

ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΠΙΘΥΜΗΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΣΕ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Π. Ψαχούλια¹, Α. Καραπατσιά^{1,2}, Χ. Χατζηδούκας^{1,*}

¹Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Ελλάδα

²Ινστιτούτο Χημικών Διεργασιών και Φυσικών Πόρων, ΙΔΕΠ/ΕΚΕΤΑ, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

(*chatzido@auth.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φως αποτελεί καίρια λειτουργική παράμετρο και παράγοντα που καθορίζει την κλιμάκωση μεγέθους διεργασιών φωτοσυνθετικής καλλιέργειας μικροφυκών. Η παρούσα εργασία μελετά την επίδραση του μπλε και κόκκινου φωτός (πηγή LED) στην ανάπτυξη του στελέχους *Stichococcus* sp., σε φωτοβιοαντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας, προκειμένου να μεθοδευτεί η συνεισφορά τους στο ρυθμό παραγωγής της βιομάζας καθώς και στη στοχευμένη συσσώρευση βιοπροϊόντων. Η υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας ψυχρό λευκό φως και άγγιξε την τιμή 3.7 g/l σε καλλιέργεια 18 ημερών, ενώ η συγκεκριμένη ποικιλία φωτός απέδωσε και τη μεγαλύτερη τιμή συγκέντρωσης υδατανθράκων (1.17 g/l). Η χρήση του μπλε φωτός συνδυαστικά με κατάλληλα επιλεγμένες συνθήκες καλλιέργειας συνέβαλε σημαντικά στη μαζική σύνθεση και συσσώρευση λιπιδίων αυξάνοντας την τελική τους συγκέντρωση σε υψηλά επίπεδα (1.43 g/l και 46% κ.β.), χωρίς καμία σημαντική αναστολή στην ανάπτυξη της καλλιέργειας. Από την άλλη πλευρά, σε αντίθεση με δημοσιευμένα πειραματικά αποτελέσματα για άλλα στελέχη, το κόκκινο φως καθώς και η εναλλαγή από μπλε σε κόκκινο φως δείχνουν να μην ευνοούν τη φωτοσυνθετική διαδικασία.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι καλλιέργειες των μικροφυκών αποτελούν συστήματα που παρουσιάζουν μεγάλη πολυπλοκότητα ενώ η ανάπτυξή τους επηρεάζεται δυναμικά από διαφορετικούς βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, με κυριότερους: το φωτισμό, τη θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα η μη των θρεπτικών συστατικών, το pH του θρεπτικού υποστρώματος, την αλατότητα, κ.ά. Η επίδραση αυτών των παραμέτρων στο ρυθμό ανάπτυξης της καλλιέργειας καθώς και η ικανότητα των μικροφυκών να προσαρμόζουν το ενδοκυττάριο περιεχόμενό τους σύμφωνα με τους εξωγενείς αυτούς παράγοντες ενισχύει το ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς. Είναι σαφές ότι η ανάπτυξη της κυτταρικής βιομάζας συνδέεται άρρηκτα με την παροχή φωτός, η οποία αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας στα φωτοσυνθετικά φύκη για την παραγωγή τροφής, μέσω της φωτοσυνθετικής διαδικασίας^[1]. Τα μικροφύκη είναι σε θέση να εκμεταλλευτούν το φως από όλο το ορατό φάσμα, δηλαδή στο εύρος 400 και 700 nm (φωτοσυνθετικά ενεργή ακτινοβολία-PAR), ενέργεια η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί από τις χρωστικές ενώσεις που περιέχουν. Βασικό φωτοδεδεσμευτικό μόριο στα περισσότερα στελέχη μικροφυκών είναι η χλωροφύλλη (α και β) η οποία, παρουσιάζει δύο κύριες ζώνες απορρόφησης, στη κυανή (450-475 nm) και την ερυθρή (630-680 nm) περιοχή του ορατού φάσματος^[2]. Ως εκ τούτου η ενίσχυση των συγκεκριμένων μηκών κύματος στον παρεχόμενο στην καλλιέργεια φωτισμό μπορεί να επιδράσει ευεργετικά τόσο στο ρυθμό ανάπτυξης όσο και επιλεκτικά στη συσσώρευση πολύτιμων ενδοκυττάρων προϊόντων. Συγκεκριμένα, αρκετές έρευνες έχουν επισημάνει την θετική επίδραση του κόκκινου φωτός στην μεγιστοποίηση της συνολικής βιομάζας των μικροφυκών, καθώς τα φωτόνια με μήκη κύματος της τάξης των 660-680 nm έχουν τη μεγαλύτερη κβαντική απόδοση, σε όσους οργανισμούς περιέχουν χλωροφύλλη α ($\lambda_{\alpha_red}= 680$ nm) ή/και χλωροφύλλη β ($\lambda_{\beta_red}= 660$ nm), όπως είναι και τα μικροφύκη^[3,4]. Άλλες μελέτες επισημαίνουν τη χρήση φωτός μπλε μήκους κύματος να οδηγεί στη συσσώρευση μεγαλύτερων ποσοστών λιπιδίων στα κύτταρα των μικροφυκών έναντι του λευκού, φαινόμενο που φαίνεται να σχετίζεται

με την επίδραση του μπλε φωτός στη γονιδιακή μεταγραφή και την ενίσχυση και ρύθμιση συγκεκριμένων ενζύμων^[5,6]. Τέλος στη βιβλιογραφία υπάρχουν έρευνες που καταδεικνύουν την παροχή αρχικά μπλε ακτινοβολίας να συμβάλει στη δημιουργία κυττάρων μεγάλης διαμέτρου τα οποία έχουν την δυνατότητα μετέπειτα διαίρεσης υπό κόκκινο φως, συντελώντας με αυτόν τον τρόπο στην συνολική αύξηση της βιομάζας^[7]. Στη παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της συνδυαστικής χρήσης μπλε και κόκκινου φωτός με λευκό, στη συνολική ανάπτυξη καλλιέργειας μικροφυκών αλλά και στην επιλεκτική παραγωγή/συσσώρευση επιμέρους βιομορίων στα κύτταρα, στο πλαίσιο της ανάπτυξης ευεργετικών πολιτικών λειτουργίας του φωτοβιοαντιδραστήρα που θα μεθοδεύσουν τη στοχευμένη και μέγιστη παραγωγή προϊόντων. Συγκεκριμένα μελετάται η πορεία ανάπτυξης και η δυναμική μεταβολή της συγκέντρωσης των λιπιδίων, πρωτεϊνών και υδατανθράκων σε καλλιέργεια του στελέχους *Stichococcus* sp., σε φωτοβιοαντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας. Το στέλεχος που επιλέγεται ανήκει στην τάξη των χλωροφυκών και απαντάται μεταξύ άλλων και στα ελληνικά ύδατα, προσαρμοσμένο στις κλιματολογικές συνθήκες της χώρας μας. Καταλυτικοί παράγοντες στην επιλογή του αποτελούν η ανθεκτικότητά του σε περιβαλλοντικές αλλαγές και το πλούσιο λιπιδικό του περιεχόμενο, καθώς και το γεγονός ότι η έρευνα γύρω από το συγκεκριμένο οργανισμό στη διεθνή βιβλιογραφία είναι σε αρκετά πρωταρχικό στάδιο, σε ότι αφορά τόσο τις βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειάς του όσο και τα ενδοκυττάρια προϊόντα του. Ως πηγή φωτισμού χρησιμοποιήθηκαν λαμπτήρες και ταινίες LED, καθώς ανάμεσα στους διάφορους τύπους φωτισμού έχουν τη πιο χαμηλή εκπομπή θερμότητας, ενώ παρέχουν τη δυνατότητα προσαρμογής εκπεμπόμενου φάσματος ως προς την ένταση και τη διαλείπουσα λειτουργία στον κύκλο ημέρας/νύχτας του ηλιακού φωτός^[8].

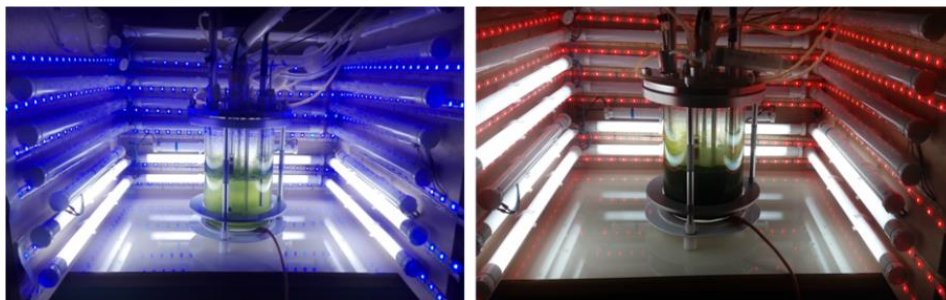
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το στέλεχος που μελετήθηκε είναι το *Stichococcus* sp., το οποίο απομονώθηκε από τη θάλασσα περιοχής της Κρήτης. Προκειμένου να μελετηθεί η συμπεριφορά και η απόκριση των κυττάρων στις διάφορες μεταβολές του φωτισμού σχεδιάστηκε μια σειρά πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας.

Προκαλλιέργεια: Στην φάση της προκαλλιέργειας, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε κωνικές φιάλες των 500 ml, σε επωαστήρα κωνικών φιαλών με συχνότητα ανάδευσης 80 rpm υπό θερμοκρασία 25 °C. Για το φωτισμό τους χρησιμοποιούνται λαμπτήρες λευκού φωτός 3000 K (warm white) συνολικής έντασης 6000 lumens και φωτοπερίοδο φωτός/σκότους ίση με 16/8 ώρες. Στις καλλιέργειες διέρχεται αέρας, με παροχή 0.1 l/min ενώ οι κωνικές φιάλες καλύπτονται με υδρόφοβο βαμβάκι που επιτρέπει τον αερισμό της φιάλης και την ανανέωση του υπερκείμενου αέρα της καλλιέργειας με ατμοσφαιρικό. Το θρεπτικό μέσο στο οποίο αναπτύσσεται το στέλεχος είναι το τροποποιημένο Bold Basal Medium (τριπλάσια συγκέντρωση αζώτου και βιταμίνες, 3N-BBM+V), του οποίου η σύσταση είναι (σε mg/l): NaNO₃ 750, CaCl₂·2H₂O 25, MgSO₄·7H₂O 75, K₂HPO₄·3H₂O 75, KH₂PO₄ 175, NaCl 25, Na₂EDTA 4.5, FeSO₄·7H₂O 0.595, MnCl₂·4H₂O 0.252, ZnCl₂ 0.03, CoCl₂·6H₂O 0.012, Na₂MoO₄·2H₂O 0.024, Θειαμίνη (B1) 1.2 και Κοβαλαμίνη (B12) 0.01. Σε αυτό το στάδιο οι καλλιέργειες παραμένουν προσεγγιστικά δεκαπέντε μέρες, έως ότου παρατηρηθεί ικανοποιητική ανάπτυξη ένδειξη της οποίας αποτελεί η οπτική πυκνότητα (O.D.). Κατόπιν, συγκεκριμένη ποσότητα από την προκαλλιέργεια, χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό της κύριας καλλιέργειας στον φωτοβιοαντιδραστήρα.

Κύρια Καλλιέργεια: Κύρια φάση της μελέτης αποτελεί η κλιμάκωση της καλλιέργειας σε φωτοβιοαντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας όγκου 5 L (FerMac 320/Electrolab Biotech Limited). Στο στάδιο αυτό οι τιμές των παραμέτρων (pH, θερμοκρασία, ρυθμός ανάδευσης, διαλυμένο οξυγόνο) καταγράφονται και ρυθμίζονται μέσω ρυθμιστικού συστήματος του αντιδραστήρα. Η παροχή του αέρα ορίζεται σε 0.1 l/min ενώ υπάρχει ξεχωριστό ρεύμα παροχής CO₂ με ροή 0.025 l/min το οποίο διοχετεύεται από φιάλη υψηλής πίεσης (καθαρότητας ≥99.9%). Το pH της καλλιέργειας ρυθμίζεται αυτόματα με διαλύματα NaOH (1M) και HCl (1M) στην τιμή του

σημείου αναφοράς (set point) που ορίζεται σε 6.7 με επιτρεπόμενο εύρος διακύμανσης 0.1. Η θερμοκρασία της καλλιέργειας ρυθμίζεται αυτόματα στους 25 °C με την τροφοδοσία ψυκτικού νερού στην ψυκτική σπείρα του αντιδραστήρα και χρήση μπάνιου θέρμανσης/ψύξης με ανακυκλοφορητή (Julabo F-12). Ο φωτισμός του βιοαντιδραστήρα υλοποιείται με χρήση μιας ιδιοκατασκευής, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1, που περιλαμβάνει συνολικά 19 λάμπες LED λευκού φωτός ημέρας (cool daylight, 6500 K), έντασης 1100 lumens η καθεμία (Osram LED φωτοσωλήνας, 60cm). Στην κατασκευή είναι επίσης περιμετρικά τοποθετημένες πέντε σειρές μπλε και πέντε σειρές κόκκινης ταινίας LED (LED strip) συνολικής έντασης 75.6 W (για το κάθε χρώμα). Η μέτρηση έντασης του φωτός γίνεται με σφαιρικό αισθητήρα που βρίσκεται βυθισμένος στην καλλιέργεια σε σταθερό σημείο. Η φωτοπερίοδος, η οποία έχει οριστεί κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων στις 16/8 ώρες ρυθμίζεται με τη χρήση χρονοδιακόπτη (Telco ETG-12A).



Σχήμα 1. Πειραματική διάταξη φωτοβιοαντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας.

Για τον αποτελεσματικό φωτισμό της καλλιέργειας στον βιοαντιδραστήρα, το προφίλ φωτισμού σε όλα τα πειράματα συνδυάστηκε με ένα προφίλ προοδευτικής αύξησης του ρυθμού ανάδευσης που θα εξασφάλιζε επαρκή ανάμιξη και έκθεση του κυτταρικού πληθυσμού στην προσπίπτουσα φωτεινή ακτινοβολία στην γυάλινη επιφάνεια του βιοαντιδραστήρα. Οι τιμές όλων των παραμέτρων επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενη μελέτη που διεξήχθη για το συγκεκριμένο στέλεχος και κρίνονται οι βέλτιστες για τη συνολική αύξηση της βιομάζας των κυττάρων ^[9].

Μεθοδολογία Μετρήσεων: Η πορεία ανάπτυξης της καλλιέργειας μελετάται δυναμικά ως προς τη συγκέντρωση ξηρής μάζας κυττάρων (DCM) και τη συγκέντρωση ενδοκυττάρων προϊόντων.

Μέτρηση ξηρής μάζας κυττάρων: Δύο φορές την ημέρα πραγματοποιούνται μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD_{600nm}) σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (Perkin Elmer, Lamda 35). Για τη συγκέντρωση της ξηρής βιομάζας του στελέχους, μία φορά την ημέρα δείγμα 5 ml καλλιέργειας διηθείται με προζυγισμένο φίλτρο υαλωδών μικροϊνών (Whatman 934-AH) πορώδους 1.5 μm , το οποίο στη συνέχεια ξηραίνεται στους 50 °C για 24 ώρες και ζυγίζεται σε μικροζυγό ακριβείας (Mettler Toledo, XP 105).

Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών: Δείγμα καλλιέργειας όγκου 10ml φυγοκεντρείται (10 min, 6000x g). Το ίζημα ψύχεται στους -20 °C και υποβάλλεται σε λυοφιλίωση. Στη συνέχεια 2 mg βιομάζας εκχυλίζονται με διάλυμα 0.5 N NaOH με 5% CH₃OH και προσθήκη φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 0.05 M με παράλληλη χρήση υπερήχων για 10 min ^[10]. Για τη μέτρηση των πρωτεϊνών γίνεται χρήση MicroBCA kit (ThermoScientific) σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακών (BioTeK, ELx808) ενώ η καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευάζεται με πρότυπα αλβουμίνης βόειου ορού (BSA).

Μέτρηση συγκέντρωσης λιπιδίων: Δείγμα 10ml καλλιέργειας φυγοκεντρείται (10 min, 6000x g). Το ίζημα αφού ψυχθεί στους -20 °C, υποβάλλεται σε λυοφιλίωση. Στη συνέχεια 2 mg βιομάζας ζυγίζονται και εκχυλίζονται με διάλυμα χλωροφορμίου-μεθανόλης 2:1 και σύγχρονη χρήση υπερήχων σε τρεις κύκλους για συνολικά 45 min, σύμφωνα με την τροποποιημένη μέθοδο Folch ^[11]. Ο προσδιορισμός των εκχυλιζόμενων λιπιδίων γίνεται βαρυμετρικά.

Μέτρηση συγκέντρωσης υδατανθράκων: Για την ανάκτηση και ποσοτική ανάλυση των περιεχόμενων υδατανθράκων, 1 mg λυοφιλοποιημένης βιομάζας εκχυλίζεται με HCl 2.5 M για 3 h στους 100 °C και στη συνέχεια χρησιμοποιείται η μέθοδος φαινόλης-θειικού οξέος ^[12].

Τέλος, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του αμμωνιακού αζώτου στο μέσο πραγματοποιείται με μετρήσεις του υπερκειμένου στα 220 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (Perkin Elmer, Lamda 35) ^[13].

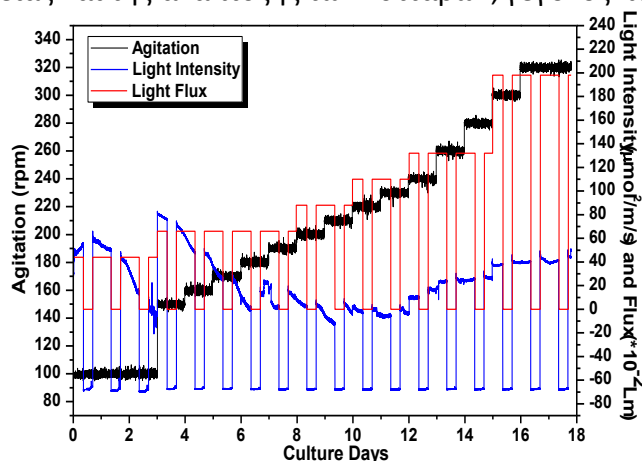
Περιγραφή Πειραμάτων: Πραγματοποιήθηκαν 4 πειράματα στα οποία εφαρμόστηκαν διαφορετικές πολιτικές φωτισμού και είχαν ως στόχο τη μελέτη ανάπτυξης της καλλιέργειας και της συσώρευσης των ενδοκυττάρων βιομορίων (λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες), σε σχέση με τα διάφορα μήκη κύματος φωτός. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το ίδιο προφίλ λευκού φωτός, ενώ στα πειράματα 2-4 έγινε συνδυαστική χρήση μπλε και κόκκινου LED φωτός (Πίνακας 1). Οι υπόλοιπες μεταβλητές παρέμειναν σταθερές στις τιμές που προαναφέρθηκαν. Η διάρκεια κάθε πειράματος είναι 18 ημέρες. Ο όγκος της καλλιέργειας σε κάθε πείραμα είναι 2 L, ενώ η αρχική οπτική πυκνότητα και η συγκέντρωση βιομάζας είναι 0.25 (OD_{@600}) και 0.03 g/l.

Πίνακας 1. Διάρθρωση της πειραματικής μελέτης.

Πειράματα	Συνθήκες Φωτισμού
Πείραμα 1	Λευκό φως
Πείραμα 2	Λευκό και κόκκινο φως
Πείραμα 3	Λευκό και μπλε φως
Πείραμα 4	Λευκό και μπλε φως για 7 ημέρες και στη συνέχεια λευκό και κόκκινο φως

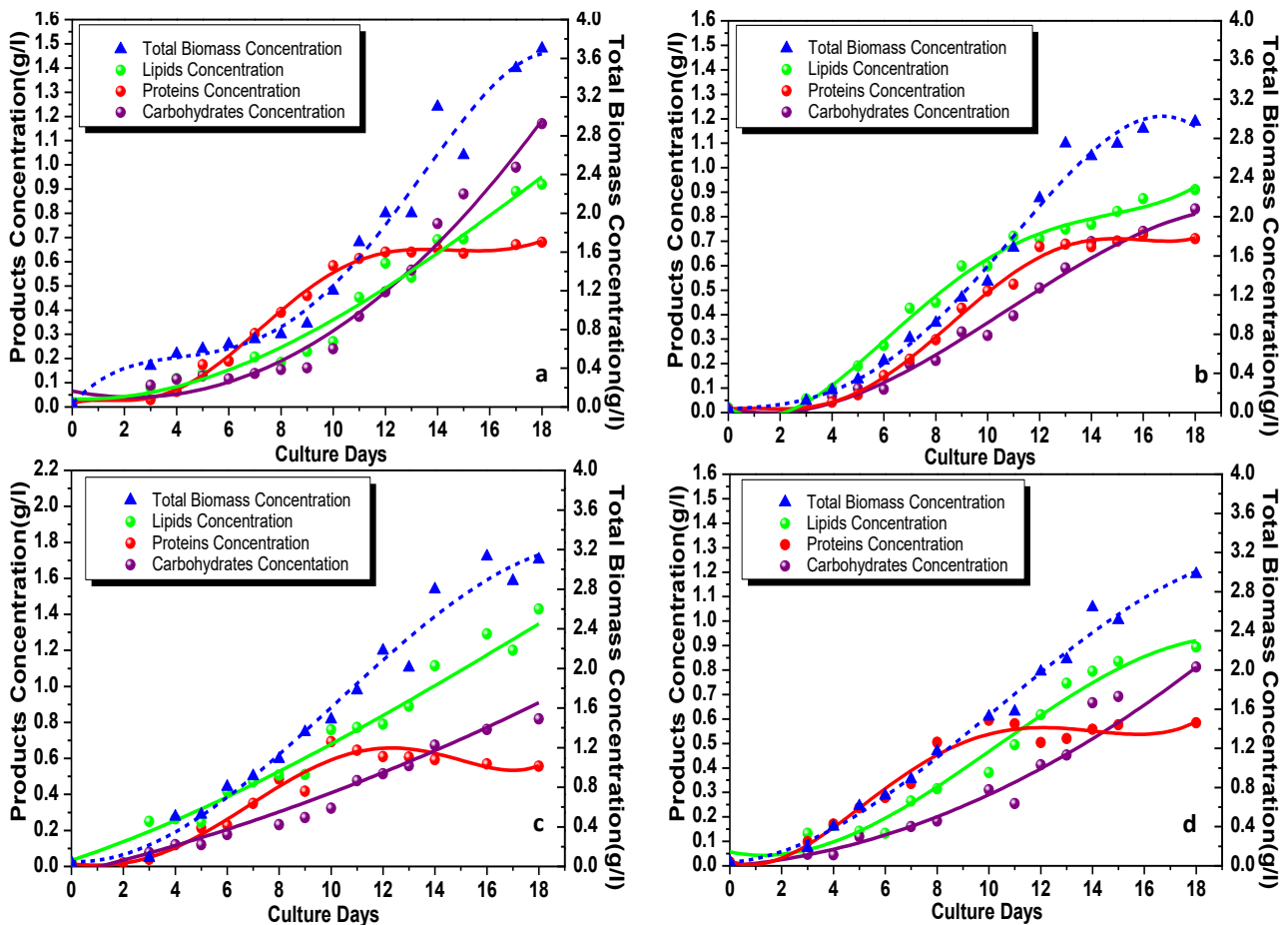
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το προοδευτικά μεταβαλλόμενο προφίλ του ρυθμού ανάδευσης σε συνάρτηση με αυτό του φωτισμού, που εφαρμόστηκε στο σύνολο των πειραμάτων καθώς και η πορεία της έντασης του φωτός στο εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα στο Πείραμα 1, παρουσιάζονται στο Σχήμα 2. Είναι εμφανής η απόκριση της καλλιέργειας στη φωτοπερίοδο που εφαρμόστηκε (16h φωτισμού/8h σκότους) καθώς και ο ρυθμός της φωτοσυνθετικής της δραστηριότητας. Με την εκκίνηση της φωτεινής περιόδου κάθε κύκλου φωτισμού η μετρούμενη ένταση φωτός στο εσωτερικό του αντιδραστήρα όπου είναι τοποθετημένος ο αισθητήρας, ανεβαίνει ενώ μειώνεται σταδιακά κατά τη διάρκεια των 16 ωρών (μπλε γραμμή στο Σχήμα 2). Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη της πύκνωσης της καλλιέργειας και της ανάπτυξης των κυττάρων, γεγονός που επιβεβαιώνεται και



Σχήμα 2. Μεταβολή του ρυθμού ανάδευσης, του φωτισμού και της προσπίπτουσας φωτεινής ακτινοβολίας στο εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα κατά τη διάρκεια του Πειράματος 1.

από τις μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας και της βιομάζας. Ωστόσο από τη 10^η ημέρα και μετά η ένταση του φωτός στο εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα παραμένει αμετάβλητη κατά τις ώρες της φωτεινής περιόδου. Αυτό οφείλεται στο φαινόμενο αυτοσκίασης μεταξύ των κυττάρων του πληθυσμού που είναι ιδιαίτερα έντονο και υπερκαλύπτει τη μείωση της έντασης του φωτός λόγω της ανάπτυξης της καλλιέργειας. Τα συγκεκριμένα φαινόμενα παρατηρήθηκαν και στα υπόλοιπα πειράματα (τα στοιχεία δεν παρατίθενται).



Σχήμα 3. Δυναμική μεταβολή της συγκέντρωσης της βιομάζας και των ενδοκυττάρων προϊόντων στο Πείραμα 1-Λευκό φως (a), Πείραμα 2-Λευκό και κόκκινο φως (b), Πείραμα 3-Λευκό και μπλε φως (c) και στο Πείραμα 4-Λευκό και μπλε φως/Λευκό και κόκκινο φως (d).

Στο Σχήμα 3 παρουσιάζεται η δυναμική μεταβολή της συγκέντρωσης των ενδοκυττάρων προϊόντων στις τέσσερις πολιτικές φωτός που εφαρμόστηκαν καθώς και η συνολική πορεία ανάπτυξης, εκφρασμένη ως συγκέντρωση ξηρής βιομάζας (Total Biomass Concentration, g/l). Συγκεκριμένα, μεγαλύτερη συγκέντρωση ξηρής βιομάζας επιτεύχθηκε με τη χρήση αποκλειστικά λευκού ψυχρού φωτός (Πείραμα 1) και άγγιξε την τιμή 3.7 g/l την τελευταία ημέρα της περιόδου των 18 ημερών. Στα υπόλοιπα τρία πειράματα οι τελικές τιμές της βιομάζας δεν ξεπερνάνε τα 3.1 g/l, ένδειξη η οποία παρατηρείται με την χρήση μπλε φωτός (Πείραμα 3), ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τα άλλα δυο πειράματα είναι 2.97 και 2.98 g/l (Πείραμα 2 και Πείραμα 4 αντίστοιχα). Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι η αποκλειστική χρήση λευκού φωτός ευνοεί την ανάπτυξη της καλλιέργειας σε σχέση με τη χρήση μπλε ή κόκκινου φωτός ή της συνδυαστικής εφαρμογή τους. Αναφορικά, με τα προϊόντα της καλλιέργειας, σε όλα τα πειράματα παρατηρείται ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών παρουσιάζει στατική και ελαφρώς πτωτική τάση από τη δέκατη μέρα και μετά, ενώ στο ίδιο διάστημα τα λιπίδια και οι υδατάνθρακες αυξάνονται. Τα στοιχεία αυτά μπορούν να συσχετιστούν άμεσα με τη συγκέντρωση του αζώτου στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Από μετρήσεις που πραγματοποιούνται σε τακτά χρονικά διαστήματα επαληθεύεται ότι το αρχικό αζώτο που περιέχεται στο μέσο (0.75 g/l NaNO₃), εξαντλείται περίπου τη δέκατη μέρα της καλλιέργειας (τα στοιχεία δεν παρουσιάζονται). Η έλλειψή του αποτελεί αιτία της συγκεκριμένης πορείας στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών, καθώς η σύνθεσή τους απαιτεί επάρκεια αζώτου. Καμία από τις πολιτικές φωτός δεν απέδωσε μεγάλες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών στα κύτταρα του στελέχους, με τη μέγιστη τιμή να επιτυγχάνεται στο Πείραμα 2 (κόκκινο φως) 0.73 g/l. Από το Σχήμα 3c γίνεται φανερό ότι η χρήση μπλε φωτός συνδυαστικά με λευκό συντέλεσε στην συσσώρευση μεγάλων συγκεντρώσεων λιπιδίων, με αποτέλεσμα να καταγραφεί η μέγιστη τιμή

τους τη δέκατη όγδοη ημέρα καλλιέργειας (1.43 g/l). Η συμπεριφορά αυτή είναι σύμφωνη με αποτελέσματα παρόμοιων μελετών σε άλλα στελέχη και μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι το μπλε φως επιδρά στο μεταβολικό μονοπάτι δημιουργίας λιπαρών οξέων, μέσω της διέγερσης συγκεκριμένων ενζύμων^[6]. Αναφορικά με τους υδατάνθρακες όπως παρατηρείται στο Σχήμα 3, η πορεία τους σε όλες τις πολιτικές φωτός ακολουθεί το ίδιο προφίλ και παραμένει αυξητική, ακολουθώντας την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας, με τη μεγαλύτερή τους τιμή να καταγράφεται στο Πείραμα 1 την τελευταία ημέρα καλλιέργειας (1.17 g/l).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ενίσχυση του ορατού φάσματος επιλεκτικά με μπλε ή κόκκινο φως μπορεί να καταστεί ωφέλιμη για την αποδοτικότερη παραγωγή λιπιδίων και υπό όρους και πρωτεϊνών από το στέλεχος *Stichococcus* sp. Η χρήση αποκλειστικά λευκού φωτός εφαρμοσμένο με κατάλληλα επιλεγμένες συνθήκες κρίνεται η βέλτιστη πολιτική για την αποτελεσματική ανάπτυξη της καλλιέργειας και την ενίσχυση του κυτταρικού περιεχομένου σε υδατάνθρακες, η συγκέντρωση των οποίων φαίνεται να επηρεάζεται άμεσα από αυτήν της βιομάζας. Η χρήση κόκκινου φωτός απέδωσε την μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεϊνών, η οποία όμως παρουσιάζει πτωτική πορεία μετά την εξάντληση του θρεπτικού μέσου σε άζωτο. Η εναλλαγή από μπλε σε κόκκινο φως στη μέση της εκθετικής φάσης ανάπτυξης της καλλιέργειας δεν ευνόησε ούτε την ενίσχυση κάποιου εκ των κυτταρικών προϊόντων ούτε τη συνολική πορεία της βιομάζας. Συμπερασματικά, το μπλε φως κρίνεται το πλέον αποτελεσματικό για τη συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων λιπιδίων στα κύτταρα του στελέχους *Stichococcus* sp., σε ποσοστά ίσα και μεγαλύτερα από το 45% κ.β. ξηρής βιομάζας του. Το στοιχείο αυτό δίνει έναυσμα για περαιτέρω μελέτη της δυνατότητας του στελέχους να αποδώσει μεγαλύτερη συγκέντρωση λιπιδίων, σε μια καλλιέργεια δυο φάσεων (two-stage cultivation) που στόχο θα έχει την ενίσχυση της συνολικής βιομάζας με χρήση λευκού φωτός και στην συνέχεια την εντατικοποίηση της παραγωγής λιπιδίων με μπλε φως, με απώτερο στόχο την εκμετάλλευση των λιπαρών οξέων για την παραγωγή βιοντίζελ.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Οι συγγραφείς εκφράζουν θερμές ευχαριστίες προς το Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας της Σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου της Κρήτης για την ευγενική προσφορά του στελέχους που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] A. P. Carvalho, S. O. Silva, J. M. Baptista, F. X. Malcata. *Appl Microbiol Biotechnol.* 89 (2011) 1275–1288.
- [2] M. Ooms, C. Dinh, E. Sargent, D. Sinton. *Nat Commun.* 7 (2016) 12699.
- [3] C.-Y. Wang, C.-C. Fu, Y.-C. Liu. *Biochem Eng J.* 37 (2007) 21–25.
- [4] P. Schulze, L. Barreira, H. Pereira, J. Perales, J. Varela. *Trends Biotechnol.* 32 (2014) 422-430.
- [5] C. Teo, M. Atta, A. Bukhari, M. Taisir, A. Yusuf, A. Idris. *Bioresour. Technol.* 162 (2014) 38-44.
- [6] G. Ruyters. *Effects of Blue Light on Enzymes* (1984) 283–301.
- [7] D. Kim, C. Lee, S. Park, Y. Choi. *Bioresour. Technol.* 159 (2014) 240-248.
- [8] A. Kommareddy, G. Anderson. In *ASAE International Meeting*. ASAE. 034057 (2003).
- [9] A. Karapatsia, G. Penloglou, C. Chatzidoukas, C. Kiparissides. *Biomass Bioenergy* 89 (2016) 123-132.
- [10] J.A. Gerde, T. Wang, L. Yao, S. Jung, L.A. Johnson, B. Iamsal. *Algal Research.* 2 (2013) 145-153.
- [11] J. Folch, M. Lees, S.H. Stanley. *J Biol Chem.* 226 (1957) 497-509.
- [12] G. Kochert, Cambridge University Press. (1978) 95-97.
- [13] Y. Collos, F. Mornet, A. Sciandra, N. Waser, A. Larson, P.J. Harrison. *J Appl Phycol.* 11(1999) 179–184.