



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗΣ**

**ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΚΠΑ-  
ΕΛΚΕΘΕ**

**ΩΚΕΑΝΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΛΙΠΙΔΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ»**

**Γεωργίου Χριστίνα**

**ΑΘΗΝΑ, 2023**

# **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

## ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

**Βασίλειος ΡΟΥΣΣΗΣ** (Καθηγητής Τμήματος Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων)

## ΜΕΛΗ

**Αθηνά ΑΜΙΛΛΗ-ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ** (Ομότιμος Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ, Τομέας Οικολογίας και Ταξινομικής)

**Ευσταθία ΙΩΑΝΝΟΥ** (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων)

## Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	8
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	9
1. Μικροφύκη.....	9
1.1 Γενικά στοιχεία .....	9
1.2 Εφαρμογές μικροφυκών.....	11
1.3 Βιομόρια υψηλής σημασίας.....	14
1.4 Καλλιέργεια μικροφυκών .....	17
1.5 Μεταβατικά συστήματα.....	22
1.6 Είδη μικροφυκών .....	24
1.7 Ρυθμός ανάπτυξης των μικροφυκών.....	28
2. Λιπίδια .....	30
2.1 Λιπίδια των μικροφυκών .....	31
2.2 Βιοσύνθεση των λιπιδίων.....	33
2.3 Το λιπιδικό προφίλ των μικροφυκών.....	35
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	43
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	44
3. Υλικά και Μέθοδοι .....	44
3.1 Είδη Μικροφυκών που μελετήθηκαν.....	44
3.2 Καλλιέργεια μικροφυκών .....	45
3.3 Ανακαλλιέργεια στελεχών .....	46

3.4 Κινητική - Καμπύλες ανάπτυξης στελεχών .....	49
3.5 Διήθηση και ξήρανση καλλιέργειας.....	49
3.6 Μέθοδος απομόνωσης ολικών λιπιδίων.....	51
3.7 Στατιστική ανάλυση.....	61
4. Αποτελέσματα.....	62
4.1 Υπολογισμός των ρυθμών αύξησης και πολλαπλασιασμού των 4 στελεχών που μελετήθηκαν .....	62
4.2 Υπολογισμός περιεκτικότητας ολικών λιπαρών οξέων (TLs) και μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAMES) .....	67
4.3 Ανάλυση των λιπαρών οξέων στα 4 στελέχη που μελετήθηκαν .....	69
4.4 Υπολογισμός των SAFA, MUFA και PUFA .....	76
4.5 Ανάλυση των ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων .....	81
4.6 Αναλογίες ω-3/ω-6 και PUFA/SAFA .....	85
5. Συζήτηση – Συμπεράσματα .....	88
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	93

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μικροφύκη είναι μονοκύτταροι ή αποικιακοί μικροοργανισμοί που απαντώνται σε όλα τα οικοσυστήματα του περιβάλλοντος. Έχουν την ικανότητα παραγωγής ποικιλίας οργανικών ενώσεων, όπως λιπίδια, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και χρωστικές ουσίες, ενώ σε συνδυασμό με τον μικρό χρόνο αναπαραγωγής τους, αποτελούν σημαντικούς οργανισμούς σε εφαρμοσμένα πεδία όπως στην παραγωγή βιοκαυσίμων αλλά και στη παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής. Ειδικότερα, τα μικροφύκη παράγουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων, κυρίως πολυακόρεστων ωμέγα-3 και ωμέγα-6 λιπαρών οξέων, τα οποία προσφέρουν πολλά οφέλη στον άνθρωπο, όπως πρόληψη καρδιαγγειακών νοσημάτων, νευρικών διαταραχών κλπ, ενώ συμβάλλουν στην ανάπτυξη κατά την εμβρυϊκή και νεογνική ηλικία. Καθώς, ο ανθρώπινος οργανισμός δε μπορεί να παράξει πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, η αναζήτηση νέων πηγών παραγωγής τους για ανθρώπινη κατανάλωση έχει μεγάλη σημασία.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 2 στελέχη του γένους *Tetraselmis*, τα στελέχη R1-2 και R1-3, και 2 στελέχη του γένους *Dunaliella*, τα στελέχη D7 και D8, οποία απομονώθηκαν από περιοχές στη Βόρεια Ελλάδα. Αρχικά προσδιορίστηκε η καμπύλη ανάπτυξης του κάθε στελέχους, και στη συνέχεια τα λιπίδια των κυττάρων παραλήφθηκαν, ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν.

Παρατηρήθηκε ότι τα 4 στελέχη έχουν διαφορετικές καμπύλες ανάπτυξης, με το στέλεχος R1-2 να εμφανίζει τον υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Κατά την 9<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας, τα κύτταρα συλλέχθηκαν, εκχυλίστηκαν για την παραλαβή των ολικών λιπιδίων, στην συνέχεια διαχωρίστηκαν τα λιπαρά τους οξέα και μετατράπηκαν στους μεθυλεστέρες τους, οι οποίοι τέλος αναλύθηκαν με αέριο χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας. Και τα 4 στελέχη που μελετήθηκαν εμφάνισαν πλούσιο λιπιδικό προφίλ, ενώ παρατηρήθηκαν αρκετές διαφορές στην χημική τους σύσταση. Και στα 4 στελέχη παρατηρήθηκε μεγάλο ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, και συγκεκριμένα λιπαρών οξέων που παρουσιάζουν σημαντικές ιδιότητες και χρησιμοποιούνται συχνά σε συμπληρώματα διατροφής και άλλα σκευάσματα.

Συνολικά, το στέλεχος R1-3 υπέδειξε το καλύτερο λιπιδικό προφίλ σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη. Αν και ο χρόνος πολλαπλασιασμού δεν είναι ο μέγιστος σε σχέση με το στέλεχος R1-2 που ανήκει στο ίδιο είδος, μπορεί να παράξει έναν σημαντικό αριθμό κυττάρων σε καλλιέργεια. Επιπλέον, το λιπιδικό του προφίλ είναι πλούσιο σε λιπαρά οξέα,

ειδικότερα πολυακόρεστα, αλλά και άλλα σημαντικά λιπαρά οξέα όπως το C16:0, C16:1, C18:1 κλπ. Επιπλέον, μια σημαντική διαφορά συνίσταται στο ότι το στέλεχος R1-2 παράγει αρκετά χαμηλότερο ποσοστό σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) σε σχέση με τα υπόλοιπα 3 στελέχη της μελέτης, ενώ αντιθέτως παράγει συγκριτικά υψηλότερα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA). Επιπλέον, το ποσοστό των  $\omega$ -3 λιπαρών οξέων του στελέχους R1-2 είναι σημαντικά χαμηλότερο σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη, ενώ το ποσοστό των  $\omega$ -6 λιπαρών οξέων είναι στα ίδια επίπεδα με το στέλεχος R1-3 του ίδιου γένους. Ως αποτέλεσμα, ο λόγος  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 είναι αρκετά χαμηλός σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη, γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανώς η κατανάλωση βιομάζας του στελέχους R1-3 που παρουσιάζει μεγαλύτερη αναλογία  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 να είναι πιο ωφέλιμη, όπως προτείνεται από τη βιβλιογραφία.

Συμπερασματικά, το R1-3, φαίνεται να είναι το καταλληλότερο προς χρήση σε συμπληρώματα διατροφής. Αντιθέτως, το στέλεχος R1-2 πιθανώς να μην αποτελεί χρήσιμο στέλεχος προς κατανάλωση εξ αιτίας των χαμηλών επιπέδων PUFA και συγκεκριμένα των  $\omega$ -3 λιπαρών οξέων. Τα στελέχη του είδους *Dunaliella*, αν και παράγουν ικανή ποσότητα λιπιδίων και ιδιαιτέρως των  $\omega$ -3 λιπαρών οξέων, έχουν ως περιοριστικό παράγοντα τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, καθώς δεν παράγεται μεγάλος αριθμός κυττάρων στις καλλιέργειες γεγονός που παρατηρείται στα στελέχη του *Tetraselmis*. Φυσικά και για τα 2 γένη είναι απαραίτητες περαιτέρω μελέτες, όπως για παράδειγμα αλλαγή των συνθηκών καλλιέργειας, καθώς πρόκειται για 2 πολλά υποσχόμενα γένη για την παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής.

## ABSTRACT

Microalgae are single-celled or colonial microorganisms found in all ecosystems in the environment. They have the ability to produce a variety of organic compounds such as lipids, carbohydrates, proteins and pigments, and in combination with their short reproduction time, they are important organisms in applied fields such as the production of biofuel or food supplements. In particular, microalgae produce large amounts of lipids, mainly polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids, which offer many benefits to humans, such as prevention of cardiovascular diseases, nervous disorders, etc., and contribute to healthy development during embryonic and neonatal age. However, the human body cannot produce them on its own so the discovery of new production sources is important.

In the present study, 2 strains of the genus *Tetraselmis*, strains R1-2 and R1-3, and 2 strains of the genus *Dunaliella*, strains D7 and D8, isolated from sites in Northern Greece, were studied. Initially, the growth curve of each strain was determined, and then cell lipids were isolated, identified and quantified.

It was observed that the four strains have different growth curves, with strain R1-2 showing the highest proliferation rate. At day 9, the cells were harvested, extracted to obtain total lipids, then their fatty acids, in the form of methyl esters, were separated and finally analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. All 4 strains studied, showed a rich lipid profile, and several differences were observed between the fatty acids of each strain. In all 4 strains, a high percentage of polyunsaturated fatty acids was observed, in particular lipids that possess important properties and are often used in dietary supplements and other formulations.

Overall, strain R1-3 showed the best profile compared to the other strains. Although the proliferation time is not the optimum compared to strain R1-2 belonging to the same genus, it produces a significant number of cells in culture. Moreover, its lipid profile is rich in fatty acids, especially polyunsaturated, as well as in other important fatty acids such as C16:0, C16:1, C18:1, etc. Moreover, an important observed difference is that strain R1-2 has a significantly lower percentage of polyunsaturated fatty acids (PUFA) as compared to the other 3 strains, while, on the contrary, it has comparatively higher percentage of monounsaturated fatty acids (MUFA). Furthermore, the omega-3 fatty acids content of strain R1-2 is significantly lower than that of the other strains, while omega-6 fatty acids are at the

same level with strain R1-3. As a result, the omega-3/omega-6 ratio is quite low compared to the other strains, indicating that it is likely that consumption of strain R1-3 is more beneficial, as the omega-3/omega-6 ratio is higher, as suggested in the literature.

In conclusion, R1-3, appears to be the most suitable for use in food supplements. In contrast, strain R1-2 is probably not a useful strain for consumption due to its low levels of PUFA, specifically omega-3 fatty acids. The *Dunaliella* strains, although producing significant amounts of lipids and in particular omega-3 fatty acids, have as a limiting factor their multiplication rate, as in culture they do not produce a high number of cells a fact observed in *Tetraselmis* strains. Since the two genera have potential in the production of food supplements. further studies should be undertaken examining for example by effect of the culture conditions.



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας αυτό το εγχείρημα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους αποτέλεσαν τους δομικούς λίθους για να αποκτήσει υπόσταση και μορφή όλη αυτή η προσπάθεια. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου κύριο Ρούσση, για όλη τη βοήθεια που μου παρείχε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την πορεία των πειραμάτων και της συγγραφής του κειμένου. Δεν χρειάστηκε ποτέ να ζητήσω κάτι αφού η κατανόησή και η ενθάρρυνση του προλάβαιναν οποιαδήποτε δική μου αναστολή ή φόβο. Από την πρώτη διάλεξη που μου έκανε σε ένα μάθημα του μεταπτυχιακού ήξερα ότι ήθελα να συνεργαστούμε και τον ευχαριστώ για αυτή την ευκαιρία.

Ιδιαίτερος, θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κυρία Αμίλλη- Οικονόμου, η οποία σε όλη αυτή την προσπάθεια ήταν δίπλα μου, στωικά και με αγάπη, επαγρυπνώντας με όπου χρειαζόταν και δίνοντας μου λύση σε αρκετά ζητήματα. Πριν 10 χρόνια περίπου, έπεσε στα χέρια μου ένα βιβλίο που αποτέλεσε οδηγό μου με τίτλο «Τα ενδημικά φυτά του Παρνασσού», συγγραφέας είναι η κυρία Οικονόμου, άρα αποδίδω και σε μία καρμική ανάγκη τη γνωριμία μας.

Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην κυρία Ευσταθίου, γιατί ήταν εκεί όταν τη χρειαζόμουν, με αυτό το πνεύμα ηρεμίας και κατανόησης. Όσα έχει καταφέρει, η εμπιστοσύνη της στην προσπάθεια των φοιτητών της και ο νεωτερισμός της την καθιστούν ένα πρότυπο εκπαιδευτή και επιστήμονα. Επίσης να ευχαριστήσω και τον κύριο Ιωάννη Τζοβενή, διδάκτορα του Gent University του Βελγίου, που συνετέλεσε σε βασικά κομμάτια αυτής της εργασίας.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συνεργάτες του εργαστηρίου Εφαρμοσμένης Φυκολογίας (A.P.U) του Τομέα, την Δρ. Ξανθή Χατζηστρούντζιου, τη Δρ. Αμέρσα Τσιριγώτη και τον Αλέξανδρο Ντζουβάρα. Η υποστήριξή τους, η συνεργασία τους στο εργαστήριο, η έμπρακτη βοήθεια τους στο πειραματικό και συγγραφικό μέρος της πτυχιακής μου εργασίας, σε συνδυασμό με την υπομονή τους υπήρξαν μεγάλο κίνητρο για την ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Τέλος, ένας πολύ σημαντικός άνθρωπος που όλο αυτό το διάστημα υπήρξε έμπρακτα δίπλα μου, σε όλα τα πειράματα, σε όλη τη συγγραφή, σε δυσκολίες, σε ευκολίες και θέλω να ευχαριστήσω είναι η Αικατερίνη-Λητώ Τζιβελέκα, Διδάκτωρ του τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ του τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων. Πλέοντας σε παρόμοια νερά, και σκεπτικά θέλω να της αποδώσω τα περισσότερα ευχαριστήρια γιατί χωρίς αυτήν δεν θα είχε ολοκληρωθεί αυτός ο αγώνας.

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. Μικροφύκη

### 1.1 Γενικά στοιχεία

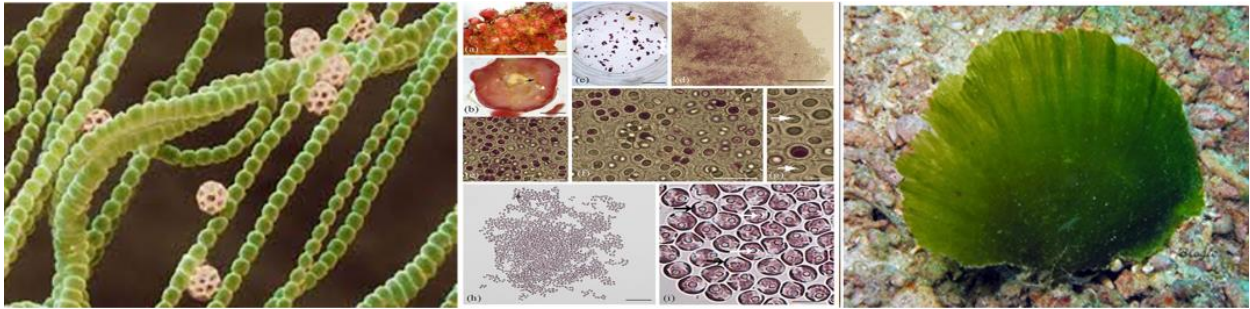
Τα φύκη (στα λατινικά *algae*) αποτελούν μια πολυφυλετική κατηγορία πολυκύτταρων και μονοκύτταρων φωτοσυνθετικών οργανισμών που δεν ανήκουν αυστηρά στο βασίλειο των φυτών. Αποτελούν μια ομάδα οργανισμών που ζουν σχεδόν σε κάθε βióτοπο. Αναπτύσσονται σε μια σειρά από υδροβιότοπους, συμπεριλαμβανομένων των λιμνών, των ποταμών, των ωκεανών, ακόμη και των λυμάτων, αλλά μπορούν να εντοπιστούν και σε χερσαία οικοσυστήματα αντιπροσωπεύοντας έτσι μια μεγάλη ποικιλία οργανισμών που ζουν σε πληθώρα περιβαλλοντικών συνθηκών (Hamed et al., 2016). Έχουν την ικανότητα να διαβιούν σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, αλατότητας και τιμών pH, διαφορετικές εντάσεις φωτός και συνθήκες σε δεξαμενές ή ερήμους (Barsanti et al., 2008). Αποτελούν το βασικό συστατικό των τροφικών αλυσίδων σε όλα τα οικοσυστήματα. Επιπλέον, αποτελούν τους κύριους παραγωγούς οξυγόνου και συμβάλλουν περίπου 40% στην παγκόσμια φωτοσύνθεση (Andersen et al., 2015).

Τα φύκη ταξινομούνται σε μακροφύκη ή μικροφύκη, με πρώτο κριτήριο διάκρισης το μέγεθός τους. Τα μακροφύκη είναι πολυκύτταρα, μεγάλου μεγέθους φύκη με μήκος από μερικά εκατοστά έως μέτρα, ενώ τα μικροφύκη είναι μικροσκοπικά, μονοκύτταρα ή αποικιακά και διακρίνονται σε προκαρυωτικά ή ευκαρυωτικά. Τα μικροφύκη απαριθμούν χιλιάδες ταυτοποιημένων ειδών, αλλά θεωρείται βέβαιο ότι υπάρχει πληθώρα ειδών που δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί. Ο όρος μικροφύκη αναφέρεται τόσο στα μικροσκοπικά φύκη όσο και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια (Κυανοβακτήρια).

Η πρώτη διάκριση των μικροφυκών γίνεται μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών (Stark et al., 2012). Η βασική διάκριση μεταξύ αυτών των δύο τύπων είναι η παρουσία δομών που σχετίζονται με την πυρηνική μεμβράνη στα ευκαρυωτικά κύτταρα, οι οποίες λείπουν από τα προκαρυωτικά. Οι δομές αυτές αποκτήθηκαν από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς μέσω της εξέλιξης.

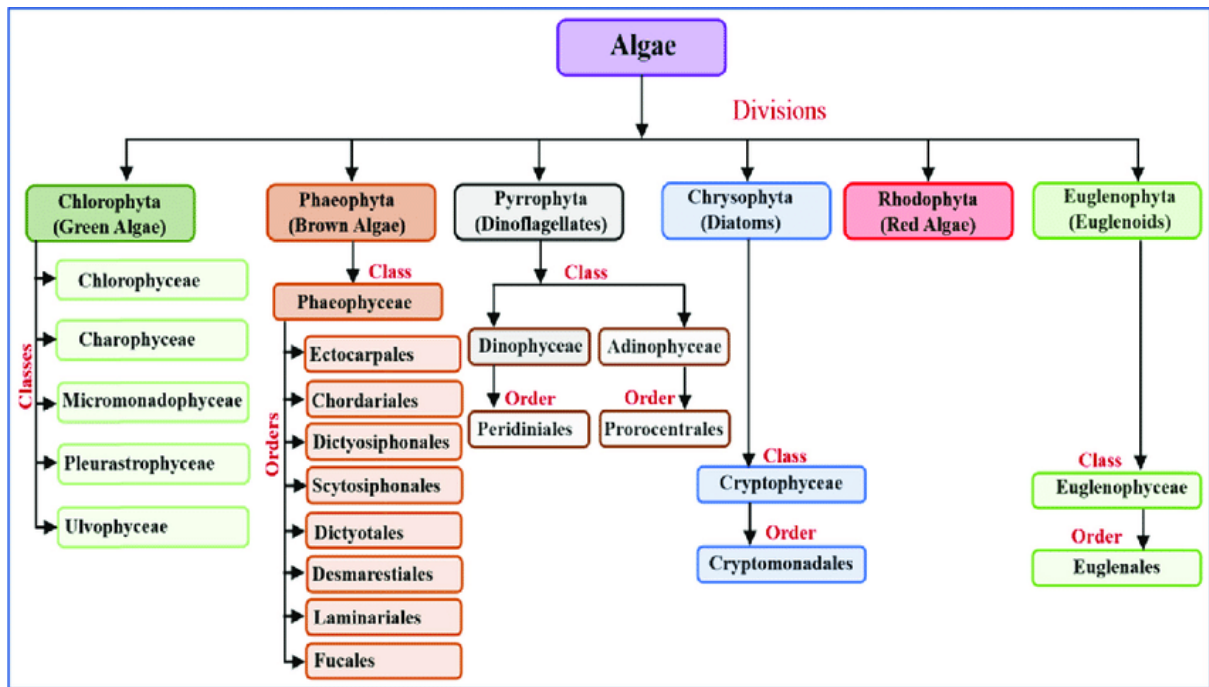
Επιπροσθέτως, τα μικροφύκη ταξινομούνται ανάλογα με τις φωτοσυνθετικές χρωστικές σε κυανοβακτήρια (γαλαζοπράσινα φύκη) (Εικόνα 1Α), ροδόφυτα (ερυθρά φύκη) (Εικόνα 1Β), χλωρόφυτα (πράσινα φύκη) (Εικόνα 1Γ) και χρωμόφυτα (όλα τα υπόλοιπα φύκη). Κάθε ομάδα περιέχει εκατοντάδες είδη και κάθε ένα από αυτά τα είδη διαθέτει χιλιάδες στελέχη. Τα κυανοβακτήρια έχουν γαλαζοπράσινο χρώμα και είναι προκαρυωτικοί

φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που περιέχουν χλωροφύλλη α. Παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά με τα βακτήρια καθώς η εσωτερική οργάνωση είναι προκαρυωτική, αλλά και με τα φυτά, καθώς επιτελούν τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Τα χλωρόφυτα περιέχουν χλωροφύλλη α και β και καροτενοειδή, ενώ τα ροδόφυτα περιέχουν φωτοσυνθετικές χρωστικές όπως ηφυκοερυθρίνη, η φυκοκυανίνη και η αλλοφυκοκυανίνη.



**Εικόνα 1** Χαρακτηριστικές εικόνες φυκών. Στην εικόνα Α παρουσιάζεται το κυανοβακτήριο *Anabaena* sp., ([newscientist.com](http://newscientist.com)), στην εικόνα Β το ροδόφυτο *Rhodospirillum rubrum* ([Wikimedia.com](http://Wikimedia.com)), στην εικόνα Γ παρουσιάζεται το χλωρόφυτο *Avrainvillea erecta* ([whatsthatfish.com](http://whatsthatfish.com))

Ωστόσο, τα σημερινά συστήματα ταξινόμησης λαμβάνουν υπόψη και άλλα κριτήρια, μεταξύ των οποίων κυτταρολογικά, μορφολογικά και τα συστατικά κυτταρικού τοιχώματος. Μερικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως για την αναγνώριση και ταξινόμηση των ειδών, περιλαμβάνουν μορφολογικές παρατηρήσεις στο μικροσκόπιο, μοριακή ταξινόμηση ή ταξινόμηση χρησιμοποιώντας κυτταρόμετρο ροής (Drews et al., 2013). Ένα από τα πιο πρόσφατα μοντέλα ταξινόμησης είναι το σύστημα των επικρατειών, που περιλαμβάνουν τους Προκαρυώτες (Prokaryota) και τους Ευκαρυώτες (Eukaryota) που διαμορφώνουν επτά βασίλεια: Αρχαιοβακτήρια (Archaeobacteria ή Archaea), Ευβακτήρια (Eubacteria ή Bacteria) Πρωτόζωα (Protozoa), Χρωμιστά (Chromista), Μύκητες (Fungi), Φυτά (Plantae) και Ζώα (Animalia) (Ruggiero et al., 2015).



Εικόνα 2 Ταξινόμηση μικροφυκών (Enamala et al., 2018)

## 1.2 Εφαρμογές μικροφυκών

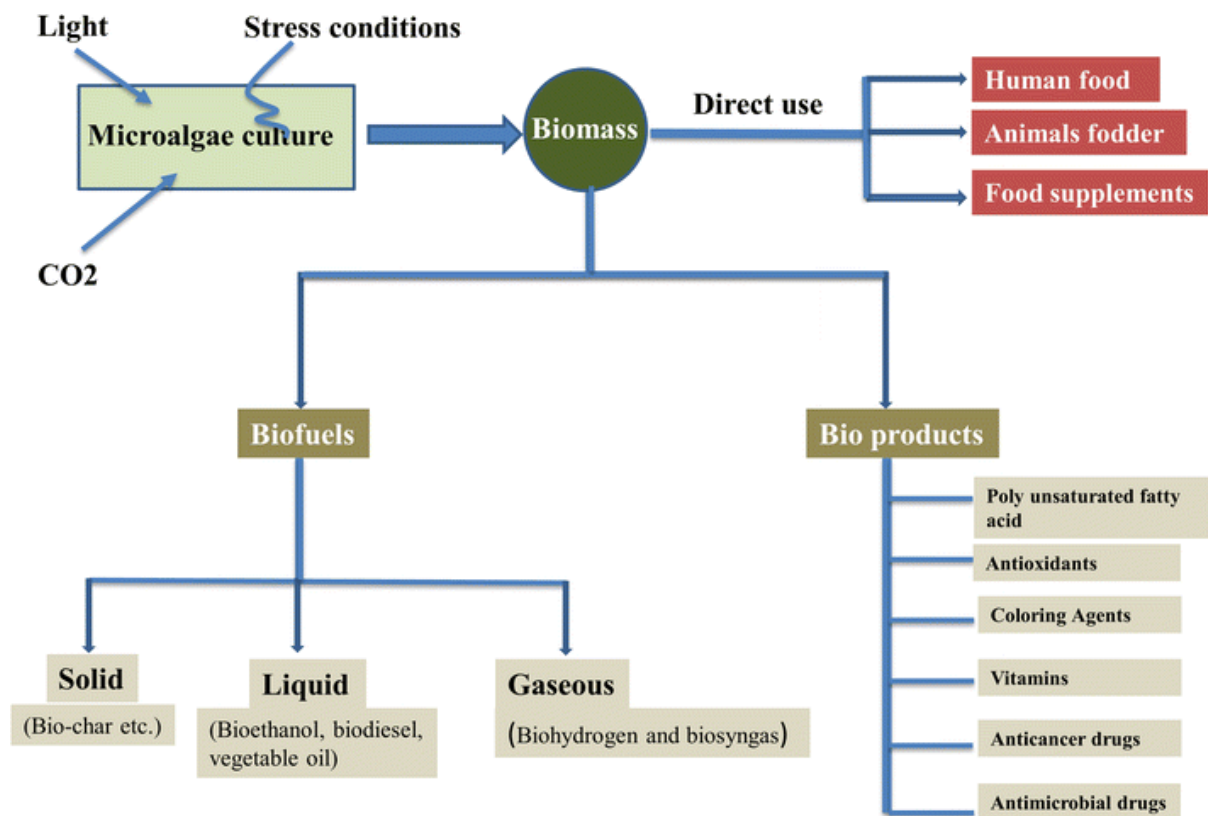
Το ενδιαφέρον για τα μικροφύκη ξεκίνησε προ πολλού. Ωστόσο, η παραγωγή βιομάζας μικροφυκών άρχισε να αναπτύσσεται στα μέσα του περασμένου αιώνα, ξεκινώντας πρώτα από τη μεταπολεμική Γερμανία λόγω της ισχυρής δημογραφικής ανάπτυξης και των επιπτώσεων στην επισιτιστική ασφάλεια (Milledge et al., 2011). Όπως είναι προφανές, η χρήση των φυκών είναι πολύ παλιά και οι ερευνητές εργάζονται συνεχώς για την αξιοποίηση και την οικονομική τους εκμετάλλευση. Τα μικροφύκη είναι μια πλούσια πηγή ενώσεων άνθρακα, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βιοκαύσιμα, συμπληρώματα διατροφής, φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά (Das et al., 2011). Οι λόγοι που εξηγούν το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που παρουσιάζουν τα μικροφύκη είναι πολλοί και παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

Αρχικά, τα μικροφύκη είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί και ως εκ τούτου μπορούν να αντλούν την ενέργειά τους από το φως και τον άνθρακα. Τα μικροφύκη χρησιμοποιούν τον άνθρακα που υπάρχει στον αέρα (CO<sub>2</sub>) για την παραγωγή ενέργειας και παράγουν περίπου το 50% του ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας το ηλιακό φως για τη σύνθεση τροφής μετατρέποντας τη φωτεινή ενέργεια σε χημική ενέργεια.

Επιπλέον, σε σύγκριση με τα ανώτερα φυτά, τα μικροφύκη παρουσιάζουν υψηλότερες ετήσιες αποδόσεις μετατροπής φωτονίου σε βιομάζα. Σε σύγκριση με τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς, τα φύκη έχουν την ικανότητα να παράγουν 30-100 φορές περισσότερη

ενέργεια ανά εκτάριο σε σύγκριση με χερσαίες καλλιέργειες. Αυτό το χαρακτηριστικό, σε συνδυασμό με την εξαιρετική ποικιλία των στελεχών, επιτρέπει πολύτιμα μόρια, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες, χρωστικές, να παράγονται με υψηλές αποδόσεις. Τα λιπίδια των μικροφυκών είναι κατάλληλα για παραγωγή βιοκαυσίμων και είναι επίσης καλή πηγή απαραίτητων ακόρεστων λιπαρών οξέων, επομένως παρέχουν δυνατότητες χρήσης ως συστατικό τροφίμων και ζωοτροφών. Τα μικροφύκη είναι επίσης μια καλή πηγή υδατανθράκων κυρίως υπό τη μορφή αμύλου, κυτταρίνης, σακχαρόζης και άλλων πολυσακχαριτών, η δε περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες της βιομάζας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος, την καλλιέργεια και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Δεύτερον, είναι δυνατή η καλλιέργεια των μικροφυκών σε λύματα ή σε μη γεωργική γη χωρίς φυτοφάρμακα, ενώ ταυτόχρονα είναι σε θέση να ανακυκλώνουν το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας και έτσι να ελαχιστοποιούν τις σχετικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις.



**Εικόνα 3** Τα μικροφύκη μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό CO<sub>2</sub> σε υδατάνθρακες, λιπίδια και άλλα πολύτιμα βιοπροϊόντα χρησιμοποιώντας το φως. Η βιομάζα των μικροφυκών είναι μια πλούσια πηγή βιοκαυσίμων και άλλων ουσιών (Khan et al., 2018).

### **1.2.1 Περιβαλλοντικές εφαρμογές**

Η αυξανόμενη υποβάθμιση του περιβάλλοντος και ο ταχέως αυξανόμενος παγκόσμιος πληθυσμός έχει οδηγήσει σε αύξηση των ενεργειακών αναγκών, καθώς και σε ταχύτερη εξάντληση των χρησιμοποιούμενων πόρων λόγω της μη βιώσιμης και μη ανανεώσιμης φύσης τους. Επομένως, η έρευνα έχει επικεντρωθεί στην ανακύκλωση και στην ανάκτηση πόρων. Τα βιοκαύσιμα αποδεικνύονται ως εξαιρετικά εναλλακτικά καύσιμα και μπορούν να παραχθούν μέσω της βιομάζας διαφόρων οργανισμών (Harun et al., 2010), ενώ χαρακτηρίζονται ως μη ρυπογόνα, τοπικά διαθέσιμα, προσβάσιμα, βιώσιμα και αξιόπιστα καύσιμα που προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές. Η επιλογή της βιομάζας αποτελεί μια κρίσιμη φάση περιορισμού του κόστους στην παραγωγή βιοκαυσίμων για την προσαρμογή και τη βελτιστοποίηση της δομής και του κόστους της ενέργειας. Η συγκεκριμένη επιλογή σχετίζεται επίσης άμεσα με τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, την περιβαλλοντική και οικονομική βιωσιμότητα. Με βάση αυτό το γεγονός μελέτες έχουν εστιάσει στα μικροφύκη λόγω της ικανότητάς τους να ενσωματώνουν τον άνθρακα, να αναπτύσσονται στα λύματα και να ενσωματώνουν ρύπους στο μεταβολισμό τους ως θρεπτικά συστατικά, της δυνατότητας σύνθεσης των μακροθρεπτικών συστατικών τους για την παραγωγή βιοπλαστικών και της χρήση τους ως βιολίπασμα λόγω του πλούσιου προφίλ μικροθρεπτικών συστατικών τους. Τα καύσιμα με βάση τα μικροφύκη είναι φιλικά προς το περιβάλλον, μη τοξικά και με ισχυρές δυνατότητες δέσμευσης CO<sub>2</sub>. Τα μικροφύκη θεωρούνται ιδανικά ως πρώτη ύλη, καθώς δεν έχουν την ανάγκη καλλιέργειας γης και γλυκού νερού για την καλλιέργειά τους και βοηθούν στην μείωση του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> και την επεξεργασία λυμάτων (Pandey et al., 2017). Τα περισσότερα είδη μικροφυκών είναι κατάλληλα για την παραγωγή βιοκαυσίμων λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια (Powell et al., 2009), ενώ η υψηλή περιεκτικότητά τους σε διαφορετικούς υδατάνθρακες τα καθιστά επιδεκτικά σε μετατροπή σε ζυμώσιμα σάκχαρα για παραγωγή βιοαιθανόλης.

### **1.2.2 Χρήση μικροφυκών για ζωοτροφές και βιοπροϊόντα**

Η χρήση των φυκών ως πηγή τροφής αποτελεί μία πρακτική με ρίζες στην αρχαιότητα. Ο ταχέως αναπτυσσόμενος παγκόσμιος πληθυσμός και η ανθρωπιστική κρίση έχουν οδηγήσει μεγάλο μέρος του πληθυσμού στον υποσιτισμό. Τα μικροφύκη αποτελούν μια εξαιρετική πηγή τροφής και άλλων σημαντικών βιοπροϊόντων, καθώς παράγουν βιταμίνες, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες (Cuellar-Bermudez et al., 2015). Επιπλέον, παράγουν διάφορα είδη βιοδραστικών και εμπορικά σημαντικών χρωστικών, όπως την χλωροφύλλη, το β-καροτένιο και άλλα καροτενοειδή. Αυτές οι χρωστικές είναι ζωτικής

σημασίας για θεραπείες εναντίον του καρκίνου, για νευρωνικές διαταραχές και για οφθαλμολογικές ασθένειες. Τα μικροφύκη συνθέτουν άμυλο, κυτταρίνη, ημικυτταρίνες και άλλους πολυσακχαρίτες από απλούς μονοσακχαρίτες όπως η γλυκόζη. Οι υψηλές ποσότητες υδατανθράκων στα κύτταρα των φυκών τα καθιστούν σημαντική πηγή τροφής (Guil-Guerrero et al., 2004). Τα μικροφύκη παράγουν και συσσωρεύουν επίσης μεγάλες ποσότητες λιπιδίων. Τα λιπαρά οξέα των φυκών έχουν διατροφικές και φαρμακευτικές εφαρμογές. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που παράγονται από τα μικροφύκη είναι σημαντικά εμπορικά προϊόντα υψηλής θεραπευτικής αξίας για τις καρδιακές παθήσεις, το άσθμα και την αρθρίτιδα (Adame-Vega et al., 2011). Τέλος, ορισμένα είδη μικροφυκών παράγουν προστατευτικές ουσίες έναντι των ελεύθερων ριζών για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες. Αυτές οι ενώσεις χρησιμοποιούνται ως αντιοξειδωτικά σε συμπληρώματα διατροφής και τρόφιμα.

Εκτός από τη χρήση τους ως ανθρώπινη τροφή, τα μικροφύκη έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετη ύλη ζωοτροφών, καθώς η βιομάζα των μικροφυκών μπορεί να ενσωματωθεί στη διατροφή μιας μεγάλης ποικιλίας ζώων που κυμαίνονται από ψάρια μέχρι κατοικίδια και ζώα (Hamed et al., 2016). Χρησιμοποιούνται κυρίως για τη βελτίωση της φυσιολογίας των ζώων αλλά και των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του τελικού καταναλωτικού προϊόντος.

### **1.3 Βιομόρια υψηλής σημασίας**

#### **1.3.1 Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα**

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ανήκουν στα αποθηκευτικά λιπίδια και είναι βιομόρια που αποτελούνται από μια μακρά αλυσίδα ακόρεστων υδρογονανθράκων που περιέχει περισσότερους από έναν διπλούς δεσμούς, με πληθώρα εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων και στις φαρμακοβιομηχανίες. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι σημαντικά για την ακεραιότητα των ιστών και έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία. Ζωτικής σημασίας για τον άνθρωπο είναι τα ωμέγα-3 ( $\omega$ -3) και ωμέγα-6 ( $\omega$ -6) λιπαρά οξέα, τα οποία δεν παράγονται από τον ίδιο τον οργανισμό και πρέπει να προσληφθούν από εξωτερικές πηγές. Επιπλέον, τα οξέα αυτά συμβάλλουν στη μείωση της εμφάνισης διαφόρων χρόνιων ασθενειών όπως ο διαβήτης, η αρθρίτιδα, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και η παχυσαρκία (Hamed et al., 2016). Μία από τις πολλά υποσχόμενες πηγές ωμέγα λιπαρών οξέων είναι τα μικροφύκη, οι κύριοι παραγωγοί του  $\omega$ -3 εικοσιπενταενοϊκού οξέος (EPA) και εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος (DHA). Υπάρχουν δύο κύριες ομάδες λιπιδίων στα μικροφύκη: τα λιπίδια που παράγονται από τη φωτοσύνθεση και αποθηκεύονται στο κύτταρο, γνωστά ως

λιπίδια αποθήκευσης (κυρίως τριγλυκερίδια), και τα λιπίδια που αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της δομής του κυττάρου, γνωστά ως δομικά λιπίδια (φωσφολιπίδια και στερόλες).

Πρόσφατα έγιναν κάποιες προσπάθειες για την ενίσχυση της παραγωγής ω-3 εικοσιπενταενοϊκού οξέος και εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος από μικροφύκη. Η προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η τροποποίηση των περιβαλλοντικών παραμέτρων με σκοπό να επηρεάσουν τον εσωτερικό μεταβολισμό. Μία από τις πλέον χρησιμοποιούμενες στρατηγικές συνίσταται στη μερική ή πλήρη στέρηση του αζώτου για την επίτευξη υψηλότερης παραγωγής λιπιδίων (Park et al., 2015). Ένας άλλος τρόπος για την τόνωση της παραγωγής λιπιδίων είναι η άμεση επίδραση στο μεταβολισμό των μικροφυκών. Είναι γνωστό ότι υπό ετερότροφες συνθήκες, τα μικροφύκη αποκτούν υψηλότερες αποδόσεις σε λιπίδια (Ramesh Kumar et al., 2019). Επιπροσθέτως, ένα κατάλληλο επίπεδο ενδοκυττάρων ελευθέρων ριζών οξυγόνου μπορεί να βελτιώσει τη συσσώρευση λιπιδίων αν και ο μεταβολικός μηχανισμός δεν είναι ακόμη απόλυτα γνωστός (Sun et al., 2018).

Ωστόσο, η παραγωγή σε εμπορική κλίμακα αυτών των σημαντικών και χρήσιμων προϊόντων από τα μικροφύκη πρέπει να υπερβεί πολλά εμπόδια και προκλήσεις για την επίτευξη υψηλών αποδόσεων.

### 1.3.2 Φωτοσυνθετικές χρωστικές

Οι χλωροφύλλες είναι πράσινες χρωστικές ουσίες, απαραίτητες για τη φωτοσύνθεση, οι οποίες υπάρχουν σε όλους σχεδόν τους φωτοαυτότροφους οργανισμούς. Έχουν αυξημένη σημασία στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών (Odjadjare et al., 2017). Αν και οι χλωροφύλλες εξάγονται κυρίως από φθηνές πηγές όπως το γρασίδι, τα μικροφύκη περιέχουν σημαντική ποσότητα από αυτές. Η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη ενός κυττάρου ποικίλλει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και με το στέλεχος (Spolaore et al., 2006). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι συνθήκες που αυξάνουν την παραγωγή χλωροφύλλης στα μικροφύκη είναι ο χαμηλός φωτισμός, το φάσμα ερυθρού φωτός, η επαρκώς υψηλή θερμοκρασία και η πλήρης περιεκτικότητα σε άζωτο και φώσφορο (da Silva et al., 2017).

Μία άλλη κατηγορία χρωστικών είναι τα καροτενοειδή που ανευρίσκονται σε αφθονία στα μικροφύκη. Πρόκειται για ειδικές χρωστικές ουσίες με κίτρινο, πορτοκαλί και κόκκινο χρωματισμό και είναι κυρίως γνωστά για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (Odjadjare et al., 2017). Τα καροτενοειδή έχουν αυξημένη σημασία για τη βιομηχανία τροφίμων και ζωοτροφών, φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών. Τα καροτενοειδή



διακρίνονται σε καροτένια και ξανθοφύλλες. Τα καροτένια είναι υδρογονάνθρακες χωρίς οξυγόνο, ενώ οι ξανθοφύλλες είναι οξυγονωμένα παράγωγα καροτενίων.

Η τρίτη κατηγορία χρωστικών είναι οι φυκοβιλίνες οι οποίες είναι σύμπλοκα υδρόφιλων πρωτεϊνικών χρωστικών που υπάρχουν μόνο στα κυανοβακτήρια και στα μικροφύκη. Απαιτούν απορρόφηση φωτός για τη φωτοσύνθεση και κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις μεγάλες υποομάδες ανάλογα με το φάσμα που απορροφούν (Odjadjare et al., 2017): στην ερυθρά φυκοερυθρίνη, την ιώδη φυκοερυθροκυανίνη, την κυανή φυκοκυανίνη και τη γαλάζια αλλοφυκοκυανίνη.

### 1.3.3 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες συντίθενται ενδοκυτταρικά και αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος των ενώσεων που προέρχονται από τη φωτοσύνθεση. Η περιεκτικότητά τους μπορεί να φτάσει έως και το 50% του ξηρού βάρους ορισμένων μικροφυκών (Yen et al., 2013). Οι υδατάνθρακες συνήθως ομαδοποιούνται σε τρεις κατηγορίες: πολυσακχαρίτες ενεργειακού αποθέματος, δομικοί πολυσακχαρίτες που συμμετέχουν στο σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος, και πολυσακχαρίτες που εμπλέκονται στην κυτταρική επικοινωνία (Pignolet et al., 2013). Από βιοτεχνολογικής απόψεως, μόνο οι πολυσακχαρίτες ενεργειακού αποθέματος και οι δομικοί πολυσακχαρίτες μπορεί να χρησιμοποιηθούν.

Οι πολυσακχαρίτες ενεργειακού αποθέματος παρέχουν ενέργεια για τις μεταβολικές διεργασίες των οργανισμών. Στην πλειονότητα των μικροφυκών, τα ενεργειακά αποθέματα έχουν τη μορφή αμύλου. Ωστόσο, τα κυανοβακτήρια τείνουν να συσσωρεύουν γλυκογόνο, σακχαρόζη ή γλυκοζυλογλυκερόλη. Σε διάφορες συνθήκες καταπόνησης (στρες), όπως είναι η υψηλή ή χαμηλή αλατότητα και θερμοκρασία, οι υδατάνθρακες μετατρέπονται σε λιπίδια (Han et al., 2016). Η κύρια εφαρμογή των συγκεκριμένων πολυσακχαριτών είναι τα βιοκαύσιμα (Yen et al., 2013).

Οι δομικοί πολυσακχαρίτες εμφανίζουν εφαρμογές στα τρόφιμα, στα καλλυντικά και στα φαρμακευτικά προϊόντα (Yen et al., 2013). Στα ευκαρυωτικά μικροφύκη, το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από μικροϊνίδια ενσωματωμένα σε μια βλέννα που αποτελείται από πολυσακχαρίτες, οι οποίοι σχετίζονται με την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος καθώς και με την αντοχή σε μηχανικές καταπονήσεις. Αντιθέτως, τα κυανοβακτήρια έχουν ένα κυτταρικό τοίχωμα με βάση την πεπτιδογλυκάνη που αποτελείται από κατάλοιπα N-ακετυλογλυκοζαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος συνδεδεμένα με δεσμούς β-1,4 που διασπώνται εύκολα. Επιπλέον, τα μικροφύκη έχουν την ικανότητα παραγωγής και έκκρισης

πολυμερών ουσιών, οι οποίες είτε παραμένουν στην επιφάνεια των κυττάρων (μεμβρανικοί πολυσακχαρίτες) είτε απελευθερώνονται με παρακρινή τρόπο στο εξωκυττάριο περιβάλλον τους, γνωστές ως εξωπολυσακχαρίτες (Yen et al., 2013). Οι εξωπολυσακχαρίτες παρέχουν μία προσαρμοστική απόκριση των μικροφυκών τόσο στις μηχανικές όσο και στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις παρέχοντας προστασία στο κύτταρο. Μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στρατηγικές για τη συσσώρευση εξωπολυσακχαριτών είναι ο περιορισμός των θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο, υφίσταται ένα μεγάλο κενό σχετικά με τη γνώση της δομής των εξωπολυσακχαριτών, οπότε προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η βιοτεχνολογική τους εκμετάλλευση είναι απαραίτητο να υπάρχει πρόσβαση στις διαρθρωτικές τους πληροφορίες για την καθιέρωση σχέσης μεταξύ δομής και βιολογικής δραστηριότητας. Επομένως, περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες και αναμένονται τα επόμενα χρόνια.

#### **1.4 Καλλιέργεια μικροφυκών**

Τα μικροφύκη δύνανται να καλλιεργηθούν τόσο σε εργαστηριακό περιβάλλον όσο και στο πεδίο, σε μεγάλου ή μικρού εύρους καλλιέργειες. Καθώς οι συνθήκες στις καλλιέργειες που λαμβάνουν χώρα σε εργαστηριακό περιβάλλον είναι δυνατόν να ελεγχθούν καλύτερα, οι καλλιέργειες αυτού του τύπου παρουσιάζουν μεγαλύτερο εύρος. Επομένως, οι εργαστηριακές καλλιέργειες δύνανται να είναι αξενικές, δηλαδή να μην περιλαμβάνουν βακτήρια, ή εναλλακτικά να περιλαμβάνουν βακτήρια, να περιλαμβάνουν άλλους οργανισμούς ή όχι, δηλαδή να είναι πολυκαλλιέργειες ή μονοκαλλιέργειες, αντιστοίχως, και να έχουν διαφορετική μορφή. Αντιθέτως, οι καλλιέργειες που λαμβάνουν χώρα εκτός εργαστηρίου αδυνατούν να είναι απομονωμένες, καθώς οι συνθήκες δεν ελέγχονται επαρκώς.

##### **1.4.1 Τεχνολογία παραγωγής μικροφυκών**

Τα μικροφύκη δύνανται να αναπτύσσονται σε σχεδόν κάθε βιότοπο λόγω της οικολογικής τους ποικιλομορφίας και της φυσικής τους προσαρμοστικότητας. Υπάρχουν δύο τύποι καλλιέργειας μικροφυκών, η ανοιχτού τύπου και η κλειστού τύπου, ανάλογα με το αν αλληλεπιδρούν ή όχι με το περιβάλλον. Τα ανοιχτά συστήματα διακρίνονται σε φυσικά νερά (λίμνες, λιμνοθάλασσες) και τεχνητές λίμνες ή δοχεία, ενώ οι κλειστού τύπου καλλιέργειες λαμβάνουν χώρα σε κλειστούς περιέκτες, οι οποίοι καλούνται σωληνοειδείς φωτοβιοαντιδραστήρες με σωλήνες διαφόρων σχημάτων. Οι φωτοβιοαντιδραστήρες βοηθούν

στην απομόνωση της καλλιέργειας των μικροφυκών από το εξωτερικό περιβάλλον, δηλαδή από τους μικροοργανισμούς που ανταγωνίζονται τα μικροφύκη, ενώ ταυτόχρονα βοηθούν στον πιο αποτελεσματικό έλεγχο των συνθηκών παραγωγής των μικροφυκών (Pulz, 2001).

Οι ανοιχτού τύπου καλλιέργειες προσομοιάζουν περισσότερο με το φυσικό περιβάλλον των μικροφυκών. Ο πιο συνηθισμένος τεχνικός σχεδιασμός για τα συστήματα ανοιχτής λίμνης είναι η επιμήκης λεκάνη (raceway) και συνήθως λειτουργεί σε βάθη νερού 15–20 cm. Σε αυτά τα βάθη νερού, οι συγκεντρώσεις βιομάζας φτάνουν έως 1.000 mg/l. Παρόμοιες ως προς τον σχεδιασμό είναι οι κυκλικές λίμνες, κοινές στην Ασία και την Ουκρανία. Η ανάδευση στους αγωγούς της επιμήκους λεκάνης γίνεται συνήθως με πτερυγωτό τροχό, ενώ στους αγωγούς κυκλικής λεκάνης, η ανάδευση λαμβάνει χώρα με κινούμενο βραχίονα (Richmond, 1992). Το κύριο μειονέκτημα που αφορά στην παραγωγικότητα φαίνεται να είναι ο περιορισμός του φωτός. Από τεχνικής άποψης είναι δυνατόν να ενισχυθεί η παροχή φωτός μειώνοντας το βάθος της δεξαμενής. Ωστόσο, πρέπει η μείωση του βάθους να είναι σχετικά μικρή, καθώς μπορεί να υπάρξει τροποποίηση στη συγκέντρωση των ιόντων του υποστρώματος, η οποία οφείλεται στην εξάτμιση του νερού.

Τα ανοιχτού τύπου συστήματα παρουσιάζουν πλεονεκτήματα σε σχέση με αυτά του κλειστού τύπου, που σχετίζονται με το μικρότερο κόστος και τη δυνατότητα μαζικής καλλιέργειας μικροφυκών (Jorquera et al., 2010). Παρά το χαμηλό κόστος, οι ανοιχτού τύπου καλλιέργειες μικροφυκών πάσχουν από διαρκείς επιμολύνσεις από άλλα μικροφύκη, βακτήρια ή μικροοργανισμούς, οι οποίες ανάλογα με την έκτασή τους μπορεί οδηγήσουν ακόμα και να σε καταστροφή της καλλιέργειας. Επιπροσθέτως, οι ανοιχτές καλλιέργειες επηρεάζονται έντονα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Σημαντικές απώλειες από την εξάτμιση του νερού που οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης των αλάτων με αρνητική επίδραση στην καλλιέργεια μικροφυκών, η διάχυση του CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα, καθώς και η μόνιμη απειλή της μόλυνσης αποτελούν τα κύρια μειονεκτήματα.

Μέχρι προσφάτως, τα ανοιχτά συστήματα αποτελούσαν τα πιο σημαντικά συστήματα για την παραγωγή μικροφυκών. Ωστόσο, η παρασκευή προϊόντων υψηλής αξίας από μικροφύκη για εφαρμογές στη φαρμακευτική και στη βιομηχανία καλλυντικών φαίνεται να είναι εφικτή μόνο με τη χρήση του κλειστού φωτοβιοαντιδραστήρα, ο οποίος παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής σε συνθήκες σχετικές με την ορθή πρακτική παραγωγής σύμφωνα με τις οδηγίες ISO και EC.

Οι κλειστού τύπου καλλιέργειες χαρακτηρίζονται από τον έλεγχο όλων των βιοτεχνολογικά σημαντικών παραμέτρων και ταυτόχρονα επιφέρουν τα παρακάτω οφέλη: μειωμένο κίνδυνο μόλυνσης, μη απώλεια CO<sub>2</sub>, αναπαραγωγίμες συνθήκες καλλιέργειας,

ελεγχόμενη υδροδυναμική και θερμοκρασία, και ευέλικτο τεχνικό σχεδιασμό. Οι κλειστού τύπου καλλιέργειες διακρίνονται σε στεγασμένες ή σε υπαίθριες καλλιέργειες, με τις στεγασμένες καλλιέργειες να χαρακτηρίζονται από πιο ελεγχόμενες συνθήκες. Η πρώτη γενιά κλειστού τύπου καλλιέργειας αποτελείται από κλειστού τύπου δοχεία, τα οποία όμως αντιμετώπιζαν σοβαρούς περιορισμούς λόγω της έλλειψης της απαιτούμενης φωτεινής ενέργειας για την επιτυχημένη ανάπτυξη βιομάζας. Οι κλειστού τύπου καλλιέργειες πραγματοποιούνται στους φωτοβιοαντιδραστήρες, οι οποίοι είναι κλειστού τύπου περιέκτες. Οι κλειστοί φωτοβιοαντιδραστήρες ελέγχουν μαζικές καλλιέργειες μικροφυκών στις ακόλουθες διαμορφώσεις: (1) σωληνωτά συστήματα (γυαλί, πλαστικό, σακούλες), (2) πεπλατυσμένα συστήματα τύπου πλάκας και (3) εξαιρετικά λεπτές ακινητοποιημένες διαμορφώσεις. Οι κάθετες διατάξεις οριζόντιων σωλήνων ή πλακών φαίνεται να προτιμώνται για λόγους διάθεσης φωτός.

Ο σχεδιασμός των φωτοβιοαντιδραστήρων αποτελεί μία εξαιρετικά πολύπλοκη υπόθεση και απαιτούνται εξειδικευμένες γνώσεις. Από τη δεκαετία του 1990, έχει αποδειχτεί ότι παράμετροι όπως η συχνότητα εμφάνισης φωτός στον αυλό του φωτοβιοαντιδραστήρα, η διαδρομή του φωτός, το πάχος στρώματος, οι αναταράξεις και η απελευθέρωση  $O_2$  από τον συνολικό όγκο του συστήματος είναι σημαντικές. Κλειστά ή σχεδόν κλειστά συστήματα που βασίζονται σε πολύ διαφορετικές σχεδιαστικές ιδέες έχουν ήδη εφαρμοστεί και δοκιμαστεί σε πιλοτική κλίμακα. Ως πιο σημαντικά μέρη των φωτοβιοαντιδραστήρων θεωρούνται τα συστήματα θρέψης, φωτισμού, εμπλουτισμού με  $CO_2$ , ανάδευσης, θέρμανσης και ψύξης και το σύστημα απομάκρυνσης  $O_2$  και διαχωρισμού αερίων (Molina et al., 2001). Οι τελευταίες εξελίξεις φαίνεται να κατευθύνονται προς τους φωτοβιοαντιδραστήρες σωληνωτής διαμόρφωσης ή τύπου compact-plate καθώς και τον συνδυασμό αυτών των κύριων αρχών σχεδιασμού προκειμένου να διανέμεται το φως σε μια διευρυμένη επιφάνεια.

Τα συστήματα αυτά, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, εμφανίζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων σε σύγκριση με της ανοιχτού τύπου καλλιέργειας, που σχετίζονται με τη μείωση των μολύνσεων της καλλιέργειας από άλλους οργανισμούς, τη μείωση της απώλειας ύδατος και  $CO_2$ , την αύξηση της παραγωγικότητας και τον καλύτερο έλεγχο της καλλιέργειας και των συνθηκών της. Ωστόσο, οι φωτοβιοαντιδραστήρες αποτελούν έναν ιδιαίτερα κοστοβόρο τρόπο καλλιέργειας (Issarapayup et al., 2011).



*Εικόνα 4 Τύποι συστημάτων ασυνεχούς καλλιέργειας μικροφυκών. (Μάρκου et al., 2013)*

#### **1.4.2 Είδη μεταβολισμού**

Όπως όλα τα ζωντανά κύτταρα, τα μικροφύκη έχουν την ανάγκη μιας πηγής ενέργειας και πρώτες ύλες για τη διατήρηση σταθερής βιοσύνθεσης, ανάπτυξης και κυτταρικής διαίρεσης (Sun et al., 2018). Ανάλογα με τις πηγές άνθρακα και ενέργειας που χρησιμοποιούνται, τα μικροφύκη κατηγοριοποιούνται σε φωτοαυτότροφα, ετερότροφα, μιξότροφα και φωτοετερότροφα (Hu et al., 2018).

Τα φωτοαυτότροφα μικροφύκη βιοσυνθέτουν οργανική ύλη χρησιμοποιώντας τον ανόργανο άνθρακα ως πηγή άνθρακα και το φως ως πηγή ενέργειας (Huang et al., 2010), σχηματίζοντας χημική ενέργεια μέσω φωτοσύνθεσης. Ο άνθρακας που δεσμεύεται από τα μικροφύκη ενσωματώνεται σε μοριακές δομές, όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή προϊόντων φυσικής προέλευσης (Subhash et al., 2017). Ο χαμηλότερος κίνδυνος βιολογικής μόλυνσης αποτελεί πλεονέκτημα, καθώς η απουσία οργανικού άνθρακα σε αυτό το είδος καλλιέργειας, προστατεύει το μέσο από τα ετερότροφα βακτήρια. Ως εκ τούτου, αυτός ο τρόπος καλλιέργειας είναι πιο κατάλληλος για την καλλιέργεια μικροφυκών στην ύπαιθρο σε σύγκριση με τους άλλους τρόπους καλλιέργειας (Chew et al., 2018). Η φωτοαυτότροφη

λειτουργία συνιστάται για την καλλιέργεια μικροφυκών σε υπαίθρια κλίμακα, αλλά η εφαρμογή της περιορίζεται από την εξάρτηση από το φως. Η χαμηλότερη παραγωγικότητα βιομάζας των μικροφυκών που καλλιεργούνται με φωτοαυτότροφο τρόπο σε σύγκριση με τους τρόπους ετερότροφης και μιξότροφης καλλιέργειας είναι ένα άλλο μειονέκτημα, το οποίο αποδίδεται στην επίδραση της αυτοσκίασης στην κατακόρυφη κατανομή των μικροφυκών που αποτρέπει τη διαθεσιμότητα φωτός για πιο πυκνή καλλιέργεια.

Αντιθέτως, στην ετερότροφη καλλιέργεια, τα μικροφύκη έχουν την ικανότητα ανάπτυξης απουσία φωτός. Τα κύτταρα χρησιμοποιούν για τον κυτταρικό μεταβολισμό ως πηγή άνθρακα και ενέργειας τον οργανικό άνθρακα (Lam & Lee, 2012a). Η παραγωγή βιομάζας με τη μέθοδο ετερότροφης καλλιέργειας είναι υψηλότερη από αυτή της φωτοαυτότροφης μεθόδου καλλιέργειας. Αυτό αιτιολογείται βάσει της ανεξαρτησίας των ετερότροφων μικροφυκών από το φως (Chew et al., 2018). Η καλλιέργεια μικροφυκών σε σκοτεινές συνθήκες μειώνει την απαίτηση υψηλής αναλογίας επιφάνειας προς όγκο, γεγονός που διευκολύνει τον σχεδιασμό των βιοαντιδραστήρων ετερότροφων μικροφυκών και μειώνει το κόστος παραγωγής (Zhan et al., 2017). Ωστόσο, αυτό το είδος καλλιέργειας παρουσιάζει και μειονεκτήματα, καθώς μόνο ορισμένα είδη μικροφυκών μπορούν να αναπτυχθούν ετεροτροφικά και υφίσταται υψηλός κίνδυνος για ανάπτυξη ανταγωνιστικών ετερότροφων μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, ζυμομύκητες και μύκητες, τα οποία ανταγωνίζονται τα ετερότροφα μικροφύκη για τα ίδια υποστρώματα οργανικού άνθρακα.

Μερικά είδη μικροφυκών αναπτύσσονται υπό μιξοτροφικές συνθήκες χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα τόσο ανόργανο σε μορφή CO<sub>2</sub>, όσο και οργανικές ενώσεις, ενώ ως πηγή ενέργειας χρησιμοποιούνται διάφορα μήκη κύματος της ηλιακής ακτινοβολίας αλλά και άλλες πηγές. Τα μιξοτροφικά μικροφύκη, που διαθέτουν φωτοαυτοτροφικά και ετεροτροφικά χαρακτηριστικά, επωφελούνται από τα πλεονεκτήματα τόσο των φωτοαυτοτροφικών, όσο και των ετεροτροφικών μεθόδων λειτουργίας. Η συνδυασμένη χρήση CO<sub>2</sub>, οργανικών ενώσεων και φωτός είναι η διακριτική ιδιότητα των μιξοτροφικών μικροφυκών. Αυτή η ικανότητα μεγιστοποιεί τη χρήση διαφορετικών πόρων για την παροχή άνθρακα και απαιτεί ενέργεια υποστηρίζοντας τις απαιτήσεις τόσο του φωτοαυτότροφου όσο και του ετερότροφου μεταβολισμού. Στη μιξοτροφική καλλιέργεια, η απαίτηση φωτός είναι χαμηλότερη από ό,τι για την φωτοαυτοτροφική ανάπτυξη, γεγονός που οδηγεί στην εξάλειψη της περιοριστικής δράσης του φωτός. Τα μιξοτροφικά μικροφύκη συμμετέχουν στη μείωση του CO<sub>2</sub> μέσω της φωτοσύνθεσης, καθώς το CO<sub>2</sub> που απελευθερώνεται από την αναπνοή στον ετεροτροφικό μεταβολισμό παγιδεύεται και επαναχρησιμοποιείται κατά τη φωτοαυτοτροφική ανάπτυξη (Gaignard et al., 2019). Η

παραγωγή βιομάζας στη μέθοδο μικτής καλλιέργειας είναι υψηλότερη από ό,τι στις δύο προηγούμενες μεθόδους καλλιέργειας που αναφέρθηκαν. Ωστόσο, παρομοίως με τη μέθοδο ετεροτροφικής καλλιέργειας, ο κίνδυνος για μόλυνση από ανεπιθύμητους ετερότροφους μικροοργανισμούς είναι αυξημένος, ενώ, παρά το γεγονός ότι η εξάρτηση από το φως είναι μειωμένη σε σχέση με την φωτοαυτοτροφική καλλιέργεια, εξακολουθεί να είναι ένα ζωτικό στοιχείο για την ανάπτυξη μικροφυκών. Επομένως, η μιξοτροφική καλλιέργεια απαιτεί οργανικά υποστρώματα και αποστείρωση για την αποφυγή μόλυνσης και επιπλέον παρουσία φωτός που ενδέχεται να αυξήσει το συνολικό κόστος του σχεδιασμού και της λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα. Επιπλέον, ο αριθμός των μικροφυκών που αναπτύσσονται μιξοτροφικά είναι ελάχιστος.

Τα φωτοετερότροφα μικροφύκη αποτελούν μια ομάδα μικροφυκών, τα οποία απαιτούν φως ως πηγή ενέργειας και οργανικό άνθρακα ως πηγή άνθρακα, ενώ δεν μπορούν να μεταβολίσουν το CO<sub>2</sub> και να αναπτυχθούν παρουσία γλυκόζης αλλά απουσία φωτός (Yeh et al., 2012). Τα φωτοετερότροφα χρησιμοποιούν τη γλυκόζη ως δομικό υλικό, αλλά όχι ως πηγή ενέργειας. Η φωτοετεροτροφική καλλιέργεια αποτελεί μία δαπανηρή καλλιέργεια, καθώς τα μικροφύκη χρειάζονται τόσο οργανικό άνθρακα όσο και φωτισμό για την ανάπτυξη και τον σχεδιασμό του φωτοβιοαντιδραστήρα (Chew et al., 2018).

## 1.5 Μεταβατικά συστήματα

Ο όρος μεταβατικά οικοσυστήματα έκανε την εμφάνισή του το 2000 με την Οδηγία 2000/60/EC με σκοπό να οριστεί το τμήμα που υπάρχει ανάμεσα στα παράκτια και τα γλυκά ύδατα. Επομένως, σύμφωνα με την οδηγία αυτή τα μεταβατικά συστήματα ορίζονται ως τα συστήματα υδάτων κοντά στο στόμιο ποταμών, τα οποία είναι κατά ένα μέρος τους αλμυρά λόγω της γειννιάσής τους με παράκτια ύδατα, αλλά επηρεάζονται και από ρεύματα γλυκού ύδατος. Τα μεταβατικά οικοσυστήματα αποτελούν περιοχές όπου συγκλίνουν δύο διαφορετικά συστήματα, μεταξύ των οποίων υφίσταται ένα σημείο συνάντησης, η άκρη ή τα οικολογικά σύνορα. Στα συγκεκριμένα οικοσυστήματα συγκαταλέγονται οι λιμνοθάλασσες, οι παράκτιες λίμνες και άλλα είδη υδάτινων συστημάτων. Μεταβατικά οικοσυστήματα υπάρχουν παντού στον κόσμο, καταλαμβάνοντας το 13% της ακτογραμμής παγκοσμίως (Nixon et al., 1982), έχουν έκταση από < 0,01 km<sup>2</sup> έως > 10.000 km<sup>2</sup> και έχουν συνήθως βάθος < 5 m. Αποτελούν εξαιρετικά δυναμικά, ετερογενή και πολύπλοκα οικοσυστήματα στο όριο μεταξύ χερσαίων και θαλάσσιων περιοχών (Pérez-Ruzafa et al., 2012). Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους, όπως η ρηχότητα, η έντονη αλληλεπίδραση μεταξύ επίγειων και

θαλάσσιων οικοσυστημάτων, η σχετική απομόνωση, η προστασία από τη θάλασσα και η παρουσία ορίων με ισχυρές φυσικές και οικολογικές κλίσεις, τα καθιστούν ως τα πιο παραγωγικά οικοσυστήματα παγκοσμίως (Nixon et al., 1982). Τα μεταβατικά οικοσυστήματα είναι εξαιρετικά εργαστήρια, με χωροταξικά καθορισμένες οριακές συνθήκες, για τη μελέτη και επικύρωση μοντέλων σε ένα πλήθος από βιολογικές και οικολογικές διεργασίες, στην οργάνωση των κοινοτήτων, την παραγωγικότητα, το αντίκτυπο των ανθρώπινων δραστηριοτήτων ή την κλιματική αλλαγή. Σε αυτόν τον τύπο οικοσυστήματος αλληλεπιδρούν διάφορες παράμετροι της χλωρίδας και της πανίδας κάθε μιας από τις βιολογικές κοινότητες, στο δε σημείο τομής ευδοκμοούν φυτικά και ζωικά είδη διαφορετικά από τα είδη που εντοπίζονται στις πέριξ (των μεταβατικών οικοσυστημάτων) περιοχές. Επίσης, παρουσιάζουν μεγάλες αβιοτικές διαφορές, π.χ. στο μέγεθος, τη μορφολογία ή την τροφική κατάσταση, την αλατότητα και τη θερμοκρασία (Pérez-Ruzafa et al., 2007).

Τα μεταβατικά οικοσυστήματα υποστηρίζουν πληθώρα φυσικών υπηρεσιών χρήσιμων για την κοινωνία, όπως είναι η αλιεία, η προστασία από τις καταιγίδες, ο τουρισμός κ.α. Παρά τη σημασία τους που τονίζει την ανάγκη διατήρησής τους, απειλούνται σοβαρά από διάφορους παράγοντες όπως είναι ο ευτροφισμός, η ρύπανση, η αστικοποίηση και ποικίλες μορφές τροποποίησης στις λεκάνες απορροής, που προκαλούνται από την ανθρώπινη δραστηριότητα στις παράκτιες περιοχές. Η πιο κοινή απειλή είναι η τροποποίηση της φυσικής τους υδρολογίας, ιδιαίτερα η τεχνητή σύνδεση με τον ωκεανό. Δημιουργούνται δηλ. τεχνητά ανοίγματα για τη διαχείριση αυτών των παράκτιων συστημάτων για διάφορους σκοπούς, όπως η βελτίωση της αλιείας, η μείωση της στάθμης των υδάτων για την αποφυγή πλημμυρών, η απομάκρυνση της άνθησης των φυκών (blooms) ή η μείωση του επιπέδου θρεπτικών συστατικών (Esteves et al., 2008).

### **1.5.1 Φυσικά χαρακτηριστικά των μεταβατικών οικοσυστημάτων**

Η ποσότητα και η ποιότητα του νερού τείνει να τροποποιείται από τον ρυθμό με τον οποίο η λιμνοθάλασσα χάνει ή κερδίζει νερό από την εξάτμιση, τη βροχόπτωση, τα υπόγεια ύδατα, την επιφανειακή απορροή και την ανταλλαγή ύδατος με τον ωκεανό. Η ανταλλαγή ύδατος ανάμεσα στη λιμνοθάλασσα και τον ωκεανό καθοδηγείται από την παλίρροια και τη δράση των κυμάτων. Η θερμότητα επηρεάζεται από την ανταλλαγή με την ατμόσφαιρα, τα ιζήματα και τον ωκεανό. Ο ρυθμός έκπλυσης στις λιμνοθάλασσες τείνει να είναι χαμηλός λόγω της περιορισμένης ανταλλαγής με τον ωκεανό, συμβάλλοντας στην υψηλή πρωτογενή



παραγωγικότητα και δυνητικά σε υψηλές συγκεντρώσεις ρύπων, αλλά και επηρεάζεται από το μέγεθος και το σχήμα της λιμνοθάλασσας, το επίπεδο συνδεσιμότητας με τον ωκεανό, το παλιρροιακό εύρος και τη ροή του γλυκού νερού.

### 1.5.2 Οικολογικά χαρακτηριστικά μεταβατικών οικοσυστημάτων

Όπως τονίστηκε και παραπάνω οι λιμνοθάλασσες αποτελούν οικοσυστήματα υψηλής παραγωγικότητας και συμβάλλουν στην αύξηση της συνολικής παραγωγικότητας των παράκτιων υδάτων υποστηρίζοντας μια ποικιλία οικοτόπων. Παρέχουν ένα φυσικό καταφύγιο για τα θηράματα, το οποίο ενισχύει την βιοποικιλότητα και αποτελεί έναν απαραίτητο οικότοπο για πολλά είδη ψαριών και οστρακοειδών (Harris et al., 2004).

Οι παράκτιες λιμνοθάλασσες αποτελούν ευνοϊκό χώρο για τους πρωτογενείς παραγωγούς, όπως είναι το φυτοπλαγκτόν και τα υδρόβια φυτά, λόγω των σχετικά χαμηλών ποσοστών έκπλυσης. Τα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των πρωτογενών παραγωγών προέρχονται από τις επιφανειακές ροές και τα υπόγεια ύδατα. Η αύξηση των πρωτογενών παραγωγών οδηγεί στην επακόλουθη αύξηση της δευτερογενούς παραγωγής. Ωστόσο, η υπερβολική αύξηση μπορεί να οδηγήσει σε ευτροφισμό και επακόλουθη υποξία και μειωμένη διείσδυση φωτός, παράγοντες που με τη σειρά τους οδηγούν στην εξαφάνιση οργανισμών (Anderson et al., 2002).

### 1.6 Είδη μικροφυκών

Μέχρι σήμερα, έχει ανευρεθεί ένας μεγάλος αριθμός φυκών, τα οποία διαθέτουν αρκετά χαρακτηριστικά που βοηθούν στην ταξινόμησή τους στα φυλογενετικά δέντρα των φυκών. Εξ αιτίας του μεγάλου αριθμού, στην παρούσα εργασία θα αναλυθούν 2 γένη μικροφυκών, τα *Tetraselmis* και *Dunaliella*, τα οποία χρησιμοποιούνται στην πειραματική διαδικασία. Πρόκειται για δύο γένη μικροφυκών με πιθανές εφαρμογές στην υδατοκαλλιέργεια, τη βιοεξυγίανση και την παραγωγή ενώσεων υψηλής αξίας. Αμφότερα τα γένη είναι μονοκύτταρα, ελευθέρως διαβιούντα μικροφύκη που είναι φωτοσυνθετικά, οπότε και χρησιμοποιούν την ενέργεια του φωτός για την παραγωγή οργανικής ύλης. Εντοπίζονται συνήθως σε μεταβατικά συστήματα, όπως τις λιμνοθάλασσες. Έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε χρωστικές ουσίες, όπως χλωροφύλλες και καροτενοειδή, οι οποίες τους προσδίδουν τον πράσινο χρωματισμό. Επιπλέον, αποτελούν δυνητικές πηγές βιοκαυσίμων, τροφίμων και άλλων πολύτιμων προϊόντων. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες διαφορές μεταξύ των δύο γενών.

Όσον αφορά στη μορφολογία, τα κύτταρα του *Tetraselmis* έχουν σχήμα απιοειδές με τέσσερις χλωροπλάστες, ενώ τα κύτταρα της *Dunaliella* είναι σφαιρικά ή ελλειψοειδή και δεν διαθέτουν μαστίγια (Guiry, M. D., 2013). Φυσιολογικά, η *Dunaliella* είναι γνωστή για την ικανότητά της να επιβιώνει σε ακραία περιβάλλοντα, όπως η υψηλή αλατότητα και η υψηλή ένταση φωτός, συσσωρεύοντας μεγάλες ποσότητες β-καροτενίου και άλλων παρόμοιων διαλυτών ουσιών (Ben-Amotz et al., 1982, Borowitzka et al., 1982). Το *Tetraselmis* έχει μικρότερη ανοχή σε ακραία περιβάλλοντα και συνήθως απαντάται σε ύδατα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά (Chauton et al., 2013). Από οικολογική άποψη, η *Dunaliella* απαντάται συνήθως σε υπεραλατούχα περιβάλλοντα, όπως αλυκές και αλμυρές λίμνες, και μπορεί να συμβάλει στη ροδόχροη απόχρωση αυτών των περιβαλλόντων λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς της σε β-καροτένιο (Ben-Amotz et al., 1982, Borowitzka et al., 1982). Το γένος *Tetraselmis* απαντάται συχνότερα σε εκβολές ποταμών και παράκτια ύδατα (Chauton et al., 2013). Στη συγκεκριμένη εργασία, τα στελέχη *Tetraselmis* και *Dunaliella* απομονώθηκαν από 2 μεταβατικά συστήματα, τη λιμνοθάλασσα Ροδιά στην Άρτα και τη λιμνοθάλασσα Μεγάλο Έμβολο στη Χαλκιδική, αντίστοιχα.

#### 1.6.1 *Tetraselmis* sp.

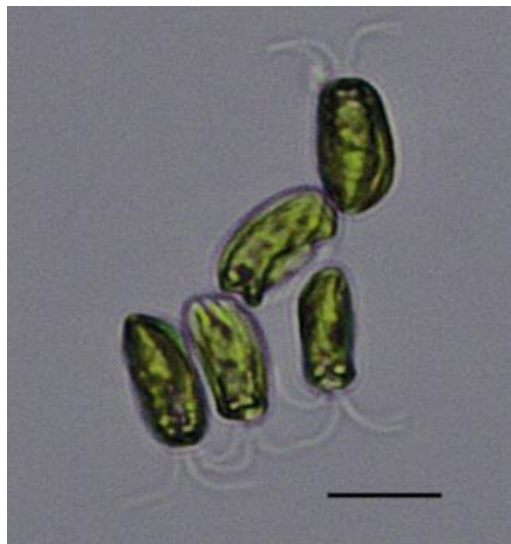
Το γένος *Tetraselmis*, το οποίο ανήκει στην τάξη των Chlorodendrales απαντάται συνήθως σε εκβολές ποταμών, σε λίμνες παλίρροιας (tidal pools) και υφάλμυρες λίμνες, όπου συχνά παρατηρούνται περιβαλλοντικές διακυμάνσεις λόγω καταιγίδων, της δράσης των κυμάτων και της εξάτμισης και περιλαμβάνει μικροφύκη θαλάσσιων και γλυκών υδάτων (Garrity et al., 1984). Είναι μονοκύτταροι μαστιγιοφόροι οργανισμοί, με ελλειπτικά ή σχεδόν σφαιρικά, ελαφρώς πεπλατυσμένα κύτταρα, με 4 ίσα μαστίγια σε 2 αντιδιαμετρικά ζεύγη, που αναδύονται από μια σχισμή στην κορυφή της βάσης, ενιαίο μεγάλο χλωροπλάστη που περιέχει ένα πυρηνοειδές και μια εμφανή οφθαλμική κηλίδα και έναν πυρήνα που τοποθετείται παράλληλα στην πλευρά που εντοπίζονται τα μαστίγια και το πυρηνοειδές. Η μορφολογία του χαρακτηρίζεται από χλωροπλάστες έντονου πράσινου χρώματος. (Guillou et al., 2004) Τα κύτταρα του γένους *Tetraselmis* αναπαράγονται αγενώς ενώ δεν έχει παρατηρηθεί εγγενής αναπαραγωγή. Η αγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται στο μη κινητό στάδιο εντός του γονεϊκού περιπλάστη. Βλαστητικές κύστες με παχιά τοιχώματα είναι γνωστές σε πολλά είδη και βλαστάνουν με διαίρεση προς 4 κύτταρα.

Τα θαλάσσια μικροφύκη είναι οι κύριοι παραγωγοί μακράς αλυσίδας ω-3 λιπαρών οξέων. Το γένος *Tetraselmis* καλλιεργείται εύκολα και πολλά είδη, όπως το *Tetraselmis*

*chuii*, το *Tetraselmis. suecica* και το *Tetraselmis. tetrahele*, χρησιμοποιούνται ευρέως ως τροφή στις υδατοκαλλιέργειες. Πιο πρόσφατα, ευρύαλα στελέχη του γένους *Tetraselmis* που έχουν την ικανότητα ανάπτυξης σε ένα πολύ ευρύ φάσμα αλατότητας έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον ως πιθανές, βιώσιμες πηγές λιπιδίων για βιοκαύσιμα. (Borowitzka, 2018)

**Πίνακας 1** Ταξινόμηση του γένους *Tetraselmis* sp. (Πηγή: <https://www.marinespecies.org>)

Επικράτεια:	Chlorophyta
Ομοταξία:	Chlorodendrophyceae
Τάξη:	Chlorodendrales
Οικογένεια:	Chlorodendraceae
Γένος:	<i>Tetraselmis</i>



**Εικόνα 5** *Tetraselmis* sp. από μια αλμυρή λίμνη στη νήσο Rottneest της Δυτικής Αυστραλίας (Borowitzka, 2018).

### 1.6.2 *Dunaliella* sp.

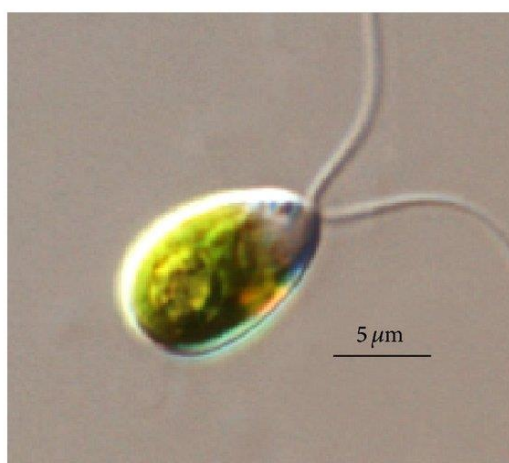
Το γένος *Dunaliella* ανήκει στο φύλο Chlorophyta, τάξη Volvocales και οικογένεια Dunaliellaceae. Τα είδη του γένους αυτού είναι μονοκύτταρα, φωτοσυνθετικά και κινητά δινομαστιγωτά μικροφύκη που διακρίνονται μορφολογικά από την έλλειψη άκαμπτου κυτταρικού τοιχώματος (Borowitzka et al., 2007). Το γένος *Dunaliella* περιλαμβάνει σχεδόν 30 είδη, τα οποία διαβιούν σε θαλάσσια καθώς και σε υπεραλατώδη περιβάλλοντα. Τα πιο γνωστά είδη του γένους είναι τα ακόλουθα: *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella primolecta*, *Dunaliella viridis*, *Dunaliella bioculata*, *Dunaliella acidophyla*, *Dunaliella parva* και *Dunaliella media*.

Τα κύτταρα του γένους *Dunaliella* είναι ωοειδή, σφαιρικά, ατρακτοειδή ή ελλειψοειδή με μέγεθος που ποικίλλει από 5 έως 25 μm σε μήκος και από 3 έως 13 μm σε πλάτος. Τα κύτταρα περιέχουν επίσης έναν ενιαίο κυπελλοειδή χλωροπλάστη που έχει ως επί το πλείστον ένα κεντρικό πυρηνοειδές που περιβάλλεται από κόκκους αμύλου. Τα κύτταρα των διαφόρων ειδών *Dunaliella* περιέχουν οργανίδια τυπικά για τα πράσινα φύκη, όπως τον πυρήνα που συνδέεται με τη μεμβράνη, μιτοχόνδρια, κενοτόπια, σύμπλεγμα Golgi και μια οφθαλμική κηλίδα. Το κύτταρο περικλείεται μόνο από μια ελαστική πλασματική μεμβράνη που καλύπτεται από μια επιφανειακή επικάλυψη βλέννας και συρρικνώνεται ή διογκώνεται άμεσα σε διαφορές όσμωσης, όταν δηλαδή εκτίθεται σε υπέρτονα κι υπότονα περιβάλλοντα, αντιστοίχως. Τα είδη του γένους *Dunaliella* πολλαπλασιάζονται με κατά μήκος διαίρεση, αλλά η εγγενής αναπαραγωγή συμβαίνει σπάνια με ισογαμία με τη διαδικασία της σύζευξης.

Το φωτοσυνθετικό σύστημα των κυττάρων του γένους βασίζεται στη χλωροφύλλη α και στη χλωροφύλλη β, που συνοδεύονται από διαφορετικά καροτενοειδή, συμπεριλαμβανομένης της λουτεΐνης και του β-καροτενίου. Μερικά είδη *Dunaliella* δύνανται υπό κατάλληλες συνθήκες να παράγουν τεράστιες ποσότητες β-καροτενίου, που υπερβαίνουν ακόμη και το 10% του ξηρού βάρους των κυττάρων (Ben-Amotz et al., 2009). Ως αποτέλεσμα, τα κύτταρα αποκτούν έντονο πορτοκαλί χρώμα (Ben-Amotz et al., 2009). Η μαζική παραγωγή β-καροτενίου σε στελέχη *Dunaliella* προκαλείται υπό συνθήκες καταπόνησης, όπως για παράδειγμα με υψηλή ένταση φωτός, υψηλή συγκέντρωση άλατος, ανεπάρκεια νιτρικών αλάτων και ακραίες θερμοκρασίες. Τα μόρια β-καροτενίου χρησιμεύουν στην προστασία των κυττάρων από υψηλής έντασης ακτινοβολία (Ben-Amotz et al., 1982).

**Πίνακας 2** Ταξινόμηση του γένους *Dunaliella* sp. (Πηγή: <https://www.marinespecies.org>)

Επικράτεια:	Chlorophyta
Ομοταξία:	Chlorophyceae
Τάξη:	Chlamydomonadales
Οικογένεια:	Dunaliellaceae
Γένος:	<i>Dunaliella</i>



**Εικόνα 6** Ζωντανό κύτταρο *Dunaliella* sp. (de Morais et al., 2015).

### 1.7 Ρυθμός ανάπτυξης των μικροφυκών

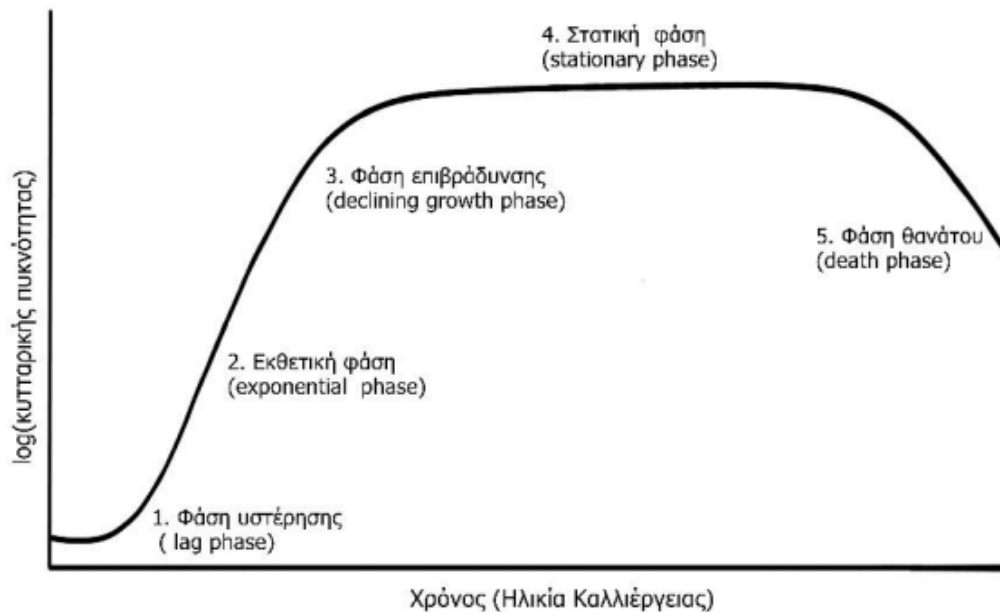
Η καλλιέργεια των μικροφυκών είναι μια διαδικασία η οποία έχει συμβάλει σε σημαντικό βαθμό, τόσο στη μελέτη των μικροφυκών όσο και στην αξιοποίησή τους για βιοτεχνολογικούς σκοπούς. Η διαδικασία αποτελεί έναν συνδυασμό τεχνικών της Φυκολογίας και της Μικροβιολογίας και αποσκοπεί στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων κυττάρων μέσω του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Οι βασικές παράμετροι για την ανάπτυξη μιας καλλιέργειας είναι το φως και το διοξείδιο του άνθρακα για την επίτευξη της φωτοσύνθεσης. Τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης συσσωρεύονται σε διάφορες μορφές, όπως

ως συστατικά των κυττάρων ή αποθηκευτικά υλικά, και η ποσότητά τους κυμαίνεται από 20 έως 50% της συνολικής βιομάζας (Imran et al., 2018, Zhong et al., 2012)

Τα κύτταρα των μικροφυκών δύνανται να καλλιεργηθούν είτε σε καλλιέργεια ασυνεχούς (batch) ή συνεχούς (continuous) τύπου. Η διαφορά μεταξύ τους είναι μία: κατά την συνεχή καλλιέργεια, το σύστημα τροφοδοτείται συνεχώς με νέα θρεπτικά συστατικά, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει περιοριστικός παράγοντας στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αντιθέτως, στο σύστημα καλλιέργειας ασυνεχούς τύπου, τα θρεπτικά εισάγονται στην καλλιέργεια μόνο στην έναρξή της, με αποτέλεσμα κάποια στιγμή η ανάπτυξή της σταματά, καθώς κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, τα θρεπτικά μειώνονται όσο αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων. Ουσιαστικά, η διαθεσιμότητα θρεπτικών αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα ανάπτυξης των καλλιεργειών στα κλειστά συστήματα καλλιέργειας.

Η ανάπτυξη των ασυνεχών καλλιεργειών των μικροφυκών μπορεί να απεικονιστεί ως μια σιγμοειδής καμπύλη όπου εμφανίζονται τα διάφορα στάδια ανάπτυξης του οργανισμού. Το πρώτο στάδιο είναι η φάση υστέρησης, όπου τα κύτταρα που έχουν εμβολιαστεί στην καλλιέργεια προσαρμόζονται στο νέο τους περιβάλλον και υπερβαίνουν σταδιακά την καταπόνηση (στρες) της μεταφοράς τους. Στο στάδιο αυτό, η βασική ανάγκη του κυττάρου είναι η επιβίωση και η ομοιόσταση, και ως εκ τούτου δεν παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων κατά τη φάση αυτή. Η επόμενη φάση είναι η εκθετική. Τα κύτταρα έχουν προσαρμοστεί και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται με εκθετικό ρυθμό, καθώς οι συνθήκες καλλιέργειας είναι ευνοϊκές και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων επιτυγχάνεται στον ελάχιστο δυνατό χρόνο. Η τρίτη φάση είναι η φάση επιβράδυνσης. Κατά τη φάση αυτή, η καλλιέργεια παύει να αυξάνεται με εκθετικό ρυθμό. Συνήθως αυτό οφείλεται σε αυξημένη κυτταρική πυκνότητα που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της διαθεσιμότητας του φωτός. Η επόμενη φάση είναι η στατική όπου δεν παρατηρείται περαιτέρω αύξηση της καλλιέργειας (όσα κύτταρα παράγονται τόσα πεθαίνουν οπότε ο πληθυσμός διατηρείται σταθερός). Κατά τη στατική φάση έχει καταναλωθεί πλήρως ένα ή περισσότερα θρεπτικά της καλλιέργειας ή κάποια μεταβολικά προϊόντα τα οποία παράγονται είναι τοξικά και συσσωρεύονται στην καλλιέργεια, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να υπόκεινται σε καταπόνηση (στρες). Τέλος, στη φάση θανάτου, τα κύτταρα εξ αιτίας της εκτεταμένης καταπόνησης αρχίζουν σταδιακά και πεθαίνουν, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων (Χαντζηστρούντσιου , 2020, Διατριβή). Τόσο στα εργαστήρια όσο και στις βιομηχανίες, είναι απαραίτητες οι δημιουργίες τέτοιων καμπυλών ανάπτυξης για την εύρεση της κατάλληλης χρονικής στιγμής κατά την πορεία της καλλιέργειας, για την πρόσληψη των

μέγιστων δυνατών ποσοτήτων βιομάζας. Συγκεκριμένα, η συλλογή επιλέγεται να γίνεται στο τέλος της εκθετικής φάσης, όπου τα κύτταρα έχουν φτάσει το μέγιστο αριθμό κυττάρων, ενώ δεν έχει επέλθει ακόμη ο κυτταρικός θάνατος. Επειδή αυτή η χρονική στιγμή μπορεί να διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ειδών, καθώς δεν διαθέτουν όλα τα μικροφύκη τον ίδιο ρυθμό ανάπτυξης, είναι απαραίτητος ο έλεγχος 'monitoring' κάθε στελέχους ξεχωριστά (Kim et al., 2005).



**Εικόνα 7** Καμπύλη αύξησης ασυνεχούς καλλιέργειας μικροφυκών (Χαντζηστρόντσιου, 2020, Διατριβή).

## 2. Λιπίδια

Τα λιπίδια συμπεριλαμβάνουν ποικίλες χημικές ενώσεις με κοινό χαρακτηριστικό ότι είναι αδιάλυτα στο νερό. Αποτελούν ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά των φυσικών τροφίμων και πολλών συνθετικών ενώσεων και γαλακτωμάτων. Τα λιπίδια είναι μια ποικίλη ομάδα μορίων που περιλαμβάνει λίπη, έλαια, κηρούς, στερόλες και συναφείς ενώσεις (Vance & Vance, 2013). Αποτελούν ζωτικό συστατικό όλων των ζωντανών κυττάρων και έχουν πολυάριθμες και σημαντικές βιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της αποθήκευσης ενέργειας, της δομικής υποστήριξης του κυττάρου και της κυτταρικής σηματοδότησης. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες λιπιδίων, μεταξύ των οποίων:

1. Λιπαρά οξέα: Τα λιπαρά οξέα είναι καρβοξυλικά οξέα μακράς αλυσίδας που μπορεί να είναι είτε κορεσμένα είτε ακόρεστα. Αποτελούν βασικό συστατικό όλων των τύπων λιπιδίων και απαντώνται τόσο στους φυτικούς όσο και στους ζωικούς ιστούς. Τα

κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι συνήθως στερεά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ τα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι αντιστοίχως υγρά (Berg et al., 2002).

2. Τριακυλογλυκερόλες (TAGs): Οι τριακυλογλυκερόλες, γνωστές και ως τριγλυκερίδια, είναι ο πιο κοινός τύπος λιπιδίων που υπάρχει στα τρόφιμα και στον λιπώδη ιστό. Αποτελούνται από τρεις αλυσίδες λιπαρών οξέων, εστεροποιημένες σε ένα σκελετό γλυκερόλης (Christie, 2003).

3. Φωσφολιπίδια: Τα φωσφολιπίδια είναι ένας τύπος λιπιδίων που αποτελούνται από ένα μόριο γλυκερόλης, δύο αλυσίδες λιπαρών οξέων, μια φωσφορική ομάδα και ένα μικρό πολικό μόριο, όπως η χολίνη ή η σερίνη. Αποτελούν το κύριο συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών και εμπλέκονται σε πολυάριθμες κυτταρικές διεργασίες (Berg et al., 2002).

4. Στερόλες: Οι στερόλες είναι λιπίδια που έχουν χαρακτηριστική δομή τεσσάρων δακτυλίων. Αποτελούν σημαντικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και είναι πρόδρομες ουσίες πολλών σημαντικών ορμονών, όπως η τεστοστερόνη και τα οιστρογόνα (Vance & Vance, 2013).

5. Γλυκολιπίδια: Τα γλυκολιπίδια είναι ένας τύπος λιπιδίων που αποτελούνται από μια αλυσίδα υδατανθράκων και ένα μόριο λιπιδίου, συνήθως ένα κεραμίδιο ή ένα φωσφολιπίδιο. Αποτελούν σημαντικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και εμπλέκονται στην κυτταρική αναγνώριση και σηματοδότηση (Berg et al., 2002).

Η συμβολή των βιοδραστικών λιπιδίων στην υγεία καθορίζεται από τους παράγοντες σύνθεσής τους. Τα ωμέγα-3, ωμέγα-6 και ωμέγα-9 λιπαρά οξέα, και άλλες δευτερεύουσες λιπιδικές ενώσεις υψηλής αξίας έχουν αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν ιδιότητες που προάγουν την υγεία και επηρεάζουν θετικά τις φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου σώματος.

## 2.1 Λιπίδια των μικροφυκών

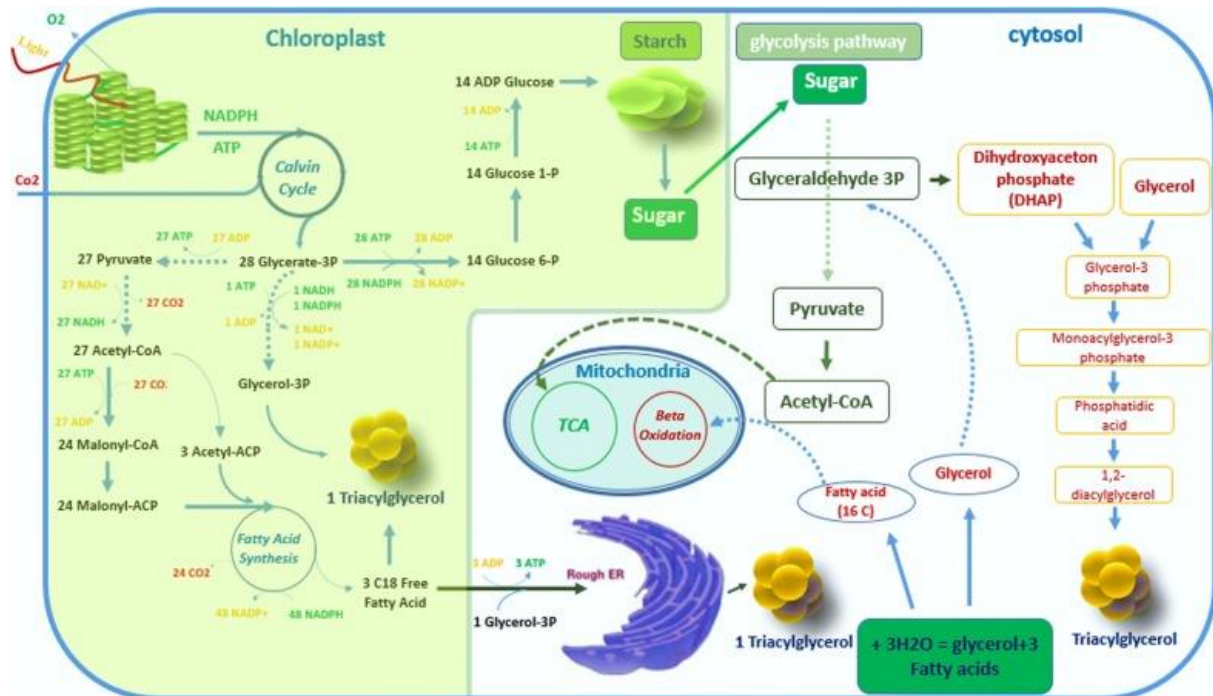
Το μεγαλύτερο ποσοστό των λιπαρών οξέων που συναντώνται στα μικροφύκη είναι οι τριακυλογλυκερόλες, οι οποίες έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνονται ακόμα περισσότερο όταν το κύτταρο υπόκειται σε συνθήκες καταπόνησης (στρες). Οι τριακυλογλυκερόλες αποτελούν το βασικό μόριο στο οποίο καταλήγουν οι βιοσυνθετικές οδοί, ενώ είναι το κύριο αποθηκευτικό μόριο στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι για την παραγωγή των τριακυλογλυκερολών είναι απαραίτητα 3 στάδια του μονοπατιού βιοσύνθεσης λιπιδίων, η παραγωγή των λιπαρών οξέων, ο σχηματισμός των συμπλόκων γλυκερόλης- λιπιδίων και η αποθήκευσή τους σε μορφή λιποσταγόνων. Η βιοσύνθεση των τριακυλογλυκερολών στα μικροφύκη πιθανόν να λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μέσω δύο διαφορετικών



μονοπατιών: το εξαρτώμενο από ακετυλο-συνένζυμο Α (ακετυλο-CoA) μονοπάτι και το ανεξάρτητο από ακετυλο-CoA μονοπάτι. Η εξαρτώμενη από το ακετυλο-CoA οδός, επίσης γνωστή ως η οδός Kennedy, είναι η κύρια οδός για τη σύνθεση τριακυλογλυκερολών στα μικροφύκη. Αυτή η οδός ξεκινά με την ακετυλίωση της φωσφορικής γλυκερόλης 3 (G-3-P) και τον σχηματισμό λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA), το οποίο μπορεί να ακετυλιωθεί περαιτέρω για την παραγωγή φωσφατιδικού οξέος (PA). Το φωσφατιδικό οξύ στη συνέχεια αποφωσφορυλιώνεται για την παραγωγή διακυλογλυκερόλης (DAG). Στο τελικό στάδιο της ακετυλίωσης, η διακυλογλυκερόλη μετατρέπεται σε τριακυλογλυκερόλη με την ενσωμάτωση του τρίτου ακετυλο-CoA. Μετά τη σύνθεση της τριακυλογλυκερόλης, αυτή πακετάρεται σε λιποσταγόνες. Οι λιποσταγόνες είναι δυναμικές δομές που εμπλέκονται ενεργά σε διάφορες πτυχές του μεταβολισμού των λιπιδίων. Ενώ σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και σε όλα τα βασιλεία, οι λιποσταγόνες φαίνεται να εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, αρκετές μελέτες έχουν αποκαλύψει λιποσταγόνες και εντός των χλωροπλαστών διαφόρων ειδών μικροφυκών, οι οποίες συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες τριακυλογλυκερολών, ειδικά υπό συνθήκες καταπόνησης, όπως στέρσης αζώτου ή καταστάσεις έντονης καταπόνησης.

Τα λιπαρά οξέα είναι αμφιπαθή μόρια με μια καρβοξυλική ομάδα στο ένα άκρο και μια ομάδα υδρογονανθράκων στο άλλο. Το μήκος και ο κορεσμός του τμήματος υδρογονανθράκων ποικίλλουν μεταξύ των διαφόρων ειδών λιπαρών οξέων. Διακρίνονται σε οξέα με μεσαία αλυσίδα (με 10-14 άτομα άνθρακα), με μακρά αλυσίδα (με 16-18 άτομα άνθρακα) και με πολύ μακρά αλυσίδα (με πάνω από 20 άτομα άνθρακα). Στα πράσινα φύκη (χλωροφύκη), η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων λαμβάνει χώρα στον χλωροπλάστη, ενώ το πυροσταφυλικό που προέρχεται από τη γλυκόλυση θεωρείται ότι είναι το κύριο φωτοσυνθετικό παράγωγο που μετατρέπεται σε ακετυλο-CoA για τη *de novo* σύνθεση των λιπαρών οξέων. Το περιοριστικό βήμα στη σύνθεση των λιπαρών οξέων είναι η μετατροπή του ακετυλο-CoA σε μαλονυλο-CoA, μια διαδικασία που καταλύεται από την ακετυλο-CoA καρβοξυλάση (ACCase). Υπό φωτοαυτότροφες συνθήκες, η φωτοσυνθετική απόδοση είναι κρίσιμη για τον έλεγχο της ροής αυτής της αντίδρασης, καθώς η πρόδρομη ουσία του άνθρακα (ακετυλο-CoA), η ενέργεια (ATP), και η αναγωγική ισχύς (NADPH) παρέχονται από τη φωτοσύνθεση. Τα επόμενα στάδια, τα οποία χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα το μαλονυλο-CoA, αποτελούνται από τη διαδοχική συμπύκνωση των μονάδων δύο ατόμων άνθρακα που καταλύονται από τα ένζυμα της συνθάσης των λιπαρών οξέων (FAS). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τέσσερις ενζυμικές αντιδράσεις, όπου κάθε κύκλος έχει ως αποτέλεσμα την προσθήκη δύο μονάδων άνθρακα στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα, οδηγώντας

στον σχηματισμό 16:0- ή 18:0- πρωτεΐνης μεταφορέα ακετυλίου (ACP), οι οποίες χρησιμοποιούνται στη συνέχεια ως πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεση μη πολικών λιπιδίων, κυρίως τριακυλογλυκερολών (Chen et al., 2021)



**Εικόνα 8** Απλοποιημένη διαδικασία φωτοσύνθεσης και οι τρεις κύριες πιθανές βιοχημικές οδοί σχηματισμού TAGs: στους χλωροπλάστες, στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) ή στο κυτταρόπλασμα (Alishah Aratboni et al., 2019)

## 2.2 Βιοσύνθεση των λιπιδίων

Μελέτες έχουν δείξει ότι η βιοσύνθεση των λιπιδίων επηρεάζεται σημαντικά από τις περιβαλλοντικές συνθήκες όπου διαβιών τα μικροφύκη. Βασικό παράδειγμα αποτελούν τα θρεπτικά συστατικά που υπάρχουν στο περιβάλλον στο οποίο διαβιών τα μικροφύκη. Έχει διαπιστωθεί ότι η παραγωγή και η αποθήκευση των λιπιδίων σε μορφή τριακυλογλυκερολών σχετίζεται άμεσα με την ύπαρξη αζώτου στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Συγκεκριμένα, η παραγωγή λιπιδίων επάγεται σε περιβάλλον με μειωμένα επίπεδα αζώτου και η επίδραση του αζώτου στην παραγωγή λιπιδίων φαίνεται να είναι αντιστρόφως ανάλογη και δοσοεξαρτώμενη. Με παρόμοιο τρόπο φαίνεται να λειτουργούν τα μικροφύκη παρουσία θείου και φωσφόρου (Ran et al., 2019). Άλλο ένα στοιχείο που έχει διαπιστωθεί ότι επηρεάζει την παραγωγή των λιπιδίων είναι ο άνθρακας και ειδικά όταν αυτός αλληλεπιδρά με άτομα οξυγόνου, παράγοντας διοξείδιο του άνθρακα. Το διοξείδιο του άνθρακα αποτελεί σημαντική

πηγή άνθρακα ιδιαιτέρως για τα φωτοσυνθετικά μικροφύκη. Πειράματα έχουν δείξει ότι η αυξημένη συγκέντρωση CO<sub>2</sub> στο περιβάλλον αυξάνει τη συχνότητα φωτοσύνθεσης και κατ' επέκταση την παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων (Chen et al., 2021).

Άλλοι αβιοτικοί παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή λιπιδίων στο εσωτερικό των μικροφυκών είναι το φως, η θερμοκρασία, η αλατότητα, το pH, κλπ. Όσον αφορά στο φως, είναι από τους πιο βασικούς παράγοντες ανάπτυξης και παραγωγής βιομάζας στα μικροφύκη. Μελέτες έχουν δείξει ότι διαφορές τόσο στην ποσότητα της ακτινοβολίας, όσο και στο μήκος κύματος, οδηγούν σε διαφορετικά αποτελέσματα. Η ένταση του φωτός έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει δραστικά την ανάπτυξη των μικροφυκών και την περιεκτικότητά τους σε λιπίδια. Συνήθως, τόσο η χαμηλή ένταση φωτός όσο και η εξαιρετικά υψηλή ένταση φωτός, προκαλούν δυσμενή ανάπτυξη και ανεπιθύμητες αντιδράσεις στα κύτταρα των μικροφυκών. Σε πολλές περιπτώσεις, αυτές οι ακραίες εντάσεις φωτός προκαλούν φωτο-αναστολή και φωτο-οξειδωση που επηρεάζουν την περιεκτικότητα σε λιπίδια. Ο προσδιορισμός του βέλτιστου εύρους έντασης φωτός βοηθά στην επίτευξη της βέλτιστης ανάπτυξης των μικροφυκών και της υψηλότερης παραγωγής λιπιδίων. Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας στην οποία τα μικροφύκη εμφανίζουν το μεγαλύτερο ρυθμό παραγωγής λιπιδίων ποικίλλει από είδος σε είδος, γεγονός που οφείλεται στη διαφορετική σύσταση του κυττάρου στις διάφορες χρωστικές. Για παράδειγμα, στο γένος *Chlorella*, η καλύτερη ανάπτυξη και η υψηλότερη συσσώρευση λιπιδίων επιτεύχθηκε όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ερυθρό φως, ενώ οι ελάχιστες τιμές επιτεύχθηκαν με πράσινο φως (Alishah Aratboni et al., 2019).

Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας σε λιπίδια στο μικροφύκος γλυκών υδάτων *Ochromonas danica*, στο θαλάσσιο φύκος *Nannochloropsis salina* και στο φύκος *Chlamydomonas*. Η σύνθεση λιπιδίων και συγκεκριμένα τριακυλογλυκερολών μπορεί επίσης να προκληθεί από την υψηλή αλατότητα, όπως παρατηρήθηκε στα πράσινα φύκη *D. salina* και *Chlamydomonas*, ή από την αφυδάτωση κατά τη διάρκεια του φωτισμού, όπως παρατηρήθηκε στο πράσινο φύκος *Chlorella kessleri* (Du & Benning, 2016).

Η χρονική στιγμή όπου εντοπίζονται τα μέγιστα επίπεδα βιοσύνθεσης λιπιδίων σε μια καλλιέργεια μικροφυκών μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το είδος, τις συνθήκες ανάπτυξης και άλλους παράγοντες. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές, η συσσώρευση λιπιδίων στα μικροφύκη τείνει να συμβαίνει κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης της ανάπτυξης, η οποία

συνήθως είναι η περίοδος αργής ή μηδενικής ανάπτυξης που ακολουθεί την εκθετική φάση (Ratledge & Wynn, 2002). Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, τα μικροφύκη επικεντρώνονται κυρίως στην κυτταρική διαίρεση και την ανάπτυξη παρά στη συσσώρευση λιπιδίων. Ωστόσο, καθώς η καλλιέργεια εισέρχεται στη στατική φάση, τα θρεπτικά συστατικά εξαντλούνται και η ανάπτυξη επιβραδύνεται ή σταματά. Αυτό προκαλεί μια μετατόπιση του μεταβολισμού προς την αποθήκευση ενέργειας και θρεπτικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων. Η συσσώρευση λιπιδίων μπορεί να συνεχιστεί και στη φάση μείωσης της ανάπτυξης, αλλά η συνολική ποσότητα της βιομάζας θα μειωθεί επίσης κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης (Griffiths et al., 2012).

Η συσσώρευση λιπιδίων επηρεάζεται από ένα ευρύ φάσμα παραγόντων, όπως η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, η ένταση και η ποιότητα του φωτός, η θερμοκρασία και το pH, μεταξύ άλλων. Η εύρεση και η βελτιστοποίηση αυτών των συνθηκών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της παραγωγικότητας των λιπιδίων στις καλλιέργειες μικροφυκών (Wijffels & Barbosa, 2010).

Τα κύτταρα μικροφυκών παράγουν κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα (Sharma et al., 2012). Η ποσότητα και η αναλογία κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων καθορίζει την καταλληλότητα των μικροφυκών ως πρώτη ύλη βιοκαυσίμου. Οι ιδιότητες του καυσίμου του βιοντίζελ που παράγεται από μικροφύκη εξαρτώνται σημαντικά από τη σύνθεση λιπαρών οξέων των μικροφυκών. Το ροδοφύκος *Porphyridium cruentum* θεωρήθηκε ως το μόνο που θα μπορούσε να συσσωρεύσει πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σε τριακυλογλυκερόλες (Cohen et al., 1988). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα είδη πράσινων μικροφυκών (χλωροφυκών), όπως το *Parietochloris incisa* έχουν μεγαλύτερη ικανότητα να παράγουν υψηλές ποσότητες ω-6 και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (Bigogno et al., 2002).

### 2.3 Το λιπιδικό προφίλ των μικροφυκών

Τα περισσότερα στελέχη των μικροφυκών διαθέτουν ένα πλούσιο λιπιδικό προφίλ, το οποίο αποτελείται κυρίως από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι λιπαρά οξέα τα οποία διαθέτουν τουλάχιστον δύο διπλούς δεσμούς στην αλυσίδα υδρογονανθράκων που διαθέτουν. Διακρίνονται, ανάλογα με το μέγεθος της αλυσίδας τους, σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας (short chain polyunsaturated fatty acids, SC-PUFAs), με 16 έως 18 άτομα άνθρακα στην αλυσίδα τους, και σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα

μεγάλης αλύσου (long-chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFAs) με περισσότερα από 18 άτομα άνθρακα. Ο άνθρωπος, όπως και τα άλλα θηλαστικά, δεν είναι σε θέση ή έχει ελάχιστη ικανότητα σύνθεσης ορισμένων βασικών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Επομένως, είναι απαραίτητη η άμεση πρόσληψη αυτών των ενώσεων από εξωτερικές πηγές. Οι πηγές αυτές περιλαμβάνουν υδρόβιους οργανισμούς (ψάρια, μαλάκια και καρκινοειδή), προϊόντα ζωικής προέλευσης (κρέας, γάλα, αυγά), μύκητες, βακτήρια και φυτικές πηγές, όπως ορισμένα φυτά και μικροφύκη. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα υποταξινομούνται σε  $\omega$ -3 και  $\omega$ -6 λιπαρά οξέα, υποδεικνύοντας τη θέση του άνθρακα που εμπλέκεται στον πρώτο διπλό δεσμό από το άκρο των ανθρακικών αλυσίδων τους (Santin et al., 2021).

Η παραγωγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από μικροφύκη παρουσιάζει μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον, επειδή είναι πηγές φυσικών βρώσιμων ελαίων με χαμηλότερα επίπεδα ρύπων (διοξίνες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, μεθυλικός υδράργυρος) σε σχέση με τα ιχθυέλαια. Επιπλέον, θεωρούνται φυσικά προϊόντα, υψηλής καθαρότητας και ποιότητας, "χορτοφαγικής" προέλευσης με βελτιωμένες ιδιότητες σε σύγκριση με τα έλαια ζωικής προέλευσης. Είδη με υψηλά επίπεδα  $\omega$ -3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (άνω του 50% του συνόλου των λιπαρών οξέων) έχουν ανευρεθεί στα Chlorophyta (*Dunaliella* sp., *Tetraselmis viridis*, *Nephroselmis* sp.), στα Cryptophyta (*Chroomonas salina*, *Cryptomonas* sp.) και στα Rhodophyta (*Rhodomonas* sp.) (Barros de Medeiros et al., 2022).

Το προφίλ των λιπιδίων των μικροφυκών μπορεί να ποικίλει από είδος σε είδος. Συνήθως τα υψηλότερα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων αντιστοιχούν σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, με πιο άφθονα εκείνα με ζυγό αριθμό ανθράκων με μήκος αλυσίδας 14, 16 ή 18 ανθράκων. Στη συνέχεια ακολουθούν τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία διαθέτουν έναν μόνο διπλό δεσμό στην υδρογονανθρακική τους αλυσίδα, και τέλος τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, τα οποία διαθέτουν μόνο απλούς δεσμούς.

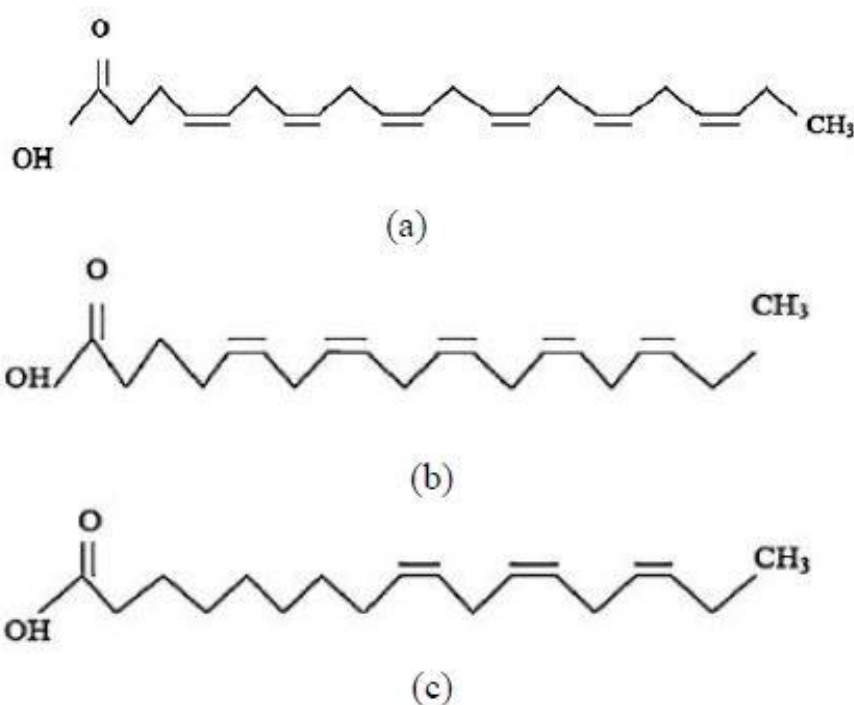
### 2.3.1 Ωμέγα-3 λιπαρά οξέα

Τα  $\omega$ -3 λιπαρά οξέα είναι ακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία αποτελούνται από τουλάχιστον έναν διπλό δεσμό που υπάρχει μεταξύ του τρίτου και του τέταρτου άνθρακα από το άκρο της αλειφατικής αλυσίδας κι έναν επιπλέον.

Τα  $\omega$ -3 λιπαρά οξέα είναι απαραίτητα στην ανθρώπινη διατροφή και απαντώνται σε αφθονία σε τρόφιμα, όπως τα θαλασσινά. Τα τρία πιο σημαντικά  $\omega$ -3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σε κλινικό επίπεδο είναι το  $\alpha$ -λινολενικό οξύ (C18:3, n-3), το εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA, C20:5, n-3) και το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA, C22:6, n-3). Τα έλαια που περιέχουν

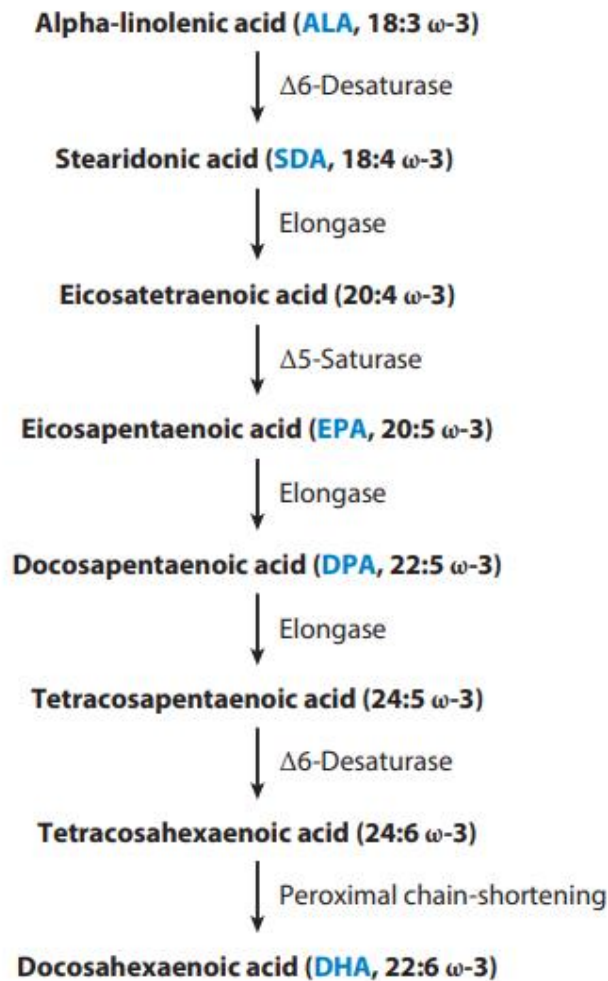
αυτά τα λιπαρά οξέα προέρχονται από φυτικές πηγές και ανευρίσκονται σε ψάρια, προϊόντα ψαριών, σπόρους, ξηρούς καρπούς, πράσινα φυλλώδη λαχανικά και φασόλια (Shahidi et al., 2018).

Το α-λινολενικό οξύ έχει τη μικρότερη αλυσίδα και εντοπίζεται στη σόγια, στα καρύδια, στο λιναρόσπορο και σε μερικά έλαια. Το εικοσιπενταενοϊκό και το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ παράγονται από τα λιπαρά ψάρια και πολλούς άλλους οργανισμούς, όπως τα μικροφύκη και τα βακτήρια. Το συνιστάμενο ημερήσιο επίπεδο πρόσληψης εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος κυμαίνεται από 0,2 έως 0,3 g/ημέρα για τον γενικό πληθυσμό και από 1,0 έως 4,0 g/ημέρα για ασθενείς με στεφανιαία νόσο.



**Εικόνα 9** Χημική δομή a) εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος, b) εικοσαπενταενοϊκού οξέος, c) α-λινολενικού οξέος.

Η μεταβολική οδός σύνθεσης των ω-3 PUFAs από το α-λινολενικό οξύ παρουσιάζεται στην Εικόνα 10. Το πρώτο μεταβολικό προϊόν που συντίθεται από α-λινολενικό είναι το στεαριδονικό οξύ (SDA, C18:4), το οποίο στη συνέχεια οδηγεί στη σύνθεση του εικοσιπενταενοϊκού και του εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος. Η μετατροπή απαιτεί τη δράση των ενζύμων αποκορεσμού (5 και 6) και του ενζύμου επιμήκυνσης του μικροσωμικού συστήματος αλλά και την πραγματοποίηση οξειδωσης στα υπεροξυσώματα για τη σμίκρυνση της υδρογονανθρακικής αλυσίδας.



**Εικόνα 10** Βιοσύνθεση ω-3 λιπαρών οξέων από α-λινολενικό οξύ (Shahidi & Ambigaipalan, 2018)

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει τη συσχέτιση των ω-3 PUFAs με την υγεία της μητέρας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και την υγεία του εμβρύου. Τα ω-3 PUFAs επηρεάζουν τη διάρκεια της κύησης, τον πρόωρο τοκετό, το βάρος γέννησης, την επιλόχειο κατάθλιψη, την υπέρταση κύησης/προεκλαμψία, τα μεταγεννητικά πρότυπα ανάπτυξης, την οπτική οξύτητα, τη νευρολογική ανάπτυξη, τη γνωστική ανάπτυξη, τη διαταραχή του φάσματος του αυτισμού, τη ΔΕΠΥ, τις μαθησιακές διαταραχές, την ατοπική δερματίτιδα, τις αλλεργίες και τις αναπνευστικές διαταραχές. Τα ω-3 λιπαρά οξέα και ειδικότερα το DHA είναι ένα κρίσιμο συστατικό των λιπιδίων της εγκεφαλικής μεμβράνης, ενώ οι δίαιτες που είναι φτωχές σε ω-3 λιπαρά οξέα φαίνεται να συμβάλουν στην κακή ανάπτυξη και λειτουργία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, ενώ έχει σχετιστεί και με την ανάπτυξη του αμφιβληστροειδούς. Ως εκ τούτου, η πρόσληψη ω-3 λιπαρών οξέων είναι κρίσιμης σημασίας για την ανάπτυξη του παιδιού, τόσο στο στάδιο του εμβρύου όπου τα ω-3

μεταφέρονται μέσω του πλακούντα, αλλά και μετά τη γέννηση, όπου τα ω-3 λιπαρά μεταφέρονται στο νεογνό μέσω του θηλασμού και του μητρικού γάλακτος (Innis, 2008, Shahidi & Ambigaipalan 2018).

Τα ω-3 λιπαρά οξέα έχει αποδειχθεί ότι έχουν ευεργετική επίδραση στην πρόληψη και την αντιμετώπιση καρδιαγγειακών παθήσεων (CVD). Οι επιδράσεις των ω-3 λιπαρών οξέων στην καρδιαγγειακή νόσο μπορεί να περιλαμβάνουν τη μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων στο αίμα, τα οποία σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, και κατ' επέκταση τη μείωση της πιθανότητας σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας. Επιπλέον μπορεί να ρυθμίζουν την εμφάνιση της φλεγμονής, καθώς τα ω-3 λιπαρά οξέα έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και μπορούν να μειώσουν τη φλεγμονή στο σώμα. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η χρόνια φλεγμονή αποτελεί βασικό παράγοντα πρόκλησης καρδιαγγειακών παθήσεων. Τέλος, τα ω-3 λιπαρά οξέα συμβάλλουν στη βελτίωση της λειτουργίας των ενδοθηλιακών ιστών, δηλαδή της ικανότητας των αιμοφόρων αγγείων να διαστέλλονται και να συστέλλονται με αποτέλεσμα την εύρυθμη λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος. Αρκετές μεγάλες τυχαίοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες έχουν διερευνήσει την επίδραση των ω-3 στην πρόληψη και την αντιμετώπιση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Οι μελέτες αυτές διαπίστωσαν ότι η χορήγηση ω-3 μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο καρδιαγγειακού συμβάντος, συμπεριλαμβανομένης της καρδιακής προσβολής, του εγκεφαλικού επεισοδίου και του καρδιαγγειακού θανάτου (Manson et al., 2019).

Υπάρχουν κάποια στοιχεία που δείχνουν ότι τα ω-3 λιπαρά οξέα διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην πρόληψη και την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας. Μελέτες έχουν δείξει ότι η υψηλότερη πρόσληψη ω-3 συνδέεται με χαμηλότερα επίπεδα λιπώδους ιστού, χαμηλότερο ποσοστό σωματικού λίπους και μειωμένη μάζα λίπους. Η επίδραση αυτή ενδέχεται να πραγματοποιείται χάρη στις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των ω-3, οι οποίες μπορούν να μειώσουν τη χρόνια φλεγμονή στον λιπώδη ιστό και να προωθήσουν τη χρήση του λίπους ως πηγή ενέργειας. Επιπλέον, η κατανάλωση ω-3 λιπαρών οξέων έχει σχετιστεί με αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, την ικανότητα του οργανισμού να ανταποκρίνεται στην ινσουλίνη και να ρυθμίζει τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα. Η αντίσταση στην ινσουλίνη αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της παχυσαρκίας και του διαβήτη τύπου 2. Τα ω-3 λιπαρά ενδέχεται να βελτιώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη μειώνοντας τη φλεγμονή και βελτιώνοντας τον μεταβολισμό των λιπιδίων (Lepretti et al., 2018). Επίσης, ενδέχεται να οδηγήσουν σε μειωμένο αίσθημα όρεξης, γεγονός που οφείλεται στον ρόλο των ω-3 λιπαρών στη ρύθμιση των επιπέδων ορμονών που εμπλέκονται στον έλεγχο της όρεξης, όπως η



λεπτίνη και η γκρελίνη (Johnstone et al., 2011). Τέλος, τα ω-3 μπορεί να βελτιώσουν την ποιότητα του εντερικού μικροβιώματος, αυξάνοντας την αφθονία των ωφέλιμων βακτηρίων και μειώνοντας τη φλεγμονή στο έντερο (Rondanelli et al., 2011).

Όσον αφορά στη συσχέτιση της κατανάλωσης ω-3 λιπαρών και του καρκίνου, υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι τα ω-3 λιπαρά οξέα μπορεί να έχουν προστατευτική δράση έναντι ορισμένων τύπων καρκίνου, αν και απαιτούνται περισσότερες έρευνες για την πλήρη κατανόηση αυτής της σχέσης. Έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές μελέτες για την επίδραση των ω-3 στον καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου μετά από κατανάλωση ω-3 λιπαρών. Η συσχέτιση αυτή πιθανώς οφείλεται στην αντιφλεγμονώδη δράση των ω-3 και την εμπόδιση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Εν συντομία, αν και τα στοιχεία είναι ελπιδοφόρα, απαιτούνται περισσότερες έρευνες για να κατανοηθεί πλήρως ο πιθανός ρόλος των ω-3 στην πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου (Brasky et al., 2013, Song et al., 2016, Zheng et al., 2013).

Τα οφέλη των ω-3 λιπαρών οξέων είναι πολλά και στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Αρχικά, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση ω-3 μπορεί να μειώσει τα συμπτώματα της κατάθλιψης, του άγχους και της ευερεθιστότητας (Grosso et al., 2014). Ενδέχεται επίσης να έχουν νευροπροστατευτική δράση, που σημαίνει ότι μπορούν να βοηθήσουν στην προστασία του εγκεφάλου από βλάβες που προκαλούνται από τραυματισμό ή ασθένεια (Dyall, 2015). Επιπλέον, είναι πιθανή η ευεργετική τους επίδραση σε φλεγμονώδεις καταστάσεις του ΚΝΣ, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας, ενώ ενδέχεται να βελτιώνεται η ποιότητα του ύπνου και να μειώνεται ο κίνδυνος διαταραχών του ύπνου, όπως η αποφρακτική άπνοια (Moro et al., 2016, Dai & Liu, 2021).

Σε ηλικιωμένους τα ω-3 λιπαρά οξέα ενδέχεται να έχουν ευεργετική επίδραση στη γνωστική λειτουργία και τη μνήμη, ενώ μπορεί να μειώσουν τον κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου και να έχουν προστατευτική δράση έναντι της νόσου Αλτσχάιμερ και άλλων μορφών άνοιας (Dyall, 2015).

Τέλος, ιδιαίτερα το εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA) και το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA), έχουν αποδειχθεί ότι μειώνουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, μόρια που προάγουν τη φλεγμονή και συμβάλλουν στη βλάβη των ιστών στις αυτοάνοσες ασθένειες. Επιπλέον, τα ω-3 λιπαρά οξέα ενδέχεται να μειώσουν τον πόνο και τη δυσκαμψία των αρθρώσεων, να βελτιώσουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και να μειώσουν την παραγωγή αντισωμάτων έναντι αυτοαντιγόνων, τα οποία αποτελούν κοινά χαρακτηριστικά των αυτοάνοσων νοσημάτων. Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τις

επιδράσεις της χορήγησης ω-3 λιπαρών οξέων σε αυτοάνοσα νοσήματα. Για παράδειγμα, μια μελέτη διαπίστωσε ότι το συμπλήρωμα ω-3 λιπαρών οξέων σε ασθενείς με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο, μια χρόνια αυτοάνοση νόσο που επηρεάζει πολλαπλά όργανα και ιστούς, μείωσε την ένταση της νόσου και βελτίωσε την ποιότητα ζωής (Bello et al., 2017). Μια άλλη μελέτη διαπίστωσε ότι η συμπληρωματική χορήγηση ω-3 λιπαρών οξέων βελτίωσε τα συμπτώματα και μείωσε την ανάγκη για αντιφλεγμονώδη φάρμακα σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (Miles & Calder, 2012). Τα ω-3 λιπαρά οξέα ενδέχεται να αποτελέσουν μια πολλά υποσχόμενη συμπληρωματική θεραπεία για άτομα με αυτοάνοσα νοσήματα. Ωστόσο, είναι απαραίτητη περαιτέρω έρευνα για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους τα λιπαρά οξέα ωφελούν στα αυτοάνοσα νοσήματα αλλά και για τον προσδιορισμό των βέλτιστων δόσεων και της διάρκειας της συμπληρωματικής χορήγησης.

### 2.3.2 Ωμέγα-6 λιπαρά οξέα

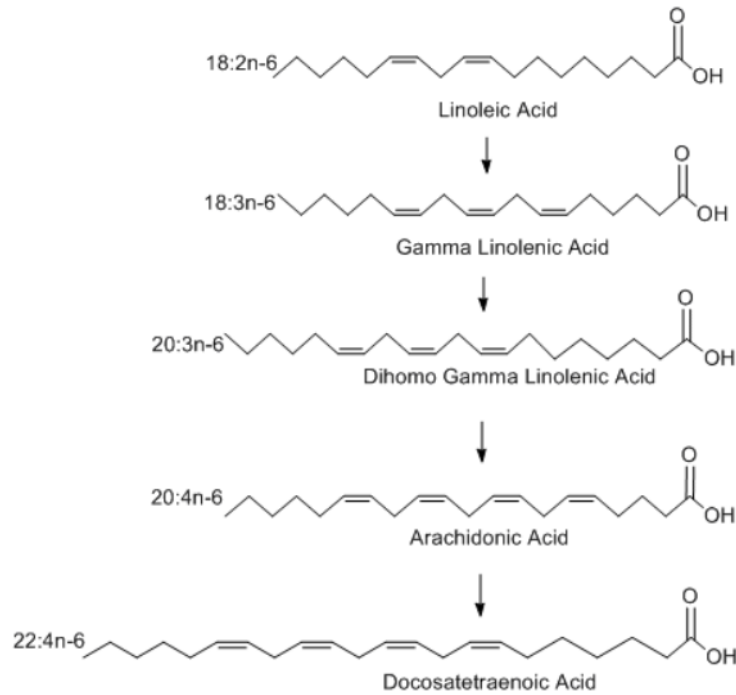
Τα ω-6 λιπαρά οξέα είναι πολυακόρεστα λιπαρά που διαθέτουν ένα διπλό δεσμό στον έκτο άνθρακα από το άκρο των ανθρακικών αλυσίδων τους και τουλάχιστον έναν διπλό δεσμό επιπλέον.

Το λινολεϊκό οξύ είναι το κύριο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ στις περισσότερες δίαιτες στον δυτικό κόσμο, το οποίο δεν μπορεί να συντεθεί σε ανώτερα θηλαστικά συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. Οι πηγές λινολεϊκού οξέος περιλαμβάνουν πολλά φυτικά έλαια, ξηρούς καρπούς, σπόρους και προϊόντα παρασκευασμένα από φυτικά έλαια (Innes et al., 2018).

Το λινολεϊκό οξύ μπορεί να μεταβληστεί σε άλλα ω-6 λιπαρά οξέα μέσω μίας οδού που περιλαμβάνει τον αποκορεσμό για να σχηματιστεί το γάμμα-λινολενικό οξύ, στη συνέχεια γίνεται επιμήκυνση για να σχηματιστεί διομο-γ-λινολενικό, και στη συνέχεια περαιτέρω αποκορεσμός για να σχηματιστεί αραχιδονικό οξύ (Innes et al., 2018). Το αραχιδονικό οξύ στη συνέχεια μπορεί να δώσει και άλλα μεγαλύτερα λιπαρά οξέα με τη χρήση ενζύμων επιμήκυνσης, όπως το εικοσιδιτετραενοϊκό οξύ (C22:4, n-6) αλλά και μια ισομορφή του εικοσιδιπενταενοϊκού οξέος (C22:5, n-6).

Το γ-λινολενικό οξύ ανευρίσκεται σε ορισμένα έλαια όπως το έλαιο μποράγου, φραγκοστάφυλου και νυχτολούλουδου. Το αραχιδονικό οξύ εντοπίζεται στο κρέας και τα αυγά. Το μόνο μικροφύκος που παράγει αραχιδονικό οξύ σε σημαντική ποσότητα είναι το μονοκύτταρο ροδοφύκος *Porphyridium cruentum*. Άλλα ροδοφύκη όπως το *Gracilaria* sp.

έχει ποσοστό αραχιδονικού οξέος έως 60% επί των συνολικών λιπαρών οξέων, αλλά η περιεκτικότητά του σε ξηρό βάρος δεν υπερβαίνει το 0,2%.



*Εικόνα 11 Ο μεταβολισμός του λινολεϊκού οξέος.*

Τα ω-6 λιπαρά οξέα, όπως και τα ω-3, είναι απαραίτητα λιπαρά οξέα που χρειάζεται ο οργανισμός του ανθρώπου για τη φυσιολογική ανάπτυξη και εξέλιξη. Ωστόσο, η υπερβολική πρόσληψη ω-6 λιπαρών οξέων, ιδιαίτερα σε σχέση με τα ω-3 λιπαρά οξέα, έχει συνδεθεί με διάφορες χρόνιες ασθένειες.

Η υψηλή πρόσληψη ω-6 λιπαρών οξέων, ιδίως με τη μορφή λινολεϊκού οξέος, έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων (Ramsden et al., 2013). Επιπλέον, ενδέχεται να προάγουν τη φλεγμονή και να συμβάλουν στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης και να οδηγήσουν σε καρδιακή προσβολή ή εγκεφαλικό επεισόδιο. Ενδέχεται επίσης να προάγουν την ανάπτυξη ορισμένων τύπων καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού (Murff et al., 2011). Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι η αναλογία των ω-6 προς τα ω-3 λιπαρά οξέα στη διατροφή μπορεί να είναι πιο σημαντική από την απόλυτη πρόσληψη οποιουδήποτε τύπου λιπαρού οξέος για τον κίνδυνο καρκίνου (Simopoulos, 2016). Η υψηλή πρόσληψη ω-6 λιπαρών οξέων μπορεί επίσης να συμβάλει στην ανάπτυξη παχυσαρκίας και μεταβολικού συνδρόμου, την αντίσταση στην ινσουλίνη, υψηλή αρτηριακή πίεση και μη φυσιολογικά επίπεδα χοληστερόλης (Kris-Etherton et al., 2002).

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα μικροφύκη είναι μικροοργανισμοί, μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι, οι οποίοι μπορούν να προσφέρουν σημαντικά βιομόρια στον άνθρωπο. Τόσο τα ίδια, όσο και οι μεταβολίτες τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ποικιλία διαδικασιών, όπως η παραγωγή βιοκαυσίμων, η απομάκρυνση τοξικών ουσιών από το περιβάλλον και η παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι τα μικροφύκη εμφανίζουν ένα ενδιαφέρον προφίλ όσον αφορά την παραγωγή λιπιδίων, και ιδιαιτέρως των πολυακόρεστων ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων, τα οποία είναι απαραίτητα για τον άνθρωπο ο οποίος δε μπορεί να τα παράξει από μόνος του.

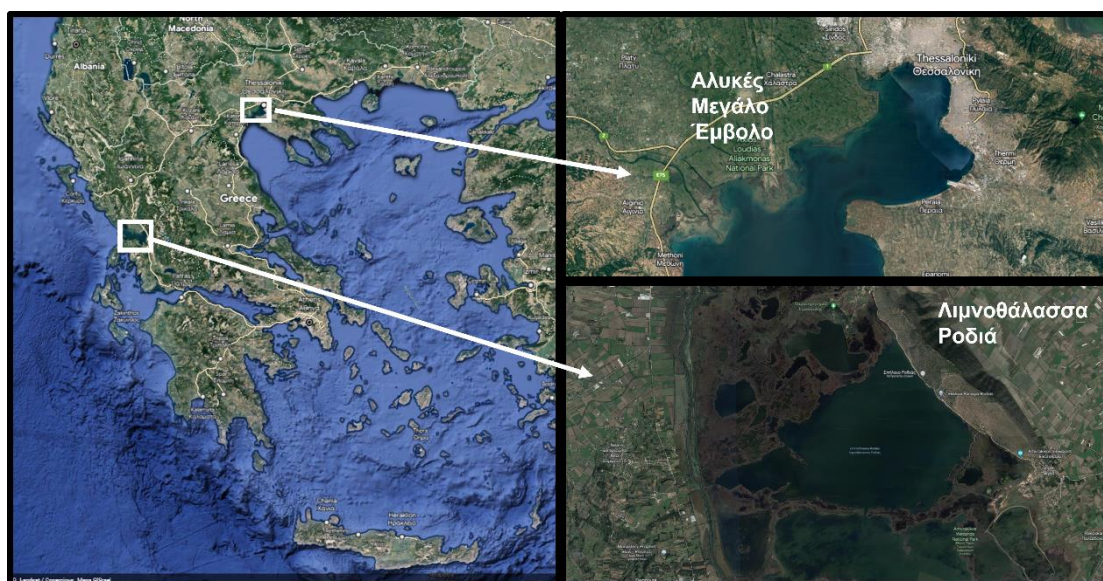
Στην παρούσα εργασία μελετώνται 4 στελέχη μικροφυκών, 2 στελέχη του γένους *Tetraselmis* και 2 στελέχη του γένους *Dunaliella* με σκοπό την εύρεση κατάλληλων στελεχών για τη χρήση στη βιομηχανία παρασκευής συμπληρωμάτων διατροφής. Τα στελέχη αυτά έχουν απομονωθεί από μεταβατικά συστήματα που βρίσκονται σε περιοχές της Δυτικής και της Βόρειας Ελλάδας αντίστοιχα και φυλάσσονται στην τράπεζα στελεχών μικροφυκών του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ ([phycotheca.biol.uoa.gr](http://phycotheca.biol.uoa.gr)), η οποία στεγάζεται στο θάλαμο καλλιεργειών του Τομέα Οικολογίας και Ταξινόμικης του Τμήματος Βιολογίας. Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο ρυθμός ανάπτυξης υπό συγκεκριμένες συνθήκες αλατότητας, θερμοκρασίας, έντασης φωτισμού και φωτοπεριόδου καθώς και η περιεκτικότητά τους σε πολυακόρεστα ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 3. Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1 Είδη Μικροφυκών που μελετήθηκαν

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 4 στελέχη μικροφυκών, 2 στελέχη του γένους *Tetraselmis* και 2 στελέχη του είδους *Dunaliella*. Τα 2 στελέχη *Tetraselmis* έχουν απομονωθεί από δείγματα νερού της λιμνοθάλασσας Ροδιάς, μιας λιμνοθάλασσας του Αμβρακικού κόλπου στην Άρτα. Τα 2 στελέχη *Dunaliella* έχουν απομονωθεί από την αλυκή του Μεγάλου Εμβόλου Αγγελοχωρίου Θεσσαλονίκης. Τα στελέχη είναι ήδη απομονωμένα και κατατεθειμένα στην τράπεζα AthU-Al (Athens University-Algae), δηλαδή την τράπεζα στελεχών μικροφυκών του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ (phycotheca.biol.uoa.gr), η οποία στεγάζεται στο θάλαμο καλλιέργειών του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του Τμήματος Βιολογίας. Στην Εικόνα 12 παρατηρούνται οι 2 περιοχές από τις οποίες απομονώθηκαν τα στελέχη, ενώ στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα βασικά χαρακτηριστικά των περιοχών.



*Εικόνα 12* Περιοχές προέλευσης των στελεχών της Τράπεζας AthU-Al (Χαντζηστρούντσιου, 2020, διατριβή). (Εικόνες: © GoogleEarth, TerraMetrics 2023)

**Πίνακας 3:** Χαρακτηριστικά των 4 στελεχών που μελετήθηκαν.

Κωδικός στελέχους	Προέλευση	Γένος	Ενδιαίτημα
R1-2	Ροδιά, Δ. Ελλάδα (legit N. Dolaps/Tzovenis, 2006)	<i>Tetraselmis</i>	Μεταβατικό θαλάσσιο (40%)
R1-3	Ροδιά, Δ.Ελλάδα (legit N. Dolaps/Tzovenis, 2006)	<i>Tetraselmis</i>	Μεταβατικό θαλάσσιο (40%)
D7	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolaps, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60%)
D8	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolaps, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60%)

Όλα τα δείγματα μεταφέρθηκαν από τους συλλέκτες τους στο εργαστήριο σε πλαστικές φιάλες, έπειτα από αδρή διήθηση με σκοπό την απομάκρυνση του ζωοπλαγκτού.

### 3.2 Καλλιέργεια μικροφυκών

Τα στελέχη μικροφυκών συντηρούνται και καλλιεργούνται σε ειδικό θρεπτικό μέσο το οποίο αποτελείται από τεχνητό θαλασσινό νερό και το διάλυμα Walne's (<https://biocyclopedia.com>). Για την παρασκευή του τεχνητού θαλασσινού νερού χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό, το οποίο προέρχεται από επιτοίχια στήλη ιοντο-ανταλλακτικών ρητινών. Είναι αναγκαίο να επιτευχθεί η κατάλληλη αλατότητα για την κάθε καλλιέργεια, οπότε στο νερό προστίθεται ένα μίγμα αλάτων Tropic Marine PRO-REEF (Tropic Marine, Switzerland) καθώς και Aquaforest Sea Salt (Aquaforest Poland). Στη συνέχεια, στο μέσον καλλιέργειας προστίθεται πυκνό θρεπτικό διάλυμα Walne, το οποίο παρασκευάζεται στο εργαστήριο ως διάλυμα φύλαξης. Το μέσον αυτό περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την επιβίωση και την ανάπτυξη των μικροφυκών (Πίνακες 4-6). Το θρεπτικό υλικό αραιώνεται σε τεχνητό θαλασσινό νερό σε αναλογία 1:1000 και αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 1,3 atm για 40 min. Το θρεπτικό διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο και αποστειρώνεται συχνά, για την αποφυγή πιθανών επιμολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς. Τέλος, παρασκευάζεται ένα επιπλέον διάλυμα στο οποίο περιέχονται οι απαραίτητες βιταμίνες για την ανάπτυξη των φυκών και

προστίθεται μετά την αποστείρωση του βασικού διαλύματος. Επίσης σε αυτήν την περίπτωση παρασκευάζεται ένα πυκνό διάλυμα βιταμινών, το οποίο αραιώνεται 1:10.000, δηλαδή, σε 1L θαλασσινού νερού προστίθεται 0,1mL από το διάλυμα βιταμινών.

**Πίνακας 4:** Συνταγή θρεπτικού διαλύματος Ιχθυοστοιχείων (*Walne*) για την παρασκευή 100 mL.

ZnCl <sub>2</sub>	2,1 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,9 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2,0 g

**Πίνακας 5:** Συνταγή θρεπτικού διαλύματος βιταμινών για την παρασκευή 100 mL.

Vitamin B12 (Cyanocobalamin)	10,0 mg
Vitamin B1 (Thiamine.HCl)	10,0 mg
Vitamin H	200,0 μg

**Πίνακας 6:** Συνταγή θρεπτικού διαλύματος θαλασσινού νερού για την παρασκευή 1L.

FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,3 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,36 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33,6 g
EDTA (Disodium salt)	45,0 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	20,0 g
NaN <sub>3</sub>	100,0 g
TMS	1,0 mL

### 3.3 Ανακαλλιέργεια στελεχών

Από κάθε στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες κυττάρων, τα οποία είναι ήδη σε μορφή μονοκαλλιέργειας. Αρχικά χρησιμοποιούνται 10mL από την πρώτη καλλιέργεια και στη συνέχεια εμβολιάζονται σε κωνικές φιάλες που περιέχουν θρεπτικό μέσο με τελικό όγκο 2L. Η διαδικασία του εμβολιασμού πραγματοποιείται υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής, όλες οι επιφάνειες έχουν απολυμανθεί με διάλυμα αιθανόλης 70%, ενώ οι κωνικές φιάλες με το θρεπτικό έχουν αποστειρωθεί εκ νέου. Πριν τον εμβολιασμό εισάγεται

το διάλυμα βιταμινών και στη συνέχεια εισάγεται η ποσότητα 10mL των κυττάρων. Για κάθε στέλεχος η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται 3 φορές, με 3 διαφορετικά φιαλίδια κάθε φορά, τα οποία αποτελούν τις βιολογικές επαναλήψεις του πειράματος (biological replicates).



*Εικόνα 13* Θάλαμος νηματικής ροής για την καλλιέργεια των μικροφυκών.

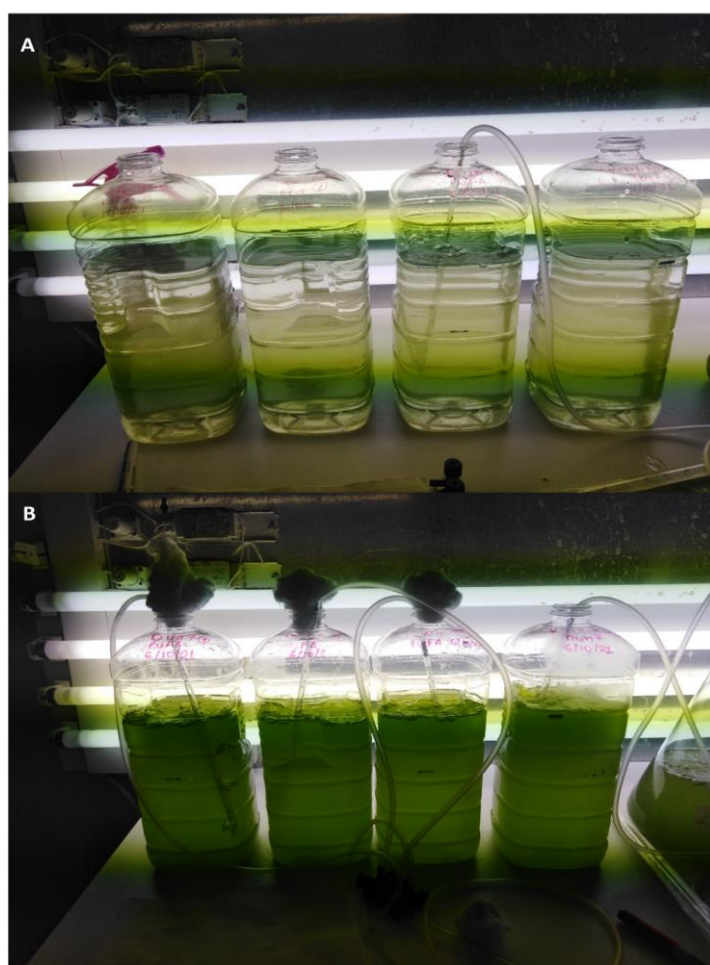
Μετά τον εμβολιασμό, οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται στο θάλαμο καλλιέργειών για κάποιο χρονικό διάστημα, υπό συνεχή ανάδευση, για την αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Οι συνθήκες στον θάλαμο καλλιέργειών είναι οι ακόλουθες: θερμοκρασία: 21 - 23°C, σχετική υγρασία αέρος: ~35%, ένταση φωτισμού: 50-100  $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (λαμπτήρες φθορισμού Gro Lux) και φωτοπερίοδος: 12:12 ώρες (φως: σκοτάδι).



*Εικόνα 14* Θάλαμος διατήρησης καλλιέργειών.



Μετά το πέρας ενός χρονικού διαστήματος, και αφού οι καλλιέργειες αναβαθμιστούν κλιμακωτά, όταν δηλαδή τα κύτταρα πολλαπλασιαστούν σε μεγάλο αριθμό (scale up), ακολουθείται μια διαδικασία ανακαλλιέργειας. Σε 4 φιάλες οι οποίες περιέχουν 1,8L θρεπτικού μέσου, προστίθενται από 200 mL καλλιέργειας και τοποθετούνται ξανά στον θάλαμο καλλιεργείων. Από αυτές τις 4 φιάλες, οι 3 θα χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση λιπιδίων και αποτελούν τα τεχνικά αντίγραφα για το κάθε στέλεχος (technical replicates), ενώ η τέταρτη φιάλη θα χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία της καμπύλης ανάπτυξης του κάθε στελέχους.



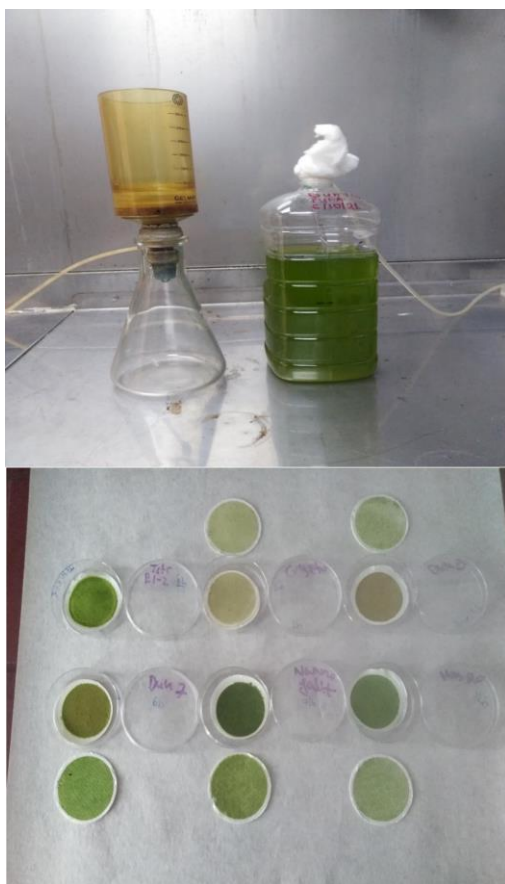
*Εικόνα 15 Φιάλες καλλιέργειας A. Ημέρα 0 και B. Ημέρα 9 πριν τη συγκομιδή (harvesting).*

### **3.4 Κινητική - Καμπύλες ανάπτυξης στελεχών**

Η ημέρα όπου οι φιάλες εμβολιάστηκαν με τα 200 mL καλλιέργειας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, θεωρείται ως ημέρα 0. Από την ημέρα αυτή και για κάθε ημέρα, πραγματοποιείται μια μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στην καλλιέργεια. Συγκεκριμένα, για περίπου 12 ημέρες, καθημερινά μια ποσότητα 500μl από την καλλιέργεια απομακρύνεται και τοποθετείται σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και υπολογίζεται η συγκέντρωση των κυττάρων στην καλλιέργεια. Το δείγμα αραιώνεται και μετράται ο αριθμός των κυττάρων στα 4 τετράγωνα του αιμοκυτταρόμετρου. Στη συνέχεια υπολογίζεται ο μέσος όρος και χρησιμοποιείται ο τύπος αριθμός καταμετρημένων κυττάρων x συντελεστής αραιώσης x 10.000) / καταμετρημένη επιφάνεια για τον υπολογισμό του αριθμού κυττάρων σε ολόκληρη την καλλιέργεια. Η καθημερινή αυτή μέτρηση οδήγησε στη δημιουργία των καμπυλών ανάπτυξης των στελεχών. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό της καμπύλης ανάπτυξης του κάθε στελέχους, καθώς και της καταλληλότερης χρονικής στιγμής για την συγκομιδή της καλλιέργειας, όπου ο αριθμός των κυττάρων της καλλιέργειας είναι ο μέγιστος. Για λόγους επαναληψιμότητας και για την αποφυγή τεχνικών διαφορών κατά την πειραματική διαδικασία, επιλέχθηκε η 9<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας για την πραγματοποίηση της συγκομιδής και στα 4 στελέχη.

### **3.5 Διήθηση και ξήρανση καλλιέργειας**

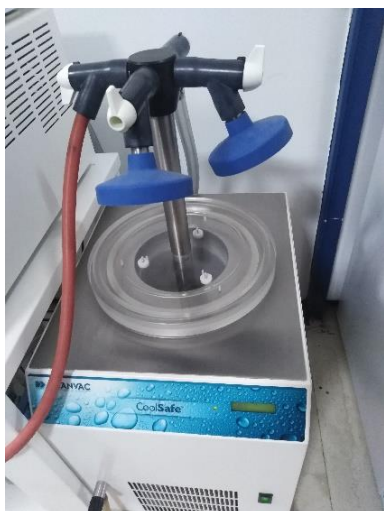
Από την κάθε φιάλη καλλιέργειας και μετά το πέρας των 12 καλλιεργητικών ημερών, πραγματοποιείται η διαδικασία της συγκομιδής (harvesting), της συλλογής των κυττάρων από το θρεπτικό μέσον. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικού διηθητικού φίλτρου υάλινων ινών GF/C Whatman® (Merck, New York, USA). Τα φίλτρα αυτά έχουν την ικανότητα να συγκρατούν τα κύτταρα ενώ το θρεπτικό μέσο απομακρύνεται. Αρχικά, το φίλτρο θερμαίνεται στους 500 °C σε κλίβανο για να απομακρυνθεί η υγρασία, μεταφέρεται με ξηραντήρα και ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας 5 δεκαδικών. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η συγκομιδή, δηλαδή διηθείται ποσότητα 50 mL από την κάθε καλλιέργεια, υπό συνθήκες κενού. Κάθε φίλτρο εκπλύνεται με 4% φορμικό αμμώνιο ( $\text{HCO}_2\text{NH}_4$ ), προκειμένου να απομακρυνθούν τα άλατα από τα κύτταρα.



*Εικόνα 16 Διήθηση με φίλτρα GF/C.*

Μετά την παραλαβή των φίλτρων GF/C, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο του τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ. Στο συγκεκριμένο εργαστήριο έλαβαν χώρα όλες οι πειραματικές-εργαστηριακές διαδικασίες για την τελική παραλαβή και χαρακτηρισμό των λιπαρών οξέων των 4 στελεχών.

Τα κύτταρα τα οποία συγκεντρώθηκαν στα GF/C φίλτρα (36 φίλτρα), τοποθετήθηκαν στον λυοφιλοποιητή, και παρέμειναν εκεί για 22 ώρες. Την επόμενη ημέρα ακολούθησε η ζύγιση της ξηρής πλέον μάζας των κυττάρων. Από την τελική αυτή τιμή αφαιρείται το αρχικό βάρος του κενού φίλτρου για να υπολογιστεί η ολική ξηρή μάζα της καλλιέργειας.



*Εικόνα 17 Λυοφιλοποιητής*

### 3.6 Μέθοδος απομόνωσης ολικών λιπιδίων

#### 3.6.1 Αντιδραστήρια

Για την εκχύλιση των ολικών λιπιδίων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Διχλωρομεθάνιο ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )
- Μεθανόλη ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )
- Υπερκάθαρο νερό (milli-Q water)
- Άνυδρο θειικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )

Για την μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Διάλυμα 5% ακετυλοχλωριδίου σε άνυδρη μεθανόλη ( $\text{CH}_3\text{COCl}-\text{MeOH}$ )
- Κυκλοεξάνιο (c- $\text{C}_6\text{H}_{14}$ )
- Άνυδρο θειικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )

Για την ποσοτικοποίηση των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία - φασματοφωτομετρία μάζας (GC-MS) χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα δκαεπτανοϊκού οξέος ( $\text{C}_{17:0}$ ) (διάλυμα φύλαξης σε  $\text{MeOH}$  1mg/mL).

### *Εργαστηριακός εξοπλισμός*

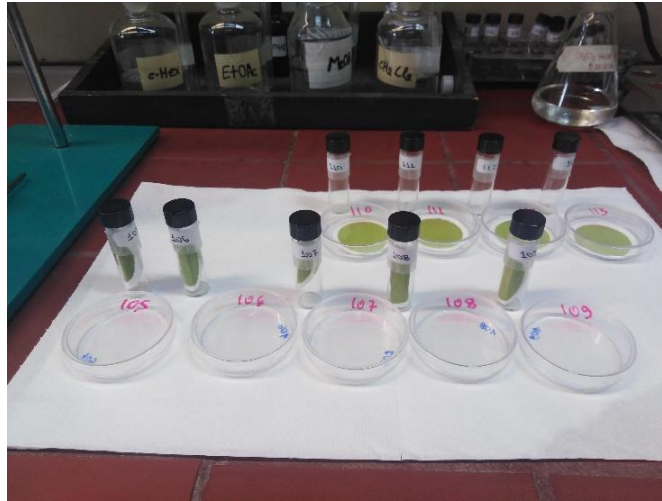
- Ζυγός ακριβείας: Sartorius
- Προζυγισμένα φιαλίδια (vials), 8mL και 10mL
- Αναδευτήρας (Vortex): VELP SCIENTIFICA Are 2
- Εσφυρισμένες σφαιρικές φιάλες
- Συσκευή υπερήχων: General Sonic GS 3
- Αέριος χρωματογράφος - φασματογράφος μάζας (GC-MS): Αέριος χρωματογράφος Hewlett Packard 6890 εξοπλισμένος με τριχοειδή στήλη HP-5MS (30 m x 0.25 mm; film thickness 0.25 μm), συνδεδεμένος με φασματογράφο μάζας Hewlett-Packard 5973 MS. Η μέθοδος ιονισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βομβαρδισμός με δέσμη ηλεκτρονίων στα 70 eV (EI-MS).

### **3.6.2 Μεθοδολογία**

Η ξηρή μάζα κυττάρων υπόκειται σε διαδικασία εκχύλισης Bligh- Dyer (Bligh & Dyer 1959). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή στο ξηρό δείγμα προστίθεται μίγμα νερού και διαλυτών διχλωρομεθάνιο- μεθανόλη σε συγκεκριμένη αναλογία. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένα μονοφασικό σύστημα εκχύλισης. Μετά το πέρας της εκχύλισης, προστίθεται νερό και διχλωρομεθάνιο, με αποτέλεσμα, τα λιπίδια να εντοπίζονται στην οργανική φάση του διχλωρομεθάνιου ενώ κάθε άλλο συστατικό να παραμένει στην υδατική φάση.

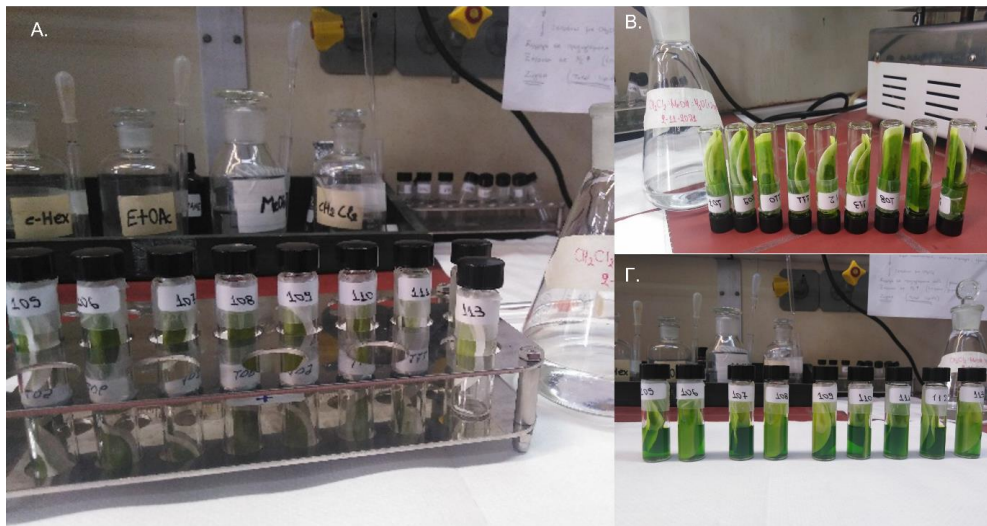
#### *Διαδικασία απομόνωσης των ολικών λιπιδίων*

1. Παρασκευή διαλύματος  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH : ddH<sub>2</sub>O (1:2:0,8 ,v/v/v), το οποίο χρησιμοποιείται για την εκχύλιση των ολικών λιπιδίων των δειγμάτων.
2. Τοποθέτηση με προσοχή των φίλτρων GF/C σε προζυγισμένα φιαλίδια των 10mL.



*Εικόνα 18 Τα φιαλίδια (vials) των 10mL αφού έχουν τοποθετηθεί τα φίλτρα GF/C.*

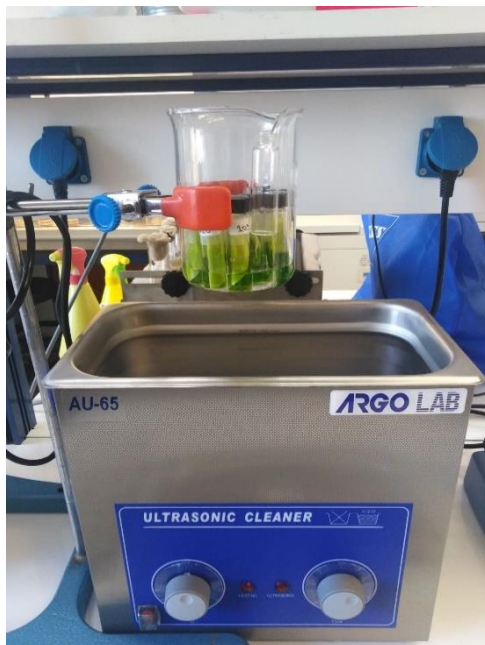
3. Προσθήκη 3,8 mL διαλύματος  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  :  $\text{MeOH}$  :  $\text{ddH}_2\text{O}$  και το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία για 20 λεπτά. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα τα φιαλίδια ανακινούνται με προσεκτικές κινήσεις, ώστε το μίγμα να μπορέσει να καταλάβει όλη την επιφάνεια του φίλτρου (τελικά απομακρύνονται όλα τα κύτταρα από το φίλτρο).



*Εικόνα 19: Προσθήκη του μίγματος διαλυτών για την απομάκρυνση των κυττάρων από το GF/C φίλτρο. Α. Τα φιαλίδια με το GF/C φίλτρο πριν την προσθήκη του μίγματος διαλυτών, Β. αμέσως μετά την προσθήκη του μίγματος διαλυτών και Γ. μετά το πέρας της διαδικασίας εκχύλισης.*



4. Ανάδευση σε vortex για 30 δευτερόλεπτα.
5. Τοποθέτηση δειγμάτων σε υπέρηχους για 20 λεπτά.



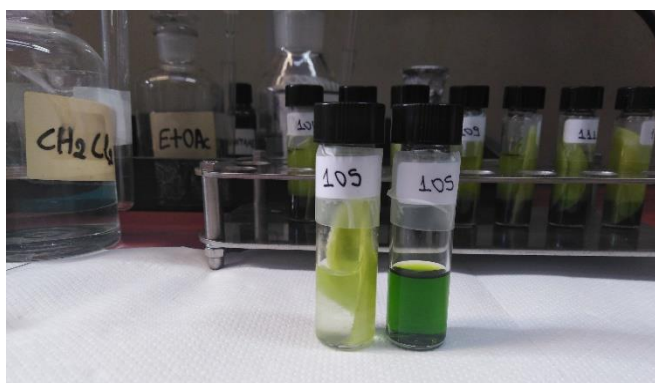
*Εικόνα 20: Συσκευή υπερήχων.*

6. Ανάδευση σε αναδευτήρα (vortex) για άλλα 30 δευτερόλεπτα, με σκοπό τη διάσπαση των κυττάρων.
7. Προσθήκη 1 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .
8. Προσθήκη 1mL υπερκάθαρου νερού για τη δημιουργία διφασικού συστήματος.
9. Τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30', έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός 2 φάσεων (η υδατική στο ανώτερο τμήμα και η οργανική στο κατώτερο).
10. Διαδικασία εκχύλισης: Προσεκτική συλλογή της οργανικής φάσης (η κατώτερη), ώστε να αποφευχθεί η ανάμιξή της με την υδατική με τη χρήση υάλινης πιπέτας. Ακολουθεί διήθηση σε γυάλινη πιπέτα Pasteur στην οποία έχει τοποθετηθεί βαμβάκι και είναι πληρωμένη με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , το οποίο βοηθά στην απομάκρυνση του νερού, το οποίο παραμένει στην οργανική φάση.



*Εικόνα 21: Προετοιμασία υλικών για τη διαδικασία της εκχύλισης*

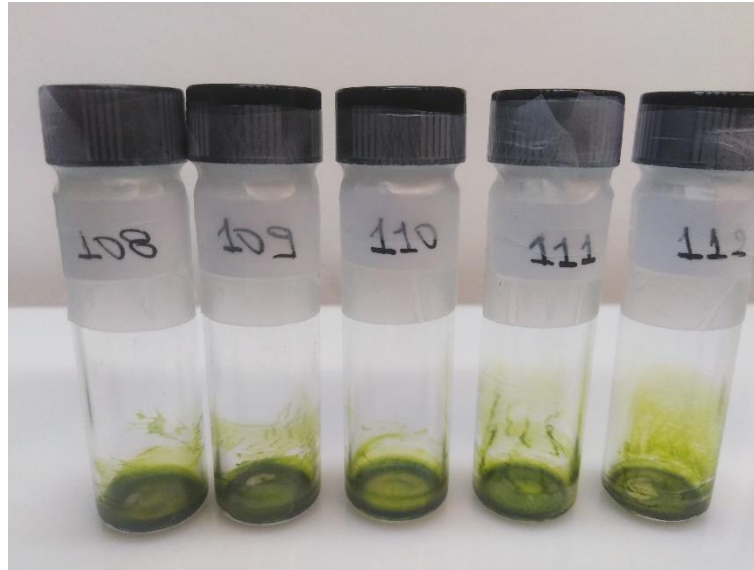
11. Προσθήκη  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  και επανάληψη της διαδικασίας εκχύλισης
12. Έκπλυση της στήλης με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .
13. Συλλογή του διαλύματος των ολικών λιπιδίων σε προζυγισμένα φιαλίδια (8mL).



*Εικόνα 22: Αριστερά το φιαλίδιο (vial) με την υδατική φάση και το κενό GF/C φίλτρο και δεξιά το φιαλίδιο (vial) με την οργανική φάση και τα ολικά λιπίδια.*

14. Ξήρανση του εκχυλίσματος μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου και χαμηλής θέρμανσης ( $37^\circ\text{C}$ ).





*Εικόνα 23 Τα ολικά λιπίδια μετά την ξήρανση.*

15. Φύλαξη εκχυλίσματος ολικών λιπιδίων στο ψυγείο μέχρι το επόμενο στάδιο.
16. Ζύγιση και υπολογισμός της επί τοις εκατό απόδοσης των εκχυλισμένων ολικών λιπιδίων (total lipids, TLs) ως προς το ξηρό βάρος των δειγμάτων.

#### *Μέθοδος μετεστεροποίησης λιπαρών οξέων*

Σε αυτό το στάδιο λαμβάνει χώρα σαπωνοποίηση των ολικών λιπιδίων και εστεροποίηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων με διάλυμα 5% ακετυλοχλωριδίου σε άνυδρη μεθανόλη (Lepage *et al.*, 1986). Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (Fatty Acids Methyl Esters: FAMES), οι οποίοι είναι πτητικοί και μπορεί να αναλυθούν με αέριο χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας.

#### *Πορεία μετεστεροποίησης λιπαρών οξέων*

1. Προσθήκη σε κάθε φιαλίδιο 5mL διαλύματος 5% AcCl σε ξηρή MeOH, υπό άνυδρες συνθήκες (διαδικασία που πραγματοποιείται εντός του απαγωγού). Η προσθήκη του AcCl στην ξηρή MeOH γίνεται διατηρώντας τον περιέκτη της μεθανόλης σε παγόλουτρο.



*Εικόνα 24 Προσθήκη διαλύματος 5% AcCl σε ξηρή MeOH.*

2. Προσθήκη 50  $\mu\text{l}$  του λιπαρού οξέος C17:0 γνωστής συγκέντρωσης (1mg/mL), το οποίο αποτελεί το εσωτερικό πρότυπο και είναι απαραίτητο για την ποσοτικοποίηση των μεθυλεστέρων που ακολουθεί. Το εσωτερικό πρότυπο (internal standard) δείγμα ελέγχου διατηρείται στο ψυγείο ως απόθεμα σε ξηρή MeOH.



*Εικόνα 25 Το εσωτερικό δείγμα ελέγχου C17:0.*

3. Τοποθέτηση των φιαλιδίων εντός αμμόλουτρου για 1 ώρα στους 80°C και ανακίνηση αυτών ανά τακτά χρονικά διαστήματα.



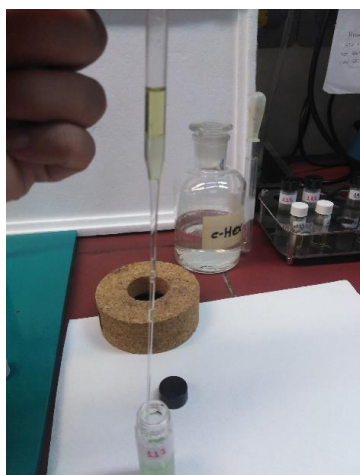
***Εικόνα 26** Θέρμανση των δειγμάτων σε αμμόλουτρο στους 80°C.*

4. Με το πέρας του χρονικού διαστήματος της 1 ώρας, τα δείγματα αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προστίθενται 2 mL H<sub>2</sub>O.
5. Προσθήκη 2mL κυκλοεξανίου (cHEX).
6. Ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex) για 30 δευτερόλεπτα.
7. Δημιουργία 2 φάσεων, η επάνω είναι η οργανική και περιέχει τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων.

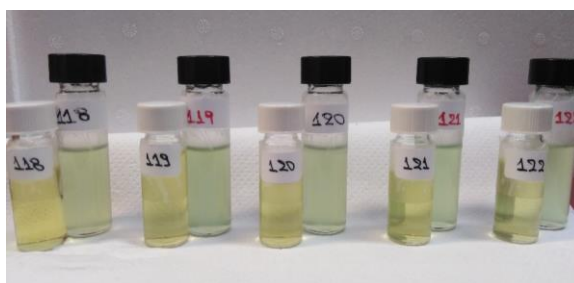


***Εικόνα 27** Ο διαχωρισμός των 2 φάσεων μετά την προσθήκη cHEX.*

8. Διήθηση της οργανικής φάσης με πιπέτα Pasteur στην οποία έχει τοποθετηθεί βαμβάκι και είναι πληρωμένη με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συλλογή της οργανικής φάσης.



*Εικόνα 28 Συλλογή της οργανικής φάσης.*



*Εικόνα 29 Η υδατική φάση (μεγαλύτερο φιαλίδιο, αποτελεί την κατώτερη φάση) και η οργανική φάση (μικρότερο φιαλίδιο, αποτελεί την ανώτερη φάση) του κάθε δείγματος.*

9. Επιπλέον έκπλυση με τον διαλύτη cHEX για πλήρη παραλαβή των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων.
10. Συλλογή σε προζυγισμένα μικρά φιαλίδια.
11. Θέρμανση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου.
12. Ζύγιση των FAMES και υπολογισμός της επί τοις εκατό απόδοσης των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (FAMES) ως προς τα ολικά λιπίδια, αλλά και ως προς το ξηρό βάρος των δειγμάτων.
13. Φύλαξη μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων στο ψυγείο για ανάλυση με αέριο χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας.

*Μέθοδος προσδιορισμού λιπαρών οξέων με αέριο χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας*

Τα FAMES αναδιαλύονται σε cHEX και μεταφέρονται στα ειδικά φιαλίδια για την ανάλυση του λιπιδικού προφίλ με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μάζας (GC-MS).

Πραγματοποιείται ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με τη βοήθεια Αέριου Χρωματογράφου συζευγμένου με Φασματογράφο Μάζας (GC-MS). Ο ποιοτικός προσδιορισμός των συστατικών του δείγματος γίνεται με ταυτοποίηση κάθε κορυφής με την βοήθεια βάσης δεδομένων που περιέχει τα χαρακτηριστικά θραύσματα πτητικών ουσιών. Ο ποσοστιαίος ποσοτικός προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων εκφράστηκε με τον εξής τρόπο: Αρχικά αναγνωρίστηκε το λιπαρό οξύ C17:0, το οποίο αποτελεί το μάρτυρα ελέγχου, από τον χρόνο έκλουσής του. Μετράται το εμβαδόν της κορυφής του C17:0 και σε συνδυασμό με τη γνωστή ποσότητα που εισάχθηκε στην αρχή της διαδικασίας (50μg), είναι δυνατός ο υπολογισμός και των ποσοτήτων των υπό μελέτη λιπαρών οξέων. Με τον τρόπο αυτό, είναι δυνατό να προσδιορισθεί η συγκέντρωση κάθε λιπαρού οξέος τόσο σε ποσοτικό επίπεδο, όσο και ως προς την επί τοις εκατό περιεκτικότητά του ως προς τα ολικά λιπίδια.

Συνθήκες λειτουργίας της αέριας χρωματογραφίας κατά τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων των δειγμάτων.

Ο αέριος χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Hewlett Packard 6890 που ήταν συνδεδεμένος με φασματογράφο μάζας Hewlett-Packard 5973 MS Τριχοειδής στήλη HP-5MS στήλη διαστάσεων μήκους 30 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 mm και πάχους φιλμ 0,25 μm

- Φέρον αέριο: He
- Ταχύτητα φέροντος αερίου: 2mL/λεπτό

Συνθήκες λειτουργίας αέριου χρωματογράφου

Θερμοκρασία εισόδου: 200°C

Θερμοκρασία ανιχνευτή: 250°C

Πρόγραμμα μεταβολής θερμοκρασίας φούρνου: Αρχική θερμοκρασία 60°C, ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας 3°C /λεπτό μέχρι 300°C, παραμονή για 10 λεπτά.

Συνολικός χρόνος ανάλυσης: 90 λεπτά.

*Διαδικασία προσδιορισμού λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία*

Τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα DATA ANALYSIS και τις βάσεις δεδομένων από 2 βιβλιοθήκες, τις WILEY275 και NIST14.L. Συγκεκριμένα, κάθε δείγμα αναλύθηκε με βάση φάσματα μάζας των βιβλιοθηκών αλλά και το εσωτερικό πρότυπο, για την αναγνώριση του κάθε εστεροποιημένου λιπαρού οξέος, αλλά και για την ποσοτικοποίηση του κάθε μεθυλεστέρα στα δείγματα που αναλύθηκαν.

### **3.7 Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα OriginPro8, ενώ τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με τη χρήση MS Excel. Συγκεκριμένα, στις περιπτώσεις όπου συγκρίνονταν και τα 4 στελέχη ταυτόχρονα, χρησιμοποιήθηκε OneWay Anova με Multiple Comparisons, όπου το  $p < 0.05$ . Η OneWay ANOVA λειτουργεί υπολογίζοντας τη μεταβλητότητα των τιμών κάθε ομάδας, καθώς και τη μεταβλητότητα μεταξύ των ομάδων. Η μεταβλητότητα μεταξύ των ομάδων συγκρίνεται με τη μεταβλητότητα εντός των ομάδων, για να διαπιστωθεί εάν οι μέσοι όροι διαφέρουν σημαντικά. Η μηδενική υπόθεση της OneWay ANOVA είναι ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων των ομάδων, ενώ η εναλλακτική υπόθεση είναι ότι υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ τουλάχιστον δύο ομάδων. Αντιστοίχως, όταν συγκρίνονταν τα 2 στελέχη του ίδιου είδους μεταξύ τους χρησιμοποιήθηκε Student's test. Το t-test υπολογίζει μια τιμή t, η οποία μετρά τη διαφορά μεταξύ των μέσων όρων δύο ομάδων σε μονάδες τυπικού σφάλματος. Στη συνέχεια, η τιμή t συγκρίνεται με μια κρίσιμη τιμή από την κατανομή t για να προσδιοριστεί η πιθανότητα η διαφορά μεταξύ των μέσων όρων να οφείλεται στην τύχη. Χρησιμοποιείται για τη σύγκριση των μέσων όρων δύο ομάδων δεδομένων, προκειμένου να διαπιστωθεί αν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.(Tuckey, 1941)

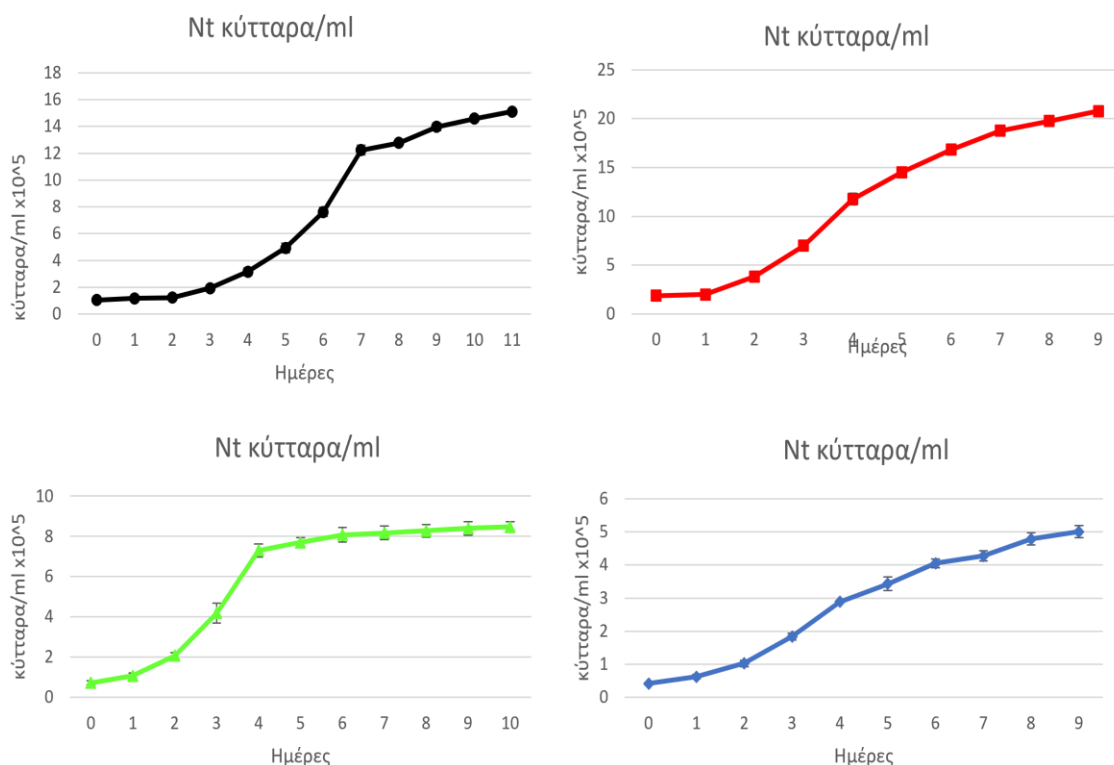
## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Υπολογισμός των ρυθμών αύξησης και πολλαπλασιασμού των 4 στελεχών που μελετήθηκαν

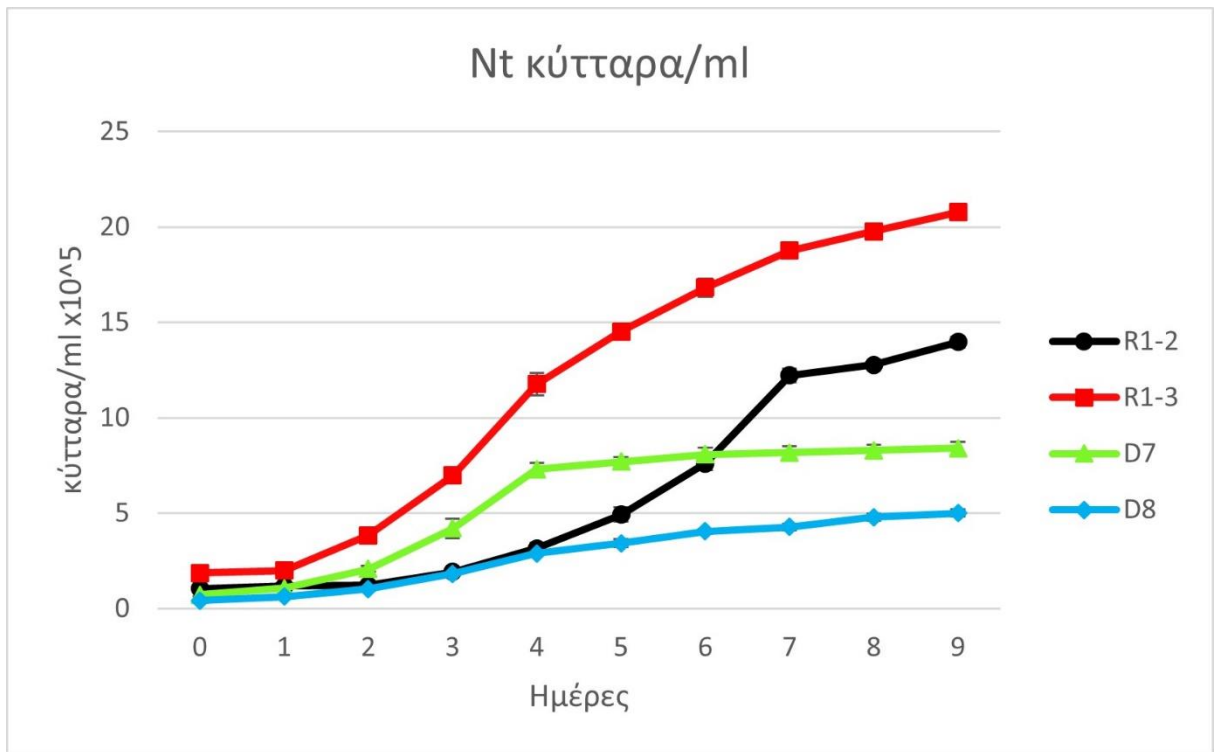
Αρχικά μελετήθηκε η συχνότητα πολλαπλασιασμού των 4 στελεχών. Ο αριθμός των κυττάρων μετρήθηκε καθημερινά για 12 ημέρες, για τον προσδιορισμό των φάσεων ανάπτυξης. Η ανάπτυξη των μικροφυκών γενικά παρουσιάζει πέντε διαφορετικές φάσεις, οι οποίες σχετίζονται με τις φάσεις ανάπτυξης που εντοπίζονται σε καλλιέργειες μικροοργανισμών, όπως τα βακτήρια κι οι ζύμες: η φάση υστέρησης, η εκθετική φάση, η φάση επιβράδυνσης, η στατική φάση και η φάση θανάτου.

Στα παρακάτω γραφήματα απεικονίζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των 4 στελεχών, ξεχωριστά για το κάθε στέλεχος (Γράφημα 1) και συνολικά (Γράφημα 2).

### Κυτταρική Ανάπτυξη



**Γράφημα 1** Καμπύλες ανάπτυξης των 4 στελεχών για 9 ημέρες καλλιέργειας. Α)R1-2, Β)R1-3, Γ)D7, Δ)D8.



**Γράφημα 2** Συγκριτική απεικόνιση των καμπύλων ανάπτυξης των 4 στελεχών για 9 ημέρες καλλιέργειας.

Για μεγαλύτερη ευκολία, ορίζεται ως φάση πολλαπλασιασμού των καλλιιεργειών το σύνολο της εκθετικής φάσης και της φάσης επιβράδυνσης, αφού και στις 2 αυτές φάσεις έχουμε αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Όσον αφορά στα στελέχη *Tetraselmis* παρατηρούμε ότι το R1-2 εμφανίζει φάση υστέρησης έως και τη δεύτερη ημέρα καλλιέργειας. Από την 3<sup>η</sup> ημέρα έως και την 7<sup>η</sup> παρατηρείται η φάση πολλαπλασιασμού, ενώ από την 8<sup>η</sup> ημέρα μέχρι το τέλος των μετρήσεων παρατηρείται η στατική φάση. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία που υποδεικνύει ότι όντως η φάση πολλαπλασιασμού του είδους *Tetraselmis* διαρκεί από την 3<sup>η</sup> έως την 7<sup>η</sup> ημέρα (Teo et al., 2014, Islam et al., 2021).

Αντιθέτως, το R1-3 εμφανίζει ένα διαφορετικό πρότυπο πολλαπλασιασμού. Όπως φαίνεται και στα αντίστοιχα γραφήματα, η φάση υστέρησης διαρκεί τις 2 πρώτες ημέρες, ενώ η φάση πολλαπλασιασμού εντοπίζεται μεταξύ της 2<sup>ης</sup> και της 4<sup>ης</sup> ημέρας. Από την 5<sup>η</sup> ημέρα και μετά παρατηρείται η φάση επιβράδυνσης. Φαίνεται λοιπόν ότι τα δύο διαφορετικά στελέχη εμφανίζουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τον ρυθμό ανάπτυξής τους, παρόλο που η φάση πολλαπλασιασμού διαρκεί σχεδόν το ίδιο χρονικό διάστημα και στα δύο στελέχη. Αυτό το φαινόμενο δεν έχει παρατηρηθεί στη βιβλιογραφία, και πιθανά η διαφορά

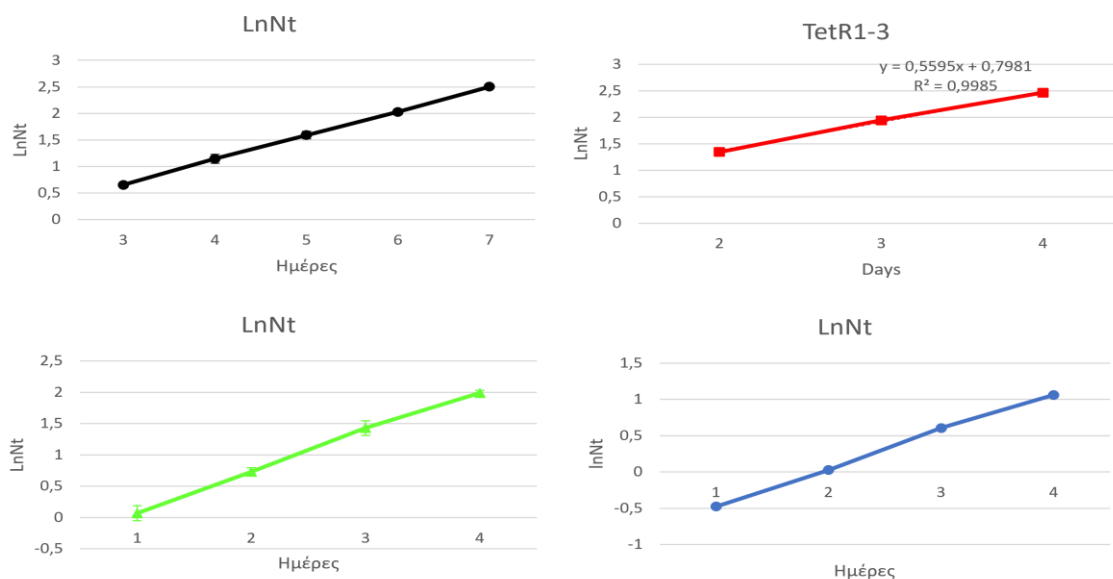


αυτή να οφείλεται σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης από αυτές που είχαν μελετηθεί προηγούμενα, οι οποίες ευνοούν την ανάπτυξη του R1-3 περισσότερο από του R1-2. (Tzovenis et al., 2008).

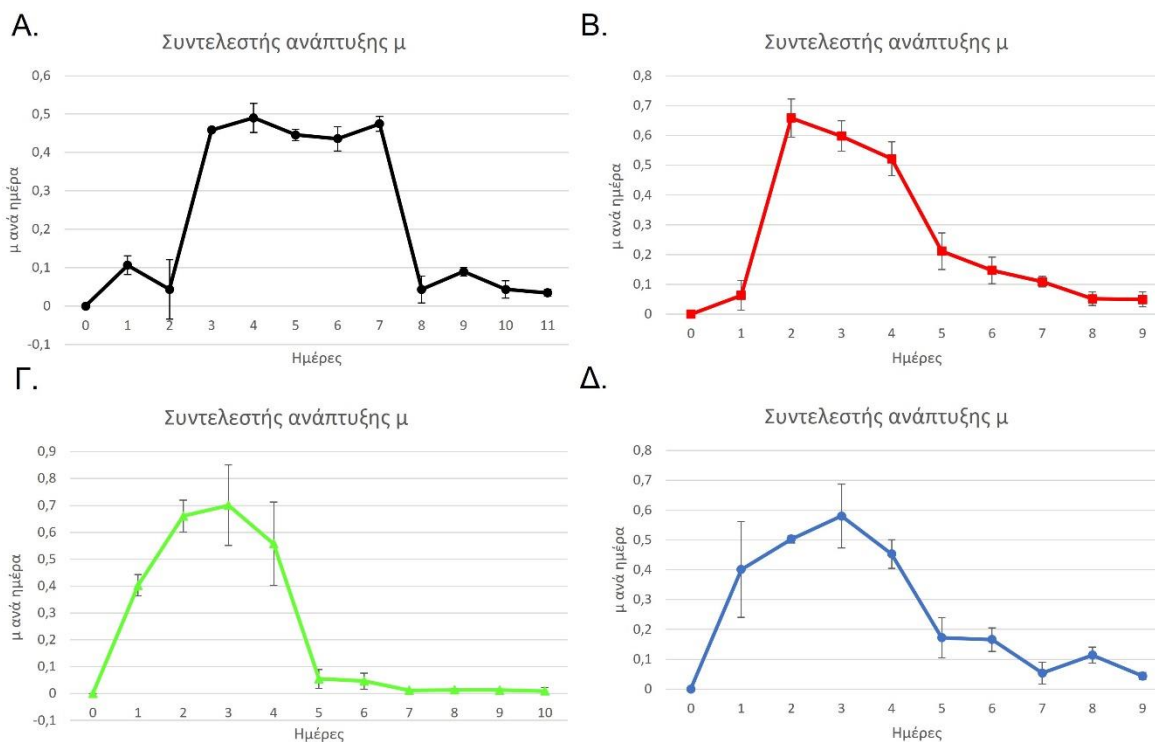
Όσον αφορά τα στελέχη του είδους *Dunaliella*, τα δύο υπό μελέτη είδη εμφανίζουν παρόμοιο ρυθμό αύξησης. Τόσο στο D7 όσο και στο D8, η φάση υστέρησης διαρκεί μόνο για μία ημέρα και ήδη από την 1<sup>η</sup> ημέρα ξεκινά η φάση πολλαπλασιασμού, η οποία διαρκεί έως και την 4<sup>η</sup> ημέρα. Από την 4<sup>η</sup> ημέρα και μετέπειτα, η καλλιέργεια εισέρχεται στη στατική φάση. Τα δεδομένα αυτά φαίνεται να συμφωνούν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, αν και λιγότερες μελέτες έχουν γίνει για τον ρυθμό ανάπτυξης της *Dunaliella* (Lanapan et al., 2013).

Στα παρακάτω γραφήματα απεικονίζονται ο λογάριθμος του αριθμού κυττάρων (Γράφημα 3), καθώς και ο συντελεστής  $\mu$  που είναι και ο συντελεστής του ρυθμού ανάπτυξης (Γράφημα 4). Όσον αφορά στα γραφήματα των λογαρίθμων, παρουσιάζονται μόνο οι ημέρες οι οποίες εμφανίζουν γραμμική συσχέτιση μεταξύ τους. Επιπλέον, στο γράφημα παρουσιάζεται η γραμμή τάσης και ο συντελεστής γραμμικότητας,  $R^2$ . Η γραμμικότητα των σημείων αυτών υποδεικνύει ότι η καλλιέργεια τις ημέρες αυτές αυξάνεται εκθετικά. Επίσης, από το Γράφημα 4, όπου παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές  $\mu$  κάθε στελέχους για κάθε ημέρα, αναγνωρίζονται επίσης οι ημέρες που ανήκουν στη φάση ανάπτυξης, μια που τις ημέρες αυτές ο συντελεστής  $\mu$  αγγίζει την τιμή του  $\mu_{\max}$ .

### InNT



**Γράφημα 3** Λογαριθμικές καμπύλες ανάπτυξης των 4 στελεχών για τις ημέρες που η καλλιέργεια διανύει τη φάση ανάπτυξης. Α)R1-2, Β)R1-3, Γ)D7, Δ)D8.



**Γράφημα 4** Καμπύλες συντελεστή ανάπτυξης μ των 4στελεχών που μελετήθηκαν για 9 ημέρες καλλιέργειας. Α)R1-2, Β)R1-3, Γ)D7, Δ)D8.

Τέλος, υπολογίστηκαν: 1) το  $\mu_{\max}$ , που αποτελεί τον συντελεστή μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης, 2) ο μέγιστος αριθμός κυττάρων ( $N_{t\max}$ ), που αναφέρεται στη συγκέντρωση των κυττάρων κατά τη στατική φάση, όπου δεν πραγματοποιείται πλέον αύξηση, 3) ο συντελεστής απόδοσης (Yield), που υποδεικνύει τη συγκέντρωση της βιομάζας που παράγεται κατά τη φάση ανάπτυξης και τέλος 4) η απόδοση P, η οποία υποδεικνύει πόσες φορές πολλαπλασιάστηκε ένα κύτταρο κατά τη φάση πολλαπλασιασμού. Τα δεδομένα των υπολογισμών των συντελεστών αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 7:

**Πίνακας 7** Στοιχεία ανάπτυξης των 4 στελεχών που μελετήθηκαν. Πραγματοποιήθηκε *OneWay* Ανονα ανάλυση με *Multiple Comparisons* ώστε να εντοπιστεί η στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ όλων των πιθανών ζευγών. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των στελεχών ελέγχεται με *Tuckey's test* και δηλώνεται με τα εξής σύμβολα: \*:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και R1-3, #:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D7, \$:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D8, %:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D7, !:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D8, ¥:  $p < 0,05$  μεταξύ του D7 και D8.

	<b>R1-2</b>	<b>R1-3</b>	<b>D7</b>	<b>D8</b>
$\mu_{\max}$ ( $\text{day}^{-1}$ )	0,461±0.004	0,592±0.044	0,580±0.031	0,484±0.017
$N_{t\max}$ (cells/mL * $10^5$ )	12,23±0.37 <sup>#</sup> \$	11,76±0.59 <sup>%! </sup>	7,30±0.32 <sup>¥</sup>	2,89±0.02
Yield (mg/mL)	11,01±0.31 <sup>#</sup> \$	9,77±0.74 <sup>%! </sup>	6,58±0.31 <sup>¥</sup>	2,47±0.02
$P_{\text{cells}}$ (mg/mL/day)	2,20±0.06 <sup>*#</sup> \$	3,26±0.25 <sup>%! </sup>	1,65±0.08 <sup>¥</sup>	0,62±0.01

Συγκρίνοντας τα παραπάνω δεδομένα, φαίνεται ότι τα στελέχη R1-3 και D7 διαθέτουν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης σε σχέση τα R1-2 και D8 αντιστοίχως. Ωστόσο, ο μέγιστος αριθμός κυττάρων στη στατική φάση δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των 2 στελεχών του είδους *Tetraselmis*, με τον αριθμό του R1-2 να εμφανίζεται ελαφρώς υψηλότερος. Αντιθέτως, στα στελέχη *Dunaliella* εντοπίζεται σημαντική διαφορά, με τον μέγιστο αριθμό κυττάρων στο στέλεχος D8 να είναι σημαντικά

χαμηλότερος σε σχέση με το D7, ενώ αμφότερα τα στελέχη εμφανίζουν σημαντικά μειωμένα επίπεδα σε σχέση με τα στελέχη του είδους *Tetraselmis*. Αντιστοίχως και ο συντελεστής απόδοσης, ο οποίος εμφανίζει στατιστικώς σημαντική διαφορά τόσο μεταξύ των δυο στελεχών *Dunaliella*, με το D8 να έχει σημαντικά χαμηλότερο συντελεστή μ σε σχέση με το D7 και το R1-3. Ωστόσο, σε αυτήν την περίπτωση, και το R1-2 εμφανίζει μικρότερη απόδοση σε σχέση με το R1-3 (2,20 mg/mL/ημέρα έναντι 3,26 mg/mL/ημέρα), ενώ η απόδοση στα στελέχη του γένους *Dunaliella* είναι και πάλι σημαντικά χαμηλότερη (1,65 mg/mL/ημέρα στο D7 έναντι 0,62 mg/mL/ημέρα στο D8.) Επομένως, η απόδοση της κάθε καλλιέργειας διαφέρει αρκετά, με το R1-3 να έχει την υψηλότερη απόδοση, ακολουθούμενο από τα R1-2, D7 και τέλος το D8.

Σε επόμενο στάδιο και μετά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μελέτης κινητικής, επιλέχθηκε η 9<sup>η</sup> ημέρα ως ημέρα συλλογής των κυττάρων. Η επιλογή της ημέρας έγινε με την παραδοχή ότι όλες οι καλλιέργειες βρίσκονται στη στατική φάση για κάποιο χρονικό διάστημα, ώστε η συλλογή να πραγματοποιηθεί την ίδια ημέρα καλλιέργειας και τα κύτταρα να βρίσκονται στην ίδια κατάσταση, με σκοπό την αποφυγή πειραματικού σφάλματος.

#### **4.2 Υπολογισμός περιεκτικότητας ολικών λιπαρών οξέων (TLs) και μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAMES)**

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης των λιπιδίων μετράται το ξηρό βάρος του αρχικού δείγματος, η ποσότητα των ολικών λιπιδίων, αλλά και η ποσότητα των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων που παράγονται μέσω της εστεροποίησης των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Στη συνέχεια, υπολογίζονται τα παρακάτω:

- Η εκατοστιαία περιεκτικότητα των ολικών λιπιδίων ως προς το ξηρό βάρος του αρχικού δείγματος (%Total Lipids-TLs/Dry Weight-DW)
- Η εκατοστιαία περιεκτικότητα των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων ως προς την ποσότητα των ολικών λιπιδίων (%FAMES/Total Lipids-TL)
- Η εκατοστιαία περιεκτικότητα των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων ως προς το ξηρό βάρος του αρχικού δείγματος (%FAMES/ Dry Weight-DW)

Οι περιεκτικότητες για το κάθε στέλεχος της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

**Πίνακας 8** Ποσότητες ξηρού βάρους, ολικών λιπιδίων και μεθυλεστέρων και ποσοστιαία περιεκτικότητα σε ολικά λιπίδια ως προς τη ξηρή μάζα, σε μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων ως προς τη ξηρή μάζα, και σε μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων ως προς τα ολικά λιπίδια των 4 στελεχών. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των στελεχών ελέγχεται με *Tuckey's test* και δηλώνεται με τα εξής σύμβολα: \*:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και R1-3, #:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D7, §:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D8, %:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D7, !:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D8, ¥:  $p < 0,05$  μεταξύ του D7 και D8.

	ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ (DW,mg)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ (TLs mg)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ (FAMES, mg)	ΟΛΙΚΑ ΛΙΠΙΔΙΑ (% TLs/DW)	ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΞΗΡΗ ΜΑΖΑ (% FAMES/DW)	ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΟΛΙΚΑ ΛΙΠΙΔΙΑ (% FAMES/TLs)
R1-2	33,11±5.72	0,98±0.1 <sup>#</sup>	0.81±0.09 <sup>#</sup>	3,00±0,00 <sup>#</sup>	2,49±0,51 <sup>#</sup>	82,72±9,54
R1-3	24.49±0.09	0,87±0.08 <sup>%</sup>	0.67±0.10 <sup>%!</sup>	3,57±0,00 <sup>%</sup>	2,72±0,26	77,16±5,6
D7	33,63±4.14	2,24±0.20 <sup>¥</sup>	1.74±0.15 <sup>¥</sup>	6,70±0,00 <sup>¥</sup>	5,28±0,78 <sup>¥</sup>	78,55±8,32
D8	38.76±5.35	0.99±0.04	0,88±0.03	2,60±0,00	2,30±0,24	88,61±1,22

Από την πειραματική διαδικασία διαπιστώθηκε ότι η περιεκτικότητα σε λιπίδια στα στελέχη του γένους *Tetraselmis* έχει τιμές 3,00% στο R1-2 και 3,57% στο R1-3, ενώ βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι τα στελέχη του γένους *Tetraselmis* παράγουν ένα ποσοστό λιπιδίων μεταξύ του 4,7 και του 6.5% (Grubišić et al., 2022, Conde et al., 2021). Αντιστοίχως, για τα στελέχη του γένους *Dunaliella* υπολογίζεται περίπου 6,7% της ξηρής μάζας του στελέχους D7 να αποτελείται από λιπίδια, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στο στέλεχος D8 είναι μόλις 2,6%. Βιβλιογραφικά, το ποσοστό των συνολικών λιπιδίων του γένους αυτού κυμαίνεται μεταξύ 4,57 και 5,99% (Babich et al., 2022).

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με OneWay Anova και παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα επίπεδα της εκατοστιαίας περιεκτικότητας τόσο σε ολικά λιπίδια όσο και σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων ως προς το ξηρό βάρος του στελέχους D7 (% TL/DW και % FAME/DW, αντίστοιχα). Ωστόσο, η εκατοστιαία περιεκτικότητα FAMES ως προς τα ολικά λιπίδια δεν εμφανίζει στατιστικώς σημαντική διαφορά σε κάποιο από τα στελέχη που μελετήθηκαν, γεγονός που υποδεικνύει ότι η περιεκτικότητα των λιπαρών σε μεθυλεστέρες είναι υψηλή και σταθερή και οι διαφορές που παρατηρούνται στα ποσοστά των TLs/DW και

FAMES/DW σχετίζεται με τη διαφορά της περιεκτικότητας του ξηρού βάρους σε ολικά λιπίδια.

### 4.3 Ανάλυση των λιπαρών οξέων στα 4 στελέχη που μελετήθηκαν

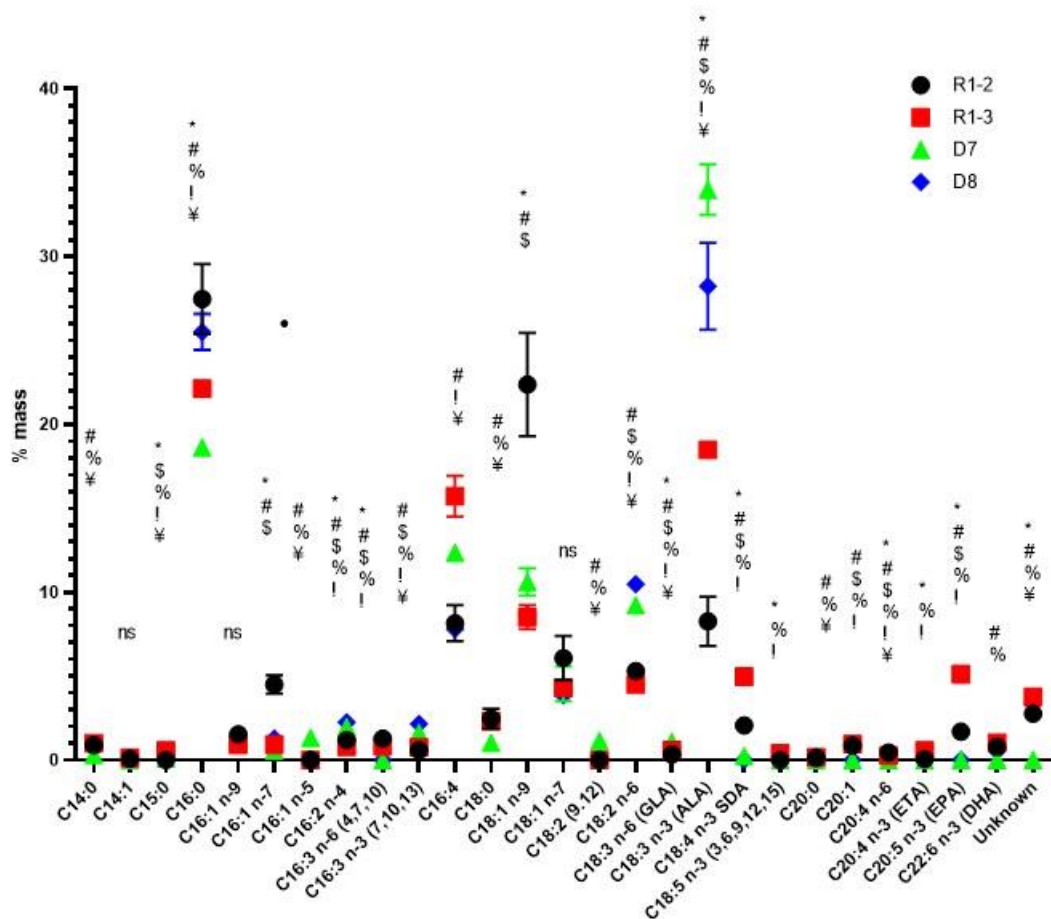
Στον Πίνακα 9, απεικονίζονται τα δεδομένα της ανάλυσης των λιπαρών οξέων που περιέχονται στα 4 στελέχη μικροφυκών που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά προήλθαν από τη χρωματογραφική ανάλυση, όπου μετρήθηκε η συγκέντρωση του κάθε λιπαρού οξέος και στη συνέχεια υπολογίστηκε η εκατοστιαία αναλογία τους. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν όλα μεταξύ τους, με τη χρήση OneWay Anova, αλλά και ανά δύο με t-test (R1-2 με R1-3 και D7 με D8).

**Πίνακας 9** Εκατοστιαία περιεκτικότητα (%) των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων που προσδιορίστηκαν κατά την ανάλυση των 4 στελεχών ως προς τη συνολική ποσότητα FAMES.

		R1-2	R1-3	D7	D8
C14:0	Μυριστικό οξύ	0,90±0,09	1,00±0,19	0,31±0,01	0,72±0,12
C14:1	Μυριστολεϊκό οξύ	0,08±0,02	0,13±0,05	0,00	0,08±0,14
C15:0	Πενταδεκανοϊκό οξύ	0,49±0,06	0,57±0,14	0,09±0,03	0,33±0,03
C16:0	Παλμιτικό οξύ	27,49±2,10	22,14±0,3	18,63±0,28	25,51±1,07
C16:1 n-9	Υπογειϊκό οξύ	1,54±0,47	0,93±0,15	1,43±0,11	1,07±0,35
C16:1 n-7	Παλμιτελαϊκό οξύ	4,50±0,55	0,92±0,3	0,58±0,27	1,29±0,14
C16:1 n-5	11-Παλμιτελαϊκό οξύ	0,86±0,24	0,43±0,1	0,64±0,01	0,64±0,35
C16:2 n-4	7,10-Δεκαεξαδιενοϊκό οξύ	1,20±0,10	0,80±0,02	1,98±0,02	2,26±0,28
C16:3 n-6 (4,7,10)	4,7,10-Δεκαεξατριενοϊκό οξύ	1,29±0,09	0,83±0,00	0,00	0,00
C16:3 n-3 (7,10,13)	7,10,13- Δεκαεξατριενοϊκό οξύ	0,60±0,12	0,77±0,04	1,64±0,06	2,15±0,07
C16:4 n-3 (4,7,10,13)	Δεκαεξατετραενοϊκό οξύ	8,15±1,08	15,74±1,22	12,36±0,18	7,81±0,18
C18:0	Στεατικό οξύ	2,47±0,59	2,32±0,35	1,01±0,05	2,34±0,11
C18:1 n-9	Ελαϊδικό οξύ	22,38±3,08	8,50±0,72	10,62±0,82	8,66±0,13
C18:1 n-7	cis-Βακενικό οξύ	6,08±1,32	4,32±0,30	4,54±1,03	3,86±0,26
C18:2 (8,11)	8,11-Δεκαοκταδιενοϊκό οξύ	0,00	0,00	1,14±0,30	0,00
C18:2 n-6	Λινελαϊκό οξύ	5,30±0,43	4,50±0,27	9,23±0,26	10,48±
C18:3 n-6 (GLA)	γ-Λινολενικό Οξύ	0,34±0,02	0,60±0,03	1,08±0,07	0,75±0,05
C18:3 n-3 (ALA)	α- Λινολενικό Οξύ	8,27±1,46	18,49±0,48	33,99±1,50	28,24±2,59
C18:4 n-3 (SDA)	Δεκαοκτατετραενοϊκό Οξύ	2,07±0,33	4,98±0,27	0,25±0,03	0,00
C18:5 n-3 (3,6,9,12,15)	3,6,9,12,15- Δεκαοκταπεντενοϊκό οξύ	0,00	0,40±0,05	0,00	0,00
C20:0	Αραχιδικό οξύ	0,13±0,06	0,16±0,04	0,00	0,20±0,02
C20:1	Εικοσαενοϊκό οξύ	0,86±0,09	0,96±0,03	0,00	0,00
C20:4 n-6	5(E)-Αραχιδονικό οξύ	0,45±0,06	0,27±0,01	0,00	0,00
C20:4 n-3 (ETA)	ω-3-Αραχιδονικό οξύ	0,07±0,06	0,59±0,01	0,00	0,00
C20:5 n-3 (EPA)	Εικοσαπενταενοϊκό οξύ	1,70±0,13	5,11±0,33	0,00	0,00
C22:6 n-3 (DHA)	Εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ	0,80±0,43	1,04±0,37	0,00	0,54±0,03
<b>Άγνωστα</b>		2,77±0,48	3,76±0,14	0,00	3,39±0,15

(Unknown)				
Σύνολο		100	100	100

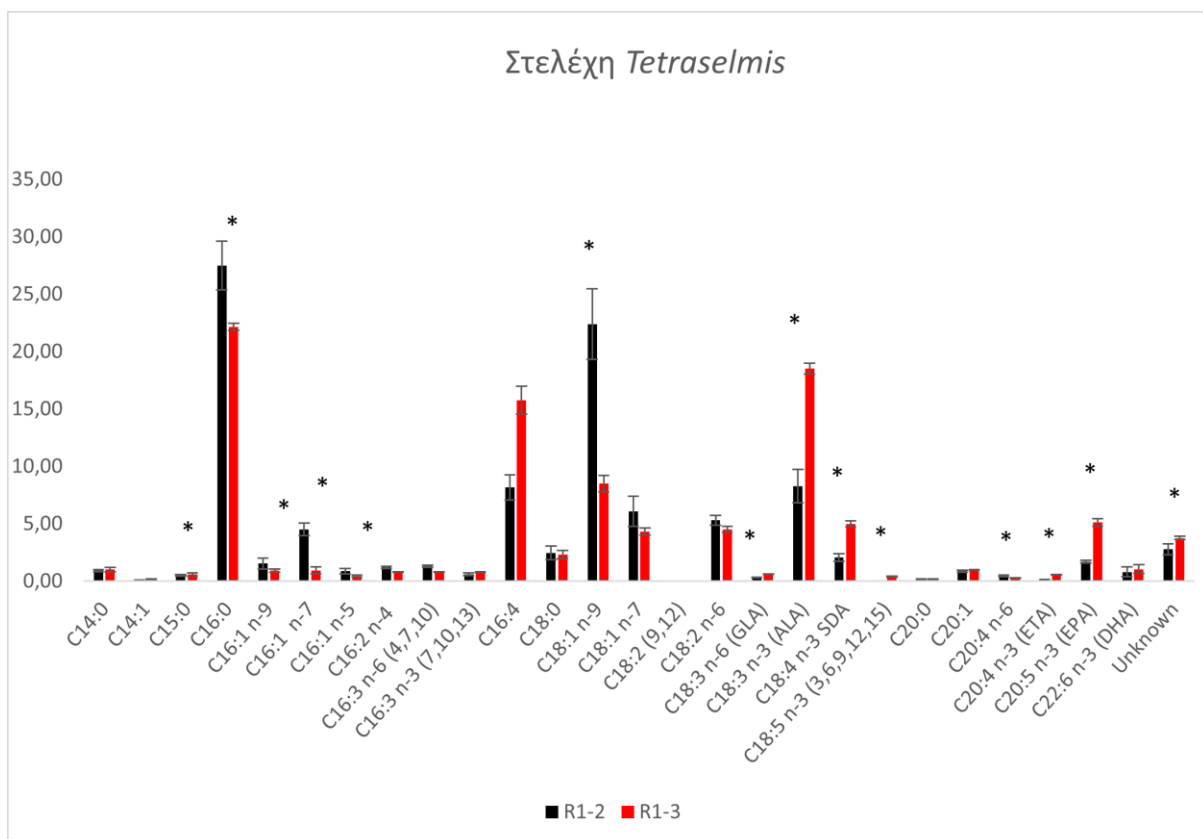
Όσον αφορά στην OneWay Ανονα ανάλυση, εντοπίζονται σημαντικές διαφορές στα περισσότερα ανιχνευθέντα λιπαρά οξέα. Τα δεδομένα απεικονίζονται στο παρακάτω γράφημα. Συγκεκριμένα, τα λιπαρά οξέα C16:4, C18:3 n-3 και C20:4 n-6 εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, όταν συγκρίνονται όλα τα στελέχη μεταξύ τους. Αντιθέτως, τα λιπαρά οξέα C14:1, C16:1 n-9 και C18:1 n-7 δεν εμφανίζουν καμία διαφορά μεταξύ τους. Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα εμφανίζουν κάποιες στατιστικώς σημαντικές διαφορές, οι οποίες εμφανίζονται στο γράφημα και επεξηγούνται με τα σύμβολα (Γράφημα 5).



**Γράφημα 5** OneWay Ανονα ανάλυση για την αναζήτηση στατιστικώς σημαντικών διαφορών στην εκατοστιαία περιεκτικότητα (%) κάθε λιπαρού οξέος (FAMES) ως προς τα συνολικά λιπίδια (TLs) στα 4 στελέχη που μελετήθηκαν. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των

στελεχών ελέγχεται με *Tuckey's test* και δηλώνεται με τα εξής σύμβολα: \*:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και R1-3, #:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D7, \$:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D8, %:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D7, !:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D8, ¥:  $p < 0,05$  μεταξύ του D7 και D8.

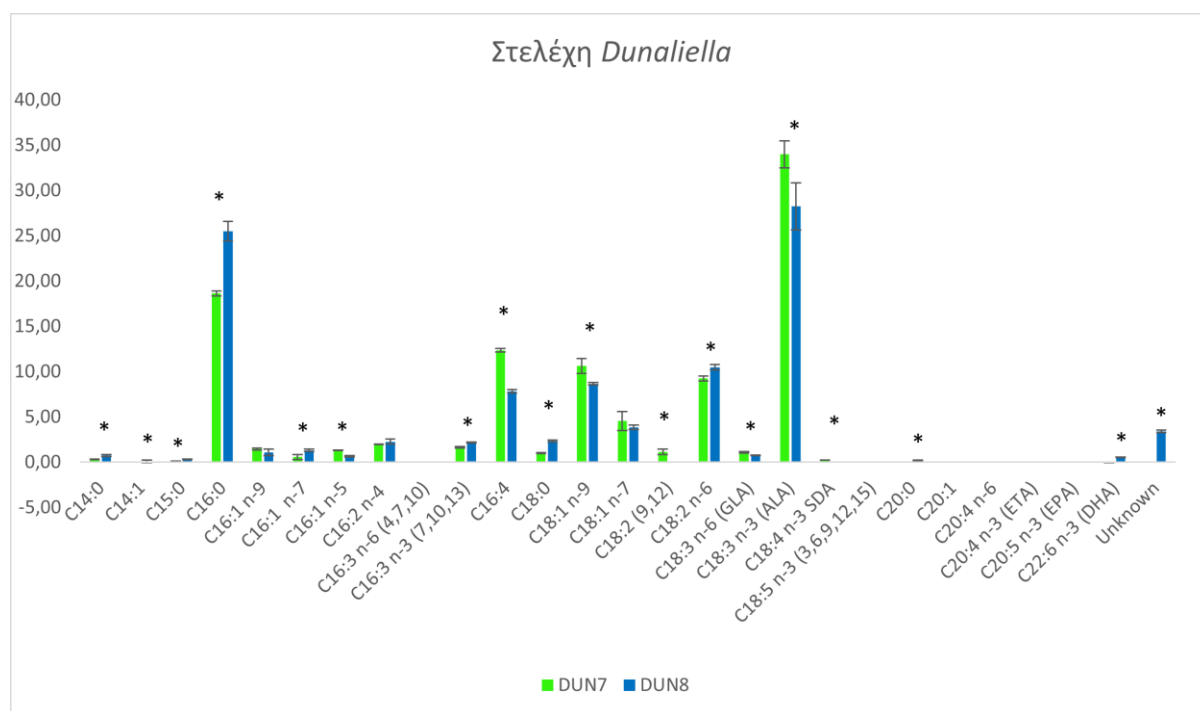
Στη συνέχεια, τα ίδια δεδομένα αναλύθηκαν με *t-test* για τη σύγκριση της περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα μεταξύ των δύο στελεχών του ίδιου γένους. Συγκεκριμένα για τα στελέχη του γένους *Tetraselmis* παρατηρήθηκε ότι τα λιπαρά οξέα C16, C16:1 n-7, C16:2 n-4, C16:3 n-6, C18:1 n-9 και C20:4 n-6 είναι στατιστικώς σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος R1-2, ενώ τα λιπαρά οξέα C15:0, C16:4, C18:3 n-6 C18:3 n-3, C18:4 n-3, C18:5 n-3 C20:4 n-3, C20:5 n-3 και τα λιπαρά οξέα που δεν αναγνωρίστηκαν είναι αυξημένα στο στέλεχος R1-3 (Γράφημα 6). Τα αποτελέσματα συνάδουν με τη βιβλιογραφία, όπου παρατηρούνται παρόμοια ποσοστά, ειδικά στα σημαντικά λιπαρά, C16:0, C16:4 n-3, C18:1 n-9, C18:3 n-3, C20:5 n-3, C18:1 n-7, C18:2 n-6 και C18:4 n-3 (Tzovenis et al., 2008)



**Γράφημα 6** Student's *t-test* ανάλυση για τη σύγκριση της εκατοστιαίας αναλογίας (%) κάθε λιπαρού οξέος (FAMES) ως προς τα συνολικά λιπίδια (TLs) στα στελέχη του γένους *Tetraselmis*. \*:  $p < 0,05$



Στα στελέχη του γένους *Dunaliella*, παρατηρήθηκε αυξημένη περιεκτικότητα στα λιπαρά οξέα C16:1 n-5, C16:4, C18:1 n-9, C18:2 (9,12), C18:3 n-6, C18:3 n-3 και C18:4 n-3 στο στέλεχος D7. Αντιθέτως, σε αυξημένα επίπεδα στο D8 εντοπίζονται τα λιπαρά οξέα C14:0, C:14:1, C15:0, C16:0, C16:1 n-7, C16:3 n-3, C16:4 n-3, C18:0 C18:2 n-6, C20:0, C22:6 n-3 και τα λιπαρά οξέα που δεν αναγνωρίστηκαν. Σημαντικό είναι να τονίσουμε ότι δεν εντοπίζονται καθόλου τα λιπαρά οξέα C16:3 n-6, C18:5 n-3, C20:1, C20:4 n-6, C20:4 n-3 και C20:5 n-3 στο γένος αυτό (Γράφημα 7), γεγονός που αναφέρεται και στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. (Talebi et al., 2015, Chen et al., 2011)



**Γράφημα 7** Student's t-test ανάλυση για τη σύγκριση της εκατοστιαίας περιεκτικότητας κάθε λιπαρού οξέος (FAMES) ως προς τα συνολικά λιπίδια (TLs) στα στελέχη του γένους *Dunaliella*. \*:  $p < 0,05$

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζεται η εκατοστιαία περιεκτικότητα των βασικότερων λιπαρών οξέων των μικροφυκών συγκριτικά με αυτές που αναφέρονται στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Όσον αφορά στα στελέχη του γένους *Tetraselmis* όπου υπάρχει και περισσότερη βιβλιογραφία, εντοπίζονται κάποιες μικρές αποκλίσεις στα ποσοστά που υπολογίστηκαν στην παρούσα εργασία σε σχέση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, οι οποίες

ενδεχομένως οφείλονται στους πειραματικούς χειρισμούς, όπως για παράδειγμα μικρές διαφορές στις συνθήκες ανάπτυξης, στο φωτισμό και στη διάθεση θρεπτικών, αλλά και διαφορές όσον αφορά το πρωτόκολλο εκχύλισης. (Tzovenis et al., 2009, Kim et al., 2016, Dahmen-Ben Moussa et al., 2017, Dammak et al., 2016, Conde et al., 2021) Ωστόσο, όσον αφορά στα στελέχη του γένους *Dunaliella*, όπου παρόμοιες μελέτες είναι λιγότερες και κατ' επέκταση το εύρος τιμών μεγαλύτερο, τα περισσότερα ποσοστά λιπαρών οξέων (με εξαίρεση το C18:1) εντοπίζονται εντός του εύρους περιεκτικότητας της βιβλιογραφίας, ενώ κάποια λιπαρά οξέα, όπως το C16:4 και το C20:5, δεν έχουν ταυτοποιηθεί ως συστατικά των ολικών λιπιδίων. (Talebi et al., 2015, Chen et al., 2011)

**Πίνακας 10** Η εκατοστιαία περιεκτικότητα (%) των βασικότερων λιπαρών οξέων ως προς τα συνολικά λιπίδια των 4 στελεχών συγκριτικά με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα.

	<b>R1-2</b>	<b>R1-3</b>	<b>βιβλιογραφία <i>Tetraselmis</i></b>	<b>D7</b>	<b>D8</b>	<b>βιβλιογραφία <i>Dunaliella</i></b>
C16:0	27,49±2,1	22,14±0,3	24,2-30,89	18,63±0,28	25,51±1,07	9,19-28,1
C18:0	2,47±0,59	2,32±0,35	0,58-1,07	1,01±0,05	2,34±0,11	0,6-6,43
C16:1	1,54±0,47	0,93±0,15	2,39-5,58	1,43±0,11	1,07±0,35	0,8-4,45
C18:1 n9	22,38±3,08	8,50±0,72	11,5-32,88	10,62±0,82	8,66±0,13	19,3-23,67
C18:2 n6	5,30±0,43	4,50±0,27	6,92-14,5	9,23±0,26	10,48±0,31	2,28-15,92
C18:3 n3	8,27±1,46	18,49±0,48	1,84-18,3	33,99±1,5	28,24±2,59	23,95-44,31
C16:4	8,15±1,08	15,74±1,22	8,48-14,5	12,36±0,18	7,81±0,18	nd
C20:5	1,70±0,13	5,11±0,33	3,43-16,6	0	0	nd

Στον Πίνακα 11, παρουσιάζονται τα επίπεδα του κάθε λιπαρού οξέος ως προς την ποσότητα των συνολικών λιπιδίων. Τα ολικά λιπίδια που απομονώθηκαν από τα κύτταρα μετατρέπονται σε FAMES. Ωστόσο, η περιεκτικότητα των ολικών λιπιδίων σε λιπαρά οξέα είναι περίπου 80%, και ως εκ τούτου οι τιμές του πίνακα αυτού είναι χαμηλότερες σε σχέση με αυτές του Πίνακα 9, όπου παρουσιάστηκαν τα ποσοστά των λιπαρών οξέων ως προς τη συνολική ποσότητα των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων. Παρόλα αυτά, το πρότυπο σημαντικότητας ακολουθεί αυτό του Πίνακα 9.

**Πίνακας 11** Περιεκτικότητα των ολικών λιπιδίων στα λιπαρά οξέα ( $\mu\text{g FAMES/mg TLs}$ ) που προσδιορίστηκαν κατά την ανάλυση των 4 στελεχών ως προς τα συνολικά λιπίδια.. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των στελεχών ελέγχεται με *Tuckey's test* και δηλώνεται με τα εξής σύμβολα: \*:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και R1-3, #:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D7, §:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D8, %:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D7, !:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D8, ¥:  $p < 0,05$  μεταξύ του D7 και D8.

	R1-2	R1-3	D7	D8
C14:0	1,97±0,34	2,06±0,42	0,83±0,07	2,14±0,12 <sup>¥</sup>
C14:1	0,18±0,03 <sup>#</sup>	0,27±0,11	0,00	0,09±0,15
C15:0	1,07±0,15 <sup>#</sup>	1,17±0,31	0,24±0,01	0,98±0,05 <sup>¥</sup>
C16:0	59,51±8,98	45,31±1,35 <sup>!</sup>	49,21±3,80	77,00±6,21
C16:1 n-9	3,36±0,78	2,20±0,17	3,79±0,49	1,90±0,22 <sup>¥</sup>
C16:1 n-7	9,87±2,07 <sup>§</sup>	3,00±1,38	1,66±0,49	3,13±0,66
C16:1 n-5	1,91±0,52	0,88±0,21 <sup>%!</sup>	3,51±0,26	1,94±0,23
C16:2 n-4	2,66±0,43 <sup>#§</sup>	1,64±0,06 <sup>%!</sup>	0,89±0,08	6,78±0,53 <sup>¥</sup>
C16:3 n-6 (4,7,10)	2,81±0,17 <sup>*#§</sup>	1,70±0,03 <sup>%!</sup>	0,00	0,00
C16:3 n-3 (7,10,13)	1,29±0,16 <sup>#§</sup>	1,58±0,10 <sup>%!</sup>	04,35±0,46	6,50±0,62
C16:4 n-3 (4,7,10,13)	16,42±5,59	33,32±1,35 <sup>%!</sup>	2,67±0,11	7,52±1,03 <sup>¥</sup>
C18:0	5,42±0,78 <sup>#§</sup>	4,57±0,60 <sup>%!</sup>	28,07±3,24	26,11±3,12
C18:1 n-9	50,65±8,87 <sup>*</sup>	17,25±1,71	11,97±2,56	11,60±1,18
C18:1 n-7	13,40±2,36 <sup>#§</sup>	8,70±0,29 <sup>%!</sup>	3,01±0,81	0,00
C18:2 (9,12)	0,00 <sup>#§</sup>	0,00 <sup>%!</sup>	24,42±2,45	0,00
C18:2 n-6	11,60±0,46 <sup>*#§</sup>	9,28±0,50 <sup>%!</sup>	2,86±0,30	2,28±0,43
C18:3 n-6 (GLA)	0,75±0,06 <sup>*#§</sup>	1,23±0,09 <sup>%!</sup>	88,79±8,48	85,27±19,13
C18:3 n-3 (ALA)	18,14±1,18 <sup>*#§</sup>	36,97±1,36 <sup>%!</sup>	0,00	0,00
C18:4 n-3 SDA	4,52±0,43 <sup>*#§</sup>	10,25±0,41 <sup>%!</sup>	0,00	0,00
C18:5 n-3 (3,6,9,12,15)	0,00 <sup>*§</sup>	0,83±0,09 <sup>%</sup>	0,00	0,60±0,04 <sup>¥</sup>
C20:0	1,88±0,11 <sup>*#§</sup>	0,33±0,09 <sup>%!</sup>	0,00	0,00
C20:1	1,88±0,07 <sup>#§</sup>	1,97±0,04 <sup>%!</sup>	0,00	0,00
C20:4 n-6	0,29±0,09 <sup>#§</sup>	0,55±0,02 <sup>%!</sup>	0,00	0,00
C20:4 n-3 (ETA)	0,00 <sup>*</sup>	1,21±0,02 <sup>%!</sup>	0,00	0,00
C20:5 n-3 (EPA)	3,73±0,42 <sup>*#</sup>	10,53±0,58 <sup>%!</sup>	0,65±0,09	1,88±0,17 <sup>¥</sup>
C22:6 n-3 (DHA)	1,50±0,44 <sup>#§</sup>	2,39±0,73 <sup>%!</sup>	0,00	0,00

Τέλος, στον Πίνακα 12 αναλύεται η περιεκτικότητα του κάθε λιπαρού οξέος ως προς τη συνολική ξηρή μάζα. Στην περίπτωση αυτή, οι τιμές των μεθυλεστέρων διαιρούνται ως προς τη μάζα των κυττάρων που απομονώθηκαν από το GF/C φίλτρο πριν την έναρξη της διαδικασίας. Στον πίνακα αυτό, οι τιμές είναι ακόμα μικρότερες συγκριτικά με τους Πίνακες 9 και 11 επειδή οι ποσότητες των λιπαρών οξέων είναι σημαντικά μικρότερες από την ολική ξηρή μάζα, η οποία αποτελείται όχι μόνο από τα λιπαρά οξέα, αλλά και από άλλα μόρια και

δομές του κυττάρου. Η στατιστική σημαντικότητα αναγράφεται στον Πίνακα και ξανά ακολουθεί το πρότυπο του Πίνακα 9.

**Πίνακας 12** Περιεκτικότητα της συνολικής ξηρής μάζας του δείγματος στα λιπαρά οξέα ( $\mu\text{g FAMES}/\text{mg DW}$ ) που προσδιορίστηκε κατά την ανάλυση των 4 στελεχών. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των στελεχών ελέγχεται με *Tuckey's test* και δηλώνεται με τα εξής σύμβολα: \*:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και R1-3, #:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D7, \$:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D8, %:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D7, !:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D8, ¥:  $p < 0,05$  μεταξύ του D7 και D8.

	R1-2	R1-3	D7	D8
C14:0	0,06±0,02	0,07±0,02	0,06±0,01	0,06±0,01
C14:1	0,01±0,00	0,01±0,00%	0,00	0,00
C15:0	0,03±0,04 <sup>\$</sup>	0,04±0,01	0,02±0,00	0,03±0,00
C16:0	1,80±0,41 <sup>#</sup>	1,62±0,17	3,29±0,39	1,98±0,04
C16:1 n-9	0,10±0,03	0,08±0,01%	0,25±0,04	0,05±0,01 <sup>¥</sup>
C16:1 n-7	0,30±0,08	0,11±0,06	0,11±0,03	0,08±0,03
C16:1 n-5	0,06±0,01 <sup>#</sup>	0,03±0,00%!	0,24±0,03	0,05±0,01 <sup>¥</sup>
C16:2 n-4	0,08±0,02 <sup>\$</sup>	0,06±0,01!	0,06±0,01	0,18±0,02 <sup>¥</sup>
C16:3 n-6 (4,7,10)	0,08±0,01 <sup>#\$</sup>	0,06±0,01%!	0,00	0,00
C16:3 n-3 (7,10,13)	0,04±0,01 <sup>#\$</sup>	0,06±0,01%!	0,29±0,05	0,17±0,00
C16:4 n-3 (4,7,10,13)	0,51±0,21 <sup>#</sup>	1,19±0,15	2,22±0,29	0,63±0,01 <sup>¥</sup>
C18:0	0,16±0,02	0,16±0,02!	0,18±0,01	0,19±0,02
C18:1 n-9	1,53±0,33	0,62±0,09%	1,87±0,23	0,67±0,02 <sup>¥</sup>
C18:1 n-7	0,39±0,04	0,31±0,02	0,79±0,14	0,30±0,02 <sup>¥</sup>
C18:2 (9,12)	0,00 <sup>#</sup>	0,00%	0,20±0,07	0,00 <sup>¥</sup>
C18:2 n-6	0,35±0,04 <sup>#\$</sup>	0,33±0,02%!	1,64±0,25	0,82±0,04
C18:3 n-6 (GLA)	0,02±0,00 <sup>#</sup>	0,04±0,00%	0,19±0,03	0,06±0,01 <sup>¥</sup>
C18:3 n-3 (ALA)	0,54±0,08 <sup>##\$</sup>	1,32±0,11%!	5,96±0,93	2,18±0,28
C18:4 n-3 SDA	0,14±0,02 <sup>##\$</sup>	0,37±0,04%!	0,00	0,00
C18:5 n-3 (3,6,9,12,15)	0,00 <sup>*</sup>	0,03±0,00%!	0,00	0,00
C20:0	0,06±0,01 <sup>#</sup>	0,01±0,00	0,00	0,02±0,00
C20:1	0,06±0,01 <sup>#\$</sup>	0,07±0,01%!	0,00	0,00
C20:4 n-6	0,01±0,00 <sup>##\$</sup>	0,02±0,00%!	0,00	0,00
C20:4 n-3 (ETA)	0,00 <sup>*</sup>	0,04±0,00%!	0,00	0,00
C20:5 n-3 (EPA)	0,11±0,02 <sup>##\$</sup>	0,37±0,02%!	0,00	0,00
C22:6 n-3 (DHA)	0,04±0,01	0,08±0,02	0,04±0,01	0,05±0,01

#### 4.4 Υπολογισμός των SAFA, MUFA και PUFA

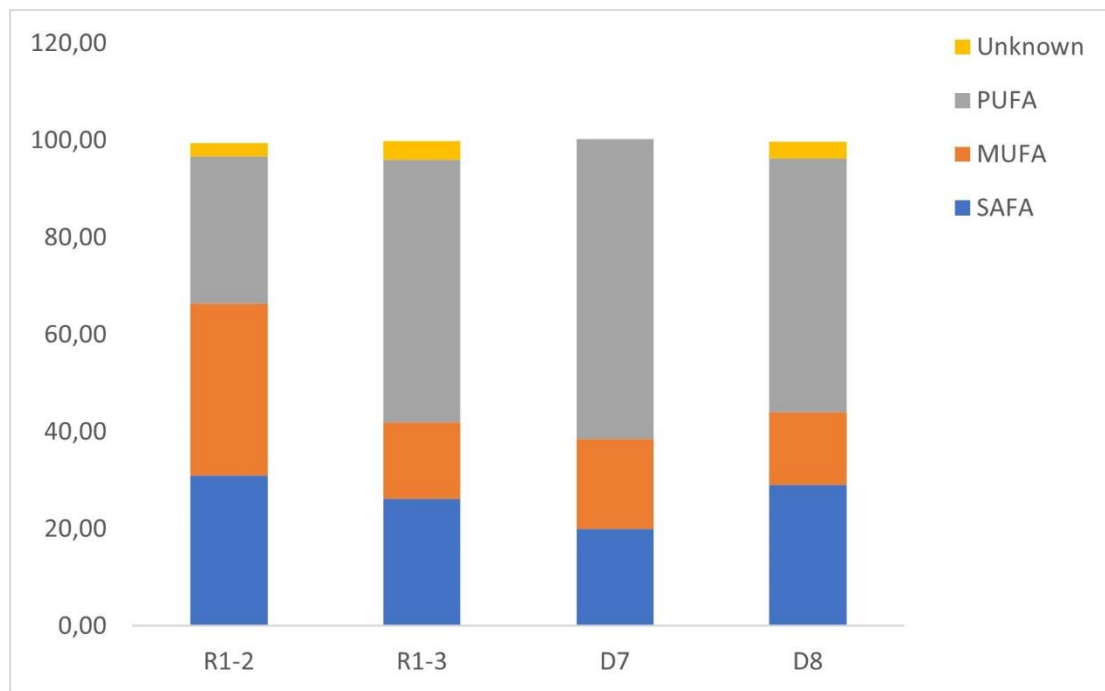
Τα λιπαρά οξέα κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα τους διπλούς δεσμούς που διαθέτουν, σε κορεσμένα, μονακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Το ποσοστό προήλθε από την άθροιση των λιπαρών οξέων που γνωρίζουμε ότι ανήκουν στην κάθε κατηγορία. Συγκεκριμένα:

- Στην ομάδα των κορεσμένων λιπαρών οξέων (Saturated Fatty Acids, SAFA) ανήκουν τα C14:0, C15:0, C16:0, C18:0 και C20:0.
- Στην ομάδα των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (Mono Unsaturated Fatty Acids, MUFA) ανήκουν τα C14:1, C16:1 n-9, C16:1 n-7, C16:1 n-5, C18:1 n-9, C18:1 n-7 και C20:1.
- Στην ομάδα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Poly Unsaturated Fatty Acids, PUFA) ανήκουν τα C16:2 n-4, C16:3 n-6(4,7,10) C16:3 n-3 (7,10,13), C16:4 n-3 (4,7,10,13), C18:2 (9,12), C18:2 n-6, C18:3 n-3, C18:4 n-3, C18:5 n-3 (3,6,9,12,15), C20:4 n-6, C20:4 n-3, C20:5 n-3 και C22:6 n-3.

Στον Πίνακα 13 παρατηρούνται η εκατοστιαία περιεκτικότητα της κάθε κατηγορίας, ενώ στο Γράφημα 8 απεικονίζεται ένα ποιοτικό προφίλ των λιπαρών οξέων στα 4 στελέχη που μελετήθηκαν.

*Πίνακας 13* Εκατοστιαία περιεκτικότητα (%) των SAFA, PUFA και MUFA που προσδιορίστηκαν κατά την ανάλυση των 4 στελεχών.

	<b>R1-2</b>	<b>R1-3</b>	<b>D7</b>	<b>D8</b>
SAFA	31,0±1,8	26,2±0.87	20,0±0.3	29,1±1.3
MUFA	35,4±3.4	15,8±0.9	18,5±2.1	15.0±0.8
PUFA	30,2±2.6	54,1±0.8	61,7±2.2	52,2±2.2
Unknown	2,8±0.5	3,8±0.1	0,00	3,4±0.2



**Γράφημα 8** Ποιοτικό προφίλ των SAFA, PUFA και MUFA στα 4 στελέχη που μελετήθηκαν.

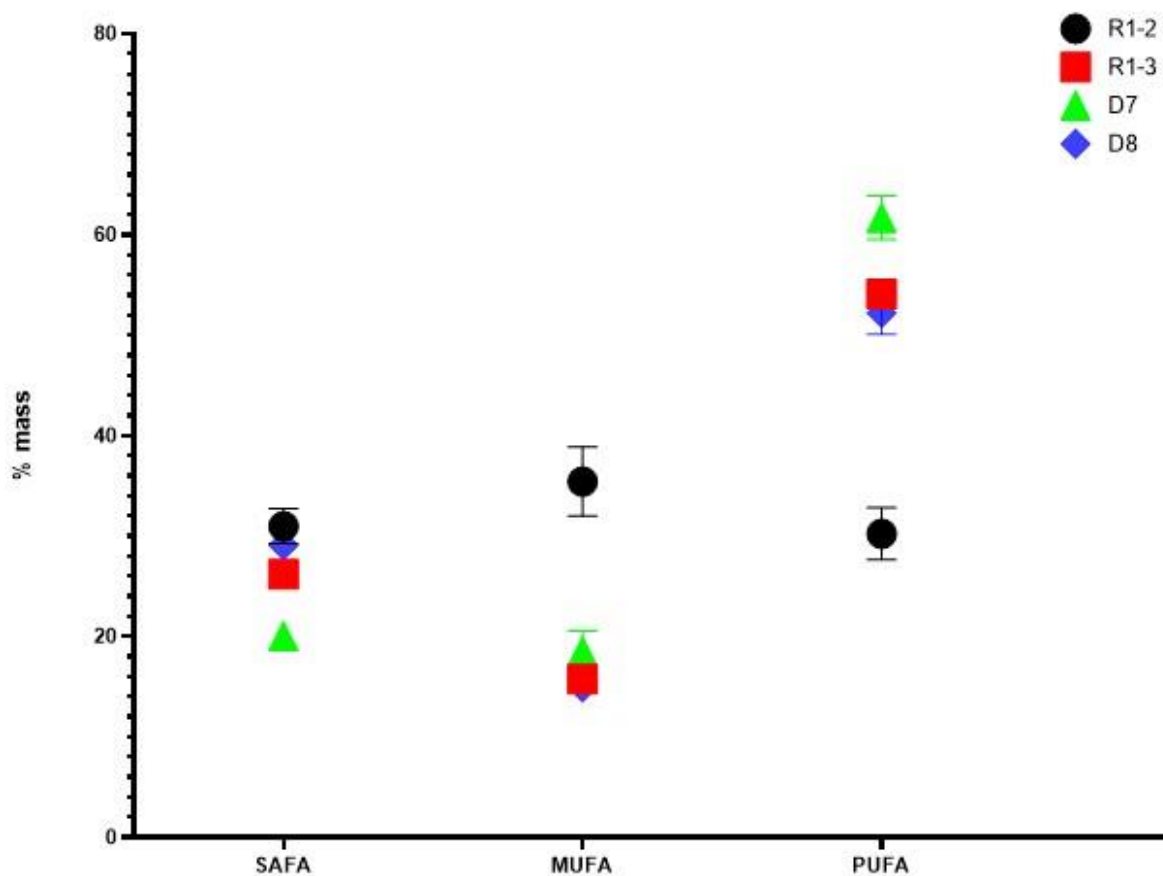
Τα επίπεδα των κορεσμένων λιπαρών οξέων στα στελέχη του γένους *Tetraselmis* ανέρχονται στο 31,0% στο R1-2, και στο 26,2% στο R1-3. Σε αντίστοιχες μελέτες διαφόρων στελεχών του είδους αυτού εντοπίστηκε ότι το ποσοστό των SAFA κυμαίνεται μεταξύ των ποσοστών 26,9 έως 51,7% (Tzovenis et al., 2009, Dahmen-Ben Moussa et al., 2017). Αντιστοίχως, τα ποσοστά των SAFA στα στελέχη που μελετήθηκαν του γένους *Dunaliella* ανέρχονται στο 20,0% για το D7, και στο 29,1% για το D8. Αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ένα εύρος τιμών μεταξύ 13,5 και 70,7% όσον αφορά τα SAFA του συγκεκριμένου γένους (Talebi et al., 2015, Chen et al., 2011).

Τα επίπεδα των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων στα δύο στελέχη του γένους *Tetraselmis* ανέρχονται στο 35,4% για το R1-2, και στο 15,8% για το R1-3. Η διαφορά αυτή οφείλεται ως επί το πλείστον στα αυξημένα επίπεδα του λιπαρού οξέος C18:1, το οποίο παρουσιάζεται αυξημένο κατά περίπου 120% στο στέλεχος R1-2. Σε αντίστοιχες μελέτες διάφορων στελεχών του γένους αυτού βρέθηκε ότι το ποσοστό των MUFA κυμαίνεται μεταξύ των ποσοστών 11,5 έως 39,2% (Dahmen-Ben Moussa et al., 2017, Dammak et al., 2016). Αντιστοίχως, τα ποσοστά των MUFA στα στελέχη του γένους *Dunaliella* ανέρχονται στο 18,5% για το D7, και στο 15,0% για το D8. Αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα

αναφέρουν ένα εύρος μεταξύ 1,2 και 32,2% όσον αφορά τα MUFA του συγκεκριμένου γένους (Hosseinzadeh Gharajeh et al., 2020).

Τέλος, τα επίπεδα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στα δύο στελέχη του είδους *Tetraselmis* ανέρχονται στο 30,2% για το R1-2, και στο 54,1% για το R1-3. Σε αντίστοιχες μελέτες διάφορων στελεχών του είδους αυτού εντοπίστηκε ότι το ποσοστό των PUFA κυμαίνεται μεταξύ των ποσοστών 16,1 έως 52,6% (Tzovenis et al., 2009, Dammak et al., 2016). Αντιστοίχως, τα ποσοστά των PUFA στα στελέχη του είδους *Dunaliella* ανέρχονται στο 61,7% για το D7, και στο 52,2% για το D8. Βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ένα εύρος ποσοστών μεταξύ 18,7 και 72,6% όσον αφορά στα PUFA του συγκεκριμένου είδους (Hosseinzadeh Gharajeh et al., 2020).

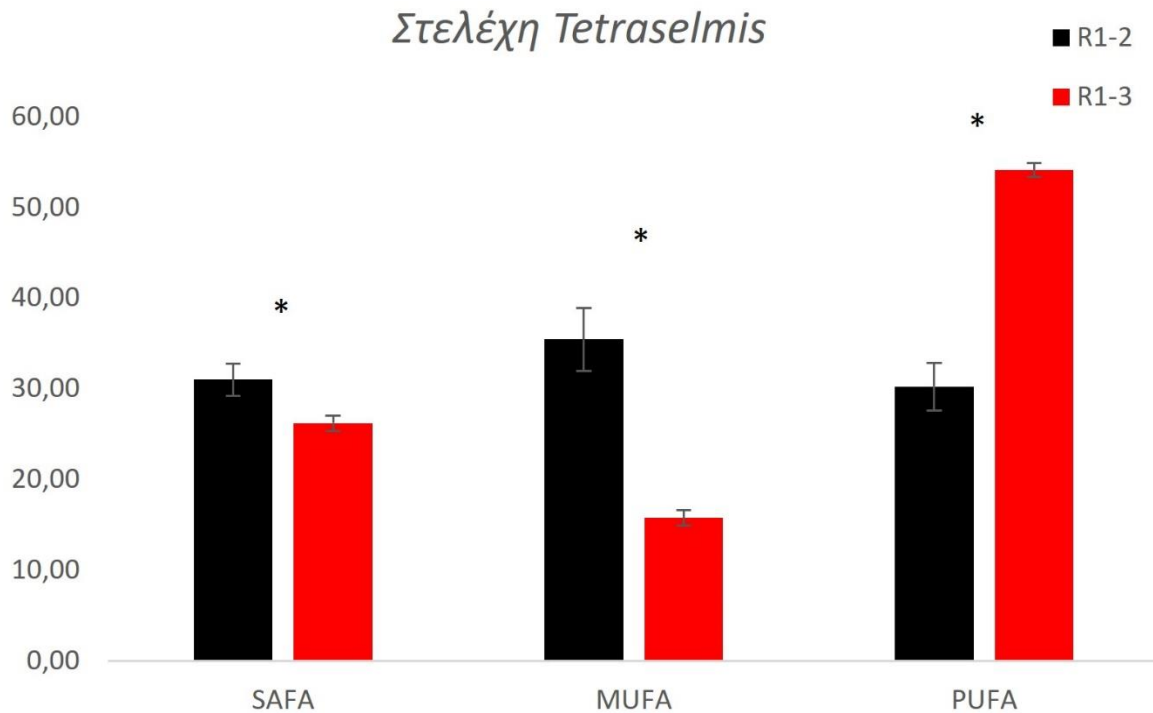
Στη συνέχεια, τα ποσοστά των κατηγοριών των λιπαρών οξέων αναλύονται με OneWay Anova και Tuckey's test για τον έλεγχο της σημαντικότητας των υπάρχουσών διαφορών μεταξύ των 4 στελεχών. Όπως φαίνεται και στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα 9), εντοπίζονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών, κυρίως όσον αφορά στην ποσότητα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.



**Γράφημα 9** OneWay Anova ανάλυση για την εύρεση στατιστικώς σημαντικών διαφορών στην εκατοστιαία αναλογία (%) των SFA, PUFA και MUFA ως προς τα συνολικά λιπίδια (TLs) στα 4 στελέχη που μελετήθηκαν. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των στελεχών ελέγχεται με Tukey's test και δηλώνεται με τα εξής σύμβολα: \*:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και R1-3, #:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D7, \$:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D8, %:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D7, !:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D8, ¥:  $p < 0,05$  μεταξύ του D7 και D8.

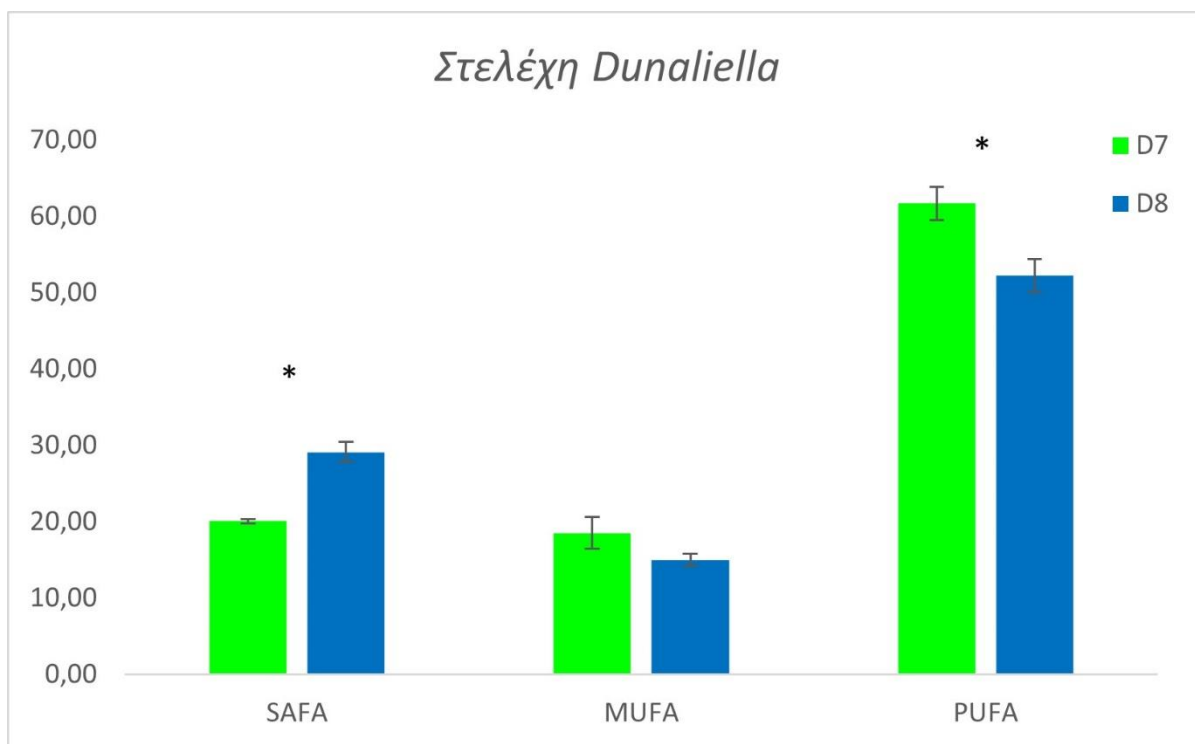
Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε student's t-test για τη σύγκριση μεταξύ των δύο στελεχών του ίδιου γένους ξεχωριστά. Παρατηρήθηκε ότι τα κορεσμένα και τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα είναι στατιστικώς αυξημένα στο στέλεχος R1-2, ενώ αντιθέτως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι αυξημένα στο στέλεχος R1-3 (Γράφημα 10).





**Γράφημα 10** Student's *t*-test ανάλυση για τη σύγκριση της εκατοστιαίας αναλογίας (%) των ομάδων των λιπαρών οξέων ως προς τα συνολικά λιπίδια (TLs) στα στελέχη του γένους *Tetraselmis*. \*:  $p < 0,05$

Όσον αφορά στα στελέχη του γένους *Dunaliella*, τα κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι στατιστικώς αυξημένα στο D8, τα πολυακόρεστα είναι στατιστικώς αυξημένα στο D7, ενώ δεν εντοπίζονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (Γράφημα 11).



**Γράφημα 11** Student's t-test ανάλυση για τη σύγκριση της ποσοστιαίας αναλογίας των ομάδων των λιπαρών οξέων ως προς τα συνολικά λιπίδια (TLs) στα στελέχη του γένους *Dunaliella*.

\*:  $p < 0,05$

Μέσω των παραπάνω αναλύσεων φαίνεται ότι σε όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία με εξαίρεση το R1-2, τα πολυακόρεστα λιπαρά βρίσκονται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα από τα κορεσμένα λιπαρά, η περιεκτικότητα των οποίων είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι και τα λιγότερα. Εξαίρεση αποτελεί το R1-2, στο οποίο διαπιστώθηκε ότι τα κορεσμένα και τα πολυακόρεστα λιπαρά βρίσκονται στα ίδια επίπεδα, ενώ τα μονοακόρεστα είναι ελαφρώς υψηλότερα.

#### 4.5 Ανάλυση των $\omega$ -3 και $\omega$ -6 λιπαρών οξέων

Στη συνέχεια, συγκρίθηκαν τα ποσοστά των  $\omega$ -3 και  $\omega$ -6 λιπαρών οξέων σε κάθε στέλεχος. Τα  $\omega$ -3 λιπαρά είναι το άθροισμα των λιπαρών οξέων C16:3 (7,10,13), C16:4 (4,7,10,13), C18:3 (ALA), C18:4 (SDA), C18:5(3,6,9,12,15), C20:4 (ETA), C:20:5 (EPA) και C22:6 (DHA). Στα  $\omega$ -6 λιπαρά οξέα ανήκουν τα C16:3 (4,7,10), C18:2, C18:3 (GLA) και C20:4. Το άθροισμά τους στα τέσσερα στελέχη παρουσιάζεται στον Πίνακα 14.

**Πίνακας 14** Εκατοστιαία περιεκτικότητα (%) των ω-3(n-3) και ω-6(n-6) ως προς τα ολικά λιπίδια που προσδιορίστηκε κατά την ανάλυση των 4 στελεχών.

	R1-2	R1-3	D7	D8
ω-3	13,5±2,2	31,4±1,3	35,9±1,5	38,8±2,4
ω-6	7,4±0,6	6,20±0,3	10,3±0,3	11,2±0,4

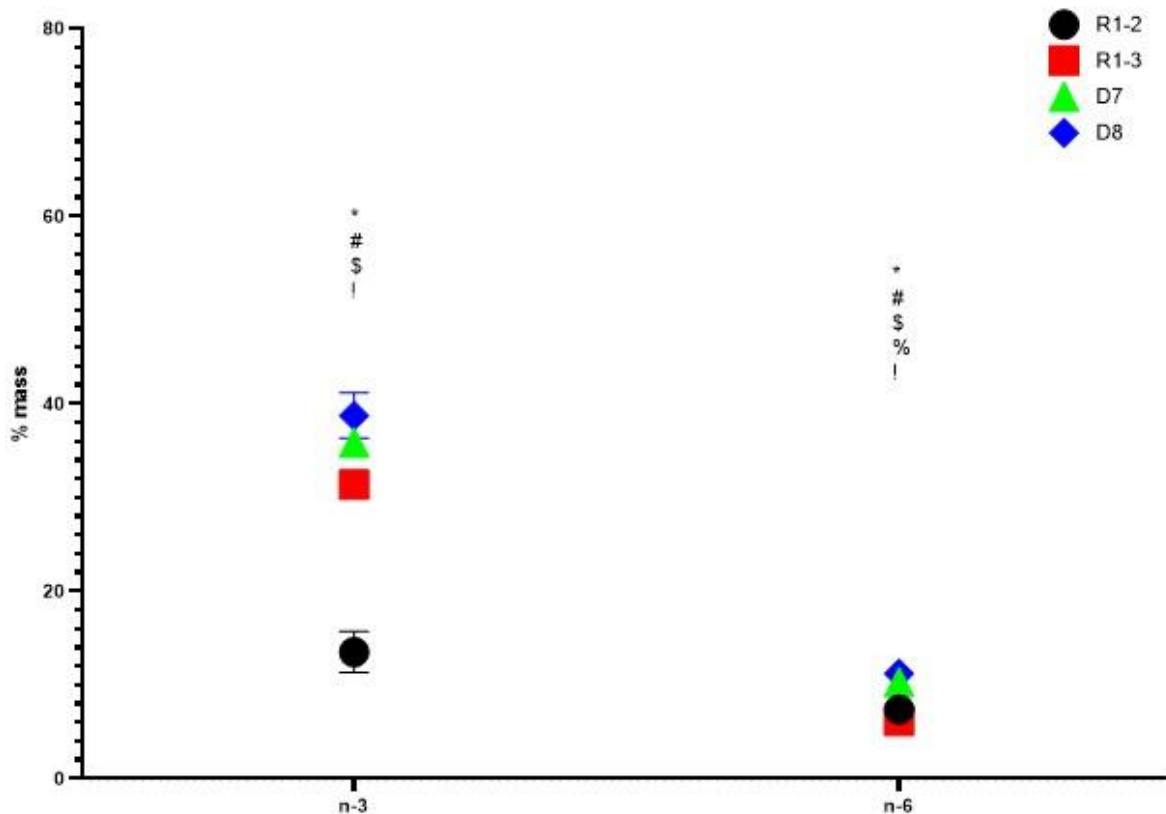
Συγκριτικά με την υπάρχουσα βιβλιογραφία όπου τα ω-3 λιπαρά οξέα στο γένος *Tetraselmis* κυμαίνονται μεταξύ του 26,8 και 42,7%, το R1-2 παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό (13.5%), ενώ το R1-3 αντιθέτως εμφανίζεται εντός του εύρους που προτείνουν παλαιότερα βιβλιογραφικά δεδομένα, σε ποσοστό 31,4% (Tzovenis et al., 2009, Tsai et al., 2016, Cardoso et al., 2019). Αντιστοίχως, τα στελέχη του γένους *Dunaliella* φαίνεται να παρουσιάζουν ποσοστά ω-3 λιπαρών οξέων εντός του εύρους της βιβλιογραφίας, το οποίο κυμαίνεται περίπου από 21,4 έως 50% (Hosseinzadeh Gharajeh et al., 2020).

Όσον αφορά στα ω-6 λιπαρά οξέα, στο γένος *Tetraselmis*, με βάση βιβλιογραφικές μελέτες, το ποσοστό βρίσκεται μεταξύ του 5,9 και του 6,5%. (Cardoso et al., 2019) Σύμφωνα με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, το ποσοστό του R1-2 είναι ελαφρώς υψηλότερο σε σχέση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, με το ποσοστό να φτάνει το 7,37%, ενώ το R1-3 βρίσκεται εντός ορίων, με τιμή 6,20%. Όσον αφορά στο γένος *Dunaliella*, τα ω-6 λιπαρά οξέα κυμαίνονται βάσει βιβλιογραφίας μεταξύ 2,6 και 9.9% (Hosseinzadeh Gharajeh et al., 2020). Στη μελέτη μας και τα δύο στελέχη εμφανίζουν ελαφρώς υψηλότερες τιμές με τιμές 10,32% για το στέλεχος D7 και 11,23% για το στέλεχος D8.

Τα αποτελέσματα για την περιεκτικότητα σε ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα των διαφορετικών στελεχών αναλύθηκαν με OneWay Anova. Το στέλεχος R1-2 έχει την πιο μειωμένη παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη. Ακολουθούν το στέλεχος R1-3 με 31.38% και το στέλεχος D7 με 35.88%. Το στέλεχος D8 διαθέτει το υψηλότερο ποσοστό ω-3 λιπαρών οξέων, το οποίο φτάνει το 38,75%. Χρησιμοποιώντας την ανάλυση Multiple Comparisons του OneWay Anova, υπολογίζεται ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά σε όλα τα πιθανά ζευγάρια στελεχών, με εξαίρεση τα στελέχη R1-3 και D7 όταν αυτά συγκρίνονται με το στέλεχος D8.

Όσον αφορά στα ω-6 λιπαρά οξέα, το στέλεχος R1-2 εμφανίζει και πάλι στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Τα επίπεδά τους είναι υψηλά, με τιμές 7,4% σε σχέση με το R1-3 όπου

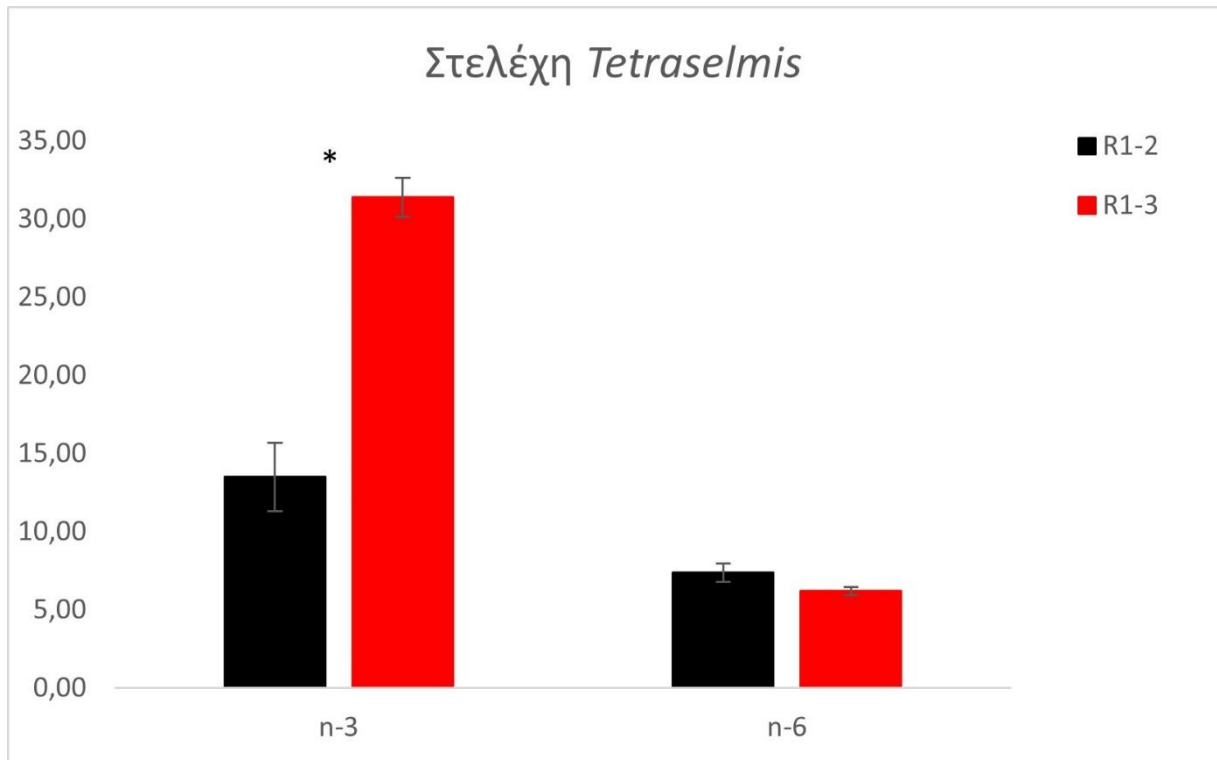
υπολογίζεται το ποσοστό στα 6,2%. Τα ποσοστά είναι χαμηλά σε σχέση με τα στελέχη του γένους *Dunaliella*. Το στέλεχος D7 έχει τιμή 10,32% τόσο με το R1-3 όσο και με το D8 11,23%. Με τη χρήση Multiple Comparisons φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά, όσον αφορά τα στελέχη των διαφορετικών γενών μεταξύ τους, ενώ τα στελέχη του ίδιου γένους δεν εμφανίζουν σημαντική διαφορά. (Γράφημα 12).



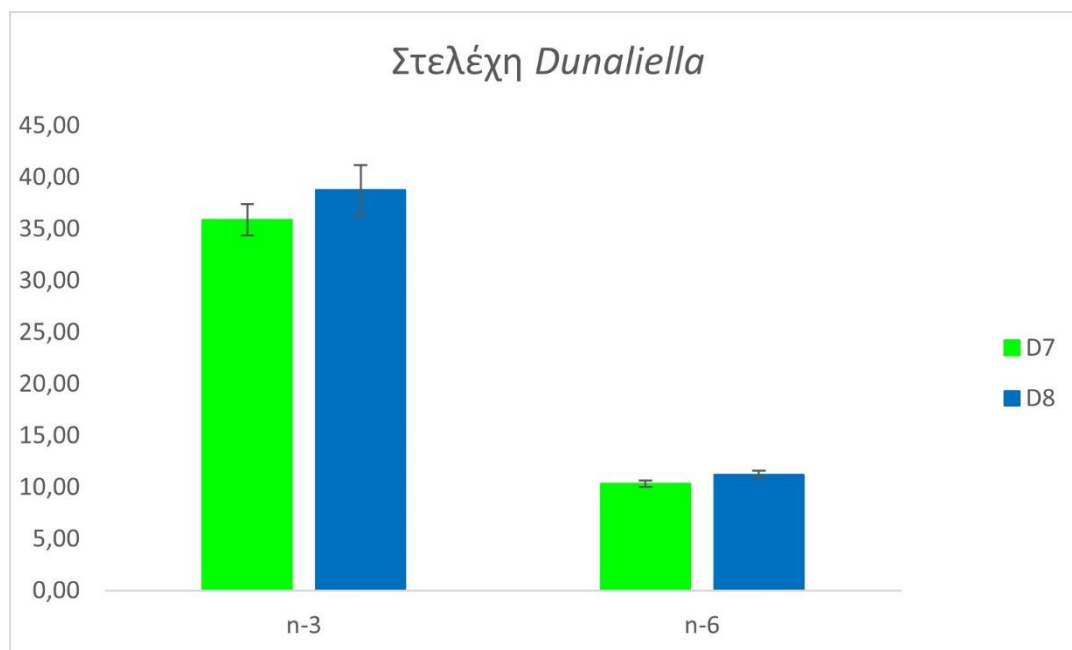
**Γράφημα 12** OneWay Anova ανάλυση για την αναζήτηση στατιστικώς σημαντικών διαφορών στην ποσοστιαία αναλογία των Ω-3 και Ω-6 λιπαρών οξέων ως προς τα συνολικά λιπίδια (TLs) στα 4 στελέχη που μελετήθηκαν. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των στελεχών ελέγχεται με Tuckey's test και δηλώνεται με τα εξής σύμβολα: \*:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και R1-3, #:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D7, \$:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D8, %:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D7, !:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D8, ¥:  $p < 0,05$  μεταξύ του D7 και D8.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν και με t-test για τη σύγκριση των διαφορών μεταξύ των στελεχών του ίδιου γένους. Όπως φαίνεται στα παρακάτω γραφήματα, τα ω-3 λιπαρά οξέα του στελεχούς R1-3 είναι στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με αυτά του R1-2, ενώ όσον αφορά την περιεκτικότητα σε ω-6 λιπαρά, δεν εντοπίζεται κάποια σημαντική

διαφορά. Αντιθέτως, στα στελέχη του γένους *Dunaliella*, η περιεκτικότητα σε ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα δεν εμφανίζει κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών στελεχών (Γραφήματα 13 και 14).



**Γράφημα 13** Student' s t-test ανάλυση για τη σύγκριση της ποσοστιαίας αναλογίας των ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων ως προς τα συνολικά λιπίδια (TLs) στα στελέχη του γένους *Tetraselmis*. \*:p<0,05



**Γράφημα 14** Student' s t-test ανάλυση για τη σύγκριση της ποσοστιαίας αναλογίας των ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων ως προς τα συνολικά λιπίδια (TLs) στα στελέχη του γένους *Dunaliella*.  
\*: $p < 0,05$

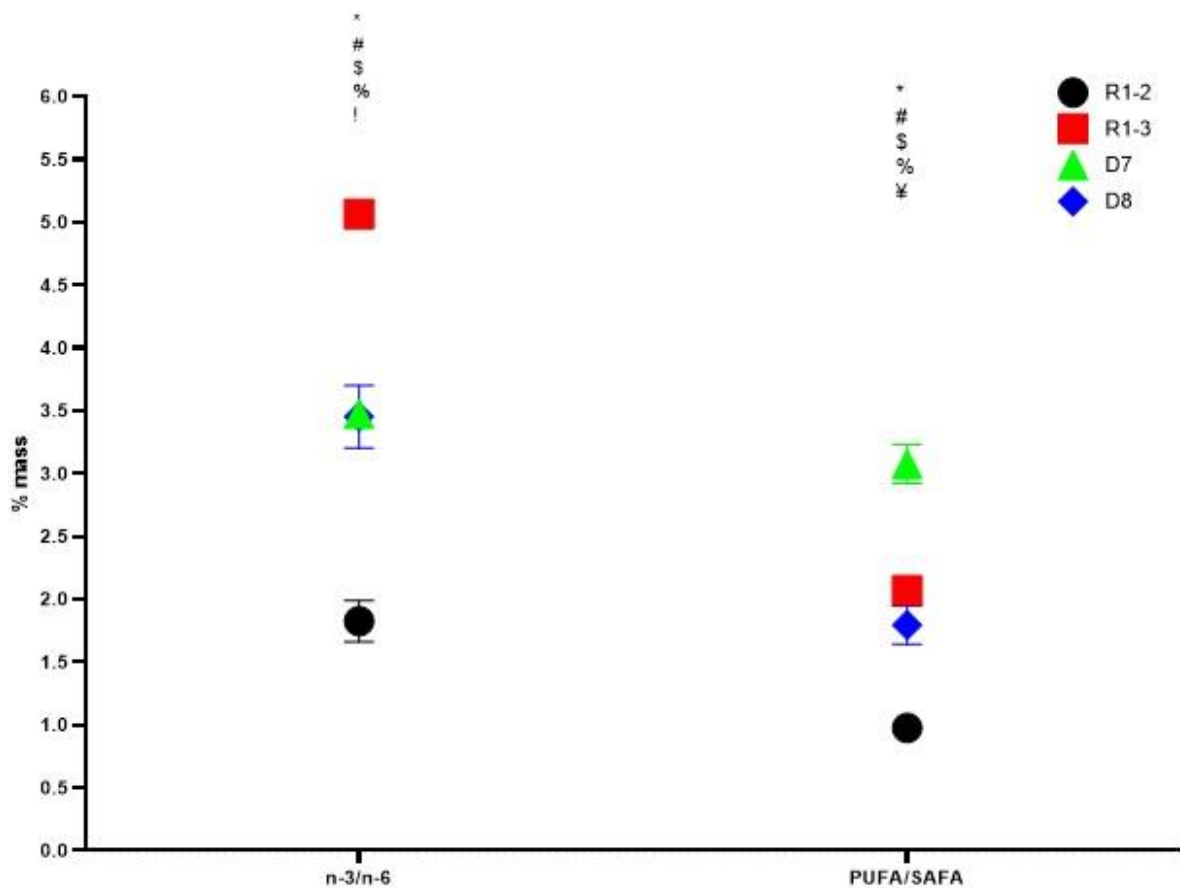
#### 4.6 Αναλογίες ω-3/ω-6 και PUFA/SAFA

Τέλος, με βάση τα αποτελέσματα των υποενοτήτων 4.4 και 4.5, υπολογίστηκαν οι λόγοι ω-3/ω-6 και PUFA/SAFA.

**Πίνακας 15** Αναλογίες ω-3/ω-6 και PUFA/SAFA των 4 στελεχών.

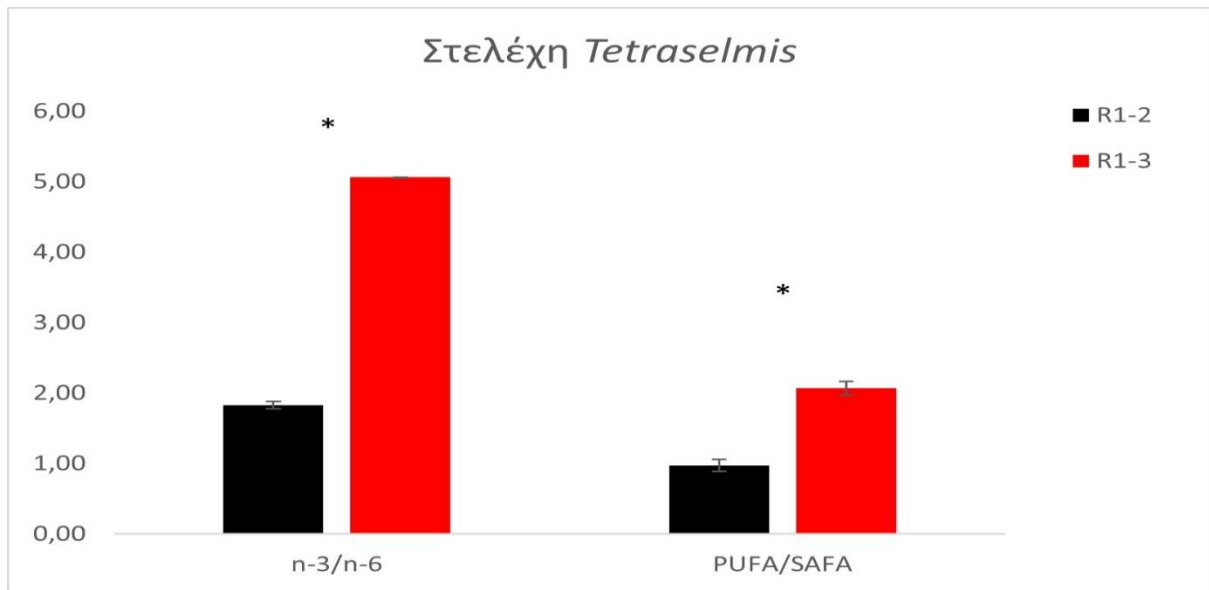
	R1-2	R1-3	D7	D8
ω-3/ω-6	1,83±0,05	5,06±0,00	3,48±0,01	3,45±0,02
PUFA/SAFA	0,98±0,08	2,07±0,10	3,08±0,16	1,80±0,15

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με OneWay Ανοva. Όσον αφορά στην αναλογία ω-3/ω-6 παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές κατά τη σύγκριση όλων των δειγμάτων, με εξαίρεση το ζεύγος D7 και D8. Για τον λόγο PUFA/SAFA, παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές και πάλι σε όλα σχεδόν τα υπό σύγκριση ζεύγη στελεχών, με εξαίρεση το ζεύγος R1-3 και D8 (Γράφημα 15).



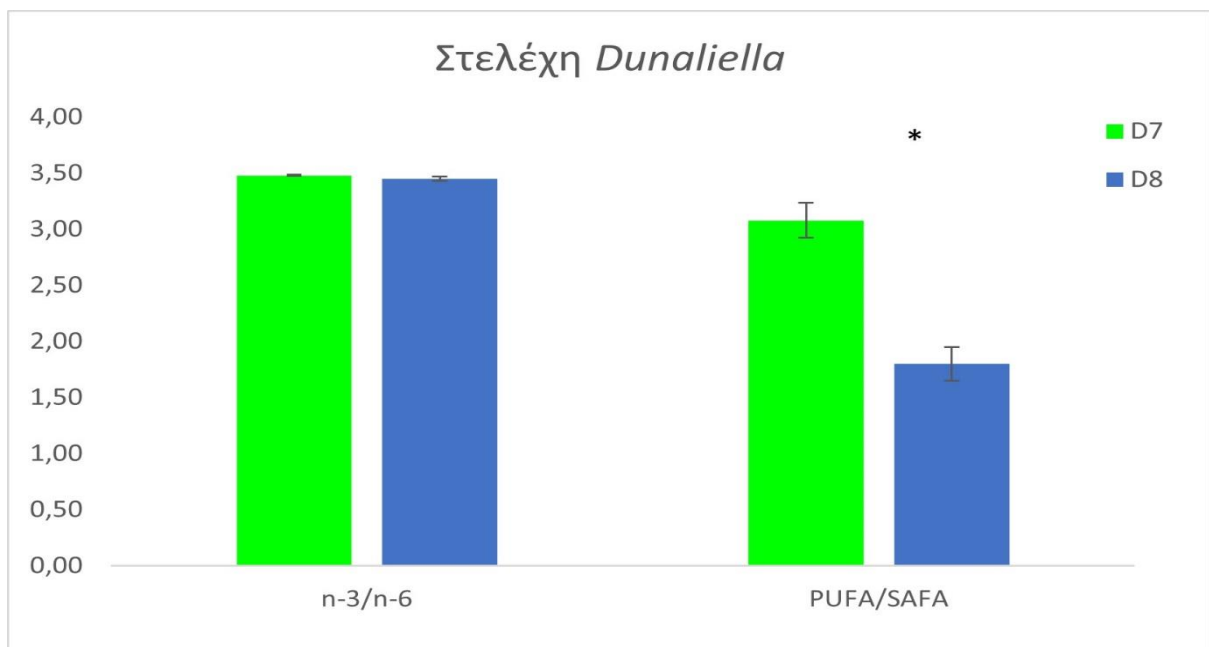
**Γράφημα 15** OneWay Anova ανάλυση για την αναζήτηση στατιστικώς σημαντικών διαφορών στην αναλογία  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 και PUFA/SAFA στα 4 στελέχη που μελετήθηκαν. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των στελεχών ελέγχεται με Tuckey's test και δηλώνεται με τα εξής σύμβολα: \*:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και R1-3, #:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D7, \$:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-2 και D8, %:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D7, !:  $p < 0,05$  μεταξύ του R1-3 και D8, †:  $p < 0,05$  μεταξύ του D7 και D8.

Τέλος, τα δεδομένα αναλύθηκαν εκ νέου ανά γένος. Στα στελέχη *Tetraselmis* παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στους λόγους  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 λιπαρών οξέων, με την τιμή του στελέχους R1-2 να είναι πολύ χαμηλότερη σε σύγκριση με το R1-3. Όσον αφορά στην αναλογία PUFA/SAFA, εντοπίζεται και πάλι στατιστικώς σημαντική διαφορά, με το στέλεχος R1-3 να εμφανίζει υψηλότερη αναλογία σε σύγκριση με το στέλεχος R1-2 (Γράφημα 16).



**Γράφημα 16** Student's *t*-test ανάλυση για τη σύγκριση της αναλογίας ω-3/ω-6 και PUFA/SAFA στα στελέχη του γένους *Tetraselmis*. \*:p<0,05

Στα στελέχη του γένους *Dunaliella* δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στους λόγους ω-3/ω-6 λιπαρών οξέων. Όσον αφορά στην αναλογία PUFA/SAFA, εντοπίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά, με το στέλεχος D7 να εμφανίζει υψηλότερη αναλογία σε σύγκριση με το στέλεχος D8 (Γράφημα 17).



**Γράφημα 17** Student's *t*-test ανάλυση για τη σύγκριση της αναλογίας ω-3/ω-6 και PUFA/SAFA στα στελέχη του γένους *Dunaliella*. \*:p<0,05



## 5. Συζήτηση – Συμπεράσματα

Τα μικροφύκη είναι μια κατηγορία φυκών που αποτελείται από μονοκύτταρους (ή και αποικιακούς) μικροοργανισμούς, οι οποίοι συμβάλλουν στην παραγωγή οξυγόνου και τη διατήρηση των οικοσυστημάτων (Andersen et al., 2015). Υπάρχουν χιλιάδες είδη στο περιβάλλον, ενώ απαντώνται σε όλα τα οικοσυστήματα (Hamed et al., 2016). Διακρίνονται ανάλογα με την ύπαρξη ευκαρυωτικών δομών στο εσωτερικό τους, την ύπαρξη διαφορετικών χρωστικών ουσιών και άλλων μορφολογικών και κυτταρικών χαρακτηριστικών (Stark et al., 2012). Μελέτες έχουν δείξει τις ευεργετικές ιδιότητες των μικροφυκών στη βιοτεχνολογία, π.χ. για την παραγωγή καυσίμων, αλλά και για τη διατροφή του ανθρώπου, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε θρεπτικά συστατικά. Γενικά, τα μικροφύκη αποτελούν πολύ καλή πηγή άνθρακα και κατ' επέκταση είναι πλούσια σε στοιχεία όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια (Das et al., 2011). Η καλλιέργεια των μικροφυκών εμφανίζει το ίδιο πρότυπο με την καλλιέργεια βακτηριακών μικροοργανισμών και αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων κυττάρων σε σύντομο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να απομονωθεί είτε η βιομάζα των κυττάρων, είτε κάποιο από τα παραγόμενα μόρια. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι ποσότητες των μορίων αυτών στα μικροφύκη δύνανται να μεταβάλλονται ανάλογα με το περιβάλλον όπου καλλιεργούνται. Ως εκ τούτου είναι απαραίτητο να διερευνηθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την παραγωγή των προϊόντων ενδιαφέροντος σε εργαστηριακό/βιομηχανικό επίπεδο (Kim et al., 2005).

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην μελέτη της παραγωγής λιπιδίων από τα μικροφύκη. Τα λιπίδια είναι χημικές ενώσεις οι οποίες διαθέτουν μακρές αλυσίδες άνθρακα και είναι αδιάλυτες στο νερό (Vance & Vance, 2013). Στα μικροφύκη τα λιπίδια εμφανίζονται υπό μορφή τριακυλογλυκερολών, δηλ. τρεις αλυσίδες υδρογονανθράκων ενωμένες σε ένα μόριο γλυκερόλης, και ως ελευθέρα λιπαρά οξέα (Chen et al., 2021). Τα περισσότερα μικροφύκη παράγουν μεγάλες ποσότητες λιπαρών οξέων, και συγκεκριμένα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, μόρια τα οποία διαθέτουν περισσότερους από έναν διπλό δεσμό στην υδρογονανθρακική τους αλυσίδα. Τα μόρια αυτά διακρίνονται σε ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα και είναι μείζονος σημασίας για τον άνθρωπο, καθώς συμβάλλουν στην πρόληψη και τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, διαταραχές του νευρικού συστήματος κ.α. Ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να τα παράγει, και ως

εκ τούτου, η χρήση μικροφυκών για την παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη στρατηγική.

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης και το λιπιδικό προφίλ 4 στελεχών μικροφυκών. Πρόκειται για 2 στελέχη του γένους *Tetraselmis*, καθώς και 2 στελέχη του γένους *Dunaliella*.

Το R1-2, το πρώτο στέλεχος του γένους *Tetraselmis* παρουσιάζει φάση ανάπτυξης 5 ημερών, από την 3<sup>η</sup> έως την 7<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας. Ο συντελεστής  $\mu$  μπορεί να φτάσει την τιμή των 0,461, ενώ διαθέτει τον μέγιστο συντελεστή απόδοσης και τον μέγιστο αριθμό κυττάρων ανά mL καλλιέργειας, σε σχέση με τα υπόλοιπα 3 στελέχη. Το στέλεχος R1-3 διαφέρει από το R1-2 καθώς και από στοιχεία της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, καθώς η φάση ανάπτυξης του διαρκεί 3 ημέρες αντί για 5, ενώ αρχίζει την 2<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας και διαρκεί έως και την 4<sup>η</sup>. Διαθέτει τον μεγαλύτερο συντελεστή  $\mu$  σε σχέση με όλα τα άλλα στελέχη, και ενώ ο μέγιστος αριθμός κυττάρων ανά mL καλλιέργειας και ο συντελεστής απόδοσης είναι χαμηλότερα σε σχέση με το στέλεχος R1-2, η απόδοση της καλλιέργειας υπολογίζεται ως η υψηλότερη. Το D7, το πρώτο στέλεχος του γένους *Dunaliella* συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, όσον αφορά στον ρυθμό ανάπτυξης, καθώς η φάση ανάπτυξης λαμβάνει χώρα επί 4 ημέρες, από την 1<sup>η</sup> ως και την 4<sup>η</sup>. Ο συντελεστής ειδικής ανάπτυξης  $\mu$  του D7 είναι μεγαλύτερος από αυτόν του D8, καθώς και ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας, η απόδοση της καλλιέργειας και ο μέγιστος αριθμός κυττάρων (Teo et al., 2014, Islam et al., 2021, Lananan et al., 2013).

Συμπερασματικά, όσον αφορά στην ανάπτυξη των καλλιιεργειών, μεταξύ των στελεχών που ανήκουν στο γένος *Tetraselmis* φαίνεται ότι την καλύτερη απόδοση διαθέτει το R1-3. Ο υψηλότερος αριθμός κυττάρων ανά mL καλλιέργειας και συντελεστής παραγωγής βιομάζας που παρατηρείται στο R1-2 πιθανώς οφείλεται στο μεγαλύτερο χρονικό διάστημα φάσης ανάπτυξης της καλλιέργειας. Αντιστοίχως, όσον αφορά στα στελέχη του γένους *Dunaliella*, φαίνεται ότι τη μεγαλύτερη αποδοτικότητα παρουσιάζει το στέλεχος D7.

Ακολούθως, σε κάθε καλλιέργεια προσδιορίστηκε το λιπιδικό της προφίλ. Αρχικά υπολογίστηκε η ποσότητα των ολικών λιπιδίων σε γνωστή ποσότητα ξηρής μάζας του κάθε στελέχους. Στη συνέχεια, μετά την παραγωγή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων υπολογίστηκε το ποσοστό των ολικών λιπιδίων που μετετράπη σε μεθυλεστέρες, αλλά και το ποσοστό της ποσότητας της ξηρής μάζας που μετετράπη σε μεθυλεστέρες. Ενώ το ποσοστό των μεθυλεστέρων ως προς τα ολικά λιπίδια δεν φαίνεται να μεταβάλλεται σημαντικά μεταξύ

των 4 στελεχών, το στέλεχος D7 εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό τόσο ολικών λιπιδίων όσο και μεθυλεστέρων ως προς την ξηρή μάζα. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στο γεγονός ότι η ποσότητα ολικών λιπιδίων που ελήφθη και κατ' επέκταση η ποσότητα των μεθυλεστέρων που προέκυψαν από την εστεροποίηση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη. Τα ποσοστά των ολικών λιπιδίων συγκρίθηκαν επίσης με βιβλιογραφικά δεδομένα και παρατηρήθηκε απόκλιση και στα 2 γένη. Αυτό πιθανώς οφείλεται σε ποικιλία παραγόντων, είτε γενετικών είτε πειραματικών. Ειδικότερα η σύσταση του μέσου ανάπτυξης, η αλατότητα, η περιεκτικότητα σε διάφορες ενώσεις όπως νιτρικά και φωσφορικά ιόντα και βιταμίνες, είναι καθοριστικά (Lananan et al., 2013).

Στη συνέχεια, οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων διαχωρίστηκαν με αέριο χρωματογραφία και αναλύθηκαν έτσι ώστε να υπολογιστεί η εκατοστιαία αναλογία κάθε λιπαρού οξέος που εντοπίζεται σε καθένα από τα 4 στελέχη. Από τα λιπαρά οξέα που ταυτοποιήθηκαν, αυτά που βρίσκονται σε μεγαλύτερα ποσοστά είναι τα C16:0, C18:0, C16:1, C16:4, C18:1, C18:2 και C18:3. Τα λιπαρά οξέα ομαδοποιήθηκαν σε κορεσμένα, μονοακόρεστα ή πολυακόρεστα λιπαρά, ανάλογα με τους διπλούς δεσμούς που διαθέτουν. Είναι γνωστόν από τη βιβλιογραφία ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά υπερτερούν στα μικροφύκη, ανάλογα μάλιστα με το είδος, το ποσοστό μπορεί να φτάσει έως και το 70% της εκατοστιαίας περιεκτικότητας των συνολικών λιπαρών οξέων. Ακολουθούν τα κορεσμένα λιπαρά και τέλος τα μονοακόρεστα, τα οποία προσδιορίζονται σε μικρότερο ποσοστό (Tzovenis et al., 2003 Remize et al., 2021). Ενώ αυτή η αρχή φαίνεται να ισχύει στα στελέχη R1-3, D8 και D7, με το τελευταίο μάλιστα να εμφανίζει και το μεγαλύτερο ποσοστό PUFAs από όλα, το στέλεχος R1-2 διαφέρει σημαντικά, καθώς τα μονοακόρεστα λιπαρά είναι περισσότερα, με ποσοστό 35%, ενώ τα πολυακόρεστα και τα κορεσμένα λιπαρά ακολουθούν με ποσοστό 30%, αμφότερα. Εντοπίζονται στατιστικές σημαντικές διαφορές και στις 3 ομάδες λιπιδίων, όταν πραγματοποιούνται συγκρίσεις μεταξύ των 2 στελεχών του κάθε γένους.

Από τα PUFAs που μετρήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία υπολογίστηκαν τα ω-3 και τα ω-6 λιπαρά οξέα. Τα ω-3 λιπαρά οξέα αποτελούν σημαντικά συστατικά για τον οργανισμό καθώς έχουν σχετιστεί με την αντιμετώπιση μιας πληθώρας νοσημάτων, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η υπέρταση, ο διαβήτης, η παχυσαρκία, ενώ έχει διαπιστωθεί ότι συμβάλλουν ενεργά στην άμυνα του οργανισμού και στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, έχουν σχετιστεί με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης νευροεκφυλιστικών νοσημάτων όπως η νόσος Alzheimer και ψυχικών διαταραχών όπως η κατάθλιψη, καθώς και διαφόρων τύπων καρκίνου. Τέλος, φαίνεται να αποτελούν συστατικό

κρίσιμης σημασίας για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος των παιδιών και των εμβρύων (Liu et al., 2022, Remize et al., 2021, Castilla Casadiego et al., 2016). Ως εκ τούτου τα επίπεδα των ω-3 λιπαρών οξέων που καταναλώνει ο άνθρωπος πρέπει να είναι υψηλά, σε αντίθεση με τα ω-6 λιπαρά οξέα, τα οποία όταν καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες αυξάνουν τον κίνδυνο παχυσαρκίας αλλά και διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού (Simopoulos et al., 2016). Τα τελευταία χρόνια παρατηρήθηκε ότι ορισμένα μικροφύκη παράγουν πολύ μεγάλες ποσότητες ω-3 λιπαρών οξέων σε σχέση με άλλα φρούτα και λαχανικά, ενώ τα επίπεδα των ω-6 λιπαρών οξέων είναι συγκριτικά χαμηλά (Liu et al., 2022, Remize et al., 2021). Το φαινόμενο αυτό καθιστά τα μικροφύκη σημαντικούς υποψήφιους για χρήση στη βιομηχανία των συμπληρωμάτων διατροφής. Στα 4 στελέχη που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία υπολογίστηκαν τα ω-3 και τα ω-6 λιπαρά οξέα, και στη συνέχεια υπολογίστηκε και ο λόγος ω-3/ω-6. Συγκεκριμένα, το R1-2 εμφανίζει στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ω-3 λιπαρών οξέων σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη. Το γένος *Dunaliella* διαθέτει τα υψηλότερα επίπεδα, και συγκεκριμένα το D8, και στη συνέχεια με μη στατιστικώς σημαντική διαφορά το D7, αφήνοντας στην τρίτη θέση το στέλεχος R1-3. Ωστόσο, για τη σωστή αξιολόγηση, είναι απαραίτητο να υπολογιστεί επίσης ο λόγος ω-3/ω-6, καθώς ένα στέλεχος είναι ιδανικό για την κατανάλωσή του όταν τα ω-3 υπερτερούν των ω-6 λιπαρών οξέων πάνω από 1 φορά. Πράγματι, αν και το γένος *Dunaliella* φαίνεται να παράγει μεγαλύτερη ποσότητα ω-3 λιπαρών οξέων, παράγει και μεγάλη ποσότητα ω-6, με αποτέλεσμα ο λόγος ω-3/ω-6 να υπολογίζεται γύρω στο 3,5. Αντιθέτως, το R1-3, παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα των ω-3 απείχαν μόλις 4,5% από το D7 και 7,4% από το D8, παράγει λιγότερα ω-6 λιπαρά οξέα, με αποτέλεσμα ο λόγος ω-3/ω-6 να υπερβαίνει το 5. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι τα 2 βασικά ω-3 λιπαρά οξέα, το εικοσιπενταενοϊκό οξύ (C20:5, EPA) και το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (C22:6, DHA), τα οποία συνήθως εμφανίζονται σε υψηλά ποσοστά στα μικροφύκη, και αποτελούν το βασικό λόγο για τη χρήση τους ως συμπληρώματα διατροφής, στην παρούσα μελέτη προσδιορίζονται σε ποσοστό κάτω του 2% σε όλα τα στελέχη, με εξαίρεση το R1-3, όπου το EPA εντοπίζεται σε ποσοστό ελαφρώς άνω του 5%.

Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη εργασία, φαίνεται να είναι πιο κατάλληλο για βιομηχανική αξιοποίηση το στέλεχος R1-3. Το συμπέρασμα αυτό βασίζεται στον αυξημένο χρόνο πολλαπλασιασμού αλλά και στο μεγαλύτερο συντελεστή ανάπτυξης που παρουσιάζει συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη. Τα στελέχη του γένους *Dunaliella* δε φαίνεται να είναι κατάλληλα με βάση τον ρυθμό ανάπτυξής τους, καθώς ο αριθμός των κυττάρων και ο χρόνος πολλαπλασιασμού τους είναι σημαντικώς χαμηλότερα,

σε σύγκριση με τα στελέχη του γένους *Tetraselmis*. Όσον αφορά το λιπιδικό προφίλ των στελεχών και τις αναλογίες ω-3/ω-6, και πάλι το στέλεχος R1-3 εμφανίζεται ως καταλληλότερο, ενώ ακολουθούν τα στελέχη του γένους *Dunaliella*. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το στέλεχος R1-3 αποτελεί την καλύτερη επιλογή συγκριτικά με τα στελέχη του γένους *Dunaliella*, αλλά και συγκριτικά με το στέλεχος R1-2, το οποίο διαφέρει τόσο ως προς τα 3 άλλα στελέχη αλλά και ως προς τα βιβλιογραφικά δεδομένα, κι ως εκ τούτου δεν καλύπτει τις απαραίτητες προδιαγραφές για αξιοποίηση σε βιομηχανικό επίπεδο.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Walne, το οποίο εμπλουτίστηκε με συγκεκριμένες ποσότητες ιόντων και βιταμινών, ενώ η αλατότητα ήταν 40‰ για τα στελέχη του γένους *Tetraselmis* και 60‰ για τα στελέχη του γένους *Dunaliella*, διαφορά η οποία είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων, καθώς τα στελέχη του γένους *Dunaliella* χρειάζονται θρεπτικό μέσον υψηλής αλατότητας για να αναπτυχθούν, σε αντίθεση με τα στελέχη του γένους *Tetraselmis*. Στο θάλαμο καλλιέργειών η θερμοκρασία κυμαινόταν από 21 έως 23°C, η σχετική υγρασία αέρος ήταν περίπου 35%, η ένταση φωτισμού 50-100  $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  και η φωτοπερίοδος αποτελούνταν από κύκλους 12:12 ωρών (φως: σκοτάδι). Ο συνδυασμός των θρεπτικών συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν, τόσο το είδος αλλά και οι ποσότητες, σε συνδυασμό με την ένταση της ακτινοβολίας και τη θερμοκρασία δωματίου, οδήγησαν στο ρυθμό ανάπτυξης και τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων στις ποσότητες που προσδιορίστηκαν παραπάνω. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι μεταβολές σε κάποια από τις συνθήκες καλλιέργειας μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την ανάπτυξη των κυττάρων και την παραγωγή λιπαρών οξέων, από την μεταβολή της περιεκτικότητας ενός μόνο λιπαρού οξέος, έως και την τροποποίηση ολόκληρου του λιπιδικού προφίλ (Arunachalam Sivagurulingam et al., 2022). Για το λόγο αυτό, θα ήταν χρήσιμος μελλοντικά ο περαιτέρω έλεγχος του λιπιδικού προφίλ των συγκεκριμένων στελεχών σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης, όπως για παράδειγμα μετά από την προσθήκη επιπλέον στοιχείων στο θρεπτικό μέσο, αλλαγές της διάρκειας των κύκλων φωτός ή την αλλαγή του μήκους κύματος της ακτινοβολίας, μεταβολές στην αλατότητα κλπ. Ενδεχομένως κάποιες από αυτές τις συνθήκες να ευνοούν την παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων λιπιδίων σε κάθε στέλεχος (Anitha et al., 2018, Casadiego et al., 2016, Abd El-Baky et al., 2004, Teo et al., 2014, Lananan et al., 2013).

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[https://biocyclopedia.com/index/algae/algae\\_culturing/walnes\\_medium\\_composition.php](https://biocyclopedia.com/index/algae/algae_culturing/walnes_medium_composition.php)

<https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=134526>

<https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=178972>

<https://www.newscientist.com/gallery/dn21691-phytoplankton/>

<https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Rhodophyta>

<https://www.whatsthatfish.com/fish/solitary-fan-green-seaweed/1796>

Μάρκου, Γ., Τζοβενής, Ι. and Νεραντζής, Η., Μικροφύκη: καλλιέργεια και βιομηχανικές εφαρμογές.

Χαντζηστρούντσιου, Ξ., 2020. *Συστηματική και οικολογία μικροφυκών από παράκτια μεταβατικά οικοσυστήματα της Δυτικής Ελλάδος (Ιονίου)* (Doctoral dissertation, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Βιολογίας. Τομέας Οικολογίας και Ταξινομικής).

Adarme-Vega, T.C., Lim, D.K., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y. and Schenk, P.M., 2012. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial cell factories*, 11(1), pp.1-10.

Alishah Aratboni, H., Rafiei, N., Garcia-Granados, R., Alemzadeh, A. and Morones-Ramírez, J.R., 2019. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microbial Cell Factories*, 18, pp.1-17.

Althoff, T., Mills, D.J., Popot, J.L. and Kühlbrandt, W., 2011. Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1. *The EMBO journal*, 30(22), pp.4652-4664.

Andersen, R.A., 1992. Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity & Conservation*, 1, pp.267-292.

Anderson, D.M., Glibert, P.M. and Burkholder, J.M., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries*, 25, pp.704-726.

- Anitha, S., Shah, A.R. and Ali, B.M.J., 2018. Modulation of lipid productivity under nitrogen, salinity and temperature stress in microalgae *Dunaliella sp.* *Journal of Environmental Biology*, 39(5), pp.625-632.
- Arunachalam Sivagurulingam, A.P., Sivanandi, P. and Pandian, S., 2022. Isolation, mass cultivation, and biodiesel production potential of marine microalgae identified from Bay of Bengal. *Environmental Science and Pollution Research*, pp.1-10.
- Babich, O., Dolganyuk, V., Andreeva, A., Katserov, D., Matskova, L., Ulrikh, E., Ivanova, S., Michaud, P. and Sukhikh, S., 2022. Isolation of Valuable Biological Substances from Microalgae Culture. *Foods*, 11(11), p.1654.
- Barsanti, L., Coltelli, P., Evangelista, V., Frassanito, A.M., Passarelli, V., Vesentini, N. and Gualtieri, P., 2008. Oddities and curiosities in the algal world. In *Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection Springer Netherlands*, pp. 353-391.
- Barros de Medeiros, V.P., da Costa, W.K.A., da Silva, R.T., Pimentel, T.C. and Magnani, M., 2022. Microalgae as source of functional ingredients in new-generation foods: Challenges, technological effects, biological activity, and regulatory issues. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(18), pp.4929-4950.
- Bello, K.J., Fang, H., Fazeli, P., Bolad, W., Corretti, M., Magder, L.S. and Petri, M., 2013. Omega-3 in SLE: a double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of endothelial dysfunction and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology international*, 33, pp.2789-2796.
- Ben-Amotz, A., Katz, A. and Avron, M., 1982. Accumulation of  $\beta$ -carotene in halotolerant alga: purification and characterization of  $\beta$ -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 18(4), pp.529-537.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. and Stryer, L., 2002. *Biochemistry*, WH Freeman. *New York*, pp.988-990.
- Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., Vonshak, A. and Cohen, Z., 2002. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*, 60(5), pp.497-503.

Borowitzka, M.A., 2018. Biology of microalgae. In *Microalgae in health and disease prevention* (pp. 23-72). Academic Press.

Borowitzka, M.A. and 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, pp.567-590.

Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J., 1988. Micro-algal biotechnology.

Brasky, T.M., Darke, A.K., Song, X., Tangen, C.M., Goodman, P.J., Thompson, I.M., Meyskens Jr, F.L., Goodman, G.E., Minasian, L.M., Parnes, H.L. and Klein, E.A., 2013. Plasma phospholipid fatty acids and prostate cancer risk in the SELECT trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(15), pp.1132-1141.

Brown, M.R., Dunstan, G.A., Norwood, S.J. and Miller, K.A., 1996. Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana* 1. *Journal of phycology*, 32(1), pp.64-73.

Cardoso, C., Pereira, H., Franca, J., Matos, J., Monteiro, I., Pousão-Ferreira, P., Gomes, A., Barreira, L., Varela, J., Neng, N. and Nogueira, J.M., 2020. Lipid composition and some bioactivities of 3 newly isolated microalgae (*Tetraselmis sp.* IMP3, *Tetraselmis sp.* CTP4, and *Skeletonema sp.*). *Aquaculture international*, 28, pp.711-727.

Castilla Casadiego, D.A., Albis Arrieta, A.R., Angulo Mercado, E.R., Cervera Cahuana, S.J., Baquero Noriega, K.S., Suárez Escobar, A.F. and Morales Avendaño, E.D., 2016. Evaluation of culture conditions to obtain fatty acids from saline microalgae species: *Dunaliella salina*, *Sinecosyfis sp.*, and *Chroomonas sp.* *BioMed Research International*, 2016.

Chauton, M.S., Winge, P., Brembu, T., Vadstein, O. & Bones, A.M., 2013. Gene regulation of carbon fixation, storage, and utilization in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* acclimated to light/dark cycles. *Plant physiology*, 2013

Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T.C., Ng, K.S. and Salley, S.O., 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource technology*, 102(2), pp.1649-1655.



- Chew, K.W., Chia, S.R., Show, P.L., Yap, Y.J., Ling, T.C. and Chang, J.S., 2018. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 91, pp.332-344.
- Cohen, Z., Vonshak, A. and Richmond, A., 1988. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum*: Correlation to growth rate 1. *Journal of phycology*, 24(3), pp.328-332.
- Conde, T.A., Neves, B.F., Couto, D., Melo, T., Neves, B., Costa, M., Silva, J., Domingues, P. and Domingues, M.R., 2021. Microalgae as sustainable bio-factories of healthy lipids: Evaluating fatty acid content and antioxidant activity. *Marine drugs*, 19(7), p.357.
- Cuellar-Bermudez, S.P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D.L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M.A. and Parra-Saldivar, R., 2015. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial biotechnology*, 8(2), pp.190-209.
- da Silva Ferreira, V. and Sant'Anna, C., 2017. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), p.20.
- Dai, Y. and Liu, J., 2021. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid and sleep: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and longitudinal studies. *Nutrition Reviews*, 79(8), pp.847-868.
- Dammak, M., Haase, S.M., Miladi, R., Ben Amor, F., Barkallah, M., Gosset, D., Pichon, C., Huchzermeyer, B., Fendri, I., Denis, M. and Abdelkafi, S., 2016. Enhanced lipid and biomass production by a newly isolated and identified marine microalga. *Lipids in Health and Disease*, 15(1), pp.1-13.
- Das, P., Aziz, S.S. and Obbard, J.P., 2011. Two phase microalgae growth in the open system for enhanced lipid productivity. *Renewable Energy*, 36(9), pp.2524-2528.
- de Morais, M.G., Vaz, B.D.S., de Morais, E.G. and Costa, J.A.V., 2015. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *BioMed research international*, 2015.

- Drewnowski, P., Colares, R.G., Machado, P., de Faria, M., Detoni, A. and Tavano, V., 2013. Microalgae classification using semi-supervised and active learning based on Gaussian mixture models. *Journal of the Brazilian Computer Society*, 19(4), pp.411-422.
- Du, Z.Y. and Benning, C., 2016. Triacylglycerol accumulation in photosynthetic cells in plants and algae. *Lipids in plant and algae development*, pp.179-205.
- Dyall, S.C., 2015. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in aging neuroscience*, 7, p.52.
- Enamala, M.K., Enamala, S., Chavali, M., Donepudi, J., Yadavalli, R., Kolapalli, B., Aradhyula, T.V., Velpuri, J. and Kuppam, C., 2018. Production of biofuels from microalgae- A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94, pp.49-68.
- Esteves, F.D.A., Caliman, A., Santangelo, J.M., Guariento, R.D., Farjalla, V.F. and Bozelli, R.L., 2008. Neotropical coastal lagoons: an appraisal of their biodiversity, functioning, threats and conservation management. *Brazilian Journal of Biology*, 68, pp.967-981.
- Gaignard, C., Gargouch, N., Dubessay, P., Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Fendri, I., Abdelkafi, S. and Michaud, P., 2019. New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnology Advances*, 37(1), pp.193-222.
- Garrity, S.D., 1984. Some adaptations of gastropods to physical stress on a tropical rocky shore. *Ecology*, 65(2), pp.559-574.
- Gharajeh, N.H., Valizadeh, M., Dorani, E. and Hejazi, M.A., 2020. Biochemical profiling of three indigenous *Dunaliella* isolates with main focus on fatty acid composition towards potential biotechnological application. *Biotechnology Reports*, 26, p.e00479.
- Gopalakrishnan, V., & Ramamurthy, D. (2014). Dyeing industry effluent system as lipid production medium of *Neochloris sp.* for biodiesel feedstock preparation. *BioMed research international*, 2014, 529560.
- Griffiths, M.J., van Hille, R.P. and Harrison, S.T., 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology*, 24, pp.989-1001.

Grosso, G., Pajak, A., Marventano, S., Castellano, S., Galvano, F., Bucolo, C., Drago, F. and Caraci, F., 2014. Role of omega-3 fatty acids in the treatment of depressive disorders: a comprehensive meta-analysis of randomized clinical trials. *PloS one*, 9(5), p.e96905.

Grubišić, M., Šantek, B., Zorić, Z., Čošić, Z., Vrana, I., Gašparović, B., Čož-Rakovac, R. and Ivančić Šantek, M., 2022. Bioprospecting of microalgae isolated from the Adriatic Sea: Characterization of biomass, pigment, lipid and fatty acid composition, and antioxidant and antimicrobial activity. *Molecules*, 27(4), p.1248.

Guil-Guerrero, J.L., Navarro-Juárez, R., López-Martinez, J.C., Campra-Madrid, P. and Reboloso-Fuentes, M., 2004. Functional properties of the biomass of three microalgal species. *Journal of food engineering*, 65(4), pp.511-517.

Guillou, L., Eikrem, W., Chrétiennot-Dinet, M.J., Le Gall, F., Massana, R., Romari, K., Pedrós-Alió, C. and Vaulot, D., 2004. Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems. *Protist*, 155(2), pp.193-214.

Guiry, M.D., 2013. AlgaeBase. World-wide electronic publication. [http://www. algaebase.org](http://www.algaebase.org).

Hamed, I., 2016. The evolution and versatility of microalgal biotechnology: A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15(6), pp.1104-1123.

Han, F., Pei, H., Hu, W., Han, L., Zhang, S. and Ma, G., 2016. Effect of high-temperature stress on microalgae at the end of the logarithmic phase for the efficient production of lipid. *Environmental technology*, 37(20), pp.2649-2657.

Harris, L.A., Buckley, B., Nixon, S.W. and Allen, B.T., 2004. Experimental studies of predation by bluefish *Pomatomus saltatrix* in varying densities of seagrass and macroalgae. *Marine Ecology Progress Series*, 281, pp.233-239.

Harun, R., Danquah, M.K. and Forde, G.M., 2010. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(2), pp.199-203.

Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.S. and Lee, D.J., 2018. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology advances*, 36(1), pp.54-67.

- Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X. and Chen, G., 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied energy*, 87(1), pp.38-46.
- Innes, J.K. and Calder, P.C., 2018. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 132, pp.41-48.
- Innis, S.M., 2008. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain research*, 1237, pp.35-43.
- Islam, Z., Khatoon, H., Minhaz, T.M., Rahman, M.R., Hasan, S., Mahmud, Y., Hossain, M.S. and Sarker, J., 2021. Data on growth, productivity, pigments and proximate composition of indigenous marine microalgae isolated from Cox's Bazar Coast. *Data in Brief*, 35, p.106860.
- Issarapayup, K., Powtongsook, S. and Pavasant, P., 2011. Economical review of *Haematococcus pluvialis* culture in flat panel airlift photobioreactors. *Aquacultural engineering*, 44(3), pp.65-71.
- Johnstone, A.M., Lobley, G.E., Horgan, G.W., Bremner, D.M., Fyfe, C.L., Morrice, P.C. and Duthie, G.G., 2011. Effects of a high-protein, low-carbohydrate v. high-protein, moderate-carbohydrate weight-loss diet on antioxidant status, endothelial markers and plasma indices of the cardiometabolic profile. *British journal of nutrition*, 106(2), pp.282-291.
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E.A., Embiruçu, M. and Ghirardi, M.L., 2010. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource technology*, 101(4), pp.1406-1413.
- Khan, M.I., Shin, J.H. and Kim, J.D., 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial cell factories*, 17(1), pp.1-21.
- Kim, G., Bae, J. and Lee, K., 2016. Nitrate repletion strategy for enhancing lipid production from marine microalga *Tetraselmis sp.* *Bioresource Technology*, 205, pp.274-279.
- Kim, S.G., Choi, A., Ahn, C.Y., Park, C.S., Park, Y.H. and Oh, H.M., 2005. Harvesting of *Spirulina platensis* by cellular flotation and growth stage determination. *Letters in applied microbiology*, 40(3), pp.190-194.

- Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S. and Appel, L.J., 2003. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new recommendations from the American Heart Association. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(2), pp.151-152.
- Lam, M.K. and Lee, K.T., 2012. Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology advances*, 30(3), pp.673-690.
- Lee, E., Jalalizadeh, M. and Zhang, Q., 2015. Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal research*, 12, pp.497-512.
- Lepretti, M., Martucciello, S., Burgos Aceves, M.A., Putti, R. and Lionetti, L., 2018. Omega-3 fatty acids and insulin resistance: focus on the regulation of mitochondria and endoplasmic reticulum stress. *Nutrients*, 10(3), p.350.
- Liu, Y., Ren, X., Fan, C., Wu, W., Zhang, W. and Wang, Y., 2022. Health benefits, food applications, and sustainability of microalgae-derived N-3 PUFA. *Foods*, 11(13), p.1883.
- Manson, J.E., Cook, N.R., Lee, I.M., Christen, W., Bassuk, S.S., Mora, S., Gibson, H., Albert, C.M., Gordon, D., Copeland, T. and D'Agostino, D., 2019. Marine n-3 fatty acids and prevention of cardiovascular disease and cancer. *New England Journal of Medicine*, 380(1), pp.23-32.
- Miles, E.A. and Calder, P.C., 2012. Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *British Journal of Nutrition*, 107(S2), pp.S171-S184.
- Milledge, J.J., 2011. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 10, pp.31-41.
- Molina, E., Ación Fernández, F.G., García Camacho, F., Camacho Rubio, F. and Chisti, Y., 2000. Scale-up of tubular photobioreactors. *Journal of applied phycology*, 12, pp.355-368.
- Moro, K., Nagahashi, M., Ramanathan, R., Takabe, K. and Wakai, T., 2016. Resolvins and omega three polyunsaturated fatty acids: Clinical implications in inflammatory diseases and cancer. *World journal of clinical cases*, 4(7), p.155.
- Moussa, I.D.B., Chtourou, H., Karray, F., Sayadi, S. and Dhouib, A., 2017. Nitrogen or phosphorus repletion strategies for enhancing lipid or carotenoid production from *Tetraselmis marina*. *Bioresource technology*, 238, pp.325-332.

- Murff, H.J., Shu, X.O., Li, H., Yang, G., Wu, X., Cai, H., Wen, W., Gao, Y.T. and Zheng, W., 2011. Dietary polyunsaturated fatty acids and breast cancer risk in Chinese women: a prospective cohort study. *International Journal of Cancer*, 128(6), pp.1434-1441.
- Nixon, S.W., 1982. Nutrient dynamics, primary production and fisheries yields of lagoons. *Oceanologica Acta, Special Issue*.
- Odjadjare, E.C., Mutanda, T. and Olaniran, A.O., 2017. Potential biotechnological application of microalgae: a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(1), pp.37-52.
- Pandey, A., 2017. Microalgae biomass production for CO<sub>2</sub> mitigation and biodiesel production. *J Microbiol Exp*, 4(4), p.00117.
- Park, J.J., Wang, H., Gargouri, M., Deshpande, R.R., Skepper, J.N., Holguin, F.O., Juergens, M.T., Shachar-Hill, Y., Hicks, L.M. and Gang, D.R., 2015. The response of *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen deprivation: a systems biology analysis. *The Plant Journal*, 81(4), pp.611-624.
- Pérez-Ruzafa, Á., Marcos, C. and Pérez-Ruzafa, I.M., 2012. Recent advances in coastal lagoons ecology: evolving old ideas and assumptions. *Transitional Waters Bulletin*, 5(1), pp.50-74.
- Pérez-Ruzafa, A., Mompeán, M.C. and Marcos, C., 2007. Hydrographic, geomorphologic and fish assemblage relationships in coastal lagoons. In *Lagoons and Coastal Wetlands in the Global Change Context: Impacts and Management Issues: Selected papers of the International Conference "CoastWetChange", Venice, 26–28 April 2004* (pp. 107-125). Springer Netherlands.
- Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C. and Michaud, P., 2013. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(8), pp.781-796.
- Powell, E.E. and Hill, G.A., 2009. Economic assessment of an integrated bioethanol–biodiesel–microbial fuel cell facility utilizing yeast and photosynthetic algae. *Chemical Engineering Research and Design*, 87(9), pp.1340-1348.

- Pulz, O., 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 57, pp.287-293.
- Ramesh Kumar B, Deviram, G., Mathimani, T., Duc, P.A. and Pugazhendhi, A., 2019. Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 17, pp.583-588. Kumar, B.R., Deviram, G., Mathimani, T., Duc, P.A. and Pugazhendhi, A., 2019. Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 17, pp.583-588.
- Ramsden, C.E., Zamora, D., Leelarthae-pin, B., Majchrzak-Hong, S.F., Faurot, K.R., Suchindran, C.M., Ringel, A., Davis, J.M. and Hibbeln, J.R., 2013. Use of dietary linoleic acid for secondary prevention of coronary heart disease and death: evaluation of recovered data from the Sydney Diet Heart Study and updated meta-analysis. *Bmj*, 346, p.e8707.
- Ran, W., Wang, H., Liu, Y., Qi, M., Xiang, Q., Yao, C., Zhang, Y. and Lan, X., 2019. Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients. *Bioresource Technology*, 291, p.121894.
- Ratledge, C. and Wynn, J.P., 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in applied microbiology*, 51, pp.1-52.
- Richmond, A., 1992. Open systems for the mass production of photoautotrophic microalgae outdoors: physiological principles. *Journal of Applied Phycology*, 4, pp.281-286.
- Remize, M., Brunel, Y., Silva, J.L., Berthon, J.Y. and Filaire, E., 2021. Microalgae n-3 PUFAs production and use in food and feed industries. *Marine drugs*, 19(2), p.113.
- Rondanelli, M., Giacosa, A., Opizzi, A., Pelucchi, C., La Vecchia, C., Montorfano, G., Negroni, M., Berra, B., Politi, P. and Rizzo, A.M., 2011. Long chain omega 3 polyunsaturated fatty acids supplementation in the treatment of elderly depression: effects on depressive symptoms, on phospholipids fatty acids profile and on health-related quality of life. *The journal of nutrition, health & aging*, 15, pp.37-44.
- Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M.D. and Kirk, P.M., 2015. A higher level classification of all living organisms. *PloS one*, 10(4), p.e0119248.

Santin, A., Russo, M.T., Ferrante, M.I., Balzano, S., Orefice, I. and Sardo, A., 2021. Highly valuable polyunsaturated fatty acids from microalgae: strategies to improve their yields and their potential exploitation in aquaculture. *Molecules*, 26(24), p.7697.

Shahidi, F. and Ambigaipalan, P., 2018. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. *Annual review of food science and technology*, 9, pp.345-381.

Sharma, K.K., Schuhmann, H. and Schenk, P.M., 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5), pp.1532-1553.

Simopoulos, A.P., 2016. An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, 8(3), p.128.

Song, M., Nishihara, R., Cao, Y., Chun, E., Qian, Z.R., Mima, K., Inamura, K., Masugi, Y., Nowak, J.A., Noshio, K. and Wu, K., 2016. Marine  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid intake and risk of colorectal cancer characterized by tumor-infiltrating T cells. *JAMA oncology*, 2(9), pp.1197-1206.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), pp.87-96.

Stark, M. and O'Gara, I., 2012. An introduction to photosynthetic microalgae. *Disruptive Science and Technology*, 1(2), pp.65-67.

Subhash, G.V., Rajvanshi, M., Kumar, B.N., Govindachary, S., Prasad, V. and Dasgupta, S., 2017. Carbon streaming in microalgae: extraction and analysis methods for high value compounds. *Bioresource technology*, 244, pp.1304-1316.

Sun, X.M., Geng, L.J., Ren, L.J., Ji, X.J., Hao, N., Chen, K.Q. and Huang, H., 2018. Influence of oxygen on the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in microalgae. *Bioresource technology*, 250, pp.868-876.

Talebi, A.F., Tohidfar, M., Mousavi Derazmahalleh, S.M., Sulaiman, A., Baharuddin, A.S. and Tabatabaei, M., 2015. Biochemical modulation of lipid pathway in microalgae *Dunaliella sp.* for biodiesel production. *BioMed research international*, 2015.

Teo, C.L., Atta, M., Bukhari, A., Taisir, M., Yusuf, A.M. and Idris, A., 2014. Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. *Bioresource technology*, 162, pp.38-44.



Tsai, H.P., Chuang, L.T. and Chen, C.N.N., 2016. Production of long chain omega-3 fatty acids and carotenoids in tropical areas by a new heat-tolerant microalga *Tetraselmis sp.* DS3. *Food chemistry*, 192, pp.682-690.

Tukey, J.W., 1941. *Convergence and uniformity in topology* (No. 2). Princeton University Press.

Tzovenis, I., De Pauw, N. and Sorgeloos, P., 2003. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids: II. Effect of different light regimes on the production of fatty acids. *Aquaculture*, 216(1-4), pp.223-242.

Tzovenis, I., Fountoulaki, E., Dolapsakis, N., Kotzamanis, I., Nengas, I., Bitis, I., Cladas, Y. and Economou-Amilli, A., 2009. Screening for marine nanoplanktic microalgae from Greek coastal lagoons (Ionian Sea) for use in mariculture. *Journal of applied phycology*, 21, pp.457-469.

Wijffels, R.H. and Barbosa, M.J., 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science*, 329(5993), pp.796-799.

Yates, C.M., Calder, P.C. and Rainger, G.E., 2014. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacology & therapeutics*, 141(3), pp.272-282.

Yeh, K.L., Chen, C.Y. and Chang, J.S., 2012. pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. *Biochemical engineering journal*, 64, pp.1-7.

Yen, H.W., Hu, I.C., Chen, C.Y., Ho, S.H., Lee, D.J. and Chang, J.S., 2013. Microalgae-based biorefinery—from biofuels to natural products. *Bioresource technology*, 135, pp.166-174.

Zhan, J., Rong, J. and Wang, Q., 2017. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bio

Zheng, J.S., Hu, X.J., Zhao, Y.M., Yang, J. and Li, D., 2013. Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. *Bmj*, 346, p.f3706.