ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

τωήμα χημείας

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



Διπλωματική εργασία

<< Μελέτη της επίδρασης της πηγής άνθρακα στην ανάπτυξη, την φωτοσυνθετική δραστηριότητα και το βιοχημικό περιεχόμενο ενός απομονωμένου στελέχους Chlorella sp>>

Γεώργιος Χρονάκης

Επιβλέπων καθηγητής: Δημήτριος Γανωτάκης

Ηράκλειο 2024

UNIVERSITY OF CRETE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

DIVISION OF BIOCHEMISTRY



Bachelor thesis

Georgios Chronakis

Supervisor: Demetrios Ghanotakis

Heraklion 2024

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ Δημήτριο Γανωτάκη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του, καθώς και για την καθοδήγηση και την στήριξη που μου παρείχε. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον δεύτερο επιβλέποντα καθηγητή μου, Γεώργιο Τσιώτη, για τον χρόνο που αφιέρωσε για την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας. Επιπλέον, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου, και ιδίως τον Ναπολέων Στρατηγάκη για την αμέτρητη καθοδήγηση και υποστήριξη καθ΄ όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, άλλα και κατά τη συγγραφή της πτυχιακής εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους ήταν δίπλα μου κατά την διάρκεια των προπτυχιακών σπουδών μου για την στήριξη και τη βοήθεια που μου παρείχαν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι, η μελέτη της επίδρασης διαφορών πηγών άνθρακα (γλυκόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη, μανιτόλη, λακτόζη, σουκρόζη και σορβιτόλη) στην ανάπτυξη, στην φωτοσυνθετική δραστηριότητα και στο βιοχημικό περιεχόμενο από ένα φωτοσυνθετικό μικροφύκος του γένους *Chlorella*, το οποίο είχε απομονωθεί από το ευτροφικό ποτάμι Γιόφυρο που βρίσκεται στο Ηράκλειο της Κρήτης.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας διαπιστώθηκε πως τόσο το είδος και η ποσότητα του οργανικού υποστρώματος όσο και ο τρόπος ανάπτυξης της καλλιέργειας έχουν άμεση επίδραση στην ανάπτυξη και στην φωτοσυνθετική ικανότητα του μικροφύκους. Ειδικότερα, το στέλεχος *Chlorella* παρουσίασε υψηλή παραγωγή βιομάζας υπό μεικτότροφες συνθήκες και σε καλλιέργειες που είχαν ως οργανική πηγή άνθρακα γλυκόζη, μαλτόζη ή σουκρόζη σε εύρος συγκεντρώσεων 150 με 200 mM. Αντιθέτως, η φωτοσυνθετική δραστηριότητα εντοπίστηκε ήταν υψηλότερη στις καλλιέργειες όπου αναπτύχθηκαν αυτότροφα αλλά και σε αυτές όπου η οργανική πηγή άνθρακα ήταν σε χαμηλή συγκέντρωση (50-100 mM).

Στο δεύτερο μέρος χρησιμοποιήθηκαν τα παραπάνω δείγματα για την ανάλυση της βιοχημικής σύστασης των κυττάρων *Chlorella*. Το μικροφύκος παρουσίασε υψηλά ποσοστά σακχάρων και χλωροφυλλών στην αυτότροφη συνθήκη δείχνοντας την αξιοσημείωτη φωτοσυνθετική του δραστηριότητα. Από την άλλη μεριά, οι καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν υπό μεικτότροφες συνθήκες, έδειξαν πως το οργανικό υπόστρωμα επηρεάζει τη βιοχημική σύσταση των κυττάρων, καθώς προκαλεί μείωση των σακχάρων και αύξηση των λιπιδίων.

Συνεπώς τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούν να χρησιμοποιήθουν ως αναφορά για την βελτίωση των τεχνικών ανάπτυξης του μικροοργανισμού ανάλογα με το σκοπό χρήσης του (βιοκαύσιμο, συμπλήρωμα διατροφής και ως μέσο για βιοαποκατάσταση).

Λέξεις κλειδιά: Μικροφύκη, *Chlorella*, πηγή άνθρακα, ανάπτυξη, βιομάζα, φωτοσυνθετική ικανότητα, βιοχημικό περιεχόμενο

ABSTRACT

The subject of this thesis is the study of the effect of different carbon sources (glucose, galactose, fructose, maltose, mannitol, lactose, sucrose, and sorbitol) on the growth, photosynthetic activity, and biochemical content of a photosynthetic microalga of the genus *Chlorella*, isolated from the eutrophic river Giofyros located in Heraklion, Crete.

In the first part of this study, it was found that both the type and quantity of organic substrate as well as the growth mode have a direct impact on the growth and photosynthetic ability of the microalgae. Specifically, the *Chlorella* strain exhibited high cellular biomass when grown under mixotrophic conditions and in cultures with glucose, maltose, and sucrose as organic carbon sources within concentrations ranging from 150 to 200 mM. Conversely, photosynthetic activity was significantly higher in cultures where autotrophic conditions prevailed or where the organic carbon source was present at low concentrations (50-100 mM).

In the second part, the above samples were used to analyze the biochemical composition of *Chlorella* cells. The microalga showed higher content of sugars and chlorophylls under autotrophic conditions, indicating remarkable photosynthetic activity. On the other hand, cultures grown under mixotrophic conditions demonstrated that the organic substrate affects the biochemical composition of the cells, causing a decrease in sugars and an increase in lipids.

The results of this study can be used as a reference for improving the cultivation techniques of the microorganism according to its intended use (biofuel, dietary supplement, and means for bioremediation).

Keywords: Microalgae, Chlorella, carbon source, growth, biomass, photosynthetic capacity, biochemical content.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ8
1.1 Φωτοσύνθεση8
1.2 Φωτεινές αντιδράσεις φωτοσύνθεσης9
1.3Σκοτεινές αντιδράσεις(Κύκλος του Calvin)11
1.4 Μικροφύκη12
1.4.1Μικροφύκη του γένους <i>Chlorella</i> 12
1.4.2Εφαρμογές του γένους <i>Chlorella</i> 13
1.5 Φωτοσυνθετικές Χρωστικές15
1.6Φθορισμός χλωροφύλλης17
1.7Είδη καλλιεργειών
1.7.1 Αυτότροφες καλλιέργειες18
1.7.2Ετερότροφες καλλιέργειες18
1.7.3 Μεικτότροφες καλλιέργειες18
1.8Στάδια ανάπτυξης μικροφύκων19
1.9Σκοπός διπλωματικής εργασίας21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ22
2.1 Συνθήκες ανάπτυξης Chlorella sp σε μητρική καλλιέργεια
2.2 Πειραματικές καλλιέργειες προς μελέτη της ανάπτυξης και της φωτοσυνθετικής
δραστηριότητα
2.3 Πειραματικές καλλιέργειες προς μελέτη βιοχημικού περιεχομένου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

2.1 Συνθήκες ανάπτυξης <i>Chlorella sp</i> σε μητρική καλλιέργεια	22
2.2 Πειραματικές καλλιέργειες προς μελέτη της ανάπτυξης και της φωτοσυνθε	τικής
δραστηριότητα	24
2.3 Πειραματικές καλλιέργειες προς μελέτη βιοχημικού περιεχομένου	25
2.4 Μετρήσεις κυτταρικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο PCV (Packed Cell Volume)	26
2.5Προσδιορισμός Φωτοσυνθετικών Χρωστικών	26
2.6 Μετρήσεις Επαγωγικού Φθορισμού	27
2.7 Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου	28
2.8 Ποσοτικός προσδιορισμός βιοχημικού περιεχομένου <i>Chlorella sp</i>	29
2.8.1 Ποσοτικός προσδιορισμός σακχάρων με την μέθοδο θυμόλης-θειικού	29
2.8.2 Ποσοτικός προσδιορισμός λιπιδίων με την μέθοδο θειικού - φωσφορικού- βανιλλίνη	30

2.8.5 HOUOLIKUS ALDOUOLOPIOHOS ALDOUELVWV HE LIJV HEOOOO LOWIY
--

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	33
3.1 Μελέτη επίδρασης της γλυκόζης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα	σε
καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM	.33
3.2 Μελέτη επίδρασης της γαλακτόζης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητ	α
σε καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM	36
3.3 Μελέτη επίδρασης της φρουκτόζης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότη	τα
σε καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM	38
3.4 Μελέτη επίδρασης της μαλτόζης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα	σε
καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM	.40
3.5 Μελέτη επίδρασης της μανιτόλης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα	ι σε
καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM	.43
3.6 Μελέτη επίδρασης της λακτόζης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα	σε
καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM	.45
3.7 Μελέτη επίδρασης της σουκρόζης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα	α
σε καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM	48
3.8 Μελέτη επίδρασης της σορβιτόλης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητ	α
σε καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM	50
3.9 Αποτελέσματα βιοχημικού περιεχομένου κυττάρων Chlorella sp, σε καλλιέργειες	που
διέθεταν τα παραπάνω οργανικά υποστρώματα	53
3.10 Συμπεράσματα	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	57

КЕФАЛАЮ 5: ВІВЛІОГРАФІА

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση αποτελεί μία διαδικασία την οποία επιτελούν οι πολυκύτταροι φυτικοί οργανισμοί και μερικοί μικροοργανισμοί (όπως κυανοβακτήρια και φύκη) με σκοπό να μπορέσουν να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες. Προκειμένου να το επιτύχουν αυτό, χρησιμοποιούν την φωτεινή ενέργεια του ήλιου ώστε να μετατρέψουν το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό σε οργανικά μόρια (κυρίως γλυκόζη, σακχαρόζη και άμυλο) και μοριακό οξυγόνο. Πολλά φωτοσυνθετικά βακτήρια δεν χρησιμοποιούν νερό ως αναγωγικό στοιχείο αλλά διαφορετικές αναγωγικές ενώσεις, όπως το υδρόθειο (H₂S). Αυτού του είδους η φωτοσύνθεση ονομάζεται μη οξυγονική καθώς δεν παράγεται μοριακό οξυγόνο ως προϊόν, σε αντίθεση με την οξυγονική. Η φωτοσύνθεση επιτελείται σε οργανίδια τα οποία ονομάζονται χλωροπλάστες και απαρτίζεται από δύο μέρη, τις φωτεινές και τις σκοτεινές αντιδράσεις [1].



Εικόνα 1: Γενική εξίσωση οξυγονικής και μη οξυγονικής φωτοσύνθεσης[2]

1.2 Φωτεινές αντιδράσεις

Οι φωτεινές αντιδράσεις πραγματοποιούνται στις μεμβράνες των θυλακοειδών και σκοπός τους είναι χρησιμοποιώντας την ηλιακή ακτινοβολία, να παράξουν ενέργεια υπό μορφή ΑΤΡ και αναγωγική ισχύ υπό μορφή NADPH. Τα στοιχεία αυτά είναι απαραίτητα κατά τις σκοτεινές αντιδράσεις (κύκλος του Calvin) όπου γίνεται η μετατροπή του CO₂ σε υδατάνθρακες [3].

Για την πραγματοποίηση των φωτεινών αντιδράσεων στα πράσινα φυτά συμμετέχουν δύο είδη φωτοευαίσθητων συμπλόκων, το φωτοσύστημα Ι (PSI) και το φωτοσύστημα ΙΙ (PSII). Στα κέντρα αντίδρασης αυτών των φωτοσυστημάτων υπάρχουν ειδικά ζεύγη (κυρίως χλωροφύλλη a) τα οποία απορροφούν φωτόνια σε συγκεκριμένα μήκη κύματος ώστε να μεταφέρουν ηλεκτρόνια μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και τελικά να παραχθούν το ATP και το NADPH. Πιο συγκεκριμένα, η φωτοσύνθεση ξεκινάει με την απορρόφηση του φωτός από το ειδικό ζεύγος του φωτοσυστήματος ΙΙ, το οποίο αναφέρεται ως P680 και απορρόφα ακτινοβολία στα 680 nm. Όταν ένα φωτόνιο απορροφάται από το P680, προκαλεί τη μετάβασή του σε μια διεγερμένη κατάσταση (P680*). Στην συνέχεια το διεγερμένο μόριο χλωροφύλλης μεταφέρει το ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο φαιοφυτίνης. Η απώλεια ηλεκτρονίου στο κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος ΙΙ αντισταθμίζεται με την οξείδωση του νερού σε μοριακό οξυγόνο η οποία επιτελείται στο σύμπλοκο οξείδωσης του νερού(WOC) ή αλλιώς στο κέντρο μαγγανίου. Η ανηγμένη φαιοφυτίνη μεταφέρει το ηλεκτρόνιο από τη χλωροφύλλη σε μια σειρά από πλαστοκινόνες, οι οποίες αναγόνται σε πλαστοκινόλες. Στη συνέχεια, το κυτόχρωμα bf εκτελεί την επανοξείδωση της πλαστοκινόλης προς πλαστοκινόνη, μεταφέροντας το ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο πλαστοκυανίνης [3,4].

Έπειτα το ειδικό ζεύγος μορίων χλωροφύλλης a το οποίο βρίσκεται στο φωτοσύστημα I και συμβολίζεται με P700 απορρόφα φωτόνια με μέγιστη απορρόφηση στα 700 nm. Όταν αυτό το ειδικό ζεύγος χλωροφυλλών διεγείρεται (P700*), μεταφέρονται ηλεκτρόνια με τελικό αποδέκτη μία πρωτεΐνη που ονομάζεται φερεδοξίνη. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων συμβαίνει διαμέσου μίας πορείας μεταφοράς ηλεκτρονίων που πέρνα από την χλωροφύλλη στην θέση A₀ και την κινόνη στην θέση A₁ για να φθάσει στο ένα σύνολό συμπλοκών 4Fe-4S τα οποία θα

αναγάγουν στην φερεδοξίνη. Η ανηγμένη φερεδοξίνη μέσω του ένζυμου αναγωγάση του ζεύγους φερεδοξίνης -NADP⁺⁻ μετατρέπει το NADP⁺ σε NADPH το οποίο αποτελεί το αναγωγικό στοιχείο για την μετατροπή του CO₂ σε υδατάνθρακες. Τέλος το P700* προσλαμβάνει το ηλεκτρόνιο το οποίο χάθηκε από την ανηγμένη πλαστοκυανίνη. Παράλληλα με την παραγωγή του NADPH, παράγεται και ATP μέσω του ενζύμου της συνθάσης της ATP. Αυτό συμβαίνει καθώς κατά την μεταφορά των ηλεκτρονίων στο ζεύγος φερεδοξίνης -NADP⁺ δημιουργείται μία βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ στρώματος και του εσωτερικού των θυλακοειδών, η οποία ωθεί την μετατροπή της ADP σε ATP [3,5].



Εικόνα 2: Διάγραμμα ενός χλωροπλάστη[6]



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της ολοκληρωμένης πορείας των φωτεινών αντιδράσεων και της βαθμίδωσης συγκέντρωσης των Η⁺.[3]

1.3 Σκοτεινές αντιδράσεις (Κύκλος του Calvin)

Οι σκοτεινές αντιδράσεις πραγματοποιούνται στο στρώμα των χλωροπλαστών και σκοπός τους είναι, χρησιμοποιώντας το ATP και το NADPH που παράχθηκε από τις φωτεινές αντιδράσεις, να μετατρέψουν το CO₂ σε καύσιμο οργανικό μόριο (π.χ εξόζη). Οι αντιδράσεις αυτές ονομάζονται σκοτεινές καθώς δεν είναι απαραίτητη η παρουσία του φωτός. Αποτελούνται από τρία στάδια, όπου στο πρώτο στάδιο γίνεται η καθήλωση του CO₂ από την 1-5 διφωσφορική ριβουλόζη προς σχηματισμού 2 μορίων 3-φωσφογλυκερικού μέσω του ενζύμου της καρβοξυλάσης/οξυγόνασης της 1-5 διφωσφορικής ριβουλόζης(rubisco). Κατά το δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η αναγωγή του 3-φωσφογλυκερικού σε εξόζη ενώ στο τρίτο στάδιο υλοποιείται η αναγέννηση της 1-5 διφωσφορικής ριβουλόζης μέσω των ενζύμων της τρανσκετολάσης και της αλδολάσης [7].



Εικόνα 4:Γενικό σχήμα του κύκλου του Calvin[8]

<u>1.4Μικροφύκη</u>

Τα πράσινα μικροφύκη υπάγονται στην γενική κατηγορία των φυκών και αποτελούν αυτότροφους, μονοκύτταρους, ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Συναντώνται κυρίως σε γλυκά νερά και σε θαλάσσια περιβάλλοντα με το μέγεθος τους να κυμαίνεται από μερικά μικρόμετρα μέχρι και εκατοντάδες μικρόμετρα(μm) [9,10]. Τα είδη των μικροφύκων που έχουν ανακαλυφθεί είναι πάνω από 300.000 εκ των οποίων τα 30.000 είναι τεκμηριωμένα. Αυτοί οι οργανισμοί ζουν σε πολύπλοκα φυσικά περιβάλλοντα και εκδηλώνουν υψηλό βαθμό προσαρμοστικότητας σε ακραίες συνθήκες, όπως σε ακραίες συνθήκες αλατότητας, θερμοκρασίας, ενώ μπορούν να αξιοποιήσουν μια ποικιλία θρεπτικών συστατικών. Η προσαρμοστικότητα αυτή επιτρέπει στα μικροφύκη να παράγουν μια εντυπωσιακή ποικιλία σημαντικών δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι είναι βιολογικά ενεργοί και παρουσιάζουν μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον [9].

1.4.1 Μικροφύκη του γένους Chlorella

Το πράσινο μικροφύκος του γένους *Chlorella* απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1890 από τον Ολλανδό μικροβιολόγο Beijerinck και μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 37 διαφορετικά είδη αυτού του γένους. Παρουσιάζουν σφαιρικό ή και ελλειψοειδές σχήμα, χωρίς μαστίγια και το μέγεθος τους κυμαίνεται από 2-10 μm. Συναντώνται κυρίως σε γλυκά ύδατα και στο έδαφος και σε μικρότερο βαθμό σε θαλάσσια περιβάλλοντα. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ένα στέλεχος *Chlorella sp*, το οποίο απομονώθηκε από τον ευτροφικό ποταμό Γιόφυρο που βρίσκεται στο Ηράκλειο Κρήτης και χαρακτηρίστηκε σε παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου. Τα κύτταρα αυτά περιβάλλονται από μία εξωκυττάρια μήτρα πολυσακχαρίτη, εντός της οποίας πραγματοποιείται η αναπαραγωγή του μέσω αυτοσπορυλίωσης, που είναι ένας συνηθισμένος τρόπος αναπαραγωγής για την *Chlorella* [11]. Αυτός ο εξωπολυσακχαρίτης προσδίδει ανθεκτικότητα σε ακραία περιβάλλοντα ανάπτυξης, όπως για παράδειγμα παρουσία αντιβιοτικών και ζιζανιοκτόνων.



Εικόνα 5: Απεικόνιση του τρόπου αναπαραγωγής μέσω αυτοσπορυλίωσης σε ένα στέλεχος *Chlorella vulgaris*: a) πρώιμη φάση κυτταρικής ανάπτυξης. b) όψιμη φάση κυτταρικής ανάπτυξης. c) πρώιμη φάση κυτταρικής διαίρεσης. d) όψιμη φάση κυτταρικής διαίρεσης. e) φάση ωρίμανσης θυγατρικών κυττάρων και f) φάση απελευθέρωσης αυτοσπορίων [12]

1.4.2 Εφαρμογές του γένους Chlorella

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των μικροφύκων όπως η *Chlorella* έχουν προσελκύσει ερευνητικό και εμπορικό ενδιαφέρον. Τα έως τώρα δεδομένα δείχνουν πως από τα μικροφύκη παράγονται φυσικά προϊόντα τα οποία βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς όπως είναι η υγεία, τα τρόφιμα, η κοσμητολογία και το περιβάλλον.

Πιο συγκεκριμένα η *Chlorella* αποτελεί εδώ και αρκετά χρόνια ένα σημαντικό συμπλήρωμα διατροφής λόγω του ότι περιέχει πληθώρα από θρεπτικά συστατικά όπως βιταμίνες (συμπεριλαμβανομένου των B₁₂ και D), μέταλλα, πρωτεΐνες, ω₃ λιπαρά οξέα και αντιοξειδωτικά. Κλινικές δοκιμές έχουν δείξει πως η λήψη των συγκεκριμένων συμπληρωμάτων μπορεί δυνητικά να βελτιώσει καταστάσεις όπως η υπερλιπιδαιμία και η υπεργλυκαιμία, προσφέροντας προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες, του καρκίνου και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας [13,14]. Επίσης τα μικροφύκη αυτά έχουν ευρεία χρήση και στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς χρησιμοποιούνται τόσο ως πρόσθετα λόγω των θρεπτικών συστατικών τους όσο και σαν φυσικές χρωστικές (π.χ καροτενοειδή). Η ξηρή βιομάζα των μικροφύκων αυτών μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως συμπλήρωμα στις τροφές των χερσαίων ζώων και των ψαριών [14]. Εξίσου σημαντική εφαρμογή του μικροφύκους *Chlorella* είναι η χρήση του στη βιολογική διαχείριση αποβλήτων. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποκατάσταση αποβλήτων όπως είναι τα αστικά λύματα ή τα λύματα βυρσοδεψίας, καθώς έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται σε ακραία περιβάλλοντα όπως είναι αυτά. Επίσης μία σπουδαία εφαρμογή τους είναι η χρήση του ως βιοκαύσιμο καθώς ο μεταβολισμός τους παράγει ποικίλες ενώσεις όπως τριάκυλογλυκερόλες, λιπαρά οξέα και παραγόμενα αέρια (όπως υδρογόνο) τα οποία με κατάλληλη επεξεργασία μπορούν να λειτουργήσουν ως βιοκαύσιμα [14].



Εικόνα 6: Διαγραμματική απεικόνιση των βιοπροϊόντων που λαμβάνονται από την βιομάζα των μικροφύκων[15]

1.5 Φωτοσυνθετικές χρωστικές

Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές αποτελούν βιοδραστικά συστατικά με μεγάλη σημασία για τις βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων. Δεν περιορίζονται μόνο στην συλλογή ηλιακής ενέργειας για τη διεξαγωγή της φωτοσύνθεσης, αλλά επίσης συμμετέχουν σε διαδικασίες προστασίας από το οξειδωτικό στρες κατά τη φωτοσύνθεση. Οι χρωστικές αυτές βρίσκονται σε αφθονία στους φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς και αποτελούν οργανικές ενώσεις οι οποίες μέσω των χημικών τους ιδιοτήτων έχουν την ικανότητα να απορροφούν φωτεινή ενέργεια στην περιοχή του ορατού φάσματος (400-700 nm). Χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή [16].

Οι χλωροφύλλες είναι οι φωτοσυνθετικές χρωστικές οι οποίες βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα χερσαία φυτά και στα πράσινα μικροφύκη και διαχωρίζονται στην χλώροφύλλη-a και την χλωροφύλλη-b. Οι χρωστικές αυτές διαθέτουν πράσινο χρώμα και παρουσιάζουν μέγιστα απορρόφησης στα 430 nm και 662 nm για την χλώροφύλλη-a και 453 και 642 nm για την χλωροφύλλη-b. Και τα δύο είδη αποτελούνται από τέσσερις πυρρολικούς δακτυλίους που ενώνονται με ένα άτομο Mg²⁺ και μία μακριά υδρογονανθρακική αλυσίδα είκοσι ατόμων άνθρακα η οποία ονομάζεται φυτόλη. Η δομή τους τις καθιστά πολύ αποτελεσματικούς αποδέκτες φωτεινής ενέργειας, διότι διαθέτουν συζευγμένους διπλούς δεσμούς όπου δίνουν την δυνατότητα στα π-ηλεκτρόνια να είναι απεντοπισμένα. Κατά αυτό τον τρόπο τα ηλεκτρόνια μπορούν εύκολα να μεταβαίνουν από μοριακά τροχιακά χαμηλής ενέργειας σε μοριακά τροχιακά υψηλής ενέργειας. Τέλος, η μόνη διαφορά μεταξύ των δύο χρωστικών είναι πως η χλώροφύλλη-a διαθέτει μία μεθυλομάδα σε σχέση με την χλωροφύλλη-b που έχει μία φορμυλομάδα στην θέση που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 7: Απεικόνιση των δομών της χλωροφύλλης και επισήμανση της διαφοράς τους

Η άλλη κύρια κατηγορία χρωστικών είναι τα καροτενοειδή τα οποία απορροφούν μεταξύ 400-500nm και είναι υπεύθυνα για τα κόκκινα και κίτρινα χρώματα των φρούτων και των ανθών. Αυτά ορίζονται σε δύο κύριες υποομάδες, τα καροτένια και τις ξανθοφύλλες. Και οι δύο υποομάδες είναι οργανικές ενώσεις οι οποίες αποτελούνται από ένα εκτεταμένο συζυγιακό σύστημα και εντοπίζονται στα κέντρα απορρόφησης του φωτός. Η δομική τους διαφορά είναι πως τα καροτένια αποτελούνται κυρίως από άνθρακα και υδρογόνο ενώ οι ξανθοφύλλες διαθέτουν και οξυγόνο σε μορφή υδροξυλικών ή εποξικών ομάδων. Ο ρόλος τους έχει διττή φύση, καθώς αρχικά μπορούν να μεταφέρουν ενέργεια στα κέντρα αντίδρασης και επίσης καταστέλλουν φωτοχημικές αντιδράσεις οι οποίες μπορεί να είναι καταστρεπτικές για το κύτταρο και κατ' επέκταση για όλο το φυτό [3,17].



Εικόνα 8: Χαρακτηριστικά παραδείγματα καροτενίων και ξανθοφυλλών[18]

1.6 Φθορισμός χλωροφύλλης

Ο φθορισμός ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο μία ουσία μετά την απορρόφηση ενός φωτονίου, εκπέμπει φωτεινή ακτινοβολία μικρότερης ενέργειας λόγω απωλειών της σε μορφή θερμότητας. Στο πλαίσιο των φωτοσυνθετικών μικροφύκων, η μελέτη του φθορισμού αποτελεί ένα γρήγορο και ασφαλή τρόπο προσδιορισμού της λειτουργικότητας του φωτοσυστήματος ΙΙ αλλά και εντοπισμού πιθανών καταπονήσεων της καλλιέργειας. Αυτό εξηγείται, καθώς όταν το φωτοσύστημα ΙΙ βρίσκεται υπό συνθήκες καταπόνησης, η ενέργεια δεν μπορεί να διοχετευτεί στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα η εκπομπή φθορισμού να είναι μεγαλύτερη [19].

Για τον προσδιορισμό του φθορισμού, τα δείγματα αρχικά τοποθετούνταν στο σκοτάδι ώστε όλα τα μόρια της χλωροφύλλης να επανέλθουν στη θεμελιώδη κατάσταση και το φωτοσύστημα ΙΙ να είναι σε πλήρη λειτουργικότητα. Στην συνέχεια, τα δείγματα αυτά εκτείθονταν κάτω από φωτισμό κόκκινης δέσμης, ο οποίος προκαλούσε μια ραγδαία άνοδο του φθορισμού από μια αρχική τιμή (F₀) σε μια μέγιστη τιμή (F_{max}), η οποία μειωνόταν σταδιακά μέχρι να σταθεροποιηθεί (F₅). Οι τιμές του φθορισμού σχετίζονται άμεσα με τα κέντρα αντίδρασης του PSII όπου σε σκοτεινές συνθήκες τα κέντρα αντίδρασης θεωρούνται «ανοιχτά» και παρουσιάζουν μέγιστη φωτοχημική δραστηριότητα ενώ εκπέμπουν ελάχιστο φθορισμό. Το F₀ λοιπόν, αντιπροσωπεύει την τιμή του φθορισμού ύστερα από έντονο φωτισμό σε ιστούς που έχουν παραμείνει στο σκοτάδι, με όλα τα ενεργά κέντρα του PSII να είναι ανοιχτά. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης σε φωτεινή ακτινοβολία, τα ενεργά κέντρα κλείνουν, φέρνοντας τον φθορισμό στην μέγιστη τιμή του (F_{max}) [20]. Η αναλογία F_{max}-F₀/F_{max} αντιπροσωπεύει τη μέγιστη τυμή απόδοση του PSII και αποτελεί τον διαδεδομένο δείκτη F_v/F_{max}. Αυτός ο δείκτης παρέχει πληροφορία για την υγεία αλλά και την απόδοση του φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών.

1.7 Είδη καλλιεργειών

1.7.1 Αυτότροφες καλλιέργειες

Σε αυτό το είδος καλλιέργειας, οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας το φως και το ατμοσφαιρικό διοξείδιο του άνθρακα το οποίο καθηλώνουν κατά τον κύκλο του Calvin [23]. Πιο συγκεκριμένα, η ενέργεια του φωτός μετατρέπεται μέσω της φωτοσύνθεσης σε ATP και NADPH, τα οποία χρησιμοποιούνται κατά τον κύκλο του Calvin για να μετατρέψουν το καθηλωμένο CO₂ σε καύσιμο οργανικό μόριο (μορφή εξόζης) [3]. Αυτός το είδος καλλιέργειας όμως σε σχέση με τα αλλά δύο είδη παρουσιάζει μειονεκτήματα όπως η χαμηλή κυτταρική συγκέντρωση και υψηλό χρόνο ανάπτυξης [24].

<u>1.7.2 Ετερότροφες καλλιέργειες</u>

Στον συγκεκριμένο τύπο καλλιέργειας τα μικροφύκη χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας οργανικά υποστρώματα όπως είναι η γλυκόζη, η σουκρόζη, το οξικό οξύ, η γλυκερίνη και πυροσταφυλικό οξύ [25]. Επίσης, αυτού του είδους οι καλλιέργειες μπορούν να πραγματοποιηθούν τόσο στο σκοτάδι όσο και με παρουσία φωτός (φωτοετερότροφη καλλιέργεια). Συνεπώς χωρίς την παρουσία φωτός, η ενέργεια ενός μικροοργανισμού εξασφαλίζεται μόνο από τον μεταβολισμό του οργανικού υποστρώματος που προστίθεται στο θρεπτικό υλικό ενώ με την παρουσία φωτός η ενέργεια εξασφαλίζεται κατά κύριο λόγο από τον μεταβολισμό του οργανικού υποστρώματος, και σε μικρότερο βαθμό και από τη φωτοσυνθετική διαδικασία, καθώς το διαθέσιμο διοξείδιο του άνθρακα είναι περιορισμένο [26].

1.7.3 Μεικτότροφες καλλιέργειες

Στον συγκεκριμένο τύπο καλλιέργειας τα μικροφύκη χρησιμοποιούν ως κύρια πηγή ενέργειας το φως αλλά τόσο το ατμοσφαιρικό CO₂ όσο και η παρουσία οργανικών

υποστρωμάτων είναι απαραίτητη. Ειδικότερα, οι μικροοργανισμοί οι οποίοι αναπτύσσονται κάτω από αυτές τις συνθήκες αποκτούν ενεργεία καταβολίζοντας τις οργανικές ενώσεις μέσω της κυτταρικής αναπνοής και μετατρέποντας την φωτεινή ενέργεια σε χημική ενέργεια μέσω της φωτοσύνθεσης [25].

1.8 Στάδια ανάπτυξης μικροφύκων

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών όπως είναι και τα μικροφύκη μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο διαφορετικούς τύπους καλλιέργειας, την κλειστή και την συνεχή. Στην κλειστή καλλιέργεια οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε συγκεκριμένη ποσότητα θρεπτικού μέσου ενώ στην συνεχή τροφοδοτούνται συνεχώς με θρεπτικά μέσα και ταυτόχρονα απομακρύνονται από την καλλιέργεια κύτταρα και άχρηστα προϊόντα. Στην εικόνα 8 απεικονίζεται η καμπύλη ανάπτυξης μικροφύκους σε συνάρτηση με τον χρόνο, σε μία κλειστή καλλιέργεια [27].



Εικόνα 9: Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμού σε κλειστή καλλιέργεια[28]

Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού όπως φαίνεται στην εικόνα διακρίνεται σε έξι διαφορετικές φάσεις. Αρχικά ο μικροοργανισμός βρίσκεται στην λανθάνουσα φάση (1), κατά την οποία ο αρχικός πληθυσμός παραμένει σταθερός μέχρι να προσαρμοστεί στις νέες συνθήκες. Την λανθάνουσα φάση διαδέχεται η εκθετική φάση (2), κατά την οποία η κυτταρική διαίρεση επιταχύνεται σημαντικά. Στη συνέχεια, ακολουθεί η γραμμική φάση ανάπτυξης (3), όπου ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι γρήγορος, αλλά με σταθερό ρυθμό. Ύστερα ο μικροοργανισμός βρίσκεται στην φθίνουσα φάση (4) όπου ο ρυθμός ανάπτυξης είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό θανάτου των κυττάρων. Οι ρυθμοί αυτοί εξισώνονται στη στατική φάση (5), όπου ο κυτταρικός πληθυσμός παραμένει σταθερός συνήθως λόγω εξάντλησης κάποιου θρεπτικού συστατικού ή συσσώρευσης τοξικών προϊόντων από τον μεταβολισμό των μικροοργανισμών. Τέλος, ακολουθεί η φάση θανάτου (6) κατά την οποία ο κυτταρικός πληθυσμός σταδιακά μειώνεται. Από την άλλη μεριά σε μία συνεχή καλλιέργεια οι φάσεις ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού διαφέρουν καθώς υπάρχει διαρκής τροφοδοσία θρεπτικού υλικού αρά και συνεχής ανάπτυξη του μικροοργανισμού (απουσία στατικής φάσης και φάσης θανάτου). Όμως είναι σημαντικό να τονισθεί πως η διαδοχή των φάσεων σε κάθε καλλιέργεια είναι συγκεκριμένη όμως η χρονική διάρκεια κάθε φάσης διαφέρει ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού [27].

1.9 Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη ανάπτυξης του μικροφύκους *Chlorella sp* το οποίο απομονώθηκε από τον ευτροφικό ποταμό Γιόφυρο. Πιο συγκεκριμένα ερευνήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης και φωτοσύνθεσης του μικροοργανισμού κάτω από μεικτότροφες και φωτοετερότροφες συνθήκες. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα σάκχαρα ως οργανικές πηγές άνθρακα, τα οποία προστέθηκαν στις καλλιέργειας σε κλιμακούμενες συγκεντρώσεις που είχαν εύρος 50-200mM. Τέλος, η παρούσα εργασία, ολοκληρώνεται με την μελέτη του βιοχημικού περιεχομένου κυττάρων *Chlorella sp* (σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια και φωτοσυνθετικές χρωστικές) όταν αυτά

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Συνθήκες ανάπτυξης Chlorella sp σε μητρική καλλιέργεια

Για την πραγματοποίηση όλων των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν υγρές μητρικές καλλιέργειες του στελέχους *Chlorella sp* που αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο TAP (Tris-Acetate-Phosphate). Η ανάπτυξη των μητρικών καλλιεργειών γινόταν υπό φωτοετερότροφες συνθήκες με συνεχή ανάδευση και σε δωμάτιο όπου είχε σταθερή θερμοκρασία 25 ± 1 °C και υπό φωτισμό με ένταση ακτινοβολίας 50-80 μmol φωτονίων m⁻²·s⁻¹. Ο συγκεκριμένος φωτισμός επιτυγχάνονταν με την χρήση λευκών λαμπτήρων φθορισμού cool white. Ο όγκος των καλλιεργειών ήταν 200 mL και τα κύτταρα συλλέγονταν κατά την εκθετική φάση (5-8 ημέρες) για να εισαχθούν στο πείραμα. Τέλος για την αποφυγή επιμολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς, τα σκεύη που είχαν τα θρεπτικά μέσα αποστειρώνονταν στο αυτόκαυστο για 20 λεπτά στους 120 °C.

Συστατικό	Ποσότητα
Trizma base	2,42 g/L
Phosphate buffer Ι (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Ι)	1 mL/L
Hutner's trace elements (διάλυμα ιχνοστοιχείων)	1 mL/L
Solution Α (τροποποιημένο διάλυμα Beijerinck)	10 mL/L
Acetic acid(CH ₃ COOH)	1,048 g/L

Πίνακας 1: Σύσταση του	υ θρεπτικού	μέσουΤΑΡ
------------------------	-------------	----------

Μετά την προσθήκη των παραπάνω συστατικών, το pH του διαλύματος ρυθμιζόταν στο 7,2 χρησιμοποιώντας HCl. Για την παρασκευή στερεής καλλιέργειας, γινόταν προθήκη υγρού θρεπτικού TAP με 1,5% agar μέσα σε αποστειρωμένα τριβλία. Στην συνέχεια παρατίθενται σε πίνακες τα συστατικά για τα stock διαλύματα που είναι το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Ι, το διάλυμα ιχνοστοιχείων Hutner's και το Solution Α (τροποποιημένο διάλυμα Beijerinck). Τα παραπάνω διαλύματα φυλάσσονται στους 4 °C για την καλύτερη διατήρηση τους.

Πίνακας 2: Σύσταση διαλύματος Phosphate buffer Ι(ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Ι)

Συστατικό	Ποσότητα
K ₂ HPO ₄	104,4 g/L
KH ₂ PO ₄	54,0 g/L

Πίνακας 3: Σύσταση διαλύματος Hutner's trace elements (διάλυμα ιχνοστοιχείων)

Συστατικό	Ποσότητα
EDTA	50,00 g/L
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	4,99 g/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22,0 g/L
H ₃ BO ₃	11,40 g/L
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	5,06 g/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1,57 g/L
Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ · 4H ₂ O	1,10 g/L
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,61 g/L

Πίνακας 4: Σύσταση διαλύματος Solution A (τροποποιημένο διάλυμα Beijerinck)

Συστατικό	Ποσότητα
NH ₄ Cl	40,0 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10,0 g/L
CaCl ₂	3,8 g/L

2.2 Πειραματικές καλλιέργειες προς μελέτη της ανάπτυξης και της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας

Για την μελέτη της επίδρασής της πηγής άνθρακα στην ανάπτυξη και στην φωτοσυνθετική δραστηριότητα του συγκεκριμένου στελέχους χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο HSM. Τα συστατικά αλλά και οι αναλογίες τους που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του συγκεκριμένου θρεπτικού μέσου αναγράφονται στον πίνακα 5.

Για την ολοκλήρωση των πειραματικών καλλιεργειών συλλέχθηκαν κύτταρα από μητρική καλλιέργεια *Chlorella sp* στο πέρας της εκθετικής φάσης, φυγοκεντρήθηκαν στα 2500*g* για 8 min στους 15°C, επαναιωρήθηκαν σε μικρή ποσότητα αποστειρωμένου απιονισμένου ύδατος και μεταφέρθηκαν στα θρεπτικά μέσα HSM με τα διαφορετικά σάκχαρα. Η αρχική συγκέντρωση κυττάρων που προστέθηκε σε κάθε θυγατρική καλλιέργεια αντιστοιχούσε σε 0,032 ± 0,003 mg ξηρής βιομάζας κυττάρων ανά mL καλλιέργειας, ενώ η ανάπτυξή τους γινόταν σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 250 mL που περιείχαν 100 mL θρεπτικού μέσου.

Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες εκτελέστηκαν τα παραπάνω πειράματα είναι η αυτότροφη, η φωτοετερότροφη και η μεικτότροφη. Κατά την αυτότροφη και μεικτότροφη συνθήκη, οι κωνικές φιάλες είχαν κλειστεί με ειδικά καπάκια τα οποία επέτρεπαν τον συνεχή αερισμό της καλλιέργειας με χρήση αντλιών αέρα. Ο αέρας διερχόταν μέσω ειδικών φίλτρων 0,22μm ώστε να αποφευχθεί πιθανή μόλυνση από κάποιο ξένο μικροοργανισμό. Για την φωτοετερότροφη συνθήκη ανάπτυξης, οι κωνικές φιάλες είχαν κλειστεί με αλουμινόχαρτο και τοποθετηθήκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα (shaker) όπου αναδεύονταν συνεχώς κατά τη διάρκεια του πειράματος με συχνότητα 110 rpm. Όλα τα δείγματα και στα δύο είδη συνθηκών αναπτύχθηκαν κάτω από συνεχή φωτισμό με ένταση φωτός τα 140-160 μmol φωτονίων·m⁻²·s⁻¹ και σε θερμοκρασία 25± 1 °C, σε ειδικό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας. Τέλος, η διάρκεια των πειραμάτων ήταν 7 ημέρες ενώ ανά δύο μέρες πραγματοποιούνταν μετρήσεις ανάπτυξης με μέτρηση του όγκου καθιζάμενων κυττάρων όπως αυτή πειραμάτων λάμβαναν χώρα όλες οι υπόλοιπες μετρήσεις που αναλύονται παρακάτω.

Πίνακας 5: Σύσταση του θρεπτικού μέσου HSM

Συστατικό	Ποσότητα
Phosphate buffer ΙΙ 1Μ (ρυθμιστικό διάλυμο	10 mL/L
φωσφορικών ΙΙ)	
Beijerinck's salts	10 mL/L
Hutner's trace elements (διάλυμα ιχνοστοιχείων)	1 mL/L

Πίνακας 6:Σύσταση διαλύματος Phosphate buffer II(ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών II)

Συστατικό	Ποσότητα
K ₂ HPO ₄	116.0 g/L (0,667M)
KH ₂ PO ₄	45.5 g/L (0,333M)

Πίνακας 7:Σύσταση διαλύματος Beijerinck's salts

Συστατικό	Ποσότητα
NH ₄ Cl	40.0 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O ή CaCl ₂	1.00 g/L ή 0,76 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2,0 g/L

2.3 Πειραματικές καλλιέργειες προς μελέτη βιοχημικού περιεχομένου

Για τον προσδιορισμό του βιοχημικού περιεχομένου των κυττάρων *Chlorella sp* χρησιμοποιήθηκε βιομάζα κυττάρων που αναπτύχθηκε μεικτότροφα στο θρεπτικό μέσο HSM, με διάφορες πηγές άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε κωνικές φιάλες των 500 mL με όγκο θρεπτικού μέσου τα 300 mL. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ρυθμίστηκε στα 0,032 mg ξηρής βιομάζας/mL καλλιέργειας και οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν για 7 ημέρες, κάτω από συνεχή φωτισμό με ένταση φωτός τα 140-160 μmol φωτονίων·m^{-2·}s⁻¹

και σε θερμοκρασία 25±1 °C, σε ειδικό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας. Τέλος μετά το πέρας των 7 ημερών τα κύτταρα συλλέχθηκαν μέσω φυγοκέντρισης στα 2500g για 8 min στους 15 °C, ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό και υπέστησαν λυοφυλίωση (freeze drying) για τη συλλογή ξηρής βιομάζας.

2.4. Μετρήσεις κυτταρικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο PCV (Packed Cell Volume)

Για την μελέτη ανάπτυξης του μικροφύκους *Chlorella sp* σε διαφορετικά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCV όπου μετράται ο όγκος των καθιζάμενων κυττάρων ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας. Κατά την διαδικασία αυτή γνωστή ποσότητα καλλιέργειας μεταφέρθηκε μέσω πιπέτας ακριβείας μεταβλητού όγκου σε σωλήνες PCV, οι οποίοι φυγοκεντρήθηκαν σε φυγόκεντρο Eppendorf για 5 λεπτά στα 1000g. Οι σωλήνες αυτοί μπορούν να λάβουν μέχρι 1,5 mL όγκο καλλιέργειας ενώ στο κάτω μέρος τους είναι βαθμονομημένοι με μέγιστη τιμή τα 5 μL κυττάρων. Με την συγκεκριμένη μέθοδο η κυτταρική συγκέντρωση εκφράζεται σε μL/mL, όμως χρησιμοποιήθηκε μία πρότυπη καμπύλη συσχέτισης PCV/ξηρή βιομάζα η οποία μετατρέπει την κυτταρική συγκέντρωση από μL/mL σε mg/mL (C(mg/mL)=0,27158x-0,043 όπου x η συγκέντρωση σε μL/mL).

2.5 Προσδιορισμός Φωτοσυνθετικών Χρωστικών

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φωτοσυνθετικών χρωστικών, αρχικά λήφθηκε γνώστη ποσότητα καλλιέργειας η οποία φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά σε φυγόκεντρο Eppendorf. Στην συνέχεια έγινε απόρριψη του υπερκειμένου διαλύματος και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 mL θερμής μεθανόλης (55°C). Ύστερα τα δείγματα αναδεύτηκαν και επωάστηκαν στο σκοτάδι στους 55 °C για 5 min. Μετά την επώαση, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμομπλόκ για 1 h στους 55 °C χωρίς να έρχονται σε επαφή με το φως και στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν ξανά για να απομακρυνθούν τυχόν ιζήματα. Η απορρόφηση του μεθανολικού εκχυλίσματος μετρήθηκε σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (470,0 nm, 652,4 nm και 665,2 nm) χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-2700. Οι

υπολογισμοί βασίστηκαν σε γνωστές εξισώσεις από τη βιβλιογραφία, οι οποίες παρέχονται παρακάτω [29].

Υπολογισμός συγκέντρωσης (μg/mL) χλωροφύλλης - a

 $C_a = 16,72 \cdot A_{665,2} - 9,16 \cdot A_{652,4}$

<u>Υπολογισμός συγκέντρωσης (μg/mL) χλωροφύλλης – b</u>

 $C_b = 34,09 \cdot A_{652,4} - 15,28 \cdot A_{665,2}$

Υπολογισμός καροτενοειδών (μg/mL)

$$C_{x+c} = \frac{1000 \cdot A_{470,0} - 1.63 \cdot C_a - 104,96 \cdot C_b}{221}$$

2.6 Μετρήσεις Επαγωγικού Φθορισμού

Οι μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας τη συσκευή Handy Plant Efficiency Analyzer από τη Hansatech Instruments, Kings' Lynn, Norfolk, UK, ακολουθώντας τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Strasser & Strasser. Για τη μέτρηση του φθορισμού της χλωροφύλλης a, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ένα σκοτεινό θάλαμο ώστε τα μόρια χλωροφύλλης-α που βρίσκονται στο κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος ΙΙ να επιστρέψουν στην αρχική τους κατάσταση, παρέχοντας έτσι μια εκτίμηση της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης του φωτοσυστήματος ΙΙ. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει ταχεία μέτρηση των αλλαγών στον φθορισμό κάθε 10 μs, με συνολική διάρκεια μέτρησης 1 δευτερόλεπτο. Τα μόρια της χλωροφύλλης-α διεγέρθηκαν χρησιμοποιώντας τρεις διόδους φωτισμού LED που εκπέμπουν κόκκινο φως σε μήκος κύματος 650 nm και ένταση 3000 μmol φωτονίων m⁻²·s⁻¹. Με την ολοκλήρωση της μέτρησης προκύπτει η τιμή της παραμέτρου F_v/F_{max} που υποδηλώνει τη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση του φωτοσυστήματος ΙΙ [30].

2.7 Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου

Για τον προσδιορισμό του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής O₂ χρησιμοποιήθηκε το όργανο YSI model 5300 Biological Oxygen Monitor το οποίο αποτελείται από ένα επιλεκτικό ηλεκτρόδιο οξυγόνου τύπου Clark το οποίο προσδιορίζει πολαρογραφικά την ποσότητα του οξυγόνου που παράγεται. Η διάταξη του συγκεκριμένου οργάνου περιλαμβάνει μια άνοδο αργύρου και μια κάθοδο πλατίνας, σε διάλυμα ηλεκτρολύτη KCl, όπου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μεταξύ ανόδου και καθόδου μέσω της αναγωγής του O₂ σε OH⁻ κατά την εξής ημιαντίδραση:

 $O_2 + 4e^- + 2H_2O \rightarrow 4OH^- \Delta E^0 = 0,401V$

Το οξυγόνο το οποίο παράγεται φωτοσυνθετικά από το δείγμα εισέρχεται επιλεκτικά στον ηλεκτρολύτη KCl μέσω μίας ημιπερατής μεμβράνης και ανάγεται στην κάθοδο σύμφωνα με την παραπάνω ημιαντίδραση. Για τις μετρήσεις του ρυθμού της φωτοσυνθετικής παραγωγής O₂ αρχικά έγινε συλλογή γνωστού όγκου καλλιέργειας σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι έπειτα φυγοκοκεντρίθηκαν στις 1500g για 15 min. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε απόχυση του υπερκείμενου διαλύματος και το κυτταρικό ίζημα επανεωρηθηκε σε 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο αποτελούνταν από Tricine 8,96 g/L και NaHCO₃ 0,34g/L σε pH ρυθμισμένο στο 7,6. Ο ρόλος του NaHCO₃ ήταν ώστε να εξασφαλιστεί η παρουσία CO₂ το οποίο είναι απαραίτητο για τη φωτοσύνθεση και την παραγωγή O₂. Τόσο για τις μετρήσεις όσο και για την σταθεροποίηση του ηλεκτροδίου χρησιμοποιήθηκε μία υδρόψυκτη γυάλινη κυψελίδα σε θερμοκρασία 25 °C η οποία ρυθμίστηκε με τη χρήση θερμοστάτη με κυκλοφορητή νερού.

Κατά τον προσδιορισμό της παράγωγης του οξυγόνου αρχικά το δείγμα τοποθετήθηκε στην κυψελίδα και αφέθηκε στο σκοτάδι μέχρι να σταθεροποιηθεί ο ρυθμός κατανάλωσης του οξυγόνου

κατά την κυτταρική αναπνοή. Στην συνέχεια το δείγμα εκτέθηκε σε λευκό φως με την χρήση δύο λαμπών LED που παρήγαγαν φωτόνια έντασης 1100-1200 μmol φωτονίων·m⁻²s⁻¹ η οποία ήταν κατάλληλη ώστε τα δείγματα κατά την ακτινοβόληση τους να παράξουν την μέγιστη ποσότητα οξυγόνου. Έτσι το δείγμα άρχισε να φωτοσυνθέτει και οι μετρήσεις καταγράφηκαν για χρονικό διάστημα 90s οι οποίες τελικά εκφράστηκαν σε mmol O₂ (mol Chl)⁻¹·min⁻¹. Τέλος η παραπάνω πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Delieu και Walker [31].

2.8 Ποσοτικός προσδιορισμός βιοχημικού περιεχομένου Chlorella sp

Στο τμήμα αυτό περιλαμβάνονται οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των σακχάρων, των λιπιδίων αλλά και των πρωτεϊνών στην ξηρή βιομάζα *Chlorella.*

2.8.1 Ποσοτικός προσδιορισμός σακχάρων με την μέθοδο θυμόλης-θειικού

Για τον προσδιορισμό των σακχάρων στα κύτταρα *Chlorella sp*, αρχικά η βιομάζα των κυττάρων κοκκοποιήθηκε με γουδί και στην συνέχεια γνωστή ποσότητα αυτής (ενδεικτικά χρησιμοποιήθηκαν 25 mg) υδρολύθηκε με 1 mL HCl 2 M και επωάστηκε για 2 h στους 100 °C. Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες και το υδρόλυμα των κυττάρων φιλτραρίστηκε με φίλτρο 0,22 μm με σκοπό την απομάκρυνση κυτταρικών θραυσμάτων. Έπειτα, το υδρόλυμα αραιώθηκε μέχρις ότου η απορρόφηση του δείγματος να βρεθεί στα όρια απορρόφησης της πρότυπης καμπύλης (ενδεικτικά 10 φορές αραίωση) και εν συνέχεια σε 100 μL αραιωμένου υδρολύματος προστέθηκαν 300μL αντιδραστηρίου θυμόλης-θειικού (1 mg θυμόλης σε 1 mL θειικού οξέος). Ύστερα τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν σε vortex και αφέθηκαν για 30 min στον φούρνο στους 110°C. Τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση του μL το οποίο υπέστη την ίδια κατεργασία.

Για την ποσοτικοποίηση των σακχάρων στα δείγματα *Chlorella sp*, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς που είχε ως πρότυπη ουσία την γλυκόζη. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε διάλυμα γλυκόζης συγκέντρωσης 1 mg/mL, στο οποίο στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις ώστε το εύρος των συγκεντρώσεων της να κυμαίνεται από 0,01 μέχρι 0,1 mg/mL. Τα αραιωμένα αυτά δείγματα γλυκόζης υπέστησαν ακριβώς την ίδια διαδικασία με τα αραιωμένα υδρολύματα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η παραπάνω διαδικασία έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου θυμόλης-θειικού [32,33], η οποία τροποποιήθηκε σύμφωνα με την αναφορά [34].

2.8.2Ποσοτικός προσδιορισμός λιπιδίων με την μέθοδο θειικού - φωσφορικού- βανιλλίνης

Για τον προσδιορισμό των λιπιδίων στα κύτταρα Chlorella sp, αρχικά η βιομάζα των κυττάρων κοκκοποιήθηκε με γουδί και στην συνέχεια σε γνωστή ποσότητα αυτής (ενδεικτικά χρησιμοποιήθηκαν 10 mg) προστέθηκαν 3 mL διαλύματος χλωροφορμίου-μεθανόλης σε αναλογία 2:1 v/v. Μετά την προσθήκη του διαλύματος, προστέθηκαν γυάλινα σφαιρίδια (glass beads) και ακολούθησε έντονη ανάδευση σε vortex, με σκοπό την καλύτερη εκχύλιση των λιπιδίων. Η ανάδευση με το vortex εφαρμόστηκε για 20 κύκλους σε κάθε δείγμα, όπου ο κάθε κύκλος περιείχε 1 min ανάδευση και 1 min διάλειμμα στον πάγο. Έπειτα στο διάλυμα αυτό προστέθηκε 1,5 mL υδατικού διαλύματος 0,9 % w/v NaCl για την συσσωμάτωση των πρωτεϊνών και ακολούθησε φυγοκέντριση στα 3500 rpm για 15 s. Κατόπιν, απορρίφθηκε η πάνω φάση (υδατική φάση) και από την κάτω φάση μεταφέρθηκαν γνωστές ποσότητες (40 μL) σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, όπου θερμάνθηκαν στους 90 °C για να εξατμιστεί το χλωροφόρμιο. Ύστερα πραγματοποιήθηκε προσθήκη 100 μL θειικού οξέος και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους 90 °C προς επώαση για 15 min. Αφότου ολοκληρώθηκε η επώαση, τα δείγματα αφέθηκαν μέχρις ότου να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου και τότε προστέθηκαν σε αυτά 2,4 mL αντιδραστηρίου φωσφορικού - βανιλλίνης, το οποίο παρασκευάσθηκε διαλύοντας 1,2 mg βανιλλίνης σε 1 mL φωσφορικού οξέος 68%. Τα δείγματα επωαστήκαν για 10 min έως ότου αποκτήσαν ιώδες χρώμα και τέλος έγινε η μέτρηση της απορρόφησης τους

στα 530 nm. Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιήθηκαν 100 μL θειικού οξέος με 2,4 mL αντιδραστηρίου φωσφορικού βανιλλίνης.

Για την ποσοτικοποίηση των λιπιδίων στα δείγματα *Chlorella sp*, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς που είχε ως πρότυπη ουσία το κραμβέλαιο (canola oil). Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε διάλυμα κραμβελαίου συγκέντρωσης 1 mg/mL (1 mg κραμβέλαιο σε 1mL χλωροφόρμιο), από το οποίο στην συνέχεια απομονώθηκαν ποσότητες όγκου με εύρος 5-100 μL και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα δοχεία στους 90 °C με σκοπό την εξάτμιση του χλωροφόρμιου. Τέλος στα δείγματα υποβλήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με αυτή που αναφέρθηκε παραπάνω. Η παραπάνω διαδικασία έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου θειικού-φωσφορικού-βανιλίνης [35] η οποία τροποποιήθηκε σύμφωνα με την αναφορά[32]

2.8.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με την μέθοδο Lowry

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών στα κύτταρα *Chlorella sp*, αρχικά η βιομάζα των κυττάρων κοκκοποιήθηκε με γουδί και στην συνέχεια σε γνωστή ποσότητα αυτής (ενδεικτικά χρησιμοποιήθηκαν 16 mg) προστέθηκαν 2 mL NaOH 1 M για την εκχύλιση των πρωτεϊνών. Τα δείγματα αφέθηκαν σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας για 30 min στους 70°C και στην συνέχεια τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4 °C για 16 h. Έπειτα, από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν 100 σε μL φιαλίδιο Eppendorf όγκου 1,5 mL και ύστερα προστέθηκαν 100 μl από διάλυμα SDS. Ακολούθησε ανάδευση με vortex και εν συνεχεία προσθήκη 1 mL από το Reagent C. Τα δείγματα αναδεύτηκαν ξανά σε vortex και έπειτα, μετά το πέρας 10 min, προστέθηκαν 100 μl αντιδραστηρίου Folin- Ciocalteu's στο σποίο είχε γίνει αραίωση 1:1 v/ν με απιονισμένο νερό. Η διαδικασία μεταφοράς του αντιδραστηρίου Folin- Ciocalteu's πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι καθώς είναι ευαίσθητο στο φως. Τέλος τα δείγματα αναδεύτηκαν για 30 min στο σκοτάδι και ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης τους στα 750 nm. Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε NaOH το οποίο αραιώθηκε στην ίδια αναλογία με τα δείγματα.

Για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών στα δείγματα *Chlorella sp*, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς που είχε ως πρότυπη ουσία το BSA (Bovine Serum Albumin). Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε διάλυμα BSA συγκέντρωσης 2 mg/mL όπου ήταν διαλυμένο σε NaOH στο οποίο στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις ώστε το εύρος των συγκεντρώσεων της να κυμαίνεται από 0,1 μέχρι 0,9 mg/mL. Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί τροποιημένη εκδοχή της μεθόδου Lowry.

	Συστατικά	Ποσότητα	Ποσότητα κάθε αντιδραστηρίου στο Reagent C(Vτελ=50mL)
Reagent A	NaOH	4 g/L	48 mL
	Na ₂ CO ₃	20,0 g/L	
Reagent B ₁	CuSO₄·5H₂O	5 g/L	1 mL
Reagent B ₂	Potassium sodium tartrate tetrahydrate	10 g/L	1 mL

Πίνακας 8: Συστατικά Reagent C

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στις ακόλουθες σειρές πειραμάτων, το κύριο αντικείμενο της έρευνας είναι η εύρεση της βέλτιστης πηγής άνθρακα και ο προσδιορισμός της ιδανικής της ποσότητας με στόχο την βελτιστοποίηση της ανάπτυξης και της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας των κυττάρων *Chlorella sp.* Τα κύτταρα *Chlorella sp* αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο HSM, κάτω από φωτοετερότροφες και μεικτότροφες συνθήκες ενώ οι πήγες άνθρακα οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ήταν η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η φρουκτόζη, η μαλτόζη, η μανιτόλη, η λακτόζη, η σουκρόζη και η σορβιτόλη. Οι ποσότητες των σακχάρων οι οποίες μελετήθηκαν ήταν 50 mM, 100 mM, 150 mM και 200 mM. Η μελέτη ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε με μετρήσεις παραγωγής βιομάζας που γίνονταν ανά δύο μέρες ενώ οι υπόλοιπες μετρήσεις εκτυλίχθηκαν κατά την 7^η ημέρα ανάπτυξης. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε ξεχωριστή αξιολόγηση της ανάπτυξης και της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας για κάθε είδος σακχάρου.

<u>3.1Μελέτη επίδρασης της γλυκόζης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε</u> καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM

Αρχικά, για την ορθότερη ανάλυση των αποτελεσμάτων μελετήθηκε η ανάπτυξη και η φωτοσυνθετική δραστηριότητα των καλλιεργειών *Chlorella* στο θρεπτικό μέσο HSM (χωρίς πηγή άνθρακα) κάτω από φωτοετερότροφες και μεικτότροφες συνθήκες. Οι καλλιέργειες αυτές χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας για την καλύτερη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Στην συνέχεια παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης και η παραγωγή βιομάζας στην εικόνα 10 ενώ οι μετρήσεις της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας στην εικόνα 11.

Όσον αφορά την βιομάζα των κύτταρων, παρατηρείται πως τόσο με παροχή αέρα όσο και χωρίς, η ανάπτυξη σε όλες τις συγκεντρώσεις της γλυκόζης είναι μεγαλύτερη από ότι στη συνθήκη του μάρτυρα. Αυτό συμβαίνει, καθώς η χρήση οργανικών πηγών άνθρακά προσφέρει την δυνατότητα στον μικροοργανισμό να καλύψει ευκολότερα τις ενεργειακές του ανάγκες, ενισχύοντας έτσι την ανάπτυξη τους. Επίσης είναι φανερό πως και στις δύο συνθήκες, η

συγκέντρωση της γλυκόζης που η ανάπτυξη είναι πιο αποδοτική είναι αυτή των 150 mM δείχνοντας κορεσμό όταν χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες ποσότητες του σακχάρου. Αυτό δείχνει πως τα κύτταρα δεν μπορούν να αξιοποιήσουν περαιτέρω τη γλυκόζη για την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών. Επιπλέον, από την εικόνα 10 προκύπτει πως η ανάπτυξη για κάθε συγκέντρωση τόσο στην μεικτότροφη όσο και στην φωτοετερότροφη συνθήκη είναι εξίσου καλή εκτός από την συνθήκες των 100 και 150 mM στις οποίες η ανάπτυξη χωρίς παροχή αέρα είναι πιο αποτελεσματική.



Εικόνα 10: Καλλιέργεια στελέχους *Chlorella* sp στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την γλυκόζη. Α) Καμπύλη ανάπτυξης σε μεικτότροφή συνθήκη, Β) Καμπύλη ανάπτυξης σε φωτοετερότροφη συνθήκη και C) Ξηρή βιομάζα κυττάρων *Chlorella sp* κατά την 7^η ημέρα λήψης.

Λαμβάνοντας υπόψη μόνο τη βιομάζα των κυττάρων, η οποία είναι αρκετά υψηλή σε όλες τις συνθήκες, αναμένεται πως και ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός είναι αρκετά αποδοτικός. Όμως, παρατηρώντας τα διαγράμματα στην εικόνα 11 είναι φανερό πως το μικροφύκος παρουσιάζει μηδενική φωτοσυνθετική λειτουργία. Πιο συγκεκριμένα, μελετώντας την μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση (F_v/F_{max}), παρατηρείται οι τιμές της παραμέτρου να είναι αρκετά χαμηλές (≤0.6) σε όλες τις συνθήκες γεγονός που υποδεικνύει την κακή λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και πιο συγκεκριμένα του φωτοσυστήματος ΙΙ. Επίσης αυτό επιβεβαιώνεται τόσο και από τις μετρήσεις της φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου που είναι μηδενικές όσο και από τα επίπεδα των φωτοσυνθετικών χρωστικών που είναι ιδιαίτερα χαμηλά.

Με βάση όλα τα παραπάνω δεδομένα, γίνεται φανερό πως η ανάπτυξη του μικροφύκους με το συγκεκριμένο σάκχαρο οφείλεται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και όχι στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Αυτό προκαλείται από το γεγονός πως η γλυκόζη αναστέλλει την σύνθεση του ενζύμου καρβοξυλάση/ οξυγενάση της 1-5 διφωσφορικής ριβουλόζης γνωστό ως rubisco. Η rubisco είναι υπεύθυνή για την καθήλωση του CO₂ κατά τον κύκλο του Calvin, μία διαδικασία που είναι απαραίτητη για την ολοκλήρωση του μηχανισμού της φωτοσύνθεσης. [36]



Εικόνα 11: Καλλιέργεια στελέχους *Chlorella* sp στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την γλυκόζη. Μετρήσεις φωτοσυνθετικής δραστηριότητας υπό όρους Α) μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_{max}), Β) ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου και C) το περιεχόμενο των φωτοσυνθετικών χρωστικών ανά βιομάζα. Chl_a: Χλωροφύλλη-α, Chl_b: Χλωροφύλλη-β, C_{x+c}: ξανθοφύλλες και καροτενοειδή.

<u>3.2 Μελέτη επίδρασης της γαλακτόζης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα</u> σε καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM

Στην εν λόγω ερευνητική διαδικασία εξετάστηκε η ανάπτυξη και η φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροφύκους, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα τη γαλακτόζη. Μελετώντας την εικόνα 14 στην οποία απεικονίζονται οι μετρήσεις της βιομάζας, παρατηρείται πως οι καλλιέργειες οι οποίες αναπτύσσονται υπό μεικτότροφες συνθήκες έχουν μεγαλύτερη παραγωγή κυττάρων *Chlorella sp*. Το γεγονός αυτό δικαιολογείται καθώς ο μικροοργανισμός κάτω από μεικτότροφες συνθήκες μπορεί να αξιοποιήσει τόσο την οργανική (σάκχαρα) όσο και την ανόργανη πηγή άνθρακα (CO₂) για την ανάπτυξη τους. Αυτό καθιστά το μικροφύκος πιο ευέλικτο καθώς μπορεί να προσαρμοστεί στις συνθήκες ανάλογα με την διαθεσιμότητα των πόρων, αυξάνοντας έτσι την βιομάζα του.

Συγκρίνοντας τις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν υπό συνεχή παροχή αέρα, σημειώνεται πως η συνθήκη των 50 και των 200 mM έχουν παρόμοια συγκέντρωση κυττάρων με αυτή του μάρτυρα ενώ αυτή των 150 mM παρουσιάζεται ως βέλτιστη. Η χαμηλή βιομάζα για τα 50 mM του συγκεκριμένου σακχάρου οφείλεται στην χαμηλή διαθεσιμότητα της οργανικής πηγής άνθρακα η οποία δεν συνεισφέρει σημαντικά στην κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του μικροφύκους και έτσι δεν ενισχύεται η ανάπτυξη. Αντιθέτως η χαμηλή ανάπτυξη των κύτταρων στην καλλιέργεια που είχε γαλακτόζη με 200 mM πιθανόν οφείλεται σε κατάσταση στρες στην οποία βρισκόταν ο μικροοργανισμός. Γενικώς οι υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών υποστρωμάτων μπορεί να προκαλέσουν ωσμωτικό στρες στο κύτταρο, μία κατάσταση που προκαλείται από μία απότομη αλλαγή της συγκέντρωσης μίας διαλυμένης ουσίας γύρω από ένα κύτταρο. Κάτω από υπερτονικές συνθήκες - συνθήκες υψηλών συγκεντρώσεων υποστρωμάτων στο υπερκείμενο υγρό, το νερό εξέρχεται έξω από το κύτταρο μέσω ώσμωσης γεγονός που αναστέλλει τη μεταφορά των υποστρωμάτων μέσα στο κύτταρο και το υποβάλει σε μία κατάσταση στρες.

Όσον αφορά την κατάσταση χωρίς παροχή αέρα, οι καλλιέργειες με συγκέντρωση του σακχάρου στα 150 mM έχουν μεγαλύτερη βιομάζα, δείχνοντας και εδώ ότι η χρήση μεγαλύτερης ποσότητας γαλακτόζης δεν οδηγεί σε αύξηση της βιομάζας. Επίσης, παρόλο που

δεν υπάρχει ιδιαίτερη ανάπτυξη σε καμία από τις τέσσερις συγκεντρώσεις, η βιομάζα τους είναι μεγαλύτερη από την συνθήκη του μάρτυρα.



Εικόνα 12: Καλλιέργεια στελέχους *Chlorella* sp στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την γαλακτόζη. Α) Καμπύλη ανάπτυξης σε μεικτότροφή συνθήκη, Β) Καμπύλη ανάπτυξης σε φωτοετερότροφη συνθήκη και C) Ξηρή βιομάζα κυττάρων *Chlorella* sp κατά την 7^η ημέρα λήψης.

Μεταβαίνοντας στη φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροφύκους και επικεντρώνοντας το ενδιαφέρον στην μέγιστη φωτοσυνθετική του ικανότητα (λόγος F_v/F_{max}), εντοπίζεται πως μόνο στις συγκεντρώσεις 50-100 mM του σακχάρου ο λόγος είναι μεγαλύτερος από 0,6 δείχνοντας πως μόνο εκεί ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός είναι υγιής. Το γεγονός αυτό αποτυπώνεται και στις μετρήσεις παράγωγης οξυγόνου αλλά και στον λόγο χρωστικών προς βιομάζα. Έτσι παρατηρείται πως η φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροοργανισμού είναι αποδοτικότερη όταν η συγκέντρωση της οργανικής πηγής άνθρακα είναι μειωμένη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως κατά την παροχή οργανικής πηγής άνθρακα, τα μικροφυκή χρησιμοποιούν κατά κύριο λόγο την διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής και λιγότερο της φωτοσύνθεσης. Έτσι λοιπόν, αυξάνοντας την συγκέντρωση της γαλακτόζης ενισχύεται η διαδικασία του οξειδωτικού μεταβολισμού και δυσχεραίνεται η διαδικασία της φωτοσύνθεσης [37].



Εικόνα 13: Καλλιέργεια στελέχους *Chlorella sp* στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την γαλακτόζη. Μετρήσεις φωτοσυνθετικής δραστηριότητας υπό όρους Α) μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fmax), B) ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου και C) το περιεχόμενο των φωτοσυνθετικών χρωστικών ανά βιομάζα. Chla: Χλωροφύλλη-α, Chlb: Χλωροφύλλη-β, Cx+c: ξανθοφύλλες και καροτενοειδή.

<u>3.3 Μελέτη επίδρασης της φρουκτόζης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα</u> σε καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM

Στην επόμενη πειραματική σειρά εξετάστηκε η ανάπτυξη και η φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροφύκους, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα τη φρουκτόζη. Αρχίζοντας από τη βιομάζα των κυττάρων παρατηρείται πως και σε αυτή την περίπτωση, χωρίς την συνεχή διοχέτευση αέρα, η ανάπτυξη ακολουθεί χαμηλότερους ρυθμούς. Στην καμπύλη ανάπτυξης Α που παριστάνεται παρακάτω, εντοπίζεται πως οι καλλιέργειες που διαθέτουν οργανική πηγή άνθρακα εμφανίζουν βελτιωμένο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με την αυτότροφή συνθήκη. Η ίδια τάση παρατηρείται και στη φωτοετερότροφη συνθήκη, εκτός την περίπτωση όπου η συγκέντρωση της φρουκτόζης είναι 50 mM. Επίσης παρατηρείται πως στην συνθήκη με παροχή αέρα, η βιομάζα των κυττάρων είναι σχεδόν ίδια σε όλες τις συγκεντρώσεις του οργανικού υποστρώματος. Αντιθέτως μελετώντας την βιομάζα που παρείχαν τα κύτταρα χωρίς την παροχή αέρα διαπιστώνεται μία ανάλογη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης των κυττάρων και της συγκέντρωσης του οργανικού υποστρώματος.



Εικόνα 14: Καλλιέργεια στελέχους Chlorella sp στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την φρουκτόζη. Α) Καμπύλη ανάπτυξης σε μεικτότροφή συνθήκη, Β) Καμπύλη ανάπτυξης σε φωτοετερότροφη συνθήκη και C) Ξηρή βιομάζα κυττάρων Chlorella sp κατά την 7^η ημέρα λήψης.

Διερευνώντας την φωτοσυνθετική ικανότητα του μικροφύκους *Chlorella* sp, παρατηρείται πως η φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροφύκους αυξάνεται όσο μειώνεται η συγκέντρωση του σακχάρου. Η τάση αυτή εντοπίζεται και στις τρεις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση της. Πιο συγκεκριμένα, στο διάγραμμα Α της εικόνας 15, σημειώνεται πως η μέγιστη φωτοσυνθετική ικανότητα του μικροοργανισμού παραμένει υψηλή (δηλαδή F_v/F_{max}≥0,6) στις καλλιέργειας που έχουν συγκέντρωση σακχάρου 50 mM και 100 mM(μόνο στην μεικτότροφη ανάπτυξη). Τα αποτελέσματα αυτά, συμφωνούν άμεσα με τις μετρήσεις παραγωγής του φωτοσυνθετικού οξυγόνου.



Εικόνα 15: Καλλιέργεια στελέχους Chlorella sp στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την φρουκτόζη. Μετρήσεις φωτοσυνθετικής δραστηριότητας υπό όρους Α) μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fmax), B) ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου και C) το περιεχόμενο των φωτοσυνθετικών χρωστικών ανά βιομάζα. Chla: Χλωροφύλλη-α, Chlb: Χλωροφύλλη-β, Cx+c: ξανθοφύλλες και καροτενοειδή.

<u>3.4 Μελέτη επίδρασης της μαλτόζης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε</u> καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM

Στην συγκεκριμένη πειραματική σειρά μελετήθηκε η ανάπτυξη και η φωτοσυνθετική ικανότητα του μικροφύκους με πηγή οργανικού άνθρακα την μαλτόζη. Με βάση τα διαγράμματα που απεικονίζονται στην εικόνα 16, διαπιστώνεται πως και σε αυτή την περίπτωση στη μεικτότροφη συνθήκη οι καλλιέργειες αναπτύσσονται με πολύ μεγαλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης σε σύγκριση με την φωτοετερότροφη συνθήκη. Επίσης άλλη μία παρατήρηση που είναι κοινή με τα υπόλοιπα σάκχαρα είναι πως και στις δύο συνθήκες, η ανάπτυξη με οργανικό υπόστρωμα είναι υψηλότερη από αυτή του μάρτυρα.

Αναλύοντας ξεχωριστά κάθε συνθήκη, παρατηρείται πως με την παροχή αέρα, η καλλιέργεια που έχει αναπτύξει μεγαλύτερη βιομάζα είναι αυτή των 200 mM ενώ χωρίς bubbling είναι η καλλιέργεια που είχε μαλτόζη σε συγκέντρωση των 150 mM. Επίσης άλλο ένα στοιχείο που διαπιστώνεται από τα διαγράμματα της εικόνας 16 είναι πως η ανάπτυξη για την εκάστοτε συνθήκη και για όλες τις συγκεντρώσεις παρουσιάζεται ιδιαίτερα ικανοποιητική. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στη δομή της μαλτόζης καθώς αποτελεί έναν δισακχαρίτη ο οποίος απαρτίζεται από δυό μόρια γλυκόζης τα οποία είναι συνδεδεμένα με α(1 \rightarrow 4) γλυκοζιτικό δεσμό. Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.1 η γλυκόζη έχει αξιοσημείωτη ανάπτυξη τόσο κάτω από μεικτότροφες όσο και κάτω από φωτοετερότροφες συνθήκες και για αυτό τον λόγο και ο δισακχαρίτης της επίσης αποτελεί ικανοποιητικό υπόστρωμα όσο αφορά την ανάπτυξη του μικροφύκους.



Εικόνα 16: Καλλιέργεια στελέχους Chlorella sp στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την μαλτόζη. Α) Καμπύλη ανάπτυξης σε μεικτότροφή συνθήκη, Β) Καμπύλη ανάπτυξης σε φωτοετερότροφη συνθήκη και C) Ξηρή βιομάζα κυττάρων Chlorella sp κατά την 7^η ημέρα λήψης.

Με βάση τα διαγράμματα που προκύπτουν στην εικόνα 17 παρατηρείται πως η φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροοργανισμού αυξάνεται όσο μειώνεται η συγκέντρωση του οργανικού υποστρώματος. Αναλύοντας την κάθε διαδικασία ξεχωριστά, εντοπίζεται πως κατά τη μέτρηση του φθορισμού της χλωροφύλλης, μόνο η συνθήκη των 50 mM μαλτόζης παρουσιάζει λόγο F_v/F_{max} μεγαλύτερο του 0,6 που σημαίνει πως το φωτοσύστημα II έχει καλή απόδοση. Με αυτό το αποτέλεσμα συμφωνούν και οι μετρήσεις της φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου οι οποίες δείχνουν πως μόνο στην συνθήκη των 50 mM οι ρυθμοί με τους οποίους εκλύεται το οξυγόνο είναι ιδιαίτερα αυξημένη. Στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις του σακχάρου, οι καλλιέργειες εμφανίζουν μη υγιή φωτοσυνθετικό μηχανισμό και ο ρυθμός παραγωγής οξυγόνου είναι ιδιαίτερα χαμηλός.



Εικόνα17: Καλλιέργεια στελέχους *Chlorella sp* στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την μαλτόζη. Μετρήσεις φωτοσυνθετικής δραστηριότητας υπό όρους Α) μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fmax), Β) ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου και C) το περιεχόμενο των φωτοσυνθετικών χρωστικών ανά βιομάζα. Chla: Χλωροφύλλη-α, Chlb: Χλωροφύλλη-β, Cx+c: ξανθοφύλλες και καροτενοειδή.

<u>3.5 Μελέτη επίδρασης της μανιτόλης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε</u> καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM

Στην εν λόγω ερευνητική διαδικασία εξετάστηκε η ανάπτυξη και η φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροφύκους, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα την μανιτόλη. Αρχίζοντάς από την βιομάζα των κυττάρων παρατηρείται όπως και στα αλλά σάκχαρα (εκτός της γλυκόζης), πως στη συνθήκη χωρίς παροχή αέρα, η κυτταρική ανάπτυξη ακολουθεί χαμηλότερους ρυθμούς. Πιο συγκεκριμένα στην συνθήκη χωρίς παροχή αέρα παρατηρείται πως το οργανικό υπόστρωμα δεν συνεισφέρει ιδιαίτερα στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, καθώς οι τιμές παραγωγής βιομάζας . Αυτό φαίνεται και από το γεγονός ότι ακόμα και υπό τις συνθήκες των 200 mM, όπου η ανάπτυξη είναι η πιο αποδοτική, η συνεισφορά στην βιομάζα είναι πολύ μικρή. Αντιθέτως στην συνθήκη με παροχή αέρα, είναι εμφανές πως οι καλλιέργειες που διαθέτουν οργανική πηγή άνθρακα αναπτύσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό από ότι την καλλιέργεια του μάρτυρα. Εμβαθύνοντας στην βιομάζα των καλλιεργειών που μεγάλωσαν κάτω από μεικτότροφες συνθήκες, διαπίστωνεται πως και εδώ όπως και στην φωτοετερότροφη συνθήκη, η ανάπτυξη είναι καλύτερη όταν χρησιμοποιείται συγκέντρωση οργανικού υποστρώματος 200 mM.



Εικόνα 18: Καλλιέργεια στελέχους *Chlorella sp* στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την μανιτόλη. Α) Καμπύλη ανάπτυξης σε μεικτότροφή συνθήκη, Β) Καμπύλη ανάπτυξης σε φωτοετερότροφη συνθήκη και C) Ξηρή βιομάζα κυττάρων *Chlorella sp* κατά την 7^η ημέρα λήψης.

Παρόλο που η βιομάζα μεταξύ μεικτότροφης και φωτοετερότροφης συνθήκης παρουσιάζει μεγάλές διαφορές, αυτές δεν εντοπίζονται κατά την μέτρηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται πως η φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροφύκους αυξάνεται όσο μειώνεται η συγκέντρωση του σακχάρου. Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 3.2 αυτό συμβαίνει, διότι κατά την παροχή οργανικής πηγής άνθρακα, τα μικροφυκή χρησιμοποιούν κατά κύριο λόγο την διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής και λιγότερο της φωτοσύνθεσης. . Όμως, αν και η φωτοσυνθετική ικανότητα του μικροφύκους είναι ικανοποιητική στις χαμηλές συγκεντρώσεις, η χαμηλή βιομάζα που παράγεται σε σχέση με αλλά υποστρώματα καθιστά την μανιτόλη όχι ιδανικό υπόστρωμα.



Εικόνα 19: Καλλιέργεια στελέχους *Chlorella sp* στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την μανιτόλη. Μετρήσεις φωτοσυνθετικής δραστηριότητας υπό όρους Α) μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fmax), B) ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου και C) το περιεχόμενο των φωτοσυνθετικών χρωστικών ανά βιομάζα. Chla: Χλωροφύλλη-α, Chlb: Χλωροφύλλη-β, Cx+c: ξανθοφύλλες και καροτενοειδή.

<u>3.6 Μελέτη επίδρασης της λακτόζης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε</u> καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM

Στην συγκεκριμένη πειραματική σειρά μελετήθηκε η ανάπτυξη και η φωτοσυνθετική ικανότητα του μικροφύκους με πηγή οργανικού άνθρακα την λακτόζης. Και σε αυτή την περίπτωση, η βιομάζα των κυττάρων είναι σαφώς μεγαλύτερη όταν η καλλιέργεια αναπτύσσεται κάτω από μεικτότροφες συνθήκες. Μελετώντας ξεχωριστά την κάθε συνθήκη, είναι εμφανές πως με την παροχή αέρα η συνθήκη που αναπτύσσεται καλύτερα είναι αυτή των 150 mM ενώ χωρίς παροχή αέρα είναι αυτή των 200 mM. Επίσης, από τα διαγράμματα στην εικόνα 20 και συγκρίνοντας με άλλους δισακχαρίτες που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία (π.χ, μαλτόζη και σουκρόζη), εντοπίζεται πως η βιομάζα που παράγεται τόσο στη μεικτότροφη όσο και στη φωτοετερότροφη συνθήκη είναι αρκετά χαμηλή (εξαίρεση αποτελεί η συνθήκη των 150 mM με bubbling). Ακριβής εξήγηση για τον παραπάνω ισχυρισμό δεν μπορεί να δοθεί καθώς δεν έχει εξακριβωθεί ο ακριβής μηχανισμός αφομοίωσης των δισακχαριτών από τα κύτταρα *Chlorella sp*. Ωστόσο υπάρχουν δύο επικρατείς υποθέσεις, οι οποίες αναφέρουν πρώτον πως οι δισακχαρίτες υδρολύονται από ειδικά ένζυμα ή δεύτερον οι δισακχαρίτες μεταφέρονται άμεσα στην πλασματική μεμβράνη μέσω μίας πρωτεΐνης μεταφορέα.



Εικόνα 20: Καλλιέργεια στελέχους Chlorella sp στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την λακτόζη. Α) Καμπύλη ανάπτυξης σε μεικτότροφή συνθήκη, Β) Καμπύλη ανάπτυξης σε φωτοετερότροφη συνθήκη και C) Ξηρή βιομάζα κυττάρων Chlorella sp κατά την 7^η ημέρα λήψης.

Περνώντας στο μέρος της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας του μικροοργανισμού, και μελετώντας το διάγραμμα Α στην εικόνα 21 που απεικονίζει της μετρήσεις της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης, παρατηρείται πως οι τιμές της παραμέτρου είναι παραπλήσιες

τόσο μεταξύ τους όσο και με τον μάρτυρα (≥0,6), γεγονός που υποδηλώνει την υγιή λειτουργία του φωτοσυστήματος ΙΙ. Όμως με αυτή την παραπλήσια συμπεριφορά μεταξύ όλων των δειγμάτων δεν συμφωνούν ούτε οι μετρήσεις της φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου ούτε οι μετρήσεις του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών ανά βιομάζα. Οι μέθοδοι αυτοί δείχνουν μία πτωτική τάση της φωτοσυνθετικής ικανότητας του μικροφύκους όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του οργανικού υποστρώματος μέσα στην καλλιέργεια. Αυτή η διαφοροποίηση των τεχνικών πιθανόν οφείλεται στο γεγονός πως η μέτρηση των φθορισμών της χλωροφύλλης μέσω του λόγου Fv/Fmax αποτελεί μία εκτίμηση της μέγιστης φωτοσυνθετικής ικανότητας και όχι απόδειξη.



Εικόνα 21: Καλλιέργεια στελέχους *Chlorella sp* στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την λακτόζη. Μετρήσεις φωτοσυνθετικής δραστηριότητας υπό όρους Α) μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fmax), Β) ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου και C) το περιεχόμενο των φωτοσυνθετικών χρωστικών ανά βιομάζα. Chla: Χλωροφύλλη-α, Chlb: Χλωροφύλλη-β, Cx+c: ξανθοφύλλες και καροτενοειδή.

<u>3.7 Μελέτη επίδρασης της σουκρόζης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα</u> σε καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM

Σε αυτή την πειραματική διαδικασία μελετήθηκε η ανάπτυξη και η φωτοσυνθετική ικανότητα του μικροφύκους με πηγή οργανικού άνθρακα την σουκρόζη. Όπως αναφέρθηκε και στις περισσότερες καλλιέργειες που συζητήθηκαν παραπάνω, έτσι και εδώ οι καλλιέργειες με παροχή αέρα παράγουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κυττάρων σε σχέση με τις καλλιέργειες χωρίς παροχή. Επίσης άλλη μία παρατήρηση που είναι κοινή με τα υπόλοιπα σάκχαρα είναι πως και στις δύο συνθήκες, η ανάπτυξη με οργανικό υπόστρωμα είναι καλύτερη από αυτή του μάρτυρα.

Ερευνώντας κάθε συνθήκη ξεχωριστά, είναι εμφανές πως στην ανάπτυξη με μεικτότροφο τρόπο η καλλιέργεια που αναπτύσσεται περισσότερο είναι αυτή που έχει συγκέντρωση σακχάρου 150 mM. Η βιομάζα στην καλλιέργεια αυτή εμφανίζει ιδιαίτερα καλή ανάπτυξη γεγονός το οποίο οφείλεται στον έντονο καταβολισμό του σακχάρου αλλά και ικανοποιητική φωτοσυνθετική ικανότητα του μικροφύκους κάτω από αυτή την συνθήκη. Από την άλλη μεριά στην φωτοετερότροφη συνθήκη, η ανάπτυξη με συγκέντρωση σακχάρου τα 200 mM παρουσιάζει την βέλτιστη ανάπτυξη, ακολουθώντας με μικρή απόκλιση αυτή των 150 mM. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις η βιομάζα είναι κοντά στο 1 mg/mL που σημαίνει πως η ανάπτυξη της είναι αρκετά μεγαλύτερη σε σχέση με τα περισσότερα σάκχαρα που μελετήθηκαν παραπάνω κάτω από φωτοετερότροφες συνθήκες. Τέλος εντοπίζεται πως στις χαμηλές συγκεντρώσεις του σακχάρου (50 και 100 mM) η βιομάζα είναι πολύ μικρή γεγονός που δείχνει πως ο καταβολισμός των σακχάρων είναι αυτός που παίζει κύριο ρόλο στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού καθώς η φωτοσυνθετική ικανότητα όπως φαίνεται στην εικόνα 23 είναι παρόμοια.



Εικόνα 22: Καλλιέργεια στελέχους *Chlorella sp* στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την σουκρόζη. Α) Καμπύλη ανάπτυξης σε μεικτότροφή συνθήκη, Β) Καμπύλη ανάπτυξης σε φωτοετερότροφη συνθήκη και C) Ξηρή βιομάζα κυττάρων Chlorella sp κατά την 7ⁿ ημέρα λήψης.

Μελετώντας την φωτοσυνθετική ικανότητα του μικροφύκους και παρατηρώντας το διάγραμμα Α στην εικόνα 23, φαίνεται πως σε όλες τις καλλιέργειες ο λόγος F_v/F_{max} είναι μεγαλύτερος από 0,6 γεγονός που δείχνει πως ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός είναι υγιής. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα αποτυπώνεται και στις μετρήσεις φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου όπου διαπίστωνεται η ικανοποιητική παραγωγή του σε όλες τις καλλιέργειες. Βεβαία και σε αυτή την περίπτωση διακρίνεται η τάση που αναφέρει πως η φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροφύκους αυξάνεται όσο μειώνεται η συγκέντρωση του σακχάρου, αλλά ισχύει μόνο στην μεικτότροφη συνθήκη. Στην συνθήκη χωρίς παροχή αέρα η παράγωγη του οξυγόνου παρουσιάζει παρόμοιους ρυθμούς σε όλες τις καλλιέργειες, και αυτό επιβεβαιώνεται και από τα διαγράμματα των χρωστικών ανά βιομάζα.



Εικόνα 23: Καλλιέργεια στελέχους *Chlorella sp* στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την σουκρόζη. Μετρήσεις φωτοσυνθετικής δραστηριότητας υπό όρους Α) μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fmax), B) ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου και C) το περιεχόμενο των φωτοσυνθετικών χρωστικών ανά βιομάζα. Chla: Χλωροφύλλη-α, Chlb: Χλωροφύλλη-β, Cx+c: ξανθοφύλλες και καροτενοειδή.

<u>3.8 Μελέτη επίδρασης της σορβιτόλης στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα</u> σε καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HSM

Στην εν λόγω πειραματική διαδικασία ερευνήθηκε η ανάπτυξη και η φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροφύκους με πηγή άνθρακα την σορβιτόλη. Εστιάζοντας στα διαγράμματα της εικόνας 23, εντοπίζεται πως η ανάπτυξη στις καλλιέργειες που μεγάλωσαν τόσο κάτω από μεικτότροφες όσο και κάτω από φωτοετερότροφες συνθήκες είναι ιδιαίτερα χαμηλή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως η σορβιτόλη δεν μπορεί να αφομοιωθεί ευκολά από τον μικροοργανισμό και έτσι δεν μπορεί να την χρησιμοποιήσει εύκολα για την ανάπτυξη του. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στις καλλιέργειες οι οποίες αναπτύσσονταν με οργανική πηγή την μανιτόλη, η οποία αποτελεί δομικό ισομερές της σορβιτόλης. Τέλος όπως και στις παραπάνω πειραματικές σειρές, έτσι και εδώ η συνθήκη με παροχή αέρα αποδεικνύεται πιο αποτελεσματική, ενώ παράλληλα και στην μεικτότροφη και στην φωτοετερότροφη συνθήκη η ανάπτυξη είναι καλύτερη με συγκέντρωση σακχάρου τα 200 mM.



Εικόνα 24: Καλλιέργεια στελέχους *Chlorella sp* στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την σορβιτόλη. Α) Καμπύλη ανάπτυξης σε μεικτότροφή συνθήκη, Β) Καμπύλη ανάπτυξης σε φωτοετερότροφη συνθήκη και C) Ξηρή βιομάζα κυττάρων *Chlorella* sp κατά την 7^η ημέρα λήψης.

Ερευνώντας τα διαγράμματα τα οποία παρουσιάζονται στην εικόνα 25, παρατηρείται αρχικά πως η μεγίστη φωτοσυνθετική ικανότητα η οποία εκφράζεται με τον λόγο F_v/F_{max}, δίνει τιμές μεγαλύτερες του 0,6 για τις συνθήκες που έχουν την σορβιτόλη σε συγκέντρωση 50 και 100 mM, εκφράζοντας τον υγιή μηχανισμό του φωτοσυστήματος ΙΙ. Στα αποτελέσματα του φθορισμού της χλωροφύλλης συμφωνούν και οι μετρήσεις του ρυθμού παραγωγής οξυγόνου αλλά και του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών ανά βιομάζα. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται αυξημένη φωτοσυνθετική δραστηριότητα στη συνθήκη με bubbling που έχει συγκέντρωση οργανικού υποστρώματος τα 50mM, η οποία είναι και αρκετά κοντά στην τιμή που παρουσιάζει η αυτότροφη καλλιέργεια. Αυτό δείχνει πως αυτή η ανάπτυξη η οποία παρουσιάζει σε αυτή την συνθήκη το μικροφύκος οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Γενικώς, και σε αυτή την περίπτωση, εντοπίζεται ότι η φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροφύκους αυξάνεται όταν η συγκέντρωση του σακχάρου μειώνεται.



Εικόνα 25: Καλλιέργεια στελέχους *Chlorella sp* στο θρεπτικό μέσο HSM, με πηγή άνθρακα την σορβιτόλη. Μετρήσεις φωτοσυνθετικής δραστηριότητας υπό όρους Α) μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fmax), B) ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου και C) το περιεχόμενο των φωτοσυνθετικών χρωστικών ανά βιομάζα. Chla: Χλωροφύλλη-α, Chlb: Χλωροφύλλη-β, Cx+c: ξανθοφύλλες και καροτενοειδή.

3.9 Αποτελέσματα προσδιορισμού βιοχημικού περιεχομένου κυττάρων Chlorella sp, σε καλλιέργειες που διέθεταν τα παραπάνω οργανικά υποστρώματα.

Σε αυτό το κομμάτι της εργασίας, παρατίθενται τα αποτελέσματα που αφορούν την μελέτη του βιοχημικού περιεχομένου των κυττάρων *Chlorella sp* όταν αυτό αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο HSM, με διάφορες πηγές άνθρακα σε συγκέντρωση 200 mM. Είναι σημαντικό να σημειωθεί, πως ερευνήθηκε το βιοχημικό περιεχόμενο μόνο στις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν κάτω από μεικτότροφες συνθήκες καθώς παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον λόγω της αυξημένης βιομάζας που παράγουν. Ως βιοχημικό περιεχόμενο ορίζεται η περιεκτικότητα των κυττάρων σε λιπίδια, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και φωτοσυνθετικές χρωστικές. Η περιεκτικότητα αυτών ερευνήθηκε για κάθε σάκχαρο ξεχωριστά και συγκρίθηκε με το περιεχόμενο των κυττάρων που αναπτύχθηκαν στην συνθήκη μάρτυρα (θρεπτικό μέσο HSM).

Από το παρακάτω πίνακα (πίνακας 9) φαίνεται πως το βιοχημικό περιεχόμενο παρουσιάζει μεγάλες διαφορές τόσο ανάλογα με την οργανική πηγή που αναπτύχθηκε η καλλιέργεια όσο και σε σχέση με την αυτότροφη συνθήκη. Αρχικά φαίνεται ότι στις αυτότροφες συνθήκες, όπου αξιοποιείται περισσότερο ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός για την ανάπτυξη των κυττάρων, είναι πιο έντονη η παρουσία των υδατανθράκων και των χρωστικών. Εξαίρεση από το παραπάνω συμπέρασμα αποτελούν οι καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν με γλυκόζη και λακτόζη καθώς φαίνεται πως έχουν ίδια ποσοστά σακχάρου με την αυτότροφη συνθήκη.

Παράλληλα παρατηρείται ότι παρουσία οργανικού υποστρώματος στις μεικτότροφες συνθήκες, υποβαθμίζεται η φωτοσυνθετική λειτουργία, άρα και η παρουσία των φωτοσυνθετικών χρωστικών. Αυτό μπορεί να εξηγήσει την υψηλότερη παραγωγή λιπιδίων σε σχέση με τις αυτότροφες συνθήκες ανάπτυξης, καθώς και το μειωμένο ποσοστό των υδατανθράκων. Η αύξηση των λιπιδίων είναι ιδιαίτερα μεγάλη όταν χρησιμοποιείται ως οργανική πηγή άνθρακα η γλυκόζη, ενώ παρόμοια ποσοστά παρουσιάζουν τα υπόλοιπα σάκχαρα εκτός της λακτόζης, όπου η περιεκτικότητα της σε λιπίδια είναι ελάχιστα αυξημένη σε σχέση με την συνθήκη του μάρτυρα. Η αυξημένη περιεκτικότητα σε λιπίδια στις

μεικτότροφες καλλιέργειες παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς τα λιπίδια χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ [38].

Μελετώντας το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των καλλιεργειών, εντοπίζεται πως η αυτότροφη συνθήκη διαθέτει ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά (47,70%). Συγκρίνοντας αυτό το ποσοστό του πρωτεϊνικού περιεχομένου με τις μεικτότροφες καλλιέργειες, παρατηρείται πως μόνο αυτή που είχε ως οργανική πηγή την μαλτόζη παρουσιάζει μεγαλύτερή περιεκτικότητα (50,12%). Αντιθέτως οι καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν με γλυκόζη και λακτόζη παρουσιάζουν αισθητά χαμηλότερο ποσοστό σε σχέση με την αυτότροφη συνθήκη, ενώ περίπου ίδια περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες διαθέτουν οι καλλιέργειες με γαλακτόζη, φρουκτόζη, σουκρόζη και σορβιτόλη. Η υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες είναι σημαντική για την βιομάζα ων κυττάρων *Chlorella* διότι αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τρόφιμο με υψηλή διατροφική

Τέλος, όπως προαναφέρθηκε και παραπάνω, η αυτότροφη συνθήκη παρουσιάζει ιδιαίτερα ψηλά ποσοστά χλωροφυλλών σε σχέση με τις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν μεικτότροφα. Αυτή η διαφορά στην ποσότητα των χλωροφυλλών μεταξύ των δύο τρόπων ανάπτυξης εκτείνεται σε μεγαλύτερα ποσοστά από το 100%. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως η αυτότροφη καλλιέργειά χρησιμοποιεί για την ανάπτυξη της κυρίως στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό ενώ οι καλλιέργειες που μεγαλώνουν με οργανικό υπόστρωμα στο θρεπτικό μέσο, χρησιμοποιούν κυρίως τον οξειδωτικό μεταβολισμό των σακχάρων και λιγότερο την φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Αντίστοιχα, αναμενόταν να ήταν και τα αποτελέσματα και για την περιεκτικότητα σε καροτένια, όμως κάτι τέτοιο δεν συνέβη για λόγους που δεν μπορούν να διευκρινιστούν.

Θρεπτικό	HSM							
μέσο	+	+	+	+	+	+	+	
	glc	gal	fruc	malt	lac	suc	sorb	
Σάκχαρα	36,59%	27,37%	20,23%	24,70%	36,55%	22,33%	23,50%	35,68%
	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,85%	2,81%	2,18%	2,15%	7,51%	1,28%	2,51%	0,85%
Λιπίδια	28,81%	15,83%	14,33%	16,41%	9,62%	13,49%	15,73%	7,45%
	±	±	±	±	±	±	±	±
	2,24%	3,10%	2,50%	4,89%	1,81%	3,46%	0,63%	2,95%
Πρωτεΐνες	34,93%	41,45%	46,43%	50,12%	31,54%	44,65%	46,12%	47,70%
	±	±	±	±	±	±	±	±
	1,66%	3,68%	2,36%	1,91%	2,34%	5,25%	1,99%	1,51%
Chl(a)	0.24%	0.94%	0.83%	1.27%	1.20%	0.92%	0.62%	2.40%
	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.03%	0.04%	0.02%	0.04%	0.02%	0.01%	0.04%	0.02%
Chl(b)	0.10%	0.25%	0.33%	0.47%	0.33%	0.42%	0.35%	0.90%
	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.05%	0.01%	0.01%	0.03%	0.02%	0.02%	0.01%	0.01%
Cx+c	0.04%	0.18%	0.05%	0.14%	0.00%	0.00%	0.17%	0.02%
	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.00%	0.01%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%

Πίνακας 9: Πίνακας βιοχημικού περιεχομένου κυττάρων Chlorella sp

3.10 Συμπεράσματα

Τα παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν πως τα κύτταρα του συγκεκριμένου στελέχους του μικροφύκους, παρουσιάζουν αυξημένη ανάπτυξη όταν αυτά αναπτύσσονται υπό μεικτότροφες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα αυτό παρατηρήθηκε σε καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν με παροχή αέρα και διέθεταν ως οργανική πηγή άνθρακα την γλυκόζη, την σουκρόζη και την μαλτόζη σε υψηλές συγκεντρώσεις της τάξης των 150-200 mM. Βέβαια σημαντική εξαίρεση αποτέλεσε η ανάπτυξη του μικροφύκους υπό φωτοετερότροφες συνθήκες με οργανικό υπόστρωμα την γλυκόζη (150 mM), η οποία εμφάνισε την μεγαλύτερη βιομάζα από όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν.

Η μελέτη της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας έδειξε πως τα κύτταρα φωτοσυνθέτουν αποδοτικότερα, εμφανίζοντας υψηλούς ρυθμούς παραγωγής οξυγόνου όταν στην καλλιέργεια δεν υπάρχει οργανικό υπόστρωμα (αυτότροφη καλλιέργεια), ή όταν αυτό βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (50-100 mM). Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως κατά την παροχή οργανικής πηγής άνθρακα, τα μικροφύκη μπορούν να αξιοποιήσουν οργανικές πηγές άνθρακα μέσω της κυτταρικής αναπνοής, παράλληλα με CO₂ μέσω της φωτοσύνθεσης.. Έτσι σε αυξημένες συγκεντρώσεις του οργανικού υποστρώματος ενισχύεται ακόμα περισσότερο η διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής ενώ δυσχεραίνεται ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι οι μεικτότροφες καλλιέργειες που έδειξαν υψηλή φωτοσυνθετική ικανότητα ήταν αυτές που διέθεταν σουκρόζη σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ αυτές με γλυκόζη είχαν μηδαμινή φωτοσυνθετική δραστηριότητα.

Τέλος οι μετρήσεις στο βιοχημικό περιεχόμενο των κυττάρων φανερώνουν πως όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν σε θρεπτικό μέσο με παρουσία οργανική πηγής άνθρακα, τότε το περιεχόμενο σε λιπίδια είναι ιδιαίτερα αυξημένο ενώ το περιεχόμενο σε υδατάνθρακες και χλωροφύλλες μειώνεται σημαντικά. Αντίθετα, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των κυττάρων, στις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν μεικτότροφα δεν έδειξε έντονη μεταβολή σε σχέση με την αυτότροφη συνθήκη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Βασικός στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την ανάπτυξη από το απομονωμένο στέλεχος *Chlorella sp* το οποίο έχει απομονωθεί από την ομάδα του εργαστηρίου από τον ευτροφικό ποταμό Γιόφυρο στην Κρήτη. Γνωρίζοντας τις πολλές και σημαντικές εφαρμογές που έχει η βιομάζα του συγκεκριμένου μικροφύκους, διενεργήθηκε ερεύνα σε καλλιέργειες του στελέχους που είχαν διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης, με διαφορετικές πηγές άνθρακα και σε διαφορετική ποσότητα οι οποίες οδήγησαν στην εύρεση την βέλτιστης συνθήκης ανάπτυξης.

Η παραγωγή υψηλής ποσότητας κυττάρων μπορεί να έχει σημαντική συνεισφορά σε πολλούς τομείς. Η *Chlorella* και η βιομάζα της αναδεικνύονται ως πηγή θρεπτικών συστατικών για τη διατροφή ανθρώπων και ζώων, ενώ ταυτόχρονα εξυπηρετούν κλάδους όπως η κοσμητολογία και η φαρμακευτική βιομηχανία. Επίσης, συμβάλλει στην βιωσιμότητα του περιβάλλοντος καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοκαύσιμο, προσφέροντας μία ανανεώσιμη πηγή ενέργειας με μηδαμινό περιβαλλοντικό αποτύπωμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5:ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] Stirbet, A., Lazár, D., Guo, Y., & Govindjee, G. (2020). Photosynthesis: basics, history and modelling. *Annals of Botany*, *126*(4), 511–537.\

[2] Milada Vítova. *Microalgae : From Physiology to Application*. London, Intechopen, 2020, pp. 49–68.

[3] Stryer, L., Berg, J., Tymoczko, J., & Gatto, G. (2019). *Biochemistry* (9th ed., pp. 633–646). New York Macmillan Learning Wh Freeman.

[4] Sudhakar, K., & Mamat, R. (2019). *Light-Dependent reactions - an overview | sciencedirect topics*. Www.sciencedirect.com. https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/light-dependent-reactions

[5] Bartee, L. (2017). *The light-dependent reactions*. Pressbooks.pub; Open Oregon Educational Resources.https://openoregon.pressbooks.pub/mhccmajorsbio/chapter/8-3-the-two-parts-of-photosynthesis-light-dependent-reactions/

[6] Encyclopedia Britannica. (2018). Chloroplast | function, location, & diagram. In *Encyclopædia Britannica*. https://www.britannica.com/science/chloroplast

[7] Chen, J.-H., Tang, M., Jin, X.-Q., Li, H., Chen, L.-S., Wang, Q.-L., Sun, A.-Z., Yi, Y., & Guo, F.-Q.
(2022). Regulation of calvin–benson cycle enzymes under high temperature stress. *ABIOTECH*, 3(1), 65–77. https://doi.org/10.1007/s42994-022-00068-3

[8] The calvin cycle. (2017, May 9). Biology LibreTexts. https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_%28Boundless%29/05%3A_ Microbial_Metabolism/5.12%3A_Biosynthesis/5.12C%3A_The_Calvin_Cycle

[9]Mobin, S., & Alam, F. (2017). Some promising microalgal species for commercial applications: A review. *Energy Procedia*, *110*, 510–517. https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.177

[10] WEHR, J. D. (2007). Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology by barsanti, L. & gualtieri, P. *Journal of Phycology*, *43*(2), 412–414. https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00335.x

[11] Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella* vulgaris: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *35*, 265–278. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007

[12] Jinnath Rehana Ritu, Ranga Rao Ambati, Ravishankar, G. A., Md. Shahjahan, & Khan, S. (2022). Utilization of astaxanthin from microalgae and carotenoid rich algal biomass as a feed supplement in aquaculture and poultry industry: An overview. *Journal of Applied Phycology*, *35*(1), 145–171. https://doi.org/10.1007/s10811-022-02817-9

[13] Abreu, A. P., Martins, R., & Nunes, J. (2023). Emerging Applications of *Chlorella sp.* and
 Spirulina (Arthrospira) sp. *Bioengineering*, 10(8), 955.
 https://doi.org/10.3390/bioengineering10080955

[14] Liu, J., & Chen, F. (2014). Biology and industrial applications of *chlorella*: Advances and prospects. *Microalgae Biotechnology*, 1–35. https://doi.org/10.1007/10_2014_286

[15] Kusmayadi, A., Leong, Y. K., Yen, H.-W., Huang, C.-Y., & Chang, J.-S. (2021). Microalgae as sustainable food and feed sources for animals and humans – Biotechnological and environmental aspects. *Chemosphere*, 271, 129800. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129800

[16] Monzón-Bensojo, J. F., Flores-Hidalgo, M. A., & Barraza-Jiménez, D. (2019). Photosynthetic pigments with potential for a photosynthetic antenna: A DFT analysis. *International Journal of Photoenergy*, *2019*, 1–17. https://doi.org/10.1155/2019/7432848

[17] Boyer, R. F. (2000). *Modern experimental biochemistry* (pp. 333–335). Pearson.

[18] Grazia Maria Borrelli, & Trono, D. (2016). Molecular Approaches to Genetically Improve the Accumulation of Health-Promoting Secondary Metabolites in Staple Crops—A Case Study: The Lipoxygenase-B1 Genes and Regulation of the Carotenoid Content in Pasta Products. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(7), 1177–1177. https://doi.org/10.3390/ijms17071177

[19] Masojídek J., Vonshak A., Torzillo G. (2011): Chlorophyll fluorescence applications in microalgal mass cultures. In: Suggett D. J., Prášil O., Borowitzka M. A. (eds): Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications. Springer, Dordrecht, 277-292 pp

[20] Νικηφόρου, Κ. (2012): Μορφολογική ασυμμετρία, αναπαραγωγική προσπάθεια, συσσώρευση ανθοκυανινών και φωτοσυνθετική ικανότητα ως δείκτες αρμοστικότητας των φυτών. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 143 σελ.

[21] Sharma D. K., Andersen S. B., Ottosen C. O., Rosenqvist E. (2015): Wheat cultivars selected for high Fv/Fm under heat stress maintain high photosynthesis, total 70 chlorophyll, stomatal conductance, transpiration and dry matter. Physiologia Plantarum 153, 284-298 pp

[22] Παυλής, Ε., Διαχείριση τυροκομικών αποβλήτων: Σενάριο εγκατάστασης κεντρικής μονάδας στη νήσι Λέσβο με παραγωγή βιοαερίου, in Τμήμα Περιβάλλοντος. 2017, Πανεπιστήμιο Αιγαίου: Μυτιλήνη

[23] Kim, S., Park, J., Cho, Y.-B., & Hwang, S.-J. (2013). Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella* sorokiniana in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*, *144*, 8–13. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.068

[24] Abreu, A. P., Fernandes, B., Vicente, A. A., Teixeira, J., & Dragone, G. (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella* vulgaris using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology*, *118*, 61–66. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.055

[25] Chojnacka, K., & Facundo-Joaquin Marq. (2003). Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology(Faisalabad)*, *3*(1), 21–34. https://doi.org/10.3923/biotech.2004.21.34

[26] Dragone, G., Fernandes, B. D., A, V. A., & A, T. J. (2014). Third generation biofuels from microalgae. *Handle.net*. https://doi.org/978-84-614-6195-0

[27] Choudhary, A., Rachan Karmakar, Kundu, K., & Dahake, V. R. (2011). "Algal" Biodiesel: Future Prospects and Problems. *Water and Energy International*, *68*(11), 44–51.

[28] Azmi, A. S., CHE AZIZ, N. A., Mohamad Puad, N. I., Halim, A. A., Yusof, F., & Yusup, S. (2018). *Chlorella* vulgaris logistic growth kinetics model in high concentrations of aqueous ammonia. *IIUM Engineering Journal*, *19*(2), 1–9. https://doi.org/10.31436/iiumej.v19i2.893

[29] Wellburn, A.R., The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. Journal of Plant Physiology 1994. 144(3): p. 307-313.

[30] Strasser, B. and R. Strasser, Measuring Fast Fluorescence Transients to Address Environmental Questions: The JIP-Test. Photosyn Thesis: From Light to Biosphere, 1995: p. 977-980.

[31] Delieu, T. and D.A. Walker, POLAROGRAPHIC MEASUREMENT OF PHOTOSYNTHETIC OXYGEN EVOLUTION BY LEAF DISCS. New Phytologist, 1981. 89(2): p. 165-178.

[32] Στρατηγάκης, Ν. Χ., Χαρακτηρισμός ενός στελέχους Chlorella που απομονώθηκε από ποταμό στην Κρήτη και πιθανές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και διαχείριση αποβλήτων., Τμήμα Χημείας. 2020, Πανεπιστήμιο Κρήτης: Ηράκλειο, Κρήτης.

[33] Groger, W.K., Determination of sugars in biological media with thymol in sulphuric acid. Clin Chim Acta, 1961. 6: p. 866-73.

[34] Schulze, C., M. Wetzel, J. Reinhardt, M. Schmidt, et al., Screening of microalgae for primary metabolites including β -glucans and the influence of nitrate starvation and irradiance on β -glucan production. J Appl Phycol, 2016. 28(5): p. 2719-2725.

[35] Knight, J.A., S. Anderson, and J.M. Rawle, Chemical basis of the sulfo-phospho- vanillin reaction for estimating total serum lipids. Clin Chem, 1972. 18(3): p. 199-202.

[36] Bajguz, A., & Piotrowska-Niczyporuk, A. (2014). Interactive effect of brassinosteroids and cytokinins on growth, chlorophyll, monosaccharide and protein content in the green alga Chlorella vulgaris (Trebouxiophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 176– 183.

[37] Valsami, E.-A., et al., Heterologous β-phellandrene production by alginate immobilized Synechocystis sp. PCC 6803. Journal of Applied Phycology, 2021. 33(4): p. 2157-2168

[38] Goswami, R.K.; Agrawal, K.; Verma, P. An overview of microalgal carotenoids: Advances in the production and its impact on sustainable development. In Bioenergy Research: Evaluating Strategies for Commercialization and Sustainability; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2021; pp. 105–128.

[39] Zhang, W., Zhang, P., Sun, H., Chen, M., Lu, S., & Li, P. (2014). Effects of various organic carbon sources on the growth and biochemical composition of Chlorella pyrenoidosa. *Bioresource Technology*, 173, 52–58.