



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας



Μελέτη του ρόλου της πηγής του άνθρακα στην ανάπτυξη του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* και την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας

ΓΚΟΥΒΟΥΣΗ ΜΕΡΟΠΗ

Επιβλέπων καθηγητής: **Φραγκίσκος Κολίσης**

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2015



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

**ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ**

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας



Μελέτη του ρόλου της πηγής του άνθρακα στην ανάπτυξη του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* και την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας

ΓΚΟΥΒΟΥΣΗ ΜΕΡΟΠΗ

Επιβλέπων καθηγητής: **Φραγκίσκος Κολίσης**

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2015

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Ε.Μ.ΤΤ. κ. Φραγκίσκο Κολίση, την υποψήφια διδάκτωρ Μαρία Σαββίδου, καθώς και όλο το ανθρώπινο δυναμικό του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας για την πολύτιμη βοήθειά τους στη διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Γκουβούση Μερόπη

ΠΕΡΙΕΣ ΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	3
I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ	8
2.1 Γενικά	13
2.2 Γενιές Βιοκαυσίμων	10
2.3 Βιοντίζελ	14
2.3.1 Παραγωγή Βιοντίζελ	18
2.3.2 Πλεονεκτήματα	22
2.3.3 Μειονεκτήματα	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΦΥΚΗ	23
3.1 Γενικά	23
3.2 Χρήσεις Φυκών	24
3.3 Ταξινόμηση Φυκών	25
3.3.1 Σύγκριση Μακροφυκών και Μικροφυκών	25
3.4 Μικροφύκη	26
3.4.1 Παραγωγή βιοντίζελ από μικροφύκη - Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί	28
3.4.2 Καλλιέργεια Μικροφυκών	31

3.4.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών	32
3.4.3 Συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών	33
3.4.3.1 Ανοιχτά Συστήματα	36
3.4.3.2 Κλειστοί βιοαντιδραστήρες	39
3.4.4 Περιεκτικότητα μικροφυκών σε λιπίδια	41
3.4.5 Επίδραση CO ₂ στην ανάπτυξη των μικροφυκών (στερεό και αέριο)	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – NANNOCHLOROPSIS	46
4.1 Γενικά	46
4.2 Κατηγοριοποίηση μικροφύκους	46
4.3 Nannochloropsis-Γονιδίωμα	47
4.4 Βιοενεργά Συστατικά	48
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	49
5.1 Μέθοδοι-Υλικά	50
5.1.1 Όργανα	50
5.1.2 Χημικά Αντιδραστήρια	50
5.1.3 Μικροοργανισμός	51
5.1.4 Διατήρηση-Καλλιέργεια Μικροφύκους	51
5.1.5 Μέσο Ανάπτυξης	52
5.1.6 Εμβολιασμός	54
5.1.7 Προσδιορισμός κυτταρικής ανάπτυξης <i>Nannochloropsis sp.</i>	56
5.1.8 Προσδιορισμός βιομάζας	56
5.1.9 Προσδιορισμός περιεχομένης χλωροφύλλης	57
5.1.10 Προσδιορισμός πρωτεϊνών	57

5.1.11 Προσδιορισμός λιπαρών		59
5.1.12 Προσδιορισμός Γλυκ εμπορικού σκευάσματος	ιδικού	61
III. ΑΠ		63
1. Εισαγωγή – Σκοπός		64
2. Προσδιορισμός βιομάζας του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3		64
3. Προσδιορισμός της περιεχομένης χλωροφύλλης του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3		69
4. Προσδιορισμός λιπαρών του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3		76
5. Προσδιορισμός πρωτεϊνών του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3		86
6. Προσδιορισμός αμύλου και γλυκόζης του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3		87
7. Συμπεράσματα-Συζήτηση		89
IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		93
V. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ, ΣΧΗΜΑΤΩΝ, ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ		100

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εξάντληση των αποθεμάτων του ορυκτού πετρελαίου, σε συνδυασμό με τους κινδύνους που εγκυμονούν οι κλιματικές αλλαγές, καθιστούν επιτακτική ανάγκη την εύρεση νέων εναλλακτικών καυσίμων. Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στα μικροφύκη, ως πρώτες ύλες παραγωγής βιοκαυσίμων, κυρίως λόγω του παρουσιάζουν μεγάλη φωτοσυνθετική ικανότητα, υψηλή παραγωγή βιομάζας, αλλά και γρηγορότερους ρυθμούς ανάπτυξης σε σύγκριση με άλλες πηγές που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε ο ρόλος της πηγής άνθρακα (NaHCO_3) στην ανάπτυξη του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* και την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις της πηγής άνθρακα για 0,5 g/L, 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L και 5 g/L NaHCO_3 , οι οποίες αναπτύχθηκαν σε φωτοβιοαντιδραστήρα με ήπια ανάδευση στα 130 rpm, ο φωτισμός ήταν συνεχής, ρυθμισμένος στα 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ και η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή στους 20°C. Ο κύκλος ανάπτυξης της κάθε καλλιέργειας διήρκησε 15 ημέρες.

Αρχικά μελετήθηκε η κυτταρική ανάπτυξη του μικροοργανισμού και διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα μέχρι μια τιμή είχε ως αποτέλεσμα τη μεγιστοποίηση της παραγωγής βιομάζας, ενώ για υψηλότερες συγκεντρώσεις NaHCO_3 σημειώθηκε μείωση αυτής. Τη μέγιστη τιμή βιομάζας σε σχέση με τις υπόλοιπες καλλιέργειες τη 15^η ημέρα, παρουσίασε η καλλιέργεια με συγκέντρωση 2 g/L NaHCO_3 και η τιμή αυτής ήταν περίπου 721 mgDCW/L, σημειώνοντας έτσι αύξηση στη συσσώρευση βιομάζας σε ποσοστό που ανέρχεται στο 89,5% συγκριτικά με την καλλιέργεια με τη μικρότερη συγκέντρωση NaHCO_3 (0,5 g/L).

Επιπλέον, μελετήθηκε η συγκέντρωση χλωροφύλλης και παρατηρήθηκε ότι παρουσιάζεται μέγιστο την 9^η ημέρα καλλιέργειας για όλες τις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Τη μέγιστη συγκέντρωση χλωροφύλλης εκείνη την ημέρα (8,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) είχε η καλλιέργεια με συγκέντρωση 2 g/L NaHCO_3 .

Ακόμα, έγινε προσδιορισμός των λιπιδίων και παρατηρήθηκε πως ο εμπλουτισμός του θρεπτικού μέσου με αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα επέφερε και τις μεγαλύτερες ποσότητες λιπιδίων. Πιο συγκεκριμένα, η καλλιέργεια με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση NaHCO_3 (5 g/L) στο θρεπτικό μέσο συγκέντρωσε τη 15^η ημέρα ένα ποσοστό λιπιδίων της τάξης του 44,81% επί της ξηρής βιομάζας.

Τέλος, μελετήθηκε η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, αλλά και ο προσδιορισμός της γλυκόζης και του αμύλου. Η αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του περιεχομένου τόσο του αμύλου όσο και της γλυκόζης, με τη μέγιστη τιμή τόσο της συγκέντρωσης αμύλου στα θραύσματα των κυτταρικών τοιχωμάτων [5,27% (επί ξηρού βάρους)], όσο και της γλυκόζης [0,58% (επί ξηρού βάρους)], να παρατηρούνται τη 15^η ημέρα της καλλιέργειας με συγκέντρωση 0,5 g/L NaHCO_3 . Το περιεχόμενο των πρωτεϊνών είχε αυξητική τάση με την αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα, μέχρι μία τιμή, φθάνοντας το ποσοστό του 20,64% (επί ξηρού βάρους) τη 15^η ημέρα στην καλλιέργεια με συγκέντρωση 2 g/L NaHCO_3 .

ABSTRACT

The depletion of the mineral oil, combined with the risks posed by the climate changes, make a pressing need to find new alternative fuels. In recent years the research interest has been focused on microalgae, as raw materials for producing biofuels mainly because they exhibit higher photosynthetic capacity, higher biomass production and faster growth rates compared with other sources used to produce biofuels.

In this thesis, the role of the carbon source (NaHCO_3) studied in the development of microalgae *Nannochloropsis sp.* and the production of high added value products.

Cultures with different concentrations of carbon source to 0,5 g/L, 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L and 5 g/L NaHCO_3 . Cultures grown in photobioreactors with gentle stirring at 130 rpm, the lighting was continuous, set at $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ and the temperature remained constant at 20°C . The growth development cycle of each culture lasted 15 days.

Initially, we studied the cell growth of the microorganism and it was found that increasing the concentration of the carbon source to a value resulted maximizing biomass production, while higher concentrations of NaHCO_3 decrease that. The culture at a concentration of 2 g/L NaHCO_3 had the maximum biomass value compared with other cultures at 15th day, and the value of this was about 721 mgDCW/L, recording thereby increase in the accumulation of biomass up to 89,5%.

Additionally, we studied the concentration of chlorophyll and was observed that this has a maximum on the 9th day of culture for all the different culture conditions. The culture at a concentration of 2 g/L NaHCO_3 had the maximum concentration of chlorophyll that day (8,4 g/mL).

Furthermore, the determination of lipids was studied and was observed that the enrichment of the medium by increasing the concentration of the carbon source resulted and larger of lipids. Specifically, the culture with the highest concentration of NaHCO_3 (5 g/L) in the culture medium resulted at 15th day, a proportion of lipids of about 44,81% of the dry biomass.

Finally, the content of protein was studied and the determination of the glucose and starch. Increasing the concentration of the carbon source in the culture medium had the effect of reducing the content of both the starch and glucose, with the maximum value of both the starch concentration in the cell wall fragments [5,27% (dry weight)] and that of

glucose [0,58% (dry weight)]are observed on the 15th day of the culture with the concentration of 0,5 g/L NaHCO₃.The content of protein had been of an increasing trend with the increase in the carbon concentration, to a value, reaching a percentage of 12,4% (dry weight) at the end of the culture.

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ

Το κλίμα της Γης μεταβάλλεται συνεχώς και αυτό έχει άμεση επίδραση στις καιρικές συνθήκες, τους ωκεανούς, το χιόνι, τον πάγο, τα οικοσυστήματα και την κοινωνία. Έτσι, οι θερμοκρασίες αυξάνονται, οι ρυθμοί χιονόπτωσης και βροχόπτωσης αλλάζουν και πιο ακραία καιρικά φαινόμενα, όπως κατακλυσμιαίες βροχοπτώσεις και υψηλές θερμοκρασίες ρεκόρ, ήδη λαμβάνουν χώρα.

Φυσικές διεργασίες, όπως οι αλλαγές στην ενέργεια του ήλιου, μετατοπίσεις ωκεάνιων ρευμάτων, και άλλα, επηρεάζουν το κλίμα της Γης, ωστόσο δεν εξηγούν την αύξηση της θερμοκρασίας που έχουμε παρατηρήσει τον τελευταίο μισό αιώνα. Οι επιστήμονες είναι ιδιαίτερα πεπεισμένοι ότι πολλές από αυτές τις παρατηρούμενες αλλαγές μπορούν να συνδεθούν με απελευθέρωση δεσκατομμυρίων τόνων διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και άλλων αερίων, όπως υδρατμών, μεθανίου, οξειδίων του αζώτου, χλωροφθορανθράκων (CFC) και του όζοντος στην τροπόσφαιρα, που παγιδεύουν τη θερμότητα και είναι γνωστά ως αέρια του θερμοκηπίου, στην ατμόσφαιρα κάθε χρόνο.



Εικόνα 1: Εκπομπή αερίων CO_2 από καμινάδα

Τα αέρια του θερμοκηπίου προέρχονται από διάφορες ανθρώπινες δραστηριότητες, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνεται, η αποψίλωση των δασών, η λίπανση των καλλιεργειών, η αποθήκευση των αποβλήτων σε χώρους υγειονομικής ταφής, η κτηνοτροφία και η παραγωγή ορισμένων ειδών των βιομηχανικών προϊόντων.

Η αυξανόμενη συγκέντρωση αυτών των αερίων σχετίζεται άμεσα με το φαινόμενο του θερμοκηπίου, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη θέρμανση της επιφάνειας της γης. Η παγκόσμια μέση θερμοκρασία του αέρα έχει αυξηθεί κατά περίπου $0,85^\circ\text{C}$ από το 1880. Η παρατηρούμενη αύξηση της θερμοκρασίας έχει συμβεί σε ολόκληρο τον κόσμο. Η μέση θερμοκρασία του πλανήτη αυξήθηκε κατά περισσότερο από $1,3^\circ\text{F}$ κατά τον τελευταίο

αιώνα. Η μέση θερμοκρασία στην Αρκτική αυξήθηκε κατά σχεδόν το διπλάσιο. Κατά τη διάρκεια του 21^{ου} αιώνα, η υπερθέρμανση του πλανήτη αναμένεται να συνεχιστεί και οι κλιματικές αλλαγές είναι πιθανό να ενταθούν. Ανάλογα με τις μελλοντικές εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου και πώς το κλίμα θα ανταποκρίνεται, οι μέσες παγκόσμιες θερμοκρασίες αναμένεται να αυξηθούν σε παγκόσμιο επίπεδο κατά 2°F έως 11,5°F μέχρι το 2100 (<http://www.epa.gov> ; <http://www.environment.gov.au>).

Ένα ακόμη σοβαρό αντίκτυπο της αυξανόμενης συγκέντρωσης των αερίων του θερμοκηπίου αποτελεί και η οξίνιση των ωκεανών. Περίπου το ένα τέταρτο του διοξειδίου του άνθρακα, που παράγεται από τον άνθρωπο, απορροφάται από τους ωκεανούς και καθώς το διοξείδιο του άνθρακα διαλύεται στο θαλασινό νερό σχηματίζει ένα ασθενές ανθρακικό οξύ, καθιστώντας τον ωκεανό περισσότερο όξινο. Υπάρχουν πρόωρες ενδείξεις ότι ορισμένοι θαλάσσιοι οργανισμοί έχουν ήδη αρχίσει να επηρεάζονται από την οξίνιση των ωκεανών.

Ωστόσο, οι εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου δεν είναι ο μόνος τρόπος με τον οποίο οι άνθρωποι μπορούν να αλλάξουν το κλίμα. Δραστηριότητες, όπως η γεωργία ή η κατασκευή δρόμων, μπορούν να αλλάξουν τον τρόπο με τον οποίο αντανακλάται το ηλιακό φως στην επιφάνεια της Γης, οδηγώντας σε τοπική θέρμανση ή ψύξη. Οι εκπομπές από μικρά σωματίδια, γνωστά ως αερολύματα, στον αέρα μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε αντανάκλαση ή απορρόφηση της ενέργειας του ήλιου.

Η κλιματική αλλαγή επηρεάζει το περιβάλλον μας και τους φυσικούς πόρους, και έχει αντίκτυπο στον τρόπο ζωής μας με πολλούς τρόπους. Για παράδειγμα:

- Υψηλότερες θερμοκρασίες αυξάνουν τη συχνότητα, την ένταση και τη διάρκεια του καύσωνα, η οποία μπορεί να δημιουργήσει κινδύνους για την υγεία, ιδιαίτερα για τα μικρά παιδιά και τους ηλικιωμένους.
- Η άνοδος της στάθμης της θάλασσας απειλεί τις παράκτιες κοινότητες και τα οικοσυστήματα.
- Αλλαγές στην ποσότητα των βροχοπτώσεων, μπορούν να επηρεάσουν τα αποθέματα και την ποιότητα του νερού, καθώς και την παραγωγή υδροηλεκτρικής ενέργειας.

- Αλλαγή των οικοσυστημάτων επηρεάζει τις γεωγραφικές ζώνες πολλών φυτικών και ζωικών ειδών και το χρονοδιάγραμμα των γεγονότων του κύκλου ζωής τους, όπως είναι η μετανάστευση και η αναπαραγωγή.
- Αυξήσεις στη συχνότητα και την ένταση των ακραίων καιρικών φαινομένων, όπως καύσωνες, ξηρασίες και πλημμύρες, μπορούν να αυξήσουν τις ζημιές της ιδιοκτησίας και να μειώσουν τη διαθεσιμότητα και το προσιτό κόστος της ασφάλισης.

Οι κλιματικές αλλαγές θα συνεχιστούν και στο μέλλον. Οι επιστήμονες συμφωνούν ότι οι χειρότερες επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής μπορεί σε μεγάλο βαθμό να αποφευχθούν εάν οι εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα μειώνονται σε αποδεκτό επίπεδο (<http://www.epa.gov>).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ

2.1 Γενικά

Η αειφόρος οικονομική και βιομηχανική ανάπτυξη απαιτεί ασφαλείς και βιώσιμες πηγές ενέργειας. Για το μέλλον είναι απαραίτητη η αναδιάταξη μιας αειφόρου οικονομίας σε βιολογικές πρώτες ύλες, εντελώς νέες προσεγγίσεις στην έρευνα και την ανάπτυξη, την παραγωγή και την οικονομία. Αυτή τη στιγμή, οι ορυκτοί πόροι δε θεωρούνται ως βιώσιμη πηγή και αμφισβητούνται από οικονομικής, οικολογικής και περιβαλλοντικής απόψεως. Η καύση ορυκτών καυσίμων συνεισφέρει σημαντικά στην αύξηση του επιπέδου του CO₂ στην ατμόσφαιρα, η οποία συνδέεται άμεσα με την υπερθέρμανση του πλανήτη που παρατηρείται τις τελευταίες δεκαετίες. Οι αρνητικές επιπτώσεις των αερίων του θερμοκηπίου (GHG) στο περιβάλλον, σε συνδυασμό με τη σταδιακή εξάντληση των αποθεμάτων πετρελαίου, είναι γεγονός. Το Πρωτόκολλο του Κιότο του 1997, ζήτησε τη μείωση κατά 5,2% των εκπομπών αερίων θερμοκηπίου σε παγκόσμιο επίπεδο από τις τιμές του 1990. Για την επίτευξη του συμφωνημένου στόχου, μια επιλογή από μια σειρά αποτελεσματικών τεχνολογιών, συμπεριλαμβανομένων των χημικών και βιολογικών δυνατοτήτων μετριασμού του CO₂, αποτέλεσε το επίκεντρο της έρευνας (Naik S.N. et al., 2010 ; Brennan and Owende, 2010).

Οι πιθανές βιώσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον διαθέσιμες πηγές ενέργειας είναι ποικίλες και περιλαμβάνουν την αιολική, τη γεωθερμική, τη θαλάσσια, την υδροηλεκτρική, την πυρηνική, την ηλιακή (θερμική και φωτοβολταϊκή) ενέργεια, τη βιομάζα, το οξυγόνο και τα βιοκαύσιμα. Μέχρι το 2040 περίπου το ήμισυ του παγκόσμιου ενεργειακού εφοδιασμού θα προέρχεται από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, και η παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας θα είναι πάνω από το 80% της συνολικής παγκόσμιας προσφοράς ηλεκτρικής ενέργειας. Κατά συνέπεια, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην παραγωγή και τη χρήση καυσίμων από φυτά ή οργανικά απόβλητα (Scragg, 2009 ; Demirbas, 2008 ; Naik S.N. et al., 2010).

Τα βιοκαύσιμα σαν όρος αναφέρονται ως στερεά, υγρά ή αέρια καύσιμα, τα οποία παράγονται από βιοανανεώσιμες ή ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Τα υγρά καύσιμα είναι ιδιαίτερα σημαντικά μιας και μπορούν να αντικαταστήσουν το πετρέλαιο. Τα βιοκαύσιμα είναι μη ρυπογόνα, τοπικά διαθέσιμα, αξιόπιστα και προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές (Demirbas, 2008).

Τα βιοκαύσιμα που παράγονται από τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην ελαχιστοποίηση της καύσης ορυκτών καυσίμων και των εκπομπών CO₂. Τα βιοκαύσιμα που παράγονται από βιομάζα, όπως από φυτά ή οργανικά απόβλητα, θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στη μείωση της εξάρτησης του κόσμου από το πετρέλαιο και της παραγωγής CO₂, επειδή τα φυτά χρησιμοποιούν CO₂ καθώς μεγαλώνουν. Τα βιοκαύσιμα και τα βιοπροϊόντα, που παράγονται από τη φυτική βιομάζα, θα αμβλύνουν την υπερθέρμανση του πλανήτη. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι το CO₂, που εκλύεται κατά την καύση, ισούται με το CO₂, που δεσμεύεται από το φυτό κατά τη φωτοσύνθεση και συνεπώς, δεν αυξάνεται το καθαρό CO₂ στην ατμόσφαιρα. Επιπλέον, η παραγωγή βιοκαυσίμων μαζί με βιολογικών προϊόντων μπορεί να προσφέρει νέες δυνατότητες εσόδων και απασχόλησης σε αγροτικές περιοχές (Naik S.N. et al., 2010).



Εικόνα 2: Βιοκαύσιμα από καλλιέργειες φυτών

Τον 21^ο αιώνα αναζητείται, επομένως, μια στροφή σε εναλλακτικές βιομηχανικές πρώτες ύλες και ‘πράσινες διεργασίες’ για την παραγωγή αυτών των χημικών ουσιών, από τους πόρους ανανεώσιμης βιομάζας (Naik S.N. et al., 2010).

2.2 Γενιές Βιοκαυσίμων

Τα βιοκαύσιμα ταξινομούνται σε τέσσερις γενιές, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Γενιές βιοκαυσίμων (Demirbas, 2008)

Γενιές	Πρώτες Ύλες	Παράδειγμα
1 ^η γενιά βιοκαυσίμων	Ζάχαρη, άμυλο, φυτικά έλαια ή ζωικά λίπη	Bioalcohols, Biodiesel, biosyngas, biogas
2 ^η γενιά βιοκαυσίμων	Καλλιέργειες μη βρώσιμων τροφίμων, άχυρο σίτου, καλαμπόκι, ξύλο, στερεά απόβλητα, ενεργειακές καλλιέργειες	Bioalcohols, bio-oil, bio-DMF, Biohydrogen, bio-Fischer-Tropsch diesel, wood diesel
3 ^η γενιά βιοκαυσίμων	Άλγη	Biodiesel, Vegetable oil
4 ^η γενιά βιοκαυσίμων	Βιοντίζελ, φυτικά έλαια	Biogasoline

Τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς αναφέρονται σε βιοκαύσιμα παραγόμενα από ζάχαρη, άμυλο, φυτικά έλαια ή ζωικά λίπη, με τη χρήση συμβατικής τεχνολογίας. Η βασική πρώτη ύλη για την παραγωγή των βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς είναι συχνά οι σπόροι, όπως το σιτάρι, το οποίο αποδίδει το άμυλο που ζυμώνεται σε βιοαιθανόλη, ή οι ηλιόσποροι, οι οποίοι πιέζονται προς απόδοση φυτικών ελαίων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για βιοντίζελ (Demirbas, 2008).

Οι τρεις κύριοι τύποι βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο είναι το βιοντίζελ (βιο-εστέρες), βιοαιθανόλη, και το βιοαέριο, από τα οποία παγκοσμίως μεγάλες ποσότητες έχουν παραχθεί μέχρι σήμερα και για τις οποίες η διαδικασία παραγωγής θεωρείται «καθιερωμένη τεχνολογία». Το βιοντίζελ είναι ένα υποκατάστατο του ντίζελ και παράγεται με μετεστεροποίηση φυτικών ελαίων, και υπολειμμάτων ελαίων και λιπών. Η βιοαιθανόλη είναι ένα υποκατάστατο της βενζίνης και αποτελεί ένα πλήρες υποκατάστατο αυτής στα λεγόμενα οχήματα flexi-καυσίμου. Προέρχεται από ζάχαρη ή άμυλο μέσω της ζύμωσης. Η βιοαιθανόλη μπορεί επίσης να χρησιμεύσει ως πρώτη ύλη για τον αιθυλικό τριτογενή βουτυλαιθέρα (ETBE), ο οποίος αναμειγνύεται πιο εύκολα με τη βενζίνη. Το βιοαέριο, ή βιομεθάνιο, είναι ένα καύσιμο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βενζινοκίνητα οχήματα με μικρές προσαρμογές. Μπορεί να παραχθεί μέσω της αναερόβιας χώνευσης της υγρής κοπριάς και άλλων εύπεπτων πρώτων υλών. Προς το παρόν, το βιοντίζελ, η βιοαιθανόλη και το βιοαέριο παράγονται από τα βασικά αγαθά που χρησιμοποιούνται επίσης για τα τρόφιμα. Οι απαιτήσεις των εδάδιμων ελαίων είναι αυξημένες, γι' αυτό είναι δύσκολο να χρησιμοποιούνται οι γεωργικές καλλιέργειες τροφίμων για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Naik S.N. et al., 2010).

Τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς, μπορούν να προσφέρουν κάποια οφέλη σχετικά με το CO₂ και να συμβάλουν στη βελτίωση της εγχώριας ενεργειακής ασφάλειας. Ωστόσο, υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με τον εφοδιασμό των πρώτων υλών, συμπεριλαμβανομένων των επιπτώσεων που ενδέχεται να υπάρξουν σχετικά με τη βιοποικιλότητα και τη χρήση της γης και ο ανταγωνισμός με τις καλλιέργειες τροφίμων. Ακόμα, εκφράζοντα ανησυχίες σχετικά με τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις και τα υπόλοιπα του άνθρακα, θέτοντας περιορισμούς στην αύξηση της παραγωγής βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς. Το κύριο μειονέκτημα των βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς είναι η ζήτηση των τροφίμων έναντι καυσίμων. Ένας από τους λόγους για την άνοδο των τιμών των τροφίμων οφείλεται στην

αύξηση της παραγωγής των καυσίμων αυτών. Επιπλέον, διατυπώνεται ο ισχυρισμός ότι το βιοντίζελ δεν είναι μια οικονομικά αποδοτική τεχνολογία μείωσης των εκπομπών ρύπων. Ως εκ τούτου, για τη μείωση των αερίων του θερμοκηπίου, συνιστάται να υπάρξουν πιο αποτελεσματικές εναλλακτικές λύσεις, που βασίζονται τόσο σε ανανεώσιμες όσο και σε συμβατικές τεχνολογίες (Naik S.N. et al., 2010).

Τα βιοκαύσιμα δεύτερης και τρίτης γενιάς καλούνται επίσης προηγμένα βιοκαύσιμα. Τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς είναι κατασκευασμένα από μη βρώσιμες καλλιέργειες, άχυρο σίτου, καλαμπόκι, ξύλο, ενεργειακές καλλιέργειες, με τη χρήση προηγμένης τεχνολογίας (Demirbas, 2008). Τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς, που παράγονται από «βιομάζα των φυτών» παραπέμπουν σε μεγάλο βαθμό σε λιγνοκυτταρινικά υλικά, καθώς αυτό αποτελεί την πλειοψηφία των φθηνών και άφθονων μη εδώδιμων υλικών που διατίθενται από φυτά (Naik S.N. et al., 2010).

Η βιομάζα των φυτών αποτελεί έναν από τους πιο άφθονους και υποεκμεταλλεύσιμους βιολογικούς πόρους στον πλανήτη, και θεωρείται ως μια πολλά υποσχόμενη πηγή υλικού για τα καύσιμα και πρώτες ύλες. Η βιομάζα των φυτών μπορεί απλά να καεί για την παραγωγή θερμότητας και ηλεκτρισμού. Υπάρχουν μεγάλες δυνατότητες όσον αφορά στη χρήση της φυτικής βιομάζας για την παραγωγή υγρών βιοκαυσίμων. Όμως, η παραγωγή βιοκαυσίμων από γεωργικά προϊόντα θα μπορούσε να ικανοποιήσει μόνο ένα μέρος της αυξανόμενης ζήτησης για τα υγρά καύσιμα. Αυτό έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση των ενεργειακών φυτών για βιομάζα ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Τα παραδείγματα των βιοκαυσίμων 2^{ης} γενιάς είναι κυτταρινική αιθανόλη και τα καύσιμα Fischer-Tropsch. Αναμένεται ότι, αυτά τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς θα μπορούσαν να μειώσουν σημαντικά την παραγωγή CO₂, δεν ανταγωνίζονται με τις καλλιέργειες τροφίμων και ορισμένα είδη μπορούν να προσφέρουν την καλύτερη απόδοση του κινητήρα. Όταν διατεθούν στο εμπόριο, το κόστος των βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς έχει τη δυνατότητα να είναι πιο συγκρίσιμο με το πρότυπα βενζίνης, ντίζελ, και θα είναι πιο αποδοτική από πλευράς κόστους διαδρομή προς τις ανανεώσιμες πηγές, ενέργεια χαμηλής εκπομπής άνθρακα για τις οδικές μεταφορές. Προς το παρόν, η παραγωγή τέτοιων καυσίμων δεν είναι αποτελεσματική, επειδή υπάρχει ένας αριθμός τεχνικών εμποδίων, που πρέπει να ξεπεραστούν, ώστε να μπορέσει να αξιοποιηθεί πλήρως το δυναμικό τους (Naik S.N. et al., 2010).

Προϋποθέσεις για μία τεχνικά και οικονομικά βιώσιμη πηγή βιοκαυσίμων είναι ότι θα πρέπει να είναι ανταγωνιστική ή να κοστίζει λιγότερο από ό,τι τα καύσιμα πετρελαίου, να απαιτεί χαμηλή ή μηδενική επιπλέον χρήση της γης, θα πρέπει να επιτρέπει τη βελτίωση της ποιότητας του αέρα και θα πρέπει να απαιτεί ελάχιστη χρήση νερού. Η συνετή εκμετάλλευση των μικροφυκών θα μπορούσε να ανταποκριθεί σε αυτές τις συνθήκες και ως εκ τούτου να συμβάλλει σημαντικά στην κάλυψη της ζήτησης πρωτογενούς ενέργειας, παρέχοντας ταυτόχρονα περιβαλλοντικά οφέλη (Brennan and Owende, 2010).

Η τρίτη γενιά βιοκαυσίμων, εκμεταλλεύεται ειδικά σχεδιασμένες ενεργειακές καλλιέργειες (όπως τα φύκη/άλγη) για την παραγωγή βιομάζας. Τα φύκη αποτελούν πρώτες ύλες, χαμηλών εισροών / υψηλής απόδοσης, για την παραγωγή βιοκαυσίμων, χρησιμοποιώντας πιο προηγμένα τεχνολογία. Τα μικροφύκη είναι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί με απλές καλλιεργητικές απαιτήσεις (φως, σάκχαρο, CO₂, N, P, και K), που μπορούν να παράγουν τα λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες σε μεγάλες ποσότητες επί σύντομων χρονικών περιόδων. Τα προϊόντα αυτά μπορούν να μετατραπούν και σε βιοκαύσιμα και σε πολύτιμα παραπροϊόντα. Διαπιστώθηκε ότι, ενώ υπάρχουν εκκρεμή ζητήματα που σχετίζονται με την φωτοσυνθετική απόδοση και την παραγωγή βιομάζας, τα βιοκαύσιμα που προέρχονται από μικροφύκη θα μπορούσαν να υποκαταστήσουν σταδιακά ένα σημαντικό ποσοστό των ορυκτών καυσίμων, που απαιτούνται για να ικανοποιήσουν την αυξανόμενη ζήτηση ενέργειας (Demirbas, 2008 ; Brennan and Philip, 2010).

Μερικά μόνο από τα πλεονεκτήματα της χρήσης των φυκών είναι το χαμηλό τους κόστος, οι υψηλές τους αποδόσεις, το γεγονός ότι αποτελούν ανανεώσιμες πρώτες ύλες και το ότι υπόσχονται μεγαλύτερη απόδοση ενέργειας ανά στρέμμα συγκριτικά με τις συμβατικές καλλιέργειες. Εκτός αυτού, τα φύκη έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν και με τη χρήση υδάτων που είναι ακατάλληλα για την παραγωγή τροφίμων, μειώνοντας έτσι την σπατάλη νερού. Τέλος, είναι κατάλληλα σαν πηγή για ένα ευρύ φάσμα καυσίμων, όπως η βενζίνη, το πετρέλαιο και τα καύσιμα αεροπλάνων (Brennan and Philip, 2010).

Από την άλλη πλευρά, η εμφάνιση της τέταρτης γενιάς βιοκαυσίμων βασίζεται στην μετατροπή των φυτικών ελαίων και του βιοντίζελ, σε biogasoline, χρησιμοποιώντας την πιο προηγμένη τεχνολογία. Όσον αφορά στα βιοκαύσιμα τέταρτης γενιάς, έχουν σαν στόχο όχι μόνο την παραγωγή ενέργειας, αλλά και τη δέσμευση και αποθήκευση CO₂. Αυτό που διαφοροποιεί την τέταρτη γενιά σε σχέση με τις άλλες δύο (δεύτερη και τρίτη) είναι ότι σε όλα τα στάδια της παραγωγής, το διοξείδιο του άνθρακα παγιδεύεται με τη μέθοδο καύσης με υψηλή συγκέντρωση O₂ / CO₂ (oxy-fuel combustion) (Demirbas 2008 ; Belden et al., 2010).

Τα βιοκαύσιμα παραμένουν το πιο πολλά υποσχόμενο δυνητικό υποκατάστατο του πετρελαίου. Ωστόσο, οι δημοσκοπήσεις για τα βιοκαύσιμα ως εναλλακτική πηγή ενέργειας, είναι ανάμικτες. Έτσι, ενώ ορισμένες μελέτες (Bolsen και Cook, 2008 και Rabe και Borick, 2008) προσέγγισαν τον τομέα των βιοκαυσίμων από μια θετική σκοπιά, άλλες έδειξαν αυξανόμενες ανησυχίες και αμφιβολίες (Belden, Russonello & Stewart, 2010). Αυτές οι διαφορετικές απόψεις θέτουν τα βιοκαύσιμα ως αμφιλεγόμενο ζήτημα της επιστήμης. Αυτοί οι κίνδυνοι και τα οφέλη μπορούν να ταξινομηθούν σε περιβαλλοντικούς, οικονομικούς, κοινωνικούς και πολιτικούς τομείς (Fung et al., 2014)

2.3 Βιοντίζελ

Πρόσφατα, με την παγκόσμια έλλειψη ορυκτών καυσίμων, την αύξηση των τιμών του αργού πετρελαίου και των περιβαλλοντικών ανησυχιών για τη μείωση της ρύπανσης έχει αναβιώσει το ενδιαφέρον για την παραγωγή βιοντίζελ. Το καύσιμο βιοντίζελ είναι ένα ανανεώσιμο υποκατάστατο καύσιμο του πετρελαίου ντίζελ και ορίζεται ως ένα μίγμα μονοαλκυλεστέρων λιπαρών οξέων μακράς αλυσιάδας (FAME), που προέρχεται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες λιπιδίων, όπως φυτικό έλαιο ή ζωικό λίπος. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε οποιοδήποτε μείγμα με καύσιμο ντίζελ πετρελαίου, καθώς έχει παρόμοια χαρακτηριστικά, αλλά χαμηλότερες εκπομπές καυσαερίων. Τα μείγματα βιοντίζελ αναφέρονται ως BXX. Το XX δηλώνει το ποσό του βιοντίζελ στο μείγμα (δηλαδή, ένα μίγμα B80 είναι 80% βιοντίζελ και 20% πετρέλαιο ντίζελ) (Demirbas, 2009).

Στην Ευρώπη το βιοντίζελ είναι το σημαντικότερο βιοκαύσιμο. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση το βιοντίζελ αντιπροσωπεύει το 82% της παραγωγής βιοκαυσίμων. Η παραγωγή βιοντίζελ για το 2003 στην ΕΕ-25 ήταν 1.504.000 τόνοι. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι το βιοντίζελ μπορεί να τρέξει σε ένα συμβατικό κινητήρα ντίζελ για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ερευνητές σε πολλά κράτη, συμπεριλαμβανομένων και αυτών των Μισούρι και Αϊντάχο, έχουν τρέξει κινητήρες ντίζελ στα αστικά λεωφορεία, τα μεγάλα φορτηγά και τρακτέρ για διάφορα μείγματα καυσίμου βιοντίζελ / ντίζελ. Αυτά τα μίγματα έχουν κυμανθεί από 2/98% (B2), 20/80% (B20) έως 100% (B100). Στάνταρ κινητήρες ντίζελ θα λειτουργούν με 100% βιοντίζελ (Bozbas, 2008).



Εικόνα 3: Βιοντίζελ από έλαια

Το καύσιμο βιοντίζελ έχει καλύτερες ιδιότητες από το πετρέλαιο ντίζελ. Είναι ανανεώσιμο, βιοδιασπώμενο, μη-τοξικό, και ουσιαστικά απαλλαγμένο από θείο και αρωματικές ενώσεις. Το βιοντίζελ είναι ένα φιλικό προς το περιβάλλον καύσιμο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε οποιαδήποτε μηχανή diesel χωρίς τροποποίηση (Demirbas, 2009).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα φυσικά χαρακτηριστικά του βιοντίζελ εν συγκρίσει με εκείνα του ντίζελ.

Πίνακας 2: Φυσικά χαρακτηριστικά βιοντίζελ και ντίζελ (Bozbas, 2008)

Ιδιότητα	Βιοντίζελ	Ντίζελ
Ειδικό βάρος (kg/L)	0.87-0.89	0.84-0.86
Αριθμός κετανίου	46-70	47-55
Σημείο νέφους (K)	262-289	256-265
Σημείο ροής (K)	258-286	237-243
Σημείο Flasf (K)	408-423	325-350
Θείο (% κ.β.)	0.0000-0.0024	0.04-0.01
Τέφρα (% κ.β.)	0.002-0.01	0.06-0.01
Αριθμός ιωδίου	60-135	-
Κινηματικό ιξώδες	3.7-5.8	1.9-3.8
Υψηλότερη τιμή θέρμανσης (MJ/kg)	39.3-39.8	45.3-46.7

Τυπικές πρώτες ύλες του βιοντίζελ είναι το κραμβέλαιο, έλαιο canola, σογιέλαιο, ηλιέλαιο και φοινικέλαιο. Το λίπος των βοοειδών και των προβάτων και το λάδι των πουλερικών από ζωικές πηγές και μαγειρικό λάδι είναι επίσης πηγές των πρώτων υλών. Υπάρχουν διάφορες άλλες πηγές βιοντίζελ: αμύγδαλο, κριθάρι, καρύδα, ιχθυέλαιο, μικροφύκοι, βρώμη, σόργο, και πολλά ακόμη (Demirbas, 2009).

Ο παρακάτω πίνακας αναφέρει τα είδη ελαίου που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε παραγωγή βιοντίζελ.

Πίνακας 3: Είδη ελαίων για παραγωγή βιοντίζελ (Demirbas, 2009)

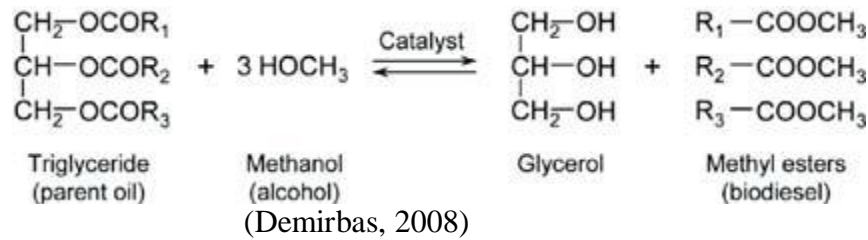
Ομάδα	Είδος ελαίου
Κυριότερα έλαια	Καρύδας, καλαμπόκι (αραβόσιτος), βαμβακέλαιο, canola (μια ποικιλία ελαιοκράμβης), ελαιόλαδο, φυστικέλαιο (αραχίδα), κάρδαμο, σουσάμι, σόγια και ηλίανθο
Έλαια ξηρών καρπών	Αμύγδαλο, κάσιους, φουντούκια, macadamia, πεκάν, φιστίκι και καρύδια
Άλλα βρώσιμα έλαια	αμάρανθος, βερίκοκο, argan, αγκινάρα, αβοκάντο, μπαμπασού, δάφνη, ξύλο οξιάς, ben, Βόρνεο ζωικό λίπος, χαρουπιές (algaroba), cohune, σπόροι κόλιανδρου, ψευδ λιναρόσποροι, σπόροι σταφυλιού, κάνναβη, σπόροι καπός, lallemantia, σπόροι λεμόνι, φρούτα macauba (Acrocomia sclerocarpa), σπόροι meadowfoam, μουστάρδα, σπόροι μπάμιας (σπόροι ιβίσκο), σπόρων perilla, requi, (Caryocar σπόροι brasiliensis), κουκουνάρι, σπόροι παπαρούνας, πυρήνας δαμάσκηνου, κινόα, ramtil (Guizotia abyssinica σπόροι ή Niger μπιζέλι), πίτουρο ρυζιού, το ζωικό λίπος, το τσάι (Camellia), γαϊδουράγκαθο (Silybum marianum σπόροι), και φυτό σιταριού
Μη βρώσιμα έλαια	Φύκη, δέντρο babassu, copaiba, honge, jatropha ή ratanjoyote, jojoba, karanja ή honge, Mahua, γάλα θάμνου, Nagchampa, neem, δέντρο σπόρων καουτσούκ, δέντρο μετάξι βαμβάκι
Άλλα έλαια	Καστορέλαιο, ραδικιού και αλευρίτη

Απευθείας χρήση των φυτικών ελαίων ή / και τη χρήση των μιγμάτων των ελαίων έχει γενικά θεωρηθεί μη ικανοποιητική και μη πρακτική τόσο για τους άμεσους όσο και για τους έμμεσους πετρελαιοκινητήρες. Το υψηλό ιξώδες, η σύνθεση οξέος, η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, καθώς επίσης και ο σχηματισμός κόμματος λόγω της οξειδωσης και του πολυμερισμού κατά την αποθήκευση και την καύση, οι καταθέσεις άνθρακα και η πύκνωση του λιπαντικού ελαίου είναι προφανή προβλήματα (Bozbas, 2008).

Διάφορες μέθοδοι έχουν αναφερθεί για την παραγωγή βιοντίζελ από φυτικά έλαια, όπως η άμεση χρήση και ανάμειξη, σχηματισμός μικρογαλακτώματος, πυρόλυση, και μετεστεροποίηση. Μεταξύ αυτών, η μετεστεροποίηση αποτελεί μία ελκυστική και ευρέως αποδεκτή τεχνική, καθώς τα φυσικά χαρακτηριστικά των (μέθυλ) αιθυλεστέρων του λιπαρού οξέος (βιοντίζελ) είναι πολύ κοντά σε εκείνα του καυσίμου ντίζελ και η διαδικασία είναι σχετικά απλή (Demirbas, 2009).

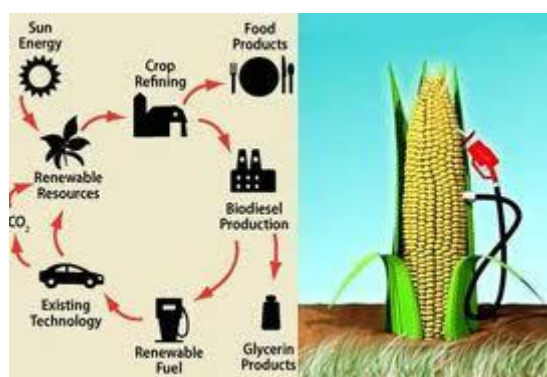
2.3.1 Παραγωγή Βιοντίζελ

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, από τις διάφορες διαθέσιμες μεθόδους για την παραγωγή βιοντίζελ, η μετεστεροποίηση φυσικών ελαίων και λιπών είναι σήμερα η μέθοδος που επιλέγεται. Η μετεστεροποίηση είναι βασικά μια διαδοχική αντίδραση. Τα τριγλυκερίδια αρχικά μετατρέπονται σε διγλυκερίδια, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε μονογλυκερίδια, τα οποία τελικά μετατρέπονται σε εστέρες λιπαρών οξέων. Η σειρά της αντίδρασης αλλάζει με τις συνθήκες της αντίδρασης. Η μετεστεροποίηση είναι εξαιρετικά σημαντική για την παραγωγή βιοντίζελ. Το βιοντίζελ, όπως αυτό ορίζεται σήμερα λαμβάνεται με μετεστεροποίηση τριγλυκεριδίων με μεθανόλη. Η μεθανόλη είναι η προτιμώμενη αλκοόλη για την απόκτηση βιοντίζελ, επειδή είναι η φθηνότερη αλκοόλη. Οι βασικοί καταλύτες είναι πιο αποτελεσματικοί από ό,τι οι όξινοι καταλύτες και τα ένζυμα. Η μεθανόλη αντιδρά με τα τριγλυκερίδια για να παράγει μεθυλεστέρες (βιοντίζελ) και γλυκερόλη (Demirbas, 2008).



Η διαδικασία της μετεστεροποίησης απαιτεί 3 mol αλκοόλης για κάθε mol τριγλυκεριδίου, για την παραγωγή 1 mol γλυκερόλης και 3 mol μεθυλεστέρα (αναλογία 3:1). Πρακτικά, για τις διεργασίες σε βιομηχανικό επίπεδο χρησιμοποιούνται 6 mol αιθανόλης για κάθε mol τριγλυκεριδίου. Αυτή η μεγάλη περίσσεια μεθανόλης είναι που εξασφαλίζει την στρέψη της αντίδρασης προς την κατεύθυνση των μεθυλεστέρων, σε μια μέγιστη απόδοση εστέρα, δηλαδή προς βιοντίζελ.

Η διαδικασία της μετεστεροποίησης διεξάγεται στους 60°C υπό ατμοσφαιρική πίεση (με θερμοκρασία βρασμού της μεθανόλης τους 65°C) και διαρκεί περίπου 90 λεπτά για να ολοκληρωθεί. Αν και είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί σε υψηλότερες θερμοκρασίες, σε συνδυασμό βέβαια με μια ανάλογη αύξηση των πιέσεων, αυτό αποφεύγεται ως επί το πλείστον λόγω του υψηλού κόστους (Chisti, 2007 ; Fangrui and Milford, 1999).



Εικόνα 4: Παραγωγή βιοντίζελ

Ο σκοπός της διαδικασίας της μετεστεροποίησης είναι να μειωθεί το ιξώδες του ελαίου. Οι πιο σημαντικές παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση του μεθυλεστέρα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης μετεστεροποίησης είναι η μοριακή αναλογία της αλκοόλης προς φυτικό έλαιο και η θερμοκρασία της αντίδρασης. Η μεθανόλη είναι η κοινώς χρησιμοποιούμενη αλκοόλη σε αυτή τη διαδικασία, εν μέρει λόγω του χαμηλού της κόστους (Demirbas, 2009).

Η αραίωση των φυτικών ελαίων με διαλύτες μειώνει το ιξώδες και κάποια προβλήματα απόδοσης του κινητήρα, όπως τις περισσότερες καταθέσεις άνθρακα. Το ιξώδες του ελαίου μπορεί να μειωθεί με την ανάμιξη με καθαρή αιθανόλη (Demirbas, 2009).

Οι μέθοδοι κατάλυσης της αντίδρασης μετεστεροποίησης μπορούν γενικά να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες, χημικές και ενζυμικές. Χημικά, η αντίδραση μετεστεροποίησης μπορεί να χρησιμοποιήσει οξύ ή βάση ως καταλύτη. Η επιλογή για το είδος του καταλύτη εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) στο ακατέργαστο έλαιο (Bajaj et al., 2010 ; Demirbas, 2009).

Οι βιοκαταλύτες, όπως η λιπάση, επιτρέπουν την σύνθεση ειδικών αλκυλεστέρων, εύκολη ανάκτηση της γλυκερόλης και τη μετεστεροποίηση των τριγλυκεριδίων με υψηλή περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα. Στην προσέγγιση αυτή, η μετεστεροποίηση καταλύομενη από λιπάση πραγματοποιείται σε μη-υδατικά περιβάλλοντα (Bajaj et al., 2010).

Οι λιπάσες είναι σημαντικά ένζυμα στη φύση, υπεύθυνα για τον κύκλο εργασιών των λιπιδίων. Έχουν τόσο υδρολυτική όσο και συνθετική δραστηριότητα. Οι ερευνητές σε όλη την υδρόγειο προσπαθούν ώστε να ξεπεραστούν οι περιορισμοί μιας ενζυμικά καταλύομενης παραγωγής βιοντίζελ, όπως το υψηλό κόστος των ενζύμων, τη χαμηλή απόδοση, τον υψηλό χρόνο αντίδρασης, την ανάγκη για οργανικούς διαλύτες και την ανάγκη του νερού στο μίγμα της αντίδρασης. Τα πιο επιθυμητά χαρακτηριστικά της λιπάσης είναι η ικανότητά της να χρησιμοποιήσει όλα τα μονο-, δι- και τριγλυκερίδια, καθώς και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα στη μετεστεροποίηση, η χαμηλή αναστολή προϊόντων, η υψηλή δραστηριότητα και η απόδοση σε μη υδατικά μέσα, ο χαμηλός χρόνος αντίδρασης, η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του ακινητοποιημένου ενζύμου, η θερμοκρασία και η αντίσταση της αλκοόλης (Bajaj et al., 2010).

Ωστόσο, ένα από τα κοινά μειονεκτήματα με των μεθόδων που βασίζονται σε ένζυμα είναι το υψηλό κόστος του ενζύμου. Η ακινητοποίηση των ενζύμων έχει γενικά χρησιμοποιηθεί για να ληφθούν επαναχρησιμοποιήσιμα παράγωγα ενζύμου. Τα ακινητοποιημένα ένζυμα είναι επίσης περισσότερο σταθερά έναντι της θερμοκρασίας. Αυτό επιτρέπει τον εύκολο χειρισμό, την ανάκτηση και την ανακύκλωση του βιοκαταλύτη και συνεπώς μειώνει το κόστος (Bajaj et al., 2010).

Μια πρόσφατη μελέτη από Fjerbaek et al. αναφέρει ότι το κόστος του ενζύμου ανά kg εστέρα που παράγεται παραμένει υψηλότερο σε σύγκριση με το κόστος του καταλύτη αλκαλίων (ανά kg εστέρα που παράγεται). Έχει προταθεί ότι το κόστος της λιπάσης μπορεί να μειωθεί με τη χρήση της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA. Επιπλέον, περαιτέρω έρευνα και ανάπτυξη είναι αναγκαία για την αποτελεσματική ανάκτηση και αξιοποίηση της γλυκερόλης, ώστε η διαδικασία να καταστεί οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον (Bajaj et al., 2010).

Η αντίδραση μετεστεροποίησης προχωρά με ή χωρίς καταλύτη, χρησιμοποιώντας πρωτοταγείς ή δευτεροταγείς μονοϋδρικές (μονοσθενείς monohydric) αλειφατικές αλκοόλες που έχουν 1-8 άτομα άνθρακα. Μεταξύ των αλκοολών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αντίδραση μετεστεροποίησης είναι η μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη, βουτανόλη και η αμυλική αλκοόλη. Η μεθανόλη και η αιθανόλη χρησιμοποιούνται πιο συχνά. Σε σύγκριση με τη μεθανόλη, η αιθανόλη προτιμάται περισσότερο για τη διαδικασία της μετεστεροποίησης, επειδή προέρχεται από γεωργικά προϊόντα και είναι ανανεώσιμη και βιολογικά λιγότερο εχθρική προς το περιβάλλον. Ωστόσο, η μεθανόλη είναι προτιμότερη, λόγω του χαμηλού της κόστους και των φυσικών και χημικών πλεονεκτημάτων της (πολική με μικρότερη αλυσίδα αλκοόλη) (Demirbas, 2009).

Οι παράμετροι που επηρεάζουν το σχηματισμό μεθυλεστέρα είναι η θερμοκρασία αντίδρασης, η πίεση, η μοριακή αναλογία, η περιεκτικότητα σε νερό, και η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα. Είναι προφανές ότι σε υποκρίσιμες καταστάσεις της αλκοόλης, ο ρυθμός αντίδρασης είναι τόσο χαμηλός και αυξάνεται σταδιακά είτε ως πίεση είτε ως άνοδο της θερμοκρασίας. Οι πιο σημαντικές μεταβλητές που επηρεάζουν την απόδοση του μεθυλεστέρα κατά τη διάρκεια της αντιδράσεως μετεστεροποίησης είναι η μοριακή αναλογία αλκοόλης προς φυτικό έλαιο και η θερμοκρασία αντίδρασης (Demirbas, 2009).

Μια άλλη σημαντική παράμετρος για τη βελτίωση της οικονομικής σκοπιμότητας της παραγωγής βιοντίζελ είναι η αξιοποίηση του πρωτογενούς υποπροϊόντος, της γλυκερόλης. Μια επιλογή είναι να πωληθεί ως καύσιμο λέβητα, ως συμπλήρωμα διατροφής των ζώων ή σε ένα διυλιστήριο γλυκερόλης. Όμως, κάτι τέτοιο δεν είναι ιδιαίτερο εφαρμόσιμο από οικονομικής απόψεως. Προκειμένου να γίνει χρήση στην παρασκευή των τροφίμων και ποτών, φαρμακευτικών ή καλλυντικών, απαιτείται ο καθαρισμός της γλυκερόλης, για την απομάκρυνση προσμείξεων, όπως το αλκοόλ, τα άλατα και το νερό, που θα επιβάρυναν με επιπλέον κόστος. Η μετατροπή της γλυκερόλης σε άλλα προϊόντα προστιθέμενης αξίας μπορεί να επιτευχθεί μέσω χημικών ή βιολογικών κατάλυσεων (Bajaj et al., 2010).

2.3.2 Πλεονεκτήματα

Ανάμεσα στα πολλά πλεονεκτήματα του καυσίμου βιοντίζελ περιλαμβάνονται τα ακόλουθα: είναι ασφαλές για χρήση σε όλους τους συμβατικούς κινητήρες ντίζελ, προσφέρει την ίδια απόδοση και την αντοχή του κινητήρα ως καύσιμο, παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής του κινητήρα και μειώνοντας την ανάγκη για συντήρηση (το βιοντίζελ έχει καλύτερη ποιότητα λίπανσης από τα ορυκτά ντίζελ). Επιπλέον, το βιοντίζελ είναι ασφαλέστερο να χειριστεί, είναι μη εύφλεκτο και μη τοξικό, μειώνει τις εκπομπές καυσαερίων (αν και μπορεί, σε ορισμένες περιπτώσεις, να αυξήσει άλλες), τον ορατό καπνό και τις επιβλαβείς αναθυμιάσεις και οσμές, έχει υψηλότερη απόδοση καύσης, χαμηλότερη περιεκτικότητα σε θείο και αρωματικά, υψηλότερο αριθμό κετανίου και υψηλότερη βιοαποικοδομησιμότητα. Το βιοντίζελ είναι ένα προϊόν προερχόμενο κυρίως από καλλιέργειες φυτών και περιέχει οξυγόνο στα μόριά του (11% κατά βάρος) με αποτέλεσμα να βελτιώνει τη διαδικασία καύσης και να μειώνει το δυναμικό οξειδωσής του (Bozbas, 2008 ; Demirbas, 2009).

2.3.3 Μειονεκτήματα

Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα του βιοντίζελ είναι το υψηλότερο ιξώδες του, η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ενέργεια, το υψηλότερο σημείο θόλωσης και σημείο ροής, οι μεγαλύτερες εκπομπές οξειδίων του αζώτου (NO_x), οι χαμηλές στροφές του κινητήρα και η ισχύς, ο εγχυτήρας εξανθράκωσης (injector coking) και η συμβατότητα των μηχανών. Οι πραγματικές τιμές απόδοσης και πίεσης του εμπορικού πετρελαίου ντίζελ κίνησης είναι μεγαλύτερες από αυτές του βιοντίζελ. Μερικά ακόμη από τα βασικά μειονεκτήματα είναι ότι μπορεί εύκολα να παγώσει σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, έχει μειωμένη ενεργειακή πυκνότητα και προκαλείται υποβάθμιση του καυσίμου εάν αποθηκευτεί για παρατεταμένη περίοδο. Τέλος η τιμή του παραμένει υψηλότερη σε σχέση με αυτή των ορυκτών καυσίμων (Demirbas, 2009 ; Bozbas, 2005).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΦΥΚΗ

3.1 Γενικά

Τα φύκη, ή αλλιώς άλγη, είναι μια μεγάλη και πολύ διαφορετική ομάδα οργανισμών. Στην ουσία είναι τα απλούστερα φυτά, χωρίς αγγειακό σύστημα και έχουν σχετικά μικρή διαφοροποίηση. Όλα απαιτούν ένα υδατικό περιβάλλον και μπορούν να κατοικούν σχεδόν σε όλα τα «κατοικήσιμα» περιβάλλοντα από ερήμους μέχρι πολικές ζώνες με χιόνια. Τα φύκη αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της βιομάζας του κόσμου και ως εκ τούτου είναι πραγματικά παγκόσμιας εμβέλειας και σημασίας. Είναι ως επί το πλείστον φωτοσυνθετικά, αν και πολλά χαρακτηρίζονται ως υποχρεωτικώς ετερότροφα (Cannell, 1993).

Τα θαλάσσια φύκη είναι υπεύθυνα για περίπου το 40% - 50% της φωτοσύνθεσης που συμβαίνει στη Γη κάθε χρόνο. Η θαλάσσια φωτοσύνθεση κυριαρχείται από τα φύκη, συμπεριλαμβανομένων των κυανοβακτηρίων (δηλαδή, μπλε-πράσινα φύκια ή Cyanophyta) και ευκαρυωτικών taxa (Qin et al., 2012).

3.2 Χρήσεις φυκών

Τα θαλάσσια φύκη χρησιμοποιούνται ως συστατικό των πηγών δολώματος για την παραγωγή ζώων υδατοκαλλιέργειας και παράγουν άφθονες πολύτιμες ενώσεις για τη χημική βιομηχανία και την ανθρώπινη υγεία, συμπεριλαμβανομένων των ελαίων (π.χ., τριγλυκερίδια), των πολυσακχαριτών (π.χ., αλγίνη, άγαρ), των χρωστικών ουσιών (π.χ. phycobiliproteins, καροτενοειδή) , καθώς και δυνητικών νέων φαρμακευτικών ουσιών (Qin et al., 2012).

Αποτελούν επίσης φυσική τροφή για τα ψάρια και άλλα υδρόβια ζώα, ενώ οι καλλιέργειες των φυκών προωθούνται ενεργά από τους αλιείς και τους υδατοκαλλιεργητές ως μέσο για την αύξηση της παραγωγικότητας (Hasan and Chakrabarti, 2009).

Με την ταχέως αυξανόμενη ζήτηση και την ανάπτυξη του σήμερα για την παραγωγή βιοενέργειας από φύκη και την κερδοφόρα αγορά για καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα από φυσικά προϊόντα αλγών, η γενετική μηχανική των θαλάσσιων φυκών έχει προσελκύσει ένα αυξανόμενο ποσό προσοχής ως μια καίρια συστηματική τεχνολογία για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της βιομάζας σε βιομηχανικές εφαρμογές και να τροποποιηθεί το μεταβολικό μονοπάτι για προϊόντα υψηλής αξίας. Παρ' όλα αυτά, μέχρι σήμερα, μόνο λίγα είδη θαλάσσιων φυκών έχουν τροποποιηθεί γενετικά με επιτυχία (Qin et al., 2012).

Τα θαλάσσια φύκη είναι σήμερα η καλύτερη επιλογή για τα εργοστάσια κυττάρων παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και της πηγής των μελλοντικών βιοκαυσίμων, επειδή έχουν απλές και ανέξοδες απαιτήσεις ανάπτυξης (δωρεάν θαλασσινό νερό, ανέξοδες πηγές αζώτου, φωσφόρου, και άνθρακα), γρήγορους ρυθμούς ανάπτυξης με επαρκές φως, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην περιφερειακή γη της παράκτιας περιοχής ή μπορούν ακόμη να χρησιμοποιηθούν στη θάλασσα. Τα κυριότερα σημεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για την ανάπτυξη των φυκών σε φωτοβιοαντιδραστήρες είναι οι θρεπτικές ουσίες, το φως, ο στροβιλισμός, η ανάδευση και η πρόληψη της ρύπανσης. Η υψηλή πυκνότητα και η καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας για τα θαλάσσια φύκη είναι ο μόνος δρόμος για την ανάπτυξη και την εφαρμογή αυτών των βιολογικών πόρων. Ο σχεδιασμός φωτοβιοαντιδραστήρα αποτελεί βασικό στοιχείο της διαδικασίας αυτής (Qin et al., 2012).

3.3 Ταξινόμηση Φυκών

Οι εκτιμήσεις για τον αριθμό των ειδών ποικίλει, υπάρχουν πιθανώς περίπου 30.000 γνωστά είδη, αλλά ο πραγματικός αριθμός των ειδών πιθανότατα υπερβαίνει σημαντικά τον ήδη υπάρχον. Η ετερογένεια των φυκών σημαίνει ότι η ταξινόμηση τους σίγουρα δεν είναι τυποποιημένη και αποτελεί αντικείμενο συχνής αναθεώρησης. Η ταξινόμηση μπορεί να βασίζεται σε έναν αριθμό ιδιοτήτων όπως το χρώμα, τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, τη μορφολογία, τη μορφή των μαστιγίων, τη φύση των προϊόντων αποθήκευσης τροφίμων και ούτω καθ' εξής (Cannell, 1993).

Τα φύκη ταξινομούνται σύμφωνα με το μέγεθός τους σε δύο κατηγορίες, τα μικροφύκη, που αποτελούνται από μικροσκοπικά μεμονωμένα κύτταρα και τα μακροφύκη, τα οποία είναι μεγάλα φυτά και έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από 30 μέτρα μήκους (Qin et al., 2012).

3.3.1 Σύγκριση μακροφυκών και μικροφυκών

- Τα μικροφύκη έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε έλαια, αλλά είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν και να συλλεχθούν με έναν οικονομικά αποδοτικό τρόπο.
- Τα μακροφύκη, αντιθέτως, παρουσιάζουν δυνατότητες καλλιέργειας και συγκομιδής χαμηλού κόστους, αλλά πολλά είδη έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια, καθώς και υδατάνθρακες.
- Με διαδικασίες, όπως η κυτταρική ζύμωση (για την εξαγωγή αιθανόλης), αεριοποίηση (για την εξαγωγή βιοντίζελ, αιθανόλης και ενός ευρύ φάσματος υδρογονανθράκων), ή αναερόβια πέψη (για μεθάνιο ή την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας) είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν σήμερα τα μακροφύκη για την παραγωγή βιοκαυσίμων.
- Έτσι, μικροφύκη και μακροφύκη αποτελούν δυναμική πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Oilgae, 2010).

3.4 Μικροφύκη

Τα μικροφύκη είναι ευκαρυωτικοί ή προκαρυωτικοί φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται γρήγορα και επιβιώνουν σε αντίξοες συνθήκες εξαιτίας της μονοκύτταρης ή απλής πολυκύτταρης δομής τους. Παράδειγμα προκαρυωτικών οργανισμών είναι τα κυανοβακτήρια (cyanophyceae) και ευκαρυωτικών μικροοργανισμών τα πράσινα φύκη (chlorophyta) και τα διάτομα (bacillariophyta). Τα μικροφύκη είναι παρόντα σε όλα τα οικοσυστήματα της γης, όχι μόνο στα υγρά, αλλά και στα εδάφιν, αναπαριστώντας μια μεγάλη ποικιλία ειδών που ζουν σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών (Mata et al., 2010).

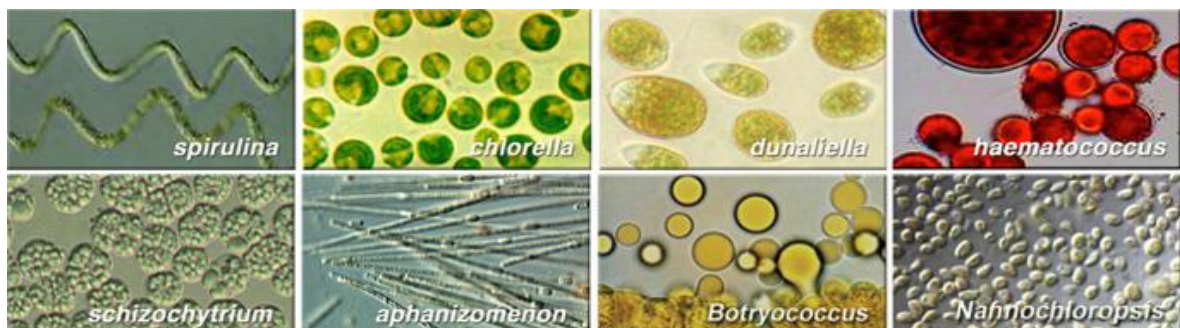


Εικόνα 5: Απεικόνιση διαφόρων μικροφυκών

Τα μικροφύκη αναπτύσσονται σε θαλασσινό ή φρέσκο νερό και αποτελούν μια μικρογραφία βιοχημικού εργοστασίου, ενώ φωτοσυνθετικά είναι περισσότερο αποτελεσματικά συγκριτικά με τα χερσαία φυτά. Ο φωτοσυνθετικός τους μηχανισμός είναι παρόμοιος με αυτόν των φυτών που αναπτύσσονται στο έδαφος, αλλά εξαιτίας της απλής κυτταρικής τους δομής και του γεγονότος ότι είναι βυθισμένα σε θαλασσινό περιβάλλον, όπου έχουν επαρκή 'πρόσβαση' σε νερό, διοξείδιο του άνθρακα και άλλα θρεπτικά, είναι γενικά πιο αποτελεσματικά στη μετατροπή ηλιακής ενέργειας σε βιομάζα (Carlsson et al., 2007 ; Adams et al., 2011 ; Muthukumar et al., 2012).

Τα μικροφύκη διαθέτουν τις δυνατότητες τόσο των μιτοχονδρίων όσο και των χλωροπλαστών, με αποτέλεσμα να μπορούν να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται σε μία σειρά από διαφορετικά περιβάλλοντα, αρκεί να υπάρχει κάποια ποσότητα νερού και μικροθρεπτικών συστατικών. Μπορούμε να συναντήσουμε μικροάλγη από σκοτεινά σπητικά περιβάλλοντα μέχρι περιβάλλοντα με υψηλές υψηλές συγκεντρώσεις άλατος. Αυτή η διευρυμένη προσαρμοστικότητα τους τα καθιστά κατάλληλα για να επιτευχθεί μαζική παραγωγή ελαίων, τόσο για τη χρήση σε βιοκαύσιμα, όσο και σε τρόφιμα. Τα μικροάλγη και γενικότερα τα άλγη παρουσιάζουν μία σημαντική συσσώρευση των λιπιδίων που ξεπερνά το 80% επί του ξηρού βάρους τους (Spolaore et al., 2006).

Υπολογίζεται ότι υπάρχουν 200.000 με 800.000 είδη μικροφυκών, από τα οποία τα 35.000 έχουν μελετηθεί και αναλυθεί. Η ταξινόμηση σε διαιρέσεις βασίζεται σε διάφορες ιδιότητες όπως η υπερδομή, η φύση των κυτταρικών αποθηκευτικών προϊόντων, η σύνθεση των χρωστικών, η οργάνωση των φωτοσυνθετικών μεμβρανών και άλλα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Οι τρεις επικρατέστερες ομάδες μικροφυκών, τα οποία έχουν στοχοποιηθεί για την παραγωγή βιοντίζελ είναι τα διάτομα (bacillariophyceae), που περιέχουν πάνω από 100.000 είδη μικροφυκών, τα οποία στο μεγαλύτερο μέρος τους σχετίζονται με υφάλμυρα και αλμυρά περιβάλλοντα, τα μπλε-πράσινα άλγη (cyanophyceae), τα οποία επί της ουσίας είναι βακτήρια, τα οποία περιέχουν χλωροπλάστες και είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τη ρύθμιση του αζώτου σε υδάτινα περιβάλλοντα και τέλος τα χρυσά άλγη (chrysophyceae), τα οποία περιλαμβάνουν πάνω από 1000 γνωστά είδη, τα οποία είναι ικανά να αποθηκεύσουν τον άνθρακα ως έλαια και πολύπλοκους υδρογονάνθρακες (Tabatabaei et al., 2011 ; Carlsson et al., 2007 ; Sheehan, 1998).



Εικόνα 6: Οκτώ εμπορικά μικροφύκη

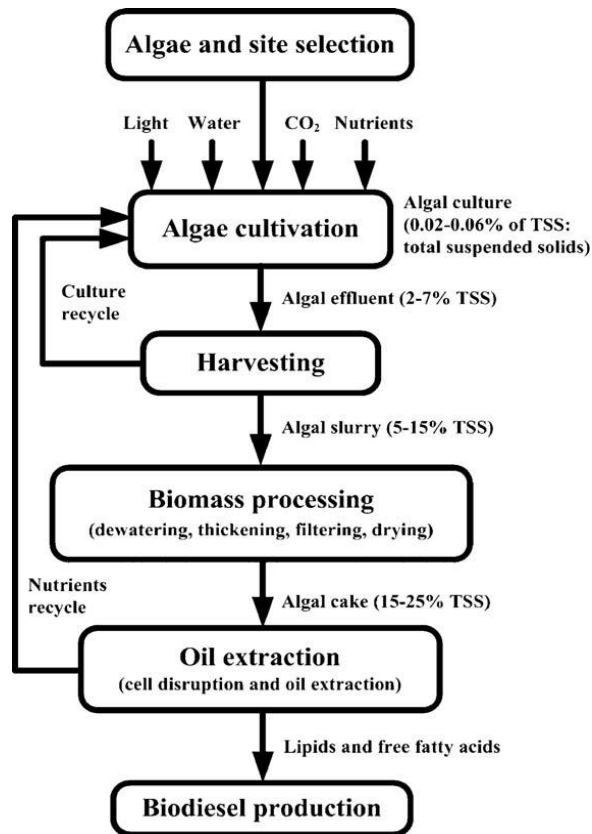
Η δέσμευση της φωτεινής ενέργειας κατά τη φωτοσύνθεση γίνεται από τη χλωροφύλλη και τις άλλες φωτοσυνθετικές χρωστικές. Με τη βοήθειά τους οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί συνθέτουν υδατάνθρακες (γλυκόζη), χρησιμοποιώντας απλές ανόργανες ενώσεις, όπως το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό, που βρίσκουν άφθονες στο περιβάλλον τους. Ως ετερότροφα, τα άλγη βασίζονται στη γλυκόζη ή άλλες αξιοποιήσιμες πηγές άνθρακα για τον μεταβολισμό και την ενέργεια. Μερικά στελέχη μπορεί επίσης να αναπτυχθούν μιξοτροπικά (Carlsson et al., 2007).

3.4.1 Παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη – Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί

Στις μέρες μας, η ιδέα της παραγωγής βιοκαυσίμων από μικροφύκη ως εναλλακτική πηγή, αποκτά μεγαλύτερο ενδιαφέρον και προσοχή εξαιτίας της ολοένα αυξανόμενης τιμής του πετρελαίου αλλά και της παγκόσμιας ανησυχίας για την υπερθέρμανση του πλανήτη που συνδέεται με την καύση ορυκτών καυσίμων (Muthukumar et al., 2012).

Τα μικροάλγη έχουν προταθεί για τη χρήση τους στην παραγωγή βιοκαυσίμων, κυρίως λόγω του ότι παρουσιάζουν υψηλότερη φωτοσυνθετική ικανότητα, υψηλότερη παραγωγή βιομάζας, αλλά και γρηγορότερους ρυθμούς ανάπτυξης σε σύγκριση με τις υπόλοιπες πρώτες ύλες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Τα περισσότερα μικροάλγη, που καλλιεργούνται σε υδάτινα περιβάλλοντα, συνήθως αναπτύσσονται υπό αυτοτροφικές συνθήκες, χρησιμοποιούν δηλαδή το φως του ήλιου ως πηγή ενέργειας και το διοξείδιο του άνθρακα ως πηγή άνθρακα. Συγκεκριμένα είδη αλγών μπορούν να αναπτυχθούν και σε ετερότροφες συνθήκες, όπου χρησιμοποιούν τους διάφορους βιολογικούς σχηματισμούς ως πηγή ενέργειας και άνθρακα. Μικτές τροφικές συνθήκες είναι οι συνθήκες εκείνες κατά τις οποίες ο μικροοργανισμός χρησιμοποιεί τόσο την ενέργεια του ήλιου, όσο και την ενέργεια από τη γλυκόζη (Miao X. and Q. Wu, 2004).

Το παρακάτω σχήμα αποτελεί μια σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της παραγωγής του βιοντίζελ από φύκη ξεκινώντας από την επιλογή των ειδών μικροφυκών ανάλογα με τις τοπικές ειδικές συνθήκες και το σχεδιασμό και την εφαρμογή του συστήματος καλλιέργειας για την ανάπτυξη μικροφυκών. Στη συνέχεια, ακολουθεί η συγκομιδή της βιομάζας, η μεταποίηση και η εξόρυξη ελαίου, να τροφοδοτούν τη μονάδα παραγωγής βιοντίζελ (Mata et al., 2010).



Στάδια εξέλιξης παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη (Mata et al., 2010)

Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα των μικροφυκών είναι ότι αναπτύσσονται πολύ πιο γρήγορα σε σχέση με άλλες καλλιέργειες και ότι είναι εξαιρετικά πλούσια σε έλαια. Για την ακρίβεια, συνήθως διπλασιάζουν τη βιομάζα τους μέσα σε 24 ώρες, ενώ κατά τη διάρκεια της εκθετικής τους φάσης ο χρόνος μπορεί να μειωθεί εξαιρετικά. Οι ταχύτεροι αναπτυσσόμενοι μικροοργανισμοί στον κόσμο λοιπόν, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν ακόμα και 23,000 λίτρα βιοκαυσίμων ανά στρέμμα καλλιέργειας (Porphy and Farid 2011).

Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση μικροφυκών για την παραγωγή βιοκαυσίμων είναι ότι τα μικροφύκη είναι ικανά όλο το χρόνο παραγωγής και ως εκ τούτου, η παραγωγικότητα του ελαίου από τις καλλιέργειες των μικροφυκών υπερβαίνει την απόδοση των καλύτερων καλλιεργειών ελαιούχων σπόρων, π.χ. η απόδοση βιοντίζελ είναι 12.000 l/ha για μικροφύκη (παραγωγή σε ανοιχτές λίμνες) σε σύγκριση με την τιμή των 1190 l/ha για την ελαιοκράμβη. Επιπλέον, αναπτύσσονται σε υδατικά μέσα, αλλά χρειάζονται λιγότερο νερό από ότι οι χερσαίες καλλιέργειες, μειώνοντας έτσι το φορτίο

των πηγών γλυκού νερού. Τα μικροφύκη μπορούν να καλλιεργηθούν σε υφάλμυρο νερό σε μη καλλιεργήσιμη γη, και ως εκ τούτου δεν μπορούν να επιφέρουν αλλαγή της χρήσης γης, ελαχιστοποιώντας τις σχετικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις, ενώ δεν θέτουν σε κίνδυνο την παραγωγή τροφίμων, ζωοτροφών και άλλων προϊόντων που προέρχονται από καλλιέργειες (Brennan and Owende, 2010).

Επιπροσθέτως, έχουν ταχύ δυναμικό ανάπτυξης και πολλά είδη έχουν περιεκτικότητα ελαίου, που κυμαίνεται από 20% έως 50% επί του ξηρού βάρους της βιομάζας. Όσον αφορά τη διατήρηση της ποιότητας του αέρα και τη βελτίωση, η παραγωγή βιομάζας των μικροφυκών μπορεί να επηρεάσει τη βιο-σταθεροποίηση των αποβλήτων του CO₂ (1 kg ξηρής βιομάζας φυκών χρησιμοποιεί περίπου 1,83 kg CO₂). Τα θρεπτικά συστατικά για την καλλιέργεια μικροφυκών (κυρίως άζωτο και φωσφόρος) μπορούν να ληφθούν από τα λύματα, ως εκ τούτου, εκτός από την παροχή μέσου ανάπτυξης, υπάρχει διπλή δυνατότητα για επεξεργασία των οργανικών λυμάτων από τη βιομηχανία γεωργικών ειδών διατροφής (Brennan and Owende, 2010).

Η καλλιέργεια φυκών δεν απαιτεί χρήση ζιζανιοκτόνων ή φυτοφαρμάκων. Τα μικροφύκη μπορούν επίσης να παράγουν πολύτιμα παραπροϊόντα, όπως πρωτεΐνες και υπολειμματική βιομάζα μετά την εξόρυξη πετρελαίου, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφή ή λίπασμα, ή να υποστούν ζύμωση για την παραγωγή αιθανόλης ή μεθανίου. Η βιοχημική σύνθεση της βιομάζας φυκών μπορεί να ρυθμίζεται μεταβάλλοντας τις συνθήκες ανάπτυξης, ως εκ τούτου, η απόδοση του ελαίου μπορεί να ενισχυθεί σημαντικά και τα μικροφύκη είναι ικανά για φωτοβιολογική παραγωγή του «βιοϋδρογόνου» (Brennan and Owende, 2010).

Παρά την εγγενή δυνατότητα των μικροφυκών ως πρώτη ύλη για παραγωγή βιοκαυσίμων, πολλές προκλήσεις έχουν εμποδίσει την ανάπτυξη της τεχνολογίας βιοκαυσίμων από φύκη σε οικονομικά βιώσιμη. Αυτά περιλαμβάνουν: την επιλογή των ειδών ώστε να ισορροπηθούν οι απαιτήσεις για την παραγωγή βιοκαυσίμων και την εξόρυξη πολύτιμων παραπροϊόντων, την επίτευξη υψηλότερων φωτοσυνθετικών αποδόσεων μέσω της συνεχούς εξέλιξης των συστημάτων παραγωγή, την ανάπτυξη τεχνικών για καλλιέργεια μεμονωμένων ειδών, τη μείωση της εξάτμισης, και των απωλειών CO₂ λόγω διάχυσης, τη δυνατότητα για αρνητικό ισοζύγιο ενέργειας μετά τον συνυπολογισμό των απαιτήσεων της άντλησης νερού, της μεταφοράς CO₂, της συγκομιδής και την εξαγωγής, των μερικών εμπορικών εγκαταστάσεων σε λειτουργία, ως εκ τούτου,

υπάρχει έλλειψη δεδομένων για εγκαταστάσεις μεγάλης κλίμακας, της ενσωμάτωσης των καυσαερίων, τα οποία είναι ακατάλληλα σε υψηλή συγκέντρωση, λόγω της παρουσίας δηλητηριωδών ενώσεων, όπως NO_x και SO_x (Brennan and Owende, 2010).

3.4.2 Καλλιέργεια μικροφυκών

Τα μικροφύκη είναι φυσικά σχεδιασμένα για να ελέγχουν το περιβάλλον τους με τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά και ενέργεια, να τα αποθηκεύουν και να βελτιστοποιούν την απόδοση της αξιοποίησης των πόρων γενικότερα. Για την ανάπτυξη της βιομάζας, τα μικροφύκη εξαρτώνται πρωτίστως από την επαρκή παροχή μιας πηγής άνθρακα και φωτός για τη διεξαγωγή της φωτοσύνθεσης (Amaro et al., 2011).

Διάφοροι τύποι μεταβολισμών μπορούν να εφαρμοστούν στα μικροφύκη, όπως για παράδειγμα αυτότροφος, ετερότροφος, μιξότροφος, φωτοετερότροφος. Τα μικροφύκη είναι ικανά για μεταβολική μετατόπιση ως απάντηση στις αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών. Έτσι, ορισμένοι οργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν:

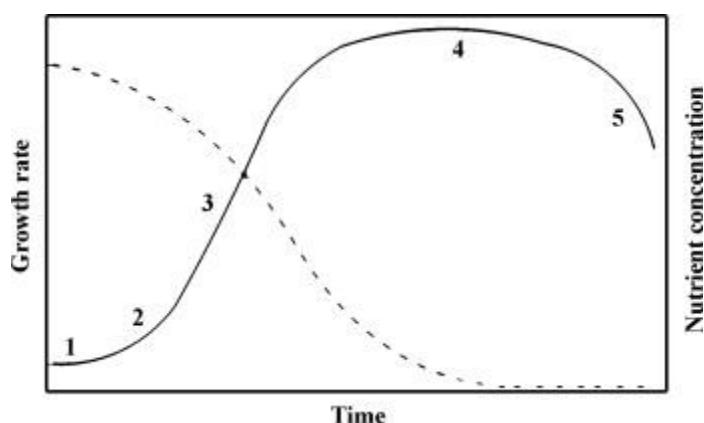
- Φωτοαυτότροφα, χρησιμοποιώντας το φως ως μοναδική πηγή ενέργειας, το οποίο μετατρέπεται σε χημική ενέργεια μέσω φωτοσυνθετικής αντιδράσης.

- Ετερότροφα, χρησιμοποιώντας μόνο οργανικές ενώσεις ως πηγή άνθρακα και ενέργειας.

- Μιξότροφα, διεξάγοντας τη φωτοσύνθεση ως την κύρια πηγή ενέργειας, αν και οι δύο οργανικές ενώσεις και το CO₂ είναι απαραίτητα. Η αμφίτροφη ανάπτυξη, που αποτελεί υποπερίπτωση της μιξότροφης, σημαίνει ότι οι οργανισμοί είναι σε θέση να ζουν είτε αυτότροφα ή ετερότροφα, ανάλογα με διαθεσιμότητα της συγκέντρωσης των οργανικών ενώσεων και της έντασης του φωτός.

- Φωτοετερότροφα, ή αλλιώς ο μεταβολισμός είναι γνωστός ως photoorganitrophy, photoassimilation, photometabolism, και στον οποίο απαιτείται φως για να χρησιμοποιηθούν οργανικές ενώσεις ως πηγή άνθρακα. Οι φωτοαυτότροφοι και μιξότροφοι μεταβολισμοί δεν διακρίνονται πλήρως. Μπορούν να καθοριστούν σύμφωνα με τη διαφορά της πηγής ενέργειας, που απαιτείται για να υπάρξει ανάπτυξη και παραγωγή ειδικών μεταβολιτών (Mata et al., 2010).

Το παρακάτω σχήμα παρουσιάζει την καμπύλη ανάπτυξης φυκών σε μία καλλιέργεια κατά παρτίδες (συνεχής γραμμή) και τη συγκέντρωση θρεπτικών (διακεκομμένη γραμμή). Έτσι, διακρίνονται πέντε φάσεις ανάπτυξης: (1) λανθάνουσα φάση, (2) εκθετική φάση ανάπτυξης, που αντιπροσωπεύει τον ανώτατο ρυθμό ανάπτυξης υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες, (3) γραμμική φάση ανάπτυξης, (4) στατική φάση ανάπτυξης, (5) μείωση ή φάση θανάτου (Mata et al., 2010).



Σχ. 1.

Σχηματική αναπαράσταση του ρυθμού ανάπτυξης φυκών σε καλλιέργεια σε παρτίδες (συνεχής γραμμή) και της συγκέντρωσης θρεπτικών (διακεκομμένη γραμμή) (Mata et al., 2010)

3.4.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών

Οι καλλιέργειες των μικροφυκών είναι αρκετά πολύπλοκα συστήματα και η ανάπτυξή τους επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, που μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε:

- αβιοτικούς παράγοντες, που περιλαμβάνονται το φως, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών, το οξυγόνο, το pH, η αλατότητα, το περιεχόμενο σε τοξικά και χημικά

- βιοτικούς παράγοντες, που περιλαμβάνουν παθογενείς μικροοργανισμούς (μύκητες, βακτήρια, ιοί) και τον ανταγωνισμό με άλλα μικροφύκη, και

- λειτουργικούς παράγοντες, όπως ο ρυθμός ανάδευσης, η διάλυση, το βάθος και η συχνότητα συγκομιδής (Mata et al., 2010).

3.4.3 Συστήματα καλλιέργειας Μικροφυκών

Ανάλογα με τις τοπικές συνθήκες και τα διαθέσιμα υλικά είναι δυνατόν να σχεδιαστούν διάφορα συστήματα καλλιέργειας βάσει των παραλλαγών στο μέγεθος, στο σχήμα, στα υλικά κατασκευής, στην κλίση και στον τύπο ανάδευσης, οι οποίες επηρεάζουν την απόδοση, το κόστος και την αντοχή τους (αντοχή στις καιρικές συνθήκες) (Mata et al., 2010).

Τα συστήματα καλλιέργειας για τη μαζική παραγωγή μικροφυκών είναι τα ανοικτού τύπου συστήματα, όπως τα κανάλια λιμνών, και οι κλειστού τύπου φωτο-βιοαντιδραστήρες (PBRs). Οι ανοιχτές λίμνες είναι το παλαιότερο και απλούστερο σύστημα για τη μαζική καλλιέργεια των μικροφυκών. Τα λειτουργικά κόστη συζητήθηκαν από την άποψη της ανάμιξης, της χρησιμοποίησης του άνθρακα, των θρεπτικών συστατικών, κροκιδωτικών μέσων, διάθεσης άλατος, της συντήρησης, της εργασία και της συσσώρευσης της φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου. Στο ανοιχτού τύπου, σύστημα λίμνης, ένας από τους βασικούς παράγοντες της παραγωγικότητας είναι η δυσκολία της κυκλοφορίας και ανάμιξης των κυττάρων των φυκών, των θρεπτικών συστατικών και του CO₂ (Moazami et al., 2012).



Εικόνα 7: Διάφοροι τύποι συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών: (1) Πλαστικοί σάκοι 300 λίτρων, (2) επίπεδοι φωτοαντιδραστήρες, (3) οριζόντιοι σωληνωτοί φωτοαντιδραστήρες και (4) ανοικτή δεξαμενή τύπου raceway

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τόσο τα ανοικτά συστήματα, όσο και τους κλειστού τύπου φωτοβιοαντιδραστήρες είναι το ηλιακό φως, το νερό, τα θρεπτικά στοιχεία και το CO₂. Από την άλλη, τόσο τα ανοικτά συστήματα, όσο και οι κλειστού τύπου φωτοβιοαντιδραστήρες έχουν περιβαλλοντικές επιπτώσεις στο νερό, στο έδαφος, στη βιοποικιλότητα, στον αέρα και στην ενέργεια (Ryan, 2009).

Η οικονομική σύγκριση ανάμεσα στις ανοικτές λίμνες και τους κλειστούς PBRs δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4: Οικονομική σύγκριση ανοικτών λιμνών και κλειστών PBRs (Moazami et al., 2012)

Parameter	Relative advantage
Capital/operating costs	Open ponds << PBRs
Biomass concentration	Open ponds < PBRs
Oxygen inhibition	Open ponds > PBRs
Contamination risk	Open ponds < PBRs
Water losses	Open ponds ~ PBRs
Carbon dioxide losses	Open ponds ~ PBRs
Process control	Open ponds ~ PBRs
Space required	Open ponds ~ PBRs

Ακόμα, στον παρακάτω πίνακα γίνεται μια σύγκριση μεταξύ PBRs και λιμνών για διάφορες συνθήκες καλλιέργειας και παραμέτρους ανάπτυξης.

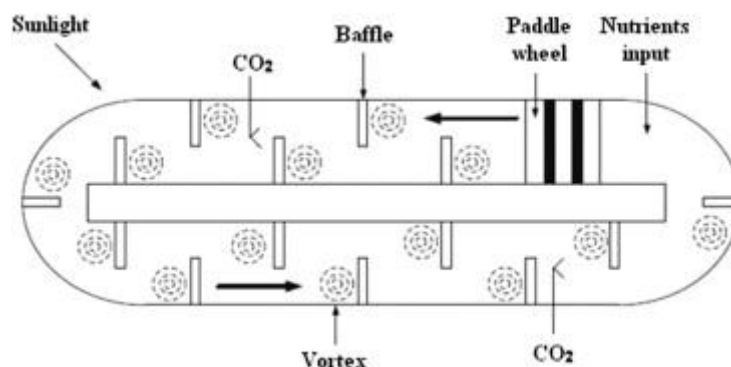
Πίνακας 5: Σύγκριση των ανοικτών και κλειστών συστημάτων καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας για μικροφυκών (Mata et al., 2010)

Culture systems for microalgae	Closed systems (PBRs)	Open systems (Ponds)
Contamination control	Easy	Difficult
Contamination risk	Reduced	High
Sterility	Achievable	None
Process control	Easy	Difficult
Species control	Easy	Difficult
Mixing	Uniform	Very poor
Operation regime	Batch or semi-continuous	Batch or semi-continuous
Space required	A matter of productivity	PBRs ~ Ponds
Area/volume ratio	High (20–200 m ⁻¹)	Low (5–10 m ⁻¹)
Population (algal cell) density	High	Low
Investment	High	Low
Operation costs	High	Low
Capital/operating costs ponds	Ponds 3–10 times lower cost	PBRs > Ponds
Light utilization efficiency	High	Poor

Culture systems for microalgae	Closed systems (PBRs)	Open systems (Ponds)
Temperature control	More uniform temperature	Difficult
Productivity	3–5 times more productive	Low
Water losses	Depends upon cooling design	PBRs ~ Ponds
Hydrodynamic stress on algae	Low–high	Very low
Evaporation of growth medium	Low	High
Gas transfer control	High	Low
CO ₂ losses	Depends on pH, alkalinity, etc.	PBRs ~ Ponds
O ₂ inhibition	Greater problem in PBRs	PBRs > Ponds
Biomass concentration	3–5 times in PBRs	PBRs > Ponds
Scale-up	Difficult	Difficult

3.4.3.1 Ανοιχτά Συστήματα

Ανάμεσα στα διάφορα μεγέθη και τα σχήματα των λιμνών που λειτουργούν σε σχετικά μεγάλη κλίμακα, οι τρεις μεγάλες κατηγορίες περιλαμβάνουν: (1) την επιμήκη λεκάνη, κατασκευασμένη ως ένας ατελείωτος βρόχος, στην οποία η ανάδευση της καλλιέργειας γίνεται συνήθως με πτερυγωτό τροχό (2) την κυκλική λεκάνη, στην οποία η ανάδευση γίνεται από κινούμενο βραχίονα (3) τα κεκλιμένα συστήματα, όπου η ανάμιξη επιτυγχάνεται με την άντληση και τη ροή της βαρύτητας (Mata et al., 2010).



Εικόνα 8: Σύστημα ανοικτού τύπου καναλιών λίμνης (Moazami et al., 2012)

Σημαντική παράμετρος για τον σχεδιασμό ανοικτών δεξαμενών είναι το βάθος της δεξαμενής, το οποίο δεν θα πρέπει να είναι πολύ μεγάλο για να επιτρέπεται η διείσδυση του φωτός, αλλά να μην είναι και πολύ μικρό για να μην αλλάζει η συγκέντρωση των ιόντων του υποστρώματος λόγω της εξάτμισης του νερού. Το βάθος της δεξαμενής θεωρείται βέλτιστο μεταξύ 20 και 30 cm. Παρόλα αυτά αναλόγως το είδος του μικροφύκους και τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής, το βάθος της δεξαμενής μπορεί να είναι μεγαλύτερο ή μικρότερο (Borowitzka, 1999).



Εικόνα 9: Τεχνικές λίμνες ελισσόμενου στίβου (Drapcho and Bruna, 2006)

Επιπροσθέτως, το σύστημα ανάδευσης των ανοικτών καλλιεργειών είναι μεγάλης σημασίας και στην ουσία αντικατοπτρίζει την εξέλιξη των διαφόρων τύπων δεξαμενών. Η ανάδευση είναι αναγκαία, γιατί εμποδίζει τη συσσωμάτωση και καθίζηση των μικροφυκών, αυξάνει την αξιοποίηση του φωτός, ομογενοποιεί το υπόστρωμα καθιστώντας τα διαλυτά ανόργανα ή/και οργανικά στοιχεία πιο προσπελάσιμα για την πρόσληψη τους από τα μικροφύκη (Chaumont, 1993).

Οι επιμήκεις λεκάνες και οι φυσικές λίμνες είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα συστήματα καλλιέργειας για την εμπορική παραγωγή των μικροφυκών. Υπό κανονικές συνθήκες, το σύστημα των ανοικτών λιμνών είναι σχετικά οικονομικό, καθαρίζεται εύκολα μετά από την καλλιέργεια και είναι αξιόλογο για την καλλιέργεια μάζας των φυκών (Mata et al., 2010).

Σε γενικές γραμμές τα κυριότερα μειονεκτήματα των ανοικτών καλλιεργειών είναι: απώλειες λόγω εξάτμισης, θερμοκρασιακές μεταβολές, μικρή αποτελεσματικότητα στην αξιοποίηση του CO₂, αναποτελεσματική ανάδευση του υποστρώματος και μικρή αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας. Επίσης, επιτρέπουν σε μικρό βαθμό τον έλεγχο των συνθηκών καλλιέργειας, η παραγωγικότητά τους είναι κακή, καταλαμβάνουν μεγάλη έκταση, οι καλλιέργειες μολύνονται εύκολα, περιορίζονται σε λίγα στελέχη φυκών και έχουν δυσκολία στην ανάπτυξη των καλλιεργειών των φυκών για μεγάλο χρονικό διάστημα (Brennan and Owende, 2010 ; Mata et al., 2010).

Τα προβλήματα των ανοικτών καλλιεργειών μπορούν να αντιμετωπιστούν με την χρήση κατάλληλων συνθηκών για το είδος του μικροφύκου. Αποτελεσματικές συνθήκες είναι συνήθως οι ακραίες και εξειδικευμένες συνθήκες, όπου μόνο το επιλεγθέν μικροφύκος μπορεί να αναπτυχθεί, ενώ είναι ακατάλληλες για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Παραδείγματα ειδών που καλλιεργούνται σε ακραίες συνθήκες είναι η *Dunaliella salina*, που καλλιεργείται σε αλμυρά νερά (>20% άλας) ή η *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*, που καλλιεργείται σε αλκαλικά περιβάλλοντα (> pH 9,2). Επίσης, για μια αποτελεσματική καλλιέργεια μπορεί να χρησιμοποιηθούν είδη μικροφυκών με σχετικά υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης για την επικράτηση έναντι άλλων μικροοργανισμών όπως τα μικροφύκη των γενών *Chlorella*, *Scenedesmus* και *Phaeodactylum* (Borowitzka, 1999 ; Brennan and Owende, 2010 ; Chen, 1996 ; Ugwu et al., 2008).

3.4.3.2 Κλειστοί βιοαντιδραστήρες

Ένας βιοαντιδραστήρας ορίζεται ως ένα σύστημα, στο οποίο επιτυγχάνεται μια βιολογική μετατροπή. Έτσι, ένας φωτο-βιοαντιδραστήρας είναι ένας αντιδραστήρας, στον οποίο τα φωτότροφα (μικροβιακά, φυκών ή φυτικά κύτταρα) αναπτύσσονται ή χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή μιας φωτο-βιολογικής αντίδρασης (Mata et al., 2010).

Οι φωτοβιοαντιδραστήρες (PBRs) είναι ευέλικτα συστήματα, τα οποία μπορούν να βελτιστοποιηθούν ανάλογα με τα βιολογικά και τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των ειδών των φυκών που καλλιεργούνται, επιτρέποντας έτσι την καλλιέργεια σε είδη φυκών, που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν σε ανοικτές δεξαμενές. Σε έναν PBR, η απευθείας ανταλλαγή των αερίων και των προσμείξεων (π.χ. μικροοργανισμοί, σκόνη) μεταξύ των καλλιεργούμενων κυττάρων και της ατμόσφαιρας είναι περιορισμένη ή δεν επιτρέπεται από τα τοιχώματα του αντιδραστήρα. Επίσης, ένα μεγάλο ποσοστό του φωτός δεν προσκρούει στην επιφάνεια της καλλιέργειας, αλλά θα πρέπει να διασχίσει τα διαφανή τοιχώματα του αντιδραστήρα (Mata et al., 2010).

Ο σχεδιασμός των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι μια πολύπλοκη υπόθεση και προϋποθέτει την καλή γνώση διαφόρων φυσικών και βιολογικών φαινομένων για τον επιτυχή σχεδιασμό των διαφόρων υποσυστημάτων. Τα κυριότερα υποσυστήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι το σύστημα φωτισμού, το σύστημα εμπλουτισμού με CO₂, το σύστημα ανάδευσης, το σύστημα απομάκρυνσης O₂ και διαχωρισμού αερίων, το σύστημα θέρμανσης/ψύξης και το σύστημα θρέψης (Chisti and Moo-Young, 2002 ; Eriksen, 2008 ; Molina et al., 2001).

Οι φωτοβιοαντιδραστήρες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τόσο το σχεδιασμό όσο και τον τρόπο λειτουργίας τους. Οι κύριες κατηγορίες περιλαμβάνουν: επίπεδους ή σωληνοειδείς, οριζόντιους, κεκλιμένους, κατακόρυφους ή σπιδάλ ή/και πολλαπλής σερπαντίνας (Mata et al., 2010).

Οι φωτοβιοαντιδραστήρες μπορούν να λειτουργήσουν κατά παρτίδες ή με συνεχή τρόπο. Υπάρχουν αρκετά πλεονεκτήματα από τη χρήση συνεχούς βιοαντιδραστήρα σε αντίθεση με τον τρόπο λειτουργίας παρτίδας:

- Ο συνεχής βιοαντιδραστήρας παρέχει υψηλότερο βαθμό ελέγχου από ό,τι με παρτίδα
- Οι ρυθμοί ανάπτυξης μπορούν να ρυθμιστούν και να διατηρηθούν για εκτεταμένες χρονικές περιόδους και η συγκέντρωση της βιομάζας μπορεί να ελέγχεται με μεταβολή του ρυθμού αραίωσης
- Λόγω της σταθερής κατάστασης του συνεχούς βιοαντιδραστήρα, τα αποτελέσματα είναι πιο αξιόπιστα και εύκολα επαναλήψιμα και η επιθυμητή ποιότητα των προϊόντων ενδέχεται να είναι πιο εύκολο να επιτευχθεί
- Συνεχείς αντιδράσεις προσφέρουν αυξημένες δυνατότητες έρευνας και ανάλυσης του συστήματος (Mata et al., 2010).

Ανάλογα με το σχήμα ή το σχεδιασμό τους, οι PBRs θεωρείται ότι έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συστήματα ανοικτού τύπου. Έτσι, προσφέρουν καλύτερο έλεγχο των συνθηκών καλλιέργειας και των παραμέτρων ανάπτυξης (pH, θερμοκρασία, ανάμιξη, CO₂ και O₂), έχουν μεγαλύτερο λόγο επιφάνειας/όγκου, σε ορισμένους τύπους φωτοβιοαντιδραστήρων γίνεται καλύτερος έλεγχος της παροχέτευσης και της κίνησης των αερίων (πχ. CO₂), εμποδίζουν την εξάτμιση νερού από το υπόστρωμα καλλιέργειας, έχουν καλύτερη θερμική κατανομή στο υπόστρωμα καλλιέργειας, έχουν σχετικά εύκολη εγκατάσταση σε ανοιχτό χώρο, προσφέρουν δυνατότητα καλλιέργειας σε τύπο μιξοτροφίας ή ετεροτροφίας χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα επιμόλυνσης, επιτρέπουν την επίτευξη υψηλότερων πυκνότητων των μικροφυκών ή κυτταρικών συγκεντρώσεων, υψηλότερες ογκομετρικές παραγωγικότητες, ένα πιο ασφαλές και προστατευμένο περιβάλλον και προλαμβάνουν τη μόλυνση ή την ελαχιστοποίηση εισβολής από ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς (Chen, 1996 ; Chisti, 2007 ; Mata et al., 2010).

Παρά τα πλεονεκτήματά τους, οι PBR δεν αναμένεται να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στο εγγύς μέλλον για κάθε προϊόν ή διαδικασία, που μπορεί να επιτευχθεί σε μεγάλες υπαίθριες επιμήκεις λεκάνες. Τα διάφορα μειονεκτήματα των PBRs, που πρέπει να εξετασθούν και να λυθούν, περιλαμβάνουν την υπερθέρμανση, τη βιο-ρύπανση, τη συσσώρευση οξυγόνου, τη δυσκολία στην κλιμάκωση, το υψηλό κόστος κατασκευής, τη λειτουργία και την καλλιέργεια της βιομάζας των φυκών και την καταστροφή των κυττάρων από διατμητική τάση (Mata et al., 2010).

3.4.4 Περιεκτικότητα μικροφυκών σε λιπίδια

Μία μεγάλη ποικιλία μικροφυκών είναι ικανά να συσσωρεύσουν μία μεγάλη ποσότητα λιπιδίων στα κύτταρα. Κατά μέσο όρο, τα περιεχόμενα των λιπιδίων τυπικά κυμαίνονται από 10 έως 30% επί του ξηρού βάρους. Ανάλογα με τα συγκεκριμένα είδη φυκών και τις συνθήκες καλλιέργειας τους, ωστόσο, η παραγωγή λιπιδίων των μικροφυκών μπορεί να κυμαίνεται ευρέως από 2 έως 75%. Η παραγωγικότητα των λιπιδίων μπορεί να αυξηθεί δραματικά με εξωτερική εφαρμογή των παραγόντων στρες και θεωρείται μια στρατηγική επιβίωσης για τα μικροφύκη κάτω από αντίξοες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα αυτά περιλαμβάνουν στέρηση των θρεπτικών συστατικών, έκθεση σε χημικές ουσίες, αλλαγές στην αλατότητα, θερμοκρασία, pH ή / και ακτινοβολία (Van et al., 2012).

Κάτω από δυσμενείς και στρεσογόνες περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης, πολλά μικροφύκη, τροποποιούν τα βιοσυνθετικά τους μονοπάτια με κατεύθυνση τη δημιουργία και συσσώρευση κυρίως τριγλυκεριδίων (TAG). Παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η ένταση της ακτινοβολίας, καθώς και η διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών, δείχνουν να επηρεάζουν τόσο τη λιπιδική σύνθεση των μικροφυκών, όσο και το περιεχόμενο των λιπιδίων τους. Στον πίνακα 6 παρουσιάζεται η περιεκτικότητα σε λιπίδια, καθώς και η παραγωγικότητα σε λιπίδια και βιομάζα διαφόρων μικροφυκών (θαλασσινού και γλυκού νερού) (Hu et al., 2008 ; Mata et al., 2010 ; Rodolfi et al., 2009).

Πίνακας 6: Περιεχόμενο και παραγωγικότητα λιπιδίων για διάφορα είδη μικροφυκών (Mata et al., 2010)

Marine and freshwater microalgae species	Lipid content (% dry weight biomass)	Lipid productivity (mg/L/day)	Volumetric productivity of biomass (g/L/day)	Areal productivity of biomass (g/m ² /day)
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	24.0-31.0	-	-	11.5-17.4
<i>Botryococcus braunii</i>	25.0-75.0	-	0.02	3.0
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33.6	21.8	0.07	-
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14.6-16.4/39.8	17.6	0.04	-
<i>Chlorella emersonii</i>	25.0-63.0	10.3-50.0	0.036-0.041	0.91-0.97
<i>Chlorella protothecoides</i>	14.6-57.8	12.14	2.00-7.70	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19.0-22.0	44.7	0.23-1.47	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0-58.0	11.2-40.0	0.02-0.20	0.57-0.95
<i>Chlorella</i> sp.	10.0-48.0	42.1	0.02-2.5	1.61-16.47/25
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2.0	-	2.90-3.64	72.5/130
<i>Chlorella</i>	18.0-57.0	18.7	-	3.50-13.90
<i>Chlorococcum</i> sp.	19.3	53.7	0.28	-
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20.0-51.1	-	10	-
<i>Dunaliella salina</i>	6.0-25.0	116.0	0.22-0.34	1.6-3.5/20-38
<i>Dunaliella primolecta</i>	23.1	-	0.09	14
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16.7-71.0	-	0.12	-
<i>Dunaliella</i> sp.	17.5-67.0	33.5	-	-
<i>Ellipsoidon</i> sp.	27.4	47.3	0.17	-
<i>Euglena gracilis</i>	14.0-20.0	-	7.70	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25.0	-	0.05-0.06	10.2-36.4
<i>Isochrysis galbana</i>	7.0-40.0	-	0.32-1.60	-
<i>Isochrysis</i> sp.	7.1-33	37.8	0.08-0.17	-
<i>Monodus subterraneus</i>	16.0	30.4	0.19	-
<i>Monallanthus salina</i>	20.0-22.0	-	0.08	12
<i>Nannochloris</i> sp.	20.0-56.0	60.9-76.5	0.17-0.51	-
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22.7-29.7	84.0-142.0	0.37-0.48	-
<i>Nannochloropsis</i> sp.	12.0-53.0	37.6-90.0	0.17-1.43	1.9-5.3
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29.0-65.0	90.0-134.0	-	-
<i>Nitzschia</i> sp.	16.0-47.0	-	-	8.8-21.6
<i>Oocystis pusilla</i>	10.5	-	-	40.6-45.8
<i>Pavlova salina</i>	30.9	49.4	0.16	-
<i>Pavlova lutheri</i>	35.5	40.2	0.14	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18.0-57.0	44.8	0.003-1.9	2.4-21
<i>Porphyridium cruentum</i>	9.0-18.8/60.7	34.8	0.36-1.50	25
<i>Senedesmus obliquus</i>	11.0-55.0	-	0.004-0.74	-

Σύμφωνα με τον πίνακα 2, η περιεκτικότητα σε λιπίδια μπορεί να φτάσει ακόμα και το 75% επί της ξηρής βιομάζας συνοδευόμενη όμως από χαμηλή παραγωγικότητα (*Botryococcus braunii*). Όσον αφορά τα πιο κοινά είδη μικροαλγών (*Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*) είναι σε θέση να παράγουν λιπίδια σε ποσοστό μεταξύ 20% και 50%, έχοντας τη δυνατότητα να πετύχουν υψηλότερα επίπεδα παραγωγικότητας (Mata et al., 2010).

3.4.5 Επίδραση CO₂ στην ανάπτυξη των μικροφυκών (στερεό και αέριο)

Τα μικροφύκη ως φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια και τον ανόργανο άνθρακα (CO₂) μέσω πολύπλοκων βιοχημικών διεργασιών σε οργανικό άνθρακα (γλυκόζη). Τα μικροφύκη μπορούν να χρησιμοποιήσουν το CO₂ από διάφορες πηγές, όπως είναι το ατμοσφαιρικό CO₂, τα βιομηχανικά καυσαέρια, ή CO₂ υπό μορφή διαλυτών ανθρακικών αλάτων (π.χ. NaHCO₃ και Na₂CO₃). Το διτανθρακικό (HCO₃⁻) είναι η επικρατούσα μορφή του διαλυμένου ανόργανου άνθρακα (DIC) σε θαλασσινό νερό (pH = 8) και η αξιοποίηση είτε του CO₂ ή HCO₃⁻, ως η προτιμώμενη πηγή άνθρακα για τη φωτοσύνθεση και ως αποτελεσματικό συμπλήρωμα, έχει βρεθεί να εξαρτάται από το είδος. Τα μικροφύκη (με εξαίρεση ορισμένες κατηγορίες, όπως για παράδειγμα τα ροδοφύκη) έχουν έναν μηχανισμό (carbon concentrating mechanism) κατά τον οποίο το διαλυμένο CO₂ συγκεντρώνεται γύρω από το κύτταρο και είτε ο άνθρακας απορροφάται ως διτανθρακική ρίζα είτε με την βοήθεια ενζύμων (carbonic anhydrase) απορροφάται σε μορφή CO₂ (Raeesossadati et al., 2014 ; Badger and Price, 2003 ; Giordano et al., 2005).

Τα ατμοσφαιρικά επίπεδα του CO₂ (0,0387% (v/v)) δεν επαρκούν για να υποστηρίξουν τα υψηλά ποσοστά ανάπτυξης μικροφυκών και τις παραγωγικότητες που απαιτούνται για την πλήρη κλίμακα παραγωγής βιοκαυσίμων (Znad et al.).

Ωστόσο, η παροχή υψηλών επιπέδων CO₂ στα μέσα καλλιέργειας οδηγεί σε αύξηση της οξύτητας, ενώ η κατανάλωση του CO₂ από τα μικροφύκη μέσω της φωτοσύνθεσης, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του pH, και οι επακόλουθες αλλαγές μπορούν να επηρεάσουν τους ρυθμούς ανάπτυξης ορισμένων ειδών μικροφυκών (Raeesossadati et al., 2014).

Οι πρόσφατες βιβλιογραφίες (Chiu et al., 2008 ; Ho et al, 2010b ; Jiang et al., 2011 ; Tang et al., 2011) έχουν δείξει ότι η υψηλή συγκέντρωση του συμπληρώματος του CO₂ θα μπορούσε να διεγείρει τα μικροφύκη στο να αναπτυχθούν ταχύτερα σε σχέση με τον ατμοσφαιρικό αέρα. Σε μια μελέτη που διεξήχθη από τον Jiang et al., 2011, οι ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *Nannochloropsis sp.* αυξήθηκε από 0,33 d⁻¹ προς 0,52 d⁻¹ (αύξηση του 58%), όταν ο αερισμός του ατμοσφαιρικού αέρα άλλαξε σε 15% CO₂. Αυτή είναι μια εύλογη παρατήρηση, επειδή η υψηλή συγκέντρωση του CO₂ ευνοεί τη φωτοσυνθετική επάρκεια των μικροφυκών για την αναπαραγωγή μέσα σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα

και ως εκ τούτου περισσότερη ποσότητα βιομάζας των μικροφυκών θα μπορούσε να επιτευχθεί. Ωστόσο, θα πρέπει να ληφθεί μέριμνα, καθώς μερικά στελέχη μικροφυκών παρουσιάζουν μικρότερη ανεκτικότητα απέναντι σε υψηλές συγκεντρώσεις του CO₂ και μπορεί ενδεχομένως να αναστέλλουν την ανάπτυξή τους. Για παράδειγμα, η *Chlorella sp.* μπορεί να ανεκτεί μόνο CO₂ συγκέντρωσης έως 2% και η περαιτέρω αύξηση αναστέλλει την ανάπτυξή της. Αυτό συμβαίνει, επειδή η υψηλή συγκέντρωση του CO₂, προκαλεί μείωση του pH στο μέσο καλλιέργειας και μειώνει τη δραστηριότητα της εξωκυτταρικής καρβονικής ανυδράσης των μικροφυκών, η οποία είναι υπεύθυνη για το μηχανισμό συγκέντρωσης άνθρακα (Lam et al., 2012).

Με βάση διάφορες πρόσφατες δημοσιεύσεις (Ho et al., 2010b ; Tang et al., 2011 ; Yoo et al., 2010), η αύξηση της περιεκτικότητας σε λιπίδια στα κύτταρα των μικροφυκών ήταν μόνο 1-6%, αν και 10-15% του CO₂ προσφέρθηκαν ως πηγή άνθρακα. Ο άνθρακας μπορεί να είναι σταθερός στη μορφή πρωτεϊνών, σακχάρων και χρωστικών ουσιών, καθώς σχετικά υψηλή σύνθεση των προϊόντων αυτών επιτεύχθηκε σε σύγκριση με τη σύνθεση λιπιδίων σε *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis* και *Dunaliella tertiolecta* (Sydney et al., 2010). Για να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός, προτάθηκε η καλλιέργεια σε δύο στάδια, ώστε να ενισχυθεί η περιεκτικότητα των κυττάρων των μικροφυκών σε λιπίδια: 1^ο στάδιο: Τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε μέσο με πλούσια θρεπτικά συστατικά, τροφοδοτούμενο με υψηλή συγκέντρωση του CO₂ για τη βελτίωση του ρυθμού ανάπτυξης τους και την παραγωγικότητα της βιομάζας, 2^ο στάδιο: αφού τα μικροφύκη έχουν αναπτυχθεί μέχρι και τη στατική φάση, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε μέσο με μη επαρκή θρεπτικά, όπως για παράδειγμα σε συνθήκες αζωτοπενίας, ώστε να αυξηθεί και η περιεκτικότητα σε λιπίδια. (Lam et al., 2012).

Η παροχή CO₂ από τον αέρα ή τα καυσαέρια για τα συστήματα καλλιέργειας των μικροφυκών μέσω φυσαλίδων, επιδέχεται αρκετούς περιορισμούς. Από την άλλη πλευρά, πρόσφατες μελέτες (Chi et al., 2011? Devgoswami et al., 2011) αναφέρουν ότι το διττανθρακικό ιόν (HCO₃⁻) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη των φωτότροφων μικροφυκών. Συνήθως, διαλυμένος ανόργανος άνθρακας (DIC), ανάλογα με το pH του διαλύματος, υπάρχει στο νερό με τη μορφή ελεύθερων μορίων CO₂ (σε pH κάτω 4.5), HCO₃⁻ (σε pH 8.5), CO₃⁻ (σε pH πάνω από 8.5) και H₂CO₃ (σε pH κάτω 4.5), όταν επιτευχθεί η δυναμική ισορροπία ιονισμού, αλλά μόνο τα CO₂ και HCO₃⁻ είναι οι κύριες μορφές DIC, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα

κύτταρα μικροφυκών με διαφορετικούς τρόπους. Γενικά, το HCO_3^- δε διαχέεται κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης (Zhao et al., 2014 ; Lam et al., 2012).

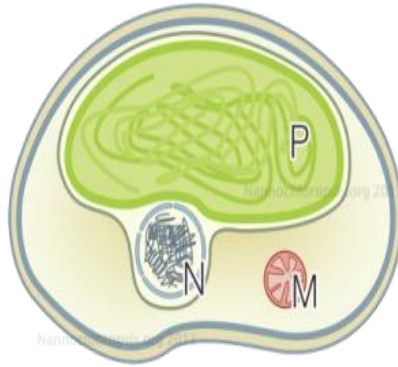
Ωστόσο, με την παρουσία του ενζύμου της καρβονικής ανυδράσης στην επιφάνεια του κυττάρου, το HCO_3^- μετατρέπεται ταχύτητα σε CO_2 και στη συνέχεια μεταφέρεται εντός του κυττάρου για αφομοίωση. Ο ρόλος της ανθρακικής ανυδράσης γίνει πιο καίριας σημασίας ειδικά όταν το περιβάλλον έχει μια περιορισμένη προσφορά σε CO_2 και η καρβονική ανυδράση θα μπορούσε να βοηθήσει τα μικροφύκη να συνεργήσουν στο μηχανισμό συγκέντρωσης άνθρακα (CCM), ώστε να ικανοποιούν τις ανάγκες τους σε άνθρακα. Διαπιστώθηκε (από Yeh et al., 2010) ότι με την προσθήκη 1 g/L NaHCO_3 σε μέσο καλλιέργειας σε pH 8,78, η *Chlorella vulgaris* ήταν σε θέση να χρησιμοποιήσει το 100% της διαθέσιμης πηγής άνθρακα (κυρίως HCO_3^-), με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται τελική απόδοση βιομάζας 0,6 g/L. Υπό αυτές τις συνθήκες καλλιέργειας, η περιεκτικότητα σε λιπίδια της βιομάζας του μικροφύκου ήταν περίπου 30-40%, το οποίο ήταν εξαιρετικά υψηλό σε σύγκριση με τις τιμές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (14 - 22%). Ωστόσο, όταν υψηλότερη ποσότητα NaHCO_3 προστέθηκε στο μέσο καλλιέργειας, η ανάπτυξη της *Chlorella vulgaris* ανεστάλη λόγω του αυξανόμενου pH στο μέσο (Lam et al., 2012).

Άλλα πλεονεκτήματα της καλλιέργειας μικροφυκών με HCO_3^- είναι πως δεδομένου ότι το CO_2 συλλαμβάνεται με τη μορφή NaHCO_3 , η πηγή άνθρακα μπορεί να αποθηκευτεί προσωρινά κατά τη διάρκεια της νύκτας ή τη διάρκεια της χειμερινής περιόδου, όπου τα μικροφύκη δε μεγαλώνουν. Επιπλέον, το NaHCO_3 έχει υψηλότερη διαλυτότητα στο νερό σε σύγκριση με το CO_2 και μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης του HCO_3^- , καθώς και δεν απαιτεί πρόσθετη ενέργεια για την άντληση του αέρα (Lam et al., 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – NANNOCHLOROPSIS

4.1 Γενικά

Το μικροφύκος *Nannochloropsis* είναι ένα μονοκύτταρο, κοκκοειδές άλγος με κιτρινοπράσινο χρώμα, το οποίο διανέμεται ευρέως σε θαλασσινό, γλυκό και υφάλμυρο νερό. Το μέγεθός του κυμαίνεται μεταξύ 2 και 5 χιλιοστών και χαρακτηρίζεται για την απουσία της χλωροφύλλης b και c. Κατηγοριοποιήθηκε ως μέλος των Eustigmatophyceae της ομάδας Heterokontophyta από τον Hibberd (1981) με βάση τόσο την ανάλυση των χρωστικών του ουσιών, όσο και κυτταρολογικών παρατηρήσεων. Στη συνέχεια, έγινε η κατάταξη του πιο συγκεκριμένα ως μέλος της οικογένειας των Monodopsidaceae (Naval and Cheng, 1982 ; Norio, 1992 ; Wang et al., 2013).



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των κυττάρων *Nannochloropsis* (www.nannochloropsis.org)

4.2 Κατηγοριοποίηση μικροφύκους

Το γένος *Nannochloropsis* διαθέτει τα μικρότερα και πιο απλής μορφής είδη, καθιστώντας την ταξινομική ταυτότητα των ειδών δύσκολη. Τα κύτταρά του μάλιστα είναι τόσο μικρά και δυσδιάκριτα σε σχέση με εκείνα των υπόλοιπων μικροφυκών, ώστε η διαδικασία του καθορισμού να καθίσταται δύσκολη ακόμα και με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Πιο συγκεκριμένα, το μικροφύκος *Nannochloropsis sp.*, περιλαμβάνει έξι διαφορετικά είδη τα οποία έχουν περιγραφεί τα τελευταία 30 χρόνια και είναι τα παρακάτω: i) *N. Salina*, ii) *N. Gaditana*, iii) *N. Oculata*, iv) *N. Oceanica*, v) *N. Granulata*, vi) *N. Limnetica* (Gladu et al., 1995 ; Hibberd 1981 ; Maruyama et al., 1986 ; Cohen, 1999 ; <http://www.algaebase.org>).

4.3 Nannochloropsis - Γονιδίωμα

Τα είδη αυτού του γένους, γίνονται όλο και πιο ελκυστικά στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών, επειδή η υψηλή τους περιεκτικότητα σε λιπίδια παρέχει μια πλούσια πηγή ενέργειας σαν τροφή για τα οστρακοειδή. Η λιπιδική τους σύνθεση, καθώς και η συσσώρευση λιπιδίων τα καθιστούν ως έναν ελκυστικό υποψήφιο παραγωγής πετρελαίου. Αν και σε πρότυπες συνθήκες καλλιέργειας, το μικροφύκος Nannochloropsis δείχνει να έχει μια μέτρια περιεκτικότητα σε λιπίδια, αυτό μπορεί να αλλάξει σημαντικά σε περιπτώσεις όπου περιορίζεται η κυτταρική διαίρεση (ανεπάρκεια αζώτου). Κατά συνέπεια, η αντίστροφη σχέση μεταξύ της συσσώρευσης λιπιδίων και της παραγωγής βιομάζας αποτελεί ένα από τα κύρια εμπόδια για την εκμετάλλευση του μικροφύκου Nannochloropsis ως πηγή βιοκαυσίμου. Μια ελκυστική προσέγγιση στο πρόβλημα αυτό είναι η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τον έλεγχο των βασικών βιοχημικών δραστηριοτήτων που οδηγούν σε συσσώρευση ελαίου. Τα τελευταία δύο χρόνια, έχουν πράγματι πραγματοποιηθεί αρκετές προσπάθειες ανεξάρτητων ομάδων σχετικά με την γονιδιωματική αλληλουχία της απομόνωσης των διαφόρων ειδών Nannochloropsis και διάφορα έγγραφα δημοσιεύθηκαν πρόσφατα με τα σχέδια των γονιδιωμάτων. Αν και τα μεγέθη του γονιδιώματος των διαφόρων ειδών Nannochloropsis είναι σχετικά μικρά (περίπου 30 MBP), με ένα εύλογα μικρό περιεχόμενο των επαναλαμβανόμενων περιοχών, αυτά τα πρώτα σχέδια είναι αρκετά αποσπασματικά και ως ένα βαθμό ελλιπή (Gladu et al., 1995 ; Seta et al., 1992 ; Volkman et al., 1993 ; Pan et al., 2011 ; Liang et al., 2012 ; Radakovits et al., 2012 ; Vieler et al., 2012 ; Carpinelli et al., 2013).

4.4 Βιοενεργά Συστατικά

Προερχόμενο από την κατηγορία των μικροφυκών, το μικροφύκος *Nannochloropsis* αποτελεί μια φυσική πηγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως είναι τα καροτενοειδή, τα λιπαρά οξέα (FAs), τα στεροειδή, καθώς και οι πολυσακχαρίτες. Σε γενικές γραμμές, το μεγαλύτερο ποσοστό παραγόμενων συστατικών του είναι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι μπορούν να χαρακτηριστούν και σαν οργανικές ενώσεις που εμφανίζονται κυρίως κάτω από στρεσογόνες συνθήκες (Recht et al., 2012).

Πιο συγκεκριμένα, όλα τα είδη του μικροφύκου *Nannochloropsis* περιέχουν σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις, εκτός από τα β-καροτενοειδή, την βιολαξανθίνη και την βοχεραξανθίνη σαν χρωστικές, χλωροφύλλη a, ενώ χαρακτηρίζονται από την απουσία χλωροφύλλης b, c καθώς και λουτεΐνης. Ωστόσο, διαθέτουν ακόμα ζεαξανθίνη και ασταξανθίνη, αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα (Cao et al., 2013 ; Cohen, 1999).

Όσον αφορά τα σάκχαρα, κυρίαρχο ρόλο κατέχει η γλυκόζη με ποσοστό 68% του συνόλου, ενώ στη συνέχεια ακολουθούν η φουκόζη, η γαλακτόζη, η μανόζη, η ραμνόζη, η ριβόζη καθώς και η ξυλόζη (Cohen, 1999).

Όσον αφορά την κατηγορία των αμινοξέων, το στέλεχος περιέχει τις ουσίες μεθιονίνη (methionine), tryptophan, cystine, histidine και hydroxyproline σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε αντίθεση με την aspartate, την glutamate και την προλίνη (proline) που κυριαρχούν σε υψηλά ποσοστά (Cohen, 1999).

Τέλος, το κυριότερο κυτταρικό συστατικό του μικροφύκου *Nannochloropsis* που ενδιαφέρει ιδιαίτερα τους επιστήμονες αλλά και την βιομηχανία, είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Πιο συγκεκριμένα, τα βασικά λιπαρά οξέα του στελέχους είναι τα εξής : 14:0, 16:0, 16:1, 20:4ω6 και 20:ω5, εμφανίζοντας ιδιαίτερα υψηλές τιμές περιεκτικότητας στο εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA). Όλα τα είδη του μικροφύκου *Nannochloropsis* διαθέτουν περιεκτικότητα σε ολικά λιπαρά σε ποσοστό 10-60% επί της ξηρής βιομάζας (Carrero et al., 2010 ; Cohen, 1999).

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1 ΜΕΘΟΔΟΙ - ΥΛΙΚΑ

5.1.1 ΟΡΓΑΝΑ

- Φωτοβιοαντιδραστήρας
- Αυτόκαυστο
- Φωτόμετρο (Hitachi UV 2000)
- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία)
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Microplate reader (SpectraMax 250, Molecular Devices)
- Φυγόκεντρος
- Συσκευή λυοφιλίωσης (freeze-drying)
- Vortex

5.1.2 ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- NaNO_3 προμηθεύτηκε από τη Sigma – Aldrich.co.Ltd, UK
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ προμηθεύτηκε από τη Sigma – Aldrich Inc. St. Louis, USA
- NaHCO_3
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και το NaHCO_3 προμηθεύτηκαν από τη Merck, Darmstadt, Germany
- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και το $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ προμηθεύτηκαν από τη Danreac Quimica SA
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, το $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ και το $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ προμηθεύτηκαν από τη Riedel – deHaen Ag Seelze – Hannover
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ προμηθεύτηκε από τη Carlo ERBA Divisione Chimica, Milano, Italy

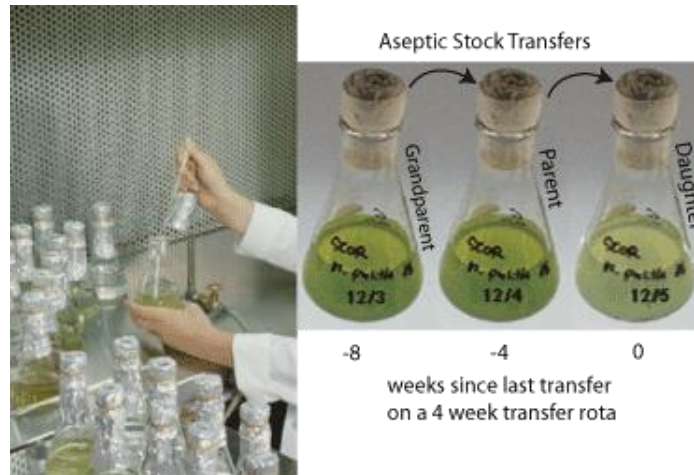
- Βιταμίνες thiamine HCl (vit. B₁), biotin (vit. H), cyanocobalamin (vit. B₁₂) προμηθεύτηκαν από τη Sigma Chemical Ltd. (St. Louis, MO, USA)
- Tris – HCl προμηθεύτηκε από τη Serva Feinbiochemica Heidelberg / New York
- MeOH
- Διαλύτης της εκχύλισης λιπαρών κ-εξάνιο προμηθεύτηκε από τη Labscan Analytical Sciences (Labscan Ltd., Dublin, Ireland).

5.1.3 Μικροοργανισμός

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ήταν το μικροφύκος *Nannochloropsis sp.* CCMP1779, το οποίο προμηθεύτηκε από το ίδρυμα CCMP (The Provasoli-Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota).

5.1.4 Διατήρηση-Καλλιέργεια μικροφύκους

Για τη διατήρηση καλλιεργειών αποθέματος του μικροφύκους ακολουθήθηκε η διαδικασία UTEX (συλλογή καλλιέργειας άλγερων στο πανεπιστήμιο του Texas Austin). Κάθε στέλεχος διατηρούνταν για τρεις γενιές, οι οποίες αναφέρονται ως κόρη, γονέας, πρόγονος (daughter, parent and grandparent cultures), σε υδατικό μέσο όγκου 50 mL, εντός αποστειρωμένων κωνικών φιαλών όγκου 100 mL, πωματισμένων με υδρόφοβο βαμβάκι, χωρίς ανάδευση σε ψυγείο με ελεγχόμενη σταθερή θερμοκρασία 20°C και με περίοδο φωτισμού 16 h φως – 8 h σκοτάδι. Ως πηγή φωτεινής ενέργειας χρησιμοποιήθηκαν λάμπες φθορισμού Philips TLD 865 18W, έντασης 75 μmol/m²*sec. Μία φορά κάθε 3 έως 4 εβδομάδες πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργειες σε καινούριες αποστειρωμένες κωνικές φιάλες με το εμβόλιο να είναι το 10% του όγκου του διαλύματος της νέας καλλιέργειας (5 mL).



Εικόνα 11: Ανακαλλιέργειες μικροφύκους *Nannochloropsis sp.*

5.1.5 Μέσο Ανάπτυξης

Το μικροφύκος *Nannochloropsis sp.* αναπτυσσόταν σε φυσικό θαλασσινό νερό, το οποίο είχε συλλεχθεί από την περιοχή της Ερέτριας του νομού Εύβοιας. Το νερό προκειμένου να χρησιμοποιηθεί διηθήθηκε εις διπλούν. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε διήθηση με διηθητικό χαρτί, προκειμένου να απομακρυνθούν τα μεγάλα στερεά και ακολούθησε διήθηση υπό κενό με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm , ώστε να απομακρυνθούν στερεά και μικροοργανισμοί μεγαλύτεροι των πόρων.

Στη συνέχεια, 1 L θαλασσινού νερού μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη των 2 L και έχοντας γίνει ρύθμιση του pH του στην τιμή 8.0 με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας Tris-HCl 0,05 M, ώστε να αποφευχθούν οι μεγάλες διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, καλύφθηκαν με πώματα από βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο στους 121°C για 20 min. Ξεχωριστά αποστειρωνόταν επίσης και κατάλληλη ποσότητα NaHCO_3 . Στο αποστειρωμένο θαλασσινό νερό γινόταν προσθήκη τροποποιημένου μέσου ανάπτυξης F/2-Si των Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975.

Το μέσο F/2-Si παρασκευάστηκε ως εξής:

Σε 1L θαλασσινού νερού γινόταν προσθήκη των ακόλουθων ποσοτήτων:

Συστατικό	Διάλυμα αποθέματος	Ποσότητα	Μοριακή συγκέντρωση στο τελικό μέσο
NaNO ₃	75 g/L dH ₂ O	1 mL	8.82 x 10 ⁻⁴ M
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	5 g/L dH ₂ O	1 mL	3.62 x 10 ⁻⁵ M
Διάλυμα ιχνοστοιχείων	Παρουσίαση συνταγής παρακάτω	1 mL	---
Διάλυμα βιταμινών	Παρουσίαση συνταγής παρακάτω	0.5 mL	---

Σε 1L milli-Q H₂O γινόταν προσθήκη των ακόλουθων ποσοτήτων:

Συστατικό	Διάλυμα αποθέματος	Ποσότητα	Μοριακή συγκέντρωση στο τελικό μέσο
FeCl ₃ ·6H ₂ O	---	3.15 g	1.17 x 10 ⁻⁵ M
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	---	4.36 g	1.17 x 10 ⁻⁵ M
CuSO ₄ ·5H ₂ O	9.8 g/L dH ₂ O	1 mL	3.93 x 10 ⁻⁸ M
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6.3 g/L dH ₂ O	1 mL	2.60 x 10 ⁻⁸ M
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22.0 g/L dH ₂ O	1 mL	7.65 x 10 ⁻⁸ M
CoCl ₂ ·6H ₂ O	10.0 g/L dH ₂ O	1 mL	4.20 x 10 ⁻⁸ M
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180.0 g/L dH ₂ O	1 mL	9.10 x 10 ⁻⁷ M

Σε 1L milli-Q H₂O γινόταν προσθήκη των ακόλουθων ποσοτήτων:

Συστατικό	Διάλυμα αποθέματος	Ποσότητα	Μοριακή συγκέντρωση στο τελικό μέσο
thiamine HCl (vit. B ₁)	---	200 mg	2.96×10^{-7} M
biotin (vit. H)	0.1 g/L dH ₂ O	10 mL	2.05×10^{-9} M
cyanocobalamin (vit. B ₁₂)	1.0 g/L dH ₂ O	1 mL	3.69×10^{-10} M

Σημείωση: Η αποστείρωση του διαλύματος των βιταμινών γινόταν με αποστειρωμένο φίλτρο και όχι στο αυτόκαυστο προς αποφυγήν καταστροφής των βιταμινών

5.1.6 Εμβολιασμός

Χρησιμοποιήθηκε αξενική αυτοτροφική καλλιέργεια *Nannochloropsis sp.* ηλικίας 7 ημερών, προκειμένου τα κύτταρα να βρίσκονται στην εκθετική τους φάση ανάπτυξης. Η ποσότητα του εμβολίου ήταν το 10% (100 mL) του τελικού όγκου της επιθυμητής καλλιέργειας (1000 mL). Πραγματοποιήθηκαν πέντε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις της πηγής του άνθρακα για 0.5 g, 1 g, 2 g, 3 g και 5 g NaHCO₃. Η διαδικασία αυτή λάμβανε χώρα σε ειδικά διαμορφωμένο και αποστειρωμένο περιβάλλον (hood). Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε φωτοβιοαντιδραστήρα με ήπια ανάδευση στα 130 rpm, προκειμένου να αποφευχθεί η δημιουργία συσσωματωμάτων καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης. Ο φωτισμός ήταν ρυθμισμένος στα 100 μmol/m²*sec και η θερμοκρασία διατηρούταν σταθερή στους 20°C. Ο κύκλος ανάπτυξης της κάθε καλλιέργειας διήρκεσε 15 ημέρες.



Εικόνα 12: Ειδικά διαμορφωμένο αποστειρωμένο περιβάλλον (αριστερή εικόνα) και επωαστήρας (δεξιά εικόνα)



Εικόνα 13: Καλλιέργειες του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* σε κωνικές φιάλες σε επωαστήρα

5.1.7 Προσδιορισμός κυτταρικής ανάπτυξης *Nannochloropsis sp.*

Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής ανάπτυξης στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της θολοσιμετρίας. Μετρήθηκε η απορρόφηση του κυτταρικού αιωρήματος σε φασματοφωτόμετρο S-22 UV/VIS Spectrophotometer της BOECO Germany, σε κυβελίδα 1 cm, στο μήκος κύματος των 750 nm. Η ληφθείσα απορρόφηση μετατράπηκε σε συγκέντρωση κυτταρικής μάζας (mg DCW/L) με χρήση της αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς. Στα δείγματα προηγήθηκε κατάλληλη αραιώση έτσι ώστε η απορρόφηση να είναι πάντα μικρότερη του 0,5. Η εξίσωση μέσω της οποίας υπολογίζεται η συγκέντρωση της ξηρής κυτταρικής μάζας είναι:

$$C \text{ (mg/L)} = 227,08 \cdot A_{750}$$

5.1.8 Προσδιορισμός βιομάζας

Δείγματα όγκου 30 mL καλλιέργειας διηθήθηκαν υπό κενό σε προζυγισμένα φίλτρα διαμέτρου πόρων 0,45 μm και γινόταν έκπλυση της βιομάζας με dH₂O, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν άλατα. Στη συνέχεια, το φίλτρο με τη βιομάζα τοποθετούνταν στη συσκευή λυοφιλίωσης για 24 ώρες (overnight), ώστε να απομακρυνθεί κάθε ίχνος υγρασίας. Τέλος, το φίλτρο παρέμενε για 10 λεπτά σε ξηραντήρα, ώστε να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα λαμβανόταν το βάρος του σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας.



Εικόνα 14: Συσκευή λυοφιλίωσης και θάλαμος κενού της συσκευής

5.1.9. Προσδιορισμός περιεχομένης χλωροφύλλης

Λαμβανόταν δείγμα 2 mL κάθε τρεις μέρες από τις καλλιέργειες και φυγοκεντρούταν για 10 min στα 3000 rpm. Στη συνέχεια, γινόταν απόχυση του υπερκείμενου και τα κύτταρα επαναιωρούνταν σε 2 mL αποσταγμένου νερού, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν άλατα. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε άλλες δύο φορές. Έπειτα, τα κύτταρα επαναιωρούνταν σε 2 mL μεθανόλης και πραγματοποιούνταν έντονη ανάδευση σε vortex για 15 sec. Τα κύτταρα παρέμεναν για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος φυγοκεντρούταν για 5 min στα 4000 rpm. Η απορρόφηση του υπερκείμενου μετρούταν σε μήκος κύματος 665 nm και με τη βοήθεια της εμπειρικής συσχέτισης κατά Mackiney υπολογιζόταν η συγκέντρωση της χλωροφύλλης ως εξής:

$$\mu\text{g χλωροφύλλης/mL καλλιέργειας} = (13,43 A_{665}^* v) / (l V)$$

όπου:

$A_{665}^* = A_{665} - A_{750}$, έπειτα από την αφαίρεση της απορρόφησης του δείγματος σε μήκος κύματος 750 nm, έναντι ενός τυφλού με διαλύτη (μεθανόλη)

v = είναι ο όγκος του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε (2 mL)

l = το μήκος της κυψελίδας (1 cm)

V = ο όγκος του δείγματος (2 mL)

5.1.10. Προσδιορισμός πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Lowry (Lowry et al., 1951), ως εξής:

Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα απαιτούμενα διαλύματα της μεθόδου:

- A: 1% w/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- B: 2% w/v sodium potassium tartrate
- C: 0,2M NaOH
- D: 4% w/v sodium carbonate
- F: 10 mL Folin + 10 mL H_2O

Από τα παραπάνω διαλύματα παρασκευαζόταν κάθε φορά ένα νέο διάλυμα, το E, ως εξής:

- E: 49 mL C + 49 mL D + 1 mL A + 1 mL B

Το τελικό διάλυμα E παρασκευαζόταν σε κάθε πείραμα (φρέσκο διάλυμα), ώστε να αποφευχθούν τυχόν αλλοιώσεις.

Μετά την ολοκλήρωση της παρασκευής των παραπάνω διαλυμάτων γινόταν ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry, αφού όμως πρώτα είχε προηγηθεί καταβύθιση των πρωτεϊνών με NaOH ως εξής:

- Δείγμα 10 mL καλλιέργειας φυγοκεντρούταν για 15 min και στη συνέχεια γινόταν απόχυση του υπερκείμενου υγρού, επαναιώρηση του pellet σε 2 mL NaOH (2N) και τοποθέτησή του σε γυάλινο vial. Τα vials αποστειρώνονταν σε αυτόκλειστο στους 100°C για 1 ώρα και ακολουθούσε εκ νέου φυγοκέντρηση.

Το υπερκείμενο χρησιμοποιούταν για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry ως εξής:

- Λαμβανόταν 0,5 mL δείγμα από το υπερκείμενο υγρό
- Αναμιγνυόταν με 2,5 mL διαλύματος E με χρήση έντονης ανάδευσης vortex.
- Το νέο αυτό διάλυμα παρέμενε σε ηρεμία για 10 min.
- Έπειτα, γινόταν προσθήκη 0,25 mL από το διάλυμα F και έντονη ανάδευση vortex
- Το νέο διάλυμα παρέμενε σε ηρεμία για 30 min
- Τέλος, το δείγμα φωτομετρούταν στα 750 nm.

Η εξίσωση μέσω της οποίας προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του δείγματος είναι η εξής:

$$\mu\text{g}_{\text{proteins}}/\text{mL}_{\text{δείγματος}} = 0,5671 * A_{750\text{nm}}$$



Εικόνα 15: Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry

5.1.11. Προσδιορισμός λιπαρών

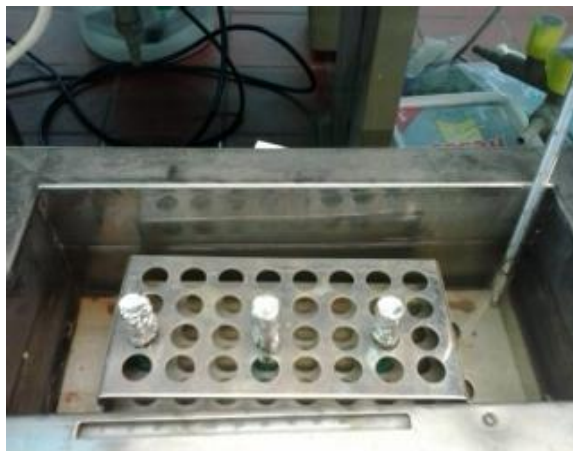
Ο προσδιορισμός των λιπαρών σε κάθε δειγματοληψία γινόταν ως εξής:

Αρχικά, γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνταν σε φούρνο ξήρανσης θερμοκρασίας 120°C, όπου και παρέμεναν για τουλάχιστον 2 ώρες, ώστε να απομακρυνθεί όποια τυχόν υγρασία. Στη συνέχεια, μεταφέρονταν σε ξηραντήρα silica gel για περίπου 30 λεπτά, ώστε να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου και να σταθεροποιηθεί το βάρος τους. Ακολούθως, ζυγίζονταν σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας και καταγραφόταν το αρχικό τους βάρος (W_{tube1}).

Σημείωση: *Η όποια επαφή με τους δοκιμαστικούς σωλήνες κάθε φορά γινόταν με τη χρήση γαντιών, ώστε να μην μεταφέρεται σε αυτούς λιπαρότητα ή/και υγρασία από την επιφάνεια των χεριών μας.*

Στη συνέχεια, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούταν με τη χρήση τσιμπίδας φιλτράκι, που είχε τοποθετηθεί νωρίτερα στη λυοφιλίωση για τον προσδιορισμό της βιομάζας. Ο κάθε δοκιμαστικός σωλήνας γέμιζε με υγρό εξάνιο, έως να καλύπτεται πλήρως το περιεχόμενο φιλτράκι, καλυπτόταν με αλουμινόχαρτο και τοποθετούταν σε υδατόλουτρο στους 69°C, που είναι η θερμοκρασία βρασμού του εξανίου, για 4 ώρες.

Γινόταν προσθήκη υγρού εξανίου στους δοκιμαστικούς σωλήνες ανά τακτά χρονικά διαστήματα, όταν εκείνο είχε εξατμιστεί πριν το πέρας των 4 ωρών.



Εικόνα 16: Εκχύλιση λιπαρών σε υδατόλουτρο

Μετά το πέρας του 4ώρου, αφαιρούταν το φιλτράκι με χρήση τσιμπίδας και οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνταν σε φούρνο ξήρανσης θερμοκρασίας 120°C για τουλάχιστον 5 ώρες, ώστε να εξατμιστεί κάθε ίχνος εξανίου ή/και υγρασίας. Έπειτα, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνταν ξηραντήρα silica gel για περίπου 30 λεπτά, όπως και στην αρχή του πειράματος και τέλος, ζυγίζόταν εκ νέου το τελικό τους βάρος (W_{tube2}).



Εικόνα 17: Παραλαβή λιπαρών μετά την εξάτμιση του διαλύτη εκχύλισης

Από τη διαφορά των δύο μετρήσεων βάρους γινόταν και ο προσδιορισμός των ολικών λιπαρών του στελέχους, δηλαδή:

$$\text{g lipids/30 mL} = (W_{\text{tube2}}) - (W_{\text{tube1}})$$

5.1.12. Προσδιορισμός Γλυκόζης – Αμύλου με χρήση ειδικού εμπορικού σκευάσματος

Προκειμένου να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε γλυκόζη και άμυλο, τα δείγματα που λαμβάνονταν απευθείας από την καλλιέργεια υποβάλλονταν αρχικά σε μια διαδικασία «παγώματος» του μεταβολισμού, ως εξής:

- Λαμβανόταν δείγμα όγκου 50 mL από την καλλιέργεια, στο οποίο γινόταν διήθηση υπό κενό με φίλτρακι πόρων διαμέτρου 0,45 μm. Τα κύτταρα ξεπλένονταν με 10 mL NaCl 0,9% και μαζεύονταν με σπαθίδα σε vial. Έπειτα, γινόταν προσθήκη 2,5 mL διαλύματος MeOH – H₂O συγκέντρωσης 50% v/v, το οποίο φυλασσόταν στους -30°C και τέλος, τα vials τοποθετούνταν στους -80°C. Η παραπάνω διαδικασία λάμβανε χώρα σε cold room.

Τα δείγματα προκειμένου να επεξεργαστούν μετέπειτα καταλλήλως για τον προσδιορισμό του αμύλου και της γλυκόζης χρειάστηκε να υποβληθούν σε 3 κύκλους ψύξης απόψυξης, ως εξής:

- Η απόψυξη των δειγμάτων γινόταν σε παγόλουτρο, ακολουθούσε έντονη ανάδευση σε vortex για 1 min και στη συνέχεια πάγωμα στους -80°C. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβανόταν για ακόμα 2 φορές. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνταν για 15 min στους -20°C και στα 12000 – 13000 rpm και το υπερκείμενο μεταφερόταν ποσοτικά σε προζυγισμένο μικρό γυάλινο ποτηράκι. Η κυτταρική μάζα καταβυθιζόταν ως ίζημα και επαναιωρούταν σε 2,5 mL διαλύματος MeOH – H₂O (50% v/v), εφαρμόζοντας έντονη ανάδευση για 30 sec. Ακολουθούσε εκ νέου φυγοκέντριση για 15 min στους -20°C και στα 12000 – 13000 rpm και το υπερκείμενο μεταφερόταν ποσοτικά στους -80°C, όπου γινόταν ένωση με το προηγούμενο υπερκείμενο. Εφόσον, το υπερκείμενο είχε παγώσει, τοποθετούνταν μετέπειτα στη συσκευή λυοφιλίωσης για 24 ώρες, ενώ η κυτταρική μάζα (pellet) φυλασσόταν στους -20°C.

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης έγινε με τη χρήση kit D – GLUCOSE – HK Megazyme (Assay Procedure), όπως περιγράφεται παρακάτω:

- Ποσότητα 100 λ από το υπερκείμενο, που προέκυψε με τη διαδικασία της απόψυξης των δειγμάτων παραπάνω, τοποθετήθηκαν σε erendorf και επωάστηκαν στους 90 – 95°C για 10 min, έτσι ώστε να αδρανοποιηθεί η δραστηριότητα του ενζύμου.

Έπειτα, τα erendorf φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 3000 rpm και τέλος, έγινε φωτομέτρηση μέσω microplate assay, όπως επακριβώς αναφέρει το kit.

Ο προσδιορισμός του αμύλου έγινε με τη χρήση του kit TOTAL STARCH Megazyme (Assay Procedure), όπως περιγράφεται παρακάτω:

· Ποσότητα 100 mg δείγματος (pellet) μεταφέρθηκαν σε ependorf και προστέθηκαν 5 mL aqueous ethanol 80% v/v. Το δείγμα επώαστηκε στους 80-85°C για 5 λεπτά και αμέσως αναδεύτηκε με τη βοήθεια vortex και προστέθηκε ξανά η ίδια ποσότητα αιθανόλης (80%). Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 3000 rpm και έγινε απόχυση του υπερκείμενου. Έπειτα, το pellet επαναιωρήθηκε σε 10 mL αιθανόλης (80%), αναδεύτηκε με vortex και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου για 10 min στις 3000 rpm.

Έγινε απόχυση του υπερκείμενου και στο pellet προστέθηκαν 2 mL KOH (2M) παραμένοντας σε παγόλουτρο για 20 min ανακινώντας τα δείγματα τακτικά. Προστέθηκαν 8 mL sodium acetate buffer (1.2M) pH 3,8. Αμέσως, προστέθηκαν 0,1 mL a-amylase (bottle 1) και 0,1 mL AMG (bottle 2), ανακατεύθηκαν καλά και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 50°C για 30 min, όπου ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν ανάδευση. Τέλος, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 3000 rpm και το υπερκείμενο φωτομετρήθηκε στο microplate (assay), όπως αναφέρει το πρωτόκολλο.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Εισαγωγή - Σκοπός

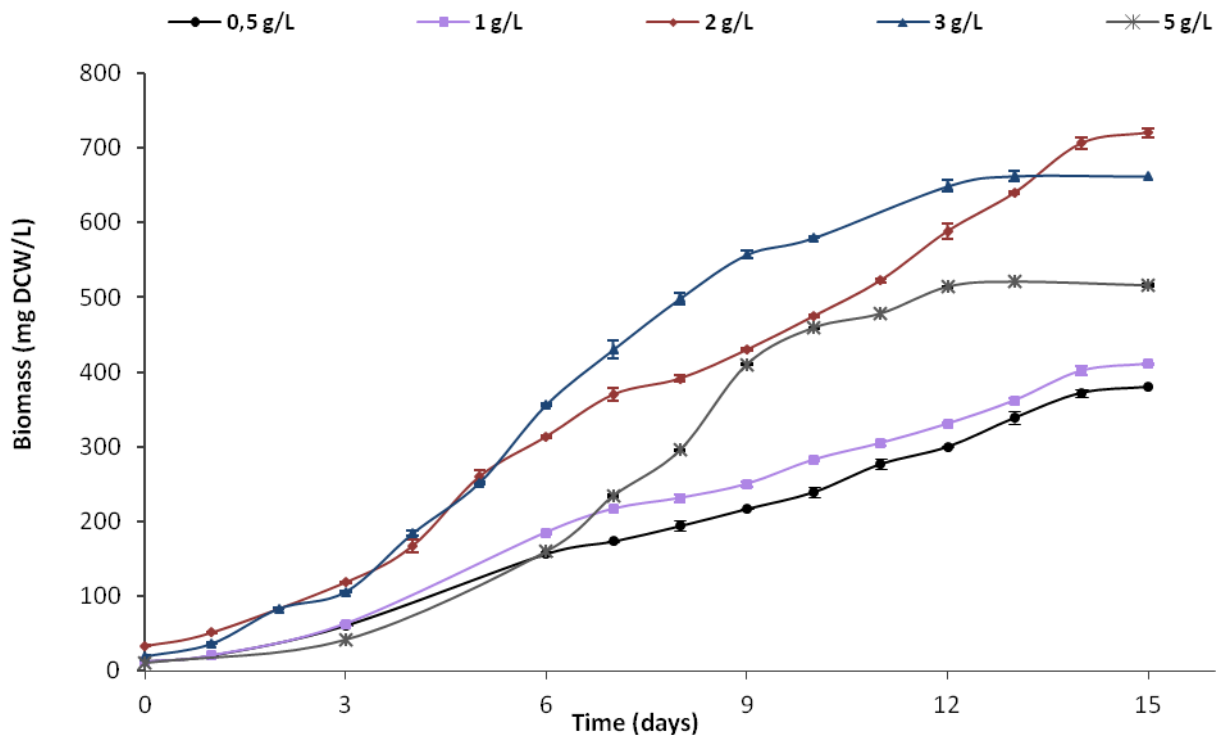
Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* για 15 ημέρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις της πηγής άνθρακα (NaHCO_3). Πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες του 1 L σε κωνικές φιάλες σε φωτοβιοαντιδραστήρα, στις εξής διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3 : 0,5 g/L, 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L και 5 g/L. Σε όλη τη διάρκεια ανάπτυξης του μικροφύκου, οι υπόλοιπες παράμετροι, δηλαδή ένταση φωτός, θερμοκρασία, και pH διατηρήθηκαν σταθερές με τιμές $100 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$, 8.00, αντίστοιχα, ενώ εφαρμόστηκε μια ήπια ανάδευση στις καλλιέργειες (130 rpm) σταθερά καθ' όλη την διάρκεια της επώασης. Έτσι, προσδιορίστηκε η παραγωγή της βιομάζας, η περιεκτικότητα σε λιπίδια, το περιεχόμενο σε χλωροφύλλη, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, καθώς και η περιεκτικότητα σε γλυκόζη και άμυλο, για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της πηγής άνθρακα.

Σημείωση: Προκειμένου τα σφάλματα να ελαχιστοποιηθούν και τα πειράματα να έχουν μεγαλύτερη αξιοπιστία, όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν δυο φορές και στα αποτελέσματα παρουσιάζεται ο μέσος όρος των δύο. Σε όλα τα διαγράμματα που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων αποτυπώνεται η τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

2. Προσδιορισμός βιομάζας του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3

Για τη μελέτη της επίδρασης της πηγής άνθρακα στην παραγωγή της βιομάζας του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.*, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες ημερησίως για κάθε καλλιέργεια σε διάστημα 15 ημερών. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές για κάθε καλλιέργεια για λόγους επαναληψιμότητας.

Στο παρακάτω διάγραμμα, παρουσιάζονται οι καμπύλες παραγωγής βιομάζας για τις πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3 συναρτήσει του χρόνου.



Διάγραμμα 1: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3 , ως πηγή άνθρακα

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1, η ανάπτυξη του μικροφύκου ακολούθησε αρχικά λανθάνουσα φάση για τις 2-3 πρώτες μέρες και στη συνέχεια εκθετική μορφή με ταχύ ρυθμό μέχρι την 6^η ημέρα. Στις καλλιέργειες με συγκέντρωση NaHCO_3 0,5 g/L, 1 g/L και 2 g/L, η ανάπτυξη συνεχίστηκε έως και τη 12^η ημέρα και έπειτα παρατηρείται φάση στασιμότητας, ενώ για τις καλλιέργειες με συγκέντρωση NaHCO_3 3 g/L και 5 g/L η φάση στασιμότητας παρατηρείται νωρίτερα.

Με την αύξηση της συγκέντρωσης του NaHCO_3 , παρατηρείται πως ελαχιστοποιείται η αρχική φάση της υστέρησης, με αποτέλεσμα την άμεση εκθετική αύξηση του μικροφύκου, γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί και βιβλιογραφικά (Chiu et al., 2008).

Τη μέγιστη τιμή βιομάζας σε σχέση με τις υπόλοιπες καλλιέργειες την 15^η ημέρα, παρουσίασε η καλλιέργεια με συγκέντρωση 2 g/L NaHCO₃ και η τιμή αυτής ήταν περίπου 721 mgDCW/L. Η αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας από 0,5 g/L σε 2 g/L NaHCO₃ είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση στη συσσώρευση βιομάζας σε ποσοστό που ανέρχεται στο 89,5%.

Παρόλο που η καλλιέργεια με συγκέντρωση 3 g/L NaHCO₃, παρουσίασε ταχύτερη ανάπτυξη καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης εν συγκρίσει με εκείνη της συγκέντρωσης των 2 g/L NaHCO₃, τη 15^η ημέρα η τιμή της βιομάζας της παρέμεινε μικρότερη από την προαναφερθείσα μέγιστη τιμή, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζει μεγάλη απόκλιση (662,52 mgDCW/L).

Οι καλλιέργειες με συγκεντρώσεις 0,5 g/L και 1 g/L NaHCO₃, σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, αναπτύσσονται ομοiotρόπως, με την καλλιέργεια του 1 g/L να προηγείται αναφορικά με την παραγωγή βιομάζας ελάχιστα από την 6^η ημέρα και έπειτα.

Όπως αναφέρθηκε και στη θεωρία παραπάνω, η παροχή υψηλών συγκεντρώσεων της πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας οδηγεί σε αύξηση της οξύτητας, ενώ η κατανάλωση του άνθρακα από τα μικροφύκη μέσω της φωτοσύνθεσης, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του pH, και οι επακόλουθες αλλαγές μπορεί να επηρεάσουν τα ποσοστά αύξησης της βιομάζας των μικροφυκών κάποιων ειδών (Raeesossadati et al., 2014). Αυτή η διαπίστωση πιθανό να εξηγεί το γεγονός πως η καλλιέργεια του μικροφύκου με συγκέντρωση 5 g/L NaHCO₃, έχει μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με αυτές των 2 g/L και 3 g/L. Έτσι, η αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας από 0,5 g/L σε 5 g/L NaHCO₃ είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση στη συσσώρευση βιομάζας σε ποσοστό που ανέρχεται μόλις στο 35,6%, ποσοστό αρκετά χαμηλό αν συγκριθεί με εκείνο των 89,5% της καλλιέργειας με τη συγκέντρωση των 2 g/L NaHCO₃.

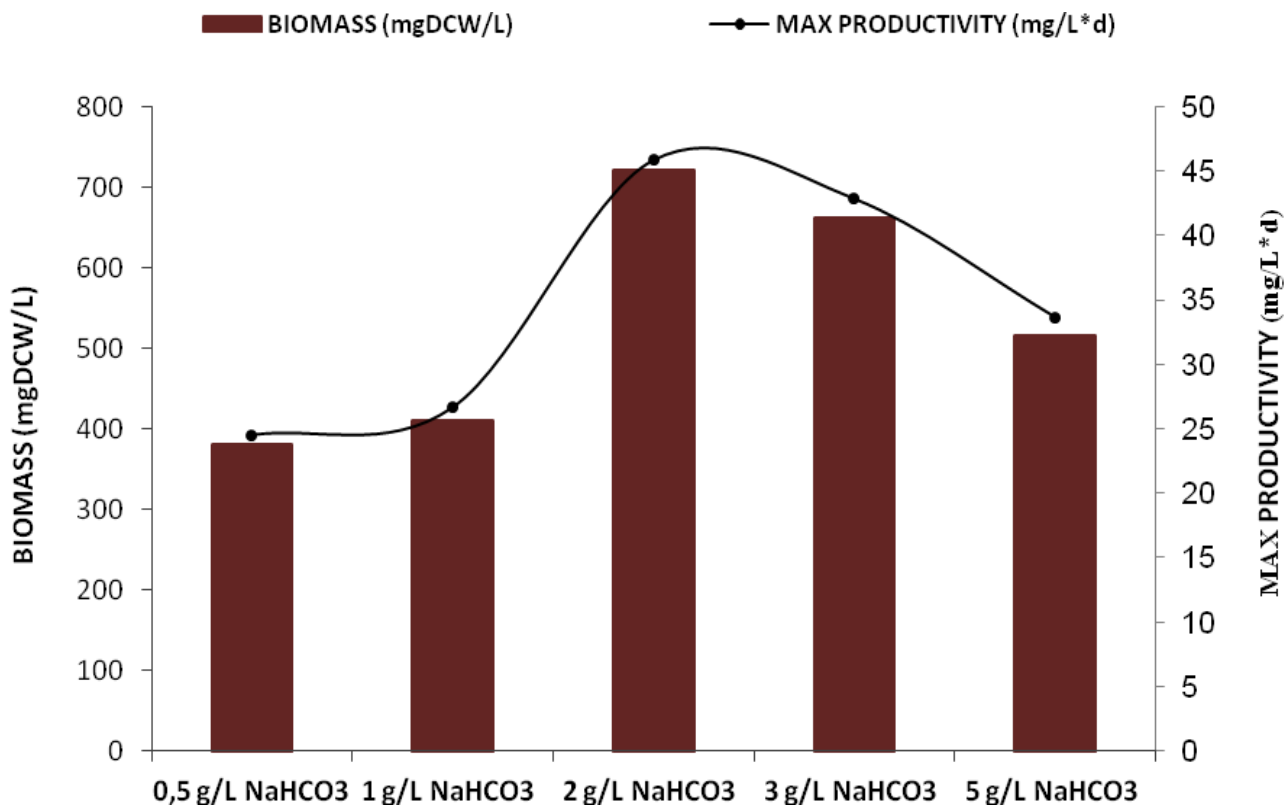
Παρόμοια αποτελέσματα παρατήρησαν και οι White et al. (2012), όπου μελετώντας την ανάπτυξη του μικροφύκου *N. Salina* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της πηγής άνθρακα, διαπιστώθηκε αύξηση αυτής μέχρι μιας συγκεκριμένης τιμής συγκέντρωσης διττανθρακικού νατρίου, ενώ με περαιτέρω αύξησή της σημειώθηκε μείωση.

Ο παρακάτω πίνακας απεικονίζει την τιμή συγκέντρωσης της βιομάζας (mgDCW/L) την 15^η ημέρα καλλιέργειας του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO₃

Πίνακας 7: Τιμή συγκέντρωσης της βιομάζας (mgDCW/L) την 15^η ημέρα καλλιέργειας του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO₃

Συγκέντρωση NaHCO₃ (g/L)	Τιμή συγκέντρωσης βιομάζας (mgDCW/L) την 15^η ημέρα
0,5	380,36
1	410,67
2	720,75
3	662,52
5	515,93

Επιπλέον, υπολογίστηκε η παραγωγικότητα της βιομάζας ($\text{mg/L}\cdot\text{d}$) για τις προαναφερθείσες καλλιέργειες με τη διαφορετική συγκέντρωση άνθρακα και απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα.



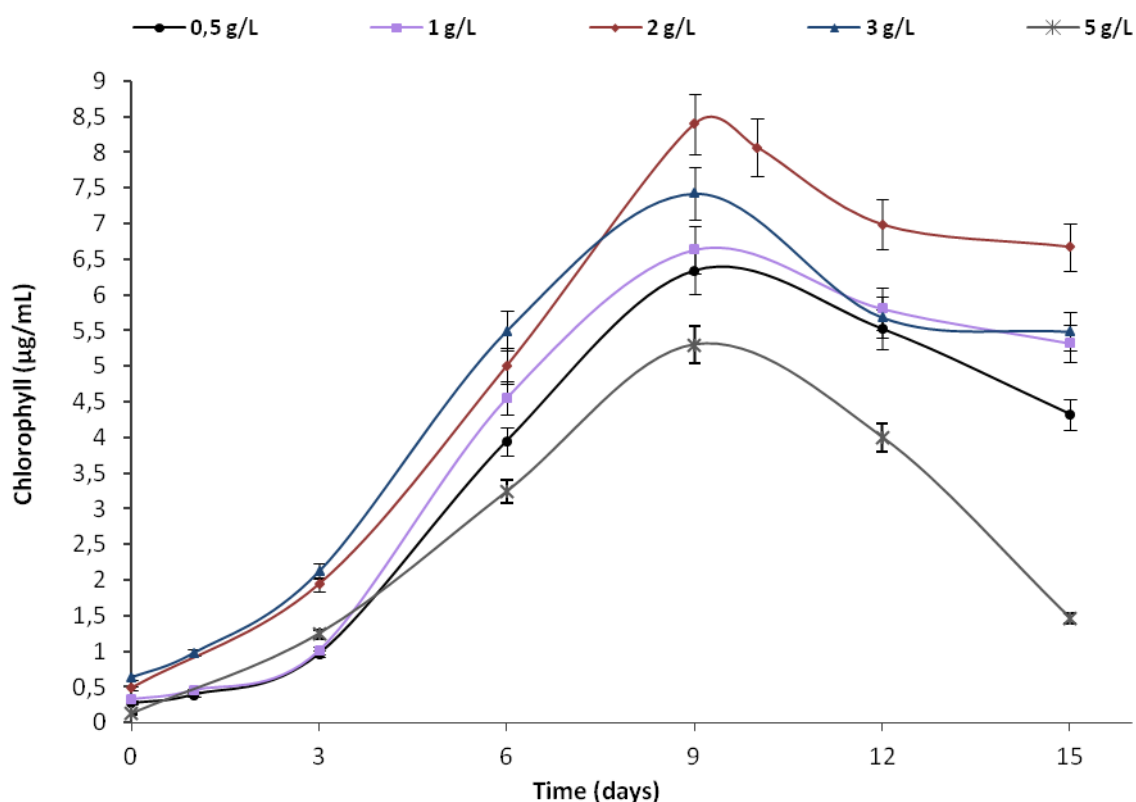
Διάγραμμα 2: Παραγωγικότητα βιομάζας ($\text{mg/L}\cdot\text{d}$) σε σύγκριση με τη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης βιομάζας (mgDCWL^{-1}) για την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3

Η μέγιστη τιμή παραγωγικότητας αντιστοιχεί σε $45,84 \text{ mg/L}\cdot\text{d}$ και εμφανίζεται στην καλλιέργεια με τα 2 g/L NaHCO_3 , ενώ οι υπόλοιπες κυμαίνονται μεταξύ $24,5\text{-}34 \text{ mg/L}\cdot\text{d}$. Η αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας από $0,5 \text{ g/L}$ σε 2 g/L NaHCO_3 επέφερε και μια αύξηση στην παραγωγικότητα της βιομάζας κατά $87,1\%$.

3. Προσδιορισμός της περιεχόμενης χλωροφύλλης του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3

Για τη μελέτη της επίδρασης της πηγής άνθρακα στην περιεχόμενη χλωροφύλλη στο μικροφύκος *Nannochloropsis sp.*, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες κάθε τρεις ημέρες για κάθε καλλιέργεια σε διάστημα 15 ημερών. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές για κάθε καλλιέργεια για λόγους επαναληψιμότητας.

Στο παρακάτω διάγραμμα, παρουσιάζονται οι καμπύλες συγκέντρωσης χλωροφύλλης για τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3 συναρτήσει του χρόνου.



Διάγραμμα 3: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης χλωροφύλλης (µg/mL) κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3 , ως πηγή άνθρακα

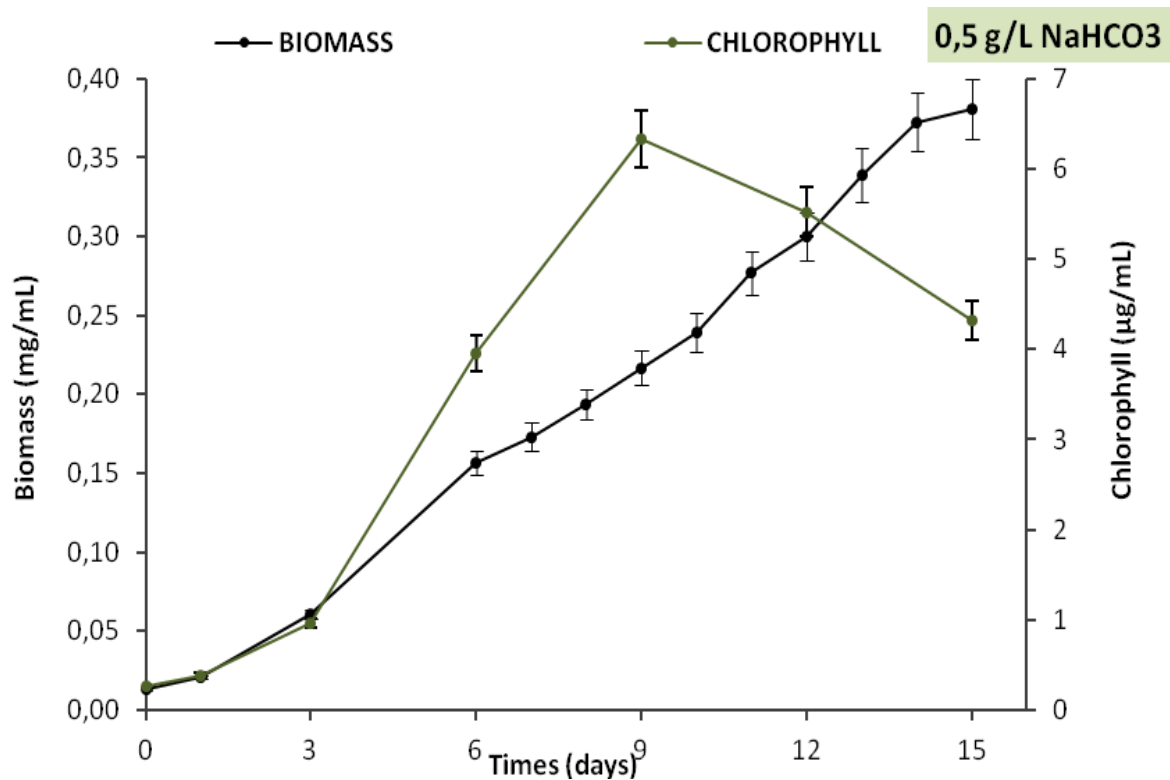
Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3, μελετήθηκε η περιεχόμενη χλωροφύλλη για όλες τις καλλιέργειες διαφορετικών συγκεντρώσεων άνθρακα σε διάστημα 15 ημερών. Παρατηρείται πως υπάρχει ομοιότροπη μεταβολή της συγκέντρωσης χλωροφύλλης σε όλες τις καλλιέργειες, και μάλιστα αυτές παρουσιάζουν μέγιστη τιμή χλωροφύλλης την 9^η ημέρα. Συγκεκριμένα, η καλλιέργεια με συγκέντρωση 2 g/L NaHCO₃ παρουσιάζει την 9^η ημέρα την υψηλότερη τιμή συγκέντρωσης χλωροφύλλης, συγκριτικά με τις υπόλοιπες καλλιέργειες, με τιμή 8,4 μg/mL.

Παρατηρείται επίσης, ότι η καλλιέργεια με την υψηλότερη συγκέντρωση NaHCO₃ (5 g/L) παρουσίασε τόσο τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις χλωροφύλλης καθ' όλη τη διάρκεια καλλιέργειάς της σε σύγκριση με τις υπόλοιπες, όσο και τη μικρότερη μέγιστη τιμή για την 9^η ημέρα, φτάνοντας στα 5,3 μg/mL χλωροφύλλης.

Τέλος, για όλες τις καλλιέργειες ισχύει ότι μετά το πέρας της 9^{ης} ημέρας η συγκέντρωση της χλωροφύλλης μειώθηκε σημαντικά μέχρι και τη 15^η ημέρα. Αυτή η μείωση, πιθανόν να οφείλεται στην απουσία άνθρακα λόγω της μη σύνθεσης μορίων που περιέχουν άνθρακα (Forjan et al., 2007). Διαπιστώνεται ότι τα κύτταρα συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες μορίων χλωροφύλλης όταν η πηγή άνθρακα είναι διαθέσιμη σε αφθονία. Συνεπώς, όταν η εξωτερική πηγή άνθρακα εξαντληθεί, τα κύτταρα αρχίζουν να χρησιμοποιούν τις χλωροφύλλες τους ως διαθέσιμη πηγή άνθρακα. Εξάλλου σύμφωνα και με τους White et al. (2012), αύξηση στη φωτοσυνθετική αποδοτικότητα μπορεί να υποδηλώνει αυξημένη καθήλωση του άνθρακα, πιθανώς λόγω της αυξημένης διαθεσιμότητας του ανόργανου άνθρακα και μεταβολικής ζήτησης.

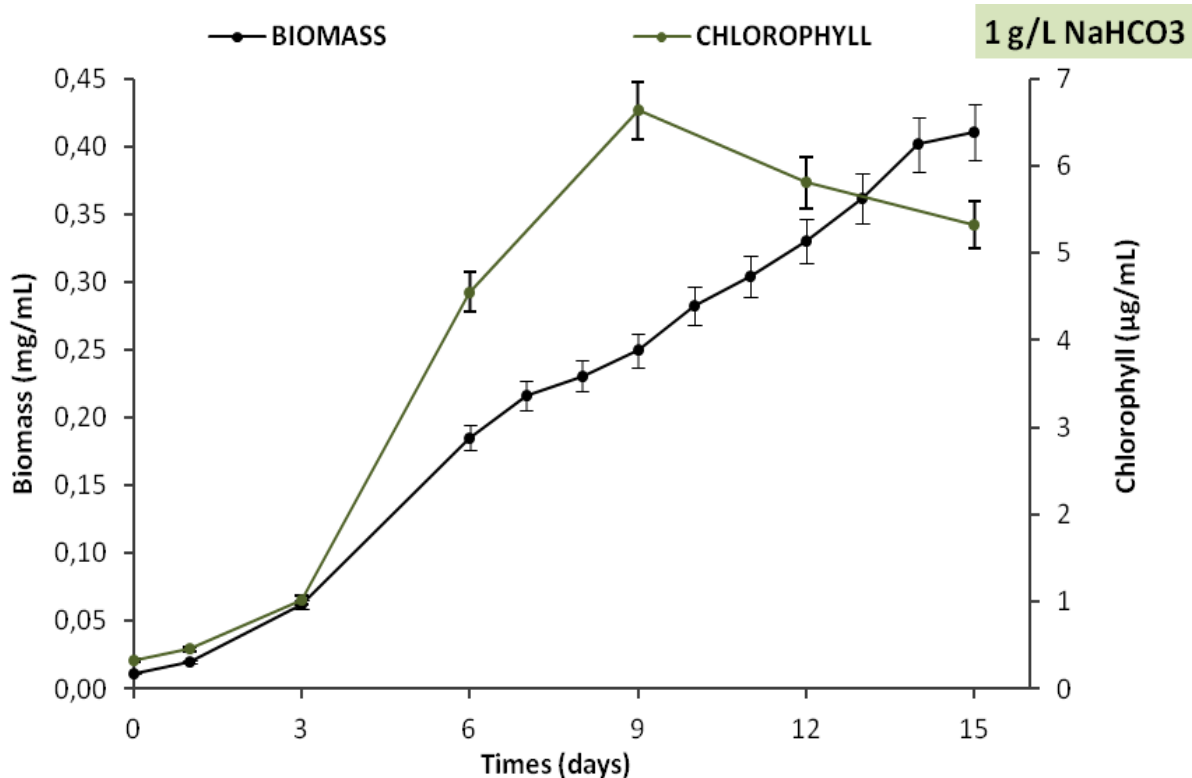
Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα διαγράμματα της χρονικής μεταβολής της βιομάζας του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* συγκριτικά με το περιεχόμενο σε χλωροφύλλη για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO₃.

Η σχέση μεταξύ της περιεχόμενης χλωροφύλλης και της ποσότητας της βιομάζας των μικροφυκών είναι αρκετά άμεση και η ποσοτικοποίηση της χλωροφύλλης-α είναι ευκολότερη από την ποσοτικοποίηση της βιομάζας (Henriques et al., 2010).



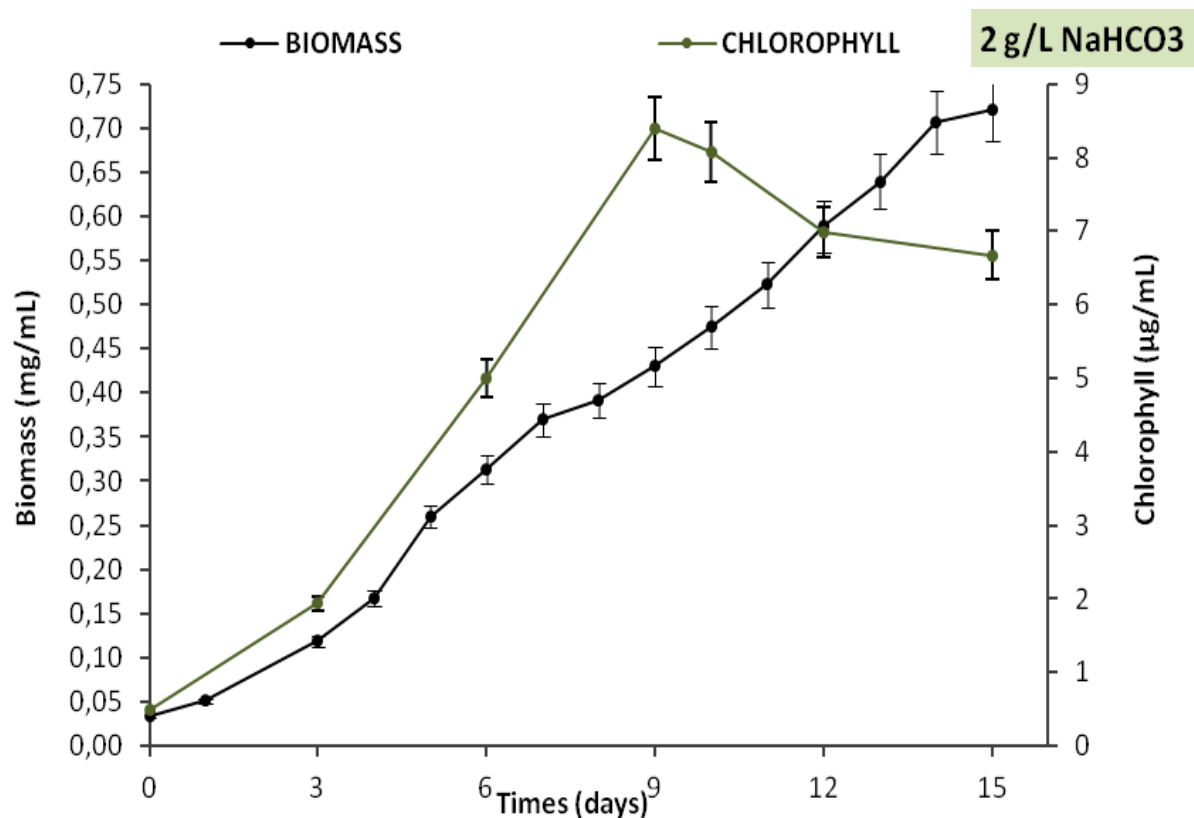
Διάγραμμα 4: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με 0,5 g/L NaHCO₃

Παρατηρείται πως μέχρι και την 3^η ημέρα στην καλλιέργεια με τη μικρότερη συγκέντρωση NaHCO₃ στο μέσο καλλιέργειας (0,5 g/L), η κινητική εξέλιξης της χλωροφύλλης ταυτίζεται με εκείνη της βιομάζας. Κατά τη διάρκεια 3^{ης} και 9^{ης} ημέρας η συγκέντρωση της χλωροφύλλης αυξήθηκε, λαμβάνοντας την 9^η ημέρα τη μέγιστη τιμή των 6,34 µg/mL. Τις τελευταίες ημέρες καλλιέργειας η συγκέντρωση της χλωροφύλλης σημείωσε συνεχή μείωση, λαμβάνοντας τη 15^η ημέρα την τιμή συγκέντρωσης 4,32 µg/mL.



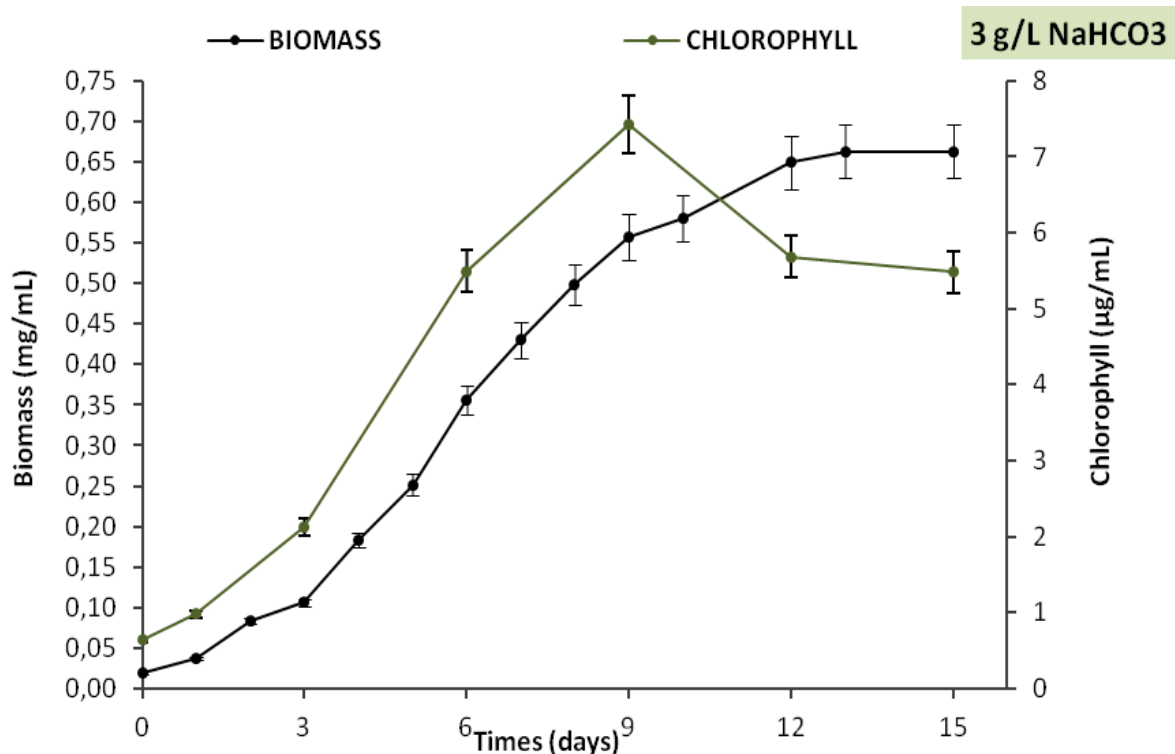
Διάγραμμα 5: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με 1 g/L NaHCO₃

Η καλλιέργεια με συγκέντρωση 1 g/L NaHCO₃ στο μέσο καλλιέργειας, παρουσίασε τη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης της χλωροφύλλης την 9^η ημέρα καλλιέργειας με τιμή συγκέντρωσης 6,63 µg/mL. Τις τελευταίες ημέρες καλλιέργειας η συγκέντρωση της χλωροφύλλης μειώθηκε λαμβάνοντας τη χαμηλότερη τιμή των 5,32 µg/mL την 15^η ημέρα.



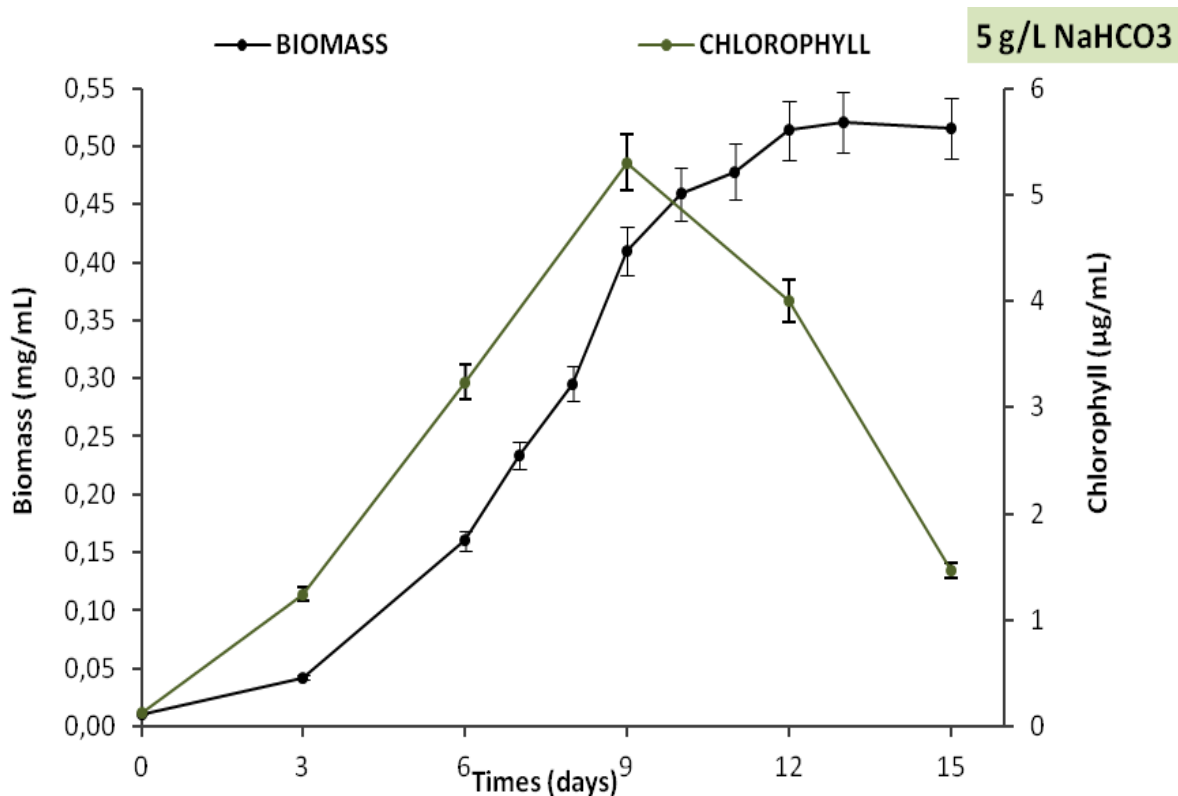
Διάγραμμα 6: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με 2 g/L NaHCO₃

Η καλλιέργεια με τη συγκέντρωση των 2 g/L NaHCO₃ στο μέσο καλλιέργειας, ήταν και αυτή που παρουσίασε τη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης χλωροφύλλης (8,4 µg/mL) συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες την 9^η ημέρα καλλιέργειας. Μέχρι και την 6^η ημέρα η κινητική εξέλιξης της χλωροφύλλης φάνηκε να πλησίαζε αρκετά εκείνη της βιομάζας. Κατά τη διάρκεια 6^{ης} και 9^{ης} ημέρας η συγκέντρωση της χλωροφύλλης αυξήθηκε σημαντικά σε ποσοστό που ανέρχεται στο 67,8%. Τις τελευταίες ημέρες καλλιέργειας, η συγκέντρωση χλωροφύλλης παρέμεινε πρακτικά σταθερή με τιμή 6,7 µg/mL.



Διάγραμμα 7: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με 3 g/L NaHCO₃

Η κινητική εξέλιξης της χλωροφύλλης φάνηκε να πλησίασε αρκετά εκείνη της βιομάζας μέχρι και την 9^η ημέρα στην καλλιέργεια με συγκέντρωση 3 g/L NaHCO₃ στο μέσο καλλιέργειας. Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης αυξήθηκε σημαντικά, λαμβάνοντας την 9^η ημέρα τη μέγιστη τιμή των 7,43 µg/mL. Από την 9^η έως και τη 12^η ημέρα η συγκέντρωση της χλωροφύλλης μειώθηκε κατά 23,4%. Ωστόσο, τις τελευταίες ημέρες καλλιέργειας διατηρήθηκε σχεδόν σταθερή η συγκέντρωση χλωροφύλλης σε περίπου 5,5 µg/mL.



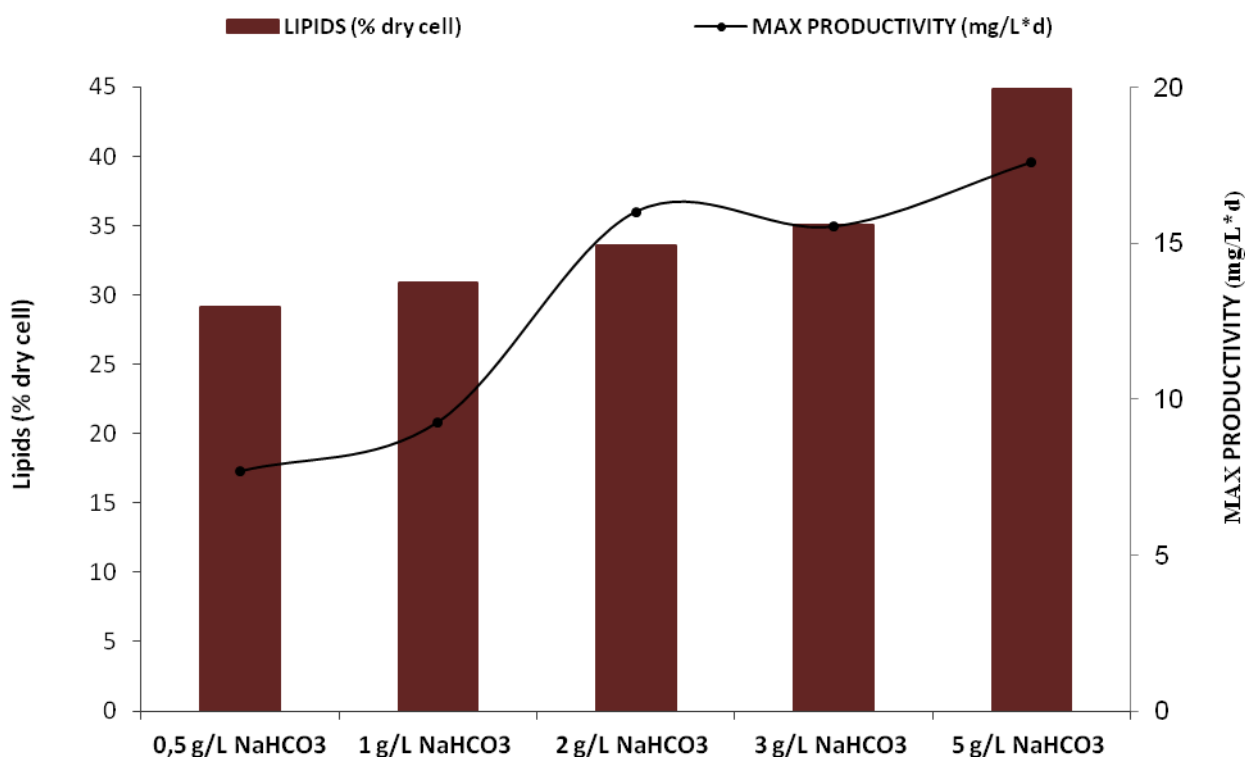
Διάγραμμα 8: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με 5 g/L NaHCO₃

Παρατηρείται πως μέχρι και την 9^η ημέρα στην καλλιέργεια με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση NaHCO₃ στο μέσο καλλιέργειας (5 g/L), η κινητική εξέλιξης της χλωροφύλλης ταυτίζεται με εκείνη της βιομάζας. Σημειώνεται απότομη αύξηση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης στο διάστημα αυτό, λαμβάνοντας τη μέγιστη τιμή των 5,3 µg/L την 9^η ημέρα καλλιέργειας. Εξίσου απότομα μειώθηκε η συγκέντρωση της χλωροφύλλης τις τελευταίες μέρες. Μάλιστα, η τιμή της την 15^η ημέρα μειώθηκε σε 1,46 µg/L, δηλαδή μειώθηκε σε ποσοστό 72,4% σε σχέση με την τιμή της 9^{ης} ημέρας.

4. Προσδιορισμός λιπαρών του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3 .

Για τη μελέτη της επίδρασης της πηγής άνθρακα στον προσδιορισμό των λιπαρών του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.*, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες κάθε τρεις ημέρες για κάθε καλλιέργεια σε διάστημα 15 ημερών. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές για κάθε καλλιέργεια για λόγους επαναληψιμότητας.

Στο παρακάτω διάγραμμα, παρουσιάζεται το ποσοστό περιεχομένου σε λιπίδια % (επί της ξηρής βιομάζας) την 15^η ημέρα ανάπτυξης, αλλά και η μέγιστη τιμή της παραγωγικότητας των λιπιδίων ($\text{mg/L}\cdot\text{d}$) για τις πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3 .



Διάγραμμα 9: Περιεχόμενο λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) την 15^η ημέρα ανάπτυξης και μέγιστη τιμή παραγωγικότητας λιπιδίων ($\text{mg/L}\cdot\text{d}$) κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3 , ως πηγή άνθρακα

Στο Διάγραμμα 9, παρουσιάζεται η περιεκτικότητα των λιπιδίων (% ποσοστό επί ξηρού βάρους) για όλες τις καλλιέργειες διαφορετικών συγκεντρώσεων τη 15^η ημέρα. Η μέγιστη τιμή περιεχομένου λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) παρατηρείται στην καλλιέργεια με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση της πηγής άνθρακα (5 g/L NaHCO₃) με τιμή 44,81%, παρόλο που, όπως αναφέρθηκε προγενέστερα, η συγκεκριμένη καλλιέργεια παρουσίασε μειωμένη συσσώρευση βιομάζας συγκριτικά με αυτές των 2 g/L και 3 g/L NaHCO₃. Ωστόσο, όπως έχει αναφερθεί και βιβλιογραφικά, η γρήγορη ανάπτυξη μόνο σπάνια συσχετίζεται με υψηλή παραγωγικότητα λιπιδίων. Οι χαμηλότεροι ρυθμοί ανάπτυξης συμβάλουν στη μείωση της παραγωγικότητας της βιομάζας, ακόμη και αν το περιεχόμενο των λιπιδίων είναι υψηλό. Γενικά, ο υψηλός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης εξαρτάται από τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και δεν αντικατοπτρίζει την ειδική ικανότητα των μικροφυκών για την παραγωγή και αποθήκευση των λιπιδίων (Nascimento et al., 2012).

Όσον αφορά τις υπόλοιπες καλλιέργειες, η περιεκτικότητα των λιπιδίων τους κυμαίνεται περίπου μεταξύ 29-35% (επί ξηρού βάρους), με τις τιμές αυτές να αυξάνονται με την αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα. Οι τιμές αυτές της περιεκτικότητας των λιπιδίων είναι εντός του εύρους των τιμών (20-50%), που έχει αναφερθεί και βιβλιογραφικά (Mata et al., 2010 ; Nobre et al., 2013).

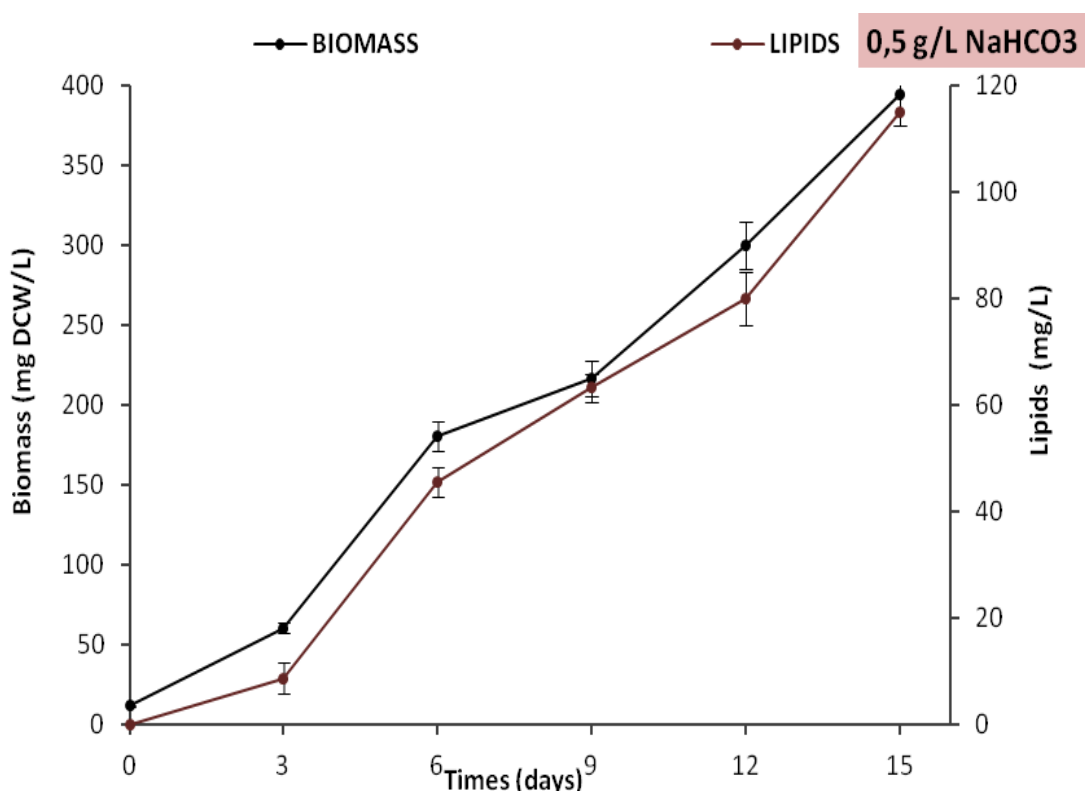
Η αύξηση της συγκέντρωσης του NaHCO₃ στο μέσο καλλιέργειας φάνηκε να έχει ως αποτέλεσμα και την υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπίδια, γεγονός που συμφωνεί με τις βιβλιογραφικές πηγές (White et al., 2012).

Επισήμανση: Δε θα πρέπει να παραληφθεί και να μην αναφερθεί το γεγονός ότι στην καλλιέργεια με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση NaHCO₃ υπήρξαν προβλήματα διαλυτοποίησης της ποσότητας των 5 g/L του όξινου ανθρακικού νατρίου. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα αδιάλυτα μέρη του διττανθρακικού νατρίου να προσμετρώνται τόσο στο φίλτρο με τη βιομάζα, κατά τη διαδικασία της διήθησης, όσο και στο γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα, στα τοιχώματα του οποίου προσκολλούνταν τα λιπαρά, κατά την εκχύλιση αυτών με διαλύτη εζάνιο. Επομένως, τα αποτελέσματα για τα λιπαρά αυτής της καλλιέργειας εμπεριέχουν αρκετά σημαντικό πειραματικό σφάλμα.

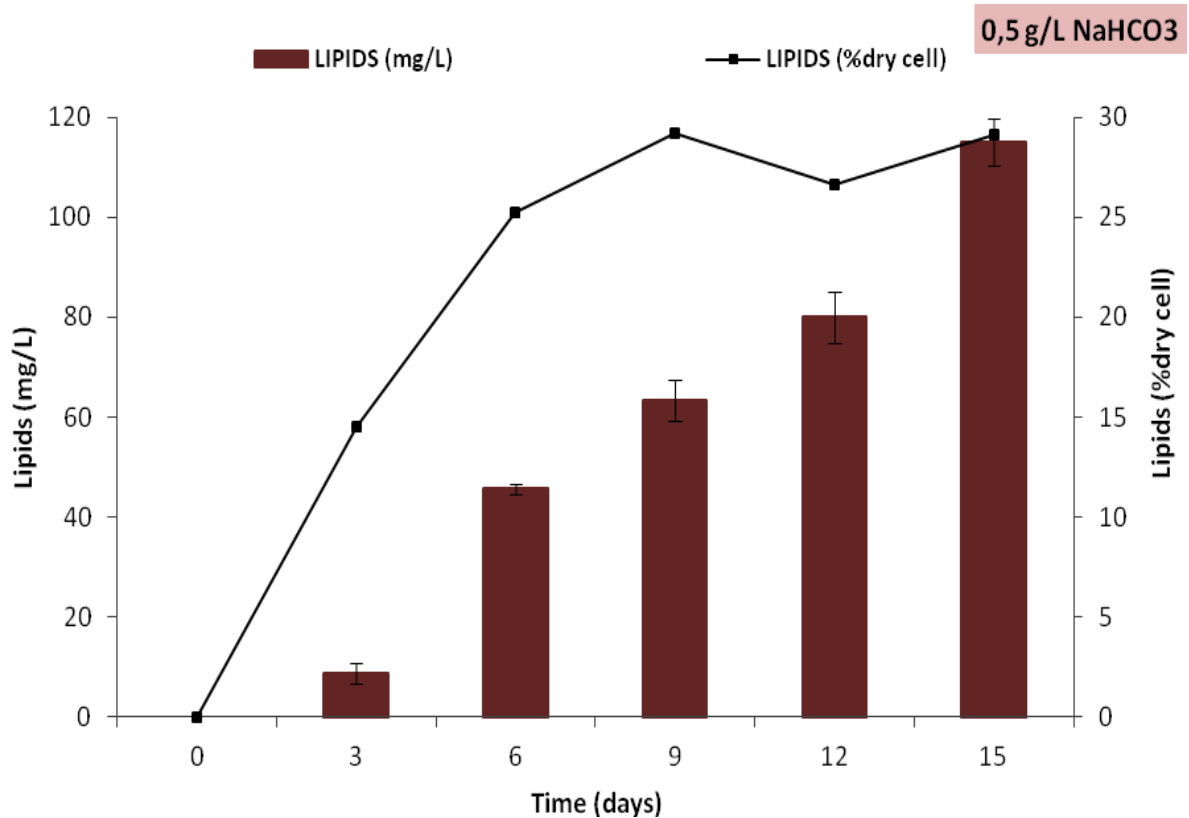
Με την αύξηση της συγκέντρωσης του NaHCO_3 στο μέσο καλλιέργειας παρατηρείται και αύξηση της τιμής της παραγωγικότητας των λιπιδίων. Μάλιστα, η μέγιστη τιμή παραγωγικότητας ($17,59 \text{ mg/L}\cdot\text{d}$) εντοπίζεται στην καλλιέργεια με τη μέγιστη συγκέντρωση άνθρακα (5 g/L NaHCO_3). Οι παραγωγικότητες των υπόλοιπων καλλιεργειών, κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα μεταξύ $7,68$ - $15,53 \text{ mg/L}\cdot\text{d}$.

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα διαγράμματα χρονικής μεταβολής των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) και τα διαγράμματα χρονικής μεταβολής της βιομάζας και των λιπιδίων, κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* στις διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3 .

Η παραγωγή των λιπιδίων συνήθως παρατηρείται κατά τη διάρκεια της φάσης στασιμότητας, όταν τα κύτταρα έχουν το μεγαλύτερο μέρος της βιοσυνθετικής τους ικανότητας, προσανατολισμένο προς την παραγωγή των τριακυλγλυκερολών (triacylglycerols) ή λιπιδίων υδρογονανθράκων (hydrocarbon lipids) (Nascimento et al., 2012).

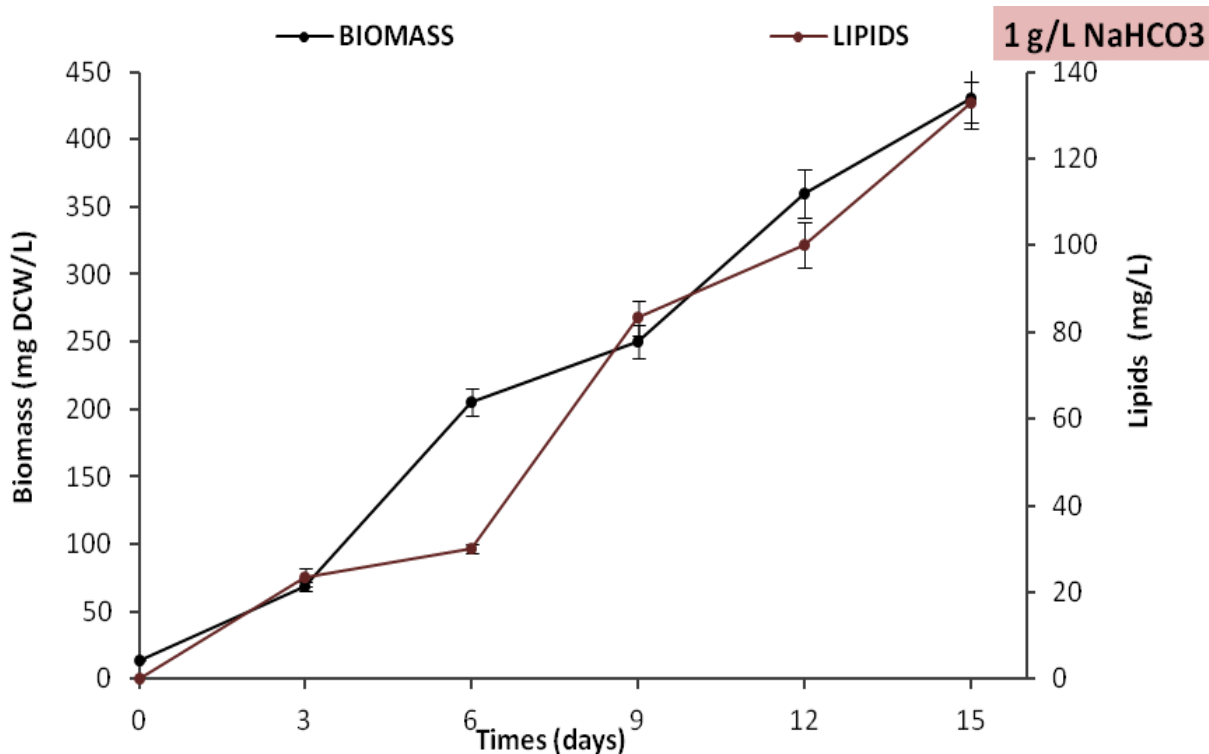


Διάγραμμα 10: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με $0,5 \text{ g/L NaHCO}_3$

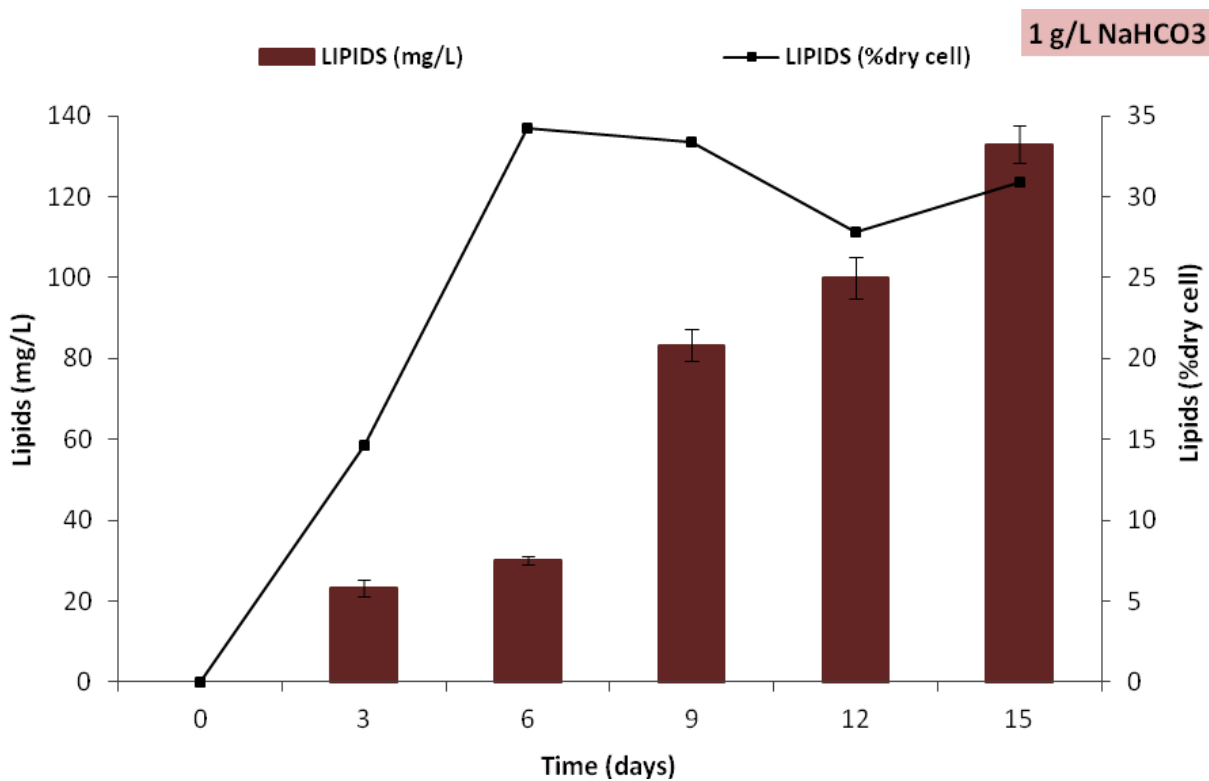


Διάγραμμα 11: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με 0,5 g/L NaHCO₃

Η καλλιέργεια με τη μικρότερη συγκέντρωση NaHCO₃ (0,5 g/L) παρουσίασε τη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης λιπαρών τη 15^η ημέρα καλλιέργειας με τιμή 115 mg/L, ενώ το περιεχόμενο των λιπιδίων εκείνη την ημέρα αντιστοιχεί σε 29,1% (επί ξηρού βάρους). Αν και το μέγιστο περιεχόμενο των λιπιδίων παρατηρήθηκε την 9^η ημέρα καλλιέργειας (29,2%), υπερβαίνει μόλις κατά 0,3% αυτό της τελευταίας ημέρας. Η κινητική εξέλιξης των λιπαρών ακολούθησε εκθετική πορεία ανάλογη με εκείνη της βιομάζας.

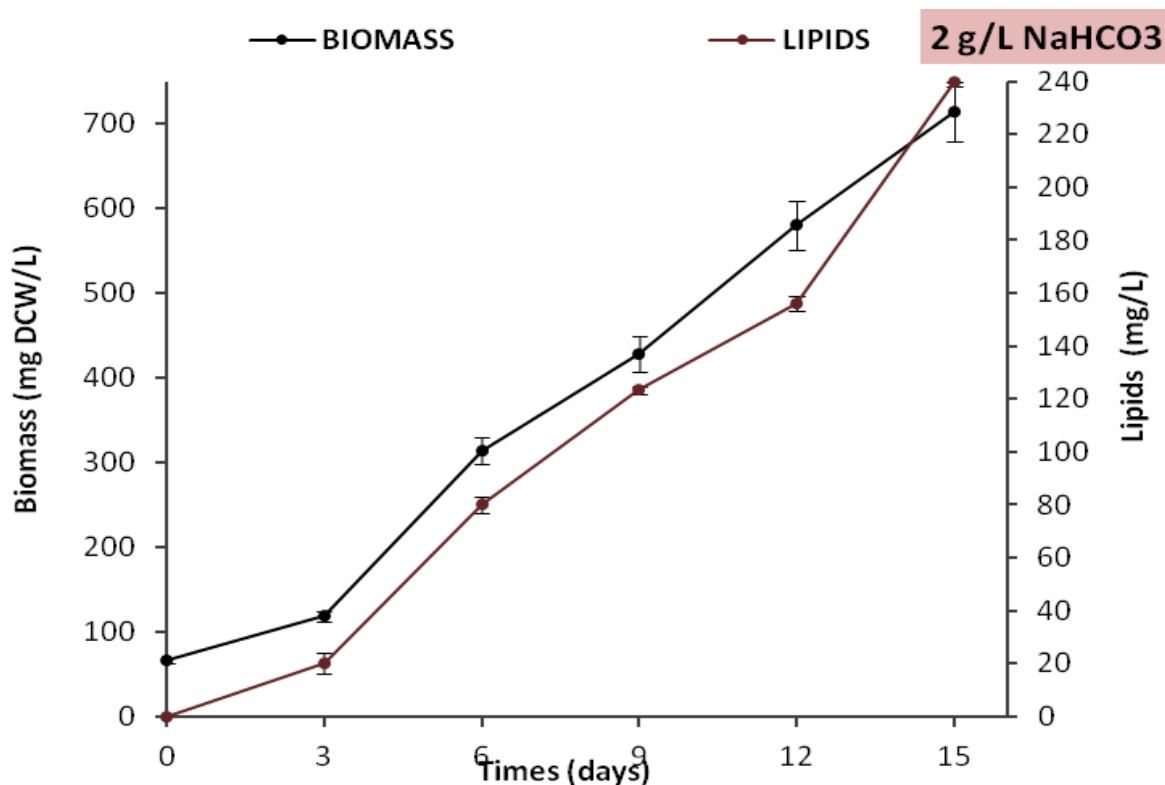


Διάγραμμα 12: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με 1 g/L NaHCO₃

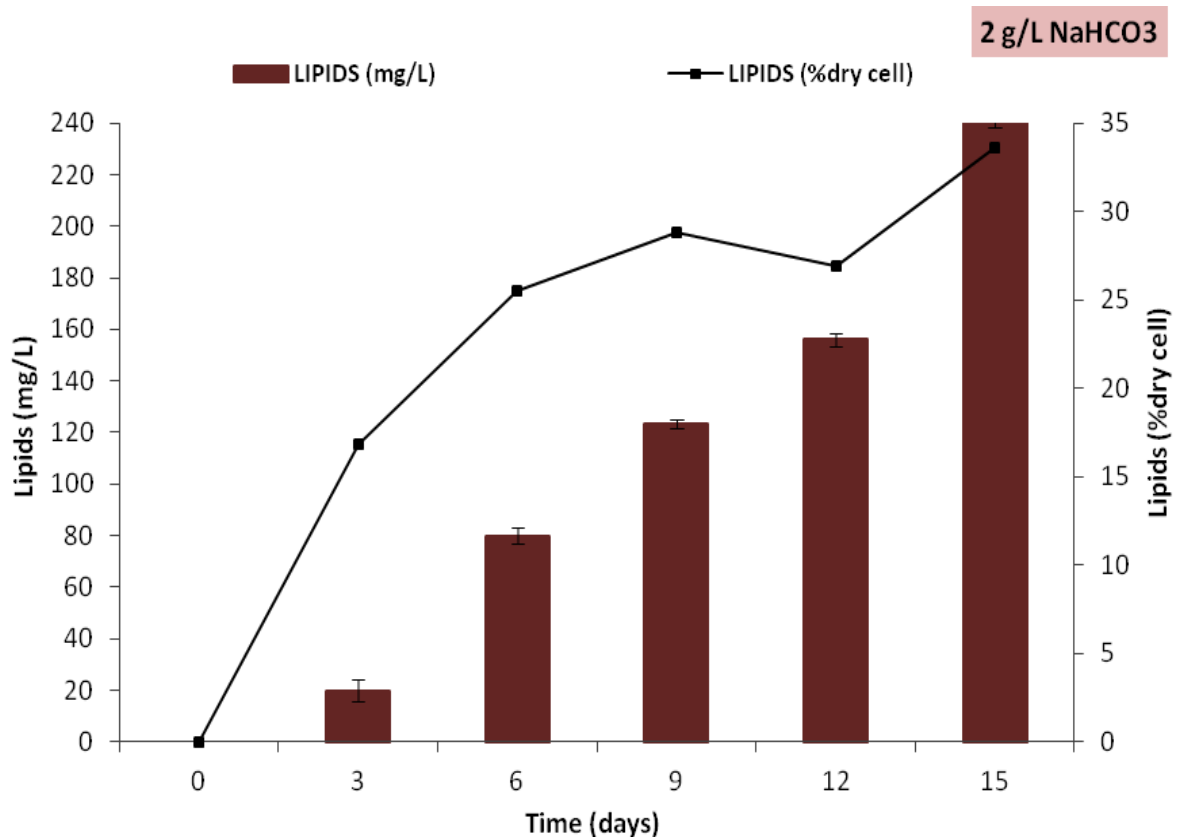


Διάγραμμα 13: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με 1 g/L NaHCO₃

Η καλλιέργεια με συγκέντρωση 1 g/L NaHCO₃ παρουσίασε τη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης λιπαρών την τελευταία ημέρα καλλιέργειας με τιμή 133 mg/L, ενώ το περιεχόμενο των λιπιδίων για εκείνη την ημέρα αντιστοιχεί σε 30,9% (επί ξηρού βάρους). Ωστόσο, παρατηρείται μια απότομη αύξηση στην περιεκτικότητα των λιπιδίων την 6^η ημέρα καλλιέργειας, φτάνοντας το ποσοστό του 34,2% (επί ξηρού βάρους), τιμή που αποτελεί και το μέγιστο περιεχόμενο των λιπιδίων στη συγκεκριμένη καλλιέργεια.

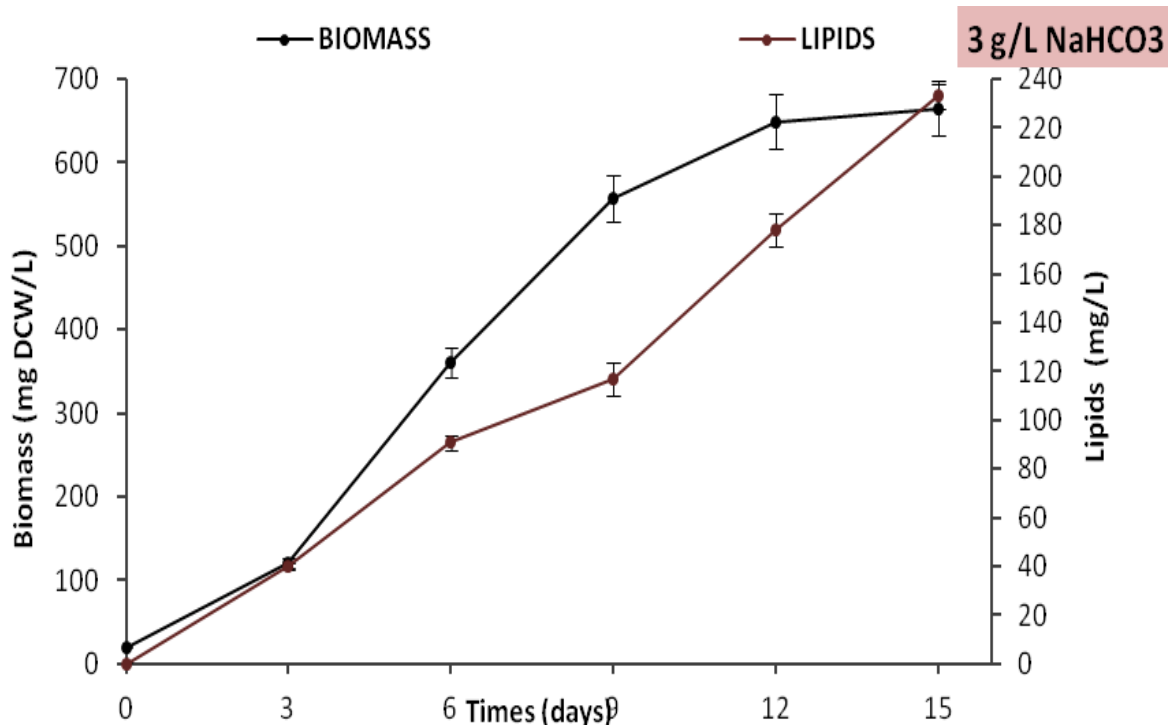


Διάγραμμα 14: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με 2 g/L NaHCO₃

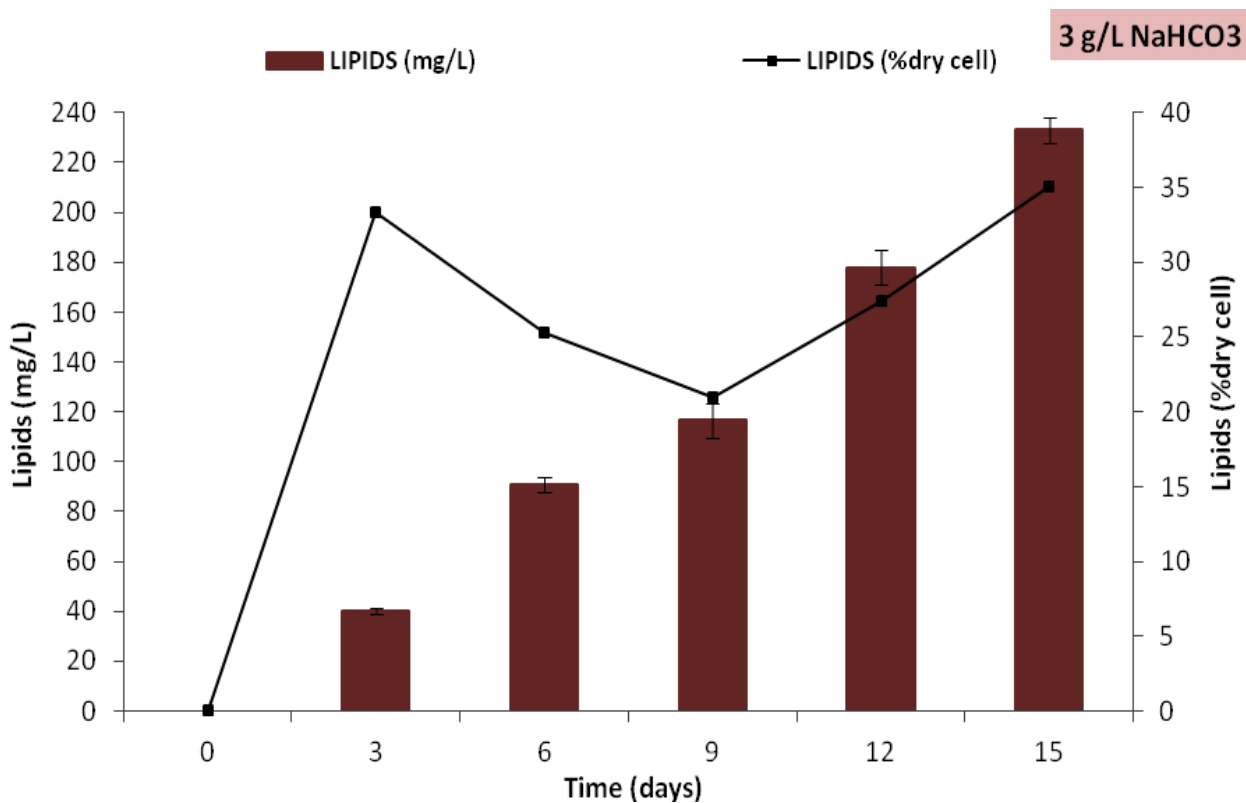


Διάγραμμα 15: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με 2 g/L NaHCO₃

Στην καλλιέργεια με συγκέντρωση 2 g/L NaHCO₃ η κινητική εξέλιξης των λιπαρών ακολούθησε εκθετική πορεία ανάλογη με εκείνη της βιομάζας. Τη 15^η ημέρα καλλιέργειας σημειώθηκε η μέγιστη τιμή συγκέντρωσης λιπαρών, φθάνοντας σε 240 mg/L. Το περιεχόμενο των λιπιδίων εκείνη την ημέρα αντιστοιχεί σε 33,6% (επί ξηρού βάρους) και αποτελεί και τη μέγιστη τιμή συγκριτικά με το περιεχόμενο των λιπιδίων των προηγούμενων ημερών.

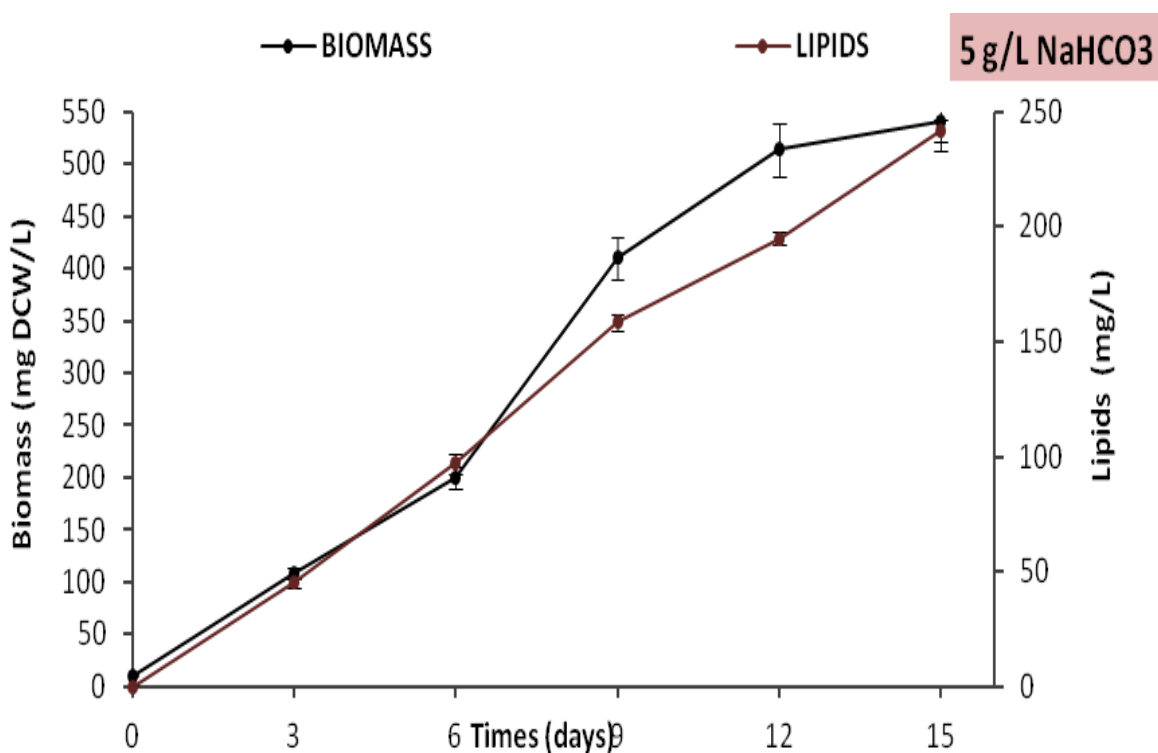


Διάγραμμα 16: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με 3 g/L NaHCO₃

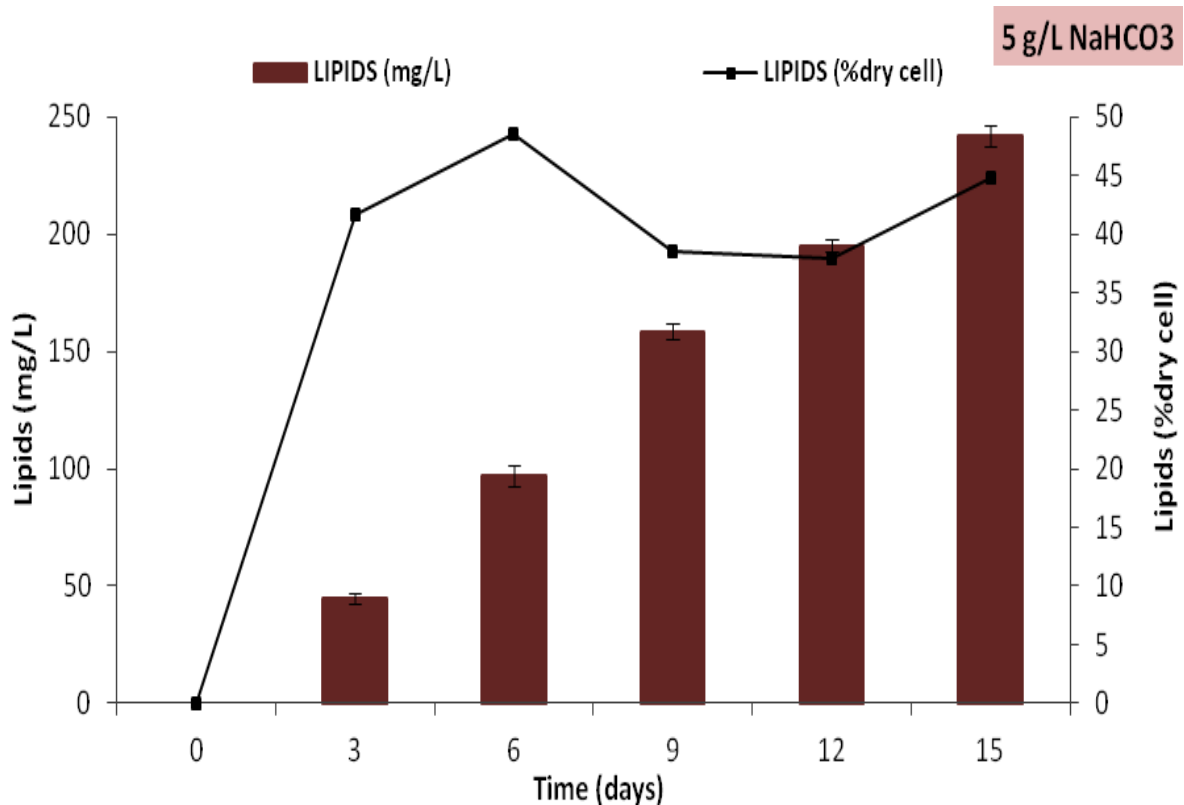


Διάγραμμα 17: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με 3 g/L NaHCO₃

Η καλλιέργεια με συγκέντρωση 3 g/L NaHCO₃ στο μέσο καλλιέργειας αύξησε κατά πολύ το περιεχόμενο λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) από την πρώτη ημέρα καλλιέργειας, φθάνοντας το ποσοστό του 33,3% (% επί ξηρού βάρους) μετά από 3 ημέρες. Από την 3^η και έως τη 15^η ημέρα καλλιέργειας σημειώθηκε αύξηση σε ποσοστό 5,1%, οπότε και παρατηρείται και η μέγιστη τιμή του περιεχομένου των λιπιδίων τη 15^η ημέρα, με τιμή 35% (% επί ξηρού βάρους). Την τελευταία ημέρα καλλιέργειας παρατηρείται και η μέγιστη συγκέντρωση λιπαρών με τιμή 233 mg/L.



Διάγραμμα 18: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με 5 g/L NaHCO₃



Διάγραμμα 19: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με 5 g/L NaHCO_3

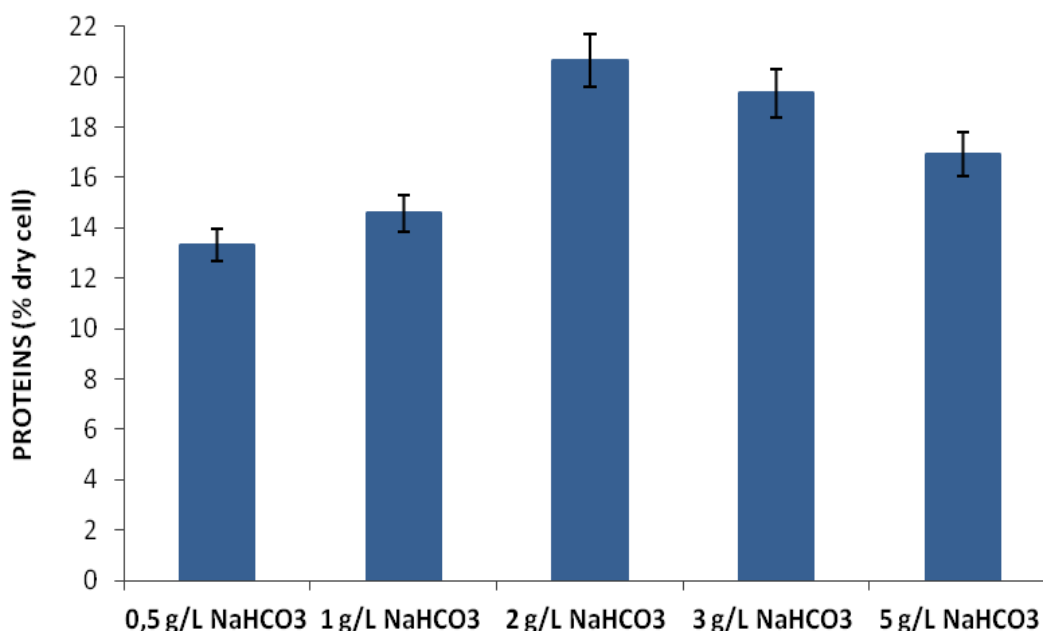
Η καλλιέργεια με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση NaHCO_3 (5 g/L) παρουσίασε τη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης λιπαρών την τελευταία ημέρα καλλιέργειας με τιμή 242 mg/L, ενώ το περιεχόμενο των λιπιδίων την ίδια ημέρα αντιστοιχεί σε 44,8% (επί ξηρού βάρους). Παρατηρήθηκε ακόμη, μια απότομη αύξηση στην περιεκτικότητα των λιπιδίων την 3^η ημέρα καλλιέργειας, η οποία συνεχίστηκε έως και την 6^η ημέρα, οπότε και σημειώθηκε και η μέγιστη τιμή του περιεχομένου των λιπιδίων αυτής της καλλιέργειας [48,5% (επί ξηρού βάρους)].

Η καλλιέργεια με τη συγκέντρωση των 5 g/L NaHCO_3 σημείωσε τις μέγιστες τιμές τόσο στη συσσώρευση λιπαρών όσο και στο περιεχόμενο (% επί ξηρού βάρους) σε σχέση με τις υπόλοιπες καλλιέργειες. Διευκρινίζεται, όμως και πάλι, πως το πειραματικό σφάλμα στη συγκεκριμένη καλλιέργεια είναι αρκετά σημαντικό, εξαιτίας των προαναφερθέντων λόγων.

5. Προσδιορισμός πρωτεϊνών του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3

Για τη μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα στον προσδιορισμό των πρωτεϊνών του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.*, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες κάθε τρεις ημέρες για κάθε καλλιέργεια σε διάστημα 15 ημερών. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές για κάθε καλλιέργεια για λόγους επαναληψιμότητας.

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα ποσοστά περιεκτικότητας των πρωτεϊνών (% επί ξηρού βάρους) για όλες τις καλλιέργειες την 15^η ημέρα καλλιέργειας.



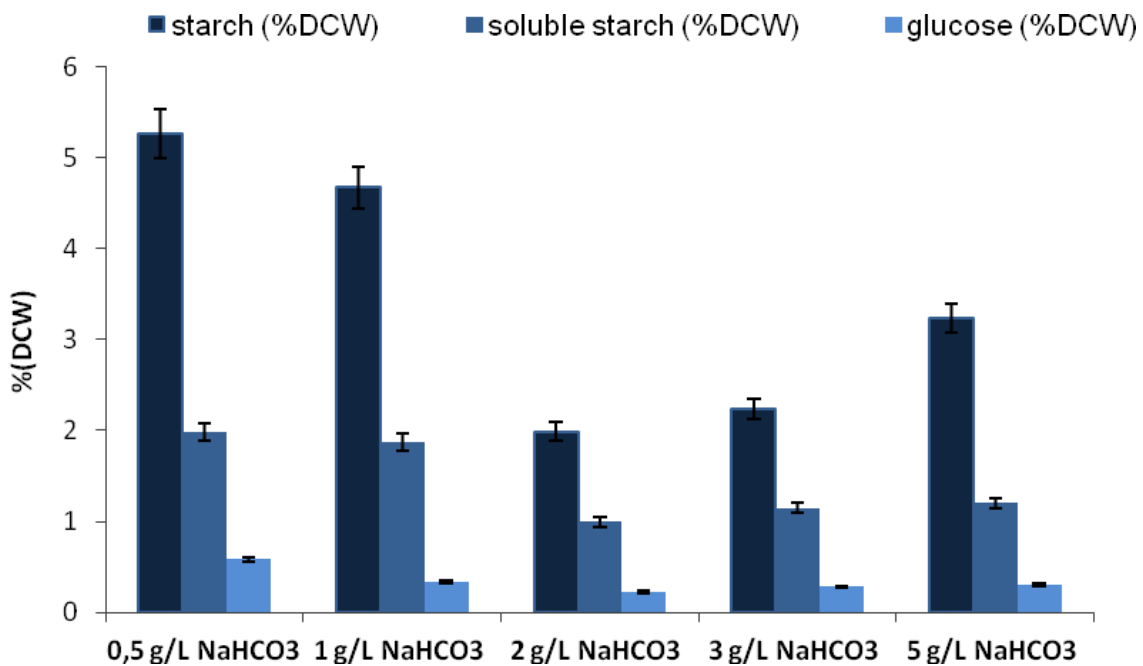
Διάγραμμα 20: Ποσοστό πρωτεϊνών (% επί ξηρού βάρους) τη 15^η ημέρα καλλιέργειας, κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3 , ως πηγή άνθρακα

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 20, μελετήθηκε η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών για τις καλλιέργειες με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3 . Η αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας των πρωτεϊνών έως και την καλλιέργεια με συγκέντρωση 2 g/L NaHCO_3 , στην οποία η περιεκτικότητα της πρωτεΐνης έλαβε και τη μέγιστη τιμή της, δηλαδή 20,64% (επί ξηρού βάρους). Οι επόμενες δύο καλλιέργειες με συγκεντρώσεις 3 g/L και 5 g/L NaHCO_3 μείωσαν την περιεκτικότητα τους σε πρωτεΐνες. Παρατηρείται πως η αύξηση της περιεκτικότητας των πρωτεϊνών είναι ανάλογη και με την αύξηση της συγκέντρωσης της βιομάζας στις καλλιέργειες με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3 και το ποσοστό των πρωτεϊνών κυμαίνεται από 13-20,64%.

6. Προσδιορισμός αμύλου και γλυκόζης του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3

Για τη μελέτη της επίδρασης της πηγής άνθρακα στον προσδιορισμό του αμύλου και της γλυκόζης του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.*, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες κάθε τρεις ημέρες για κάθε καλλιέργεια σε διάστημα 15 ημερών. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές για κάθε καλλιέργεια για λόγους επαναληψιμότητας.

Παρακάτω, παρουσιάζεται το ποσοστό του περιεχόμενου αμύλου τόσο στο εσωκυτταρικό υγρό όσο και στα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς και η περιεχόμενη γλυκόζη (% επί της ξηρής βιομάζας) για όλες τις καλλιέργειες την 15^η ημέρα καλλιέργειας. Προτιμήθηκε να μην παρουσιαστούν τα ποσοστά καθ'όλη τη διάρκεια των ημερών της επώασης, καθώς οι μεταβολές αυτών ήταν αμελητέες.



Διάγραμμα 21: Ποσοστό περιεχομένου (% επί ξηρού βάρους) του αμύλου στα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης και στο εσωκυτταρικό υγρό, καθώς και της γλυκόζης κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου *Nannochloropsis* sp. με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO₃

Η αύξηση της πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας, είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της περιεκτικότητας του αμύλου που βρίσκεται στα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης. Συγκεκριμένα, η καλλιέργεια με τη μικρότερη συγκέντρωση NaHCO₃ (0,5 g/L) παρουσίασε τη 15^η ημέρα καλλιέργειας το μέγιστο ποσοστό του αμύλου που βρίσκεται στα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης, με τιμή 5,27%, ενώ το μικρότερο ποσοστό αποδόθηκε από την καλλιέργεια με συγκέντρωση 2 g/L NaHCO₃ [1,99 % (επί ξηρού βάρους)].

Όσον αφορά το ποσοστό περιεχομένου του αμύλου στο εσωκυτταρικό υγρό, ήταν αρκετά χαμηλό συγκριτικά με εκείνο που βρίσκεται στα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης, με τα ποσοστά και για τις πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις να κυμαίνονται μεταξύ 1,99-0,99 % (επί ξηρού βάρους). Το υψηλότερο ποσοστό του 1,99% (επί ξηρού βάρους) παρουσίασε η καλλιέργεια με τη μικρότερη συγκέντρωση NaHCO₃ (0,5 g/L).

Η περιεκτικότητα της γλυκόζης % (επί ξηρού βάρους) για όλες τις καλλιέργειες ήταν σε χαμηλά επίπεδα τιμών με τη μέγιστη τιμή (0,58% επί ξηρού βάρους) να ανήκει στην καλλιέργεια με τη μικρότερη συγκέντρωση NaHCO_3 (0,5 g/L).

Συνεπώς, η αύξηση της συγκέντρωσης του NaHCO_3 στο μέσο καλλιέργειας, είχε σαν αποτελέσματα την αναλογική μείωση της περιεκτικότητας τόσο του αμύλου που βρίσκεται στα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης, όσο και του αμύλου στο εσωκυτταρικό υγρό, αλλά και της γλυκόζης. Παρατηρείται, δηλαδή, πως οι καλλιέργειες που απέδωσαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις βιομάζας, επέφεραν ως αποτέλεσμα χαμηλότερες περιεκτικότητες σε άμυλο και γλυκόζη.

7. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου της πηγής άνθρακα στην ανάπτυξη του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.*, αλλά και στη σύνθεση ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Σύμφωνα με τους Jegan et al. (2013), το διττανθρακικό νάτριο είναι μια αποτελεσματική πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη των μικροφυκών, καθώς βέλτιστη συγκέντρωση αυτού είναι ευεργετική για την υψηλότερη παραγωγή βιομάζας. Αναφέρεται ότι η προσθήκη διττανθρακικού μπορεί να αυξήσει σημαντικά τη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα και την παραγωγή των κυτταρικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των φυσικών χρωστικών και λιπιδίων στα μικροφύκη.

Έτσι, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3 (πηγή άνθρακα), 0,5 g/L, 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L και 5 g/L. Κατά τη διάρκεια της αύξησης της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα μέχρι μια τιμή, η σύνθεση της βιομάζας αυξήθηκε συγκριτικά με τις καλλιέργειες στις οποίες η συγκέντρωση του όξινου ανθρακικού νατρίου είναι μικρότερη. Η μέγιστη τιμή βιομάζας (721 mgDCW/L) και η μέγιστη τιμή παραγωγικότητας της βιομάζας ($45,84 \text{ mgL}^{-1} \text{d}^{-1}$), ανήκει στην καλλιέργεια με συγκέντρωση 2 g/L NaHCO_3 .

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η περιεχόμενη χλωροφύλλη με τη μέθοδο της εκχύλισης και τη χρήση της μεθανόλης ως διαλύτη. Με συγκέντρωση της πηγής άνθρακα 2 g/L NaHCO₃ προέκυψε και η μέγιστη συγκέντρωση της χλωροφύλλης. Σε αυτή την καλλιέργεια, η συγκέντρωση της χλωροφύλλης έλαβε τη μέγιστη τιμή της την 9^η ημέρα (8,4 μg/mL). Ωστόσο, την 9^η ημέρα σημειώθηκε και η μέγιστη τιμή συγκέντρωσης χλωροφύλλης για όλες τις καλλιέργειες των διαφορετικών συγκεντρώσεων άνθρακα, με τιμές χαμηλότερες βέβαια από την προαναφερθείσα μέγιστη.

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των λιπιδίων του μικροφύκου, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της εκχύλισης και τη χρήση του εξανίου ως διαλύτη. Ως βασικό υπόστρωμα για τη φωτοσύνθεση και τη διαρθρωτική σύνθεση των κυττάρων των μικροφυκών, το στοιχείο του άνθρακα έχει αναφερθεί να επηρεάζει την ανάπτυξη και τη σύνθεση των λιπαρών οξέων σε ορισμένα στελέχη των μικροφυκών (Ota et al., 2009). Στην παρούσα εργασία, η καλλιέργεια με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση NaHCO₃ (5 g/L) παρουσίασε τόσο τη μέγιστη τιμή περιεκτικότητας σε λιπίδια με ποσοστό 44,81% (επί ξηρού βάρους), όσο και τη μέγιστη συσσώρευση λιπιδίων με τιμή 242 mg/L, καθώς και μέγιστη παραγωγικότητα των λιπιδίων (17,59 mg/Ld) στο τέλος της καλλιέργειας (15^η ημέρα).

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των πρωτεϊνών % (επί ξηρού βάρους), πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Lowry για όλες τις καλλιέργειες, εμφανίζοντας την μέγιστη τιμή τους την τελευταία ημέρα της καλλιέργειας. Η αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα μέχρι μια τιμή, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας πρωτεϊνών με μέγιστη τιμή ποσοστού 20,64% (επί ξηρού βάρους) για την καλλιέργεια με συγκέντρωση 2 g/L NaHCO₃. Το αποτέλεσμα ήταν λογικό, διότι η μείωση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, οδηγεί στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των κυττάρων και κατ'επέκταση τη σύνθεση των πρωτεϊνών.

Οι Brown et al. (1997), για παράδειγμα, παρατήρησαν αύξηση (\cong 100%) στην περιεκτικότητα πρωτεΐνης, όταν οι καλλιέργειες εμπλουτίστηκαν με 1% διοξείδιο του άνθρακα, σε πολλά είδη μικροφυκών. Ακόμα, οι Chrismadha και Borowitzka (1994), αναφέρουν πως η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη για το *Phaeodactylum tricornutum* αυξήθηκε με την προσθήκη του διοξειδίου του άνθρακα. Σύμφωνα με τους Araujo και

Garcia (2005), τα κύτταρα με το πλεόνασμα του άνθρακα αφομιώνουν πολύ περισσότερο τη σύνθεση των πρωτεϊνών και την ανάπτυξη, από ότι σε υδατάνθρακες.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του αμύλου, τόσο στο εσωκυτταρικό υγρό όσο και στα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά και της γλυκόζης με τη βοήθεια ειδικού σκευάσματος (kit). Ο πιο σημαντικός παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό της σύνθεσης αμύλου, και τη συσσώρευση του, είναι ο μέσος φωτισμός, που προκύπτει από το συνδυασμό της συγκέντρωσης της βιομάζας και της έντασης του προσπίπτοντος φωτός. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας είναι η φάση του κυτταρικού κύκλου. Επομένως, σε σχετικά χαμηλή πυκνότητα της βιομάζας, το φως διαχέεται ευκολότερα, όπως και τα ανθρακικά ιόντα. Έτσι, αναμένεται να διαπιστώσουμε ότι, για μια δεδομένη ένταση του φωτός, σε χαμηλή κυτταρική πυκνότητα, τα κύτταρα θα περιέχουν ένα υψηλότερο ποσοστό αμύλου από τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε υψηλότερη πυκνότητα βιομάζας. Οι Brányiková et al. (2011) έδειξαν ότι κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης της αυτότροφου *C. vulgaris*, η περιεκτικότητα σε άμυλο μειώθηκε έως και 13% του αρχικού ξηρού της βάρους (Francisco et al., 2012). Ακόμα, οι Izumo et al. (2007) αναφέρουν πως η *Chrorella* είχε αυξημένη περιεκτικότητα σε άμυλο σε αέρια παροχή 0,04% CO₂, από ότι σε παροχή 3% CO₂.

Στην παρούσα εργασία, παρατηρήθηκε ότι ο περιορισμός της πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του περιεχομένου του αμύλου στα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης με μέγιστη την τιμή των 5,27% (επί ξηρού βάρους) στη καλλιέργεια με τη μικρότερη συγκέντρωση NaHCO₃ (0,5 g/L). Όσον αφορά στην περιεκτικότητα της γλυκόζης, βρέθηκε σε μικρότερα ποσοστά [(0,22-0,58% (επί ξηρού βάρους)] συγκριτικά με εκείνα του αμύλου για όλες τις καλλιέργειες. Η αύξηση της συγκέντρωσης του διττανθρακικού νατρίου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της περιεκτικότητας της γλυκόζης στις καλλιέργειες.

Καταλήγοντας, λόγω της αυξημένης περιεκτικότητας των μικροφυκών σε έλαια, το επιστημονικό ενδιαφέρον στρέφεται πλέον κυρίως στην αυξημένη παραγωγή λιπιδίων. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, τα μικροφύκη αναπτύσσονται ως επί το πλείστον σε συνθήκες μειωμένης παροχής νιτρικών αλάτων στο θρεπτικό τους μέσο (συνθήκες αζωτοπενίας), λόγω των αυξημένων αποδόσεων που έχουν παρατηρηθεί και οι οποίες ανέρχονται σε περιεκτικότητα λιπιδίων έως και 80% (Rodolfi et al., 2009 ; Bondioli et al., 2012). Οι Spoehr και Milner (1949), αναφέρουν ότι το μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa* κατάφερε να συσσωρεύσει μέχρι και 85% λιπιδίων με τον περιορισμό της πηγής του αζώτου. Μάλιστα, επειδή όπως αναφέρεται κι προγενέστερα ο υψηλός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης εξαρτάται από τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και δεν αντικατοπτρίζει την ειδική ικανότητα των μικροφυκών για την παραγωγή και αποθήκευση των λιπιδίων (Nascimento et al., 2012), ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανάπτυξη των μικροφυκών σε δύο στάδια, ώστε να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός, και να ενισχυθεί η περιεκτικότητα των κυττάρων των μικροφυκών σε λιπίδια. Έτσι, σε 1^ο στάδιο τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε μέσο με πλούσια θρεπτικά συστατικά, τροφοδοτούμενο με υψηλή συγκέντρωση της πηγής άνθρακα για τη βελτίωση του ρυθμού ανάπτυξης τους και την παραγωγικότητα της βιομάζας και ακολούθως σε 2^ο στάδιο, αφού τα μικροφύκη έχουν αναπτυχθεί μέχρι και τη στατική φάση, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε μέσο με μη επαρκή θρεπτικά, όπως για παράδειγμα σε συνθήκες αζωτοπενίας, ώστε να αυξηθεί και η περιεκτικότητα σε λιπίδια. (Lam et al., 2012). Τέλος, οι Dou X. et al. (2013), αναφέρουν ότι σημαντικές επιπτώσεις στο περιεχόμενο λιπιδίων και την παραγωγικότητα, επιφέρει και η αναλογία άνθρακα προς άζωτο.

IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams J.M.M., Toop T.A., Donnison I.S., Gallagher J.A. (2011). Seasonal variation in *Laminaria digitata* and its impact on biochemical conversion routes to biofuels, *Biosource Technology*, Volume 102, Pages 9976-9984
- Amaro M. Helena, A. Catarina Guedes, F. Xavier Malcata (October 2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel, *Applied Energy*, Volume 88, Issue 10, Pages 3402–3410
- Antia, N.J. & Cheng, J.Y. (1982). The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the Eustigmatophyceae, *British Phycological Journal*, Volume 17, Pages 39-50
- Badger M. R. and Price G. D. (2003). CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution, *Journal of Experimental Botany*, Volume 54, Pages 609-622
- Bajaj Akhil, Purva Lohan, Prabhat N. Jha, Rajesh Mehrotra (January 2010). Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview' *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Volume 62, Issue 1-2, Pages 9–14
- Bondioli Paolo, Laura Della Bella, Gabriele Rivolta, Graziella Chini Zittelli, Niccolò Bassi, Liliana Rodolfi, David Casini, Matteo Prussi, David Chiaramonti, Mario R. Tredici (2012). Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33, *Bioresource Technology*, Volume 114, Pages 567–572
- Bozbas Kahraman (February 2008). Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 12, Issue 2, Pages 542–552
- Borowitzka M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters, *Journal of Biotechnology*, Volume 70, Issue 1–3, Pages 313-321
- Brányiková I, Marsáľková B, Doucha J, Brányik T, Bisová K, Zachleder V, et al. (2011). Microalgae novel highly efficient starch producers, *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 108, Pages 766–776
- Brennan Liam, Philip Owende (February 2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 14, Issue 2, Pages 557–577
- Carlsson Anders S, Beilen Jan B van, Möller Ralf, Clayton David (September 2007). Micro- and Macro-Algae: utility for industrial applications, Outputs from the EPOBIO project

- Carpinelli Elisa Corteggiani, Andrea Telatin, Nicola Vitulo, Claudio Forcato, Michela D'Angelo, Riccardo Schiavon, Alessandro Vezzi, Giorgio Mario Giacometti, Tomas Morosinotto, and Giorgio Valle (2013). Chromosome Scale Genome Assembly and Transcriptome Profiling of *Nannochloropsis gaditana* in Nitrogen Depletion Molecular Plant 1-14
- Chaumont D. (1993). Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture, *Journal of Applied Phycology*, Volume 5, Issue 6, Pages 593-604
- Cannell Richard J.P. (1993). Algae as a Source of Biologically Active Products
- Chen F. (1996). High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth, *Trends in Biotechnology*, Volume 14, Issue 11, Pages 421-426
- Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*, Volume 25, Issue 3, Pages 294- 306
- Chisti Y. and Moo-Young M. (2002). Bioreactors, In: R. A. Meyers eds. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, San Diego, Pages 247-271
- Cohen Zvi (1999). *Chemicals from Microalgae*, CRC Press
- Demirbas Ayhan (2008). *Biodiesel : A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines*, Springer
- Demirbas Ayhan (January 2009). Progress and recent trends in biodiesel fuels, *Energy Conversion and Management*, Volume 50, Issue 1, Pages 14–34
- Demirbas Ayhan (2008). *Biofuels: Securing the Planet's Future Energy Needs*, Green Energy and Technology
- Dou X, Lu X, Lu M, Xue R, Yan R, Ji J. (2013). Effects of carbon source and concentration on the growth density, lipid accumulation and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*, *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, Volume 29, Issue 3, Pages 358-69
- Eriksen N. (2008). The technology of microalgal culturing, *Biotechnology Letters*, Volume 30, Issue 9, Pages 1525-1536

- Francisco J. Choix, Luz E. de-Bashan, Yoav Bashan (2012). Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: I. Autotrophic conditions, *Enzyme and Microalgae Technology*, Volume 51, Pages 294-299
- Fung Timothy K.F., Doo Hun Choi, Dietram A. Scheufele, Bret R. Shaw (October 2014). Public opinion about biofuels: The interplay between party identification and risk/benefit perception, *Energy Policy*, Volume 73, Pages 344–355
- Giordano M., Beardall J. and Raven J. (2005). CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution, *Annual Review of Plant Biology*, Volume 56, Pages 99-131
- Gladu PK, Patterson GW, Wikfors GH, Smith BC (1995). Sterol fatty acid and pigment characteristics of UTEX 2341, a marine eustigmatophyte identified previously as *Chlorella minutissima* (Chlorophyceae), *J Phycol*, Volume 31, Pages 774-777
- Henriques M., A. Silva and J. Rocha (2010). Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method, *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*
- Hibberd D.J. (1981). Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae), *Botanical Journal of the Linnean Society*
- Hu Qiang, Sommerfeld Milton, Jarvis Eric, Ghirardi Maria, Posewitz Matthew, Seibert Michael, Darzins Al (May 2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, *the plant journal*, *Harnessing plant biomass for biofuels and biomaterials*, Volume 54, Issue 4, Pages 621-639
- Izumo Asako, Shoko Fujiwara, Yasunori Oyama, Aya Satoh, Naoko Fujita, Yasunori Nakamura, Mikio Tsuzuki (2007). Physicochemical properties of starch in *Chlorella* change depending on the CO₂ concentration during growth: Comparison of structure and properties of pyrenoid and stroma starch, *Plant Science*, Volume 172, Issue 6, June 2007, Pages 1138–1147
- Jegan, G, S.Mukund, N.S.Senthilkumar and RamaRajaVallinayagam (2013). Influence of different concentrations of sodium bicarbonate on growth rate and biochemical composition of micro algae, *J. Algal Biomass Utln.*, Volume 4, Issue 4, Pages 81–87
- Lam Man Kee, Keat Teong Lee, Abdul Rahman Mohamed (2012). Current status and challenges on microalgae-based carbon capture, *International Journal of Greenhouse Gas Control*, Volume 10, Pages 456-469

- Maruyama I, Nakamura T, Matsubayashi T, Ando Y, Maeda T (1986). Identification of the alga known as "marine *Chlorella*" as a member of the Eustigmatophyceae, *Jap J Phycol*, Volume 34, Pages 319-325
- Mata M. Teresa, António A. Martins, Nidia. S. Caetano (January 2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 14, Issue 1, Pages 217–232
- Miao X., Q. Wu (May 2004). High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*, Volume 110, Issue 1, Pages 85-93
- Moazami Nasrin, Alireza Ashori, Reza Ranjbar, Mehrnoush Tangestani, Roghieh Eghtesadi, Ali Sheykhi Nejad (April 2012). Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*, *Biomass and Bioenergy*, Volume 39, Pages 449–453
- Molina E., Fernández J., Ación F. G. and Chisti Y. (2001). Tubular photobioreactor design for algal cultures, *Journal of Biotechnology*, Volume 92, Issue 2, Pages 113-131
- Murata Norio (1992). *Research in Photosynthesis: Proceedings of the IXth International Congress on Photosynthesis*, Nagoya, Japan. Springer Science & Business Media 203
- Muthukumar A., Elayaraja S., Ajithkumar T. T., Kumaresan S., Balasubramanian T. (2012). Biodiesel production from marine microalgae *Chlorella marina* and *Nannochloropsis salina*, *Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels*, Volume 3, Issue 5
- Naik S.N., Vaibhav V. Goud, Prasant K. Rout, Ajay K. Dalai (February 2010). Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 14, Issue 2, Pages 578–597
- Nascimento Andrade Iracema, Sheyla Santa Izabel Marques, Iago Teles Dominguez Cabanelas, Solange Andrade Pereira, Janice Isabel Druzian, Carolina Oliveira de Souza, Daniele Vital Vich, Gilson Correia de Carvalho, Mauricio Andrade Nascimento (2012). Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria, *Bioenerg., Res.* (2013), 6:1-13
- Oilgae (2010). *Oilgae guide to fuels from macroalgae*, Tamilnadu, India
- Qin Song, Hanzhi Lin, Peng Jiang (November–December 2012). Advances in genetic engineering of marine algae, *Biotechnology Advances*, Volume 30, Issue 6, Pages 1602–1613, Special issue on ACB 2011

- Raesossadati M.J., H. Ahmadzadeh, M.P. McHenry, N.R. Moheimani (October 2014). CO₂ bioremediation by microalgae in photobioreactors: Impacts of biomass and CO₂ concentrations, light, and temperature, *Algal Research*, Volume 6, Part A, Pages 78–85
- Recht Lee, Zarka Aliza, Boussiba Sammy (2012). Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. *Appl Microbiol Biotechnol*, Springer
- Rodolfi Liliana, Zittelli Graziella Chini, Bassi Niccolo, Padovani Giulia, Biondi Natascia, Bonini Gimena, Tredici Mario R. (January 2009). Microalgae for oil: Strain Selection, Induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor, *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 102, Issue 1, Pages 100-120
- Ryan Catie (October 2009). *The Promise of Algae Biofuels, Cultivating Green Energy*
- Seta A, Kumasaka K, Hosaka M, Kojima E, Kashawakura M, Kato T (1992). Production of eicosapentaenoic acid by marine microalgae and its commercial utilization for aquaculture. In Kyle DJ, Rattledge C (eds) *Industrial Applications of Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL USA, Pages 220-234
- Sheehan, J. Dunahay, T. Bebermann, J. Roessler, P. (1998). Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae
- Spolaore Pauline, Joannis-Cassan Claire, Duran Elie, Isambert Arsene (2006). Commercial Applications of Microalgae, Review, *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING* ©2006, The Society for Biotechnology, Japan, Volume 101, Issue 2, Pages 87–96
- Tabatabaei Meisam, Masoud Tohidfar, Gholamreza Salehi Jouzani, Mohammadrezan Safarnejad, Mohammad Pazouki (May 2011). Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 15, Issue 4, Pages 1918-1927
- Ugwu C. U., Aoyagi H. and Uchiyama H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae, *Bioresource Technology*, Volume 99, Issue 10, Pages 4021-4028
- Van Thang Duong, Yan Li, Ekaterina Nowak and Peer M. Schenk (2012). Microalgae Isolation and Selection for Prospective Biodiesel Production, Issue 5, Pages 1835-1849
- Volkman JK, Brown MR, Dunstan GA, Jeffrey SW (1993) The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae. *J Phycol* 29: 69-78

Wang Dongmei, Kang Ning, Jing Li, Jianqiang Hu, Danxiang Han, Hui Wang, Xiaowei Zeng, Xiaoyan Jing, Qian Zhou, Xiaoquan Su, Xingzhi Chang, Anhui Wang, Wei Wang, Jing Jia, Li Wei, Yi Xin, Yinghe Qiao, Ranran Huang, Jie Chen, Bo Han, Kangsup Yoon, Russell T. Hill, Yonathan Zohar, Feng Chen, Qiang Hu, Xu Jian, (2013). Nannochloropsis Genomes Reveal Evolution of Microalgal Oleaginous Traits, Journal Plos Genetics

White D. A., A. Paragette, P. Rooks, S. T. Ali (2012). The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures, J. Appl. Phycol., 25: 153-165

Xu Yuan, Mathias Nordblad, Per M. Nielsen, Jesper Brask, John M. Woodley (November 2011). *In situ* visualization and effect of glycerol in lipase-catalyzed ethanolysis of rapeseed oil, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Volume 72, Issues 3–4, Pages 213–219

Zhao Bingtao , Yaxin Su, Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Volume 31, March 2014, Pages 121–132

Znad Hussein, Gita Naderi, H.M. Ang and M.O. Tade. CO₂ Biomitigation and Biofuel Production Using Microalgae: Photobioreactors Developments and Future Directions, Curtin University Australia

Διαδίκτυο- Ιστοσελίδες

(<http://www.environment.gov.au>)

(<http://www.epa.gov>)

(<http://www.nannochloropsis.org/index.php>)

**V. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ, ΣΧΗΜΑΤΩΝ,
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ**

	Σελ.
Πίνακας 1: Γενιές βιοκαυσίμων (Demirbas, 2008)	10
Πίνακας 2: Φυσικά χαρακτηριστικά βιοντίζελ και ντίζελ (Bozbas, 2008)	16
Πίνακας 3: Είδη ελαίων για παραγωγή βιοντίζελ (Demirbas, 2009)	17
Πίνακας 4: Οικονομική σύγκριση ανοικτών λιμνών και κλειστών PBRs (Moazami et al., 2012)	35
Πίνακας 5: Σύγκριση των ανοικτών και κλειστών συστημάτων καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας για μικροφυκών (Mata et al., 2010)	35
Πίνακας 6: Περιεχόμενο και παραγωγικότητα λιπιδίων για διάφορα είδη μικροφυκών (Mata et al., 2010)	42
Πίνακας 7: Τιμή συγκέντρωσης της βιομάζας (mgDCW/L) την 15 ^η ημέρα καλλιέργειας του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO ₃	67
Εικόνα 1: Εκπομπή αερίων CO ₂ από καμινάδα	6
Εικόνα 2: Βιοκαύσιμα από καλλιέργειες φυτών	10
Εικόνα 3: Βιοντίζελ από έλαια	15
Εικόνα 4: Παραγωγή βιοντίζελ	19
Εικόνα 5: Απεικόνιση διαφόρων μικροφυκών	26
Εικόνα 6: Οκτώ εμπορικά μικροφύκη	27
Εικόνα 7: Διάφοροι τύποι συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών: (1) Πλαστικοί σάκοι 300 λίτρων, (2) επίπεδοι φωτοαντιδραστήρες, (3) οριζόντιοι σωληνωτοί φωτοαντιδραστήρες και (4) ανοικτή δεξαμενή τύπου raceway	34
Εικόνα 8: Σύστημα ανοικτού τύπου καναλιών λίμνης (Moazami et al., 2012)	36
Εικόνα 9: Τεχνηκές λίμνες ελισσόμενου στίβου (Drapcho and Bruna, 2006)	37

Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των κυττάρων <i>Nannochloropsis</i> (www.nannochloropsis.org)	46
Εικόνα 11: Ανακαλλιέργειες μικροφύκους <i>Nannochloropsis sp.</i>	52
Εικόνα 12: Ειδικά διαμορφωμένο αποστειρωμένο περιβάλλον (αριστερή εικόνα) και επωαστήρας (δεξιά εικόνα)	55
Εικόνα 13: Καλλιέργειες του μικροφύκους <i>Nannochloropsis sp.</i> σε κωνικές φιάλες σε επωαστήρα	55
Εικόνα 14: Συσκευή λυοφιλίωσης	56
Εικόνα 15: Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry	59
Εικόνα 16: Εκχύλιση λιπαρών σε υδατόλουτρο	60
Εικόνα 17: Εκχύλιση λιπαρών για διάφορες μέρες καλλιέργειας	60
Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση του ρυθμού ανάπτυξης φυκών σε καλλιέργεια σε παρτίδες (συνεχής γραμμή) και της συγκέντρωσης θρεπτικών (διακεκομμένη γραμμή) (Mata et al., 2010)	32
Διάγραμμα 1: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας κατά την καλλιέργεια του μικροφύκους <i>Nannochloropsis sp.</i> με πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3 , ως πηγή άνθρακα	65
Διάγραμμα 2: Παραγωγικότητα βιομάζας ($\text{mg/L}\cdot\text{d}$) σε σύγκριση με τη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης βιομάζας (mgDCWL^{-1}) για την καλλιέργεια του μικροφύκους <i>Nannochloropsis sp.</i> σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3	68
Διάγραμμα 3: Χρονική μεταβολή της χλωροφύλλης ($\mu\text{g/mL}$) κατά την καλλιέργεια του μικροφύκους <i>Nannochloropsis sp.</i> με τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO_3 , ως πηγή άνθρακα	69
Διάγραμμα 4: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του μικροφύκους <i>Nannochloropsis sp.</i> με $0,5 \text{ g/L NaHCO}_3$	71

Διάγραμμα 5: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με 1 g/L NaHCO ₃	72
Διάγραμμα 6: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με 2 g/L NaHCO ₃	73
Διάγραμμα 7: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με 3 g/L NaHCO ₃	74
Διάγραμμα 8: Χρονική μεταβολή της παραγωγής της βιομάζας και της χλωροφύλλης κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με 5 g/L NaHCO ₃	75
Διάγραμμα 9: Περιεχόμενο λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) την 15 ^η ημέρα ανάπτυξης και μέγιστη τιμή παραγωγικότητας λιπιδίων (mg/L*d) κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO ₃ , ως πηγή άνθρακα	76
Διάγραμμα 10: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με 0,5 g/L NaHCO ₃	78
Διάγραμμα 11: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με 0,5 g/L NaHCO ₃	79
Διάγραμμα 12: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με 1 g/L NaHCO ₃	80
Διάγραμμα 13: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με 1 g/L NaHCO ₃	80

Διάγραμμα 14: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με 2 g/L NaHCO ₃	81
Διάγραμμα 15: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με 2 g/L NaHCO ₃	82
Διάγραμμα 16: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με 3 g/L NaHCO ₃	83
Διάγραμμα 17: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με 3 g/L NaHCO ₃	83
Διάγραμμα 18: Χρονική μεταβολή της βιομάζας και των λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με 5 g/L NaHCO ₃	84
Διάγραμμα 19: Χρονική μεταβολή των λιπιδίων και του περιεχομένου των λιπιδίων (% επί ξηρού βάρους) κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με 5 g/L NaHCO ₃	85
Διάγραμμα 20: Ποσοστό πρωτεϊνών (% επί ξηρού βάρους) τη 15 ^η ημέρα καλλιέργειας, κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO ₃ , ως πηγή άνθρακα	86
Διάγραμμα 21: Ποσοστό περιεχομένου (% επί ξηρού βάρους) του αμύλου στο εσωκυτταρικό υγρό και στα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς και της γλυκόζης κατά την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Nannochloropsis sp.</i> με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaHCO ₃	88

