



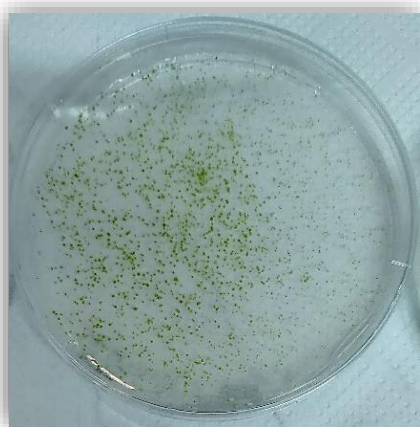
ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Σχολή Χημικών Μηχανικών και
Μηχανικών Περιβάλλοντος

**Επιλογή του κατάλληλου στελέχους μικροφυκών *Stichococcus*
sp. με χαρακτηριστικά μειωμένης χλωροφύλλης και υψηλότερης
παραγωγής λιπιδίων**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΤΗΣ**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΠΑΝΤΕΛΙΔΑΚΗ



Χανιά, Φεβρουάριος 2023

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για μη κερδοσκοπικό σκοπό, εκπαιδευτικού ή ερευνητικού χαρακτήρα, με την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για άλλη χρήση θα πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης.



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Σχολή Χημικών Μηχανικών και
Μηχανικών Περιβάλλοντος

**Επιλογή του κατάλληλου στελέχους μικροφυκών *Stichococcus*
sp. με χαρακτηριστικά μειωμένης χλωροφύλλης και υψηλότερης
παραγωγής λιπιδίων**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΤΗΣ**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΠΑΝΤΕΛΙΔΑΚΗ

Τριμελής επιτροπή:

Πέτρος Γκίκας, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Νικόλαος Καλογεράκης, Ομότιμος Καθηγητής

Δανάη Βενιέρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μεγιστοποίηση της ανάπτυξης μικροφυκών, με τη μείωση του «φαινόμενου σκίασης» που δημιουργείται από την υψηλή συγκέντρωση χλωροφύλλης στην κυτταρική μάζα των μικροφυκών. Για την επίτευξη των παραπάνω, εφαρμόστηκε μεταλλαξιογόνος παράγοντας στο στέλεχος μικροφυκών *Stichococcus* sp. και επιλέχθηκαν τα στελέχη με χαμηλή περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη. Αυτά τα στελέχη δοκιμάστηκαν στη συνέχεια ως προς την αποδοτικότητα της ανάπτυξης και για την ικανότητά τους να παράγουν λιπίδια και χρωστικές ουσίες. Το στέλεχος *Stichococcus* sp., είναι ένα πράσινο μικροφύκι ραβδοειδούς σχήματος, το οποίο ανήκει στην ταξινόμηση των χλωροφύτων. Είναι ανθεκτικό σε ακραίες τιμές pH, υψηλές θερμοκρασίες, αλατότητα και θρεπτικά συστατικά στο περιβάλλον ανάπτυξης του. Αναπτύσσεται κυρίως σε αλατούχο νερό, αλλά οι ερευνητές το έχουν συναντήσει να αναπτύσσεται σε γλυκό νερό, έδαφος, ακόμη και στο ακραίο περιβάλλον της Ανταρκτικής. Η μετάλλαξη του *Stichococcus* sp. επιτεύχθηκε με τη χρήση μεθανοσουλφονικού αιθυλεστέρα (EMS) ως χημικό μεταλλαξιογόνο. Το EMS είναι ένας παράγοντας αιθυλίωσης, ο οποίος προκαλεί αλλαγές στο DNA των μικροφυκών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη ανά κύτταρο μειώθηκε επιτυχώς στα μεταλλαγμένα στελέχη με την ονομασία EMS1 και EMS2. Συγκεκριμένα οι μέγιστες τιμές περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη για τα μεταλλαγμένα στελέχη EMS1 και EMS2 είναι $6,25 \pm 0,7 \text{ mg g}^{-1}$ βιομάζας και $8,4 \pm 1,05 \text{ mg g}^{-1}$ βιομάζας αντίστοιχα σε αντίθεση με $14,22 \pm 1,26 \text{ mg g}^{-1}$ βιομάζας που είναι στο άγριο στέλεχος ενώ ελάχιστη τιμή είναι 3 mg g^{-1} βιομάζας. Η μειωμένη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη ελαχιστοποιεί την επίδραση σκιάς των μικροφυκών, που καλλιεργούνται σε φωτο-βιοαντιδραστήρες. Η μεταλλαξογένεση του *Stichococcus* sp. με χρήση του EMS αποδείχθηκε επιτυχής. Επιπλέον, η απόδοση βιομάζας ήταν μεγαλύτερη στα μεταλλαγμένα στελέχη EMS1 και EMS2 από ότι στο άγριο στέλεχος του *Stichococcus* sp. Συγκεκριμένα, η παραγωγή βιομάζας *Stichococcus* που παρατηρήθηκε στο μεταλλαγμένο στέλεχος με την ονομασία EMS1 ήταν 12% μεγαλύτερη σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Οι μέγιστες τιμές για τα στελέχη EMS1 και EMS2 είναι $2,47 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$ και $2,18 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$ αντίστοιχα ενώ του άγριου στελέχους ήταν $2,20 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ από $0,5 \text{ g L}^{-1}$ που ήταν η αρχική τιμή βιομάζας στην καλλιέργεια. Όσον αφορά τα λιπίδια, το EMS1 επέδειξε την υψηλότερη περιεκτικότητα, με τιμή $214 \pm 28 \text{ mg g}^{-1}$, ενώ ακολουθεί το EMS2 με $179 \pm 16 \text{ mg g}^{-1}$ και τέλος το άγριο στέλεχος (Wild) με $148 \pm 17 \text{ mg g}^{-1}$. Η απόδοση λιπιδίων ήταν μεγαλύτερη στα μεταλλαγμένα στελέχη EMS1 και EMS2 από ότι στο άγριο στέλεχος του *Stichococcus* sp. Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα λιπιδίων που παρατηρήθηκε στα μεταλλαγμένα στελέχη EMS1 και EMS2 ήταν 30% και 20% μεγαλύτερη σε σχέση με το άγριο στέλεχος, αντίστοιχα. Συμπερασματικά, το μεταλλαγμένο στέλεχος EMS1 φαίνεται πλεονεκτικό έναντι του άγριου και EMS2 στελεχών *Stichococcus* sp., όσον αφορά την απόδοση βιομάζας και λιπιδίων, ενώ περιέχει σημαντικά λιγότερη χλωροφύλλη.

Λέξεις-κλειδιά: μικροφύκη, *Stichococcus* sp., χημική μετάλλαξη, Ethyl methanesulfonate, χλωροφύλλη, λιπίδια, φωτο-βιοαντιδραστήρες

ABSTRACT

The aim of the present study is to maximize microalgae growth, by reducing the "shadow effect" created by the high concentration of chlorophyll in the cell mass. To achieve the above, a mutagenic agent was applied to *Stichococcus* sp. and strains with low chlorophyll content were selected. These strains were then tested for growth productivity and their ability to produce lipids and pigments. *Stichococcus*, is a green rod-shaped microalgae, which belongs to the classification of chlorophytes. It is resistant to extreme pH values, high temperatures, salinity and nutrients in its growing environment. It grows mainly in saline water, but researchers have encountered it in fresh water, soil, and even in the extreme Antarctic environment. The mutation of *Stichococcus* sp. was obtained using Ethyl methanesulfonate (EMS) as a chemical mutagen. EMS is an ethylating agent, which causes changes in the DNA of microalgae. Results showed that the chlorophyll content was successfully reduced in the mutant strains, named EMS1 and EMS2. Specifically, the maximum chlorophyll content values for the mutant strains EMS1 and EMS2 were $6.25 \pm 0.7 \text{ mg g}^{-1}$ of biomass and $8.4 \pm 1.05 \text{ mg g}^{-1}$ of biomass compared to $14.22 \pm 1.26 \text{ mg g}^{-1}$ of biomass that is for the Wild strain, while the minimum value was 3 mg g^{-1} of biomass. The reduced chlorophyll content minimizes the shadow effect of microalgae grown in photo-bioreactors. The mutagenesis of *Stichococcus* sp. using EMS proved to be successful. In addition, the biomass yield was 12% higher in the mutant strain EMS1 compared to the wild strain of *Stichococcus* sp. Maximum values of EMS1 and EMS2 strains were $2.47 \pm 0.10 \text{ g L}^{-1}$ and $2.18 \pm 0.11 \text{ g L}^{-1}$, respectively, while of the Wild strain was $2.20 \pm 0.06 \text{ g L}^{-1}$ from 0.5 g L^{-1} which was the starting concentration of biomass inside the culture. With respect to lipids, EMS1 showed the highest content, with a value of $214 \pm 28 \text{ mg g}^{-1}$, followed by EMS2 with $179 \pm 16 \text{ mg g}^{-1}$ and finally the wild strain with $148 \pm 17 \text{ mg g}^{-1}$. The lipid yield was greater in the EMS1 and EMS2 mutant strains than in the wild-type strain of *Stichococcus* sp. Specifically, the lipid content observed in the EMS1 and EMS2 mutant strains was 30% and 20% higher than the wild strain, respectively. In conclusion, the mutant strain EMS1 appears to be advantageous over the wild and EMS2 strain *Stichococcus* sp. in terms of biomass and lipids yield, while containing significantly less chlorophyll.

Keywords: microalgae, *Stichococcus* sp., chemical mutation, Ethyl methanesulfonate, chlorophyll, lipids, photo-bioreactors

ΠΡΟΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επιβλέπων Καθηγητή μου κ. Πέτρο Γκίκα για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω αυτήν τη διπλωματική εργασία, καθώς και τη διδάκτορα Εύη Συρανίδου που με βοήθησε κατά τη διεξαγωγή του πειράματος.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ θα ήθελα να πω στον υποψήφιο διδάκτορα Γιώργο Μακάρογλου που ήταν μαζί μου από την πρώτη μέχρι την τελευταία μέρα αυτής εδώ της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και την οικογένειά μου που με στήριξαν και με βοήθησαν κατά τη διάρκεια αυτού εδώ του ταξιδιού.

Σας ευχαριστώ όλους!

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΠΡΟΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΥΚΗ - ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	14
1.1 Ταξινόμηση και χημική σύνθεση	14
1.1.1 Κύριες ομάδες φυκών.....	14
1.1.2 Στέλεχος <i>Stichococcus</i> sp.	17
1.2 Καλλιέργεια μικροφυκών.....	19
1.2.1 Αβιοτικοί παράγοντες	19
1.2.3 Βιοτικοί παράγοντες	24
1.2.4 Κλιμάκωση της καλλιέργειας μικροφυκών από το εργαστήριο	25
1.3 Παραδοσιακά συστήματα καλλιέργειας	26
1.3.1 Ανοιχτά συστήματα καλλιέργειας.....	27
1.3.2 Κλειστά συστήματα καλλιέργειας	28
1.4 Μετάλλαξη μικροφυκών	32
1.5 Λιπίδια από βιομάζα μικροφυκών	33
1.5.1. Μεταβολικές πορείες συσσώρευσης λιπιδίων.....	33
1.5.2 Λιπίδια σε μικροφύκη	35
1.5.3 Προσεγγίσεις για την προώθηση της παραγωγής λιπιδίων	37
1.5.4 Επιδράσεις του φωτός στην παραγωγή βιομάζας και συσσώρευση λιπιδίων	37
1.5.5 Διοξείδιο του άνθρακα	39
1.5.6 Θερμοκρασία	40
1.5.7 Περιορισμός θρεπτικών συστατικών.....	41
1.5.8 Αλατούχο στρες.....	42
1.5.9 Νανοσωματίδια (NP)	44
1.6 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας.....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	46
2.1 Ανάπτυξη καλλιεργειών	46
2.2 Μετάλλαξη <i>Stichococcus</i> sp.....	47
2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός βιομάζας και βιο-προϊόντων	49

2.3.1 Προσδιορισμός βιομάζας	50
2.3.2 Προσδιορισμός χλωροφύλλης.....	50
2.3.3 Προσδιορισμός λιπιδίων.....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	52
3.1 Προσδιορισμός βιομάζας.....	52
3.2 Προσδιορισμός χλωροφύλλης	52
3.3 Προσδιορισμός λιπιδίων	53
3.4 Χαρακτηριστικά στελεχών <i>Stichococcus</i> sp.	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: <i>Stichococcus</i> sp.	18
Εικόνα 1.2: Διάγραμμα ροής για την καλλιέργεια μικροφυκών σε πιλοτική κλίμακα	25
Εικόνα 1.3: Καμπύλη μικροβιακής ανάπτυξης [Lag phase: υστέρηση ή προσαρμογή (επαγωγή της ανάπτυξης), Exponential phase Log: (εκθετική ανάπτυξη), (μείωση της ανάπτυξης), Stationary phase: στάσιμη μετάβαση και Death phase: παρακμή/ θάνατος].....	26
Εικόνα 1.4: Παραδοσιακά συστήματα καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται συνήθως στην καλλιέργεια μικροφυκών: (α) ανοιχτή λίμνη (β) επίπεδος φωτο-βιοαντιδραστήρας.....	27
Εικόνα 1.5: Αντιδραστήρας επίπεδης πλάκας για την καλλιέργεια μικροφυκών.....	29
Εικόνα 1.6: Σωληνοειδής αντιδραστήρας για την καλλιέργεια μικροφυκών	30
Εικόνα 1.7: Κάθετος αντιδραστήρας στήλης για την καλλιέργεια μικροφυκών	30
Εικόνα 1.8: Απλοποιημένος μεταβολισμός τριακυλογλυκερόλης (TAG) σε πράσινα μικροφύκη. Οι διακεκομμένες γραμμές αναφέρονται στις αντιδράσεις που συμβαίνουν στο κυτταρόλυμα. Το σχήμα απεικονίζει δύο πιθανές οδούς σχηματισμού TAG ακολουθώντας την υποτιθέμενη οδό στους χλωροπλάστες ή πάνω από τις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) στο κυτταρόλυμα. TAG: τριγλυκερίδια, Cytosol: κυτοσόλη, Mitochondrion: Μιτοχόνδριο, Sugars: Σάκχαρα, Energy: Ενέργεια, Fatty acid syntesis: Σύνθεση λιπαρών οξέων, Chloroplast: Χλωροπλάστης, Glucose: Γλυκόζη, Calvin cycle: Κύκλος του Calvin, Starch: Άμυλο, Light: Φως, Glycerate: Γλυκερικό οξύ, Pyruvate: Πυροσταφυλικό οξύ.....	34
Εικόνα 1.9: Απλοποιημένη διαδικασία φωτοσύνθεσης και οι τρεις κύριες πιθανές βιοχημικές διαδρομές για το σχηματισμό TAG: στους χλωροπλάστες, στο ενδοπλασματικό δίκτυο ή στο κυτταρόλυμα. TAG: τριγλυκερίδια, Cytosol: κυτοσόλη, Mitochondrion: Μιτοχόνδριο, Sugars: Σάκχαρα, Energy: Ενέργεια, Fatty acid syntesis: Σύνθεση λιπαρών οξέων, Chloroplast: Χλωροπλάστης, Glucose: Γλυκόζη, Calvin cycle: Κύκλος του Calvin, Starch: Άμυλο, Light: Φως, Glycerate: Γλυκερικό οξύ, Pyruvate: Πυροσταφυλικό οξύ, glycolysis pathway: Οδός γλυκόλυσης	36

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Κύρια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ανοιχτών και κλειστών συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών.....	31
Πίνακας 2.1 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού (Guillard & Ryther 1962, Guillard 1975)	46

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 3.1: Παραγωγή βιομάζας σε σχέση με τις ημέρες καλλιέργειας, για τα στελέχη Wild, EMS1 και EMS2. Η τυπική απόκλιση απεικονίζεται με τις γραμμές σφάλματος.	52
Σχήμα 3.2: Συγκέντρωση χλωροφύλλης σε σχέση με τις ημέρες καλλιέργειας, για τα στελέχη Wild, EMS1 και EMS2. Η τυπική απόκλιση απεικονίζεται με τις γραμμές σφάλματος.	53
Σχήμα 3.3: Περιεχόμενο λιπιδίων κατά τη 14 ^η ημέρα ανάπτυξης για τα στελέχη Wild, EMS1, EMS2 <i>Stichococcus</i> sp. Η τυπική απόκλιση απεικονίζεται με τις γραμμές σφάλματος.	54
Σχήμα 3.4: Χρωματική διαφορά μεταξύ των αποικιών Wild και EMS1.	55
Σχήμα 3.5: Φωτογραφίες μικροσκοπίου σε μεγέθυνση 100x των καλλιεργειών Wild, EMS1 και EMS2.	56
Σχήμα 3.6: Χρωματική διαφορά του υγρού των καλλιεργειών Wild και EMS1.	56
Σχήμα 4.1: Σύγκριση της περιεκτικότητας των λιπιδίων σε διάφορα στελέχη μικροφυκών (Sprague et al., 2017, Scharff et al., 2017, Chandra et al., 2017, Josephine et al., 2015). Wild, EMS1, EMS2: ευρήματα παρούσας μελέτης (πορτοκαλί), <i>Stichococcus</i> sp.(1) (Karapatsia et al., 2016) (κίντρινο), <i>Stichococcus</i> sp.(2): (Mutaf et al., 2019) (πράσινο), <i>Stichococcus</i> sp.(3): (Gargano et al., 2016) (γκρι).	60
Σχήμα 4.2: Σύγκριση της περιεκτικότητας συνολικής χλωροφύλλης σε διάφορα στελέχη μικροφυκών (D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016, Koller et al., 2014, Mulders et al., 2013). Wild, EMS1, EMS2: ευρήματα παρούσας μελέτης (πορτοκαλί).	61
Σχήμα 4.3: Σύγκριση της απόδοσης σε βιομάζα σε διάφορα στελέχη μικροφυκών τη 14η ημέρα ανάπτυξης (Dolganyuk et al., 2020, Qiu et al., 2017, Villarruel-López et al., 2017). Wild, EMS1, EMS2: ευρήματα παρούσας μελέτης (πορτοκαλί), <i>Stichococcus</i> sp.(1) (Karapatsia et al., 2016) (κίντρινο), <i>Stichococcus</i> sp.(2): (Mutaf et al., 2019) (πράσινο).	62

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μικροφύκη είναι πολύ αποδοτικοί μετατροπείς ηλιακής ενέργειας και έχουν μεγάλη ποικιλία μεταβολιτών που θα μπορούσαν να αποτελέσουν εξαιρετική πηγή αρκετών χρήσιμων ενώσεων για τρόφιμα ή φυσικά προϊόντα υγείας. Πρόσφατα, τα θέματα της καλλιέργειας μικροφυκών παρουσιάζουν αυξανόμενο ενδιαφέρον μεταξύ των ερευνητών λόγω της ικανότητάς τους να συνθέτουν διάφορες βιολογικά δραστικές ουσίες, της ταχείας ανάπτυξης της βιομάζας και της ικανότητας προσαρμογής της βιοχημικής τους σύνθεσης ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας. Τα μικροφύκη είναι μικροοργανισμοί θαλάσσιου ή γλυκού νερού που αποτελούνται από ένα μόνο ευκαρυωτικό κύτταρο. Πρόκειται για αντιπροσώπους μονοκύτταρων χλωρίδων με τεράστιες δυνατότητες εφαρμογής σε διάφορους κλάδους της επιστήμης και της τεχνολογίας (Dolganyuk et al., 2020). Τα κυανοβακτήρια, τα οποία αργότερα θεωρήθηκαν βακτήρια, ταξινομούνταν επίσης ως μπλε-πράσινα φύκια. Επί του παρόντος, υπάρχουν πολλοί τύποι ευκαρυωτικών μονοκύτταρων μικροοργανισμών. Η ποικιλομορφία τους μπορεί να συγκριθεί με την ποικιλομορφία των εντόμων. Σε αντίθεση με τους ετερότροφους μικροοργανισμούς, που απαιτούν διάφορες οργανικές ενώσεις για την ανάπτυξη, οι μονοκύτταροι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί παράγουν βιομάζα από πλήρως οξειδωμένες ανόργανες ουσίες και μεταλλικά στοιχεία λόγω της φωτεινής ενέργειας που μετατρέπεται κατά τη φωτοσύνθεση. Επιπλέον, οι τεχνολογίες παραγωγής βιομάζας μικροφυκών δεν μολύνουν το περιβάλλον, χρησιμοποιούν διοξείδιο του άνθρακα ενώ παράγουν οξυγόνο, καταναλώνουν σχετικά μικρή ποσότητα νερού και μπορεί να καταλαμβάνουν γη ακατάλληλη για καλλιέργεια γεωργικών καλλιεργειών (Demirel et al., 2018).

Επί του παρόντος, μπορούν να διακριθούν δύο κύριοι τομείς χρήσης των μικροφυκών: η παραγωγή βιομάζας ως βιολογικά ενεργού πρόσθετου και η καλλιέργεια μικροφυκών για την επακόλουθη απομόνωση βιολογικά δραστικών ουσιών από τη βιομάζα.

Τα μικροφύκη είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά και βιολογικά ενεργές ουσίες, όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λιπίδια, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, βιταμίνες, χρωστικές, φυκοχολοπρωτεΐνες, ένζυμα κ.λπ., αντιυπερτασικές, νευροπροστατευτικές και ανοσοδιεγερτικές επιδράσεις. Αυτές οι ενώσεις είναι σε ζήτηση στη φαρμακολογία, την ιατρική, την κοσμετολογία, τη χημική βιομηχανία, την ιχθυοκαλλιέργεια, την ενεργειακή βιομηχανία, τη γεωργία στην παραγωγή ζωοτροφών και λειτουργικών τροφίμων (Bhattacharjee, 2016).

Τα μικροφύκη είναι λιγότερο μελετημένα από τα φύκια, αλλά τα πλεονεκτήματά τους συνδέονται με την ταχεία ανάπτυξη, την υψηλή φωτοσυνθετική απόδοση και τη δυνατότητα καλλιέργειας υπό συνθήκες παραγωγής. Επιπλέον, η βιοποικιλότητα των μικροφυκών θα αυξήσει τον αριθμό των διαφορετικών πηγών βιολογικά δραστικών ουσιών, όπως πολυσακχαρίτες, λιπίδια, πρωτεΐνες και χρωστικές.

Τα μικροφύκη είναι ταχέως αναπτυσσόμενοι οργανισμοί φωτοσύνθεσης που απαιτούν φως για την ανάπτυξή τους, το οποίο μπορεί να προέρχεται από το ηλιακό φως, καθώς και από διοξείδιο του άνθρακα, νερό και ορισμένα απαραίτητα ανόργανα θρεπτικά συστατικά, όπως ο φώσφορος και ο σίδηρος. Λόγω της καλλιέργειας κάτω από πιο ελεγχόμενες και βελτιστοποιημένες συνθήκες, η φωτοσύνθεση στα μικροφύκη είναι πιο αποτελεσματική από ότι στα αγγειακά φυτά.

Ως εκ τούτου, διαθέτουν υψηλότερο ποσοστό παραγωγής βιομάζας. Επιπλέον, τα μικροφύκη ανέχονται διαφορετικά κλίματα και δεν χρειάζονται εύφορη γη.

Η χλωροφύλλη είναι μια ζωτικής σημασίας ενεργός φωτοσυνθετική φυσική χρωστική ουσία που διανέμεται ευρέως σε φυτά και οργανισμούς φυκιών. Εκτός από τη βιολογική της σημασία, η χλωροφύλλη έχει μεγάλες δυνατότητες ως βιοτεχνολογικό προϊόν, όπου χρησιμοποιείται ήδη ως φυσικός χρωματισμός τροφίμων και έχει οφέλη για την υγεία στους τομείς της κοσμετολογίας, εντάσσοντας σε προϊόντα όπως σαμπουάν, αποσμητικά και ενυδατικές κρέμες προσώπου και σώματος και δερματολογία, λόγω της αποτελεσματικότητάς της στη θεραπεία της δερματίτιδας. Η χλωροφύλλη και τα παράγωγά της έχουν μελετηθεί ως φυσιολογικά ενεργά συστατικά της ανθρώπινης διατροφής. Στην πραγματικότητα, η χλωροφύλλη και τα παράγωγά της, οι φαιοφυτίνες και οι φαιοφορβίνες, έχουν αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση *in vitro* (Ferreira et al., 2016). Επιπλέον, τα παράγωγα χλωροφύλλης παράγουν αντιπολλαπλασιαστικές επιδράσεις στα ανθρώπινα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου. Σε μελέτες σε ανθρώπους, η χλωροφύλλη και τα παράγωγά της μείωσαν τον κίνδυνο καρκίνου που προκαλείται από μεταλλαξιόγόνους παράγοντες που υπάρχουν στη διατροφή.

Η χρήση μικροοργανισμών για τη λήψη χλωροφύλλης είναι και πιο παραγωγική και πιο γρήγορη σε σύγκριση με τα φυτά, επειδή η καλλιέργεια μικροοργανισμών επιτρέπει την αξιολόγηση με συνεχή τρόπο, παρουσιάζει ταχύτερη ανάπτυξη και δεν είναι εποχιακή (Danesi et al., 2004). Στα μικροφύκη, η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη ποικίλλει ανάλογα με τους φυσικούς παράγοντες, όπως η ένταση του φωτός, η ανάδευση και η θερμοκρασία, και χημικοί παράγοντες, όπως η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών. Στην *Chlorella vulgaris*, θερμοκρασίες πάνω από 40 °C προκάλεσαν μείωση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη (Chinnasamy et al., 2009). Στο *Scenedesmus obliquus*, η αύξηση της ανάδευσης οδήγησε σε μείωση της ποσότητας χλωροφύλλης λόγω πιο ομοιόμορφης κατανομής φωτός. Διακύμανση στη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών *in vitro* μπορεί να αλλάξει τη συγκέντρωση χλωροφύλλης στις καλλιέργειες. Για παράδειγμα, η μειωμένη συγκέντρωση μαγνησίου σε καλλιέργειες *C. vulgaris* οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης χλωροφύλλης. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου στις καλλιέργειες *Chlamydomonas reinhardtii* και *Scenedesmus subspicatus* οδηγούν επίσης στη μείωση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη. Η ποσότητα της χλωροφύλλης ποικίλλει επίσης ανάλογα με το στάδιο της καλλιέργειας, καθώς συχνά μειώνεται σε στατική φάση.

Επί του παρόντος, αναζητούνται ολοκληρωμένες τεχνολογίες για την καλλιέργεια μικροφυκών με στόχο την απομόνωση διαφόρων βιολογικά δραστικών ουσιών από τη βιομάζα για την αύξηση της κερδοφορίας της παραγωγής φυκών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΥΚΗ - ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

1.1 Ταξινόμηση και χημική σύνθεση

Παραδοσιακά, τα άλγη (φύκη) έχουν ταξινομηθεί με βάση δύο κύρια χαρακτηριστικά: την ικανότητα εκτέλεσης φωτοσύνθεσης και την ικανότητα να ζουν εντελώς βυθισμένα σε υδάτινο περιβάλλον. Τα κύτταρα των αλγών μπορεί να είναι μονοκύτταρα ή πολυκύτταρα. Μπορούν επίσης να είναι προκαρυωτικά ή ευκαρυωτικά. Σήμερα, τα άλγη χωρίζονται συνήθως σε τρεις μεγάλες ομάδες. Αυτές οι ομάδες είναι τα μακροφύκη, τα κυανοβακτήρια και τα μικροφύκη (Not et al., 2004).

1.1.1 Κύριες ομάδες φυκών

Μακροφύκη

Τα μακροφύκη είναι κοινώς γνωστά ως φύκη. Είναι μακροσκοπικοί, πολυκύτταροι, βενθικοί οργανισμοί. Αυτά τα είδη φυκών χρησιμοποιούνται ως τροφή, ως λίπασμα, στην ιατρική και στην παραγωγή ενέργειας.

Τα περισσότερα μακροφύκη αναπτύσσονται συνήθως στη φύση, αλλά μπορούν επίσης να καλλιεργηθούν από τον άνθρωπο. Συναντώνται κόκκινα, καφέ ή πράσινα λόγω διαφορετικών φωτοσυνθετικών χρωστικών που κατέχει κάθε ομάδα.

Κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια είναι ένα αρχαίο φάσμα βακτηρίων που λαμβάνουν την ενέργειά τους μέσω της φωτοσύνθεσης. Αυτά τα κύτταρα είναι προκαρυωτικά και μονοκύτταρα. Πολλά είδη κυανοβακτηρίων σχηματίζουν ορατές αποικίες. Τα κυανοβακτήρια θεωρούνται μία από τις σημαντικότερες ομάδες οργανισμών, επειδή μετατρέπουν την πρώιμη αναγωγική ατμόσφαιρα της γης σε οξειδωτική μορφή μέσω της φωτοσύνθεσης. Αυτό προκάλεσε μια δραστική αλλαγή στη βιοποικιλότητα της ζωής στη γη. Επίσης, σύμφωνα με την ενδοσυμβιωτική θεωρία, όλοι οι χλωροπλάστες στα φυτά και τα ευκαρυωτικά φύκη εξελίχθηκαν από την ενδοσυμβίωση των κυανοβακτηρίων (Saber et al., 2022).

Μικροφύκη

Τα μικροφύκη είναι μονοκύτταροι οργανισμοί και μπορούν να βρεθούν σε μοναχικά κύτταρα ή σε ομάδες μεμονωμένων κυττάρων συνδεδεμένων μεταξύ τους. Τα μικροφύκη παράγουν περίπου το ήμισυ του οξυγόνου που παράγεται στη γη ενώ ταυτόχρονα καταναλώνουν διοξείδιο του άνθρακα κατά τη φωτοσύνθεση. Υπάρχουν πάνω από 200.000 είδη ενώ μόνο περίπου τα 50.000 έχουν καταγραφεί. Πάνω από 15.000 νέες ενώσεις προέρχονται από βιομάζα φυκών (Cardozo et al., 2007).

Μια ενδιαφέρουσα πτυχή των μικροφυκών είναι ότι ορισμένα είδη μπορεί να είναι τόσο φωτοτροφικά όσο και/ή ετεροτροφικά ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Λόγω αυτού του φαινομένου, τα μικροφύκη μπορούν επίσης να αναπτυχθούν σε ζυμωτές που συμπληρώνονται με πηγές οργανικού άνθρακα, όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα και αλκοόλες. Η ετεροτροφική καλλιέργεια μικροφυκών οδηγεί συνήθως σε πολύ υψηλότερη πυκνότητα κυττάρων από τη

φωτοτροφική καλλιέργεια επειδή δεν υπάρχει περιορισμός φωτός στην ετεροτροφική καλλιέργεια. Σε ορισμένες περιπτώσεις, έχουν χρησιμοποιηθεί μιξοτροφικές καλλιέργειες (ένας συνδυασμός ετεροτροφικής και αυτοτροφικής καλλιέργειας). Αυτές οι καλλιέργειες συμβάλλουν σε πολύ υψηλότερη πυκνότητα κυττάρων από τα αποκλειστικά φωτοτροφικά συστήματα (Ceron et al., 2006). Μερικά από τα τελευταία έχασαν την ικανότητα φωτοσύνθεσης και μετατράπηκαν σε υποχρεωτικά ετερότροφα παράσιτα όπως το *Plasmodium* και το *Toxoplasma* (*P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. falciparum*, *P. vivax* και *P. ovale*) (Babich et al., 2022).

Τα φύκια έχουν πολλές αναπαραγωγικές στρατηγικές και μπορεί να είναι μονοκύτταροι οργανισμοί ή να έχουν πολύπλοκη πολυκυτταρικότητα. Τα φύκια μπορούν να χωριστούν σε μικρο- και μακροφύκη. Τα μικροφύκη (μικρόφυτα) αντιπροσωπεύονται από πράσινα (Chlorophyta), γαλαζοπράσινα (Cyanobacteria), κιτρινοπράσινα (Ochrophyta & Xanthophyta) και χρυσά (Ochrophyta & Chrysophyta) φύκια και διάτομα (Bacillariophyta). Τα μακροφύκη ή τα απλά φύκια περιλαμβάνουν τα κόκκινα (Rhodophyta), τα πράσινα (Chlorophyta) και τα καφέ φύκια (Ochrophyta) (Lee et al., 2020).

Τα μακροφύκη βρίσκονται κυρίως στο θαλάσσιο περιβάλλον. Διατίθενται φυσικά ή μπορούν να καλλιεργηθούν σε μεγάλες παραθαλάσσιες εκτάσεις. Τα φύκια χρησιμοποιούν φυσικά θρεπτικά συστατικά που είναι διαθέσιμα στη θάλασσα για την ανάπτυξή τους.

Το ενδιαφέρον για τα μικροφύκη πηγάζει από τις μοναδικές βιολογικές του ιδιότητες. Τα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν με ταχύ ρυθμό και συγκεκριμένα πιο γρήγορα από τις χερσαίες καλλιέργειες. Εκτός από το γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης, τα μικροφύκη μπορούν να καλλιεργηθούν οπουδήποτε λαμβάνουν ηλιακό φως, συμπεριλαμβανομένων των περιοχών με κακή ποιότητα εδάφους. Τέλος, τα μικροφύκη μπορούν να έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, τα οποία μπορούν να μετατραπούν σε βιοκαύσιμα μέσω διαφόρων τεχνικών. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων (υψηλός ρυθμός ανάπτυξης, ευελιξία στην τοποθεσία και υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια), τα μικροφύκη έχουν θεωρηθεί ως κορυφαίος υποψήφιος για την ελαχιστοποίηση της ανάγκης για ορυκτά καύσιμα.

Οι κύριοι πρωτογενείς μεταβολίτες των φυκών είναι τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες και το νερό (Andreeva et al., 2021). Οι χλωροφύλλες, τα κυτοχρώματα, τα νουκλεοτίδια και οι ενώσεις που είναι ενδιάμεσα σε διάφορες μεταβολικές αντιδράσεις είναι επίσης πρωτογενείς μεταβολίτες. Η βιοχημική σύνθεση των μικροφυκών τα καθιστά κατάλληλα για την παραγωγή διαφόρων ενώσεων. Η αναλογία των πρωτογενών μεταβολιτών εξαρτάται από τον τύπο των φυκών και τις συνθήκες καλλιέργειάς τους. Για παράδειγμα, το *S. maxima* (Cyanobacteria) είναι μια εξαιρετική πηγή πρωτεΐνης (60-71% κατά βάρος), το *P. cruentum* (Cyanobacteria) είναι μια πλούσια πηγή υδατανθράκων (40-60%) και το *Scenedesmus dimorphus* (Chlorophyta) περιέχει 40% λιπίδια (Nigam & Singh, 2011).

Εκτός από τα τρία κύρια συστατικά, τα κύτταρα μπορούν να περιέχουν μικρότερες ποσότητες νουκλεϊκών οξέων και χρωστικών όπως καροτενοειδή. Σε πολλές περιπτώσεις, οι ερευνητές κατάφεραν να χειριστούν αυτά τα επίπεδα για να ευνοήσουν ένα συγκεκριμένο τελικό προϊόν. Για παράδειγμα, εάν το άζωτο περιοριστεί, τα μικροφύκη τείνουν να παράγουν περισσότερα λιπαρά από υδατάνθρακες (Chisti, 2007). Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την παραγωγή λιπαρών από μικροφύκη θα αναπτυχθούν στο επόμενο κεφάλαιο.

Εκτός από τους πρωτογενείς μεταβολίτες, τα μικροφύκη περιέχουν δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι είναι ουσίες που δεν εμπλέκονται στον κύριο μεταβολισμό και μπορεί να είναι ειδικά για ένα ή περισσότερα είδη φυκιών. Άγαρ, αλγινικό, φουκοϊδάνη, ulvan, λαμιναρίνη, άμυλο, κυτταρίνη (1,4-β-D-γλυκάνη), ουσίες πηκτίνης β-D-mannuronic και α-L-guluronic, και carrageenan είναι παραδείγματα δευτερογενών μεταβολιτών των φυκιών. Τα μικροφύκη παράγουν μεγάλο αριθμό δευτερογενών μεταβολιτών κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους, καθιστώντας τα μια σημαντική φυσική πηγή αυτών των βιοδραστικών ενώσεων (Tanna & Mishra, 2018).

Επίσης είναι πλούσιες πηγές βιολογικά ενεργών ενώσεων με αντιικές, αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και είναι επίσης πηγές διεγερτών ανάπτυξης φυτών ή αντιοξειδωτικών παραγόντων. Τα συστατικά των μικροφυκών βοηθούν στη διατήρηση της υγείας του καρδιαγγειακού συστήματος και παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις, αντιπηκτικές, αντιικές, αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και άλλες ιδιότητες. Τα συστατικά των μικροφυκών χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα και είναι αποτελεσματικά κατά της υπερχοληστερολαιμίας. Τα ενεργά συστατικά των μικροφυκών μπορούν να απομακρύνουν επιβλαβή στοιχεία από το ανθρώπινο σώμα και έχουν επίσης ιδιότητες επούλωσης έλκους και πληγών. Τα εκχυλίσματα μικροφυκών μπορούν να αυξήσουν τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, να μειώσουν το επίπεδο του σακχάρου στο αίμα και να επιδείξουν αναλγητική, βρογχοδιασταλτική και υποτασική δράση. Ως αποτέλεσμα, δίνεται όλο και μεγαλύτερη προσοχή στην εφαρμογή των φυκιών στη φαρμακευτική, τη βιομηχανία καλλυντικών και τροφίμων. Οι κύριες βιοχημικές ενώσεις των φυκών περιλαμβάνουν υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια και μέταλλα (μικρο- και μακροστοιχεία). Οι υδατάνθρακες που υπάρχουν στα φύκια είναι πολυσακχαρίτες, οι οποίοι μπορούν να χωριστούν σε μητρικούς (άγαρ, αλγινικό, φουκοϊδάνη και ουλβάν), αποθηκευτικούς (λαμιναρίνη και άμυλο) και ινώδεις (κυτταρίνη) πολυσακχαρίτες. Οι φυκοβιολιπρωτεΐνες είναι πρωτεΐνες χρωστικής που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ποικίλες εφαρμογές. Ορυκτά όπως μικρο- και μακροστοιχεία υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες στα φύκια (Sudhakar et al., 2018).

Οι πιθανές εφαρμογές διάφορων μικροφυκών είναι αρκετά εκτεταμένες: παραγωγή ενέργειας, βιοαποκατάσταση βιομηχανικών και οικιακών λυμάτων, απομάκρυνση διοξειδίου του άνθρακα από τις εκπομπές βιομηχανικών καυσαερίων μέσω βιομόνωσης φυκιών, την παραγωγή αιθανόλης ή μεθανίου, ζωοτροφών για τα ζώα, πρώτης ύλης για πυρόλυση, οργανικού λιπάσματος ή βιοδιεγερτικών στη γεωργία. Επιπλέον, τα φύκια χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοκαυσίμων τρίτης γενιάς. Τα *C. reinhardtii*, *C. vulgaris*, *D. salina* και τα διάτομα είναι τα πιο μελετημένα είδη μικροφυκών για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Ścieszka & Klewicka, 2019).

Οι πηκτωματοποιητικές, πυκνωτικές και σταθεροποιητικές ουσίες όπως το άγαρ, το αλγινικό και η καραγενάνη λαμβάνονται από τα μικροφύκη. Τα φύκια έχουν αναμφισβήτητα πλεονεκτήματα σε διάφορους τομείς εφαρμογής.

Το ενδιαφέρον για τρόφιμα από βιομάζα πλήρους μικροφυκών αποδίδεται σε αναφορές υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και οφέλη για την υγεία. Τα φύκια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λειτουργικά συστατικά για την ενίσχυση της θρεπτικής αξίας των τροφίμων. Ωστόσο, τα περισσότερα φύκια έχουν παχιά κυτταρικά τοιχώματα, γεγονός που καθιστά δύσκολη την εξαγωγή θρεπτικών ουσιών και βιολογικά ενεργών συστατικών. Από αυτή την άποψη, η

επεξεργασία των μικροφυκών απαιτεί μια κατάλληλη τεχνολογία για την καταστροφή των κυττάρων χωρίς τη μετουσίωση των ενεργών συστατικών (Matos et al., 2017).

Στη διαδικασία της ζωής, τα φύκια παράγουν πολλούς δευτερογενείς μεταβολίτες, γεγονός που τα καθιστά σημαντική φυσική πηγή αυτών των βιοδραστικών ενώσεων. Η προσθήκη παρασκευασμάτων που λαμβάνονται από μικροφύκη επιτρέπει πρόσθετες ευεργετικές ιδιότητες να προσδοθούν στα τρόφιμα εκτός από την παραδοσιακή θρεπτική αξία. Έτσι, η λειτουργική διατροφή με συστατικά φυκιών έχει ευεργετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, βελτιώνει την ευημερία και την ποιότητα ζωής, καθώς και μειώνει τον κίνδυνο ασθενειών ανάλογα με τη χρήση κατάλληλων τεχνολογιών για τη λύση των κυττάρων και την εξαγωγή ενεργών προϊόντων σε ήπιες συνθήκες.

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εφαρμογή φυκιών στα τρόφιμα έχει οδηγήσει σε πολλές έρευνες και στη συσσώρευση δεδομένων για τρόφιμα από φύκια. Αυτό το πεδίο απαιτεί τη συστηματοποίηση και γενίκευση των διαθέσιμων αποτελεσμάτων. Αυτή η ανασκόπηση συζητά τα θρεπτικά και βιοενεργά συστατικά των μικροφυκών, τα χημικά χαρακτηριστικά και τις βιολογικές τους ιδιότητες, καθώς και τις μεθόδους εξαγωγής τους. Η χρήση των μικροφυκών ως βιοδραστικών συστατικών για λειτουργική διατροφή (οργάνωση της καθημερινής διατροφής και πρόσληψης τροφής για να διασφαλιστεί ότι το ανθρώπινο σώμα λαμβάνει την απαιτούμενη ποσότητα μετάλλων, βιταμινών, αμινοξέων, υδατανθράκων και πρωτεϊνών), καθώς και τα προβλήματα που προκύπτουν εξετάζεται επίσης η βιομηχανική παραγωγή συστατικών μικροφυκών.

1.1.2 Στέλεχος *Stichococcus* sp.

Το γένος *Prasiola* των Trebouxiophyceae περιλαμβάνει πράσινα φύκια με διαφορετικά μορφολογικά επίπεδα οργάνωσης. Οι φυλογενετικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι οι εκπρόσωποι των ψευδοπαρεγγυματωδών γενών *Prasiola* και *Rosenviengiella*, των διακλαδισμένων νηματωδών *Prasiolopsis* και του σαρκινοειδούς *Prasiococcus* σχετίζονται στενά με τα νηματοειδή είδη του *Stichococcus* και του *Pseudostichococcus*, του *Desmococcus* και του *Diplosphaera*, του κοκκοειδούς *Pseudochlorella*, *Edaphochlorella*, *Pseudomarvania-Koolarvania* (Εικόνα 1.1) (Pröschold & Darienko, 2020).



Εικόνα 1.1: *Stichococcus* sp.

Όλα αυτά τα γένη σχηματίζουν μια καλά υποστηριζόμενη μονοφυλετική γενεαλογία γνωστή ως *Prasiola-clade* στη βιβλιογραφία (Thüs et al., 2011). Πρόσφατα περιεγράφηκαν αρκετά νέα γένη *Prasionema*, *Rosenviengiellopsis*, *Prasionella* με βάση τη φυλογένεση των γονιδίων *rbcL* και *tufA*. Οι σχέσεις εντός της *Pseudochlorella* και της *Edaphochlorella* διευκρινίστηκαν πρόσφατα. Ωστόσο, η γενική έννοια μεταξύ των *Stichococcus*, *Pseudostichococcus*, *Desmococcus* και *Diplosphaera* δεν έχει επιλυθεί. Οι Hodač et al. (2016) έδειξαν ότι το *Desmococcus* σχετίζεται στενά με το *Stichococcus* και τοποθετήθηκε ανάμεσα σε φύκια με μορφολογία που μοιάζει με *Stichococcus*. Τα μικροφύκη που μοιάζουν με *Stichococcus* είναι πολύ κοινά και μπορούν να βρεθούν σε όλους σχεδόν τους τύπους οικοτόπων από γλυκό νερό, υφάλμυρο, θαλάσσιο έως θερμές όξινες πηγές και χιόνι. Ειδικά σε δείγματα που συλλέχθηκαν από χερσαίους οικοτόπους ο «*Stichococcus*» μπορούσε να βρεθεί σχεδόν σε κάθε δείγμα εδάφους. Αρχικά το γένος *Stichococcus* με το είδος του *S. bacillaris* περιεγράφηκε από την Ελβετία. Αυθεντικό στέλεχος αυτού του είδους δεν υπάρχει. Από την πρώτη του περιγραφή, περισσότερα από 100 ονόματα ειδών μπορούν να βρεθούν στη βιβλιογραφία, αλλά τα περισσότερα από αυτά περιγράφονται ελάχιστα και πολύ λίγα είναι γνωστά για τη μορφολογία και την οικολογία τους. Τα μικροφύκη που μοιάζουν με *Stichococcus* χαρακτηρίζονται από απλή μορφολογία. Αντιπροσωπεύονται ως επί το πλείστον από κυλινδρικά ή βραχεία κυλινδρικά κύτταρα που περιέχουν χλωροπλάστες τύπου πλάκας χωρίς (ή μερικές φορές με) πυρηνοειδή. Μερικές φορές τα κύτταρα σχηματίζουν μικρά (από 2-3 κύτταρα) έως μεσαίου μήκους (20-30 κύτταρα) νημάτια. Αναπαράγονται με βλαστική διαίρεση. Μόνο για τον σχηματισμό ζωοσπορίων *Pseudostichococcus monallantoides* αναφέρθηκε. Λόγω της μορφολογικής τους απλότητας, πολλοί επιστήμονες έδωσαν ιδιαίτερη προσοχή στο πλάτος των νηματίων και στην αναλογία μήκους:πλάτους και επεσήμαναν ότι το μήκος είναι μεταβλητό χαρακτηριστικό. Ορισμένοι επιστήμονες έχουν λάβει υπόψη τον τρόπο ζωής (φωτοβίωση και είδος ή γένος λειχήνων) για την καθιέρωση νέων ειδών. Ερευνητές επεσήμαναν ότι ο *Stichococcus* σχετίζεται πολύ στενά με το γένος *Diplosphaera* και συμπεριέλαβε το *Diplosphaera* στο *Stichococcus*. Τόνισαν τις δυσκολίες πολλών περιγραφόμενων ειδών και συνώνυσαν πολλά είδη *Stichococcus* με οκτώ υπάρχοντα είδη. Σε αυτή την ομάδα οργανισμών που σχετίζονται στενά, μόνο μία ομάδα διαχωρίζεται σαφώς μορφολογικά από τους *Stichococcus/Diplosphaera*: το γένος *Desmococcus*. Αυτό το γένος

χαρακτηρίζεται από ένα σχηματισμό δομών που μοιάζουν με συσκευασία, οι οποίες αναπτύσσονται σε διακλαδισμένα νημάτια, παράγοντας ακινέτες με διακοσμημένα κυτταρικά τοιχώματα. Επιπλέον, ο *Desmococcus* μπορεί να αναπαραχθεί με ζωοσπόρια. Τα γένη *Stichococcus* και *Diplosphaera* συνήθως αναπαράγονται μόνο με βλαστική κυτταρική διαίρεση. Η διαφορά μεταξύ των δύο γενών είναι ότι το *Diplosphaera* μπορεί να σχηματίσει πακέτα (διαίρεση σε δύο διαστάσεις), ενώ ο *Stichococcus* κάνει διαίρεση μόνο σε μία διάσταση. Η κατάσταση για την ταξινόμηση γίνεται πιο δύσκολη λόγω έλλειψης αυθεντικών στελεχών. Μόνο λίγα αυθεντικά στελέχη είναι γνωστά μεταξύ των ταξινομικών κατηγοριών που μοιάζουν με *Stichococcus*: *Diplosphaera mucosa* (SAG 48.86), *D. epiphytica* (SAG 11.88), *Desmococcus endolithicus* (SAG 25.92), *D. olivaceus* (SAG 1.93.92.90ctica), *D. Stichococcus jenerensis* (SAG 2138), *S. deasonii* (SAG 2139) και *Pseudostichococcus monallantoides* (SAG 380-1). Οι Hodac et al. (2016) έδειξαν ότι οι οργανισμοί που μοιάζουν με *Stichococcus* είναι πολυφυλετικοί, αλλά η γενική ιδέα και η έννοια των ειδών μεταξύ των ταξινομικών ειδών παραμένουν άλυτα.

1.2 Καλλιέργεια μικροφυκών

Στις καλλιέργειες ανάπτυξης μικροφυκών υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την αύξηση της βιομάζας. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι αβιοτικοί και βιοτικοί. Αβιοτικοί παράγοντες θεωρούνται οι φυσικοχημικοί παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν την καλλιέργεια, όπως το φως, η θερμοκρασία, τα θρεπτικά υλικά, το αέριο CO₂, το pH, η αλατότητα, καθώς και η θολερότητα. Στους βιοτικούς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται η επίδραση της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών και η ανταγωνιστικότητα με άλλα είδη μικροφυκών (Mata et al., 2010).

1.2.1 Αβιοτικοί παράγοντες

Φως

Η ανάπτυξη των μικροφυκών σε εσωτερικούς και εξωτερικούς χώρους εξαρτάται άμεσα από το είδος της ακτινοβολίας και την ένταση αυτής. Η φωτοσύνθεσή τους πραγματοποιείται σε μήκη κύματος μεταξύ 400 και 700 nm, δηλαδή στο ορατό φως. Σε χαμηλά έως και μέτρια επίπεδα φωτός, η απόδοση της φωτοσύνθεσής τους κυμαίνεται από 4,5 % έως και 7% σε λίμνες και φωτο-βιοαντιδραστήρες (Scragg et al., 2002), παράγοντας 30 – 40 g ξηρής βιομάζας m⁻² d⁻¹. Το άφθονο φως είναι απαραίτητο για τη φωτοσύνθεση των μικροφυκών και την παραγωγή ενέργειας κατά την ανάπτυξή τους. Οι ανοιχτές τεχνητές λίμνες με μεγάλη επιφάνεια, ενδεχομένως να παρουσιάζουν μεγαλύτερη φωτοσυνθετική απόδοση, όμως, η απόδοσή τους επηρεάζεται από αρκετούς παράγοντες όπως η εποχή, το κλίμα, η διάρκεια της ημέρας και τυχόν κτίσματα που βρίσκονται κοντά, τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν σκίαση (Ryan, 2009).

Η ένταση του φωτός, η διάρκεια και το μήκος κύματος επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών. Οι λαμπτήρες πυρακτώσεως προσομοιώνουν καλύτερα το πλάτος των μηκών κύματος μεταξύ 350 και 700 nm, απαραίτητα για τη φωτοσύνθεση αλλά θα μπορούσαν να θερμάνουν την καλλιέργεια. Οι λαμπτήρες φθορισμού δεν θερμαίνονται αφού τα μήκη κύματος στην κόκκινη περιοχή δεν εκπέμπονται, αλλά θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μη ικανοποιητική ανάπτυξη. Το φως του ήλιου, όχι σε υπερβολικό βαθμό, θα μπορούσε να τονώσει την ανάπτυξη. Μελετάται επίσης η αποτελεσματικότητα των ηλιακών συλλεκτών στην παραγωγή μικροφυκών.

Λαμπτήρες 40 και 20 W χρησιμοποιούνται συχνότερα, συνιστάται απόσταση 25-30 cm από την καλλιέργεια για να ελαχιστοποιηθεί η θερμότητα που εκπέμπεται. Η επαρκής φωτοπερίοδος είναι σημαντική, καθώς η χρήση 12:12 ωρών (ημέρα:νύχτα) για τη συντήρηση καλλιεργειών και συνεχούς φωτός για 18:6 ώρες είναι κοινή για εμπορικούς σκοπούς (Cruz et al., 2018).

Στα κλειστά συστήματα η αξιοποίηση του φυσικού φωτός είναι ένα από τα βασικά οικονομικά εμπόδια στις καλλιέργειες αυτές, και για αυτό το λόγο γίνεται συχνά η ταυτόχρονη χρήση τεχνητού και φυσικού ηλιακού φωτός. Επίσης, το υψηλό κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας με τεχνητές πηγές φωτός σε συμβατικούς φωτο-βιοαντιδραστήρες παραμένει ένα σημαντικό μειονέκτημα. Για τη μείωση του κόστους έχουν προταθεί διαφορετικές στρατηγικές φωτισμού για την ενίσχυση του ρυθμού παραγωγής των μικροφυκών και την απόδοση των λιπιδίων τους που προορίζεται για τα βιοκαύσιμα. Σημειώνεται ότι οι φωτο-βιοαντιδραστήρες μπορούν να χρησιμοποιήσουν τεχνητό και ηλιακό φως, ή ακόμα και συνδυασμό αυτών. Οι μεγάλες αποδόσεις μικροφυκών σε λιπίδια με τη χρήση φωτο-βιοαντιδραστήρων οφείλεται κυρίως στη σταθερότητα καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης των καλλιεργειών και της σταθερής έντασης του τεχνητού φωτός. Οι περισσότερες προσεγγίσεις εργαστηριακής κλίμακας για τη μελέτη παραγωγής μικροφυκών εκμεταλλεύονται λάμπες φθορισμού, οι οποίες έχουν σχετικά υψηλή κατανάλωση ενέργειας ανά μονάδα φωτοσυνθετικής ενεργής ακτινοβολίας (Photosynthetically Active Radiation, PAR). Τα περισσότερα εμπορικά συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών εξακολουθούν να διεξάγονται σε ανοικτές δεξαμενές με χρήση της ηλιακής ενέργειας ως μοναδική πηγή φωτός. Όμως θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα προβλήματα που ενδέχεται να δημιουργηθούν από την ανάπτυξη καλλιεργειών σε μεγάλο όγκο και μεγάλη συγκέντρωση μικροφυκών λόγω δυσκολίας διείσδυσης του φωτός. Ωστόσο, η απόδοση των εξωτερικών συστημάτων είναι συνήθως χαμηλή και απαιτείται μεγάλη επιφάνεια (Ramaraj et al., 2015).

Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι ο σημαντικότερος περιοριστικός παράγοντας, μετά το φως, για την καλλιέργεια μικροφυκών σε κλειστά και ανοιχτά συστήματα. Η επίδραση της θερμοκρασίας για πολλά είδη μικροφυκών στο εργαστήριο είναι καλά τεκμηριωμένη, αλλά το μέγεθος της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ετήσια παραγωγή βιομάζας σε εξωτερικούς χώρους δεν έχει ακόμα επαρκώς διερευνηθεί. Το εύρος της θερμοκρασίας στο οποίο η παραγωγικότητα των μικροφυκών αποκτά τη μέγιστη δυνατή τιμή διαφέρει ανάλογα με το εξεταζόμενο στέλεχος. Πολλά μικροφύκη μπορούν να ανεχθούν εύκολα σε θερμοκρασίες έως και 15 °C χαμηλότερα από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, αλλά η λειτουργία σε θερμοκρασία μεγαλύτερη κατά 2 έως 4 °C από τη βέλτιστη θερμοκρασία, μπορεί να οδηγήσει στην πλήρη απώλεια της καλλιέργειας (Mata et al., 2010). Προβλήματα υπερθέρμανσης μπορεί να προκύψουν σε κλειστά συστήματα καλλιέργειας κατά τη διάρκεια ζεστών περιόδων, όπου η θερμοκρασία στο εσωτερικό του αντιδραστήρα μπορεί να φθάσει στους 55 °C. Σε αυτήν την περίπτωση, εφαρμόζονται συστήματα ψύξης για τη μείωση της θερμοκρασίας στους 20 – 26 °C.

Η καλλιέργεια μικροφυκών απαιτεί κλιματιζόμενο χώρο, με σταθερή θερμοκρασία, έτσι ώστε το θερμικό πλάτος να επιτρέπει τις δραστηριότητες που είναι απαραίτητες για το κύτταρο. Στον εργαστηριακό χώρο θα πρέπει να υπάρχει ελεγχόμενη πρόσβαση για τη μείωση ανταλλαγής θερμότητας λόγω της ανθρώπινης παρουσίας, καθώς και την αποφυγή επιμολύνσεων. Καθώς η θερμοκρασία επηρεάζει το μεταβολικό ρυθμό των οργανισμών, πρέπει να επιλέγεται ανάλογα με

το είδος που μελετάται και σύμφωνα με το σκοπό της καλλιέργειας. Η διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας και η χαμηλή μεταβλητότητα ($<0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) παρέχουν σταθερότητα και προβλεψιμότητα στην καλλιέργεια. Τα τροπικά είδη που μπορούν να καλλιεργηθούν σε θερμοκρασίες μεταξύ 20 και $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, είναι για παράδειγμα, *Spirulina*, *Scenedesmus*, *Ankistrodermus*, *Monoraphidium*, *Chlorella*, *Chlamydomonas* και *Stichococcus*. Γενικά, η επιλογή είναι για μια θερμοκρασία $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ που είναι ανεκτή, αν και μπορεί να μην ευνοεί τη βέλτιστη ανάπτυξη.

Θρεπτικό μέσο

Αρκετές μελέτες έχουν περιγράψει συγκεκριμένη σύνθεση θρεπτικού μέσου για ανάπτυξη μικροφυκών που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βιομηχανική κλίμακα παραγωγής λιπιδίων από μικροφύκη. Αυτά περιλαμβάνουν τόσο τον περιορισμό των θρεπτικών αζώτου και φωσφόρου, αλλά και της επιπλέον προσθήκης CO_2 . Η συνολική απόδοση των μικροφυκών σε βιοκαύσιμα δεν εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση της βιομάζας που επιτυγχάνεται, αλλά επίσης και από την περιεκτικότητα των μεμονωμένων κυττάρων σε λιπίδια. Σε γενικές γραμμές, η ανάπτυξη της βιομάζας μικροφυκών και η περιεκτικότητά της σε λιπίδια είναι αντιστρόφως ανάλογα μεταξύ τους σε συνθήκες στρες. Για παράδειγμα, η στέρηση του αζώτου (ή φωσφορικών, σε μικρότερο βαθμό), περιορίζει την ανάπτυξη των κυττάρων, αυξάνοντας παράλληλα την περιεκτικότητα σε λιπίδια. Μελέτες έδειξαν ότι η υψηλή συγκέντρωση σιδήρου θα μπορούσε επίσης να προκαλέσει σημαντική συσσώρευση λιπιδίων στο θαλάσσιο είδος *C. vulgaris* (Liu et al., 2008). Αυτό σημαίνει ότι ορισμένες μεταβολικές αντιδράσεις συσχετίζονται με τη συσσώρευση λιπιδίων στη *C. vulgaris* και είναι πιθανόν να τροποποιηθούν από το υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης του σιδήρου στο αρχικό μέσο. Ερευνητές διαπίστωσαν ότι η μείωση του αζώτου στο θρεπτικό υπόστρωμα, αυξάνει την περιεκτικότητα των λιπιδίων. Για την ανάπτυξη των μικροφυκών είναι αναγκαία η παρουσία θρεπτικών στοιχείων όπως το άζωτο, ο φώσφορος και το διοξείδιο του άνθρακα. Η χρήση υδάτων που είναι πλούσια σε αυτά τα θρεπτικά στοιχεία, όπως είναι τα ύδατα από γεωργικές επεξεργασίες ή και από εκροές βιομηχανικών λυμάτων, μειώνουν την ανάγκη για τεχνητή παροχή θρεπτικών στοιχείων.

Διοξείδιο του άνθρακα (CO_2)

Το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) αποτελεί την κύρια πηγή πρόσληψης άνθρακα, το οποίο μαζί με το άζωτο, το φώσφορο και το κάλιο χρησιμοποιούνται ως θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Στα ανοιχτά συστήματα χρησιμοποιείται το CO_2 της ατμόσφαιρας. Όταν το ατμοσφαιρικό CO_2 δεν επαρκεί, γίνεται τεχνητή παροχή στις καλλιέργειες. Στα κλειστά συστήματα, η αξιοποίηση του ατμοσφαιρικού CO_2 δεν είναι δυνατή και έτσι προστίθεται με τεχνητά μέσα, ως διάλυμα ανόργανου άνθρακα, για την εξασφαλισμένη ανάπτυξη των μικροφυκών. Η επίδραση του CO_2 στην ανάπτυξη μικροφυκών έχει εξεταστεί από διάφορους ερευνητές. Οι Chiu et al. (2009) αναφέρουν ότι η αύξηση της παραγωγής βιομάζας και της συσσώρευσης λιπιδίων με την αύξηση της περιεκτικότητας του CO_2 σε καλλιέργειες *Nannochloropsis oculata*. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται για καλλιέργειες *Scenedesmus obliquus* και *Chlorella kessleri*, οι οποίες απομονώθηκαν από μια λίμνη επεξεργασίας σε θερμοηλεκτρική μονάδα στη Βραζιλία, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι τα μικροφύκη αυτά έχουν τη δυνατότητα για βιοσταθεροποίηση των εκπομπών CO_2 σε θερμοηλεκτρικές μονάδες.

pH

Το pH είναι άλλος ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροφυκών σε καλλιέργειες. Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με pH που κυμαίνεται μεταξύ 7 – 9 (Nikolaou et al., 2016).

Αλατότητα

Η αλατότητα σε ανοιχτά και κλειστά συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη και τη σύνθεση των κυττάρων των μικροφυκών. Κάθε είδος μικροφυκών έχει διαφορετικό επιθυμητό εύρος αλατότητας. Η περιεκτικότητα αλάτων στις καλλιέργειες μπορεί να αυξηθεί κατά την περίοδο των θερινών μηνών λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας και κατ' επέκταση της εξάτμισης. Η αλατότητα επηρεάζει τα μικροφύκη με τρεις τρόπους:

1. Προκαλώντας ωσμωτικό στρες λόγω υψηλής συγκέντρωσης αλάτων
2. Προκαλώντας ιοντικό στρες λόγω υψηλής ιοντικής ισχύος
3. Αλλάζοντας την εκλεκτική διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης ιόντων

Για να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω προβλήματα, ο έλεγχος της αλατότητας επιτυγχάνεται με την προσθήκη γλυκού νερού ή άλατος (NaCl) όταν απαιτείται (Mata et al., 2010).

Θολερότητα

Η θολερότητα είναι μια σημαντική παράμετρος για την εκτίμηση της ποιότητας των επιφανειακών υδάτων. Η θολερότητα ενός δείγματος οφείλεται σε κολλοειδή σωματίδια, ανόργανης ή οργανικής προέλευσης. Το μέγεθος, το σχήμα και η σύσταση των σωματιδίων επηρεάζουν το βαθμό σκέδασης του φωτός. Η θολερότητα είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην καλλιέργεια μικροφυκών, καθώς επηρεάζει τη διάχυση του φωτός στην υδάτινη στήλη. Η ανάμιξη και η ομογενοποίηση της καλλιέργειας είναι υπεύθυνες για τη σωστή κατανομή των θρεπτικών, τη μεταφορά του διοξειδίου του άνθρακα στην καλλιέργεια, αλλά και την κυκλοφορία των κυττάρων των μικροφυκών από το σκοτάδι στη ζώνη του φωτός. Χαμηλές τιμές θολερότητας έχουν σαν αποτέλεσμα τη γρήγορη ανάπτυξη της καλλιέργειας, λόγω αυξημένης διαπερατότητας του φωτός σε όλη τη στήλη του διαλύματος της καλλιέργειας. Σε αντίθεση, υψηλές τιμές θολερότητας προκαλούν την εμπόδιση της διαπερατότητας του φωτός με συνέπεια την μείωση της ανάπτυξης. Η παρουσία μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μια καλλιέργεια έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπασή τους κατά την ανάμιξη η οποία προκαλείται μέσω μηχανικών δραστηριοτήτων. Η ιδανική τιμή της θολερότητας εξαρτάται από το είδος του μικροφύκου και πρέπει να ελέγχεται πριν την διεξαγωγή μιας τέτοιας καλλιέργειας σε βιομηχανική κλίμακα, έτσι ώστε να αποτραπεί η μείωση της παραγωγικότητας (Mata et al., 2010).

Ανάμιξη καλλιέργειας

Διαφορετικοί τύποι ανάμειξης σε καλλιέργειες μικροφυκών:

i) Τροχιακή ανακίνηση σε δοκιμαστικούς σωλήνες και φιάλες: Τα γενικά χρησιμοποιούμενα δοχεία καλλιέργειας στα εργαστήρια περιλαμβάνουν δοκιμαστικούς σωλήνες, φιάλες και μικρότερους αντιδραστήρες. Η προκαλλιέργεια μικροφυκών συνήθως παρασκευάζεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και φιάλες προτού εμβολιαστούν σε μεγαλύτερους αντιδραστήρες. Η οριζόντια ανάμιξη

εφαρμόζεται σε καλλιέργειες δοκιμαστικών σωλήνων, ενώ οι καλλιέργειες φιάλης αναμιγνύονται με τροχιακή ανακίνηση κάτω από αναδευτήρες εξοπλισμένους με τεχνητό φως (Ugwu & Aoyagi, 2012).

ii) Ανάμιξη με απευθείας φυσαλίδες αέρα σε σωληνοειδείς φωτο-αντιδραστήρες (PBR): Στα περισσότερα σωληνωτά PBR, ο αέρας διοχετεύεται στις καλλιέργειες χρησιμοποιώντας αντλίες αέρα και η κατεύθυνση ροής αέρα είναι συνήθως σε ροή βύσματος, ανάλογα με τον ρυθμό αερισμού. Ωστόσο, η ανάμιξη μπορεί να συμβεί εάν η ροή γίνει τυρβώδης είτε λόγω εγκατάστασης στατικών αναμικτών είτε λόγω αυξημένου ρυθμού αερισμού. Επίσης, ανάλογα με άλλους παράγοντες (π.χ. καταπόνηση φυκών, στατικοί αναμικτήρες, διάμετρος σωλήνων, κ.λπ.), μπορεί να εισαχθεί μια κατακόρυφη ανάμιξη σε σωληνοειδείς PBR. Οι καλλιέργειες φυκών στροβιλίζονται από το σημείο αερισμού στους στατικούς αναμικτήρες, οι οποίοι με τη σειρά τους σπρώχνουν τον ζωμό προς τα επάνω προς το πάνω τμήμα των σωλήνων και στη συνέχεια τους επιστρέφουν στα κάτω μέρη πριν τους περάσουν στους επόμενους αναμικτήρες και στο τμήμα κατερχόμενου.

iii) Ανάμιξη σε PBR που αναδεύονται πνευματικά: Σε αντίθεση με το σωληνοειδές PBR, η ανάμιξη σε PBR στήλης φυσαλίδων μπορεί να είναι τυχαία και ασταθής ανάμιξη όταν εκτοξεύεται αέριο από τον πυθμένα του PBR. Σε ένα συμβατικού τύπου φυσαλίδας PBR, ο εξωτερικός φωτισμός γίνεται με τη χρήση μερικών λαμπτήρων φθορισμού. Τα αέρια διοχετεύονται από τον πυθμένα του αντιδραστήρα και οι φυσαλίδες μπορούν να φανούν μέσα στη στήλη σε μια μη καθορισμένη κίνηση. Από την άλλη πλευρά, μια στήλη φυσαλίδας PBR εξοπλισμένη με σωλήνα έλξης θα διατηρούσε μια καλά καθορισμένη ροή αέρα κατά μήκος των τμημάτων ανύψωσης και καθόδου (Ugwu & Aoyagi, 2012).

Παρόλο που οι τύποι σωλήνων έλξης είναι πολλά υποσχόμενοι στα PBR στηλών, μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα διαστρωμάτωσης φωτός, ειδικά τους αδιαφανείς τύπους. Ένας τρόπος επίλυσης αυτού του προβλήματος είναι η κατασκευή ενός σωλήνα βύθισης που μπορεί να παρέχει εσωτερικό φωτισμό στη στήλη PBR. Σε αυτήν την περίπτωση, το αέριο τροφοδοτείται από την κορυφή του τμήματος ανύψωσης (αριστερή πλευρά) και στη συνέχεια αφήνεται να ρέει προς τα κάτω μέσω του κάτω τμήματος του σωλήνα αντλίας και μετά πάλι προς τα πάνω, αριστερόστροφα.

iv) Ανάμιξη σε λίμνες: Η λίμνη «Raceway» είναι ένα από τα παλαιότερα συστήματα καλλιέργειας για την καλλιέργεια μικροφυκών. Σε κάποιο βαθμό, μια καθορισμένη κυκλοφορία μπορεί να διατηρηθεί σε μια λίμνη ιπποδρομίου όταν χρησιμοποιούνται συνεχώς τροχοί με κουπίά για τη μετακίνηση των καλλιεργειών από τη μια πλευρά της λίμνης στο άλλο μέρος της. Οι τροχοί με πτερύγια συνήθως αποτελούνται από μερικές λεπίδες που είναι διατεταγμένες αξονικά και συνδέονται με έναν ρότορα που κυκλοφορεί τις καλλιέργειες με τρόπο κούρσας. Σε αντίθεση με τα συστήματα PBR, η ταχύτητα ανάμειξης στις λίμνες είναι αργή και όχι τυρβώδης. Η κακή ανάμιξη μικροφυκών σε λίμνες θα είχε ως αποτέλεσμα την κροκίδωση των κυττάρων. Ένας συνδυασμός κωπηλασίας (χρησιμοποιώντας τροχούς με κουπίά) και κούμπωμα (τοποθέτηση τεμαχίων στις λίμνες) μπορεί να προσφέρει καλύτερη ανάμιξη των καλλιεργειών (Ugwu & Aoyagi, 2012).

v) Ανάμιξη σε φωτο-βιοαντιδραστήρες επίπεδης πλάκας: Τα επίπεδα PBR για την υπαίθρια καλλιέργεια μικροφυκών συνήθως χαρακτηρίζονται από τυχαία ανάμιξη (Feng et al., 2011). Όπως και στην περίπτωση των PBR στήλης φυσαλίδων, τα αέρια διαχέονται από το κάτω μέρος

και οι φυσαλίδες μπορούν να φανούν να κινούνται τυχαία ή ακανόνιστα σε ολόκληρο το PBR. Το PBR επίπεδης πλάκας μπορεί επίσης να είναι σε συμπαγή μορφή (τύπου διαχωρισμένης πλάκας ή διάφραγμα), παρόμοια με το σύστημα αερομεταφοράς. Αυτός ο σχεδιασμός θα εξασφαλίσει μια καλά καθορισμένη ροή καλλιέργειών κατά μήκος των πλακών, βελτιώνοντας έτσι τη μεταφορά μάζας στο PBR. Σε μια μελέτη, αναφέρθηκε ότι ένας αντιδραστήρας PBR κάθετης στήλης τύπου αερομεταφοράς εξοπλισμένος με διαφράγματα έδειξε υψηλότερη απόδοση μεταφοράς μάζας σε σύγκριση με αυτόν χωρίς διαφράγματα.

1.2.3 Βιοτικοί παράγοντες

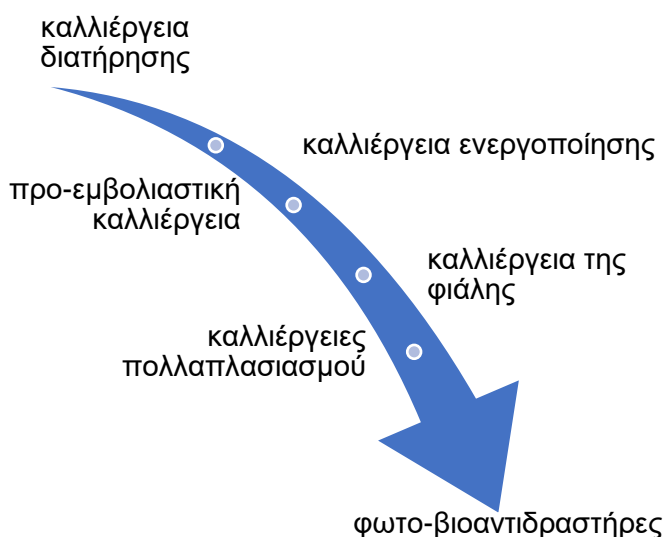
Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροφυκών και βακτηρίων είναι πιθανό να είναι καθολικές στο περιβάλλον. Πολλά αξιοσημείωτα παραδείγματα είναι ειδικά για τα είδη, όπως το πράσινο φύκι *Ulva mutabilis*, το οποίο βασίζεται σε διαφορετικά βακτηριακά στελέχη για επιτυχή μορφογένεση. Στο εργαστήριο, αντί να σχηματίζουν την τυπική μορφολογία που μοιάζει με λεπίδα ή σωλήνα, οι αζονικοί γαμέτες του *U. mutabilis* αναπτύσσονται σε συσσωματώματα αδιαφοροποίητων κυττάρων που μοιάζουν με εξογκώματα με μη φυσιολογικά κυτταρικά τοιχώματα. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν την ύπαρξη χημικής σηματοδότησης μεταξύ των βακτηρίων και των φυκών και, ενδεχομένως, τη συμπληρωματικότητα των μεταβολικών οδών (Brodie et al., 2017). Παρόμοιες αλληλεπιδράσεις έχουν επίσης βρεθεί μεταξύ του βακτηρίου *Sulfitobacter pseudonitzschiae* και της πολλαπλής σειράς *Pseudo-nitzschia* διατόμων και έχει αποδειχθεί ότι τα βακτήρια διευκολύνουν τον εγκλιματισμό των καφέ φυκιών *Ectocarpus siliculosus* σε περιβάλλον γλυκού νερού. Ένα άλλο εντυπωσιακό παράδειγμα αυτού του φαινομένου είναι η σχέση «Jekyll-and-Hyde» (που ονομάστηκε από τους συγγραφείς) μεταξύ του *Phaeobacter gallaeciensis*, ενός ροδοβακτηρίου που σχηματίζει βιοφίλμ, και του απόφυτου φύκου *Emiliania huxleyi* που σχηματίζει άνθη (Seyedsayamdost et al., 2011). Υπό κανονικές συνθήκες ανάπτυξης, το *P. gallaeciensis* εκκρίνει αντιβιοτικά και φυτοορμόνες ανάπτυξης (π.χ. την αυξίνη ινδολο-3-οξικό οξύ) που φαίνεται να ωφελούν τα φύκια. Ωστόσο, καθώς ο πληθυσμός των φυκών γερνάει, τα βακτήρια μετατοπίζουν τις οδούς βιοσύνθεσης των μικρών μορίων τους προς την παραγωγή αλκοκτόνων και δρουν ως παθογόνα *E. huxleyi*. Ένας διαφορετικός τύπος βιοτικής αλληλεπίδρασης περιλαμβάνει τη σύλληψη και την «καλλιέργεια» του κρυπτόφυτου φυκιού *Teleaulax amphioxeia* από το ξενιστή του, το *Mesodinium rubrum*, για την εξαγωγή θρεπτικών ουσιών από το άθικτο φύκι (H. Qiu et al., 2013).

Πιο γενικές αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται με βακτήρια που παίζουν βασικό ρόλο στην παροχή μικροθρεπτικών συστατικών στα φύκη. Παραδείγματα είναι βασικές οργανικές ενώσεις, όπως η θειαμίνη (βιταμίνη B1) και η κοβαλαμίνη (βιταμίνη B12). Αυτές οι ενώσεις απαιτούνται ως ενζυμικοί συμπαραγόντες, αλλά πολλά είδη φυτοπλαγκτού δεν είναι σε θέση να τα συνθέσουν. Μόνο προκαρυώτες (και μόνο τότε, ένα υποσύνολο τόσο των Eubacteria όσο και των Archaea) μπορούν να συνθέσουν κοβαλαμίνη *de novo* και τα επίπεδα ελεύθερα στο υδάτινο περιβάλλον είναι γενικά πολύ χαμηλά για να υποστηρίξουν την ανάπτυξη φυκών. Η άμεση παροχή της βιταμίνης από βακτήρια στα φύκια έχει αποδειχθεί στο εργαστήριο (Durham et al., 2015) και στοιχείο ότι παρόμοια οι ανταλλαγές που συμβαίνουν στο φυσικό περιβάλλον προέρχονται από συσχετίσεις που παρατηρούνται μεταξύ της παρουσίας βακτηρίων που παράγουν B12 και των φυκών. Υπάρχει ειδικότητα σε αυτή την αλληλεπίδραση, που αποδεικνύεται από το γεγονός ότι, αν και τα κυανοβακτήρια είναι παραγωγοί B12, παράγουν μια παραλλαγή γνωστή ως

ψευδοκοβαλαμίνη, η οποία είναι σημαντικά λιγότερο βιοδιαθέσιμη στα ευκαρυωτικά φύκια από την κοβαλαμίνη, την παραλλαγή που παράγεται από πολλά ετερότροφα βακτήρια (Helliwell et al., 2016). Έτσι, η παροχή φωτοσυνθετικού από τα φύκια μπορεί να παρέχει το σήμα για την προσέλκυση και διατήρηση των παραγωγών κοβαλαμίνης εντός της φυκόσφαιρας. Παρόμοια με το B12, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα βακτήρια μπορούν επίσης να παρέχουν είτε θειαμίνη (βιταμίνη B1) είτε τους πρόδρομους της στο φυτοπλαγκτόν και επειδή η θειαμίνη είναι επίσης συχνά περιοριστική, η άνθηση του φυτοπλαγκτού μπορεί παρομοίως να περιορίζεται από βακτήρια ή άλλα μικρόβια που παράγουν θειαμίνη.

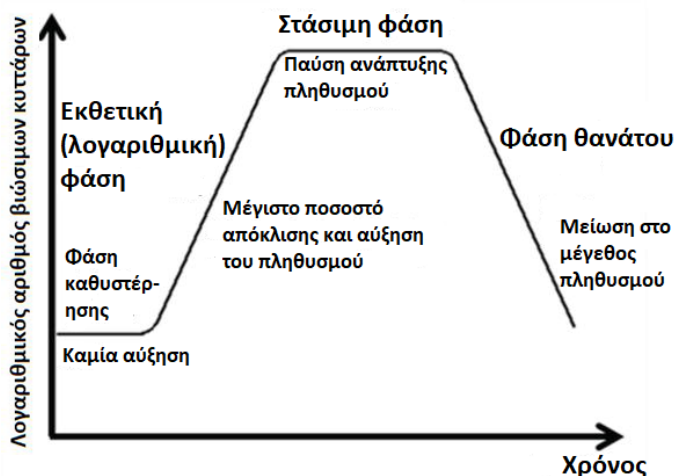
1.2.4 Κλιμάκωση της καλλιέργειας μικροφυκών από το εργαστήριο

Η καλλιέργεια μικροφυκών από το εργαστήριο αυξάνεται με διαδοχικές μεταφορές καλλιεργειών μικροφυκών από μικρότερα συστήματα καλλιέργειας σε μεγαλύτερα, ακολουθούμενα από την προσθήκη θρεπτικού μέσου καλλιέργειας. Στις περισσότερες περιπτώσεις πραγματοποιούνται τέσσερις μεταφορές, δηλαδή καλλιέργεια από το σωλήνα συντήρησης στο σύστημα καλλιέργειας 250 mL, καλλιέργεια ενεργοποίησης, από την καλλιέργεια ενεργοποίησης στο σύστημα του 1 L, μια προ-εμβολιαστική καλλιέργεια. Από την προ-εμβολιαστική καλλιέργεια σε ένα σύστημα 20 L, για να επιτευχθεί η καλλιέργεια της φιάλης, ακολουθούμενη από τη διάδοση από τη φιάλη σε διάφορα συστήματα των 20 L, που ονομάζονται καλλιέργειες πολλαπλασιασμού για να επιτευχθεί ο όγκος της καλλιέργειας που θα εμβολιαστεί στους φωτο-βιοαντιδραστήρες φτάνοντας, σε αυτό το βήμα, την καλλιέργεια μικροφυκών σε πιλοτική κλίμακα (Εικόνα 1.2). Οι τέσσερις μεταφορές, από το στάδιο συντήρησης έως τον πολλαπλασιασμό της καλλιέργειας, διεξάγονται σε στείρες ατμόσφαιρες και επίσης χρησιμοποιούν στείρα θρεπτικά υλικά.



Εικόνα 1.2: Διάγραμμα ροής για την καλλιέργεια μικροφυκών σε πιλοτική κλίμακα

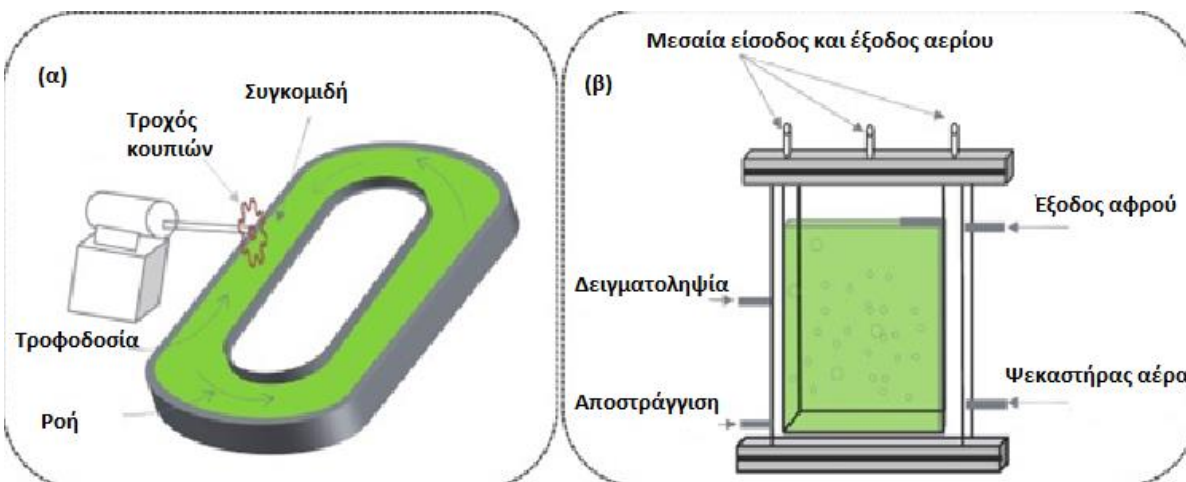
Η ανάπτυξη των καλλιεργειών σχετικά με τα μικροφύκη, σε κάθε στάδιο καλλιέργειας που περιεγράφηκε προηγουμένως, ακολουθεί τις φάσεις ανάπτυξης που δίνονται στην Εικόνα 1.3 - υστέρηση ή προσαρμογή (επαγωγή της ανάπτυξης), Log (εκθετική ανάπτυξη), μετάβαση (μείωση της ανάπτυξης), στάσιμη και παρακμή/ θάνατος. Η περίοδος διάρκειας κάθε φάσης εξαρτάται από το είδος και τις συνθήκες καλλιέργειας. Για την κατασκευή κινητικών προφίλ κάθε καλλιέργειας, που είναι απαραίτητα για την παρακολούθηση της παραγόμενης βιομάζας, συλλέγονται δείγματα κάθε μέρα και εκτελούνται οι αναλύσεις των κυττάρων, του ξηρού βάρους και της θολερότητας.



Εικόνα 1.3: Καμπύλη μικροβιακής ανάπτυξης: φάση καθυστέρησης: υστέρηση ή προσαρμογή (επαγωγή της ανάπτυξης), φάση εκθετικής ανάπτυξης: εκθετική ανάπτυξη, (μείωση της ανάπτυξης), στάσιμη φάση: στάσιμη μετάβαση και φάση θανάτου: παρακμή/ θάνατος

1.3 Παραδοσιακά συστήματα καλλιέργειας

Ο λόγος που τα μικροφύκη έχουν πολλά μοναδικά πλεονεκτήματα οφείλεται κυρίως στα φωτοαυτοτροφικά χαρακτηριστικά τους. Χρησιμοποιώντας ένα φωτο-βιοαντιδραστήρα, τα μικροφύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιομάζας και άλλων προϊόντων υψηλής αξίας, καθώς και για την επίλυση των προβλημάτων έλλειψης ενέργειας και την απόκτηση οικονομικών οφελών. Ο φωτο-βιοαντιδραστήρας μπορεί να ελεγχθεί και να ρυθμιστεί στις επιθυμητές συνθήκες καλλιέργειας που αφορούν το φως, τη θερμοκρασία, το διαλυμένο οξυγόνο, το CO₂, το pH και τα θρεπτικά συστατικά για να επιτευχθεί ένα σύστημα υψηλής απόδοσης για την καλλιέργεια μικροφυκών. Η μεγάλη κλίμακα καλλιέργειας μικροφυκών έχει καταγραφεί ως η βασική κατεύθυνση της θαλάσσιας βιοτεχνολογίας σε πολλές ανεπτυγμένες χώρες (Kumar et al., 2010). Δύο ώριμα συστήματα για την καλλιέργεια μικροφυκών περιλαμβάνουν το ανοικτό σύστημα και το κλειστό σύστημα καλλιέργειας. Ο τύπος ανοιχτής λίμνης και ο επίπεδος φωτο-βιοαντιδραστήρες (PBR) μπορούν να εφαρμοστούν ευρέως σε μεγάλη κλίμακα (Εικόνα 1.4) (Chisti, 2007).



Εικόνα 1.4: Παραδοσιακά συστήματα καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται συνήθως στην καλλιέργεια μικροφυκών: (α) ανοιχτή λίμνη (β) επίπεδος φωτο-βιοαντιδραστήρας

1.3.1 Ανοιχτά συστήματα καλλιέργειας

Η καλλιέργεια των μικροφυκών σε ανοικτές λίμνες, είτε φυσικές (λίμνες, λιμνοθάλασσες), είτε τεχνητές είναι το πιο συνηθισμένο σύστημα καλλιέργειας αλγών σε όλο τον κόσμο (Orlando Jorquera et al., 2010). Τα ανοιχτά συστήματα λιμνών χρησιμοποιούν ρηχά βάθη νερού (συνήθως 30 cm), ενώ η έκταση εκτείνεται από περίπου ένα στρέμμα, μέχρι και αρκετά στρέμματα, μέσα στα οποία τα μικροφύκη εκτίθενται σε φυσική ηλιακή ακτινοβολία. Τα πιο χρησιμοποιημένα ανοιχτά συστήματα λιμνών περιλαμβάνουν δεξαμενές, ρηχές μεγάλες λίμνες, κυκλικές λίμνες και λίμνες διαδρόμων (Norsker et al., 2011). Οι λίμνες διαδρόμων αποτελούνται ως επί το πλείστον από ωοειδές κλειστό κύκλωμα σχηματίζοντας κανάλια ανακύκλωσης, μεταξύ 0,2 και 0,5 m σε βάθος. Κατά αυτό τον τρόπο, επιτυγχάνεται η ανάμειξη και η διασπορά που απαιτείται για τη σταθεροποίηση της ανάπτυξης και της παραγωγικότητας των μικροφυκών.

Πλεονεκτήματα ανοικτών λιμνών:

- Έχουν χαμηλότερα λειτουργικά έξοδα, σε σχέση με τα κλειστά συστήματα φωτο-αντιδραστήρων

Μειονεκτήματα ανοικτών λιμνών:

- Απαιτούν μεγάλες εκτάσεις γης
- Υψηλή κατανάλωση νερού
- Χαμηλή παραγωγικότητα
- Απαιτούν κατάλληλες κλιματολογικές συνθήκες (θερμοκρασία, ατμοσφαιρικές κατακρημνίσεις)
- Συχνά προκύπτουν προβλήματα επιμόλυνσης από μύκητες, βακτήρια και πρωτόζωα, καθώς και υπάρχει ανταγωνισμός από άλλα μικροφύκη (Patil et al., 2008). Εξάλλου, οι αναποτελεσματικοί μηχανισμοί ανατάραξης και οι περιορισμοί φωτισμού είναι βασικά

προβλήματα σε αυτό το σύστημα. Παρά το γεγονός ότι στις ανεπτυγμένες χώρες εφαρμόζεται η εμπορική καλλιέργεια των μικροφυκών, υπάρχουν καιρικές μεταβολές στη θερμοκρασία και την ηλιακή ακτινοβολία καθ' όλη τη διάρκεια του έτους στις περισσότερες από τις περιοχές. Ως εκ τούτου, είναι δύσκολο να επιτευχθεί μαζική καλλιέργεια βιομάζας μικροφυκών μέσα στο χρόνο. Ωστόσο, στις αναπτυσσόμενες τροπικές χώρες, οι ανοιχτές καλλιέργειες μπορούν να καλλιεργούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα κατά τη διάρκεια του έτους, διότι το κλίμα παραμένει σταθερό και δεν υπάρχουν χαμηλές περιβαλλοντικές θερμοκρασίες.

1.3.2 Κλειστά συστήματα καλλιέργειας

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για να γίνει να μειωθεί το κόστος κατασκευής και λειτουργίας των φωτο-βιοαντιδραστήρων για την καλλιέργεια μικροφυκών. Οι τρεις κύριοι τύποι κλειστών φωτο-βιοαντιδραστήρων (PBRs) είναι, 1) οι κλειστοί, 2) οι σωληνοειδείς, και 3) οι επίπεδοι. Οι κλειστοί φωτο-βιοαντιδραστήρες μπορούν να είναι πλάκες, σωλήνες, δακτυλιοειδής ή σάκοι κατασκευασμένοι από γυαλί, πλαστικό ή άλλα διαφανή υλικά, στα οποία καλλιεργούνται τα μικροφύκη με θρεπτικά συστατικά, φως και διοξείδιο του άνθρακα (Carvalho et al., 2006). Οι κλειστοί φωτο-βιοαντιδραστήρες είναι μια τεχνολογία που αφαιρεί μερικά από τα βασικά ζητήματα που σχετίζονται με τα ανοικτά συστήματα παραγωγής.

Πλεονεκτήματα κλειστών φωτο-βιοαντιδραστήρων:

- Υψηλότερη απόδοση σε σύγκριση με τα ανοικτά συστήματα (Lehr & Posten, 2009)
- Μειωμένες πιθανότητες εξωτερικής ρύπανση και επιμόλυνσης από μικροοργανισμούς (Ugwu et al., 2008)
- Υψηλότερη ειδική επιφάνεια
- Πιο κατάλληλα για ταξινομημένα στελέχη μικροφυκών
- Καλύτερη μεταφορά μάζας αερίου-υγρού

Μειονεκτήματα κλειστών φωτο-βιοαντιδραστήρων:

- Υψηλό κόστος κατασκευής και λειτουργίας
- Χαμηλότερη διαπερατότητα φωτός, λόγω της υψηλής πυκνότητας μικροφυκών και ανάπτυξης βιοφιλμ (Scott et al., 2010)

Σωληνοειδής φωτο-βιοαντιδραστήρας

Ο σωληνοειδής φωτο-βιοαντιδραστήρας είναι ένας από τους καταλληλότερους τύπους μαζικής καλλιέργειας μικροφυκών, καθώς εκθέτουν μεγάλη επιφάνεια στην ηλιακή ακτινοβολία. Κυρίως οι σωληνοειδείς φωτο-βιοαντιδραστήρες είναι κατασκευασμένοι από γυάλινο ή πλαστικό σωλήνα. Η ανάμιξη και ο αερισμός των καλλιεργειών σε τέτοιους βιοαντιδραστήρες πραγματοποιείται με συστήματα ανάδευσης με αέρα ή αντλία αέρα για μεγαλύτερη παραγωγικότητα του συστήματος. Αυτοί οι βιοαντιδραστήρες μπορούν να είναι κάθετοι, κωνικοί και κεκλιμένοι. Είναι σχετικά φτηνοί και έχουν καλή παραγωγή βιομάζας (Brennan & Owende, 2010). Ο κύριος περιορισμός στους σωληνοειδής φωτο-βιοαντιδραστήρες είναι κακή μεταφορά βιομάζας και ο έλεγχος θερμοκρασίας.

Επιπλέον, οι μεγάλοι φωτο-βιοαντιδραστήρες ενδέχεται να αντιμετωπίσουν κάποιο πρόβλημα με την ισορροπία του pH, του διαλυμένου οξυγόνου και του CO₂ κατά μήκος των σωλήνων (Ugwu et al., 2002).

Επίπεδοι Φωτο-βιοαντιδραστήρες

Οι φωτο-βιοαντιδραστήρες με επίπεδη πλάκα (Εικόνα 1.5) αποτελούνται από δύο διαφανείς πλάκες, συνήθως από πλαστικό, όπου ανάμεσά τους ρέει ένα πολύ λεπτό, πυκνό στρώμα μικροφυκών (Richmond et al., 2003). Έχουν μέγιστη δέσμευση ηλιακής ενέργειας συνεπώς και απορρόφηση ακτινοβολίας κατά μήκος των πρώτων χιλιοστών και επιτυγχάνουν καλύτερο φωτοσυνθετικό ρυθμό (Guzzon et al., 2008). Μπορεί να προσαρμόσει τη βέλτιστη κατεύθυνση φωτισμού και να αυξήσει τη διαπερατότητα σύμφωνα με τις αλλαγές στην ένταση του ηλιακού φωτός και την κατεύθυνση προσπίπτοντος για να επιτευχθεί καλλιέργεια υψηλής πυκνότητας. Τέτοιοι φωτο-βιοαντιδραστήρες είναι κατάλληλοι για εξωτερικές καλλιέργειες μικροφυκών με υψηλή παραγωγή βιομάζας λόγω της χαμηλής συσσώρευσης διαλυμένου οξυγόνου, είναι εύκολο να αποστειρωθούν, της πυκνότητας των φωτοαυτοτροφικών κυττάρων και πετυχαίνουν υψηλά φωτοσυνθετικά αποτελέσματα σε σύγκριση με τους σωληνοειδείς. Τα προβλήματα με αυτό το σύστημα είναι η δυσκολία στον έλεγχο της θερμοκρασίας, σε κάποιο βαθμό ανάπτυξη βιοφίλμ στην επιφάνεια της πλάκας και μικρό βαθμό υδροδυναμικού στρες.



Εικόνα 1.5: Αντιδραστήρας επίπεδης πλάκας για την καλλιέργεια μικροφυκών

Οι σωληνοειδείς φωτο-βιοαντιδραστήρες είναι κατασκευασμένοι από διαφανή, γυάλινο ή πλεξιγκλάς σωλήνα (Εικόνα 1.6). Η κυκλοφορία των μικροφυκών γίνεται από μια αντλία νερού ή έναν κύκλο ανύψωσης αέρα. Η αύξηση της διαμέτρου του διαφανούς σωλήνα μειώνει την αναλογία περιοχής φωτισμού προς όγκο αντιδραστήρα, επηρεάζοντας άμεσα την ανάπτυξη μικροφυκών. Ωστόσο, οι εφαρμογές μεγάλης κλίμακας περιορίζονται από μια σειρά προβλημάτων, όπως συσσώρευση O₂ στο υγρό μέσο καλλιέργειας, κακή κυκλοφορία κυττάρων στον αγωγό, άνιση έκθεση στο φως και υψηλή θερμοκρασία.



Εικόνα 1.6: Σωληνοειδής αντιδραστήρας για την καλλιέργεια μικροφυκών

Οι κάθετοι φωτο-βιοαντιδραστήρες στήλης αποτελούνται από κυλινδρικά δοχεία, τα οποία περιέχουν έναν εσωτερικό σωλήνα για την παροχή αέρα ή/και CO_2 υπό τη μορφή φυσαλίδων. Ταυτόχρονα επιτυγχάνεται ανάδευση της καλλιέργειας (Εικόνα 1.7). Κατά αυτόν τον τρόπο, παρέχεται κατάλληλος συντελεστής μεταφοράς μάζας και ρυθμός ροής υγρού για καλύτερες συνθήκες κατά την καλλιέργεια μικροφυκών. Αυτοί οι φωτο-βιοαντιδραστήρες, είναι μικροί σε έκταση, χαμηλού κόστους και απλοί στη χρήση και χρησιμοποιούνται ευρέως σε διαδικασίες βιολογικής επεξεργασίας, όπως η επεξεργασία λυμάτων και οι χημικές βιομηχανίες (Loubière et al., 2009).



Εικόνα 1.7: Κάθετος αντιδραστήρας στήλης για την καλλιέργεια μικροφυκών

Επίσης, ένας άλλος τύπος φωτο-βιοαντιδραστήρα, όπως ο αναδευόμενος φωτο-αντιδραστήρας, ο οποίος προτάθηκε για πρώτη φορά να χρησιμοποιηθεί στην καλλιέργεια μικροφυκών με αύξηση της έντασης του φωτός. Εφαρμόζεται συνήθως σε εργαστηριακή κλίμακα, αλλά και στη βιομηχανία. Ωστόσο, η αναλογία της επιφάνειας φωτισμού προς τον όγκο του βιοαντιδραστήρα είναι πραγματικά πολύ μικρή. Η αύξηση αυτής της αναλογίας χωρίς να επηρεάζονται άλλες ιδιότητες είναι ένα σημαντικό πρόβλημα που πρέπει να λυθεί.

Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα κύρια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των ανοιχτών και κλειστών συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών (Jerney & Spilling, 2018; Qin et al., 2019).

Πίνακας 1.1: Κύρια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ανοιχτών και κλειστών συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών.

Σύστημα καλλιέργειας	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Ανοικτά συστήματα καλλιέργειας	Χαμηλό λειτουργικό κόστος	Έλεγχος διαδικασίας και επιμόλυνσης με χαμηλή απόδοση
	Εύκολη κλιμάκωση	Υψηλός ρυθμός εξάτμισης
	Ψύξη μέσω άμεσης επαφής με την ατμόσφαιρα	Απαιτείται πολύ γη για παραγωγή
	Καλή ανταλλαγή αερίου	Κακή διείσδυση φωτός
	-	Υψηλή απώλεια CO ₂
	-	Υψηλό κόστος συγκομιδής
	-	Χαμηλή απόδοση παραγωγής
Κλειστά συστήματα καλλιέργειας	-	Χαμηλός έλεγχος των αυξητικών παραγόντων (π.χ. εξάτμιση, θερμοκρασία)
	Χαμηλότερος κίνδυνος επιμόλυνσης	Υψηλό κόστος κατασκευής
	Υψηλή απόδοση παραγωγής	Υψηλό κόστος λειτουργίας
	Σχετικά χαμηλό κόστος ανάκτησης βιομάζας	Δύσκολο να κλιμακωθεί
	Υψηλή απόδοση χρήσης φωτός	-
	Υψηλές παράμετροι ελέγχου καλλιέργειας	-
	Χαμηλή απώλεια CO ₂	-

Τόσο τα ανοικτά όσο και τα κλειστά συστήματα καλλιέργειας PBR χρησιμοποιούνται σε εμπορική παραγωγή βιομάζας μεγάλης κλίμακας για τη λήψη διαφορετικών χημικών ενώσεων, όπως λιπαρά οξέα, πρωτεΐνες, αντιοξειδωτικά, χρωστικές και ζωικές πρώτες ύλες. Παρ'όλα αυτά, λαμβάνοντας υπόψη την ευαισθησία του συστήματος ανοικτής λίμνης στην επιμόλυνση, τα συστήματα ανοικτής λίμνης χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή βιομάζας στελεχών μικροφυκών, τα οποία αναπτύσσονται σε ειδικές συνθήκες, όπως υψηλή συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών. Οι Jorquera et al. (2010) εισήγαγαν τα *Chlorella sp.*, *Spirulina sp.* και *Dunaliella salina* ως στελέχη με απαίτηση ειδικής συνθήκης ανάπτυξης. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν PBR για την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας, όπως ανθρώπινα θρεπτικά συστατικά και φαρμακευτικά προϊόντα από μικροφύκη, τα οποία καλλιεργούνται υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες.

1.4 Μετάλλαξη μικροφυκών

Η τυχαία μεταλλαξογένεση είναι ένα ενδιαφέρον εργαλείο κυτταρικής τροποποίησης για εφαρμογές τροφίμων, καθώς δεν θεωρείται μέθοδος που δημιουργεί γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς (ΓΤΟ), επειδή δεν εισάγει ξένο γενετικό υλικό στο κύτταρο στόχο. Με έκθεση των κυττάρων-στόχων σε φυσικούς (π.χ. υπεριώδης φως) ή χημικούς μεταλλαξιογόνους παράγοντες (π.χ. μεθανοσουλφονικό αιθυλεστέρα), δημιουργούνται στελέχη με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Κατά τη μεταλλαξιογένεση, είναι σημαντικό να εφαρμοστεί μια διαδικασία επιλογής για τη διαλογή για τους επιθυμητούς μεταλλάκτες, π.χ., αβιοτικούς παράγοντες στρες όπως η ένταση του φωτός. Επιπλέον, όταν στοχεύονται τα γονίδια της βιοσυνθετικής οδού καροτενοειδών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ειδικοί αναστολείς όπως η κομπακτίνη, η διφαινυλαμίνη, η νικοτίνη ή η νορφλουραζόνη (Schüler et al., 2020).

Οι προσεγγίσεις βιοχημικής μηχανικής που ρυθμίζουν τις φυσικοχημικές συνθήκες της καλλιέργειας, όπως η βελτιστοποίηση του pH, της αλατότητας, της θερμοκρασίας και των επιπέδων θρεπτικών συστατικών, έχουν διερευνηθεί ευρέως για την παραγωγή μικροφυκών με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Πρόσφατα, οι τεχνικές multi-omics χρησιμοποιήθηκαν όλο και περισσότερο για την ανάλυση της σύνθεσης λιπιδίων μικροφυκών και διάφορες προσεγγίσεις γενετικής και μεταβολικής μηχανικής για την αύξηση της παραγωγής λιπιδίων εφαρμόστηκαν στα μικροφύκη για επιλογή και βελτίωση στελεχών.

Αρκετές προσεγγίσεις εφαρμόστηκαν για την αύξηση της αποτελεσματικότητας της φωτοσύνθεσης ή/και για τη μείωση του αντίκτυπου της φωτοαναστολής στην ανάπτυξη των μικροφυκών. Η πρόσφατη ανάπτυξη επικεντρώθηκε στη μείωση των μεγεθών των φωτοσυλλεκτικών κεραιών της χλωροφύλλης και στη μείωση του αριθμού των συμπλεγμάτων συλλογής φωτός για τη μείωση της αφομοίωσης του ηλιακού φωτός. Η χρήση της προσέγγισης μεταλλαξογένεσης του γονιδίου *tlc1* (γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση του μεγέθους της κεραίας του χλωροπλάστη στα πράσινα μικροφύκη) είχε ως αποτέλεσμα μια μερικώς αποκομμένη κεραία χλωροφύλλης, με ένα λειτουργικό μέγεθος φωτοσυλλεκτικής κεραίας χλωροφύλλης του φωτοσυστήματος I και του φωτοσυστήματος II να μειώνεται περίπου 50% και 65%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τον άγριου τύπου, και έτσι το μεταλλαγμένο έδειξε υψηλότερη αποδοτικότητα της ηλιακής μετατροπής και ρυθμούς ανάπτυξης σε σχέση με τον άγριο τύπο. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μερικώς αποκομμένη χλωροφύλλη της

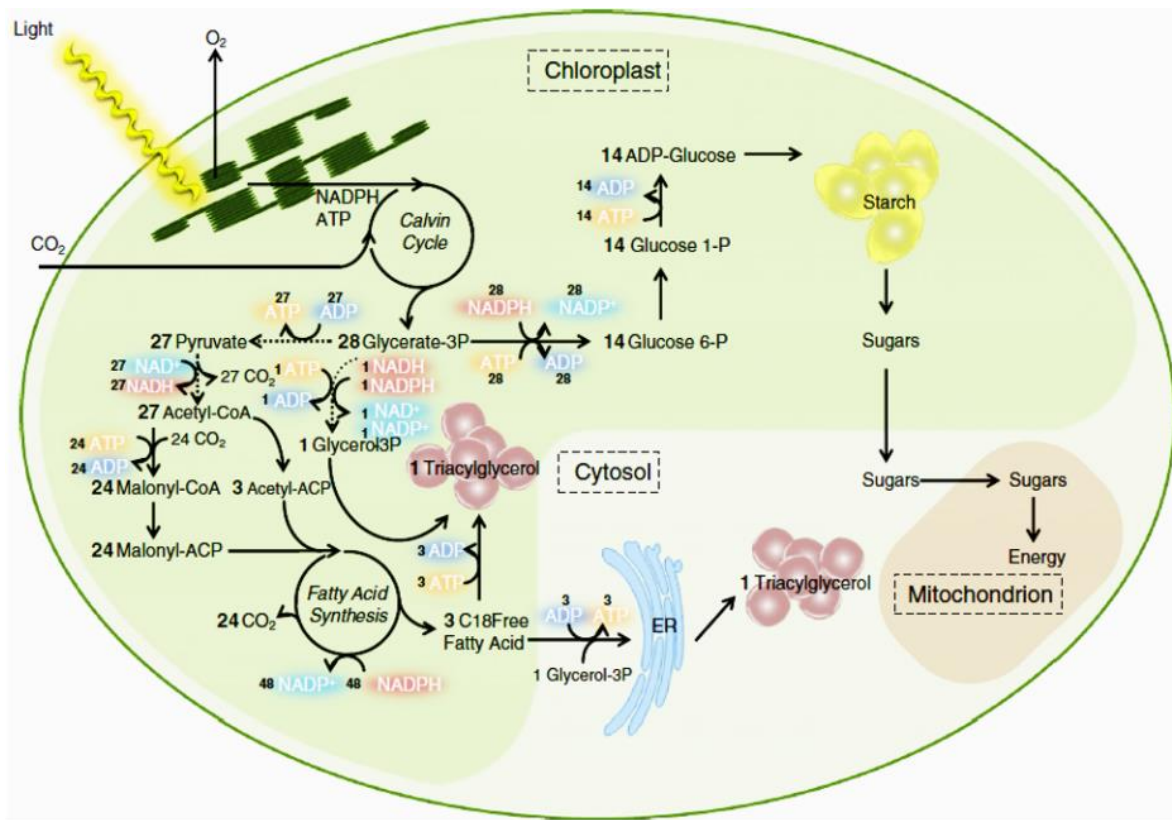
μεταλλαγμένης κεραίας *tla1* εμποδίζει την υπεραπορρόφηση του προσπίπτοντος ηλιακού φωτός, μετριάζει την περιττή διάχυση της απορροφούμενης ακτινοβολίας και μειώνει τη μάλλον έντονη κλίση φωτός και την αμοιβαία σκίαση των κυττάρων, καθώς και επιτρέποντας έναν πιο ομοιόμορφο φωτισμό των κυττάρων στη μαζική καλλιέργεια. Σε μια άλλη προσέγγιση, η τεχνολογία RNAi χρησιμοποιήθηκε για να μειώσει τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης ολόκληρων συμπλεγμάτων κεραίων συγκομιδής φωτός (LHC). Το προκύπτον μεταλλαγμένο *Stm3LR3* εμφάνισε σημαντική μείωση στο LHC mRNA και την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, αν και η λειτουργία της σύνθεσης χλωροφύλλης και χρωστικής διατηρήθηκε (Gramma et al., 2022).

1.5 Λιπίδια από βιομάζα μικροφυκών

1.5.1. Μεταβολικές πορείες συσσώρευσης λιπιδίων

Η έρευνα για την καλλιέργεια μικροφυκών πλούσιων σε λιπίδια κυρίως για την παραγωγή βιοντίζελ έχει λάβει αυξημένο ενδιαφέρον. Τα λιπίδια και τα πολυγλυκερίδια είναι τα αποθέματα ενέργειας και άνθρακα στα κύτταρα μικροφυκών, αλλά τα πολυγλυκερίδια αντιπροσωπεύουν λιγότερο συγκεντρωμένα αποθέματα μεταβολικής ενέργειας από τα λιπίδια. Τόσο τα λιπίδια όσο και τα πολυγλυκερίδια όχι μόνο διασφαλίζουν την επιβίωση των μικροφυκών κυττάρων όπως σε νυχτερινές περιόδους καθώς και σε περιόδους με μεταβλητή ένταση φωτός αλλά παρέχουν ενέργεια για βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των μικροφυκών κυττάρων, όπως η αντιγραφή του DNA, η διαίρεση του πυρήνα, κυτοκίνηση και σχηματισμός και απελευθέρωση θυγατρικών κυττάρων. Σύμφωνα με τους Berg et al. (2002), η πλήρης οξείδωση των λιπαρών οξέων μπορεί να παράγει ενέργεια στα 9 kcal g^{-1} (38 kJ g^{-1}), σε σύγκριση με περίπου 4 kcal g^{-1} (17 kJ g^{-1}) για υδατάνθρακες. Τα λιπίδια περιλαμβάνουν δύο τύπους: ουδέτερα λιπίδια που χρησιμεύουν ως αποθέματα ενέργειας και πολικά λιπίδια που αποτελούν συστατικά των οργανιδίων και των μεμβρανών. Τα κύτταρα μικροφυκών συσσωρεύουν και αποθηκεύουν ουδέτερα λιπίδια με τη μορφή τριακυλογλυκερολών (TAG).

Ο κυτταρικός κύκλος των μικροφυκών περιέχει αρκετές διαδοχικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης, της αντιγραφής του DNA, της πυρηνικής διαίρεσης και της κυτταρικής διαίρεσης. Ο μεταβολισμός τόσο του αμύλου όσο και των λιπιδίων ξεκινά με την ίδια αρχική δεξαμενή μορίων που περιέχουν τρεις άνθρακες όπως 3-φωσφορική γλυκεραλδεύδη (GAP) και 3-φωσφογλυκερική (3PG). Η Εικόνα 1.8 απεικονίζει μεταβολικές οδούς που επηρεάζουν τη συσσώρευση λιπιδίων από κοινούς προδρόμους C3. Όσον αφορά τα αυτότροφα μικροφύκη, η λήψη φωτός για τη φωτοσύνθεση είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη μικροφυκών για τη συσσώρευση ενεργειακών αποθεμάτων όπως τα λιπίδια. Ως αποτέλεσμα, η αντιγραφή του DNA και η πυρηνική και κυτταρική διαίρεση στον κυτταρικό κύκλο μπορούν να ολοκληρωθούν μέσω της χρήσης των αποθεμάτων για την κάλυψη των απαιτήσεων άνθρακα και ενέργειας (Bišová & Zachleder, 2014).



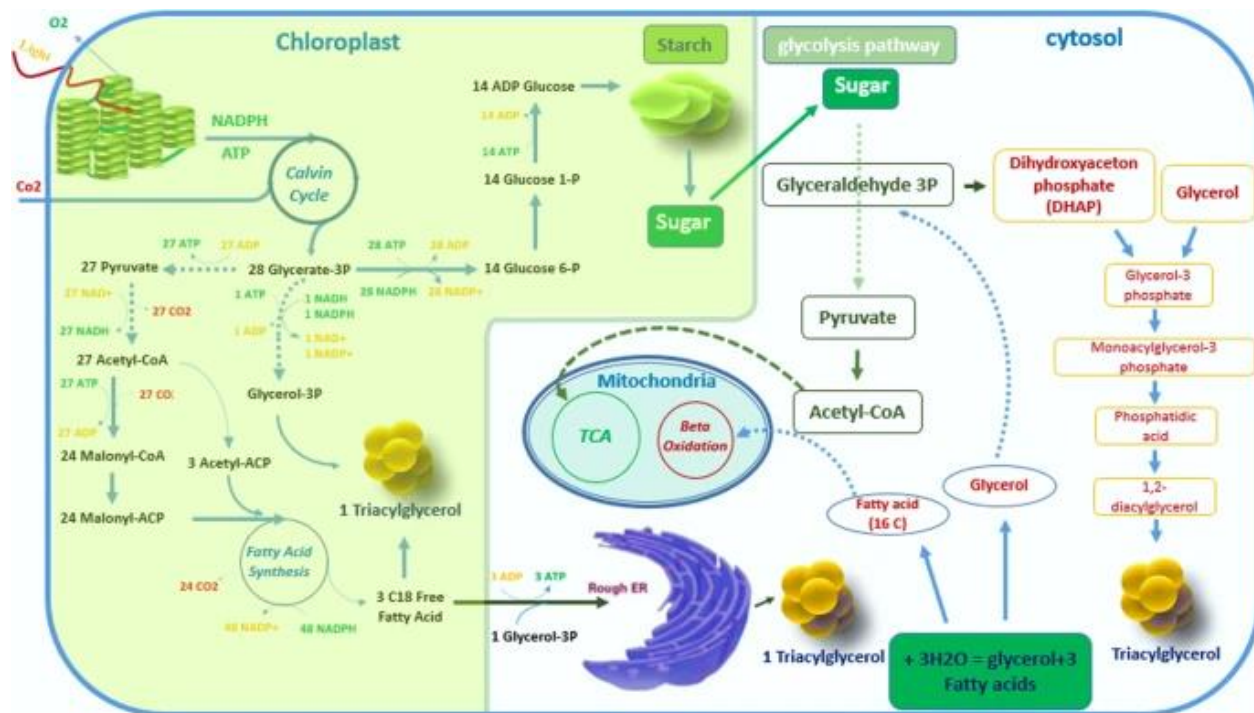
Εικόνα 1.8: Απλοποιημένος μεταβολισμός τριακυλογλυκερόλης (TAG) σε πράσινα μικροφύκη. Οι διακεκομμένες γραμμές αναφέρονται στις αντιδράσεις που συμβαίνουν στο κυτταρόλυμα. Το σχήμα απεικονίζει δύο πιθανές οδούς σχηματισμού TAG ακολουθώντας την υποτιθέμενη οδό στους χλωροπλάστες ή πάνω από τις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) στο κυτταρόλυμα. TAG: τριγλυκερίδια, Cytosol: κυτοσόλη, Mitochondrion: Μιτοχόνδριο, Sugars: Σάκχαρα, Energy: Ενέργεια, Fatty acid synthesis: Σύνθεση λιπαρών οξέων, Chloroplast: Χλωροπλάστης, Glucose: Γλυκόζη, Calvin cycle: Κύκλος του Calvin, Starch: Άμυλο, Light: Φως, Glycerate: Γλυκερικό οξύ, Pyruvate: Πυροσταφυλικό οξύ

Ο σχηματισμός τόσο των TAG όσο και του αμύλου ανταγωνίζεται τον άνθρακα μέσω κοινών προδρόμων C3, με αποτέλεσμα τη διαίρεση του άνθρακα. Ωστόσο, ο μηχανισμός πίσω από τη διαίρεση του άνθρακα μαζί με τη μετάβαση από το άμυλο στην παραγωγή TAG δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός στη βιβλιογραφία. Όταν αναστέλλεται η πορεία προς το σχηματισμό αμύλου, βελτιώνεται η πορεία προς το σχηματισμό μορίων TAG. Οι Li et al. (2010) πρότειναν ότι η περιεκτικότητα σε άμυλο μεταλλαγμένων σε άμυλο μικροφυκών *C. reinhardtii* ήταν περιορισμένη ή ακόμη και εντελώς απούσα, οδηγώντας σε αυξημένο περιεχόμενο TAG σε αντίθεση με τον άγριο τύπο. Παρά την αύξηση του περιεχομένου TAG, οι Li, Han, Hu, Dauvillee, et al. (2010) διαπίστωσαν ότι η ανάπτυξη μικροφυκών χωρίς άμυλο *C. reinhardtii* αναστέλλεται σημαντικά από την εισαγόμενη μετάλλαξη, προκαλώντας μείωση της παραγωγικότητας των TAG.

1.5.2 Λιπίδια σε μικροφύκη

Τα λιπίδια που παράγονται από μικροφύκη μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες ομάδες: πολικά λιπαρά, όπως τα γλυκεροφωσfolιπίδια, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική δομή και μη πολικά λιπαρά, όπως οι τριακυλογλυκερόλες, κυρίως υπεύθυνες για την αποθήκευση ενέργειας. Τα δομικά λιπαρά (πολικά λιπαρά) έχουν συνήθως μεγάλες αλυσίδες λιπαρών οξέων που θα μπορούσαν να μετασχηματιστούν για να ληφθούν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), αυτός ο τύπος λιπαρού οξέος περιλαμβάνει το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA), το δοκοσαπεντανοϊκό οξύ (DPA) και το δοκοσαεξαενοϊκό οξύ (DHA). Τα PUFA παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό μιτοχονδριακών υπερσυμπλεγμάτων, έχουν δυνατότητα παραγωγής βιοκαυσίμων και έχουν βρεθεί ότι έχουν εφαρμογές στη θεραπεία ορισμένων ασθενειών όπως η αθηροσκλήρωση, η Πάρκινσον και το Αλτσχάιμερ. Τα πολικά λιπαρά και μερικές στερόλες παρέχουν ένα επιλεκτικά διαπερατό φράγμα που προστατεύει το κύτταρο από έξω και βοηθά στο διαχωρισμό των διαφόρων ενδοκυττάρων οργανιδίων. Αυτά τα λιπίδια έχουν ειδικούς ρόλους στη βέλτιστη διατήρηση της ρευστότητας της μεμβράνης για μια ποικιλία μεταβολικών και βιοσυνθετικών διεργασιών και συμμετέχουν άμεσα σε διαφορετικά συμβάντα σύντηξης ενδοκυτταρικής μεμβράνης. Επιπλέον, αυτά τα δομικά λιπίδια έχουν σημαντική λειτουργία στα μονοπάτια σηματοδότησης των κυττάρων και παίζουν βασικό ρόλο ως απάντηση στις αλλαγές στο κυτταρικό περιβάλλον.

Από την άλλη πλευρά, οι TAG παίζουν θεμελιώδη ρόλο στην αποθήκευση ενέργειας στο κύτταρο των μικροφυκών (Εικόνα 1.9), όπου η διαδικασία της φωτοσύνθεσης παράγει βασική ενέργεια μετατρέποντας το ηλιακό φως σε ένα χρήσιμο μόριο για το κύτταρο. Για να γίνει αυτό, τα κύτταρα χρησιμοποιούν ένα μόριο με σκελετό άνθρακα (Glycerate-3P) και στη συνέχεια το μετατρέπουν σε πιο σημαντικά μόρια (όπως πυροσταφυλικό, γλυκόζη, ξυλόζη, οξική, αμινοξέα, λιπίδια κ.λπ.). αυτή η πολύπλοκη διαδικασία βοηθά το κύτταρο να παράγει τη βιοχημεία που αποτελεί μέρος του βασικού και πολύπλοκου μεταβολισμού, της ανάπτυξης, της αποθήκευσης και της συντήρησης της ενέργειας. Επιπλέον, λιγότερο από το 10% αυτών των ενώσεων μπορούν να μεταβολιστούν για να παράγουν λιπαρά οξέα στο χλωροπλάστη (Liang & Jiang, 2013).



Εικόνα 1.9: Απλοποιημένη διαδικασία φωτοσύνθεσης και οι τρεις κύριες πιθανές βιοχημικές διαδρομές για το σχηματισμό TAG: στους χλωροπλάστες, στο ενδοπλασματικό δίκτυο ή στο κυτταρόλυμα. TAG: τριγλυκερίδια, Cytosol: κυτταρόλη, Mitochondrion: Μιτοχόνδριο, Sugars: Σάκχαρα, Energy: Ενέργεια, Fatty acid synthesis: Σύνθεση λιπαρών οξέων, Chloroplast: Χλωροπλάστης, Glucose: Γλυκόζη, Calvin cycle: Κύκλος του Calvin, Starch: Άμυλο, Light: Φως, Glycerate: Γλυκερικό οξύ, Pyruvate: Πυροσταφυλικό οξύ, glycolysis pathway: Οδός γλυκόλυσης

Τα κύτταρα μικροφυκών αποτελούνται από κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Πιστεύεται ότι το κόκκινο φύκι *Porphyridium cruentum* ήταν το μόνο που μπορούσε να συσσωρεύσει PUFA σε TAGs, ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν ανακαλύψει ότι ορισμένα είδη πράσινων μικροφυκών, όπως το *Parietochloris incisa* έχουν καλύτερες ικανότητες να παράγουν υψηλές ποσότητες ωμέγα- 6, μακράς αλυσίδας PUFA (n-6 LC-PUFA). Άλλα είδη, όπως *Pavlova lutheri*, *Nannochloropsis oculata*, *Thalassiosira pseudonana* και *Phaeodactylum tricornutum* θα μπορούσαν επίσης να συσσωρεύουν TAG αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα (Eizadora et al., 2009).

Διαφορετικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα TAG μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να εκτελέσουν περισσότερες δραστηριότητες εκτός από την ενεργοποίηση της αποθήκευσης ενέργειας. Για παράδειγμα, θα μπορούσαν να έχουν έναν έμμεσο ρόλο στην αναδιοργάνωση της μεμβράνης ως απάντηση σε ξαφνικές αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες, οι TAG μπορούν να βοηθήσουν στην παραγωγή πολικών λιπαρών μεταφέροντας μια ειδική ομάδα ακυλίου για να προκαλέσει μια ταχεία προσαρμοστική αναδιάταξη της μεμβράνης.

1.5.3 Προσεγγίσεις για την προώθηση της παραγωγής λιπιδίων

Διάφορα είδη μικροφυκών έχουν διαφορετικό τύπο και ποσότητα λιπαρών, αλλά τα βασικά επίπεδα μπορούν να μεταβληθούν τροποποιώντας τον μεταβολισμό των λιπιδίων με διαφορετικούς τρόπους. Μια βιοχημική προσέγγιση μηχανικής είναι μια μέθοδος που βασίζεται στον χειρισμό των διατροφικών και/ή καλλιεργητικών συνθηκών. Οι διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας περιλαμβάνουν έκθεση σε διαφορετικά μήκη κύματος και ένταση φωτός, επίπεδα διοξειδίου του άνθρακα, θερμοκρασία, διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά, καταπόνηση στα βαρέα μέταλλα, πίεση σε αλατότητα και χρήση νανοσωματιδίων (NP).

Μια άλλη προσέγγιση είναι μέσω της γενετικής μηχανικής, όπου συγκεκριμένα γονίδια, που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των λιπιδίων, χειρίζονται για να βελτιώσουν τη σύνθεση, την αποθήκευση και το δομικό περιεχόμενο των λιπιδίων μέσα στο κύτταρο των μικροφυκών.

1.5.4 Επιδράσεις του φωτός στην παραγωγή βιομάζας και συσσώρευση λιπιδίων

Το φως είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες για την ανάπτυξη των μικροφυκών και την παραγωγή βιομάζας. Το πιο σημαντικό, το μήκος κύματος και η ένταση του φωτός μπορούν να προκαλέσουν δραστικές αλλαγές στον τρόπο με τον οποίο τα μικροφύκη αναπτύσσονται και παράγουν/συσσωρεύουν λιπαρά. Μεταξύ των διαφορετικών ειδών φυκών, τα φωτοατροφικά είδη είναι τα μόνα που απαιτούν φως για να αναπτυχθούν, χρησιμοποιώντας το φως ως πηγή ενέργειας για τις βιοεπεξεργασίες τους. Ωστόσο, είναι σημαντικό να μελετηθούν άλλα είδη μικροφυκών, όπως τα φωτοετεροτροφικά και τα μιξοτροφικά για τη βελτίωση της βιομάζας, ειδικά επειδή περίπου το ήμισυ του ξηρού βάρους της μικροζωικής βιομάζας είναι άνθρακας και παραγωγή λιπαρών (Demirbas & Demirbas, 2011).

Στη βιβλιογραφία, υπάρχουν διαφορετικές μελέτες που αναφέρουν την επίδραση διαφορετικών μηκών κύματος φωτός στην ανάπτυξη και το μεταβολισμό μικροφυκών. Ορισμένες αναφορές επιβεβαιώνουν την επίδραση μπλε (400-500 nm) και κόκκινου (600-700 nm) μήκη κύματος στην ανάπτυξη μικροφυκών και τη βέλτιστη απόδοση βασικών ενζύμων (δομική αλλοίωση) στις διαδικασίες φωτοσύνθεσης και το σχηματισμό προϊόντος. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι χρωστικές των κυττάρων παίζουν σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση συγκεκριμένων μηκών κύματος φωτός, για παράδειγμα, το φυσιολογικό εύρος του φάσματος φωτοσύνθεσης στα κύτταρα μικροφυκών είναι 400 nm έως 700 nm. Επομένως, οι χρωστικές στο εσωτερικό του κυττάρου (κυρίως χλωροφύλλη α και β) συσχετίζουν το φάσμα προσρόφησής τους με τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης μικροφυκών.

Σχετικά με αυτό, οι ανέφεραν ότι ένας συνδυασμός των μηκών κύματος κόκκινου και μπλε φωτός για τον φωτισμό μιας καλλιέργειας του *Chlorella* sp. μπορεί να τους προκαλέσει αύξηση της παραγωγής βιομάζας. Επίσης, έχουν δείξει ότι το ξηρό βάρος των λιπιδίων που περιέχονται στα κύτταρα της *Chlorella* διπλασιάζεται όταν εφαρμόζεται το μήκος κύματος του κόκκινου φωτός κατά τις περιόδους ανάπτυξης. Παρόμοια αποτελέσματα δημοσιεύθηκαν από τους Rai et al. (2015) όπου αναφέρουν την επίδραση διαφορετικών μηκών κύματος φωτός (ανοιχτά χρώματα: λευκό, κόκκινο, κίτρινο και πράσινο) στη συμπεριφορά ανάπτυξης και τη συσσώρευση λιπαρών ενός *Chlorella* sp. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, η καλύτερη ανάπτυξη και η υψηλότερη

συσσώρευση λιπαρών ήταν όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε κόκκινο φως, εν τω μεταξύ, οι ελάχιστες τιμές σε αυτές τις δύο όψεις ελήφθησαν με το πράσινο φως.

Σε άλλη μελέτη, ένα στέλεχος *Chlorella vulgaris* αναπτύχθηκε κάτω από διαφορετικές εσωτερικές λωρίδες LED ψυχρού λευκού, μπλε και κόκκινου, δείχνοντας ότι μετά από 10 ημέρες με 18:6 φωτεινές/σκοτεινές περιόδους, με τα λύματα ως μέσο καλλιέργειας και με έναν αρχικό αριθμό κυττάρων περίπου 106 κύτταρα/mL έλαβαν μικροφύκη καλλιεργημένο με μπλε φως που φτάνουν στην υψηλότερη παραγωγή περιεκτικότητας σε λιπαρά (34,06%) λόγω της αποτελεσματικότητας και της βαθιάς διείσδυσής του. Οι Osman et al. (2018) ανακάλυψαν ότι το χρώμα του φωτός καλλιέργειας επηρεάζει τόσο τη συνολική περιεκτικότητα σε λιπίδια όσο και το προφίλ λιπαρών οξέων. ανέφεραν ότι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα δεν ήταν διαφορετικά στο μπλε, το λευκό και το πράσινο φως, αλλά μειώθηκαν με το κόκκινο φως. Η θεραπεία διαπίστωσε επίσης ότι η τάση των κορεσμένων λιπαρών οξέων ήταν η αντίθετη από το μονοακόρεστο λιπαρό οξύ. Η επίδραση του φωτός στη συνολική συσσώρευση λιπαρών και τη σύνθεσή τους συσχετίζεται με τις αναφορές που παρουσίασε ο Markou (2014).

Οι Takeshita et al. (2014) διαπίστωσαν ότι τα *C. sorokiniana*, *C. viscosa*, *C. emersonii*, *C. vulgaris*, *P. beijeinckii* και *P. kessleri* CCALA255, NIES-2152 και NIES-2159 ήταν σε θέση να αυξήσουν την παραγωγικότητα των λιπαρών υπό υψηλό φως ένταση 600 μmol φωτονίων $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Έχει διαπιστωθεί ότι η περιεκτικότητα σε λιπίδια των μικροφυκών *Scenedesmus abundans* συνεχίζει να αυξάνεται καθώς η ένταση του φωτός αυξήθηκε από 3.000 σε 6.000 lux. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά 32,77% επιτεύχθηκε, όταν η καλλιέργεια ήταν κάτω από την ένταση φωτός των 6.000 lux, ακολουθούμενη από 27,10 και 21,20% στην καλλιέργεια με ένταση 5.000 και 3.000 lux, αντίστοιχα. Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι το *Botryococcus* sp. είχε δείξει το υψηλότερο ποσοστό λιπαρών (35,9%) στα 6.000 lux. Ωστόσο, άλλοι ερευνητές πρότειναν ότι το υψηλότερο ποσοστό λιπαρών (33,0%) των μικροφυκών *N. oleoabundans* HK-129 επιτεύχθηκε σε ένταση 14.800 lux. Έτσι, διαφορετικά είδη μικροφυκών έχουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά σε μεταβλητές εντάσεις φωτός, αφού υποδεικνύουν διαφορετική αποτελεσματικότητα στη χρήση του φωτός.

Μια πτυχή που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι η δυσκολία ελέγχου της έκθεσης στο φως σε μια βιομηχανική παραγωγή. Μια κύρια πτυχή σχεδιασμού των συστημάτων καλλιέργειας περιλαμβάνει την αναλογία μεταξύ της επιφάνειας έκθεσης στο φως και του όγκου της καλλιέργειας. Η βιβλιογραφία δείχνει ότι τυπικά υψηλές αναλογίες μεταξύ αυτών των δύο παραμέτρων οδηγούν σε υψηλότερες αποδόσεις βιομάζας και ανάπτυξη μικροφυκών. Ως εκ τούτου, αναπτύσσεται διεξοδική έρευνα για το σχεδιασμό καινοτόμων συστημάτων καλλιέργειας με σκοπό τη μεγιστοποίηση της έκθεσης στο φως ανά όγκο καλλιέργειας. Αν και οι ανοιχτές λίμνες και τα κλειστά PBR μπορούν να χρησιμοποιήσουν είτε φυσικό ηλιακό φως είτε τεχνητό φωτισμό για καλλιέργεια μικροφυκών, τα κλειστά PBR προσφέρουν καλύτερο έλεγχο του φωτός από τα ανοιχτά συστήματα. Ο έλεγχος του μήκους κύματος και της έντασης του φωτός είναι πιο εφικτός σε PBR εργαστηριακής κλίμακας σε σύγκριση με τις βιομηχανικές ρυθμίσεις. Επομένως, οι βέλτιστους συνθήκες καθορίζονται σε εργαστηριακή κλίμακα PBR για περαιτέρω δοκιμές μοντέλων μεγάλης κλίμακας. Μία από τις πολυπλοκότητες της επεκτασιμότητας αυτών των συστημάτων είναι η συσχέτιση της διαπερατότητας του φωτός στο σύστημα καλλιέργειας αφού μειώνεται εκθετικά με την απόσταση από την πηγή φωτός, δημιουργώντας ένα δύσκολο πρόβλημα μηχανικής κατά την κλιμάκωση των συστημάτων PBR.

Σε αντίθεση με τα κλειστά PBR, η αναλογία επιφάνειας προς όγκο και η αντίστοιχη διείσδυση φωτός σε ανοιχτές λίμνες δεν είναι καθόλου ιδανικές. Το άμεσο ηλιακό φως είναι πολύ ισχυρό για τα περισσότερα μικροφύκη, τα περισσότερα από αυτά χρειάζονται μόνο το 1/10 του άμεσου ηλιακού φωτός. Κυρίως, στα περισσότερα ανοιχτά συστήματα λίμνης, μόνο τα επάνω 7-10 εκατοστά νερού εκτίθενται σε αρκετή διείσδυση φωτός για αποτελεσματική φωτοσύνθεση, τα αίτια είναι η μαζική βιομάζα φυκών που συσσωρεύεται στην επιφάνεια και οδηγεί στον αποκλεισμό φυσικών πηγών φωτός και εμποδίζοντας να φτάσει βαθύτερα στο νερό. Ωστόσο, ένα κύριο πλεονέκτημα των συστημάτων ανοικτής καλλιέργειας είναι ότι είναι φθηνά στην εγκατάσταση και τη λειτουργία τους.

Κατά τη σύγκριση τόσο των ανοικτών όσο και των κλειστών συστημάτων, η επιλογή μεταξύ τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από συγκεκριμένες συνθήκες του χρήστη, ωστόσο, θα πρέπει να είναι σαφές ότι για την έρευνα και προκειμένου να διευρυνθεί η κατανόηση της συμπεριφοράς μιας καλλιέργειας μικροφυκών, ο πιο βολικός τρόπος είναι μέσω των PBR. Από αυτή την άποψη, ένα μοντέλο προσομοίωσης για την παραγωγή φυκιών σε θερμοκήπια, που αναπτύχθηκε από τους Hermans & Slager (2011) τους στη συνέχεια υιοθετήθηκε σε βιομηχανικά περιβάλλοντα, χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ετήσιας παραγωγής φυκιών σε ένα θερμοκήπιο ενός εκταρίου γεμάτο με PBRs στις Κάτω Χώρες. Η μελέτη τους έδειξε ότι η ελάχιστη τιμή κόστους των φυκών που παράγονται σε μονοφασικό και σε δύο φάσεις σωληνοειδή PBR ήταν μεταξύ 16–35€ και 11–19€ ανά κιλό ξηρής βιομάζας άλγης, αντίστοιχα.

1.5.5 Διοξείδιο του άνθρακα

Η ατμόσφαιρα, οι βιομηχανίες εκκένωσης αερίων και ανθρακικών αλάτων είναι εξαιρετικά πολύτιμες πηγές για καλλιέργειες μικροφυκών και άλλους φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς, για τη δέσμευση CO₂ και παρουσία ηλιακού φωτός χρησιμοποιώντας τον ανόργανο άνθρακα για την παραγωγή βιομάζας και χημικών ενώσεων. Προκειμένου τα μικροφύκη να αναπτυχθούν και να είναι μεταβολικά ενεργά, υπάρχουν συγκεκριμένες παράμετροι μέγιστου και ελάχιστου επιπέδου CO₂ που πρέπει να επιτευχθούν. Αυτά τα βέλτιστα επίπεδα CO₂ επηρεάζουν την παραγωγή λιπαρών και τη συσσώρευσή τους στο κύτταρο. Αν και η αύξηση του CO₂ θα μπορούσε να βοηθήσει στην παραγωγή και συσσώρευση λιπαρών στα κύτταρα μικροφυκών, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως υπάρχει επίσης ένα μέγιστο επίπεδο όπου τα περίσσεια επίπεδα CO₂ οδηγούν σε διαταραχές στην παραγωγή λιπαρών και την ανάπτυξη των κυττάρων. Προηγουμένως πιστεύεται ότι τα κύτταρα μικροφυκών αναπτύσσονται καλύτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις CO₂ και αυτό επιβεβαιώθηκε με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με ορισμένα είδη *Nannochloropsis*, τα οποία δεν αναστέλλονται σε υψηλά επίπεδα CO₂. Ωστόσο, μεταγενέστερα πειράματα έδειξαν ότι τα περισσότερα είδη παρουσιάζουν ένα μέγιστο εύρος όπου το CO₂ καθίσταται μη βέλτιστο και σε ορισμένες περιπτώσεις θανατηφόρο για την καλλιέργεια μικροφυκών.

Οι Li et al. (2013) πρότειναν ότι ο αερισμός με καθαρό αέρα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ανάπτυξης και της παραγωγής λιπαρών των μικροφυκών *Parachlorella kessleri*. Περιορισμένη ποσότητα διαθέσιμων επιπέδων CO₂ σε καλλιέργειες επιβραδύνει το μεταβολισμό των μικροφυκών, προκαλώντας μειωμένα λιπίδια. Για να μειωθεί το κόστος, τα καυσαέρια (πλούσια σε CO₂) μπορούν να εισαχθούν σε συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών ως πηγή άνθρακα.

Ωστόσο, η υψηλή περιεκτικότητα σε CO₂ θα επηρεάσει επίσης την ανάπτυξη μικροφυκών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το αχρησιμοποίητο CO₂ στην καλλιέργεια θα μετατραπεί σε ανθρακικό οξύ (H₂CO₃), μειώνοντας την τιμή του pH της καλλιέργειας. Επομένως, για να επιτευχθεί ενισχυμένη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων απαιτούνται βέλτιστα επίπεδα CO₂.

Η βέλτιστη ποσότητα CO₂ ποικίλλει μεταξύ των μικροφυκών. Σε καλλιέργεια μικροφυκών *Chlorella vulgaris* με συγκέντρωση CO₂ κάτω από 8% (v/v), οι Ortiz Montoya et al. (2014) πέτυχαν τη μέγιστη ποσότητα κορεσμένων λιπαρών οξέων και παραγωγικότητας λιπιδίων 29,5 mg (L d)⁻¹. Ομοίως, οι Widjaja et al. (2009) ανέφεραν ότι η ανάπτυξη και η παραγωγή λιπιδίων του *C. vulgaris* ενισχύθηκαν με αυξημένη συγκέντρωση CO₂. Τα μικροφύκη *Chlamydomonas* sp. στέλεχος JSC4 παρήγαγαν μέγιστη περιεκτικότητα σε λιπαρά (65,3%) και παραγωγικότητα 169,1 mg (L d)⁻¹ σε συγκέντρωση CO₂ 4% v/v. Η μέγιστη περιεκτικότητα σε λιπίδια (34% κ.β.) επιτεύχθηκε όταν καλλιεργήθηκαν μικροφύκη *Chlorococcum littorale* με 5% συγκέντρωση CO₂. Σε άλλη μελέτη, ερευνητές καλλιεργήσαν πράσινα μικροφύκη *S. armatus* σε συγκέντρωση CO₂ 2% και έλαβε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπίδια 22,4%.

1.5.6 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη και την περιεκτικότητα σε λιπίδια στα κύτταρα μικροφυκών. Διαφορετικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι αλλαγές θερμοκρασίας έχουν καθοριστική επίδραση στην ανάπτυξη μικροφυκών, την παραγωγή λιπαρών και το σχηματισμό λιπαρών οξέων, ωστόσο οι βέλτιστες παράμετροι εξαρτώνται από το είδος. Η βιβλιογραφία δείχνει ότι οι βιοχημικές οδοί που σχετίζονται με τη σύνθεση και τη συσσώρευση λιπιδίων ελέγχονται από ένζυμα με υψηλή ευαισθησία στις θερμικές παραλλαγές. Ορισμένες έρευνες που βασίζονται σε αναφερόμενα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, τα μικροφύκη τείνουν να παράγουν και να συσσωρεύουν κορεσμένα λιπαρά οξέα. σε αντίθεση με αυτό, σε χαμηλές θερμοκρασίες τα μικροφύκη τείνουν να παράγουν και να συσσωρεύουν ακόρεστα λιπαρά οξέα. Οι Menegol et al. (2017) μελέτησαν τις επιδράσεις της θερμοκρασίας στο *Heterochlorella luteoviridis*, διαπιστώνοντας ότι με θερμοκρασία 22 °C, θα μπορούσε να πάρει το 40,7% των PUFA's (του συνολικού ποσοστού λιπαρών οξέων), και όταν η θερμοκρασία αλλάξει από 22 σε 27 °C, το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων αυξήθηκε (52,9%).

Ανάλογα με τον στόχο της μελέτης, μπορεί να επιλεγεί η ιδανική θερμοκρασία για την καλλιέργεια μικροφυκών, αλλά όπως και με τις άλλες παραμέτρους, η βέλτιστη θερμοκρασία θα ποικίλει για κάθε είδος μικροφυκών επηρεάζοντας σημαντικά την ανάπτυξη και την παραγωγή λιπιδίων τους. Αυτή είναι η περίπτωση που παρατηρείται με το *Nannochloropsis limnetica*, όπου τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν στην περιοχή από 15 °C έως 27 °C, αλλά η μέγιστη ανάπτυξή τους και η παραγωγικότητα των λιπαρών τους συμβαίνει στους 22 °C. Οι Converti et al. (2009) έρευναν τα *N. oculata* και *C. vulgaris* και προτείνουν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μείωση της περιεκτικότητας σε λιπίδια στο *C. vulgaris* και η μείωση προκαλεί αύξηση της περιεκτικότητας σε λιπίδια. Εν τω μεταξύ, στο *N. oculata*, η αύξηση και η μείωση της θερμοκρασίας οδήγησαν σε αύξηση και μείωση της παραγωγής λιπιδίων, αντίστοιχα.

Το *C. vulgaris* συσσώρευσε τα μέγιστα επίπεδα λιπαρών στους 25 °C, ενώ η μείωση της θερμοκρασίας είχε ως αποτέλεσμα μια εμφανή μείωση της περιεκτικότητας σε λιπαρά. Η

θερμοκρασία των 20 °C βρέθηκε ότι είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για τα μικροφύκη *Scenedesmus* sp. για την παραγωγή λιπαρών. Η συγκέντρωση λιπαρών των μικροφυκών *S. obliquus* κυμάνθηκε από 18 έως 40%, όταν η θερμοκρασία κυμάνθηκε από 20 έως 27,5 °C. Σε μια άλλη μελέτη, η βέλτιστη θερμοκρασία του *C. minutissima* βρέθηκε να είναι 20 °C, όπου η παραγωγικότητα των λιπιδίων ήταν η υψηλότερη.

Η αύξηση της θερμοκρασίας σε ένα βέλτιστο επίπεδο προκαλεί την αύξηση της συνολικής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Ωστόσο, δεν σημαίνει ότι όλοι οι τύποι λιπιδίων βιώνουν την αύξηση. Οι Wei et al. (2015) μελέτησαν τις επιδράσεις της θερμοκρασίας στις λιπιδικές ιδιότητες των μικροφυκών *Tetraselmis subcordiformis* και *Nannochloropsis oculata* και διαπίστωσαν ότι η αυξημένη θερμοκρασία οδήγησε σε μείωση των ουδέτερων λιπιδίων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αλλά σε αύξηση των κορεσμένων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων. Ομοίως, οι James et al. (2013) ερεύνησαν τη διαμόρφωση της θερμοκρασίας των προφίλ λιπαρών οξέων για τα μικροφύκη *Chlamydomonas reinhardtii* και πρότειναν ότι η μετάβαση σε θερμοκρασίες κάτω των 25 °C θα μπορούσε να μειώσει τη συνολική ποσότητα αποθηκευμένων λιπαρών οξέων αλλά να αυξήσει την περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα.

1.5.7 Περιορισμός θρεπτικών συστατικών

Βασικά ανόργανα θρεπτικά συστατικά όπως άζωτο, θείο, άνθρακας, σίδηρος και φώσφορος έχουν αξιοσημείωτη επίδραση στην ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και το μεταβολισμό των κυττάρων μικροφυκών. Ο περιορισμός των θρεπτικών συστατικών είναι μια εφαρμοσμένη και πολλά υποσχόμενη στρατηγική που χρησιμοποιείται από πολλούς ερευνητές για να αλλάξει και να ελέγξει τον κυτταρικό κύκλο μικροφυκών και τις βιοχημικές οδούς που συνδέονται με την παραγωγή και τη συσσώρευση λιπαρών. Η έλλειψη θρεπτικών συστατικών προκαλεί ανεπιθύμητες καταστάσεις στο εσωτερικό του κυττάρου, δημιουργώντας συσσώρευση περισσότερων λιπιδικών ενώσεων ως απάντηση, επομένως αυτή η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί τους ερευνητές και τη βιομηχανία για να αυξήσει την παραγωγή και τη συσσώρευση λιπιδίων σε ένα μέσο καλλιέργειας, η κυτταρική ανάπτυξη συνδέεται με τη διαθεσιμότητα μιας υψηλής συγκέντρωσης θρεπτικών συστατικών στην καλλιέργεια, ειδικά κατά τα πρώτα στάδια του κύκλου ζωής της κυτταρικής ανάπτυξης. Επομένως, ένα πλούσιο μέσο οδηγεί σε μεγιστοποίηση της παραγωγικότητας της βιομάζας. Στη συνέχεια, μετά την επίτευξη της απαραίτητης βιομάζας, ο περιορισμός των θρεπτικών συστατικών μπορεί να προκαλέσει ένα περιβάλλον άγχους/στρες και μια αύξηση της παραγωγής λιπιδίων, ιδιαίτερα παρατηρούμενο στα τελευταία στάδια ανάπτυξης. Οι περισσότερες από τις εργασίες και τις μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά είδη μικροφυκών παράγουν και συσσωρεύουν υψηλότερη ποσότητα λιπιδίων, ειδικά τα TAGs, σε μειοτροφικές συνθήκες περιορισμένων αζώτου. Ωστόσο, είναι πιθανό ο περιορισμός των θρεπτικών συστατικών να επηρεάσει άλλες βιοχημικές οδούς στα κύτταρα που επηρεάζουν έμμεσα την παραγωγικότητα των λιπιδίων.

Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει διαφορετικές τεχνικές περιορισμού θρεπτικών συστατικών σε διαφορετικά στελέχη για να κατανοήσουν και να βελτιστοποιήσουν διαφορετικές παραμέτρους εξόδου. Οι Yang και συν. έδειξαν ότι σε περιπτώσεις ανεπάρκειας φωσφόρου ή αζώτου η απόδοση λιπαρών οξέων στο *Chlamydomonas reinhardtii* είναι σημαντικά αυξημένη. Οι Cordeiro et al. (2017) πραγματοποίησαν μελέτη για τις επιδράσεις του επιπέδου φωσφόρου και αζώτου

στην ανάπτυξη των ειδών του *Microcystis*, ανέφεραν ότι η λαμβανόμενη λιπιδική απόδοση από τα *Microcystis panniformis* και *Microcystis novacekii* είχε την αντίστροφη και άμεση συσχέτιση με το άζωτο (35,8%) και τη συγκέντρωση φωσφόρου (31,7%), αντίστοιχα. Έχουν επίσης αναφέρει ότι το *Microcystis aeruginosa* είχε αντίστροφη συσχέτιση με τη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών (23,3%). Επιπλέον, οι Mata et al. (2013) έδειξαν ότι αυξάνοντας δέκα φορές τη συγκέντρωση αζώτου στο μέσο καλλιέργειας, η παραγωγικότητα και η περιεκτικότητα σε λιπίδια αυξήθηκαν 33,5% και 47,4 mg (L d)⁻¹, αντίστοιχα στο *Dunaliella tertiolecta*. Αποδείχθηκε επίσης ότι αυξάνοντας τη συγκέντρωση σιδήρου 10 φορές (σε σύγκριση με το τυπικό μέσο καλλιέργειας), η παραγωγικότητα των λιπιδίων αυξήθηκε από 14,6 mg (L d)⁻¹ σε 28,0 mg (L d)⁻¹. Τέλος, άλλοι ερευνητές καλλιέργησαν το *C. reinhardtii* υπό περιορισμένες μιζοτροφικές συνθήκες και είχε σημαντική αύξηση 66% στην παραγωγή λιπιδίων (0,08 g L⁻¹).

Ο περιορισμός σε άζωτο, φώσφορο και/ή θείο αναγνωρίζεται ευρέως ως κύριος επαγωγέας λιπαρών για πράσινα είδη μικροφυκών. Οι Ito et al. (2013) ανέφεραν ότι υπό συνθήκες στρες αζώτου οι ποσότητες των ουδέτερων λιπιδίων στα κύτταρα μικροφυκών αυξήθηκαν σημαντικά, ενώ τα αμινοξέα μειώθηκαν σημαντικά στο 1/20 της ποσότητας ή και λιγότερο. Άλλοι ερευνητές καλλιέργησαν τα μικροφύκη *Scenedesmus obliquus* κάτω από περιορισμό φωσφόρου και είδαν αύξηση της περιεκτικότητας σε λιπαρά από 10,0 σε 29,5%. Οι Sato et al. (2014) πρότειναν ότι ο περιορισμός σε θείο θα μπορούσε να ωθήσει τα μικροφύκη *Chlamydomonas reinhardtii* να συσσωρεύουν TAG σε κύτταρα μικροφυκών μέσω της εκτροπής της μεταβολικής ροής άνθρακα από πρωτεΐνη σε σύνθεση TAG. Εκτός από την περιορισμό σε άζωτο, φώσφορο και θείο, η εξάντληση του θρεπτικού μέσου κατά την ανάπτυξη της καλλιέργειας μικροφυκών έχει βρεθεί επίσης ως μια άλλη αποτελεσματική επεξεργασία για την παραγωγή λιπιδίων, καθώς ο περιορισμός όλων των στοιχείων σε θρεπτικά μέσα μπορεί να επιτευχθεί ταυτόχρονα. Για παράδειγμα, οι Přibyl et al. (2012) διαπίστωσαν ότι η συνολική περιεκτικότητα σε εκχύλιση λιπαρών θα μπορούσε να φτάσει έως και το 57,25%, όταν το *C. vulgaris* καλλιεργήθηκε υπό συνθήκες εξάντλησης θρεπτικών συστατικών για 7 ημέρες.

1.5.8 Αλατούχο στρες

Τα άλατα παίζουν ζωτικό ρόλο στις φυσιολογικές και βιοχημικές οδούς ανάπτυξης, αναπαραγωγής και μεταβολισμού των λιπαρών οξέων στα μικροφύκη επομένως, το αλατούχο στρες είναι μία από τις πιο αποτελεσματικές στρατηγικές εμπλουτισμού για την περιεκτικότητα σε λιπίδια. Εξαιτίας αυτού, πολλοί ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη του άλατος για το σκοπό αυτό.

Το αλατούχο στρες είναι γνωστό ότι προκαλεί διαφορά στην ωσμωτική πίεση στα κύτταρα των μικροφυκών, η οποία προκαλεί απόκριση στρες που οδηγεί στην τροποποίηση του μεταβολισμού τους, η οποία θα επιτρέψει στα μικροφύκη να προσαρμοστούν σε αυτές τις νέες συνθήκες. Μεταβολές στο μεταβολικό επίπεδο προκαλούν διακυμάνσεις αλατούχου διαλύματος μέσα στο κύτταρο, αυξάνοντας σημαντικά την περιεκτικότητα σε λιπαρά. Έχει διαπιστωθεί ακόμη ότι οι παραλλαγές στη συγκέντρωση του αλατιού στο μέσο ανάπτυξης όχι μόνο αυξάνουν τα συνολικά λιπίδια των μικροφυκών κυττάρων, αλλά μπορούν επίσης να αλλάξουν τη λιπιδική σύνθεση.

Οι Bartley et al. διερεύνησαν τις επιδράσεις του άλατος στην ανάπτυξη θαλάσσιων μικροφυκών *Nannochloropsis salina*. Αύξησαν τη συγκέντρωση σε 22 PSU (μονάδα αλατότητας σωματιδίων)

μέχρι να φτάσει η καλλιέργεια σε φάση στασιμότητας και στη συνέχεια αύξησαν τη συγκέντρωση αλάτων σε 34, 46 και 58 PSU. Ανέφεραν ότι η περιεκτικότητα σε λιπίδια αυξήθηκε σημαντικά κάτω από αυτές τις συγκεντρώσεις αλατιού, αποκτώντας την υψηλότερη συνολική περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα (36% ξηρή μάζα ιστού) σε 34 PSU.

Σύμφωνα με τους Salama et al. (2013), τα *Chlamydomonas Mexicana* και *Scenedesmus obliquus* αναπτύχθηκαν σε ένα μέσο καλλιέργειας με διαφορετικά επίπεδα άλατος που έφθασαν έως και 100 mM NaCl, δείχνοντας ότι η μέγιστη περιεκτικότητα σε λιπίδια που ελήφθη (37% και 34% αντίστοιχα) από τα *C. Mexicana* και *S. obliquus* επιτεύχθηκε με συγκέντρωση 25 mM NaCl. Διερεύνησαν επίσης τη σύνθεση των λιπαρών οξέων, διαπιστώνοντας ότι τα λινολεϊκά οξέα (41%) και τα ελαϊκά οξέα (41%) ήταν τα κυρίαρχα κλάσματα. Παρόλο που τα δεδομένα για την επίδραση του NaCl στη σύνθεση λιπαρών οξέων των λιπιδίων μικροφυκών είναι λιγοστά, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν επίσης ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις NaCl σε ορισμένα είδη μικροφυκών όπως το *Chlamydomonas Mexicana* και το *Scenedesmus obliquus* μπορούν να βελτιώσουν τη σύνθεση των λιπαρών τους οξέα. Ανάλογα με τον τύπο του λιπιδίου που χρησιμοποιείται, διαφορετικά επίπεδα NaCl μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αλλάξουν τη σύνθεση του λιπαρού οξέος. Με άλλα λόγια, ανάλογα με το ποιο από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και τα κορεσμένα λιπαρά οξέα απαιτείται, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το κατάλληλο επίπεδο NaCl.

Οι Pandit et al. (2017) ανέπτυξαν δύο στελέχη μικροφυκών (*C. vulgaris* και *Acutodesmus obliquus*) σε ένα μέσο που περιείχε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης αλατιού (από 0,06 έως 0,4 M NaCl) και ανέφεραν ότι η μέγιστη ποσότητα λιπιδίων (49% και 43%, αντίστοιχα) λαμβάνεται σε συγκέντρωση 0,4 M NaCl. Επιπλέον, το *Acutodesmus dimorphus* έδειξε σημαντική συσσώρευση λιπιδίων ($33,40 \pm 2,29\%$) σε 200 mM NaCl προστιθέμενου μέσου και η συσσώρευση λιπιδίων αυξήθηκε σημαντικά έως και 43%, όταν το αλατούχο στρες επεκτάθηκε σε 3 ημέρες.

Ο τύπος άλατος που χρησιμοποιείται για την πρόκληση φυσιολογικού άλατος έχει επίσης επίδραση στη συσσώρευση λιπιδίων στα μικροφύκη. Οι Srivastava & Goud (2017) καλλιέργησαν *Chlorella sorokiniana* CG12 (KR905186) και *Desmodesmus* GS12 (KR905187) με διαφορετικούς τύπους αλάτων (NaCl, KCl, MgCl₂ και CaCl₂) και διαπίστωσαν ότι με το CaCl₂ επιτεύχθηκε η μέγιστη επίδραση στην παραγωγή λιπιδίων, βελτιώνοντας έως και 40,02% και 44,97% σε CG12 και GS12, αντίστοιχα. Θεωρείται ότι το Ca²⁺ παίζει καθοριστικό ρόλο στη σηματοδότηση των κυττάρων υπό συνθήκες στρες άλατος που προκαλεί αύξηση της σύνθεσης λιπιδικών ενώσεων.

Οι Takagi & Yoshida (2006) μελέτησαν την επίδραση της συγκέντρωσης άλατος στην ενδοκυτταρική συσσώρευση λιπιδίων τριακυλογλυκερόλης σε θαλάσσια μικροφύκη *Dunaliella* και διαπίστωσαν ότι καθώς οι συγκεντρώσεις αλατιού αυξάνονταν η περιεκτικότητα των ενδοκυτταρικών λιπιδίων αυξάνεται και η τελική περιεκτικότητα σε λιπίδια μπορεί να φτάσει έως και 70%. Υπό την πίεση αλατότητας, το *C. vulgaris* παρουσίασε αύξηση 21,1% στις αποδόσεις λιπιδίων.

Η καλλιέργεια μικροφυκών υπό παρουσία άλατος μπορεί επίσης να περιορίσει τους μολυσματικούς παράγοντες, τους διηθητικούς οργανισμούς και τους ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς στα συστήματα μικροφυκών, γεγονός που παρουσιάζει ένα άλλο

πλεονέκτημα. Ωστόσο, η πολύ υψηλή αλατότητα που εισάγεται μπορεί να αναστείλει την κυτταρική ανάπτυξη και να αλλάξει το σχήμα και τη δομή των μικροφυκών, λόγω της πίεσης του νερού μεταξύ μέσων και κυττάρων. Επομένως, υποτίθεται ότι καθορίζεται ένα βέλτιστο εύρος για το επίπεδο αλατότητας.

1.5.9 Νανοσωματίδια (NP)

Οι έρευνες έχουν χρησιμοποιήσει διάφορους τύπους μεταλλικών NPs, σε μια περιοχή 5-100 nm, αφού εμφανίζουν διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες από τα ίδια τα μέταλλα στη μακροκλίμακα. Η φυσικοχημική συμπεριφορά των μεταλλικών νανοσωματιδίων επέτρεψε τη χρήση τους για πολλές διαφορετικές εφαρμογές σε συστήματα χορήγησης φαρμάκων, στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών, οπτικών και στη σύνθεση πολυλειτουργικών βιοϋλικών. Μια πολύ πρόσφατη εφαρμογή NPs συνδέεται με την ικανότητά τους να βελτιώνουν το ρυθμό μεταφοράς μάζας αερίου-υγρού στις ζυμώσεις. Η παρουσία των NP βελτιώνει τον συντελεστή μεταφοράς μάζας στη διεπαφή αερίου-υγρού. Ως εκ τούτου, η υπόθεση είναι ότι η αύξηση των συγκεντρώσεων CO₂ μέσω NPs μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό ανάπτυξης και την επαγωγή λιπιδίων σε ορισμένα μικροφύκη.

Οι Jeon et al. (2017) χρησιμοποίησαν νανοσωματίδια πυριτίου και νανοσωματίδια πυριτίου με λειτουργικό μεθύλιο (SiO₂ – CH₃) σε καλλιέργεια *C. vulgaris*. Χρησιμοποιούσαν μπλε-πράσινο μέσο (BG-11) και καλλιεργούσαν μικροφύκη που χρησιμοποιούσαν αποκλειστικά CO₂ ως πηγή άνθρακα. Παρατήρησαν ότι τα NPs αύξησαν το ρυθμό μεταφοράς μάζας αερίου -υγρού σε αυτό το σύστημα καλλιέργειας CO₂/μέσου καλλιέργειας και βελτίωσαν τόσο την ανάπτυξη όσο και τη συσσώρευση λιπιδίων στα καλλιεργημένα μικροφύκη. Αnéφεραν ότι η χρήση και των δύο NPs προκαλεί αύξηση του συντελεστή ογκομετρικής μεταφοράς μάζας (kLa) κατά 31% και 145%, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι, αν και η προσθήκη NPs πυριτίου οδηγεί σε αύξηση του κυτταρικού ξηρού βάρους και της παραγωγικότητας μεθυλεστέρα λιπαρών οξέων, το υψηλότερο κυτταρικό ξηρό βάρος (1,49 g L⁻¹) και η υψηλότερη παραγωγικότητα μεθυλεστέρα λιπαρών οξέων (610%) ελήφθησαν με την προσθήκη 0,2% κ.β. SiO₂ – CH₃ NP.

Ομοίως, οι Ahn et al. (2018) εξέτασαν την επίδραση του NPs του φερρίτη/πυριτίου του κοβαλτίου και των μεθυλίου που λειτουργούσαν μαγνητικά πυριτία (methyl-MSNs) στην ανάπτυξη και την παραγωγή λιπιδίων σε μια καλλιέργεια του *C. vulgaris* βελτιώνοντας τη μεταφορά μάζας αερίου-νερού και αυξάνοντας τη συγκέντρωση του διαλυμένου CO₂. Αναφέροντας ότι για το kLa 0,3% κατά βάρος των MSN και των μεθυλο-MSN ήταν 3,11 h⁻¹ και 4,01 h⁻¹, αντίστοιχα. και η χρήση 0,3% κ.β. Methyl-MSN απέδωσε το υψηλότερο ποσοστό μεταφοράς μάζας. Παρ'όλα αυτά, η βελτίωση του ρυθμού μεταφοράς μάζας όχι μόνο δεν αυξάνει την περιεκτικότητα σε λιπίδια αλλά επίσης την μειώνει απότομα (στο 3,37% και 4,57%, αντίστοιχα).

Έχει διαπιστωθεί ότι ορισμένα μεταλλικά NP όπως Ag, Au, CuO, ZnO, Se, Pd και FeO αποδεικνύονται εξαιρετικά τοξικά για διαφορετικούς οργανισμούς. Ένας από αυτούς τους προσβεβλημένους οργανισμούς είναι τα μικροφύκη. Η τοξική επίδραση των NPs σχετίζεται με την παραγωγή ROS και την πρόκληση οξειδωτικού στρες, αυτό επιτυγχάνεται μόνο όταν η συγκέντρωση των NPs φτάσει σε ένα αποτελεσματικό επίπεδο. Άλλες αναφορές που σχετίζονται με τη χρήση των NP για τη βελτίωση της παραγωγικότητας των λιπιδίων. Θα πρέπει να τονιστεί

ότι η χρήση των NP για τη βελτίωση της παραγωγικότητας των λιπιδίων είναι μια μοναδική μέθοδος και έχει ορισμένα μειονεκτήματα, για παράδειγμα, τη δαπανηρή ανακύκλωση των NP. Επομένως, θα πρέπει να διεξαχθούν πιο εμπειριστατωμένες μελέτες για να περιγραφεί λεπτομερώς η σταθερότητα και οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις που μπορούν να προκαλέσουν τα NP.

1.6 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι εύρεση και επιλογή κατάλληλων στελεχών μικροφύκους του γένους *Stichococcus* sp., τα οποία θα σημειώνουν μειωμένη χλωροφύλλη, αλλά ταυτόχρονα θα παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων στο εσωτερικό των κυττάρων. Η υψηλή συγκέντρωση χλωροφύλλης προκαλεί φαινόμενα σκίασης στους φωτο-βιοαντιδραστήρες, μειώνοντας τη διαπερατότητα του φωτός στο εσωτερικό της καλλιέργειας. Ως αποτέλεσμα προκαλείται μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και μια συνολική μείωση της απόδοσης των φωτο-βιοαντιδραστήρων. Αυτές οι βασικές πληροφορίες μπορεί να βοηθήσουν στην κατανόηση αυτών των σημαντικών πτυχών στη διαδικασία καλλιέργειας μικροφυκών και να προωθήσουν τις μελλοντικές προσπάθειες έρευνας και εμπορευματοποίησής τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Ανάπτυξη καλλιεργειών

Το στέλεχος *Stichococcus* sp. αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υλικό με την ονομασία F/2 Medium (Guillard & Ryther 1962, Guillard 1975). Η σύνθεση του θρεπτικού υλικού αποτυπώνεται στον παρακάτω Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού (Guillard & Ryther 1962, Guillard 1975)

Συστατικό	Διάλυμα Stock	Ποσότητα	Μοριακή συγκέντρωση στο τελικό μέσο
NaNO₃	75 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	8,82 x 10 ⁻⁴ M
NaH₂PO₄ H₂O	5 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	3,62 x 10 ⁻⁵ M
Na₂SiO₃ 9H₂O	30 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	1,06 x 10 ⁻⁴ M
Διάλυμα ιχνών μετάλλων	Δίνεται συνταγή παρακάτω	1 mL	-
FeCl₃ 6H₂O	---	3,15 g	1,17 x 10 ⁻⁵ M
Na₂EDTA 2H₂O	---	4,36 g	1,17 x 10 ⁻⁵ M
CuSO₄ 5H₂O	9,8 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	3,93 x 10 ⁻⁸ M
Na₂MoO₄ 2H₂O	6,3 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	2,60 x 10 ⁻⁸ M
ZnSO₄ 7H₂O	22,0 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	7,65 x 10 ⁻⁸ M
CoCl₂ 6H₂O	10,0 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	4,20 x 10 ⁻⁸ M
MnCl₂ 4H₂O	180,0 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	9,10 x 10 ⁻⁷ M
Διάλυμα βιταμινών	Δίνεται συνταγή παρακάτω	0.5 mL	---
Θειαμίνη HCl (vit. B1)	---	200 mg	2,96 x 10 ⁻⁷ M
Βιοτίνη (vit. H)	1,0 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	2,05 x 10 ⁻⁹ M
Κυανοκοβαλαμίνη (vit. B12)	1,0 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	3,69 x 10 ⁻¹⁰ M

Το F/2 Medium χρησιμοποιείται σε αναλογία 1:50 (έτοιμο αντιδραστήριο:θαλασσινό νερό), καθώς είναι συμπυκνωμένο και έτοιμο παρασκεύασμα. Το θαλασσινό νερό είχε συλλεχθεί από παρακείμενη παραθαλάσσια περιοχή και στη συνέχεια είχε φιλτραριστεί για την απομάκρυνση άμμου και άλλων ξένων σωματιδίων. Τα μικροφύκη αναπτύχθηκαν σε ποτήρια ζέσεως των 600 mL, με όγκο καλλιέργειας 200 mL. Το F/2 αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 min και στη συνέχεια για την έναρξη των καλλιεργειών αναμιγνύεται κατάλληλη ποσότητα προηγούμενης καλλιέργειας, με το F/2 Medium. Η επιθυμητή οπτική πυκνότητα έναρξης καλλιέργειας είναι το 0,3, στα 600 nm.

Οι καλλιέργειες αφήνονται σε περιβάλλον με ελεγχόμενη θερμοκρασία 24 °C, ομαλή ανάδευση σε τράπεζα ανακίνησης και κάτω από τεχνητό φωτισμό. Ο τεχνητός φωτισμός αποτελείται από δύο λάμπες φθορίου θερμού φωτός, με συνολική ισχύ 36 W. Η φωτοπερίοδος είναι 16:8 h (Ημέρα:Νύκτα), προκειμένου να επιτευχθεί γρήγορη ανάπτυξη των μικροφυκών και αυτότροφες συνθήκες. Έπειτα από περίπου δύο εβδομάδες πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια του άγριου στελέχους *Stichococcus* sp. σε νέα δοχεία, έτσι ώστε να διατηρούνται οι καλλιέργειες για τη χρήση σε επόμενα πειράματα.

2.2 Μετάλλαξη *Stichococcus* sp.

Η μετάλλαξη του *Stichococcus* sp. πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το χημικό μεταλλαξιγόνο Ethyl methanesulfonate (EMS). Το EMS προκαλεί τυχαίες μεταλλάξεις στο DNA των στελεχών. Τα μεταλλαγμένα στελέχη έχουν μειωμένη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη και ταυτόχρονη αύξηση βιομάζας. Για τη διαδικασία της μετάλλαξης, γίνεται δοκιμή διαφορετικών συγκεντρώσεων του EMS, για την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης που επιφέρει τη μετάλλαξη. Συγκεκριμένα, εξετάζονται 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις: 1,00, 1,25, 1,50, 1,75 και 2,0% EMS σε 5 mL δείγματος καλλιέργειας.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την μετάλλαξη του *Stichococcus* sp. περιγράφεται παρακάτω.

Αρχικά ετοιμάστηκαν τρυβλία τύπου petri στα οποία θα έγινε η καλλιέργεια των μεταλλαγμένων δειγμάτων *Stichococcus* sp. Για αυτό το σκοπό παρασκευάστηκε στερεό θρεπτικό υλικό F/2 σε μπουκάλια Boro. Πρακτικά, στο 1 L θρεπτικού υλικού προσθέτουμε 15 g άγαρ γενικής χρήσης. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό που περιέχει το άγαρ αποστειρώνονται για τη διαλυτοποίηση του άγαρ και το διαμοιρασμό στα τρυβλία. Αποστειρώθηκαν επίσης και οι δοκιμαστικοί σωλήνες που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των κατάλληλων αραιώσεων. Μετά το πέρας της αποστείρωσης τα μπουκάλια τύπου Boro αφέθηκαν να κρυώσουν ελαφρώς και στην συνέχεια γεμίστηκαν τα τρυβλία τύπου petri με το θρεπτικό υλικό. Τα τρυβλία έμειναν στον απαγωγό για μία μέρα, έως ότου σταθεροποιηθεί το θρεπτικό υλικό και να είναι έτοιμα προς χρήση.

Για την ορθή εκτίμηση της επιτυχίας της μετάλλαξης θα πρέπει να παρασκευαστούν δείγματα όμοια με τα μεταλλαγμένα το οποία θα είναι δείγματα ελέγχου ή όπως ονομάστηκαν κατά την πειραματική διαδικασία, 'control'.

Για τα control:

Σε 15 δοκιμαστικούς σωλήνες (5 για κάθε αραιώση) τοποθετήθηκαν 10 mL αποστειρωμένου θαλασσινού νερού. Από τα πρώτα 7 αφαιρέθηκαν 100 μ L που αντικαταστάθηκαν από 100 μ L καλλιέργειας *Stichococcus* sp. για να επιτευχθεί αραιώση της τάξης 10^{-2} . Στη συνέχεια για να γίνει αραιώση της τάξης 10^{-3} , από τους επόμενους 7 σωλήνες αφαιρέθηκαν 1 mL αποστειρωμένου θαλασσινού νερού το οποίο αντικαταστάθηκε από το 1 mL αραιώσεων 10^{-2} . Τέλος για την επίτευξη αραιώσης 10^{-5} αφαιρέθηκαν από τους τελευταίους 7 δοκιμαστικούς σωλήνες 100 μ L, τα οποία αντικαταστάθηκαν με την αραιώση 10^{-3} . Πριν από κάθε μετάγγιση οι δοκιμαστικοί σωλήνες, από τους οποίους αφαιρούνταν καλλιέργεια για να μπει στον επόμενο και να γίνει η αραιώση με ανάδευση με τη βοήθεια vortex. Τέλος στρώθηκαν 2 τρυβλία για κάθε αραιώση. Για το στρώσιμο χρειάστηκαν 100 μ L από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα για κάθε τρυβλίο. Να σημειωθεί ότι και εδώ πριν αποσπαστεί το δείγμα ο δοκιμαστικός σωλήνας περνούσε πάλι από vortex.

Το επόμενο βήμα ήταν να παρασκευαστούν και τα μεταλλαγμένα δείγματα με τις συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν προηγουμένως καθώς και οι αραιώσεις αυτών.

Για τα μεταλλαγμένα δείγματα:

Αρχικά παρασκευάστηκαν 2 stock συγκεντρώσεις, η Low-Stock (LS) και η High-Stock (HS) με τελικές συγκεντρώσεις 1% και 10% αντίστοιχα.

- Για την LS:
Σε ένα δοχείο falcon τοποθετήθηκαν 5 mL αποστειρωμένου θαλασσινού νερού από τα οποία αφαιρέθηκαν 5 μ L που αντικαταστάθηκαν με 5 μ L EMS.
- Για την HS:
Σε ένα δοχείο falcon τοποθετήθηκαν 5 mL αποστειρωμένου θαλασσινού νερού από τα οποία αφαιρέθηκαν 500 μ L που αντικαταστάθηκαν με 500 μ L EMS

Στόχος ήταν η δημιουργία 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων EMS.

C_A= 1,00 %: προστέθηκαν 500 μ L EMS από την HS στο πρώτο falcon

C_B= 1,25 %: προστέθηκαν 625 μ L EMS από την HS στο δεύτερο falcon

C_C= 1,50 %: προστέθηκαν 750 μ L EMS από την HS στο τρίτο falcon

C_D= 1,75%: προστέθηκε 875 μ L EMS από την HS τέταρτο falcon

C_E= 2,00 %: προστέθηκε 1 mL EMS από την HS στο πέμπτο falcon

Στη συνέχεια τα falcon καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο, διότι το EMS πρέπει να παραμείνει στο σκοτάδι για να δράσει και αφέθηκαν στο shaker για 2 ώρες.

Κατά τη διάρκεια αυτή παρασκευάστηκε διάλυμα αδρανοποίησης του EMS με 100 mL απιονισμένο νερό και 0,7 g θειοθειικό νάτριο (sodium thiosulphate).

Μετά το πέρας των 2 ωρών, προστέθηκε 1 mL αδρανοποιητικού διαλύματος 7% θειοθειικού νατρίου (sodium thiosulphate) σε κάθε falcon. Έπειτα με τον ίδιο τρόπο που έγιναν οι αραιώσεις για τα control έγιναν αραιώσεις και για τα μεταλλαγμένα δείγματα.

Σε 5 δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 10 mL αποστειρωμένου θαλασσινού νερού, αφαιρέθηκαν 100 μ L από κάθε σωλήνα, τα οποία αντικαταστάθηκαν από 100 μ L από τα falcon για την δημιουργία της αραιώσης 10^{-2} . Για την δημιουργία της αραιώσης 10^{-3} από τους επόμενους 7 δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 10 mL αποστειρωμένου θαλασσινού νερού αφαιρέθηκαν 1 mL και αντικαταστάθηκε με 1 mL από τους δοκιμαστικούς σωλήνες αραιώσης 10^{-2} . Για την δημιουργία της αραιώσης 10^{-5} από τους τελευταίους 5 δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 10 mL αποστειρωμένου θαλασσινού νερού, αφαιρέθηκαν 100 μ L τα οποία αντικαταστάθηκαν με 100 μ L από τους δοκιμαστικούς σωλήνες αραιώσης 10^{-3} . Και σε αυτήν την περίπτωση πριν από κάθε μετάγγιση οι δοκιμαστικοί σωλήνες, από τους οποίους αφαιρούνταν καλλιέργεια για να μπει στον επόμενο και να γίνει η αραιώση, γίνονταν ανάδευση με τη βοήθεια vortex. Τέλος στρώθηκαν 2 τρυβλία για κάθε αραιώση. Για το στρώσιμο χρειάστηκαν 100 μ L από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα για κάθε τρυβλίο. Κάπου εδώ αξίζει να αναφερθεί ότι εκτός από τις αραιωμένες καλλιέργειες στρώθηκαν δύο τρυβλία από κάθε μία από τις πυκνές καλλιέργειες, τόσο από τις μεταλλαγμένες όσο και από την αρχική.

Μετά το πέρας δυο βδομάδων περίπου, παρατηρώντας τα τρυβλία γίνεται επιλογή των μεταλλαγμένων στελεχών βάσει της χρωματικής απόχρωσης. Επιλέγονται οι αποικίες με ανοιχτότερο πράσινο χρώμα, σε σχέση με τα controls και αναπτύσσονται για 3 γενεές για να διαπιστωθεί η μετάλλαξη.

Τελικές αποικίες

Από τις δοκιμές προέκυψαν 2 αποικίες οι οποίες οπτικά είχαν χαμηλότερη χλωροφύλλη, σε σχέση με το Wild. Οι 2 αυτές αποικίες (σε συντομογραφία EMS1 και EMS2), μαζί με το control (Wild) αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες με όγκο 200 mL. Οι καλλιέργειες αναδεύονταν σε τράπεζα ανάδευσης καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης. Για το φωτισμό χρησιμοποιήθηκαν 2 λάμπες φθορισμού 2.200 lux, η κάθε μία. Κατά την ανάπτυξη των μικροφυκών πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις παραγωγής βιομάζας, χλωροφύλλης και λιπιδίων. Τα αποτελέσματα των Wild, EMS1, EMS2 αποτυπώνονται στο Κεφάλαιο 3.

2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός βιομάζας και βιο-προϊόντων

Για την παρακολούθηση της καλλιέργειας χρειάστηκε να γίνουν μετρήσεις ως προς την παραγωγή βιομάζας, οπτικής πυκνότητας, χλωροφύλλης και παραγωγής λιπιδίων. Για αυτό το σκοπό τόσο το άγριο στέλεχος *Stichococcus* sp. όσο και τα σταθεροποιημένα, μεταλλαγμένα στελέχη ανακαλλιεργήθηκαν σε ποτάρια ζέσεως με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και θρεπτικό συστατικό F/2.

Κατά την διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος, ανά 24 h, συλλέγονταν 5 mL υγρής καλλιέργειας τα οποία διηθούνταν σε ξηραμένα, προζυγισμένα φίλτρα, διαμέτρου πόρων 0,7 μ m. Τα φίλτρα ξηραίνονταν στους 64 °C για 24 h, προκειμένου να απομακρυνθεί η υγρασία. Στη συνέχεια, ζυγίζονταν και γινόταν υπολογισμός της βιομάζας σε mg mL⁻¹.

2.3.1 Προσδιορισμός βιομάζας

Η βιομάζα μετρούταν και ποιοτικά και ποσοτικά. Για τον ποιοτικό προσδιορισμό γινόταν μέσω της οπτικής απορρόφησης (OD). Ανά δύο ημέρες, συλλέγονταν δείγματα καλλιέργειας από κάθε ποτήρι ζέσεως τα οποία τοποθετούνταν σε κυψελίδες των 2 mL. Οι κυψελίδες φωτομετρούνταν στα 600 nm.

Κατά την διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος, ανά 48 h, συλλέγονταν 5 mL υγρής καλλιέργειας τα οποία διηθούνταν σε ξηραμένα, προζυγισμένα φίλτρα, διαμέτρου πόρων 0,7 μm . Τα φίλτρα ξηραίνονταν στους 64 °C για 24 h, προκειμένου να απομακρυνθεί η υγρασία. Στη συνέχεια, ζυγίζονταν και γινόταν υπολογισμός της βιομάζας σε g L^{-1} .

2.3.2 Προσδιορισμός χλωροφύλλης

Για τον προσδιορισμό της χλωροφύλλης χρησιμοποιούνταν τα φίλτρα με τη διηθημένη βιομάζα. Τα φίλτρα τεμαχίζονταν και τοποθετούνταν σε γυάλινα δοχεία με πώμα, μαζί με 4 mL μεθανόλη 99,9%, για την εκχύλιση των χρωστικών. Τα φιαλίδια παραμέναν σε φούρνο στους 45 °C με ομαλή ανάδευση για 24 h. Μετά το πέρας των 24 h, γινόταν φωτομέτρηση του εκχυλίσματος στα 665,2 nm και 652,4 nm. Σύμφωνα με τον Lichtenthaler (1987), η χλωροφύλλη προσδιορίζονταν από τις εξισώσεις (1), (2), (3) όπου προέκυψαν η Χλωροφύλλη a, η Χλωροφύλλη b και η Συνολική Χλωροφύλλη, αντίστοιχα.

$$\text{Chl a (mg} \cdot \text{ml}^{-1}) = 16.72 \cdot A_{665.2} - 9.16 \cdot A_{652.4} \quad (1)$$

$$\text{Chl b (mg} \cdot \text{ml}^{-1}) = 34.09 \cdot A_{652.4} - 15.28 \cdot A_{665.2} \quad (2)$$

$$\text{Tot Chl} = \text{Chl a} + \text{Chl b} \quad (3)$$

Όπου:

- A είναι η απορρόφηση στα 665,2 nm και 652,4 nm.

2.3.3 Προσδιορισμός λιπιδίων

Η συγκέντρωση των λιπιδίων εξετάστηκε με τη μέθοδο Sulpho-Phospho-Vanilin (SPV) (Mishra et al., 2014). Η μέθοδος αυτή χωρίζεται σε δύο στάδια:

1) Δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης

Αρχικά, δημιουργήθηκε πρότυπο διάλυμα λιπιδίων αναμιγνύοντας 20 mg ελαιόλαδου σε 10 mL χλωροφόρμιο, για να επιτευχθεί συγκέντρωση 2 mg mL^{-1} . Το διάλυμα αποθηκεύτηκε στους -20 °C. Στη συνέχεια, έγιναν αραιώσεις του πρότυπου διαλύματος σε ξεχωριστά φιαλίδια. Οι

αραιώσεις που εφαρμόστηκαν ήταν: 0, 0,03, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,60 και 0,70 mg mL⁻¹.

2) Μέθοδος Sulpho-Phospho-vanillin για τον προσδιορισμό των λιπιδίων

Παρασκευάστηκε διάλυμα phospho-vanillin αναμιγνύοντας 0,6 g βανιλίνης σε 10 mL αιθανόλη και 90 mL απιονισμένο νερό, με διαρκή ανάδευση. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 400 mL πυκνού φωσφορικού οξέος. Το αντιδραστήριο αναμίχθηκε συνεχώς σε σκοτεινό μέρος μέχρι τη χρήση. Οι ποσότητες τους προσαρμόστηκαν ανάλογα με το πλήθος των δειγμάτων. Το αντιδραστήριο phospho-vanillin παρασκευάστηκε πριν από κάθε πείραμα, προκειμένου να έχει υψηλή ενεργότητα.

Για τον προσδιορισμό των λιπιδίων στα δείγματα μικροφυκών αναμίχθηκε βιομάζα από 2,5 mL διηθημένης καλλιέργειας, με 2 mL χλωροφόρμιο. Το χλωροφόρμιο έδρασε ως διαλύτης για την εκχύλιση των λιπιδίων από τα κύτταρα των μικροφυκών. Σε φιαλίδια με πώμα από PTFE τοποθετήθηκαν 100 μ L από τις αραιώσεις λιπιδίων-ελαίου οξέος της καμπύλης βαθμονόμησης. Τα φιαλίδια αυτά, μαζί με τα φιαλίδια που περιείχαν τα λιπίδια δειγμάτων μικροφυκών τοποθετήθηκαν σε θερμαντική πλάκα στους 60 °C, έως ότου εξατμιστεί το χλωροφόρμιο. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 100 μ L απιονισμένου νερού και 2 mL πυκνού θειικού οξέος. Τα διαλύματα θερμάνθηκαν στους 100 °C για 10 min και έπειτα ψύχθηκαν σε πάγο, έως ότου φτάσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σε κάθε φιαλίδιο προστέθηκαν 5 mL από το αντιδραστήριο phospho-vanillin και τοποθετήθηκαν σε φούρνο στους 37 °C για 15 min. Τέλος, έπειτα από 45 min μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 530 nm, διότι έχει επιτευχθεί σταθεροποίηση των αντιδραστηρίων. Η ποσότητα των λιπιδίων υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg mL⁻¹ καλλιέργειας. Για την καλύτερη εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε αναγωγή των λιπιδίων σε mg g⁻¹ βιομάζας σε ξηρή βάση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

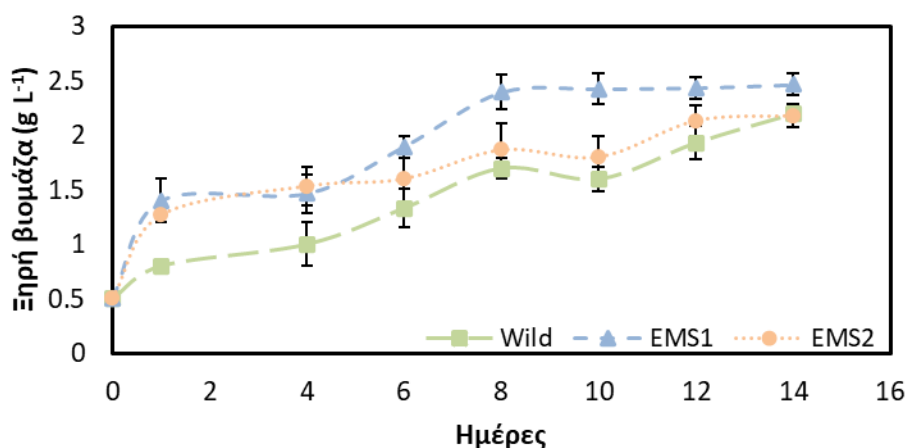
3.1 Προσδιορισμός βιομάζας

Στο Σχήμα 3.1 παρουσιάζεται η παραγωγή βιομάζας σε σχέση με τις ημέρες καλλιέργειας, για τα εξεταζόμενα στελέχη *Stichococcus* sp., Wild, EMS1 και EMS2. Όσον αφορά τη βιομάζα, η παραγωγή του Wild σημειώνει μέγιστη τιμή τα $2,20 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$, η οποία σημειώνεται την 14^η ημέρα ανάπτυξης.

Το EMS1 σημειώνει τις υψηλότερες τιμές βιομάζας, σε σχέση με το Wild. Από την αρχή της καλλιέργειας, η βιομάζα βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα, με τη μέγιστη τιμή να είναι $2,47 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$ (14^η ημέρα ανάπτυξης). Η βιομάζα του EMS1 έχει στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι του Wild, με τη διαφορά να είναι κατά 12% υψηλότερη.

Η μέγιστη τιμή βιομάζας του EMS2 σημειώθηκε τη 14^η ημέρα, με τιμή τα $2,18 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$, παραπλήσια τιμή του στελέχους Wild.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρατηρείται ότι ο ρυθμός ανάπτυξης βιομάζας ήταν μεγαλύτερος στα μεταλλαγμένα στελέχη EMS1 και EMS2 από ότι στο άγριο στέλεχος του *Stichococcus* sp., αν και την τελευταία ημέρα η βιομάζα του υπερέβη τη μέγιστη του EMS1.



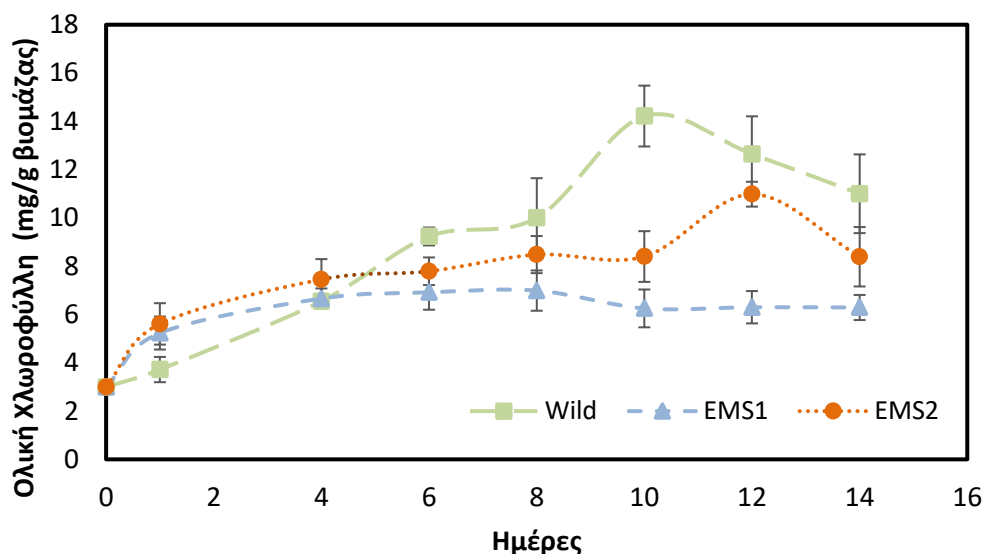
Σχήμα 3.1: Παραγωγή βιομάζας σε σχέση με τις ημέρες καλλιέργειας, για τα στελέχη Wild, EMS1 και EMS2. Η τυπική απόκλιση απεικονίζεται με τις γραμμές σφάλματος.

3.2 Προσδιορισμός χλωροφύλλης

Στο Σχήμα 3.2 παρουσιάζεται η συγκέντρωση χλωροφύλλης σε σχέση με τις ημέρες καλλιέργειας, για τα εξεταζόμενα στελέχη *Stichococcus* sp., Wild, EMS1 και EMS2. Όσον αφορά τη χλωροφύλλη, παρατηρήθηκε ότι τα μεταλλαγμένα ήδη EMS 1 και EMS2 παρουσίασαν μειωμένες τιμές περιεχόμενης χλωροφύλλης σε σχέση με το δείγμα Wild. Οι Beacham et al. (2017) δήλωσαν ότι η μειωμένη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη ελαχιστοποιεί την επίδραση σκιάς των μικροφυκών, που καλλιεργούνται σε φωτο-βιοαντιδραστήρες. Συγκεκριμένα, η μέση τιμή της περιεχόμενης χλωροφύλλης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας βρέθηκε ίση με $8,79 \text{ mg g}^{-1}$, $5,95 \text{ mg g}^{-1}$ και $7,51 \text{ mg g}^{-1}$ για τα στελέχη Wild, EMS1 και EMS2, αντίστοιχα. Γενικότερα, κατά το

μεγαλύτερο μέρος της καλλιέργειας οι τιμές κυμαίνονταν σε χαμηλά επίπεδα, με μέση τιμή στα $6,99 \pm 0,83 \text{ mg g}^{-1}$. Σχετικά με τα μεταλλαγμένα στελέχη, η μέγιστη τιμή χλωροφύλλης ήταν $10,98 \pm 0,51 \text{ mg g}^{-1}$ βιομάζας για το EMS2, η οποία ήταν μεγαλύτερη των αντίστοιχων τιμών για το EMS1, αλλά μικρότερη αυτών του Wild.

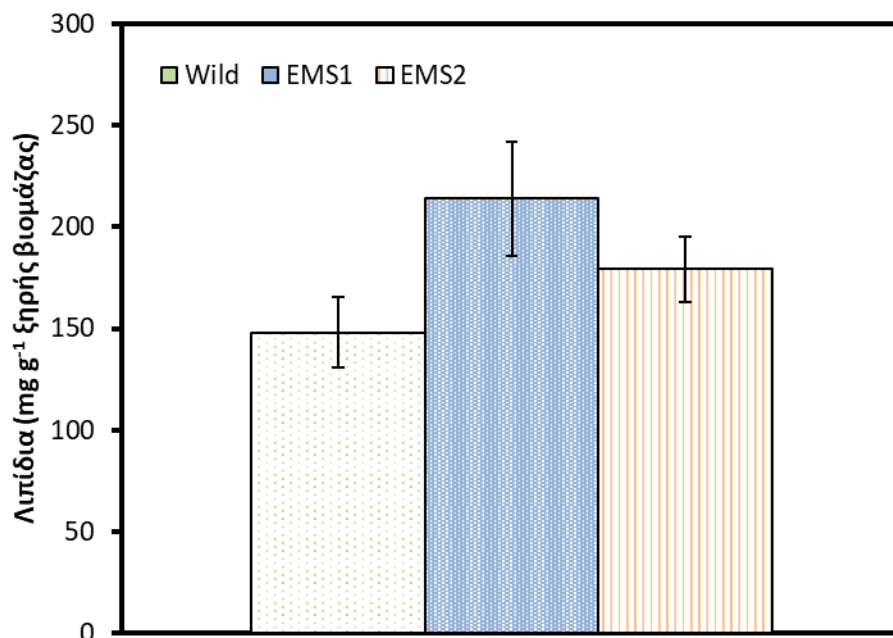
Κατά την ανάπτυξη των στελεχών, παρόμοια άνοδο ακολουθεί η χλωροφύλλη, η οποία αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο πληθυσμός των κυττάρων. Η μέγιστη τιμή της χλωροφύλλης φθάνει τα $14,22 \pm 1,26 \text{ mg g}^{-1}$ βιομάζας, κατά τη 10^η ημέρα ανάπτυξης και έπειτα υπάρχει πτώση της χλωροφύλλης, η οποία φτάνει τα $11,00 \pm 1,63 \text{ mg g}^{-1}$ τη 14^η ημέρα ανάπτυξης για το Wild. Οι αντίστοιχες τιμές της χλωροφύλλης για τα μεταλλαγμένα στελέχη EMS1 και EMS2 ήταν $6,25 \pm 0,78 \text{ mg g}^{-1}$ και $8,40 \pm 1,05 \text{ mg g}^{-1}$, αντίστοιχα για τη 10^η ημέρα ανάπτυξης και $6,29 \pm 0,52 \text{ mg g}^{-1}$ και $8,39 \pm 1,23 \text{ mg g}^{-1}$, αντίστοιχα για τη 14^η ημέρα ανάπτυξης.



Σχήμα 3.2: Συγκέντρωση χλωροφύλλης σε σχέση με τις ημέρες καλλιέργειας, για τα στελέχη Wild, EMS1 και EMS2. Η τυπική απόκλιση απεικονίζεται με τις γραμμές σφάλματος.

3.3 Προσδιορισμός λιπιδίων

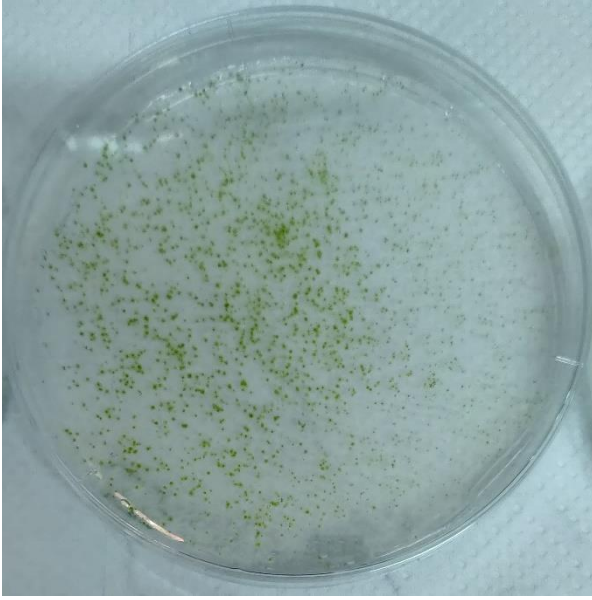
Στο Σχήμα 3.3 παρουσιάζεται η παραγωγή λιπιδίων τη 14^η ημέρα καλλιέργειας, για τα εξεταζόμενα στελέχη *Stichococcus* sp, Wild, EMS1 και EMS2. Όσον αφορά τα λιπίδια, το EMS1 επέδειξε την υψηλότερη περιεκτικότητα, με τιμή $214 \pm 28 \text{ mg g}^{-1}$, ενώ ακολουθεί το EMS2 με $179 \pm 16 \text{ mg g}^{-1}$ και τέλος το Wild με $148 \pm 17 \text{ mg g}^{-1}$. Η απόδοση λιπαρών ήταν μεγαλύτερη στα μεταλλαγμένα στελέχη EMS1 και EMS2 από ότι στο άγριο στέλεχος του *Stichococcus* sp. Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα λιπαρών που παρατηρήθηκε στα μεταλλαγμένα στελέχη EMS1 και EMS2 ήταν 45% και 21% μεγαλύτερη σε σχέση με το άγριο στέλεχος, αντίστοιχα.



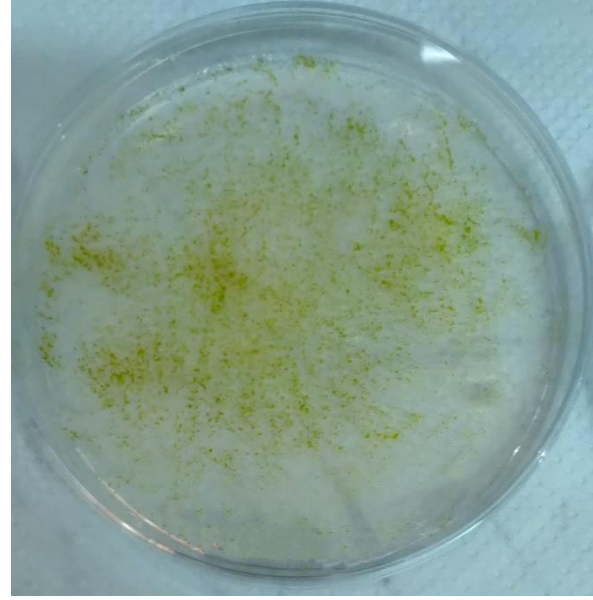
Σχήμα 3.3: Περιεχόμενο λιπιδίων κατά τη 14^η ημέρα ανάπτυξης για τα στελέχη Wild, EMS1, EMS2 *Stichococcus* sp. Η τυπική απόκλιση απεικονίζεται με τις γραμμές σφάλματος.

3.4 Χαρακτηριστικά στελεχών *Stichococcus* sp.

Στο Σχήμα 3.4 παρουσιάζονται οι ορατές αποικίες του μεταλλαγμένου στελέχους EMS1 και του Wild *Stichococcus* sp σε διάφορες κατάλληλες αραιώσεις σε τρυβλία Petri. Στο Σχήμα 3.5 παρουσιάζονται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του Wild *Stichococcus* sp και των μεταλλαγμένων στελεχών του EMS1 και EMS2. Παρατηρείται ότι τα κύτταρα του EMS1 έχουν το πιο ανοικτό πράσινο χρώμα, σε σχέση με τα υπόλοιπα δύο στελέχη. Στο Σχήμα 3.6 παρουσιάζεται η χρωματική διαφορά του υγρού των καλλιεργειών Wild και EMS1, όπου είναι εμφανής η μειωμένη συγκέντρωση χλωροφύλλης στο μεταλλαγμένο στέλεχος EMS1 σε σχέση με το Wild.



Wild

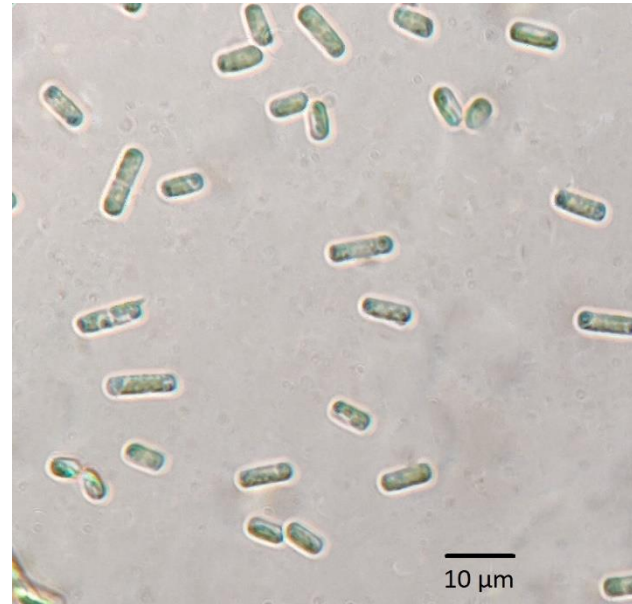


EMS1

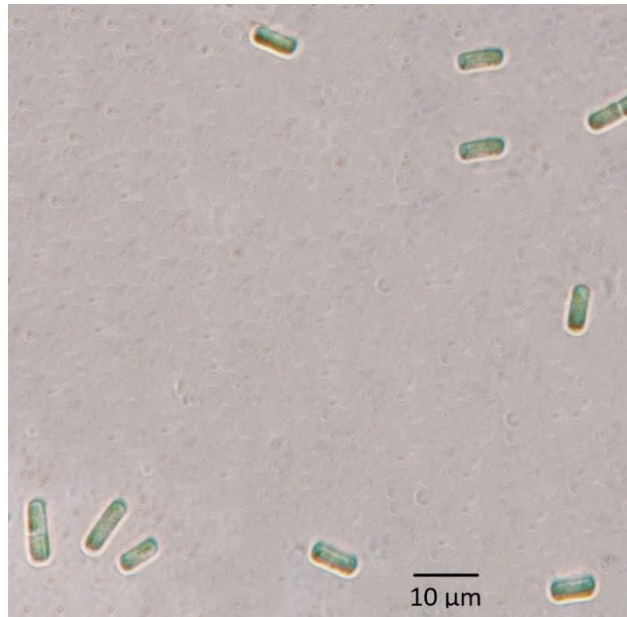
Σχήμα 3.4: Χρωματική διαφορά μεταξύ των αποικιών Wild και EMS1.



Wild



EMS1

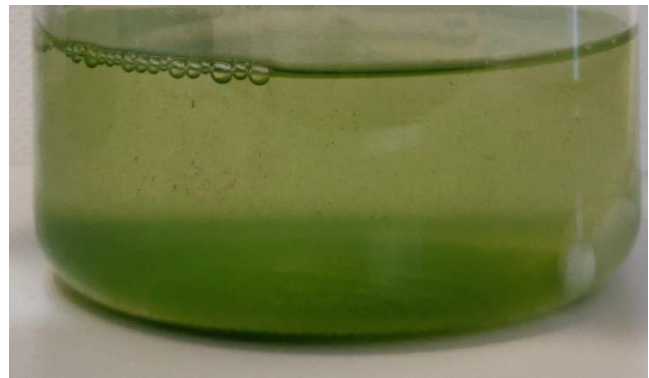


EMS2

Σχήμα 3.5: Φωτογραφίες μικροσκοπίου σε μεγέθυνση 100x των καλλιεργειών Wild, EMS1 και EMS2.



Wild



EMS1

Σχήμα 3.6: Χρωματική διαφορά του υγρού των καλλιεργειών Wild και EMS1.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διαδικασία φωτοσυνθετικής καλλιέργειας μικροφυκών, που συνδυάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την παραγωγή βιομάζας και την ενδοκυτταρική συσσώρευση συγκεκριμένων προϊόντων, αποδείχθηκε ότι εξαρτάται σοβαρά από διάφορους παράγοντες κατά την καλλιέργεια, όπως τη χρήση χημικών μεταλλαξιογόνων παραγόντων αλλά και την ποιότητα του διαθέσιμου φωτός κατά την καλλιέργεια.

Ο *Stichococcus* sp. θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως ένα πιθανό μέσο κυττάρων για τη δημιουργία πληθυσμών κυττάρων υψηλής πυκνότητας που συσσωρεύουν αποτελεσματικά τρεις σημαντικούς μεταβολίτες, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λιπίδια ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας που επιλέγονται. Μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση μεθανοσουλφονικού αιθυλεστέρα παράγει στελέχη με μικρότερη συγκέντρωση χλωροφύλλης (Makaroglou et al., 2019) κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Επίσης οι Psachoulia & Chatzidoukas (2021) έδειξαν ότι η συγκέντρωση της χλωροφύλλης αλλά και άλλων μεταβολιτών σε *Stichococcus* sp. μπορεί να προβλεφθούν με τη χρήση διαφορετικών μηκών κύματος φωτός στην καλλιέργειά του. Το κόκκινο και το μπλε φως σε συνδυασμό με το λευκό μπορούν να αυξήσουν δραματικά τις συγκεντρώσεις χλωροφύλλων. Το λευκό φως LED έχει αποδειχθεί ότι ευνοεί το *Stichococcus* sp. να αναπτύξει καλλιέργειες με μεγάλες τιμές ξηρής κυτταρικής μάζας. Από την άλλη πλευρά, η ενίσχυση του φάσματος του λευκού φωτός με το μπλε φως LED πυροδοτεί την υπερπαραγωγή λιπιδίων, ευνοώντας την αφομοίωση του CO₂ κατά προτίμηση στη μεταβολική οδό της σύνθεσης λιπιδίων, ενώ η ενίσχυση του λευκού φωτός στην κόκκινη ζώνη είναι μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για εντείνουν τη συσσώρευση πρωτεϊνών όταν εξασφαλίζεται επαρκής παροχή αζώτου. Συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη η μετάλλαξη με EMS οδήγησε σε στελέχη με μέγιστη παραγωγή βιομάζας 2,47 g L⁻¹, ενώ οι Psachoulia & Chatzidoukas (2021) παρέλαβαν 3,5 g L⁻¹ βιομάζας καλλιεργώντας το *Stichococcus* sp. με αποκλειστικά λευκό φως αυξανόμενης έντασης.

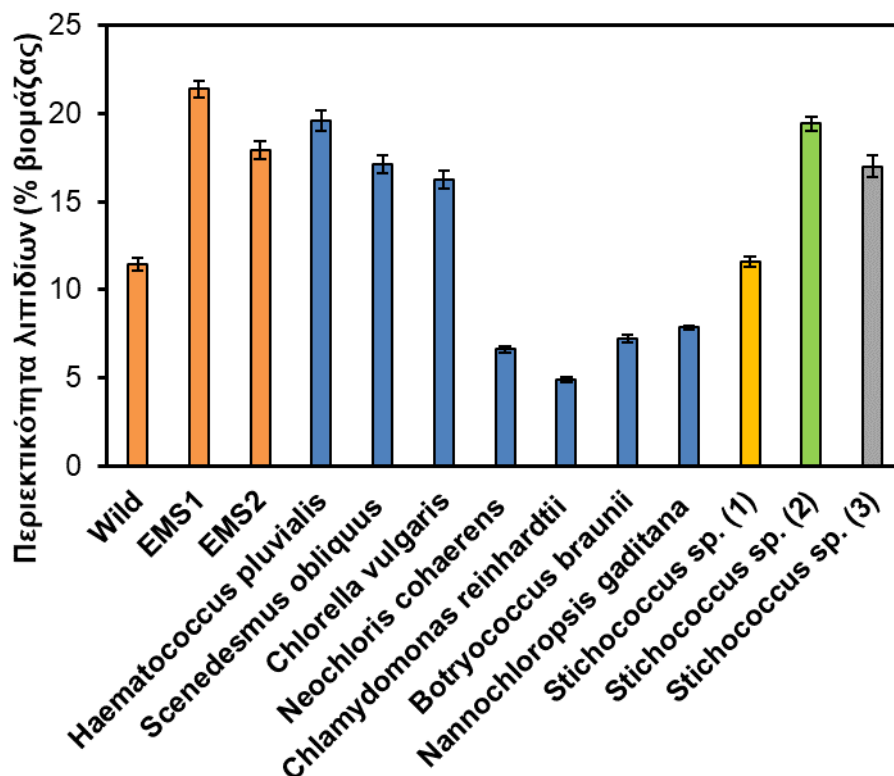
Οι μελέτες σε μικροφύκη που έχουν μεταλλαχθεί από μεθανοσουλφονικό αιθυλεστέρα (EMS) εξακολουθούν να είναι περιορισμένες. Η μεταλλαξιογένεση που προκαλείται από χημικά μεταλλαξιογόνα μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα μετάλλαξης, ιδιαίτερα σε ορισμένες γονιδιωματικές περιοχές με υψηλή περιεκτικότητα σε GC. Αναμένεται ότι ορισμένα πειράματα μεταλλαξιογένεσης μπορεί να μην οδηγήσουν σε επιθυμητούς φαινοτύπους λόγω των περιορισμένων σειρών μεταλλάξεων. Ο μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας (EMS) είναι ένα άλλο δημοφιλές χημικό μεταλλαξιογόνο που έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό και αποδοτικό στη μεταλλαξιογένεση (Arisha et al., 2015).

Έχει πραγματοποιηθεί επιτυχής μεταλλαξιογένεση χρησιμοποιώντας EMS για τη δημιουργία μεταλλαγμένων μικροφυκών με αυξημένη συγκέντρωση λιπιδίων, όπως για παράδειγμα το *Chlamydomonas reinhardtii* μεταλλάχθηκε τυχαία από το EMS για ενισχυμένη παραγωγή λιπιδίων (Chaturvedi & Fujita, 2006). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας που αφορούν τη μετάλλαξη του *Stichococcus* sp είναι σύμφωνα με τα ευρήματα της βιβλιογραφίας για τη χημική μεταλλαξιογένεση με στόχο τη βελτίωση της βιομάζας της παραγωγικότητας λιπιδίων μικροφυκών όπως το *Nannochloropsis* sp. και *Chlorella* sp. (Doan & Obbard, 2012, Shin et al., 2016).

Οι Al-saedi et al. (2019) έδειξαν ότι τα μεταλλαγμένα μικροφύκη *Nanochloropsis oculata* και *Chlorella* sp. παρουσίασαν υψηλή δυνατότητα για ενεργειακή αποθήκευση λιπιδίων καθώς και υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης σε σύγκριση με τα μη μεταλλαγμένα (σπάντα). Εκτός από την εκθετική αύξηση των υδατανθράκων της βιομάζας, οι πρωτεΐνες και τα λιπαρά οξέα αυξήθηκαν σημαντικά μετά τη μετάλλαξη αυτών των στελεχών από EMS. Η βιοχημική ανάλυση σύστασης των λιπαρών διεξήχθη χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία για να βρεθούν οι συγκεντρώσεις πέντε κύριων λιπαρών οξέων: παλμιτικού οξέος, λινολενικού οξέος, στεατικού οξέος, ελαϊκού οξέος και λινελαϊκού οξέος. Σε μεταλλαγμένο *N. oculata* και *Chlorella* sp. το λινολενικό οξύ βρέθηκε το κύριο λιπαρό οξύ με υψηλό ποσοστό (11,7% και 4,8%) αντίστοιχα σε σύγκριση με το μη μεταλλαγμένο (0,24% και 1,82%). Κάτι ανάλογο επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα μελέτη όπου τα μεταλλαγμένα στελέχη EMS1 και EMS2 παρουσίασαν υψηλότερη απόδοση λιπαρών κατά 30% και 20% αντίστοιχα σε σύγκριση με αυτή από το άγριο στέλεχος του *Stichococcus* sp.

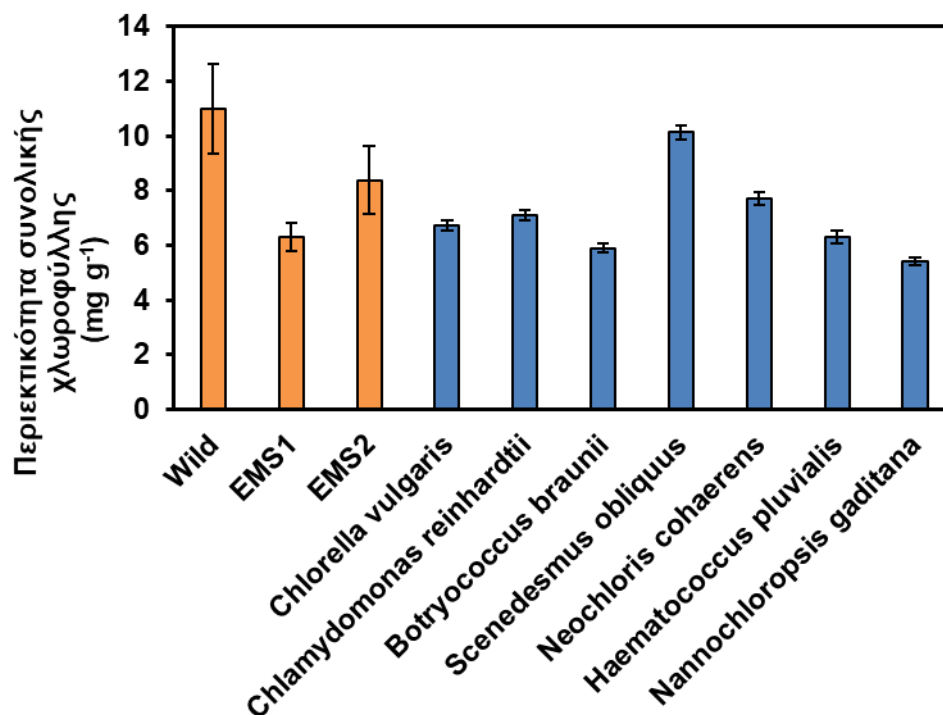
Η ποικιλομορφία των ειδών των μικροφυκών και οι διαφορές στις συγκεκριμένες αποκρίσεις παρακινούν τη διεξαγωγή μελετών που στοχεύουν να καθορίσουν τις καλύτερες στρατηγικές για βελτιωμένη ποιότητα και ποσότητα βιομάζας με βάση τα μικροφύκη. Τα δεδομένα που συγκεντρώνονται από τη βιβλιογραφία υπογραμμίζουν την πολυπλοκότητα του μεταβολισμού των μεταβολικών των μικροφυκών όπως των λιπιδίων ως συνάρτηση των συνθηκών ανάπτυξης των μικροφυκών.

Συγκριτικά με άλλα μικροφύκη της βιβλιογραφίας, υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια έχει σημειωθεί σε καλλιέργειες των μικροφυκών *Haematococcus pluvialis*, *Scenedesmus obliquus* και *Chlorella vulgaris*. Η ποσότητα των λιπιδίων σε αυτές τις καλλιέργειες μικροφυκών είναι $19,61 \pm 0,58\%$, $17,13 \pm 0,51\%$ και $16,24 \pm 0,48\%$, αντίστοιχα. Η περιεκτικότητα σε λιπίδια στην καλλιέργεια *Neochloris cohaerens* ήταν $6,61 \pm 0,19\%$, που είναι 1,35 φορές υψηλότερη από την περιεκτικότητα σε λιπίδια στην ξηρή βιομάζα των μικροφυκών *Chlamydomonas reinhardtii* ($4,90 \pm 0,14\%$), αλλά μικρότερη από ό,τι στην καλλιέργεια των *Bobranyunii*. και *Nannochloropsis gaditana* ($7,23 \pm 0,21\%$ και $7,84 \pm 0,13\%$, αντίστοιχα). Περαιτέρω μελέτη του μικροβιακού λιπιδικού προφίλ των μικροοργανισμών *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus braunii*, *Neochloris cohaerens*, *Chlamydomonas reinhardtii* και *Nannochloropsis gaditana* έχει πραγματοποιηθεί και διαπιστώθηκε ότι η σύνθεση λιπαρών οξέων των μελετημένων καλλιεργειών με χρήση αέριας χρωματογραφίας αντιπροσωπεύεται από υψηλού μοριακού βάρους πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Sprague et al., 2017, Scharff et al., 2017, Chandra et al., 2017, Josephine et al., 2015). Συγκριτικά η περιεκτικότητα λιπαρών που παρατηρήθηκε στο μεταλλαγμένο στέλεχος EMS1 είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή στα μικροφύκη της βιβλιογραφίας που μελετήθηκε (Σχήμα 4.1).



Σχήμα 4.1: Σύγκριση της περιεκτικότητας των λιπιδίων σε διάφορα στελέχη μικροφυκών (Sprague et al., 2017; Scharff et al., 2017; Chandra et al., 2017; Josephine et al., 2015). Wild, EMS1, EMS2: ευρήματα παρούσας μελέτης (πορτοκαλί), *Stichococcus* sp.(1) (Karapatsia et al., 2016) (κίτρινο), *Stichococcus* sp.(2): (Mutaf et al., 2019) (πράσινο), *Stichococcus* sp.(3): (Gargano et al., 2016) (γκρι).

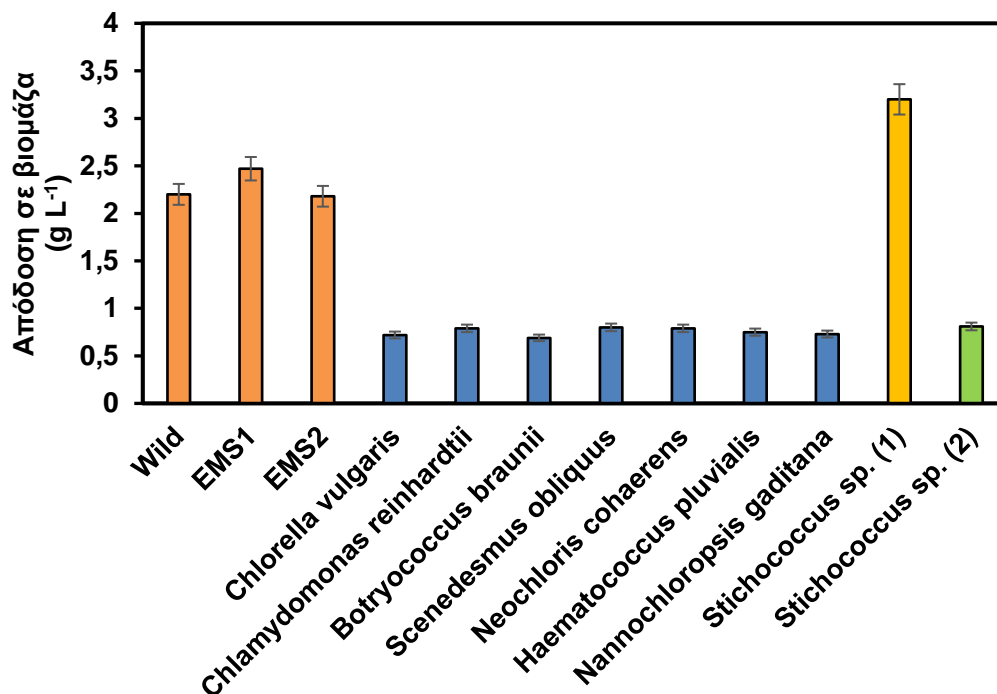
Το σύμπλεγμα χρωστικών των καλλιεργειών περιλαμβάνει καροτενοειδή και χλωροφύλλες a και b. Ανάλογα με τον τύπο της μικροκαλλιέργειας και τη σύνθεση του θρεπτικού μέσου, η ποσοτική περιεκτικότητα του συμπλέγματος χρωστικής μπορεί να ποικίλλει. Το κύριο μέρος των χρωστικών των μικροφυκών (*Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus obliquus*, *Neochloris cohaerens*, *Haematococcus pluvialis* και *Nannochloropsis gaditana*) είναι η χλωροφύλλη. Διαπιστώθηκε (D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016, Koller et al., 2014, Mulders et al., 2013) ότι στα μικροφύκη *Botryococcus braunii*, *Neochloris cohaerens*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nannochloropsis gaditana* και *Chlorella vulgaris*, η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη a υπερβαίνει την ποσοτική περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη b. Επομένως το μικροφύκη *Botryococcus braunii* έχει βρεθεί να περιέχει $6,58 \pm 0,19 \text{ mg g}^{-1}$ και $2,17 \pm 0,07 \text{ mg g}^{-1}$ χλωροφύλλη a και b, αντίστοιχα. Τα κύτταρα μικροφυκών του *Neochloris cohaerens* περιέχουν 3,9 φορές λιγότερη χλωροφύλλη b ($6,13 \pm 0,18 \text{ mg g}^{-1}$ και $1,57 \pm 0,05 \text{ mg g}^{-1}$). Οι καλλιέργειες του γένους *Chlamydomonas reinhardtii* χαρακτηρίζονται από περιεκτικότητα $2,53 \pm 0,07 \text{ mg g}^{-1}$ και $1,72 \pm 0,04 \text{ mg g}^{-1}$ χλωροφύλλης a και b, αντίστοιχα. Συγκριτικά με τη βιβλιογραφία το μεταλλαγμένο στέλεχος EMS 1 παρουσίασε μειωμένες τιμές περιεχόμενης συνολικής χλωροφύλλης σε σχέση με αυτές που βρέθηκαν στα μικροφύκη της βιβλιογραφίας (Σχήμα 4.2).



Σχήμα 4.2: Σύγκριση της περιεκτικότητας συνολικής χλωροφύλλης σε διάφορα στελέχη μικροφυκών (D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016; Koller et al., 2014; Mulders et al., 2013). Wild, EMS1, EMS2: ευρήματα παρούσας μελέτης (πορτοκαλί).

Το επίπεδο συσσώρευσης βιομάζας και η παραγωγικότητα των βιολογικά δραστικών ουσιών είναι ένας σημαντικός δείκτης της αποτελεσματικότητας του στελέχους των μικροφυκών. Αυτές οι παράμετροι επηρεάζονται από πολλές συνθήκες, όπως η σύσταση του μέσου καλλιέργειας, η θερμοκρασία, το pH, η φάση ανάπτυξης, η μέθοδος συγκομιδής και ο φωτισμός. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία σημαντική συσσώρευση βιομάζας παρατηρείται μέχρι την 14^η ημέρα της καλλιέργειας των περισσότερων μικροφυκών που μελετήθηκαν όπως *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus obliquus*, *Neochloris cohaerens*, *Haematococcus pluvialis* και *Nannochloropsis gaditana* (Dolganyuk et al., 2020, Qiu et al., 2017, Villarruel-López et al., 2017). Συγκριτικά με τη βιβλιογραφία την 14^η ημέρα ανάπτυξης, το EMS1 σημειώνει τις υψηλότερες τιμές βιομάζας, σε σχέση με αυτές των μικροφυκών που μελετήθηκαν (Σχήμα 4.3).

Σχήμα 4.3: Σύγκριση της απόδοσης σε βιομάζα σε διάφορα στελέχη μικροφυκών τη 14^η ημέρα ανάπτυξης (Dolganyuk et al., 2020; Qiu et al., 2017; Villarruel-López et al., 2017). Wild, EMS1, EMS2: ευρήματα παρούσας μελέτης (πορτοκαλί), *Stichococcus* sp. (1) (Karapatsia et al., 2016) (κίτρινο), *Stichococcus* sp. (2): (Mutaf et al., 2019) (πράσινο).



Η εισαγωγή νέων ειδών θα τονίσει την τεχνική σκοπιμότητα των βιοκαυσίμων που βασίζονται σε μικροφύκη για εμπορικές εφαρμογές. Ο *Stichococcus* sp. θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως ένα πιθανό μέσο κυττάρων για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Η εργασία των Mutaf et al. (2019) αναφέρει την επίδραση του μέσου καλλιέργειας και του μήκους κύματος φωτός στην παραγωγή βιομάζας και λιπαρών οξέων του *Stichococcus bacillaris* που έχει ορισμένα πλεονεκτήματα όπως σύντομο κύκλο ζωής, εύκολη καλλιέργεια, υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια, ποικιλία λιπαρών οξέων και σταθερότητα υπό σκληρές περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέγιστη παραγωγικότητα βιομάζας και λιπιδίων επιτεύχθηκε στο μέσο TAP (τρεις οξικό φωσφορικό) ως 81 mg L⁻¹·ημέρα, 19,44 mg L⁻¹·την ημέρα, αντίστοιχα. Το μήκος κύματος του φωτός δεν άλλαξε σημαντικά την κινητική ανάπτυξης, αλλά έπαιξε κρίσιμο ρόλο στη συσσώρευση χλωροφύλλης. Τα C14:0, C16:0 και C18:0 λιπαρά οξέα ήταν άφθονα τα οποία είναι κατάλληλα για μετατροπή βιοντίζελ. Είναι ενδιαφέρον ότι το μπλε και το κόκκινο φως αύξησαν την περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα μεγαλύτερης αλυσίδας. Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το *Stichococcus bacillaris* έχει δυνατότητες για περαιτέρω ανάπτυξη για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Συγκριτικά, τα αποτελέσματα έδειξαν παρόμοια επίπεδα λιπιδίων αλλά μικρότερη συγκέντρωση βιομάζας σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές για τα στελέχη EMS1 και EMS2 της παρούσας μελέτης.

Άλλοι συγγραφείς Karapatsia et al. (2016) χρησιμοποίησαν ένα σχεδιασμό πειραμάτων Taguchi για τη συστηματική διερεύνηση της επίδρασης πέντε επιλεγμένων μεταβλητών εισόδου της διαδικασίας (δηλαδή, ροή φωτισμού, ρυθμός αερισμού, ρυθμός παροχής CO₂, συγκέντρωση NaNO₃ - πηγή αζώτου - συγκέντρωση και αλατότητα) στο προφίλ καλλιέργειας του *Stichococcus* sp. για τη χρήση του σε μία μονάδα βιοδιυλιστηρίου για την παραγωγή βιοκαυσίμου. Οι μεταβλητές απόκρισης της διαδικασίας ήταν οι συγκεντρώσεις βιομάζας, υδατανθράκων,

πρωτεϊνών, λιπιδίων και συνολικών προϊόντων. Μέσω μιας μελέτης ανάλυσης ευαισθησίας, βρέθηκε ότι ο αερισμός έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στην ανάπτυξη της βιομάζας και στη συσσώρευση υδατανθράκων. Από την άλλη πλευρά, η παραγωγή πρωτεϊνών και ολικών προϊόντων επηρεάστηκε σημαντικά από τη συγκέντρωση NaNO_3 , ενώ η συσσώρευση λιπιδίων πυροδοτήθηκε κυρίως από το ρυθμό παροχής CO_2 . Από τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων, αναπτύχθηκε ένα μοντέλο παλινδρόμησης, το οποίο συσχετίζει τις συγκεντρώσεις βιομάζας και βιοχημικών με τις μεταβλητές εισόδου της διεργασίας. Τρεις μεμονωμένες πολιτικές λειτουργίας προσομοιώθηκαν και επαληθεύτηκαν πειραματικά, μεγιστοποιώντας τις συγκεντρώσεις είτε βιομάζας-υδατανθράκων, είτε πρωτεϊνών-συνολικών προϊόντων ή λιπιδίων. Η δεύτερη πολιτική λειτουργίας που ακολούθησαν οι συγγραφείς συνάδει περισσότερο με τη λειτουργία μιας πιθανής μονάδας βιοδιυλιστηρίου. Στο πλαίσιο αυτής της στρατηγικής, η καλλιέργεια του *Stichococcus* sp. οδήγησε σε συγκεντρώσεις βιομάζας και συνολικών προϊόντων ίσες με 3,20 και 2,51 g L⁻¹, αντίστοιχα. Τα κλάσματα μάζας αυτών των βιοχημικών σε σχέση με την ξηρή βιομάζα ήταν: υδατάνθρακες 40,63%, πρωτεΐνες 26,25% και λιπίδια 11,56%. Το επίπεδο της βιομάζας της καλλιέργειας με τις συγκεκριμένες συνθήκες που επέλεξαν οι συγγραφείς ήταν κατά 23% υψηλότερο σε σχέση με αυτό της καλλιέργειας του στελέχους EMS1. Ωστόσο, η περιεκτικότητα αυτής της καλλιέργειας μικροφυκών σε λιπίδια ήταν παρόμοια με αυτή για το στέλεχος Wild και κατά 50% μικρότερη από την αντίστοιχη για το στέλεχος EMS1.

Ο χαρακτηρισμός και η βελτιστοποίηση των συνδυασμένων βημάτων έχουν διερευνηθεί και από τους ερευνητές (Gargano et al., 2016) σε στέλεχος *Stichococcus bacillaris*, εστιάζοντας στον τύπο και τη συγκέντρωση καταλύτη, το χρόνο και τη θερμοκρασία αντίδρασης, την αναλογία μεθανόλης/βιομάζας, το χρόνο προανάμιξης και την περιεκτικότητα σε νερό στη βιομάζα. Η απόδοση βιοκαυσίμου έχει αναφερθεί ως παραγωγή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAMEs). Η μέγιστη απόδοση (~17%) επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας αποξηραμένη βιομάζα με αλκαλικό καταλύτη στους 60 °C και αναλογία βάρους μεθανόλης/βιομάζας 79:1. Οι συνθήκες αλκαλικού καταλύτη έδωσαν ταχύτερους ρυθμούς αντίδρασης και υψηλότερες αποδόσεις βιοκαυσίμου από τον όξινο καταλύτη. Η απόδοση επηρεάστηκε επίσης έντονα από την περιεκτικότητα σε νερό στη βιομάζα. Το βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο άμεσης μετεστεροποίησης για τα στέλεχη *Stichococcus bacillaris* δοκιμάστηκε σε άλλα στέλεχη *Stichococcus* και σε αρκετά άλλα είδη Chlorophyta που χαρακτηρίζονται από διαφορετική δομή κυτταρικού τοιχώματος. Αποδείχθηκε ξεκάθαρα ότι διαφορετικά αποτελέσματα για την απόδοση βιοκαυσίμου λήφθηκαν στο ίδιο είδος μικροφυκών και πολύ περισσότερα σε διαφορετικά γένη μικροφυκών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Από τα στελέχη *Stichococcus* sp. (άγριο και μεταλλαγμένα) που καλλιεργήθηκαν, εξετάστηκαν αυτά που έχουν χαμηλότερο περιεχόμενο σε χλωροφύλλη και υψηλότερη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων, σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν για 3 γενεές. Έπειτα, με κριτήριο την χρωματική απόχρωση (πιο ανοιχτό πράσινο), επιλέχθηκαν 2 στελέχη, τα EMS1 και EMS2 και έγινε σύγκριση τους με το Wild *Stichococcus* sp.

Όσον αφορά τη χλωροφύλλη, το μεταλλαγμένο στέλεχος EMS1 παρουσίασε τη χαμηλότερη συγκέντρωση, σε σχέση με τα Wild και EMS2. Η καλλιέργεια του EMS1 έχει πιο ανοιχτό πράσινο χρώμα, γεγονός που επιτρέπει τη μεγαλύτερη διέλευση φωτός στο εσωτερικό της καλλιέργειας. Επίσης, και τα 2 μεταλλαγμένα στελέχη έχουν την τάση να καθιζάνουν και να προσκολλώνται στον πυθμένα, αυξάνοντας τη διαύγεια του υγρού καλλιέργειας. Αντίθετα, στο Wild υπάρχουν περισσότερα αιωρούμενα κύτταρα, με αποτέλεσμα κατά τη συγκομιδή να αφαιρείται μεγάλο μέρος του πληθυσμού με το υγρό της καλλιέργειας. Στόχος είναι να προσκολλώνται στον πυθμένα όσο το δυνατό, περισσότερα κύτταρα, για να υπάρχει μεγάλος βαθμός ανάκτησης βιομάζας κατά τη συγκομιδή από συστήματα ακινητοποιημένων καλλιεργειών. Η βιομάζα και τα λιπίδια του EMS1 είναι υψηλότερα των Wild και EMS2, με τη βιομάζα να αυξάνεται σε συντομότερο χρονικό διάστημα. Επομένως, έχει μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης και μπορεί να γίνει πιο γρήγορα ανάκτηση της τελικής παραγόμενης βιομάζας για την περαιτέρω αξιοποίηση της.

Γενικότερα από την παρούσα μελέτη επιβεβαιώνεται ότι το *Stichococcus* sp. είναι κατάλληλο για επίπεδους φωτο-βιοαντιδραστήρες λόγω της τάσης του να προσκολλάται σε επίπεδες επιφάνειες, καθιστώντας έτσι ευκολότερη την εξαγωγή και την αξιοποίηση των μεταβολιτών του όπως τα λιπίδια.

Το μεταλλαγμένο στέλεχος EMS1 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε φωτο-βιοαντιδραστήρες μεγαλύτερης κλίμακας για να αυξηθεί η παραγωγικότητα σε βιομάζα και στα λιπίδια. Μία επιπλέον πρόταση είναι η βελτιστοποίηση της καλλιέργειας του στελέχους για την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών ανάπτυξης. Λόγω της μεγάλης ποικιλίας μικροφυκών, της υψηλής μεταβολικής ευελιξίας και των διαφόρων συνθηκών καλλιέργειας, το πραγματικό δυναμικό τους δεν έχει ακόμη αξιολογηθεί πλήρως. Γενικότερα, κάποιες πιθανές προτάσεις για περαιτέρω έρευνα από τους ερευνητές που εργάζονται με μικροφύκη είναι τα παρακάτω:

- Βελτίωση των φωτο-βιοαντιδραστήρων
- Βελτίωση της παραγωγικότητας του στελέχους (μέθοδοι επιλογής και γενετικής μηχανικής)
- Αναζήτηση για στελέχη με νέες ιδιότητες
- Μελέτη της επίδρασης των συνθηκών καλλιέργειας στην περιεκτικότητα σε βιολογικά δραστικές ουσίες στα κύτταρα
- Βελτιστοποίηση των διαδικασιών καλλιέργειας (χαμηλότερο κόστος και αυξημένη απόδοση προϊόντος)
- Πράσινη παραγωγή (εισαγωγή κλειστών κύκλων παραγωγής, μείωση των αποβλήτων, πιο ολοκληρωμένη χρήση χρήσιμων εξαρτημάτων)

-Εκτίμηση των περιβαλλοντικών, οικονομικών και ιατρικών κινδύνων από την κλιμάκωση της παραγωγής

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahn, B., Park, S. E., Oh, B. K., & Kim, Y. K. (2018). Effect of nanoparticle on cellular growth and lipid production in *Chlorella vulgaris* culture. *Biotechnology Progress*, 34(4), 929–933.
- AL-SAEDI, R. K. M., NAJEM, A. M., & ABED, I. J. (2019). Impact of the Chemical Mutagenesis on Biomass and Productivity of some Micro Green Algae. *The Eurasia Proceedings of Science Technology Engineering and Mathematics*, 6, 88–95.
- Andreeva, A., Budenkova, E., Babich, O., Sukhikh, S., Dolganyuk, V., Michaud, P., & Ivanova, S. (2021). Influence of Carbohydrate Additives on the Growth Rate of Microalgae Biomass with an Increased Carbohydrate Content. *Marine Drugs*, 19(7), 381. <https://doi.org/10.3390/md19070381>
- Arisha, M. H., Shah, S. N. M., Gong, Z.-H., Jing, H., Li, C., & Zhang, H.-X. (2015). Ethyl methane sulfonate induced mutations in M2 generation and physiological variations in M1 generation of peppers (*Capsicum annuum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00399>
- Babich, O., Sukhikh, S., Larina, V., Kalashnikova, O., Kashirskikh, E., Prosekov, A., Noskova, S., Ivanova, S., Fendri, I., Smaoui, S., Abdelkafi, S., Michaud, P., & Dolganyuk, V. (2022). Algae: Study of Edible and Biologically Active Fractions, Their Properties and Applications. *Plants*, 11(6), 780. <https://doi.org/10.3390/plants11060780>
- Beacham, T. A., Sweet, J. B., & Allen, M. J. (2017). Large scale cultivation of genetically modified microalgae: A new era for environmental risk assessment. *Algal Research*, 25, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.028>
- Berg, A. H., Combs, T. P., & Scherer, P. E. (2002). ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13(2), 84–89.
- Bhattacharjee, M. (2016). PHARMACEUTICALLY VALUABLE BIOACTIVE COMPOUNDS OF ALGAE. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(6), 43. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9i6.14507>
- Bišová, K., & Zachleder, V. (2014). Cell-cycle regulation in green algae dividing by multiple fission. *Journal of Experimental Botany*, 65(10), 2585–2602.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Brodie, J., Ball, S. G., Bouget, F., Chan, C. X., De Clerck, O., Cock, J. M., Gachon, C., Grossman, A. R., Mock, T., Raven, J. A., Saha, M., Smith, A. G., Vardi, A., Yoon, H. S., & Bhattacharya, D. (2017). Biotic interactions as drivers of algal origin and evolution. *New Phytologist*, 216(3), 670–681. <https://doi.org/10.1111/nph.14760>
- Cardozo, K. H., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., & Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and*

Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 146(1–2), 60–78.

- Carvalho, A. P., Meireles, L. A., & Malcata, F. X. (2006). Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. *Biotechnology Progress*, 22(6), 1490–1506. <https://doi.org/10.1021/bp060065r>
- Ceron, G. M., Camacho, F. G., Mirón, A. S., Sevilla, J. M., Chisti, Y., & Grima, E. M. (2006). Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(5), 689–694.
- Chaturvedi, R., & Fujita, Y. (2006). Isolation of enhanced eicosapentaenoic acid producing mutants of *Nannochloropsis oculata* ST-6 using ethyl methane sulfonate induced mutagenesis techniques and their characterization at mRNA transcript level. *Phycological Research*, 54(3), 208–219. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2006.00428.x>
- Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A., & Das, K. (2009). Biomass Production Potential of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(2), 518–532. <https://doi.org/10.3390/ijms10020518>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306.
- Chiu, S.-Y., Tsai, M.-T., Kao, C.-Y., Ong, S.-C., & Lin, C.-S. (2009). The air-lift photobioreactors with flow patterning for high-density cultures of microalgae and carbon dioxide removal. *Engineering in Life Sciences*, 9(3), 254–260. <https://doi.org/10.1002/elsc.200800113>
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (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. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006>
- Cordeiro, R., & et al. (2017). Effects of nutritional conditions on lipid production by cyanobacteria. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 89, 2021–2031.
- Cruz, Y. R., Aranda, D. A., Seidl, P. R., Diaz, G. C., Carliz, R. G., Fortes, M. M., & de Paula, R. C. (2018). Cultivation systems of microalgae for the production of biofuels. *Biofuels-State of Development*, 199–218.
- D'Alessandro, E. B., & Antoniosi Filho, N. R. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 832–841. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162>
- Danesi, E. D. G., Rangel-Yagui, C. O., Carvalho, J. C. M., & Sato, S. (2004). Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 26(4), 329–335. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(03\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(03)00127-2)
- Demirbas, A., & Demirbas, M. F. (2011). Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, 52(1), 163–170.

- Demirel, Z., Yilmaz, F. F., Ozdemir, G., & Conk Dalay, M. (2018). No Title. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(10). https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18_10_06
- Doan, T. T. Y., & Obbard, J. P. (2012). Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting. *Algal Research*, 1(1), 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.03.001>
- Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., Patyukov, N., & Sukhikh, S. (2020). Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules*, 10(8), 1153. <https://doi.org/10.3390/biom10081153>
- Durham, B. P., Sharma, S., Luo, H., Smith, C. B., Amin, S. A., Bender, S. J., Dearth, S. P., Van Mooy, B. A. S., Campagna, S. R., Kujawinski, E. B., Armbrust, E. V., & Moran, M. A. (2015). Cryptic carbon and sulfur cycling between surface ocean plankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2), 453–457. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413137112>
- Eizadora, T. Y., Zendejas, F. J., Lane, P. D., Gaucher, S., Simmons, B. A., & Lane, T. W. (2009). Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum* (Baccilariophyceae) during starvation. *Journal of Applied Phycology*, 21(9), 669–681.
- Feng, P., Deng, Z., Hu, Z., & Fan, L. (2011). Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors. *Bioresource Technology*, 102(22), 10577–10584. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.109>
- Ferreira, V. S., Pinto, R. F., & Sant'Anna, C. (2016). Low light intensity and nitrogen starvation modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus*. *Journal of Applied Microbiology*, 120(3), 661–670. <https://doi.org/10.1111/jam.13007>
- Gargano, I., Marotta, R., Andreozzi, R., Olivieri, G., Marzocchella, A., Spasiano, D., Pinto, G., & Pollio, A. (2016). Alkaline direct transesterification of different species of *Stichococcus* for bio-oil production. *New Biotechnology*, 33(6), 797–806. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.07.012>
- Grama, S. B., Liu, Z., & Li, J. (2022). Emerging Trends in Genetic Engineering of Microalgae for Commercial Applications. *Marine Drugs*, 20(5), 285. <https://doi.org/10.3390/md20050285>
- Guzzon, A., Bohn, A., Diociaiuti, M., & Albertano, P. (2008). Cultured phototrophic biofilms for phosphorus removal in wastewater treatment. *Water Research*, 42(16), 4357–4367. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.07.029>
- Helliwell, K. E., Lawrence, A. D., Holzer, A., Kudahl, U. J., Sasso, S., Kräutler, B., Scanlan, D. J., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2016). Cyanobacteria and Eukaryotic Algae Use Different Chemical Variants of Vitamin B12. *Current Biology*, 26(8), 999–1008. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.041>
- Hermans, K., & Slager, B. (2011). *U.S. Patent Application No. 12/933,222*.
- Hodač, L., Hallmann, C., Spitzer, K., Elster, J., Faßhauer, F., Brinkmann, N., Lepka, D., Diwan, V., & Friedl, T. (2016). Widespread green algae *Chlorella* and *Stichococcus* exhibit polar-

- temperate and tropical-temperate biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8), fiw122. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw122>
- Ito, T., Tanaka, M., Shinkawa, H., Nakada, T., Ano, Y., Kurano, N., & Tomita, M. (2013). Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxiphycean alga in nitrogen-deficient conditions. *Metabolomics*, 9(1), 178–187.
- James, G. O., Hocart, C. H., Hillier, W., Price, G. D., & Djordjevic, M. A. (2013). Temperature modulation of fatty acid profiles for biofuel production in nitrogen deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology*, 127, 441–447.
- Jeon, H. S., Park, S. E., Ahn, B., & Kim, Y. K. (2017). Enhancement of biodiesel production in *Chlorella vulgaris* cultivation using silica nanoparticles. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 22(2), 136–141.
- Jerney, J., & Spilling, K. (2018). Large scale cultivation of microalgae: open and closed systems. Totowa, New Jersey: Humana Press. In *Methods in molecular biology*.
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E. A., Embiruçu, M., & Ghirardi, M. L. (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, 101(4), 1406–1413.
- Jorquera, Orlando, Kiperstok, A., Sales, E. A., Embiruçu, M., & Ghirardi, M. L. (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, 101(4), 1406–1413. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.038>
- Josephine, A., Niveditha, C., Radhika, A., Shali, A. B., Kumar, T. S., Dharani, G., & Kirubakaran, R. (2015). Analytical evaluation of different carbon sources and growth stimulators on the biomass and lipid production of *Chlorella vulgaris* – Implications for biofuels. *Biomass and Bioenergy*, 75, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.016>
- Karapatsia, A., Penloglou, G., Chatzidoukas, C., & Kiparissides, C. (2016). An experimental investigation of *Stichococcus* sp. cultivation conditions for optimal co-production of carbohydrates, proteins and lipids following a biorefinery concept. *Biomass and Bioenergy*, 89, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.01.009>
- Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 6, 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>
- Kumar, A., Ergas, S., Yuan, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewulf, J., & Van Langenhove, H. (2010). Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*, 28(7), 371–380.
- Lee, X. J., Ong, H. C., Gan, Y. Y., Chen, W.-H., & Mahlia, T. M. I. (2020). State of art review on conventional and advanced pyrolysis of macroalgae and microalgae for biochar, bio-oil and bio-syngas production. *Energy Conversion and Management*, 210, 112707. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.112707>
- Lehr, F., & Posten, C. (2009). Closed photo-bioreactors as tools for biofuel production. *Current*

- Opinion in Biotechnology*, 20(3), 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.04.004>
- Li, Y., Han, D., Hu, G., Dauvillee, D., Sommerfeld, M., Ball, S., & Hu, Q. (2010). Chlamydomonas starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. *Metabolic Engineering*, 12(4), 387–391.
- Li, Y., Han, D., Hu, G., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2010). Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in Chlamydomonas reinhardtii. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(2), 258–268.
- Li, Yuqin, Mu, J., Chen, D., Han, F., Xu, H., Kong, F., Xie, F., & Feng, B. (2013). Production of biomass and lipid by the microalgae Chlorella protothecoides with heterotrophic-Cu(II) stressed (HCuS) coupling cultivation. *Bioresource Technology*, 148, 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.153>
- Liang, M. H., & Jiang, J. G. (2013). Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 395–408.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). *Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes* (pp. 350–382). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Liu, Z.-Y., Wang, G.-C., & Zhou, B.-C. (2008). Effect of iron on growth and lipid accumulation in Chlorella vulgaris. *Bioresource Technology*, 99(11), 4717–4722. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.073>
- Loubière, K., Olivo, E., Bougaran, G., Pruvost, J., Robert, R., & Legrand, J. (2009). A new photobioreactor for continuous microalgal production in hatcheries based on external-loop airlift and swirling flow. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 132–147.
- Makaroglou, G., Syranidou, E., Pantelidaki, K., Kalogerakis, N., & Gikas, P. (2019). Chemical mutation of Stichococcus sp. for the selection of strains with reduced chlorophyll content. *2nd International Conference ADAPTtoCLIMATE, Heraklion, Greece, 24-25 June*.
- Markou, G. (2014). Effect of various colors of light-emitting diodes (LEDs) on the biomass composition of Arthrospira platensis cultivated in semi-continuous mode. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 2758–2768.
- Mata, T. M., Almeida, R., & Caetano, N. S. (2013). Effect of the culture nutrients on the biomass and lipid productivities of microalgae Dunaliella tertiolecta. *Chemical Engineering*, 32, 973.
- Mata, Teresa M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Matos, J., Cardoso, C., Bandarra, N. M., & Afonso, C. (2017). Microalgae as healthy ingredients for functional food: a review. *Food & Function*, 8(8), 2672–2685. <https://doi.org/10.1039/C7FO00409E>
- Menegol, T., Diprat, A. B., Rodrigues, E., & Rech, R. (2017). Effect of temperature and nitrogen concentration on biomass composition of Heterochlorella luteoviridis. *Food Science and*

Technology, 37, 28–37.

- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J.-W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, 155, 330–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.077>
- Mulders, K. J. M., Weesepeel, Y., Lamers, P. P., Vincken, J.-P., Martens, D. E., & Wijffels, R. H. (2013). Growth and pigment accumulation in nutrient-depleted *Isochrysis aff. galbana* T-ISO. *Journal of Applied Phycology*, 25(5), 1421–1430. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9954-6>
- Mutaf, T., Oz, Y., Kose, A., Elibol, M., & Oncel, S. S. (2019). The effect of medium and light wavelength towards *Stichococcus bacillaris* fatty acid production and composition. *Bioresource Technology*, 289, 121732. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121732>
- Nigam, P. S., & Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>
- Nikolaou, A., Booth, P., Gordon, F., Yang, J., Matar, O., & Chachuat, B. (2016). Multi-Physics Modeling of Light-Limited Microalgae Growth in Raceway Ponds. *IFAC-PapersOnLine*, 49(26), 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2016.12.147>
- Norsker, N.-H., Barbosa, M. J., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2011). Microalgal production — A close look at the economics. *Biotechnology Advances*, 29(1), 24–27. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.005>
- Not, F., Latasa, M., Marie, D., Cariou, T., Vaulot, D., & Simon, N. (2004). A Single Species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), Dominates the Eukaryotic Picoplankton in the Western English Channel. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4064–4072. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4064-4072.2004>
- Ortiz Montoya, E. Y., Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Perego, P., Converti, A., & de Carvalho, J. C. M. (2014). Production of *Chlorella vulgaris* as a source of essential fatty acids in a tubular photobioreactor continuously fed with air enriched with CO₂ at different concentrations. *Biotechnology Progress*, 30(4), 916–922. <https://doi.org/10.1002/btpr.1885>
- Osman, S. M., Chuah, T. S., Loh, S. H., San Cha, T., & Ahmad, A. (2018). Light-color-induced changes in fatty acid biosynthesis in *Chlorella* sp. strain Ks-ma2 in early stationary growth phase. *BIOTROPICA-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology*, 25(1), 33–42.
- Pandit, P. R., Fulekar, M. H., & Karuna, M. S. L. (2017). Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(15), 13437–13451.
- Patil, V., Tran, K.-Q., & Giselsrød, H. R. (2008). Towards Sustainable Production of Biofuels from Microalgae. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(7), 1188–1195. <https://doi.org/10.3390/ijms9071188>
- Přibyl, P., Cepák, V., & Zachleder, V. (2012). Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and

- Parachlorella, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(2), 549–561.
- PRÖSCHOLD, T., & DARIENKO, T. (2020). The green puzzle *Stichococcus* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta): New generic and species concept among this widely distributed genus. *Phytotaxa*, 441(2), 113–142. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.441.2.2>
- Psachoulia, P., & Chatzidoukas, C. (2021). Illumination Policies for *Stichococcus* sp. Cultures in an Optimally Operating Lab-Scale PBR toward the Directed Photosynthetic Production of Desired Products. *Sustainability*, 13(5), 2489. <https://doi.org/10.3390/su13052489>
- Qin, L., Alam, M., & Wang, Z. (2019). Open pond culture systems and photobioreactors for microalgal biofuel production. Berlin: Springer. In *Microalgae biotechnology for development of biofuel and wastewater treatment*. (pp. 45–75).
- Qiu, H., Price, D. C., Weber, A. P. M., Facchinelli, F., Yoon, H. S., & Bhattacharya, D. (2013). Assessing the bacterial contribution to the plastid proteome. *Trends in Plant Science*, 18(12), 680–687. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.09.007>
- Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A., & Ogden, K. L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 28, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.004>
- Rai, M. P., Gautam, T., & Sharma, N. (2015). Effect of salinity, pH, light intensity on growth and lipid production of microalgae for bioenergy application. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 15(4), 260.
- Ramaraj, S., Hemaiswarya, S., Raja, R., Ganesan, V., Anbazhagan, C., Carvalho, I. S., & Juntawong, N. (2015). Microalgae as an Attractive Source for Biofuel Production. In *Environmental Sustainability* (pp. 129–157). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2056-5_8
- Richmond, A., Cheng-Wu, Z., & Zarmi, Y. (2003). Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell-growth inhibition. *Biomolecular Engineering*, 20(4–6), 229–236. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00060-1)
- Ryan, C. (2009). *Cultivation Clean Energy: The Promise of Algae Biofuels*, Hartley, A., Ed., Terrapin, Bright Green.
- Saber, A. A., El-Refaey, A. A., Saber, H., Singh, P., van Vuuren, S. J., & Cantonati, M. (2022). Cyanoprokaryotes and algae: classification and habitats. In *Handbook of Algal Biofuels* (pp. 1–38). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823764-9.00024-8>
- Salama, E.-S., Kim, H.-C., Abou-Shanab, R. A. I., Ji, M.-K., Oh, Y.-K., Kim, S.-H., & Jeon, B.-H. (2013). Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(6), 827–833. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0919-1>
- Sarat Chandra, T., Aditi, S., Maneesh Kumar, M., Mukherji, S., Modak, J., Chauhan, V. S.,

- Sarada, R., & Mudliar, S. N. (2017). Growth and biochemical characteristics of an indigenous freshwater microalga, *Scenedesmus obtusus*, cultivated in an airlift photobioreactor: effect of reactor hydrodynamics, light intensity, and photoperiod. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(7), 1057–1068. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1768-0>
- Sato, A., Matsumura, R., Hoshino, N., Tsuzuki, M., & Sato, N. (2014). Responsibility of regulatory gene expression and repressed protein synthesis for triacylglycerol accumulation on sulfur-starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Frontiers in Plant Science*, 5, 444.
- Scharff, C., Domurath, N., Wensch-Dorendorf, M., & Schröder, F.-G. (2017). Effect of different photoperiods on the biochemical profile of the green algae *C. vulgaris* and *S. obliquus*. *Acta Horticulturae*, 1170, 1149–1156. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1170.148>
- Schüler, L., Greque de Moraes, E., Trovão, M., Machado, A., Carvalho, B., Carneiro, M., Maia, I., Soares, M., Duarte, P., Barros, A., Pereira, H., Silva, J., & Varela, J. (2020). Isolation and Characterization of Novel *Chlorella Vulgaris* Mutants With Low Chlorophyll and Improved Protein Contents for Food Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00469>
- Ścieszka, S., & Klewicka, E. (2019). Algae in food: a general review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(21), 3538–3547. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1496319>
- Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J., & Smith, A. G. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3), 277–286.
- Scragg, A. ., Illman, A. ., Carden, A., & Shales, S. . (2002). Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy*, 23(1), 67–73. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00028-4)
- Seyedsayamdost, M. R., Case, R. J., Kolter, R., & Clardy, J. (2011). The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nature Chemistry*, 3(4), 331–335. <https://doi.org/10.1038/nchem.1002>
- Shin, W.-S., Lee, B., Jeong, B., Chang, Y. K., & Kwon, J.-H. (2016). Truncated light-harvesting chlorophyll antenna size in *Chlorella vulgaris* improves biomass productivity. *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3193–3202. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0874-8>
- Sprague, M., Betancor, M. B., & Tocher, D. R. (2017). Microbial and genetically engineered oils as replacements for fish oil in aquaculture feeds. *Biotechnology Letters*, 39(11), 1599–1609. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2402-6>
- Srivastava, G., & Goud, V. V. (2017). Salinity induced lipid production in microalgae and cluster analysis (ICCB 16-BR_047). *Bioresource Technology*, 242, 244–252.
- Sudhakar, K., Mamat, R., Samykano, M., Azmi, W. H., Ishak, W. F. W., & Yusaf, T. (2018). An overview of marine macroalgae as bioresource. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 165–179. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.100>
- Takagi, M., & Yoshida, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids

- and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(3), 223–226.
- Takeshita, T., Ota, S., Yamazaki, T., Hirata, A., Zachleder, V., & Kawano, S. (2014). Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions. *Bioresource Technology*, 158, 127–134.
- Tanna, B., & Mishra, A. (2018). Metabolites Unravel Nutraceutical Potential of Edible Seaweeds: An Emerging Source of Functional Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(6), 1613–1624. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12396>
- Thüs, H., Muggia, L., Pérez-Ortega, S., Favero-Longo, S. E., Joneson, S., O'Brien, H., Nelsen, M. P., Duque-Thüs, R., Grube, M., Friedl, T., Brodie, J., Andrew, C. J., Lücking, R., Lutzoni, F., & Gueidan, C. (2011). Revisiting photobiont diversity in the lichen family Verrucariaceae (Ascomycota). *European Journal of Phycology*, 46(4), 399–415. <https://doi.org/10.1080/09670262.2011.629788>
- Ugwu, C. U., & Aoyagi, H. (2012). Microalgal Culture Systems: An Insight into their Designs, Operation and Applications. *Biotechnology(Faisalabad)*, 11(3), 127–132. <https://doi.org/10.3923/biotech.2012.127.132>
- Villarruel-López, A., Ascencio, F., & Nuño, K. (2017). Microalgae, a Potential Natural Functional Food Source – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 67(4), 251–263. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2017-0017>
- Wei, L., Huang, X., & Huang, Z. (2015). Temperature effects on lipid properties of microalgae *Tetraselmis subcordiformis* and *Nannochloropsis oculata* as biofuel resources. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 33(1), 99–106.
- Widjaja, A., Chien, C.-C., & Ju, Y.-H. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40(1), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2008.07.007>