



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Υδατοκαλλιέργειες» -

«Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδρόβιων Οργανισμών»

ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ ΜΕ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ ΤΟΥ Τ.Ε.Ι. ΗΠΕΙΡΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**“Καλλιέργεια σε εσωτερικό χώρο του χλωροφύκου
Haematococcus pluvialis σε κυλινδρικό φωτοβιοαντιδραστήρα
για παραγωγή ασταξανθίνης”**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ

Χριστόφορος Βαβάσης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δρ. Ιωάννης Τζοβενής - Υπεύθυνος Καθηγητής

Δρ. Κώστας Περδικάρης

Δρ. Μάρκος Κολύγας

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2017



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

POSTGRADUATE STUDIES PROGRAM

“Aquaculture” – “Aquatic Animal Health”

**IN COLLABORATION WITH
THE DEPARTMENT OF [AGRICULTURAL TECHNOLOGY](#), TEI OF EPIRUS**

Thesis:

**“Indoor culture [of](#) *Haematococcus pluvialis* algae in tubular
photobioreactor for astaxanthin production”**

POSTGRADUATE STUDENT

Christopher Vavasis

ADVISOR COMMITTEE

Dr. Ioannis Tzovenis - Supervisor

Dr. Costas Perdikaris

Dr. Markos Kolygas

KARDITSA 2017

Αφιερώσεις

Η παρακολούθηση και ολοκλήρωση με επιτυχία ενός Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών στο οποίο τα μαθήματα γίνονται μακριά από τον τόπο διαμονής μου δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί αν δεν υπήρχε η αμέριστη συμπαράσταση από την Οικογένειά μου. Η εργασία αυτή είναι αφιερωμένη στη σύζυγό μου Δήμητρα και στα παιδιά μου Ειρήνη και Ουρανία που με βοήθησαν σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος καθώς επίσης και στη μητέρα μου Ειρήνη, η οποία πάντα με στηρίζει σε κάθε βήμα που πραγματοποιώ.

Περίληψη

Το χλωροφύκος του γλυκού νερού *Haematococcus pluvialis* Flotow 1844 είναι η πλουσιότερη πηγή φυσικής ασταξανθίνης. Η ασταξανθίνη (3,3'-διδυδροξυ-β,β-καροτενο-4,4-διόνη) είναι μια κόκκινη χρωστική που χρησιμοποιείται στις τροφές, στην υδατοκαλλιέργεια, στη βιομηχανία καλλυντικών και συμπληρωμάτων διατροφής και πρόσφατα στη φαρμακοβιομηχανία λόγω των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων που διαθέτει.

Σκοπός της εργασίας ήταν η καλλιέργεια του *H. pluvialis* σε κυλινδρικό φωτοβιοαντιδραστήρα στήλης πνευματικής ανάδευσης (bubble column photobioreactor) προκειμένου να διερευνηθεί:

α) αν το συγκεκριμένο στέλεχος του χλωροφύκου *H. pluvialis* (SAG 34-1n) μπορεί να αναπτυχθεί σε κυλινδρικό φωτοβιοαντιδραστήρα στήλης πνευματικής ανάδευσης χωρίς την ύπαρξη τεχνητού φωτισμού,

β) η ανάπτυξη του χλωροφύκου σε δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα και η σύγκριση του ρυθμού ανάπτυξης σε κάθε ένα από αυτά, και

γ) η συγκέντρωση των συνολικών καροτενοειδών και της ασταξανθίνης φασματοφωτομετρικά σε σχέση με τα δύο προηγούμενα θρεπτικά μέσα.

Για την πραγματοποίηση του πειράματος έγινε προμήθεια του στελέχους *H. pluvialis* (SAG 34-1n) από τη συλλογή μικροφυκών και πρωτοζώων του Πανεπιστημίου του Göttingen στη Γερμανία (Experimental Phycology and Culture Collection of Algae at the University of Goettingen-EPSAG). Κατασκευάστηκαν τέσσερις φωτοβιοαντιδραστήρες (PBR) στήλης πνευματικής ανάδευσης από διάφανο PVC, στους οποίους τελικά μετά από διαδοχικές αραιώσεις ο όγκος της καλλιέργειας έφθασε στα 7 L στον κάθε ένα. Στους δύο PBR, το χλωροφύκος αναπτύχθηκε στο θρεπτικό μέσο Bold's Basal Medium - triple Nitrate (BBM-3N) και στους άλλους δύο σε θρεπτικό μέσο το οποίο κατασκευάστηκε με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαφυλλικού λιπάσματος Nutrileaf 30-10-10 NPK σε απιονισμένο νερό. Για χρονικό διάστημα 38 ημερών ελέγχθηκε η ανάπτυξη του χλωροφύκου σε κάθε φωτοβιοαντιδραστήρα μετρώντας σε αιμοκυτταρόμετρο τον αριθμό των κυττάρων. Από τις μετρήσεις αυτές βρέθηκε ότι, στους δύο φωτοβιοαντιδραστήρες με το θρεπτικό μέσο BBM-3N η μέγιστη πυκνότητα της καλλιέργειας έφθασε τα $4,85 \times 10^5$ κύτταρα/ml. Στους άλλους δύο φωτοβιοαντιδραστήρες με το θρεπτικό μέσο Nutrileaf η μέγιστη πυκνότητα της καλλιέργειας έφθασε τα $2,77 \times 10^5$ κύτταρα/ml. Η μέση τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης του χλωροφύκου για τα δύο θρεπτικά μέσα BBM-3N και Nutrileaf, βρέθηκε $0,14 \text{ d}^{-1}$ και $0,05 \text{ d}^{-1}$ αντίστοιχα.

Στο τέλος της καλλιέργειας συλλέχθηκε ποσότητα κύστεων χλωροφύκους από τα τοιχώματα των δύο φωτοβιοαντιδραστήρων με το θρεπτικό μέσο BBM-3N και προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά η ποσότητα σε mg των συνολικών καροτενοειδών και της ασταξανθίνης ανά mg ξηρού βάρους του χλωροφύκους. Στους φωτοβιοαντιδραστήρες με το θρεπτικό μέσο Nutrileaf, ενώ αρχικά ξεκίνησε η διαδικασία της εγκύστωσης με την εμφάνιση πράσινων κοκκοειδών και ενδιάμεσων κυττάρων, δεν ολοκληρώθηκε με τη δημιουργία αιματοκύστεων για το χρονικό διάστημα του διήρκεσε το πείραμα. Η μέση περιεκτικότητα σε ολικά καροτενοειδή και ασταξανθίνη των δειγμάτων που εξετάστηκαν βρέθηκε 0,031 mg/mg και 0,027 mg/mg ξηρού βάρους αιματοκύστεων *H. pluvialis*, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ενθαρρυντικά για την περαιτέρω συνέχιση της έρευνας για το συγκεκριμένο στέλεχος του *H. pluvialis*.

Abstract

The freshwater Chlorophyte *Haematococcus pluvialis* Flotow 1844 is considered as the richest source of natural astaxanthine. Astaxanthine (3,3'- dihydroxy- β , β -carotene-4, 4-dione) is a red pigment used in food, supplements, aquaculture, cosmetics and recently in pharmaceuticals due to its antioxidant, anti-inflammatory and antitumor properties.

The present study aims to cultivate *H. pluvialis* in bubble column photobioreactors in order to:

- a) explore whether the strain *H. pluvialis* (SAG 34-1n) could grow in such a reactor under ambient light conditions.
- b) compare the two different culture media in terms of algal growth, and
- c) determine the carotenoids content and particularly astaxanthine in the produced biomass.

Four bubble column photobioreactors were assembled from crystal PVC with 7 L working volumes. As culture media Bold's Basal Medium - triple Nitrate (BBM-3N) and commercial fertiliser Nutrileaf 30-10-10 NPK were used in duplicate cultures of strain *H. pluvialis* (SAG 34-1n) (obtained from the Experimental Phycology and Culture Collection of Algae at the University of Goettingen-EPSAG). Growth was monitored for 38 days as cells/ml using haemocytometres.

BBM-3N gave best growth with maximum cell concentration of 4.85×10^5 cells/ml, while Nutrileaf gave a maximum concentration of 2.77×10^5 cells/ml. At the end of the cultivation period, algal cysts were collected for analysis. Cultures with Nutrileaf failed to produce cysts during the designated cultivation time. Analysis showed a total carotenoid content of 0.031 mg/mg per dry weight (dw), while astaxanthine was measured at 0.027 mg/mg dw in average.

Results seem promising for future commercialization of the *H. pluvialis* strain, after optimization of the cultivation process.

Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση μιας πειραματικής διαδικασίας μακριά από οργανωμένο εργαστήριο απαιτεί μεγαλύτερη προσπάθεια και σίγουρα βοήθεια από ανθρώπους σε διάφορα στάδια της διαδικασίας. Έτσι θα ήθελα να ευχαριστήσω τους παρακάτω οι οποίοι με βοήθησαν στην πραγματοποίηση του πειράματος:

Τον Υπεύθυνο Καθηγητή Δρ. Ιωάννη Τζοβενή χωρίς τη βοήθεια του οποίου δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η συγκεκριμένη εργασία.

*Την Ξανθή Χαντζηστρουόντισου η οποία ξεκίνησε την υγρή καλλιέργεια του χλωροφύκου *Haematococcus pluvialis* αλλά και όλους όσους βοήθησαν στο Εργαστήριο Οικολογίας και Συστηματικής του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών.*

Τον Αλέκο Βακουφτσή για την τεχνική βοήθεια στην κατασκευή των φωτοβιοαντιδραστήρων.

Περιεχόμενα

Αφιερώσεις.....	3
Περίληψη.....	4
Abstract	6
Ευχαριστίες.....	7
1. Εισαγωγή.....	13
Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας	16
2. <i>Haematococcus pluvialis</i>	17
2.1 Βιολογία κυττάρου και φυσιολογία.....	17
2.2 Κύκλος ζωής	19
2.3 Φυσιολογικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την διαδικασία της σύνθεσης της ασταξανθίνης.	23
2.3.1 Αλλαγές στα κυτταρικά συστατικά	23
2.3.2. Αλλαγές στις κυτταρικές δραστηριότητες.....	23
2.4 Οξειδωτική <u>καταπόνηση (stress)</u> και σύνθεση ασταξανθίνης	24
2.5 Χημική δομή καροτενοειδών-Ασταξανθίνη.	25
3. Κλειστά συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών Φωτοβιοαντιδραστήρες (PBRs)	30
3.1 Τύποι κλειστών φωτοβιοαντιδραστήρων (PBR).....	30
3.1.1. Φωτοβιοαντιδραστήρες κάθετης στήλης (Vertical column photobioreactors).30	
3.1.2 Επίπεδοι φωτοβιοαντιδραστήρες (Flat panel PBRs).....	31
3.1.3 Κυλινδρικοί σωληνοειδείς φωτοβιοαντιδραστήρες (Tubular Photo Bioreactors- TPBR).	32
3.1.4 Φωτοβιοαντιδραστήρες σε πλαστικές σακούλες (Plastic bag PBRs)	33
3.2 Σημαντικές παράμετροι στο σχεδιασμό PBR.	34
3.2.1 Απορρόφηση φωτός, κατανομή και χρησιμοποίηση.....	34
3.2.2 CO ₂ /O ₂ Ισορροπία και ανταλλαγές αερίων.....	36
3.2.3 Θερμοκρασία.....	36
3.2.4 pH.....	37
3.2.5 Μείξη, ανάδευση, κυκλοφορία.	37
3.2.6 Αποστείρωση και καθαριότητα.....	38
4. Υλικά και μέθοδοι.....	39
4.1 Υλικά	39
4.2 Αναλυτικές μέθοδοι.....	46

4.2.1 Αρχική καλλιέργεια.....	46
4.2.2 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας.....	47
4.2.3 Μετρήσεις κυττάρων <i>H. pluvialis</i>	49
4.2.4 Υπολογισμός ρυθμού αύξησης.....	49
4.2.5. Καλλιέργεια <i>H. pluvialis</i> – Διαδικασία διαδοχικών αραιώσεων.....	51
4.2.6 Φασματοφωτομετρική μέθοδος υπολογισμού συγκέντρωσης καροτενοειδών και ασταξανθίνης.....	54
4.2.7 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	55
5. Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	56
5.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις.....	56
5.2 Μικροσκοπικές παρατηρήσεις.....	57
5.3 Ανάπτυξη <i>H. pluvialis</i> στους φωτοβιοαντιδραστήρες – Ρυθμός αύξησης.....	61
5.3.1 Ανάπτυξη του <i>H. pluvialis</i> στο θρεπτικό μέσο BBM-3N.....	61
5.3.2 Ανάπτυξη του <i>H. pluvialis</i> στο θρεπτικό μέσο Nutrileaf.....	65
5.4 Περιεκτικότητα αιματοκύστεων σε καροτενοειδή και ασταξανθίνη.....	68
5.5 Σύγκριση αποτελεσμάτων.....	69
5.5.1 Πυκνότητα καλλιέργειας.....	69
5.5.2 Σύγκριση ειδικού ρυθμού αύξησης (μ) στα δύο θρεπτικά μέσα.....	70
5.5.3 Σύγκριση διαιρέσεων ανά ημέρα (k).....	71
5.5.4 Χρόνος διπλασιασμού (T_2).....	72
5.6 Περιεκτικότητα καροτενοειδών και ασταξανθίνης.....	73
6. Συμπεράσματα.....	74
6.1 Ανθεκτικότητα στελέχους SAG 34-1n του χλωροφύκου <i>H. pluvialis</i>	74
6.2 Φωτοβιοαντιδραστήρας στήλης πνευματικής ανάδευσης.....	74
6.3 Ανάπτυξη του <i>H. pluvialis</i> στα θρεπτικά μέσα BBM-3N και Nutrileaf.....	75
6.4 Σύνθεση ολικών καροτενοειδών και ασταξανθίνης από το στελεχος SAG 34-1n <i>H. pluvialis</i>	75
7. Βιβλιογραφία.....	77

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1. Κύκλος ζωής <i>H. pluvialis</i>	19
Εικόνα 2. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου πράσινων κοκκοειδών κυττάρων στο <i>H. pluvialis</i>	20
Εικόνα 3. Μικρογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από κύτταρα <i>H. pluvialis</i> που βρίσκονται στο ενδιάμεσο στάδιο.....	21
Εικόνα 4. Μικρογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κυτταρικών κύστεων του <i>H. pluvialis</i>	21
Εικόνα 5. 3D TEM (Transmission electron microscopy) απεικόνιση των κυτταρικών συστατικών.....	22
Εικόνα 6. Χημική δομή καροτενοειδών.....	25
Εικόνα 7. Ισομερή διαμόρφωσης ασταξανθίνης.....	26
Εικόνα 8. Τρισδιάστατη δομή του μορίου ασταξανθίνης.....	27
Εικόνα 9. Πιθανό βιοσυνθετικό μονοπάτι για το σχηματισμό της ασταξανθίνης στο χλωροφύκος <i>H. pluvialis</i>	28
Εικόνα 10. Πιθανό βιοσυνθετικό μονοπάτι για το σχηματισμό ξανθοφυλλών στα βακτήρια, φύκη και μύκητες.....	29
Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση διάφορων τύπων vertical column PBRs.....	30
Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση ενός airlift FP-PBR και κάτοψη ενός FP-PBR με αντλία.....	31
Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση ενός σωληνοειδούς φωτοβιοαντιδραστήρα.....	32
Εικόνα 14. Αρχικό στέλεχος χλωροφύκου <i>H. pluvialis</i> (SAG 34-1n).....	39
Εικόνα 15. Τέσσερις φωτοβιοαντιδραστήρες πνευματικής ανάδευσης (Bubble column PBR) με το μεταλικό πλαίσιο στήριξής τους.....	39
Εικόνα 16. Αεραντλία Sera air 550 R plus.....	40
Εικόνα 17. (α) Εύκαμπτος σωλήνας σιλικόνης διαμέτρου 2 mm.....	41
Εικόνα 18. Διάταξη φιλτραρίσματος αέρα.....	41
Εικόνα 19. Συσκευασία λιπάσματος Nutrileaf 30-10-10.....	42
Εικόνα 20. Γυάλινα μπουκαλάκια και γυάλινες πιπέττες μετρήσεως όγκου.....	43
Εικόνα 21. Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.....	43
Εικόνα 22. Οπτικό μικροσκόπιο OLYMPUS CX41.....	43
Εικόνα 23. Φυγόκεντρος Hettich EBA III.....	44
Εικόνα 24. Ζυγαριά ακριβείας ADAM ACB plus-150.....	44
Εικόνα 25. Φασματοφωτόμετρο Hach Lange DR 2800.....	45
Εικόνα 26. 500 ml καλλιέργειας <i>H. pluvialis</i> σε θρεπτικό μέσο BBM-3N.....	46

Εικόνα 27. Σύνθεση θρεπτικού μέσου BBM-3N.	47
Εικόνα 28. Υπολογισμός και ζύγιση απαιτούμενης ποσότητας Nutrileaf.....	48
Εικόνα 29. Καλλιέργεια σε πλαστικά διάφανα μπουκάλια 1,5 L.....	51
Εικόνα 30. Καλλιέργεια σε πλαστικά διάφανα δοχεία 5 L.	52
Εικόνα 31. Καλλιέργεια σε φωτοβιοαντιδραστήρες.....	53
Εικόνα 32. Καλλιέργεια σε φωτοβιοαντιδραστήρες.....	54
Εικόνα 33. Μακροσκοπική παρατήρηση καλλιέργειας.	56
Εικόνα 34. Δομή εναιωρούμενων σωματιδίων.....	56
Εικόνα 35. Αφρός στο πάνω μέρος των φωτοβιοαντιδραστήρων.....	57
Εικόνα 36. Τέσσερις PBRs με 7 L καλλιέργειας ο κάθε ένας.....	57
Εικόνα 37. Μαστιγοφόρος μορφή <i>H. pluvialis</i>	58
Εικόνα 38. Μαστιγοφόρος μορφή <i>H. pluvialis</i> στους PBR 1 & PBR 2	58
Εικόνα 39. Μαστιγοφόρος μορφή <i>H. pluvialis</i> στους PBR 3 & PBR 4.....	58
Εικόνα 40. Πράσινα κοκκοειδή κύτταρα <i>H. pluvialis</i> στον PBR 4.	59
Εικόνα 41. Ενδιάμεσα κύτταρα <i>H. pluvialis</i> στον PBR 4.....	59
Εικόνα 42. Κύστες <i>H. pluvialis</i> στον 2ο PBR.....	60
Εικόνα 43. Κύστες <i>H. pluvialis</i> στον PBR 2.	60
Εικόνα 44. Κύστες <i>H. pluvialis</i> στον PBR 1 και στον PBR 2.....	60
Εικόνα 45. Συσσωμάτωμα κυττάρων <i>H. pluvialis</i> στον PBR 3.	61
Εικόνα 46. Καμπύλες αύξησης πληθυσμού <i>H. pluvialis</i> στους PBR 1 και PBR 2 - Αριθμός κυττάρων N συναρτήσει του χρόνου.....	61
Εικόνα 47. Καμπύλη αύξησης πληθυσμού <i>H. pluvialis</i> στους PBR 1 και PBR 2 - ln (N) συναρτήσει του χρόνου.	62
Εικόνα 48. Καμπύλες αύξησης πληθυσμού <i>H. pluvialis</i> στους PBR 3 και PBR 4 Αριθμός κυττάρων N συναρτήσει του χρόνου.....	65
Εικόνα 49. Καμπύλες αύξησης πληθυσμού <i>H. pluvialis</i> στους PBR 3 και PBR 4 ln(N) συναρτήσει του χρόνου.	65
Εικόνα 50. Κύστες <i>H. pluvialis</i> στον PBR 1 και PBR 2.....	68
Εικόνα 51. Σύγκριση ειδικού ρυθμού αύξησης (μ) του <i>H. pluvialis</i> στα θρεπτικά μέσα BBM-3N και Nutrileaf.....	70
Εικόνα 52. Σύγκριση των διαιρέσεων ανά ημέρα (k) του <i>H. pluvialis</i> στα θρεπτικά μέσα BBM-3N και Nutrileaf.....	71
Εικόνα 53. Διαιρέσεις ανά ημέρα (k) του <i>H. pluvialis</i>	72

Κατάλογος πινάκων

<u>Πίνακας 1. Συστηματική κατάταξη του <i>Haematococcus pluvialis</i>.</u>	17
<u>Πίνακας 2. Βέλτιστες συνθήκες για την αγενή ανάπτυξη του <i>H. pluvialis</i>.</u>	18
<u>Πίνακας 3. Χημικές Ιδιότητες Ασταξανθίνης.</u>	26
<u>Πίνακας 4. Σύσταση του θρεπτικού μέσου Bold's Basal.</u>	42
<u>Πίνακας 5. Υπολογισμός παραμέτρων στους PBR 1 και PBR 2.....</u>	63
<u>Πίνακας 6. Μέση τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης (μ), των διαιρέσεων ανα ημέρα (k) και του χρόνου διπλασιασμού (T_2) στο θρεπτικό μέσο BBM-3N.....</u>	64
<u>Πίνακας 7. Υπολογισμός παραμέτρων στους PBR 3 και PBR 4.....</u>	66
<u>Πίνακας 8. Μέση τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης (μ), των διαιρέσεων ανα ημέρα (k) και του χρόνου διπλασιασμού (T_2) στο θρεπτικό μέσο Nutrileaf.</u>	67
<u>Πίνακας 9. Μετρήσεις περιεκτικότητας ολικών καροτενοειδών και ασταξανθίνης.</u>	68

1. Εισαγωγή

Τα μικροφύκη θεωρούνται σημαντικές πηγές για την παραγωγή διαφόρων συστατικών όπως τρόφιμα, χημικά, φαρμακευτικά, συμπληρώματα διατροφής, βιοκαύσιμα (Olaizola, 2003). Τα μικροφύκη είναι μια κατηγορία μικροοργανισμών με μεγάλη βιοποικιλότητα η οποία ακόμα δεν έχει διερευνηθεί πλήρως (Stern *et al.*, 2010). Σε αυτή συμπεριλαμβάνονται εκτός από ευκαριωτικά μικροφύκη και τα προκαρυωτικά κυανοβακτήρια. Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί αυτής της κατηγορίας είναι οι πρωταρχικοί παραγωγοί της οργανικής ύλης μέσω της φωτοσυνθετικής διαδικασίας (Suh *et al.*, 2006).

Αυτή η βιοποικιλότητα που σκοπό έχει την προσαρμογή και επιβίωση των μικροοργανισμών αυτών σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών, πολλές φορές και ακραίων, μεταφράζεται σε μια μεγάλη ποικιλία στη χημική σύνθεση των οργανισμών. Αυτή η λεπτομέρεια κάνει τους μικροοργανισμούς ελκυστικούς για διερεύνηση της δυνατότητας που έχουν μερικοί για σύνθεση σημαντικών βιομορίων καθώς και της εμπορικής εκμετάλευσής τους σαν “εργοστάσια” παραγωγής σημαντικών βιομορίων. Μερικές από τις υψηλής αξίας χημικές ουσίες που μπορούν να παραχθούν στα κύτταρα των μικροφυκών είναι τα καροτενοειδή (Borowitzka, 2010), τα μεγάλης αλυσίδας πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Ratledge, 2004) και οι φυκοβιλίνες (Singh *et al.*, 2005). Κάτω από ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, οι οποίες μπορούν να προκληθούν και τεχνητά στις καλλιέργειες, όπως έλλειψη θρεπτικών, μείωση ή αύξηση της φωτεινής ακτινοβολίας, αύξηση της αλατότητας, τα μικροφύκη υποβάλλονται σε καταπόνηση (stress) και συνθέτουν μεγάλες ποσότητες ορισμένων βιομορίων ως αντίδραση στις δυσμενείς συνθήκες (Aflalo *et al.*, 2007; García-Malea *et al.*, 2009; Shahid *et al.*, 2013). Σαν κυτταρικά “εργοστάσια” παραγωγής υψηλής αξίας βιομορίων, τα μικροφύκη παρουσιάζουν μερικά πλεονεκτήματα όπως: α) η δυνατότητα καλλιέργειας σε άγονες εκτάσεις, β) πιθανότητα χρησιμοποίησης επεξεργασμένων λυμάτων που παρέχουν στα μικροφύκη τα απαραίτητα θρεπτικά για την ανάπτυξη και γ) τη δυνατότητα να κατευθύνουμε τη βιοχημική σύνθεση των κυττάρων των μικροφυκών μεταβάλλοντας τις συνθήκες ανάπτυξης (Stephenson *et al.*, 2010). Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό που αποτελεί και δυναμικό πλεονέκτημα των οργανισμών αυτών, είναι η πιθανότητα χρησιμοποίησης του διοξειδίου του άνθρακα CO₂ που παράγεται από βιομηχανικές διαδικασίες μειώνοντας έτσι τις εκπομπές CO₂ στην ατμόσφαιρα (Munir *et al.*, 2012; Olaizola, 2003). Τα συστήματα καλλιέργειας που έχουν αναπτυχθεί για τα μικροφύκη μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κύριες ομάδες: τα ανοιχτά συστήματα δεξαμενών (π.χ. raceway ponds) και τα κλειστά συστήματα φωτοβιοαντιδραστήρων (closed photobioreactors-PBRs). Σημαντικές διαφορές υπάρχουν μεταξύ των δύο συστημάτων: οι

κλειστοί φωτοβιοαντιδραστήρες απαιτούν λιγότερη ποσότητα νερού λόγω μικρότερης εξάτμισης, έχουν μικρότερη πιθανότητα επιμόλυνσης της καλλιέργειας, μεγαλύτερη παραγωγικότητα και δυνατότητα ελέγχου των συνθηκών (θερμοκρασία, φως, κ.λπ.). Έχουν όμως μεγάλο αρχικό κόστος κατασκευής και απαιτούν μεγαλύτερη ποσότητα ενέργειας για να λειτουργήσουν, γεγονός που αυξάνει τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις της δραστηριότητας (Tredici, 2004, Jorquera *et al.*, 2010).

Όταν η καλλιέργεια μικροφυκών μεγαλώσει τα κύτταρα πρέπει να συλλεχθούν. Οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για τη διαδικασία αυτή είναι η κροκίδωση, η φυγοκέντρωση, η διήθηση και επίπλευση αέρα. Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η απαιτούμενη ενέργεια και τα κυτταρικά χαρακτηριστικά των μικροφυκών (μέγεθος, πυκνότητα των κυττάρων) (Brentner *et al.*, 2011, Olaizola, 2003). Μετά τη συγκομιδή, τα συστατικά που μας ενδιαφέρουν εξάγονται με διάφορους τρόπους. Συνήθως χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες όπως το εξάνιο, η μεθανόλη ή η ακετόνη (Kobayashi & Sakamoto, 1999, Stephenson *et al.*, 2010) και υπερκρίσιμα υγρά για εκχύλιση. Επίσης η ενζυματική εκχύλιση είναι μια μέθοδος που αναπτύσσεται ακόμα και έχει μεγάλο ενδιαφέρον, ειδικά όταν το τελικό προϊόν προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση (Mercer & Armenta, 2011).

Τα καροτενοειδή είναι μια αρκετά ενδιαφέρουσα κατηγορία βιομορίων που μπορούν να παραχθούν από μερικά είδη μικροφυκών. Είναι μια οικογένεια που περιλαμβάνει περισσότερες από 600 χρωστικές ουσίες οι οποίες συντίθεται *de novo* στα ανώτερα φυτά, βρύα, φύκη, βακτήρια και μύκητες (Goodwin, 1980). Ένα καροτενοειδές που έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας είναι η ασταξανθίνη. Η ασταξανθίνη ανήκει στην ομάδα των ξανθοφυλλών. Παρουσιάζει αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται στην εκτροφή του σολωμού, της μεγαλύτερης σε παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιέργειας θαλάσσιων ψαριών, ως χρωστική για το χρωματισμό της σάρκας του και σε πολύ μικρότερες ποσότητες στην τροφή φαγκριού και λυθρινιού στην Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια. Το γεγονός και μόνο αυτό, ώθησε μεγάλες εταιρείες όπως η Roche να συνθέσουν χημικά την κανθαξανθίνη προκειμένου να εφοδιάζουν τις ιχθυοκαλλιέργειες σολωμού. Η συνθετική μορφή της ασταξανθίνης παρόλο που έχει το ίδιο αποτέλεσμα στο χρωματισμό της σάρκας του σολωμού με την φυσική, διαφέρει τόσο στην αναλογία των ισομερών της, όσο και στη μορφή τους (καθαρή ή εστεροποιημένη μορφή). Επειδή τα τελευταία χρόνια οι καταναλωτές στρέφονται ολοένα και περισσότερο σε φυσικά προϊόντα, καθώς υπάρχει ανησυχία και έντονος προβληματισμός για τις επιπτώσεις των συνθετικών χημικών ουσιών στα βιολογικά συστήματα, άρχισε η αναζήτηση φυσικών πηγών ασταξανθίνης.

Ένας μικροοργανισμός που μπορεί να συνθέσει ασταξανθίνη, κάτω από κατάλληλες συνθήκες είναι ο κόκκινος ζυμομύκητας *Phaffia rhodozyma*. Σήμερα η *P. rhodozyma* βρίσκεται στην αγορά σε μορφή λεπτής σκόνης ως μια πηγή φυσικής ασταξανθίνης, πρωτεϊνών, και άλλων θρεπτικών συστατικών και χρησιμοποιείται σαν συστατικό της τροφής των σολομοειδών. Το προϊόν που παράγεται περιέχει υψηλά ποσοστά ελεύθερης ασταξανθίνης (8.000 μg/g) (Higuera-Ciarpaga *et al.*, 2007). Στην κατηγορία των μικροφυκών έχουν διερευνηθεί μερικά είδη για σύνθεση ασταξανθίνης όπως η *Chlorella vulgaris* (Gouveia *et al.*, 1996, 2002) και *Chlorococcum* sp. (Li & Chen, 2001; Ma & Chen, 2001). Όμως εκείνος ο μικροοργανισμός, ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί εμπορικά για την παραγωγή ασταξανθίνης είναι το χλωροφύκος *Haematococcus pluvialis* Flotow 1844. Η συγκέντρωση της ασταξανθίνης σε αυτόν το μικροοργανισμό, κάτω από κατάλληλες διαχειριστικές μεθόδους μπορεί να φθάσει από 1,5 έως 3 % του ξηρού του βάρους (Lorenz & Cysewsky, 2000). Το γεγονός αυτό έδωσε ώθηση στην έρευνα για το μικροφύκος *H. pluvialis*. Από τα αποτελέσματα διάφορων ερευνητικών εργασιών προέκυψε ότι η ασταξανθίνη είναι ένα από τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά που υπάρχουν προστατεύοντας τον οργανισμό από τις ελεύθερες ρίζες είτε αντιδρώντας μαζί τους σχηματίζοντας αβλαβή συστατικά, είτε σταματώντας τις οξειδωτικές αντιδράσεις όπως κάνουν και τα περισσότερα καροτενοειδή (Britton, 1995). Βρέθηκε επίσης ότι έχει αντικαρκινικές ιδιότητες (Ranga Rao *et al.*, 2013; Maoka *et al.*, 2012), προστατεύει από καρδιαγγειακές παθήσεις (Nakao *et al.*, 2010), έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Chew *et al.*, 2013), επιδρά ενάντια σε λοιμώξεις από *Helicobacter pylori* (Bennedsen *et al.*, 1999), ενίσχυει το ανοσοποιητικό σύστημα (Park *et al.*, 2010), προστατεύει το DNA από τη ζημιά της υπεριώδους ακτινοβολίας (Ranga Rao *et al.*, 2013, έχει νευροπροστατευτικές ιδιότητες (Lu *et al.*, 2010). Δικαίως λοιπόν μετά από αυτές τις ιδιότητες, η ασταξανθίνη έχει κινήσει το ενδιαφέρον της βιομηχανίας φαρμάκων και συμπληρωμάτων διατροφής αλλά και διάφορων εταιρειών βιοτεχνολογικών εφαρμογών παραγωγής του μικροφύκου *H. pluvialis*.

Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας

Σκοπός του πειράματος ήταν η καλλιέργεια του *H. pluvialis* σε κυλινδρικό φωτοβιοαντιδραστήρα στήλης πνευματικής ανάδευσης (bubble column photobioreactor) προκειμένου να διερευνηθεί:

- α) αν το συγκεκριμένο στέλεχος του χλωροφύκου *H. pluvialis* (SAG 34-1n) μπορεί να αναπτυχθεί σε κυλινδρικό φωτοβιοαντιδραστήρα στήλης πνευματικής ανάδευσης χωρίς την ύπαρξη τεχνητού φωτισμού,
- β) η ανάπτυξη του χλωροφύκου σε δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα και η σύγκριση του ρυθμού ανάπτυξης σε κάθε ένα από αυτά,
- γ) η συγκέντρωση των συνολικών καροτενοειδών και της ασταξανθίνης φασματοφωτομετρικά.

2. *Haematococcus pluvialis*

2.1 Βιολογία κυττάρου και φυσιολογία

Το μονοκύτταρο μικροφύκος του γλυκού νερού *Haematococcus pluvialis* Flotow 1844 ανήκει στην κλάση των χλωροφυκών. Η συστηματική κατάταξη του είδους φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 1.

Πίνακας 1. Συστηματική κατάταξη του *Haematococcus pluvialis*.
(<http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=7007>).

Rank	Name
Υπερβασίλειο	Eukaryota
Βασίλειο	Plantae
Φύλλο	Chlorophyta
Κλάση	Chlorophyceae
Τάξη	Chlamydomonadales
Οικογένεια	Haematococcaceae
Γένος	<i>Haematococcus</i>
Είδος	<i>Haematococcus pluvialis</i>

Στα στάδια ανάπτυξης του, εμφανίζεται με κινούμενες ή ακίνητες μορφές. Πρώτος ο Elliot, το 1934 πρόσθεσε λεπτομέρειες για την κυτταρική μορφολογία του μικροφύκου. Κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής διακρίνονται τέσσερις τύποι κυττάρων: μικροζωΐδια (microzooids), μεγάλα μαστιγοφόρα μακροζωΐδια (large flagellated macrozooids), μη μετακινούμενες μορφές (non-motile palmella forms) και αιματοκύστες (haematocysts). Στη μαστιγοφόρο κινούμενη μορφή του ένα αχλαδοειδής μορφής κύτταρο κυμαίνεται από 8 έως 50 μm σε διάμετρο. Η κυτταρική δομή αυτού του σταδίου είναι παρόμοια με τα περισσότερα από τα μέλη της οικογένειας: ένας κυπελοειδής χλωροπλάστης με πολυάριθμα και διάσπαρτα πυρηνοειδή, συσταλτικά κενοτόπια τα οποία είναι αρκετά, ακανόνιστα κατανεμημένα κοντά στην επιφάνεια του πρωτοπλάστη, έναν πυρήνα και 2 μαστίγια ίσου μήκους που αναδύονται από την πρόσθια θηλή (papilla) και διατρέχουν το κυτταρικό τοίχωμα σε ευρεία γωνία. Η δομή του χαρακτηρίζεται από το κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο είναι έντονα παχυμένο, ζελατινώδες και συνήθως συνδεδεμένο με τον πρωτοπλάστη του με απλά ή διακλαδισμένα σκέλη.

Στη μη κινούμενη μορφή, το λεγόμενο στάδιο «palmella», ο σφαιρικός πρωτοπλάστης είναι κλεισμένος μέσα σε μια στενά προσκολλημένη palmella μεμβράνη, και με εξαίρεση το μαστίγιο, η κυτταρική δομή του παραμένει η ίδια με αυτή της κινούμενης μορφής.

Μόλις οι συνθήκες καλλιέργειας γίνονται δυσμενείς, τα κύτταρα αυξάνουν τον όγκο τους δραστικά και εισέρχονται σε μια φάση αδράνειας, στην οποία το κύτταρο περιβάλλεται από ένα βαρύ ανθεκτικό κυτταρινικό τοίχωμα, που αποτελείται εν μέρει από ουσίες όπως οι σποροπολλενίνες (sporopollenin) (Boussiba, 2000). Όλη αυτή η διαδικασία ονομάζεται εγκύστωση. Το πρωτόπλασμα στη συνέχεια παίρνει ένα έντονο κόκκινο χρώμα που οφείλεται στη σύνθεση ενός δευτερογενούς μεταβολίτη. Η ουσία αυτή προσδιορίστηκε ότι είναι ένα καροτενοειδές, η ασταξανθίνη (Goodwin & Jamikorn, 1954). Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για αυτό το μικροφύκος, ως εναλλακτική πηγή φυσικής ασταξανθίνης έχει δημιουργήσει αρκετά ερευνητικά προγράμματα για τον προσδιορισμό των κατάλληλων συνθηκών ανάπτυξής του.

Οι άριστες συνθήκες ανάπτυξης του μικροφύκου κατά την αγενή φάση ανάπτυξης φαίνονται στον πίνακα 2. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ , h^{-1}) του μικροφύκου κάτω από αυτές τις συνθήκες ανάπτυξης είναι $0,054 h^{-1}$ που αντιστοιχεί σε ένα χρόνο διπλασιασμού 13 ωρών (Boussiba & Vonshak 1991, Lu *et al.*, 1994).

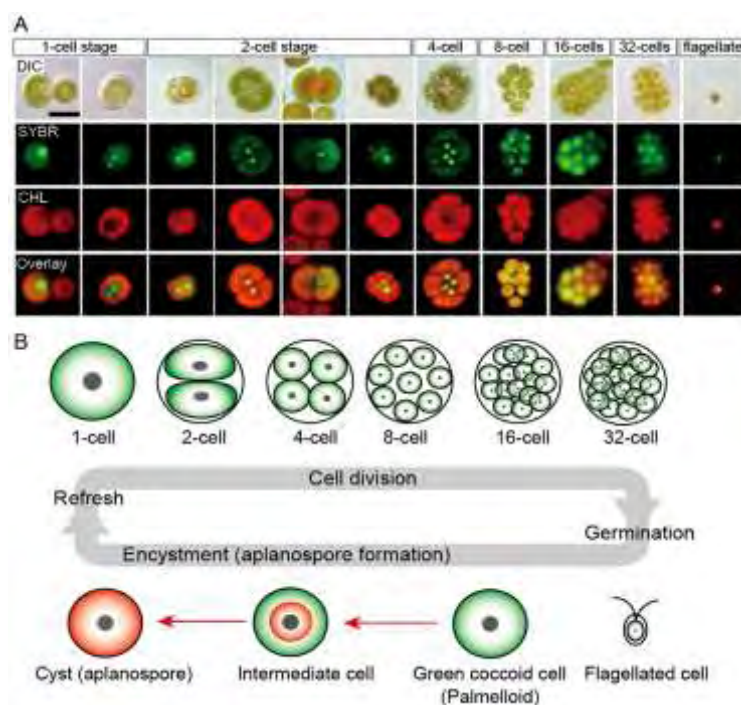
Πίνακας 2. Βέλτιστες συνθήκες για την αγενή ανάπτυξη του *H. pluvialis* (Boussiba & Vonshak 1991, Lu *et al.*, 1994).

Θρεπτικό μέσο:	BG-11 (Andersen, 2005) το οποίο περιέχει 17,6 mM νιτρικά and 0,22 mM φωσφορικά.
Ένταση φωτός:	90–150 mmol photons $m^{-2} s^{-1}$
Αερισμός:	αέρας εμπλουτισμένος με 1,5 % CO ₂
Θερμοκρασία:	25–28 °C
pH:	6–7

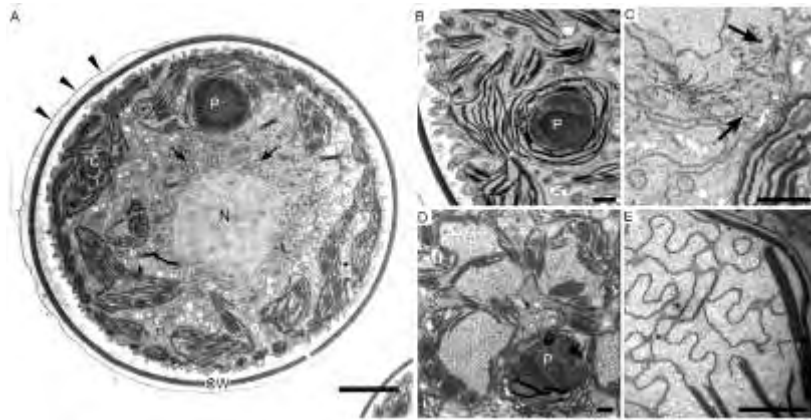
2.2 Κύκλος ζωής

Αγενής αναπαραγωγή – γαμετογένεση.

Όταν παλιές καλλιέργειες (2 εβδομάδων ή περισσότερο) μεταφέρθηκαν (εμβολιάστηκαν) σε φρέσκο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας τα κοκκοειδή κύτταρα εκκινούν κυτοκίνηση και σχηματίζονται ως 32 θυγατρικά μαστιγωτά κύτταρα μέσα στο μητρικό κυτταρικό τοίχωμα (Εικόνα 1). Σε 3-5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, τα περισσότερα μαστιγωτά κύτταρα μεταβάλλονται σε πράσινα κοκκοειδή κύτταρα (palmelloid). Όταν τα πράσινα κοκκοειδή κύτταρα μεγαλώσουν σε ηλικία, συνήθως γίνονται πρασινο-πορτοκαλί σαν αποτέλεσμα της συσσώρευσης της ασταξανθίνης. Ορισμένες συνθήκες [καταπόνησης](#), όπως δυνατός συνεχόμενος φωτισμός, επιταχύνει τη διαδικασία της εγκύστωσης από το μαστιγοφόρο στάδιο στο κυστικό στάδιο (Wayama *et al.*, 2013).



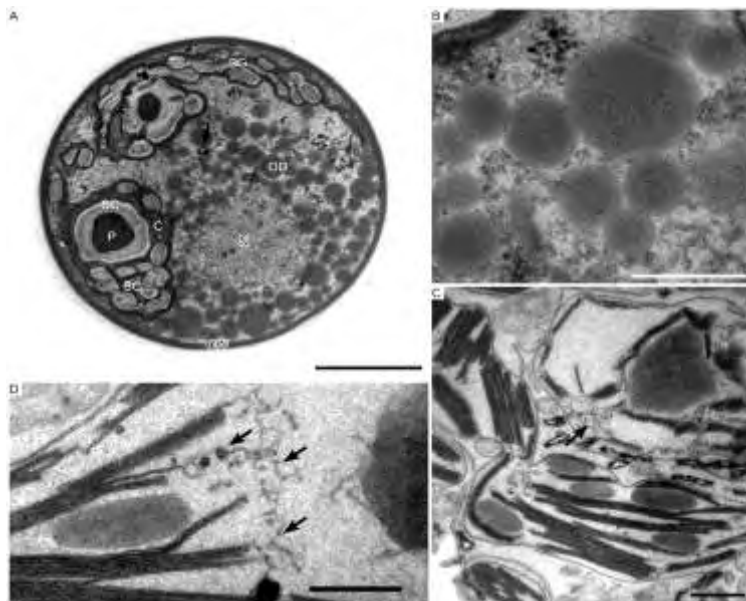
Εικόνα 1. Κύκλος ζωής *H. pluvialis*. **A.** Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού που δείχνουν τα στάδια 1 έως 32 κυττάρων και το μαστιγωτό στάδιο. DIC: Εικόνα μικροσκοπίας διαφορικής αντίθετης παρεμβολής (DIC) (differential interference contrast image) SYBR: Μέθοδος χρώσης νουκλεϊκού οξέος με ασύμμετρη χρωστική κυανίνης (SYBR Green I-stained cells green); CHL: Αυτοφθορισμός χλωροφύλλης (chlorophyll auto fluorescence - κόκκινο) και Overlay: επικαλυπτόμενες εικόνες των μεθόδων CHL και SYBR (overlaid images of SYBR and CHL). **B.** Απεικόνιση του κύκλου ζωής του *H. pluvialis* (Wayama *et al.*, 2013).



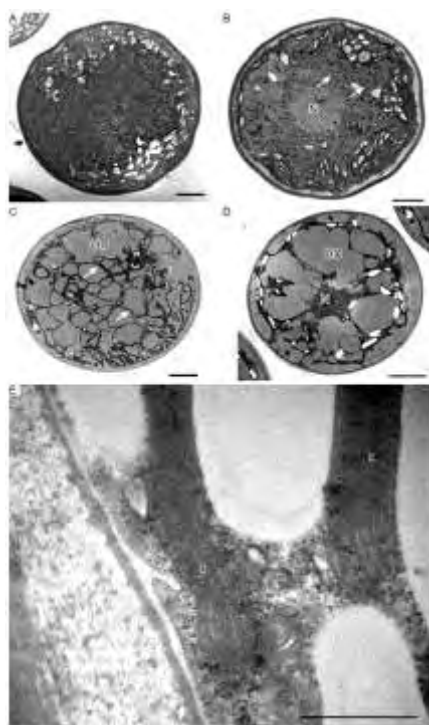
Εικόνα 2. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου πράσινων κοκκοειδών κυττάρων στο *H. pluvialis*. **A.** Γενική μικροσκοπική δομή. Το κυτταρικό τοίχωμα περιβάλλεται από εξωκυτταρική ουσία. Τα βέλη εντός του κυττάρου υποδεικνύουν κόκκους ασταξανθίνης. **B.** Χλωροπλάστες και πυρηνοειδή. **C.** Προβολή υψηλής μεγένθυσης κόκκων ασταξανθίνης (βέλη). **D, E.** Ένα στρώμα θυλακοειδών με κανονική διάταξη. C, χλωροπλάστης, CW, κυτταρικό τοίχωμα, N, πυρήνας, P, πυρηνοειδές. Κλίμακα μπάρας στο A και B-E: 5 μm και 1 μm, αντίστοιχα (Wayama *et al.*, 2013).

Κατά τη διάρκεια της εγκύστωσης στο *H. pluvialis* συχνά παρατηρούνται πορτοκαλοπράσινα κύτταρα σε μέσης ηλικίας καλλιέργειες (1-2 εβδομάδες). Σε αυτό το ενδιάμεσο στάδιο, εμφανή πυρηνοειδή που βρίσκονται στο στρώμα περιβάλλονται από παχιές κάψουλες αμύλου. Πολλοί κόκκοι αμύλου βρίσκονται γύρω από τα πυρηνοειδή. Σταγονίδια ελαίου που περιέχουν ασταξανθίνη βρίσκονται γύρω από τον πυρήνα. Αυτά τα σταγονίδια είναι στρογγυλά διαφόρων μεγεθών και δεν έχουν καμιά δομή σαν μεμβράνη που να τα περιβάλλει (Εικόνα 2). Σε αυτό το στάδιο παρατηρείται επίσης μερική αποικοδόμηση των θυλακοειδών (Εικόνα 3) (Wayama *et al.*, 2013).

Η γενική μικροσκοπική δομή των κυττάρων του *H. pluvialis* στο στάδιο των κύστεων που φαίνεται στην εικόνα 4 δείχνει ότι τα ελαιώδη σταγονίδια και η συσσώρευση της ασταξανθίνης διαφέρει ανάμεσα στις κύστες. Για παράδειγμα, οι κόκκοι ασταξανθίνης εμφανίζονται σε μερικά κύτταρα. Σε άλλα κύτταρα, υπάρχουν σχετικά μεγάλα ελαιώδη σταγονίδια, τα οποία φαίνονται να περιέχουν ασταξανθίνη. Τα σταγονίδια είναι λιγότερο πυκνά στο μικροσκόπιο και σε διάφορα μεγέθη. Οι χλωροπλάστες είναι ιδιαίτερα εκφυλισμένοι και εντοπίζονται στο χώρο μεταξύ των σταγονιδίων με αποτέλεσμα οι χλωροπλάστες να έχουν μια εμφάνιση διχτού. Οι χλωροπλάστες περιέχουν συμπιεσμένα πολυστρωματικά θυλακοειδή, τα οποία αλοιώνονται κατά τη διάρκεια της εγκύστωσης (Εικόνα 4) (Wayama *et al.*, 2013).

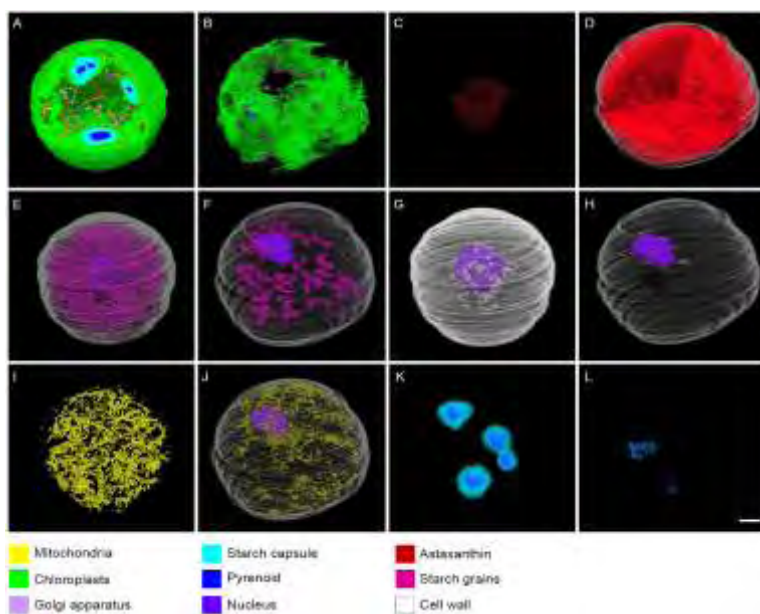


Εικόνα 3. Μικρογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από κύτταρα *H. pluvialis* που βρίσκονται στο ενδιάμεσο στάδιο (intermediate). **A.** Γενική μικροσκοπική δομή. **B.** Προβολή υψηλής μεγέθυνσης των ελαιωδών σταγονιδίων ασταξανθίνης. **C.** Μερική αποικοδόμηση των θυλακοειδών. **D.** Προβολή υψηλής μεγέθυνσης της αποικοδόμησης των θυλακοειδών. C, χλωροπλάστης, CW, κυτταρικό τοίχωμα, N, πυρήνας, SC, κάβουλες αμύλου, SG, αμυλόκοκκος. Κλίμακα μπάρας στο A και B-D: 5μm και 1 μm, αντίστοιχα. (Wayama *et al.*, 2013).



Εικόνα 4. Μικρογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κυτταρικών κύστεων του *H. pluvialis*. **A.** Γενική μικροσκοπική δομή των κύστεων, στις οποίες φαίνονται μικροί κόκκοι που περιέχουν ασταξανθίνη. **B.** Γενική μικροσκοπική δομή μιας κύστεως στην οποία φαίνεται η συσσώρευση της ασταξανθίνης σε σταγονίδια ελαίου. **C.** Γενική μικροσκοπική δομή μιας κύστεως στην οποία φαίνεται μεγάλα σταγονίδια ελαίου. Χλωροπλάστες εντοπίζονται στο μεσοδιάστημα μεταξύ των σταγονιδίων ελαίου (βέλη). **D.** Μερικά σταγονίδια ελαίου συγχωνεύονται. **E.** Προβολή υψηλής μεγέθυνσης των χλωροπλάστων. C, χλωροπλάστης, N, πυρήνας, OD, σταγονίδια ελαίου. Κλίμακα μπάρας στο A-D και E: 5μm και 0,5μm, αντίστοιχα. (Wayama *et al.*, 2013).

Η τρισδιάστατη απεικόνιση των κυτταρικών συστατικών σε διάφορες φάσεις του κύκλου ζωής του *H. pluvialis* φαίνεται στην [Εικόνα 5](#).



Εικόνα 5. 3D TEM (Transmission electron microscopy) απεικόνιση των κυτταρικών συστατικών. A, C, E, G, I, και K αντιστοιχούν σε πράσινο κοκκοειδές κύτταρο. B, D, F, H, J, και L απεικονίζουν κυτταρικές κύστεις. **A και B.** 3D απεικόνιση χλωροπλαστών με πυρηνοειδή, μιτοχόνδρια, και/ή κάμουλες αμύλου. **C και D.** 3D απεικόνιση της κατανομής της ασταξανθίνης. **E και F.** 3D απεικόνιση κόκκων αμύλου με τον πυρήνα. **G και H.** 3D απεικόνιση του συστήματος Golgi με τον πυρήνα. **I και J.** 3D απεικόνιση των μιτοχονδρίων (με τον πυρήνα στη J). **K και L.** 3D απεικόνιση των πυρηνοειδών και καμουλών αμύλου. Κλίμακα ~~5 μm~~ **5 μm** σε όλες τις εικόνες: 5 ~~mm~~ **mm**. (Wayama *et al.*, 2013).

2.3 Φυσιολογικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την διαδικασία της σύνθεσης της ασταξανθίνης

2.3.1 Αλλαγές στα κυτταρικά συστατικά

Η μετατροπή των πράσινων κινητικών κυττάρων σε κόκκινα απλανοσπόρια συνοδεύεται από μαζική αύξηση στην περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, η οποία μπορεί να φθάσει μέχρι το 63% του ξηρού βάρους του κυττάρου (Boussiba & Vonshak, 1991). Αυτό απεικονίζει την είσοδο σε μια φάση ανάπαυσης (χαμηλότερο μεταβολισμό) και η σύνθεση των ενώσεων απαιτεί λιγότερη ενέργεια από τη σύνθεση των πρωτεϊνών, για τις οποίες απαιτείται υψηλότερη ενέργεια εισόδου. Έτσι συνεχώς μειώνονται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας. Παρατηρήθηκε επίσης μια αύξηση στο λιπιδικό περιεχόμενο, η οποία σχετίζεται με τη συσσώρευση της χρωστικής ουσίας (Boussiba & Vonshak, 1991). Αυτό φανερώνει την ανάγκη της χρωστικής να μείνει μέσα στα σφαιρίδια λιπιδίων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η συσσώρευση της ασταξανθίνης συνδέεται στενά με τη σύνθεση των λιπαρών οξέων. Τα καροτενοειδή είναι υδροφοβικές ενώσεις που διαλύονται σε λάδι. Είναι πιθανόν ότι τα συσσωρευμένα λιπαρά οξέα να χρησιμεύουν για τη διαλυτοποίηση της εστεροποιημένης χρωστικής. Αυτό επιτρέπει στους εστέρες της ασταξανθίνης να επιπλέουν και να διαχέονται σε όλο το κυτταρόπασμα. Η πιο έντονη αλλαγή, όμως κατά τη διάρκεια της εγκύστωσης είναι η μαζική σύνθεση και συσσώρευση του κόκκινου κετοκαροτενοειδούς, της ασταξανθίνης. Στα πράσινα κύτταρα, οι χλωροφύλλες συνοδεύονται από τα καροτενοειδή λουτεΐνη και β-καροτένιο και κυριαρχούν στο συνολικό περιεχόμενο χρωστικών. Έτσι τα κύτταρα εμφανίζονται πράσινα (Lu *et al.*, 1995). Κατά τη διαδικασία της εγκύστωσης, η συγκέντρωση της ασταξανθίνης αυξάνει από λίγα πικογραμμάρια (pg) ανά κύτταρο σε μερικές εκατοντάδες στο τέλος της διαδικασίας. Σε αυτό το στάδιο οι εστέρες της ασταξανθίνης (μόνο- και διεστέρες) αποτελούν το 98% των συνολικών καροτενοειδών και φθάνουν μέχρι το 4% του συνολικού κυτταρικού βάρους (Boussiba *et al.*, 1999).

2.3.2. Αλλαγές στις κυτταρικές δραστηριότητες

Η πιο αξιοσημείωτη φυσιολογική αλλαγή στο *H. pluvialis* κατά τη διάρκεια της συσσώρευσης της ασταξανθίνης είναι η μείωση της φωτοσύνθεσης. Αυτή η μείωση αποδόθηκε κυρίως στη ζημιά στο σύμπλεγμα του φωτοσυστήματος II (PSII) και έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού σύνθεσης σε οξυγόνο (O₂) ή ανάλογη μείωση στο μεταβλητό φθορισμό Fv/Fm (Zlotnik *et al.*, 2006). Πιο συγκεκριμένα η μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας στο PSII οφείλεται κυρίως στην έλλειψη του κυτοχρώματος f που σαν αποτέλεσμα έχει την μείωση της ροής των ηλεκτρονίων από το

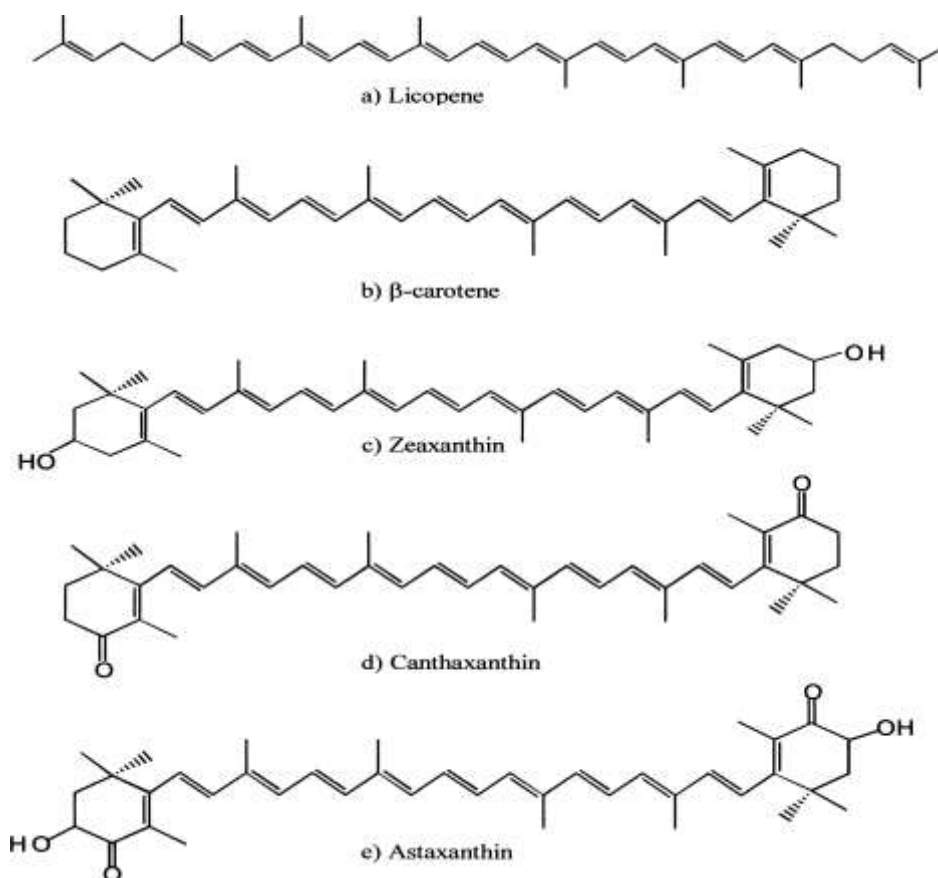
PSII προς το φωτοσύστημα I (PSI) και σε μικρότερο βαθμό στην έλλειψη κάποιων από τα συστατικά των PSI και PSII (Tan *et al.*, 1995).

2.4 Οξειδωτική καταπόνηση (stress) και σύνθεση ασταξανθίνης

Οι ενεργές οξυγονούχες ρίζες (ROS - Reactive Oxygen Species) μπορεί να προκαλέσουν ζημιά στα οργανίδια του κυττάρου. Κατά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης κάτω από άριστες συνθήκες ανάπτυξης, η φωτεινή ακτινοβολία που απορροφάται από τις χρωστικές μετατρέπεται σε χημική ενέργεια σχηματίζοντας ATP και NADPH μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων στην φωτοσυνθετική αλυσίδα. Αυτή η χημική ενέργεια τελικά αποθηκεύεται σε άμυλο μέσω του κύκλου του Calvin. Κάτω από περιβαλλοντικές συνθήκες πίεσης, ωστόσο, ROS θα παραχθούν όταν η φωτοσυνθετική ενεργειακή ισορροπία μεταξύ εισόδου (απορρόφηση ακτινοβολίας από τις κεραίες χρωστικών) και εξόδου (ενσωμάτωση CO₂) διαταραχθεί. Σε αυτή την περίπτωση το οξυγόνο που παράγεται μπορεί να μετατραπεί σε H₂O₂ και OH⁻ τα οποία είναι τοξικά για το κύτταρο. Από την άλλη πλευρά, όταν η ενσωμάτωση του CO₂ ελαττωθεί λόγω δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών όπως έλλειψη θρεπτικών, υψηλή αλατότητα, χαμηλές θερμοκρασίες, ή χαμηλή διαθεσιμότητα σε CO₂, η παραγωγή ROS μπορεί να συμβεί ακόμη και κάτω από μέτρια ένταση φωτός λόγω του πλεονάσματος ενέργειας. Εν ολίγοις, ROS θα παραχθούν κάθε φορά που υπάρχει μια υπερβολική μείωση στη φωτοσύνθεση. Στο φύκος *H. pluvialis* παρατηρήθηκε ότι κάτω από κανονικές συνθήκες ανάπτυξης, ROS μπορεί να προκαλέσουν την σύνθεση της ασταξανθίνης και έχει προταθεί ότι η σύνθεση των καροτενοειδών ρυθμίζεται από ROS. Παρόλο που οι ενεργές οξυγονούχες ρίζες προκαλούν τη σύνθεση της ασταξανθίνης μέσω του σχηματισμού κανθαξανθίνης, η ασταξανθίνη είναι υποπροϊόν ενός μηχανισμού άμυνας που αναπτύσσει το κύτταρο για να προστατευθεί, παρά η ίδια η αμυντική ουσία. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύει το γεγονός ότι η μεγαλύτερη ποσότητα ασταξανθίνης βρίσκεται εστεροποιημένη και εναποθεμένη στα σφαιρικά λιπίδια έξω από τους χλωροπλάστες (Boussiba, 2000).

2.5 Χημική δομή καροτενοειδών-Ασταξανθίνη

Τα καροτενοειδή είναι μια οικογένεια που περιλαμβάνει περισσότερες από 600 χρωστικές ουσίες οι οποίες συντίθεται *de novo* στα ανώτερα φυτά, βρύα, φύκη, βακτήρια και μύκητες (Goodwin, 1980). Η δομή των χημικών αυτών ενώσεων προέρχεται από το λυκοπένιο (Εικόνα 6). Η πλειοψηφία τους είναι υδρογονάνθρακες 40 ατόμων που περιέχουν δύο τερματικούς κυκλικούς δακτυλίους, ενωμένοι μεταξύ τους με μια αλυσίδα συζευμένους διπλούς δεσμούς ή σύστημα *polyene*. Δύο ομάδες έχουν χαρακτηριστεί ως οι πιο σημαντικές: τα καροτένια που αποτελούνται μόνο από άνθρακα και υδρογόνο και οι ξανθοφύλλες οι οποίες είναι τα οξυγονομένα παράγωγά τους. Σε αυτές το οξυγόνο μπορεί να βρίσκεται ως υδροξυλικές ομάδες ($-OH$), όπως στην ζεαξανθίνη, ως κετο-ομάδες ($O=$) όπως στην κανθαξανθίνη ή σε συνδυασμό και των δύο, όπως στην ασταξανθίνη (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Χημική δομή καροτενοειδών (Higuera-Ciara *et al.*, 2007).

Το σύστημα πολυενίου δίνει στα καροτενοειδή τη χαρακτηριστική μοριακή δομή, τις χημικές τους ιδιότητες και την απορρόφηση του φωτός. Κάθε διπλός δεσμός από την αλυσίδα μπορεί να εμφανιστεί ως δύο μορφές ισομερών, ως γεωμετρικά *cis* ή *trans*-ισομερή. Τα *cis*-ισομερή είναι θερμοδυναμικά λιγότερο σταθερά από τα *trans*-ισομερή.

Στα φυτά τα περισσότερα από τα καροτενοειδή απαντώνται ως *trans*-ισομερή, ωστόσο η συγκέντρωση του *cis*-ισομερούς μπορεί να αυξηθεί λόγω του ισομερισμού της *trans*-

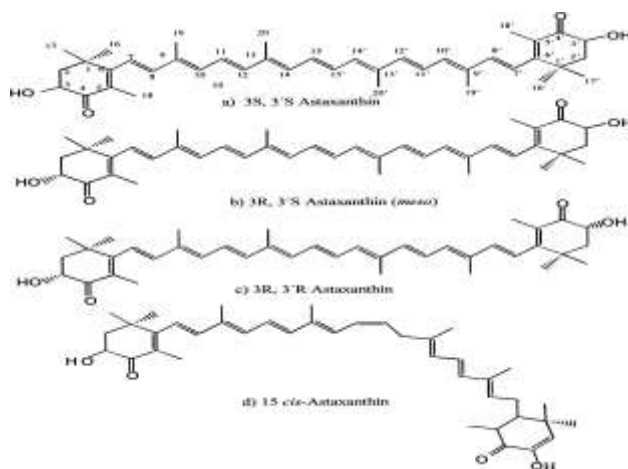
μορφής του (Zakynthinos & Varzakas, 2016). Η επεξεργασία τροφίμων είναι μια διαδικασία που προκαλεί ισομερισμό των trans-ισομερών καροτενοειδών σε cis-ισομερή, τα οποία έχουν διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες (Schieber & Carle, 2005).

Η επιστημονική ονομασία της ασταξανθίνης κατά IUPAC είναι 3,3'-διύδροξυ-β,β-καροτενο-4, 4-διόνη και ο μοριακός τύπος της είναι C₄₀H₅₂O₄. Στον παρακάτω πίνακα 3 αναγράφονται οι χημικές ιδιότητές της.

Πίνακας 3. Χημικές Ιδιότητες Ασταξανθίνης.

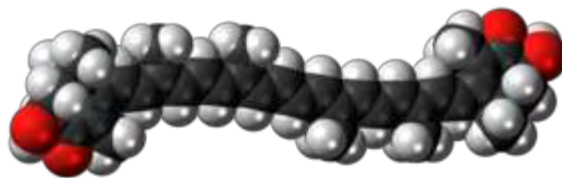
Χημικός Μοριακός Τύπος	C ₄₀ H ₅₂ O ₄
Μοριακή Μάζα	596.84 g/mol
Μορφή	Κόκκινη στερεά σκόνη
Πυκνότητα	1.071 g/mL
Σημείο τήξης	216 °C (421 °F; 489 K)
Σημείο ζέσεως	774 °C (1,425 °F; 1,047 K)
Διαλυτότητα	30 g/L in DCM; 10 g/L στο CHCl ₃ ; 0.5 g/L στο DMSO; 0.2 g/L στην ακετόνη

Το μόριο της ασταξανθίνης έχει δύο ασύμμετρα άτομα άνθρακα που βρίσκονται στις θέσεις 3 και 3' των βενζοϊκών δακτυλίων σε κάθε άκρο του μορίου. Τα εναντιομερή του μορίου, είναι αποτέλεσμα του τρόπου σύνδεσης των υδροξυλομάδων στα άτομα άνθρακα των κέντρων ασυμμετρίας. Όταν η υδροξυλομάδα, συνδέεται έτσι ώστε να προβάλλει πάνω από το επίπεδο του μορίου, έχουμε την R-διαμόρφωση και όταν η υδροξυλομάδα, συνδέεται έτσι ώστε να είναι κάτω από το επίπεδο του μορίου, έχουμε την S-διαμόρφωση. Έτσι τα τρία πιθανά εναντιομερή του μορίου της ασταξανθίνης είναι: 3R,3'R, 3S,3'S και 3R,3'S (meso) (Turujman *et al.*, 1997). ([Εικόνα 7](#)).



Εικόνα 7. Ισομερή διαμόρφωσης ασταξανθίνης (a-c) και ένα γεωμετρικό cis-ισομερές (d). (Turujman *et al.*, 1997; Osterlie *et al.*, 1999).

Στην εικόνα 8 φαίνεται η τρισδιάστατη δομή του μορίου της ασταξανθίνης.



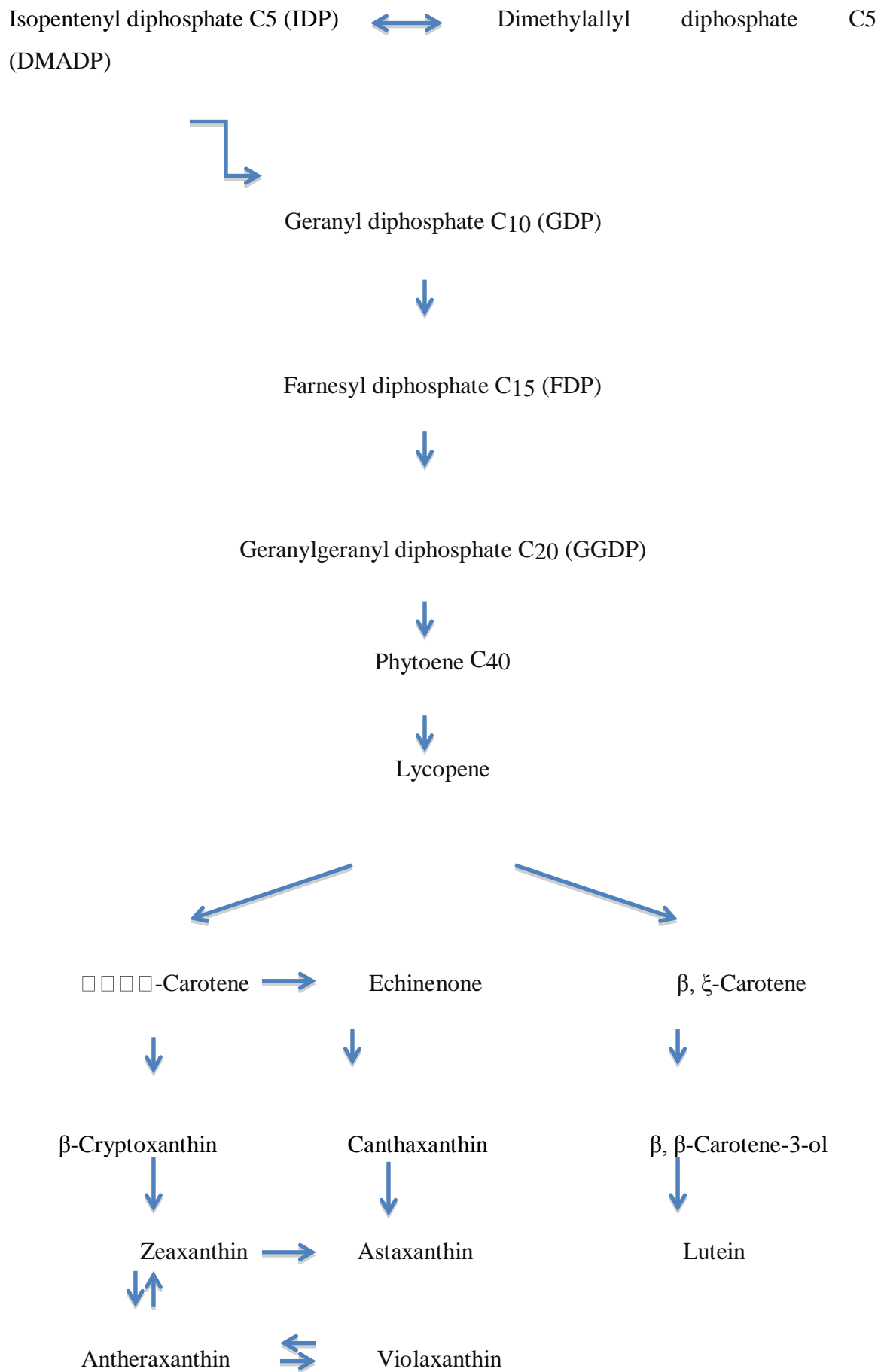
Εικόνα 8. Τρισδιάστατη δομή του μορίου ασταξανθίνης. Με μαύρο χρώμα απεικονίζονται τα άτομα άνθρακα, με άσπρο τα άτομα του υδρογόνου και με κόκκινα του οξυγόνου (<http://www.worldofmolecules.com/antioxidants/astaxanthin.htm>).

Από όλα αυτά τα ισομερή, η 3S, 3'S μορφή είναι η πιο άφθονη στη φύση. Η συνθετική ασταξανθίνη αποτελείται από ένα ρακεμικό μείγμα των δύο εναντιομερών και της meso μορφής σε αναλογία 1:2:1 δηλαδή των ισομερών (3S, 3S) (3R, 3S) και (3R, 3R) αντίστοιχα (Turujman *et al.*, 1997). Ανάλογα με την προέλευσή της η ασταξανθίνη μπορεί να ενωθεί με άλλες χημικές ουσίες. Μπορεί να εστεροποιηθεί στη μια ή και στις δύο υδροξυλικές ομάδες με διαφορετικά λιπαρά οξέα όπως το παλμιτικό, ολεϊκό, στεατικό ή λινολεϊκό. Μπορεί επίσης να βρεθεί σε ελεύθερη μορφή ή να σχηματίσει χημικά σύμπλοκα με πρωτεΐνες (καροτενοπρωτεΐνες) ή με λιποπρωτεΐνες (καροτενολιποπρωτεΐνες). Η συνθετική ασταξανθίνη δεν είναι σε εστεροποιημένη μορφή, ενώ αυτή που βρίσκεται στα φύκη είναι πάντα εστεροποιημένη (Johnson & An, 1991; Yuan *et al.*, 1997). Η ασταξανθίνη βιοσυντίθεται μέσω της οδού των ισοπρενοειδών, η οποία είναι υπεύθυνη για ένα ευρύ φάσμα λιποδιαλυτών μορίων, όπως οι στερόλες, τα στεροειδή, οι προσταγλαδίνες, ορμόνες και βιταμίνες D, K και E. Το μονοπάτι ξεκινά με ακετυλο συνένζυμο-A (acetyl-CoA) και προχωρά μέσω φυτοενίου, λυκοπενίου, β-καροτενίου και κανθαξανθίνης πριν από το τελικό στάδιο οξείδωσης σε ασταξανθίνη ([Εικόνα 9](#)) (Bhosale & Bernstein, 2005).



Εικόνα 9. Πιθανό βιοσυνθετικό μονοπάτι για το σχηματισμό της ασταξανθίνης στο χλωροφύκος *H. pluvialis* (Bhosale & Bernstein, 2005).

Παρακάτω φαίνεται πιο αναλυτικά το βιοσυνθετικό μονοπάτι για το σχηματισμό των ξανθοφυλλών στα βακτήρια, φύκη και στους ζυμομύκητες ([Εικόνα 10](#)).



Εικόνα 10. Πιθανό βιοσυνθετικό μονοπάτι για το σχηματισμό ξανθοφυλλών στα βακτήρια, φύκη και μύκητες (Bhosale & Bernstein, 2005).

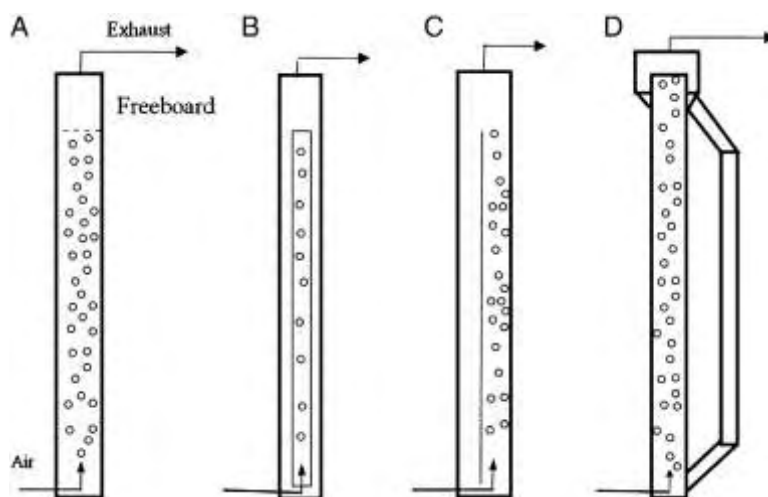
3. Κλειστά συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών Φωτοβιοαντιδραστήρες (PBRs)

3.1 Τύποι κλειστών φωτοβιοαντιδραστήρων (PBR)

Διάφοροι τύποι φωτοβιοαντιδραστήρων έχουν αναπτυχθεί οι οποίοι μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με το σχήμα τους σε κάθετη στήλη, κυλινδρικοί και επίπεδο έλασμα ή πάνελ.

3.1.1. Φωτοβιοαντιδραστήρες κάθετης στήλης (Vertical column photobioreactors)

Οι φωτοβιοαντιδραστήρες κάθετης στήλης είναι συνήθως κυλινδρικοί με ακτίνες μέχρι 0,2 m και ύψη που μπορούν να φθάσουν πάνω από 4 m. Αυτοί πρέπει να έχουν μικρή ακτίνα για να αυξηθεί η αναλογία επιφάνειας όγκου. Χαρακτηρίζονται από υψηλούς ογκομετρικούς συντελεστές μεταφοράς αερίων. Οι φυσαλίδες αερίων από τη βάση της στήλης επιτρέπουν την αποδοτική απορρόφηση του CO₂ και την καλύτερη απομάκρυνση του O₂. Έτσι η ανάπτυξη των φυκών περιορίζεται από άλλους παράγοντες όπως η ένταση του φωτός. Η συνεχής ανάδευση του θρεπτικού μέσου προκαλείται από τις φυσαλίδες αερίου οι οποίες ανακατεύουν απαλά την καλλιέργεια προκαλώντας λιγότερη καταπόνηση σε σύγκριση με τις φτερωτές και τις αντλίες (Sánchez *et al.*, 2002). Έτσι πολύ μικρή ζημιά προκαλείται στα κύτταρα με την καλλιέργεια σε φωτοβιοαντιδραστήρα κάθετης στήλης εκτός από τις ακραίες ταχύτητες των αερίων φυσαλίδων (Vega-Estrada *et al.*, 2005). Διάφοροι τύποι PBR κάθετης στήλης φαίνονται στην εικόνα 11.



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση διάφορων τύπων vertical column PBRs. A. PBR στήλης φυσαλίδων. B. PBR με εσωτερικό σωλήνα. C. PBR με μεσαίο διαχωριστικό. D. PBR με εξωτερικό σωλήνα (Wang *et al.*, 2012).

Είναι σαφές ότι το μεγαλύτερο πλεονέκτημα του PBR είναι η καλή ανάμιξη που επιτυγχάνεται, γεγονός που επιτρέπει την έκθεση των κυττάρων στην φωτεινή

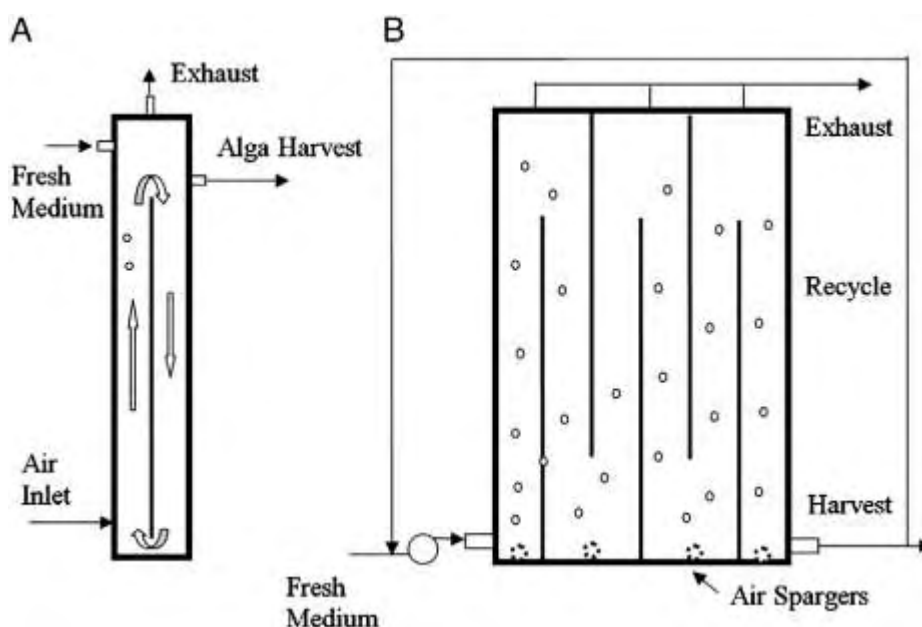
ακτινοβολία ακόμα και σε μεγαλύτερης διαμέτρου στήλες με υψηλή πυκνότητα κυττάρων. Άλλα πλεονεκτήματα είναι η απλότητα και η δυνατότητα καθαρισμού.

3.1.2 Επίπεδοι φωτοβιοαντιδραστήρες (Flat panel PBRs)

Οι επίπεδοι φωτοβιοαντιδραστήρες (FP-PBRs) είναι κλειστοί PBRs και χαρακτηρίζονται από μεγάλη τιμή αναλογίας φωτιζόμενη επιφάνεια προς όγκο. Αυτοί οι τύποι φωτοβιοαντιδραστήρα μπορεί να τοποθετηθούν σε μηχανισμό ώστε να προσανατολίζονται συνέχεια στην πορεία του ήλιου για να επιτύχουν μέγιστη έκθεση στην ηλιακή ενέργεια.

Διάφοροι τύποι FP-PBRs

Ο πρώτος FP-PBR περιγράφηκε το 1950. Από τότε διάφοροι τύποι FP-PBR έχουν κατασκευαστεί. Όπως φαίνεται στην εικόνα 12 αυτοί μπορούν να καταταχθούν σε δύο κατηγορίες: σε αυτούς που διαθέτουν αντλίες και σε αυτούς που χρησιμοποιούν αέρα για την ανάμειξη. Στην πρώτη κατηγορία η αντλία προκαλεί κίνηση του υγρού μέσου δημιουργώντας την απαιτούμενη ανάμειξη, ενώ στη δεύτερη ο πεπιεσμένος αέρας είναι η κινητήριος δύναμη της ανάμειξης.



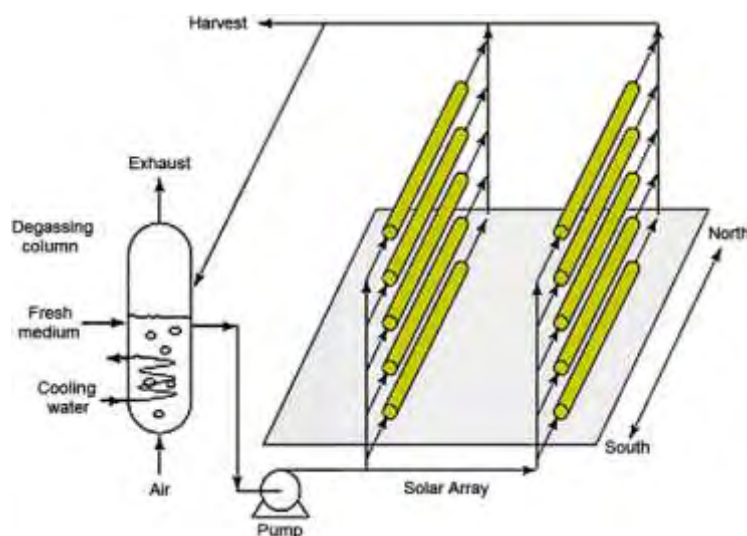
Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση ενός airlift FP-PBR (A) και κάτοψη ενός FP-PBR με αντλία (B) (Wang *et al.*, 2012).

Το πλάτος του FP-PBR είναι πολύ σημαντικό στο σχεδιασμό διότι από αυτό εξαρτάται η αναλογία επιφάνειας/όγκου καθώς και το μήκος της διαδρομής που πρέπει να περάσει το φως. Μικρότερο πάχος επιτρέπει καλύτερη διάχυση και διάδοση της φωτεινής ακτινοβολίας. Γενικά όσο μικρότερο είναι το πάχος τόσο υψηλότερη είναι η κυτταρική πυκνότητα και η παραγωγή βιομάζας (Hu *et al.*, 1996; Zou & Richmond, 1999). Αξίζει να σημειωθεί ότι FP-PBR είναι πιο ακριβοί και δύσκολοι στην κατασκευή τους,

καθαρίζονται δύσκολα, ενώ ευκολότερα υποβάλλονται σε φώτο αναστολή και σε θερμοκρασιακή διακύμανση.

3.1.3 Κυλινδρικοί σωληνοειδείς φωτοβιοαντιδραστήρες (Tubular Photo Bioreactors-TPBR)

Οι κυλινδρικοί φωτοβιοαντιδραστήρες είναι από τις πιο δημοφιλείς κατασκευές PBR. Συνήθως περιλαμβάνουν μια σειρά από διαφανείς σωλήνες τοποθετημένους σε διάφορα σχέδια όπως ευθεία, λυγισμένοι ή σε σπирάλ. Οι σωλήνες είναι μικρής διαμέτρου 0,1 m ή μικρότερης προκειμένου να διασφαλιστεί η καλύτερη απορρόφηση της φωτεινής ακτινοβολίας και η μέγιστη παραγωγή βιομάζας. Οι TPBR μπορεί να τοποθετηθούν οριζόντια, κάθετα ή με μια ορισμένη γωνία κλίσης σε σχέση με το έδαφος. Στην εικόνα 13 φαίνεται μια σχηματική απεικόνιση ενός TPBR, ο οποίος αποτελείται από τους διάφανους σωλήνες, εκεί όπου γίνεται η απορρόφηση του φωτός από τα μικροφύκη, η μονάδα συγκομιδής-διαχωρισμού των φυκών από το θρεπτικό μέσο, ένα δοχείο εξαέρωσης, ένα σύστημα ψύξης ή θέρμανσης και μια αντλία για την κίνηση της υγρής καλλιέργειας. Η προσθήκη θρεπτικού μέσου πραγματοποιείται στο δοχείο εξαέρωσης.



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση ενός σωληνοειδούς φωτοβιοαντιδραστήρα (vertical tubular photobioreactor) (Wang *et al.*, 2012).

3.1.3.1 Διαστάσεις

Πρέπει να σημειωθεί ότι η υπερβολική παροχή φωτεινής ακτινοβολίας σε μικρής διαμέτρου σωλήνες μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια φωτονίων ή ακόμη και σε φωτοαναστολή ειδικά στη φάση χαμηλής πυκνότητας κυττάρων. Αυτό το πρόβλημα θα μπορούσε να ξεπεραστεί χρησιμοποιώντας μεγάλης διαμέτρου σωλήνες σε συνδυασμό με καλή ανάμειξη. Η φωτοαναστολή μπορεί επίσης να μειωθεί με σκίαση.

3.1.3.2 Έλεγχος θερμοκρασίας σε TPBR

Μερικές μέθοδοι για τον έλεγχο της θερμοκρασίας που έχουν χρησιμοποιηθεί περιλαμβάνουν σκίαση στους σωλήνες με σκούρα φύλλα (Ugwu & Aoyagi, 2008), ψεκασμός με νερό όταν η θερμοκρασία της καλλιέργειας ξεπεράσει μια ορισμένη τιμή (Prakash *et al.*, 1997), βυθίζοντας όλη την καλλιέργεια με τους διάφανους σωλήνες κάτω από νερό (Carlozzi *et al.*, 2006) είτε εγκαθιστώντας εναλλάκτη θερμότητας στο PBR (Watanabe & Hall, 1995). Έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι η σκίαση των διάφανων σωλήνων ώστε να μειωθεί η φωτεινή ακτινοβολία 70 % μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της βιομάζας και σε μεγαλύτερη συσσώρευση χλωροφύλλης και καροτενοειδών σε σύγκριση με τις τιμές που λήφθηκαν όταν ο PBR ήταν εκτεθειμένος στην άμεση ηλιακή ακτινοβολία (Ugwu & Aoyagi, 2008). Ωστόσο η σκίαση μπορεί να μειώσει δραστικά το τμήμα του φωτός που χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιομάζας. Ο ψεκασμός με νερό είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για την ψύξη, αλλά απαιτεί την άντληση μεγάλων ποσοτήτων νερού γεγονός που μπορεί να αυξήσει το κόστος λειτουργίας σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια. Η βύθιση της καλλιέργειας (των διάφανων σωλήνων) σε νερό είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας. Έχει επίσης βρεθεί ότι η αντανάκλαση της φωτεινής ακτινοβολίας από τον πυθμένα και τα τοιχώματα της πισίνας μπορεί να αυξήσει την ακτινοβολία μέσα στους διάφανους σωλήνες καλλιέργειας (Fernandez *et al.*, 1997).

3.1.4 Φωτοβιοαντιδραστήρες σε πλαστικές σακούλες (Plastic bag PBRs)

Πλαστικές σακούλες PBRs είναι ιδιαίτερα ελκυστικές για εμπορικής κλίμακας παραγωγή λόγω του χαμηλού κόστους και της καλής αποστείρωσης λόγω της υψηλής θερμοκρασίας κατά την κατασκευή τους. Μεγάλες πλαστικές σακούλες πολυαιθυλενίου χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες για την καλλιέργεια μικροφυκών στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς από παλιά μέχρι και σήμερα. Ωστόσο πάσχουν από ανεπαρκή ανάμειξη και από συχνή κατάρρευση της καλλιέργειας μικροφυκών. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η χρησιμοποίηση πλαστικών σακουλών μεγαλύτερου όγκου δεν οδηγεί πάντα σε αύξηση της παραγωγικότητας (Martínez-Jerónimo & Espinosa-Chávez, 1994).

3.2 Σημαντικές παράμετροι στο σχεδιασμό PBR

Η απόδοση ενός PBR καθορίζεται από την ενσωμάτωση, την απορρόφηση, τη μεταφορά, την κατανομή και την εκμετάλλευση του φωτός από τα μικροφύκη μέσω της φωτοσύνθεσης (Zijffers *et al.*, 2008).

Ένας αποδοτικός PBR πρέπει να συνδυάζει τα εξής:

- 1) να απορροφά όσο το δυνατόν περισσότερη ηλιακή ακτινοβολία, να τη μεταφέρει και να την διανέμει στο δοχείο καλλιέργειας με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε μέγιστη φωτεινή ενέργεια να χρησιμοποιείται για το σχηματισμό της βιομάζας
- 2) να επιτρέπει με εύκολο και ακριβή τρόπο τον έλεγχο σημαντικών παραμέτρων, έτσι ώστε τα φωτοσυνθετικά μικροφύκη να βρίσκονται σε περιβάλλον με βέλτιστες συνθήκες για την καλύτερη αξιοποίηση της φωτεινής ακτινοβολίας,
- 3) να έχει χαμηλό κόστος κατασκευής και λειτουργίας και
- 4) να έχει χαμηλή κατανάλωση ενέργειας κατά τη λειτουργία.

3.2.1 Απορρόφηση φωτός, κατανομή και χρησιμοποίηση.

Η ένταση του φωτός παίζει σημαντικό ρόλο στη φωτοσύνθεση μικροφυκών. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε έντονο φωτισμό και όταν ξεπεράσει ένα κρίσιμο επίπεδο μπορεί να εμφανιστεί φωτοαναστολή. Η φωτοαναστολή μπορεί να είναι αναστρέψιμη ή μη αναστρέψιμη, ανάλογα με την ένταση της καταπόνησης και το χρονικό διάστημα που τα μικροφύκη εκτίθενται σε αυτό. Η φωτοαναστολή θα πρέπει να αποφεύγεται όσο το δυνατόν περισσότερο.

Ένα σημαντικό στοιχείο που πρέπει να συνυπολογιστεί είναι ότι μόνο οι ακτινοβολίες με μήκη κύματος μεταξύ 400 και 700 nm είναι φωτοσυνθετικά ενεργές ακτινοβολίες (photosynthetically active radiation-PAR). Αυτές αντιστοιχούν στο 50 % της απορροφούμενης ηλιακής ακτινοβολίας (Suh & Lee, 2003).

Άλλος ένας σημαντικός παράγοντας είναι η επίδραση της φυσικής εναλλαγής φωτός και σκοταδιού (φωτοπερίοδος) η οποία έχει αξιοσημείωτη επίδραση στη γενικότερη αξιοποίηση της απορροφούμενης φωτεινής ακτινοβολίας. Λόγω της έλλειψης φωτεινής ενέργειας κατά τη διάρκεια της νύχτας, τα μικροφύκη πρέπει να υποστηρίξουν το μεταβολισμό τους με την αναπνοή προκειμένου να επιβιώσουν. Αποτέλεσμα αυτής της μεταβολικής διαδικασίας είναι ότι μεγάλο ποσοστό της βιομάζας που παράχθηκε κατά τη διάρκεια της μέρας μπορεί να χαθεί κατά τη διάρκεια της νύχτας (ακόμα και > 42% Jacob-Lopes *et al.*, 2009).

Πρέπει να σημειωθεί ότι μέσα σε ένα φωτοβιοαντιδραστήρα τα μικροφύκη μπορούν να αντιμετωπίσουν και ένα διαφορετικό τύπο εναλλαγής φωτός/σκοταδιού κατά την κίνησή τους μέσα στο κύκλωμα κατά τη διάρκεια της ημέρας. Τα μικροφύκη μπορούν να αντιμετωπίσουν διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα, όπως ο έντονος φωτισμός κοντά στην επιφάνεια του PBR αλλά και σκοτάδι στο κέντρο του PBR κατά ένα επαναλαμβανόμενο τρόπο. Σαν αποτέλεσμα, τα μικροφύκη υποβάλλονται σε διάφορους κύκλους φωτός/σκοταδιού, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από δύο παραμέτρους το κλάσμα φωτός και την περίοδο. Το κλάσμα φωτός είναι το ποσό του χρόνου που τα μικροφύκη εκτίθενται στο φως διαιρούμενο με το συνολικό χρόνο που διαρκεί ο κύκλος φωτός/σκοταδιού. Περίοδος είναι ο χρόνος που τα κύτταρα κάνουν έναν ολοκληρωμένο κύκλο στον PBR. Όταν ο κύκλος φωτός/σκοταδιού διαρκεί μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στην αύξηση των κυττάρων και στην απορρόφηση της φωτεινής ακτινοβολίας. Τα αρνητικά αποτελέσματα φαίνεται να μειώνονται όταν η περίοδος γίνεται αρκετά μικρή. Έχει επίσης βρεθεί ότι η βιομάζα και ο ρυθμός αύξησης επηρεάζονται έντονα από το κλάσμα φωτός (Barbosa *et al.*, 2003).

Ο πιο σημαντικός παράγοντας που αφορά στην απορρόφηση του φωτός είναι η διαφάνεια των υλικών και η αναλογία επιφάνειας όγκου.

Τα πιο κοινά υλικά που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή PBRs είναι το γυαλί, το πολύ-μεθ-ακρυλικό (PMMA, plexiglass), το πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC), το ακρυλικό πολυβινυλοχλωρίδιο (acrylic-PVC), και το πιο κοινό πολυαιθυλένιο (LDPE ή HDLPE). Τα υλικά αυτά έχουν ικανοποιητική φωτο-διαπερατότητα και μηχανικά επαρκούν για την κατασκευή PBRs. Παρόλα αυτά, όλα έχουν αρνητικά και θετικά και πρέπει να εξετάστεί ξεχωριστά η κάθε κατασκευή ενός PBR για να αποφασιστεί ποιο θα χρησιμοποιηθεί. Για παράδειγμα, το γυαλί είναι σκληρό και διάφανο και πολύ καλό υλικό για κατασκευή μικρών φωτοβιοαντιδραστήρων, αλλά απαιτεί πολλές συνδέσεις για την κατασκευή μεγάλης κλίμακας PBR, γεγονός που αυξάνει το κόστος κατασκευής.

Η δυνατότητα της επιφάνειας του υλικού να αποτρέψει το σχηματισμό biofilm είναι ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό γνώρισμα που πρέπει να εξετασθεί. Το biofilm δεν είναι μόνο δύσκολο να καθαριστεί αλλά μειώνει δραστικά τη φωτεινή ακτινοβολία που μπορεί να απορροφήσουν τα μικροφύκη.

Διάφοροι τύποι PBR έχουν κατασκευαστεί προκειμένου να αυξήσουν την αναλογία επιφάνεια/όγκου. Για παράδειγμα επίπεδου ελάσματος (flat panel PBR FP-PBR) και κυλινδρικοί (T-PBR) έχουν καθιερωθεί σαν δύο από τους πιο υποσχόμενους τύπους φωτοβιοαντιδραστήρων για βιομηχανική παραγωγή μικροφυκών κυρίως γιατί προσφέρουν μεγάλη αναλογία επιφάνειας/όγκου.

3.2.2 CO₂/O₂ ισορροπία και ανταλλαγές αερίων

Στην ανάπτυξη των κυττάρων των φωτοσυνθετικών μικροφυκών εμπλέκονται τρεις ανταγωνιστικές κυτταρικές διαδικασίες: η φωτοσύνθεση, η φωτοαναπνοή και η αναπνοή στο σκοτάδι. Η φωτοσύνθεση χρησιμοποιεί τη φωτεινή ενέργεια για την αναγωγή του CO₂ και την χρήση του στην σύνθεση βιομάζας και απελευθερώνει O₂ σαν παραπροϊόν. Σε υψηλές τιμές διαλυμένου οξυγόνου, το ένζυμο ριβουλόζη-1,5-διφωσφορική καρβοξυλάση οξυγενάση (Rubisco), το βασικό ένζυμο καρβοξυλίωσης το οποίο ενσωματώνει CO₂ στο κύκλο του Calvin κατά την φωτοσύνθεση, μπορεί να χρησιμοποιήσει το O₂ για φωτοαναπνοή και να παραχθεί CO₂ οξειδώνοντας σάκχαρα. Υψηλή συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) άρα είναι τοξική για τα μικροφύκη. Κατά την έκθεση σε υψηλή φωτεινή ακτινοβολία σχηματίζονται ενεργές οξυγονούχες ενώσεις όπως οι οξυγονούχες ρίζες οι οποίες μπορεί να καταστρέψουν τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες και άλλα κυτταρικά συστατικά. Οι υψηλές θερμοκρασίες, ο έντονος φωτισμός σε συνδυασμό με μείωση του CO₂ μπορεί να εντείνει την ανασταλτική δράση του DO. Στα κλειστά κυκλώματα φωτοβιοαντιδραστήρων το O₂ που παράγεται μπορεί να φύγει από το κύκλωμα μόνο όταν φθάσει στη δεξαμενή εξαέρωσης γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της ανάπτυξης των μικροφυκών (Weissman *et al.*, 1988).

Το CO₂ είναι η πηγή άνθρακα σε αυτότροφους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς και μπορεί να γίνει περιοριστικός παράγοντας εάν η συγκέντρωση του είναι χαμηλή. Από την άλλη μεριά υψηλή συγκέντρωση διαλυμένου CO₂ (dCO₂) μπορεί να χαμηλώσει σημαντικά το pH της καλλιέργειας, κάτι που μπορεί να είναι ανασταλτικός παράγοντας για την ανάπτυξη των περισσότερων μικροφυκών. Για να επιτύχουμε μια άριστη ισορροπία μεταξύ dCO₂/DO ένας ειδικός χώρος για ανταλλαγή αερίων (δοχείο ή δεξαμενή) συνήθως περιλαμβάνεται στους κλειστούς φωτοβιοαντιδραστήρες PBR.

Στο σύστημα επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί εμπλουτισμός με CO₂ ή/και σύστημα απομάκρυνσης O₂ για να βελτιωθεί η ισορροπία μεταξύ dCO₂/DO στην καλλιέργεια.

3.2.3 Θερμοκρασία

Οι απαιτήσεις σε έκταση και σε φωτεινή ακτινοβολία της καλλιέργειας μικροφυκών συνεπάγεται ότι η εμπορικής κλίμακας καλλιέργειες θα είναι τοποθετημένες σε εξωτερικό χώρο εκτεθειμένο σε μεγάλη μεταβολή φωτός/σκοταδιού αλλά και σε εποχιακές θερμοκρασιακές μεταβολές. Η κατασκευή χαμηλού κόστους μηχανισμών ρύθμισης της θερμοκρασίας που να έχουν ικανοποιητικό αποτέλεσμα είναι μια πρόκληση στο σχεδιασμό PBRs. Έχει αποδειχθεί ότι χωρίς έλεγχο της θερμοκρασίας σε ένα κλειστό κύκλωμα PBR η θερμοκρασία μπορεί να φθάσει από 10 έως 30° C υψηλότερα από την

επιθυμητή. Έτσι διάφοροι μηχανισμοί ψύξης έχουν σχεδιαστεί για να ρυθμίζουν τη θερμοκρασία στα επιθυμητά όρια. Μερικοί από αυτούς είναι: η βύθιση ολόκληρης της καλλιέργειας σε νερό, η σκίαση, το βρέξιμο-ψεκασμός με νερό ή και η ενσωμάτωση ενός συστήματος ψύξης στο PBR (Mehlitz, 2009).

3.2.4 pH

Οι άριστες τιμές pH για τα περισσότερα καλλιεργούμενα μικροφύκη είναι μεταξύ 7-9. Υπάρχουν όμως και μερικά μικροφύκη που μπορούν να αναπτύσσονται σε περισσότερο όξινα ή αλκαλικά περιβάλλοντα. Για παράδειγμα το κυανοβακτήριο *Spirulina platensis* αναπτύσσεται σε pH μεταξύ 7-10 (Vieira Costa *et al.*, 2004). Στις καλλιέργειες μικροφυκών υψηλής πυκνότητας χρησιμοποιείται αέρας εμπλουτισμένος με CO₂. Η συγκέντρωση dCO₂ στο θρεπτικό μέσο είναι ένας από τους κυριότερους παράγοντες που μπορούν να χαμηλώσουν την τιμή του pH (Sanchez *et al.*, 2003). Σε πολλούς συμβατικούς PBR (στους οποίους το pH δεν μπορεί να ελεγχθεί με άλλο τρόπο) ο μηχανισμός ρύθμισης του pH έχει ενοποιηθεί με το σύστημα αερισμού προσφέροντας βασικές λύσεις για την καλλιέργεια.

3.2.5 Μείξη, ανάδευση, κυκλοφορία

Τα μικροφύκη ζουν στα φυσικά περιβάλλοντά τους σε μια κατά προσέγγιση μέγιστη πυκνότητα 10³ κύτταρα/ml και η απόσταση που έχουν τα κύτταρα μεταξύ τους είναι μεγαλύτερη από 1000 μm. Όμως σε υψηλή πυκνότητα κυττάρων που μπορεί να φθάσει τα 10⁹ κύτταρα/ml μειώνεται δραστικά η διαπερατότητα του φωτός, αυξάνεται ο ρυθμός απορρόφησης του dCO₂ και της συσσώρευσης του DO και αυξάνεται η θερμοκρασία της καλλιέργειας. Η ανάμειξη της καλλιέργειας είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος διότι:

- Αποτρέπει την καθίζηση των κυττάρων.
- Διασφαλίζει ότι τα κύτταρα της καλλιέργειας θα έχουν την ίδια περίπου μέση έκθεση στο φως και σε θρεπτικά.
- Διευκολύνει τη μεταφορά θερμότητας και αποφεύγεται η θερμική διαστρωμάτωση.
- Βελτιώνει την ανταλλαγή αερίων μεταξύ του θρεπτικού μέσου και της αέριας φάσης.

Ανάλογα με την κλίμακα και το είδος του καλλιεργητικού συστήματος, η ανάμειξη της καλλιέργειας μπορεί να γίνει με αερισμό, με αντλία, με μηχανική ανάδευση ή με συνδυασμό των ανωτέρω. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν είναι όλα τα είδη μικροφυκών ανθεκτικά σε έντονη ανάμειξη. Η μηχανική ανάδευση και οι φυσαλίδες συχνά οδηγούν σε

υδροδυναμική καταπόνηση το οποίο επηρεάζει την ανάπτυξη των φυκών και τις μεταβολικές τους διαδικασίες (Suh & Lee, 2003).

3.2.6 Αποστείρωση και καθαριότητα

Όταν η καλλιέργεια μικροφυκών χρησιμοποιείται για χαμηλής αξίας προϊόντα, όπως τα βιοκαύσιμα και η δέσμευση CO₂, τότε η επιμόλυνσεις της καλλιέργειας με άλλα είδη μικροοργανισμών δεν επηρεάζουν πολύ αρνητικά την καλλιέργεια. Ωστόσο προφυλάξεις πρέπει να λαμβάνονται προκειμένου να αποφευχθούν μεγάλης έκτασης μόλυνσεις. Ευτυχώς, για τις καλλιέργειες αυτότροφων μικροφυκών οι επιμόλυνσεις από ετερότροφους μικροοργανισμούς δεν είναι ανησυχητικές λόγω της έλλειψης πηγών άνθρακα στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Παρόλα αυτά ο έλεγχος των εξωτικών και επεκτατικών ειδών φυκών καθώς και οι θηρευτές τους είναι κρίσιμος για σταθερή και συνεχή καλλιέργεια αλλά και για την ποιότητα των προϊόντων.

Ο καθαρισμός είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία ενός PBR διότι προλαμβάνει το σχηματισμό biofilm στα τοιχώματα των σωληνώσεων και κατά συνέπεια δεν μειώνεται η φωτεινή ακτινοβολία που φθάνει στους μικροοργανισμούς και ελαχιστοποιεί την πιθανότητα μόλυνσης. Για να αυξήσουμε τη δυνατότητα καθαρισμού πρέπει να ακολουθούνται οι ακόλουθες αρχές:

Η εσωτερική επιφάνεια του PBR πρέπει να είναι ομαλή.

Ο αριθμός των εσωτερικών στρωφών πρέπει να είναι μικρός.

Οι εσωτερικές διαστάσεις πρέπει να είναι αρκετά μεγάλες ώστε να επιτρέπουν τον κατάλληλο καθαρισμό.

4. Υλικά και μέθοδοι

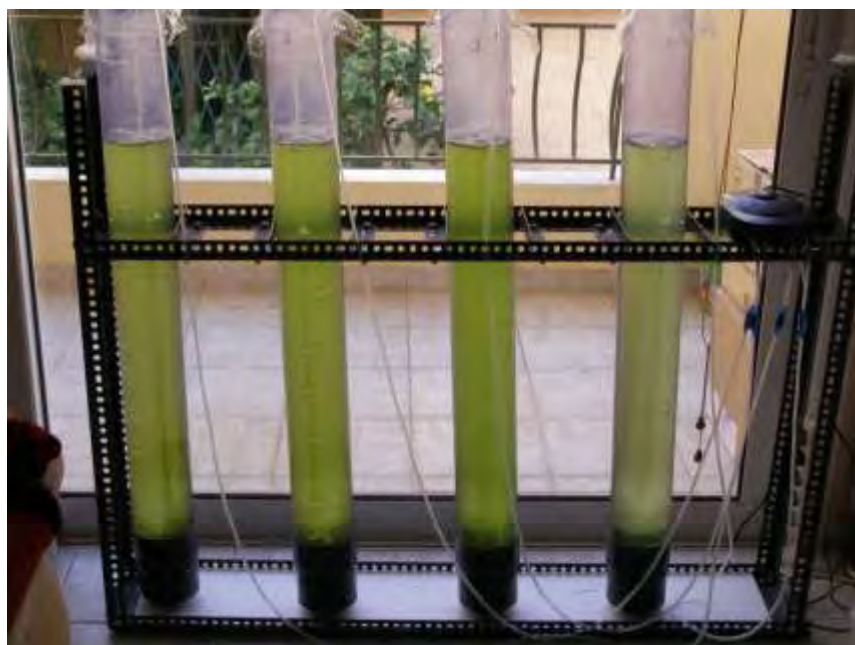
4.1 Υλικά

Για την καλλιέργεια του χλωροφύκου *H. pluvialis* έγινε προμήθεια του στελέχους SAG 34-1n από τη συλλογή μικροφυκών και πρωτοζώων του Πανεπιστημίου του Göttingen στη Γερμανία [The Culture Collection of Algae at the University of Göttingen, Germany (SAG)] (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Αρχικό στέλεχος χλωροφύκου *H. pluvialis* (SAG 34-1n).

Η καλλιέργεια του χλωροφύκου *H. pluvialis* πραγματοποιήθηκε σε 4 φωτοβιοαντιδραστήρες πνευματικής ανάδευσης (bubble column photo bioreactor) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Τέσσερις φωτοβιοαντιδραστήρες πνευματικής ανάδευσης (Bubble column PBR) με το μεταλλικό πλαίσιο στήριξής τους.

Ο κάθε φωτοβιοαντιδραστήρας αποτελούνταν από ένα σωλήνα ύψους 1 m κατασκευασμένο από διάφανο πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC-U). Οι σωλήνες προμηθεύτηκαν από την εταιρεία George Fisher Deka GmbH (+GF+). Στο κάτω μέρος του σωλήνα τοποθετήθηκε με κόλληση ένα μικρό τμήμα αδιαφανή σωλήνα PVC κλειστό από την κάτω πλευρά έτσι ώστε να μπορεί να τοποθετηθεί υγρό μέσα σε αυτόν σε κατακόρυφη θέση. Ο κάθε σωλήνας είχε εξωτερική διάμετρο 110 mm και εσωτερική 107,8 mm (R=53,9 mm). Όλοι στηρίζονται σε μεταλλικό πλαίσιο (dexion). Ο μέγιστος όγκος κάθε σωλήνα ήταν 9,12 L, όμως κατά τη διάρκεια του πειράματος ο μέγιστος όγκος καλλιέργειας που τοποθετήθηκε στους φωτοβιοαντιδραστήρες ήταν 7 L, για λόγους ασφαλείας (Εικόνα 15).

Μια αεραντλία Sera air 550 R plus με τέσσερις εξόδους παροχής αέρα (Εικόνα 16) τροφοδοτούσε τον κάθε φωτοβιοαντιδραστήρα με αέρα μέσω εύκαμπτου σωλήνα σιλικόνης διαμέτρου 2 mm. Κάθε σωληνάκι σιλικόνης κατέληγε στο εσωτερικό του σωλήνα στο κάτω μέρος του με 2 διακλαδώσεις σχήματος T έτσι ώστε ο αέρας να διοχετεύεται από περισσότερες από μίας πηγές στο θρεπτικό μέσο και να αυξάνεται ο αριθμός των φυσαλίδων στο σύστημα (Εικόνα 17).



Εικόνα 16. Αεραντλία Sera air 550 R plus με τέσσερις εξόδους παροχής αέρα.



(α)

(β)

Εικόνα 17. (α) Εύκαμπτος σωλήνας σιλικόνης διαμέτρου 2 mm. (β) Διακλάδωση στο κάτω μέρος του σωλήνα σιλικόνης.

Η διοχέτευση αέρα σε μια καλλιέργεια χλωροφύκους μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα διότι στον αέρα βρίσκονται διάφοροι μικροοργανισμοί ή σπόρια μυκήτων τα οποία μπορούν να επιμολύνουν την καλλιέργεια. Έτσι στην έξοδο κάθε παροχής αέρα της αεραντλίας κατασκευάστηκε διάταξη φιλτραρίσματος αέρα. Η διάταξη αυτή αποτελείται από 2 φίλτρα με ενεργό άνθρακα ανάμεσά τους και εξασφαλίζει την καθαρότητα του παρεχόμενου αέρα στην καλλιέργεια ([Εικόνα 18](#)).



Εικόνα 18. Διάταξη φιλτραρίσματος αέρα.

Στους δύο φωτοβιοαντιδραστήρες το χλωροφύκος καλλιεργήθηκε στο θρεπτικό μέσο BBM-3N (Bold's Basal Medium and triple Nitrate). Στον πίνακα 4 φαίνονται τα θρεπτικά άλατα-συστατικά του BBM. Το BBM-3N προκύπτει αν προστεθεί τριπλάσια ποσότητα νιτρικού άλατος (NaNO_3) (Andersen, 2005).

Πίνακας 4. Σύσταση του θρεπτικού μέσου Bold's Basal. Το BBM-3N προκύπτει αν προσθέσουμε τριπλάσια ποσότητα νιτρικού άλατος (NaNO_3) (Andersen, 2005).

Component	Stock Solution ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
<i>Macronutrients</i>			
NaNO_3	25.00	10 mL	2.94×10^{-3}
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.50	10 mL	1.70×10^{-4}
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.50	10 mL	3.04×10^{-4}
K_2HPO_4	7.50	10 mL	4.31×10^{-4}
KH_2PO_4	17.50	10 mL	1.29×10^{-3}
NaCl	2.50	10 mL	4.28×10^{-4}
Alkaline EDTA Solution		1 mL	
EDTA	50.00		1.71×10^{-4}
KOH	31.00		5.53×10^{-4}
Acidified Iron Solution		1 mL	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.98		1.79×10^{-5}
H_2SO_4		1 mL	
Boron Solution		1 mL	
H_3BO_3	11.42		1.85×10^{-4}
Trace Metals Solution		1 mL	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.82		3.07×10^{-5}
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.44		7.28×10^{-6}
MoO_3	0.71		4.93×10^{-6}
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.57		6.29×10^{-6}
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.49		1.68×10^{-6}

Στους άλλους δύο σωλήνες το χλωροφύκος καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο που δημιουργήθηκε με προσθήκη λιπάσματος Nutrileaf 30-10-10 της εταιρείας MILLER σε απιονισμένο νερό. Το Nutrileaf 30-10-10 είναι ένα υδατοδιαλυτό διαφυλλικό λίπασμα με ιχνοστοιχεία (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Συσκευασία λιπάσματος Nutrileaf 30-10-10.

Η σύνθεση του λιπάσματος αυτού είναι: 30% N (3% νιτρικό, 3,7% αμμωνιακό και 23,3% ουρία), 10% P_2O_5 , 10% K_2O , 0,0251% Mg, 0,02% B, 0,05% Cu, 0,10% Fe, 0,05% Mn, 0,001% Mo, 0,05% Zn.

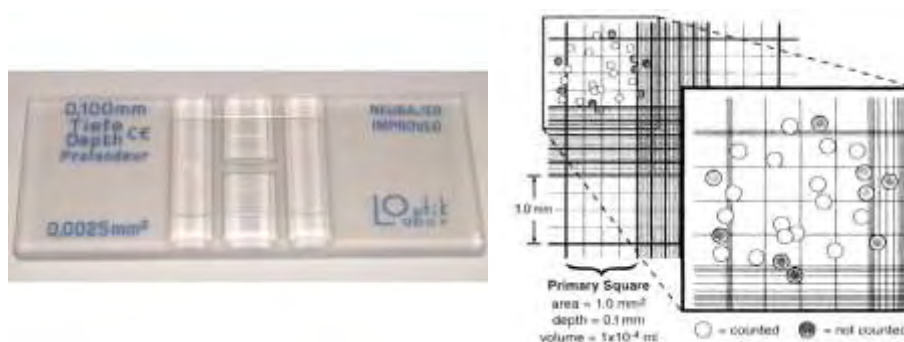
Οι μετρήσεις όγκων του απιονισμένου νερού καθώς και των διαλυμάτων των συστατικών του θρεπτικού μέσου 3N-BBM έγιναν με γυάλινο ογκομετρικό σωλήνα 500 ml καθώς και με γυάλινες πιπέτες μετρήσεως 10 ml και 2 ml (HBG Germany). Επίσης

χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα γυάλινα μπουκαλάκια για την τοποθέτηση μικρών όγκων καλλιέργειας για διάφορες μετρήσεις (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Γυάλινα μπουκαλάκια και γυάλινες πιπέτες μετρήσεως όγκου.

Για τις μετρήσεις των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Ο όγκος του κυτταρικού ελαιωρήματος που καλύπτει ένα από τα εννέα τετράγωνα είναι 0.1mm³ ή 1x10⁻⁴ ml.

Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις του χλωροφύκου *H. pluvialis* έγιναν με οπτικό μικροσκόπιο OLYMPUS CX41 (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Οπτικό μικροσκόπιο OLYMPUS CX41.

Για το φασματοφωτομετρικό υπολογισμό της συγκέντρωσης των καρροτενοειδών και της ασταξανθίνης χρησιμοποιήθηκε [αρχικά](#) φυγόκεντρος τεσσάρων θέσεων (Hettich EBA III) ([Εικόνα 23](#)).



Εικόνα 23. Φυγόκεντρος Hettich EBA III.

Ζυγαριά ακριβείας μέχρι [τριών](#) δεκαδικών ψηφίων ADAM ACB plus-[150](#) ($d=0,001$ g, $\text{max}= 150$ g) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της βιομάζας του μικροφύκου, καθώς και για τη μέτρηση της μάζας του λιπάσματος για τη δημιουργία του θρεπτικού Nutrileaf ([Εικόνα 24](#)).



Εικόνα 24. Ζυγαριά ακριβείας μέχρι [τριών](#) δεκαδικών ψηφίων ADAM ACB plus-[150](#).

Για την φασματοφωτομετρική μέτρηση της ασταξανθίνης χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Hach Lange DR 2800 ([Εικόνα 25](#)).



Εικόνα 25. Φασματοφωτόμετρο Hach Lange DR 2800.

4.2 Αναλυτικές μέθοδοι

4.2.1 Αρχική καλλιέργεια

Το αρχικό στέλεχος του χλωροφύκου *H. pluvialis* (SAG 34-1n) εστάλλει σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα 10 ml, μέσα στον οποίο το χλωροφύκος βρισκόταν σε στερεό θρεπτικό μέσο ([Εικόνα 14](#)). Σε συνεργασία με τον επιβλέποντα καθηγητή αποφασίστηκε να σταλλεί στο εργαστήριο Οικολογίας και Συστηματικής του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών προκειμένου το χλωροφύκος με ασφάλεια να μεταφερθεί σε υγρό θρεπτικό μέσο χωρίς να επιμολυνθεί η καλλιέργεια αφού στο χώρο παραγματοποίησης του πειράματος (Κεφαλονιά) δεν υπήρχε δυνατότητα για την υλοποίηση αυτής της διαδικασίας. Αφού η διαδικασία αυτή προχώρησε με επιτυχία, [παρελήφθησαν](#) 500 ml υγρής καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο BBM-3N ([Εικόνα 26](#)).



Εικόνα 26. 500 ml καλλιέργειας *H. pluvialis* σε θρεπτικό μέσο BBM-3N.

4.2.2 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο θρεπτικά μέσα προκειμένου συγκρίνουμε την ανάπτυξη του χλωροφύκου σε κάθε ένα από αυτά. Το πρώτο είναι το BBM-3N και το δεύτερο ένα αυτοσχέδιο θρεπτικό που κατασκευάστηκε με το διαφυλλικό λίπασμα Nutrileaf.

4.2.2.1 Σύνθεση θρεπτικού μέσου Bold's Basal Medium and triple Nitrate (BBM-3N)

Για τη σύνθεση του θρεπτικού μέσου Bold's Basal Medium and triple Nitrate BBM-3N απαιτούνται τα συστατικά που αναφέρονται στον πίνακα 4. Θα μπορούσε να συντεθεί η συνολική ποσότητα του θρεπτικού 3N-BBM που απαιτήθηκε για την εργασία, όμως για να αποφευχθεί η κατακρίμνηση ιζημάτων που δημιουργούνται από την ταυτόχρονη προσθήκη όλων των ανόργανων συστατικών και την χημική αλληλεπίδρασή τους, πραγματοποιήθηκε η σταδιακή σύνθεση και προσθήκη θρεπτικού για την αύξηση του όγκου της καλλιέργειας, ανάλογα με την πορεία του πειράματος. Έτσι παρασκευάστηκαν έξι (6) διαφορετικά διαλύματα των θρεπτικών αλάτων 1 L το καθένα (NaNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl) και τέσσερα (4) διαλύματα (διάλυμα EDTA-EDTA solution, Όξινο διάλυμα σιδήρου-Acidified iron solution, διάλυμα βορικού οξέος- H_3BO_3 , διάλυμα ιχνοστοιχείων-Trace metals solution). Για την σύνθεση 1L BBM-3N προστέθηκαν σε 936 ml απιονισμένου νερού, 10 ml από καθένα από τα 6 πρώτα διαλύματα (Εικόνα 27α) και από 1 ml από τα υπόλοιπα 4 διαλύματα (Εικόνα 27β). Έτσι ο συνολικός όγκος του θρεπτικού έγινε 1 L.



(α)

(β)

Εικόνα 27. Σύνθεση θρεπτικού μέσου BBM-3N. (α) Θρεπτικά άλατα σε κρυσταλλική μορφή από τα οποία παρασκευάστηκαν 6 υδατικά διαλύματα 1 L με κάθε ένα από αυτά. (β) Τέσσερα έτοιμα υδατικά διαλύματα θρεπτικών συστατικών.

4.2.2.2 Σύνθεση θρεπτικού μέσου Nutrileaf

Για τη σύνθεση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας με το διαφυλλικό λίπασμα Nutrileaf πρέπει να προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα λιπάσματος σε 1 L απιονισμένου νερού. Επειδή ένα από τα σημαντικότερα ανόργανα συστατικά για την ανάπτυξη χλωροφυκών είναι το άζωτο (N), η ποσότητα του λιπάσματος υπολογίστηκε βάσει της επί τοις εκατό (%) βάρους κατ' όγκο συγκέντρωσης του αζώτου (N₂) που περιέχεται στο νιτρικό νάτριο (NaNO₃) του θρεπτικού μέσου BBM-3N. Η ποσότητα σε g του λιπάσματος Nutrileaf που έπρεπε να προστεθεί σε 1L απιονισμένου νερού υπολογίστηκε σε 0,41 g (Εικόνα 28). Τα υπόλοιπα συστατικά των δύο συγκρινόμενων θρεπτικών μέσων διέφεραν και ένας από τους στόχους του πειράματος ήταν να παρακολουθηθεί η ανάπτυξη του μικροφύκου σε κάθε ένα από αυτά.



Εικόνα 28. Υπολογισμός και ζύγιση απαιτούμενης ποσότητας Nutrileaf.

4.2.3 Μετρήσεις κυττάρων *H. pluvialis*

Για τις μετρήσεις των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (Εικόνα 21). Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Κάθε μια από αυτές έχει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm. Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2.5 μm, που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του εάν τα κύτταρα θα θεωρηθούν ότι βρίσκονται μέσα ή έξω από πλέγμα. Επίσης κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0.1 mm χαμηλότερα από δύο «ράχες» στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται μικρή ποσότητα από την καλλιέργεια, η οποία με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που καλύπτει ένα από τα εννέα τετράγωνα είναι 0.1 mm^3 ή 1×10^{-4} ml. Έτσι ο αριθμός των κυττάρων σε 1 ml προκύπτει από τη μέση τιμή των κυττάρων που έχουν μετρηθεί στα 5 τετράγωνα πολλαπλασιαζόμενη με 10^4 .

4.2.4. Υπολογισμός ρυθμού αύξησης

Κατά την εκθετική αύξηση πληθυσμού μονοκύτταρων μικροοργανισμών, ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων είναι ανάλογος του αρχικού αριθμού κυττάρων της καλλιέργειας. Ο εξίσωση που περιγράφει την αύξηση του πληθυσμού είναι:

$$\frac{dn}{dt} = rN \quad (1)$$

Η λύση της παραπάνω εξίσωσης ως προς τον αριθμό κυττάρων καλλιέργειας στο τέλος του χρόνου παρατήρησης δίνει τον παρακάτω τύπο:

$$N_t = N_0 e^{rt} \quad (2)$$

όπου, N_0 αριθμός κυττάρων του πληθυσμού στην αρχή του χρονικού διαστήματος, N_t ο αριθμός κυττάρων του πληθυσμού στο τέλος του χρονικού διαστήματος, r ο στιγμιαίος ρυθμός αύξησης ή Μαλθουσιανή παράμετρος (Michelle Wood *et al.*, 2005). Οι μονάδες για το r εκφράζονται ανά μονάδα χρόνου t^{-1} .

Λύνοντας την εξίσωση (2) ως προς το r φθάνουμε στον παρακάτω τύπο:

$$r = \frac{\ln(N_t/N_0)}{\Delta t} = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\Delta t} \quad (3)$$

όπου $\Delta t = t_t - t_0$.

Η εξίσωση (1) είναι ισοδύναμη με την κλασική εξίσωση αύξησης

$$r = \mu - m \quad (4),$$

όπου μ ο ειδικός ρυθμός αύξησης και m η θνησιμότητα. Στην εξίσωση αυτή το r γίνεται ίσο με το μ όταν η θνησιμότητα (m) είναι μηδέν.

Εάν ο χρόνος t εκφράζεται σε ημέρες τότε ο ρυθμός αύξησης r μπορεί να μετατραπεί σε διπλασιασμούς ανά ημέρα (k) διαιρώντας το r με το νεπέριο λογάριθμο του 2 ($\ln 2$)

$$k = \frac{r}{\ln 2} = \frac{r}{0,6931} \quad (5)$$

Έτσι προκύπτει ότι $k = \frac{\ln(N_t/N_0)}{\Delta t} = \frac{\ln 2}{\Delta t} \quad (6)$

Ο χρόνος διπλασιασμού του αριθμού των κυττάρων (T_2) μπορεί να υπολογιστεί αν γνωρίζουμε το r .

Ο τύπος υπολογισμού είναι:

$$T_2 = 0,6931/r \quad (7)$$

Ο χρόνος διπλασιασμού T_2 μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση (3) αν θέσουμε $N_t = 2N_0$ και $\Delta t = T_2$. Έτσι προκύπτει ότι:

$$r = \frac{\ln 2}{T_2} \Rightarrow T_2 = \frac{\ln 2}{r} \Rightarrow T_2 = \frac{0,6931}{r} \quad (8)$$

(Michelle Wood *et al.*, 2005).

4.2.5. Καλλιέργεια *H. pluvialis* – Διαδικασία διαδοχικών αραιώσεων

Ο όγκος της αρχικής καλλιέργεια *H. pluvialis* σε υγρό θρεπτικό μέσο BBM-3N (Εικόνα 18) ήταν 500 ml. Για να εμβολιαστεί ικανή ποσότητα καλλιέργειας στους φωτοβιοαντιδραστήρες έπρεπε ο όγκος της να αυξηθεί έτσι ώστε σε κάθε σωλήνα να τοποθετηθούν 2 L καλλιέργειας. Αυτό έγινε με τη διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων.

4.2.5.1. Α΄ φάση καλλιέργειας - Καλλιέργεια σε διάφανα πλαστικά μπουκάλια χωρητικότητας 1,5 L

Η αρχική καλλιέργεια αφού αφέθηκε 4 μέρες να εγκληματιστεί, μοιράστηκε σε δύο διάφανα πλαστικά μπουκάλια χωρητικότητας 1,5 L, στα οποία ο όγκος καλλιέργειας στο κάθε ένα έφθασε στο 1 L (Εικόνα 29). Χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο BBM-3N και προστέθηκε αερισμός προκειμένου μπορέσει το μικροφύκος να πολλαπλασιαστεί και να συνεχιστεί η διαδικασία αραίωσης.



Εικόνα 29. Καλλιέργεια σε πλαστικά διάφανα μπουκάλια 1,5 L. Η αρχική καλλιέργεια μοιράστηκε σε 2 μπουκάλια. Ο όγκος της καλλιέργειας σε κάθε μπουκάλι ήταν 1 L.

Μετά από μία ημέρα μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε μπουκάλι και υπολογίστηκε σε 4×10^4 κύτταρα/ml για το πρώτο και σε $8,4 \times 10^4$ κύτταρα/ml για το δεύτερο. Όταν η καλλιέργεια εμφανώς πύκνωσε μετά από δύο ημέρες, μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων ξανά και υπολογίστηκε σε 6×10^5 κύτταρα/ml για το πρώτο και σε $2,5 \times 10^5$ κύτταρα/ml για το δεύτερο.

Στη φάση αυτή προστέθηκε 250 ml θρεπτικού BBM-3N σε κάθε μπουκάλι για να αυξηθεί ο όγκος.

4.2.5.2. Β' φάση καλλιέργειας - Καλλιέργεια σε διάφανα πλαστικά μπουκάλια χωρητικότητας 5 L

Επειδή στα πλαστικά μπουκάλια του 1,5 L δεν ήταν εφικτή η προσθήκη άλλου θρεπτικού, μεταφέρθηκε η καλλιέργεια σε διάφανα πλαστικά δοχεία χωρητικότητας 5 L έκαστο. Ο αρχικός όγκος σε κάθε δοχείο ήταν 1,25 L. Για την αύξηση του όγκου της καλλιέργειας και επειδή το χλωροφύκος είναι λίγο ευαίσθητο, ακολουθήθηκε η τακτική της προσθήκης 500 ml θρεπτικού μέσου BBM-3N σε κάθε δοχείο μέχρι να επιτευχθεί ο συνολικός επιθυμητός όγκος των 8 L (Εικόνα 30).



Εικόνα 30. Καλλιέργεια σε πλαστικά διάφανα δοχεία 5 L. Ο τελικός όγκος της καλλιέργειας σε κάθε δοχείο έφθασε στα 4 L.

Όταν η καλλιέργεια έφθασε τον επιθυμητό όγκο των 8 L συνολικά, αφέθηκαν τα κύτταρα του χλωροφύκου μια εβδομάδα να πολλαπλασιαστούν προτού εμβολιαστούν οι μεγάλοι φωτοβιοαντιδραστήρες.

Προτού εμβολιαστούν τα μικροφύκη, πραγματοποιήθηκε μέτρηση κυττάρων σε κάθε πλαστικό δοχείο και υπολογίστηκαν σε 8×10^5 κύτταρα/ml στο πρώτο και $8,5 \times 10^5$ κύτταρα/ml στο δεύτερο.

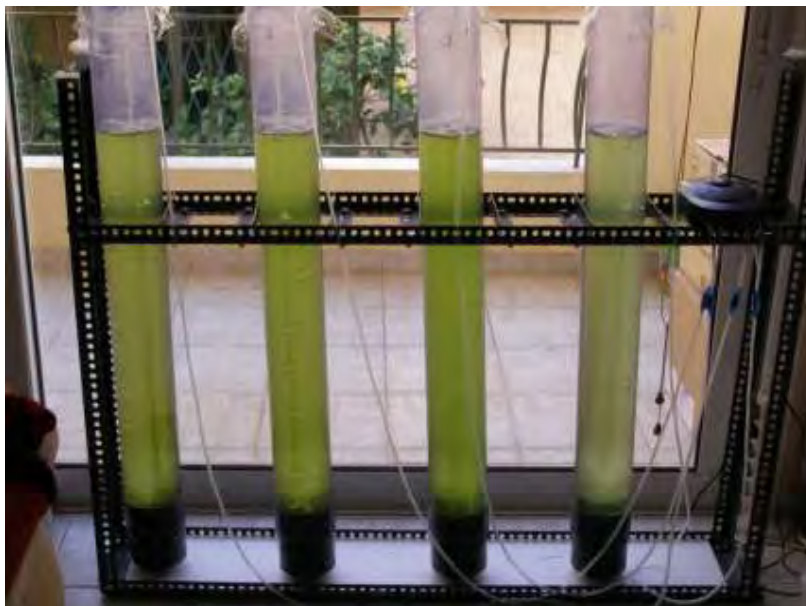
4.2.5.3 Γ' φάση καλλιέργειας - Καλλιέργεια σε φωτοβιοαντιδραστήρες χωρητικότητας 9 L

Ο συνολικός όγκος της καλλιέργειας του χλωροφύκου από τα διάφανα πλαστικά δοχεία των 5L, μοιράστηκε στους 4 φωτοβιοαντιδραστήρες. Έτσι σε κάθε ένα εμβολιάστηκαν 2 L καλλιέργειας. Στη φάση αυτή ξεκίνησε η καλλιέργεια του χλωροφύκου στο θρεπτικό μέσο Nutrileaf. Έτσι στους δύο φωτοβιοαντιδραστήρες (PBR 1 & 2) το χλωροφύκος *H. pluvialis* αναπτύχθηκε αποκλειστικά σε θρεπτικό μέσο BBM-3N και στους άλλους δύο (PBR 3 & 4) σε θρεπτικό μέσο Nutrileaf. Η προσθήκη θρεπτικού μέσου στους φωτοβιοαντιδραστήρες έγινε σταδιακά. Μετά από ένα διάστημα προσαρμογής 2 ημερών του μικροοργανισμού στις νέες συνθήκες, προστέθηκαν 500 ml BBM-3N στους PBR 1 & 2 κάθε μέρα μέχρι να επιτευχθεί ο όγκος των 5 L. Μετά από μια ημέρα προστέθηκε 1 L για 2 ημέρες μέχρι να επιτευχθεί ο τελικός όγκος του PBR στα 7 L.

Στους φωτοβιοαντιδραστήρες 3 & 4 (PBR 3 & 4), μετά από 4 ημέρες προσαρμογής του μικροοργανισμού στις νέες συνθήκες (περισσότερες από το ζεύγος με BBM-3N για να ελαττωθούν τα θρεπτικά από το BBM-3N), προστέθηκαν 500 ml θρεπτικού Nutrileaf κάθε ημέρα μέχρι να επιτευχθεί ο όγκος των 5 L. Μετά από μια ημέρα προστέθηκε 1 L κάθε ημέρα για 2 ημέρες μέχρι να επιτευχθεί ο τελικός όγκος του PBR στα 7 L (Εικόνες 31, 32).



Εικόνα 31. Καλλιέργεια σε φωτοβιοαντιδραστήρες. Στους δύο από αριστερά (PBR 1 & 2) το χλωροφύκος αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο BBM-3N, ενώ στους δύο επόμενους (PBR 3 & 4) σε θρεπτικό μέσο Nutrileaf.



Εικόνα 32. Καλλιέργεια σε φωτοβιοαντιδραστήρες. Ο τελικός όγκος σε κάθε φωτοβιοαντιδραστήρα ήταν 7 L.

Η διαδικασία της σταδιακής προσθήκης μικρής ποσότητας θρεπτικού μέσου προτιμήθηκε για την αποφυγή έντονης αλλαγής στις συνθήκες καλλιέργειας του χλωροφύκου με ενδεχόμενες δυσάρεστες συνέπειες για την εξέλιξη του πειράματος.

Η τρίτη φάση καλλιέργειας διήρκησε 50 ημέρες. Οι 12 πρώτες ημέρες ήταν το χρονικό διάστημα που χρειάστηκε η καλλιέργεια για να φθάσει στον τελικό όγκο των 7 L. Για τις επόμενες 38 ημέρες σε κάθε φωτοβιοαντιδραστήρα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αριθμού κυττάρων του *H. pluvialis* με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου προκειμένου μελετηθεί η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε κάθε έναν από αυτούς.

Η καλλιέργεια του χλωροφύκου πραγματοποιήθηκε στην Κεφαλονιά (Αργοστόλι) το Μάρτιο και Απρίλιο του 2015 σε εσωτερικό χώρο, στον οποίο η θερμοκρασία κυμάνθηκε από 16° C (πρώτες πρωινές ώρες) ως 21° C (μεσημεριανές ώρες).

4.2.6 Φασματοφωτομετρική μέθοδος υπολογισμού συγκέντρωσης καρροτενοειδών και ασταξανθίνης

4.2.6.1 Εξαγωγή καρροτενοειδών από ξηρή βιομάζα *H. pluvialis*

α. Ζύγιση περίπου 25 mg ξηρής βιομάζας *H. pluvialis* και τοποθέτηση σε ένα καθαρό και στεγνό σωλήνα χωρητικότητας 10 ml.

β. Τοποθέτηση 0,5 g μικροσκοπικών θρυμμάτων γυαλιού στο σωλήνα και 2-3 ml καθαρής ακετόνης. Καλό κλείσιμο του σωλήνα και ανακάτεμα δυνατά για 30 δευτερόλεπτα. Φυγοκέντρηση στις 3800-4200 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 3 λεπτά. Μεταφορά του υπερκείμενου διαλύματος σε ένα καθαρό δοχείο χωρητικότητας 50-80 ml.

γ. Επανάληψη της διαδικασίας της ανακίνησης και φυγοκέντρωσης μέχρις ότου το υπερκείμενο διάλυμα γίνει άχρωμο. Συνήθως 4-5 εξαγωγές είναι αρκετές.

δ. Αφού συλλεχθεί όλο το υπερκείμενο, αφήνεται το διάλυμα να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθήκη ακετόνης μέχρι να γεμίσει το δοχείο και καλό ανακάτεμα.

ε. Μεταφορά μιας ποσότητας 8-10 ml σε ένα καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα και φυγοκέντρωση στις 3800-4200 rpm για 3 λεπτά. Αυτό είναι το πρώτο διάλυμα.

στ. Ετοιμασία ενός δεύτερου διαλύματος με αραιώση 1/5 του πρώτου. Μεταφορά 2 ml του πρώτου διαλύματος σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα 10 ml και πλήρωση με ακετόνη. Κλείσιμο και καλή ανακίνηση. Αυτό είναι το δεύτερο διάλυμα.

ζ. Καταγραφή της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο στα 474 nm του δεύτερου διαλύματος χρησιμοποιώντας τυφλό διάλυμα καθαρής ακετόνης.

Για κάθε αρχική ποσότητα βιομάζας προετοιμάζονται 2 δείγματα και πρέπει η φασματοφωτομετρική μέτρηση μεταξύ αυτών να μην διαφέρει πάνω από 3 % (Cyanotech Corporation, 2013).

4.2.6.2 Προσδιορισμός της ποσότητας συνολικών καροτενοειδών και ασταξανθίνης.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας των συνολικών καροτενοειδών βρίσκεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ολικά καροτενοειδή (mg)} = \frac{\text{Abs max} \times \text{όγκος ακετόνης} \times \text{αραιώση}}{210} \quad (9)$$

όπου 210 είναι συντελεστής απορρόφησης της ασταξανθίνης στην ακετόνη.

Από την παραπάνω ποσότητα καροτενοειδών μπορούμε να υπολογίσουμε κατά προσέγγιση το ποσοστό ασταξανθίνης με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ασταξανθίνη} = \frac{\text{εξαγόμενα καροτενοειδή (mg)} \times 85\%}{\text{μάζα δείγματος (mg)}} \quad (10)$$

όπου 85% είναι η επί τοις εκατό σύσταση σε ασταξανθίνη των ολικών καροτενοειδών κατά προσέγγιση (Cyanotech Corporation, 2013).

4.2.7 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον ειδικό ρυθμό αύξησης του μικροφύκου στα δύο θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήσαμε, έγινε με τη μέθοδο ONE WAY ANOVA με το λογισμικό στατιστικό πακέτο Statistica v.7, StatSoft Inc.

5. Αποτελέσματα-Συζήτηση

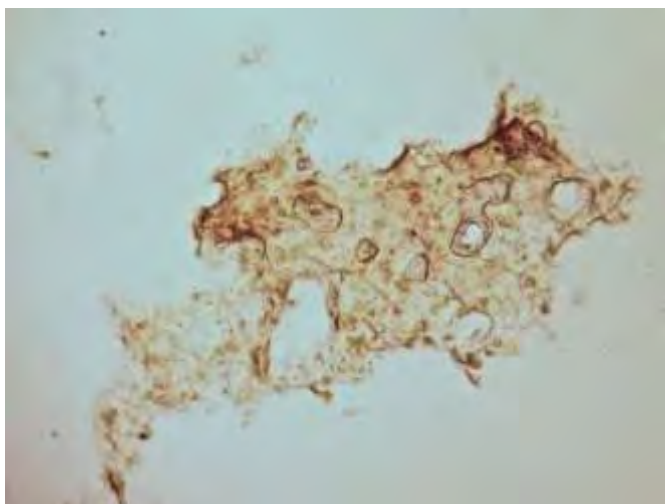
5.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις

Κατά τη διάρκεια και των τριών φάσεων καλλιέργειας του χλωροφύκου *H. pluvialis* παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά κάποια φαινόμενα και πιθανώς οφείλονται στην ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό του μικροοργανισμού στις συνθήκες πραγματοποίησης του πειράματος. Έτσι ενώ στην αρχή κάθε καλλιέργεια ήταν αραιή, με το πέρασμα του χρόνου τα κύτταρα *H. pluvialis* πολλαπλασιάζονται και από σχεδόν διάφανο χρώμα κατέληξαν καταλήγουμε σε έντονο πράσινο (Εικόνα 33).



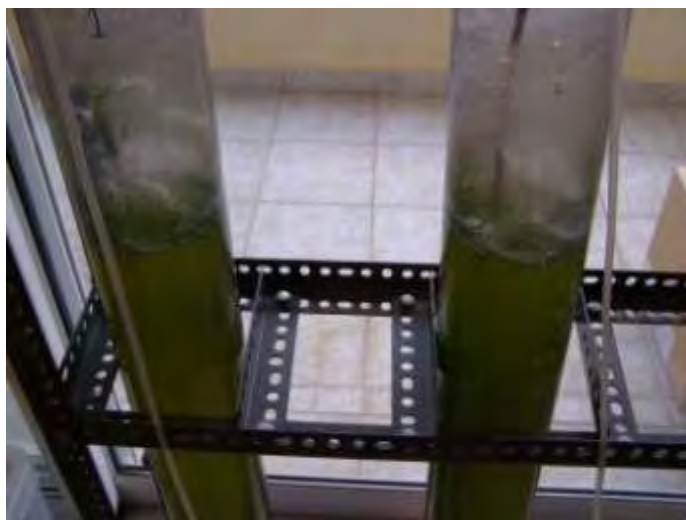
Εικόνα 33. Μακροσκοπική παρατήρηση καλλιέργειας.

Επίσης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας παρατηρήθηκε ότι εναιωρούνταν σωματίδια καφέ-κίτρινου χρώματος που ξεχώριζαν από τα κύτταρα του μικροφύκου γιατί ήταν αρκετά μεγαλύτερα. Στην εικόνα 34 φαίνεται η δομή των σωματιδίων τα οποία αποτελούνται από κρυστάλους πολυσακχαριτών και εκκρίσεις των κυττάρων *H. pluvialis* σχηματίζοντας συσσωματώματα.



Εικόνα 34. Δομή εναιωρούμενων σωματιδίων.

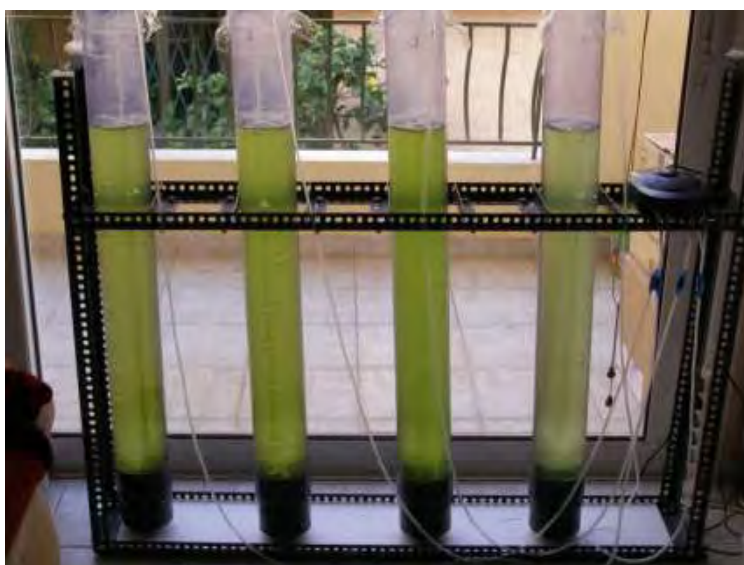
Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού με την προσθήκη αερισμού στους φωτοβιοαντιδραστήρες εμφάνισε στο πάνω μέρος τους αφρό (Εικόνα 35).



Εικόνα 35. Αφρός στο πάνω μέρος των φωτοβιοαντιδραστήρων.

5.2 Μικροσκοπικές παρατηρήσεις

Η συστηματική παρατήρηση και μέτρηση κυττάρων ξεκίνησε όταν ολοκληρώθηκε η συμπλήρωση των PBRs με την απαιτούμενη ποσότητα θρεπτικών δηλαδή όταν όλοι οι PBR είχαν όγκο 7 L (Εικόνα 36).

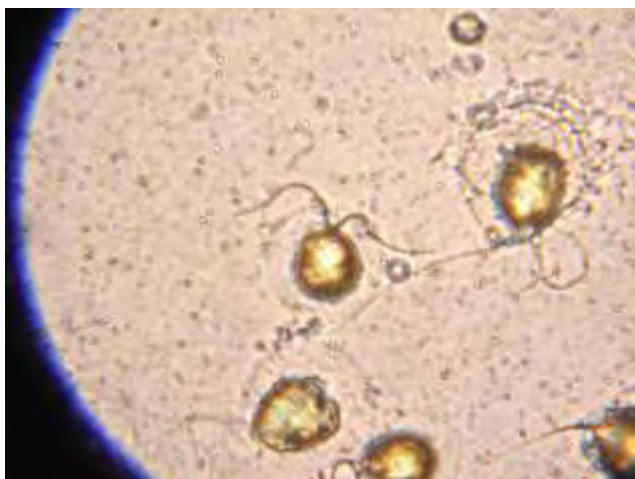


Εικόνα 36. Τέσσερις PBRs με 7 L καλλιέργειας ο κάθε ένας.

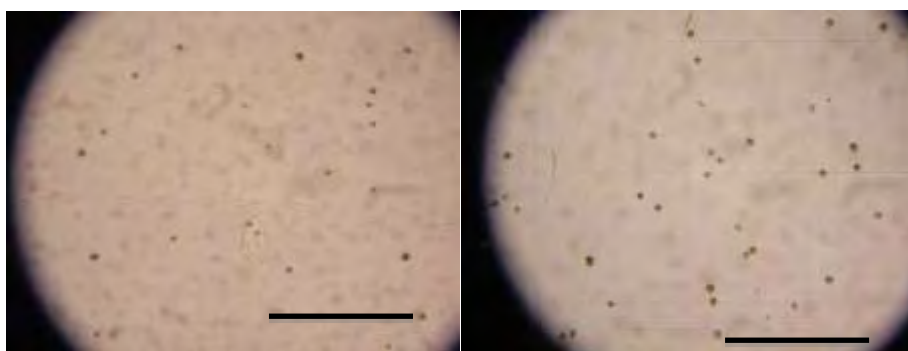
Στη φάση αυτή φωτογραφήθηκε το στέλεχος 34.1n *H. pluvialis* και καταγράφηκαν οι φυσιολογικές αλλαγές που υφίσταντο κατά τη διάρκεια του πειράματος και στις συνθήκες που επικρατούσαν σε κάθε PBR.

Στα αρχικά στάδια καλλιέργειας όπου οι συνθήκες καλλιέργειας ευνοούσαν την ανάπτυξη του μικροφύκου λόγω της περίσσειας των θρεπτικών, τα κύτταρα του *H.*

pluvialis βρίσκονται σχεδόν εξολοκλήρου σε μαστιγοφόρο μορφή σε όλους τους PBRs (Εικόνες 37- 39).



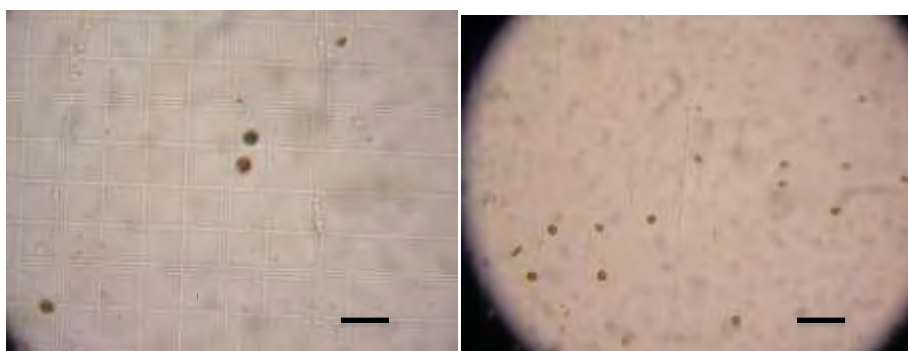
Εικόνα 37. Μαστιγοφόρος μορφή *H. pluvialis*.



(α)

(β)

Εικόνα 38. Μαστιγοφόρος μορφή *H. pluvialis* στους PBR 1 (α) & PBR 2 (β). Φωτογραφία από τη μέτρηση κυττάρων. Κλίμακα 60 μm.



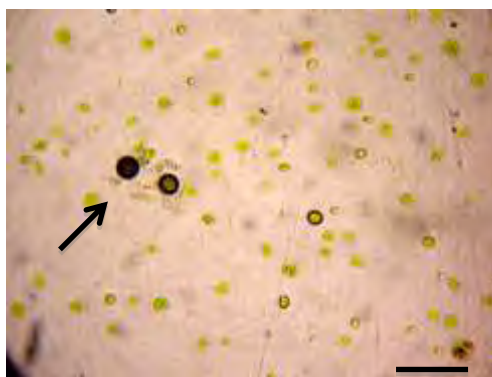
(α)

(β)

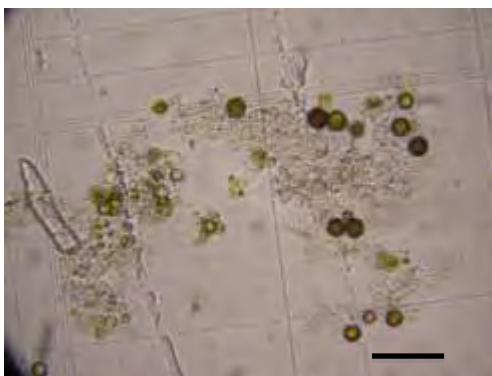
Εικόνα 39. Μαστιγοφόρος μορφή *H. pluvialis* στους PBR 3 (α) & PBR 4 (β). Φωτογραφία από τη μέτρηση κυττάρων. Κλίμακα 50 μm.

Κατά την διάρκεια του πειράματος και όσο περνούσε ο χρόνος καλλιέργειας άρχισαν να εμφανίζονται μεγαλύτερα σφαιρικά κύτταρα χωρίς μαστίγια γεγονός που φανερώνει ότι κάποια κύτταρα είχαν καταπονηθεί και από κινούμενα μαστιγοφόρα μετατρέπονται σε ακίνητα πράσινα κοκκοειδή κύτταρα (palmeloid) (Εικόνα 40).

Στη χρονική φάση αυτή εντοπίστηκαν και κύτταρα στα οποία είχε ξεκινήσει η σύνθεση και η συσσώρευση της ασταξανθίνης στο εσωτερικό των κυττάρων. Έτσι τα κύτταρα εμφάνιζαν μια πορτοκαλοπράσινη όψη που οφειλόταν στην ταυτόχρονη παρουσία της ασταξανθίνης και της χλωροφύλλης. Τα κύτταρα αυτά λέγονται ενδιάμεσα (intermediate cells) (Εικόνες 40, 41).

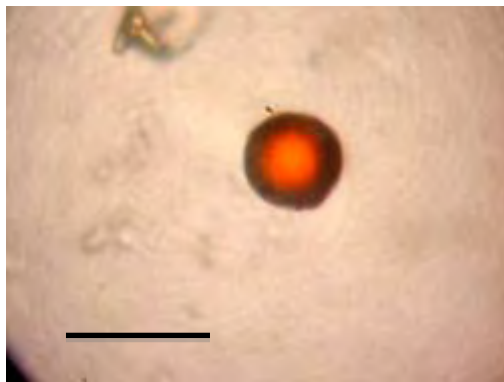


Εικόνα 40. Πράσινα κοκκοειδή κύτταρα *H. pluvialis* στον PBR 4. Το βέλος δείχνει ενδιάμεσα κύτταρα. Κλίμακα 80 μm.

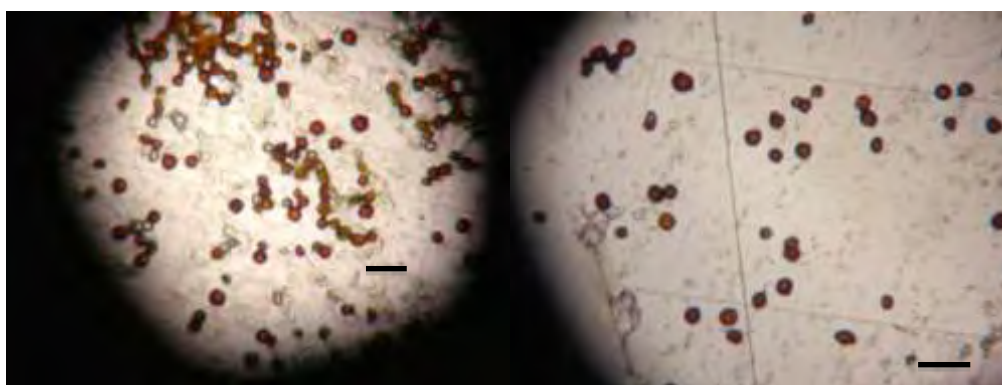


Εικόνα 41. Ενδιάμεσα κύτταρα *H. pluvialis* στον PBR 4. Κλίμακα 80 μm.

Τα ενδιάμεσα κύτταρα συνέχιζαν να παράγουν και να συσσωρεύουν ασταξανθίνη στο εσωτερικό τους με παράλληλη μείωση της χλωροφύλλης. Τα κύτταρα περιβάλλονταν από βαρύ ανθεκτικό κυτταρινικό τοίχωμα, που αποτελούνταν εν μέρει από ουσίες όπως οι σποροπολλενίνες (sporopollenin). Η διαδικασία αυτή λέγεται εγκύστωση και τα κύτταρα-κύστες έχουν έντονο κόκκινο χρώμα λόγω της μεγάλης ποσότητας της συσσωρευμένης ασταξανθίνης (Boussiba, 2000) (Εικόνες 42, 43).



Εικόνα 42. Κύστες *H. pluvialis* στον 2ο PBR. Κλίμακα 20 μm .



(α)

(β)

Εικόνα 43. Κύστες *H. pluvialis* στον PBR [2](#). Κλίμακα 50 μm .

Για το χρονικό διάστημα που διήρκησε το πείραμα, τα κύτταρα του χλωροφύκου που βρίσκονταν στο θρεπτικό μέσο σε όλους τους PBRs δεν μετατράπηκαν όλα σε αιματοκύστες. Αυτό που παρατηρήθηκε όμως στους δύο φωτοβιοαντιδραστήρες με το θρεπτικό μέσο BBM-3N (PBR [1](#) & PBR [2](#)) είναι ότι τα κύτταρα του *H. pluvialis* τα οποία είχαν κολλήσει στα τοιχώματα του διάφανου πλαστικού σωλήνα και κυρίως πάνω από το επίπεδο της στάθμης της υγρής καλλιέργειας είχαν μετατραπεί όλα σε κύστες με έντονο κόκκινο χρώμα ([Εικόνα 44](#)).

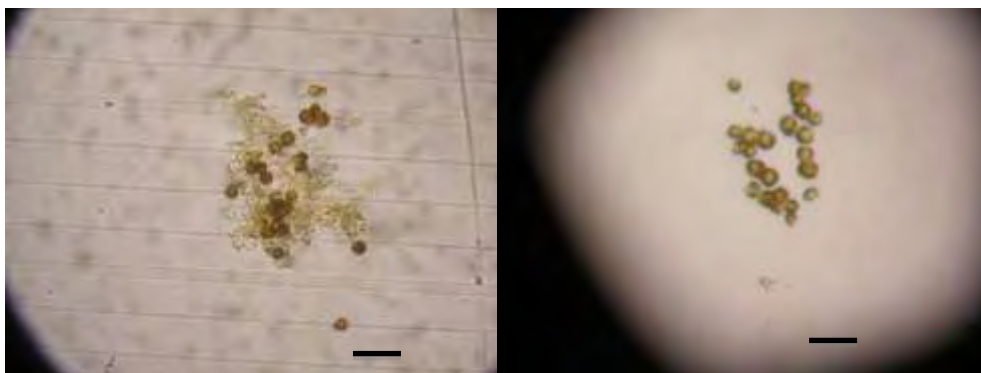


(α)

(β)

Εικόνα 44. Κύστες *H. pluvialis* στον PBR [1](#) (α) και [στον](#) PBR [2](#) (β).

Σε όλους τους PBR παρατηρήθηκαν συσσωματώματα κυττάρων *H. pluvialis* πιθανόν λόγω της υψηλής πυκνότητας του πληθυσμού (Εικόνα 45).

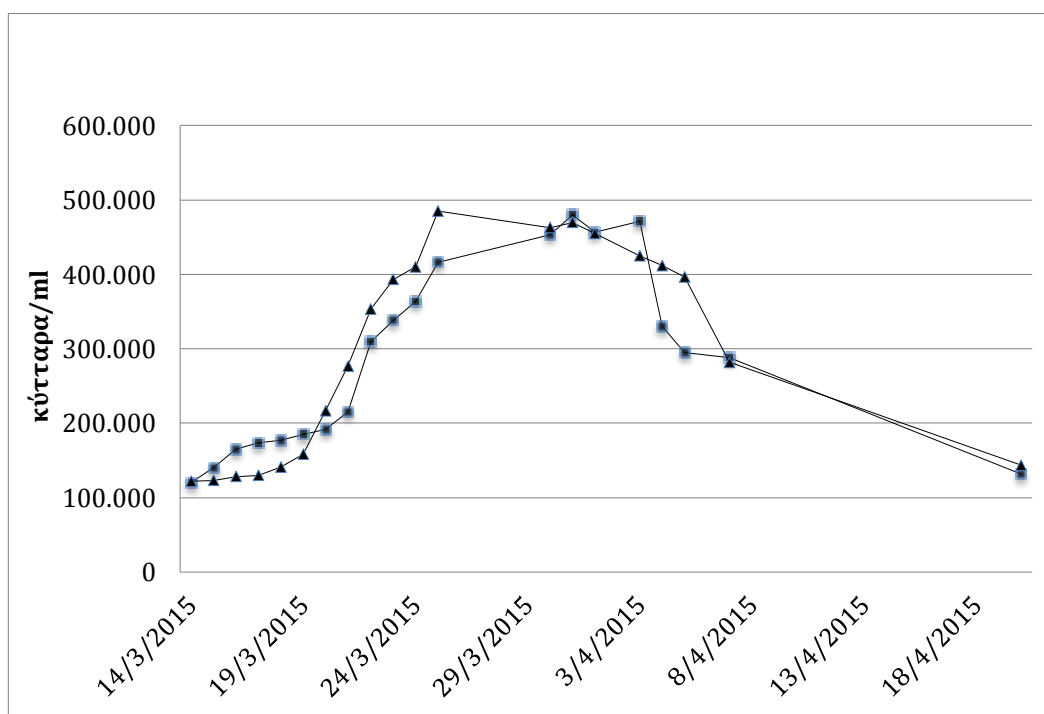


Εικόνα 45. Συσσωμάτωμα κυττάρων *H. pluvialis* στον PBR 3. Κλίμακα 50 μm .

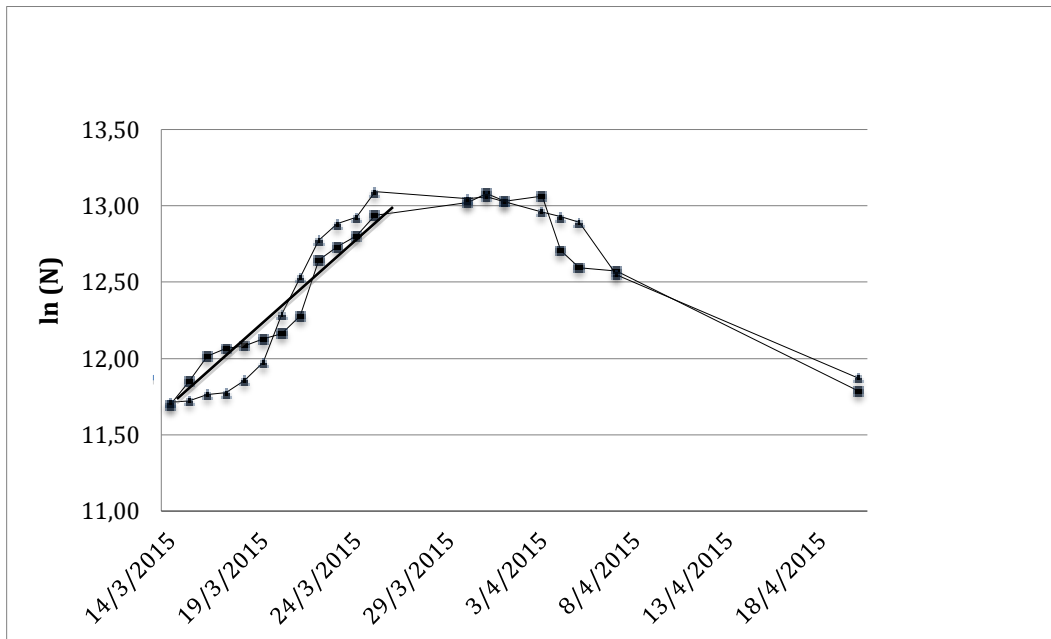
5.3 Ανάπτυξη *H. pluvialis* στους φωτοβιοαντιδραστήρες – Ρυθμός αύξησης

5.3.1 Ανάπτυξη του *H. pluvialis* στο θρεπτικό μέσο BBM-3N

Από τις μετρήσεις κυττάρων με τη βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου στους PBR 1 και PBR 2, με θρεπτικό μέσο BBM-3N, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αύξησης του πληθυσμού του χλωροφύκου *H. pluvialis* – αριθμός κυττάρων N συναρτήσει του χρόνου (Εικόνα 46) καθώς και οι καμπύλες του λογάριθμου του αριθμού κυττάρων $\ln(N)$ συναρτήσει του χρόνου (Εικόνα 47).



Εικόνα 46. Καμπύλες αύξησης πληθυσμού *H. pluvialis* στους PBR 1 και PBR 2. Αριθμός κυττάρων N συναρτήσει του χρόνου.



Εικόνα 47. Καμπύλη αύξησης πληθυσμού *H. pluvialis* στους PBR 1 και PBR 2 - $\ln(N)$ συναρτήσει του χρόνου.

Από τις μετρήσεις του αριθμού των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου οι οποίες απεικονίζονται στις παραπάνω γραφικές παραστάσεις προκύπτει ότι, για το PBR 1 η εκθετική αύξηση του πληθυσμού διαρκεί από 14-3-2015 έως 25-3-2015 ενώ για το PBR 2 διαρκεί από 18-3-2015 (4^η μέρα καλλιέργειας) έως 25-3-2015, διότι μετά η καλλιέργεια μπαίνει σε μια φάση στασιμότητας προτού περάσει στη φάση θανάτου. Έτσι μπορεί να υπολογιστεί ο ρυθμός αύξησης (r) της εκθετικής φάσης και ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) για αυτό το χρονικό διάστημα. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) ισούται με το ρυθμό αύξησης (r) για την περίοδο της εκθετικής αύξησης διότι θεωρούμε ότι δεν υπάρχει θνησιμότητα (m).

Από τις αντίστοιχες μετρήσεις σε κάθε PBR μπορεί να υπολογιστεί εκτός από τον ρυθμό αύξησης του πληθυσμού της καλλιέργειας (r), οι διαιρέσεις ανά ημέρα (k) και ο χρόνος διπλασιασμού (T_2) της καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα για το θρεπτικό μέσο BBM-3N παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5), στον οποίο τα αποτελέσματα για τους PBR 1 και PBR 2 φαίνονται ξεχωριστά. Έχουν υπολογιστεί ο ρυθμός αύξησης τόσο για κάθε μέρα του διαστήματος της εκθετικής αύξησης του χλωροφύκους όσο και συνολικά για όλο το χρονικό διάστημα της αύξησης. Με αντίστοιχο τρόπο έχουν υπολογιστεί οι διαιρέσεις ανά ημέρα (k) και ο χρόνος διπλασιασμού (T_2) της καλλιέργειας. Επίσης έχει βρεθεί και ο ρυθμός μείωσης του πληθυσμού της καλλιέργειας για το χρονικό διάστημα που ο πληθυσμός εισέρχεται στη φάση μείωσης μέχρι την 38^η μέρα της καλλιέργειας.

Πίνακας 5. Υπολογισμός παραμέτρων στους PBR 1 και PBR 2.

PBR 1														
Χρονικό διάστημα (ημέρες)	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11	11-17	1-11	20-37
N_2/N_1	1,17	1,18	1,05	1,02	1,05	1,04	1,12	1,44	1,09	1,07	1,15	1,15	2,98	0,28
$\ln(N_2/N_1)$	0,15	0,16	0,05	0,02	0,04	0,04	0,11	0,37	0,09	0,07	0,14	0,14	1,09	-1,28
$\Delta t=t_2-t_1$	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6	10	17
$r = \frac{\ln(N_t/N_0)}{\Delta t}$	0,15	0,16	0,05	0,02	0,04	0,04	0,11	0,37	0,09	0,07	0,14	0,02	0,11	-0,08
$k = r/\ln 2$	0,22	0,24	0,07	0,03	0,06	0,05	0,17	0,53	0,13	0,10	0,20	0,03	0,16	-0,11
T_2	4,50	4,22	13,80	34,71	15,68	19,58	6,03	1,89	7,93	9,70	5,07	29,39	6,36	
PBR 2														
Χρονικό διάστημα (ημέρες)	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11	11-17	4-11	17-37
N_2/N_1	1,01	1,04	1,01	1,08	1,12	1,37	1,28	1,28	1,11	1,04	1,18	0,97	3,44	0,30
$\ln(N_2/N_1)$	0,01	0,04	0,01	0,08	0,12	0,31	0,24	0,24	0,11	0,04	0,17	-0,03	1,24	-1,19
$\Delta t=t_2-t_1$	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6	7	20
$r = \frac{\ln(N_t/N_0)}{\Delta t}$	0,01	0,04	0,01	0,08	0,12	0,31	0,24	0,24	0,11	0,04	0,17	-0,01	0,18	-0,06
$k = r/\ln 2$	0,02	0,06	0,02	0,12	0,17	0,45	0,35	0,35	0,15	0,06	0,24	-0,01	0,25	-0,09
T_2	63,73	16,56	59,73	8,53	5,98	2,21	2,84	2,83	6,46	16,70	4,13	-	3,93	

Για το PBR 1 ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) για το χρονικό διάστημα της εκθετικής αύξησης βρέθηκε $0,11 \text{ d}^{-1}$, οι διαιρέσεις (k) ανά ημέρα σε $0,16 \text{ d}^{-1}$ και ο χρόνος διπλασιασμού (T_2) της καλλιέργειας $6,36$ ημέρες. Η μέγιστη τιμή του $r = 0,37 \text{ d}^{-1}$ εμφανίστηκε μεταξύ των ημερών 7 και 8.

Για το PBR 2 ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) για το χρονικό διάστημα της εκθετικής αύξησης βρέθηκε $0,18 \text{ d}^{-1}$, οι διαιρέσεις (k) ανά ημέρα σε $0,25 \text{ d}^{-1}$ και ο χρόνος διπλασιασμού (T_2) της καλλιέργειας $3,93$ ημέρες. Η μέγιστη τιμή του $r = 0,31 \text{ d}^{-1}$ εμφανίστηκε μεταξύ των ημερών 5 και 6.

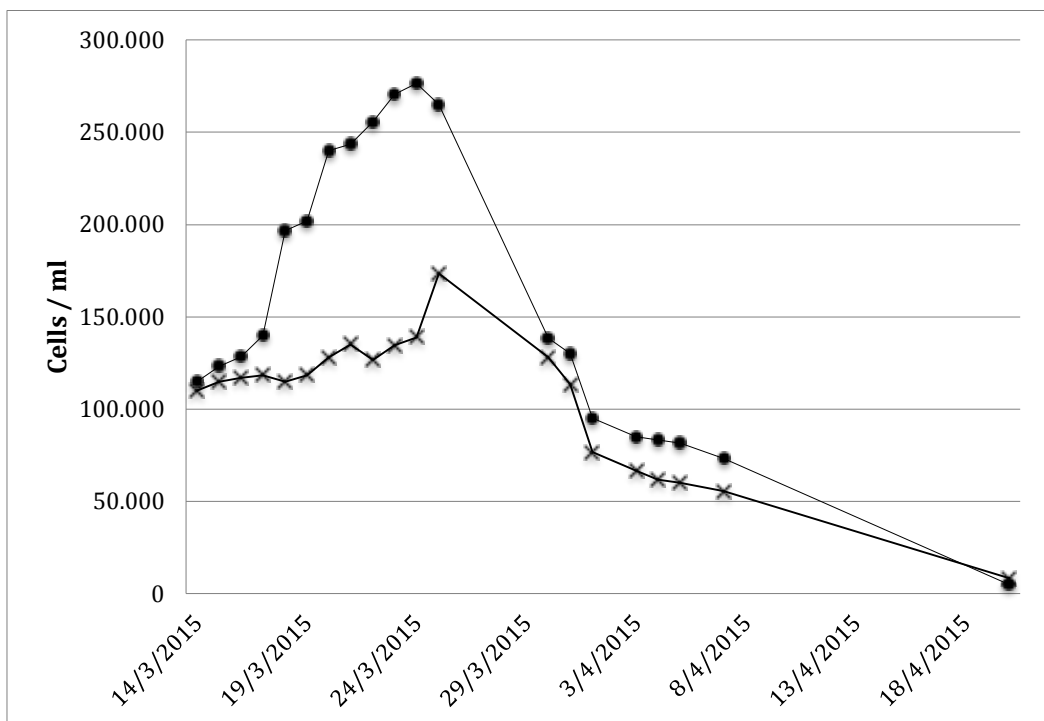
Από τις μετρήσεις των δύο PBR με θρεπτικό μέσο BBM-3N [υπολογίστηκε](#) η μέση τιμή για τον ειδικό ρυθμό αύξησης (μ), τις διαιρέσεις (k) ανά ημέρα και το χρόνο διπλασιασμού (T_2) ([Πίνακας 6](#)).

Πίνακας 6. Μέση τιμή [του](#) ειδικού ρυθμού αύξησης (μ), [των](#) διαιρέσεων [ανα](#) ημέρα (k) και [του](#) χρόνου διπλασιασμού (T_2) στο θρεπτικό μέσο BBM-3N.

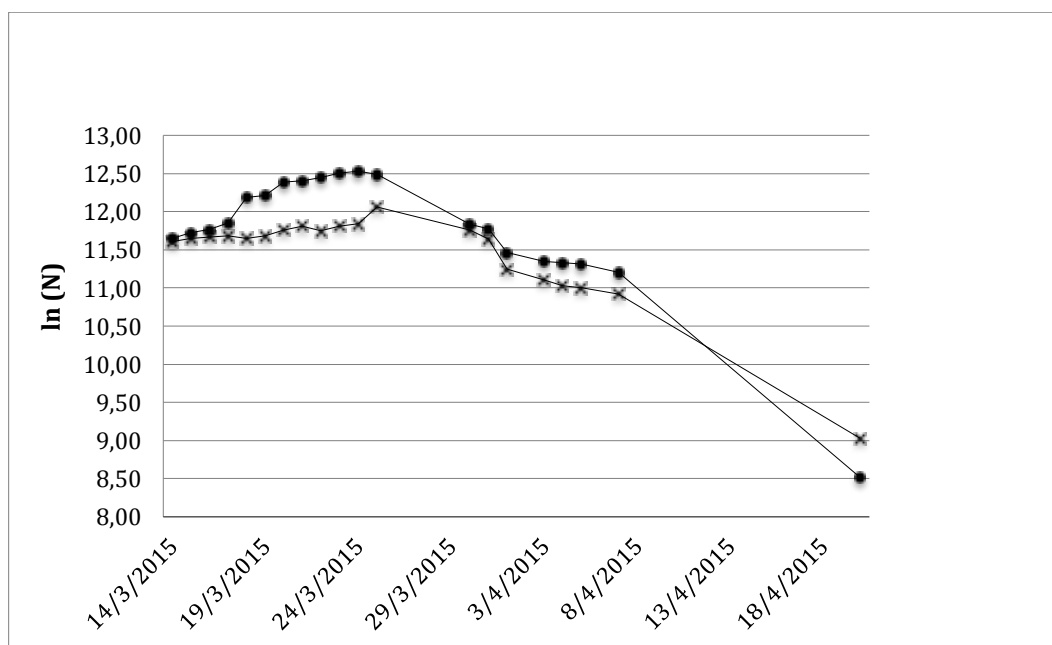
<u>Ειδικός ρυθμός αύξησης - μ (d^{-1})</u>			
<u>μ_1</u>	<u>μ_2</u>	<u>μ</u>	<u>SD</u>
<u>0,11</u>	<u>0,18</u>	<u>0,14</u>	<u>0,05</u>
<u>Διαιρέσεις ανά ημέρα (k)</u>			
<u>k_1</u>	<u>k_2</u>	<u>k</u>	
<u>0,16</u>	<u>0,25</u>	<u>0,21</u>	<u>0,06</u>
<u>Χρόνος διπλασιασμού (T_2)</u>			
<u>T_2 (1)</u>	<u>T_2 (2)</u>	<u>T_2</u>	
<u>6,36</u>	<u>3,93</u>	<u>5,14</u>	<u>1,72</u>

5.3.2 Ανάπτυξη του *H. pluvialis* στο θρεπτικό μέσο Nutrileaf

Από τις μετρήσεις κυττάρων με τη βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου στους PBR 3 και PBR 4, με θρεπτικό μέσο Nutrileaf, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αύξησης του πληθυσμού του χλωροφύκου *H. pluvialis* – αριθμός κυττάρων N συναρτήσει του χρόνου (Εικόνα 48) καθώς και οι καμπύλες του λογάριθμου του αριθμού κυττάρων $\ln(N)$ συναρτήσει του χρόνου (Εικόνα 49).



Εικόνα 48. Καμπύλες αύξησης πληθυσμού *H. pluvialis* στους PBR 3 και PBR 4. Αριθμός κυττάρων N συναρτήσει του χρόνου.



Εικόνα 49. Καμπύλες αύξησης πληθυσμού *H. pluvialis* στους PBR 3 και PBR 4. $\ln(N)$ συναρτήσει του χρόνου.

Από τις μετρήσεις του αριθμού των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου οι οποίες απεικονίζονται στις παραπάνω γραφικές παραστάσεις προκύπτει ότι, για το PBR 3 η εκθετική αύξηση του πληθυσμού διαρκεί από 18-3-2015 (4^η μέρα καλλιέργειας) έως 24-3-2015 (11^η μέρα καλλιέργειας) ενώ για το PBR 4 από τις 15-3-2015 (1^η μέρα καλλιέργειας) έως 25-3-2015 (12^η μέρα καλλιέργειας), διότι μετά η καλλιέργεια μπαίνει σε μια φάση στασιμότητας προτού περάσει στη φάση θανάτου. Έτσι μπορεί να υπολογιστεί ο ρυθμός αύξησης (r) της εκθετικής φάσης και ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) για αυτό το χρονικό διάστημα. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) ισούται με το ρυθμό αύξησης (r) για την περίοδο της εκθετικής αύξησης διότι θεωρούμε ότι δεν υπάρχει θνησιμότητα (m).

Από τις αντίστοιχες μετρήσεις σε κάθε PBR μπορεί να υπολογιστεί εκτός από τον ρυθμό αύξησης του πληθυσμού της καλλιέργειας (r), οι διαιρέσεις ανά ημέρα (k) και ο χρόνος διπλασιασμού (T_2) της καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα για το θρεπτικό μέσο Nutrileaf παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7), στον οποίο τα αποτελέσματα για τους PBR 3 και PBR 4 φαίνονται ξεχωριστά. Έχουν υπολογιστεί ο ρυθμός αύξησης τόσο για κάθε μέρα του διαστήματος της εκθετικής αύξησης του χλωροφύκου όσο και συνολικά για όλο το χρονικό διάστημα της αύξησης. Με αντίστοιχο τρόπο έχουν υπολογιστεί οι διαιρέσεις ανά ημέρα (k) και ο χρόνος διπλασιασμού (T_2) της καλλιέργειας. Επίσης έχει βρεθεί και ο ρυθμός μείωσης του πληθυσμού της καλλιέργειας για το χρονικό διάστημα που ο πληθυσμός εισέρχεται στη φάση μείωσης μέχρι την 38^η μέρα της καλλιέργειας.

Πίνακας 7. Υπολογισμός παραμέτρων στους PBR 3 και PBR 4.

PBR 3														
Χρονικό διάστημα (ημέρες)	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11	11-17	4-10	11-37
N_2/N_1	1,07	1,04	1,09	1,41	1,03	1,19	1,02	1,05	1,06	1,02	0,96	0,49	1,41	0,02
$\ln(N_2/N_1)$	0,07	0,04	0,08	0,34	0,03	0,17	0,02	0,05	0,06	0,02	-0,04	-0,71	0,34	-3,97
$\Delta t=t_2-t_1$	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6	6	26
r $r=\ln(N_2/N_0)/\Delta t$	0,07	0,04	0,08	0,34	0,03	0,17	0,02	0,05	0,06	0,02	-0,04	-0,12	0,06	-0,15
k $k=r/\ln 2$	0,10	0,06	0,12	0,49	0,04	0,25	0,02	0,07	0,08	0,03	-0,06	-0,17	0,08	-0,22
T_2	10,02	16,57	8,18	2,03	27,03	4,00	45,71	14,54	12,21	30,75	-	-	12,19	
PBR 4														
Χρονικό διάστημα (ημέρες)	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11	11-17	1-11	11-38
N_2/N_1	1,05	1,02	1,01	0,97	1,03	1,08	1,05	0,94	1,06	1,03	1,25	0,65	1,51	0,05
$\ln(N_2/N_1)$	0,04	0,02	0,01	-0,03	0,03	0,08	0,05	-0,06	0,06	0,03	0,22	-0,42	0,41	-3,03

Πίνακας 7 (συνέχεια)														
$\Delta t=t_2-t_1$	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>6</u>	<u>10</u>	<u>27</u>
$r=\frac{r}{\ln(N_t/N_0)/\Delta t}$	<u>0.04</u>	<u>0.02</u>	<u>0.01</u>	<u>-0.03</u>	<u>0.03</u>	<u>0.08</u>	<u>0.05</u>	<u>-0.06</u>	<u>0.06</u>	<u>0.03</u>	<u>0.22</u>	<u>-0.07</u>	<u>0.04</u>	<u>-0.11</u>
$k=\frac{k}{\ln 2}$	<u>0.06</u>	<u>0.02</u>	<u>0.02</u>	<u>-0.04</u>	<u>0.04</u>	<u>0.11</u>	<u>0.08</u>	<u>-0.09</u>	<u>0.09</u>	<u>0.05</u>	<u>0.32</u>	<u>-0.10</u>	<u>0.06</u>	<u>-0.16</u>
T_2	<u>15.59</u>	<u>40.20</u>	<u>61.18</u>	<u>-</u>	<u>23.37</u>	<u>8.83</u>	<u>13.02</u>	<u>-</u>	<u>11.46</u>	<u>21.61</u>	<u>3.14</u>	<u>-</u>	<u>16.89</u>	

Για το PBR 3 ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) για το χρονικό διάστημα της εκθετικής αύξησης βρέθηκε **0,06** d^{-1} , οι διαιρέσεις (k) ανά ημέρα σε 0,08 d^{-1} και ο χρόνος διπλασιασμού (T_2) της καλλιέργειας 12,19 ημέρες. Η μέγιστη τιμή του $r = 0,34 d^{-1}$ εμφανίστηκε μεταξύ των ημερών 3 και 4.

Για το PBR 4 ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) για το χρονικό διάστημα της εκθετικής αύξησης βρέθηκε **0,04** d^{-1} , οι διαιρέσεις (k) ανά ημέρα σε 0,06 d^{-1} και ο χρόνος διπλασιασμού (T_2) της καλλιέργειας 16,89 ημέρες. Η μέγιστη τιμή του $r = 0,08 d^{-1}$ εμφανίστηκε στο χρονικό μεταξύ των ημερών 5 και 6.

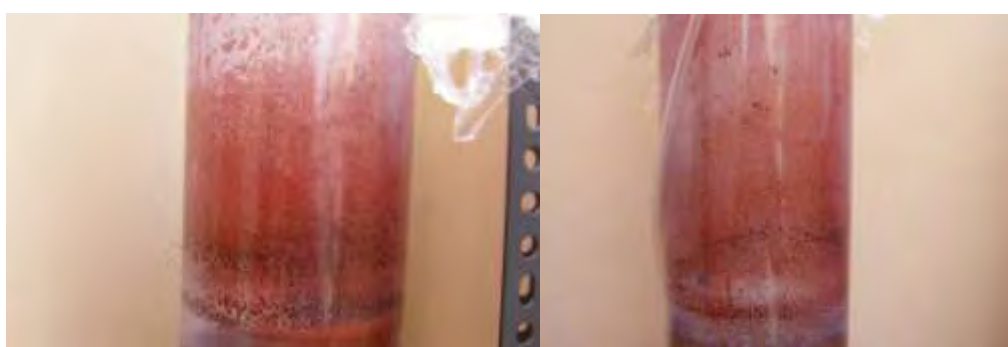
Από τις μετρήσεις των δύο PBR με θρεπτικό μέσο Nutrileaf υπολογίστηκε η μέση τιμή για τον ειδικό ρυθμό αύξησης (μ), τις διαιρέσεις (k) ανά ημέρα και το χρόνο διπλασιασμού (T_2) (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Μέση τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης (μ), των διαιρέσεων ανα ημέρα (k) και του χρόνου διπλασιασμού (T_2) στο θρεπτικό μέσο Nutrileaf.

Ειδικός ρυθμός αύξησης - μ (d^{-1})			
μ_3	μ_4	μ	SD
<u>0,06</u>	<u>0,04</u>	<u>0,05</u>	<u>0,02</u>
Διαιρέσεις ανά ημέρα (k)			
k_3	k_4	k	
<u>0,08</u>	<u>0,06</u>	<u>0,07</u>	<u>0,02</u>
Χρόνος διπλασιασμού (T_2)			
T_2 (3)	T_2 (4)	T_2	
<u>12,19</u>	<u>16,89</u>	<u>14,54</u>	<u>3,33</u>

5.4 Περιεκτικότητα αιματοκύστεων σε καροτενοειδή και ασταξανθίνη

Η διαδικασία της εγκύστωσης δεν προχώρησε στους PBR 3 και PBR 4 με το θρεπτικό μέσο Nutrileaf με αποτέλεσμα να μη μπορούμε να συγκρίνουμε την περιεκτικότητα σε ολικά καροτενοειδή και ασταξανθίνη των αιματοκύστεων στα δύο θρεπτικά. Έτσι συλλέχθηκαν κύστες *H. pluvialis* που είχαν σχηματιστεί στα τοιχώματα των σωλήνων στους PBR 1 και PBR 2 με το θρεπτικό μέσο BBM-3N προκειμένου να προσδιοριστεί η περιεκτικότητά τους. Οι τιμές από τους PBR 1 και PBR 2 σε ολικά καροτενοειδή και ασταξανθίνη δεν εμφάνισαν σημαντικώς στατιστική διαφορά και για το λόγο αυτό υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση για τα δείγματα που προέρχονταν και από τους δύο σωλήνες (PBR 1 & PBR 2). (Εικόνα 50, Πίνακας 9).



(α)

(β)

Εικόνα 50. Κύστες *H. pluvialis* στον PBR 1 (α) και PBR 2 (β).

Πίνακας 9. Μετρήσεις περιεκτικότητας ολικών καροτενοειδών και ασταξανθίνης.

Τιμή απορρόφησης στα 274 nm	Συνολικά εξαγόμενα καροτενοειδή (mg)	Περιεκτικότητα καροτενοειδών (mg) ανά mg ξηρού βάρους αιματοκύστεων	Περιεκτικότητα σε ασταξανθίνη (mg)	Περιεκτικότητα σε ασταξανθίνη (mg) ανά mg ξηρού βάρους αιματοκύστεων
0,262	0,012476	0,0312	0,010605	0,0265
0,275	0,013095	0,0327	0,011131	0,0278
0,266	0,012667	0,0317	0,010767	0,0269
0,272	0,012952	0,0324	0,01101	0,0275
0,260	0,012381	0,0310	0,010524	0,0263
0,271	0,015486	0,0310	0,013163	0,0263
0,263	0,015029	0,0301	0,012774	0,0255
0,265	0,015143	0,0303	0,012871	0,0257
0,271	0,015486	0,0310	0,013163	0,0263
0,274	0,015657	0,0313	0,013309	0,0266
Μέση τιμή	0,014037	0,0313	0,011932	0,0265
Τυπική απόκλιση (SD)	0,001420	0,0008	0,001206	0,0007

5.5 Σύγκριση αποτελεσμάτων

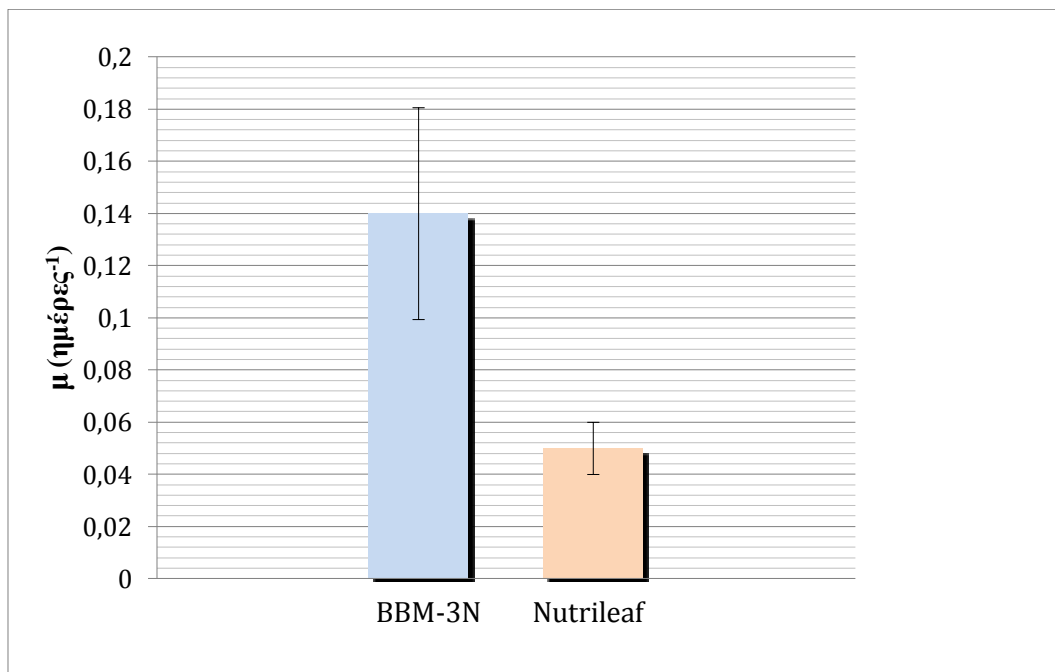
5.5.1 Πυκνότητα καλλιέργειας

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων του αριθμού των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο παρατηρήθηκε ότι το χλωροφύκος *H. pluvialis* αναπτύχθηκε στο θρεπτικό μέσο BBM-3N φθάνοντας σε μέγιστη πυκνότητα περίπου τα 5×10^5 κύτταρα/ml, τετραπλασιάζοντας τον αρχικό αριθμό κυττάρων/ml. Στο θρεπτικό μέσο Nutrileaf η μέγιστη πυκνότητα έφθασε τα $2,7 \times 10^5$ κύτταρα/ml, νούμερο το οποίο δεν κινήθηκε σε ικανοποιητικά επίπεδα. Τα θρεπτικά συστατικά του Nutrileaf δεν απορροφήθηκαν από τα κύτταρα του *H. pluvialis* σε ικανοποιητικό βαθμό, γεγονός που αποτυπώνεται στην καμπύλη αύξησης του πληθυσμού.

Η μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση στους 2 φωτοβιοαντιδραστήρες με το θρεπτικό μέσο BBM-3N (4×10^5 κύτταρα/ml) μπορεί να χαρακτηριστεί ικανοποιητική με βάση πρόσφατες μελέτες, όπου η καλλιέργεια του χλωροφύκου *H. pluvialis* σε φωτοβιοαντιδραστήρα με πλήρως ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτεινότητας έφθασε σε πυκνότητα τα 6×10^5 κύτταρα/ml (Giannelli *et al.*, 2015) και 8×10^5 κύτταρα/ml (Imamoglu *et al.*, 2010). Το γεγονός αυτό αποδुकνύει ότι υπάρχει πολύ μεγάλη δυνατότητα βελτίωσης ρυθμίζοντας τις συνθήκες καλλιέργειας του φωτοβιο-αντιδραστήρα που θα επιφέρουν αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας της καλλιέργειας.

5.5.2 Ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) στα δύο θρεπτικά μέσα

Από τα στοιχεία των πινάκων 7 και 12 στους οποίους φαίνονται οι μέσες τιμές του ειδικού ρυθμού αύξησης (μ), κατασκευάστηκε το παρακάτω ραβδόγραμμα (Εικόνα 51) στο οποίο φαίνεται ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) κατά την εκθετική αύξηση του χλωροφύκους στα θρεπτικά μέσα BBM-3N και Nutrileaf αντίστοιχα.

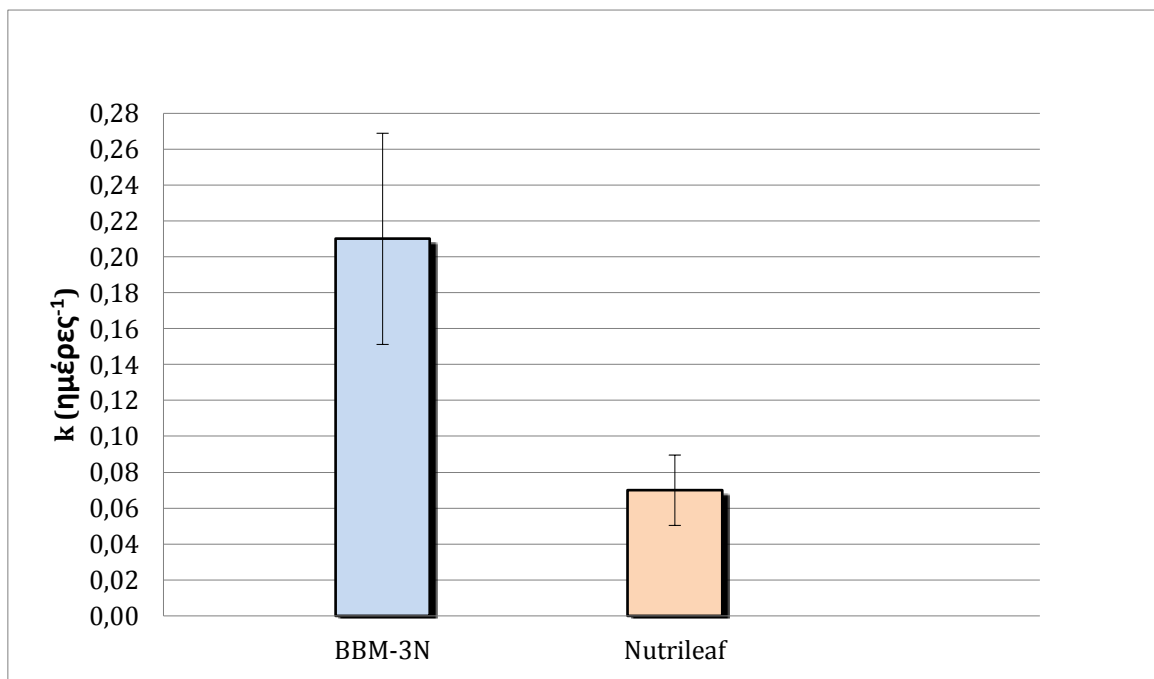


Εικόνα 51. Σύγκριση ειδικού ρυθμού αύξησης (μ) του *H. pluvialis* στα θρεπτικά μέσα BBM-3N και Nutrileaf.

Όπως φαίνεται από τις τιμές από το παραπάνω ραβδόγραμμα ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) που έχει το χλωροφύκος *H. pluvialis* στο θρεπτικό μέσο BBM-3N ($\mu=0,14$ ημέρα⁻¹) είναι σχεδόν τριπλάσιος από αυτό στο θρεπτικό μέσο Nutrileaf ($\mu=0,04$ ημέρα⁻¹) και με στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους ($p<0,05$).

5.5.3 Διαιρέσεις ανά ημέρα (k)

Από τα στοιχεία των πινάκων 8 και 13 κατασκευάστηκε το παρακάτω ραβδόγραμμα (Εικόνα 52) στο οποίο φαίνονται οι διαιρέσεις ανά ημέρα (k) κατά την εκθετική αύξηση του χλωροφύκους στα θρεπτικά μέσα BBM-3N και Nutrileaf αντίστοιχα.

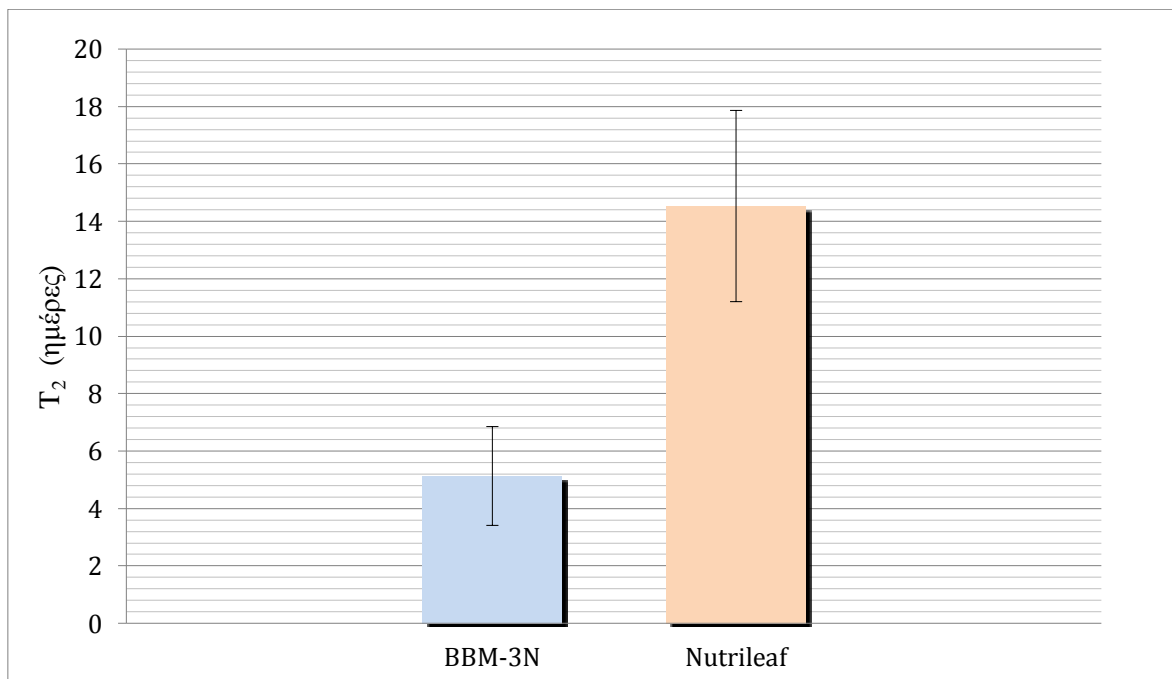


Εικόνα 52. Σύγκριση των διαιρέσεων ανά ημέρα (k) του *H. pluvialis* στα θρεπτικά μέσα BBM-3N και Nutrileaf.

Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε αντιστοιχία με τον ειδικό ρυθμό αύξησης του χλωροφύκους σε κάθε θρεπτικό μέσο. Στο θρεπτικό μέσο BBM-3N όπου ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ) εμφανίζει μεγαλύτερη τιμή και ο αριθμός των κυττάρων ανά ml είναι υψηλότερος, είναι λογικό η καλλιέργεια να εμφανίζει μεγαλύτερο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων (k) ανά ημέρα, σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μικροφύκους στο θρεπτικό Nutrileaf. Οι καλλιέργειες στα δύο θρεπτικά διήρκεσαν ίδιο χρονικό διάστημα. Άρα αυτή που έφθασε σε μεγαλύτερες τιμές κυτταρικής συγκέντρωσης ανα ml εμφανίζει υψηλότερες τιμές (k) και (μ).

5.5.4 Χρόνος διπλασιασμού (T_2)

Από τα στοιχεία των πινάκων 10 και 14 κατασκευάστηκε το παρακάτω ραβδόγραμμα (Εικόνα 53) στο οποίο φαίνονται ο χρόνος διπλασιασμού (T_2) της καλλιέργειας κατά την εκθετική αύξηση του χλωροφύκου *H. pluvialis* στα θρεπτικά μέσα BBM-3N και Nutrileaf αντίστοιχα.



Εικόνα 53. Διαιρέσεις ανά ημέρα (k) του *H. pluvialis*.

Το γράφημα αυτό βρίσκεται σε πλήρη αντιστοιχία με αυτό του ειδικού ρυθμού αύξησης (μ) και των διαιρέσεων ανά ημέρα (k) και είναι λογικό, αφού υψηλότερος ειδικός ρυθμός αύξησης σημαίνει και περισσότερες κυτταρικές διαιρέσεις στο ίδιο χρονικό διάστημα. Αυτό μεταφράζεται σε μικρότερο χρόνο διπλασιασμού της καλλιέργειας.

5.6 Περιεκτικότητα καροτενοειδών και ασταξανθίνης

Η διαδικασία της εγκύστωσης προχώρησε μόνο στο θρεπτικό μέσο BBM-3N για αυτό και τα αποτελέσματα των μετρήσεων που αφορούν στην περιεκτικότητα των αιματοκύστεων σε καροτενοειδή και ασταξανθίνη (Πίνακας 8) προέρχονται από τους PBR 1 & 2. Η παρουσία των κύστεων στους συγκεκριμένους PBRs μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στο πάνω μέρος τους είχε εναποτεθεί ικανός αριθμός κυττάρων, τα οποία προχώρησαν σε διαδικασία εγκύστωσης, όταν εμφανίστηκαν οι κατάλληλες συνθήκες. Προφανώς στους PBR 3 & 4 δεν εκπληρώθηκαν οι κατάλληλες προϋποθέσεις. Έτσι δεν υπάρχει σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο θρεπτικών μέσων καλλιέργειας.

Κάνοντας μετατροπή σε επί τοις εκατό (%) βρίσκουμε, ότι η περιεκτικότητα των αιματοκύστεων σε καροτενοειδή είναι περίπου 3,1 % και της ασταξανθίνης 2,7 %. Η περιεκτικότητα αιματοκύστεων σε ασταξανθίνη είναι σε ίδια επίπεδα με αυτές που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία [1,5-3,0 % περιεκτικότητα σε ασταξανθίνη (Lorenz & Cysewsky, 2000), 2,79 % περιεκτικότητα σε ασταξανθίνη (Zhang *et al.*, 2009),] για διάφορα άλλα στελέχη του μικροφύκου και πρέπει να επαληθευτούν με τη μέθοδο HPLC.

Τα κύτταρα του *H. pluvialis*, τα οποία καταπονήθηκαν και μετατράπηκαν σε αιματοκύστες, ήταν αυτά που είχαν εναποτεθεί στα τοιχώματα των φωτοβιοαντιδραστήρων και μάλιστα πάνω από το επίπεδο της στάθμης του θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα αυτά εγκαταστάθηκαν σε ένα λεπτό επιφανειακό στρώμα, χωρίς δυνατότητα μετακίνησης. Το γεγονός αυτό βοήθησε ώστε να δημιουργηθούν συνθήκες καταπόνησης (έντονη ηλιακή ακτινοβολία, θερμοκρασία), περιοδικά κάθε μέρα για μεγάλο χρονικό διάστημα που ανάγκασαν τα κύτταρα του χλωροφύκου *H. pluvialis* να παράξουν ασταξανθίνη.

Οι τιμές περιεκτικότητας σε ολικά καροτενοειδή και ασταξανθίνη που υπολογίστηκαν πρέπει να επαληθευτούν με τη μέθοδο HPLC και για δύο ακόμη λόγους που μπορεί να έχουν επηρεάσει το τελικό αποτέλεσμα:

- οι μετρήσεις ξηρού βάρους (στο τρίτο και τέταρτο δεκαδικό ψηφίο) σε ένα μη εργαστηριακό χώρο είναι δύσκολο να πραγματοποιηθούν με ακρίβεια,
- η ποσότητα των αιματοκύστεων του χλωροφύκου που συλλέχθηκαν από την επιφάνεια των σωλήνων περιελάμβανε προσμίξεις (νεκρά κύτταρα, εκκρίσεις κυττάρων), οι οποίες έπρεπε να αφαιρεθούν.

Σε αναζήτηση στη διεθνή βιβλιογραφία για το συγκεκριμένο στέλεχος δεν βρέθηκε αναφορά ως προς την περιεκτικότητα του σε ασταξανθίνη ανά mg ξηρού βάρους αιματοκύστεων χλωροφύκου.

6. Συμπεράσματα

6.1 Ανθεκτικότητα στελέχους SAG 34-1n του χλωροφύκου *H. pluvialis*

Το συγκεκριμένο στέλεχος του χλωροφύκου συμπεριφέρθηκε αρκετά καλά στις συνθήκες καλλιέργειας που αναπτύχθηκε δεδομένου ότι δεν υπήρχε αυτόματο σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας και pH. Το χλωροφύκος σε όλες τις φάσεις καλλιέργειας έδειξε ανθεκτικότητα κι έτσι αποφεύχθηκε η κατάρρευση καλλιέργειας. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από τη διατήρηση μικρής ποσότητας της αρχικής καλλιέργειας που εστάλλει σε πλαστικό δοχείο, για μεγάλο χρονικό διάστημα (6 μήνες) χωρίς να παρατηρηθεί πρόβλημα βιωσιμότητας του μικροοργανισμού. Το χλωροφύκος αυτό σε θερμοκρασίες δωματίου μπορεί να διατηρηθεί σε πλαστικά διάφανα δοχεία, για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια του πειράματος, μικρός όγκος καλλιέργειας του χλωροφύκου σε πλαστικό διάφανο δοχείο αφέθηκε σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την κατάρρευση της καλλιέργειας (μακροσκοπική παρατήρηση), όμως όταν η ίδια καλλιέργεια τοποθετούνταν σε φυσιολογικές θερμοκρασίες, τότε αυτή ανέκαμπτε.

6.2 Φωτοβιοαντιδραστήρας στήλης πνευματικής ανάδευσης

Ο τύπος φωτοβιοαντιδραστήρα που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα ήταν στήλης πνευματικής ανάδευσης (Bubble column PBR) με παροχή αέρα μέσω αντλίας και το χλωροφύκος *H. pluvialis* αναπτύχθηκε αρκετά καλά κατά την εκθετική φάση ανάπτυξής του. Κατά τη φάση της εγκύστωσης κατά την οποία τα κύτταρα χάνουν τα μαστίγιά τους, παρατηρήθηκε το φαινόμενο της καθίζησης των κυττάρων στο κάτω μέρος του φωτοβιοαντιδραστήρα. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι ο αερισμός στο κάτω μέρος του αντιδραστήρα δεν είναι ικανοποιητικός κατά τη φάση αυτή και πρέπει να ενδυναμωθεί καλύπτοντας όλη την επιφάνεια βάσης του κυλινδρικού σωλήνα. Έτσι τα κύτταρα που δεν έχουν δυνατότητα κίνησης δεν θα μπορούν να καθιζάνουν. Επίσης στο στάδιο αυτό διαπιστώθηκε και ένα κατασκευαστικό λάθος για τον φωτοβιοαντιδραστήρα που αφορά στο αδιαφανές κάτω τμήμα του. Το αδιαφανές τμήμα εμποδίζει τα κύτταρα να απορροφήσουν τη φωτεινή ακτινοβολία και να φωτοσυνθέσουν, γεγονός αρνητικό για την ανάπτυξή τους και για την καταπόνησή τους κατά τη διάρκεια της εγκύστωσης. Η τοποθέτηση του αδιαφανούς τμήματος όμως ήταν αναγκαστική, λόγω μη ύπαρξης διαφανών τμημάτων στην ελληνική αγορά που να ταιριάζουν στον 11 ιντσών σωλήνα, ο οποίος αγοράστηκε από τη Γερμανία.

Επίσης μια κατασκευαστική παράλειψη που διαπιστώθηκε κατά εξέλιξη του πειράματος, ήταν η μη ύπαρξη κάποιας βάνας ή βρύσης στο κάτω μέρος του PBR ώστε να μπορεί να γίνει εύκολα λήψη μικρών ποσοτήτων της υγρής καλλιέργειας, χωρίς να απαιτείται το

άνοιγμα από το πάνω μέρος του PBR, το οποίο πολλές φορές ενέχει μεγάλο κίνδυνο επιμόλυνσης της καλλιέργειας.

Το γεγονός όμως, ότι η κυτταρική συγκέντρωση στους 2 φωτοβιοαντιδραστήρες με το θρεπτικό μέσο BBM-3N (4×10^5 [κύτταρα/ml](#)) ήταν ικανοποιητική, αποδουκνύει ότι υπάρχει πολύ μεγάλη δυνατότητα βελτίωσης, ρυθμίζοντας με αυτόματο σύστημα τις συνθήκες καλλιέργειας του φωτοβιοαντιδραστήρα οι οποίες θα επιφέρουν και αύξηση της πυκνότητας της καλλιέργειας.

6.3 Ανάπτυξη του *H. pluvialis* στα θρεπτικά μέσα BBM-3N και Nutrileaf

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων της εκθετικής αύξησης του μικροφύκου φαίνεται ότι το θρεπτικό μέσο BBM-3N είναι καταλληλότερο για την καλλιέργεια του *H. pluvialis* από το θρεπτικό μέσο Nutrileaf και μπορεί να χρησιμοποιείται στην πρώτη φάση καλλιέργειας του μικροοργανισμού για την αύξηση του αριθμού των κυττάρων του *H. pluvialis*. Ενώ φάνηκε στην αρχή (όταν εμβολιάστηκε) να προσαρμόζεται καλά το μικροφύκος στο θρεπτικό μέσο Nutrileaf και να απορροφά τα συστατικά του, στη συνέχεια δεν κατάφερε να φθάσει η συγκέντρωσή του (αριθμός κυττάρων/ml) σε ικανοποιητικά επίπεδα. Ίσως η προσαρμογή να ήταν πλασματική και να οφείλεται στο ότι, ο αρχικός όγκος του μικροφύκου που εμβολιάστηκε στο Nutrileaf είχε αναπτυχθεί στο θρεπτικό BBM-3N. Όσον αφορά τη διαδικασία της εγκύστωσης στα δύο θρεπτικά μέσα, το μικροφύκος συμπεριφέρθηκε περίπου με τον ίδιο τρόπο. Η διαδικασία ξεκίνησε και στα δύο με την εμφάνιση διαδοχικά, πράσινων κοκκοειδών κυττάρων και ενδιάμεσων κυττάρων, με μια σημαντική διαφορά, ότι αιματοκύστες εμφανίστηκαν στο [πάνω μέρος των PBRs με το](#) θρεπτικό μέσο BBM-3N. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι δημιουργήθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες στους φωτοβιοαντιδραστήρες με το θρεπτικό μέσο BBM-3N, πάνω όμως από το επίπεδο της στάθμης του θρεπτικού και όχι λόγω των συστατικών του BBM-3N. Τα θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι κατάλληλα για την εκθετική αύξηση του συγκεκριμένου χλωροφύκου όχι όμως και για τη διαδικασία της εγκύστωσης στις συνθήκες [και το χρόνο διάρκειας](#) του πειράματος. Η πρόκληση [καταπόνησης](#) στο μικροφύκος απαιτεί ελεγχόμενες συνθήκες (φωτεινή ακτινοβολία, αύξηση αλατότητας, θερμοκρασία), γεγονός που καθιστά απαραίτητη τη χρησιμοποίηση αυτόματου συστήματος ελέγχου συνθηκών στο σύστημά μας προκειμένου να έχουμε μετατροπή του μεγαλύτερου ποσοστού των κυττάρων *H. pluvialis* σε κύστες.

6.4 Σύνθεση ολικών καροτενοειδών και ασταξανθίνης από το στελεχος SAG 34-1n *H. pluvialis*.

Η περιεκτικότητα ολικών καροτενοειδών και ασταξανθίνης στις κύστες που συλλέχθηκαν από τους 2 φωτοβιοαντιδραστήρες, αποδεικνύει ότι το στέλεχος SAG 34-

In *H. pluvialis* μπορεί να παράξει ασταξανθίνη, αλλά για να φθάσουμε στο συμπέρασμα ότι είναι κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί σε εμπορικής κλίμακας καλλιέργεια, απαιτείται η συνέχιση της μελέτης, προκειμένου να διερευνηθούν με ακρίβεια, οι συνθήκες κάτω από τις οποίες το συγκεκριμένο στέλεχος του *H. pluvialis* εμφανίζει τη μέγιστη περιεκτικότητα σε ασταξανθίνη. Αυτό μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας φωτοβιοαντιδραστήρα με ελεγχόμενο φωτισμό και αυτόματο σύστημα ελέγχου των συνθηκών καλλιέργειας.

7. Βιβλιογραφία

- Aflalo, C., Meshulam, Y., Zarka, A., Boussiba, S., 2007. On the relative efficiency of two vs one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Bioengineering* 98(1): 300-305.
- Algaebase. 1996. <http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=7007>. [accessed 5 January 2015].
- Andersen, A. R., 2005. Algal Culturing Techniques. [Phycological Society of America, Elsevier Academic Press](#).
- Barbosa, M.J., Janssen, M., Ham, N., Tramper, J., Wijffels, R.H., 2003. Microalgae cultivation in air-lift reactors: modeling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency. *Biotechnology Bioengineering* 82: 170–179.
- Bennedsen, M., Wang, X., Willen, R., Wadstrom, T., Andersen, L.P., 1999. Treatment of *H. pylori* infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes. *Immunology Letters*, 70: 185–189.
- Bhosale, P., and Bernstein, P.S., 2005. Microbial xanthophylls. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68: 445–455.
- Borowitzka, M.A., 2010. Carotenoid production using microorganisms. In: Cohen Z., Ratledge C., (eds) *Single cell oils: microbial and algal oils*. AOCS Press, Urbana, pp 225–240.
- Boussiba, S., 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*, 108: 111–117.
- Boussiba, S., Bing, W., Zarka, A., Yuan, J.P., Chen, F., 1999. Changes in pigment profiles of *Haematococcus pluvialis* during exposure to environmental stresses. *Biotechnology Letters*, 21: 601–604.
- Boussiba, S., Vonshak, A., 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant and Cell Physiology*, 32: 1077–1082.
- Brentner, L.B., Eckelman, M.J., Zimmerman, J.B., 2011. Combinatorial life cycle assessment to inform process design of industrial production of algal biodiesel. *Environmental Science and Technology*, 45(16): 7060-7067.
- Britton, G., 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9: 1551–1558.

- Carlozzi, P., Pushparaj, B., Degl'Innocenti, A., Capperucci, A., 2006. Growth characteristics of *Rhodospseudomonas palustris* cultured outdoors, in an underwater tubular photobioreactor, and investigation on photosynthetic efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73: 789–795.
- Chew, W., Mathison, B.D., Kimble, L.L., Mixer, P.F., Chew, B.P., 2013. Astaxanthin decreases inflammatory biomarkers associated with cardiovascular disease in human umbilical vein endothelial cells. *American Journal of Advanced Food Science and Technology*, 1: 1–17.
- Cyanotech Corporation, 2013. Analysis of natural astaxanthin derived from *Haematococcus* microalgae in astaxanthin oleoresin, astaxanthin gencaps, astaxanthin beadlets and *Haematococcus* Biomass. www.cyanotech.com.
- Elliot, A.M., 1934. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. *Archiv für Protistenkunde*, 82: 250-272.
- Fernandez, F., Camacho, F., Perez, J., Sevilla, J., Grima, E., 1997. Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: effect of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*, 58: 605–616.
- García-Malea, M.C., Acién, F.G., Del Río, E., Fernández, J.M., Cerón, M.C., Guerrero, M.G., *et al.*, 2009. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: taking the one-step system outdoors. *Biotechnology and Bioengineering*, 102 (2): 651-657.
- Giannelli, L., Yamada, H., Katsuda, T., and Yamaji, H., 2015. Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119: 345-350.
- Goodwin, T.W., 1980. Nature and distribution of carotenoids. *Food Chemistry*, 5: 3-13.
- Goodwin T.W., Jamikorn, M., 1954. Studies in Carotenogenesis 11. Carotenoid synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis*. *Biochemical Journal*, 57: 376–381.
- Gouveia, L., Gomes, E., & Empis, J., 1996. Potential use of a microalga (*Chlorella vulgaris*) in the pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und-Forschung*, 202: 75–79.
- Gouveia, L., Choubert, G., Pereira, N., 2002. Pigmentation of gilthead seabream, *Sparus aurata* (L. 1875) using *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Volvocales) microalga. *Aquaculture Research*, 33: 987–993.

- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L. & Goycoolea, F. M., 2007. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 185-196.
- Hu, Q.H., Guterman, H., Richmond, A., 1996. A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs. *Biotechnology and Bioengineering* 51: 51–60.
- Imamoglu, E., Dalay, M.C. & Sukan, V.F., 2010. Semi-continuous Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for Commercial Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 764–772.
- Jacob-Lopes, E., Scoparo, C.H.G., Lacerda, L., Franco, T.T., 2009. Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing* 48: 306–10.
- Johnson, E.A. & An, G.H., 1991. Astaxanthin from microbial sources. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 11: 297–326.
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E.A., Embirucu, M., Ghirardi, M.L., 2010. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, 101: 1406-1413.
- Kobayashi, M., Sakamoto, Y., 1999. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*, 21: 265-269.
- Li, H.B. and Chen, F., 2001. Preparative isolation and purification of astaxanthin from the microalga *Chlorococcum* sp. by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 925: 133–137.
- Lorenz, R.T. and Cysewsky, G.R., 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 18: 160–167.
- Lu, F., Vonshak, A., Gabbay, R., Hirschberg, J., Boussiba, S., 1995. The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine. *Plant and Cell Physiology*, 36: 1519–1524.
- Lu, F., Vonshak, A., Boussiba, S., 1994. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 30: 829–833.

- Lu, Y.P., Liu, S.Y., Sun, H., Wu, X.M., Li, J.J., Zhu, L., [2010](#). Neuroprotective effect of astaxanthin on H₂O₂-induced neurotoxicity in vitro and on focal cerebral ischemia in vivo. *Brain Research*, 1360: 40–48.
- Ma, R.Y.N. and Chen, F., 2001. Enhanced production of free trans-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga *Chlorococcum sp.* *Process Biochemistry*, 36: 1175–1179.
- Maoka, T., Tokuda, H., Suzuki, N., Kato, H., Etoh, H., [2012](#). Anti-oxidative, anti-tumor-promoting, and anti-carcinogenesis activities of nitroastaxanthin and nitrolutein, the reaction products of astaxanthin and lutein with peroxyxynitrite. *Marine Drugs*, 10: 1391–1399.
- Martínez-Jerónimo, F. & Espinosa-Chávez, F., 1994. A laboratory-scale system for mass culture of freshwater microalgae in polyethylene bags. *Journal of Applied Phycology*, 6: 423–425.
- Mehlitz, T.H., 2009. Temperature influence and heat management requirements of microalgae cultivation in PBRs. [A Thesis presented to California Polytechnic State University, www.digitalcomons.calpoly.edu/theses/54/](#).
- Mercer, P. & Armenta, R.E., 2011. Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113: 539-547.
- Michelle Wood, A., Everroad, R.C., Wingard, L.M., 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. in: [Andersen A.R., eds. Algal Culturing Techniques Phycological Society of America, Elsevier Academic Press, pp. 269-285](#).
- Munir, S.M., Manan, Z.A., Wan Alwi, S.R., 2012. Holistic carbon planning for industrial parks: a waste-to-resources process integration approach. *Journal of Cleaner Production*, 33: 74-85.
- Nakao, R., Nelson, O.L., Park, J.S., Mathison, B.D., Thompson, P.A., Chew, B.P., [2010](#). Effect of astaxanthin supplementation on inflammation and cardiac function in BALB/c mice. *Anticancer Research*, 30: 2721–2725.
- Olaizola, M., 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering* 20: 459-466.
- Osterlie, M., Bjerkeng, B., Liaaen-Jensen, S., 1999. Accumulation of astaxanthin all E, 9z and 13z geometrical isomers and 3 and 3' optical isomers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is selective. *Journal of Nutrition*, 2: 391–398.

- Park, J.S., Chyun, J.H., Kim, Y.K., Line, L.L., Chew, B.P., 2010. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutrition and Metabolism*, 7: 1–10.
- Prakash, J., Pushparaj, B., Carlozzi, P., Torzillo, G., Montaini, E., Materassi, R., 1997. Microalgal biomass drying by a simple solar device. *International Journal of Solar Energy*, 18:303–11.
- Ranga Rao, A., Sindhuja, H.N., Dharmesh, S.M., Sankar, K.U., Sarada, R., Ravishankar, G.A., 2013. Effective inhibition of skin cancer, tyrosinase, and antioxidative properties by astaxanthin and astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 3842–3851.
- Ratledge, C., 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86: 807–815.
- Sanchez, J.L.G., Berenguel, M., Rodriguez, F., Sevilla, J.M.F., Alias, C.B., Fernandez, F.G.A., 2003. Minimization of carbon losses in pilot-scale outdoor photobioreactors by model-based predictive control. *Biotechnology and Bioengineering*, 84: 533–43.
- Sánchez Mirón, A., Cerón Garcia, M.C., Garcia Camacho, F., Molina Grima, E., Chisti, Y., 2002. Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 1015–23.
- [Schieber, A., Carle, R., 2005. Occurrence of carotenoid *cis*-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 416-422.](#)
- Shahid, M., Shahid, U.I., Mohammad, F., 2013. Recent advancements in natural dye applications: a review. *Journal of Cleaner Production*, 53: 310-331.
- Singh, S., Kate, B.N., Banerjee, U.C., 2005. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Critical Reviews of Biotechnology*, 25: 73–95.
- Stephenson, A.L., Kazamia, E., Dennis, J.S., Howe, C.J., Scott, S.A., Smith, A.G., 2010. Life-cycle assessment of potential algal biodiesel production in the United Kingdom: A comparison of raceways and air-lift tubular bioreactors. *Energy Fuels* 24: 4062-4077.
- Stern, R.F., Horak, A., Andrew, R.L., Coffroth, M.A., Andersen, R.A., Küpper, F.C., Jameson, I., Hoppenrath, M., Véron, B., Kasai, F., Brand, J., James, E.R., Keeling,

- P.J., 2010. Environmental barcoding reveals massive dinoflagellate diversity in marine environments. *PLOS ONE*, 5: [e13991](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013991). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013991>
- Suh, I.S., Joo, H.N., Lee, C.G., 2006. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. *Journal of Biotechnology*, 125: 540-546.
- Suh, I.S. & Lee, C.G., 2003. Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8: 313-334.
- Tan, S., Cunningham, Jr, F.X., Youmans, M., Grabowski, B., Sun, Z., Gantt, E., 1995. Cytochrome f loss in astaxanthin accumulating red cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): Comparison of photosynthetic activity, photosynthetic enzymes and thylakoid membrane polypeptides in red and green cells. *Journal of Phycology*, 31: 897-905.
- Tredici, R. M., 2004. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors in: [Amos Richmond eds.](#) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Publishing Ltd. [pp. 178-214](#).
- Turujman, S.A., Wamer, W.G., Wei, R.R. *et al.*, 1997. Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin. *Journal of AOAC International*, 3: 622-632.
- Ugwu, C.U. & Aoyagi, H., 2008. Influence of shading inclined tubular photobioreactor surfaces on biomass productivity of *C. sorokiniana*. *Photosynthetica*, 46: 283-285.
- Vega-Estrada, J., Montes-Horcasitas, M.C., Domínguez-Bocanegra, A.R., Cañizares-Villanueva, R.O., 2005. *Haematococcus pluvialis* cultivation in split-cylinder internal-loop airlift photobioreactor under aeration conditions avoiding cell damage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68: 31-36.
- Vieira Costa, J.A., Colla, L.M., Duarte Filho, P.F., 2004. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. *Bioresource Technology*, 92: 237-241.
- Wang, B., Lan, C., Horsman, M., 2012. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology advances*, 30: 904-912.
- Watanabe, Y. & Hall, D.O., 1995. Photosynthetic CO₂ fixation technologies using a helical tubular bioreactor incorporating the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Energy Conversion and Management*, 36: 721-724.

- Wayama, M., Ota, S., Matsuura, H., Nango, N., Hirata, A., [Kawano, S.](#), 2013. Three-Dimensional Ultrastructural Study of Oil and Astaxanthin Accumulation during Encystment in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. PLOS ONE 8(1): e53618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053618>.
- Weissman, J.C., Goebel, R.P., Benemann, J.R., 1988. Photobioreactor design, carbon utilization, and oxygen accumulation. Biotechnology and Bioengineering, 31: 336–344.
- [Worldofmolecules, 1999. http://www.worldofmolecules.com/antioxidants/astaxanthin.htm](http://www.worldofmolecules.com/antioxidants/astaxanthin.htm). [Accessed 5 September 2016].
- Yuan, J.P., Xian, D.G. and Chen, F., 1997. Separation and analysis of carotenoids and chlorophylls in *Haematococcus lacustris* by high performance liquid chromatography photodiode array detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 1952–1956.
- [Zakynthinos, G. & Varzakas, T., 2016. Carotenoids: from Plants to Food Industry. Current Research in Nutrition and Food Science, 4: 38-51.](#)
- [Zhang, B., Geng, Y., Li, Z., Hu, H.J., Li, Ye G., 2009. Production of astaxanthin from Haematococcus in open pond by two-stage growth one-step process. Aquaculture, 295: 275-281.](#)
- Zijffers, J.W.F., Janssen, M., Tramper, J., Wijffels, R.H., 2008. Design process of an area-efficient photobioreactor. Marine Biotechnology, 10: 404–415.
- Zlotnik, I.S., Sukenik, A., Dubinsky, Z., [2006](#). Physiological and photosynthetic changes during the formation of red aplanospores in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. Journal of Phycology, 29: 463–469.
- Zou, N, Richmond, A., 1999. Effect of light-path length in outdoor flat plate reactors on output rate of cell mass of EPA in *Nannochloropsis sp.* Journal of Biotechnology, 70: [351-356](#).

