



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ

Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

**Βιοενεργητική στρατηγική βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων του
μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* για την παραγωγή βιοντίζελ**

Αμαλία Καραμαλάκη

Επιβλέπων Καθηγητής: **Καθ. Κυριάκος Κοτζαμπάσης**

Συνεπιβλέποντες: **Επικ. Καθ. Στέργιος Πυρίντσος**

Dr. Pascal Divanach

Ηράκλειο, 2011



**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF BIOLOGY**

**GRADUATE PROGRAM
PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**

Master thesis

**Bioenergetic strategy of the microalga *Scenedesmus obliquus*
in the biosynthesis of lipids for biodiesel production**

Amalia Karamalaki

Supervisor: **Prof. Kiriakos Kotzabasis**

Co-supervisors: **Assist. Prof. Stergios Pirentos**

Dr. Pascal Divanach

Heraklion, 2011

Η πιο θλιβερή πλευρά της ζωής αυτή τη στιγμή
είναι ότι η επιστήμη συγκεντρώνει γνώση πολύ πιο
γρήγορα από ότι η κοινωνία αποκτά σοφία.....

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην εύρεση των καλύτερων δυνατών συνθηκών καλλιέργειας του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* για την μέγιστη δυνατή συγκέντρωση λιπαρών ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοντίζελ.

Τα αποτελέσματα της εργασίας έδειξαν ιδιαίτερα υψηλές τιμές όσον αφορά την ποσότητα των λιπαρών εκφρασμένη ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας καλλιεργειών του φύκου *Scenedesmus obliquus* που αναπτύχθηκαν μικτότροφα σε σχέση με αντίστοιχες καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν αυτότροφα ή ετερότροφα.

Η αβιοτική καταπόνηση (διαφοροποιήσεις θερμοκρασίας και αλατότητας) δεν άλλαξε ουσιαστικά την κυτταρική περιεκτικότητα των κυττάρων σε λιπίδια. Μόνο στις ιδανικές για την ανάπτυξη συνθήκες (αυξημένη βιομάζα) της μικτότροφης καλλιέργειας μπορούμε να έχουμε έμμεσα αύξηση των λιπιδίων σε επίπεδο καλλιέργειας.

Οι πειραματικές προσεγγίσεις της παρούσας εργασίας κατάφεραν να δώσουν ιδιαίτερα υψηλές τιμές όσον αφορά την ποσότητα των λιπαρών εκφρασμένη ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας καλλιεργειών του φύκου *Scenedesmus obliquus* που αναπτύχθηκαν μικτότροφα σε συνθήκες έλλειψης αζώτου [-N] (25%), φωσφόρου [-P] (16%) και συνδυασμού των δύο [-N/P] (32%). Παρά τις υψηλές αυτές συγκεντρώσεις στους χειρισμούς [-N] και [-N/P] δεν είναι βιοτεχνολογικά εκμεταλλεύσιμες λόγω της ιδιαίτερα χαμηλής ανάπτυξης των καλλιεργειών. Μία εναλλακτική βιοτεχνολογική εκμετάλλευση θα ήταν η ανάπτυξη των καλλιεργειών σε πλήρες θρεπτικό μέσο, μέχρι την μέγιστη ανάπτυξη και στη συνέχεια η επιβολή συνδυαστικής έλλειψης αζώτου και φωσφόρου. Με αυτόν τον τρόπο θα επιτυγχανόταν υψηλότερες τιμές λιπαρών και ανά καλλιέργεια.

Λέξεις κλειδιά: Μικροφύκος *Scenedesmus obliquus*, Λιπαρά, Βιοντίζελ,

SUMMARY

The present work is focused on the research of the best possible growing conditions of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus* for maximal synthesis of lipids that can be used for biodiesel production.

The experimental results from microalgae cultures grown mixotrophically, showed significantly high amount of lipids, expressed as percentage of cellular dry weight, compared with corresponding cultures grown autotrophically and heterotrophically.

Abiotic stress conditions (such as differentiation of temperature and salinity) did not change significantly the cellular content of lipids, except for the optimal growth conditions (increased biomass) of the mixotrophic culture, where it can be observed an indirect increase of lipids level per culture.

The experimental approaches of the present work gave significantly high amount of lipids expressed as percentage of dry weight of algae that were grown mixotrophically in conditions of lack of nitrogen [- N] (25%), phosphor [- P] (16%) and a combination of both [- N/P] (32%). Despite these high concentrations in the treatments [- N] and [- N/P], they are not biotechnologically exploitable due to the extremely low growth of the cultures. An alternative biotechnological exploitation could be the growth of cultures in complete growth medium, up to the maximum growth and afterwards imposition of combinational lack of nitrogen and phosphor. In this way, very high amounts of lipids also per culture could be achieved.

Keywords: Microalgae *Scenedesmus obliquus*, Lipids, Biodiesel

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ.....	10
1.1.2 Προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά μικροφύκη	10
1.1.3 Φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης μικροφυκών	12
1.1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη καλλιέργειών μικροφυκών	13
1.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ	16
1.2.1 Μη Κυκλική Ροή Ηλεκτρονίων – Μη Κυκλική Φωσφορυλίωση.....	19
1.2.2 Κυκλική Ροή Ηλεκτρονίων – Κυκλική Φωτοφωσφορυλίωση	20
1.2.3 Ψευδοκυκλική Ροή Ηλεκτρονίων ή Αντίδραση Mehler	21
1.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕΣΩ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ	21
1.4 ΛΙΠΑΡΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	23
1.4.1 Κηροί, λίπη και έλαια	23
1.4.2 Λιπαρές ουσίες από Μικροφύκη.....	24
1.5 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ	27
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
2.1. Οργανισμός	30
2.2 Συνθήκες Ανάπτυξης	31
2.3 Υπολογισμός Κυτταρικής Συγκέντρωσης	32
2.4 Επαγωγικός Φθορισμός-Φυσικοχημικές Αναλύσεις της Μοριακής Δομής και Λειτουργίας του Φωτοσυνθετικού Μηχανισμού (JIP-test)	33
2.5 Πολαρογραφικές Μετρήσεις Μέγιστης Φωτοσυνθετικής Δραστηριότητας και Αναπνοής	36
2.6 Λυοφιλοποίηση κυττάρων	37
2.7 Επιλογή μεθόδου παραγωγής των λιπαρών	37
<i>Μέθοδος Folch</i>	37
<i>Μέθοδος Hara and Radin</i>	38
<i>Μέθοδος Bligh and Dyer</i>	38
<i>Μέθοδος Fajardo και συνεργατών του</i>	38
2.8 Μέθοδος εκχύλισης λιπαρών	39
2.10 Μέτρηση Αμύλου	40
2.11 Μέθοδος Πρωτεϊνών (Bradford).....	40
2.12 Μέθοδος παρασκευής Βιοντίζελ.....	40
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
3.1.Επιλογή μεθόδου εκχύλισης λιπαρών από μικροφύκη	42
3.1.1. ΜΕΘΟΔΟΣ FOLCH.	42
3.1.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ HARA AND RADIN	42
3.1.3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ BLIGH AND DYER	42
3.1.4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ FAJARDO ΚΑΙ ΣΥΝΕΡΓΑΤΩΝ ΤΟΥ	43
3.2. Συγκριτική μελέτη διαφορετικών τρόπων καλλιέργειας του χλωροφύκου <i>Scenedesmus obliquus</i>	44
3.3. Επίδραση αβιοτικής καταπόνησης στη σύνθεση λιπαρών ουσιών.....	47
3.3.1 Επίδραση αλατότητας.....	47
3.3.2 Επίδραση Θερμοκρασίας.....	51
3.3.3 Επίδραση φωτός.....	53

3.4 Επίδραση έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στη σύνθεση λιπαρών ουσιών.....	55
3.4.1 Επίδραση της έλλειψης θρεπτικών (αζώτου, φωσφόρου και συνδυασμού αυτών) στα κυτταρικά επίπεδα γλωροφυλλών, πρωτεϊνών και υδατανθράκων.....	61
4. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ ΑΠΟ ΛΙΠΑΡΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ.....	65
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
SUMMARY.....	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ.....	10
1.1.2 Προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά μικροφύκη.....	10
1.1.3 Φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης μικροφυκών.....	12
1.1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη καλλιεργειών μικροφυκών.....	13
1.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ.....	16
1.2.1 Μη Κυκλική Ροή Ηλεκτρονίων – Μη Κυκλική Φωσφορυλίωση.....	19
1.2.2 Κυκλική Ροή Ηλεκτρονίων – Κυκλική Φωτοφωσφορυλίωση.....	20
1.2.3 Ψευδοκυκλική Ροή Ηλεκτρονίων ή Αντίδραση Mehler.....	21
1.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕΣΩ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ.....	21
1.4 ΛΙΠΑΡΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	23
1.4.1 Κηροί, λίπη και έλαια.....	23
1.4.2 Λιπαρές ουσίες από Μικροφύκη.....	24
1.5 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ.....	27
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
2.1. Οργανισμός.....	30
2.2 Συνθήκες Ανάπτυξης.....	31
2.3 Υπολογισμός Κυτταρικής Συγκέντρωσης.....	32
2.4 Επαγωγικός Φθορισμός-Φυσικοχημικές Αναλύσεις της Μοριακής Δομής και Λειτουργίας του Φωτοσυνθετικού Μηχανισμού (JIP-test).....	33
2.5 Πολαρογραφικές Μετρήσεις Μέγιστης Φωτοσυνθετικής Δραστηριότητας και Αναπνοής.....	36
2.6 Λυοφιλοποίηση κυττάρων.....	37
2.7 Επιλογή μεθόδου παραγωγής των λιπαρών.....	37
<i>Μέθοδος Folch.....</i>	<i>37</i>
<i>Μέθοδος Hara and Radin.....</i>	<i>38</i>
<i>Μέθοδος Bligh and Dyer.....</i>	<i>38</i>
<i>Μέθοδος Fajardo και συνεργατών του.....</i>	<i>38</i>
2.8 Μέθοδος εκχύλισης λιπαρών.....	39
2.10 Μέτρηση Αμύλου.....	40
2.11 Μέθοδος Πρωτεϊνών (Bradford).....	40
2.12 Μέθοδος παρασκευής Βιοντίζελ.....	40
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
3.1.Επιλογή μεθόδου εκχύλισης λιπαρών από μικροφύκη.....	42
3.1.1. ΜΕΘΟΔΟΣ FOLCH.....	42

3.1.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ HARA AND RADIN.....	42
3.1.3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ BLIGH AND DYER.....	42
3.1.4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ FAJARDO ΚΑΙ ΣΥΝΕΡΓΑΤΩΝ ΤΟΥ.....	43
3.2. Συγκριτική μελέτη διαφορετικών τρόπων καλλιέργειας του χλωροφύκου Scenedesmus obliquus	44
3.3. Επίδραση αβιοτικής καταπόνησης στη σύνθεση λιπαρών ουσιών.....	47
3.3.1 Επίδραση αλατότητας.....	47
3.3.2 Επίδραση Θερμοκρασίας.....	51
3.3.3 Επίδραση φωτός.....	53
3.4 Επίδραση έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στη σύνθεση λιπαρών ουσιών.....	55
3.4.1 Επίδραση της έλλειψης θρεπτικών (αζώτου, φωσφόρου και συνδυασμού αυτών) στα κυτταρικά επίπεδα χλωροφυλλών, πρωτεϊνών και υδατανθράκων.....	61
4. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ ΑΠΟ ΛΙΠΑΡΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ.....	65
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μικροφύκη

Η ιστορία των μικροφυκών ξεκινάει από την Προκάμβριο περίοδο, καθώς ευρήματά τους ανακαλύφθηκαν σε απολιθώματα, που χρονολογούνται πριν από τρία περίπου δισεκατομμύρια χρόνια [<http://www.nmnh.si.edu/botany/projects/algae/AlgIntro.htm>].

Πρόκειται για μια μεγάλη και ποικίλη ομάδα φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών που ζουν σε αλμυρά, υφάλμυρα, γλυκά, στάσιμα ή τρέχοντα υδατικά περιβάλλοντα, αλλά και σε υγρές τοποθεσίες της στεριάς. Τα φύκη δε θεωρούνται ταξινομική ομάδα, αν και μερικές φορές ομαδοποιούνται μαζί με άλλους οργανισμούς στο βασίλειο «Πρώτιστα». Συνήθως οι επί μέρους ομάδες των φυκών αναγνωρίζονται ως ταξινομικές υποδιαιρέσεις. Ο διαχωρισμός σε αυτές τις υποδιαιρέσεις βασίζεται πρωταρχικά στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος, τη φύση των τροφικών αποθεμάτων και την παρουσία άλλων – εκτός της χλωροφύλλης – φωτοσυνθετικών χρωστικών.

Η ύπαρξη των φυκών είναι πολύ σημαντική, γιατί ενισχύουν την πρωτογενή παραγωγή οργανικής ύλης στη βάση της τροφικής αλυσίδας και κυρίως, γιατί παράγουν οξυγόνο, που είναι απαραίτητο σε άλλους υδρόβιους οργανισμούς [<http://www.nmnh.si.edu/botany/projects/algae/AlgIntro.htm>].

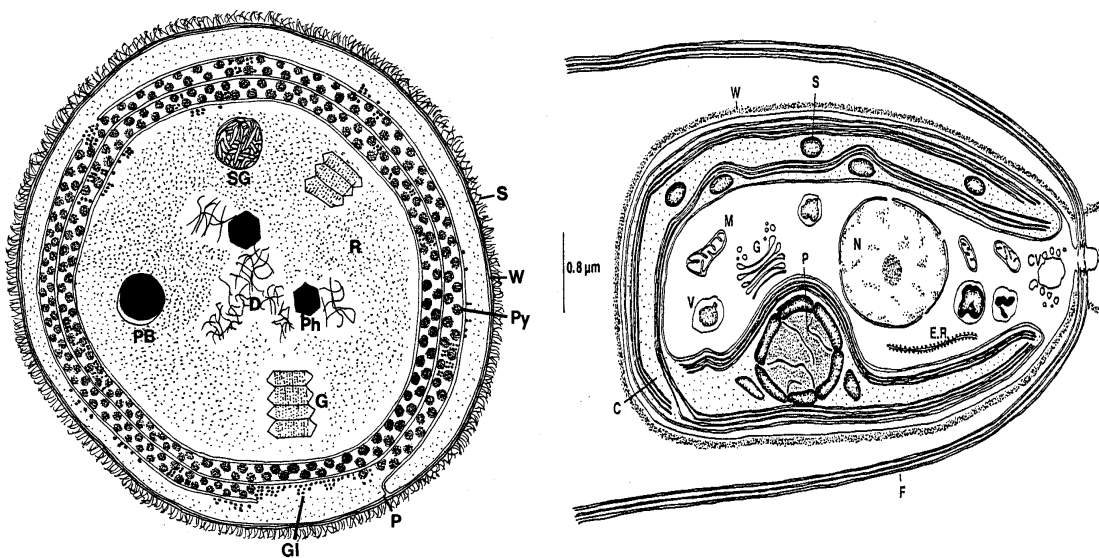
1.1.2 Προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά μικροφύκη

Στα φύκη απαντώνται δύο βασικοί τύποι κυττάρων: τα προκαρυωτικά και τα ευκαρυωτικά. Τα τελευταία αποτελούν και την πλειοψηφία των φυκών [Lee, 1999].

προκαρυωτικά: χαρακτηρίζονται από παντελή έλλειψη πυρηνικής μεμβράνης. Δεν έχουν μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες, ενώ το πρωτόπλασμα τους έχει υφή πηκτής. Αναπαράγονται ασεξουαλικά. Διαθέτουν εκτός από χρωμοσωμικό και εξωχρωμοσωμικό DNA, που οργανώνεται σε μικρές κυκλικές κατασκευές, τα πλασμίδια. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι τα προκαρυωτικά μικροφύκη έχουν συχνά διαφορετικές χρωστικές από τις αντίστοιχες των ευκαρυωτικών.

ευκαρυωτικά: χαρακτηρίζονται από υψηλή οργάνωση. Έχουν πυρηνική μεμβράνη και ένα πολύπλοκο σύστημα μεμβρανών στο εσωτερικό τους. Ευδιάκριτα και αυτόνομα μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες ανιχνεύονται σε ορισμένες κατηγορίες ευκαρυωτικών κυττάρων. Οι γενετικές πληροφορίες βρίσκονται κυρίως στα χρωμοσώματα του πυρήνα. Αποτελούνται από DNA και από ειδικές (ιστόνες) και μη ειδικές πρωτεΐνες. Επιπλέον μερικές γενετικές πληροφορίες περιέχονται και σε ορισμένα κυτταρικά οργανίδια. Η αναπαραγωγή τους γίνεται τόσο με ασεξουαλικό, όσο και με σεξουαλικό τρόπο [Μακρής, Κέκος & Χριστακόπουλος, 1999].

Στην παρακάτω Εικόνα 1 παρουσιάζονται δύο κύτταρα φυκών, ένα από την κάθε κατηγορία :



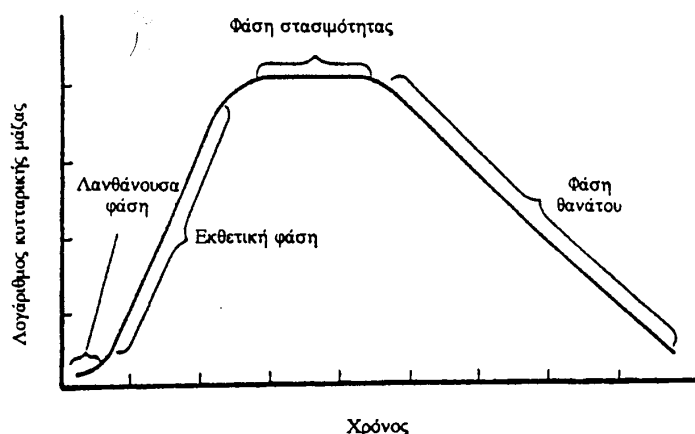
Εικόνα 1. : Παραδείγματα προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών μικροφυκών

Αριστερά: προκαρυωτικό κύτταρο ενός κυανοφύκου, όπου (D) ίνες από DNA, (G) κυστίδια αερίων, (GI) κόκκοι γλυκογόνου, (P) πλασμαλλήμα (εγκόλπωση πλασματικής μεμβράνης), (Py) φυκοβιλισώματα, (R) ριβοσώματα, (S) περίβλημα, (SG) κοκκοειδής δομή (cyanophycin granules), (W) κυτταρικό τοίχωμα

Δεξιά: ευκαρυωτικό κύτταρο (*Chlamidomonas*), όπου (C) χλωροπλάστης, (CV) συσταλά κενοτόπια, (E.R.) ενδοπλασματικό δίκτυο, (F) μαστίγιο, (G) συμπλέγματα golgi, (M) μιτοχόνδρια, (N) πυρήνας, (P) πυρηνοειδής, (S) άμυλο, (V) κενοτόπια, (W) κυτταρικό τοίχωμα [Lee, 1999].

1.1.3 Φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης μικροφυκών

Τα τυπικά στάδια της κυτταρικής ανάπτυξης σε μια διεργασία διαλείποντος έργου παρουσιάζονται στην Εικόνα 10. Η καλλιέργεια γίνεται σε περιορισμένη ποσότητα θρεπτικών υλικών και ο ρυθμός ανάπτυξης της εξαρτάται από τη συγκέντρωση ενός θρεπτικού συστατικού (υποστρώματος), έναντι του οποίου όλα τα άλλα βρίσκονται σε περίσσεια [Κέκος & Παπαγιαννάκος, 1999]. Η καλλιέργεια των μικροφυκών περνά από 4 διαδοχικές αναπτυξιακές φάσεις: λανθάνουσα φάση, εκθετική φάση, φάση στασιμότητας και φάση θανάτου (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Τυπικές φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης. [Κέκος & Παπαγιαννάκος, 1999].

Λανθάνουσα φάση: πρόκειται για την αρχική φάση, όπου παρατηρείται μια καθυστέρηση στην ανάπτυξη. Οφείλεται στην προσαρμογή των κυττάρων στο νέο περιβάλλον και στην προετοιμασία της μεταβολικής μηχανής του κυττάρου (σύνθεση νέων ενζύμων), με σκοπό να χρησιμοποιήσει τις παρεχόμενες θρεπτικές ουσίες για τον καταβολισμό και τη βιοσύνθεση των απαραίτητων συστατικών. Προς το τέλος της φάσης αυτής παρατηρείται μια μεταβατική φάση, κατά τη διάρκεια της οποίας ορισμένος αριθμός κυττάρων αρχίζει να αναπτύσσει τους ενζυμικούς μεταβολικούς μηχανισμούς, καταναλώνοντας υπόστρωμα και παρουσιάζοντας μικρή ανάπτυξη.

Από τεχνολογική άποψη ενδιαφέρει η μείωση της χρονικής διάρκειας της λανθάνουσας φάσης. Η διάρκειά της εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως οι αλλαγές στη σύσταση ή στη συγκέντρωση του θρεπτικού μέσου και τα

χαρακτηριστικά των κυττάρων, που χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου (είδος, ηλικία, μέγεθος).

Η ελαχιστοποίηση της διάρκειας της λανθάνουσας φάσης προϋποθέτει τη χρήση :

- ✘ εμβολίων με κύτταρα που βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης
- ✘ καλλιέργειας εμβολίου σε θρεπτικά υλικά παραπλήσια σύστασης με εκείνη της κύριας καλλιέργειας
- ✘ μεγέθους εμβολίου 5-10 % της κύριας καλλιέργειας των κυττάρων.

Εκθετική ή λογαριθμική φάση: κατά τη φάση αυτή όλα τα κύτταρα αναπτύσσονται με σταθερούς ρυθμούς –τουλάχιστον για το μεγαλύτερο μέρος της, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του πληθυσμού.

Φάση στασιμότητας: χαρακτηριστικό της φάσης αυτής είναι η σταθεροποίηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Ο ρυθμός παραγωγής νέων κυττάρων συνεχώς μειώνεται, λόγω εξάντλησης του υποστρώματος και συσσώρευσης τοξικών ουσιών, και γίνεται ίσος με το ρυθμό θανάτου των κυττάρων. Οι παράγοντες, που καθορίζουν το πότε θα αρχίσει η φάση στασιμότητας είναι κυρίως το φως, τα θρεπτικά συστατικά, το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), που περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω.

Φάση θανάτου: στη φάση αυτή κυριαρχεί το φαινόμενο του θανάτου των κυττάρων.

1.1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη καλλιεργειών μικροφυκών

Εκτός από το μέσο ανάπτυξης των μικροφυκών που επιβάλλεται να διαθέτει τις βέλτιστες συγκεντρώσεις σε θρεπτικά συστατικά, μια σειρά επιπλέον παράγοντες επηρεάζουν την ανάπτυξη τους. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι ο φωτισμός (ποιοτικός και ποσοτικός), η θερμοκρασία, το διοξείδιο του άνθρακα και η αλατότητα του μέσου καλλιέργειας και η ανάδευση της καλλιέργειας.

- ◆ **Φως:** η φωτεινή ενέργεια λαμβάνεται από τους φωτοαυτότροφους μικροοργανισμούς με τη μορφή πυκνής ροής φωτονίων, που καταλήγουν στην επιφάνεια της καλλιέργειας. Τα κύτταρα όμως απορροφούν μόνο ένα μέρος αυτής της ροής, το ποσοστό της οποίας είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων, μερικοί από τους οποίους είναι η πυκνότητα και οι οπτικές ιδιότητες της

καλλιέργειας, ο ρυθμός ανάδευσης και η απόσταση της καλλιέργειας από την φωτεινή πηγή [Richmond, 2004].

Τα αποτελέσματα της έκθεσης των φωτοσυνθετικών μικροφυκών σε φως ελέγχονται ολοκληρωτικά από τη διαδικασία, που καλείται «φωτοεγκλιματισμός» ή αλλιώς «φωτοπροσαρμογή». Σε αυτήν τη διαδικασία τα κύτταρα των φυκών υφίστανται δυναμικές αλλαγές στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, που έχει επιπτώσεις και στην αύξηση της βιομάζας. Σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτισμού, σε αντίθεση με τις αντίστοιχες υψηλής έντασης, παρατηρείται αύξηση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHCII) και μείωση των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων αντίδρασης, που οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα τη μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, αλλά και μείωση του σημείου αντισταθμίσεως μεταξύ αναπνοής και φωτοσύνθεσης [Kotzabasis et al., 1999].

Μετά από όλα αυτά, καταλαβαίνει κανείς ότι η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι μείζονος σημασίας, ειδικά σε συνθήκες υψηλής κυτταρικής πυκνότητας. Η διεισδυτικότητα του φωτός σε μία καλλιέργεια εξαρτάται κυρίως από την πυκνότητά της σε κύτταρα και μειώνεται σημαντικά με το βάθος, λόγω αυτοσκιασμού. Το 90 % των φωτονίων με μήκος κύματος 440–680 nm απορροφώνται από τα κύτταρα του πρώτου εκατοστόμετρου σε μία καλλιέργεια με 1 g βιομάζας/L.

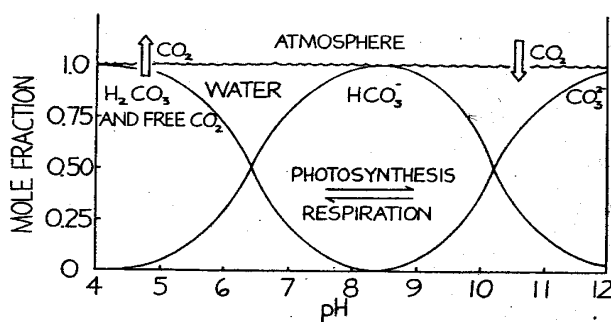
- ◆ **Θερμοκρασία:** Η θερμοκρασία του κάθε κυττάρου ισούται με τη θερμοκρασία του μέσου ανάπτυξης της καλλιέργειας. Αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την αύξηση της βιομάζας, αφού επηρεάζει τους ρυθμούς των κυτταρικών αντιδράσεων, τη φύση του μεταβολισμού, τις θρεπτικές απαιτήσεις και τη σύσταση της βιομάζας [Richmond, 2000].

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη και δράση της κυτταρικής βιομάζας οφείλεται πρωτίστως στην εξάρτηση της δομής των συστατικών των κυττάρων (ειδικότερα των πρωτεϊνών και των λιπιδίων) και του ρυθμού της δράσης διάφορων μεταβολικών μηχανισμών, την εξειδίκευση των ενζυμικών δράσεων, τη διαπερατότητα και τη σύσταση των κυττάρων [Richmond, 2000].

Η εξάρτηση της ανάπτυξης των φυκών από την θερμοκρασία ακολουθεί εκθετική αύξηση μέχρι να λάβει η θερμοκρασία μια βέλτιστη τιμή, πέρα από

την οποία ο ρυθμός αύξησης της κυτταρικής βιομάζας μειώνεται δραματικά. [Richmond, 2000].

- ◆ **Διοξείδιο του άνθρακα:** Σε όλες τις αυτότροφες καλλιέργειών απαιτείται χρήση διαλυμένου διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) ή ένυδρων αλάτων του, με σκοπό τη σύνθεση οργανικών συστατικών. Στο νερό, το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) μπορεί να εμφανιστεί ως H_2CO_3 , HCO_3^- ή ως CO_3^{2-} , ανάλογα με την τιμή του pH, όπως φαίνεται στην ακόλουθη Εικόνα 3 [Richmond, 2004].



Εικόνα 3. Επίδραση της φωτοσύνθεσης και της αναπνοής στο pH, μορφές ανόργανου άνθρακα στο νερό και ανταλλαγή CO_2 από τη διεπιφάνεια αέρα-νερού. [Richmond, 2004]

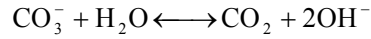
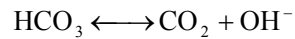
Στα περισσότερα φυσικά υδάτινα περιβάλλοντα το κυριότερο ρυθμιστικό σύστημα του pH είναι το $\text{CO}_2\text{-H}_2\text{CO}_3\text{-HCO}_3^-\text{-CO}_3^{2-}$, που αποτελεί ταυτόχρονα ένα πολύ χρήσιμο ρυθμιστικό σύστημα για την αύξηση της βιομάζας σε καλλιέργειες μικροφυκών, συντηρώντας τα σε ένα αλκαλικό pH. Η ολική διαθέσιμη συγκέντρωση διαλυμένου ανόργανου άνθρακα δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση :



Η σχετική συγκέντρωση του ανόργανου άνθρακα θα καθορίσει το pH, όπως φαίνεται στην παραπάνω Εικόνα 3, αλλά και το αντίστροφο. Στην ισορροπία η συγκέντρωση του $\text{CO}_2(\text{aq})$ είναι πολύ μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του H_2CO_3 και η συγκέντρωση του $\text{CO}_2(\text{aq})$ μπορεί να υπολογιστεί από το άθροισμα των ένυδρων και άνυδρων μορφών του CO_2 . Έτσι έχουμε την ακόλουθη σχέση :



Το σύστημα των ανθρακικών αλάτων μπορεί να προμηθεύει με CO₂ μέσω των ακόλουθων δράσεων :



Όμως, παράλληλα με την επιπλέον παροχή του διοξειδίου του άνθρακα, συσσωρεύονται και υδροξυλιόντα, που επηρεάζουν το pH της καλλιέργειας. Γι' αυτό και προστίθεται στο μέσο της καλλιέργειας κάποιο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να διατηρεί το pH της σε σταθερά επίπεδα. [Richmond, 2004]

- ◆ **Αλατότητα:** τα φυτικά κύτταρα είναι υδρολυτικά συστήματα, που πραγματοποιούν χημικές αντιδράσεις σε υδάτινα μέσα. Τα κύτταρα διαχωρίζονται από το περιβάλλον τους με μια μεμβράνη, που είναι διαπερατή από το νερό, όχι όμως και από τις διαλυτές ουσίες. Αυξημένη αλατότητα στο μέσο ανάπτυξης προκαλεί σύγχυση στις λειτουργίες του κυττάρου, αφού παραβιάζονται οι απαιτήσεις του σε νερό. Έτσι απαιτείται η συντήρηση υδάτωσης των κυττάρων, που επιτυγχάνεται με φυσική κυκλοφορία του νερού διαμέσου της μεμβράνης.

Η αντοχή των φυκών στις διάφορες αλατότητες κυμαίνεται σε πολύ μεγάλο εύρος. Έτσι, ενώ σε μια τιμή αλατότητας ένα είδος μπορεί να προσαρμόζεται με μεγάλη ευκολία, ένα άλλο είναι δυνατόν να καταστραφεί. [Richmond, 2000].

- ◆ **Ανάδευση:** με την ανάδευση διατίθενται ομοιόμορφα σε όλα τα κύτταρα της καλλιέργειας το φως και τα θρεπτικά συστατικά. Συνήθως, οι καλλιέργειες των φυκών αναδεύονται, είτε με παροχή φυσαλίδων αέρα, που είναι δυνατόν να λειτουργεί ταυτόχρονα και για τη μεταφορά του αερίου διοξειδίου του άνθρακα, είτε με μηχανικό τρόπο [Laing, 1991].

1.2 Παραγωγή Ενέργειας Μέσω του Φωτοσυνθετικού Μηχανισμού

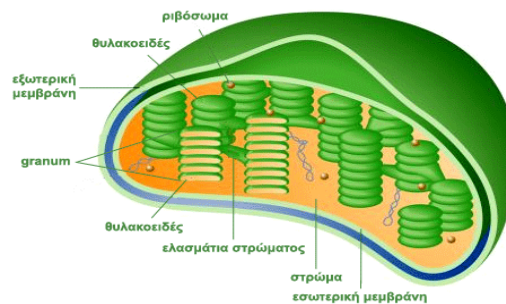
Φωτοσύνθεση είναι η φυσικοχημική διαδικασία μέσω της οποίας οι φυτικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν την ηλιακή ενέργεια για να συνθέσουν οργανικές ενώσεις.

Μέσω της φωτοσυνθετικής διαδικασίας η ηλιακή ενέργεια μετατρέπεται σε μια εκμεταλλεύσιμη από τη βιόσφαιρα μορφή χημικής ενέργειας, το ATP, το οποίο στη συνέχεια «επενδύεται» στον κύκλο του Calvin για να μετατρέψει την ανόργανη ύλη (CO₂) σε οργανική. Η μοναδική αυτή διαδικασία που επιτρέπει την ύπαρξη ζωής στον πλανήτη λαμβάνει χώρα στους χλωροπλάστες όλων των φυτικών οργανισμών.

Η φωτοσύνθεση μπορεί να χωριστεί σε δύο στάδια:

- **Φωτεινές αντιδράσεις**, οι οποίες περιλαμβάνουν:
 - την παραγωγή του ισχυρού αναγωγικού NADPH
 - τον σχηματισμό του ATP, που είναι συζευγμένος με τη ροή των ηλεκτρονίων από το νερό στο NADP⁺
 - την έκλυση O₂, που είναι παραπροϊόν της φωτόλυσης του νερού
- **Σκοτεινές αντιδράσεις**, οι οποίες χρησιμοποιούν το NADPH και το ATP για να μετατραπεί η ανόργανη ύλη (CO₂) σε οργανική (υδατάνθρακες).

Χωροταξικά, ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός εντοπίζεται στους χλωροπλάστες (Εικόνα 4). Η μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε μεταβολικά χρησιμοποιήσιμη μορφή γίνεται στις μεμβράνες των θυλακοειδών στους χλωροπλάστες. Η εσωτερική μεμβράνη των χλωροπλάστων αναδιπλώνεται σε ένα πολύπλοκο τρισδιάστατο δίκτυο στο οποίο μπορούν να διακριθούν δύο διαφορετικά δομικά στοιχεία. Περίπου το 80% της μεμβράνης αποτελείται



Εικόνα 4: Χλωροπλάστης

από αυστηρά πακεταρισμένους δίσκους μεμβρανών (grana) με ένα κυλινδρικό σχήμα και διάμετρο περίπου 0,5 μm. Τα grana συνδέονται μεταξύ τους με μη πακεταρισμένες μεμβράνες στρώματος (θυλακοειδή στρώματος).

Σήμερα είναι γνωστό ότι η φωτοσυνθετική μονάδα (Εικόνα 5) αποτελείται από τρία διακριτά σύμπλοκα χρωστικών/πρωτεϊνών: το φωτοσύστημα II (PSII), με το σύμπλοκο συλλογής του φωτός (Light Harvesting Complex, LHCI), το φωτοσύστημα I (PSI) και το κυτόχρωμα b₆/f (cyt b₆/f), καθώς και από μια συνθάση του ATP.

Φωτοσύστημα II

Το PSII είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, που αποτελείται από δύο διακριτά λειτουργικά ενζυμικά σύμπλοκα: το σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHCII) και τον πυρήνα του PSII.

Το σύμπλοκο LHCII περιέχει 6 πρωτεΐνες, με μοριακά βάρη 25-28 kD και μόρια χλωροφύλλης a, χλωροφύλλης b και καροτενοειδών. Το σύμπλοκο LHCII εντοπίζεται περιφερειακά του PSII, συνδέει τις μεμβράνες των θυλακοειδών και ελέγχει την κατανομή της ενέργειας μεταξύ του PSII και του PSI. Το σύμπλοκο LHCII περιέχει σχεδόν όλη τη χλωροφύλλη b και το 50 % της χλωροφύλλης a του PSII.

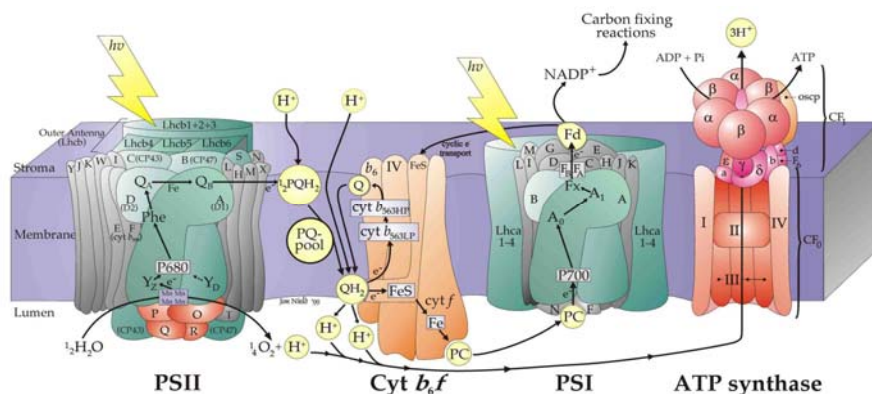
Ο πυρήνας του PSII είναι ένα πολυπεπτιδικό σύμπλοκο που περιλαμβάνει το κέντρο αντίδρασης, όπου πραγματοποιείται ο πρωτογενής διαχωρισμός φορτίου και το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου.

Φωτοσύστημα I

Στους ευκαρυωτικούς φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, το PSI αποτελείται από το σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHCI) και τον πυρήνα του PSI. Το σύμπλοκο LHCI δρα ως βοηθητική κεραία, η οποία συγκεντρώνει το φως και μεταφέρει την ενέργειά του στον πρωτογενή ηλεκτρονιοδότη του κέντρου αντίδρασης, P₇₀₀, που βρίσκεται στον πυρήνα του PSI. Εκτός από το P₇₀₀, το πρωτεϊνικό σύμπλοκο του πυρήνα, περιέχει επίσης τις χρωστικές και τους οξειδοαναγωγικούς παράγοντες, που είναι απαραίτητοι για να επιτευχθεί η μεταφορά ηλεκτρονίων από το PSI στο NADP⁺.

Κυτόχρωμα b₆/f

Το κυτόχρωμα b₆/f αποτελεί το ενδιάμεσο πρωτεϊνικό σύμπλοκο στη μη

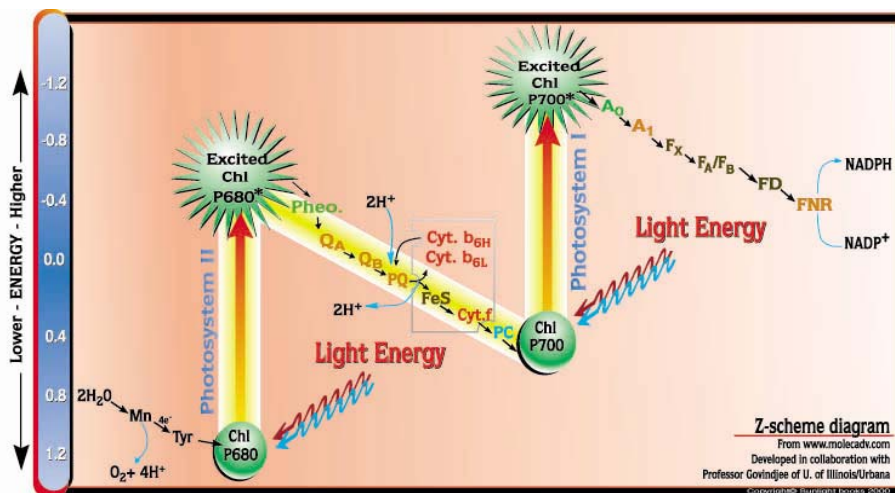


Εικόνα 5: Δομική περιγραφή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού

κυκλική μεταφορά ηλεκτρονίων. Αποτελείται από τέσσερις πρωτεΐνες: το κυτόχρωμα b_6 , το κυτόχρωμα f , την υπομονάδα IV και μια πρωτεΐνη Fe-S. Τα ηλεκτρόνια της πλαστοκινόνης του Φωτοσυστήματος II μεταφέρονται μέσω του πρωτεϊνικού συμπλόκου $cyt\ b_6/f$ στην πλαστοκυανίνη και από εκεί στο PSI.

1.2.1 Μη Κυκλική Ροή Ηλεκτρονίων – Μη Κυκλική Φωσφορυλίωση

Η ηλιακή ενέργεια που δεσμεύεται από το LHClI μεταφέρεται μέχρι το κέντρο αντίδρασης του Φωτοσυστήματος II (PSII), P_{680} με αποτέλεσμα την ενεργειακή του διέγερση (P_{680}^*). Αυτό με τη σειρά του μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο στη φαιοφυτίνη (Pheo a). Η ανηγμένη φαιοφυτίνη δίνει με τη σειρά της ένα ηλεκτρόνιο στην κινόνη Q_A , και αυτή στην κινόνη Q_B , που την μετατρέπει σε ημικινόνη Q_B^- . Μετά από την απορρόφηση ενός δεύτερου φωτονίου και αφού πάρει δύο πρωτόνια από το στρώμα, η κινόνη Q_B ανάγεται σε πλαστοκινόνη PQH_2 (Εικόνα 6). Η οξειδωμένη μορφή του P_{680}^* θα αναχθεί από e^- που θα προκύψουν από τη φωτοσδιάσπαση του νερού, ενώ τα απελευθερωμένα H^+ θα κατευθυνθούν στο μικροχώρο.



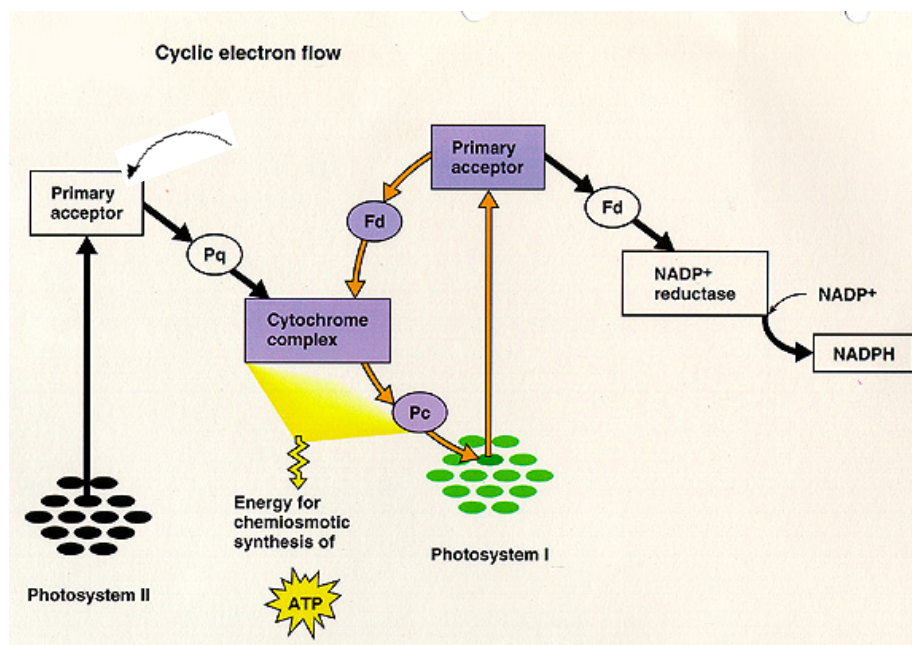
Εικόνα 6: Μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων

Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο κυτόχρωμα b_6/f και στη συνέχεια στην πλαστοκυανίνη, ενώ τα H^+ μεταφέρονται στο μικροχώρο. Εν τέλει τα ηλεκτρόνια καταλήγουν στο Φωτοσύστημα I (PSI), όπου προηγήθηκε διέγερση του κέντρου

αντίδρασης (P_{700}^*), που του επέτρεψε να μεταφέρει ηλεκτρόνια έως τη φερρεδοξίνη και από εκεί στο $NADP^+$, που το ανάγει σε $NADPH$. Η διαφορά πρωτονιακής συγκέντρωσης (διαφορά δυναμικού) που δημιουργείται κατά τη φωτοσυνθετική διαδικασία μεταξύ στρώματος και μικροχώρου είναι η κινητήρια δύναμη, βάση της χημειοσμωτικής θεωρίας του Mitchel, που θα ενεργοποιήσει την ΑΤΡάση και θα δημιουργήσει ΑΤΡ. Στη συνέχεια ΑΤΡ και $NADPH$ θα χρησιμοποιηθούν στον κύκλο του Calvin για τη σύνθεση νέων οργανικών μορίων (Εικόνα 6).

1.2.2 Κυκλική Ροή Ηλεκτρονίων – Κυκλική Φωτοφωσφορλίωση

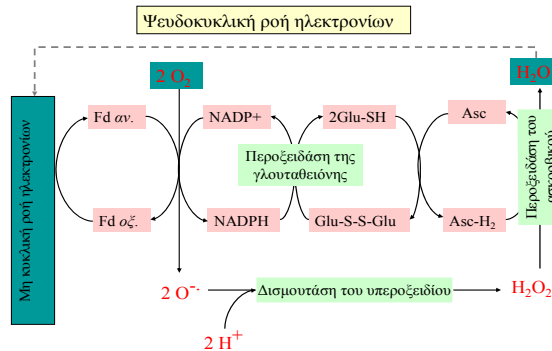
Ορισμένες φορές που ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός απαιτεί περισσότερο ΑΤΡ από ότι $NADPH$, τότε παράλληλα με τη μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων ενεργοποιείται και η κυκλική ροή. Κατά την κυκλική ροή ηλεκτρονίων τα e^- που θα φτάσουν από το P_{700} στη φερρεδοξίνη έχουν τη δυνατότητα, αντί να προωθηθούν στο $NADP^+$ μέσω πλαστοκινόνης και κυτοχρώματος b_6/f , πρωτεΐνης Rieske και πλαστοκυανίνης, να καταλήξουν πάλι στο κέντρο αντίδρασης του Φωτοσυστήματος I (PSI), το P_{700} (Εικόνα 7). Και σε αυτήν τη διαδικασία δημιουργείται διαφορά δυναμικού μεταξύ μικροχώρου κα στρώματος που οδηγεί σε σχηματισμό ΑΤΡ (κυκλική φωσφορλίωση), χωρίς τη δημιουργία του οξειδοαναγωγικού παράγοντα $NADPH$.



Εικόνα 7: Κυκλική ροή ηλεκτρονίων

1.2.3 Ψευδοκυκλική Ροή Ηλεκτρονίων ή Αντίδραση Mehler

Έχει πολλές ομοιότητες με τη μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων. Η ροή ηλεκτρονίων από τη φωτόλυση του νερού μέχρι την αναγωγή της φερρεδοξίνης είναι η ίδια. Η ανηγμένη φερρεδοξίνη έπειτα ανάγει το μοριακό οξυγόνο (O_2), με αποτέλεσμα τον



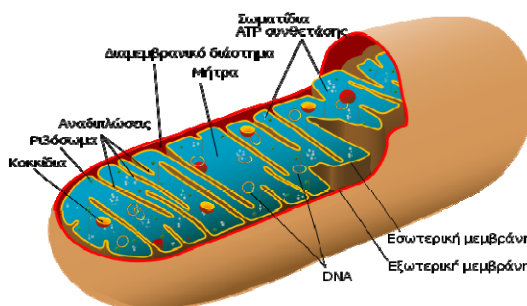
Εικόνα 8: Ψευδοκυκλική ροή ηλεκτρονίων

ελεγχόμενο σχηματισμό ενεργών ριζών οξυγόνου (O_2^{*-}), που μέσω του ενζύμου της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) μετατρέπεται σε υπεροξείδιο (H_2O_2), που με τη σειρά του μετατρέπεται σε νερό, με τη βοήθεια των ενζύμων περοξειδάση της γλουταθειόνης και ασκορβική περοξειδάση (Εικόνα 8).

1.3 Παραγωγή Ενέργειας Μέσω Οξειδωτικής Φωσφορύλισης

Το μιτοχόνδριο (Εικόνα 11) είναι κυτταρικό οργανίδιο, το οποίο περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη. Μιτοχόνδρια απαντούν μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα και αποκαλούνται συχνά "εργοστάσια του κυττάρου", επειδή τα ένζυμά τους διενεργούν τα στάδια του αερόβιου μεταβολισμού, τα οποία αποδίδουν ενέργεια.

Η εξωτερική τους μεμβράνη είναι λεία, ενώ η εσωτερική είναι αναδιπλωμένη και σχηματίζει πολυάριθμες δισκοειδείς ή δακτυλοειδείς πτυχώσεις. Είναι



Εικόνα 9: Μιτοχόνδριο

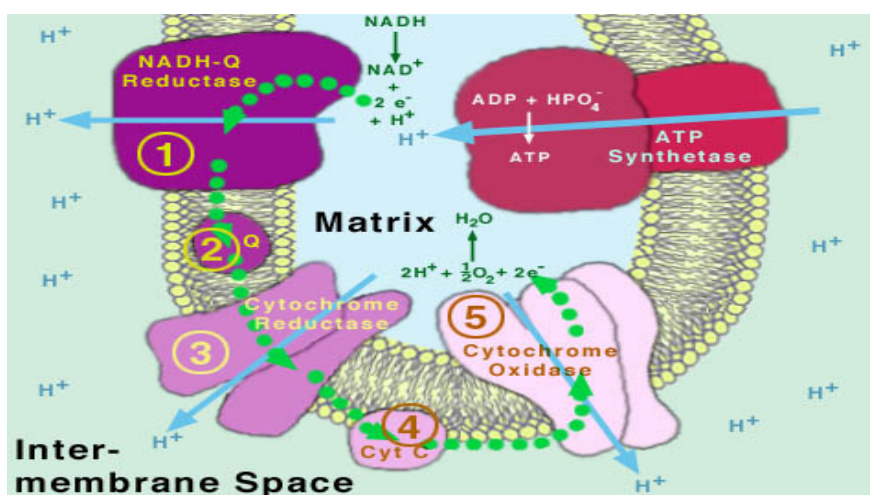
ημιαυτόνομα οργανίδια και διαθέτουν δικό τους DNA, έτσι ώστε να μπορούν να αναπαράγονται χωρίς να χρειάζεται να διαιρεθεί το κύτταρο.

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι μια βιοενεργητική διαδικασία που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Ηλεκτρόνια από οξειδωτικά υποστρώματα μεταφέρονται στο οξυγόνο μέσω των συμπλόκων I, II, III και IV (Εικόνα 9) με αποτέλεσμα την παραγωγή νερού. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας πρωτόνια μεταφέρονται ενεργητικά από τη μήτρα του μιτοχονδρίου στο διαμεμβρανικό χώρο αυτού. Όταν τα πρωτόνια επιστρέφουν στη μιτοχονδριακή μήτρα, κατά μήκος του **ηλεκτροχημικού δυναμικού** τους παράγεται ATP από το σύμπλοκο V (ATP συνθάση) (Chan 2006).

Πιο συγκεκριμένα η αναπνευστική μονάδα του μιτοχονδρίου αποτελείται από τα εξής τέσσερα σύμπλοκα:

- οξειδοαναγωγή της ουμπικινόνης (Σύμπλοκο I),
- ουμπικινόνη (Σύμπλοκο II),
- οξειδοαναγωγή του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο III)
- και οξειδάση του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο IV).

Το σύμπλοκο I συνδέει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH στην ουμπικινόνη με μετατόπιση πρωτονίων κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης σε μία αναλογία 4 H^+ ανά 2 e^- και με τελικό αποδέκτη το σύμπλοκο IV, όπου και ο καταλυτικός κύκλος συνοδεύεται από μετατόπιση με μια στοιχειομετρία 2 πρωτονίων ανά δύο ηλεκτρόνια (Joseph-Horne et al. 2001). Επίσης η εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου περιλαμβάνει και άλλα ένζυμα τα οποία μεταφέρουν



Εικόνα 10: Κυτοχρωμικό μονοπάτι μιτοχονδριακής αναπνοής

ηλεκτρόνια στην ουμπικινόνη, όπως η NADH-, ή η NADPH-αφυδρογενάση, η οποία παρακάμπτει το σύμπλοκο I (Douce and Neuburger 1989). Κάποια από αυτά τα ένζυμα είναι προσανατολισμένα στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, ώστε να επιτρέπεται η οξειδωση κυτοπλασμικών μεταβολιτών οι οποίοι περνάνε την εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου (Noctor et al. 2007).

1.4 Λιπαρές Ουσίες

Οι λιπαρές ουσίες μελετήθηκαν για πρώτη φορά τον 19^ο αιώνα, σε συνθήκες που ήταν πολύ δύσκολο να εντοπιστούν και να διαχωριστούν από τους εκάστοτε επιστήμονες.

Πρόκειται για οργανικά μόρια που απαντούν στη φύση και μπορούν να απομονωθούν κατά την εκχύλιση κυττάρων και ιστών με απλούς οργανικούς διαλύτες. Ο ορισμός αυτός διαφέρει από τον ορισμό που χρησιμοποιείται για τους υδατάνθρακες και τις πρωτεΐνες κατά το ότι τα λιπίδια προσδιορίζονται με βάση τη φυσική τους ιδιότητα (διαλυτότητα) και όχι με βάση τη δομή τους.

Τα λιπίδια ταξινομούνται σε δύο γενικές κατηγορίες:

- Αυτά που περιέχουν εστερομάδες και μπορούν να υδρολυθούν, όπως τα λίπη και οι κηροί
- Αυτά που δεν περιέχουν εστερομάδες και δεν υδρολύονται, όπως η χοληστερόλη και τα άλλα στεροειδή.

Ο ορισμός αυτός καλύπτει ένα ευρύ φάσμα ουσιών που περιέχουν τμήματα από υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, αλδεΐδες, οξέα, αμίνες ή γλυκοσίδες. Η πλειοψηφία των μορίων είναι κηροί, τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια και γλυκολιπίδια, ενώ συμπεριλαμβάνονται και ουσίες που ανήκουν σε άλλες κατηγορίες μορίων, όπως λιποδιαλυτές βιταμίνες (A, D, E και K), συνένζυμα (ουμπικινόνες), χρωστικές (καροτενοειδή), τερπένια, φαινολικά και στερόλες, γιατί εκχυλίζονται από τους ίδιους διαλύτες. [<http://lipidlibrary.aocs.org/lipids.html>]

1.4.1 Κηροί, λίπη και έλαια

Οι **κηροί** είναι μίγματα εστέρων καρβοξυλικών οξέων και αλκοολών, με μεγάλες ανθρακικές αλυσίδες. Το καρβοξυλικό οξύ περιέχει άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα από 16 έως 36, ενώ οι αλκοόλες περιέχουν επίσης άρτιο αριθμό ατόμων

άνθρακα από 24 έως 36. Για παράδειγμα ένα από τα κυριότερα συστατικά του κηρού της μέλισσας είναι το δεκαεξανοϊκό τριακοντύλιο, δηλαδή ο εστέρας της τριακοντανόλης (C_{30}) και του δεκαεξανοϊκού οξέος (C_{16}). Τα κηρώδη προστατευτικά περιβλήματα στα περισσότερα φρούτα, στα φύλλα και στο τρίχωμα των ζώων έχουν παραπλήσιες δομές.

Τα ζωικά λίπη και τα φυτικά έλαια είναι τα πλέον διαδεδομένα λιπίδια. Παρόλο που φαίνονται διαφορετικά – τα ζωικά λίπη όπως το βούτυρο και το λαρδί, είναι στερεά, ενώ τα φυτικά έλαια όπως το καλαμποκέλαιο και το φυσικέλαιο είναι υγρά – οι δομές τους παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες. Από χημική άποψη τα λίπη και τα έλαια είναι τριγλυκερίδια (ονομάζονται επίσης τριακυλογλυκερόλες), δηλαδή τριεστέρες της γλυκερόλη με τρία καρβοξυλικά οξέα που φέρουν μακριές ευθείες ανθρακικές αλυσίδες. Τα αλκύλια R' , R'' και R''' μπορεί να προέρχονται από το ίδιο λιπαρό οξύ, οπότε το γλυκερίδιο χαρακτηρίζεται απλό, ή να προέρχονται από διαφορετικά λιπαρά οξέα, οπότε το γλυκερίδιο χαρακτηρίζεται μικτό.

Η υδρόλυση ενός λίπους ή ενός ελαίου με υδατικό διάλυμα $NaOH$, οδηγεί στο σχηματισμό γλυκερόλης και τριών λιπαρών οξέων. Τα λιπαρά οξέα που προέρχονται από την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων δεν είναι συνήθως διακλαδισμένα και περιέχουν άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα, μεταξύ 12 και 20. Εάν υπάρχουν διπλοί δεσμοί, έχουν συνήθως γεωμετρία Z (cis). Τα τρία λιπαρά οξέα ενός τριγλυκεριδίου δεν είναι απαραίτητα να είναι ίδια και συνήθως ένα λίπος ή έλαιο συνίσταται από διαφορετικά τριγλυκερίδια.

[http://journeytoforever.org/biodiesel_glycerin.html]

1.4.2 Λιπαρές ουσίες από Μικροφύκη

Η ιστορία των φυκών ξεκινάει από την Προκάμβριο περίοδο, καθώς ευρήματά τους ανακαλύφθηκαν σε απολιθώματα, που χρονολογούνται πριν από τρία περίπου δισεκατομμύρια χρόνια [<http://www.nmnh.si.edu/botany/projects/algae/AlgIntro.htm>].

Τα ευνοϊκά χαρακτηριστικά, για βιοτεχνολογική εκμετάλλευση, των μικροφυκών οφείλονται κυρίως στην εξελικτική τους προέλευση και είναι τα εξής:

- ➡ είναι εύκολη η καλλιέργεια και η συλλογή τους σε υδατικά διαλύματα

- εμφανίζουν ταχείς ρυθμούς πολλαπλασιασμού (πολλές φορές ανά ημέρα), υψηλή παραγωγικότητα (πολλές εκατοντάδες τόνους ανά εκτάριο ανά έτος) και συνεχίζουν να αναπτύσσονται ακόμη και σε μεγάλης πυκνότητας καλλιέργειες (αρκετές δεκάδες γραμμάρια ανά λίτρο)
- αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος αλατότητας (ευρύαλοι οργανισμοί) και θερμοκρασιακών διακυμάνσεων, οπότε είναι κατάλληλοι για ένα μεγάλο εύρος κλιματολογικών συνθηκών (10–40 °C)
- χάρη στο μικροσκοπικό τους μέγεθος μπορούν εύκολα να χωρέσουν σε εξαιρετικά μικρά ή λεπτά μέσα, όπως σταγονίδια, φυσαλίδες ή αερολύματα
- εμφανίζουν ανθεκτικότητα στις υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας και διατηρούν υψηλές φωτοσυνθετικές αποδόσεις, χωρίς να εμφανίζουν φωτοαναστολή, όπως άλλα φυτικά είδη
- η βιοχημική τους σύσταση είναι κατάλληλη για πολλές εφαρμογές. Είναι εφικτή η χρήση τους ως πηγή υψηλής αξίας προϊόντων, όπως η παραγωγή αντιοξειδωτικών, χρωστικών, λιπαρών οξέων υψηλής διατροφικής αξίας.

Τα μικροφύκη ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης παρουσιάζουν διαφορές στην ποιότητα και την ποσότητα των λιπαρών τους οξέων. Καλλιέργειες ετερότροφων φυκών που χρησιμοποιούν οργανική πηγή άνθρακα για την αύξηση της παραγωγής λιπιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν καταλλήλως έτσι ώστε να παραχθεί καλύτερης ποιότητας βιοντίζελ. Το σημαντικότερο μειονέκτημα είναι ότι τα λιπίδια φυκών περιέχουν περισσότερα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) (Ferrao et al. 2003), δηλαδή οξέα με δύο και περισσότερους διπλούς δεσμούς στα μόρια τους. Όμως τα ευρωπαϊκά πρότυπα για το biodiesel (π.χ., το EN 14214 ή το EN 14213) έχουν κάποιους ακριβείς περιορισμούς στην ποιότητα και στην ποσότητα των ακόρεστων οξέων .

Για κάθε φυτικό οργανισμό το άζωτο και ο φώσφορος είναι δυο πολύ σημαντικά στοιχεία για την διεργασία κάποιων φυσικοχημικών διαδικασιών, όπως στην φωτοσύνθεση κατά την οποία τόσο το άζωτο είναι απαραίτητο για την σύνθεση π.χ. χλωροφύλλης-καροτενοΐδη, όσο και ο φώσφορος για τη διεξαγωγή π.χ. της οξειδωτική φωσφορυλίωση, που είναι ο κύριος παραγωγός ενέργειας στο κύτταρο. Όπως γίνεται αντιληπτό η στέρηση αυτών των δύο στοιχείων από οποιαδήποτε φυτά τα αποδιοργανώνει και επιβραδύνει την ανάπτυξη και την αύξηση τους. Στα μικροφύκη τα οποία έχουν μελετηθεί και για την συμπεριφορά τους μετά από την

έλλειψη του N₂, του P ή και των δυο μαζί συγχρόνως έχει διαπιστωθεί ότι είναι πιο αποδοτικότερη προσέγγιση ως προς την περιεκτικότητα τους σε λιπίδια (Rodolfi et al. 2009). Σε συνθήκες έλλειψης N₂ η φωτοσύνθετική διαδικασία συνεχίζεται, έστω και με μειωμένο ρυθμό, ωστόσο περιορίζεται η σύνθεση πρωτεϊνών και ενισχύεται ο σχηματισμός λιπιδίων και υδατανθράκων (Sultemeyer et al. 1989). Έτσι οι υδατάνθρακες μπορεί να φτάσουν πάνω από 70% ανά ξηρά βιομάζα χωρίς να μειωθεί ιδιαίτερα η παραγωγικότητα, όμως κατά τη συσσώρευση λιπιδίων υπάρχει μείωση παραγωγικότητας με αποτέλεσμα την μείωση της βιομάζας (Ratledge and Cohen 2008). Κάποια πράσινα μικροφύκη η ποσότητα των λιπαρών που μπορεί να συσσωρευτεί είναι αρκετά μεγάλη σε σχέση με την βιομάζα του φύκου (Ratledge and Cohen 2008). Κάποια μικροφύκη που μπορούν να χαρακτηριστούν και ως ελαιώδη, διότι διοχετεύουν όλη την ενέργεια τους και τις ποσότητες του άνθρακα στην σύνθεση τριασιγλυκερολών (TAGs) (Wang et al. 2009). Τα μη ελαιώδη μικροφύκη κατά την καλλιέργεια σε θρεπτικό με ανεπάρκεια αζώτου αντιδρούν σταματώντας την ανάπτυξη τους ή αποθηκεύουν πολυσακχαρίτες λόγω του αφομοιωμένου άνθρακα (Hossain et al. 2008).

Τόσο το άζωτο όσο και το φώσφορος είναι δυο πολύ σημαντικά στοιχεία για τις κυτταρικές λειτουργίες των μικροφυκών. Η βέλτιστη αναλογία (αναλογία Redfield) που απαιτείται για την σωστή κυτταρική λειτουργία είναι C:N:P = 106:16:1 (αναφορά). Έτσι μπορεί να γίνει κατανοητό ότι όταν αυτή αναλογία δεν είναι επαρκής δηλαδή υπάρχει έλλειψη αζώτου ή φωσφόρου ή και των δύο μαζί τότε ο άνθρακας πιθανόν να αποθηκεύεται ως άμυλο ή λιπαρά στα κύτταρα (Jermyn 1963; Redfield 1963).

Τα λιπίδια του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* που καλλιεργήθηκε κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες μελετήθηκαν αέρια-υγρή χρωματογραφία (GLC) και τα συνολικά λιπαρά ήταν 11,17%, από αυτά ήταν το 7,24% ουδέτερα λιπίδια, 2,45% γλυκολιπίδια και κλάσματα φωσφολιπιδίων 1,48% επί του ξηρού βάρους (Lee et al. 1993).

Για την δημιουργία του βιοντίζελ τα συστατικά του μίγματος της αντίδρασης να είναι 97,73% τα τριγλυκερίδια, 1,92% διγλυκεριδίων, και 0,35% μονογλυκεριδίων και μετά από 12 ώρες που έχει γίνει η αντίδραση, η σύνθεση είναι 98,15% μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων, 0,94% των τριγλυκεριδίων, 0,63% των διγλυκεριδίων και 0,28% μονογλυκεριδίων (Xiong et al. 2008).

1.5 Βιοκαύσιμα

Το βιοντίζελ είναι εναλλακτικό του «συμβατικού» ντίζελ καύσιμο, που μπορεί να παραχθεί από ανανεώσιμες βιολογικές πηγές, όπως οι φυτικές και ζωικές λιπαρές ουσίες. Γενικά υπάρχουν αρκετά οφέλη από τη χρήση του, κυρίως για το περιβάλλον, γιατί πρόκειται για καύσιμο με χαμηλό ποσοστό εκπομπών επιβλαβών αερίων, είναι βιοδιασπώμενο και κυρίως μη τοξικό.

Το μεγάλο πρόβλημα της υπερθέρμανσης του πλανήτη από το φαινόμενο του θερμοκηπίου, που επηρεάζει διάφορες πτυχές της ανθρώπινης ζωής, σε συνδυασμό με τη μείωση των αποθεμάτων του αργού πετρελαίου και γενικότερα τις δυσκολίες στην εξόρυξη και την επεξεργασία του, που θα οδηγήσουν στη δραματική αύξηση του κόστους του, καθιστούν τη χρήση του βιοντίζελ ως επιτακτική ανάγκη. Για να αποφευχθούν λοιπόν μεγάλα προβλήματα σε πολλούς τομείς της καθημερινότητας και ιδιαίτερα στον τομέα των μεταφορών, όπου μέχρι και σήμερα υπάρχουν κάποιες προσωρινές λύσεις για τα ορυκτά καύσιμα και για την αντικατάστασής τους είναι αναγκαίο να βρεθούν καθαρές και ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, ώστε να αντιμετωπιστεί ένα από τα πλέον δυσκολότερα προβλήματα που αντιμετωπίζει η ανθρωπότητα σε μια μεσοπρόθεσμη έως μακροπρόθεσμη πραγματικότητα.

Τα πιο συνηθισμένα βιοκαύσιμα είναι το βιοντίζελ και η βιο-αιθανόλη, τα οποία μπορούν να αντικαταστήσουν το ντίζελ και τη βενζίνη αντίστοιχα, ακόμα και στα σημερινά αυτοκίνητα με καμία ή/και μικρές τροποποιήσεις των κινητήρων τους. Το κυριότερο πλεονέκτημα των βιοκαυσίμων σε σύγκριση με τα συμβατικά ορυκτά καύσιμα είναι ότι για παραγωγή ισοδύναμης ισχύος αποβάλλουν λιγότερους επιβλαβείς για το περιβάλλον αέριους ρύπους. Μπορούν να παραχθούν με τις υπάρχουσες τεχνολογίες και να διανέμονται μέσω του ήδη υπάρχοντος διαθέσιμου συστήματος διανομής (Feofilova et al.).

Παρά το γεγονός ότι η παραγωγή των βιοκαυσίμων είναι οικονομικά ασύμφορη σε σύγκριση με την παραγωγή των ορυκτών καυσίμων, υπάρχει ταχεία αύξηση της παραγωγής τους σε διάφορες χώρες σε ολόκληρο τον κόσμο. Με την ενθάρρυνση των πολιτικών μέτρων και των στόχων που έχουν τεθεί για την χρήση των βιοκαυσίμων στις μεταφορές, η παγκόσμια παραγωγή τους υπολογίζεται πάνω από 35 δισεκατομμύρια λίτρα/έτος. Η κύρια εναλλακτική λύση στο πετρέλαιο ντίζελ στην Ε.Ε. είναι το βιοντίζελ που αντιπροσωπεύει το 82% της συνολικής παραγωγής βιοκαυσίμων και εξακολουθεί να αυξάνεται σε Ευρώπη, Βραζιλία και Η.Π.Α, με

βάση τους πολιτικούς και τους οικονομικούς στόχους που έχουν θεσπίσει οι κυβερνήσεις.

Το βιοντίζελ παράγεται από φυτικά έλαια (εδώδιμα και μη) ή ζωικά λίπη. Επειδή τα φυτικά έλαια μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για ανθρώπινη κατανάλωση, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των τιμών των τροφίμων ανάλογα με την ποιότητα του λαδιού, με αποτέλεσμα αύξηση του κόστους του βιοντίζελ, ακόμη και αν έχει πολλά περισσότερα πλεονεκτήματα σε σχέση με το «συμβατικό» ντίζελ.

Το πρόβλημα που αναφέρεται έγκειται στο γεγονός ότι η διαθεσιμότητα των φυτικών ελαίων δεν είναι επαρκής για να καλύψει τις απαιτήσεις για την παραγωγή του βιοντίζελ σε αναγκαίες ποσότητες. Για παράδειγμα, για την παραγωγή του 10% από το απαιτούμενο βιοντίζελ χρειάζονται πολύ περισσότερες πρώτες ύλες (φυτικά έλαια) από αυτές που υπάρχουν διαθέσιμες. Οι εκτεταμένες φυτείες και η γενικότερη πίεση για αλλαγή της χρήσης της γης, έτσι ώστε να αυξηθούν τα καλλιεργούμενα αγροτεμάχια, μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια της βιοποικιλότητας, λόγω της αποψίλωσης των υπαρχόντων δασών, αγνοώντας την οικολογική σημασία των ζωνών αυτών. Το βιοντίζελ μπορεί επίσης να γίνει επιζήμιο λόγω της αντικατάστασης των βρώσιμων φυτικών καλλιεργειών με καλλιέργειες που θα χρησιμοποιηθούν μόνο για την παραγωγή του (Scott et al.).

Για να δημιουργηθούν πιο βιώσιμες εναλλακτικές λύσεις για τα καύσιμα, έτσι ώστε να μπορέσουν να επιβιώσουν στην αγορά, είναι αναγκαίο να μειωθεί το κόστος παραγωγής του βιοντίζελ, το οποίο εξαρτάται κυρίως από την τιμή των πρώτων υλών, που αντιπροσωπεύει το 60-75% του συνολικού κόστους του. Έτσι γίνονται προσπάθειες αξιοποίησης μη βρώσιμων ελαίων, όπως λάδια τηγανίσματος, ζωικά λίπη, σαπούνι και λίπη. Ωστόσο, οι διαθέσιμες ποσότητες των παραπάνω εναλλακτικών πρώτων υλών δεν επαρκούν για την παραγωγή των απαιτούμενων ποσοτήτων βιοντίζελ. Έτσι η μετάβαση προς τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς (π.χ. με πρώτη ύλη τα μικροφύκη), μπορούν να συμβάλουν στη μείωση των εκτάσεων που απαιτούνται για καλλιέργειες φυτικών ειδών, λόγω των υψηλότερων ενεργειακών αποδόσεων τους ανά εκτάριο, δεδομένου ότι απαιτούν πολύ μικρότερες εκτάσεις γεωργικής γης. Επιπλέον, είναι αναγκαίο να εξασφαλιστεί η ποιότητα του παραγόμενου από τα μικροφύκη βιοντίζελ, ώστε να είναι καλύτερη ή ίδια με την αντίστοιχη του «συμβατικού» ντίζελ (Mata et al. 2010).

Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση των μικροφυκών για την παραγωγή του βιοντίζελ σε σύγκριση με άλλες διαθέσιμες πρώτες ύλες είναι αρκετά και σημαντικά. Από πρακτική άποψη τα μικροφύκη είναι εύκολο να καλλιεργηθούν, μπορούν να αναπτυχθούν χρησιμοποιώντας νερό ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση και εύκολα προσλαμβάνουν τις θρεπτικές ουσίες από αυτό που ίσως να περιέχουν.

Τα μικροφύκη για να αναπαραχθούν χρειάζονται μονό λίγες μέρες για να ολοκληρώσουν τον κύκλο ανάπτυξης τους λόγω της φωτοσυνθετικής τους δραστηριότητας. Επιπλέον, μπορούν να αυξηθούν σχεδόν οπουδήποτε, με την χρήση της ηλιακής ακτινοβολίας και μερικές απλές θρεπτικές ουσίες, ενώ οι ρυθμοί ανάπτυξης μπορούν να επιταχυνθούν με την προσθήκη ειδικών θρεπτικών ουσιών και με τον επαρκή αερισμό τους. Έχουν πολύ υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης και παραγωγικότητας σε σύγκριση με τα άλλα φυτικά είδη των γεωργικών καλλιεργειών, καθώς και άλλα υδρόβια φυτά. Απαιτούν πολύ λιγότερη έκταση από ό, τι άλλα φυτικά είδη γεωργικών καλλιεργειών (49 και 132 φορές λιγότερη σε σχέση με την ελαιοκράμβη ή την σόγια αντίστοιχα), ενώ το βιοντίζελ που μπορεί να περιέχει η βιομάζα των μικροφυκών μπορεί να φτάσει και το 30% (w / w) (αναφορά). Ως εκ τούτου, με την εκτεταμένη χρήση μικροφυκών για την παραγωγή βιοντίζελ ο ανταγωνισμός για τις καλλιέργειες του εδάφους με άλλες καλλιέργειες, ιδίως για ανθρώπινη κατανάλωση, μειώνεται σημαντικά.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να ερευνηθούν και να διαπιστωθούν οι καταλληλότερες συνθήκες αύξησης και ανάπτυξης του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* για την βέλτιστη παραγωγή λιπαρών, κατάλληλων για δημιουργία βιοντίζελ.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Οργανισμός

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* (Εικόνα 11). Η φυλογενετική του ταξινόμηση είναι η εξής:

Βασίλειο : Φυτά

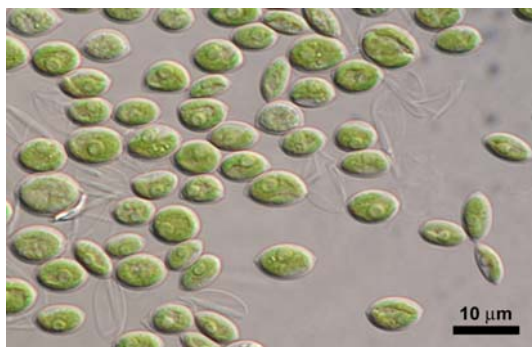
Διαίρεση : Χλωρόφυτα

Κλάση : Χλωροφύκη

Τάξη : Chlorococcales

Γένος : *Scenedesmus*

Είδος : *Scenedesmus obliquus*



Εικόνα 11 Κύτταρα *Scenedesmus obliquus*

Ο οργανισμός αυτός είναι μονοκύτταρος ευκαρυωτικός, με ελλειψοειδή κύτταρα, μήκους περίπου 5-10 μm. Ο κύκλος ζωής του διαρκεί γύρω στις 20 ώρες. Στη διάρκεια αυτή, διαιρείται μία φορά δίνοντας 4-8 θυγατρικά κύτταρα, τα οποία μόλις σχηματιστούν πλήρως, συνήθως αποκόπτονται μεταξύ τους (δεν σχηματίζουν κοινόβια). Εξελικτικά βρίσκεται πολύ κοντά στα άλλα δύο γνωστά στο ερευνητικό πεδίο φύκη τη Χλαμυδομονάδα (*Chlamydomonas*) και τη Χλωρέλλα (*Chlorella*).

Πρόκειται για φωτοσυνθετικό μικροοργανισμό, που παράγει οξυγόνο κατά τη φωτοσύνθεσή του. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της φωτοσυνθετικής του δραστηριότητας μοιάζει με τα γυμνόσπερμα φυτά. Ο άγριος τύπος (wt) έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης και στο σκοτάδι. Δηλαδή, ακόμα και σε ετερότροφες συνθήκες έχει διαμορφωμένους χλωροπλάστες και ενεργά φωτοσυστήματα I και II (εφ' όσον του παρέχεται κάποια πηγή οργανικού άνθρακα στο θρεπτικό μέσο).



Εικόνα 12: Καλλιέργεια *Scenedesmus obliquus*

2.2 Συνθήκες Ανάπτυξης

Η ανάπτυξη των οργανισμών έγινε σε επιμήκεις γυάλινους σωλήνες (διαμέτρου 5 cm), με ειδικό στόμιο στο κάτω μέρος του σωλήνα, που επιτρέπει τον αερισμό της καλλιέργειας, ενώ τοποθετήθηκαν σε ενυδρείο σταθερής θερμοκρασίας 30°C, μπροστά από λάμπες λευκού φωτισμού, με ρυθμιζόμενη ένταση (Εικόνα 13). Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε αυτές τις συνθήκες για 3-4 ημέρες περίπου, έπειτα ανακαλλιεργήθηκαν προσθέτοντας νέο μέσο καλλιέργειας (Πίνακας 3) (Bishop and Senger 1971), ενώ ακολούθως, μετά το πέρας 5 ημερών, χρησιμοποιήθηκαν ως μητρική καλλιέργεια για τη διεξαγωγή του εκάστοτε πειράματος.

Όλα τα πειράματα έλαβαν χώρα σε κωνικές φιάλες των 500 mL (Σχήμα 10). Η διάρκεια των 5 ημερών επιλέχθηκε ως η ιδανικότερη για την αποφυγή του προβλήματος της έλλειψης θρεπτικών, μετά από προκαταρκτικά πειράματα

αναφορικά με την καμπύλη ανάπτυξης του χλωροφύκου στις συγκεκριμένες συνθήκες. Ο τελικός όγκος της καλλιέργειας σε κάθε κωνική φιάλη ήταν 300 mL. Η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων ήταν 10 μL PCV/mL (Packed Cell Volume–Πακεταρισμένα Κύτταρα) καλλιέργειας. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν (innova™ 4340 ILLUMINATED REFRIGERATED INCUBATOR SHAKER NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC) (Εικόνα 14) σε σταθερή θερμοκρασία (30 °C) και συνεχή ανακίνηση στις 150 στροφές/min, ενώ το φως που έφτανε στην επιφάνεια της καλλιέργειας ήταν 50-60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Εικόνα 13: Σύστημα προκαλλιέργειας του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*



Εικόνα 14: Ο επωαστήρας των καλλιεργειών

Πίνακας 1. Συστατικά του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας του *Scenedesmus obliquus* (Bishop and Senger 1971)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (σε g/L)
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,50

KNO_3	80,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	24,6
$NaCl$	47,0
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	17,8
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	40,5
$FeSO_4 \cdot H_2O$	0,06
$Fe(III)citrate$	0,24
H_3BO_3	2,86
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,81
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,222
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,079
MoO_3 (85%-99.5%)	0,0177

Στη διάρκεια της παρούσας εργασίας δοκιμάστηκαν 4 διαφορετικοί χειρισμοί όσον αφορά τη χρησιμοποιούμενη πηγή του άνθρακα. Ο πρώτος [CO₂] αφορά την προσθήκη ανόργανης πηγής άνθρακα, η οποία ήταν 10% CO₂ (Logothetis et al. 2004), ο δεύτερος [glc] την οργανική πηγή άνθρακα, η οποία ήταν 5 g/L D⁺-γλυκόζη (Bishop and Senger 1971), ο τρίτος [CO₂ + glc] αφορά τη συνδυασμένη χρήση οργανικής και ανόργανης πηγής άνθρακα (10% CO₂ και 5 g/L D⁺-γλυκόζη) και ο τελευταίος [limit C] αφορά τη μη προσθήκη οποιασδήποτε μορφής εξωγενούς πηγής άνθρακα.

2.3 Υπολογισμός Κυτταρικής Συγκέντρωσης

Δείγματα των 5 mL από τις καλλιέργειες των μικροφυκών φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 1500g προκειμένου να καθιζήσουν σε βαθμονομημένο τριχοειδή υαλοσωλήνα (Εικόνα 15) (Logothetis et al. 2004). Η εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης παρουσιάζεται ως όγκος καθιζαμένων κυττάρων (Packed Cell Volume; PCV) ανά mL καλλιέργειας (μL PCV/mL καλλιέργειας).



Εικόνα:15
Διαβαθμισμένοι σωλήνες
PCV

2.4 Επαγωγικός Φθορισμός-Φυσικοχημικές Αναλύσεις της Μοριακής Δομής και Λειτουργίας του Φωτοσυνθετικού Μηχανισμού (JIP-test)

Μόνο ένα μέρος της ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χρησιμοποιείται για τη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης. Το υπόλοιπο εκπέμπεται είτε ως θερμότητα είτε ως **φθορισμός**. Η επαγωγή του φθορισμού από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τους Kautsky & Hirsch (1931). Η επαγωγή του φθορισμού από τα φυτά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή. Σήμερα, η μελέτη της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού –ιδιαίτερα της ταχείας φάσης- έχει εξελιχθεί σε πολύτιμο ερευνητικό μέσο για τη μελέτη της μοριακής δομής και λειτουργίας, αλλά και της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Βάσει της μεθόδου των Strasser & Strasser (1995), μπορεί να εκτιμηθεί, εκτός των άλλων, το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας, η πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης και μια σειρά από παραμέτρους, που αφορούν τη δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Ο φθορισμός αυξάνεται όταν η φωτοχημική απόδοση της φωτοσύνθεσης παρεμποδίζεται για οποιοδήποτε λόγο, για παράδειγμα όταν δεν υπάρχει διαθέσιμος οξειδωμένος δέκτης ηλεκτρονίων σε κάποιο σημείο στην πορεία της ηλεκτρονιακής μεταφοράς. Όταν ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός, μετά από την προσαρμογή του στο σκοτάδι, δεχτεί την επίδραση συνεχούς φωτισμού, τότε ο φθορισμός του αυξάνεται από το αρχικό του επίπεδο (F_0) σε ένα μέγιστο επίπεδο (F_m) και στη συνέχεια μειώνεται βαθμιαία μέχρι ένα σταθερό επίπεδο (F_s) Strasser & Strasser (1995)

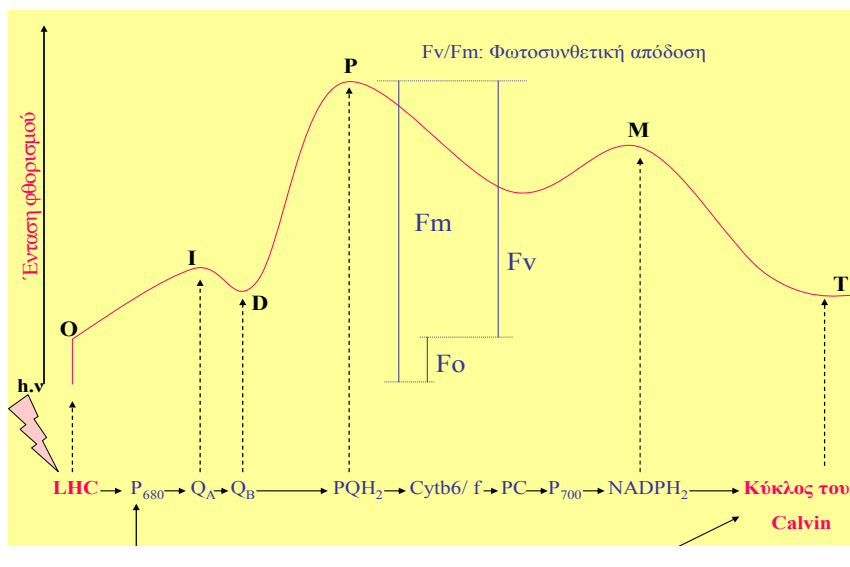
Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη φορητή συσκευή Plant Efficiency Analyser (Handy PEA Hansatech Instruments) (Εικόνα 16), και ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση εξειδικευμένου λογισμικού εφαρμογής του JIP-test (BioLyzer HP 4.0), σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser & Strasser (1995).

Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε δείγματα καλλιεργειών όγκου 1 mL, τα οποία προτού διεγερθούν είχαν παραμείνει στο σκοτάδι για 10 min, προκειμένου να «αδειάσουν» τα κέντρα αντίδρασης από ηλεκτρόνια. Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος F_v/F_m , που συνδέεται άμεσα με τη φωτοσυνθετική απόδοση (Strasser and Strasser 1995). Επίσης με εφαρμογή του JIP-TEST για τιμές



Εικόνα 16. Handy PEA για τις μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού

φθορισμού, που αντιστοιχούν σε καθορισμένα στάδια [J, I και P (Εικόνα 17) υπολογίστηκαν τα επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού: ο λόγος ABS/RC , που συνδέεται με το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII, ο λόγος DI_0/RC , που συνδέεται με την ενέργεια που χάνεται με τη μορφή θερμότητας και ο λόγος RC/CS_0 , που συνδέεται με την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης του PSII.



Εικόνα 17. Τυπική καμπύλη επαγωγικού φθορισμού

Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10 μs σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας μέχρι $3000 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ ερυθρού φωτός (650nm).

Πίνακας 2. Βασικές παράμετροι του JIP-TEST

Μεταβλητή OJIP καμπύλης	Ορισμός
F_t	Τιμή φθορισμού σε χρόνο t μετά την ακτινοβόληση
$F_{50\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα 50 μs
$F_{300\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα 300 μs
$F_J = F_{2ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα J (2 ms) της καμπύλης OJIP
$F_I = F_{30ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα I (30 ms) της καμπύλης OJIP
$F_P (= F_m)$	Μέγιστη ένταση φθορισμού στο P της καμπύλης OJIP
t_{Fm}	Χρόνος σε (ms) που απαιτείται για να μεγιστοποιηθεί η ένταση του φθορισμού F_m
Area	Συνολική συμπληρωματική περιοχή ανάμεσα στην

	καμπύλη OJIP και την ευθεία που διέρχεται από το $F = F_m$
Παράμετροι JIP-test	
F_o	Ελάχιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί σε «ανοιχτά» κέντρα (open PSII RC_s , $t = 0$)
F_m	Μέγιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί στο χρόνο όπου όλα τα κέντρα είναι «κλειστά» (closed PSII RC_s , $t = t_{Fm}$)
F_v	Μεταβλητή τιμή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$F_v = F_m - F_o$	Μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής φθορισμού
$V_t = (F_t - F_o)/(F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$V_J = (F_J - F_o)/(F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού στο βήμα J
$M_o = (\Delta V/\Delta t)_o =$ $= 4(F_{300\mu s} - F_o)/(F_m - F_o)$	Αρχική κλίση σε ms της καμπύλης $V = f(t)$
$S_m = (Area)/(F_m - F_o)$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP (Area), ομαλοποιούμενο ως προς F_v (αποτελεί μέτρο του αριθμού των οξειδοαναγωγικών κύκλων της Q_A)
$S_s = V_J/M_o$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP που αντιστοιχεί μόνο στην OJ φάση (διάστημα όπου η Q_A των RC ανάγεται μία φορά)
$N = S_m/S_s = S_m M_o (1/V_J)$	Μέτρο αριθμού κύκλων αναγωγής της Q_A στο διάστημα t_{Fm}
Ειδικές ροές ενέργειας (ανά κέντρο που ανάγει Q_A)	Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας
$ABS/RC = M_o (1/V_J)(1/\Phi_{Po})$	Ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$)
$TR_o/RC = M_o (1/V_J)$	Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$)
$ET_o/RC = M_o (1/V_J)\Psi_o$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (για $t = 0$)
$DI_o/RC = (ABS/RC) - (TR_o/RC)$	
Αποδόσεις ή λόγοι επιμέρους ροών	Μέγιστη κβαντική απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας (για $t = 0$)
$\Phi_{Po} = TR_o/ABS = [1 - (F_o/F_m)]$	Πιθανότητα να προκαλέσει μια διέγερση (exciton) τη μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου κατά μήκος της αλυσίδας πέρα από την Q_A^- (για $t = 0$)
$\Psi_o = ET_o/TR_o = 1 - V_J$	Κβαντική απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων (για $t = 0$)
$\Phi_{Eo} = ET_o/ABS = [1 - (F_o/F_m)]\Psi_o$	Κβαντική απόδοση της διάχυσης ηλεκτρονίων (για $t = 0$)
$\Phi_{Do} = 1 - \Phi_{Po} = F_o/F_m$	
Εκτιμώμενες ροές ενέργειας ανά διεγερμένη περιοχή	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το F_o
ABS/CS_o	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το F_m
ABS/CS_m	Παγιδευμένη ενέργεια ανά διεγερόμενη περιοχή της μεμβράνης (για $t = 0$)
$TR_o/CS_o = \Phi_{Po}(ABS/CS_o)$	

$$ET_o/CS_o = \Phi_{E_o}(ABS/CS_o)$$

$$DI_o/CS_o = (ABS/CS_o) - (TR_o/CS_o)$$

**Πυκνότητα ενεργών κέντρων
αντίδρασης**
 RC/CS_o

Δείκτες επίδοσης

$$PI_{ABS} = (RC/ABS) (\Phi_{P_o}/1-\Phi_{P_o})(\Psi_o/1-\Psi_o)$$

$$PI_{CS_o} = (RC/CS_o) (\Phi_{P_o}/1-\Phi_{P_o})(\Psi_o/1-\Psi_o)$$

$$PI_{CS_m} = (RC/CS_m) (\Phi_{P_o}/1-\Phi_{P_o})(\Psi_o/1-\Psi_o)$$

$$SFI_{abs} = (1-\Phi_{P_o})(1-\Psi_o)$$

Ικανότητα παραγωγής έργου
 $DF_{ABS} = \log(PI_{ABS})$

Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή διέγερσης
(για $t = 0$)
Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή διέγερσης
(για $t = 0$)

Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης

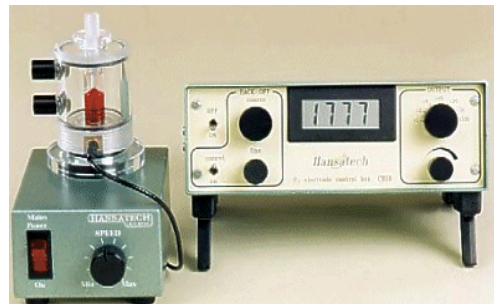
Επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια
Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ($t = 0$)
Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης ($t = t_{Fm}$)
Δείκτης λειτουργικότητας

Εκτιμώμενη παραγωγή έργου ανά απορροφώμενη
ενέργεια

2.5 Πολαρογραφικές Μετρήσεις Μέγιστης Φωτοσυνθετικής Δραστηριότητας και Αναπνοής

Οι μετρήσεις της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και της αναπνοής έγιναν με σύστημα Clark type ηλεκτροδίου της Hansatech (Εικόνα 18). Μεταξύ ενός ηλεκτροδίου πλατίνας (κάθοδος) και ενός άλλου από άργυρο (άνοδος) τίθεται, μέσω ενός ηλεκτρολύτη (κορεσμένο διάλυμα KCl), μία μικρή ηλεκτρική τάση (~50V). Για τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ανόδου και καθόδου, χρειάζεται O_2 το οποίο περνά από μία ημιπερατή μεμβράνη, που χωρίζει το δείγμα από τα ηλεκτρόδια. Η καταγραφή της έντασης του ρεύματος (σε A) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης οξυγόνου του δείγματος.

Η φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου από το δείγμα (φωτοσυνθετικά κύτταρα) επιτυγχάνεται μόνο με το φωτισμό του δείγματος. Η αποφυγή του περιοριστικού για τη φωτοσύνθεση παράγοντα (συγκέντρωση CO_2 στο διάλυμα του δείγματος) επιτυγχάνεται με την προσθήκη $NaHCO_3$. Μονοκύτταρα φύκη *Scenedesmus obliquus* συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση 5 min στα 1500 g και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα A (34 mg $NaHCO_3$ και 8,96 mg Tricin σε 100 mL dH_2O , pH: 7,6 με KOH), έτσι ώστε η πυκνότητα του αιωρήματος σε κύτταρα να είναι 10 μL PCV/mL. Η οριοθέτηση του επιπέδου συγκέντρωσης του οξυγόνου από το 0-100% στο διάλυμα του δείγματος γίνεται με αέριο αζώτου και κορεσμένου σε οξυγόνο νερού, αντίστοιχα. Η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα καταγράφηκε σε ένταση



Εικόνα18. Οξυγονόμετρο

φωτισμού $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, μετά από προκαταρκτικά πειράματα σε διάφορες εντάσεις φωτισμού (ώστε να αποφευχθεί τόσο ο αυτοσκιασμός όσο και η φωτοαναστολή), ενώ η αναπνευστική δραστηριότητα σε απόλυτο σκοτάδι. Τέλος τόσο η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα όσο και η αναπνοή ανήχθησαν ανά $\mu\text{L PCV}$.

2.6 Λυοφιλοποίηση κυττάρων

Η λυοφιλοποίηση των κυττάρων για τον υπολογισμό του ξηρού βάρους, αλλά και για την περαιτέρω χρήση τους για την εκχύλιση των λιπαρών ουσιών, μετά από φυγοκέντρηση των καλλιιεργειών λάμβανε χώρα σε λυοφιλοποιητή (Heto, MAXI dry Iyo) για 10-12 ώρες (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Speedvac(Heto, MAXI dry Iyo)

2.7 Επιλογή μεθόδου παραγωγής των λιπαρών

Η παραγωγή των λιπαρών από τα μικροφύκοι είναι αρκετά σημαντικό κομμάτι των πειραμάτων που ακολουθήθηκαν, οι μέθοδοι για την παραγωγή των λιπαρών υπάρχουν αρκετές στην βιβλιογραφία. Κρίθηκε σκόπιμο να επιλέγουν τέσσερις μέθοδοι λόγω του ότι βγάζουν τα συνολικά λιπαρά από τα μικροφύκοι και της πιο συχνής τους αναφοράς από διαφορές επιστημονικές έρευνες που μελετούσαν παρόμοιο ή ίδιο αντικείμενο έρευνας. Οι μέθοδοι περιγράφονται και παρουσιάζονται παρακάτω αναλυτικά.

Μέθοδος Folch

Στην μέθοδος Folch η διαδικασία για την παραγωγή λιπαρών από ξηρή βιομάζα του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* γίνεται για 1g ξηρής βιομάζας προστίθεται $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ σε αναλογία 2:1, αντίστοιχα, δηλαδή για την ποσότητα της ξηρής βιομάζας οι ποσότητες θα είναι 14ml CHCl_3 και 7ml CH_3OH . Αφού έχουν προστεθεί στο δείγμα το αφήνουν σε συνεχή ανάδευση για 20min και μετά γίνεται φυγοκέντρηση στις 3000rpm 5min και κρατιέται η υπερκείμενη φάση. Μετά βάζουν 4ml από ένα ρυθμιστικό διάλυμα NaCl 0,9% διάλυμα που είχε κρατηθεί από τον παραπάνω χειρισμό και γίνεται για λίγα λεπτά vortex, και όλο αυτό το διάλυμα το βάζουν σε μια χοάνη, τα αφήνουν για μερικά λεπτά να γίνει ο σωστός διαχωρισμός των φάσεων. Τέλος μετά που θα έχει γίνει ο

διαχωρισμός κρατιέται η κάτω φάση, περιέχει τα λιπαρά και την ποσότητα του CHCl_3 , και είναι έτοιμο για εξάτμιση.(Iverson et al. 2001)

Μέθοδος Hara and Radin

Στην μέθοδο *Hara and Radin* η διαδικασία για την παραγωγή των λιπαρών είναι από 1g ξηρής βιομάζας του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* προστίθεται Hexane (C_6H_{14}) : Propanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) σε αναλογία 3:2, αντίστοιχα, και για τη ποσότητα της ξηρής βιομάζας η ποσότητες θα είναι 12ml C_6H_{14} και 8ml $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. Στην συνέχεια γίνεται για λίγα λεπτά vortex και μετά γίνεται η φυγοκέντριση στις 3000rpm για 5min. Μετά το τέλος της φυγοκέντρισης έχουν σχηματιστεί δύο φάσης, από τις οποίες αυτή που περιέχει τα λιπαρά είναι η πάνω φάση, ακολούθως γίνεται η εξάτμιση (Hara and Radin 1978).

Μέθοδος Bligh and Dyer

Στην μέθοδο του Bligh και Dyer η ακόλουθη διαδικασία για την παραγωγή των λιπαρών είναι για 1 g ξηρής βιομάζας του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* προστίθεται 1ml H_2O και γίνεται ομογενοποίηση. Στην συνέχεια $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ σε αναλογία 1:2 και ο συνολικός όγκος που θα προστεθεί θα είναι 3,75ml όποτε θα προστεθεί 1,25ml CHCl_3 και 2,5ml CH_3OH , γίνεται vortex για λίγα λεπτά και μετά συνεχής ανάδευση για 15min κατόπιν προστίθεται 1,25 CHCl_3 και γίνεται ανάδευση και μίξερ για ένα λεπτό, μετά προστίθεται 1,25 H_2O γίνεται ξανά ανάδευση και μίξερ για ένα λεπτό. Ακολούθως γίνεται φυγοκέντριση στις 3000rpm για 5min, σχηματίζονται φάσης στο δείγμα, με ένα σιφόνιο συλλέγεται η κάτω φάση. Μετά προσθέτουν 1,25ml από ένα ρυθμιστικό διάλυμα NaCl 1% στο διάλυμα που είχε κρατηθεί από τον παραπάνω χειρισμό και γίνεται για λίγα λεπτά vortex για ένα λεπτό, αυτό το βάζουν σε μια χοάνη και σε λίγα λεπτά υπάρχει διαχωρισμός φάσεων και κρατιέται η κάτω φάση, στην περιέχονται τα λιπαρά και είναι έτοιμο για εξάτμιση.(Bligh and Dyer 1959;Iverson et al. 2001)

Μέθοδος Fajardo και συνεργατών του

Στην μέθοδο του Fajardo για την εκχύλιση των λιπαρών είναι για 1g ξηρής βιομάζας του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* προστίθεται 5ml ethanol 96% γίνεται μια φυγοκέντριση στις 3000 rpm για 5 min και κρατιέται η κάτω φάση. Στην συνέχεια προστίθεται H_2O : hexane (C_6H_{14}) σε αναλογία 2:1, οι ποσότητες που θα προστεθούν θα είναι 6mL H_2O και 3mL C_6H_{14} γίνεται μια ανάδευση για 2-3 min και ακολούθως γίνεται μια φυγοκέντριση στις 3000 rpm για 5 min. Μετά το τέλος της φυγοκέντρισης τα λιπαρά

βρίσκονται στην φάση του hexane (C_6H_{14}), παίρνονται με μεγάλη προσοχή για να μην απορροφηθεί νερό, και τα λιπαρά είναι έτοιμα για εξάτμιση.

Από αυτές τις μεθόδους που μόλις περιγράφηκαν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος *Folch* με μια τροποποίηση, η οποία γίνεται για την καλύτερη και πιο αποτελεσματική διεξαγωγή των λιπαρών από τα κύτταρα. Όπως περιγραφή η μέθοδος γίνεται ανάδευση της βιομάζας για 20min αλλά μετά που θα προσθέτονται νέες ποσότητες $CHCl_3:CH_3OH$ γίνεται χρήση υπερήχων(sonication) για άλλα 20min. Όποτε γινόταν εναλλάξ η διαδικασίες μια φορά ανάδευση και την άλλη φορά χρήση υπερήχων, μέχρι να απομυζηθούν όσο δυνατόν περισσότερα λιπαρές ουσίες. Αν και με τις συνεχής επανάληψης της μεθόδου διαπιστώθηκε ότι αρκούν τέσσερις επανάληψης δηλαδή δυο φορές με ανάδευση και δυο φορές με υπερήχους, εναλλάξ πάντα. (Fajardo et al. 2007)

2.8 Μέθοδος εκχύλισης λιπαρών

Για την εκχύλιση λιπαρών οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν (5min στα 1500g) και στην συνέχεια λυοφιλοποιήθηκαν για περίπου 10-12 ώρες. Το ξηρό βάρος κάθε δείγματος ζυγίστηκε και προστέθηκαν οι ανάλογες ποσότητες χλωροφόρμιου και μεθανόλης για την εκχύλιση των λιπαρών ουσιών. Η αναλογία για 1g ξηρής βιομάζας μικροφυκών προστίθενται 2ml $CHCl_3$ και 1ml CH_3OH . ομογενοποιήθηκε το δείγμα με την χρήση ειδικού μίξερ (ULTRA TURRAX T25, IKA LABORTECHNIK) για μερικά λεπτά για το κάθε δείγμα. Το ομογενοποιημένο δείγμα παρέμεινε σε συνεχή ανάδευση για 20min, μετά φυγοκεντρίθηκε για 5min στις 1500g και κρατήθηκε το υπερκείμενο. προστέθηκε ξανά η ίδια αναλογία $CHCl_3$ και CH_3OH που είχε υπολογιστεί αρχικά για το κάθε δείγμα. Ακολούθως αναδεύτηκε στο μίξερ λίγα λεπτά και μετά τοποθετήθηκε για 20min σε υπερήχους για καλύτερο σπάσιμο των κυττάρων. Από την φυγοκέντρωση που ακολούθησε (5min στις 1500g) κρατήθηκε το υπερκείμενο. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για ακόμη μια φορά. Μετά το τέλος της διαδικασίας τα λιπαρά που έχουν κρατηθεί (μετά από κάθε φυγοκέντρωση) από κάθε δείγμα τοποθετούνται σε μια διαχωριστική χοάνη και με την προσθήκη NaCl 1% (v/v) σε αναλογία 2mL ανά g ξηρής βιομάζας του κάθε δείγματος, υπάρχει διαχωρισμός φάσεων. Η κάτω φάση που είναι τα λιπαρά με το χλωροφόρμιο αποσπάται με μεγάλη προσοχή και θα εξατμιστεί στην συνέχεια τα υπολείμματα του οργανικού διαλύτη.



Εικόνα 20:
ULTRA
TURRAX T25
basic IKA
LABORTECHNIK

2.10 Μέτρηση Αμύλου

Για τις μετρήσεις αμύλου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος anthrone (Jermyn 1963). Σε 25μl δείγματος και 975μl H₂O, προστέθηκαν 2mL H₂SO₄ και 0,004g Anthrone (C₁₄H₁₀O). Στη συνέχεια αφού το δείγμα αναδευτεί μετράται στο φωτόμετρο (Mikropack DH-2000-BAL UV-VIS-NIR LIGHTSOURCE) στα 630nm. Για την ποσοτική εκτίμηση των μετρήσεων ετοιμάστηκε καμπύλη αναφοράς.

2.11 Μέθοδος Πρωτεϊνών (Bradford)

Στην μέθοδο για την μέτρηση των πρωτεϊνών επονομαζόμενη και Bradford τα δείγματα μετρούνται στο φωτόμετρο (Olennikov and Tankhaeva 2006). Αρχικά παρασκευάζετε ένα διάλυμα που θα περιέχει 100mg από την χρωστική Coomasie Brilliant Blue G250, 50mL αιθανόλης CH₃CH₂OH 95% και 100 mL φωσφορικού οξέος H₃PO₄ 85%, το διάλυμα το ονομάζουμε stock.

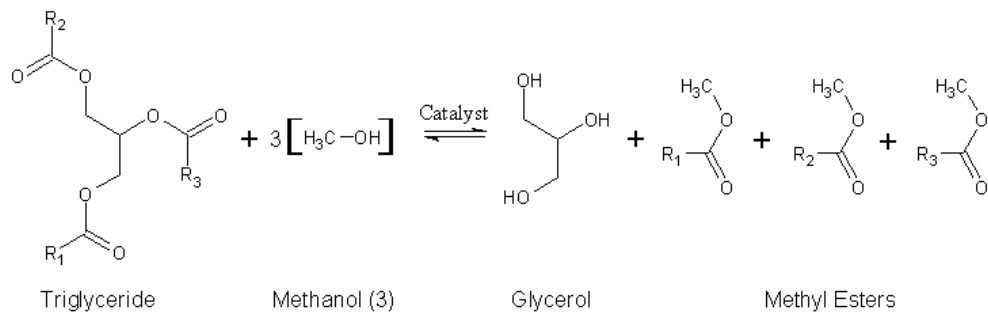
Για να γίνουν οι μετρήσεις προσθέτουμε από κάθε δείγμα 20 mg, 780 mg H₂O και 200 mg από το stock διάλυμα, που προετοιμάστηκε παραπάνω, αυτό θα έχει συνολικό όγκο 1 mL, θα γίνει καλή ανάδευση και είναι έτοιμο για μέτρηση.

Οι μετρήσεις έγιναν στο φωτόμετρο (Mikropack DH-2000-BAL UV-VIS-NIR LIGHTSOURCE) στο ορατό φως και παίρνονται οι τιμές που δίνει το φάσμα στ 595nm και το δείγμα τοποθετείτε σε μια κυψελίδα quartz του μισού εκατοστού θα προστεθεί με μια παστέ μέσα σε αυτήν.

[<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bradford.html>]

2.12 Μέθοδος παρασκευής Βιοντίζελ

Για την παραγωγή του βιοντίζελ κάποια ποσότητα (4mL) των λιπαρών ουσιών που εκχυλίστηκε από τις καλλιέργειες των μικροφυκών θερμίνεται στους 55°C. Ετοιμάζεται διάλυμα 12 mL μεθανόλης και 125 mg NaOH, αναδεύεται μέχρι δηλαδή να διαλυθεί καλά και στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα (Μεθοξείδιο) σιγά σιγά στο ζεστό δείγμα λιπαρών και αναδεύεται για 3h έτσι ώστε να γίνει η αντίδραση της εστεροποίησης (Chisti 2007).



Μετά αφήνεται το διάλυμα να ηρεμήσει και αμέσως αρχίζει να διαφαίνεται ο διαχωρισμός των φάσεων (ολοκληρώνεται μετά από 10-12 ώρες), όπου στην κάτω φάση καταλήγει η γλυκερίνη, και στο υπερκείμενο είναι το βιοντίζελ. Παίρνεται το υπερκείμενο που είναι το βιοντίζελ με μεγάλη προσοχή και πλένεται με 5% νερό. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι το βιοντίζελ γίνει αρκετά διαυγές. Η διαύγεια του δείγματος αποτελεί ένα από τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του βιοντίζελ. Κάποια άλλα ποιοτικά χαρακτηριστικά είναι το pH του που πρέπει να είναι ουδέτερο (pH 7), ο πλήρης διαχωρισμός του από το νερό και η μυρωδιά του (δηλαδή να μην μυρίζει αλκοόλη αλλά σαν την μυρωδιά κάποιου σπορέλαιου)(Hossain et al. 2008).

3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1.Επιλογή μεθόδου εκχύλισης λιπαρών από μικροφύκη

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εύρεση των καλύτερων δυνατών συνθηκών καλλιέργειας του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* για τη μέγιστη συγκέντρωση λιπαρών ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοντίζελ. Με δεδομένο τα παραπάνω, προϋπόθεση οποιασδήποτε πειραματικής προσέγγισης είναι η εύρεση της κατάλληλης εκείνης μεθοδολογίας που θα μας επιτρέψει τη μέγιστη δυνατή εκχύλιση λιπαρών από τα κύτταρα του μικροφύκου. Επιλέχθηκαν τέσσερις μέθοδοι εκχύλισης λιπαρών και έγινε συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων τους.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη συγκριτική μελέτη είναι οι παρακάτω:

3.1.1. Μέθοδος Folch.

Στη μέθοδο Folch (Iverson et al. 2001) η διαδικασία για την εκχύλιση λιπαρών από ξηρή βιομάζα του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* γίνεται με 1g ξηρής βιομάζας στην οποία προστίθεται $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ σε αναλογία 2:1, σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται διεξοδικά στα «Υλικά και Μεθόδους».

3.1.2. Μέθοδος των Hara and Radin.

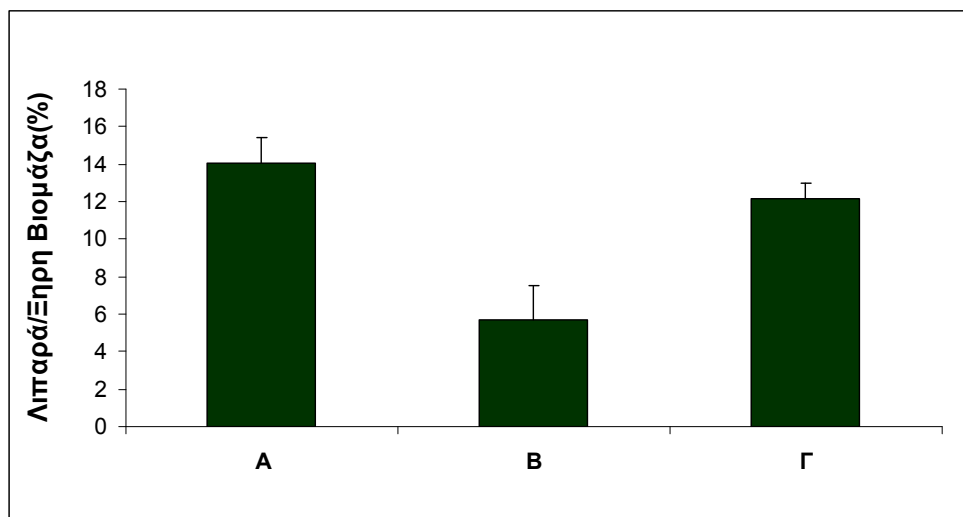
Στην μέθοδο *Hara and Radin* (Hara and Radin 1978) η διαδικασία για την παραγωγή των λιπαρών ξεκινά από 1g ξηρής βιομάζας του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* και προστίθεται εξάνιο (C_6H_{14}) και προπανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) σε αναλογία 3:2, αντίστοιχα. Στην συνέχεια αναδεύεται για λίγα λεπτά και μετά φυγοκεντρείται στα 1500g για 5min. Μετά το τέλος της φυγοκέντρισης έχουν σχηματιστεί δύο φάσεις, από τις οποίες αυτή που περιέχει τα λιπαρά είναι η πάνω φάση. Συλλέγεται η πάνω φάση και εξατμίζονται οι οργανικοί διαλύτες.

3.1.3. Μέθοδος των Bligh and Dyer

Στην μέθοδο των Bligh και Dyer (Bligh and Dyer 1959) η ακόλουθη διαδικασία για την παραγωγή των λιπαρών ξεκινά και αυτή από 1g ξηρής βιομάζας του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* προστίθεται 1mL H_2O και γίνεται ομογενοποίηση. Στην συνέχεια προστίθενται χλωροφόρμιο (CHCl_3) και μεθανόλη (CH_3OH) σε αναλογία 1:2, αναδεύεται για λίγα λεπτά, ομογενοποιείται και φυγοκεντρείται σχηματίζοντας 2 φάσεις. Συλλέγεται η κάτω φάση, αναδεύεται με NaCl 1% και επανασυλλέγεται η κάτω φάση που περιέχει τα λιπαρά εξατμιστούν τα υπόλοιπα των οργανικών διαλυτών.

3.1.4. Μέθοδος των Fajardo και συνεργατών του

Στην μέθοδο του Fajardo (Fajardo et al. 2007) για την εκχύλιση των λιπαρών χρησιμοποιείται 1g ξηρής βιομάζας του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* προστίθενται 5mL αιθανόλης 96%, φυγοκεντρείται και συλλέγεται η κάτω φάση. Στη συνέχεια προστίθεται H₂O και εξάνιο (C₆H₁₄) σε αναλογία 2:1, γίνεται μια ανάδευση για 2-3 λεπτά και φυγοκέντριση. Τα λιπαρά βρίσκονται στην φάση του εξανίου, απομακρύνονται με προσοχή και είναι έτοιμα για εξάτμιση των οργανικών διαλυτών.

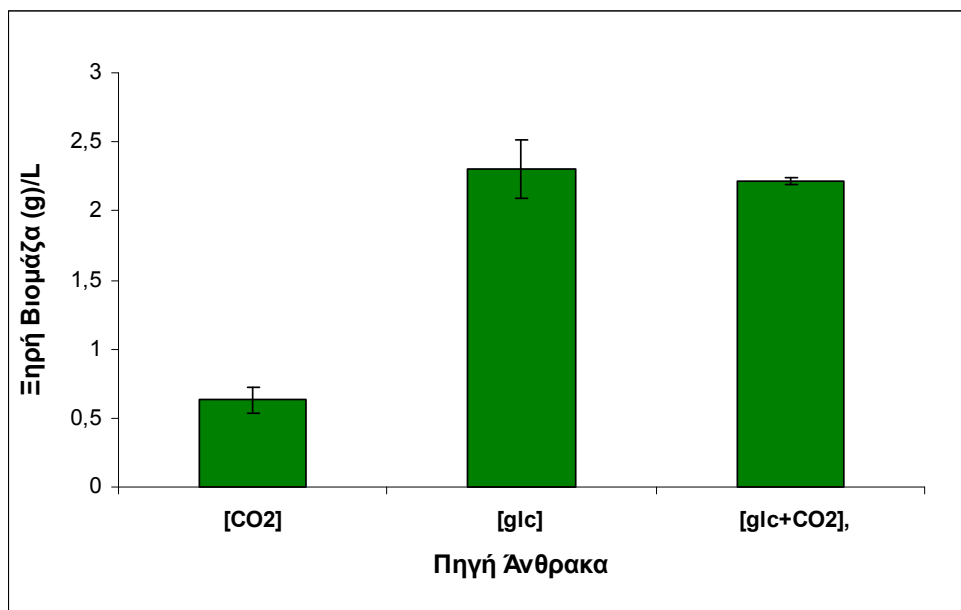


Εικόνα 21: Ποσοστό λιπαρών (ως προς την ξηρή βιομάζα) που εκχυλίστηκαν από ξηρή βιομάζα του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* σύμφωνα με τις μεθόδους εκχύλισης των Α) Folch, Β) Hara and Radin και Γ) Bligh and Dyer.

Η συγκριτική μελέτη των τεσσάρων παραπάνω μεθόδων έδειξε ξεκάθαρα ότι η μέθοδος *Folch* είναι αυτή που εκχυλίζει τα περισσότερα λιπαρά, ακολουθεί, όσον αφορά την αποτελεσματικότητά της, η μέθοδος των *Bligh and Dyer* και έπειτα η μέθοδος των *Hara and Radin* (Εικόνα 21). Η μέθοδος *Fajardo* δεν παρουσιάζεται στην Εικόνα 21 διότι κατά την εκτέλεση της αντιμετωπίστηκαν κάποια τεχνικά προβλήματα που δεν μας επέτρεψε να έχουμε αποτελέσματα, αφού η προσθήκη του νερού δεν επέτρεπε τον διαχωρισμό των φάσεων. Η μέθοδος *Folch* θα χρησιμοποιηθεί στις περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες με κάποιες μικρές τροποποιήσεις, όπως περιγράφεται και στα «Υλικά και Μεθόδους» με την επιπλέον χρήση και υπερήχων για την καλύτερη εκχύλιση των λιπαρών.

3.2. Συγκριτική μελέτη διαφορετικών τρόπων καλλιέργειας του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*

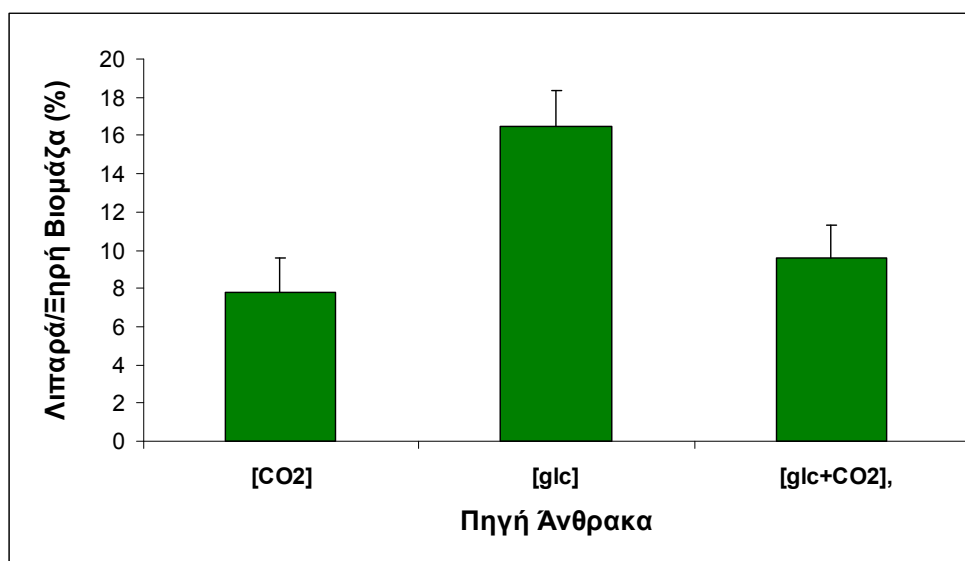
Στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε αρχικά καλλιεργήθηκε το φύκος σε διαφορετικές καταστάσεις από τις οποίες διαπιστώθηκε ποια είναι η ιδανικότερη και αποδοτικότερη για να παράγει τα περισσότερα λιπαρά. Οι χειρισμοί που εφαρμόστηκαν σε διαφορετικές καλλιέργειες είναι α) η αυτότροφη καλλιέργεια [limit C], β) αυτότροφη καλλιέργεια με συνεχή προσθήκη αέρα (0,034% CO₂) [CO₂], γ) μικτότροφη καλλιέργεια εμπλουτισμένη με 5 g/L γλυκόζη [glc] και δ) μικτότροφη εμπλουτισμένη με γλυκόζη με επιπλέον συνεχή παροχή αέρα (0,034% CO₂) [glc+CO₂]. Αυτοί οι χειρισμοί αναπτύχθηκαν σε ίδιες συνθήκες, δηλαδή είχαν σταθερή θερμοκρασία γύρω στους 30°C, ενώ ο φωτισμός ήταν (50-60 μmol/m²/s). Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε μέσο καλλιέργειας (Bishop and Senger 1971), για 5 ημέρες και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ως μητρικές καλλιέργειες για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.



Εικόνα 22: Ξηρή βιομάζα του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* ανά λίτρο καλλιέργειας σε διαφορετικούς χειρισμούς: α) Αυτότροφη καλλιέργεια με προσθήκη αέρα (0,034% CO₂) [CO₂], β) μικτότροφη (εμπλουτισμένη με γλυκόζη) [glc] και γ) μικτότροφη εμπλουτισμένη με γλυκόζη και με επιπλέον συνεχή παροχή αέρα (0,034 %CO₂) [glc+CO₂].

Τα αποτελέσματα από τις πειραματικές προσεγγίσεις με τους τέσσερις χειρισμούς, όπως αυτά παρουσιάζονται στην Εικόνα 22, δείχνουν ξεκάθαρα ότι ο χειρισμός [glc] που περιείχε μόνο γλυκόζη έδωσε τη περισσότερη βιομάζα με μικρή διαφορά από το χειρισμό [glc+CO₂] που περιείχε γλυκόζη και CO₂. Το ενδιαφέρον των αποτελεσμάτων αυτών εστιάζεται στο ότι ο βέλτιστος, όσον αφορά τη βιομάζα χειρισμός [glc] παράγει και τα περισσότερα λιπαρά (Εικόνα 23).

Ο χειρισμός με την αυτότροφη καλλιέργεια [limit C] παρουσίασε κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες εξαιρετικά χαμηλές τιμές ξηρής βιομάζας και ως εκ τούτου μη επαναλήψιμες μετρήσεις στη ποσότητα των λιπαρών, οπότε θεωρήθηκε σκόπιμο να μην παρουσιαστούν καθόλου στα αποτελέσματα των Εικόνων 22 & 23

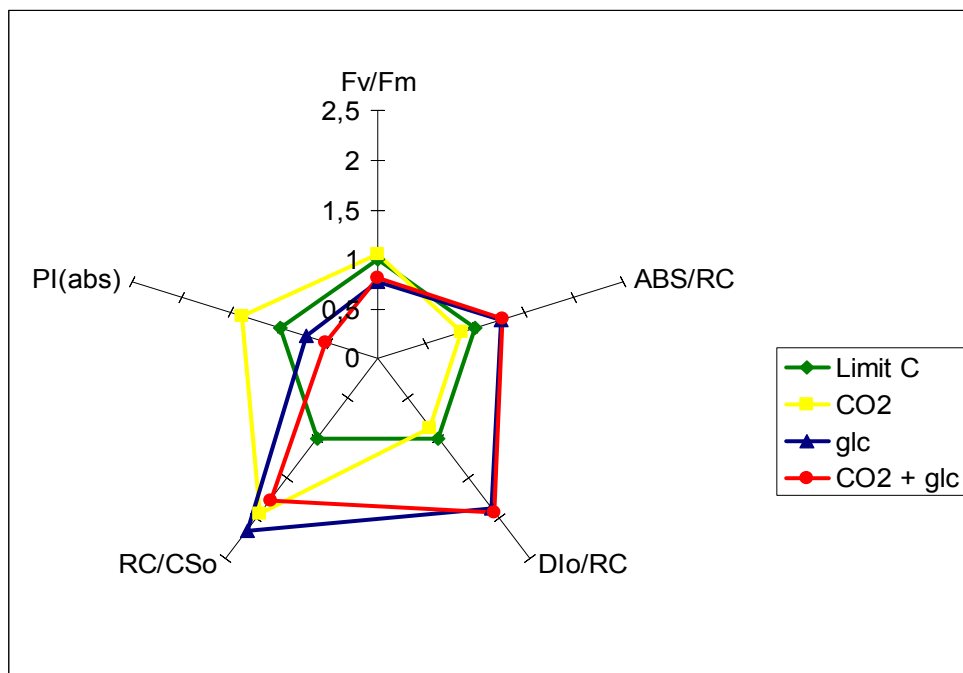


Εικόνα 23: Περιεκτικότητα των κυττάρων σε λιπαρά ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας τους σε διαφορετικούς χειρισμούς: α) Αυτότροφη καλλιέργεια με προσθήκη αέρα 0,034% CO₂ [CO₂], β) μικτότροφη (εμπλουτισμένη με γλυκόζη) [glc] και γ) μικτότροφη εμπλουτισμένη με γλυκόζη και με επιπλέον συνεχή παροχή αέρα (0,034% CO₂) [glc+CO₂],

Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραματικών προσεγγίσεων βρίσκονται σε συμφωνία με πρόσφατες μελέτες που έχουν γίνει και σε άλλα είδη μικροφυκών όπως η *Chlorella protothecoides*, όπου έχει αποδειχθεί ότι με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα συσσωρεύουν υψηλά ποσοστά λιπιδίων τα οποία είναι κατάλληλα για παραγωγή βιοντίζελ (Gao et al. 2010). Μάλιστα βρέθηκε πως το ποσοστό των λιπαρών αυξάνει ως και τέσσερις φορές στις ετερότροφες καλλιέργειες σε σχέση με τις αυτότροφες. Διότι κατά την ετεροτροφική ανάπτυξη της *Chlorella protothecoides* είχε ως αποτέλεσμα να εξαφάνιση σχεδόν τις χλωροφύλλες κύτταρα και να συσσωρευση λιπίδια υψηλής περιεκτικότητας (Miao and Wu 2006).

Η επίδραση του διοξειδίου του άνθρακα στην βιοχημική σύσταση κάποιων μικροφύκων φαίνεται να αυξάνει την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες όπως έχει παρατηρηθεί στο φύκος *Chaetoceros calcitrans*. Τα λιπίδια και οι υδατάνθρακες, από την άλλη πλευρά, δεν φαίνεται να επηρεάζονται ιδιαίτερα από τον εμπλουτισμό των καλλιέργειών σε CO₂. Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι το πλεόνασμα του CO₂ βοηθάει κυρίως τη πρωτεϊνική σύνθεση υποδηλώνοντας έτσι την θετική επίδραση που έχει στη φυσιολογία των κυττάρων και πιθανόν να μην ωφελεί ιδιαίτερα στην βιοσύνθεση λιπιδίων και υδατανθράκων (Brown et al., 1997). Αυτό άλλωστε αιτιολογεί τα χαμηλότερα επίπεδα λιπιδίων στον συνδυαστικό χειρισμό [glc+CO₂] σε σχέση με τον αντίστοιχο [glc] (Εικόνα 23).

Για να μπορέσει να διαπιστωθεί κατά πόσο οι συνθήκες καλλιέργειας επηρεάζουν τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό και κατ'επέκταση την ενεργειακή ομοιοστασία του κυττάρου και επομένως έμμεσα τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των μικροφυκών, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού (OJIP-test) όλων των χειρισμών κατά την πέμπτη ημέρα καλλιέργειας τους. Για το λόγο αυτό παρουσιάζονται συγκριτικά σειρά παραμέτρων που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (για διευκρινίσεις βλ. Υλικά και Μεθόδους) (Εικόνα 24).



Εικόνα 24: Συγκριτική παρουσίαση σειράς παραμέτρων που προκύπτουν από μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού (OJIP-test) και αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού από μικροφύκη που αναπτύχθηκαν για 5 ημέρες σε (πράσινο) αυτότροφη καλλιέργεια [limit C], (κίτρινο) αυτότροφη καλλιέργεια με προσθήκη αέρα (0,034% CO₂) [CO₂], (μπλέ) μικτότροφη εμπλουτισμένη με γλυκόζη [glc] και (κόκκινο) μικτότροφη εμπλουτισμένη με επιπλέον συνεχή παροχή αέρα (0,036 % CO₂) [glc+CO₂].

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του επαγωγικού φθορισμού, όπως αυτά παρουσιάζονται στην Εικόνα 24 δείχνουν ότι οι μικτότροφες καλλιέργειες [glc] και [glc+CO₂] φαίνεται να έχουν μια αυξημένη διαχεόμενη ενεργεία ανά κέντρο αντίδρασης (DIO/RC), στο μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC) δεν παρουσιάζεται αισθητή διαφορά ενώ εμφανίζεται αύξηση στην πυκνότητα των ενεργών κέντρων όλων των χειρισμών σε σχέση πάντα με την καλλιέργεια μάρτυρα [limit C]. Την καλύτερη φωτοσυνθετική επίδοση ανα απορροφώμενη ενέργεια [PI_(ABS)] την είχε ο χειρισμός με το CO₂ [CO₂], ενώ η φωτοσυνθετική απόδοση (Fv/Fm) σε όλους τους χειρισμούς είναι αρκετά καλή.

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω Εικόνες επειδή η γλυκόζη ως πηγή άνθρακα είναι πολύ πιο αποτελεσματική στην παράγωγη βιομάζας και λιπαρών από το CO₂ αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί αυτός ο χειρισμός [glc] για τα ακόλουθα πειράματα αριστοποίησης της παραγωγής των λιπαρών και του βιοντίζελ.

3.3. Επίδραση αβιοτικής καταπόνησης στη σύνθεση λιπαρών ουσιών

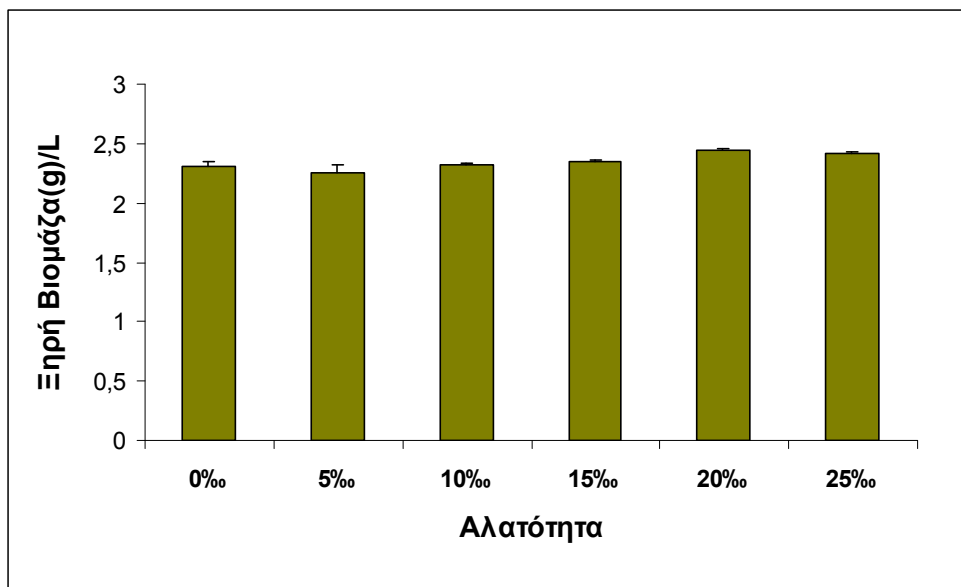
Είναι γνωστό από τη διεθνή βιβλιογραφία ότι η αβιοτική καταπόνηση αλλάζει τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και ως εκ τούτου την ενεργειακή ομοιότητα του κυττάρου (Lütz et al., 2006; Sfichi et al., 2008) με πιθανές διαφοροποιήσεις στα διάφορα βιοχημικά του μονοπάτια. Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε η επίδραση τριών αβιοτικών παραγόντων, της αλατότητας, της θερμοκρασίας και του φωτισμού στη σύνθεση λιπαρών ουσιών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την παραγωγή βιοντίζελ.

3.3.1 Επίδραση αλατότητας

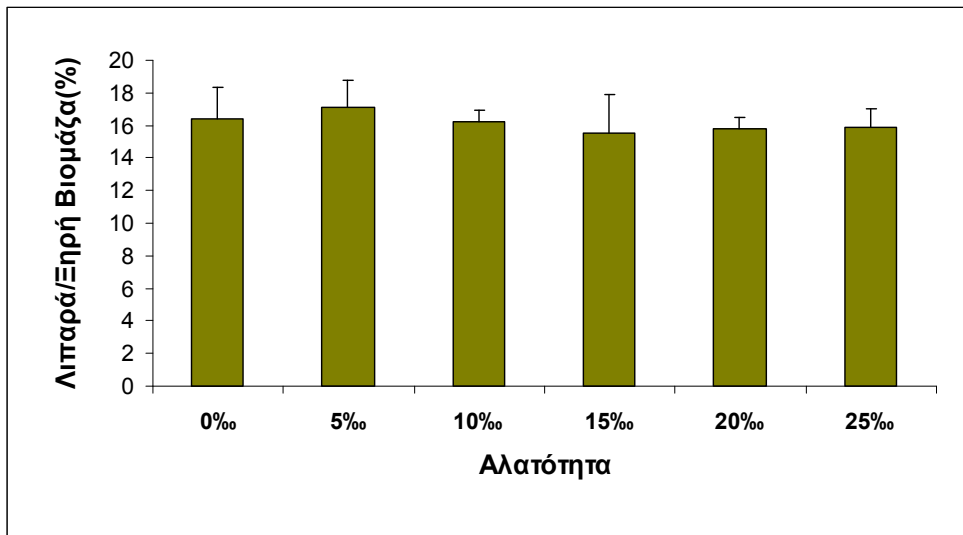
Σε αυτή την πειραματική προσέγγιση, μικτότροφες καλλιέργειες [glc] του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (0g/L, 5g/L, 10g/L, 15g/L, 20g/L και 25g/L) σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας και φωτισμού. Σε αυτές τις συνθήκες μετρήθηκε η παραγωγή βιομάζας και η ποσότητα λιπαρών, ενώ καταγράφηκαν οι διαφοροποιήσεις στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Είναι γνωστό ότι η παραγωγή των λιπιδίων των μικροφυκών ρυθμίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Harwood and Jones 1989). Ένας από τους παράγοντες που

επιρεάζουν την περιεκτικότητα σε λιπίδια των φυκών προκαλώντας αύξηση της είναι η αλατότητα. Έτσι στα *Isochrysis* sp. και *Nannochloropsis oculata*, αυξημένη αλατότητα οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού και των λιπιδίων τους (Renaud and Parry, 1994). Ωστόσο, τα στοιχεία για την επίδραση του χλωριούχου νατρίου στο *Botryococcus braunii* είναι αντιφατικά, πιθανώς λόγω της ιδιαιτερότητας αυτού του στελέχους διότι με την παρουσία NaCl μεσοπρόθεσμα αναστέλλεται η ανάπτυξη των κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προκαλέσει σημαντικές αλλαγές στο προφίλ λιπαρών οξέων των λιπιδίων καθώς η παρουσία 0,3M και 0,7 M NaCl στο θρεπτικό μέσο αναστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη των κυττάρων κατά τις πρώτες μέρες καλλιέργειας (Zhila et al. 2010).

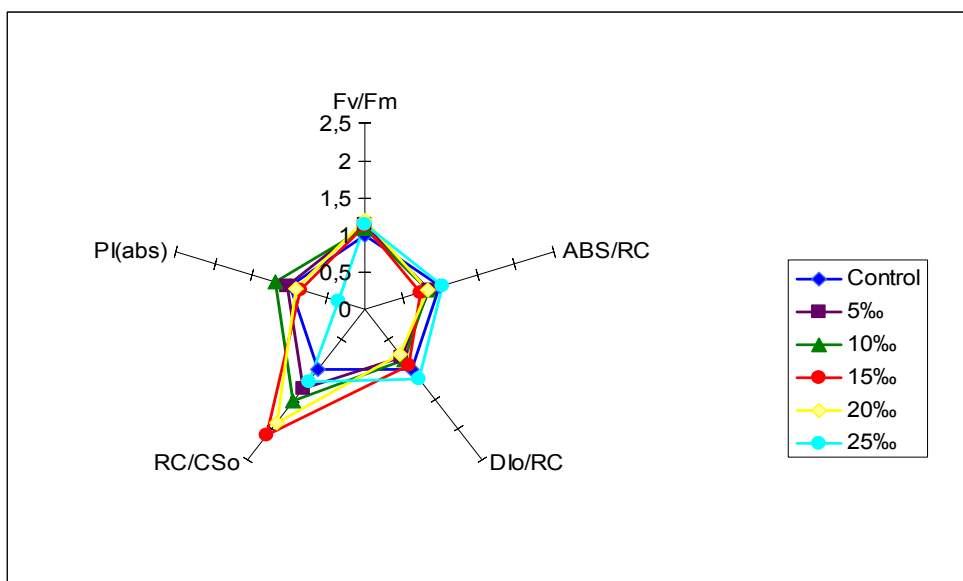


Εικόνα 25: Ξηρή βιομάζα ανά λίτρο καλλιέργειας του φύκου *Scenedesmus obliquus* σε χειρισμούς με διαφορετική συγκέντρωση NaCl 0‰, 5‰, 10‰, 15‰, 20‰ και 25‰.



Εικόνα 26: Η ποσότητα των λιπαρών εκφρασμένη ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας καλλιεργειών του φύκου *Scenedesmus obliquus* σε χειρισμούς με διαφορετική συγκέντρωση NaCl 0‰, 5‰, 10‰, 15‰, 20‰ και 25‰.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 25 οι διαφορές στη βιομάζα (για το χρονικό διάστημα των 5 ημερών που διαρκεί το πείραμα) αρχίζουν να αυξάνονται όσο αυξάνεται το ποσοστό της αλατότητας με μια αύξηση στο μεγαλύτερο ποσοστό των 25‰ σε NaCl. Σύμφωνα όμως με την Εικόνα 26, οι ποσότητες των λιπαρών σε επίπεδο κυττάρου δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές σε σχέση με την καλλιέργεια μάρτυρα (0‰ NaCl).



Εικόνα 27 : Συγκριτική παρουσίαση σειράς παραμέτρων που προκύπτουν από μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού (OJIP-test) και αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού από μικροφύκη που αναπτύχθηκαν για 5 ημέρες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (0-25‰).

Από τα αποτελέσματα της Εικόνας 27 προκύπτει πως, κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες, η αλατότητα επηρεάζει την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αυξάνοντάς την μέχρι το 15‰ NaCl. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αλατότητας φαίνεται η παραπάνω τάση να αντιστρέφεται και να αυξάνεται το μέγεθος της λειτουργικής κεραίας (ABS/RC) και η μη φωτοχημική διάχυση της ενέργειας (DIO/RC). Όσον αφορά τους υπολοίπους συντελεστές δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των χειρισμών με εξαίρεση το PI(abs) που μειώνεται αισθητά με την αύξηση της αλατότητας και ιδιαίτερα στην συγκέντρωση των 25‰ NaCl.

Τα παραπάνω αποτελέσματα της παρούσας εργασίας που προέκυψαν από μικτότροφες καλλιέργειες εμφανίζουν χαρακτηριστικά μεγαλύτερης ανθεκτικότητας από αντίστοιχες αυτότροφες καλλιέργειες του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* (Parazi et al. 2009), αλλά επιβεβαιώνουν και την γενική τάση των αλλαγών που λαμβάνουν χώρα στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, όπως αυτές παρουσιάζονται στην Εικόνα 27, οι οποίες συνολικά επισημαίνουν την αυξανόμενη πίεση διέγερσης του φωτοσυστήματος II με την αύξηση της αλατότητας που στη συνέχεια με τη σειρά του επηρεάζει όλες τις επιμέρους δομικές και λειτουργικές αλλαγές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Dernetriou et al. 2007).

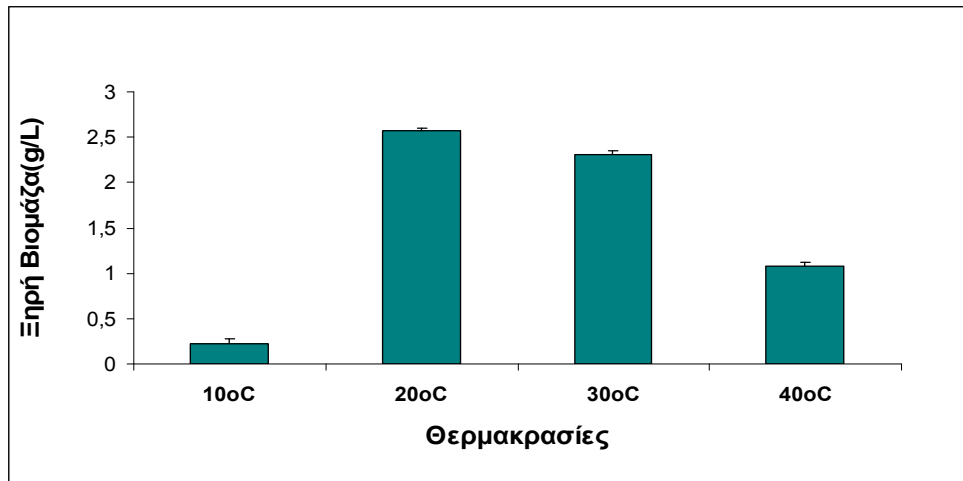
Η αλατότητα όπως υποστηρίζουν και άλλες επιστημονικές έρευνες δεν έχει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη, στην μέγιστη κυτταρική πυκνότητα, στη βιομάζα και στη συγκέντρωση των χλωροφυλλών (Zhila et al. 2010). Βεβαία παρουσιάζεται μια μικρή τάση αύξησης της βιομάζας όσο αυξάνεται η αλατότητα (Mohapatra et al. 1998). Στα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας (Εικόνα 25), η ανάπτυξη της βιομάζας έως το 20‰ NaCl, είναι σημαντική, πιθανόν λόγω των μικτότροφων συνθηκών καλλιέργειας. Αυτή η αντίθεση που παρουσιάζεται ανάμεσα στον υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης και στη χαμηλότερη μέγιστη πυκνότητα των κυττάρων θα μπορούσε να εξηγηθεί κυρίως από τις βιοενεργητικές αλλαγές που επάγονται σε σχετικά μέτριες συγκεντρώσεις άλατος (έως 20‰ NaCl). Η αύξηση (σε σχέση με τον μάρτυρα) της συγκέντρωσης των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CS_o) και η μείωση της μη φωτοχημικής απόσβεσης (DIO/RC) της δεσμευμένης ενέργειας, οδηγεί σε ένα φωτοσυνθετικό μηχανισμό με αυξημένη φωτοχημική απόσβεση που οδηγεί σε κύτταρα με αυξημένο ενεργειακό δυναμικό που μπορεί να «επενδυθεί» στην ανάπτυξη.

Γίνεται λοιπόν αντιληπτό μετά από αυτά που περιγράφηκαν παραπάνω (Εικόνα 26) ότι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις του αλατιού δεν επηρεάζουν πάντα την

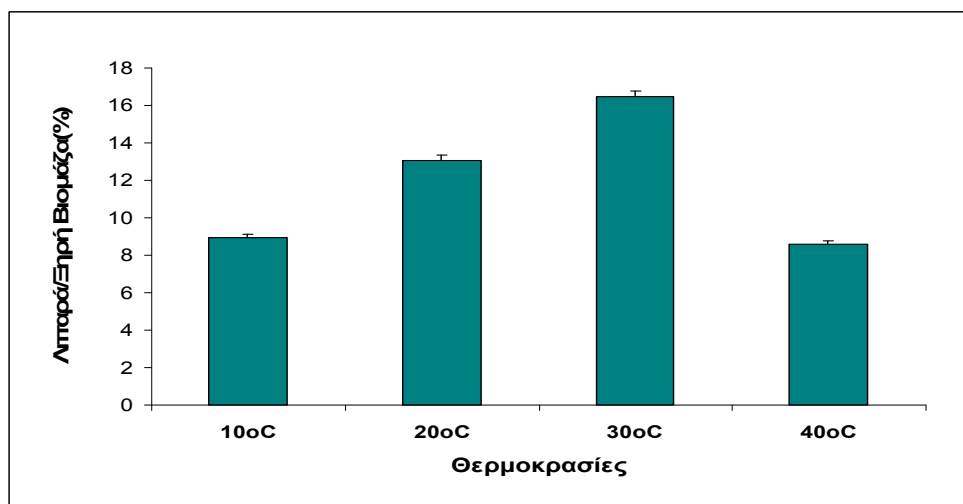
συγκέντρωση των λιπαρών ουσιών (ακόμη και σε επίπεδο καλλιέργειας) σε πολύ μεγάλο βαθμό. Για το λόγο αυτό θα εξεταστούν και άλλοι παράγοντες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αύξηση παραγωγής λιπαρών.

3.3.2 Επίδραση Θερμοκρασίας

Σε αυτή την πειραματική προσέγγιση το μικροφύκος αναπτύχθηκε μιστότροφα (χειρισμός [glc]) σε διαφορετικές θερμοκρασίες οι οποίες ήταν ίσες με 10 °C, 20 °C, 30 °C και 40 °C ενώ όλοι οι άλλοι παράμετροι για την ανάπτυξη του φύκου παρέμειναν σταθεροί.



Εικόνα 28: Ξηρή βιομάζα του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* ανά λίτρο καλλιέργειας σε χειρισμό με διαφορετικές θερμοκρασίες 10 °C, 20 °C, 30 °C και 40 °C.



Εικόνα 29: Η ποσότητα των λιπαρών εκφρασμένη ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας καλλιεργειών του φύκου *Scenedesmus obliquus* σε χειρισμό με διαφορετική θερμοκρασία, 10°C, 20°C, 30°C και 40°C.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 28 η βιομάζα είναι σημαντικά περισσότερη στους 20 και τους 30°C, πολύ λιγότερη στους 40°C και ακόμα πιο λίγη στους 10°C. Στην ποσοτικοποίηση των λιπαρών ουσιών φαίνεται ότι στους 30°C υπάρχει καλύτερη απόδοση σε λιπαρά από ότι στις υπόλοιπες θερμοκρασίες (Εικόνα 29).

Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό αύξησης των μικροφυκών έχει παρατηρηθεί σε πολλά άλλα είδη, όπως το *Chaetoceros pseudocurvisetus*, *Skeletonema hantzschii*, *Skeletonema costatum*, που εμφανίζουν μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 25°C (Yoshihiro and Takahashi, 1995). Για το *Chaetoceros* sp. το υψηλότερο ποσοστό ανάπτυξης που βρέθηκε ήταν στο εύρος 25 - 30°C θερμοκρασίας (Renaud et al., 2002). Οι Fogg και Thake (1987) αναφέρουν ότι ένας χαμηλότερος ρυθμός ανάπτυξης σε υψηλές θερμοκρασίες στα μικροφύκη θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της αύξησης στην αναπνοή λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας πάνω από το βέλτιστο επίπεδο του είδους αυτού.

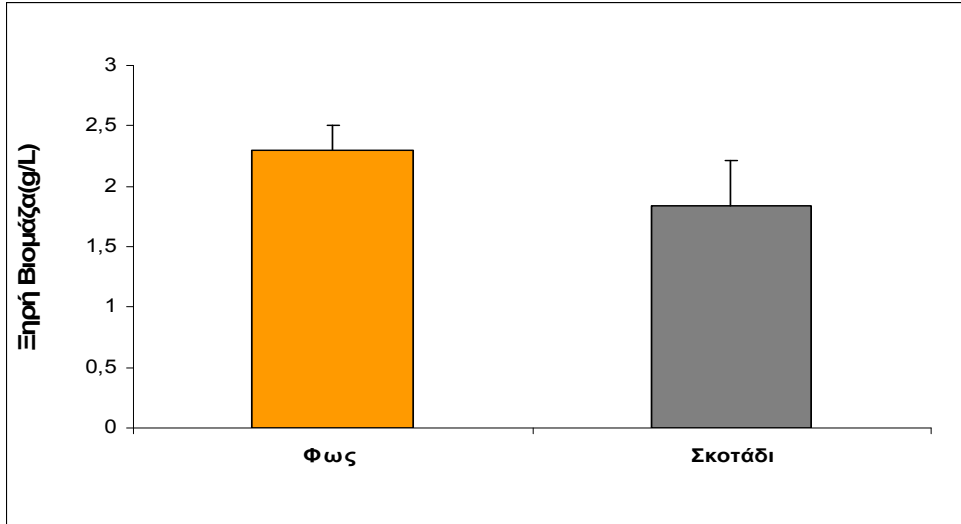
Σε καλλιέργειες του μικροφύκου *Synechococcus lividus* διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε χαμηλότερη θερμοκρασία από τους 25°C παρουσιάζουν σε γενικές γραμμές αύξηση στα λιπίδια και σε όλες τις κατηγορίες των λιπαρών (Fork 1979). Αντίθετα βρέθηκε ότι ανάμεσα στις θερμοκρασίες των 30 °C και 15°C τα λιπίδια αυξάνονται περισσότερο στους 30°C ανεξάρτητα από την φάση ανάπτυξης που βρίσκονται τα μικροφύκη (Converti et al. 2009). Η σύνθεση των λιπιδίων στο φύκος *Botryococcus* μελετήθηκε σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (18°C, 25°C και 32°C). Στην καλλιέργεια που ήταν στους 32°C βρέθηκε ότι αναστέλλεται σημαντικά η σύνθεση όλων σχεδόν των ενδοκυτταρικών λιπιδίων, εκτός από τα τριγλυκερίδια. Τα λιπίδια ήταν πολύ χαμηλότερα στους 18°C από ό, τι στους 32°C και στους 25°C που θεωρήθηκε και ιδανικότερη θερμοκρασία για το συγκεκριμένο φύκος. Ταυτόχρονα διαπιστώθηκε ότι η σύνθεση των λιπαρών οξέων του φύκου *Botryococcus* επηρεάζονται ελάχιστα από τη θερμοκρασία της καλλιέργειας (Zhila et al. 2010).

Παρά τη σχετική ασάφεια των αποτελεσμάτων της διεθνούς βιβλιογραφίας που αφορούν την επίδραση της θερμοκρασίας στη σύνθεση λιπαρών, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν σαφέστατες διαφορές, σε συνάρτηση με την θερμοκρασία ανάπτυξης, στην ανάπτυξη των μικροφυκών (βιομάζα) και στην περιεκτικότητά τους σε λιπαρά (Εικόνα 28 & 29). Γίνεται λοιπόν αντιληπτό μετά από αυτά που περιγράφηκαν παραπάνω ότι η θερμοκρασία των 30°C στις μικτότροφες

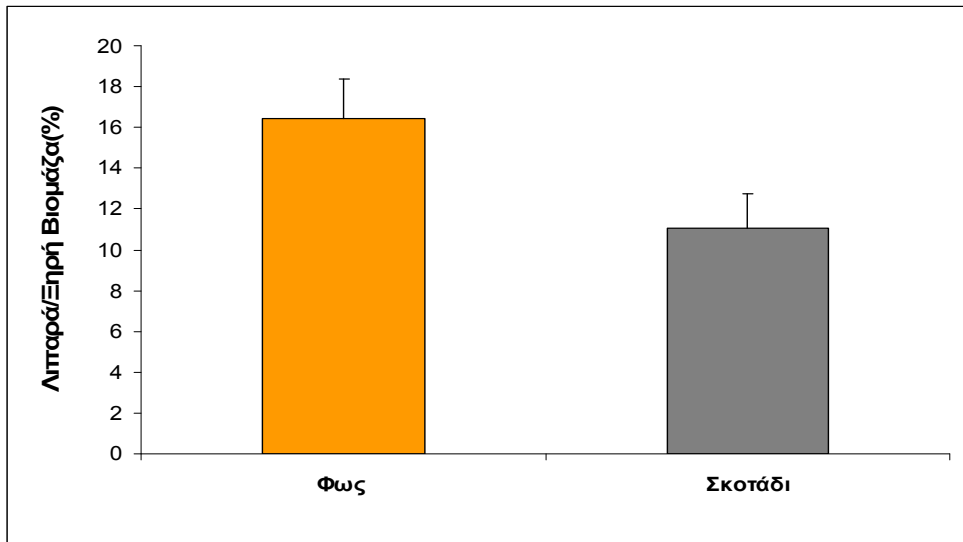
καλλιέργειες του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* συνδυάζει αυξημένη βιομάζα και υψηλή συγκέντρωση λιπαρών.

3.3.3 Επίδραση φωτός

Σε αυτή την πειραματική προσέγγιση ερευνήθηκε η επίδραση του φωτός στην ανάπτυξη της βιομάζας και στην παραγωγή των λιπαρών σε μικτότροφες καλλιέργειες μικροφυκών σε φως ($50-60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) και σε σκοτάδι.

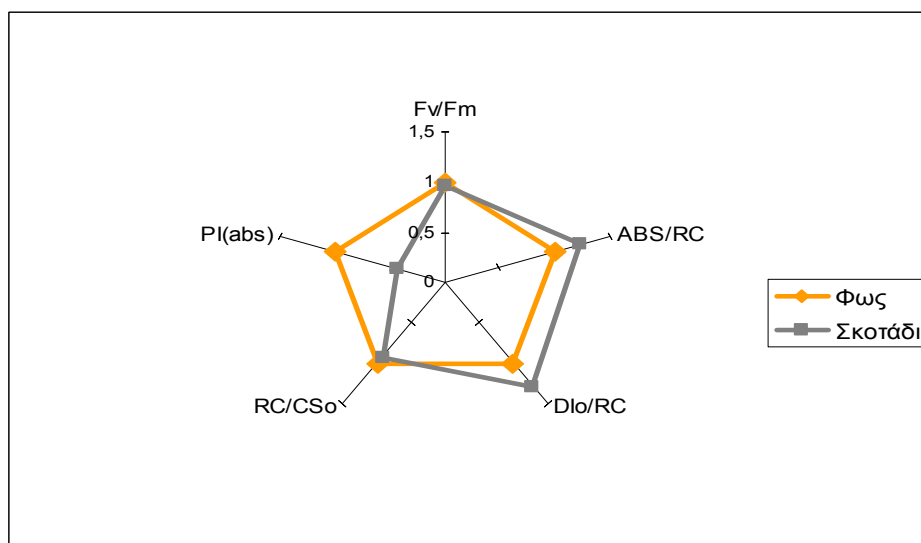


Εικόνα 30: Ξηρή βιομάζα του μονοκύτταρου γλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* ανά λίτρο καλλιέργειας σε χειρισμούς που αναπτυχθήκαν μικτότροφα σε φως ($50-60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) και ετερότροφα σε ασκοτάδι.



Εικόνα 31: Η ποσότητα των λιπαρών εκφρασμένη ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας καλλιεργειών του φύκου *Scenedesmus obliquus* που αναπτύχθηκαν μικτότροφα σε φως ($50-60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) και ετερότροφα σε απόλυτο σκοτάδι.

Τα αποτελέσματα αυτής της προσέγγισης όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 30 και 31, δείχνουν ότι κατά την ετερότροφη ανάπτυξη σε απόλυτο σκοτάδι η παραγωγή της βιομάζας αλλά και των λιπαρών ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες των μικτότροφων καλλιεργειών, αλλά όχι τόσο μεγάλη όσο αναμενόταν λόγω της μη λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στο απόλυτο σκοτάδι.



Εικόνα 32: Συγκριτική παρουσίαση σειράς παραμέτρων που προκύπτουν από μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού (OJIP-test) και αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού από μικροφύκη που αναπτύχθηκαν για 5 ημέρες μικτότροφα σε φως ($50-60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) και ετερότροφα σε απόλυτο σκοτάδι.

Η συγκριτική παρουσίαση των παραμέτρων που προκύπτουν από μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού (OJIP-test) και αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Εικόνα 32) δείχνουν ότι στο σκοτάδι ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός αυξάνει κυρίως το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC) και τη διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (D1o/RC), ενώ παραμένουν σταθερά η πυκνότητα των ενεργών κέντρων (RC/CSo) και η φωτοσυνθετική απόδοση (Fv/Fm).

Σε μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο μονοκύτταρο φύκος *Trebouxia* και σε δύο λειχήνες, *Parmelia sulcata* και *P. laevigata* διαπιστώθηκε ότι παρουσιάζουν μια ποσοτική μείωση των λιπαρών οξέων στο σκοτάδι. Υπάρχουν αλλαγές που σαφώς σχετίζονται με την φωτοσυνθετική και με την αναπνευστική διαδικασία στο σκοτάδι και τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι ορισμένες ενδοκυτταρικές δομές για την παραγωγή ενέργειας αλλάζουν σε γρήγορους ρυθμούς.

Στα κυανοβακτήρια σε συνθήκες σκότους υπάρχει αλλαγή στη σύνθεση των λιπαρών που βρίσκονται στους χλωροπλάστες όπως π.χ. μείωση του λινολενικού οξέος. Υπήρχαν βεβαία και μεμονωμένες αυξήσεις κάποιων λιπαρών όπως του ελαϊκού οξέος (Alhasan et al. 1989).

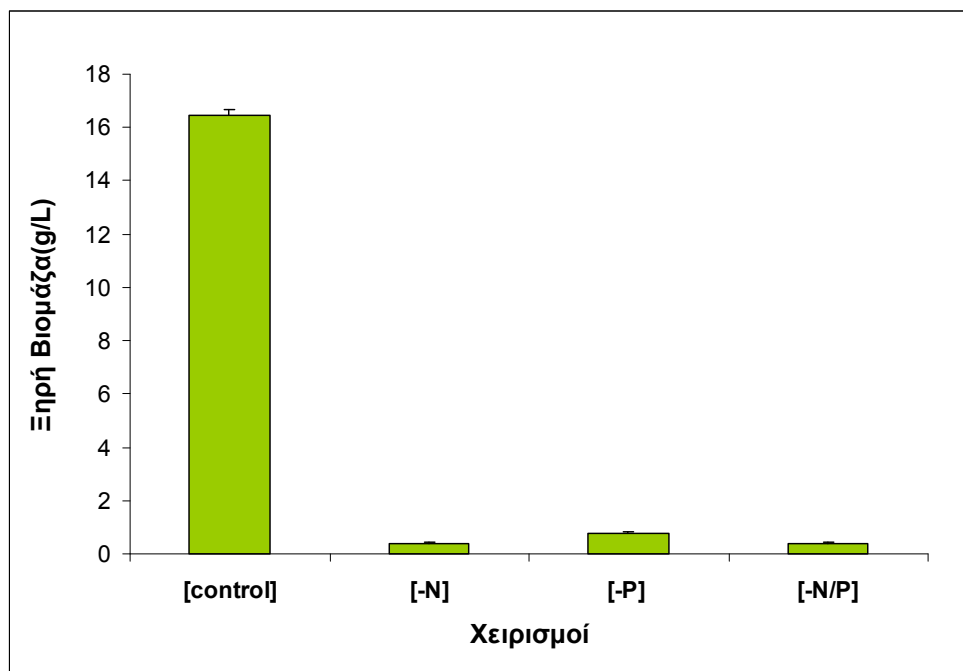
Γίνεται κατανοητό ότι τα μικροφύκη αποδίδουν σαφώς καλύτερα στην παρουσία φωτός τόσο σε βιομάζα όσο και σε άλλες διεργασίες που εκτελούν όπως την παραγωγή λιπαρών.

3.4 Επίδραση έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στη σύνθεση λιπαρών ουσιών

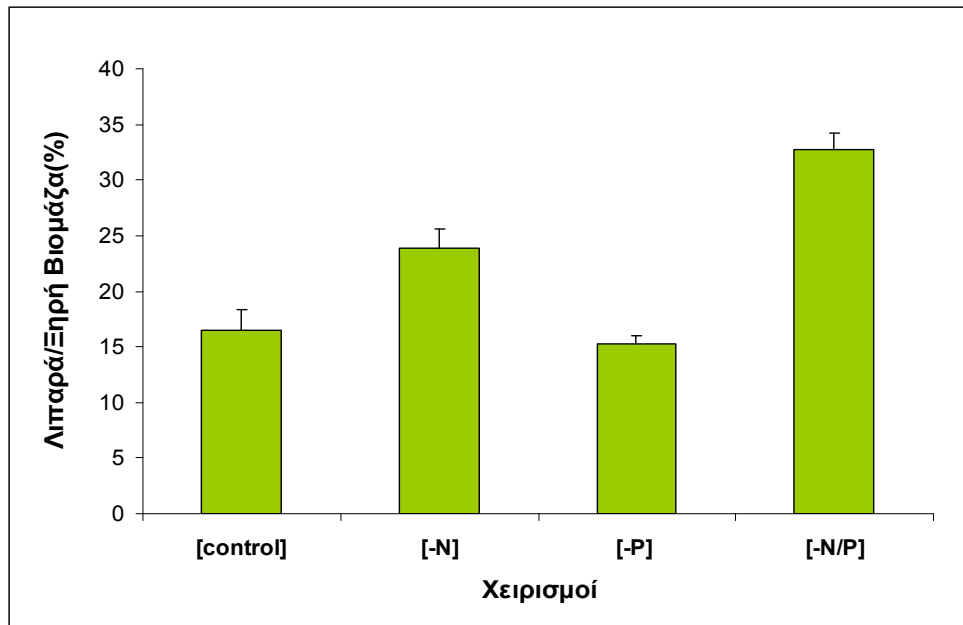
Σε αυτή την θεματική ενότητα έγινε προσπάθεια «χειραγώγησης» των μεταβολικών μονοπατιών του *Scenedesmus obliquus*, αποσκοπώντας στην αύξηση της κυτταρικής συγκέντρωσης των λιπαρών τους, με την επιλεκτική έλλειψη αζώτου [-N], φωσφόρου [-P] ή και των δύο μαζί [-N/P]. Τόσο το άζωτο όσο και το φώσφορος είναι δυο πολύ σημαντικά στοιχεία για τις κυτταρικές λειτουργίες των μικροφυκών. Η βέλτιστη αναλογία (αναλογία Redfield) που απαιτείται για την σωστή κυτταρική λειτουργία είναι C:N:P = 106:16:1 (Redfield 1963). Έτσι μπορεί να γίνει κατανοητό ότι όταν αυτή αναλογία δεν είναι επαρκής δηλαδή υπάρχει έλλειψη αζώτου ή φωσφόρου ή και των δύο μαζί τότε ο άνθρακας πιθανόν να αποθηκεύεται ως άμυλο ή λιπαρά στα κύτταρα (Jermyn 1963; Redfield 1963).

Μικτότροφες καλλιέργειες του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* που αναπτύχθηκαν για 5 ημέρες σε θρεπτικά που δεν περιείχαν άζωτο [-N], φώσφορο [-P] ή και τα δύο μαζί [-N/P], έδειξαν όπως αναμενόταν σημαντικό περιορισμό της ανάπτυξης τους (Εικόνα 33).

Είναι γνωστό ότι για κάθε φυτικό οργανισμό το άζωτο και ο φώσφορος είναι δυο πολύ σημαντικά στοιχεία. Η έλλειψη αζώτου παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση κεντρικών βιομορίων όπως των νουκλεϊκών οξέων και των αμινοξέων/πρωτεϊνών ενώ η έλλειψη φωσφόρου παρεμποδίζει τη σύνθεση πρωτεϊνών και ως εκ τούτου η απουσία τους από το θρεπτικό μέσο οδηγεί σε περιορισμό ανάπτυξης της καλλιέργειας. Επιπλέον σειρά φυσικοχημικών/μεταβολικών διαδικασιών, όπως η φωτοσύνθεση χρειάζεται τόσο το άζωτο που είναι απαραίτητο για την σύνθεση π.χ. χλωροφύλλης, όσο και τον φώσφορο για τη διεξαγωγή της κυκλικής και μη κυκλικής φωτοφωσφορυλίωσης (παραγωγή ATP), που είναι ο κύριος παραγωγός ενέργειας στο κύτταρο.

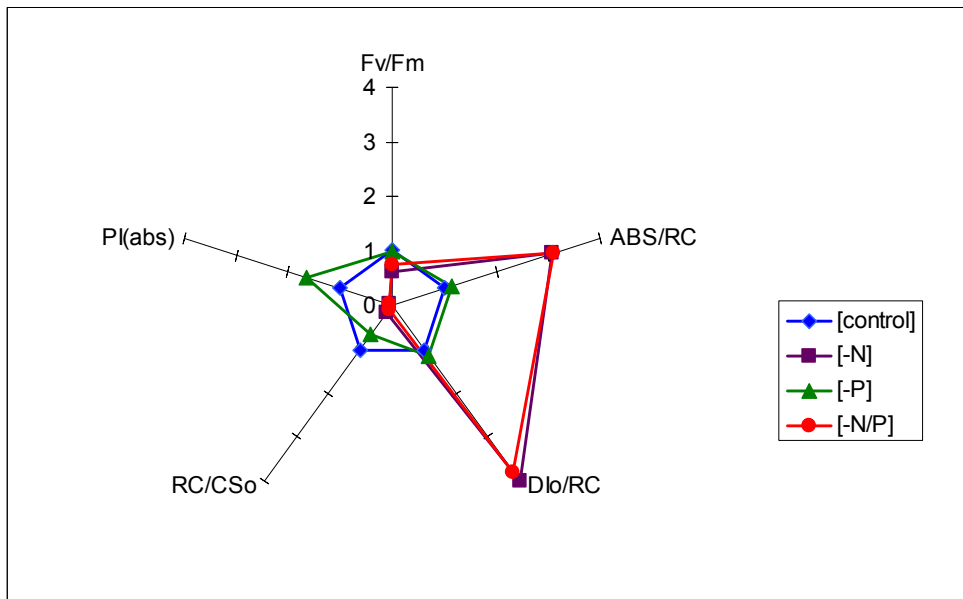


Εικόνα 33: Ξηρή βιομάζα του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* ανά λίτρο σε καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν μικτότροφα σε συνθήκες έλλειψης αζώτου [-N], φωσφόρου [-P] και συνδυασμού των δύο [-N/P].



Εικόνα 34: Η ποσότητα των λιπαρών εκφρασμένη ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας καλλιέργειών του φύκου *Scenedesmus obliquus* που αναπτύχθηκαν μικτότροφα σε συνθήκες έλλειψης αζώτου [-N], φωσφόρου [-P] και συνδυασμού των δύο [-N/P].

Η εκχύλιση λιπαρών ουσιών από τις καλλιέργειες όλων των χειρισμών έδειξαν ξεκάθαρα ότι ο [-N] χειρισμός αύξησε την ποσότητα των λιπαρών εκφρασμένη ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας από 16% του μάρτυρα στο 25%. Ο [-P] χειρισμός δεν άλλαξε την συγκέντρωση των λιπαρών σε σχέση με την καλλιέργεια του μάρτυρα, αλλά ο συνδυαστικός χειρισμός [-N/P] διπλασίασε την περιεκτικότητα των κυττάρων σε λιπαρά, αυξάνοντας τα στο 32,7% (Εικόνα 34).

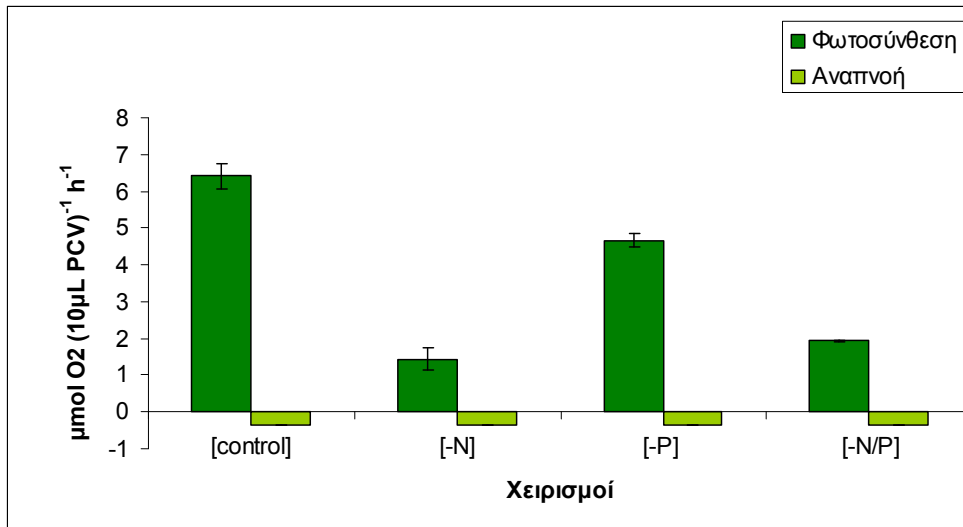


Εικόνα 35: Συγκριτική παρουσίαση σειράς παραμέτρων που προκύπτουν από μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού (OJIP-test) και αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού από μικροφύκη που αναπτύχθηκαν για 5 ημέρες μικτότροφα σε συνθήκες έλλειψης αζώτου [-N], φωσφόρου [-P] και συνδυασμού των δύο [-N/P].

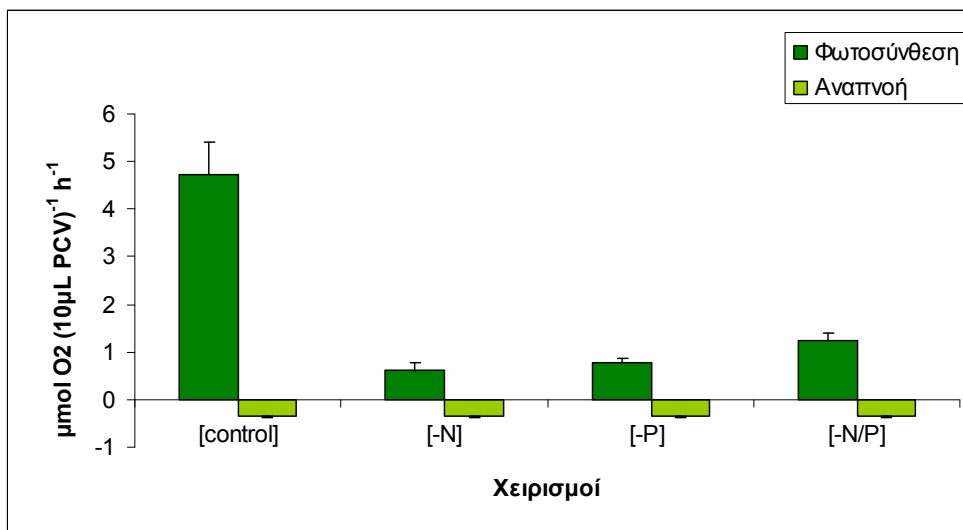
Η OJIP-ανάλυση που ακολούθησε παρουσιάζει συγκριτικά σειρά παραμέτρων που προκύπτουν από μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού και αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού από μικροφύκη που αναπτύχθηκαν για 5 ημέρες μικτότροφα σε όλους τους χειρισμούς (Εικόνα 35). Οι διαφορές ανάμεσα στους χειρισμούς είναι πιο εμφανείς κυρίως στον [-N] και τον [-N/P] χειρισμό. Τα βασικά χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού τους μηχανισμού σε σχέση με την καλλιέργεια μάρτυρα είναι η χαμηλή συγκέντρωση ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CSO), οι ιδιαίτερα υψηλές τιμές της μη φωτοχημικά διαχεόμενης ενέργειας ανά κέντρο αντίδρασης (DIo/RC) και του μεγέθους της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC), που οδηγούν σε χαμηλές φωτοσυνθετικές αποδόσεις [βλ. τιμές F_v/F_m $PI_{(ABS)}$]. Η λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού της καλλιέργειας με τον [-P] χειρισμό είναι παρόμοια της αντίστοιχης του μάρτυρα, που υποδηλώνει λιγότερη καταπόνηση σε σχέση με τους υπόλοιπους δύο χειρισμούς.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αναπαράγονται και στις πολωρογραφικές μετρήσεις της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και αναπνοής που παρουσιάζονται στην Εικόνα 36. Στους χειρισμούς [-N] και [-N/P] η μέγιστη

φωτοσυνθετική δραστηριότητα από την πρώτη μέρα περιορίζεται σημαντικά, ενώ η καλλιέργεια του χειρισμού [-P] παραμένει σχετικά υψηλή. Φυσικά μετά από την πάροδο 5 ημερών και οι τρεις χειρισμοί παρουσιάζουν πολύ χαμηλή φωτοσυνθετική δραστηριότητα (Εικόνα 37).



Εικόνα 36: Μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα και αναπνοή από μικροφύκη που αναπτύχθηκαν για 1 ημέρα μισθότροφα σε συνθήκες έλλειψης αζώτου [-N], φωσφόρου [-P] και συνδυασμού των δύο [-N/P].



Εικόνα 37: Μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα και αναπνοή από μικροφύκη που αναπτύχθηκαν για 5 ημέρες μισθότροφα σε συνθήκες έλλειψης αζώτου [-N], φωσφόρου [-P] και συνδυασμού των δύο [-N/P].

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, πρόσφατες εργασίες έδειξαν ότι η έλλειψη αζώτου σε καλλιέργειες του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* περιορίζει την ανάπτυξη του (Kenesi et al. 2009), αυξάνει τα λιπαρά του σε επίπεδο κυττάρου (Wang et al. 2009) και οδηγεί στη σύνθεση διαφορετικών μορφών λιπιδίων και ειδικά τριγλυκεριδίων, καθώς και τριακυλογλυκερολών (Wang et al. 2009).

Η αναλογία, 16N:1P, η οποία είναι γνωστή ως ο λόγος Redfield, έχει χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή της στοιχειώδους σύνθεσης του φυτοπλαγκτόν και των μικροφυκών. Ωστόσο η αναλογία αυτή ποικίλλει σημαντικά, ανάλογα με τα είδη των φυκών και των περιβαλλοντικών συνθηκών (Redfield 1963).

Μικροφύκη τα οποία έχουν μελετηθεί και για την συμπεριφορά τους μετά από την έλλειψη του N, του P ή και των δυο μαζί συγχρόνως υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι πιο αποδοτικότερη προσέγγιση ως προς την περιεκτικότητα τους σε λιπίδια. Πρόσφατα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε συνθήκες έλλειψης N η φωτοσυνθετική διαδικασία συνεχίζεται, έστω και με μειωμένο ρυθμό, ωστόσο περιορίζεται η σύνθεση πρωτεϊνών και ενισχύεται ο σχηματισμός λιπιδίων και υδατανθράκων. Έτσι οι υδατάνθρακες μπορούν να φτάσουν πάνω από 70% ανά ξηρά βιομάζα χωρίς να μειωθεί ιδιαίτερα η παραγωγικότητα, όμως κατά τη συσσώρευση λιπιδίων υπάρχει μείωση παραγωγικότητας με αποτέλεσμα την μείωση της βιομάζας (Ratledge and Cohen 2008).

Σε κάποια χλωροφύκη η ποσότητα των λιπαρών που μπορεί να συσσωρευτεί είναι αρκετά μεγάλη σε σχέση με την βιομάζα του φύκου (Ratledge and Cohen 2008). Μερικά μάλιστα μικροφύκη χαρακτηρίζονται και ως ελαιώδη, διότι διοχετεύουν όλη την ενέργεια τους και τις ποσότητες του άνθρακα στην σύνθεση τριγλυκεριδίων (TAGs) (Wang et al. 2009). Τα μη ελαιώδη μικροφύκη κατά την καλλιέργεια σε θρεπτικό με ανεπάρκεια αζώτου αντιδρούν σταματώντας την ανάπτυξη τους ή αποθηκεύουν πολυσακχαρίτες λόγω του αφομοιωμένου άνθρακα (Hossain et al. 2008).

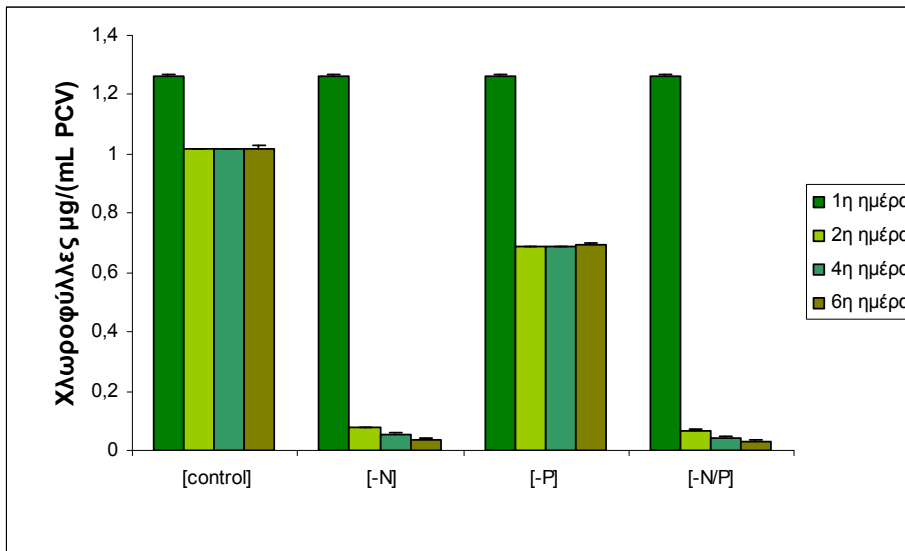
Σε καλλιέργειες κυανοβακτηρίων (κυανοφύκη) με στέρηση της αναλογίας N:P διαπιστώθηκε ότι η ανάπτυξη τους εξαρτάται περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το φως και η θερμοκρασία, που μπορεί να είναι σε τέτοιες τιμές ώστε να ευνοήσουν πολύ την ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων παρά την γενικότερη έλλειψη που υφίστανται. Σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στα ανώτερα φυτά και τα ευκαρυωτικά φύκη, η έλλειψη αζώτου κατά την ανάπτυξη στα κυανοβακτήρια *Pseudanabaena* sp.

και *Oscillatoria splendida*, προκαλεί μια αλλαγή στη σύνθεση των χρωστικών ουσιών, αλλά δεν παρουσιάζουν σημαντικές αλλαγές στο σύνολο των κυτταρικών λιπιδίων τους (Delouira et al. 1987).

3.4.1 Επίδραση της έλλειψης θρεπτικών (αζώτου, φωσφόρου και συνδυασμού αυτών) στα κυτταρικά επίπεδα χλωροφυλλών, πρωτεϊνών και υδατανθράκων

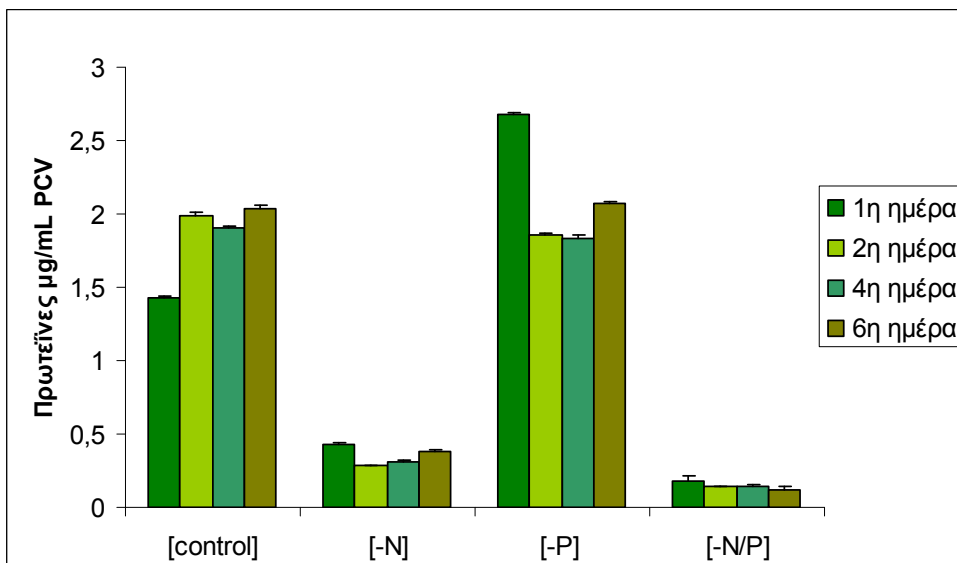
Στις παραπάνω διαδικασίες που διεξήχθησαν διαπιστώθηκε ότι ο [-N] χειρισμός αύξησε την ποσότητα των λιπαρών εκφρασμένη ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας από 16% του μάρτυρα στο 25%, ενώ ο συνδυαστικός χειρισμός [-N/P] διπλασίασε την περιεκτικότητα των κυττάρων σε λιπαρά, αυξάνοντας τα στο 32,7%! Για να κατανοήσουμε καλύτερα το μεταβολικό προφίλ των κυττάρων από όλους τους χειρισμούς, μετρήθηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα τα επίπεδα των χλωροφυλλών, των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων.

Οι μετρήσεις των χλωροφυλλών ανά κυτταρικό όγκο παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές στους χειρισμούς [-N] και [-N/P], ενώ ο χειρισμός [-P] παρουσίασε ουσιαστικά παρόμοιες τιμές με την καλλιέργεια μάρτυρα (ανάπτυξη σε πλήρες θρεπτικό) [Εικόνα 38]. Τα εν λόγω αποτελέσματα ουσιαστικά μπορούν να δικαιολογηθούν, από το ότι το άζωτο και όχι ο φώσφορος αποτελεί κύριο δομικό στοιχείο των τετραπυρρολών.



Εικόνα 38: Ποσοτικοποίηση χλωροφυλλών από μικροφύκη *Scenedesmus obliquus* που αναπτύχθηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα μισκτότροφα σε συνθήκες έλλειψης αζώτου [-N], φωσφόρου [-P] και συνδυασμού των δύο [-N/P].

Με την ίδια λογική ποσοτικοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες με την μέθοδο Bradford (Εικόνα 39).

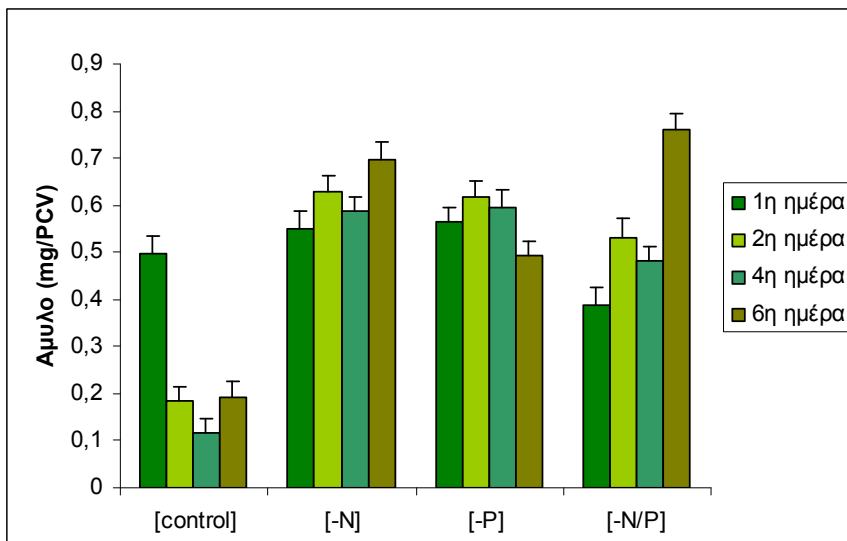


Εικόνα 39: Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών από μικροφύκη *Scenedesmus obliquus* που αναπτύχθηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα μισκτότροφα σε συνθήκες έλλειψης αζώτου [-N], φωσφόρου [-P] και συνδυασμού των δύο [-N/P].

Όπως παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την Εικόνα 39 φαίνεται ότι τις λιγότερες πρωτεΐνες έχει ο χειρισμός [-N], πράγμα αναμενόμενο καθώς το άζωτο είναι δομικό στοιχείο των αμινοξέων και ως εκ τούτου και των πρωτεϊνών.

Ακολουθεί ο χειρισμός [-N/P], ενώ ο χειρισμός [-P] δεν παρουσιάζει σαφείς διαφορές σε σχέση με την καλλιέργεια του μάρτυρα.

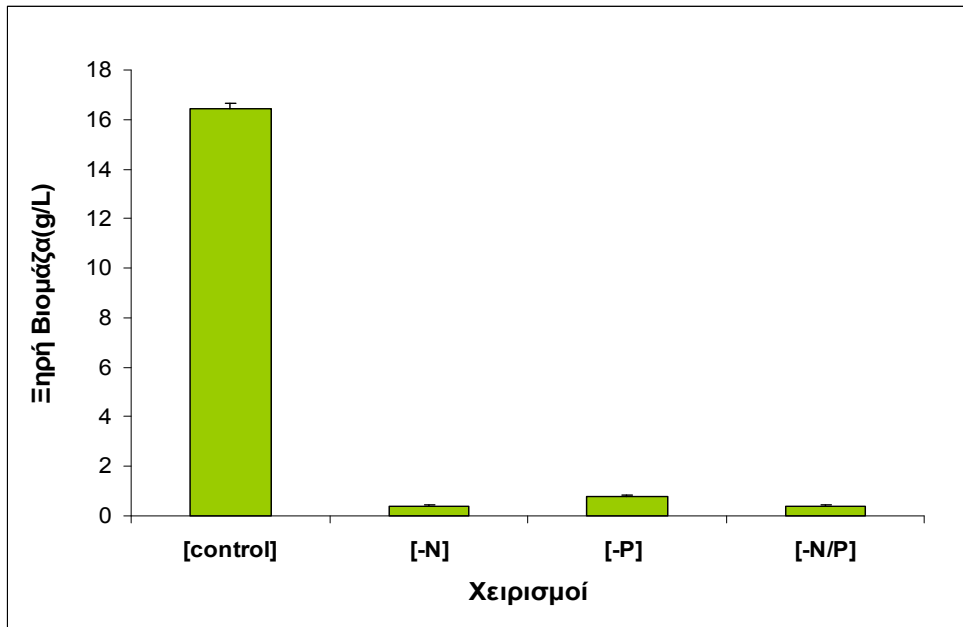
Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η ποσοτικοποίηση του αμύλου έδειξε ότι οι τιμές των καλλιεργειών και των τριών χειρισμών ([-N], [-P] και [-N/P]) είναι διπλάσιες και τριπλάσιες σε σχέση με τις αντίστοιχες της καλλιέργειας του μάρτυρα (Εικόνα 30). Ο λόγος προφανώς είναι ότι η παρεμπόδιση σύνθεσης πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων, οδηγεί στην διοχέτευση όλου του μεταβολικού δυναμικού στην βιοσύνθεση αμύλου (Εικόνα 30), όπως και λιπιδίων (Εικόνα 34), που δεν απαιτούν άζωτο ή φώσφορο.



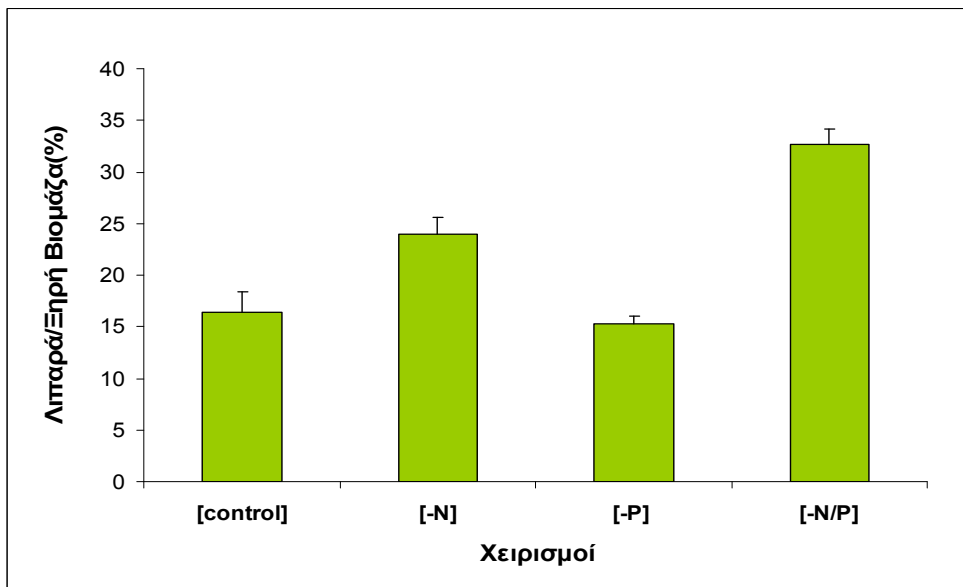
Εικόνα 40: Ποσοτικοποίηση αμύλου από μικροφύκη *Scenedesmus obliquus* που αναπτύχθηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα μικτότροφα σε συνθήκες έλλειψης αζώτου [-N], φωσφόρου [-P] και συνδυασμού των δύο [-N/P].

Τα παραπάνω αποτελέσματα της παρούσας εργασίας βρίσκονται σε συμφωνία με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία μικροφύκη όπως η *Chlamydomonas reinhardtii* βιώνουν δραστηκές αλλαγές στο μεταβολισμό τους και επομένως αναπόφευκτα στην ανάπτυξή τους όταν στερούνται το άζωτο (Sultemeyer et al. 1989). Η ανάπτυξη της καλλιέργειας εισέρχεται στη στάσιμη φάση, τα κύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες κυτοπλασματικών λιποσωμάτων και άφθονο άμυλο, μέσω ενός μονοπατιού που εμπλέκει ένα ρυθμιζόμενο πρόγραμμα και το οποίο πιθανότατα πραγματοποιείται μέσω αλλαγής του προφίλ των microRNAs (Moellering and Benning 2010).

Επειδή η βιομάζα είναι πολύ μικρή έγινε μια νέα πειραματική διαδικασία όπου το φύκος αρχικά καλλιεργήθηκε στο ενυδρείο με τα θρεπτικά που χρειάζεται το φύκος για να αναπτυχθεί κανονικά. Μετά από 3 ημέρες ανακαλλιεργήθηκαν χωρίς τα θρεπτικά ([-N], [-P] και [-N/P]) που έχουν προαναφερθεί σε όλους τους χειρισμούς.



Εικόνα 41: Ξηρή βιομάζα του μονοκύτταρου γλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* ανά λίτρο σε καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν μικτότροφα σε συνθήκες έλλειψης αζώτου [-N], φωσφόρου [-P] και συνδυασμού των δύο [-N/P]



Εικόνα 42: Η ποσότητα των λιπαρών εκφρασμένη ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας καλλιεργειών του φύκου *Scenedesmus obliquus* που αναπτύχθηκαν μικτότροφα σε συνθήκες έλλειψης αζώτου [-N], φωσφόρου [-P] και συνδυασμού των δύο [-N/P].

Όπως φαίνεται από την Εικόνα 41 η βιομάζα αυξάνεται αλλά στα λιπαρά υπάρχει μια διαφοροποίηση (Εικόνα 42) και αυτό οφείλεται στο ότι τα κύτταρα τις 3 μέρες που παρέμειναν στο ενυδρείο είχαν αποθέματα άζωτου και φωσφόρου όποτε χρειαζόταν περισσότερος χρόνος επώασης ώστε να φανούν οι επιπτώσεις της έλλειψης θρεπτικών.

4. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ ΑΠΟ ΛΙΠΑΡΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Όλες οι προηγούμενες παρατηρήσεις έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη βιοτεχνολογική χρήση των μικροφυκών για την παραγωγή βιοκαυσίμων.

Η παραγωγή βιοκαυσίμων από φύκη εξαρτάται από το ρυθμό ανάπτυξης των μικροφυκών την παραγωγή βιομάζας και την περιεκτικότητά τους σε λιπίδια (Kim et al. 2007). Τόσο η παραγωγή βιομάζας όσο και η κυτταρική συσσώρευση λιπιδίων περιορίζονται από πολλούς παράγοντες, εκ των οποίων τα θρεπτικά συστατικά παίζουν σημαντικό ρόλο. Από τα αποτελέσματα που παρατέθηκαν παραπάνω προκύπτει ότι ο χειρισμός που στερείται συνδυαστικά το άζωτο και τον φώσφορο ([-N/P]) είναι ο καταλληλότερος για να χρησιμοποιηθεί στη παραγωγή βιοντίζελ καθώς δίνει το μεγαλύτερο ποσοστό λιπαρών οξέων σε κυτταρικό επίπεδο.

Ως εκ τούτου σε αυτή την πειραματική προσέγγιση χρησιμοποιήθηκαν μεγάλες ποσότητες καλλιέργειας (λόγω της μικρής ανάπτυξης της) του εν λόγω χειρισμού, συλλέχθηκε η βιομάζα, αποξηράνθηκε και εκχυλίστηκαν οι λιπαρές ουσίες. Αυτά τα λιπαρά χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή βιοντίζελ, βάσει της μεθόδου που περιγράφηκε στα Υλικά και Μεθόδους. Συγκριτικά με τα λιπαρά από το μικροφύκος, χρησιμοποιήθηκαν και τέσσερα λάδια του εμπορίου (αραβοσιτέλαιο, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο και σογιέλαιο) στην απόδοση τους σε βιοντίζελ. Τα αποτελέσματα όπως αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 3, το παραγόμενο από τα λιπαρά του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* βιοντίζελ είναι ποσοστιαία μικρότερο από το αντίστοιχο των λαδιών του εμπορίου, αλλά αρκετά σημαντικό. Οι προϋποθέσεις που δείχνουν την ποιότητα του βιοντίζελ, έτσι ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί, πληρούνται: 1) Έχει pH 7, 2) δεν έχει καθόλου αναμειξιμότητα, 3) η διαύγεια του είναι καλή, και 4) και η μυρωδιά του είναι σπορέλαιου.

	Έλαιο (mL)	Biodisel(mL)
Αραβοσιτέλαιο	4	3,5
Ελαιόλαδο	4	3,5
Ηλιέλαιο	4	3,5
Σογιέλαιο	4	3,5
S. obliquus [-N/P] Λιπαρά	4	2,0

Πίνακας 3: Παραγωγή βιοντίζελ και γλυκερόλης από το αραβοσιτέλαιο, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, σογιέλαιο και από το φύκος *Scenedesmus obliquus*.

Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση των μικροφυκών για την παραγωγή του βιοντίζελ σε σύγκριση με άλλες διαθέσιμες πρώτες ύλες είναι αρκετά και σημαντικά. Από πρακτική άποψη τα μικροφύκη είναι εύκολο να καλλιεργηθούν, μπορούν να αναπτυχθούν χρησιμοποιώντας νερό ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση και εύκολα προσλαμβάνουν τις θρεπτικές ουσίες από αυτό που ίσως να περιέχουν.

Τα μικροφύκη για να αναπαραχθούν χρειάζονται μονό λίγες μέρες για να ολοκληρώσουν τον κύκλο ανάπτυξης τους λόγω της φωτοσυνθετικής τους δραστηριότητας. Επιπλέον, μπορούν να αυξηθούν σχεδόν οπουδήποτε, με την χρήση της ηλιακής ακτινοβολίας και μερικές απλές θρεπτικές ουσίες, ενώ οι ρυθμοί ανάπτυξης μπορούν να επιταχυνθούν με την προσθήκη ειδικών θρεπτικών ουσιών και με τον επαρκή αερισμό τους. Έχουν πολύ υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης και παραγωγικότητας σε σύγκριση με τα άλλα φυτικά είδη των γεωργικών καλλιεργειών, καθώς και άλλα υδρόβια φυτά. Απαιτούν πολύ λιγότερη έκταση από ό,τι άλλα φυτικά είδη γεωργικών καλλιεργειών (49 και 132 φορές λιγότερη σε σχέση με την ελαιοκράμβη ή την σόγια αντίστοιχα), ενώ το βιοντίζελ που μπορεί να περιέχει η βιομάζα των μικροφυκών μπορεί να φτάσει και το 32% (w / w) (βλ. τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας στον μικτότροφο χειρισμό [-N/P] του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus*). Ως εκ τούτου, με την εκτεταμένη χρήση μικροφυκών για την παραγωγή βιοντίζελ ο ανταγωνισμός για τις καλλιέργειες του εδάφους με άλλες καλλιέργειες, ιδίως για ανθρώπινη κατανάλωση, μειώνεται σημαντικά.

Υπάρχουν αρκετά διαφορετικά είδη μικροφυκών που μπορούν να προσαρμοστούν για να ζήσουν σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Έτσι, είναι δυνατό να βρεθούν τα είδη που να ταιριάζουν καλύτερα στις τοπικές συνθήκες η/και τα ειδικά χαρακτηριστικά για την ανάπτυξη τους, κάτι το οποίο δεν είναι

δυνατόν να γίνει με αλλά φυτικά είδη που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή του βιοντίζελ (π.χ. σόγια, ελαιοκράμβη, ηλίανθος ...).

Τα μικροφύκη μπορούν να παράξουν ως πρώτη ύλη για διαφορετικά είδη ανανεώσιμων καυσίμων όπως είναι το βιοντίζελ, το μεθάνιο, το υδρογόνο και αιθανόλη. Το βιοντίζελ των μικροφυκών δεν περιέχει θείο όπως το ντίζελ του συμβατικού πετρελαίου, μειώνοντας έτσι παράλληλα τις εκπομπές σωματιδίων CO, υδρογονάνθρακες, και SOx. Ωστόσο, οι εκπομπές των NOx ενδέχεται όμως να είναι υψηλότερες σε κάποιους κινητήρες (Gao et al. 2010).

Η αξιοποίηση των μικροφυκών για την παραγωγή βιοκαυσίμων μπορεί να χρησιμεύει και για άλλους σκοπούς όπως:

- Με την παραγωγή βιοντίζελ μπορεί να μειωθεί η παραγωγή του συμβατικού πετρελαίου και έτσι να μειωθούν οι εκπομπές των επιβλαβών αερίων που παράγονται κατά την επεξεργασία του συμβατικού πετρελαίου.

- Τα μικροφύκη μπορούν να χρησιμοποιούν και τα υγρά απόβλητα ως θρεπτικά συστατικά και έτσι να αφαιρούν του επιβλαβείς ρύπους.

- Μετά την επεξεργασία των μικροφυκών για την παραγωγή του βιοντίζελ παραμένει μια ποσότητα βιομάζας που μπορεί να μεταποιηθεί και χρησιμοποιηθεί και για άλλες χρήσης, όπως σε οργανικό λίπασμα καθώς περιέχει υψηλά ποσοστά της αναλογία του N:P, ή απλά μπορούν να καίγονται για παραγωγής ενέργειας (ηλεκτρισμού και θερμότητας).

- Τα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και να επιβιώνουν σε δυσμενείς συνθήκες ακόμα και όταν μειώνονται τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται, έτσι μπορούν να καλλιεργούνται σε εκτάσεις ακατάλληλες για γεωργική χρήση, ανεξάρτητα από τις εποχιακές και καιρικές αλλαγές, έτσι δεν είναι ανταγωνιστική η καλλιέργεια τους για τις συμβατικές καλλιεργούμενες εκτάσεις.

- Ανάλογα με το είδος του μικροφύκου μπορούν να εξαχθούν ενώσεις, με πολύτιμες εφαρμογές σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς, αφού συμπεριλαμβάνουν ένα μεγάλο φάσμα ευγενών χημικών ουσιών και προϊόντων, όπως τα σάκχαρα, τις χρωστικές ουσίες, τα αντιοξειδωτικά, και άλλα χημικά προϊόντα της βιομάζας τους.

- Λόγω της ποικιλίας αυτής και της υψηλής αξίας βιολογικών παραγώγων, με πολλές πιθανές εμπορικές εφαρμογές, τα μικροφύκη μπορεί να φέρουν επανάσταση σε πολλούς τομείς της βιοτεχνολογίας, συμπεριλαμβανομένων των βιοκαυσίμων, τα καλλυντικά, τα φαρμακευτικά προϊόντα, στη διατροφή και στα πρόσθετα τροφίμων, της υδατοκαλλιέργειας, καθώς και στην πρόληψη της ρύπανσης.

Η παραγωγή του βιοντίζελ από μικροφύκη έχει αρκετά πλεονεκτήματα που κάνουν την χρήση τους ίσως και επιτακτική ανάγκη αλλά υπάρχουν και κάποια από τα μειονεκτήματα τους που πρέπει να επιλυθούν για να μπορέσουν να μπου δυναμικά σε όλες τις αγορές του κόσμου.

Κάποια από αυτά είναι η σχετικά νέα τεχνολογία και χρειάζεται επιπλέον έρευνα για να τυποποιηθεί ένα γενικό πρωτόκολλο για την πιο αποδοτικότερη καλλιέργεια των μικροφυκών και για την παραγωγή του βιοκαυσίμου, έτσι ώστε να καταφέρει να ανταπεξέλθει στις μεγάλες ανάγκες που δημιουργούνται. Ακόμα η παραγωγή βιοντίζελ από μικροφύκη έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ασταθών ενώσεων και κατά συνέπεια ασταθές βιοντίζελ. Επίσης οι επιδόσεις από βιοντίζελ που παράγεται από μικροφύκη είναι χαμηλότερες σε σχέση με τις επιδόσεις του βιοντίζελ που παράγεται από ελαιοκράμβη και σόγια (βλέπε Πίνακα 4). Τέλος το μεγαλύτερο μειονέκτημα από την παραγωγή βιοντίζελ από μικροφύκη είναι το πολύ υψηλό κόστος που ακόμα δεν μπορεί να ανταγωνιστεί το συμβατικό πετρέλαιο.

Αρκετές πειραματικές προσεγγίσεις μέχρι σήμερα (σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης) έδειξαν ότι πολλά είδη μικροφυκών παράγουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων (ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας τους), συμβάλλοντας έτσι στην υψηλή απόδοση σε βιοντίζελ (βλ. Πίνακα 4).

Πίνακας 4: Παραγωγικότητα βιομάζας και λιπιδίων σε διαφορετικά είδη μικροφυκών

<i>Θαλάσσια και γλυκού νερού μικροφυκών ειδών</i>	<i>Περιεκτικότητα λιπιδίων (% κατά βάρος σε ξηρά βιομάζα)</i>	<i>Παραγωγικότητα λιπιδίων (mg / L / ημέρα)</i>	<i>Παραγωγικότητα ανα όγκο καλλιέργειας (g / L / ημέρα)</i>	<i>Επιφανειακή παραγωγικότητα της βιομάζας (g / m² / Ημέρα)</i>
Ankistrodesmus sp.	24.0-31.0	-	-	11.5-17.4
Botryococcus braunii	25.0-75.0	-	0.02	3.0
Chaetoceros muelleri	33.6	21.8	0.07	-
Chaetoceros calcitrans	14.6-16.4/39.8	17.6	0.04	-
Chlorella emersonii	25.0-63.0	10.3-50.0	0.036-0.041	0.91-0.97
Chlorella protothecoides	14.6-57.8	1214	2.00-7.70	-
Chlorella sorokiniana	19.0-22.0	44.7	0.23-1.47	-
Chlorella vulgaris	5.0-58.0	11.2-40.0	0.02-0.20	0.57-0.95
Chlorella sp.	10.0-48.0	42.1	0.02-2.5	1.61-16.47/25
Chlorella pyrenoidosa	2.0	-	2.90-3.64	72.5/130
Chlorella	18.0-57.0	18.7	-	3.50-13.90
Chlorococcum sp.	19.3	53.7	0.28	-
Cryptocodinium cohnii	20.0-51.1	-	10	-
Dunaliella salina	6.0-25.0	116.0	0.22-0.34	1.6-3.5/20-38
Dunaliella primolecta	23.1	-	0.09	14
Dunaliella tertiolecta	16.7-71.0	-	0.12	-

Dunaliella sp.	17.5-67.0	33.5	-	-
Ellipsoidion sp.	27.4	47.3	0.17	-
Euglena gracilis	14.0-20.0	-	7.70	-
Haematococcus pluvialis	25.0	-	0.05-0.06	10.2-36.4
Isochrysis galbana	7.0-40.0	-	0.32-1.60	-
Isochrysis sp.	7.1-33	37.8	0.08-0.17	-
Monodus subterraneus	16.0	30.4	0.19	-
Monallanthus salina	20.0-22.0	-	0.08	12
Nannochloris sp.	20.0-56.0	60.9-76.5	0.17-0.51	-
Nannochloropsis oculata.	22.7-29.7	84.0-142.0	0.37-0.48	-
Nannochloropsis sp.	12.0-53.0	37.6-90.0	0.17-1.43	1.9-5.3
Neochloris oleoabundans	29.0-65.0	90.0-134.0	-	-
Nitzschia sp.	16.0-47.0			8.8-21.6
Oocystis pusilla	10.5	-	-	40.6-45.8
Pavlova salina	30.9	49.4	0.16	-
Pavlova lutheri	35.5	40.2	0.14	-
Phaeodactylum tricornutum	18.0-57.0	44.8	0.003-1.9	2.4-21
Porphyridium cruentum	9.0-18.8/60.7	34.8	0.36-1.50	25
Scenedesmus quadricauda	1.9-18.4	35.1	0.19	-
Scenedesmus sp.	19.6-21.1	40.8-53.9	0.03-0.26	2.43-13.52
Skeletonema sp.	13.3-31.8	27.3	0.09	-
Skeletonema costatum	13.5-51.3	17.4	0.08	-
Spirulina platensis	4.0-16.6	-	0.06-4.3	1.5-14.5/24-51
Spirulina maxima	4.0-9.0	-	0.21-0.25	25
Thalassiosira pseudonana	20.6	17.4	0.08	-
Tetraselmis suecica	8.5-23.0	27.0-36.4	0.12-0.32	19
Tetraselmis sp.	12.6-14.7	43.4	0.30	-
Scenedesmus obliquus	20-22	16,00	-	-
Scenedesmus obliquus [-N]	20-22	24	-	-
Scenedesmus obliquus [-P]	20-22	15	-	-
Scenedesmus obliquus [-N/P]	20-22	32,7	-	-

Οι πειραματικές προσεγγίσεις της παρούσας εργασίας κατάφεραν να δώσουν ιδιαίτερα υψηλές τιμές όσον αφορά την ποσότητα των λιπαρών εκφρασμένη ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας καλλιεργειών του φύκου *Scenedesmus obliquus* που αναπτύχθηκαν μικτότροφα σε συνθήκες έλλειψης αζώτου [-N] (25%), φωσφόρου [-P] (16%) και συνδυασμού των δύο [-N/P] (32%). Παρά τις υψηλές αυτές συγκεντρώσεις στους χειρισμούς [-N] και [-N/P] δεν είναι βιοτεχνολογικά εκμεταλλεύσιμες λόγω της ιδιαίτερα χαμηλής ανάπτυξης των καλλιεργειών. Η εναλλακτική βιοτεχνολογική εκμετάλλευση θα ήταν η ανάπτυξη των καλλιεργειών σε πλήρες θρεπτικό μέσο, μέχρι την μέγιστη ανάπτυξη και στη συνέχεια να επιβάλλεται συνδυαστική έλλειψη αζώτου και φωσφόρου. Με αυτόν τον τρόπο θα επιτυγχανόταν υψηλότερες τιμές λιπαρών και ανά καλλιέργεια.

Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην εύρεση των καλύτερων δυνατών συνθηκών καλλιέργειας του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* για την μέγιστη δυνατή συγκέντρωση λιπαρών ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοντίζελ. Τα τελικά συμπεράσματα που προέκυψαν από αυτή την μελέτη συνοψίζονται ως εξής:

1. Συγκριτική μελέτη τεσσάρων διαφορετικών χειρισμών (α) αυτότροφη καλλιέργεια [limit C], β) αυτότροφη καλλιέργεια με προσθήκη αέρα (0,034% [CO₂], γ) μικτότροφη (εμπλουτισμένη με γλυκόζη) [glc] και δ) μικτότροφη με επιπλέον συνεχή παροχή CO₂ [glc+CO₂]), έδειξε ότι ο χειρισμός [glc] παρουσιάζει τη βέλτιστη βιομάζα ανά καλλιέργεια αλλά και τα υψηλότερα λιπαρά ανά κύτταρο.
2. Στις ίδιες συνθήκες απουσία φωτός (ετερότροφη ανάπτυξη) μειώνονται βιομάζα και κυτταρικό επίπεδο λιπιδίων, σε σχέση με την αντίστοιχη μικτότροφη.
3. Η αβιοτική καταπόνηση (διαφοροποιήσεις θερμοκρασίας και αλατότητας) δεν άλλαξε ουσιαστικά την κυτταρική περιεκτικότητα των κυττάρων σε λιπίδια. Μόνο στις ιδανικές για την ανάπτυξη συνθήκες (αυξημένη βιομάζα) της μικτότροφης καλλιέργειας μπορούμε να έχουμε έμμεσα αύξηση των λιπιδίων σε επίπεδο καλλιέργειας.
4. Η προσπάθεια «χειραγώγησης» των μεταβολικών μονοπατιών του *Scenedesmus obliquus*, αποσκοπώντας στην αύξηση της κυτταρικής συγκέντρωσης των λιπαρών τους, με την επιλεκτική έλλειψη αζώτου [-N], φωσφόρου [-P] ή και των δύο μαζί [-N/P], έδειξε ότι ο [-N] χειρισμός αύξησε την ποσότητα των λιπαρών εκφρασμένη ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας από 16% του μάρτυρα στο 25%, ενώ ο συνδυαστικός χειρισμός [-N/P] διπλασίασε την περιεκτικότητα των κυττάρων σε λιπαρά, αυξάνοντας τα στο 32,7%!
5. Η χαμηλή παραγωγή βιομάζας στον χειρισμό [-N/P] μπορεί να ξεπεραστεί με την αρχική ανάπτυξη των καλλιεργειών σε πλήρες θρεπτικό μέσο, μέχρι την μέγιστη ανάπτυξη τους και στη συνέχεια να επιβάλλεται συνδυαστική έλλειψη αζώτου και φωσφόρου. Με αυτόν τον τρόπο θα επιτευχθούν υψηλότερες τιμές λιπαρών και ανά καλλιέργεια.
6. Έγινε παραγωγή βιοντίζελ από τα λιπαρά που απομονώθηκαν από τον χειρισμό [-N/P] και η απόδοσή τους σε βιοντίζελ είναι της τάξεως του 50%.

Βιβλιογραφία

1. Alhasan, R. H., A. M. Ali, et al. (1989). "Effects of Light and Dark Incubation on the Lipid and Fatty-Acid Composition of Marine Cyanobacteria." *Journal of General Microbiology* 135: 865-872.
2. Bishop, N. L. and H. Senger (1971). *Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of Scenedesmus*. New York, Academic Press.
3. Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
4. Chan, D. C. (2006). "Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development." *Cell* 125(7): 1241.
5. Chisti, Y. (2007). "Biodiesel from microalgae." *Biotechnology Advances* 25(3): 294-306.
6. Choi, K. J., Z. Nakhost, et al. (1987). "Lipid content and fatty acid composition of green algae *Scenedesmus obliquus* grown in a constant cell density apparatus." *Food Biotechnol* 1(1): 117-28.
7. Converti, A., A. A. Casazza, et al. (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* 48(6): 1146-1151.
8. Deloura, I. C., J. P. Dubacq, et al. (1987). "The Effects of Nitrogen Deficiency on Pigments and Lipids of Cyanobacteria." *Plant Physiology* 83(4): 838-843.
9. Dernetriou, G., C. Neonaki, et al. (2007). "Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus - The protective role of polyamines." *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1767(4): 272-280.
10. Douce, R. and M. Neuburger (1989). "The uniqueness of plant mitochondria." *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 371-414.
11. Fajardo, A. R., L. E. Cerdan, et al. (2007). "Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*." *European Journal of Lipid Science and Technology* 109(2): 120-126.
12. Feofilova, E. P., E. Sergeeva Ia, et al. "[Biodiesel-fuel: content, production, producers, contemporary biotechnology (review)]." *Prikl Biokhim Mikrobiol* 46(4): 405-15.
13. Ferrao, A. S., C. Fileto, et al. (2003). "Effects of essential fatty acids and N and P-limited algae on the growth rate of tropical cladocerans." *Freshwater Biology* 48(5): 759-767.
14. Fork, D. C. (1979). "Effect of Growth Temperature on the Lipid and Fatty Acid Composition, and the Dependence on Temperature of Light-induced Redox Reactions of Cytochrome f and of Light Energy Redistribution in the Thermophilic Blue-Green Alga *Synechococcus lividus*." *Plant Physiol* 63(3): 524-30.
15. Gao, C. F., Y. Zhai, et al. (2010). "Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*." *Applied Energy* 87(3): 756-761.
16. Hara, A. and N. S. Radin (1978). "Lipid Extraction of Tissues with a Low-Toxicity Solvent." *Analytical Biochemistry* 90(1): 420-426.
- 17.

Formatted: French (France)

Formatted: Spanish
(Spain-Modern Sort)

Formatted: French (France)

18. Hossain, A. B. M. S., A. Salleh, et al. (2008). "Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy." *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4(3): 250-254.
19. Iverson, S. J., S. L. C. Lang, et al. (2001). "Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue." *Lipids* 36(11): 1283-1287.
20. Jermyn, M. A. (1963). "Anthrone as a reagent for the determination of S-carboxymethylcysteine in proteins." *Anal Biochem* 5: 433-42.
21. Joseph-Horne, T., D. W. Hollomon, et al. (2001). "Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components." *Biochimica et Biophysica Acta* 1504: 179-195.
22. Kautsky, H. and A. Hirsch (1931). "Neue versuche zur kohlenfaure-assimilation." *Naturwissenschaften* 19: 964.
23. Kenesi, G., H. Shafik, et al. (2009). "Effect of nitrogen forms on growth, cell composition and N₂ fixation of *Cylindrospermopsis raciborskii* in phosphorus-limited chemostat cultures." *Hydrobiologia* 623(1): 191-202.
24. Kim, H. S., S. J. Hwang, et al. (2007). "Effects of limiting nutrients and N : P ratios on the phytoplankton growth in a shallow hypertrophic reservoir (vol 581, pg 255, 2007)." *Hydrobiologia* 589: 317-317.
25. Logothetis, K., S. Dakanali, et al. (2004). "The impact of high CO₂ concentrations on the structure and function of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines." *J Plant Physiol* 161(6): 715-24.
26. Mata, T. M., A. A. Martins, et al. (2010). "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217-232.
27. Miao, X. L. and Q. Y. Wu (2006). "Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil." *Bioresource Technology* 97(6): 841-846.
28. Miller, R., G. X. Wu, et al. (2010). "Changes in Transcript Abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following Nitrogen Deprivation Predict Diversion of Metabolism." *Plant Physiology* 154(4): 1737-1752.
29. Moellering, E. R. and C. Benning (2010). "RNA Interference Silencing of a Major Lipid Droplet Protein Affects Lipid Droplet Size in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Eukaryotic Cell* 9(1): 97-106.
30. Mohapatra, P. K., R. C. Dash, et al. (1998). "Effects of nutrients at different salinities on growth of the freshwater green alga *Scenedesmus bijugatus* in water of Narendra Pond, Puri, Orissa." *International Review of Hydrobiology* 83(4): 297-304.
31. Noctor, G., R. De Paepe, et al. (2007). "Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants." *Trends Plant Sci* 12(3): 125-134.
32. Olennikov, D. N. and L. M. Tankhaeva (2006). "Absorption spectra of carbohydrates and related compounds in H₂SO₄." *Chemistry of Natural Compounds* 42(3): 262-264.
33. Ratledge, C. and Z. Cohen (2008). "Microbial and algal oils: Do they have a future for
34. biodiesel or as commodity oils?" *Lipid Technology* 20(7): 155-160.
35. Redfield, D. (1963). "MODEL FOR JUNCTION LUMINESCENCE." *Solid State Communications* 1: 151-153.
36. Rodolfi, L., G. C. Zittelli, et al. (2009). "Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor." *Biotechnology and Bioengineering* 102(1): 100-112.

37. Scott, S. A., M. P. Davey, et al. "Biodiesel from algae: challenges and prospects." *Curr Opin Biotechnol* 21(3): 277-86.
38. Strasser, B. J. and R. J. Strasser (1995). *Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test*. Dordrecht, Kluwer Academic Press.
39. Wang, Z. T., N. Ullrich, et al. (2009). "Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*." *Eukaryot Cell* 8(12): 1856-68.
40. Xiong, W., X. F. Li, et al. (2008). "High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production." *Applied Microbiology and Biotechnology* 78(1): 29-36.