



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Ταμείο
Περιφερειακής Ανάπτυξης

ΕΠΑνεΚ 2014-2020
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

**ΔΡΑΣΗ ΕΘΝΙΚΗΣ ΕΜΒΕΛΕΙΑΣ:
«ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ»**



**Αξιοποίηση υγρών αποβλήτων για καλλιέργεια μικροφυκών και
χρησιμοποίηση αυτών προς παραγωγή βιοντίζελ και συμπληρωμάτων
ιχθυοτροφών**

«Alga4Fuel&Aqua»

Παραδοτέο 2: Έκθεση επιλογής ΜΦ για βιοντίζελ

Έκδοση 1.0.: Πρώτη έκδοση που δημιουργήθηκε στις 08-01-2019

Έκδοση 2.0.: Δεύτερη έκδοση που δημιουργήθηκε στις 08-09-2020

Αυτό το έργο χρηματοδοτήθηκε από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
«Ανταγωνιστικότητα – Επιχειρηματικότητα - Καινοτομία (ΕΠΑνεΚ) 2014-2020, Δράση
Εθνικής Εμβέλειας «Ερευνώ-Δημιουργώ-Καινοτομώ», με Κωδικό Έργου Τ1ΕΔΚ-01580



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ
ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΕΣΠΑ & ΤΕ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΡΙΣΗΣ ΕΠΑ-ΕΚ



ΓΓΕΤ
ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ
ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΠΑνεΚ 2014-2020
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Λεπτομέρειες Έργου:

Πρόγραμμα: **ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ – ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ (ΕΠΑνεΚ) 2014-2020**

Τίτλος Έργου: **Αξιοποίηση υγρών αποβλήτων για καλλιέργεια μικροφυκών και χρησιμοποίηση αυτών προς παραγωγή βιοντίζελ και συμπληρωμάτων ιχθυοτροφών**

Ακρωνύμιο Έργου: **Alga4Fuel&Aqua**

Αριθμός Πρότασης: **Τ1ΕΔΚ-01580**

Συντονιστής: **Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

Διάρκεια: **09/07/2018 – 08/10/2022**

Λεπτομέρειες Παραδοτέου

ΕΕ2: Παραγωγή Μικροφυκών για Βιοντίζελ

ΥΕ2.1: Μελέτη βάσης δεδομένων & επιλογή ΜΦ- Μελέτη βιβλιογραφίας

Τίτλος Παραδοτέου: Έκθεση επιλογής ΜΦ για βιοντίζελ

Συντονιστής: **ΤΕΙ ΘΕΣ**

Συμμετέχοντες Εταίροι: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας ,GRINCO S.A. (Formerly STAFF COLOUR ENERGY)



Περιεχόμενα

1. Περίληψη.....	5
2. Εισαγωγή.....	8
3. Γενικά Χαρακτηριστικά Ετεροτροφικής Καλλιέργειας.....	15
3.1 Εισαγωγή.....	15
3.2 Συστήματα μεταφοράς άνθρακα στα μικροφύκη.....	16
3.3 Μεταβολικές Οδοί.....	18
3.4 Πηγές Άνθρακα - Αφομοίωση του Οργανικού Άνθρακα Κατά τη Διάρκεια Ετεροτροφικής και Μικτοτροφικής Καλλιέργειας.....	19
3.4.1 Γλυκόζη.....	19
3.4.2 Αλκοόλες (κυρίως Γλυκερόλη).....	22
3.4.3 Καρβοξυλικά οξέα (κυρίως οξικό άλας).....	23
4. Προαπαιτούμενα – Προϋποθέσεις για Ετεροτροφική Καλλιέργεια – Σύγκριση με Αυτοτροφική Καλλιέργεια - Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα.....	25
4.1 Προαπαιτούμενα.....	25
4.2 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα Σχετικά με την Αυτότροφη Καλλιέργεια.....	26
4.2.1 Πλεονεκτήματα.....	26
4.2.2 Μειονεκτήματα - Περιορισμοί.....	27
5. Επιθυμητά Χαρακτηριστικά Βιομάζας για την παραγωγή Βιοντίζελ.....	28
5.1 Προδιαγραφές Βιοντίζελ.....	28
5.1.1 Ιστορικό.....	28
5.1.2 Παρατηρήσεις.....	33
5.1.3 Επεξήγηση Προδιαγραφών:.....	33
6. Εκτεταμένη Βιβλιογραφική Ανασκόπηση.....	36
6.1 Υποσχόμενα Είδη Μικροφυκών Για την Ετεροτροφική Και Μιξοτροφική Καλλιέργεια.....	36
6.2 Ανάλυση Ανά Είδος Μικροφυκών επί Μέρους Χαρακτηριστικών - Επίδοσης - Σύστασης.....	52
6.3 Είδη Μικροφυκών Και Χαρακτηριστικά Τους Που Είναι Διαθέσιμα Από Διεθνή Ερευνητικά Κέντρα.....	55
7. Βασικά Συμπεράσματα.....	67
8. Επιλογή Ειδών Για Συγκριτική Καλλιέργεια Και Έλεγχο και Επιλογή Του Πλέον Υποσχόμενου Μικροφύκου.....	69
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70



Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 3-1. Σχέδιο μεταβολικών οδών για αφομοίωση του άνθρακα και παραγωγή ενέργειας σε φωτοαυτοτροφικά, ετεροτροφικά και μικτοτροφικά μικροφύκη. Οι συντομογραφίες ενώσεων είναι ως εξής: 2-OG:2-oxoglutarate, 2PG:2-phosphoglycerate, 3PG:3-phosphoglycerate, ACA: Ακεταλδεΐδη, R5P:ribulose-5 phosphate, ACCoA:acetyl-Coenzyme A, ADP:adenosine-diphosphate, ATP:adenosine-triphosphate, BPG:1,3-biphospho glycerate, BPG:1,3-bisphosphoglycerate, CIT:citrate, F6P:fructose-6 phosphate, FDP:Fructose 1,6-biphosphate, FUM:fumarate, G1P:glucose-1 phosphate, G3P:glyceraldehyde-3 phosphate, G6P:glucose-6 phos-phate, GLN: glutamine, GLU:glutamate, ICIT:isocitrate, MAL:malate, NAD+: nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized), NADH: nicotinamide adenine dinucleotide (reduced), NADP+: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized), NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced), OAA: oxaloacetate, OXA: oxalosuccinate, PEP:phosphoenolpyruvate, PYR:pyruvate, RBP:ribulose-1,5 biphosphate, SUCC: succinate, SUCCCoA: succinyl-Coenzyme A (Octavio Perez-Garcia, 2015).....20

Εικόνα 3-2: Σχέδιο μεταβολικών οδών για αφομοίωση του άνθρακα και παραγωγή ενέργειας σε φωτοαυτοτροφικά, ετεροτροφικά και μικτοτροφικά μικροφύκη.....24

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2-1. Τρόποι ανάπτυξης καλλιεργειών μικροφυκών..... 10

Πίνακας 5-1. Προδιαγραφές βιοντίζελ, πετρελαϊκού ντίζελ και μέθοδοι δοκιμών σύμφωνα με τα πρότυπα ASTM D6751 και EN 14214..... 30

Πίνακας 6-1. Είδη μικροφυκών που έχουν καλλιεργηθεί ετεροτροφικά και μικτοτροφικά καθώς και α) η πηγή άνθρακα, β) η μέθοδος καλλιέργειας, γ) το επιθυμητό προϊόν, δ) η παραγωγικότητα της βιομάζας και ε) η παραγωγικότητα του επιθυμητού προϊόντος 37

Πίνακας 6-2. Είδη μικροφυκών που έχουν καλλιεργηθεί ετεροτροφικά και μικτοτροφικά καθώς και α) η πηγή άνθρακα, β) η μέθοδος καλλιέργειας, γ) το επιθυμητό προϊόν, δ) η παραγωγικότητα της βιομάζας και ε) η παραγωγικότητα του επιθυμητού προϊόντος. 47

Πίνακας 6-3. Διάφορες καλλιέργειες μικροφυκών σε αντιδραστήρες ημιδιαλείποντος έργου με σκοπό τη καλλιέργεια μικροφυκών σε υψηλές κυτταρικές συγκεντρώσεις (Fabian Bumbak 2011). 50

Πίνακας 6-4. Υποσχόμενα μικροφύκη για ετεροτροφική ή και μικτοτροφική καλλιέργεια (Department Experimental Phycology and Culture Collection of Algae) ... 58

Πίνακας 6-5: Υποσχόμενα μικροφύκη για ετεροτροφική ή και μικτοτροφική καλλιέργεια (Culture Collection of Algae and Protozoa Scottish Marine Institute) 61

Πίνακας 6-6: Υποσχόμενα μικροφύκη για ετεροτροφική ή και μικτοτροφική καλλιέργεια (Bigelow, National Center for Marine Algae and Microbiota) 65



1. Περίληψη

Στο παρόν παραδοτέο περιγράφεται μία εκτενής μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας σχετικά με το ποια είδη μικροφυκών έχουν καλλιέργηθεί ετεροτροφικά ή και μικτοτροφικά καθώς και τα χαρακτηριστικά της καλλιέργειάς τους (μέθοδος – συνθήκες καλλιέργειας) και της απόδοσής της σε βιομάζα και προϊόντα (λίπη και πρωτεΐνες). Στο πρώτο μέρος της ανασκόπησης γίνεται μία παρουσίαση της ετεροτροφικής καλλιέργειας, δηλαδή του μεταβολισμού της ετεροτροφικής καλλιέργειας, των συνθηκών που απαιτούνται, καθώς και των χαρακτηριστικών των μέσων καλλιέργειας (θρεπτικών μέσων). Στο δεύτερο μέρος γίνεται η βιβλιογραφική ανασκόπηση των κυριότερων μελετών σχετικά με την ετερότροφη ή και μικτότροφη καλλιέργεια μικροφυκών. Να σημειωθεί, ότι ορισμένα μόνο μικροφύκη παρουσιάζουν την ικανότητα να μπορούν να καλλιεργηθούν-πολλαπλασιαστούν ετερότροφα. Ένα μικροφύκος που έχει την ικανότητα να πολλαπλασιαστεί ετερότροφα μπορεί και να πολλαπλασιαστεί σε μικτοτροφική καλλιέργεια. Στο τρίτο μέρος γίνεται διερεύνηση των Δημόσιων Ερευνητικών Κέντρων που ασχολούνται με τη συλλογή και το χαρακτηρισμό ειδών μικροφυκών από όλα τα μέρη της γης. Με βάση τα ευρήματα του δεύτερου μέρους, παρουσιάζονται σε πίνακα τα χαρακτηριστικά, όπως καταγράφηκαν από τα τρία κυριότερα ερευνητικά κέντρα, των κυριότερων ειδών μικροφυκών που είναι υποσχόμενα για ετεροτροφική ή και μικτοτροφική καλλιέργεια. Στο Τέταρτο μέρος γίνεται συγκριτική μελέτη των ειδών μικροφυκών για την επιλογή των 2-3 ειδών που είναι τα πλέον υποσχόμενα για ετεροτροφική καλλιέργεια με πρώτες ύλες βιομηχανικά απόβλητα – βιομηχανικά υποπροϊόντα που το παρόν ερευνητικό έργο θα χρησιμοποιήσει, όπως η γλυκερίνη (crude glycerol) και το υγρό κλάσμα από μονάδες παραγωγής βιοαερίου από την αναερόβια ζύμωση κτηνοτροφικών αποβλήτων και βιομηχανικών αγροτικών υποπροϊόντων.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Πολλά είδη και αρκετά γένη μικροφυκών μπορούν να καλλιεργηθούν ετεροτροφικά,
2. Τα υποστρώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί περισσότερο για τις ετεροτροφικές καλλιέργειες είναι διάφορα απλά σάκχαρα, κυρίως γλυκόζη και δευτερευόντως φρουκτόζη,
3. Τα θρεπτικά μέσα είναι κυρίως τεχνητά διαλύματα που περιέχουν τα παραπάνω σάκχαρα,
4. Υπάρχει έλλειψη χρήσης φυσικών υποστρωμάτων τα οποία παρασκευάζονται με μίξη διάφορων υποπροϊόντων ή αποβλήτων,
5. Η γλυκερόλη ως υπόστρωμα έχει διερευνηθεί ελάχιστα,



6. Υπάρχει πολύ μεγάλη διαφορά τόσο στην απόδοση ως προς τη βιομάζα όσο και στην περιεκτικότητα σε λίπη και πρωτεΐνες, όχι μόνο από είδος σε είδος, αλλά για το ίδιο είδος από υπόστρωμα σε υπόστρωμα,
7. Δεν έχει ερευνηθεί καθόλου η χρήση μιγμάτων γλυκερόλης και υγρού βιολιπάσματος από εκροές μονάδων βιοαερίου,
8. Πολλές καλλιέργειες έχουν λάβει χώρα σε δημοτικά απόβλητα. Ο σκοπός όμως ήταν διαφορετικός,
9. Το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* διαφαίνεται ότι παρουσιάζει την καλύτερη απόδοση με τη χρήση θρεπτικών μέσων που έχουν τη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα,
10. Η κάθε έρευνα εστιάζει σε συγκεκριμένο προϊόν είτε αυτό είναι λίπη ή πρωτεΐνες. Σε γενικές γραμμές απαιτείται ξεχωριστά η ανάπτυξη κατάλληλων καλλιεργειών που παρουσιάζουν υψηλή παραγωγικότητα ως προς τη βιομάζα. Κατόπιν, με έλεγχο του θρεπτικού μέσου και των συνθηκών καλλιέργειας θα πρέπει να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή λιπών ή πρωτεϊνών,
11. Θα πρέπει πρώτα να προηγηθεί κατάλληλη ανάπτυξη της τεχνολογίας σε εργαστηριακή κλίμακα,
12. Εκτός από τη βιομάζα, η παραγωγικότητα ως προς τα λίπη ή τις πρωτεΐνες, μπορεί να αυξηθεί σημαντικά με την καλλιέργεια σε συνθήκες ημιδιαλείποντος έργου όπου διαφοροποιείται χρονικά η συγκέντρωση του άνθρακα και του αζώτου,
13. Διαφαίνεται ότι υψηλότερες παραγωγικότητες ως προς τη βιομάζα λαμβάνονται από μικτοτροφικές καλλιέργειες,
14. Μέγιστη παραγωγικότητα ως προς την παραγωγή βιομάζας παρουσιάζουν τα είδη *Chlorella protothecoides*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus obliquus*, *Botryococcus braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii* και *Euglena gracilis*.
15. Η παραγωγικότητα των παραπάνω ειδών ως προς τη βιομάζα, τα λίπη και τις πρωτεΐνες διαφέρει σημαντικά σε κάθε είδος, ανάλογα με το είδος και τη σύσταση του θρεπτικού μέσου και τις συνθήκες καλλιέργειας,
16. Διαφαίνεται ότι οι βέλτιστες θερμοκρασίες καλλιέργειας, αν και έχουν μελετηθεί σε πολύ λίγες περιπτώσεις, κυμαίνονται μεταξύ 25 °C και 35 °C.
17. Η επιρροή του pH του θρεπτικού μέσου επίσης δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς,
18. Διαφαίνεται ότι ενώ σε αυτοτροφικές καλλιέργειες κάτω από pH 4,5 τα κύτταρα των μικροφυκών χάνουν όλη τη χλωροφύλη και νεκρώνονται, σε ετεροτεροφικές καλλιέργειες σε αερόβιο περιβάλλον, τα κύτταρα των μικροφυκών μπορεί να πολλαπλασιαστούν σε πολύ όξινες καλλιέργειες,



19. Η κατανομή λιπών επίσης δεν έχει διερευνηθεί αρκετά. Η κατανομή των λιπών είναι σημαντική διότι καθορίζει τις ιδιότητες του παραγόμενου βιοντίζελ.

Από τα παραπάνω υποσχόμενα είδη θα επιλεγούν 2-4 διαθέσιμα είδη που θα πληρούν τις προδιαγραφές καθαρότητας (αξενικές καλλιέργειες), καθώς και του περιβάλλοντος χώρου από όπου συλλέχθηκαν και απομονώθηκαν. Τα είδη αυτά θα υποβληθούν σε ένα γρήγορο προέλεγχο, μία συγκριτική καλλιέργεια, για να απομονωθούν 1-2 είδη τα οποία θα είναι τα πλέον υποσχόμενα για ετεροτροφική καλλιέργεια με τη χρήση θρεπτικού μέσου που θα ετοιμαστεί με γλυκερόλη και υγρό βιολίπασμα από εκροές μονάδων βιοαερίου.