

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



Διπλωματική Εργασία

*Αξιοποίηση των αποβλήτων τυροκομείων και
παραγωγή βιομάζας υψηλής διατροφικής αξίας με χρήση
του μικροφύκου *Chlorella sp.**

Τσολακίδη Αγγελική

Επιβλέπων: Καθηγητής Γανωτάκης Δημήτριος

Ηράκλειο 2022

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
DIVISION OF BIOCHEMISTRY



Bachelor Thesis

*Valorization of cheese-whey wastewaters and
production of high-nutritional value biomass using
the green microalga *Chlorella* sp.*

Tsolakidi Angeliki

Supervisor: Demetrios Ghanotakis

Heraklion 2022



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκά Διαρθρωτικά
και Επενδυτικά Ταμεία



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΝΔΥΣΕΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΕΤΠΑ & ΤΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΑνεΚ

ΕΠΑνεΚ 2014-2020
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Η εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ, συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνεΚ)

Κωδικός έργου: Τ2ΕΔΚ-03976

Ευχαριστίες

Φτάνοντας στο τέλος των προπτυχιακών μου σπουδών και ολοκληρώνοντας τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω ανθρώπους, οι οποίοι με βοήθησαν να φτάσω ως εδώ και να καταφέρω τους στόχους που είχα θέσει. Κάποιοι από αυτούς είναι χρόνια δίπλα μου, ενώ κάποιους άλλους τους γνώρισα κατά την πορεία των σπουδών μου στο Πανεπιστήμιο Κρήτης. Όλοι αυτοί υπήρξαν στήριγμα για μένα σε περιόδους που τους είχα ανάγκη.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πανεπιστήμιο Κρήτης, το οποίο μου παρέχει υψηλού επιπέδου γνώσεις, αλλά και τις κατάλληλες δομές (εργαστήρια, αμφιθέατρα κτλ) για την λήψη όλων των σημαντικών εφοδίων. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές που με δίδαξαν, καθώς ο καθένας από αυτούς με το δικό του τρόπο στο καθένα από τα προπτυχιακά μαθήματα μου μεταλαμπάδευσαν γνώσεις και νέες τεχνικές, οι οποίες ήταν άγνωστες σε εμένα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον κύριο Δημήτριο Γανωτάκη, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ στο εργαστήριό του για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά και που μου παρείχε σημαντικές συμβουλές για το θέμα με το οποίο ασχολήθηκα, καθώς και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, με την ανάθεση ενός σημαντικού project για το εργαστήριο. Η πόρτα του ήταν πάντοτε ανοικτή όποτε τον χρειάστηκα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου τα οποία είχα την χαρά και την τύχη να γνωρίσω. Ιδιαίτερω, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Θεοχάρη Νάζο, για την συνεργασία μας, αλλά και την υποστήριξη που μου παρείχε, όχι μόνο σε γνωστικό επίπεδο, αλλά και σαν άνθρωπος. Οι στοχευμένες παρατηρήσεις του για το project, αλλά και η τρέλα και το χαμόγελο που πάντα είχε αποτέλεσαν σημαντικούς παράγοντες για την ομαλή και ευχάριστη εργασία μου στο εργαστήριο. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδακτορικό μου , Ναπολέον Στρατηγάκη, οι οποίος ήταν πάντα εκεί για μένα και έδειξε τεράστια υπομονή και κατανόηση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, ακόμα και σε λάθη που έκανα. Η πολύτιμη βοήθεια του, οι γνώσεις που μου παρείχε, και η διάθεση του να απαντήσει σε ό,τι απορία είχα, υπήρξαν καθοριστικές για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας. Τα άτομα αυτά υπήρξαν και φίλοι μου και με στηρίζαν όποτε τους χρειάστηκα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Αγγελική Χατζηαθανασίου, τη Ζένια Βισκαδουράκη, τη Σοφία Λιουδάκη και τη Μαρία Μανουσάκη οι οποίες με βοήθησαν στην κατανόηση τεχνικών του εργαστηρίου, αλλά και διασφάλισαν ένα ευχάριστο περιβάλλον εργασίας, για όσο καιρό ήμουν εκεί, μέσα από τις όμορφες στιγμές που πέρασα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την παρέα μου από το Πανεπιστήμιο, την οποία είχα την τύχη να γνωρίσω κατά τη διάρκεια των σπουδών μου και μέσα από αυτά τα άτομα έζησα πολλές όμορφες στιγμές που θα μείνουν ανεξίτηλα στη μνήμη μου. Ιδιαίτερος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Νεκταρία-Χαίδω Λιακούλη, τη Βασιλική Τζωράκη και τον Γιάννη Φλουρή, οι οποίοι αποτέλεσαν τους πιο κοντινούς μου ανθρώπους σε δύσκολες στιγμές, όταν είχα ανάγκη την παρουσία τους. Τα γέλια, οι χαρές και οι λύπες που περάσαμε πάνω στα έδρανα τις σχολής, και όχι μόνο, έκαναν ομορφότερη την πορεία μου στο πανεπιστήμιο.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις κολλητές μου, Αιμιλία και Πασχαλιά, με τις οποίες έχουμε περάσει αμέτρητες στιγμές, κατά τη διάρκεια της ζωής μου, από το σχολείο μέχρι και τώρα και οι οποίες μέσα από την μακροχρόνια φιλία μας υπήρξαν στήριγμα για μένα, ακόμα και τώρα, παρά την απόσταση που μας χωρίζει. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Γιάννη Καλυκάκη, ο οποίος όλα αυτά τα χρόνια μου έχει σταθεί και με έχει βοηθήσει να συνεχίζω να προσπαθώ και να χαμογελώ πάντα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τους γονείς μου Κωνσταντίνο και Μαρία, και τα αδέρφια μου Πηνελόπη και Στέφανο, οι οποίοι μου έδωσαν πολλή αγάπη και τις αρχές που έχω σήμερα και με βοήθησαν να ξεπεράσω ό,τι εμπόδιο συνάντησα στη ζωή μου, μένοντας πάντα δίπλα μου. Χωρίς αυτούς δεν θα είχα φτάσει να είμαι ο άνθρωπος που είμαι τώρα και για αυτό τους χρωστάω πολλά.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ανάπτυξη ενός μικροφύκου *Chlorella* σε απόβλητα τυροκομείων από το πρωτογενές και το δευτερογενές στάδιο παραγωγής τυριών με βάση το αιγοπρόβειο γάλα.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μάς έδειξαν ότι τα απόβλητα τυροκομείων που ερευνήθηκαν έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως μέσα καλλιέργειας του μικροφύκου, ακολουθώντας την κατάλληλη στρατηγική. Τα προκαταρκτικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε μικρό όγκο καλλιέργειας. Στο πρωτογενές κλάσμα (πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά) παρουσιάστηκε υψηλή παραγωγή βιομάζας και τα μικροφύκη έδειξαν υψηλή φωτοσυνθετική απόδοση. Στο δευτερογενές κλάσμα, ο περιοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη ήταν η υψηλή αλατότητα των αποβλήτων, καθώς η ανάπτυξη ήταν εφικτή μόνο κατά την αραιώσή τους με νερό. Το γεγονός αυτό αντιμετωπίστηκε με την προσέγγιση της ανάμειξης των δευτερογενών αποβλήτων με το πρωτογενές κλάσμα σε ένα εύρος αναλογιών, προκειμένου να μειωθεί το ποσοστό αλατότητας του δευτερογενούς κλάσματος. Η προσέγγιση αυτή οδήγησε σε υψηλή ανάπτυξη και φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροφύκου, σε συγκρίσιμα επίπεδα με τις καλλιέργειες του μάρτυρα. Στη συνέχεια, μελετήθηκε και η ανάπτυξη του μικροφύκου στα πρωτογενή απόβλητα, σε εργαστηριακούς βιοαντιδραστήρες όγκου καλλιέργειας ενός λίτρου. Η καλλιέργεια σε μεγαλύτερο όγκο αποβλήτων παρουσίασε συγκρίσιμα αποτελέσματα με αυτά των πειραμάτων μικρής κλίμακας. Από την ανάλυση της στερεής βιομάζας αποδείχθηκε ότι το βιοχημικό της περιεχόμενο ήταν πλούσιο σε πρωτεΐνες και εμπλουτισμένο πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Σε όλες τις περιπτώσεις η μόνη κατεργασία που υπέστησαν τα απόβλητα ήταν κλιβανισμός με αυτόκαυστο και προσθήκη ενός διαλύματος ιχνοστοιχείων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής καθιστούν σαφές ότι τα απόβλητα τυροκομείου μπορούν να αποτελέσουν θρεπτικά μέσα για την καλλιέργεια μικροφυκών, με σκοπό την ταυτόχρονη βιοαποκατάστασή των αποβλήτων, αλλά και την παραγωγή εμπορικά αξιοποιήσιμης βιομάζας.

Λέξεις κλειδιά: *Chlorella*, φωτοσύνθεση, ανάπτυξη, βιομάζα, απόβλητα τυροκομείων

ABSTRACT

In the present thesis, a methodology for *Chlorella* biomass production using primary and secondary cheese whey wastewaters, was investigated. This cheese whey was originated from sheep and goat milk.

Results of this study proved that cheese whey waste-waters have the potential to be used as substrates in culture media for microalgae using the appropriate experimental approach. Initial experiments were performed in small culture volume. In the primary fraction (rich in nutrients), microalgae exhibited high biomass production and photosynthetic efficiency. In the secondary fraction, growth was limited by the high salinity of the waste-waters and cell growth was only observed in diluted cheese whey wastewaters. For this purpose, these fractions were mixed together in various volumetric ratios, in order to decrease the salt content of the secondary. This approach led to an increase in both biomass production and photosynthetic efficiency to comparable levels with control cultures. In the last stage, microalgal growth was studied in pilot laboratory scale bioreactors (1000 mL volume). Cultivation in higher volumes presented comparable results to those of initial experiments. The dry biomass collected had been enriched in protein and polyunsaturated fatty acids content. In all cases the only pre-treatment performed was the autoclaving of the waste-waters and the addition of a trace mineral solution.

The outcomes of the present thesis clearly show that cheese whey waste-waters have the potential to be used as a proper nutrient substrate for the cultivation of microalgae with their simultaneous bioremediation and high-value biomass production.

Keywords: *Chlorella*, photosynthesis, growth, biomass, primary cheese whey, secondary cheese whey

Περιεχόμενα

Πίνακας περιεχομένων

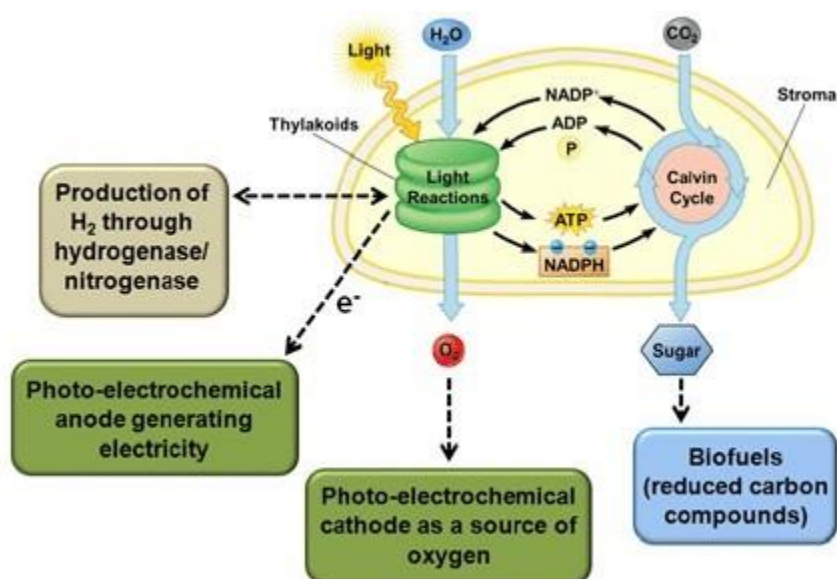
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Φωτοσύνθεση	9
1.2 Φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί.....	10
1.2.1 Μικροφύκη.....	10
1.2.2 Μικροφύκη του γένους <i>Chlorella sp</i>	11
1.3 Φθορισμός χλωροφύλλης.....	12
1.4 Καλλιέργειες κυττάρων.....	13
1.4.1 Φάσεις ανάπτυξης	13
1.4.2 Καλλιέργειες <i>Chlorella sp</i>	14
1.4.2.1 Αυτότροφες συνθήκες	14
1.4.2.2 Ετερότροφες συνθήκες	14
1.4.2.3 Μεικτότροφες συνθήκες	15
1.5 Βιοχημικό περιεχόμενο.....	15
1.5.1 Λιπίδια.....	16
1.5.2 Υδατάνθρακες.....	16
1.5.3 Πρωτεΐνες.....	16
1.5.4 Φωτοσυνθετικές χρωστικές	16
1.5.4.1 Χλωροφύλλες	17
1.5.4.2 Καροτενοειδή	18
1.6 Εφαρμογές <i>Chlorella sp</i>	19
1.6.1 Τρόφιμα.....	19
1.6.2 Χρωστικές.....	20
1.6.3 Βιοντίζελ [13].....	21
1.6.4 Ιατρική-Φαρμακευτική	21
1.6.5 Ζωοτροφές [38]	21
1.6.6 Βιοαποικοδόμηση.....	22
1.7 Απόβλητα τυροκομείου	23
1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	26
2.1 Δείγματα υγρών γαλακτοκομικών αποβλήτων.....	26

2.2 Οργανισμός και συνθήκες ανάπτυξης	27
2.3 Μελέτη ανάπτυξης <i>Chlorella sp</i> σε δείγματα τυροκομικών αποβλήτων	29
2.3.1 Παρασκευή πειραματικών καλλιεργειών <i>Chlorella sp</i> με απόβλητα τυροκομείων σε εύρος αραιώσεων και σε μείγματα τυρογαλάκτων ως υπόστρωμα σε μικρή κλίμακα	29
2.3.2 Μελέτη ανάπτυξης <i>Chlorella sp</i> σε δείγματα πρωτογενών αποβλήτων σε βιοαντιδραστήρα και καμπύλη ανάπτυξης	32
2.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΔΙΟΡΙΣΜΟΣ	33
2.5 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΕΠΑΓΩΓΙΚΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	34
2.6 Μετρήσεις ξηρής βιομάζας κυττάρων	34
2.7 Προσδιορισμός βιοχημικού περιεχομένου του μικροφύκου	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
3.1 Προηγούμενα πειράματα διερεύνησης συνθηκών ανάπτυξης της <i>Chlorella sp</i>	36
3.2 Διερεύνηση ανάπτυξης της <i>Chlorella sp</i> σε πρωτογενή απόβλητα τυρογάλακτος, με αραιώση 37	
3.3 Διερεύνηση ανάπτυξης της <i>Chlorella sp</i> σε δευτερογενή απόβλητα τυρογάλακτος με αραιώση	42
3.4 Διερεύνηση ανάπτυξης της <i>Chlorella sp</i> σε δείγματα με ανάμειξη των πρωτογενών και των δευτερογενών αποβλήτων σε διάφορες αναλογίες	48
3.5 Διερεύνηση ανάπτυξης <i>Chlorella sp</i> σε φωτοβιοαντιδραστήρα	52
3.6 Ανάλυση βιοχημικού περιεχομένου	57
3.7 Συμπεράσματα	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	63
Βιβλιογραφία	65

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

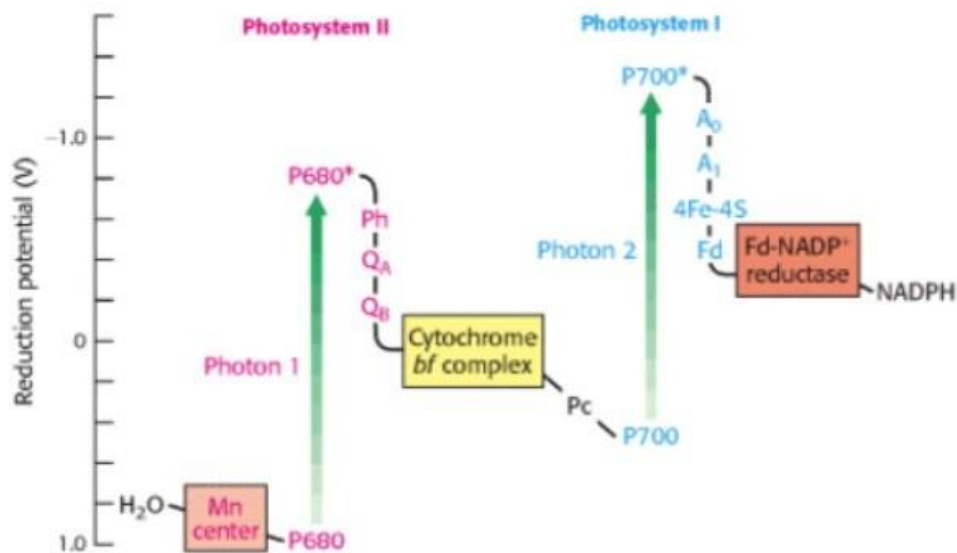
1.1 Φωτοσύνθεση

Ως φωτοσύνθεση ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία από τον ήλιο μετατρέπεται σε χημική ενέργεια. Κατά τη διεργασία αυτή, το διοξείδιο του άνθρακα μετατρέπεται σε υδατάνθρακες. Παράλληλα, το νερό μετατρέπεται σε μοριακό οξυγόνο αντίστοιχα. Η φωτοσύνθεση συνιστά μείζονος σημασίας διεργασία για την εξασφάλιση της ζωής, καθώς μέσω αυτής παρέχεται η απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση των οργανισμών, ενώ παράλληλα παράγεται ένα μεγάλο ποσοστό οργανικών μορίων. Η φωτοσύνθεση περιλαμβάνει δύο ειδών αντιδράσεις, τις φωτεινές και τις σκοτεινές. Στις φωτεινές αντιδράσεις, η φωτεινή ενέργεια μετατρέπεται σε ATP, καθώς και αναγωγική ισχύ, γνωστή ως NADPH. Στις σκοτεινές αντιδράσεις, γνωστές και ως κύκλος του Calvin, τα προϊόντα από τις φωτεινές αντιδράσεις χρησιμοποιούνται για την αναγωγή του CO₂ και μετατροπή σε γλυκόζη, καθώς και άλλες μορφές οργανικού άνθρακα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι σκοτεινές αντιδράσεις μπορούν να λάβουν χώρα και παρουσία φωτός. Αντίθετα, οι φωτεινές αντιδράσεις απαιτούν την παρουσία φωτός για να πραγματοποιηθούν [1].



Εικόνα 1.1: Τα χαρακτηριστικά των φωτεινών και σκοτεινών διαδικασιών κατά την φωτοσύνθεση. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [4].

Η φωτοσύνθεση μπορεί να είναι οξυγονική ή μη οξυγονική. Κατά την οξυγονική φωτοσύνθεση παράγεται οξυγόνο ως παραπροϊόν, καθώς ο αναγωγικός παράγοντας είναι το νερό. Οι οργανισμοί που είναι ικανοί να φωτοσυνθέτουν οξυγονικά είναι τα φυτά, τα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια. Στα ανώτερα φυτά, καθώς και στα πράσινα μικροφύκη, η φωτοσύνθεση πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες, και πιο συγκεκριμένα στις θυλακοειδείς μεμβράνες, όπου συνιστούν τα φωτοσυστήματα. Η διεργασία ξεκινά με την απορρόφηση του φωτός από τις χρωστικές στο φωτοσύστημα II. Η απορροφηθείσα ενέργεια μεταφέρεται στο κέντρο της αντίδρασης (P680). Καθοριστικό στάδιο αποτελεί η βαθμίδωση συγκέντρωσης ηλεκτρονίων μεταξύ των δύο πλευρών της θυλακοειδούς μεμβράνης [2].



Εικόνα 1.2 Πορεία των ηλεκτρονίων κατά τη φωτοσύνθεση. Το φως απορροφάται από το φωτοσύστημα II (P680) και το φωτοσύστημα I (P700). Αναγράφονται με συντομογραφίες: Ph φαιοφυτίνη, Q_A και Q_B οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν την πλαστοκινίνη, Pc πλαστοκυανίνη, A_0 , A_1 δέκτες ηλεκτρονίων από το P_{700} , Fd φερρεδοξίνη, WOC σύμπλοκο οξειδωσης νερού. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [1].

1.2 Φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί

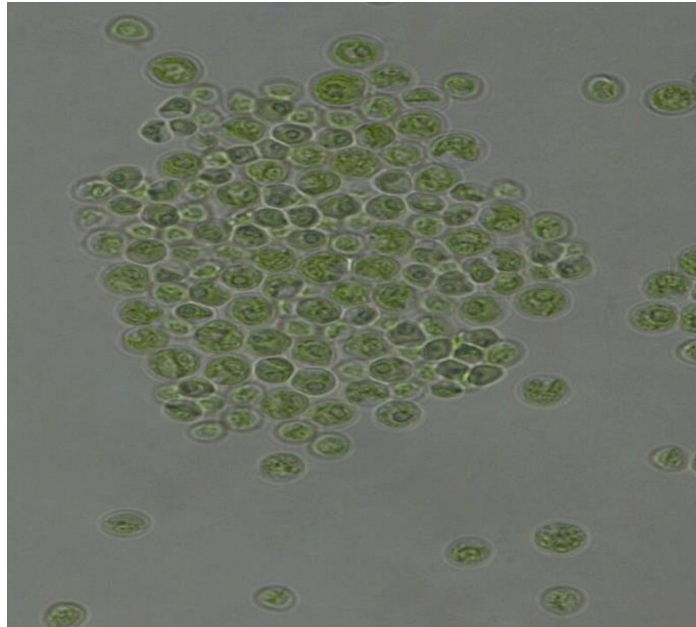
1.2.1 Μικροφύκη

Τα μικροφύκη είναι ευκαρυωτικοί ή προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι, που έχουν τη δυνατότητα να φωτοσυνθέτουν [24]. Σε αυτούς κατατάσσονται φωτοσυνθετικά κυανοβακτήρια, καθώς και οι τα ευκαρυωτικά πράσινα μικροφύκη του γένους *Chlorella*. Εντοπίζονται σε αλμυρά και γλυκά νερά, ακόμα και στο έδαφος, ενώ σε πολλές περιπτώσεις είναι παρόντα σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, πίεσης, αλατότητας, ή ακτινοβολίας. Τα μικροφύκη έχουν ένα ευρύ φάσμα βιοτεχνολογικών εφαρμογών, καθώς παράγουν μία μεγάλη ποικιλία φυσικών προϊόντων υψηλής αξίας. Ανάμεσα σε αυτά είναι τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, οι φωτοσυνθετικές χρωστικές και τα αντιοξειδωτικά. Οι μεταβολίτες των μικροφυκών διατίθενται στο εμπόριο ως πρόσθετα και συμπληρώματα διατροφής.

1.2.2 Μικροφύκη του γένους *Chlorella sp*

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε ένα μικροφύκος το οποίο ανήκει στο γένος *Chlorella sp*. Οι μικροοργανισμοί του γένους *Chlorella sp* είναι μονοκύτταρα ευκαρυωτικά πράσινα μικροφύκη, με σφαιρικό σχήμα με διάμετρο 2-10 μm. Εντοπίζονται σε περιοχές με γλυκό νερό (πχ ποταμούς), αλλά και στο έδαφος και διαθέτουν την ικανότητα να φωτοσυνθέτουν. Ο μικροοργανισμός αυτός απομονώθηκε από ευτροφικό σημείο στον ποταμό Γιόφυρο στην πόλη του Ηρακλείου Κρήτης, την εργαστηριακή μας ομάδα. Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου πραγματοποιήθηκε γενετικός, μορφολογικός και βιοχημικός χαρακτηρισμός του στελέχους [5,6,7,8]. Τα κύτταρα έχουν σφαιρικό-ελλειψοειδές σχήμα και ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται μέσω αυτοσπορίωσης. Το στέλεχος αυτό εμφανίζει αυξημένη ανθεκτικότητα σε τοξικές για φωτοσυνθετικά μικροφύκη ουσίες, όπως αντιβιοτικά και αναστολείς της φωτοσύνθεσης (ζιζανιοκτόνα). Αυτό θεωρείται ότι οφείλεται σε έναν εκτενή εξωπολυσακχαρίτη που περιβάλλει τα κύτταρα. Η *Chlorella sp* πολλαπλασιάζεται εντός αυτής της μήτρας, περιορίζοντας έτσι την επίδραση τοξικών ουσιών από το περιβάλλον. Μελέτες μας έδειξαν ότι αυτός ο πολυσακχαρίτης είναι πλούσιος σε αμινοσάκχαρα και εμφανίζει δομή παρόμοια με τη χιτοζάνη (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Η ανάπτυξη της μπορεί να γίνει με υψηλότερους ρυθμούς σε ετερότροφες συνθήκες, με την παροχή οργανικής πηγής άνθρακα (π.χ CH₃COOH), είτε σε αυτότροφες συνθήκες, κατά τις οποίες χρησιμοποιεί ως πηγή άνθρακα το CO₂ από την ατμόσφαιρα, όπου και εμφανίζει έντονη φωτοσυνθετική δραστηριότητα ακόμα και σε συνθήκες πολύ χαμηλής έντασης φωτός. Επιπλέον, παρουσιάζει πλούσιο βιοχημικό περιεχόμενο σε πρωτεΐνες και

αντιοξειδωτικά. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν αυτό το στέλεχος μικροφύκους ιδανικό για εφαρμογές βιοαποκατάστασης αποβλήτων, με την παράλληλη παραγωγή βιομάζας υψηλής αξίας.



Εικόνα 1.3: Κύτταρα του γένους *Chlorella sp.*, όπως παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο. Τα κύτταρα παρουσιάζονται πράσινα, με σφαιρικό σχήμα, είτε μεμονωμένα, είτε ως συσσωματώματα.

1.3 Φθορισμός χλωροφύλλης

Κατά τον φθορισμό χλωροφύλλης, τα μόρια του κυττάρου που βρίσκονται στη θεμελιώδη κατάσταση διεγείρονται με την εφαρμογή ακτινοβολίας συγκεκριμένης συχνότητας. Το διεγερμένο μόριο υφίσταται κρούσεις με τα γύρω μόρια και μεταβαίνει σε χαμηλότερες ενεργειακές στάθμες, αποβάλλοντας ενέργεια. Στον φθορισμό, η διάρκεια της εκπομπής ακτινοβολίας είναι της τάξης των ns [3]. Όταν το φως πέφτει πάνω στα μόρια της χλωροφύλλης, η ενέργεια μπορεί να διοχετευτεί σε τρία μονοπάτια: 1) φωτοχημεία-φωτοσύνθεση, 2) θερμότητα, 3) φθορισμός [25]. Η απόδοση φθορισμού μπορεί να είναι χαμηλή όταν υπάρχει έντονη φωτοσυνθετική δραστηριότητα ή μεγάλη αποβολή θερμότητας. Συνεπώς, μελετώντας τη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση, λαμβάνονται πληροφορίες για την κατάσταση στην οποία βρίσκεται ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός, για τυχόν καταπόνηση ή φθορά στο σύστημα. Ενδεικτικά, μπορεί να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα μεταφοράς

ηλεκτρονίων, καθώς και η ικανότητα του φωτοσυστήματος I και II να απορροφήσουν φως. Για τη μέτρηση του φθορισμού, τα κύτταρα τοποθετούνται στο σκοτάδι, προκειμένου τα ηλεκτρόνια να αποδεσμευτούν από τα κέντρα αντίδρασης και να μεταβούν στη θεμελιώδη κατάσταση. Στη συνέχεια, το δείγμα ακτινοβολείται με παλμό συνεχούς φωτός. Τότε, ο φθορισμός αυξάνεται από την αρχική τιμή (F_0) στο μέγιστο επίπεδο (F_m) και στη συνέχεια μειώνεται βαθμιαία μια σταθερή τιμή (F_s). Η τιμή F_v αφορά την ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο επιπέδων ($F_v = F_m - F_0$). Ως παράμετρος της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης χρησιμοποιείται ο λόγος $\frac{F_v}{F_m}$, ο οποίος σε υγιή δείγματα αναμένεται να παίρνει τιμές κοντά στο 0,7-0,8. Μείωση των τιμών του λόγου υποδεικνύουν φθορά και καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

1.4 Καλλιέργειες κυττάρων

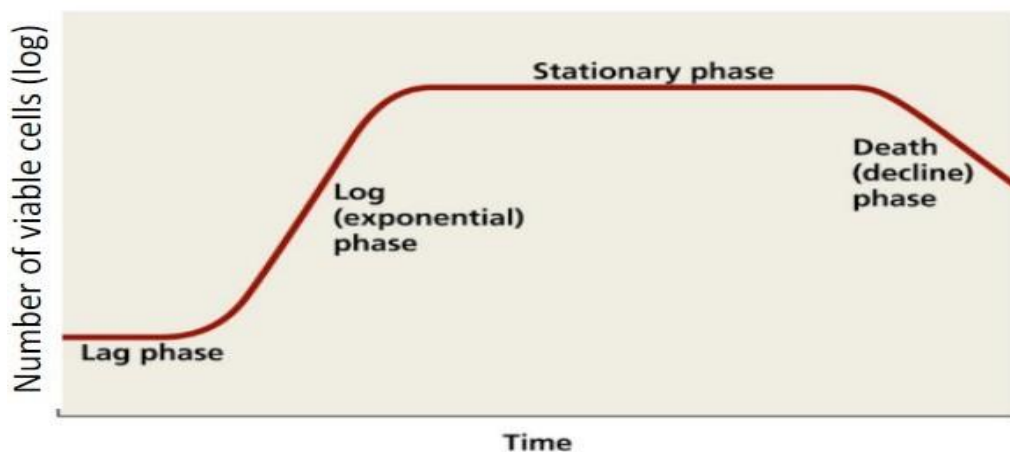
1.4.1 Φάσεις ανάπτυξης

Οι φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων είναι 4 και παρατίθενται παρακάτω [24]:

1. Λανθάνουσα: Στην φάση αυτή δεν παρατηρείται ιδιαίτερη κυτταρική ανάπτυξη. Τα κύτταρα προσαρμόζονται στο περιβάλλον και τις συνθήκες.
2. Εκθετική: Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι ταχύς, ακολουθώντας εκθετική πορεία. Στην φάση αυτή καταναλώνονται τα θρεπτικά συστατικά, ενώ παράλληλα παράγονται οι μεταβολίτες.
3. Στατική: Ο ρυθμός ανάπτυξης επιβραδύνεται και εξισώνεται με το ρυθμό θανάτου, καθώς καταναλώνονται τα θρεπτικά συστατικά, ενώ οι μεταβολίτες που παράγονται ενδέχεται να είναι τοξικοί.
4. Φάση θανάτου: Ο αριθμός κυττάρων που πεθαίνουν είναι μεγαλύτερος από αυτόν που αναπτύσσεται.

Η διάρκεια της κάθε φάσης διαφέρει μεταξύ των μικροοργανισμών.

Οι φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων κατά την κυτταρική καλλιέργεια παρατίθενται στην εικόνα 1.4.



Εικόνα 1.4: Οι φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [24].

1.4.2 Καλλιέργειες *Chlorella sp*

Η *Chlorella* μπορεί να αναπτυχθεί τόσο σε αυτότροφες, όσο και σε ετερότροφες αλλά και μεικτότροφες συνθήκες, οδηγώντας στην παραγωγή ικανής ποσότητας βιομάζας.

1.4.2.1 Αυτότροφες συνθήκες

Σε αυτότροφες συνθήκες η *Chlorella sp* χρησιμοποιεί ανόργανες πηγές άνθρακα, όπως το CO₂ που λαμβάνει από την ατμόσφαιρα και μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης μετατρέπει την ηλιακή ενέργεια σε χημική. Στην κατηγορία αυτή κατατάσσονται οι χημειοαυτότροφοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι οξειδώνουν ανόργανες ενώσεις για τη λήψη της ενέργειας που χρειάζονται. Η καλλιέργεια υπό αυτότροφες, και πιο συγκεκριμένα υπό φωτοαυτότροφες συνθήκες αποτελεί τον πιο κοινό τρόπο καλλιέργειας και λαμβάνει μέρος τόσο σε ανοικτές λίμνες, όσο και σε φωτοαντιδραστήρες. Παρόλα αυτά, καθίσταται περιοριστική για την παραγωγή υψηλής ποσότητας βιομάζας σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη καλλιέργειας.

1.4.2.2 Ετερότροφες συνθήκες

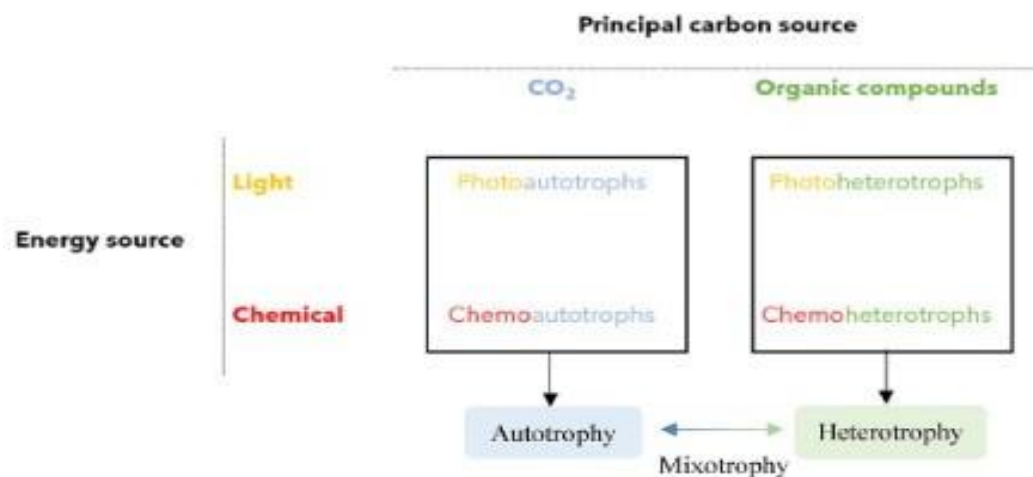
Στην περίπτωση της ετερότροφης ανάπτυξης, κύριες πηγές άνθρακα αποτελούν οργανικές ενώσεις που λαμβάνονται είτε μέσα από διαλύματα (ωσμοτροφία) είτε κατά την κατανάλωση ζωντανών ή νεκρών σωματιδίων (φαγοτροφία). Στην περίπτωση που

χρησιμοποιούν την ηλιακή ενέργεια ονομάζονται φωτο-οργανότροφοι, ενώ στην περίπτωση που οξειδώνουν τις οργανικές ενώσεις ονομάζονται χημειοετερότροφοι ή χημοοργανότροφοι. [10]

1.4.2.3 Μεικτότροφες συνθήκες

Η ανάπτυξη της *Chlorella sp* λαμβάνει χώρα και υπό μεικτότροφες συνθήκες. Στην περίπτωση αυτή γίνεται παροχή τόσο ανόργανου άνθρακα (CO_2), όσο και οργανικού, γεγονός που αυξάνει την απόδοση στην παραγωγή βιομάζας, αλλά και το ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Παραδείγματα οργανικού άνθρακα αποτελούν το οξικό οξύ, η γλυκερόλη, καθώς και οι απλοί και σύνθετοι υδατάνθρακες, με τη γλυκόζη να αποτελεί το καλύτερο υπόστρωμα για την παροχή άνθρακα, ενώ οι δισακχαρίτες (π.χ. μαλτόζη, λακτόζη) αποτελούν δυσκολότερα υποστρώματα για τη χρήση τους από το μικροφύκος. Η προσθήκη πηγών μονοσακχαριτών επιδρά στην βιοχημική σύσταση του μικροφύκους ως προς το λιπιδικό της περιεχόμενο. [10]

Οι τρόποι καλλιέργειας παρατίθενται συνοπτικά στην εικόνα 1.5



Εικόνα 1.5: Κατηγορίες καλλιέργειών μικροφυκών με βάση την πηγή άνθρακα και την πηγή ενέργειας για την ανάπτυξή τους. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [10].

1.5 Βιοχημικό περιεχόμενο

1.5.1 Λιπίδια

Τα λιπίδια αποτελούν πηγή ενέργειας για το κύτταρο, ενώ παράλληλα αποτελούν συστατικά των μεμβρανών, αλλά και αποθήκες ενέργειας. Συνίσταται από πολικές (υδρόφιλες) και μη πολικές (υδρόφοβες) ομάδες. Το μεγαλύτερο μέρος των λιπιδίων υπάρχει με την μορφή τριγλυκεριδίων, καθώς τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που μπορεί να υπάρχουν είναι πιθανό να είναι τοξικά. Άλλες μορφές των λιπιδίων είναι τα φωσφολιπίδια και τα γλυκολιπίδια, στα οποία η υδρογονοανθρακική αλυσίδα είναι συνδεδεμένη με πολικές ομάδες, όπως η φωσφορική ομάδα ή ομάδα γλυκερόλης ή σφιγγοσίνης αντίστοιχα. Η μετεστεροποίηση των τριακυλογλυκεριδίων, οδηγεί στην παραγωγή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAMES) που αποτελούν το κύριο συστατικό των βιοντίζελ. Χαρακτηριστικά παραδείγματα λιπαρών οξέων που παράγονται είναι το παλμιτικό (16:0), το στεατικό (18:0) τα οποία είναι κορεσμένα, καθώς και το παλμιτελαϊκό (16:1) και το ελαϊκό (18:1), τα οποία είναι μονοακόρεστα. Το ποσοστό στο οποίο απαντώνται τα λιπίδια κυμαίνεται σε ένα εύρος 5-40%.

1.5.2 Υδατάνθρακες

Ο ρόλος των υδατανθράκων είναι διπλός: αποτελούν αποθήκες ενέργειας και πηγή άνθρακα, ενώ ταυτόχρονα και συνιστούν δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Κάποια είδη του γένους *Chlorella sp* έχουν την ικανότητα να αποθηκεύουν μεγάλες ποσότητες υδατανθράκων όπως το άμυλο για τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου [1]. Αποτελούν το 26-41% της ξηρής μάζας του κυττάρου.

1.5.3 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες συνίσταται από αλυσίδες αμινοξέων συνδεδεμένα μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Μπορούν να αποτελέσουν πηγή αζώτου (λόγω αμινικής ομάδας), καθώς και ανθράκων. Αποτελούν λειτουργικά και δομικά συστατικά των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες αποτελούν το 34-39% της ξηρής μάζας των κυττάρων.

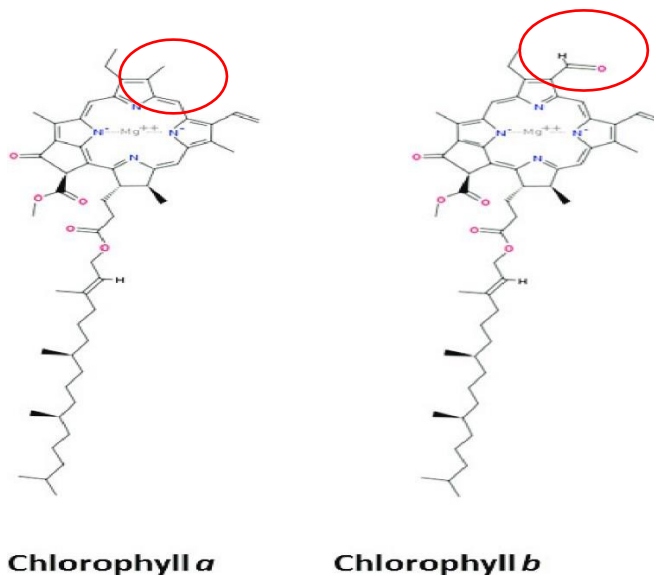
1.5.4 Φωτοσυνθετικές χρωστικές

Όπως προαναφέρθηκε, τα μικροφύκη του γένους *Chlorella sp* είναι ικανά να φωτοσυνθέτουν, συνεπώς η παρουσία φωτοσυνθετικών χρωστικών είναι αναγκαία. Οι χρωστικές αυτές συντίθενται στους χλωροπλάστες και πιο συγκεκριμένα στα θυλακοειδή των οργανιδίων αυτών. Αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες με ασθενείς, μη ομοιοπολικούς δεσμούς από τις οποίες μπορούν να απομακρυνθούν με διαλυτοποίηση με οργανικούς διαλύτες και άλεσμα. Κατατάσσονται στην κατηγορία των λιπιδίων και εμφανίζουν απορρόφηση στο ορατό φάσμα (400-800 nm).¹ Τα κυριότερα είδη φωτοσυνθετικών χρωστικών είναι οι χλωροφύλλες, τα καροτενοειδή (καροτένια, ξανθοφύλλες) και οι φυκοβιλίνες. Οι χρωστικές αυτές εμφανίζουν αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Επιπλέον, δρουν κατά την εμφάνιση της παχυσαρκίας, ενώ παράλληλα προστατεύουν το νευρικό σύστημα. Ως εκ τούτου, βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε συμπληρώματα διατροφής, καθώς και ως πρόσθετα τροφίμων ως αντιοξειδωτικά. Το ποσοστό των συνολικών χρωστικών ανέρχεται στο 3,4-8% σε ολικές χλωροφύλλες και 0,6-0,8% ολικά καροτενοειδή. Το ποσοστό των χρωστικών που υπάρχουν είναι ενδεικτικό της κατάστασης στην οποία βρίσκεται το φωτοσυνθετικό σύστημα, καθώς και αν το κύτταρο έχει υποστεί καταπόνηση κατά την ανάπτυξή του.

1.5.4.1 Χλωροφύλλες

Οι χλωροφύλλες a και b αποτελούν τις κύριες μορφές της χλωροφύλλης, και είναι υπεύθυνες για το πράσινο χρώμα του μικροφύκου. Η χλωροφύλλη a ιδιαίτερα, προσδίδει το σκούρο πράσινο χρώμα. Η χλωροφύλλη a εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό από την χλωροφύλλη b. Οι χλωροφύλλες απορροφούν φως στο κυανό (450 nm) και στο ερυθρό (650-700 nm) τμήμα του ορατού. Οι δομές των χλωροφυλλών παρατίθενται στην εικόνα 1.6.

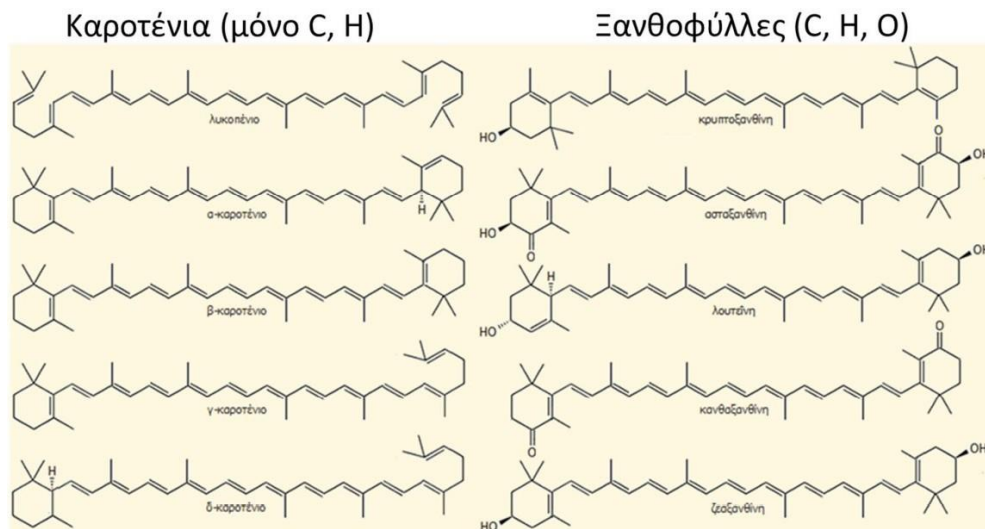
¹ Πηγή: https://www.researchgate.net/figure/Structures-of-the-chlorophyll-molecules_fig5_317151195



Εικόνα 1.6: Οι δομές των χλωροφυλλών a και b. Όπως φαίνεται, τα μόρια αποτελούνται από 4 πυρρολικούς δακτυλίους με ένα κεντρικό άτομο μαγνησίου και μία μακριά υδρογονοανθρακική αλυσίδα φυτόλης. Η διαφορά των δύο μορίων επισημαίνεται με κόκκινο χρώμα, όπου υπάρχει μεθυλομάδα ή αλδεΐδομάδα και αντιπροσωπεύει την χλωροφύλλη a και b αντιστοίχως ¹.

1.5.4.2 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα καροτένια και τις ξανθοφύλλες. Τα καροτένια είναι πολυένια και αποτελούνται από άνθρακα και υδρογόνο, ενώ οι ξανθοφύλλες περιέχουν άνθρακα, υδρογόνο και οξυγόνο. Ενδεικτικά, το β-καροτένιο, η λουτεΐνη, η νεοξανθίνη, η βιολαξανθίνη και η ζεαξανθίνη συνιστούν παραδείγματα χρωστικών που είναι παρούσες στον μικροοργανισμό. Τα καροτενοειδή απορροφούν κυρίως τις ακτινοβολίες που ανήκουν στο κυανό και μεταξύ κυανού και πράσινου τμήματος του φάσματος. Ο ρόλος των καροτενοειδών είναι σημαντικός, καθώς είναι υπεύθυνα για την μεταφορά της ενέργειας σε μόρια της χλωροφύλλης a κατά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, ενώ παράλληλα εμποδίζουν την φωτοξείδωση της χλωροφύλλης a. [11,12]. Κάποιες από τις τυπικές δομές των καροτενοειδών παρατίθενται στην εικόνα 1.7.



Εικόνα 1.7: Τυπικές δομές των καροτενοειδών. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [12]

Η *Chlorella sp* χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνες, πρωτεΐνες και μέταλλα. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται ευρέως στα τρόφιμα, ως συμπλήρωμα διατροφής. Η ξηρή βιομάζα χρησιμοποιείται ευρέως σε υδατοκαλλιέργειες και σε ζωοτροφές. Κάποια είδη μπορούν και συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες αμύλου όταν βρίσκονται σε στρεσογόνες συνθήκες (π.χ έλλειψη αζώτου), ενώ κάποια άλλα είδη συνθέτουν λιπίδια με τη μορφή ουδέτερων τριακυλογλυκερολών.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί το γεγονός ότι οι συνθήκες ανάπτυξης επιδρούν σημαντικά στην βιοχημική σύσταση του κυττάρου, καθώς η ανάπτυξη σε αυτότροφες και ετερότροφες συνθήκες μεταβάλλει το ποσοστό των παραπάνω μεταβολιτών. Ενδεικτικά, η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες είναι σημαντικά υψηλότερη σε αυτότροφες συνθήκες, όπου τα κύτταρα χρησιμοποιούν μόνο το CO₂ ως πηγή άνθρακα.

1.6 Εφαρμογές *Chlorella sp*

Τα φωτοσυνθετικά μικροφύκη έχουν ελκύσει ερευνητικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον, καθώς παρουσιάζουν εφαρμογές σε πολλούς τομείς, με ενδεικτικούς τον τομέα των τροφίμων, αλλά και της φαρμακευτικής και της κοσμητολογίας. Επιπλέον, η εφαρμογή τους στα βιοντίζελ αποτελεί μία υποσχόμενη εναλλακτική πηγή ενέργειας.

1.6.1 Τρόφιμα

Η διερεύνηση για τα διατροφικά οφέλη που παρέχει η *Chlorella sp* ξεκίνησε από το 1950. Πλέον, η *Chlorella sp* χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής σε παγκόσμιο επίπεδο. Μελέτη σε ζώα έχει δείξει ότι το 80% των πρωτεϊνών της είναι εύπεπτες. Η ανάλυση των πρωτεϊνών αυτών έδειξε ότι περιέχεται σημαντική ποσότητα των απαραίτητων αμινοξέων για τον άνθρωπο (ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, θρεονίνη, τρυπτοφάνη, βαλίνη και ιστιδίνη), σε μεγαλύτερο μάλιστα ποσοστό σε σχέση με τη σόγια. Επιπλέον, περιέχονται σημαντικές ποσότητες αργινίνης, η οποία δρα ως υπόστρωμα για την παραγωγή NO, ενός νευροδιαβιβαστή που επηρεάζει κάθε σύστημα θηλαστικών, καθώς και ως ρυθμιστής των λειτουργιών του ανοσοποιητικού. Η *Chlorella sp* χαρακτηρίζεται και από περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, εκ των οποίων το 65% υπάγονται στις διαιτητικές ίνες, που προέρχονται από το κυτταρικό τοίχωμα. Αξιοσημείωτο είναι επίσης και το γεγονός ότι περίπου το 65-70% των συνολικών λιπαρών οξέων που βρίσκονται στα εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα *Chlorella sp* αποτελούνται από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

Εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα περιέχουν ποικιλία βιταμινών, όπως αυτές του συμπλέγματος Β (Β1, Β2, Β6, Β12, νιασίνη, φυλλικό οξύ, βιοτίνη, παντοθενικό οξύ), βιταμίνη C, D2, E και K. Τα προϊόντα *Chlorella sp* περιέχουν σημαντικές ποσότητες βιταμινών D2 και Β12, οι οποίες είναι γνωστό ότι απουσιάζουν στα φυτά.

Εκτός από αυτά, η *Chlorella sp* περιέχει αξιοσημείωτες ποσότητες μετάλλων, όπως ο σίδηρος, το κάλιο, το σελήνιο, το ασβέστιο, το νάτριο, ο ψευδάργυρος, φώσφορος, το μαγνήσιο[36].

Η ποικιλία ωφέλιμων συστατικών σε σημαντικές ποσότητες, καθιστούν τη χρήση της *Chlorella sp* ως συμπλήρωμα διατροφής σημαντικό παράγοντα αύξησης της διατροφικής αξίας του τροφίμου.

1.6.2 Χρωστικές

Τα καροτενοειδή είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές διεργασίες στα φυτά. Αποτελούν πολύτιμα συστατικά για την ανθρώπινη διατροφή, καθώς έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, αλλά και το β-καροτένιο έχει δράση ως προβιταμίνης Α. Το β-καροτένιο, η ασταξανθίνη, η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη και το λυκοπένιο είναι ευρέως γνωστά ως τα κύρια καροτενοειδή. Η *Chlorella vulgaris* παράγει λουτεΐνη ως το κύριο καροτενοειδές, ενώ η *Chlorella zofingiensis* συσσωρεύει σημαντικές ποσότητες ασταξανθίνης [36].

1.6.3 Βιοντίζελ [13]

Τα λιπίδια που παράγονται κατά την ανάπτυξη του μικροφύκου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοντίζελ. Τα περισσότερα λιπίδια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοντίζελ αποτελούνται από υψηλής περιεκτικότητας ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), γεγονός που καθιστά αναγκαία την εστεροποίηση τους [31]. Η καλλιέργεια των μικροφυκών παρέχει μεγάλες αποδόσεις ενέργειας σε χαμηλό κόστος, χρησιμοποιώντας διαδικασίες με χαμηλό περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Τα μικροφύκη έχουν την δυνατότητα να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων, έως και 80% της συνολικής τους βιομάζας, των οποίων η απόδοση σε βιοντίζελ μπορεί να φτάσει και το 91%. Τα κυρίαρχα είδη λιπιδίων, C:16 και C:18, που βρίσκονται σε ποσοστό του συνολικού ποσού των FAMES (Fatty Acid Methyl Ester) αποδίδουν καλής ποιότητας προϊόντα βιοντίζελ [35].

1.6.4 Ιατρική-Φαρμακευτική

Η *Chlorella sp* χρησιμοποιείται ευρέως ως συμπλήρωμα διατροφής παρέχοντας πλήθος σημαντικών συστατικών, καθιστώντας την ως πιθανό θεραπευτικό παράγοντα. Οι θεραπευτικές της *Chlorella sp* έχουν μελετηθεί πάνω σε διάφορες ασθένειες, όπως ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, καθώς και διάφορες μορφές καρκίνου. Η χορήγηση *Chlorella* είχε αντιοξειδωτική, αντικαταρράκτη και αντιπεργλυκαιμική δράση σε διαβητικούς αρουραίους. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κουνέλια και παχύσαρκα ποντίκια, η κατάποση *Chlorella* έδειξε δράση μείωσης των λιπιδίων και αντιαθηροσκληρωτική δράση [36]. Επιπλέον, μελέτες σε ζώα έδειξαν αντιθηρογόνες ιδιότητες του μικροφύκου, το οποίο καταστέλλει την παραγωγή προϊόντων γλυκοζυλίωσης (AGEs), τα οποία εμπλέκονται στην ανάπτυξη πολλών από τα παθολογικά επακόλουθα του διαβήτη και της γήρανσης, όπως αθηροσκλήρωση και διαβητική μικροαγγειοπάθεια, καθώς και σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Η ανασταλτική δράση για την παραγωγή των AGEs αποτελεί μία πιθανή θεραπεία για ασθένειες όπως αυτή του διαβήτη και της νόσου Alzheimer.

1.6.5 Ζωοτροφές [38]

Λόγω της ποικιλίας θρεπτικών συστατικών, ιχνοστοιχείων, βιταμινών και αντιοξειδωτικών που προσφέρει η *Chlorella sp*, είναι σημαντική η χρήση της για τον εμπλουτισμό ζωοτροφών. Η χρήση *Chlorella sp* σχετίζεται με βελτίωση της γεύσης και της αυξημένης απορρόφησης μετάλλων, καθώς δρα ως μεταφορέας σεληνίου και ιωδίου. Η *Chlorella sp* χρησιμοποιείται με τη μορφή λεπτής σκόνης, που έχει προκύψει από την ξήρανση της βιομάζας που λαμβάνεται από την καλλιέργεια. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μεγάλης κλίμακας χρήση της βιομάζας φυκιών ως συμπλήρωμα ζωοτροφών είναι το χαμηλό κόστος παραγωγής, αλλά και η δυνατότητα πέψης του προϊόντος. Λόγω της υψηλής πυκνότητας των φυκιών κατά τη συγκομιδή και της ικανότητας του μηρυκαστικά για την πέψη των κυτταρικών τοιχωμάτων, μπορεί να προστεθεί βιομάζα απευθείας στη τροφή αγελάδων γαλακτοπαραγωγής.

1.6.6 Βιοαποικοδόμηση

Η βιοαποκατάσταση είναι ένας κλάδος της βιοτεχνολογίας που χρησιμοποιεί τη χρήση ζωντανών οργανισμών, όπως τα μικρόβια και τα βακτήρια, για την απομάκρυνση, των ρύπων και των τοξινών από το έδαφος, το νερό και άλλα περιβάλλοντα ². Η βιοαποκατάσταση μπορεί να γίνει «in situ» (στο σημείο της μόλυνσης) ή «ex situ» (μακριά από την περιοχή). Κατά τη βιοαποικοδόμηση, οι μικροοργανισμοί μετατρέπουν τους ρύπους σε μικρές ποσότητες νερού, καθώς και σε αβλαβή αέρια όπως το διοξείδιο του άνθρακα. Οι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι μακροφύκη, μικροφύκη και κυανοβακτήρια. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και ένζυμα. Η βιοαποκατάσταση απαιτεί συνδυασμό σωστής θερμοκρασίας, θρεπτικών συστατικών και τροφών. Η απουσία αυτών των στοιχείων μπορεί να παρατείνει τον καθαρισμό από ρύπους.

Τα μικροφύκη βρίσκουν εφαρμογές στην αποικοδόμηση τοξικών αποβλήτων, συμβάλλοντας στην περιβαλλοντική βιωσιμότητα. Η επεξεργασία των αποβλήτων με τα μικροφύκη μειώνει τις ποσότητες COD και BOD, αλλά και ανόργανες και οργανικές ενώσεις οι οποίες είναι μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα τόσο υγείας, όσο και περιβαλλοντικά. Η χρήση μικροφυκών μπορεί να μειώσει επιπλέον και το κόστος που απαιτείται για την επεξεργασία αποβλήτων, συμβάλλοντας έτσι και στην οικονομική βιωσιμότητα. Τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία πολλών ειδών λυμάτων: λύματα από

² Πηγή: <https://www.investopedia.com/terms/b/bioremediation.asp#toc-what-is-bioremediation>

ιχθυοκαλλιέργειες, τυροκομικές εταιρείες, χοιροτροφικές μονάδες, ακόμα και σε αστικά λύματα. [40]. Πιο συγκεκριμένα, η *Chlorella sp* έχει τη δυνατότητα να προσλαμβάνει μόρια ρυπαντές και να τα χρησιμοποιεί ως πηγές θρεπτικών συστατικών, όπως πηγές άνθρακα, φωσφόρου και αζώτου.

1.7 Απόβλητα τυροκομείου

Τα απόβλητα κατά την παραγωγή τυριού και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων χαρακτηρίζονται από υψηλές τιμές BOD³ και COD⁴, γεγονός που οφείλεται στις μεγάλες ποσότητες λακτόζης και λιπαρών οξέων που υπάρχουν [27,29]. Επιπλέον, εντοπίζονται σημαντικές ποσότητες ενώσεων αζώτου και φωσφόρου, δημιουργώντας κινδύνους ευτροφισμού, προκαλώντας προβλήματα καθαρισμού των λυμάτων, αύξηση κόστους του καθαρισμού, καθώς και παραγωγή επικίνδυνων ουσιών. Το αυξημένο οργανικό φορτίο από την άλλη, δυσχεραίνει την διαχείριση των λυμάτων πριν αποβληθούν στο περιβάλλον.

Τα απόβλητα που προκύπτουν κατηγοριοποιούνται σε 3 είδη:

1) Στα πρωτογενή απόβλητα (Cheese Whey - CW), τα οποία προκύπτουν κατά την παραγωγή του τυροπήγματος για την παρασκευή σκληρού τυριού (γραβιέρα, φέτα) στο πρώτο στάδιο επεξεργασίας του γάλακτος.

2) Στα δευτερογενή απόβλητα (Second Cheese Whey - SCW), όπου μέρος του ορού του πρωτογενούς τυρογάλακτος επαναχρησιμοποιείται για την παραγωγή τυριών τυρογάλακτος (τυρί cottage, μυζήθρα).

3) Στα απόβλητα που προκύπτουν από τον καθαρισμό των σωληνώσεων, δεξαμενών κτλ. (Cheese Whey Wastewaters - CWW). Αυτά περιέχουν και CW και SCW.

³ BOD (Biological Oxygen Demand): Το BOD αντιπροσωπεύει το ποσοστό οξυγόνου που χρησιμοποιείται από βακτήρια και άλλα είδη μικροοργανισμών για την αποσύνθεση οργανικής ύλης σε μία συγκεκριμένη θερμοκρασία. Το BOD χρησιμοποιείται, συχνά σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, ως δείκτης του βαθμού οργανικής ρύπανσης του νερού. Πηγή: <https://www.usgs.gov/special-topics/water-science-school/science/biological-oxygen-demand-bod-and-water>

⁴COD (Chemical Oxygen Demand): Το COD αντιπροσωπεύει το ποσοστό οξυγόνου που χρησιμοποιείται που καταναλώνεται για την χημική οξειδωση των οργανικών ρύπων του νερού σε ανόργανα προϊόντα. Ομοίως, το COD αποτελεί δείκτη για την αξιολόγηση της επίδρασης που θα έχουν τα λύματα που απορρίπτονται στο περιβάλλον. Υψηλές τιμές COD σημαίνουν μεγαλύτερη ποσότητα οξειδώσιμου οργανικού υλικού στο δείγμα, μειώνοντας το ποσοστό διαλυμένου οξυγόνου (DO). Πηγή: <https://realtechwater.com/parameters/chemical-oxygen-demand/>

pH/EC	Lactose/ LA	Proteins	Fats and oils	Mineral salts	BOD ₅	COD	BOD ₅ / COD
5	-	-	-	-	40-60	75.8	0.53- 0.79
-	-	-	-	-	-	68.8 ± 11.5	-
-	45-50/ 0.5	6-8	4-5 ^d	8-10 ^a	30-50	60-80	0.50- 0.63
3.92	-	-	-	-	-	74.5 ± 0.4	-
4.9	50	-	-	-	-	74.2	-
4.5-5.0	-	-	-	-	-	73-86	-
-	3.9 ^a	0.72 ^a	0.79 ^a	0.46 ^a	-	-	-
4.2	49.2	-	-	-	-	102.1	-
3.8-6.3	-	-	-	-	35.5- 46.0 ^c	60.3- 66.7	-
4.9 ± 0.3	45.9 ± 0.88	2.71 ± 0.05	9.44 ± 1.14	-	37.7 ± 2.8	68.6 ± 3.3	0.55
-	43.92	1.42	0 ^a	6.1	-	100	-
5.8	-	-	0.99	-	29.5	73.4	0.4
4.46 ± 0.3/7.6 ± 0.15	-	125 ± 2 ^b	0.9 ± 0.5 ^a	-	40 ± 2.55	60 ± 10	0.67
4.7	42.6	-	-	-	-	86.3	-
6.0-6.5	50-60	-	-	-	27-36	50-70	0.51- 0.54

Εικόνα 1.8: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των πρωτογενών αποβλήτων. Τα δεδομένα λήφθηκαν από την παραπομπή [27]

pH	EC	Lactose	Protein	Fats	TOC	COD	BOD ₅	BOD ₅ /COD
4.5	-	45.0	8.2 ^c	-	-	79.0	-	-
3.3	7.7	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	0.49 ± 0.09 ^a	0.53 ± 0.28 ^a	-	-	-	-
6.2	23.3	50.6	8.3 ^b	-	31.2	-	-	-
5.4	-	-	-	0.49	-	58.5	26.8	0.46

Εικόνα 1.9: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δευτερογενών αποβλήτων. Τα δεδομένα λήφθηκαν από την παραπομπή [27]

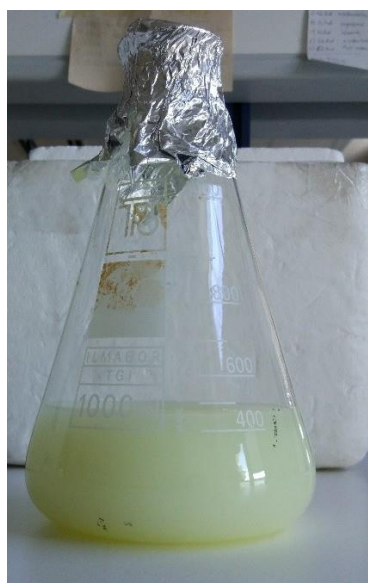
1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε το στέλεχος ενός μικροφύκου, που ανήκει στο γένος *Chlorella*, η *Chlorella sp* που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης του μικροφύκου σε δείγματα πρωτογενών και δευτερογενών αποβλήτων γαλακτοκομικών εταιρειών, σε διαφορετικές διαβαθμίσεις αραιώσεων, παρουσία στερεών. Στα δείγματα είχε προστεθεί θρεπτικό Hutner's για την παροχή βασικών ιχνοστοιχείων και θρεπτικών συστατικών, ενώ παράλληλα γινόταν παροχή ατμοσφαιρικού αέρα, μέσω αντλίας για την παροχή CO₂, παρουσία φωτός. Επιπλέον, διερευνήθηκε η δυνατότητα ή όχι ανάπτυξης του στελέχους σε κλάσματα που προέκυψαν από αναμίξεις των δύο ειδών αποβλήτων, για την ελάττωση της χρησιμοποιούμενης ποσότητας νερού, αλλά και του ποσοστού αλατότητας που υπάρχει στο δευτερογενές κλάσμα αποβλήτων. Επιπλέον, το μικροφύκος μελετήθηκε και ως προς την ανάπτυξη σε πρωτογενές κλάσμα πρωτογενών αποβλήτων με στερεά σε κλίμακα φωτοβιοαντιδραστήρα σε όγκο του 1 L. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου διερευνήθηκε και ως προς την διατροφική αξία της ξηρής βιομάζας που παρήχθη με προσδιορισμό των λιπιδίων, των υδατανθράκων, πρωτεϊνών, καθώς και των φωτοσυνθετικών χρωστικών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Δείγματα υγρών γαλακτοκομικών αποβλήτων

Δείγματα αποβλήτων από διάφορα στάδια παραγωγής (τυρόγαλα) προμηθεύτηκαν από γαλακτοκομική εταιρεία στον νομό Ρεθύμνου, στην Κρήτη). Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή περιλάμβαναν ένα πρωτογενές κλάσμα και ένα δευτερογενές κλάσμα με υψηλή αλατότητα (2%). Μετά τη δειγματοληψία, τα δείγματα αποβλήτων αποθηκεύτηκαν άμεσα σε πλαστικά μπουκάλια του 1,5 λίτρου σε θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Σε κάθε περίπτωση, οι αναλύσεις για τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν από συνεργαζόμενα αναλυτικά εργαστήρια, τα οποία εξειδικεύονται σε αναλύσεις υδάτων και λυμάτων στον νομό Ρεθύμνου, στην Κρήτη. Πριν τη χρήση τους στα πειράματά , τα απόβλητα υπέστησαν αποστείρωση σε αυτόκαυστο για 20 min. Αυτό το βήμα ήταν απαραίτητο, όχι μόνο για την εξουδετέρωση του ενδογενούς μικροβιακού φορτίου και την αποφυγή μολύνσεων, αλλά και στην καθίζηση στερεών, μειώνοντας αποτελεσματικά τη θολερότητα των δειγμάτων. Μετά την αποστείρωσή τους, ο χειρισμός των δειγμάτων σε όλα τα πειράματα έλαβε χώρα σε θάλαμο νηματικής ροής αέρα παρουσία φλόγας.



Εικόνα 2.1: Δείγματα αποβλήτων τυρογάλακτος πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την αποστείρωση.

2.2 Οργανισμός και συνθήκες ανάπτυξης

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες από το απομονωμένο στέλεχος *Chlorella sp.* Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο TAP (Tris-Acetate-Phosphate) σε κωνικές φιάλες των 250 mL και υπό συνεχή ανάδευση. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε σε δωμάτιο με σταθερή θερμοκρασία 25 ± 1 °C και υπό φωτισμό με ένταση ακτινοβολίας 50-60 φωτονίων $m^{-2} \cdot s^{-1}$ με τη χρήση λευκών λαμπτήρων φθορισμού. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τις μητρικές καλλιέργειες στο τέλος της εκθετικής φάσης.

Πίνακας 2.1: Σύσταση θρεπτικού μέσου TAP (Tris-Acetate-Phosphate). Κατά την παρασκευή του το pH ρυθμίστηκε στα 7,20 με χρήση KOH ή HCl.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
Trizma-base	2,42 g/L
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Ι (Phosphate buffer I)	1 mL/L
Διάλυμα ιχνοστοιχείων (Hutner's Trace Metals)	1 mL/L
Τροποποιημένο διάλυμα του Beijerinck (Solution A)	10 mL/L
Οξικό οξύ	1,048 mL/L

Πίνακας 2.2: Σύσταση του solution A

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
NH ₄ Cl	40,0 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10,0 g/L

CaCl ₂	3,8 g/L

Πίνακας 2.3 : Σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (Phosphate buffer)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
K ₂ HPO ₄	104,4 g/L
KH ₂ PO ₄	54,4 g/L

Πίνακας 2.4 : Σύσταση του διαλύματος Hutner's trace metals.

Hutner's trace metals	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
EDTA	50,00 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,99 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22,00 g/L
H ₃ BO ₃	11,40 g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5,06 g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57 g/L
Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ ·4H ₂ O	1,10 g/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,61 g/L

Για στερεές καλλιέργειες κατά την παρασκευή του θρεπτικού μέσου TAP πραγματοποιούνταν προσθήκη άγαρ 1,5 % w/v.

Όλα τα θρεπτικά μέσα και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο στους 120°C για 20 min για την αποφυγή μολύνσεων. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar Flow Hood), ο οποίος είχε

προηγουμένως απολυμανθεί με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και αιθανόλη. Τα πειράματα έλαβαν χώρα παρουσία φλόγας.

2.3 Μελέτη ανάπτυξης *Chlorella sp* σε δείγματα τυροκομικών αποβλήτων

Η μελέτη ανάπτυξης της *Chlorella sp* σε απόβλητα τυροκομικών προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τέσσερις πειραματικές σειρές:

1. Μελέτη ανάπτυξης *Chlorella sp* σε πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων σε εύρος αραιώσεων με νερό σε μικρή κλίμακα
2. Μελέτη ανάπτυξης *Chlorella sp* σε δευτερογενές κλάσμα αποβλήτων με υψηλή αλατότητα (2 %) σε εύρος αραιώσεων με νερό σε μικρή κλίμακα
3. Μελέτη ανάπτυξης *Chlorella sp* σε ανάμειξη τυρογάλακτος από διαφορετικά στάδια (πρωτογενές – δευτερογενές με υψηλή αλατότητα) σε μικρή κλίμακα
4. Κλιμάκωση καλλιέργειας *Chlorella sp* σε πρωτογενές κλάσμα σε φωτοβιοαντιδραστήρα

2.3.1 Παρασκευή πειραματικών καλλιεργειών *Chlorella sp* με απόβλητα τυροκομείων σε εύρος αραιώσεων και σε μείγματα τυρογαλάκτων ως υπόστρωμα σε μικρή κλίμακα

Για τις πειραματικές σειρές που αφορούν αραιώσεις με νερό, τα απόβλητα τυροκομείων σε κάθε περίπτωση αραιώθηκαν με χρήση απιονισμένου νερού, με τελική περιεκτικότητα σε απόβλητα 25%, 50% , 75% και 100% (χωρίς αραιώση) αντίστοιχα, σε κωνικές φιάλες των 250 mL, με όγκο καλλιέργειας τα 100 mL. Όσον αφορά τα μείγματα τυρογάλακτος, αυτά αναμείχθηκαν μεταξύ τους σε αναλογίες που παρουσιάζονται στον πίνακα 2.5. Σε κάθε περίπτωση, τα δείγματα αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο και στην συνέχεια έγινε προσθήκη του διαλύματος ιχνοστοιχείων Hutner's (βλ. θρεπτικό μέσο TAP), σε τελική συγκέντρωση ίδια με το πρότυπο θρεπτικό μέσο.

Πίνακας 2.5: Η περιεκτικότητα του κάθε δείγματος σε πρωτογενές και δευτερογενές δείγμα αντίστοιχα.

Δείγμα	Περιεκτικότητα σε πρωτογενές	Περιεκτικότητα σε δευτερογενές με υψηλό αλάτι (2%)
0/100	0%	100%
25/75	25%	75%
50/50	50%	50%
75/25	75%	25%
100/0	100%	0%

Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ρυθμίστηκε στα $33,63 \pm 2,23$ mg DCW/L καλλιέργειας και οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 25 ± 1 °C και συνεχούς φωτισμού $140-160$ $\mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Επιπλέον, σε όλα τα δείγματα εφαρμόστηκε αερισμός (bubbling) με ατμοσφαιρικό αέρα, ο οποίος διέρχονταν από φίλτρο σύριγγας $0,22$ μm , προς αποφυγή μόλυνσεων. Ο αερισμός είχε σκοπό τόσο την ήπια ανάδευση των δειγμάτων, όσο και την παροχή CO_2 , επιτρέποντας την μεικτότροφη ανάπτυξη. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες *Chlorella* sp. Στα θρεπτικά μέσα HSM και HSLM, των οποίων η σύσταση παρουσιάζεται παρακάτω, στις ίδιες συνθήκες με τις πειραματικές καλλιέργειες.



Εικόνα 2.2: Καλλιέργειες *Chlorella* sp σε πρωτογενή κλάσματα αποβλήτων, καθώς και σε θρεπτικό HSM. Από αριστερά προς τα δεξιά παρατίθενται οι περιεκτικότητες σε τυρόγαλα σε αυξανόμενο ποσοστό.

Πίνακας 2.6 : Σύσταση του θρεπτικού μέσου HSM

HSM (High Salt medium – Modified)	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
Phosphate buffer 1 M, 7,2 pH	10 mL/L
Beijerinck's salts	10 mL/L
Hutner's trace elements	1 mL/L

Πίνακας 2.7 : Σύσταση του διαλύματος Beijerinck's salts

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
NH_4Cl	40,0 g/L
CaCl_2	0,76 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 g/L

Στην περίπτωση του HSLM, πραγματοποιήθηκε επιπλέον προσθήκη λακτόζης 7 % w/v. Και στα δυο θρεπτικά μέσα το pH ρυθμίζεται στην τιμή 7,2 μέσω του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών.

Όλα τα πειράματα διήρκησαν 7 ημέρες, όπου την τελευταία πειραματική ημέρα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις περιεχομένου φωτοσυνθετικών χρωστικών, παραγωγής βιομάζας μέσω μετρήσεων ξηρής βιομάζας και επαγωγικού φθορισμού χλωροφύλλης.

Η παρασκευή των πειραματικών καλλιεργειών έλαβε χώρα σε θάλαμο νηματική ροής αέρα, παρουσία φλόγας και όλα τα σκεύη και τα διαλύματα είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο στους 120 °C για 20 min.

2.3.2 Μελέτη ανάπτυξης *Chlorella sp* σε δείγματα πρωτογενών αποβλήτων σε βιοαντιδραστήρα και καμπύλη ανάπτυξης

Για την κλιμάκωση των καλλιεργειών *Chlorella sp* σε μεγαλύτερο όγκο χρησιμοποιήθηκαν γυάλινοι φωτοβιοαντιδραστήρες χωρητικότητας 1 L, με όγκο καλλιέργειας 750 mL. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων, με προσθήκη του διαλύματος ιχνοστοιχείων, στην ίδια τελική συγκέντρωση με τους μάρτυρες. Οι φωτοβιοαντιδραστήρες περιείχαν μαγνητικό αναδευτήρα για την συνεχή ανάδευση των δειγμάτων. Η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ρυθμίστηκε στα $33,63 \pm 2,23$ mg DCW/L καλλιέργειας, η οποία αντιστοιχεί σε $0,69 \pm 0,06$ μg Ca/mL. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 25 ± 1 °C και συνεχούς φωτισμού $140-160$ μmol φωτονίων·m⁻²·s⁻¹. Επιπλέον, σε όλα τα δείγματα εφαρμόστηκε αερισμός με ατμοσφαιρικό αέρα, ο οποίος διέρχονταν από φίλτρο σύριγγας 0,22 μm, προς αποφυγή μολύνσεων, με σκοπό την μικτότροφη ανάπτυξη των δειγμάτων. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες *Chlorella sp* στα θρεπτικά μέσα HSM και HSLM, στις ίδιες συνθήκες ανάπτυξης. Τα πειράματα διήρκησαν για 7 ημέρες.

Καθημερινά πραγματοποιούνταν δειγματοληψία για μετρήσεις του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών. Στο πέρας του πειράματος, πραγματοποιούνταν μετρήσεις περιεχομένου φωτοσυνθετικών χρωστικών, παραγωγής βιομάζας μέσω μετρήσεων της ξηρής βιομάζας, καθώς και μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού χλωροφύλλης. Επιπλέον, συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των καλλιεργειών, καθώς και η βιομάζα για περαιτέρω αναλύσεις.

Η παρασκευή των πειραματικών καλλιεργειών, καθώς και οι καθημερινές δειγματοληψίες έλαβαν χώρα σε θάλαμο νηματική ροής αέρα, παρουσία φλόγας και όλα τα σκεύη και τα διαλύματα είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο στους 120 °C για 20 min.



Εικόνα 2.3: Καλλιέργειες *Chlorella* sp σε πρωτογενή απόβλητα τυρογάλακτος, σε φωτοβιοαντιδραστήρα 1 L.

2.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Για την ποσοτικοποίηση των φωτοσυνθετικών χρωστικών, γνωστή ποσότητα καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε στα 1000xg για 5 min σε φυγόκεντρο Eppendorf και έπειτα από την απόρριψη του υπερκειμένου, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 mL θερμής (50°C) μεθανόλης. Τα δείγματα αναδεύτηκαν και αφέθηκαν 5 min για επώαση στους 50°C στο σκοτάδι. Μετά την επώαση, τα δείγματα επέστρεψαν σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση των κυτταρικών θραυσμάτων. Έπειτα,

μετρήθηκε η απορρόφηση του μεθανολικού εκχυλίσματος σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (470,0 nm, 652,4 nm και 665,2 nm) με χρήση ενός φασματοφωτομέτρου υπεριώδους-ορατού (Shimadzu UV-2700). Ο υπολογισμός έγινε με βάση γνωστές εξισώσεις από τη παραπομπή [44], οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω:

$$Ca(\mu\text{g/ml}) = 16.72 \cdot A_{665.2} - 9.16 \cdot A_{652.4}$$

$$Cb(\mu\text{g/ml}) = 34.09 \cdot A_{652.4} - 15.28 \cdot A_{665.2}$$

$$Cx+c(\mu\text{g/ml}) = \frac{1000 \cdot A_{470.0} - 1.63 \cdot Ca - 104.96 \cdot Cb}{221}$$

2.5 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΕΠΑΓΩΓΙΚΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη φορητή συσκευή Handy Plant Efficiency Analyzer (Hansatech Instruments, Kings' Lynn, Norfolk, UK), σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser & Strasser [50]. Για τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού τα δείγματα τοποθετήθηκαν αρχικά σε σκοτεινό θάλαμο για 10 min, έτσι ώστε τα μόρια της χλωροφύλλης *a* στα κέντρα αντίδρασης, να επιστρέψουν στη θεμελιώδη κατάσταση, και γίνει δυνατή η εκτίμηση της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης. Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10 μs σε χρονικό διάστημα 1 s. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση πραγματοποιήθηκε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας 3000 μmol·m⁻²·s⁻¹ ερυθρού φωτός (650 nm). Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος $\frac{F_v}{F_m}$, που αποτελεί τη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση του φωτοσυστήματος II.

2.6 Μετρήσεις ξηρής βιομάζας κυττάρων

Για τη μέτρηση της ξηρής βιομάζας των κυττάρων της καλλιέργειας γινόταν λήψη γνωστού όγκου καλλιέργειας και έπειτα από φυγοκέντριση στα 1500xg για 10 min και την απομάκρυνση του υπερκείμενου, το ίζημα με τα κύτταρα εκπλύθηκε με απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση αλάτων από το θρεπτικό μέσο. Έπειτα το ίζημα επαναιωρήθηκε σε μικρό

όγκο νερού και μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα αλουμινένια πιατάκια. Τα δείγματα αφέθηκαν για ξήρανση σε φούρνο σε θερμοκρασία 70°C για τουλάχιστον 14 h, και έπειτα μετρήθηκε η ξηρή βιομάζα με χρήση αναλυτικού ζυγού τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.

2.7 Προσδιορισμός βιοχημικού περιεχομένου του μικροφύκου

Για τον προσδιορισμό του βιοχημικού περιεχομένου, συλλέχθηκαν κύτταρα ανεπτυγμένα σε φωτοβιοαντιδραστήρες του 1 L, με όγκο καλλιέργειας 750 mL και λυοφιλοποιήθηκαν. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό σακχάρων στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος θυμόλης-θεικού (thymol-sulfuric acid method) [45], κατά την αναφορά [46]. Για την ποσοτικοποίηση του λιπιδικού περιεχομένου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος θεικού-φωσφορικού-βανιλίνης (sulfo-phospho-vanillin method), σύμφωνα με ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο, το οποίο βασίστηκε στην μέθοδο της βιβλιογραφίας [50]. Για την ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Lowry [48], ακολουθώντας το τροποποιημένο πρωτόκολλο από τη βιβλιογραφική αναφορά [49]. Οι μέθοδοι αυτές είναι φωτομετρικές και για κάθε περίπτωση οι απορροφήσεις μετρήθηκαν μέσω ενός φασματοφωτομέτρου υπεριώδους-ορατού (Shimadzu UV-2700).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Προηγούμενα πειράματα διερεύνησης συνθηκών ανάπτυξης της *Chlorella sp.*

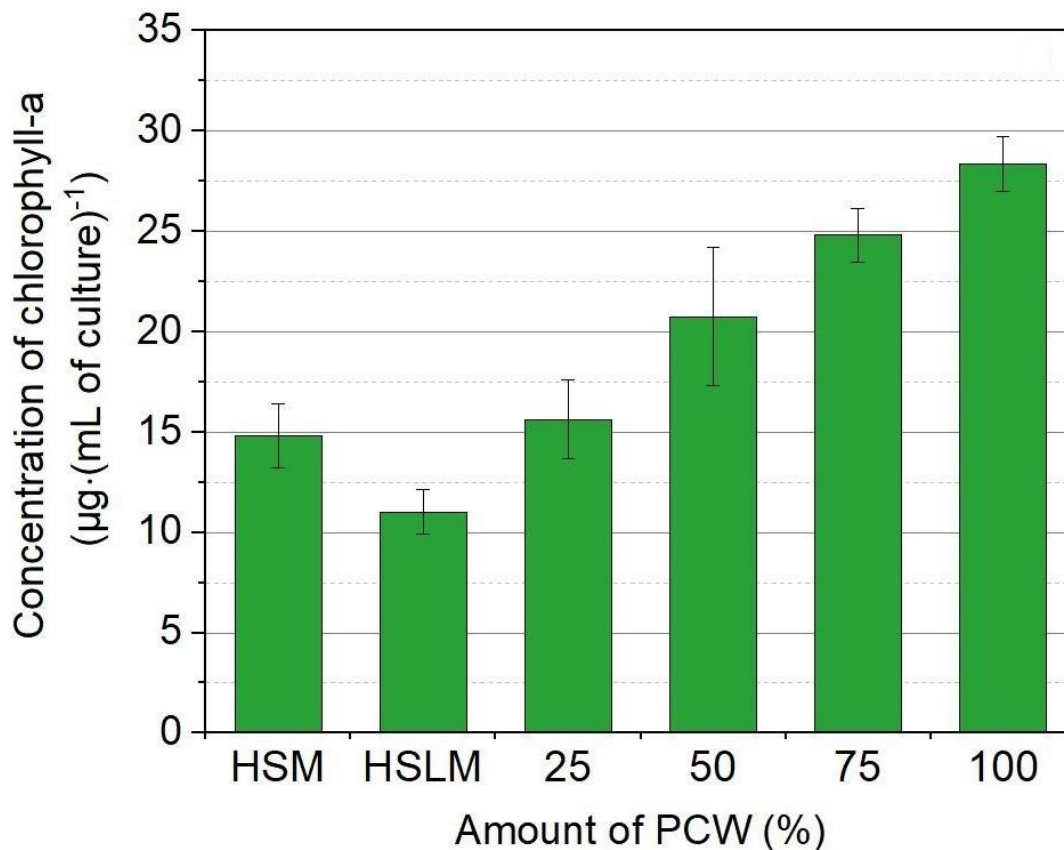
Σε προηγούμενες φάσεις διερεύνησης των συνθηκών ανάπτυξης της *Chlorella sp* διερευνήθηκε η ανάπτυξη της *Chlorella sp* σε αυτότροφες, ετερότροφες και μεικτότροφες συνθήκες. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάπτυξης της *Chlorella sp* σε πλήρως ακατέργαστα, μη αποστειρωμένα απόβλητα τυροκομείου. Ωστόσο, τα κύτταρα δεν παρουσίασαν καμία ανάπτυξη σε αυτές τις συνθήκες. Η αποστείρωση των αντιδραστηρίων και του εργαστηριακού εξοπλισμού κρίθηκε σημαντικής σημασίας για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου και την επιβίωση του μικροφύκου. Εκτός αυτού, η φυγοκέντριση και απόχυση του υπερκείμενου ως πρωταρχικό στάδιο επεξεργασίας εξασφάλισε τη μείωση της θολερότητας και κατά συνέπεια την καλύτερη διείσδυση του φωτός. Επιπλέον, ερευνήθηκε η ανάπτυξη της *Chlorella sp* παρουσία ή απουσία θρεπτικών συστατικών. Στις αυτότροφες συνθήκες πραγματοποιήθηκε παροχή μόνο CO₂ μέσω ατμοσφαιρικού αέρα μέσω αντλίας. Στις ετερότροφες συνθήκες προστέθηκε οξικό οξύ για ως πηγή άνθρακα, ενώ στις μεικτότροφες συνθήκες γινόταν παροχή τόσο CO₂ όσο και οξικό οξύ. Η μεικτότροφη συνθήκη αποδείχθηκε η ιδανικότερη συνθήκη για την ανάπτυξη και μεταβολισμό της *Chlorella sp*. Αναφορικά με την προσθήκη θρεπτικών συστατικών και ιχνοστοιχείων, κρίθηκε απαραίτητη η προσθήκη ιχνοστοιχείων μέσω διαλύματος Hutner's σε αναλογία 1μl/100 mL καλλιέργειας για την ανάπτυξη του μικροφύκου στα κλάσματα αποβλήτων τυρογάλακτος. Ως προς την παρουσία ή απουσία φωτός, απεδείχθη ότι η *Chlorella* μπορεί να αναπτυχθεί και στο σκοτάδι, παρόλα αυτά η αποδοτικότερη ανάπτυξη παρατηρήθηκε σε συνθήκες φωτός, και μάλιστα σε ένα συγκεκριμένο εύρος έντασης. Επιπλέον, η ανάδευση στις καλλιέργειες υποβοήθησε στην ομοιόμορφη κατανομή των θρεπτικών στην καλλιέργεια και κατά συνέπεια στην μεγαλύτερη προσβασιμότητά τους στα κύτταρα, αλλά και στην καλύτερη πρόσβαση στο φως. Σε επόμενη φάση μελετήθηκε η ανάπτυξη της *Chlorella* σε ένα εύρος αραιώσεων που περιλάμβανε συγκέντρωση αποβλήτων 25-100% του συνολικού όγκου καλλιέργειας. Η αραιώση αποδείχθηκε ανεπαρκής όταν δεν γίνει προσθήκη θρεπτικών συστατικών (P,N,H), ενώ αν γίνει συνδυασμός αραιώσης και προσθήκης θρεπτικών στοιχείων, η *Chlorella* αναπτύσσεται αποδοτικά, παράγοντας μάλιστα υψηλή ποσότητα βιομάζας. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε σύγκριση με τους μάρτυρες HSM και

HSLM, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως σημεία αναφοράς, καθώς αντιπροσωπεύουν ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης του μικροφύκου.

Με βάση τα παραπάνω τα κύτταρα αναπτύχθηκαν στις συνθήκες που αναφέρονται την παράγραφο 2.2 και 2.3.

3.2 Διερεύνηση ανάπτυξης της *Chlorella sp* σε πρωτογενή απόβλητα τυρογάλακτος, με αραιώση

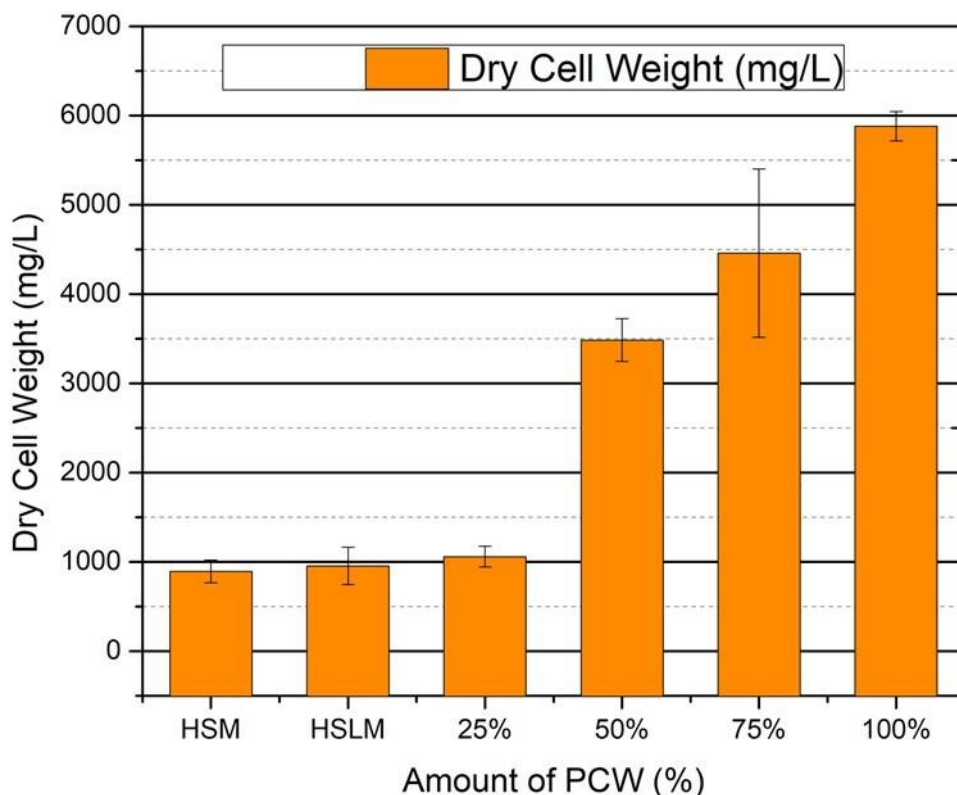
Σε πρώτη φάση μελετήθηκε η ανάπτυξη *Chlorella* σε κλάσματα πρωτογενών αποβλήτων τυρογάλακτος. Η προετοιμασία των δειγμάτων περιγράφεται στην ενότητα 2.3.1. Τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω.



Εικόνα 3.1: Μετρήσεις συγκέντρωσης χλωροφύλλης a καλλιεργειών *Chlorella* σε πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων τυροκομείου σε εύρος αραιώσεων, με περιεκτικότητα τυρογάλακτος 25%-100%.

Παράλληλα, αναπαρίστανται και οι μάρτυρες στα θρεπτικά μέσα HSM και HSLM. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7^η πειραματική ημέρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση. Ca: χλωροφύλλη-a

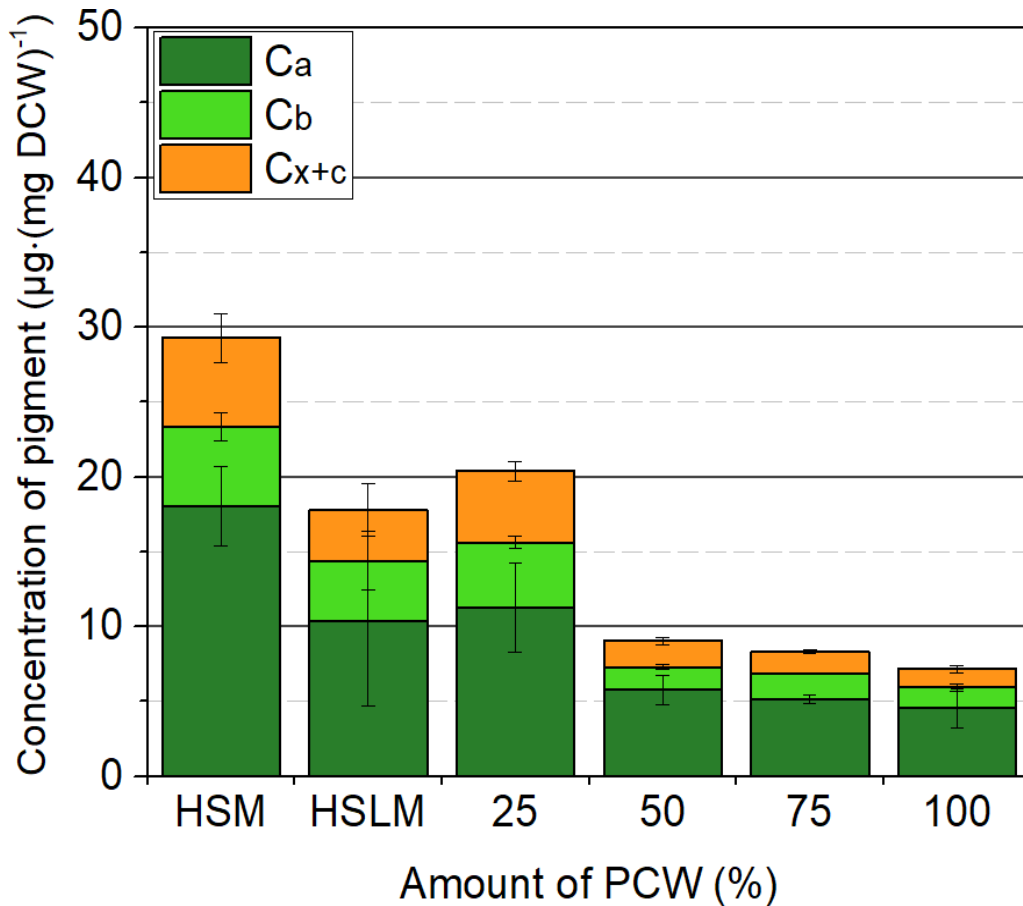
Αρχικά, παρατηρείται ότι η παραγωγή χλωροφύλλης *a* ήταν σημαντικά υψηλότερη (άνω του 50%) για τη συνθήκη του αυτότροφου μάρτυρα (HSM), σε σχέση με τον μεικτότροφο μάρτυρα με την λακτόζη (HSLM). Η συνθήκη 25%, η οποία είναι εκείνη όπου πραγματοποιήθηκε η μεγαλύτερη αραίωση, εμφάνισε παραγωγή χλωροφύλλης *a* σε επίπεδα παρόμοια από τον μάρτυρα HSM, και υψηλότερη από τον μάρτυρα HSLM. Στις υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες, η παραγωγή χλωροφύλλης ήταν υψηλότερη από τις αντίστοιχες των μαρτύρων. Στα απόβλητα που δεν είχαν υποστεί αραίωση (συνθήκη 100%) σημειώθηκε και η υψηλότερη παραγωγή χλωροφύλλης *a*, η οποία έφτασε έως και τριπλάσια επίπεδα από τους μάρτυρες. Παρουσιάζεται μια τάση αύξησης της χλωροφύλλης *a*, με την αύξηση του περιεχομένου σε απόβλητα στις καλλιέργειες του μικροφύκου. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι με την αραίωση των αποβλήτων μειώνεται και η περιεκτικότητα των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών, το οποίο μπορεί να αποτελέσει και περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη του μικροφύκου.



Εικόνα 3.2: Μετρήσεις ξηρής βιομάζας καλλιεργειών *Chlorella* σε πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων τυροκομείου σε εύρος αραιώσεων, με περιεκτικότητα τυρογάλακτος 25%-100%. Παράλληλα, αναπαρίστανται και οι μάρτυρες στα θρεπτικά μέσα HSM και HSLM. Οι μετρήσεις

πραγματοποιήθηκαν την 7^η πειραματική ημέρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση.

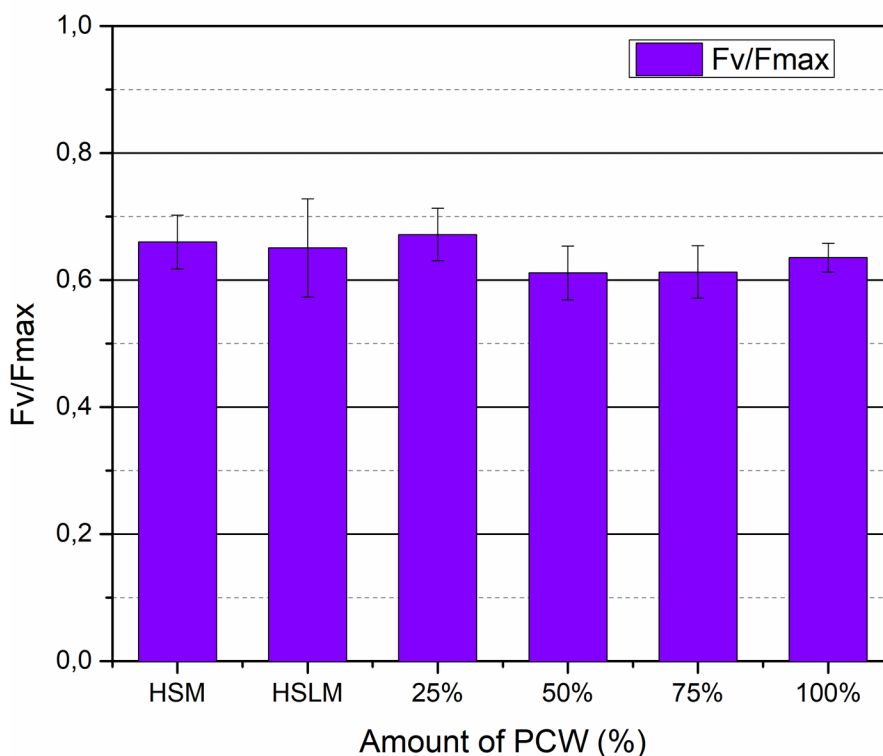
Η ποσότητα βιομάζας *Chlorella* που παράγεται κατά την ανάπτυξή της στις συνθήκες των δύο μαρτύρων είναι σε παρόμοια επίπεδα. Σε αντίστοιχα επίπεδα ήταν και η παραγωγή βιομάζας για το κλάσμα με περιεκτικότητα 25% σε τυρόγαλα. Αντίθετα, στα κλάσματα με περιεκτικότητες 50%, 75% και 100% η ποσότητα βιομάζας που παράγεται είναι σημαντικά υψηλότερη. Πιο συγκεκριμένα, η ποσότητα βιομάζας που παράγεται στο κλάσμα με περιεκτικότητα 50% είναι περίπου 3,5 φορές μεγαλύτερη από αυτή που προκύπτει στους μάρτυρες. Αντίστοιχα, στο κλάσμα με περιεκτικότητα 75% η παραγόμενη ποσότητα είναι 4,5 φορές μεγαλύτερη, ενώ στο κλάσμα με περιεκτικότητα 100% είναι 5,5 φορές μεγαλύτερη από τους μάρτυρες. Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι η βιομάζα που μετράται στις συνθήκες των δειγμάτων με τα απόβλητα δεν προέρχεται από καθαρή βιομάζα *Chlorella*, αλλά περιέχει και στερεά του τυρογάλακτος. Οι υψηλότερες τιμές για την ξηρή βιομάζα στα πυκνότερα απόβλητα, αποτελούν και αναμενόμενο αποτέλεσμα, δεδομένου του αυξημένου περιεχομένου στα στερεά τυρογάλακτος, των οποίων η μάζα επηρεάζει τις μετρήσεις βιομάζας. Συνεπώς, δεν μπορούν να διεξαχθούν ασφαλή αποτελέσματα για την κυτταρική ανάπτυξη από τις μετρήσεις ξηρής βιομάζας, λόγω της σημαντικής παρεμβολής των στερεών τυρογάλακτος.



Εικόνα 3.3: Μετρήσεις περιεχομένου φωτοσυνθετικών χρωστικών στη βιομάζα *Chlorella*, σε πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων τυροκομείου, με περιεκτικότητα τυρογάλακτος 25%-100%. Παράλληλα, αναπαρίστανται οι μάρτυρες στα θρεπτικά μέσα HSM και HSLM. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7^η πειραματική ημέρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. Ca: χλωροφύλλη-α, Cb: χλωροφύλλη-β, Cx+c: ξανθοφύλλες και καρροτενοειδή.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι το υψηλότερο περιεχόμενο σε χρωστικές στη βιομάζα εμφανίστηκε στη συνθήκη του αυτότροφου μάρτυρα HSM. Αυτό αποτελεί και μια λογική παρατήρηση, καθώς στη συνθήκη αυτή, τα κύτταρα εξαρτώνται πλήρως από τη φωτοσύνθεση για την ανάπτυξή τους, συνεπώς αναμένεται και υψηλότερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Μια ένδειξη για αυτό αποτελεί και το υψηλότερο περιεχόμενο σε φωτοσυνθετικές χρωστικές. Ο μάρτυρας με τη λακτόζη παρουσίαζε χαμηλότερο περιεχόμενο από τον αυτότροφο μάρτυρα, το οποίο ήταν σε ανάλογα επίπεδα με τη συνθήκη 25%. Για τις υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες (50%, 75% και 100%) το περιεχόμενο σε χρωστικές εμφανίζεται σημαντικά χαμηλότερο, παρόλα αυτά σε παρόμοια επίπεδα. Αυτό το γεγονός μπορεί να αποδοθεί στα στερεά τυρογάλακτος, τα οποία

συνυπολογίζονται στις μετρήσεις βιομάζας, . Οι τιμές λόγου $\frac{Ca}{Cb}$ κυμαίνονται μεταξύ 2,6-3,8.



Εικόνα 3.4: Μετρήσεις μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης καλλιιεργειών *Chlorella* σε πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων τυροκομείου σε εύρος αραιώσεων, με περιεκτικότητα τυρογάλακτος 25%-100%.

Παράλληλα αναπαρίστανται και οι μάρτυρες στα θρεπτικά μέσα HSM και HSLM. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7^η πειραματική ημέρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση.

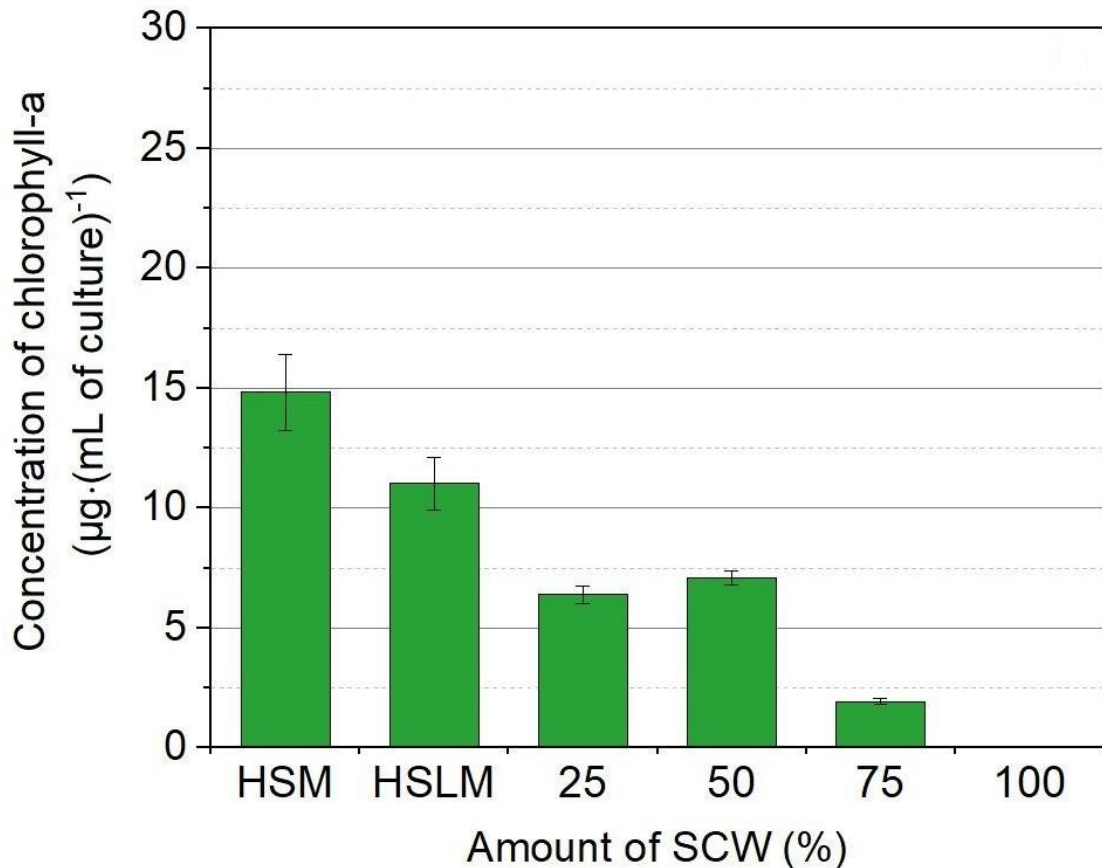
Αναφορικά με τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού, παρατηρείται ότι οι καλλιέργειες *Chlorella* παρουσίασαν τιμές της παραμέτρου F_v/F_m περίπου 0,660 για τις συνθήκες των δυο μαρτύρων. Οι τιμές φθορισμού που παρατηρούνται για όλα τα πειραματικά δείγματα αποβλήτων είναι πολύ κοντά σε αυτές που εμφανίζουν οι μάρτυρες. Όλες οι τιμές παρουσιάζονται σε επίπεδα $>0,7$, δείχνοντας μια πολύ μικρή καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, η οποία μπορεί να αποδοθεί στην πυκνότητα του θρεπτικού μέσου, η οποία εμποδίζει την αποδοτική διέλευση του φωτός. Η πυκνότητα αυτή οφείλεται τόσο στον στην αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού, το οποίο προκαλεί φαινόμενα σκίασης,

όσο και στην θολερότητα του θρεπτικού μέσου στην περίπτωση των αποβλήτων. Παρόλα αυτά, μπορεί να εκτιμηθεί ότι το μικροφύκος παρουσιάζει ικανοποιητική φωτοσυνθετική λειτουργία, ακόμα και στο δυσμενές περιβάλλον των αποβλήτων. Ωστόσο, οι τιμές φθορισμού που λαμβάνονται δεν μπορούν από μόνες τους να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Συμπερασματικά, τα απόβλητα τυροκομείων από το πρωτογενές στάδιο παραγωγής μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη του μικροφύκου *Chlorella*. Ένα σημαντικό αποτέλεσμα της παρούσας πειραματικής σειράς αποτελεί το γεγονός ότι η ανάπτυξη του μικροφύκου στα πρωτογενή απόβλητα ήταν ακόμα και σχεδόν 2 φορές υψηλότερη σε σχέση με την καλλιέργεια του μάρτυρα, όπου χρησιμοποιήθηκαν συμβατικά θρεπτικά μέσα. Επιπλέον, το περιβάλλον των αποβλήτων δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη, καθώς είναι εφικτή η ανάπτυξη του μικροφύκου ακόμα και στα αναραιώτα απόβλητα. Μάλιστα, οι υψηλότερες περιεκτικότητες σε απόβλητα επέτρεψαν την παραγωγή υψηλότερης ποσότητας χλωροφύλλης *a*, λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης θρεπτικών συστατικών στο μέσο καλλιέργειας. Η μη αναγκαιότητα για αραίωση αποτελεί ένα σημαντικό πλεονέκτημα της μεθοδολογίας, καθώς εξοικονομείται πολύτιμο νερό.

3.3 Διερεύνηση ανάπτυξης της *Chlorella sp* σε δευτερογενή απόβλητα τυρογάλακτος με αραίωση

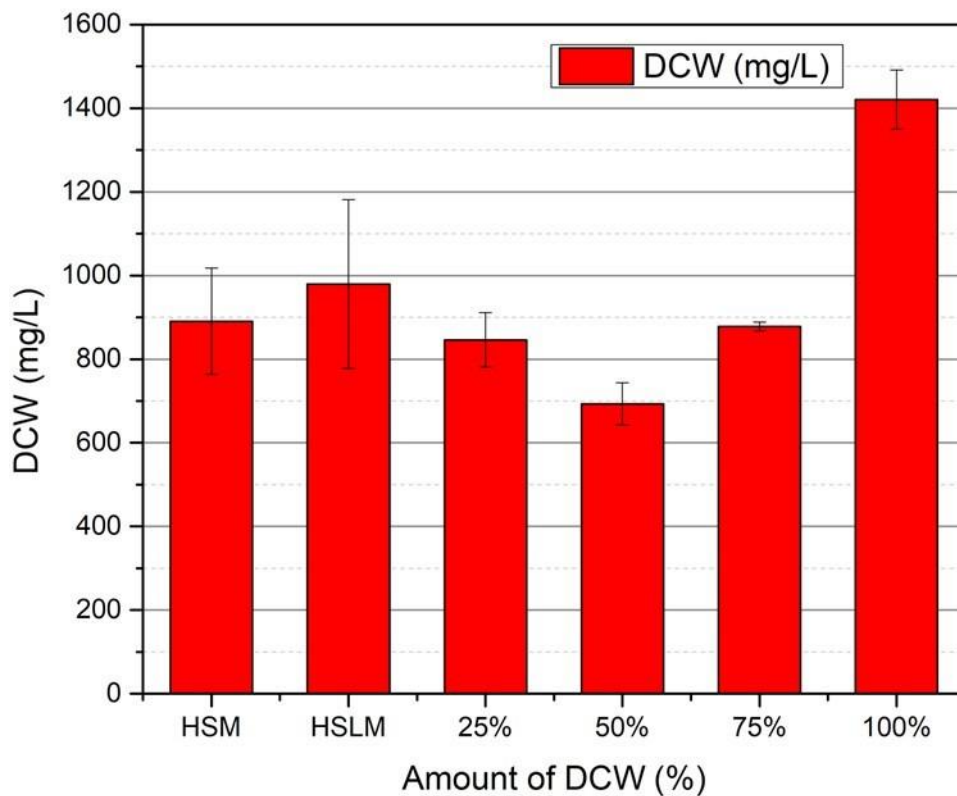
Η προετοιμασία των δειγμάτων είναι η ίδια με αυτήν της παραγράφου 2.3.1. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα.



Εικόνα 3.5: Μετρήσεις χλωροφύλλης α *Chlorella sp* σε δευτερογενές κλάσμα αποβλήτων τυροκομείου σε εύρος αραιώσεων, με περιεκτικότητα τυρογάλακτος 25%-100%. Παράλληλα, αναπαρίστανται και οι μάρτυρες στα θρεπτικά μέσα HSM και HSLM. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7^η πειραματική ημέρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση Ca: χλωροφύλλη-α

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων την 7^η πειραματική ημέρα έδειξαν ότι η παραγωγή χλωροφύλλης α ήταν υψηλότερη για τους μάρτυρες, σε σχέση με τα πειραματικά δείγματα όπου χρησιμοποιήθηκαν τα δευτερογενή απόβλητα. Η παραγωγή χλωροφύλλης α αποκτά τη μέγιστη τιμή της για τη συνθήκη 50% ανάμεσα στα δείγματα τυρογάλακτος, η οποία αντιστοιχεί περίπου στο ήμισυ της τιμής του μάρτυρα HSM. Σε ελαφρώς χαμηλότερα επίπεδα παρουσιάζεται η τιμή για τη συνθήκη 25%. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός της εξαιρετικά μειωμένης συγκέντρωσης χλωροφύλλης για τη συνθήκη με 75% v/v περιεκτικότητα αποβλήτων, η οποία πλησιάζει την τιμή χλωροφύλλης α κατά την έναρξη του πειράματος, ενώ στα ανααίωτα απόβλητα, τα κύτταρα *Chlorella* έχουν χάσει πλήρως τη

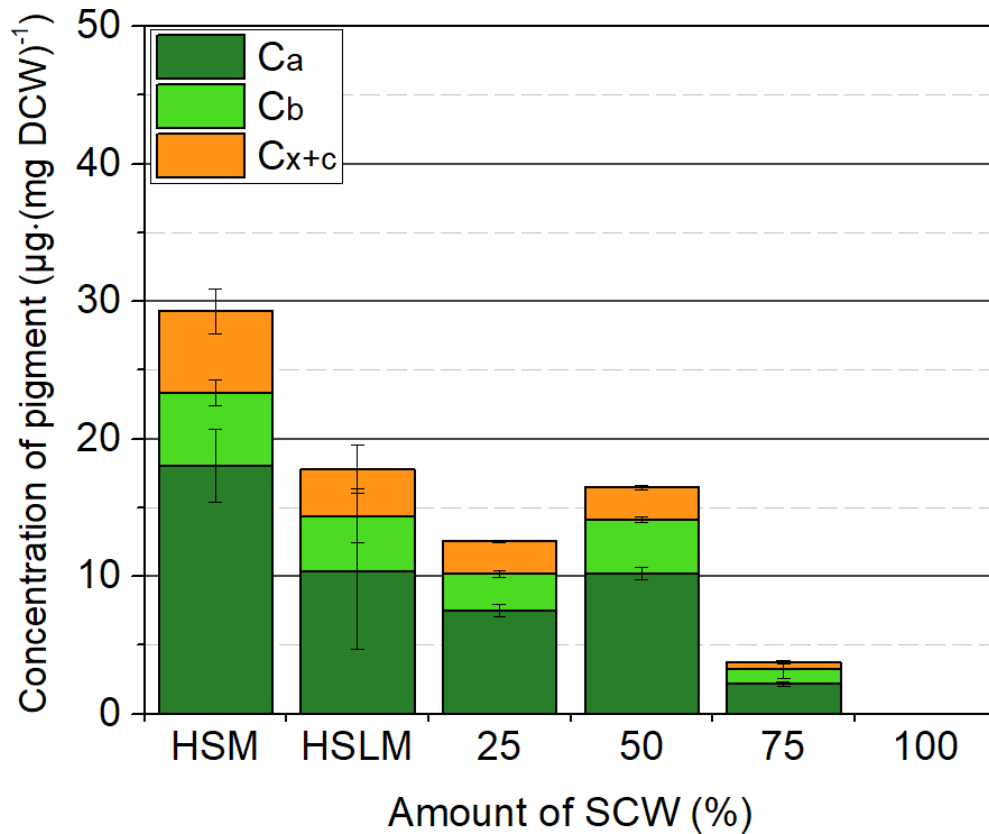
χλωροφύλλη. Ο λόγος $\frac{Ca}{Cb}$ κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 2-2,9 για τα κλάσματα τυρογάλακτος.



Εικόνα 3.6: Μετρήσεις ξηρής βιομάζας καλλιιεργειών *Chlorella* σε δευτερογενές κλάσμα αποβλήτων τυροκομείου σε εύρος αραιώσεων, με περιεκτικότητα τυρογάλακτος 25%-100%. Παράλληλα, αναπαρίστανται και οι μάρτυρες στα θρεπτικά μέσα HSM και HSLM. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7^η πειραματική ημέρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση

Οι μετρήσεις παραγωγής βιομάζας στο τέλος του πειράματος έδειξαν ότι η παραγωγή βιομάζας για τους μάρτυρες ήταν σε παραπλήσια επίπεδα με τις συνθήκες 25% και 75%. Η συνθήκη 50% εμφάνισε τη χαμηλότερη και το αναραίωτο δείγμα την υψηλότερη ποσότητα βιομάζας. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα στερεά τυρογάλακτος παρεμβαίνουν στις μετρήσεις βιομάζας, συνεπώς τα αποτελέσματα δεν είναι αντιπροσωπευτικά. Βάσει των αποτελεσμάτων παραγωγής χλωροφύλλης a, οι συνθήκες 75% και 100% εμφάνισαν

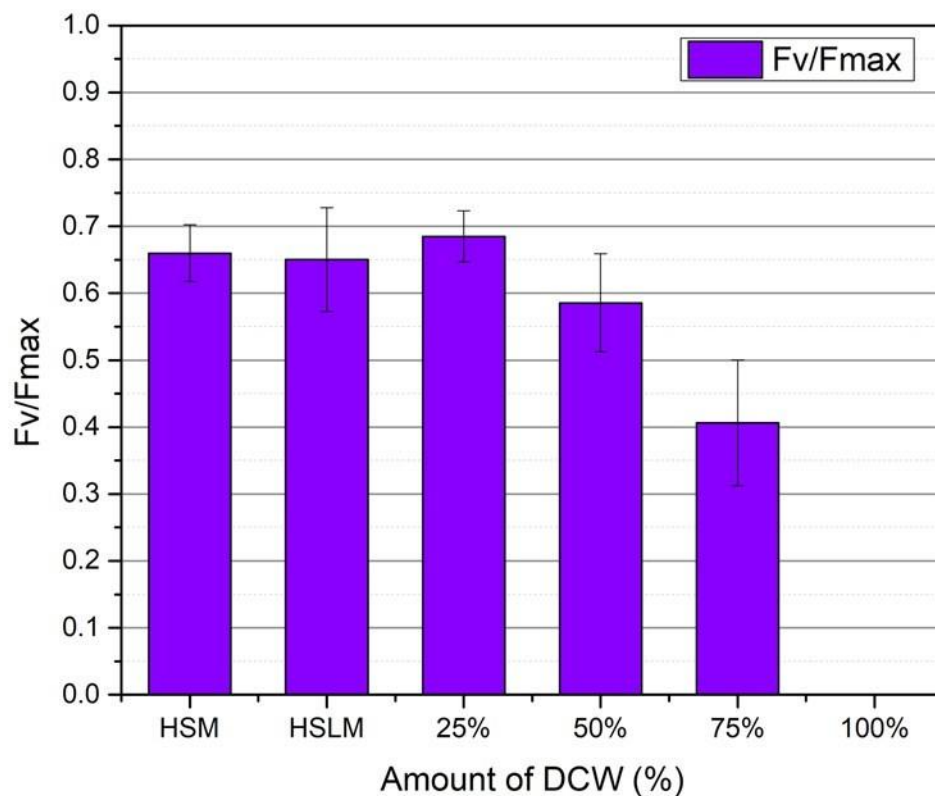
σημαντικά χαμηλή και καθόλου αντίστοιχα ανάπτυξη, το οποίο δεν αντικατοπτρίζεται στις παραπάνω μετρήσεις.



Εικόνα 3.7: Μετρήσεις φωτοσυνθετικών χρωστικών καλλιεργειών *Chlorella* σε πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων τυροκομείου σε εύρος αραιώσεων, με περιεκτικότητα τυρογάλακτος 25%-100%, συναρτήσει της παραγόμενης ξηρής βιομάζας Παράλληλα, αναπαρίστανται και τα controls HSM και HSLM. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7^η ημέρα
Ca: χλωροφύλλη-α, Cb: χλωροφύλλη-β, Cx+c: ξανθοφύλλες και καροτενοειδή.

Από την εικόνα 3.7, παρατηρείται ότι και σε αυτήν την περίπτωση η παραγωγή χρωστικών είναι σημαντικά χαμηλότερη στο κλάσμα 75% σε σχέση με τα κλάσματα 25% και 50% αντίστοιχα. Ο λόγος $\frac{Ca}{Cb}$ κυμαίνεται μεταξύ 2-2,86. Συνεπώς, απόδοση παραγωγής φωτοσυνθετικών χρωστικών και κατ' επέκταση της φωτοσύνθεσης μειώνεται σημαντικά σε υψηλές περιεκτικότητες δευτερογενούς κλάσματος τυρογάλακτος, σε ποσοστό μεγαλύτερο

μεγαλύτερες του 50%. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης α και χλωροφύλλης β στην περίπτωση του κλάσματος με 50% τυρόγαλα είναι μεγαλύτερες από αυτήν του κλάσματος 25%. Πιο αναλυτικά, η συγκέντρωση της χλωροφύλλης α στο κλάσμα 50% είναι κατά 35% αυξημένη σε σχέση με το κλάσμα 25%. Ομοίως, η χλωροφύλλη β στο κλάσμα 50% είναι αυξημένη κατά ποσοστό 47% σε σχέση με το κλάσμα 25%.



Εικόνα 3.8: Μετρήσεις μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης καλλιεργειών *Chlorella* σε δευτερογενές κλάσμα αποβλήτων τυροκομείου σε εύρος αραιώσεων, με περιεκτικότητα τυρογάλακτος 25%-100%.

Παράλληλα αναπαρίστανται και οι μάρτυρες στα θρεπτικά μέσα HSM και HSLM. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7η πειραματική ημέρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι το μικροφύκος παρουσιάζει τη υψηλότερη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση στην συνθήκη 25%, σε επίπεδα συγκρίσιμα με τους μάρτυρες. Σε παρόμοια επίπεδα με τους μάρτυρες ήταν η τιμή Fv/Fm για τα δείγματα της συνθήκης 50% περιεκτικότητα σε τυρόγαλα. Στην συνθήκη 75% εμφανίζεται έντονη καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, μέσω της μειωμένης τιμής του λόγου Fv/Fm,

ενώ η μηδενική τιμή του λόγου στην περίπτωση των 100% οφείλεται στην έλλειψη φωτοσυνθετικής δραστηριότητας.

Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, η ύπαρξη αλάτων επηρεάζει τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών και σε μεγάλες τιμές μπορεί να επιφέρει και την λύση των κυττάρων, καθώς καταστρέφει τις μεμβράνες αυτές. Η *Chlorella sp* είναι ικανή να αναπτύσσεται σε περιβάλλοντα με χαμηλή αλατότητα, παράγοντας παράλληλα σημαντική ποσότητα λιπιδίων, τα οποία έχουν σημαντικές εφαρμογές στον τομέα της βιομηχανίας. Παρόλα αυτά, υψηλές τιμές αλατότητας δρουν ανασταλτικά για την ανάπτυξη του μικροφύκου [32]. Γενικά, τα άλατα σχηματίζουν ένα φράγμα που εμποδίζει τη διείσδυση διαλύτη στη βιομάζα που οδηγεί σε λιγότερο αποτελεσματική εκχύλιση καροτενοειδών [41].

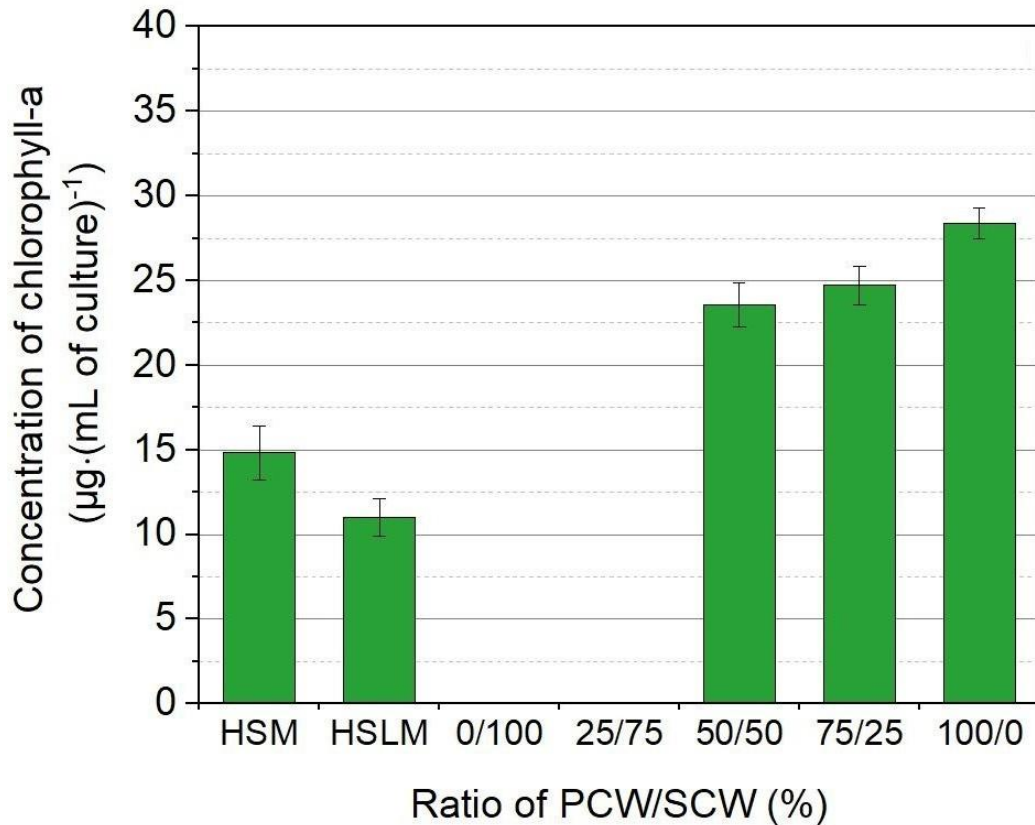
Συμπερασματικά, η ανάπτυξη στις αντίστοιχες συνθήκες του κλάσματος με υψηλή αλατότητα ήταν σημαντικά περιορισμένη, σε σχέση με το πρωτογενές κλάσμα. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να αποδοθεί σε δύο κύριους παράγοντες. Αρχικά, τα δευτερογενή απόβλητα τυροκομείων προκύπτουν από την επαναχρησιμοποίηση των πρωτογενών αποβλήτων για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων. Συνεπώς, είναι αναμενόμενο να είναι λιγότερο πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, γεγονός που μπορεί να αποτελέσει και περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Ο δεύτερος παράγοντας έχει να κάνει με την αλατότητα. Τα δευτερογενή απόβλητα περιέχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα αλατότητας σε σχέση με τα πρωτογενή. Σύμφωνα με τις μετρήσεις χλωροφύλλης a, η είναι εφικτή και σε επίπεδα συγκρίσιμα με τους μάρτυρες σε περιεκτικότητες δευτερογενών αποβλήτων 50% και 25%. Η απότομη μείωση που παρατηρείται στην χλωροφύλλη σε περιεκτικότητα αποβλήτων 75%, καθώς και η πλήρη απουσία σε 100%, υποδηλώνει η αλατότητα στις συνθήκες αυτές παραμένει σε επίπεδα που είναι απαγορευτικά για την ανάπτυξη του μικροφύκου. Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η *Chlorella sp* απομονώθηκε από περιβάλλον με γλυκό νερό, συνεπώς τα υψηλότερα επίπεδα αλατότητας ενδέχεται να αναστείλουν πλήρως την ανάπτυξη. Άρα, η αραίωση των δευτερογενών αποβλήτων με υψηλή αλατότητα αποτελεί απαραίτητη συνθήκη για την ανάπτυξη του μικροφύκου σε αυτά. Όμως, η αραίωση μπορεί να οδηγήσει σε περεταίρω μείωση των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών. Επιπλέον, η αραίωση με καθαρό νερό είναι μη συμφέρουσα περιβαλλοντικά και οικονομικά.

Όπως είναι γνωστό, μία μέθοδος μείωσης αλατότητας είναι η πλύση με οξύ, το οποίο δεσμεύει αλάτι. Ωστόσο, η χρήση οξέος, ιδιαίτερα σε υψηλές τιμές μπορεί να αποβεί καταστροφική για τα κύτταρα. Σημαντικές ερευνητικές εκθέσεις έχουν επίσης αποδείξει τη διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος της *Chlorella* που προκαλείται από τις θεραπείες πλύσης με οξύ ως φαινόμενο που προκαλείται από την αλληλεπίδραση των ιόντων H^+ οξέων με τους γλυκοσιδικούς δεσμούς των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος. Αυτό μπορεί να έχει προκαλέσει τη σοβαρή βλάβη στο κυτταρικό τοίχωμα που είναι εμφανής κάτω από τις αυξημένες συγκεντρώσεις οξέος [41]. Συνεπώς, είναι σημαντικό να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές μέθοδοι μείωσης αλατιού, ενώ παράλληλα είναι ιδανικό να μειωθεί όσο το δυνατό περισσότερο το ποσοστό χρήσης χημικών ενώσεων. Εκτός από την αραίωση με απιονισμένο νερό ως πιθανή λύση, διερευνήθηκε επίσης και η ανάμιξη των δύο ειδών κλασμάτων μεταξύ τους σε διάφορες αναλογίες Πρωτογενούς Δευτερογενούς. Η ανάμειξη θα επιτρέψει

αρχικά τη μείωση των επιπέδων του άλατος, αφού τα πρωτογενή απόβλητα έχουν χαμηλή αλατότητα. Επιπλέον, εφόσον τα πρωτογενή απόβλητα είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, η χρήση τους στην αραίωση των δευτερογενών κλασμάτων θα επιτρέψει τη διατήρηση των θρεπτικών συστατικών σε επίπεδα που θα επιτρέψουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

3.4 Διερεύνηση ανάπτυξης της *Chlorella sp* σε δείγματα με ανάμειξη των πρωτογενών και των δευτερογενών αποβλήτων σε διάφορες αναλογίες

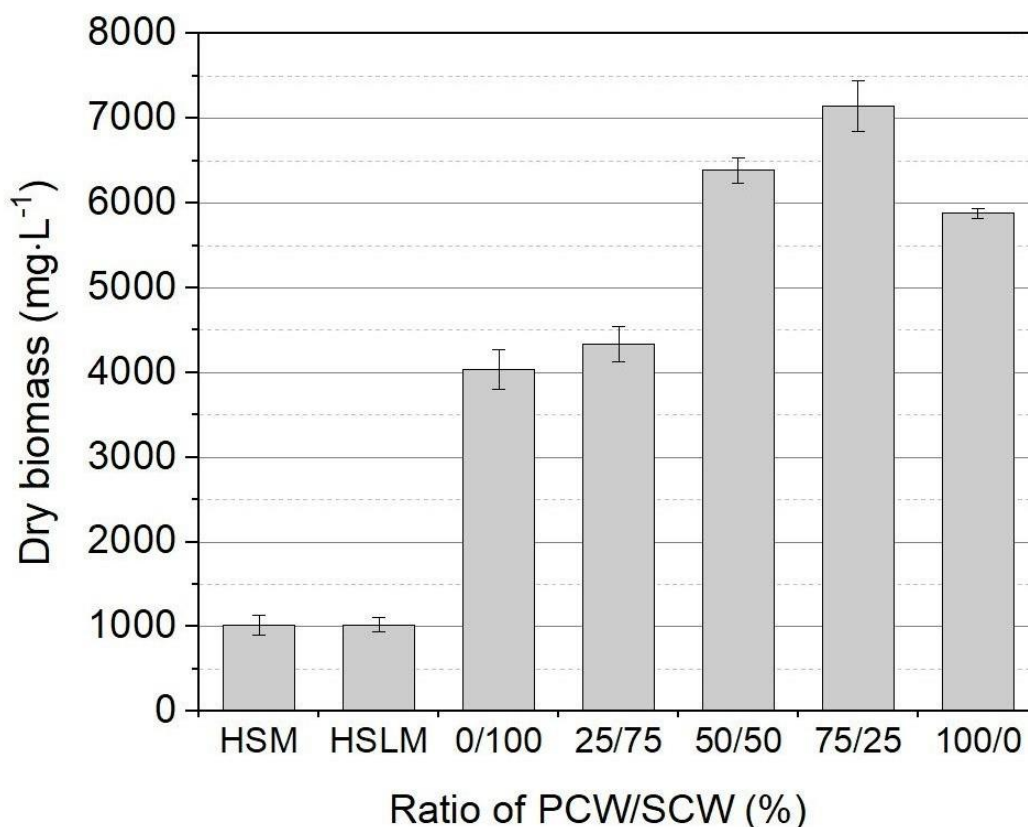
Η προετοιμασία των δειγμάτων περιγράφεται στην ενότητα 2.3.1 και τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω.



Εικόνα 3.9: Μετρήσεις χλωροφύλλης α καλλιεργειών *Chlorella* σε μίγμα με πρωτογενές και δευτερογενές κλάσμα και αποβλήτων τυροκομείου. Ο πρώτος αριθμός αντιπροσωπεύει την περιεκτικότητα στο πρωτογενές και ο δεύτερος αριθμός την περιεκτικότητα σε δευτερογενές. Παράλληλα, αναπαρίστανται και οι μάρτυρες στα θρεπτικά μέσα HSM και HSLM. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7^η πειραματική ημέρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. Ca: χλωροφύλλη-α

Η παραγωγή χλωροφύλλης α στα κλάσματα 50/50, 75/25 και 100/0 είναι πολύ υψηλότερη σε σχέση με αυτήν των μαρτύρων. Αναφορικά με την χλωροφύλλη α, στη συνθήκη 50/50 είναι περίπου 1 φορά μεγαλύτερη από το HSM και περίπου 2 φορές μεγαλύτερη από το HSLM. Στο κλάσμα 75/25 εμφανίζεται μία παρόμοια αναλογία με αυτήν του 50/50 ως προς τους μάρτυρες. Στο κλάσμα 100/0, όπου πρακτικά περιέχεται μόνο πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων η ποσότητα χλωροφύλλης α είναι η υψηλότερη και εμφανίζεται λίγο χαμηλότερα από διπλάσια σε σχέση με το HSM. Αναφορικά με τις συνθήκες 0/100 και 25/75, δεν παρατηρήθηκε παραγωγή χλωροφύλλης α. Αυτή το γεγονός θεωρείται ότι οφείλεται στην υψηλότερη περιεκτικότητα άλατος στις συνθήκες αυτές, καθώς τα δευτερογενή απόβλητα περιέχονται σε μεγαλύτερο ποσοστό. Συνεπώς, η ανάπτυξη

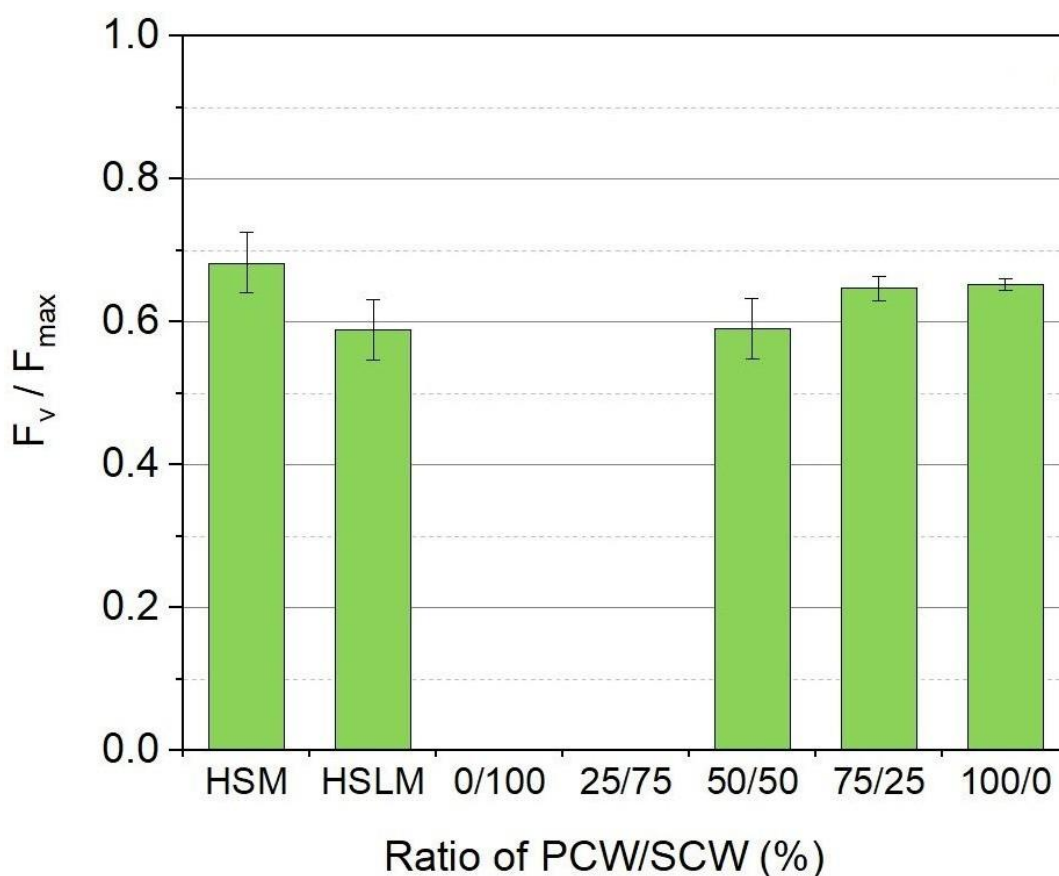
Chlorella στις συνθήκες ανάμειξης, επιτράπηκε μόνο στα δείγματα που τα δευτερογενή απόβλητα περιέχονται σε ποσοστό 50% και λιγότερο. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί και με τα αντίστοιχα αποτελέσματα για την πειραματική σειρά των αραιώσεων των δευτερογενών αποβλήτων με νερό, όπου η ανάπτυξη στα δευτερογενή απόβλητα δεν ήταν εφικτή για περιεκτικότητες αποβλήτων άνω του 50% v/v.



Εικόνα 3.10 : Μετρήσεις ξηρής βιομάζας καλλιεργειών *Chlorella* σε μίγμα με πρωτογενές και δευτερογενές κλάσμα και αποβλήτων τυροκομείου. Ο πρώτος αριθμός αντιπροσωπεύει την περιεκτικότητα στο πρωτογενές και ο δεύτερος αριθμός την περιεκτικότητα σε δευτερογενές. Παράλληλα, αναπαρίστανται και οι μάρτυρες στα θρεπτικά μέσα HSM και HSLM. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7^η πειραματική ημέρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση.

Από την εικόνα 3.10, η ποσότητα βιομάζας σε όλα τα κλάσματα είναι υψηλότερη από αυτήν των μαρτύρων, γεγονός που ήταν αναμενόμενο, καθώς όπως προαναφέρθηκε η ύπαρξη στερεών στα κλάσματα προσμετράται στις τελικές τιμές ξηρής βιομάζας. Επιπλέον, η ποσότητα βιομάζας στα κλάσματα 0/100 και 25/75 όπου δεν εντοπίστηκε κυτταρική

ανάπτυξη, βάσει των μετρήσεων χλωροφύλλης, είναι σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη που μετρήθηκε στα κλάσματα που παρουσίασαν ανάπτυξη. Πιο συγκεκριμένα, οι ποσότητες ξηρής βιομάζας ανά L καλλιέργειας στα θρεπτικά μέσα βρίσκονται μεταξύ 800-1000 mg/L , ενώ στα κλάσματα 0/100 και 25/75 η ξηρή βιομάζα κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 4000-4500 mg/L , δηλαδή 4 φορές μεγαλύτερη από αυτήν των μαρτύρων. Αντιθέτως, στα κλάσματα 50/50, 75/25 και 100/0 οι ποσότητες ξηρής βιομάζας κυμαίνονται σε τιμές μεταξύ 6000 - 7500 mg/L καλλιέργειας. Μια παρατήρηση που προκύπτει από τις μετρήσεις είναι ότι η παραγωγή βιομάζας είναι σημαντικά υψηλότερη για τις συνθήκες όπου τα δευτερογενή απόβλητα περιέχονταν σε ποσοστό 50% και κάτω. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με τις μετρήσεις παραγωγής χλωροφύλλης α.



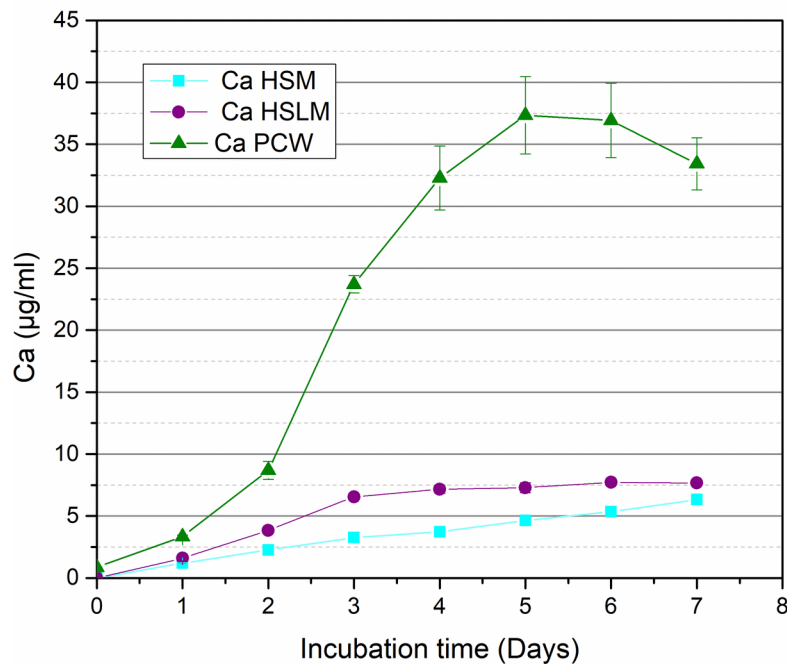
Εικόνα 3.11: Μετρήσεις μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης καλλιεργειών *Chlorella* σε μείγμα με πρωτογενές και δευτερογενές κλάσμα και αποβλήτων τυροκομείου. Ο πρώτος αριθμός αντιπροσωπεύει την περιεκτικότητα στο πρωτογενές και ο δεύτερος αριθμός την περιεκτικότητα σε δευτερογενές. Παράλληλα, αναπαρίστανται και οι μάρτυρες στα θρεπτικά μέσα HSM και HSLM. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 7^η πειραματική ημέρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση.

Από την εικόνα 3.11 παρατηρείται ότι στην περίπτωση υψηλής περιεκτικότητας σε δευτερογενές κλάσμα δεν παρατηρήθηκε κυτταρική ανάπτυξη (κλάσματα 0/100 και 25/75). Αντίθετα, στα κλάσματα 50/50, 75/25 και 100/0 τα κύτταρα μπόρεσαν να αναπτυχθούν και εμφάνισαν ικανοποιητικές τιμές μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης, η οποίες μάλιστα προσεγγίζουν και αυτές των μαρτύρων στα θρεπτικά μέσα HSM και HSLM. Αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι η ανάμιξη πρωτογενών και δευτερογενών αποβλήτων μπορεί να υποβοηθήσει την ανάπτυξη της *Chlorella*, καθώς μειώνει το ποσοστό αλατότητας στο τελικό κλάσμα.

3.5 Διερεύνηση ανάπτυξης *Chlorella sp* σε φωτοβιοαντιδραστήρα

Σε επόμενη πειραματική σειρά μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροφύκου *Chlorella* σε πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων, κλιμακώνοντας τον όγκο σε φωτοβιοαντιδραστήρα του 1 L, με όγκο καλλιέργειας τα 750 mL. Για τον σκοπό αυτό, κατά την ανάπτυξη του μικροφύκου στον φωτοβιοαντιδραστήρα λαμβάνονταν καθημερινά μετρήσεις απορρόφησης για τις φωτοσυνθετικές χρωστικές σε διάστημα 7 ημερών. Παρακάτω παρατίθενται οι τιμές συγκέντρωσης της εκάστοτε χρωστικής, συγκρινόμενη με τους μάρτυρες HSM και HSLM. Οι μετρήσεις χλωροφύλλης a χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

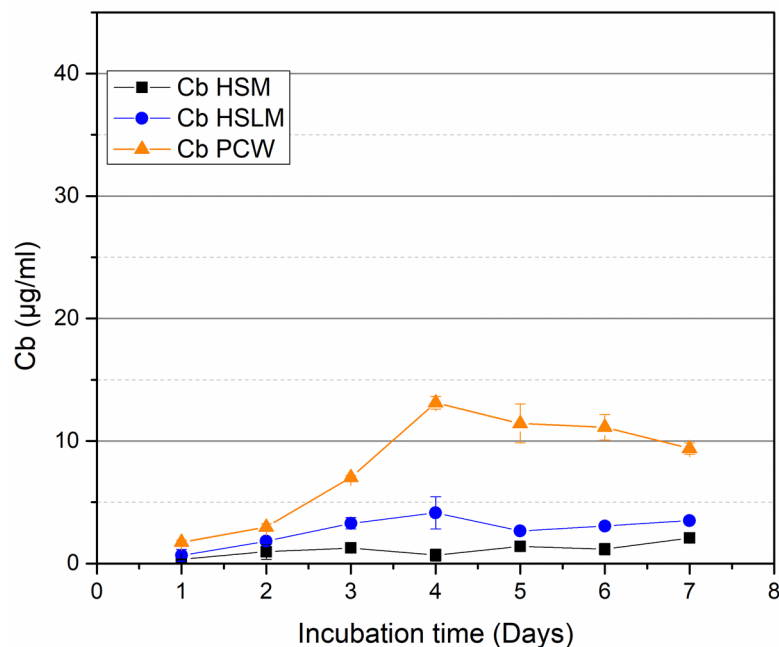
Η προετοιμασία των δειγμάτων περιγράφεται στην ενότητα 2.3.2



Εικόνα 3.12: Μετρήσεις συγκέντρωσης χλωροφύλλης α που παρήχθη από τη *Chlorella* σε φωτοβιοαντιδραστήρα του 1 L σε μεικτότροφες συνθήκες για το πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων σε διάστημα 7 ημερών. Επιπλέον, παρατίθενται και οι αντίστοιχες τιμές για τους μάρτυρες στα θρεπτικά μέσα HSM και HSLM. Ca: χλωροφύλλη-α

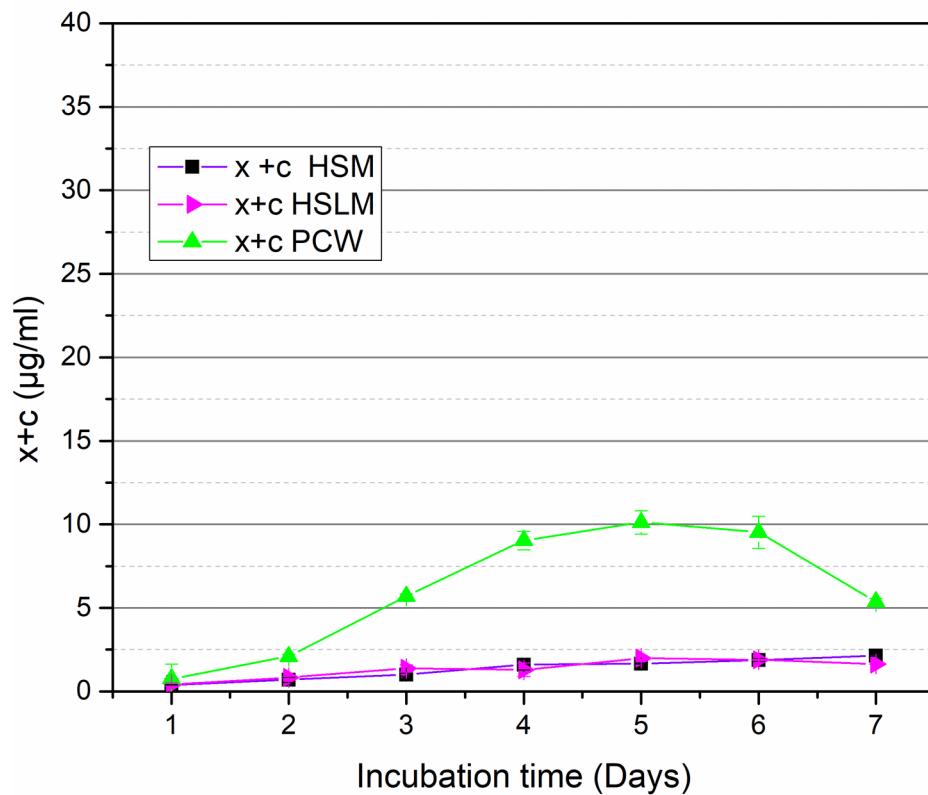
Τα κύτταρα *Chlorella* εμφανίζουν τις τυπικές φάσεις ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Αρχικά, παρατηρείται σε όλες τις συνθήκες η λανθάνουσα φάση για τις πρώτες 24 ώρες, όπου η ανάπτυξη είναι περιορισμένη, καθώς στο διάστημα αυτό τα κύτταρα προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες καλλιέργειας. Οι καλλιέργειες του μάρτυρα HSM εμφανίζουν μια εκτενή εκθετική φάση από τη 2^η έως την 7^η ημέρα. Στη συνθήκη του θρεπτικού HSLM, τα κύτταρα εισέρχονται επίσης στην εκθετική φάση μετά, την πρώτη ημέρα, με το τέλος της φάσης αυτής να παρατηρείται την 3^η ημέρα. Έπειτα, το περιεχόμενο χλωροφύλλης α παραμένει σε σταθερά επίπεδα, όπου τα κύτταρα παραμένουν στην στατική φάση έως το τέλος του πειράματος. Όσον αφορά την συνθήκη των πρωτογενών αποβλήτων, το μικροφύκος μεταβαίνει στην εκθετική φάση μετά την πρώτη ημέρα, στην οποία και παραμένει μέχρι την 5^η πειραματική ημέρα. Τα κύτταρα τότε εισέρχονται στην στατική φάση μέχρι την 6^η ημέρα. Έπειτα παρατηρήθηκε μείωση του περιεχομένου χλωροφύλλης κατά περίπου 10% την τελευταία ημέρα. Η μείωση αυτή μπορεί να συσχετιστεί με δύο κύριους παράγοντες. Αρχικά, λόγω εξάντλησης θρεπτικών συστατικών, τα κύτταρα δεν μπορούν να αναπτυχθούν περαιτέρω και αφετέρου λόγω της υπέρμετρης θολερότητας του θρεπτικού

μέσου από την ανάλογη αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού. Μια σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερη ανάπτυξη στις συνθήκες των αποβλήτων σε σχέση με τους μάρτυρες. Η υψηλότερη τιμή χλωροφύλλης στο δείγμα των αποβλήτων παρατηρήθηκε την 5^η ημέρα, όπου και ήταν υψηλότερη κατά περίπου 5 και 7,5 φορές σε σχέση με τους μάρτυρες HSLM και HSM αντίστοιχα. Συμπερασματικά, η παραγωγή της χλωροφύλλης α είναι αποδοτική ακόμα και σε μεγαλύτερες κλίμακες παραγωγής.



Εικόνα 3.13: Μετρήσεις συγκέντρωσης χλωροφύλλης β που παρήχθη από τη *Chlorella* σε φωτοβιοαντιδραστήρα του 1 L σε μεικτότροφες συνθήκες, για το πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων σε διάστημα 7 ημερών. Επιπλέον, παρατίθενται και οι αντίστοιχες τιμές για τους μάρτυρες HSM και HSLM. Cb: χλωροφύλλη- β

Όπως παρατηρήθηκε και στη χλωροφύλλη α , και στην περίπτωση της χλωροφύλλης β η παραγωγή τις δύο πρώτες ημέρες είναι χαμηλή, γεγονός που είναι αναμενόμενο, καθώς τα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση προσαρμογής στο περιβάλλον τους. Η μέγιστη τιμή της χλωροφύλλης παρατηρείται την τέταρτη ημέρα, όπου προσεγγίζει την τιμή 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ καλλιέργειας, τριπλάσια από την παραγόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στην περίπτωση των μαρτύρων.



Εικόνα 3.14: Μετρήσεις συγκέντρωσης για τα καροτένια και τις ξανθοφύλλες που παρήχθησαν από τη *Chlorella* σε φωτοβιοαντιδραστήρα του 1 L σε μεικτότροφες συνθήκες, για το πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων σε διάστημα 7 ημερών. Επιπλέον, παρατίθενται και οι αντίστοιχες τιμές για τους μάρτυρες HSM και HSLM. Cx+c: ξανθοφύλλες και καροτενοειδή.

Η μέγιστη τιμή παραγωγής των καροτενοειδών βρίσκεται κοντά στα 10 µg/L καλλιέργειας που αντιπροσωπεύει το πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων και είναι περίπου 4 φορές υψηλότερη από τους μάρτυρες. Οι τιμές εμφανίζουν ανοδική πορεία μέχρι την 5^η ημέρα, ενώ μετά το πέρας της εμφανίζουν μία σταθεροποίηση. Επιπλέον, παρατηρείται ότι το προφίλ για τους δύο μάρτυρες είναι παρόμοιο καθ' όλη τη διάρκεια των 7 ημερών.

Πίνακας 3.1: Μετρήσεις φωτοσυνθετικών χρωστικών καλλιέργειας *Chlorella* σε πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων τυροκομείου. Οι τιμές αυτές λήφθηκαν την ημέρα 7 της κυτταρικής ανάπτυξης και αντιπροσωπεύουν καλλιέργεια *Chlorella* που αναπτύχθηκε σε φωτοβιοαντιδραστήρα 1 L σε μεικτότροφες συνθήκες.

Χρωστικές ανά mL καλλιέργειας (μg/mL)			
	Ca	Cb	x+c
HSM	6,32784 ± 0,19421	2,09284 ± 0,08251	2,14288 ± 0,04184
HSLM	7,6762 ± 0,06935	3,50108 ± 0,05724	1,63908 ± 0,01057
<i>Chlorella</i> σε πρωτογενές τυρόγαλα	33,424 ±2,097	9,384 ±0,460	5,365 ± 0,197
Χρωστικές ανά DCW (μg/mg DCW)			
	Ca	Cb	x+c
HSM	19,253 ± 0,591	6,368 ± 0,251	6,520 ± 0,127
HSLM	10,336 ± 0,093	4,714 ± 0,077	2,207 ± 0,014
<i>Chlorella</i> σε πρωτογενές τυρόγαλα	5,526 ±0,347	1,552 ±0,076	0,887 ±0,032

Πίνακας 3.2: Μετρήσεις μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης και ξηρής βιομάζας *Chlorella sp* σε πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων τυροκομείου. Οι τιμές αυτές λήφθηκαν την ημέρα 7 της κυτταρικής ανάπτυξης και αντιπροσωπεύουν καλλιέργεια *Chlorella* που αναπτύχθηκε σε φωτοβιοαντιδραστήρα 1L σε μεικτότροφες συνθήκες.

	HSM	HSLM	PCW
Fv/Fmax	0,795 ± 0,004	0,470 ± 0,038	0,506 ± 0,060
DCW (mg/L)	328,6666667 ± 14,50287328	742,6666667 ±28,50146195	6048,15 ± 467,37

Αναφορικά με την ποσότητα των χρωστικών που παρήχθησαν, η υψηλότερη ποσότητα των φωτοσυνθετικών χρωστικών από τους μάρτυρες υποδηλώνει την δυνατότητα φωτοσυνθετικής δραστηριότητας του μικροφύκου σε μεγαλύτερους όγκους καλλιέργειας. Επιπλέον, οι τιμές φθορισμού είναι κοντά με τις τιμές των μαρτύρων, γεγονός που επιβεβαιώνει την καλή λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Παράλληλα, η ποσότητα ξηρής βιομάζας στο πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων με *Chlorella* είναι σημαντικά υψηλότερη από τους δύο μάρτυρες. Από τις τιμές των πινάκων 3.1 και 3.2 συμπεραίνεται ότι η *Chlorella sp* εμφανίζει υψηλή φωτοσυνθετική απόδοση, καθώς τόσο οι τιμές φθορισμού κοντά στο 0,5 όσο και οι παραγόμενες ποσότητες χρωστικών είναι ικανοποιητικές, συγκρινόμενες με αυτές των μαρτύρων. Εκτός αυτού, παράγεται σημαντική ποσότητα ξηρής βιομάζας, στην τελική τιμή της οποίας επιδρά σημαντικά η ύπαρξη στερεών. Παρόλα αυτά, η ύπαρξη στερεών δεν καταστέλλει την φωτοσυνθετική δράση της *Chlorella sp*. Ο λόγος $\frac{Ca}{Cb}$ είναι ίσος με 3,5.

3.6 Ανάλυση βιοχημικού περιεχομένου

Η βιομάζα των μικροφυκών βρίσκει μια σειρά εφαρμογών στην βιομηχανία των τροφίμων και ζωοτροφών, στην φαρμακοβιομηχανία, και για βιοκαύσιμα. Η παραγωγή υψηλής ποσότητας βιομάζας αποτελεί πρωταρχικό στόχο για την αξιοποίηση της *Chlorella sp* κατά την εφαρμογή της για την βιοαποικοδόμηση αποβλήτων, καθώς η παραγωγή εμπορικά αξιοποιήσιμης βιομάζας θα μειώσει και το κόστος της επεξεργασίας των αποβλήτων τυροκομείου.

Μία τεχνική που χρησιμοποιείται είναι η εφαρμογή δυσμενών καταστάσεων για το κύτταρο. Εφαρμογή στρες με έλλειψη συστατικών, κυρίως N και P μπορεί να αυξήσει την περιεκτικότητα σε λιπίδια, είτε επιβάλλοντας περισσότερη δέσμευση άνθρακα στη σύνθεση λιπιδίων μονοπάτι ή προκαλώντας τη ροή των υδατανθράκων στο λιπίδιο μονοπάτι σύνθεσης άμεσα. Ωστόσο, είναι πιθανό να προκαλέσει μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, με αποτέλεσμα μικρότερη ποσότητα βιομάζας και μείωση της συνολικής παραγωγικότητας λιπιδίων. Επομένως, η ισορροπία μεταξύ της ανάπτυξης μικροφυκών και της περιεκτικότητας σε λιπίδια θα πρέπει να βελτιστοποιηθεί.

Εκτός από την μελέτη ανάπτυξης και φωτοσυνθετικής δραστηριότητας του μικροοργανισμού στα απόβλητα τυροκομείου, είναι σημαντικό να διερευνηθεί και το βιοχημικό προφίλ της παραγόμενης βιομάζας. Παρακάτω παρουσιάζονται οι αναλύσεις του

βιοχημικού περιεχομένου ξηρής βιομάζας καθαρής *Chlorella* από θρεπτικό TAP, στερεών τυρογάλακτος και *Chlorella* ανεπτυγμένης στο πρωτογενές κλάσμα. Στην πρώτη και την τελευταία περίπτωση, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε φωτοβιοαντιδραστήρες, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.2. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η βιομάζα στην συνθήκη της *Chlorella* στα απόβλητα εμπεριέχει και τα στερεά τυρογάλακτος, τα οποία επηρεάζουν και την τελική σύσταση της ξηρής βιομάζας, όπως φαίνεται και από τις παρακάτω αναλύσεις.

Πίνακας 3.3: Μετρήσεις περιεκτικότητας πρωτεϊνών στην ξηρή βιομάζα. Οι μετρήσεις αφορούν καλλιέργειες *Chlorella* σε TAP, δείγματα στερεών πρωτογενούς κλάσματος τυρογάλακτος, καθώς και βιομάζα *Chlorella* ανεπτυγμένης στα πρωτογενή απόβλητα.

Δείγμα	mg πρωτεΐνης/ 100 mg cells = % (πρωτεΐνες/ξηρή βιομάζα)
Βιομάζα <i>Chlorella</i> σε πρωτογενές τυρόγαλα	34,76 ± 2,31
Στερεά πρωτογενούς τυρογάλακτος	31,23 ± 2,28
<i>Chlorella</i> στο θρεπτικό μέσο TAP	41,76 ± 2,91

Από τις παραπάνω τιμές παρατηρείται ότι η ποσότητα πρωτεϊνών που παρήχθησαν στη βιομάζα πριν και μετά την επεξεργασία των αποβλήτων δεν μεταβλήθηκε σε σημαντικό βαθμό, παρόλο που εμφανίζεται μία μικρή αύξηση σε ποσοστό 3,5% στην περίπτωση που προστέθηκε η *Chlorella*. Επιπλέον, η καλλιέργεια TAP εμφάνισε μεγαλύτερες τιμές σε σχέση με την περίπτωση των αποβλήτων τυρογάλακτος. Αυτό υποδηλώνει ότι η προσθήκη *Chlorella* στα απόβλητα δεν συμβάλλει σημαντικά στην παραγωγή πρωτεϊνών. Πιθανόν ο ρυθμός κατανάλωσης πρωτεϊνών από την *Chlorella* να είναι περίπου ίσος με το ρυθμό παραγωγής νέων πρωτεϊνικών προϊόντων, αν ληφθεί μάλιστα υπόψη ότι σε καλλιέργειες θρεπτικού η παραγωγή πρωτεϊνών είναι σημαντική.

Πίνακας 3.4: Μετρήσεις περιεκτικότητας λιπιδίων στην ξηρή βιομάζα. Οι μετρήσεις αφορούν καλλιέργειες *Chlorella* σε TAP, δείγματα στερεών πρωτογενούς κλάσματος τυρογάλακτος, καθώς και βιομάζα *Chlorella* ανεπτυγμένης στα πρωτογενή απόβλητα.

Δείγμα	mg λιπιδίων/ 100 mg cells
--------	---------------------------

	% (λιπίδια/ξηρή βιομάζα)
Βιομάζα <i>Chlorella</i> σε πρωτογενές τυρόγαλα	36,36 ±3,46
Στερεά πρωτογενούς τυρογάλακτος	63,83 ±1,82
<i>Chlorella</i> στο θρεπτικό μέσο TAP	10,40 ±1,13

Η περιεκτικότητα λιπιδίων στα στερεά τυρογάλακτος πριν την επεξεργασία είναι ίση με 63,83 ±1,82 %, η οποία φαίνεται να μειώνεται σημαντικά μετά την επεξεργασία των αποβλήτων με *Chlorella*, κατά ποσοστό ίσο με 27%. Η *Chlorella* χωρίς τα στερεά τυρογάλακτος είναι σημαντικά λιγότερο πλούσια σε λιπίδια (συνθήκη θρεπτικού μέσου TAP), συνεπώς η συμμετοχή της στη βιομάζα που περιέχει και τα στερεά τυρογάλακτος θα μειώσει ανάλογα και το συνολικό λιπιδικό περιεχόμενο.

Πίνακας 3.5: Μετρήσεις περιεκτικότητας ολικών υδατανθράκων. Οι μετρήσεις αφορούν καλλιέργειες *Chlorella* σε TAP, δείγματα πρωτογενούς κλάσματος τυρογάλακτος, καθώς και δείγματα αποβλήτων μετά από επεξεργασία με *Chlorella*.

Δείγμα	mg σακχάρων/ 100 mg cells = % (υδατάνθρακες/ξηρή βιομάζα)
Βιομάζα <i>Chlorella</i> σε πρωτογενές τυρόγαλα	16,26 ± 0,72
Στερεά πρωτογενούς τυρογάλακτος	7,10 ± 0,76
<i>Chlorella</i> στο θρεπτικό μέσο TAP	28,10 ± 2,97

Η περιεκτικότητα υδατανθράκων στα στερεά από το πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων πριν την επεξεργασία με *Chlorella* είναι ~7%. Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες μετά την επεξεργασία με *Chlorella* οδηγεί σε περιεκτικότητα διπλάσια από αυτήν πριν την επεξεργασία. Συνεπώς, η ανάπτυξη *Chlorella* σε απόβλητα τυροκομείου οδηγεί στην αύξηση ποσότητας των υδατανθράκων στο τυρόγαλα σε ένα ποσοστό λίγο παραπάνω από το 100%. Από την καλλιέργεια των κυττάρων σε TAP παρατηρείται ότι η ποσότητα σακχάρων που παράγονται είναι 4 φορές μεγαλύτερη από αυτήν που περιέχονται στο τυρόγαλα, ενώ αν συγκρίνουμε την ποσότητα σακχάρων που προκύπτουν στην καλλιέργεια με TAP και στο τυρόγαλα, φαίνεται ότι η περιεκτικότητα στο κλάσμα τυρογάλακτος είναι κατά 42,1%

μικρότερη από αυτήν στην καλλιέργεια TAP. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι το τυρόγαλα από τη δεν αποτελεί το αποδοτικότερο υπόστρωμα για την *Chlorella* σε σχέση με μία καλλιέργεια θρεπτικού, στα πλαίσια της παραγωγής υδατανθράκων. Εδώ είναι σημαντικό να επισημάνουμε το γεγονός ότι το τυρόγαλα περιέχει σε μεγάλο ποσοστό λακτόζη, η οποία δεν είναι εύκολα αφομοιώσιμο υπόστρωμα, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να χρειάζονται ενέργεια για να μπορέσουν να αποικοδομήσουν τον δισακχαρίτη και να λάβουν τα απαραίτητα συστατικά.

Πίνακας 3.6: Μετρήσεις συγκέντρωσης φωτοσυνθετικών χρωστικών ξηρής βιομάζας. Οι μετρήσεις αφορούν καλλιέργειες *Chlorella* σε TAP, καθώς και δείγματα αποβλήτων μετά από επεξεργασία με *Chlorella*.

Χρωστικές /DCW (μg/mg)			
Δείγμα	Ca	Cb	x+c
Βιομάζα <i>Chlorella</i> σε πρωτογενές τυρόγαλα	5,15± 0,23	1,60± 0,19	1,53 ± 0,21
<i>Chlorella</i> στο θρεπτικό μέσο TAP	12,81± 0,30	4,09 ±0,22	4,01 ± 0,08

Όπως είναι εμφανές, η συγκέντρωση φωτοσυνθετικών χρωστικών είναι πολύ χαμηλότερη κατά την ανάπτυξη της *Chlorella* σε πρωτογενές κλάσμα αποβλήτων συγκριτικά με καλλιέργεια TAP. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι τιμές αφορούν συγκεντρώσεις ανά mg ξηρής βιομάζας και όχι ανά mL καλλιέργειας. Συνεπώς, η παραγόμενη βιομάζα στην περίπτωση του τυρογάλακτος θα είναι αποτέλεσμα όχι μόνο της καθαρής βιομάζας *Chlorella*, αλλά και από την επίδραση των στερεών. Συνεπώς, το μικροφύκος είναι ικανό να φωτοσυνθέσει σε περιβάλλον με απόβλητα τυρογάλακτος, ανεξάρτητα από το γεγονός ότι παρουσιάζει μεγάλες τιμές βιομάζας. Ενδεικτικά, ο λόγος $\frac{Ca}{Cb}$ είναι παρόμοιος και περίπου 3,1-3,2 και στις δύο περιπτώσεις, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μικροφύκος ακολουθεί το ίδιο μοτίβο παραγωγής των δύο ειδών χλωροφύλλης.

3.7 Συμπεράσματα

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η *Chlorella* μπορεί να χρησιμοποιήσει τα πρωτογενή και δευτερογενή κλάσματα αποβλήτων γαλακτοκομικών προϊόντων ως πηγές θρεπτικών συστατικών και να αναπτυχθεί σε συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης. Από προηγούμενες μελέτες ήταν γνωστό ότι οι ιδανικότερες συνθήκες ανάπτυξης ήταν οι μεικτότροφες συνθήκες παρουσία φωτός, με μόνη προσθήκη ιχνοστοιχείων μέσω του διαλύματος Hutner's στα δείγματα των αποβλήτων για την κυτταρική ανάπτυξη. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν δύο κλάσματα αποβλήτων από τυροκομική μονάδα. Το πρώτο αποτελούσε κλάσμα από πρωτογενές στάδιο παραγωγής, το οποίο ήταν πλούσιο σε ρυπαντικό φορτίο και θρεπτικά συστατικά. Το δεύτερο κλάσμα προέρχονταν από δευτερογενές στάδιο και ήταν λιγότερο πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και περιείχε σημαντικά υψηλά επίπεδα αλατότητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μικροφύκος μπορεί να αναπτυχθεί επιτυχώς στα πρωτογενή απόβλητα, ακόμα και όταν δεν πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις με νερό. Η υψηλή θολερότητα και τα στερεά τυρογάλακτος που συσσωματώνονται μετά την αποστείρωση στο αυτόκαυστο δεν αποτελούν περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη. Μάλιστα, το μικροφύκος παρουσίασε ανάπτυξη σε διπλάσια επίπεδα σε σχέση με καλλιέργειες του μικροφύκου σε συμβατικά θρεπτικά μέσα. Επιπλέον, τα κύτταρα στις συνθήκες αυτές εμφάνισαν φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε επίπεδα ανάλογα με του μάρτυρα. Η αραιώση των αποβλήτων με νερό οδήγησε σε μειωμένη ανάπτυξη, το οποίο αποδίδεται και στην μείωση των διαθέσιμων υποστρωμάτων για την ανάπτυξη. Συνεπώς τα πρωτογενή απόβλητα, λόγω του πλούσιου περιεχομένου τους σε θρεπτικά συστατικά μπορούν να αποτελέσουν ένα ιδανικό μέσο για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Σχετικά με τα δευτερογενή απόβλητα, παρατηρήθηκε διαφορετική συμπεριφορά του μικροοργανισμού σε σχέση με τα πρωτογενή. Δηλαδή τα κύτταρα δεν μπόρεσαν να αναπτυχθούν στα αναραιώτα απόβλητα, αλλά μόνο όταν είχαν αραιωθεί τουλάχιστον σε αναλογία 1:1 με απιονισμένο νερό. Αυτό θεωρούμε ότι οφείλεται στις τεράστιες συγκεντρώσεις άλατος που φέρουν τα απόβλητα. Το στέλεχος αυτό απομονώθηκε από φυσικό περιβάλλον με γλυκό νερό, συνεπώς είναι λογικό να μην έχει αναπτύξει μηχανισμούς προσαρμογής σε περιβάλλοντα με υψηλή αλατότητα. Η αλατότητα μπορεί να

δράσει ανασταλτικά για την ανάπτυξη της *Chlorella*, καθώς μπορεί να καταστρέψει τις κυτταρικές μεμβράνες του κυττάρου. Μία εναλλακτική λύση είναι η ανάμιξη των δύο ειδών κλασμάτων, αντί να γίνει αραίωση με νερό, εξασφαλίζοντας μια πιο «πράσινη» τεχνική και λιγότερο κοστοβόρα. Πράγματι, η ανάμιξη των δύο ειδών κλασμάτων απεδείχθη αποτελεσματική για την ανάπτυξη της *Chlorella*, για ποσοστό δευτερογενούς κλάσματος αποβλήτων από 50% και κάτω. Το μικροφύκος εμφάνισε αξιοσημείωτη ανάπτυξη και φωτοσυνθετική δραστηριότητα, στις συνθήκες όπου το δευτερογενές κλάσμα περιέχονταν σε ποσοστό 50% και λιγότερο. Αυτές οι παρατηρήσεις συμφωνούν και με τις αντίστοιχες παρατηρήσεις για την επίδραση της αλατότητας, από την πειραματική σειρά με το δευτερογενές κλάσμα αποβλήτων. Στη συνέχεια μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στα πρωτογενή απόβλητα χωρίς αραίωση, σε υψηλότερους όγκους καλλιέργειας. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης, σημαντικά υψηλότερους από τις καλλιέργειες του μάρτυρα στις αντίστοιχες συνθήκες. Στο τελευταίο τμήμα της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του βιοχημικού περιεχομένου της παραγόμενης βιομάζας του μικροοργανισμού, κατά την ανάπτυξή του σε απόβλητα και σε ένα συμβατικό θρεπτικό μέσο. Το μικροφύκος *Chlorella* όταν αναπτύχθηκε στο θρεπτικό μέσο TAP ήταν ιδιαίτερα πλούσιο σε πρωτεΐνες, και λιγότερο πλούσιο σε λιπίδια. Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι η βιομάζα που συλλέχθηκε από τις καλλιέργειες αποβλήτων περιείχε όχι μόνο τον μικροοργανισμό σε καθαρή μορφή, αλλά και τα στερεά τυρογάλακτος, επηρεάζοντας ανάλογα και τα περιεχόμενα της βιομάζας. Έτσι, η βιομάζα από τις καλλιέργειες στα πρωτογενή απόβλητα ήταν περισσότερο πλούσια σε λιπίδια, καθώς τα στερεά τυρογάλακτος στην καθαρή τους μορφή είναι πολύ περιεκτικά σε αυτά. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της τελικής βιομάζας *Chlorella* από τα απόβλητα παρέμεινε σε πρακτικά σταθερά επίπεδα, σε σχέση με τη συνθήκη του συμβατικού θρεπτικού. Η αποφυγή χρήσης μεγάλης ποσότητας χημικών αντιδραστηρίων και η μείωση ποσότητας νερού που χρησιμοποιείται για τις αραιώσεις μέσω ανάμιξης των κλασμάτων μεταξύ τους, αποτελεί βασικό συντελεστή για την οικονομικότερη διαδικασία και την μείωση του περιβαλλοντικού αντικτύπου. Τελικά, η χρήση του μικροφύκου για την διαχείριση των αποβλήτων με βελτιστοποιημένες τεχνικές αποτελεί βασικό σημείο της «Πράσινης Χημείας».

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε το στέλεχος *Chlorella sp.*, ένα φωτοσυνθετικό μικροφύκος που λήφθηκε από την εργαστηριακή ομάδα από τον ποταμό στην περιοχή Γιόφυρο σε προηγούμενες χρονιές. Το στέλεχος αυτό μπορεί να αναπτυχθεί σε περιβάλλοντα με υψηλό ρυπαντικό φορτίο, μεταξύ των οποίων είναι και τα απόβλητα τυροκομικών εταιρειών, τα οποία εμφανίζουν υψηλές τιμές BOD και COD. Οι τιμές αυτές είναι αποτέλεσμα παρουσίας λακτόζης και οργανικού άνθρακα, με αποτέλεσμα αν απορριφθούν στο περιβάλλον μπορούν να προκαλέσουν περιβαλλοντικά προβλήματα με πιθανές επιπτώσεις και στον άνθρωπο. Η διαχείριση των αποβλήτων τυροκομείων με το στέλεχος αυτό μπορεί να μειώσει τα επίπεδα των ρυπαντών σε αυτά, με την ταυτόχρονη παραγωγή εμπορικά αξιοποιήσιμης βιομάζας. Για την ανάπτυξη του στελέχους στα απόβλητα αυτά είναι απαραίτητη η προσθήκη θρεπτικών συστατικών (μεταλλικών ιχνοστοιχείων), καθώς και ενδεχομένως η αραίωση των αποβλήτων για την μείωση της αλατότητας και της καλύτερης διείσδυσης του φωτός. Το μικροφύκος εμφάνισε αξιοσημείωτη ανάπτυξη σε απόβλητα από πρωτογενές στάδιο, όμως η ανάπτυξη περιορίστηκε σημαντικά στην περίπτωση δευτερογενών αποβλήτων, λόγω της υψηλής αλατότητας σε αυτά. Η ανάμειξη των δύο ειδών αποβλήτων μπορεί να αντικαταστήσει το νερό για την αραίωση των δειγμάτων, γεγονός που εξασφαλίζει τον «πράσινο» χαρακτήρα της διαδικασίας. Σημαντική παράμετρος που μελετάται είναι και η παραγωγή χρήσιμης βιομάζας, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλούς τομείς, όπως η παραγωγή βιοντίζελ, συμπληρώματα διατροφής, καθώς και σε τομείς της ιατρικής, της φαρμακευτικής, της κοσμητολογίας, και όχι μόνο. Για την εφαρμογή της μεθοδολογίας σε βιομηχανική κλίμακα, είναι σημαντική και η σταδιακή αύξησης τις κλίμακας καλλιέργειας στα απόβλητα. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή έδειξαν ότι σε κλίμακα φωτοβιοαντιδραστήρα του 1 L, η ανάπτυξη του μικροφύκου ήταν αποδοτική με επαρκή ποσότητα παραγόμενων φωτοσυνθετικών χρωστικών. Είναι αξιόλογο να μελετηθεί σε μελλοντικά πειράματα και η αύξηση του όγκου καλλιέργειας σε ακόμα υψηλότερα επίπεδα, για την προσομοίωση των συνθηκών που συναντώνται στη βιομηχανία. Η βιομάζα των φυκών που λαμβάνονται από PBRs μπορούν να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή βιομορίων του εμπορικού ενδιαφέροντος (λιπίδια και β-γλυκοσιδάση) ενώ η υπολειμματική η βιομάζα κατά την εκχύλιση μπορεί να πωληθεί για άλλους σκοπούς συμπεριλαμβανομένου του

παραγωγή βιοαερίου. Λόγω της ευρείας εξειδίκευσης του υποστρώματος, οι β-γλυκοσιδάσες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την απομάκρυνση της d-Λακτόζης από τα γαλακτοκομικά προϊόντα καθώς και για την αποικοδόμηση της κυτταροβιόζης σε d-Γλυκόζη για παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνοκυτταρινική βιομάζα. Συμπερασματικά, η παραγόμενη βιομάζα αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη πηγή χρήσιμων προϊόντων [42]. Παράλληλα, μέσω ανασυνδυασμού του μικροφύκους είναι πιθανόν να ξεπεραστούν περιορισμοί ανάπτυξης του μικροφύκους, να αποκτηθούν νέες βελτιστοποιημένες ικανότητες του μικροφύκους. Ως εκ τούτου, θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα πιο ευρύ επίπεδο και να βελτιστοποιήσει θεραπείες ασθενειών, να αυξήσει τη διατροφική αξία των προϊόντων και να χρησιμοποιηθεί για αποικοδόμηση άλλων ειδών τοξικών προϊόντων. Η ταυτόχρονη μείωση ρυπαντών και η παραγωγή χρήσιμων μεταβολιτών καθιστά την χρήση *Chlorella* σε γαλακτοκομικά απόβλητα, μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο βιοαπαποκατάστασης τοξικών προϊόντων σε μη τοξικά που ακολουθεί τους σκοπούς και τις αρχές τις «Πράσινης Χημείας».

Βιβλιογραφία

1. J. M. Berg, J. L Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, «Βιοχημεία», 2015, 8η έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
2. Harvey J.M. Hou, Mohammad Mahdi Najafpour, Gary F. Moore, Suleyman I. Allakhverdiev, Photosynthesis: Structures, Mechanisms, and Applications, 2017
3. ATKINS PETER - DE PAULA JULIO, Φυσικοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτη
4. Sekar, N. and R. Ramasamy (2015). "Photosynthetic Energy Conversion: Recent Advances and Future Perspective." Electrochemical Society Interface 24: 67-73.
5. Nazos, T. T., et al. (2020). "Characterization of a novel herbicide and antibiotic-resistant *Chlorella* sp. with an extensive extracellular matrix." Photosynthesis Research 143(3): 315-334.
6. Liu, J., Z. Sun, and F. Chen, Chapter 6 - Heterotrophic Production of Algal Oils, in Biofuels from Algae, A. Pandey, et al., Editors. 2014, Elsevier: Amsterdam. p. 111- 142.
7. Νάζος, Θ., Μελέτη της βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από μικροοργανισμούς. 2018, Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας: Ηράκλειο.
8. Κοκαράκης, Ε., Απομόνωση και χαρακτηρισμός φυσικών προϊόντων από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς. 2018, Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας: Ηράκλειο
9. Dragone, G. (2022). "Challenges and opportunities to increase economic feasibility and sustainability of mixotrophic cultivation of green microalgae of the genus *Chlorella*." Renewable and Sustainable Energy Reviews 160: 112284.
10. Zhang, W., et al. (2014). "Effects of various organic carbon sources on the growth and biochemical composition of *Chlorella pyrenoidosa*." Bioresource Technology 173: 52-58.
11. Nurachman, Z., et al. (2015). "Tropical marine *Chlorella* sp. PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells." Algal Research 10: 25-32.
12. Φουσκάκη, «Σημειώσεις Εργαστηριακών ασκήσεων»

13. Sözmen, A. B., et al. (2022). "Optimization of the algal species *Chlorella* *miniata* growth: Mathematical modelling and evaluation of temperature and light intensity effects." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 39: 102239.
14. Converti, A., 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: Process Intensification* 48(6): 1146-1151.
15. Chang, H.-X., et al. (2016). "Kinetic characteristics and modeling of microalgae *Chlorella* *vulgaris* growth and CO₂ biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon." *Bioresource Technology* 206: 231-238.
16. Le Gouic, B., et al. (2021). "Investigation of growth limitation by CO₂ mass transfer and inorganic carbon source for the microalga *Chlorella* *vulgaris* in a dedicated photobioreactor." *Chemical Engineering Science* 233: 116388.
17. Huang, Y., et al. (2017). "Optimizing the gas distributor based on CO₂ bubble dynamic behaviors to improve microalgal biomass production in an air-lift photo-bioreactor." *Bioresource Technology* 233: 84-91
18. Sadeghizadeh, A., et al. (2017). "CO₂ capture from air by *Chlorella* *vulgaris* microalgae in an airlift photobioreactor." *Bioresource Technology* 243: 441-447
19. Cheng, C.-L., et al. (2022). "Effect of pH on biomass production and carbohydrate accumulation of *Chlorella* *vulgaris* JSC-6 under autotrophic, mixotrophic, and photoheterotrophic cultivation." *Bioresource Technology* 351: 127021.
20. He, Z., et al. (2022). "Effect of microwave on biomass growth and oxygen production of microalgae *Chlorella* *pyrenoidosa* cultured in real wastewater." *Process Safety and Environmental Protection* 161: 22-33.
21. Farooq, W., et al. (2022). "Monitoring lipids profile, CO₂ fixation, and water recyclability for the economic viability of microalgae *Chlorella* *vulgaris* cultivation at different initial nitrogen." *Journal of Biotechnology* 345: 30-39
22. Li, T., et al. (2016). "Morphology, growth, biochemical composition and photosynthetic performance of *Chlorella* *vulgaris* (Trebouxiophyceae) under low and high nitrogen supplies." *Algal Research* 16: 481-491.
23. Σφλώμος, Χημεία Τροφίμων, Εκδόσεις Τσότρας

24. Χρυσταλένη, Χημεία Τροφίμων-Βιταμίνες και ανόργανα άλατα, lecture 1,2 ,3
25. Bhagooli, R., et al. (2021). "Chlorophyll fluorescence – A tool to assess photosynthetic performance and stress photophysiology in symbiotic marine invertebrates and seaplants." *Marine Pollution Bulletin* 165: 112059.
26. Umetani, I., et al. (2021). "Bicarbonate for microalgae cultivation: a case study in a chlorophyte, *Tetrademus wisconsinensis* isolated from a Norwegian lake." *Journal of Applied Phycology* 33(3): 1341-1352. Ferreira de Oliveira, A. P. and A. P. A. Bragotto (2022). "Microalgae-based products: Food and public health." *Future Foods* 6: 100157.
27. Carvalho, F., et al. (2013). "Cheese whey wastewater: Characterization and treatment." *Science of The Total Environment* 445-446: 385-396.
28. Zhang, W., et al. (2014). "Effects of various organic carbon sources on the growth and biochemical composition of *Chlorella pyrenoidosa*." *Bioresource Technology* 173: 52-58.
29. Farizoglu, B., et al. (2007). "Simultaneous removal of C, N, P from cheese whey by jet loop membrane bioreactor (JLMBR)." *Journal of Hazardous Materials* 146(1): 399-407.
30. Lee, C., et al. (2019). "*Chlorella*-gold nanorods hydrogels generating photosynthesis-derived oxygen and mild heat for the treatment of hypoxic breast cancer." *Journal of Controlled Release* 294: 77-90.
31. Moradi, P. and M. Saidi (2022). "Biodiesel production from *Chlorella Vulgaris* microalgal-derived oil via electrochemical and thermal processes." *Fuel Processing Technology* 228: 107158.
32. Haris, N., et al. (2022). "Effect of different salinity on the growth performance and proximate composition of isolated indigenous microalgae species." *Aquaculture Reports* 22: 100925.
33. Rosli, S.-S., et al. (2018). "pH optimization to promote attached growth of microalgae biomass onto polyurethane foam material." *AIP Conference Proceedings* 2016(1): 020123
34. Leong, W. H., et al. (2022). "Photoperiod-induced mixotrophic metabolism in *Chlorella vulgaris* for high biomass and lipid to biodiesel productions using municipal wastewater medium." *Fuel* 313: 123052.

35. Bito T, Okumura E, Fujishima M, Watanabe F. Potential of *Chlorella* as a Dietary Supplement to Promote Human Health. *Nutrients*. 2020 Aug 20;12(9):2524. doi: 10.3390/nu12092524. PMID: 32825362; PMCID: PMC7551956.
36. Fallah, A. A., et al. (2018). "Effect of *Chlorella* supplementation on cardiovascular risk factors: A meta-analysis of randomized controlled trials." *Clinical Nutrition* 37(6, Part A): 1892-1901.
37. Yamagishi, S., et al. (2005). "Therapeutic potentials of unicellular green alga *Chlorella* in advanced glycation end product (AGE)-related disorders." *Medical Hypotheses* 65(5): 953-955.
38. Kotrbáček, V., et al. (2015). "The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review." *Journal of Applied Phycology* 27(6): 2173-2180.
39. Fazal, T., et al. (2021). "Integrating bioremediation of textile wastewater with biodiesel production using microalgae (*Chlorella vulgaris*)." *Chemosphere* 281: 130758.
40. PeraLa, E., et al. (2019). "Centrate grown *Chlorella fusca* (Chlorophyta): Potential for biomass production and centrate bioremediation." *Algal Research* 39: 101458.
41. J. T, M. L., et al. (2021). "A critical look into different salinity removal treatments for the production of high value pigments and fatty acids from marine microalgae *Chlorella vulgaris* (NIOT-74)." *Biotechnology Reports* 30: e00627.
42. Gamegna, G., et al. (2020). "Exploring the potential of microalgae in the recycling of dairy wastes." *Bioresource Technology Reports* 12: 100604
43. Leong, W. H., et al. (2022). "Photoperiod-induced mixotrophic metabolism in *Chlorella vulgaris* for high biomass and lipid to biodiesel productions using municipal wastewater medium." *Fuel* 313: 123052.
44. Wellburn, A.R. (1994) The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, As Well As Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal Plant Physiology*, 144, 307-313.
45. Groger, W.K., Determination of sugars in biological media with thymol in sulphuric acid. *Clin Chim Acta*, 1961. 6: p. 866-73.
46. Schulze, C., M. Wetzel, J. Reinhardt, M. Schmidt, et al., Screening of microalgae for primary metabolites including β -glucans and the influence of nitrate starvation and irradiance on β -glucan production. *J Appl Phycol*, 2016. 28(5): p. 2719-2725.

47. Knight, J.A., S. Anderson, and J.M. Rawle, Chemical basis of the sulfo-phosphovanillin reaction for estimating total serum lipids. Clin Chem, 1972. 18(3): p. 199- 202
48. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951. 193(1): p. 265-75.
49. González López, C.V., M.d.C.C. García, F.G.A. Fernández, C.S. Bustos, et al., Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. Bioresour Technol, 2010. 101(19): p. 7587-7591
50. Jeon, J.-Y., K.-K. Park, K.-W. Lee, S.-W. Jang, et al., Dietary effects of lutein fortified Chlorella on milk components of Holstein cows. SpringerPlus, 2016. 5(1): p. 908-908.
51. Strasser, B. and R. Strasser, Measuring Fast Fluorescence Transients to Address Environmental Questions: The JIP-Test. Photosyn Thesis: From Light to Biosphere, 1995: p. 977-980.
52. Jafarihaghighi, F., et al. (2020). "Effect of Fatty Acid Profiles and Molecular Structures of Nine New Source of Biodiesel on Combustion and Emission." ACS Omega 5(26): 16053-16063.

URL LINKS

- <https://passel2.unl.edu/view/lesson/920a6340a995/3>
- https://www.researchgate.net/figure/Structures-of-the-chlorophyll-molecules_fig5_317151195
- <https://www.investopedia.com/terms/b/bioremediation.asp#toc-what-is-bioremediation>
- <https://www.usgs.gov/special-topics/water-science-school/science/biological-oxygen-demand-bod-and-water>
- <https://realtechwater.com/parameters/chemical-oxygen-demand/>
-

