

**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 6:**

Τελική Έκθεση εξάρτησης της κινητικής ανάπτυξης & της  
ποιότητας των μικροφυκών από τις συνθήκες καλλιέργειας  
[ΤΕΙΘ]

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, GRINCO ABEE

Προθεσμία Παράδοσης: Μήνας 51

Ημέρα Παράδοσης: M51-08/10/2022

## Λίστα Περιεχομένων

---

1. Περίληψη.....	10
2. Εισαγωγή.....	14
3. Υλικά και μέθοδοι.....	16
3.1 Εργαστηριακοί Βιοαντιδραστήρες.....	16
3.2 Υλικά.....	16
3.3 Ανάλυση οργανικού άνθρακα.....	16
3.4 Κινητική μείωσης του οργανικού άνθρακα.....	17
4. Αποτελέσματα.....	18
4.1 Αφομοίωση του οργανικού άνθρακα στο βιολίπασμα χωρίς την προσθήκη γλυκερίνης και με προσθήκη γλυκερίνης.....	18
4.2 Επιρροή του pH.....	21
4.2.1 Εισαγωγή.....	21
4.2.2 Προσδιορισμός τα κατανομής των λιπαρών οξέων.....	22
4.2.3 Υπολογισμός των βασικών ιδιοτήτων των μεθυλεστέρων.....	22
4.2.4 Πειραματικά Αποτελέσματα.....	23
4.3 Κατανομή λιπαρών οξέων – Σύγκριση σε δύο διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας.....	29
4.3.1 Εισαγωγή.....	29
4.3.2 Κατανομή λιπαρών οξέων.....	30
4.3.3 Ιδιότητες του βιοντήζελ.....	32
4.4 Επιρροή του βιολιπάσματος.....	33
4.4.1 Εισαγωγή.....	33
4.4.2 Πειραματικά αποτελέσματα.....	34
4.4.3 Κατανομή των λιπαρών οξέων.....	37
4.4.4 Εκτίμηση ιδιοτήτων του βιοντίζελ (FAME).....	40
4.5 Επιρροή της συγκέντρωσης του οργανικού άνθρακα της γλυκερόλης.....	42
4.5.1 Πειραματικά αποτελέσματα.....	43
4.5.2 Κατανομή των λιπαρών οξέων.....	45
4.5.3 Εκτίμηση των ιδιοτήτων των FAME.....	47
4.6 Επιρροή της συγκέντρωσης του αζώτου.....	48
4.6.1 Εισαγωγή.....	48
4.6.2 Πειραματικά αποτελέσματα.....	49
4.6.3 Κατανομή των λιπαρών οξέων.....	51
4.6.4 Εκτίμηση των ιδιοτήτων των FAME.....	54
4.7 Σύγκριση Αυτότροφης και Ετερότροφης καλλιέργειας.....	55
4.7.1 Chlorella sorokiniana.....	55
4.7.2 Chlorella vulgaris.....	56
4.7.3 Chlamydomonas reihardii.....	57
4.7.4 Chlorella kessleri.....	57



4.7.5 Chlorella protothecoides.....	58
4.7.6 Συμπεράσματα: Αυτότροφη – Ετερότροφη καλλιέργεια .....	59
5. Συζήτηση και Συμπεράσματα .....	60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	67

## Λίστα Εικόνων

---

<b>Εικόνα 4.1.1</b> Η συγκέντρωση οργανικού άνθρακα ως συνάρτηση του χρόνου καλλιέργειας για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αραιωμένου βιολιπάσματος, χωρίς την προσθήκη γλυκερίνης. Ο οργανικός άνθρακας προέρχεται αποκλειστικά από το άπεπτο οργανικό υλικό του βιολιπάσματος. Ο λόγος Co/No είναι 2,2 και στις τρεις καμπύλες. Η θερμοκρασία και το pH διατηρήθηκαν στους 30 °C ( $\pm 1$ °C) και 7 ( $\pm 0,3$ ) αντίστοιχα.....	18
<b>Εικόνα 4.1.2</b> Η συγκέντρωση οργανικού άνθρακα ως συνάρτηση του χρόνου καλλιέργειας για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αραιωμένου βιολιπάσματος με την προσθήκη γλυκερίνης και αζώτου ούτως ώστε ο λόγος Co/No να μην μεταβάλλεται και να είναι ίσος με $6.9 \pm 0,1$ και στις τρεις καμπύλες. Η θερμοκρασία και το pH διατηρήθηκαν στους 30 °C ( $\pm 1$ °C) και 7 ( $\pm 0,3$ ) αντίστοιχα.....	20
<b>Εικόνα 4.1.4</b> Ο ρυθμός βιοαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα στις δύο περιπτώσεις του πίνακα 4.1.1 όπου α) ο λόγος Co/No=2,2 είναι σταθερός αλλά, οι συγκεντρώσεις του άνθρακα και του αζώτου μεταβάλλονται και β) ο λόγος Co/No=6,9 είναι σταθερός όπως επίσης σταθερές είναι και οι συγκεντρώσεις του άνθρακα και του αζώτου (πίνακας 4.1.1) .....	21
<b>Εικόνα 4.2.1</b> Η συγκέντρωση οργανικού άνθρακα ως συνάρτηση του χρόνου καλλιέργειας για το μικροφύκος <i>Chlorella sorokiniana</i> σε πέντε διαφορετικά pH σε θρεπτικά μέσα ανάπτυξης που περιέχουν 15% βιολίπασμα.....	24
<b>Εικόνα 4.2.2</b> Σύγκριση του ρυθμού πρόσληψης άνθρακα ως συνάρτηση του pH του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας για το μικροφύκος <i>Chlorella sorokiniana</i> σε θρεπτικά μέσα ανάπτυξης που περιέχουν 15% βιολίπασμα.....	24
<b>Εικόνα 4.2.3</b> Η κατανομή των FA στη βιομάζα του μικροφύκου <i>C. sorokiniana</i> σύμφωνα με το μήκος της αλυσίδας σε σχέση με το pH του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας.....	27
<b>Εικόνα 4.2.4</b> Η κατανομή των FA σύμφωνα με το βαθμό κορεσμό τους, ως κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA), μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) σε σχέση με το pH του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας.....	28
<b>Εικόνα 4.3.1</b> Σύγκριση μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων GLIN και GLAD της κατανομής των κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.....	31
<b>Εικόνα 4.3.2</b> Σύγκριση μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων GLIN και GLAD της κατανομής των λιπαρών οξέων ως προς το μήκος της αλυσίδας, ως λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (C10-C14), μέσης αλυσίδας (C16-C18) και μακράς αλυσίδας (>C18). .....	32
<b>Εικόνα 4.4.1</b> Ο ρυθμός μείωσης του οργανικού άνθρακα συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας, για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις βιολιπάσματος στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, ίσες με 0 % (τυφλό), 15%, 30% και 50%.....	35

- Εικόνα 4.4.2** Ο μέσος ρυθμός πρόσληψης άνθρακα στη φάση εκθετικής ανάπτυξης, συναρτήσει του ποσοστού βιολιπάσματος στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας..... 36
- Εικόνα 4.4.3** Η κατανομή των λιπαρών στη βιομάζα της *Chlorella sorokiniana* σύμφωνα με το μήκος της αλυσίδας έναντι του βιολιπάσματος που προστίθεται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας..... 39
- Εικόνα 4.4.4** Η κατανομή των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το βαθμό κορεσμού τους σε: κορεσμένα (SFA), μονοακόρεστα (MUFA) και πολυακόρεστα (PUFA) λιπαρά οξέα έναντι του ποσοστού βιολιπάσματος που προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας..... 40
- Εικόνα 4.5.1** Η συγκέντρωση οργανικού άνθρακα συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας για τέσσερις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις οργανικού άνθρακα με την προσθήκη βιολιπάσματος. Η αρχική συγκέντρωση του αζώτου είναι 110 mg/L. Επίσης φαίνεται και η αντίστοιχη μεταβολή του οργανικού άνθρακα στο θρεπτικό μέσο χωρίς την προσθήκη βιολιπάσματος. Η θερμοκρασία και το pH διατηρήθηκαν στους 28 °C ( $\pm 1$  °C) και 7 ( $\pm 0,3$ ) αντίστοιχα..... 43
- Εικόνα 4.5.2** Ο ρυθμός βιοαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα συναρτήσει του λόγου Co/No για τέσσερις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις οργανικού άνθρακα με την προσθήκη βιολιπάσματος. Η αρχική συγκέντρωση του αζώτου είναι 110 mg/L. Ο αντίστοιχος ρυθμός βιοαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα χωρίς την προσθήκη βιολιπάσματος (Co/No=65,8, πίνακας 4.5.1) είναι ίσος με 0,48 g/(L-d).... 44
- Εικόνα 4.5.3** Η κατανομή των λιπαρών οξέων στη βιομάζα του μικροφύκου *C. sorokiniana* σύμφωνα με το μήκος της αλυσίδας σε σχέση με το λόγο Co/No, για σταθερή αρχική συγκέντρωση αζώτου ίση με 110 mg/L (πίνακας 4.5.1). Στην πρώτη μεταχείριση (Co/No = 65,8) δεν χρησιμοποιήθηκε βιολίπασμα. .... 47
- Εικόνα 4.5.4** Η κατανομή των λιπαρών οξέων στη βιομάζα του μικροφύκου *C. sorokiniana* σύμφωνα με το βαθμό κορεσμού τους σε σχέση με το λόγο Co/No, για σταθερή αρχική συγκέντρωση αζώτου ίση με 110 mg/L (πίνακας 4.5.1). Στην πρώτη μεταχείριση (Co/No = 65,8) δεν χρησιμοποιήθηκε βιολίπασμα. .... 47
- Εικόνα 4.6.1** Η μείωση του άνθρακα συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας για τέσσερις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις αζώτου όπως απεικονίζονται στο διάγραμμα με αντίστοιχους αρχικούς λόγους Co/No = 130,2, 46,3, 17,7 και 7 ενώ, οι αρχικές συγκεντρώσεις άνθρακα διατηρήθηκαν σταθερές στα  $14 \pm 0,1$  g/L. Χρησιμοποιήθηκε 12% βιολίπασμα και η θερμοκρασία και το pH διατηρήθηκαν στους 28 °C ( $\pm 1$  °C) και 7 ( $\pm 0,3$ ) αντίστοιχα..... 50
- Εικόνα 4.6.2** Ο ρυθμός βιοαπορρόφησης του οργανικού άνθρακα συναρτήσει της αρχικής συγκέντρωσης του αζώτου με την προσθήκη 12% βιολιπάσματος (πίνακας 4.6.1). .... 50
- Εικόνα 4.6.3** Η κατανομή των λιπαρών οξέων στη βιομάζα του μικροφύκου *C. sorokiniana* σύμφωνα με το μήκος της αλυσίδας σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση του αζώτου για σταθερή αρχική συγκέντρωση άνθρακα ίση με  $14 \pm 0,1$  g/L (πίνακας 4.6.1). .... 53



**Εικόνα 4.6.4** Η κατανομή των λιπαρών οξέων στη βιομάζα του μικροφύκου *C. sorokiniana* σύμφωνα με το βαθμό κορεσμού τους σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση του αζώτου για σταθερή αρχική συγκέντρωση άνθρακα ίση με  $14 \pm 0,1$  g/L (πίνακας 4.6.1) ..... 54

## Λίστα Πινάκων

---

<b>Πίνακας 4.1.1</b> Οι βασικές παράμετροι των πειραμάτων που αναφέρονται στα σχήματα 4.1.1 και 4.1.2 όπου, χρησιμοποιήθηκε αραιωμένο βιολίπασμα είτε χωρίς την προσθήκη γλυκερίνης και αζώτου (Εικόνα 4.1.1) ή με την προσθήκη ποσότητας γλυκερίνης και αμμωνιακού αζώτου (Εικόνα 4.1.2).....	19
<b>Πίνακας 4.2.1</b> Οι βασικές παράμετροι των πέντε βιοαντιδραστήρων .....	22
<b>Πίνακας 4.2.2</b> Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λίπη της βιομάζας του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> και η παραγωγικότητα σε βιομάζα ( $P_b$ ), λίπη ( $P_l$ ) και πρωτεΐνη ( $P_p$ ) σε mg/(L-d) του μικροφύκου <i>C. sorokiniana</i> που καλλιέργηθηκε με 15 % βιολίπασμα σε pH = 4,5, 6, 7,5, 9 και 10,5 . .....	25
<b>Πίνακας 4.2.3</b> Η κατανομή λιπαρών οξέων (FA) του βιοελαίου του μικροφύκου <i>C. sorokiniana</i> που καλλιεργήθηκε σε πέντε διαφορετικά pH.....	26
<b>Πίνακας 4.2.4</b> Υπολογισθείσες ιδιότητες FAME του βιοντίζελ που ελήφθη από την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>C. sorokiniana</i> με 15% AD και γλυκερόλη σε pH ίσο με 4,5, 6, 7,5, 9 και 10,5.....	28
<b>Πίνακας 4.3.1</b> Η κατανομή των μεθυλεστέρων των αντίστοιχων FA του μικροφύκου <i>C. sorokiniana</i> που καλλιεργήθηκε με γλυκερίνη και ανόργανα μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά (μεταχείριση GLIN).....	30
<b>Πίνακας 4.3.2</b> Η κατανομή των μεθυλεστέρων των αντίστοιχων FA του μικροφύκου <i>C. sorokiniana</i> που καλλιεργήθηκε με γλυκερίνη και 40% αναερόβιο χωνεμένο υπόλειμμα (μεταχείριση GLAD). .....	30
<b>Πίνακας 4.3.3</b> Οι ιδιότητες των FAME από το βιοέλαιο που προκύπτουν από την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> , με τις δύο μεταχειρίσεις GLIN και GLAD.....	32
<b>Πίνακας 4.4.1</b> Οι βασικές παράμετροι των τεσσάρων πειραμάτων.....	34
<b>Πίνακας 4.4.2</b> Η περιεκτικότητα της βιομάζας σε πρωτεΐνες και λίπη και η παραγωγικότητα σε βιομάζα, και βιοέλαιο.....	36
<b>Πίνακας 4.4.3</b> Η κατανομή λιπαρών οξέων των μεθυλεστέρων (FAME) για το βιοέλαιο που εξήχθη από τη βιομάζα του μικροφύκου <i>Chlorella sorokiniana</i> χρησιμοποιώντας 0%, 15%, 30% και 50% βιολίπασμα (AD) στα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας.....	37
<b>Πίνακας 4.4.4</b> Οι ιδιότητες FAME του βιοντίζελ που ελήφθη από την καλλιέργεια της <i>Chlorella sorokiniana</i> με 0 %, 15 %, 30 % και 50 % AD. ....	42
<b>Πίνακας 4.5.1</b> Οι μεταβλητές των θρεπτικών μέσων των βιοαντιδραστήρων όπου μελετήθηκε η επιρροή της αρχικής συγκέντρωσης του οργανικού άνθρακα. ....	42
<b>Πίνακας 4.5.2</b> Η περιεκτικότητα της βιομάζας σε πρωτεΐνες και βιοέλαιο (λίπη) και η παραγωγικότητα σε βιομάζα, πρωτεΐνες και βιοέλαιο (λίπη). ....	45
<b>Πίνακας 4.5.3</b> Η κατανομή των λιπαρών οξέων για τις πέντε μεταχειρίσεις του πίνακα 4.5.1. Και στις πέντε μεταχειρίσεις η συγκέντρωση του αζώτου (αμμωνιακού αζώτου) είναι ίση με 110 g/L.....	45



**Πίνακας 4.5.4** Οι ιδιότητες FAME του βιοελαίου που ελήφθη από την καλλιέργεια της *Chlorella sorokiniana* σε σχέση με το λόγο Co/No, για σταθερή αρχική συγκέντρωση αζώτου ίση με 110 mg/L (πίνακας 4.5.1)..... 48

**Πίνακας 4.6.1** Οι μεταβλητές των θρεπτικών μέσων των βιοαντιδραστήρων όπου μελετήθηκε η επιρροή της αρχικής συγκέντρωσης του αζώτου διατηρώντας σταθερή την αρχική συγκέντρωση του οργανικού άνθρακα. Χρησιμοποιήθηκε 12% βιολίπασμα, ενώ για την αρχική συγκέντρωση του αζώτου στον 2ο, 3ο και 4ο βιοαντιδραστήρα προστέθηκε και ποσότητα αμμωνιακού αζώτου..... 49

**Πίνακας 4.6.2** Η περιεκτικότητα της βιομάζας σε πρωτεΐνες και λίπη και η παραγωγικότητα σε βιομάζα, πρωτεΐνες και βιοέλαιο (λίπη). ..... 51

**Πίνακας 4.6.3** Η κατανομή των λιπαρών οξέων για τις τέσσερις μεταχειρίσεις του πίνακα 4.6.1. Και στις τέσσερις μεταχειρίσεις η συγκέντρωση του άνθρακα είναι ίση με  $14 \pm 0,1$  g/L. Χρησιμοποιήθηκε 12% βιολίπασμα (v/v του θρεπτικού μέσου) και η θερμοκρασία και το pH διατηρήθηκαν στους 28 °C ( $\pm 1$  °C) και 7 ( $\pm 0,3$ ) αντίστοιχα. .... 52

**Πίνακας 4.6.4** Οι ιδιότητες FAME του βιοελαίου που ελήφθη από την καλλιέργεια της *Chlorella sorokiniana* σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση του αζώτου για σταθερή αρχική συγκέντρωση άνθρακα ίση με  $14 \pm 0, 1$  gr/l (πίνακας 4.6.1)..... 54

## 1. Περίληψη

---

Στην ενδιάμεση έκθεση (Π5) αναφέρθηκαν τα αποτελέσματα από τις πειραματικές μελέτες που αφορούν καλλιέργειες πέντε μικροφυκών, ήτοι των μικροφυκών α) *Chlorella vulgaris*, β) *Chlorella sorokiniana*, γ) *Chlorella protothecoides*, δ) *Chlorella kessleri* και ε) *Chlamydomonas reinhardtii*, με τη χρήση γλυκερίνης ως πηγή οργανικού άνθρακα και ανόργανων αλάτων ως πηγή μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών. Οι μελέτες έγιναν σε βιοαντιδραστήρες των πέντε λίτρων. Μελετήθηκε τόσο η κινητική ανάπτυξης (growth rate) όσο και η παραγωγή βιομάζας καθώς και η περιεκτικότητά της σε πρωτεΐνες και λίπη. Το μικροφύκος *Chlorella sorokiniana* αποτελεί το πλέον υποσχόμενο είδος διότι σε ετερότροφη καλλιέργεια έχει πολύ καλή κινητική και παραγωγή βιομάζας. Το είδος *Chlorella kessleri* επίσης είχε καλή κινητική και παραγωγή βιομάζας. Και τα δύο ακολούθως καλλιεργήθηκαν στους πιλοτικούς βιοαντιδραστήρες και συγκρίθηκε τόσο η παραγωγή βιομάζας όσο και η περιεκτικότητά τους σε βιοέλαιο αλλά και η ποιότητα του ίδιου του βιοελαίου. Το τελευταίο έλαβε χώρα με τον προσδιορισμό της κατανομής των λιπαρών τους οξέων. Το μικροφύκος *Chlorella sorokiniana* υπερέχει έναντι του μικροφύκου *Chlorella kessleri* και όσο αφορά την παραγωγή βιομάζας και την περιεκτικότητά της σε βιοέλαιο όσο και ως προς την ποιότητα του βιοελαίου. Το μικροφύκος *Chlorella kessleri* περιέχει ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων και αυτό, όπως εξηγείται στις δημοσιεύσεις (Π18) και στο παραδοτέο Π16, επηρεάζει αρνητικά τη συμπεριφορά του παραγόμενου βιοντήζελ. Μελετήθηκε επίσης, εκτός της επιρροής του οργανικού άνθρακα, και η επιρροή του αζώτου και του pH για το μικροφύκος *Chlorella vulgaris*. Επίσης στην ενδιάμεση έκθεση, στους πιλοτικούς βιοαντιδραστήρες, μελετήθηκε η επιρροή της θερμοκρασίας στην κινητική ανάπτυξης, στην περιεκτικότητα της παραγόμενης βιομάζας σε βιοέλαιο και στην κατανομή των λιπαρών οξέων σε αυτό. Ακόμη, έλαβε χώρα μελέτη της επιρροής του βιολιπάσματος στην καλλιέργεια των μικροφυκών *Chlorella vulgaris* και *Chlorella sorokiniana*. 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.

Στο 2<sup>ο</sup> μέρος της πειραματικής μελέτης, στο παρόν παραδοτέο, οι μελέτες επικεντρώθηκαν στην καλλιέργεια του μικροφύκου *Chlorella sorokiniana* στους πιλοτικούς βιοαντιδραστήρες με τη χρήση γλυκερίνης και βιολιπάσματος. Μελετήθηκε τόσο η κινητική ανάπτυξης όσο και η περιεκτικότητα της βιομάζας σε βιοέλαιο και πρωτεΐνες και η κατανομή των λιπαρών οξέων του βιοελαίου. Σε πρώτη φάση μελετήθηκε η βιοαπορρόφηση και η χρησιμοποίηση του άνθρακα που περιέχεται στο βιολίπασμα. Κατόπιν μελετήθηκαν η επιρροή της ποσότητας του βιολιπάσματος, η επιρροή του pH, η επιρροή του οργανικού άνθρακα και η επιρροή του αζώτου. Από τις μελέτες προκύπτει ότι περίπου 70% του οργανικού άνθρακα που περιέχεται στο βιολίπασμα είναι αφομοιώσιμο και αξιοποιείται από το μικροφύκος *Chlorella*

sorokiniana για την παραγωγή βιομάζας. Από τα πειράματα επιρροής του βιολιπάσματος (0%, 15%, 30% και 50%, v/v) διαφαίνεται ότι η ποσότητα του βιολιπάσματος επηρεάζει τόσο τον ρυθμό πρόσληψης άνθρακα από τα κύτταρα *Chlorella sorokiniana* καθώς και την περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες και λιπίδια. Ο μέγιστος ρυθμός πρόσληψης άνθρακα εμφανίζεται με περίπου 30% (v/v) προσθήκη βιολιπάσματος στο θρεπτικό μέσο. Αυξάνοντας το ποσοστό του βιολιπάσματος από 0 % σε 50 % η περιεκτικότητα σε βιοέλαιο μειώθηκε σταδιακά έως και 5% και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες αυξήθηκε κατά 6,1%. Η παραγωγή βιομάζας ήταν 3,4 g/L, 3,7 g/L, 3,9 g/L και 3,5 g/L για περιεκτικότητα του θρεπτικού μέσου σε βιολίπασμα 0%, 15%, 30% και 50% αντίστοιχα. Επίσης, οι διαφορετικές μεταχειρίσεις προσθήκης βιολιπάσματος στο μέσο ανάπτυξης επηρεάζουν την κατανομή των λιπαρών οξέων (FA) στο εξαγόμενο βιοέλαιο και τις ιδιότητες των μεθυλεστέρων αυτών (FAME). Η κατανομή των FA κυμαίνεται από C10 έως C26. Αυξάνοντας το ποσοστό του βιολιπάσματος από 0 % σε 50 % αυξάνεται το ποσοστό λιπαρών οξέων με C<16 από 7,6 σε 26,4 % και το ποσοστό με C>18 από 3,8 σε 19,7 %. Αντίθετα, το ποσοστό με C16-C18 μειώθηκε από 88,6% σε 53,9%. Επιπλέον, η αύξηση του ποσοστού του βιολιπάσματος από 0% σε 50% αύξησε το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA) κατά 33% και μείωσε το ποσοστό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) κατά 57%. Σε όλα τα ποσοστά βιολιπάσματος το ποσοστό των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFA) δεν διέφερε σημαντικά και κυμαινόταν από 48% έως 56%.

Στα πειράματα επιρροής του pH έγιναν πέντε καλλιέργειες, σε pH 4,5, 6, 7,5, 9 και 10,5. Από τα πειράματα προκύπτει ότι η παραγωγικότητα της βιομάζας επηρεάζεται σημαντικά από το pH και αυξάνεται καθώς αυτό μειώνεται. Η παραγωγή βιομάζας κυμαίνεται από 2,4 g/L σε pH 4,5 έως 1,1 g/L σε pH 10,5 ενώ η περιεκτικότητα σε λίπη κυμαίνεται από 20,2% σε pH 4,5 έως 29,3% σε pH 7,5. Το βιοέλαιο που λαμβάνεται και στις πέντε διαφορετικές τιμές του pH, χαρακτηρίζεται από ευρεία κατανομή λιπαρών οξέων (FA) που κυμαίνεται από C10:0 έως C26:1. Τα κυρίαρχα FA είναι αυτά των λιπαρών οξέων μέσης αλυσίδας (C16-C18) που κυμαίνονται από ένα χαμηλό ποσοστό 41,5% σε pH 9 έως ένα υψηλό ποσοστό 86,2% σε pH 4,5. Σε pH 9 εμφανίζονται οι υψηλότερες τιμές των FA βραχείας (C10-C14) και μακράς αλυσίδας (>C18) δηλαδή, 36,0% και 22,6% αντίστοιχα. Ο βαθμός κορεσμού επηρεάζεται επίσης από το pH της καλλιέργειας. Τα μονοκορεσμένα FA (MUFA) κυριαρχούν σε όλες τις καλλιέργειες pH και κυμαίνονται από ένα ποσοστό 45,1% σε pH 6 έως 56,3% σε pH 4,5. Τα αντίστοιχα εύρη για τα κορεσμένα FA (SFA) είναι 24,7% σε pH 4,5 και 40,1% σε pH 9 και για τα πολυακόρεστα FA (PUFA) είναι 13,2% σε pH 9 και 26,2% σε pH 6.

Σε ένα ξεχωριστό πείραμα έλαβε χώρα η μελέτη της επιρροής του οργανικού άνθρακα από τη γλυκερόλη. Τα μακροθρεπτικά και τα μικροθρεπτικά συστατικά στα θρεπτικά μέσα προήλθαν εξ' ολοκλήρου από το βιολίπασμα. Έτσι η ποσότητα του βιολιπάσματος στα τέσσερα θρεπτικά μέσα ήταν η ίδια σε ποσοστό 11% του

όγκου του θρεπτικού μέσου. Η αρχική συγκέντρωση του αζώτου ήταν 110 mg/L και στα τέσσερα θρεπτικά μέσα. Για να μελετηθεί η επιρροή του άνθρακα η αρχική του συγκέντρωση μεταβλήθηκε και κάλυψε ένα ευρύ φάσμα αρχικών συγκεντρώσεων ίσο με 1,98 g/L, 3,79 g/L, 7,29 g/L και 17,50 g/L με αντίστοιχους λόγους αρχικών συγκεντρώσεων Co/No ίσους με 18,0, 34,5, 66,3 και 159,1. Σε επιπλέον 5<sup>ο</sup> παράλληλο πείραμα χρησιμοποιήθηκε αρχική συγκέντρωση άνθρακα ίση με 7,24 g/L με λόγο Co/No 65,8 αλλά χωρίς τη χρήση βιολιπάσματος, με την ίδια συγκέντρωση μακροθρεπτικών συστατικών από ανόργανα άλατα, για να συγκριθεί με το τρίτο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε βιολίπασμα και ιδίων συγκεντρώσεων άνθρακα και μακροθρεπτικών συστατικών. Αυξανόμενη της συγκέντρωσης του οργανικού άνθρακα και του λόγου Co/No η περιεκτικότητα σε λίπη αυξάνεται ενώ, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες μειώνεται. Η κινητική της καλλιέργειας επηρεάζεται από την αρχική συγκέντρωση άνθρακα. Καθώς αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση του άνθρακα αυξάνεται και ο ρυθμός απορρόφησης του οργανικού άνθρακα από 0,37 g/(L-d) για Co/No 18 (Co=1,98 g/L) σε 0,73 g/(L-d) για Co/No 159,1 (Co=17,50 g/l). Η κινητική με την προσθήκη βιολιπάσματος είναι κατά περίπου 12,5% γρηγορότερη συγκρινόμενη με την κινητική χωρίς την προσθήκη βιολιπάσματος καθώς με την προσθήκη βιολιπάσματος ο ρυθμός απορρόφησης του οργανικού άνθρακα είναι 0,54 g/(L-d) ενώ ο αντίστοιχος, χωρίς την προσθήκη βιολιπάσματος, είναι 0,48 g/(L-d). Το ίδιο ισχύει και για την παραγωγή βιομάζας. Η παραγωγή βιομάζας χωρίς την προσθήκη και με την προσθήκη βιολιπάσματος (Co/No 65,8 και Co/No 66,3) είναι 2,2 g/L και 2,4 g/L αντίστοιχα, υψηλότερος κατά περίπου 9% με την προσθήκη βιολιπάσματος. Επίσης αυξανόμενη της συγκέντρωσης του οργανικού άνθρακα η παραγωγή βιομάζας αυξάνεται και είναι ίση με 0,95 g/L, 1,7 g/L, 2,4 g/L και 3,5 g/L για Co/No : 18,0, 34,5, 66,3 και 159,1 αντίστοιχα. Η συγκέντρωση του οργανικού άνθρακα επίσης επηρεάζει και την κατανομή των λιπαρών οξέων τόσο όσο αφορά το βαθμό κορεσμού όσο επίσης και το μήκος της αλυσίδας. Κυριαρχούν τα λιπαρά οξέα με μεσαίο μήκος αλυσίδας (C16-C18) και τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA).

Μελετήθηκε κατόπιν η επιρροή του αζώτου με την προσθήκη βιολιπάσματος διατηρώντας την αρχική συγκέντρωση του οργανικού άνθρακα σταθερή. Στις τέσσερις αυτές καλλιέργειες οι συγκεντρώσεις οργανικού άνθρακα, αζώτου και ο αρχικός λόγος Co(mg/L)/No(mg/L) ήταν: α) Co/No=14090/108,2=130,2, β) Co/No=13890/300= 46,3, γ) Co/No=13990/800= 17,7 και δ) Co/No=1395/2000 = 7,0. Στα θρεπτικά μέσα χρησιμοποιήθηκε βιολίπασμα σε ποσοστό 12% που αντιστοιχεί σε 108,2 g/L στοιχειακό άζωτο, ενώ το άζωτο στις υπόλοιπες τρεις καλλιέργειες αυξήθηκε με την προσθήκη ποσότητας αμμωνιακού αζώτου. Αυξανόμενη της συγκέντρωσης του αζώτου η περιεκτικότητα σε λίπη μειώνεται ενώ, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες αυξάνεται. Η κινητική της καλλιέργειας επηρεάζεται από την αρχική συγκέντρωση αζώτου. Το άζωτο για συγκεντρώσεις πάνω από 300 g/L μειώνει το ρυθμό απορρόφησης του οργανικού άνθρακα με

αποτέλεσμα να αυξάνεται σημαντικά ο απαιτούμενος χρόνος καλλιέργειας. Έτσι ο ρυθμός απορρόφησης του οργανικού άνθρακα είναι 0,55 g/(L-d), 0,39 g/(L-d), 0,24 g/(L-d) και 0,18 g/(L-d) για αρχικές συγκεντρώσεις αζώτου ίσες με 108,2 mg/L, 300 mg/L, 800 mg/L, και 2000 mg/L αντίστοιχα. Η παραγωγή βιομάζας αυξάνεται δραματικά καθώς αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση του αζώτου και είναι ίση με 2,9 g/L, 4,1 g/L, 6,5 g/L και 7,6 g/L για αρχικές συγκεντρώσεις αζώτου ίσες με 108,2 mg/L, 300 mg/L, 800 mg/L, και 2000 mg/L αντίστοιχα. Το μήκος της αλυσίδας κυμαίνεται από C10:0 έως C26:1 και τα λιπαρά οξέα που βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό είναι τα C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 και το C18:2. Η αρχική συγκέντρωση του αζώτου επηρεάζει σημαντικά την κατανομή ως προς το μήκος της αλυσίδας. Ενώ έως μία αρχική συγκέντρωση αζώτου ίση με 300 mg/L λαμβάνονται λιπαρά οξέα έως C26:1, στις μεταχειρίσεις με υψηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις αζώτου ίσες με 800 mg/L και 2000 mg/L λαμβάνονται λιπαρά οξέα μόνο έως C20:1. Η αρχική συγκέντρωση του αζώτου επηρεάζει την κατανομή ως προς το μήκος της αλυσίδας. Τα λιπαρά οξέα μέσου μήκους αλυσίδας (C16-C18), υπερεισχύουν ως ποσοστό των συνολικών λιπαρών οξέων και κυμαίνονται από 59,5% έως 81,3%. Η μέγιστη συγκέντρωσή τους σημειώνεται για μία αρχική συγκέντρωση αζώτου ίση με 300 mg/L, συγκέντρωση στην οποία σημειώνεται το ελάχιστο ποσοστό των λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (C10-C14). Όσο αφορά το βαθμό κορεσμού, τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) υπερεισχύουν ως ποσοστό των συνολικών λιπαρών οξέων και κυμαίνονται από 55,9% έως 59,4%, χωρίς το ποσοστό τους να μεταβάλλεται σημαντικά στις τέσσερις μεταχειρίσεις. Αντιθέτως η αρχική συγκέντρωση του αζώτου επηρεάζει το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA) που κυμαίνονται από 24,5% έως 31,1% και σε μικρότερο βαθμό το ποσοστό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) που κυμαίνονται από 12,8% έως 18,0%.

Τα κυριότερα συμπεράσματα της μελέτης, που συμπεριλαμβάνουν και αυτά της ενδιάμεσης έκθεσης, συνοψίζονται στο τέλος αυτής της έκθεσης. Όσο αφορά τη χρήση της γλυκερίνης και του βιολιπάσματος διαφαίνεται ότι και τα δύο είναι άριστες πρώτες ύλες για την παρασκευή των απαραίτητων θρεπτικών μέσων. Όμως η τιμή της γλυκερίνης έχει σημειώσει δραματική αύξηση τα τελευταία 3 έτη. Αντιθέτως, το βιολίπασμα είναι ευρέως διαθέσιμο, χωρίς κόστος και διαφαίνεται ότι η χρήση του, στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας, μπορεί να αντικαταστήσει ολικά τη χρήση ανόργανων συστατικών.