (2020): 1445-1455.
- Ge, S., Qiu, S., Tremblay, D., Viner, K., Champagne, P., & Jessop, P. G. (2018). Centrate wastewater treatment with *Chlorella vulgaris*: Simultaneous enhancement of nutrient removal, biomass and lipid production. *Chemical Engineering Journal*, 342, 310–320.
- Giordano, Mario, John Beardall, and John A. Raven. 2005. “CO₂ CONCENTRATING MECHANISMS IN ALGAE: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution.” *Annual Review of Plant Biology* 56 (1): 99–131. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144052>.
- Giordano, Mario, and Laura Prioretti. 2016. “Sulphur and Algae: Metabolism, Ecology and Evolution.” In *The Physiology of Microalgae*, edited by Michael A. Borowitzka, John Beardall, and John A. Raven, 185–209. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_9.
- Glass, J. B., F. Wolfe-Simon, and A. D. Anbar. 2009. “Coevolution of Metal Availability and Nitrogen Assimilation in Cyanobacteria and Algae.” *Geobiology* 7 (2): 100–123. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2009.00190.x>.

- Gledhill, Martha. 2012. "The Organic Complexation of Iron in the Marine Environment: A Review." *Frontiers in Microbiology* 3.
- Griffiths, Melinda J., Robert P. van Hille, and Susan TL Harrison. "The effect of nitrogen limitation on lipid productivity and cell composition in *Chlorella vulgaris*." *Applied microbiology and biotechnology* 98 (2014): 2345-2356.
- Goldman, Yosef, Nissim Garti, Yoel Sasson, Ben-Zion Ginzburg, and M.R. Bloch. 1980. "Conversion of Halophilic Algae into Extractable Oils 11 Israeli Patent Pending, No. 57712, July 3, 1979." *Fuel* 59 (3): 181–84. [https://doi.org/10.1016/0016-2361\(80\)90163-5](https://doi.org/10.1016/0016-2361(80)90163-5).
- Gonzalez-Bashan, Luz E, Vladimir K Lebsky, Juan P Hernandez, Jose J Bustillos, and Yoav Bashan. 2000. "Changes in the Metabolism of the Microalga *Chlorella Vulgaris* When Coimmobilized in Alginate with the Nitrogen-Fixing *Phyllobacterium Myrsinacearum*." *Canadian Journal of Microbiology* 46 (7): 653–59. <https://doi.org/10.1139/w00-041>.
- Gougoulias N., Metsoviti M.N., Grigoriou M, Lamprakopoulos S., Mpesios A., and Papapolymerou G. 2019. "Heterotrophic Growth of *Chlorella Vulgaris* on Crude Glycerol," no. 16 th International Conference on Environmental Science and Technology (September).
- Guiry, Michael D. 2012. "HOW MANY SPECIES OF ALGAE ARE THERE?" *Journal of Phycology* 48 (5): 1057–63. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x>.
- Guiry, Michael D., Gwendoline M. Guiry, Liam Morrison, Fabio Rindi, Salvador Valenzuela Miranda, Arthur C. Mathieson, Bruce C. Parker, et al. 2014. "AlgaeBase: An On-Line Resource for Algae." *Cryptogamie, Algologie* 35 (2): 105–15. <https://doi.org/10.7872/crya.v35.iss2.2014.105>.
- Haass, D., and W. Tanner. 1974. "Regulation of Hexose Transport in *Chlorella Vulgaris*: Characteristics of Induction and Turnover." *Plant Physiology* 53 (1): 14–20. <https://doi.org/10.1104/pp.53.1.14>.
- Hardie, L. P., D. L. Balkwill, and S. E. Stevens. 1983. "Effects of Iron Starvation on the Physiology of the Cyanobacterium *Agmenellum Quadruplicatum*." *Applied and Environmental Microbiology* 45 (3): 999–1006. <https://doi.org/10.1128/aem.45.3.999-1006.1983>.
- Harun, Razif, Michael K. Danquah, and Gareth M. Forde. 2009. "Microalgal Biomass as a Fermentation Feedstock for Bioethanol Production." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jctb.2287>.
- Healey F.P. 1982. *Hosphate*. In: *The Biology of Cyanobacteria* (Eds N.G. Carrand B.A. Whitton). Blackwell Scientific, Oxford, UK.
- Hee-Jeong Choi & Sung-Whan Yu (2015) Influence of crude glycerol on the biomass and lipid content of microalgae, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29:3, 506-513, DOI: [10.1080/13102818.2015.1013988](https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1013988)
- Heimann, Kirsten, and Roger Huerlimann. 2015. "Microalgal Classification." In *Handbook of Marine Microalgae*, 25–41. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00003-0>.
- Hemaiswarya, Shanmugam, et al. "Microalgae taxonomy and breeding." *Biofuel crops: production, physiology and genetics*. Wallingford UK: CABI, 2013. 44-53
- Heredia-Arroyo, Tamarys, Wei Wei, and Bo Hu. 2010. "Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella Protothecoides*." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162 (7): 1978–95.
- Hermesmeier, D.; Mala, E.; Schulz, R.; Thielmann, J.; Galland, P.; Senger, H. Antagonistic blue and red-light regulation of cab-gene expression during photosynthetic adaptation in *Scenedesmus obliquus*. *J. Photochem. Photobiol.* **1991**, *11*, 189–202
- Hildebrand, Mark. 2008. "Diatoms, Biomineralization Processes, and Genomics." *Chemical Reviews* 108 (11): 4855–74. <https://doi.org/10.1021/cr078253z>.
- Hirano, R. Ueda, S. Hirayama, Y. Ogushi CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation *Energy*, 22 (1997), pp. 137-142
- Ho, Shih-Hsin, Akihiko Kondo, Tomohisa Hasunuma, and Jo-Shu Chang. 2013. "Engineering Strategies for Improving the CO₂ Fixation and Carbohydrate Productivity of *Scenedesmus Obliquus* CNW-

- N Used for Bioethanol Fermentation.” *Bioresource Technology* 143 (September): 163–71. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.043>.
- Hoiczuk, E. 2000. “Gliding Motility in Cyanobacteria: Observations and Possible Explanations.” *Archives of Microbiology* 174 (1–2): 11–17. <https://doi.org/10.1007/s002030000187>.
- Howe, C.J, A.C Barbrook, R.E.R Nisbet, P.J Lockhart, and A.W.D Larkum. 2008. “The Origin of Plastids.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363 (1504): 2675–85. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0050>.
- Hu Qiang. 2004. . “. ‘Environmental Effects on Cell Composition in Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology (Richmond, A., Ed.).’”
- Huerlimann, Roger, Rocky de Nys, and Kirsten Heimann. 2010. “Growth, Lipid Content, Productivity, and Fatty Acid Composition of Tropical Microalgae for Scale-up Production.” *Biotechnology and Bioengineering* 107 (2): 245–57. <https://doi.org/10.1002/bit.22809>.
- Humbeck, K.; Hoffmann, B.; Senger, H. Influence of energy flux and quality of light on the molecular organization of the photosynthetic apparatus in *Scenedesmus*. *Planta* **1988**, *173*, 205–212.
- Hultberg, M., Jönsson, H. L., Bergstrand, K. J., & Carlsson, A. S. (2014). Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, *159*, 465-467.
- Ike, N. Toda, N. Tsuji, K. Hirata, K. Miyamoto Hydrogen photoproduction from CO₂-fixing microalgal biomass: application of halotolerant photosynthetic bacteria *J. Ferment. Bioeng.*, 84 (1997), pp. 606-609
- Illman, A.H. Scragg, S.W. Shales Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium *Enzyme Microb. Technol.*, 27 (2000), pp. 631-635
- Ifrim, George A., Mariana Titica, Guillaume Cogne, Lionel Boillereaux, Jack Legrand, and Sergiu Caraman. 2014. “Dynamic PH Model for Autotrophic Growth of Microalgae in Photobioreactor: A Tool for Monitoring and Control Purposes.” *AIChE Journal* 60 (2): 585–99. <https://doi.org/10.1002/aic.14290>.
- Jiang, Y, and F Chen. 1999. “Effects of Salinity on Cell Growth and Docosahexaenoic Acid Content of the Heterotrophic Marine Microalga *Cryptocodinium Cohnii*.” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23 (6): 508–13. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900759>.
- Johansen, Melanie N., ed. 2012. *Microalgae: Biotechnology, Microbiology, and Energy*. Marine Biology. Hauppauge, N.Y: Nova Science Publisher’s.
- Kamjunke, N., T. Henrichs, and U. Gaedke. 2006. “Phosphorus Gain by Bacterivory Promotes the Mixotrophic Flagellate *Dinobryon* Spp. during Re-Oligotrophication.” *Journal of Plankton Research* 29 (1): 39–46. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbl054>.
- Karlander, Edward P., and Robert W. Krauss. 1966. “Responses of Heterotrophic Cultures of *Chlorella Vulgaris* Beyerinck to Darkness and Light. II. Action Spectrum for and Mechanism of the Light Requirement for Heterotrophic Growth.” *Plant Physiology* 41 (1): 7–14. <https://doi.org/10.1104/pp.41.1.7>.
- Katiyar, Richa, B.R. Gurjar, Shalini Biswas, Vikas Pruthi, Nalin Kumar, and Prashant Kumar. 2017. “Microalgae: An Emerging Source of Energy Based Bio-Products and a Solution for Environmental Issues.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 72 (May): 1083–93. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.10.028>.
- Katiyar, Richa, et al. "Heterotrophic cultivation of microalgae in photobioreactor using low cost crude glycerol for enhanced biodiesel production." *Renewable energy* 113 (2017): 1359-1365.
- Keeling, Patrick J. 2013. “The Number, Speed, and Impact of Plastid Endosymbioses in Eukaryotic Evolution.” *Annual Review of Plant Biology* 64 (1): 583–607. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120144>.
- Khalili, Arezoo, et al. "Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae *Chlorella vulgaris*." *Biotechnology and bioprocess engineering* 20 (2015): 284-290.

- Khozingoldberg, I, and Z Cohen. 2006. "The Effect of Phosphate Starvation on the Lipid and Fatty Acid Composition of the Fresh Water Eustigmatophyte *Monodus Subterraneus*." *Phytochemistry* 67 (7): 696–701. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.010>.
- Kies, L., and B. P. Kremer. 1979. "Function of Cyanelles in the Thecamoeba *Paulinella Chromatophora*." *Naturwissenschaften* 66 (11): 578–79.
- Kim, D.G.; Lee, C.; Park, S.M.; Choi, Y.E. Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* **2014**, *159*, 240–248.
- Kim, J.S. Baek, Y.S. Yun, S.J. Sim, S. Park, S.C. Kim Hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using a two-step conversion process: anaerobic conversion and photosynthetic fermentation *Int. J. Hydrogen Energy*, 31 (2006), pp. 812-816
- Kitada, Kiwa, Siti Machmudah, Mitsuru Sasaki, Motonobu Goto, Yuya Nakashima, Shoichiro Kumamoto, and Takashi Hasegawa. 2009a. "Supercritical CO₂ Extraction of Pigment Components with Pharmaceutical Importance from *Chlorella Vulgaris*." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84 (5): 657–61. <https://doi.org/10.1002/jctb.2096>.
- Kitada, K., Machmudah, S., Sasaki, M., Goto, M., Nakashima, Y., Kumamoto, S., & Hasegawa, T. 2009b. "Supercritical CO₂ Extraction of Pigment Components with Pharmaceutical Importance from *Chlorella Vulgaris*." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84 (5): 657–61. <https://doi.org/10.1002/jctb.2096>.
- Komor, E., and W. Tanner. 1971. "Characterization of the Active Hexose Transport System of *Chlorella Vulgaris*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 241 (1): 170–79. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(71\)90314-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(71)90314-2).
- Kong, Wei-Bao, Shao-Feng Hua, Hai Cao, Yu-Wen Mu, Hong Yang, Hao Song, and Chun-Gu Xia. 2012. "Optimization of Mixotrophic Medium Components for Biomass Production and Biochemical Composition Biosynthesis by *Chlorella Vulgaris* Using Response Surface Methodology." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 43 (3): 360–67. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2011.11.007>.
- Konstantinovic, Sandra, Bojana Danilovic, Jovan Ciric, Slavica Ilic, Dragisa Savic, and Vlada Veljkovic. 2016. "Valorization of Crude Glycerol from Biodiesel Production." *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 22 (4): 461–89. <https://doi.org/10.2298/CICEQ160303019K>.
- Korozi, Evagelina, Vasiliki Tsagou, Io Kefalogianni, Giorgos Markou, Dimitris Antonopoulos, Lambis Chakalis, Yannis Kotzamanis, and Iordanis Chatzipavlidis. 2022. "Continuous Culture of *Auxenochlorella Protothecoides* on Biodiesel Derived Glycerol under Mixotrophic and Heterotrophic Conditions: Growth Parameters and Biochemical Composition." *Microorganisms* 10 (3): 541..
- Lane, C.D.; Coury, D.A.; Allnut, F.C.T. Composition and potential products from *Auxenochlorella protothecoides*, *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella vulgaris*. *Ind. Biotechnol.* **2017**, *13*, 270–276
- Larkum, Anthony W. 2016. "Photosynthesis and Light Harvesting in Algae." In *The Physiology of Microalgae*, edited by Michael A. Borowitzka, John Beardall, and John A. Raven, 67–87. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_3.
- Larkum, Anthony W. D., and Maret Vesik. 2003. "Algal Plastids: Their Fine Structure and Properties." In *Photosynthesis in Algae*, edited by Anthony W. D. Larkum, Susan E. Douglas, and John A. Raven, 14:11–28. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1038-2_2.
- Latysheva, Natasha, Vivien L. Junker, William J. Palmer, Geoffrey A. Codd, and Daniel Barker. 2012. "The Evolution of Nitrogen Fixation in Cyanobacteria." *Bioinformatics* 28 (5): 603–6.
- Lavasseur, W.; Perre, P.; Pozzobon, V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnol. Adv.* **2020**, *41*, 107545.

- Leite, Gustavo B., Kiran Paranjape, Ahmed E.M. Abdelaziz, and Patrick C. Hallenbeck. 2015. "Utilization of Biodiesel-Derived Glycerol or Xylose for Increased Growth and Lipid Production by Indigenous Microalgae." *Bioresource Technology* 184 (May): 123–30. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.117>.
- Lemahieu, Charlotte, Charlotte Bruneel, Romina Termote-Verhalle, Koenraad Muylaert, Johan Buyse, and Imogen Foubert. 2013. "Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Enriched Eggs by Microalgal Supplementation." *Lipid Technology* 25 (9): 204–6. <https://doi.org/10.1002/lite.201300297>.
- Lemahieu, C., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Muylaert, K., Buyse, J., & Foubert, I. 2014. "Effect of Different Microalgal N-3 PUFA Supplementation Doses on Yolk Color and N-3 LC-PUFA Enrichment in the Egg." *Algal Research* 6 (October): 119–23. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.10.007>.
- Lewin, R. A., and Nancy W. Withers. 1975. "Extraordinary Pigment Composition of a Prokaryotic Alga." *Nature* 256 (5520): 735–37. <https://doi.org/10.1038/256735a0>.
- Lewis, Louise A., and Richard M. McCourt. 2004. "Green Algae and the Origin of Land Plants." *American Journal of Botany* 91 (10): 1535–56. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.10.1535>.
- Leya, Thomas, Andreas Rahn, Cornelius LÃ¼tz, and Daniel Remias. 2009. "Response of Arctic Snow and Permafrost Algae to High Light and Nitrogen Stress by Changes in Pigment Composition and Applied Aspects for Biotechnology: Pigment Change in Snow Algae." *FEMS Microbiology Ecology* 67 (3): 432–43. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00641.x>.
- Li, Tingting, Yubin Zheng, Liang Yu, and Shulin Chen. 2013. "High Productivity Cultivation of a Heat-Resistant Microalga *Chlorella Sorokiniana* for Biofuel Production." *Bioresource Technology* 131 (March): 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.121>.
- Li, Zhi-Yong, Si-Yuan Guo, and Lin Li. 2003. "Bioeffects of Selenite on the Growth of *Spirulina Platensis* and Its Biotransformation." *Bioresource Technology* 89 (2): 171–76. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00041-5).
- Liang, Yanna, Nicolas Sarkany, and Yi Cui. 2009. "Biomass and Lipid Productivities of *Chlorella Vulgaris* under Autotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Growth Conditions." *Biotechnology Letters* 31 (7): 1043–49. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9975-7>.
- Liotenberg, Sylviane, Douglas Campbell, Rosmarie Rippka, Jean Houmard, and Nicole Tandeau de Marsac. 1996. "Effect of the Nitrogen Source on Phycobiliprotein Synthesis and Cell Reserves in A Chromatically Adapting Filamentous Cyanobacterium." *Microbiology* 142 (3): 611–22. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-3-611>.
- Liu, X., Ying, K., Chen, G., Zhou, C., Zhang, W., Zhang, X., ... Tao, Y. (2017). *Growth of Chlorella vulgaris and nutrient removal in the wastewater in response to intermittent carbon dioxide. Chemosphere, 186, 977–985. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.07.160*
10.1016/j.chemosphere.2017.07.160
- Loganathan, B.G.; Orsat, V.; Lefsrud, M.; Wu, B.S. A comprehensive study on the effect of light quality imparted by light emitting diodes (LEDs) on the physiological and biochemical properties of the microalgal consortia of *Chlorella variabilis* and *Scenedesmus obliquus* cultivated in dairy wastewater. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2020**, *43*, 1445–1455
- Luo, Xiaolan, Xumeng Ge, Shaoqing Cui, and Yebo Li. 2016. "Value-Added Processing of Crude Glycerol into Chemicals and Polymers." *Bioresource Technology* 215 (September): 144–54.
- Lv, J. M., Cheng, L. H., Xu, X. H., Zhang, L., & Chen, H. L. (2010). Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource technology*, *101*(17), 6797–6804.
- Ma, Ruijuan, Skye R. Thomas-Hall, Elvis T. Chua, Faisal Alsenani, Eladl Eltanahy, Michael E. Netzel, Gabriele Netzel, Yinghua Lu, and Peer M. Schenk. 2018. "Gene Expression Profiling of Astaxanthin and Fatty Acid Pathways in *Haematococcus Pluvialis* in Response to Different LED

- Lighting Conditions.” *Bioresource Technology* 250 (February): 591–602. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.094>.
- Mandal, Shovon, and Nirupama Mallick. 2009. “Microalga *Scenedesmus Obliquus* as a Potential Source for Biodiesel Production.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 (2): 281–91.
- Markou, G.; Kougia, E.; Kefalogianni, I.; Tzagou, V.; Arapoglou, D.; Chatzipavlidis, I. Effect of Glycerol Concentration and Light Intensity on Growth and Biochemical Composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *Platensis*: A Study in Semi-Continuous Mode with Non-Aseptic Conditions. *Appl. Sci.* **2019**, 9, 4703
- Markou, Giorgos, Irini Angelidaki, and Dimitris Georgakakis. 2012. “Microalgal Carbohydrates: An Overview of the Factors Influencing Carbohydrates Production, and of Main Bioconversion Technologies for Production of Biofuels.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 96 (3): 631–45. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>.
- Markou, Giorgos, Alexandros Diamantis, Evagelina Korozi, Vasiliki Tzagou, Io Kefalogianni, and Iordanis Chatzipavlidis. 2021. “Effects of Monochromatic Illumination with LEDs Lights on the Growth and Photosynthetic Performance of *Auxenochlorella Protothecoides* in Photo- and Mixotrophic Conditions.” *Plants* 10 (4): 799. <https://doi.org/10.3390/plants10040799>.
- Marquez, Facundo J., Ken Sasaki, Naomichi Nishio, and Shiro Nagai. 1995. “Inhibitory Effect of Oxygen Accumulation on the Growth of *Spirulina Platensis*.” *Biotechnology Letters* 17 (2): 225–28. <https://doi.org/10.1007/BF00127993>.
- Martin-Jezequel, Veronique, Mark Hildebrand, and Mark A. Brzezinski. 2000. “SILICON METABOLISM IN DIATOMS: IMPLICATIONS FOR GROWTH.” *Journal of Phycology* 36 (5): 821–40. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.00019.x>.
- Masojdek, Ji, Michal Koblek, and Giuseppe Torzillo. 2003. “Photosynthesis in Microalgae.” In *Handbook of Microalgal Culture*, edited by Amos Richmond, 20–39. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch2>.
- Mathimani, Thangavel, Arianna Baldinelli, Karthik Rajendran, Desika Prabakar, Manickam Matheswaran, Richard Pieter van Leeuwen, and Arivalagan Pugazhendhi. 2019. “Review on Cultivation and Thermochemical Conversion of Microalgae to Fuels and Chemicals: Process Evaluation and Knowledge Gaps.” *Journal of Cleaner Production* 208 (January): 1053–64. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.096>.
- Mathiot, Charlie, Pauline Ponge, Benjamin Gallard, Jean-François Sassi, Florian Delrue, and Nicolas Le Moigne. 2019. “Microalgae Starch-Based Bioplastics: Screening of Ten Strains and Plasticization of Unfractionated Microalgae by Extrusion.” *Carbohydrate Polymers* 208 (March): 142–51. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.057>.
- Milligan, Allen J., and Paul J. Harrison. 2000. “Effects of Non-steady-state Iron Limitation on Nitrogen Assimilatory Enzymes in the Marine Diatom *Thalassiosira Weissflogii* (BACILLARIOPHYCEAE).” *Journal of Phycology* 36 (1): 78–86. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99013.x>.
- Moestrup, Ø.. 1982. *Flagellar Structure in Algae: A Review, with New Observations Particularly on the Chrysophyceae, Phaeophyceae (Fucophyceae), Euglenophyceae and Reckertia*.
- Moestrup, Øjvind. 1972. “Observations on the Fine Structure of Spermatozoids and Vegetative Cells of the Green Alga *Golenkinia*.” *British Phycological Journal* 7 (2): 169–83. <https://doi.org/10.1080/00071617200650191>.
- Molina, E., J. Fernández, F.G. Acién, and Y. Chisti. 2001. “Tubular Photobioreactor Design for Algal Cultures.” *Journal of Biotechnology* 92 (2): 113–31. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00353-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00353-4).
- Muller-Feuga, Arnaud. 2013. “Microalgae for Aquaculture: The Current Global Situation and Future Trends.” In *Handbook of Microalgal Culture*, edited by Amos Richmond and Qiang Hu, 613–27. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch33>.

- Neilson, A. H., and R. A. Lewin. 1974. "The Uptake and Utilization of Organic Carbon by Algae: An Essay in Comparative Biochemistry." *Phycologia* 13 (3): 227–64..
- Niizawa, I.; Leonardi, R.J.; Irazoqui, H.A.; Heinrich, J.M. Light wavelength distribution effects on the growth rate of *Scenedesmus quadricauda*. *Biochem. Eng. J.* **2017**, *126*, 126–134.
- Norsker, Niels-Henrik, Maria J. Barbosa, Marian H. Vermuë, and René H. Wijffels. 2011. "Microalgal Production — A Close Look at the Economics." *Biotechnology Advances* 29 (1): 24–27. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.005>.
- Nozaki, H., Maruyama, S., Matsuzaki, M., Nakada, T., Kato, S., & Misawa, K. (2009). Phylogenetic positions of Glaucophyta, green plants (Archaeplastida) and Haptophyta (Chromalveolata) as deduced from slowly evolving nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(3), 872–880. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.08.015>
- Nowack, Eva C. M., and Arthur R. Grossman. 2012. "Trafficking of Protein into the Recently Established Photosynthetic Organelles of *Paulinella Chromatophora*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (14): 5340–45. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118800109>.
- Oliveira, M.A.C.L. de, M.P.C. Monteiro, P.G. Robbs, and S.G.F. Leite. 1999. "[No Title Found]." *Aquaculture International* 7 (4): 261–75. <https://doi.org/10.1023/A:1009233230706>.
- Olofsson, M.; Lindehoff, E.; Legrand, C. Production stability and biomass quality in microalgal cultivation—Contribution of community dynamics. *Eng. Life Sci.* **2019**, *19*, 330–340.
- Oncel, Suphi S. 2015. "Biohydrogen from Microalgae, Uniting Energy, Life, and Green Future." In *Handbook of Marine Microalgae*, 159–96. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00011-X>.
- Osmond, C.B. 1981. "Photorespiration and Photoinhibition." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* 639 (2): 77–98. [https://doi.org/10.1016/0304-4173\(81\)90006-9](https://doi.org/10.1016/0304-4173(81)90006-9).
- Pang, Na, Xiangyu Gu, Shulin Chen, Helmut Kirchhoff, Hanwu Lei, and Sanja Roje. 2019. "Exploiting Mixotrophy for Improving Productivities of Biomass and Co-Products of Microalgae." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 112 (September): 450–60. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.06.001>.
- Papanikolaou, Seraphim, and George Aggelis. 2002. "Lipid Production by *Yarrowia Lipolytica* Growing on Industrial Glycerol in a Single-Stage Continuous Culture." *Bioresource Technology* 82 (1): 43–49. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00149-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00149-3).
- Park, Seunghye, Yew Lee, and EonSeon Jin. 2013. "Comparison of the Responses of Two *Dunaliella* Strains, *Dunaliella Salina* CCAP 19/18 and *Dunaliella Bardawil* to Light Intensity with Special Emphasis on Carotenogenesis." *ALGAE* 28 (2): 203–11..
- Patel, A.; Matsakas, L.; Rova, U.; Christakopoulos, P. Heterotrophic cultivation of *Auxenochlorella protothecoides* using forest biomass as a feedstock for sustainable biodiesel production. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11*, 1–16
- Patiño, Rodrigo, Marcel Janssen, and Urs von Stockar. 2007. "A Study of the Growth for the Microalga *Chlorella Vulgaris* by Photo-Bio-Calorimetry and Other on-Line and off-Line Techniques." *Biotechnology and Bioengineering* 96 (4): 757–67. <https://doi.org/10.1002/bit.21182>.
- Pattanaik A, Lala Behari Sukla, Debabrata Pradhan (2018) Effect of LED Lights on the Growth of Microalgae. *Biofuels and Bioprocessing Research Center, Institute of Technical Education and Research, Siksha 'O' Anusandhan (Deemed to be University), Bhubaneswar-751030, India* INGLOMAYOR. Section C, Volume 14 (2018), 14 – 24. ISSN 0719 – 7578
- Peng, Licheng, Christopher Q. Lan, and Zisheng Zhang. 2013. "Evolution, Detrimental Effects, and Removal of Oxygen in Microalga Cultures: A Review." *Environmental Progress & Sustainable Energy* 32 (4): 982–88. <https://doi.org/10.1002/ep.11841>.
- Perez-Garcia, Octavio, Froylan M.E. Escalante, Luz E. de-Bashan, and Yoav Bashan. 2011. "Heterotrophic Cultures of Microalgae: Metabolism and Potential Products." *Water Research* 45 (1): 11–36.

- PEREZ-PAZOS, Jazmín-Vanessa and FERNANDEZ-IZQUIERDO, Pablo. SYNTHESIS OF NEUTRAL LIPIDS IN CHLORELLA SP. UNDER DIFFERENT LIGHT AND CARBONATE CONDITIONS. *C.T.F Cienc. Tecnol. Futuro* [online]. 2011, vol.4, n.4 [cited 2023-10-09], pp.47-5
- Petkov, G., & Garcia, G. (2007). Which are fatty acids of the green alga Chlorella? *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(5), 281-285.
- Priscilla de Souza, Maiara, Andrea Sanchez-Barrios, Tiele Medianeira Rizzetti, Lisianne Brittes Benitez, Michele Hoeltz, Rosana de Cassia de Souza Schneider, and Fábio de Farias Neves. 2020. “Concepts and Trends for Extraction and Application of Microalgae Carbohydrates.” In *Microalgae - From Physiology to Application*, edited by Milada Vítová. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89323>.
- Pulz, Otto, and Wolfgang Gross. 2004. “Valuable Products from Biotechnology of Microalgae.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 65 (6): 635–48. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>.
- Quigg, Antonietta, Andrew J. Irwin, and Zoe V. Finkel. 2011. “Evolutionary Inheritance of Elemental Stoichiometry in Phytoplankton.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278 (1705): 526–34. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1356>.
- Ra, Chae-Hun, Chang-Han Kang, Jang-Hyun Jung, Gwi-Taek Jeong, and Sung-Koo Kim. 2016. “Effects of Light-Emitting Diodes (LEDs) on the Accumulation of Lipid Content Using a Two-Phase Culture Process with Three Microalgae.” *Bioresource Technology* 212 (July): 254–61. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.059>.
- Rai, M.P.; Gupta, S. Growth and lipid production from *Scenedesmus* sp. under mixotrophic condition for bioenergy application. In *Proceedings of the First International Conference on Recent Advances in Bioenergy Research*; Kumar, S., Khanal, S.K., Yadav, Y.K., Eds.; Springer Proceedings in Energy; Springer: New Delhi, India, 2016
- Rammuni, M.N., Thilini U. Ariyadasa, P.H.V. Nimarshana, and R.A. Attalage. 2019. “Comparative Assessment on the Extraction of Carotenoids from Microalgal Sources: Astaxanthin from *H. Pluvialis* and β -Carotene from *D. Salina*.” *Food Chemistry* 277 (March): 128–34. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.066>.
- Raven, John A., and Mario Giordano. 2016. “Combined Nitrogen.” In *The Physiology of Microalgae*, edited by Michael A. Borowitzka, John Beardall, and John A. Raven, 143–54. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_7.
- Razzak, Shaikh A., Mohammad M. Hossain, Rahima A. Lucky, Amarjeet S. Bassi, and Hugo de Lasa. 2013. “Integrated CO₂ Capture, Wastewater Treatment and Biofuel Production by Microalgae Culturing—A Review.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27 (November): 622–53. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.063>.
- Razzak, Shaikh Abdur, Saad Aldin M. Ali, Mohammad Mozahar Hossain, and Hugo deLasa. 2017. “Biological CO₂ Fixation with Production of Microalgae in Wastewater – A Review.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 76 (September): 379–90. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.038>.
- Renaud, Susan M, Luong-Van Thinh, George Lambrinidis, and David L Parry. 2002. “Effect of Temperature on Growth, Chemical Composition and Fatty Acid Composition of Tropical Australian Microalgae Grown in Batch Cultures.” *Aquaculture* 211 (1–4): 195–214. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00875-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00875-4).
- Richmond, Amos. 1992. “Open Systems for the Mass Production of Photoautotrophic Microalgae Outdoors: Physiological Principles.” *Journal of Applied Phycology* 4 (3): 281–86. <https://doi.org/10.1007/BF02161213>.
- Richmond, ed. 2004. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford, UK ; Ames, Iowa, USA: Blackwell Science.

- Riding, R., Pentecost, A. 2000. *Calcification in Cyanobacteria*. In: *Leadbeater, B.S.C., Riding, R. (Eds.), Biomineralization in Lower Plants and Animals. The Systematics Association*. Oxford.
- Rismani-Yazdi, H.; Hampel, K.H.; Lane, C.D.; Kessler, B.A.; White, N.M.; Moats, K.M.; Allnut, F.C.T. High-productivity lipid production using mixed trophic state cultivation of *Auxenochlorella* (*Chlorella*) *protothecoides*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2014**, 38, 639–650.
- Rizwan, Muhammad, Ghulam Mujtaba, Sheraz Ahmed Memon, Kisay Lee, and Naim Rashid. 2018. “Exploring the Potential of Microalgae for New Biotechnology Applications and beyond: A Review.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 92 (September): 394–404. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>.
- Roessler, Paul G. 1988. “EFFECTS OF SILICON DEFICIENCY ON LIPID COMPOSITION AND METABOLISM IN THE DIATOM CYCLOTETRA CRYPTICA.” *Journal of Phycology* 24 (3): 394–400. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1988.tb00189.x>.
- Rossi, Federico, and Roberto De Philippis. 2016. “Exocellular Polysaccharides in Microalgae and Cyanobacteria: Chemical Features, Role and Enzymes and Genes Involved in Their Biosynthesis.” In *The Physiology of Microalgae*, edited by Michael A. Borowitzka, John Beardall, and John A. Raven, 565–90. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_21.
- Ruggiero, Michael A., Dennis P. Gordon, Thomas M. Orrell, Nicolas Bailly, Thierry Bourgoin, Richard C. Brusca, Thomas Cavalier-Smith, Michael D. Guiry, and Paul M. Kirk. 2015. “Correction: A Higher Level Classification of All Living Organisms.” *PLOS ONE* 10 (6): e0130114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130114>.
- Saeid, Agnieszka, Katarzyna Chojnacka, Sebastian Opaliński, and Mariusz Korczyński. 2016. “Biomass of *Spirulina Maxima* Enriched by Biosorption Process as a New Feed Supplement for Laying Hens.” *Algal Research* 19 (November): 342–47.
- Saman Maleki i, M.S., Mansouri, H. The novel strategy for enhancing growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* microalgae cultured in dairy wastewater by monochromatic LEDs and melatonin. *J Appl Phycol* **35**, 593–601 (2023).
- Safdar, W.; Shamoan, M.; Zan, X.; Haider, J.; Sharif, H.R.; Shoaib, M.; Song, Y. Growth kinetics, fatty acid composition and metabolic activity changes of *Cryptocodinium cohnii* under different nitrogen source and concentration. *AMB Express* **2017**, 7, 1–15.
- Sajjadi, Baharak, Wei-Yin Chen, Abdul. Aziz. Abdul Raman, and Shaliza Ibrahim. 2018. “Microalgae Lipid and Biomass for Biofuel Production: A Comprehensive Review on Lipid Enhancement Strategies and Their Effects on Fatty Acid Composition.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 97 (December): 200–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.050>.
- Santabarbara, Stefano, Ilaria Cazzalini, Andrea Rivadossi, Flavio M. Garlaschi, Giuseppe Zucchelli, and Robert C. Jennings. 2007. “Photoinhibition in Vivo and in Vitro Involves Weakly Coupled Chlorophyll-Protein Complexes†¶.” *Photochemistry and Photobiology* 75 (6): 613–18. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0750613PIVAIV2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750613PIVAIV2.0.CO2).
- Schmid, Anna-Maria M., M. A. Borowitzka, and B. E. Volcani. 1981. “Morphogenesis and Biochemistry of Diatom Cell Walls.” In *Cytomorphogenesis in Plants*, edited by Oswald Kiermayer, 8:63–97. Cell Biology Monographs. Vienna: Springer Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8602-2_3.
- Schumacher, G. J., and L. A. Whitford. 1965. “RESPIRATION AND P³² UPTAKE IN VARIOUS SPECIES OF FRESHWATER ALGAE AS AFFECTED BY A CURRENT.” *Journal of Phycology* 1 (2): 78–80. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1965.tb04561.x>.
- Seiji Takeda, Seiji Takeda. 1991. “An Atomic Model of Electron-Irradiation-Induced Defects on {113} in Si.” *Japanese Journal of Applied Physics* 30 (4A): L639. <https://doi.org/10.1143/JJAP.30.L639>.

- Sengmee, Dennapa, et al. "Biophotolysis-based hydrogen and lipid production by oleaginous microalgae using crude glycerol as exogenous carbon source." *International Journal of Hydrogen Energy* 42.4 (2017): 1970-1976.
- Sengmee, D., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., & Prasertsan, P. (2017). Biophotolysis-based hydrogen and lipid production by oleaginous microalgae using crude glycerol as exogenous carbon source. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(4), 1970–1976. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.10.08
- Shi, Dalin, Yan Xu, Brian M. Hopkinson, and François M. M. Morel. 2010. "Effect of Ocean Acidification on Iron Availability to Marine Phytoplankton." *Science* 327 (5966): 676–79. <https://doi.org/10.1126/science.1183517>.
- Smalley, Gabriela W., and D. Wayne Coats. 2002. "Ecology of the Red-Tide Dinoflagellate *Ceratium Furca*: Distribution, Mixotrophy, and Grazing Impact on Ciliate Populations of Chesapeake Bay." *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 49 (1): 63–73. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2002.tb00343.x>.
- Sousa, Cláudia, Lenneke de Winter, Marcel Janssen, Marian H. Vermuë, and René H. Wijffels. 2012. "Growth of the Microalgae *Neochloris Oleoabundans* at High Partial Oxygen Pressures and Sub-Saturating Light Intensity." *Bioresource Technology* 104 (January): 565–70. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.048>.
- Spiegel, M. van der, M.Y. Noordam, and H.J. van der Fels-Klerx. 2013. "Safety of Novel Protein Sources (Insects, Microalgae, Seaweed, Duckweed, and Rapeseed) and Legislative Aspects for Their Application in Food and Feed Production: Safety Aspects of Novel Protein Sources...." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12 (6): 662–78. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12032>.
- Spolaore, Pauline, Claire Joannis-Cassan, Elie Duran, and Arsène Isambert. 2006a. "Commercial Applications of Microalgae." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (2): 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A.. 2006b. "Commercial Applications of Microalgae." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (2): 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>.
- Stengel, Eberhard. 1970. "Anlagentypen Und Verfahren Der Technischen Algenmassenproduktion1." *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 83 (11): 589–606. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1971.tb02311.x>.
- Stoecker, Diane K. 1999. "Mixotrophy among Dinoflagellates." *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 46 (4): 397–401. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04619.x>.
- Sudhir, P., and S.D.S. Murthy. 2004. "Effects of Salt Stress on Basic Processes of Photosynthesis." *Photosynthetica* 42 (4): 481–86. <https://doi.org/10.1007/S11099-005-0001-6>.
- Tagliabue, Alessandro, Andrew R. Bowie, Philip W. Boyd, Kristen N. Buck, Kenneth S. Johnson, and Mak A. Saito. 2017. "The Integral Role of Iron in Ocean Biogeochemistry." *Nature* 543 (7643): 51–59. <https://doi.org/10.1038/nature21058>.
- Takahashi, Hideki, Stanislav Kopriva, Mario Giordano, Kazuki Saito, and Rüdiger Hell. 2011. "Sulfur Assimilation in Photosynthetic Organisms: Molecular Functions and Regulations of Transporters and Assimilatory Enzymes." *Annual Review of Plant Biology* 62 (1): 157–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103921>.
- Tan, H. W., AR Abdul Aziz, and M. K. Aroua. "Glycerol production and its applications as a raw material: A review." *Renewable and sustainable energy reviews* 27 (2013): 118-127.
- Tanner, W., M. Löffler, and O. Kandler. 1969. "Cyclic Photophosphorylation *in Vivo* and Its Relation to Photosynthetic CO₂-Fixation." *Plant Physiology* 44 (3): 422–28. <https://doi.org/10.1104/pp.44.3.422>.
- Teoh, Ming-Li, Wan-Loy Chu, Harvey Marchant, and Siew-Moi Phang. 2004. "Influence of Culture Temperature on the Growth, Biochemical Composition and Fatty Acid Profiles of Six Antarctic

- Microalgae.” *Journal of Applied Phycology* 16 (6): 421–30. <https://doi.org/10.1007/s10811-004-5502-3>.
- Thangaraj, Balakumar, Craig C. Jolley, Iosifina Sarrou, Jelle B. Bultema, Jason Greyslak, Julian P. Whitelegge, Su Lin, et al. 2011. “Efficient Light Harvesting in a Dark, Hot, Acidic Environment: The Structure and Function of PSI-LHCI from *Galdieria Sulphuraria*.” *Biophysical Journal* 100 (1): 135–43. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.09.069>.
- Thompson, Guy A. 1996. “Lipids and Membrane Function in Green Algae.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1302 (1): 17–45. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(96\)00045-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(96)00045-8).
- Tomaselli L. 2004. *The Microalgal Cell. In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd. Oxford. UK.
- Trainor, Francis R., and Patrick F. Egan. 1991. “Discovering the Various Ecomorphs of *Scenedesmus*: The End of a Taxonomic Era.” *Archiv Für Protistenkunde* 139 (1–4): 125–32. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(11\)80014-X](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(11)80014-X).
- Trautwein, Elke. 2001. “N-3 Fatty Acids — Physiological and Technical Aspects for Their Use in Food.” *European Journal of Lipid Science and Technology* 103 (1): 45–55. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200101\)103:1<45::AID-EJLT45>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200101)103:1<45::AID-EJLT45>3.0.CO;2-9).
- Tsiplakou, E., M. A. M. Abdullah, A. Mavrommatis, M. Chatzikonstantinou, D. Skliros, K. Sotirakoglou, E. Flemetakis, N. E. Labrou, and G. Zervas. 2018. “The Effect of Dietary *Chlorella Vulgaris* Inclusion on Goat’s Milk Chemical Composition, Fatty Acids Profile and Enzymes Activities Related to Oxidation.” *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 102 (1): 142–51. <https://doi.org/10.1111/jpn.12671>.
- Van de Waal, Dedmer B., Uwe John, Patrizia Ziveri, Gert-Jan Reichart, Mirja Hoins, Appy Sluijs, and Björn Rost. 2013. “Ocean Acidification Reduces Growth and Calcification in a Marine Dinoflagellate.” Edited by Howard I. Browman. *PLoS ONE* 8 (6): e65987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065987>.
- Vigani, Mauro, Claudia Parisi, Emilio Rodríguez-Cerezo, Maria J. Barbosa, Lolke Sijtsma, Matthias Ploeg, and Christien Enzing. 2015. “Food and Feed Products from Micro-Algae: Market Opportunities and Challenges for the EU.” *Trends in Food Science & Technology* 42 (1): 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.004>.
- Visser, Cornelis Leonardus Maria de, Remco Schreuder, and Frederick Stoddard. 2014. “The EU’s Dependency on Soya Bean Import for the Animal Feed Industry and Potential for EU Produced Alternatives.” *OCL* 21 (4): D407. <https://doi.org/10.1051/ocl/2014021>.
- Wang, Chih-Yu, Chun-Chong Fu, and Yung-Chuan Liu. 2007. “Effects of Using Light-Emitting Diodes on the Cultivation of *Spirulina Platensis*.” *Biochemical Engineering Journal* 37 (1): 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.03.004>.
- Wen, Zhi-You, Yue Jiang, and Feng Chen. 2002. “High Cell Density Culture of the Diatom *Nitzschia Laevis* for Eicosapentaenoic Acid Production: Fed-Batch Development.” *Process Biochemistry* 37 (12): 1447–53. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00034-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00034-1).
- Wen, X.; Geng, Y.; Li, Y. Enhanced lipid production in *Chlorella pyrenoidosa* by continuous culture. *Bioresour. Technol.* **2014**, *161*, 297–303.
- Widin, Spenser. 2021. “Biodiversity Does Not Enhance Algal Feedstock Production When Exposed to Fungal Infection: An Experimental Test in Outdoor Ponds Using a before-after-Control-Impact (BACI) Design,” April.
- Wilhelm, C.; Jakob, T. From photons to biomass and biofuels: Evaluation of different strategies for the improvement of algal biotechnology based on comparative energy balances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 909–919

- Xiao, Yibo, Jianying Guo, Huachang Zhu, Anwar Muhammad, Haiteng Deng, Zhangli Hu, and Qingyu Wu. 2020. "Inhibition of Glucose Assimilation in *Auxenochlorella Protothecoides* by Light." *Biotechnology for Biofuels* 13 (1): 146. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01787-9>.
- Xiong, Wei, Xiufeng Li, Jinyi Xiang, and Qingyu Wu. 2008. "High-Density Fermentation of Microalga *Chlorella Protothecoides* in Bioreactor for Microbio-Diesel Production." *Applied Microbiology and Biotechnology* 78 (1): 29–36. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1285-1>.
- Xu, S., Elsayed, M., Ismail, G. A., Li, C., Wang, S., & Abomohra, A. E. F. (2019). Evaluation of bioethanol and biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* grown in biodiesel waste glycerol: A sequential integrated route for enhanced energy recovery. *Energy Conversion and Management*, 197, 111907. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.111907>
- Yamamoto, Maki, Mariko Fujishita, Aiko Hirata, and Shigeyuki Kawano. 2004. "Regeneration and Maturation of Daughter Cell Walls in the Autospore-Forming Green Alga *Chlorella Vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)." *Journal of Plant Research* 117 (4). <https://doi.org/10.1007/s10265-004-0154-6>.
- Yang, Fangxia, Milford A Hanna, and Runcang Sun. 2012. "Value-Added Uses for Crude Glycerol--a Byproduct of Biodiesel Production." *Biotechnology for Biofuels* 5 (1): 13. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-13>.
- Yoshioka, M., Yago, T., Yoshie-Stark, Y., Arakawa, H., & Morinaga, T. (2012). Effect of high frequency of intermittent light on the growth and fatty acid profile of *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 338-341, 111-117.
- Yun., YS., Park, J. Attenuation of monochromatic and polychromatic lights in *Chlorella vulgaris* suspensions. *Appl Microbiol Biotechnol* 55, 765–770 (2001). <https://doi.org/10.1007/s002530100639>
- Zhang, Zhao, Dongzhe Sun, Yue Zhang, and Feng Chen. 2019. "Glucose Triggers Cell Structure Changes and Regulates Astaxanthin Biosynthesis in *Chromochloris Zofingiensis*." *Algal Research* 39 (May): 101455. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101455>.
- Zhou, Wenguang, Yecong Li, Min Min, Bing Hu, Hong Zhang, Xiaochen Ma, Liang Li, Yanling Cheng, Paul Chen, and Roger Ruan. 2012. "Growing Wastewater-Born Microalga *Auxenochlorella Protothecoides* UMN280 on Concentrated Municipal Wastewater for Simultaneous Nutrient Removal and Energy Feedstock Production." *Applied Energy* 98 (October): 433–40. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.04>.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΕΓΙΝΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΤΡΕΧΟΥΣΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

- Korozi, E., Kefalogianni, I., Tsagou, V., Chatzipavlidis, I., Markou, G., & Karnaouri, A. (2023). Evaluation of Growth and Production of High-Value-Added Metabolites in *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris* Grown on Crude Glycerol under Heterotrophic and Mixotrophic Conditions Using Monochromatic Light-Emitting Diodes (LEDs). *Foods*, 12(16), 3068.
- Korozi, E., Tsagou, V., Kefalogianni, I., Markou, G., Antonopoulos, D., Chakalis, L., & Chatzipavlidis, I. (2022). Continuous culture of *Auxenochlorella protothecoides* on biodiesel derived glycerol under mixotrophic and heterotrophic conditions: growth parameters and biochemical composition. *Microorganisms*, 10(3), 541.
- Markou G.; Diamantis A.; Korozi E.; Tsagou V.; Kefalogianni I; Chatzipavlidis I. Effects of Monochromatic Illumination with LEDs Lights on the Growth and Photosynthetic Performance of *Auxenochlorella protothecoides* in Photo- and Mixotrophic Conditions. *Plants* 2021, 10, 799.

**ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΔΙΕΘΝΩΝ ΚΑΙ ΕΘΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ
ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΡΙΤΩΝ**

1. Korozi E. *et al.* Growth, productivity, amino and fatty acid composition of *Auxenochlorella protothecoides* grown on biodiesel-derived glycerol in a continuous culture under heterotrophic and mixotrophic conditions. POSTER 9th conference of Mikrobiokosmos (Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Agricultural University of Athens, Athens, Greece)
2. Korozi E. *et al.* Growth, productivity, amino' and fatty acid composition of *Auxenochlorella protothecoides* grown on biodiesel-derived glycerol in a continuous culture under heterotrophic and mixotrophic conditions. Paper reference : PP178. Abstract 9th conference of Mikrobiokosmos (Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Agricultural University of Athens, Athens, Greece)
3. Kefalogianni I., Tsigou V., Korozi E., Chatzipavlidis I., Markou G., and Kougia E. Effect of culture conditions on microalgae grown on pure and biodiesel-derived crude glycerol. POSTER 8th conference of Mikrobiokosmos – 2019 (Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Agricultural University of Athens, Athens, Greece)
4. Korozi E. *et al.* Assessing growth kinetics and accumulation of high-value metabolites in freshwater and marine microalgae using crude glycerol as a carbon source. Paper reference: PP089. Abstract 10th conference of Mikrobiokosmos – 2023 (Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Agricultural University of Athens, Athens, Greece)
5. Korozi *et al.* Assessing growth kinetics and accumulation of high-value metabolites in freshwater microalgae using crude glycerol as a carbon source. POSTER 10th conference of Mikrobiokosmos 2023 (Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Agricultural University of Athens, Athens, Greece)