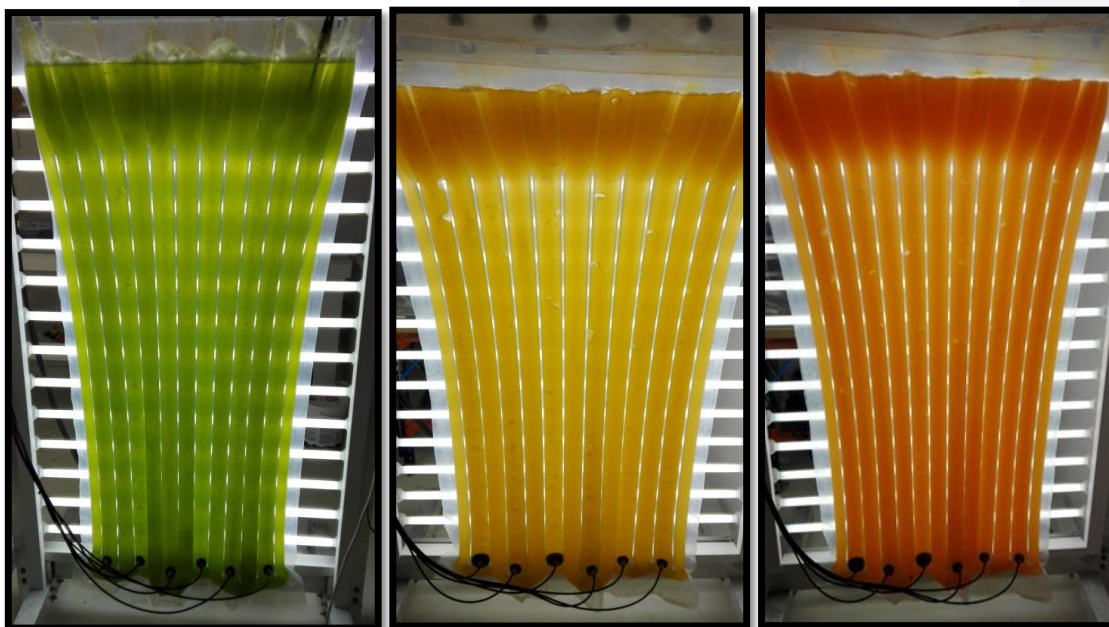




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗΣ



ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΣΠΟΥΔΩΝ ΩΚΕΑΝΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



«Καλλιέργεια ελληνικών στελεχών *Dunaliella* sp. σε
φωτοβιοαντιδραστήρες για τη μεγιστοποίηση παραγωγής
καρωτενοειδών»

Διπλωματική εργασία

Αλέξανδρος Ντζουβάρας AM 214009

2018

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην εκπόνηση της εργασίας αυτής είχα τη βοήθεια και την πολύτιμη υποστήριξη πολλών συνεργατών και φίλων. Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη της εργασίας μου, Καθηγήτρια του τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής, Αθηνά Οικονόμου-Αμίλλη, η οποία μου εμπιστεύτηκε την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας και η οποία μαζί με τον κύριο Ιωάννη Τζοβενή, διδάκτορας του Gent University του Βελγίου, αποτέλεσαν τους στυλοβάτες αυτής της προσπάθειας και με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Για τη βοήθειά τους θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κ. Μαγδαληνή Κροκίδα, Καθηγήτρια του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ, καθώς και την δόκτωρα Σοφία Παπαδάκη, Διδάκτορα του Πανεπιστημίου της Κρήτης, καθώς χωρίς την βοήθειά τους οι αναλύσεις με τη μέθοδο της HPLC θα ήταν αδύνατες, και τον κ. Δημήτρη Χατζηνικολάου, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ για την πολύτιμη βοήθειά του.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συνεργάτες του εργαστηρίου Εφαρμοσμένης Φυκολογίας (Α.Ρ.Υ) του Τομέα, την Ξανθή Χατζηστρούντζιου, τη Λένα Ευρυγένη, την Ειρήνη Γρατσία, τον Κώστα Πανταζή και τη δόκτωρα Αμέρσα Τσιριγώτη για την ηθική υποστήριξή τους, την άψογη συνεργασία στο εργαστήριο, την έμπρακτη βοήθεια και κυρίως για τη φιλία τους.

Πάνω απ' όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, ήταν πάντα στο πλευρό μου, με στήριξαν και μου έδωσαν την αυτοπεποίθηση να ακολουθήσω το αντικείμενο που επέλεξα, που δεν με πίεσαν και δεν μου δημιούργησαν ποτέ προβλήματα, αλλά αντιθέτως ήταν πάντα εκεί όταν τους χρειάστηκα. Τέλος θέλω να ευχαριστήσω όλους μου τους φίλους που ήταν δίπλα μου και κυρίως τη σύντροφό μου την Ισμήνη, που ήταν μαζί μου σε όποιες δυσκολίες αντιμετώπισα. Σας ευχαριστώ όλους θερμά.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Γενικά στοιχεία για τα φύκη.....	8
1.2 Εφαρμογές μικροφυκών	9
1.3 Καλλιέργεια μικροφυκών.....	10
1.4 Παράμετροι καλλιέργειών	12
1.5 Στάδια κλειστών καλλιέργειών	15
1.6 Ταξινομική του γένους <i>Dunaliella</i>	17
1.7 Το γένος <i>Dunaliella</i>	18
1.8 Καρωτενοειδή	19
1.9 Βιοσύνθεση β-καρωτενίου στο γένος <i>Dunaliella</i>	21
1.10 Επίδραση της αλατότητας στην ανάπτυξη της <i>Dunaliella salina</i>	24
1.11 Επίδραση της συγκέντρωσης αζώτου στην ανάπτυξη του γένους <i>Dunaliella</i>	25
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1 Στελέχη μικροφυκών	27
2.2 Πειραματικός σχεδιασμός.....	28
2.3 Επίδραση της σύστασης των θρεπτικών μέσων στην ανάπτυξη των καλλιέργειών και στη συσσώρευση β-καρωτενίου	29
2.4 Καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας με τη χρήση φωτοβιοαντιδραστήρων	29
2.5 Μεγιστοποίηση της παραγωγής β-καρωτενίου.....	30
2.6 Ανάπτυξη πρωτοκόλλων παραγωγής β-καρωτενίου	31
2.7 Καλλιέργειες μικροφυκών.....	33
2.8 Παράμετροι υπολογισμού της ανάπτυξης.....	34
2.9 Στατιστική επεξεργασία	37
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
3.1 Επίδραση της σύστασης των θρεπτικών μέσων στην ανάπτυξη των καλλιέργειών και στη συσσώρευση β-καρωτενίου	39
3.2 Καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας με τη χρήση βιοαντιδραστήρων	46
3.3 Μεγιστοποίηση της παραγωγής β-καρωτενίου.....	48
3.4 Ανάπτυξη πρωτοκόλλων παραγωγής β-καρωτενίου	55
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	59

4.1 Ανασκόπηση της πειραματικής διαδικασίας.....	59
4.2 Επίδραση της σύστασης των θρεπτικών μέσων στην ανάπτυξη των καλλιιεργειών και στη συσσώρευση β-καρωτενίου	60
4.3 Καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας.....	61
4.4 Χρήση παραγόντων καταπόνησης	61
4.5 Ανάπτυξη πρωτοκόλλων παραγωγής β καρωτινίου	64
4.6 Αξιολόγηση αποτελεσμάτων.....	65
4.7 Μελλοντικές προοπτικές.....	66
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	68
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	75

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μεγιστοποίηση της παραγωγής β-καροτενίου από ελληνικά στελέχη του γένους *Dunaliella* με τη χρήση φωτοβιοαντιδραστήρων. Βασικός στόχος της διαδικασίας αυτής είναι η ανεύρεση στελεχών προερχόμενων από την Ελλάδα, τα οποία θα είναι κατάλληλα προς χρήση στην εγχώρια βιομηχανία παραγωγής καροτενοειδών και θα μπορούν να αντικαταστήσουν τα στελέχη που προέρχονται από το εξωτερικό, με τελικό αποτέλεσμα, τη μείωση του κόστους για την εν λόγω βιομηχανία.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν επτά ελληνικά στελέχη του γένους *Dunaliella*, τα οποία απομονώθηκαν από τις αλυκές του Μεσολογίου και την υπεραλμυρή λιμνοθάλασσα του Μεγάλου Εμβόλου Θεσσαλονίκης και τα οποία διατηρούνται σε μονοκαλλιέργειες στην Τράπεζα στελεχών του Τομέα Οικολογίας και Ταξινόμικής του Τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α. Τα στελέχη αυτά (D2, D5, D6, D8, D30, D31, D32, D35) ελέγχθηκαν όσον αφορά την παραγωγικότητά τους σε β-καροτένιο σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας (250mL) με τα αποδοτικότερα από αυτά να δοκιμάζονται σε μεγαλύτερη κλίμακα με τη χρήση φωτοβιοαντιδραστήρων. Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια ανάπτυξης πρωτοκόλλων μαζικής καλλιέργειας για τη βιώσιμη βιομηχανική εκμετάλλευσή τους σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας, συνεισφέροντας με αυτόν τον τρόπο στην ανάπτυξη τεχνογνωσίας στη χώρα μας.

Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου εργαστήκαμε σε τέσσερα κύρια στάδια:

1. Τη χρήση τεσσάρων διαφορετικής σύστασης θρεπτικών μέσων και τριών διαφορετικών συγκεντρώσεών τους στην τελική καλλιέργεια.
2. Εφαρμογή των αποδοτικότερων συνδυασμών στελεχών και θρεπτικών μέσων σε μεγαλύτερη κλίμακα με τη χρήση φωτοβιοαντιδραστήρων έτσι ώστε να επιβεβαιώσουμε την αποτελεσματικότητά τους.
3. Χρήση της αύξησης της αλατότητας και διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου ως μηχανισμούς αύξησης της καταπόνησης των μικροφυκών έτσι ώστε να επιτευχθεί η μεγιστοποίηση της παραγωγής β-καροτενίου.
4. Εφαρμογή δύο διαφορετικών προσεγγίσεων όσον αφορά την ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου για την όσο το δυνατόν αποδοτικότερη καλλιέργεια των μελετούμενων μικροφυκών για την παραγωγή β-καροτενίου.

Δύο στελέχη (D31 και D30) διακρίθηκαν ως προς τις τιμές παραγωγικότητας τις οποίες εμφάνισαν σε όλες τις διενεργηθείσες φάσεις των πειραμάτων, οι οποίες ήταν μάλιστα συγκρίσιμες και σε πολλές περιπτώσεις μεγαλύτερες από τις αναφερόμενες στη βιβλιογραφία. Επίσης, τα πρωτόκολλα τα οποία αναπτύχθηκαν και δοκιμάστηκαν στα δύο αυτά στελέχη έδωσαν πολύ ελπιδοφόρα αποτελέσματα για τη χρήση τους στη βιομηχανία σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας

Τέλος, η εργασία αυτή ανοίγει νέες προοπτικές για την εκμετάλλευση των στελεχών αυτών σε βιομηχανικό επίπεδο αλλά και την περαιτέρω διερεύνηση τόσο του μηχανισμού της καρωτονεογένεσης στο συγκεκριμένο γένος όσο και σε αλλαγές στα χρησιμοποιούμενα στελέχη, στους φωτοβιοαντιδραστήρες και στα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία καθώς και στην ανάπτυξη μίας υγιούς βιομηχανίας στη χώρα μας.

ABSTRACT

The purpose of this study is to maximize β -carotene production by Greek strains of the genus *Dunaliella* using photobioreactors. The main objective of this effort is to select strains from Greece suitable for use in the carotenoid industry, able to replace imported strains, and improve the productivity and the cost of production.

Seven Greek strains of the genus *Dunaliella* isolated from the Mesolongi salt ponds and the Great Emvolon salt lake of Thessaloniki, which are kept in monocultures at the Strain Bank of the Department of Taxonomy and Ecology of the Faculty of Biology of NKUA. These strains (D2, D5, D6, D8, D30, D31, D32) were tested for their β -carotene productivity in small scale cultures (250mL), the most efficient ones being tested on a larger scale using photobioreactors. Lastly, mass culture protocols were developed for their sustainable industrial exploitation in large scale crops, thus contributing to the development of know-how in our country.

During this study four main stages were executed:

1. Usage of four different formulations of nutrients and three different concentrations in the final culture.
2. Application of the most efficient combinations of strains and nutrients on a larger scale using photobioreactors to confirm their efficacy.
3. Usage of increased salinity and different concentrations of nitrogen in nutrients as mechanisms of increasing the stress of microalgae so as to maximize β -carotene production.
4. Application of two different approaches in order to develop a protocol for the most efficient cultivation of studied microalgae for the production of β -carotene.

Two strains (D31 and D30) stood out in terms of productivity during all phases as mentioned above, which were even comparable and in many cases larger than those reported in the literature. Moreover, the protocols developed and tested in these two strains gave very promising results for their use in the industry on large scale crops.

Finally, this work opens up new perspectives for the exploitation of these strains at the industrial level but also for further investigation of both the mechanism of carotenogenesis in the targeted genus and strains, photobioreactors and protocols used by the industry. These results could play a crucial role in the development of this industry in our country.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά στοιχεία για τα φύκη

Τα φύκη είναι μια ετερογενής συνάθροιση οργανισμών, οι οποίοι κυμαίνονται σε μέγεθος από τα μικροσκοπικά μονήρη κύτταρα έως τα γιγαντιαία θαλάσσια μακροφύκη, ανήκουν δε σε ποικίλες εξελικτικές σειρές. Μολονότι με τον γενικό ορισμό φύκη (algae) περιλαμβάνονται τα φωτοσυνθετικά, οξυγονο-παραγωγά υδρόβια βακτήρια ή πρωτίστα, υπάρχουν πολλές εξαιρέσεις. Επί παραδείγματι, ένας αριθμός μη φωτοσυνθετικών πρωτίστων περιλαμβάνονται μεταξύ των φυκών επειδή έχουν στενή συγγένεια με φωτοσυνθετικά είδη. Είναι επίσης βασικοί συντελεστές για τη διαμόρφωση της παγκόσμιας βιοποικιλότητας, με εκτιμώμενο αριθμό ειδών από 36.000 έως μεγαλύτερο από 10 εκατομμύρια (Lee 2008).

Επειδή η Γη είναι ένας πλανήτης με αφθονία νερού, τα φύκη παράγουν μέσω της

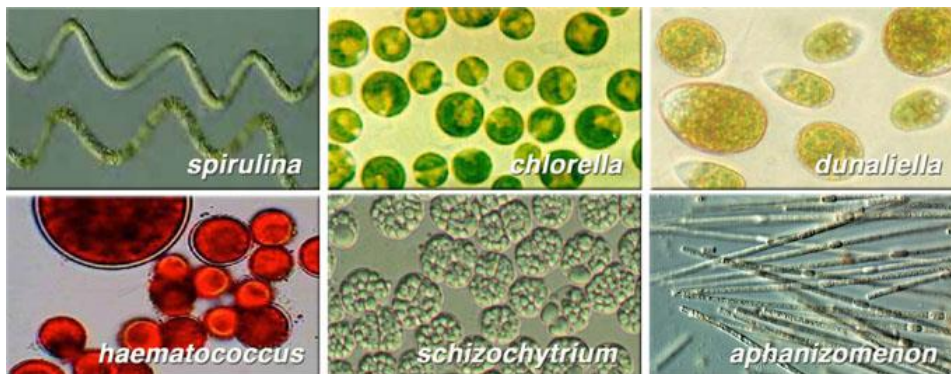


φωτοσυνθετικής τους δραστηριότητας περίπου το ήμισυ του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και επηρεάζουν δυναμικά την ανακύκλωση του άνθρακα, αζώτου, φωσφόρου, θείου και άλλων στοιχείων, διεργασίες που επηρεάζουν μια μεγάλη ποικιλία άλλων οργανισμών κατά ποικίλους τρόπους. Επίσης παράγουν τεράστιες ποσότητες οργανικού άνθρακα, αποτελώντας τη βάση των θαλάσσιων τροφικών

πλεγμάτων επηρεάζοντας άμεσα την ποιότητα και την ποσότητα της παγκόσμιας αλιείας (Lee 2008).

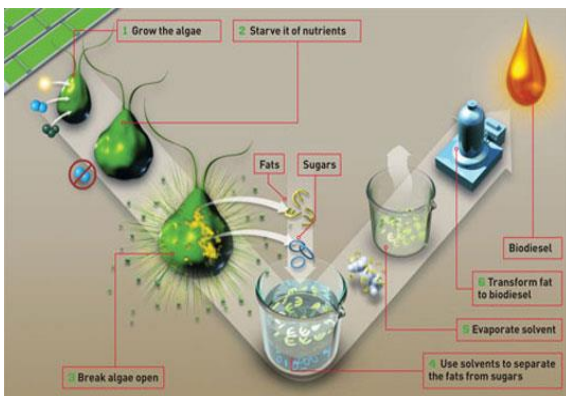
Τα φύκη διασυνδέονται επομένως όπως αναφέρθηκε με άλλους οργανισμούς στους βιογεωχημικούς κύκλους, στα τροφικά πλέγματα και στις συμβιωτικές σχέσεις. Συνεπώς, υπάρχει εύλογη ανησυχία από πλευράς των οικολόγων ότι περιβαλλοντικές αλλαγές όπως η υπερθέρμανση του πλανήτη πιθανώς θα διαταράξουν τα φυσικά πρότυπα των φυκών κατά τρόπους που θα επιφέρουν εκτεταμένες και μη-αναμενόμενες επιπτώσεις στο σύνολο των υδρόβιων ειδών. Μια εικόνα των αρνητικών συνεπειών που μπορεί να προκληθούν αν διαταραχθούν οι ισορροπίες που επικρατούν μας δίνει ο σχηματισμός επιβλαβών πληθυσμιακών εξάρσεων ('ανθίσεων') μικροφυκών, οι οποίες προκύπτουν από τον υπερεμπλουτισμό των φυσικών υδάτων με θρεπτικές ουσίες όπως φώσφορο και άζωτο. Τέτοιες 'ανθίσεις' σκιάζουν τα υδρόβια φυτά, οδηγώντας στη μείωση του αριθμού τους και ως εκ τούτου σε περιορισμό του ενδιατήματος για ψάρια και ασπόνδυλα ενώ όταν αποσυντίθενται τα κύτταρα των μικροφυκών, ένα μεγάλο μέρος του οξυγόνου στο νερό καταναλώνεται, θανατώνοντας ψάρια και οστρακόδερμα. Πράγματι, οι

‘ανθίσεις’ φυκών έχουν σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις με τους εμπειρογνώμονες να αναμένουν ότι η περιβαλλοντική αλλαγή πιθανώς θα αυξήσει τη συχνότητα εμφάνισης τέτοιων φαινομένων (Egertson et al. 2004).



1.2 Εφαρμογές μικροφυκών

Μια πληθώρα μικροφυκών, εμφανίζουν φυσιολογικές και βιοχημικές ιδιότητες που τα καθιστούν κατάλληλα προς εμπορική εκμετάλλευση αλλά και ως δείκτες παρακολούθησης του περιβάλλοντος. Μη τοξικά θαλάσσια μικροφύκη, συμπεριλαμβανομένων ειδών από τα Σταχυομαστιγωτά (Stramenopiles) *Isochrysis* (Haptophyceae), *Pavlova* (Haptophyceae), *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), και διάφορα κρυπτοφύκη και διάτομα, αλλά και άλλα είδη όπως *Tetraselmis* (Prasinophyceae) και *Chlorella* (Chlorophyceae) αντιπροσωπεύουν την πρωταρχική



πηγή τροφής για τουλάχιστον κάποια στάδια του βιολογικού κύκλου των περισσότερων καλλιεργούμενων θαλάσσιων ζώων με αναντικατάστατο ρόλο στη λειτουργία των υδατοκαλλιεργειών (Da Silva 2008). Επίσης αρκετά είδη καλλιεργούνται για την παραγωγή θρεπτικών συμπληρωμάτων ή προσθετικών τροφών όπως το β-καρωτένιο (Ben-Amotz et al., 1982), είναι πηγές φαρμακευτικών ενώσεων με π.χ. αντι-

βιοτική ή αντικαρκινική δράση καθώς και άλλων βιοδραστικών ενώσεων (Gerwick et al., 1994, Patterson et al. 1994).

Μία πολλά υποσχόμενη χρήση των μικροφυκών αποτελεί η καλλιέργειά τους για παραγωγή βιοκαυσίμων (Pittman 2011). Χλωροφύκη, διάτομα και άλλα μικροφύκη παράγουν σχετικώς μεγάλα ποσά λιπιδίων ως φωτοσυνθετικό αποταμειωτικό υλικό και σε συνδυασμό με την ικανότητα ανάπτυξης μεγάλων πληθυσμών σε βιομηχανικής κλίμακας φωτοβιοαντιδραστήρες ή καλλιεργητικές δεξαμενές οδηγούν στη

συγκομιδή ικανών ποσοτήτων λιπαρών οξέων. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μικροφύκη κατά κανόνα στερούνται λιγνίνης και άλλων μεγάλων βιοπολυμερών, που παρεμποδίζουν τη ζύμωση της βιομάζας στα ανώτερα φυτά και η καλλιέργειά τους δεν απαιτεί τη δέσμευση γεωργικών εδαφών (Chen 2007).

Τα φύκη έχουν χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές απορρύπανσης για τον σχεδιασμό συστημάτων απομάκρυνσης των θρεπτικών από τα υγρά απόβλητα πριν αυτά αποχετευθούν, συμβάλλοντας



έτσι στην αποτροπή του ευτροφισμού αυξάνοντας το οξυγόνο στο νερό κατά 100-300%, αφομοιώνοντας άζωτο, φώσφορο και πολλά μεταλλικά στοιχεία, συμβάλλοντας δε στην κατακρήμνιση των φωσφορικών (Craggs 2001).

1.3 Καλλιέργεια μικροφυκών

Η ιδέα της φωτοανότροφης καλλιέργειας προτάθηκε για πρώτη φορά στη Γερμανία στις αρχές της δεκαετίας του 1940, σύμφωνα με την οποία το CO₂ και η ενέργεια του φωτός χρησιμοποιούνται ως πηγές άνθρακα και ενέργειας, αντιστοίχως. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η *D. salina* μπορεί να επιβιώσει κάτω από ακραίες συνθήκες όπως υψηλή αλατότητα και υψηλή θερμοκρασία, ως εκ τούτου, η καλλιέργειά της είναι εύκολο να διατηρηθεί. Αυστραλοί ερευνητές πρότειναν τη μέθοδο της «εκτατικής καλλιέργειας», στην οποία χρησιμοποιούνται μεγάλες ανοικτές λίμνες χωρίς προσθήκη CO₂, με ελάχιστο έλεγχο και χαμηλό σχετικά κόστος (Borowitzka et al. 1988). Οι εγκαταστάσεις αυτές γίνονται συνήθως σε μέρη όπου η ηλιακή ακτινοβολία είναι μέγιστη, οι νεφώσεις ελάχιστες και το κλίμα είναι ζεστό (Ben-Amotz 1993). Ο κίνδυνος μόλυνσης της καλλιέργειας στις ανοικτές αυτές δεξαμενές είναι αρκετά μεγάλος και ως εκ τούτου χρησιμοποιείται υπεράλμυρο νερό ώστε να μειωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο ο κίνδυνος αυτός. Από την άλλη πλευρά, τα φύκη αναπτύσσονται αργά κάτω από τέτοιες συνθήκες, και η συγκέντρωση του β-καρωτενίου είναι αρκετά μικρή συγκρινόμενη με τιμές που επιτυγχάνονται με άλλες μεθόδους (Borowitzka MA 1999). Ωστόσο, το χαμηλό κόστος λειτουργίας τέτοιων εγκαταστάσεων έχουν οδηγήσει στην εφαρμογή τους σε αρκετές χώρες (Ισραήλ, ΗΠΑ, Αυστραλία, κ.α.).

Η ανάγκη για την επίτευξη υψηλότερης παραγωγικότητας και τη διατήρηση μονοκαλλιέργειας των μικροφυκών μειώνοντας τον κίνδυνο μολύνσεων οδήγησε στην ανάπτυξη εντατικών καλλιεργειών όπου χρησιμοποιούνται τεχνητές λίμνες, κανάλια και φωτοβιοαντιδραστήρες.

Οι φωτοβιοαντιδραστήρες εμφανίζουν σαφή πλεονεκτήματα σε σχέση με τα εκτατικά αλλά και τα ανοικτά εντατικά συστήματα:

- Αποφυγή ή μείωση της πιθανότητας μόλυνσης της καλλιέργειας, επιτρέποντας την καλλιέργεια ειδών που δεν δύνανται ως εκ τούτου να καλλιεργηθούν με τις άλλες μεθόδους.
- Επιτρέπουν τον καλύτερο έλεγχο των συνθηκών της καλλιέργειας
- Αποφυγή εξάτμισης και μείωση των απωλειών νερού
- Έχουν χαμηλότερες απώλειες διοξειδίου του άνθρακα
- Επιτρέπουν την υποστήριξη υψηλότερων κυτταρικών συγκεντρώσεων καλλιέργειας
- Εμφανίζουν μεγαλύτερη παραγωγικότητα

Στον αντίποδα, συγκεκριμένες απαιτήσεις των φωτοβιοαντιδραστήρων όπως η ανάγκη ψύξης των συστημάτων και η ανάγκη για αυστηρό έλεγχο των συνθηκών αυξάνει το κόστος κατασκευής αλλά και λειτουργίας των συστημάτων αυτών. Η αύξηση ωστόσο της παραγωγικότητας και η μείωση του κόστους στο μέλλον θα μπορούσαν δυνητικά να κάνουν αυτά τα συστήματα πολύ πιο ανταγωνιστικά τόσο μεσοπρόθεσμα όσο και μακροπρόθεσμα (Oilgae, 2010).



Έχει αναπτυχθεί μια μεγάλη ποικιλία φωτοβιοαντιδραστήρων όσον αφορά το μέγεθος και κυρίως τη μορφή (πλαστικοί σωλήνες, πλαστικές σακούλες, πάνελ και άλλα). Το σχήμα του φωτοβιοαντιδραστήρα επηρεάζει την αναλογία όγκου – επιφάνειας, η οποία καθορίζει το ποσό της φωτεινής ενέργειας που δέχεται η καλλιέργεια και το μέγεθος της επιφάνειας στην οποία κατανέ-

μεται. Υψηλότερες αναλογίες οδηγούν σε μεγαλύτερο χρόνο έκθεσης των κυττάρων στη φωτεινή ακτινοβολία και επομένως στη δυνατότητα υποστήριξης πυκνότερων καλλιεργειών και σε μεγαλύτερη παραγωγικότητα στη μονάδα του όγκου (Janssen et al. 2003). Ως εκ τούτου, η γενικότερη τάση είναι η μείωση όσο το δυνατόν περισσότερο της διαμέτρου και του πάχους των κυλινδρικών και των πάνελ βιοαντιδραστήρων αντιστοίχως.

Οι καλλιέργειες σε φωτοβιοαντιδραστήρες μπορεί να συλλέγονται σταδιακά και συνεχώς (το μεγαλύτερο μέρος των συστημάτων καλλιέργειας μεγάλων όγκων) ή η συγκομιδή της παρτίδας να γίνεται με την πλήρη συλλογή της καλλιέργειας. Στη δεύτερη περίπτωση στον φωτοβιοαντιδραστήρα προσθέτουμε θρεπτικά συστατικά και το εμβόλιο των μικροφυκών, και αφού αναπτυχθεί πλήρως η καλλιέργεια συλλέγεται ολόκληρη. Με τη χρήση ημισυνεχούς τρόπου καλλιέργειας συλλέγεται ένα συγκεκριμένο ποσό της καλλιέργειας σε καθορισμένο χρόνο, για όσο χρονικό διάστημα έχει επιλεγεί.

Μία σχετικά νεότερη προσέγγιση αποτελεί η χρήση αντιδραστήρων δύο σταδίων. Αυτή η προσέγγιση εφαρμόζεται σε περιπτώσεις όπου κάποια μορφή κιαταπόνησης (στρες) είναι απαραίτητη προκειμένου να παραχθεί κάποια ενδιαφέρουσα ένωση. Αυτό έχει γίνει για το μικροφύκος του γένους *Haematococcus* όπου το στάδιο παραγωγής διαχωρίζεται από το στάδιο άσκησης πίεσης απαραίτητης για την παραγωγή ασταξανθίνης (Boussiba, 1996). Παρομοίως, η ίδια προσέγγιση έχει εφαρμοστεί και σε περιπτώσεις παραγωγής β-καρωτινίου όπως και στην περίπτωση μας. Στο πρώτο στάδιο, τα μικροφύκη αναπτύσσονται παρουσία επαρκών θρεπτικών με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται υψηλού ρυθμού παραγωγή βιομάζας, η οποία στη συνέχεια συλλέγεται και κατά το δεύτερο στάδιο επαναιωρείται σε θρεπτικό μέσο που στερείται αζώτου ώστε να επιτευχθεί όσο το δυνατό μεγαλύτερη συσσώρευση β-καρωτινίου.

1.4 Παράμετροι καλλιέργειών

Οι πιο σημαντικές παράμετροι που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των φυκών είναι τα θρεπτικά συστατικά (τόσο η ποσότητα όσο και η σύστασή τους), το φως, το pH, η ανάμιξη, η αλατότητα και η θερμοκρασία. Οι βέλτιστες τιμές καθώς και τα ανεκτά εύρη είναι διαφορετικά για κάθε είδος και οι διάφοροι παράγοντες μπορεί να είναι αλληλοεξαρτώμενοι έτσι ώστε μια τιμή κάποιας συγκεκριμένης παραμέτρου που είναι βέλτιστη για ένα σύνολο συνθηκών δεν είναι απαραίτητα η βέλτιστη και για ένα άλλο.

- Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία διατήρησης της καλλιέργειας πρέπει ιδανικά να είναι όσο το δυνατόν πλησιέστερα προς τη θερμοκρασία συλλογής των οργανισμών. Η πλειοψηφία των καλλιεργούμενων ειδών μικροφυκών ανέχονται θερμοκρασίες μεταξύ 16 και 27°C, αν και αυτό μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, το είδος και το στέλεχος που καλλιεργείται. Θερμοκρασίες χαμηλότερες από 16°C θα επιβραδύνει την ανάπτυξη, ενώ υψηλότερες από 35°C είναι θανατηφόρες για έναν σχετικά μεγάλο αριθμό ειδών.

- Φως

Όπως και για τα φυτά, το φως είναι η πηγή ενέργειας που οδηγεί τις φωτοσυνθετικές αντιδράσεις στα φύκη και πρέπει πάντα να λαμβάνονται υπόψη η ένταση, η φασματική ποιότητα και η φωτοπερίοδος. Η ένταση του φωτός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, αλλά οι απαιτήσεις ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με τον όγκο της καλλιέργειας και την πυκνότητα των φυκών στην καλλιέργεια: σε μεγαλύτερα βάθη και αυξημένες κυτταρικές συγκεντρώσεις η ένταση του φωτός θα πρέπει να αυξηθεί για να διεισδύσει μέσα σε όλη την καλλιέργεια. Επίσης πάρα πολύ υψηλή ένταση φωτός πρέπει να αποφεύγεται καθώς μπορεί να οδηγήσει σε φωτοαναστολή και βλάβες στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Τις περισσότερες φορές χρησιμοποιούνται εντάσεις φωτός που κυμαίνονται μεταξύ 100 και 200 μmol s

photons sec⁻¹ m⁻², το οποίο αντιστοιχεί σε περίπου 5-10% του πλήρους φωτός της ημέρας (2000 μmols photons sec⁻¹ m⁻²).

Επιπλέον, όταν χρησιμοποιείται ισχυρός φυσικός ή τεχνητός φωτισμός θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα ώστε να αποφεύγεται η υπερθέρμανση. Πολλά είδη μικροφυκών δεν αναπτύσσονται καλά κάτω από συνεχή φωτισμό και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται κύκλοι φωτός-σκοταδιού (LD) (μέγιστο 16: 8 LD, συνήθως 14:10 ή 12:12).

Κάτω από ιδανικές συνθήκες θερμοκρασίας και θρεπτικών, η παραγωγικότητα των καλλιεργειών μικροφυκών εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του φωτός σε κάθε κύτταρο της καλλιέργειας. Σε αραιές καλλιέργειες η σκίαση των κυττάρων είναι ελάχιστη και όλα τα κύτταρα δέχονται την ίδια ποσότητα φωτός ανεξαρτήτως θέσεως. Ενώ όμως η διαθεσιμότητα του φωτός οδηγεί στην επίτευξη μέγιστου ρυθμού αύξησης, η καλλιέργεια θα έχει πολύ χαμηλή αποδοτικότητα καθώς ένα μεγάλο μέρος του φωτός θα διέρχεται από την καλλιέργεια χωρίς να αξιοποιείται. Στη μαζική καλλιέργεια μικροφυκών, η κυτταρική πυκνότητα πρέπει να είναι μεγάλη ώστε να επιτρέπει την αξιοποίηση του συνόλου του διαθέσιμου φωτός. Μπορεί σε αυτήν την περίπτωση η σκίαση των κυττάρων να είναι μεγαλύτερη και ως εκ τούτου η ένταση φωτός που φτάνει σε κάθε κύτταρο να είναι μικρότερη οδηγώντας σε χαμηλότερο ρυθμό αύξησης αλλά η αποδοτικότητα είναι μεγαλύτερη καθώς η αυξημένη κυτταρική πυκνότητα υπερκαλύπτει τα αποτελέσματα του μειωμένου ρυθμού αύξησης. Επομένως, η επίτευξη της μέγιστης παραγωγικότητας εξαρτάται από τον σωστό συνδυασμό κυτταρικής πυκνότητας καλλιέργειας και βάθους καλλιέργειας (I. Ben-Amotz et al. 2009).

- pH

Το εύρος pH για τα περισσότερα καλλιεργούμενα είδη φυκών είναι μεταξύ 7 και 9, με το βέλτιστο εύρος να είναι 8.2 έως 8.7, αν και υπάρχουν αρκετά είδη που χρειάζονται πιο όξινα ή βασικά περιβάλλοντα. Πλήρης κατάρρευση της καλλιέργειας λόγω της διατάραξης πολλών κυτταρικών διεργασιών μπορεί να προκύψει από μια αποτυχία να διατηρηθεί το pH σε αποδεκτές τιμές. Το τελευταίο επιτυγχάνεται με τον σωστό αερισμό της καλλιέργειας. Στην περίπτωση καλλιεργειών πολύ υψηλής πυκνότητας, η προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα επιτρέπει τη διόρθωση της αύξησης του pH, η οποία μπορεί να φθάσει τιμές έως και 9 κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυκών.

- Αλατότητα

Τα θαλάσσια μικροφύκη είναι εξαιρετικά ανεκτικά στις αλλαγές της αλατότητας. Τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται καλύτερα σε αλατότητες που είναι ελαφρώς χαμηλότερες από εκείνη του περιβάλλοντός τους.

- Ανάμιξη

Η ανάμιξη είναι αναγκαία για την πρόληψη της καθίζησης των κυττάρων, για να εξασφαλιστεί ότι όλα τα κύτταρα του πληθυσμού είναι εξ ίσου εκτεθειμένα στο φως και στα θρεπτικά συστατικά, να αποφευχθεί η θερμική στρωμάτωση (σε υπαίθριες καλλιέργειες) και να βελτιωθεί η ανταλλαγή αερίων μεταξύ μέσου καλλιέργειας και αέρος. Το τελευταίο είναι πρωταρχικής σημασίας καθώς ο αέρας περιέχει την πηγή άνθρακα για τη φωτοσύνθεση με τη μορφή διοξειδίου του άνθρακα. Για πολύ πυκνές καλλιέργειες, το CO₂ που προέρχεται από τον αέρα (που περιέχει 0,03% CO₂) και διοχετεύεται μέσω της καλλιέργειας περιορίζει την ανάπτυξη των φυκών και σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να συμπληρωθεί με την παροχή καθαρού CO₂ (π.χ. σε ποσοστό 1% του όγκου του αέρα). Επιπλέον, το CO₂ δρα ως ρυθμιστικό για τις αλλαγές του pH, ως αποτέλεσμα του ισοζυγίου HCO₃⁻/CO₂. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο αερισμός και στην απομάκρυνση του O₂, το οποίο παράγεται μέσω της φωτοσύνθεσης των κυττάρων και η αυξημένη συγκέντρωσή του οδηγεί σε μείωση της απόδοσης της φωτοσύνθεσης λόγω του ανταγωνισμού του με το CO₂. Ανάλογα με την κλίμακα του συστήματος καλλιέργειας, η ανάμιξη επιτυγχάνεται με ανάδευση καθημερινά με το χέρι (δοκιμαστικοί σωλήνες, μικρές κωνικές φιάλες), αερισμό (φωτο-βιοαντιδραστήρες, μεγάλες κωνικές φιάλες, δεξαμενές), ή με τη χρήση αντλιών τζετ (λίμνες). Είναι επίσης πολύ σημαντικό να γνωρίζουμε ότι δεν μπορούν όλα τα είδη μικροφυκών να ανεχθούν έντονη ανάμιξη και επομένως σε αυτές τις περιπτώσεις συνιστάται η χρήση ηπιότερων μηχανισμών ανάδευσης.

- Θρεπτικά

Για να επιτευχθεί αύξηση, τα φύκη απαιτούν ένα μεγάλο εύρος μεταλλικών θρεπτικών εκτός του φωτός, του νερού και του άνθρακα. Ενωμένο (δεσμευμένο) άζωτο, σίδηρος, φωσφορικά και ενίοτε πυρίτιο είναι τα βασικά θρεπτικά που απαιτούνται από τα φύκη σε ιδιαίτερες μεγάλες ποσότητες. Τα επίπεδα των θρεπτικών που είναι απαραίτητα για την αύξηση διαφέρουν ευρέως μεταξύ των φυκών ενώ και οι αναλογίες των θρεπτικών είναι εξ ίσου σημαντικές. Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται τα πιο συνήθη στοιχεία που απαιτούνται από τα φύκη:

Στοιχείο	Παραδείγματα λειτουργίας/εντοπισμού σε κύτταρα φυκών
N	Αμινοξέα, νουκλεοτίδια, χλωροφύλλη, φυκοβιλίνες
P	Φωσφολιπίδια, ATP, DNA
Cl	Φωτοσύνθεση, τριχλωροαιθυλένιο, υπερχλωροαιθυλένιο
S	Ορισμένα αμινοξέα, νιτρογενάση, λιπίδια θυλακοειδών, CoA, καρραγενάνη, DMSP
Si	Θήκες διατόμων, σκελετοί πυριτιομαστιγωτών, φολίδες φυκών τύπου- <i>Synura</i>
Na	Νιτρική αναγωγή
Ca	Αλγινικά, ανθρακικό ασβέστιο, καλμοδουλίνη
Mg	Χλωροφύλλη

Fe	Φερρεδοξίνη, κυτοχρώματα, νιτρογενάση, αναγωγή νιτρωδών και νιτρικών, καταλάση
K	Άγαρ, καρραγενάνη, οσμωτική ρύθμιση, συμπαράγοντας πολλών ενζύμων
Mo	Νιτρική αναγωγή, νιτρογενάση
Mn	Σύμπλοκο του φωτοσυστήματος II, υπεροξειδική δισμουτάση
Zn	Καρβονική ανυδράση, αλκοολική αφυδρογονάση, γλουταμική αφυδρογονάση
Cu	Πλαστοκυανίνη, κυτοχρωμική οξειδάση
Co	Βιταμίνη B12
V	Βρωμο-υπεροξειδάση, μερικές νιτρογενάσες
Br, I	Αλογονωμένες ενώσεις με αντιμικροβιακές ή αλληλοπαθητικές λειτουργίες

Όταν επιλέγεται ένα μέσον καλλιέργειας, το φυσικό περιβάλλον του εν λόγω είδους θα πρέπει να εξεταστεί προκειμένου να καθοριστούν όσο το δυνατόν καλύτερα οι περιβαλλοντικές απαιτήσεις του. Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε αν το περιβάλλον είναι ευτροφικό και ως εκ τούτου, πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, ή oligotroφικό, ως εκ τούτου πτωχό σε θρεπτικά αλλά και αν τα φύκη χρησιμοποιούν την r ή την K στρατηγική ανάπτυξης.

Οι συνταγές για τα θρεπτικά μέσα που διατίθενται σήμερα δεν είναι πάντοτε επαρκείς για πολλά είδη, και ως εκ τούτου η ακριβής επιλογή για ένα συγκεκριμένο είδος εξαρτάται από πειραματικές δοκιμές δοκιμάζοντας διάφορες προσθήκες, που συνήθως βασίζονται σε θεωρητικές εκτιμήσεις. Η βελτιστοποίηση της σύνθεσης των θρεπτικών μέσων αποτέλεσαν αντικείμενο έρευνας για αρκετές δεκαετίες, με αποτέλεσμα να έχουν αναπτυχθεί πολλές συνταγές και διαφορετικά θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται σε διαφορετικά εργαστήρια. Τα μέσα αυτά δύνανται να παρασκευαστούν με την ανάμιξη πολύ πυκνών διαλυμάτων, τα οποία διατηρούνται ως απόθεμα (stock) και τα οποία δεν αναμιγνύονται πριν από τη χρήση, για να αποφευχθεί η καθίζηση και η πιθανότητα μόλυνσης. Ασθενής θέρμανση σε συνδυασμό με μαγνητική ανάδευση των διαλυμάτων χρησιμοποιούνται για να εξασφαλιστεί η πλήρης διάλυση.

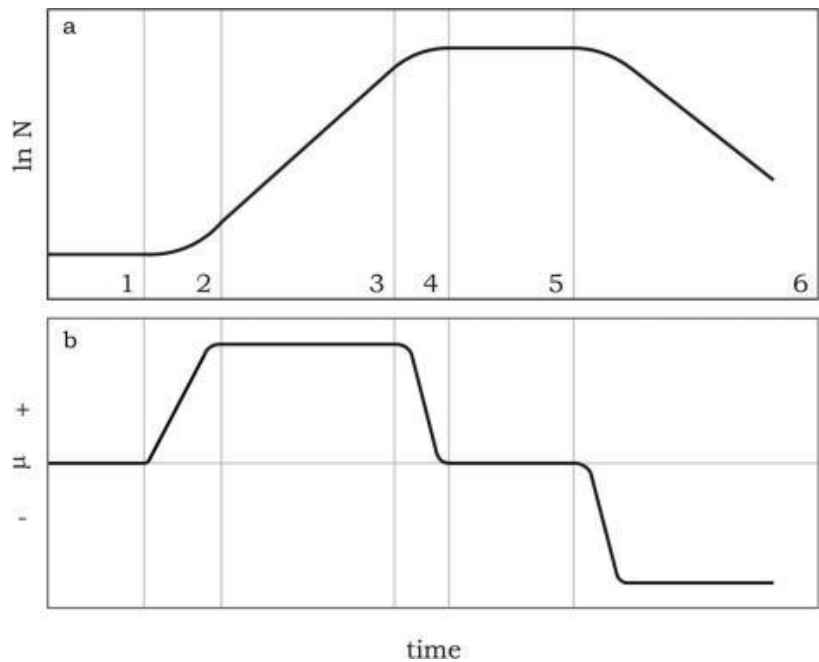
1.5 Στάδια κλειστών καλλιιεργειών

Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά μιας καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της κατάστασής της είναι ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων της. Η ανάπτυξη της καλλιέργειας μπορεί να εκτιμηθεί με μία πληθώρα διαφορετικών προσεγγίσεων υπολογίζοντας αλλαγές στη βιομάζα της, οι οποίες μπορούν να εκφράζονται ως μεταβολή αριθμού κυττάρων, χλωροφύλλης, βιο-όγκου, οπτικής πυκνότητας και ξηρού βάρους.

Όταν μια κλειστή καλλιέργεια αναπτύσσεται κάτω από κατάλληλες συνθήκες, η καμπύλη αύξησής της ακολουθεί ένα πρότυπο όπου διακρίνονται έξι φάσεις (I. Ben-Amotz et al. 2009). Κάθε φάση χαρακτηρίζεται από έναν συγκεκριμένο ρυθμό

αύξησης των κυττάρων και αντικατοπτρίζει μία συγκεκριμένη μεταβολική κατάσταση των κυττάρων αυτών.

- I. Λανθάνουσα φάση: Τον εμβολιασμό της καλλιέργειας δεν ακολουθεί απαραίτητα άμεση ανάπτυξη καθώς ενδέχεται τα περισσότερα κύτταρα να είναι ζωντανά αλλά να μην είναι έτοιμα να διαιρεθούν άμεσα. Αυτό οφείλεται στην κατάσταση της μητρικής καλλιέργειας αλλά και στις διαφορετικές συνθήκες που επικρατούν στη νέα καλλιέργεια. Το διάστημα που μεσολαβεί από τον εμβολιασμό της καλλιέργειας μέχρι τον μεταβολικό εγκλιματισμό και την αρχή της αύξησης των κυττάρων, ονομάζεται φάση επώασης.
- II. Εκθετική φάση: Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής οι συνθήκες που επικρατούν στην καλλιέργεια (ένταση φωτός, διαθέσιμα θρεπτικά, επίπεδα CO₂ και O₂, απουσία τοξικών μεταβολικών παραπροϊόντων) επιτρέπουν την επίτευξη του μέγιστου ρυθμού αύξησης. Ωστόσο, η εκθετική φάση διαρκεί ένα σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα ειδικά στους φωτοαυτότροφους οργανισμούς όπως τα υπό μελέτη μικροφύκη καθώς η αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας οδηγεί στη μείωση του διαθέσιμου φωτός.
- III. Μετεκθετική φάση: Μετά την εκθετική φάση, η αύξηση της πυκνότητας της καλλιέργειας οδηγεί στον μη επαρκή φωτισμό όλων των κυττάρων καθιστώντας την έλλειψη επαρκούς φωτός περιοριστικό παράγοντα για την απρόσκοπτη ανάπτυξη της καλλιέργειας. Στη φάση αυτή επομένως επιτυγχάνεται ένας σταθερός ρυθμός αύξησης με την καλλιέργεια να αυξάνεται γραμμικά. Η σκίαση που προκαλούν τα κύτταρα αλλά και η έλλειψη της δυνατότητας αποθήκευσης της διαθέσιμης πηγής ενέργειας, δηλαδή του φωτός, είναι οι παράγοντες που διαφοροποιούν έντονα τους φωτοβιοαντιδραστήρες από τους απλούς βιοαντιδραστήρες.
- IV. Φάση επιβράδυνσης: Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, η κυτταρική πυκνότητα συνεχίζει να αυξάνεται αλλά ο ρυθμός αύξησης μειώνεται καθώς πέραν της σκίασης πλέον αρχίζουν να μειώνονται σε ανεπαρκή επίπεδα και τα διαθέσιμα θρεπτικά στοιχεία όπως το άζωτο και ο φώσφορος.
- V. Στατική φάση: Όταν ο ρυθμός αύξησης μηδενιστεί η καλλιέργεια εισέρχεται στη στατική φάση. Σε αυτήν τη φάση η κυτταρική πυκνότητα μένει σταθερή στη μέγιστη τιμή της. Η σημασία της φάσης αυτής είναι πολύ μεγάλη καθώς κατά τη διάρκειά της παράγονται σε μεγάλο βαθμό τα μεταβολικά προϊόντα των οργανισμών που μας ενδιαφέρουν.
- VI. Φάση θανάτου: Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης η έλλειψη διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών και η πιθανή παραγωγή τοξικών μεταβολικών παραπροϊόντων οδηγεί στη μείωση της κυτταρικής πυκνότητας.



asturgalicia.net

1.6 Ταξινόμηση του γένους *Dunaliella*

Domain: Eukaryota

Kingdom: Plantae

Phylum: Chlorophyta

Class: Chlorophyceae

Order: Chlamydomonadales

Family: Dunaliellaceae

Genus: *Dunaliella*

Τα Chlorophyceae αποτελούν μία από τις τέσσερις εξελικτικές σειρές (lineages) των χλωροφυκών (green-algae). Ως τμήμα των Chlorophyta ή του UTC κλάδου, τα Chlorophyceae έχουν στενότερη συγγένεια με τα Ulvophyceae και τα Trebouxiophyceae παρά με τα στρεπτόφυτα και τα φυτά της ξηράς. Επιδεικνύουν ένα εύρος ποικιλομορφίας παρόμοιο με εκείνο των άλλων κλάσεων των χλωροφυκών.

Επιπλέον, ο ζυγωτικός βιολογικός κύκλος που απαντάται μεταξύ των εγγενώς αναπαραγομένων Chlorophyceae παρατηρείται και σε άλλα χλωροφύκη, ωστόσο τα Chlorophyceae διαθέτουν έναν μοναδικό συνδυασμό μιτωτικών και κυτοκινητικών γνωρισμάτων και μαστιγιοφόρου αναπαραγωγικής κυτταρικής δομής.

Στο παρελθόν, τα Chlorophyceae ήταν ομαδοποιημένα σε τάξεις πρωτίστως βάσει μορφολογικών γνωρισμάτων των επιμέρους οργανισμών. Τα μαστιγωτά, επί παραδείγματι, είχαν ενταχθεί στα Volvocales, τα κοκκοειδή μονήρη κύτταρα και οι ακίνητες κοινοβιακές αποικίες στα Chlorococcales, τα πλείστα των μη-διακλαδιζόμενων νημάτων στα Ulotrichales, ενώ τα πλείστα των διακλαδιζόμενων νημάτων στα Chaetophorales (Bold & Wynne 1985). Προσφάτως, η εφαρμογή μοριακών φυλογενετικών μεθόδων απεκάλυψε ότι στα χλωροφύκη έχει λάβει χώρα εκτεταμένη παράλληλη εξέλιξη σωματικών τύπων (τύπων θαλλού). Συνεπώς, δεν είναι πλέον δυνατόν να ομαδοποιούνται τα χλωροφύκη σε τάξεις μόνον βάσει μορφολογίας, δεδομένου ότι τα συστήματα ταξινόμησης πρέπει να αντικατοπτρίζουν τη φυλογένεση όσο το δυνατόν πλησιέστερα. Σε πολύ μεγάλο βαθμό, το φαινομενικά λογικό και εξυπηρετικό σύστημα μέσω του οποίου τα χλωροφύκη είχαν ενταχθεί σε ομάδες έχει καταρρεύσει και πλέον αντικαθίσταται με ένα άλλο πιο ακριβές από εξελικτική άποψη, ωστόσο περίπλοκο, ταξινομικό ικρίωμα.

1.7 Το γένος *Dunaliella*

Τα κύτταρα είναι μονήρη και φέρουν δύο μαστίγια. Υπάρχει ένας μοναδικός χλωροπλάστης με μία οφθαλμική κηλίδα, ενώ απουσιάζουν τα σφυγμόδη χυμοτόπια, εκτός εάν το φύκος αναπτύσσεται σε θρεπτικά μέσα χαμηλής αλατότητας. Η αγενής αναπαραγωγή γίνεται με διαμήκη διαίρεση, ενώ η εγγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται με ισογαμέτες. Επίσης παράγονται κύστεις με λεία τοιχώματα. Μολονότι οι αντιπρόσωποι του γένους αυτού συχνά περιγράφονται ως γυμνοί ή άνευ-τοιχώματος, το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο απεκάλυψε ότι υπάρχει μια ινιδώδης εξωκυτταρική μήτρα στην κυτταρική επιφάνεια. Μοριακές φυλογενετικές μελέτες υποδηλώνουν ότι το γένος *Dunaliella* είναι πιθανώς μονοφυλετικό γένος, ότι οι προγονικές μορφές έφεραν τοίχωμα, και ότι



η απουσία ουσιαστικού κυτταρικού τοιχώματος αντιπροσωπεύει εξελικτική απώλεια (Nakayama et al. 1996a).

Απαντάται σε εξόχως αλμυρά ύδατα, συμπεριλαμβανομένης της λίμνης Great Salt Lake των Ηνωμένων Πολιτειών, εμπορικών αλατούχων δεξαμενών (αλυκών), και σε κοινότητες αλατούχων εδαφικών εκτάσεων (Kirkwood & Henley 2006). Σε αντίθεση με άλλα πράσινα φύκη, τα κύτταρα *Dunaliella* δεν έχουν συμπαγές κυτταρικό τοίχωμα, με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να αντιδρούν ταχύτατα σε μεταβολές της

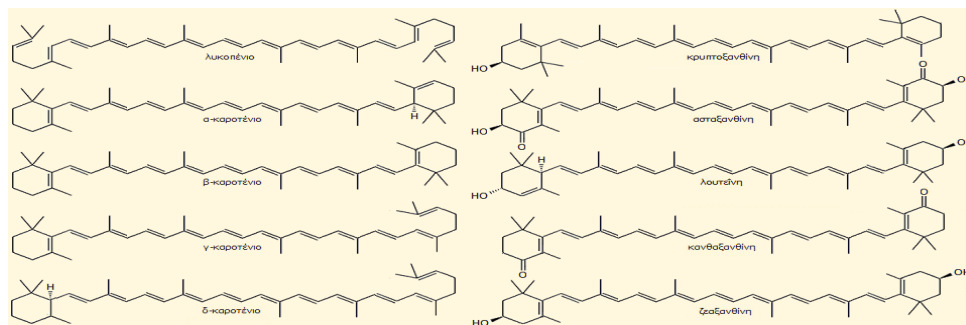
ωσμωτικής πίεσης, μεταβάλλοντας τον κυτταρικό τους όγκο. Τα κύτταρα προσαρμόζονται στις υψηλές αλατότητες συσσωρεύοντας τη φωτοσυνθετικώς παραχθείσα γλυκερόλη για να ισορροπήσει στις υψηλές εξωτερικές ωσμωτικές πιέσεις και με αυτόν το μηχανισμό μπορούν να ανεχθούν αλατότητα μεγαλύτερη των 300ppt. Έχει παρατηρηθεί ότι η ενδοκυττάρια συγκέντρωση γλυκερόλης υπερβαίνει το 50% και επαρκεί ως ωσμωρυθμιστικός παράγοντας για την εξισορρόπηση της εξωκυττάριας ωσμωτικής συγκέντρωσης (Avron & Ben-Amotz 1992). Ως εκ τούτου τα κύτταρα του είδους *Dunaliella salina* εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερον όγκο και πιο σφαιρικό σχήμα (σε σχέση με το ωοειδές δακρυοειδές τους σχήμα) σε υψηλές τιμές αλατότητας.

Ενώ ένα υγιές κύτταρο είναι σε κατάσταση φυσιολογικής ισορροπίας, υπό συνθήκες καταπόνησης (stress) η ισορροπία αυτή διαταράσσεται με χαρακτηριστικό υπαίτιο την εκτεταμένη δημιουργία ελεύθερων ριζών, οι οποίες μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή και αποδιάταξη βιολογικών μορίων απαραίτητων για την επιβίωση του κυττάρου. Το μονοκύτταρο μικροφύκος *Dunaliella salina* συσσωρεύει μεγάλες ποσότητες β-καρωτίνιου, ως απόκριση στη φυσιολογική καταπόνηση (stress), με σκοπό την προστασία της φυσιολογικής λειτουργίας τους και τη συνέχιση της ανάπτυξής τους (Boussiba & Vonshak, 1991). Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι επειδή η χρωστική αυτή έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες οι οποίες μειώνουν δραστικά τις πλεονάζουσες ελεύθερες ρίζες δεσμεύοντάς τις και αποκαθιστώντας έτσι τη φυσιολογική ισορροπία των κυττάρων (Moller et al. 2000). Οι διαταραχές αυτές ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα πολλών και ποικίλων παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των χημικών ουσιών που παρεμποδίζουν ή επιβραδύνουν την κυτταρική ανάπτυξη, μειωμένης διαθεσιμότητας αζώτου, αυξημένης αλατότητας, υψηλής ακτινοβολίας, αυξημένης θερμοκρασίας καθώς και συνδυασμούς των παραπάνω (Pisal & Lele, 2005).

1.8 Καρωτενοειδή

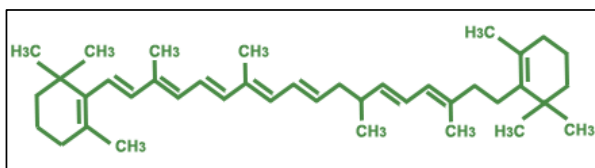
Τα καρωτενοειδή είναι μια ομάδα τετρατερπενίων (C_{40}) αποτελούμενων από 8 μονάδες ισοπρενίου (C_5) που ενώνονται για να σχηματίσουν ένα σκελετού υδρογονανθράκων φυτοενίου ($C_{40}H_{56}$). Το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρωτενοειδών είναι μια μακρά αλυσίδα πολυενίου, η οποία μπορεί να τερματιστεί από κυκλικές ομάδες (δακτύλιοι) ή συμπληρώνεται με στοιχεία οξυγόνου. Άλλα στοιχεία εκτός από άνθρακα, υδρογόνο και οξυγόνο δεν είναι άμεσα συνδεδεμένα με τον σκελετό άνθρακα σε φυσικά καρωτενοειδή. Τα υδρογονανθρακικά καρωτενοειδή είναι γνωστά ως καρωτίνες (π.χ. α-καρωτίνη, β-καρωτίνη και λυκοπένιο), ενώ τα οξυγονωμένα παράγωγα ονομάζονται ξανθοφύλλες. Στην τελευταία περίπτωση, το οξυγόνο μπορεί να είναι παρόν ως ομάδες OH (π.χ. λουτεΐνη), ως οξο- ομάδες (π.χ. κανθαξανθίνη) ή ως συνδυασμός των δύο (π.χ. ασταξανθίνη).

Η ομάδα αυτή των φυσικών λιποδιαλυτών χρωστικών εμφανίζεται σε φυτά, φύκη και φωτοσυνθετικά βακτήρια (Stahl και Sies, 2005). Τα καρωτενοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φωτοσύνθεση, περιλαμβάνουν περισσότερες από 600 χημικές ενώσεις και κάποια από τα μόρια αυτά αποτελούν προδρόμους της βιταμίνης Α (προβιταμίνη Α). Τα καρωτενοειδή είναι κρίσιμης σημασίας για την όραση και έχουν συσχετιστεί με τη μείωση των κινδύνων για αρκετές εκφυλιστικές ασθένειες (Ausich 1997, Sandmann 2001).



Πηγή : kpe-kastor.kas.sch.gr

Στη φύση απαντώνται περισσότερα από 400 καρωτενοειδή, με το β-καρωτένιο να κατέχει εξέχουσα θέση μεταξύ τους. Το β-καρωτένιο χρησιμοποιείται στη βιομηχανία



τροφίμων ως πρόσθετη χρωστική, αντι-οξειδωτικός παράγοντας αλλά και ως προβιταμίνη-Α. Έχει αναφερθεί επίσης ότι έχει σημαντικές

αντικαρκινικές, αντιγηραντικές και ανοσορυθμιστικές ιδιότητες (Rock 2002, Russell 2002). Το β-καρωτένιο συντίθεται βιομηχανικά ή/και ανακτάται μέσω εκχύλισης από φυσικές πηγές. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι το φυσικό, αλλά πιο ακριβό, ισομερές του β-καρωτενίου είναι ανώτερο από την all-trans συνθετική μορφή (Becker 2004, Radmer 1996, Vilchez 1997, Cysewski and Todd Lorenz 2004).

Τα καρότα και τα φύκη (*Dunaliella salina*, *D. bardawil*) είναι από τις «κλασικές» φυσικές πηγές β-καρωτενίου, ανάμεσα σε λαχανικά, φρούτα και άλλες πηγές οι οποίες αποτελούν αντικείμενο βιομηχανικής εκμετάλλευσης (Heidlas et al. 1998). Το



ua.all.biz

είδος *Dunaliella salina* συσσωρεύει μεγάλες ποσότητες (άνω του 10% του ξηρού βάρους) β-καρωτενίου, όταν αναπτύσσεται υπό δυσμενείς συνθήκες όπως υψηλή αλατότητα, υψηλή θερμοκρασία, υψηλή ακτινοβολία και/ή περιορισμένα θρεπτικά συστατικά (Raja et al. 2007). Το β – καρωτένιο που συντίθεται από τη *Dunaliella* έχει πολλά πλεονεκτήματα όπως αυξημένη απορρόφηση, υψηλή δραστηριότητα και πολύ καλή ισομερική σύνθεση καθώς αποτελεί ένα μίγμα cis και trans-

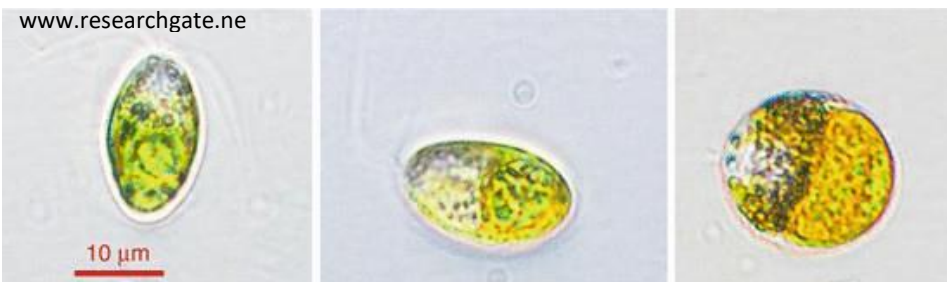
ισομερών με μια τυπική σύνθεση: 9- cis (41%), all-trans (42%), 15- cis (10 %) και άλλα ισομερή (6 %) (Borowitzka and Borowitzka 1989, Metting 1996).

Σε σύγκριση με άλλες πηγές β-καρωτενίου, το φύκος *Dunaliella* παρουσιάζει επίσης τα εξής πλεονεκτήματα:

- 1) Η διάρρηξη των κυττάρων είναι πολύ εύκολη λόγω της απουσίας ανθεκτικού κυτταρικού τοιχώματος.
- 2) Η συνεχής καλλιέργεια σε εργαστηριακές συνθήκες είναι εύκολη και οι ρυθμοί αύξησης αρκετά υψηλοί.
- 3) Η αντοχή σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες είναι υψηλότερη από ό,τι σε άλλα φύκη (Aizawa & Miyachi 1993)

Ωστόσο η παραγωγή μικροφυκών συνδέεται και με προβλήματα όπως είναι ο μικρός σχετικά έλεγχος των συνθηκών στην περίπτωση ανοιχτών συστημάτων (Borowitzka 1992), υψηλή κατανάλωση CO₂ με χαμηλή απόδοση (Chaumont 1993), προβλήματα μολύνσεων και οι υψηλές απαιτήσεις σε ποσότητες αλατιού, νερού, γης και ηλιακής ακτινοβολίας (Ogbonna and Tanaka 2000).

1.9 Βιοσύνθεση β-καρωτενίου στο γένος *Dunaliella*



Η καρωτενογένεση στο γένος *Dunaliella* μελετάται έντονα λόγω της μεγάλης σημασίας που έχει η σε βάθος γνώση του μηχανισμού αυτού για την κατανόηση και τη διερεύνηση της συσσώρευσης β-καρωτενίου. Η απόκτηση καλύτερης γνώσης του μηχανισμού αυτού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής καρωτενοειδών από τα συγκεκριμένα μικροφύκη αποφέροντας εκτός από διεύρυνση της επιστημονικής γνώσης και άμεσα οικονομικά οφέλη. Ωστόσο, η βιοσύνθεση των καρωτενοειδών δεν έχει μελετηθεί επαρκώς στο γένος *Dunaliella* με αποτέλεσμα το μοντέλο που προτείνεται να βασίζεται σε όσα επιστημονικά στοιχεία είναι διαθέσιμα για το γένος αυτό αλλά και σε δεδομένα που έχουν προκύψει από άλλα μικροφύκη (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Haematococcus pluvialis*) και από ανώτερα φυτά (Yan et al. 2005, Zhu et al. 2005, Merchant et al. 2007).

Οι δομικοί λίθοι της παραγωγής όλων των καρωτενοειδών είναι ο πυροφωσφορικός ισοπεντενυλεστέρας (IPP) και ο πυροφωσφορικός διμεθυλαλλυλεστέρας (DMAPP), τα οποία μέσω μιας σειράς αντιδράσεων που δεν είναι σαφώς γνωστές για το γένος

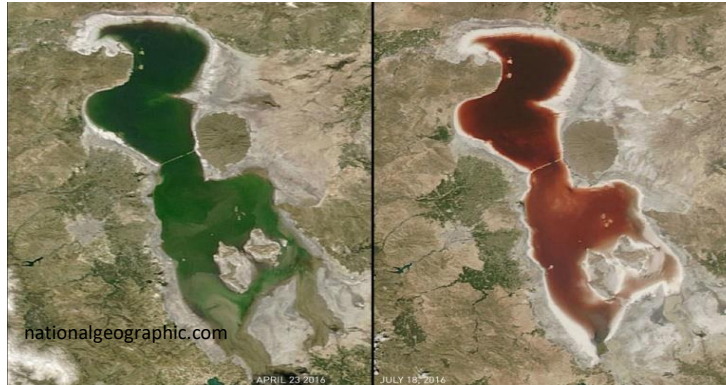
Dunaliella οδηγούν στη σύνθεση πυροφωσφορικού γερανυλγλυανυλίου GGPP. Στη συνέχεια υπάρχουν τρία στάδια τα οποία καταλήγουν στην παραγωγή β-καρωτενίου:

- 1) Στους χλωροπλάστες, η συνθετάση του φυτοενίου (PSY) καταλύει το πρώτο στάδιο με τη σύνθεση φυτοενίου, το οποίο αποτελεί την πρόδρομη ένωση όλων των καρωτενοειδών, μέσω της συμπύκνωσης δύο μορίων GGPP.
- 2) Στη συνέχεια μέσω της διαδοχικής εισαγωγής συζευγμένων διπλών δεσμών αρχίζει η δημιουργία έγχρωμων χρωστικών. Δύο δομικά και λειτουργικά παρόμοια ένζυμα, η αποκορεσάση του φυτοενίου (PDS) και η αποκορεσάση του ζ-καρωτενίου (ZDS) μετατρέπουν το φυτοένιο σε λυκοπένιο.
- 3) Τέλος με τη δράση του ενζύμου της β-κυκλάσης του λυκοπενίου (LCYB), το λυκοπένιο υφίσταται κυκλοποίηση στα άκρα του γραμμικού του μορίου και σχηματίζεται το β-καρωτένιο.

Το β-καρωτένιο δεν αποτελεί το τέλος της βιοσύνθεσης των καρωτενοειδών καθώς με τη διαδοχική δράση των ενζύμων υδροξυλάση του β-καρωτενίου (CHYB) και εποξιδάση της ζεαξανθίνης (ZEP) παράγονται ζεαξανθίνη και βιολαξανθίνη αντιστοίχως.

Οι έρευνες που έχουν διενεργηθεί στο είδος *Haematococcus pluvialis* δείχνουν ότι η καταπόνηση των κυττάρων του είδους αυτού οδήγησε στην αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας των γονιδίων που παράγουν τα προαναφερθέντα ένζυμα (Grunewald et al. 2000, Steinbrenner and Linden 2001, 2003). Η έκφραση των γονιδίων αυτών θεωρείται ότι σηματοδοτείται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οι οποίες παράγονται στο κύτταρο υπό συνθήκες καταπόνησης όπως είναι η αύξηση της αλατότητας, της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και της θερμοκρασίας. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με ευρήματα ερευνών στο είδος *Dunaliella salina* καθώς έχει παρατηρηθεί αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα PDS και PSY ως αντίδραση σε αύξηση της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (Pick 1998). Ευρήματα παλαιότερων ακόμη ερευνών σε διαφορετικά στελέχη του είδους *Dunaliella bardawil* εντόπισαν διαφορές τόσο στον ρυθμό παραγωγής φυτοενίου όσο και στον ρυθμό μετατροπής του σε λυκοπένιο και εν συνεχεία σε β-καρωτένιο. Ένα επίσης αρκετά ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι η αυξημένη παραγωγή β-καρωτενίου σε κάποια στελέχη συνοδευόταν από αντίστοιχη αύξηση της παραγωγής χλωροφύλλης οδηγώντας τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι οι αλλαγές συμβαίνουν σε μεταβολικά στάδια τα οποία προηγούνται της σύνθεσης του GGPP (Burrascano et al. 1988, Shaish et al. 1991).

1.10 Επίδραση της αλατότητας στην ανάπτυξη της *Dunaliella salina*



Σε αντίθεση με άλλα πράσινα φύκη, τα κύτταρα του γένους *Dunaliella* δεν έχουν συμπαγές κυτταρικό τοίχωμα, με αποτέλεσμα να αντιδρούν ταχύτατα σε μεταβολές της ωσμωτικής πίεσης, μεταβάλλοντας τον κυτταρικό τους όγκο. Όταν το μέσον καλλιέργειας που χρησιμοποιείται είναι υπέρτονο (δηλαδή η εξωκυττάρια συγκέντρωση της διαλυόμενης ουσίας είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την ενδοκυττάρια), υπάρχει μια εκροή μορίων νερού από το κύτταρο προς το εξωτερικό περιβάλλον. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συρρίκνωση του κυττάρου και τη ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος (πλασμόλυση). Δεδομένου ότι τα κύτταρα *Dunaliella* δεν έχουν συμπαγές κυτταρικό τοίχωμα, παρουσιάζουν σημαντικές ικανότητες προσαρμογής σε υψηλή αλατότητα και έχει παρατηρηθεί, ότι σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, η κυτταρική αύξηση παρουσιάζει μια καθυστέρηση ορισμένων ημερών σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες (Pisal & Lele 2005).

Η αυξημένη αλατότητα του μέσου καλλιέργειας έχει άμεση επίδραση και στον μηχανισμό της φωτοσύνθεσης. Όταν το νερό αρχίζει να εξαντλείται στο κύτταρο εξ αιτίας της υψηλής αλατότητας, η φωτοσύνθεση επηρεάζεται αρνητικά, με την περιεκτικότητα του κυττάρου σε χλωροφύλλη να μειώνεται καθώς αυξάνεται η αλατότητα. Το β-καρωτένιο είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης, τον οποίο το κύτταρο συνθέτει σε συνθήκες καταπόνησης ως προστατευτικό κυτταρικό μηχανισμό, με αποτέλεσμα η αύξηση της αλατότητας να ενισχύει την παραγωγή του.

Ωστόσο, τα κύτταρα προσαρμόζονται στις υψηλές αλατότητες εξ αιτίας της παρουσίας της γλυκερόλης, καθώς η ουσία αυτή έχει τη δυνατότητα να εξισορροπεί την εξωκυττάρια ωσμωτική καταπόνηση. Έχει παρατηρηθεί ότι η ενδοκυττάρια συγκέντρωση γλυκερόλης υπερβαίνει το 50% και επαρκεί ως ωσμωρυθμιστικός παράγοντας για την εξισορρόπηση της εξωκυττάριας ωσμωτικής συγκέντρωσης (Avron & Ben-Amotz 1992).

Ως εκ τούτου τα κύτταρα *Dunaliella salina* εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερο όγκο και πιο σφαιρικό σχήμα σε αυξημένες τιμές αλατότητας (σε σχέση με το ωοειδές δακτυοειδές τους σχήμα) σε σύγκριση με τις φυσιολογικές αλατότητες. Έχει παρατηρηθεί ότι οι βέλτιστες αλατότητες για την αύξηση της βιομάζας *Dunaliella* κυμαίνονται γύρω στο 100-120 ‰ ενώ η μέγιστη παραγωγή καρωτενοειδών κυμαίνεται γύρω στο 160-180 ‰ (Pisal & Lele 2005, Tran et al. 2014).

1.11 Επίδραση της συγκέντρωσης αζώτου στην ανάπτυξη του γένους *Dunaliella*

Το άζωτο αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στοιχεία όσον αφορά την ανάπτυξη των μικροφυκών. Ο λόγος της σπουδαιότητάς του έγκειται στον ρόλο που έχει στον σχηματισμό πολύ σημαντικών για την επιβίωση των κυττάρων συστατικών όπως είναι τα αμινοξέα, τα νουκλεοτίδια, η χλωροφύλλη και οι φυκοβιλίνες. Επομένως γίνεται εύκολα κατανοητό ότι σε περιπτώσεις μείωσης της συγκέντρωσης ή και ολικής έλλειψης του αζώτου στο θρεπτικό μέσον αυξάνεται η καταπόνηση που δέχεται το κύτταρο και μειώνεται ο ρυθμός αύξησής του (Merzlyak et al. 2007, Packo et al. 2012). Η καταπόνηση τέλος που δέχεται το κύτταρο οδηγεί όπως και στην περίπτωση της αυξημένης αλατότητας σε αυξημένη παραγωγή β-καρωτενίου (Lamers et al., 2010).

Η ανεπάρκεια αζώτου (N) επηρεάζει πολλές πτυχές της φυσιολογίας των μικροφυκών. Ο μειούμενος ρυθμός ανάπτυξης και οι μειώσεις της κυτταρικής πρωτεΐνης και των χλωροφύλων κατά τη διάρκεια της στέρησης αζώτου δείχνουν περιορισμένη ικανότητα διατήρησης των φωτοσυνθετικών λειτουργιών (Thompson 1996, Young and Beardall 2003). Υπό αυτές τις συνθήκες, μερικά φύκη συσσωρεύουν τεράστιες ποσότητες άνθρακα υπό μορφή καρωτινοειδών και λιπιδίων (Thompson 1996). Είναι γενικώς αποδεκτό ότι τα φύκη εγκλιματίζονται στις περιβαλλοντικές συνθήκες με αλλοίωση του λιπιδικού μεταβολισμού και της σύνθεσής τους, η οποία θεωρείται ότι αναπροσαρμόζει τα συστήματα μεμβρανών για να αντιμετωπίσουν τόσο τις σταδιακές όσο και τις οξείες καταπονήσεις (Thompson 1996). Με τη στέρηση θρεπτικών ουσιών, ιδιαίτερα τη στέρηση αζώτου, ορισμένα είδη φυκών συνθέτουν ενεργώς τις τριακυλογλυκερόλες (TAG) ως έναν αποδοτικό τρόπο εκμετάλλευσης του άνθρακα (Thompson 1996, Guschina και Harwood 2006). Οι τριακυλογλυκερόλες των περισσότερων ελαιούχων μικροβίων αποτελούνται κυρίως από κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (Cohen και Khozin Goldberg 2005).

Η συσσώρευση των καρωτενοειδών υπό συνθήκες καταπόνησης (στρες) αντιπροσωπεύει έναν μηχανισμό που προστατεύει τα κύτταρα από φθορά από το φως (Demmig-Adams et al., 1996, Niyogi 1999, Ledford and Niyogi 2005). Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά σχετικά με τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς της απόκρισης στην ανεπάρκεια αζώτου (Lamers et al., 2008).

Χρησιμοποιώντας τους αναστολείς ακτινομυκίνη D, χλωραμφενικόλη και κυκλοεξιμίδιο, διαπιστώθηκε ότι η μεταγραφική και η μεταφραστική δραστηριότητα είναι απαραίτητες για την υπερπαραγωγή καρωτενίου που προκαλείται από την επίδραση ισχυρού φωτός (Lers et al., 1990), αλλά παραμένει να επιβεβαιωθεί εάν αυτό ισχύει και για την ανεπάρκεια αζώτου. Επιπροσθέτως, η επίδραση της διαθεσιμότητας αζώτου στην έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται άμεσα στη βιοσυνθετική οδό των καρωτενοειδών απαιτεί περαιτέρω εξέταση. Μέχρι στιγμής, έχει αναφερθεί για το είδος *D. salina* ότι η στέρηση αζώτου είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη έκφραση της 1-δεοξυξυλουλόζης-5-φωσφορικής συνθάσης, ενώ η έκφραση μεταγραφημάτων συνθάσης φυτοενίου παρέμεινε σταθερή (Sanchez-Estudillo et al., 2006). Η έλλειψη ενός συνδυασμού θρεπτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των νιτρικών, αναφέρθηκε ότι ενεργοποιεί την έκφραση αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των καρωτενοειδών όπως είναι η συνθάση του φυτοενίου και η κυκλάση του λυκοπενίου (Coesel et al., 2008, Ramos et al. 2009).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Στελέχη μικροφυκών

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν επτά στελέχη (Dup 2, 5, 6, 8, 30, 31, 32) προερχόμενα από την τράπεζα καλλιεργειών μικροφυκών ATHU-AL, η οποία στεγάζεται στον θάλαμο καλλιεργειών του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα επτά αυτά στελέχη έχουν απομονωθεί από δείγματα νερού των αλυκών του Μεσολογγίου και την υπεραλμυρή λιμνοθάλασσα του Μεγάλου Εμβόλου Αγγελοχωρίου Θεσσαλονίκης που προσήχθησαν στο εργαστήριο σε πλαστικές φιάλες μετά από αδρή διήθηση για απομάκρυνση του ζωοπλαγκτού.

Τυπικά η ταξινόμηση του γένους *Dunaliella* βασίζεται τόσο σε μορφολογικά όσο και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του οργανισμού. Εκτός από τη γενική μορφολογία, η ανοχή σε υψηλή αλατότητα και η παραγωγή καρωτενοειδών (ιδιαίτερα β-καρωτενίου) είναι τα δύο πιο κοινώς μελετημένα φυσιολογικά χαρακτηριστικά της *Dunaliella* (Polle et al. 2008). Το γένος *Dunaliella* είναι μοναδικό στην ύπαρξη μιας λεπτής μεμβράνης αντί ενός άκαμπτου κυτταρικού τοιχώματος και είναι σε θέση να αλλάξουν το σχήμα των κυττάρων και τον όγκο τους σε απόκριση μεταβολών της αλατότητας και άλλων συνθηκών ανάπτυξης. Λόγω αυτής της μεγάλης πλαστικότητας της κυτταρικής μορφολογίας, η παραδοσιακή πρακτική της διαφοροποίησης των ειδών που βασίζεται αποκλειστικά σε μικροσκοπικές παρατηρήσεις καθίσταται δύσκολη και χρονοβόρα. Η μοριακή ταξινόμηση εμφανίστηκε ως ταχύτερο και ισχυρότερο εργαλείο, καθώς είναι συνεπής και ανεξάρτητη από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και τα στάδια ανάπτυξης (Bornet et al., 2004). Από το 1999, ο μοριακός χαρακτηρισμός χρησιμοποιείται ευρέως στην ταξινόμηση του γένους *Dunaliella* (Hajezi et al., 2010). Προς το παρόν χρησιμοποιούνται ευρέως το 18S rRNA γονίδιο (Olmos et al., 2000), η περιοχή ITS (Gomez et al., 2004) και το γονίδιο της μεγάλης υπομονάδας ριβουλόζης-διφωσφορικής καρβοξυλάσης (rbcL) ως αποτελεσματικά μοριακά εργαλεία σε μελέτες χαρακτηρισμού ειδών του γένους *Dunaliella*.

Η αναγνώριση των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία διεξήχθη χρησιμοποιώντας τόσο κλασικές ταξινομικές μεθόδους (μικροσκοπία φωτός και επιφθορισμού και μορφολογικές κλείδες) (Lerche 1937, Butcher 1959, Massyuk 1973, Oliveira et al. 1980, Ettl 1983, Borowitzka & Borowitzka 1988, Preisig 1992, Leonardi & Caceres 1997, Gonzalez et al., 1999 & 2001, Cifuentes et al., 2001, Oren 2005, Borowitzka & Siva 2007) καθώς επίσης και ανάλυση DNA επιλεγμένων γενετικών δεικτών (ITS1, ITS2, 5,8S, 18S, rbcL) (Δολαψάκης διδακτορική διατριβή, Chantzistroutsiou unpublished data).

2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την εξυπηρέτηση του στόχου της μεγιστοποίησης της παραγωγής β-καρωτενίου εξετάστηκε ένα σύνολο παραγόντων όπως είναι η σύνθεση των θρεπτικών μέσων, η αλατότητα και η συγκέντρωση του θρεπτικού μέσου σε άζωτο. Οι υπόλοιποι παράγοντες των καλλιεργειών όπως είναι η θερμοκρασία, η ένταση του φωτός και η φωτοπερίοδος επιλέχθηκαν έτσι ώστε να προσομοιάζουν τις συνθήκες οι οποίες επικρατούν στη χώρα μας κατά τη διάρκεια των εαρινών και των φθινοπωρινών μηνών (θερμοκρασία $24 \pm 1^\circ\text{C}$, φωτοπερίοδο 12:12 h L:D, $60 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$) και οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις εποχές όπου στηρίζεται κυρίως η συγκομιδή των καλλιεργειών, σε αντίθεση με τους θερινούς και χειμερινούς μήνες κατά τη διάρκεια των οποίων οι ακραίες συνθήκες που επικρατούν μειώνουν σημαντικά την απόδοση.

Όπως αναφέρθηκε και στο αντίστοιχο τμήμα της εισαγωγής της παρούσας εργασίας, η σύνθεση και η ποσότητα των θρεπτικών μέσων επηρεάζει τόσο την αύξηση της βιομάζας όσο και τη συσσώρευση β-καρωτενίου των μελετούμενων μικροφυκών. Στόχος της πρώτης πειραματικής διάταξης που αναπτύχθηκε είναι να εξαχθούν κάποια αρχικά συμπεράσματα για την παραγωγή β-καρωτενίου από τα επιλεγμένα στελέχη σε συνδυασμό με την ανεύρεση της αποδοτικότερης σύστασης και ποσότητας θρεπτικού μέσου. Οι αποδοτικότεροι συνδυασμοί στελεχών και θρεπτικών μέσων που προέκυψαν, αξιοποιήθηκαν για καλλιέργεια σε μεγαλύτερη κλίμακα με τη χρήση φωτοβιοαντιδραστήρων 25 και 70 L αντίστοιχως για να αξιολογηθεί η δυνατότητά τους για παραγωγή καρωτενοειδών σε ασυνεχή καλλιέργεια κατά τη στατική φάση (γήρανση των κυττάρων με συνεπακόλουθη παραγωγή καρωτενοειδών).

Δεδομένου ότι η παραγωγή καρωτενοειδών κατά τη στατική φάση προϋποθέτει αρκετές μέρες καλλιέργειας με αρνητική επίπτωση στην παραγωγικότητα, κρίθηκε απαραίτητο να δοκιμαστούν μέθοδοι αύξησης της καταπόνησης των συγκεκριμένων μικροφυκών έτσι ώστε να επιτευχθεί η μεγιστοποίηση της παραγωγικότητας β-καρωτενίου. Όπως αναφέρθηκε και στο αντίστοιχο τμήμα της εισαγωγής, η συγκέντρωση του β-καρωτενίου στο κύτταρο εξαρτάται από μία σειρά παραγόντων όπως είναι η αλατότητα, η συγκέντρωση αζώτου στο θρεπτικό μέσο και η θερμοκρασία.

Για να γίνει η επιλογή των παραγόντων που θα χρησιμοποιούνταν ώστε να προκληθεί καταπόνηση στις καλλιέργειες έπρεπε να ληφθεί υπ'όψιν η δυνατότητα χρήσης αντίστοιχων τεχνικών σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας. Επομένως παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η ένταση της ακτινοβολίας, ενώ προκαλούν αύξηση της συσσώρευσης β-καρωτενίου, δεν χρησιμοποιήθηκαν λόγω είτε αδυναμίας ελέγχου σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας (ένταση ακτινοβολίας) είτε απαγορευτικού κόστους (θερμοκρασία). Ως εκ τούτου επιλέχθηκαν η αλατότητα και η συγκέντρωση αζώτου στο θρεπτικό μέσον καθώς αποτελούν μεταβλητές που μεταβάλλονται εύκολα και χωρίς ιδιαίτερο κόστος ακόμη και σε βιομηχανική κλίμακα.

Τέλος, στα πλαίσια της διερεύνησης της μεγιστοποίησης της παραγωγικότητας σε β-καρωτένιο δοκιμάστηκαν δύο επιπλέον καλλιεργητικές προσεγγίσεις: ημισυνεχής καλλιέργεια εκκινώντας από στατική φάση πλούσια σε καροτενοειδή και καλλιέργεια δύο σταδίων (αραίωση νεαρής καλλιέργειας με θρεπτικό μέσο χωρίς άζωτο).

2.3 Επίδραση της σύστασης των θρεπτικών μέσων στην ανάπτυξη των καλλιεργειών και στη συσσώρευση β-καρωτενίου

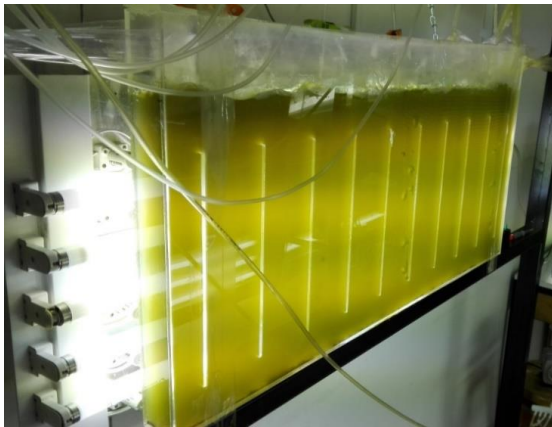
Για να μελετηθεί η επίδραση των θρεπτικών επιλέχθηκαν τρία καλλιεργητικά μέσα από τη βιβλιογραφία καθώς και ένα εμπορικό λίπασμα που χρησιμοποιείται και στις θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες φυτοπλαγκτού. Τα στελέχη D2, D5, D6, D8, D30, D31, D32 καλλιεργήθηκαν σε κυλινδρικά πλαστικά δοχεία των 500 mL με 250 mL συνθετικό θαλασσινό νερό αλατότητας 120 ‰ εμπλουτισμένο με τυπική, διπλάσια ή τριπλάσια δοσολογία (1x, 2x, 3x) τεσσάρων διαφορετικών θρεπτικών μέσων που επιλέχθηκαν. Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο θερμοκρασίας $22 \pm 1^\circ\text{C}$, φωτοπερίοδο 12:12 h L:D, $30 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$, με αερισμό για ανάδευση της καλλιέργειας και ανανέωση των αερίων (απομάκρυνση οξυγόνου και προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα). Μετά την πάροδο περίπου 15-20 ημερών οι καλλιέργειες ανέπτυξαν καρωτενοειδή σε αφθονία (χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα) και ελήφθησαν δείγματα για τη μέτρηση της κυτταρικής πυκνότητας και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των καρωτενοειδών.

2.4 Καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας με τη χρήση φωτοβιοαντιδραστήρων

Κατά τη διάρκεια αυτών των καλλιεργητικών προσπαθειών καταμετρήθηκε η ημερήσια αύξηση και υπολογίστηκε ο ειδικός ρυθμός αύξησης, η παραγωγικότητα και η απόδοση σε β-καρωτένιο. Ξεκινώντας με μικρές καλλιέργειες όγκου 200-250mL και χρησιμοποιώντας τεχνικές κλιμάκωσης (scale-up), διαμορφώθηκαν καλλιέργειες 500mL, 1L, 3L και τέλος 5L. Οι τελικές αυτές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλιο για τη δημιουργία καλλιεργειών μεγάλης κλίμακας στους βιοαντιδραστήρες. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικής δυναμικότητας φωτοβιοαντιδραστήρες τύπου flat-panel:

I. Φωτοβιοαντιδραστήρας 25 L:

Ο συγκεκριμένος φωτοβιοαντιδραστήρας ανήκει στην οικογένεια των flat-panel (ήτοι λεπτών παραλληλεπίπεδων φωτοβιοαντιδραστήρων όπου κατά κανόνα η ανάδευση γίνεται με αερισμό) και έχει χωρητικότητα 25 λίτρων (ορθογώνιο παραλληλεπίπεδο με διαστάσεις $0,5 \times 1 \times 0,05 \text{ m}$). Ο ενεργός όγκος καλλιέργειας είναι 22 L. Το υλικό κατασκευής είναι πολύ-μεθ-ακρυλικό (PMMA, plexiglas) το οποίο προσφέρει αντοχή, μικρό βάρος, ευκολία κατασκευής και κυρίως διαύγεια δεδομένου ότι εξασφαλίζει διαπερατότητα στο φως πάνω από 90 %. Το εσωτερικό του χωρίζεται από εγκάρσια τοιχώματα σε έντεκα επικοινωνούντα τμήματα όπου τοποθετούνται σωλήνες αερισμού ανά ένα με την επίτευξη εσωτερικής ανάδευσης με ανάβλυση (air-lift) για πιο ομοιογενή ανάδευση και μείωση στο ήμισυ της έντασης για την αποφυγή προβλημάτων διάρρηξης των κυττάρων από την έντονη πίεση που τους ασκείται με



τη δημιουργία των φυσαλίδων. Η διάταξη αυτή εξυπηρετεί τον καλύτερο αερισμό της καλλιέργειας, συνθήκη άκρως σημαντική ειδικά σε καλλιέργειες μεγάλου όγκου όπου η ανάδευση γίνεται δυσκολότερη.

II. Φωτοβιοαντιδραστήρας 70 L



Ο φωτοβιοαντιδραστήρας αυτός είναι επίσης λεπτός παραλληλεπίπεδος με το ίδιο σχήμα με τον προηγούμενο αλλά με άλλες αναλογίες (1,7 x 1,2 x 0,05m). Το υλικό κατασκευής του είναι καθαρό πολυαιθυλένιο τροφίμων και έχει διαμορφωθεί με θερμοκόλληση υψηλής ποιότητας με βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Το εσωτερικό του χωρίζεται όπως και στον προηγούμενο από εγκάρσια τοιχώματα τα οποία αερίζονται ανά ένα ώστε να διευκολύνουν τον σωστό αερισμό με εσωτερική ανάβλυση (air-lift). Ο ενεργός όγκος για καλλιέργεια ανέρχεται στα 50 L που φωτίζονται απ' ευθείας μέσω ενός πλαισίου με λαμπτήρες φθορισμού 1,2 m 36W/865.

2.5 Μεγιστοποίηση της παραγωγής β-καρωτενίου

Επίδραση της αλατότητας στην ανάπτυξη των καλλιεργειών και στη συσσώρευση β-καρωτενίου

Για την επίδραση της καταπόνησης με αύξηση της αλατότητας στη συσσώρευση β-καρωτενίου, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων επελέγησαν τα στελέχη D30, D31, D32 και το θρεπτικό μέσο Nutrileaf plus που εμφάνιζαν την καλύτερη παραγωγικότητα σε β-καρωτένιο. Καλλιέργειες των 250 mL όπως στην προηγούμενη σειρά πειραμάτων αναπτύχθηκαν σε ικανοποιητικά επίπεδα (μετά την πάροδο 4-5 ημερών) και η αλατότητα αυξήθηκε απότομα από 120 ‰ σε 140 ‰, 160 ‰ και 180 ‰ αντιστοίχως. Η μέτρηση της κυτταρικής πυκνότητας και των επιπέδων του β-καρωτενίου έγινε όπως και προηγουμένως.

Επίδραση της συγκέντρωσης αζώτου του θρεπτικού μέσου στην ανάπτυξη των καλλιέργειών και στη συσσώρευση β-καρωτενίου

Για την επίδραση της έλλειψης αζώτου επελέγησαν τα στελέχη D30, D31, και D32 όπως και προηγουμένως. Ως θρεπτικό μέσον χρησιμοποιήθηκε το Conway (Walne 1970) επειδή επέτρεπε τη διαχείριση της σύνθεσής του στο εργαστήριο σε αντιδιαστολή με το λίπασμα του εμπορίου, το οποίο τροποποιήθηκε ώστε να έχει συγκεντρώσεις αζώτου 0 %, 25 %, 50 % και 75 % σε σχέση με το αρχικό. Τριπλές καλλιέργειες των 250 mL εμβολιάστηκαν όπως προηγουμένως, σε αλατότητα 120 ‰ και με την εμφάνιση της χαρακτηριστικής πορτοκαλί απόχρωσης της καλλιέργειας ελήφθησαν δείγματα για τη μέτρηση της κυτταρικής πυκνότητας και του β-καρωτενίου.

2.6 Ανάπτυξη πρωτοκόλλων παραγωγής β-καρωτενίου

Για τις ανάγκες αυτών των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες των στελεχών D30 και D31 (τα οποία εμφάνισαν τα καλύτερα αποτελέσματα στα προηγούμενα πειράματα) όγκου 1,5 L, οι οποίες αναπτύχθηκαν σε κυλινδρικά πλαστικά δοχεία όγκου 2 L με σταθερή ανάδευση, θαλασσινό νερό αλατότητας 120 ‰, θρεπτικό μέσο Nutrileaf plus, σταθερή θερμοκρασία $24 \pm 1^\circ\text{C}$ και ένταση φωτός $60 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 12:12 h L:D.

1) Πρωτόκολλο ημερήσιων σταθερών αραιώσεων

Κατά την ανάπτυξη του πρωτοκόλλου αυτού οι καλλιέργειες αφέθηκαν έως ότου αποκτήσουν το χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα λόγω της αυξημένης συσσώρευσης καρωτινοειδών. Οι καλλιέργειες αραιώθηκαν με νέο θρεπτικό μέσο κατά 10 %, 15 % και 20 % του όγκου της καλλιέργειας ημερησίως, και ελήφθησαν δείγματα για τον υπολογισμό της κυτταρικής πυκνότητας. Όταν επετεύχθη δυναμική ισορροπία (steady-state) στις καλλιέργειες έγινε προσδιορισμός του β-καρωτενίου και του ξηρού βάρους της καλλιέργειας.

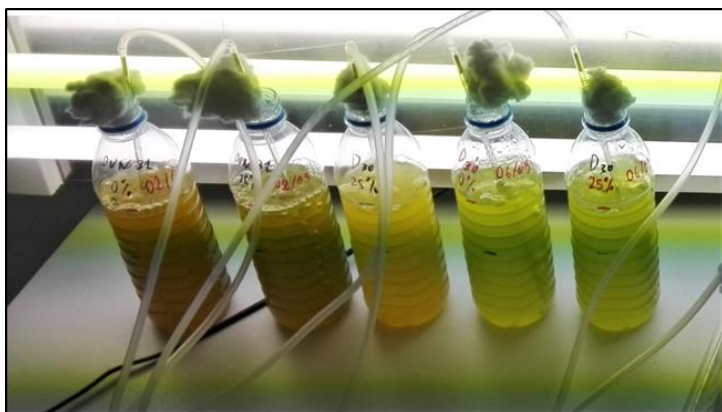
Το πρωτόκολλο αυτό βασίζεται στην περιοδική (π.χ. ημερήσια) αναπλήρωση συγκεκριμένου όγκου που αφαιρείται για συγκομιδή και αναπληρώνεται με ισόποσο όγκο νέου θρεπτικού μέσου (ή επανατοποθέτηση μετά από απομάκρυνση των κυττάρων). Εάν τα κύτταρα που απομακρύνονται είναι περισσότερα από αυτά που μπορεί η καλλιέργεια να αναπληρώσει τότε παρατηρείται μεγάλη μείωση της κυτταρικής πυκνότητας, η οποία οδηγεί στην αύξηση των διαθέσιμων θρεπτικών ουσιών, αερίων και φωτός ανά κύτταρο και επομένως στη μείωση της καταπόνησής του. Η μείωση της καταπόνησης οδηγεί στη μείωση της συσσώρευσης β-καρωτενίου, επομένως και στη μείωση της απόδοσης της καλλιέργειας.



2. Πρωτόκολλο ανάπτυξης δύο φάσεων

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο βασίζεται σε μια ελαφρώς διαφορετική προσέγγιση. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε μία μητρική καλλιέργεια όπου επικρατούσαν οι ιδανικές συνθήκες για την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη κυτταρική ανάπτυξη (περίσσεια θρεπτικών υλικών, χαμηλότερη αλατότητα) από την οποία τακτικά αφαιρούνταν ένα ποσοστό το οποίο είχε αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσον με μικρή ή μηδενική συγκέντρωση αζώτου. Με αυτόν τον τρόπο έγινε δυνατή η εκμετάλλευση της μεγάλης κυτταρικής πυκνότητας που επιτυγχάνεται στο πρώτο στάδιο σε συνδιασμό με την αυξημένη συσσώρευση β-καρωτενίου που επιτυγχάνεται στο δεύτερο.

Οι μητρικές καλλιέργειες (D30,D31) αναπτύχθηκαν για 7 ημέρες με περίσσεια θρεπτικού μέσου Nutrileaf plus σε αλατότητα 100 ‰ ώστε να επιτευχθεί υψηλή κυτταρική πυκνότητα. Κάθε δύο ημέρες απομακρύνονταν 200 mL καλλιέργειας και η καλλιέργεια αυτή χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο για τη δημιουργία δύο νέων καλλιεργειών όγκου 250 mL (100mL εμβόλιο και 150 mL νερό) 0 ‰ και 25 ‰ συγκέντρωσης αζώτου με τροποποιημένο θρεπτικό μέσο Walne. Οι καλλιέργειες αυτές αφέθηκαν να αναπτυχθούν μέχρις ότου αποκτήσουν το χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα (συνήθως 5-7 ημέρες) και στη συνέχεια γινόνταν λήψη δειγμάτων για μέτρηση κυτταρικής πυκνότητας και συγκέντρωσης β-καρωτενίου.



2.7 Καλλιέργειες μικροφυκών

Τα στελέχη *Dunaliella salina* αναπτύχθηκαν σε σταθερές συνθήκες με τυπικό πρωτόκολλο καλλιέργειας και διαφοροποίηση συνθηκών ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας.

Διατήρηση των καλλιεργειών

Οι καλλιέργειες των στελεχών που χρησιμοποιήσαμε καθώς και ο φωτοβιοαντιδραστήρας διατηρούνται σε κλειστό θάλαμο, με επικρατούσες τις εξής συνθήκες:

- Θερμοκρασία: 22 ± 1 °C
- Σχετική υγρασία αέρος: ~35 %
- Ένταση φωτισμού: $30 \mu\text{mols photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ μέσω συστήματος λαμπτήρων φθορισμού 120 cm L36W/865 της Osram σε φυσική φωτοπερίοδο 12:12 h L:D
- Σε περίπτωση αερισμού χρησιμοποιείται φυσητήρας (blower) ενυδρείων σε κατάλληλη ένταση



Θρεπτικά μέσα

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά θρεπτικά μέσα καλλιέργειας σε συνθήκες που αναδείχθηκαν ως κατάλληλες στην πειραματική διερεύνηση.

Τα θρεπτικά μέσα ήταν:

- Conway (Walne 1970)
Αποτελεί ένα δημοφιλές λόγω αποτελεσματικότητας θρεπτικό μέσον για εντατική παραγωγή θαλάσσιου φυτοπλαγκτού σε υδατοκαλλιέργειες.
- Nutrileaf (εμπορικό λίπασμα NPK με ιχνοστοιχεία)
Το Nutrileaf είναι εμπορικό λίπασμα με σχετική δημοφιλία στις υδατοκαλλιέργειες λόγω του χαμηλότερου κόστους από αναλυτικής καθαρότητας χημικά και της συμπτυκνωμένης υφής του.
- Nutrileaf plus (προσθήκη διττανθρακικής σόδας στο παραπάνω μέσο)
Το Nutrileaf plus έχει ίδια σύνθεση με το προηγούμενο μέσον αλλά έχει ενισχυθεί με δικαρβονική σόδα για παροχή CO₂ σε υψηλές τιμές pH
- MD4 (Tran et al., 2013)
Είναι δημοφιλές θρεπτικό μέσον για το φύκος *Dunaliella salina*

Η αναλυτική σύνθεση των μέσων παρατίθεται στο τμήμα του παραρτήματος (Πίνακες 1-3)



2.8 Παράμετροι υπολογισμού της ανάπτυξης

1. Κυτταρική πυκνότητα

Ο υπολογισμός της κυτταρικής πυκνότητας έγινε με τη βοήθεια μικροσκοπίου Zeiss με φακούς (x10, x20) Planapo της Zeiss και αιμοκυτταρομέτρου τύπου Neubauer Improved. Το αιμοκυτταρόμετρο αυτό αποτελείται από δύο θαλάμους κάθε ένας από τους οποίους χωρίζεται σε εννέα τετράγωνα βάθους 1 mm. Ο συνολικός όγκος και των 18 τετραγώνων είναι 0,0018 mL και επομένως δείγμα με κυτταρική πυκνότητα ίση με 10⁴ κύτταρα/mL θα εμφανίζει 1 κύτταρο ανά τετράγωνο.

Η πορεία μέτρησης της κυτταρικής πυκνότητας αποτελείται από τα εξής βήματα:

- Λήψη δείγματος όγκου 0,5 mL
- Προσθήκη διαλύματος Lugol όγκου 0,5 mL για τη θανάτωση των κυττάρων και τον ευκολότερο εντοπισμό τους σε σχέση με μη βιολογικά υλικά δεδομένου ότι το ιώδιο που περιέχεται στο διάλυμα μετατρέπει το χρώμα του αμύλου
- Φόρτωση του δείγματος στο αιμοκυτταρόμετρο

- Αναμονή 3-5 λεπτά ώστε να καθιζάνουν πλήρως τα κύτταρα
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο

Επομένως ο υπολογισμός της κυτταρικής πυκνότητας γίνεται με τον εξής τύπο:

$$C = 10^4 \times d \times Q \text{ cells mL}^{-1}$$

Όπου:

C = κυτταρική πυκνότητα δείγματος

Q= μέσος αριθμός κυττάρων ανά τετράγωνο

d= βαθμός αραίωσης (στην περίπτωση που αναφέρθηκε παραπάνω ισούται με 2' και σε περίπτωση μεγάλης πυκνότητας για την ευκολότερη καταμέτρηση διενεργείται κατάλληλη αραίωση, όπως και σε κάθε περίπτωση που η πυκνότητα υπερβαίνει τα 300 κύτταρα στο κεντρικό τετράγωνο).

2. Προσδιορισμός καρωτενοειδών

Για την εκτίμηση της παραγωγής β-καρωτενίου χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι, η φασματοφωτομετρία και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Η εκχύλιση των χρωστικών στα χρησιμοποιηθέντα δείγματα πραγματοποιήθηκε με το εξής πρωτόκολλο:

- Διήθηση καλλιέργειας όγκου 2mL με τη βοήθεια φίλτρων GF/C υπό κενό.
- Εκχύλιση των δειγμάτων σε ακετόνη 80 %.
- Διατήρηση των δειγμάτων στο ψυγείο για μία ημέρα.
- Διάλυση του φίλτρου με τη βοήθεια υάλινης ράβδου.
- Πολύ καλή ανάδευση των δειγμάτων με τη χρήση μηχανήματος Vortex.
- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 1500 στροφές για 3 έως 5 λεπτά έως ότου τα κομμάτια του φίλτρου καθιζάνουν και τα δείγματα γίνουν διαυγή.
- Φωτομέτρηση των εκχυλισμάτων στα 443, 492 και 505 nm με τη χρήση φωτομέτρου ορατού φάσματος.

Η μεθοδολογία φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού βασίστηκε στις μελέτες των Ben-Amotz & Avron (1983), Çelekli & Dönmez (2006) και Nagata et al. (2007). Οι εξισώσεις ωστόσο οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω εργασίες δεν έδιναν συγκρίσιμα αποτελέσματα με αυτά που προέρχονταν με τη χρήση της μεθόδου της HPLC. Ως εκ τούτου κρίθηκε απαραίτητη η ανάπτυξη μιας νέας διορθωμένης εξίσωσης, η οποία να επιτρέπει τον ακριβέστερο υπολογισμό του β-καρωτενίου. Η εξίσωση αυτή προέκυψε από την επίλυση συστήματος τριών αγνώστων με εισαγωγή λύσεων από πρότυπες καμπύλες γνωστών συγκεντρώσεων αναλυτικής καθαρότητας β-καρωτενίου (Sigma) στα χρησιμοποιούμενα μήκη κύματος απορρόφησης.

Η εξίσωση που προέκυψε από την παραπάνω διαδικασία και αναφέρεται σε συγκέντρωση β-καρωτενίου σε mg/L καλλιέργειας, είναι η ακόλουθη:

$$\text{β-καρωτένιο (mg/L)} = 0,0017(A_{443}) + 0,0054(A_{492}) + 0,0031(A_{505})$$

Η ποιοτική ανάλυση των καρωτενοειδών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική υγρής χρωματογραφίας (HPLC-DAD). Πριν από την ανάλυση τα εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω με την προσθήκη στην αρχή ενός σταδίου εκχύλισης με τη βοήθεια υπερήχων (λουτρό υπερήχων Clifton SW Series Industrial Ultrasonic Baths) για 5 λεπτά στα 200 W και στους 25 ° C. Η κατεργασία αυτή ενισχύει τη λύση των κυττάρων και βελτιώνει σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης των καρωτενοειδών. Η χρωματογραφική ανάλυση (HPLC) πραγματοποιήθηκε με συσκευή HPLC Shimadzu HP 1100 Series (HPLC) εξοπλισμένη με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων και αυτόματο εγχυτήρα Agilent 1200 Series. Τα καρωτενοειδή αναλύθηκαν με μια αναλυτική στήλη YMC C30 (Germany) (5 m, 250 x 4.6 mm I.D.). Οι διαλύτες αποτελούνταν από μεθανόλη, t-βουτυλο-μεθυλαιθέρα και 1% υδατικό διάλυμα φωσφορικού οξέος και ο ρυθμός ροής ήταν 1 mL / min. Η γραμμική κλίση προσαρμόστηκε σύμφωνα με την Fuji Chemical Industry Co., LTD, (www.fujihealthscience.com/assaymethod_astareal-110.pdf). Η ανίχνευση του β-καρωτενίου επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας ένα σύστημα συστοιχίας διόδων σε μήκος κύματος 458 nm. Το β-καρωτένιο αναγνωρίστηκε με σύγκριση με εξωτερικό πρότυπο και ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση εσωτερικού προτύπου και πρότυπης καμπύλης με βάση την απορρόφηση προκαθορισμένων συγκεντρώσεων β-καρωτενίου στα 458 και 447 nm. Για την ταυτοποίηση των κορυφών των διαφόρων καρωτενοειδών που εμφανίζονται ελήφθησαν φάσματα απορρόφησης και οι τιμές των $\lambda_{\max}$ συγκρίθηκαν με τη βιβλιογραφία (Jing et al., 2012; Choi et al., 2007; Kleingreis et al., 2010; Hu et al., 2008; Fu et al., 2013).



2.9 Στατιστική επεξεργασία

Για να διευκολυνθεί η επιλογή των αποδοτικότερων στελεχών και θρεπτικών μέσων, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο σημείο της διπλωματικής αυτής εργασίας, αλλά και γενικότερα για την καλύτερη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήσαμε εργαλεία στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων μας τόσο για τα πειράματα επίδρασης διαφορετικών θρεπτικών μέσων όσο και διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήσαμε για την πραγματοποίηση αυτής της επεξεργασίας είναι το TIBCO Statistica. Το πρόγραμμα αυτό προσφέρει μια ποικιλία στατιστικών επεξεργασιών αλλά και γραφικής απεικόνισης των αποτελεσμάτων. Οι στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήσαμε είναι η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) καθώς και το Tukey's HSD test.

Ανάλυση Διακύμανσης (ANOVA) ονομάζεται μια στατιστική μέθοδος πειραματικού σχεδιασμού, κατά την οποία πραγματοποιείται έλεγχος υποθέσεων με στόχο να ανιχνευθούν εάν υπάρχουν διαφορές στις μέσες τιμές περισσότερων των δύο πληθυσμών. Για να δοθεί απάντηση στο συγκεκριμένο ερώτημα, κατασκευάζουμε έναν έλεγχο υποθέσεων με μηδενική υπόθεση H_0 ότι όλα τα δείγματα προέρχονται από πληθυσμούς με την ίδια μέση τιμή έναντι μιας εναλλακτικής υπόθεσης ότι τουλάχιστον δύο μέσες τιμές είναι διαφορετικές (Montgomery 2001).

Οι προϋποθέσεις που θα χρειαστεί να ισχύουν για να μπορέσουμε να εφαρμόσουμε την ανάλυση διακύμανσης, είναι τρεις :

- η κατανομή των τιμών να είναι κανονική
- τα δείγματα να είναι αντιπροσωπευτικά και οι παρατηρήσεις ανεξάρτητες μεταξύ τους
- οι πληθυσμοί από τους οποίους επελέγησαν τα δείγματα να έχουν την ίδια διακύμανση

Το Tukey HSD test, είναι μια διαδικασία πολλαπλής σύγκρισης και στατιστικής επεξεργασίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ακατέργαστα δεδομένα ή σε συνδυασμό με τη μέθοδο ANOVA για να υπάρξουν μέσες τιμές που διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Η μέθοδος αυτή έλαβε το όνομά της από τον μαθηματικό John Tukey που την ανέπτυξε και συγκρίνει όλα τα πιθανά ζεύγη μέσων τιμών και βασίζεται σε μια εξειδικευμένη κλίμακα κατανομής. Συγκρίνει τις μέσες τιμές κάθε επεξεργασίας με τις μέσες τιμές κάθε άλλης επεξεργασίας και προσδιορίζει οποιαδήποτε διαφορά είναι μεγαλύτερη από το αναμενόμενο τυπικό σφάλμα (Tukey 1949).

Εκτός από τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων μας με τις μεθόδους που αναλύσαμε παραπάνω, χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα Statistica (TIBCO-StatSoft Ohio) και για τη γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων με τη μορφή γραφημάτων ώστε να έχουμε μια πιο παραστατική εικόνα και να κάνουμε πιο εύκολη τη σύγκριση μεταξύ τους. Τόσο τα αποτελέσματα των στατιστικών επεξεργασιών όσο και τα γραφήματα παρουσιάζονται στο κεφάλαιο των Αποτελεσμάτων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση της σύστασης των θρεπτικών μέσων στην ανάπτυξη των καλλιιεργειών και στη συσσώρευση β-καρωτενίου

Στους ακόλουθους πίνακες παρατίθενται τα αποτελέσματα του πειράματος επίδρασης των θρεπτικών μέσων διαφορετικής σύστασης στα μελετηθέντα στελέχη. Τα στοιχεία που παρατίθενται περιλαμβάνουν την αλατότητα της καλλιέργειας, την κυτταρική πυκνότητα του εμβολίου και της τελικής καλλιέργειας, τις ημέρες καλλιέργειας, τον ρυθμό αύξησης και την ποσότητα του β-καρωτενίου (ποσοστό επί του ξηρού βάρους, ποσότητα σε mg ανά ml καλλιέργειας, ποσότητα σε pg ανά κύτταρο).

Η σημαντικότερη και πιο χρήσιμη παράμετρος είναι η παραγωγικότητα που εμφανίζουν οι καλλιέργειες όσον αφορά το β-καρωτένιο. Ως εκ τούτου στους παρακάτω πίνακες οι τιμές της συγκεκριμένης παραμέτρου έχουν επισημανθεί με διαφορετικά χρώματα ανάλογα με τη βαρύτητά τους: 0.1-0.2 mg/L/day → **Blank**, 0.2-0.4 mg/L/day → **Green**, 0.4-0.6 mg/L/day → **Orange**, 0.6-1.3 mg/L/day → **Brown**, > 1.3mg/L/day → **Red**

Πίνακας 1. Παραγωγικότητα β-καροτενίου στελεχών *Dunaliella* σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας σε διάφορα θρεπτικά μέσα

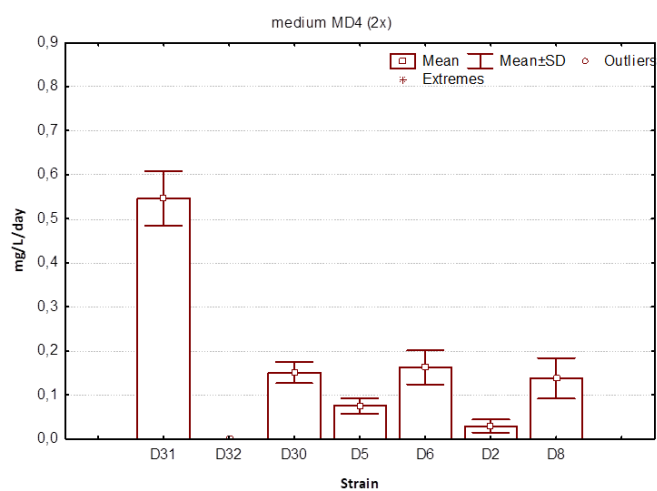
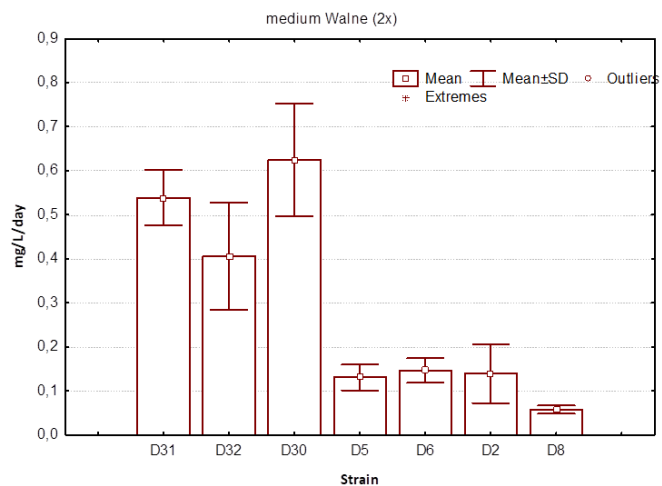
medium	Walne 1x	Walne 2x	Walne 3x	Nutri 1x	Nutri 2x	Nutri 3x	Nutri + 1x	Nutri + 2x	Nutri + 3x	MD4 1x	MD4 2x	MD4 3x
strain	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2
salinity	120 ppt	120 ppt	120 ppt	120 ppt	120 ppt	120 ppt	120 ppt	120 ppt	120 ppt	120 ppt	120 ppt	120 ppt
initial cells/ml	1,47E+05	1,47E+05	1,47E+05	1,47E+05	1,47E+05	1,47E+05	1,47E+05	1,47E+05	1,47E+05	1,47E+05	1,47E+05	1,47E+05
final cells/ml	5,87E+05	9,15E+05	1,72E+05	2,87E+05	6,09E+05	1,49E+06	1,15E+05	1,34E+05	1,15E+05	1,34E+06	5,60E+05	4,16E+05
culture days	35	35	38	35	38	38	35	38	40	38	40	40
μ(d-1)	0,041	0,054	0,004	0,02	0,038	0,063	-0,007	0,06	-0,006	0,06	0,034	0,027
b-carotene % DW	5,46	3,91	5,30	6,99	1,34	1,81	8,31	19,97	6,65	2,42	5,16	8,54
b-carotene mg/L	4,36	4,86	1,24	2,73	1,11	3,67	1,3	3,64	1,04	4,41	3,93	4,83
b-carotene pg/cell	7,43E+00	5,31E+00	7,21E+00	9,51E+00	1,82E+00	2,46E+00	1,13E+01	2,72E+01	9,04E+00	3,29E+00	7,02E+00	1,16E+01
b-carotene mg/L/day	0,125	0,139	0,033	0,078	0,029	0,097	0,037	0,096	0,026	0,116	0,098	0,121
strain	D5			D5			D5			D5		
salinity	120 ppt			120 ppt			120 ppt			120 ppt		
initial cells/ml	1,82E+05			1,82E+05			1,82E+05			1,82E+05		
final cells/ml	7,90E+05			7,03E+05			3,67E+05			4,35E+05		
culture days	27			28			33			35		
μ(d-1)	0,056			0,05			0,022			0,026		
b-carotene % DW	2,29			3,26			2,89			3,09		
b-carotene mg/L	3,53			4,47			2,07			2,62		
b-carotene pg/cell	4,47E+00			6,36E+00			5,64E+00			6,02E+00		
b-carotene mg/L/day	0,131			0,160			0,063			0,075		
strain	D6			D6			D6			D6		
salinity	120 ppt			120 ppt			120 ppt			120 ppt		
initial cells/ml	1,74E+05			1,74E+05			1,74E+05			1,74E+05		
final cells/ml	1,41E+06			8,70E+05			4,81E+05			1,11E+06		
culture days	34			34			27			47		
μ(d-1)	0,063			0,049			0,039			0,04		
b-carotene % DW	2,24			3,92			4,17			4,36		
b-carotene mg/L	4,99			5,39			3,17			7,65		
b-carotene pg/cell	3,54E+00			6,20E+00			6,59E+00			6,89E+00		
b-carotene mg/L/day	0,147			0,159			0,117			0,163		

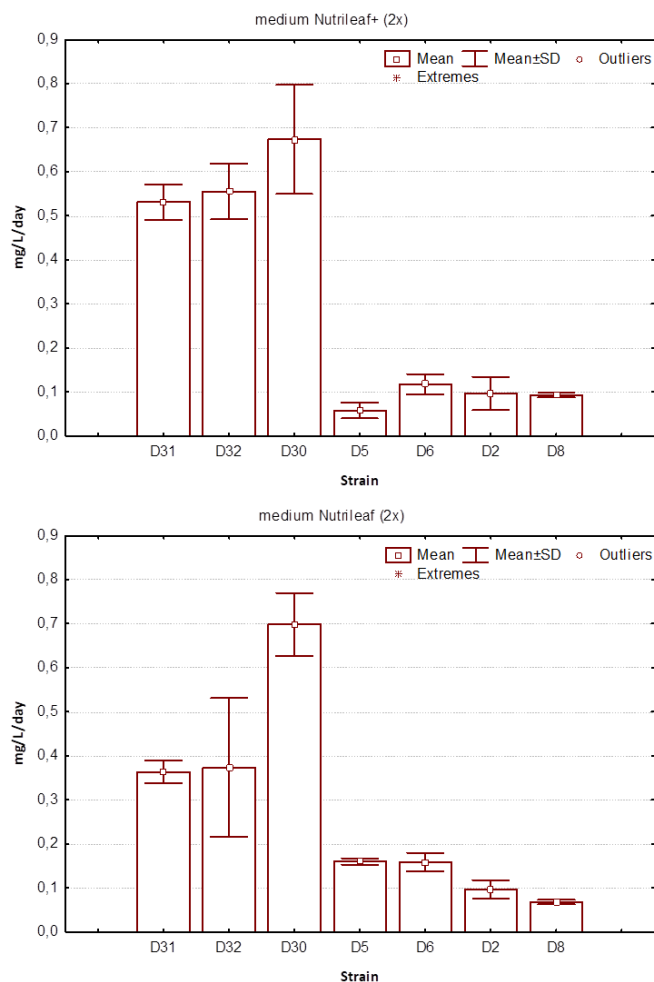
strain	D8			D8			D8			D8		
salinity		120 ppt			120 ppt			120 ppt			120 ppt	
initial cells/ml		1,57E+05			1,57E+05			1,57E+05			1,57E+05	
final cells/ml		1,74E+05			1,25E+05			1,60E+05			3,45E+05	
culture days		28			28			22			41	
μ(d-1)		0,004			-0,008			0,001			0,02	
b-carotene % DW		4,97			8,22			6,89			8,82	
b-carotene mg/L		1,61			1,91			2,05			5,66	
b-carotene pg/cell		9,25E+00			1,53E+01			1,28E+01			1,64E+01	
b-carotene mg/L/day		0,058			0,068			0,093			0,138	
medium	Walne 1x	Walne 2x	Walne 3x	Nutri 1x	Nutri 2x	Nutri 3x	Nutri + 1x	Nutri + 2x	Nutri + 3x	MD4 1x	MD4 2x	MD4 3x
strain	D32	D32		D32	D32	D32	D32	D32	D32	D32		D32
salinity	120 ppt	120 ppt		120 ppt	120 ppt	120 ppt	120 ppt	120 ppt	120 ppt	120 ppt		120 ppt
initial cells/ml	8,84E+04	8,84E+04		8,84E+04	8,84E+04	8,84E+04	8,84E+04	8,84E+04	8,84E+04	8,84E+04		8,84E+04
final cells/ml	4,22E+05	1,26E+06		9,30E+04	6,29E+05	8,30E+05	2,61E+05	1,70E+06	1,87E+06	7,32E+05		1,50E+05
culture days	31	23		31	23	31	31	14	31	23		34
μ(d-1)	0,052	0,121		0,002	0,089	0,075	0,036	0,227	0,102	0,096		0,016
b-carotene % DW	6,31	4,08		16,13	7,50	5,75	7,62	2,51	2,72	7,26		4,14
b-carotene mg/L	4,85	9,35		2,73	8,59	8,68	3,62	7,77	9,27	9,67		1,13
b-carotene pg/cell	1,15E+01	7,42E+00		2,94E+01	1,37E+01	1,05E+01	1,39E+01	4,57E+00	4,96E+00	1,32E+01		7,53E+00
b-carotene mg/L/day	0,156	0,407		0,088	0,373	0,280	0,117	0,555	0,299	0,420		0,033
strain	D30			D30				D30			D30	
salinity	120 ppt			120 ppt				120 ppt			120 ppt	
initial cells/ml	3,30E+04			3,30E+04				3,30E+04			3,30E+04	
final cells/ml	6,31E+05			5,77E+05				5,45E+05			2,32E+05	
culture days	14			14				14			36	
μ(d-1)	0,227			0,22				0,216			0,056	
b-carotene % DW	5,27			10,53				10,75			14,51	
b-carotene mg/L	5,35			9,78				9,43			5,42	
b-carotene pg/cell	8,48E+00			1,69E+01				1,73E+01			2,34E+01	
b-carotene mg/L/day	0,382			0,699				0,674			0,151	
strain	D31			D31				D31			D31	
salinity	120 ppt			120 ppt				120 ppt			120 ppt	
initial cells/ml	3,40E+05			3,40E+05				3,40E+05			3,40E+05	
final cells/ml	1,15E+06			5,45E+05				5,65E+05			5,72E+05	
culture days	25			17				17			24	
μ(d-1)	0,051			0,029				0,032			0,023	
b-carotene % DW	6,30			6,10				8,22			5,47	
b-carotene mg/L	13,47			6,18				8,64			5,82	
b-carotene pg/cell	1,17E+01			1,13E+01				1,53E+01			1,02E+01	
b-carotene mg/L/day	0,539			0,364				0,508			0,243	

Μεταξύ των μελετηθέντων στελεχών διακρίνονται δύο ομάδες με βάση τα αποτελέσματα τόσο της παραγωγικότητας όσο και της συνολικής συγκέντρωσης της καλλιέργειας σε β-καρωτενίου. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τα στελέχη D2, D5, D6 και D8 τα οποία εμφανίζουν παραγωγικότητες που δεν υπερβαίνουν τα 0,16 mg β καρωτενίου ανά λίτρο καλλιέργειας ανά ημέρα και η συγκέντρωση β-καρωτενίου στην καλλιέργεια σε ελάχιστες περιπτώσεις υπερέβη τα 5mg/L. Αντιθέτως η δεύτερη ομάδα που αποτελείται από τα στελέχη D30, D31 και D32 εμφανίζει πολύ υψηλότερες παραγωγικότητες που προσεγγίζουν τα 0,7 mg β καρωτενίου ανά λίτρο καλλιέργειας ανά ημέρα και συγκεντρώσεις που σχεδόν καθολικά υπερβαίνουν τα 5 mg/L και φτάνουν μέχρι και τα 13mg/L. Οι τιμές παραγωγικότητας του D30 είναι ιδιαίτερα υψηλές (περίπου 0,7 mg/L/day) και σχετικά συγκρίσιμες όμως με αυτές του D31 (μέγιστα 0,51-0,54 mg/L/day) και του D32 (μέγιστα 0,4-0,55 mg/L/day). Τα αποτελέσματα αυτά εύκολα διαπιστώνονται από τη γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων όπως αυτή πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος Statistica με τη μορφή των γραφημάτων που ακολουθούν (βλ. γραφήματα 1-12) αλλά και με τα αποτελέσματα του Tukey test που οδήγησαν στην ίδια ομαδοποίηση.

Τα αποτελέσματα διαφοροποιούνται από αυτήν την εικόνα όταν μελετάται η συγκέντρωση β-καρωτενίου που παρατηρείται στα κύτταρα. Σε αυτήν την περίπτωση το στέλεχος D8 εμφανίζει πολύ καλά αποτελέσματα, ωστόσο οι καλλιέργειες του συγκεκριμένου στελέχους έδιναν αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις κυττάρων οδηγώντας σε χαμηλή συνολική ποσότητα β-καρωτενίου και επομένως απόρριψή του ως υποψήφιο για εμπορική καλλιέργεια. Παρουσιάζει ωστόσο αρκετό ενδιαφέρον η

περαιτέρω μελέτη του συγκεκριμένου στελέχους για την ανεύρεση των βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξής του καθώς η συγκέντρωση β-καρωτενίου είναι αρκετά ενθαρυντική.

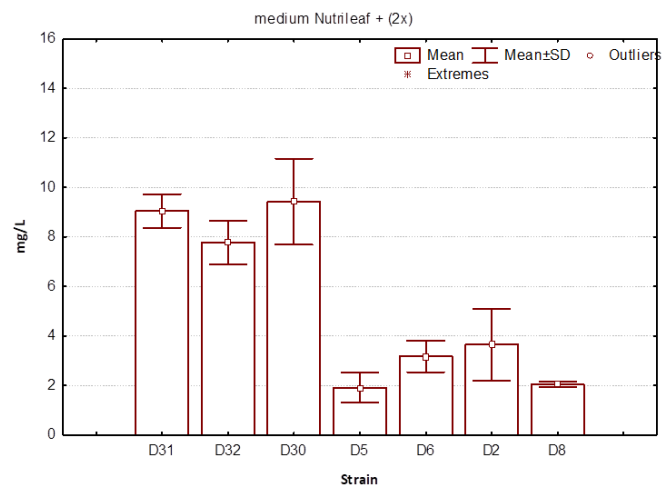
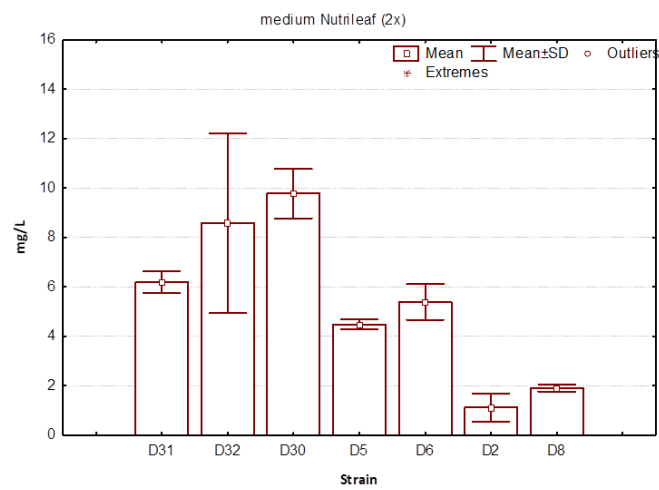
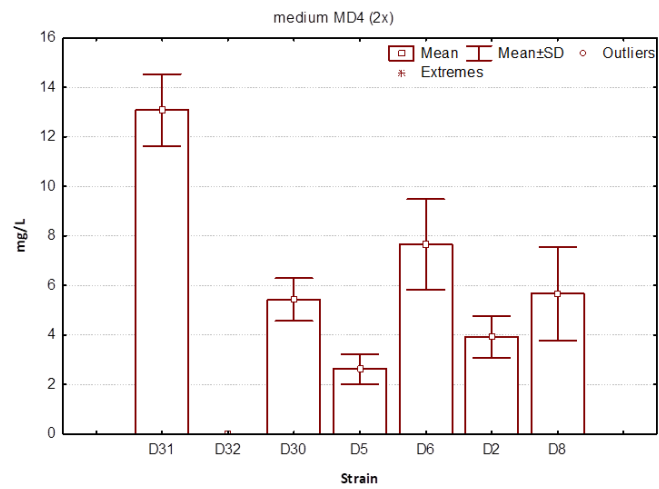


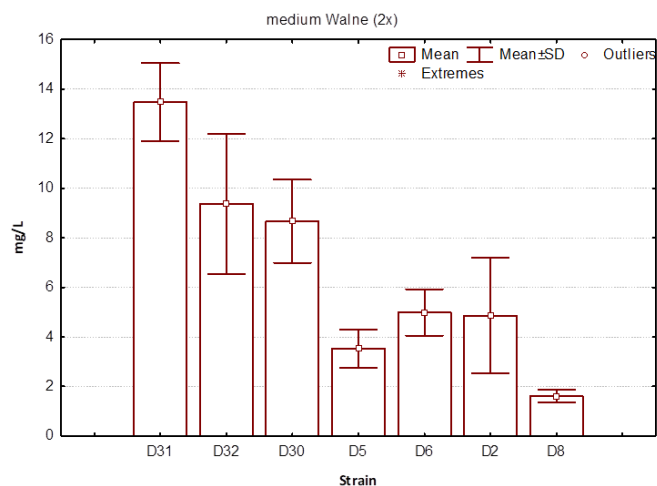


Γραφήματα 1-4: Παραγωγικότητα β-καροτενίου στελεχών *Dunaliella* (σε mg/L/day) σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας σε διάφορα θρεπτικά μέσα

Πίνακας 2: Αποτελέσματα επεξεργασίας ANOVA στην παραγωγικότητα β-καροτενίου στελεχών *Dunaliella* (σε mg/L/day) σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας σε διάφορα θρεπτικά μέσα

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	5,538354	1	5,538354	1479,492	0,000000
Strain	2,782185	6	0,463697	123,870	0,000000
Medium	0,286194	3	0,095398	25,484	0,000000
Strain*Medium	0,944087	18	0,052449	14,011	0,000000
Error	0,209631	56	0,003743		

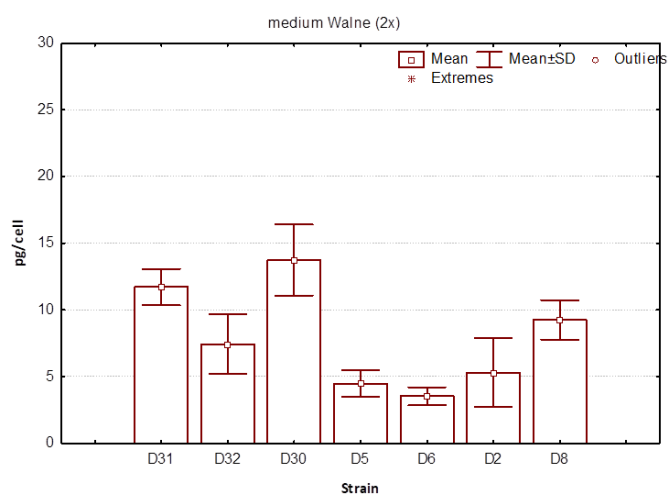


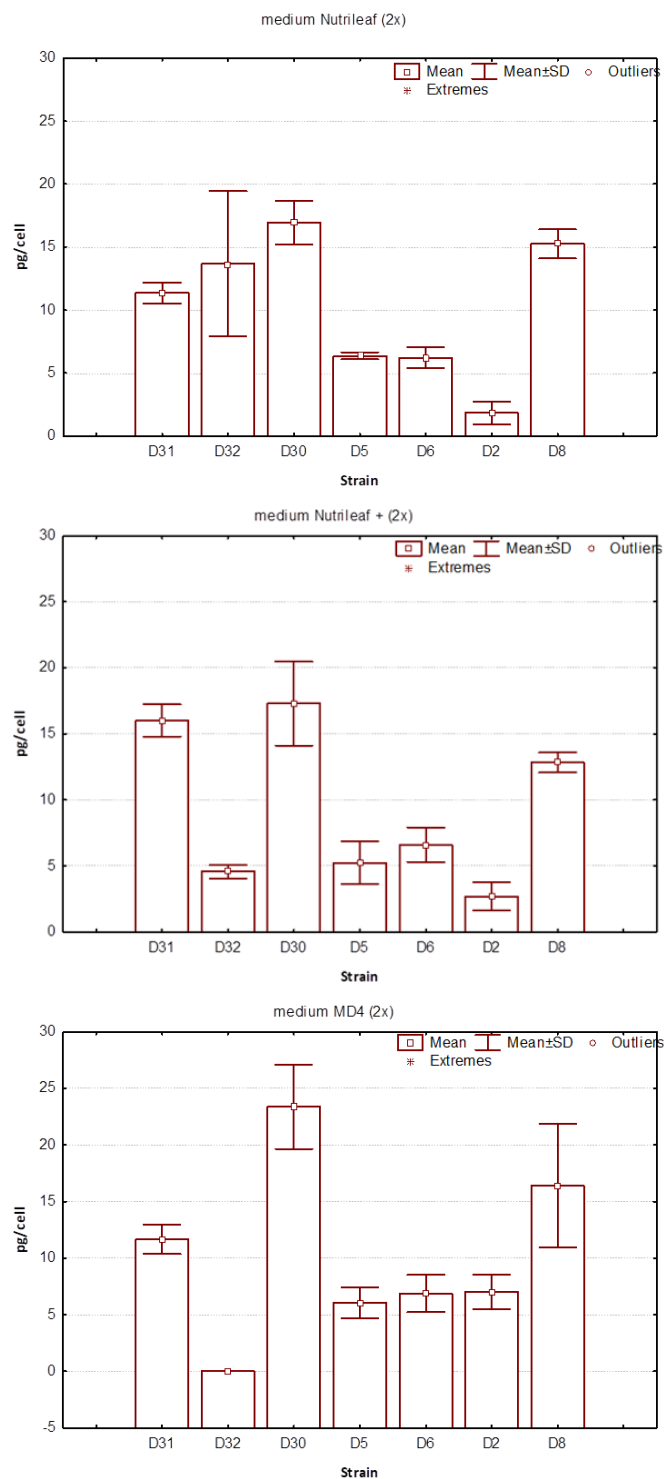


Γραφήματα 5-8: Παραγωγικότητα β-καροτενίου στελεχών *Dunaliella* (σε mg/L) σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας σε διάφορα θρεπτικά μέσα

Πίνακας 3: Αποτελέσματα επεξεργασίας ANOVA στην παραγωγικότητα β-καρωτενίου στελεχών *Dunaliella* (σε mg/L) σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας σε διάφορα θρεπτικά μέσα

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2719,194	1	2719,194	1424,200	0,000000
Strain	604,784	6	100,797	52,793	0,000000
Medium	25,836	3	8,612	4,511	0,006648
Strain*Medium	384,671	18	21,371	11,193	0,000000
Error	106,920	56	1,909		





Γραφήματα 9-12: Συγκέντρωση β-καρωτενίου στελεχών *Dunaliella* (σε pg/cell) σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας σε διάφορα θρεπτικά μέσα

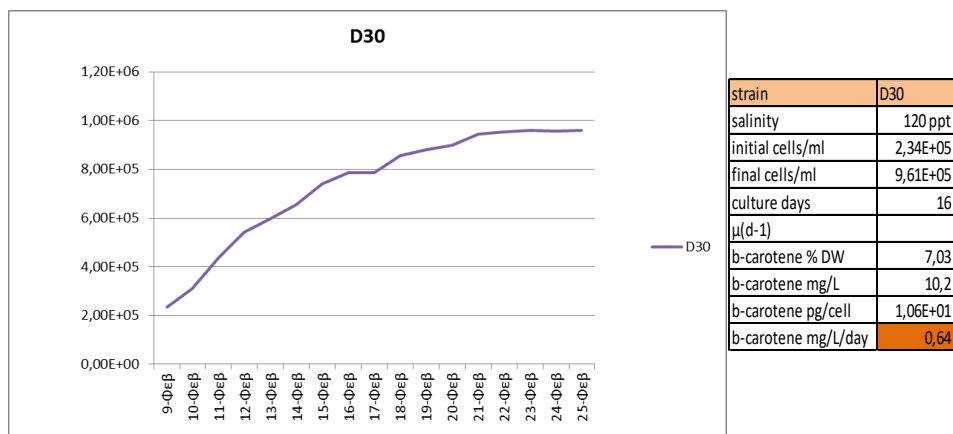
Πίνακας 4: Αποτελέσματα επεξεργασίας ANOVA στην συγκέντρωση β-καρωτενίου στελεχών *Dunaliella* (σε pg/cell) σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας σε διάφορα θρεπτικά μέσα

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	7449,148	1	7449,148	1554,400	0,000000
Strain	1943,776	6	323,963	67,601	0,000000
Medium	73,462	3	24,487	5,110	0,003395
Strain*Medium	579,067	18	32,170	6,713	0,000000
Error	268,369	56	4,792		

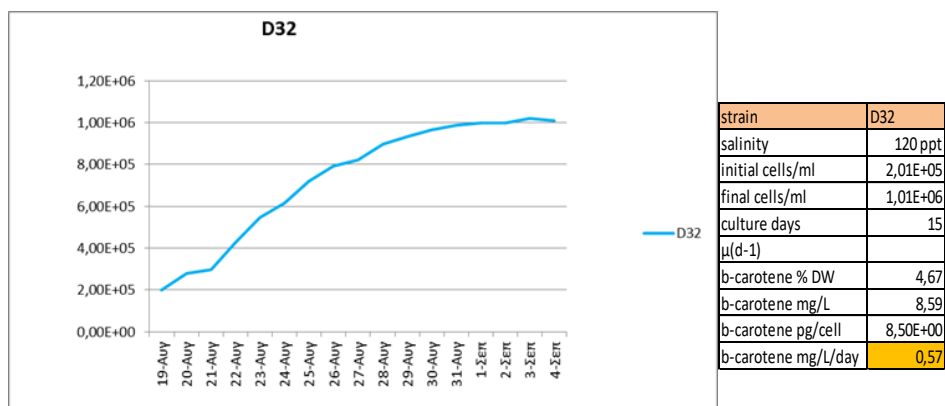
Τα αποτελέσματα που λάβαμε με τη βοήθεια της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) δείχνουν μία πολύ εντονότερη επίδραση του στελέχους τόσο στην παραγωγικότητα όσο και στην συγκέντρωση του εκάστοτε στελέχους σε β-καρωτένιο. Ωστόσο οι υψηλότερες παραγωγικότητες παρατηρούνται στα θρεπτικά υλικά Nutrileaf και Nutrileaf (+) τα οποία έχουν χαμηλό κόστος και υψηλή ευκολία σύνθεσης καθώς παράγονται με βάση εμπορικά λιπάσματα. Το γεγονός αυτό καθιστά τα θρεπτικά αυτά μέσα πολλά υποσχόμενα για μαζική καλλιέργεια σε εντατικά συστήματα μεγάλης κλίμακας. Επίσης, το γεγονός ότι το Nutrileaf (+) περιέχει δικαρβονικά ανιόντα, σε υψηλά pH όπως αυτά που παρατηρούνται σε καλλιέργειες που δεν παρέχεται αέριο CO₂, είναι ένα επιπλέον πλεονέκτημα καθώς τα ανιόντα αυτά διαλυόμενα στο νερό απελευθερώνουν CO₂ προάγοντας έτσι τη φωτοσύνθεση και επομένως την παραγωγικότητα των συστημάτων.

3.2 Καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας με τη χρήση βιοαντιδραστήρων

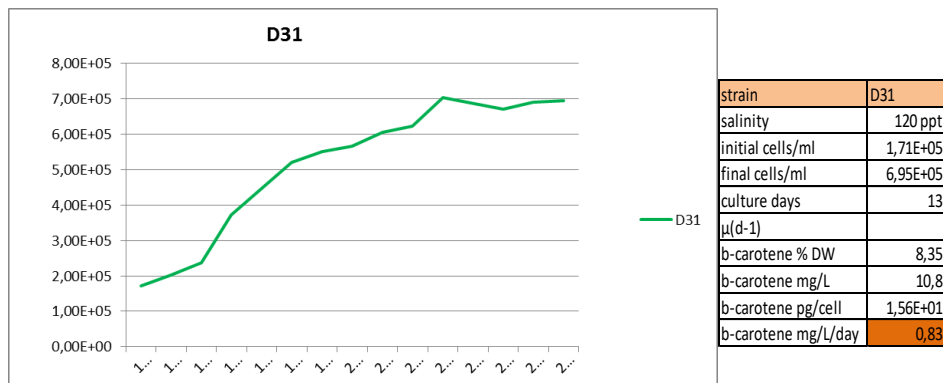
Όπως αναφέρθηκε τα στελέχη D30, D31 και D32 είναι αυτά που επιλέχθηκαν για περαιτέρω πειραματισμό. Αρχικά και τα τρία στελέχη καλλιεργήθηκαν σε φωτοβιοαντιδραστήρα όγκου 20L με τη χρήση θρεπτικού μέσου Nutrileaf (+) ώστε να επαληθευτούν τα αποτελέσματα τα οποία ελήφθησαν στις μικρές καλλιέργειες και σε καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου. Στα ακόλουθα διαγράμματα παρατίθενται τα αποτελέσματα των πειραμάτων που έγιναν σε καλλιέργειας μεγαλύτερης κλίμακας με τη χρήση βιοαντιδραστήρων. Παρουσιάζονται οι μεταβολές στην κυτταρική πυκνότητα της καλλιέργειας καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος καθώς και οι μετρήσεις που έγιναν στο τέλος των πειραμάτων όπως και για τις καλλιέργειες μέσης κλίμακας.



Γράφημα 13: Μεταβολές κυτταρικής πυκνότητας και παραγωγικότητα β-καρωτενίου του στελέχους D30 σε καλλιέργεια σε φωτοβιοαντιδραστήρα



Γράφημα 14: Μεταβολές κυτταρικής πυκνότητας και παραγωγικότητα β-καρωτενίου του στελέχους D32 σε καλλιέργεια σε φωτοβιοαντιδραστήρα.



Γράφημα 16: Μεταβολές κυτταρικής πυκνότητας και παραγωγικότητα β-καρωτενίου του στελεχούς D31 σε καλλιέργεια σε φωτοβιοαντιδραστήρα

Οι τιμές είναι συγκρίσιμες με αυτές του προηγούμενου πειράματος στην περίπτωση των D30 (0,64 mg/L/day έναντι 0,674 mg/L/day στο πρώτο πείραμα) και D32 (0,555 mg/L/day έναντι 0,57 mg/L/day στο πρώτο πείραμα), ενώ στην περίπτωση του D31 (0,83 mg/L/day έναντι 0,508 mg/L/day στο πρώτο πείραμα) παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της παραγωγικότητας. Τα στοιχεία αυτά είναι ιδιαίτερος ελπιδοφόρος ειδικότερα για τη χρήση των συγκεκριμένων στελεχών σε μαζικές καλλιέργειες σε συστήματα μεγάλης κλίμακας, αφήνοντας πολλές ελπίδες για μετέπειτα βιομηχανική τους εκμετάλλευση.

3.3 Μεγιστοποίηση της παραγωγής β-καρωτενίου

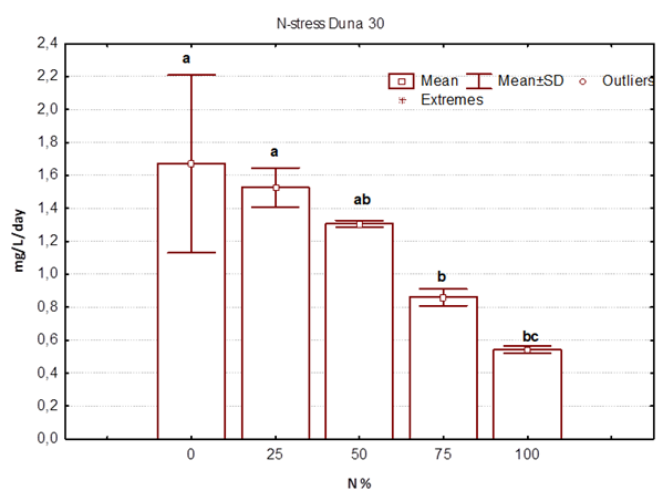
Στη συνέχεια έγιναν προσπάθειες έτσι ώστε να μεγιστοποιηθεί, όσο αυτό ήταν δυνατόν, η παραγωγικότητα των στελεχών αυτών. Η πιο κοινή λύση είναι η χρήση παραγόντων καταπόνησης όπως αναφέρθηκε και στο αντίστοιχο τμήμα της εισαγωγής της διπλωματικής εργασίας. Με δεδομένο ότι οι αλλαγές στους παράγοντες που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να μπορούν να εφαρμοστούν με τη μεγαλύτερη δυνατή ευκολία και το μικρότερο δυνατό κόστος σε συστήματα μεγάλης κλίμακας, επιλέχθηκαν η αύξηση της αλατότητας και η συγκέντρωση αζώτου στο θρεπτικό μέσο. Οι ακόλουθοι πίνακες δείχνουν τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού στα στελέχη που επιλέχθηκαν, ήτοι τα D30, D31 και D32. Για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις αζώτου παρουσιάζονται τόσο τα αποτελέσματα της ανάλυσης ANOVA όσο και οι γραφικές απεικονίσεις των αποτελεσμάτων.

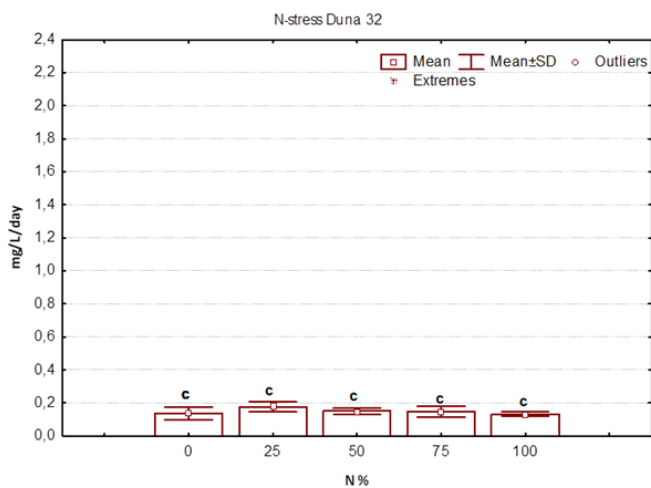
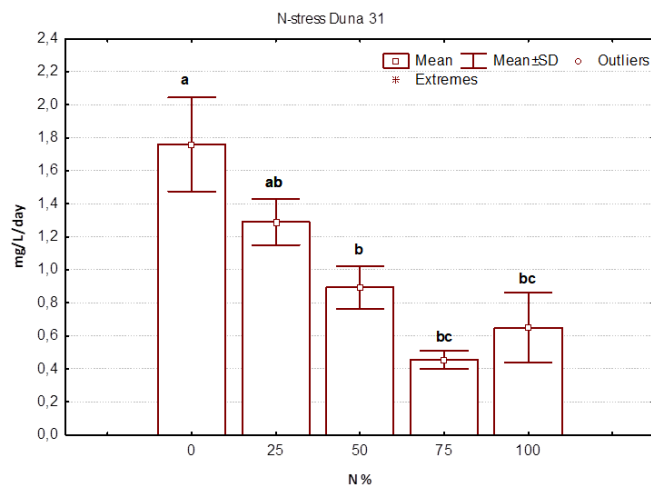
Πίνακας 6. Παραγωγικότητα β-καρωτενίου στελεχών *Dunaliella* σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας με εφαρμογή αύξησης της αλατότητας.

strain	D30	D30	D30
salinity	120-140 ppt	120-160 ppt	120-180 ppt
initial cells/ml	3,50E+05	3,50E+05	3,50E+05
final cells/ml	5,56E+05	4,80E+05	5,10E+05
culture days	30	30	26
$\mu(d-1)$			
b-carotene % DW	6,31	7,87	8,54
b-carotene mg/L	5,65	5,78	6,71
b-carotene pg/cell	1,02E+01	1,20E+01	1,32E+01
b-carotene mg/L/day	0,18	0,18	0,25
strain	D31	D31	D31
salinity	120-140 ppt	120-160 ppt	120-180 ppt
initial cells/ml	3,10E+05	3,10E+05	3,10E+05
final cells/ml	5,46E+05	3,40E+05	5,60E+05
culture days	29	29	23
$\mu(d-1)$			
b-carotene % DW	5,16	6,77	6,40
b-carotene mg/L	5,24	4,25	6,45
b-carotene pg/cell	9,61E+00	1,25E+01	1,15E+01
b-carotene mg/L/day	0,18	0,15	0,28
strain	D32	D32	D32
salinity	120-140 ppt	120-160 ppt	120-180 ppt
initial cells/ml	3,15E+05	3,15E+05	3,15E+05
final cells/ml	4,20E+05	4,20E+05	4,11E+05
culture days	18	18	25
$\mu(d-1)$			
b-carotene % DW	2,22	2,46	4,09
b-carotene mg/L	1,7	1,91	3,12
b-carotene pg/cell	4,04	4,54	7,59
b-carotene mg/L/day	0,09	0,11	0,13

Πίνακας 7. Παραγωγικότητα β-καρωτενίου στελεχών *Dunaliella* σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας με εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου στο θρεπτικό μέσον.

strain	D30	D30	D30	D30	D30
N percentage	0%	25%	50%	75%	100%
initial cells/ml	3,13E+05	3,13E+05	3,13E+05	3,13E+05	3,13E+05
final cells/ml	4,35E+05	6,04E+05	8,30E+05	1,06E+06	1,13E+06
culture days	5	8	11	14	21
$\mu(d-1)$					
b-carotene % DW	12,71	12,41	10,18	7,03	6,27
b-carotene mg/L	8,35	14,9	13,6	12	11,4
b-carotene pg/cell	1,92E+01	2,02E+01	1,64E+01	1,13E+01	1,01E+01
b-carotene mg/L/day	1,67	1,53	1,23	0,86	0,54
strain	D31	D31	D31	D31	D31
N percentage	0%	25%	50%	75%	100%
initial cells/ml	3,43E+05	3,43E+05	3,43E+05	3,43E+05	3,43E+05
final cells/ml	5,46E+05	5,57E+05	6,00E+05	5,56E+05	9,06E+05
culture days	5	7	11	13	16
$\mu(d-1)$					
b-carotene % DW	8,84	8,74	8,65	5,76	5,40
b-carotene mg/L	8,79	9,05	9,86	5,96	9,1
b-carotene pg/cell	1,65E+01	1,67E+01	1,64E+01	1,07E+01	1,00E+01
b-carotene mg/L/day	1,76	1,29	0,9	0,46	0,57
strain	D32	D32	D32	D32	D32
N percentage	0%	25%	50%	75%	100%
initial cells/ml	4,72E+05	4,72E+05	4,72E+05	4,72E+05	4,72E+05
final cells/ml	1,16E+05	3,50E+05	7,70E+05	6,42E+05	7,38E+05
culture days	14	18	21	25	28
$\mu(d-1)$					
b-carotene % DW	9,52	6,19	3,61	4,11	3,85
b-carotene mg/L	2,01	3,94	5,06	4,8	5,17
b-carotene pg/cell	17,3	11,3	6,58	7,48	6,96
b-carotene mg/L/day	0,14	0,22	0,24	0,19	0,18

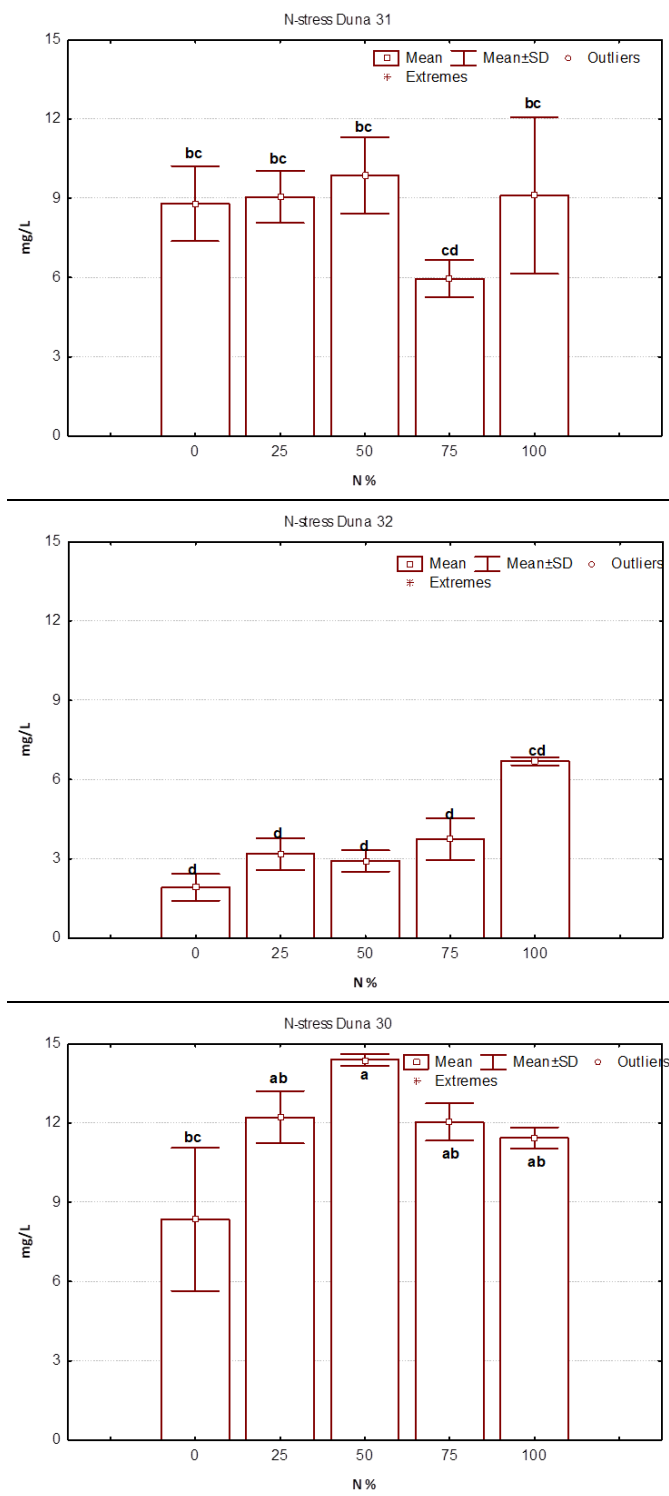




Γραφήματα 17-19: Παραγωγικότητα β-καρωτενίου στελεχών *Dunaliella* (σε mg/L/day) σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας σε διάφορες συγκεντρώσεις αζώτου.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα επεξεργασίας ANOVA στην παραγωγικότητα β-καρωτενίου στελεχών *Dunaliella* (σε mg/L/day) σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας σε διάφορα θρεπτικά μέσα

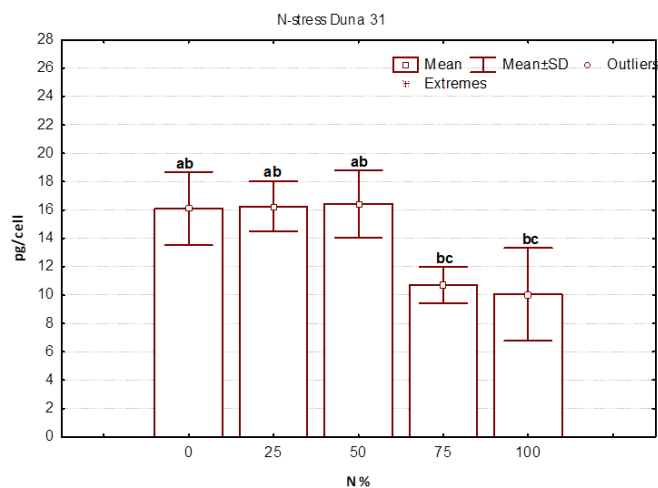
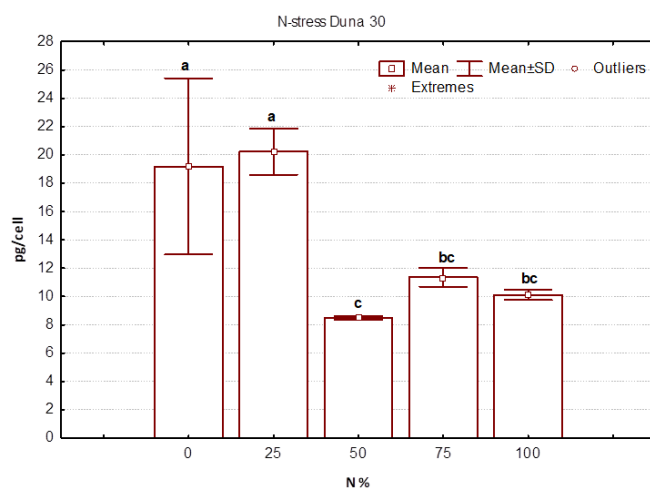
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	27,37800	1	27,37800	860,2220	0,000000
Strain	9,18825	2	4,59413	144,3483	0,000000
N %	3,72704	4	0,93176	29,2761	0,000000
Strain*N %	2,19950	8	0,27494	8,6386	0,000005
Error	0,95480	30	0,03183		



Γραφήματα 20-22: Παραγωγικότητα β-καρωτενίου στελεχών *Dunaliella* (σε mg/L) σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας σε διάφορες συγκεντρώσεις αζώτου.

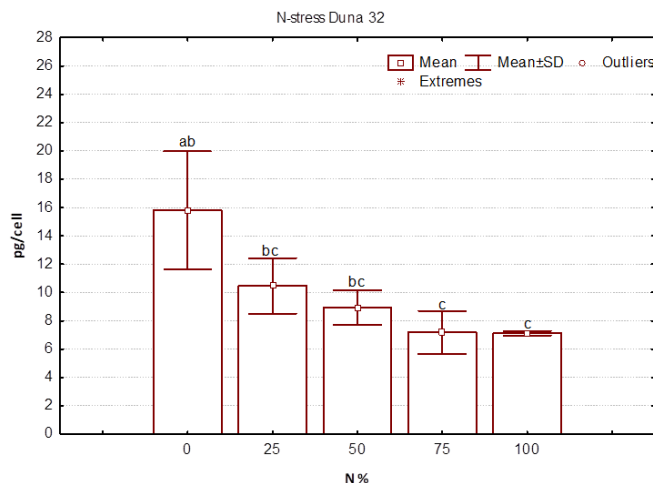
Πίνακας 9: Αποτελέσματα επεξεργασίας ANOVA στην παραγωγικότητα β-καρωτενίου στελεχών *Dunaliella* (σε mg/L) σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας σε διάφορα θρεπτικά μέσα

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2861,629	1	2861,629	1730,083	0,000000
Strain	486,897	2	243,448	147,184	0,000000
N %	50,145	4	12,536	7,579	0,000241
Strain*N %	72,619	8	9,077	5,488	0,000261
Error	49,621	30	1,654		



Γραφήματα 23-24: Συγκέντρωση β-καρωτενίου των στελεχών D30 και D31 (σε pg/cell) σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας σε διάφορες συγκεντρώσεις αζώτου.

Γράφημα 25: Συγκέντρωση β-καρωτενίου του στελέχους D32 (σε pg/cell) σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας σε διάφορες συγκεντρώσεις αζώτου.



Πίνακας 10: Αποτελέσματα επεξεργασίας ANOVA στην συγκέντρωση β-καρωτενίου στελεχών *Dunaliella* (σε pg/cell) σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας σε διάφορα θρεπτικά μέσα.

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	7101,424	1	7101,424	1121,394	0,000000
Strain	159,393	2	79,697	12,585	0,000107
N %	459,658	4	114,915	18,146	0,000000
Strain*N %	173,169	8	21,646	3,418	0,006569
Error	189,980	30	6,333		

Η αύξηση της αλατότητας δεν έφερε τα αναμενόμενα αποτελέσματα καθώς παρατηρήθηκε σημαντικά χαμηλότερη παραγωγικότητα από τις τιμές αναφοράς και στα τρία δοκιμασθέντα στελέχη (D30→ 0,25 mg/L/day, D31→0,28 mg/L/day, D32→0,13 mg/L/day). Η αύξηση της αλατότητας και στις τρεις περιπτώσεις οδήγησε σε πολύ χαμηλές κυτταρικές πυκνότητες, βραδεία ανάπτυξη της καλλιέργειας και επομένως μικρή παραγωγικότητα σε β-καρωτένιο. Πάντως από τα αποτελέσματα γίνεται φανερόν ότι η μεγαλύτερη αύξηση της αλατότητας ήταν αυτή που επέφερε και τη μεγαλύτερη συγκριτικά συσσώρευση β-καρωτενίου και στα τρία υπό μελέτη στελέχη.

Η χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου στο θρεπτικό μέσον (0%, 25%, 50%, 75%, 100%) σε αντίθεση με την αύξηση της αλατότητας προκάλεσε μεγάλη αύξηση στην παραγωγικότητα σε β-καρωτένιο στα στελέχη D30 (1,67 mg/L/day έναντι 0,674 mg/L/day στο πρώτο πείραμα) και D31 (1,76 mg/L/day έναντι 0,508 mg/L/day στο πρώτο πείραμα), ενώ δεν είχε αντίστοιχα καλά αποτελέσματα στο στέλεχος D32 (0,24 mg/L/day έναντι 0,57 mg/L/day στο πρώτο πείραμα).

Τόσο στο στέλεχος D30 όσο και στο στέλεχος D31 τις μεγαλύτερες τιμές παραγωγικότητας σε β-καρωτένιο αλλά και συγκέντρωση β-καρωτενίου στο κύτταρο τις εμφάνιζαν οι συγκεντρώσεις αζώτου 0% και 25%. Παρατηρήθηκε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση αζώτου μειώνεται η % περιεκτικότητα β-καρωτενίου στο ξηρό βάρος αλλά και η ποσότητα β-καρωτενίου στο κύτταρο καθώς μειώνεται και η καταπόνηση (στρες) που δέχεται το κύτταρο λόγω της έλλειψης αζώτου. Πιο αδιευκρίνιστη είναι η εικόνα στη συνολική παραγωγή β-καρωτενίου καθώς ενώ για το στέλεχος D32 η μεγαλύτερη τιμή εμφανίζεται στη συγκέντρωση 50% και βαθμιαία μειώνεται όσο η συγκέντρωση αυξάνεται ή μειώνεται, για το στέλεχος D31 οι μεγαλύτερες τιμές παρατηρούνται στις συγκεντρώσεις 0%, 25% και 50% καθώς παρατηρούνται πολύ παρεμφερή αποτελέσματα.

3.4 Ανάπτυξη πρωτοκόλλων παραγωγής β-καρωτενίου

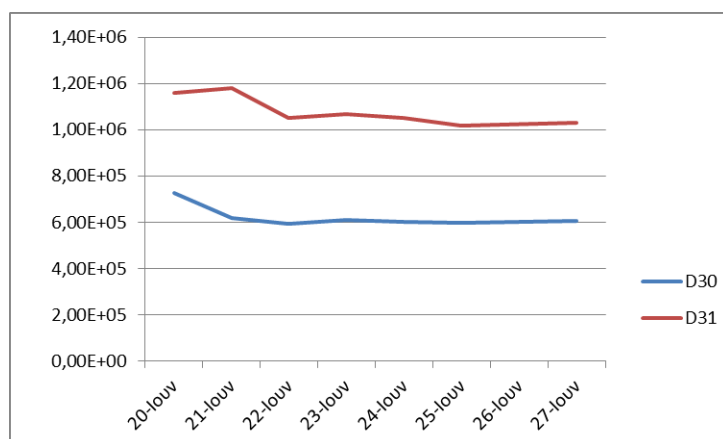
Στο τελευταίο στάδιο της εργασίας κρίθηκε σκόπιμο να αναπτυχθεί ένα βιώσιμο πρωτόκολλο για την παραγωγή β-καρωτενίου σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας. Δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα παραγωγής β-καρωτενίου έτσι ώστε να διευκρινιστεί αυτό το οποίο θα ήταν παραγωγικά επωφελέστερο. Το ένα πρωτόκολλο βασίζεται σε διαδοχικές αραιώσεις ώριμης καλλιέργειας και το δεύτερο σε χρήση θρεπτικών χαμηλής συγκέντρωσης αζώτου. Τα αποτελέσματα των πρωτοκόλλων αυτών στα επιλεγμένα στελέχη δίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 11. Παραγωγικότητα β-καρωτενίου του στελέχους D30 σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας με εφαρμογή πρωτοκόλλου διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου στο θρεπτικό μέσον.

strain	D30	D30	D30	D30	D30	D30
N percentage	0% (1)	25% (1)	0% (2)	25% (2)	0% (3)	25% (3)
initial cells/ml	3,23E+05	3,23E+05	5,86E+05	5,86E+05	8,03E+05	8,03E+05
final cells/ml	4,42E+05	7,13E+05	6,82E+05	8,53E+05	9,11E+05	1,14E+06
culture days	6	9	5	8	7	10
μ(d-1)						
b-carotene % DW	9,95	11,24	6,86	6,49	6,31	6,08
b-carotene mg/L	8,18	14,9	8,7	10,3	10,7	12,9
b-carotene pg/cell	1,85E-01	2,09E-01	1,28E-01	1,21E-01	1,17E-01	1,13E-01
b-carotene mg/L/day	1,36	1,66	1,74	1,29	1,53	1,29

Πίνακας 12. Παραγωγικότητα β-καρωτενίου του στελέχους D31 σε εργαστηριακές αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας με εφαρμογή πρωτοκόλλου διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου στο θρεπτικό μέσον.

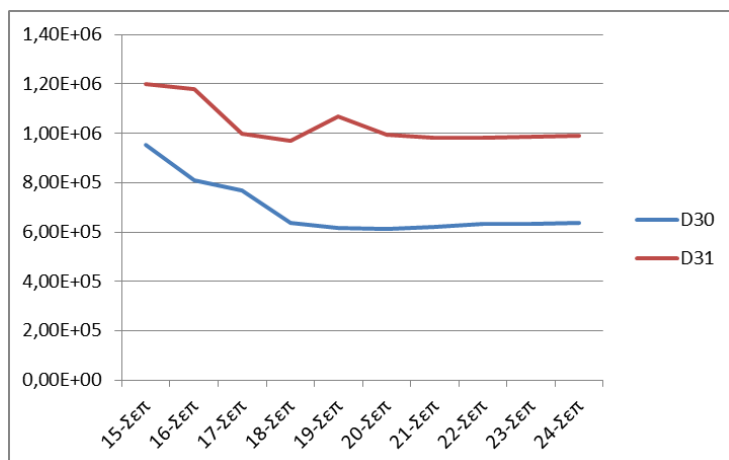
strain	D31	D31	D31	D31	D31	D31
N percentage	0% (1)	25% (1)	0% (2)	25% (2)	0% (3)	25% (3)
initial cells/ml	2,13E+05	2,13E+05	4,12E+05	4,12E+05	7,65E+05	7,65E+05
final cells/ml	3,12E+05	5,57E+05	5,73E+05	8,00E+05	1,00E+06	1,22E+06
culture days	5	6	6	6	6	8
μ(d-1)						
b-carotene % DW	9,91	10,42	6,85	5,65	5,59	4,54
b-carotene mg/L	5,75	10,8	7,3	8,4	10,40	10,30
b-carotene pg/cell	1,84E+01	2,02E+01	1,27E+01	1,05E+01	1,27E+01	1,05E+01
b-carotene mg/L/day	1,15	1,8	1,22	1,4	1,7	1,29



Γράφημα 26: Μεταβολές κυτταρικής των στελεχών D30 και D31 με τη χρήση πρωτοκόλλου αραιώσεων 10% και θρεπτικού μέσου Nutrileaf plus 2x.

Πίνακας 13: Μεταβολές κυτταρικής πυκνότητας και παραγωγικότητας β-καρωτενίου των στελεχών D30 και D31 με τη χρήση πρωτοκόλλου αραιώσεων 10% με τη χρήση θρεπτικού μέσου Nutrileaf plus 2x.

strain	D30	D31
salinity	120ppt	120ppt
initial cells/ml	7,27E+05	1,16E+06
final cells/ml	6,05E+05	1,03E+06
culture days	8	8
μ(d-1)		
b-carotene % DW	10,50	8,84
b-carotene mg/L	9,59	14,1
b-carotene pg/cell	1,59E+01	1,37E+01
b-carotene mg/L/day	1,2	1,76



Γράφημα 27: Μεταβολές κυτταρικής πυκνότητας των στελεχών D30 και D31 με τη χρήση πρωτοκόλλου αραιώσεων 15% και θρεπτικού μέσου Nutrileaf plus 2x.

Πίνακας 14: Μεταβολές κυτταρικής πυκνότητας και παραγωγικότητας β-καρωτενίου των στελεχών D30 και D31 με τη χρήση πρωτοκόλλου αραιώσεων 15% με τη χρήση θρεπτικού μέσου Nutrileaf plus 2x.

strain	D30	D31
salinity	120ppt	120ppt
initial cells/ml	9,54E+05	1,20E+06
final cells/ml	6,36E+05	9,90E+05
culture days	10	10
μ(d-1)		
b-carotene % DW	15,82	9,88
b-carotene mg/L	16,2	18,2
b-carotene pg/cell	2,55E+01	1,84E+01
b-carotene mg/L/day	1,62	1,82

Το πρωτόκολλο δύο φάσεων με τη χρήση έλλειψης αζώτου έδωσε αποτελέσματα τα οποία ήταν συγκρίσιμα με εκείνα που ελήφθησαν στα πειράματα έλλειψης αζώτου τόσο για το στέλεχος D30 (1,36 – 1,74 mg/L/day σε συγκέντρωση αζώτου 0% και 1,29 – 1,64 mg/L/day σε συγκέντρωση αζώτου 25%) όσο και για το στέλεχος D31 (1,15 – 1,7 mg/L/day σε συγκέντρωση αζώτου 0% και 1,29 – 1,8 mg/L/day σε συγκέντρωση αζώτου 25%). Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο μπορεί να αποδόσει επομένως σημαντική ποσότητα β-καρωτενίου και για τα δύο μελετούμενα στελέχη. Αντιστοίχως καλά αποτελέσματα έδωσε και το πρωτόκολλο σταθερών ημερήσιων αραιώσεων. Για το στέλεχος D30 οι τιμές ήταν 1,2 mg/L/day και 1,6 mg/L/day για ημερήσια αραιώση 10% και 15% αντιστοίχως ενώ για το στέλεχος D31 οι τιμές ήταν 1,76 mg/L/day και 1,82 mg/L/day.

Τα δύο πρωτόκολλα επομένως έδωσαν συγκρίσιμα αποτελέσματα τόσο μεταξύ τους όσο και με τα πειράματα μικρότερης κλίμακας που είχαν προηγηθεί.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Ανασκόπηση της πειραματικής διαδικασίας

Στα πρώτα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, εκτιμήθηκε η παραγωγή β-καρωτενίου σε καλλιέργειες όγκου 250 mL στα οκτώ μελετηθέντα στελέχη. Κάθε στέλεχος καλλιεργήθηκε σε τέσσερα θρεπτικά μέσα, τα στελέχη D2 και D32 σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του κάθε μέσου (x1, x2, x3), ενώ τα υπόλοιπα έξι στελέχη μόνο στη διπλάσια από την τυπική συγκέντρωση καθώς εμφάνιζε τα καλύτερα ή παρεμφερή αποτελέσματα με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Οι τιμές των Ελληνικών στελεχών είναι εξαιρετικά ενθαρρυντικές και ιδίως για τα D31 (6-14 mg/L), D32 (7,8-9,7 mg/L), D30 (5,5 – 9,8 mg/L) τα οποία διακρίθηκαν, στα πλέον επιτυχή θρεπτικά μέσα.

Τα τρία αυτά στελέχη (D30, D31, D32) είναι αυτά που επιλέχθηκαν για περαιτέρω πειραματισμό. Αρχικά και τα τρία στελέχη καλλιεργήθηκαν σε φωτοβιοαντιδραστήρα όγκου 20L με τη χρήση θρεπτικού μέσου Nutrileaf (+) ώστε να επαληθευτούν τα αποτελέσματα τα οποία ελήφθησαν στις μικρές καλλιέργειες και σε καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου. Οι τιμές είναι συγκρίσιμες με αυτές του προηγούμενου πειράματος στην περίπτωση των D30 (0,64 mg/L/day έναντι 0,674 mg/L/day στο πρώτο πείραμα) και D32 (0,555 mg/L/day έναντι 0,57 mg/L/day στο πρώτο πείραμα), ενώ στην περίπτωση του D31 (0,83 mg/L/day έναντι 0,508 mg/L/day στο πρώτο πείραμα) παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της παραγωγικότητας.

Στη συνέχεια έγιναν προσπάθειες έτσι ώστε να μεγιστοποιηθεί, όσο αυτό ήταν δυνατόν, η παραγωγικότητα των στελεχών αυτών. Η πιο κοινή λύση είναι η χρήση παραγόντων καταπόνησης όπως αναφέρθηκε και στο αντίστοιχο τμήμα της εισαγωγής της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Με δεδομένο ότι οι αλλαγές στους παράγοντες που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να μπορούν να εφαρμοστούν με τη μεγαλύτερη δυνατή ευκολία και το μικρότερο δυνατό κόστος σε συστήματα μεγάλης κλίμακας, επιλέχθηκαν η αύξηση της αλατότητας και η συγκέντρωση αζώτου στο θρεπτικό μέσον. Η αύξηση της αλατότητας δεν έφερε τα αναμενόμενα αποτελέσματα καθώς παρατηρήθηκε σημαντικά χαμηλότερη παραγωγικότητα από τις τιμές αναφοράς και στα τρία μελετηθέντα στελέχη (D30→ 0,25 mg/L/day, D31→0,28 mg/L/day, D32→0,13 mg/L/day). Η χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου στο θρεπτικό μέσον (0%, 25%, 50%, 75%, 100%) σε αντίθεση με την αύξηση της αλατότητας προκάλεσε μεγάλη αύξηση στην παραγωγικότητα σε β καροτένιο στα στελέχη D30 (1,67 mg/L/day έναντι 0,674 mg/L/day στο πρώτο πείραμα) και D31 (1,76 mg/L/day έναντι 0,508 mg/L/day στο πρώτο πείραμα) ενώ δεν είχε αντίστοιχα καλά αποτελέσματα στο στέλεχος D32 (0,24 mg/L/day έναντι 0,57 mg/L/day στο πρώτο πείραμα).

Τα αποτελέσματα των ανωτέρω πειραμάτων είναι αρκετά ελπιδοφόρα για τη βιομηχανική εκμετάλλευση των εν λόγω στελεχών και επομένως κρίθηκε σκόπιμο να αναπτυχθεί ένα βιώσιμο πρωτόκολλο για την παραγωγή β-καρωτενίου σε

καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας και δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις: το πρωτόκολλο ημερήσιων σταθερών αραιώσεων και το πρωτόκολλο δύο φάσεων.

Το πρωτόκολλο δύο φάσεων με τη χρήση έλλειψης αζώτου έδωσε αποτελέσματα τα οποία ήταν συγκρίσιμα με εκείνα που ελήφθησαν στα πειράματα έλλειψης αζώτου τόσο για το στέλεχος D30 (1,36 – 1,74 mg/L/day σε συγκέντρωση αζώτου 0% και 1,29 – 1,64 mg/L/day σε συγκέντρωση αζώτου 25%) όσο και για το στέλεχος D31 (1,15 – 1,7 mg/L/day σε συγκέντρωση αζώτου 0% και 1,29 – 1,8 mg/L/day σε συγκέντρωση αζώτου 25%). Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο μπορεί να αποδόσει επομένως σημαντική ποσότητα β-καρωτενίου και για τα δύο μελετηθέντα στελέχη. Αντίστοιχα καλά αποτελέσματα έδωσε και το πρωτόκολλο σταθερών ημερήσιων αραιώσεων. Για το στέλεχος D30 οι τιμές ήταν 1,2 mg/L/day και 1,6 mg/L/day για ημερήσια αραιώση 10% και 15% αντιστοίχως ενώ για το στέλεχος D31 οι τιμές ήταν 1,76 mg/L/day και 1,82 mg/L/day. Τα δύο πρωτόκολλα επομένως έδωσαν συγκρίσιμα αποτελέσματα τόσο μεταξύ τους όσο και με τα πειράματα μικρότερης κλίμακας που είχαν προηγηθεί.

4.2 Επίδραση της σύστασης των θρεπτικών μέσων στην ανάπτυξη των καλλιιεργειών και στη συσσώρευση β-καρωτενίου

Σε αυτά τα αρχικά πειράματα έγινε η επιλογή του καταλληλότερου θρεπτικού μέσου σε συνδυασμό με τα πιο υποσχόμενα στελέχη. Το θρεπτικό μέσο που επιλέχθηκε ήταν το Nutrileaf plus το οποίο βασίζεται σε εμπορικό λίπασμα τύπου NPK με την προσθήκη διττανθρακικού νατρίου και το οποίο συνδιάζει το χαμηλό κόστος, με την ευκολία παραγωγής και τα θετικά αποτελέσματα στην παραγωγικότητα των μελετηθέντων στελεχών (εμφανίζει τον καλύτερο συνδυασμό κυτταρικής ανάπτυξης και συσσώρευσης β-καρωτενίου). Τα εμπορικά λιπάσματα τύπου NPK χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραγωγή φυτοπλαγκτού με πολύ θετικά αποτελέσματα (Garcia-Gonzalez et al. 2003, Simental and Sanchez-Saavedra 2003 Nguyen et al. 2014, Tran et al. 2014). Οι Tran et al. (2014) με τη χρήση εμπορικού λιπάσματος NPK αύξησαν τόσο τη συγκέντρωση σε β-καρωτενίου όσο και την κυτταρική πυκνότητα της καλλιέργειας κατά περίπου 50% σε σχέση με τη χρήση θρεπτικού μέσου χωρίς την προσθήκη λιπάσματος (2×10^6 cells/ml αντι για $1,4 \times 10^6$ cells/ml και 6 mg β-καρωτενίου/ml καλλιέργειας αντί για 4 mg β-καρωτενίου/ml καλλιέργειας). Οι Nguyen et al. (2014) παρατήρησαν ότι ενώ η προσθήκη εμπορικού λιπάσματος στο θρεπτικό μέσον δεν είχε σημαντική επίπτωση στην παραγωγή β-καρωτενίου των χρησιμοποιηθέντων στελεχών, οδήγησε σε υπερδιπλασιασμό της κυτταρικής πυκνότητας της καλλιέργειας ($2,78 \times 10^6$ cells/ml έναντι $1,28 \times 10^6$ cells/ml).

Επιπροσθέτως, το Nutrileaf plus είναι το μέσον που διαθέτει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φωσφόρου από τα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία. Αρκετές εργασίες υποδεικνύουν τη σημασία της συγκέντρωσης του φωσφόρου στη σωστή ανάπτυξη της καλλιέργειας (Singh et al. 2000, Gomez et al. 2003, Abu-Rezq et al. 2010). Οι Singh et al. (2000) ανέδειξαν τη σημασία του φωσφόρου καθώς καλλιέργειες πλούσιες σε φώσφορο επέδειξαν 2.3 φορές

μεγαλύτερη κυτταρική συγκέντρωση σε σχέση με τις καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Παρεμφερή αποτελέσματα παρουσίασαν και οι Abu-Rezq et al. (2010), στην εργασία των οποίων η κυτταρική πυκνότητα καλλιεργειών πλούσιων σε φώσφορο ήταν αισθητά αυξημένη σε σχέση με αυτή που εμφάνιζαν καλλιέργειες με μικρές συγκεντρώσεις φωσφόρου ($2,9 \times 10^6$ cells/ml έναντι $2,4 \times 10^6$ cells/ml). Οι Gomez et al. (2003) ανέδειξαν τη σημασία του φωσφόρου και στη συσσώρευση των καρωτενοειδών καθώς για αλατότητα 120 ‰ η συγκέντρωση των καρωτενοειδών αυξήθηκε από 10,8 mg ολικών καρωτενοειδών/ml καλλιέργειας σε 12,9 mg ολικών καρωτενοειδών/ml καλλιέργειας με τη χρήση θρεπτικού μέσου που περιείχε δεκαπλάσιο φώσφορο. Η διαφορά αυτή έγινε ακόμη μεγαλύτερη σε αυξημένη αλατότητα (180 ‰) όπου η συγκέντρωση των καρωτενοειδών αυξήθηκε από 12,9 mg ολικών καρωτενοειδών/ml καλλιέργειας σε 29,5 mg ολικών καρωτενοειδών/ml καλλιέργειας με τη χρήση του ίδιου θρεπτικού μέσου.

Τέλος πολύ σημαντική κρίνεται η προσθήκη διττανθρακικού νατρίου στο Nutrileaf plus ως πηγή CO₂ για την ενίσχυση της φωτοσύνθεσης και ως επακόλουθο της παραγωγικότητας, αλλά και ως μέσον μείωσης των υψηλών τιμών pH που παρατηρούνται στις καλλιέργειες (Gardner et al. 2012, White et al. 2013). Οι Ramachandran et al. (2018) παρατήρησαν ότι σε θρεπτικά μέσα που στερούνται αζώτου, η προσθήκη διττανθρακικού νατρίου προκάλεσε διπλασιασμό της συγκέντρωσης του β-καρωτενίου που συσσωρεύσαν τα κύτταρα.

4.3 Καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας

Τα αποτελέσματα των αρχικών πειραμάτων ήταν ιδιαιτέρως ελπιδοφόρα ειδικά στις περιπτώσεις των πιο παραγωγικών στελεχών (D30, D31 και D32). Ωστόσο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η χρήση των στελεχών σε μαζικές καλλιέργειες σε συστήματα μεγάλης κλίμακας για βιομηχανική εκμετάλλευσή τους. Επομένως κρίθηκε αναγκαίο, τα στελέχη αυτά να δοκιμαστούν και σε καλλιέργειες σε φωτοβιοαντιδραστήρες έτσι ώστε να επαληθευτούν τα αποτελέσματα από τα πειράματα μικρής κλίμακας. Τα αποτελέσματα των δύο πειραμάτων είναι συγκρίσιμα στην περίπτωση των D30 (0,64 mg/L/day έναντι 0,674 mg/L/day στο πρώτο πείραμα) και D32 (0,555 mg/L/day έναντι 0,57 mg/L/day στο πρώτο πείραμα) ενώ στην περίπτωση του D31 (0,83 mg/L/day έναντι 0,508 mg/L/day στο πρώτο πείραμα) παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της παραγωγικότητας επιβεβαιώνοντας την ορθότητα των αποτελεσμάτων των αρχικών πειραμάτων.

4.4 Χρήση παραγόντων καταπόνησης

Ο πρώτος παράγοντας καταπόνησης ο οποίος δοκιμάστηκε ήταν η αύξηση της αλατότητας της καλλιέργειας. Η αυξημένη αλατότητα αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους και πιο διαδεμένους παράγοντες καταπόνησης που χρησιμοποιούνται για την αύξηση της παραγωγής β-καρωτενίου από στελέχη *Dunaliella salina* (Ben-Amotz et al. 1983, Borowitzka et al. 1990, Cifuentes et al. 1996, Gomez et al. 2003, Pisal et al. 2005). Οι Borowitzka et al. (1990) ανέπτυξαν τρία στελέχη σε καλλιέργειες με αλατότητα 50 ‰ και στη συνέχεια τα μετέφεραν σε καλλιέργειες με αλατότητες 100 ‰, 150 ‰ και 200 ‰.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση της αλατότητας σε 100 ‰ και 150 ‰ δεν επέφερε καμία αλλαγή στη συσσώρευση β-καρωτενίου από τα μελετούμενα στελέχη. Ωστόσο η αύξηση της αλατότητας σε 200 ‰ οδήγησε σε σχεδόν διπλασιασμό της συγκέντρωσης του συσσωρευμένου β-καρωτενίου από το σύνολο των στελεχών. Οι Pisal et al. (2005) παρατήρησαν ότι το στέλεχος που μελέτησαν, σε αλατότητες 180 ‰ και 240 ‰ συσσωρεύει υπερδιπλάσιες ποσότητες β-καρωτενίου (4,1 pg/cell και 5,6 pg/cell αντίστοιχως) σε σχέση με τα αποτελέσματα των καλλιεργειών που αναπτύχθηκαν σε αλατότητες 60 ‰ και 120 ‰ (1,9 pg/cell και 2,1 pg/cell αντίστοιχα). Οι Sifuentes et al. (1996) επίσης κατέδειξαν ότι σημαντική διαφοροποίηση στη συγκέντρωση β-καρωτενίου στο στέλεχος που μελέτησαν άρχισε να παρατηρείται σε αλατότητες μεγαλύτερες του 150 ‰. Αντιθέτως, οι Orset et al. (1999) δεν παρατήρησαν αξιοσημείωτες αλλαγές στη συγκέντρωση του μελετούμενου στελέχους σε β-καρωτένιο σε ένα εύρος αλατοτήτων από 50 ‰ έως και 190 ‰. Παρόμοια αποτελέσματα εμφάνισε και η έρευνα των Gomez et al. (2003) καθώς το στέλεχος το οποίο χρησιμοποίησαν δεν επέδειξε αξιοσημείωτη αλλαγή στη συσσώρευση β-καρωτενίου στις τρεις διαφορετικές αλατότητες όπου καλλιεργήθηκε (60 ‰, 120 ‰ και 240 ‰). Τα στελέχη που χρησιμοποιήσαμε σε αυτό το πείραμα επίσης δεν επέδειξαν σημαντική διαφοροποίηση στη συγκέντρωσή τους σε β-καρωτένιο ενώ και τα αποτελέσματα που είχαμε στα στελέχη D30 και D31 είναι μικρότερα από τα αποτελέσματα που λάβαμε για τα συγκεκριμένα στελέχη στα πειράματα όπου δεν χρησιμοποιήσαμε κάποιον παράγοντα καταπόνησης. Ενδεικτικά για τα στελέχη D30 και D31 η δοκιμή με αύξηση της αλατότητας από 120 ‰ σε 180 ‰, η οποία έδωσε και τα καλύτερα αποτελέσματα, οδήγησε σε συγκεντρώσεις β-καρωτενίου 13,2 pg/cell και 11,5 pg/cell αντίστοιχως έναντι 17,3 pg/cell και 15,3 pg/cell στα αρχικά πειράματα χωρίς την επίδραση κάποιου περιοριστικού παράγοντα. Σε αντίθεση με τα δύο αυτά στελέχη, το στέλεχος D32 επέδειξε αύξηση της συγκέντρωσής του σε β-καρωτένιο κατά 70 % στην πιο ακραία αύξηση αλατότητας (από 120 ‰ σε 180 ‰) σε σχέση με τα πειράματα μηδενικής καταπόνησης. Ωστόσο, και τα τρία στελέχη παρουσίασαν πολύ περιορισμένη αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας των καλλιεργειών τους οδηγώντας σε χαμηλή παραγωγικότητα σε β-καρωτένιο. Η βιβλιογραφία παρουσιάζει αρκετές περιπτώσεις μελετών όπου η αύξηση της αλατότητας δεν οδηγεί σε αξιοσημείωτη αύξηση της παραγωγής β-καρωτενίου με τα αποτελέσματα αυτά να ερμηνεύονται κυρίως με τις ιδιαιτερότητες των μελετούμενων στελεχών και την ανθεκτικότητά τους σε αύξηση της αλατότητας του περιβάλλοντός τους (Orset et al. 1999, Gomez et al. 2003). Ωστόσο στην περίπτωση των στελεχών μας δεν μπορούμε να είμαστε απολύτως βέβαιοι ότι ισχύει κάτι παρόμοιο καθώς στη συντριπτική πλειοψηφία των μελετών χρησιμοποιήθηκαν αρκετά πιο ακραίες αλλαγές στην αλατότητα από διαφορές της τάξης των 20 ‰, 40 ‰ και 60 ‰ που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα εργασία. Ενδεικτικά όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως οι Borowitzka et al. (1990) χρησιμοποίησαν αύξηση της αλατότητας κατά 50 ‰, 100 ‰ και 150 ‰ και οι Pisal et al. (2005) 60 ‰, 120 ‰ και 180 ‰. Επομένως εάν δεν χρησιμοποιήσουμε μεγαλύτερη αύξηση της αλατότητας για τα υπό μελέτη στελέχη δεν μπορούμε να είμαστε απολύτως σίγουροι εάν τα αποτελέσματα που λάβαμε οφείλονται στη φυσιολογία των συγκεκριμένων

στελεχών, σε ανεπαρκή καταπόνησή τους ή ακόμη και σε συνδιασμό των δύο αυτών παραγόντων.

Μαζί με την αύξηση της αλατότητας ο παράγοντας που χρησιμοποιείται περισσότερο για την καταπόνηση των κυττάρων στις μαζικές καλλιέργειες και είναι ένας απο τους πιο καλά μελετημένους είναι η στέρηση αζώτου στο χρησιμοποιούμενο θρεπτικό μέσον (Ben-Amotz 1999, Phadwal and Singh, 2003). Ως εκ τούτου επιλέχθηκε ως παράγοντας καταπόνησης και στην παρούσα εργασία. Οι Marin et al. (1998) χρησιμοποίησαν τρία διαφορετικά θρεπτικά μέσα όσον αφορά στη συγκέντρωση αζώτου που περιείχαν (882, 435 και 212 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{N}$) και μελέτησαν την επίδρασή τους τόσο στη συνολική παραγωγή β-καρωτενίου όσο και στη συγκέντρωση των κυττάρων σε β-καρωτένιο. Τα αποτελέσματα στα οποία κατέληξαν δεν έδειξαν κάποια αξιόλογη διαφοροποίηση στη συνολική παραγωγή β-καρωτενίου ανάμεσα στα τρία διαφορετικά θρεπτικά, ωστόσο παρατηρήθηκε μεγάλη διαφορά ανάμεσα στη συγκέντρωση των κυττάρων σε β-καρωτένιο (0.4, 0.8 και 1.1 pg/cell αντίστοιχα για τα τρία θρεπτικά με σειρά μειούμενης συγκέντρωσης σε άζωτο). Οι Pisal et al. (2005) κατάφεραν με τη χρήση θρεπτικού μέσου χωρίς άζωτο να αυξήσουν τη συγκέντρωση του στελέχους που μελέτησαν σε β-καρωτένιο κατά 300% (από 2 pg/cell σε 6 pg/cell). Οι Lamers et al. (2012) κατάφεραν να αυξήσουν το ποσοστό του β-καρωτενίου από 0,75 % του ξηρού βάρους σε καλλιέργειες με πλήρες άζωτο σε 2,7 % του ξηρού βάρους με τη χρήση θρεπτικού μέσου χωρίς άζωτο. Στην περίπτωση της παρούσας εργασίας, τα στελέχη D30 και D31 εμφάνισαν μικρή αύξηση τόσο της συγκέντρωσης β-καρωτενίου στο κύτταρο όσο και στο ποσοστό του β-καρωτενίου στο ξηρό βάρος. Ενδεικτικά, για το στέλεχος D30 η συγκέντρωση του β-καρωτενίου στα κύτταρα αυξήθηκε από 17,3 pg/cell σε 20,2 pg/cell και το ποσοστό του β-καρωτενίου στο ξηρό βάρος αυξήθηκε από 10,75% σε 12,7%. Για το στέλεχος D31 οι αντίστοιχες τιμές αυξήθηκαν από 15,3 pg/cell σε 16,7 pg/cell και από 8,22 % σε 8,84 %. Ωστόσο, το γεγονός που εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι ότι λόγω της ικανοποιητικής αύξησης της κυτταρικής πυκνότητας αλλά και της πολύ ταχείας συσσώρευσης β-καρωτενίου, στην περίπτωση του στελέχους D30 η παραγωγικότητα υπερδιπλασιάστηκε (από 0,674 mg/L/day σε 1,67 mg/L/day) και στην περίπτωση του στελέχους D31 υπερτριπλασιάστηκε (από 0,508 mg/L/day σε 1,76 mg/L/day). Την αντίθετη εικόνα εμφάνισε το στέλεχος D32. Η μείωση της κυτταρικής πυκνότητας λόγω της ισχυρής καταπόνησης από την έλλειψη αζώτου οδήγησε σε χαμηλότερη παραγωγικότητα συγκρινόμενη με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν χωρίς καταπόνηση του εν λόγω στελέχους (από 0,555 mg/L/day σε 0,24 mg/L/day). Η μεγάλη αυτή καταπόνηση ωστόσο οδήγησε σε σχεδόν τετραπλάσια συγκέντρωση β-καρωτενίου στο κύτταρο (από 4,57 pg/cell σε 17,3 pg/cell) και σχεδόν τετραπλάσιο ποσοστό του β-καρωτενίου στο ξηρό βάρος (από 2,51 % σε 9,52%). Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν σοβαρή ένδειξη επιτυχούς καταπόνησης και των τριών στελεχών με τις μεγαλύτερες επιπτώσεις να εμφανίζονται στο στέλεχος D32, σε τέτοιο βαθμό που επηρεάζεται αρνητικά η παραγωγικότητα του συγκεκριμένου στελέχους σε αντίθεση με τα άλλα δύο χρησιμοποιηθέντα στελέχη.

4.5 Ανάπτυξη πρωτοκόλλων παραγωγής β καρωτενίου

Τα δύο χρησιμοποιηθέντα πρωτόκολλα ήταν τα πιο διαδεδομένα στη βιομηχανική καλλιέργεια του είδους *Dunaliella salina*, το πρωτόκολλο δύο σταδίων και της ημισυνεχούς καλλιέργειας (Richmond et al. 1993, Michael 1999, Hejazi et al. 2003). Οι Zhu et al. (2008) με τη χρήση ημερήσιων διαδοχικών αραιώσεων ποσοστών 10 και 15 % του συνολικού όγκου της καλλιέργειας κατάφεραν να επιτύχουν παραγωγή β-καρωτενίου της τάξης των 17 και 30 mg/L αντιστοίχως. Οι Garcia-Gonzalez et al. (2005) χρησιμοποίησαν αραιώσεις της καλλιέργειάς τους κάθε 4 ημέρες σε ποσοστό περίπου 50 % έτσι ώστε η κυτταρική πυκνότητα της καλλιέργειας να μειώνεται σε 2×10^6 cells/ml στην αρχή κάθε κύκλου. Η καλλιέργεια που απομακρυνόταν είχε κυτταρική πυκνότητα περίπου 4×10^6 cells/ml, συγκέντρωση β-καρωτενίου 20 mg/L καλλιέργειας και τα κύτταρα περιείχαν β-καρωτένιο σε ποσοστό 4 % του ξηρού βάρους. Οι Prieto et al. (2011) χρησιμοποίησαν τόσο ημισυνεχή καλλιέργεια όσο και το πρωτόκολλο δύο σταδίων με τη χρήση θρεπτικού μέσου χωρίς άζωτο. Για το πρωτόκολλο ημισυνεχούς καλλιέργειας, η καλλιέργεια ξεκινούσε με κυτταρική πυκνότητα ίση με 3×10^6 cells/ml και όταν μετά την πάροδο 5 ημερών έφτανε σε επίπεδα ίσα με 9×10^6 cells/ml αραιωνόταν ώστε να ξεκινήσει ένας καινούργιος κύκλος. Η μέση παραγωγικότητα σε β-καρωτένιο ήταν 50 mg/l καλλιέργειας και τα κύτταρα περιείχαν β-καρωτένιο σε ποσοστό 5-6 % του ξηρού βάρους. Για το πρωτόκολλο των δύο φάσεων η καλλιέργεια αφέθηκε να αναπτυχθεί κάτω από ιδανικές συνθήκες έως ότου η κυτταρική πυκνότητα φτάσει τα 5×10^6 cells/ml και στη συνέχεια αραιωνόταν κατά το ήμισυ με θρεπτικό μέσο χωρίς την προσθήκη αζώτου. Η περιεκτικότητα σε β-καρωτένιο με τη μέθοδο αυτή αυξήθηκε σε 82 mg/L καλλιέργειας και το β-καρωτένιο αποτελούσε το 10 % του ξηρού βάρους της καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δεν έδειξαν μεγάλες διαφορές τόσο ανάμεσα στα δύο διαφορετικά πρωτόκολλα όσο και ανάμεσα στα δύο στέλεχη. Για το πρωτόκολλο ημερήσιων αραιώσεων τα καλύτερα αποτελέσματα έδωσε η αραιώση σε ποσοστό 15 % του όγκου της καλλιέργειας τόσο για το στέλεχος D30 (1,62 mg b-carotene/L/day, 16,2 mg b-carotene/L και το β-καρωτένιο αποτελούσε το 15,82 % του ξηρού βάρους) όσο και για το D31 (1,82 mg b-carotene/L/day, 18,2 mg b-carotene/L και το β-καρωτένιο αποτελούσε το 9,88 % του ξηρού βάρους).

Για το πρωτόκολλο των δύο σταδίων τόσο το στέλεχος D30 (1,42 mg b-carotene/L/day, 12,9 mg β-carotene/L και το β-καρωτένιο αποτελούσε το 8 % του ξηρού βάρους) όσο και το στέλεχος D31 (1,53 mg β-carotene/L/day, 10,5 mg β-carotene/L και το β-καρωτένιο αποτελούσε το 8% του ξηρού βάρους) έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα σε συγκέντρωση αζώτου 25% χωρίς ωστόσο οι διαφοροποιήσεις με τη συγκέντρωση αζώτου 0% να είναι μεγάλες.

Εάν συγκρίνουμε τα αποτελέσματά μας με αυτά των παραπάνω εργασιών παρατηρούμε ότι ενώ οι τιμές στην παραγωγικότητα σε β-καρωτένιο είναι μικρότερες, το ποσοστό του β-καρωτενίου στο ξηρό βάρος είναι σαφώς μεγαλύτερο. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στις κατά πολύ μεγαλύτερες κυτταρικές

πυκνότητες που επιτυγχάνονται σε αυτές τις εργασίες (από 2 έως και 10 φορές μεγαλύτερες). Οι κύριοι λόγοι που οδηγούν σε αυτή τη διαφοροποίηση είναι οι διαφοροποιήσεις σε σημαντικούς, για την ανάπτυξη των κυττάρων, παράγοντες όπως είναι η θερμοκρασία και η ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας. Ενδεικτικά, οι Zhu et al. (2008) χρησιμοποίησαν σαφώς αυξημένη θερμοκρασία (35 °C) και τριπλάσια ένταση φωτεινής ακτινοβολίας (180 $\mu\text{mol photons sec}^{-1} \text{ m}^{-2}$), οι Garcia-Gonzalez et al. (2005) τετραπλάσια ένταση ακτινοβολίας (255 $\mu\text{mol photons sec}^{-1} \text{ m}^{-2}$) και χρήση CO₂ για τον έλεγχο του pH της καλλιέργειας. Επίσης, οι Prieto et al. (2011), οι οποίοι εμφάνισαν και τις μεγαλύτερες τιμές, χρησιμοποίησαν πολύ μεγαλύτερη ένταση ακτινοβολίας (500 $\mu\text{mol photons sec}^{-1} \text{ m}^{-2}$), σταθερή προσθήκη αέριου CO₂ για έλεγχο του pH της καλλιέργειας και πολύ μεγαλύτερη κυτταρική πυκνότητα αρχικού εμβολίου ($1,5 \times 10^6$ cells/ml). Τέλος είναι επίσης πιθανόν, η παραγωγικότητα των στελεχών μας να υποτιμάται λόγω της μη ολικής εκχύλισης του β-καρωτενίου καθώς και οι τρεις προαναφερθείσες εργασίες χρησιμοποιούν αρκετά πιο εκλεπτυσμένες τεχνικές εκχύλισης χωρίς τη χρήση φίλτρων μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο πιθανή κατακράτηση β-καρωτενίου.

4.6 Αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσας εργασίας έχουν αναλυθεί σε μεγάλη έκταση σε προηγούμενα κομμάτια και έχουν συγκριθεί με αρκετά αποτελέσματα από άλλες εργασίες της διαθέσιμης βιβλιογραφίας. Ωστόσο κρίνεται απαραίτητη μία συνολική σύγκριση των αποτελεσμάτων μας με σύγχρονες μελέτες, οι οποίες χρησιμοποίησαν παρεμφερείς συνθήκες καλλιέργειας με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 15) επιβεβαιώνεται η πολύ θετική εικόνα που έχει σχηματιστεί για τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Είναι ενδεικτικό ότι η πλειοψηφία των στελεχών έδωσε καλύτερα αποτελέσματα από την πλειοψηφία των ερευνών που παρατίθενται στις αντίστοιχες συνθήκες, με τα στελέχη D30 και D31 να συσσωρεύουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις β-καρωτενίου και να υπερβαίνουν τα 15 mg/L, τιμή που είναι η μεγαλύτερη από τις εργασίες που αναφέρονται παρακάτω (Rad et al. 2011)

Πίνακας 15: Βιβλιογραφική ανασκόπηση τιμών παραγωγής βιομάζας και περιεχομένου β-καρωτενίου σε στελέχη *Dunaliella*

Reference	Strain	Conditions	Medium	Cell density cells/ml	b-carotene mg/L
Ben Amotz & Avron (1983)	<i>D. salina</i>	Salinity 210‰ Continuous light (5-550 kergs/cm s)	Custom(?)	$4,4 \times 10^8$	4,92
Rad et al (2011)	<i>D. salina</i> (from Lake Urmia)	Salinity 60‰, 120‰, 180‰ 100 $\mu\text{mol photons/m.s}$ 25°C	Modified Johnson's	$1,68 \times 10^8$	15,02
Erneish (2012)	<i>D. salina</i> (from Dead Sea)		Modified Johnson's	5×10^8	
AbuSara et al (2011)	<i>D. salina</i> (from Dead Sea)	Salinity 250‰ 61 $\mu\text{mol photons/m.s}$ 25°C	Custom (M1)	$6,5 \times 10^8$	5,2
Trung & Tran (2014)	<i>D. salina</i> 19/18 CCAP	Salinity 90‰, 120‰ 50 $\mu\text{mol photons/m.s}$ 25°C	Custom (MD4)	9×10^8	5
Taha et al (2012)	<i>D. salina</i> (from Egypt wetlands)	Salinity 150‰ 22,5 x 10 ³ Lux 28°C	MH medium	1×10^8	2,46
Pisal & Lele (2011)	<i>D. salina</i> 19.3 SAG	Salinity 150‰ 2300 Lux 25°C	Custom	$1,91 \times 10^8$	5,2
Dipak S Pisal and S S Lele (2005)	<i>D. salina</i>	Salinity 120‰, 1200 lux 25°C	Custom (N depleted)	$1,5 \times 10^8$	10,57

Η σύγκριση αυτή αναδεικνύει ακόμη πιο ανάγλυφα τη σημασία των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας για μελλοντική χρήση των συγκεκριμένων στελεχών σε βιομηχανική εκμετάλλευσή τους για την παραγωγή β-καρωτενίου.

4.7 Μελλοντικές προοπτικές

Η εργασία αυτή μπορεί να αποτελέσει έναυσμα για μια σειρά μελλοντικών ερευνητικών προοπτικών με εστίαση:

- Στην έρευνα περισσότερων ελληνικών στελεχών για την απόδοσή τους στην παραγωγή καρωτενοειδών.
- Στην περαιτέρω διερεύνηση παραγόντων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αύξηση της παραγωγής β-καρωτενίου.
- Στην έρευνα για τον μηχανισμό παραγωγής και συσσώρευσης καρωτενοειδών σε μοριακό επίπεδο.
- Στη γενετική τροποποίηση στελεχών με στόχο τη μεγαλύτερη δυνατή συσσώρευση εμπορεύσιμων καρωτενοειδών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας επετεύχθη ο έλεγχος επτά ελληνικών στελεχών του γένους *Dunaliella* ως προς την παραγωγικότητά τους σε β-καρωτένιο.

- 1) Τα αποτελέσματα των ελληνικών στελεχών είναι συγκρίσιμα και σε πολλές περιπτώσεις αρκετά πλεονεκτικότερα από αντίστοιχα της βιβλιογραφίας.
- 2) Τα στελέχη D31 και D32 είχαν τα καλύτερα αποτελέσματα τόσο στις καλλιέργειες μεγαλύτερης κλίμακας όσο και στις καλλιέργειες με τη χρήση παραγόντων καταπόνησης.
- 3) Τα αποτελέσματα των στελεχών αυτών από την ανάπτυξη των πειραματικών πρωτοκόλλων αφήνουν πολλές ελπίδες για τη χρήση τους σε βιομηχανικό επίπεδο αλλά και για την περαιτέρω αύξηση της παραγωγικότητάς τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abu-Rezq, T.S., Al-Hooti, S.N., & Jacob, D.A. (2010). Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*.
- Becker E.W. (1988). Micro-algae for human and animal consumption. In Borowitzka M. A. and Borowitzka L. J. (ed.), Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge. p. 222–256
- Ben-Amotz A. & Avron M. (1983). On the Factors Which Determine Massive beta-Carotene Accumulation in the Halotolerant Alga *Dunaliella bardawil*. Plant. Physiol., 72(3): 593-597
- Ben-Amotz (1993) Production of β -carotene and vitamins by the halotolerant alga *Dunaliella*. In: Attaway DH, Zaborsky OR (eds.). Marine biotechnology volume 1: pharmaceutical and bioactive natural products. Plenum Press, New York, pp: 411-417.
- Ben-Amotz A (1995) New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. J Appl Phycol 7: 65-68.
- Bornet B., Antoine E., Bardouil M., Baut M.C. (2004). ISSR as new markers for genetic characterization and evaluation of relationships among phytoplankton. J Appl Phycol. 2004;16:285–290.
- Borowitzka M, Borowitzka L (1988) *Dunaliella*. In: M Borowitzka, L Borowitzka (eds.). Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, pp: 27-58.
- Borowitzka, L.J. and Borowitzka, M.A. (1989) b-carotene (provitamin A) production with algae. In Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors ed. Vandamme, E.J. pp. 15–26. London: Elsevier Applied Science
- Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. & Kessly, D. J. 1990. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. J Appl Phycol 2: 111
- Borowitzka LJ (1992) Commercial *Dunaliella* production: history of development. In: Villa TG, Abalde J (eds) Profiles on biotechnology: servicio de publicaciones, Universidad Santiago de Compostela, A Coruna pp 235–245
- Borowitzka MA (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. J Biotechnol 70: 313-321.
- Borowitzka, M.J. & Siva, C.J. (2007). The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. Journal of Applied Phycology 19: 567-590.

- Buchheim M.A., Kirkwood A.E., Buchheim J.A., Verghese B., Henly W.J.(2010). Hypersaline soil supports a diverse community of *Dunaliella* (Chlorophyceae) J Phycol. 2010;46:1038–1047.
- Çelekli A. & Dönmez G. (2006). Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and b-carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. World J. Microbiol. Biotech., 22: 183-189
- Chaumont D (1993) Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. J Appl Phycol 5:593–604
- Chen Y-C (2007) Immobilization of twelve benthic diatom species for long-term storage and as feed for post-larval abalone *Haliotis diversicolor*. Aquaculture 263(1–4):97–106
- Choi, S. K., Harada, H., Matsuda, S., & Misawa, N. (2007). Characterization of two β -carotene ketolases, CrtO and CrtW, by complementation analysis in *Escherichia coli*. Applied microbiology and biotechnology, 75(6), 1335-1341.
- Cifuentes A., Gonzalez M., Conejeros M., Dellarosa V., Parra O. (1992). Growth and carotenogenesis in eight strains of *Dunaliella salina* Teodoresco from Chile. J Appl Phycol 4: 111-118.
- Cifuentes A., Gonzalez M., Parra O. (1996). The effect of salinity on the growth and carotenogenesis in two Chilean strains of *Dunaliella salina* Teodoresco. Biol Res 29: 227-236.
- Coesel, S.N., Baumgartner, A.C., Teles, L.M., Ramos, A.A., Henriques, N.M., Cancela, L., Varela, J.C.S., (2008). Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for Psy and Pds steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. Marine Biotechnology 10, 602–611.
- Cohen, Z. & Khozin-Goldberg, I. (2005). Searching for PUFA-rich microalgae. In Cohen, Z. & Ratledge, C. [Eds.] Single Cell Oils. American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, pp. 53– 72.
- Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. (2000) Natural products (secondary metabolites). In: BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones (eds.). Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA. pp: 1250-1317.
- Cysewski G. R. and Todd Lorenz R., (2004). Industrial production of microalgal cellmass and secondary products. Major industrial species — *Haematococcus*. In Richmond, A. (ed.), Handbook of microalgal culture. Blackwell, Oxford. p. 281–288.
- Da Silva, R. L., Barbosa, J. M. (2008). Seaweed meal as a protein source for the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Applied Phycology, 21,193-197.

Demmig-Adams, B., Gilmore, A. M. & Adams, W. W. (1996). In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* 10:403–13.

Egertson C.J., and. Downing J.A. (2004). Relationship of fish catch and composition to water quality in a suite of agriculturally eutrophic lakes, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 61, no. 9, pp. 1784–1796.

Fu W., Guðmundsson Ó., Paglia G., Herjólfsson G., Andr sson  . S., P lsson B.  ., & Brynj lfsson S. (2013). Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(6), 2395-2403.

Garcia-Gonzalez M., Moreno J., Canavate J.P., Anguis V., Prieto A., Manzano C., Florencio F.J., Guerrero M.G. (2003). Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. *J Appl Phycol* 15:177–184.

García-González M., Moreno J., Manzano C., Florencio F.J., Guerrero M.G. (2005). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of biotechnology*. 115. 81-90.

Gardner, R. D. (2012). Use of sodium bicarbonate to stimulate triacylglycerol accumulation in the chlorophyte *Scenedesmus* sp. and the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Appl. Phycol.* 24, 1311–1320.

G mez, P.I., Barriga, A., Cifuentes, A.S., & González, M.A. (2003). Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta. *Biological research*, 36 2, 185-92.

Gomez P.I., Gonzalez M.A.(2004). Genetic variation among seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with industrial potential, based on RAPD banding patterns and on nuclear ITS rDNA sequences. *Aquaculture*. 2004;233:149–162.

Grobbelaar, J.A. (2003). Quality control and assurance: crucial for the sustainability of the applied phycology industry. *Journal of Applied Phycology* 15: 209-215.

Grunewald, K., Eckert M., Hirschberg J. and Hagen C. (2000). Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales). *Plant. Physiol.* 122: 1261-1268.

Guschina, I. A. & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 45:160–86.

Hejazi MA, Andrysiewicz J, Wijffels RH (2003) Effect of mixing rate on  -carotene production and extraction by *Dunaliella salina* in two-phase bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 84:591–596.

- Hejazi M.A., Barzegari A., Gharajeh N.H., Hajezi M.S.(2010). Introduction of a novel 18S rDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga *Dunaliella*. *Saline Systems*. 2010;6:4.
- Hu, C. C., Lin, J. T., Lu, F. J., Chou, F. P., & Yang, D. J. (2008). Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food chemistry*, 109(2), 439-446
- Jing Chen, X Qun, J Rohrer, (2012). HPLC Separation of All-Trans- β -Carotene and Its Iodine-Induced Isomers Using a C30 Column. Application Update 187, Thermo Fisher Scientific, Inc.
- Kleinegris, D. M., van Es, M. A., Janssen, M., Brandenburg, W. A., & Wijffels, R. H. (2010). Carotenoid fluorescence in *Dunaliella salina*. *Journal of applied phycology*, 22(5), 645-649.
- Lamers, P.P., Janssen, M., De Vos, R.C.H., Bino, R.J., Wijffels, R.H., (2008). Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends in Biotechnology* 26, 631–638.
- Lamers P.P., Janssen M., De Vos R.C.H., Bino R.J., Wijffels R.H., (2012). Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *J Biotechnol* 988 2012,162:21–7.
- Ledford, H. K. & Niyogi, K. K. (2005). Singlet oxygen and photooxidative stress management in plants and algae. *Plant Cell Environ.* 28:1037–45.
- Lee, R. (2008). *Phycology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Lers, A., Biener, Y., Zamir, A., (1990). Photoinduction of massive β -carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology* 93, 389–395.
- Liaaen-Jensen S (2004) Basic carotenoid chemistry. In: ST Mayne, NI Krinsky, H Sies (eds.). *Carotenoids in health and disease*. Marcel Dekker Press, New York, USA. pp: 1-30.
- Marín, N., Morales, F., Lodeiros, C. (1998). Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *Journal of Applied Phycology* 10: 405.
- Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O., Harris E.H., Karpowicz S.J., Witman G.B., Terry A. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318 (5848):245-251.
- Merzlyak M. N., Chivkunova O. B., Gorelova O. A., Reshetnikova I. V., Solovchenko A. E., Khozin-Goldberg I. and Cohen Z. (2007). Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa*. *Journal of Phycology*, 43: 833–843.

- Metting FB (1996). Biodiversity and application of microalgae. J Ind Microbiol 17:477–489.
- Michael AB (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. J Biotechnol 70:313–321.
- Montgomery (2001). Experiments with a single factor: The analysis of variance; Analysis of the fixed effects model Section 3-3.
- Nagata, M., Noguchi, Y., Imanishi, S. & Sugiyama, K. (2008). A simple method for the estimation of alpha- and beta-carotene in carrots. Acta Hortic., 768, 565569.
- Nguyen S., Duc T., Sixto P., Trung V. (2006). Medium Improvement for Higher Growth and Longer Stationary Phase of *Dunaliella*. Journal of Plant Sciences. Vol. 2, No. 1, 2014, pp. 9-13. doi: 10.11648/j.jps.20140201.13.
- Niyogi, K. (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 50:333– 59.
- Ogbonna J.C., Tanaka H. (2000). Light requirement and photosynthetic cell cultivation: development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. J Appl Phycol 12:207–218.
- Olmos S.J., Paniagua M.J., Contreras F.R.(2000). Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. Lett Appl Microbiol. 2000;30:80–84.
- Orset S., Young A. (1999) Low temperature induced synthesis of α -carotene in the microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). J Phycol 35: 520-527.
- Packo P. Lamers, Marcel Janssen, Ric C.H. De Vos, Raoul J. Bino, René H. Wijffels , (2008) . Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications.
- Packo P. Lamers, Marcel Janssen, Ric C.H. De Vos, Raoul J. Bino, René H. Wijffels. (2012). Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga, Journal of Biotechnology, Volume 162, Issue 1, Pages 21-27.
- Phadwal K., Singh P.K. (2003). Effect of nutrient depletion on β -carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. Bioresour Technol. 90:55–8.
- Pisal D. S., & Lele S. S. (2005). Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. Indian J. Biotechnol. 4: 476-483.
- Pittman J. K., Andrew P. D., Olumayowa O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources, Bioresource Technology, Volume 102, Issue 1, Pages 17-25.

Formatted: English (U.S.)

Polle J.E.W., Struwe L., Jin E. (2008). Identification and characterization of a new strain of the unicellular green alga *Dunaliella salina* (Teod.) from Korea. *J Microbiol Biotchnol.* 18:821–827.

Prieto A., Cañavate J.P., García-González M., (2011). Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. *Journal of Biotechnology*, Volume 151, Issue 2, Pages 180-185,

Radmer R. J., (1996). Algal diversity and commercial algal products. *Bioscience.* 46, 263–270.

Raja R., S. Hemaiswarya and Rengasamy, R. (2007). Exploitation of *Dunaliella* for -carotene production. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:517 523

Ramos, A.A., Marques, A.R., Rodrigues, M., Henriques, N., Baumgartner, A., Castilho, R., Brenig, B., Varela, J.C., (2009). Molecular and functional characterization of a cDNA encoding 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase from *Dunaliella salina*. *Journal of Plant Physiology* 166, 968–977.

Richmond, A., Boussiba, S., Vonshak, A., Kopel, R., (1993). A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *J. Appl. Phycol.* 5, 327–332.

Rufus K, and Regunathan (2012). Is earthen unmixed pond culture technology for *Dunaliella*, the only way to beat high natural β -carotene prices?

Sanchez-Estudillo L., Freile-Pelegrin Y., Rivera-Madrid R., Robledo D., Narvaez-Zapata J.A. (2006). Regulation of two photosynthetic pigment-related genes during stress-induced pigment formation in the green alga, *Dunaliella salina*. *Biotechnology Letters* 28, 787–791.

Shaish A., Ben-Amotz A., and Avron M. (1991). Production and selection of high β -carotene mutants of *Dunaliella bardawil*, *J. Phycol.*, 27, 652.

Simental JA, Sanchez-Saavedra MP (2003). The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquacult Eng* 27:265–272.

Streinbrenner J. and Linden H. (2001). Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant. Physiol.* 125: 810-817.

Streinbrenner J. and Linden H. (2003). Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. *Plant Mol. Biol.* 52:343-356

Thompson G.A. Jr. (1996). Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta* 1302:17–45.

Tran D., Doan N., Louime C., Giordano M., Portilla S., (2014). Growth, antioxidant capacity and total carotene of *Dunaliella salina* DCCBC15 in a low cost enriched natural seawater medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol.30 (1): 317-322.

Tukey, J. (1949). "Comparing Individual Means in the Analysis of Variance". *Biometrics*. 5 (2): 99–114. JSTOR 3001913.

Vílchez C., Garbayo I., Lobato M. V., and Vega J. M., (1997). Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 562–572.

White, D. A., Pagarette, A., Rooks, P. & Ali, S. T. (2013). The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. *J. Appl. Phycol.* 25, 153–165.

Yan Y., Zhu Y.H., Jiang J.G. and Song D.L.. (2005). Cloning and sequence analysis of the phytoene synthase gene from a unicellular chlorophyte, *Dunaliella salina*. *J. Agric. Food Chem.* 53(5): 1466-1479.

Zhu Y.H., Jiang J.G., Yan Y. and Chen X.W. (2005). Isolation and characterization of phytoene desaturase cDNA involved in the beta carotene biosynthetic pathway in *Dunaliella salina*. *J. Agric. Food Chem* 53(14) 5593-5597.

Zhu Y.H. & Jiang J.G. (2008). Continuous cultivation of *Dunaliella salina* in photobioreactor for the production of β -carotene. *Eur Food Res Technol* 227: 953.

Οικονόμου-Αμίλλη Α. (2011). 'Φύκη' Εκδ. Κωσταράκη (επιμέλεια μετάφρασης και έκδοσης στην ελληνική από το πρωτότυπο βιβλίο των Graham et al. 'Algae')

WALNE'S MEDIUM FOR ALGAL CULTURES

Recommended for large volumes of aquaculture strains

Stocks	per 100 ml
(1) Trace metal solution (TMS)	
ZnCl ₂	2.1 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	2.0 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.9 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	2.0 g
Make up to 100 ml with distilled water. This solution is normally cloudy. Acidify with a few drops of conc. HCl to give a clear solution.	
(2) Vitamin solution	
Vitamin B ₁₂ . (Cyanocobalamin)	10.0 mg
Vitamin B ₁ (Thiamine.HCl)	10.0 mg
Vitamin H (Biotin)	200.0 µg
Make up to 100 ml with distilled water.	
(3) Nutrient solution	per litre
FeCl ₃ .6H ₂ O	1.3 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.36 g
H ₃ BO ₃	33.6 g
EDTA(Disodium salt)	45.0 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	20.0 g
NaNO ₃	100.0 g
TMS (1 above)	1.0 ml
Make up to 1 litre with distilled water.	
Medium	per litre
Nutrient solution (3)	1.0 ml
Vitamin solution (2)	0.1 ml
Sterilised seawater	1.0 litre

Dispense nutrient and vitamin solutions separately into 10 ml and 1 ml respectively and autoclave at 15 psi for 15 minutes. Add an aliquot of each aseptically to 10 litres of sterilised seawater.

Reference

Walne PR (1970) Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria*, and *Mytilus*. Fish. Invest. **26**, 1-62.

7 August 2002

MD4 MEDIUM

Stocks	per 100ml
1. Vitamin solution	
Vitamin B12. (Cyanocobalamin)	10.0 mg
Vitamin B1 (Thiamine.HCl)	10.0 mg
Vitamin H (Biotin)	200.0 µg
	per litre
2. Nutrient solution	
NaNO ₃	182gr
KH ₂ PO ₄	52.3gr
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	9.96gr
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0.418gr
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.184gr
H ₃ BO ₃	0.058gr
ZnCl ₂	0.104gr
CuCl ₂ . 2H ₂ O	0.134gr
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0.712gr
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1.98gr
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0.01gr
NaHCO ₃	0.04gr
EDTA	8.76gr
Medium	per litre
Nutrient solution (2)	1.0 ml
Vitamin solution (1)	0.1 ml
Sterilised seawater	1.0 litre

Reference

Tran D., Doan N., Louime C., Giordano M., Portilla S., 2014. Growth, antioxidant capacity and total carotene of *Dunaliella salina* DCCBC15 in a low cost enriched natural seawater medium. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol.30 (1): 317-322. DOI 10.1007/s11274-013-1413-2

Nutrileaf - Nutrileaf (+)

Stocks per 100ml

1. Vitamin solution	
Vitamin B12. (Cyanocobalamin)	10.0 mg
Vitamin B1 (Thiamine.HCl)	10.0 mg
Vitamin H (Biotin)	200.0 µg

per litre

2. Nutrient solution	
Nutrileaf fertilizer (NPK 30:10:10)	54.67 gr
NaHCO ₃ (only in Nutrileaf plus)	0.04 gr

Medium per litre

Nutrient solution (2)	1.0 ml
Vitamin solution (1)	0.1 ml
Sterilised seawater	1.0 litre

Nutrileaf fertilizer

Element percentage

N.....	30%
P.....	10%
K.....	10%
S.....	1.90%
Fe.....	0.10%
Cu.....	0.05%
Zn.....	0.05%
Mn.....	0.05%
Mg.....	0.025%
B.....	0.02%
Mo.....	0.0005%