

**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
**ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**  
**ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ • ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ • ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ**  
**ΔΡΑΣΗ ΕΘΝΙΚΗΣ ΕΜΒΕΛΕΙΑΣ:**  
**«ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ»**



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

**Παραδοτέο 5: Ενδιάμεση Έκθεση εξάρτησης της κινητικής ανάπτυξης &  
της ποιότητας των μικροφυκών από τις συνθήκες καλλιέργειας**

*Έκδοση 1.0.: Πρώτη έκδοση που δημιουργήθηκε στις 08-07-2020*

*Έκδοση 2.0.: Δεύτερη έκδοση που δημιουργήθηκε στις 08-03-2021*

*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*



Λεπτομέρειες Έργου:

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

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

Ακρωνύμιο Έργου: **Alga4Fuel&Aqua**

Αριθμός Πρότασης: **Τ1ΕΔΚ-01580**

Συντονιστής: **Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

Διάρκεια: **09/07/2018 – 08/10/2022**

Λεπτομέρειες Παραδοτέου

ΕΕ:2 Παραγωγή ΜΦ για βιοντήζελ

ΥΕ2.4: Επίδραση των συνθηκών ανάπτυξης & μεθόδου καλλιέργειας στην ποιότητα των ΜΦ

Μελέτη της επίδρασης αυτών στα μακροθρεπτικά συστατικά των ΜΦ

Τίτλος Παραδοτέου: *Ενδιάμεση Έκθεση εξάρτησης της κινητικής ανάπτυξης & της ποιότητας των μικροφυκών από τις συνθήκες καλλιέργειας.*

Συντονιστής: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Συμμετέχων Εταίρος: ΤΕΙ ΘΕΣ-ΠΘ

Προθεσμία Παράδοσης: Μήνας 32

Ημέρα Παράδοσης: M32-08/03/2021



## Κατάλογος Περιεχομένων

1. Περίληψη.....	9
2. Εισαγωγή.....	13
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	15
3.1 Εργαστηριακοί Βιοαντιδραστήρες.....	15
3.2 Υλικά.....	15
3.3 Ανάλυση οργανικού άνθρακα.....	16
3.4 Κινητική μείωσης του οργανικού άνθρακα.....	17
3.5 Κινητική αύξησης της βιομάζας των μικροφυκών.....	17
4. Αποτελέσματα.....	19
4.1 Επιρροή της Αρχικής Συγκέντρωσης του Οργανικού Άνθρακα (Co).....	19
4.1.1 Chlorella vulgaris.....	19
4.1.2 Chlorella sorokiniana.....	21
4.1.3 Chlorella Kessleri.....	23
4.1.4 Chlorella (Parachlorella) protothecoides.....	25
4.1.5 Chlamydomonas reinhardtii.....	27
4.2 Επιρροή της Αρχικής Συγκέντρωσης Αζώτου.....	29
4.3 Περιεκτικότητες σε: α) Βιοέλαιο και β) Πρωτεΐνες.....	33
4.4 Σύγκριση Όλων των Ρυθμών Βιοαπορρόφησης του Οργανικού Άνθρακα..	34
4.5 Η επιρροή του pH του Θρεπτικού Μέσου.....	35
4.6 Επιρροή της Θερμοκρασίας στην καλλιέργεια του μικροφύκου Chlorella sorokiniana.....	39
4.6.1 Κινητική.....	39
4.6.2 Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και βιοέλαιο (λίπη).....	41
4.6.3 Κατανομή λιπαρών οξέων.....	42
4.7 Επιρροή της Λειτουργίας του Βιοαντιδραστήρα ως Ημιδιαλείποντος Έργου στην Περιεκτικότητα της Βιομάζας σε Λίπη και Πρωτεΐνες και την Κατανομή των Λιπαρών Οξέων.....	45
4.7 A) Chlorella sorokiniana.....	45
4.7.1 Περιεκτικότητα σε Πρωτεΐνες και Λίπη.....	46
4.7.2 Κατανομή Λιπαρών Οξέων.....	47
4.7 B) Chlorella kessleri.....	50
4.8 Επιρροή του Βιολιπάσματος στην καλλιέργεια μικροφυκών.....	54
4.8.1 Chlorella vulgaris.....	55
4.8.2 Chlorella sorokiniana.....	57
4.9 Περιεκτικότητα βιομάζας σε τέφρα και πτητικά στερεά και θερμογόνος δύναμη της βιομάζας.....	60
5. Συζήτηση και Συμπεράσματα.....	62



## Κατάλογος Εικόνων

<b>Εικόνα 4-1.</b> Μείωση του οργανικού άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας. Οι καμπύλες αναφέρονται στις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις του οργανικού άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 4.1). ....	20
<b>Εικόνα 4-2.</b> Διακύμανση του ρυθμού βιοαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα (Rate of Carbon Uptake) συναρτήσει του λόγου των αρχικών συγκεντρώσεων του άνθρακα και αζώτου Co/No για αρχική συγκέντρωση αζώτου ίση με 45,4 mg/l και άνθρακα ίση με 0,27, 0,59, 1,15, 2,79 και 5,36 mg/l. ....	21
<b>Εικόνα 4-3.</b> Μείωση του οργανικού άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας. Οι καμπύλες αναφέρονται στις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις του οργανικού άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 4.2). ....	22
<b>Εικόνα 4-4.</b> Διακύμανση του ρυθμού βιοαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα (Rate of Carbon Uptake) συναρτήσει του λόγου των αρχικών συγκεντρώσεων του άνθρακα και αζώτου Co/No κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> . ....	23
<b>Εικόνα 4-5.</b> Μείωση του οργανικού άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας του μικροφύκου <i>Chlorella (Parachlorella) kessleri</i> συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας. Οι καμπύλες αναφέρονται στις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις του οργανικού άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 4.3). ....	24
<b>Εικόνα 4-6.</b> Διακύμανση του ρυθμού βιοαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα (Rate of Carbon Uptake) συναρτήσει του λόγου των αρχικών συγκεντρώσεων του άνθρακα και αζώτου Co/No κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Chlorella (Parachlorella) kessleri</i> . ....	25
<b>Εικόνα 4-7.</b> Μείωση του οργανικού άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας του μικροφύκου <i>Chlorella (Parachlorella) protothecoides</i> συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας. Οι καμπύλες αναφέρονται στις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις του οργανικού άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 4.4). ....	26
<b>Εικόνα 4-8.</b> Διακύμανση του ρυθμού βιοαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα (Rate of Carbon Uptake) συναρτήσει του λόγου των αρχικών συγκεντρώσεων του άνθρακα και αζώτου Co/No κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Chlorella (Parachlorella) protothecoides</i> ....	27
<b>Εικόνα 4-9.</b> Μείωση του οργανικού άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας του μικροφύκου <i>Chlamydomonas reinhardii</i> συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας. Οι καμπύλες αναφέρονται στις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις του οργανικού άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 4.5). ....	28
<b>Εικόνα 4-10.</b> Διακύμανση του ρυθμού βιοαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα (Rate of Carbon Uptake) συναρτήσει του λόγου των αρχικών συγκεντρώσεων του άνθρακα και αζώτου Co/No κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Chlamydomonas reinhardii</i> . ....	29



<b>Εικόνα 4-11.</b> Μείωση του οργανικού άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Chlorella vulgaris</i> . Οι διαφορετικές καμπύλες αναφέρονται στις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις του αζώτου δεξιά του σχήματος.....	30
<b>Εικόνα 4-12.</b> Διακύμανση του ρυθμού βιοαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα (Rate of Carbon Uptake) συναρτήσει του λόγου των αρχικών συγκεντρώσεων του άνθρακα και αζώτου Co/No κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Chlorella vulgaris</i> με μεταβαλλόμενη αρχική συγκέντρωση αζώτου.....	31
<b>Εικόνα 4-13.</b> Αύξηση της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας. Οι διαφορετικές καμπύλες αναφέρονται στις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις του αζώτου δεξιά του σχήματος.....	31
<b>Εικόνα 4-14.</b> Διακύμανση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης $\mu_{exp}$ ( $d^{-1}$ ) συναρτήσει της αρχικής συγκέντρωσης του αζώτου.....	32
<b>Εικόνα 4-15.</b> Σύγκριση του ρυθμού βιοαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα (Rate of Carbon Uptake) συναρτήσει του λόγου των αρχικών συγκεντρώσεων του άνθρακα και αζώτου Co/No για τα πέντε είδη μικροφυκών που καλλιεργήθηκαν. 35	
<b>Εικόνα 4-16.</b> Μείωση του οργανικού άνθρακα στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας. Οι διαφορετικές καμπύλες αναφέρονται στις διαφορετικές τιμές του pH του θρεπτικού μέσου των βιοαντιδραστήρων.....	36
<b>Εικόνα 4-17.</b> Διακύμανση του ρυθμού βιοαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα (Carbon Uptake Rate) συναρτήσει του pH του θρεπτικού μέσου.....	37
<b>Εικόνα 4-18.</b> Μεταβολή της απορρόφησης του θρεπτικού μέσου συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας. Οι διαφορετικές καμπύλες αναφέρονται στις διαφορετικές τιμές του pH της καλλιέργειας.....	37
<b>Εικόνα 4-19.</b> Διακύμανση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης $\mu_{exp}$ ( $d^{-1}$ ) συναρτήσει του pH του θρεπτικού μέσου.....	38
<b>Εικόνα 4-20.</b> Μείωση του οργανικού άνθρακα συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας για το μικροφύκος <i>Chlorella sorokiniana</i> στις θερμοκρασίες που απεικονίζονται στο διάγραμμα.....	40
<b>Εικόνα 4-21.</b> Για ευκρίνεια, η μείωση του οργανικού άνθρακα συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας για το μικροφύκος <i>Chlorella sorokiniana</i> σε θερμοκρασίες 29,5 και 33,2 οC.....	40
<b>Εικόνα 4-22.</b> Ο μέσος ρυθμός απορρόφησης (rate of Carbon uptake) του οργανικού άνθρακα συναρτήσει της θερμοκρασίας καλλιέργειας του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> στους πιλοτικούς βιοαντιδραστήρες για τις παραμέτρους του πίνακα 4.9.....	41
<b>Εικόνα 4-23.</b> Κατανομή των λιπαρών οξέων ως προς τον βαθμό κορεσμού των σε ι) κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA), ιι) μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) και ιιι) πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) για τις πέντε θερμοκρασίες που δείχνονται στο διάγραμμα κατά την ετερότροφη καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	44

<b>Εικόνα 4-24.</b> Κατανομή των λιπαρών οξέων ως προς το μήκος της αλυσίδας των λιπαρών οξέων σε ι) μικρού μήκους αλυσίδα (C10-C14), ιι) μεσαίου μήκους αλυσίδα (C16-C18) και ιιι) μεγάλου μήκους αλυσίδα (>C18) για τις πέντε θερμοκρασίες που δείχνονται στο διάγραμμα κατά την ετερότροφη καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	44
<b>Εικόνα 4-25.</b> Κατανομή των λιπαρών οξέων ως προς τον βαθμό κορεσμού των σε ι) κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA), ιι) μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) και ιιι) πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) για τις πέντε θερμοκρασίες που δείχνονται στο διάγραμμα κατά την ετερότροφη καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	48
<b>Εικόνα 4-26.</b> Κατανομή των λιπαρών οξέων ως προς το μήκος της αλυσίδας των λιπαρών οξέων σε ι) μικρού μήκους αλυσίδα (C10-C14), ιι) μεσαίου μήκους αλυσίδα (C16-C18) και ιιι) μεγάλου μήκους αλυσίδα (>C18) για τις πέντε θερμοκρασίες που δείχνονται στο διάγραμμα κατά την ετερότροφη καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	49
<b>Εικόνα 4-27.</b> Κατανομή των λιπαρών οξέων ως προς τον βαθμό κορεσμού των σε ι) κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA), ιι) μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) και ιιι) πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) για τις πέντε θερμοκρασίες που δείχνονται στο διάγραμμα κατά την ετερότροφη καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	53
<b>Εικόνα 4-28.</b> Κατανομή των λιπαρών οξέων ως προς το μήκος της αλυσίδας των λιπαρών οξέων σε ι) μικρού μήκους αλυσίδα (C10-C14), ιι) μεσαίου μήκους αλυσίδα (C16-C18) και ιιι) μεγάλου μήκους αλυσίδα (>C18) για τις πέντε θερμοκρασίες που δείχνονται στο διάγραμμα κατά την ετερότροφη καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	53
<b>Εικόνα 4-29.</b> Μείωση του οργανικού άνθρακα συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας για το μικροφύκο <i>Chlorella vulgaris</i> για τις περιεκτικότητες βιολιπιδίου στο θρεπτικό μέσο που απεικονίζονται στο διάγραμμα.....	56
<b>Εικόνα 4-30.</b> Ο μέσος ρυθμός απορρόφησης (rate of Carbon uptake) του οργανικού άνθρακα συναρτήσει της θερμοκρασίας καλλιέργειας του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> στους πιλοτικούς βιοαντιδραστήρες για τις παραμέτρους του πίνακα 4.8. ....	57
<b>Εικόνα 4-31.</b> Μείωση του οργανικού άνθρακα συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας για το μικροφύκο <i>Chlorella sorokiniana</i> για τις περιεκτικότητες βιολιπιδίου στο θρεπτικό μέσο που απεικονίζονται στο διάγραμμα.....	58
<b>Εικόνα 4-32.</b> Η βιοαπορρόφηση του οργανικού άνθρακα συναρτήσει του ποσοστού βιολιπιδίου στο θρεπτικό μέσο <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	59
<b>Εικόνα 4-33.</b> Η βιοαπορρόφηση του οργανικού άνθρακα συναρτήσει του ποσοστού βιολιπιδίου στο θρεπτικό μέσο κατά την καλλιέργεια των μικροφυκών <i>Chlorella vulgaris</i> και <i>sorokiniana</i> .....	59

## Κατάλογος Πινάκων

---

<b>Πίνακας 4-1.</b> Οι μεταβλητές του των πέντε (5) πειραμάτων με μεταβαλλόμενη συγκέντρωση οργανικού άνθρακα κατά την καλλιέργεια <i>Chlorella vulgaris</i> .....	19
<b>Πίνακας 4-2.</b> Οι μεταβλητές του των πέντε (5) πειραμάτων με μεταβαλλόμενη συγκέντρωση οργανικού άνθρακα κατά την καλλιέργεια <i>Chlorella vulgaris</i> .....	22
<b>Πίνακας 4-3.</b> Οι μεταβλητές του των πέντε (5) πειραμάτων με μεταβαλλόμενη αρχική συγκέντρωση οργανικού άνθρακα κατά την καλλιέργεια <i>Chlorella (Parachlorella) kessleri</i> .....	24
<b>Πίνακας 4-4.</b> Οι μεταβλητές του των πέντε (5) πειραμάτων με μεταβαλλόμενη αρχική συγκέντρωση οργανικού άνθρακα κατά την καλλιέργεια <i>Chlorella (Parachlorella) protothecoides</i> .....	26
<b>Πίνακας 4-5.</b> Οι μεταβλητές του των πέντε (5) πειραμάτων με μεταβαλλόμενη αρχική συγκέντρωση οργανικού άνθρακα κατά την καλλιέργεια <i>Chlamydomonas reinhardii</i> .....	28
<b>Πίνακας 4-6.</b> Οι μεταβλητές των θρεπτικών μέσων των πέντε Βιοαντιδραστήρων .....	30
<b>Πίνακας 4-7.</b> Η περιεκτικότητα της βιομάζας σε πρωτεΐνες και βιοέλαιο για όλα τα είδη μικροφυκών που καλλιεργήθηκαν και για τις αρχικές συγκεντρώσεις άνθρακα και αζώτου που απεικονίζονται στον πίνακα καθώς και οι παραγωγικότητες σε βιομάζα ( $P_b$ ), πρωτεΐνες ( $P_p$ ) και βιοέλαιο ( $P_l$ ). Η αρχική συγκέντρωση του αζώτου ήταν σταθερή σε όλες τις συγκριτικές καλλιέργειες του Πίνακα 4-7 και ίση με 45,4 mg/l. Τα υπόλοιπα μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά ήταν επίσης ίδια όπως επίσης και η θερμοκρασία και το pH, $30 \pm 1^\circ\text{C}$ και $7 \pm 0,3$ αντίστοιχα.....	33
<b>Πίνακας 4-8.</b> Οι μεταβλητές των πέντε πειραμάτων .....	36
<b>Πίνακας 4-9.</b> Οι παράμετροι των πέντε πειραμάτων στους πέντε πιλοτικούς βιοαντιδραστήρες κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	39
<b>Πίνακας 4-10.</b> Η περιεκτικότητα της βιομάζας του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> σε πρωτεΐνες και λίπη συναρτήσει της θερμοκρασίας καλλιέργειας. Οι υπόλοιπες παράμετροι της καλλιέργειας είναι οι ίδιοι και για τις πέντε καλλιέργειες. ....	41
<b>Πίνακας 4-11.</b> Η κατανομή λιπαρών οξέξεων (FA) ως ποσοστό του συνολικού βιοελαίου που εξήχθη από τη βιομάζα της <i>Chlorella sorokiniana</i> και καλλιεργήθηκε στις πέντε θερμοκρασίες όπως φαίνεται στον πίνακα. ....	42
<b>Πίνακας 4-12.</b> Οι παράμετροι της καλλιέργειας του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> στους πέντε πιλοτικούς βιοαντιδραστήρες σε τη λειτουργία ημιδιαλείποντος έργου. Το άζωτο προέρχεται α) από αμμωνιακό άζωτο (52,8 mg/l) και νιτρικό άζωτο (27,7 mg/l) για συνολικό άζωτο = 80,5 mg/l. Στα τελευταία δύο πειράματα – καλλιέργειες μία επιπρόσθετη ποσότητα νιτρικού αζώτου ίση με 27,7	



mg/l προστέθηκε στο μέσο της καλλιέργειας για μία συνολική ποσότητα αζώτου ίση με 108,2 mg/l. .... 45

**Πίνακας 4-13.** Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λίπη για τις καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου του μικροφύκου *Chlorella sorokiniana*. .... 46

**Πίνακας 4-14.** Κατανομή Λιπαρών Οξέων βιομάζας του μικροφύκου *Chlorella sorokiniana* που καλλιεργήθηκε σε βιοαντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου με την προσθήκη γλυκερίνης με τη συχνότητα και ποσότητα που δείχνεται..... 47

**Πίνακας 4-15.** Οι παράμετροι των τεσσάρων πειραμάτων και η μεθοδολογία προσθήκης άνθρακα κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Chlorella kessleri* σε βιοαντιδραστήρες ημιδιαλείποντος έργου. .... 50

**Πίνακας 4-16.** Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λίπη για τις τέσσερις καλλιέργειες - μεταχειρίσεις ημιδιαλείποντος έργου του μικροφύκου *Chlorella kessleri*. Στην πρώτη γραμμή του πίνακα αναφέρεται η μεθοδολογία προσθήκης της γλυκερόλης. Συνολικά προστέθηκαν 800 ml γλυκερόλης..... 51

**Πίνακας 4-17.** Η κατανομή των λιπαρών οξέων των FAME του μικροφύκου *Chlorella kessleri* που καλλιεργήθηκε σε βιοαντιδραστήρες ημιδιαλείποντος έργου με την προσθήκη 800 ml συνολικά, α) σε 2 δόσεις, 400 ml έκαστη, β) σε 4 δόσεις, 200 ml έκαστη, γ) σε 8 δόσεις, 100 ml έκαστη και δ) σε 20 δόσεις, 40 ml έκαστη..... 51

**Πίνακας 4-18.** Οι παράμετροι των πέντε πειραμάτων στους πέντε εργαστηριακούς βιοαντιδραστήρες κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροφύκου *Chlorella vulgaris*..... 55

**Πίνακας 4-19.** Οι παράμετροι των τεσσάρων πειραμάτων στους εργαστηριακούς βιοαντιδραστήρες κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροφύκου *Chlorella sorokiniana*. .... 57

**Πίνακας 4-20.** Ενδεικτικές τιμές ποσοστών τέφρας, πτητικών στερεών και θερμογόνου δύναμης για το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* και για διάφορες μεταχειρίσεις..... 60

**Πίνακας 4-21.** Ενδεικτικές τιμές ποσοστών τέφρας, πτητικών στερεών και θερμογόνου δύναμης για το μικροφύκος *Chlorella sorokiniana* και για διάφορες μεταχειρίσεις..... 61

**Πίνακας 4-22.** Ενδεικτικές τιμές ποσοστών τέφρας, πτητικών στερεών και θερμογόνου δύναμης για το μικροφύκος *Chlorella sorokiniana* και για διάφορες μεταχειρίσεις..... 61



## 1. Περίληψη

Έχουν λάβει χώρα πειράματα ετεροτροφικής καλλιέργειας των ακόλουθων μικροφυκών: α) *Chlorella vulgaris*, β) *Chlorella sorokiniana*, γ) *Chlorella protothecoides*, δ) *Chlorella kessleri* και ε) *Chlamydomonas reinhardtii*. Τα πειράματα αυτά έλαβαν χώρα σε βιοαντιδραστήρες των 5 λίτρων με αερισμό 300 λίτρα/ώρα. Στα πειράματα αυτά μελετήθηκε κυρίως η επιρροή της αρχικής συγκέντρωσης διαλυμένου οργανικού άνθρακα που προέρχεται από γλυκερόλη. Μελετήθηκαν: α) η ταχύτητα μείωσης του οργανικού άνθρακα, β) ο ρυθμός απορρόφησης του οργανικού άνθρακα (carbon uptake rate), γ) η παραγωγή βιομάζας, δ) η παραγωγικότητα βιομάζας, ε) η περιεκτικότητα της βιομάζας (επί ξηρού) σε λίπη και πρωτεΐνες και στ) η παραγωγικότητα λιπών (βιο-ελαίου) και πρωτεϊνών. Για όλα τα παραπάνω είδη μικροφυκών η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε ως προς την επιρροή του οργανικού άνθρακα ήταν η εξής: α) μελετήθηκε η επιρροή της συγκέντρωσης οργανικού άνθρακα (διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του αζώτου) στο ρυθμό μείωσης του οργανικού άνθρακα στο θρεπτικό μέσο και στο ρυθμό απορρόφησης του από τα μικροφύκη, β) μελετήθηκαν συγκεντρώσεις οργανικού άνθρακα από περίπου 250 mg/l έως περίπου 6.500 mg/L (Co/No από περίπου 6 έως περίπου 145) διατηρώντας σε όλα τα πειράματα σταθερή την αρχική συγκέντρωση του αζώτου και ίση με 45,4 mg/l, σταθερή τη θερμοκρασία στους  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  και το  $\text{pH}=7 \pm 0,3$ , γ) συλλέχθηκε, αποξηράθηκε και ζυγίστηκε η βιομάζα, δ) προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα της βιομάζας σε βιοέλαιο και πρωτεΐνες, ε) υπολογίστηκαν οι παραγωγικότητες σε βιομάζα, σε βιοέλαιο και σε πρωτεΐνες και στ) έγινε σύγκριση των πέντε μικροφυκών.

Από τα παραπάνω πειράματα εξαγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα: α) Καθώς αυξάνεται ο λόγος Co/No αυξάνεται η περιεκτικότητα σε βιοέλαιο και σε παραγόμενη βιομάζα σε g/l και μειώνεται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, β) σε χαμηλές συγκεντρώσεις οργανικού άνθρακα η κινητική είναι αργή λόγω έλλειψης άνθρακα, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις οργανικού άνθρακα η κινητική περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα του αζώτου, γ) ο ρυθμός βιοαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα καθώς επίσης και η παραγωγή βιομάζας και η περιεκτικότητάς της σε βιοέλαιο διαφέρει σημαντικά από μικροφύκος σε μικροφύκος, δ) την υψηλότερη ταχύτητα απορρόφησης του οργανικού άνθρακα έχει το μικροφύκος *Chlorella sorokiniana* ακολοθούμενο πολύ κοντά από το μικροφύκος *Chlorella kessleri* και ε) την υψηλότερη περιεκτικότητα σε βιοέλαιο, καθώς και την υψηλότερη παραγωγικότητα και σε βιομάζα και σε βιοέλαιο έχει το μικροφύκος *Chlorella sorokiniana*.

Τα είδη *Chlorella kessleri*, και *Chlorella sorokiniana* ακολούθως καλλιεργήθηκαν, για λόγους περαιτέρω σύγκρισης, στους πιλοτικούς βιοαντιδραστήρες. Το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* έχει μελετηθεί εντατικά στο παρελθόν σε αυτότροφη καλλιέργεια από υποψήφιο διδάκτορα του Ιδρύματος στα

πλαίσια εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής και, εκτός του ότι είναι ένα υποσχόμενο είδος, αποτελεί και μοντέλο για σύγκριση της αυτότροφης με την ετερότροφη καλλιέργεια. Για το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* μελετήθηκε επιπρόσθετα και η επιρροή της αρχικής συγκέντρωσης αζώτου καθώς και του pH στο ρυθμό μείωσης του οργανικού άνθρακα. Η ετεροτροφική καλλιέργεια του μικροφύκου *Chlorella vulgaris* σε μεταβαλλόμενο pH, ήτοι 4,5, 6, 7,5, 9 και 10,5 έδειξε ότι η κινητική επηρεάζεται σημαντικά από το pH του θρεπτικού υποστρώματος. Διατηρώντας σταθερές τις υπόλοιπες παραμέτρους της καλλιέργειας το βέλτιστο εύρος του pH από άποψη κινητικής σημειώνεται μεταξύ pH 8 και 9. Στα πειράματα της επιρροής του pH οι αρχικές συγκεντρώσεις του οργανικού άνθρακα και του αζώτου ήταν 3.160 mg/L και 114 mg/L (Co/No=27,7). Μελλοντικά η επιρροή του pH θα μελετηθεί και στην καλλιέργεια του μικροφύκου *Chlorella sorokiniana* με τη χρήση βιολιπάσματος. Σε σχέση με την επιρροή του αζώτου, μελετήθηκαν αρχικές συγκεντρώσεις αζώτου ίσες με 22,7, 45,4, 114, 227 και 450 mg/l και αρχική συγκέντρωση άνθρακα ίση με 3300 mg/l (Co/No = 145,4, 72,7, 28,9, 14,5 και 7,3). Τα δύο βασικά συμπεράσματα είναι ότι: α) αυξανόμενης της συγκέντρωσης του αζώτου (μειούμενου του Co/No) μειώνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε βιοέλαιο και αυξάνεται η περιεκτικότητά της σε πρωτεΐνες και β) σε υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου (>227 mg/l) σημειώνεται μικρή μείωση στην ταχύτητα απορρόφησης του οργανικού άνθρακα.

Το μικροφύκος *Chlorella sorokiniana* διαφαίνεται ότι αποτελεί το πλέον υποσχόμενο είδος διότι στις προαναφερθείσες ετερότροφες καλλιέργειες έχει πολύ καλή κινητική και παραγωγή βιομάζας και υψηλή περιεκτικότητα σε λίπη. Το είδος αυτό καλλιεργήθηκε και στους πιλοτικούς βιοαντιδραστήρες, έγινε εξαγωγή βιοελαίου, μετατροπή του σε βιοντίζελ και προσδιορισμός της κατανομής λιπαρών οξέων. Το είδος *Chlorella kessleri* επίσης καλλιεργήθηκε στους πιλοτικούς βιοαντιδραστήρες και έλαβε χώρα προσδιορισμός της κατανομής λιπαρών οξέων και σύγκριση με την αντίστοιχη του μικροφύκου *Chlorella sorokiniana*. Οι βιοαντιδραστήρες των 45 L τέθηκαν σε λειτουργία ημιδιαλείποντος έργου για τα είδη *Chlorella sorokiniana* και *Chlorella kessleri*. Τα τελευταία αυτά δύο πειράματα διενεργήθηκαν διότι η κινητική του μικροφύκου *C. kessleri*, αν και η περιεκτικότητά του σε βιο-έλαιο ήταν μικρότερη της αντίστοιχης του μικροφύκου *C. sorokiniana*, ήταν παρόμοια με αυτήν του μικροφύκου *C. sorokiniana*. Όμως και από την τελευταία αυτή μελέτη προκύπτει ότι το μικροφύκος *C. sorokiniana* υπερτερεί έναντι του μικροφύκου *C. kessleri* και όσο αφορά την περιεκτικότητα της βιομάζας σε βιοέλαιο και όσο αφορά την ποιότητά του. Το βιοέλαιο του μικροφύκου *C. kessleri* περιέχει ένα ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων.

Συγκεκριμένα, από τη μελέτη καλλιέργειας του μικροφύκου *C. sorokiniana* με την προσθήκη γλυκερόλης – καλλιέργεια ημιδιαλείποντος έργου – όπου η προσθήκη συνολικής ποσότητας γλυκερόλης ήταν ίδια αλλά η συχνότητα και η ποσότητα εκάστοτε ήταν διαφορετική (2x400 ml, 4x200 ml και 10x80 ml) προέκυψαν τα



ακόλουθα: α) Προσθήκη μεγάλης ποσότητας αραιά (2x400 ml) παράγει βιομάζα με υψηλότερη περιεκτικότητα σε βιοέλαιο και ακολούθως η περιεκτικότητα της βιομάζας σε βιοέλαιο μειώνεται σταδιακά καθώς αυξάνεται η συχνότητα προσθήκης της γλυκερίνης (με όλο και μικρότερη εκάστοτε φορά ποσότητας γλυκερίνης). Ενδιάμεση προσθήκη αζώτου στην καλλιέργεια επίσης μειώνει την περιεκτικότητα σε βιοέλαιο και αυξάνει την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Παρόμοια αποτελέσματα ισχύουν και για το μικροφύκος *Chlorella kessleri*. Όσο αφορά την κατανομή λιπαρών οξέων για το μικροφύκος *Chlorella sorokiniana* σε λειτουργία των βιοαντιδραστήρων ως ημιδιαλείποντος έργου, για την ίδια συνολική ποσότητα οργανικού άνθρακα που προστέθηκε σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας, η κατανομή των λιπαρών οξέων βρέθηκε ότι επηρεάζεται από την εκάστοτε ποσότητα άνθρακα που αυτός προστίθεται ενδιάμεσα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Η κατανομή των λιπαρών οξέων επηρεάζεται και από την συχνότητα και από την ποσότητα προσθήκης του άνθρακα. Προσθήκη άνθρακα σε υψηλές δόσεις (2x400 ml και 4x200 ml) οδηγεί στη παραγωγή λιπαρών οξέων σχετικά μικρών-μεσαίων αλυσίδων έως το C18 ενώ, η προσθήκη άνθρακα σε χαμηλότερες δόσεις (10x80) οδηγεί και στην παραγωγή λιπαρών οξέων μεγαλύτερης αλυσίδας, αν και σε μικρές ποσότητες, έως C24.

Η επιρροή της θερμοκρασίας μελετήθηκε και στην κινητική ανάπτυξης του μικροφύκου *Chlorella sorokiniana* καθώς, και στην περιεκτικότητά του σε βιοέλαιο και πρωτεΐνες. Μελετήθηκε η κινητική στις ακόλουθες πέντε θερμοκρασίες: 16,7 °C, 19,6 °C, 24,7 °C, 29,5 °C και 33,2 °C. Έγινε εξαγωγή του βιοελαίου και προσδιορίστηκαν η περιεκτικότητά της βιομάζας επί ξηρού σε βιοέλαιο και πρωτεΐνες και η κατανομή των λιπαρών οξέων. Από τη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι αυξανόμενη της θερμοκρασίας της καλλιέργειας αυξάνεται η περιεκτικότητά της βιομάζας σε πρωτεΐνες και μειώνεται η περιεκτικότητά της σε βιοέλαιο. Από τα πειραματικά αποτελέσματα διαφαίνεται ότι η βέλτιστη θερμοκρασία που αφορά στην κινητική ανάπτυξης είναι περίπου στους 25 °C. Επίσης από τη μελέτη της κινητικής βιαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα (Rate of Carbon Uptake), διαφαίνεται ότι επίσης ο ρυθμός βιαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα είναι μέγιστος περίπου στους 25 °C. Η διαφορά όμως δεν κρίνεται ουσιαστική με τις θερμοκρασίες των 19,6 °C και 29,5 °C όπου ο ρυθμός βιαπορρόφησης του άνθρακα σε σχέση με την θερμοκρασία των 24,7 °C είναι χαμηλότερος κατά 16% και 10% αντίστοιχα. Επίσης, η θερμοκρασία καλλιέργειας επηρεάζει την κατανομή των λιπαρών οξέων (Fatty Acids – FA) σε σχέση με τον κορεσμό τους. Τα κορεσμένα λιπαρά (SFA) μειώνονται κατά περίπου 46% ενώ τα πολυακόρεστα (MUFA) αυξάνονται κατά περίπου 50% καθώς η θερμοκρασία καλλιέργειας αυξάνεται από 16,7 °C σε 33,2 °C. Το μέσο μήκος της αλυσίδας των λιπαρών οξέων επηρεάζεται σε πολύ μικρότερο βαθμό από τη θερμοκρασία καλλιέργειας.



Επίσης, για τα δύο είδη *Chlorella vulgaris* και *Chlorella sorokiniana*, στους ΒΑ των 5 λίτρων, μελετήθηκε η επιρροή της προσθήκης βιολιπάσματος, στην κινητική ανάπτυξης (απορρόφησης του οργανικού άνθρακα της γλυκερόλης). Η ποσότητα βιολιπάσματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν μικρή και κυμάνθηκε από 4% έως 16%. Και στις δύο περιπτώσεις το βιολίπασμα δεν επηρεάζει σημαντικά την κινητική βιοαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα. Ο ρυθμός βιοαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα σημείωσε μικρή αύξηση για ποσότητες βιολιπάσματος πάνω από 8% και συγκεκριμένα ο ρυθμός βιοαπορρόφησης αυξήθηκε έως 18% για το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* και έως 12% για το μικροφύκος *Chlorella sorokiniana*. Από τα προκαταρκτικά αυτά αποτελέσματα διαφαίνεται ότι η χρήση βιολιπάσματος, στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας, μπορεί να αντικαταστήσει ολικά ή μερικά τη χρήση ανόργανων συστατικών.

Για το υπόλοιπο του Έργου η προσπάθεια επικεντρώνεται στο μικροφύκος *Chlorella sorokiniana*, το οποίο είναι το πλέον υποσχόμενο διότι, από τα πειράματα το μικροφύκος *C. sorokiniana* υπερέχει τόσο ως προς την παραγωγικότητα σε βιομάζα όσο και ως προς την παραγωγικότητα σε βιοέλαιο. Στους πιλοτικούς βιοαντιδραστήρες θα μελετηθούν παράμετροι καλλιέργειας όπως ο λόγος των αρχικών συγκεντρώσεων σε άνθρακα και άζωτο, το pH, κ.α. με τη χρήση αποκλειστικά γλυκερόλης και βιολιπάσματος. Από την βιομάζα θα γίνει εξαγωγή του βιοελαίου, μετατροπή του σε βιοντήζελ (Fatty Acid Methyl Esters – FAME), μέτρηση της κατανομής των λιπαρών οξέων και προσδιορισμός βασικών ιδιοτήτων των FAME.