



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΩΚΕΑΝΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**Μελέτη της ανάπτυξης του μικροφύκου *Dunaliella sp.* που απομονώθηκε από τις Αλυκές Καλλονής Λέσβου σε μιζοτροφικές συνθήκες**



**Πετρίδη Αθηνά**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέποντες Καθηγητές: Καλλονιάτη Χρυσάνθη, Τσιρτσής Γεώργιος

Μυτιλήνη, Ιούλιος 2023

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αποφοίτου του Τμήματος Ωκεανογραφίας και Θαλασσίων Βιοεπιστημών

**Πετρίδη Αθηνά**

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

Μελέτη της ανάπτυξης του μικροφύκου *Dunaliella sp.* που απομονώθηκε από τις Αλυκές Καλλονής Λέσβου σε μιξοτροφικές συνθήκες

Τριμελής Επιτροπή Επίβλεψης και Κρίσης της Εργασίας

Υπογραφές

Γεώργιος Τσιρτσής

Χρυσάνθη Καλλονιάτη

Βασίλειος Μπακόπουλος



## Ευχαριστίες

Για την εκπόνηση της παρούσας Πτυχιακής Εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους Επιβλέποντες Καθηγητές κα. Χρυσάνθη Καλλονιάτη και κ. Γιώργο Τσιρτσή για την καθοδήγηση στο ερευνητικό μου έργο και την πολύτιμη επιστημονική βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια και μέχρι και την ολοκλήρωση πραγματοποίησης της Εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ το οικογενειακό μου περιβάλλον για την ενθάρρυνση, την υπομονή, την υποστήριξη και την αγάπη, που μου έδειξε, δίνοντας τη δύναμη και το κουράγιο, ώστε να ολοκληρώσω την πτυχιακή μου εργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μου τους φίλους για την στήριξη και συγκεκριμένα τις συμφοιτήτριες μου Ιωάννα και Αρχοντούλα για την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφεραν στο εργαστήριο και κατά την διάρκεια υλοποίησης των πειραμάτων.

## Περίληψη

Τα μικροφύκη είναι σημαντικοί φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που καλλιεργούνται για ποικίλους λόγους, διαθέτοντας πολλές εμπορικές εφαρμογές. Γι' αυτόν τον λόγο, είναι ζωτικής σημασίας να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή τους μέσω της εύρεσης αποτελεσματικότερων μεθόδων καλλιέργειας. Ανάλογα με την πηγή άνθρακα στην καλλιέργεια των μικροφυκών, υπάρχουν τρεις κυρίως μορφές: η αυτοτροφική, η ετεροτροφική και η μιξοτροφική. Η μιξοτροφική καλλιέργεια αποτελεί έναν αποδοτικό τρόπο ανάπτυξης των μικροφυκών, καθώς βοηθά στην αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης και της παραγωγής βιομάζας. Υπάρχουν πολλές οργανικές πηγές άνθρακα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μιξοτροφική καλλιέργεια, όπως η γλυκερόλη, η γλυκόζη, η μεθανόλη και άλλες.

Στην παρούσα εργασία μελετάται η ανάπτυξη του μικροφύκου *Dunaliella sp.*, που απομονώθηκε από τις Αλυκές Καλλονής Λέσβου, σε μιξοτροφικές συνθήκες. Οι αναλύσεις που εφαρμόστηκαν στις καλλιέργειες ήταν ο προσδιορισμός συγκέντρωσης χλωροφυλλών και ολικών καροτενοειδών, ο προσδιορισμός πρωτεϊνών και η αντιοξειδωτική ικανότητα του συγκεκριμένου μικροφύκου. Πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα καλλιέργειας της *Dunaliella sp.*, οι οποίες περιείχαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης από τρεις βιολογικές επαναλήψεις η κάθε μία, 0% (control), 0.5% και 2% για το πρώτο πείραμα και 0‰ (control), 0.5‰ και 2‰ για το δεύτερο πείραμα. Προσδιορίστηκε ο ρυθμός ανάπτυξης της καλλιέργειας, η ποσότητα της χλωροφύλλης-α, -β και ολικών καροτενοειδών, η ποσότητα πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford και το ολικό οξειδωτικό δυναμικό των καλλιεργειών με την μέθοδο FRAP.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η παρουσία γλυκερόλης δεν επηρεάζει σημαντικά τον ρυθμό ανάπτυξης των καλλιεργειών *Dunaliella sp.* Στην ποσότητα χλωροφύλλης-α,-β και ολικών καροτενοειδών, στο πρώτο πείραμα, παρατηρήθηκε ότι οι καλλιέργειες με την μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκερόλης (2%) παρουσίασαν υψηλότερη ποσότητα σε σχέση με το control, ειδικότερα στην τελευταία μέρα του πειράματος. Στο δεύτερο πείραμα, το control παρουσίασε υψηλότερη ποσότητα σε χλωροφύλλη-α και -β σε σχέση με τις συγκεντρώσεις γλυκερόλης (0.5‰ και 2‰), ενώ τα καροτενοειδή εμφάνισαν αυξημένη ποσότητα στις συγκεντρώσεις γλυκερόλης σε σχέση με το control. Κατά τον προσδιορισμό συγκέντρωσης των πρωτεϊνών παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις της γλυκερόλης (0.5% και 2%) εμφάνισαν υψηλότερη ποσότητα στις καλλιέργειες σε σχέση με το control, ειδικότερα στην τελευταία μέρα του πρώτου πειράματος, ενώ στο δεύτερο πείραμα η συγκέντρωση 0.5‰ παρουσίασε την υψηλότερη ποσότητα. Διαφορές παρατηρήθηκαν και στο ολικό οξειδωτικό δυναμικό των καλλιεργειών με γλυκερόλη σε σχέση με το control, με μεγαλύτερη ποσότητα αντιοξειδωτικών να παρουσιάζει το control.

## Abstract

Microalgae are extremely important photosynthetic organisms and are cultivated for a variety of purposes, with many commercial applications. On account of this, it is vital to optimize their production by discovering more efficient cultivation methods. Based on the carbon source in microalgae cultivation, there are three main forms: autotrophic, heterotrophic and mixotrophic. Mixotrophic cultivation is an efficient way of growing microalgae as it helps to increase the growth rate and biomass production. There are many organic carbon sources that can be used in mixotrophic culture, such as glycerol, glucose, methanol and others.

In the present study, the growth of the microalga *Dunaliella sp.*, isolated from the Kalloni's Salt Pans of Lesvos, is studied under mixotrophic conditions. The analyses performed on the cultures were the determination of chlorophylls and total carotenoids, protein determination and antioxidant capacity of this microalgae. Two culture experiments of *Dunaliella sp.* were carried out, containing three different concentrations of glycerol from three biological replicates each, 0% (control), 0.5% and 2% for the first experiment and 0‰ (control), 0.5‰ and 2‰ for the second experiment. The growth rate of the culture, the amount of chlorophyll-a, -b and total carotenoids, the protein content by Bradford method and the total oxidative potential of the cultures by FRAP method were determined.

The results of the experiments showed that the presence of glycerol does not significantly affect the growth rate of *Dunaliella sp.* In the amount of chlorophyll-a, -b and total carotenoids, in the first experiment, it was observed that the cultures with the highest concentration of glycerol (2%) showed higher amount than the control, especially on the last day of the experiment. In the second experiment, the control showed higher amount of chlorophyll-a and -b than the glycerol concentrations (0.5‰ and 2‰), while the carotenoids showed increased amount in the glycerol concentrations compared to the control. During the determination of proteins, it was observed that the concentrations of glycerol (0.5% and 2%) showed higher amount in the cultures compared to the control, especially on the last day of the first experiment, while in the second experiment the 0.5‰ concentration showed the highest amount. Differences were also observed in the total oxidative potential of the cultures with glycerol compared to the control, with the control showing higher antioxidant content.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	4
Abstract .....	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
<b>1.1 Γενικά χαρακτηριστικά</b> .....	8
<b>1.2 Εφαρμογές και χρήσεις μικροφυκών</b> .....	9
<b>1.2.1 Παραγωγή διαφόρων προϊόντων</b> .....	9
<b>1.2.2 Παραγωγή βιοκαυσίμων</b> .....	9
<b>1.3 Περιπτώσεις Καλλιεργειών Μικροφυκών</b> .....	10
<b>1.3.1 Φάσεις της κυτταρικής ανάπτυξης</b> .....	10
<b>1.3.2 Τεχνολογία παραγωγής μικροφυκών</b> .....	12
<b>1.4 Είδη μεταβολισμού</b> .....	13
<b>1.4.1 Μιξοτροφικός τρόπος καλλιέργειας</b> .....	14
<b>1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών</b> .....	15
<b>1.5.1 Φωτισμός</b> .....	15
<b>1.5.2 Θερμοκρασία</b> .....	16
<b>1.5.3 Θρεπτικά στοιχεία</b> .....	16
<b>1.5.4 Άνθρακας</b> .....	16
<b>1.5.5 Άζωτο</b> .....	16
<b>1.5.6 Φώσφορος</b> .....	16
<b>1.5.7 Αλατότητα</b> .....	17
<b>1.5.8 pH</b> .....	17
<b>1.6 Βιολογικές χρωστικές</b> .....	17
<b>1.6.1 Χλωροφύλλες</b> .....	17
<b>1.6.2 Καροτενοειδή</b> .....	18
<b>1.7 Πρωτεΐνες</b> .....	18
<b>1.8 Αντιοξειδωτική ικανότητα και Μικροφύκη</b> .....	19
2. ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	19
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	20
<b>3.1 Υλικά</b> .....	20
<b>3.2 Μηχανήματα</b> .....	20
<b>3.3 Διαλύματα</b> .....	20

<b>3.4 Καλλιέργεια της <i>Dunaliella sp.</i></b> .....	20
<b>3.5 Το μέσο καλλιέργειας f medium</b> .....	21
<b>3.5.1 Παρασκευή διαλύματος θρεπτικού με συνθετικό θαλασσινό νερό με προσθήκη γλυκερόλης</b> .....	22
<b>3.6 Εμβολιασμός καλλιέργειας</b> .....	24
<b>3.7 Μέθοδος μέτρησης κυττάρων της καλλιέργειας <i>Dunaliella sp.</i></b> .....	24
<b>3.8 Μέθοδος προσδιορισμού χλωροφύλλης και ολικών καροτενοειδών</b> .....	25
<b>3.9 Μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνών κατά Bradford</b> .....	25
<b>3.9.1 Αρχή της μεθόδου</b> .....	25
<b>3.9.2 Διαλύματα</b> .....	26
<b>3.9.3 Διαδικασία εκχύλισης πρωτεϊνών</b> .....	26
<b>3.9.4 Υπολογισμοί</b> .....	27
<b>3.10 Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικών (FRAP)</b> .....	27
<b>3.10.1 Συλλογή κυττάρων και λυοφιλίωση</b> .....	28
<b>3.10.2 Προετοιμασία αντιδραστηρίων</b> .....	28
<b>3.10.3 Προετοιμασία αραιώσεων Ασκορβικού οξέος</b> .....	29
<b>3.10.4 Διαδικασία εκχύλισης αντιοξειδωτικών</b> .....	29
<b>3.10.5 Μετρήσεις και υπολογισμοί</b> .....	29
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	31
<b>4.1 Επίδραση της γλυκερόλης σε καλλιέργειες <i>Dunaliella sp.</i></b> .....	31
<b>4.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης χλωροφύλλης και ολικών καροτενοειδών</b> .....	33
<b>4.3 Προσδιορισμός πρωτεϊνών</b> .....	43
<b>4.4 Ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό (FRAP)</b> .....	46
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	47
<b>5.1 Επίδραση της γλυκερόλης σε καλλιέργειες <i>Dunaliella sp.</i></b> .....	47
<b>5.2 Χλωροφύλλες και ολικά καροτενοειδή υπό μιξοτροφικές συνθήκες</b> .....	47
<b>5.3 Ολικός προσδιορισμός πρωτεϊνών υπό μιξοτροφικές συνθήκες</b> .....	49
<b>5.4 Ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό (FRAP) υπό μιξοτροφικές συνθήκες</b> .....	49
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	50



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Τα φύκη (λατινικά *alga*, πλ. *algae*) είναι μια μεγάλη πολυφυλετική κατηγορία μονοκύτταρων ή πολυκύτταρων οργανισμών με σχήματα και μεγέθη που ποικίλουν σημαντικά. Ο όρος «φύκη» περιλαμβάνει δύο κύριες μορφολογικές ομάδες: τα μακροφύκη (*macroalgae* ή κοινώς *seaweeds*), τα οποία είναι συνήθως θαλάσσια είδη και τα μικροφύκη (*microalgae*). Το κριτήριο που διακρίνει τις δύο κατηγορίες είναι απλώς το μέγεθος. Τα μακροφύκη έχουν μήκος μερικών εκατοστών και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φτάσουν και πολλά μέτρα (50-70), όπως τα γιγάντια Φαιοφύκη (καφέ φύκη, *kelp*). Αντίθετα, το μήκος των μικροφυκών κυμαίνεται από μερικά μικρόμετρα (συνήθως 0.2-50 μm μονοκύτταρα έως 100-200 μm στην περίπτωση πολυκύτταρων σχηματισμών νηματωδών όπως το κυανοβακτήριο *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) έως αρκετές εκατοντάδες (έως 1-2.000 μm σε ορισμένα διάτομα). Στην τρέχουσα ταξινόμηση τους στον όρο «φύκη» συμπεριλαμβάνονται μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι φωτοσυνθέτοντες οργανισμοί που παράγουν οξυγόνο αλλά και μη, ευκαρυωτικοί οργανισμοί, εξαιρουμένων όμως των ανώτερων φυτών (Barsanti and Gualtieri, 2006). Τα τελευταία εξελίχθηκαν από μεγάλα πράσινα φύκη (*Chlorophyta*) για την ζωή στην χέρσο (van den Hoek, et al., 1997).

Η βιολογία, η φυσιολογία και η οικολογία των μικροφυκών ποικίλλουν ανάλογα με την ταξινόμηση του μικροφύκου. Οι βασικότερες ομάδες μικροφυκών (φύλα ή διαιρέσεις) είναι τα Χλωροφύκη (*Chlorophyta*), τα Πρασινοφύκη (*Prasinophytes*), τα Ετεροκοντόφυτα (*Heterokontophyta*) με κύριες υποδιαιρέσεις, τα Χρυσοφύκη (*Chrysophyceae*), τα Διάτομα (*Bacillariophyceae* ή *Diatomeae*), τα Ευστιγματοφύκη (*Eustigmatophyceae*) τα Ραφιδοφύκη (*Raphidophytes*), τα Απτόφυτα (*Haptophytes*, *Prymnesiophyceae*), τα Κρυπτοφύκη (*Cryptophyceae*), τα Δινομαστιγωτά (*Dinophyta*) και τα Κυανοβακτήρια (*Cyanobacteria* – blue-green algae) (Barsanti and Gualtieri, 2006, Darley, 1982, Metting, 1996, Waterbury, 2006). Περισσότερα από 120.000 είδη (>100.000 είδη διατόμων) έχουν καταγραφεί επίσης, αλλά ο πραγματικός αριθμός είναι πιθανό να είναι πολύ μεγαλύτερος (Metting, 1996).

Τα μικροφύκη περιλαμβάνουν μαστιγωτές, κοκκοειδείς, ή παλμελοειδείς μορφές και τριχώματα αλλά και μεγάλους σχηματισμούς νηματωδών αποικιών, μικροθαλλούς ή πιο περίπλοκες συσσωματώσεις. Όπως και τα μακροφύκη που διαβιούν στην παραλιακή ζώνη, έτσι και το φυτοπλαγκτό και τα βενθικά μικροφύκη του εύφωτου πυθμένα, αποτελούν τους κύριους (είτε μοναδικούς) πρωτογενείς παραγωγούς στην θάλασσα ή στα εσωτερικά ύδατα (Falkowski, 1980, Reynolds, 2006) καθώς και σε ακραία περιβάλλοντα όπως οι παγετώνες (Bunt and Wood, 1963) ή οι θερμοπηγές (Brock, 1967). Εν ολίγοις, αποτελούν τη βάση διατροφής για το 70% της γήινης παραγωγής βιομάζας (Andersen, 1996) ενώ ευθύνονται για το 50% περίπου της φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου του πλανήτη (Wiessner, et al., 1995). Η χρήση τους στην ανθρώπινη διατροφή έχει καταγραφεί από αρχαιοτάτων χρόνων (Jassby, 1988) και έχει τεκμηριωθεί εκτενώς στην παραδοσιακή και την σύγχρονη υδατοκαλλιέργεια (De Pauw and Persoone, 1988, Guedes and Malcata, 2012).

Η εναγώνια αναζήτηση νέων υλικών και πρώτων υλών για την βιομηχανία οδήγησε στην ανάπτυξη της λεγόμενης μπλε βιοτεχνολογίας εστιάζοντας στους υδρόβιους μικροοργανισμούς (Bongiorni and Pietra, 1996, Kreeger, 1996). Αντίθετα, η έντονη συζήτηση που διεξήχθη για την αντιμετώπιση των συνεπειών του υπερπληθυσμού και την πίεση, που αυτός ασκεί στους διαθέσιμους πόρους τις προηγούμενες δεκαετίες (Cairns, 1998, Greep, 1998, Klatzmann, 1996) οδήγησε πολλούς ερευνητές στην διερεύνηση της πιθανής καταφυγής και στα μικροφύκη, είτε ως διατροφική λύση με παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (Kay and Barton, 1991, Kuhad, et al., 1997), είτε ως ανάκτηση του ρυπασμένου νερού (de la Noüe, et al., 1992) επαναφέροντας στο προσκήνιο και την πρόταση χρήσης τους στην αξιοποίηση άγονων εκτάσεων ιδίως με εξαλμυρισμένους υδροφόρους ορίζοντες για διάφορα προϊόντα (Barclay, et al., 1987, Dubinsky, et al., 1978, Isichei, 1990, Mitsui, 1980, Regan and Gartside, 1983). Όλη αυτή η συζήτηση

κινητοποίησε θεαματικά πόρους και επιστημονικές ομάδες στην δεκαετία του 2000 στην κατεύθυνση της αξιοποίησης μικροφυκών με πολλές προοπτικές για τις επόμενες δεκαετίες (Mata, et al., 2010, Spolaore, et al., 2006, Wijffels and Barbosa, 2010, Μάρκου et al., 2013).

## 1.2 Εφαρμογές και χρήσεις μικροφυκών

### 1.2.1 Παραγωγή διαφόρων προϊόντων

Τα μικροφύκη καλλιεργούνται παγκοσμίως, κυρίως ως ζωντανή τροφή στις υδατοκαλλιέργειες αλλά χρησιμοποιούνται επίσης και στην παραγωγή διαφόρων προϊόντων, κατά το πλείστον υψηλής αξίας, που αφορούν προϊόντα τροφής, κοσμετολογίας, φαρμακευτικής και γενικά βιομηχανικής χρήσης. Ορισμένα είδη χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιομάζας για τρόφιμα και συμπληρώματα διατροφής, παράγοντας υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης, λιπαρών οξέων (εικοσαπενταενοϊκού οξέος-EPA, δοκοσαεξαενοϊκού οξέως-DHA, γ-λινολενικού οξέος-GLA κλπ.), βιταμινών και ανόργανων στοιχείων. Η παραγωγή αυτών των προϊόντων ενδέχεται να έχει εφαρμογή στην ανθρώπινη διατροφή, στην διατροφή ζώων και των ψαριών. Πολλοί μεταβολίτες των φυκών έχουν φαρμακευτική αξία, είτε επειδή είναι αντιοξειδωτικά, είτε επειδή ενισχύουν το ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων, είτε επειδή έχουν ιστατική δράση. Τα κυριότερα στελέχη που καλλιεργούνται ανήκουν στα γένη *Chlorella*, *Dunaliella*, *Arthrospira*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Haematococcus* και *Schizochytrium* (Brennan and Owende, 2010, Harun et al., 2010, Pulz and Gross, 2004).

Τα μικροφύκη καλλιεργούνται και συλλέγονται για διάφορους βιομηχανικούς σκοπούς, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής χρωστικών ουσιών, όπως της χλωροφύλλης, της φυκοκυανίνης και των καροτενοειδών (π.χ. ασταξανθίνη, β-καροτένιο). Εκτός από αυτές τις χρήσεις, τα φύκη μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία λιπασμάτων και εδαφοβελτιωτικών προϊόντων. Η χρήση τους για τη βελτίωση του εδάφους είναι μια πρακτική που εφαρμοζόταν σε παλαιότερες εποχές και εξακολουθεί να είναι αποτελεσματική μέχρι και σήμερα. Η εδαφοβελτιωτική δράση των φυκών οφείλεται στην ικανότητα της βιομάζας τους να κατακρατούν μεγάλες ποσότητες νερού και να βελτιώνουν τα δομικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά του εδάφους. Επιπλέον, τα φύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα βραδείας αποδέσμευσης (slow release) και ειδικά τα αζωτοδεσμευτικά (nitrogen-fixing) είδη όπως τα *Anabaena* και *Nostoc*. Αυτά τα είδη είναι ικανά να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο και να το μετατρέπουν σε οργανική ύλη εντός της βιομάζας τους, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή λιπασμάτων που έχουν μικρότερο περιβαλλοντικό αντίκτυπο από την τυπική διαδικασία παραγωγής αζωτούχων λιπασμάτων μέσω της διεργασίας Haber-Bosch (Grewe and Pulz, 2012, Metting, 1996, Pulz and Gross, 2004, Pulz, et al., 2008, Razon, 2012, Spolaore, et al., 2006).

### 1.2.2 Παραγωγή βιοκαυσίμων

Τα μικροφύκη έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών, όσον αφορά την παραγωγή βιοενέργειας ως μια από τις απαντήσεις στα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκύπτουν από την αυξανόμενη χρήση ορυκτών καυσίμων με σκοπό την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών καθώς και την συσσώρευση του διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) στην ατμόσφαιρα. Η παραγωγή βιομάζας μικροφυκών και κατ' επέκταση της βιοενέργειας, προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα που προκύπτουν από τη χρήση των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Ίσως το πιο σημαντικό πλεονέκτημα της παραγωγής βιομάζας μικροφυκών είναι η δυνατότητα αξιοποίησης του διοξειδίου του άνθρακα από την πηγή έκλυσής του, με την απευθείας απελευθέρωσή του στο υγρό περιβάλλον όπου αναπτύσσεται (Ferreira et al., 2012, Rosa et al., 2011). Με αυτόν τον τρόπο, το CO<sub>2</sub> επαναχρησιμοποιείται από τα μικροφύκη, τα οποία το μετατρέπουν ξανά σε οργανική ύλη (βιομάζα) μέσω της φωτοσύνθεσης, δημιουργώντας έναν κλειστό κύκλο στις μεταμορφώσεις του άνθρακα. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της καλλιέργειας μικροφυκών για παραγωγή ενέργειας είναι τα εξής:

1. είναι αποδοτικά βιολογικά συστήματα που μπορούν να αξιοποιήσουν την ηλιακή ενέργεια με συγκρίσιμο ή ακόμα και μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τα επίγεια φυτά,
2. είναι απλοί οργανισμοί χωρίς πολύπλοκα αναπαραγωγικά όργανα, και μπορεί να αξιοποιηθεί ολόκληρη η βιομάζα τους,
3. είναι μικροοργανισμοί που ακολουθούν έναν απλό κύκλο κυτταρικής διαίρεσης υπό ευνοϊκές συνθήκες,
4. μπορούν να καλλιεργηθούν σε αλμυρό ή υφάλμυρο νερό,
5. η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας ως λιπάσματα απόβλητα και απόνερα από διάφορους παραγωγικούς τομείς,
6. Η παραγωγή βιομάζας από μικροφύκη σε στρεμματική κλίμακα είναι συγκρίσιμη ή ακόμα και μεγαλύτερη από αυτήν των επίγειων φυτών, και μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μη καλλιεργήσιμες εκτάσεις.

Ωστόσο, η καλλιέργεια μικροφυκών παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, με τα πιο κύρια, το υψηλό κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας των μονάδων καλλιέργειας, και το αυξημένο κόστος παραγωγής βιομάζας (Amin, 2009, Brennan and Owende, 2010, Chisti, 2007, Singh, et al., 2011).

Η προσοχή στην παραγωγή βιοενέργειας από μικροφύκη έχει επικεντρωθεί κυρίως σε είδη που περιέχουν υψηλές ποσότητες λιπιδίων, καθώς αυτά αποτελούν τη βασική πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ μετά τη μετεστεροποίησή τους σε μεθυλεστέρες (Chisti, 2007). Τα μικροφύκη περιέχουν επίσης υψηλές ποσότητες πρωτεϊνών και υδατανθράκων, σε επίπεδα παρόμοια με τα λιπίδια (Πίνακας 1), (Becker, 1994) και αποτελούν πηγή πρώτης ύλης για την παραγωγή ενέργειας ή βιοκαυσίμων μέσω διάφορων τεχνολογιών, όπως η αναερόβια χώνευση για την παραγωγή βιοαερίου, η πυρόλυση για την παραγωγή πυρολυτικών ελαίων, η αεριοποίηση για την παραγωγή συνθετικών αερίων (syngas), η αναερόβια ζύμωση για την παραγωγή βιοαιθανόλης, καθώς και άλλες μέθοδοι παραγωγής βιοκαυσίμων (Demirbas, 2010; Harun et al., 2010; Kruse and Hankamer, 2010; Lam and Lee, 2012, Μάρκου et al., 2013).

**Πίνακας 1:** Περιεκτικότητα ορισμένων μικροφυκών σε πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες (Πηγή: Brennan and Owende, 2010).

<b>Είδος</b>	<b>Πρωτεΐνες (%)</b>	<b>Λιπίδια (%)</b>	<b>Υδατάνθρακες (%)</b>
<i>Euglena gracilis</i>	39–61	14–20	14–18
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	21	17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	26
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58	14–22	12–17
<i>Dunaliella salina</i>	57	6	32
<i>Arthrospira (Spirulina) maxima</i>	60–71	6–7	13–16
<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>	46–63	4–9	8–14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56	12–14	10–17

### 1.3 Περιπτώσεις Καλλιεργείων Μικροφυκών

#### 1.3.1 Φάσεις της κυτταρικής ανάπτυξης

Για την κατανόηση της λειτουργίας των μικροφυκών κατά τη διάρκεια της καλλιέργειάς τους, είναι απαραίτητη η γνώση της διαδικασίας της κυτταρικής ανάπτυξής τους. Η κυτταρική ανάπτυξη των μικροφυκών περιλαμβάνει πέντε

φάσεις. Αυτές είναι: (1) η φάση της λανθάνουσας ανάπτυξης ή φάση επώασης, (2) η φάση της εκθετικής ανάπτυξης, (3) η φάση του φθίνοντα ρυθμού ανάπτυξης, (4) η φάση της στατικής ανάπτυξης και (5) η φάση του θανάτου.

Κατά τη φάση της **λανθάνουσας ανάπτυξης**, η πυκνότητα της καλλιέργειας των μικροφυκών αυξάνεται ελάχιστα. Αν τα μικροφύκη μεταφερθούν από ένα πιάτο στην υγρή καλλιέργεια, η διάρκεια της φάσης είναι μεγάλη. Αντίθετα, οι καλλιέργειες που εμβολιάζονται με εκθετικά αναπτυσσόμενα μικροφύκη έχουν μικρότερες λανθάνουσες φάσεις, πράγμα που συμβάλλει σημαντικά στην επιτάχυνση της μετάβασης σε βιομηχανική κλίμακα (upscaling). Κατά τη φάση της λανθάνουσας ανάπτυξης, παρατηρείται μια φυσιολογική προσαρμογή του κυτταρικού μεταβολισμού στην ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης των ενζύμων και των μεταβολιτών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη (μέσω διαχωρισμού) των κυττάρων και τη δέσμευση του άνθρακα.

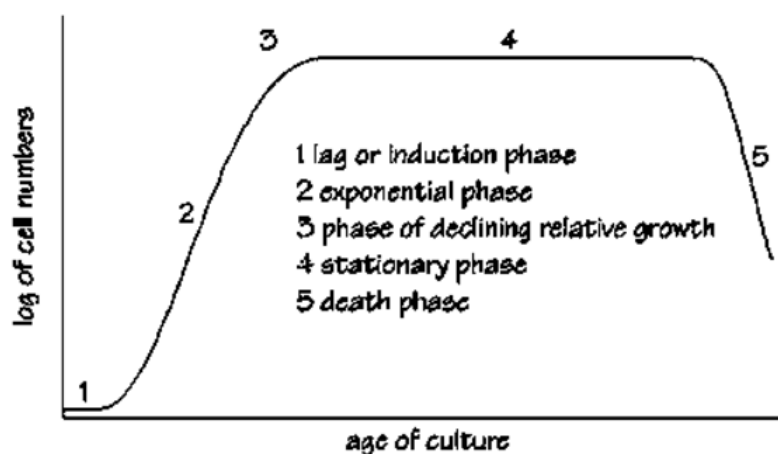
Στην **εκθετική φάση**, η πυκνότητα των κυττάρων αυξάνεται εκθετικά σε συνάρτηση του χρόνου βάσει της εξίσωσης,  $C_t = C_0 \cdot e^{mt}$ , όπου  $C_t$  και  $C_0$  είναι οι συγκεντρώσεις των κυττάρων τις χρονικές στιγμές  $t$  και  $0$  αντίστοιχα, ενώ  $m$  είναι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, ο οποίος εξαρτάται από το είδος των μικροφυκών, την ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας και την θερμοκρασία.

Κατά τη **φάση του φθίνοντα** ρυθμού ανάπτυξης, ο ρυθμός της κυτταρικής ανάπτυξης (μέσω διαχωρισμού των κυττάρων) μειώνεται, καθώς οι παράγοντες όπως τα θρεπτικά συστατικά, το φως, το pH, το  $CO_2$  καθώς και άλλοι φυσικοί και χημικοί παράγοντες επηρεάζουν αρνητικά τη διαδικασία ανάπτυξης.

Κατά τη **στατική φάση**, υπάρχει ισορροπία μεταξύ του ρυθμού ανάπτυξης και της δράσης περιοριστικών παραγόντων, με αποτέλεσμα τη σταθερή πυκνότητα των κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι ρυθμοί ανάπτυξης και θανάτου των κυττάρων είναι ίσοι.

Συνολικά, κατά τη διάρκεια της **φάσης του θανάτου**, η ποιότητα του νερού υποβαθμίζεται και τα θρεπτικά συστατικά εξαντλούνται. Η πυκνότητα των κυττάρων μειώνεται και τελικά η καλλιέργεια καταρρέει. Άλλοι παράγοντες που οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα είναι η έλλειψη οξυγόνου, η υπερθέρμανση, οι μεταβολές στο pH και η μόλυνση. Ο στόχος της καλλιέργειας των μικροφυκών είναι η παραμονή όλων, αν αυτό καθίσταται δυνατό, των κυττάρων στην εκθετική φάση. Επιπλέον, η θρεπτική αξία των παραγόμενων μικροφυκών μειώνεται στην περίπτωση που αυτά συλλέγονται μετά τη φάση του φθίνοντος ρυθμού ανάπτυξης. Η υποβάθμιση της θρεπτικής αξίας των τελικών προϊόντων οφείλεται στη μειωμένη ευπεψία, την ελλιπή σύσταση και την πιθανή παραγωγή τοξικών μεταβολιτών.

Παρακάτω φαίνεται ένα αντιπροσωπευτικό διάγραμμα των διαφόρων φάσεων της κυτταρικής ανάπτυξης (Σχήμα 1).



**Σχήμα 1:** Οι πέντε φάσεις ανάπτυξης καλλιεργειών μικροφυκών (Πηγή:FAO,2.3.Algal production).

### 1.3.2 Τεχνολογία παραγωγής μικροφυκών

Η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να γίνει είτε σε ανοικτούς είτε σε κλειστούς τύπους καλλιεργειών. Στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες, τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε τεχνητούς ή φυσικούς περιέκτες, όπως δεξαμενές, λίμνες ή νερόλακκοι. Αντίθετα, στις κλειστού τύπου καλλιέργειες, η καλλιέργεια γίνεται εντός διαφόρων κλειστών συστημάτων που ονομάζονται φωτοβιοαντιδραστήρες (photobioreactors). Οι φωτοβιοαντιδραστήρες προστατεύουν την καλλιέργεια από τις εξωτερικές συνθήκες, αποτρέποντας την άμεση επαφή με το περιβάλλον και τους κινδύνους που μπορεί να επιφέρουν (Pulz, 2001, Richmond, 1992). Παρακάτω αναφέρονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα κάθε τύπου καλλιέργειας. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η τεχνολογία παραγωγής μικροφυκών πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για τη βέλτιστη παραγωγή του κάθε είδους.

#### 1.3.2.1 Ανοικτού τύπου καλλιέργειες

Οι καλλιέργειες ανοικτού τύπου έχουν το πλεονέκτημα της χαμηλότερης κόστους εγκατάστασης και λειτουργίας σε σύγκριση με τις καλλιέργειες κλειστού τύπου, και επιτρέπουν τη μαζική παραγωγή μικροφυκών (Jorquera, et al., 2010). Ωστόσο, στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες, τα μικροφύκη είναι εκτεθειμένα σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και συχνά επιμολύνονται από άλλα είδη μικροφυκών, βακτήρια ή άλλους μικροοργανισμούς. Οι μολύνσεις με άλλους μικροοργανισμούς παραμορφώνουν τη σύσταση των καλλιεργειών και δυσκολεύουν την επίτευξη μονοκαλλιέργειας. Έντονες επιμολύνσεις μπορεί να οδηγήσουν σε χαμηλή παραγωγή ή ακόμα και στην κατάρρευση της καλλιέργειας, είτε λόγω του ανταγωνισμού άλλων μικροοργανισμών, είτε λόγω της εμφάνισης παρασιτικών ασθενειών (Day, et al., 2011).

Οι καλλιέργειες ανοικτού τύπου αντιμετωπίζουν επιπλέον προβλήματα λόγω της εξάτμισης του νερού, η οποία οδηγεί στην απώλεια σημαντικών ποσοτήτων νερού και στην αύξηση της συγκέντρωσης αλάτων, η οποία επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των μικροφυκών. Ως αποτέλεσμα αυτού, απαιτείται η αναπλήρωση του χαμένου νερού με την χρήση μεγάλων ποσοτήτων αντίστοιχα. Επίσης, το νερό μπορεί να είναι υφάλμυρο ή αλμυρό, ανάλογα με το είδος των μικροφυκών που καλλιεργούνται και την ανεκτικότητά τους στα άλατα. Έτσι αντλείται αλλά και χρησιμοποιείται μη πόσιμο ή/και μη αρδεύσιμο νερό από διάφορες πηγές (Bilanovic, et al., 2009).

Συνοπτικά, τα βασικά μειονεκτήματα των ανοικτών καλλιεργειών είναι: 1) απώλεια νερού λόγω εξάτμισής του, 2) αλλαγές της θερμοκρασίας, 3) χαμηλή αποτελεσματικότητα της χρήσης του CO<sub>2</sub>, 4) ανεπαρκής ανάδευση του υποστρώματος και 5) περιορισμένη αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας (Brennan and Owende, 2010).



**Εικόνα 1:** Καλλιέργειες ανοικτού τύπου μικροφυκών. Οι καλλιέργειες φυκών απαιτούν τεράστιες υδάτινες επιφάνειες για την αποτελεσματική μετατροπή του ηλιακού φωτός σε έλαιο που χρησιμοποιείται ως βιοκαύσιμο (Πηγή: CYANOTECH CORPORATION).

### 1.3.2.2 Κλειστού τύπου καλλιέργειες

Στις καλλιέργειες κλειστού τύπου, οι συνθήκες ελέγχονται σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό, ανάλογα αν πρόκειται για καλλιέργειες σε εσωτερικούς ή εξωτερικούς χώρους. Στις καλλιέργειες εξωτερικού χώρου, οι συνθήκες δεν ελέγχονται πλήρως (ηλιακή ένταση και θερμοκρασία). Αντίθετα, στις εσωτερικές καλλιέργειες, οι συνθήκες με τον ένα ή άλλο τρόπο είναι πιο ελεγχόμενες. Οι καλλιέργειες κλειστού τύπου πραγματοποιούνται σε κλειστούς περιέκτες, τους φωτοβιοαντιδραστήρες (photobioreactors). Οι φωτοβιοαντιδραστήρες διαφέρουν όσον αφορά τα υλικά κατασκευής και τα σχήματά τους. Μπορεί να υπάρχουν επίπεδοι φωτοβιοαντιδραστήρες παρόμοιοι με ηλιακούς συλλέκτες, κατακόρυφοι ή κεκλιμένοι, ελικοειδούς μορφής και κυλινδρικοί με επιμήκεις αγωγούς κατασκευασμένοι από διάφορα διαφανή υλικά (όπως γυαλί ή πλαστικό). Επίσης, οι απλές μορφές φωτοβιοαντιδραστήρων θεωρούνται αυτοί που είναι κατασκευασμένοι από πολυαιθυλένιο σε μορφή σάκων (Brennan and Owende, 2010; Chisti, 2007).



**Εικόνα 2:** Κλειστού τύπου καλλιέργειες μικροφυκών. Το σύστημα αποτελείται από μια σειρά κάθετα τοποθετημένων διαφανών σωλήνων. Οι σωλήνες αυτοί παρέχουν ένα ελεγχόμενο περιβάλλον για την καλλιέργεια μικροφυκών (Πηγή: [Microalgae in Biofuel Production : Plantlet](#)).

## 1.4 Είδη μεταβολισμού

Η πλειοψηφία των μικροφυκών είναι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί που παράγουν οξυγόνο ως προϊόν της φωτοσύνθεσής τους, με πηγή ενέργειας τον ήλιο και πηγή άνθρακα το CO<sub>2</sub>. Ωστόσο, ορισμένα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να προσαρμόζουν τον μεταβολισμό τους ανάλογα με τη διαθέσιμη μορφή ενέργειας και άνθρακα. Τα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν με διάφορους μεταβολικούς τύπους, περιλαμβανομένων:

**1) Φωτοαυτότροφος:** Τα μικροφύκη αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας τον ήλιο ως πηγή ενέργειας και το CO<sub>2</sub> ή άλλες ανόργανες μορφές ως πηγή άνθρακα, **2) Ετερότροφος:** Τα μικροφύκη χρησιμοποιούν οργανικές ουσίες όπως γλυκόζη, οξικό οξύ, γλυκερίνη κλπ. ως πηγή ενέργειας και άνθρακα, **3) Μιξότροφος:** Τα μικροφύκη μπορούν να αυξάνονται και να πολλαπλασιάζονται είτε αξιοποιώντας τον ήλιο ως πηγή ενέργειας είτε χρησιμοποιώντας οργανικές ουσίες ως πηγή άνθρακα, όπως το CO<sub>2</sub> ή άλλες οργανικές ενώσεις **4) Φωτοετερότροφος:** Τα μικροφύκη χρησιμοποιούν τον ήλιο ως πηγή ενέργειας και οργανικές ενώσεις ως πηγή άνθρακα (Chojnacka and Marquez-Rocha, 2004).

Ο ετερότροφος και μιξότροφος μεταβολισμός μπορούν να αποτελέσουν ιδανική τεχνική καλλιέργειας για την παραγωγή μικροφυκών, καθώς αντιμετωπίζουν το πρόβλημα της αξιοποίησης του φωτός σε καλλιέργειες με μεγάλη πυκνότητα ή με φωτοπαρεμπόδιση κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Στις ετερότροφες ή/και μιξότροφες καλλιέργειες, η προσθήκη οργανικού άνθρακα στο υπόστρωμα της καλλιέργειας οδηγεί σε μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας σε σχέση με τις φωτοαυτότροφες καλλιέργειες. Γενικά, ο μιξότροφος μεταβολισμός έχει υψηλότερους ρυθμούς

ανάπτυξης με μεγαλύτερη τελική παραγωγή βιομάζας σε σχέση με τους άλλους τρεις μεταβολικούς τύπους (Chojnacka and Marquez-Rocha, 2004). Ωστόσο, η προσθήκη οργανικού άνθρακα προϋποθέτει αξεπληρούσες συνθήκες καλλιέργειας λόγω του κινδύνου της υπέρμετρης ανάπτυξης βακτηρίων και της τελικής τους επικράτησης στις καλλιέργειες. Ειδικά για την παραγωγή μικροφυκών για ενεργειακούς σκοπούς, όπου το ζήτημα της μείωσης του κόστους των χρησιμοποιούμενων θρεπτικών υλικών είναι πολύ σημαντικό, για την πραγματοποίηση ετερότροφων ή μιξότροφων καλλιεργειών είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν οργανικά απόβλητα του παραγωγικού τομέα (Abreu et al., 2012, Andrade and Costa, 2007, Chen, 1996, Chojnacka and Zielińska, 2011, Gao et al., 2010, Zhang et al., 2011, Μάρκου et al., 2013).

#### 1.4.1 Μιξοτροφικός τρόπος καλλιέργειας

Το κύριο είδος μεταβολισμού που μελετήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία είναι η Μιξοτροφία. Όπως προαναφέρθηκε, η Μιξοτροφία αναφέρεται σε έναν τύπο ανάπτυξης όπου το CO<sub>2</sub> και ο οργανικός άνθρακας αφομοιώνονται ταυτόχρονα, με τη συνύπαρξη της αναπνευστικής και φωτοσυνθετικής δραστηριότητας. Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της μιξοτροφικής καλλιέργειας είναι, συνεπώς, περίπου ίσος με το άθροισμα των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης των κυττάρων που αναπτύσσονται κάτω από φωτοαυτότροφες και ετερότροφες συνθήκες. Τα πλεονεκτήματα της ετεροτροφίας, όπως η υψηλή συγκέντρωση κυττάρων και η παραγωγικότητα, ισχύουν και για τη μιξοτροφία. Τα μικροφύκη δαπανούν ενέργεια και πόρους για τη σύνθεση του φωτοσυνθετικού συστήματος, γι' αυτό και το σαφές πλεονέκτημα της χρήσης της μοναδικής αυτής ιδιότητας των φυκών και της αξιοποίησης του φωτός ως ενεργειακή πηγή. Επιπλέον, το φως λειτουργεί ως καταλύτης και ρυθμιστής για την παραγωγή ορισμένων προϊόντων από φύκη, όπως οι χρωστικές ουσίες (Chen and Zhang, 1997) και λιπαρών οξέων (Cohen, 1999). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται παραδείγματα ειδών μικροφυκών που μπορούν να καλλιεργηθούν μιξοτροφικά, καθώς και τα κατάλληλα οργανικά υποστρώματα (Richmond, 2004).

**Πίνακας 2:** Εμπορικά σημαντικά μικροφύκη που μπορούν να καλλιεργηθούν μιξοτροφικά (Πηγή: Richmond, 2004).

Microalgae	Organic carbon substrate	References
<i>Anabaena variabilis</i>	Fructose, glucose	Pearce & Carr (1969) and Valiente et al. (1992)
<i>Brachiomonas submarina</i>	Acetate	Tsavalos & Day (1994)
<i>Chlorella minutisima</i>	Methanol	Kotzabasis et al. (1999)
<i>C. regularis</i>	Acetate	Endo et al. (1977)
<i>C. sorokiniana</i>	Glucose	Lee et al. (1996)
<i>C. vulgaris</i>	Glucose	Ogawa & Aiba (1981)
<i>Chlorococcum</i> sp.	Acetate, fructose, glucose, maltose, manose	Non-published data
<i>Cyclotella cryptica</i>	Glycerol, glucose	Wood et al. (1999)
<i>Euglena gracilis</i>	Glucose, glycerol, galactose, ethanol	Tanim & Tsumura (1989)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Acetate	Kobayashi et al. (1992)
<i>Nannochloropsis</i> CCAP879/5	Glycerol, glucose	Wood et al. (1999)
<i>Nannochloropsis</i> CCAP211/78	Glycerol	Wood et al. (1999)
<i>Navicula saprophila</i>	Acetate	Kitano et al. (1997)
<i>Nitzschia</i> sp.	Acetate	Kitano et al. (1997)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Glycerol	Garcia et al. (2000)
<i>Rhodomonas reticulata</i>	Glycerol, glucose	Wood et al. (1999)
<i>R. salina</i>	Acetate	Kitano et al. (1997)
<i>Scenedesmus acutus</i>	Glucose	Ogawa & Aiba (1981)
<i>S. obliquus</i>	Methanol	Kotzabasis et al. (1999)
<i>Spirulina platensis</i>	Glucose	Chen & Zhang (1997) and Marquez et al. (1993)

Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε ότι η μιξοτροφική *Chlorella sp.* που αναπτύχθηκε σε γλυκόζη εμφάνισε μεγαλύτερη απόδοση και παραγωγικότητα σε σύγκριση με τα ετερότροφα και τα φωτοαυτότροφα κύτταρα (Lalucat et al., 1984, Lee et al., 1989, 1996). Οι Lalucat et al. πραγματοποίησαν μια λεπτομερή βιοενεργειακή ανάλυση και διαπίστωσαν ότι υπήρξε σημαντική μείωση στο ποσοστό της φωτεινής ενέργειας που αξιοποιείται για τη δέσμευση του CO<sub>2</sub> από μιξοτροφικά κύτταρα. Το μεγαλύτερο μέρος της φωτεινής ενέργειας χρησιμοποιήθηκε αντ' αυτού ως πηγή ενέργειας για την αφομοίωση του άνθρακα. Τα αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η μιξοτροφία οδηγεί σε υψηλή ενεργειακή απόδοση, καθώς η ποσότητα ενέργειας που διαχέεται είναι ελάχιστη. Η αναλογία ενέργειας προς άνθρακα για τη βιομάζα της *Chlorella* είναι περίπου 138 kcal mol<sup>-1</sup> C (Pirt et al., 1980), ενώ ο λόγος ενέργειας προς άνθρακα για τη γλυκόζη είναι 114.3 kcal mol<sup>-1</sup> C.

Μια επιπλέον μελέτη, των Garcia et al., (2000), εξετάζει την παραγωγή του EPA (εικοσαπενταενοϊκού οξέος) στο θαλάσσιο διάτομο *P. tricornutum* UTEX 640 σε καλλιέργεια παρτίδας υπό μιξοτροφικές συνθήκες, χρησιμοποιώντας την γλυκερόλη ως πηγή οργανικού άνθρακα. Η μελέτη εξετάζει επίσης την επίδραση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης και των διαδοχικών προσθηκών γλυκερόλης και χλωριούχου αμμωνίου στην κινητική της ανάπτυξης, την παραγωγικότητα της βιομάζας και το προφίλ των λιπαρών οξέων.

Πραγματοποιήθηκε ένα επιπλέον πείραμα στο διαδεδομένο μικροφύκος *Spirulina platensis* των Pereira et al. (2019) με σκοπό να εξετάσουν τις επιδράσεις της μιξοτροφικής καλλιέργειας στην παραγωγή βιομάζας, τη βιοχημική σύνθεση και την αντιοξειδωτική ικανότητα. Κατά τη μιξοτροφική ανάπτυξη, το μικροφύκος *Spirulina platensis* παρουσίασε αυξημένη παραγωγή βιομάζας και υψηλότερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες. Ωστόσο, η αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς και η περιεκτικότητα λιπιδίων και πρωτεϊνών, ήταν χαμηλότερη από αυτή της αυτοτροφικής καλλιέργειας, γεγονός που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Βασιζόμενοι σε αυτά τα τρία πειράματα, εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι μιξοτροφικές συνθήκες καλλιέργειας σε διάφορα μικροφύκη συμβάλλουν στην αύξηση της παραγωγής βιομάζας και των λιπαρών οξέων, επηρεάζοντας επίσης την αντιοξειδωτική ικανότητα.

## 1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών

Οι καλλιέργειες των μικροφυκών αποτελούν πολύπλοκα συστήματα και η ανάπτυξή τους επηρεάζεται από διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Οι κυριότεροι περιλαμβάνουν τους ακόλουθους: τον φωτισμό, τη θερμοκρασία, τα θρεπτικά συστατικά (C, N, P και μικροστοιχεία), το pH του θρεπτικού υποστρώματος, την αλατότητα του θρεπτικού υποστρώματος, καθώς και διάφορες παρεμποδιστικές και ανασταλτικές ουσίες που παράγονται από τα ίδια τα μικροφύκη ή που μπορεί να υπάρχουν στο θρεπτικό υπόστρωμα, ο αερισμός, η ανάδευση, η παρουσία ή μη άλλων ειδών μικροοργανισμών στην καλλιέργεια. Παρακάτω θα παρουσιαστεί μια σύντομη ανάλυση ορισμένων από τους παραπάνω παράγοντες (Μάρκου et al., 2013).

### 1.5.1 Φωτισμός

Η ποιότητα, η διάρκεια (φωτοπερίοδος) και η ένταση του φωτισμού αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη των μικροφυκών σε μία καλλιέργεια. Η ποιότητα του φάσματος του φωτός και η έντασή του πρέπει να επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπουν τη μέγιστη ανάπτυξη των οργανισμών. Το φάσμα του φωτός που αξιοποιείται από τα μικροφύκη είναι μεταξύ 400-700 nm (PAR, ενεργή φωτοσυνθετική ακτινοβολία). Τα διάφορα είδη μικροφυκών περιέχουν διάφορες φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες σε διαφορετικές αναλογίες, και ως εκ τούτου χρησιμοποιούν περισσότερο ή λιγότερο διαφορετικά μήκη κύματος. Γενικά, ο φωτισμός αποτελεί τον κρισιμότερο παράγοντα για την ανάπτυξη των μικροφυκών, ιδίως στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες, συνήθως αποτελεί και τον περιοριστικό παράγοντα (Μάρκου et al., 2013).



### 1.5.2 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία αποτελεί τον δεύτερο σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 20-30°C, ενώ υπάρχουν επίσης και θερμοφιλά στελέχη που μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες έως 40-42°C. Πολλά μικροφύκη μπορούν να αντέξουν θερμοκρασίες που είναι χαμηλότερες κατά έως 15°C από την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους, αλλά υπάρχει πιθανότητα, με μια μεταβολή της τάξης των 2-4°C πάνω από το βέλτιστο σημείο, να υπάρξει πλήρης απώλεια της καλλιέργειας. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, μειώνεται επίσης και το σημείο έντασης του φωτισμού που δημιουργεί ανασταλτικές συνθήκες ή φωτοοξείδωση. Επομένως, για τους παραπάνω λόγους, είναι απαραίτητο να υπάρχει εγκατεστημένο σύστημα ψύξης στην καλλιέργεια (Carvalho et al. 2011; Richmond, 1992).

### 1.5.3 Θρεπτικά στοιχεία

Τα μικροφύκη για να πολλαπλασιαστούν χρειάζονται διάφορα ανόργανα στοιχεία, τα οποία είναι αναγκαία για τις διάφορες μεταβολικές κυτταρικές διεργασίες. Τα κυριότερα θρεπτικά στοιχεία (μακροστοιχεία) είναι το άζωτο (N), ο φώσφορος (P) και το κάλιο (K). Αναγκαία αλλά σε μικρότερες ποσότητες τα μικροστοιχεία όπως το θείο (S), ο σίδηρος (Fe), το μαγνήσιο (Mg), το ασβέστιο (Ca), όπως και διάφορα άλλα μέταλλα (μόλυβδος, νικέλιο, κλπ.) (Richmond, 1992).

### 1.5.4 Άνθρακας

Τα μικροφύκη, ως φωτοσυνθέτοντες μικροοργανισμοί, μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια και τον ανόργανο άνθρακα (CO<sub>2</sub>), μέσω πολύπλοκων βιοχημικών διεργασιών, σε οργανικό άνθρακα (γλυκόζη). Το CO<sub>2</sub>, όταν είναι διαλυμένο στο νερό, βρίσκεται είτε σε μορφή διτανθρακικής ρίζας (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) για τιμές pH όπου αναπτύσσονται τα περισσότερα μικροφύκη, είτε σε μορφή ανθρακικής ρίζας (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) σε μεγαλύτερες τιμές pH. Τα μικροφύκη έχουν έναν μηχανισμό (carbon concentrating mechanism), κατά τον οποίο το διαλυμένο CO<sub>2</sub> συγκεντρώνεται γύρω από το κύτταρο και είτε ο άνθρακας απορροφάται ως διτανθρακική ρίζα, είτε με την βοήθεια των ενζύμων (carbonic anhydrase) απορροφάται σε μορφή CO<sub>2</sub> (Badger and Price 2003).

### 1.5.5 Άζωτο

Το άζωτο συμμετέχει σε αρκετά σημαντικά βιοχημικά μακρομόρια (πρωτεΐνες, DNA, RNA κλπ.) και η παροχή του είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Η περιεκτικότητα του αζώτου στην βιομάζα των μικροφυκών μπορεί να ανέλθει ακόμα και στο 10%. Το άζωτο μπορεί να προσληφθεί από διάφορες μορφές όπως αμμωνιακό άζωτο, νιτρικό, μοριακό από την ατμόσφαιρα και λιγότερο από τη νιτρώδη μορφή. Η παροχή νιτρικών αλάτων έχει δείξει ότι έχει καλύτερα αποτελέσματα στην παραγωγή βιομάζας (Costa et al. 2001). Για την μείωση του κόστους παραγωγής, αρκετοί ερευνητές προσπάθησαν να αντικαταστήσουν τα νιτρικά άλατα με φτηνότερα υλικά, όπως η ουρία (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O).

### 1.5.6 Φώσφορος

Ουσιαστικής σημασίας θρεπτικό στοιχείο είναι και ο φώσφορος, ο οποίος συμμετέχει σε διάφορα μακρομόρια, όπως φωσφολιπίδια, αδενοσινωτριφωσφορικό οξύ (ATP) κ.α. Τα μικροφύκη περιέχουν λιγότερο από 1% φώσφορο στη βιομάζα τους, παρόλα αυτά, αυτός είναι ο περιοριστικός παράγοντας ανάπτυξης, ειδικότερα σε φυσικά περιβάλλοντα. Ο φώσφορος προσλαμβάνεται από τα μικροφύκη ως ορθοφωσφορική ρίζα (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). Όταν η συγκέντρωση φωσφόρου στο περιβάλλον είναι χαμηλή τότε τα μικροφύκη τον αποθηκεύουν σε μεγαλύτερες ποσότητες από αυτές που χρειάζονται άμεσα και η αποθήκευση αυτή μπορεί να καλύψει τις ανάγκες δύο ή ακόμα και τριών κύκλων διαίρεσης (γενιές) (Powell et al. 2011).

### 1.5.7 Αλατότητα

Υπάρχουν είδη μικροφυκών, όπως για παράδειγμα η *Dunaliella salina* που αναπτύσσονται καλύτερα σε αλμυρά ή υφάλμυρα νερά με σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων (μεταξύ 20 και 24 g/L, αν και κάθε είδος έχει την δικιά του βέλτιστη τιμή). Άλλα μικροφύκη, όπως για παράδειγμα τα γένη *Chlorella*, *Spirulina* και *Porphyridium* είναι απλώς ανεκτικά σε μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων, παρόλο που δεν τις προϋποθέτουν. Πολλά είδη δεν αναπτύσσονται σε υποστρώματα με αλατότητα περισσότερη από 4 g/L. Η αυξημένη αλατότητα επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των μικροφυκών επιδρώντας άμεσα στο σύστημα της φωτοσύνθεσης (Richmond, 2004).

### 1.5.8 pH

Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται σε περιβάλλον με pH που κυμαίνεται μεταξύ 7 και 9, με το βέλτιστο εύρος να είναι 8.2-8.7. Παρόλα αυτά, υπάρχουν είδη που είναι οξύφιλα (όπως το *Chlamydomonas acidophila*), αλλά και αλκαλόφιλα (όπως η Σπιρουλίνα). Απότομη αλλαγή στο pH μπορεί να έχει καταστροφικές επιπτώσεις στην καλλιέργεια. Κατά την φωτοσύνθεση, το pH της καλλιέργειας έχει την τάση να αυξάνεται. Αν αυξηθεί πάνω από μια τιμή τότε επέρχεται κυτταρόλυση. Το αντίθετο συμβαίνει όταν χρησιμοποιείται αμμωνία ως πηγή αζώτου, όπου το pH μειώνεται. Μεγάλες τιμές του pH ευνοούν την στερεοποίηση και καθίζηση του φωσφόρου με ανάλογες επιπτώσεις στην καλή ανάπτυξη των μικροφυκών (Richmond, 2004).

## 1.6 Βιολογικές χρωστικές

### 1.6.1 Χλωροφύλλες

Η χλωροφύλλη είναι ένα πράσινο φωτοσυνθετικό μόριο που βρίσκεται στα περισσότερα φυτά, τα φύκη και τα κυανοβακτήρια. Απορροφά το ηλιακό φως και χρησιμοποιεί την ενέργεια για να "δεσμεύσει" το διοξείδιο του άνθρακα και να παράγει υδατάνθρακες και οξυγόνο. Αυτή η διαδικασία, γνωστή ως φωτοσύνθεση, αποτελεί την κινητήρια δύναμη της ζωής στα φυτά. Η χλωροφύλλη είναι ένα κυκλικό τετραπυρόλιο, το οποίο είναι παρόμοιο στη δομή με αυτό της αιμοσφαιρίνης με τη διαφορά ότι το κεντρικό μέταλλο είναι μαγνήσιο έναντι σιδήρου. Υπάρχουν πέντε τύποι χλωροφύλλης στα μικροφύκη, συμπεριλαμβανομένης της χλωροφύλλης-α, β, γ, δ και ε. Η χλωροφύλλη -α είναι η κύρια φωτοσυνθετική χρωστική ουσία, που υπάρχει σε αφθονία στα Κυανοβακτήρια και τα Ροδόφυτα. Η χλωροφύλλη -β υπάρχει στα Χλωρόφυτα και Ευγλενόφυτα, ενώ οι χλωροφύλλες γ, δ και ε βρίσκονται στα Διάτομα του γλυκού νερού (Begum et al., 2016). Λόγω της υψηλής πράσινης χρώσης τους και της αυξανόμενης ζήτησης των καταναλωτών για περισσότερα φυσικά προϊόντα, οι χλωροφύλλες είναι υψίστης σημασίας ως παράγοντες βαφής στις βιομηχανίες τροφίμων, καθώς και στα φαρμακευτικά προϊόντα και στα καλλυντικά (Odjadjare et al., 2017; Yaakob et al., 2014). Αν και οι χλωροφύλλες εξάγονται κυρίως από φθηνές πηγές, όπως το γρασίδι ή τη μηδική, τα μικροφύκη περιέχουν σημαντική ποσότητα χλωροφυλλών και επομένως μπορούν να θεωρηθούν ως εναλλακτική πηγή για την εκχύλιση χλωροφύλλης (Odjadjare et al., 2017; Yaakob et al., 2014). Πράγματι, η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη ενός κυττάρου ποικίλλει από περίπου 0.5 έως 4% του ξηρού βάρους ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, καθώς και το στέλεχος (Harun et al., 2010; Spolaore et al., 2006).

Μια ανασκόπηση ανέδειξε τις συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή χλωροφύλλης στα μικροφύκη, μεταξύ των οποίων είναι το χαμηλής έντασης φως, το φάσμα κόκκινου φωτός, αρκετά υψηλή θερμοκρασία και πλούσια περιεκτικότητα σε άζωτο και φώσφορο (Da Silva Ferreira and Sant'Anna, 2017). Μόλις εκχυλιστούν οι χλωροφύλλες, τα υπόλοιπα κυτταρικά θραύσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παράδειγμα στην παραγωγή βιοκαυσίμων. Μεταξύ των πιο εκμεταλλευόμενων στελεχών, τα πιο γνωστά μικροφύκη είναι από το γένος *Chlorella*, του οποίου η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη αντιπροσωπεύει περίπου το 7% της βιομάζας του, πέντε φορές περισσότερο από αυτό του *Arthrospira* (Khanra et al., 2018a).

Επιπλέον, η *Spirulina sp.* είναι η πιο σημαντική πηγή χλωροφύλλης, που παράγει 2-3 φορές περισσότερη χλωροφύλλη σε σχέση με άλλα μικροφύκη. Παρουσιάζει πολύ υψηλά περιεχόμενα σε χλωροφύλλη α, που αντιστοιχεί στο 1,15% της βιομάζας τους. Με βάση αυτό το γεγονός, αλλά και την ζήτηση των καταναλωτών για φυσικές χρωστικές, η χρήση των μικροφυκών για παραγωγή χλωροφυλλών είναι μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική, γιατί εκτός από πράσινο χρώμα, η ενσωμάτωση των μικροφυκών στα τρόφιμα αυξάνει και την θρεπτική τους αξία (Danesi et al., 2002).

### 1.6.2 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι μια άλλη κατηγορία χρωστικών, που βρίσκονται σε αφθονία στα μικροφύκη. Αυτά τα πλούσια χρωματισμένα μόρια, που κυμαίνονται από το κίτρινο έως το κόκκινο είναι κυρίως γνωστά για την αντιοξειδωτική τους ιδιότητα, καθώς και για τη χρήση τους ως βαφή (Levasseur et al., 2020). Χάρη στις ιδιότητές τους, τα καροτενοειδή συναντώνται συχνά στις βιομηχανίες τροφίμων και ζωοτροφών, καθώς και στον τομέα των καλλυντικών και των φαρμακευτικών προϊόντων (Siqueira et al., 2018). Με περισσότερους από 1.100 αντιπροσώπους στη φύση, τα καροτενοειδή αποτελούν την πιο ποικιλόμορφη και διαδεδομένη κατηγορία χρωστικών (Gong and Bassi, 2016; Odjadjare et al., 2017).

Οι κύριες πηγές καροτενοειδών είναι τα μικροφύκη, που ανήκουν στην κατηγορία των Χλωροφυκών. Αυτά τα μικροφύκη είναι ικανά να παράγουν ένα ευρύ φάσμα χρωστικών: καροτένια, όπως β-καροτένιο και λυκοπένιο, καθώς και ξανθοφύλλες, όπως ασταξανθίνη, βιολακανθίνη, αντραξανθίνη, ζεαξανθίνη, νεοξανθίνη και λουτεΐνη και άλλες. Άλλες χρωστικές, όπως η φουκοξανθίνη, η διατοξανθίνη και η διαδινοξανθίνη παράγονται από άλλα μικροφύκη (Berthon et al., 2017). Κατά μέσο όρο, τα καροτενοειδή αντιπροσωπεύουν το 0.1 έως 0.2% της ξηρής ύλης των μικροφυκών (Spolaore et al., 2006). Ωστόσο, κάτω από δυσμενείς συνθήκες, αυτές οι χρωστικές μπορούν να εκφραστούν έως και 12% στο γένος Χλωρόφυτα. Επί του παρόντος, οι δύο χρωστικές που έχουν τη μεγαλύτερη ζήτηση στην παγκόσμια αγορά καροτενοειδών είναι το β-καροτένιο και η ασταξανθίνη από τα γένη *Dunaliella* και *Haematococcus*, αντίστοιχα (Levasseur et al., 2020). Επιπλέον, τα οφέλη των καροτενοειδών για την υγεία είναι κυρίως γνωστά τόσο στα χερσαία φυτά, όσο και στα μικροφύκη, αλλά απομένει να ανακαλυφθεί ο μηχανισμός δράσης των καροτενοειδών, που υπάρχουν αποκλειστικά στα μικροφύκη (Galasso et al., 2019).

### 1.7 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη δομή και το μεταβολισμό των κυττάρων των μικροφυκών. Αποτελούν αναπόσπαστο συστατικό της μεμβράνης και του συμπλέγματος συλλογής φωτός, συμπεριλαμβανομένων πολυάριθμων καταλυτικών ενζύμων, τα οποία εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση (Williams and Laurens, 2010). Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη πολλών ειδών μικροφυκών μπορεί να ανταγωνιστεί τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά τις συμβατικές πηγές πρωτεΐνης (Batista et al., 2013; Graziani et al., 2013). Όσον αφορά την ποσότητα, αρκετά είδη μικροφυκών αναφέρεται ότι διαθέτουν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης σε ποσοστό που μπορεί να κυμαίνεται από 42% έως πάνω από 70% σε ορισμένα κυανοβακτήρια και έως 58% για το *Chlorella vulgaris* σε ξηρό βάρος (Becker, 2007; Galasso et al., 2019; Plaza et al., 2009).

Οι πρωτεΐνες από τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται κυρίως ως θρεπτικά συστατικά ή περιλαμβάνονται στη σύνθεση λειτουργικών τροφίμων (Khanra et al., 2018a; Siqueira et al., 2018). Η κατανάλωση μικροφυκών ως συμπλήρωμα διατροφής γίνεται μέσω χαπιών, δισκίων, σκόνης ή πάστας (Pulz and Gross, 2004). Αν και τα τελευταία χρόνια, πρωτεΐνες, που προέρχονται από μικροφύκη, έχουν ενσωματωθεί σε μπισκότα, γλυκά, ψωμί, ζυμαρικά, ποτά και μύρα (Liang et al., 2004). Ένα από τα πιο διαδεδομένα μικροφύκη λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε

πρωτεΐνες και των πρόσθετων ευεργετικών ιδιοτήτων του είναι το *Spirulina sp.*, που καταναλώνεται ευρέως σε όλο τον κόσμο.

### 1.8 Αντιοξειδωτική ικανότητα και Μικροφύκη

Η ύπαρξη βιολογικών συστημάτων σε περιβάλλοντα με υψηλή περιεκτικότητα οξυγόνου έχει απαιτήσει την εξέλιξη αντιοξειδωτικών μηχανισμών που αντιμετωπίζουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Οι γενικοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται από τα μικροφύκη για την αντιμετώπιση των ROS φαίνεται να είναι παρόμοιοι με αυτούς των υδρόβιων και χερσαίων οργανισμών. Ωστόσο, ορισμένα μικροφύκη έχουν αναπτύξει μοναδικές προσαρμογές σε αυτούς τους μηχανισμούς. Ένας κοινός δείκτης της τοξικότητας του περιβάλλοντος και της καταπόνησης είναι η μείωση της περιεκτικότητας χλωροφύλλης στα κύτταρα. Οι μελέτες χρησιμοποιούν τέτοιους δείκτες για να διερευνήσουν το αποτέλεσμα των ενδογενών και εξωγενών τοξινών στα μικροφύκη (Judith et al., 2013).

Τα μικροφύκη παράγουν διάφορες ενώσεις χαμηλού ή υψηλού μοριακού βάρους για την αντιμετώπιση της οξειδωτικής καταπόνησης, είτε αυτή προκύπτει από ενδογενείς διεργασίες είτε από εξωγενείς συνθήκες, όπως χρωστικές, φυτοελατίνες, πολυφαινόλες και άλλα. Μελέτες έχουν εξετάσει εάν αυτές οι αντιοξειδωτικές ενώσεις που παράγονται από τα μικροφύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής ή φαρμακευτικά προϊόντα από τους ανθρώπους. Η γενική προσέγγιση αυτών των ερευνών ήταν η παροχή εκχυλίσματος ή υδροφιλικών ενώσεων των μικροφυκών σε καρκινικά κύτταρα θηλαστικών ή στη διατροφή τρωκτικών. Οι αρχικές αυτές μελέτες αναφέρουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, προτείνοντας ότι η προσθήκη μικροφυκών μπορεί να έχει θετικές επιδράσεις που συνδέονται με αντιοξειδωτικά ένζυμα, χρωστικές, φυτοελατίνες, πολυφαινόλες ή πολυσακχαρίτες. Είναι πιθανό ότι τα μικροφύκη περιέχουν και άλλες ευεργετικές ενώσεις, όπως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Τέλος, είναι σημαντικό να διερευνηθεί εάν οι επιδράσεις μεταξύ αυτών των μηχανισμών παίζουν σημαντικό ρόλο στην επίτευξη των ευεργετικών αποτελεσμάτων αντιοξειδωτικής δράσης.

## 2. ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι να μελετηθούν οι μιξοτροφικές συνθήκες καλλιέργειας του είδους *Dunaliella sp.* απομονωθέντων από τις αλυκές της Καλλονής με προσθήκη πηγής άνθρακα σε συνθετικό θαλασσινό νερό. Για την διερεύνηση της επίδρασης της μιξοτροφίας έγινε ένα σύνολο μετρήσεων. Πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα, από τρεις βιολογικές επαναλήψεις για κάθε διαφορετική συγκέντρωση γλυκερόλης που περιείχε η καλλιέργεια. Στο πρώτο πείραμα οι συγκεντρώσεις ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη, ενώ στο δεύτερο πείραμα οι συγκεντρώσεις ήταν 0‰ (control), 0.5‰ και 2‰ γλυκερόλη. Προσδιορίστηκε αρχικά, ο ρυθμός ανάπτυξης των καλλιεργειών σε κάθε συγκέντρωση με χρήση αναστροφής μικροσκοπίας. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η ποσότητα χλωροφύλλης (χλωροφύλλη-α, -β) και ολικών καροτενοειδών σε κάθε συνθήκη της καλλιέργειας. Ακόμη, προσδιορίστηκε η ποσότητα πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford και ολικών αντιοξειδωτικών με την μέθοδο FRAP σε κάθε συνθήκη της καλλιέργειας *Dunaliella sp.* Από το σύνολο των αποτελεσμάτων έγινε εμφανής ότι η επίδραση της γλυκερόλης στις καλλιέργειες δεν επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροφύκου.

## 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1 Υλικά

Για τη διεξαγωγή του πειράματος έγινε χρήση των παρακάτω υλικών και μηχανημάτων:

1. Μπουκάλια των 200 ml και γυάλινες πιπέττες Pasteur
2. Υδρόφοβο βαμβάκι
3. Κωνικές φιάλες Erlenmeyer 1 L
4. Αντικειμενοφόρο πλάκα και καλυπτρίδες
5. Μηχανική πιπέττα και πλαστικές μύτες
6. Cups κωνικά Eppendorf των 1.5ml και 2ml
7. Γυάλινες και πλαστικές κυβέττες των 2 και 1ml
8. Κωνικά σωληνάρια FALCON των 50ml
9. Ποτήρια ζέσεως
10. Parafilm

### 3.2 Μηχανήματα

1. Μικροσκόπιο Motic AE31, φακός 40x
2. Φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης Hitachi Digilab U-1800
3. Αντλίες κενού αέρος EHEIM 200
4. Φυγόκεντρος THERMO scientific Pico 21
5. Κλίβανος υγρής αποστείρωσης- Αυτόκαυστο
6. Ζυγαριά KERN AU 220-4M
7. Αναδευτήρας magnetic stirrer
8. Ομογενοποιητής υπερήχων Ultrasonic Homogenizer (Sonicator)
9. Θάλαμος σταθερών συνθηκών με λάμπες
10. Υδατόλουτρο GFL

### 3.3 Διαλύματα

1. Ουδέτερο διάλυμα Ιωδίνης Lugol
2. Βιταμίνες (5/1000, 1/1000) stock
3. Glycerol 100%
4. Acetone 90%
5. Bradford solution
6. Lysis buffer
7. f/2 stock

### 3.4 Καλλιέργεια της *Dunaliella sp.*

Το είδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία είναι η *Dunaliella sp.*, η οποία απομονώθηκε από τις αλυκές της Καλλονής και αναλύθηκε στο εργαστήριο Οικολογίας και Δυναμικής Συστημάτων του τμήματος Ωκεανογραφίας και Θαλασσίων Βιοεπιστημών. Για την προετοιμασία της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν 9 μπουκάλια των 200 ml, όπου στα καπάκια δημιουργήθηκαν δύο τρύπες με σκοπό να τοποθετηθούν δύο γυάλινες πιπέττες με υδρόφοβο βαμβάκι. Στην κορυφή αυτών συνδέθηκαν λεπτά σωληνάκια τα οποία οδηγούσαν σε αντλίες κενού αέρος. Η συνεχής ανάμιξη με αέρα ήταν απαραίτητη για να αποφευχθεί η καθίζηση των κυττάρων, να

εξασφαλιστεί ότι όλα τα κύτταρα του πληθυσμού εκτίθεντο εξίσου στο φως και τα θρεπτικά συστατικά και να βελτιωθεί η ανταλλαγή αερίων μεταξύ του μέσου καλλιέργειας και του αέρα. Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με φωτοπερίοδο, 12 ώρες φως-12 ώρες σκοτάδι.



**Εικόνα 3:** Μπουκάλια συνδεδεμένα με τις αντλίες στον θάλαμο σταθερών συνθηκών.

### 3.5 Το μέσο καλλιέργειας f medium

Το θρεπτικό μέσο Medium f/2 είναι ένα δημοφιλές και ευρέως χρησιμοποιούμενο μέσο για την καλλιέργεια θαλάσσιων φυτοπλαγκτονικών οργανισμών, ιδίως σε παράκτια διάτομα. Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου, χρησιμοποιήθηκε συνθετικό θαλασσινό νερό, στο οποίο προστέθηκαν θρεπτικά συστατικά, ιχνοστοιχεία και βιταμίνες.

#### Παρασκευή μέσου καλλιέργειας medium f/2

##### 1. Θρεπτικά

Ουσία	Stock διάλυμα
$\text{NaNO}_3$	15gr/200ml
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.565 gr/100ml
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	4.46 gr/200 ml

Τα διαλύματα διατηρούνταν στην ψύξη. Το διάλυμα φωσφορικών έπρεπε να παρασκευάζεται κάθε φορά που φτιάχνεται medium f/2.

## 2. Μέταλλα

Ουσία	Stock διάλυμα
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.96 gr/200 ml
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.26 gr/200 ml
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.4 gr /200ml
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 gr/200 ml
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	18 gr/ 100 ml

Για να παρασκευαστεί το stock διάλυμα όλων των μετάλλων διαλύθηκε 0.85 gr FeEDTA σε περίπου 100 ml νερού, στην συνέχεια προστέθηκε 0.2 ml από το καθένα από τα παραπάνω και συμπληρώθηκε με νερό μέχρι όγκου 200 ml. Το τελικό δείγμα διατηρείται στην ψύξη.

## 3. Medium f/2

Για να παρασκευαστεί το medium f/2 αναμίχθηκαν από 25 ml από τα τρία διαλύματα θρεπτικών και 25 ml από το stock διάλυμα όλων των μετάλλων. Το τελικό διάλυμα διατηρήθηκε στην ψύξη.

## 4. Διαλύματα βιταμινών

Ουσία	Stock διάλυμα
Thiamine HCl	0.4 gr/200 ml
Biotin + B12	από 0.02 gr/ 200 ml

Παρασκευάστηκε το stock διάλυμα βιταμινών αναμειγνύοντας 1 ml του διαλύματος Thiamine HCl και 0.1 ml του διαλύματος Biotin/B12 και συμπληρώθηκε με νερό μέχρι όγκου 100 ml. Όλα τα διαλύματα διατηρούνταν στην ψύξη.

### 3.5.1 Παρασκευή διαλύματος θρεπτικού με συνθετικό θαλασσινό νερό με προσθήκη γλυκερόλης

Θρεπτικό medium f/2 με sea salt για 2 λίτρα:

1. 80 g sea salt
2. 2 L απεσταγμένου νερού  $\text{DH}_2\text{O}$  (λιγότερο από 2L ~1800 ml)
3. 8 ml medium f/2 stock

- Για το 1<sup>ο</sup> πείραμα (Ιούνιος 2022) χρησιμοποιήθηκε ποσότητα συγκέντρωσης γλυκερόλης σε ποσοστό επί τοις εκατό (%).

Χρησιμοποιήθηκαν 3 κωνικές Erlenmeyer 1 L για τον διαχωρισμό του θρεπτικού και την προσθήκη γλυκερόλης:

1<sup>η</sup>) control 0% γλυκερόλη 800 ml

2<sup>η</sup>) 0.5% γλυκερόλη 600 ml

3<sup>η</sup>) 2% γλυκερόλη 600 ml

Ποσότητες σε κάθε κωνική:

- **0%** : 760 ml f/2 + 39.2 ml DH<sub>2</sub>O + 0.8 ml stock vitamin (μετά την αποστείρωση)
- **0.5%**: 570 ml f/2 + 2.4 ml γλυκερόλης + 27 ml DH<sub>2</sub>O + 0.6 ml stock vitamin
- **2%**: 570 ml f/2 + 9.6 ml γλυκερόλης + 19.8 ml DH<sub>2</sub>O + 0.6 ml stock vitamin

Στη συνέχεια, αφού αναδεύτηκαν πολύ καλά στον μαγνητικό αναδευτήρα, διαχωρίστηκε το θρεπτικό με τη γλυκερόλη στα 9 μπουκάλια ανά τριπλέτες. Στο κάθε μπουκάλι προστέθηκε ογκομετρημένη ποσότητα 200 ml από την κάθε κωνική και συγκεκριμένα στα τρία πρώτα μπουκάλια προστέθηκαν στο καθένα 200 ml από την κωνική με το control, στα άλλα τρία μπουκάλια προστέθηκαν 200 ml στο καθένα από την κωνική με την 0.5% συγκέντρωση γλυκερόλης και αντίστοιχα έγινε για την κωνική με συγκέντρωση 2% γλυκερόλης. Μετά την προσθήκη του θρεπτικού στα μπουκάλια, τοποθετήθηκαν στον κλίβανο για αποστείρωση σε θερμοκρασία 120 °C/20 min. Στη συνέχεια, μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης προστέθηκαν οι βιταμίνες σε κάθε μπουκάλι με τις ποσότητες που αναγράφτηκαν παραπάνω.

- Για το 2<sup>ο</sup> πείραμα (Δεκέμβριος 2022) χρησιμοποιήθηκε ποσότητα συγκέντρωσης γλυκερόλης σε ποσοστό επί τοις χιλίους (%).

Χρησιμοποιήθηκαν 3 κωνικές Erlenmeyer 1 L για τον διαχωρισμό του θρεπτικού και την προσθήκη γλυκερόλης:

1<sup>η</sup>) control 0‰ γλυκερόλη 800 ml

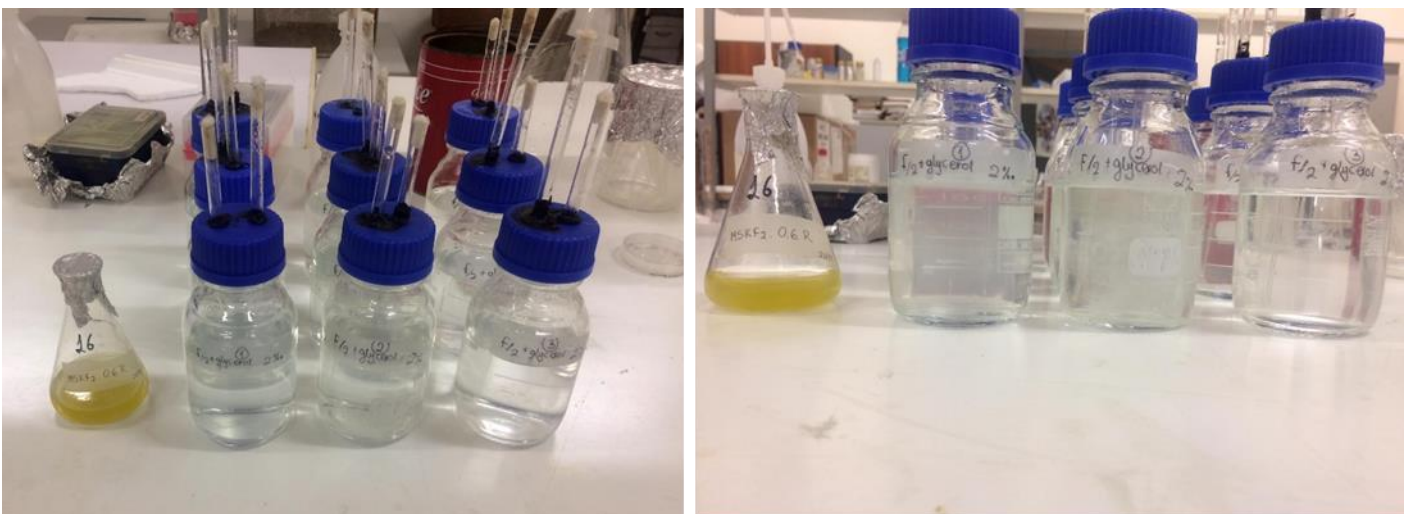
2<sup>η</sup>) 0.5‰ γλυκερόλη 600 ml

3<sup>η</sup>) 2‰ γλυκερόλη 600 ml

Ποσότητες σε κάθε κωνική:

- **0‰** : 760 ml f/2 + 39.2 ml DH<sub>2</sub>O + 0.8 ml stock vitamin (μετά την αποστείρωση)
- **0.5‰**: 570 ml f/2 + 0.24 ml γλυκερόλης + 29.16 ml DH<sub>2</sub>O + 0.6 ml stock vitamin
- **2‰**: 570 ml f/2 + 0.96 ml γλυκερόλης + 28.44 ml DH<sub>2</sub>O + 0.6 ml stock vitamin

Αντίστοιχη διαδικασία με το πρώτο πείραμα, μετά την ανάδευση έγινε προσθήκη του θρεπτικού στα μπουκάλια, αποστειρώθηκαν και τέλος προστέθηκαν οι βιταμίνες.



**Εικόνα 4:** Μπουκάλια με το θρεπτικό f2 πριν τον εμβολιασμό, του δεύτερου πειράματος.



### 3.6 Εμβολιασμός καλλιέργειας

Το είδος που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια και των δύο πειραμάτων ήταν το *Dunaliella sp.* όπου απομονώθηκε από τις αλυκές της Καλλονής. Για τον εμβολιασμό της καλλιέργειας έπρεπε πρώτα να υπολογιστεί η ποσότητα του δείγματος που απαιτείται για τους όγκους θρεπτικού κάθε μπουκαλιού. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση κυττάρων στο μικροσκόπιο σε φακό 40x από το είδος *Dunaliella sp.* Τοποθετήθηκε ποσότητα 150μl δείγματος στην αντικειμενοφόρο πλάκα, το οποίο ήταν αναμειγμένο με ουδέτερο διάλυμα Ιωδίνης Lugol.

Ο τύπος για τον υπολογισμό της ποσότητας δείγματος που προστέθηκε σε κάθε μπουκάλι, δεδομένου ότι τα κύτταρα στην αρχή της καλλιέργειας είναι 5000 cells/ml, είναι ο εξής:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε σε στείρες συνθήκες.

### 3.7 Μέθοδος μέτρησης κυττάρων της καλλιέργειας *Dunaliella sp.*

#### Μικροσκόπιο

Η μικροσκοπική καταμέτρηση κυττάρων της καλλιέργειας *Dunaliella sp.* πραγματοποιούνταν καθημερινά, από την ημέρα 0 έως την τελευταία μέρα του πειράματος. Για την μέθοδο μέτρησης κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο (φακός 40x), λήφθηκε δείγμα 300 μl από κάθε μπουκάλι και για την σταθεροποίησή του προστέθηκε ποσότητα 20 μl ουδέτερου διαλύματος Ιωδίνης Lugol και αναδεύτηκε καλά. Από το δείγμα με την Lugol λήφθηκε ποσότητα 150 μl και τοποθετήθηκε στην αντικειμενοφόρο πλάκα Palmer Malone. Ακολουθήθηκε η καταμέτρηση κυττάρων με τη βοήθεια μετρητή χειρός. Ο φακός του μικροσκοπίου διαθέτει ένα πλαίσιο το οποίο χωρίζεται σε 100 μικρότερα τετράγωνα και τα κύτταρα που βρίσκονταν μέσα στο πλαίσιο καταμετρούνταν. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν αρχικά σε 9 πεδία και όσο αυξανόταν ο πληθυσμός τόσο λιγότερα πεδία μετρούνταν. Για τον υπολογισμό της ποσότητας κυττάρων σε 1 ml χρειάστηκε να πολλαπλασιαστεί ο αριθμός της καταμέτρησης με έναν συντελεστή ανάλογα με τα πεδία που μετρήθηκαν. Στην περίπτωση που ο αριθμός κυττάρων είναι μεγάλος, τότε χρειάζεται το δείγμα αραιώση με αναλογία 1/10.

*Πίνακας 3: Πίνακας συντελεστών με τα 9 πεδία.*

Πεδία	Συντελεστής (Cells/ml)
1	32143
2	16071
3	10714
4	8036
5	6429
6	5357
7	4592
8	4018
9	3571

Αφού μετρηθούν όλα τα κύτταρα στα πεδία ακολουθήθηκε ο υπολογισμός του πληθυσμού της καλλιέργειας ως εξής:

$$\text{Αριθμός κυττάρων από μικροσκόπιο} * \text{αραιώση (αν υπάρχει)} * \text{συντελεστής πεδίου}$$

### 3.8 Μέθοδος προσδιορισμού χλωροφύλλης και ολικών καροτενοειδών

Αρχικά, για κάθε ένα μπουκάλι της καλλιέργειας προζυγίστηκαν δυο Errendorf των 2 ml. Αφού ζυγίστηκαν λήφθηκε δείγμα 4 ml σύνολο από κάθε μπουκάλι της καλλιέργειας και τοποθετήθηκε ανά δυο Errendorf, έχοντας τελικά 18 Errendorf. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 13000 στροφές. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα δείγματα ζυγίστηκαν ξανά. Για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε η ακετόνη 90% ως διαλύτης και προστέθηκε ποσότητα 1 ml στο ένα Errendorf από τα δύο που αντιστοιχούν σε κάθε μπουκάλι. Αναμίχθηκε η ακετόνη με τα κύτταρα με την βοήθεια πιπέτας και στην συνέχεια μεταφέρθηκε στο δεύτερο Errendorf για να αναμιχθεί ξανά. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για να γίνει η εκχύλιση ήταν ο Ομογενοποιητής υπερήχων (Sonicator) σε πλάτος πίεσης (amplitude) 35% για πέντε φορές το κάθε δείγμα, με διάρκεια 10 sec. Ενδιάμεσα το δείγμα τοποθετούνταν για 30 sec μέσα σε πάγο (ice bathing). Ακολουθήθηκε ξανά φυγοκέντριση των δειγμάτων για 5 min στις 13000 στροφές. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε στη συνέχεια σε γυάλινες κυβέττες μαζί με την προσθήκη 1ml ακετόνης 90%, ώστε τελικά να υπάρχει σε κάθε κυβέττα ποσότητα 2 ml. Αυτό έγινε για τις μετρήσεις της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 2 ml ακετόνης 90% και πριν από κάθε δείγμα στο κατάλληλο μήκος κύματος, μηδενίζεται το όργανο.

Τα μήκη κύματος που ενδιαφέρουν είναι:

- 750 nm: έγινε έλεγχος αν η απορρόφηση είναι μηδενική
- 470, 662, 664, 647, 630 nm: μήκη κύματος που απορροφούν οι χλωροφύλλες (μπλε και κόκκινο)
- 510, 480 nm: μήκη κύματος που απορροφούν τα καροτενοειδή

Στη συνέχεια, έγινε ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των χρωστικών στον μετρούμενο όγκο καλλιέργειας με την χρήση των παρακάτω εξισώσεων:

$$Ca (\mu g/L) = 11.75(A_{662}) - 2.35(A_{647}) \quad \text{Εξ. 1}$$

$$Cb (\mu g/L) = 18.61(A_{647}) - 3.96(A_{662}) \quad \text{Εξ. 2}$$

$$CX + c (\mu g/L) = (1000(A_{470}) - 2.27 Ca - 81.40Cb)/227 \quad \text{Εξ. 3}$$

Η Εξίσωση 1 χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της χλωροφύλλης-α, η Εξίσωση 2 για τον υπολογισμό της χλωροφύλλης-β και Εξίσωση 3 για τον υπολογισμό των ολικών καροτενοειδών.

### 3.9 Μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνών κατά Bradford

#### 3.9.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 όταν αυτή αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον να αλλάζει χρώμα. Η ελεύθερη χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική είναι γαλάζιο και απορροφά στα 595 nm. Η μέθοδος είναι αξιόπιστη για πρωτεϊνικά δείγματα των οποίων η συγκέντρωση κυμαίνεται από 0.04 mg/ml έως 0.20 mg/ml (40-200  $\mu$ g/ml).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης βασίζεται στην σχέση:

$$A = \varepsilon \cdot d \cdot c$$

A: απορρόφηση διαλύματος

d: οπτική διαδρομή (πλάτος κυβέτας)

ε: σταθερά που υπολογίζεται από την δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς (συντελεστής απόσβεσης)

ς: συγκέντρωση πρωτεΐνης

### 3.9.2 Διαλύματα

#### **Stock solution χρωστικής**

Οι ποσότητες για την παρασκευή του Bradford stock ήταν:

- 100 mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250
- 100 ml πυκνού φωσφορικού οξέος (85% w/v)
- 100 ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50% v/v). Χρειάστηκαν 50 ml μεθανόλης και 50 ml dd H<sub>2</sub>O.

Όλα τα παραπάνω συστατικά προστέθηκαν εντός σκοτεινού δοχείου και το διάλυμα που δημιουργήθηκε αφού απαερώθηκε διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

#### **Assay solution**

Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης, το stock solution της χρωστικής αραιώνεται με νερό σε αναλογία ¼ (1 μέρος stock solution προς 4 μέρη νερό). Το διάλυμα που δημιουργήθηκε διατηρήθηκε σε σκοτεινό δοχείο και σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες.

#### **BSA stock solution**

10 mg BSA (αλβουμίνη από ορό μόσχου) διαλύθηκαν σε 50 ml νερό (dd H<sub>2</sub>O) και το διάλυμα διατηρήθηκε στους 4°C.

#### **Lysis Buffer**

- Για την παρασκευή 50 ml διαλύματος 3 M NaCl, διαλύθηκαν 8.766 gr NaCl σε 50 ml νερού (dd H<sub>2</sub>O).
- Για την Παρασκευή 50 ml διαλύματος 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, διαλύθηκαν 8.709 gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> σε 50 ml νερού (dd H<sub>2</sub>O).
- Για την Παρασκευή 50 ml διαλύματος 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, διαλύθηκαν 6.804 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> σε 50 ml νερού (dd H<sub>2</sub>O).

Ποσότητες για το Lysis buffer:

- 7.5 ml από 3M NaCl
- 0.5 ml 10% SDS
- 0.1ml 0.5M EDTA
- 2.005 ml 1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0.495 ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Νερό dd H<sub>2</sub>O μέχρι τα 50 ml

### 3.9.3 Διαδικασία εκχύλισης πρωτεϊνών

Για κάθε ένα μπουκάλι της καλλιέργειας προζυγίστηκαν δυο Eppendorf των 2 ml. Αφού ζυγίστηκαν λήφθηκε δείγμα 4 ml σύνολο από κάθε μπουκάλι της καλλιέργειας και τοποθετήθηκε ανά δυο Eppendorf, έχοντας τελικά 18 Eppendorf. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 13000 στροφές. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απορρίφθηκε

και ζυγίστηκαν τα δείγματα ξανά. Για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε το Lysis Buffer, που προπαρασκευάστηκε, ως διαλύτης και προστέθηκε ποσότητα 0.4 ml στο ένα Eppendorf από τα δύο που αντιστοιχούν σε κάθε μπουκάλι. Αναμίχθηκε το Buffer με τα κύτταρα με την βοήθεια πιπέτας και στην συνέχεια μεταφέρθηκε στο δεύτερο Eppendorf, ώστε να αναμιχθεί ξανά. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για να γίνει η εκχύλιση ήταν ο Ομογενοποιητής υπερήχων (Sonicator) σε πλάτος πίεσης (amplitude) 35% για πέντε φορές το κάθε δείγμα, με διάρκεια 10 sec. Ενδιάμεσα το δείγμα τοποθετούνταν για 30 sec μέσα σε πάγο (ice bathing). Ακολουθήθηκε ξανά φυγοκέντριση των δειγμάτων για 5 min στις 13000 στροφές.

Ο υπολογισμός της σταθεράς  $\epsilon$  έγινε από καμπύλη αναφοράς που σχεδιάστηκε έχοντας σαν πρότυπο γνωστές ποσότητες (2-10  $\mu\text{g}$ ) αλβουμίνης από ορό μόσχου.

Για την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς, σε κυβέτες του '1 ml' προστέθηκαν τα ακόλουθα συστατικά και στις ποσότητες που αναγράφονται στον πίνακα:

$\alpha/\alpha$	assay solution ( $\mu\text{l}$ )	νερό ( $\mu\text{l}$ )	BSA-stock ( $\mu\text{l}$ )	Συγκέντρωση ή c (mg πρωτεΐνης/ml δείγματος)
1	950	40	10	0.04
2	950	30	20	0.08
3	950	20	30	0.12
4	950	10	40	0.16
5	950	0	50	0.2
CONTROL	950	50	0	0

Τα δείγματα αναδεύτηκαν και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min, και ακολούθως για το καθένα λήφθηκε η απορρόφηση στα 595 nm. Για τον προσδιορισμό αγνώστου δείγματος πρωτεΐνης σε 950  $\mu\text{l}$  ASSAY SOLUTION προστέθηκαν 50  $\mu\text{l}$  διαλύματος πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης, ώστε στην κυβέτα να υπάρχουν 2-10  $\mu\text{g}$ . Αν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν πέρα των ορίων της μεθόδου τότε, είτε έγινε κατάλληλη αραιώση του αρχικού δείγματος πρωτεΐνης, είτε στα 950  $\mu\text{l}$  ASSAY SOLUTION προστέθηκε λιγότερη ποσότητα δείγματος πρωτεΐνης και συμπληρώθηκε με νερό έως τελικού όγκου 1 ml.

### 3.9.4 Υπολογισμοί

Με βάση όσα προαναφέρθηκαν κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Από την επεξεργασία των δεδομένων με την βοήθεια του ηλεκτρονικού υπολογιστή, λήφθηκε η τιμή του συντελεστή συσχέτισης της καμπύλης αναφοράς ( $r$ ), η οποία θα έπρεπε να προσεγγίζει την τιμή 1, καθώς και η κλίση της καμπύλης αναφοράς, η τιμή της οποίας αντιστοιχεί στον συντελεστή απόσβεσης ( $\epsilon$ ).

### 3.10 Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικών (FRAP)

Η FRAP (Ferric-Reducing Antioxidant Power) περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τους Benzie και Strain (1996). Σε χαμηλό pH, όταν το αντιδραστήριο ferric-tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ) ανάγεται σε μορφή δισθενή σιδήρου ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ), αναπτύσσεται ένα έντονο μπλε χρώμα και συνοδεύεται από μέγιστη απορρόφηση στα 593nm (Benzie 1996). Η αντίδραση είναι μη ειδική και κάθε ημιαντίδραση που έχει μια μικρότερη-θετική αναγωγική δυνατότητα, υπό τις συνθήκες της αντίδρασης, σε σχέση με την ημιαντίδραση  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ -TPTZ θα οδηγήσει στην αντίδραση αναγωγής  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ. Οι συνθήκες δοκιμής ευνοούν την συγκεκριμένη αναγωγή και κατά συνέπεια την ανάπτυξη χρώματος, με την

προϋπόθεση ότι ένα αναγωγικό (αντιοξειδωτικό) είναι παρόν. Η φεροζίνη (Ferrozine), μία ένωση που σχετίζεται με το TPTZ έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως, με περίσσεια ασκορβικού οξέος, ώστε να μετρηθεί ο σίδηρος.

Στην ανάλυση FRAP, χρησιμοποιήθηκε περίσσεια  $\text{Fe}^{\text{III}}$  και ο περιοριστικός παράγοντας της τιμής του σχηματισμού του  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -TPTZ, και κατά συνέπεια του χρώματος, ήταν η αναγωγική ικανότητα του δείγματος (Benzie and Strain 1996). Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμή FRAP, συντέθηκε από τα τρία παρακάτω χημικά αντιδραστήρια Α,Β,Γ σε αναλογία 10:1:1 και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 37°C για 2 ώρες.

- Α: 300mM  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  pH=3,6
- Β: 10mM TPTZ [2,4,6-Tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine]
- Γ: 20mM  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$

### 3.10.1 Συλλογή κυττάρων και λυοφιλίωση

Αρχικά, χρειάστηκαν 9 κωνικοί σωλήνες Falcon των 50 ml, κάθε ένα falcon για κάθε μπουκάλι της καλλιέργειας. Αφού ονομάστηκαν οι σωλήνες, λήφθηκε από κάθε μπουκάλι της καλλιέργειας 50 ml δείγματος και τοποθετήθηκε σε αυτούς. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 13000 στροφές στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν ακόμη 50 ml δείγματος από την καλλιέργεια στα ίδια Falcon πραγματοποιώντας την ίδια διαδικασία. Συνολικά φυγοκεντρήθηκαν 100 ml καλλιέργειας από κάθε μπουκάλι. Με πιπέττα προστέθηκε ποσότητα 1 ml  $\text{DH}_2\text{O}$  στο falcon και αναδεύτηκαν με τα κύτταρα. Έπειτα, προζυγίστηκαν 9 άδεια Erpendorf των 1.5 ml και μεταφέρθηκε η ποσότητα νερού και δείγματος σε αυτά. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η λυοφιλίωση για 24 ώρες.

Η λυοφιλίωση είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ξήρανση και τη βελτίωση της σταθερότητας διαφόρων φαρμακευτικών προϊόντων, τροφίμων και άλλων ευπαθών βιολογικών προϊόντων. Συγκεκριμένα, καταψύχει το υλικό και μειώνει την περιβάλλουσα πίεση για να επιτρέψει στο παγωμένο νερό που περιέχεται στο υλικό να περάσει από την στερεά φάση στην αέρια (εξάχνωση). Ο κύκλος της ξήρανσης με κατάψυξη μπορεί να διαιρεθεί σε τρία βήματα: την κατάψυξη (στερεοποίηση), την πρωτογενή ξήρανση (εξάχνωση πάγου) και την δευτερογενή ξήρανση (εκρόφηση του παγωμένου νερού)(Abdelwahed et al. 2006).

### 3.10.2 Προετοιμασία αντιδραστηρίων

- Για το Acetate Buffer 300mM  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  με pH 3,6

Διαλύθηκε ποσότητα 6.15 g Sodium acetate σε 150 ml ddH<sub>2</sub>O μέσα σε ποτήρι ζέσεως. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μέτρηση του pH με την προσθήκη διαλύματος Glacial acetic acid, ώστε το pH όλου του διαλύματος να μεταβεί στην τιμή 3,6. Το διάλυμα διατηρήθηκε εκτός ψυγείου.

- Για το 10mM TPTZ [2,4,6-Tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine] σε 40 mM HCl

Διαλύθηκε ποσότητα 31.2 mg TPTZ 10mM σε 6 ml ddH<sub>2</sub>O μέσα σε falcon των 15 ml. Προστέθηκε έπειτα ποσότητα 4 ml HCl 0.1M και αναδεύτηκε πολύ καλά. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους 4°C για λίγες μέρες.

- Για το 20mM  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Διαλύθηκε ποσότητα 54 mg  $\text{FeCl}_3$  σε 10 ml ddH<sub>2</sub>O μέσα σε falcon των 15 ml. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους 4°C για λίγες μέρες.

### 3.10.3 Προετοιμασία αραιώσεων Ασκορβικού οξέος

Αρχικά, ζυγίστηκε ποσότητα 11.5 mg Ascorbic acid και διαλύθηκε σε 1.15 ml dd H<sub>2</sub>O μέσα σε Eppendorf των 1.5 ml. Η ποσότητα αυτού του διαλύματος είναι 10 mg/ml και αραιώθηκε με στόχο τα 100 µg/ml, ώστε από αυτό να γίνουν οι διαδοχικές αραιώσεις.

Οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν οι παρακάτω:

Για 1 mg/ml: 0.1 ml Ascorbic από 10 mg/ml + 0.9 ml dd H<sub>2</sub>O

- Για το 100 µg/ml: 0.8 ml Ascorbic από 1 mg/ml + 7.2 ml dd H<sub>2</sub>O
- 90 µg/ml: 0.9 ml από το 100 µg/ml + 0.1 ml dd H<sub>2</sub>O
- 80 µg/ml: 0.8 ml από το 100 µg/ml + 0.2 ml dd H<sub>2</sub>O
- 70 µg/ml: 0.7 ml από το 100 µg/ml + 0.3 ml dd H<sub>2</sub>O
- 60 µg/ml: 0.6 ml από το 100 µg/ml + 0.4 ml dd H<sub>2</sub>O
- 50 µg/ml: 0.5 ml από το 100 µg/ml + 0.5 ml dd H<sub>2</sub>O
- 40 µg/ml: 0.4 ml από το 100 µg/ml + 0.6 ml dd H<sub>2</sub>O
- 30 µg/ml: 0.3 ml από το 100 µg/ml + 0.7 ml dd H<sub>2</sub>O
- 20 µg/ml: 0.2 ml από το 100 µg/ml + 0.8 ml dd H<sub>2</sub>O
- 10 µg/ml: 0.1 ml από το 100 µg/ml + 0.9 ml dd H<sub>2</sub>O
- 5 µg/ml: 0.5 ml από το 10 µg/ml + 0.5 ml dd H<sub>2</sub>O

### 3.10.4 Διαδικασία εκχύλισης αντιοξειδωτικών

Αφού είχε ολοκληρωθεί η διαδικασία της ξήρανσης των κυττάρων με την μέθοδο της λυοφιλίωσης μετά από 24 ώρες, τα δείγματα μεταφέρθηκαν για την διαδικασία της εκχύλισης των κυττάρων. Για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε η Μεθανόλη ως διαλύτης και προστέθηκε ποσότητα 0.3 ml σε κάθε Eppendorf. Αναμίχθηκε η Μεθανόλη με τα κύτταρα με την βοήθεια πιπέτας. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για να γίνει η εκχύλιση ήταν ο Ομογενοποιητής υπερήχων (Sonicator) σε πλάτος πίεσης (amplitude) 35% για πέντε φορές το κάθε δείγμα, με διάρκεια 10 sec. Ενδιάμεσα το δείγμα τοποθετούνταν για 30 sec μέσα σε πάγο (ice bathing). Ακολουθήθηκε φυγοκέντριση των δειγμάτων για 5 min στις 13000 στροφές.

### 3.10.5 Μετρήσεις και υπολογισμοί

#### Παρασκευή διαλύματος FRAP

Αναμείχθηκε σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml σε αναλογία 10:1:1 οι εξής ποσότητες των αντιδραστηρίων:

- 50ml 300mM CH<sub>3</sub>COONa\*3H<sub>2</sub>O pH=3,6
- 5ml 10mM TPTZ
- 5ml 20mM FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O

Το διάλυμα διατηρήθηκε στους 37°C για 2 ώρες.

Σε 27 Eppendorf προστέθηκε ποσότητα 0.95 ml διαλύματος FRAP και 0.05 ml ποσότητας δείγματος μετά την εκχύλιση και φυγοκέντρωση. Για το τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε η Μεθανόλη.

Για την Πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα του διαλύματος αραιώσεων του Ασκορβικού οξέος. Σε 11 Erpendorf προστέθηκε ποσότητα 0.95 ml διαλύματος FRAP και 0.05 ml ποσότητας Ασκορβικού από τις αραιώσεις. Για το τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε dd H<sub>2</sub>O.

Ακολούθησε ανάδευση και επώαση των δειγμάτων και της πρότυπης καμπύλης σε υδατόλουτρο στους 37°C για 30 min.

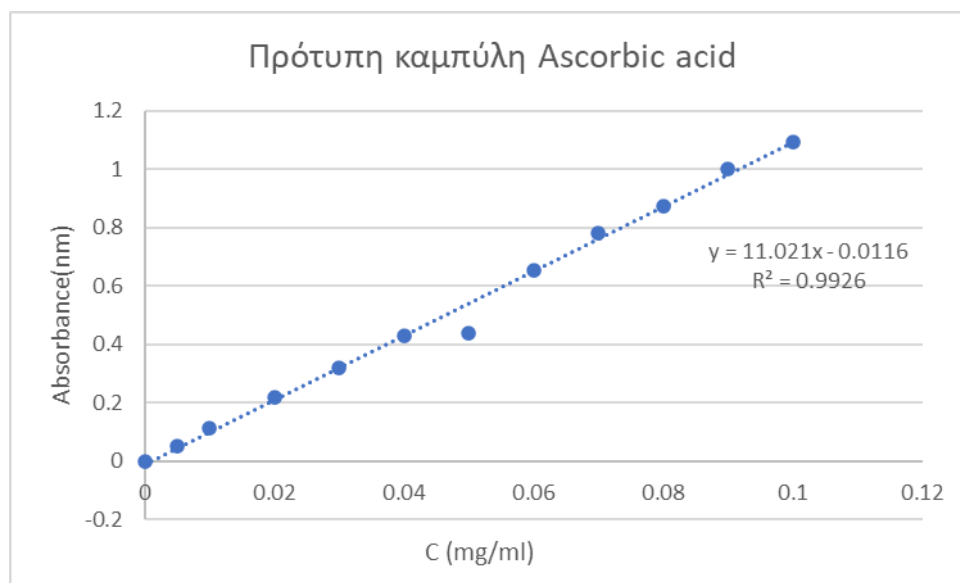
#### Μετρήσεις αντιοξειδωτικών στο φασματοφωτόμετρο

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της επώασης στο υδατόλουτρο, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε πλαστικές κυβέττες και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο με μήκος κύματος 593 nm. Για τα δείγματα μηδενίστηκε το όργανο με το δείγμα τυφλού της Μεθανόλης και για την Πρότυπη καμπύλη με το dd H<sub>2</sub>O.

#### Υπολογισμοί

Ο υπολογισμός των τιμών της FRAP έγινε με την μετατροπή της τιμής απορρόφησης του δείγματος ανάλογα με την απορρόφηση του εξεταζόμενου δείγματος με την απορρόφηση της Πρότυπης καμπύλης του Ασκορβικού οξέος (πάντα μικρότερη από την απορρόφηση του εξεταζόμενου δείγματος). Οι τιμές FRAP υπολογίστηκαν σε mg/10<sup>6</sup> κύτταρα, με την χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

Τιμή FRAP = ABS δείγματος / συντελεστή απόσβεσης πρότυπης καμπύλης



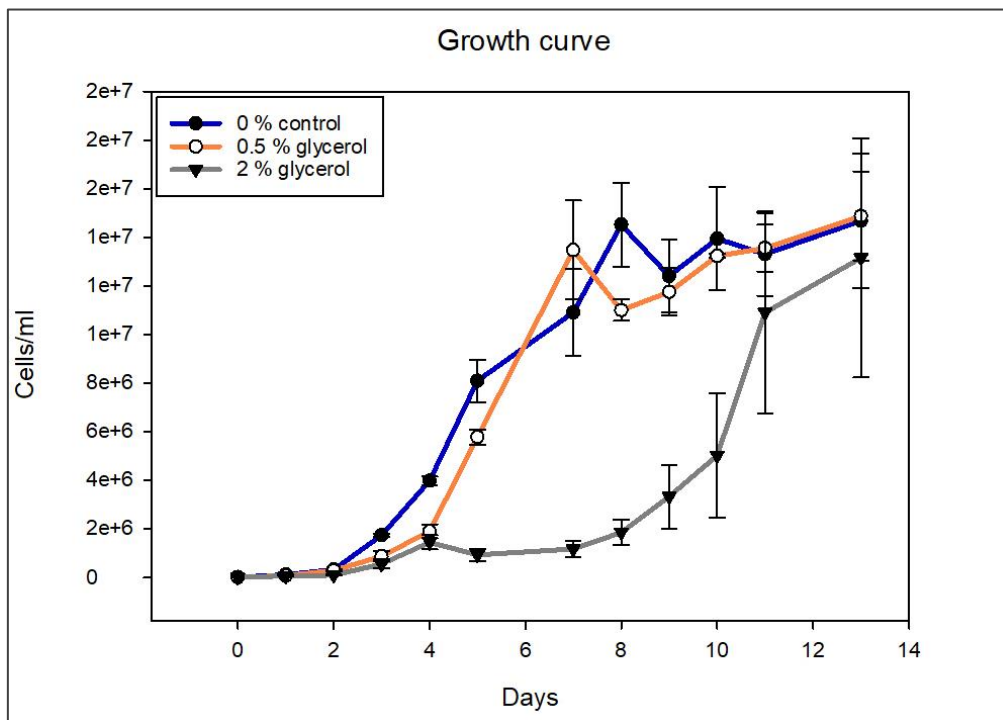
**Σχήμα 2:** Πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος της μεθόδου FRAP.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από το σύνολο των πειραμάτων που διεξήχθησαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία. Αρχικά, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού του ρυθμού ανάπτυξης της *Dunaliella sp.*, με χρήση μικροσκοπίου, ενώ στη συνέχεια τα αποτελέσματα της ποσότητας χλωροφυλλών-α,-β και καροτενοειδών, όπως και της ποσότητας πρωτεϊνών και αντιοξειδωτικών στις καλλιέργειες ανά κύτταρο.

### 4.1 Επίδραση της γλυκερόλης σε καλλιέργειες *Dunaliella sp.*

Στο πρώτο πείραμα (Ιούνιος 2022) αναπτύχθηκαν τρεις διαφορετικές καλλιέργειες από τρεις βιολογικές επαναλήψεις η κάθε μία του συγκεκριμένου μικροφύκου. Η αρχή της μέτρησης των κυττάρων πραγματοποιήθηκε από την ημέρα του εμβολιασμού. Στις καλλιέργειες υπήρχαν ποσότητες 0% γλυκερόλη (control), στην άλλη 0.5% γλυκερόλη και στην άλλη 2% γλυκερόλη, από τρεις επαναλήψεις η κάθε μία. Πραγματοποιήθηκαν καθημερινές μετρήσεις του αριθμού κυττάρων με τις μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα αποτελέσματα που ακολουθούν είναι ο μέσος όρος των τιμών που προέκυψαν από τις τρεις επαναλήψεις κάθε καλλιέργειας (Εικόνα 5).



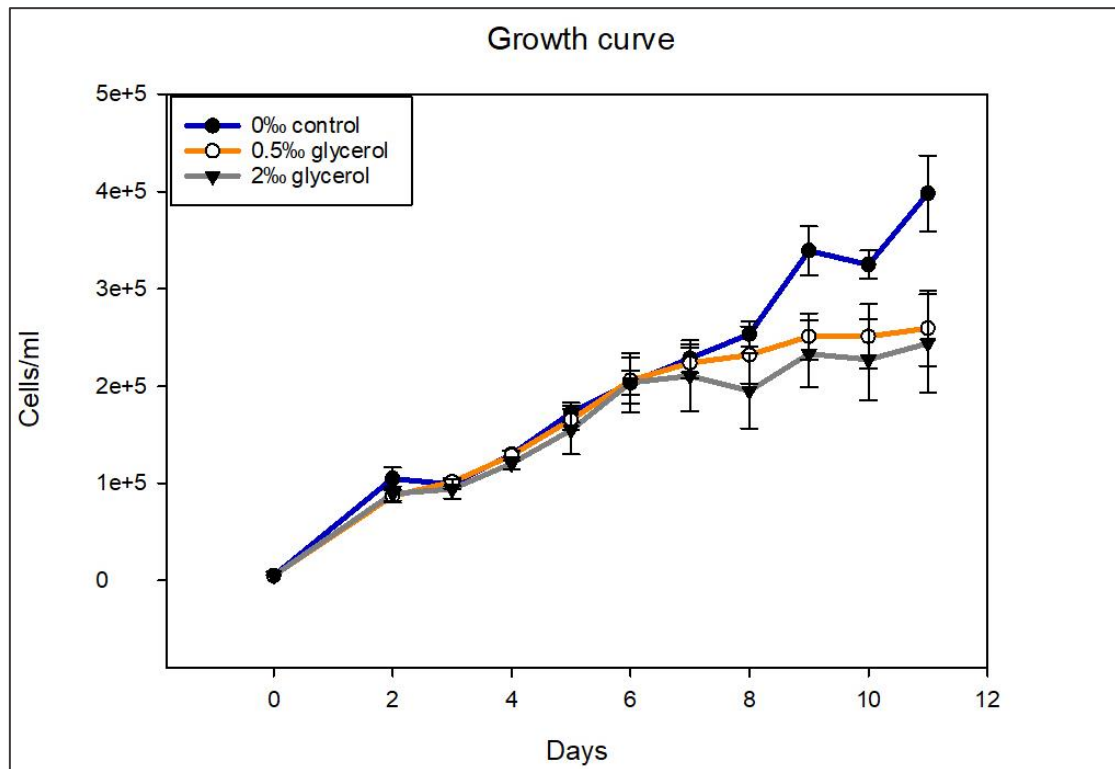
**Εικόνα 5:** Μέσος όρος αριθμού συνολικών κυττάρων ανά ml για κάθε καλλιέργεια του είδους *Dunaliella sp.* του πρώτου πειράματος (Ιούνιος 2022). Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη. Οι μπάρες υποδεικνύουν το μέγεθος του τυπικού σφάλματος.

Στην εικόνα 5 παρατηρείται ότι το control και η συγκέντρωση 0.5% γλυκόζης βρίσκονται περίπου στα ίδια επίπεδα ανάπτυξης, ενώ η 2% συγκέντρωση αναπτύσσεται με πιο αργούς ρυθμούς και κατά την 11<sup>η</sup> μέρα παρουσιάζει απότομη αύξηση του πληθυσμού. Συγκεκριμένα, παρατηρείται εκθετική αύξηση στο control και στο 0.5% από την 3<sup>η</sup> μέρα και σταθεροποιούνται κατά τη 13<sup>η</sup> μέρα. Αντίθετα, η 2% συγκέντρωση παρουσιάζει εκθετική αύξηση από την 8<sup>η</sup> μέρα. Η συγκέντρωση 0.5% και το control παρουσίασαν έντονο ενδιαφέρον καθώς εμφάνισαν διακοπή της ανάπτυξης και ελάχιστη μείωση τις ημέρες 8 και 9 αντίστοιχα και στη συνέχεια εκθετική αύξηση ξανά. Συνολικά, η



μεγαλύτερη συγκέντρωση (2%) αναπτύχθηκε με πιο αργούς ρυθμούς σε σχέση με το control και την 0.5% συγκέντρωση, γεγονός που καθιστά την συγκέντρωση αυτή αρκετά υψηλή για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου είδους, ειδικότερα τις πρώτες ημέρες της ανάπτυξης.

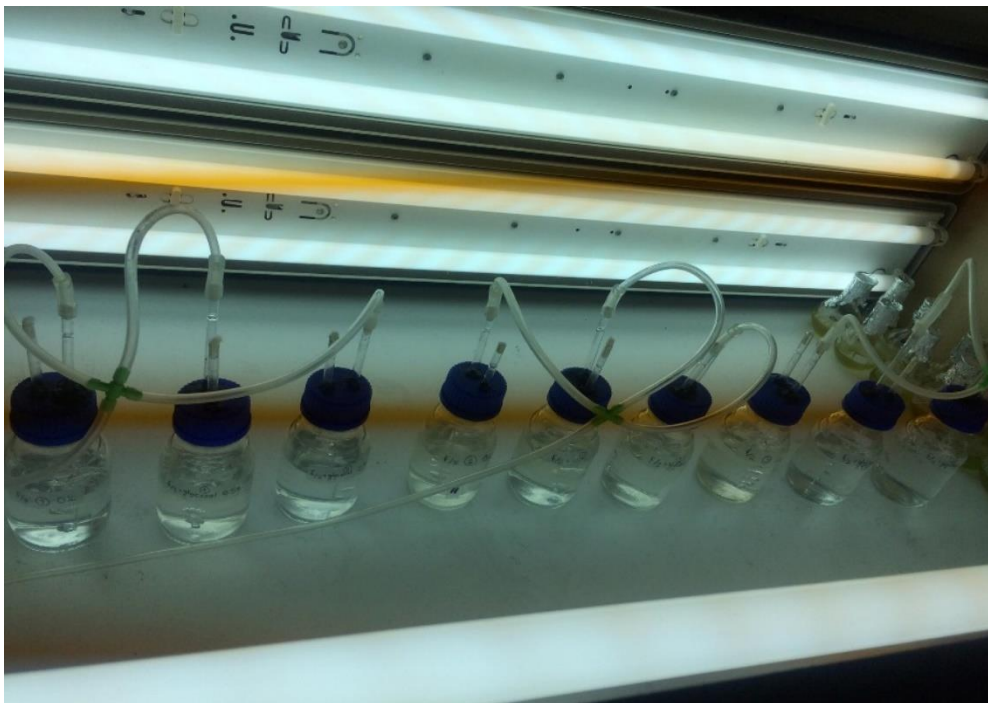
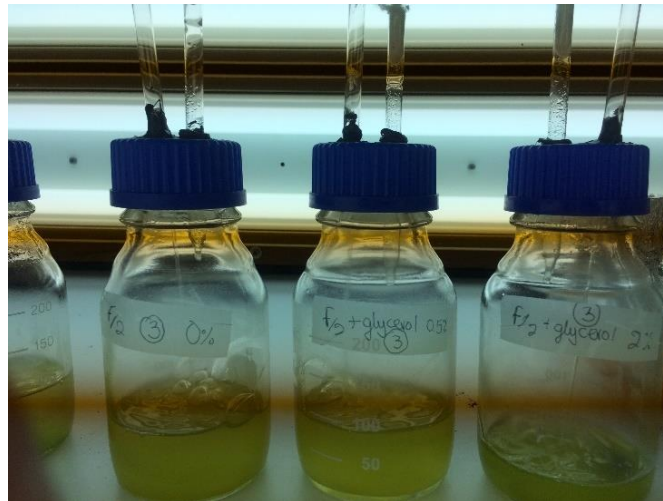
Στο δεύτερο πείραμα (Δεκέμβριος 2022) αναπτύχθηκαν πάλι τρεις διαφορετικές καλλιέργειες από τρεις βιολογικές επαναλήψεις η κάθε μία του συγκεκριμένου μικροφύκου. Στις καλλιέργειες αυτή τη φορά υπήρχαν ποσότητες 0% γλυκερόλη (control), στην άλλη 0.5% και 2% γλυκερόλη, από τρεις επαναλήψεις η κάθε μία. Πραγματοποιήθηκαν καθημερινές μετρήσεις αριθμού κυττάρων με τον ίδιο τρόπο όπως και στο πρώτο πείραμα. Τα αποτελέσματα που ακολουθούν είναι ο μέσος όρος των τιμών που προέκυψαν από τις τρεις επαναλήψεις κάθε καλλιέργειας (Εικόνα 6).



**Εικόνα 6:** Μέσος όρος αριθμού συνολικών κυττάρων ανά ml για κάθε καλλιέργεια του είδους *Dunaliella sp.* του δεύτερου πειράματος (Δεκέμβριος 2022). Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη. Οι μπάρες υποδεικνύουν το μέγεθος του τυπικού σφάλματος.

Στην εικόνα 6 παρατηρείται ότι στο control υπήρξε αύξηση στον αριθμό κυττάρων σε σχέση με τις συγκεντρώσεις γλυκερόλης (0.5% και 2%). Γενικότερα, φαίνεται ότι και οι τρεις καλλιέργειες έχουν παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης μέχρι την 7<sup>η</sup> μέρα, από εκείνη την ημέρα το control εμφάνισε εκθετική αύξηση συγκριτικά με τις συγκεντρώσεις γλυκερόλης.

Συνολικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η γλυκερόλη είχε θετική αλλά και αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη καλλιεργειών. Συγκεκριμένα, στο πρώτο πείραμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκερόλης (2%) ο αριθμός κυττάρων της *Dunaliella sp.* ήταν μικρότερος σε σχέση με το control και της 0.5% συγκέντρωσης. Επομένως, η προσθήκη 2% συγκέντρωσης γλυκερόλης είχε αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη κυττάρων. Στο δεύτερο πείραμα, η προσθήκη γλυκερόλης έγινε σε μικρότερες συγκεντρώσεις, επί τοις χιλίοις. Ωστόσο, η ανάπτυξη των καλλιεργειών με τις συγκεντρώσεις γλυκερόλης (0.5% και 2%) ήταν χαμηλότερες από το control.

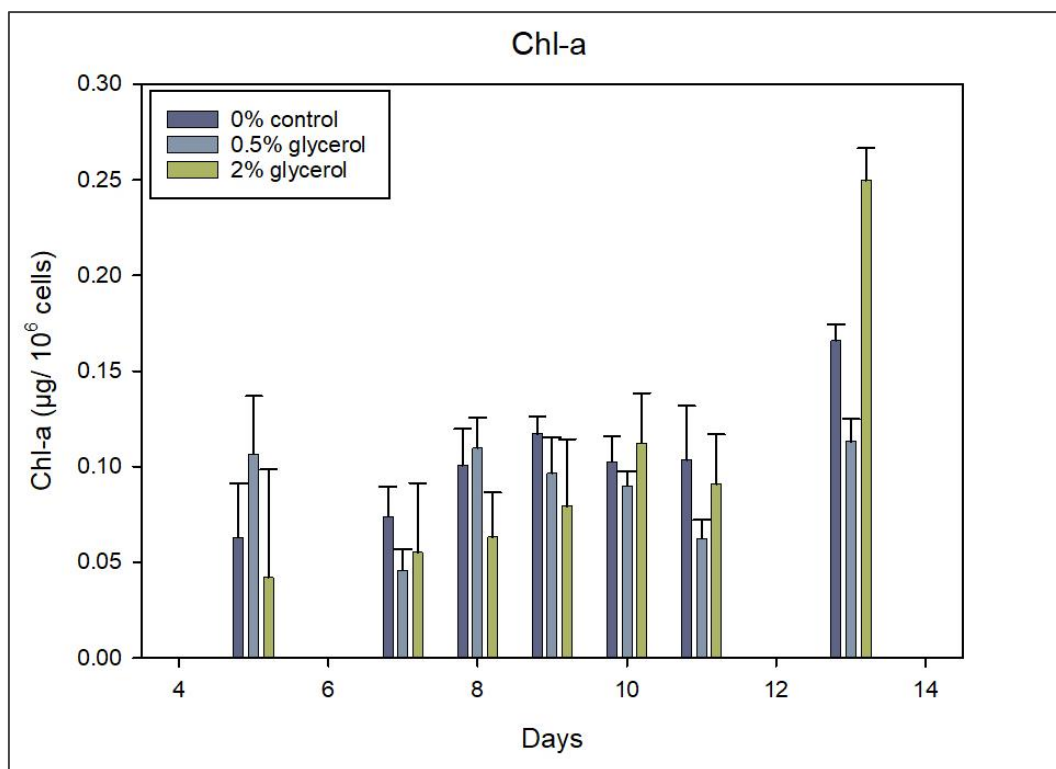


**Εικόνα 7:** Καλλιέργειες ανάπτυξης *Dunaliella* sp. με προσθήκη αέρα υπό συνεχή ανάδευση με τρεις συγκεντρώσεις γλυκερόλης από τρεις βιολογικές επαναλήψεις η κάθε μία (2<sup>ο</sup> πείραμα: Control 0%, 0.5%, 2% γλυκερόλη).

#### 4.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης χλωροφύλλης και ολικών καροτενοειδών

Στο πρώτο πείραμα λήφθηκε ποσότητα από τις καλλιέργειες σε επτά διαφορετικές χρονικές στιγμές, ημέρα 5, 7, 8, 9, 10, 11 και 13 μετά τον εμβολιασμό. Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη. Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν έγινε ποσοτικοποίηση της χλωροφύλλης -α, -β και ολικών καροτενοειδών με την μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μέσου όρου κάθε συγκέντρωσης καλλιέργειας για τις συγκεκριμένες ημέρες που προαναφέρθηκαν για την χλωροφύλλη -α, -β και ολικών καροτενοειδών.

Παρακάτω παρουσιάζονται αρχικά τα αποτελέσματα της χλωροφύλλης-α:



**Εικόνα 8:** Ποσότητα Chl-a σε µg/10<sup>6</sup> cells των καλλιεργειών στις τρεις συγκεντρώσεις (Μ.Ο.) του είδους *Dunaliella* sp. του πρώτου πειράματος. Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη. Ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει τις ημέρες της πειραματικής διαδικασίας, ενώ ο κατακόρυφος άξονας αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση. Οι μπάρες υποδεικνύουν το μέγεθος του τυπικού σφάλματος.

Στην εικόνα 8 παρατηρείται ότι η ποσότητα της χλωροφύλλης -α είναι υψηλότερη και στις τρεις καλλιέργειες την 13<sup>η</sup> μέρα σε σχέση με τις υπόλοιπες ημέρες. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με την εφαρμογή του t-test, ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων γλυκερόλης ανάλογα με την ποσότητα της χλωροφύλλης-α. Τα αποτελέσματα των P-values (P<0.05) από τα t-tests παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 4:** Πίνακας τιμών P των συγκεντρώσεων για την χλωροφύλλη-α του πρώτου πειράματος(P<0.05). Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη.

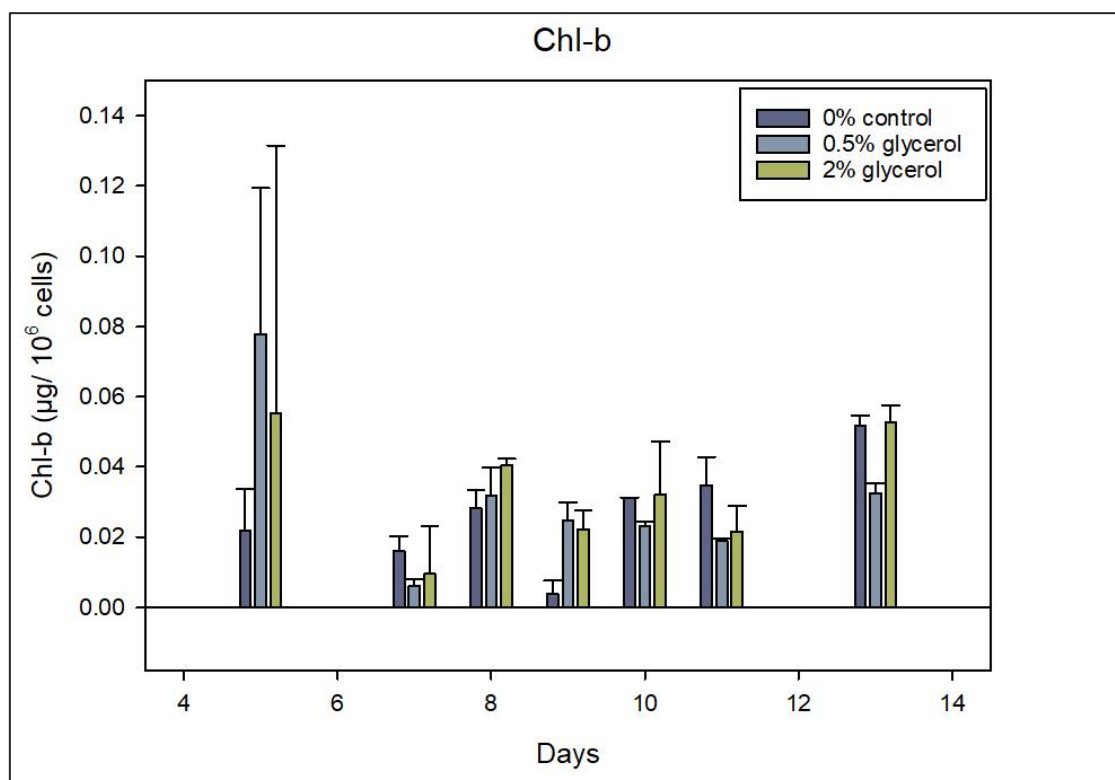
CHLa			
Days	0.5/0	2/0.	0.5/2
5	0.352	0.757	0.372
7	0.218	0.133	0.288
8	0.729	0.283	0.172
9	0.379	0.356	0.689
10	0.453	0.756	0.455
11	0.241	0.759	0.362
13	<b>0.021</b>	<b>0.011</b>	<b>0.003</b>

Στον Πίνακα 4 παρατηρείται ότι για την χλωροφύλλη-α από την 5<sup>η</sup> μέρα έως την 11<sup>η</sup>, οι τιμές P είναι μεγαλύτερες από την συνθήκη P<0.05. Αυτές οι τιμές P υποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση χλωροφύλλης-α μεταξύ των ομάδων control με 0.5%, control με 2% και 0.5% με 2% συγκέντρωση. Συγκεκριμένα, η

προσθήκη γλυκερόλης σε αυτές τις συγκεντρώσεις δεν επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη και την παραγωγή χλωροφύλλης-α στην καλλιέργεια *Dunaliella sp.* σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου χωρίς γλυκερόλη (control).

Η ανάλυση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-α την 13<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας *Dunaliella sp.* δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές κατά τη σύγκριση διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης. Οι διαφορές αυτές αντικατοπτρίζονται στις λαμβανόμενες τιμές P-values: P=0.021 για τη σύγκριση μεταξύ control και 0.5% γλυκερόλης, P=0.011 για τη σύγκριση μεταξύ control και 2% γλυκερόλης και P=0.003 για τη σύγκριση μεταξύ 0.5% και 2% γλυκερόλης. Οι σημαντικές διαφορές που παρατηρήθηκαν στη συγκέντρωση χλωροφύλλης-α υποδηλώνουν ότι η παρουσία γλυκερόλης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επηρέασε την ανάπτυξη και την παραγωγή χρωστικών ουσιών της *Dunaliella sp.* την 13<sup>η</sup> ημέρα. Η γλυκερόλη είναι γνωστό ότι δρα ως πηγή άνθρακα και ωσμωτικός προστάτης στις καλλιέργειες μικροφυκών. Μπορεί να χρησιμεύσει ως πηγή ενέργειας για τις κυτταρικές διεργασίες και να παρέχει ωσμωτική ισορροπία στα κύτταρα. Η χαμηλότερη P τιμή (P=0.003) της χλωροφύλλης-α που παρατηρήθηκε παρουσία γλυκερόλης, ιδίως στις συγκεντρώσεις 0.5% και 2%, μπορεί να αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες. Η γλυκερόλη θα μπορούσε να επηρεάσει τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών ή να τροποποιήσει τα μεταβολικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη σύνθεση της χλωροφύλλης. Είναι επίσης πιθανό ότι η παρουσία γλυκερόλης μεταβάλλει τις ωσμωτικές συνθήκες στην καλλιέργεια, επηρεάζοντας ενδεχομένως την κυτταρική φυσιολογία και την παραγωγή χλωροφύλλης της *Dunaliella sp.* Συνοπτικά, οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που παρατηρήθηκαν στη συγκέντρωση χλωροφύλλης-α την 13<sup>η</sup> ημέρα, όπως υποδεικνύεται από τις παρεχόμενες τιμές P, υποδηλώνουν ότι η παρουσία γλυκερόλης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.5% και 2%) επηρέασε την ανάπτυξη και την παραγωγή χλωροφύλλης-α της *Dunaliella sp.*

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χλωροφύλλης-β:



**Εικόνα 9:** Ποσότητα Chl-b σε  $\mu\text{g}/10^6$  cells των καλλιεργειών στις τρεις συγκεντρώσεις (M.O.) του είδους *Dunaliella sp.* του πρώτου πειράματος. Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη. Ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει τις ημέρες της

πειραματικής διαδικασίας, ενώ ο κατακόρυφος άξονας αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση. Οι μπάρες υποδεικνύουν το μέγεθος του τυπικού σφάλματος.

Στην Εικόνα 9 παρατηρείται ότι η ποσότητα της χλωροφύλλης -β είναι υψηλότερη και στις τρεις καλλιέργειες την 5<sup>η</sup> μέρα σε σχέση με τις υπόλοιπες ημέρες. Πραγματοποιήθηκε ξανά στατιστική ανάλυση με την εφαρμογή του t-test, ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων γλυκερόλης ανάλογα με την ποσότητα της χλωροφύλλης-β. Τα αποτελέσματα των P-values ( $P < 0.05$ ) από τα t-tests παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

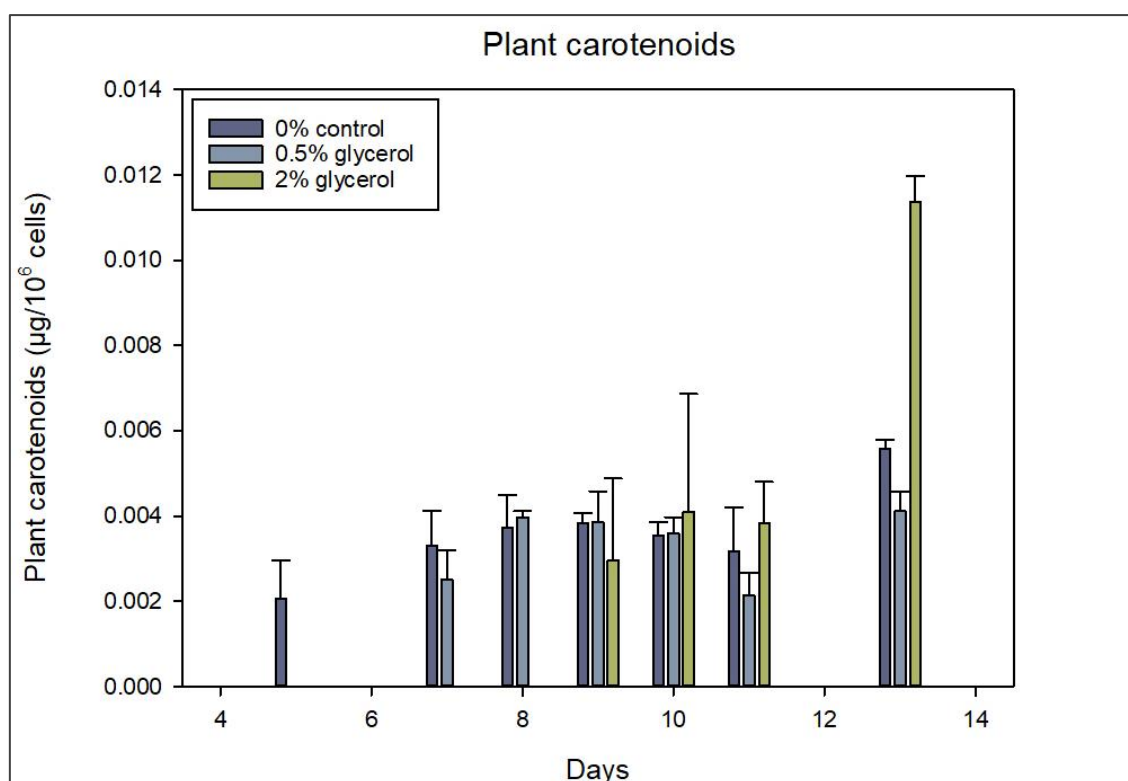
**Πίνακας 5:** Πίνακας τιμών P των συγκεντρώσεων για την χλωροφύλλη-β του πρώτου πειράματος ( $P < 0.05$ ). Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη.

Days	CHLb		
	0.5/0	2/0.	0.5/2
5	0.266	0.686	0.808
7	0.1	0.672	0.806
8	0.744	0.666	0.76
9	0.118	0.086	0.742
10	0.222	0.946	0.578
11	0.123	0.293	0.73
13	<b>0.012</b>	0.885	<b>0.025</b>

Στον Πίνακα 5 παρατηρείται ότι για την χλωροφύλλη-β από την 5<sup>η</sup> μέρα έως την 11<sup>η</sup>, οι τιμές P είναι μεγαλύτερες από την συνθήκη  $P < 0.05$ , όπως και στην 13<sup>η</sup> μέρα για την ομάδα ελέγχου control με 2% συγκέντρωση. Αυτές οι τιμές P υποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση χλωροφύλλης-β μεταξύ των ομάδων control με 0.5%, control με 2% και 0.5% με 2% συγκέντρωση, όπως και στην χλωροφύλλη-α. Επομένως, η προσθήκη γλυκερόλης σε αυτές τις συγκεντρώσεις δεν επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη και την παραγωγή χλωροφύλλης-β στην καλλιέργεια *Dunaliella sp.* σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου χωρίς γλυκερόλη (control).

Η ανάλυση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-β την τελευταία ημέρα της καλλιέργειας του *Dunaliella sp.* αποκαλύπτει ενδιαφέρουσες πληροφορίες κατά τη σύγκριση διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης. Οι τιμές P-values που προέκυψαν για τις συγκρίσεις μεταξύ control με 0.5%, control με 2% και 0.5% με 2% γλυκερόλης είναι 0.012, 0.885 και 0.025 αντίστοιχα. Η στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε μεταξύ του control και 0.5% γλυκερόλη ( $P = 0.012$ ) υποδεικνύει ότι η παρουσία 0.5% γλυκερόλης επηρέασε τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης-β στην καλλιέργεια *Dunaliella sp.* την 13<sup>η</sup> μέρα. Αυτό υποδηλώνει ότι η προσθήκη 0.5% γλυκερόλης είχε θετικό ή αρνητικό αντίκτυπο στη βιοσύνθεση ή τη συσσώρευση της χλωροφύλλης-β, με αποτέλεσμα μια στατιστικά σημαντική αλλαγή σε σύγκριση με την καλλιέργεια χωρίς γλυκερόλη (control). Αντίθετα, η σύγκριση μεταξύ του control και 2% γλυκερόλης ( $P = 0.885$ ) δεν αποκαλύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση της χλωροφύλλης-β. Αυτό σημαίνει ότι η παρουσία 2% γλυκερόλης στην καλλιέργεια δεν φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στην περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη-β σε σύγκριση με την καλλιέργεια χωρίς γλυκερόλη (control). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση των δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης, δηλαδή 0.5% με 2% γλυκερόλη, όπου παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση χλωροφύλλης-β ( $P = 0.025$ ). Αυτό υποδεικνύει ότι οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις 0.5% και 2% είχαν ως αποτέλεσμα διαφορετικές περιεκτικότητες χλωροφύλλης-β εντός της καλλιέργειας *Dunaliella sp.* την τελευταία ημέρα.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα των ολικών καροτενοειδών του πρώτου πειράματος:



**Εικόνα 10:** Ποσότητα Plant carotenoids σε µg/10<sup>6</sup> cells των καλλιεργειών στις τρεις συγκεντρώσεις (Μ.Ο.) του είδους *Dunaliella sp.* του πρώτου πειράματος. Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη. Ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει τις ημέρες της πειραματικής διαδικασίας, ενώ ο κατακόρυφος άξονας αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση. Οι μπάρες υποδεικνύουν το μέγεθος του τυπικού σφάλματος.

Στην Εικόνα 10 παρατηρείται ότι η ποσότητα των ολικών καροτενοειδών είναι υψηλότερη και στις τρεις καλλιέργειες την 13<sup>η</sup> μέρα σε σχέση με τις υπόλοιπες ημέρες. Στην 5<sup>η</sup>, 7<sup>η</sup> και 8<sup>η</sup> μέρα φαίνεται ότι η συγκέντρωση 2% γλυκερόλης σε καροτενοειδή είναι πολύ χαμηλή και γι' αυτό δεν εμφανίζεται στο διάγραμμα. Αντίθετα, την 13<sup>η</sup> μέρα η συγκέντρωση 2% γλυκερόλης είναι αρκετά υψηλή σε ποσότητα καροτενοειδών. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ξανά στατιστική ανάλυση με την εφαρμογή του t-test, ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων γλυκερόλης ανάλογα με την ποσότητα των καροτενοειδών. Τα αποτελέσματα των P-values (P<0.05) από τα t-tests παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 6:** Πίνακας τιμών P των συγκεντρώσεων των ολικών καροτενοειδών του πρώτου πειράματος (P<0.05). Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη

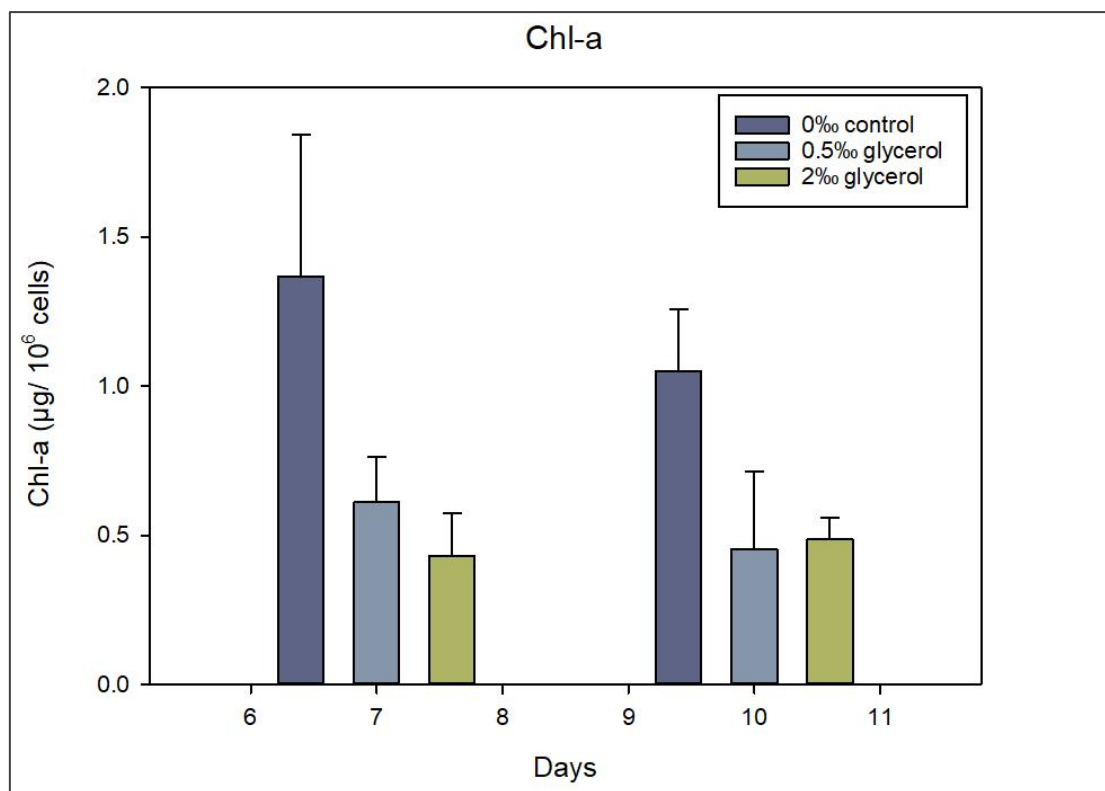
Days	PI carot		
	0.5/0	2/0.	0.5/2
5	0.355	0.387	0.798
7	0.499	0.315	0.394
8	0.764	0.1	0.069
9	0.961	0.681	0.685
10	0.923	0.853	0.867
11	0.435	0.661	0.2
13	<b>0.048</b>	<b>&lt;=0.001</b>	<b>&lt;=0.001</b>

Στον Πίνακα 6 παρατηρείται ότι για τα ολικά καροτενοειδή από την 5<sup>η</sup> μέρα έως την 11<sup>η</sup>, οι τιμές P είναι μεγαλύτερες από την συνθήκη  $P < 0.05$ . Αυτές οι τιμές P υποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση των καροτενοειδών μεταξύ των ομάδων control με 0.5%, control με 2% και 0.5% με 2% συγκέντρωση, όπως και στην χλωροφύλλη-α και -β. Επομένως, η προσθήκη γλυκερόλης σε αυτές τις συγκεντρώσεις δεν επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη και την παραγωγή καροτενοειδών στην καλλιέργεια *Dunaliella sp.* σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου χωρίς γλυκερόλη (control).

Κατά τη σύγκριση του control με 0.5% γλυκερόλης, προέκυψε τιμή  $P = 0.048$ . Αυτή η τιμή P-value είναι κάτω από το όριο σημαντικότητας  $P < 0.05$ , υποδεικνύοντας μια στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών μεταξύ αυτών των δύο καλλιεργειών. Αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία 0.5% γλυκερόλης επηρέασε την περιεκτικότητα σε καροτενοειδή στην καλλιέργεια *Dunaliella sp.* την 13<sup>η</sup> μέρα σε σύγκριση με την καλλιέργεια χωρίς γλυκερόλη (control). Παρόμοια, κατά τη σύγκριση του control με 2% γλυκερόλη, παρατηρήθηκε μια εξαιρετικά σημαντική διαφορά. Η λαμβανόμενη τιμή P-value ήταν μικρότερη από 0.001, υποδεικνύοντας μια εξαιρετικά στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών μεταξύ αυτών των δύο. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία 2% γλυκερόλης είχε ουσιαστικό αντίκτυπο στην περιεκτικότητα σε καροτενοειδή στην καλλιέργεια *Dunaliella sp.* σε σύγκριση με την καλλιέργεια χωρίς γλυκερόλη. Επιπλέον, κατά τη σύγκριση των δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης, δηλαδή 0.5% και 2% γλυκερόλη, διαπιστώθηκε εξαιρετικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση των φυτικών καροτενοειδών. Το P-value που προέκυψε ήταν μικρότερο από 0.001, υποδεικνύοντας μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις γλυκερόλης 0.5% και 2% είχαν ως αποτέλεσμα διαφορετικές περιεκτικότητες σε καροτενοειδή εντός της καλλιέργειας *Dunaliella sp.* την τελευταία ημέρα του πειράματος. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν την επίδραση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στη σύνθεση και τη συσσώρευση ολικών καροτενοειδών στην καλλιέργεια *Dunaliella sp.* Τόσο οι συγκεντρώσεις 0.5% όσο και 2% γλυκερόλης έδειξαν σημαντικές επιδράσεις στην παραγωγή καροτενοειδών σε σύγκριση με την καλλιέργεια χωρίς γλυκερόλη. Η παρουσία 0.5% γλυκερόλης έχει σημαντική επίδραση, ενώ η παρουσία 2% γλυκερόλης έχει ακόμη πιο έντονη και ιδιαίτερα σημαντική επίδραση στην παραγωγή καροτενοειδών.

Στο δεύτερο πείραμα λήφθηκε ποσότητα από τις καλλιεργειές σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, ημέρα 7 και 10 μετά τον εμβολιασμό. Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης σε αυτό το πείραμα ήταν μικρότερες, 0‰ (control), 0.5‰ και 2‰ γλυκερόλη. Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν έγινε ποσοτικοποίηση της χλωροφύλλης -α, -β και ολικών καροτενοειδών με την μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω, όπως και στο πρώτο πείραμα. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μέσου όρου κάθε συγκέντρωσης καλλιέργειας για τις συγκεκριμένες ημέρες που προαναφέρθηκαν για την χλωροφύλλη -α, -β και ολικών καροτενοειδών.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χλωροφύλλης-α του δεύτερου πειράματος:



**Εικόνα 11:** Ποσότητα Chl-a σε µg/10<sup>6</sup> cells των καλλιεργειών στις τρεις συγκεντρώσεις (Μ.Ο.) του είδους *Dunaliella sp.* του δεύτερου πειράματος. Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη. Ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει τις ημέρες της πειραματικής διαδικασίας, ενώ ο κατακόρυφος άξονας αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση. Οι μπάρες υποδεικνύουν το μέγεθος του τυπικού σφάλματος

Στην Εικόνα 11 παρατηρείται ότι η ποσότητα της χλωροφύλλης -α είναι υψηλότερη στην καλλιέργεια του control, ενώ οι καλλιέργειες 0.5% και 2% έχουν χαμηλότερη συγκέντρωση σε χλωροφύλλη-α. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με την εφαρμογή του t-test, ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων γλυκερόλης ανάλογα με την ποσότητα της χλωροφύλλης-α. Τα αποτελέσματα των P-values (P<0.05) από τα t-tests παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 7:** Πίνακας τιμών P των συγκεντρώσεων χλωροφύλλης-α του δεύτερου πειράματος (P<0.05). Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη.

CHLa			
Days	0.5/0	2/0.	0.5/2
7	0.204	0.132	0.442
10	0.059	0.062	0.799

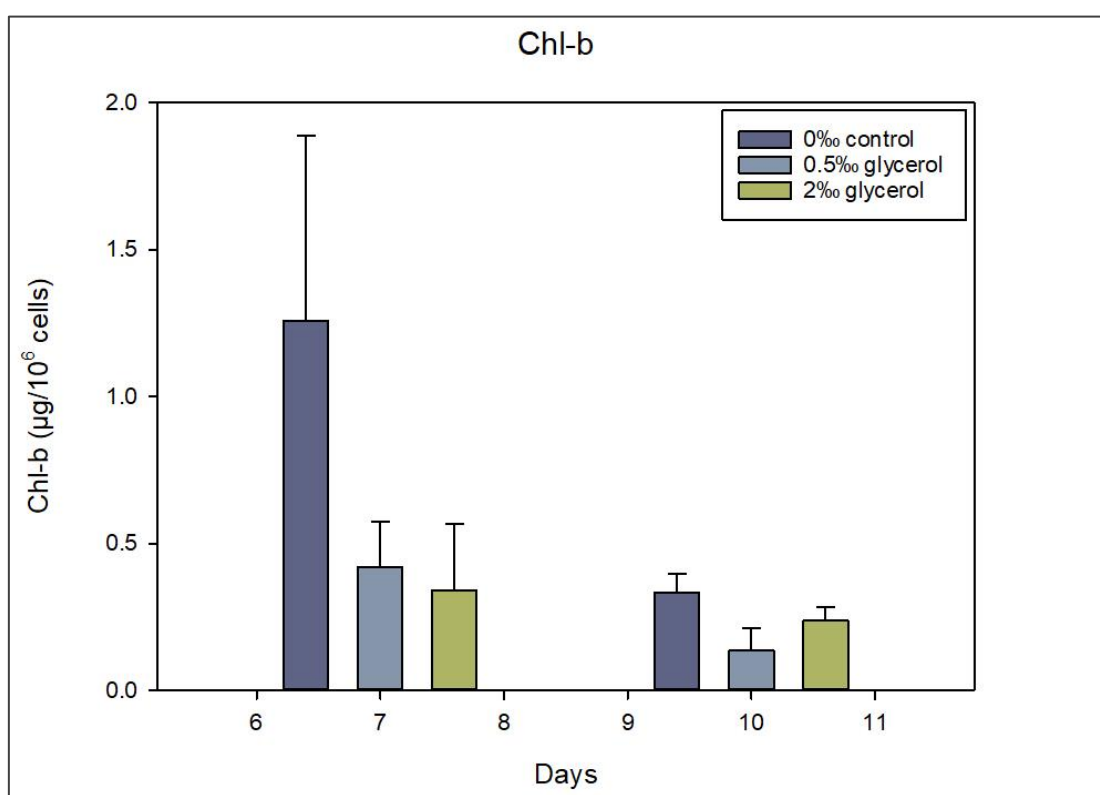
Στον Πίνακα 7 παρατηρείται ότι την 7<sup>η</sup> ημέρα, κατά τη σύγκριση του control με 0.5% γλυκερόλης, προέκυψε P=0.204. Αυτή η τιμή P-value είναι πάνω από το όριο σημαντικότητας P<0.05, υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση χλωροφύλλης-α μεταξύ αυτών των δύο ομάδων. Ομοίως, κατά τη σύγκριση της ομάδας control με 2% γλυκερόλη, η P τιμή που προέκυψε ήταν 0.132, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση χλωροφύλλης-α. Επιπλέον, κατά τη σύγκριση της ομάδας 0.5% με 2% γλυκερόλης, η λαμβανόμενη P τιμή ήταν 0.442, η οποία επίσης υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στη



συγκέντρωση χλωροφύλλης-α. Επομένως, την 7η ημέρα, καμία από τις συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα χλωροφύλλης-α.

Κατά τη 10<sup>η</sup> ημέρα, η ανάλυση αποκάλυψε ελαφρώς διαφορετικά αποτελέσματα. Κατά τη σύγκριση του control με 0.5% γλυκερόλη, προέκυψε τιμή  $P=0.059$ . Αυτή η τιμή  $P$ -value είναι ακριβώς κάτω από το όριο σημαντικότητας  $P<0.05$ , υποδεικνύοντας μια οριακή στατιστική σημαντικότητα. Υποδηλώνει ότι μπορεί να υπάρχει πιθανή διαφορά στη συγκέντρωση χλωροφύλλης-α μεταξύ αυτών των δύο καλλιεργειών. Ομοίως, κατά τη σύγκριση του control με 2% γλυκερόλη, η τιμή  $P$  που προέκυψε ήταν 0.062, πλησιάζοντας επίσης το όριο σημαντικότητας. Ωστόσο, κατά τη σύγκριση του 0.5% με 2% γλυκερόλης, η τιμή  $P$  ήταν 0.799, η οποία είναι πάνω από το όριο σημαντικότητας, υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση χλωροφύλλης-α. Επομένως, τη 10<sup>η</sup> μέρα, υπάρχει κάποια ένδειξη για πιθανή διαφορά στα επίπεδα χλωροφύλλης-α μεταξύ των καλλιεργειών control και 0.5% γλυκερόλης.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χλωροφύλλης-β του δεύτερου πειράματος:



**Εικόνα 12:** Ποσότητα Chl-b σε  $\mu\text{g}/10^6$  cells των καλλιεργειών στις τρεις συγκεντρώσεις (M.O.) του είδους *Dunaliella* sp. του δεύτερου πειράματος. Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη. Ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει τις ημέρες της πειραματικής διαδικασίας, ενώ ο κατακόρυφος άξονας αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση. Οι μπάρες υποδεικνύουν το μέγεθος του τυπικού σφάλματος.

Στην Εικόνα 12 παρατηρείται ότι η ποσότητα της χλωροφύλλης-β είναι υψηλότερη την 7<sup>η</sup> μέρα και στις τρεις καλλιέργειες των συγκεντρώσεων γλυκερόλης σε σχέση με την 10<sup>η</sup> μέρα, όπου η συγκέντρωση χλωροφύλλης-β είναι χαμηλότερη στις τρεις καλλιέργειες. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με την εφαρμογή του t-test, ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων γλυκερόλης ανάλογα με την ποσότητα της χλωροφύλλης-β. Τα αποτελέσματα των  $P$ -values ( $P<0.05$ ) από τα t-tests παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

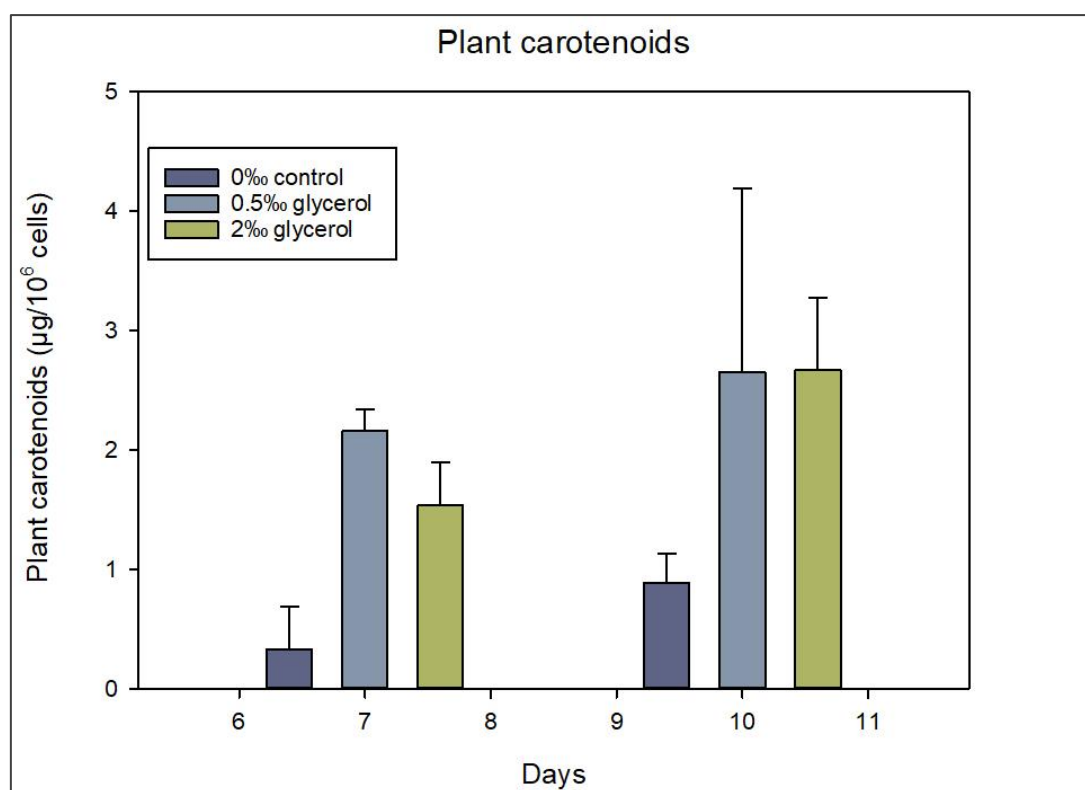
**Πίνακας 8:** Πίνακας τιμών  $P$  των συγκεντρώσεων χλωροφύλλης-β του δεύτερου πειράματος ( $P < 0.05$ ). Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη.

CHLb			
Days	0.5/0	2/0.	0.5/2
7	0.265	0.242	0.79
10	0.1	0.299	0.269

Στον Πίνακα 8 παρατηρείται ότι την 7<sup>η</sup> μέρα, η σύγκριση μεταξύ των καλλιεργειών control με 0.5% γλυκερόλης έδωσε τιμή  $P=0.265$ . Αυτή η τιμή  $P$ -value είναι πάνω από το όριο σημαντικότητας  $P < 0.05$ , υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση χλωροφύλλης-β μεταξύ αυτών των δύο καλλιεργειών. Παρόμοια, κατά τη σύγκριση του control με 2% γλυκερόλης, η  $P$  τιμή που προέκυψε ήταν 0.242, υποδηλώνοντας ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στα επίπεδα της χλωροφύλλης-β. Επιπλέον, κατά τη σύγκριση του 0.5% με 2% γλυκερόλη, η λαμβανόμενη  $P$  τιμή ήταν 0.790, η οποία επίσης υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση της χλωροφύλλης-β. Επομένως, την 7<sup>η</sup> μέρα, καμία από τις συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα χλωροφύλλης-β.

Στη συνέχεια την 10<sup>η</sup> μέρα, η ανάλυση παρουσίασε παρόμοια αποτελέσματα. Η σύγκριση μεταξύ του control με 0.5% γλυκερόλης έδωσε τιμή  $P=0.100$ , ενώ η σύγκριση μεταξύ control με 2% γλυκερόλη έδωσε τιμή  $P=0.299$ . Και στις δύο περιπτώσεις, αυτές οι τιμές  $P$ -value είναι πάνω από το όριο σημαντικότητας, υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση χλωροφύλλης-β μεταξύ αυτών των καλλιεργειών. Παρομοίως, η σύγκριση μεταξύ της ομάδας 0.5% με 2% γλυκερόλη έδωσε τιμή  $P=0.269$ , υποδηλώνοντας ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στα επίπεδα της χλωροφύλλης-β. Έτσι, και την 10<sup>η</sup> μέρα, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση της χλωροφύλλης-β μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα των ολικών καροτενοειδών του δεύτερου πειράματος:



**Εικόνα 13:** Ποσότητα Plant carotenoids σε µg/10<sup>6</sup> cells των καλλιεργειών στις τρεις συγκεντρώσεις (Μ.Ο.) του είδους *Dunaliella* sp. του δεύτερου πειράματος. Ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει τις ημέρες της πειραματικής διαδικασίας, ενώ ο κατακόρυφος άξονας αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση. Οι μπάρες υποδεικνύουν το μέγεθος του τυπικού σφάλματος.

Στην Εικόνα 13 παρατηρείται ότι η ποσότητα των ολικών καροτενοειδών είναι υψηλότερη την 10<sup>η</sup> μέρα και στις τρεις καλλιεργείες σε σχέση με την 7<sup>η</sup> μέρα όπου η συγκέντρωση καροτενοειδών είναι χαμηλότερη, ειδικότερα στο control. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ξανά στατιστική ανάλυση με την εφαρμογή του t-test, ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων γλυκερόλης ανάλογα με την ποσότητα των καροτενοειδών. Τα αποτελέσματα των P-values ( $P < 0.05$ ) από τα t-tests παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 9:** Πίνακας τιμών P των συγκεντρώσεων των ολικών καροτενοειδών του δεύτερου πειράματος ( $P < 0.05$ ). Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη.

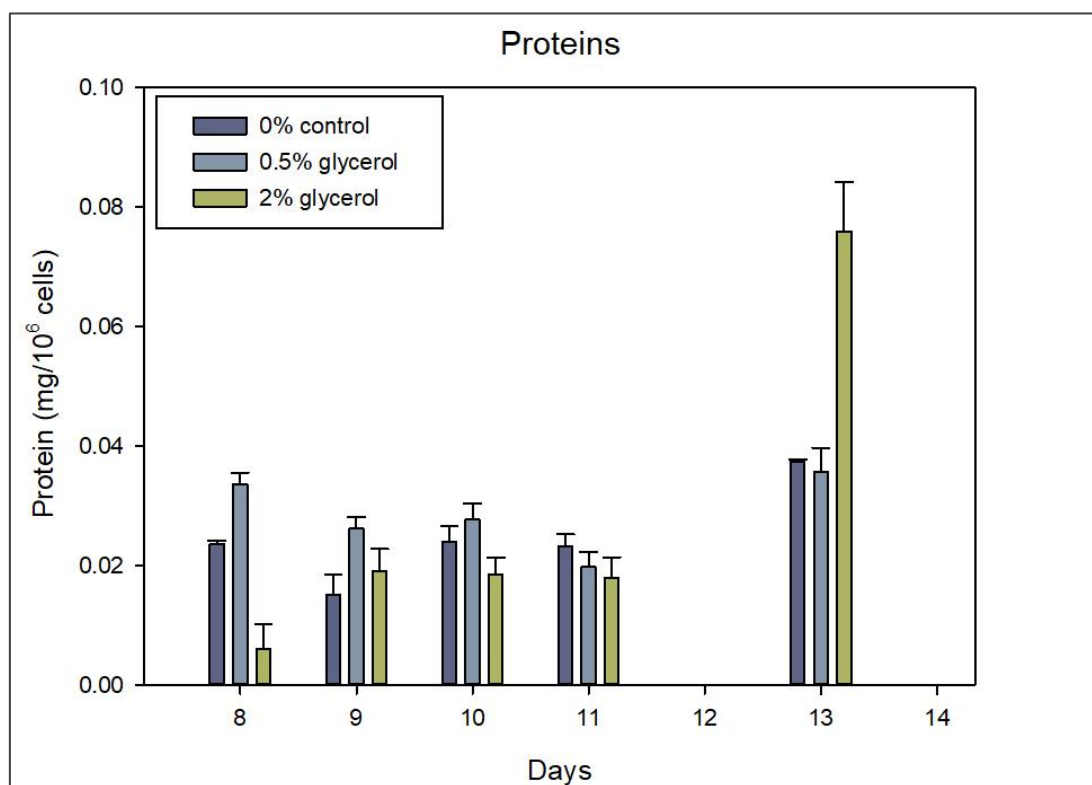
Days	PI carot		
	0.5/0	2/0.	0.5/2
7	<b>0.010</b>	0.076	0.198
10	<b>0.005</b>	0.052	0.981

Στον Πίνακα 9 παρατηρείται ότι την 7<sup>η</sup> μέρα, η σύγκριση μεταξύ των καλλιεργειών control με 0.5% γλυκερόλης απέδωσε P-value ίσο με 0.010. Αυτό υποδεικνύει μια στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών μεταξύ αυτών των δύο καλλιεργειών. Παρόμοια, κατά τη σύγκριση του control με 2% γλυκερόλη, η τιμή P που προέκυψε ήταν 0.076, υποδηλώνοντας μια πιθανή διαφορά στα επίπεδα καροτενοειδών. Ωστόσο, η σύγκριση μεταξύ των καλλιεργειών 0.5% με 2% γλυκερόλης οδήγησε σε τιμή  $P = 0.198$ , υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση καροτενοειδών. Επομένως, κατά την 7<sup>η</sup> μέρα, η παρουσία 0.5% γλυκερόλης φάνηκε να έχει πιο έντονη επίδραση στα επίπεδα καροτενοειδών σε σύγκριση με την 2% γλυκερόλη.

Στη συνέχεια κατά τη 10<sup>η</sup> μέρα, η ανάλυση έδειξε ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Η σύγκριση μεταξύ του control με 0.5% γλυκερόλης απέδωσε τιμή  $P=0.005$ , υποδεικνύοντας στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών. Αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία 0.5% γλυκερόλης είχε σημαντικό αντίκτυπο στα επίπεδα καροτενοειδών σε σύγκριση με την απουσία γλυκερόλης. Παρόμοια, κατά τη σύγκριση του control με 2% γλυκερόλης, η τιμή  $P$  που προέκυψε ήταν 0.052, υποδηλώνοντας μια πιθανή διαφορά στα επίπεδα καροτενοειδών. Ωστόσο, η σύγκριση μεταξύ του 0.5% με 2% γλυκερόλης οδήγησε σε τιμή  $P=0.981$ , υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση καροτενοειδών.

### 4.3 Προσδιορισμός πρωτεϊνών

Στο πρώτο πείραμα για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών λήφθηκε ποσότητα από τις καλλιέργειες σε πέντε διαφορετικές χρονικές στιγμές, ημέρα 8, 9, 10, 11 και 13 μετά τον εμβολιασμό. Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη. Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν έγινε ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μέσου όρου κάθε συγκέντρωσης καλλιέργειας για τις συγκεκριμένες ημέρες που προαναφέρθηκαν για τις πρωτεΐνες.



**Εικόνα 14:** Ποσότητα Πρωτεϊνών σε  $mg/10^6$  cells των καλλιεργειών στις τρεις συγκεντρώσεις (Μ.Ο.) του είδους *Dunaliella* sp. του πρώτου πειράματος. Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη. Ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει τις ημέρες της πειραματικής διαδικασίας, ενώ ο κατακόρυφος άξονας αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση. Οι μπάρες υποδεικνύουν το μέγεθος του τυπικού σφάλματος.

Στην Εικόνα 14 παρατηρείται ότι η ποσότητα των πρωτεϊνών είναι υψηλότερη την 13<sup>η</sup> μέρα και στις τρεις καλλιέργειες σε σχέση με τις υπόλοιπες όπου η συγκέντρωση πρωτεϊνών είναι χαμηλότερη. Παρουσίασε έντονο ενδιαφέρον η καλλιέργεια 2% γλυκερόλη κατά τη 13<sup>η</sup> μέρα όπου η συγκέντρωση σε πρωτεΐνες είναι αρκετά υψηλή σε σύγκριση με τις προηγούμενες μέρες του πειράματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με

την εφαρμογή του t-test, ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων γλυκερόλης ανάλογα με την ποσότητα των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα των P-values ( $P < 0.05$ ) από τα t-tests παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

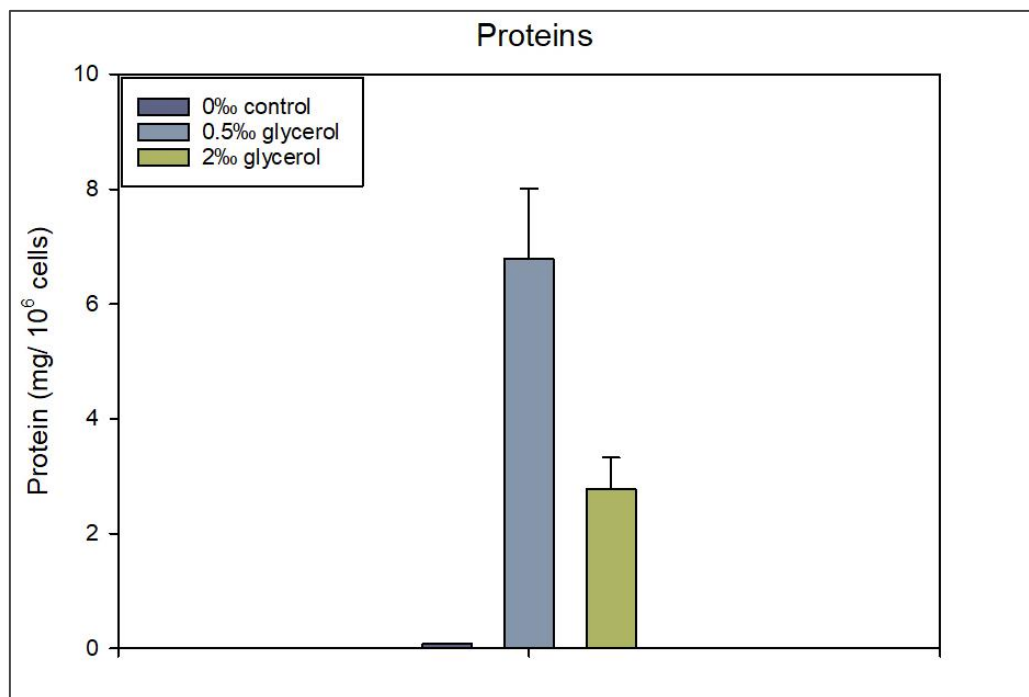
**Πίνακας 10:** Πίνακας τιμών P των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών του πρώτου πειράματος ( $P < 0.05$ ). Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0% (control), 0.5% και 2% γλυκερόλη.

Days	Protein		
	0.5/0	2./0	0.5/2
8	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;=0.001</b>	<b>&lt;=0.001</b>
9	<b>0.011</b>	0.561	0.092
10	0.336	0.178	<b>0.033</b>
11	0.295	0.202	0.665
13	<b>0.028</b>	0.316	<b>&lt;=0.001</b>

Στον Πίνακα 10 παρατηρείται κατά την 8<sup>η</sup> μέρα, η σύγκριση μεταξύ του control με 0.5% γλυκερόλη οδήγησε σε τιμή  $P < 0.001$ , υποδεικνύοντας μια εξαιρετικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση πρωτεϊνών. Παρόμοια, κατά τη σύγκριση του control με 2% γλυκερόλη, η τιμή που προέκυψε ήταν επίσης  $P \leq 0.001$ , υποδηλώνοντας σημαντική διαφορά στα επίπεδα πρωτεΐνης. Επιπλέον, η σύγκριση μεταξύ του 0.5% με 2% γλυκερόλη έδωσε ξανά την τιμή  $P \leq 0.001$ , υποδεικνύοντας σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση πρωτεϊνών μεταξύ αυτών των δύο ομάδων. Έτσι, την 8<sup>η</sup> μέρα, τόσο η 0.5% όσο και η 2% γλυκερόλη άσκησαν σημαντική επίδραση στη σύνθεση των πρωτεϊνών.

Κατά τις επόμενες ημέρες, η σημασία των διαφορών σε περιεκτικότητα πρωτεϊνών διαφοροποιήθηκε. Την 9<sup>η</sup> μέρα, η σύγκριση μεταξύ του control με 0.5% γλυκερόλη απέδωσε τιμή  $P = 0.011$ , υποδεικνύοντας στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση πρωτεϊνών. Ωστόσο, κατά τη σύγκριση του control με 2% γλυκερόλη, η τιμή P που προέκυψε ήταν 0.561, υποδηλώνοντας ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στα επίπεδα πρωτεΐνης. Από τη σύγκριση μεταξύ του 0.5% με 2% γλυκερόλης προέκυψε  $P = 0.092$ , υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει πάλι ουσιαστική διαφορά στη συγκέντρωση πρωτεϊνών. Τη 10<sup>η</sup> μέρα, η ανάλυση έδειξε τιμή  $P = 0.336$  κατά τη σύγκριση του control με 0.5% γλυκερόλης, υποδηλώνοντας ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση πρωτεϊνών. Ωστόσο, κατά τη σύγκριση του control με 2% γλυκερόλης, η λαμβανόμενη τιμή P ήταν 0.178, υποδηλώνοντας μια πιθανή διαφορά στα επίπεδα πρωτεΐνης. Η σύγκριση μεταξύ του 0.5% με 2% γλυκερόλης οδήγησε σε τιμή  $P = 0.033$ , υποδηλώνοντας στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση πρωτεϊνών. Την 11<sup>η</sup> μέρα, καμία από τις συγκρίσεις δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση πρωτεϊνών, όπως υποδεικνύεται από τις λαμβανόμενες τιμές P-value. Την 13<sup>η</sup> μέρα παρατηρείται ότι υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά στις καλλιέργειες 0.5% με 2% γλυκερόλη με τιμή  $P \leq 0.001$ , υποδηλώνοντας σημαντική διαφορά στα επίπεδα πρωτεΐνης. Συνοψίζοντας, η επίδραση της συγκέντρωσης γλυκερόλης στη σύνθεση πρωτεϊνών στη *Dunaliella* διέφερε ανάλογα με τη συγκεκριμένη ημέρα ανάλυσης. Την 8<sup>η</sup> μέρα, τόσο η 0.5% όσο και η 2% γλυκερόλη είχαν σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση πρωτεΐνης. Ωστόσο, τις επόμενες ημέρες, η σημασία μειώθηκε, με ορισμένες μόνο συγκρίσεις να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η συγκέντρωση γλυκερόλης μπορεί να έχει χρονικά εξαρτώμενη επίδραση στη σύνθεση πρωτεϊνών στη *Dunaliella*.

Στο δεύτερο πείραμα για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών λήφθηκε ποσότητα από τις καλλιέργειες μίας ημέρας, ημέρα 10 μετά τον εμβολιασμό. Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0‰ (control), 0.5‰ και 2‰ γλυκερόλη. Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν έγινε ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μέσου όρου κάθε συγκέντρωσης καλλιέργειας για την συγκεκριμένη μέρα που προαναφέρθηκε για τις πρωτεΐνες, όπου έγινε αναγωγή ανά ένα εκατομμύριο κύτταρα.



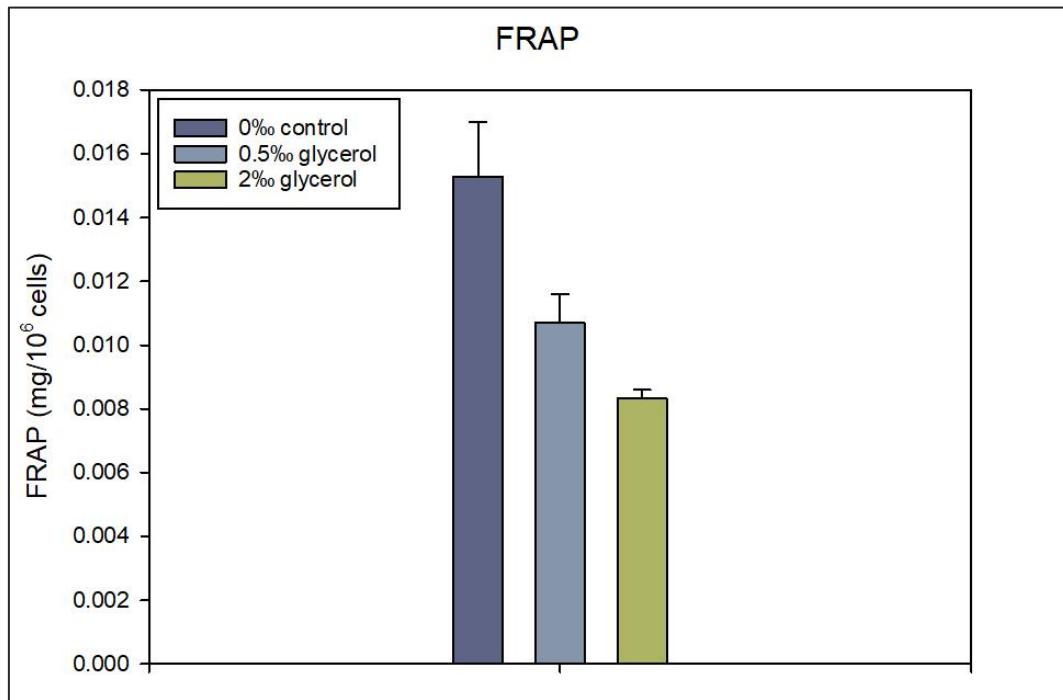
**Εικόνα 15:** Ποσότητα Πρωτεϊνών σε mg/10<sup>6</sup> cells των καλλιεργειών στις τρεις συγκεντρώσεις (Μ.Ο.) του είδους *Dunaliella sp.* του δεύτερου πειράματος. Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0‰(control), 0.5‰ και 2‰ γλυκερόλη. Ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει τις ημέρες της πειραματικής διαδικασίας, ενώ ο κατακόρυφος άξονας αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση. Οι μπάρες υποδεικνύουν το μέγεθος του τυπικού σφάλματος.

Στην Εικόνα 15 παρατηρείται ότι η ποσότητα των πρωτεϊνών είναι υψηλότερη στην καλλιέργεια με 0.5‰ ποσότητα γλυκερόλης, ακολουθεί η καλλιέργεια 2‰ και το control με την χαμηλότερη συγκέντρωση απ' όλες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με την εφαρμογή του t-test, ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων γλυκερόλης ανάλογα με την ποσότητα των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα των P-values ( $P < 0.05$ ) από τα t-tests αναφέρονται παρακάτω.

Τη συγκεκριμένη ημέρα, η σύγκριση μεταξύ του control με 0.5‰ γλυκερόλη έδωσε τιμή  $P=0.006$ , υποδεικνύοντας εξαιρετικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση πρωτεϊνών. Αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία 0.5‰ γλυκερόλης έχει σημαντικό αντίκτυπο στη σύνθεση πρωτεϊνών στη *Dunaliella* σε σύγκριση με την απουσία γλυκερόλης. Παρόμοια, κατά τη σύγκριση του control με 2‰ γλυκερόλη, η τιμή που προέκυψε ήταν  $P=0.008$ , γεγονός που σημαίνει σημαντική διαφορά στα επίπεδα πρωτεϊνών. Αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία 2‰ γλυκερόλης επηρεάζει επίσης την πρωτεϊνοσύνθεση στην *Dunaliella sp.* Επιπλέον, η σύγκριση μεταξύ του 0.5‰ με 2‰ γλυκερόλης οδήγησε σε τιμή  $P=0.041$ , υποδηλώνοντας στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση πρωτεϊνών μεταξύ αυτών των δύο καλλιεργειών. Αυτό σημαίνει ότι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (0.5‰ και 2‰) ασκούν διακριτές επιδράσεις στη σύνθεση πρωτεϊνών στη *Dunaliella*.

#### 4.4 Ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό (FRAP)

Στο δεύτερο πείραμα, οι καλλιέργειες *Dunaliella sp.* περιείχαν τρεις συγκεντρώσεις γλυκερόλης control, 0.5% και 2% από τρεις επαναλήψεις η κάθε μία. Δείγμα ξηρής βιομάζας λήφθηκε μία ημέρα κατά τη διάρκεια του πειράματος, ημέρα 10 μετά τον εμβολιασμό. Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν έγινε ποσοτικοποίηση του ολικού οξειδωτικού δυναμικού τους με τη μέθοδο FRAP. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μέσου όρου της κάθε συγκέντρωσης control, 0.5% και 2%, όπου έγινε αναγωγή ανά ένα εκατομμύριο κύτταρα.



**Εικόνα 16:** Ποσότητα αντιοξειδωτικών σε mg/10<sup>6</sup> cells των καλλιεργειών στις τρεις συγκεντρώσεις (Μ.Ο.) του είδους *Dunaliella sp.* του δεύτερου πειράματος. Οι ποσότητες στη συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 0%(control), 0.5% και 2% γλυκερόλη. Ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει τις ημέρες της πειραματικής διαδικασίας, ενώ ο κατακόρυφος άξονας αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση. Οι μπάρες υποδεικνύουν το μέγεθος του τυπικού σφάλματος.

Στην Εικόνα 16 παρατηρείται ότι το control έχει υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τις συγκεντρώσεις γλυκερόλης 0.5% και 2%, με χαμηλότερη ικανότητα να ανέρχεται η συγκέντρωση 2% γλυκερόλη. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με εφαρμογή του t-test, ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων γλυκερόλης. Τα αποτελέσματα των P-values ( $P < 0.05$ ) από τα t-tests παρουσιάζονται παρακάτω:

Κατά τη σύγκριση μεταξύ control και 0.5% γλυκερόλης η τιμή που υπολογίστηκε ήταν  $P = 0.03$ , υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών μεταξύ της καλλιέργειας control και της καλλιέργειας με συγκέντρωση 0.5% γλυκερόλης της *Dunaliella sp.* Αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία 0.5% γλυκερόλης έχει επηρεάσει την αντιοξειδωτική ικανότητα της καλλιέργειας, οδηγώντας σε σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου χωρίς γλυκερόλη. Στη συνέχεια κατά τη σύγκριση μεταξύ του control και 2% γλυκερόλης η τιμή ήταν  $P \leq 0.001$ , υπάρχει εξαιρετικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών μεταξύ του control και της καλλιέργειας με συγκέντρωση 2% γλυκερόλης. Αυτό δείχνει ότι η παρουσία 2% γλυκερόλης έχει επηρεάσει σημαντικά την αντιοξειδωτική ικανότητα της καλλιέργειας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου χωρίς γλυκερόλη. Επιπλέον, κατά τη σύγκριση μεταξύ 0.5% και 2% γλυκερόλης με  $P = 0.023$ , υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών μεταξύ της καλλιέργειας *Dunaliella sp.* με συγκέντρωση 0.5% γλυκερόλης και της καλλιέργειας με συγκέντρωση 2% γλυκερόλης. Επομένως, οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις γλυκερόλης (0.5% και 2%) έχουν

οδηγήσει σε διαφορετικές αντιοξειδωτικές ικανότητες εντός της καλλιέργειας και η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική. Συνολικά, με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης FRAP και τις υπολογιζόμενες τιμές P, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η παρουσία γλυκερόλης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις είχε σημαντική επίδραση στην αντιοξειδωτική ικανότητα της καλλιέργειας *Dunaliella sp.* σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου χωρίς γλυκερόλη.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη του μικροφύκου *Dunaliella sp.* υπό μιξοτροφικές συνθήκες ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της γλυκερόλης στην ανάπτυξη του μικροφύκου καθώς επίσης και η ποσότητα σε χλωροφύλλη-α,-β και ολικά καροτενοειδή. Επιπλέον, των πρωτεϊνών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας της *Dunaliella sp.* υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες.

### 5.1 Επίδραση της γλυκερόλης σε καλλιέργειες *Dunaliella sp.*

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι φανερό ότι η γλυκερόλη δεν επηρέασε ιδιαίτερα τις καλλιέργειες *Dunaliella sp.* Οι συγκεντρώσεις γλυκερόλης που χρησιμοποιήθηκαν έδειξαν μείωση στον αριθμό κυττάρων του μικροφύκου ή πιο αργή ανάπτυξη σε σχέση με το control. Πιο συγκεκριμένα, στο πρώτο πείραμα η συγκέντρωση 0.5% αποδείχθηκε ότι είχε πολύ παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης με το control, ενώ η συγκέντρωση 2% είχε πολύ πιο αργό ρυθμό ανάπτυξης μέχρι την 10<sup>η</sup> μέρα και στη συνέχεια εμφάνισε απότομη αύξηση μέχρι την λήξη του πειράματος. Στο δεύτερο πείραμα και οι τρεις καλλιέργειες, control, 0.5% και 2% είχαν παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης μέχρι την 7<sup>η</sup> μέρα και στην συνέχεια το control εμφάνισε απότομη αύξηση συγκριτικά με τις καλλιέργειες 0.5% και 2%. Συνολικά, οι καλλιέργειες με τις συγκεντρώσεις 0.5 και 2 και στα δύο πειράματα δεν επηρέασαν σημαντικά τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων. Τα παραπάνω αποτελέσματα ταιριάζουν με ορισμένες από τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές στις οποίες διαφαίνεται έντονα ότι με την προσθήκη γλυκερόλης στην καλλιέργεια τα κύτταρα της *Dunaliella sp.* δεν αυξάνονται σημαντικά. Για παράδειγμα, μία μελέτη έδειξε ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη των μικροφυκών (Liang et al. 2019). Συγκεκριμένα, με την προσθήκη γλυκερόλης, τα κύτταρα του *Dunaliella tertiolecta* έφτασαν στην στατική φάση σε σύντομο χρονικό διάστημα (την ημέρα 10) λόγω της ταχείας κυτταρικής ανάπτυξης, ενώ η κανονική ανάπτυξη των κυττάρων των φυκών χωρίς την προσθήκη γλυκερόλης έφτασε στην στατική φάση την ημέρα 18. Ο αριθμός των κυττάρων αυξήθηκε με την αύξηση των συγκεντρώσεων γλυκερόλης σε ένα εύρος από 1 έως 4 g/L. Σε συγκέντρωση γλυκερόλης 5 g/L, ο αριθμός των κυττάρων δεν αυξανόταν πλέον, λόγω επίδρασης στη φωτοσυνθετική απόδοση των κυττάρων των μικροφυκών (Liang et al. 2019). Αυτό σημαίνει ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης η ανάπτυξη των μικροφυκών αναστέλλεται και δεν αναπτύσσονται περαιτέρω. Επιπλέον, μια άλλη μελέτη έδειξε ότι σε καλλιέργειες *Chlorella vulgaris* βρέθηκε υψηλότερη παραγωγικότητα βιομάζας με γλυκερόλη σε αναλογία 80:20% γλυκόζης: γλυκερόλης, η οποία ήταν περίπου 4 φορές μεγαλύτερη από την παραγωγικότητα βιομάζας που βρέθηκε στις καλλιέργειες με 100% γλυκερόλη. Συνολικά, ο μιξοτροφικός τρόπος καλλιέργειας μικροφυκών, είναι ελάχιστα μελετημένος και τα διαθέσιμα παραδείγματα περιορίζονται σε αρκετά είδη, όπως τα κυανοβακτήρια *Spirulina platensis* και *Chlamydomonas reinhardtii* (Heredia-Arroyo et al., 2011).

### 5.2 Χλωροφύλλες και ολικά καροτενοειδή υπό μιξοτροφικές συνθήκες

Με βάση τα αποτελέσματα από την εκχύλιση των χλωροφυλλών και των ολικών καροτενοειδών για το πρώτο πείραμα (control, 0.5% και 2% γλυκερόλη) της *Dunaliella sp.* υπό μιξοτροφικές συνθήκες παρατηρήθηκε ότι η



χλωροφύλλη-α παρουσίασε αύξηση στις καλλιέργειες, η χλωροφύλλη-β μείωση και τα καροτενοειδή αύξηση μέχρι το τέλος του πειράματος. Στόχος ήταν να εκτιμηθεί η πιθανή επίδραση της γλυκερόλης στα επίπεδα των χλωροφυλλών και ολικών καροτενοειδών, πραγματοποιώντας στατιστική ανάλυση με τη χρήση t-test για τον προσδιορισμό της σημαντικότητας τυχόν παρατηρούμενων διαφορών. Πιο συγκεκριμένα, την 13<sup>η</sup> μέρα του πειράματος η χλωροφύλλη-α είχε την υψηλότερη συγκέντρωση και στις τρεις καλλιέργειες, ειδικότερα στην 2% γλυκερόλη όπου ταυτόχρονα είχε σημαντική στατιστική διαφορά συγκριτικά με την 0.5% γλυκερόλη και με το control. Αντίθετα, η συγκέντρωση της χλωροφύλλης-β ήταν υψηλότερη την 5<sup>η</sup> μέρα του πειράματος, ειδικότερα στις καλλιέργειες 0.5% και 2%, ενώ το control είχε υψηλότερη συγκέντρωση σε χλωροφύλλη-β την 13<sup>η</sup> μέρα. Σημαντική στατιστική διαφορά όμως είχαν οι καλλιέργειες control με 0.5% γλυκερόλη και το 0.5% με 2% κατά την 13<sup>η</sup> μέρα του πειράματος, όπου η καλλιέργεια με 0.5% γλυκερόλη είχε την χαμηλότερη συγκέντρωση σε χλωροφύλλη-β. Όσον αφορά τα ολικά καροτενοειδή, εμφάνισαν υψηλότερη συγκέντρωση κατά την 13<sup>η</sup> μέρα, με την καλλιέργεια 2% να έχει σημαντική στατιστική διαφορά σε σχέση με την 0.5% και το control, δηλαδή υψηλότερη συγκέντρωση σε ολικά καροτενοειδή.

Στο δεύτερο πείραμα, η συγκέντρωση των χλωροφυλλών και ολικών καροτενοειδών στην *Dunaliella* υπό μιξοτροφικές συνθήκες διερευνήθηκε την 7<sup>η</sup> και τη 10<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος, με διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης 0%, 0.5% και 2%. Στόχος ήταν να εκτιμηθεί η πιθανή επίδραση της γλυκερόλης στα επίπεδα των χλωροφυλλών και ολικών καροτενοειδών και πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με τη χρήση t-test για τον προσδιορισμό της σημαντικότητας τυχόν παρατηρούμενων διαφορών. Πιο αναλυτικά, την 7<sup>η</sup> μέρα το control εμφάνισε υψηλότερη συγκέντρωση σε χλωροφύλλη-α, όπως και η καλλιέργεια 0.5%, ενώ η καλλιέργεια 2% εμφάνισε ελάχιστη αύξηση την 10<sup>η</sup> μέρα. Η συγκέντρωση σε χλωροφύλλη-β ήταν υψηλότερη επίσης την 7<sup>η</sup> μέρα, με το control να έχει την υψηλότερη, μετά το 0.5% και μετά το 2%, ενώ την 10<sup>η</sup> μέρα και οι τρεις καλλιέργειες εμφάνισαν χαμηλές συγκεντρώσεις χλωροφύλλης-β. Αντίθετα, τα ολικά καροτενοειδή εμφάνισαν υψηλότερη συγκέντρωση την 10<sup>η</sup> μέρα του πειράματος, με το 0.5% και 2% να έχουν την υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με το control. Στατιστικά σημαντική διαφορά στην συγκέντρωση των καροτενοειδών είχαν οι καλλιέργειες του control με το 0.5% την 7<sup>η</sup> και την 10<sup>η</sup> μέρα όπως φάνηκε ανάγλυφα στο διάγραμμα.

Γενικότερα, σε προηγούμενες μελέτες έχει παρατηρηθεί ευρέως ότι η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη (ξηρό βάρος βιομάζας) των μικροφυκών υπό μιξοτροφική/ετεροτροφική καλλιέργεια μειώνεται δραματικά σε σύγκριση με εκείνη υπό φωτοαυτότροφη καλλιέργεια (Wang et al., 2014). Η μείωση αυτή οφείλεται πιθανώς στη μείωση της σύνθεσης της χλωροφύλλης, δεδομένου ότι η ενέργεια μπορεί να ληφθεί μέσω της αναπνοής οργανικών ενώσεων εκτός από τη φωτοσύνθεση που συνθέτει τη χλωροφύλλη. Πιο αναλυτικά, καθώς ο άνθρακας ενσωματώνεται απευθείας από τα σάκχαρα, δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί φωτοσύνθεση. Ως εκ τούτου, τα κύτταρα υιοθετούν μειωμένη ρύθμιση της σύνθεσης χλωροφύλλης και εξοικονομούν ενέργεια. Αυτό θα μπορούσε επίσης να οφείλεται στη βιοαποικοδόμηση της χλωροφύλλης λόγω της μεταβολικής ρύθμισης. Λαμβάνοντας υπόψη την παρεμβολή της χλωροφύλλης στη μετεστεροποίηση, η εν λόγω μείωση της χλωροφύλλης κατά την ετεροτροφία και/ή τη μιξοτροφία προσθέτει αξία στη διαδικασία καλλιέργειας των φυκών ως πρώτη ύλη για βιοντίζελ (Bhatnagar et al., 2011). Μια άλλη μελέτη για το είδος *Dunaliella salina* υπό μιξοτροφικές συνθήκες με προσθήκη γλυκερόλης, όσον αφορά την συγκέντρωση σε ολικά καροτενοειδή, έδειξε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στο μέσο είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερη περιεκτικότητα των κυττάρων σε καροτενοειδή, δηλαδή όσο μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκερόλης, τόσο μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε καροτενοειδή (Shorabi et al., 2019). Επομένως, η πρόσληψη γλυκερόλης από την *Dunaliella salina* αντιπροσωπεύει περισσότερη ενέργεια και άνθρακα για την προώθηση της ανάπτυξης, της σύνθεσης καροτενοειδών και της καροτενογένεσης (Cara-Robles et al. 2021). Αυτές οι μελέτες επαληθεύουν και τα παρόντα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

### 5.3 Ολικός προσδιορισμός πρωτεϊνών υπό μιξοτροφικές συνθήκες

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για το πρώτο πείραμα διαπιστώθηκε ότι η γλυκερόλη επηρέασε τις καλλιέργειες *Dunaliella sp.* στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών. Όλες οι συγκεντρώσεις γλυκερόλης (control, 0.5%, 2%) που χρησιμοποιήθηκαν παρουσίασαν αύξηση στην συγκέντρωση των πρωτεϊνών κατά την 13<sup>η</sup> μέρα του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, η καλλιέργεια με την συγκέντρωση 2% γλυκερόλης εμφάνισε υψηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης την 13<sup>η</sup> μέρα και ταυτόχρονα στατιστικά σημαντική διαφορά με την καλλιέργεια 0.5% γλυκερόλης. Αυτό σημαίνει ότι η υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης στην καλλιέργεια βοηθάει στην παραγωγή πρωτεϊνών του είδους *Dunaliella sp.* Στο δεύτερο πείραμα, παρόλο που η ανάλυση πρωτεϊνών έγινε μόνο μία μέρα κατά τη διάρκεια του πειράματος τη 10<sup>η</sup> μέρα, παρατηρείται ότι η καλλιέργεια με 0.5% γλυκερόλη εμφάνισε υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεϊνών σε σχέση με την καλλιέργεια 2%. Επιπλέον, παρουσίασαν και οι τρεις καλλιέργειες στατιστικά σημαντική διαφορά, αφού το control είχε πολύ χαμηλή συγκέντρωση και το 0.5% πολύ υψηλή σε σχέση με το 2%. Μια προηγούμενη μελέτη για το είδος *Dunaliella salina* έδειξε ότι η καλλιέργεια παρουσίασε ελάχιστη αύξηση στην περιεκτικότητα πρωτεϊνών σε μιξοτροφικές συνθήκες με προσθήκη γλυκόζης (Wan et al., 2011). Επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα ότι με την προσθήκη άνθρακα μέσα σε καλλιέργειας *Dunaliella sp.* μπορεί να αυξήσει την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Σε μια άλλη μελέτη, παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης γλυκόζης από 0 έως 15 g/L, η βιομάζα και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες αυξήθηκαν. Ωστόσο, σε συγκεντρώσεις γλυκόζης και NaCl υψηλότερες από 15 g/L και 2.5 M, αντίστοιχα, οι αποκρίσεις αυτές μειώθηκαν δραματικά. Με βάση τη διαδικασία βελτιστοποίησης, η παραγωγή πρωτεϊνών στη *Dunaliella salina* ενισχύθηκε σημαντικά από τη γλυκόζη (Kadkhodaei et al., 2015). Συμπερασματικά, η υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών που βρέθηκε στους χειρισμούς 2% και 2‰ σε συνδυασμό με τα υψηλά επίπεδα καρροτενοειδών θα μπορούσαν να αποτελέσουν βάση για την αξιοποίηση του συγκεκριμένου μικροφύκου για την ανάπτυξη βιοτεχνολογικών προϊόντων, όπως συμπλήρωμα διατροφής.

### 5.4 Ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό (FRAP) υπό μιξοτροφικές συνθήκες

Με βάση τα αποτελέσματα από την μέθοδο FRAP, του δεύτερου πειράματος, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι υπό μιξοτροφικές συνθήκες η αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάζει μείωση στις καλλιέργειες με ποσότητα γλυκερόλης 0.5‰ και 2‰ σε σχέση με το control. Πιο αναλυτικά, την ημέρα που έγινε η ανάλυση FRAP το control είχε τις υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών σε σχέση με το 0.5‰ και το 2‰. Όλες οι καλλιέργειες εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, έχοντας την μεγαλύτερη το control με το 2‰. Από αυτό εξάγεται το συμπέρασμα ότι όσο πιο υψηλή είναι η συγκέντρωση της γλυκερόλης στην καλλιέργεια τόσο μικρή και η περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες φαίνεται ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του μικροφύκου *S. Platensis* μειώνεται κάτω από μιξοτροφικές συνθήκες καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, οι τιμές των αντιοξειδωτικών που παρατηρήθηκαν με τη μέθοδο FRAP κατά την αυτότροφη καλλιέργεια ήταν υψηλότερες από αυτές της μιξοτροφικής. Είναι πιθανό ότι η αναστολή της οξειδωτικής καταπόνησης οδήγησε στην παραγωγή ελεύθερων ριζών στα κύτταρα, τα οποία αντέδρασαν και μείωσαν την αντιοξειδωτική τους σύνθεση, πιθανώς λόγω του ότι το μέσο παρέχει ευνοϊκές συνθήκες για τους οργανισμούς και δεν επηρεάζει την παραγωγή αντιοξειδωτικών (Pereira et al., 2019). Αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται να συμφωνούν με αυτά της παρούσας μελέτης, όπου η αντιοξειδωτική ικανότητα των καλλιεργειών με τις συγκεντρώσεις γλυκερόλης μειώνεται, ενώ στο control αυξάνεται.

## 6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdelwahed, W. et al., (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), pp.1688–1713.
- Abreu, A.P. et al., (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology*, 118, pp.61–66. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.055>
- Allain, K. R. (2007). Extraction of Chlorophyll using Dimethyl sulfoxide and Acetone. Retrieved from: <https://digitalcommons.wpi.edu/mqp-all/418>
- Amin S. (2009). Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management*, 50(7): 1834-1840.
- Andersen R. A. (1996). Algae. In: J. C. Hunter-Cevera and C. A. Belt eds. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*, London, UK, p. 29-64.
- Andrade M. R. and Costa J. A. V. (2007). Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 264(1-4): 130-134.
- Badger M. R. and Price G. D. (2003). CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany*, 54): 609-622.
- Barclay W. R., Terry K. L., Nagle N. J., Weissman J. C. and Goebel R. P. (1987). Potential of New Strains of Marine and Inland Saline-Adapted Microalgae for Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 18(4): 218-228.
- Barsanti L. and Gualtieri P. (2006). *Algae: Anatomy, biochemistry and biotechnology*. New York, *CRC Taylor & Francis*.
- Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Franco, J. M., & Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2(2), 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.01.004>
- Becker, E.W., (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), pp.207–10. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497500600139X>
- Begum, H., Yusoff, F. Md., Banerjee, S., Khatoon, H., & Shariff, M. (2016). Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2209-2222. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Berthon, J.-Y., Nachat-Kappes, R., Bey, M., Cadoret, J.-P., Renimel, I., & Filaire, E. (2017). Marine algae as attractive source to skin care. *Free Radical Research*, 51(6), 555–567. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1355550>
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., & Das, K. C. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 88, 3425–3431.

- Bilanovic D., Andargatchew A., Kroeger T. and Shelef G. (2009). Freshwater and marine microalgae sequestering of CO<sub>2</sub> at different C and N Concentrations-Response surface methodology analysis. *Energy Conversion and Management*, 50(2): 262-267.
- Bongiorni L. M. and Pietra F. (1996). Marine natural products for industrial applications. *Chemistry and Industry*, 2): 54-58.
- Brennan L. and Owende P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and coproducts. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2): 557-577.
- Brock T. D. (1967). Life at high temperatures. *Science*, 158): 1012-1019.
- Bunt J. S. and Wood E. J. C. (1963). Microbiology and Antarctic Sea ice. *Nature*, 199): 1254-1255.
- Cairns J. (1998). Malthus, exemptionism and the risk/uncertainty paradox. *Hydrobiologia*, 384): 1-5.
- Capa-Robles, W., García-Mendoza, E., Paniagua-Michel, J.d.J. (2021). Enhanced β-carotene and Biomass Production by Induced Mixotrophy in *Dunaliella salina* across a Combined Strategy of Glycerol, Salinity, and Light. *Metabolites*, 11, 866. <https://doi.org/10.3390/metabo11120866>
- Carvalho A., Monteiro C. and Malcata F. (2009). Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. *Journal of Applied Phycology*, 21(5): 543-552.
- Carvalho A., Silva S., Baptista J. and Malcata F. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5): 1275-1288
- Chen, F. & Zhang, Y. (1997). High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 221–24.
- Chen F. (1996). High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*, 14(11): 421-426.
- Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3): 294- 306.
- Chojnacka K. and Marquez-Rocha F. J. (2004). Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology Advances*, 3): 21-34.
- Chojnacka K. and Zielińska A. (2011). Evaluation of growth yield of *Spirulina (Arthrospira) sp.* in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*): 1-9.
- Cohen, Z. (ed.) (1999) Chemicals from Microalgae. *Taylor & Francis, London*, 419pp.
- Costa J. A. V., Cozza K. L., Oliveira L. and Magagnin G. (2001). Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(5): 439-442.
- Coulombier, N.; Jauffrais, T.; Lebouvier, N. Antioxidant Compounds from Microalgae: A Review. *Mar. Drugs* 2021, 19, 549. <https://doi.org/10.3390/md19100549>

- Danesi, E. D. G., de O. Rangel-Yagui C., de Carvalho J. C. M., & Sato S. (2002). An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 23(4),261-269
- Darley W. M. (1982). Algal biology: A physical approach. In: J. F. Wilkinson eds. *Basic microbiology*, London, p. 30-52.
- Day, J. G., Slocombe, S. P., & Stanley, M. S. (2012). Overcoming biological constraints to enable the exploitation of microalgae for biofuels. *Bioresource Technology*, 109, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.033>
- Dey, S. & Rathod, V.K., (2013). Ultrasound assisted extraction of  $\beta$ -carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), pp.271–6.
- de la Noüe J., Laliberté G. and Proulx D. (1992). Algae and waste water. *Journal of Applied Phycology*, 4(3): 247-254
- De Pauw N. and Persoone G. (1988). Micro-algae for aquaculture. In: M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka eds. *Micro-Algal Biotechnology*, Cambridge, p. 197-221.
- Demirbas A. (2010). Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*, 51(12): 2738-2749
- Dubinsky Z., Berner T., and Aaronson S., (1978). Potential of large-scale algal culture for biomass and lipid production in arid lands. United States: N. p. Web.
- Falkowski P. G. (1980). Primary Productivity in the Sea. New York, Plenum Press
- “FAO. 2013. Algal Production (Growth Phases) - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).” [Online]. Available: <http://www.fao.org/docrep/003/W3732E/w3732e06.htm>
- Ferreira L. S., Rodrigues M. S., Converti A., Sato S. and Carvalho J. C. M. (2012). *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor: Use of no cost CO<sub>2</sub> from ethanol fermentation. *Applied Energy*, 92(0): 379-38
- Garcia, M.C.C., Sevilla, J.M.F., Fernandez, F.G.A., Grima, E.M. & Camacho, F.G. (2000). Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. *J. Appl. Phycol.*, 12, 239–48.
- Galasso, C., Gentile, A., Orefice, I., Ianora, A., Bruno, A., Noonan, D. M., Sansone, C., Albini, A., & Brunet, C. (2019). Microalgal Derivatives as Potential Nutraceutical and Food Supplements for Human Health: A Focus on Cancer Prevention and Interception. *Nutrients*, 11(6), 1226. <https://doi.org/10.3390/nu11061226>
- Gao C., Zhai Y., Ding Y. and Wu Q. (2010). Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. *Applied Energy*, 87(3): 756-761.
- Gong, M., Bassi, A., (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8): 1396-1412.
- Graziani, G., Schiavo, S., Nicolai, M. A., Buono, S., Fogliano, V., Pinto, G., & Pollio, A. (2013). Microalgae as human food: Chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Food Funct.*, 4(1), 144–152. <https://doi.org/10.1039/C2FO30198A>
- Greep R. O. (1998). Whither the global population problem. *Biochemical Pharmacology*, 55(4): 383-386

- Grewe C. B. and Pulz O. (2012). The Biotechnology of Cyanobacteria. In: B. A. Whitton eds. *Ecology of Cyanobacteria II*, p. 707-739.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M. & Malcata, F.X., (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs*, 9(4), pp.625–644.
- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M. A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M. R., & Nafissi-Varcheh, N. (2010). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 22(1), 43–50. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9424-y>
- Harun R., Singh M., Forde G. M., & Danquah M. K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3), 1037–1047. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.004>
- Heredia-Arroyo T, Wei W, Ruan R, Hu B. (2011). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass Bioenergy* 35:2245–2253. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.036>
- Isichei A. O. (1990). The role of algae and cyanobacteria in arid lands. A review. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 4(1): 1-17.
- Jassby A. (1988). *Spirulina*: a model of microalgae as human food. In: C. Lembi and J. R. Waaland eds. *Algae and Human Affairs*, Cambridge, p. 149-179.
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E. A., Embiruçu, M., & Ghirardi, M. L. (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, 101(4), 1406–1413. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.038>
- Judith T. Cirulis, J. Ashley Scott, and Gregory M. Ross (2013). Management of oxidative stress by microalgae. *Can. J. Physiol, Pharmacol*, 91: 15–21.
- Kadkhodaei, S., Abbasiliasi, S., Shun, T. J., Masoumi, H. R. F., Mohamed, M. S., Movahedi, A., & Ariff, A. B., (2015). Enhancement of protein production by microalgae *Dunaliella salina* under mixotrophic condition using response surface methodology. *RSC Advances*.
- Kay R. A. and Barton L. L. (1991). Microalgae as food and supplement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(6): 555-573
- Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Gayen, K., & Bhowmick, T. K. (2018a). Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food and Bioprocess Processing*, 110, 60–84. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.02.002>
- Klatzmann J. (1996). Overpopulation, threat or myth?. *Comptes Rendus de l' Academie d'Agriculture de France*, 82): 83-89

- Kreeger K. Y. (1996). Industry investors show increased interest in denizens of the deep. *The Scientist*, 10): 8-9.
- Kruse O. and Hankamer B. (2010). Microalgal hydrogen production. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3): 238-243.
- Kuhad R. C., Singh A., Tripathi K. K., Saxena R. K. and Eriksson K.-E. L. (1997). Microorganisms as an Alternative Source of Protein. *Nutrition Reviews*, 55(3): 65- 75.
- Lalucat, J., Imperial, J. & Pares, R. (1984). Utilization of light for the assimilation of organic matter in *Chlorella sp.* VJ79. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 677–81.
- Lam M. K. and Lee K. T. (2012). Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30(3): 673–690.
- Lee, H.Y., Lee, S.Y. & Park, B.K. (1989). The estimation of algal yield parameters associated with mixotrophic and photoheterotrophic growth under batch cultivation. *Biomass*, 18, 153–60.
- Lee, Y.K., Ding, S.Y., Hoe, C.H. & Low, C.S. (1996). Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor. *J. Appl. Phycol.*, 8, 163–6.
- Levasseur, W., Perré, P., & Pozzobon, V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances*, 41, 107545. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107545>
- Liang, S., Liu, X., Chen, F., & Chen, Z. (2004). Current microalgal health food R & D activities in China. *Hydrobiologia*, 512(1–3), 45–48. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000020366.65760.98>
- Liang M-H, Xue L-L, Jiang J-G. (2019). Two-stage cultivation of *Dunaliella tertiolecta* with glycerol and triethylamine for lipid accumulation: a viable way to alleviate the inhibitory effect of triethylamine on biomass. *Appl Environ Microbiol* 85:e02614-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02614-18>.
- Mata T. M., Martins A. A. and Caetano N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1): 217-232.
- Metting F. B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology*, 17(5): 477-489.
- Mitsui A., Hollaender, J. C. Aller, E. Epstein, A. San Pietro and O. R. Zaborsky (1980). Biosaline Research: The Use of Photosynthetic Marine Organisms in Food and Feed Production. *The Biosaline Concept*, New York, p. 177-215.
- Odjadjare, E.C., Mutanda, T., Olaniran, A.O., (2017). Potential biotechnological application of microalgae: a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(1):37-52.
- Pereira MIB, Chagas BME, Sassi R, Medeiros GF, Aguiar EM, Borba LHF, et al. (2019). Mixotrophic cultivation of *Spirulina platensis* in dairy wastewater: Effects on the production of biomass, biochemical composition and antioxidant capacity, *PLoS ONE*, 14(10): e0224294.
- Pirt, S. J., Lee, Y.-K., Richmond, A., & Pirt, M. W. (1980). The photosynthetic efficiency of *Chlorella* biomass growth with reference to solar energy utilisation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 30(1), 25–34. <https://doi.org/10.1002/jctb.503300105>

- Plaza, M., Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2009). Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae. *J. Agric. Food Chem*, 57 (16): 7159-7170.
- Powell N., Shilton A., Pratt S. and Chisti Y. (2011). Luxury uptake of phosphorus by microalgae in full-scale waste stabilization ponds. *Water Science and Technology*, 63(4): 704-709.
- Pulz O. and Gross W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6): 635-648.
- Pulz O., Scheibenbogen K. and Groß W. (2008). Biotechnology with Cyanobacteria and Microalgae. In: eds. *Biotechnology Set*, p. 105-136.
- Pulz O. P. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3): 287-293.
- Rangel-Yagui, C. D. O., Danesi, E. D. G., De Carvalho, J. C. M., & Sato, S. (2004). Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: Cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresource Technology*, 92(2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.09.002>
- Razon L. F. (2012). Life cycle energy and greenhouse gas profile of a process for the production of ammonium sulfate from nitrogen-fixing photosynthetic cyanobacteria. *Bioresource Technology*, 107(0): 339-346.
- Regan D. L. and Gartside G. (1983). Liquid Fuels from Microalgae in Australia. Melbourne, *CSIRO*.
- Reynolds C. S. (2006). The ecology of phytoplankton. *Cambridge University Press*.
- Richmond A. (1992). Open systems for the mass production of photoautotrophic microalgae outdoors: physiological principles. *Journal of Applied Phycology*, 4(3): 281-286.
- Richmond, A. (Ed.). (2004). Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. *Blackwell Science*.
- Rinawati M., Sari L. A., & Pursetyo K. T. (2020). Chlorophyll and carotenoids analysis spectrophotometer using method on microalgae. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 441(1), 012056. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/441/1/012056>
- Rosa A. P. C. d., Carvalho L. F., Goldbeck L. and Costa J. A. V. (2011). Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Conversion and Management*, 52(8–9): 3071-3073.
- Da Silva Ferreira V., & Sant'Anna C. (2017). Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 20. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2181-6>
- Singh A., Nigam P. S. and Murphy J. D. (2011). Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*, 102(1): 10-16.
- Siqueira, S. F., Queiroz, M. I., Zepka, L. Q., & Jacob-Lopes, E. (2018). Introductory Chapter: Microalgae Biotechnology - A Brief Introduction. In E. Jacob-Lopes, L. Q. Zepka, & M. I. Queiroz (Eds.), *Microalgal Biotechnology*. *InTech*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73250>



- Sohrabi, D., Jazini, M.H., Shariati, M (2019). Mixotrophic cultivation of *Dunaliella salina* on crude glycerol obtained from calcinated fatty acid production process. *Russ. J. Mar. Biol.* 2019, 45, 470–480.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Van den Hoek C., Mann D. G. and Jahns H. M. (1997). *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press.
- Wan, M., Liu, P., Xia, J., Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Betenbaugh, M.J., Nie, Z., and Qiu, G. (2011). The Effect of Mixotrophy on Microalgal Growth, Lipid Content, and Expression Levels of Three Pathway Genes in *Chlorella sorokiniana*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 91, pp. 835–844.
- Wang, J., Yang, H., & Wang, F. (2014). Mixotrophic Cultivation of Microalgae for Biodiesel Production: Status and Prospects. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(7), 3307–3329. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0729-1>
- Waterbury J. B. (2006). The Cyanobacteria—Isolation, Purification and Identification. In: M. Dworkin eds. *The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria*, p. 1053–1073.
- Wiessner W., Schnepf E. and Starr R. C. (1995). *Algae, Environment Human Affairs*. Bristol, UK, *Biopress Ltd*.
- Wijffels R. H. and Barbosa M. J. (2010). An outlook on microalgal biofuels. *Science*, 329(5993): 796-799.
- Williams, P. J. le B., & Laurens, L. M. L. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, 3(5), 554. <https://doi.org/10.1039/b924978h>
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., & Takriff, M. S. (2014). An overview: Biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21(1), 6. <https://doi.org/10.1186/2241-5793-21-6>
- Zhang H., Wang W., Li Y., Yang W. and Shen G. (2011). Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*. *Biomass and Bioenergy*, 35(5): 1710-1715.
- Μάρκου Γ., Τζοβενής Ι., Νερατζής Η, (2013). ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ: ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ. *Journal of Science and Technology*, (1),8.

Πηγή εικόνας εξώφυλλου: [CSIRO Science Image - CSIRO Science Image](#)