

ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΜΙΚΤΟΤΡΟΦΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ
ΑUXENOCHLORELLA PROTOTHECOIDES ΜΕ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΚΟΡΕΣΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ
ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΑΞΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

του

ΜΑΤΘΑΙΟΥ ΤΣΕΛΙΟΥ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Οκτώβριος 2021

ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΜΙΚΤΟΤΡΟΦΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ
ΑUXENOCHLORELLA PROTOTHECOIDES ΜΕ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΚΟΡΕΣΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ
ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΑΞΙΑΣ

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Νικόλαος Κοψαχείλης

Παπαδάκη Αικατερίνη

Καχριμανίδου Βασιλική

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως την οικογένειά μου, για τη στήριξή τους και τη βοήθειά τους, όλα αυτά τα χρόνια της φοίτησής μου και εν συνεχεία τον καθηγητή μου, Κοψαχείλη Νικόλαο για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής. Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω τον ερευνητή Γεώργιο Μάρκου, τον συνεργάτη του Αλέξανδρο Διαμαντή και τον Χρήστο Ηλιόπουλο, για τη βοήθεια και τις υποδείξεις τους στην υλοποίηση της πτυχιακής μου εργασίας, όποτε αυτή χρειάστηκε. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τον ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ/ΙΤΑΠ, για τη συνεργασία και την ευκαιρία να υλοποιήσω εργαστηριακά τη πτυχιακή αυτή εργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα πτυχιακή εργασία, αναπτύχθηκαν καλλιέργειες του μικροφύκου *Auxenochlorella protothecoides* SAG 211-8d, κάτω από μικτότροφες συνθήκες, έχοντας ως σκοπό την παραγωγή λιπιδίων και άλλων προϊόντων προστιθέμενης αξίας(συμπληρώματα διατροφής, φαρμακευτικά προϊόντα, κλπ.). Σχεδιάστηκαν τέσσερις πειραματικές πορείες, με αναλύσεις στους υδατάνθρακες, τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τις χρωστικές. Σκοπός των αναλύσεων, ήταν ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του στελέχους, στις διάφορες μετατροπές του λόγου γλυκερόλη/πεπτόνη. Στη πρώτη πορεία, αναπτύχθηκαν καλλιέργειες με το λόγο γλυκερόλη/πεπτόνη, έχοντας 5 g/L καθαρή γλυκερόλη και πεπτόνη με εύρος τιμών 0,125-2g/L. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων, κατά % μέσο όρο λιπιδίων για αυτή τη σειρά, ποικίλουν από 10,47±0,47% έως 17,83±0,81%, με διάφορες διακυμάνσεις ενδιάμεσα. Ενώ, η βιομάζα από τα 0,125-2g/L πεπτόνης, ξεκινά από τα 933,28mg/L και φτάνει έως τα 1051,51mg/L, κατά μέσο όρο. Στη δεύτερη πορεία, επιλέχθηκαν οι λόγοι γλυκερόλη/πεπτόνη, 5/2 και 5/0,25 από τη πρώτη πορεία και επεξεργάστηκαν σε συγκεντρώσεις από δύο έως και δέκα φορές μεγαλύτερες του αρχικού λόγου, δημιουργώντας έτσι τη 2^η και τη 3^η σειρά. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του λόγου 5/2 γλυκερόλη/πεπτόνη, τα λιπίδια κατά μέσο όρο, είχαν εύρος τιμών από 9,66±0,41% έως 21,56±1,65%, ενώ οι βιομάζες ξεκινούσαν από 2591,04mg/L και έφταναν μέχρι τα 4138,45 mg/L, κατά μέσο όρο αντίστοιχα. Για το λόγο 5/0,25, τα λιπίδια είχαν τιμές από 8,8±0,35% έως 26,5±1,59%. Οι βιομάζες αυτής της σειράς ήταν από 854,78-1702,48mg/L, κατά μέσο όρο αντίστοιχα. Στη τρίτη πορεία, έγινε μία δοκιμαστική ανάπτυξη του στελέχους, χορηγώντας του σκόνη ηλιόσπορου(πηγή οργανικού αζώτου για αμινοξέα/πρωτεΐνες) εκχυλισμένη με NaOH 0,25N και οξυγόνο, αφαιρώντας τα διττανθρακικά από το υπόστρωμα. Τέλος, στο στέλεχος έγινε ακόμα μία δοκιμή με τυρόγαλο, στο θρεπτικό υπόστρωμα. Σχεδιάστηκαν δύο πορείες, εκ των οποίων η μία περιείχε και 10g/L γλυκερόλης. Χρόνος ανάπτυξης ήταν 6 μέρες, παρουσία οξυγόνου. Το στέλεχος απέδωσε 2,93 g/L βιομάζας κατά μέσο όρο στις καλλιέργειες χωρίς γλυκερόλη και 5,67 g/L σε αυτές με γλυκερόλη. Όσο για τα αποτελέσματα στα λιπίδια, οι τιμές που αντιστοιχούν στις καλλιέργειες χωρίς γλυκερόλη, είναι από 6,68±0,31% έως 9,3±0,44%, ενώ στις καλλιέργειες με γλυκερόλη, ξεκινούν από 12,52±0,68% και φτάνουν έως 12,81±0,55%, αντίστοιχα.

ABSTRACT

In this project, cultivations of the microalgae *Auxenochlorella protothecoides* SAG 211-8d, were grown under mixotrophic conditions in order to produce lipids and other value-added products (dietary supplements, pharmaceuticals products, etc.). Four experimental paths were designed, with analyzes on carbohydrates, proteins, lipids and pigments. The purpose of the analyzes, was the biochemical characterization of the strain, under various conversions in the glycerol/peptone ratio. On the first path, the cultures were designed to grow with the ratio glycerol/peptone, having 5g/L of pure derived glycerol and peptone with a price range, from 0,125-2g/L. The results of the analyzes, on average % of lipids for this series, vary from $10,47 \pm 0,47\%$ to $17,83 \pm 0,81\%$, with various fluctuations in between. Biomass from 0.125-2g/L peptone, begins with 933.28mg/L and reaches up to 1051.51mg/L, on average. In the second procedure, the glycerol/peptone ratios, 5/2 and 5/0.25 from the first procedure were selected and processed at concentrations two to ten times higher than the original ratio, creating the 2nd and 3rd series. At the highest concentrations of the 5/2 glycerol/peptone ratio, lipids on average, ranged from $9.66 \pm 0.41\%$ to $21.56 \pm 1.65\%$, while biomass ranged from 2591.04 mg/L to 4138.45 mg/L, on average respectively. For the 5/0.25 ratio, lipids ranged from $8.8 \pm 0.35\%$ to $26.5 \pm 1.59\%$. The biomass of this series was 854.78-1702.48mg/L, on average. In the third procedure, a test growth of the strain was performed by administering sunflower powder (source of organic nitrogen for amino acids/proteins) extracted with 0.25N NaOH and oxygen, removing the bicarbonate from the substrate. Finally, another test was performed on the strain with whey, on the nutrient substrate. Two courses were designed, one of which also contained 10g/L of glycerol. Growth time was 6 days, in the presence of oxygen. The strain yielded an average of 2.93 g/L biomass in the glycerol-free cultures and 5.67 g/L in those with glycerol. As for the results in lipids, the values corresponding to the cultures without glycerol, are from $6.68 \pm 0.31\%$ to $9.3 \pm 0.44\%$, while in the cultures with glycerol, they start from $12.52 \pm 0,68\%$ and reach up to $12.81 \pm 0.55\%$, respectively.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο	Σελίδα
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.1.1 Μία σφαιρική εικόνα για τα μικροφύκη.....	1
1.2 Ανάπτυξη και τροφοδοσία καλλιεργειών	3
1.2.1 Συστήματα ανάπτυξης και τροφοδοσίας των καλλιεργειών.....	3
1.3 Μέθοδος ανάπτυξης των καλλιεργειών	6
1.3.1 Επιλογή κατάλληλης μεταβολικής οδού.....	6
1.4 Περιγραφή στελέχους για υλοποίηση της έρευνας.....	7
1.4.1 Ανασκόπηση της <i>A.protothecoides</i>	7
1.5 Σημαντικές ενδοκυτταρικές λειτουργίες.....	9
1.5.1 Ενδοκυτταρικοί κύκλοι και δομικές τροπολογίες.....	9
1.6 Παράμετροι που επηρεάζουν την ανάπτυξη των καλλιεργειών.....	10
1.6.1 Ιδανικό pH ανάπτυξης και θερμοκρασία.....	10
1.6.2 Φωτισμός και επιλογή οργανικής πηγής για τη καλλιέργεια.....	11
II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 Υλικά και μέθοδοι.....	14
2.1.1 Σχεδιασμός πειραματικών πορειών και τύπος εξαγωγής της έρευνας.....	14
2.1.2 Θρεπτικά υποστρώματα και pH των τριών πρώτων σειρών.....	15
2.1.3 Θρεπτικά υποστρώματα και pH τρίτης και τέταρτης πορείας.....	17
2.2 Εξοπλισμός μετρήσεων, εμβολιασμών και παρασκευής αντιδραστηρίων	18
2.2.1 Εμβολιασμός.....	18
2.2.2 Παρασκευή του αντιδραστηρίου Na ₂ CO ₃ 2% με NaOH 0,1N.....	18
2.2.3 Παρασκευή αντιδραστηρίου σουλφο-φωσφο-βανιλίνης.....	18
2.2.4 Γενική εικόνα εξοπλισμού	18
2.3 Βασικές αρχές και μέθοδοι αναλύσεων-μετρήσεων.....	19
2.3.1 Μέθοδοι και νόμοι οπτικής απορρόφησης αναλύσεων.....	19
2.3.2 Το φασματοφωτόμετρο.....	20
2.3.3 Χρωματομετρικοί μέθοδοι αναλύσεων.....	20
2.4 Μέτρηση και υπολογισμοί αποτελεσμάτων των αναλύσεων.....	22
2.4.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης και υπολογισμός βιομάζας.....	22
2.4.2 Υπολογισμός βιομάζας πειραματικών σειρών.....	23
2.4.3 Υδατάνθρακες.....	24
2.4.4 Πρωτεΐνες.....	24
2.4.4.1 Υπολογισμός πρωτεϊνών στην ηλιόσκονη.....	26
2.4.4.2 Μέτρηση πρωτεϊνών στο τυρόγαλο.....	27
2.4.5 Λιπίδια.....	27
2.4.6 Χρωστικές.....	29
2.4.7 Στατιστικοί υπολογισμοί.....	30

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Αποτελέσματα και συζήτηση.....	31
3.1.1 Αποτελέσματα μετρήσεων 1 ^{ης} πορείας.....	31
3.2 Αποτελέσματα 2 ^{ης} πορείας.....	39
3.2.1 Αποτελέσματα 2 ^{ης} σειράς.....	39
3.2.2 Αποτελέσματα 3 ^{ης} σειράς.....	48
3.3 Αποτελέσματα 3 ^{ης} πορείας.....	56
3.3.1 Αποτελέσματα μετρήσεων 3 ^{ης} πορείας.....	56
3.4 Αποτελέσματα 4 ^{ης} πορείας.....	58
3.4.1 Αποτελέσματα 4 ^α σειράς.....	58
3.4.2 Αποτελέσματα 4 ^β σειράς.....	65
3.5 Αδυναμίες παρούσας πτυχιακής.....	72
3.5.1 Παράγοντες που επηρέασαν τα αποτελέσματα.....	72
3.6 Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	74
3.6.1 Σύγκριση ευρημάτων με ήδη υπάρχοντα αποτελέσματα.....	74

IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Συμπεράσματα πρακτικής αξίας της έρευνας.....	76
4.1.1 Παρουσίαση συμπερασμάτων πρακτικής αξίας.....	76

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79
--------------------	----

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	79
------------------------------	----

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	81
----------------------------	----

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	82
-------------------	----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας	Σελίδα
Πίνακας 2.1 Μέτρηση pH 1 ^{ης} πορείας	16
Πίνακας 2.2 Μέτρηση pH 2 ^{ης} σειράς	16
Πίνακας 2.3 Μέτρηση pH 3 ^{ης} σειράς	16
Πίνακας 2.4 pH συστατικών Θ.Υ. 1 ^{ης} πορείας	16
Πίνακας 2.5 pH συστατικών Θ.Υ. 2 ^{ης} και 3 ^{ης} σειράς.....	17
Πίνακας 2.6 pH Θ.Υ. με προσθήκη ηλίδσκονης.....	17
Πίνακας 2.7 pH Θ.Υ. με προσθήκη τυρόγαλου	17
Πίνακας 3.1 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 1 ^{ης} πορείας πριν τις φυγοκεντρίσεις....	31
Πίνακας 3.2 Βιομάζα 1 ^{ης} πορείας πριν τις φυγοκεντρίσεις	31
Πίνακας 3.3 Μέσοι όροι βιομάζας 1 ^{ης} πορείας πριν τις φυγοκεντρίσεις	32
Πίνακας 3.4 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 1 ^{ης} πορείας μετά τις φυγοκεντρίσεις...	32
Πίνακας 3.5 Βιομάζα 1 ^{ης} πορείας μετά τις φυγοκεντρίσεις.....	32
Πίνακας 3.6 Μέσοι όροι βιομάζας 1 ^{ης} πορείας μετά τις φυγοκεντρίσεις	33
Πίνακας 3.7 Αραιώσεις αναλύσεων 1 ^{ης} πορείας.....	34
Πίνακας 3.8 Συνολικά αθροίσματα αναλύσεων 1 ^{ης} πορείας	38
Πίνακας 3.9 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 2 ^{ης} σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις	40
Πίνακας 3.10 Βιομάζα 2 ^{ης} σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις	40
Πίνακας 3.11 Μέσοι όροι βιομάζας 2 ^{ης} σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις.....	40
Πίνακας 3.12 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 2 ^{ης} σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις...	41
Πίνακας 3.13 Βιομάζα 2 ^{ης} σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις.....	41
Πίνακας 3.14 Μέσοι όροι βιομάζας μετά τις φυγοκεντρίσεις	41
Πίνακας 3.15 Αραιώσεις αναλύσεων 2 ^{ης} σειράς.....	42
Πίνακας 3.16 Συνολικά αθροίσματα αναλύσεων 2 ^{ης} σειράς	47
Πίνακας 3.17 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 3 ^{ης} σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις ...	48
Πίνακας 3.18 Βιομάζα 3 ^{ης} σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις	49
Πίνακας 3.19 Μέσοι όροι βιομάζας 3 ^{ης} σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις.....	49
Πίνακας 3.20 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 3 ^{ης} σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις...	49
Πίνακας 3.21 Βιομάζα 3 ^{ης} σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις.....	49
Πίνακας 3.22 Μέσοι όροι βιομάζας 3 ^{ης} σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις	50
Πίνακας 3.23 Αραιώσεις αναλύσεων 3 ^{ης} σειράς.....	51
Πίνακας 3.24 Συνολικό άθροισμα αναλύσεων 3 ^{ης} σειράς	56
Πίνακας 3.25 Εκχύλιση ηλίδσκονης σε διάφορες κανονικότητες NaOH	57
Πίνακας 3.26 Αραιώσεις εκχυλισμένης με NaOH 0,25N ηλίδσκονη.....	57
Πίνακας 3.27 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 4 ^α σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις....	59
Πίνακας 3.28 Βιομάζα 4 ^α σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις	59
Πίνακας 3.29 Μέσοι όροι βιομάζας 4 ^α σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις.....	59
Πίνακας 3.30 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 4 ^α σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις....	60
Πίνακας 3.31 Βιομάζα 4 ^α σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις.....	60
Πίνακας 3.32 Μέσοι όροι βιομάζας 4 ^α σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις	60
Πίνακας 3.33 Αραιώσεις 4 ^α σειράς.....	61
Πίνακας 3.34 Συνολικό άθροισμα αναλύσεων 4 ^α σειράς	65
Πίνακας 3.35 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 4β σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις....	65
Πίνακας 3.36 Βιομάζα 4β σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις.....	65
Πίνακας 3.37 Μέσοι όροι βιομάζας 4β σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις	65
Πίνακας 3.38 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 4β σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις ...	66
Πίνακας 3.39 Βιομάζα 4β σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις	67

Πίνακας 3.40 Μέσοι όροι βιομάζας 4β σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις.....	68
Πίνακας 3.41 Αραιώσεις 4β σειράς	68
Πίνακας 3.42 Συνολικό άθροισμα αναλύσεων 4β σειράς.....	71

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα	Σελίδα
Γράφημα 2.1.Πρότυπη καμπύλη βιομάζας	23
Γράφημα 2.2 Πρότυπη καμπύλη υδατανθράκων	25
Γράφημα 2.3 Πρότυπη καμπύλη πρωτεϊνών	26
Γράφημα 2.4.Πρότυπη καμπύλη λιπιδίων	29
Γράφημα 3.1 Βιομάζα 1 ^{ης} πορείας	33
Γράφημα 3.2. Υδατάνθρακες 1 ^{ης} πορείας.....	34
Γράφημα 3.3 Πρωτεΐνες 1 ^{ης} πορείας.....	35
Γράφημα 3.4 Λιπίδια 1 ^{ης} πορείας.....	36
Γράφημα 3.5 Χλωροφύλλες α, β και ολικά καροτενοειδή 1 ^{ης} πορείας	37
Γράφημα 3.6 Ολική χλωροφύλλη 1 ^{ης} πορείας	38
Γράφημα 3.7 Βιομάζα 2 ^{ης} σειράς.....	41
Γράφημα 3.8 Υδατάνθρακες 2 ^{ης} σειράς.....	42
Γράφημα 3.9 Πρωτεΐνες 2 ^{ης}	43
Γράφημα 3.10 Λιπίδια 2 ^{ης} σειράς	44
Γράφημα 3.11 Χλωροφύλλες α, β και ολικά καροτενοειδή 2 ^{ης} σειράς	46
Γράφημα 3.12 Ολική χλωροφύλλη 2 ^{ης} σειράς.....	46
Γράφημα 3.13 Βιομάζα 3 ^{ης} σειράς.....	50
Γράφημα 3.14 Υδατάνθρακες 3 ^{ης} σειράς.....	51
Γράφημα 3.15 Πρωτεΐνες 3 ^{ης} σειράς.....	52
Γράφημα 3.16 Λιπίδια 3 ^{ης} σειράς	53
Γράφημα 3.17 Χλωροφύλλες α, β και ολικά καροτενοειδή 3 ^{ης} σειράς	54
Γράφημα 3.18 Ολική χλωροφύλλη 3 ^{ης} σειράς.....	55
Γράφημα 3.19 Πειραματική εκχύλιση ηλιόσκονης	57
Γράφημα 3.20 Βιομάζα 4 ^α σειράς.....	61
Γράφημα 3.21 Υδατάνθρακες 4 ^α σειράς.....	62
Γράφημα 3.22 Πρωτεΐνες 4 ^α σειράς.....	63
Γράφημα 3.23 Λιπίδια 4 ^α σειράς	64
Γράφημα 3.24 Βιομάζα 4β σειράς	68
Γράφημα 3.25 Υδατάνθρακες 4β σειράς	69
Γράφημα 3.26 Πρωτεΐνες 4β σειράς.....	70
Γράφημα 3.27 Λιπίδια 4β σειράς.....	71

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα	Σελίδα
Εικόνα 1.1 Αποικίες <i>A.protothecoides</i> από streaking.....	8
Εικόνα 1.2 Θερμόμετρο στο χώρο ανάπτυξης των καλλιεργειών.....	11
Εικόνα 1.3 Ανάπτυξη καλλιεργειών μικροφυκών με φωτισμό 16/8 ώρες φως/σκοτάδι.....	13
Εικόνα 2.1 Σχεδιασμός πειραματικών πορειών.....	15
Εικόνα 2.2 Μέρος εξοπλισμού για τη παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος.....	19
Εικόνα 2.3 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης.....	22
Εικόνα 3.1 Μέτρηση υδατανθράκων 1 ^{ης} πορείας.....	35
Εικόνα 3.2 Μέτρηση πρωτεϊνών 1 ^{ης} πορείας.....	36
Εικόνα 3.3 Μέτρηση λιπιδίων 1 ^{ης} πορείας.....	37
Εικόνα 3.4 Μέτρηση χρωστικών 1 ^{ης} πορείας.....	38
Εικόνα 3.5 Συλλογή βιομάζας 1 ^{ης} πειραματικής πορείας.....	39
Εικόνα 3.6 Μέτρηση υδατανθράκων 2 ^{ης} σειράς.....	43
Εικόνα 3.7 Μέτρηση πρωτεϊνών 2 ^{ης} σειράς.....	44
Εικόνα 3.8 Μέτρηση λιπιδίων 2 ^{ης} σειράς.....	45
Εικόνα 3.9 Μέτρηση χρωστικών 2 ^{ης} σειράς.....	47
Εικόνα 3.10 Συλλογή βιομάζας 2 ^{ης} σειράς.....	48
Εικόνα 3.11 Μέτρηση υδατανθράκων 3 ^{ης} σειράς.....	52
Εικόνα 3.12 Μέτρηση πρωτεϊνών 3 ^{ης} σειράς.....	53
Εικόνα 3.13 Μέτρηση λιπιδίων 3 ^{ης} σειράς.....	54
Εικόνα 3.14 Μέτρηση χρωστικών 3 ^{ης} σειράς.....	55
Εικόνα 3.15 Συλλογή βιομάζας 3 ^{ης} σειράς.....	56
Εικόνα 3.16 Μέτρηση πρωτεϊνών εκχυλισμένης ηλιόσκονης με NaOH 0,25N.....	60
Εικόνα 3.17 Βιομάζες 4 ^{ης} πορείας.....	60
Εικόνα 3.18 Μέτρηση υδατανθράκων 4 ^α σειράς.....	64
Εικόνα 3.19 Μέτρηση πρωτεϊνών 4 ^α σειράς.....	65
Εικόνα 3.20 Μέτρηση λιπιδίων 4 ^α σειράς.....	66
Εικόνα 3.21 Μέτρηση OD καθαρής βιομάζας 4 ^α και 4 ^β σειράς.....	68
Εικόνα 3.22 Καθαρισμός βιομάζας 4 ^β σειράς.....	69
Εικόνα 3.23 Μέτρηση υδατανθράκων 4 ^β σειράς.....	71
Εικόνα 3.24 Μέτρηση πρωτεϊνών 4 ^β σειράς.....	72
Εικόνα 3.25 Μέτρηση λιπιδίων 4 ^β σειράς.....	73

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.1 Μία σφαιρική εικόνα για τα μικροφύκη

Ένα από τα θέματα που απασχολεί τη παγκόσμια επιστημονική και βιομηχανική κοινότητα είναι η αναζήτηση, αλλά και η εύρεση σταθερών πηγών ανανεώσιμης ενέργειας. Η αναγκαιότητα της αναζήτησης αυτής, στηρίζεται κατά κύριο λόγο σε δύο πυλώνες. Ο πρώτος, είναι η μείωση της ποσότητας των ορυκτών καυσίμων από τις πετρελαιοπηγές. Ο δεύτερος πυλώνας, είναι οι επιπτώσεις τόσο στο περιβάλλον, όσο και στην υγεία των ανθρώπων. Η επιβάρυνση της ατμόσφαιρας και η υπερθέρμανση του πλανήτη, δημιουργούν ανάγκη, να στραφούμε σε πιο φυσικές πηγές καυσίμων. Τα βιοκαύσιμα, λοιπόν, είναι ένα εναλλακτικό μέσον για την επίτευξη αυτού του σκοπού. Βιοκαύσιμα, θεωρούνται όλα τα στερεά, υγρά και αέρια καύσιμα, που προέρχονται από τη βιομάζα(φυτικά υλικά, φύκη, ζωϊκά απόβλητα). Η χρησιμότητά τους, είναι μεγάλη καθώς, συμβάλλουν στη προστασία του περιβάλλοντος λόγω μείωσης εκπομπών επικίνδυνων αερίων στην ατμόσφαιρα, αξιοποιούν την υπολειμματική βιομάζα, σώζοντας έτσι υδροφόρους ορίζοντες και τέλος, δημιουργούν νέες ευκαιρίες στον αγροτικό τομέα, αλλά και τη μεταποίηση της βιομηχανίας. Τα βιοκαύσιμα, χωρίζονται σε τέσσερις γενιές. Στη πρώτη γενιά, κατατάσσονται τα βιοκαύσιμα που αποσκοπούν στη παραγωγή βιοκαυσίμων, από διαθέσιμες πρώτες ύλες. Αυτά έχουν προέλευση, ζωϊκά λίπη, φυτικά έλαια, διάφορα σάκχαρα και βιομάζα(στερεή, απόβλητη κλπ). Μία δυσκολία που εμφανίζεται εδώ, είναι το γεγονός ότι οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή τους, είναι διατροφικής αξίας στις τροφικές αλυσίδες ανθρώπων και ζώων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, τη μείωση της βιοποικιλότητας, ενώ παράλληλα σχηματίζονται και βιομηχανικά παραπροϊόντα. Στη δεύτερη γενιά, κατατάσσονται τα βιοκαύσιμα, που αποσκοπούν στη χρήση πρώτων υλών, που δεν προορίζονται για τροφές. Κάποια από αυτά προέρχονται από υπολειμματικές και απόβλητες μορφές, προϊόντων της πρώτης γενιάς. Μειονέκτημα που τα υποβαθμίζει, είναι η διαθεσιμότητα πρώτων υλών και εκτάσεων ή υδάτων για καλλιέργειες. Συνεχίζοντας, ακολουθούν τα βιοκαύσιμα τρίτης γενιάς. Σκοπός τους είναι η αύξηση παραγωγής πρώτων υλών, ενώ η προέλευση και η χρήση τους βρίσκεται γύρω από τα μικροφύκη. Εδώ, υπάρχουν πλεονεκτήματα τόσο στο γεγονός ότι, καταναλώνεται CO₂ από την ατμόσφαιρα, όσο και στο γεγονός ότι μπορούν να αποδώσουν μέχρι και 30 φορές παραπάνω ενέργεια, ανά καλλιεργήσιμη έκταση. Τέλος, έχουμε τα βιοκαύσιμα τέταρτης γενιάς, που σκοπεύουν την ανάπτυξη καλλιεργειών με

αυξημένη δέσμευση CO₂ και τη παραγωγή βιοκαυσίμων αρνητικού άνθρακα, με γεω-αποθήκευση CO₂(agroenergy.gr/categories/βιοκαύσιμα). Δεδομένου όμως τις απαιτήσεις των δύσκολων τωρινών καταστάσεων, λόγω μείωσης των αποθεμάτων σε κοιτάσματα πετρελαίου και την επιβάρυνση της ατμόσφαιρας, αποσκοπούμε στην εύρεση ενεργειακών πηγών, όπου θα είναι ικανές να ξεπεράσουν τα εμπόδια, που αντιμετωπίζουμε με τη πρώτη και τη δεύτερη γενιά βιοκαυσίμων. Οπότε το ενδιαφέρον, στρέφεται στα μικροφύκη. Τα μικροφύκη είναι μονοκύτταροι, φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί, που μπορούν να καταναλώσουν ανόργανο άνθρακα και να απορροφήσουν φωτόνια. Χρησιμοποιούν το ηλιακό φως για τη παραγωγή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), με την οποία συνθέτουν λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες(<https://www.certh.gr/dat/0D92D187/file.pdf>, 2007). Στηριζόμενοι σε αναφορές από το βιβλίο του Majid Hosseini(2019a), υπολογίζεται ότι τα μικροφύκη βιοχημικά, αποτελούνται από 30-50% πρωτεΐνες, 20-40% υδατάνθρακες και 8-15% λιπίδια. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, προτιμώνται για τη παραγωγή βιοκαυσίμων, λόγω κάποιων πλεονεκτημάτων, τα οποία είναι:

- η ικανότητα τους να παράγουν μεγάλες ποσότητες βιομάζας αλλά και λιπιδίων
- ότι μπορούν να αναπτυχθούν σε ποικίλα περιβάλλοντα, ακόμη και αν αυτά είναι πιο ασφυκτικά(αυξημένη αλατότητα, χαμηλές/υψηλές τιμές pH κλπ.)
- ότι μπορούν επίσης να αναπτυχθούν, σε θερμοκρασίες από 20-30°C και σε άγρονη γη
- παραμένουν μια σταθερή πηγή ενέργειας με τη δυνατότητα συνεχούς επεξεργασίας
- λόγω υψηλής φωτοσυνθετικής δράσης, μπορούν να συμβάλλουν στη ρύθμιση του διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα
- παράγουν βιώσιμους υδρογονάνθρακες για πολλά προϊόντα
- είναι κάτι που σχεδόν όλοι μπορούν να αναπτυχθούν
- Τα βιοκαύσιμα φυκών συνεργάζονται με το τρέχον σύστημα διανομής μας.

Πέρα από όλα αυτά τα πλεονεκτήματα όμως, υπάρχουν και κάποια μειονεκτήματα(futureofworking.com, 2021). Κάποια από αυτά τα μειονεκτήματα είναι ότι:

- Τα φύκια έχουν τις ίδιες ανησυχίες για τη μονοκαλλιέργεια που βιώνει η γεωργική βιομηχανία(ρύπανση υδάτων, αποτυχία παραγωγής, ανάπτυξη παρασίτων, κλπ),

- Η ανάπτυξη φυκών μπορεί να δημιουργήσει ποιοτικές παραλλαγές, κατά τη διαδικασία βελτίωσης των προϊόντων,
- Τα βιοκαύσιμα φυκών δεν πληρούν πάντα τους στόχους ενεργειακής απόδοσης,
- Η ανάπτυξη φυκών δημιουργεί περιφερειακά προβλήματα αειφορίας,
- Τα φύκια μπορεί να αναπτυχθούν γρήγορα, αλλά χρειάζεται περεταίρω χρόνος και επεξεργασία για την παραγωγή βιώσιμων ελαίων,
- Τα βιοκαύσιμα φυκών έχουν υψηλότερο κόστος παραγωγής,
- Η ανάπτυξη φυκών απαιτεί υψηλά επίπεδα λιπασμάτων για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής. Στο κομμάτι που αφορά τα θρεπτικά συστατικά, χρειάζονται στοιχεία όπως άζωτο, φώσφορο, σίδηρο, κάτι το οποίο στέκεται εν μέρει σαν εμπόδιο, κυρίως οικονομικά(Sandeep Kumar Duran, Pramod Kumar & Sarbjot S.Sandhu, 2018a). Η απάντηση όμως και πάλι μπορεί να δοθεί, με την αξιοποίηση αποβλήτων, στα οποία εμπεριέχονται διάφορα νιτρικά και φωσφορικά άλατα και τα οποία, μπορούν ευκόλως να καταναλωθούν από τα μικροφύκη
- Τα φύκια απαιτούν σημαντικούς υδάτινους πόρους(έκταση γης), για την παραγωγή λαδιού για συλλογή,
- Επιμολύνσεις σε καλλιέργειες φυκών με μεθόδους παραγωγής μεγάλης κλίμακας, συμβαίνουν συχνότερα.

Για να μπορέσει, εν τέλει να επιτευχθεί η ανάπτυξη καλλιεργειών με μικροφύκη, θα πρέπει να εφαρμοστεί και το κατάλληλο σύστημα ανάπτυξης. Λαμβάνεται υπόψιν, πάντοτε η επιλογή συστήματος, που πληρεί τα επιθυμητά κριτήρια.

1.2 Ανάπτυξης και τροφοδοσία καλλιεργειών

1.2.1 Συστήματα ανάπτυξης και τροφοδοσίας των καλλιεργειών

Για τα μικροφύκη, χρησιμοποιούνται δύο τύποι συστημάτων καλλιέργειας(Sandeep Kumar Duran, Pramod Kumar & Sarbjot S. Sandhu, 2018b). Το πρώτο, είναι το ανοιχτό σύστημα. Στο σύστημα αυτό, έχουμε ένα υδατικό κύκλωμα, βάθος ενός ποδιού(0,3m), το οποίο περιβάλλεται από τσιμέντο, ενώ στο εσωτερικό του έχει τοποθετηθεί πλαστικό, προς αποφυγή διαρροών και μείωση επιμολύνσεων. Επιπλέον, υπάρχουν κουπιά εντός του συστήματος, ώστε να αναμιγνύονται τα θρεπτικά συστατικά με τα μικροφύκη. Τα θρεπτικά συστατικά εισάγονται είτε κατευθείαν, είτε μέσω του καναλιού. Όσο για το κλειστό σύστημα, είναι πιο δαπανηρό από το ανοιχτό σύστημα, όμως εδώ έχουμε μικρότερες πιθανότητες επιμόλυνσης, ένα καλά ελεγχόμενο

περιβάλλον και μεγαλύτερες αποδόσεις βιομάζας. Συνήθως, χρησιμοποιούνται περιστρεφόμενοι πλαστικοί σωλήνες, ώστε να διεισδύει το ηλιακό φως στη καλλιέργεια. Και πάλι όμως, το σύστημα, τα υλικά και ο εξοπλισμός που θα χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη μιας καλλιέργειας, είναι στην επιλογή του καθενός. Ωστόσο και τα δύο προαναφερόμενα συστήματα έχουν κάποια μειονεκτήματα. Στο ανοιχτό σύστημα, έχουμε προβλήματα με επιμολύνσεις, το κόστος της γης, τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και ακόμα και το ίδιο το νερό που χρησιμοποιείται στο σύστημα παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη της καλλιέργειας. Παράλληλα, η εξάτμιση του νερού σε συνδυασμό με τα προαναφερθέντα, ωθεί σε παραγωγή λιγότερης βιομάζας. Από την άλλη, το κλειστό σύστημα έχει το αυξημένο κόστος και την έλλειψη διοξειδίου του άνθρακα. Γενικότερα, το ανοιχτό σύστημα διαφημίζεται περισσότερο, αλλά πιο ασφαλές και αποδοτικό, φαίνεται να είναι το κλειστό. Παράλληλα, όσον αφορά τη τροφοδοσία των καλλιεργειών, βρίσκουμε 3 τύπους τροφοδοσίας με θρεπτικό υπόστρωμα (<https://www.infors-ht.com/>, 2020). Η πρώτη είναι η batch τροφοδοσία. Σε αυτή τα θρεπτικά συστατικά προστίθενται μόνο στην αρχή της διαδικασίας και όχι ενδιάμεσα, κατά την εξέλιξη της. Η τροφοδοσία αυτή τη χρησιμοποιείται συνήθως για χαρακτηρισμό στελεχών αλλά και για βελτιστοποίηση κάποιου θρεπτικού μέσου. Είναι ένα κλειστό κύκλωμα, του οποίου

τα θετικά, είναι :

- η σύντομη διάρκειά του,
- η αποφυγή επιμολύνσεων,
- η ευκολία στη διαχείριση και
- ο εντοπισμός/ανιχνευσιμότητα επιθυμητών προϊόντων ή μικροοργανισμών.

Από την άλλη, μερικά ζητήματα που δημιουργούνται, είναι :

- Μετά το τέλος μίας batch τροφοδοσίας, μόνο η βιομάζα ή το μέσο συλλέγεται και υποβάλλεται σε κατάλληλη επεξεργασία για να ληφθεί το επιθυμητό προϊόν,
- η μικρότερη παραγωγή βιομάζας/προϊόντων λόγω μειωμένης διάρκειας της διαδικασίας και έλλειψης θρεπτικών συστατικών,
- η ανάμιξη προϊόντων με δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού των μικροοργανισμών, κάτι που θα οδηγήσει σε απαραίτητο καθαρισμό αυτών,
- αυξημένος κίνδυνος αναστολής υποστρώματος ή προϊόντος(κυρίως σε βιοαντιδραστήρες). Αυτό συμβαίνει, λόγω παρεμβολής της ενζυμικής δραστηριότητας από την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων υποστρώματος ή

προϊόντος, η οποία μπορεί να προκαλέσει μεταβολική ανάδραση, που μπορεί να μειώσει δραστικά την απόδοση. Επιπλέον, (στου βιοαντιδραστήρες) η διαδικασία διακόπτεται επανειλημμένα με στάδια καθαρισμού και αποστείρωσης και η βιομάζα παράγεται μόνο σταδιακά,

Προχωρώντας, έχουμε τη τροφοδοσία fed batch. Σε αυτή, η τροφοδοσία της καλλιέργειας είναι ημισυνεχής και συνήθως το θρεπτικό υποστρώμα χορηγείται μέσω πλαστικού σωλήνα στη καλλιέργεια. Δίνεται η δυνατότητα επιλογής του ρυθμού τροφοδοσίας της καλλιέργειας, είτε χειροκίνητα(πχ παλμικά, γραμμικά), είτε μπορούν να προστεθούν επιπλέον συστατικά υπό ορισμένες συνθήκες πχ συγκεκριμένη συγκέντρωση βιομάζας ή μείωση συστατικών του θρεπτικού υποστρώματος. Είναι ένα μερικώς ανοιχτό σύστημα και τα θετικά που έχει, είναι :

- Η επέκταση παραγωγικής διάρκειας των καλλιεργειών(αυξημένη εκθετική φάση),
- Η δυνατότητα μέγιστης παραγωγικότητας, με κατάλληλες τεχνικές χορήγησης του θρεπτικού υποστρώματος στη καλλιέργεια
- Η ενεργοποίηση/απενεργοποίηση γονιδίων(των στελεχών που εμπεριέχονται στη καλλιέργεια), με εναλλαγές θρεπτικών υποστρωμάτων.

Όπως είναι φυσικώς αναμενόμενο, υπάρχουν και κάποια αρνητικά, τα οποία είναι:

- Υψηλότερες πιθανότητες επιμολύνσεις,
- συσσώρευση παραπροϊόντων του μεταβολισμού,
- συσσώρευση μεγάλης απόδοσης προϊόντων και παραγωγής βιομάζας, τα οποία δημιουργούν σημεία συμφόρησης(δηλαδή ο διαχωρισμός προϊόντος/βιομάζας μέσα στη καλλιέργεια, δε γίνεται εύκολα, μπλοκάροντας τη ροή και τη διάχυση υγρού στο βιοαντιδραστήρα).

Τέλος, ένας ακόμη τροφοδοτικός τύπος είναι η συνεχής τροφοδοσία(continuous batch). Εδώ, ουσιαστικά αποκαλύπτεται η ισορροπία μεταξύ κάποιας φάσης ανάπτυξης της καλλιέργειας, με ένα συγκεκριμένο συστατικό του θρεπτικού υποστρώματος(με την αύξηση ή τη μείωση αυτού). Δηλαδή, για όση ποσότητα νέου θρεπτικού υποστρώματος προστίθεται, αφαιρείται ανάλογη ποσότητα παλαιότερου υποστρώματος, μαζί με τα διάφορα παραπροϊόντα που προκύπτουν. Υπάρχουν 3 τύποι συνεχούς τροφοδοσίας. Πρώτος είναι ο χημειοστάτης. Κατά τη διαδικασία αυτή, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων ελέγχεται από το ρυθμό προσθήκης μεμονωμένου υποστρώματος. Με λίγα λόγια, η ανάπτυξη των κυττάρων μιας καλλιέργειας, βρίσκεται σε αναλογία με τη

ποσότητα του υποστρώματος που προστίθεται σε αυτή, χρονικά. Ακολουθεί ο θολοστάτης, στον οποίο μετρώντας τον αριθμό των κυττάρων(οπτική πυκνότητα, θολότητα) σε μια καλλιέργεια, ελέγχεται η προσθήκη/αφαίρεση υγρού από αυτήν. Η πρόσθεση/αφαίρεση υγρού, συνήθως χρειάζεται και έναν επιπρόσθετο αισθητήρα, αλλά μπορεί να πραγματοποιηθεί και από ανατροφοδότηση σε πραγματικό χρόνο. Τελευταίος, μένει ο τύπος της διάχυσης. Ο τύπος αυτός, βασίζεται είτε στη διατήρηση των κυττάρων στο βιοαντιδραστήρα, είτε στην ανακύκλωση των κυττάρων πίσω στο βιοαντιδραστήρα. Παρέχεται φρέσκο υπόστρωμα, ενώ το υπερκείμενο αφαιρείται χωρίς τα κύτταρα. Τα πλεονεκτήματα της συνεχούς τροφοδοσίας, είναι τα εξής :

- Μέγιστη παραγωγικότητα
- Μείωση καθαρισμού, αποστειρώσεων και χειρισμών
- Διατήρηση σταθερών συνθηκών για μεταβολικές μελέτες, όταν πολλά στοιχεία αθροίζονται στο μηδέν.

Ενώ σαν μειονεκτήματα, παρουσιάζονται :

- Αυξημένοι κίνδυνοι μόλυνσεων ή/και γενετικών αλλαγών
- Δυσκολία ιχνηλασιμότητας προϊόντων
- Δυσκολία στη διατήρηση σταθερής πυκνότητας για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

1.3 Μέθοδος ανάπτυξης των καλλιιεργειών

1.3.1 Επιλογή κατάλληλης μεταβολικής οδού

Η επιλογή των μικροφυκών, ως υλικό για πιο οικονομική παραγωγή βιοκαυσίμων, είναι ένα πρώτο σωστό βήμα. Για να επιτευχθεί όμως το μέγιστο αποτέλεσμα, τόσο σε βιομάζα, όσο και στα επιθυμητά λιπίδια, χρειάζεται και η μέγιστη δυνατή μεταχείριση. Με λίγα λόγια, το αμέσως επόμενο ζήτημα είναι ο τρόπος ανάπτυξης. Ένας πολλά υποσχόμενος τρόπος ανάπτυξης που εξετάζεται τελευταία, είναι η μικτοτροφία. Μικτοτροφία είναι μία μεταβολική οδός, κατά την οποία, οι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουν οργανικές και ανόργανες πηγές άνθρακα. Υπάρχει δηλαδή συνδυασμός, ετεροτροφίας και αυτοτροφίας(Silvia Salati et al, 2017). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, ο ανόργανος άνθρακας κατασκευάζεται κατά τη φωτοσύνθεση και επηρεάζεται από την ένταση του φωτισμού, ενώ τα οργανικά συστατικά καταναλώνονται κατά την ετερότροφη διαδρομή και εξαρτώνται από τη διαθεσιμότητα του οργανικού άνθρακα. Τα οφέλη που προσδίδει αυτός ο τρόπος ανάπτυξης είναι:

- Μεγαλύτερη βιομάζα λόγω ταυτόχρονης κατανάλωσης φωσφορικής πεντόζης και φωτοσύνθεσης,
- Εκτεταμένη εκθετική φάση, λόγω ετεροτροφικής συνεισφοράς,
- Μείωση απώλειας βιομάζας, λόγω αναπνοής τις ώρες χωρίς φωτισμό,
- Μείωση φωτο-αναστολής, λόγω ενεργοποίησης εναλλακτικού μονοπατιού φωσφορικής πεντόζης,
- Ευελιξία εναλλαγής σε ετερότροφη ή αυτότροφη λειτουργία, εξαιτίας φωτισμού και/ή διαθεσιμότητας οργανικής πηγής,
- Προστασία από φωτο-οξείδωση εξαιτίας συσσώρευσης οξυγόνου, από την ταχεία χρήση του στην αναπνοή, σε κλειστά συστήματα καλλιέργειας.

Από την άλλη στα μειονεκτήματα αυτής της μεταβολικής οδού, υπάγονται τα εξής:

- Μειωμένη ρύθμιση βιοσύνθεσης χλωροφύλλης
- Μειωμένη δράση των κύκλων του Κρεμπς και Calvin (James Gilmour, 2019).

1.4 Περιγραφή στελέχους για υλοποίηση της έρευνας

1.4.1 Ανασκόπηση της *A. protothecoides*

Στην έρευνα αυτή, χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Auxenochlorella protothecoides*. Το στέλεχος αυτό, παρατηρήθηκε στη Γερμανία και η πρώτη του αναφορά έγινε από τον Krüger το 1894. Το στέλεχος αυτό είναι ένα πράσινο φύκος, το οποίο ανήκει στη τάξη των Trebouxiophyceae. Είναι μονοκυτταρικό και ευκαρυωτικό, ενώ μπορεί και να φωτοσυνθέσει. Η φωτοτροφική ανάπτυξη και τα κύτταρα απαιτούν θειαμίνη και είναι ανίκανα να χρησιμοποιήσουν τα νιτρικά ως πηγή αζώτου. Οι καλλιέργειες μπορούν να αναπτυχθούν σε φως ή σκοτάδι με την προσθήκη κατάλληλων πηγών οργανικού αζώτου. Σε σύγκριση με τα αυτοτροφικά κύτταρα, η ενδοκυτταρική δομή και σύνθεση υφίστανται μεγάλες αλλαγές στα ετεροτροφικά κύτταρα. Το πιο ελκυστικό φαινόμενο είναι η υποβάθμιση του χλωροπλάστη και η συσσώρευση των ελαίων. Τα ετεροτροφικά κύτταρα είναι πιο κατάλληλα για παραγωγή βιοντίζελ λόγω της αύξησης τόσο της απόδοσης βιομάζας (51,2 g/L) όσο και της περιεκτικότητας σε λάδι (55,2%). Έτσι, το *A. protothecoides* μπορεί να χρησιμεύσει ως μοντέλο για τη μελέτη του μηχανισμού υψηλής συσσώρευσης λαδιού και για την εξεύρεση τρόπων για περαιτέρω μείωση του κόστους του βιοντίζελ. Τα κύτταρά του, έχουν έναν εκκεντρικό πυρήνα, κοκκοειδούς σχήματος με 3-6 μm διάμετρο, πολλαπλά μιτοχόνδρια, ένα βρεγματικό και απλό

χλωροπλάστη και δεν είναι ενσωματωμένα στο βλεννογόνο. Το κυτταρικό του τοίχωμα, είναι λείο και αποτελείται από πολλαπλά στρώματα. Αυτά χωρίζονται σε δύο είδη, στα εσωτερικά στρώματα πολυσακχαρίτη και τα εξωτερικά τριμελλαιικά στρώματα. Επιπλέον, το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από υλικό ανθεκτικό στην ακετόνη και δεν περιέχει πυρηνοειδή και δευτερογενή καροτενοειδή. Η παραγωγή αμύλου στο στέλεχος αυτό είναι χαμηλή. Αναπαράγεται ασεξουαλικά με αυτοσπόρια, που απελευθερώνονται από ρήξη των γονικών κυτταρικών τοιχωμάτων, τα οποία παραμένουν ευδιάκριτα στη καλλιέργεια. Οι παλαιότερες καλλιέργειες έχουν ένα κιτρινοπράσινο χρώμα. Η μελέτη της σεξουαλικής τους αναπαραγωγής, έχει ακόμα αρκετά άγνωστα στάδια. Το γένος διακρίνεται εν μέρει από την *Chlorella*, με βάση τη δομή των κυτταρικών του τοιχωμάτων, καθώς και από την επιβεβαίωση του 18S rRNA(algaebase.org 2011, phycocosm.jgi.doe.gov 2017a).



Εικόνα 1.1 Αποικίες *A. protothecoides* από streaking

1.5 Σημαντικές ενδοκυτταρικές λειτουργίες

1.5.1 Ενδοκυτταρικοί κύκλοι και δομικές τροπολογίες

Όπως προαναφέρθηκε, σε αντίθεση με τα περισσότερα φωτοτροφικά πράσινα φύκια, η *A. protothecoides* μπορεί να ζήσει φωτοτροφικά μέσω της φωτοσύνθεσης, αλλά μπορεί επίσης και να χρησιμοποιήσει οργανικά συστατικά απευθείας από το περιβάλλον, έχοντας μια ετεροτροφική ανάπτυξη. Σε σύγκριση με τα φωτοτροφικά κύτταρα, η ενδοκυτταρική δομή και σύνθεση υφίστανται μεγάλες αλλαγές στα ετεροτροφικά κύτταρα. Ένα σημαντικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα, είναι η υποβάθμιση του χλωροπλάστη και η συσσώρευση των λιπαρών σωμάτων(phycococsm.jgi.doe.gov, 2017b). Όπως εύκολα γίνεται αντιληπτό και το στέλεχος αυτό αλλά και γενικότερα τα μικροφύκη, παρουσιάζουν μια ποικιλία δυνατοτήτων. Η ικανότητά τους να προσαρμοστούν και στο σκοτάδι και στο φως, είναι ένα από τα πράγματα τα οποία τα κάνει, ακόμα πιο ανταγωνιστικά. Κατά τη φωτοσύνθεση όμως, δίνεται ένα πάτημα για να κατανοηθούν κάποιες διεργασίες στο εσωτερικό των κυττάρων, του στελέχους αυτού. Πέρα από την αναπνοή και τη διαπνοή που είναι κομμάτι του φωτοσυνθετικού κύκλου, υπάρχουν ακόμα δύο κύκλοι, οι οποίοι είναι ζωτικής σημασίας για τα μικροφύκη. Ένας τέτοιος κύκλος, είναι αυτός του κιτρικού οξέος, γνωστός και ως κύκλος του Κρεμπς. Κατά τη διάρκεια αυτού του κύκλου, αξιοποιείται μια σειρά χημικών αντιδράσεων που χρησιμοποιούνται από όλους τους αερόβιους οργανισμούς για την απελευθέρωση της αποθηκευμένης ενέργειας, μέσω της οξειδωσης του ακέτυλο-συνενζύμου A(acetyl-CoA), που προέρχεται από υδατάνθρακες, λίπη και πρωτεΐνες. Ο κύκλος αυτός παρέχει πρώιμα συστατικά ορισμένων αμινοξέων, καθώς και τον αναγωγικό παράγοντα δινουκλεοτίδιο νικοταδενίνης αδενίνης (NADH), που χρησιμοποιείται σε πολλές άλλες αντιδράσεις. Οι μεταβολίτες δεν είναι απαραίτητο να ακολουθούν μόνο μία συγκεκριμένη οδό. Έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον τρία τμήματα του κύκλου κιτρικού οξέος. Το όνομα αυτής της μεταβολικής οδού προέρχεται από το κιτρικό οξύ, που καταναλώνεται και στη συνέχεια αναγεννιέται από αυτήν την ακολουθία αντιδράσεων για να ολοκληρωθεί ο κύκλος. Ο κύκλος καταναλώνει οξικό άλας(με τη μορφή acetyl-CoA) και νερό, ώστε να μειώσει το NAD^+ σε NADH, απελευθερώνοντας διοξείδιο του άνθρακα. Το NADH που παράγεται από τον κύκλο κιτρικού οξέος, τροφοδοτείται στην οδό οξειδωτικής φωσφορυλίωσης(μεταφορά ηλεκτρονίων). Το καθαρό αποτέλεσμα αυτών των δύο στενά συνδεδεμένων οδών, είναι η οξείδωση των θρεπτικών ουσιών για την παραγωγή χρήσιμης χημικής ενέργειας, με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ο κύκλος του

κιτρικού οξέος εμφανίζεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου(<https://en.wikipedia.org/>). Ένας ακόμη πολύ σημαντικός κύκλος που λαμβάνει χώρα, είναι ο κύκλος του Calvin. Κατά το κύκλο αυτό, αντιδράσεις που είναι ανεξάρτητες από το φως στη φωτοσύνθεση, λαμβάνουν χώρα σε τρία βασικά βήματα. Ο κύκλος Calvin εξαρτάται έμμεσα από το φως, καθώς οι απαραίτητοι ενεργειακοί φορείς (ATP και NADPH), είναι προϊόντα αντιδράσεων που εξαρτώνται από το φως. Οι αντιδράσεις ωστόσο, σε αυτό το κύκλο είναι ανεξάρτητες από το φως. Ρίχνοντας συνοπτικά μία ματιά, φαίνεται ότι στη πρώτη φάση (σταθεροποίηση), το CO₂ στερεώνεται από ένα ανόργανο σε ένα οργανικό μόριο. Προχωρώντας στο δεύτερο στάδιο, τα ATP και NADPH χρησιμοποιούνται για τη μείωση του 3-PGA σε G3P. Ακολούθως, τα ATP και NADPH μετατρέπονται σε ADP και NADP⁺. Τέλος, στο τρίτο στάδιο, το RuBP(διφωσφορική ριβουλόζη), αναγεννιέται και επιτρέπει στο σύστημα να προετοιμάζεται για τον καθορισμό περισσότερου CO₂(bio.libretexts.org, 2021).

1.6 Παράμετροι που επηρεάζουν την ανάπτυξη των καλλιεργειών

1.6.1 Ιδανικό pH ανάπτυξης και θερμοκρασία

Τα μικροφύκη που ανήκουν στη *Chlorella*, έχουν ιδανικές τιμές pH 8,5-9 και ανήκουν στα αλκαλόφιλα είδη. Καλλιέργειες με αρχικό pH 5.5-8.0, ανήκουν ουδετρόφιλα και τέλος, σε τιμές pH από 0-5.5, ανήκουν στα οξύφιλα(synoxis-algae.com, 2019). Σε σχετική έρευνα για το pH της *Chlorella protothecoides*, αναφέρεται ότι σε αρχικό pH καλλιέργειας 5.0-8.0, το στέλεχος παρουσιάζει αντίσταση στις διακυμάνσεις του pH. Παράλληλα, στο τομέα της τροφοδοσίας, ετεροτροφικά φάνηκε ότι με τιμή pH=6 εποφελείται η batch τροφοδοσία, ενώ οι τιμές pH γύρω στο 6,8 ευνοεί την ανάπτυξη στους βιοαντιδραστήρες. Περνώντας, στο θέμα της θερμοκρασίας, αναφέρεται ότι για τα είδη που ανήκουν στη *Chlorella*, υπάρχουν διαφορετικές βέλτιστες θερμοκρασίες ανά είδος. Σε έρευνα επί του θέματος, αναφέρεται ότι η πιο ευνοϊκή θερμοκρασία είναι 28°C, για τη *C.protothecoides* (Shwetha Sivakanathan Clemson University, 2012). Η θερμοκρασία είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας και για την ομαλή λειτουργία του μεταβολισμού των μικροφυκών.



Εικόνα 1.2 Θερμόμετρο στο χώρο ανάπτυξης των καλλιεργειών

1.6.2 Φωτισμός και επιλογή οργανικής πηγής για τη καλλιέργεια

Βασικό ρόλο, για τη καλή απόδοση μιας καλλιέργειας μικροφυκών σε βιομάζα, αλλά και σε λιπίδια, είναι η ένταση και η περίοδος του φωτισμού σε αυτήν. Ο φωτισμός, ουσιαστικά παίζει ρόλο και στη διαμόρφωση των κυττάρων μίας καλλιέργειας, καθώς φωτοτροφικά και ετερότροφα κύτταρα, έχουν διαφορές μεταξύ τους. Σχετική έρευνα που είχε γίνει, γύρω από το θέμα του φωτισμού των καλλιεργειών με μικροφύκη, αναφέρονται σε ένα σύστημα με αναλογίες φωτισμού/σκοταδιού (Izabela Krzeminska et al, 2015). Η συγκεκριμένη διαδικασία, δεν βλάπτει το στέλεχος, καθώς, τις ώρες που δεν υπάρχει φωτισμός και κατά την κυτταρική αναπνοή, καταναλώνονται τα οργανικά συστατικά από το υπόστρωμα και αυτά που έχουν παραχθεί μέσω φωτοσύνθεσης. Τα αποτελέσματα κάποιων ερευνών όμως, έρχονται σε αντιπαράθεση μεταξύ τους. Κατά την έρευνα αυτή δοκιμάστηκαν, διάφορες αναλογίες φωτός/σκοταδιού. Τα αποτελέσματα αυτής, μας αναφέρουν πως η ιδανική προσέγγιση, θα ήταν να αναπτύξουμε τις καλλιέργειες υπό συνεχή χαμηλό φωτισμό, με προσθήκη ανόργανου άνθρακα από την ατμόσφαιρα σε μορφή CO₂ (Anil Kumar Patel, 2019a). Έλλειψη ή μείωση της ποσότητας του CO₂, παίζει ανασταλτικό παράγοντα στην ανάπτυξη βιομάζας, των μικροφυκών. Παράλληλα, όμως μαζί με το φωτισμό, θα χρειαστεί και μία αξιοποιήσιμη ανθρακική πηγή. Έτσι, δημιουργείται το ερώτημα ποιά οργανική

πηγή είναι ικανή να καλύψει και τις ανάγκες του στελέχους μας για ενέργεια και ταυτόχρονα να είναι πιο οικονομική. Η λειτουργικότητα και η χρησιμότητα της γλυκόζης, δεν μπορεί να αμφισβητηθεί. Η ενέργεια και το κόστος παραγωγής της όμως, καθώς και οι τιμές της στην αγορά, την ωθούν να είναι σχετικά δυσπρόσιτη. Οι αναγκαστικές συνθήκες για οικονομία, οδηγούν στην εύρεση ενός αντικαταστάτη της γλυκόζης, πιο προσιτό τόσο οικονομικά όσο και ενεργειακά παραγόμενο. Ταυτόχρονα, θα πρέπει να αποδίδει αποτελέσματα κοντινά ή και καλύτερα από εκείνη. Μία πρόταση είναι η αξιοποίηση της γλυκερόλης. Η γλυκερόλη, κατά κύριο λόγο, προκύπτει από τη παραγωγή βιοντίζελ. Έχει γίνει μεγάλος αριθμός ερευνών για τη χρήση της, στις καλλιέργειες μικροφυκών καθώς, είναι οικονομική και άφθονη σε ποσότητα, από τις διεργασίες για παραγωγή βιοντίζελ. Συνεπώς, υπάρχουν πολλαπλές αναφορές στο θέμα αυτό, καθώς εξετάστηκαν αποτελέσματα σε ετεροτροφικές, φωτοτροφικές και μικτότροφες συνθήκες. Το θέμα με αυτά τα αποτελέσματα, είναι ότι έρχονται σε αντιπαράθεση ως προς τη λειτουργία και τη χρησιμότητα της γλυκερόλης. Για παράδειγμα, σε έρευνα με μικτότροφες συνθήκες (Anil Kumar Patel et al., 2019b), βγήκε το συμπέρασμα ότι η γλυκερόλη χρειάζεται συνεχή και πιο πιθανά υψηλό φωτισμό, ώστε να αφομοιωθεί από τη *C.protothecoides*, ενώ από ότι φάνηκε ήταν και η λιγότερο επιθυμητή οργανική πηγή, από το συγκεκριμένο στέλεχος και ετεροτροφικά κατά το διάστημα χωρίς φως. Αντίθετα, σε αντίστοιχες έρευνες που έγιναν ετεροτροφικά (John O'Grady-John A. Morgan 2011a, Yen Hui Chen-Terry H. Walker 2011), αναφέρουν την αφομοίωση της καθαρής αλλά και της ακατέργαστης γλυκερόλης, ενώ στη τελευταία τονίζεται ιδιαίτερα, η θετική δράση που έχει στη βιομάζα και τα λιπίδια, καθώς θεωρείται ακόμη πιο αξιοποιήσιμη από τη καθαρή γλυκερόλη, τόσο οικονομικά όσο και αποδοτικά στην ανάπτυξη βιομάζας και τη παραγωγή λιπιδίων. Οι αντιθέσεις, για τη χρησιμότητα της γλυκερόλης και η ανάγκη για εύρεση νέων τρόπων παραγωγής βιοκαυσίμων, μέσω των μικροφυκών, είναι οι λόγοι υλοποίησης της παρούσας πτυχιακής εργασίας και έρευνας.



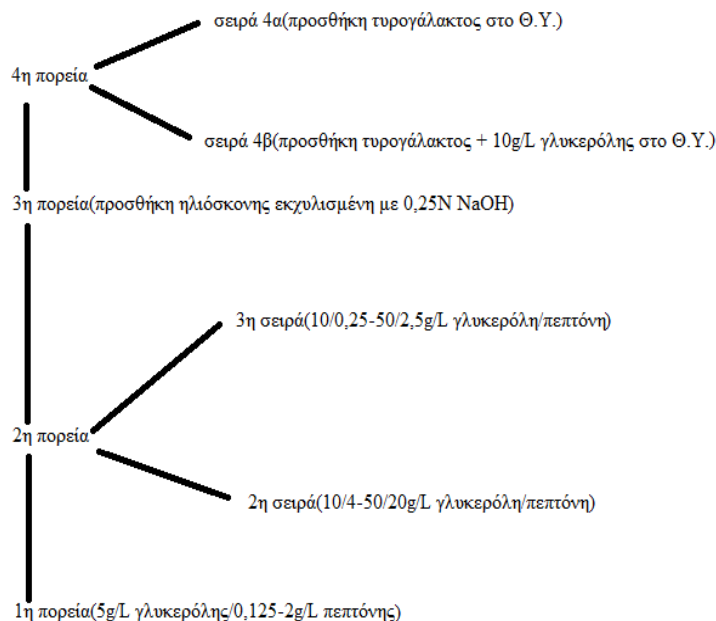
Εικόνα 1.3 Ανάπτυξη καλλιεργειών μικροφυκών με φωτισμό 16/8 ώρες φως/σκοτάδι

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1 Σχεδιασμός πειραματικών πορειών και τύπος εξαγωγής της έρευνας

Η υλοποίηση της έρευνας αυτής, έλαβε χώρα στο ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ/ΙΤΑΠ στη Λυκόβρυση Αττικής, ενώ το στέλεχος *Auxenochlorella protothecoides* SAG (211-8d), ήταν ευγενική χορηγία του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Με τις αναλύσεις που υλοποιήθηκαν, υπολογίστηκαν οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και οι χρωστικές που παράχθηκαν από τις καλλιέργειες, στις διάφορες πειραματικές πορείες. Η σχεδίαση του πειράματος, ξεκίνησε με τη δοκιμή διάφορων λόγων γλυκερόλης προς πεπτόνη(1^η πορεία). Σε αυτό το κομμάτι η συγκέντρωση της γλυκερόλης παρέμεινε σταθερή στα 5g/L, ενώ της πεπτόνης είχε αύξουσα σειρά από τα 0,125g/L-2g/L. Εν συνεχεία, επιλέχθηκαν δύο από τους λόγους της πρώτης σειράς και παρασκευάστηκαν από 2-10 φορές μεγαλύτεροι σε συγκέντρωση(2^η πορεία). Σκοπός ήταν η υψηλότερη παραγωγή βιομάζας, αλλά και λιπιδίων. Οι λόγοι γλυκερόλη/πεπτόνη που επιλέχθηκαν, ήταν οι 5/2 και 5/0,25. Περνώντας στη τρίτη πορεία, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με ηλιόσκονη ως πηγή αζώτου, για αξιοποίηση και σε μετέπειτα έρευνες, σε περίπτωση ευνοϊκών αποτελεσμάτων. Τέλος, χορηγήθηκε τυρόγαλο σε καλλιέργειες, σε δύο διαφορετικές σειρές(4^η πορεία). Στη μία από αυτές, είχαν χορηγηθεί 10 g/L γλυκερόλη για την καταμέτρηση της διαφορετικότητας των αποτελεσμάτων. Οι καλλιέργειες, όπως και οι αναλύσεις καθ'όλη τη διάρκεια των πειραματικών σειρών, έγιναν εις τριπλούν(n=3) για κάθε συγκέντρωση. Η διάρκεια ανάπτυξης των πειραματικών καλλιεργειών διήρκεσε 6 μέρες, για κάθε σειρά. Στο παρακάτω σχήμα, δίνεται το πλάνο που ακολουθήθηκε.



Εικόνα 2.1 Σχεδιασμός πειραματικών πορειών

2.1.2 Θρεπτικό υπόστρωμα και pH των πρώτων τριών σειρών

Οι τρεις πρώτες σειρές, ως θρεπτικό υπόστρωμα αλλά και στα προεμβόλια, είχαν ένα μέρος με τα ανόργανα συστατικά και ένα με τα οργανικά(διττανθρακικά και γλυκερόλη), λόγω σωματιδίων που σχηματίζονταν κατά την αποστείρωση. Το πρώτο μέρος περιείχε:

- 10ml/L BG-11 ($\text{Na}_2\text{MG EDTA}$ 0,1g/L, Ferric ammonium citrate 0,6 g/L, Citric acid.1H₂O 0,6 g/L, CaCl₂.2H₂O
- 10ml/L MgSO₄.7H₂O (7,5 g/L)
- 1ml/L διάλυμα 6(μικροστοιχεία): (H₃BO₃ 2,86 g/L, MnCl₂.4H₂O 1,81 g/L, ZnSO₄.7 H₂O 0,222 g/L, CuSO₄.5H₂O 0,079 g/L, COCl₂.6H₂O 0,050 g/L, NaMoO₄.2H₂O 0,391g/L).

Ενώ το δεύτερο μέρος:

- NaHCO₃ 1g/L,
- KH₂PO₄.3H₂O 0,5g/L,
- γλυκερόλη(καθαρή) 5g/L, στη πρώτη σειρά και στα προεμβόλιά μας και από 10-50 g/L στη δεύτερη πορεία(2 σειρές),
- Η πεπτόνη τοποθετούταν μαζί με τα ανόργανα συστατικά και είχε τιμές 0,125-2 g/L στη πρώτη πορεία, 4-20 g/L και 0,5-2,5g/L στη δεύτερη πορεία αντίστοιχα.

Λόγω διπλής αραίωσης, οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιούσαμε στις δύο πρώτες πορείες (1^η έως 3^η σειρά), ήταν διπλάσιες αρχικά. Ωστόσο, για να υπάρξει μια καλή εικόνα των θρεπτικών υποστρωμάτων, επόμενο βήμα ήταν η μέτρηση pH αυτών. Στις τιμές των pH στις 3 πρώτες σειρές, δεν έγινε κάποια διόρθωση. Στη πρώτη σειρά, με σταθερά 5g/L γλυκερόλης προς 0,125-2g/L πεπτόνης, μετρήθηκαν τα εξής pH θρεπτικού υποστρώματος:

Πίνακας 2.1 Μέτρηση pH Θ.Υ. 1^{ης} πορείας

Glyc/pept	5/2	5/1,5	5/1	5/0,5	5/0,25	5/0,125
pH	8,01	8,05	8,12	8,14	8,26	8,32

Η δεύτερη σειρά, έχει το λόγο γλυκερόλη/πεπτόνη στις ακόλουθες αναλογίες g/L: 50/20, 40/16, 30/12, 20/8, 15/6 και 10/4. Τα pH για κάθε υπόστρωμα ήταν τα εξής:

Πίνακας 2.2 Μέτρηση pH Θ.Υ. 2^{ης} σειράς

Glyc/pept	50/20	40/15	30/12	20/8	15/6	10/4
pH	7,41	7,46	7,54	7,61	7,7	7,82

Η τρίτη σειρά, έχει τους λόγους γλυκερόλη/πεπτόνη (σε g/L) 50/2,5, 40/2, 30/1,5, 20/1, 15/0,75 και 10/0,5. Τα pH ήταν:

Πίνακας 2.3 Μέτρηση pH Θ.Υ. 3^{ης} σειρά

Glyc/pept	50/2,5	40/2	30/1,5	20/1	15/0,75	10/0,5
pH	8,01	8,11	8,13	8,2	8,26	8,32

Τιμές pH συλλέχθηκαν και από τα μέρη των υποστρωμάτων, ξεχωριστά. Έτσι, στο παρακάτω πίνακα, για τη πρώτη σειρά, δίνεται :

Πίνακας 2.4 pH συστατικών Θ.Υ. 1^{ης} πορείας

Substrate	pH 1 ^{ης} σειρά
Inorganic	4,6
Inorganic + peptone	7,01
Bicarbonate + glycerol	7,72

Στη δεύτερη και τρίτη σειρά αντίστοιχα, παρατηρείται:

Πίνακας 2.5 pH συστατικών Θ.Υ. 2^{ης} και 3^{ης} σειράς

Substrate	pH 2 ^{ης} σειρά	pH 3 ^{ης} σειρά
Inorganic	4,77	4,44
Inorganic + peptone	7,13	7,18
Bicarbonate + glycerol	7,82	7,84

2.1.3 Θρεπτικά υποστρώματα και pH τρίτης και τέταρτης πορείας

Στη τρίτη πορεία, έγινε μία προσπάθεια αντικατάστασης της πεπτόνης, με εκχυλισμένη πρωτεΐνη από ηλιόσκονη. Χρησιμοποιήθηκε NaOH 0,25N για την εκχύλιση της και η μέθοδος Lowry, για τον υπολογισμό των πρωτεϊνών σε αυτή. Το αποτέλεσμα της διεργασίας αυτής είναι ένα εκχύλισμα πρωτεϊνών, με 44,75 g/L εκχυλισμένης πρωτεΐνης. Τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη σειρά αυτή ήταν τα ανόργανα συστατικά και 10g/L ακατέργαστης γλυκερόλης. Ωστόσο, πριν μετρηθεί το pH του υποστρώματος έπρεπε πρώτα να ρυθμιστεί το pH του εκχυλίσματος, το οποίο έβγαине κοντά στο 11,3. Χρησιμοποιήθηκε, H₂SO₄ 0,25N για ρύθμιση προς ουδέτερο pH. Το pH του υποστρώματος ήταν :

Πίνακας 2.6 pH Θ.Υ. με προσθήκη ηλιόσκονης

Substrate	pH 3 ^{ης} πορείας
Inorganic + sunseed powder	6,96

Τέλος, στη τέταρτη πορεία, υπάρχουν δύο σειρές. Στη μία από αυτές έχει χορηγηθεί (καθαρή) γλυκερόλη, μαζί με τα υπόλοιπα ανόργανα συστατικά του υποστρώματος. Η κάθε σειρά συγκροτείται από τρεις καλλιέργειες. Στα pH αυτών των σειρών, έγινε διόρθωσή τους με NaOH 1N και HCl 1N, ώστε να βρίσκεται μεταξύ των τιμών 8-8,5. Οι τιμές που μετρήθηκαν, είναι :

Πίνακας 2.7 pH Θ.Υ. με προσθήκη τυρόγαλου

Cultivations	A	B	Γ
pH Inorganic + milk whey	8,11	8,05	7,92
pH Inorganic + milk whey + glycerol	8,29	8,2	8,47

2.2 Εξοπλισμός μετρήσεων, εμβολιασμών και παρασκευής αντιδραστηρίων

2.2.1 Εμβολιασμός

Ο εμβολιασμός αρχικά, έγινε στο Laminar. Το Laminar, είναι ένα μηχάνημα, το οποίο μπορεί να δημιουργήσει ασηπτικές συνθήκες. Στο πάνω μέρος του εσωτερικού, υπάρχει μια λάμπα η οποία εκπέμπει UV ακτινοβολία, όταν την ενεργοποιηθεί, για να αποστειρώνεται το εσωτερικό του Laminar. Ταυτόχρονα, έχουμε τη διαρροή αποστειρωμένου αέρα, από τα φίλτρα που εμπεριέχονται σε αυτό. Ο αποστειρωμένος αέρας μαζί με το λύγχο του Bunsen, χρησιμοποιούνται συνήθως για τους εμβολιασμούς των καλλιιεργειών. Λόγω επιμόλυνσης των φίλτρων αέρα, αξιοποιήθηκε η τεχνική των διασταυρωμένων φλογών, για ασφαλέστερους εμβολιασμούς τόσο στις πειραματικές πορείες, όσο και στα προεμβόλια που παρασκευάζονταν. Οπότε, για να αποφευχθεί, η οποιαδήποτε εξωτερική επιμόλυνση, χρησιμοποιήσαμε γάντια και αιθανόλη για την αποστείρωση των σκευών, που εισέρχονταν στο Laminar. Κατά τη διάρκεια των εμβολιασμών, χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες με τα ανάλογα ρύγχη, ποδιές και κωνικές φιάλες με θρεπτικό υπόστρωμα και προεμβόλια.

2.2.2 Παρασκευή του αντιδραστηρίου Na_2CO_3 2% με NaOH 0,1N

Για τη κατασκευή, του αντιδραστηρίου Na_2CO_3 2% με NaOH 0,1N, χρειάστηκαν πιπέτες του 1-5mL και ογκομετρικό κύλινδρο, ανάλογο του όγκου των δειγμάτων προς μέτρηση. Για την αποθήκευση και τη κατασκευή των αντιδραστηρίων, χρησιμοποιήθηκαν αναδευτήρες και ποτήρια ζέσεως.

2.2.3 Παρασκευή αντιδραστηρίου σούλφο-φώσφο-βανιλίνης

Το αντιδραστήριο παρασκευάστηκε ζυγίζοντας 0,12g βανιλίνης σε ζυγό ακριβείας και διαλύοντας τα σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε 2mL καθαρής αιθανόλης, με 18mL απιονισμένο νερό και 80ml φωσφορικού οξέος 85%. Οι ποσότητες της μεθανόλης συλλέχθηκαν με πιπέττα των 5mL, ενώ οι ποσότητες του απιονισμένου νερού και του φωσφορικού οξέος, ογκομετρήθηκαν σε ογκομετρικούς κυλίνδρους των 50mL και 100mL, αντίστοιχα. Στις τρεις πρώτες πειραματικές σειρές, το αντιδραστήριο κατασκευαζόταν με 20ml νερού, χωρίς αιθανόλη. Στις πορείες όπου χορηγήθηκε τυρόγαλο, η χρήση της αιθανόλης έγινε κανονικά.

2.2.4 Γενική εικόνα εξοπλισμού

Όπως εύκολα είναι κατανοητό, για να μπορέσουν τα πειράματα να βγουν εις πέρας, αλλά και να αποδώσουν αποτελέσματα, χρειάστηκε ένα μεγάλο μέγεθος εξοπλισμού. Μία εικόνα του εξοπλισμού αυτού, που παρέχεται παρακάτω είναι η εξής:

- Φασματοφωτόμετρο Cadas 50,

- Ογκομετρικοί κύλινδροι 10-500mL,
- Πιπέττες 10μL-5mL,
- Υδροβολέας απιονισμένου νερού,
- Ζυγοί ακρίβειας και ζυγαριά(0-200g),
- Ογκομετρικοί φιάλες 100mL-1L,
- Κωνικές φιάλες των 100μL-250mL και φιάλες Duran,
- Λάμπες φωτισμού LED και Laminar,
- Αναδευτήρες, φυγόκεντροι, πλακίδιο θέρμανσης-ανάδευσης,
- pHμετρο,
- Μάτια εστίασης, χύτρα, ταψί,
- Vortex,
- Πέλλετ και Falcons,
- Φιαλίδια
- Air condition και σώμα θέρμανσης.



Εικόνα 2.2 Μέρος εξοπλισμού για τη παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος

2.3 Βασικές αρχές και μέθοδοι αναλύσεων-μετρήσεων

2.3.1 Μέθοδοι και νόμοι οπτικής απορρόφησης αναλύσεων

Οι μετρήσεις των δειγμάτων των αναλύσεων και της βιομάζας, βασίστηκαν στη χρωματομετρία. Χρωματομετρία, είναι η επιστήμη που αναφέρεται στο ποσοτικό προσδιορισμό και την φυσική περιγραφή της ανθρώπινης αντίληψης του χρώματος. Με λίγα λόγια, εξηγεί ότι το χρώμα εκφράζεται μέσω αριθμητικών τιμών, οι οποίες

αντιστοιχούν σε κάποιες μαθηματικές εξισώσεις(παγκοσμίως αποδεκτά χρωματομετρικά συστήματα C.I.E.) (<https://docplayer.gr/7682221-Metrisi-hromatos-hromatometria.html>). Όσο για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων, σε φασματοφωτόμετρο, ισχύει ο νόμος του Lambert-Beer. Ο νόμος, εξηγεί ότι η απορρόφηση (A) για σταθερό πάχος στοιβάδας (d) και ορισμένο μήκος κύματος φωτός (λ), είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύματος (C) της ουσίας που απορροφά. Η εξίσωση του τύπου, είναι: $A = -\log T = -\log(I/I_0) = \varepsilon \cdot d \cdot C$, όπου T η διαπερατότητα, η οποία εκφράζεται σε % (αν $T = 0\%$ τότε $A = \infty$ και αν $T = 100\%$ τότε $A = 0$). Η απεικόνιση της απορρόφησης (A) σε συνάρτηση με το μήκος κύματος(λ), καλείται φάσμα απορρόφησης(repository.kallipos.gr, 2015a).

2.3.2 Το φασματοφωτόμετρο

Ένα φασματοφωτόμετρο, μετρά την απορρόφηση του φωτός και καταγράφει ένα φάσμα απορρόφησης. Βασικά μέρη ενός τέτοιου μηχανήματος, είναι η πηγή δέσμης φωτός, το μονοχρωμάτορα(δύο διαφράγματα εξόδου με ένα πρίσμα στη μέση), τη θέση που εφαρμόζει το δείγμα και τέλος τον ανιχνευτή (repository.kallipos.gr, 2015b).

2.3.3 Χρωματομετρικοί μέθοδοι αναλύσεων

Σε αυτό το σημείο παρατίθενται, οι μέθοδοι που αντιστοιχούν σε κάθε ανάλυση. Οπότε, ξεκινώντας:

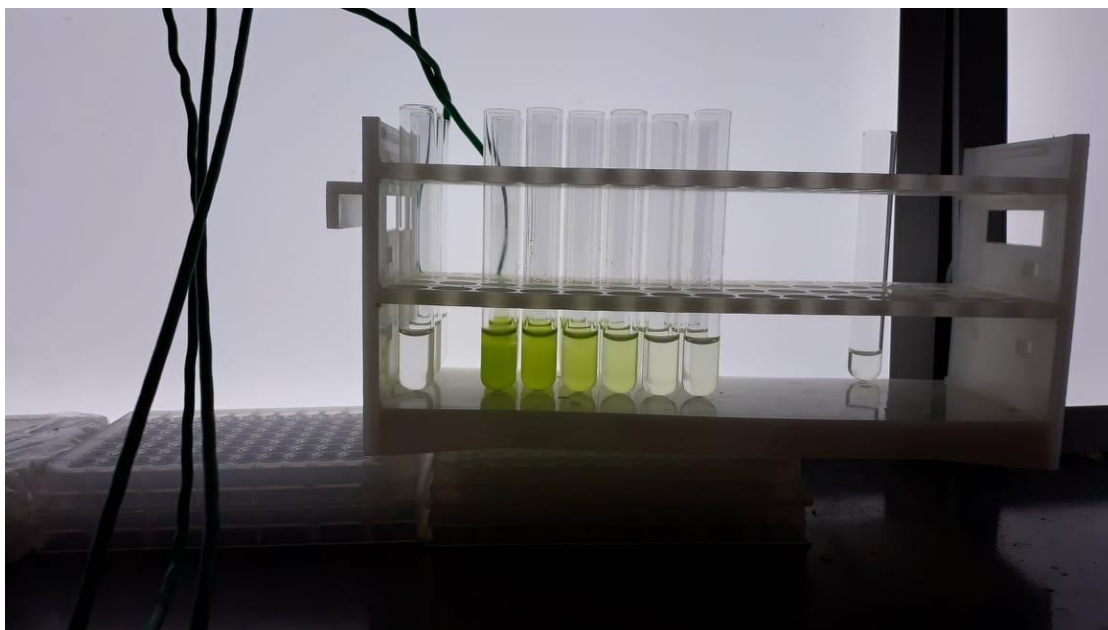
- για τους υδατάνθρακες, υλοποιήθηκε μια τροποποιημένη μέθοδο φαινόλης-θεικού οξέος. Η μέθοδος αυτή είναι χρωματομετρική και χρησιμοποιείται, για τον υπολογισμό, των ολικών υδατανθράκων, βασισμένη στην αντίδραση μεταξύ φαινόλης-θεικού οξέος. Είναι πολύ ευαίσθητη και μπορεί να εντοπίσει, πολύ μικρά ποσά σακχάρων(M.Dubois et al, 1956).
- για τις πρωτεΐνες, οι οποίες μετρήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο Lowry σε συνδυασμό με το αντιδραστήριο Folin(Lowry et al, 1951). Η μέθοδος αφορά, μετρήσεις πρωτεΐνης, που περιέχονται σε διάλυμα μετά από καθίζηση με οξέα ή βάσεις, είτε με άλλα αντιδραστήρια και βασίζεται σε συνδυασμό της αντίδρασης Biuret, με το αντιδραστήριο Folin αλλά και την αντίδραση Folin-Ciocalteau. Στην αντίδραση Biuret, οι πεπτιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών, αντιδρούν με χαλκό υπό αλκαλικές συνθήκες, ώστε να παράγουν κατιόν χαλκού(Cu^+). Από την άλλη, στις αντιδράσεις μεταξύ των αντιδραστηρίων Folin και Folin-Ciocalteau, το φωσφομολυβδενικό βολφράμιο μειώνεται σε ετεροπολυβενδένιο με οξείδωση καταλυόμενη από χαλκό των αρωματικών

αμινοξέων. Το αποτέλεσμα, είναι ένα δυνατό μπλε χρώμα, που οφείλεται εν μέρει, στη παρουσία τυροσίνης και τρυπτοφάνης(Waterborg J.H., 2009).

- τα ολικά λιπίδια, τα οποία μετρήθηκαν με τροποποίηση των μεθόδων Folch(Folch J, 1941) και σούλφο-φώσφο-βανιλίνης(N. Zöllner, K. Kirsch, 1962). Η συνεργασία αυτών των μεθόδων, γίνεται γιατί στη Folch, με τη χρήση διαλύματος χλωροφορμίου-μεθανόλης και βιομάζας σε αναλογίες 2:1:0,2, καταφέρνουμε διαχωρισμό λιπαρών συστατικών, από τα μη λιπαρά συστατικά του δείγματός μας. Ταυτόχρονα με τη προσθήκη κορεσμένου νερού, καταφέρνουμε τον διαχωρισμό υδρόφιλων συστατικών από τα υδρόφοβα λίπη, έχοντας την ελάχιστη ή και αμελητέα απώλεια σε λίπη. Στη συνέχεια, αφού εξατμιστεί το χλωροφόρμιο και προστεθεί πυκνό θειικό οξύ, το αντιδραστήριο σουλφο-φωσφο-βανιλίνης, μας βοηθά γρήγορα και εύκολα, να έχουμε μία ποσοτική και συγκριτική ανάλυση, δίνοντας μας μια εικόνα του ποσού που περιέχει το δείγμα μας σε λιπίδια, μέσω της χρωματομετρικής αντίδρασης.
- τις χρωστικές, οι οποίες αναλύθηκαν με εξισώσεις από μέθοδο, που έχει ερευνηθεί από τον Lichtenthaler(H.K. Lichtenthaler, 1987). Οι εξισώσεις για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων στις χρωστικές, βασίστηκαν σε συγκεκριμένους συντελεστές απορρόφησης, διαφορετικοί αναλόγως το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε, κατά την ανάλυση. Χρησιμοποιήθηκε διαλύτης μεθανόλη 90%.
- Τέλος, για το καθαρισμό της βιομάζας, σε Falcons των 50mL τοποθετήθηκε η βιομάζα των καλλιεργειών από τις διάφορες πειραματικές σειρές. Ακολούθως, έγινε επαναραίωση με απιονισμένο νερό και φυγοκέντριση 3-4 φορές, για να ξεπλυθεί η βιομάζα. Στο τέλος, μετά το καθαρισμό ξανασυμπληρώθηκαν τα Falcons, με τη πλέον καθαρή βιομάζα, με απιονισμένο νερό μέχρι τον αρχικό όγκο των 50 mL και αποθηκεύτηκαν στη κατάψυξη.

2.4 Μέτρηση και υπολογισμοί αποτελεσμάτων αναλύσεων και βιομάζας

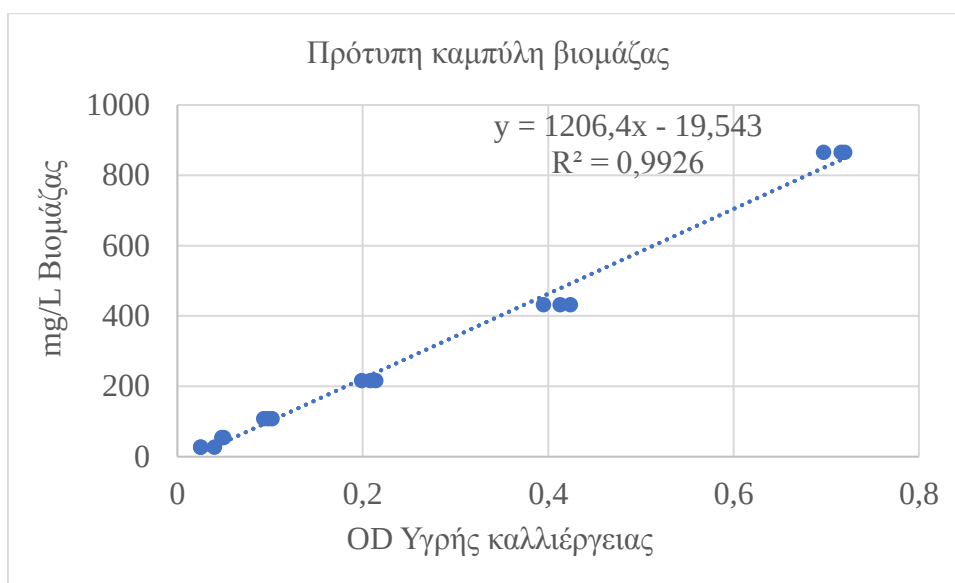
2.4.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης και υπολογισμός βιομάζας



Εικόνα 2.3 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης βιομάζας

Αφότου έγινε η προμήθεια του στελέχους, προτεραιότητα δόθηκε στην ανάπτυξη καλλιεργειών. Οι λόγοι, ως γνωστόν ήταν για την δημιουργία προεμβολίων, αλλά πρωτίστως για τη κατασκευή πρότυπης καμπύλης βιομάζας. Για την διαδικασία αυτή, επιλέχθηκε μία από τις καλλιέργειες που είχαν αναπτυχθεί. Αυτή λοιπόν μοιράστηκε σε τρία Falcons των 50mL. Τα Falcons, φυγοκεντρίθηκαν στις 3500 στροφές για 10 λεπτά. Οι ποσότητες στα Falcons, επαναρραιώθηκαν 4 φορές ώστε να ξεπλυθεί η βιομάζα από το υπόστρωμα και από τα άλατα, που περιέχονταν σε αυτό. Όταν καθάρισε η βιομάζα, τα Falcon συμπληρώθηκαν πάλι μέχρι τα 50 mL με απιονισμένο νερό. Αφού αναμίχθηκαν οι ποσότητες, σε ένα κοινό ποτήρι ζέσεως, συλλέχθηκαν 25 mL(κάθε φορά) και τοποθετήθηκαν σε 3 προ-ζυγισμένα γυάλινα τρυβλία. Τα τρυβλία αυτά ξηράθηκαν σε φούρνο, σε υψηλή θερμοκρασία για 1 μέρα. Μετά από τη ξήρανση τοποθετήθηκαν για 1 ώρα σε ξηραντήρα, για καλύτερη αφαίρεση υγρασίας. Όσο η προηγούμενη διαδικασία εξελισσόταν, σε ποτήρι ζέσεως των 150 mL, τοποθετήθηκε η ποσότητα της υγρής και καθαρής βιομάζας που είχε περισσέψει. Επόμενο βήμα, ήταν διπλές αραιώσεις σε 5 από τα 6 σημεία, τα οποία όλα μαζί συγκρότησαν την πρότυπη καμπύλη της βιομάζας μας. Σημειώνεται ότι για κάθε συγκέντρωση, λήφθηκαν 3 μετρήσεις οπτικής πυκνότητας. Οπότε, σε γυάλινα φιαλίδια ανά τριάδες, τοποθετήθηκαν 2mL($V_{\text{τελ.δειγμάτων}}$) σκέτο απιονισμένο νερό ως μάρτυρα, ενώ στα υπόλοιπα φιαλίδια, με εξαίρεση τη πρώτη σειρά(αρχική συγκέντρωση), οι επόμενες

πέντε σειρές περιείχαν νερό και βιομάζα, ανάλογα των αραιώσεων κάθε σειράς. Η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μας, λήφθηκε στα 750 nm σε φασματοφωτόμετρο Cadas 50. Μετά το πέρας μιας μέρας και εφόσον αφαιρέθηκε η υγρασία, ζυγίστηκαν τα τρυβλία και αφαιρέθηκαν τα βάρη μετά τη ξήρανση, από τα αρχικά βάρη. Ο μέσος όρος που προέκυψε από τα βάρη αυτά, διαιρούταν διά 2 για κάθε συγκέντρωση. Έτσι, τηρήθηκαν οι διπλές αραιώσεις που έγιναν, στα ανάλογα σημεία. Ακολούθησε, η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης στο Excel, όπου υπολογίστηκαν η κλίση a (slope), η προσπίπτουσα b (intercept), ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 , δίνοντας τη μορφή της εξίσωσης γραμμικής παλινδρόμησης $y=ax+b$.



Γράφημα 2.1 Πρότυπη καμπύλη βιομάζας

Η βιομάζα ξεκινά από τα 27,042 mg/L και φτάνει έως τα 865,33 mg/L, περίπου με εύρος τιμών οπτικής πυκνότητας από OD:0,025-0,720 στα 750nm. Η κλίση a και η σταθερά b της ευθείας, υπολογίστηκαν από τους τύπους =SLOPE(γνωστά y ; γνωστά x) και =INTERCEPT(γνωστά y ; γνωστά x).

2.4.2 Υπολογισμός βιομάζας πειραματικών σειρών

Όσον αφορά τον υπολογισμό της βιομάζας, των πειραματικών πορειών, τηρήθηκαν τα εξής βήματα:

1. αρχικά σε 3 φιαλίδια, τα οποία περιείχαν μόνο απιονισμένο νερό, εμβολιάστηκε ίδια ποσότητα εμβολίου, με αυτή που είχαν τα θρεπτικά υποστρώματα. Προχωρώντας, μετρήθηκε οπτική απορρόφηση(OD) στα 750 nm και έγιναν αραιώσεις όπου αυτό χρειαζόταν. Σκοπός αυτού, ήταν να υπάρχει μια εικόνα της βιομάζας κατά την έναρξη της πειραματικής σειράς. Σε περίπτωση, που το θρεπτικό υπόστρωμα είχε πιο έντονο χρώμα, πρώτα γινόταν μέτρηση της

οπτικής πυκνότητας του θρεπτικού υποστρώματος με την εμβολιασμένη βιομάζα(ποσότητα 10% του όγκου του θρεπτικού υποστρώματος) και ύστερα γινόταν μέτρηση με το υπόστρωμα μόνο του. Όσον αφορά τη τελευταία μέτρηση, γινόταν προσθήκη απιονισμένου νερού σε ποσότητα 10% του όγκου(ίδια ποσότητα με αυτή του εμβολίου). Επιπλέον, όσες αραιώσεις χρειαζόταν το δείγμα εμβολίου-υποστρώματος, οι ίδιες αραιώσεις έγιναν και για το δείγμα απιονισμένου νερού-υποστρώματος.

2. Μετά τον εμβολιασμό των φιαλιδίων με το θρεπτικό υπόστρωμα, πέρασαν 6 μέρες(διάρκεια πειράματος). Κατά τη συλλογή, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα πριν και μετά τις φυγοκεντρίσεις, κάνοντας αραιώσεις όπου αυτό χρειαζόταν
3. βάσει της συνάρτησης της εξίσωσης γραμμικής παλινδρόμησης $y=ax+b$ υπολογιζόντουσαν οι ποσότητες της βιομάζας (επί ξηρού βάρους) .

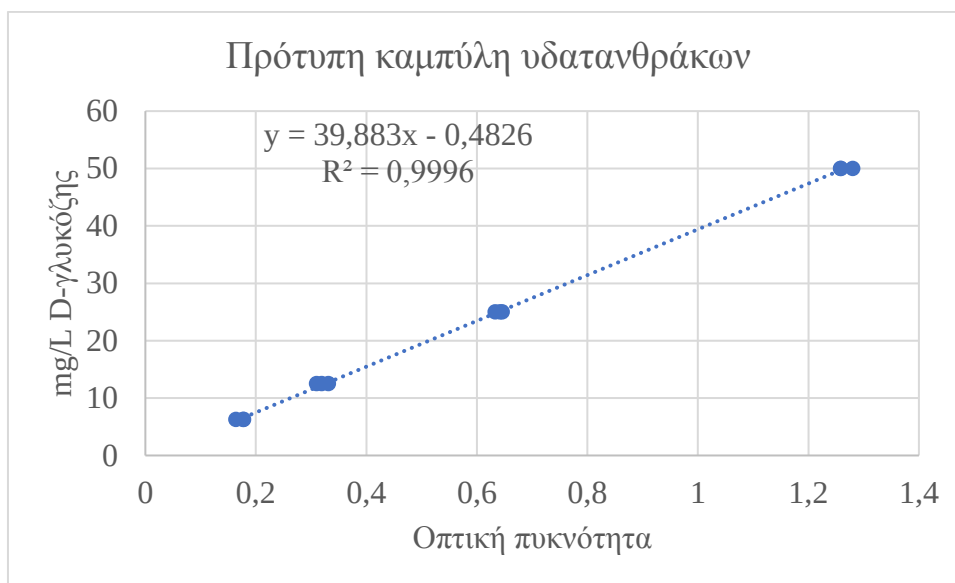
Διευκρινίζεται ότι οι θέσεις των μεταβλητών στην εξίσωση, έχουν ως εξής:

y: συγκέντρωση βιομάζας σε mg/L, a: κλίση της γραμμής γραμμικής παλινδρόμησης, x: οπτική απορρόφηση, b προσπίπτουσα στον άξονα y. Οι αραιώσεις που γίνονταν πολλαπλασιάζονταν με το αποτέλεσμα της εξίσωσης $y=ax+b$, κάτι που ακολουθήθηκε, κατά τον υπολογισμό της βιομάζας των πειραμάτων. Οι μετρήσεις της βιομάζας λαμβάνονταν σε φασματοφωτόμετρο και σε μήκος κύματος 750 nm. Στις δύο πρώτες πειραματικές πορείες, οι καλλιέργειες αναπτύσσονταν, σε κωνικές φιάλες των 100 mL ,ενώ, οι ποσότητες του θρεπτικού υποστρώματος και του εμβολίου μαζί ήταν συνολικά 44mL (40mL το θρεπτικό υπόστρωμα, 4mL εμβόλιο). Στη τρίτη και τέταρτη πορεία, χρησιμοποιήθηκαν φιάλες Duran των 500mL. Οι ποσότητες των υποστρωμάτων, ήταν 200 mL και 170 mL αντίστοιχα. Εδώ όμως επειδή υπήρχε χρώμα στο υπόστρωμα, έπρεπε να εφαρμοστεί η διαδικασία που αναφέραμε νωρίτερα.

2.4.3 Υδατάνθρακες

Για το εργαστηριακό κομμάτι της μέτρησης, σε γυάλινα φιαλίδια παρασκευάστηκαν 0,5mL κυτταρικού δείγματος, με την επιθυμητή αραιώση. Για τις αραιώσεις και τη συλλογή δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν πιπέττες του 1mL. Προχωρώντας, με πιπέττα των 10μL προστέθηκαν και αναμίχθηκαν 10 μL διαλύματος φαινόλης 90%, ακολουθούμενη από την προσθήκη 1,25mL πυκνού θεικού οξέος(95-97%), με πιπέττα των 5mL. Μετά από 30 λεπτά, η OD μετρήθηκε στα 485 nm. Μετά από τη προσθήκη των χημικών κάθε φορά, χρησιμοποιήθηκε vortex, για ομογενοποίηση των δειγμάτων. Η διαμόρφωση των αποτελεσμάτων στους υδατάνθρακες, έγινε ως εξής. Αρχικά, πολλαπλασιάστηκε η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων, με τη κλίση της ευθείας a

και προστέθηκε η προσπίπτουσα b. Ακολούθως, πολλαπλασιάστηκαν οι αραιώσεις που έγιναν, βρίσκοντας έτσι τα mg/L υδατανθράκων στα δείγματά. Το αποτέλεσμα που βγήκε διαιρέθηκε με τη βιομάζα του δείγματος και το πολλαπλασιάστηκε με το 100%. Από τα νέα % αποτελέσματα που προέκυψαν, υπολογίστηκαν τον μέσο όρο, την τυπική απόκλιση και τη σχετική τυπική απόκλιση. Για τη κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των υδατανθράκων, χρησιμοποιήθηκε D-γλυκόζη σε ποσότητες 0-50mg/L, ενώ η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε είναι η ίδια που αναφέρεται νωρίτερα, για το προσδιορισμό υδατανθράκων στα δείγματα με τη βιομάζα των μικροφυκών.

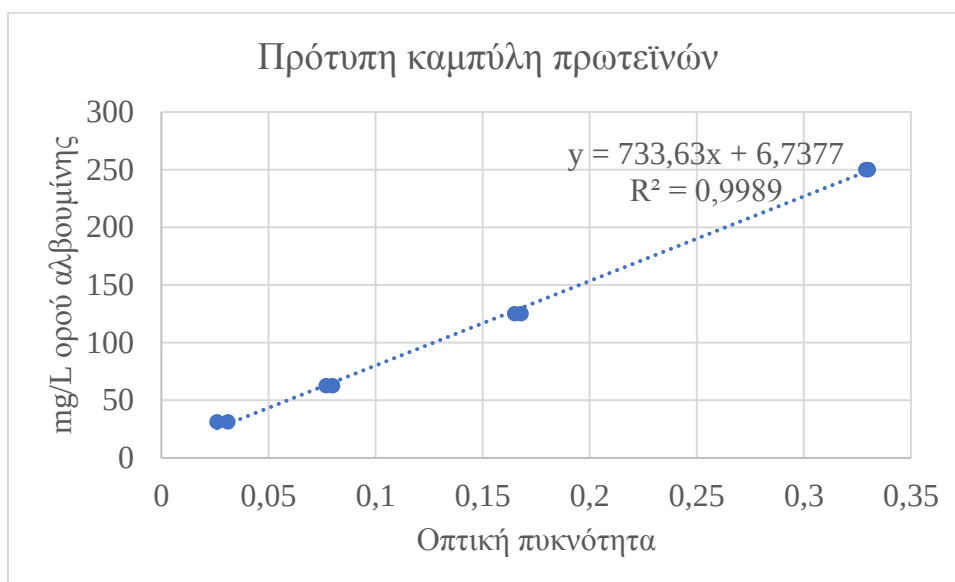


Γράφημα 2.2 Πρότυπη καμπύλη υδατανθράκων

2.4.4 Πρωτεΐνες

Για το αναλυτικό κομμάτι των πρωτεϊνών, σε pellets των 2mL αναμίχθηκαν ποσότητα καλλιέργειας, NaOH 1N και απιονισμένο νερό(όπου αυτό χρειαζόταν), έτσι ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή αραιώση, αλλά και η κανονικότητα NaOH 0,5N. Οι ποσότητες συλλέχθηκαν με πιπέττες των 1-5mL. Ακολούθησε εκχύλιση με το πλέον 0,5N NaOH, με τελικό όγκο δείγματος 0,5mL(ή 1mL σε περίπτωση μεγάλης αραιώσης). Εν συνεχεία, τα δείγματα επώαστηκαν σε πλακίδιο θέρμανσης-ανάδευσης για 30 λεπτά στους 105 βαθμούς °C. Με τη χρήση πιπετών των 100 μL, συλλέχθηκε δείγμα 0,1mL εκχυλισμένων πρωτεϊνών. Τα δείγματα αυτά τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια, όπου προστέθηκε σε 0,1mL 5% SDS. Μετά την ομογενοποίησή τους σε vortex, συμπληρώθηκε 1mL διαλύματος Na_2CO_3 2% σε NaOH 0,1N, το οποίο αναμίχθηκε με $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ και $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, σε αναλογίες όγκου(σε mL) 50:1:1. Μετά από 10 λεπτά, προστέθηκαν 0,1mL φρέσκο-παρασκευασμένου αντιδραστηρίου Folin & Ciocalteu 1N, με άμεση ομογενοποίηση σε vortex. Μετά τη προσθήκη και την

ομογενοποίησή τους, τα δείγματα αφέθηκαν για 30 λεπτά στο σκοτάδι. Η οπτική απορρόφηση, μετρήθηκε στα 750 nm, σε φασματοφωτόμετρο Cadas 50. Όσο για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων, όπως και στους υδατάνθρακες, η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων πολλαπλασιάστηκε με τη κλίση a και προστέθηκε με τη προσπίπτουσα b , της εξίσωσης γραμμικής παλινδρόμησης από τη πρότυπη καμπύλη των πρωτεϊνών. Οι αραιώσεις που έγιναν πολλαπλασιάστηκαν με τα αποτελέσματα της εξίσωσης, εμφανίζοντας έτσι τα mg/L, πρωτεϊνών στα δείγματά μας. Για τους στατιστικούς υπολογισμούς, ακολουθήθηκαν τα ίδια βήματα, με αυτά των υδατανθράκων. Η πρότυπη καμπύλη εδώ, κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ποσότητες ορού αλβουμίνης από 0-250mg/L. Η μεθοδολογία κατασκευής της πρότυπης καμπύλης, ήταν η ίδια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των εκχυλισμένων πρωτεϊνών, στα δείγματα με τη μικροβιακή βιομάζα(βιομάζα μικροφυκών).

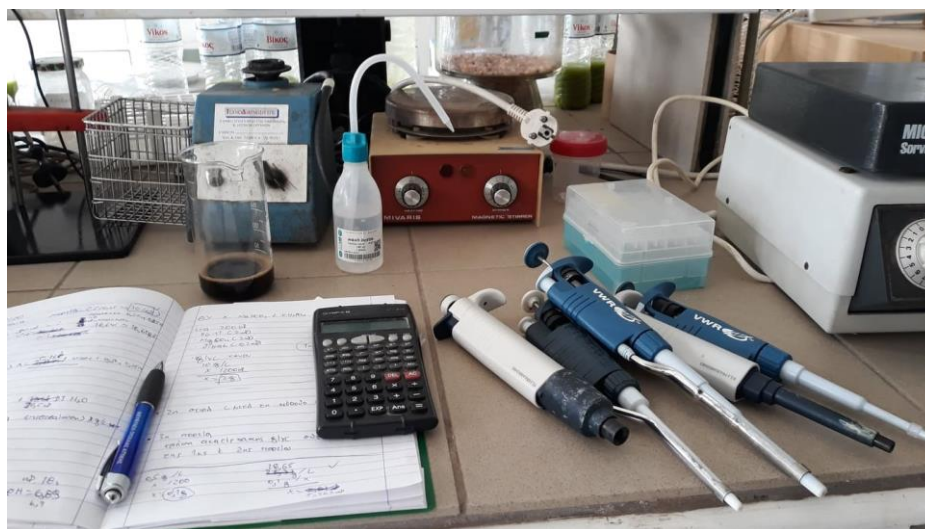


Γράφημα 2.3 Πρότυπη καμπύλη πρωτεϊνών

2.4.4.1 Υπολογισμός πρωτεϊνών στην ηλιόσκονη

Για τη καταμέτρηση των πρωτεϊνών, στην ηλιόσκονη, έλαβαν μέρος δύο αναλύσεις. Σκοπός της πρώτης ανάλυσης, ήταν να αποκαλυφθεί σε ποια από τις κανονικότητες αυτές, υπήρξε πιο υψηλή εκχύλιση. Ξεκινώντας δηλαδή με τη πρώτη ανάλυση, σε μικρά pellets των 2mL, ζυγίστηκαν 0,05g ηλιόσκονης και μετέπειτα προστέθηκε 1mL NaOH 1/0,5/0,25/0,1N, αντίστοιχα. Ακολούθησε υδρόλυση των δειγμάτων, σε πλακίδιο θέρμανσης-ανάδευσης για 30 λεπτά. Αφότου τα δείγματα αφαιρέθηκαν από το πλακίδιο, μετά από μία ώρα όπου είχαν ήδη κρυώσει, φυγοκεντρίθηκαν στις 5000 στροφές ανά λεπτό(rpm). Τα υπόλοιπα βήματα που πραγματοποιήθηκαν για τη μέτρηση, ήταν τα ήδη γνωστά. Όλες αυτές οι σειρές έγιναν σε τριπλέτες. Όταν πλέον

δοθήκαν τα αποτελέσματα, επόμενο βήμα ήταν εκχύλιση σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, αλλά και ποσότητα. Οπότε, σε ποτήρι ζέσεως των 800mL, ογκομετρήθηκαν 200mL NaOH 0,25N και χορηγήθηκαν 75g/L ηλιόσκονης. Το δείγμα υδρολύθηκε για 45 λεπτά. Μετά το πέρας μίας ώρας και εφόσον το διάλυμα είχε κρυώσει, μοιράστηκε σε Falcons των 50mL. Στη συνέχεια, στη μεγάλη φυγόκεντρο στις 5000 στροφές ανά λεπτό, φυγοκεντρίθηκαν τα δείγματα, με την εκχυλισμένη πλέον ηλιόσκονη, για διαχωρισμό των σωμάτων ηλιόσκονης από το εκχύλισμα. Μετά τις αναγκαίες αραιώσεις, η υπόλοιπη μέθοδος υλοποιήθηκε κανονικά, με τα γνωστά βήματα.



Εικόνα 2.4 Μέρος εξοπλισμού για την εκχύλιση των 75g/L ηλιόσκονης

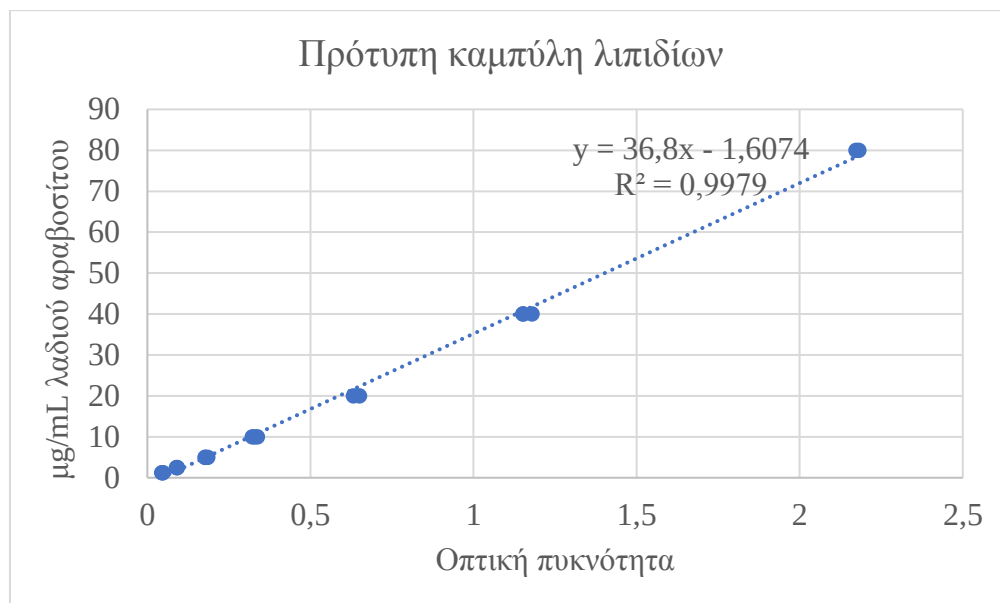
2.4.4.2 Μέτρηση πρωτεϊνών τυρόγαλου

Η μέτρηση των πρωτεϊνών στο τυρόγαλο, έγινε με τυρόγαλο, το οποίο αραιώθηκε 30 φορές (2% τυρόγαλο). Μετρήθηκαν 9 δείγματα, ενώ ακολουθήθηκαν κανονικά τα βήματα της μεθόδου Lowry. Ο εξοπλισμός, παρέμεινε ο ίδιος.

2.4.5 Λιπίδια

Για τη μέτρηση των λιπιδίων, σε pellets των 2mL, φυγοκεντρίθηκαν 2mL βιομάζας και αφαιρέθηκε 1,8mL υπερκείμενο με τη πιπέττα των 5mL. Στη συνέχεια με την ίδια πιπέττα, προστέθηκαν 1,5mL χλωροφόρμιο-μεθανόλη 2:1 και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλακίδιο ανάδευσης για 1 ώρα σε ανάδευση. Μετά την 1 ώρα, προστέθηκαν 0,1mL κορεσμένου νερού με dispenser (που είχε το κατάλληλο ρύγχος), για καλύτερο διαχωρισμό βιομάζας από το εκχυλισμένο λίπος. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές για 1 λεπτό. Επόμενο βήμα, συλλέχθηκαν 100μL ή 50μL εκχυλισμένου δείγματος (ανάλογα το πόσο υψηλή βιομάζα είχε μετρηθεί σε επί % ξηρού βάρους) και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια. Τα φιαλίδια τοποθετούνταν σε ειδικό ταψί με ζεστό νερό(υδατόλουτρο), ώστε να εξατμιστεί το χλωροφόρμιο με τη

μεθανόλη. Εν συνεχεία, πάλι με χρήση dispenser χορηγήθηκαν 0,4mL πυκνού θεικού οξέος(96%) και τα δείγματα βράστηκαν, για δέκα λεπτά. Μετά το βρασμό τα δείγματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, να κρυώσουν και προστέθηκε 1mL αντιδραστηρίου φωσφορικού οξέος/βανιλίνης, με πιπέττα του 1mL. Τα δείγματα επωάστηκαν, σε επωαστήρα με υδατόλουτρο, στους 37 ° C για 15 λεπτά και η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 530 nm. Για τον υπολογισμό των λιπιδίων, ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι, στα λίπη δεν αραιώθηκαν τα δείγματα και ότι η πρότυπή τους εκφράζεται σε $\mu\text{g}/\text{mL}$. Πέρα από τη χρήση της εξίσωσης γραμμικής παλινδρόμησης της πρότυπης καμπύλης των λιπιδίων, ρόλο έπαιξε και η αναλογία βιομάζας/εκχυλισμένου λίπους, η οποία είναι 40% βιομάζα/60% λίπος. Στις μετρήσεις των λιπιδίων, συλλέχθηκαν είτε 100 μL (0,1mL), είτε 50 μL (0,05mL) εκχυλισμένου λίπους από 1,80mL δείγματος(υγρής βιομάζας με χλωροφόρμιο-μεθανόλη και κορεσμένο νερό). Συνεπώς, οι συντελεστές είναι για τα 100 μL ($0,6 \cdot 1,80/0,1$)=10,8 και για τα 50 μL ($0,6 \cdot 1,80/0,05$)=21,6 αντίστοιχα. Οι συντελεστές, πολλαπλασιάστηκαν με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εξίσωσης γραμμικής παλινδρόμησης. Από εκεί και πέρα, οι στατιστικοί υπολογισμοί, έγιναν με τα ήδη γνωστά βήματα, όπως και νωρίτερα. Η πρότυπη καμπύλη των λιπιδίων, είχε εύρος τιμών 0-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και χρησιμοποιήθηκε λάδι αραβοσίτου, για τη κατασκευή της. Η πρώτη κίνηση που έγινε, ήταν να υπολογιστεί η ποσότητα (σε μL) του λαδιού, που αντιστοιχεί στα 80 μg . Εν συνεχεία η ποσότητα που προκύπτει αραιώθηκε με χλωροφόρμιο μέχρι το 1mL. Προχωρώντας, 10 μL από το διάλυμα λίπους -χλωροφορμίου 1mL, αραιώθηκαν σε άλλα 990 μL χλωροφόρμιο. Ο λόγος των αραιώσεων αυτών, οφείλεται στο γεγονός ότι η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε στην αρχή, ήταν 1000 φορές μεγαλύτερη της επιθυμητής(80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Από εκεί και πέρα, εφόσον φτάσαμε τα 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ακολούθησαν διπλές αραιώσεις σε 7 σημεία και η υπόλοιπη διαδικασία(εξάτμιση χλωροφορμίου, προσθήκη αντιδραστηρίων, μέτρηση) υλοποιήθηκε με τα ίδια βήματα, όπως και στα δείγματα με τα λιπίδια των μικροφυκών.



Γράφημα 2.4 Πρότυπη καμπύλη λιπιδίων

2.4.6 Χρωστικές

Για τη μέτρηση των χρωστικών στο εργαστήριο, σε pellets των 2mL, συλλέχθηκαν αρχικά 2mL υγρής καθαρής βιομάζας, με τη χρήση πιπέτας των 5mL. Οι βιομάζες φυγοκεντρήθηκαν στις 5000 στροφές, για 5 λεπτά και αφαιρέθηκε υπερκείμενο 1,8mL. Στη συνέχεια, στα δείγματα προστέθηκαν 1,8mL μεθανόλη 90% και επωάστηκαν με ανάδευση στους 80 °C σε πλάκα ανάδευσης-θέρμανσης, για 15 λεπτά. Με το πέρας, αυτής της διαδικασίας τα δείγματα ξαναφυγοκεντρήθηκαν, στις 5000 στροφές για 5 λεπτά. Τέλος, συλλέχθηκαν 1,5mL χρωματισμένου υπερκείμενου από τα pellets και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων, έγιναν στα 470, 652, 665 nm, σε φασματοφωτόμετρο Cadas 50. Υπολογίστηκαν οι χλωροφύλλες α και β, τα ολικά καροτενοειδή και η ολική χλωροφύλλη. Ο τρόπος με τον οποίο υπολογίστηκαν οι χρωστικές, ήταν ο εξής:

- Για τη χλωροφύλλη α (chl a) έχουμε : $16,28 \cdot OD_{665} - 9,28 \cdot OD_{652}$
- Χλωροφύλλη β (chl b) : $36,92 \cdot OD_{652} - 16,54 \cdot OD_{665}$
- Ολικά καροτενοειδή (Total Carotenoids) :

$$1000 \cdot OD_{470} - 1,91 \cdot \text{Chl a (mg/L)} - 95,15 \cdot \text{Chl b (mg/L)} / 225$$
- Ολική χλωροφύλλη = χλωροφύλλη α + χλωροφύλλη β

Η διαδικασία που αφορά τους υπολογισμούς για τον % μέσο όρο, την % τυπική απόκλιση και την % σχετική τυπική απόκλιση, παραμένει παρόμοια με αυτή των προηγούμενων αναλύσεων.

2.4.7 Στατιστικοί υπολογισμοί

Ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων, για τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, έγιναν στο Excel. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν κάποια μέτρα διασποράς, τα οποία εκφράστηκαν σε % ποσοστά. Τα μέτρα αυτά είναι:

- η τυπική απόκλιση (Standard Deviation) μεταξύ των μετρήσεων, δηλαδή μέχρι πόσο περίπου περιμένουμε μία τυπική τιμή της X (τυχαία μεταβλητή) να απέχει από τη μέση τιμή. Δηλαδή, πόσο απέχουν οι τιμές των μετρήσεων, από τη μέση τιμή που προέκυψε. Ο τύπος της για το Excel, είναι =STDEV.S(κελί:κελί),
- ο μέσος όρος (Average), την αριθμητική τιμή δηλαδή που υπολογίστηκε, με τη διαίρεση του αθροίσματος των τιμών μιας σειράς μετρήσεων, προς τον αριθμό των μετρήσεων. Ο τύπος στο Excel, είναι =AVERAGE(κελί:κελί),
- η % σχετική τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων (Relative Standard deviation), η οποία είναι το πηλίκο της τυπικής απόκλισης των μετρήσεών μας, προς τη μέση τιμή αυτών πολλαπλασιασμένη επί 100% και εκφράζει την επαναληψιμότητα σε σχέση προς τη μέση τιμή με εκατοστιαίους όρους. Ο τύπος στο Excel, είναι $RSD\% = (s/x) * 100\%$, όπου s : η τυπική απόκλιση και x : ο μέσος όρος των μετρήσεων (Α.Ν. Ανθεμίδης και συνεργάτες, 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1.1 Αποτελέσματα μετρήσεων 1^{ης} πορείας

Ξεκινώντας, μετρήθηκαν τρία αρχικά OD, τα οποία έδωσαν μέσο όρο βιομάζας 176,3 mg/L, με τον οποίο ξεκινάει η πρώτη πορεία(1^η σειρά). Ο μέσος όρος αυτός προήλθε από τα OD:

- 0,161
- 0,162
- 0,164 στα 750 nm. Με το πέρας έξι ημερών συλλέχθηκαν οι βιομάζες που είχαν αναπτυχθεί. Πριν τις φυγοκεντρίσεις, για το καθαρισμό της βιομάζας, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα στις καλλιέργειες αυτές, όπου έγινε τέσσερις φορές αραίωση.

Πίνακας 3.1 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 1^{ης} πορείας πριν τις φυγοκεντρίσεις

g/L	2	1,5	1	0,5	0,25	0,125
peptone						
Dilution	4	4	4	4	4	4
OD _{sample}	0,321	0,289	0,308	0,386	0,409	0,296
	0,357	0,267	0,326	0,313	0,39	0,294
	0,329	0,275	0,253	0,31	0,354	0,288

Στα πρώτα αυτά OD, παρατηρούνται διάφορες διακυμάνσεις μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων πεπτόνης. Ωστόσο, για να υπάρχει μια πιο καλή αρχική εικόνα, χρειάζεται τα OD να μεταφραστούν σε βιομάζες. Μέσω των οπτικών πυκνοτήτων αυτών, λοιπόν και με τη βοήθεια της γραμμικής εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης, υπολογίστηκαν οι βιομάζες στις οποίες αντιστοιχούν τα OD αυτά και βρέθηκαν τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 3.2 Βιομάζα 1^{ης} πορείας πριν τις φυγοκεντρίσεις

g/L peptone	2	1,5	1	0,5	0,25	0,125
Biomass(mg/L)	1470,86	1316,44	1408,13	1784,53	1895,52	1350,22
	1644,58	1210,28	1494,99	1432,26	1803,83	1340,57
	1509,47	1248,88	1142,72	1417,78	1630,11	1311,62

Γίνεται εύκολα αντιληπτό, ότι σε κάθε συγκέντρωση πεπτόνης ξεχωριστά, ότι τουλάχιστον οι 2 από τις 3 καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν, φαίνεται να βρίσκονται πιο κοντά. Τέλος, οι μέσοι όροι που προκύπτουν από αυτά είναι:

Πίνακας 3.3 Μέσοι όροι βιομάζας 1^{ης} πορείας πριν τις φυγοκεντρίσεις

g/L peptone	2	1,5	1	0,5	0,25	0,125
Average of biomass (mg/L)	1541,64	1258,53	1348,61	1544,85	1776,48	1334,14

Μετά από 3-4 φυγοκεντρίσεις, με τη πλέον βιομάζα καθαρή, ξαναμετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων. Αυτή τη φορά, τα δείγματα αραιώθηκαν δύο φορές. Οι μετρήσεις τις οπτικής πυκνότητας, είναι οι ακόλουθες:

Πίνακας 3.4 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 1^{ης} πορείας μετά τις φυγοκεντρίσεις

g/L peptone	2	1,5	1	0,5	0,25	0,125
Dilution	2	2	2	2	2	2
OD _{sample}	0,421	0,378	0,45	0,55	0,557	0,421
	0,464	0,355	0,46	0,451	0,504	0,39
	0,471	0,385	0,376	0,445	0,49	0,398

Η βιομάζα που αντιστοιχεί σε κάθε συγκέντρωση, είναι για:

Πίνακας 3.5 Βιομάζα 1^{ης} πορείας μετά τις φυγοκεντρίσεις

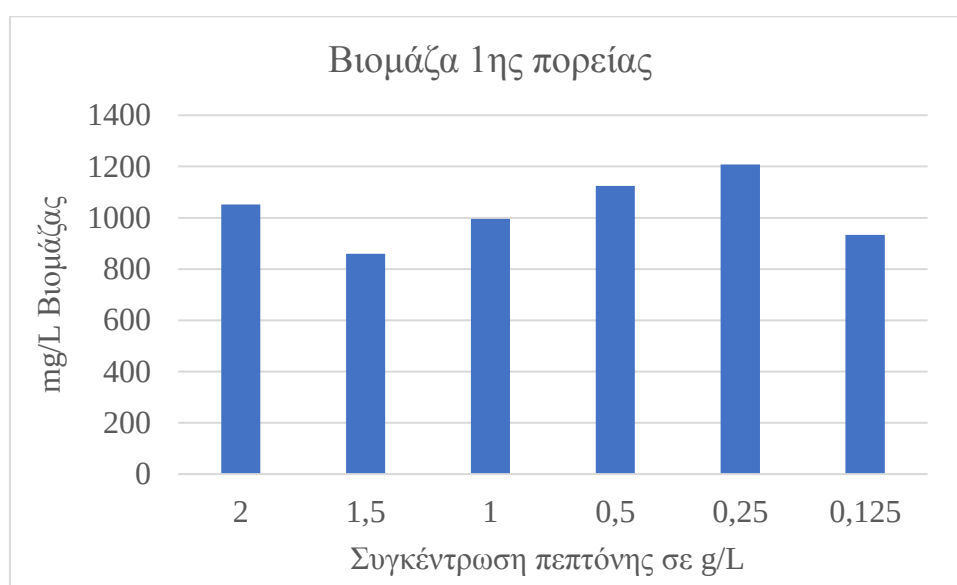
g/L peptone	2	1,5	1	0,5	0,25	0,125
Biomass(mg/L)	976,71	872,96	1046,68	1287,96	1304,85	976,71
	1080,46	817,47	1070,81	1049,1	1176,97	901,91
	1097,35	889,85	868,14	1034,62	1143,19	921,22

Έχοντας μια πιο ολοκληρωμένη απεικόνιση της βιομάζας, για αυτή τη σειρά, ουσιαστικά επιβεβαιώνεται το γεγονός ότι, οι τιμές βιομάζας είναι πιο κοντινές σε τουλάχιστον 2 από τις 3 καλλιέργειες. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο, αποφασίστηκε να αναπτύσσεται μονός αριθμός καλλιιεργειών, ώστε τα αποτελέσματα να γίνονται πιο εμφανή. Συνεχίζοντας, οι μέσοι όροι βιομάζας που σχηματίστηκαν,

αποτελέσαν τη τάση της βιομάζας ανά τις διάφορες συγκεντρώσεις. Ακολουθούν πίνακας και γράφημα με τη τάση της βιομάζας, για κάθε συγκέντρωση :

Πίνακας 3.6 Μέσοι όροι βιομάζας ανά g/L πεπτόνης μετά τις φυγοκεντρίσεις

g/L	2	1,5	1	0,5	0,25	0,125
peptone						
Average	1051,51	860,09	995,21	1123,89	1208,34	933,28
of						
biomass						
(mg/L)						



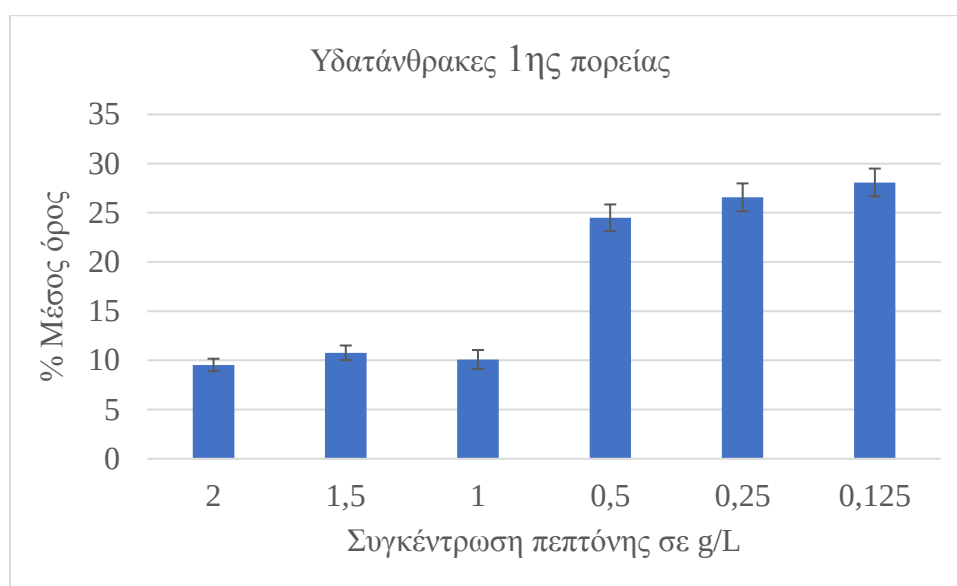
Γράφημα 3.1 Βιομάζα 1^{ης} πορείας

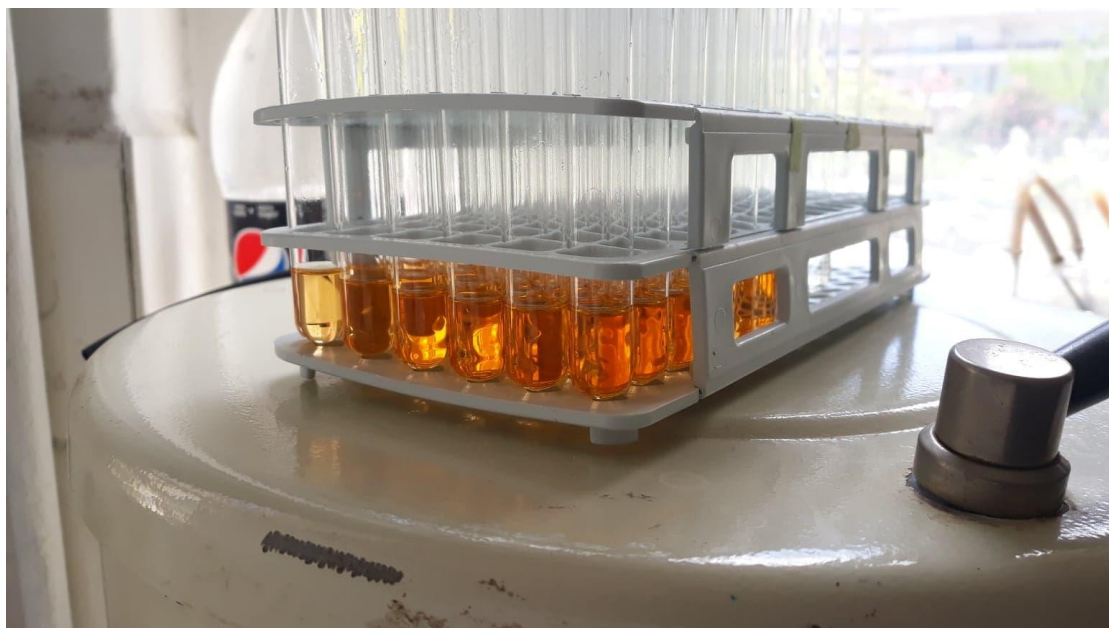
Έχοντας μεταφράσει τη βιομάζα που προκύπτει σε κάθε δείγμα (όχι τους μέσους όρους) σε mg/L, επόμενο βήμα ήταν οι αναλύσεις. Σκοπός ήταν, να αποκτηθεί μία εικόνα της βιοχημικής σύστασης του στελέχους σε τι ποσοστό % αποτελείται από υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη και χρωστικές. Όπως είναι κατανοητό, στα δείγματα έπρεπε να γίνουν αραιώσεις, ώστε να βρίσκονται εντός του εύρους των πρότυπων καμπυλών, κάθε ανάλυσης. Στο πίνακα που ακολουθεί, φαίνονται οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν για κάθε ανάλυση στη 1^η πορεία.

Πίνακας 3.7 Αραιώσεις αναλύσεων 1^{ης} πορείας

g/L	2	1,5	1	0,5	0,25	0,125
peptone						
Proteins	3	3	3	3	3	3
dilution						
C/H	10	10	10	10	10	10
dilution						
Lipids	-	-	-	-	-	-
dilution						
Pigments	-	-	-	-	-	-
dilution						

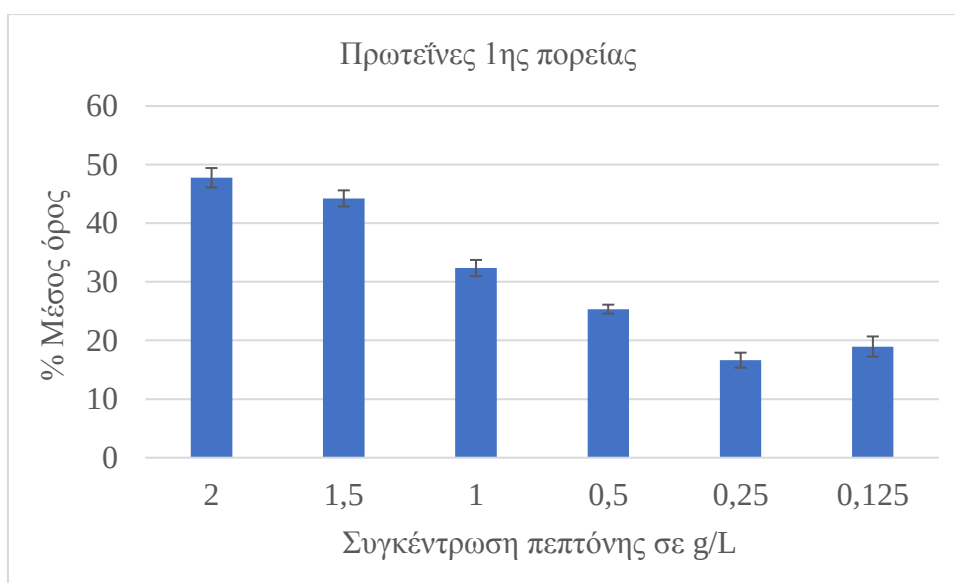
Η πρώτη ανάλυση ήταν αυτή των υδατανθράκων. Τα αποτελέσματα, που προέκυψαν σε αυτή την ανάλυση, δίνονται στο ακόλουθο γράφημα:

**Γράφημα 3.2** Υδατάνθρακες 1^{ης} πορείας

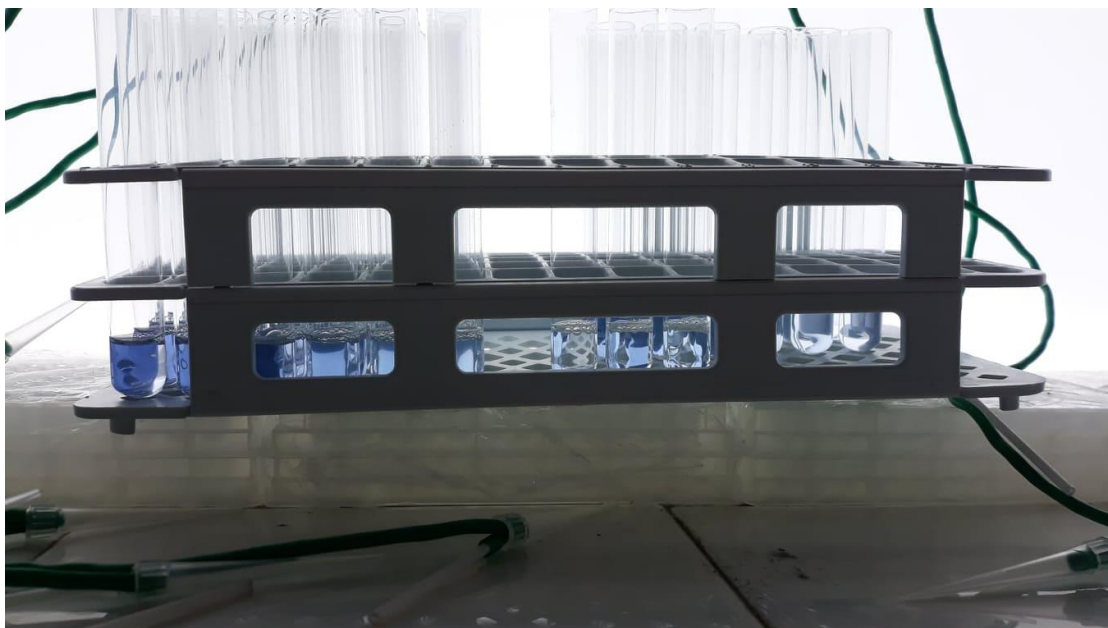


Εικόνα 3.1 Μέτρηση υδατανθράκων 1^{ης} πορείας

Οι υψηλοί υδατάνθρακες στις χαμηλές συγκεντρώσεις πεπτόνης, είναι κάτι αναμενόμενο, καθώς είναι γνωστό ότι η έλλειψη/μείωση αζώτου(N) μπορεί να προκαλέσει αύξηση λιπιδίων και υδατανθράκων. Για τις συγκεντρώσεις πεπτόνης 0,125-0,5g/L, τα ποσοστά υδατανθράκων βρίσκονται εντός βιβλιογραφικού εύρους. Το αντίθετο ισχύει για τις καλλιέργειες με 1-2g/L πεπτόνης. Συνεχίζοντας, ακολουθεί η ανάλυση των πρωτεϊνών. Στο παρακάτω γράφημα, φαίνεται η τάση των πρωτεϊνών :

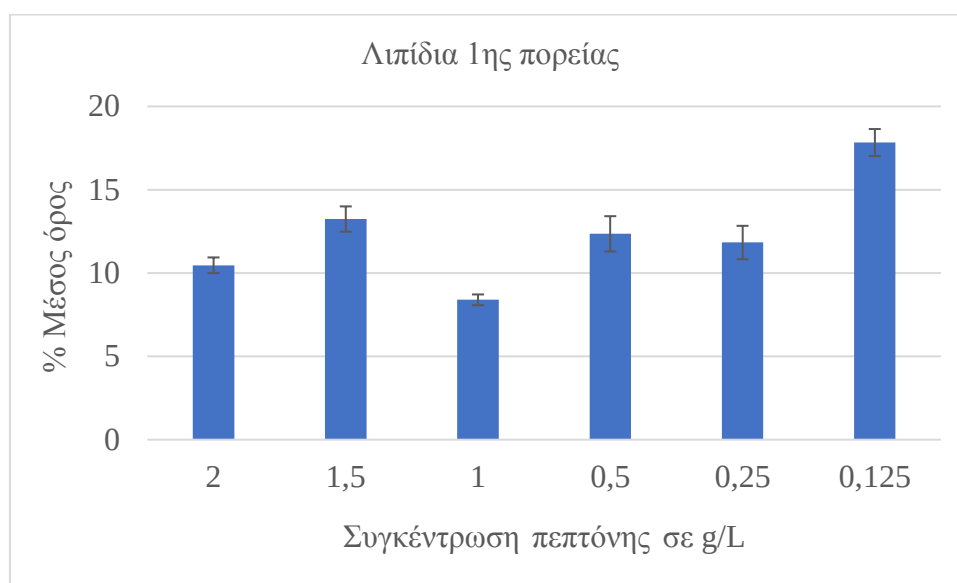


Γράφημα 3.3 Πρωτεΐνες 1^{ης} πορείας



Εικόνα 3.2 Μέτρηση πρωτεϊνών 1^{ης} πορείας

Ακολουθώντας αντίθετη λογική από τους υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες σε καλλιέργειες με 1-2g/L πεπτόνης είναι πιο υψηλές και εντός βιβλιογραφικού εύρους, εν συγκρίσει με τις καλλιέργειες που είχαν πεπτόνη από 0,125-0,5g/L. Άρα, όσο περισσότερο άζωτο προμηθεύεται το στέλεχος, τόσο υψηλότερες πρωτεΐνες θα δώσει. Τα λιπίδια της 1^{ης} πορείας, μετρήθηκαν με τη συλλογή 100μl εκχυλισμένου δείγματος, κατά την ανάλυση και τα αποτελέσματα φαίνονται στο εξής γράφημα:

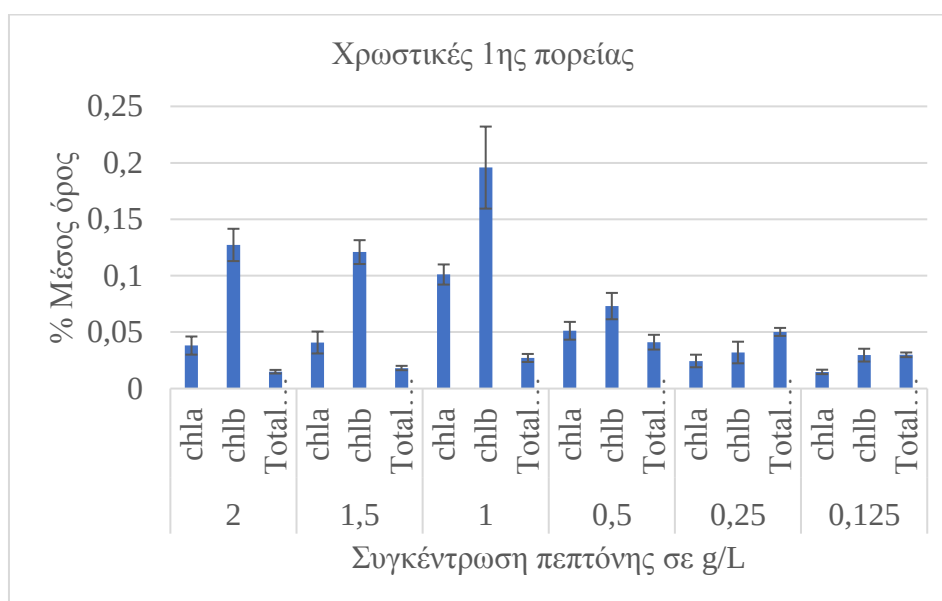


Διάγραμμα 3.4 Λιπίδια 1^{ης} πορείας



Εικόνα 3.3 Μέτρηση λιπιδίων 1^{ης} πορείας

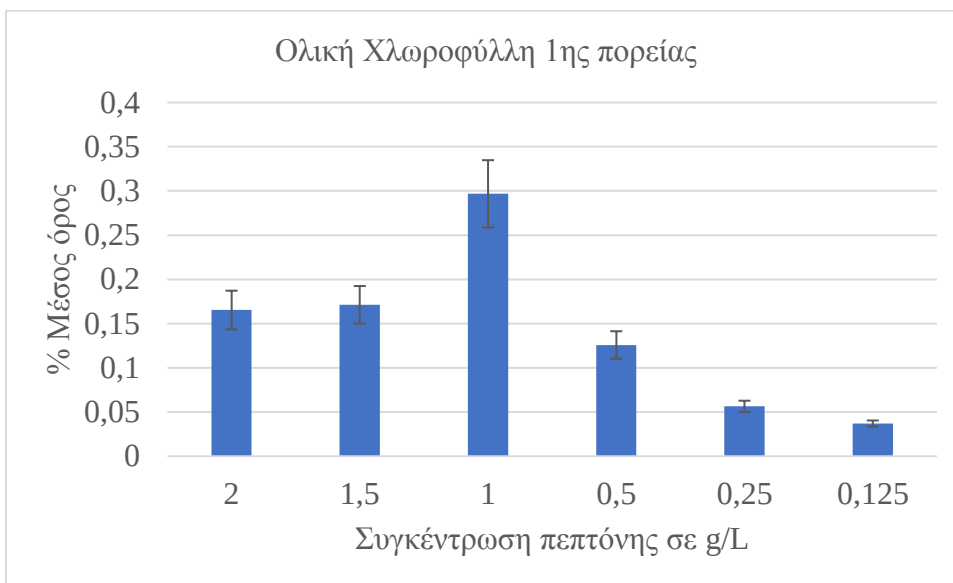
Κοιτάζοντας το διάγραμμα των λιπιδίων, θα περίμενε κανείς να δει ομοιόμορφη αύξηση των λιπιδίων, από τα 2g/L-0,125g/L πεπτόνης. Ωστόσο, αυτό που παρατίθεται στο διάγραμμα, είναι αυξομειώσεις από τα 2g/L πεπτόνης κατεβαίνοντας στο 1g/L, ενώ από εκεί και πέρα, από τα 0,5g/L-0,125g/L υπάρχει ξανά αυξητική τάση λιπιδίων. Τελευταίες μένουν οι μετρήσεις των χρωστικών. Παρακάτω, παρουσιάζονται χλωροφύλλη α, β και ολικά καροτενοειδή της 1^{ης} σειράς, σε κοινό γράφημα:



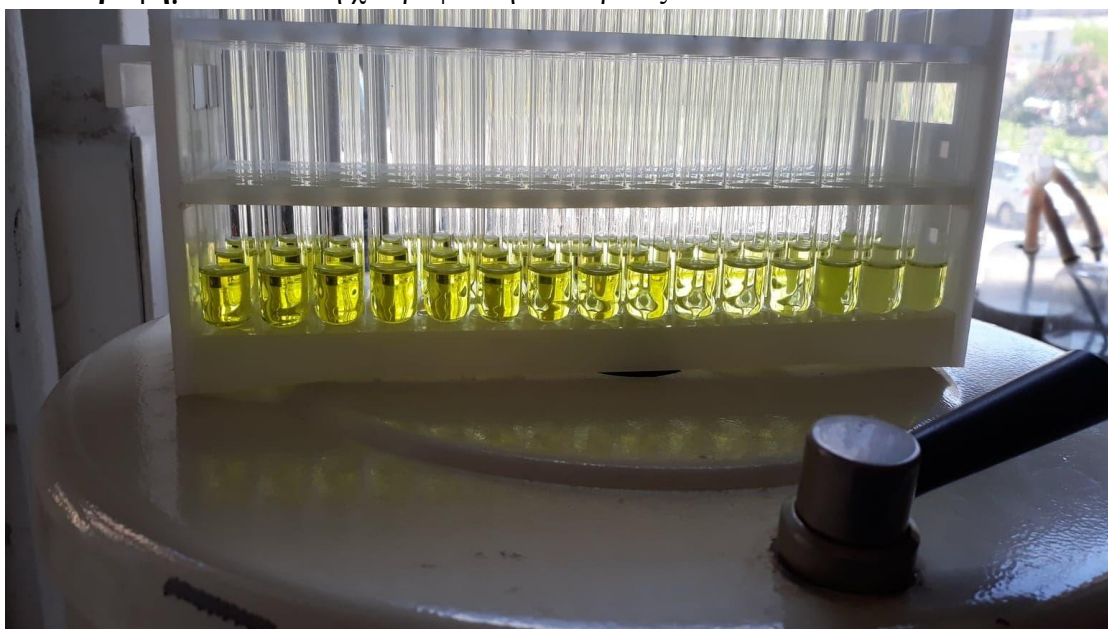
Γράφημα 3.5 Χλωροφύλλες α, β και ολικά καροτενοειδή 1^{ης} πορείας

Οι χρωστικές, γενικότερα μέσα στην έρευνα αυτή δε δόθηκαν σε κάποιο υψηλό ποσοστό. Αυτό που είναι εφικτό όμως, να εντοπιστεί και σχολιαστεί, είναι οι σχέσεις μεταξύ των μετρούμενων αντικειμένων. Οι τιμές των ολικών καροτενοειδών και της

χλωροφύλλης α, είναι πιο κοντινές από αυτές της χλωροφύλλης β, η οποία είναι σε εμφανείς μεγαλύτερες ποσότητες. Αυτό μπορεί να οφείλεται, στο γεγονός ότι η προκαλλιέργεια του εμβολίου δεν περιείχε άζωτο, στο θρεπτικό της υπόστρωμα. Η έλλειψη αζώτου, μπορεί να αναστάλλει κάποιες λειτουργίες(και να δημιουργήσει αναστατώσεις σε διάφορους μηχανισμούς), συμπεριλαμβανομένου και τη παραγωγή χλωροφύλλης. Τελευταία μέτρηση είναι αυτή της ολικής χλωροφύλλης. Για την ολική χλωροφύλλη, δίνονται τα εξής:



Γράφημα 3.6 Ολική χλωροφύλλη 1^{ης} πορείας



Εικόνα 3.4 Μέτρηση χρωστικών 1^{ης} σειράς

Όπως είναι ευκόλως κατανοητό, με εξαίρεση στο 1g/L, η τάση της ολικής χλωροφύλλης μειώνεται όσο μειώνεται και η συγκέντρωση της πεπτόνης. Ενώ για την ολοκλήρωση της πορείας αυτής, παρατίθεται πίνακας με το συνολικό άθροισμα % των αναλύσεων που έγιναν, για τη βιοχημική σύσταση του στελέχους:

Πίνακας 3.8 Βιοχημική σύσταση καλλιεργειών 1^{ης} πορείας

Peptone	2	1,5	1	0,5	0,25	0,125
conc. in g/L						
% Total	68,31	68,6	51,45	62,48	55,19	64,99
sum of analyzes						

Στο παραπάνω πίνακα, απεικονίζεται η βιοχημική σύσταση του στελέχους από τις διάφορες αναλύσεις. Στις συγκεντρώσεις πεπτόνης 1g/L και 0,25g/L, φαίνεται ξεκάθαρα ότι οι λόγοι γλυκερόλη/πεπτόνη, είναι χαμηλότεροι των υπολοίπων γεγονός που είτε μπορεί να οφείλεται σε υπερεκτίμηση/υποτίμηση της βιομάζας, είτε το στέλεχος λόγω διάφορων παραγόντων δε λειτούργησε όπως αναμενόταν.



Εικόνα 3.5 Συλλογή βιομάζας 1^{ης} πειραματικής πορείας

3.2 Αποτελέσματα 2^{ης} πορείας

3.2.1 Αποτελέσματα μετρήσεων 2^{ης} σειράς

Στη δεύτερη πορεία, εξελίσσονται 2 σειρές, τη 2^η και τη 3^η σειρά. Η πορεία αυτή ξεκινά με τη σειρά με λόγο γλυκερόλη/πεπτόνη, 10/4-50/20 και συνεχίζει με το λόγο 10/0,5-50/2,5, λόγοι που είναι 2-10 φορές μεγαλύτεροι των αρχικών. Ο εμβολιασμός ήταν 1349,89 mg/L κατά μέσο όρο, αριθμός που προήλθε από τα εξής OD:

- 0,581
- 0,579

- 0,567.

Τα OD που μετρήθηκαν πριν τις φυγοκεντρίσεις, είναι τα εξής:

Πίνακας 3.9 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 2^{ης} σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις

g/L	50	40	30	20	15	10
glycerol						
Run	16	16	16	16	16	16
OD _{sample}	0,423	0,357	0,381	0,322	0,356	0,304
	0,271	0,371	0,366	0,273	0,371	0,296
	0,415	0,292	0,309	0,281	0,265	0,245

Η βιομάζα πριν τις φυγοκεντρίσεις, είναι :

Πίνακας 3.10 Βιομάζα 2^{ης} σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις

g/L glycerol	50	40	30	20	15	10
Biomass(mg/L)	7852,25	6578,29	7041,54	5902,7	6558,98	5555,26
	4918,28	6848,52	6752,01	4956,88	6848,52	5400,84
	7697,83	5323,63	5651,77	5111,3	4802,46	4416,41

Για ακόμη μία φορά παρατηρούνται διακυμάνσεις στις τιμές κάθε συγκέντρωσης, αλλά η μεγαλύτερη βρίσκεται στα 50g/L γλυκερόλης, που πιθανόν να έγινε κάποιο σφάλμα κατά τη μέτρηση OD του δείγματος. Οι μέσοι όροι που αντιστοιχούν σε αυτές τις μετρήσεις, είναι οι εξής :

Πίνακας 3.11 Μέσοι όροι βιομάζα 2^{ης} σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις

g/L	50	40	30	20	15	10
glycerol						
Average	6822,78	6250,14	6481,77	5323,63	6069,99	5124,17
of						
biomass						
(mg/L)						

Μετά το καθαρισμό τις βιομάζας, μετρήθηκαν οι νέες τιμές OD και βιομάζας, οι οποίες δίνονται τις παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 3.12 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 2^{ης} σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις

g/L	50	40	30	20	15	10
glycerol						
Run	8	8	8	8	8	8
OD _{sample}	0,486	0,326	0,401	0,302	0,415	0,411
	0,424	0,414	0,391	0,256	0,42	0,381
	0,425	0,367	0,274	0,296	0,288	0,283

Η πλέον καθαρή βιομάζα για κάθε λόγο και ανά συγκέντρωση γλυκερόλης, είναι :

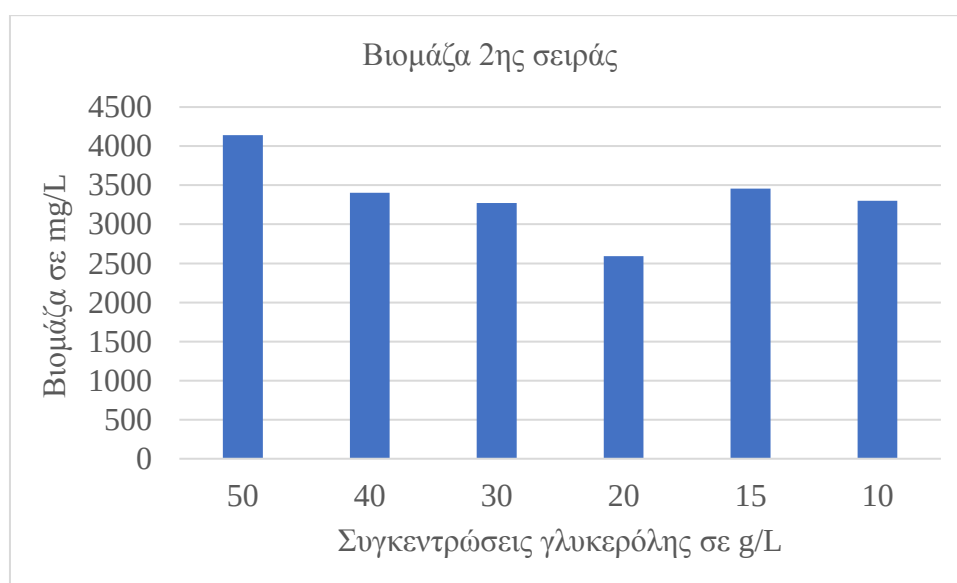
Πίνακας 3.13 Βιομάζα 2^{ης} σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις

g/L glycerol	50	40	30	20	15	10
Biomass(mg/L)	4534,15	2989,96	3713,8	2758,33	3848,91	3810,31
	3935,77	3839,26	3617,28	2314,37	3897,17	3520,77
	3945,43	3385,66	2488,09	2700,42	2623,21	2574,95

Οι τιμές που σχηματίζουν τη τάση της βιομάζας μας, σε αυτή τη σειρά βρίσκονται στο πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 3.14 Μέσος όρος βιομάζας 2^{ης} σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις

g/L glycerol	50	40	30	20	15	10
Average of	4138,45	3404,96	2591,04	3273,06	3456,43	3302,01
biomass						
(mg/L)						

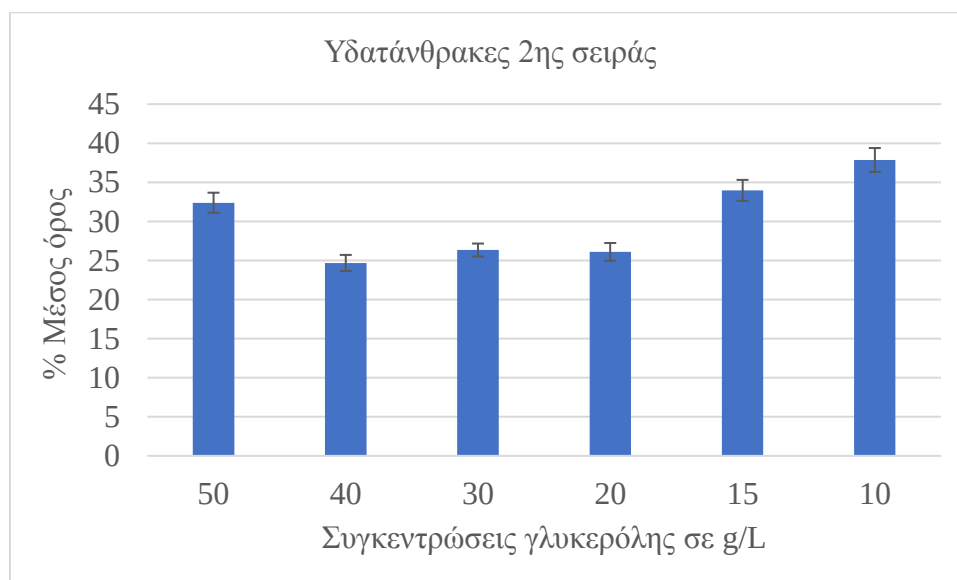
**Γράφημα 3.7** Βιομάζα 2^{ης} σειράς

Συνεχίζοντας, όπως και προηγουμένως, παρουσιάζονται οι αραιώσεις, των αναλύσεων σε κάθε λόγο ξεχωριστά. Στον πίνακα που ακολουθεί, παρατηρούμε ότι, στις χρωστικές της σειράς αυτής, αναφερόμενοι πάντα , για δείγματα που ανήκουν στον ίδιο λόγο γλυκερόλη/πεπτόνη(ίδια συγκέντρωση), χρειάστηκαν είτε 2, είτε 4 φορές αραιώση. Με δεδομένα αυτά, για τις αραιώσεις της σειράς αυτής, ισχύουν τα εξής :

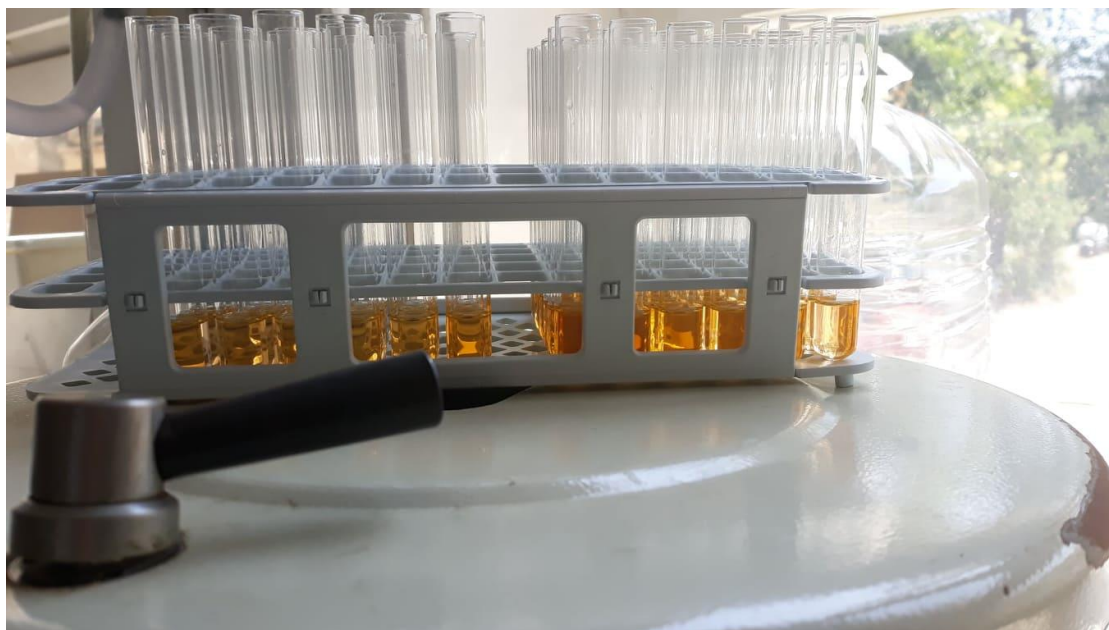
Πίνακας 3.15 Αραιώσεις αναλύσεων 2^{ης} σειράς

g/L	50	40	30	20	15	10
glycerol						
Prots	10	10	10	10	10	10
dilution						
C/H	40	40	40	40	40	40
dilution						
Lipids	-	-	-	-	-	-
dilution						
Pigments	2-4	2-4	2-4	2	2	2-4
dilution						

Ξεκινώντας, για τη σειρά αυτή στο κομμάτι των αναλύσεων στους υδατάνθρακες, δίνονται τα εξής:

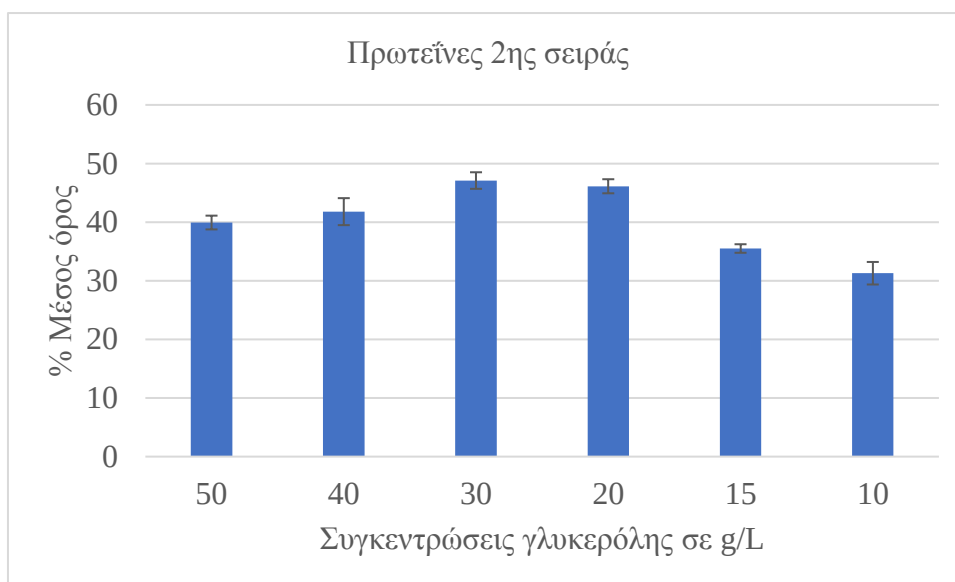


Γράφημα 3.8 Υδατάνθρακες 2^{ης} σειράς

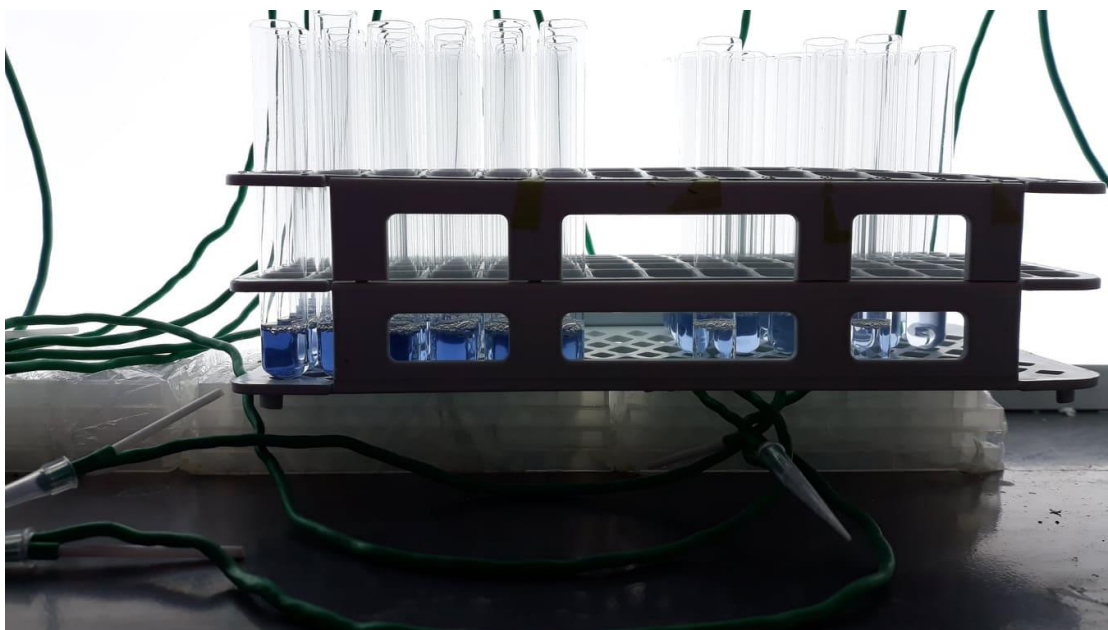


Εικόνα 3.6 Μέτρηση υδατανθράκων 2^{ης} σειράς

Τα αποτελέσματα δείχνουν τους υδατάνθρακες εντός γνωστού βιβλιογραφικού εύρους ότι στα 50g/L γλυκερόλης, οι υδατάνθρακες είναι πιο υψηλοί από αυτούς στα 20-40g/L γλυκερόλης, ενώ τέλος στα 10-15g/L γλυκερόλης οι υδατάνθρακες βρίσκονται στις υψηλότερες ποσότητες της σειράς αυτής. Με λίγα λόγια, η μείωση της πεπτόνης με εξαίρεση στα 50g/L, αποδίδει περισσότερους υδατάνθρακες. Συνεχίζοντας έχουμε τις πρωτεΐνες :

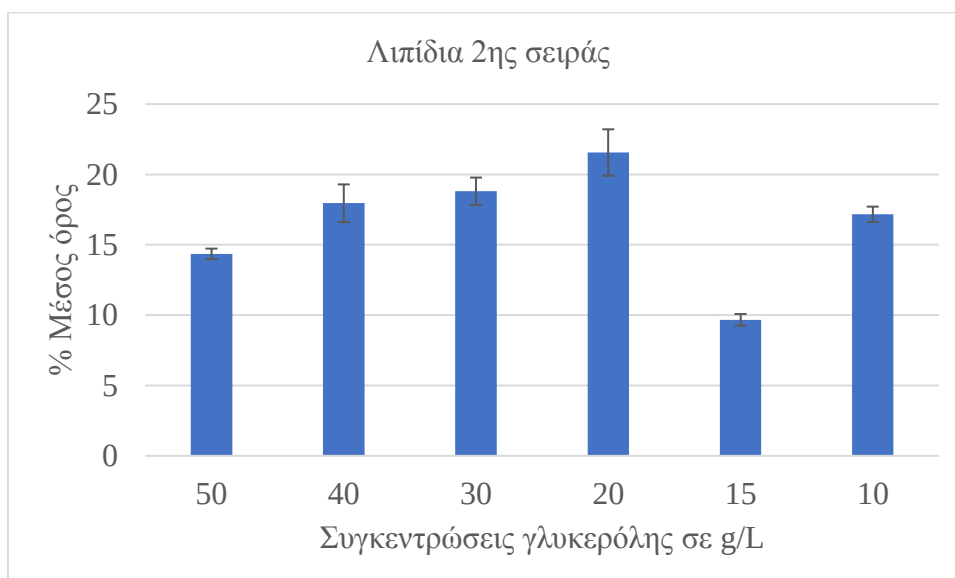


Γράφημα 3.9 Πρωτεΐνες 2^{ης} σειράς

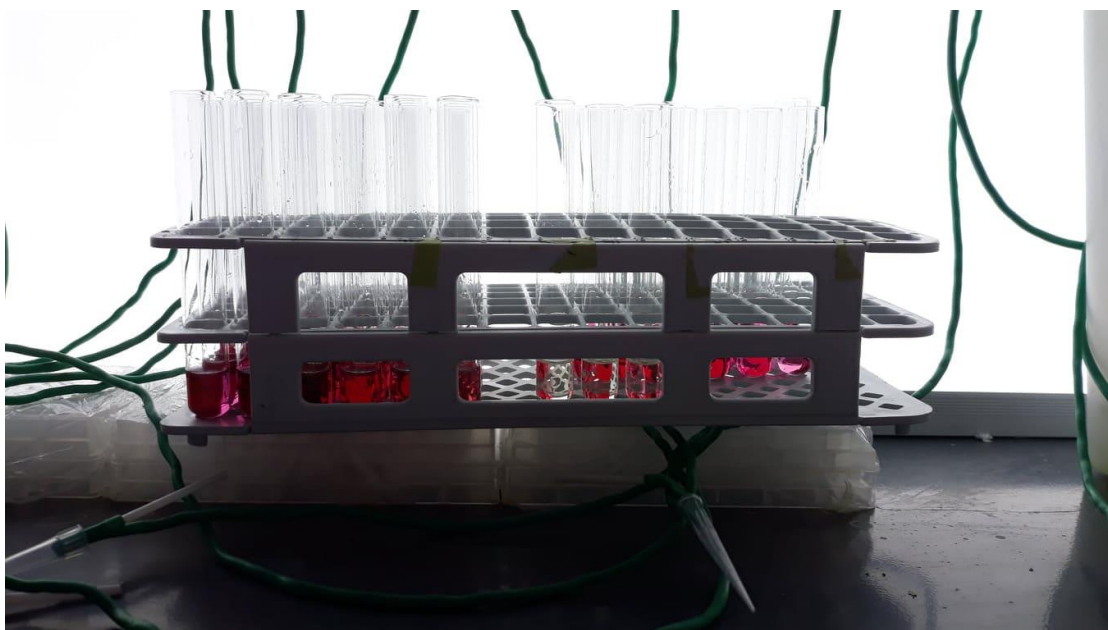


Εικόνα 3.7 Μέτρηση πρωτεϊνών 2^{ης} σειράς

Για τις πρωτεΐνες, τα ανώτερα σημεία βρίσκονται στα 20-30g/L γλυκερόλης. Η τάση του διαγράμματος δείχνει όσο πλησιάζουμε τα 30g/L γλυκερόλης, οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν ανοδική πορεία, λόγω αφθονίας σε άζωτο. Από την άλλη στα 30-50g/L γλυκερόλης, φαίνεται μια ελαφριά μείωση πρωτεϊνών. Βασιζόμενοι στο λόγο γλυκερόλη/πεπτόνη, θα έπρεπε στις υψηλές συγκεντρώσεις πεπτόνης να αποδίδονται και περισσότερες πρωτεΐνες. Στα λιπίδια σε αυτή τη σειρά, συλλέχθηκαν 100μl από τα 10-30 g/L γλυκερόλης και 50 μl, από τα 40-50 g/L γλυκερόλης.

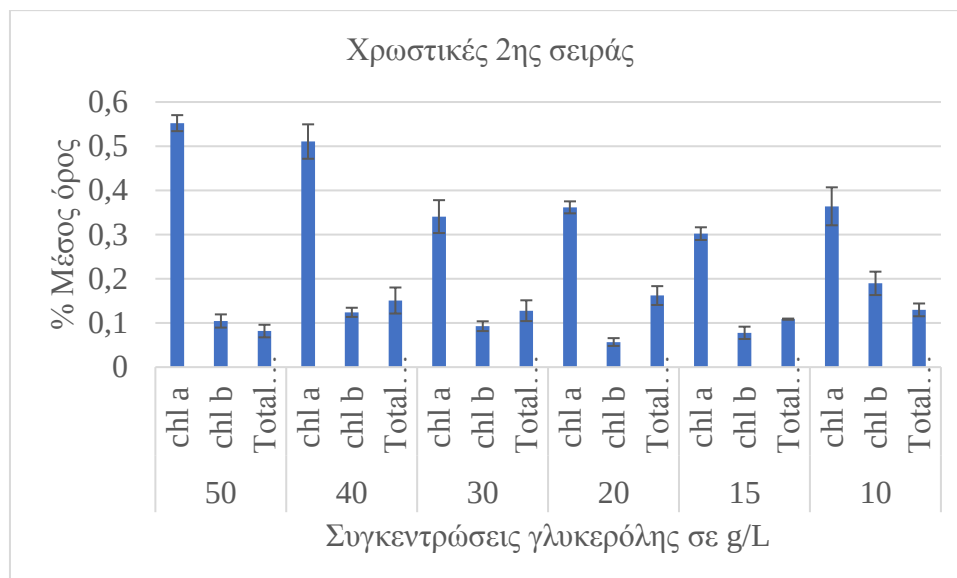


Γράφημα 3.10 Λιπίδια 2^{ης} σειράς

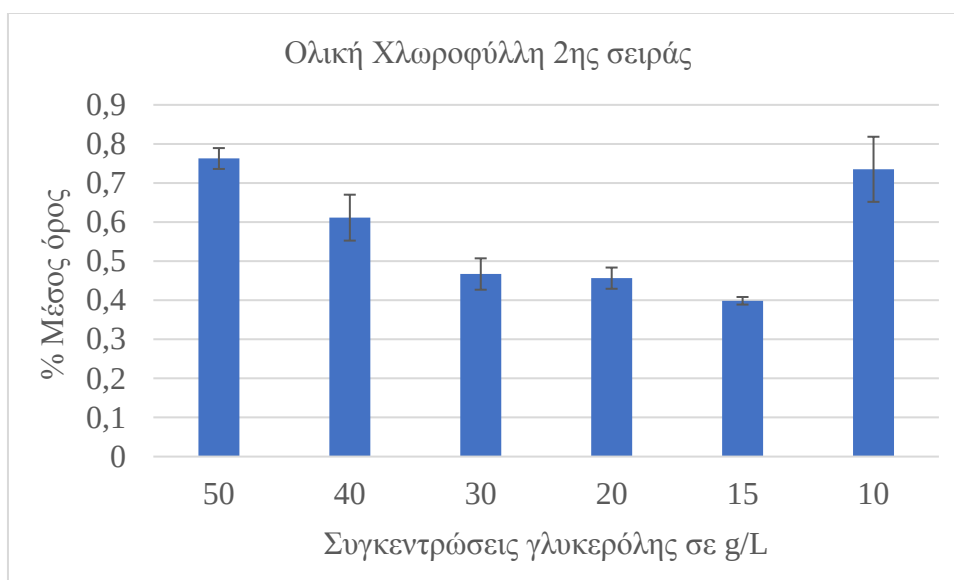


Εικόνα 3.8 Μέτρηση λιπιδίων 2^{ης} σειράς

Το γράφημα απεικονίζει τα αποτελέσματα των λιπιδίων ανά συγκέντρωση γλυκερόλης. Για ακόμα μία φορά τα υψηλότερα σημεία βρίσκονται στα 20-30g/L, γεγονός που προκαλεί εντύπωση, αν ληφθεί υπόψιν η τροφοπενία αζώτου. Ουσιαστικά, θα αναμενόταν να υπάρχουν περισσότερα λιπίδια όσο οι λόγοι γλυκερόλης πεπτόνης μικραίνουν. Αντιθέτως, η πορεία του γραφήματος δείχνει τα λιπίδια να φτάνουν στο καλύτερό τους σημείο από 10-20g/L γλυκερόλης, ενώ από τα 20-50g/L γλυκερόλης τα λιπίδια μειώνονται, έχοντας και πάλι όμως μεγαλύτερες τιμές από τα 10-20g/L γλυκερόλης. Τέλος, στα 15g/L γλυκερόλης φαίνεται να έγινε κάποιο σφάλμα στη μέτρηση κατά πάσα πιθανότητα, ενώ δεν αποκλείεται ο συγκεκριμένος λόγος γλυκερόλη/πεπτόνη να μην αποδίδει τόσα λιπίδια όσα θα ήταν αναμενόμενο. Επιπροσθέτως, τα ποσοστιαία τους αποτελέσματα βρίσκονται εντός βιβλιογραφικού εύρους στα χαμηλά σημεία, ενώ στα υψηλά εμφανίζονται να είναι λίγο παραπάνω από το κανονικό. Όσο για τις χρωστικές, παρουσιάζονται με σειρά τα αποτελέσματα όλων των ήδη γνωστών μετρήσεων. Την αρχή για ακόμη μία φορά κάνουν οι μετρήσεις στις χλωροφύλλες α, β και τα ολικά καροτενοειδή:

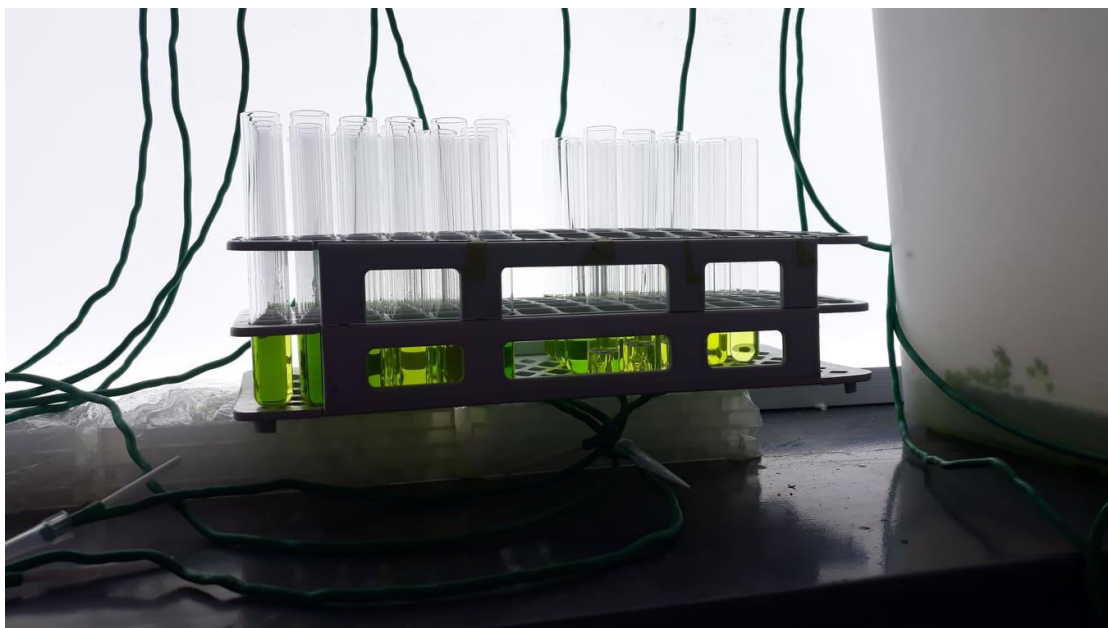


Γράφημα 3.11 Χλωροφύλλες α, β και ολικά καροτενοειδή 2^{ης} σειράς



Γράφημα 3.12 Ολική χλωροφύλλη 2^{ης} σειράς

Εδώ λοιπόν, οι τιμές της χλωροφύλλης α φαίνεται να είναι μεγαλύτερες, από τις τιμές των ολικών καροτενοειδών, αλλά και της χλωροφύλλης β. Παράγοντας που διαμόρφωσε το αποτέλεσμα αυτό, ήταν η υψηλή παρουσία αζώτου τόσο στις πειραματικές καλλιέργειες της σειράς αυτής, όσο και στις καλλιέργειες των εμβολίων. Η ολική χλωροφύλλη εδώ μειώνεται όσο μειώνονται και οι συγκεντρώσεις της πεπτόνης, αντίστοιχα. Εξαίρεση αποτελούν τα 10g/L γλυκερόλης τα οποία φαίνεται να έχουν υψηλή συγκέντρωση, ολικής χλωροφύλλης. Τέλος, μία αδυναμία που αφορά τα καροτενοειδή στα 10g/L γλυκερόλης, είναι ότι το αποτέλεσμα βγήκε βασιζόμενο σε μικρότερο αριθμό δειγμάτων, λόγω υπολογιστικών σφαλμάτων που προέκυψαν σε κάποια δείγματα.



Εικόνα 3.9 Μέτρηση χρωστικών 2^{ης} σειράς

Τέλος, τα % συνολικά αθροίσματα των αναλύσεων, για το χαρακτηρισμό της βιοχημικής σύστασης αυτής της σειράς, είναι:

Πίνακας 3.16 Βιοχημική σύσταση καλλιεργειών 2^{ης} σειράς

Glycerol	50	40	30	20	15	10
conc. In g/L						
% Total sum of analyzes	89,78	87,82	95,35	97,21	81,1	89,64

Όπως φαίνεται η σειρά αυτή, έδωσε την εικόνα δυναμικών καλλιεργειών και αυτό δίνεται τόσο από τα αποτελέσματα των αναλύσεων, όσο και από την εικόνα της βιομάζας που αποδόθηκε.



Εικόνα 3.10 Συλλογή βιομάζας στη 2^η πειραματική σειρά

3.2.2 Αποτελέσματα 3^{ης} σειράς

Η 3^η σειρά με OD :

- 0,07
- 0,068
- 0,075

ξεκινά με μέσο όρο εμβολιασμού 66,11 mg/L και η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια, με τις προηγούμενες σειρές. Οπότε, για τις μετρήσεις οπτικής πυκνότητας που είναι 8 φορές αραιωμένες, πριν τις φυγοκεντρίσεις δίνεται:

Πίνακας 3.17 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 3^{ης} σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις

g/L	50	40	30	20	15	10
glycerol						
Run	8	8	8	8	8	8
OD _{sample}	0,135	0,151	0,16	0,157	0,262	0,213
	0,127	0,13	0,157	0,136	0,22	0,27
	0,126	0,147	0,153	0,206	0,183	0,221

Ενώ για τις μετρήσεις, αυτές η βιομάζα που τους αντιστοιχεί, είναι:

Πίνακας 3.18 Βιομάζα 3^{ης} σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις

g/L glycerol	50	40	30	20	15	10
Biomass(mg/L)	1146,57	1300,99	1387,85	1358,9	2372,28	1899,37
	1069,36	1098,32	1358,9	1156,22	1966,93	2449,49
	1059,71	1262,39	1320,29	1831,81	1609,83	1976,58

Οι μέσοι όροι των βιομαζών που προκύπτουν, φαίνονται στον επόμενο πίνακα:

Πίνακας 3.19 Μέσοι όροι βιομάζα 3^{ης} σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις

g/L glycerol	50	40	30	20	15	10
Average of biomass (mg/L)	1091,88	1220,56	1355,68	1448,98	1983,01	2108,48

Μετά τις φυγοκεντρίσεις, οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας, είναι αραιωμένες 4 φορές και δίνουν τα εξής:

Πίνακας 3.20 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 3^{ης} σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις

g/L glycerol	50	40	30	20	15	10
Dilution	4	4	4	4	4	4
OD _{sample}	0,21	0,219	0,24	0,235	0,399	0,323
	0,183	0,194	0,23	0,212	0,34	0,439
	0,187	0,213	0,216	0,316	0,3	0,345

Η αντιστοίχισή τους σε καθαρή βιομάζα, είναι:

Πίνακας 3.21 Βιομάζα 3^{ης} σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις

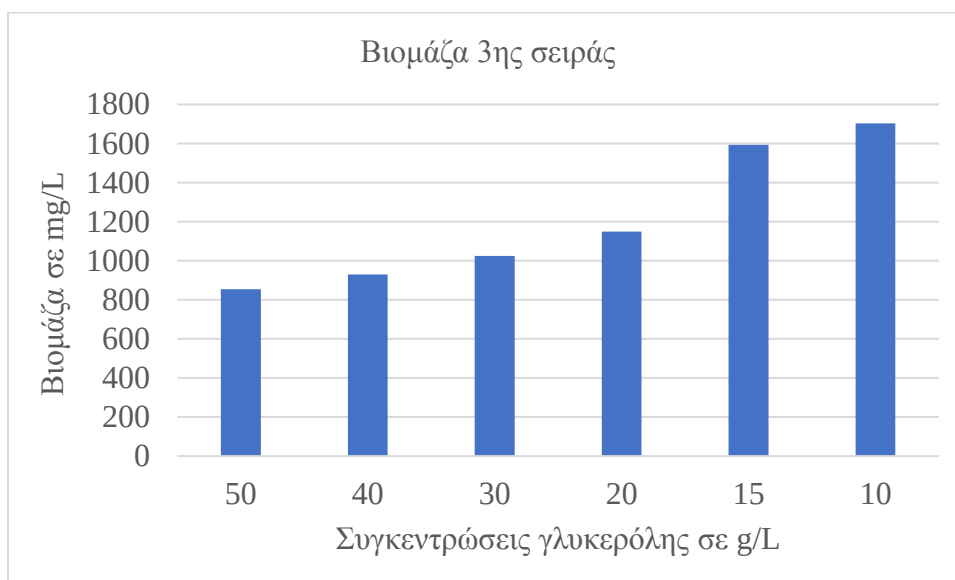
g/L glycerol	50	40	30	20	15	10
Biomass(mg/L)	935,21	978,64	1079,97	1055,85	1847,25	1480,5
	804,91	858	1031,72	944,86	1562,54	2040,27
	824,22	949,68	964,16	1446,72	1369,51	1586,66

Παρατηρείται ότι στις υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης, οι τιμές της βιομάζας των καλλιιεργειών για κάθε συγκέντρωση ξεχωριστά, είναι πιο κοντινές. Από την άλλη, από

τα 10-20g/L γλυκερόλης, φαίνεται να υπάρχουν λίγο μεγαλύτερες αποστάσεις στις τιμές των βιομαζών. Η τάση της βιομάζας, που ακολουθεί, προκύπτει από τους μέσους όρους του ακριβώς επόμενου πίνακα:

Πίνακας 3.22 Μέσοι όροι βιομάζας 3^{ης} σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις

g/L	50	40	30	20	15	10
glycerol						
Average	854,78	928,77	1025,28	1149,14	1593,1	1702,48
of						
biomass						
(mg/L)						



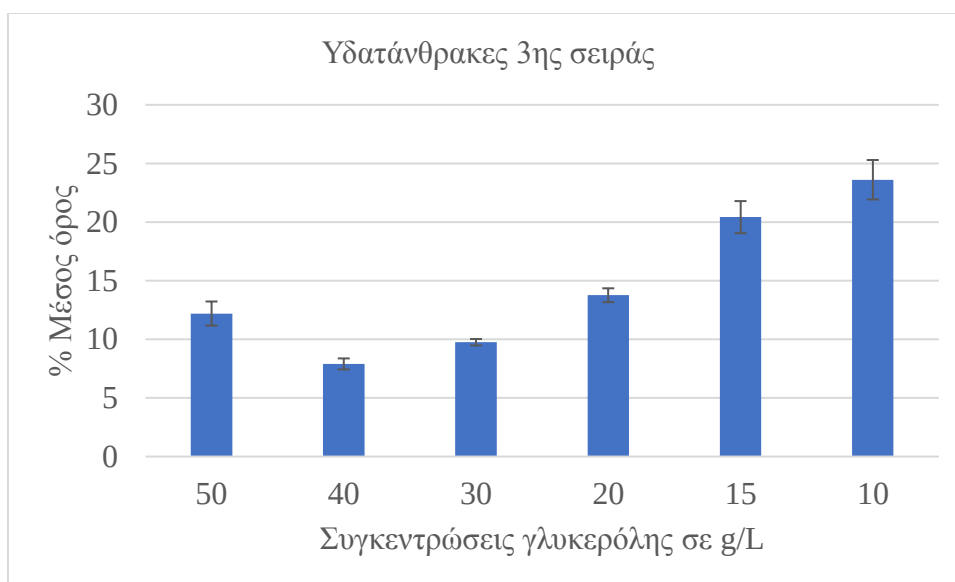
Γράφημα 3.13 Βιομάζα 3^{ης} σειράς

Από ότι φαίνεται στη σειρά αυτή, στους λόγους που περιείχαν περισσότερη γλυκερόλη και πεπτόνη, η βιομάζα δεν είναι τόσο υψηλή. Ουσιαστικά, λειτούργησε αντιστρόφως η αναλογία της ποσότητας της πεπτόνης με την απόδοση της βιομάζας. Βέβαια, ένας παράγοντας που έπαιξε ρόλο στη διαμόρφωση αυτή, είναι η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, η οποία ήταν αρκετά υψηλή, αναστέλλοντας έτσι βασικές λειτουργίες του μεταβολισμού. Γεγονός που οδήγησε τις καλλιέργειες σε αναστολή της ανάπτυξής τους. Από την άλλη όμως, δεν αποκλείεται να έγινε κάποια υπερεκτίμηση αποτελεσμάτων, κατά τη συλλογή της βιομάζας. Όσον αφορά τις αναλύσεις, οι αραιώσεις που έγιναν, δίνονται στο πίνακα από κάτω:

Πίνακας 3.23 Αραιώσεις αναλύσεων 3^{ης} σειράς

g/L	50	40	30	20	15	10
glycerol						
Proteins	2	2	3	3	4	4
dilution						
C/H	10	10	10	10	15	15
dilution						
Lipids	-	-	-	-	-	-
dilution						
Pigments	-	-	-	-	-	-
dilution						

Για τους υδατάνθρακες, αρχικά οι μετρήσεις παρουσιάζουν τα εξής αποτελέσματα:

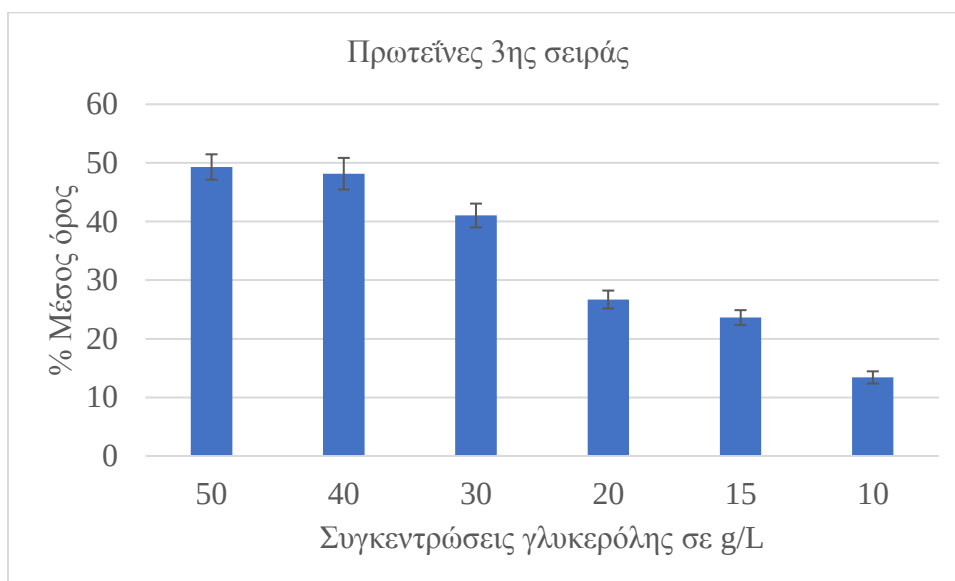
**Γράφημα 3.14** Υδατάνθρακες 3^{ης} σειράς

Αυτό που για μία ακόμα φορά συμβαίνει, είναι όπως γίνεται κατανοητό η αύξηση των υδατανθράκων με τη μείωση της πεπτόνης. Φυσικά, εξαίρεση αποτελούν οι καλλιέργειες στα 50g/L γλυκερόλης, όπου δε φαίνεται να ακολουθούν τη ροή των υπόλοιπων συγκεντρώσεων. Πιθανόν, τα δείγματα αυτά να είχαν παραπάνω υδατάνθρακες ή μπορεί να έγινε κάποιο σφάλμα κατά τη μέτρηση τους. Όσο για τα εύρη τιμών, μόνο στα 10-15g/L γλυκερόλης φαίνεται οι τιμές να βρίσκονται εντός εύρους. Παράλληλα, οι τιμές υδατανθράκων στις περισσότερες συγκεντρώσεις είναι πολύ χαμηλές. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στη θερμοκρασία, η οποία είχε ανασταλτικό ρόλο, είτε στο κατά πόσο δυνατό ήταν το εμβόλιο.



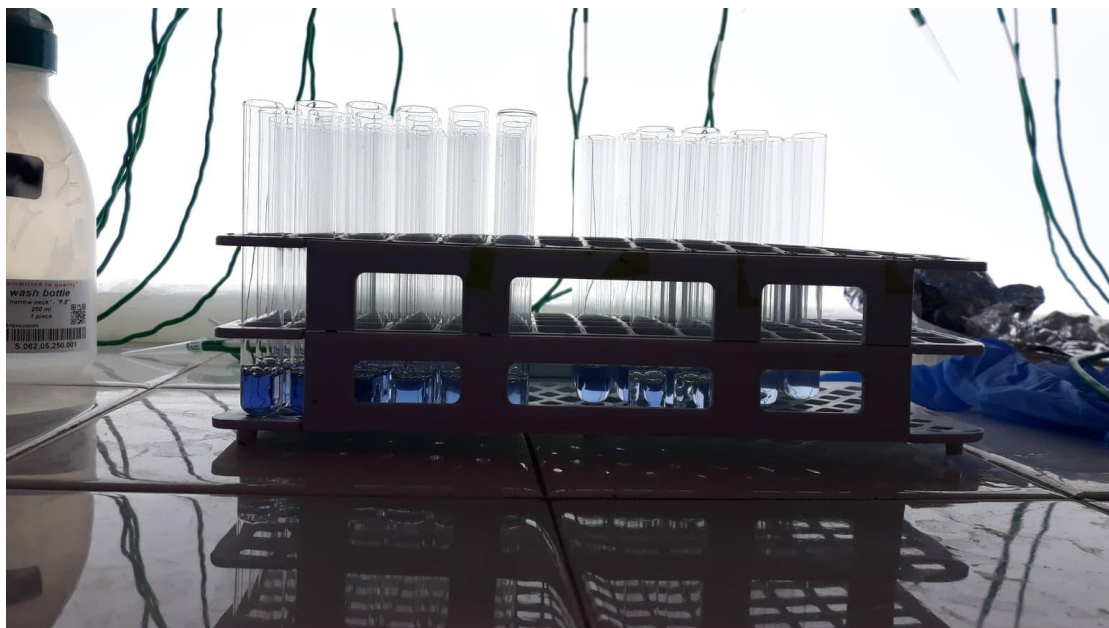
Εικόνα 3.11 Μέτρηση υδατανθράκων 3^{ης} σειράς

Συνεχίζοντας, οι πρωτεΐνες αυτής της σειράς δίνουν τα παρακάτω αποτελέσματα:



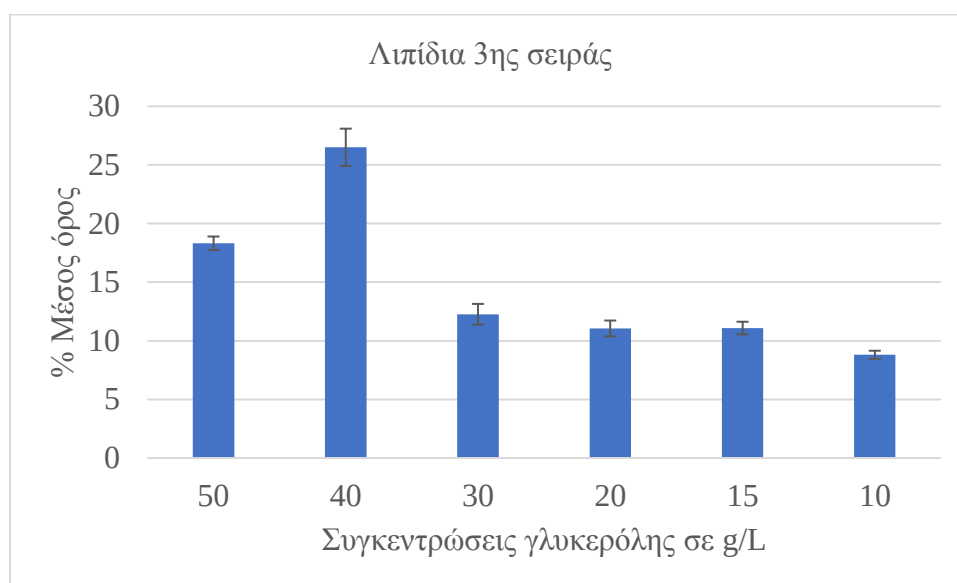
Γράφημα 3.15 Πρωτεΐνες 3^{ης} σειράς

Εδώ φαίνεται ουσιαστικά, ότι με τη μείωση της πεπτόνης στις καλλιέργειες, μειώνεται και η απόδοση των δειγμάτων σε πρωτεΐνες. Όσο για τις ποσοστιαίες τιμές των αποτελεσμάτων βρίσκονται εντός βιβλιογραφικού εύρους από τα 30-50g/L γλυκερόλης και εκτός από τα 10-20g/L γλυκερόλης. Οι πρωτεΐνες, δε φάνηκε να επηρεάζονται ιδιαίτερα από τη χαμηλή ισχύ του εμβολίου ή την ανασταλτική δράση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος.



Εικόνα 3.12 Μέτρηση πρωτεϊνών 3^{ης} σειράς

Για τα λιπίδια, στη σειρά αυτή συλλέχθηκαν 100μl εκχυλισμένου δείγματος:



Γράφημα 3.16 Λιπίδια 3^{ης} σειράς

Η διαφορά των αποτελεσμάτων από τα 40-50g/L γλυκερόλης, σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις από τα 10-30g/L γλυκερόλης, είναι αρκετά ευδιάκριτη. Πιθανώς, τα δείγματα από 10-30g/L γλυκερόλης να είναι πολύ αδύναμα και η παραγωγή λιπιδίων να έχει ανασταλθεί. Από την άλλη, στα 40-50g/L γλυκερόλης ο λόγος γλυκερόλη/πεπτόνη, φαίνεται να λειτουργήσει αρκετά καλά.



Εικόνα 3.13 Μέτρηση λιπιδίων 3^{ης} σειράς

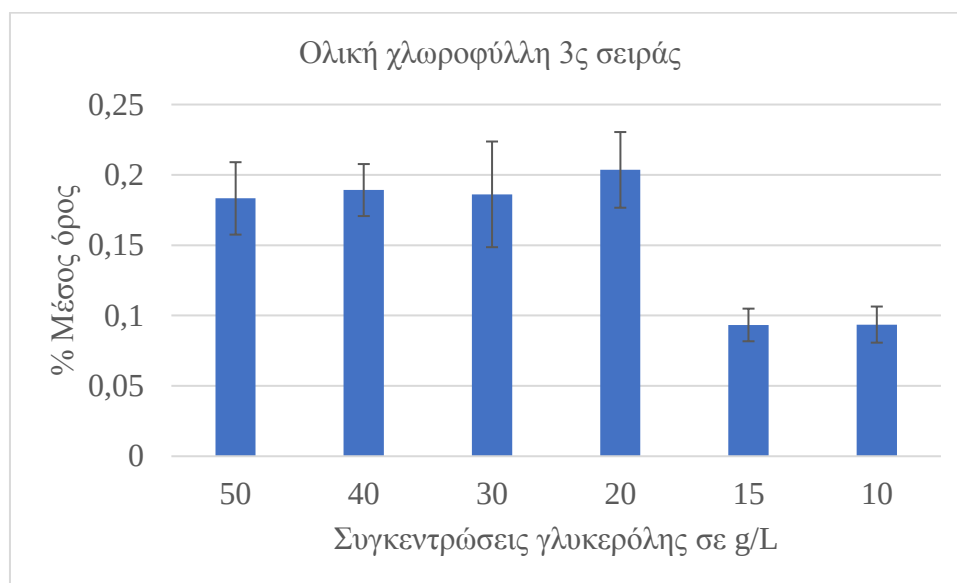
Στις χρωστικές τα αποτελέσματα, παρουσιάζονται με την ίδια σειρά όπως προηγουμένως. Συνεπώς, δίνονται αρχικά οι χλωροφύλλες α, β και τα ολικά καροτενοειδή μαζί και ακολουθεί η ολική χλωροφύλλη:



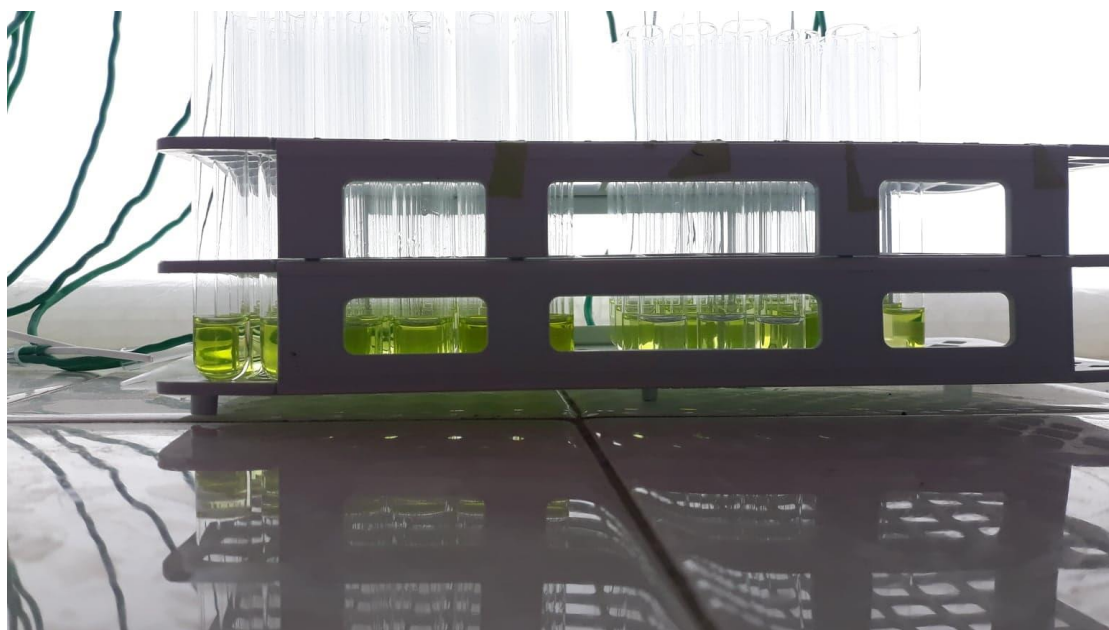
Γράφημα 3.17 Χλωροφύλλες α, β και ολικά καροτενοειδή 3^{ης} σειράς

Για ακόμα μία φορά, η χλωροφύλλη β κατά κύριο λόγο έχει πιο υψηλές τιμές από τα ολικά καροτενοειδή και τη χλωροφύλλη α, ενώ βλέποντας το διάγραμμα φαίνεται η μείωσή της όσο μειώνεται και ο λόγος γλυκερόλη/πεπτόνη. Το γεγονός μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη διττανθρακικών από το θρεπτικό υπόστρωμα. Η διαφορά εδώ με τη 1^η πειραματική πορεία, είναι ότι εδώ η χλωροφύλλη α και τα ολικά καροτενοειδή, έχουν πιο απόμακρες τιμές. Ουσιαστικά, αυτό που γίνεται

είναι ότι και στη χλωροφύλλη α ισχύει εν μέρει, αυτό που συμβαίνει και στη χλωροφύλλη β με τη μείωση του λόγου γλυκερόλη/πεπτόνη. Αυτό γίνεται πιο εμφανές, παρατηρώντας τις τιμές της χλωροφύλλης α στα σημεία, 30-50g/L γλυκερόλης και στα 10-20g/L γλυκερόλης. Στα ολικά καροτενοειδή, φαίνεται να ισχύει το αντίθετο καθώς, όσο αυξάνεται ο λόγος γλυκερόλη/πεπτόνη, μειώνεται η απόδοσή τους. Σημεία που η παρατήρηση αυτή είναι εμφανής, είναι από τα 10-20g/L γλυκερόλης και από τα 30-50g/L γλυκερόλης.



Γράφημα 3.18 Ολική χλωροφύλλη 3^{ης} σειράς.



Εικόνα 3.14 Μέτρηση χρωστικών 3^{ης} σειράς

Τέλος, στην ολική χλωροφύλλη παρατηρείται ότι από τα 10-15g/L γλυκερόλης, οι τιμές της παραμένουν πολύ κοντά και χαμηλές, ενώ από τα 20-50g/L γλυκερόλης οι τιμές

των δειγμάτων είναι λίγο πιο υψηλές και δε παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους. Όσον αφορά το % συνολικό άθροισμα των αναλύσεων, για τη βιοχημική σύσταση των καλλιιεργειών, τα αποτελέσματα παραδίδονται στο πίνακα που ακολουθεί :

Πίνακας 3.24 Βιοχημική σύσταση καλλιιεργειών 3^{ης} σειράς

Glycerol	50	40	30	20	15	10
conc. in g/L						
% Total sum of analyzes	79,82	82,57	63,05	51,5	55,12	45,82

Παρατηρείται ότι κυρίως στις 2 υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης, οι καλλιέργειες φαίνεται να έχουν αποδώσει αρκετά καλά, ενώ κάτι φαίνεται να προσπαθεί να γίνει και στα 30g/L γλυκερόλης. Αντίθετα, από τα 10-20g/L γλυκερόλης τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ανάπτυξη στις καλλιέργειες αυτές έχει ανασταλεί. Εν μέρει το γεγονός αυτό, μπορεί να οφείλεται είτε στην υψηλή θερμοκρασία, είτε μπορεί οι λόγοι αυτοί(γλυκερόλη/πεπτόνη), να μην λειτούργησαν για το στέλεχος.



Εικόνα 3.15 Συλλογή βιομάζας 3^{ης} σειράς

3.3 Αποτελέσματα 3^{ης} πορείας

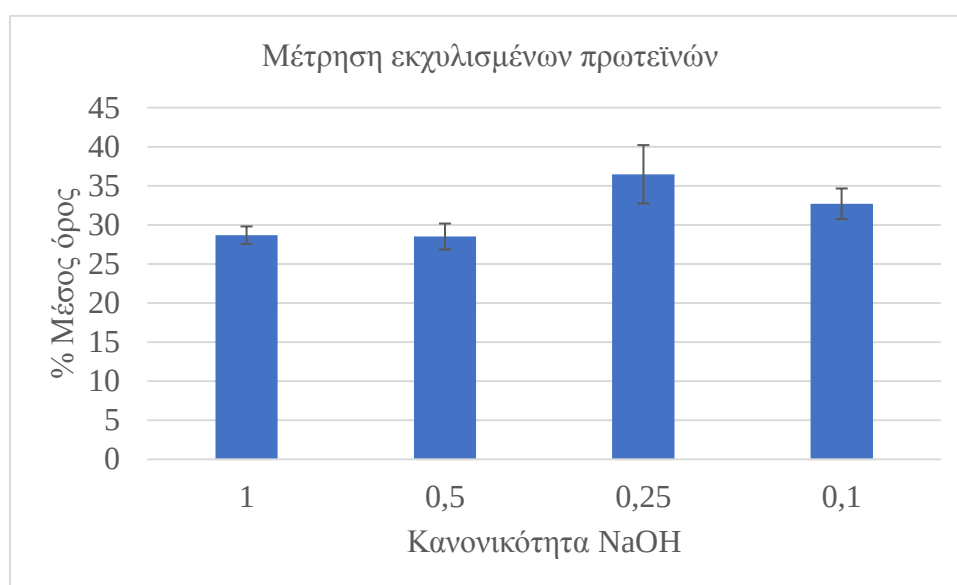
3.3.1 Αποτελέσματα μετρήσεων 3^{ης} πορείας

Στη 3^η πορεία (4^η σειρά), χορηγήθηκε εκχυλισμένη ηλιόσκονη, με NaOH 0,25N. Το στέλεχος, δε μπόρεσε όμως να αποδώσει. Αυτό που είναι εφικτό να παρουσιαστεί όμως,

είναι τα δεδομένα από την εκχύλιση της ηλιόσκονης. Όσον αφορά την ηλιόσκη, πριν χρησιμοποιηθεί σε πειραματική πορεία, έγινε πρώτα μία δοκιμή. Στη δοκιμή αυτή, ζυγίστηκαν 0,05g ηλιόσκονης και εκχυλίστηκαν, σε 1mL NaOH κανονικότητας 0,1-0,25-0,5-1N. Τα δεδομένα που προέκυψαν και οι αραιώσεις που έγιναν είναι οι εξής:

Πίνακας 3.25 Εκχύλιση ηλιόσκονης σε διάφορες κανονικότητες NaOH

Normality of NaOH	1	0,5	0,25	0,1
Dilution	100	100	100	100



Γράφημα 3.19 Πειραματική εκχύλιση ηλιόσκονης

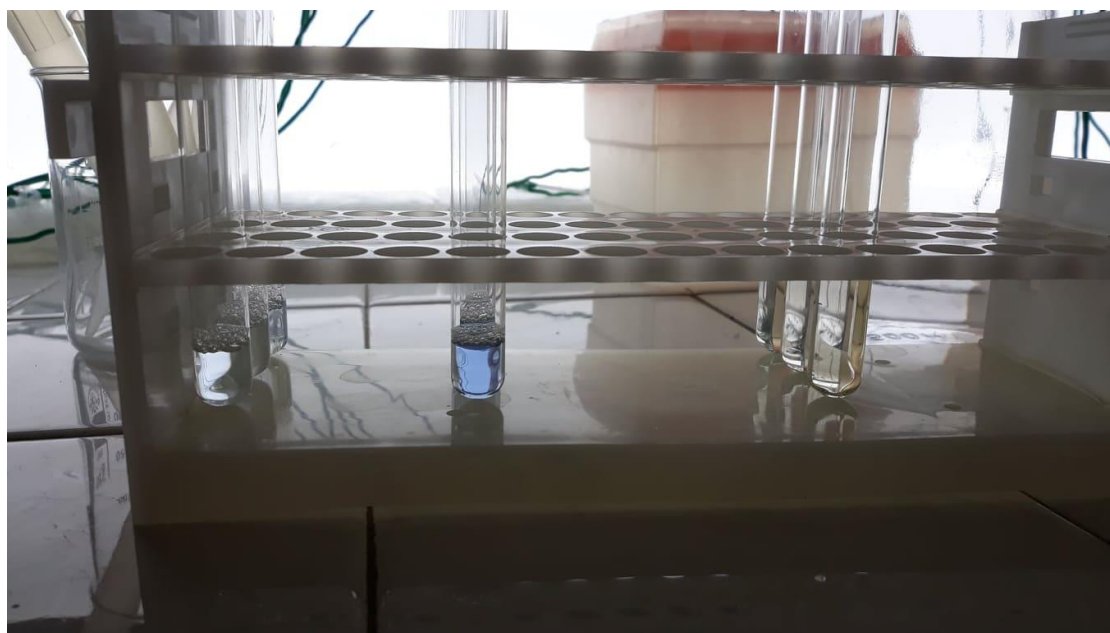
Έχοντας, αυτά τα δεδομένα, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση στα 75 g/L, με NaOH 0,25N. Προέκυψαν 44,75g/L, εκχυλισμένης πρωτεΐνης στην ηλιόσκη, με μέσο όρο (ποσοστό εκχύλισης) 59,67%.

Πίνακας 3.26 Αραιώσεις στην εκχυλισμένη με NaOH 0,25N ηλιόσκη

Normality of NaOH	0,25
Dilution	240

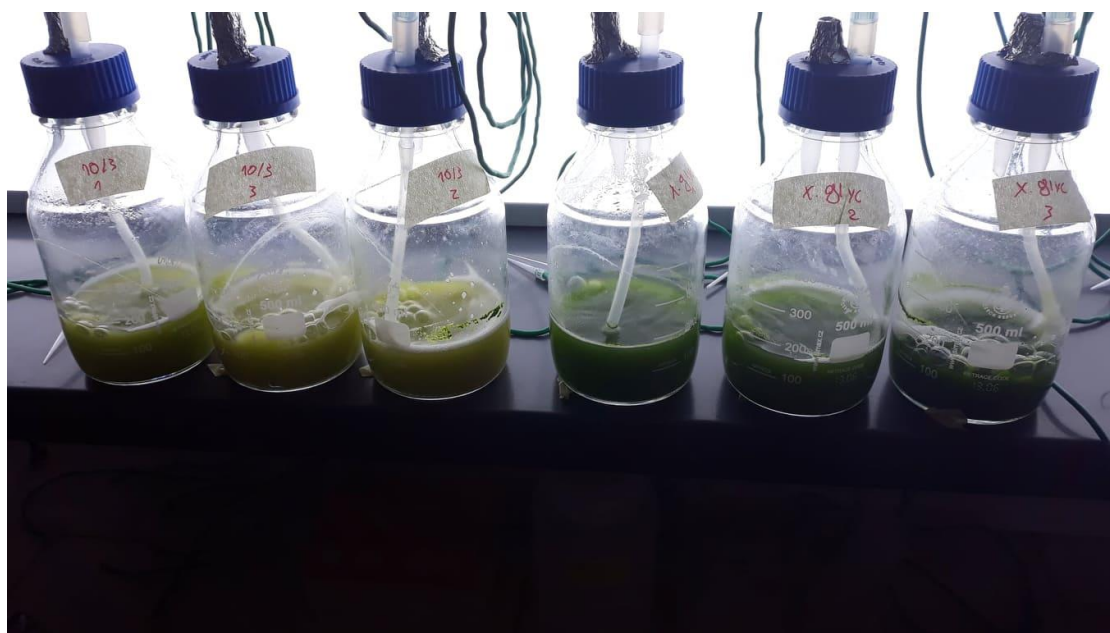
Έγιναν 2 προσπάθειες για να αναπτυχθεί το στέλεχός μας σε υπόστρωμα με ηλιόσκη. Στη μία προσπαθήσαμε να χορηγήσουμε 0,75g/L εκχυλισμένων πρωτεϊνών από ηλιόσκη, με το γνωστό θρεπτικό υπόστρωμα. Το στέλεχος δε φάνηκε να επιβιώνει, οπότε έγινε άλλη μία προσπάθεια. Αυτή τη φορά, 0,5g/L εκχυλισμένων πρωτεϊνών από ηλιόσκη, 10g/L ακατέργαστης γλυκερόλης, παρουσία οξυγόνου και έλλειψη διττανθρακικών και δισόξινου φωσφορικού καλίου, προσπάθησαν να δώσουν τη λύση.

Μαζί με όλα τα προηγούμενα, έγινε και ρύθμιση pH με H_2SO_4 0,25N. Επιπλέον, τα πειράματα αυτά διήρκεσαν γύρω στις 13 ημέρες. Και πάλι όμως, σε καμία από τις δύο προσπάθειες το στέλεχος, δε φάνηκε να μπορέσει να επιβιώσει.



Εικόνα 3.16 Μέτρηση πρωτεϊνών εκχυλισμένης ηλίσκωνης με NaOH 0,25N

3.4 Αποτελέσματα 4^{ης} πορείας



Εικόνα 3.17 Βιομάζες 4^{ης} πορείας

3.4.1 Αποτελέσματα 4^α σειράς

Στη τελευταία πειραματική πορεία, σχεδιάστηκαν δύο σειρές, όπου στη μία από τις δύο μαζί με το τυρόγαλο, χορηγήθηκε και γλυκερόλη. Οι καλλιέργειες σε κάθε σειρά ήταν τρεις. Οι αναλύσεις σε αυτές τις σειρές αφορούν τα λίπη, τους υδατάνθρακες και τις

πρωτεΐνες. Ξεκινώντας, παρατίθενται οι καλλιέργειες χωρίς τη γλυκερόλη (4α σειρά). Στις σειρές αυτές δεν λήφθηκαν δείγματα που να δείχνουν τις βιομάζες με τις οποίες ξεκίνησαν οι πειραματικές σειρές. Πριν τις φυγοκεντρίσεις, έγιναν οι ίδιες μετρήσεις με τις προηγούμενες σειρές. Συνεπώς, για την οπτική πυκνότητα πριν τις φυγοκεντρίσεις, δίνονται:

Πίνακας 3.27 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 4α σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις

Cultivation	1	2	3
Dilution	4	4	4
OD _{sample}	0,546	0,581	0,851
	0,546	0,599	0,873
	0,542	0,628	
	0,551		

Οι τιμές οπτικής πυκνότητας, διαφέρουν μεταξύ τους σε κάποια σημεία. Αυτό συμβαίνει γιατί, λόγω χορήγησης αέρα και για λόγους που οφείλονται στη λειτουργία του τροφοδοτικού μηχανήματος, ποικίλει ο αριθμός των Falcon που χρησιμοποιήθηκαν για αποθήκευση και διαχωρισμό της καλλιέργειας. Επίσης, στη 3^η καλλιέργεια, έπρεπε να γίνουν 8 φορές αραίωση αντί 4. Η βιομάζα που αντιστοιχεί σε αυτές τις μετρήσεις, βρίσκεται στο παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 3.28 Βιομάζα 4^α σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις

Cultivation	1	2	3
Biomass (mg/L)	2556,62	2725,52	4028,44
	2561,45	2812,38	4134,6
	2537,32	2952,32	
	2580,75		

Ακολουθεί και ο πίνακας, με το μέσο όρο της βιομάζας :

Πίνακας 3.29 Μέσοι όροι βιομάζας 4^α σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις

Cultivation	1	2	3
Average of	2559,04	2830,08	4081,52
biomass			
(mg/L)			

Μετά το καθαρισμό της βιομάζας, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα, η οποία για κάθε καλλιέργεια, είναι:

Πίνακας 3.30 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 4α σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις

Cultivation	1	2	3
Dilution	4	4	8
OD _{sample}	0,461	0,54	0,452
	0,46	0,549	0,442
	0,462	0,518	
	0,439		

Η αντίστοιχη καθαρή βιομάζα που δίνεται για κάθε καλλιέργεια, είναι:

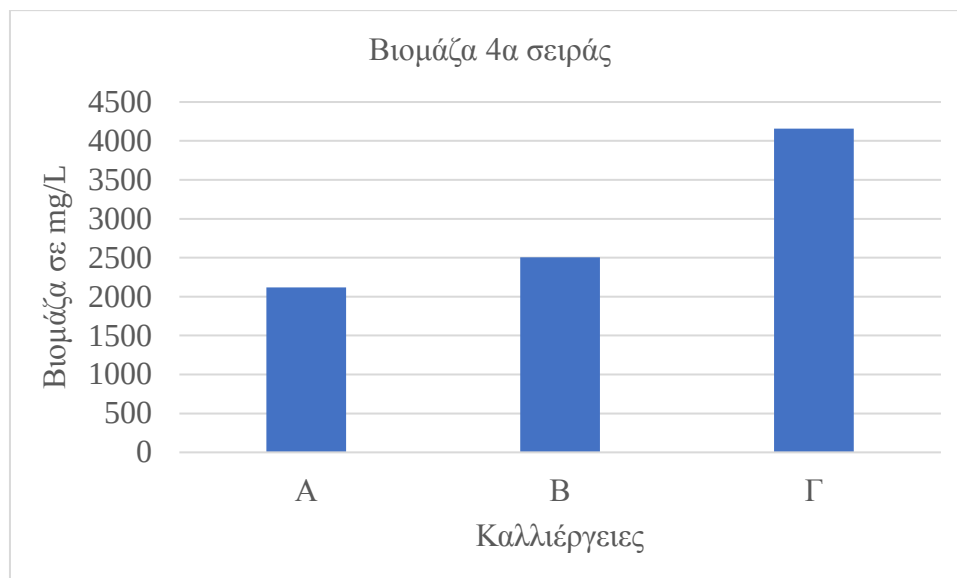
Πίνακας 3.31 Βιομάζα 4^α σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις

Cultivation	1	2	3
Biomass (mg/L)	2146,45	2527,67	4206,03
	2141,62	2571,1	4109,52
	2151,27	24,21,51	
	2040,28		

Διορθωμένες πλέον οι αραιώσεις και έχοντας πλέον τη καθαρή βιομάζα που χρειάζεται, παρατηρείται η διαφορά ανάμεσα στις καλλιέργειες αναλόγως τη χορήγηση αέρα. Δηλαδή εκεί όπου χορηγήθηκε περισσότερος αέρας, υπάρχει και περισσότερη βιομάζα, πέρα από την περισσότερη εξάτμιση. Προχωρώντας, στο μέσο όρο της καθαρής πλέον βιομάζας, απεικονίζεται η τάση της βιομάζας, που είναι:

Πίνακας 3.32 Μέσοι όροι βιομάζας 4^α σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις

Cultivation	1	2	3
Average of biomass (mg/L)	2119,91	2506,76	4157,78



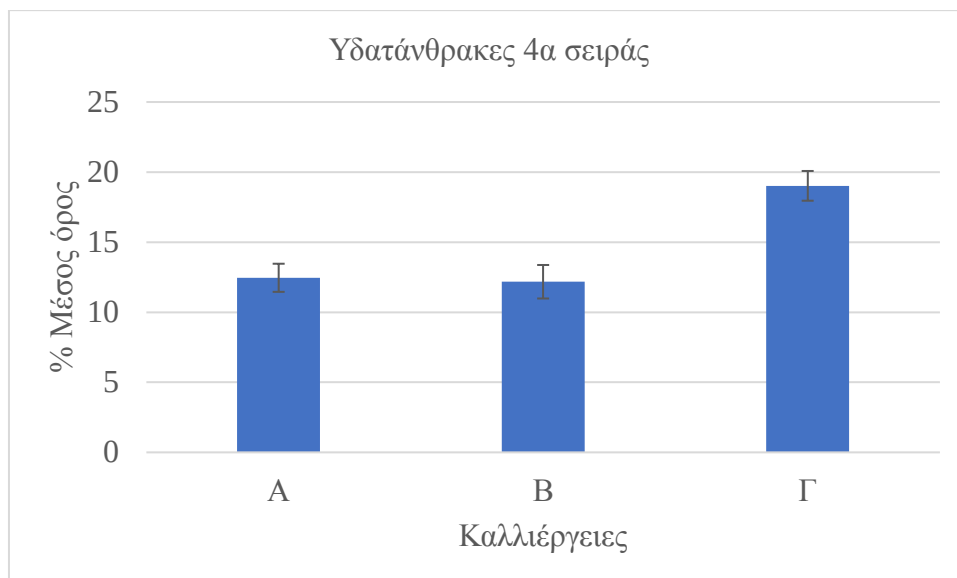
Γράφημα 3.20 Βιομάζα 4^α σειράς

Στις αναλύσεις της σειράς αυτής, οι αραιώσεις που έγιναν δίνονται στον ακριβώς επόμενο πίνακα:

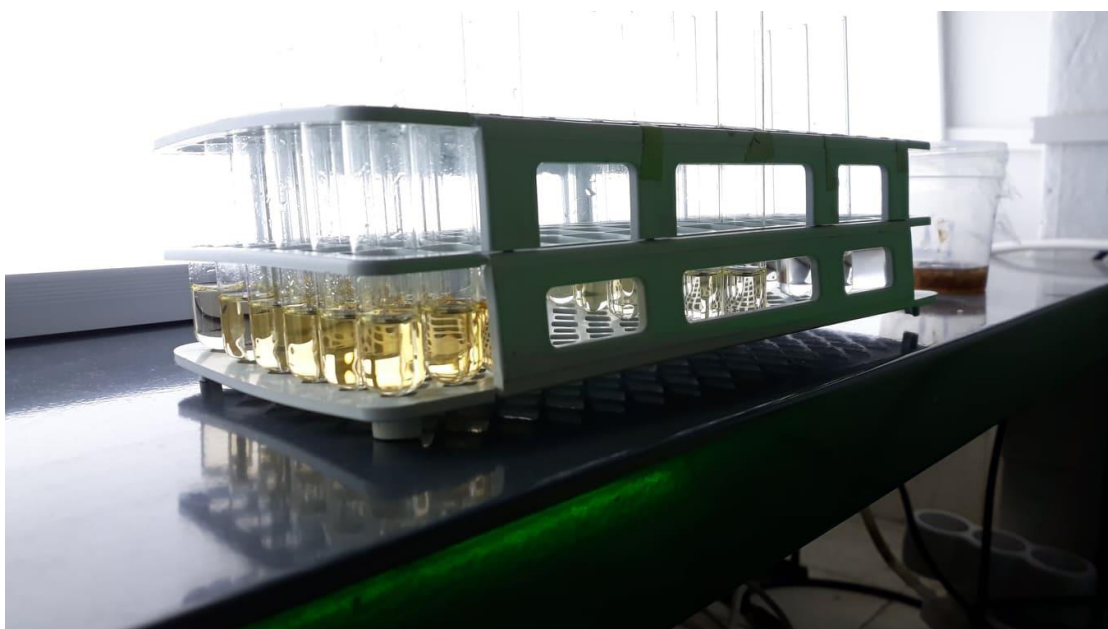
Πίνακας 3.33 Αραιώσεις 4^α σειράς

Cultivation	1	2	3
Prots	10	10	10
dilution			
C/H	40	40	40
dilution			
Lipids	-	-	-
dilution			

Οπότε ξεκινώντας με τους υδατάνθρακες, είναι εμφανές ότι λόγω πολύ ευνοϊκών συνθηκών, οι τιμές των υδατανθράκων είναι πολύ χαμηλές, διότι το στέλεχος σε αυτή τη περίπτωση δεν αντιμετώπισε κάποια δυσκολία. Άρα, οι μηχανισμοί άμυνας που ενεργοποιούνται σε δυσνόητες για την επιβίωση περιβάλλοντα, δεν ενεργοποιήθηκαν. Οι καλλιέργειες εδώ δεν εμφανίζουν κάποια ιδιαίτερη διαφορά στα αποτελέσματά τους, με εξαίρεση τη 3^η καλλιέργεια η οποία αποδίδει λίγο παραπάνω. Την εικόνα των υδατανθράκων στα δείγματα, τη δίνει το παρακάτω γράφημα:

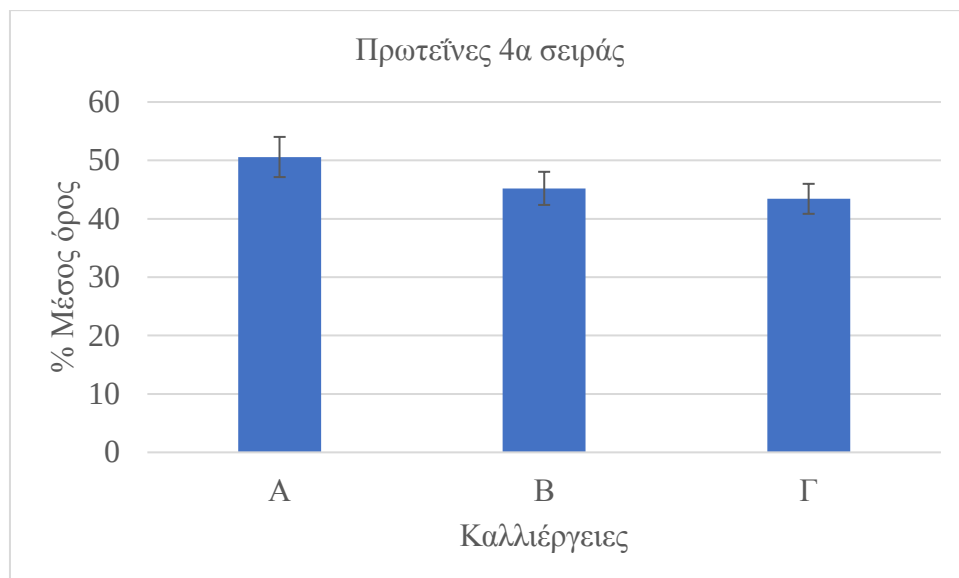


Γράφημα 3.21 Υδατάνθρακες 4α σειράς

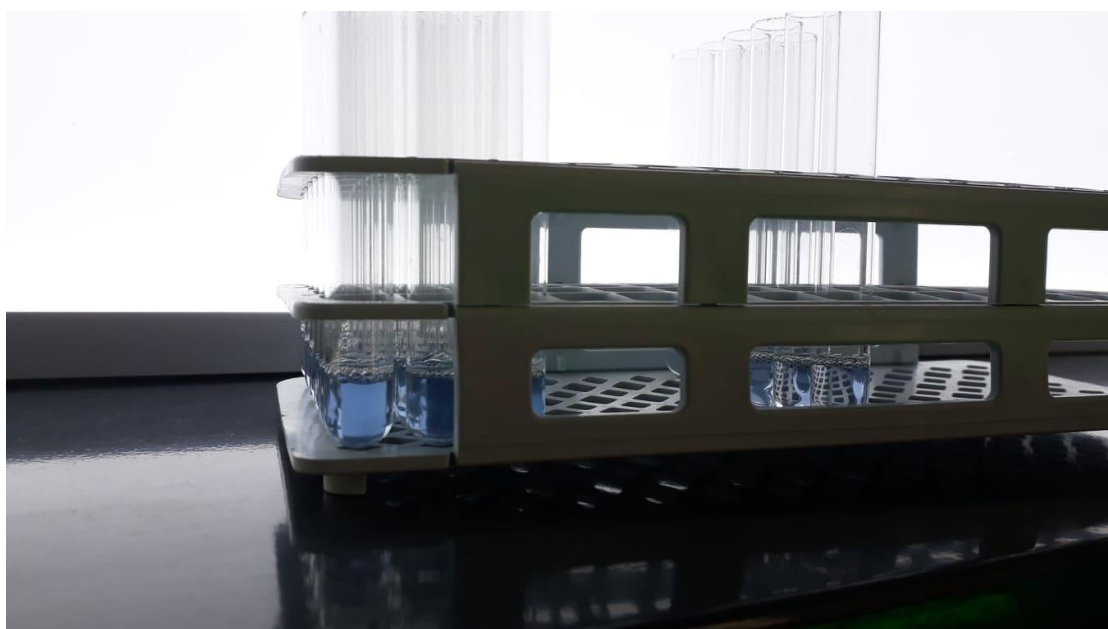


Εικόνα 3.18 Μέτρηση υδατανθράκων 4α σειράς

Στις πρωτεΐνες αντίστοιχα, οι διαφορές δεν είναι απαραίτητα πολύ μεγάλες μεταξύ των καλλιεργειών. Ωστόσο, λόγω παρουσίας τυρογάλακτος στο θρεπτικό υπόστρωμα, η απόδοση των πρωτεϊνών είναι σχετικά υψηλή. Στο παρακάτω γράφημα, φαίνονται τα αποτελέσματα των πρωτεϊνών που προέκυψαν:

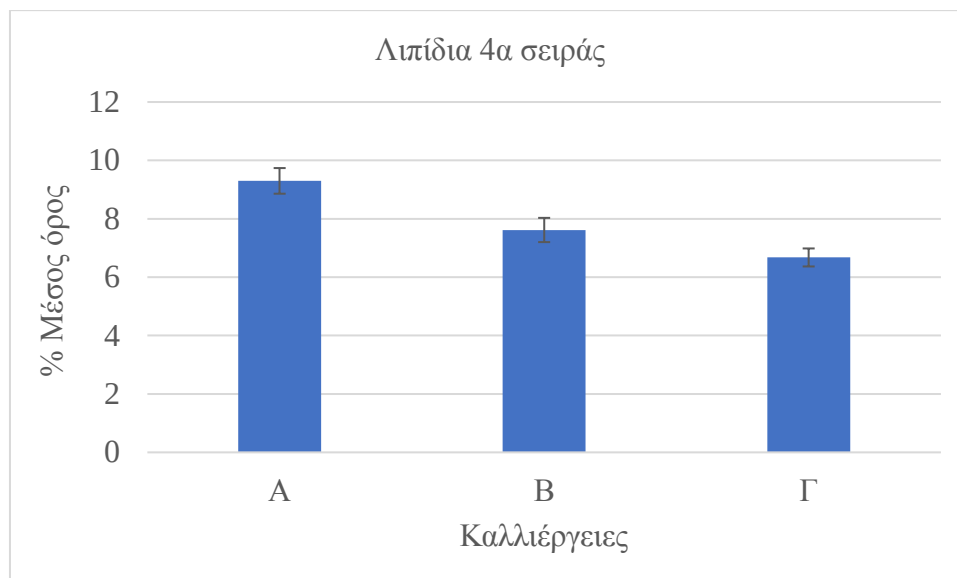


Γράφημα 3.22 Πρωτεΐνες 4α σειράς



Εικόνα 3.19 Μέτρηση πρωτεϊνών 4α σειράς

Τέλος, για τη μέτρηση των λιπιδίων, συλλέχθηκαν 100μl εκχυλισμένου δείγματος. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, λόγω ευνοϊκών συνθηκών δεν υπήρξε υψηλή παραγωγή λιπιδίων. Τα αποτελέσματά τους, δίνονται στο ακόλουθο γράφημα:



Γράφημα 3.23 Λιπίδια 4α σειράς



Εικόνα 3.20 Μέτρηση λιπιδίων 4α σειράς

Οι τιμές των λιπιδίων στις καλλιέργειες A, είναι υψηλότερες από αυτές των υπόλοιπων καλλιεργειών. Έτσι, λόγω στρεσοσάριατος(έλλειψη οξυγόνου λόγω αδυναμίας μηχανισμού αέρα), τα λιπίδια αυξήθηκαν, δείχνοντας ότι στις αναερόβιες συνθήκες μπορούν να παραχθούν λίγο περισσότερα λιπίδια, από ότι στις αερόβιες συνθήκες. Όσο για τις χρωστικές, δυστυχώς σε αυτές τις 2 σειρές με το τυρόγαλο, για τεχνικούς λόγους που αφορούν το φασματοφωτόμετρο, δεν ήταν εφικτή η καταμέτρηση τους. Οπότε, περνώντας αυτή τη μέτρηση, μένει το % συνολικό άθροισμα των αναλύσεων που δείχνει τη βιοχημική σύσταση, κάθε καλλιέργειας. Ισχύουν τα εξής:

Πίνακας 3.34 Βιοχημική σύσταση καλλιιεργειών 4^α σειράς

Cultivation	1	2	3
% Total	72,34	65,01	69,12
sum of analyzes			

3.4.2 Αποτελέσματα 4^β σειράς

Μπαίνοντας στη σειρά με τις καλλιέργειες, όπου χορηγήθηκε γλυκερόλη, δίνονται τα παρακάτω αποτελέσματα, για τις μετρήσεις οπτικής πυκνότητας πριν τις φυγοκεντρίσεις:

Πίνακας 3.35 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 4^β σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις

Cultivation	1	2	3
Dilution	16	16	16
OD _{sample}	0,329	0,411	0,415
	0,336	0,399	0,417
	0,341	0,415	0,416

Αυτές έδωσαν την ακόλουθη βιομάζα :

Πίνακας 3.36 Βιομάζα 4^β σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις

Cultivation	1	2	3
Biomass(mg/L)	6037,87	7620,67	7697,88
	6269,49	7389,04	7736,48
	6172,98	6797,88	7717,18

Ακολουθεί ο πίνακας με τους μέσους όρους, πριν τις φυγοκεντρίσεις:

Πίνακας 3.37 Μέσοι όροι βιομάζας 4^β σειράς πριν τις φυγοκεντρίσεις

Cultivation	1	2	3
Average of biomass (mg/L)	6160,11	7569,19	7717,18

Μετά τις φυγοκεντρίσεις, στη πλέον καθαρή βιομάζα, φαίνεται πως έγινε καλύτερη τροφοδότηση με αέρα, αλλά και οι διαφορές μεταξύ των καλλιιεργειών. Οπότε εμφανίζονται τα εξής :

Πίνακας 3.38 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας 4β σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις

Cultivation	1	2	3
Dilution	8	8	8
OD _{sample}	0,52	0,611	0,715
	0,533	0,683	0,684
	0,5	0,643	0,544

Η βιομάζα φαίνεται να αυξάνεται από τη 1^η έως τη 3^η καλλιέργεια. Αυτό, ίσως να οφείλεται και σε καλύτερη αφομοίωση της γλυκερόλης. Ωστόσο, η μέτρηση της βιομάζας σε αυτή τη σειρά ήταν λίγο πιο δύσκολη λόγω θολότητας των δειγμάτων. Αυτό, χωρίς να είναι απόλυτο, ενδέχεται να οδήγησε σε υπερεκτίμηση της βιομάζας, σε κάποια σημεία.



Εικόνα 3.21 Μέτρηση OD καθαρής βιομάζας 4^α και 4β σειράς

Ο λόγος για τον οποίο υπάρχει αυτή η χρωματική διαφορά, είναι γιατί στις καλλιέργειες με γλυκερόλη η βιομάζα περιβαλλόταν από ένα κίτρινο περίβλημα, το οποίο δεν ταυτοποιήθηκε. Παρόμοια συμπεριφορά εμφανίσθηκε και στη 3^η σειρά στους λόγους 10/0,5-50/2,5g/L γλυκερόλη/πεπτόνη.



Εικόνα 3.22 Καθαρισμός βιομάζας 4β σειράς

Συνεχίζοντας, η βιομάζα που προέκυψε δίνεται στο πίνακα από κάτω:

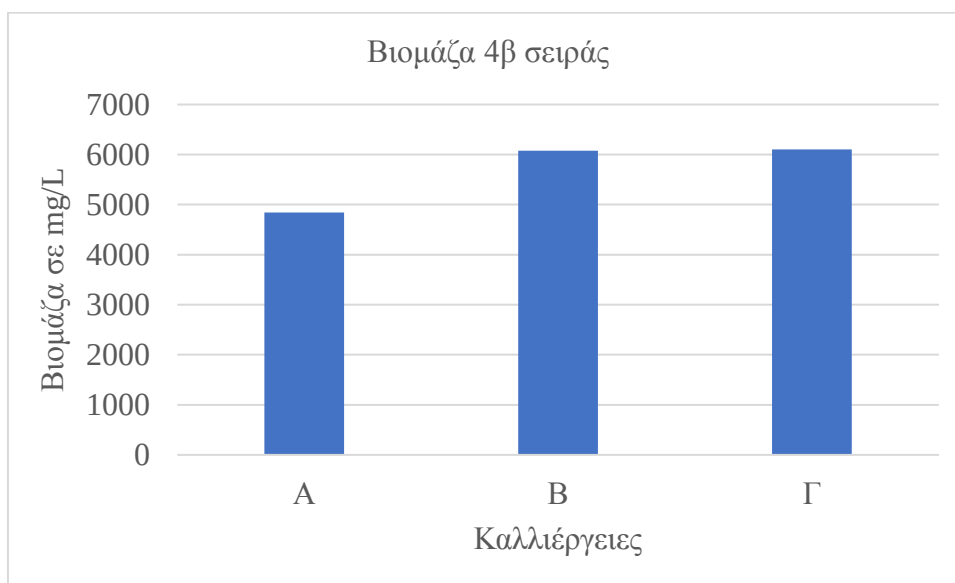
Πίνακας 3.39 Βιομάζα 4β σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις

Cultivation	1	2	3
Biomass(mg/L)	4862,32	5740,58	6744,31
	4987,78	6435,47	6474,07
	4669,29	6049,42	5093,95

Ενώ, ο μέσος όρος που προκύπτει, για τη τάση της βιομάζας:

Πίνακας 3.40 Μέσοι όροι βιομάζας 4β σειράς μετά τις φυγοκεντρίσεις

Cultivation	1	2	3
Average of biomass (mg/L)	4839,8	6075,15	6104,11



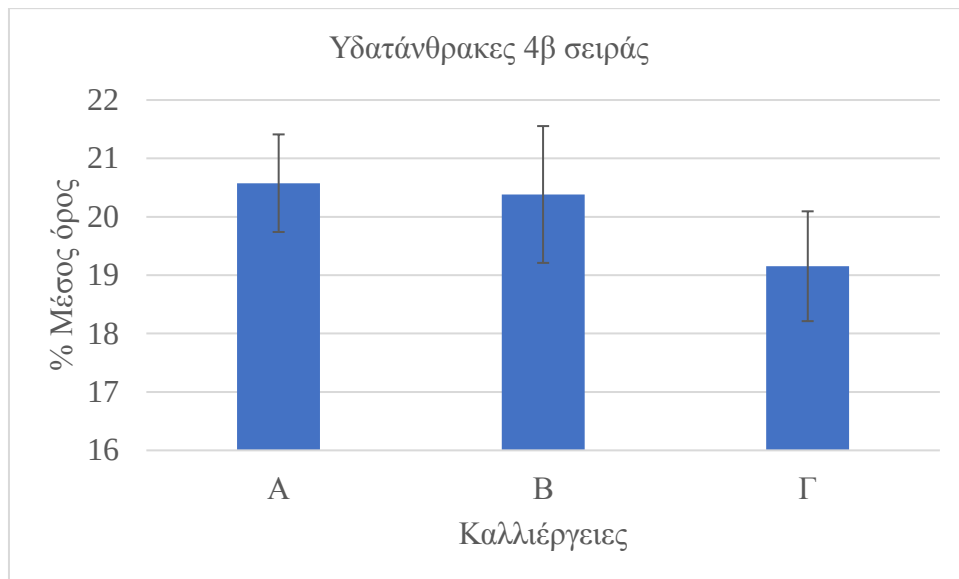
Γράφημα 3.24 Βιομάζα 4β σειράς

Μπαίνοντας στο τελευταίο στάδιο των πειραματικών πορειών και των αναλύσεων, οι αραιώσεις αυτής της σειράς είναι οι εξής :

Πίνακας 3.41 Αραιώσεις 4β σειράς

Cultivation	1	2	3
Prots dilution	20	20	20
C/H dilution	50	50	50
Lipids dilution	-	-	-

Στη μέτρηση των υδατανθράκων, τα αποτελέσματα βρίσκονται οριακά εντός εύρους ενώ παραμένουν πολύ χαμηλά. Οι υδατάνθρακες σε αυτή τη σειρά, έχουν ως εξής:

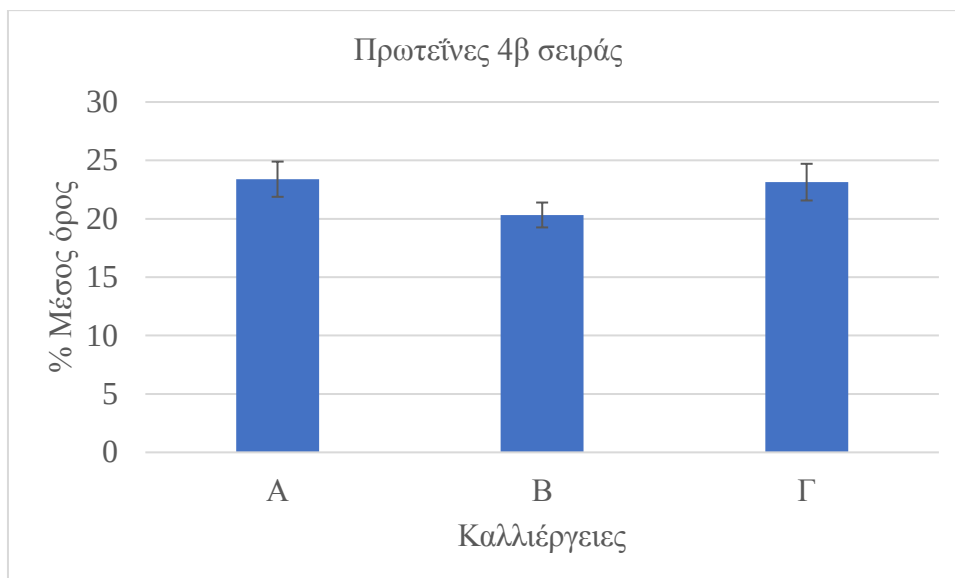


Γράφημα 3.25 Υδατάνθρακες 4β σειράς

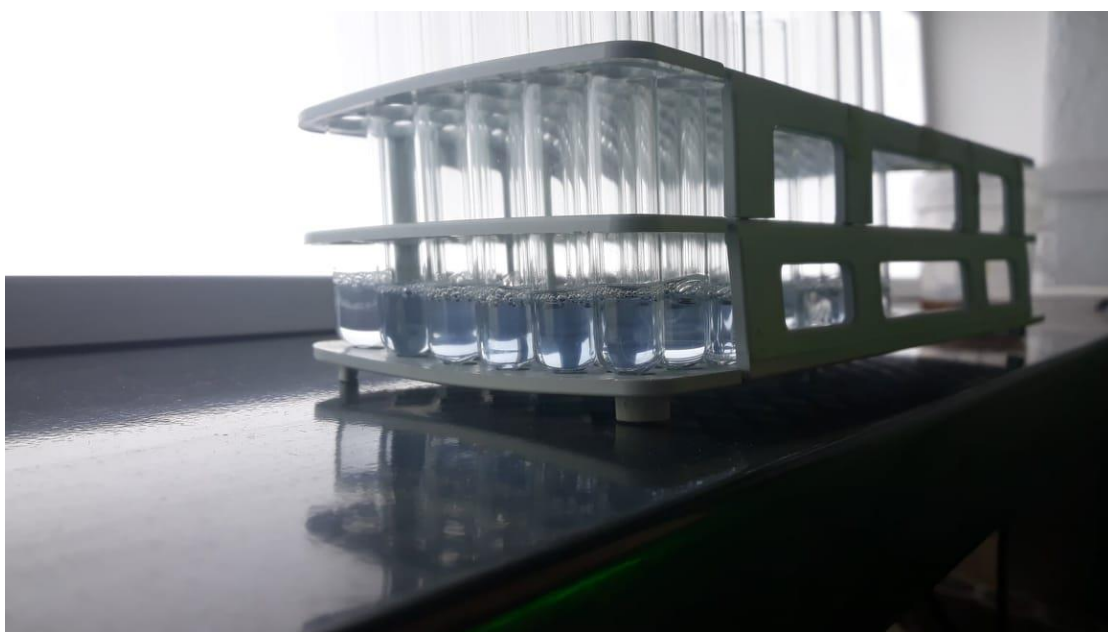


Εικόνα 3.23 Μέτρηση υδατανθράκων 4β σειράς

Εν συνεχεία, ακολουθούν οι εξίσου πολύ χαμηλές και εκτός εύρους πρωτεΐνες. Όπως φάνηκε πιο πριν η βιομάζα, φάνηκε να είναι αρκετή. Ωστόσο, από ότι φαίνεται το στέλεχος εδώ, δε μπόρεσε να αποδώσει και πολλά σε πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα είναι:

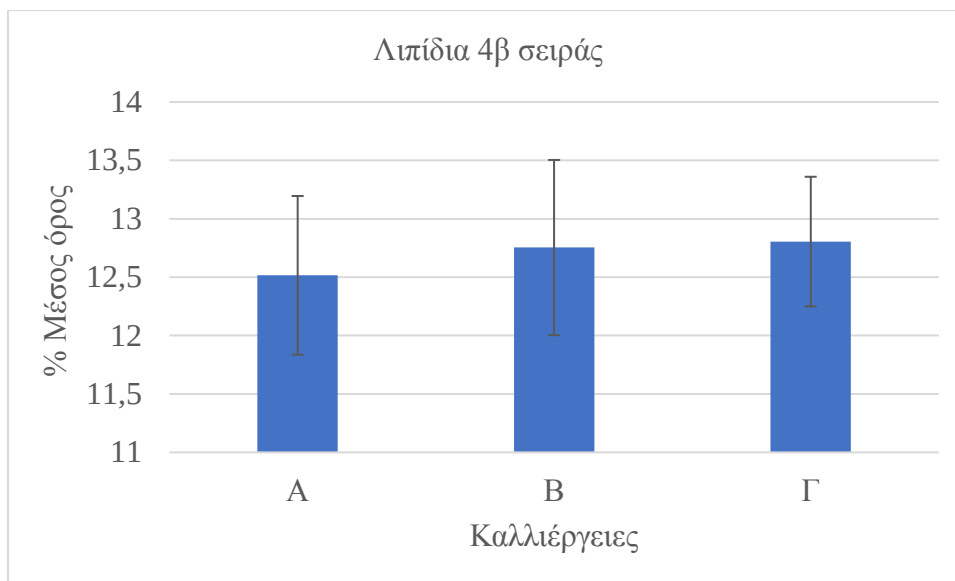


Γράφημα 3.26 Πρωτεΐνες 4β σειράς



Εικόνα 3.24 Πρωτεΐνες 4β σειράς

Τέλος, στα λιπίδια συλλέχθηκαν 100μl εκχυλισμένου δείγματος προς μέτρηση. Στα λιπίδια οι τιμές βρίσκονται εντός εύρους, σε ένα καλό σχετικά σημείο. Η απεικόνιση των λιπιδίων είναι η εξής:



Γράφημα 3.27 Λιπίδια 4β σειράς



Εικόνα 3.25 Λιπίδια 4β σειράς

Τέλος, για το % συνολικό άθροισμα των αναλύσεων, για τη βιοχημική σύσταση αυτής της σειράς, παρατίθεται ο παρακάτω πίνακας:

Πίνακας 3.42 Βιοχημική σύσταση καλλιέργειας 4β σειράς

Cultivation	1	2	3
% Total	56,48	53,46	55,1
sum of analyzes			

Όπως φαίνεται το στέλεχος δεν μπόρεσε να αναπτυχθεί όσο δυναμικά αναμενόταν. Ωστόσο, σε αυτό το σημείο θα μπορούσε να υποθεί ότι λόγω γλυκερόλης(η οποία αφομοιώθηκε καλύτερα μετά τη διάσπασή της με αέρα), δίνονται και πιο υψηλές τιμές λιπιδίων και βιομάζας(σε περίπτωση μη υπερεκτίμησής της). Από την άλλη όμως, δημιουργείται το ερώτημα, αν λόγω συσσωματωμάτων που δημιουργήσε η γλυκερόλη με το τυρόγαλο(τα οποία δε μπορούν να μεταβολιστούν από το στέλεχος), αναστάληκε η ανάπτυξη και έγινε παραγωγή λιπιδίων ως μηχανισμός άμυνας.

3.5 Ανασταλτικοί παράγοντες

3.5.1 Παράγοντες που επηρέασαν τα αποτελέσματα

Οι συνθήκες ανάπτυξης των καλλιεργειών, έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση των αποτελεσμάτων. Οι κύριοι παράγοντες που έπαιξαν ρόλο στην ανάπτυξη των καλλιεργειών ήταν το θρεπτικό υπόστρωμα, το pH, η θερμοκρασία, η παρουσία/έλλειψη αερισμού και ο φωτισμός. Παρακολουθώντας τη πορεία της εργασίας, το pH των θρεπτικών υποστρωμάτων είχε τιμές ουδέτερες προς το αλκαλικό, με εξαίρεση τη τελευταία πειραματική πορεία όπου έγινε ρύθμιση του pH, σε αλκαλικές τιμές. Παράλληλα, οι περισσότερες πειραματικές σειρές πραγματοποιήθηκαν υπό υψηλές θερμοκρασίες στο χώρο, γεγονός που δημιούργησε πρόβλημα στη ρύθμιση/διατήρηση επιθυμητής θερμοκρασίας, εντός του χώρου ανάπτυξης των καλλιεργειών. Η υψηλή θερμοκρασία του περιβάλλοντος, οδήγησε σε μερική αναστολή της ανάπτυξης των καλλιεργειών. Με πιο ευνοϊκές περιβαλλοντικές θερμοκρασίες, ενδεχομένως να υπήρξαν και πιο καλά αποτελέσματα, καθώς πετυχαίνοντας τη βέλτιστη θερμοκρασία σε ένα μικροοργανισμό, επιτυγχάνεται και η μέγιστη απόδοση των μεταβολικών του λειτουργιών. Αυτό ίσως να φαίνεται χαρακτηριστικά στις απεικονίσεις των βιομαζών. Με πιο καλές θερμοκρασίες, ίσως οι αποδόσεις της βιομάζας να ήταν πιο υψηλές, όπου περιεχόταν περισσότερη πεπτόνη και γλυκερόλη. Από την άλλη, το γεγονός ότι δε ρυθμίστηκε το pH και σε αυτές τις καλλιέργειες, μπορεί να παίζει ρόλο καθώς παρατηρείται μείωση pH κατά την αύξηση των συγκεντρώσεων στη πεπτόνη. Οι ανασταλτικοί παράγοντες ωστόσο, ίσως να μη βρίσκονται μόνο στις ρυθμίσεις θερμοκρασίας και pH. Ένα ακόμη σημείο που θα μπορούσε να δημιουργήσει κάποια αδυναμία, είναι η ένταση του φωτισμού στις καλλιέργειες. Εδώ θα μπορούσε να γίνει ένας συνδυασμός της θερμοκρασίας με την ένταση του φωτός. Αν η ένταση του φωτός είναι υψηλή, ενώ το εμβόλιο είναι πιο αδύναμο πιθανόν η καλλιέργεια να οδηγηθεί σε ολική αναστολή ανάπτυξης. Από εκεί κι πέρα, η μη τροφοδότηση με αέρα των προεμβολίων, αλλά και των πειραματικών

καλλιιεργειών της 1^{ης}-3^{ης} σειράς, οδήγησε θεωρητικά σε απόδοση μικρότερης βιομάζας. Στη παρούσα εργασία, η λειτουργικότητα της προσθήκης οξυγόνου στις καλλιέργειες, έγινε εμφανής στη 4^η πειραματική πορεία. Ωστόσο, η τροφοδότηση με αέρα όλων των καλλιιεργειών της 1^{ης} και 2^{ης} πορείας δεν ήταν εφικτή, λόγω περιορισμένου χώρου και εξοπλισμού. Συνεχίζοντας, υπάρχουν τα σφάλματα τόσο σε ατομικό επίπεδο, αλλά και τα σφάλματα των μεθόδων. Κάποια προσωπικά σφάλματα, όπως είναι λογικό, μπορεί να έγιναν κατά τη διάρκεια κάποιων αναλύσεων/μετρήσεων και πιθανόν κατά τη συλλογή της βιομάζας. Κάποια από αυτά, διορθώνονται συνήθως εύκολα πραγματοποιώντας κάποια επανάληψη στις μετρήσεις. Σε αναλυτικό επίπεδο όμως, θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι, στις χρωματομετρικές αναλύσεις, η ένταση του χρώματος στο μετρούμενο δείγμα, δεν αντικατροπτίζει πάντοτε, με ακρίβεια τη ποσότητα/συγκέντρωση του επιθυμητού συστατικού. Ακόμη, στην ανάλυση των λιπιδίων το αντιδραστήριο της σουλφο-φωσφο-βανιλίνης, παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας και αιθανόλη. Στις τρεις πρώτες πειραματικές σειρές(1^η και 2^η πορεία), το αντιδραστήριο παρασκευάστηκε χωρίς την αιθανόλη, ενώ παράλληλα, δεν υπήρχε πρότυπη καμπύλη λιπιδίων που να αναφέρεται στην τροποποίηση αυτή. Κλείνοντας το κύκλο των 3 πρώτων πειραματικών σειρών, θα γίνει σύντομη αναφορά στις χρωστικές. Γενικότερα, η μικτοτροφία δεν οφείλει την υψηλή παραγωγή χρωστικών(Anil Kumar Patel et al, 2019d). Ένας ακόμη παράγοντας όμως που μπορεί να συμβάλλει σε αυτό, είναι και η ένταση του φωτισμού της καλλιέργειας. Αν η ένταση είναι πολύ υψηλή, αυτό ίσως να λειτουργήσει ανασταλτικά ως προς τη παραγωγή χρωστικών(Majid Hosseini, 2019b), κάτι το οποίο πιθανολογείται να συνέβη κατά την ανάπτυξη των καλλιιεργειών της 1^{ης}-3^{ης} πειραματικής σειράς. Όσον αφορά τη 3^η πειραματική πορεία, κατά πάσα πιθανότητα λόγω υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών και παρουσία θεικών αλάτων(προσπάθεια ρύθμισης pH προς ουδέτερο με H₂SO₄ 0,25N) στο εκχυλισμένο δείγμα, η ανάπτυξη του στελέχους να μην ήταν δυνατό να συμβεί. Μία λύση ίσως θα ήταν να προηγηθεί ξέπλυμα της ηλίόσκονης, για απομάκρυνση των φαινολικών, με τη πιθανότητα όμως απομάκρυνσης υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών ή/και χρήση διαφορετικού οξέος, για εξουδετέρωση. Τέλος, για τη 4^η πειραματική πορεία βασικό βήμα, είναι η αποστείρωση της γλυκερόλης σε ξεχωριστή φιάλη από το τυρόγαλο, καθώς(ακολουθώντας τη συμπεριφορά της πεπτόνης) η αποστείρωση των 2 αυτών συστατικών μαζί, δημιούργησε εν μέρη ιζήματα τα οποία δεν μπορούν να αφομοιωθούν από το στέλεχος. Όσο για κάποιες βελτιώσεις, αυτό που θα μπορούσε να γίνει κυρίως σε επόμενο στάδιο, για τη παραγωγή λιπιδίων, είναι η

μείωση εκχυλισμένων πρωτεϊνών στο θρεπτικό υπόστρωμα(χορήγηση μικρότερης ποσότητας τυρόγαλου) και επανένταξη(στο υπόστρωμα) διττανθρακικών και δισόξινου φωσφορικού καλίου. Εφόσον, φάνηκε ότι το τυρόγαλο μπορεί να αφομοιωθεί χωρίς πρόβλημα από την *A.protothecoides*, θα μπορούσαν να γίνουν δοκιμές και σε μικρότερες ποσότητες σκοπεύοντας σε τροφοπενία αζώτου, ενώ θα δινόταν και η ευκαιρία να εργαστούν και οι αναερόβιες συνθήκες. Με λίγα λόγια, θα μπορούσαν να ξαναδοκιμαστούν κάποια μέρη από την εργασία αυτή, πιο σωστά ίσως, αλλά και με κάποιες βελτιωμένες παραμέτρους. Εν τέλει, παρά τις όποιες δυσκολίες που προέκυψαν, η εργασία αυτή παρέχει μία σχετική εικόνα, που δείχνει τις τάσεις των αποτελεσμάτων βασισμένες στους διάφορους λόγους γλυκερόλη/πεπτόνη ανά τις πειραματικές σειρές, ενώ αναδεικνύεται και η χρησιμότητα του τυρογάλακτος στην ανάπτυξη των μικροφυκών.

3.6 Συζήτηση των αποτελεσμάτων

3.6.1 Σύγκριση ευρημάτων με ήδη υπάρχοντα αποτελέσματα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί νωρίτερα, οι έρευνες που παρουσιάζουν αποτελέσματα για την αξιοποίηση ή μη της γλυκερόλης, για την ανάπτυξη μικροφυκών, είναι πολλαπλές. Η σύγκριση που μπορεί να γίνει ανάμεσα σε κάποιες από αυτές με τη συγκεκριμένη εργασία, πέρα από τη χρήση της γλυκερόλης, αφορά τον τρόπο ανάπτυξης αλλά και κάποιες εξωτερικές μεταβλητές, που διαμόρφωσαν αυτά τα αποτελέσματα. Ουσιαστικά, διαμορφώνεται ένας κατάλογος με σημεία προς συζήτηση, έχοντας βασικά κριτήρια:

- Το θρεπτικό υπόστρωμα και το pH,
- Την παρουσία/έλλειψη αερισμού,
- Τη θερμοκρασία,
- Το φωτισμό,
- Τον τρόπο ανάπτυξης,
- Τη διάρκεια ανάπτυξης.

Ξεκινώντας, το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το BG-11, με διάρκεια ανάπτυξης 6 μέρες. Το υπόστρωμα αυτό, παρουσιάζει ευρεία χρήση στην ανάπτυξη μικροφυκών και έχει υψηλές συγκεντρώσεις σε άζωτο. Από τα πολύ σημαντικά δομικά συστατικά για την ανάπτυξη των μικροφυκών, θεωρούνται το άζωτο(N) και ο φώσφορος(P). Το συγκεκριμένο υπόστρωμα, περιέχει παραπάνω άζωτο σε σύγκριση με το φώσφορο, αποτέλεσμα βασισμένο σε έρευνα σύγκρισης με άλλο

θρεπτικό υπόστρωμα(Cornelius Darpito et al, 2014). Επιπλέον, ένα ακόμα που παρατηρήθηκε στη προαναφερόμενη έρευνα, είναι ότι με $pH > 8$ και θερμοκρασία $28^{\circ}C$, υπό αναερόβιες συνθήκες, γίνεται καλύτερη προσαρμογή των κυττάρων στο νέο περιβάλλον, ενώ σε $pH=10$ τα λίπη που προέκυψαν ήταν $25,1 \pm 1,1\%$. Βέβαια, η σύγκριση δεν μπορεί να είναι απόλυτη, καθώς(όπως προαναφέρθηκε) υπήρξε τροποποίηση στο αντιδραστήριο, ενώ κάποιες διαφορές υπάρχουν και στο τρόπο ανάπτυξης των προκαλλιέργειών. Στη περίπτωση της έρευνας το στέλεχος αναπτυσσόταν φωτοτροφικά με $0,1\%(w/v)$ πεπτόνη χωρίς οργανική πηγή, ενώ στην εργασία αυτή οι προκαλλιέργειες και οι βιομάζες στις πειραματικές πορείες, αναπτύχθηκαν μικτοτροφικά και ετεροτροφικά, με ένα κύκλο φως/σκοτάδι 16/8 και υψηλότερες συγκεντρώσεις πεπτόνης, έχοντας και γλυκερόλη. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, αν το άζωτο στις καλλιέργειες με χαμηλές συγκεντρώσεις πεπτόνης(οργανική πηγή αζώτου) αφομοιώθηκε εύκολα, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η γλυκερόλη, έπαιξε βασικό ρόλο στην ανάπτυξη βιομάζας των καλλιέργειών αυτών. Ταυτόχρονα, σημείο σύγκρισης των αποτελεσμάτων είναι και τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται. Και αυτό γιατί, δεν είναι εφικτό όλα τα θρεπτικά υποστρώματα, να ταιριάζουν απόλυτα(να αφομοιώνονται/μεταβολίζονται) σε όλους τους μικροοργανισμούς. Ανάλογο παράδειγμα, είναι και η έρευνα των (Anil Kumar Patel et al, 2019e), όπου κάτω από κύκλο 16/8 φως/σκοτάδι, με γλυκόζη αποδόθηκαν $3g/L$ βιομάζας, με χρόνο ανάπτυξης 4-5 μέρες. Στην έρευνα αυτή, η γλυκερόλη φάνηκε να είναι η λιγότερο αποδοτική οργανική πηγή, με αποδόσεις βιομάζας λιγότερες και από την αυτοτροφία και αδυναμία στήριξης της καλλιέργειας, κατά την ετεροτροφική οδό. Παράλληλα προωθείται ο συνεχής χαμηλός φωτισμός για τη μικτοτροφία με γλυκόζη, ενώ τονίζεται η υψηλή και συνεχής ένταση φωτισμού για την αφομοίωση της γλυκερόλης, καθώς ετεροτροφικά δε φάνηκε να μπορέσει να αφομοιωθεί ιδιαιτέρως. Ωστόσο, το θρεπτικό υπόστρωμα της έρευνας, περιείχε αμμωνία. Όταν έγινε προσπάθεια να αναπτυχθούν καλλιέργειες της *A.protothecoides* με τη προσθήκη νιτρικών και αμμωνίας, οι καλλιέργειες της πτυχιακής αυτής εργασίας, δε φάνηκε να επιβιώνουν. Αντίθετα, με τη προσθήκη πεπτόνης ακολούθησε ανάπτυξη της βιομάζας. Οπότε, μπορεί να θεωρηθεί ότι το συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα δε βοηθούσε το στέλεχος να αναπτυχθεί όπως θα έπρεπε και να αξιοποιήσει τη γλυκερόλη. Από την άλλη, η ευεργετική δράση της γλυκόζης και του ακετονικού άλατος, είναι ευρέως διαδεδομένη. Η φάση προσαρμογής με τη γλυκερόλη μπορεί να είναι μεγαλύτερη(John O'Grady, John A. Morgan, 2001b), αλλά αν το θρεπτικό υπόστρωμα δεν είναι το

κατάλληλο, η ανασταλτική του δράση θα φανεί στα αποτελέσματα και τη συμπεριφορά της καλλιέργειας. Τέλος, η ευεργετική δράση του αερισμού, πέρα από τη 4^η πορεία, φαίνεται να επιβεβαιώνεται και από την έρευνα των Bing Hu et al 2012. Ουσιαστικά, συμπεραίνει ότι η χορήγηση CO₂ σε διάφορα ποσοστά με αυξητική σειρά(0%, 1%, 5%), αποδόθηκαν και μεγαλύτερα ποσά βιομάζας σε σύγκριση με τις καλλιέργειες όπου δεν χορηγήθηκε CO₂. Στη 4^η πειραματική πορεία, αυτό που συμβαίνει είναι ουσιαστικά, η σύγκριση μεταξύ μικτοτροφίας και αυτοτροφίας. Τα αποτελέσματα της μικτοτροφίας φαίνεται να είναι πιο υψηλά σε υδατάνθρακες και λίπη. Αυτό, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι, η γλυκερόλη αποστειρώθηκε στην ίδια φιάλη Duran, με το τυρόγαλο, σχηματίζοντας συσσωματώματα. Αυτό σημαίνει ότι η γλυκερόλη και το τυρόγαλο που χορηγήθηκαν, δε θα μπορούσαν να αφομοιωθούν πλήρως. Ουσιαστικά, μέσω της αποστείρωσης, μπορεί να δημιουργήθηκαν συνθήκες στρεσοαρίσματος, λόγω παραμόρφωσης συστατικών του θρεπτικού υποστρώματος. Επίσης, η αφαίρεση των διττανθρακικών και του δισόξινου φωσφορικού καλίου από το υπόστρωμα, πέρα από τη μείωση του pH(της οποίας έγινε ρύθμιση όμως), επέφεραν και έλλειψη φωσφόρου, αρνητικό για τη περεταίρω ανάπτυξη της βιομάζας(Sakashii Bansal, 2019). Το τυρόγαλο, έχει ξαναχρησιμοποιηθεί σε προηγούμενη έρευνα ετεροτροφικά(Isabel Espinosa-Gonzalez et al, 2014). Στις καλλιέργειες batch προέκυψαν 9,1±0,2 g/L με ολικά λίπη 42,0±6,6%. Η διαφορά, είναι ότι το τυρόγαλο είτε υδρολύθηκε με 2M KOH, είτε έγινε και χρήση ενζύμων μετά την υδρόλυση, χρησιμοποιώντας έτσι τα σάκχαρα του σαν οργανική πηγή. Αντίστοιχα, στη παρούσα έρευνα, δόθηκαν 2,12, 2,51 και 4,16g/L βιομάζας στη σειρά 4^α και 4,84, 6,08 και 6,1g/L βιομάζας. Στα λιπίδια η σειρά 4^α έδωσε τιμές 9,3±0,44%, 7,62±0,42%, 6,68±0,31%, ενώ στη 4^β προέκυψαν τιμές 12,52±0,68%, 12,75±0,75% και 12,81±0,33%.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Συμπεράσματα πρακτικής αξίας της έρευνας

4.1.1 Παρουσίαση συμπερασμάτων πρακτικής αξίας

Φτάνοντας στο τελευταίο κεφάλαιο αυτής της έρευνας, υπάρχει πλέον εικόνα από τα πιο πρακτικής αξίας ευρήματα. Οπότε, συνοψίζοντας:

- στις καλλιέργειες, που χορηγήθηκε περισσότερη πεπτόνη, δόθηκαν υψηλές πρωτεΐνες ποσοτικά, ενώ υψηλότερη βιομάζα παρατηρήθηκε σε μερικές από τις πειραματικές σειρές(κυρίως λόγω ευνοϊκότερων συνθηκών) .

- Η τροφοπενία αζώτου, που προήλθε από τη μείωση στη συγκέντρωση της πεπτόνης, όπως ήταν φυσικά αναμενόμενο, απέδωσε περισσότερους υδατάνθρακες και λιπίδια.
- Ως προς τη χρησιμότητα των πειραματικών σειρών, φαίνεται στη δεύτερη πειραματική πορεία, η εμφανή λειτουργικότητα των λόγων, γλυκερόλης/πεπτόνης με εύρος τιμών 10/4-50/20. Οι τιμές των αποτελεσμάτων, στις αναλύσεις των πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων, ήταν εντός βιβλιογραφικού εύρους για τα μικροφύκη, γενικότερα. Οι πιο αποδοτικοί λόγοι, γλυκερόλης/πεπτόνης, ήταν οι 20/8 g/L και 30/12 g/L.
- Αντίθετα, στη σειρά με λόγους 10/0,5-50/2,5, στους πιο υψηλούς λόγους γλυκερόλη/πεπτόνη(40/2-50/2,5), δόθηκαν κάποια σχετικά καλά αποτελέσματα, κυρίως σε πρωτεΐνες και λιπίδια, ενώ οι περισσότεροι λόγοι πιθανολογείται να κατέρρευσαν.
- Ακολούθως, όσον αφορά τις πορείες με το τυρόγαλο, η αποστείρωση του τυρογάλακτος θα πρέπει να γίνεται ξεχωριστά από τη γλυκερόλη. Στη περίπτωση αυτοτροφίας(χωρίς γλυκερόλη), επιτυγχάνεται μία καλή απόδοση βιομάζας και υψηλές πρωτεΐνες. Όσο για τα λιπίδια και τους υδατάνθρακες, τα πρώτα βρίσκονται εντός γνωστού βιβλιογραφικά εύρους σε χαμηλά επίπεδα, ενώ οι υδατάνθρακες είναι πολύ χαμηλοί και εκτός γνωστού εύρους. Εν συγκρίσει, οι καλλιέργειες με τυρόγαλο και γλυκερόλη, κατέληξαν να είναι πιο ευαλλοιώτες(λόγω αδυναμιών στο θρεπτικό υπόστρωμα) και δίνουν πολύ χαμηλές πρωτεΐνες, ενώ παράλληλα, οι υδατάνθρακες και τα λιπίδια είναι εντός βιβλιογραφικού εύρους, με τους υδατάνθρακες σε πολύ οριακό σημείο.
- Στο κομμάτι των χρωστικών, ανά τις πορείες, παρατηρήθηκε ότι όταν στις καλλιέργειες των εμβολίων υπάρχει έλλειψη αζώτου, από το θρεπτικό υπόστρωμα, μετά την ανάπτυξη σε υπόστρωμα με άζωτο (λόγω εξέλιξης πειραματικής σειράς), οι ποσότητες της χλωροφύλλης β αυξάνονται. Από την άλλη, οι ποσότητες της χλωροφύλλης α και των ολικών καροτενοειδών είτε θα έρθουν πιο κοντά (όπως στη 1^η πορεία), είτε στηριζόμενοι στις συγκεντρώσεις γλυκερόλης και πεπτόνης, θα έχουν αντιστρόφως ανάλογα αποτελέσματα(3^η σειρά). Οι συμπεριφορές αυτές ωστόσο, εξαρτώνται και από την ένταση του φωτός, στη καλλιέργεια.

- Τέλος, η τροφοδοσία με αέρα στις καλλιέργειες, είναι ικανή να αποδώσει υψηλές συγκεντρώσεις βιομάζας, εξαιτίας του διοξειδίου του άνθρακα αλλά και του οξυγόνου, το οποίο φαίνεται να βοηθά στη διάσπαση της γλυκερόλης. Παράλληλα, η ρύθμιση pH σε αλκαλικές τιμές και ο εμπλουτισμός των καλλιεργειών με αέρα, οφέλησε την ανάπτυξη περισσότερης βιομάζας. Έτσι, όμως το στέλεχος, σε συνδυασμό με ένα θρεπτικό υπόστρωμα, που περιέχει άζωτο (N) σε ευνοϊκές συγκεντρώσεις, δεν εισέρχεται σε πιο δυσνόητες συνθήκες επιβίωσης. Επομένως, δεν θα παραχθούν υψηλοί υδατάνθρακες και λιπίδια, γιατί παρέχονται καλές προϋποθέσεις, για να αναπτυχθεί σωστά το στέλεχος.

Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Άρθρα σε επιστημονικά περιοδικά

- {1} Tony Allman(23rd July 2020), The difference Batch, Fed-batch and Continuous processes, link: <https://www.infors-ht.com/en/blog/the-difference-between-batch-fed-batch-and-continuous-processes/>
- {2} Sakshi Bansal, Mixotrophic Growth of *Chlorella Sp.* Using Glycerol for the Production of Biodiesel: A Review, *Mapana Journal of Sciences* 2019, Vol. 18, No. 2, 1-12 ISSN 0975-3303|<https://doi.org/10.12723/mjs.49.1>
- {3} Clara Benounna(16th April 2019), The pH, a major parameter for your microalgae cultures, link: <https://www.synoxis-algae.com/the-ph-a-major-parameter-for-your-microalgae-cultures/>
- {4} Yen-Hui Chen, Terry H. Walker, Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol, *Biotechnol Lett*(2011), DOI 10.1007/s10529-011-0672-y
- {5} Cornelius Darpito • Won-Sub Shin • Seungjib Jeon •Hansol Lee • Kibok Nam • Jong-Hee Kwon • Ji-Won Yang, Cultivation of *Chlorella protothecoides* in anaerobically treated brewery wastewater for cost-effective biodiesel production, *Bioprocess Biosyst Eng*(2014), DOI 10.1007/s00449-014-1292-4
- {6} M. DuBois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 350-356.
- {7} Isabel Espinosa-Gonzalez, Archana Parashar, David C. Bressler, Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production, *Bioresource Technology* 155 (2014) 170–176
- {8} Folch J. The isolation of phosphatidyl serine from brain cephalin, and identification of the serine component. *J Biol Chem.* 1941;139(2):973–4.
- {9} M.D. Guiry(December 20th, 2011), link: http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=45154

- {10} Bing Hu & Min Min & Wenguang Zhou & Yecong Li & Michael Mohr & Yanling Cheng & Hanwu Lei & Yuhuan Liu & Xiangyang Lin & Paul Chen & Roger Ruan, Influence of Exogenous CO₂ on Biomass and Lipid Accumulation of Microalgae *Auxenochlorella protothecoides* Cultivated in Concentrated Municipal Wastewater, *Appl Biochem Biotechnol* (2012) 166:1661–1673, DOI 10.1007/s12010-012-9566-2
- {11} Izabela Krzemińska¹, Agnieszka Nawrocka¹, Agata Piasecka¹, Paweł Jagielski, Jerzy Tys¹, Cultivation of *Chlorella protothecoides* in photobioreactors: The combined impact of photoperiod and CO₂ concentration, *Eng. Life Sci.* 2015, 15, 533–541
- {12} Sandeep Kumar Duran, Pramod Kumar & Sarbjot S Sandhu, A review on microalgae strains, cultivation, harvesting, biodiesel conversion and engine implementation, *Biofuels*(2018a,b), DOI: 10.1080/17597269.2018.1457314
- {13} Anil Kumar Patel¹, Jae Min Joun¹, Min Eui Hong, Sang Jun Sim, Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae, *Bioresource Technology* 282 (2019a,b,c,d,e) 245–253
- {14} H.K. Lichtenthaler, [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods Enzymol.*, 148 (1987) 350-382.
- {15} O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193(1951) 265-275
- {16} Keith Miller(2021), 17 Advantages and Disadvantages of Algae biofuels, link: <https://futureofworking.com/7-advantages-and-disadvantages-of-algae-biofuel/>
- {17} John O’Grady, John A. Morgan, Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol, *Bioprocess Biosyst Eng* (2011a,b) 34:121–125 DOI 10.1007/s00449-010-0474-y
- {18} Silvia Salati, Giuliana D’Imporzano, Barbara Menin, Davide Veronesi, Barbara Scaglia, Pamela Abbruscato, Paola Mariani, Fabrizio Adani, Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products, *Bioresource Technology* 230 (2017) 82–89
- {19} N. Zöllner, K. Kirsch, Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion, *Res. Exp. Med. (Berl.)*, 135 (1962) 545-561.

Ερευνητικές ξενόγλωσσες διπλωματικές εργασίες

{20} Shwetha Sivakaminathan, BIOMASS AND LIPID PRODUCTION FROM HETEROTROPHIC AND MIXOTROPHIC FED-BATCH CULTIVATIONS OF MICROALGAE *Chlorella protothecoides* USING GLYCEROL (2012), *All Theses*. 1478. https://tigerprints.clemson.edu/all_theses/1478

Ξενόγλωσσες διαδικτυακές πηγές

{21} Biology LibreTexts(January 4th, 2021), link:
[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_\(Bounless\)/5%3A_Microbial_Metabolism/5.12%3A_Biosynthesis/5.12C%3A_The_Calvin_Cycle](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Bounless)/5%3A_Microbial_Metabolism/5.12%3A_Biosynthesis/5.12C%3A_The_Calvin_Cycle)

{22} JGI PhycoCosm THE ALGAL GENOMICS RESOURCES(2017a,b), link:
<https://phycocosm.jgi.doe.gov/Auxeprot1/Auxeprot1.home.html>

{23} Wikipedia(2021), link: https://en.wikipedia.org/wiki/Citric_acid_cycle,

Ξενόγλωσσα βιβλία και κεφάλαια βιβλίων στο διαδίκτυο

{24} Majid Hosseini(February 23rd, 2019a,b), Advances in Feedstock Conversion Technologies for Alternative Fuels and Bioproducts(New Technologies, Challenges and Opportunities), WOODHEAD PUBLISHING SERIES, link:
https://books.google.gr/books?id=ltGJDwAAQBAJ&pg=PA53&lpg=PA53&dq=chlorella+protothecoides+carbohydrates&source=bl&ots=g8HXAYzOhv&sig=ACfU3U2cVRA1kJvrWC3o_aO6O9v5VFSBOW&hl=el&sa=X&ved=2ahUKEwi94OnxgqTqAhUGBGMBHVJxBdsQ6AEwBHoECAoQAQ#v=onepage&q&f=false

{25} Walker, John M. (2009), [*Springer Protocols Handbooks*] *The Protein Protocols Handbook* || *The Lowry Method for Protein Quantitation, Chapter 2*), 7–10, Publisher Name Humana Press, Totowa, NJ

doi:10.1007/978-1-59745-198-7_2

{26} D. James Gilmour, Mixotrophy p. 1-30, Advances in Applied Microbiology, Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, Sheffield, United Kingdom, 2019, DOI: 10.1016/bs.aambs.2019.10.001

Κεφάλαιο βιβλίου σε ελληνικές διαδικτυακές πηγές

{27} Καρκαλούσος Πέτρος, Γεωργίου Ζωή, Κρούπης Χρήστος, Παπαϊωάννου Άγγελος, Πλαγιάς, Παναγιώτης Σπυρόπουλος, Βασίλειος Τσότσου, Γεωργία Ελένη Φούντζουλα Χριστίνα(2015a,b), Βασικές αρχές φωτομετρίας και χρωματομετρικών αναλύσεων, σελ. 1-23, Εκδόσεις Καλλιπός,

link: https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/5383/3/02_chapter_01.pdf

Κεφάλαιο σε ελληνικά βιβλία

{28} A.N. Ανθεμίδης, A.N. Βουλγαρόπουλος, Γ.Α. Ζαχαριάδης, Ι.Α. Στράτης 2012, Ορισμοί στατιστικών παραμέτρων σελ.76-79, Ποσοτική Χημική Ανάλυση-Αρχές και Εργαστηριακές Εφαρμογές, Εκδόσεις ΖΗΤΗ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παραρτήματα 1^{ης} σειράς

Πίνακας 1: Υδατάνθρακες 1^{ης} πορείας

%	9,53	10,77	10,09	24,49	26,57	28,08
Average						
% St.	0,64	0,74	0,97	1,36	1,42	1,41
Dev.						
% RSD	6,67	6,91	9,59	5,54	5,36	5,03

Πίνακας 2: Πρωτεΐνες 1^{ης} πορείας

%	47,76	44,24	32,35	25,34	16,63	18,96
Average						
% St.	1,65	1,37	1,38	0,76	1,28	1,72
Dev.						
% RSD	3,46	3,1	4,28	3,01	7,71	9,1

Πίνακας 3: Λιπίδια 1^{ης} πορείας

%	10,74	13,24	8,39	12,35	11,83	17,83
Average						
% St.	0,47	0,76	0,32	1,06	1	0,81
Dev.						
% RSD	4,49	5,57	3,84	8,57	8,47	4,54

Πίνακας 4: Χλωροφύλλη α 1^{ης} πορείας

%	0,038	0,041	0,101	0,051	0,024	0,015
Average						
% St.	0,008	0,0097	0,0089	0,0079	0,0056	0,002
Dev.						
% RSD	21,12	23,78	8,83	15,41	22,8	13,28

Πίνακας 5: Χλωροφύλλη β 1^{ης} πορείας

%	0,127	0,121	0,196	0,073	0,032	0,03
Average						
% St.	0,0143	0,0106	0,0363	0,0117	0,0097	0,0057
Dev.						
% RSD	11,24	8,74	18,56	15,97	29,97	19,09

Πίνακας 6: Ολικά καροτενοειδή 1^{ης} πορείας

%	0,015	0,018	0,027	0,041	0,05	0,03
Average						
% St.	0,0016	0,002	0,0036	0,0066	0,0035	0,0021
Dev.						
% RSD	10,67	10,94	13,1	15,94	7,05	6,03

Πίνακας 7: Ολική χλωροφύλλη 1^{ης} πορείας

%	0,165	0,171	0,297	0,126	0,056	0,037
Average						
% St.	0,0219	0,0212	0,038	0,0156	0,0064	0,0034
Dev.						
% RSD	13,22	12,35	12,8	12,36	11,34	9,31

Παραρτήματα 2^{ης} σειράς

Πίνακας 1: Υδατάνθρακες 2^{ης} σειράς

%	32,39	24,68	26,33	26,09	33,97	37,86
Average						
% St.	1,28	1,02	0,83	1,14	1,34	1,53
Dev.						
% RSD	3,96	4,14	3,16	4,37	3,95	4,04

Πίνακας 2: Πρωτεΐνες 2^{ης} σειράς

%	39,93	41,79	47,1	46,12	35,5	31,29
Average						
% St.	1,17	2,3	1,41	1,2	0,73	1,92
Dev.						
% RSD	2,94	5,51	3	2,6	2,05	6,14

Πίνακας 3: Λιπίδια 2^{ης} σειράς

%	14,36	17,96	18,8	21,56	9,66	17,7
Average						
% St.	0,37	1,34	0,98	1,65	0,41	0,55
Dev.						
% RSD	2,59	7,44	5,19	7,66	4,29	3,18

Πίνακας 4: Χλωροφύλλη α 2^{ης} σειράς

%	0,55	0,51	0,34	0,36	0,3	0,36
Average						
% St.	0,0181	0,039	0,0372	0,0136	0,0143	0,043
Dev.						
% RSD	3,28	7,63	10,93	3,75	4,74	11,8

Πίνακας 5: Χλωροφύλλη β 2^{ης} σειράς

%	0,1	0,12	0,09	0,06	0,08	0,19
Average						
% St.	0,0149	0,0104	0,011	0,0088	0,014	0,0265
Dev.						
% CV	14,31	8,35	11,91	15,48	17,97	13,96

Πίνακας 6: Ολικά καροτενοειδή 2^{ης} σειράς

%	0,08	0,15	0,13	0,16	0,11	0,13
Average						
% St.	0,0142	0,0295	0,0235	0,0213	0,014	0,0145
Dev.						
% RSD	17,42	19,54	18,4	13,15	1,28	11,17

Πίνακας 7: Ολική χλωροφύλλη 2^{ης} σειράς

%	0,69	0,55	0,42	0,41	0,36	0,66
Average						
% St.	0,024	0,0529	0,0361	0,0245	0,0087	0,075
Dev.						
% RSD	3,5	9,61	8,59	5,95	2,44	11,33

Παραρτήματα 3^{ης} σειράς**Πίνακας 1:** Υδατάνθρακες 3^{ης} σειράς

%	12,2	7,9	9,75	13,76	20,42	23,61
Average						
% St.	1,03	0,47	0,28	0,50	1,37	1,68
Dev.						
% RSD	8,45	5,94	2,84	4,29	6,71	7,12

Πίνακας 2: Πρωτεΐνες 3^{ης} σειράς

%	49,3	48,17	41,04	26,69	23,61	13,4
Average						
% St.	2,17	2,69	2,02	1,53	1,27	1,04
Dev.						
% RSD	4,4	5,59	4,93	5,95	5,39	7,75

Πίνακας 3: Λιπίδια 3^{ης} σειράς

%	18,32	26,5	12,26	11,05	11,09	8,8
Average						
% St.	0,58	1,59	0,88	0,68	0,54	0,35
Dev.						
% RSD	3,15	6	7,19	6,14	1,85	3,96

Πίνακας 4: Χλωροφύλλη α 3^{ης} σειράς

%	0,069	0,0631	0,0703	0,0461	0,0366	0,0362
Average						
% St.	0,0102	0,0106	0,0159	0,0099	0,0041	0,028
Dev.						
% RSD	14,85	16,82	22,67	21,39	11,24	7,36

Πίνακας 5: Χλωροφύλλη β 3^{ης} σειράς

%	0,1207	0,1207	0,0878	0,0703	0,0703	0,694
Average						
% St.	0,0139	0,0115	0,0145	0,0124	0,0054	0,0034
Dev.						
% RSD	11,52	9,51	16,46	17,61	7,72	6,97

Πίνακας 6: Ολικά καροτενοειδή 3^{ης} σειράς

%	0,0297	0,0275	0,0235	0,0283	0,0363	0,0657
Average						
% St.	0,0048	0,0022	0,0024	0,005	0,0087	0,0037
Dev.						
% RSD	16,09	7,84	10,12	17,73	24,02	5,58

Πίνακας 7: Ολική χλωροφύλλη 3^{ης} σειράς

%	0,1833	0,1892	0,1862	0,2035	0,0933	0,0936
Average						
% St.	0,0257	0,0185	0,0376	0,0269	0,0116	0,0128
Dev.						
% RSD	14,05	9,77	20,18	13,22	12,42	13,72

Παραρτήματα 3^{ης} πορείας**Πίνακας 1:** Δεδομένα εκχυλισμένης ηλιόσκονης σε NaOH 0,1-1N

%	28,68	28,61	36,47	32,69
Average				
% St.	1,12	1,66	3,74	1,96
Dev.				
% RSD	3,91	5,92	10,25	6

Παραρτήματα 4^{ης} πορείας**Παραρτήματα 4^α σειράς****Πίνακας 1:** Υδατάνθρακες 4^α σειράς

%	12,46	12,18	19,02
Average			
% St.	1	1,2	1,06
Dev.			
% RSD	8,05	9,82	5,58

Πίνακας 2:Πρωτεΐνες 4^α σειράς

%	50,59	45,22	43,42
Average			
% St.	3,44	2,84	2,57
Dev.			
% RSD	6,8	6,28	6,92

Πίνακας 3:Λιπίδια 4^α σειράς

%	9,3	7,62	6,68
Average			
% St.	0,44	0,42	0,31
Dev.			
% RSD	4,72	5,45	4,62

Παραρτήματα 4β σειράς**Πίνακας 1:**Υδατάνθρακες 4β σειράς

%	20,58	20,38	19,15
Average			
% St.	0,84	1,17	0,94
Dev.			
% RSD	4,06	5,75	4,91

Πίνακας 2: Πρωτεΐνες 4β σειράς

%	23,39	20,33	23,14
Average			
% St.	1,51	1,07	1,57
Dev.			
% RSD	6,45	5,24	6,79

Πίνακας 3: Λιπίδια 4β σειράς

%	12,52	12,71	12,81
Average			
% St.	0,68	0,75	0,55
Dev.			
% RSD	5,43	5,88	4,33