

**Πρόγραμμα:** Απομόνωση και καλλιέργεια τοπικών ειδών φυτοπλαγκτού για διερεύνηση δυνατοτήτων παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών, λιπαρών οξέων, χρωστικών και αντιοξειδωτικών (MIS 5048496).

**Ακρωνύμιο:** ALGAVISION (Επιστ. Υπεύθυνος, Παύλος Μακρίδης, αναπλ. καθηγητής)

**Ειδικές Δράσεις:** «Υδατοκαλλιέργειες»

Σύμπραξη εργαστηρίων Παν. Πατρών:

1. Καλλιέργειας Πλαγκτού (Τμ. Ζωικής Παραγωγής, Αλιείας & Υδατοκαλλιεργειών),

2. Ζωολογίας (Τμ. Βιολογίας),

3. Βιοχημικής Μηχανικής και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος (Τμ. Χημικών Μηχανικών).

**Επιστημονικός Υπεύθυνος Τμ. Ζωικής Παραγωγής, Αλιείας & Υδατοκαλλιεργειών:**  
Γεώργιος Χώτος, καθηγητής

#### Ερευνητική ομάδα

Γεώργιος Χώτος, καθηγητής

Δέσποινα Αβραμίδου, ΕΤΕΠ

Αθηνά Σαμαρά, ΕΤΕΠ

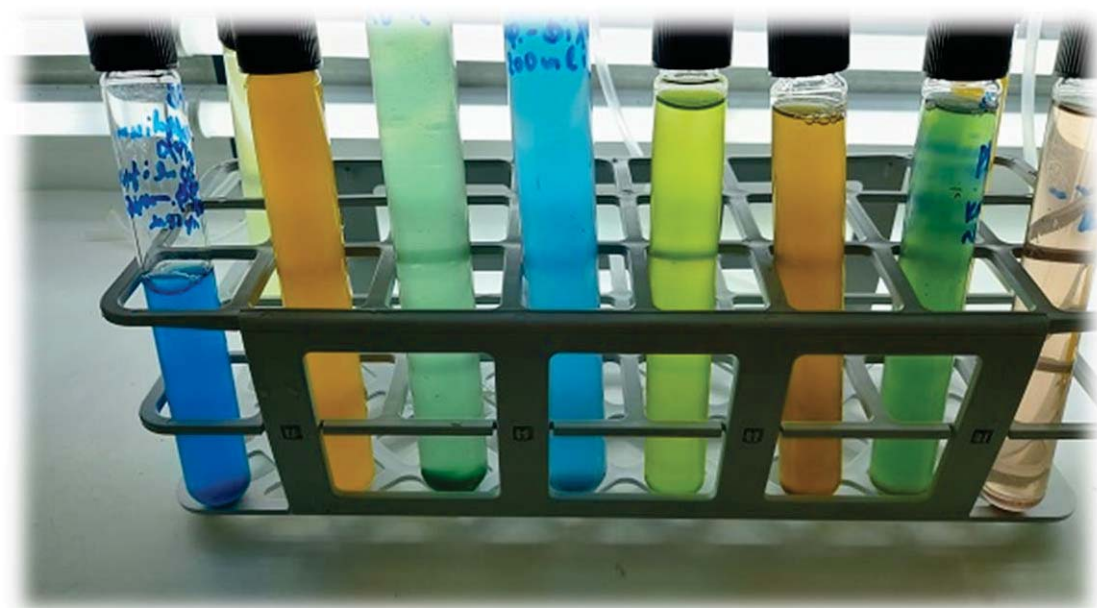
Ιωάννης Κλαδάς, καθηγητής

Σαββούλα Κολυροπούλου, γεωπόνος επί συμβάσει

Θεόδωρος Αντωνιάδης, ιχθυολόγος ΤΕ, Μηχανολόγος ΤΕ, επί συμβάσει

### **Παραδοτέο ενότητα εργασίας 3. Βελτιστοποίηση βιοδραστικών ουσιών. 3.2.-παραγωγή χρωστικών - αντιοξειδωτικών ουσιών - Εκθεση αποτελεσμάτων**

Συντάκτης: Γεώργιος Χώτος, καθηγητής  
Μεσολόγγι, Απρίλιος 2023



## Περιεχόμενα

### Βελτιστοποίηση βιοδραστικών ουσιών, χρωστικές-αντιοξειδωτικά

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	1
Συνοπτική παρουσίαση των φωτοσυνθετικών χρωστικών .....	2
Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές .....	9
Χλωροφύλλες .....	10
Καροτενοειδή .....	12
Σύμπλοκα πρωτεϊνών με χλωροφύλλες/καροτενοειδή .....	14
Βιλιπρωτεΐνες .....	16
Η χρησιμότητα των χρωστικών .....	19
Γενική θεώρηση των πειραματισμών στη βελτιστοποίηση παραγωγής χρωστικών .....	21
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	23
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	28
<i>Amphidinium carterae</i> .....	28
<i>Nephroselmis</i> sp. ....	31
<i>Anabaena</i> sp. Η επίδραση του λευκού φωτός .....	33
<i>Anabaena</i> sp. Η επίδραση τριών χρωμάτων φωτός .....	35
<i>Dunaliella</i> sp. Η επίδραση του λευκού φωτός.....	39
<i>Dunaliella</i> sp. Η επίδραση τριών χρωμάτων φωτός.....	43
<i>Phormidium</i> sp. Η επίδραση του λευκού φωτός .....	47
<i>Phormidium</i> sp. Η επίδραση τριών χρωμάτων φωτός....	51
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	54
<b>ΟΙΚΕΙΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	56

## Βελτιστοποίηση παραγωγής βιοδραστικών ουσιών- χρωστικές-αντιοξειδωτικά

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις μέρες μας το καταναλωτικό κοινό ενδιαφέρεται πολύ για την υγιεινή διατροφή και την ασφάλεια των τροφίμων προτιμώντας φυσικά, καθαρά και θρεπτικά προϊόντα. Αυτή η τάση έχει υποχρεώσει τους παραγωγούς τροφίμων να επιδιώκουν βιομηχανικώς την παραγωγή φυσικών προϊόντων υψηλής αξίας. Μεταξύ των σημαντικών προϊόντων περιλαμβάνονται και οι βιολογικές χρωστικές η μεγάλη ζήτηση των οποίων έχει οδηγήσει τη βιομηχανία σε τεχνικές παραγωγής των εκτός του κυττάρου μέσω μια χημικής διαδικασίας η οποία εγκυμονεί και ορισμένους κινδύνους τοξικότητας λόγω ακριβώς της τεχνητής παρασκευής των.

Αντίθετα από τις συνθετικές χρωστικές, οι αντίστοιχες φυσικές δεν είναι τοξικές ούτε προκαλούν παρενέργειες στον άνθρωπο, μάλιστα ενισχύουν τα διατροφικά οφέλη. Οι χρωστικές από τα μικροφύκη παρουσιάζονται πολύ ευεργετικές και η κατανάλωσή τους αυξάνεται συνεχώς με πρόβλεψη παγκόσμια αξία το 2025 στα 453 εκατομμύρια δολάρια. Συνεπώς η αγορά για προϊόντα μικροφυκών θα ενισχύει όλο και περισσότερο μια σχετική επιχείρηση μεγάλης κλίμακας.

Τα μικροφύκη είναι ευρέως γνωστό ότι αποτελούν σημαντική πηγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας (πρωτεΐνες, λιπίδια, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα-PUFAs, πολυσακχαρίτες, βιταμίνες, μέταλλα και χρωστικές), τα οποία είναι υψίστης σημασίας για την υγεία και ευζωία όχι μόνο του ανθρώπου αλλά και των εκτρεφόμενων ζώων. Τα ευκαρυωτικά μικροφύκη μαζί με τα προκαρυωτικά κυανοβακτήρια, μέσω της φωτοσύνθεσης μετατρέπουν τη φωτεινή ενέργεια σε χημική. Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα επιτελείται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές οι οποίες διακρίνονται γενικώς σε τρεις κατηγορίες, τις χλωροφύλλες (περί τα 0.1-0.2 % του ξηρού βάρους του κυττάρου- $\Xi$ B), τα καροτενοειδή (0.1-0.2 % του  $\Xi$ B ή και ακόμα 14 % σε ορισμένα είδη) και τις φυκοβιλιπρωτεΐνες -PBP (περί το 8% του  $\Xi$ B). Συγκρινόμενες με άλλες χρωστικές προερχόμενες από φρούτα, βλαστούς, φύλλα ή και ζώα οι φυκικές χρωστικές διαθέτουν καλύτερες αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην υγεία καθώς και μεγάλη δυνατότητα πρόσδωσης χρωματικής απόχρωσης, απολύτως αφαλούς, στα τρόφιμα. Τα μικροφύκη μπορούν να καλλιεργηθούν σε βιομηχανική κλίμακα με φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο, μη περιοριζόμενα πρακτικώς από εποχιακότητα και κλιματικές συνθήκες. Το γεγονός ότι δεν χρειάζονται καλλιεργήσιμη γη, έχουν γρήγορο ρυθμό αύξησης και υψηλή περιεκτικότητα σε χρωστικές, καθιστά τα μικροφύκη την πλέον υποσχόμενη πηγή χρωστικών ουσιών.

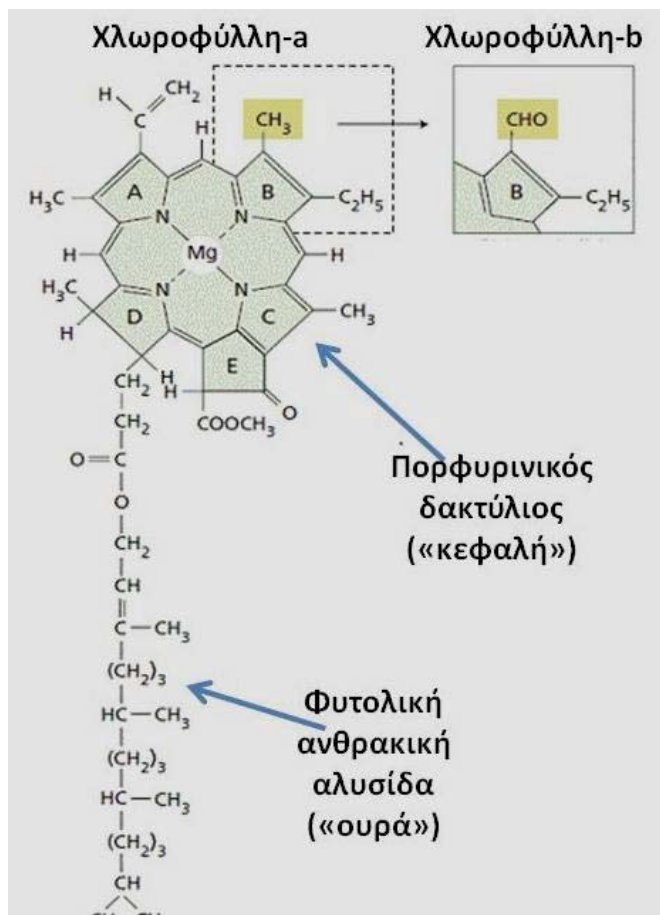
Σήμερα υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον μεγιστοποίησης του περιεχομένου των χρωστικών στα μικροφύκη διερευνώντας πρωτόκολλα καλλιέργειας μικροφυκών. Ορισμένες ενεργές χρωστικές, συμπεριλαμβανομένων των φυκοβιλιπρωτεϊνών (PBP) όπως η φυκοκυανίνη (μπλε χρωστική που εκχυλίζεται από κυανοβακτήρια του γένους «σπιρουλίνα»), ασταξανθίνη (κίτρινη προς κόκκινη χρωστική ουσία που εκχυλίζεται από χλωροφύκη του γένους *Haematococcus*) και η  $\beta$ -καροτίνη (πορτοκαλοκόκκινη χρωστική που εκχυλίζεται από χλωροφύκη του γένους *Dunaliella*) έχουν κλιμακωθεί στη βιομηχανική παραγωγή και χρησιμοποιούνται ευρέως σε τρόφιμα, φαρμακευτικά, υδατοκαλλιέργειες,

καλλυντικών και διάφορες άλλες βιομηχανικές εφαρμογές. Στα μικροφύκη, οι χρωστικές συντίθενται κατά τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης ή σε συνθήκες στρες και διάφοροι βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες σε αυτή τη διαδικασία μπορούν να επηρεάσουν την τελική ποσότητα και ποιότητα των χρωστικών.

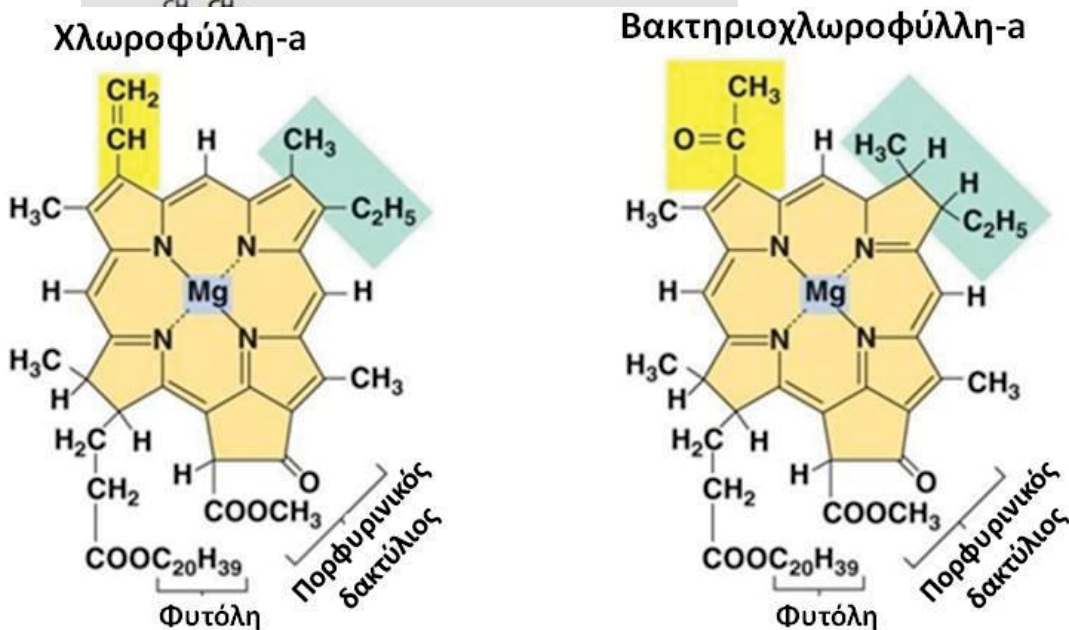
## Συνοπτική παρουσίαση των φωτοσυνθετικών χρωστικών

Για να γίνει η **φωτοσύνθεση** στα φυτά, τα φύκη, τα κυανοβακτήρια και σε ορισμένα φωτοσυνθετικά βακτηρίδια πρέπει να δεσμευτεί η ενέργεια του φωτός. Αυτό επιτυγχάνεται με τις **φωτοσυνθετικές χρωστικές** που είναι ειδικά μεγάλα μόρια που βρίσκονται είτε στις εσωτερικές μεμβράνες (θυλακοειδή) των χλωροπλαστών που διαθέτουν στα κύτταρά τους τα φυτά και τα ευκαρυωτικά φύκη, είτε σε ειδικές μεμβράνες στο κύτταρό τους (και αυτές θυλακοειδή ονομάζονται) στους προκαρυωτικούς οργανισμούς (κυανοβακτήρια και άλλα βακτήρια).

Οι πιο σημαντικές χρωστικές είναι οι **χλωροφύλλες** (χλωροφύλλη-a, -b, -c & -d). Το μόριο των χλωροφυλλών (Σχήμα 1) είναι πολύπλοκο με ένα μεγάλο δακτύλιο πορφυρίνης σαν "κεφαλή" και μια μακρά αλυσίδα υδρογονάνθρακα (φυτόλιο) σαν "ουρά". Όλες οι χλωροφύλλες (και οι βακτηριοχλωροφύλλες στα βακτήρια που επιτελούν ανοξυγονογενή φωτοσύνθεση-Σχήμα 2) σε κεντρική θέση του δακτυλίου της πορφυρίνης έχουν ένα άτομο **μαγνησίου** (Mg). Από τις διάφορες μορφές χλωροφύλλης (-a, -b, -c & -d) οι οποίες απαντώνται όλες ή μερικές από αυτές στους φωτοσυνθέτες (ανάλογα με το είδος του οργανισμού), πρέπει να επισημανθεί ότι η **χλωροφύλλη-a** υπάρχει οπωσδήποτε σε όλους. Αυτή η μορφή της χλωροφύλλης είναι που επιτελεί τη βασική διεργασία της δέσμευσης της ενέργειας του φωτός ενώ οι άλλες, μαζί και με άλλες χρωστικές που θα αναφερθούν παρακάτω (καροτενοειδή, βιλιπρωτεΐνες) βοηθούν τη χλωροφύλλη-a στο έργο της που είναι να δεσμεύσει τα φωτόνια, να διεγερθεί, να διασπάσει το νερό σε αέριο οξυγόνο (O<sub>2</sub>) και πρωτόνια (H<sup>+</sup>), να στείλει ηλεκτρόνιά της σε ανώτερο ενεργειακό επίπεδο και από εκεί και πέρα να γίνουν διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις (δεν είναι του παρόντος) που θα καταλήξουν στη βάση της ζωής, δηλαδή τη δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) στον κύκλο των αντιδράσεων που καταλήγουν στην παραγωγή γλυκόζης με την κατανάλωση της οποίας τρέφεται κάθε έμβιο ον στη Γη στα μέρη του κυττάρου όπου βρίσκονται οι χλωροφύλλες υπάρχουν και άλλες φωτοσυνθετικές χρωστικές τα **καροτενοειδή** (Σχήμα 3). Τα καροτενοειδή που παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες τα **καρωτένια** και τις **ξανθοφύλλες**. Εκτός από τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή στα **κυανοβακτήρια** και σε ορισμένα ευκαρυωτικά φύκη (ροδοφύκη και κρυπτοφύκη) υπάρχουν και άλλες ιδιαίτερες φωτοσυνθετικές χρωστικές οι **φυκοβιλίνες** ή ορθότερα **βιλιπρωτεΐνες** (**φυκοκυανίνη**, **φυκοερυθρίνη**, **αλλοφυκοκυανίνη**) (Σχήμα 4) οι οποίες βρίσκονται μεν κοντά στις χλωροφύλλες αλλά είναι ομαδοποιημένες σε ειδικούς σχηματισμούς που μοιάζουν με "βεντάλια" (Σχήμα 16).

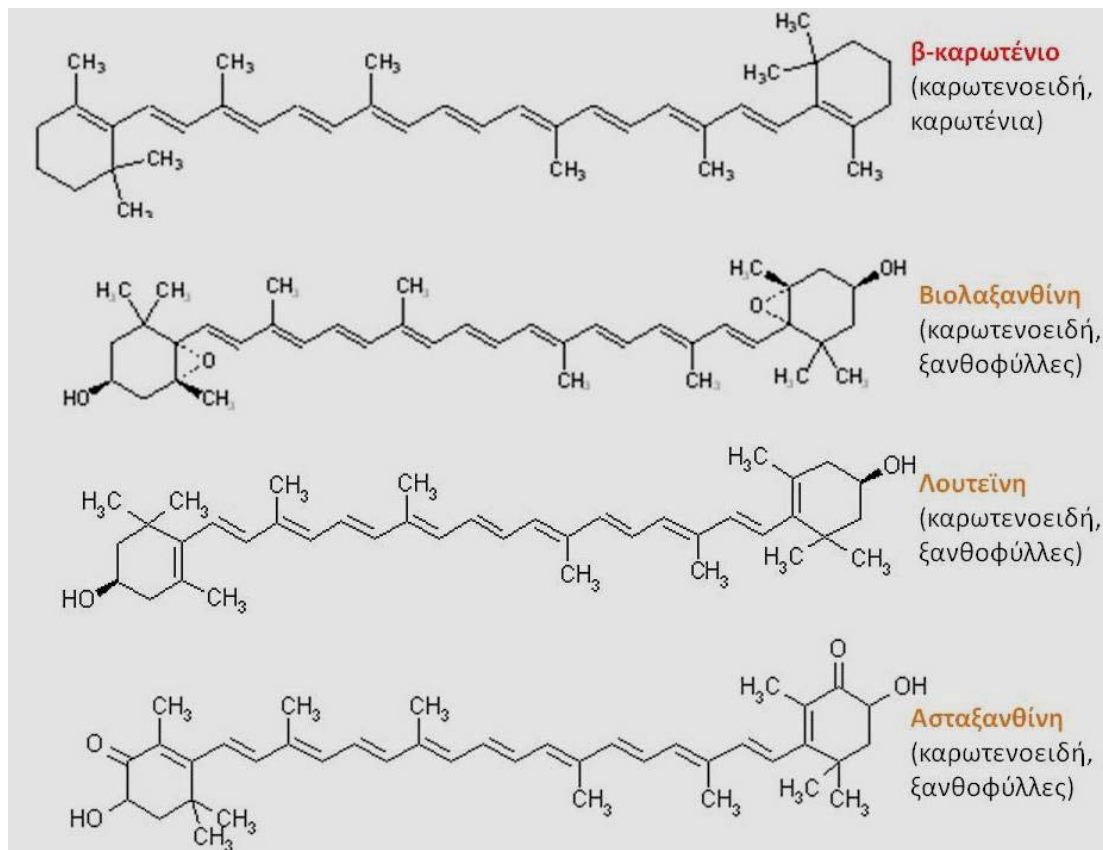


**Σχήμα 1.** Απεικόνιση του μορίου της χλωροφύλλης-a και της χλωροφύλλης-b για να φανεί ότι διαφέρουν μόνο ελαφρά στο μόριό τους. Η χλωροφύλλη-a έχει μια μεθυλομάδα ( $\text{CH}_3$ ) στη θέση που υποδεικνύεται αριστερά ενώ η χλωροφύλλη-b στη θέση της μεθυλομάδας έχει μια αλδεϋδομάδα ( $\text{CHO}$ ). Κατά τα άλλα το μόριο των δύο χλωροφυλλών είναι ίδιο με ένα άτομο μαγνησίου ( $\text{Mg}$ ) σε κεντρική θέση του πορφυρινικού δακτυλίου και μια μακρά ανθρακική φυτολική αλυσίδα σαν "ουρά".



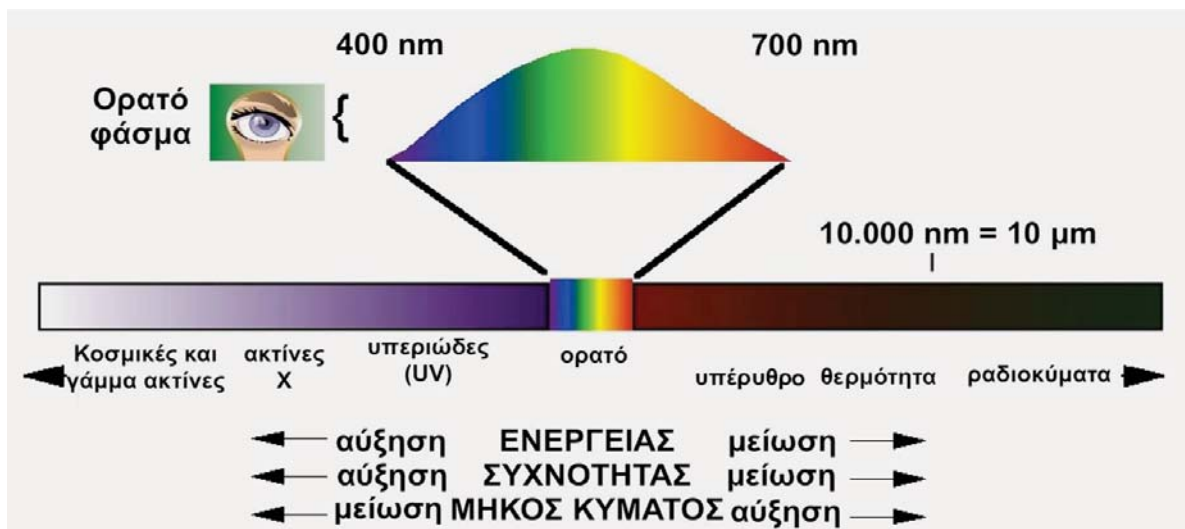
**Σχήμα 2.** Απεικόνιση του μορίου της χλωροφύλλης-a (αριστερά) που υπάρχει σε όλους τους οξυγονογενείς φωτοσυνθετικούς οργανισμούς (ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς που παράγουν οξυγόνο κατά τη φωτοσύνθεση) και της βακτηριοχλωροφύλλης-a (δεξιά) η οποία απαντάται μόνο στα ανοξυγονογενή φωτοσυνθετικά βακτήρια. Πηγή: <https://www.slideserve.com/elmo/metabolic-diversity-phototrophy-autotrophy-chemolithotrophy-and-nitrogen-fixation>

Πριν προχωρήσουμε να διευκρινιστούν 2 βασικά πράγματα. Πρώτον, οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή είναι κατά βάση λιποδιαλυτά μόρια ενώ οι φυκοβιλίνες υδατοδιαλυτά. Δεύτερον, καρωτένια και ξανθοφύλλες είναι σχεδόν πανομοιότυπα μόρια και διαφέρουν μόνο στο ότι οι ξανθοφύλλες έχουν και κάποια άτομα οξυγόνου στο μόριό τους ενώ τα καρωτένια καθόλου.

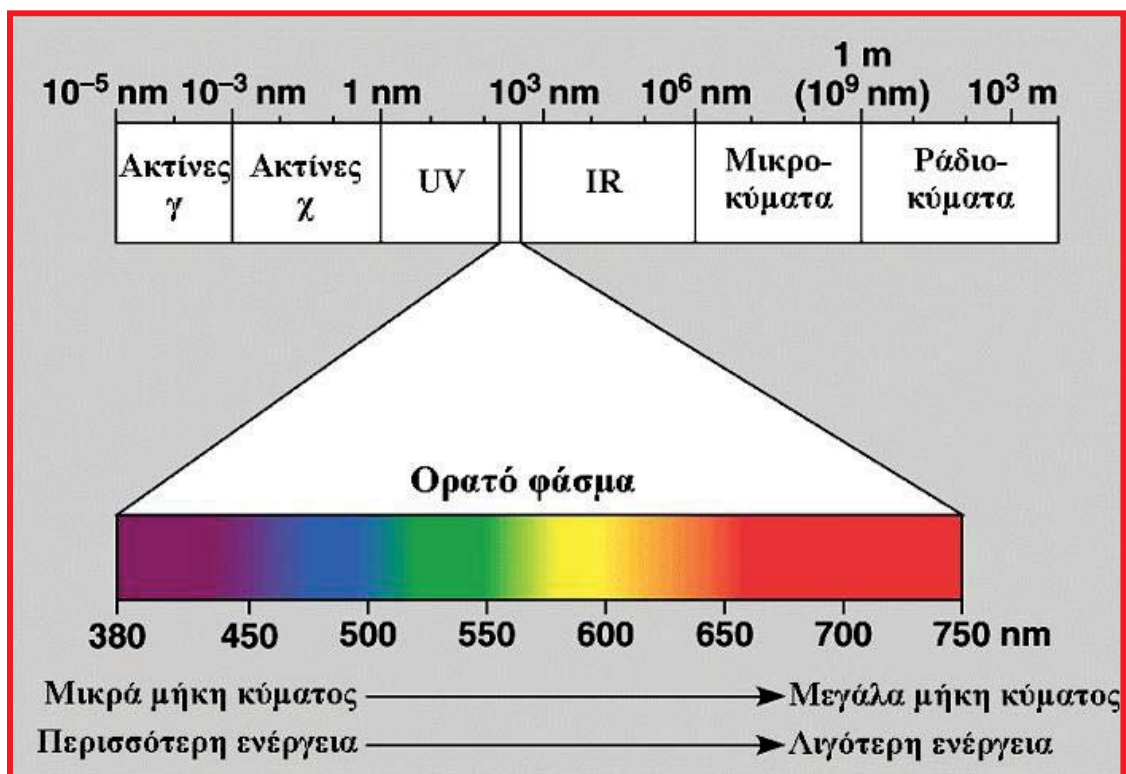


**Σχήμα 3.** Χαρακτηριστικές επικουρικές χρωστικές στα φωτοσυνθετικά φυτά και φύκη. Πρόκειται για τις χρωστικές που ανήκουν στην κατηγορία των καροτενοειδών και διακρίνονται σε καρωτένια (π.χ. β-καροτένιο ή β-καροτίνιο) και ξανθοφύλλες (π.χ. βιολαξανθίνη, λουτεΐνη, ασταξανθίνη). Όλα τα μόρια είναι σχεδόν πανομοιότυπα και αυτό που τα ξεχωρίζει είναι ότι τα καρωτένια αποτελούνται μόνο από άνθρακα (C) και υδρογόνο (H), ενώ οι ξανθοφύλλες περιέχουν και λίγα άτομα οξυγόνου (O).





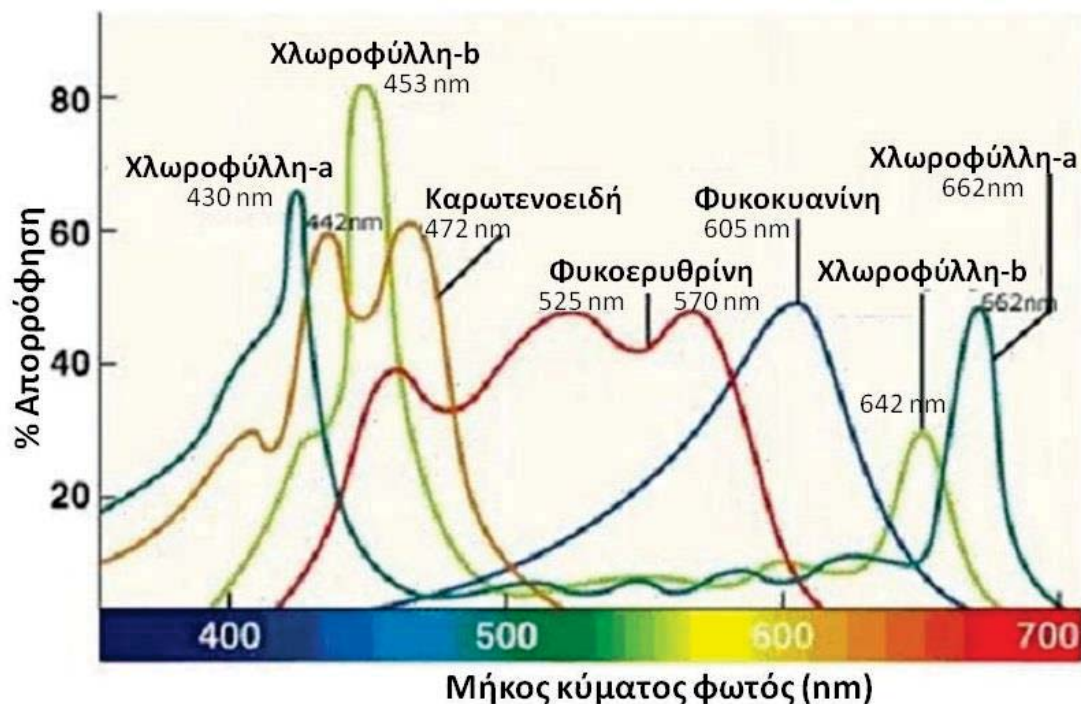
**Σχήμα 6.** Απεικόνιση του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που εκπέμπει ο Ήλιος (δεν εκπέμπει μόνο ορατό φως όπως απλοϊκά πιστεύεται) και της οποίας μικρό μόνο μέρος αποτελεί το ορατό μέρος του φάσματος.



**Σχήμα 7.** Επικέντρωση από το Σχήμα 6 στην περιοχή του φάσματος που αποτελεί το ορατό φως με τα μήκη κύματος που αντιστοιχούν στα διάφορα χρώματα. Χαρακτηριστική η βαθμιαία μετάβαση από το ένα χρώμα στο άλλο (ιώδες-μπλε-πράσινο-κίτρινο-πορτοκαλί-κόκκινο). Τα μικρά μήκη κύματος διαθέτουν περισσότερη ενέργεια από τα μεγαλύτερα.



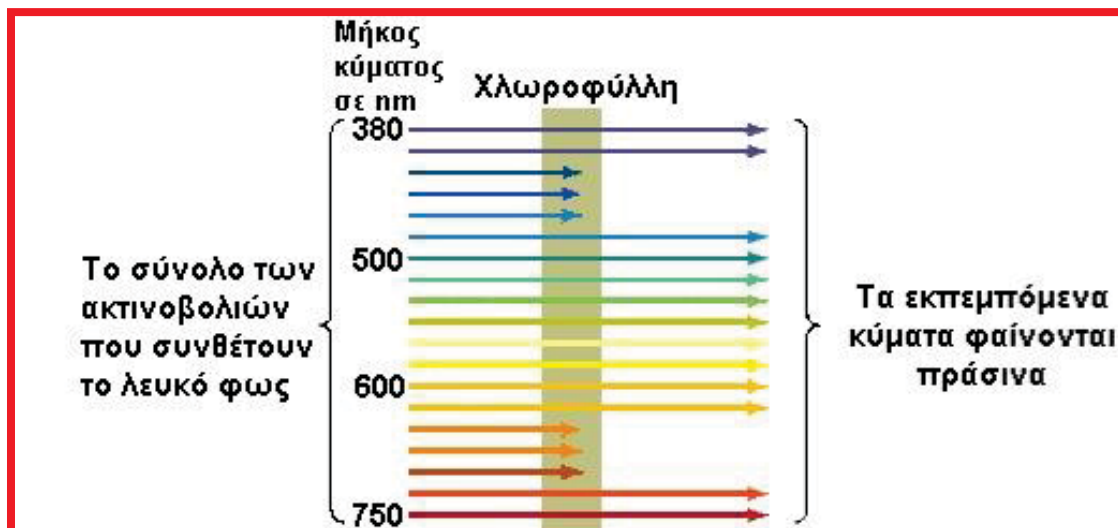
Το **ορατό φως** που λούζει τη Γη δεν αποτελεί παρά μέρος μόνο του φάσματος της **ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας** που εκπέμπει ο Ήλιος (Σχήματα 6 & 7). Τα φωτόνια του ορατού φάσματος χρησιμοποιούνται στη φωτοσύνθεση και αυτά γενικώς ανήκουν στο εύρος του φάσματος που περικλείεται μεταξύ 400 και 700 nm. Στην περιοχή των 400-500 nm περίπου είναι οι **μπλε** ακτινοβολίες και στην περιοχή 630-700 nm οι **κόκκινες**. Σε αυτές τις περιοχές και με μέγιστο απορρόφησης στα ~430 nm και ~662 nm είναι που η χλωροφύλλη-α εργάζεται αποδοτικά απορροφώντας την ενέργεια των φωτονίων. Το υπόλοιπο μέρος του φάσματος ~440-670 nm (πράσινο-κίτρινο-πορτοκαλί) παρόλο που και αυτό λούζει τη Γη με φωτόνια θα πήγαινε άχρηστο για τη φωτοσύνθεση αν δεν υπήρχαν οι επικουρικές χρωστικές να το δεσμεύουν και να μεταφέρουν την ενέργεια των φωτονίων του στη χλωροφύλλη-α (Σχήμα 8). Οι επικουρικές χρωστικές (χλωροφύλλες, -b, -c, -d, καροτενοειδή, βιλιπρωτεΐνες) έχουν μέγιστα απορρόφησης σε αυτή την περιοχή του φάσματος (440-650 nm) και δρουν σαν "κεραίες" ή σαν ένα ενεργειακό "χωνί" που όση ενέργεια πέφτει στη "χοάνη" του την οδηγούν στο ενεργό κέντρο όπου βρίσκεται η χλωροφύλλη-α για να μπορέσει διεγερόμενη να κάνει αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω.



**Σχήμα 8.** Οι χαρακτηριστικές καμπύλες των φασμάτων απορρόφησης για τις διάφορες χρωστικές (χλωροφύλλες-καροτενοειδή-βιλιπρωτεΐνες) των φωτοσυνθετικών οργανισμών. Φαίνονται χαρακτηριστικά οι κορυφές (peaks) στην απορρόφηση του φωτός για την κάθε χρωστική εκεί δηλαδή που απορροφούν με τον αποτελεσματικότερο τρόπο φωτόνια.

Όλα τα φυσικά σώματα έχουν το χαρακτηριστικό τους χρώμα. Αυτό που αντιλαμβανόμαστε ως χρώμα τους είναι το μέρος εκείνο της φωτεινής ακτινοβολίας το οποίο δεν το απορροφούν αλλά το ανακλούν. Έτσι και τα φύλλα φαίνονται πράσινα επειδή η χλωροφύλλη που τα κατακλύζει απορροφά το μπλε και το κόκκινο μέρος του φάσματος και ανακλά το πρασινο-κίτρινο-πορτοκαλί το οποίο αντιλαμβανόμαστε ως πράσινο (Σχήμα

9). Τα καροτενοειδή βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα που φωτοσυνθέτουν αλλά σε διαφορετικές αναλογίες ανάλογα με το είδος του οργανισμού. Στα φυλλοβόλα δέντρα πριν ρίξουν τα φύλα τους τα καροτενοειδή καλύπτονται από τις χλωροφύλλες και το φύλλωμα φαίνεται πράσινο. Όταν όμως μπαίνει ο χειμώνας και η χλωροφύλλη των φύλλων αποσυντίθεται το φύλλωμα αρχίζει να δείχνει χρώματα κιτρινο-πορτοκαλί καθώς τα καροτενοειδή αποσυντίθενται τελευταία.



**Σχήμα 9.** Φαντασιακή απεικόνιση κατά την οποία στη δέσμη του λευκού φωτός που το αποτελούν όλα τα μήκη κύματος όλων των χρωμάτων του ορατού φωτός παρεμβάλλουμε ένα διάλυμα χλωροφύλλης. Το φως που θα εξέλθει από τη στήλη της χλωροφύλλης θα φαίνεται πράσινο επειδή τα χρώματα που δεν απορροφά η χλωροφύλλη συνθέτουν το "πράσινο". Από τη φωτογραφία δεν πρέπει να βγάλουμε λανθασμένα συμπεράσματα, οι δύο μπλε γραμμές που εξέρχονται στην περιοχή των 380-400 nm και οι δύο ερυθρόχρωμες στα 730-750 nm, αποτελούν μέρος του υπεριώδους και υπέρυθρου φάσματος αντίστοιχα και δεν είναι ορατές, συνεπώς δεν συμβάλλουν στην θέαση του "πράσινου" που δημιουργούν οι γραμμές που εξέρχονται στο εύρος ~480-620 (ανοικτό μπλε - λαχανί - ανοικτό πράσινο - κίτρινο - ανοικτό πορτοκαλί) ο συνδυασμός των οποίων δημιουργεί γενικώς το πράσινο χρώμα των χλωροφυλλούχων φυτών.

Τα τελευταία χρόνια ο ρόλος των καροτενοειδών για την υγεία του ανθρώπου έχει εκτιμηθεί πολύ διότι δρουν ως **αντιοξειδωτικά**, δηλαδή εξουδετερώνουν τις βλαβερές ελεύθερες ρίζες που είναι τοξικές για τον οργανισμό. Ετσι η βιομηχανία (Σχήμα 10) έχει στραφεί διεθνώς στην καλλιέργεια φυτών αλλά πολύ περισσότερο φυκών που περιέχουν στα κύτταρά τους μεγάλες ποσότητες καροτενοειδών. Το πιο γνωστό καροτενοειδές είναι το **β-καροτένιο** που βρίσκεται ως γνωστόν στα καρότα και το οποίο μετατρέπεται στον οργανισμό των ζώων που θα το καταναλώσουν σε βιταμίνη Α. Υπάρχουν και μικροφύκη όπως το χλωροφύκος *Dunaliella salina* το οποίο αντέχει σε πολύ υψηλές αλατότητες και μάλιστα σε αυτές συσσωρεύει τόσο πολύ β-καροτένιο που από πράσινο το κύτταρό του γίνεται κόκκινο. Η βιομηχανία καλλιεργεί τη *Dunaliella salina* για να παράγει β-καροτένιο (αξίας > 12.000 ευρώ/kg) το οποίο θα χρησιμοποιηθεί σε σκευάσματα. Υπάρχουν και άλλα

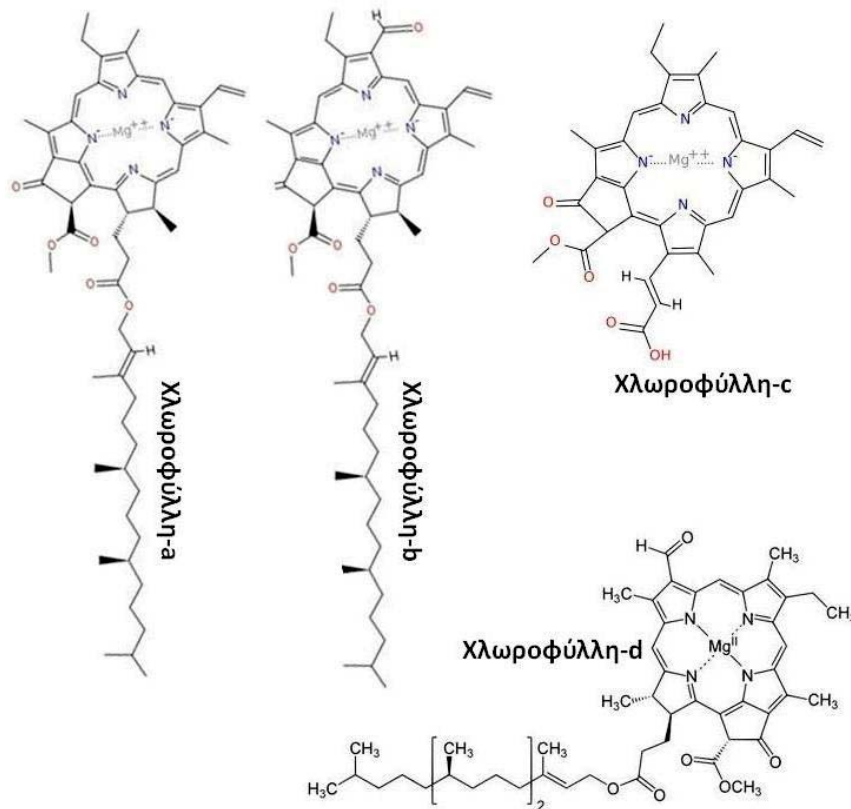
καροτενοειδή με αντιοξειδωτική δράση όπως το λυκοπένιο (τομάτες), η λουτεΐνη, η βιολαξανθίνη, η **ασταξανθίνη** (από το φύκος *Haematococcus*) που αποτελούν αντικείμενο παραγωγής (την πρωτιά όμως κατέχουν τα πανάκριβα β-καροτένιο και ασταξανθίνη). Εξίσου ισχυρή αντιοξειδωτική δράση με τα καροτενοειδή έχουν και οι φυκοβιλίνες χρωστικές των κυανοβακτηρίων και μάλιστα απορροφούν τόσο αποτελεσματικά στο φάσμα εκείνο του φωτός (πρασino-κιτρινο-πορτοκαλί) που καμιά άλλη χρωστική δεν μπορεί να απορροφήσει με αποτέλεσμα τα κυανοβακτήρια να αναπτύσσονται ταχύτατα στα νερά ξεπερνώντας σε πληθυσμό τα υπόλοιπα φύκη. Ακριβώς αυτές οι φυκοβιλιπρωτεΐνες (**φυκοερυθρίνη** και **φυκοκυανίνη**) είναι που προσδίδουν ενίοτε και ανάλογα με το ποια επικρατεί στο κύτταρό τους το χαρακτηριστικό πρασινο-μπλε χρώμα τους και γι' αυτό άλλωστε τα κυανοβακτήρια ονομάζονται και γαλαζο-πράσινα φύκη (blue-green algae). Σήμερα το κυανοβακτήριο **σπιρουλίνα** καλλιεργείται εντατικώς ανά τον κόσμο και εκτός από εξαιρετική ειδική και υγιεινή τροφή για τον άνθρωπο (πρωτεΐνες-πολυακόρεστα λιπαρά-βιταμίνες) είναι και εξαιρετική πηγή φυκοκυανίνης και φυκοερυθρίνης που είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά (και επίσης σαν το β-καροτένιο, πολύ ακριβά).



**Σχήμα 10.** Ειδικά προϊόντα υγιεινών τροφών με αντιοξειδωτικές ουσίες οι οποίες δεν είναι τίποτε άλλο παρά η καθαρή μορφή φωτοσυνθετικών χρωστικών (καροτενοειδή και φυκοβιλιπρωτεΐνες) που εξήχθησαν από καλλιεργούμενα φύκη (ευκαρυωτικά και κυανοβακτήρια).

### Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές

Τα μόρια που συλλέγουν την ενέργεια του φωτός που διαχέεται στο νερό είναι οι ήδη αναφερθείσες φωτοσυνθετικές χρωστικές η δομή των οποίων τα καθιστά ικανά να απορροφούν αποτελεσματικά το φως στα μήκη κύματος 400-700 nm (ορατό φως). Από τις 3 κατηγορίες των χρωστικών αυτών οι μεν δύο (χλωροφύλλες και καροτενοειδή) υπάρχουν σε όλες τις κατηγορίες των φυκών (ευκαρυωτικών και κυανοβακτηρίων) ενώ η τρίτη (βιλιπρωτεΐνες) υπάρχει μόνο στα κυανοβακτήρια, στα ροδοφύκη και στα κρυπτοφύκη. Ας τις εξετάσουμε ξεχωριστά παρακάτω.



**Σχήμα 11.** Τα μόρια των διάφορων τύπων των χλωροφυλλών. Χαρακτηριστική η "κολοβή" φυτολική αλυσίδα στη χλωροφύλλη-γ.

## Χλωροφύλλες

Οι χλωροφύλλες (Σχήμα 11) είναι κυκλικές τετραπυρολικές ενώσεις με ένα άτομο μαγνησίου (Mg) να συνδέει χηλικά τους 4 δακτυλιοειδώς διατεταγμένους πυρολικούς δακτυλίους και μια μακρά υδρογονανθρακική (φυτολική) αλυσίδα (σαν "ουρά") συνδεδεμένη στο τετραπυρόλιο (δακτύλιος πορφυρίνης). Από τους 4 διαφορετικούς τύπους χλωροφυλλών (α, β, γ, δ) οι οποίοι διαφέρουν ελαφρά μεταξύ τους λόγω ορισμένων μορίων που αντικαθιστούν άλλα σε χαρακτηριστικές θέσεις της τετραπυρολικής "κεφαλής" του μεγαλομορίου της χλωροφύλλης (Σχήμα 15), η χλωροφύλλη-α απαντάται σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς του πλανήτη, η χλωροφύλλη-δ μόνο σε ορισμένα είδη των ροδοφυκών (και σ' αυτά σε πολύ μικρή ποσότητα) και οι -β και -γ (στην οποία διακρίνονται οι τύποι  $c_1$  και  $c_2$ ) σε διάφορες αναλογίες στα διάφορα είδη των φυκών (Πίνακας 1). Η χλωροφύλλη-α αποτελεί σε όλους τους χλωροφυλλούχους οργανισμούς το μεγαλύτερο ποσοστό από το εκάστοτε συνολικό ποσό των χλωροφυλλών που υπάρχει σε κάθε είδος φύκος και κυμαίνεται σε 0,37 % - 1,8 % επί του ξηρού βάρους του φύκου που αναπτύσσεται στα φυσικά νερά. Σε συνθήκες καλλιέργειας με πλούσια παροχή θρεπτικών (ιδιαίτερα ανόργανου αζώτου) και όχι έντονο φωτισμό, η χλωροφύλλη-α αυξάνεται και αυτή σε ποσοστό ακολουθώντας την αυξημένη περιεκτικότητα συνολικώς σε χλωροφύλλες που επιφέρουν στα φύκη αυτές οι συνθήκες (2-5 % επί του ξηρού βάρους της *Chlorella*, 3,5 % της *Euglena gracilis*). Οι χλωροφύλλες λόγω της κατασκευής του μεγαλομορίου τους παρουσιάζουν ιδιόμορφη διαλυτότητα. Η μεν φυτολική αλυσίδα (ουρά) είναι υδρόφοβη (λιποδιαλυτή) ο δε πορφυρινικός δακτύλιος (κεφαλή) είναι κατά το μεγαλύτερο μέρος του υδρόφοβος όμως ένα τμήμα του (στην περιοχή σύνδεσης με τη φυτόλη) είναι υδρόφιλο. Αυτό το χαρακτηριστικό τους προσδίδει ιδιαίτερη πρόσδεση στη θυλακοειδή μεμβράνη με

το υδρόφοβο μέρος του πορφυρινικού δακτυλίου και την αλυσίδα της φυτόλης προς το υδρόφοβο μέρος της μεμβράνης (εσωτερικό) και το υδρόφιλο τμήμα του πορφυρινικού δακτυλίου προς το επιφανειακό υδρόφιλο τμήμα της μεμβράνης. Όμως μη νομίζει κάποιος ότι τα μόρια της χλωροφύλλης (και των καροτενοειδών επίσης) βρίσκονται χυμένα ή σκορπισμένα μόνο τους στις θυλακοειδείς μεμβράνες. Όπως θα δούμε και παρακάτω οι χρωστικές αυτές δημιουργούν ειδικά σύμπλοκα με πρωτεΐνες και αυτά τα σύμπλοκα με την ειδική γεωμετρία και χωροθέτησή τους επάνω στις θυλακοειδείς μεμβράνες είναι που καθιστούν τις χρωστικές αποτελεσματικούς απορροφητές του φωτός. Συνεπώς το "υδρόφοβον" ή το "υδρόφιλον" χαρακτηριστικό των χρωστικών καθορίζεται, εκφράζεται και τελικώς δίδει την ιδιαίτερη τοποθέτηση των χρωστικών ανάλογα με τη διαμόρφωση του συμπλόκου χρωστικών-πρωτεϊνών. Πάντως κατά γενική θεώρηση οι χλωροφύλλες κατατάσσονται στις υδρόφοβες λιποδιαλυτές ενώσεις και γι αυτό άλλωστε τις εκχυλίζουμε από τα κύτταρα χρησιμοποιώντας για να διαλυθούν μέσα τους οργανικούς διαλύτες (αιθανόλη, ακετόνη κ.ά.).

Από τον Πίνακα 1 αξίζει να επισημανθούν τα εξής:

1. Όλοι οι φωτοσυνθέτες περιέχουν χλωροφύλλη-α.
2. Χλωροφύλλη-β υπάρχει σε όλα τα φυτά, μόνο στα χλωρόφυτα και ευγληνόφυτα από τα ευκαρυωτικά φύκη και από τα κυανοβακτήρια μόνο στην Τάξη *Prochlorales*.
3. Στα φύκη που περιέχουν χλωροφύλλη- $c_1$  θα υπάρχει οπωσδήποτε και χλωροφύλλη- $c_2$ .

Η μοριακή αναλογία χλωροφύλλης-α / χλωροφύλλη-β είναι μεγαλύτερη (~ 3) στα φυτά απ' ότι στα χλωροφύκη (~1 - 2,3) και μικρότερη από την αντίστοιχη στα ευγλενοφύκη (~ 6). Στο κυανοβακτήριο *Prochloron* η αναλογία είναι πολύ μεγάλη (2,6 - 12). Παρόμοιες αναλογίες με την χλωροφύλλη-β παρουσιάζει και η χλωροφύλλη- $c$  όπου υπάρχει.

Η χλωροφύλλη-α απορροφά εντονότερα στη μπλε και ερυθρά περιοχή του φάσματος παρουσιάζοντας μέγιστα απορρόφησης στα 430 και 662 nm αντίστοιχα. Μεταξύ 450 και 650 nm η απορρόφησης της είναι αμελητέα και εκεί βοηθά η χλωροφύλλη-β με μέγιστα απορρόφησης στα 453 και 642 nm (σχεδόν παρομοίως και οι χλωροφύλλες- $c_1$  και  $c_2$ ).

**Πίνακας 1.** Η κατανομή των διαφόρων τύπων της χλωροφύλλης στα αθροίσματα των φυκών (και των φυτών).

Αθροίσματα φωτοσυνθετικών οργανισμών	Χλωροφύλλες			
	a	b	c <sub>1</sub>	c <sub>2</sub>
<b>Φυτά</b>	+	+	-	-
<b>Φύκη (Φύλα)</b>				
Χλωρόφυτα	+	+	-	-
Ευγληνόφυτα	+	+	-	-
Δινόφυτα (Δινομαστιγωτά)	+	-	-	+
Κρυπτόφυτα	+	-	-	+
Ροδόφυτα	+	-	-	-
Απτόφυτα	+	-	+	+
<b>Ετεροκοντόφυτα (Ομοταξίες)</b>				
• Φαιοφύκη (Phaeophyceae)	+	-	+	+
• Χρυσοφύκη (Chrysophyceae)	+	-	+	+
• Ευστιγματοφύκη (Eustigmatophyceae)	+	-	-	-
• Διάτομα (Bacillariophyceae)	+	-	+	+
• Ξανθοφύκη (Xanthophyceae)	+	-	-	-
<b>Κυανοβακτήρια</b>	+	-	-	-
Κυανοβακτήρια μόνο στην Τάξη Prochlorales	+	+	-	-

## Καροτενοειδή

Η κατηγορία των φωτοσυνθετικών χρωστικών που περιλαμβάνονται στην ονομασία καροτενοειδή και βοηθούν στην απορρόφηση του φωτός στη μπλε περιοχή του φάσματος και σε μήκη κύματος πέραν του μεγίστου της χλωροφύλλης-a (434 nm), δηλαδή στην περιοχή 440 - 470 nm, επεκτείνουν τη δυνατότητα της χλωροφύλλης-a να εκμεταλλεύεται ευρύτερο μέρος του ορατού φωτός (βοηθούμενη επίσης και από τις άλλες χλωροφύλλες και τις βιλιπρωτεΐνες).

Από χημική άποψη διαφέρουν πολύ από τις χλωροφύλλες καθώς είναι C<sub>40</sub> ισοπρενοειδείς ενώσεις. Η ικανότητά τους να απορροφούν φως οφείλεται στους πολλούς διπλούς δεσμούς του μορίου τους. Επειδή απορροφούν πολύ όλη σχεδόν τη μπλε περιοχή του φάσματος και λίγο από την πράσινη, το χρώμα τους ποικίλλει σε αποχρώσεις του κιτρινο-πορτοκαλί και κόκκινου.

Πίνακας 2. Σύνοψη των καροτενοειδών χρωστικών που απαντώνται στα φύκη.

Καροτενοειδή	Κυανοβακτήρια	Ροδόφυτα	Κρυπτόφυτα	Δινόφυτα	Ετεροκοντόφυτα (Rhodophyceae)	Απτόφυτα	Ετεροκοντόφυτα (Λιότσια)	Ετεροκοντόφυτα (Xanthophyceae)	Ετεροκοντόφυτα (Eustigmatophyceae)	Ευγληνόφυτα	Χλωρόφυτα	Χλωρόφυτα (Prasinophyceae)	Ετεροκοντόφυτα (Chrysothyceae)
Ασταξανθίνη				δ						π	π		
β-καροτένιο	Κ	Κ	Κ	δ	Κ	Κ	Κ	Κ	Κ	Κ	(Κ)	Κ	Κ
α-καροτένιο		Κ	Κ	δ		δ					Κ	δ	
Κανθαξανθίνη	δ					δ			π	π	δ		
Κρυπτοξανθίνη	δ	δ				δ		δ			δ		π
Διαδινοξανθίνη				δ		δ	Κ	Κ		Κ			
Διατοξανθίνη				δ		δ	Κ	Κ		δ			
Δινοξανθίνη				δ									
Εχινόνη	δ					δ			π		δ		
Φυκοξανθίνη		δ		(Κ)		Κ	Κ						Κ
Ετεροξανθίνη								π		δ			
Λουτεΐνη		Κ			?						Κ	δ	
Λυκοπένιο	δ												
Μυξοξανθοφύλλη	Κ												
Νεοξανθίνη		δ					π	δ		δ	δ	δ	π
Οσκιλαξανθίνη	Κ												
Περιδινίνη				Κ									
Φυτοφλοένιο				δ									
Βιολαξανθίνη		δ							Κ		δ	δ	δ
Ζεαξανθίνη	δ	Κ							δ		Κ	δ	δ

Συμβολισμοί: Κ = κύριο καροτενοειδές, δ = δευτερεύον καροτενοειδές, π = υπάρχει σε ορισμένα είδη, (Κ) = συσσωρευση σε μεγάλες ποσότητες σε ορισμένα είδη.

Στα καροτενοειδή περιλαμβάνονται πάρα πολλές χρωστικές, πολλές περισσότερες από τις 4 χλωροφύλλες, και ανάμεσά τους διακρίνονται δύο ομάδες. Η πρώτη περιλαμβάνει τα 2 καρωτένια, α-καροτένιο και β-καροτένιο (ή καρωτίνη) και η δεύτερη τις δεκάδες ποικίλες ξανθοφύλλες που υπάρχουν στα διάφορα είδη.

Για να μην επικρατεί σύγχυση να ξεκαθαρίσουμε την ονοματολογία. Καροτενοειδή είναι ο γενικός όρος που περιλαμβάνει καρωτένια και ξανθοφύλλες. Καρωτένια σημαίνει α-καροτένιο ή/και β-καροτένιο. Ξανθοφύλλες μόνο τα καροτενοειδή που είναι ξανθοφύλλες. Τα καρωτένια είναι καθαροί υδρογονάνθρακες χωρίς οξυγόνο στο μόριό τους ενώ οι ξανθοφύλλες περιέχουν και οξυγόνο. Όπως και οι χλωροφύλλες τα καροτενοειδή είναι υδρόφοβες ενώσεις διαλυόμενα σε οργανικούς διαλύτες. Τα καρωτένια ειδικά είναι πλήρως λιποδιαλυτά (πλήρως υδροφοβικά). Οι ξανθοφύλλες όμως που έχουν πολικότητα στα άκρα τους (υδροξύλια-OH) παρουσιάζουν και κάποια διαλυτότητα στο νερό έστω και αν το κεντρικό μακρύ μέρος του μορίου τους είναι υδροφοβικό.

Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί περιέχουν μεγάλες αναλογίες καροτενοειδών (Πίνακας 2) στην εκάστοτε συνολική ποσότητα των φωτοσυνθετικών χρωστικών τους. Στα φυτά και στα χλωροφύκη η μοριακή αναλογία καροτενοειδών/χλωροφύλλες είναι περίπου 1/3. Στα άλλα φύκη (που δεν έχουν και βιλιπρωτεΐνες) μπορεί να είναι ακόμα πιο εντυπωσιακή (περισσότερα καροτενοειδή) όπως π.χ. 1/0,5 στο διάτομο *Phaeodactylum*, 1/1,4 στο δινομαστιγωτό *Gymnodinium* και 1/2, 1/0,5 στα φαιοφύκη *Hormosira* και *Laminaria* αντίστοιχα. Ακόμα και στα ροδοφύκη των οποίων η φωτοσύνθεση υποβοηθείται από τις βιλιπρωτεΐνες τους παρουσιάζονται πολλά καροτενοειδή με αναλογίες καροτενοειδών/χλωροφύλλες 1/1 - 1/2,6.

### **Σύμπλοκα πρωτεϊνών με χλωροφύλλες/καροτενοειδή**

Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές δεν είναι απλά ως διακριτά μόρια απλωμένες στις θυλακοειδείς μεμβράνες αλλά συζευγμένες με ειδικές πρωτεΐνες ώστε να σχηματίζουν ειδικά συγκροτήματα-σύμπλοκα. Μόνο υπό αυτή τη μορφή μπορούν να επιτελέσουν τους φωτοσυνθετικούς τους ρόλους. Όλα τα φωτοσυνθετικά σύμπλοκα περιέχουν χλωροφύλλη-α και ανάλογα με το είδος του φύκου και χλωροφύλλη-β ή -c. Περιέχουν επίσης ένα ή περισσότερα καροτενοειδή. Για κάθε πρωτεΐνη που σχηματίζει σύμπλοκο υπάρχουν συνδεδεμένες μαζί της περισσότερα του ενός μόρια χλωροφύλλης και ταυτόχρονα ένα ή περισσότερα καροτενοειδή. Αν και η μελέτη της δομής και λειτουργίας αυτών των συμπλόκων συνεχώς βρίσκει καινούργια στοιχεία, το επικρατούν σενάριο υπαγορεύει προς την άποψη ότι οι χλωροφύλλες και πιθανόν και τα καροτενοειδή βρίσκονται εντός των αναδιπλώσεων της πεπτιδικής αλυσίδας της πρωτεΐνης και όχι στην επιφάνειά της. Οι δεσμοί που συγκρατούν πρωτεΐνη-χρωστικές δεν είναι ομοιοπολικοί. Το επικρατέστερο σενάριο δείχνει να υπάρχουν οι 3 παρακάτω τύποι δεσμών.

1. Μερικά ίσως και όλα τα μόρια της χλωροφύλλης συνδέονται λόγω ελκτικών δυνάμεων μέσω του μαγνησίου τους με ορισμένα αμινοξέα όπως ιδίως η ιστιδίνη των πλευρικών πεπτιδικών αλυσίδων.
2. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου των δακτυλίων της πορφυρίνης της χλωροφύλλης και υδρογόνων σε κατάλληλες θέσεις της πεπτιδικής αλυσίδας.
3. Υδροφοβικές σχέσεις μεταξύ της μη πολικής φυτολικής αλυσίδας της χλωροφύλλης και των μη πολικών περιοχών της πρωτεΐνης.

Για τα καροτενοειδή η σύνδεσή τους με την πρωτεΐνη του συμπλόκου φαίνεται να βασίζεται στις υδροφοβικές σχέσεις μεταξύ της κεντρικής μακράς υδρογονανθρακικής τους αλυσίδας (υδροφοβική) και των μη πολικών αμινοξέων των πλευρικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα καρωτένια που δεν έχουν ούτε στα άκρα του μορίου τους πολικές ομάδες. Αντίθετα στις ξανθοφύλλες όπου τα άκρα παρουσιάζουν πολικότητα πιθανολογείται η ύπαρξη δεσμών υδρογόνου μεταξύ αυτών και ορισμένων πολικών περιοχών του πολυπεπτιδίου.

Τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-χρωστικών συμμετέχουν στη φωτοσύνθεση με δύο τρόπους. Κάποια από αυτά υπάρχουν στα φωτοσυνθετικά κέντρα αντίδρασης των Φωτοσυστημάτων PS I και PS II συμμετέχοντας στη φωτεινή αντίδραση (φωτόλυση του νερού, αφαίρεση και μεταφορά ηλεκτρονίων), όμως ο μεγαλύτερος αριθμός τους συμμετέχει στη συλλογή της ενέργειας των φωτονίων σχηματίζοντας τις λεγόμενες "κεραίες συλλογής φωτονίων" για να μεταβιβάσουν την ενέργεια στα κέντρα αντίδρασης.

Μια σπουδαία ιδιότητα που παρουσιάζεται στο σύμπλοκο χρωστικών-πρωτεΐνης είναι αυτή που οφείλεται στην αλληλεπίδρασή τους και η οποία εκφράζεται ως



τροποποίηση στο φάσμα απορρόφησης της κάθε χρωστικής. Με πιο απλά λόγια άλλο μέγιστο απορρόφησης παρουσιάζει η χρωστική στην καθαρή της μορφή και άλλο ως μέρος του συμπλόκου με την πρωτεΐνη. Έτσι όταν μετράμε τη χλωροφύλλη-α στο εργαστήριο στην καθαρή της μορφή μετά τη διάλυσή της σε οργανικούς διαλύτες, παρουσιάζει μέγιστα στην περιοχή 661-667 nm, 9-15 nm χαμηλότερα από τα 676 nm που παρουσιάζει όταν μετράται σε χλωροπλάστες ζωντανών κυττάρων όπου βρίσκεται σε σύμπλοκο με πρωτεΐνη. Δηλαδή το σύμπλοκο χλωροφύλλης-πρωτεΐνης παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης μετατοπισμένο σε μακρύτερα μήκη κύματος απ' ότι της χλωροφύλλης μόνη της.

Το ίδιο φαινόμενο παρουσιάζεται και στα καροτενοειδή (ιδιαίτερα στο β-καροτένιο) με μετατόπιση του μέγιστου της απορρόφησης σε μακρύτερα μήκη κύματος στο σύμπλοκο καρωτενοειδούς-πρωτεΐνης (in vivo δηλ. σε ζωντανά κύτταρα) συγκριτικά με το καρωτενοειδές μόνο του. Η μετατόπιση μάλιστα αυτή σε σύμπλοκα με τα καροτενοειδή φυκοξανθίνη, περιδινίνη και σιφωνοξανθίνη είναι ιδιαίτερα μεγάλη της τάξεως των 40 nm. Αυτά τα καροτενοειδή απαντώνται στα φαιοφύκη, χρυσοφύκη, διάτομα και δινομαστιγιωτά και η λόγω της παραπάνω μετατόπισης του μέγιστου της απορρόφησης των σε μήκη κύματος στην πράσινη περιοχή (απορροφούν το πράσινο ~500-560 nm) τα κάνει να φαίνονται καφετί. Αυτό βέβαια συμβαίνει στα ζωντανά κύτταρα όπου λειτουργεί το σύμπλοκο καροτενοειδών-πρωτεϊνών παρουσιάζοντας την παραπάνω ιδιότητα. Αν για κάποιο λόγο το σύμπλοκο αποδομηθεί π.χ. με θέρμανση (καταστροφή της πρωτεΐνης) τότε τα καροτενοειδή παρουσιάζουν το κανονικό τους φάσμα και μέγιστο απορρόφησης περί τα μήκη κύματος (λίγο λιγότερο από 500 nm) που αντιστοιχούν στο τέλος της μπλε περιοχής και αρχής της πράσινης. Στην πράξη τα παραπάνω αποδεικνύονται πολύ απλά. Αν ένα κομμάτι θαλλού ενός φαιοφύκου (χρώμα καφέ) βυθιστεί σε πολύ ζεστό νερό τότε τάχιστα το χρώμα του θα μετατραπεί σε πράσινο. Το αποτέλεσμα αυτό το επιφέρει η καταστροφή των συμπλόκων καροτενοειδών-πρωτεϊνών μέσω της μετουσίωσης των πρωτεϊνών λόγω της θέρμανσης. Έτσι ενώ πριν το άθικτο σύμπλοκο καροτενοειδών-πρωτεΐνης απορροφούσε το πράσινο μέρος του φάσματος και το φύκος φαινόταν καφέ, με την καταστροφή της πρωτεΐνης τα καροτενοειδή μόνα τους δεν απορροφούν το πράσινο και το φύκος φαίνεται πράσινο.

Δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι μιλάμε για σύμπλοκα χλωροφυλλών-καροτενοειδών-πρωτεΐνης. Κάθε σύμπλοκο περιέχει συζευγμένα με την πεπτιδική αλυσίδα οπωσδήποτε χλωροφύλλη-α, χλωροφύλλες-β ή/και -c σε ποικίλες αναλογίες και ένα ή περισσότερα καροτενοειδή. Η ακριβής σύνθεση του κάθε συμπλόκου σε χλωροφύλλες και καροτενοειδή ποικίλλει ανάμεσα στα είδη όπως ποικίλλει και το πόσα από αυτά (τα σύμπλοκα) συμμετέχουν άμεσα στα κέντρα αντίδρασης των φωτοσυστημάτων ή στο σύστημα "κεραίας" συλλογής φωτονίων. Δεν υπάρχει λόγος εδώ να αναφερθούν επ' αυτού τα πολλά νούμερα που δίδονται από τις πολυπληθείς ερευνητικές εργασίες. Αυτό που πρέπει να συγκρατήσουμε και έχει πρακτική σημασία ιδιαίτερα για την καλλιέργεια των φυκών, είναι ότι τα ζωντανά κύτταρα παρουσιάζουν ευρύτερη και αποτελεσματικότερη εκμετάλλευση του φωτεινού φάσματος διαφορετική απ' ότι υποδεικνύουν οι τιμές που μας δίνει το φασματοφωτόμετρο όταν εξετάζουμε την κάθε χρωστική στην καθαρή της μορφή. Αιτία για αυτό είναι φυσικά η διαμορφωμένη απορρόφηση του φωτός που παρουσιάζουν τα σύμπλοκα χλωροφυλλών-καροτενοειδών-πρωτεΐνης.

## Βιλιπρωτεΐνες

Οι χρωστικές βιλιπρωτεΐνες απαντώνται μόνο στους χλωροπλάστες των ροδοφυκών και κρυπτοφυκών από τα ευκαρυωτικά φύκη και στις θυλακοειδείς μεμβράνες του κυτταροπλάσματος στα κυανοβακτήρια. Το χρώμα τους είναι είτε κόκκινο (φυκοερυθρίνες, φυκοερυθροκυανίνες) είτε μπλε (φυκοκυανίνες, αλλοφυκοκυανίνες). Το χρώμα τους προκαλείται από την εκάστοτε συμμετέχουσα φυκοβιλίνη στη βιλιπρωτεΐνη. Οι φυκοβιλίνες (φυκοερυθροβιλίνη, φυκοκυανοβιλίνη, φυκοουροβιλίνη) που αποτελούν το χρωμοφόρο συστατικό των φυκοβιλιπρωτεϊνών είναι από χημική άποψη ανοικτές τετραπυρολικές αλυσίδες. Για να σχηματιστεί μια φυκοβιλιπρωτεΐνη, η συμμετέχουσα φυκοβιλίνη ενώνεται με την πρωτεΐνη με ομοιοπολικό δεσμό (σε αντίθεση με τα σύμπλοκα χλωροφυλών-καροτενοειδών-πρωτεΐνης όπου δεν υπάρχουν ομοιοπολικοί δεσμοί). Οι φυκοβιλιπρωτεΐνες παρουσιάζουν πολικότητα στο μόριό τους (υδρόφιλες) και ως εξ' αυτού είναι διαλυτές στο νερό.

Ας ξεκαθαρίσουμε όμως πρώτα τη χρησιμοποιούμενη ορολογία διότι αλλιώς δεν θα ξέρουμε κάθε φορά σε τι αναφερόμαστε:

- Φυκοβιλίνες = ανοικτών αλυσίδων τετραπυρρόλες (φυκοερυθροβιλίνη και φυκοκυανοβιλίνη)
- Φυκοβιλίνες + πρωτεΐνες = φυκοβιλιπρωτεΐνες
- Φυκοβιλιπρωτεΐνες = φυκοκυανίνη, αλλοφυκοκυανίνη, φυκοερυθρίνη**
- Βιλιπρωτεΐνη = φυκοβιλιπρωτεΐνη

Κάθε φυκοβιλιπρωτεΐνη (ή απλά βιλιπρωτεΐνη) αποτελείται από ίσες γραμμομοριακές ποσότητες δύο υπομονάδων ονομαζόμενες υπομονάδα-α και υπομονάδα-β. Υπάρχει και μια τρίτη η υπομονάδα-γ σε μερικές φυκοερυθρίνες σε πολύ μικρότερες ποσότητες (μία υπομονάδα-γ για κάθε -α ή -β). Κάθε υπομονάδα -α ή -β σε μια βιλιπρωτεΐνη είναι ενωμένη με τουλάχιστον μία φυκοβιλίνη. Η υπομονάδα-α μπορεί να έχει μία ή δύο φυκοβιλίνες. Η υπομονάδα-β μία, δύο ή τέσσερις και η υπομονάδα-γ τέσσερις. Η αναλογία των φυκοβιλινών στις βιλιπρωτεΐνες που συμμετέχουν μπορεί να αλλάζει ως αποτέλεσμα της επίδρασης της έντασης του φωτός. Ειδικά στα κυανοβακτήρια η ιδιότητα αυτή παρουσιάζεται έντονα ονομαζόμενη χρωματική προσαρμογή και τους επιτρέπει να αποικίζουν και να αυξάνονται πρακτικά σε όλα τα περιβάλλοντα ποικίλης φωτεινής έντασης.

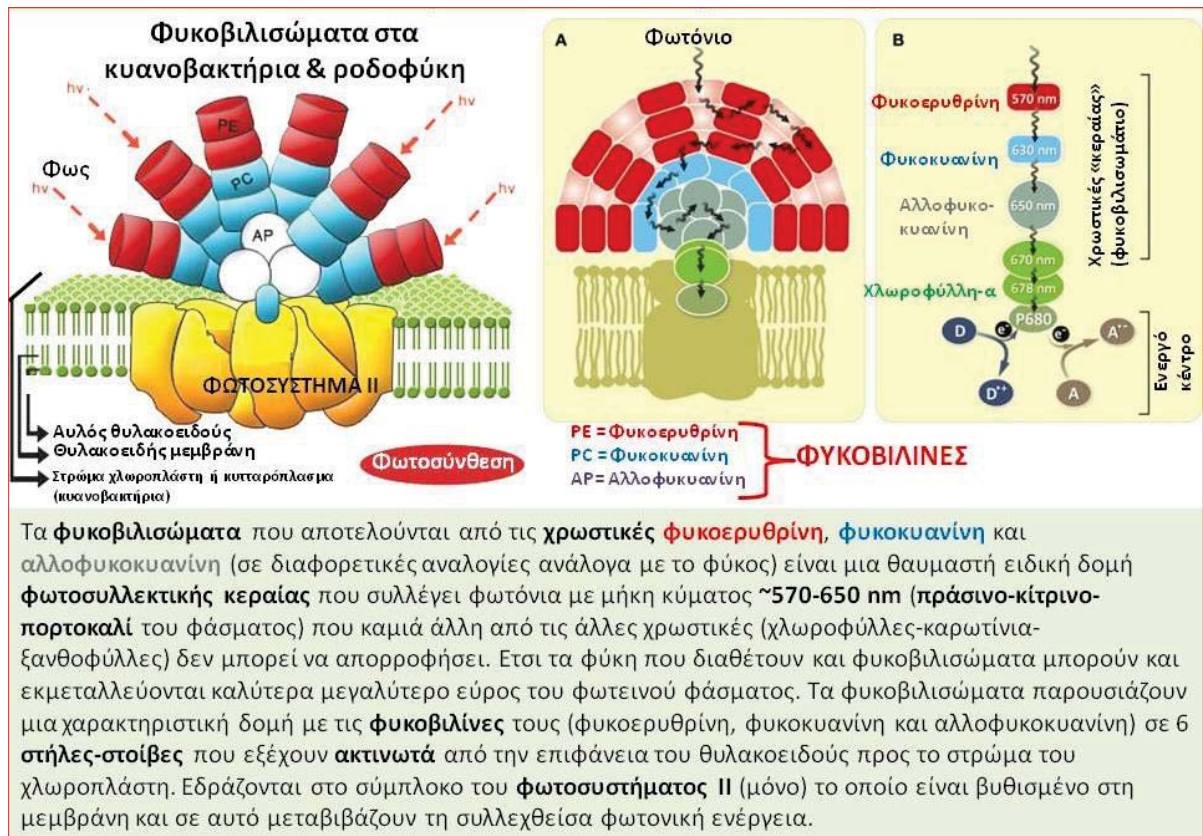
Τα ροδοφύκη διαθέτουν όλες τις βιλιπρωτεΐνες (φυκοκυανίνη, φυκοερυθρίνη και αλλοφυκοκυανίνη), τα κυανοβακτήρια το ίδιο με την εξαίρεση κάποιων ειδών όπου απουσιάζει η φυκοερυθρίνη και στα κρυπτοφύκη υπάρχει μόνο φυκοερυθρίνη ή φυκοκυανίνη. Στα ροδοφύκη σε ποσότητα επικρατεί η φυκοερυθρίνη ενώ στην πλειονότητα των κυανοβακτηρίων η φυκοκυανίνη. Η αλλοφυκοκυανίνη συμμετέχει σε όλα (εκτός των κρυπτοφυκών όπου απουσιάζει) με το μικρότερο ποσοστό.

Το φάσμα απορρόφησης των βιλιπρωτεϊνών είναι χαρακτηριστικό και εντελώς διαφορετικό από αυτό των χλωροφυλλών και καροτενοειδών. Τα μέγιστα απορρόφησης των παρουσιάζουν μάλιστα 2 ή 3 κορυφές στο εύρος των ~ 500-650 nm δηλαδή από το τέλος του μπλε έως την αρχή του κόκκινου (περιλαμβάνει δηλαδή πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί). Στο Σχήμα 8 αποτυπώνεται το φάσμα απορρόφησης της φυκοερυθρίνης και της φυκοκυανίνης και παρατηρούμε ότι η φυκοερυθρίνη έχει 3 μέγιστα απορρόφησης και η φυκοκυανίνη ένα.

Οι βιλιπρωτεΐνες ως υδατοδιαλυτά μακρομόρια βρίσκονται στην επιφάνεια των θυλακοειδών μεμβρανών "βρεχόμενες" από το υδαρές στρώμα του χλωροπλάστη (στα ροδοφύκη) ή το κυτταρόπλασμα στα κυανοβακτήρια ή τον υδαρή αυλό του θυλακοειδούς στα κρυπτοφύκη. Ομως δεν συγκροτούνται σε άμορφες μάζες βιλιπρωτεϊνών αλλά είναι τακτοποιημένες με θαυμαστό τρόπο σε συγκροτήματα στοιβαγμένων βιλιπρωτεϊνών που συγκροτούν τα λεγόμενα φυκοβιλισωμάτια. Τα φυκοβιλισωμάτια έχουν μια χαρακτηριστική διάταξη από έξι στοίβες βιλιπρωτεϊνών ακτινωτά διατεταγμένων σε σχήμα βεντάλιας στη βάση της οποίας υπάρχει μόνο αλλοφυκοκυανίνη (Σχήμα 16). Το μέγεθος του φυκοβιλισωματίου είναι 30-40 nm (σε διάμετρο της "βεντάλιας") και το καθένα είναι προσκολλημένο στη θυλακοειδή μεμβράνη. Στα κρυπτοφύκη δεν υπάρχουν φυκοβιλισωμάτια. Η φυκοερυθρίνη στην πλειονότητα των κρυπτοφυκών (ή η φυκοκυανίνη σε μερικά) υπάρχει ως κοκκοειδούς μορφής μακρομόρια βιλιπρωτεϊνών κατανεμημένη πυκνά στον ενδοθυλακοειδή χώρο (αυλό του θυλακοειδούς).

Στα φυκοβιλισωμάτια των ροδοφυκών και των κυανοβακτηρίων συμμετέχουν και οι 3 βιλιπρωτεΐνες μαζί με μικρές ποσότητες άχρωμων πρωτεϊνών. Σε κάθε μία από τις ακτινωτά τοποθετημένες στοίβες βιλιπρωτεϊνών του κάθε φυκοβιλισωματίου, τα ακραία τμήματα καταλαμβάνονται από τις φυκοερυθρίνες και τα πιο κάτω από τις φυκοκυανίνες. Οι φυκοκυανίνες της βάσης κάθε ακτίνας βρίσκονται σε επαφή με 3 μονάδες αλλοφυκοκυανίνης που αποτελούν το κέντρο της "βεντάλιας" που είναι προσκολλημένο στην επιφάνεια της θυλακοειδούς μεμβράνης. Η αλλοφυκοκυανίνη είναι αυτή που μεταφέρει τη συλλεχθείσα από τις άλλες βιλιπρωτεΐνες ενέργεια των φωτονίων στη χλωροφύλλη-a του ενεργού κέντρου του Φωτοσυστήματος-II (PS II) που βρίσκεται βυθισμένο στη θυλακοειδή μεμβράνη και που επάνω του βρίσκεται τοποθετημένο το φυκοβιλισωμάτιο.

Η ύπαρξη των φυκοβιλισωματίων και η θέση τους στην επιφάνεια στον θυλακοειδών μεμβρανών προσφέρει στα φύκη που τα διαθέτουν (ροδοφύκη και κυανοβακτήρια) μεγάλο πλεονέκτημα στην εκμετάλλευση κάθε φωτεινής ακτινοβολίας. Οχι μόνο "συλλαμβάνουν" πιο εκτεταμένο εύρος φάσματος συγκριτικά με τα φύκη που δεν τα διαθέτουν αλλά και μπορούν και συλλέγουν ακόμα και φως ελάχιστης έντασης λόγω της διαμόρφωσης σαν φωτοσυλλεκτική "κεραία-βεντάλια" των φυκοβιλισωματίων. Αυτός άλλωστε είναι και ο λόγος που σε μεγάλα βάθη της θάλασσας (μέχρι περίπου τα 200 m) όπου το φως έχει μόλις το 1-2 % της έντασης που έχει στη επιφάνεια, τα μόνα μακροφύκη που επιβιώνουν εκεί είναι κάποια ροδοφύκη.



**Σχήμα 12.** Φαντασική απεικόνιση των φυκοβιλιωμάτων στην επιφάνεια των θυλακοειδών μεμβρανών των κυανοβακτηρίων και των ροδοφυκών. Επεξηγήσεις δίδονται ενσωματωμένες στο σχήμα.

Οι φυκοβιλιπρωτεΐνες (PBP) είναι διαλυτές στο νερό και είναι σχετικά εύκολο να απομονωθούν και να καθαριστούν. Μπορούν γενικά να χωριστούν σε φυκοερυθρίνη (PE, κόκκινο, απορρόφηση που ανιχνεύεται στα 565-575 nm), φυκοκυανίνη (PC, μπλε, απορρόφηση που ανιχνεύεται στα 625-640 nm), καθώς και αλλοφυκοκυανίνη (APC, πράσινο-μπλε, απορρόφηση που ανιχνεύεται σε 650-655 nm) σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά φασματοσκοπίας και τις αλληλουχίες των αμινοξέων τους. Οι PBPs, ως ολιγομερείς πρωτεΐνες, αποτελούνται από πολυπεπτίδια που φέρουν χρωμοφόρο. Μπορούν να συναρμολογηθούν σε φυκοβιλιώματα ή να προσκολληθούν σε θυλακοειδή μεμβράνη για φωτοσύνθεση. Σε ορισμένα μικροφύκη που στερούνται χλωροφύλλης b, τα PBP συντίθενται για να αντισταθμίσουν το τεράστιο κενό απορρόφησης χλωροφύλλης βελτιστοποιώντας τη συλλογή της φωτεινής ενέργειας. Στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, οι PBPs μπορούν να συλλάβουν φωτεινή ενέργεια, περνώντας τη στη συνέχεια στις χλωροφύλλες. Οι PBPs έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως πρόσθετα τροφίμων ή/και εξαιρετικά συμπληρώματα θρεπτικών συστατικών για την ανθρώπινη διατροφή, επιδεικνύοντας μια σειρά από υγιεινές λειτουργίες. Στα περισσότερα κυανοβακτήρια, κρυπτόφυτα, γλαυκόφυτα και ροδοφύκη, η πιο κοινή φυκοβιλιπρωτεΐνη είναι η φυκοκυανίνη (PC), η οποία είναι ιδιαίτερα άφθονη σε πολυάριθμα κυανοβακτηριακά στελέχη στο φυσικό περιβάλλον. Σήμερα, η PC

παράγεται κυρίως από κυανοβακτήρια του είδους *Spirulina platensis* επειδή καλλιεργούνται εύκολα. Ένα άλλο γένος κυανοβακτηρίων το *Phormidium* (*Geitlerinema*) μπορεί επίσης να επιτύχει απόδοση >170 mg/ g ξηρού βάρους.

### Η χρησιμότητα των χρωστικών

Με μοναδική μοριακή δομή και διάφορες ευεργετικές δραστηριότητες, οι χρωστικές των μικροφυκών έχουν θεωρηθεί ως υποσχόμενες οικολογικές χρωστικές, θρεπτικές ουσίες και αντιοξειδωτικά με μεγάλη εμπορική αξία σε τρόφιμα και γαλακτοκομικά, εναλλακτικά τρόφιμα, συμπληρώματα διατροφής, φαρμακευτικά προϊόντα, καλλυντικά, υδατοκαλλιέργεια, υφάσματα και άλλα ελαφρά μεταποιητικά πεδία. Επί του παρόντος, αυτές οι χρωστικές έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικούς βαθμούς, μερικές από αυτές έχουν επιτύχει αποτελεσματική βιομηχανική παραγωγή και υψηλή οικονομική αξία. Παρόμοια με τις περισσότερες φυσικές χρωστικές, οι χλωροφύλλες έχουν πολυάριθμες λειτουργίες στη βιομηχανία προσθέτων τροφίμων, εντός των οποίων η πιο εκτεταμένη εφαρμογή είναι οι χρωστικές. Λόγω της τάσης αποφυγής χρησιμοποίησης συνθετικών χρωστικών με πιθανές παρενέργειες, οι βιομηχανίες τροφίμων τείνουν πλέον να χρησιμοποιούν φυσικές πράσινες χρωστικές για να προσδώσουν, να ενισχύσουν ή να ομοιομορφήσουν το χρώμα των τροφίμων, παρουσιάζοντας έτσι την καλύτερη χρωματική ένταση και απόχρωση για να ικανοποιήσουν τις προσδοκίες, τις απαιτήσεις και τις ανάγκες των καταναλωτών. Επί του παρόντος, τα μικροφύκη έχουν αναγνωριστεί ως η βιώσιμη πηγή για την παραγωγή φυσικών χρωστικών ουσιών για τρόφιμα με χαμηλή αλλεργιογένεση, τοξικότητα και καρκινογένεση. Ως η πιο άφθονη φυσική χρωστική με πράσινο χρώμα που είναι σπάνια στα τρόφιμα, οι χλωροφύλλες κερδίζουν σήμερα τεράστια προσοχή ως τρόφιμα, ζωοτροφές, καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα, χρωστικές και λειτουργικά συμπληρώματα διατροφής. Μπορούν επιπλέον να εμφανίσουν βοηθητικά αποτελέσματα συντήρησης και αντισηψίας στην αποθήκευση τροφίμων ως συνέπεια των φυσιολογικών τους δραστηριοτήτων. Οι χλωροφύλλες αποδείχθηκε επίσης ότι χρησιμεύουν ως εξαιρετικό αποσμητικό τροφίμων. Οι χλωροφύλλες έχουν αντιοξειδωτική δράση, εξισορροπούν την εντερική μικροχλωρίδα και μειώνουν τον κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου. Καθώς δρουν και ως υποκατάστατα της αιμοσφαιρίνης σε συνθήκες ανεπάρκειας, η χρήση συμπληρώματος χλωροφύλλων έχει προταθεί ως επικουρική θεραπεία για τη θαλασσαιμία και την αιμολυτική αναιμία.

Οι ενώσεις χλωροφύλλης προτείνεται επίσης να έχουν φαρμακευτική εφαρμογή με επουλωτικές, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, αντιμεταλλαξιογόνες, αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Επιπλέον, μπορούν να εφαρμοστούν ως συστατικά οδοντόκρεμας ή για την παραγωγή καλλυντικών για τη φροντίδα του δέρματος. Η χλωροφυλλίνη αντιπροσωπεύει το παράγωγο της χλωροφύλλης, όπου ο χαλκός ή το νάτριο αντικαθιστά το μαγνήσιο, με την απώλεια

αλυσίδων φυτόλης. Χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής και βρέθηκε ότι παρουσιάζει αντιμεταλλαξιογόνο και αντικαρκινογόνο δράση.

Με εντυπωσιακά χρωματικά χαρακτηριστικά και βιοδραστικότητα, τα φυσικά καροτενοειδή είναι η καλύτερη χρωστική επιλογή για τους παραγωγούς τροφίμων, ιδιαίτερα για μαγειρεμένα λουκάνικα, αναψυκτικά και αρτοσκευάσματα. Εκτός από αυτό, οι εξαιρετικές αντιοξειδωτικές και συντηρητικές τους ιδιότητες βοηθούν τα τρόφιμα να διατηρούν το αρχικό χρώμα και τη γεύση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και να αποτρέπουν την οξείδωση και την αλλοίωση των λιπαρών οξέων και άλλων ουσιών. Έτσι, έχουν αναγνωρίσιμο αντίκτυπο και ζήτηση σε τρόφιμα με πολλά λιπαρά όπως βούτυρο, μαργαρίνη, γαλακτοκομικά προϊόντα, αναψυκτικά και κέικ.

Τα καροτενοειδή έχουν επίσης ικανότητα αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους, νευροπροστασίας, αποτρέποντας έτσι την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας και την καρδιακή δυσλειτουργία. Τα καροτενοειδή μπορούν να εμποδίσουν αποτελεσματικά το σχηματισμό ενδοκυτταρικών ελεύθερων ριζών (ROS) παρουσιάζοντας έτσι ισχυρή φυσιολογική αντιοξειδωτική δράση. Τα καροτενοειδή μικροφυκών περιέχουν trans- και cis- εναντιομερή που ενισχύουν περαιτέρω τη βιο-αποτελεσματικότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα. Είναι επίσης βιοενεργά και μπορούν να αντισταθούν στον καρκίνο επειδή περιέχουν ξανθοφύλλες. Έτσι, αυτά τα βιομόρια έχουν εφαρμοσθεί σε πολλούς τομείς, συμπεριλαμβανομένων των καλλυντικών, των φαρμακευτικών, των λειτουργικών τροφίμων, των θρεπτικών προϊόντων, της γεωργίας και των υδρόβιων ζωοτροφών.

Οι φυκοβιλιπρωτεΐνες (PBPs) χρησιμοποιούνται ευρέως στον εμπορικό τομέα ως φυσικές χρωστικές. Η κόκκινη ή ροζ-κόκκινη φυκοερυθρίνη (PE) ως χρωστική τροφίμων έχει λάβει αρκετές πατέντες σε τρόφιμα, όπως ζαχαροπλαστικά, σιρόπια, γαλακτοκομικά προϊόντα, ψημένα τρόφιμα, επιδόρπια ζελατίνης, αποξηραμένα τρόφιμα, γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, παγωτό και milk shakes. Επιπλέον, η PE έχει ιδιότητες κίτρινου φθορισμού και μπορεί να προστεθεί στη διακόσμηση κέικ, αναψυκτικά και αλκοολούχα ποτά για να τους προσδώσει ιδιότητες φθορισμού και να βελτιώσει την ελκυστικότητά τους στους καταναλωτές. Όσον αφορά το φυσικό μπλε χρώμα, η φυκοκυανίνη (PC) από κυανοβακτήρια χρησιμοποιείται για να χρωματίζει παγωτά, αναψυκτικά και γιαούρτι στην Ιαπωνία. Μπορεί επίσης να προστεθεί σε τσίχλες, καραμέλες, λαχανικά, ζελέ, γαλακτοκομικά προϊόντα και αναψυκτικά. Για παράδειγμα, ένα γιαούρτι εμπλουτισμένο με φυκοκυανίνη έδειξε θετικά αποτελέσματα στη σταθερότητα του χρώματος κατά την αποθήκευση.

Οι φυκοβιλιπρωτεΐνες έχουν αντιοξειδωτικά, αντιφλεγμονώδη και ηπατικά προστατευτικά αποτελέσματα, δίνοντάς τους έτσι εξαιρετικές δυνατότητες στην ανθρώπινη υγεία. Η φυκοκυανίνη (PC) θεωρείται ένα ισχυρό in vivo αντιοξειδωτικό με ιδιότητες καθαρισμού ελεύθερων ριζών. Σε πειράματα, η PC μπορεί να

λειτουργήσει ως λειτουργική τροφή με εξαιρετική αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, βοηθητική ηπατοπροστατευτική και νευροπροστατευτική δράση.

Λόγω των βιοδραστικών τους ιδιοτήτων, οι φυκοβιλιπρωτεΐνες χρησιμοποιούνται επίσης ευρέως σε ανοσολογικά εργαστήρια και βιομηχανίες. Γενικά, έχουν χρησιμοποιηθεί συνήθως ως φθορίζοντες δείκτες στη μοριακή βιολογία και ως φθορίζουσες βαφές στη μικροσκοπία και στους ανοσοπροσδιορισμούς. Πάνω από 297 αρχεία διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας είναι διαθέσιμα για PBP, όπως φθορίζοντες δείκτες. Για παράδειγμα, το PC και το PE που συλλέγονται στα κυανοβακτηριακά είδη έχουν υιοθετηθεί ως ανιχνευτές φθορισμού στην ηλεκτροφόρηση γέλης ως δείκτες πρωτεΐνης.

### Γενική θεώρηση των πειραματισμών στη βελτιστοποίηση παραγωγής χρωστικών

Τα απομονωθέντα είδη μικροφυκών που διατηρούνται σε καθαρές καλλιέργειες στο εργαστήριο καλλιέργειας πλαγκτού, καλλιεργήθηκαν σε δοχεία μεσαίου μεγέθους (1 - 2 L) και σε διάφορες συνθήκες προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση διαφόρων παραμέτρων στο περιεχόμενο των χρωστικών τους με σκοπό τη βελτιστοποίηση της παραγωγής των. Επιλέχθηκαν 5 είδη μικροφυκών για τις ανακαλλιέργειες υπό επιλεγμένες συνθήκες επίδρασης διαφορετικών εντάσεων φωτός και χρώματος φωτός, επειδή από τα προκαταρκτικά πειράματα βρέθηκε ότι αφενός αυτά τα είδη ανταποκρίνονται καλά και παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες χρωστικών από τα υπόλοιπα και αφετέρου η επίδραση του φωτός είχε την εντονότερη και καθοριστικότερη επίδραση στο περιεχόμενο των χρωστικών από κάθε άλλη περιβαλλοντική παράμετρο.

Τα είδη των μικροφυκών που εξετάστηκαν ήταν τα παρακάτω:

1. *Amphidinium carterae*
2. *Nephroselmis* sp.
3. *Dunaliella* sp.
4. *Anabaena* sp.
5. *Phormidium* sp.

Τα 3 πρώτα είναι ευκαρυωτικά μονοκύτταρα μικροφύκη (το *Amphidinium carterae* δινομαστιγωτό, τα 2 άλλα χλωροφύκη) και τα άλλα δύο κυανοβακτήρια, τα νηματοειδή *Phormidium* & *Anabaena*.

Από τις προκαταρκτικές καλλιέργειες δοκιμών σε διάφορες συνθήκες διαπιστώθηκαν ορισμένα γεγονότα τα οποία τελικά οδήγησαν στην επιλογή των βασικών συνθηκών καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν για τους πειραματισμούς. Τα γεγονότα αυτά ήταν:

**Αλατότητα:** Διαπιστώθηκε ότι σε διαφορετικές αλατότητες παρουσιάζονται έντονες διαφορές στην αύξηση της καλλιέργειας σε ορισμένα από τα μικροφύκη. Συνεπώς η αλατότητα ήταν ένας από τους παράγοντες που επελέγησαν να δοκιμαστούν για να

μελετηθεί η επίδρασή της στο περιεχόμενο των κυττάρων σε χρωστικές. Επιλέχθηκαν μία χαμηλή αλατότητα (20 ppt), μία τυπικού θαλασσινού νερού (40 ppt) και μία υπεραλατότητας (60 ή 100 ppt κατά περίπτωση φύκους).

**Ένταση φωτισμού:** Οι διαφορετικές εντάσεις φωτισμού επέδρασαν καταλυτικά όχι μόνο στην αύξηση των καλλιεργειών αλλά και στο περιεχόμενο των χρωστικών. Συνεπώς επιλέχθηκαν 2 περιβάλλοντα φωτισμού, ένα με χαμηλή ένταση (2000 lux-L) και ένα με υψηλή ένταση (8000 lux-XL).

**Χρώμα φωτός.** Επειδή η χρήση τεχνητού φωτισμού τύπου LED διαφορετικών μηκών κύματος (χρώμα) έχει προσελκύει ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον στη φυκοκαλλιέργεια διεθνώς σχετικά με την επίδραση του χρωματιστού φωτός στην αύξηση και στο περιεχόμενο των χρωστικών, πειραματιστήκαμε σε επιλεγμένα είδη φυκών που από προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν έντονη αποκριση με τη χρήση πράσινου, μπλε και κόκκινου φωτός.

**Διάρκεια φωτισμού:** Από τις 4 αρχικά δοκιμασθείσες φωτοπεριόδους φωτισμού, συνεχής φωτισμός (24hL:0hD), τυπικός (12hL:12hD), επικράτηση σκότους (8hL:16hD) και επικράτηση φωτός (16hL:8hD), βρέθηκε ότι η φωτοπερίοδος με 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι (16hL:8hD) ήταν η πιο αξιόπιστη δίδοντας τις καλύτερες αποδόσεις, συνεπώς αυτή επελέγη ως σταθερό καθεστώς φωτισμού σε όλες τις καλλιέργειες.

**Αερισμός.** Αρχικά δοκιμάστηκαν καλλιέργειες σε δοχεία με αερισμό μέσω πιπέτας παροχής ατμοσφαιρικού αέρα από αεραντλία και αντίστοιχες καλλιέργειες του εκάστοτε φύκους σε δοχεία χωρίς καθόλου αερισμό παρά μόνο με περιοδική ανάδευση. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια έντονη διαφορά ανάπτυξης των καλλιεργειών στα δοχεία με παροχή αέρα συγκριτικά με τα δοχεία που δεν παρέχονταν αέρας όπου η ανάπτυξη ήταν από μηδενική έως πολύ φτωχή. Συνεπώς επελέγη η σταθερή και συνεχής παροχή αέρα σε όλα τα δοχεία και με όγκο παροχής ίσο με 1 όγκο δοχείου / min.

**Διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>).** Σε δοκιμαστικές καλλιέργειες με παροχή και άνευ παροχής διοξειδίου του άνθρακα, διαπιστώθηκε μεν μια ελαφρώς ταχύτερη ανάπτυξη των καλλιεργειών που δέχονταν διοξείδιο όμως αυτή δεν ήταν τόσο έντονη ώστε να αξίζει την εκ βάθρων τροποποίηση του συστήματος αερισμού με τρόπο τέτοιο που να επιτρέπει την ακριβή ρύθμιση της παροχής διοξειδίου σε πολλά δοχεία καλλιέργειας ταυτόχρονα. Ετσι αρκεστήκαμε στο διοξείδιο που παρέχονταν φυσικώς με τον ούτως ή άλλως επαρκή αερισμό των δοχείων.

**pH.** Η διατήρηση του pH σε προκαθορισμένα επίπεδα τιμών είναι μια πολύ δύσκολη διαδικασία και αυτό αποδείχθηκε κατά τις προκαταρκτικές καλλιέργειες. Σε αυτές επιχειρήθηκε η δια μέσου πρόσθεσης αραιού οξέως (HCl) ή αραιάς βάσεως (NaOH) ελεγχόμενη οξίνιση ή αλκαλοποίηση αντίστοιχα των καλλιεργειών σε τιμές στην περιοχή του όξινου 6-7 και πολύ αλκαλικού (9-10), όμως μετά την επιτυχία της επιθυμητής τιμής οι καλλιέργειες επανέρχονταν στο φυσιολογικό για αυτές pH (7,8 – 9,0). Καθώς η αναγκαστικά συνεχής επέμβαση στο pH προκειμένου αυτό να



διατηρηθεί σε μια επιλεγόμενη τιμή είναι πολύ διαταρακτική της διαδικασίας της καλλιέργειας, επιλέχθηκε το pH να αφεθεί να σταθεροποιηθεί βάσει της φωτοσύνθεσης στην φυσιολογική του τιμή και απλώς να καταγράφεται καθημερινώς.

**Θερμοκρασία.** Καθώς η θερμοκρασία σε ένα χώρο καλλιέργειας δεν μπορεί να διατηρηθεί παρά μόνο ομοιόμορφα για όλα τα δοχεία, έπρεπε να επιλεγεί μία σταθερή τιμή της που θα διατηρούνταν καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Μία τιμή που θα είναι αφενός εύκολα επιτεύξιμη σε συνθήκες παραγωγής και αφετέρου ικανοποιητική για την αύξηση των καλλιεργειών. Από τα δεδομένα της βιβλιογραφίας είναι γνωστό ότι τα μικροφύκη αυξάνονται καλά σε εύρος θερμοκρασίας 20-28 °C. Έτσι έγιναν προκαταρκτικές δοκιμές αύξησης σε θερμοκρασίες 21, 25 και 28 °C. Βρέθηκε ότι στους 21 και 25 °C η διαφορά ήταν αμελητέα και στους 28 °C ήταν μεν η αύξηση πιο γρήγορη κατά περίπου 2 ημέρες (μέχρι την επίτευξη της μέγιστης πυκνότητας) αλλά η μέγιστη πυκνότητα ήταν η ίδια. Επιλέχθηκε έτσι η θερμοκρασία των  $21 \pm 1$  °C ως η συμφερότερη ενεργειακώς τιμή.

Επισημαίνεται ότι για την επιλογή των παραπάνω μεταβλητών συνθηκών λήφθηκε υπ' όψιν η διαχειριστική πρακτική σε μονάδες φυκοκαλλιέργειας όπου οι συνθήκες που μπορούν πρακτικά να διαμορφωθούν σε λειτουργικό επίπεδο χωρίς να γίνουν δαπανηρές μετατροπές που θα καθιστούσαν ασύμφορη την όποια καλλιέργεια, είναι αυτές της αλατότητας και του φωτισμού. Η μεν αλατότητα εύκολα μεταβάλλεται προς τα κάτω με αραιώση του θαλασσινού νερού με γλυκό. Εάν δε απαιτηθεί υψηλότερη, τότε πλέον είτε διαλύεται στο νερό αλάτι, είτε εφόσον αποδειχθεί ότι η υψηλή αλατότητα είναι η καλύτερη για ένα είδος μικροφύκους τότε η μονάδα κατασκευάζεται σε επιλεγμένες θέσεις, π.χ. παραπλεύρως των αλυκών.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα εξετασθέντα μικροφύκη που χρησιμοποιήθηκαν για τους πειραματισμούς αποτελούνται από είδη που απομονώθηκαν από τα λιμνοθαλάσσια νερά της περιοχής και τα οποία αφού υπέστησαν διαδικασίες απομόνωσης μονοειδικής καλλιέργειας από το νερό στο οποίο περιείχοντο ανάμικτα και με άλλα είδη, τελικά κατέληξαν σε δοχεία με θαλασσινό νερό που περιείχε μόνο το επιθυμητό είδος (Σχήμα 2B). Από αυτά τα δοχεία με διαδοχικές επεκτάσεις προέκυψαν οι μεγαλύτεροι όγκοι των 0,5, 1 και 2 L με τους οποίους έγιναν τα πειράματα.

Το κάθε φύκος καλλιεργήθηκε σε γυάλινες κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer (εκτός του *Amphidinium* που καλλιεργήθηκε σε κυλινδρικές φιάλες και του *Phormidium* σε κωνικές), σε νερό της επιθυμητής αλατότητας το οποίο είχε πρώτα αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο στους 121 °C, πίεσης 2bar για 20 min. Κατόπιν το νερό αφήνονταν να κρυώσει για 24 ώρες και ήταν έτοιμο για χρήση. Με την αποστείρωση εξασφαλιζονταν τόσο η πλήρης απουσία ασπονδύλων, πρωτοζώων,

φυκών και μυκήτων καθώς και των βακτηριδίων με τους σπόρους αυτών. Από τα δοχεία Nalgene 12 L (Σχήμα 14B) που περιείχαν το αποστειρωμένο και λιπασμένο με θρεπτικά μεταλλικά στοιχεία νερό λαμβάνονταν η απαιτούμενη ποσότητα στην οποία εμβολιάζονταν με δόση 10% κατ' όγκο, η καθαρή ποσότητα του εκάστοτε μικροφύκου και αφήνονταν να αυξηθεί.

Η πλέον σπουδαία παράμετρος για την αύξηση της καλλιέργειας είναι η λίπανση του νερού με τα αναγκαία στοιχεία τα οποία όπως αναφέρθηκε είχαν διαλυθεί στο προς αποστείρωση νερό. Στο εργαστήριο μεταξύ των αναφερομένων στη βιβλιογραφία συνταγών λίπανσης επιλέχθηκε η τροποποιημένη συνταγή Walne 1966 η οποία χρησιμοποιείται επί χρόνια στο εργαστήριο και καλύπτει πλήρως τις ανάγκες κάθε είδους φυκών. Η συνταγή αυτή συνίσταται στα παρακάτω:

#### **ΑΛΑΤΑ ΒΑΣΙΚΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ**

NaNO<sub>3</sub> : 300 g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 30 g Διαλύονται σε 1 L αποσταγμένου νερού  
 NH<sub>4</sub>Cl : 20 g

Τοποθετείται για 30 λεπτά σε αυτόκαυστο (Σχήμα 12A) στους 120 °C.

Το διάλυμα διατηρείται στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, και είναι το πρώτο διάλυμα που χρησιμοποιούμε για τη λίπανση του νερού.

#### **ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ**

Πρόδρομα διαλύματα:

##### **Διάλυμα Α**

ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O : 30 g  
 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 25 g Διαλύονται σε 1 L αποσταγμένου νερού.  
 CoSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 30 g  
 MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O : 20 g

**Διάλυμα Β** FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O : 50 g Διάλυση σε 1 L αποσταγμένου νερού.

**Διάλυμα Γ** Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O : 25 g Διάλυση σε 1 L αποσταγμένου νερού.

**Διάλυμα Δ** Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O : 50 g Διάλυση σε 1 L αποσταγμένου νερού.

Τοποθετούνται για 30 λεπτά σε αυτόκαυστο στους 120 °C.

Διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

##### **Τελικό διάλυμα**

Διάλυμα Δ : 100 mL από το πρόδρομο διάλυμα  
 Διάλυμα Α : 10 mL " " " "  
 Διάλυμα Β : 10 mL " " " "  
 Διάλυμα Γ : 10 mL " " " "

Προσθήκη 800 mL αποσταγμένου νερού.

Τοποθετούνται σε αυτόκαυστο για 30 λεπτά στους 120 °C.

Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Αυτό είναι το δεύτερο διάλυμα που χρησιμοποιούμε για τη λίπανση του νερού.

#### **ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ**

Πρόδρομα διαλύματα:

B<sub>12</sub> : 100 mg σε 1 L αποσταγμένου νερού  
 Βιοτίνη : 100 mg σε 1 L αποσταγμένου νερού

Θειαμίνη : 10 mg σε 1 L αποσταγμένου νερού

Τα διαλύματα των βιταμινών δεν τοποθετούνται σε αυτόκαυστο διότι καταστρέφονται. Επίσης επειδή είναι φωτοευαίσθητα τοποθετούνται σε σκουρόχρωμες φιάλες. Διατηρούνται σε ψυγείο.

#### **Τελικό διάλυμα**

B<sub>12</sub> : 10 mL από το βασικό διάλυμα

Βιοτίνη : 10 mL από το βασικό διάλυμα

Θειαμίνη: 10 mL από το βασικό διάλυμα

Διαλύονται σε 1 L αποσταγμένου νερού

Διατηρείται σε ψυγείο, και είναι το  τρίτο διάλυμα  που χρησιμοποιούμε για τη λίπανση του νερού.

Για τη λίπανση του θαλασσινού νερού προσθέτουμε 1 mL από κάθε ένα από τα τρία διαλύματα για κάθε 1 L θαλασσινού νερού.

Τα χλωροφύκη *Nephroselmis* sp. και *Dunaliella* sp., το δινομαστιγωτό *Amphidinium carterae* και τα κυανοβακτήρια *Phormidium* sp. και *Anabaena* sp. καλλιεργήθηκαν και αναλύθηκαν στην πορεία του χρόνου οι χρωστικές τους. Και τα 6 είδη απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια έρευνας στα λιμνοθάλασσα του Μεσσολογγίου στη Δυτική Ελλάδα (38 ° 20' 05.16 " N, 21° 25' 28.51" E) και διατηρήθηκαν ως μονοκαλλιέργειες στο εργαστήριο. Σύμφωνα με ένα πρωτόκολλο πειραματισμού, όλα ήταν παρτίδες που καλλιεργήθηκαν σε εσωτερικούς χώρους σε κλιματιζόμενο δωμάτιο στις 19-20 °C, σε αλατότητα 35-40 ppt και σε εντάσεις λευκού φωτός 2000 και 8000 lux. Τα δοχεία καλλιέργειας *Phormidium* αποτελούνται από 1,5 L ανεστραμμένα πλαστικά μπουκάλια και για τα άλλα δύο είδη κωνικών γυάλινων φιαλών Erlenmeyer, γεμάτες με το 1L με προηγουμένως αποστειρωμένο θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με μέσο Walne. Τα τρία τελικά διαλύματα αποθεμάτων A, B και C που αποτελούν τη μέση φόρμουλα της Walne χρησιμοποιήθηκαν σε αναλογία 1 ml ανά λίτρο νερού καλλιέργειας. Για τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά N, P και K, 300 γραμμάρια NaNO<sub>3</sub>, 20 γραμμάρια NH<sub>4</sub>Cl και 30 γραμμάρια KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Germany) αραιώθηκαν σε 1 λίτρο αποσταγμένου νερού για να δημιουργηθούν διάλυμα A. ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (30 g), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (25 g), CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (30 g) και MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (20 g) είναι ιχνοστοιχεία (Merck, Germany) που διαλύονται σε 1 λίτρο αποσταγμένου νερού για να καταστεί διάλυμα B. Το διάλυμα C περιέχει 100 mg της βιταμίνης B<sub>12</sub>, 100 mg βιοτίνης και 10 mg θειαμίνης (Merck, Germany) αραιωμένη σε 1 λίτρα αποσταγμένου νερού.

Χρησιμοποιήθηκε λευκό φως που εκπέμπεται από μια σειρά από λαμπτήρες LED 20 Watt 1600 LM. Οι εντάσεις 40 και 160 μmol photons/m<sup>2</sup>/s (2000 και 8000 lux, αντίστοιχα) ελήφθησαν τοποθετώντας τα δοχεία στη σωστή απόσταση από τους λαμπτήρες. Η ένταση μετρήθηκε στο κέντρο της εξωτερικής επιφάνειας των δοχείων χρησιμοποιώντας ένα λουξόμετρο (BioBlock LX -101, Panasonic). Η περίοδος φωτισμού των 16hL:8hD καθορίζονταν από ηλεκτρικό χρονοδιακόπτη που ενεργοποίησε και απενεργοποιούσε τους λαμπτήρες. Για τον πειραματισμό χρησιμοποιώντας έγχρωμο φως, τα δοχεία καλύφθηκαν με διαφορετικά περιτυλίγματα φίλτρων χρώματος (πράσινο, μπλε και κόκκινο) και τοποθετήθηκαν στην κατάλληλη απόσταση του λευκού φωτός LED που έλαβε 8000 lux. Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε εναιώρημα με έγχυση αέρα (με φυσική περιεκτικότητα σε CO<sub>2</sub>) μέσω πιπέτας γυαλιού 2 ml (μία σε κάθε δοχείο) με παροχή μισού όγκου καλλιέργειας ανά λεπτό. Οι πιπέτες συνδέονταν μέσω

αποστειρωμένων πλαστικών σωλήνων με το σύστημα παροχής κεντρικού αέρα διερχόμενου μέσω φίλτρου 0,45 μm, το οποίο τροφοδοτούνταν από έναν φυσητήρα.

Οι ημερήσιες πυκνότητες κυττάρων καταγράφονταν χρησιμοποιώντας ένα αιματοκυτταρόμετρο Fuchs-rosenthal για μονοκύτταρα είδη και ξήρανση και ζύγιση δείγματος των νηματοειδών κυανοβακτηρίων κάθε 2-4 ημέρες. Με αυτές τις διαδικασίες καταγράφηκε η ανάπτυξη των φυκών, η οποία μετρήθηκε είτε ως κύτταρα/ml για τα μονοκύτταρα είδη, είτε ως ξηρό βάρος ανά λίτρο (g DW/L) για τα νηματοειδή κυανοβακτήρια. Ταυτόχρονα, η οπτική πυκνότητα καταγράφηκε στα 750 nm στο φασματοφωτόμετρο (για όλα τα είδη). Το ξηρό βάρος υπολογίστηκε φιλτράροντας μια γνωστή ποσότητα καλλιέργειας μέσω φίλτρων 0,45 μm GF/C σε αντλία κενού (heto-sue-3q). Τα φίλτρα πλύθηκαν στη συνέχεια με όξινο ανθρακικό αμμώνιο για την αφαίρεση των αλάτων και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε φούρνο στους 100 °C για 2 ώρες. Η διαφορά βάρους μεταξύ του αποξηραμένου δείγματος και του φίλτρου έδωσε το βάρος του φύκους το οποίο κατόπιν το αναγάγαμε στο λίτρο.

Τα μη επεξεργασμένα δείγματα καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των φάσματος απορρόφησης των καλλιεργειών σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-1800 (Kyoto, Ιαπωνία) και τα δεδομένα μετασχηματίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό UVProbe 3.2.3.

Η χλωροφύλλη-a και τα ολικά καροτενοειδή στην περίπτωση των κυανοβακτηρίων εκχυλίστηκαν με απόλυτη μεθανόλη από δείγματα φυγοκεντρωμένης καλλιέργειας και οι συγκεντρώσεις τους (μg/ml) προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά σε ένα φασματοφωτόμετρο Shimadzu Uvmini-1240 (Kyoto, Ιαπωνία) χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\text{chl-a} = 12.9447 (A665 - A720)$$

$$\text{Total carot.} = \frac{1000(A470 - A720) - 2.86\text{chlor.} - a}{221}$$

Οπου: (A) σημαίνει την απορρόφηση (ή την οπτική πυκνότητα-OD) του μετρούμενου δείγματος στο υποδεικνυόμενο μήκος κύματος.

Στην περίπτωση του χλωροφύκους *Dunaliella* sp. η χλωροφύλλη-a, η χλωροφύλλη-b και τα συνολικά καροτενοειδή εκχυλίστηκαν με DMSO από δείγμα φυγοκεντρωμένων καλλιεργειών και οι συγκεντρώσεις τους (μg/mL) υπολογίστηκαν φασματοφωτομετρικά χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\text{chl-a} = 12.47(A665) - 3.62(A649)$$

$$\text{chl-b} = 25.06(A649) - 6.5(A665)$$

$$\text{Total carot.} = \frac{1000(A480) - 1.29(\text{chlor.} - a) - 53.78(\text{chlor.} - b)}{220}$$

Η χλωροφύλλη-*a* και τα ολικά καροτενοειδή στην περίπτωση του δινομαστιγωτού *A. carterae* εκχυλίστηκαν με DMSO και υπολογίστηκαν όπως παραπάνω αλλά για τη χλωροφύλλη-*c*, η εκχύλιση έγινε με μεθανόλη στους 20 °C και η συγκέντρωσή της (μg/mL) υπολογίστηκε βάσει της εξίσωσης:

$$\text{chl-c} = 23.5902(A630) - 7.8516(A647) - 1.5214(A664) - 1.7443(A691)$$

Η εκτίμηση του β-καρωτινίου έγινε εν συντομία ως εξής: Συλλέχθηκαν 1 ml καλλιέργειας φυκών, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 3000 σ.α.λ. για να καθιζάνει η μάζα των κυττάρων ως ίζημα. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στο ίζημα προστέθηκαν 3 mL μίγματος εξανίου/αιθανόλης (1:2). Μετά από ζωηρή ανάδευση και επανααιώρηση, το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 3000 σ.α.λ. για 10 λεπτά. Αφού σχηματίστηκαν δύο φάσεις, η ανώτερη φάση που περιείχε το β-καροτένιο συλλέχθηκε και η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 450 nm και ο ακόλουθος τύπος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης β-καροτένιο ως μg/mL:

$$\beta\text{-carotene (}\mu\text{g/mL)} = 25 \times A_{450}$$

Με κατάψυξη (-20 °C) για 24 ώρες συμπυκνωμένης γνωστής ποσότητας κυανοβακτηριακής καλλιέργειας σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.1 M (pH 7.1) ως διαλύτη σε αναλογία 1:10 (μάζα φυκών: διαλύτης) και στη συνέχεια απόψυξη στους 4 °C στο σκοτάδι, το περιεχόμενο των κυττάρων σε βιλιπρωτεΐνες [φυτοκυανίνη (PC) – φυκοερυθρίνη (PE) – αλλοφυκοκυανίνη (APC)] εκχυλίστηκε. Κατά τη διάρκεια δύο ημερών, η διαδικασία της κατάψυξης και της απόψυξης επαναλήφθηκε. Ο πολτός του δείγματος στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 3000 rpm για 5 λεπτά για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της φυκοκυανίνης (PC), της φυκοερυθρίνης (PE) και της αλλοφυκοκυανίνης (APC) μετρημένες σε mg/mL στο υπερκείμενο χρησιμοποιώντας μετρήσεις οπτικής πυκνότητας στο φασματοφωτόμετρο με τις εξισώσεις:

$$\text{PC} = \frac{A_{615} - 0.474 A_{652}}{5.34}$$

$$\text{PE} = \frac{A_{562} - [(2.41\text{PC}) - (0.849\text{APC})]}{9.62}$$

$$\text{APC} = \frac{A_{652} - 0.208 A_{615}}{5.09}$$

Από τις παραπάνω εξισώσεις η απόδοση (yield) σε φυκοκυανίνη (PC) σε mg PC/g dry weight υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

$$\text{PC}_{\text{yield}} = \frac{\text{PC} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \times V \text{ (mL)}}{\text{D. W. (g)}}$$

Όπου: PC<sub>yield</sub> = mg φυκοκυανίνης ανά g ξηρού βάρους μικροφύκους

V = όγκος διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε (mL)

D.W. = g ξηρού βάρους της μάζας μικροφύκους που χρησιμοποιήθηκε

Χρησιμοποιώντας το δωρεάν πρόγραμμα PAST3, οι διάφορες μεταβλητές αναλύθηκαν στατιστικά με χρήση ANOVA και ελέγχου Tukey για σύγκριση των μέσων στο επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Οι στατιστικοί υπολογισμοί των γραμμών παλινδρόμησης, του συντελεστή συσχέτισης Pearson, της τυπικής απόκλισης (SD) και του τυπικού σφάλματος (SE) έγιναν με το λογισμικό Excel (Microsoft, ΗΠΑ).

Η ημερήσια μέτρηση κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο Fuchs-Rosenthal για μονοκύτταρα είδη και ξήρανση-ζύγιση ενός διηθήματος δείγματος των νηματοειδών κυανοβακτηρίων κάθε 3-4 ημέρες χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της ανάπτυξης των φυκών, η οποία μετρήθηκε ως κύτταρα/mL για μονοκύτταρα μικροφύκη ή ξηρό βάρος (g/L) για τα νηματοειδή κυανοβακτήρια. Ταυτόχρονα, η οπτική πυκνότητα στα 750 nm καταγράφηκε στο φασματοφωτόμετρο (για όλα τα είδη). Χρησιμοποιώντας μη επεξεργασμένα δείγματα καλλιέργειας, τα φάσματα απορρόφησης των καλλιεργειών σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-1800 (Kyoto, Ιαπωνία), και τα δεδομένα μετασχηματίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό UVprobe 3.2.3.

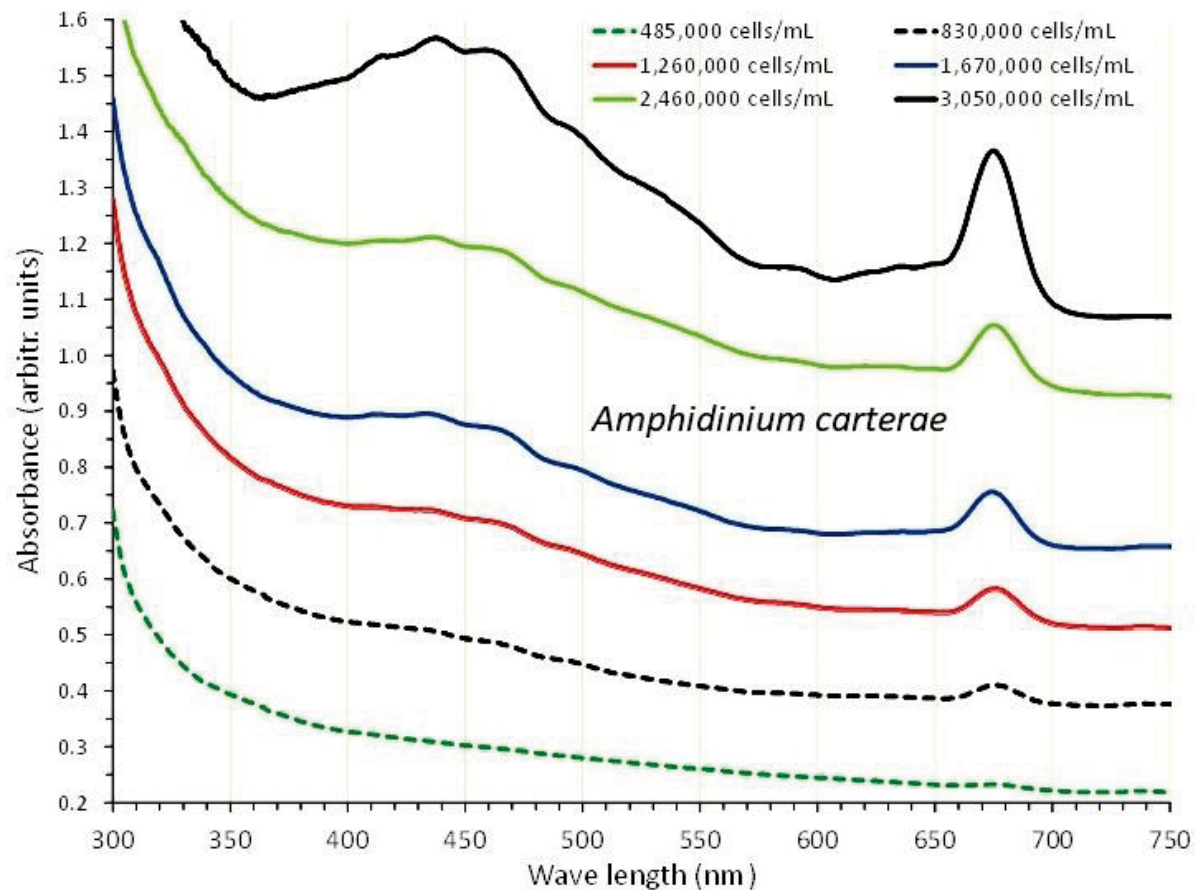
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### *Amphidinium carterae*

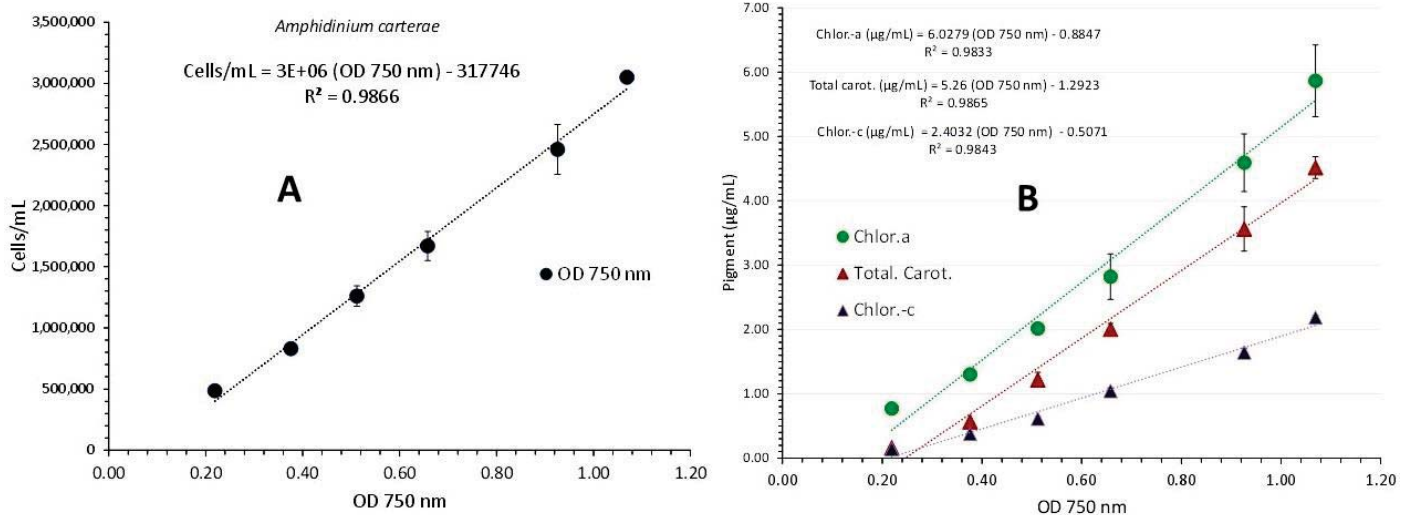
Το *A. carterae* καλλιεργήθηκε για 15 ημέρες σε πλαστικά μπουκάλια 1 L με αλατότητα 30 ppt και 8000 lux φωτισμού. Από τη δεύτερη έως τη δέκατη πέμπτη ημέρα της καλλιέργειας, συλλέχθηκαν έξι φάσματα απορρόφησης, με κυτταρικές πυκνότητες που κυμαίνονταν από 485.000 κύτταρα/mL τη δεύτερη ημέρα έως 3.050.000 κύτταρα/mL τη δέκατη πέμπτη ημέρα (Σχήμα 13). Με βάση την γραφική παράσταση της οπτικής πυκνότητας (OD) κάθε φάσματος στα 750 nm έναντι των αντίστοιχων πυκνοτήτων φυκών (Σχήμα 14 A), παρήχθη μια γραμμή παλινδρόμησης με  $R^2=0.986$  και την εξίσωσή της πρώτης τάξης: «Πυκνότητα κυττάρων (κύτταρα/mL) = 3.000.000 x OD750nm - 317.746”.

Η συνολική εικόνα των φασμάτων εμφανίζει ένα ομοιόμορφο σχήμα των καμπυλών με σχεδόν επίπεδο σχήμα για την πρώτη (2η ημέρα) και στη συνέχεια, τις επόμενες ημέρες, μια σταδιακά αυξανόμενη κορυφή στα μήκη κύματος που διακρίνουν τις διαφορετικές χρωστικές (675 και 440) nm για τη χλωροφύλλη-α, 465 nm για τα καρροτενοειδή και 590 nm για τη χλωροφύλλη-β. Στο τελικό φάσμα (της υψηλότερης πυκνότητας φυκών), οι κορυφές για όλα τα προαναφερθέντα μήκη κύματος έγιναν σημαντικά πιο έντονες. Το Σχήμα 15 δείχνει τις τιμές κάθε χρωστικής για το μήκος κύματος και την πυκνότητα φυκών που σχετίζεται με κάθε φάσμα. Όλες οι χρωστικές αυξάνονταν σαφώς καθώς ωρίμαζε η καλλιέργεια και αυτή η αύξηση ήταν ιδιαίτερα αισθητή στα δύο τελευταία φάσματα με πυκνότητες φυκών 2,460,000 και 3,050,000 κύτταρα/mL. Η χλωροφύλλη-α ήταν πάντα πολύ υψηλότερη από τη χλωροφύλλη-β ή τα ολικά καρροτενοειδή σε όλες τις πυκνότητες. Σε πυκνότητα 3,050,000 κυττάρων/mL, η μέγιστη συγκέντρωση όλων των χρωστικών καταγράφηκε ως:  $5.86 \pm 0.322$ (SE)  $\mu\text{g/mL}$  χλωροφύλλη-α,  $2.18 \pm 0.019$ (SE)  $\mu\text{g/mL}$  χλωροφύλλη-β και  $4.52 \pm 0.099$ (SE)  $\mu\text{g/mL}$  ολικών καρροτενοειδών. Χρησιμοποιώντας τις τιμές χρωστικής, το διάγραμμα τους σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές τους των 750 nm απεικονίζεται στο Σχήμα 14B. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης για τη χρωστική ουσία – σχέση OD 750 nm: “Chlor.-a ( $\mu\text{g/mL}$ ) =  $6.0279 \times (\text{OD } 750 \text{ nm}) - 0.8847$ ” ( $R^2 = 0.9833$ ), “Total carot. ( $\mu\text{g/mL}$ ) =  $5.26 \times (\text{OD } 750 \text{ nm}) - 1.2923$ ” ( $R^2 = 0.9865$ ) και

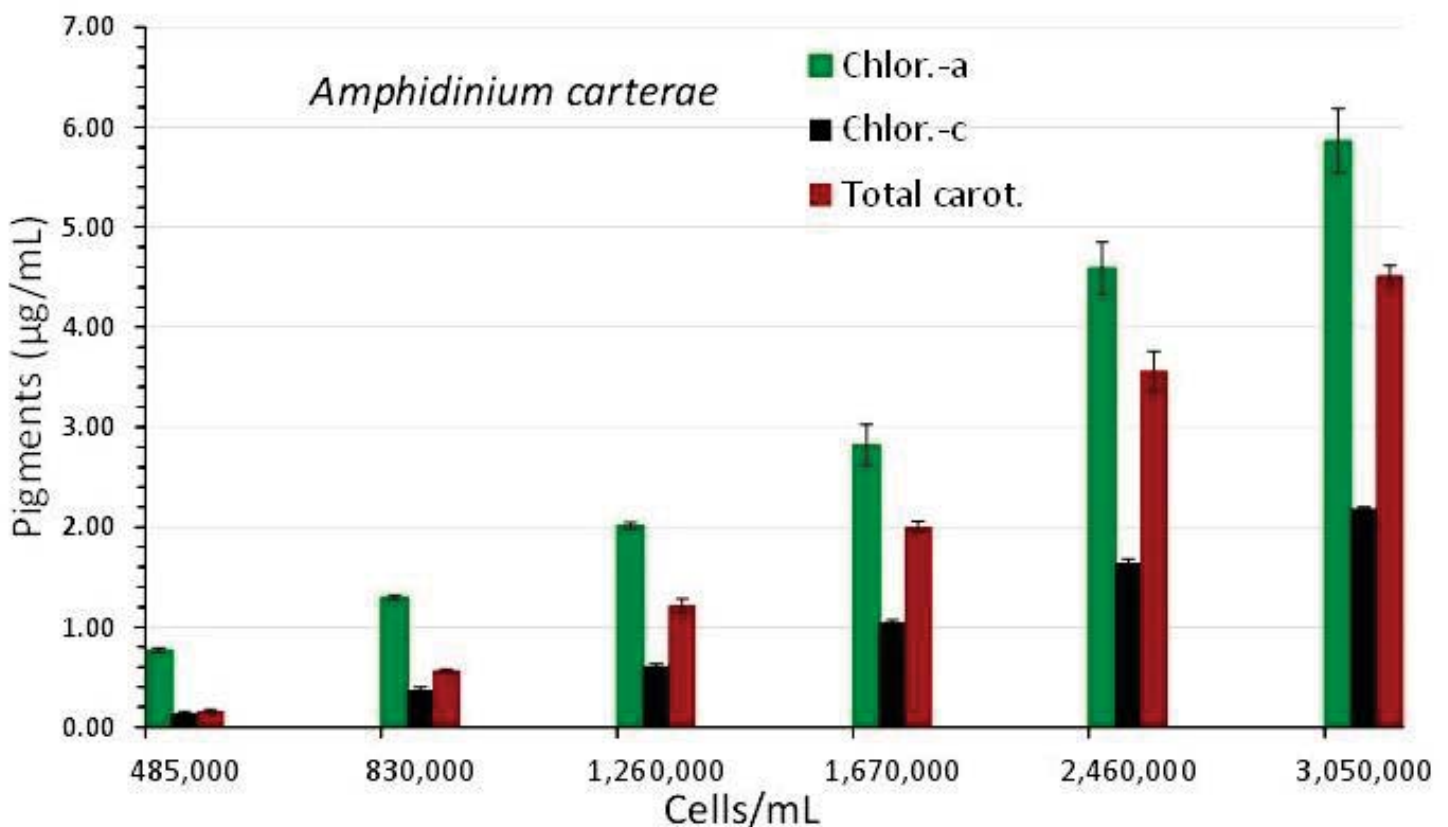
“Chlor.-c (μg/mL) = 2.4032x(OD 750 nm) - 0.5071” ( $R^2 = 0.9843$ ) είναι όλες είναι πολύ προγνωστικές όπως υποδεικνύεται από τον πολύ υψηλό συντελεστή Pearson ( $R^2 > 0,98$ ).



**Σχήμα 13.** Φάσματα απορρόφησης καλλιέργειας *Amphidinium carterae* στη διάρκεια του χρόνου σε διάφορες αυξανόμενες πυκνότητες σε κύτταρα/mL (cells/mL).



**Σχήμα 14.** Συσχέτιση της πυκνότητας κυττάρων (A) και της συγκέντρωσης των χρωστικών (B) με την οπτική πυκνότητα (Optical Density-OD) στα 750 nm σε καλλιέργειες του *Amphidinium carterae*. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 αντιγράφων ± SD.



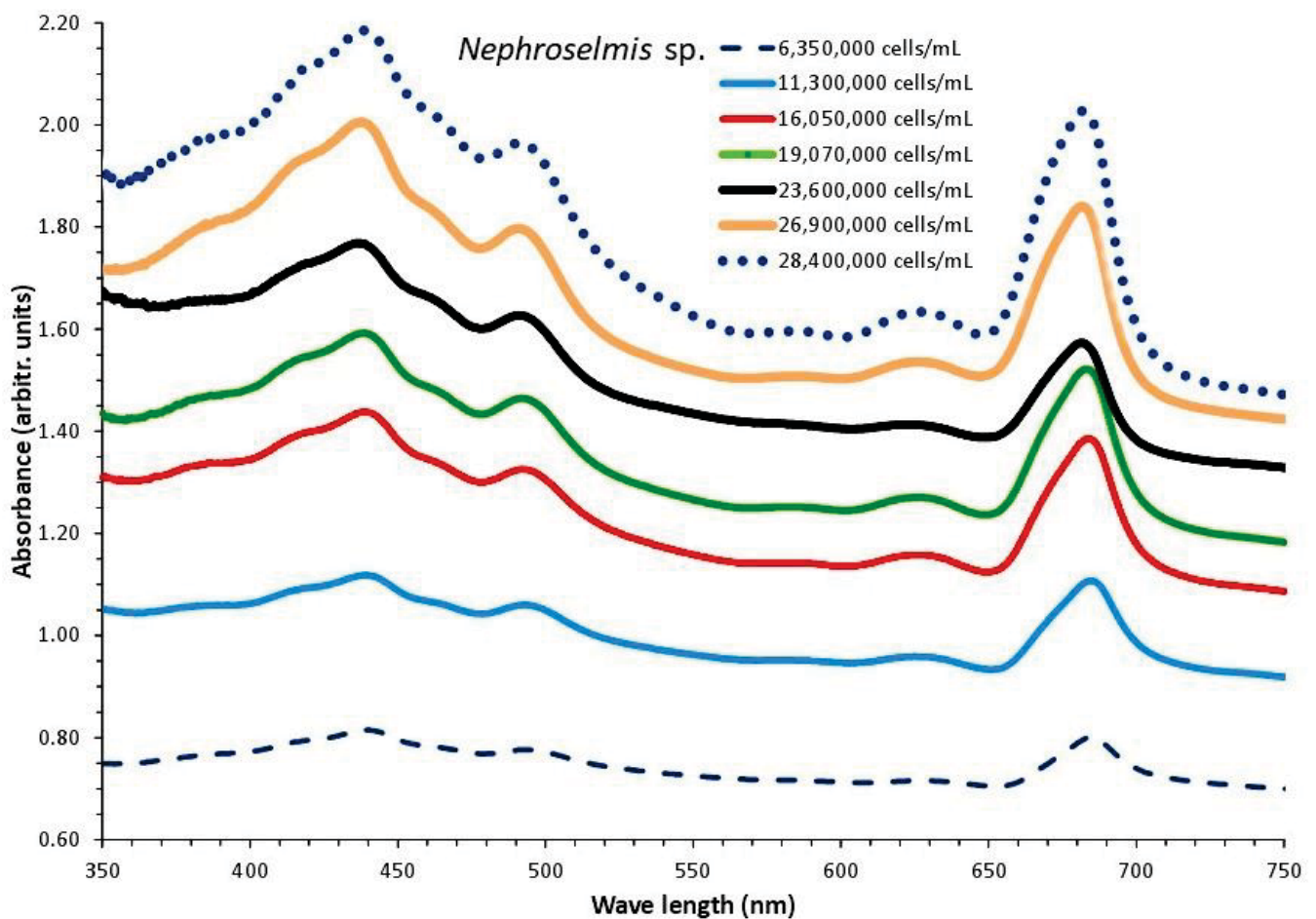
**Σχήμα 15.** Συγκέντρωση χρωστικών (pigments) σε µg/mL ± SE των καλλιεργειών του *Amphidinium carterae* σε διάφορες πυκνότητες κυττάρων (cells/mL). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 αντιγράφων ± SE.



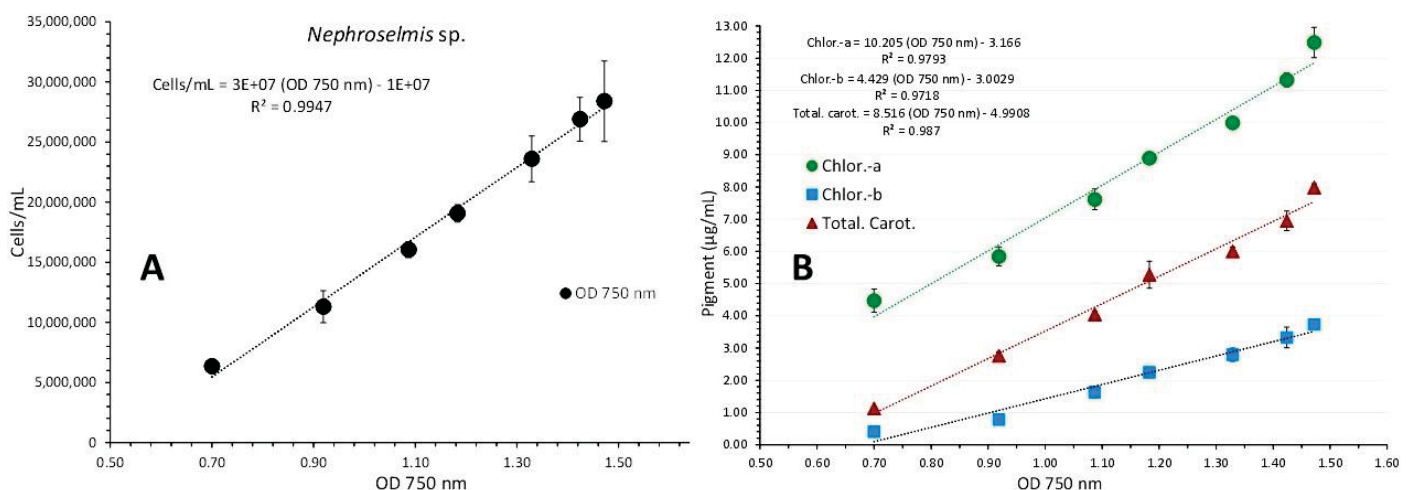
## ***Nephroselmis* sp.**

Το *Nephroselmis* sp. καλλιεργήθηκε για 20 ημέρες σε γυάλινες φιάλες Erlenmeyer του 1 L σε αλατότητα 40 ppt με φωτισμό 8000 lux. Από τη δεύτερη έως τη δέκατη ένατη ημέρα της καλλιέργειας, συλλέχθηκαν φάσματα απορρόφησης για επτά διαφορετικές ημέρες, με πυκνότητες κυττάρων που κυμαίνονταν από 6,350,000 κύτταρα/mL τη δεύτερη ημέρα έως 28,400,000 κύτταρα/mL τη δέκατη ένατη ημέρα (Σχήμα 16). Η γραφική παράσταση της οπτικής πυκνότητας κάθε φάσματος (OD) έναντι των αντίστοιχων πυκνοτήτων φυκών στα 750 nm (Σχήμα 17A) παρήγαγε μια γραμμή παλινδρόμησης με  $R^2=0.9947$  και εξηγήθηκε από την εξίσωση πρώτης τάξης: «πυκνότητα κυττάρου (κύτταρα/mL) =  $3 \times 10^7 \times OD_{750nm} - 10^7$ ».

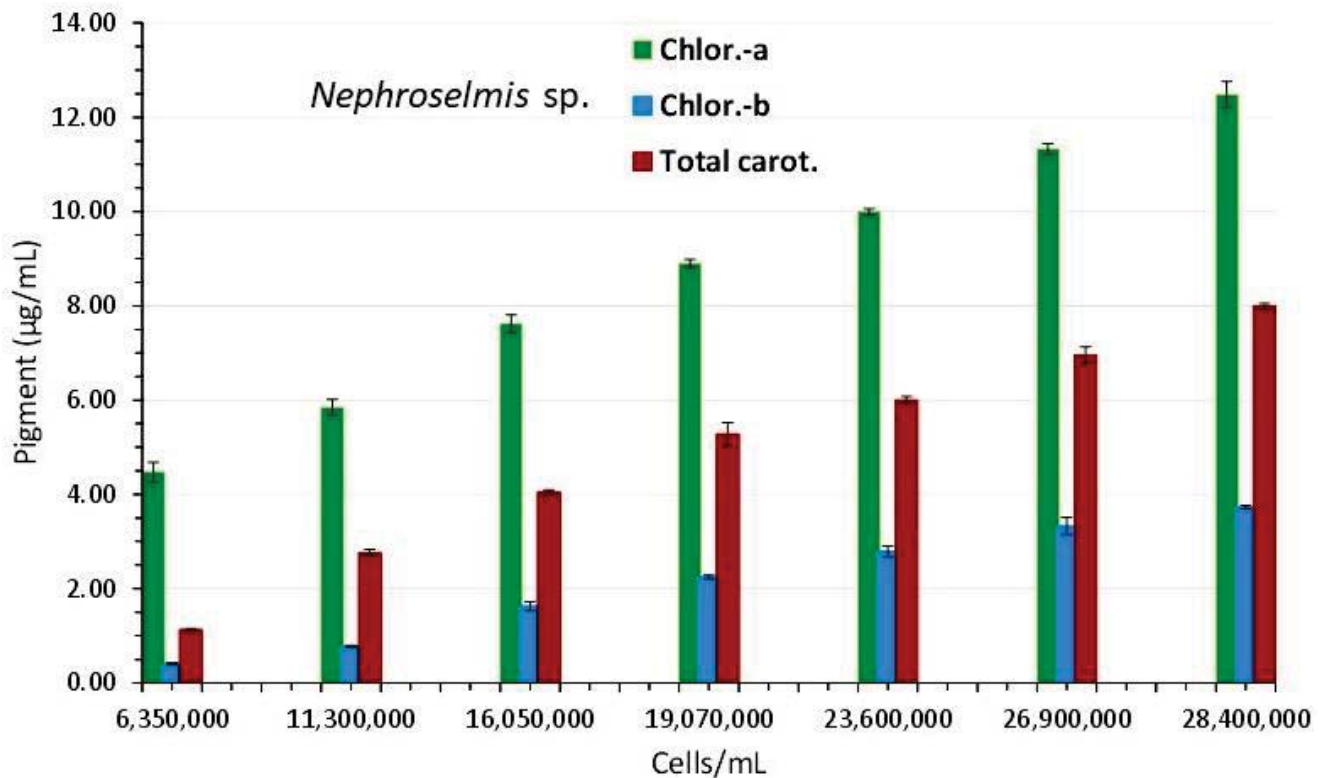
Η συνολική εμφάνιση των φασμάτων αποκαλύπτει ένα σταθερό μοναδικό σχήμα των καμπυλών με ελάχιστα αντιληπτές κορυφές στην πρώτη (2η ημέρα) και στη συνέχεια, τις επόμενες ημέρες, μια σταδιακά αυξανόμενη κορυφή στα μήκη κύματος που διακρίνουν τις διαφορετικές χρωστικές (682 και 440 nm για τη χλωροφύλλη-a, 491 nm για τα καροτενοειδή και 627 nm για τη χλωροφύλλη-b). Στα δύο τελευταία φάσματα, οι κορυφές για όλα τα προαναφερθέντα μήκη κύματος έγιναν σημαντικά πιο αισθητές (των ημερών 17 και 19 με τις υψηλότερες πυκνότητες φυκών). Το Σχήμα 18 δείχνει τις τιμές κάθε χρωστικής για κάθε αντίστοιχο μήκος κύματος και την πυκνότητα φυκών κάθε φάσματος. Υπάρχει μια προφανής αύξηση όλων των χρωστικών κατά την ωρίμανση της καλλιέργειας, η οποία έγινε πολύ εμφανής στα δύο τελευταία φάσματα των πυκνοτήτων φυκών των 26,900,000 και 28,400.000 κυττάρων/mL. Η τιμή της χλωροφύλλης-a σε όλες τις πυκνότητες ήταν πάντα υψηλότερη είτε από τη χλωροφύλλη-b είτε από τα ολικά καροτενοειδή. Η μέγιστη περιεκτικότητα σε όλες τις χρωστικές καταγράφηκε στην πυκνότητα των 28,400,000 κυττάρων/mL με:  $12.487 \pm 0.273(SE)$   $\mu\text{g/mL}$  χλωροφύλλη-a,  $3.733 \pm 0.033(SE)$   $\mu\text{g/mL}$  χλωροφύλλη-b και  $7.99 \pm 0.064(SE)$   $\mu\text{g/mL}$  ολικά καροτενοειδή. Χρησιμοποιώντας τις τιμές χρωστικής, το διάγραμμα τους σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές τους των 750 nm απεικονίζεται στο Σχήμα 17B. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης για τη χρωστική ουσία – σχέση OD 750 nm: “Chlor.-a ( $\mu\text{g/mL}$ ) =  $10,205 \times (OD\ 750\ \text{nm}) - 3,166$ ” ( $R^2 = 0,9793$ ), “Total carot. ( $\mu\text{g/mL}$ ) =  $8.516 \times (OD\ 750\ \text{nm}) - 4.9908$ ” ( $R^2 = 0.987$ ) and “Chlor.-b ( $\mu\text{g/mL}$ ) =  $4.429 \times (OD\ 750\ \text{nm}) - 3.0029$ ” ( $R^2 = 0.9716$ ), είναι όλες είναι πολύ προγνωστικές όπως υποδεικνύεται από τον πολύ υψηλό συντελεστή Pearson ( $R^2 > 0,97$ ).



**Σχήμα 16.** Φάσματα απορρόφησης καλλιέργειας *Nephroselmis* sp. στη διάρκεια του χρόνου σε διάφορες αυξανόμενες πυκνότητες σε κύτταρα/mL (cells/mL).



**Σχήμα 17.** Συσχέτιση της πυκνότητας κυττάρων (A) και της συγκέντρωσης των χρωστικών (B) με την οπτική πυκνότητα (Optical Density-OD) στα 750 nm σε καλλιέργειες του *Nephroselmis* sp. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 αντιγράφων  $\pm$  SD.



**Σχήμα 18.** Συγκέντρωση χρωστικών (pigments) σε µg/mL  $\pm$  SE των καλλιιεργειών του *Nephroselmis* sp. σε διάφορες πυκνότητες κυττάρων (cells/mL). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 αντιγράφων  $\pm$  SE.

### ***Anabaena* sp. – Η επίδραση του λευκού φωτός**

Η καλλιέργεια του *Anabaena* sp. διήρκεσε 17 ημέρες και έγινε σε αλατότητα 40 ppt, φωτισμό 2000 και 8000 lux και χρησιμοποιώντας τρεις γυάλινες φιάλες Erlenmeyer του 1 L για κάθε σετ φωτισμού. Όλες οι παράμετροι εξετάστηκαν και καταγράφηκαν ξεχωριστά για καθεμία από τις εντάσεις φωτός εκτός από τη συσχέτιση του ξηρού βάρους – OD 750 nm όπου χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρωμένα δεδομένα και από τις δύο εντάσεις.

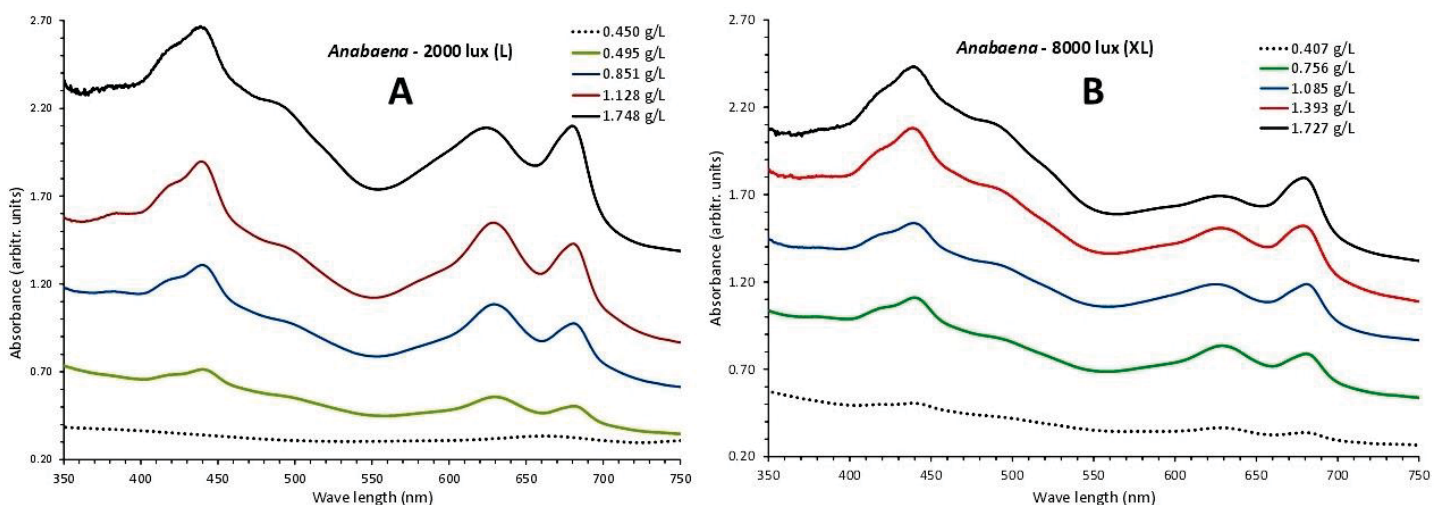
Ελήφθησαν φάσματα απορρόφησης 4 ημερών που καλύπτουν την περίοδο από τη 2η έως τη 16η ημέρα της καλλιέργειας, με καταγεγραμμένα ξηρά βάρη από 0.45 και 0.407 g/L τη δεύτερη ημέρα έως 1.14 και 1.727 g/L τη δέκατη έκτη ημέρα για χαμηλό φωτισμό (L) 2000 lux και extra light (XL) 8000 lux, αντίστοιχα. (Σχήμα 19). Με βάση την τιμή των 750 nm της οπτικής πυκνότητας (OD) κάθε φάσματος, η συγκεντρωτική γραφική παράσταση τους έναντι του αντίστοιχου ξηρού βάρους (Σχήμα 20A) οδήγησε σε μια γραμμή παλινδρόμησης με  $R^2=0,9989$  και περιγράφεται από την εξίσωση πρώτης τάξης «ξηρό βάρος ( g/mL) =  $1.2368 \times OD750nm + 0.0754$ ».

Η συνολική εικόνα των φασμάτων δείχνει ένα ομοιόμορφο συνολικό σχήμα των καμπυλών με ελαφρώς ευδιάκριτες κορυφές για το πρώτο (2η ημέρα) και στη συνέχεια, τις επόμενες ημέρες, μια σταδιακή αύξηση των κορυφών στα μήκη κύματος που χαρακτηρίζουν τις διάφορες χρωστικές. 679 και 439 nm για τη

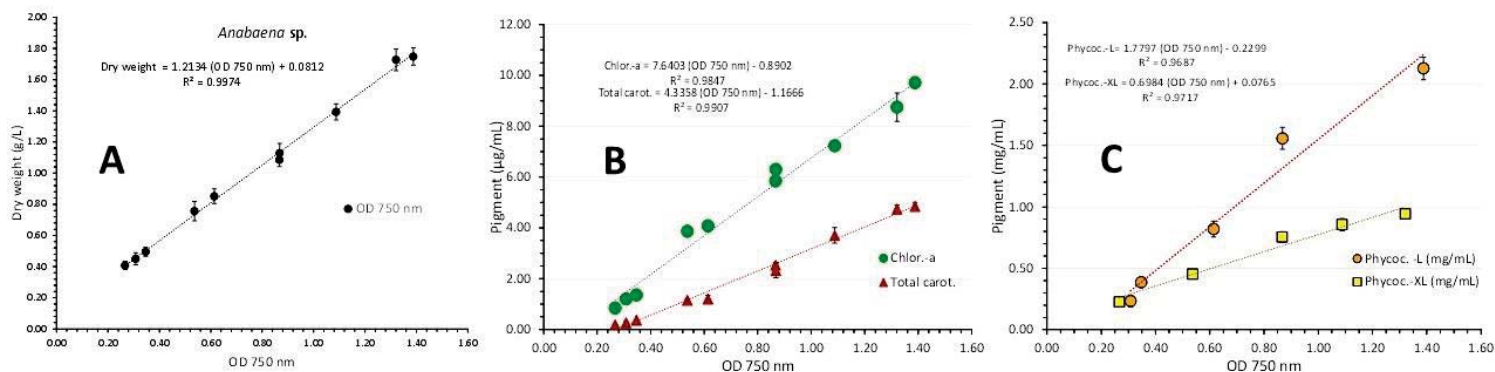
χλωροφύλλη-α, 490 nm για τα καρροτενοειδή και 630 nm για τη φυκοκυανίνη). Οι κορυφές για όλα τα παραπάνω μήκη κύματος έγιναν πολύ εμφανείς στα δύο τελευταία φάσματα (των ημερών 12 και 16 για το L και 14 και 16 για το XL με τις υψηλότερες πυκνότητες φυκών). Οι τιμές κάθε χρωστικής για κάθε αντίστοιχο μήκος κύματος και πυκνότητα φυκών κάθε φάσματος απεικονίζονται στο Σχήμα 21. Υπάρχει μια προφανής αύξηση όλων των χρωστικών κατά την ωρίμανση της καλλιέργειας που έγινε πολύ εμφανής στα δύο τελευταία φάσματα των πυκνοτήτων φυκών 0.851 και 1.141 g/L σε L και 1.393 και 1.727 g/L σε XL.

Η τιμή της χλωροφύλλης-α σε όλες τις πυκνότητες και των δύο συνθηκών φωτός ήταν πάντα υψηλότερη από αυτή των ολικών καρροτενοειδών. Η μέγιστη περιεκτικότητα καταγράφηκε στο ξηρό βάρος 1.141 g/L με:  $6.163 \pm 0,114(\text{SE})$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  χλωροφύλλη-α και  $2.319 \pm 0,163(\text{SE})$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  ολικών κα-ροτενοειδών σε «L» και σε 1.727 g/L με:  $8.75 \pm 0.323(\text{SE})$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  χλωροφύλλη-α και  $4.742 \pm 0.091(\text{SE})$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  ολικών καρροτενοειδών στο «XL». Στην περίπτωση της φυκοκυανίνης η κατάσταση ήταν εντελώς διαφορετική καθώς η αναλογία της περιεκτικότητας σε φυκοκυανίνη είτε σε συγκέντρωση (mg/mL) είτε σε απόδοση (mg/g dw), ήταν υψηλότερη κατά την αύξηση της βιομάζας των φυκών σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού (L) σε σύγκριση με τον υψηλό φωτισμό (XL) (Σχήμα 21).

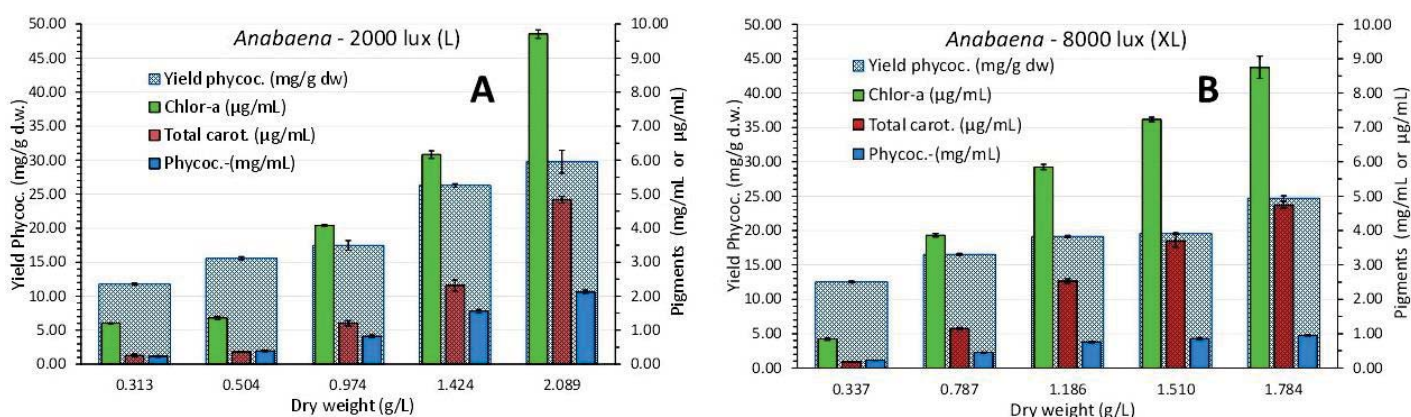
Χρησιμοποιώντας τις τιμές της χρωστικής, η γραφική παράσταση τους για χλωροφύλλη-α και ολικά καρροτενοειδή έναντι των αντίστοιχων τιμών τους των 750 nm απεικονίζεται στο Σχήμα 20B. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης για τη χρωστική ουσία – σχέση OD 750 nm: «Chlor.-a ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) =  $7.6403 \times (\text{OD } 750 \text{ nm}) - 0.8902$ » ( $R^2 = 0.9847$ ) και «Total carot. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) =  $4.3358 \times (\text{OD } 750 \text{ nm}) - 1.1666$ » ( $R^2 = 0.9907$ ), είναι και τα δύο πολύ προγνωστικά, όπως υποδεικνύεται από τον πολύ υψηλό συντελεστή Pearson ( $R^2 > 0,98$ ). Οι αντίστοιχες εξισώσεις για τη σχέση φυκοκυανίνης - OD 750 nm (Σχήματα 20C) υπολογίστηκαν ξεχωριστά για το φωτισμό «L» και «XL» και προέκυψαν: «Φυκοκυανίνη (mg/mL) =  $1.7797 \times (\text{OD } 750 \text{ nm}) - 0.2299$ . ( $R^2 = 0.9687$ ) σε "L" και "Φυκοκυανίνη (mg/mL) =  $0.6984 \times (\text{OD } 750 \text{ nm}) + 0.0765$ " ( $R^2 = 0.9897$ ) σε "XL", και τα δύο πολύ προγνωστικά όπως υποδεικνύεται από τον πολύ υψηλό συντελεστή Pearson ( $R^2 > 0,965$ ).



**Σχήμα 19.** Φάσματα απορρόφησης καλλιέργειας *Anabaena* sp. στη διάρκεια του χρόνου σε διάφορες αυξανόμενες πυκνότητες σε ξηρό βάρος (g dw/L) σε δύο διαφορετικές εντάσεις φωτισμού, (A) 2000 lux (L) και (B) 8000 lux (XL).



**Σχήμα 20.** Συσχέτιση της πυκνότητας κυττάρων (A), συγκέντρωσης χλωροφύλλης-α και ολικών καροτενοειδών (B) και φυκοκυανίνης σε δύο διαφορετικές εντάσεις φωτισμού (C) με την οπτική πυκνότητα (Optical Density-OD) στα 750 nm σε καλλιέργειες του *Anabaena* sp. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 αντιγράφων ± SD.

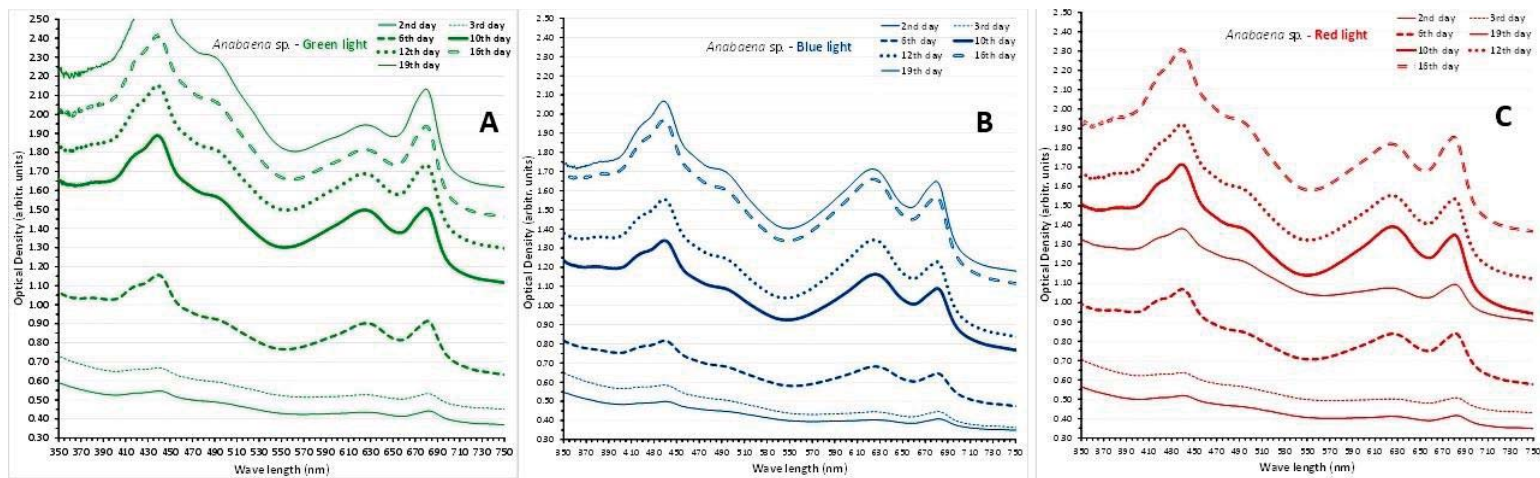


**Σχήμα 21.** Συγκέντρωση χρωστικών (pigments) σε µg/mL ± SE για χλωροφύλλη-α και ολικά καροτενοειδή, mg/mL για φυκοκυανίνη και απόδοση (yield) φυκοκυανίνης σε mg/g d.w. των καλλιεργειών του *Anabaena* sp. σε διάφορες πυκνότητες μαζών (g/L) σε δύο διαφορετικές εντάσεις φωτισμού, (A) 2000 lux (L) και (B) 8000 lux (XL). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 αντιγράφων ± SE.

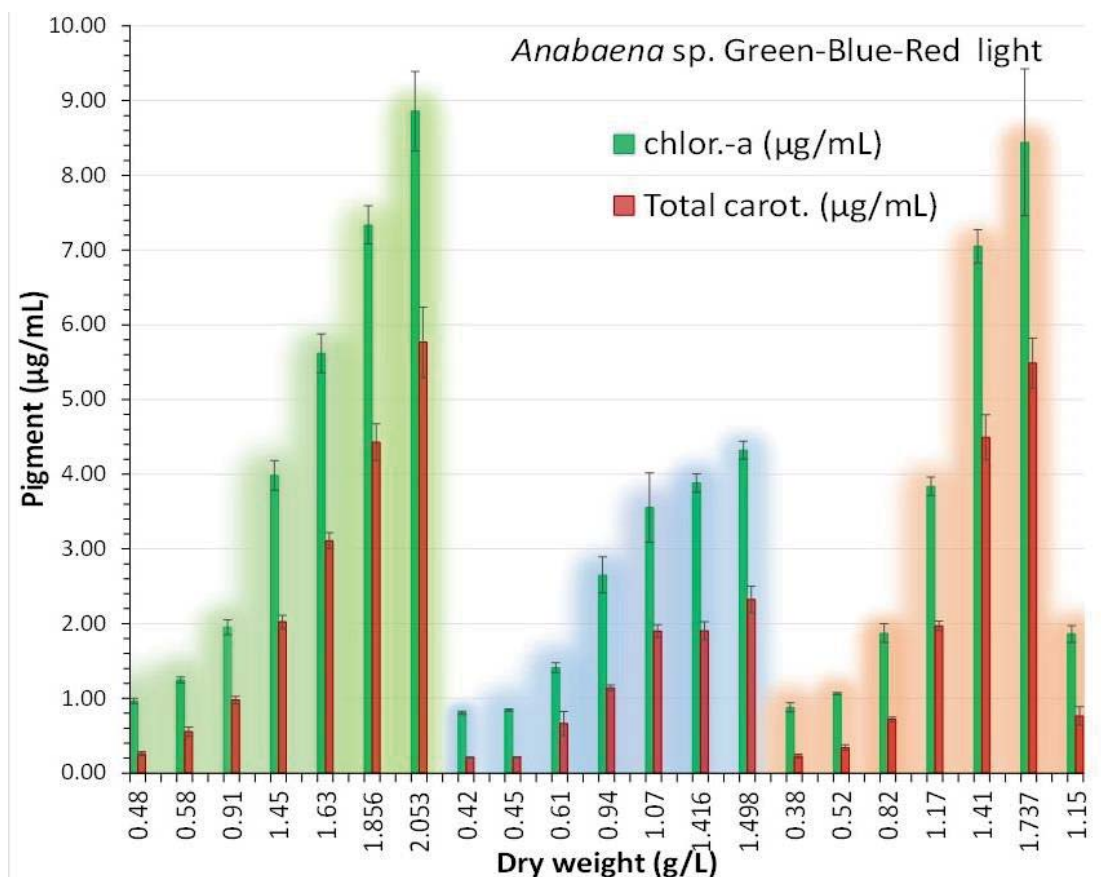
## **Anabaena** sp. – Η επίδραση τριών χρωμάτων φωτός

Τα αποτελέσματα της επίδρασης τριών διαφορετικών χρωμάτων φωτός στις καλλιέργειες του *Anabaena* sp. ήταν πολύ χαρακτηριστικά καθώς το περιεχόμενο των χρωστικών επηρεάστηκε από το κάθε χρώμα (πράσινο, μπλε, κόκκινο) με εμφανή τρόπο. Στο Σχήμα 22 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης για το κάθε χρώμα στη διάρκεια 19 ημερών καλλιέργειας. Προκύπτει ότι το πράσινο χρώμα ακολουθούμενο από το κόκκινο επιφέρει μια γρήγορη και συνεχή αύξηση της βιομάζας από τη 2<sup>η</sup> μέχρι τη 19<sup>η</sup> ημέρα στο πράσινο, ενώ στο κόκκινο η αύξηση ακολουθεί το ίδιο πρότυπο μέχρι τη 16<sup>η</sup> ημέρα και μετά καταρρέει. Στο μπλε η αύξηση είναι κατά τι πιο αργή και μετά τη 16<sup>η</sup> ημέρα σταματά. Οι κορυφές για τη χλωροφύλλη (682 nm) είναι πιο υψηλές στο πράσινο και το ίδιο συμβαίνει και για τα

καροτενοειδή (490 nm), ενώ οι κορυφές για τη φυκοκυανίνη (630 nm) είναι πιο έντονες στο μπλε και στο κόκκινο.

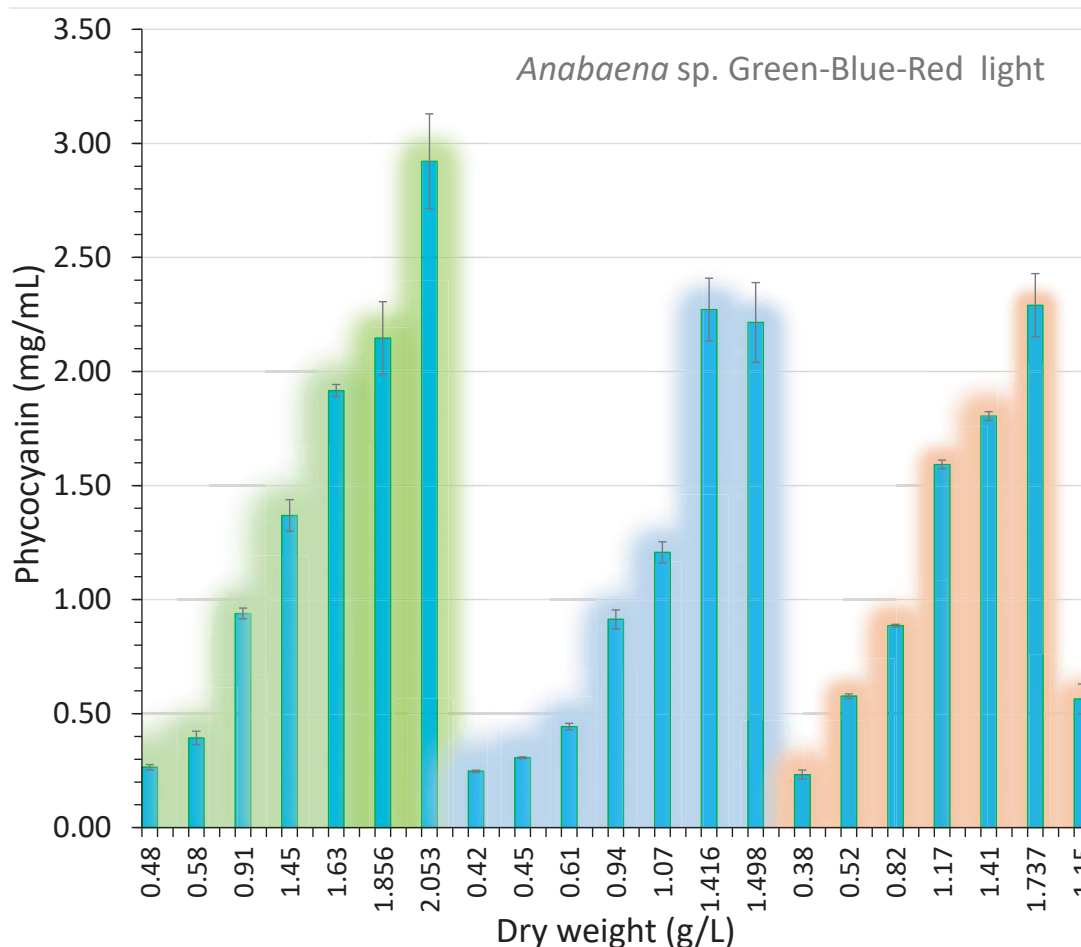


**Σχήμα 22.** Φάσματα απορρόφησης καλλιέργειών του νηματοειδούς λυανοβακτηρίου *Anabaena sp.* σε πράσινο φως (A), μπλε (B) και κόκκινο (C) σε 7 διαφορετικές ημέρες της διάρκειας της καλλιέργειας.

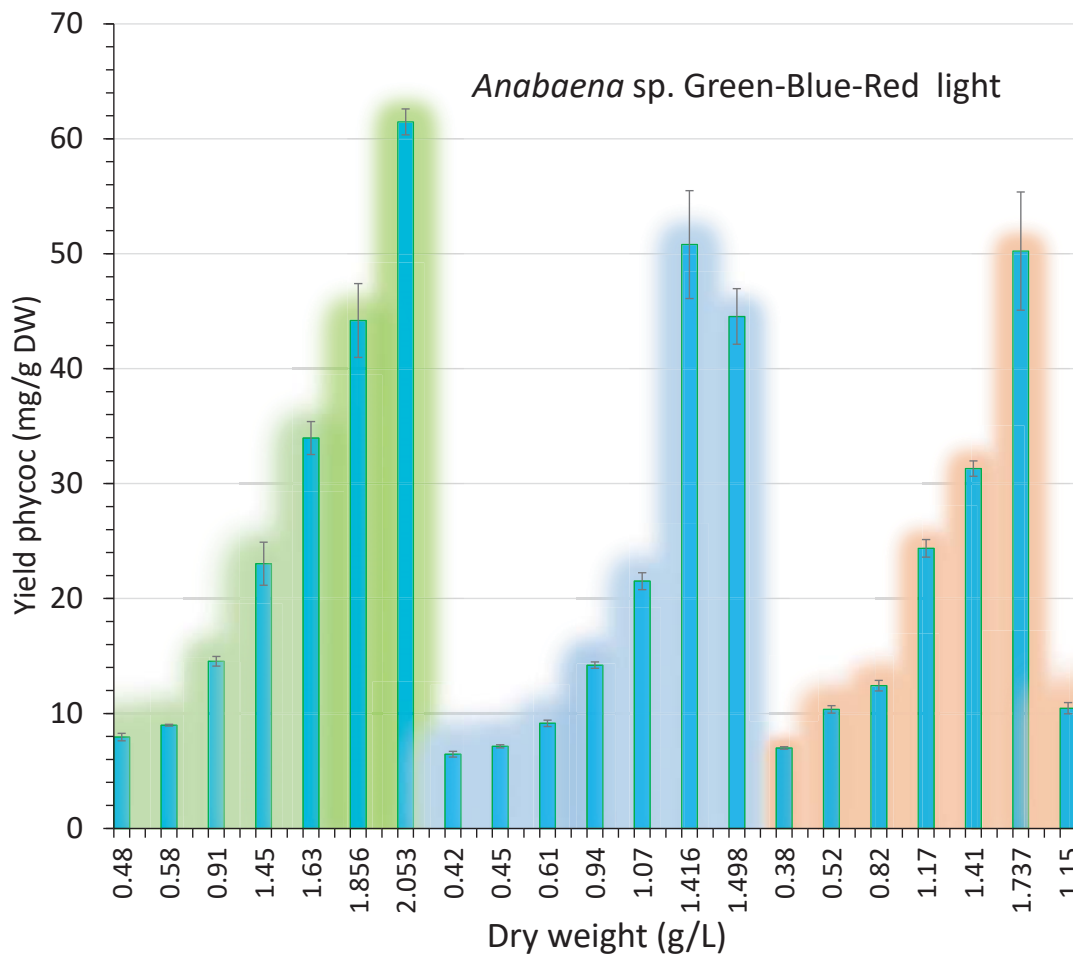


**Σχήμα 23.** Οι συγκεντρώσεις σε  $\mu\text{g/mL}$  των χρωστικών (pigments) χλωροφύλλης-α και ολικών καροτενοειδών του *Anabaena sp.* υπό πράσινο, μπλε και κόκκινο φως στην εξέλιξη της αύξησης της βιομάζας του ως ξηρό βάρος (dry weight) σε g/L κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

Από το Σχήμα 23 Προκύπτει ότι τόσο η απόδοση σε χλωροφύλλη όσο και ολικά καροτενοειδή μεγιστοποιείται στο πράσινο και κόκκινο φως συγκριτικά με το μπλε. Η απόδοση μάλιστα στο κόκκινο φως φθάνει το μέγιστο ενωρίτερα από το πράσινο μια και ο λόγος χλωροφύλλης / ξηρό βάρος ή ολικά καροτ./ ξηρό βάρος είναι μεγαλύτερος στο κόκκινο φως ( $8.433 \pm 0.983/1.737 = 4.85$  για τη χλωροφύλλη,  $5.487 \pm 0.335/1.737 = 3.15$  για τα ολικά καροτ.) έναντι ( $8.859 \pm 0.532/2.059 = 4.3$  για τη χλωροφύλλη,  $5.766 \pm 0.472/2.059 = 2.8$  για τα ολικά καροτ.) των αντίστοιχων τιμών για το πράσινο φως. Οι μέγιστες τιμές για τη χλωροφύλλη στο πράσινο και στο κόκκινο είναι στατιστικά ίσες με την τιμή  $8.75 \pm 0.323(\text{SE})$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  για τη χλωροφύλλη-*a* στον υψηλό φωτισμό (XL) λευκού φωτός αλλά στατιστικά χαμηλότερες από αυτή των  $9.82 \pm 0.223$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  στον χαμηλό φωτισμό (L) λευκού φωτός (Σχήμα 23). Για τα ολικά καροτενοειδή οι μέγιστες τιμές σε όλες τις συνθήκες (λευκό φως χαμηλής και υψηλής έντασης και στο πράσινο ή κόκκινο φως) ήταν στατιστικά ίσες στην περιοχή των 5.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Συνεπώς προκύπτει ότι στην καλλιέργεια του *Anabaena* sp. η μέγιστη απόδοση τόσο σε βιομάζα όσο και στις χρωστικές χλωροφύλλη-*a* και ολικά καροτενοειδή ευνοείται από τον χαμηλό φωτισμό (2000 lux-L) και με παρόμοια απόδοση από το κόκκινο ή το πράσινο φως με το μπλε μακράν λιγότερο αποδοτικό.



**Σχήμα 24.** Η συγκέντρωση της φυκοκυανίνης σε  $\text{mg}/\text{mL}$  στην εξέλιξη της αύξησης της βιομάζας του ως ξηρό βάρος (dry weight) σε  $\text{g}/\text{L}$  κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του *Anabaena* sp. υπό πράσινο, μπλε και κόκκινο φως.



**Σχήμα 25.** Η απόδοση (yield) της φυκοκυανίνης σε mg/g d.w. στην εξέλιξη της αύξησης της βιομάζας του ως ξηρό βάρος (dry weight) σε g/L κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του *Anabaena* sp. υπό πράσινο, μπλε και κόκκινο φως.

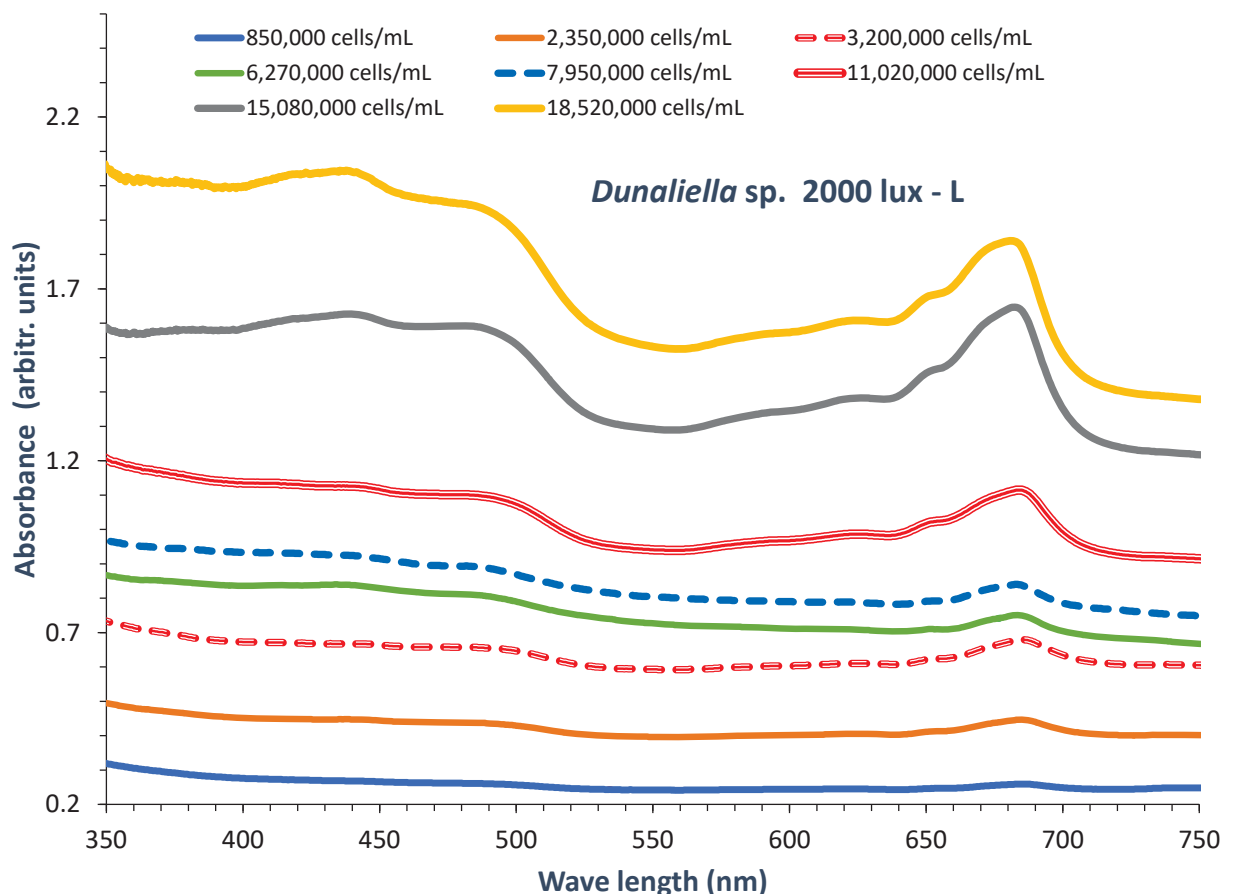
Η επίδραση του χρώματος του φωτός στο περιεχόμενο των κυττάρων στη φυκοκυανίνη (Σχήματα 24 και 25) παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των χρωμάτων. Στο πράσινο χρώμα τόσο η μέγιστη συγκέντρωση της φυκοκυανίνης όσο και η μέγιστη απόδοση απόδοσης (yield) ήταν στατιστικώς υψηλότερες από τις στατιστικώς ίσες αντίστοιχες τιμές για το μπλε και κόκκινο χρώμα. Έτσι στο μεν πράσινο χρώμα η μέγιστη τιμή ήταν  $2.922 \pm 0.207$  mg/mL ενώ στο κόκκινο και στο μπλε  $2.291 \pm 0.139$  και  $2.271 \pm 0.138$  mg/mL, αντίστοιχα. Για την απόδοση η μέγιστη τιμή στο πράσινο ήταν  $61.467 \pm 1.126$  mg/g d.w. ενώ στο κόκκινο και στο μπλε  $50.230 \pm 5.140$  και  $50.799 \pm 4.694$  mg/g d.w., αντίστοιχα.

Από τα εν γένει αποτελέσματα για τη φυκοκυανίνη προκύπτει ότι οι μέγιστες τιμές τόσο της συγκέντρωσης όσο και της απόδοσης είναι πολύ υψηλότερες σε όλα τα χρώματα (και ιδιαίτερα του πράσινου) από τις αντίστοιχες τιμές με τη χρησιμοποίηση λευκού φωτός υψηλής έντασης (8000 lux – XL) ενώ είναι παρόμοιες στην περίπτωση του πράσινου με τις αντίστοιχες για το λευκό φως χαμηλής έντασης (2000 lux – L) (σύγκριση διαγραμμάτων των Σχημάτων 23, 24 και 25).



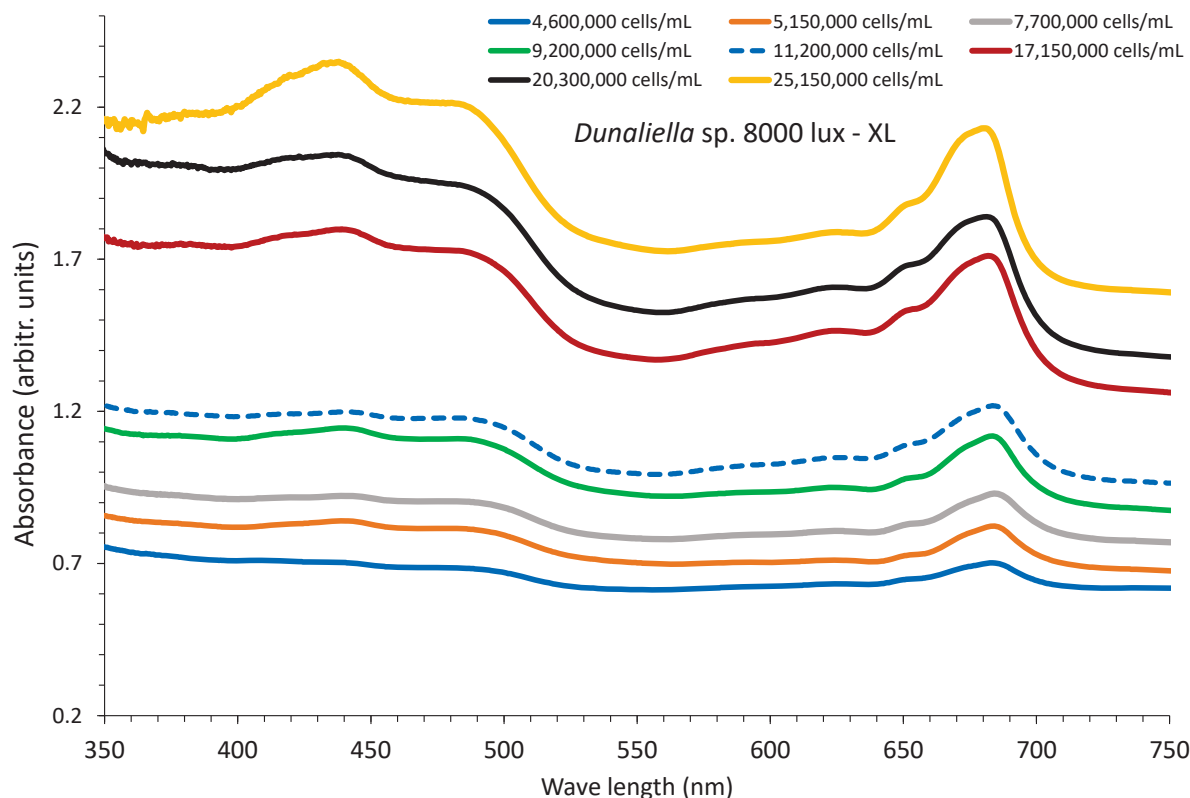
## *Dunaliella* sp. – Η επίδραση του λευκού φωτός

Στο χλωροφύκος *Dunaliella* sp. η επίδραση του λευκού φωτός τόσο στο τάχος της αύξησης όσο και στο περιεχόμενο στις χρωστικές χλωροφύλλη-α, χλωροφύλλη-β και ολικά καροτενοειδή παρουσίασε έντονες διαφορές μεταξύ των δύο εντάσεων φωτισμού που χρησιμοποιήθηκαν, του χαμηλού (2000 lux-L) και του υψηλού (8000 lux-XL). Υπολογίστηκαν οι πυκνότητες των κυττάρων και το περιεχόμενο σε χρωστικές κατά τη 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 7<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 13<sup>η</sup> και 16<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας στις καλλιέργειες του χαμηλού φωτισμού (2000 lux-L) και 4<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 7<sup>η</sup>, 8<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup> και 14<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας στις καλλιέργειες του υψηλού φωτισμού (8000 lux-XL). Στα Σχήματα 26 και 27 αποτυπώνεται η εξέλιξη των φασμάτων απορρόφησης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας στον χαμηλό και υψηλό φωτισμό, αντίστοιχα. Στον χαμηλό φωτισμό (Σχήμα 26) οι κορυφές για τη χλωροφύλλη-α στα 680 nm, τη χλωροφύλλη-β στα 650 nm και τα ολικά καροτενοειδή στα 484 nm αρχίζουν να γίνονται εμφανείς από την πυκνότητα των 11,020,000 cells/mL για να κορυφωθούν με τον πλέον έντονο τρόπο στη μέγιστη πυκνότητα των 18,520,000 cells/mL.



**Σχήμα 26.** Φάσματα απορρόφησης καλλιέργειας *Dunaliella* sp. στη διάρκεια του χρόνου σε διάφορες αυξανόμενες πυκνότητες σε κύτταρα/mL (cells/mL) στη συνθήκη του λευκού φωτός χαμηλής έντασης (2000 lux – L).

Στον υψηλό φωτισμό (Σχήμα 27) οι κορυφές για τη χλωροφύλλη-a στα 680 nm, τη χλωροφύλλη-b στα 650 nm και τα ολικά καροτενοειδή στα 484 nm αρχίζουν να γίνονται εμφανείς ήδη από πολύ ενωρίς από την πυκνότητα των 5,150,000 cells/mL για να κορυφωθούν με τον πλέον έντονο τρόπο και σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ότι στις ανάλογες πυκνότητες στον χαμηλό φωτισμό, στη μέγιστη πυκνότητα των 25,150,000 cells/mL.



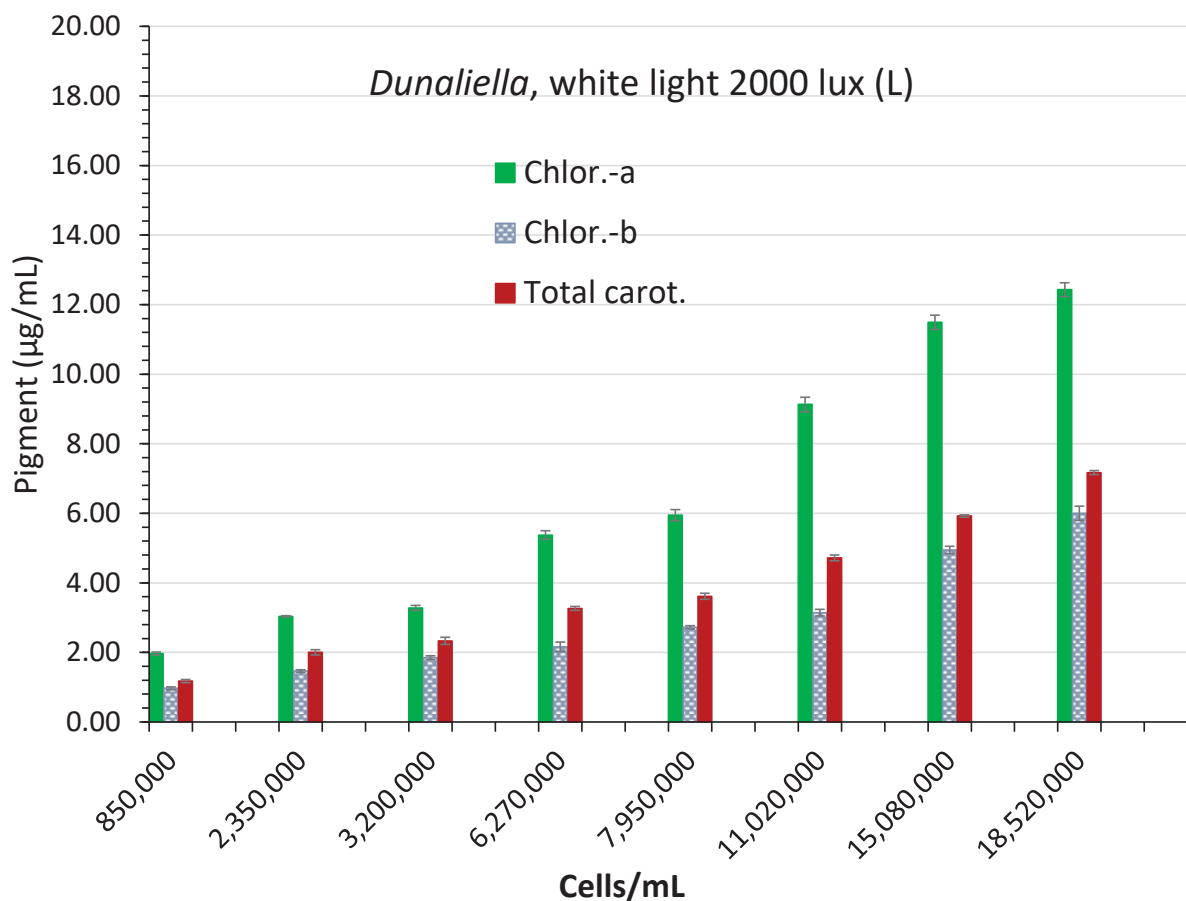
**Σχήμα 27.** Φάσματα απορρόφησης καλλιέργειας *Dunaliella* sp. στη διάρκεια του χρόνου σε διάφορες αυξανόμενες πυκνότητες σε κύτταρα/mL (cells/mL) στη συνθήκη του λευκού φωτός υψηλής έντασης (8000 lux – XL).

Η γενική εικόνα περί της συγκέντρωσης των χρωστικών που προκύπτει από την εξέταση των φασμάτων απορρόφησης των Σχημάτων 26 και 27 γίνεται σαφέστερη και ακριβέστερη στα διαγράμματα των Σχημάτων 28 και 29 όπου καταγράφονται οι τιμές των χρωστικών χλωροφύλλη-a, χλωροφύλλη-b και ολικά καροτενοειδή σε mg/mL στις εξετασθείσες πυκνότητες της καλλιέργειας τις ημέρες κατά τις οποίες ελήφθησαν και τα φάσματα απορρόφησης.

Ένα πρώτο συμπέρασμα που βγαίνει από τη σύγκριση των διαγραμμάτων των Σχημάτων 28 και 29 που αντιστοιχούν στη συνθήκη του λευκού φωτός χαμηλής έντασης (2000 lux-L) και υψηλής έντασης (8000 lux-XL), αντίστοιχα, είναι η υψηλότερη συγκέντρωση όλων των χρωστικών στην υψηλή ένταση φωτισμού. Ένα δεύτερο συμπέρασμα είναι η μεγαλύτερη αναλογία ολικών καροτενοειδών στο

σύνολο των χρωστικών της εκάστοτε εξεταζόμενης πυκνότητας καλλιέργειας στον υψηλό φωτισμό συγκριτικά με τον χαμηλό.

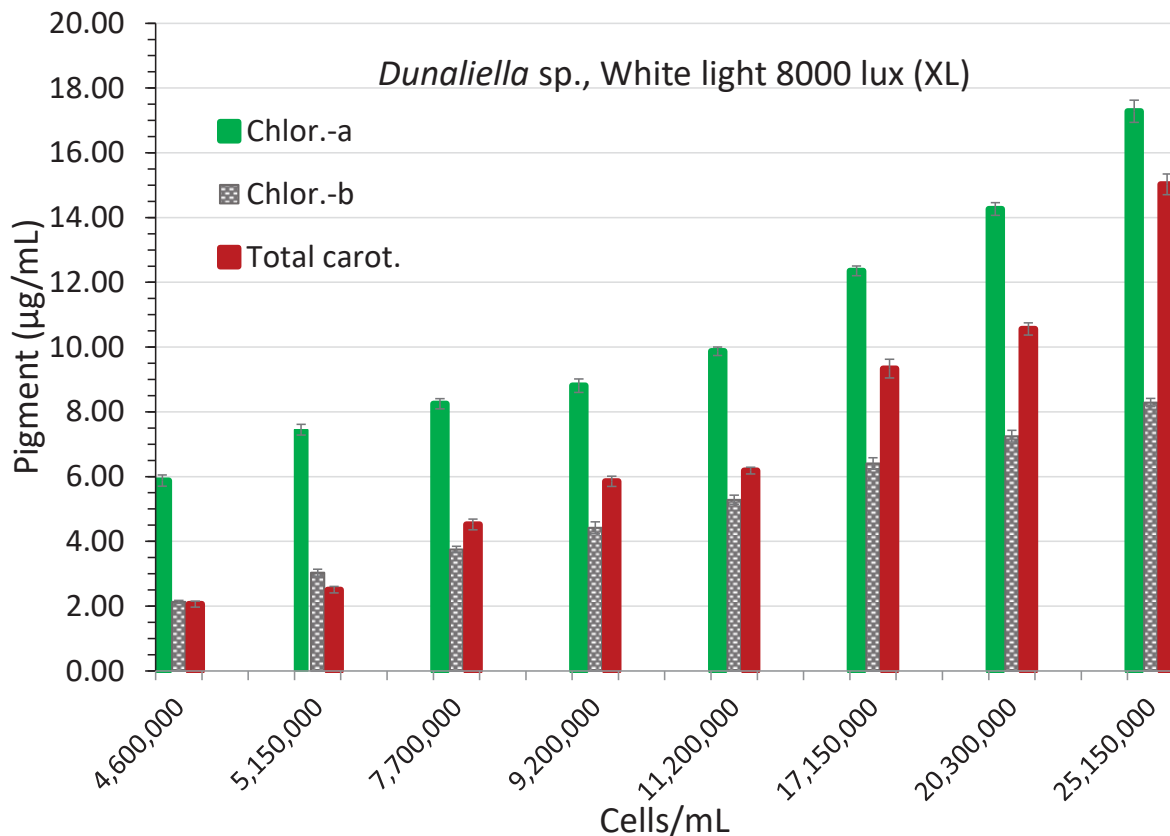
Στη συνθήκη του χαμηλού φωτισμού (Σχήμα 28) όλες οι χρωστικές αυξάνονταν με την αύξηση της πυκνότητας παρουσιάζοντας τη μέγιστη τιμή τους στην πυκνότητα των 18,520,000 cells/mL με  $12.433 \pm 0.196$   $\mu\text{g/mL}$  για τη χλωροφύλλη-a,  $5.977 \pm 0.204$   $\mu\text{g/mL}$  για τη χλωροφύλλη-b και  $7.170 \pm 0.055$   $\mu\text{g/mL}$  για τα ολικά καροτενοειδή. Σε αυτές τις μέγιστες συγκεντρώσεις ο λόγος χλωροφύλλης-a/ ολικών καροτενοειδών ήταν 1.73 ενώ ο λόγος χλωροφύλλης-a / χλωροφύλλης-b ήταν 2.08. Από τις μετρήσεις για την περιεκτικότητα των ολικών καροτενοειδών σε  $\beta$ -καροτίνιο, βρέθηκε ότι ο λόγος ολικών καροτενοειδών προς  $\beta$ -καροτίνιο κυμάνθηκε από το 1/5 στις χαμηλότερες πυκνότητες έως 1/3.5 στις υψηλότερες πυκνότητες φθάνοντας το 2.048  $\mu\text{g/mL}$   $\beta$ -καροτίνιο στη μέγιστη πυκνότητα.



**Σχήμα 28.** Συγκέντρωση χρωστικών (pigments) σε  $\mu\text{g/mL} \pm \text{SE}$  των καλλιεργειών του *Dunaliella* sp. σε διάφορες πυκνότητες κυττάρων (cells/mL) στη συνθήκη του λευκού φωτός χαμηλής έντασης (2000 lux – L). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 αντιγράφων  $\pm \text{SE}$ .

Στη συνθήκη του υψηλού φωτισμού (Σχήμα 29) επίσης όλες οι χρωστικές αυξάνονταν με την αύξηση της πυκνότητας παρουσιάζοντας τη μέγιστη τιμή τους στην πυκνότητα των 25,150,000 cells/mL με  $17.282 \pm 0.344$   $\mu\text{g/mL}$  για τη χλωροφύλλη-a,  $8.287 \pm 0.126$   $\mu\text{g/mL}$  για τη χλωροφύλλη-b και  $15.027 \pm 0.321$   $\mu\text{g/mL}$

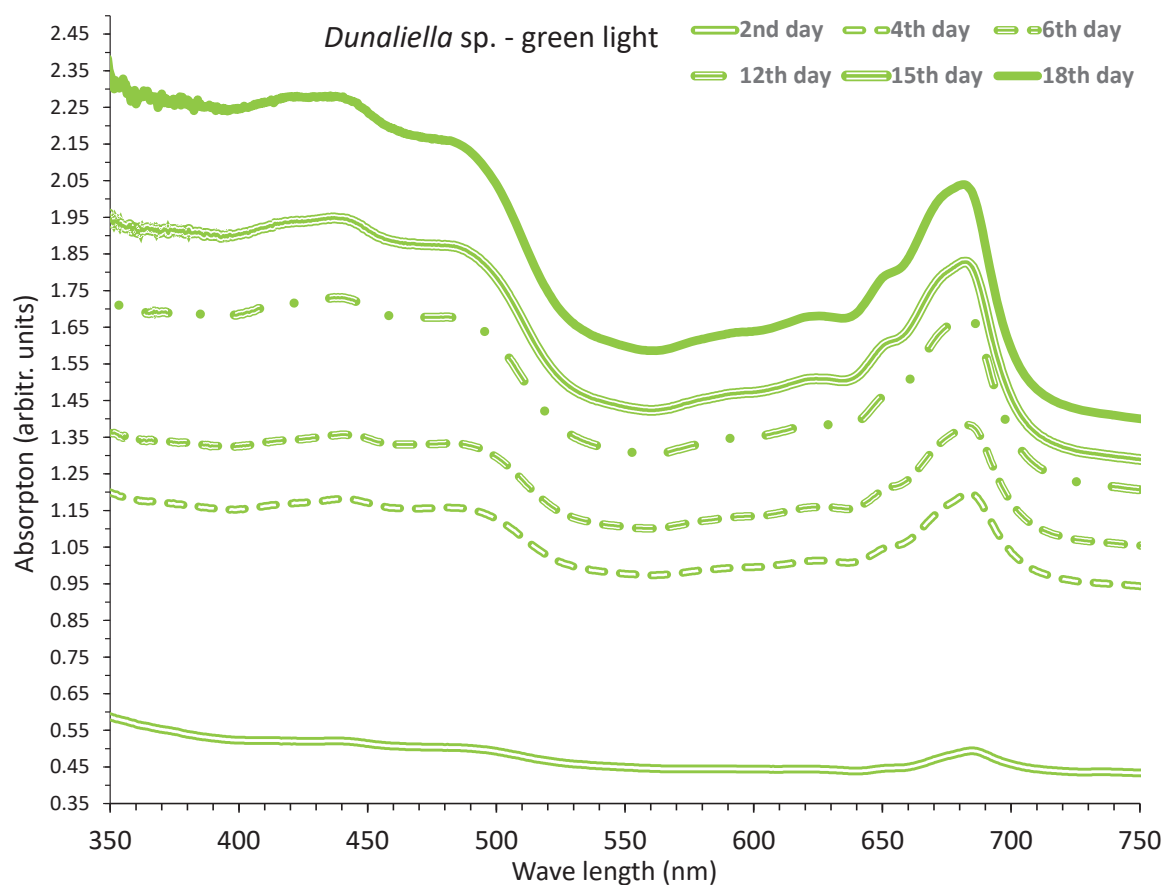
για τα ολικά καροτενοειδή. Σε αυτές τις μέγιστες συγκεντρώσεις ο λόγος χλωροφύλλης-a / ολικών καροτενοειδών ήταν 1.15 ενώ ο λόγος χλωροφύλλης-a / χλωροφύλλης-b ήταν 2.08 ίδιος με τον αντίστοιχο στη συνθήκη του χαμηλού φωτισμού. Από τις μετρήσεις για την περιεκτικότητα των ολικών καροτενοειδών σε β-καροτίνιο, βρέθηκε ότι ο λόγος ολικών καροτενοειδών προς β-καροτίνιο κυμάνθηκε από το 1/5.5 στις χαμηλότερες πυκνότητες έως 1/3 στις υψηλότερες πυκνότητες φθάνοντας το 5.009  $\mu\text{g}/\text{mL}$  β-καροτίνιο στη μέγιστη πυκνότητα.



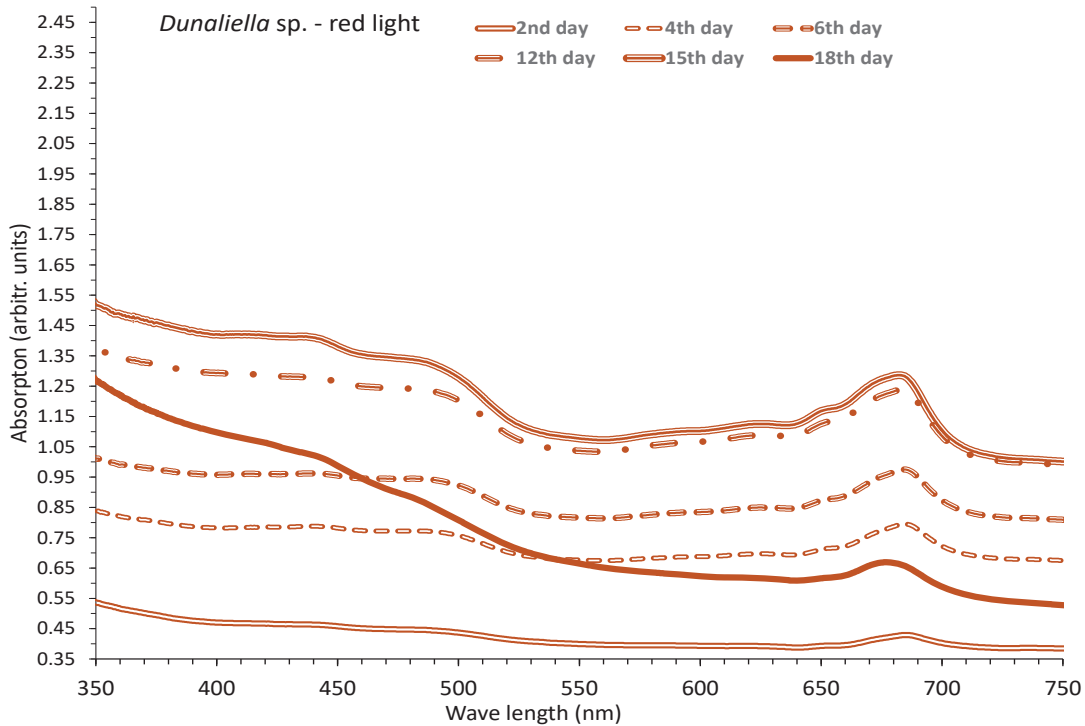
**Σχήμα 29.** Συγκέντρωση χρωστικών (pigments) σε  $\mu\text{g}/\text{mL} \pm \text{SE}$  των καλλιεργειών του *Dunaliella sp.* σε διάφορες πυκνότητες κυττάρων (cells/mL) στη συνθήκη του λευκού φωτός υψηλής έντασης (8000 lux – XL). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 αντιγράφων  $\pm \text{SE}$ .

## **Dunaliella sp. – Η επίδραση τριών χρωμάτων φωτός**

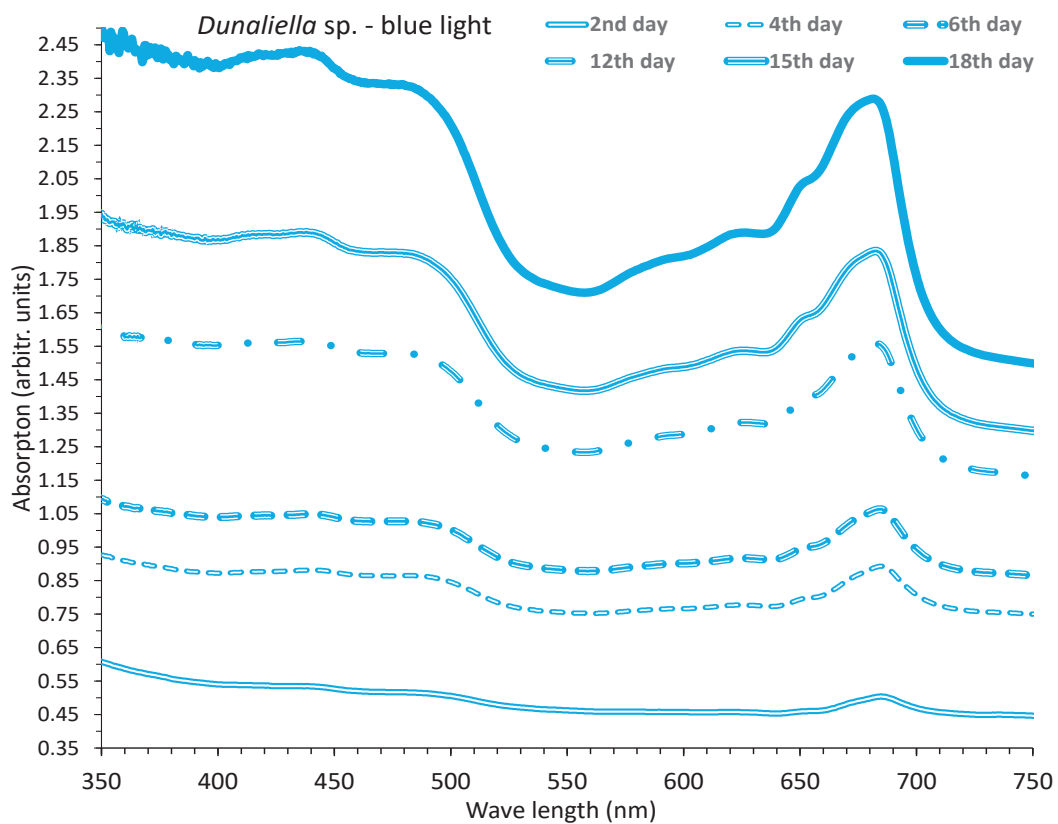
Τα αποτελέσματα της επίδρασης τριών διαφορετικών χρωμάτων φωτός στις καλλιέργειες του *Dunaliella* sp. ήταν πολύ χαρακτηριστικά καθώς το περιεχόμενο των χρωστικών επηρεάστηκε από το κάθε χρώμα (πράσινο, μπλε, κόκκινο) με εμφανή τρόπο. Στα Σχήματα 30, 31 και 32 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης για πράσινο (Σχήμα 30), κόκκινο (Σχήμα 31) και μπλε (Σχήμα 32) στη διάρκεια 18 ημερών καλλιέργειας. Προκύπτει ότι το πράσινο χρώμα ακολουθούμενο από το μπλε επιφέρει μια γρήγορη και συνεχή αύξηση της βιομάζας από τη 2<sup>η</sup> μέχρι τη 18<sup>η</sup> ημέρα στο πράσινο και στο μπλε, ενώ στο κόκκινο η αύξηση ήταν πολύ αργότερη μέχρι τη 15<sup>η</sup> ημέρα και μετά καταρρέει. Στο πράσινο η αύξηση είναι κατά τι πιο αργή συγκριτικά με το μπλε και μετά τη 12<sup>η</sup> ημέρα μειώνεται εμφανώς. Οι κορυφές για τη χλωροφύλλη-a (684 nm) και τη χλωροφύλλη-b (650 nm) είναι πιο υψηλές στο πράσινο και το μπλε και το ίδιο συμβαίνει και για τα καροτενοειδή (484 nm) όπου αφενός σε όλα τα φάσματα είναι πιο έντονες στο πράσινο και στο μπλε και αφετέρου γίνονται πολύ πιο εμφανείς μετά την 6<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας.



**Σχήμα 30.** Φάσματα απορρόφησης καλλιέργειας *Dunaliella* sp. στη διάρκεια του χρόνου στη διάρκεια της καλλιέργειας στη συνθήκη του πράσινου φωτός.

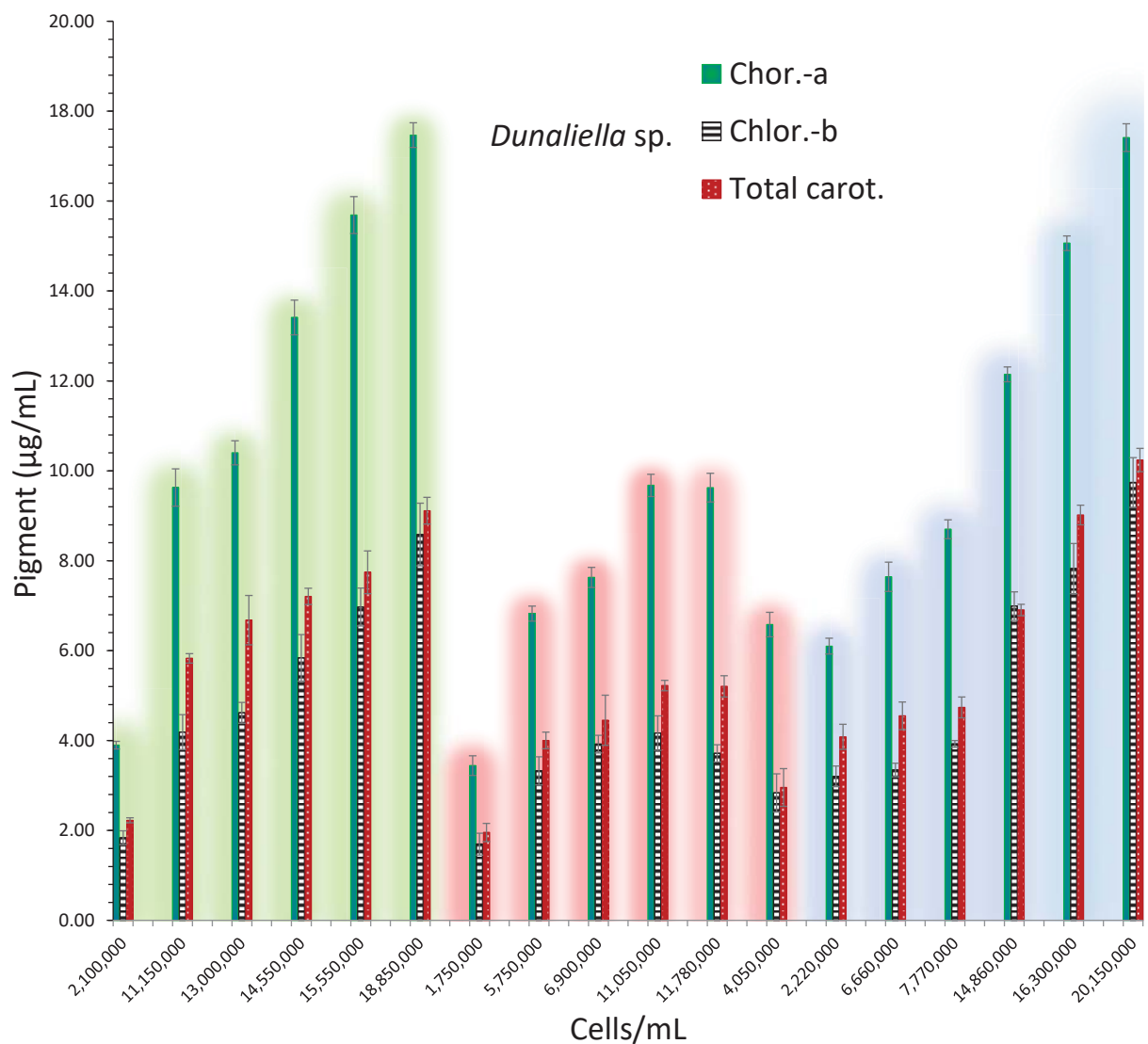


**Σχήμα 31.** Φάσματα απορρόφησης καλλιέργειας *Dunaliella* sp. στη διάρκεια του χρόνου στη διάρκεια της καλλιέργειας στη συνθήκη του κόκκινου φωτός.



**Σχήμα 32.** Φάσματα απορρόφησης καλλιέργειας *Dunaliella* sp. στη διάρκεια του χρόνου στη διάρκεια της καλλιέργειας στη συνθήκη του μπλε φωτός.

Η γενική εικόνα περί της συγκέντρωσης των χρωστικών που προκύπτει από την εξέταση των φασμάτων απορρόφησης των Σχημάτων 30, 31 και 32 γίνεται σαφέστερη και ακριβέστερη στο διάγραμμα του Σχήματος 33 όπου καταγράφονται οι τιμές των χρωστικών χλωροφύλλη-α, χλωροφύλλη-β και ολικά καροτενοειδή σε  $\mu\text{g}/\text{mL}$  στις εξετασθείσες πυκνότητες της καλλιέργειας τις ημέρες κατά τις οποίες ελήφθησαν και τα φάσματα απορρόφησης.



**Σχήμα 33.** Οι συγκεντρώσεις των χρωστικών (pigments) χλωροφύλλη-α (chlor.-a), χλωροφύλλη-β (chlor.-b) και ολικά καροτενοειδή (total carot.) σε  $\mu\text{g}/\text{mL}$  στις εξετασθείσες πυκνότητες (cells/mL) της καλλιέργειας του *Dunaliella sp.* τις ημέρες κατά τις οποίες ελήφθησαν και τα φάσματα απορρόφησης. Η κάθε ομάδα των 6 μετρήσεων που αντιστοιχεί στο πράσινο, κόκκινο και μπλε φως σημαδεύεται από την αντίστοιχη απόχρωση στο Σχήμα. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 αντιγράφων  $\pm$  SE.

Ένα πρώτο συμπέρασμα που βγαίνει από τη σύγκριση των διαγραμμάτων του Σχήματος 33 είναι η υψηλότερη (και στατιστικώς διαφορετική, Anova και Tukey's test,  $p < 0.05$ ) περιεκτικότητα σε όλες τις χρωστικές σε όλες τις διαδοχικές έξι μετρήσεις στο πράσινο και στο μπλε συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές στο κόκκινο. Ένα δεύτερο συμπέρασμα είναι η σταθερή σχετικά αναλογία ολικών καροτενοειδών στο σύνολο των χρωστικών καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας και στα 3 εξεταζόμενα χρώματα φωτισμού.

Οι μέγιστες τιμές της χλωροφύλλης-α στο πράσινο φως  $17.47 \pm 0.274$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  και στο μπλε φως  $17.41 \pm 0.308$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  είναι στατιστικά ίσες ( $P > 0.05$ ) και επίσης στατιστικά ίσες με αυτή που καταγράφηκε ως μέγιστη στη συνθήκη του λευκού φωτός υψηλής έντασης (8000 lux – XL)  $17.282 \pm 0.344$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Όμως, ως προς την αναλογία χλωροφύλλης-α προς πυκνότητα κυττάρων, ο λόγος είναι σαφώς ευνοϊκότερος στο πράσινο χρώμα με  $17.47/18,850,000$  έναντι  $17.41/20,150,000$  στο μπλε και ακόμα ευνοϊκότερος έναντι του λευκού φωτός υψηλής έντασης ( $17.282/25,150,000$ ).

Οι μέγιστες τιμές της χλωροφύλλης-β στο πράσινο φως  $8.58 \pm 0.697$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  και στο μπλε φως  $9.74 \pm 0.533$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  είναι στατιστικά ίσες ( $P > 0.05$ ) και στατιστικά ανώτερες ( $P < 0.05$ ) από την αντίστοιχη τιμή ( $3.72 \pm 0.192$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) στο κόκκινο φως και επίσης στατιστικά ίσες με αυτή που καταγράφηκε ως μέγιστη ( $8.287 \pm 0.126$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) στη συνθήκη του λευκού φωτός υψηλής έντασης (8000 lux – XL).

Στα ολικά καροτενοειδή το μπλε φως απέδωσε στατιστικά υψηλότερη τιμή ( $10.24 \pm 0.258$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) συγκριτικά με το πράσινο ( $9.11 \pm 0.297$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), και τα δύο όμως πολύ υψηλότερη (στατιστικά) συγκέντρωση από την αντίστοιχη τιμή του κόκκινου φωτός ( $5.22 \pm 0.114$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Οι ανωτέρω τιμές των ολικών καροτενοειδών για το πράσινο και μπλε φως είναι πάντως στατιστικά πολύ χαμηλότερες από την αντίστοιχη μέση τιμή που επιτεύχθηκε στη συνθήκη του λευκού φωτός υψηλής έντασης ( $15.027 \pm 0.321$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  – Σχήμα 29). Η παραπάνω κατάσταση πιστοποιεί την στατιστικά ανώτερη αναλογία ολικών καροτενοειδών προς χλωροφύλλες ή ολικές χρωστικές στη συνθήκη του λευκού φωτός υψηλής έντασης συγκριτικά με κάθε συνθήκη χρωματιστού φωτός.

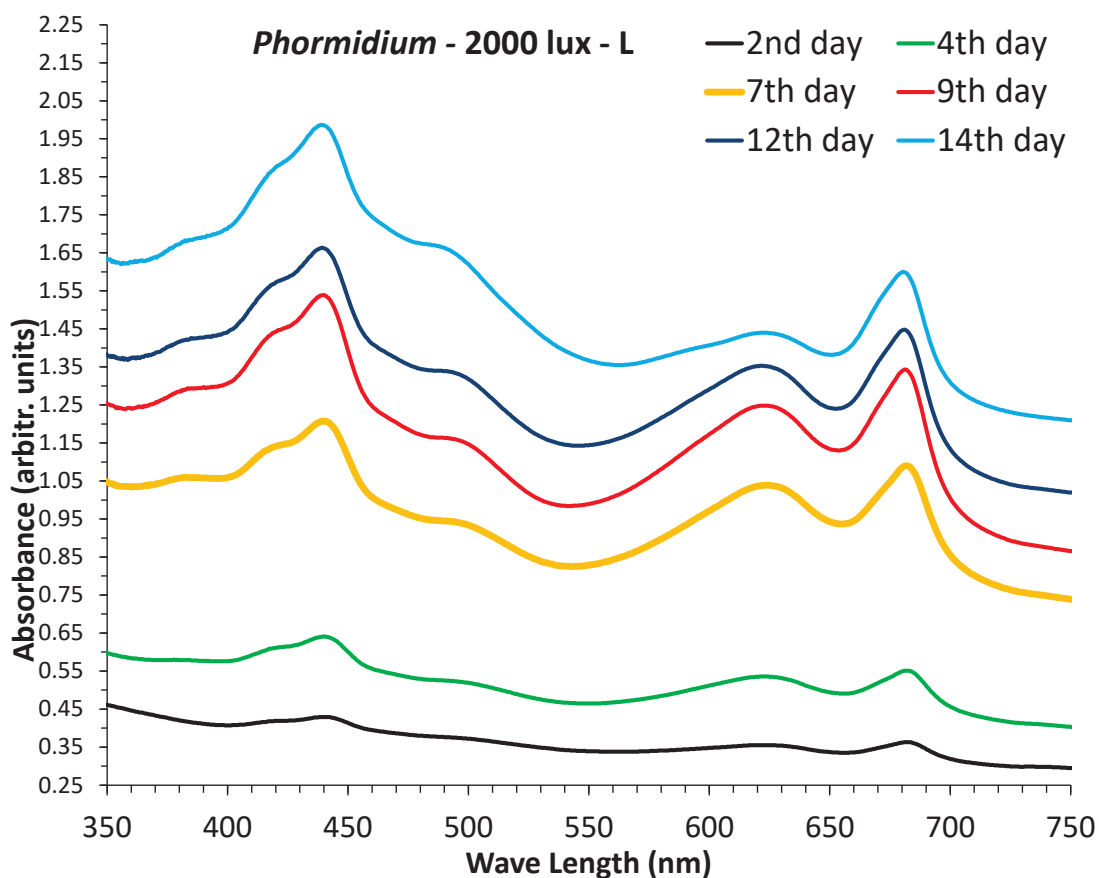
Από τις μετρήσεις για την περιεκτικότητα των ολικών καροτενοειδών σε  $\beta$ -καροτίνιο, βρέθηκε ότι ο λόγος ολικών καροτενοειδών προς  $\beta$ -καροτίνιο κυμάνθηκε από το 1/6.5 στις χαμηλότερες πυκνότητες έως 1/3.5 στις υψηλότερες πυκνότητες του πράσινου και μπλε φωτός φθάνοντας το 2.92  $\mu\text{g}/\text{mL}$  και 2.60  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\beta$ -καροτίνιο στη μέγιστη πυκνότητα για το μπλε και πράσινο φως, αντίστοιχα.



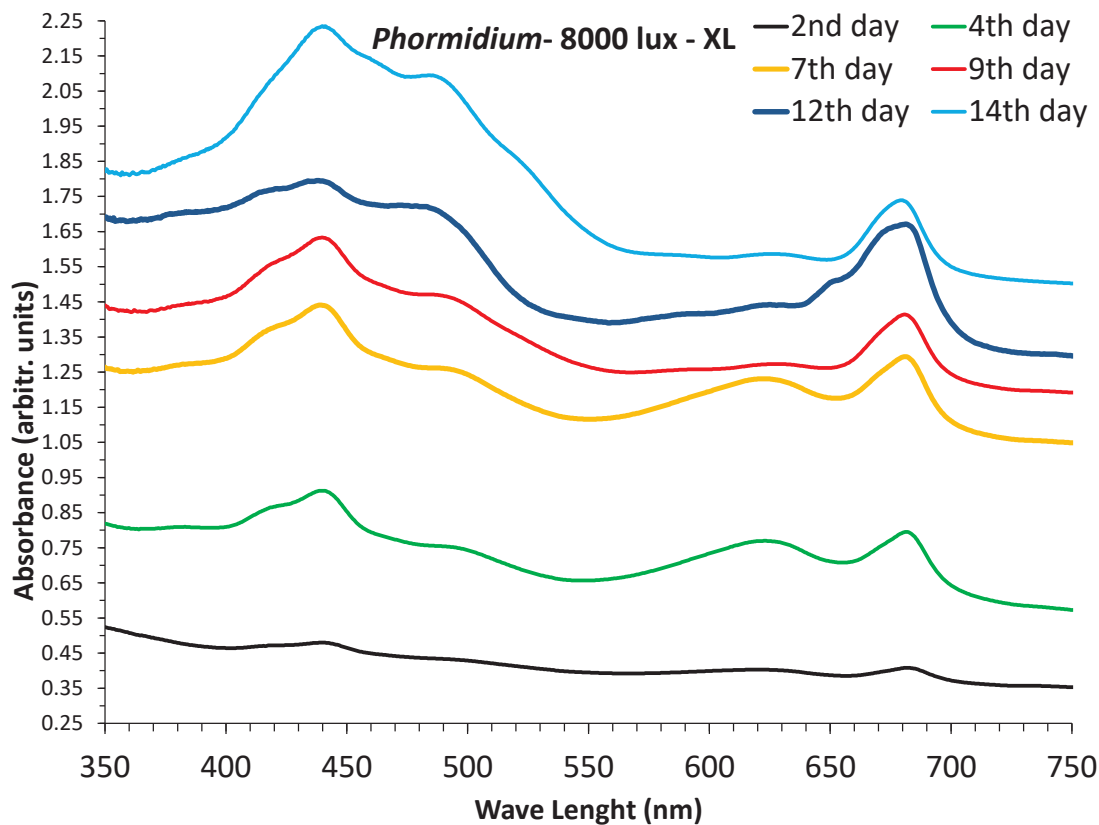
## **Phormidium sp. – Η επίδραση του λευκού φωτός**

Η καλλιέργεια του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Phormidium* sp. διήρκεσε 14 ημέρες και έγινε σε αλατότητα 40 ppt, φωτισμό 2000 και 8000 lux και χρησιμοποιώντας τρία ειδικά διαμορφωμένα πλαστικά δοχεία των 1.5 L για κάθε σετ φωτισμού, με το κωνικό τους μέρος προς τα κάτω στην άκρη του οποίου είχε προσαρμοστεί καταλλήλως πλαστική βάνα. Όλες οι παράμετροι εξετάστηκαν και καταγράφηκαν ξεχωριστά για καθεμία από τις εντάσεις φωτός εκτός από τη συσχέτιση του ξηρού βάρους – OD 750 nm όπου χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρωμένα δεδομένα και από τις δύο εντάσεις.

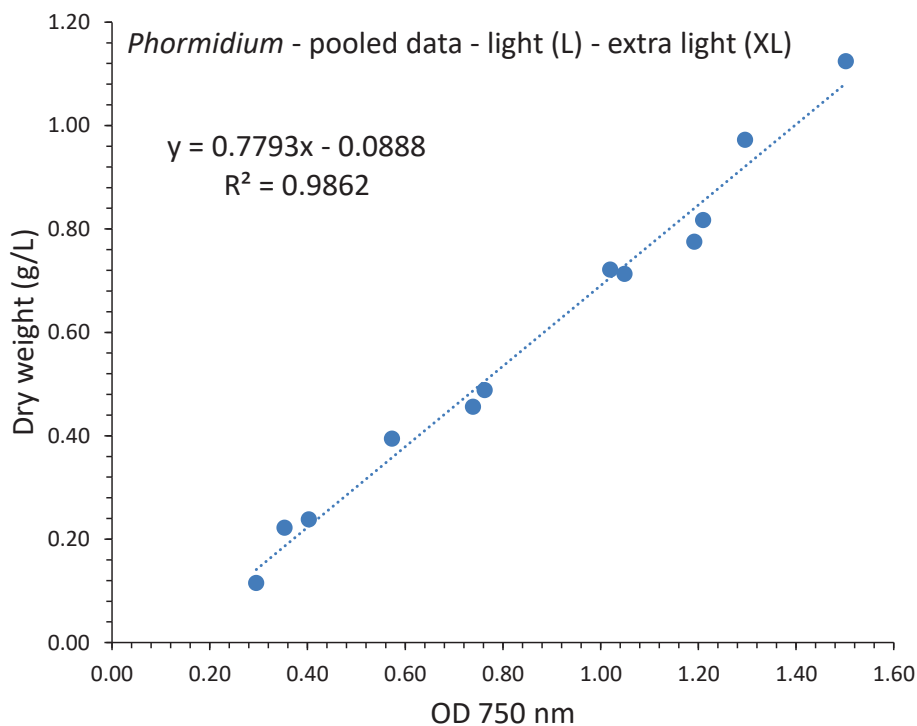
Ελήφθησαν φάσματα απορρόφησης 6 ημερών που καλύπτουν την περίοδο από τη 2η έως τη 14η ημέρα της καλλιέργειας, με καταγεγραμμένα ξηρά βάρη από 0.115 και 0.222 g/L τη δεύτερη ημέρα έως 0.817 και 1.124 g/L τη δέκατη τέταρτη ημέρα για χαμηλό φωτισμό (L) 2000 lux και υψηλό φωτισμό (XL) 8000 lux, αντίστοιχα. (Σχήματα 34 και 35). Με βάση την τιμή των 750 nm της οπτικής πυκνότητας (OD) κάθε φάσματος, η συγκεντρωτική γραφική παράσταση τους έναντι του αντίστοιχου ξηρού βάρους (Σχήμα 36) οδήγησε σε μια γραμμή παλινδρόμησης με  $R^2=0.9862$  και περιγράφεται από την εξίσωση πρώτης τάξης «ξηρό βάρος (g/mL) =  $0.7993 \times OD_{750nm} + 0.0888$ ».



**Σχήμα 34.** Φάσματα απορρόφησης καλλιέργειας *Phormidium* sp. στη διάρκεια του χρόνου σε χαμηλή ένταση φωτισμού 2000 lux (L).



**Σχήμα 35.** Φάσματα απορρόφησης καλλιέργειας *Phormidium* sp. στη διάρκεια του χρόνου σε υψηλή ένταση φωτισμού 8000 lux (XL).



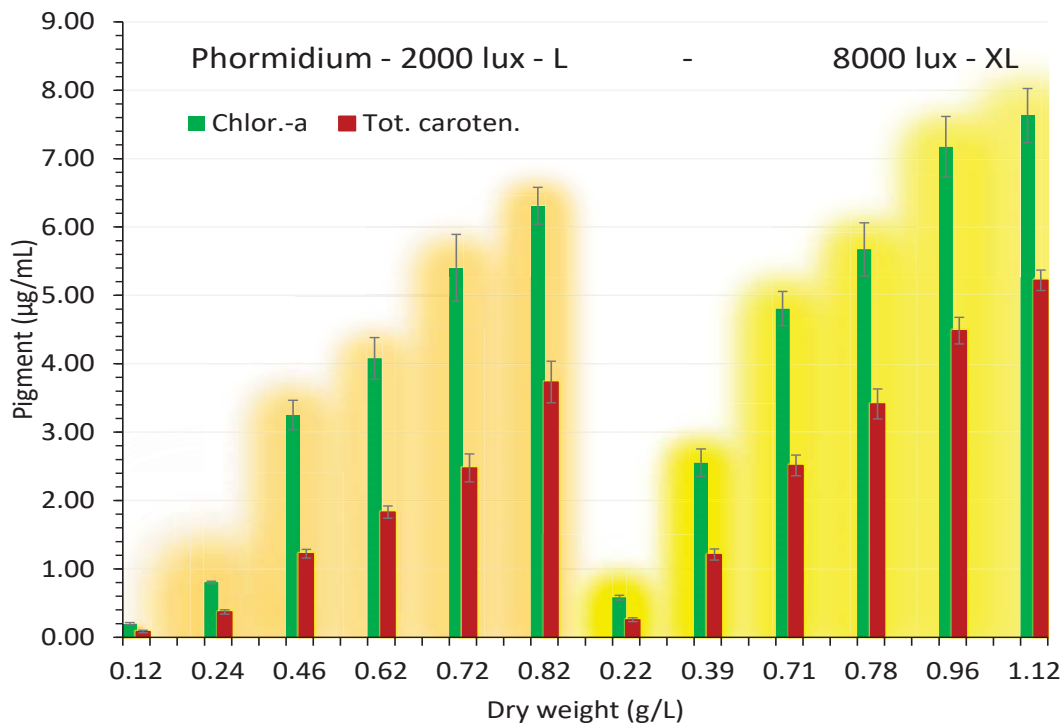
**Σχήμα 36.** Συσχέτιση του ξηρού βάρους (dry weight, g/L) και της οπτικής πυκνότητας (Optical Density-OD) στα 750 nm σε καλλιέργειες του *Phormidium* sp. χρησιμοποιώντας τις τιμές και από τις δύο εντάσεις φωτισμού.

Η συνολική εικόνα των φασμάτων δείχνει ένα γενικώς ομοιόμορφο σχήμα των καμπυλών με ελαφρώς ευδιάκριτες κορυφές για το πρώτο (2η ημέρα) και στη συνέχεια, τις επόμενες ημέρες, μια σταδιακή αύξηση των κορυφών στα μήκη κύματος που χαρακτηρίζουν τις διάφορες χρωστικές, (682 και 442 nm για τη χλωροφύλλη-a, 492 nm για τα καροτενοειδή και 625 nm για τη φυκοκυανίνη). Οι κορυφές για όλα τα παραπάνω μήκη κύματος έγιναν πολύ εμφανείς στα 4 τελευταία φάσματα (των ημερών 7, 9, 12 και 14 για το L και 4 και 7 μόνο για το XL με τις επόμενες ημέρες χωρίς κορυφές). Οι τιμές κάθε χρωστικής για κάθε αντίστοιχο μήκος κύματος και πυκνότητα φυκών κάθε φάσματος απεικονίζονται στο Σχήμα 37. Υπάρχει μια προφανής αύξηση όλων των χρωστικών κατά την ωρίμανση της καλλιέργειας που έγινε πολύ εμφανής στα δύο τελευταία φάσματα των πυκνοτήτων φυκών 0.851 και 1.141 g/L σε L και 1.393 και 1.727 g/L σε XL.

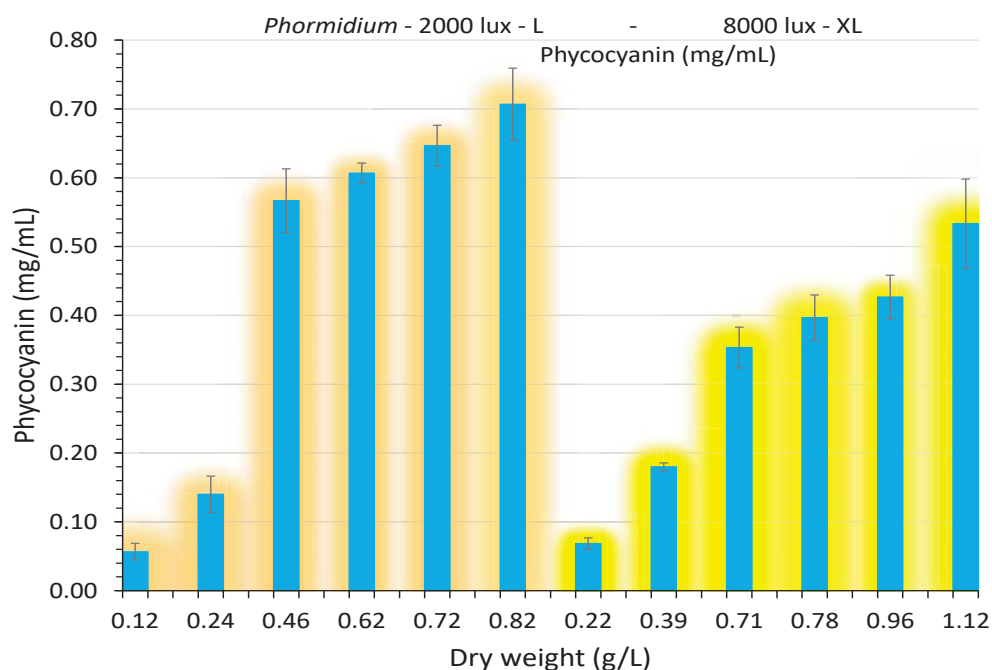
Η τιμή της χλωροφύλλης-a σε όλες τις πυκνότητες και των δύο συνθηκών φωτός ήταν πάντα υψηλότερη από αυτή των ολικών καροτενοειδών (Σχήμα 37). Η μέγιστη περιεκτικότητα καταγράφηκε στο ξηρό βάρος 1.12 g/L (της 14<sup>ης</sup> ημέρας) με:  $7.630 \pm 0.397$ (SE)  $\mu\text{g}/\text{mL}$  χλωροφύλλη-a και  $5.220 \pm 0.155$ (SE)  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ολικών καροτενοειδών στη συνθήκη του υψηλού φωτισμού «XL», τιμές στατιστικά υψηλότερες ( $P < 0.05$ ) από τις αντίστοιχες μέγιστες τιμές στη βιομάζα των 0.82 g/L (της 14<sup>ης</sup> ημέρας) με  $6.310 \pm 0.269$ (SE)  $\mu\text{g}/\text{mL}$  χλωροφύλλη-a και  $3.733 \pm 0.306$ (SE)  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ολικών καροτενοειδών στη συνθήκη χαμηλού φωτισμού «L».

Στην περίπτωση της φυκοκυανίνης η κατάσταση ήταν εντελώς διαφορετική καθώς η αναλογία της περιεκτικότητας σε φυκοκυανίνη είτε σε συγκέντρωση (mg/mL) είτε σε απόδοση (mg/g d.w.), ήταν υψηλότερη κατά την αύξηση της βιομάζας των φυκών σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού (L) σε σύγκριση με τον υψηλό φωτισμό (XL) (Σχήματα 38 και 39). Ηδη από την 7<sup>η</sup> ημέρα και εντεύθεν στον χαμηλό φωτισμό (2000 lux – L) και από την πυκνότητα των κυττάρων των 0.46 g dw/L την 7<sup>η</sup> ημέρα έως την πυκνότητα των 0.82 g dw/L τη 14<sup>η</sup> ημέρα, οι συγκεντρώσεις της φυκοκυανίνης ( $0.567 \pm 0.046$ (SE) mg/mL έως  $0.707 \pm 0.052$ (SE) mg/mL) ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες ( $P < 0.05$ ) από τις αντίστοιχες ημερήσιες τιμές στην κατάσταση του υψηλού φωτισμού (8000 lux – XL) που κυμάνθηκαν από  $0.353 \pm 0.030$ (SE) mg/mL την 7<sup>η</sup> ημέρα έως  $0.533 \pm 0.065$ (SE) mg/mL τη 14<sup>η</sup> ημέρα (Σχήμα 38).

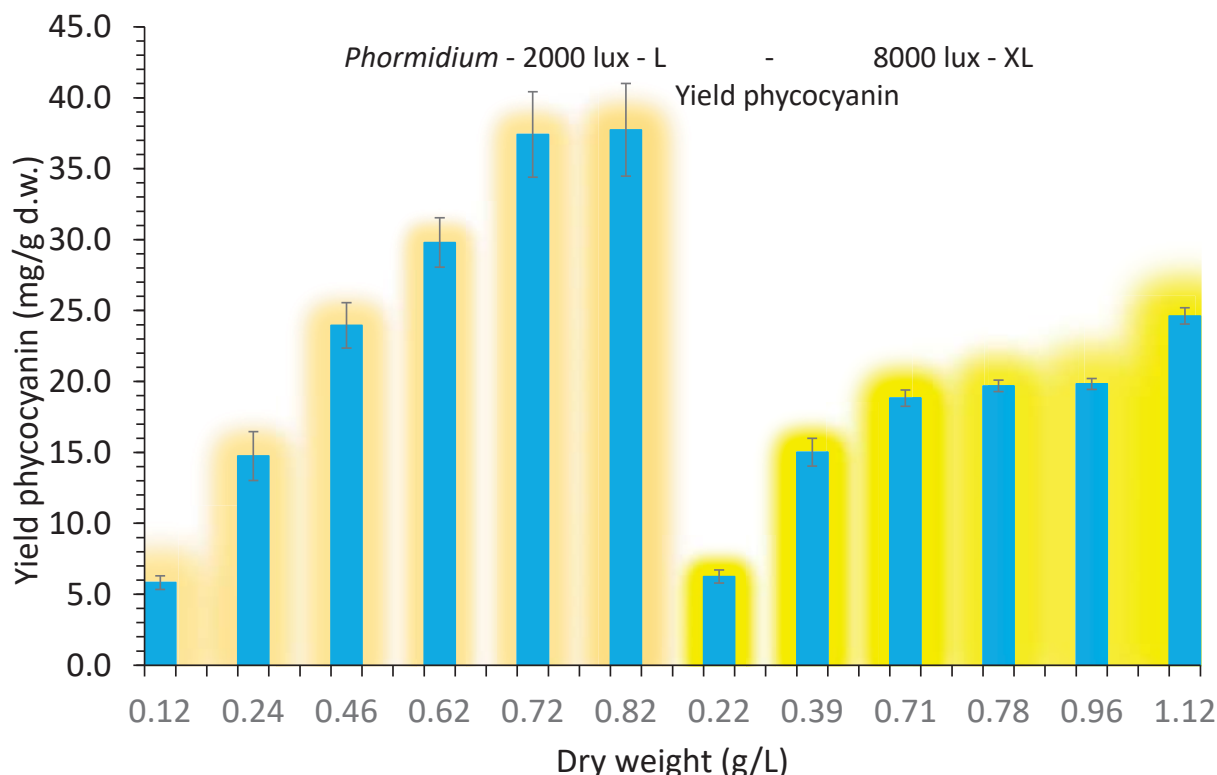
Η παραπάνω κατάσταση απεικονίζεται με το ίδιο πρότυπο και στον υπολογισμό της απόδοσης (yield) συ φυκοκυανίνη (Σχήμα 39) κατά το οποίο οι τιμές από την 7<sup>η</sup> ημέρα και εντεύθεν ήταν πολύ υψηλότερες και στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές ( $P < 0.05$ ) στην κατάσταση του χαμηλού φωτισμού ( $23.957 \pm 1.60$ (SE) mg/g d.w. την 7<sup>η</sup> ημέρα έως  $37.74 \pm 3.268$ (SE) mg/g d.w. τη 14<sup>η</sup> ημέρα) έναντι των αντίστοιχων τιμών ( $18.830 \pm 0.578$ (SE) mg/g d.w. την 7<sup>η</sup> ημέρα έως  $24.62 \pm 0.57$ (SE) mg/g d.w. τη 14<sup>η</sup> ημέρα) στην κατάσταση του υψηλού φωτισμού.



**Σχήμα 37.** Οι συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης-α και των ολικών καροτενοειδών (µg/mL) στις διάφορες πυκνότητες καλλιέργειας σε ξηρό βάρος ανά λίτρο (g dry weight/L) των καλλιεργειών του *Phormidium* sp. στις συνθήκες του χαμηλού φωτισμού (πορτοκαλί σκίαση) και υψηλού φωτισμού (κίτρινη σκίαση). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 αντιγράφων ± SE.



**Σχήμα 38.** Οι συγκεντρώσεις της φυκοκυανίνης (mg/mL) στις διάφορες πυκνότητες καλλιέργειας ως ξηρό βάρος ανά λίτρο (g dry weight/L) του *Phormidium* sp. στις συνθήκες του χαμηλού φωτισμού (πορτοκαλί σκίαση) και υψηλού φωτισμού (κίτρινη σκίαση). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 αντιγράφων ± SE.



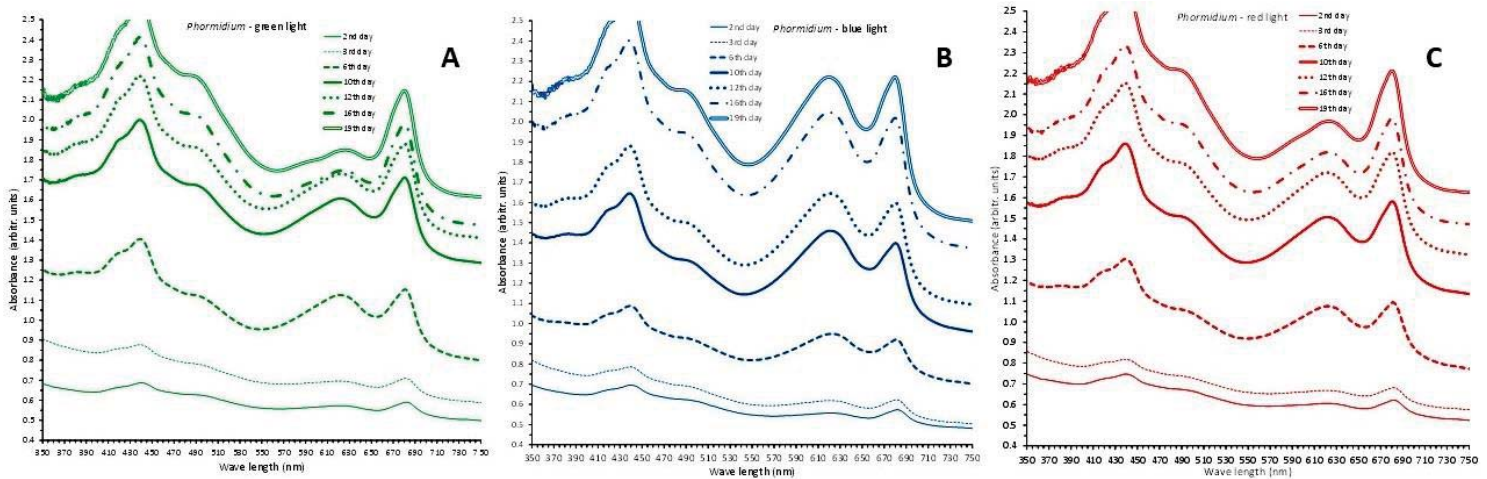
**Σχήμα 39.** Οι αποδόσεις (yield) της φυκοκυανίνης (mg/g d.w.) στις διάφορες πυκνότητες καλλιέργειας ω ξηρό βάρος ανά λίτρο (g dry weight/L) του *Phormidium* sp. στις συνθήκες του χαμηλού φωτισμού (πορτοκαλί σκίαση) και υψηλού φωτισμού (κίτρινη σκίαση). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 αντιγράφων  $\pm$  SE.

### **Phormidium** sp. – Η επίδραση τριών χρωμάτων φωτός

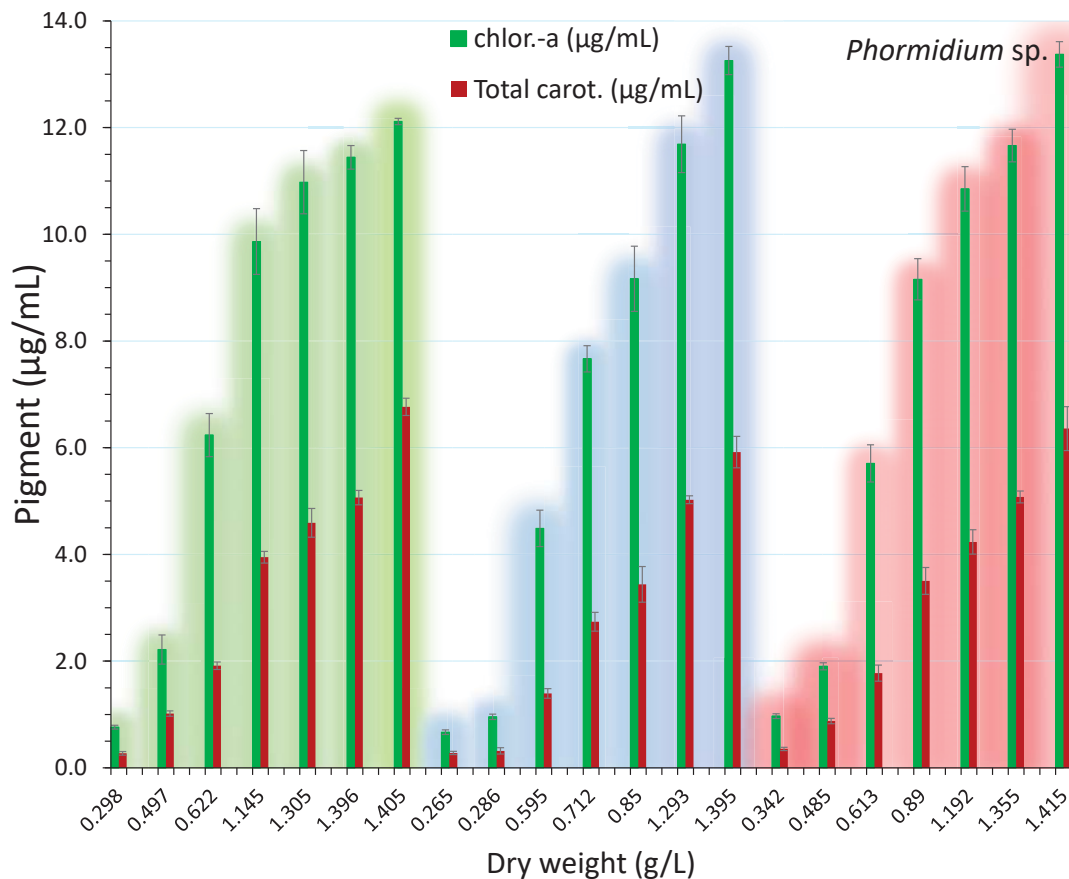
Τα αποτελέσματα της επίδρασης τριών διαφορετικών χρωμάτων φωτός στις καλλιέργειες του *Phormidium* sp. ήταν πολύ χαρακτηριστικά καθώς το περιεχόμενο των χρωστικών επηρεάστηκε από το κάθε χρώμα (πράσινο, μπλε, κόκκινο) με εμφανή τρόπο. Στο Σχήμα 40 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης για το κάθε χρώμα στη διάρκεια 19 ημερών καλλιέργειας. Ελήφθησαν φάσματα τη 2<sup>η</sup>, 3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 16<sup>η</sup> και 19<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας. Προκύπτει ότι όλα τα χρώματα επιφέρουν μια γρήγορη και συνεχή αύξηση της βιομάζας από τη 2<sup>η</sup> μέχρι τη 19<sup>η</sup> ημέρα η οποία ήταν ελαφρά πιο έντονη στο μπλε και στο κόκκινο συγκριτικά με το πράσινο.

Οι κορυφές για τη χλωροφύλλη-a (682 και 442 nm) διατήρησαν μια αξιοσημείωτη ομοιομορφία τόσο στην εξέλιξη στο χρόνο των φασμάτων όσο και στην κορυφή τους μεταξύ των τριών χρωμάτων του φωτός. Το ίδιο λίγο πολύ παρατηρήθηκε και για την περίπτωση της κορυφής για τα ολικά καροτενοειδή (492 nm).

Οι μέγιστες τιμές χλωροφύλλης στο μπλε και στο κόκκινο  $13.26 \pm 0.264(\text{SE})$  και  $13.37 \pm 0.239(\text{SE})$   $\mu\text{g/mL}$ , αντίστοιχα (Σχήμα 41) ήταν στατιστικά ίσες μεταξύ τους ( $P > 0.05$ ) και στατιστικά υψηλότερες ( $P < 0.05$ ) από την αντίστοιχη τιμή του πράσινου φωτός  $12.11 \pm 0.06(\text{SE})$   $\mu\text{g/mL}$ .



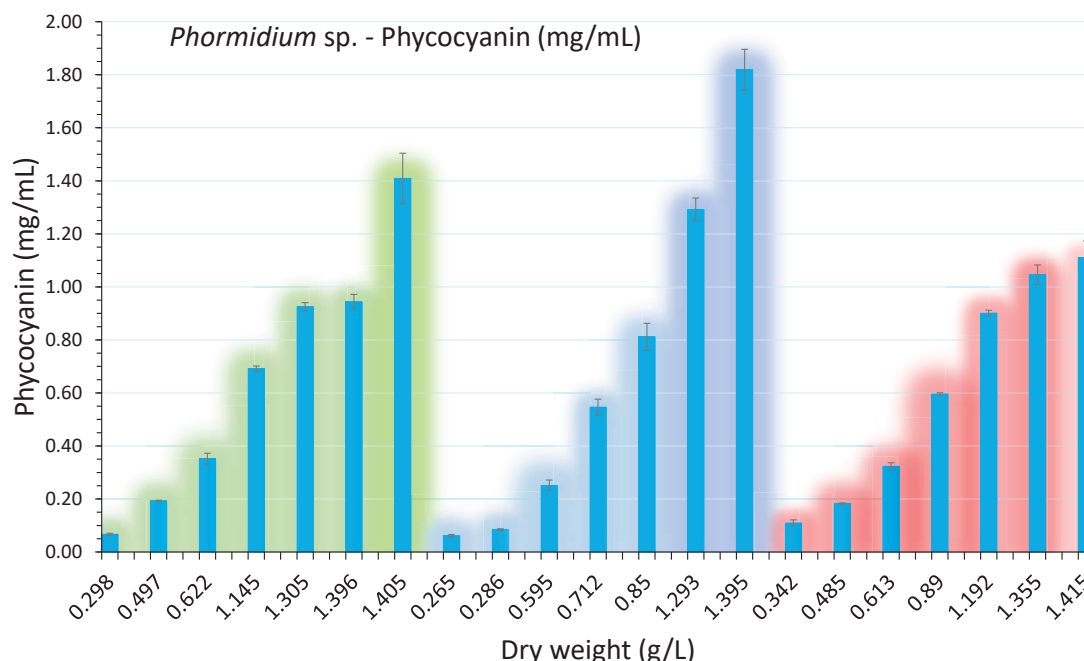
**Σχήμα 40.** Φάσματα απορρόφησης καλλιεργειών του νηματοειδούς λυανοβακτηρίου *Phormidium* sp. σε πράσινο φως (A), μπλε (B) και κόκκινο (C) σε 7 διαφορετικές ημέρες της διάρκειας της καλλιέργειας.



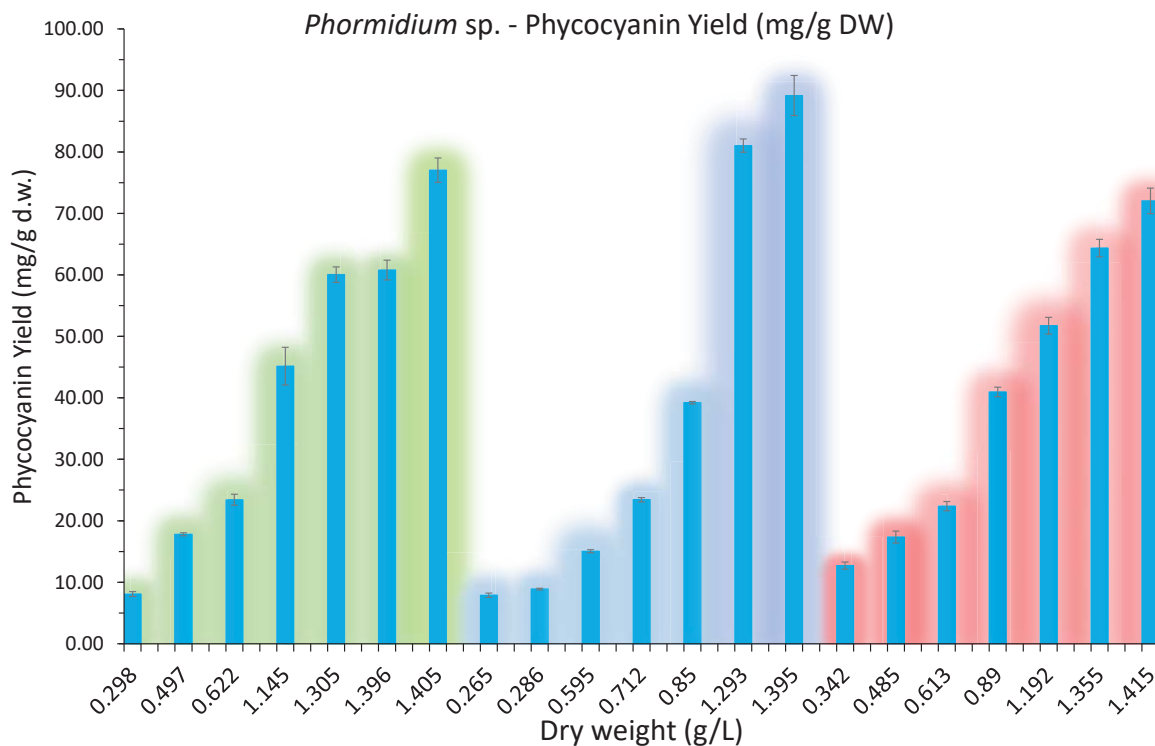
**Σχήμα 41.** Οι συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης-α και των ολικών καροτενοειδών (μg/mL) στις διάφορες πυκνότητες καλλιέργειας σε ξηρό βάρος ανά λίτρο (g dry weight/L) των καλλιεργειών του *Phormidium* sp. στις συνθήκες του πράσινου φωτισμού (πράσινη σκίαση), μπλε φωτισμού (μπλε σκίαση) και κόκκινου φωτισμού (κόκκινη σκίαση). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 αντιγράφων ± SE.

Οι μέγιστες τιμές για τα ολικά καροτενοειδή παρουσίασαν μια διαφορετική κατάσταση από αυτή για τη χλωροφύλλη-α (Σχήμα 41). Έτσι οι μέγιστες τιμές ολικών καροτενοειδών στο πράσινο και στο κόκκινο  $6.77 \pm 0.163(\text{SE})$  και  $6.36 \pm 0.412(\text{SE})$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , αντίστοιχα ήταν στατιστικά ίσες μεταξύ τους ( $P > 0.05$ ) και στατιστικά υψηλότερες ( $P < 0.05$ ) από την αντίστοιχη τιμή του μπλε φωτός  $5.92 \pm 0.295(\text{SE})$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Η επίδραση του χρώματος του φωτός στο περιεχόμενο των κυττάρων στη φυκοκυανίνη (Σχήματα 42 και 43) παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των χρωμάτων. Στο μπλε χρώμα τόσο η μέγιστη συγκέντρωση της φυκοκυανίνης όσο και η μέγιστη απόδοση απόδοσης (yield) ήταν στατιστικώς υψηλότερες ( $P < 0.05$ ) από τις αντίστοιχες τιμές για το πράσινο (δεύτερο σε κατάταξη) και κόκκινο φως (τρίτο σε κατάταξη) οι οποίες επίσης διέφεραν στατιστικά ( $P < 0.05$ ). Έτσι στο μπλε χρώμα η μέγιστη τιμή ήταν  $1.82 \pm 0.077$   $\text{mg}/\text{mL}$  ενώ στο κόκκινο και στο πράσινο  $1.11 \pm 0.064$  και  $1.41 \pm 0.095$   $\text{mg}/\text{mL}$ , αντίστοιχα. Για την απόδοση η μέγιστη τιμή στο μπλε ήταν  $89.18 \pm 3.248$   $\text{mg}/\text{g d.w.}$  ενώ στο κόκκινο και στο πράσινο  $72.04 \pm 2.077$  και  $77.037 \pm 1.971$   $\text{mg}/\text{g d.w.}$ , αντίστοιχα. Από τα εν γένει αποτελέσματα για τη φυκοκυανίνη προκύπτει ότι οι μέγιστες τιμές τόσο της συγκέντρωσης όσο και της απόδοσης είναι πολύ υψηλότερες σε όλα τα χρώματα (και ιδιαίτερα του μπλε) από τις αντίστοιχες τιμές με τη χρησιμοποίηση λευκού φωτός χαμηλής (2000 lux – L) ή υψηλής έντασης (8000 lux – XL) (σύγκριση διαγραμμάτων των Σχημάτων 42-43 και 38-39).



**Σχήμα 42.** Η συγκέντρωση της φυκοκυανίνης σε  $\text{mg}/\text{mL}$  στην εξέλιξη της αύξησης της βιομάζας του ως ξηρό βάρος (dry weight) σε  $\text{g}/\text{L}$  κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του *Phormidium* sp. υπό πράσινο (πράσινη σκίαση), μπλε (μπλε σκίαση) και κόκκινο (κόκκινη σκίαση) φως. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 αντιγράφων  $\pm$  SE.



**Σχήμα 43.** Η απόδοση (yield) της φυκοκυανίνης σε mg/g d.w. στην εξέλιξη της αύξησης της βιομάζας του ως ξηρό βάρος (dry weight) σε g/L κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του *Phormidium* sp. υπό πράσινο (πράσινη σκίαση), μπλε (μπλε σκίαση) και κόκκινο (κόκκινη σκίαση) φως. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 αντιγράφων  $\pm$  SE.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα των πειραματισμών σχετικά με τη βελτιστοποίηση παραγωγής από τα καλλιεργούμενα μικροφύκη των χρωστικών που περιέχουν τα κύτταρά τους και οι οποίες χρωστικές αναγνωρίζονται διεθνώς ως έντονα αντιοξειδωτικές ουσίες για τον οργανισμό, προέκυψαν αξιοσημείωτα συμπεράσματα. Τα συμπεράσματα αυτά μπορούν να βοηθήσουν στην εφαρμογή τους σε κλίμακα μαζικής καλλιέργειας αυτών των μικροφυκών για την καλύτερη εκμετάλλευσή τους. Συνοπτικά τα αποτελέσματα του παρόντος συνοψίζονται στα παρακάτω:

1. Υπάρχουν μεγάλες διαφορές στην περιεκτικότητα σε χρωστικές μεταξύ των διαφορετικών ειδών φυτοπλαγκτού τόσο ως προς τις κοινές σε όλα τα είδη χρωστικές (χλωροφύλλη-*a*, ολικά καροτενοειδή), όσο και στις ειδικές για τα κυανοβακτήρια (φυκοκυανίνη).
2. Η ένταση του φωτισμού λευκού φωτός (χαμηλή ένταση 2000 lux έναντι υψηλής έντασης 8000 lux επηρεάζει έντονα τη διαφοροποίηση της περιεκτικότητας σε όλες τις χρωστικές σε όλα τα εξετασθέντα είδη.



3. Η ποιότητα του φωτός εκφραζόμενη ως διαφορετικό χρώμα (μπλε, πράσινο, κόκκινο) παρουσιάζει επίσης έντονη επίδραση στο περιεχόμενο των χρωστικών τόσο ανάμεσα στα χρώματα, μεταξύ των ειδών όσο και συγκρινόμενη ανά είδος και χρώμα με το λευκό φως.
4. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη-a καταγράφηκε στο χλωροφύκος *Dunaliella* sp. με ~18 µg/mL στο μπλε, πράσινο και λευκό φως των 8000 lux, ακολουθούμενη από το κυανοβακτήριο *Phormidium* sp. με ~14 µg/mL στο μπλε και κόκκινο φως, το χλωροφύκος *Nephroselmis* sp. με ~13 µg/mL στο λευκό φως των 8000 lux, το κυανοβακτήριο *Anabaena* sp. με 9-10 µg/mL σε όλες τις εντάσεις λευκού φωτός και στα χρώματα εκτός του μπλε και τέλος στο δινομαστιγωτό *Amphidinium carterae* με ~5.8 µg/mL στο λευκό φως των 8000 lux.
5. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά καροτενοειδή καταγράφηκε στο χλωροφύκος *Dunaliella* sp. με ~15 µg/mL στο λευκό φως των 8000 lux, ακολουθούμενη από το χλωροφύκος *Nephroselmis* sp. με ~8 µg/mL στο λευκό φως των 8000 lux, το κυανοβακτήριο *Phormidium* sp. με ~7 µg/mL στο πράσινο και κόκκινο φως, το κυανοβακτήριο *Anabaena* sp. με ~5.8 µg/mL σε όλες τις εντάσεις λευκού φωτός και στα χρώματα εκτός του μπλε και τέλος στο δινομαστιγωτό *Amphidinium carterae* με ~4.7 µg/mL στο λευκό φως των 8000 lux.
6. Γενικώς στο λευκό φως η υψηλή ένταση φωτισμού των 8000 lux προκαλεί αύξηση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλες και ολικά καροτενοειδή συγκριτικά με τη χαμηλή ένταση των 2000 lux σε όλα τα εξετασθέντα είδη.
7. Επιπροσθέτως παρουσιάζεται η τάση αύξησης της περιεκτικότητας των κυττάρων σε χλωροφυλλες και των καροτενοειδή όταν ο φωτισμός είναι με χρώμα σε σχέση με τον λευκό φωτισμό.
8. Στα κυανοβακτήρια η περιεκτικότητα στην παραδεκτή στη βιβλιογραφία έχουσα έντονη αντιοξειδωτική δράση φυκοβιλιπρωτεΐνη φυκοκυανίνη, παρουσιάζει έντονες διαφορές μεταξύ των εντάσεων φωτισμού λευκού φωτός και μεταξύ αυτού και του χρωματιστού φωτός και περαιτέρω, μεταξύ των χρωμάτων.
9. Γενικώς και εντελώς αντίθετα από το αντίστοιχο πρότυπο για χλωροφύλλες και καροτενοειδή, η χαμηλή ένταση λευκού φωτός (2000 lux) προκαλεί πολύ μεγαλύτερη παραγωγή φυκοκυανίνης απ' ό,τι η υψηλή ένταση (8000 lux).
10. Όμως, και στα δύο εξετασθέντα κυανοβακτήρια η επίδραση του χρώματος του φωτός εκτινάσσει σε ακόμα υψηλότερες τιμές την περιεκτικότητα σε φυκοκυανίνη συγκριτικά με το λευκό φως.
11. Σε όρους απόδοσης (yield) σε φυκοκυανίνη εκφρασμένη ως mg/g d.w. (ξηρού βάρους φύκους) τις μεγαλύτερες τιμές κατέγραψε το κυανοβακτήριο *Phormidium* sp. με ~90 mg/g d.w. στο μπλε φως συγκριτικά με τα ~62 mg/g d.w. του *Anabaena* sp. στο πράσινο φως.

12. Τα φάσματα απορρόφησης που μπορούν να λαμβάνονται με εύκολο, συνεχή, γρήγορο, ανέξοδο και μη επεμβατικό τρόπο από τις καλλιέργειες των φυκών μπορούν να δίδουν πολύτιμες πληροφορίες για την κατάσταση της εκάστοτε καλλιέργειας τόσο ως προς την πυκνότητά της όσο και ως προς το περιεχόμενο των χρωστικών έτσι ώστε να διευκολύνεται ο καλλιεργητής στην ιδανική στιγμή συλλογής της φυκομάζας τότε που θα υπάρχει μια ιδανική σχέση μεταξύ βιομάζας και περιεχομένου σε χρωστικές.
13. Από τη γενική τάση που παρατηρήθηκε στις πειραματικές καλλιέργειες προκύπτει το αξιοπρόσεκτο γεγονός ότι η χρήση του χρωματιστού φωτός αποδίδει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χρωστικές συγκρινόμενη με το λευκό φως. Συνεπώς η χρήση φωτισμού τύπου LED κατάλληλου χρώματος μπορεί να έχει ωφέλιμη επίδραση στην καλλιέργεια των μικροφυκών ως προς τη μεγιστοποίηση της παραγωγής χρήσιμων χρωστικών.

## OIKEIA BIBΛIOΓPAΦIA

**HOTOS G.** (2016). The halotolerant green alga *Asteromonas gracilis*, an ideal tool for research, education and mass culture. A preliminary report. *2<sup>nd</sup> Congress on Appl. Ichthyology & Aquatic Environment*. 10-12 Nov. 2016. Messolonghi Greece.

**HOTOS, G.** (2018). Protists, Cyanobacteria, Rotifers and Crustacea from the hypersaline lakes of Messolonghi saltworks (W. Greece). *10<sup>th</sup> World Salt Symposium, 2018, Park city, Utah, U.S.A.*

**HOTOS, G.** (2019). A short review on the halotolerant green microalga *Asteromonas gracilis* Artari with emphasis on its uses. *Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research*, 4(3): 1-8.

**HOTOS, G., AVRAMIDOU, D. & V., BEKIARI,** (2020). Calibration curves of culture density assessed by spectrophotometer for three microalga (*Nephroselmis*, *Amphidinium carterae* and *Phormidium* sp.). *European Journal of Biology and Biotechnology*, 1(6): 1-7. <https://doi.org/10.24018/ejbio.2020.1.6.132>.

**HOTOS, G.,** (2021). A preliminary survey on the planktonic biota of a hypersaline pond of Messolonghi saltworks (W. Greece). *Diversity*, 13, 270: 1-12. <https://doi.org/10.3390/d13060270>

**HOTOS, G.** (2021). “Culture Growth of the Cyanobacterium *Phormidium* sp. in Various Salinity and Light Regimes and Their Influence on Its Phycocyanin and Other Pigments Content” *Journal of Marine Science and Engineering* 9, no. 8: 798. <https://doi.org/10.3390/jmse9080798>

**HOTOS, G.**, and Despoina Avramidou. 2021. “The Effect of Various Salinities and Light Intensities on the Growth Performance of Five Locally Isolated Microalgae [*Amphidinium carterae*, *Nephroselmis* sp., *Tetraselmis* sp. (var. red pappas), *Asteromonas gracilis* and *Dunaliella* sp.] in Laboratory Batch Cultures” *Journal of Marine Science and Engineering* 9, no. 11: 1275. <https://doi.org/10.3390/jmse9111275>

**HOTOS, George N.**, and Theodoros I. Antoniadis. 2022. “The Effect of Colored and White Light on Growth and Phycobiliproteins, Chlorophyll and Carotenoids Content of the Marine Cyanobacteria *Phormidium* sp. and *Cyanothece* sp. in Batch Cultures” *Life* 12, no. 6: 837. <https://doi.org/10.3390/life12060837>

**HOTOS, G.N.**; Avramidou, D.; Samara, A. (2022). The Effect of Salinity and Light Intensity on the Batch Cultured Cyanobacteria *Anabaena* sp. and *Cyanothece* sp. *Hydrobiology*, 278-287. <https://doi.org/10.3390/hydrobiology1030020>

**HOTOS George**, Despoina Avramidou, Savvas Giannis Mastropetros, Konstantina Tsigkou, Konstantina Kouvara, Pavlos Makridis, Michael Kornaros. Isolation, identification, and chemical composition analysis of nine microalgal and cyanobacterial species isolated in lagoons of Western Greece, *Algal Research*, 2022, 102935, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102935>