



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**Τομέας IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών**

## **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

# **ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ**

**Πετρουλά Στεφανία**

**ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κος Φ. ΚΟΛΙΣΗΣ**

**ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2012**



## Περιεχόμενα

Περίληψη.....7

### Κεφάλαιο 1: Κλίμα-φαινόμενο του θερμοκηπίου-ανανεώσιμες πηγές ενέργειας

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1.1 | Εισαγωγή.....                            | 9  |
| 1.2 | Κλίμα και φαινόμενο του θερμοκηπίου..... | 10 |
| 1.3 | Αέρια του θερμοκηπίου.....               | 13 |
| 1.4 | Πιθανά σενάρια επιπτώσεων.....           | 17 |
| 1.5 | Επιπτώσεις των κλιματικών αλλαγών.....   | 19 |
| 1.6 | Ανανεώσιμες πηγές ενέργειας.....         | 21 |
| 1.7 | Βιοκαύσιμα.....                          | 26 |

### Κεφάλαιο 2: Βιοντίζελ-Πηγές και Παραγωγή του

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2.1   | Βιοντίζελ.....   | 30 |
| 2.2   | Χαρακτηριστικά του βιοντίζελ και σύγκριση με το ορυκτό ντίζελ.....     | 33 |
| 2.3   | Πηγές βιοντίζελ.....   | 41 |
| 2.3.1 | Χημική σύσταση εναλλακτικών καυσίμων και ντίζελ.....                   | 43 |
| 2.3.2 | Ιδιότητες των πρώτων υλών για την παραγωγή βιοντίζελ.....              | 49 |
| 2.3.3 | Επιπτώσεις της σύστασης των τριγλυκεριδίων στη παραγωγή βιοντίζελ..... | 50 |
| 2.4   | Παραγωγή βιοντίζελ.....  | 57 |
| 2.5   | Παραγωγή βιοντίζελ με μετεστεροποίηση.....                             | 58 |
| 2.5.1 | Μέθοδοι καταλυτικής μετεστεροποίησης.....                              | 61 |
| 2.5.2 | Πλεονεκτήματα ενζυμικής κατάλυσης στη παραγωγή βιοντίζελ.....          | 66 |
| 2.5.3 | Κρίσιμοι παράγοντες ενζυμικής σύνθεσης βιοντίζελ.....                  | 66 |
| 2.6   | Μέθοδοι μη καταλυτικής μετεστεροποίησης.....                           | 76 |
| 2.7   | Επίδραση διαφόρων παραμέτρων πάνω στη παραγωγή βιοντίζελ.....          | 79 |

### **Κεφάλαιο 3: Ο ρόλος των μικροοργανισμών στο βιοντίζελ**

|   |     |
|---|-----|
| 3.1 Εισαγωγή.....   | 82  |
| 3.2 Μικροοργανισμοί διαθέσιμοι για το βιοντίζελ.....                                | 82  |
| 3.3 Ελαιούχοι μύκητες.....  | 85  |
| 3.3.1 Βιοχημεία συσσώρευσης λιπιδίων.....   | 87  |
| 3.3.2 Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων στους μύκητες.....                                   | 87  |
| 3.3.3 Βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων και βιογένεση λιπαρών σωμάτων.....                  | 89  |
| 3.3.4 Μεταβολική μηχανική στους ελαιούχους μύκητες.....                             | 90  |
| 3.3.5 Επιπτώσεις των συνθηκών καλλιέργειας στις ελαιούχες ζύμες.....                | 91  |
| 3.3.6 Υποστρώματα και πρώτες ύλες.....  | 93  |
| 3.4 Τριγλυκερίδια στους προλαρυωτικούς μικροοργανισμούς.....                        | 94  |
| 3.4.1 Σχηματισμός τριγλυκεριδίων στα βακτήρια.....                                  | 94  |
| 3.4.2 Φυσιολογία του βακτηριακού μεταβολισμού τριγλυκεριδίων.....                   | 96  |
| 3.4.3 Βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων στα βακτήρια.....                                   | 96  |
| 3.4.4 Ο ρόλος του βακτηριδιακού τριγλυκεριδίου.....                                 | 98  |
| 3.4.5 Δυνατότητες εφαρμογών των βακτηριακών τριγλυκεριδίων.....                     | 99  |
| 3.5 Μικροφύκη.....  | 101 |
| 3.5.1 Πλεονεκτήματα χρήσης μικροφυκών για τη παραγωγή βιοντίζελ.....                | 101 |
| 3.5.2 Λιπιδιακό περιεχόμενο μικροφυκών και παραγωγικότητα.....                      | 103 |
| 3.5.3 Βασικά στάδια παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη.....                          | 105 |
| 3.5.4 Μικροφύκη και γενετική μηχανική.....  | 108 |
| 3.5.5 Μεταβολική μηχανική μικροφυκών και ενίσχυση της παραγωγής<br>βιοκαυσίμων..... | 109 |
| 3.5.6 Κυανοβακτήρια.....  | 111 |
| 3.5.7 Βιοκαύσιμα και κυανοβακτήρια.....   | 113 |

## **Κεφάλαιο 4: Η Βιοτεχνολογία στη παραγωγή βιοντίζελ**

|   |     |
|---|-----|
| 4.1 Μεταβολικές ρυθμίσεις των μικροβιακών λιπιδίων.....   | 115 |
| 4.2 Βελτίωση της παραγωγής των μικροβιακών λιπιδίων.....  | 116 |
| 4.3 Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων σε μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται για<br>SCO.....                   | 123 |
| 4.4 Ενίσχυση λιπιδιακής παραγωγής.....  | 129 |
| 4.41 Επισκόπηση του γενικού μονοπατιού βιοσύνθεσης λιπιδίων.....  | 129 |
| 4.4.2 Υπερέκφραση ενζύμων που βρίσκονται στο μεταβολικό μονοπάτι σχηματισμού των<br>τριγλυκεριδίων..... | 131 |
| 4.5 Ποιότητα του βιοντίζελ προερχόμενου από μικροοργανισμούς.....                                       | 134 |
| 4.6 Επιθυμητές ιδιότητες ξενιστών για βιοκαύσιμα.....   | 134 |
| 4.7 Τεχνολογίες για την ενίσχυση της παραγωγής λιπιδίων.....  | 135 |
| 4.8 Προοπτικές της μικροβιακής παραγωγής βιοντίζελ.....   | 137 |
| 4.8.1 Παράδειγμα παραγωγής Microdiesel.....   | 140 |
| 4.8.2 Παράδειγμα παραγωγής βιοντίζελ από ελαιούχο μύκητα.....   | 141 |
| 4.9 Μελλοντικές προοπτικές της συστημικής μεταβολικής μηχανικής για την παραγωγή<br>βιοκαυσίμων.....    | 148 |

## **Κεφάλαιο 5: Ερωτηματικά για τα βιοκαύσιμα και ανάγκη εξέλιξης**

|  |     |
|--|-----|
| 5.1 Συμπεράσματα.....                                      | 151 |
| 5.2 Ερωτηματικά για τα βιοκαύσιμα και ανάγκη εξέλιξης..... | 152 |
| Βιβλιογραφία.....  | 159 |



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η βιβλιογραφική επισκόπηση της παραγωγής του εναλλακτικού καυσίμου βιοντίζελ, με τις σύγχρονες συμβατικές μεθόδους και με τις μελλοντικές εν δυνάμει βιοτεχνολογικές μεθόδους.

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. Το βιοντίζελ αποτελεί ένα ανανεώσιμο καύσιμο για μηχανές ντίζελ το οποίο προέρχεται από φυτικά έλαια, όπως σογιέλαιο, και το οποίο πληροί τις προδιαγραφές κατά ASTM D6751. Κάποιες από τις κύριες πηγές βιοντίζελ που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι η σόγια και η ελαιοκράμβη. Οι απαιτήσεις για αποδοτικότερες και μη εδώδιμες πηγές ελαίων, ώστε να μην υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ τροφής και καυσίμων, οδήγησε στην ανάπτυξη παραγωγής βιοντίζελ από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα και χρησιμοποιημένα έλαια και λίπη, καθώς και έλαια προερχόμενα από μη εδώδιμα φυτά (πχ. *Jatropha*). Το έλαιο το οποίο θα αποτελέσει την πρώτη ύλη για το βιοντίζελ παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των ιδιοτήτων του τελικού προϊόντος.

Η βασική μέθοδος παραγωγής βιοντίζελ είναι η μετεστεροποίηση. Η μετεστεροποίηση πραγματοποιείται μεταξύ τριγλυκεριδίων και μιας μικρού μήκους αλκοόλης, προς σχηματισμό μονοαλκυλεστέρων, δηλαδή βιοντίζελ, και γλυκερόλης. Η αντίδραση της μετεστεροποίησης μπορεί να συμβεί είτε καταλυτικά είτε μη καταλυτικά.

Ωστόσο, ακόμα και με αυτές τις προσεγγίσεις, εξακολουθούν και υπάρχουν σοβαρά προβλήματα και αμφιβολίες για την αποτελεσματικότητα των μεθόδων αυτών. Στο σημείο αυτό, μια νέα προσέγγιση που δύναται να δώσει λύση στο μέλλον είναι η παραγωγή ελαίων από μικροοργανισμούς (Single Cell Oils, SCO). Οι μικροοργανισμοί αυτοί ονομάζονται ελαιούχοι οργανισμοί, και ορίζονται ως οι μικροοργανισμοί που το μικροβιακό λιπιδιακό περιεχόμενό τους υπερβαίνει το 20%. Τέτοιοι μικροοργανισμοί ανήκουν στα είδη των ζυμών, των μυκήτων, των μικροφυκών και των, σχετικά προσφάτως διαπιστωμένο, βακτηρίων.

Με τη βοήθεια της ανάπτυξης της βιοτεχνολογίας, νέων τεχνικών, στρατηγικών και γενετικών εργαλείων έχει γίνει εφικτή η «κατασκευή» μικροοργανισμού με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά για την παραγωγή SCO, ή ακόμα και για την απευθείας παραγωγή βιοντίζελ. Οι επιστήμονες έχουν πλέον τη δυνατότητα να επεμβαίνουν στο γενετικό υλικό των κυττάρων και να τροποποιούν τα μεταβολικά μονοπάτια των μικροοργανισμών. Αυτές οι νέες τάσεις των βιολογικών και βιοτεχνολογικών επιστημών εκτιμάται ότι θα παίξουν καίριο ρόλο στην ανάπτυξη των ανανεώσιμων καυσίμων.





## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Κλίμα-φαινόμενο του θερμοκηπίου-ανανεώσιμες πηγές ενέργειας**

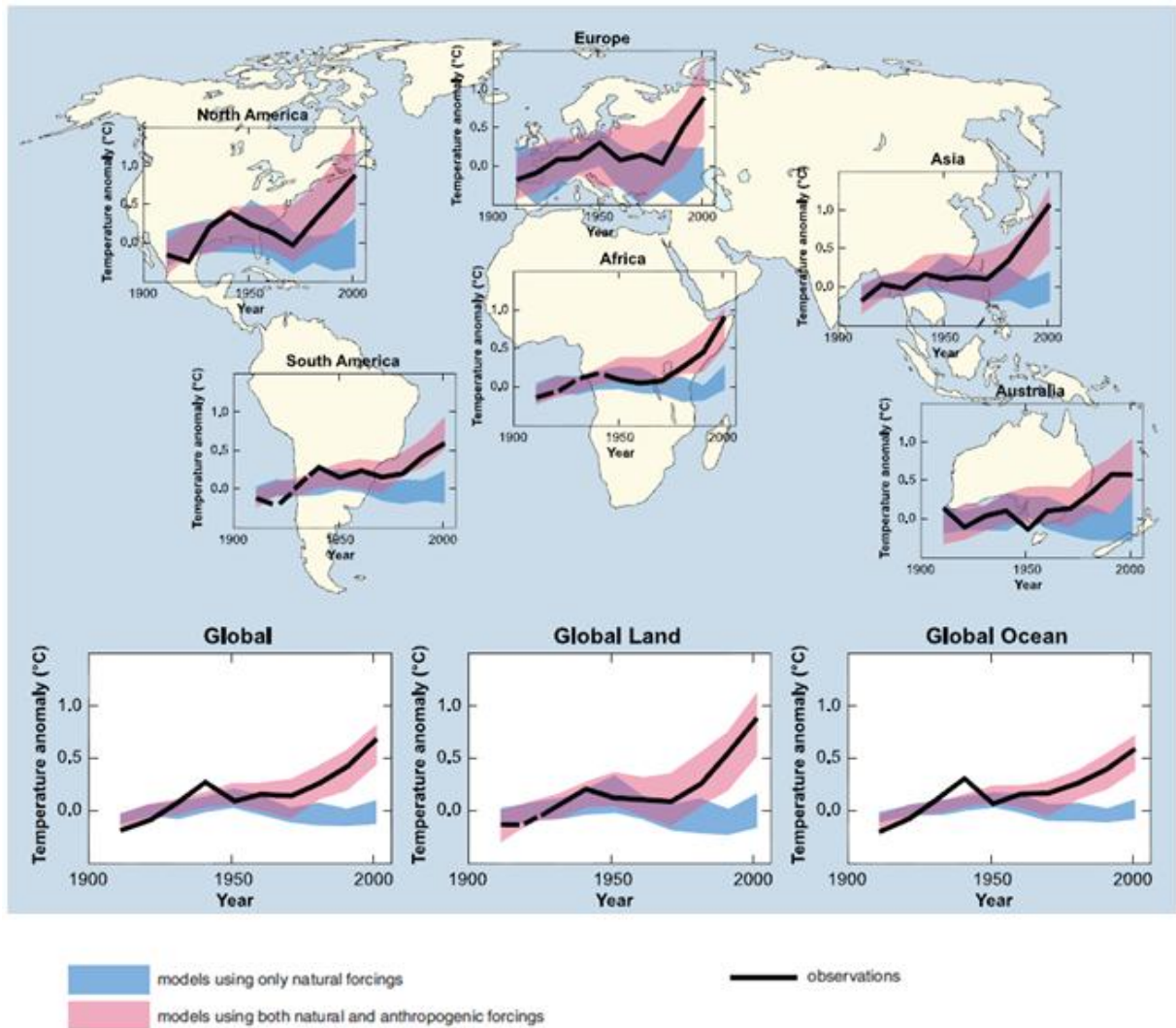
### **1.1 Εισαγωγή**

Είναι ευρέως γνωστό σήμερα πως ο πλανήτης μας βρίσκεται σε μεγάλο κίνδυνο εξαιτίας κυρίως των ανθρωπογενών παραγόντων. Οι κλιματικές αλλαγές αποτελούν ίσως έναν από τους πιο άμεσους κινδύνους που καλείται να αντιμετωπίσει η επιστημονική κοινότητα.

Με τον όρο κλιματικές αλλαγές εννοούμε:

- Κατά IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change): τις αλλαγές αυτές του κλίματος, οι οποίες μπορούν να εντοπιστούν (π.χ. με στατιστικές μελέτες) και αφορούν την μέση τιμή ή/και τις διακυμάνσεις των χαρακτηριστικών του κλίματος οι οποίες εμμένουν για μια παρατεταμένη χρονική περίοδο, συνήθως δεκαετιών ή και περισσότερο. Αναφέρεται σε οποιαδήποτε αλλαγή κλίματος είτε εξαιτίας φυσικών αιτιών είτε εξαιτίας ανθρώπινων δραστηριοτήτων [1].
- Κατά UNFCCC (United Nations Framework Convention on Climate Change): τις αλλαγές του κλίματος που οφείλονται άμεσα ή έμμεσα σε ανθρώπινες δραστηριότητες που αλλάζουν τη σύσταση της ατμόσφαιρας και είναι επιπρόσθετες στις κλιματικές αλλαγές που προκαλούνται από φυσικά αίτια [1].

Η αλλαγή κλίματος στο πλανήτη μας είναι ένα αναμφισβήτητο γεγονός και υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις όπως: η αύξηση θερμοκρασίας της ατμόσφαιρας και των ωκεανών, η τήξη των πάγων, η άνοδος της στάθμης της θάλασσας, και τα ακραία καιρικά φαινόμενα όπως πλημμύρες, τυφώνες κτλ. Τα χρόνια από το 1995 και μετά έχουν χαρακτηριστεί ως τα θερμότερα χρόνια από το 1850. Η τάση για αύξηση της θερμοκρασίας από το 1956 ως το 2005 είναι σχεδόν διπλάσια σε σχέση με αυτή του διαστήματος 1906-2005. Η στάθμη της θάλασσας για το διάστημα 1961-2003 αυξήθηκε κατά μέσο όρο με ρυθμό 1,8mm/χρόνο και για το διάστημα 1993-2003 κατά 3,1 mm/χρόνο. Επίσης, δεδομένα από δορυφόρους δείχνουν ότι οι πάγοι του Αρκτικού ωκεανού μειώνονται κατά 2,7% ανά δεκαετία και τα νούμερα το καλοκαίρι φτάνουν το 7,4% ανά δεκαετία. Οι θερμοκρασίες στην επιφάνεια των μόνιμων παγωμένων περιοχών στη Αρκτική έχουν αυξηθεί από το 1980 κατά 3°C. Ακόμα, τα τελευταία 50 χρόνια οι κρύες μέρες και νύχτες μειώνονται, ενώ αυξάνονται οι ζεστές μέρες και νύχτες, τα φαινόμενα των καυσώνων και των έντονων βροχοπτώσεων παρατηρούνται πιο συχνά σε πολλές περιοχές και ακόμη έχει παρατηρηθεί τάση αύξησης της δραστηριότητας των τροπικών κυκλώνων όπως, στο βόρειο Ατλαντικό αλλά και σε άλλες περιοχές. (Σχήμα 1)



Σχήμα 1 : Διακύμανση της θερμοκρασίας στην επιφάνεια της Γης. Τα αποτελέσματα έχουν προσομοιωθεί σε κλιματικά μοντέλα χρησιμοποιώντας είτε τους φυσικούς παράγοντες, είτε τους φυσικούς και ανθρωπογενείς παράγοντες. Οι συνεχείς γραμμές αναπαριστούν τους μέσους όρους των παρατηρήσεων για το 1906-2005 (οι ασυνεχείς γραμμές αφορούν τις περιοχές όπου η χωρική κάλυψη ήταν λιγότερη από 50%). Η μπλε σκίαση προκύπτει από κλιματικά μοντέλα που έλαβαν υπόψη τους φυσικούς παράγοντες της ηλιακής δραστηριότητας και των ηφαιστειών. Η κόκκινη σκίαση προκύπτει από κλιματικά μοντέλα που χρησιμοποίησαν και φυσικούς και ανθρωπογενείς παράγοντες. (IPCC, *Climate change 2007: Synthesis Report*, σελ.40)

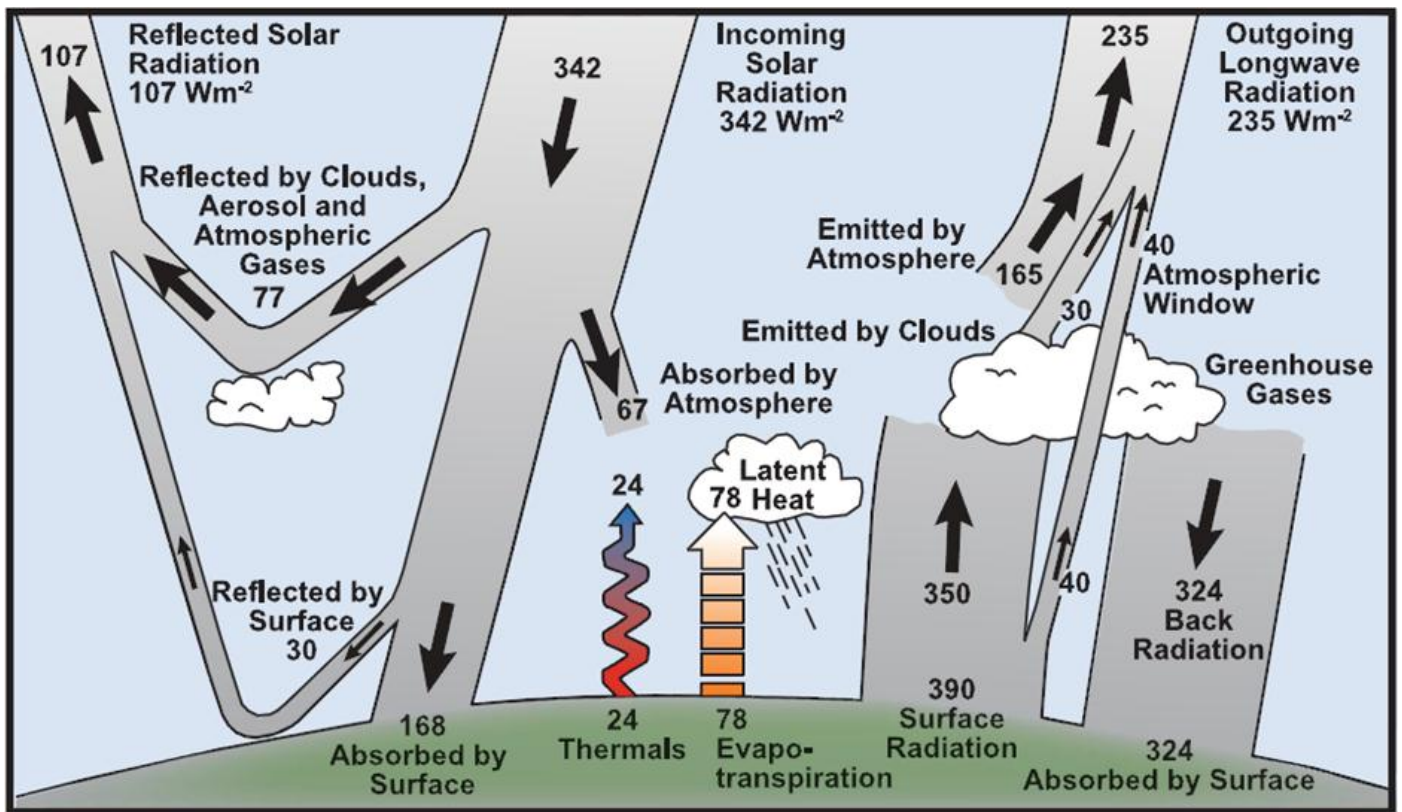
## 1.2 Κλίμα-Φαινόμενο του θερμοκηπίου

Το κλίμα είναι ένα πολύπλοκο διαδραστικό σύστημα που αποτελείται από την ατμόσφαιρα, την ξηρά, το χιόνι και τον πάγο, τους ωκεανούς και άλλα υγρά τμήματα, καθώς και έμβιους οργανισμούς. Το κλίμα χαρακτηρίζεται ως προς μια μέση θερμοκρασία και τις διακυμάνσεις

της, τις κατακρημνίσεις και τον άνεμο για μια εκτεταμένη χρονική περίοδο (συνήθως 30 χρόνων). Το σύστημα του κλίματος εξελίσσεται με τον χρόνο καθώς επηρεάζεται από τους διάφορους εσωτερικούς του παράγοντες αλλά και από μεταβολές εξωτερικών παραγόντων οι οποίοι και του ασκούν επιρροή (forcings) [2]. Οι μεταβολές αυτές ή αλλιώς εξωτερικές πιέσεις (external forcings) αναφέρονται σε παράγοντες εκτός του συστήματος, που αφορούν το κλίμα και προκαλούν αλλαγές σε αυτό, όπως για παράδειγμα ηφαιστειακή έκρηξη, ανθρώπινες δραστηριότητες και οι οποίες έχουν επίπτωση στη σύσταση της ατμόσφαιρας [3]. Πηγή ενέργειας στο σύστημα του κλίματος είναι η ηλιακή ακτινοβολία. Υπάρχουν τρεις βασικοί τρόποι με τους οποίους επηρεάζεται η ισορροπία μεταξύ Γης και ηλιακής ακτινοβολίας:

1. Μεταβάλλοντας την εισερχόμενη ηλιακή ακτινοβολία (πχ. καθώς μεταβάλλεται η τροχιά της Γης γύρω από τον Ήλιο)
2. Μεταβάλλοντας το κλάσμα της ηλιακής ακτινοβολίας που ανακλάται (πχ. αλλαγές νέφη ή τμήματα της ατμοσφαιράς)
3. Μεταβάλλοντας τα μικροκύματα που εκπέμπει η Γη πίσω στο διάστημα (πχ μεταβάλλοντας τη σύσταση των αερίων του θερμοκηπίου)

Το κλίμα ανταποκρίνεται άμεσα ή έμμεσα σε τέτοιες αλλαγές με διάφορους μηχανισμούς. Το ποσό της ενέργειας που φτάνει στα ανώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας της Γης ανά δευτερόλεπτο και ανά  $m^2$  κατά τη διάρκεια της μέρας, είναι περίπου 1.370 Watt, και το ποσό της ενέργειας που φτάνει στην επιφάνεια του πλανήτη είναι περίπου το  $\frac{1}{4}$  αυτής (Σχήμα 2). Περίπου το 30% της ηλιακής ακτινοβολίας που φτάνει στην επιφάνεια της ατμόσφαιρας ανακλάται πίσω στο διάστημα. Τα  $\frac{2}{3}$  του ποσού αυτού ανακλώνται από τα νέφη και από τα αέρια σωματίδια που υπάρχουν στην ατμόσφαιρα, γνωστά και ως αερολύματα (aerosol). Το  $\frac{1}{3}$  που απομένει ανακλάται από τις «λευκόχρωμες» περιοχές της γης όπως είναι οι έρημοι και οι περιοχές καλυμμένες με χιόνι. Η ακτινοβολία που δεν ανακλάται πίσω στο διάστημα απορροφάται από την επιφάνεια της Γης και την ατμόσφαιρα. Το ποσό αυτό είναι περίπου  $240 \text{ Watt}/m^2$ . Για να ισορροπήσει το ισοζύγιο αυτό, η Γη θα πρέπει να ανακλά περίπου τόση ενέργεια όση εισρέει σ' αυτήν. Πράγματι, η Γη ανακλά ακτινοβολία στη ζώνη του υπέρυθρου. Εάν η Γη ακτινοβόλυνε  $240 \text{ Watt}/m^2$  τότε η θερμοκρασία στην επιφάνειά της θα ήταν περίπου  $-19^\circ\text{C}$ . Ο λόγος που η επιφάνεια της Γης διατηρείται θερμή οφείλεται στη παρουσία των αερίων του θερμοκηπίου (GreenHouse Gases, GHG).



Σχήμα 2: Υπολογισμός της ενεργειακής ισορροπίας της Γης. Η εισερχόμενη ηλιακή ακτινοβολία απορροφάται από τη Γη και την ατμόσφαιρα, απελευθερώνοντας το ίδιο ποσό σε υπέρυθρη ακτινοβολία. Περίπου το μισό της εισερχόμενης ηλιακής ακτινοβολίας απορροφάται από την επιφάνεια της Γης. Η ενέργεια αυτή μεταφέρεται στην ατμόσφαιρα είτε μέσω συναγωγής, είτε μέσω εξατμισιοδιαπνοής (evapotranspiration) ,είτε μέσω ακτινοβολίας που απορροφούν τα αέρια του θερμοκηπίου και την ακτινοβολούν πίσω στη Γη και στο διάστημα (IPCC, Frequentlyasked questions σελ 94)

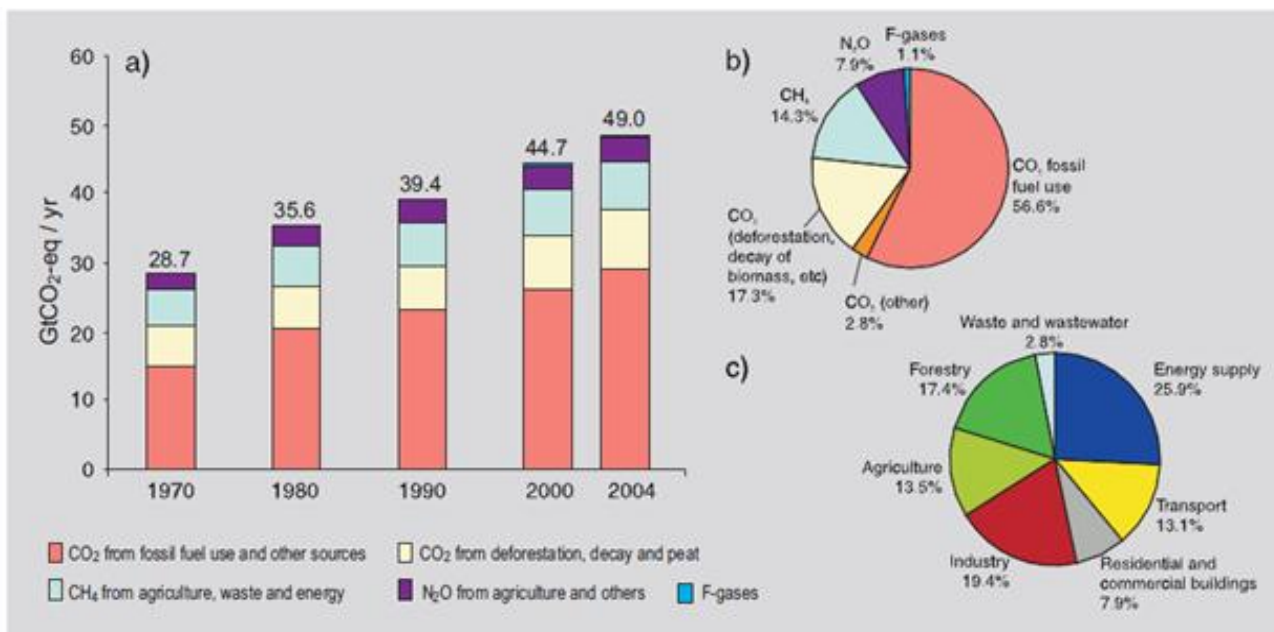
Τα GHG λειτουργούν σαν ένα «κάλυμμα» για την υπέρυθρη ακτινοβολία της Γης με αποτέλεσμα η μέση θερμοκρασία να είναι  $15^{\circ}C$ . Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται φυσικό φαινόμενο του θερμοκηπίου (σχήμα 2). Τα σημαντικότερα GHG είναι το διοξείδιο του άνθρακα και οι υδρατμοί.

Παρόλο που το φαινόμενο του θερμοκηπίου είναι αυτό που δίνει ζωή στον πλανήτη μας, ανθρωπογενείς δραστηριότητες και κυρίως η καύση των ορυκτών καυσίμων και η αποψίλωση των δασών έχουν εντείνει ιδιαίτερα το φαινόμενο αυτό προκαλώντας την υπερθέρμανση του πλανήτη [2].

### 1.3 Αέρια του θερμοκηπίου

Για το διάστημα 1970-2004 έχει παρατηρηθεί αύξηση των GHGs κατά 70% σε σχέση με την προβιομηχανική περίοδο (έναρξη της βιομηχανικής περιόδου θεωρείται το 1750) και υπαίτιος αυτού είναι οι ανθρωπίνες δραστηριότητες (σχήμα 3). Η αύξηση της συγκέντρωσης των GHGs και των αερολυμάτων (aerosols) στην ατμόσφαιρα εξαιτίας της αποψίλωσης των δασών, των αλλαγών του εδάφους και της ηλιακής ακτινοβολίας, αυξάνουν αυτή τη «κάλυψη» και επηρεάζουν την ισορροπία του συστήματος του κλίματος. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι τα GHGs έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την απορρόφηση, τη διασπορά και την εκπομπή της ακτινοβολίας μεταξύ ατμόσφαιρας και επιφάνεια της Γης και έτσι κατ' επέκταση, ασκούν έντονη επιρροή στο κλίμα.

Η επίδραση ενός παράγοντα που μπορεί να προκαλέσει κλιματικές αλλαγές, όπως τα αέρια του θερμοκηπίου, συχνά εκτιμάται με την *πίεση ακτινοβολίας* (radiative forcing [60]). Η πίεση ακτινοβολίας είναι ένα μέτρο που αφορά το πως διαταράσσεται η ενεργειακή ισορροπία του συστήματος Γη-ατμόσφαιρα όταν μεταβάλλονται παράγοντες που επηρεάζουν το κλίμα. Η λέξη «ακτινοβολία/radiation» προκύπτει εξαιτίας αυτών των παραγόντων οι οποίοι αλλάζουν την ισορροπία μεταξύ της εισερχόμενης ηλιακής ακτινοβολίας και της εξερχόμενης υπέρυθρης μέσω της ατμόσφαιρας. Αυτή η ισορροπία ακτινοβολίας ελέγχει την θερμοκρασία στην επιφάνεια της Γης. Ο όρος «πίεση/forcing» χρησιμοποιείται για να υποδείξει πως η ισορροπία αυτή απωθείται από τα φυσικά της όρια και τη φυσιολογική της κατάσταση. Η πίεση ακτινοβολίας συνήθως προσδιορίζεται ως: « ο ρυθμός αλλαγής της ενέργειας ανά την έκταση της περιοχής της υδρογείου, μετρούμενη στην ανώτερη επιφάνεια της ατμόσφαιρας και εκφράζεται σε  $\text{Watt/m}^2$ ». Όταν η πίεση ακτινοβολίας εξαιτίας κάποιου παράγοντα ή κάποιου συνόλου παραγόντων είναι θετική, τότε το ισοζύγιο του συστήματος Γη-ατμόσφαιρα είναι θετικό και έχουμε τη θέρμανση του συστήματος. Αντίθετα, όταν η πίεση ακτινοβολίας είναι αρνητική τότε το ισοζύγιο είναι αρνητικό και οδηγεί στη ψύξη του συστήματος.[2]



Σχήμα 3: (α) Οι παγκόσμιες ετήσιες εκπομπές GHG ανθρωπογενών παραγόντων από το 1970-2004. Περιλαμβάνονται τα αέρια: CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, HFCs, CFCs, SF<sub>6</sub>. (β) Ποσοστά διαφόρων ανθρωπογενών GHGs στις συνολικές εκπομπές του 2004 με βάση το CO<sub>2</sub>-eq. (γ) Τα ποσοστά εκπομπής GHGs σε διάφορους τομείς το 2004 με βάση το CO<sub>2</sub>-eq (IPCC, *Climate change 2007: Synthesis report*, σελ.36).

Στα αέρια του θερμοκηπίου περιλαμβάνονται:

- **Διοξείδιο του άνθρακα:** έχει αυξηθεί εξαιτίας των ορυκτών καυσίμων που χρησιμοποιούμε στις μεταφορές, στη θέρμανση και ψύξη κτιρίων, στις βιομηχανίες τσιμέντων και άλλων αγαθών. Η αποψίλωση των δασών αυξάνει το CO<sub>2</sub> αφού τα φυτά είναι οι φυσικοί καταναλωτές του [2]. 10.000 χρόνια πριν την βιομηχανική επανάσταση το ατμοσφαιρικό CO<sub>2</sub> ήταν σχεδόν σταθερό στα 280 ppm (μόρια του αερίου προς μόρια ξηρού αέρα). Το 2009 τα επίπεδα του CO<sub>2</sub> έφτασαν τα 386.8 ppm [6].
- **Μεθάνιο:** βασικές αιτίες για την αύξησή του είναι η γεωργία, η διανομή του φυσικού αερίου και οι χωματερές. Επίσης, μεθάνιο απελευθερώνεται και μέσω φυσικών διεργασιών που λαμβάνουν μέρος σε υδροβιότοπους [2].
- **Οξείδιο αζώτου:** υπεύθυνο για τις εκπομπές του είναι η χρήση λιπασμάτων και η καύση ορυκτών καυσίμων. Φυσικές διεργασίες στο έδαφος και στους ωκεανούς ελευθερώνουν επίσης, οξείδια αζώτου [2].

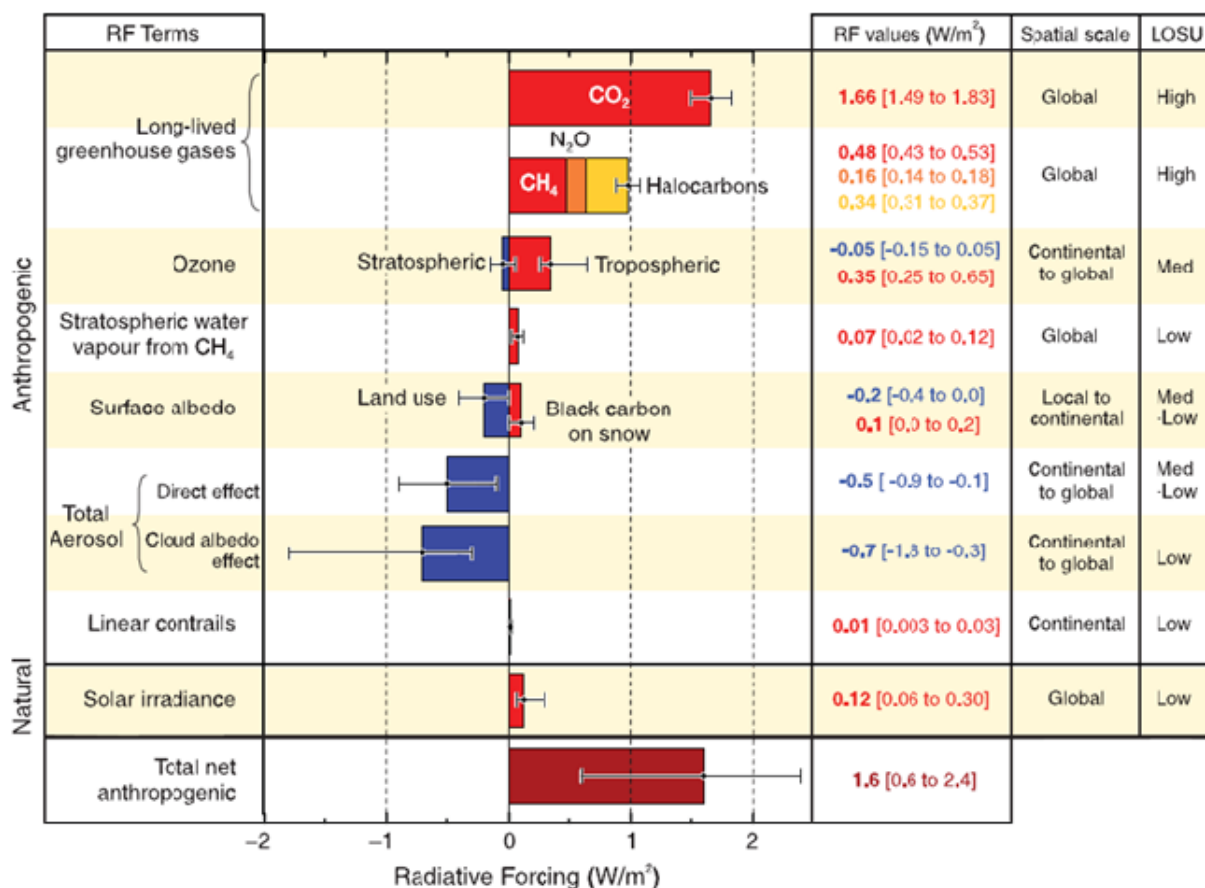
- *Αλογονάνθρακες:* βασική αιτία αύξησης αυτών είναι οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Οι κυριότεροι αλογονάνθρακες είναι οι χλωροφθοράνθρακες και πιο συγκεκριμένα οι CFC-11 και CFC-12. Οι χλωροφθοράνθρακες αυτοί χρησιμοποιούνταν εκτεταμένα στα συστήματα ψύξης και σε άλλες βιομηχανικές διεργασίες μέχρις ότου ανακαλύφθηκε ότι προκαλούν την διάσπαση του όζοντος στη στρατόσφαιρα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία της τρύπας του όζοντος πάνω από την Ανταρκτική. Τα επίπεδα των χλωροφθορανθράκων έχουν μειωθεί λόγω διεθνών κανονισμών που θεσπίστηκαν για την προστασία του όζοντος [2].
- *Όζον:* είναι ένα αέριο του θερμοκηπίου το οποίο παράγεται και διασπάται συνεχώς στην ατμόσφαιρα με χημικές αντιδράσεις. Οι ανθρώπινες δραστηριότητες έχουν αυξήσει τα επίπεδα του όζοντος στην τροπόσφαιρα ελευθερώνοντας μονοξείδιο του άνθρακα, υδρογονάνθρακες και οξείδια του αζώτου τα οποία αντιδρούν μεταξύ τους στην ατμόσφαιρα και παράγουν όζον [2].
- *Υδρατμοί:* Είναι ίσως το βασικότερο και πιο άφθονο αέριο του θερμοκηπίου. Εν αντιθέσει με τα άλλα αέρια του θερμοκηπίου, οι ανθρώπινες δραστηριότητες παίζουν πολύ μικρό ρόλο στη συσσώρευση υδρατμών στην ατμόσφαιρα. Έμμεσα όμως, οι άνθρωποι έχουν την δυνατότητα να επηρεάζουν την ποσότητα των υδρατμών αλλάζοντας το κλίμα. Για παράδειγμα μια θερμότερη ατμόσφαιρα περιέχει περισσότερους υδρατμούς από κάποια με χαμηλότερη θερμοκρασία. Να σημειωθεί επίσης ότι οι εκπομπές μεθανίου υποκινούν κάποιες χημικές αντιδράσεις στην στρατόσφαιρα προς παραγωγή μικρής ποσότητας υδρατμών [2].
- *Aerosols (αερόλυμα):* Το ατμοσφαιρικό αερόλυμα αποτελείται από αιωρούμενα σωματίδια διαφορετικής φυσικής και χημικής σύστασης, μεγέθους και συγκέντρωσης. Κάποια αερολύματα εκπέμπονται απευθείας στην ατμόσφαιρα (πρωτογενή) ενώ άλλα σχηματίζονται στην ατμόσφαιρα μετά από μεταξύ τους αντιδράσεις (δευτερογενή). Τα αερολύματα αποτελούνται από σωματίδια τόσο φυσικής προέλευσης όσο και από ανθρώπινες δραστηριότητες. Παράγονται από ορυκτά καύσιμα και βιομάζα που περιέχουν θειούχα και οργανικά συστατικά και αιθάλη (black carbon). Επιπλέον, άλλη πηγή αερολυμάτων είναι η εξόρυξη μετάλλων και άλλες βιομηχανικές διεργασίες που αυξάνουν τα μικροσωματίδια στην ατμόσφαιρα. Να σημειωθεί επίσης ότι τα aerosol έχουν την ικανότητα να απορροφούν και να εκπέμπουν θερμότητα, να ανακλούν το φως και με αυτό το τρόπο συμβάλλουν είτε στη θέρμανση είτε στη ψύξη της ατμοσφαιρας [2].



Συνοψίζοντας, τα τέσσερα πιο σημαντικά GHGs που συσσωρεύονται στην ατμόσφαιρα εξαιτίας ανθρωπογενών δραστηριοτήτων είναι: CO<sub>2</sub> (διοξείδιο του άνθρακα), CH<sub>4</sub> (μεθάνιο), N<sub>2</sub>O (υποξείδιο του αζώτου), αλογονάνθρακες και πιο ειδικά οι CFC-11 και CFC-12. Όταν ο ρυθμός παραγωγής των GHGs είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό κατανάλωσης/απομάκρυνσης τους, τότε συσσωρεύονται και αυξάνεται η συγκέντρωσή τους στην ατμόσφαιρα. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις των CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, και N<sub>2</sub>O, συγκρινόμενες με την προβιομηχανική περίοδο, έχουν σημειώσει σημαντική άνοδο από το 1750 μέχρι και σήμερα. Ειδικά για τα τελευταία 650.000 χρόνια, οι συγκεντρώσεις του CH<sub>4</sub> και CO<sub>2</sub> το 2005 ξεπέρασαν κατά πολύ τα φυσικά τους όρια. Στη προβιομηχανική περίοδο τα επίπεδα της συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> ήταν 280ppm και το 2005 άγγιξαν τα 379 ppm. Για την περίοδο 1995-2005 ο ρυθμός αύξησης του ήταν 1,9ppm/χρόνο ενώ για το διάστημα 1960-2005 ήταν 1,4ppm/χρόνο. Παρομοίως, αυξητική τάση υπάρχει και στα επίπεδα του μεθανίου. Την προβιομηχανική εποχή ήταν στο επίπεδο των 715 ppb και στις αρχές του 1990 έφτασε τα 1732 ppb και το 2005 τα 1774 ppb. Ο ρυθμός αύξησής του έχει μειωθεί από τη δεκαετία του '90 και μετά και τα τελευταία χρόνια έχει παραμείνει σχεδόν σταθερός. Το ατμοσφαιρικό N<sub>2</sub>O έχει σημειώσει αύξηση από 270 ppb στην προβιομηχανική εποχή στα 319ppb το 2005. Οι αλογονάνθρακες και κυρίως οι υδροφθοράνθρακες, λόγω των ανθρωπίνων δραστηριοτήτων έχουν σημειώσει αύξηση από σχεδόν μηδενικά επίπεδα. Υπάρχει η πεποίθηση ότι οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες από το 1750 έχουν συνεισφέρει στην θέρμανση του πλανήτη πίεση ακτινοβολίας: +1,6W/m<sup>2</sup> (Σχήμα 4) [1].



## παράγοντες πίεσης ακτινοβολίας



Σχήμα 4 : Παράγοντες πρόκλησης πίεσης ακτινοβολίας, προερχόμενοι είτε από φυσικά αίτια, είτε από ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Οι τιμές αφορούν το 2005 συγκριτικά με το 1750. Οι γραμμές στις χρωματιστές μπάρες αφορούν το ποσοστό αβεβαιότητας (IPCC, *Climate change 2007: Synthesis report*, σελ.39).

### 1.4 Πιθανά σενάρια επιπτώσεων

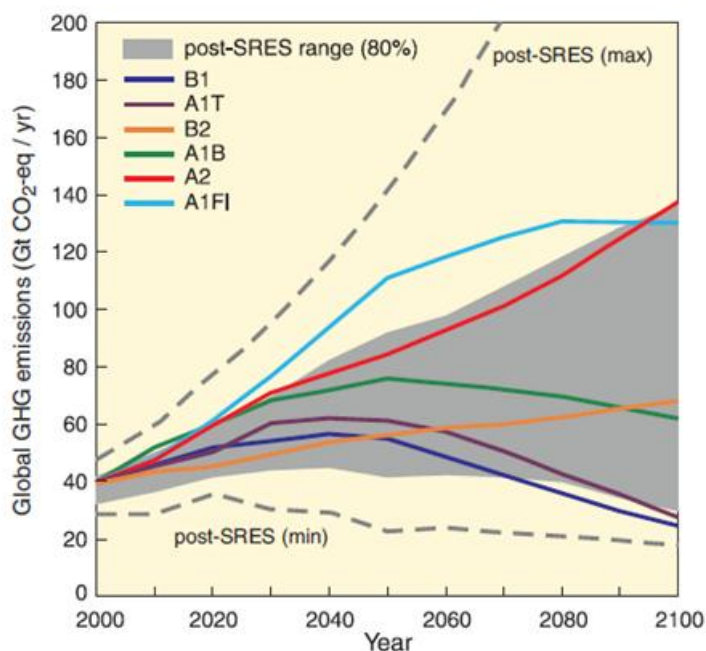
Η IPCC ανέπτυξε μακροπρόθεσμα σενάρια (Special Report on Emission Scenarios, SRES) που αφορούν τις εκπομπές αερίων (σχήμα 5). Αυτά τα σενάρια έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για αναλύσεις πιθανών εκβάσεων των κλιματικών αλλαγών, τις επιπτώσεις που μπορεί να έχουν και τις επιλογές εξομάλυνσης (mitigation) των κλιματικών αλλαγών. Τα σενάρια για τις εκπομπές των GHGs αναπτύχθηκαν μέσω πολύπλοκων δυναμικών συστημάτων που καθορίζονται από διάφορους παράγοντες όπως η δημογραφική ανάπτυξη, η κοινωνικοοικονομική ανάπτυξη και η τεχνολογία. Ο σκοπός των σεναρίων αυτών είναι να παρουσιάσουν πιθανές εικόνες του μέλλοντος ενώ ταυτόχρονα είναι ένα χρήσιμο εργαλείο το οποίο αναλύει το πως οι παράγοντες επηρεάζουν τα αποτελέσματα των μελλοντικών εκπομπών και αξιολογούν τις αβεβαιότητες που σχετίζονται με αυτά. Τέλος, βοηθούν στην

ανάλυση της κλιματικής αλλαγής με κλιματικά μοντέλα και στην αξιολόγηση των επιπτώσεων, της προσαρμοστικότητας (adaptation) και εξομάλυνσης (mitigation). Παρόλα αυτά υπάρχει μεγάλο ποσοστό αβεβαιότητας για το αν θα ακολουθηθούν τα μονοπάτια που περιγράφονται [4].

Σύμφωνα με τα SRES τα πιθανά σενάρια χωρίζονται σε τέσσερις οικογένειες σεναρίων: A1, A2, B1, B2 και η κάθε μια εξερευνά διαφορετικά μονοπάτια συσχετίζοντας διάφορους παράγοντες με τις εκπομπές των GHGs. Τα SRES δεν περιλαμβάνουν κάποια επιπλέον πολιτική που αφορά το κλίμα πέρα από αυτές που αναφέρθηκαν.

- *Σενάριο A1*: Περιγράφει έναν κόσμο με ταχύτατη οικονομική ανάπτυξη, ο παγκόσμιος πληθυσμός αυξάνεται μέχρι τα μέσα του αιώνα και έπειτα αρχίζει η πτώση του, υπάρχει ανάπτυξη νέας πιο αποτελεσματικής τεχνολογίας και η κεντρική ιδέα είναι ότι υπάρχει ελαχιστοποίηση των διαφορών (convergence) μεταξύ των περιοχών, κοινωνικές και πολιτιστικές αλληλεπιδράσεις και ουσιαστική μείωση της διαφοράς του κατά κεφαλήν εισοδήματος. Το A1 χωρίζεται σε 3 υποομάδες που περιγράφουν εναλλακτικές πορείες της τεχνολογίας: A1FI: γίνεται εντατική χρήση των ορυκτών καυσίμων, A1T: γίνεται χρήση μη ορυκτών πηγών ενέργειας, A1B: υπάρχει ισορροπία μεταξύ όλων των πηγών [1,4].
- *Σενάριο A2*: Περιγράφει έναν κόσμο ετερογενή, με γρήγορη αύξηση του πληθυσμού και αργή οικονομική και τεχνολογική ανάπτυξη [1,4].
- *Σενάριο B1*: Περιγράφει έναν κόσμο όπου μειώνονται οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών περιοχών, με πληθυσμό παρόμοιο με του σεναρίου A1, αλλά με ταχύτερες αλλαγές στη δομή της οικονομίας, με μειωμένες υλικές ανάγκες και πιο «καθαρές» και αποτελεσματικές τεχνολογίες [1,4].
- *Σενάριο B2*: Περιγράφει έναν κόσμο όπου λύσεις για την οικονομική, κοινωνική και περιβαλλοντολογική αειφορία δίνονται σε συγκεκριμένες περιοχές. Ο πληθυσμός αυξάνεται, αλλά με χαμηλότερους ρυθμούς από ότι το σενάριο A2, υπάρχει ενδιάμεση οικονομική ανάπτυξη και βραδύτερες τεχνολογικές αλλαγές από ότι το σενάριο B1 και A1 [1,4].

### Σενάρια εκπομπών GHG από το 2000 ως το 2100



Σχήμα 5: Οι παγκόσμιες εκπομπές GHGs (σε GtCO<sub>2</sub>-eq per year) απουσία πολιτικών για τις κλιματικές αλλαγές: οι χρωματιστές γραμμές απεικονίζουν τα 6 SRES σενάρια, η σκιασμένη περιοχή απεικονίζει το 80% του εύρους πρόσφατων δημοσιευμένων μελετών (post-SRES) και η διακεκομμένη όλο το εύρος των post-SRES. Οι εκπομπές περιλαμβάνουν το CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub>, και F-gases (IPCC, *Climate change 2007: Synthesis report*, σελ.44).

### 1.5 Οι επιπτώσεις των κλιματικών αλλαγών

Για τις επόμενες δύο δεκαετίες προβλέπεται άνοδος 0,2°C/δεκαετία σύμφωνα με τα SRES. Ακόμα και αν οι συγκεντρώσεις όλων των GHGs και των αερολυμάτων παρέμεναν σταθερές στα επίπεδα του 2000 πάλι θα αναμέναμε αύξηση της θερμοκρασίας περίπου 0,1°C/δεκαετία. Επίσης, αν οι εκπομπές των GHGs παραμείνουν στα επίπεδα που είναι σήμερα ή αυξηθούν, θα προκαλέσουν περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας και το κλίμα θα υποστεί μεγάλες αλλαγές τον 21<sup>ο</sup> αιώνα, οι οποίες πιθανότατα θα είναι πολύ μεγαλύτερες από αυτές που παρατηρήθηκαν στον 20<sup>ο</sup>. Μεγαλύτερο εύρος πληροφοριών είναι πλέον διαθέσιμο για να περιγράψει κανείς τις πιθανές επιπτώσεις που θα έχει η αύξηση της θερμοκρασίας στους διάφορους τομείς, περιοχές και συστήματα. Οι επιπτώσεις που περιγράφονται παρακάτω θεωρούνται πολύ πιθανές:

### *Οικοσυστήματα:*

- υπέρβαση των ορίων της προσαρμοστικότητας των οικοσυστημάτων εξαιτίας των κλιματικών αλλαγών και των διαταραχών όπως πλημμύρες, ξηρασία κτλ. και παραγόντων όπως μόλυνση και υπερεκμετάλλευση φυσικών πόρων
- 20-30% είδη φυτών και ζώων απειλούνται με εξαφάνιση
- Προβλέπονται ριζικές αλλαγές στη δομή των οικοσυστημάτων και στη λειτουργία τους που θα επηρεάσουν τη βιοποικιλότητα, τα αγαθά και τον εφοδιασμό νερού και τροφής

### *Παραθαλάσσιες περιοχές*

- Το 2080 προβλέπεται εκατομμύρια άνθρωποι να υποφέρουν κάθε χρόνο από πλημμύρες εξαιτίας της ανόδου της στάθμης της θάλασσας. Πιο ευπαθείς θα είναι οι περιοχές κοντά σε εκβολές ποταμών και τα μικρά νησιά

### *Βιομηχανίες*

- Πιο ευάλωτες βιομηχανίες, κοινωνίες και εγκαταστάσεις είναι αυτές που βρίσκονται στα παράλια και κοντά σε ποταμούς, και όσων η οικονομία σχετίζεται με πόρους ευπαθείς στο κλίμα.

### *Υγεία*

- Η υγεία εκατομμυρίων ανθρώπων θα κλονιστεί λόγω υποσιτισμού, θα υπάρξει αύξηση θνησιμότητας, ξέσπασμα επιδημιών, τραυματισμοί λόγω ακραίων καιρικών συνθηκών, αύξηση καρδιοαναπνευστικών νοσημάτων

### *Νερό*

- Το χιόνι και οι πάγοι παίζουν κρίσιμο ρόλο στη διαθεσιμότητα του πόσιμου νερού. Η τήξη των πάγων και του χιονιού έχει ήδη επηρεάσει ένα μεγάλο ποσοστό ανθρώπων του πλανήτη που εφοδιάζεται με αυτό το νερό (πχ. λαοί που ζουν στα Ιμαλάια και στις Άνδεις)
- Οι μεταβολές στις βροχοπτώσεις, στη θερμοκρασία οδηγούν σε επιφανειακές απορροές με επιπτώσεις στη διαθεσιμότητα του πόσιμου νερού
- Περιοχές με ημί-ξηρο κλίμα, όπως το μεσογειακό, θα υποφέρουν από μείωση των αποθεμάτων του νερού και στις περιοχές με ξηρό κλίμα η κατάσταση θα επιδεινωθεί.

Σε περιοχές όπως η Αφρική, το 2020 προβλέπεται 75-250 εκατομμύρια άνθρωποι να έχουν έλλειψη νερού. Οι καλλιέργειες που εξαρτώνται από τις βροχές θα μειωθούν κατά 50% με

αποτέλεσμα τον υποσιτισμό των ανθρώπων. Το 2080 υπολογίζεται πως το άγονο έδαφος της Αφρικής θα αυξηθεί κατά 5-8%.

Στη Ασία το 2050 προβλέπεται μείωση του πόσιμου νερού ενώ ενδέχεται να σημειωθεί αύξηση της θνησιμότητας στη Νότια, Ανατολική και νοτιοανατολική Ασία, λόγω επιδημιών που σχετίζονται με τις πλημμύρες και την ξηρασία.

Στην Ευρώπη θα είναι αυξημένος ο κίνδυνος για πλημμύρες και ειδικά σε παράκτιες περιοχές. Θα υποχωρήσουν οι πάγοι θα μειωθεί το χιόνι και θα εξαφανιστούν είδη φυτών και ζώων. Στη νότια Ευρώπη θα αυξηθεί θερμοκρασία και η ξηρασία, θα μειωθούν τα αποθέματα νερού και θα κάνουν πιο συχνή την εμφάνισή τους καύσωνες και πυρκαγιές [1].

## **1.6 Ανανεώσιμες πηγές ενέργειας**

Οι ενεργειακές απαιτήσεις, καθώς και οι υπηρεσίες που προσφέρουν σε τομείς όπως οικονομία, κοινωνία, τρόπος ζωής και υγεία, συνεχώς όλο και αυξάνονται. Όλες οι κοινωνίες χρειάζονται ενέργεια για την κάλυψη των βασικών αναγκών τους (πχ. μαγείρεμα, φωτισμός, επικοινωνία, μετακίνηση) και των παραγωγικών διεργασιών. Περίπου από το 1850 βασική πηγή ενέργειας ήταν τα ορυκτά καύσιμα (άνθρακας, πετρέλαιο, φυσικό αέριο), πράγμα που οδήγησε σε αυξημένες εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα. Πρόσφατα δεδομένα επιβεβαιώνουν ότι η κατανάλωση ορυκτών καυσίμων είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο ποσοστό εκπομπών GHGs που σχετίζονται με τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Ένας ακόμη βασικός λόγος που οδήγησε τους επιστήμονες να ψάξουν για νέες πηγές ενέργειας και να ερευνήσουν νέους δρόμους για την παραγωγή της, είναι το γεγονός ότι τα ορυκτά καύσιμα είναι περιορισμένα. Μάλιστα, υπολογίζεται πως αν η χρήση των ορυκτών καυσίμων συνεχιστεί με αυτούς τους ρυθμούς, τα αποθέματα σε πετρέλαιο και κα αέριο θα εξαντληθούν σε 41 και 63 χρόνια αντίστοιχα.

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι μείωσης των αερίων του θερμοκηπίου που σχηματίζονται κατά την παραγωγή ενέργειας και ταυτόχρονα να ικανοποιούνται οι παγκόσμιες ενεργειακές απαιτήσεις. Κάποιες πιθανές επιλογές είναι η διατήρηση και η βελτίωση απόδοσης ενέργειας, η πυρηνική ενέργεια, η δέσμευση και αποθήκευση του άνθρακα (CCS) και τέλος, ιδιαίτερο βάρος έχει δοθεί στις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας (renewable energy sources RES) [6]. Με τον όρο ανανεώσιμη ενέργεια (renewable energy, RE) εννοούμε την ενέργεια, όχι πυρηνικής μορφής, με την οποία μπορούμε να εφοδιαζόμαστε συνεχώς. Αντίθετα, η προερχόμενη ενέργεια από ορυκτά καύσιμα όπως πετρέλαιο, αέριο και άνθρακα, είναι περιορισμένη [7].

Οι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας θα παίξουν πολύ σημαντικό ρόλο στο μέλλον του κόσμου. Οι ενεργειακοί πόροι έχουν χωριστεί σε 3 κατηγορίες: (α) ορυκτά καύσιμα (β) ανανεώσιμες πηγές (γ) πυρηνικές πηγές ενέργειας. Οι ανανεώσιμες πηγές είναι αυτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ενέργειας ξανά και ξανά όπως για παράδειγμα η αιολική ενέργεια, ηλιακή ενέργεια, και συχνά ονομάζονται και εναλλακτικές πηγές ενέργειας. Οι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας θα έχουν την δυνατότητα να παρέχουν ενέργεια με σχεδόν μηδενικές εκπομπές αερίων ρύπων και GHGs. Η ανάπτυξη συστημάτων ανανεώσιμης ενέργειας μπορεί να βοηθήσει να λυθούν κάποια από τα βασικότερα και κρισιμότερα προβλήματα που μαστίζουν τη σημερινή εποχή όπως:

- ✓ βελτίωση της αξιοπιστίας των παροχών ενέργειας,
- ✓ βελτίωση οικονομίας οργανικών καυσίμων,
- ✓ λύσεις στα κατά τόπους προβλήματα εφοδιασμού νερού και ενέργειας,
- ✓ άνοδος του βιοτικού επιπέδου,
- ✓ απασχόληση εργασίας για τους γύρω πληθυσμούς,
- ✓ εξασφάλιση συνεχούς ανάπτυξης των απομονωμένων περιοχών στην έρημο και στις ορεινές περιοχές,
- ✓ βοηθά στην πραγματοποίηση των στόχων με τις οποίες έχουν δεσμευτεί χώρες για την προστασία του περιβάλλοντος
- ✓ Ανάπτυξη και η εφαρμογή του σχεδίου ανανεώσιμων πηγών ενέργειας στις αγροτικές περιοχές και παροχή ευκαιριών για εργασία
- ✓ Μείωση του φαινομένου μετανάστευσης προς τις αστικές περιοχές [8].

Υπό τις περισσότερες συνθήκες, για να αυξηθεί το ποσοστό συνεισφοράς των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, απαιτούνται αλλαγές στο ενεργειακό σύστημα. Η τεχνολογία της RE έχει αναπτυχθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια, προσφέροντας φιλόδοξα σενάρια για την εξομάλυνση των αλλαγών που έχει υποστεί το περιβάλλον [6].

Το μερίδιο των RES αναμένεται να αυξηθεί σημαντικά στο μέλλον. Το σενάριο για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας μέχρι το 2040 βρίσκεται στο ΠΙΝΑΚΑ 1. Απαραίτητες είναι όμως οι επενδύσεις σε τεχνολογία και υποδομές [8]. Στο σχήμα 6 παρουσιάζονται οι ενεργειακές πηγές και το ποσοστό συνεισφοράς των ανανεώσιμων πηγών σε παγκόσμιο επίπεδο για το 2008.

## Πίνακας 1

Παγκόσμιο σενάριο ανανεώσιμων πηγών ενέργειας έως το 2040 [8]

|   | 2001    | 2010    | 2020    | 2030   | 2040   |
|---|---------|---------|---------|--------|--------|
| <b>Total consumption</b><br>(million tons oil equivalent) | 10.038  | 10.549  | 11.425  | 12.352 | 13.310 |
| <b>Biomass</b>  | 1.080   | 1.313   | 1.791   | 2.483  | 3.271  |
| <b>Large hydro</b>  | 22,7    | 266     | 309     | 341    | 358    |
| <b>geothermal</b>   | 43,2    | 86      | 186     | 333    | 493    |
| <b>Small hydro</b>  | 9,5     | 19      | 49      | 106    | 189    |
| <b>wind</b>   | 4,7     | 44      | 266     | 542    | 688    |
| <b>Solar thermal</b>                                      | 4,1     | 15      | 66      | 244    | 480    |
| <b>photovoltaic</b>                                       | 0,1     | 2       | 24      | 221    | 784    |
| <b>Solar thermal electricity</b>                          | 0,1     | 0,4     | 3       | 16     | 68     |
| <b>Marine (tide/wave/ocean)</b>                           | 0,05    | 0,1     | 0,4     | 3      | 20     |
| <b>Total RES</b>  | 1.365,5 | 1.745,5 | 2.964,4 | 4.289  | 6.351  |
| <b>RES contribution (%)</b>                               | 13,6    | 16,6    | 23,6    | 34,7   | 47,7   |

Οι βασικότερες πηγές ανανεώσιμης ενέργειας είναι :

- *Βιοενέργεια*: Είναι δυνατόν να παραχθεί από μια ποικιλία πρώτης ύλης βιομάζα που είναι δασικά, αγροτικά και κτηνοτροφικά υπολείμματα, ενεργειακές καλλιέργειες, το οργανικό φορτίο αστικών αποβλήτων, άλλες ροές αστικών αποβλήτων, υπολείμματα γεωργικών/δασικών βιομηχανιών [9]. Μέσω διαφορών διεργασιών αυτές οι πρώτες υλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας για τη παραγωγή ηλεκτρισμού ή θερμότητας ή ακόμα και στερεών, υγρών και αερίων καυσίμων. Η τεχνολογία της βιοενέργειας όλο και διευρύνεται.

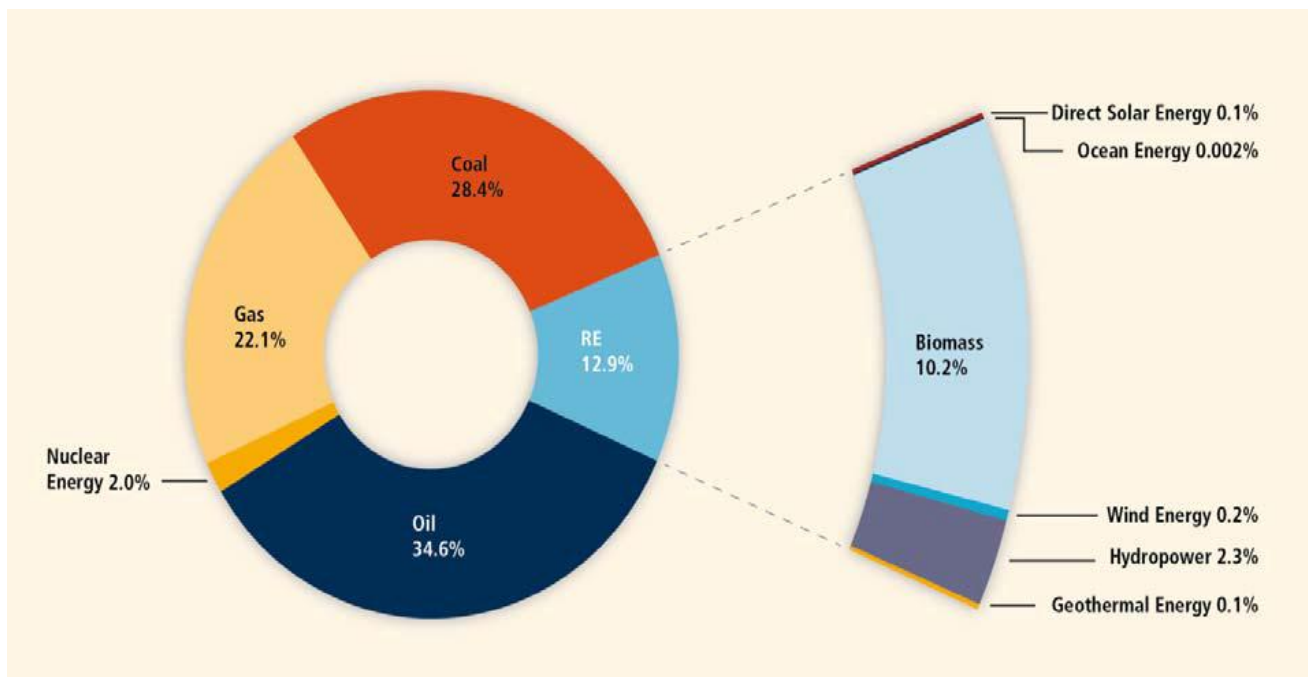
Κάποια εμπορικά διαθέσιμα παραδείγματα είναι η μικρής ή μεγάλης κλίμακας boilers, πελλέτες θέρμανσης για οικιακή χρήση, παραγωγή αιθανόλης από άμυλο και

σάκχαρα. Σε προ-εμπορικό στάδιο βρίσκονται η παραγωγή καυσίμων από λιγνινοκυτταρίνη (lignocelluloses) ενώ η παραγωγή υγρών βιοκαυσίμων από μικροφύκη και από βιολογικές μετατροπές βρίσκονται στο στάδιο έρευνας και ανάπτυξης (research and development, R&D) [6]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παραγωγή βιοαερίου μέσω αναερόβιας χώνευσης και η παραγωγή βιοντίζελ ως εναλλακτική των υγρών καυσίμων [8].

- *Ηλιακή ενέργεια:* Οι τεχνολογίες αυτές δεσμεύουν την ηλιακή ακτινοβολία και παρέχουν ηλεκτρισμό ή/και θερμική ενέργεια. Παράδειγμα, τα φωτοβολταϊκά κελιά μετατρέπουν την ηλιακή ακτινοβολία σε ηλεκτρισμό, τα θερμικά ηλιακά συστήματα, μέσω ενός ηλιακού συλλέκτη, δεσμεύουν την ηλιακή ακτινοβολία και την μετατρέπουν σε θερμική. Επίσης, στο σχέδιο R&D βρίσκεται ένα σχέδιο παραγωγής καυσίμων από ηλιακή ενέργεια. [6,8]
- *Γεωθερμική ενέργεια:* Η γεωθερμική ενέργεια εκμεταλλεύεται την προσβάσιμη θερμική ενέργεια που βρίσκεται στο εσωτερικό της Γης. Η θερμότητα αποσπάται από γεωθερμικά αποθέματα με χρήση πηγαδιών ή άλλων μέσων. Υγρά διαφόρων θερμοκρασιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ηλεκτρισμού ή επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν πιο άμεσα σε εφαρμογές που απαιτούν θερμότητα, όπως για παράδειγμα η διανομή θέρμανσης [6].
- *Αιολική ενέργεια:* Η αιολική ενέργεια στην ουσία δεσμεύει την κινητική ενέργεια του ανέμου και τη μετατρέπει σε ηλεκτρική ή μηχανική ενέργεια μέσω τουρμπίνων. Οι τουρμπίνες μπορεί να είναι τοποθετημένες στη ξηρά (onshore) ή εκτός ξηράς (offshore). Η αιολική ενέργεια στη ξηρά είναι ήδη αρκετά διαδεδομένη. Η αιολική δύναμη είναι πρακτική για μικρές ενεργειακές απαιτήσεις σε απομονωμένα μέρη. Παρόλα αυτά είναι ευπρεπής σε κλιματικές αλλαγές και εξαρτώνται πολύ από την γεωγραφική περιοχή. Ο ηλεκτρισμός που παράγεται από τον άνεμο έχει το πλεονέκτημα ότι η τιμή του μένει σταθερή [6,8].
- *Υδροηλεκτρική ενέργεια:* Δαμάζει την ενέργεια του κινούμενου νερού από τα υψηλότερα στα χαμηλότερα ύψη και χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή ηλεκτρισμού. Τα υδροδυναμικά έργα περιλαμβάνουν φράγματα με αποθέματα νερού, ποτάμια, άλλα υγρά ρεύματα και λειτουργούν σε συνεχή κλίμακα. Αυτή η προσαρμοστικότητα της υδροδύναμης δίνει την δυνατότητα να εφαρμοστεί τόσο σε αστικά κέντρα όσο και σε πιο απόκεντρες αγροτικές περιοχές [6].



- **Θαλάσσια ενέργεια:** Προέρχεται από την δυναμική, κινητική, θερμική και χημική ενέργεια του θαλασσινού νερού τα οποία μετατρέπονται σε θερμική, ηλεκτρική ενέργεια και πόσιμο νερό. Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα τεχνολογιών όπως για παράδειγμα, οι υποθαλάσσιες τουρμπίνες που εκμεταλλεύονται τα παλιρροιακά και ωκεάνια ρεύματα [6].
- **Υδρογόνο:** Το υδρογόνο αναμένεται να παίξει πολύ σημαντικό ρόλο στο μέλλον του κόσμου αντικαθιστώντας τα ορυκτά καύσιμα. Η μετατροπή του σε θερμότητα ή δύναμη είναι απλή και «καθαρή». Όταν το υδρογόνο καίγεται με το οξυγόνο δεν παράγει ρυπαντές παρά μόνο νερό το οποίο μπορεί να επιστρέψει στη φύση. Μολονότι το υδρογόνο είναι το πιο άφθονο στοιχείο στη φύση δεν απαντάται σε στοιχειακή μορφή. Θα πρέπει να διαχωριστεί με χημικές διεργασίες, λόγω χάριν ηλεκτρόλυση [8].



Σχήμα 6: Οι ενεργειακές πηγές για το 2008 σε παγκόσμιο επίπεδο (IPCC, *Special report on renewable energy sources and climate change mitigation*, σελ 6)

## 1.7 Βιοκαύσιμα

Τα βιοκαύσιμα, όπως προαναφέρθηκε, είναι μια μορφή ανανεώσιμης πηγής ενέργειας. Πιο συγκεκριμένα, είναι καύσιμα στερεής, υγρής και αέριας μορφής προερχόμενα άμεσα ή έμμεσα από βιομάζα. Με τον όρο βιομάζα εννοούμε την ύλη που προέρχεται από ζωντανούς οργανισμούς. Τα βασικότερα βιοκαύσιμα που κυκλοφορούν σήμερα στο εμπόριο είναι το βιοντίζελ, η βιοαιθανόλη και το βιοαέριο. Η *βιοαιθανόλη* είναι ουσιαστικά αιθυλική αλκοόλη που παράγεται με ζύμωση βιομάζας. Πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι κυρίως σάκχαρα προερχόμενα από φυτά όπως ζαχαροκάλαμο, σιτάρι, καλαμπόκι και υπολείμματα δασικών και αγροτικών διεργασιών πχ. αγροτικά παραπροϊόντα. Ανάλογα με τον βαθμό πολυμερισμού τα σάκχαρα υποβάλλονται σε διάφορες προεπεξεργασίες με στόχο να μετατραπούν οι πολυμερείς αλυσίδες σε απλά ζυμώσιμα σάκχαρα. Οι ζυμώσεις γίνονται μέσω μικροοργανισμών και η βιοαιθανόλη ανακτάται με απόσταξη και ακολουθείται αφυδάτωση. Η βιοαιθανόλη είναι υποκατάστατο της βενζίνης και στα λεγόμενα flexi-fuels οχήματα μπορεί να την αντικαταστήσει 100%. Το *βιοαέριο* ή βιομεθάνιο σχηματίζεται με αναερόβια χώνεψη οργανικής ύλης με τη βοήθεια μικροοργανισμών. Το αέριο που παράγεται είναι μίγμα μεθανίου και διοξειδίου του άνθρακα και χρησιμοποιείται κυρίως για θέρμανση. Το *βιοντίζελ* είναι ένας εστέρας που συνήθως παράγεται από φυσικά έλαια και χρησιμοποιείται ως καύσιμο οχήματος. Χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο του ντίζελ [10]. Τα βιοκαύσιμα που παράγονται από ανανεώσιμες πηγές μπορούν να βοηθήσουν στη μείωση της χρήσης των ορυκτών καυσίμων και κατ' επέκταση στη μείωση παραγωγής του διοξειδίου του άνθρακα και στη μείωση της εξάρτησης από τα ορυκτά καύσιμα. Τα βιοκαύσιμα και τα βιοπροϊόντα έχουν τη δυνατότητα να εξομαλύνουν το φαινόμενο του θερμοκηπίου του πλανήτη. Αυτό προκύπτει επειδή το διοξείδιο του άνθρακα που απελευθερώνεται κατά την καύση ισοδυναμεί με το διοξείδιο του άνθρακα που δεσμεύεται από τα φυτά κατά τη φωτοσύνθεση με αποτέλεσμα να μην υπάρχει συσσώρευση στην ατμόσφαιρα [11].

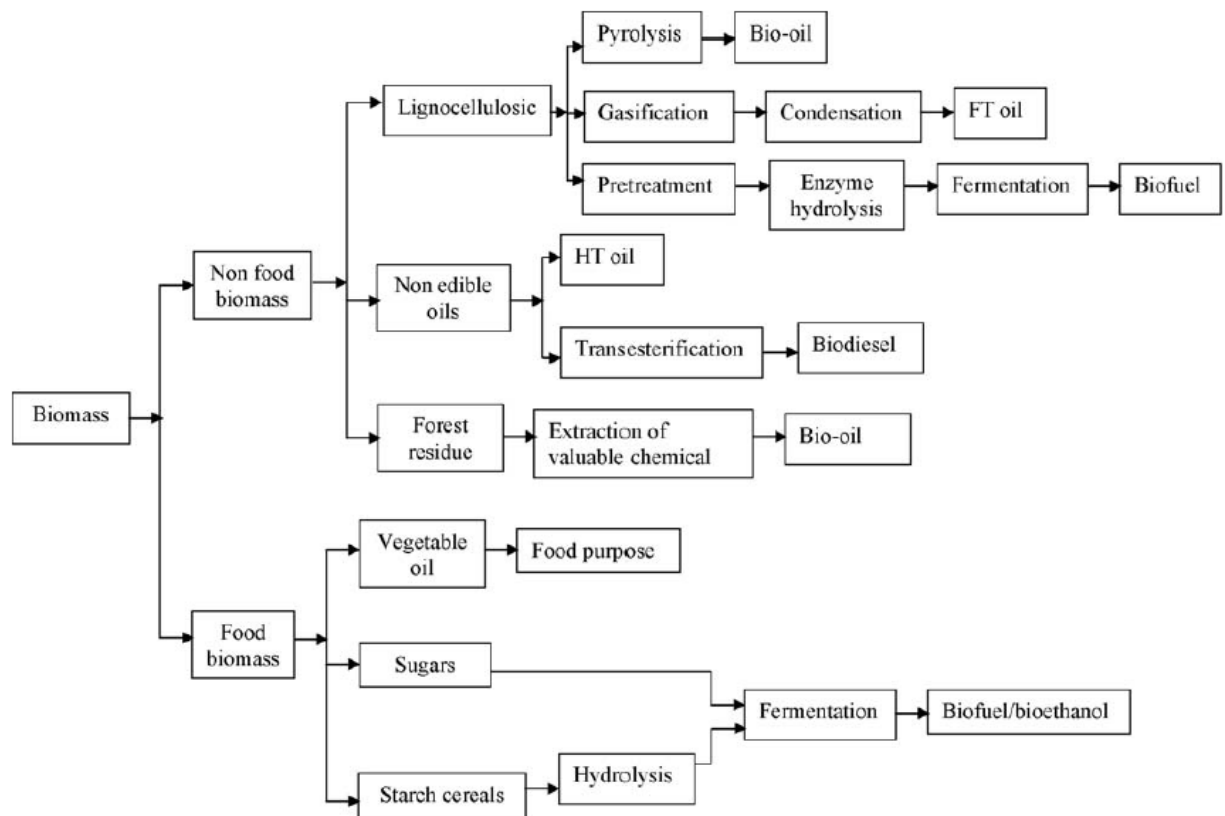
Τα βιοκαύσιμα που προορίζονται για τις μετακινήσεις διαχωρίζονται σε βιοκαύσιμα 1<sup>ης</sup>, 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενιάς ανάλογα με τη διαθεσιμότητά τους. Τα βιοκαύσιμα 2<sup>ης</sup> 3<sup>ης</sup> γενιάς ονομάζονται και προηγμένα (advanced biofuels) [12]. (Σε κάποιες βιβλιογραφίες γίνεται αναφορά μόνο για 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς βιοκαύσιμα παραδείγματος χάριν [38]).

**Βιοκαύσιμα 1<sup>ης</sup> γενιάς:** Οι πρώτες ύλες των καυσίμων 1<sup>ης</sup> γενιάς είναι συνήθως φυτά όπως αραβόσιπος (καλαμπόκι), ζαχαροκάλαμο, σιτάρι κ.α. Τα φυτά αυτά που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων είναι εδώδιμα και παράλληλα καλλιεργούνται και για τροφή. Τα καύσιμα αυτά συνεισφέρουν στο περιορισμό του διοξειδίου του άνθρακα. Υπάρχουν όμως

αμφιβολίες για τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται, τι αντίκτυπο θα έχουν στη βιοποικιλότητα και στη χρησιμοποίηση της γης με στόχο την καλλιέργεια φυτών για τροφή. Τα κύρια βιοκαύσιμα 1<sup>ης</sup> γενιάς που βρίσκονται στο εμπόριο είναι βιοντίζελ, βιοαιθανόλη, βιοαέριο έχουν ως χαρακτηριστικό τη δυνατότητα να αναμιγνύονται με ορυκτά καύσιμα και να χρησιμοποιούνται στις ήδη υπάρχουσες μηχανές και υποδομές ή και σε εναλλακτικής τεχνολογίας οχήματα όπως πχ. FFVs (Flexible Fuel Vehicles) και οχήματα φυσικού αερίου. Παρόλα αυτά, τα καύσιμα 1<sup>ης</sup> γενιάς προβληματίζουν τους επιστήμονες για τις επιπτώσεις που μπορούν να έχουν στο περιβάλλον και στις ισορροπίες του άνθρακα και αυτό περιορίζει την παραγωγή τους. Το βασικό μειονέκτημα των καυσίμων αυτών είναι ο ανταγωνισμός ανάμεσα στα τρόφιμα και καύσιμα. Εξαιτίας αυτού του λόγου, έχουν αυξηθεί οι τιμές των τροφίμων. Επιπλέον, για να καλυφθούν οι ανάγκες για βιοκαύσιμα έχουν αποψιλωθεί τεράστιες εκτάσεις δασών ώστε να καλλιεργηθούν σοδιές που προορίζονται για βιοντίζελ. Αυτό έχει οδηγήσει σε πολύ σοβαρές περιβαλλοντικές και οικολογικές επιπτώσεις. Τέλος, υποστηρίζεται ότι ο περιορισμός των GHGs μπορεί να αντιμετωπιστεί με πιο αποτελεσματικές εναλλακτικές, βασισμένες και στη συμβατική τεχνολογία και στις ανανεώσιμες πηγές. Αυτός ο λόγος οδήγησε στην ανάπτυξη δεύτερης γενιάς βιοκαυσίμων [11,12].

*Βιοκαύσιμα 2<sup>ης</sup> γενιάς:* Παράγονται από μη εδώδιμα υλικά και είναι πολύ πιο ισχυρός ο ανανεώσιμος χαρακτήρας τους. Στις πηγές καυσίμων 2<sup>ης</sup> γενιάς περιλαμβάνονται απόβλητα βιομάζας, στελέχη σιταριού και καλαμποκιού, ξύλο, ειδικές ενεργειακές σοδιές, ζωικά λίπη κτλ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά τα οποία είναι άφθονα, μη εδώδιμα συστατικά φυτών. Η φυτική βιομάζα είναι μια από τις αφθονότερες πηγές στο πλανήτη και πολλά υποσχόμενη όσον αφορά την παραγωγή των υγρών βιοκαυσίμων από βιομάζα. Παρόλα αυτά, η παραγωγή βιοκαυσίμων από αγροτικά και δασικά παραπροϊόντα δεν καλύπτει παρά μόνο ένα μέρος των απαιτήσεων για υγρά βιοκαύσιμα. Για αυτό το λόγο, το ενδιαφέρον έχει στραφεί και στη καλλιέργεια σοδιών που προορίζονται αποκλειστικά και μόνο για τη παραγωγή βιοκαυσίμων (ενεργειακές σοδιές). Στόχος των ενεργειακών σοδιών είναι οι μεγάλες αποδόσεις με χαμηλές απαιτήσεις. Τα καύσιμα 2<sup>ης</sup> γενιάς συνεισφέρουν σημαντικά στη μείωση του διοξειδίου του άνθρακα – με σχεδόν ουδέτερο φορτίο άνθρακα (carbon neutral)- και δεν ανταγωνίζονται τις καλλιέργειες που προορίζονται για τροφή και μάλιστα, κάποια είδη βιοντίζελ 2<sup>ης</sup> γενιάς έχουν βελτιωμένη απόδοση στους κινητήρες (κυρίως το βιοντίζελ από ζωικής προέλευσης λίπος). Επίσης, οι απαιτήσεις για καλλιεργήσιμη γη είναι χαμηλότερες εφόσον τα φυτά που χρησιμοποιούνται είναι ικανά να αναπτυχθούν σε άγονα εδάφη. Τα βιοκαύσιμα 2<sup>ης</sup> γενιάς δεν έχουν βγει ακόμα στην αγορά αλλά είναι στο

στάδιο της δοκιμής και της ανάπτυξης (R&D) [11,12]. Στο σχήμα 7 παρουσιάζεται η πορεία παραγωγής καυσίμων 2<sup>ης</sup> γενιάς ξεκινώντας από την παραγωγή βιομάζας:



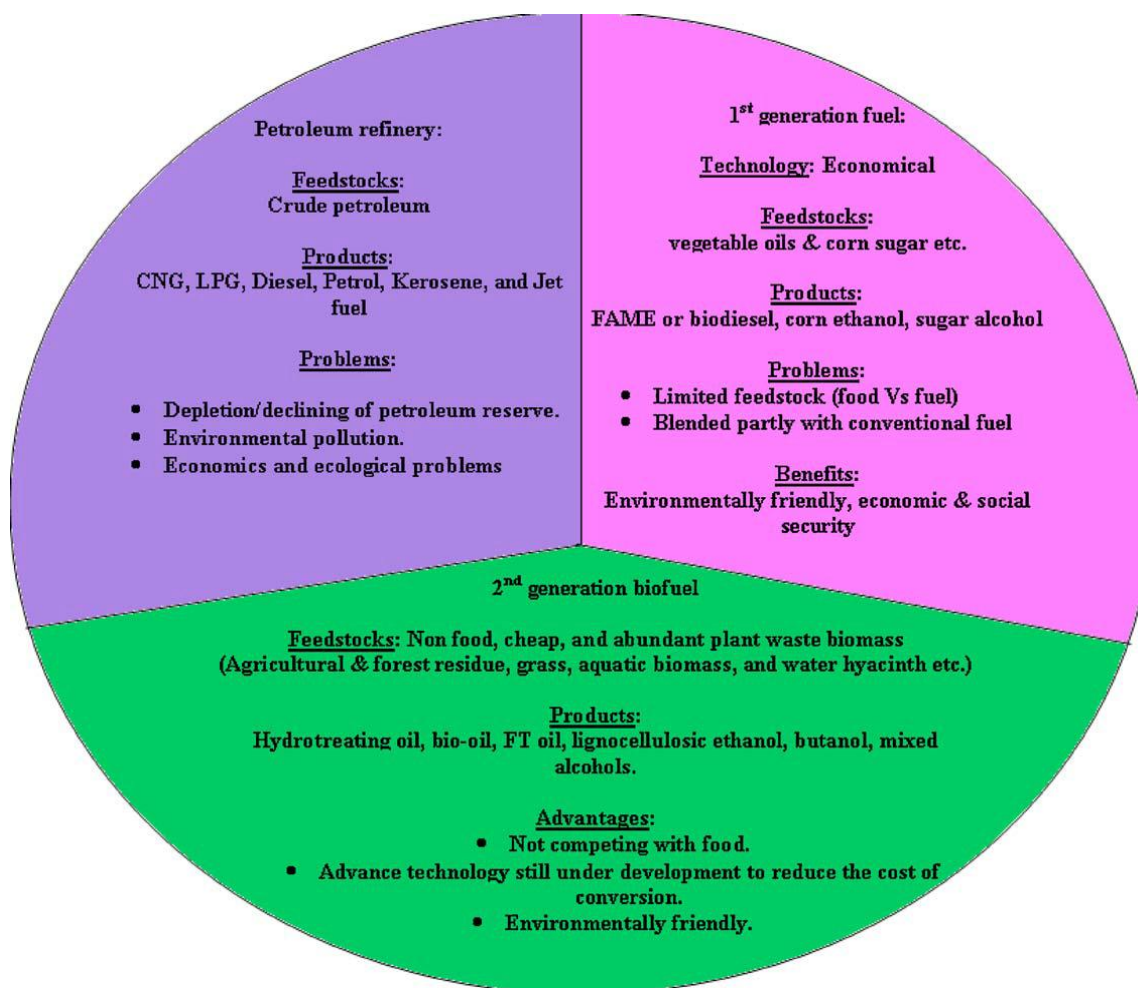
Σχήμα 7: Παραγωγή καυσίμων 2<sup>ης</sup> γενιάς από βιομάζα (S.N. Naik, *Renewable and sustainable Energy reviews*, σελ.588)

Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα στα βιοκαύσιμα 1<sup>ης</sup> γενιάς και ξεκάθαρα πλεονεκτήματα στα βιοκαύσιμα 2<sup>ης</sup> (σχήμα 8). Οι προσεγγίσεις για χρησιμοποίηση ολόκληρης της φυτικής μάζας για την αειφόρο ανάπτυξη είναι πολύ πιο λογικές και αποδοτικές [11].

**Βιοκαύσιμα 3<sup>ης</sup> γενιάς:** Ακόμα και το κόστος των καυσίμων 2<sup>ης</sup> γενιάς είναι αρκετά υψηλό ώστε να μην είναι δυνατή η εμπορευματοποίησή τους σε μεγάλη κλίμακα. Αυτό οφείλεται κυρίως στις δαπάνες για την καλλιέργεια και την ανάπτυξη των φυτών. Μια ακόμα ανησυχία για τα καύσιμα 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς είναι η ανεπάρκεια και η μη αειφορία. Αντίθετα, τα βιοκαύσιμα 3<sup>ης</sup> γενιάς, που η προέλευσή τους είναι από (μικρο)φύκη, έχουν τη δυνατότητα να ξεπεράσουν τα παραπάνω προβλήματα και θεωρούνται ως πολλά υποσχόμενες εναλλακτικές. Συγκεκριμένα για το βιοντίζελ, τα μικροφύκη αποτελούν πολύ καλές πηγές λιπιδίων. Φωτοσυνθέτοντας, παράγουν βιομάζα με πολύ καλές αποδόσεις, αναπτύσσονται εύκολα και γρήγορα καθώς και είναι πολύ καλοί παραγωγοί λιπιδίων [11,12]. Στο σημείο αυτό

να αναφερθεί ότι σε πολλές βιβλιογραφίες τα βιοκαύσιμα προερχόμενα από μικροφύκη κατατάσσονται στα βιοκαύσιμα 2<sup>ης</sup> γενιάς. Στη παρούσα εργασία κατατάχθηκαν στη 3<sup>η</sup> γενιά βασιζόμενοι στη βιβλιογραφία [39,12].

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας θα δώσουμε το βάρος στο βιοντίζελ και στο πως βοηθά η επιστήμη της βιοτεχνολογίας την παραγωγή του.



Σχήμα 8: Σύγκριση 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς βιοκαυσίμων και πετρελαίου (S.N. Naik, Renewable and sustainable Energy reviews, σελ.580)

## Κεφάλαιο 2: Βιοντίζελ- Πηγές και η Παραγωγή του

### 2.1 Βιοντίζελ

Ο όρος βιοντίζελ αναφέρεται σε ένα επεξεργασμένο καύσιμο ισοδύναμο του ντίζελ που προέρχεται από βιολογικές πηγές. Το βιοντίζελ μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε σε καθαρή μορφή απευθείας σε μηχανή είτε ως πρόσθετο συστατικό σε ορυκτό ντίζελ (diesel blend).[13] Θα μπορούσαμε να αναφέρουμε δύο ορισμούς του βιοντίζελ, έναν γενικό και έναν πιο τεχνικό:

Γενικός ορισμός: Το βιοντίζελ είναι ένα ανανεώσιμο καύσιμο για μηχανές ντίζελ, το οποίο προέρχεται από φυσικά έλαια όπως το σογιέλαιο, και το οποίο πληροί τις προδιαγραφές κατά ASTM D 6751 [14]. (Πίνακας 2 ).

#### Τεχνικός ορισμός:

*Βιοντίζελ:* Είναι ένα καύσιμο που αποτελείται από αλκυλεστέρες λιπαρών οξέων που προέρχονται από φυσικά έλαια ή ζωικά λίπη, συμβολίζεται με B100 και πληροί τις προδιαγραφές της ASTM D 6751 [14].

*Μίγμα βιοντίζελ:* Είναι ένα μίγμα από βιοντίζελ που πληροί τις κατά ASTM D 6751 προδιαγραφές και ορυκτού ντίζελ. Συμβολίζεται με BXX όπου XX αναπαριστά τον ποσοστιαίο όγκο του βιοντίζελ στο μίγμα [14].



Πίνακας 2 : Προδιαγραφές biodiesel (B100) – ASTM 6751-

| Property                             | ASTM Method | Limits           | Units                 |
|--------------------------------------|-------------|------------------|-----------------------|
| Calcium & Magnesium, combined        | EN 14538    | 5 maximum        | ppm (µg/g)            |
| Flash Point (closed cup)             | D 93        | 93 minimum       | °C                    |
| Alcohol Control (one to be met)      |             |                  |                       |
| 1. Methanol Content                  | EN 14110    | 0.2 maximum      | mass %                |
| 2. Flash Point                       | D93         | 130 minimum      | °C                    |
| Water & Sediment                     | D 2709      | 0.05 maximum     | % vol.                |
| Kinematic Viscosity, 40 C            | D 445       | 1.9 – 6.0        | mm <sup>2</sup> /sec. |
| Sulfated Ash                         | D 874       | 0.02 maximum     | % mass                |
| Sulfur                               |             |                  |                       |
| S 15 Grade                           | D 5453      | 0.0015 max. (15) | % mass (ppm)          |
| S 500 Grade                          | D 5453      | 0.05 max. (500)  | % mass (ppm)          |
| Copper Strip Corrosion               | D 130       | No. 3 maximum    |                       |
| Cetane                               | D 613       | 47 minimum       |                       |
| Cloud Point                          | D 2500      | report           | °C                    |
| Carbon Residue 100% sample           | D 4530*     | 0.05 maximum     | % mass                |
| Acid Number                          | D 664       | 0.5 maximum      | mg KOH/g              |
| Free Glycerin                        | D 6584      | 0.020 maximum    | % mass                |
| Total Glycerin                       | D 6584      | 0.240 maximum    | % mass                |
| Phosphorus Content                   | D 4951      | 0.001 maximum    | % mass                |
| Distillation                         | D 1160      | 360 maximum      | °C                    |
| Sodium/Potassium, combined           | EN 14538    | 5 maximum        | ppm (µg/g)            |
| Oxidation Stability                  | EN 15751    | 3 minimum        | hours                 |
| Cold Soak Filtration                 | D7501       | 360 maximum      | seconds               |
| For use in temperatures below -12 °C | D7501       | 200 maximum      | seconds               |

Πάνε πάνω από 100 χρόνια από τότε που ο Dr. Rudolf Diesel χρησιμοποίησε φυσικόλαιο ως καύσιμο για την μηχανή του. Η απευθείας χρήση ελαίου ως καύσιμο παρουσίασε πλεονεκτήματα όπως, άμεση διάθεση, το ότι είναι ανανεώσιμο, χαμηλή περιεκτικότητα σε θείο και αρωματικά συστατικά και το ότι είναι βιοδιασπώμενο. Το βασικό μειονέκτημά του είναι το υψηλό ιξώδες, η χαμηλή πτητικότητα, και η δραστηριότητα των ακόρεστων αλυσίδων των υδρογονανθράκων. Επίσης η μακρόχρονη χρήση του έδειξε ότι δημιουργεί προβλήματα στις μηχανές όπως η συσσώρευση άνθρακα σε βασικά εξαρτήματα, σχηματισμός εναποθέσεων και άλλες επιπλοκές. Τα λάδια παρουσιάζουν 10-17 φορές υψηλότερο ιξώδες σε σχέση με το ντίζελ και για την απευθείας χρήση τους απαιτούνται τροποποιήσεις στις μηχανές. Επίσης έχουν γίνει αναφορές για ένα συστατικό, την ακρολεΐνη (acrolein), το οποίο

είναι τοξικό και σχηματίζεται στα φυτικά λάδια κατά τη καύση τους στη μηχανή. Αυτό οφείλεται στη αποδόμηση της γλυκερόλης [25]. Για τους παραπάνω λόγους η απευθείας χρήση του λαδιού δεν είναι κατάλληλη. Η χημική δομή του λαδιού χρειάζεται να τροποποιηθεί ώστε να μειωθεί το μοριακό βάρος, το ιξώδες, το ειδικό βάρος και γενικότερα οι ιδιότητες τους να πλησιάσουν αυτές του ντίζελ ώστε να μην απαιτηθούν μετατροπές στις μηχανές. Το τροποποιημένο αυτό προϊόν, ονομάζεται βιοντίζελ και υπερτερεί κατά πολύ σε σχέση με τα ακατέργαστα λάδια. Είναι ανακυκλώσιμο, φιλικό με το περιβάλλον και έχει καλύτερες λιπαντικές ιδιότητες σε σχέση με το ντίζελ [13,17].

Το βιοντίζελ είναι ένα εναλλακτικό καύσιμο για τις μηχανές εσωτερικής καύσης. Είναι ένα μίγμα μονοαλκυλεστέρων λιπαρών οξέων που προέρχονται από την αντίδραση ανανεώσιμων λιπιδίων όπως, φυτικά έλαια και ζωικά λίπη, με μία αλκοόλη. Η αντίδραση αυτή είναι μια αντίδραση *μετεστεροποίησης* περισσότερες πληροφορίες για την αντίδραση και το μηχανισμό της θα δοθούν παρακάτω. Οι αλκοόλες και πιο συγκεκριμένα η μεθανόλη, είναι οι πιο συνηθισμένοι δέκτες ακυλο-ομάδων. Σε μικρότερο βαθμό ισχύουν τα παραπάνω και για την αιθανόλη. Άλλες αλκοόλες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι η προπανόλη, η βουτανόλη, ισοπροπανόλη και άλλες διακλαδωμένες αλκοόλες, με το κόστος όμως να αυξάνεται. Όσον αφορά την επιλογή μεταξύ μεθανόλης και αιθανόλης, το κόστος της πρώτης είναι πολύ πιο χαμηλό, είναι πιο δραστική και οι μεθυλεστέρες του λιπαρού οξέος (Fatty-Acid Methyl Esters, FAME) που σχηματίζονται είναι πιο πτητικοί σε σχέση με τους αιθυλεστέρες του λιπαρού οξέως (FAEE). Παρόλα αυτά, η αιθανόλη είναι λιγότερο τοξική από τη μεθανόλη και πιο ανανεώσιμη διότι μπορεί και παράγεται από ανανεώσιμες πηγές με ζύμωση. Αντίθετα η μεθανόλη παράγεται κυρίως από μη ανανεώσιμες ορυκτές πηγές όπως είναι το φυσικό αέριο. Όσον αφορά τις διαφορές των χαρακτηριστικών τους ως καύσιμα τα FAME και FAEE έχουν πολύ μικρές διαφορές, για παράδειγμα τα FAEE έχουν λίγο υψηλότερο ιξώδες και λίγο χαμηλότερο σημείο θόλωσης (cloud point) και σημείο απόχυσης (pour point) από ότι τα FAME. Το βιοντίζελ είναι το καλύτερο υποψήφιο υποκατάστατο για το ντίζελ στους αντίστοιχους κινητήρες [13,15].

Μια ποικιλία βιολιπιδίων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοντίζελ είναι: (α) παρθένα φυτικά έλαια, όπως το έλαιο από ελαιοκράμβη και σόγια (β) τα ζωικά λίπη όπως το χοίρειο και βόειο λίπος (tallow lard) (γ) τα απόβλητα φυτικά λάδια (yellow grease) (δ) τα μη βρώσιμα έλαια όπως το jatropha oil και καστορέλαιο. Επίσης, σήμερα το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί και στη παραγωγή ελαίου από μικροφύκη και άλλους μικροοργανισμούς. Τα έλαια που αποτελούν την πρώτη ύλη για το βιοντίζελ συνήθως επιλέγονται σύμφωνα με τη διαθεσιμότητά τους έτσι για παράδειγμα στις Ηνωμένες Πολιτείες χρησιμοποιείται κυρίως



σογιέλαιο και στην Ευρώπη ελαιοκράμβη (rapeseed). Τα φυτικά έλαια και τα ζωικά λίπη αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια και διγλυκερίδια καθώς και ένα πολύ μικρό ποσοστό μονογλυκεριδίων.

Προτερήματα που προσφέρει το βιοντίζελ, πέρα από την μείωση των GHGs, είναι ανάπτυξη των περιοχών, των κοινωνικών δομών και της οικονομίας ιδίως των αναπτυσσόμενων χωρών. Η χρήση του βιοντίζελ βοηθά στην αποκατάσταση της ισορροπίας μεταξύ της γεωργίας, οικονομίας και περιβάλλοντος [13].

## 2.2 Χαρακτηριστικά του βιοντίζελ και σύγκριση με το ορυκτό ντίζελ

Το βιοντίζελ είναι ένα διαυγές υγρό με κεχριμπάρνιο χρώμα. Τα βασικά του χαρακτηριστικά είναι το ιξώδες, η πυκνότητα, ο αριθμός κετανίου (CN), το σημείο θόλωσης (cloud point CP), το σημείο ροής (pour point PP), το σημείο ανάφλεξης, ο βαθμός απόσταξης (distillation range), η περιεκτικότητα σε τέφρα και σε θείο, το ανθρακούχο υπόλειμμα, η αντοχή στην οξειδωση, η διάβρωση χαλκού και η ανώτερη θερμογόνο δύναμη (high heating value HHV).

Για να γίνουν πιο κατανοητά τα χαρακτηριστικά του βιοντίζελ δίνονται οι παρακάτω ορισμοί:

*Αριθμός κετανίου:* Η ετοιμότητα ενός καυσίμου να αναφλεγεί όταν ψεκάζεται σε έναν κινητήρα ντίζελ, φαίνεται από τον αριθμό κετανίου. Όσο υψηλότερος είναι ο αριθμός κετανίου τόσο ευκολότερη είναι η ανάφλεξη. Ο αριθμός κετανίου ορίζεται με σύγκριση της ποιότητας ανάφλεξης κάτω από πρότυπες συνθήκες λειτουργίας, με δύο γνωστά καύσιμα αναφοράς γνωστού αριθμού κετανίου. Το ένα καύσιμο αναφοράς είναι το κανονικό δεκαεξάνιο (κ-δεκαεξάνιο ή κετάνιο) με αριθμό κετανίου 100 εξ' ορισμού και το επτα-μεθυλο-εννεάνιο με αριθμό κετανίου 15 [18].

*Σημείο θόλωσης:* Το σημείο θόλωσης είναι η υψηλότερη θερμοκρασία στην οποία παρατηρείται διαχωρισμός κρυστάλλων παραφίνης από το καύσιμο όταν αυτό ψυχθεί κάτω από ειδικές συνθήκες (ASTM D-2500) [18].

*Σημείο ροής:* Το σημείο ροής δίνει τη θερμοκρασία στην οποία ο διαχωρισμός παραφίνης είναι τόσο έντονος που δεν επιτρέπει στο καύσιμο να είναι ρευστό, όταν ψυχθεί κάτω από ειδικές συνθήκες (ASTM D-97) [18].

*Σημείο ανάφλεξης:* Το σημείο ανάφλεξης (flash point) είναι η χαμηλότερη θερμοκρασία στην οποία αναφλέγονται οι ατμοί του καυσίμου με προσαγωγή όταν αυτό θερμαίνεται κάτω από πρότυπες συνθήκες. Το σημείο ανάφλεξης αποτελεί και μία προδιαγραφή ασφάλειας για τις συνθήκες αποθήκευσης και μεταφοράς, και αποτελεί την πρώτη ένδειξη μόλυνσης με ελαφρύτερα συστατικά [18].

Οι ιδιότητες του βιοντίζελ δίνονται αναλυτικότερα στον ΠΙΝΑΚΑ 3 . Το ιξώδες του είναι παρόμοιο με αυτό του ορυκτού ντίζελ, δεν είναι εύφλεκτο, έχει σημείο ανάφλεξης 423 K, (αντίθετα με το ορυκτό ντίζελ που είναι εύφλεκτο και έχει σημείο ανάφλεξης 337 K) επίσης, είναι βιοδιασπώμενο, μη τοξικό και έχει σημαντικά μειωμένες εκπομπές κατά την καύση του. Ο ΠΙΝΑΚΑΣ 4 δείχνει τις προδιαγραφές κατά ASTM του βιοντίζελ και του ορυκτού ντίζελ καυσίμου. Στον ΠΙΝΑΚΑ 5 παρουσιάζονται οι διεθνείς προδιαγραφές για το βιοντίζελ από ελαιοκράμβη (Ευρωπαϊκές προδιαγραφές). Βασικό μειονέκτημα του βιοντίζελ σε σχέση με το ορυκτό ντίζελ είναι τα προβλήματα εκκίνησης μηχανών σε χαμηλές θερμοκρασίες, η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ενέργεια, η υψηλή διάβρωση του χαλκού και η δυσκολία στην άντληση λόγω του υψηλού ιξώδους [13].

Πίνακας 3: Τεχνικές ιδιότητες του βιοντίζελ (A.Demirbas,Energy Conversion and management, σελ.15)

|  |   |
|--|---|
| Common name  | Biodiesel (bio-diesel)  |
| Common chemical name                                     | Fatty acid (m)ethyl ester   |
| Chemical formula range                                   | C <sub>14</sub> -C <sub>24</sub> methyl esters or<br>C <sub>15-25</sub> H <sub>28-48</sub> O <sub>2</sub> |
| Kinematic viscosity range (mm <sup>2</sup> /s, at 313 K) | 3.3-5.2   |
| Density range (kg/m <sup>3</sup> , at 288 K)             | 860-894   |
| Boiling point range (K)                                  | >475  |
| Flash point range (K)                                    | 420-450   |
| Distillation range (K)                                   | 470-600   |
| Vapor pressure (mm Hg, at 295 K)                         | <5  |
| Solubility in water                                      | Insoluble in water  |
| Physical appearance                                      | Light to dark yellow, clear liquid  |
| Odor   | Light musty/soapy odor  |
| Biodegradability   | More biodegradable than petroleum diesel  |
| Reactivity   | Stable, but avoid strong oxidizing agents   |

Πίνακας 4: Σύγκριση ιδιοτήτων βιοντίζελ και ντίζελ (S.N. Naik, Renewable and sustainable Energy reviews, σελ.210)

| Fuel Property                       | Diesel     | Biodiesel    |
|-------------------------------------|------------|--------------|
| Fuel Standard                       | ASTM D975  | ASTM PS 121  |
| Fuel composition                    | C10-C21 HC | C12-C22 FAME |
| Lower Heating Value (Btu/gal)       | 131,295    | 117,093      |
| Kin. Viscosity, @ 40 °C             | 1.3-4.1    | 1.9-6.0      |
| Specific Gravity kg/l @ 60 °F       | 0.85       | 0.88         |
| Density, lb/gal @ 15 °C             | 7.079      | 7.328        |
| Water, ppm by wt.                   | 161        | 0.05% max    |
| Carbon (wt.%)                       | 87         | 77           |
| Hydrogen (wt.%)                     | 13         | 12           |
| Oxygen, by dif. wt.%                | 0          | 11           |
| Sulfur (wt.%)                       | .05 max    | 0.0 - 0.0024 |
| Boiling Point (°C)                  | 188-343    | 182-338      |
| Flash Point (°C)                    | 60-80      | 100-170      |
| Cloud Point (°C)                    | -15 to 5   | -3 to 12     |
| Pour Point (°C)                     | -35 to -15 | -15 to 10    |
| Cetane Number                       | 40-55      | 48-65        |
| Stoichiometric Air/Fuel Ratio (w/w) | 15         | 13.8         |
| BOCLE Scuff (g)                     | 3,600      | >7,000       |
| HFRR (μm)                           | 685        | 314          |

Πίνακας 5: Διεθνείς προδιαγραφές (EN 14214) για το βιοντίζελ (A.Demirbas, Energy Conversion and management, σελ.26)

| Property                                       | Units              | Lower limit | Upper limit | Test-method              |
|--|--------------------|-------------|-------------|--------------------------|
| Ester content                                  | % (m/m)            | 96.5        | -           | Pr EN 14103 d            |
| Density at 15 °C                               | kg/m <sup>3</sup>  | 860         | 900         | EN ISO 3675/EN ISO 12185 |
| Viscosity at 40 °C                             | mm <sup>2</sup> /s | 3.5         | 5.0         | EN ISO 3104              |
| Flash point                                    | °C                 | >101        | -           | ISO CD 3679e             |
| Sulfur content                                 | mg/kg              | -           | 10          | -                        |
| Tar remnant (at 10% distillation remnant)      | % (m/m)            | -           | 0.3         | EN ISO 10370             |
| Cetane number                                  | -                  | 51.0        | -           | EN ISO 5165              |
| Sulfated ash content                           | % (m/m)            | -           | 0.02        | ISO 3987                 |
| Water content                                  | mg/kg              | -           | 500         | EN ISO 12937             |
| Total contamination                            | mg/kg              | -           | 24          | EN 12662                 |
| Copper band corrosion (3 h at 50 °C)           | rating             | Class 1     | Class 1     | EN ISO 2160              |
| Oxidation stability at 110 °C                  | hours              | 6           | -           | pr EN 14112 k            |
| Acid value                                     | mg KOH/g           | -           | 0.5         | pr EN 14104              |
| Iodine value                                   | -                  | -           | 120         | pr EN 14111              |
| Linoleic acid methyl ester                     | % (m/m)            | -           | 12          | pr EN 14103d             |
| Polyunsaturated (≥ 4 double bonds) methylester | % (m/m)            | -           | 1           | -                        |
| Methanol content                               | % (m/m)            | -           | 0.2         | pr EN 141101             |
| Monoglyceride content                          | % (m/m)            | -           | 0.8         | pr EN 14105m             |
| Diglyceride content                            | % (m/m)            | -           | 0.2         | pr EN 14105m             |
| Triglyceride content                           | % (m/m)            | -           | 0.2         | pr EN 14105m             |
| Free glycerine                                 | % (m/m)            | -           | 0.02        | pr EN 14105m/pr EN 14106 |
| Total glycerine                                | % (m/m)            | -           | 0.25        | pr EN 14105m             |
| Alkali metals (Na + K)                         | mg/kg              | -           | 5           | pr EN 14108/pr EN 14109  |
| Phosphorus content                             | mg/kg              | -           | 10          | pr EN14107p              |

Οι φυσικές ιδιότητες του βιοντίζελ είναι παρόμοιες με αυτές του ντίζελ. Το ιξώδες είναι μια από τις πιο σημαντικές ιδιότητες εφόσον επηρεάζει το ακροφύσιο ψεκασμού καυσίμου και

ειδικότερα, σε χαμηλές θερμοκρασίες που επηρεάζεται το ιξώδες και η ροή του καυσίμου. Το υψηλό ιξώδες οδηγεί σε μειωμένη εκνέφωση κατά τον ψεκασμό του καυσίμου και σε πιο ανακριβή διάχυση καυσίμου. Όσο χαμηλότερο είναι το ιξώδες του βιοντίζελ τόσο πιο εύκολα εκνεφώνεται σε σταγονίδια. Ακόμη έχει παρατηρηθεί ότι το βιοντίζελ από χοίρειο και βοειο λίπος έχουν υψηλότερο ιξώδες από βιοντίζελ προερχόμενο από σόγια και ελαιοκράμβη. Σε γενικές γραμμές, όσο η θερμοκρασία του ελαίου αυξάνεται τόσο το ιξώδες μειώνεται. Το βιοντίζελ έχει υψηλότερο σημείο ανάφλεξης από το ορυκτό ντίζελ. Αυτό είναι αποτέλεσμα των διαφορετικών σημείων ζέσης που έχουν τα ξεχωριστά συστατικά του. Παράδειγμα, το σημείο ζέσης του μεθυλεστέρας του παλμιτικού οξέος είναι 417°C και του μεθυλεστέρα του δεκανοϊκού οξέος 224°C. Τα υπολείμματα της αλκοόλης που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του βιοντίζελ επηρεάζουν πολύ το σημείο ανάφλεξης του. Πέρα από τους εστέρες των λιπαρών οξέων, που είναι το κύριο συστατικό του βιοντίζελ, υπάρχουν και άλλα συστατικά όπως μονο- και διγλυκερίδια, τριγλυκερίδια που δεν αντέδρασαν, μεθανόλη, ελέυθερα λιπαρά οξέα, γλυκερόλη και στερόλες. Η γλυκερόλη, τα ακυλο-γλυκερίδια, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, και η μεθανόλη σύμφωνα με τις προδιαγραφές κατά ASTM πρέπει να είναι περιορισμένα. Όσον αφορά τον αριθμό κετανίου, το βιοντίζελ έχει υψηλότερο αριθμό από ότι το συμβατικό ντίζελ. Ο αριθμός κετανίου των εστέρων του λιπαρού οξέος εξαρτάται από το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας και το βαθμό κορεσμού. Όσο πιο μακριά είναι η υδρογονοανθρακική αλυσίδα του λιπαρού οξέος και όσο πιο κορεσμένη είναι τόσο υψηλότερος είναι ο αριθμός κετανίου. Η αλυσίδα του λιπαρού οξέος στο βιοντίζελ αντιστοιχεί στην αλυσίδα του ελαίου από την οποία προήλθε. Τα βασικά συστατικά των καυσίμων του βιοντίζελ είναι οι αλυσίδες των λιπαρών οξέων, οι πιο συνηθισμένες έχουν μήκος 16-18 άτομα άνθρακα. Υπάρχουν όμως και μικρότερες όπως αυτή για παράδειγμα, του λαυρικού οξέος που βρίσκεται στο έλαιο της καρυδας. Η παρουσία πολυακόρεστων εστέρων του λιπαρού οξέως στο βιοντίζελ προκαλούν προβλήματα οξειδωσης και η παρουσία πολλών κορεσμένων εστέρων του λιπαρού οξέως είναι υπεύθυνοι για τα προβλήματα ροής σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ο αριθμός κετανίου του βιοντίζελ από ζωικά λίπη είναι μεγαλύτερος από ότι του βιοντίζελ προερχόμενου από τα φυτικά έλαια. Σπουδαίο ρόλο στην εφαρμογή του βιοντίζελ στις χαμηλές θερμοκρασίες παίζουν το σημείο θόλωσης και το σημείο ροής. Για εφαρμογές βιοντίζελ σε χαμηλές θερμοκρασίες καθοριστική παράμετρος είναι το σημείο θόλωσης. Το σημείο θόλωσης (CP) είναι η θερμοκρασία στην οποία εμφανίζεται ο πρώτος κρύσταλλος εξαιτίας της πτώσης της θερμοκρασίας του καυσίμου και λόγω αυτού του φαινομένου μπορούν να δημιουργηθούν προβλήματα απόφραξης του φίλτρου. Για βιοντίζελ προερχόμενο από σογιέλαιο το CP είναι περίπου 0°C και για προερχόμενο από φοινικέλαιο

και ζωικό λίπος είναι περίπου 15°C. Η διαφορά αυτή οφείλεται στη ποσότητα των κορεσμένων εστέρων λιπαρού οξέος. Άλλη σημαντική παράμετρος είναι το σημείο ροής (PP). Στη θερμοκρασία αυτή το καύσιμο δεν μπορεί να ρεύσει ελεύθερα. Το βιοντίζελ έχει πιο υψηλό τόσο το σημείο θόλωσης όσο και το σημείο ροής του. Επειδή συνήθως στο CP υποτιμά τις ιδιότητες ψυχρής ροής του καυσίμου και αντίθετα το PP τις υπερεκτιμά, υπάρχει μια άλλη δυναμική μέθοδος δοκιμής για τη ροή καυσίμου σε χαμηλές θερμοκρασίες, το σημείο απόφραξης ψυχρού φίλτρου (cold filter plugging point CFPP) η οποία είναι και πιο αντιπροσωπευτική προς την πραγματικότητα. Σύμφωνα με αυτή, μετρίεται η τελευταία θερμοκρασία στην οποία ποσότητα 20ml καυσίμου μπορεί να περάσει μέσω του φίλτρου σε λιγότερο από 60 sec κάτω από τις συνθήκες της μεθόδου [18]. Η βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων του βιοντίζελ τροποποιώντας τη σύσταση των εστέρων του λιπαρού οξέος είναι ένα θέμα που αναδύεται και ερευνάται συνεχώς. Παράδειγμα, οι εστέρες του παλμιτολικού οξέος είναι κατάλληλοι για να εμπλουτίσουν το βιοντίζελ επειδή έχουν χαμηλό σημείο τήξης (σ.τ. -34°C). Ο εμπλουτισμός με κορεσμένους εστέρες όπως, του εστέρα δεκανοϊκού οξέος, μπορεί να μειώσει το σημείο θόλωσης.

Η περιεκτικότητα του βιοντίζελ σε οξυγόνο βελτιώνει την καύση του και ταυτόχρονα μειώνει την τάση οξειδωσης του (oxidation potential). Το δομικό οξυγόνο που υπάρχει στο βιοντίζελ βελτιώνει την απόδοση της καύσης λόγω της ομογένειας του οξυγόνου με το καύσιμο κατά την διαδικασία της καύσης. Το βιοντίζελ περιέχει 11% οξυγόνο κατά βάρος και καθόλου θείο. Η χρήση βιοντίζελ μπορεί να επιμηκύνει το χρόνο ζωής της μηχανής γιατί έχει καλύτερες λιπαντικές ιδιότητες από ότι το ορυκτό ντίζελ. Η ανώτερη θερμογόνο δύναμη (HHV) του βιοντίζελ είναι σχετικά υψηλή. Η HHV του βιοντίζελ (39-41 MJ/kg) είναι ελαφρώς χαμηλότερη από αυτή της βενζίνης (46 MJ/kg) του ορυκτού ντίζελ (43 MJ/kg) αλλά υψηλότερη από τον άνθρακα (32-37 MJ/kg) [13,15].

Η ονοματολογία που έχουν υιοθετήσει τα διεθνή πρακτικά είναι η λεγόμενη ονοματολογία BXX με την οποία αναγνωρίζεται η συγκέντρωση των μιγμάτων βιοντίζελ. Το XX αναπαριστά το ποσοστό κατόγκο του βιοντίζελ σε μίγμα ντίζελ/βιοντίζελ. Για παράδειγμα το B2, B5, B20, B100 είναι καύσιμα με συγκεντρώσεις 2%, 5%, 20%, και 100% βιοντίζελ αντίστοιχα. Τα βασικότερα καύσιμα βιοντίζελ που υπάρχουν σήμερα στην αγορά είναι το καθαρό βιοντίζελ (B100), μίγματα (B20-30), πρόσθετο (B5) και πρόσθετο λίπανσης (B2). Το B5 δεν χρειάζεται καμία τροποποίηση στους κινητήρες. Έχει παρόμιες φυσικές και χημικές ιδιότητες με το ντίζελ και είναι απόλυτα διαλυτό. Το βιοντίζελ μπορεί να αντληθεί, να αποθηκευτεί και να μετακινηθεί όπως το ορυκτό ντίζελ, να χρησιμοποιηθεί στις ίδιες συσκευές και υποδομές. Επιπλέον, οι ατμοί του βιοντίζελ δεν είναι εύλεκτοι εξαιτίας του χαμηλού σημείου ανάφλεξης

με αποτέλεσμα να είναι πολύ πιο ασφαλές στις μεταφορές και στην αποθήκευση από το ορυκτό ντίζελ [17].

Οι προδιαγραφές των μιγμάτων βιοντίζελ μεταξύ B5-20 δίνονται από τον ΠΙΝΑΚΑ 6:

Πίνακας 6 : Προδιαγραφές κατά ASTM 7467-10 για τα μίγματα καυσίμων B5-20 [19]

| Property                                  | ASTM Method           | Limits                  | Units                 |
|---|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| Flash Point                               | D 93                  | 52 minimum              | °C                    |
| Water & Sediment                          | D 2709                | 0.05 maximum            | % vol.                |
| Kinematic Viscosity, 40°C                 | D 445                 | 1.9 – 4.1 <sup>A</sup>  | mm <sup>2</sup> /sec. |
| Ash Content                               | D 482                 | 0.01 maximum            | % mass                |
| <b>Sulfur</b>                             |                       |                         |                       |
| <b>S 15 Grade</b>                         | <b>D 5453</b>         | <b>0.0015 max. (15)</b> | <b>% mass (ppm)</b>   |
| <b>S 500 Grade</b>                        | <b>D 5453</b>         | <b>0.05 max. (500)</b>  | <b>% mass (ppm)</b>   |
| Copper Strip Corrosion                    | D 130                 | No. 3 maximum           |                       |
| Cetane                                    | D 613                 | 40 minimum              |                       |
| <b>Cloud Point, max or LTFT/CFPP, max</b> | <b>D 2500, D4539,</b> | <b>report</b>           | <b>°C</b>             |
| Ramsbottom Carbon Residue on 10% bottoms  | D 524                 | 0.35 maximum            | % mass                |
| <b>Acid Number</b>                        | <b>D 664</b>          | <b>0.3 maximum</b>      | <b>mg KOH/g</b>       |
| Distillation, T90 AET                     | D 86                  | 343 maximum             | °C                    |
| <b>Oxidation Stability</b>                | <b>EN 15751</b>       | <b>6 minimum</b>        | <b>hours</b>          |
| Lubricity, HFRR at 60 C                   | D 6079                | 520 maximum             | microns               |
| <b>Biodiesel Content, % (V/V)</b>         | <b>D 7371</b>         | <b>6. – 20.</b>         | <b>% volume</b>       |

Το βιοντίζελ είναι το πρώτο και το μόνο εναλλακτικό βιοκαύσιμο για το οποίο έχει γίνει μια πλήρης εκτίμηση των εκπομπών και των επιπτώσεων που μπορεί να έχει. Τα US Department of Energy (DOE) και US Department of Agriculture (USDA) έχουν διεξάγει μια έρευνα για τη σύγκριση επιπτώσεων που προκαλούνται καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του βιοντίζελ και ορυκτού ντίζελ [20,21]. Τα βασικότερα σημεία της έρευνας αυτής είναι:

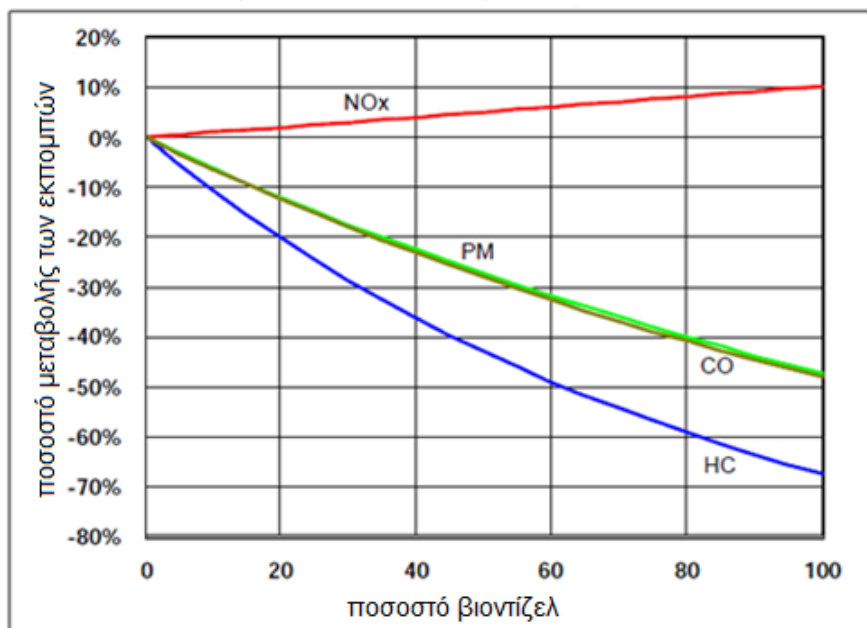
- Ντίζελ και βιοντίζελ έχουν παρόμοιες συνολικές ενεργειακές αποδόσεις (total energy efficiency ratio, συνολική καύσιμη ενέργεια / συνολική ενέργεια που χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή, μεταφορά και διανομή) με 83,28% και 80,55% αντίστοιχα
- Η συνολική καύσιμη ενεργειακή απόδοση (total fossil energy efficiency ratio, συνολική καύσιμη ενέργεια/ συνολική ενέργεια προερχόμενη από ορυκτά καύσιμα που χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή, μεταφορά και διανομή) του βιοντίζελ είναι τέσσερεις

φορές μεγαλύτερη από του ορυκτού ντίζελ. Εδώ φαίνεται η έννοια της ανανεώσιμης φύσης του βιοντίζελ

- Οι εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του βιοντίζελ είναι κατά 78% χαμηλότερες. Αυτό οφείλεται στην κατανάλωση του άνθρακα από τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του βιοντίζελ
- Οι εκπομπές του μονοξειδίου του άνθρακα καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του βιοντίζελ είναι 35% χαμηλότερες από το ορυκτό βιοντίζελ
- Οι εκπομπές σε σωματίδια (particulate matter, PM) καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του βιοντίζελ είναι 32% χαμηλότερες από ότι στο ορυκτό ντίζελ
- Οι εκπομπές σε οξειδία του θείου καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του βιοντίζελ είναι 8% χαμηλότερες από ότι στο ορυκτό ντίζελ
- Οι εκπομπές σε μεθάνιο καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του βιοντίζελ είναι κατά 3% χαμηλότερες από ότι στο ορυκτό ντίζελ
- Οι εκπομπές σε οξειδία του αζώτου είναι αυξημένες κατά 13% στο βιοντίζελ από ότι στο ορυκτό ντίζελ
- Η παραγωγή απόβλητων νερών καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του βιοντίζελ είναι 79,0% χαμηλότερη από ότι στο ντίζελ
- Κατά τη διάρκεια ζωής του βιοντίζελ παράγονται 96% λιγότερα βλαβερά στερεά σωματίδια (hazardous solid wastes) από ότι στο ορυκτό ντίζελ. Τα ακίνδυνα σωματίδια όμως που παράγονται κατά τη διάρκεια ζωής του βιοντίζελ είναι διπλάσια σε σχέση με αυτά του ορυκτού ντίζελ. [21]

Μια πιο πρόσφατη έρευνα που πραγματοποιήθηκε πάνω στο βιοντίζελ και στις εκπομπές του έγινε από τον Οργανισμό προστασίας περιβάλλοντος των Ηνωμένων Εθνών (U.S. Environmental Protection Agency, EPA). Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής συνοψίζονται στο παρακάτω Σχήμα 9. Οι αναλύσεις αυτές έγιναν σε (heavy-duty highway) μηχανές. Τα αποτελέσματα αφορούν τους πιο σημαντικούς ρύπους δηλαδή τα οξειδία του αζώτου (NO<sub>x</sub>), στερεά σωματίδια (PM), μονοξείδιο του άνθρακα (CO), και υδρογονάνθρακες (HC) [23].

### Μέσος όρος των επιπτώσεων του βιοντίζελ σε μηχανές



Σχήμα 9: Ο μέσος όρος των επιπτώσεων στις εκπομπές συναρτήσει του ποσοστού βιοντίζελ [22].

Ένα από τα πιο συνηθισμένα μίγματα βιοντίζελ είναι το B20. Ο υπολογισμός εκπομπής αερίων για το B20 με βιοντίζελ προερχόμενο από έλαιο σόγιας φαίνεται στο παρακάτω Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Ποσοστά μεταβολών των εκπομπών σε B20 προερχόμενο από σογιέλαιο [22].

| Αέριες εκπομπές | Ποσοστά μεταβολών στις εκπομπές |
|-----------------|---------------------------------|
| NOx             | +2.0 %                          |
| PM              | -10.1 %                         |
| HC              | -21.1 %                         |
| CO              | -11.0 %                         |

Κάποιες επιπλέον χημικές ιδιότητες του βιοντίζελ και του ορυκτού ντίζελ φαίνονται και στον παρακάτω Πίνακα 8:



Πίνακας 8: Σύγκριση χημικών ιδιοτήτων και HHV βιοντίζελ και ορυκτού ντίζελ (N.N.A.N. Yusuf, *Energy conversion and management*, σελ. 2746)

| Chemical property | Biodiesel (methyl ester) | Diesel       |
|-------------------|--------------------------|--------------|
| Ash (wt.%)        | 0.002–0.036              | 0.006–0.010  |
| Sulfur (wt.%)     | 0.006–0.020              | 0.020–0.050  |
| Nitrogen (wt.%)   | 0.002–0.007              | 0.0001–0.003 |
| Aromatics (vol.%) | 0                        | 28–38        |
| Iodine number     | 65–156                   | 0            |
| HHV (MJ/kg)       | 39.2–40.6                | 45.1–45.6    |

Συνοψίζοντας, η καύση βιοντίζελ στις ντιζελομηχανές οδηγεί σε αυξημένες εκπομπές NO<sub>x</sub> περίπου κατά 10% σε σχέση με το ντίζελ. Παρόλα αυτά, οι υπόλοιποι βασικοί ρύποι όπως τα στερεά σωματίδια (particulate matter PM), οι υδρογονάνθρακες (HC), και το μονοξείδιο του άνθρακα μειώνονται σημαντικά με τη χρήση βιοντίζελ. Επιπλέον, νέες τεχνολογίες όπως καταλυτές και η τεχνική του επιλεκτικού καταλυτικού περιορισμού (selective catalytic reduction SCR) σε συνδυασμό με νέες βελτιωμένες μηχανές, πιθανότατα μπορούν να οδηγήσουν στη μείωση και των στερεών σωματιδίων και των οξειδίων του αζώτου και να εκπληρώσουν τις επιθυμητές προδιαγραφές [15].

### 2.3 Πηγές βιοντίζελ

Τα εναλλακτικά καύσιμα ντίζελ παράγονται από φυσικές, ανανεώσιμες πηγές όπως τα φυτικά λάδια και λίπη. Η ποικιλία βιολιπιδίων από την οποία μπορεί να παραχθεί βιοντίζελ είναι κυρίως (α) τα παρθένα φυτικά έλαια (β) τα απόβλητα φυτικά έλαια (γ) τα λίπη φυσικής προέλευσης (δ) μη εδώδιμα έλαια. Τα πιο συνηθισμένα λάδια για την παραγωγή βιοντίζελ είναι το σογιέλαιο, το έλαιο από ηλιάνθο, ελαιοκράμβη, jatropha, βαμβακέλαιο, παλμέλαιο [13]. Επειδή οι τιμές των εδωδιμων φυτικών ελαίων είναι υψηλότερες από αυτές του ντίζελ, τα μη εδωδιμα και ακατέργαστα έλαια καθώς και τα απόβλητα φυτικά λάδια είναι προτιμότερες πηγές βιοντίζελ εξαιτίας του χαμηλότερου τους κόστους. Επίσης, η χρήση βρώσιμων λαδιών για παραγωγή βιοντίζελ σε πολλές χώρες δεν είναι εφικτή αν λάβουμε υπόψη τις μεγάλες απαιτήσεις για τα εδωδιμα λάδια. Υπό αυτές τις συνθήκες τα μόνα φυτά που μπορούν να καλλιεργηθούν για βιοντίζελ είναι αυτά που παράγουν μη εδωδιμα έλαια σε μεγάλες ποσότητες και μπορούν να αναπτυχθούν σε περιοχές απομακρυσμένες, πιο άγονες και σε μεγάλη κλίμακα. Τα ζωικά λίπη αν και αναφέρονται συχνά, δεν έχουν μελετηθεί τόσο όσο τα φυτικά έλαια κυρίως λόγω των διαφορών τους στις ιδιότητες. Τα ζωικά λίπη περιέχουν σε

μεγαλύτερο ποσοστό κορεσμένα λιπαρά οξέα και για αυτό βρίσκονται σε στερεή μορφή στη θερμοκρασία δωματίου [16]. Οι πηγές βιοντίζελ όσον αφορά φυτικά, μη εδώδιμα έλαια, ζωικά λίπη και άλλες βιομάζες παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 9.

Πίνακας 9 : Πηγές ελαίων (S.N. Naik, *Renewable and sustainable Energy reviews*, σελ.202)

| Vegetable oils      | Non-edible oils           | Animal Fats | Other Sources                           |
|---------------------|---------------------------|-------------|---|
| Soybeans            | Almond                    | Lard        | Bacteria                                |
| Rapeseed            | <i>Abutilon muticum</i>   | Tallow      | Algae                                   |
| Canola              | Andiroba                  | Poultry Fat | Fungi                                   |
| Safflower           | Babassu                   | Fishoil     | Micro algae                             |
| Barley              | <i>Brassica carinata</i>  |             | Terpenes                                |
| Coconut             | <i>B. napus</i>           |             | Latexes                                 |
| Copra               | Camelina                  |             | Cooking Oil (Yellow Grease)             |
| Cotton seed         | Cumaru                    |             | Microalgae ( <i>Chlorellavulgaris</i> ) |
| Groundnut           | <i>Cynara cardunculus</i> |             |   |
| Oat                 | <i>Jatropha curcas</i>    |             |   |
| Rice                | <i>Jatropha nana</i>      |             |   |
| Sorghum             | Jojoba oil                |             |   |
| Wheat               | Pongamiaglabra            |             |   |
| Winter rapeseed oil | Laurel                    |             |   |
|                     | Lesquerellafendleri       |             |   |
|                     | Mahua                     |             |   |
|                     | Piqui                     |             |   |
|                     | Palm                      |             |   |
|                     | Karang                    |             |   |
|                     | Tobacco seed              |             |   |
|                     | Rubber plant              |             |   |
|                     | Rice bran                 |             |   |
|                     | Sesame                    |             |   |
|                     | Salmon oil                |             |   |

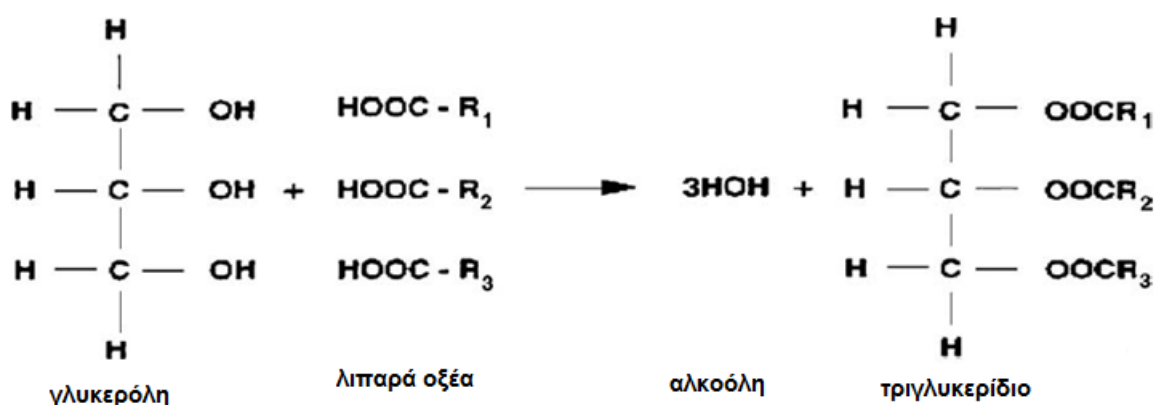
Οι πηγές του βιοντίζελ συνήθως εξαρτώνται από το κατά πόσο ευδοκιμούν οι σοδιές στο τοπικό κλίμα. Μια πηγή για την παραγωγή βιοντίζελ θεωρείται κατάλληλη, όταν δεν συναγωνίζεται με άλλες εφαρμογές που μπορεί να της αυξήσουν την τιμή όπως για παράδειγμα, φαρμακευτικές πρώτες ύλες. Οι απαιτήσεις στις φαρμακευτικές πρώτες ύλες πρέπει να είναι χαμηλότερες από ότι στα καύσιμα. Οι πηγές για την παραγωγή βιοντίζελ θα πρέπει να ακολουθούν όσο το δυνατό περισσότερο δύο απαιτήσεις: χαμηλό κόστος παραγωγής και ταυτόχρονα παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα. Τα επεξεργασμένα λάδια έχουν υψηλό κόστος παραγωγής και χαμηλή παραγωγικότητα. Στην αντίθετη πλευρά βρίσκονται οι μη βρώσιμοι σπόροι (seeds) τα φύκη και τα μικροφύκη, τα οποία έχουν χαμηλά κόστη παραγωγής και βρίσκονται σε μεγαλύτερη διαθεσιμότητα από ότι τα επεξεργασμένα ή ανακυκλωμένα λάδια. Μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους για μια πηγή βιοντίζελ είναι το ποσοστό ελαίου και η σοδιά ανά εκτάριο. Στον ΠΙΝΑΚΑ 10 βρίσκονται τα ποσοστά περιεκτικότητας σε λάδι μη εδώδιμων σπόρων [16].

Πίνακας 10 : Παραγωγή μη εδώδιμων ελαίων (S.N. Naik, Renewable and sustainable Energy reviews, σελ.202)

| Species            | Oil fraction (%) | Seed estimate (10 <sup>6</sup> tones/y) | Oil (tons/ha/y) |
|--------------------|------------------|---|-----------------|
| Castor             | 45–50            | 0.25                                    | 0.5–1.0         |
| Jatropha           | 50–60            | 0.20                                    | 2.0–3.0         |
| Mahua              | 35–40            | 0.20                                    | 1.0–4.0         |
| Sal                | 10–12            | 0.20                                    | 1.0–2.0         |
| Linseed            | 35–45            | 0.15                                    | 0.5–1.0         |
| Neem               | 20–30            | 0.10                                    | 2.0–3.0         |
| Pongamia (Karanja) | 30–40            | 0.06                                    | 2.0–4.0         |
| Others             | 10–50            | 0.50                                    | 0.5–2.0         |
| Others             | 10–50            | 0.50                                    | 0.5–2.0         |

### 2.3.1 Χημική σύσταση εναλλακτικών καυσίμων (έλαιο και βιοντίζελ) και ντίζελ

Από χημικής άποψης, τα έλαια από διαφορετικές πηγές έχουν διαφορετική σύσταση σε λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα ποικίλουν ως προς το μήκος της ανθρακικής τους αλυσίδας και τον αριθμό των ακόρεστων δεσμών που περιέχουν. Τα λίπη και τα έλαια είναι καταρχήν υδρόφοβα και αδιάλυτα στο νερό τόσο στο φυτικό όσο και στο ζωικό βασίλειο. Αποτελούνται από ένα mole γλυκερόλης και τρία moles λιπαρού οξέος και κοινώς αναφέρονται ως τριγλυκερίδια (ή τρι-ακυλ-γλυκερίδια, TAG). (Σχήμα 10)

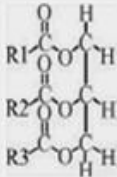
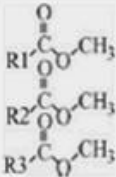


Σχήμα 10 : Χημική δομή φυτικού ελαίου [16]

Χημικά, τα έλαια και τα λίπη αποτελούνται κατά ένα 90-98% από τριγλυκερίδια και από ένα μικρό ποσοστό μονο- και δι-γλυκερίδια. Τα τριγλυκερίδια είναι εστέρες τριών λιπαρών οξέων και μιας γλυκερόλης. Τα παραπάνω περιέχουν ένα σημαντικό ποσό οξυγόνου στις δομές

τους. Όταν τρία λιπαρά οξέα είναι όμοια, τότε πρόκειται για ένα απλό τριγλυκερίδιο, όταν είναι διαφορετικά μεταξύ τους τότε πρόκειται για ένα μικτό τριγλυκερίδιο. Αυτά το οποία έχουν ένα υδρογόνο λιγότερο δημιουργούν ένα διπλό δεσμό μεταξύ των ατόμων του άνθρακα και ονομάζονται μονοακόρεστα. Αυτά που έχουν πάνω από ένα υδρογόνο λιγότερο, έχουν πάνω από ένα διπλό δεσμό μεταξύ των ατόμων άνθρακα και ονομάζονται πολυακόρεστα. Τα κορεσμένα τριγλυκερίδια δεν έχουν κανένα διπλό δεσμό και κατά τη καύση τους οδηγούν σε εναποθέσεις άνθρακα στις μηχανές. Τα λιπαρά οξέα διαφέρουν ανάλογα με το μήκος της αλυσίδας, τον βαθμό ακορεστότητας και την παρουσία ή όχι άλλων χημικών λειτουργικών ομάδων [16]. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα με λιγότερα από δέκα άτομα άνθρακα είναι υγρά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ αυτά με μεγαλύτερη αλυσίδα είναι στερεά. Όσο μικρότερο είναι το μήκος της αλυσίδας του λιπαρού οξέος, τόσο χαμηλότερο το σημείο τήξης του (με εξαίρεση το οξικό οξύ). Το σημείο τήξης των τριγλυκεριδίων είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των λιπαρών οξέων [23]. Χημικά το βιοντίζελ αναφέρεται ως ο μονοαλκυλεστέρας λιπαρών οξέων με μεγάλου μήκους αλυσίδες που προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές λιπιδίων. Το βιοντίζελ παράγεται μέσω μιας χημικής διεργασίας που ονομάζεται μετεστεροποίηση. Στη διεργασία αυτή τα οργανικής προέλευσης έλαια (φυτικά έλαια, ζωικά λίπη, χρησιμοποιημένα λάδια) συνδυάζονται με μία αλκοόλη (στις περισσότερες περιπτώσεις είναι η μεθανόλη) και τροποποιούνται χημικά σχηματίζοντας εστέρες του λιπαρού οξέος παράδειγμα, μεθυλεστέρες. Το μεγαλύτερο ποσοστό του βιοντίζελ αποτελείται από αλκυλεστέρες (συνήθως μεθυλεστέρες) ενώ το ορυκτό ντίζελ κυρίως από αλκάνια και αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Τα έλαια, οι εστέρες και το ντίζελ έχουν διαφορετικό αριθμό ανθράκων και υδρογόνων. Το ντίζελ δεν περιέχει οξυγόνο και είναι μιας καλής ποιότητας καύσιμο. Αντιθέτως, στην περίπτωση των καυσίμων από φυτικά έλαια, η αντίσταση στην οξειδωση επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την σύνθεση του λιπαρού οξέος. Το μεγάλο μέγεθος του μορίου του φυτικού ελαίου (περίπου τρεις ή περισσότερες φορές μεγαλύτερο από το μόριο των H/C καυσίμων) και η παρουσία του οξυγόνου στο μόριο, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι κάποιες ιδιότητες των καυσίμων των φυτικών ελαίων θα παρουσιάσουν σημαντικές διαφορές από τα καύσιμα υδρογονανθράκων. Η χημική δομή των ελαίων, βιοντίζελ και ορυκτού ντίζελ δίνονται στον πίνακα 11 [16].

Πίνακας 11 : Χημική δομή ελαίου, εστέρων και ντίζελ [16]

| χημική δομή μονογλυκεριδίου  | χημική δομή διγλυκεριδίου  | χημική δομή ελαίων και λιπών  | χημική δομή εστέρα  | χημική δομή ντίζελ           |
|--|--|---|---|------------------------------|
| $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{COR}_1 \\   \\ \text{HC}-\text{OH} \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{COR}_1 \\   \\ \text{HC}-\text{O}-\text{COR}_2 \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array}$ |  |  | $\text{C}_{12}\text{H}_{23}$ |

Τα ορυκτά καύσιμα έχουν διαφορετικές χημικές δομές από ότι τα φυτικά έλαια και εστέρες. Τα πρώτα αποτελούνται μόνο από άτομα άνθρακα και υδρογόνου που βρίσκονται είτε σε ευθείες αλυσίδες είτε διακλαδισμένες είτε σε αρωματικούς σχηματισμούς. Το ντίζελ καύσιμο περιέχει και κορεσμένους και ακόρεστους υδρογονάνθρακες αλλά οι τελευταίοι είναι σε πολύ μικρά ποσοστά γιατί μπορούν να προκαλέσουν την οξειδωση του καυσίμου. Το ορυκτό ντίζελ αποτελείται κατά 75% από κορεσμένους υδρογονάνθρακες και 25% αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Ο μέσος χημικός τύπος για το ορυκτό ντίζελ είναι  $\text{C}_{12}\text{H}_{23}$ . [16]

Τα βασικά συστατικά των φυτικών ελαίων είναι τα λιπαρά οξέα, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα φωσφατίδια, τα φωσφολιπίδια, καροτενοειδή, τοκοφερόλες, θειικά συστατικά και ίχνη νερού. Τα πιο συνηθισμένα λιπαρά οξέα που απαντώνται στα φυτικά έλαια είναι το στεαρικό οξύ, το παλμτικό οξύ, το ελαϊκό οξύ, το λινελαϊκό οξύ και το λινολενικό οξύ. Ο πίνακας 12 συνοψίζει τη σύσταση των λιπαρών οξέων σε έναν αριθμό φυτικών ελαίων.

Πίνακας 12 : Χημική δομή κοινών λιπαρών οξέων (S.N. Naik, Renewable and sustainable Energy reviews, σελ.203)

| Name of fatty acid     | Chemical name of fatty acids         | Structure (xx:y) | Formula                                |
|------------------------|--------------------------------------|------------------|--|
| Lauric                 | Dodecanoic                           | 12:0             | $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$ |
| Myristic               | Tetradecanoic                        | 14:0             | $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$ |
| Palmitic               | Hexadecanoic                         | 16:0             | $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ |
| Stearic                | Octadecanoic                         | 18:0             | $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$ |
| Oleic cis-9-           | Octadecenoic                         | 18:1             | $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ |
| Linoleic cis-9,cis-12- | Octadecadienoic                      | 18:2             | $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ |
| Linolenic              | cis-9,cis-12,cis-15-Octadecatrienoic | 18:3             | $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$ |
| Arachidic              | Eicosanoic                           | 20:0             | $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$ |
| Behenic                | Docosanoic                           | 22:0             | $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_2$ |
| Erucic                 | cis-13-Docosenoic                    | 22:1             | $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{O}_2$ |
| Lignoceric             | Tetracosanoic                        | 24:0             | $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$ |

Τα μόρια των τριγλυκεριδίων έχουν μοριακό βάρος περίπου 800-900 και είναι περίπου τέσσερις φορές μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα μόρια του ορυκτού ντίζελ. Τα διάφορα φυτικά έλαια και εστέρες έχουν διαχωριστεί με βάση τη σύσταση του λιπαρού οξέος τους. Στους πίνακες 13 και 14 παρουσιάζονται κάποια λιπαρά οξέα και ο αντίστοιχος αριθμός ανθράκων

τους. Στον πίνακα 13 περιλαμβάνεται η σύσταση σε λιπαρά οξέα από 51 δείγματα ελαίων και λιπών. Εικοσιένα λιπαρά οξέα βρίσκονται σε όλα τα δείγματα. Τα πιο συνήθη λιπαρά οξέα που βρίσκονται σε όλα τα φυτικά έλαια και λίπη είναι το στεαρικό, το παλμικό, το ελαϊκό και το λινελαϊκό οξύ. Άλλα λιπαρά οξέα τα οποία βρίσκονται σε πολλά έλαια και λίπη είναι το μυριστικό οξύ, παλμιτελαϊκό οξύ, το αραχιδικό, το λινολενικό και το οκταδεκατετρανοϊκό οξύ. Υπάρχουν πολλά ακόμα λιπαρά οξέα τα οποία βρίσκονται μαζί με τα προαναφερθέντα λιπαρά οξέα. Παράδειγμα, το λαυρικό οξύ βρίσκεται στο έλαιο της καρύδας, το μυριστοελαϊκό βρίσκεται στα λίπη των πουλερικών και στο βόειο λίπος κτλ. Επίσης, σε πολλά φυτά η σύσταση του ελαίου σε λιπαρά οξέα για το ίδιο φυτό μπορεί να είναι διαφορετική ανάλογα με το τμήμα του φυτού. Στον πίνακα 14 παρουσιάζονται τα ποσοστά των λιπαρών οξέων των μεθυλεστέρων από 75 είδη φυτών. Η σύσταση των λιπαρών οξέων χρησιμοποιήθηκε για να προβλεφθεί η ποιότητα των μεθυλεστέρων που θα προκύψουν κατά την παραγωγή βιοντίζελ από τα συγκεκριμένα έλαια [16]. Επειδή τα λιπαρά οξέα αποτελούν το 94-96% του συνολικού βάρους του γλυκεριδίου, η χημεία των λιπών και των ελαίων έχει άμεση σχέση με τη χημεία και τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των λιπαρών οξέων [23]. Οι μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων προερχόμενοι από τα έλαια 26 ειδών περιλαμβανομένου *Azadirachta indica*, *Calophyllum inophyllum*, *Jatropha curcas*, και *Pongamia pinnata* θεωρούνται οι πιο κατάλληλοι για χρήση για βιοντίζελ και πληρούν τις προδιαγραφές της χρήσης βιοντίζελ για τις Ηνωμένες Πολιτείες, Γερμανία και τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό.

Πίνακας 13: Σύσταση του ελαίου σε λιπαρά οξέα (S.N. Naik, Renewable and sustainable Energy reviews, σελ.204)

| S. No. | Vegetable oil         | Fatty acid composition (wt.%) |         |      |           |      |           |          |      |      |           |      |           |      |      |   |
|--------|-----------------------|-------------------------------|---------|------|-----------|------|-----------|----------|------|------|-----------|------|-----------|------|------|---|
|        |                       | 12:0                          | 14:0    | 14:1 | 16:0      | 16:1 | 18:0      | 20:0     | 20:1 | 22:0 | 24:0      | 18:1 | 22:1      | 18:2 | 18:3 | 18:4  |
| 1.     | Cottonseed            | -                             | -       | -    | 28.7      | -    | 0.9       | -        | -    | -    | 13.0      | -    | 57.4      | -    | -    | -   |
| 2.     | Cottonseed            | -                             | 0       | -    | 28        | -    | 1         | 0        | -    | 0    | 13        | 0    | 58        | 0    | -    | -   |
| 3.     | Tobacco               | -                             | 0.09    | -    | 10.96     | 0.2  | 3.34      | -        | -    | -    | 14.54     | -    | 69.49     | 0.69 | -    | 0.69  |
| 4.     | Tobacco               | -                             | 0.17    | -    | 8.87      | 0.0  | 3.49      | -        | -    | -    | 12.4      | -    | 67.75     | 4.20 | -    | -   |
| 5.     | Rapeseed              | -                             | -       | -    | 3.5       | -    | 0.9       | -        | -    | -    | 64.1      | -    | 22.3      | 8.2  | -    | -   |
| 6.     | Rapeseed              | -                             | 0       | -    | 3         | -    | 1         | 0        | -    | 0    | 64        | 0    | 22        | 8    | -    | -   |
| 7.     | Safflower seed        | -                             | -       | -    | 7.3       | -    | 1.9       | -        | -    | -    | 13.6      | -    | 77.2      | -    | -    | -   |
| 8.     | Safflower             | -                             | 0       | -    | 9         | -    | 2         | 0        | -    | 0    | 12        | 0    | 78        | 0    | -    | -   |
| 9.     | H.O.Safflower         | -                             | Tr      | -    | 5         | -    | 2         | Tr       | -    | 0    | 79        | 0    | 13        | 0    | -    | -   |
| 10.    | Sunflower             | -                             | -       | -    | 6.4       | 0.1  | 2.9       | -        | -    | -    | 17.7      | -    | 72.9      | -    | -    | -   |
| 11.    | Sunflower             | -                             | 0       | -    | 6         | -    | 3         | 0        | -    | 0    | 17        | 0    | 74        | 0    | -    | -   |
| 12.    | Sesame                | -                             | -       | -    | 13.1      | -    | 3.9       | -        | -    | -    | 52.8      | -    | 30.2      | -    | -    | -   |
| 13.    | Sesame                | -                             | 0       | -    | 13        | -    | 4         | 0        | -    | 0    | 53        | 0    | 30        | 0    | -    | -   |
| 14.    | Linseed               | -                             | -       | -    | 5.1       | 0.3  | 2.5       | -        | -    | -    | 18.9      | -    | 18.1      | -    | -    | -   |
| 15.    | Linseed               | -                             | 0       | -    | 5         | -    | 2         | 0        | -    | 0    | 20        | 0    | 18        | 55.1 | -    | -   |
| 16.    | Palm                  | -                             | -       | -    | 42.6      | 0.3  | 4.4       | -        | -    | -    | 40.5      | -    | 10.1      | 0.2  | 1.1  | -   |
| 17.    | Palm tree             | -                             | -       | -    | 35        | -    | 7         | -        | -    | -    | 44        | -    | 14        | -    | -    | -   |
| 18.    | Corn marrow           | -                             | -       | -    | 11.8      | -    | 2.0       | -        | -    | -    | 24.8      | -    | 61.3      | -    | 0.3  | -   |
| 19.    | Corn                  | -                             | 0       | -    | 12        | -    | 2         | Tr       | -    | 0    | 25        | 0    | 6         | Tr   | -    | -   |
| 20.    | Tallow                | -                             | -       | -    | 23.3      | 0.1  | 19.3      | -        | -    | -    | 42.4      | -    | 2.9       | 0.9  | 2.9  | -   |
| 21.    | Beef tallow           | -                             | 2.73    | 0.50 | 22.99     | 2.86 | 19.44     | 0.14     | 0.33 | -    | 41.60     | -    | 3.91      | 0.49 | 0.36 | -   |
| 22.    | Soybean               | -                             | -       | -    | 13.9      | 0.3  | 2.1       | -        | -    | -    | 23.2      | -    | 56.2      | 4.3  | 0    | -   |
| 23.    | Soya bean             | -                             | -       | -    | 14        | -    | 4         | -        | -    | -    | 24        | -    | 52        | 6    | -    | -   |
| 24.    | Soya bean             | -                             | 0       | -    | 12        | -    | 3         | 0        | -    | 0    | 23        | 0    | 55        | 6    | -    | -   |
| 25.    | Peanut kernel         | -                             | -       | -    | 11.4      | 0    | 2.4       | -        | -    | 2.7  | 48.3      | -    | 32.0      | 0.9  | 4.0  | -   |
| 26.    | Peanut                | -                             | 0       | -    | 11        | -    | 2         | 1        | -    | 2    | 48        | 0    | 32        | 1    | -    | -   |
| 27.    | Hazelnutkernel        | -                             | -       | -    | 4.9       | 0.2  | 2.6       | -        | -    | -    | 83.6      | -    | 8.5       | 0.2  | 0    | -   |
| 28.    | Walnut kernel         | -                             | -       | -    | 7.2       | 0.2  | 1.9       | -        | -    | -    | 18.5      | -    | 56.0      | 16.2 | 0    | -   |
| 29.    | Almond kernel         | -                             | -       | -    | 6.5       | 0.5  | 1.4       | -        | -    | -    | 70.7      | -    | 20.0      | 0    | 0.9  | -   |
| 30.    | Olive kernel          | -                             | -       | -    | 5.0       | 0.3  | 1.6       | -        | -    | -    | 74.7      | -    | 17.6      | 0    | 0.8  | -   |
| 31.    | Coconut               | 48.8                          | 19.9    | -    | 7.8       | 0.1  | 3.0       | -        | -    | -    | 4.4       | -    | 0.8       | 0    | 65.7 | 8.9 <sup>b</sup> , 6.2 <sup>c</sup>                         |
| 32.    | Choice white          | -                             | 1.57    | 0.36 | 22.04     | 5.03 | 9.95      | 0.14     | 0.56 | -    | 42.45     | -    | 13.17     | 0.97 | 0.29 | -   |
| 33.    | Poultry fat           | -                             | 0.57    | 0.26 | 22.76     | 8.37 | 5.36      | 0.00     | 0.45 | -    | 42.07     | -    | 17.14     | 1.07 | 0.22 | -   |
| 34.    | Yellow grease         | -                             | 0.70    | 0.00 | 14.26     | 1.43 | 8.23      | 0.33     | 0.48 | -    | 43.34     | -    | 26.25     | 2.51 | 0.47 | -   |
| 35.    | Babassu               | 48                            | 16      | -    | 10        | -    | 2         | -        | -    | -    | 14        | -    | 5         | -    | 5    | -   |
| 36.    | Cumaru                | -                             | -       | -    | 23        | -    | 7         | -        | -    | -    | 37        | -    | 29        | -    | 4    | -   |
| 37.    | Piqui                 | -                             | -       | -    | 40        | -    | 2         | -        | -    | -    | 47        | -    | 4         | -    | 7    | -   |
| 38.    | Castor                | -                             | -       | -    | 1.1       | 0    | 3.1       | -        | -    | -    | 4.9       | -    | 1.3       | 0    | -    | Ricinoic acid 89.6  |
| 39.    | Poppy seed            | -                             | -       | -    | 12.6      | 0.1  | 4.0       | -        | -    | -    | 22.3      | -    | 60.2      | 0.5  | -    | -   |
| 40.    | Bay laurel leaf       | 26.5                          | 4.5     | -    | 25.9      | 0.3  | 3.1       | -        | -    | -    | 10.8      | -    | 11.3      | 17.6 | 31.0 | -   |
| 41.    | Wheat grain           | -                             | 0.4     | -    | 20.6      | 1.0  | 1.1       | -        | -    | -    | 16.6      | -    | 56.0      | 2.9  | 1.8  | 11.4 <sup>b</sup>   |
| 42.    | Crambe                | -                             | 0       | -    | 2         | -    | 1         | 2        | -    | 1    | 19        | 59   | 9         | 7    | -    | -   |
| 43.    | Rice-bran             | -                             | 0.4-0.6 | -    | 11.7-16.5 | -    | 1.7-2.5   | 0.4-0.6  | -    | -    | 39.2-43.7 | -    | 26.4-35.1 | -    | -    | -   |
| 44.    | Sal                   | -                             | -       | -    | 4.5-8.6   | -    | 34.2-44.8 | 6.3-12.2 | -    | -    | 34.2-44.8 | -    | 2.7       | -    | -    | -   |
| 45.    | Mahua                 | -                             | -       | -    | 16.0-28.2 | -    | 20.0-25.1 | 0.0-3.3  | -    | -    | 41.0-51.0 | -    | 8.9-13.7  | -    | -    | -   |
| 46.    | Neem                  | -                             | -       | -    | 13.6-16.2 | -    | 14.4-24.1 | 0.8-3.4  | -    | -    | 49.1-61.9 | -    | 2.3-15.8  | -    | -    | -   |
| 47.    | Karanja               | -                             | -       | -    | 3.7-7.9   | -    | 2.4-8.9   | -        | -    | -    | 44.5-71.3 | -    | 10.8-18.3 | -    | -    | -   |
| 48.    | Camelina oil          | -                             | -       | -    | 5.4       | -    | 2.6       | 0.25     | 16.8 | 1.4  | 14.3      | 2.9  | 38.4      | -    | -    | -   |
| 49.    | Andiroba              | -                             | -       | -    | 27        | 1    | 7         | -        | -    | -    | 49        | 16   | 16        | -    | -    | -   |
| 50.    | B. carinata crude oil | -                             | -       | -    | 3.1       | -    | 1.0       | 0.7      | -    | -    | 9.7       | 42.5 | 16.8      | 16.6 | -    | -   |
| 51.    | Cuphea viscosissima   | 4.81                          | 6.84    | -    | 3.33      | -    | 0.15      | -        | -    | -    | 1.37      | 2.05 | 2.05      | 0.13 | -    | 4.19 <sup>a</sup> , 40.24 <sup>b</sup> , 36.90 <sup>c</sup> |







Στο σημείο αυτό να αναφέρουμε ότι εξαιτίας του υψηλού κόστους των ελαίων, οικονομικότερες πηγές βιοντίζελ, όπως τα ζωικά λίπη και τα χρησιμοποιημένα λάδια, έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον. Δυστυχώς όμως, αυτού του είδους τα λάδια έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (free fatty acids FFA). Τα εξευγενισμένα λάδια περιέχουν συνολικά λιγότερο από 0,05% FFA ενώ τα ανεπεξεργαστα, τα χρησιμοποιημένα και τα ζωικά λίπη τα ποσοστά σε FFA κυμαίνονται στα 0,3-0,7%, 2-7%, 5-30% αντίστοιχα για το καθένα. Οποιαδήποτε παρουσία νερού ή FFA στην πρώτη ύλη καθυστερεί σημαντικά την καταλυόμενη από βασικούς καταλυτές μετεστεροποίηση. Ερευνητές έχουν αποδείξει συγκεκριμένα για το βόειο λίπος, πως για την καλύτερη απόδοση βιοντίζελ τα FFA πρέπει να είναι μεταξύ των ορίων 0,06%w/w και 0,5%w/w. Οι τροφοδοσίες ελαίων με υψηλά ποσοστά FFA συνήθως υπόκεινται σε μια προεπεξεργασία γιατί αλλιώς θα ήταν αδύνατη η παραγωγή βιοντίζελ με απλή μετεστεροποίηση με βασικό καταλύτη σε ένα μόνο στάδιο. Είναι απαραίτητο ένα στάδιο προεπεξεργασίας με μεθανόλη παρουσία θειικού οξέος για γίνει δυνατή η μείωση τους [26].

### 2.3.2 Ιδιότητες των πρώτων υλών για την παραγωγή βιοντίζελ

Οι ιδιότητες του βιοντίζελ που παράγεται εξαρτώνται κυρίως, από τα προερχόμενα λιπαρά οξέα και την περιεκτικότητά τους. Τα βασικά φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την παραγωγή του βιοντίζελ και την ποιότητα του είναι:

- *Σύσταση λιπαρών οξέων.* Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες των ελαίων, των λιπών και των εστέρων που προέρχονται από αυτά, ποικίλουν ανάλογα με τη ποσότητα του κάθε λιπαρού οξέος που υπάρχει στη τροφοδοσία/πρώτη ύλη (feedstock).
- *Περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA).* Είναι το %wt του λιπαρού οξέος στο έλαιο το οποίο δεν είναι συνδεδεμένο στο μόριο του τριγλυκεριδίου. Ένας δείκτης για την περιεκτικότητα του δείγματος σε FFA είναι η οξύτητα % που ορίζεται ως η ποσότητα του υδροξειδίου του νατρίου που απαιτείται για την εξουδετέρωση του δείγματος [23]. Άλλος ένας δείκτης που χρησιμοποιείται συχνά είναι ο αριθμός οξύτητας. Ο αριθμός οξύτητας είναι η ποσότητα του υδροξειδίου του καλίου που απαιτείται για να εξουδετερωθεί το δείγμα [25]. Η θέρμανση του ελαίου μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό FFAs. Κατά τη μετεστεροποίηση τα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντιδρούν με τα αλκάλια και σχηματίζουν σάπωνες και νερό. Και οι δυο αυτές ουσίες είναι ανεπιθύμητες και πρέπει να απομακρύνονται κατά τη διεργασία εξευγενισμού

των εστέρων. Επιπλέον τα FFA έλκουν το νερό εξαιτίας του υδροσκοπικού τους χαρακτήρα.

- *Θερμική περιεκτικότητα.* Η ενεργειακή περιεκτικότητα του βιοντίζελ εξαρτάται από το ενεργειακό περιεχόμενο του ελαίου από το οποίο προήλθε. Όσο πιο ακόρεστο είναι ένα καύσιμο τόσο χαμηλότερη ενέργεια αποδίδει. Για αυτό και τα κορεσμένα καύσιμα έχουν μεγαλύτερη θερμική περιεκτικότητα.
- *Νερό.* Το νερό πρέπει να απομακρύνεται για την αντίδραση μετεστεροποίησης γιατί σε υψηλές θερμοκρασίες το νερό μπορεί να υδρολύσει το τριγλυκερίδιο σε διγλυκερίδιο και τελικά να σχηματιστεί ελεύθερο λιπαρό οξύ. Τα λιπαρά οξέα αντιδρούν με τους αλκαλικούς καταλύτες και σχηματίζουν σάπωνες. Ακόμα και η παρουσία 1% νερού μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την μετεστεροποίηση.
- *Αδιάλυτα συστατικά.* Οι αδιάλυτες ακαθαρσίες μπορεί να είναι άμμος, θρύμματα οστών ή σπόρων κ.α. Η τροφοδοσία θα πρέπει πάντα να διέρχεται από φίλτρα πριν την εισαγωγή της στην διεργασία.
- *Μη σαπωνοποιήσιμα συστατικά.* Πρόκειται για οργανικά συστατικά τα οποία δεν αντιδρούν με βάσεις προς σχηματισμό σαπώνων. Σ' αυτά περιλαμβάνονται οι στερόλες, οι αλκοόλες υψηλού μοριακού βάρους, κηροί (waxes), υδρογονάνθρακες. Τα συστατικά αυτά απομακρύνονται κατά τον εξευγενισμό του ελαίου.
- *Τίτλος (titre):* Η θερμοκρασία στην οποία μεταπίπτει το έλαιο από την στερεά στην υγρή κατάσταση ονομάζεται τίτλος [26]. Το σημείο πήξης/τήξης των τριγλυκεριδίων αναφέρεται ως τίτλος και αντιπροσωπεύει μια θερμοκρασιακή περιοχή. [23]. Η θερμοκρασία αυτή είναι σημαντική εφόσον η μετεστεροποίηση γίνεται στην υγρή φάση και τα έλαια με υψηλό τίτλο απαιτούν θέρμανση, πράγμα που αυξάνει τις ενεργειακές απαιτήσεις και το κόστος παραγωγής βιοντίζελ [26].

### **2.3.3 Επιπτώσεις της σύστασης των τριγλυκεριδίων στην παραγωγή βιοντίζελ**

Πολλοί επιστήμονες έχουν ασχοληθεί με την μελέτη των λιπαρών οξέων και τις επιπτώσεις που έχουν στο παραγόμενο βιοντίζελ στη ποιότητά του και τα χαρακτηριστικά του. Έτσι, είναι δυνατόν να γίνει μια πρόβλεψη των χαρακτηριστικών του βιοντίζελ εάν γνωρίζουμε τη σύσταση του ελαίου που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Στο σημείο αυτό θα παραθέσουμε τα αποτελέσματα μιας έρευνας που έγινε πάνω στα έλαια από ελαιοκράμβη, σόγια, ηλίανθο, παλμέλαιο, ελαιόλαδο, φυστικέλαιο, αμυγδαλέλαιο, αραβοσιτέλαιο, σπόρους σταφυλιών

(grape seeds) και έλαιο από ηλιάνθο υψηλής περιεκτικότητας σε ελαϊκό οξύ (high oleic sunflower oil, HOS) και τις ανάλογες παρατηρήσεις και συμπεράσματα που εξήχθησαν από αυτή τη μελέτη. Στον πίνακα 15 φαίνονται τα αποτελέσματα που αφορούν τον βαθμό ακορεστότητας των συγκεκριμένων ελαίων, τη σύσταση σε κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και λιπαρά οξέα μεγάλου μήκους κορεσμένης αλυσίδας.

Πίνακας 15: Χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων των υπο μελέτη φυτικών ελαίων [27]

Σύσταση (wt. %), βαθμός ακορεστότητας (DU) long chain saturated factor (LCSF)

|                       | Palm | Olive | Peanut | Rape  | Soybean | Sunflower | Grape | H.O. Sunflower | Almond | Corn  |
|-----------------------|------|-------|--------|-------|---------|-----------|-------|----------------|--------|-------|
| Saturated             | 44.7 | 15.7  | 15.6   | 6.5   | 15.3    | 11.1      | 11.3  | 9.3            | 13.9   | 8.0   |
| Monounsaturated       | 46.4 | 76.0  | 55.7   | 65.3  | 25.6    | 25.6      | 19.1  | 62.9           | 78.0   | 66.4  |
| Polyunsaturated (2,3) | 8.9  | 8.4   | 28.7   | 28.3  | 59.1    | 63.3      | 69.4  | 27.6           | 8.4    | 25.3  |
| DU                    | 64.2 | 92.7  | 113.1  | 121.9 | 143.8   | 152.2     | 157.8 | 118.2          | 94.8   | 117.0 |
| LCSF (A) <sup>a</sup> | 2.9  | 1.7   | 3.8    | 0.6   | 1.6     | 2.1       | 1.7   | 2.0            | 1.4    | 0.6   |
| LCSF (B) <sup>b</sup> | 7.7  | 4.2   | 10.7   | 1.3   | 3.4     | 4.2       | 3.0   | 4.1            | 3.3    | 1.5   |

<sup>a</sup> Long chain saturated factor calculated using the melting point.

<sup>b</sup> Long chain saturated factor calculated using the methyl ester composition.

Το βιοντίζελ που σχηματίστηκε από τα παραπάνω έλαια, μελετήθηκε σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές προδιαγραφές EN 41214. Τα αποτελέσματα των ιδιοτήτων των βιοντίζελ που σχηματίστηκαν από τα έλαια φαίνονται στον πίνακα 16 με βάση τις προδιαγραφές EN 41214

Πίνακας 16: Ιδιότητες του παραγομένου βιοντίζελ από τα υπό μελέτη έλαια (M.J. Ramos, *Bioresource technology*, σελ.264)

| Property                    | Units                   | Test method    | Limits |                  | Palm | Olive | Peanut | Rape | Soybean | Sunflower | Grape | H.O. Sunflower | Almond | Corn |
|-----------------------------|-------------------------|----------------|--------|------------------|------|-------|--------|------|---------|-----------|-------|----------------|--------|------|
|                             |                         |                | Min.   | Max.             |      |       |        |      |         |           |       |                |        |      |
| Ester content               | wt%                     | EN 14103       | 96.5   |                  | 97.7 | 99.0  | 99.5   | 99.5 | 96.9    | 97.2      | 97.8  | 99.5           | 99.7   | 99.8 |
| Kinematic viscosity, 40 °C  | mm <sup>2</sup> /s      | EN ISO 3104    | 3.5    | 5.0              | 4.5  | 4.5   | 4.6    | 4.4  | 4.2     | 4.2       | 4.1   | 4.4            | 4.2    | 4.4  |
| Flash point                 | °C                      | EN ISO 3679    | 120    |                  | 176  | 178   | 176    | 170  | 171     | 177       | 175   | 174            | 172    | 170  |
| Cetane number               | -                       | - <sup>a</sup> | 51     |                  | 61   | 57    | 53     | 55   | 49      | 50        | 48    | 53             | 57     | 53   |
| Oxidative stability, 110 °C | h                       | EN 14112       | 6.0    |                  | 4.0  | 3.3   | 2.0    | 2.0  | 1.3     | 0.8       | 0.5   | 1.2            | 3.0    | 1.2  |
| Acid value                  | mg KOH/g                | EN 14104       |        | 0.50             | 0.12 | 0.13  | 0.10   | 0.16 | 0.14    | 0.15      | 0.27  | 0.21           | 0.17   | 0.15 |
| Iodine value                | g I <sub>2</sub> /100 g | EN 14111       |        | 120 <sup>b</sup> | 57   | 84    | 97     | 109  | 128     | 132       | 138   | 102            | 92     | 101  |
| Linolenic acid content      | wt%                     | EN 14103       |        | 12.0             | 0.2  | 0.6   | 0.3    | 7.9  | 6.3     | 0.2       | 0.4   | 0.1            | 0.8    | 0.1  |
| CFPP                        | °C                      | EN 116         |        | - <sup>c</sup>   | 10   | -6    | 17     | -10  | -5      | -3        | -6    | -6             | -6     | -12  |
| Methanol content            | wt%                     | EN 14110       |        | 0.20             | 0    | 0     | 0      | 0    | 0       | 0         | 0     | 0              | 0      | 0    |
| Monoglycerides content      | wt%                     | EN 14105       |        | 0.80             | 0.17 | 0.67  | 0.32   | 0.41 | 0.21    | 0.37      | 0.28  | 0.31           | 0.27   | 0.40 |
| Diglycerides content        | wt%                     | EN 14105       |        | 0.20             | 0.06 | 0.09  | 0.07   | 0.08 | 0.10    | 0.07      | 0.08  | 0.05           | 0.08   | 0.06 |
| Triglycerides content       | wt%                     | EN 14105       |        | 0.20             | 0.04 | 0.03  | 0.03   | 0.03 | 0.07    | 0.04      | 0.03  | 0.06           | 0.02   | 0.03 |
| Free glycerol               | wt%                     | EN 14105       |        | 0.02             | 0.01 | 0.00  | 0.01   | 0.01 | 0.07    | 0.00      | 0.00  | 0.00           | 0.00   | 0.00 |
| Total glycerol              | wt%                     | EN 14105       |        | 0.25             | 0.06 | 0.19  | 0.11   | 0.09 | 0.00    | 0.11      | 0.09  | 0.13           | 0.07   | 0.09 |

<sup>a</sup> Internal procedure.

<sup>b</sup> RD 61/2006 (Spain) iodine value, 140 max. (g I<sub>2</sub>/100 g).

<sup>c</sup> RD 61/2006 (Spain) CFPP, 0 °C max. in summer time and -10 °C max in winter time.

Οι περισσότεροι παράμετροι ικανοποιούν τις ευρωπαϊκές προδιαγραφές. Ο βαθμός συμφωνίας αυτών των παραμέτρων (περιεκτικότητα σε μεθανόλη, εστέρα, κινηματικό ιξώδες,

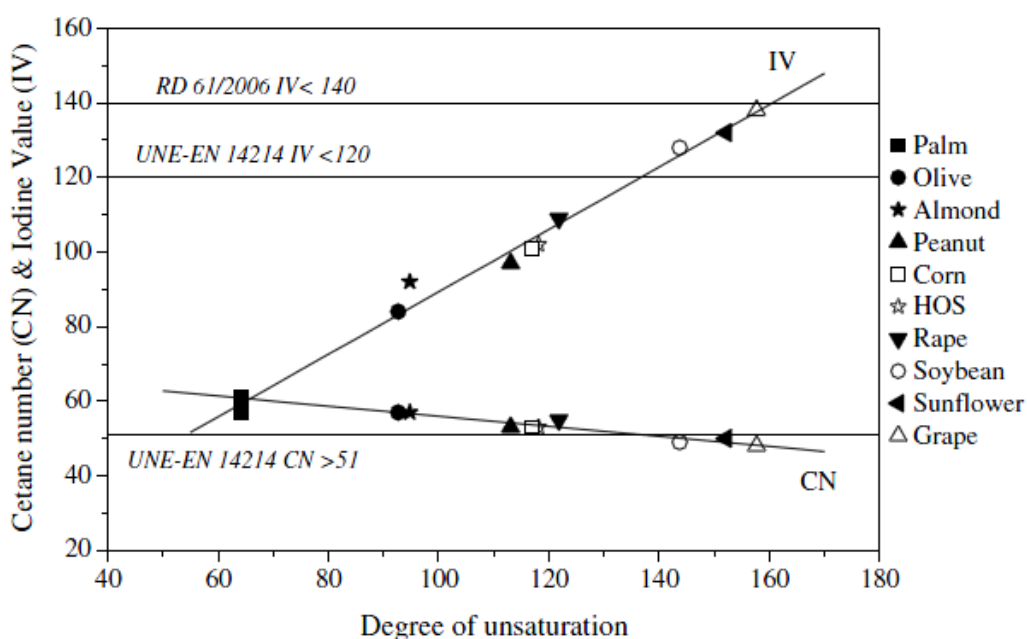
αριθμό οξύτητας, τριγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια, γλυκερόλη ελεύθερη και συνολική, σημείο ανάφλεξης) εξαρτάται από τον βαθμό εξευγενισμού του ελαίου (προεπεξεργασία), τη διεργασία μετεστεροποίησης και την ποιότητα των φάσεων στο στάδιο του εξευγενισμού. Κάποιοι παράμετροι όμως ήταν εκτός των προδιαγραφών. Αυτοί οι παράμετροι εξαρτώνται από τη φύση του ελαίου και είναι ο αριθμός κετανίου (CN), οξειδωτική σταθερότητα, ο αριθμός ιωδίου (IV) και το σημείο απόφραξης ψυχρού φίλτρου (CFPP) και τα οποία βρίσκονται στον πίνακα 16.

Ο αριθμός κετανίου χρησιμοποιείται συχνά ως ένδειξη της ποιότητας του ντίζελ προβλέφθηκε με χρήση της εξίσωσης:

$$CN = \sum X_{ME}(wt\%) \cdot CN_{ME}$$

$X_{ME}$ : Το ποσοστό του βάρους κάθε μεθυλεστέρα,  $CN_{ME}$ : Ο αριθμός κετανίου καθενός μεθυλεστέρα

Τα αποτελέσματα που προβλέφθηκαν βρίσκονται στον πίνακα 16. Είναι γνωστό ότι ο αριθμός κετανίου του βιοντίζελ εξαρτάται από το υλικό παραγωγής του, δηλαδή όσο πιο μακριά είναι η ανθρακική αλυσίδα του λιπαρού οξέος τόσο πιο και όσο πιο κορεσμένα είναι τα μόρια, τόσο υψηλότερος είναι ο αριθμός κετανίου. Στο σχήμα 11 φαίνεται ο συσχετισμός μεταξύ του αριθμού κετανίου και του βαθμού ακορεστότητας.



Σχήμα 11 : Αριθμός κετανίου και βαθμός ιωδίου για τα παραγόμενα βιοντίζελ συνάρτηση του βαθμού ακορεστότητας (M.J. Ramos, Bioresource technology, σελ.264)

Είναι σαφές ότι ο αριθμός κετανίου έχει γραμμική σχέση με τον βαθμό ακορεστότητας. Με βάση τις προδιαγραφές της UNE-EN 14214 το κατώτερο όριο είναι CN ίσο με 51. Οι

μεθυλεστέρες που δεν πληρούν τις προδιαγραφές είναι τα βιοντίζελ σόγιας, ηλίανθου, και grape seed. Συμπερασματικά, ο βαθμός ακορεστότητας πάνω από 137 έχει σαν αποτέλεσμα μη επιτρεπτό αριθμό κετανίου με βάση τις Ευρωπαϊκές προδιαγραφές. Οι χαμηλοί αριθμοί κετανίου συσχετίζονται με υψηλά ακόρεστα συστατικά όπως οι εστέρες του λινελαϊκού οξέος (C18:2) και του λινολενικού οξέος (C18:3). Τα βιοντίζελ που περιέχουν υψηλά ποσά των προαναφερθέντων λιπαρών οξέων είναι αυτά που προήλθαν από σόγια, ηλίανθο, και grape seed (Πίνακας 17).

Πίνακας 17: Σύσταση (wt%) των υπό μελέτη τριγλυκεριδίων (M.J. Ramos, *Bioresource technology*, σελ.263)

| Fatty acid  |       | Palm | Olive | Peanut | Rape | Soybean | Sunflower | Grape | H.O. Sunflower | Almond | Corn |
|-------------|-------|------|-------|--------|------|---------|-----------|-------|----------------|--------|------|
| Lauric      | C12:0 | 0.1  | 0.0   | 0.0    | 0.0  | 0.0     | 0.0       | 0.0   | 0.0            | 0.0    | 0.0  |
| Myristic    | C14:0 | 0.7  | 0.0   | 0.1    | 0.0  | 0.0     | 0.0       | 0.1   | 0.0            | 0.0    | 0.0  |
| Palmitic    | C16:0 | 36.7 | 11.6  | 8.0    | 4.9  | 11.3    | 6.2       | 6.9   | 4.6            | 10.4   | 6.5  |
| Palmitoleic | C16:1 | 0.1  | 1.0   | 0.0    | 0.0  | 0.1     | 0.1       | 0.1   | 0.1            | 0.5    | 0.6  |
| Stearic     | C18:0 | 6.6  | 3.1   | 1.8    | 1.6  | 3.6     | 3.7       | 4.0   | 3.4            | 2.9    | 1.4  |
| Oleic       | C18:1 | 46.1 | 75.0  | 53.3   | 33.0 | 24.9    | 25.2      | 19.0  | 62.8           | 77.1   | 65.6 |
| Linoleic    | C18:2 | 8.6  | 7.8   | 28.4   | 20.4 | 53.0    | 63.1      | 69.1  | 27.5           | 7.6    | 25.2 |
| Linolenic   | C18:3 | 0.3  | 0.6   | 0.3    | 7.9  | 6.1     | 0.2       | 0.3   | 0.1            | 0.8    | 0.1  |
| Arachidic   | C20:0 | 0.4  | 0.3   | 0.9    | 0.0  | 0.3     | 0.3       | 0.3   | 0.3            | 0.3    | 0.1  |
| Gadoleic    | C20:1 | 0.2  | 0.0   | 2.4    | 9.3  | 0.3     | 0.2       | 0.0   | 0.0            | 0.0    | 0.1  |
| Behenic     | C22:0 | 0.1  | 0.1   | 3.0    | 0.0  | 0.0     | 0.7       | 0.0   | 0.7            | 0.1    | 0.0  |
| Erucic      | C22:1 | 0.0  | 0.0   | 0.0    | 23.0 | 0.3     | 0.1       | 0.0   | 0.0            | 0.0    | 0.1  |
| Lignoceric  | C24:0 | 0.1  | 0.5   | 1.8    | 0.0  | 0.1     | 0.2       | 0.0   | 0.3            | 0.2    | 0.1  |
| Nervonic    | C24:1 | 0.0  | 0.0   | 0.0    | 0.0  | 0.0     | 0.0       | 0.0   | 0.0            | 0.4    | 0.0  |

Υψηλοί αριθμοί κετανίου έχουν παρατηρηθεί σε εστέρες κορεσμένων λιπαρών οξέων όπως το παλμιτικό οξύ (C16:0) και το στεατικό οξύ (C18:0). Το φοινικέλαιο είναι πλούσιο σε αυτά τα συστατικά με αποτέλεσμα να έχει ένα υψηλό αριθμό κετανίου. Τα βιοντίζελ από ελαιόλαδο, αμύγδαλο και ελαιοκράμβη παρουσίασαν έναν αριθμό κετανίου κοντά σ' αυτό του φοινικέλαιου. Αυτό συμβαίνει γιατί τα παραπάνω έλαια είναι πλούσια σε μονοακόρεστα συστατικά. Συγκεκριμένα για το βιοντίζελ από ελαιοκράμβη, ένας ακόμη λόγος που ο αριθμός κετανίου του είναι ιδιαίτερα αυξημένος, είναι η παρουσία μακριάς ανθρακικής αλυσίδας των λιπαρών οξέων του.

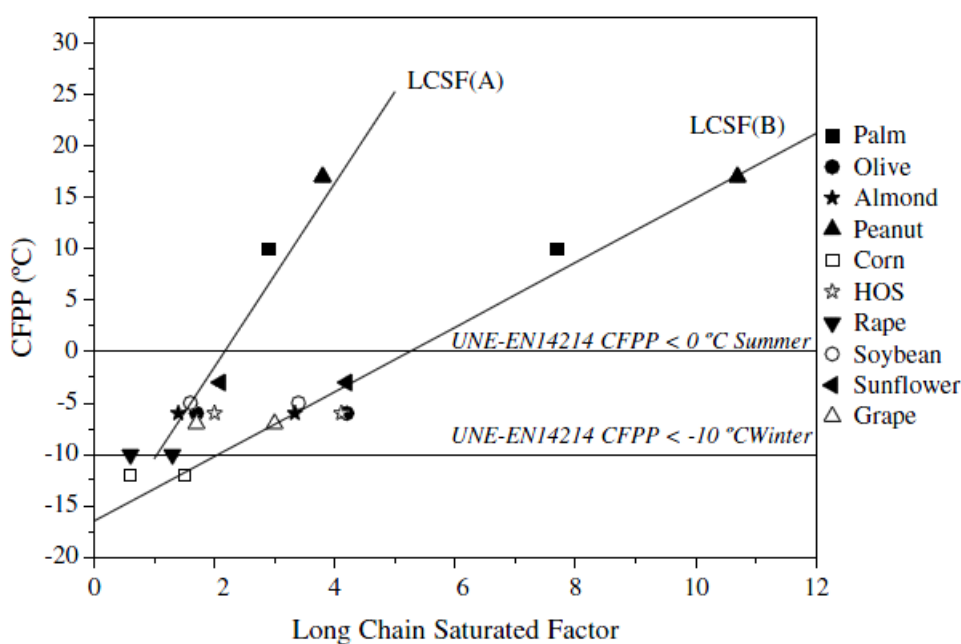
Ο αριθμός ιωδίου (iodine Value) εκφράζει τον αριθμό των gr I<sub>2</sub> που απορροφούνται από 100 gr λιπιδίου. Βασίζεται σε αντίδραση προσθήκης ιωδίου στους διπλούς δεσμούς του ακόρεστου λιπαρού και παρέχει το μέτρο του βαθμού ακορεστότητας του. Ο βαθμός ιωδίου ενός φυτικού ελαίου ή φυτικού λίπους είναι σχεδόν ίδιος με αυτόν του αντίστοιχου μεθυλεστέρα. Σύμφωνα με τα UNE-EN 14214 το όριο της τιμής είναι 120gr I<sub>2</sub> / 100gr. Το όριο αυτό αποκλείει πολλές υποσχόμενες πηγές ελαίων όπως σόγια, ηλίανθο και grape seed. Ο περιορισμός των ακόρεστων λιπαρών οξέων είναι απαραίτητος εξαιτίας του γεγονότος ότι, η θέρμανση των υψηλά ακόρεστων λιπαρών οξέων έχει ως αποτέλεσμα τον πολυμερισμό

των γλυκεριδίων. Αυτό με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό εναποθέσεων ή στην υποβάθμιση της λιπαντικής ικανότητας. Η σχέση μεταξύ του αριθμού ιωδίου με και του βαθμού ακορεστότητας (degree of unsaturation, DU) δίνεται στο σχήμα 11. Εφόσον ο αριθμός ιωδίου είναι ένα μέτρο της συνολικής ακορεστότητας ενός λιπαρού υλικού, είναι αναμενόμενο να υπάρχει γραμμική συσχέτιση συναρτήσεως του DU: όσο πιο ακόρεστο είναι το έλαιο, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός ιωδίου. Τα έλαια σόγιας, ηλίανθου και grape seed ξεπερνούν τις ευρωπαϊκές προδιαγραφές. Το φοινικέλαιο που είναι πλούσιο σε κορεσμένους εστέρες λιπαρών οξέων όπως παλμιτικό (C16:0) και στεατικό οξύ (C18:0) έχει το χαμηλότερο αριθμό ιωδίου.

Η οξειδωτική σταθερότητα είναι από τα βασικά θέματα που επηρεάζουν τη χρήση του βιοντίζελ και οφείλεται στη περιεκτικότητα σε πολυακόρεστους μεθυλεστέρες. Η ελάχιστη χρονική περίοδος Rancimat για δείγματα βιοντίζελ (η μέθοδος rancimat χρησιμοποιείται για να καθορίσει την σταθερότητα της οξειδωσης για το βιοντίζελ και τα μίγματα βιοντίζελ. Πραγματοποιούνται δοκιμές διαφόρων χρονικών περιόδων σύμφωνα με το EN 14112. Το όργανο μετρά την ικανότητα ενός δείγματος βιοντίζελ να αντιστέκεται στην οξειδωση υπό συνθήκες θέρμανσης και συνεχούς ροής αέρα [28].) είναι οι 6 ώρες σύμφωνα με τη UNE-EN 142114. Στο χρονικό διάστημα αυτό επικρατούν συνθήκες 110°C υπό σταθερή ροή αέρα. Το βιοντίζελ στο διάστημα αυτό δεν θα πρέπει να υποβαθμιστεί σε σημείο ώστε ο σχηματισμός των πτητικών οξειδίων να καταγράφει αύξηση στην αγωγιμότητα. Το όριο αυτό είναι πού δύσκολο να επιτευχθεί στο βιοντίζελ για αυτό συνίσταται η χρήση αντιοξειδωτικών. Κανένα βιοντίζελ δεν εκπλήρωσε αυτές τις έξι ώρες σταθερότητας με αποτέλεσμα η χρήση αναστολέων οξειδωσης (αντιοξειδωτικά) να είναι απαραίτητη. Η σταθερότητα των λιπαρών συστατικών επηρεάζεται από παράγοντες όπως η παρουσία αέρα, θερμότητας, ίχνη μετάλλων, υπεροξειδία, φως και χαρακτηριστικά της δομής των ιδίων των συστατικών και κυρίως η παρουσία διπλών δεσμών. Η οξειδωτική σταθερότητα μειώνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας σε πολυακόρεστους μεθυλεστέρες.

Σε χαμηλές θερμοκρασίες, στα καύσιμα σχηματίζονται κρύσταλλοι παραφίνης με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται προβλήματα λειτουργίας στις μηχανές. Η βασική παράμετρος μέτρησης αυτού του φαινομένου είναι το σημείο απόφραξης ψυχρού φίλτρου (CFPP). Το CFPP των βιοντίζελ φαίνεται στον πίνακα 16 και παρατηρείται πως υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Το βιοντίζελ από φοινικέλαιο έχει σχετικά μειωμένες ιδιότητες σε χαμηλές θερμοκρασίες (CFPP=10°C). Οι εστέρες του στεατικού (18:0) και παλμιτικού οξέος (16:1) είναι οι πρώτοι οι οποίοι θα κρυσταλλώσουν και θα συσσωματωθούν. Το βιοντίζελ από φοινικέλαιο είναι πλούσιο σε αυτά τα συστατικά (Πίνακας 17) και για αυτό παρουσιάζει ένα

από τα πιο υψηλά CFPP. Το βιοντίζελ από φυσικέλαιο έδωσε το πιο υψηλό CFPP =17°C. Το βιοντίζελ από φυσικέλαιο είναι πλούσιο σε μεθυλεστέρες μεγάλου μήκους κορεσμένης ανθρακικής αλυσίδας των λιπαρών οξέων παραδείγματος χάριν, το βεχενικό οξύ (C22:0) και το λιχνοκηρικό οξύ (C22:0). Όσο πιο μεγάλες οι ανθρακικές αλυσίδες στο βιοντίζελ τόσο χειρότερες είναι οι ιδιότητες σε χαμηλές θερμοκρασίες. Οι ιδιότητες σε χαμηλές θερμοκρασίες εξαρτώνται κυρίως από την περιεκτικότητα σε κορεσμένους εστέρες, ενώ η επίδραση των ακόρεστων εστέρων μπορεί να παραβλεφθεί. Υπό αυτό το σκεπτικό το CFPP του βιοντίζελ συσχετίζεται με παράμετρο το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας. (Long chain saturated factor LCSF(A)) η οποία είναι υπολογισμένη με βάση το σημείο τήξης των εστέρων των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Οι ακόρεστοι εστέρες δεν συμπεριλαμβάνονται σε αυτή τη παράμετρο γιατί έχουν αρκετά χαμηλότερο σημείο τήξης από τους κορεσμένους. Ο συσχετισμός του CFPP και του LCSF(A) παρουσιάζονται στο σχήμα 12. Οι τιμές του CFPP αυξάνονται με την αύξηση του LCSF(A). Για βελτίωση της πρόβλεψης του CFPP έγινε συσχετισμός με το LCFS(B) για το οποίο χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι κορεσμένοι μεθυλεστέρες.

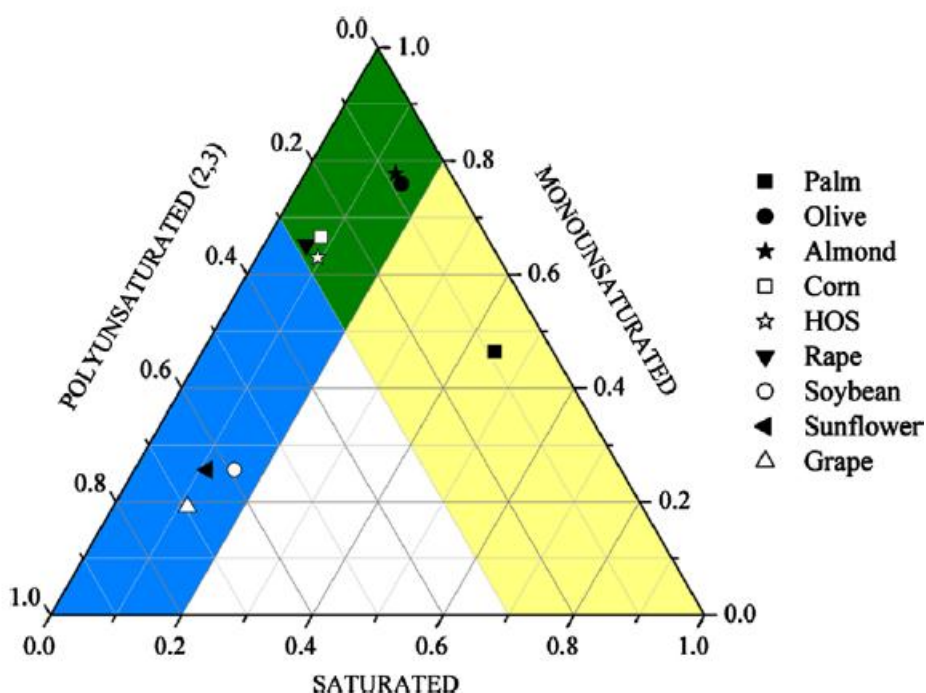


Σχήμα 12: Σημείο απόφραξης ψυχρού φίλτρου βιοντίζελ συνάρτηση LCSF (A) LCSF(B) (M.J. Ramos, Bioresource technology, σελ.266)

Τα βιοντίζελ που παράχθηκαν χρησιμοποιώντας τα έλαια που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στο παρακάτω τριγωνικό γράφημα (Σχήμα 13). Οι τρεις γωνίες αντιπροσωπεύουν την 100% σύσταση σε μονοακόρεστους, πολυακόρεστους και κορεσμένους μεθυλεστέρες αντίστοιχα. Η περιοχή του γραφήματος που ικανοποιεί τα όρια του αριθμού κετανίου και του αριθμού



ιωδίου βρίσκεται στη κίτρινη περιοχή. Η περιοχή αυτή είναι φτωχή σε πολυακόρεστους μεθυλεστέρες και πλούσια σε κορεσμένους. Τα βιοντίζελ που ανταποκρίθηκαν στη περιοχή αυτή είναι αυτά που προέρχονται από φοινικέλαιο, ελαιόλαδο, ελαιοκράμβη, ηλιέλαιο υψηλής περιεκτικότητας ελαϊκού οξέος, αμυγδαλέλαιο και αραβοσιτέλαιο. Τα βιοντίζελ αυτά έχουν έναν μονοακόρεστο μεθυλεστέρα σε σύσταση πάνω από 50wt%. Τα υπόλοιπα ήταν αυξημένα σε πολυακόρεστα και μειωμένα σε κορεσμένα λιπαρά και για αυτό το λόγο δεν κάλυπταν τις προδιαγραφές. Η περιοχή που ικανοποιεί τα όρια του CFPP είναι η μπλε περιοχή. Εδώ, η περιεκτικότητα σε κορεσμένους μεθυλεστέρες είναι χαμηλή. Όλα τα βιοντίζελ εκτός του προερχόμενου από φοινικέλαιο βρίσκονται στη περιοχή αυτή (δεν λαμβάνουμε υπόψη το προερχόμενο από φυσικέλαιο), και η περιεκτικότητα σε μονοακόρεστους μεθυλεστέρες βρίσκεται μεταξύ 20-80wt%. Εάν συνενώσουμε αυτές τις δύο περιοχές βρίσκουμε τη βέλτιστη περιεκτικότητα όπου τα βιοντίζελ ικανοποιούν τα όρια με βάση UNE-EN 14214 για τον αριθμό κετανίου, αριθμό ιωδίου, σημείο απόφραξης ψυχρού φίλτρου. (πράσινη περιοχή). Η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση μονοακόρεστων λιπαρών οξέων. Έτσι τα βιοντίζελ από αμυγδαλέλαιο, ελαιόλαδο, αραβοσιτέλαιο, ελαιοκράμβη, ηλιέλαιο υψηλής περιεκτικότητας σε ελαϊκό οξύ είναι πλούσια σε μονοακόρεστα συστατικά και βρίσκονται στη περιοχή αυτή.



Εικόνα 13: Βιοντίζελ μονοακόρεστων, πολυακόρεστων και κορεσμένων μεθυλεστέρων. Κίτρινη περιοχή: ικανοποιούνται οι Ευρωπαϊκές προδιαγραφές για τον αριθμό κετανίου και ιωδίου, μπλε περιοχή: ικανοποιούνται οι Ευρωπαϊκές προδιαγραφές για CFPP, πράσινη: ικανοποιούνται και οι τρεις προδιαγραφές (M.J. Ramos, *Bioresource technology*, σελ.266)



## 2.4 Παραγωγή βιοντίζελ

Πολλοί ερευνητές θεωρούν τα φυτικά λάδια μια υποσχόμενη εναλλακτική για τα καύσιμα που προορίζονται για ντίζελ μηχανές. Κατά τη διάρκεια του Δευτέρου Παγκοσμίου πολέμου, έγιναν δοκιμές χρήσης απευθείας φυτικών ελαίων ως καύσιμο στις ντιζελομηχανές και τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά. Ωστόσο, η απευθείας χρήση ελαίων προκαλεί πολλά προβλήματα όπως, μείωση της απόδοσης της μηχανής μετά από μακρόχρονη χρήση, βλάβες στα εξαρτήματα της μηχανής λόγω εναποθέσεων άνθρακα, παραφίνης και άλλων ουσιών και διάφορα ακόμα προβλήματα [16]. Τα βασικά θέματα που προκύπτουν από την αντικατάσταση του ορυκτού ντίζελ με τριγλυκερίδα σχετίζονται κυρίως με (α) υψηλό ιξώδες (β) χαμηλή αντίσταση στην οξείδωση (και τις επακόλουθες αντιδράσεις του πολυμερισμού) (γ) χαμηλή πτητικότητα η οποία οδηγεί στον σχηματισμό ενός αρκετά μεγάλου ποσού τέφρας εξαιτίας της ατελούς καύσης. [17]. Κάποιες μέθοδοι με τις οποίες αντιμετωπίζονται τα παραπάνω προβλήματα είναι:

- *Διάλυση των φυτικών ελαίων.* Με την ανάμιξη φυτικών ελαίων με διαλύτες μειώνεται το ιξώδες, καθώς και αμβλύνονται κάποια προβλήματα όσον αφορά την απόδοση και το χρόνο ζωής της μηχανής. Το ιξώδες του λαδιού μπορεί να μειωθεί αν αναμιχθεί για παράδειγμα με αιθανόλη. Μίγματα καυσίμων (10-50%) με έλαια όπως σογιέλαιο, μπορεί να μειώσει την εναπόθεση άνθρακα στο θάλαμο καύσης. Παρόλο που το ιξώδες μειώνεται, θα εξακολουθούν να υπάρχουν προβλήματα στη μακρόχρονη χρήση μηχανής [16,13,17].
- *Μικρογαλακτώματα.* Μικρογαλάκτωμα είναι μια ισότροπη και θερμοδυναμικά σταθερή διασπορά ελαίου, νερού, επιφανειοενεργού (surfactant) και συχνά ενός αμφίφιλου μορίου που ονομάζεται συνεπιφανειοενεργό (cosurfactant). Η διάμετρος των μικρογαλακτωμάτων κυμαίνεται από 100-1000 Å. Μικρογαλάκτωμα μπορεί να σχηματιστεί με την ανάμιξη φυτικού ελαίου, εστέρα σε μέσο διασποράς (συνδιαλύτης) ή φυτικού ελαίου αλκοόλης, και επιφανειοενεργού. Με αυτό τον τρόπο μειώνεται το ιξώδες και βελτιώνεται ο ψεκασμός του καυσίμου [17,13].
- *Θερμική διάσπαση (Pyrolysis, thermal cracking).* Πυρόλυση είναι μια μέθοδος μετατροπής μιας οργανικής ουσίας σε μια άλλη μέσω της θερμότητας ή θερμότητας παρουσία καταλύτη. Το υλικό που πυρολύεται μπορεί να είναι φυτικό έλαιο, ζωικό λίπος, φυσικά λιπαρά οξέα ή μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων. Η πυρόλυση των ελαίων ερευνάται τουλάχιστον 100 χρόνια, ειδικά σε περιοχές όπου υπήρχε έλλειψη

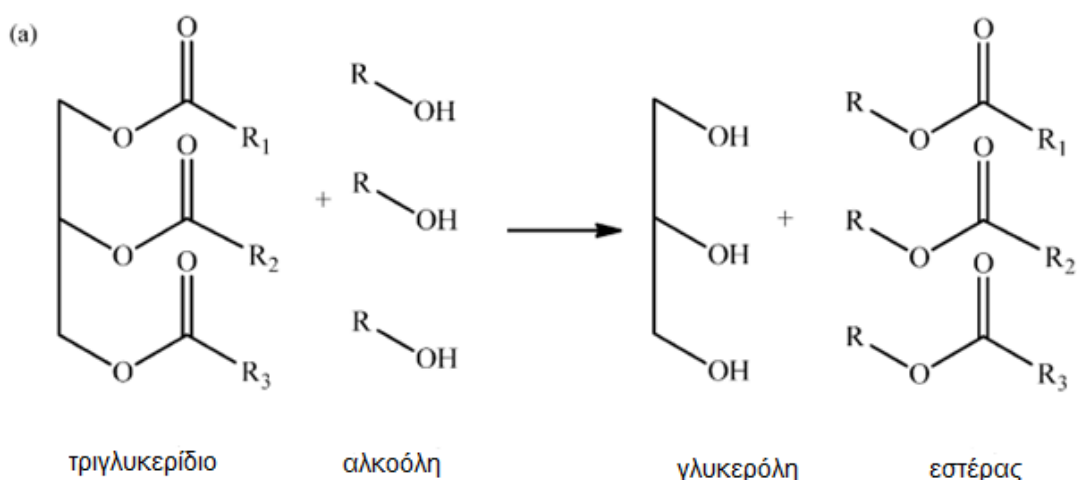
πετρελαίου. Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την πυρόλυση των τριγλυκεριδίων για τη απόκτηση προϊόντων κατάλληλων για μηχανές ντίζελ. Με τη θερμική διάσπαση των τριγλυκεριδίων παράγονται αλκάνια, αλκένια, αλκαδιένια, αρωματικά και καρβοξυλικά οξέα [17].

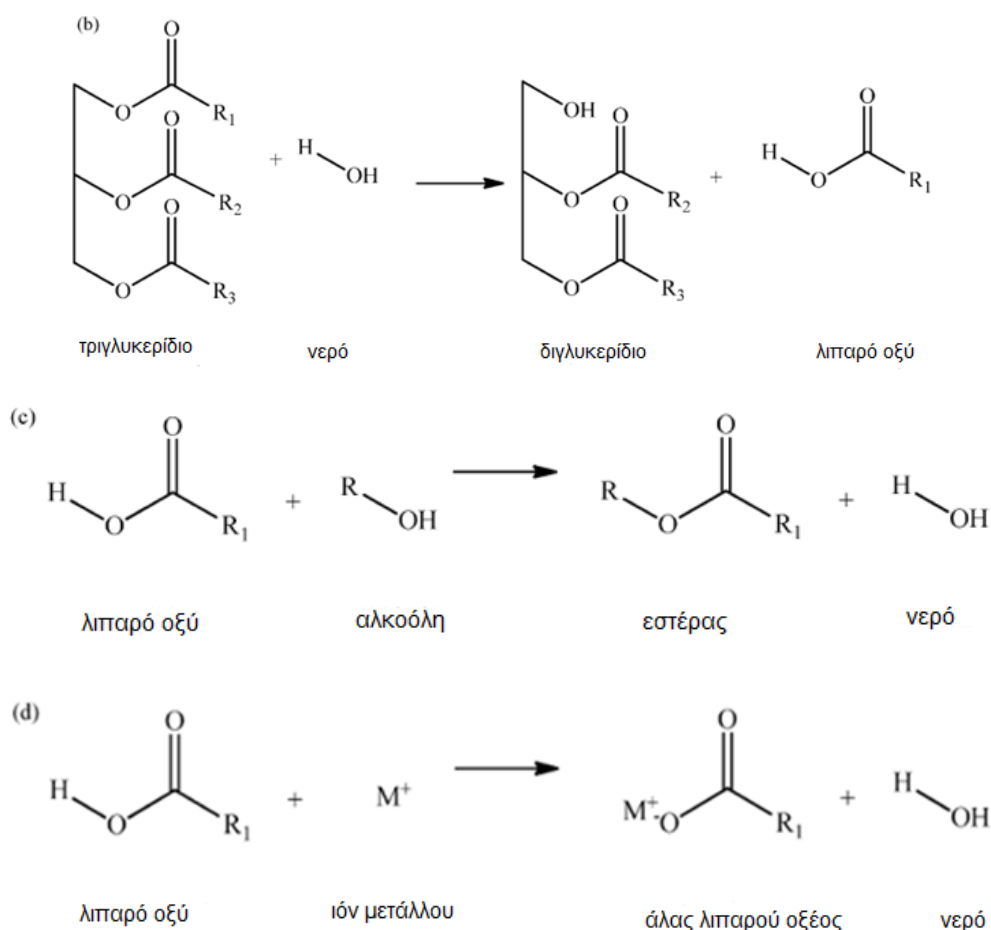
- *Μετεστεροποίηση*

Η μετεστεροποίηση (ονομάζεται και αλκοόλυση) είναι μια χημική αντίδραση μεταξύ τριγλυκεριδίων και αλκοόλης προς το σχηματισμό εστέρων και γλυκερόλης. Συνήθως χρησιμοποιούνται καταλύτες για να βελτιώσουν την απόδοση και το ρυθμό της αντίδρασης [16]. Συνίσταται από τρεις διαδοχικές αντιστρεπτές αντιδράσεις όπου τα τριγλυκερίδια μετατρέπονται σε διγλυκερίδια, τα διγλυκερίδια σε μονογλυκερίδια και τέλος τα μονογλυκερίδια σε γλυκερόλη. Σε κάθε βήμα παράγεται ένας εστέρας, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τελικά να παράγονται τρία μόρια εστέρων συνολικά από ένα μόριο τριγλυκεριδίου [13].

## 2.5 Παραγωγή βιοντίζελ με μετεστεροποίηση

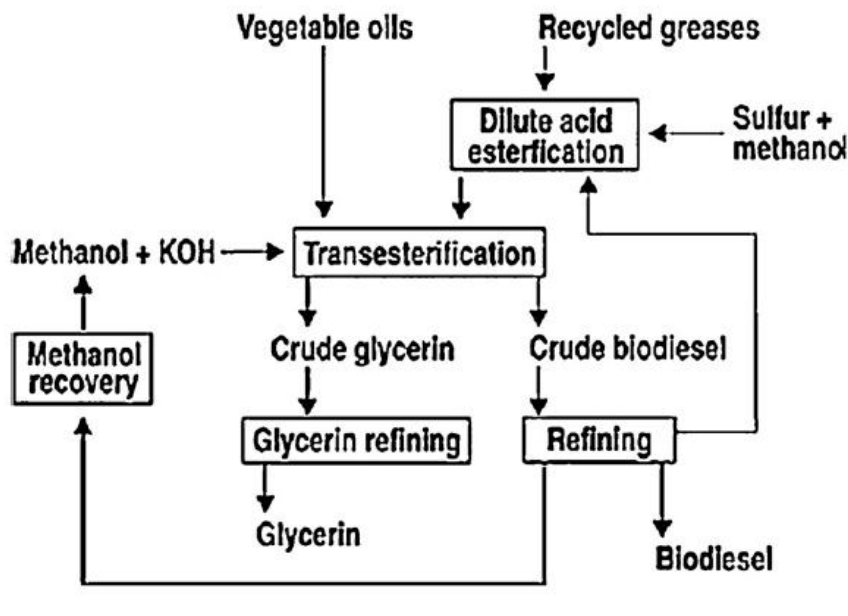
Οι τυπικές αντιδράσεις που λαμβάνουν μέρος κατά τη παραγωγή βιοντίζελ παρουσιάζονται στο παρακάτω Σχήμα 14. Η μετεστεροποίηση είναι το βασικό κομμάτι για την παραγωγή βιοντίζελ (σχήμα 14a). Παρουσία νερού το τριγλυκερίδιο υπό κατάλληλες συνθήκες μπορεί να υδρολυθεί και να σχηματιστεί διγλυκερίδιο και λιπαρό οξύ (σχήμα 14 b). Τα λιπαρά οξέα συμπεριλαμβανομένου και των ελεύθερων λιπαρών οξέων που βρίσκονται στη τροφοδοσία μπορούν να μετατραπούν σε βιοντίζελ μέσω εστεροποίησης (σχήμα 14 c) ή σε ανεπιθύμητα προϊόντα (σάπωνες, άλατα) όπως φαίνεται στην σχήμα 14 d. [29]





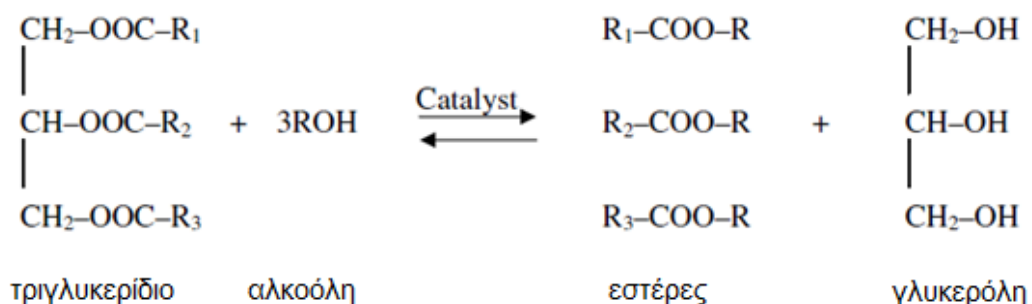
Σχήμα 14: Αντιδράσεις κατά την παραγωγή βιοντίζελ (α) μετεστεροποίηση, (β) υδρόλυση (c) εστεροποίηση (d) σαπωνοποίηση

Από τις προηγούμενες μεθόδους που προαναφέρθηκαν (διάλυση, πυρόλυση, μικρογαλακτώματα) η μετεστεροποίηση είναι η πιο αποδοτική μέθοδος μέχρι στιγμής. Τα χαρακτηριστικά των μεθυλεστέρων (βιοντίζελ) που παράγονται έχουν έντονες ομοιότητες με το ορυκτό ντίζελ, η μέθοδος είναι σχετικά απλή και τέλος, μέσω της μετεστεροποίησης παράγεται γλυκερόλη που είναι προϊόν υψηλής εμπορικής αξίας. Να αναφέρουμε επίσης, ότι η μετεστεροποίηση δεν είναι πρόσφατη ανακάλυψη αλλά ξεκινά από το 1846 όταν ο Rochieder παρασκεύασε γλυκερόλη μέσω αιθανόλυσης καστορελαίου. Από τότε επιστήμονες από όλο τον κόσμο έχουν μελετήσει τη σημαντικότητα της αλκοόλυσης, τις συνθήκες και άλλες παραμέτρους για την βελτιστοποίησή της [13]. Ένα διάγραμμα ροής της διεργασίας της μετεστεροποίησης βρίσκεται στο σχήμα 15.



Σχήμα 15 : Τεχνολογία μετεστεροποίησης (E.M. Shahid, Renewable and sustainable energy reviews, σελ.4733)

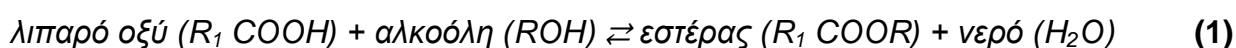
Στο σχήμα 16 φαίνεται η αντίδραση της μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων με μια αλκοόλη. Η αντίδραση είναι αντιστρεπτή και για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται περίσσεια αλκοόλης ώστε να μετατοπιστεί η αντίδραση προς το σχηματισμό προϊόντος. Οι καταλύτες που χρησιμοποιούνται είναι είτε αλκαλικοί είτε όξινοι. Η επιλογή όξινου ή αλκαλικού καταλύτη εξαρτάται από το ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) που υπάρχουν στο έλαιο. Τα FFA δεν πρέπει να ξεπερνούν κάποια όρια όταν η μετεστεροποίηση γίνεται με αλκαλικό καταλύτη. Ένας ακόμη καταλύτης που χρησιμοποιείται και έχει κερδίσει το ενδιαφέρον των επιστημών τελευταία, είναι η λιπάση. Η λιπάση πλεονεκτεί σε πολλά σημεία έναντι των χημικών καταλυτών αλλά περιορίζεται πολύ λόγω του υψηλού της κόστους [13].



Σχήμα 16 : Μετεστεροποίηση τριγλυκεριδίου με αλκοόλη [13]

Η μετεστεροποίηση πραγματοποιείται με ή χωρίς καταλύτη με τη χρήση πρωτοταγούς ή δευτεροταγούς αλειφατικής αλκοόλης, με ένα υδροξύλιο έχοντας 1-8 άτομα άνθρακα.

Ανάμεσα στις αλκοόλες που χρησιμοποιούνται οι πιο διαδεδομένες είναι η μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη, βουτανόλη και η amyl-αλκοόλη (C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>OH). Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι η αιθανόλη και η μεθανόλη. Η αιθανόλη προτιμάται λόγω του ανανεώσιμου χαρακτήρα της (παράγεται από αγροτικά υπολείμματα) ωστόσο όμως, η μεθανόλη είναι αυτή που χρησιμοποιείται περισσότερο λόγω χαμηλού κόστους και των φυσικών και χημικών προτερημάτων (πολικότητα, μικρού μήκους αλκοόλη). Όπως προαναφέρθηκε, η μετεστεροποίηση αποτελείται από ένα αριθμό διαδοχικών αντιστρεπτών αντιδράσεων. Τα τριγλυκερίδια μετατρέπονται σε διγλυκερίδια, μονο- γλυκερίδια και τελικά σε γλυκερόλη, σύμφωνα με τις αντιδράσεις (2)-(4). Οι αντιδράσεις (1)-(4) παρουσιάζουν τις διαδοχικές αντιδράσεις κατά τη διαδικασία της μετεστεροποίησης.



Κατά τις αντιδράσεις αυτές 1 mole αλκυλεστέρα απομακρύνεται σε κάθε βήμα. Ο μηχανισμός της αντίδρασης για αλκαλικά καταλυόμενη μετεστεροποίηση πραγματοποιείται σε τρία στάδια. Ο μηχανισμός των αλκυλεστέρων από μονογλυκερίδια είναι και το στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αντίδρασης εφόσον το μονογλυκερίδιο είναι το πιο σταθερό ενδιάμεσο [13].

### 2.5.1 Μέθοδοι καταλυτικής μετεστεροποίησης

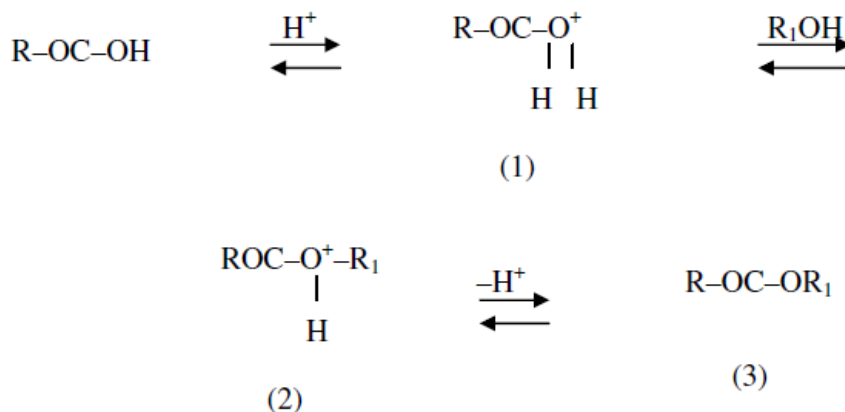
Τα έλαια και λίπη μπορούν να μετεστεροποιηθούν με θέρμανση, περίσσεια άνυδρης μεθανόλης και έναν καταλύτη. Η μετεστεροποίηση καταλύεται από αλκάλια, οξέα ή ένζυμα. Οι καταλύτες μπορεί να είναι ομογενείς όπως υδροξείδιο του νατρίου, καλίου η ετερογενείς όπως οι λιπάσες, CaO, και MgO [13].

#### ▪ Οξίνα καταλυόμενη μετεστεροποίηση

Οι βασικοί όξινοι καταλύτες για τη μετεστεροποίηση είναι θειικό οξύ (methanolic sulphuric acid H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), θειικός σίδηρος III (ferric sulphate Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> H<sub>2</sub>O), σουλφονικά οξέα (RS(=O)<sub>2</sub>-OH), υδροχλώριο και τριφθοριούχο βόριο (BF<sub>3</sub>). Το θειικό οξύ και το υδροχλωρικό οξύ είναι προτιμότεροι καταλύτες. Ο καταλύτης διαλύεται μέσα σε μεθανόλη με έντονη ανάδευση σε έναν μικρό αντιδραστήρα. Το έλαιο μεταφέρεται στον αντίδραστήρα του βιοντίζελ και τότε το μίγμα καταλύτη-αλκοόλης αντλείται προς στο έλαιο.

Για τη μετεστεροποίηση προτιμούνται τα θειικά και σουλφονικά οξέα. Αυτοί οι καταλύτες δίνουν μια πολύ ικανοποιητική απόδοση στους αλκυλεστέρες αλλά οι ρυθμοί τους είναι γενικά

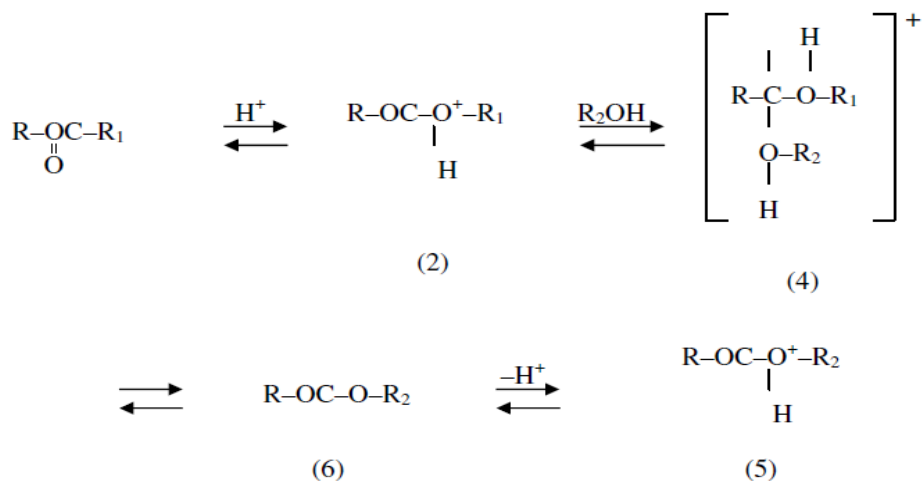
αργοί. Ένας από τους βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό είναι η αναλογία αλκοόλης/ελαίου. Η περίσσεια αλκοόλης ευνοεί το σχηματισμό αλκυλεστέρων. Από την άλλη μεριά όμως, τα μεγάλα ποσά αλκοόλης δυσχεραίνουν την ανάκτηση της γλυκερόλης, με αποτέλεσμα η ιδανική αναλογία ελαίου/αλκοόλης να καθιερώνεται εμπειρικά ανάλογα με τη ξεχωριστή κάθε φορά διεργασία. Στο σχήμα 17 φαίνεται ο μηχανισμός της όξινα καταλυόμενης εστεροποίησης του λιπαρού οξέος.



Σχήμα 17 : Μηχανισμός της όξινα καταλυόμενης εστεροποίησης των λιπαρών οξέων (A.Demirbas, *Energy conversion and management*, σελ.21)

Το αρχικό βήμα είναι η πρωτονίωση του οξέος προς το σχηματισμό ενός ιόντος οξωνίου (1) το οποίο υφίσταται σε μία αντίδραση αντικατάστασης με την αλκοόλη και σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο (2) και αυτό με τη σειρά του χάνει ένα πρωτόνιο και γίνεται εστέρας (3). Κάθε βήμα κατά αυτό το μηχανισμό είναι αντιστρεπτό, αλλά παρουσία περίσσειας αλκοόλης η ισορροπία της αντίδρασης μετατοπίζεται προς το σχηματισμό του εστέρα.

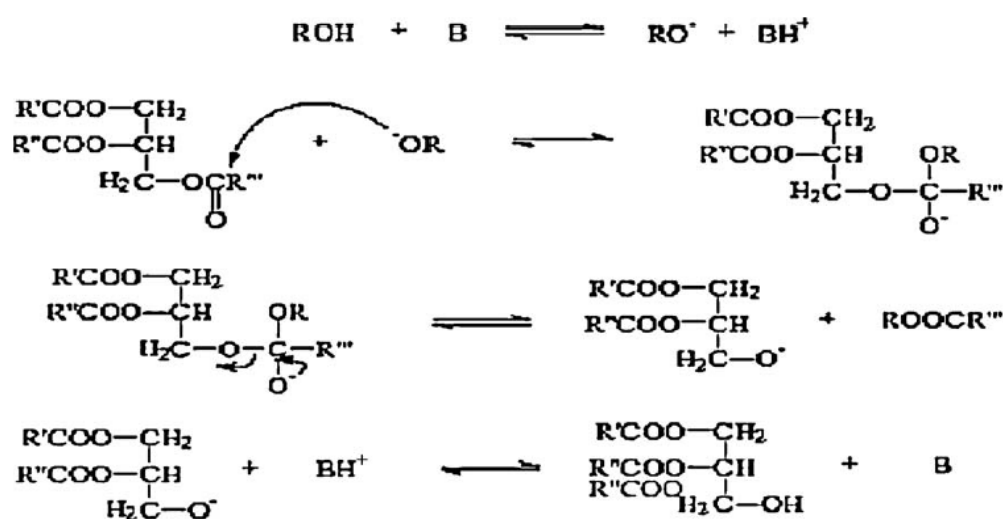
Στο σχήμα 18 φαίνεται ο μηχανισμός της όξινης μετεστεροποίησης των ελαίων. Στη περίπτωση αυτή, η αρχική πρωτονίωση του εστέρα ακολουθείται με μια επιπλέον αντικατάσταση της αλκοόλης προς το σχηματισμό του ενδιάμεσου (4) το οποίο διαχωρίζεται μέσω του μεταβατικού σταδίου (5) και σχηματίζεται ο εστέρας (6) [13].



Σχήμα 18: Μηχανισμός της όξινα καταλυόμενης μετεστεροποίησης ελαίων (A.Demirbas, *Energy conversion and management*, σελ.22)

- Αλκαλικά καταλυόμενη μεταστεροποίηση

Ο μηχανισμός της μετεστεροποίησης με αλκαλικούς καταλύτες πραγματοποιείται σε τρία στάδια όπως φαίνεται και στο σχήμα 19.



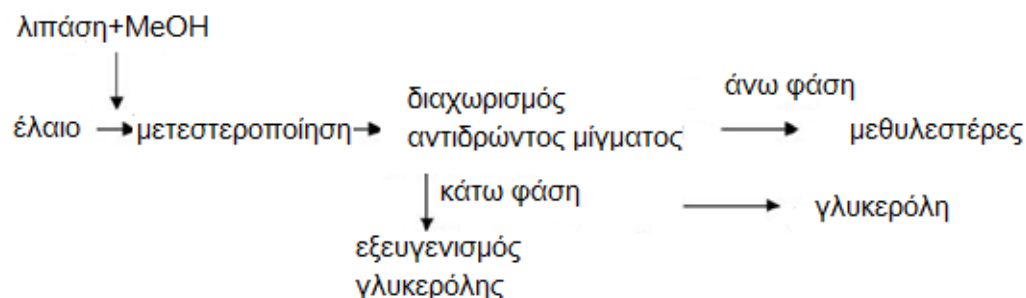
Σχήμα 19 : Μηχανισμός αλκαλικά καταλυόμενης μετεστεροποίησης ελαίου (S.N. Naik, *Renewable and sustainable Energy reviews*, σελ.207)

Το πρώτο βήμα είναι η αντίδραση της βάσης με την αλκοόλη παράγοντας ένα αλκοξείδιο και ένα πρωτονιομένο καταλύτη. Έτσι ξεκινά μια «επίθεση» που γίνεται στον καρβονυλικό άνθρακα του τριγλυκεριδίου από το ανιόν της αλκοόλης (αλκοξείδιο, RO<sup>-</sup>) προς το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου προϊόντος. Από αυτό το ενδιάμεσο σχηματίζονται ο αλκυλεστέρας και το αντίστοιχο ανιόν διγλυκεριδίου. Τα διγλυκερίδια και μονογλυκερίδια τροποποιούνται με τον ίδιο μηχανισμό σε μίγμα αλκυλεστέρων και γλυκερόλης. Όταν NaOH,

KOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ή άλλοι παρόμοιοι καταλύτες αναμιγνύονται με αλκοόλη σχηματίζεται, ο πραγματικός καταλύτης, το αλκοξείδιο. Σε αυτού του τύπου μετεστεροποίηση πρέπει να επικρατούν άνυδρες συνθήκες. Η παρουσία νερού οδηγεί σε σαπωνοποίηση και σε σχηματισμό αφρισμού [13,16]. Επίσης, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα πρέπει να βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα στη τροφοδοσία αυτής της διεργασίας. Εάν η συγκέντρωση των FFA είναι πάνω από 0,5% στο έλαιο, τότε απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο επεξεργασίας της τροφοδοσίας με όξινο καταλύτη για την εστεροποίηση των FFA [30]. Σε περίπτωση που η τροφοδοσία έχει υψηλή περιεκτικότητα σε FFA προτιμούνται οι όξινοι καταλύτες. Οι βασικοί καταλύτες προτιμούνται από τους όξινους εξαιτίας της δυνατότητας να ολοκληρώσουν την αντίδραση σε πολύ μικρότερο χρόνο, με χαμηλότερη θερμοκρασία, και με μεγαλύτερη απόδοση μετατροπής συγκρινόμενους με τους όξινους καταλύτες [25].

- *Ενζυμικά καταλυόμενη μετεστεροποίηση με λιπάσες*

Αυτός ο τρόπος μετεστεροποίησης έχει πολλές ομοιότητες με την αντίδραση με αλκαλικούς καταλύτες. Οι διαφορές κυρίως είναι στη αναλογία καταλύτη - διαλύματος, στο χρόνο ανάδευσης και στη χρήση λιπασών ως καταλύτη. Η διεργασία εξηγείται στο σχήμα 20



Σχήμα 20 : Διάγραμμα ροής για την παραγωγή βιοντίζελ με χρήση λιπασών [16]

Οι λιπάσες υδρολύουν τα λιπίδια σε λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Επίσης, μπορούν να καταλύσουν ενδοεστεροποίηση ελαίων και λιπών [72]. Χρησιμοποιούνται για την κατάλυση υδρόλυσης, αλκοόλησης, εστεροποίησης και μετεστεροποίησης καρβοξυλικών οξέων. Οι λιπάσες έχουν εξαιρετική καταλυτική δραστικότητα και σταθερότητα στα μη υδατικά διαλύματα, πράγμα που διευκολύνει τη διαδικασία εστεροποίησης και μετεστεροποίησης του βιοντίζελ [73]. Είναι γνωστό ότι οι λιπάσες έχουν την τάση να δρουν πάνω σε μακριές αλυσίδες λιπαρών οξέων παρά σε μικρές αλυσίδες. Σε γενικές γραμμές, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η απόδοση της μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων με μεθανόλη (μεθανόλυση) να είναι χαμηλότερη από ότι αν χρησιμοποιούνταν αιθανόλη σε συστήματα είτε με είτε χωρίς διαλύτη. Διάφορα είδη αλκοολών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την



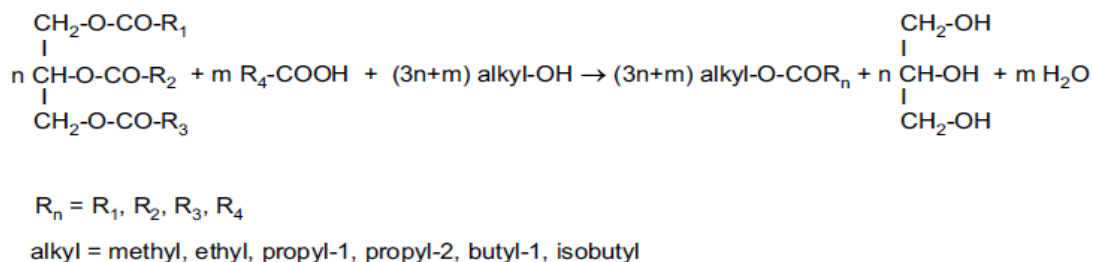
μετεστεροποίηση με λιπάσες. Μπορεί να είναι ευθείας αλύσου ή διακλαδωμένης, πρωτοταγής ή δευτεροταγής. Υπάρχουν πολλές μελέτες πάνω στην μετεστεροποίηση με λιπάσες με χρήση διαφόρων λιπασών, αλκοολών, αναλογιών και ελαίων. Κάποια από αποτελέσματα ερευνών υποστηρίζουν πως η λιπάση από *M. Miehei* ήταν η πιο αποτελεσματική όσον αφορά την μετατροπή των τριγλυκεριδίων στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες χρησιμοποιώντας πρωτοταγείς αλκοόλες. Η *C.antartica* ήταν η πιο αποτελεσματική στη μετεστεροποίηση τριγλυκεριδίων με δευτεροταγείς αλκοόλες προς το σχηματισμό διακλαδισμένων εστέρων [16].

### **2.5.2 Πλεονεκτήματα ενζυμικής κατάλυσης στη παραγωγή βιοντίζελ**

Η χημική κατάλυση για τη βιομηχανική παραγωγή βιοντίζελ έχουν υψηλές αποδόσεις μετεστεροποίησης που φτάνουν μέχρι και το 99%. Παρά την εξαιρετική παραγωγικότητα, η χημική παραγωγή βιοντίζελ περιορίζεται κυρίως εξαιτίας λόγων όπως η δυσκολία στην ανάκτηση γλυκερόλης, η απαίτηση για εξευγενισμένα έλαια, ο σχηματισμός αφρού και πηγμάτων από μόνο- και δι- γλυκερίδια. Τα υπολείμματα όλων αυτών των παραπροϊόντων μειώνουν την ποιότητα του βιοντίζελ. Άλλα μειονεκτήματά της κατάλυσης είναι η ανάγκη του ελαίου για προεπεξεργασία, οι μεγάλες απαιτήσεις σε αλκοόλη και η ανάγκη για απουσία νερού. Η παραγωγή βιοντίζελ μέσω λιπασών μπορεί να περιορίσει μέχρι και να εξαλείψει τα παραπάνω ζητήματα. Επιπλέον, οι λιπάσες μπορούν και ανακτώνται μετά τα πέρας της διεργασίας και επαναχρησιμοποιούνται. Ακόμα, ο διαχωρισμός του καταλύτη-προϊόν είναι ευκολότερος από ότι στις χημικές μεθόδους. Οι λιπάσες παράγονται από μικροοργανισμούς (μύκητες, βακτήρια) ζώα, φυτά. Αυτές που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο είναι κυρίως προϊόν μικροοργανισμών. Τόσο οι εσωκυτταρικές όσο οι εξωκυτταρικές λιπάσες χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή βιοντίζελ. Οι πιο διαδεδομένες είναι οι εξωκυτταρικές ακινητοποιημένες λιπάσες.

Η ενζυμική σύνθεση του βιοντίζελ πραγματοποιείται μεταξύ 20-60°C. Στη λήξη της μετεστεροποίησης η κατώτερη φάση (γλυκερόλη) διαχωρίζεται με την ανώτερη φάση (βιοκαύσιμο) χωρίς να χρειάζεται το προϊόν κάποια ιδιαίτερη επεξεργασία. Μικρή περίσσεια αλκοόλης οδηγεί σε υψηλή απόδοση βιοντίζελ και ο βιοκαταλύτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί περισσότερο από μια φορά. Η μετεστεροποίηση με λιπάσες μπορεί να εφαρμοστεί σε εξευγενισμένα έλαια, σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), σε χρησιμοποιημένα έλαια και απόβλητα λίπη, με διάφορες αλκοόλες όπως μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη, ισοπροπανόλη, βουτανόλη, ισοβουτανόλη. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό έχει θετική

επίδραση στη παραγωγή βιοντίζελ. Για την παραγωγή βιοντίζελ με λιπάσες η συγκέντρωση των FFA των ελαίων επιτρέπεται να είναι πολύ υψηλότερη από ότι στη χημική κατάλυση. Τα τριγλυκερίδια και τα FFA που υπάρχουν στα έλαια μπορούν ενζυμικά να μετατραπούν σε βιοντίζελ σε διεργασία ενός σταδίου λόγω του ότι οι λιπάσες καταλύουν αντιδράσεις μετεστεροποίησης και εστεροποίησης. (Σχήμα 21) Με τον τρόπο αυτό παραλείπονται τα αρχικά, χρονοβόρα στάδια του καθαρισμού και εξευγενισμού της πρώτης ύλης. Στην ενζυμική παραγωγή βιοντίζελ παραλείπονται τα αρχικά στάδια του εξευγενισμού του ελαίου και ο χρονοβόρος εξευγενισμός του βιοντίζελ.

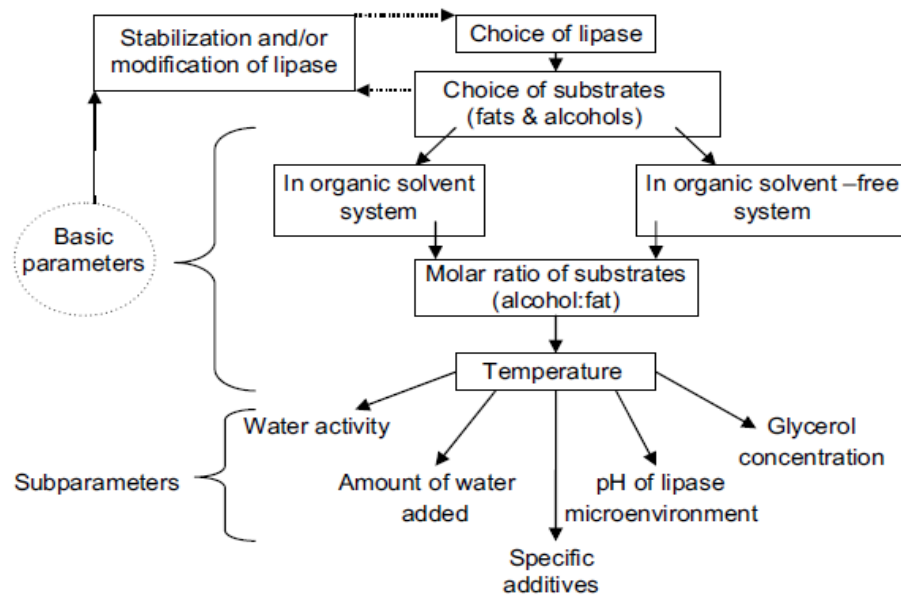


Σχήμα 21: Ενζυμική (μετ)εστεροποίηση ενός σταδίου ελαίων που περιέχουν FFA με μικρές αλκοόλες (M.Szczesna, Renewable energy, σελ. 1186)

Η ενζυμική σύνθεση βιοντίζελ πραγματοποιείται είτε σε οργανικούς διαλύτες είτε solvent-free (δηλαδή μόνο το μίγμα των υποστρωμάτων) συστήματα. Το κόστος της χημικής παραγωγής βιοντίζελ είναι πολύ μικρότερο από της ενζυμικής. Αν όμως ληφθεί υπόψη η μόλυνση του περιβάλλοντος τότε τα κόστη είναι συγκρίσιμα [30,31].

### 2.5.3 Κρίσιμοι παράγοντες ενζυμικής σύνθεσης βιοντίζελ

Οι κρίσιμοι παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική παραγωγή βιοντίζελ αναπαρίστανται στην εικόνα 22. Για να επιτευχθεί οικονομική βιωσιμότητα πρέπει αρχικά να γίνει σωστή επιλογή πρώτων υλών και λιπάσης. Η λιπάση μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να βελτιωθεί η σταθερότητα της και η καταλυτική της απόδοση. Επιπλέον, σημαντικά είναι η σωστή επιλογή οργανικού καταλύτη, θερμοκρασίας, ενεργότητας νερού, βελτιστοποίηση της μοριακής αναλογίας των υποστρωμάτων, διατήρηση του pH του μικροπεριβάλλοντος του ενζύμου και τέλος, διατήρηση των επιτρεπτών ορίων της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στο προϊόν.



Εικόνα 22 : Κρίσιμοι παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση της ενζυμικής σύνθεσης του βιοντίζελ (M.Szczesna, Renewable energy, σελ.1187)

- Επιλογή λιπάσης

Μόνο κάποια είδη λιπασών έχουν βρεθεί να είναι ικανά για αποτελεσματική σύνθεση βιοντίζελ και μόνο κάποια από αυτά μπορούν να καταλύσουν την αντίδραση και στα δύο συστήματα: οργανικά και solvent free (Πίνακας 18 ).

Πίνακας 18: Μικροοργανισμοί για την παραγωγή λιπασών για παραγωγή βιοντίζελ σε συστήματα που περιέχουν ή όχι οργανικούς διαλύτες [30].

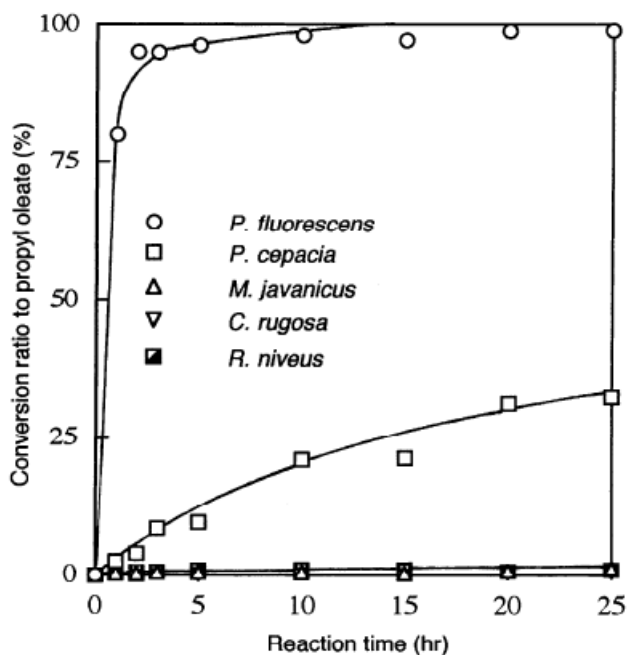
| Αντίδραση σε οργανικά διαλύματα | solvent-free συστήματα         |
|---------------------------------|--------------------------------|
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>  | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| <i>Pseudomonas cepacia</i>      | <i>Candida antarctica</i>      |
| <i>Candida antarctica</i>       | <i>Candida rugosa</i>          |
| <i>Rhizopus delemar</i>         | <i>Rhizopus oryzae</i>         |
| <i>Rhizopus oryzae</i>          | <i>Mucor miehei</i>            |
| <i>Mucor miehei</i>             | <i>Rhizomucor miehei</i>       |
| <i>Geotrichum candidum</i>      | <i>Thermomyces lanuginosa</i>  |
| <i>Candida rugosa</i>           | <i>Aspergillus niger</i>       |
|                                 | <i>Pseudomonas cepacia</i>     |

Τα περισσότερα από αυτά είναι εξωκυτταρικά ένζυμα τα οποία έχουν ακινητοποιηθεί πάνω σε φορείς. Η εξειδίκευση των λιπασών για τη σύνθεση του βιοντίζελ αφορά την τοποεκλεκτικότητά τους (regiospecificity) και την εκλεκτικότητα ανάλογα με το μήκος της υδρογονανθρακικής αλυσίδας των λιπαρών οξέων. Με βάση την τοποεκλεκτικότητα οι λιπάσες χωρίζονται σε τρεις τύπους:

- sn-1,3 specific (υδρόλυση εστερικού δεσμού στις θέσεις R1 και R3 του τριγλυκεριδίου)
- sn-2-specific (υδρόλυση εστερικού δεσμού στις θέσεις R2 του τριγλυκεριδίου)
- non specific (δεν διακρίνει τις θέσεις των εστερικών δεσμών που πρόκειται να διασπαστούν)

Οι λιπάσες που χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή βιοντίζελ παρουσιάζουν μεγάλο εύρος εκλεκτικότητας υποστρώματος και τοποεκλεκτικότητας. Η τοποεκλεκτικότητα των λιπασών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες που δεν έχουν ακόμα αναγνωριστεί. Το μόνο που είναι γνωστό είναι ότι εξαρτώνται από τη δομή των υποκαταστατών των μορίων των τριγλυκεριδίων. Η εξειδίκευση υποστρώματος των λιπασών διακρίνεται από την ικανότητα να διαχωρίζει τα δομικά συστατικά των ακυλ-αλυσίδων όπως είναι το μήκος, ο αριθμός, η θέση και η διάταξη των διπλών δεσμών ή παρουσία διακλαδισμένων αλυσίδων. Επίσης, σημαντική είναι και η φύση της πηγής των αλκυλομάδων δηλαδή, αν προέρχεται από ελεύθερο οξύ, αλκυλεστέρα, εστέρα της γλυκερόλης κ.α. Στις αντιδράσεις τριγλυκεριδίων και αλκοολών οι λιπάσες ξεχωρίζουν το μήκος και τον τύπο του λιπαρού οξέος που περιέχεται στο τριγλυκερίδιο και το μήκος της αλκοόλης. Για παράδειγμα η λιπάση από *R.oryzae* διαχωρίζει τα λιπαρά οξέα με βάση το διαφορετικό τους μήκος. Υπό βέλτιστες συνθήκες προτιμά το C18 ελεύθερα οξέα και τις C2-C4 αλκοόλες.

Παρακάτω παραθέτουμε ένα παράδειγμα, όσον αφορά την επιλογή της λιπάσης κατά τη μετεστεροποίηση. Στην συγκεκριμένη εφαρμογή χρησιμοποιήθηκε ως πηγή τριγλυκεριδίου η τριολεΐνη (εστέρας του ελαϊκού οξέος) ως αλκοόλη χρησιμοποιήθηκε η προπανόλη, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 50°C για πέντε διαφορετικά είδη λιπασών. Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής (σχήμα 23):



Σχήμα 23: Οι διαφορές στην αντίδραση της μετεστεροποίησης ανάλογα με το είδος της ακνητοποιημένης λιπάσης που χρησιμοποιήθηκε. (Mamoru Iso, *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, σελ.55)

- Υποστρώματα για παραγωγή βιοντίζελ
- Λιπίδια

Οι πρώτες ύλες για παραγωγή βιοντίζελ αποτελούνται από όλα τα διαθέσιμα φυτικά έλαια (εδώδιμα και μη), μικροβιακά έλαια, απόβλητα έλαια, χρησιμοποιημένα λάδια, λίπη (βόεια, χοίρεια), ακόμα και παραπροϊόντα από έλαια ψαριών. Οι πρώτες ύλες για τη σύνθεση βιοντίζελ προέρχονται από ελαιούχα φυτά που αναπτύσσονται ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή. Παράδειγμα στην Ευρώπη, η βασική πρώτη ύλη για παραγωγή βιοντίζελ είναι η ελαιοκράμβη. Η μετεστεροποίηση του ελαίου αυτού με μεθανόλη ή αιθανόλη (σε συστήματα με οργανικούς διαλύτες) καταλύεται με λιπάσες από *M.miehei*, *Mucor circinelloides*. Σε συστήματα solvent free πραγματοποιείται με μεθανόλη και λιπάση από *T.lanuginose*, *M. Circinelloides* και άλλα. Το βόειο λίπος είναι πολύ κακής ποιότητας πρώτη ύλη για παραγωγή βιοκαυσίμων από έλαια, εφόσον πρόκειται για λίπος που είναι στερεό στη θερμοκρασία περιβάλλοντος και είναι απόβλητο. Με τη βοήθεια των λιπασών μετεστεροποιήθηκε επιτυχώς σε εξάνιο με μεθανόλη και αιθανόλη χρησιμοποιώντας *M. miehei* λιπάση. Σε solvent-free σύστημα η μετεστεροποίηση έγινε σε ισοπροπανόλη και 2-βουτανόλη με *C. Antarctica* λιπάση.

- Επιλογή αλκοόλης

Οι μεθανόλη και η αλκοόλη είναι οι φθηνότερες αλκοόλες και παράγονται σε μεγάλη κλίμακα και για αυτό έχουν επιλεγεί για να χρησιμοποιηθούν στη παραγωγή βιοντίζελ. Παρόλα αυτά, οι αλκοόλες αυτές, είναι πιο ισχυροί παράγοντες μετουσίωσης, από ότι οι αλκοόλες με

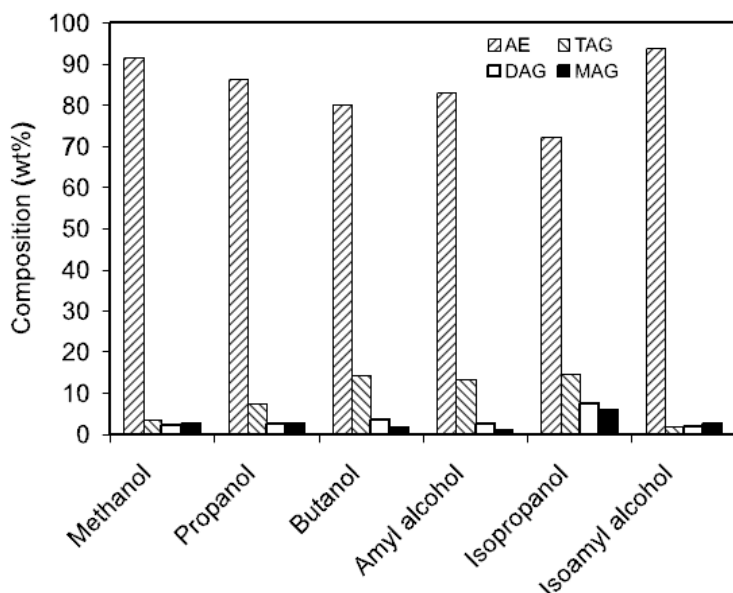
μακρύτερη ανθρακική αλυσίδα, και απενεργοποιούν το ένζυμο. Η απόδοση της ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης εξαρτάται από τη ταχύτητα της αντίδρασης και το ρυθμό μετουσίωσης του ενζύμου. Η περιεκτικότητα αλκοόλης στο μίγμα της αντίδρασης εξαρτάται από την αντίσταση του ενζύμου στην αλκοόλη και τη συγκέντρωση του νερού. Η ταυτόχρονη παρουσία μεθανόλης και νερού μπορεί να επιταχύνει τη μετουσίωση, ενώ σε συστήματα που περιέχουν αιθανόλη, προπανάλη, ισοπροπανάλη, βουτανόλη και ισοβουτανόλη η παρουσία μικρών ποσοτήτων νερού είναι απαραίτητη. Στον Πίνακα 19 παρουσιάζονται παραδείγματα διεργασιών μετεστεροποίησης λιπών σε συστήματα με διάφορες αλκοόλες και λιπάσες με ή χωρίς οργανικό διαλύτη.

Πίνακας 19: Μετεστεροποίηση με λιπάσες ελαίων με διάφορες αλκοόλες (M.Szczesna, Renewable energy,σελ.1188)

| Alcohol       | Fat           | Lipase                                  | System                          | Time [h]     | Yield [%] |        |
|---------------|---------------|---|---------------------------------|--------------|-----------|--------|
| Methanol      | Tallow        | <i>Mucor miehei</i> IM60                | Solvent-free                    | 5            | 19.4      |        |
|               |               |   | hexane                          | 5            | 73.8      |        |
|               |               |   | hexane                          | 8            | 94.8      |        |
|               | Sunflower oil | <i>Pseudomonas fluorescens</i>          | Solvent-free                    | 24           | 3.0       |        |
|               |               |   | Petroleum ether                 | 24           | 79.0      |        |
|               | Cotton oil    | <i>Candida antarctica</i> (Novozym-435) | Solvent-free                    | 7            | 91.5      |        |
|               | Soybean oil   | <i>Pseudomonas cepacia</i>              | <i>tert</i> -butanol            | 10           | 90.0      |        |
|               | Palm oil      |   | Solvent-free                    | 48           | 93.8      |        |
|               | Coconut oil   |   | Solvent-free                    | 8            | 15.0      |        |
|               | Ethanol       | Tallow                                  | <i>Mucor miehei</i> IM60        | Solvent-free | 8         | traces |
| hexane        |               |   |                                 | 5            | 65.5      |        |
| Solvent-free  |               |   |                                 | 5            | 98.0      |        |
| Sunflower oil |               | <i>Pseudomonas fluorescens</i>          | Solvent-free                    | 5            | 83.0      |        |
|               |               |   | Solvent-free                    | 24           | 82.0      |        |
| Palm oil      |               | <i>Pseudomonas cepacia</i>              | Solvent-free                    | 8            | 72.0      |        |
| Coconut oil   |               |   | Solvent-free                    | 8            | 35.0      |        |
| Isopropanol   |               | Tallow                                  | <i>Candida antarctica</i> SP435 | Solvent-free | 16        | 90.3   |
|               |               |   |                                 | hexane       | 16        | 51.7   |
|               |               | Palm oil                                | <i>Pseudomonas cepacia</i>      | Solvent-free | 8         | 24.0   |
|               | Solvent-free  |   |                                 | 8            | 16.0      |        |
| Isobutanol    | Tallow        | <i>Mucor miehei</i> IM60                | Solvent-free                    | 5            | 97.4      |        |
|               |               |   | hexane                          | 5            | 98.5      |        |
|               | Palm oil      | <i>Pseudomonas cepacia</i>              | Solvent-free                    | 8            | 42.0      |        |
|               |               |   | Solvent-free                    | 8            | 40.0      |        |
| 2-butanol     | Tallow        | <i>Candida antarctica</i> SP435         | Solvent-free                    | 16           | 96.4      |        |
|               |               |   | hexane                          | 16           | 83.8      |        |
| 1-butanol     | Palm oil      | <i>Pseudomonas cepacia</i>              | Solvent-free                    | 8            | 42.0      |        |
|               |               |   | Coconut oil                     | 8            | 40.0      |        |

Η δομή και η συγκέντρωση των αλκοολών επηρεάζει την λειτουργική σταθερότητα του ενζύμου. Για παράδειγμα, καθορίζει το χρόνο για τον οποίο το ένζυμο είναι ικανό να καταλύει τη μετεστεροποίηση. Η επιλογή του συστήματος της αντίδρασης (με ή χωρίς οργανικό διαλύτη) αποσκοπεί στη καλή λειτουργία του ενζύμου (συνήθως οι οργανικοί διαλύτες ως ένα βαθμό προστατεύουν τα ένζυμα από τη μετουσίωση που προκαλούν οι αλκοόλες).

Παράδειγμα εφαρμογής της επίδρασης των αλκοολών και το πως επηρεάζουν την απόδοση της μετεστεροποίησης παρατίθεται παρακάτω: Στο σχήμα 24 παρουσιάζονται έξι διαφορετικές αλκοόλες και οι αποδόσεις τους σε αλκυλεστέρες (AE), τριγλυκερίδια (TAG), διγλυκερίδια (DAG), μονογλυκερίδια (MAG) όταν πραγματοποιείται αντίδραση μετεστεροποίησης διάρκειας 7 hr, 50°C, 1:4 mol βαμβακελαίου:mol αλκοόλης και 30% κατα βάρος ακινητοποιημένο ένζυμο *C.antartica*.



Σχήμα 24: Επίδραση του είδους της αλκοόλης κατά τη μετεστεροποίηση βαμβακελαίου (Oznur Kose, Bioresource technology, σελ. 129)

- Επιλογή μοριακής αναλογίας των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση της μετεστεροποίησης

Η περίσσεια αλκοόλης υπέρ των λιπαρών οξέων που περιέχονται στα τριγλυκερίδια, αυξάνουν την απόδοση μετεστεροποίησης αλλά ταυτόχρονα, μπορούν να απενεργοποιήσουν το ένζυμο ειδικά όταν η αλκοόλη είναι αδιάλυτη στο μίγμα αντίδρασης. Η μεθανόλη και τα φυτικά έλαια σχηματίζουν διάλυμα όταν βρίσκονται κοντά σε μοριακή αναλογία 1:1 (στους 40°C). Η προσθήκη οργανικού διαλύτη στο μίγμα αυξάνει τη διαλυτότητα των αλκοολών (για αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις) προστατεύει το ένζυμο από την απενεργοποίηση και εξασφαλίζει την ενζυμική μετεστεροποίηση σε ένα στάδιο. Η βέλτιστη μοριακή αναλογία υποστρωμάτων που θα χρησιμοποιηθεί για την ενζυμική σύνθεση βιοντίζελ χρειάζεται να καθοριστεί ξεχωριστά για το κάθε σύστημα αλκοόλης-λιπαρού-λιπάσης. Συνήθως στα συστήματα με οργανικούς διαλύτες μια μικρή περίσσεια αλκοόλης (πάνω από τη στοιχειομετρική αναλογία αλκοόλη:λιπαρό 4-5:1) είναι απαραίτητο για να επιτύχει μια ικανοποιητική απόδοση μετεστεροποίησης. Σε solvent free συστήματα η αλκοόλη πρέπει να προστίθεται στο μίγμα αντίδρασης σε διαδοχικές μικρές ποσότητες. Η χαμηλή και ταυτόχρονα εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία, διαλυτότητα των αλκοολών στα έλαια, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη από το 1<sup>ο</sup> κίβλας βήμα της διαδικασίας της μετεστεροποίησης.

Παράδειγμα, η επίδραση της μοριακής αναλογίας των υποστρωμάτων (έλαιο:αλκοόλη) στην απόδοση της μετεστεροποίησης δίνεται στον Πίνακα 20 για συστήματα solvent-free, στους 40°C, για 7 ώρες, το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι το Novozyme 435. Η βέλτιστη αναλογία είναι ¼.

Πίνακας 20: Επίδραση της αναλογίας ελαίου:μεθανόλης κατά τη μεθανόλυση το βαμβακελαίου (Ozpur Kose, Bioresource technology, σελ.128)

| Oil/alcohol (mol/mol) | Composition (wt%) |                  |                  |                  |                  |
|-----------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                       | ME <sup>b</sup>   | TAG <sup>c</sup> | DAG <sup>d</sup> | MAG <sup>e</sup> | FFA <sup>f</sup> |
| 1/1                   | 29.9 ± 2.1        | 27.0 ± 2.0       | 21.3 ± 2.2       | 9.4 ± 1.2        | 12.4 ± 1.2       |
| 1/2                   | 57.3 ± 0.8        | 11.6 ± 1.4       | 17.2 ± 1.1       | 4.9 ± 1.8        | 9.0 ± 1.3        |
| 1/3                   | 83.6 ± 0.7        | 6.4 ± 1.7        | 5.8 ± 1.8        | 2.2 ± 1.2        | 2.0 ± 0.2        |
| 1/4                   | 87.4 ± 0.5        | 7.3 ± 1.2        | 2.8 ± 1.4        | 1.9 ± 1.2        | 0.6 ± 0.5        |
| 1/5                   | 85.2 ± 0.5        | 7.1 ± 1.2        | 4.3 ± 1.3        | 2.9 ± 1.6        | 0.5 ± 0.4        |
| 1/6                   | 63.9 ± 0.7        | 18.9 ± 1.2       | 10.8 ± 1.4       | 5.9 ± 1.6        | 0.5 ± 0.3        |

Values are reported as mean ± standard deviation.

<sup>a</sup> Reactions were performed in duplicate at 40 °C for 7 h in a mixture of 12 g oil/methanol, 30% immobilized *C. antarctica* lipase based on oil weight.

<sup>b</sup> Methyl esters.

<sup>c</sup> Triacylglycerol.

<sup>d</sup> Diacylglycerol.

<sup>e</sup> Monoacylglycerol.

<sup>f</sup> Free fatty acids.

▪ Ο ρόλος και η επιλογή των οργανικών διαλυτών

Επιστήμονες υποστηρίζουν ότι το θεμελιώδες κριτήριο που περιγράφει την επίδραση πολικότητας-υδροφοβικότητας των οργανικών διαλυτών στη ενζυμική κατάλυση είναι ο λογάριθμος logP (οι τιμές του είναι γνωστές ως μέτρο λιποφιλικότητας). Ο βέλτιστος οργανικός διαλύτης διασφαλίζει καλή διαλυτότητα των υποστρωμάτων και διατηρεί την ενζυμική ενεργότητα. Σε πολλές περιπτώσεις το βέλτιστο για την ενζυμική αντίδραση αποτελείται από ένα μίγμα οργανικών διαλυτών.

Οι οργανικοί διαλύτες χρησιμοποιούνται στην ενζυμική παραγωγή βιοντίζελ για να αυξήσουν το ρυθμό της μετεστεροποίησης διαμέσου βελτίωσης της αμοιβαίας διαλυτότητας των υδρόφοβων τριγλυκεριδίων και των υδρόφιλων αλκοολών. Να σημειωθεί ότι η διαλυτότητα της προπανόλης και βουτανόλης στα έλαια είναι υψηλότερη από της μεθανόλης και αιθανόλης και για αυτό οι δύο πρώτες αλκοόλες δεν χρειάζονται επιπλέον οργανικό διαλύτη. Όπως προαναφέρθηκε, οι οργανικοί διαλύτες προστατεύουν τα ένζυμα από τη μετουσίωση εξαιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης των αλκοολών, όπως μεθανόλη και αιθανόλη.

Ανάμεσα στους οργανικούς διαλύτες για την ενζυμική σύνθεση βιοντίζελ βρέθηκε ότι οι υδρόφοβοι είναι πιο κατάλληλοι παράδειγμα, το ισοοκτάνιο (logP=4.7) n-επτάνιο (logP=4.0). Οι υδρόφιλοι οργανικοί διαλύτες αλληλεπιδρούν με το νερό σχηματίζοντας μια μεμβράνη η οποία επικαλύπτει τα μόρια του ενζύμου και για αυτό δεν χρησιμοποιούνται τόσο στις ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις σύνθεσης. Η σύνθεση του βιοντίζελ πραγματοποιείται σε πολλούς οργανικούς διαλύτες και οι αποδόσεις της διεργασίας αυτής συνήθως εξαρτώνται από την λιπάση και τη σύσταση του λιπαρού. (Πίνακας 21)



Πίνακας 21 : Ενζυμική αλκοόλυση ελαίων σε διάφορους οργανικούς διαλύτες (M.Szczesna, *Renewable energy*, σελ.1190)

| Organic solvent | Oil              | Molar ratio alcohol: oil | Lipase   | Volume of organic solvent/amount of oil | Temp. | Yield [%]  |
|-----------------|------------------|--------------------------|--|---|-------|------------|
| n-hexane        | sunflower        | 5:1                      | <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 10 ml/20 mM                             | 40 °C | 94%        |
|                 | sunflower        | 3:1                      | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                 | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 80%        |
|                 | sunflower        | 3:1                      | <i>Thermomyces lanuginosa</i>                  | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 73%        |
|                 | sunflower edible | 3:1 <sup>a</sup>         | <i>Rhizomucor miehei</i><br><i>Candida sp.</i> | 2 ml/0.2 mmol<br>5 ml/2 g               | 40 °C | 72%<br>96% |
| cyclohexane     | sunflower        | 3:1                      | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                 | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 73%        |
|                 | sunflower        | 3:1                      | <i>Thermomyces lanuginosa</i>                  | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 35%        |
|                 | sunflower        | 3:1                      | <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 65%        |
|                 | sunflower edible | 3:1 <sup>a</sup>         | <i>Candida sp.</i>                             | 5 ml/2 g                                | 40 °C | 94%        |
| n-heptane       | sunflower        | 3:1                      | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                 | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 70%        |
|                 | sunflower        | 3:1                      | <i>Thermomyces lanuginosa</i>                  | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 68%        |
|                 | sunflower        | 3:1                      | <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 68%        |
|                 | sunflower edible | 3:1 <sup>a</sup>         | <i>Candida sp.</i>                             | 5 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 94%        |
| petroleum ether | sunflower        | 3:1                      | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                 | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 80%        |
|                 | sunflower        | 3:1                      | <i>Thermomyces lanuginosa</i>                  | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 73%        |
|                 | sunflower        | 3:1                      | <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 60%        |
|                 | waste            | 3:1 <sup>a</sup>         | <i>Candida sp.</i>                             | 5 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 93%        |
| isooctane       | sunflower        | 3:1                      | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                 | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 80%        |
|                 | sunflower        | 3:1                      | <i>Thermomyces lanuginosa</i>                  | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 65%        |
|                 | sunflower        | 3:1                      | <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 60%        |
| acetone         | sunflower        | 3:1                      | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                 | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 20%        |
|                 | sunflower        | 3:1                      | <i>Thermomyces lanuginosa</i>                  | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 8%         |
|                 | sunflower        | 3:1                      | <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 2 ml/0.2 mmol                           | 40 °C | 20%        |
|                 | waste            | 3:1 <sup>a</sup>         | <i>Candida sp.</i>                             | 5 ml/2 g                                | 40 °C | 40%        |
| Chloroform      | waste            | 3:1 <sup>a</sup>         | <i>Candida sp.</i>                             | 5 ml/2 g                                | 40 °C | 83%        |
| 1,4-dioxane     | triolein         | 3:1                      | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                 | 90 wt%/30 g                             | 50 °C | 60%        |
| tert-butanol    | cottonseed       | 6:1                      | <i>Candida antarctica</i>                      | 32.5 vol%/18 g                          | 50 °C | 90%        |
|                 | rapeseed         | 4:1                      | <i>Thermomyces lanuginosa</i>                  | 0.75:1 (v/v) tert-butanol/oil           | 35 °C | 75%        |
|                 | rapeseed         | 4:1                      | <i>Candida antarctica</i>                      | 1:1 (v/v) tert-butanol/oil              | 35 °C | 90%        |

<sup>a</sup> Stepwise addition of alcohol.

Άλλοι διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σύνθεση βιοντίζελ είναι τα ιοντικά υγρά (ζεύγη ιόντων που είναι υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος). Τα ιοντικά υγρά είναι μη πτητικά, μη τοξικά και θερμικά σταθεροί διαλύτες. Επιπροσθέτως, η υδροφοβικότητα/υδροφιλικότητα μπορεί να προσαρμοστεί ανάλογα με τη φύση του κατιόντος ή ανιόντος. Επιπλέον, διαλυτοποιούν πολλά πολικά και μη-πολικά μόρια που συμμετέχουν τη διαδικασία της μετεστεροποίησης και μπορούν να σταθεροποιήσουν κάποια ένζυμα.

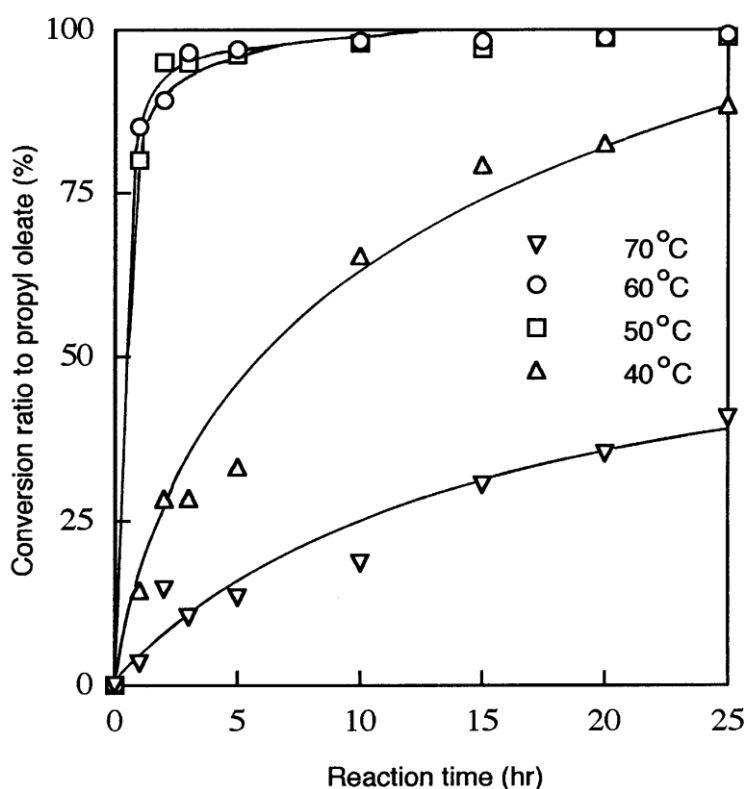
Συνοψίζοντας, ο βασικός λόγος προσθήκης οργανικών διαλυτών στο μίγμα έλαιο-αλκοόλη συντελεί στη βελτίωση της διαλυτότητας των υποστρωμάτων και στη βελτίωση της λειτουργικότητας των λιπασών. Ωστόσο, η απομάκρυνση των οργανικών διαλυτών όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση είναι δύσκολη. Επίσης, η πτητικότητα, ευφλεκτικότητα, τοξικότητα, των οργανικών διαλυτών μπορούν να περιορίσουν την παραγωγή βιοντίζελ σε μεγάλη κλίμακα. Για τους παραπάνω λόγους το βάρος έχει δοθεί στη μετεστεροποίηση σε solvent free συστήματα.

### ▪ Θερμοκρασία ενζυμικής αλκοόλυσης

Η βέλτιστη θερμοκρασία για διάφορες λιπάσες που χρησιμοποιούνται στη μετεστεροποίηση ελαίων με μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη, ισοπροπανόλη, βουτανόλη και ισοβουτανόλη σε εξάνιο βρίσκεται μεταξύ 30-55°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία για μετεστεροποίηση σε solvent free συστήματα βρίσκονται περίπου στη ίδια θερμοκρασιακή περιοχή (30-50°C).

Μετά από επιστημονικές μελέτες προτείνεται ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για ενζυμική μετεστεροποίηση προκύπτει από την αλληλεπίδραση μεταξύ της λειτουργικής σταθερότητας του βιοκαταλύτη και του ρυθμού μετεστεροποίησης. Ακόμα, εξαρτάται από τη μοριακή αναλογία αλκοόλη:έλαιο, τον τύπο του οργανικού διαλύτη και τη θερμική σταθερότητα του ένζυμου.

Η επίδραση της θερμοκρασίας στη μετεστεροποίηση διακρίνεται στο σχήμα 25 όπου πραγματοποιήθηκε μετεστεροποίηση με χρήση τριολεΐνης και προπανόλης με λιπάση *P. fluorescens* σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες (Σχήμα 25).



Σχήμα 25: Επίδραση της θερμοκρασίας στη παραγωγή προπυλικού εστέρα του ελαϊκού οξέος από ακινητοποιημένη λιπάση *P. fluorescens*. (Mamoru Iso, *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, σελ.56)

### ▪ Περιεκτικότητα νερού στη μετεστεροποίηση

Η περιεκτικότητα σε νερό στο αντιδρών μίγμα μπορεί να εκφράζεται ως ενεργότητα νερού ( $a_w$ : στα μη υδατικά διαλύματα όπως αυτά του βιοντίζελ ορίζεται ως η αναλογία της πίεσης ατμών του συστήματος προς την πίεση των ατμών του νερού  $p/p_{H_2O}$ ) ή περιεκτικότητα

νερού (%). Ο καθορισμός του βέλτιστου ποσοστού νερού στη μετεστεροποίηση είναι απαραίτητος εφόσον τα λίπη συνήθως περιέχουν νερό. Στη βέλτιστη περιεκτικότητα νερού η υδρόλυση των εστερικών δεσμών διατηρείται στα ελάχιστα επίπεδα και αυτό διασφαλίζει υψηλότερο βαθμό μετεστεροποίησης και απόδοσης σχηματισμού βιοντίζελ.

Ενεργότητα νερού: Η τιμή της  $a_w$  ορίζει το ποσό του νερού το οποίο δεν είναι δεσμευμένο με το σύστημα και μπορεί να εξατμιστεί. Έχει βρεθεί ότι η βέλτιστη ενεργότητα νερού που αντιστοιχεί στην υψηλότερη ενεργότητα ενζύμου είναι χαρακτηριστικό τόσο του ενζύμου και της σύστασης του μέσου αντίδρασης (υποστρώματα και οργανικοί διαλύτες), όσο και του είδους της ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης. Μέσα από σειρές πειραμάτων έχει αποδειχθεί ότι η ενεργότητα νερού πρέπει να βελτιστοποιηθεί ξεχωριστά για κάθε σύστημα μετεστεροποίησης γιατί επηρεάζεται από τις τιμές των  $a_w$  όλων των συστατικών του συστήματος. Επίσης σχετίζεται με το ένζυμο ειδικά όταν είναι υδρόφιλο.

Προσθήκη νερού: Η συγκέντρωση νερού στο αντιδρών μίγμα είναι ένα από τα χαρακτηριστικά και ένας από τους πιο σημαντικούς και καθοριστικούς παράγοντες του ρυθμού και απόδοσης της καταλυόμενης μετεστεροποίησης από λιπάσες. Μελέτες αποκάλυψαν ότι η προσθήκη ενός μικρού ποσού νερού στην ενζυμική αντίδραση (η ποσότητα αυτή δεν μετατοπίζει την αντίδραση προς υδρόλυση) αυξάνει τον ρυθμό σύνθεσης εστέρων λιπαρού οξέος. Η περιεκτικότητα νερού στο μίγμα αντίδρασης είναι κρίσιμος παράγοντας για την απόδοση ενζυμικής σύνθεσης βιοντίζελ. Η ενεργότητα νερού είναι μια παράμετρος που περιγράφει ακριβέστερα το βαθμό υγρασίας στα μη υδατικά συστήματα και η μέτρησή του είναι πιο δύσκολη από το να καθοριστεί το ποσοστό περιεκτικότητας νερού. Η χαμηλή ενεργότητα νερού (ή χαμηλή περιεκτικότητα σε ελεύθερο νερό) έχει θετική επίδραση στη σύνθεση εστέρων των λιπαρών οξέων. Η βέλτιστη ποσότητα νερού που προστίθεται στο σύστημα της αντίδρασης αυξάνει τον ρυθμό σύνθεσης εστέρα και ταυτόχρονα διατηρεί την συγκέντρωση των FFA σε χαμηλά επίπεδα.

- *Το αποτέλεσμα της γλυκερόλης στην ενζυμική μετεστεροποίηση*

Μελέτες έχουν αποδείξει ότι η γλυκερόλη έχει αρνητική επίδραση στη μετεστεροποίηση με ένζυμο, καθώς έχει βρεθεί ότι απενεργοποιεί το ένζυμο ειδικά σε συνεχείς και επαναλαμβανόμενες διεργασίες διαλείποντος έργου. Παρατηρήθηκε μια σημαντική πτώση στην ενεργότητα των ακινητοποιημένων λιπασών όταν εκτίθονταν στη γλυκερόλη. Τα μόρια της γλυκερόλης απορροφώνταν στην επιφάνεια των φορέων σχηματίζοντας έτσι μια υδρόφιλη επικάλυψη η οποία καθιστά το ένζυμο μη προσβάσιμο στις υδρόφοβες ουσίες. Η προσθήκη μιας υδρόφιλης ουσίας όπως ακετόνη ή silica gel απομακρύνει τη γλυκερόλη από

το περιβάλλον της λιπάσης και αυτό οδηγεί σε αποτελεσματικότερη μετεστεροποίηση. Παράδειγμα, η πλύση των ακινητοποιημένων λιπασών με ισοπροπυλική αλκοόλη αποκαθιστά την ενεργότητα καθώς η γλυκερόλη απομακρύνεται από το φορέα [30].

Σύμφωνα με τη παραπάνω θεωρία και παραδείγματα, συμπεραίνουμε ξεκάθαρα, ότι για συγκεκριμένα υποστρώματα (τριγλυκερίδια, αλκοόλη) υπάρχουν βέλτιστες συνθήκες, (ποσότητα ενζύμου, περιεκτικότητα σε έλαιο και αλκοόλη, θερμοκρασία κτλ). Λόγω των μειονεκτημάτων των χημικά καταλυόμενων μετεστεροποιήσεων, το βάρος έχει δοθεί στις μετεστεροποιήσεις με βιοκαταλύτες οι οποίοι σχεδόν εξαλείφουν τα προβλήματα των χημικών καταλυτών, αλλά το κόστος τους είναι πολύ υψηλό. Έτσι η διερεύνηση για την επίτευξη των βέλτιστων αποδόσεων παίζει σημαντικό ρόλο για την οικονομική βιωσιμότητα της μεθόδου.

## **2.6 Μέθοδοι μη καταλυτικής μετεστεροποίησης**

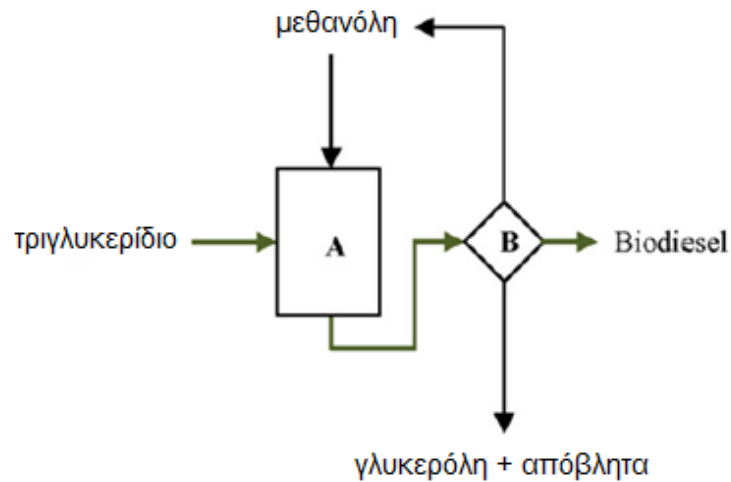
- *Παραγωγή βιοντίζελ με BIOX σύστημα συνδιαλυτών*

Η διεργασία BIOX αναπτύχθηκε στο Πανεπιστήμιο του Τορόντο από τον Dr. David Boocock και είναι αρκετά ιδιαίτερη. Στη μέθοδο αυτή αδρανείς συνδιαλύτες σχηματίζουν σύστημα μιας φάσης που είναι πλούσια σε έλαιο. Με τη πατέντα BIOX μετατρέπονται και τριγλυκερίδια και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Πρώτα μετατρέπονται τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (με εστεροποίηση) και έπειτα τα τριγλυκερίδια (με μετεστεροποίηση). Η διεργασία πραγματοποιείται διαμέσου προσθήκης ενός συνδιαλύτη σε δύο στάδια, σε μία φάση, σε συνεχή διεργασία και σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία και με διάρκεια μικρότερη των 90 min. Δεν απαιτείται κάποιο στάδιο προεπεξεργασίας. Ο συνδιαλύτης ανακυκλώνεται και επαναχρησιμοποιείται συνεχώς. Με τη διεργασία BIOX οι αποδόσεις μπορούν να ξεπεράσουν το 99% και το παραγόμενο βιοντίζελ πληροί τις προδιαγραφές κατά ASTM. Η BIOX διαχειρίζεται και πρώτες ύλες από φυτά και ζωικά λίπη και χρησιμοποιημένα λάδια [13,34].

- *Μετεστεροποίηση με υπερκρίσιμη αλκοόλη*

Οι συμβατικές διεργασίες που προαναφέρθηκαν έχουν κάποια μειονεκτήματα όπως μεγάλες ποσότητες απόβλητου νερού και σαπωνοποιητικών παραγόντων, απαίτηση για προεπεξεργασία, εξευγενισμό και καθαρισμό των πρώτων υλών. Εξαιτίας αυτών των λόγων έχει προταθεί η παραγωγή βιοντίζελ με υπερκρίσιμη μεθανόλη (supercritical methanol, SCM). Η μετεστεροποίηση με υπερκρίσιμη μεθανόλη είναι μια τεχνική στην οποία οι πρώτες ύλες

αντιδρούν με υπερκρίσιμη μεθανόλη και πολύ υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες. Μέσω αυτής της τεχνικής τα φυτικά έλαια και ζωικά λίπη μπορούν να μετατραπούν σε βιοντίζελ σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα και χωρίς τη χρήση καταλύτη. Στην ΕΙΚΟΝΑ 26 παρουσιάζεται ένα σκαρίφημα για την παραγωγή βιοντίζελ με SCM



Εικόνα 26: Σχέδιο παραγωγής βιοντίζελ με SCM: A: αντιδραστήρας B: διαχωρισμός προϊόντος και ανακύκλωση MeOH [29]

Πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ότι λόγω της απουσίας του καταλύτη δεν απαιτείται πλύση ή εξουδετέρωση, η ποσότητα του νερού δεν επηρεάζει την αντίδραση, η προεργασία της τροφοδοσίας που απαιτείται είναι ελάχιστη, ο ρυθμός της αντίδρασης είναι γρήγορος, η υγρασία και η περιεκτικότητα σε FFA δεν επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή βιοντίζελ. Τα προβλήματα της τεχνικής αυτής είναι οι υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις ώστε να επιτευχθούν οι υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες. Υποστηρίζεται ότι η υπερκρίσιμη μεθανόλη λύνει τα προβλήματα που σχετίζονται με τη φύση των δύο φάσεων των κανονικών μιγμάτων μεθανόλης/ελαίου καθώς σχηματίζει μια φάση εξαιτίας της χαμηλής τιμής της διηλεκτρικής σταθεράς της μεθανόλης στο υπερκρίσιμο στάδιο. Οι βασικοί παράμετροι για να επιτευχθεί η παραγωγή βιοντίζελ με SCM είναι η θερμοκρασία, η πίεση και η αναλογία μεθανόλης-ελαίου. Για βέλτιστες μετατροπές ελαίου και μεθανόλης σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων απαιτούνται πιέσεις μεταξύ 19-45 MPa, θερμοκρασίες 320-350°C και υψηλές αναλογίες μεθανόλη:έλαιο μεταξύ 40:1-42:1. Στο Πίνακα 21 παρουσιάζονται συγκρίσεις μεταξύ της καταλυτικής μεθόδου με μεθανόλη και της μεθόδου SCM για παραγωγή βιοντίζελ μέσω μετεστεροποίησης από φυτικά έλαια. Στον πίνακα 22 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύγκρισης της απόδοσης της μετατροπής διαφόρων ελαίων χρησιμοποιώντας όξινους καταλύτες αλκαλικούς και SCM.

Πίνακας 22: Σύγκριση καταλυτικής μεθανόλυσης και SCM για παραγωγή βιοντίζελ με μετεστεροποίηση (A.Demirbas, *Energy conversion and management* σελ.23)

|                          | Catalytic MeOH process              | SCM method           |
|--------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| Methylating agent        | Methanol                            | Methanol             |
| Catalyst                 | Alkali (NaOH or KOH)                | None                 |
| Reaction temperature (K) | 303–338                             | 523–573              |
| Reaction pressure (MPa)  | 0.1                                 | 10–25                |
| Reaction time (min)      | 60–360                              | 7–15                 |
| Methyl ester yield (wt%) | 96                                  | 98                   |
| Removal for purification | Methanol, catalyst, glycerol, soaps | Methanol             |
| Free fatty acids         | Saponified products                 | Methyl esters, water |
| Smelling from exhaust    | Soap smell                          | Sweet smelling       |

Πίνακας 23 : Σύγκριση απόδοσης μετατροπής με διαφορετικές μεθόδους και τροφοδοσίες [29]

| πρώτη ύλη       | FFA περιεκτικότητα (wt%) | περιεκτικότητα νερού wt% | Απόδόσεις μεθυλεστέρων wt% |                |                      |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------|----------------------|
|                 |                          |                          | αλκαλική κατάλυση          | όξινη κατάλυση | υπερκρίσιμη μεθανόλη |
| Rapeseed oil    | 2.0                      | 0.02                     | 97                         | 98.4           | 98.5                 |
| Palm oil        | 5.3                      | 2.1                      | 94.4                       | 97.8           | 98.9                 |
| Used frying oil | 5.6                      | 0.2                      | 94.1                       | 97.8           | 96.9                 |
| Waste palm oil  | >20.0                    | >61.0                    | No reaction                | No reaction    | 95.8                 |

Επίσης, στην μετεστεροποίηση με SCM μπορεί να προστεθούν και καταλύτες. Με την προσθήκη αυτών έχει αποδειχθεί ότι τη βέλτιστη θερμοκρασία και χρόνος αντίδρασης μειώνεται αλλά δεν συμβαίνει το ίδιο και στη αναλογία μεθανόλης-ελαίου. Σε γενικές γραμμές η προσθήκη ομογενών καταλυτών σε αντίδραση SCM δεν είναι ιδιαίτερα ελκυστική ιδέα. Παρόλο τον γρηγορότερο ρυθμό της αντίδρασης με καταλύτη υπάρχουν προβλήματα με τον επακόλουθο καθαρισμό του προϊόντος και την διαχείριση αποβλήτων. Οι ετερογενείς καταλύτες όπως nano MgO και CaO έχουν χρησιμοποιηθεί στη μετεστεροποίηση με SCM. Επιτεύχθηκε μέγιστη μετατροπή σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες και πιέσεις, ο επακόλουθος διαχωρισμός του καταλύτη είναι εύκολος και μπορεί να ανακυκλωθεί και για αυτούς τους λόγους, οι ετερογενείς καταλύτες παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον [13,29,25].

- *Μετεστεροποίηση μέσω συχνότητων των μικροκυμάτων (microwaves)*

Μετεστεροποίηση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας υψηλής συχνότητας ακτινοβολίας μικροκυμάτων. Η ακτινοβολία με μικροκύματα επιταχύνει τις χημικές αντιδράσεις μειώνοντας το χρόνο από ώρες σε λεπτά και τα λεπτά σε δευτερόλεπτα. Η

ακτινοβολία των μικροκυμάτων ουσιαστικά αποτελείται από κύματα της υπέρυθρης περιοχής και ραδιοκύματα. Γενικά, το μήκος κύματος αυτών βρίσκεται μεταξύ 1mm και 1m και η συχνότητα μεταξύ 300MHz και 300GHz. Έχουν πραγματοποιηθεί μετεστεροποιήσεις χρησιμοποιημένων ελαίων χρησιμοποιώντας 20% μεθανόλης και 1% NaOH στους 65°C. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 60 min και η φάση διαχωρισμού ολοκληρώθηκε σε 8 ώρες με τη συμβατική μέθοδο. Η ίδια αντίδραση εκτελέστηκε με τα ίδια ποσά αλκοόλης και καταλύτη χρησιμοποιώντας ακτινοβολία μικροκυμάτων. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 2 min και η φάση διαχωρισμού σε 30 min. Η απόδοση μετατροπής ήταν 100% αντίθετα με τη συμβατική μέθοδο που έφτασε το 96%. Άλλες επιστημονικές ομάδες που πραγματοποίησαν μετεστεροποιήσεις διαφόρων ελαίων ανέφεραν ότι ο χρόνος 1 min είναι επαρκής για να ολοκληρωθεί η αντίδραση με εξαιρετική απόδοση μετατροπής. Επίσης, έχουν πραγματοποιηθεί πολλά πειράματα για τη βελτίωση του ποσού της αιθανόλης και του χρόνου αντίδρασης χρησιμοποιώντας 1% NaOH. Όταν η μοριακή αναλογία της αιθανόλης με το χρησιμοποιημένο έλαιο αυξήθηκε από 3 σε 9, η απόδοση σε βιοντίζελ αυξήθηκε από 7.19% σε 100%. Η μέγιστη απόδοση (100%) επιτεύχθηκε σε δέκα δευτερόλεπτα όταν η μοριακή αναλογία ελαίου-αλκοόλης ξεπέρασε το 9. Ακόμα, συμπεράστηκε ότι η χημική αντίδραση δεν εξαρτάται από το χρόνο αντίδρασης, αλλά από την αναλογία ελαίου/μεθανόλης [25].

## 2.7 Επίδραση διαφόρων παραμέτρων πάνω στη παραγωγή βιοντίζελ

Οι παράμετροι που επηρεάζουν τον σχηματισμό των μεθυλεστέρων είναι η θερμοκρασία αντίδρασης, η πίεση, οι μοριακές αναλογίες, η περιεκτικότητα σε νερό και σε λιπαρά οξέα. Έχει αποδειχθεί ότι στην υποκρίσιμη κατάσταση της αλκοόλης ο ρυθμός αντίδρασης είναι χαμηλός και αυξάνεται με την αύξηση πίεσης και θερμοκρασίας. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση σε μεθυλεστέρες κατά τη μετεστεροποίηση είναι η μοριακή αναλογία αλκοόλης-ελαίου και η θερμοκρασία αντίδρασης.

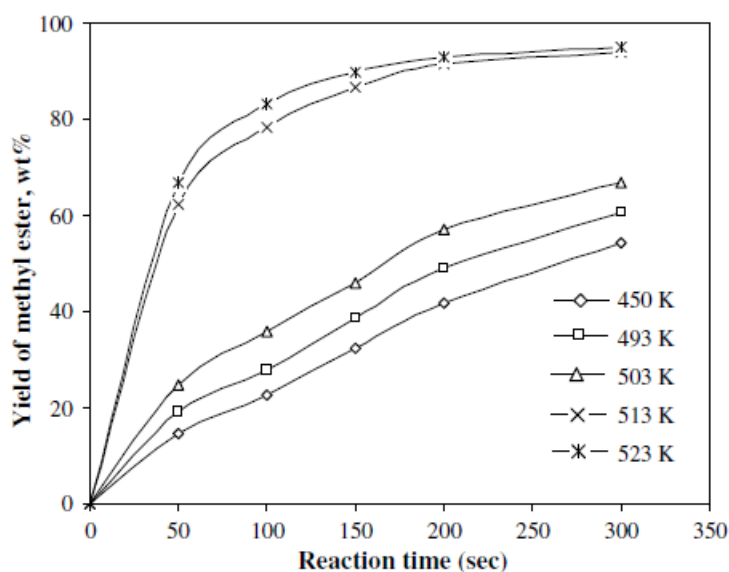
- *Επίδραση μοριακής αναλογίας*

Η απόδοση σε αλκυλεστέρες αυξάνεται, όταν η μοριακή αναλογία ελαίου-αλκοόλης αυξάνεται. Η στοιχειομετρική αναλογία για την αντίδραση της μετεστεροποίησης απαιτεί 3 mol αλκοόλης και 1 mol τριγλυκεριδίου προς απόδοση 3 mol εστέρα του λιπαρού οξέος και 1 mol γλυκερόλης. Έχουν παρουσιαστεί διάφορες απόψεις πάνω στις βέλτιστες μοριακές αναλογίες για την όξινη και αλκαλική κατάλυση μετεστεροποίησης. Για παράδειγμα κάποιοι επιστήμονες θεωρούν βέλτιστη τη 18:1 μοριακή αναλογία ενώ άλλοι την 6:1 μοριακή αναλογία για τη όξινη

κατάλυση. Αντίστοιχα, ισχύει και για την αλκαλική κατάλυση με 6:1 και 12:1 αναλογία. Οι υψηλότερες μοριακές αναλογίες οδηγούν σε μεγαλύτερη παραγωγή εστέρα και σε μικρότερο χρόνο.

- *Επίδραση θερμοκρασίας*

Έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση της θερμοκρασίας της αντίδρασης, ιδιαίτερα στις υπερκρίσιμες συνθήκες, επηρεάζει θετικά την απόδοση σε εστέρες. Στην αλκαλική μετεστεροποίηση η θερμοκρασία παραμένει μεταξύ 318-338 K. Το σημείο βρασμού της μεθανόλης είναι 337.9 K. Μια υψηλότερη θερμοκρασία από αυτή, θα κάψει την αλκοόλη και θα οδηγηθούμε σε πολύ μικρές αποδόσεις. Σύμφωνα με έρευνες, οι θερμοκρασίες άνω των 323 K μειώνουν την απόδοση για τα μη χρησιμοποιημένα έλαια αλλά την αυξάνουν στα απόβλητα έλαια με μεγαλύτερο ιξώδες. Στο παρακάτω σχήμα 27 φαίνεται η σχέση της θερμοκρασίας με το χρόνο αντίδρασης. Παρατηρείται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας αντίδρασης, ειδικά στις υπερκρίσιμες θερμοκρασίες έχει θετικό αποτέλεσμα στη μετατροπή εστέρων [13].

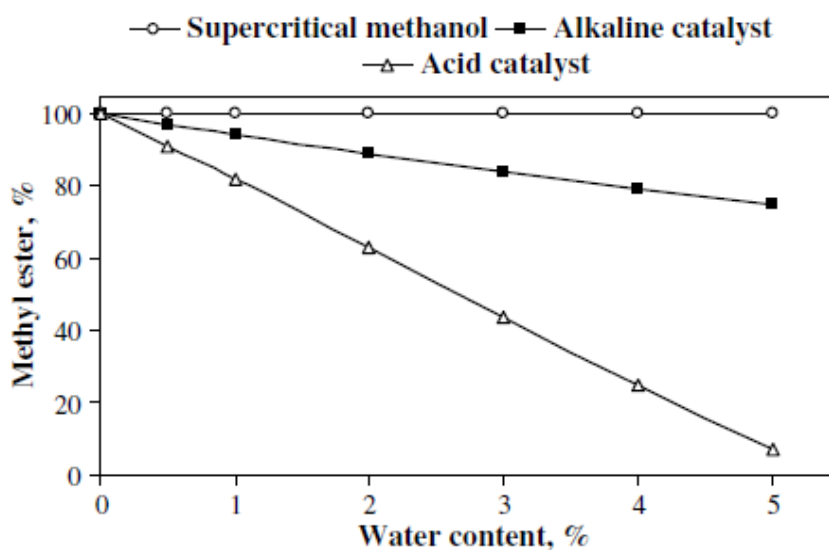


Σχήμα 27: Αλλαγές στα ποσοστά απόδοσης μεθυλεστέρων όταν επεξεργάζονται με υπερκρίσιμη και υποκρίσιμη μεθανόλη σε διαφορετικές θερμοκρασίες συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης. Η μοριακή αναλογία ελαίου:μεθανόλης: 1:41. Έλαιο: huzelnut kernel oil (A.Demirbas, Energy conversion and management σελ.23)

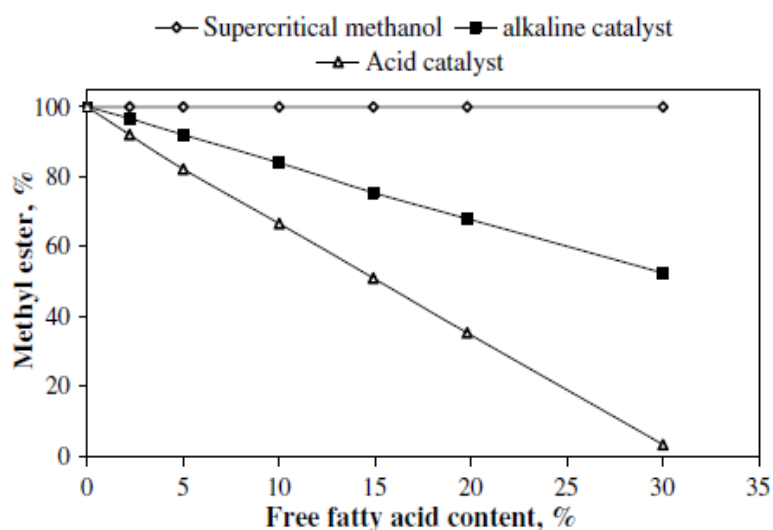


- Επίδραση της περιεκτικότητας σε νερό και σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) στην απόδοση βιοντίζελ

Η περιεκτικότητα σε νερό είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη συμβατική καταλυτική μετεστεροποίηση φυτικών ελαίων. Στη συμβατική μετεστεροποίηση λιπών και ελαίων για παραγωγή βιοντίζελ, τα FFA και το νερό έχουν αρνητικές επιδράσεις εφόσον η παρουσία τους προκαλεί το σχηματισμό σαπώνων, κατανάλωση του καταλύτη και μείωση της καταλυτικής του απόδοσης. Το νερό θεωρείται ότι μπορεί να προκαλέσει χειρότερες επιπτώσεις από ότι τα FFA και για αυτό όλα τα συστατικά της αντίδρασης, δεν θα πρέπει να περιέχουν νερό. Όταν η μεθανόλη αντικατασταθεί με υπερκρίσιμη μεθανόλη η παρουσία νερού έχει θετική επίδραση. Στη μετεστεροποίηση με λιπάσες η παρουσία νερού δεν έχει καμία σχεδόν επίδραση. Στα παρακάτω σχήματα 28,29 φαίνονται οι αποδόσεις των μεθυλεστέρων μέσω μετεστεροποίησης τριγλυκεριδίων συνάρτηση της περιεκτικότητας του νερού και συνάρτηση της περιεκτικότητας σε FFA [13].



Εικόνα 28 : Απόδοση μεθυλεστέρων συνάρτηση περιεκτικότητας νερού στη μετεστεροποίηση τριγλυκεριδίων (A.Demirbas, *Energy conversion and management* σελ.24)



Εικόνα 29: Απόδοση μεθυλεστέρων συνάρτηση περιεκτικότητας FFA στη μετεστεροποίηση τριγλυκεριδίων (A.Demirbas, *Energy conversion and management* σελ.24)

### **Κεφάλαιο 3: Ο Ρόλος των μικροοργανισμών στο βιοντίζελ**

#### **3.1 Εισαγωγή**

Στην Νοτιοανατολική Ασία, Ευρώπη, Ηνωμένα Έθνη και Κίνα το φοινικέλαιο, το έλαιο από ελαιοκράμβη, η διαγονιδιακή σόγια και άλλα απόβλητα έλαια χρησιμοποιούνται για να παράξουν βιοντίζελ. Ωστόσο, τα φυτά για την παραγωγή ελαίων απαιτούν ενέργεια και έκταση ώστε να είναι επαρκής η ποσότητα ελαίου που παράγεται. Παρομοίως και για τα ζωικά λίπη, τα ζώα απαιτούν τροφή. Παρόλα τα θετικά που θα μπορούσε να προσφέρει η εμπορευματοποίηση των παραπάνω, από οικονομικής άποψης το κόστος του βιοντίζελ, παραγόμενο με αυτό τον τρόπο, είναι αρκετά υψηλό, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η παραγωγή του. Εάν τα φυσικά έλαια χρησιμοποιούνταν για τη παραγωγή βιοντίζελ το κόστος της πρώτης ύλης θα καταλάμβανε το 70-85% όλου του κόστους παραγωγής. Συνεπώς, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, θα πρέπει να γίνει περαιτέρω έρευνα ώστε να μειωθεί το κόστος του βιοντίζελ. Μια πιθανή εναλλακτική λύση που ερευνάται είναι οι μικροοργανισμοί.

#### **3.2 Μικροοργανισμοί διαθέσιμοι για το βιοντίζελ**

Για να θεωρηθεί ένα εναλλακτικό καύσιμο υποκατάστατο των ορυκτών καυσίμων πρέπει να παρέχει περιβαλλοντικά οφέλη, να συναγωνίζεται οικονομικώς τα ορυκτά καύσιμα, να παράγεται σε επαρκείς ποσότητες ώστε να καλύπτει τις ενεργειακές ανάγκες και κυρίως, να

παρέχει ενεργειακό κέρδος με βάση τις ενεργειακές πηγές από τις οποίες προήλθε. Οι ελαιούχοι μικροοργανισμοί (oleaginous microorganisms) ορίζονται ως οι μικροοργανισμοί οι οποίοι περιέχουν μικροβιακά λιπίδια σε ποσοστό πάνω από 20%. Η παραγωγή βιοντίζελ που χρησιμοποιεί μικροβιακά λιπίδια έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Τα έλαια αυτά αναφέρονται ως (βιοτεχνολογικά) έλαια παραγόμενα από μονοκύτταρους οργανισμούς (Single cell oil, SCO). Αν και υπάρχουν πολλά είδη μικροοργανισμών που παράγουν έλαια όπως μικροφύκη, βακτήρια, μύκητες και ζύμες δεν είναι όλα αυτά κατάλληλα για τη παραγωγή βιοντίζελ (Πίνακας 24).

Πίνακας 24 : Η περιεκτικότητα σε έλαιο κάποιων μικροοργανισμών (X.Meng, Renewable energy, σελ.2)

| Microorganisms                     | Oil content (% dry wt) | Microorganisms                | Oil content (% dry wt) |
|------------------------------------|------------------------|-------------------------------|------------------------|
| <b>Microalgae</b>                  |                        | <b>Yeast</b>                  |                        |
| <i>Botryococcus braunii</i>        | 25–75                  | <i>Candida curvata</i>        | 58                     |
| <i>Cylindrotheca</i> sp.           | 16–37                  | <i>Cryptococcus albidus</i>   | 65                     |
| <i>Nitzschia</i> sp.               | 45–47                  | <i>Lipomyces starkeyi</i>     | 64                     |
| <i>Schizochytrium</i> sp.          | 50–77                  | <i>Rhodotorula glutinis</i>   | 72                     |
| <b>Bacterium</b>                   |                        | <b>Fungi</b>                  |                        |
| <i>Arthrobacter</i> sp.            | >40                    | <i>Aspergillus oryzae</i>     | 57                     |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | 27–38                  | <i>Mortierella isabellina</i> | 86                     |
| <i>Rhodococcus opacus</i>          | 24–25                  | <i>Humicola lanuginosa</i>    | 75                     |
| <i>Bacillus alcalophilus</i>       | 18–24                  | <i>Mortierella vinacea</i>    | 66                     |

Έχει αναφερθεί μεγάλος αριθμός ελαιούχων ζυμών και μικροφυκών οι οποίοι αναπτύσσουν και συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες λιπιδίων παρόμοιων με των φυτικών ελαίων, μεθυλεστέρες και σάπωνες χρησιμοποιώντας μόνο άνθρακα και ενέργεια. Τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί ένας μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών που συσσωρεύουν υδρόφοβα λιπίδια, για να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για την παραγωγή SCO και συγκεκριμένα για παραγωγή βιοντίζελ. Στους μικροοργανισμούς ο βαθμός συσσώρευσης λιπιδίων καθορίζεται από τη γενετική δομή. Η μέγιστη περιεκτικότητα σε λιπίδια μπορεί να ποικίλει σε πολύ μεγάλο βαθμό ανάμεσα σε είδη και στελέχη. Ακόμη, ανάλογα με τον μικροοργανισμό και τις συνθήκες καλλιέργειας (θερμοκρασία, pH, χρόνος καλλιέργειας κτλ) η σύνθεση και η περιεκτικότητα στο κάθε έλαιο διαφέρουν. (Πίνακας 25)

Πίνακας 25: Σύσταση σε λιπίδια κάποιων μικροοργανισμών (X.Meng, Renewable energy, σελ.2)

| Microorganisms | Lipid composition (w/total lipid) |       |       |       |       |       |
|----------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                | C16:0                             | C16:1 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | C18:3 |
| Microalga      | 12–21                             | 55–57 | 1–2   | 58–60 | 4–20  | 14–30 |
| Yeast          | 11–37                             | 1–6   | 1–10  | 28–66 | 3–24  | 1–3   |
| Fungi          | 7–23                              | 1–6   | 2–6   | 19–81 | 8–40  | 4–42  |
| Bacterium      | 8–10                              | 10–11 | 11–12 | 25–28 | 14–17 | –     |

Τα μικροφύκη είναι «εργοστάσια» τα οποία με το φως μετατρέπουν το CO<sub>2</sub> σε εν δυνάμει βιοκαύσιμο. Επίσης μπορούν να παρέχουν διάφορους τύπους ανανεώσιμων βιοκαυσίμων συμπεριλαμβανομένου μεθάνιο, που παράγεται με αναερόβια χώνεψη των μικροφυκών, βιοντίζελ και φωτοβιολογικό βιο-υδρογόνο. Οι μελέτες έδειξαν ότι οι βιομάζες των φυκών είναι πλούσιες σε ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα και αμινοξέα. Το έλαιο που συσσωρεύεται στα μικροφύκη είναι κυρίως τριγλυκερίδιο (>80%) με λιπαρά οξέα πλούσια σε C16 και C18, συγκρίσιμο με αυτό των φυτικών ελαίων περιέχοντας στεατικό, ελαϊκό, λινελαϊκό και παλμιτικό οξύ. Τα μικροφύκη αναπτύσσονται εξαιρετικά γρήγορα και κάποια έχουν πολύ μεγάλη περιεκτικότητα σε έλαιο και μπορούν να διπλασιάζουν τη βιομάζα τους σε 24 ώρες. Ο μέσος όρος της περιεκτικότητας σε λιπαρά των κυττάρων των φυκών κυμαίνεται μεταξύ 1-70% αλλά μπορεί να φτάσει και το 90% του ξηρού βάρους κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Θεωρείται μια από τις καλύτερες υποψήφιες πηγές για παραγωγή βιοντίζελ. Βασίζεται πάνω στην αποτελεσματικότητα της φωτοσύνθεσης, στην υψηλή παραγωγή βιομάζας και στη γρήγορη ανάπτυξη συγκριτικά με άλλες ενεργειακές σοδιές.

Αν και τα μικροφύκη είναι μικροοργανισμοί υψηλοί σε λιπίδια, χρειάζονται μεγάλες εκτάσεις για να καλλιεργηθούν και μεγαλύτερο χρόνο ζύμωσης από τα βακτήρια. Σύμφωνα με τον Πίνακα 24 όλα σχεδόν τα βακτήρια συσσωρεύουν λιγότερα λιπίδια από τα μικροφύκη. Ο μέσος όρος περιεκτικότητας του ελαίου είναι περίπου 20-40% της ξηρής βιομάζας, αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι τα *Arthrobacter sp.* και *Acinetobacter calcoaceticus* των οποίων η περιεκτικότητα σε έλαιο είναι 40% και 38% αντίστοιχα. Τα βακτήρια έχουν την υπεροχή στη παραγωγή βιοντίζελ λόγω του υψηλού ρυθμού ανάπτυξης (φτάνουν σε μέγιστη βιομάζα μέσα σε 12-24 ώρες) και τις εύκολες μεθόδους καλλιέργειας. Ως εκ τούτου, μια ακόμα εναλλακτική είναι και τα βακτήρια που αποθηκεύουν και συσσωρεύουν λιπίδια. Συγκεκριμένα, τα βακτήρια της ομάδας του ακτινομύκητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν καθώς, είναι ικανά στο να συνθέτουν ιδιαίτερα υψηλά ποσά λιπαρών οξέων (μέχρι και περίπου 70% του βάρους του κυττάρου) από απλές πηγές άνθρακα, όπως γλυκόζη, κάτω από περιοριστικές συνθήκες ανάπτυξης και να συσσωρεύουν εσωκυτταρικά τριγλυκερίδια. Σε γενικές γραμμές όμως τα περισσότερα βακτήρια δεν είναι παραγωγοί ελαίων. Μόνο ένας μικρός αριθμός συσσωρεύει περίπλοκα λιποειδή. Επιπροσθέτως, είναι δύσκολο να εκχυλισθούν γιατί αυτά τα λιποειδή παράγονται στην εξωτερική μεμβράνη και έτσι η βιομηχανική αξία των βακτηριδίων ως πρώτη ύλη μειώνεται.

Οι ζύμες και οι μύκητες (ειδικά οι ευρωτομύκητες) θεωρούνται ως οι πιο ευνοϊκοί ελαιούχοι μικροοργανισμοί από την δεκαετία του '80. Κάποια στελέχη ζυμών όπως *Rhodospiridium sp.*, *Rhodotorula sp.* και *Lipomyces sp.* μπορούν να συσσωρεύσουν εσωκυτταρικά λιπίδια εως και

70% του ξηρού βάρους της βιομάζας τους. Η πιο αποτελεσματική ελαιούχα ζύμη *Cryptococcus curvatus* που μπορεί να συσσωρεύσει λιπίδια >60% επί ξηρό βάρος ειδικά όταν αναπτύσσεται υπό συνθήκες περιορισμένου αζώτου. Αυτά τα λιπίδια συνήθως αποτελούνται από 90% w/w τριγλυκερίδια με ένα ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων (%SFA: saturated fatty acids) περίπου 44%, το οποίο είναι παρόμοιο με έλαια προερχόμενα από φυτά. Οι ελαιούχες ζύμες και οι ευρωτομύκητες συσσωρεύουν τριγλυκερίδια πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ή έχουν συγκεκριμένη δομή, κατά κάποιο τρόπο περιορισμένη: τα ελαϊκό (18:1) και λινοελαϊκό (18:2) οξέα, μαζί με παλμιτικό (16:0) ή παλμιτελαϊκό (16:1) οξύ είναι τα πιο συχνά εμφανιζόμενα λιπαρά οξέα. Για παράδειγμα, το *Rhodospiridium toruloides* Y4 περιέχει κυρίως μακριές αλυσίδες λιπαρών οξέων με 16 και 18 άτομα άνθρακα και είναι γνωστός παραγωγός μικροβιακών λιπιδίων. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι μπορεί να φτάσει σε ξηρή βιομάζα και κυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων 151.5 g/l και 48.0% (w/w) αντίστοιχα, σε διαλείποντος έργου καλλιέργειες μέσα σε διάστημα 25 ημερών. Και άλλοι μικροοργανισμοί έχουν αποδώσει ικανοποιητικά νούμερα και με βάση αυτά, είναι λογικό οι ζύμες και οι μύκητες να αποτελούν εναλλακτική πηγή ελαίου για την παραγωγή βιοντίζελ. [24]

### 3.3 Ελαιούχοι μύκητες

Η συσσώρευση τριγλυκεριδίων ως ενεργειακό απόθεμα είναι συνήθης σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπως μύκητες, φυτά και ζώα, ενώ σπάνια εμφανίζεται σε βακτήρια. Ανάμεσα στους ετερότροφους μικροοργανισμούς οι ελαιούχοι μύκητες συμπεριλαμβανομένου ευρωτομύκητες (moulds) και ζύμες, έχουν διακριθεί για την παραγωγικότητά τους σε TAG.

Κάποια είδη ζυμών και νηματοειδών μυκήτων (filamentous fungi) θεωρούνται ελαιούχοι εφόσον έχουν την ικανότητα να συνθέτουν και να συσσωρεύουν υψηλά ποσά TAG που ξεπερνούν το 70% του βάρους της βιομάζας τους. Αυτά τα λιπίδια έχουν παρόμοια σύσταση και ενεργειακή αξία με τα έλαια προερχόμενα από φυτά και ζώα αλλά αδυνατούν να χρησιμοποιηθούν ως εδωδιμα συστατικά. Επίσης, τα έλαια που παράγονται από μύκητες πλεονεκτούν στο ότι έχουν μικρό κύκλο διεργασιών και η παραγωγή τους δεν επηρεάζεται από τις διακυμάνσεις του καιρού.

Η ικανότητα των μυκήτων να συσσωρεύουν λιπίδια είναι γνωστή από την δεκαετία του '70 αλλά μόνο τα τελευταία χρόνια έχει στραφεί η προσοχή στην εκμετάλλευσή τους για παραγωγή βιοντίζελ. Οι ζύμες βρίσκονται παντού τόσο στο έδαφος όσο και στο υδάτινο περιβάλλον. Μπορούν και δημιουργούν αποικίες ακόμα και σε ακραίες περιβαλλοντικές

συνθήκες όπως σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου. Υπάρχουν περίπου 1500 είδη ζυμών που έχουν καταγραφεί μέχρι στιγμής. Τα περισσότερα από αυτά είναι ωφέλιμα για τον άνθρωπο ενώ ένας μικρός αριθμός είναι παθογηνής. Από όλα αυτά τα είδη ζυμών μόνο 30 είναι αυτά τα οποία μπορούν και συσσωρεύουν πάνω από 25% του ξηρού βάρους σε λιπίδια. Οι ελαιούχες ζύμες πάνω στις οποίες έχει γίνει η μεγαλύτερη έρευνα ανήκουν στο γένος *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus* και *Lipomyces*. Το *Yarrowia lipolytica* είναι ένας καλός παραγωγός για SCO. Τα *yarrowia* μπορούν και αποσυνθέτουν υδρόφοβα υποστρώματα όπως παραφίνες και έλαια πολύ αποτελεσματικά και αυτό το χαρακτηριστικό παρακίνησε τους επιστήμονες να ερευνήσουν τις βιοτεχνολογικές τους εφαρμογές. Παρόλο που το *Y. Lipolytica* είναι μακρινός συγγενής της συμβατικής ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, το γονιδίωμά του παρουσιάζει κάποιες επιπλέον οικογένειες πρωτεϊνών και γονιδίων που εμπλέκονται στη χρήση του υδρόφοβου υποστρώματος. Οι άγριοι τύποι του είδους αυτού συσσωρεύουν το 38% του ξηρού βάρους τους σε λιπίδια. Αν και το ποσοστό αυτό είναι αρκετά χαμηλότερο από άλλα είδη ελαιούχων ζυμών, ο μικροοργανισμός αυτός χρησιμοποιείται γιατί μπορεί να υποβληθεί σε γενετικές και μεταβολικές τροποποιήσεις, καθώς έχουν αναπτυχθεί αξιόπιστα και ευέλικτα συστήματα για την αποκοπή, κλωνοποίηση και έκφραση των γονιδίων-στόχων.

Άλλοι μικροοργανισμοί με ενδιαφέρον για SCO είναι από το γένος *Candida*, το *Candida curvata*. Ο μικροοργανισμός αυτός συνθέτει και αποθηκεύει σημαντικό ποσό λιπιδίων. Επίσης, το *Lipomyces spp.* παρουσιάζει μια ιδιαίτερη τάση για συσσώρευση TAG. Συγκεκριμένα το *Lipomyces starkeyi* έχει την ικανότητα να συσσωρεύει λιπίδια πάνω από το 70% τη κυτταρικής του βιομάζας υπό ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας και χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ξυλόζη, αιθανόλη και L-αραβινόζη ή καταναλώνοντας μίγμα γλυκόζης και ξυλόζης καθώς και άλλα απόβλητα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για βιομηχανική εφαρμογή έχει η ζύμη *Cryptococcus curvatus*. Η ζύμη αυτή μπορεί να αναπτυχθεί και να συσσωρεύσει έλαιο με χρήση μεγάλου εύρους υποστρώματος. Απαιτεί μικρό ποσό θρεπτικών συστατικών και συσσωρεύει εσωκυτταρικά λιπίδια πάνω από το 60% του κυτταρικού ξηρού βάρους. Άλλες ελαιούχες ζύμες είναι αυτές που ανήκουν στο γένος *Rhodospiridium* και *Rhodotorula*. Το μεσόφιλο *Rhodotorula glutinis* μπορεί να συνθέτει και να αποθηκεύει λιπίδια καθώς και να αναπτύσσεται σε γλυκερόλη. Το ψυχρόφιλο είδος *Rhodotorula glacialis* μπορεί να συσσωρεύει λιπίδια σε εύρος θερμοκρασιών -3 με 20°C. Τα *Rhodospiridium* μπορούν και πραγματοποιούν έναν αριθμό διαφορετικών αντιδράσεων, παραδείγματος χάριν αποικοδόμηση εποξειδίων, αλλά αυτό που έχει βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον είναι η ικανότητά τους να μετατρέπουν τη γλυκερόλη και τα λιγνοκυτταρικά απόβλητα σε λιπίδια.

Η εκμετάλλευση των ελαιούχων νηματοειδών μυκήτων για παραγωγή βιοντίζελ ξεκίνησε από μελέτες που αφορούσαν την παραγωγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Ένας βασικός παραγωγός λιπιδίων είναι το *Mucor circinelloides* ο οποίος είναι ένας ευκαιριακά παθογόνος μικροοργανισμός. Ο μικροοργανισμός αυτός έχει χρησιμοποιηθεί για τη πρώτη εμπορική παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Η συσσώρευση των λιπιδίων στον μικροοργανισμό αυτό έχει μελετηθεί διεξοδικά και τα παραγόμενα TAG έχουν προταθεί ως πρώτη ύλη για την άμεση μετατροπή των λιπιδίων του [56] .

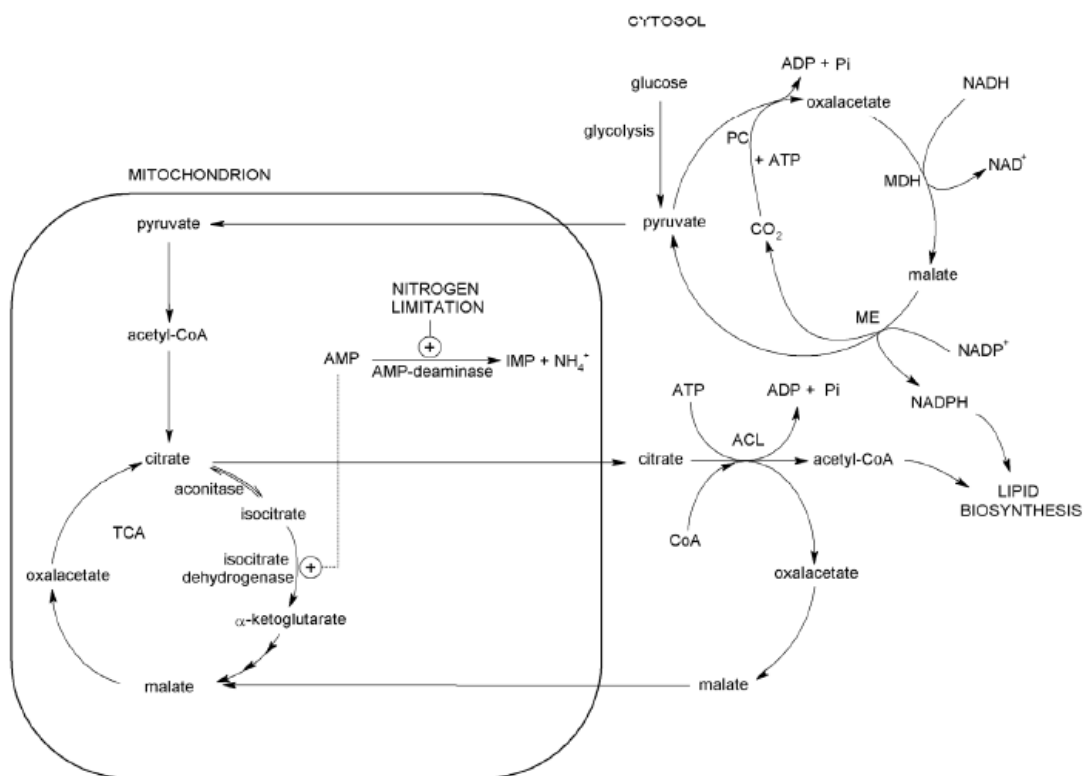
### **3.3.1 Βιοχημεία συσσώρευσης λιπιδίων**

Η συσσώρευση λιπιδίων στις ελαιούχες ζύμες και στους ευρωτομύκητες συμβαίνει όταν ένα θρεπτικό συστατικό του μέσου ανάπτυξης (π.χ. πηγή αζώτου ή φωσφόρου) περιορίζεται ενώ η πηγή άνθρακα βρίσκεται σε περίσσεια ποσότητα. Ο περιορισμός του αζώτου είναι η πιο αποτελεσματική συνθήκη για την πρόκληση λιπογένεσης. Κατά τη φάση ανάπτυξης, το άζωτο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων ενώ ο άνθρακας διανέμεται ανάμεσα σε αναβολικές και ενεργειακές εργασίες αποδίδοντας υδαάνθρακες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες. Όταν το άζωτο περιορίζεται, ο ρυθμός ανάπτυξης επιβραδύνεται και η σύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων τείνει να διακοπεί. Στους μη-ελαιούχους μικροοργανισμούς η περίσσεια άνθρακα παραμένει ανεκμετάλλευτη ή μετατρέπεται σε πολυσακχαρίτες που αποθηκεύονται. Τα ελαιούχα είδη συνήθως συντονίζονται προς τη σύνθεση λιπιδίων οδηγώντας στη συσσώρευση των TAG σε εσωκυτταρικά λιπαρά σώματα. Το βιοχημικό μονοπάτι για τη βιοσύνθεση λιπιδίων δεν διαφέρει πολύ ανάμεσα στους ευκαρυωτές μικροοργανισμούς και δεν διαφέρει ούτε στους ελαιούχους και μη ελαιούχους μύκητες. Η ικανότητα στο να συσσωρεύουν υψηλά ποσά λιπιδίων εξαρτάται κυρίως από τη ρύθμιση του βιοσυνθετικού μονοπατιού και την παροχή πρόδρομων μορίων (πχ. ακετυλο-CoA) και του συμπαραγόντα NADPH. Οι περισσότερες πληροφορίες προέρχονται από τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* η οποία δεν συσσωρεύει λίπη και το *Yarrowia lipolytica* που αναπαριστά κύτταρο-μοντέλο για παραγωγή βιο-ελαίου και είναι κατάλληλο για γενετικούς χειρισμούς.

### **3.3.2 Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων στους μύκητες**

Η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων απαιτεί συνεχή εφοδιασμό ακετυλο-CoA ως αρχική βιοσυνθετική μονάδα και μηλονυλο-CoA ως μονάδα επιμήκυνσης προσδίδοντας κάθε φορά 2

άτομα άνθρακα σε κάθε βήμα. Οι μη ελαιούχες ζύμες χρησιμοποιούν το ακετυλο-CoA που προέρχεται από τη γλυκόλυση. Στις ελαιούχες ζύμες το ακετυλο-CoA προέρχεται κυρίως με τη διάσπαση του κιτρικού στο κυτοσόλιο το οποίο συσσωρεύεται εξαιτίας του περιορισμού του αζώτου (σχήμα 30). Στη πραγματικότητα η συσσώρευση λιπιδίων από ελαιούχους μύκητες δεν πραγματοποιείται υπο ισορροπημένη παροχή θρεπτικών συστατικών. Στις ελαιούχες ζύμες ο περιορισμός αζώτου ενεργοποιεί τη AMP απαμινάση η οποία εφοδιάζει με αμμώνιο (ammonium) το κύτταρο. Αυτό έχει ως συνέπεια να μειωθεί η μιτοχονδριακή συγκέντρωση της AMP προκαλώντας την πτώση της δραστηριότητας της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης. Ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος τότε εμποδίζεται και περίσσεια κιτρικού συσσωρεύεται και εξέρχεται από το μιτοχόνδριο. Η κυτοσολική ATP κιτρική λύαση (ACL) διασπά το κιτρικό προς οξαλοξικό και ακετυλο-CoA (Σχήμα 30). Η ACL είναι από ένζυμα-κλειδιά που συνεισφέρουν στον ελαιούχο χαρακτηρισμό των ζυμών ενώ η δραστηριότητά του είναι αμελητέα στα μη ελαιούχα είδη. Ένα ακόμα ένζυμο-κλειδί στη de novo σύνθεση λιπαρών οξέων είναι η ACC (ακετυλο-CoA καρβοξυλάση) η οποία καταλύει την αντίδραση σχηματισμού του μηλονυλο-CoA από το ακετυλο-CoA.



Εικόνα 30 : Βιοσύνθεση λιπιδίων από περίσσεια κιτρικού εξαιτίας περιορισμού του αζώτου (M.Rossi, *Biodiesel feedstocks and processing technologies*, σελ.76)

Επίσης, απαιτείται μεγάλη ποσότητα κυτοσολικού NADPH κατά τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων. Οι βασικές πηγές κυτοσολικού NADPH είναι το μονοπάτι φωσφοριλιωμένων



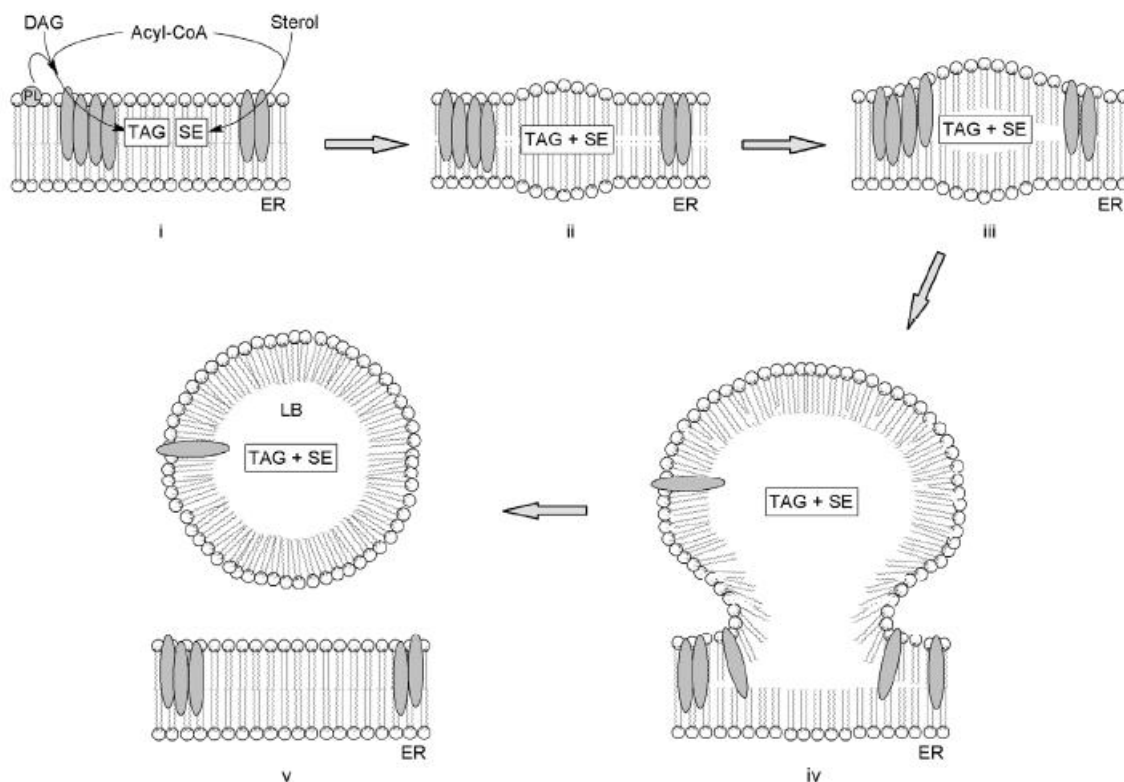
πεντοζών (pentose phosphate) και ο κύκλος των τρανσυδρογονασών, τα οποία τροποποιούν το NADH σε NADPH μέσω μιας σειράς αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν η καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, η μηλική αφυδρογονάση (malate dehydrogenase, MDH) και το μηλικό ένζυμο (malic enzyme ME). Το μηλικό ένζυμο έχει βρεθεί σε διάφορους ελαιούχους μύκητες και θεωρείται ως το ένζυμο-κλειδί που σχετίζεται με τη συσσώρευση λιπιδίων. Στο *Mortierella circinelloides* η υπερέκφραση του ME ενίσχυσε τη συσσώρευση λιπιδίων ενώ, η υπερέκφραση του αντίστοιχου γονιδίου στο *Yarrowia lipolytica* δεν οδήγησε σε καμία βελτίωση. Τα τελικά προϊόντα βιοσύνθεσης λιπιδίων είναι το μυριστικό οξύ (C14:0) και το παλμιτικό οξύ (C16:0) ανάλογα με το είδος της ζύμης. Η επιπλέον επιμήκυνση ή σχηματισμός ακόρεστων δεσμών λαμβάνει μέρος στο ενδοπλασματικό δίκτυο με τη βοήθεια άλλων ενζύμων.

### 3.3.3 Βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων και βιογένεση λιπαρών σωμάτων

Τα λιπαρά ακυλο-CoA που παράγονται με de novo σύνθεση εστεροποιούνται με γλυκερόλη ή στερόλη προς σχηματισμό τριγλυκεριδίων και στερυλεστέρων (SE) αντιστοίχως. Στους ελαιούχους μύκητες τα ουδέτερα λιπίδια TAG και SE αποθηκεύονται μέσα σε λιπαρά σώματα (lipid bodies, LB). Περισσότερες λεπτομέρειες πάνω στη βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων σε μικροοργανισμούς θα αναφερθούν στα επόμενα κεφάλαια.

Στους ευκαριωτές τα ουδέτερα λιπίδια αποθηκεύονται σε ειδικά διαμερίσματα γνωστά ως λιπαρά σώματα (lipid bodies, LB). Συγκεντρώνονται σε ειδικές υποπεριοχές του ενδοπλασματικού δικτύου όπου βρίσκονται τα βιοσυνθετικά ένζυμα και οι δομικές πρωτεΐνες. Τα ουδέτερα λιπίδια δεν «ταιριάζουν» ανάμεσα στα φωσφολιπίδια και ως εκ τούτου εναποτίθενται ανάμεσα στη διπλοστοιβάδα της μεμβράνης. Παρόλα αυτά, σημαντικά ποσά ουδέτερων λιπιδίων δεν μπορούν να ενσωματωθούν στη διπλοστοιβάδα της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου, με αποτέλεσμα η συνεχής σύνθεση ουδέτερων λιπιδίων να οδηγεί σε σχηματισμό έγκλιστων (bud) τα οποία ελευθερώνονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο όταν τα λιπαρά σώματα φτάσουν ένα κρίσιμο μέγεθος. (Σχήμα 31)

Στις περισσότερες ελαιούχες ζύμες τα ουδέτερα λιπίδια των λιπαρών σωμάτων κυρίως αποτελούνται από TAG (πάνω από 90%) ενώ ένα μικρό ποσό είναι οι στερυλεστέρες. Στο *Y.lipolytica* έχει βρεθεί μια σημαντική ποσότητα ελεύθερων λιπαρών οξέων στο λιπαρό σώμα. Το *S. cerevisiae* συσσωρεύει λιγότερο από το 15% λιπιδίων της βιομάζας του και το λιπαρό σώμα περιέχει παρόμοιες ποσότητες TAG και SE.



Σχήμα 31: Μοντέλο βιογένεσης λιπαρών σωμάτων στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. TAG και SE συσσωρεύονται μεταξύ των διπλοστοιβάδων των φωσφολιπιδίων. (i-iv) δημιουργία λιπαρού σώματος (v) λιπαρό σώμα (M.Rossi, *Biodiesel feedstocks and processing technologies*, σελ.79)

Ο πυρήνας των λιπαρών σωμάτων αποτελείται από ουδέτερα λιπίδια που περιβάλλονται από μια στοιβάδα φωσφολιπιδίων και μερικές ενσωματωμένες πρωτεΐνες οι οποίες ασκούν ρόλο-κλειδί στο μεταβολισμό λιπιδίων, στη βιοσύνθεση και στη μετακίνηση υποστρώματος. Η αποδόμηση του προϊόντος αυτού εξυπηρετεί ως ενεργειακή πηγή ή/και ως δομική μονάδα για το σχηματισμό μεμβρανών. Πιο συγκεκριμένα, τα λιπαρά οξέα που προέρχονται από την υδρόλυση των TAG ή SE είτε υπόκεινται σε β-οξειδωση είτε σε βιοσύνθεση φωσφολιπιδίων.

### 3.3.4 Μεταβολική μηχανική στους ελαιούχους μύκητες

Η διαθεσιμότητα γονιδιακών δεδομένων και εργαλείων της γενετικής καθώς και η πιθανότητα να ενσωματωθούν ομόλογα και ετερόλογα γονίδια, έχει ανοίξει το δρόμο στη χρήση της μεταβολικής μηχανικής ώστε να κατανοηθούν οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη συσσώρευση των λιπιδίων και στην αύξηση της απόδοσης των συσσωρευμένων λιπιδίων στο *S. cerevisiae* και *Y. lipolytica*. Το *S. cerevisiae* έχει χρησιμοποιηθεί πιο πολύ ως μοντέλο για την έρευνα του μεταβολισμού των λιπιδίων, ενώ στο *Y. Lipolytica* έγιναν διάφορες προσπάθειες για να κατευθυνθεί η ροή του άνθρακα προς παραγωγή και συσσώρευση TAG.

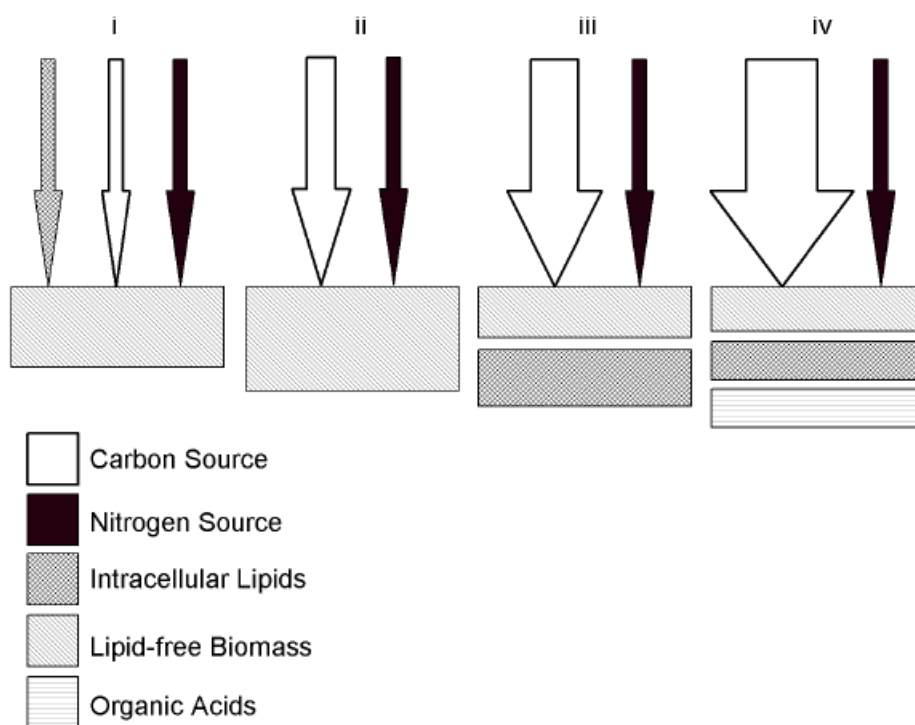
Παρόμοιες προσπάθειες δεν έχουν γίνει σε άλλους ελαιούχους μύκητες διότι υπάρχει έλλειψη γενετικών πληροφοριών και απαραίτητων εργαλείων για τον χειρισμό των γονιδίων και τη βελτίωση των στελεχών.

Οι επιστήμονες κατάφεραν μέσω υπερέκφρασης γονιδίων-στόχων και διαγραφής γονιδίων που εμπλέκονται σε ανταγωνιστικές οδούς για τη βιοσύνθεση και συσσώρευση των TAG, πχ. γονίδια που σχετίζονται με τη β-οξειδωση, να φτάσει το ποσοστό των λιπιδίων σε ξηρή βιομάζα στο *Y. Lipolytica* το 65%.

### 3.3.5 Επιπτώσεις των συνθηκών καλλιέργειας στις ελαιούχες ζύμες

Η συσσώρευση λιπιδίων στους ελαιούχους μικροοργανισμούς εξαρτάται κυρίως από τις συνθήκες περιορισμού όταν υπάρχει περίσσεια άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας. Ο περιορισμός θρεπτικών συστατικών εμποδίζει την κυτταρική παραγωγή και τον άνθρακα τον μετατρέπει σε TAG και τον αποθηκεύει. Έχουν δημοσιευθεί μελέτες που αναφέρουν πως ο περιορισμός φωσφόρου, μαγνησίου, ψευδαργύρου και σιδήρου οδηγούν σε συσσώρευση λιπιδίων στα μοντέλα ελαιούχων μικροοργανισμών. Όμως ο περιορισμός το αζώτου, είναι ο πιο αποτελεσματικός στη λιπογένεση και οδηγεί σε υψηλότερες τιμές μετατροπής υποστρώματος/λιπιδίου και περιεκτικότητα λιπιδίου στη βιομάζα. Έτσι ο περιορισμός αζώτου είναι ο πιο συνηθισμένος στους ελαιούχους μύκητες και η αναλογία άνθρακα-αζώτου (C/N) είναι καθοριστική για την παραγωγή λιπιδίων.

Διάφορες μελέτες έχουν εστιάσει στο καθορισμό της βέλτιστης σύστασης στο μέσο καλλιέργειας για ελαιούχους μύκητες με σκοπό την βελτίωση της απόδοσης της παραγωγής λιπιδίων. Το αποτέλεσμα που έχει η αναλογία C/N στο μεταβολισμό του λιπιδίου έχει ερευνηθεί για έναν αριθμό ελαιούχων ζυμών και ευρωτομυκητών όπως το *Y. Lipolytica* και για πολλά άλλα ελαιούχα είδη όπως *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Mortierella* και κάποια από αυτά έχουν μοντελοποιηθεί μαθηματικά. Οι περισσότερες πληροφορίες έχουν συλλεχθεί για το *Y. Lipolytica* για αυτό και ο μύκητας αυτός χρησιμοποιείται ως οργανισμός-μοντέλο για τη μικροβιακή παραγωγή ελαίου και τα χαρακτηριστικά του μεταβολισμού μπορούν να περιγράψουν μια γενική απόκριση της C/N αναλογίας στη πλειοψηφεία των ελαιούχων ζυμών. Με την αύξηση της C/N αναλογίας, παρατηρήθηκαν διάφορες μεταβολικές συμπεριφορές στο *Y. Lipolytica*: (i) ανάπτυξη με κινητοποίηση των αποθηκευμένων λιπιδίων (ii) ανάπτυξη βιομάζας, όχι λιπαρής φύσης (iii) ανάπτυξη και συσσώρευση λιπιδίων (iv) ανάπτυξη με συσσώρευση λιπιδίων και παραγωγή οργανικών οξέων. (Σχήμα 32)



Σχήμα 32: Μεταβολική δραστηριότητα των ελαιούχων μυκήτων για μεταβλητό ρυθμό ροής του άνθρακα και για σταθερό ρυθμό ροής αζώτου. Τα βέλη υποδείχνουν την κατανάλωση του αζώτου και του άνθρακα από τα κύτταρα, τα τετράγωνα υποδείχνουν το ρυθμό παραγωγής. Οι διαστάσεις των τετραγώνων και των βέλων είναι ανάλογα με τη ροή (M. Rossi, *Biodiesel feedstocks and processing technologies*, σελ. 81)

Εάν ο άνθρακας στο μέσο είναι περιορισμένος ή η εξωκυτταρική παροχή άνθρακα εξαντληθεί τα λιπίδια που έχουν αποθηκευτεί εσωκυτταρικά μπορεί να κινητοποιηθούν και να χρησιμοποιηθούν από τους ελαιούχους μικροοργανισμούς για να διατηρήσουν τον κυτταρικό τους πολλαπλασιασμό και να παράξουν μη λιπαρή βιομάζα (Σχήμα 32(i)). Εάν το μέσο ανάπτυξης είναι ισορροπημένο ή παρέχονται οι σωστές ποσότητες άνθρακα ώστε να ικανοποιούνται οι ανάγκες ανάπτυξης, τότε η ανάπτυξη γίνεται ισορροπημένα χωρίς συσσώρευση και αποθήκευση λιπιδίων (Σχήμα 32(ii)). Σε συνθήκες περίσσειας άνθρακα, ένα μέρος της ροής άνθρακα, το οποίο είναι ανάλογο με τη διαθέσιμη ποσότητα αζώτου, κατευθύνεται προς τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και το υπόλοιπο ποσό άνθρακα κατευθύνεται προς τη παραγωγή και αποθήκευση λιπιδίων (Σχήμα 32(iii)). Σε κάποια ελαιούχα είδη η παρουσία μεγάλου ποσού περίσσειας άνθρακα οδηγεί στη παραγωγή σημαντικών ποσών οργανικών οξέων, όπως πυροσταφυλικό οξύ και άλλα ενδιάμεσα του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος, εις βάρος της συσσώρευσης λιπιδίων (Σχήμα 32 iv)

### 3.3.6 Υποστρώματα και πρώτες ύλες

Η απαίτηση για οικονομική παραγωγή βιοκαυσίμων είναι ιδιαίτερα έντονη. Γίνονται προσπάθειες για να αυξηθεί το κέρδος ψάχνοντας τις καταλληλότερες πρώτες ύλες. Για να παραχθεί έλαιο από μικροοργανισμούς η πηγή άνθρακα πρέπει να είναι απαραίτητως οικονομική και διαθέσιμη σε μεγάλες ποσότητες. Συνεπώς, ενώ οι πρώτες έρευνες πάνω στους ελαιούχους μύκητες χρησιμοποιούσαν τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, σήμερα η παραγωγή SCO κυρίως στρέφεται στη τροποποίηση ακατέργαστης ύλης και παραπροϊόντων. Η γλυκόζη χρησιμοποιείται πολύ συχνά ως πηγή άνθρακα στους ελαιούχους μύκητες και η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης αυξάνει τη ροή του άνθρακα που οδηγείται στο σχηματισμό ελεύθερων λιπαρών οξέων και TAG. Ωστόσο όμως, υπάρχουν κάποια είδη ζυμών (πχ. *R.toruloides*) που παρεμποδίζονται από τις υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Άλλες πηγές άνθρακα που έχουν μελετηθεί είναι η ξυλόζη, αραβινόζη, λακτόζη, μαννόζη, μανιτόλη και αιθανόλη. Επίσης, από τις πιο σημαντικές εν δυνάμει πηγές άνθρακα είναι οι προερχόμενες από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα. Διάφορα είδη βιομάζας όπως δασικά και αγροτικά υπολείμματα, αστικά λύματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη λιγνοκυτταρινούχα παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Η υδρόλυση τέτοιων ουσιών έχει το μειονέκτημα ταυτόχρονα παράγονται ανασταλτικές ουσίες όπως οξικό οξύ. Η κυτταρίνη και ημικυτταρίνη υδρολύονται και αφομοιώνονται δύσκολα από τις ζύμες, ενώ μπορούν να αποδομηθούν από νηματοειδής μύκητες.

Σήμερα η παραγωγή λιπιδίων με ελαιούχες ζύμες έχει στοχεύσει στην επιλογή και ανάπτυξη ζυμών που μετατρέπουν τη γλυκερόλη σε λιπίδιο για τη παραγωγή βιοντίζελ εφόσον, αυτή είναι το βασικό παραπροϊόν στη παραγωγή βιοντίζελ. Η βιομετατροπή της γλυκερόλης σε TAG θεωρείται ένας υποσχόμενος τρόπος για να μειωθεί το κόστος παραγωγής βιοντίζελ διαμέσου της επανάχρησης του βασικού παραπροϊόντος. Ένας εν τω βάθει χαρακτηρισμός της συσσώρευσης λιπιδίων με βάση τη γλυκερόλη έχει πραγματοποιηθεί στο *Yarrowia lipolytica*, το οποίο μπορεί και μεταβολίζει αγροτικά και βιομηχανικά παραπροϊόντα όπως η ακατέργαστη γλυκερόλη, παράγοντας μεγάλα ποσά ελαίου και οργανικών οξέων. Η καθαρή γλυκερόλη ενισχύει την ανάπτυξη και συσσώρευση λιπιδίων του *Rhodotorula glutinis* και *Candida freyschussi* είτε χρησιμοποιείται μόνη της είτε με γλυκόζη και ξυλόζη. Σημαντικό είναι πως η διαφορετικότητα της σύστασης του μέσου καλλιέργειας δεν επηρεάζει μόνο την απόδοση λιπίδιο/βιομάζα αλλά και τη σύσταση των τριγλυκεριδίων όσον αφορά την αναλογία κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Προσπάθειες για τη μετατροπή γλυκερόλης σε λιπίδια έχει επιτευχθεί με τη χρήση της ελαιούχου ζύμης *Cryptococcus curvatus*. Η συσσώρευση λιπιδίων στον οργανισμό αυτό σε υπόστρωμα

γλυκερόλης παρουσίασε υψηλά ποσά μονοακόρεστων λιπαρών οξέων αποδεικνύοντας πως η γλυκερόλη αποτελεί ένα εξαιρετικό υπόστρωμα για τη μετατροπή σε βιοντίζελ. [35]

### **3.4 Τριγλυκερίδια στους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς**

Τα τριγλυκερίδια βρίσκονται στους περισσότερους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Στην περίπτωση των φυτών συνήθως αποθηκεύονται στους σπόρους, στα ζώα το λιπώδη ιστό και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως μύκητες και ζύμες, συσσωρεύονται συνήθως όταν υπόκεινται σε περιόδους μεταβολικού στρες. Αντίθετα, στα βακτήρια, τα λιπίδια που συσσωρεύουν είναι διαφορετικής μορφής πχ. πολυ-υδροξύ βουτυρικοί εστέρες (poly- $\beta$ -hydroxy-butyrate) και άλλα αλκανοειδή όπως πολυ-υδροξύ αλκανοειδή (PHA). Τα PHA αποτελούν πολύπλοκες μορφές αποθήκευσης πολυεστέρων που σχηματίζουν έγκλειστα (inclusions) στο κύτταρο. Επιπλέον στους προκαρυωτές, εκτός από το PHA, έχουν σημειωθεί και άλλου είδους έγκλειστα, όπως κηροί (wax esters) κατά την ανάπτυξη του είδους *Acinetobacter* σε υδρογονάνθρακες. Μέχρι σχετικά προσφάτως τα TAG δεν θεωρούνταν ως το κοινό συστατικό αποθήκευσης των βακτηρίων και πολύ λίγα είδη είχαν καταγραφεί να παράγουν TAG. Πρόσφατα έγινε γνωστό ότι TAG σχηματίζονται συχνά σε ομάδες προκαρυωτικών και νέες πληροφορίες ήρθαν στην επιφάνεια πάνω στην έρευνα του βακτηριδιακού TAG.

#### **3.4.1 Σχηματισμός τριγλυκεριδίων στα βακτήρια**

Η βιοσύνθεση και η εσωκυτταρική συσσώρευση των TAG έχει αναφερθεί τόσο για Gram αρνητικά όσο για Gram θετικά βακτήρια. Ωστόσο, η ικανότητα αυτή φαίνεται να περιορίζεται μόνο σε μικρές ομάδες προκαρυωτικών οργανισμών. (Πίνακας 26). Μέχρι σήμερα η βιοσύνθεση TAG έχει εντοπιστεί μόνο σε αερόβια ετερότροφα βακτήρια και κυανοβακτήρια.

Πίνακας 26: Σχηματισμός TAG στα βακτήρια. Δίνεται το ποσοστό των τριγλυκεριδίων που παράγει κάθε βακτήριο μετά από την καλλιέργειά του σε πηγή άνθρακα που σημειώνεται με τη σκούρα γραμματοσειρά. Cdw : βάρος ξηρής βιομάζας, n.r. not reported (H.M. Alvarez, *Microbiol biotechnol*, σελ.369)

| Bacterium                                       | Carbon sources  | TAG content                   | References  |
|---|---|-------------------------------|---|
| Gram-positive bacteria                          |   |                               |   |
| <i>Dietzia maris</i>                            | Acetate, <b>hexadecane</b>  | 19.2% (cdw) <sup>a</sup>      | Alvarez 2002  |
| <i>Gordonia amarae</i>                          | <b>Gluconate</b> , hexadecane   | 6.1% (cdw) <sup>a</sup>       | Alvarez 2002  |
| <i>Mycobacterium avium</i>                      | Palmitic acid   | 5.0% (cdw) <sup>b</sup>       | Barksdale and Kim 1977  |
| <i>Mycobacterium ratisbonense</i>               | Squalane  | n.r.                          | M. Berekaa and A. Steinbüchel, unpublished data                 |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i>                  | Nutrient medium   | n.r.                          | Akao and Kusaka 1976  |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i>               | Glycerol-containing medium  | n.r.                          | Barksdale and Kim 1977  |
| <i>Nocardia asteroides</i>                      | <b>Gluconate</b> , pentadecane, hexadecane, gas-oil   | 12.2% (cdw) <sup>a</sup>      | Alvarez 2002  |
| <i>Nocardia corallina</i>                       | Glucose, hexadecane, <b>valerate</b>  | 23.9% (cdw) <sup>a</sup>      | Alvarez et al. 1997a  |
| <i>Nocardia globberula</i>                      | <b>Gluconate</b> , hexadecane, pristane   | 18.6% (cdw) <sup>a</sup>      | Alvarez et al. 2001; Alvarez 2002                               |
| <i>Nocardia restricta</i>                       | <b>Gluconate</b> , hexadecane   | 19.3% (cdw) <sup>a</sup>      | Alvarez 2002  |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i>                 | <b>Gluconate</b> , hexadecane, pentadecane, valerate  | 21.0% (cdw) <sup>a</sup>      | Alvarez et al. 1997a; Alvarez 2002                              |
| <i>Rhodococcus fascians</i>                     | glucose, <b>hexadecane</b> , pentadecane, valerate  | 18.1% (cdw) <sup>a</sup>      | Alvarez et al. 1997a; Alvarez 2002                              |
| <i>Rhodococcus opacus</i>                       | Gluconate, fructose, acetate, citrate, succinate, propionate, valerate, phenylacetate, <b>olive oil</b> , phenyldecane, n-alkanes | 87.0% (cdw) <sup>a</sup>      | Alvarez et al. 1996, 1997a                                      |
| <i>Rhodococcus ruber</i>                        | Glucose, acetate, citrate, valerate, pentadecane, <b>hexadecane</b>   | 26.0% (cdw) <sup>a</sup>      | Alvarez et al. 1997a  |
| <i>Rhodococcus sp.</i> strain 20                | Gluconate, <b>hexadecane</b>  | 8.1% (cdw) <sup>a</sup>       | Alvarez 2002  |
| <i>Streptomyces coelicolor</i>                  | Nutrient medium   | 84 mg/l medium <sup>b</sup>   | Olukoshi and Packter 1994                                       |
| <i>Streptomyces lividans</i>                    | Nutrient medium   | 125 mg/l medium <sup>b</sup>  | Olukoshi and Packter 1994                                       |
| <i>Streptomyces albus</i>                       | Nutrient medium   | 56 mg/l medium <sup>b</sup>   | Olukoshi and Packter 1994                                       |
| <i>Streptomyces griseus</i>                     | Nutrient medium   | 93 mg/l medium <sup>b</sup>   | Olukoshi and Packter 1994                                       |
| Gram-negative bacteria                          |   |                               |   |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain BD413 | Hexadecane  | 3-4% (cdw) <sup>a</sup>       | Reiser and Somerville 1997                                      |
| <i>Acinetobacter lwoffii</i>                    | <b>Hexadecane + ethanol</b>   | 16 µg/mg protein <sup>b</sup> | Vachon et al. 1982  |
| <i>Acinetobacter sp.</i> strain HO1-N           | Hexadecane, <b>hexadecanol</b>  | 1.9% (cdw) <sup>b</sup>       | Makula et al. 1975; Scott and Finnerty 1976; Singer et al. 1985 |
| <i>Acinetobacter sp.</i> strain 211             | Acetate, ethanol, <b>olive oil</b> , hexadecanol, heptadecane   | 25.0% (cdw) <sup>a</sup>      | Alvarez et al. 1997b  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain 44T1       | Glucose, n-alkane, <b>olive oil</b>   | 38.0% (cdw) <sup>a</sup>      | De Andrés et al. 1991   |
| Other bacteria                                  |   |                               |   |
| <i>Nostoc commune</i>                           | Nutrient medium   | n.r.                          | Taranto et al. 1993   |

<sup>a</sup>Total amounts of cellular fatty acids

<sup>b</sup>Total amounts of TAG

Η βιοσύνθεση και συσσώρευση TAG φαίνεται να είναι κοινό χαρακτηριστικό των βακτηρίων που ανήκουν στην ομάδα του ακτινομύκητα όπως *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Dietzia* και *Gordonia*. (Πίνακας 26). Τα μέλη αυτών των γενών παράγουν διαφορετικά ποσά ουδέτερων λιπιδίων ανάλογα με τη πηγή άνθρακα που καλλιεργούνται. Για παράδειγμα το είδος *Streptomyces* συσσωρεύει TAG από 50-150 mg/l μέσου καλλιέργειας και σε μερικές περιπτώσεις συνεισφέρει σε ποσοστό πάνω από το 60% των συνολικών κυτταρικών του λιπιδίων. Αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορούν να χαρακτηριστούν ως ελαιούχα βακτήρια εφόσον μπορούν και συσσωρεύουν πάνω από το 20% της βιομάζας του σε λιπίδια. Πολλοί ερευνητές έχουν αναφέρει την εσωκυτταρική και εξωκυτταρική συσσώρευση TAG καθώς και μόνο- και δι-γλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα και κηρούς στα κύτταρα του είδους

του ακτινομύκητα κατά τη καλλιέργειά τους σε κανονικά αλκάνια (Πίνακας 26). Παρόλα αυτά οι κηροί είναι το βασικό συστατικό λιπιδίων που συσσωρεύεται από το είδος *Acinetobacter* ενώ τα TAG αναπαριστούν μόνο ένα μικρό ποσοστό των ουδέτερων λιπιδίων. Το κυανοβακτήριο *Nosostoccommune* σχηματίζει TAG ως βασικό συστατικό των ουδετέρων λιπιδίων.

### 3.4.2 Φυσιολογία του βακτηριδιακού μεταβολισμού τριγλυκεριδίων

Σε γενικές γραμμές ένα μεγάλο εύρος πηγών ανθράκων έχει χρησιμοποιηθεί για βακτηριδιακή βιοσύνθεση TAG. Αυτές οι πηγές άνθρακα περιλαμβάνουν σάκχαρα, οργανικά οξέα, αλκοόλες, n-αλκάνια, διακλαδισμένα αλκάνια, φαινυλ-αλκάνια, έλαια και γαιάνθρακα (coal). Στα περισσότερα βακτήρια η συσσώρευση των TAG και άλλων ουδετέρων λιπιδίων συνήθως παρακινείται όταν η πηγή άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας βρίσκεται σε περίσσεια και η πηγή αζώτου είναι περιορισμένη. Η κυτταρική ανάπτυξη υπό αυτές τις συνθήκες είναι εξασθενημένη και τα κύτταρα χρησιμοποιούν την πηγή άνθρακα για τη βιοσύνθεση ουδετέρων λιπιδίων. Η συσσώρευση των TAG κυρίως πραγματοποιείται κατά την στατική φάση ανάπτυξης σύμφωνα με μελέτη πάνω στα είδη του *Streptomyces* και *Rhodococcus*. Κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης τα λιπαρά οξέα που συντίθενται από αυτά τα βακτήρια κυρίως χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση φωσφολιπιδίων τα οποία είναι απαραίτητα για το κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι επιστήμονες ισχυρίζονται πως υπάρχει ένας ισχυρός συσχετισμός ανάμεσα στην δραστικότητα του ενζύμου DGAT, την φάση ανάπτυξης και το ποσοστό TAG στα κύτταρα του στελέχους *Streptomyces*. Υποστηρίζουν επίσης, ότι το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για τη μετάβαση από τον σχηματισμό φωσφολιπιδίων για την μεμβράνη, στη βιοσύνθεση TAG κατά την στατική φάση ανάπτυξης. Τα μέλη του είδους του ακτινομύκητα, υπό περιοριστικές συνθήκες, χρησιμοποιούν την πηγή άνθρακα κυρίως για την βιοσύνθεση λιπαρών οξέων που μετέπειτα συσσωρεύονται υπό μορφή TAG και εναποτίθενται στο κυτόπλασμα. Τα βακτήρια του ακτινομύκητα εκτελούν de novo βιοσύνθεση λιπιδίων κατά τη στατική φάση ανάπτυξης, αντίθετα πολλά βακτήρια σε μη ισορροπημένες συνθήκες ανάπτυξης εμποδίζουν τον μεταβολισμό λιπιδίων.

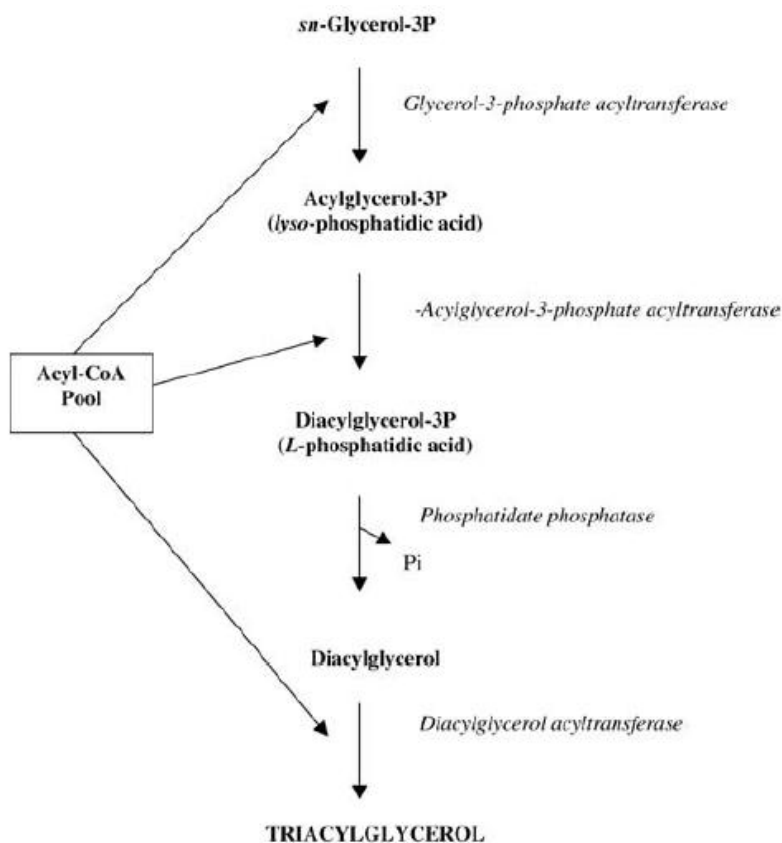


### 3.4.3 Βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων στα βακτήρια

Η βιοσύνθεση των TAG μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τρία βήματα:

- (1) Παραγωγή ακυλο-συστατικών των λιπαρών οξέων
- (2) Σχηματισμός ενδιάμεσων της γλυκερόλης
- (3) Εστεροποίηση της γλυκερόλης με ακυλο-συστατικά των λιπαρών οξέων

Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην εστεροποίηση της γλυκερόλης δρουν με διαδοχική ακυλίωση των θέσεων sn-1,2 και 3 της φωσφορικής γλυκερίνης (glycerol-3-phosphate) απομακρύνοντας τη φωσφορική ομάδα πριν το τελικό βήμα ακυλίωσης (Σχήμα 33). Η διανομή των ακυλομάδων στις υδροξυλομάδες της γλυκερόλης δεν είναι τυχαία. Σύμφωνα με μελέτες πάνω στο *R. oracus PD630*, το μικρότερο και πιο κορεσμένο λιπαρό οξύ εστεροποιείται στο υδροξύλιο της θέσης 2 ενώ τα ακόρεστα λιπαρά οξέα τείνουν να βρίσκονται στη θέση 3. Η διανομή αυτή των βακτηριδιακών TAG διαφέρει από τα TAG των θηλαστικών και των φυτών όπου το μακρύτερο και το πιο ακόρεστο λιπαρό οξύ βρίσκεται στη θέση sn-2.



Σχήμα 33 : Αντιδράσεις του μεταβολισμού των βασικότερων ενζύμων της βιοσύνθεσης των τριγλυκεριδίων (TAG) και τα πρόδρομα μόρια των ακυλογλυκεριδίων reported (H.M. Alvarez, *Microbiol biotechnol*, σελ.370)

Το ένζυμο DGAT, το οποίο καταλύει τα τελικό βήμα ακυλίωσης, είναι το μόνο εξειδικευμένο ένζυμο που εμπλέκεται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης του TAG εφόσον οι αντιδράσεις που συμβαίνουν είναι κοινές και για το σχηματισμό των φωσφολιπιδίων. Η δραστηριότητα του DGAT ενζύμου εντοπίστηκε στα είδη *Mycobacterium*, *Streptomyces* τα οποία μπορούν να συσσωρεύουν σημαντικά ποσά TAG. Η ενζυμική δραστηριότητα εξαρτάται από τη κυτταρική φάση ανάπτυξης. Παράδειγμα, είναι χαμηλή κατά την εκθετική φάση αυξάνεται περίπου 5 φορές στην στατική φάση και μειώνεται στις γηραιότερες καλλιέργειες.

Πρόσφατα, οι επιστήμονες πρότειναν ότι στο *R. oryzae* PD630 υπάρχουν τουλάχιστον δύο διαφορετικά μονοπάτια για τη βιοσύνθεση TAG. Ενώ το DGAT είναι ο βασικός παραγωγός TAG, υποστηρίζεται ότι υπάρχει ακόμη ένα μονοπάτι που συνεισφέρει σε μικρό βαθμό TAG. Αυτό το ένζυμο αναφέρεται ως ακυλοτρανσφεράση φωσφολιπιδική : διγλυκερόλη (phospholipid : diacylglycerol acyltransferase, PDAT) και είναι ανεξάρτητο από το ακυλο-CoA. Πολλοί επιστήμονες υποστηρίζουν ότι το PDAT μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σύστασης των λιπαρών οξέων και στη συσσώρευση TAG. Ανάλογα με το μέσο καλλιέργειας κάποια βακτήρια όπως αυτά του *Rhodococcus* και *Norcadia* μπορούν να σχηματίσουν ασυνήθιστα λιπαρά οξέα ως συστατικό των TAG.

#### **3.4.4 Ο ρόλος των βακτηριδιακών τριγλυκεριδίων**

Ο γενικός μεταβολισμός των βακτηριδίων έχει αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς ώστε να ανταπεξέλθει σε ακραίες συνθήκες όπως η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, η αφυδάτωση και οι ακραίες θερμοκρασίες. Κάποιοι από τους μηχανισμούς αυτούς είναι ο σχηματισμός σπορίων και η συσσώρευση συστατικών καταφέρνοντας έτσι να επιβιώσουν. Οι συσσωρευμένες ουσίες κυρίως εξυπηρετούν ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Τα TAG αποτελούν εξαιρετικό υλικό ως απόθεμα εξαιτίας των υδρόφοβων ιδιοτήτων, οι οποίοι επιτρέπουν τη συσσώρευσή τους σε μεγάλες ποσότητες στα κύτταρα χωρίς να επηρεάζεται η ωσμωτικότητα του κυτοπλάσματος. Επιπλέον η οξειδωση των TAG παράγει πολύ μεγάλη ποσότητα ενέργειας σε σχέση με άλλα συστατικά αποθήκευσης όπως υδρογονάνθρακες. Αυτό συμβαίνει γιατί τα άτομα του άνθρακα των ακυλίων των TAG βρίσκονται στη πιο ανηγμένη μορφή (reductive form). Τα βακτήρια μπορούν και συσσωρεύουν TAG ως πηγή άνθρακα και ενέργειας για να διατηρηθούν στη ζωή σε περιόδους έλλειψης τροφής. Η β-οξειδωση των λιπαρών οξέων που περιέχονται στο TAG παράγουν μεγάλες ποσότητες αναγωγικών ισοδύναμων (reducing equivalents) και NADP και για αυτό το λόγο, πρέπει να

αναγεννάται. Έτσι, η β-οξειδωση συμβαίνει μόνο υπό αερόβιες συνθήκες. Αυτός είναι και ο πιο πιθανός λόγος για τον οποίο όλα τα βακτήρια που έχουν βρεθεί μέχρι στιγμής να συσσωρεύουν TAG είναι αερόβια βακτήρια.



*Σχήμα 34 : Έγκλειστα TAG στα κύτταρα του R.oracus PD630 σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα έγκλειστα περιέχουν ουδέτερα λιπίδια (ET1) που συντίθενται από το βακτήριο. Περιλαμβάνονται από μια μεμβράνη (B) για να σταθεροποιηθεί το υδρόφοβο περιεχόμενο στο υδατικό περιβάλλον του κυτταροπλάσματος reported (H.M. Alvarez, Microbiol biotechnol, σελ.372)*

Τα TAG μπορούν να εξυπηρετήσουν και ως «δεξαμενή» αναγωγικών ισοδύναμων στα βακτηριακά κύτταρα. Επίσης, η βιοσύνθεση λιπαρών οξέων που προορίζονται για συσσώρευση TAG βοηθά στο να μη παρεμποδίζεται ο βασικός μεταβολισμός των κυττάρων από διάφορα παράγωγα του μεταβολισμού που μπορεί να συσσωρευτούν στα κύτταρα και να παρεμποδίσουν λειτουργίες βασικών ενζύμων του κεντρικού μεταβολισμού. Αυτή η ιδιότητα μπορεί να επιτρέπει στο κύτταρο να διατηρεί την ισορροπία του σύμφωνα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον, τα βακτηριδιακά TAG παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σύστασης των λιπαρών οξέων των λιπιδίων της μεμβράνης ώστε να προσαρμόζεται η ρευστότητά του στο περιβάλλον. Στα πλαίσια αυτά, τα TAG λειτουργούν ως δότες λιπαρών οξέων για φωσφολιπιδιακή βιοσύνθεση και ως δέκτες ασυνήθιστων λιπαρών οξέων τα οποία θα διατάρασαν τη ρευστότητα της μεμβράνης. Επιπλέον, σύμφωνα με τους επιστήμονες τα TAG μπορούν να λειτουργήσουν ως πηγή άνθρακα για τη βιοσύνθεση αντιβιοτικών από ακυλο-CoA και μηλονυλο-CoA. Τα ουδέτερα λιπίδια που σχηματίζονται στα βακτήρια συνήθως σχηματίζουν έγκλειστα (Σχήμα 34).

### 3.4.5 Δυνατότητες εφαρμογών του βακτηριδιακού TAG

Τα λίπη και τα έλαια που χρησιμοποιούνται για τους διάφορους εμπορικούς σκοπούς προέρχονται αποκλειστικά από αγροτικές πηγές. Τα μικροβιακά λιπίδια θεωρούνται ως μια εναλλακτική πηγή, ωστόσο όμως, η παραγωγή τους σε βιομηχανική κλίμακα δεν είναι ακόμα οικονομικά ωφέλιμη. Μέχρι προσφάτως, η ζύμες και οι μύκητες χρησιμοποιούνταν για τη μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων. Όταν έγινε γνωστό ότι και κάποιοι προκαρυωτές μικροοργανισμοί παράγουν λιπίδια προστέθηκαν και αυτοί στη λίστα βιομηχανικής παραγωγής ελαίου. Υπάρχουν κάποια ελαιούχα βακτήρια που συσσωρεύουν TAG πάνω από το 80% της κυτταρικής τους βιομάζας και τα οποία ήδη έχουν χρησιμοποιηθεί για παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων TAG σε βιοαντιδραστήρες.

Κατά βάσει, οι εφαρμογές των βακτηριδιακών TAG μπορεί να είναι παρόμοιες με αυτές των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών. Τα μικροβιακά TAG μοιράζονται κάποιες ιδιότητες με αυτές των φυτών και ζώων αλλά έχουν κάποια επιπλέον χαρακτηριστικά. Παραδείγματος χάριν, η χρήση των μικροοργανισμών για λιπιδιακή παραγωγή έχει το επιπλέον πλεονέκτημα ότι ανάλογα με την πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται οδηγούμαστε σε μεγάλη ποικιλία λιπαρών οξέων. Επίσης έχουμε ευκολότερη πρόσβαση στο γενετικό υλικό με τις σύγχρονες εξελίξεις της γενετικής και μεταβολικής μηχανικής. Οι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί ειδικά, ανταποκρίνονται σε τέτοιου είδους μεθόδους και πολλά «εργαλεία» ήδη υπάρχουν.

Μια από τις πιο βασικές χρήσεις των TAG είναι η χρήση τους ως εδώδιμα λίπη και έλαια. Ο πίνακας 27 δείχνει τη σύσταση κάποιων διατροφικών ελαίων από ζώα, φυτά και ζύμες σε σχέση με τα βακτηριακά έλαια. Να προστεθεί ότι οι ιδιότητες των TAG που αποθηκεύονται στα βακτήρια μπορούν να μεταβληθούν με τη βοήθεια της μεταβολικής μηχανικής. Τα βακτηριακά συστήματα είναι αρκετά ευέλικτα στην ανάπτυξη νέων βιοτεχνολογικών διεργασιών σχετικά με την παραγωγή ελαίων που ενδιαφέρουν. Παρόλα αυτά, η εφαρμογή των βακτηριδιακών ελαίων για θρεπτικούς σκοπούς είναι αβέβαιος εξαιτίας οικονομικών λόγων και έλλειψης πληροφοριών όσον αφορά την πέψη και την αφομοίωση τους από τον οργανισμό. Άλλη εφαρμογή ελαίων και λιπών είναι η χρήση τους για θεραπευτικούς και φαρμακευτικούς σκοπούς. Αν και δεν φαίνεται να έχουν κάποιες φαρμακευτικές ιδιότητες, εξυπηρετούν ως μέσο για τη μεταφορά άλλων φαρμάκων. Τα TAG βρίσκουν εφαρμογή στην οδοντιατρική ως κονιόματα καθώς και στη σύνθεση διαφόρων φαρμάκων. Τα έλαια επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής. Ενδιαφέρον ακόμα παρουσιάζει και η δυνατότητα παραγωγής ελαιοχημικών από βακτηριδιακά έλαια, για παράδειγμα λιπαρά οξέα, γλυκερόλη, μεθυλεστέρες, κ.α. Τέτοιου είδους συστατικά μέχρι σήμερα προέρχονταν από πετρελαιοχημικά. Τα ελαιοχημικά που προέρχονται από λίπη και

έλαια μπορεί να θεωρηθούν ως φυσικά συστατικά και να παραχθούν από ανανεώσιμες πηγές. Από τα ελαιοχημικά αυτά μπορούν να παρασκευαστούν πλήθος συστατικών περιλαμβανομένου χρώματα, λιπαντικά, τασιενεργά και πολλά άλλα [36]. Τα λιπίδια που παράγονται από τα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την παραγωγή εστέρων (βιοντίζελ). Με την πρόοδο της συστημικής βιολογίας και της μεταβολικής μηχανικής οι επιστήμονες κατάφεραν και τροποποίησαν το *E.coli* ώστε να αυξήσει την παραγωγή του σε λιπίδια. Αν και τα βακτήρια συσσωρεύουν χαμηλές συγκεντρώσεις λιπιδίων, (σχετικά με τα μικροφύκη για παράδειγμα) έχουν άλλα πλεονεκτήματα που σχετίζονται με την παραγωγή βιοντίζελ: κατέχουν ένα ψηλό ρυθμό ανάπτυξης (μεγιστοποιούν τη βιομάζα τους μέσα σε 12-24 ώρες) και καλλιεργούνται εύκολα [37].

Πίνακας 27:Σύσταση λιπαρών οξέων από έλαια φυτών, ζώων, ζύμες και βακτήρια. *cdw*: ξηροκυτταρικό βάρος, *tr*: ίχνη, - : δεν εντοπίστηκε reported (H.M. Alvarez, *Microbiol biotechnol*, σελ.374)

| Source  | Fatty acids %<br>cdw | Relative proportion of fatty acids (% w/w) |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |        |
|---|----------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
|   |                      | C <sub>12:0</sub>                          | C <sub>13:0</sub> | C <sub>14:0</sub> | C <sub>14:1</sub> | C <sub>15:0</sub> | C <sub>16:0</sub> | C <sub>16:1</sub> | C <sub>17:0</sub> | C <sub>17:1</sub> | C <sub>18:0</sub> | C <sub>18:1</sub> | C <sub>18:2</sub> | Others |
| Bovine tallow                                   |                      | -  | -                 | 3                 | 0.5               | -                 | 26                | 3.5               | -                 | -                 | 19.5              | 40                | 4.5               | 3      |
| Cocoa butter<br>( <i>Theobroma cacao</i> )      |                      | -  | -                 | -                 | -                 | -                 | 25                | -                 | -                 | -                 | 37                | 34                | 3                 | -      |
| Illipe butter<br>( <i>Madhuca longfolia</i> )   |                      | -  | -                 | -                 | -                 | -                 | 28                | -                 | -                 | -                 | 14                | 49                | 9                 | -      |
| Maize seeds<br>( <i>Zea mays</i> )              |                      | -  | -                 | -                 | -                 | -                 | 10.5              | 0.5               | -                 | -                 | 2.5               | 32.5              | 52                | 1.5    |
| Palm oil  |                      | -  | -                 | -                 | -                 | -                 | 44                | -                 | -                 | -                 | 5                 | 39                | 11                | Tr     |
| <i>Rhodotorula glutinis</i><br>(yeast)          | 72                   | -  | -                 | Tr                | -                 | -                 | 37                | 1                 | -                 | -                 | 3                 | 47                | 8                 | -      |
| <i>Lipomyces starkeyi</i><br>(yeast)            | 63                   | -  | -                 | Tr                | -                 | -                 | 34                | 6                 | -                 | -                 | 5                 | 51                | 3                 | -      |
| <i>R. opacus</i> PD630<br>substrate: gluconate  | 76                   | 0.8  | -                 | 4.3               | -                 | 6.3               | 25.7              | 9.5               | 12.3              | 15.4              | 3.5               | 22.0              | -                 | Tr     |
| <i>R. opacus</i> PD630<br>substrate: octadecane | 39                   | Tr   | -                 | 4.7               | -                 | -                 | 41.7              | 1.4               | -                 | -                 | 14.3              | 37.9              | -                 | -      |
| <i>R. opacus</i> PD630<br>substrate: olive oil  | 87                   | Tr   | -                 | 0.7               | -                 | -                 | 16.8              | 5.9               | -                 | -                 | 2.8               | 73.8              | -                 | -      |
| <i>R. opacus</i> UFA4<br>substrate: gluconate   | 73                   | 0.8  | -                 | 7.1               | -                 | 1.6               | 47.1              | 17.8              | Tr                | Tr                | 18.8              | 6.4               | -                 | Tr     |

### 3.5 Μικροφύκη

#### 3.5.1 Πλεονεκτήματα χρήσης μικροφυκών για την παραγωγή βιοντίζελ

Τα μικροφύκη είναι ευκαρυωτικοί ή προκαρυωτικοί φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται γρήγορα και επιβιώνουν σε αντίξοες συνθήκες εξαιτίας της μονοκύτταρης ή απλής πολυκύτταρης τους δομής. 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 εδάφινά, αναπαριστώντας μια μεγάλη ποικιλία ειδών που ζουν σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών [38]. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν 200.000 με 800.000 είδη μικροφυκών από τα οποία, τα 35.000 περίπου έχουν μελετηθεί και αναλυθεί [41].

Έχουν γίνει πολλές έρευνες και πολλές μελέτες που περιγράφουν τα πλεονεκτήματα της χρήσης των μικροφυκών πάνω στο τομέα παραγωγής βιοντίζελ και σε σύγκριση με άλλες διαθέσιμες πρώτες ύλες. Τα επίπεδα ελαίων στα πιο κοινά μικροφύκη κυμαίνονται μεταξύ 20%-50% κατά βάρος ξηρής βιομάζας. Ωστόσο, είναι δυνατόν να επιτευχθούν ακόμα υψηλότερες παραγωγικότητες. Τα μικροφύκη μπορούν να διπλασιάσουν τη βιομάζα τους μέσα σε 24 ώρες και στην εκθετική φάση συγκεκριμένα, διπλασιάζουν τη βιομάζα τους μέσα σε 3,5 ώρες. Επιπροσθέτως, τα λιπίδια που παράγονται στα μικροφύκη είναι κυρίως ουδέτερα λιπίδια. Ο βαθμός ακορεστότητας τους, η συσσώρευσή τους στο κύτταρο του μικροφύκου στις διάφορες φάσεις ανάπτυξης, καθιστούν τα λιπίδια αυτά κατάλληλα για τη παραγωγή βιοντίζελ [37]. Από την πρακτική σκοπιά του θέματος, τα μικροφύκη καλλιεργούνται εύκολα χωρίς να απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, χρησιμοποιώντας νερό ακατάλληλο για κατανάλωση και επίσης είναι σχετικά εύκολη η λήψη των θρεπτικών συστατικών. Τα μικροφύκη με τη βοήθεια της φωτοσύνθεσης αναπαράγονται και μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια σε χημική ολοκληρώνοντας ένα πλήρη κύκλο ανάπτυξης κάθε λίγες ημέρες. Επιπλέον μπορούν να αναπτυχθούν σχεδόν οπουδήποτε απαιτώντας μόνο φως και μερικά απλά συστατικά. Οι ρυθμοί ανάπτυξης μπορούν να επιταχυνθούν με τη προσθήκη συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών και επαρκούς αερισμού. Οι ρυθμοί ανάπτυξης και παραγωγικότητάς τους είναι ιδιαίτερα υψηλοί. Για να αποκτήσουμε μια αίσθηση του μεγέθους σε σχέση με τα καλλιεργήσιμα φυτά θα παραθέσουμε την εξής σύγκριση: για την παραγωγή ελαίου η έκταση της γης που καταλαμβάνεται από μικροφύκη περιεκτικότητας ελαίου 30%(w/w) βιομάζας φυκών είναι 49 ή 132 φορές μικρότερη από τη γη που απαιτείται για την καλλιέργεια ελαιοκράμβης ή σόγιας αντίστοιχα.

Λόγω του ότι υπάρχουν τόσα διαφορετικά είδη μικροφυκών τα οποία μπορούν να προσαρμοστούν σε μια ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών, είναι δυνατόν, να βρεθεί το είδος που να ταιριάζει καλύτερα στο τοπικό περιβάλλον, κάτι που δεν είναι εφικτό να συμβεί με τη χρήση άλλων πρώτων υλών βιοντίζελ (φοινικέλαιο, ηλιέλαιο κ.α.). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα μικροφύκη αποτελούν την πρώτη ύλη για διάφορα είδη βιοκαυσίμων, όχι μόνο βιοντίζελ, αλλά και μεθάνιο, υδρογόνο αιθανόλη. Η χρησιμοποίηση των φυκών μπορεί να εξυπηρετήσει και άλλους σκοπούς. Κάποιες από τις επιπλέον εφαρμογές τους είναι:

- ✓ Απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα από τις εκπομπές βιομηχανιών (bio-fixation) με μικροφύκη, μείωση των αερίων του θερμοκηπίου κατά την παραγωγή βιοντίζελ [38]. Ενδεικτικά, 1 kg ξηρής βιομάζας μικροφύκους απαιτεί περίπου 1,8 kg CO<sub>2</sub> [39].
- ✓ Επεξεργασία απόβλητων νερών απομακρύνοντας NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> τα οποία τα μικροφύκη τα χρησιμοποιούν για θρεπτικά συστατικά.
- ✓ Μετά την εκχύλιση του ελαίου, η απομένουσα βιομάζα των μικροφυκών μπορεί να επεξεργαστεί και να παραχθεί αιθανόλη, μεθάνιο, τροφή για ζώα, να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα λόγω της υψηλής αναλογίας N:P ή απλά να καεί για παραγωγή ενέργειας.
- ✓ Συνδυάζοντας την ικανότητά τους να αναπτύσσονται υπό αντίξοες συνθήκες, με την ιδιότητά τους για μειωμένες ανάγκες σε θρεπτικά συστατικά, μπορούν να αναπτυχθούν σε περιοχές ακατάλληλες για γεωργικούς σκοπούς και ανεξάρτητα των καιρικών συνθηκών. Αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα να μην ανταγωνίζεται η καλλιεργήσιμη γη και να χρησιμοποιούνται απόβλητο νερό και όχι πόσιμο.
- ✓ Ανάλογα με το είδος του μικροφύκους μπορούν να εκχυλιστούν και άλλα συστατικά που να βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας. Για παράδειγμα τέτοιων συστατικών είναι τα λίπη, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, σάκχαρα, αντιοξειδωτικά, καθώς και άλλου είδους υψηλής αξίας χημικά.
- ✓ Λόγω της ποικιλίας των υψηλής αξίας βιολογικών παραγώγων και των πολλών πιθανών εμπορικών εφαρμογών, τα μικροφύκη μπορούν να φέρουν την επανάσταση σε διάφορους τομείς της βιοτεχνολογίας περιλαμβανομένου τα βιοκαύσιμα, τα καλλυντικά, τα φαρμακευτικά, τα πρόσθετα τροφίμων και την προστασία από ρύπανση.

### **3.5.2 Λιπιδιακό περιεχόμενο μικροφυκών και παραγωγικότητα**

Πολλά είδη μικροφυκών μπορούν να συγκεντρώνουν σημαντικές ποσότητες λιπιδίων με αποτέλεσμα να έχουν υψηλές αποδόσεις ελαίου. Η μέση περιεκτικότητα σε λιπαρά στα μικροφύκη κυμαίνεται μεταξύ 1% και 70% αλλά υπό συγκεκριμένες συνθήκες κάποια είδη μπορούν να φτάσουν και το 90% του ξηρού βάρους. Στον Πίνακα 28 παρουσιάζεται το λιπιδιακό περιεχόμενο, η παραγωγικότητα λιπιδίων και η βιομάζα διαφόρων ειδών μικροφυκών.

Πίνακας 28: Περιεκτικότητα λιπιδίων και παραγωγικότητες διαφόρων ειδών μικροφυκών (T.M. Mata, Renewable and sustainable energy reviews,σελ.221)

| 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 <sup>2</sup> /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                            | 121.4                         | 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 colnii</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>Ellipsoidion</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 tricorutum</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>Scenedesmus obliquus</i>              | 11.0–55.0                            | –                             | 0.004–0.74                                   | –   |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i>           | 1.9–18.4                             | 35.1                          | 0.19   | –   |
| <i>Scenedesmus</i> sp.                   | 19.6–21.1                            | 40.8–53.9                     | 0.03–0.26                                    | 2.43–13.52  |
| <i>Skeletonema</i> sp.                   | 13.3–31.8                            | 27.3                          | 0.09   | –   |
| <i>Skeletonema costatum</i>              | 13.5–51.3                            | 17.4                          | 0.08   | –   |
| <i>Spirulina platensis</i>               | 4.0–16.6                             | –                             | 0.06–4.3                                     | 1.5–14.5/24–51  |
| <i>Spirulina maxima</i>                  | 4.0–9.0                              | –                             | 0.21–0.25                                    | 25  |
| <i>Thalassiosira pseudonana</i>          | 20.6                                 | 17.4                          | 0.08   | –   |
| <i>Tetraselmis suecica</i>               | 8.5–23.0                             | 27.0–36.4                     | 0.12–0.32                                    | 19  |
| <i>Tetraselmis</i> sp.                   | 12.6–14.7                            | 43.4                          | 0.30   | –   |

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα το περιεχόμενο σε λιπίδια μπορεί να φτάσει το 75% κατά βάρος ξηρής βιομάζας αλλά συνδυάζεται με χαμηλές παραγωγικότητες. Τα περισσότερα μικροφύκη έχουν περιεκτικότητα ελαίου μεταξύ 20% και 50% επιτυγχάνοντας όμως μεγαλύτερες παραγωγικότητες. Το *chlorella* φαίνεται ως μια καλή επιλογή για να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή βιοντίζελ. Αν και υπάρχουν και άλλα είδη που έχουν αντίστοιχη αποδοτικότητα και παραγωγικότητα, η επιλογή του καταλληλότερου είδους πρέπει να λαμβάνει υπόψη και άλλους παράγοντες όπως για παράδειγμα, την ικανότητα ανάπτυξης στα διαθέσιμα συστατικά και τις υπάρχουσες περιβαλλοντικές συνθήκες. Πολλοί οι παράμετροι πρέπει να συνυπολογιστούν για να γίνει σωστή επιλογή του είδους ή του στελέχους για τη παραγωγή βιοντίζελ. Σπουδαίο ρόλο επίσης παίζει η σύσταση των λιπαρών οξέων των διάφορων ειδών των μικροφυκών, καθώς έχουν σημαντική επίδραση στα χαρακτηριστικά του παραγόμενου βιοντίζελ. Μια επιστημονική ομάδα ανέλυσε την σύσταση των λιπαρών οξέων από 7 είδη μικροφυκών και παρατήρησαν ότι όλα εμφάνισαν τα C14:0, C16:0, C18:1, C18:2, C18:3 λιπαρά οξέα. Άλλα λιπαρά οξέα παρουσιάζονταν ανάλογα με το είδος του μικροφύκου παράδειγμα, τα λιπαρά οξέα C16:2 C16:3 C20:5 εμφανίζονται στο *Nannochloropsis* sp. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες τα θρεπτικά συστατικά, οι συνθήκες



καλλιέργειας και οι φάσεις ανάπτυξης επηρεάζουν τη σύσταση των λιπαρών οξέων. Λόγου χάριν, η έλλειψη αζώτου και το ωσμωτικό στρες οδήγησαν στη συσσώρευση C18:1 σε όλα σχεδόν τα είδη.

Στον πίνακα 29 παρουσιάζονται οι αποδόσεις ελαίου από μικροφύκη και ελαιούχα φυτά. Να παρατηρήσουμε ότι αν και η περιεκτικότητα σε έλαιο είναι παρόμοια μεταξύ των φυτικών σπόρων και μικροφυκών, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη συνολική παραγωγικότητα βιομάζας δίνοντας το προβάδισμα στα μικροφύκη.

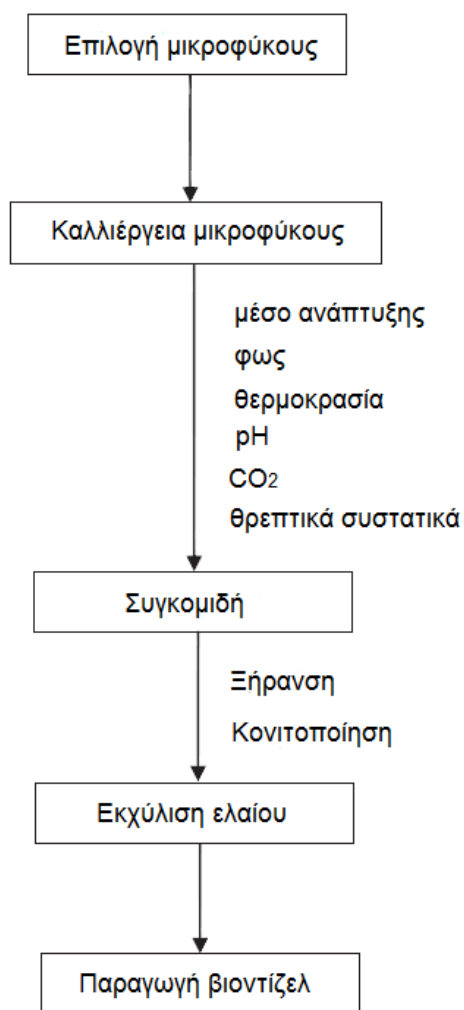
Πίνακας 29 : Σύγκριση μικροφυκών με άλλες πρώτες ύλες για βιοντίζελ (T.M. Mata, *Renewable and sustainable energy reviews*,σελ.221)

| Plant source                                | Seed oil content<br>(% oil by wt in biomass) | Oil yield<br>(L oil/ha year) | Land use<br>(m <sup>2</sup> year/kg biodiesel) | Biodiesel productivity<br>(kg biodiesel/ha year) |
|---|--|------------------------------|--|--|
| Corn/Maize ( <i>Zea mays</i> L.)            | 44   | 172                          | 66   | 152  |
| Hemp ( <i>Cannabis sativa</i> L.)           | 33   | 363                          | 31   | 321  |
| Soybean ( <i>Glycine max</i> L.)            | 18   | 636                          | 18   | 562  |
| Jatropha ( <i>Jatropha curcas</i> L.)       | 28   | 741                          | 15   | 656  |
| Camelina ( <i>Camelina sativa</i> L.)       | 42   | 915                          | 12   | 809  |
| Canola/Rapeseed ( <i>Brassica napus</i> L.) | 41   | 974                          | 12   | 862  |
| Sunflower ( <i>Helianthus annuus</i> L.)    | 40   | 1070                         | 11   | 946  |
| Castor ( <i>Ricinus communis</i> )          | 48   | 1307                         | 9  | 1156   |
| Palm oil ( <i>Elaeis guineensis</i> )       | 36   | 5366                         | 2  | 4747   |
| Microalgae (low oil content)                | 30   | 58,700                       | 0.2  | 51,927   |
| Microalgae (medium oil content)             | 50   | 97,800                       | 0.1  | 86,515   |
| Microalgae (high oil content)               | 70   | 136,900                      | 0.1  | 121,104  |

### 3.5.3 Βασικά στάδια παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη

Όλες οι υπάρχουσες διεργασίες για τη παραγωγή βιοντίζελ από μικροφύκη περιλαμβάνουν μία μονάδα παραγωγής στη οποία αρχικά αναπτύσσονται τα κύτταρα, ακολουθεί διαχωρισμός των κυττάρων από το μέσο ανάπτυξης και τέλος γίνεται η εκχύλιση των λιπιδίων. Στο επόμενο στάδιο ξεκινά ο σχηματισμός και παραγωγή του βιοντίζελ και άλλων βιοκαυσίμων με παρόμοιες μεθόδους και τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται και για άλλες πρώτες ύλες (πυρόλυση, μετεστεροποίηση κ.α.).

Στο σχήμα 35 αναπαρίστανται σχηματικά τα στάδια παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη. Ξεκινά με το στάδιο επιλογής μικροφύκους ανάλογα με τις τοπικές συνθήκες και το σχεδιασμό το συστήματος καλλιέργειας, στη συνέχεια ακολουθεί η συλλογή βιομάζας (harvesting) και η εκχύλιση του ελαίου, τέλος με τη σειρά του, το έλαιο κατευθύνεται προς τη μονάδα παραγωγής βιοντίζελ.



Εικόνα 35: Στάδια παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη [39]

- Επιλογή χώρου και είδους μικροοργανισμού

Ιδιαίτερο βάρος έχει δοθεί στη μονάδα καλλιέργειας εφόσον παίζει πολύ σημαντικό ρόλο και καθορίζει την οικονομική βιωσιμότητα της διεργασίας. Στο σημείο αυτό επιλέγεται αν η μονάδα καλλιέργειας λειτουργεί ως σύστημα διαλείποντος έργου ή συνεχούς όπως επίσης, αν οι μονάδες παραγωγής είναι ανοιχτά ή κλειστά συστήματα. Η παραπάνω επιλογή εξαρτάται από το είδος του μικροοργανισμού, τις αναμενόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών, ακόμα και από τη πιθανότητα να συνδυαστεί η ανάπτυξη των μικροφυκών με στρατηγικές για τον έλεγχο των μολυσματικών παραγόντων από βιομηχανίες.

Η επιλογή τόσο του είδους του μικροφύκους που θα χρησιμοποιηθεί όσο και της μονάδας καλλιέργειας του βασίζεται :

- Στους ρυθμούς ανάπτυξης μετρούμενοι ως το συνολικό ποσό βιομάζας που συσσωρεύεται ανά μονάδα χρόνου και όγκου

- Στο λιπιδιακό περιεχόμενο που αντιστοιχεί κυρίως στα ελεύθερα λιπαρά οξέα και τριγλυκερίδια (είναι αυτά που αφορούν την παραγωγή βιοντίζελ)
  - Στην ανθεκτικότητα πάνω στις περιβαλλοντικές αλλαγές (θερμοκρασία, θρεπτικά συστατικά, φως, ανταγωνισμός με άλλους μικροοργανισμούς)
  - Διαθεσιμότητα διοξειδίου του άνθρακα
  - Ευκολία διαχωρισμού και επεξεργασία της βιομάζας
  - Πιθανότητα ανάκτησης και άλλων υψηλής αξίας χημικών ουσιών
- Καλλιέργεια μικροφυκών

Σε γενικές γραμμές η ανάπτυξη βιομάζας μικροφυκών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πηγή άνθρακα και το φως για την διεργασία της φωτοσύνθεσης. Μπορούμε να θεωρήσουμε πολλούς τύπους μεταβολισμού για τα μικροφύκη και τα οποία είναι ικανά να μεταβούν σε μεταβολικές αλλαγές ανάλογα με τις συνθήκες περιβάλλοντος. Παράδειγμα κάποιοι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν:

- *Φωτοαυτότροφα*: χρησιμοποιούν ως μόνη πηγή ενέργεια το φως το οποίο μετατρέπεται σε χημική ενέργεια μέσω της φωτοσύνθεσης και CO<sub>2</sub> ως πηγή άνθρακα
- *Ετερότροφα*: χρησιμοποιούν οργανικά συστατικά ως πηγή ενέργειας και άνθρακα
- *Μιξότροφα*: πραγματοποιούν τη φωτοσύνθεση ως βασική πηγή ενέργειας τόσο όμως τα οργανικά συστατικά όσο και το CO<sub>2</sub> είναι απαραίτητα. Στην κατηγορία των μικτότροφων περιλαμβάνονται και οι μικροοργανισμοί που μπορούν να ζήσουν είτε αυτότροφα είτε ετερότροφα ανάλογα με την διαθεσιμότητα του φωτός και τη συγκέντρωση των οργανικών συστατικών
- *Φωτοετερότροφα*: σε αυτό το είδος μεταβολισμού απαιτείται φως για να γίνει η αφομοίωση των οργανικών συστατικών ως πηγή άνθρακα.

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη φυκών. Μπορούμε να τους κατηγοριοποιήσουμε σε *αβιοτικούς παράγοντες*: φως, θερμοκρασία, συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών, οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα, pH, αλατότητα, περιεχόμενο σε τοξικά και χημικά σε *βιοτικούς παράγοντες* : παθογενείς μικροοργανισμοί (βακτήρια, μύκητες, ιοί) ανταγωνισμός με άλλα μικροφύκη και τέλος σε *λειτουργικούς παράγοντες*: ρυθμός ανάδευσης, διάλυσης, βάθος και συχνότητα συγκομιδής

- Συγκομιδή βιομάζας (harvesting)

Μόλις τα λιπίδια συντεθούν και συσσωρευτούν στα κύτταρα, σειρά έχει η συγκομιδή της βιομάζας και η απελευθέρωση των λιπιδίων πριν τη διεργασία σχηματισμού του βιοντίζελ. Η διεργασία της συγκομιδής συνεισφέρει στο 20-30% το συνολικού κόστους της παραγωγής της βιομάζας. Η κατάλληλη μέθοδος συγκομιδής μπορεί να περιέχει πάνω από ένα στάδιο ώστε να επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός στερεού-υγρού. Στις βασικές διαθέσιμες τεχνικές περιλαμβάνονται η φυγοκέντριση, η κροκίδωση (flocculation), η διήθηση, καθίζηση, (sedimentation), επίπλευση (flotation). Η επιλογή της καταλληλότερης τεχνικής εξαρτάται από τις ιδιότητες του μικροφύκους, την ποιότητα του επιθυμητού προϊόντος, την επιθυμητή πυκνότητα και υγρασία για την επόμενη διεργασία που ακολουθεί. Το κόστος των τεχνικών συγκομιδής είναι ακόμα αρκετά υψηλό και έχει ένα μεγάλο περιθώριο για έρευνα και ανάπτυξη οικονομικότερης και αποδοτικότερης τεχνικής για τη συγκομιδή μικροφυκών.

- Εκχύλιση ελαίου

Συνήθως μετά τη λήψη των κυττάρων ακολουθεί ξήρανση της βιομάζας. Η ξήρανση επιτυγχάνεται είτε με ξηραντήρες τυμπάνου και με παρεμφερή όργανα και μεθόδους, είτε με οικονομικότερους τρόπους όπως με χρήση της ηλιακής ενέργειας. Το επόμενο στάδιο που ακολουθεί είναι η ρήξη των κυττάρων για την απελευθέρωση των εσωκυτταρικών συστατικών. Οι μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξαρτώνται από τη φύση του μικροφύκους και από το προϊόν που θέλουμε να ανακτήσουμε. Κάποιοι από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται είναι οι ομογενοποιητές κυττάρων, bead mills, υπέρηχοι, μικροκύματα. Η τελευταία έχει αποδειχτεί ως η πιο απλή, εύκολη και αποτελεσματική [38]. Η βιομάζα που συλλέγεται ξηραίνεται υπό κενό μέχρι σταθεροποίηση βάρους και στη συνέχεια κονιοποιείται πριν την εκχύλιση του ελαίου [39]. Μια ακόμη μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η λυοφιλίωση όπου σπάνε τα κύτταρα και σχηματίζουν μια λεπτή σκόνη χωρίς να χρειάζεται κάποια μετέπειτα επεξεργασία. (Στη μέθοδο αυτή το νερό απομακρύνεται με εξάχνωση του κατεψυγμένου διαλύματος [72]).

Η ιδανική μέθοδος εκχύλισης για το βιοντίζελ από μικροφύκη θα πρέπει να είναι εξειδικευμένη ως προς το έλαιο ώστε, να μην εκχυλιστούν άλλου είδους ουσίες και να είναι εκλεκτική ως προς τα συγκεκριμένα είδη λιπιδίων πχ. ουδέτερα λιπίδια. Όσον αφορά τα λιπίδια, η εκχύλιση μπορεί να γίνει κατευθείαν από τη λυοφιλιωμένη βιομάζα. Κάποιοι από τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση είναι μίγματα αιθανόλης-εξανίου, μέθοδος Folch (χρησιμοποιούνται διαλύτες χλωροφόρμιο-μεθανόλη). Μια πιο σύγχρονη και

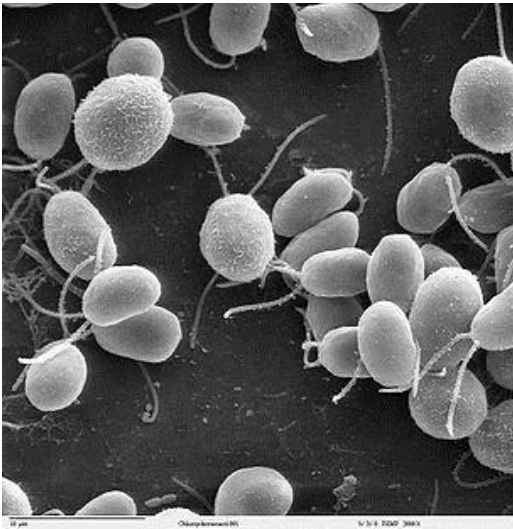
πιο «πράσινη» τεχνολογία για την εκχύλιση είναι το υπερκρίσιμο διοξείδιο το άνθρακα. Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα αποδοτική αλλά το κόστος της είναι εξαιρετικά υψηλό.

Στη συνέχεια το έλαιο που εκχυλίζεται οδηγείται προς τη διεργασία παραγωγής βιοντίζελ με κάποια από τις γνωστές μεθόδους που έχουν αναφερθεί και στα προηγούμενα κεφάλαια (μετεστεροποίηση, πυρόλυση κτλ).

#### **3.5.4 Μικροφύκη και γενετική μηχανική**

Δεδομένου των δυνατοτήτων των μικροφυκών και της υψηλής παραγωγικότητάς τους, είναι πολύ πιθανό, ότι τελικά τα μικροφύκη θα αποδειχθούν η πιο σημαντική πηγή εναλλακτικής ενέργειας [41]. Οι σύγχρονες μεθοδολογίες περιορίζουν την εμπορική βιωσιμότητα της παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη εξαιτίας του κόστους παραγωγής [42]. Κάποιες από τις στρατηγικές που έχουν προταθεί για την οικονομική επάρκεια των βιομηχανιών παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη, είναι η έννοια του βιοδιυλιστηρίου (biorefinery) και η εκμετάλλευση των συμπροϊόντων. Με βάση τις παραπάνω στρατηγικές, η ενσωμάτωση διαφόρων ειδών βιοδιεργασιών και χημικών τεχνολογιών φιλικών προς το περιβάλλον, οδηγεί στη παραγωγή μεγάλης ποικιλίας χημικών υψηλής αξίας καθώς και βιοκαυσίμων. Άλλες στρατηγικές στοχεύουν, στον σχεδιασμό νέων φωτοβιοαντιδραστήρων με υψηλή απόδοση φωτοσύνθεσης και σε νέες τεχνολογίες για τη συγκομιδή και ξήρανση της βιομάζας με αποδοτικότερους και οικονομικότερους τρόπους. Ωστόσο, αυτό που θα δώσει την καλύτερη λύση είναι η εφαρμογή της γενετικής μηχανικής των μεταβολικών μονοπατιών που σχετίζονται με την παραγωγή των λιπαρών οξέων.

Μέχρι και τα τελευταία 10 περίπου χρόνια η πρόοδος της γενετικής μηχανικής στα μικροφύκη ήταν πολύ μικρή και τα τελευταία 15 χρόνια η μεθοδολογία για τον μετασχηματισμό των μικροφυκών αναπτύχθηκε σημαντικά. Σήμερα πάνω από 30 είδη μικροφυκών έχουν τροποποιηθεί επιτυχώς. Ο μικροοργανισμός-μοντέλο πάνω στον οποίο έχουν γίνει οι περισσότερες μελέτες είναι το πράσινο φύκος *Chlamydomonas reinhardtii* (Σχήμα 36).



*Σχήμα 36: Chlamydomonas reinhardtii*  
μονοκύτταρος ευκαρυωτικός μικροοργανισμός  
ανήκει στα πράσινα φύκη. Έχει μελετηθεί  
ευρέως στη γενετική ως μικροοργανισμός-  
μοντέλο.

Στο μικροοργανισμό αυτό έχουν πραγματοποιηθεί σταθερές γενετικές μεταλλάξεις σε επίπεδο πυρήνα και χλωροπλαστών. Οι βασικές τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί για τη μεταφορά DNA στα κύτταρα των μικροφυκών είναι «σωματιδιακός βομβαρδισμός» (particle bombardment), ηλεκτροδιάτρηση (electroporation), μόλυνση με *Agrobacterium*, τεχνικά τρανσποζόνια, ιοί. Τα βασικά προβλήματα των γενετικά τροποποιημένων μικροφυκών είναι ο χαμηλός ρυθμός ανάπτυξής τους και η ποσότητα της έκφρασης των γονιδίων στα είδη μικροφυκών. Από προηγούμενες μελέτες έχει φανεί ότι η απόδοση της έκφρασης εξωγενών γονιδίων είναι πάρα πολύ χαμηλή και για αυτό οι σύγχρονες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ενίσχυση της έκφρασης των γονιδίων στα μικροφύκη ως ετερόλογους ξενιστές. Ακόμα, έχει αποδειχθεί ότι η συχνότητα της μετάλλαξης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του μικροφύκου [41].

### **3.5.5. Μεταβολική μηχανική μικροφυκών και ενίσχυση της παραγωγής βιοκαυσίμων**

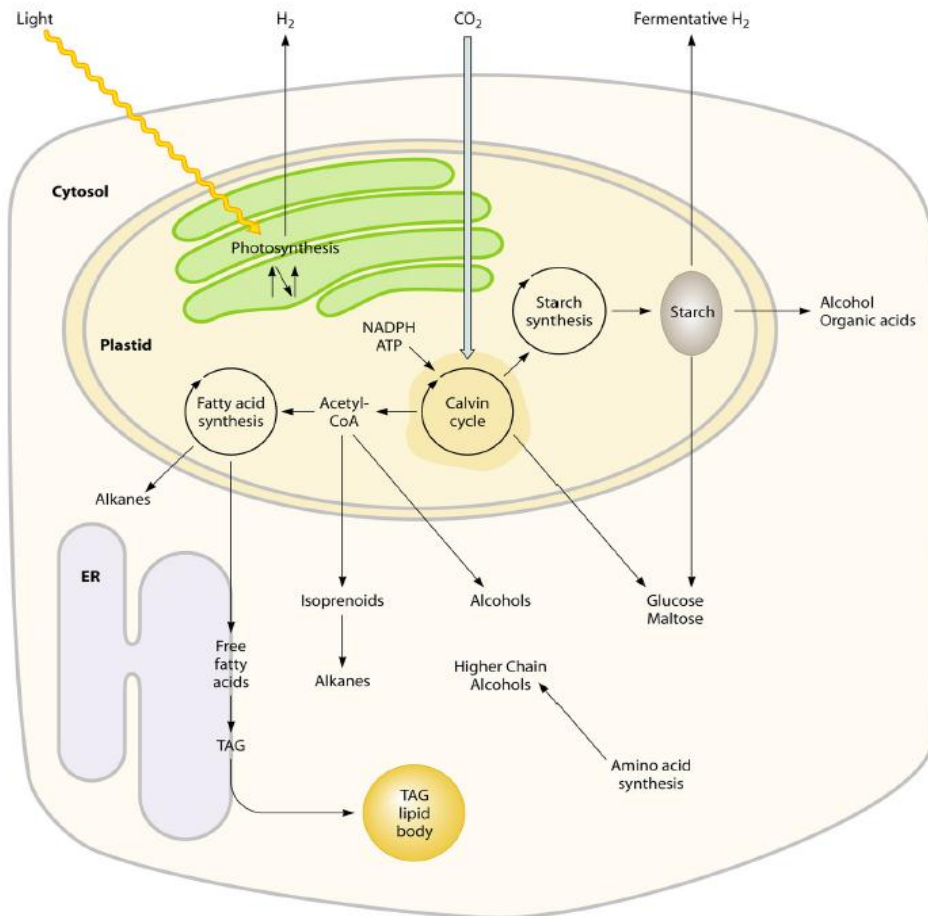
Οι γενετικές μελέτες πάνω στα μικροφύκη έχουν κατευθυνθεί κυρίως προς την ανάλυση της μεταβολικής οδού της φωτοσύνθεσης. Η γενετική τροποποίηση των μικροφυκών είχε ως στόχο την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών όπως ορμονών και αντισωμάτων (εμβόλια) καθώς και βιοεξυγίανση εδάφους μολυσμένο με βαρέα μέταλλα. Επιπλέον, τα περισσότερα μικροφύκη είναι ανίκανα να αναπτυχθούν με εξωγενή γλυκόζη απουσία φωτός. Με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής εκφράστηκαν τα γονίδια για τη μεταφορά γλυκόζης με αποτέλεσμα να μπορούν να μπορούν να αναπτυχθούν και στο σκοτάδι.

Η πρόσφατη επανάσταση των “omics” που περιλαμβάνει τη δομική και λειτουργική γενομική (genomics), τη πρωτεομική (proteomics), μεταβολομική (metabolomics), μεταγραφομική

(transcriptomics) και τέλος τη συστημική βιολογία, συντέλεσαν στο προσδιορισμό των μεταβολικών οδών, στη ρύθμιση και στην βελτιστοποίηση των βιοκαυσίμων.

Η εφαρμογή της γενετικής μηχανικής στα ευκαρυωτικά μικροφύκη για την ενίσχυση της παραγωγής βιοκαυσίμων βρίσκεται ακόμη σε εμβρυακό στάδιο. Εντούτοις, έχουν γίνει αξιοσημείωτες πρόοδοι σε εργαλεία γενετικού χειρισμού πάνω σε μικροφύκη-μοντέλα και έχει επιτευχθεί η χειραγώγηση του κεντρικού μεταβολισμού του άνθρακα στους οργανισμούς αυτούς. Η διαθεσιμότητα βάσεων δεδομένων του γονιδιώματος και πληροφορίες από προηγούμενες μελέτες, συντέλεσαν στο να χαρακτηριστεί η μεταβολική οδός της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων. Η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων στα φυτά και στα μικροφύκη πραγματοποιούνται στα πλαστίδια πριν τη μεταφορά τους στο κυτόπλασμα και το σχηματισμό μορίων δι- και τρι- γλυκεριδίων. Πολλά ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων κωδικοποιούνται από μεμονωμένα γονίδια και εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια. Εκεί είναι απαραίτητα τα πρόδρομα μόρια των λιπαρών οξέων για την παραγωγή των απαραίτητων συμπαραγόντων (cofactor) για τη μιτοχονδριακή ενζυμική δραστηριότητα. (εικόνα 37 ) Τα λιπίδια των μικροφυκών είναι ποικίλα και συχνά αποτελούνται από τριγλυκερίδια και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που είναι επηρρεπής σε αντιδράσεις οξειδωσης επηρεάζοντας, κατ' επέκταση, τις ιδιότητες των παραγόμενων βιοκαυσίμων. Η βιοσύνθεση λιπιδίων και στα μικροφύκη ξεκινά με την ακετυλο-CoA καρβοξυλάση (ACC) η οποία καταλύει την αναντίστρεπτη καρβοξυλίωση του ακετυλο-CoA προς παραγωγή μηλονυλο-CoA. Έχει παρατηρηθεί ότι η υπερέκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την ACC στο μικροφύκος *Chlorella cryptic* ενίσχυσε την ενζυμική δραστηριότητα 2-3 φορές.

Ο χαρακτηρισμός των λιπιδίων των μικροφυκών έχει σπουδαίο ενδιαφέρον για την παραγωγή βιοντίζελ. Η ποιότητα και η ποσότητα των πρόδρομων μορίων του βιοντίζελ στα μικροφύκη είναι συνδεδεμένη με το πως ελέγχεται ο μεταβολισμός των λιπιδίων. Η βιοσύνθεση λιπιδίων, ο καταβολισμός τους και τα μονοπάτια που τροποποιούν το μήκος και το ποσό των κορεσμένων λιπαρών οξέων δεν έχουν μελετηθεί τόσο στα μικροφύκη όσο στα φυτά. Παρόλα αυτά, πολλά από τα γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό λιπιδίων των φυτών έχουν ομόλογα στη γονιδιακή αλληλουχία των μικροφυκών. Για το παραπάνω λόγο, είναι πιθανό κάποιες από τις διαγονιδιακές στρατηγικές που έχουν χρησιμοποιηθεί στα φυτά να μπορούν να είναι αποτελεσματικές και στα μικροφύκη.



Εικόνα 37 :Οι μεταβολικοί οδοί μικροφυκών που εμπλέκονται στη παραγωγή βιοκαυσίμου ER: ενδοπλασματικό δίκτυο (R.Randakovits, Eukaryotic cell, σελ.487)

Υπάρχουν στρατηγικές για την τροποποίηση της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων στα μικροφύκη προς σχηματισμό πιο συμβατού λιπιδιακού προφίλ καθώς και για την έκκριση λιπιδίων από τα κύτταρα στο μέσο καλλιέργειας: Με υπερέκφραση βασικών ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα των πρόδρομων μορίων όπως ακετυλο-CoA, με τη ρύθμιση του καταβολισμού των λιπαρών οξέων παρεμποδίζοντας τη β-οξειδωση ή την υδρόλυση από λιπάσες, αλλάζοντας το βαθμό κορεσμού μέσω της εισαγωγής ή ρύθμισης της δεσατουράσης και τέλος, με την βελτιστοποίηση του μήκους των λιπαρών οξέων με θειοεστεράσες. Η υπερέκφραση του ACC γονιδίου από μόνο του δεν αρκεί για την αύξηση ολόκληρου του λιπιδιακού μονοπατιού. Η παρεμπόδιση ανταγωνιστικών οδών, πχ. β-οξειδωση, μπορούν να ενισχύσουν την λιπιδιακή βιοσύνθεση. Για να ενισχυθεί η λιπιδιακή βιοσύνθεση χρειάζεται να υπερεκφραστεί πάνω από ένα ένζυμο-κλειδί του μονοπατιού σχηματισμού των τριγλυκεριδίων.

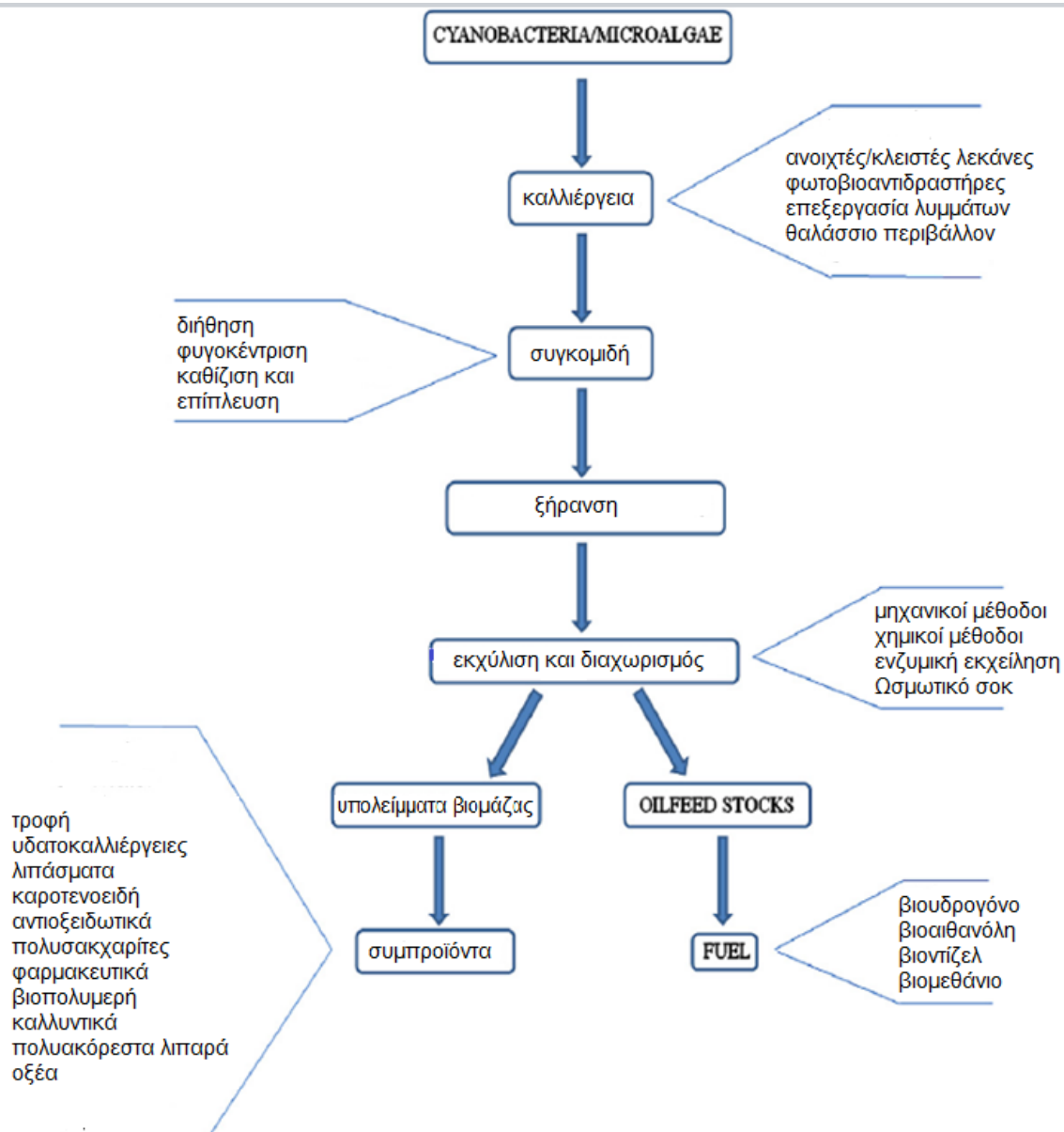
Παρά αυτές τις προόδους υπάρχουν τουλάχιστον δύο βασικά εμπόδια που σχετίζονται με τη γενετική μηχανική στα μικροφύκη: το ένα είναι ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροφυκών και το άλλο είναι η απόδοση της έκφρασης εξωγενών γονιδίων στα μικροφύκη. Από τις πιο



δαπανηρές διεργασίες για την παραγωγή βιοκαυσίμων είναι η εκχύλιση του επιθυμητού συστατικού. Μια πιθανή λύση είναι η επέμβαση στη βιολογία του κυττάρου με στόχο την έκκριση των λιπιδίων στο μέσο ανάπτυξης. Υπάρχουν διάφορα μονοπάτια στη φύση που οδηγούν στην έκκριση υδρόφοβων συστατικών. Προηγούμενες έρευνες πάνω στην έκκριση λιπαρών οξέων στις ζύμες έδειξαν ότι η αδρανοποίηση των γονιδίων που εμπλέκονται στη β-οξειδωση και η δραστηριότητα της ακυλο-CoA συνθάσης οδηγεί στην αποβολή λιπαρών οξέων σε κάποιες περιπτώσεις. Παρόμοιες μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στα μικροφύκη. Από τις πιο απλές προσεγγίσεις για την ενίσχυση της έκκρισης των λιπιδίων από μικροφύκη είναι η χρήση ABC μεταφορέων (Υπεροικογένεια ολιγοπεπτιδίων υπεύθυνων για την μεταφορά μεγάλου εύρους υποστρωμάτων διαμέσου των μεμβρανών [43]). Οι ABC μεταφορείς μεσολαβούν για την έκκριση διαφόρων ειδών φυτικών κηρών [41].

### 3.5.6 Κυανοβακτήρια

Ένας ακόμη φωτοσυνθετικός μικροοργανισμός που παίζει σημαντικό ρόλο στη παραγωγή βιοκαυσίμων είναι τα κυανοβακτήρια. Τα κυανοβακτήρια είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί και έχουν ένα σημαντικό ρόλο τη βιολογική δέσμευση του άνθρακα, στη παραγωγή οξυγόνου και στο κύκλο του αζώτου. Τα κυανοβακτήρια μπορούν να αποτελέσουν εξαιρετικά κυτταρικά εργοστάσια τα οποία συλλέγουν την ηλιακή ενέργεια και μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό διοξείδιο του άνθρακα σε χρήσιμα προϊόντα. Τα κυανοβακτήρια μετατρέπουν το 10% της ηλιακής ενέργειας σε βιομάζα ενώ οι συμβατικές ενεργειακές σοδιές όπως το ζαχαροκάλαμο μετατρέπει το 1% και τα φύκη το 5%. Υποστηρίζεται ότι έχουν βρεθεί ίχνη απολιθωμάτων κυανβακτηρίων ηλικίας 3,5 δισεκατομμυρίων χρόνων και είναι πολύ πιθανό να έπαιξαν καίριο ρόλο στο σχηματισμό του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και να έχουν εξελιχθεί στους σημερινούς χλωροπλάστες των φυκών και φυτών. Τα κυανοβακτήρια, γνωστά και ως κυανοπράσινα φύκη, παρουσιάζουν ποικιλομορφία στο μεταβολισμό και στη δομή τους ανάλογα με τη μορφολογία και το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Τα κυανοβακτήρια και τα μικροφύκη είναι οι μόνοι, μέχρι στιγμής, γνωστοί οργανισμοί που είναι ικανοί για τη φωτοσύνθεση και παραγωγή υδρογόνου. Η φωτοβιολογική παραγωγή υδρογόνου από μικροοργανισμούς έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού υπόσχεται ανανεώσιμη ενέργεια από τις πιο άφθονες φυσικές πηγές: φως και νερό. Πέρα από το υδρογόνο τα κυανοβακτήρια όπως και τα μικροφύκη αποτελούν πρώτη ύλη και για άλλες πηγές ενέργειας (βιοαιθανόλη, βιοντίζελ, βιομεθάνιο). [44] (Σχήμα 38)



Εικόνα 38: Διάγραμμα ροής που απεικονίζει την παραγωγή βιοκαυσίμων και συμπροϊόντων από την καλλιέργεια κυανοβακτηρίων και μικροφύκων [44]

### 3.5.7 Βιοκαύσιμα και κυανοβακτήρια

Συνοπτικά, η ανανεώσιμη στρατηγική για την ανάπτυξη ανανεώσιμων βιοκαυσίμων από κυανοβακτηρία είναι η σύνθεση συστατικών βασισμένων σε λιπαρά οξέα, χρησιμοποιώντας την ηλιακή ενέργεια ως πηγή ενέργειας, διοξείδιο του άνθρακα ως πηγή άνθρακα και τα κυανοβακτήρια ως το βιολογικό σύστημα. Η βιοσύνθεση βιοκαυσίμων βασισμένων στα λιπαρά οξέα στα κυανοβακτήρια περιλαμβάνει δύο βήματα: την υπερπαραγωγή λιπαρών οξέων και την μετεστεροποίηση προς σχηματισμό αιθυλεστέρων των λιπαρών οξέων. Η βιοσύνθεση των λιπιδίων είναι παρόμοια με αυτή των μικροφυκών και των οργανισμών γενικότερα. Η αδρανοποίηση ενός γονιδίου που είναι υπεύθυνο για το πρώτο βήμα της

αποικοδόμησης των λιπιδίων (fatty acyl-CoA synthase) οδήγησε στη συγκέντρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων στο μέσο καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση των λιπαρών οξέων του άγριου τύπου *Synechocystis sp. PCC8803* ήταν ελάχιστη και μετά τη γονιδιακή τροποποίηση παρατηρήθηκε στο μέσο συγκέντρωση  $6.4\text{nmol}^{-1}\text{OD}_{750}^{-1}$  λιπαρών οξέων. Πρόσφατα, δημοσιεύτηκε από τη PNAS μια επιτυχής στρατηγική για την υπερπαραγωγή και έκκριση λιπαρών οξέων με τη διαγραφή των S στρώματος πρωτεϊνών. Αυτό οδήγησε σε αποδόσεις  $133\pm 12\text{ mg/L}$  ανά μέρα για κυτταρική πυκνότητα  $0.23\text{ g}$  ξηρής βιομάζας ανά λίτρο. Ακόμα, με τη χρήση συγκεκριμένων ενζύμων, πχ. ACP-ακυλοθειοεστεράσες, όπως και για τα μικροφύκη, μπορούμε να ελέγξουμε το μήκος της αλυσίδας των λιπαρών οξέων. Για το βιοντίζελ συγκεκριμένα το επιθυμητό μήκος είναι 14-18 άνθρακες [45].

## **Κεφάλαιο 4: Η Βιοτεχνολογία στη παραγωγή βιοντίζελ**

### **4.1 Μεταβολικές ρυθμίσεις των μικροβιακών λιπιδίων**

Τα SCO παράγονται από διάφορους ελαιούχους μικροοργανισμούς, τα ερωτήματα είναι γιατί οι μικροοργανισμοί μπορούν να παράγουν και να συσσωρεύουν έλαια και γιατί κάποιοι είναι ικανοί να συσσωρεύουν περισσότερα λιπίδια από άλλα είδη; Δεν έχουν όλοι οι μικροοργανισμοί την ικανότητα να συσσωρεύουν έλαια και ιδιαίτερα σε μορφή τριγλυκεριδίων. Περίπου τα τελευταία 20 χρόνια έχουν γίνει προσπάθειες για την κατανόηση της διεργασίας συσσώρευσης λιπιδίων στους λεγόμενους ελαιούχους μικροοργανισμούς. Παράδειγμα στα 600 είδη ζυμών λιγότερα από 30 έχουν βρεθεί μέχρι στιγμής να συσσωρεύουν πάνω από 25% του βάρους της βιομάζας τους σε έλαιο. Τα *Rhodotorula spp.* και *Cryptococcus curvatus* μπορούν να συγκεντρώσουν 40-70% της βιομάζας τους σε λιπίδια, ενώ ο *Saccharomyces cerevisiae* και *Candida utilis* δεν μπορούν να ξεπεράσουν το 5-10% ακόμα και αν αναπτύσσονται στις ίδιες συνθήκες.

Η συγκέντρωση λιπιδίων στους ελαιούχους μικροοργανισμούς ξεκινά όταν εξαντλείται ένα θρεπτικό συστατικό από μέσο καλλιέργειας (συνήθως είναι το άζωτο), αλλά περίσσεια άνθρακα (στη μορφή της γλυκόζης) εξακολουθεί να αφομοιώνεται από τα κύτταρα και να μετατρέπεται σε τριγλυκερίδια. Ταυτόχρονα συντίθενται λιπίδια κατά τη φάση ισορροπίας της κυτταρικής ανάπτυξης, με σχεδόν ίδιο ρυθμό. Ο περιορισμός του αζώτου, εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου και το λιπίδιο που σχηματίζεται αποθηκεύεται στο υπάρχον κύτταρο το οποίο πια δεν μπορεί να διαιρεθεί. Αυτός ο λόγος οδηγεί στη συσσώρευση

λιπιδίων. Δύο κρίσιμα περιοριστικά ένζυμα το μηλικό ένζυμο (malate enzyme) και η κιτρική λυάση (ATP:citrate lyase, ACL) έχουν επίδραση στη συσσώρευση των λιπιδίων. Υπάρχει ένας ισχυρός συσχετισμός ανάμεσα στη δραστικότητα της ACL και της ικανότητας συσσώρευσης λιπιδίων σε ζύμες και μύκητες και άλλους ελαιούχους μικροοργανισμούς. Παρόλα αυτά, έχει βρεθεί ένας μικρός αριθμός ζυμών όπου δρα η ACL αλλά δεν συγκεντρώνονται λιπίδια πάνω από ένα συγκεκριμένο ποσοστό. Συνεπώς, η ACL είναι προαπαιτούμενο για τη συγκέντρωση των λιπιδίων, και η κατοχή του δεν οδηγεί απαραίτητα στη συσσώρευση τους και για αυτό δεν μπορεί να είναι ο μοναδικός παράγοντας. Στη πραγματικότητα άλλα ένζυμα είναι αυτά που είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο και την έκταση της βιοσύνθεσης των λιπιδίων σε κάθε μικροοργανισμό.

Η συνολική μάζα των μικροβιακών λιπιδίων ρυθμίζεται επίσης από την περιεκτικότητα των λιπαρών οξέων. Αυτό σημαίνει ότι ο έλεγχος των παραγόντων που ρυθμίζουν την σύνθεση των λιπαρών οξέων, μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό μεγάλου ποσού SCO. Υπάρχουν διάφορα είδη ενζύμων που επηρεάζουν την σύνθεση των λιπαρών οξέων όπως η ακετυλο-CoA καρβοξυλάση (ACCase). Αυτό είναι το ένζυμο που καθορίζει το ρυθμό της σύνθεσης και καταλύει την πρώτη αντίδραση των λιπαρών οξέων στους μικροοργανισμούς. Εάν χρησιμοποιηθεί η σύγχρονη βιοτεχνολογία για την ενίσχυση της δραστικότητας του in vivo τότε μπορεί να οδηγηθούμε σε υψηλά επίπεδα λιπαρών οξέων. Παραδείγματος χάριν, το γονίδιο του ACCase στο E.Coli κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδια και εκφράστηκε σε BL21(DE3) και τα αποτελέσματα φανέρωσαν μια 6πλασια αύξηση στο ρυθμό σύνθεσης των λιπαρών οξέων [24].

#### **4.2 Βελτίωση παραγωγής των μικροβιακών λιπιδίων**

Η συνεχής εντατική έρευνα και ανάπτυξη της μικροβιακής παραγωγής ελαίου αποσκοπεί στη βελτίωση του οικονομικού συναγωνισμού των μικροβιακών λιπιδίων σε σχέση με τα λιπαρά από φυτά και ζώα. Τρία είναι τα βασικά μονοπάτια που έχουν αναφερθεί για την οικονομική βελτίωση του βιοντίζελ από μικροοργανισμούς:

- ✓ Έρευνα για κατάλληλους μικροοργανισμούς
- ✓ Γενετική και μεταβολική μηχανική
- ✓ Χρήση των παραπροϊόντων

## Εξέταση για κατάλληλους μικροοργανισμούς

Το πρώτο και βασικότερο βήμα είναι ο περιορισμός του αριθμού των ειδών για περεταίρω μελέτη και πρακτική χρήση. Αν και μερικοί τύποι ελαιούχων μικροοργανισμών μπορούν να συνθέσουν έλαιο, έχουν περιορισμένη δυνατότητα στη παραγωγή βιομάζας. Χρησιμοποιώντας τεχνικές μεταλλάξεις στη μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων οδηγούμαστε σε είδη που παράγουν περισσότερη βιομάζα από τον άγριο τύπο (wild type). Πρόσφατα, Έλληνας ερευνητής ανέφερε ότι το *Mortirella isabellina* καλλιεργήθηκε σε μέσο με περιορισμένο άζωτο και παρουσίασε αξιοσημείωτη ανάπτυξη (μέχρι 35,9 g/L) και υψηλή πρόσληψη γλυκόζης ακόμα και με αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων στα 100 g/L στο μέσο [24].

## Γενετική και μεταβολική μηχανική

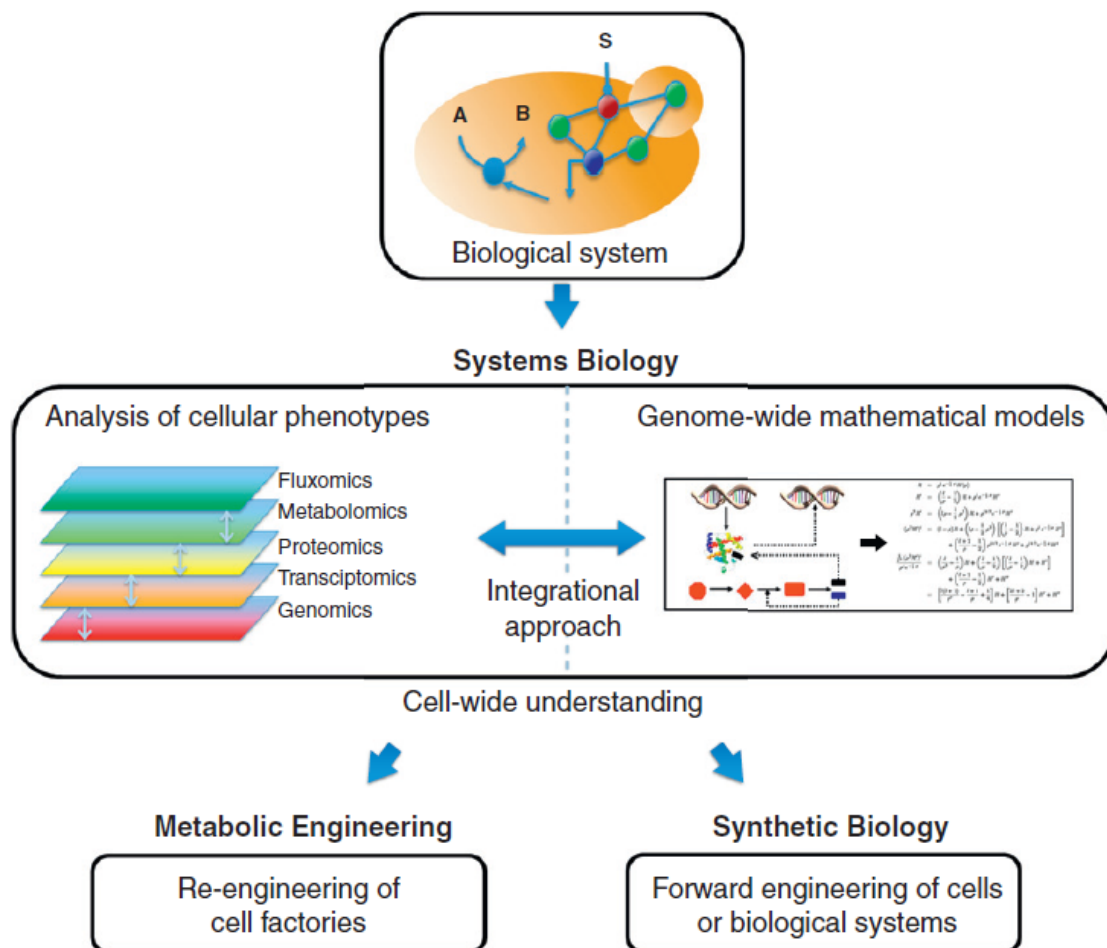
Με την ανάπτυξη της βιοχημείας και της μοριακής βιολογίας (όπως το ανασυνδυασμένο DNA) η πρόοδος της μηχανικής στους μικροοργανισμούς έχει οδηγήσει σε υποθέσεις όπως ότι συγκεκριμένα έλαια μπορούν να εμπορευματοποιηθούν εάν τα γονίδια των άγριων-τύπων (wild-type) ελαιούχων μικροοργανισμών τροποποιηθούν κατάλληλα. Είναι πολύ πιθανό αυτό να έχει σημαντικό αντίκτυπο στη οικονομική παραγωγή βιοντίζελ από μικροφύκη [24].

Η ανάπτυξη της μεταβολικής μηχανικής όπως και άλλων τεχνολογιών που θα αναφερθούν παρακάτω είναι πολλά υποσχόμενες τεχνολογίες. Η μεταβολική μηχανική είναι η επιστήμη που συνδυάζει την συστηματική ανάλυση μεταβολικών και άλλων οδών με μοριακές και βιολογικές τεχνικές για τη βελτίωση τεχνικών ιδιοτήτων σχεδιάζοντας και εφαρμόζοντας λογικές γενετικές τροποποιήσεις. Έτσι η μεταβολική μηχανική έχει να κάνει με μετρήσεις των μεταβολικών ροών και τη διευκρίνιση του ελέγχου τους ως παράγοντες της μεταβολικής λειτουργίας και φυσιολογίας του κυττάρου. Η καινοτομία της μεταβολικής μηχανικής είναι ότι εγκαταλείπει τα παραδοσιακά πρότυπα του κυτταρικού μεταβολισμού έχοντας μια πιο ολιστική άποψη. Υπό αυτή την έννοια η μεταβολική μηχανική ταίριαξε ως μια πλατφόρμα για την ανάλυση του γονιδιώματος και των δεδομένων για την έκφραση γονιδίων σε συνδυασμό με δεδομένα του πρωτεϊνικού περιεχομένου και των *in vivo* μεταβολικών ροών. Η γνώση και η κατανόηση ολόκληρου του μεταβολισμού από τη μεταβολική μηχανική θα έχει εφαρμογή στη βιοτεχνολογία καθώς και σε στρατηγικές για στοχευμένες επιλογές φαρμάκων ή στο σχεδιασμό γονιδιακών θεραπειών [46].

Η βελτίωση της παραγωγής των λιπιδίων στα φύκη παραμένει ένας από τους πιο σημαντικούς στόχους της μεταβολικής μηχανικής. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει

στραφεί στο βιοντίζελ διαμέσου ελαιούχων ζυμών και άλλων μικροβίων. Με βάση την τεχνολογία αυτή επιδιώκεται η μετατροπή της κυτταρινούχου ύλης σε λιπίδια με τη βοήθεια μικροοργανισμών. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα λίπη σχηματίζονται στο εσωτερικό του κυττάρου με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός και η εκχύλισή τους να απαιτεί επιπλέον ενέργεια. Αυτό αποτελεί μια πρόκληση για τη μεταβολική μηχανική και για αυτό έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στο σχεδιασμό για έκκριση των λιπαρών προϊόντων. Λεπτομέρειες για την έκκριση των λιπαρών οξέων ακόμη και σε οργανισμούς όπως το *E.coli* και *S. Cerevisiae* δεν έχουν κατανοηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό. Αυτά τα πεδία αποτελούν κάποιους από τους βασικούς στόχους της μεταβολικής μηχανικής [47].

Η κατανόηση του συμπλέγματος των κυτταρικών συστημάτων είναι απαραίτητη για τη δημιουργία νέων φαινοτύπων μέσω της μεταβολικής μηχανικής και της συστημικής βιολογίας (Σχήμα 39). Με τις παραδοσιακές μεθόδους της μοριακής βιολογίας ήταν πολύ δύσκολο να γίνουν πολλές τροποποιήσεις ταυτόχρονα και έτσι ήταν δύσκολο να εκτιμηθεί ένα σύστημα. Αυτό άλλαξε με την εισαγωγή της συστημικής βιολογίας στη βιομηχανική βιοτεχνολογία και στη μεταβολική μηχανική. Σήμερα η συστημική βιοτεχνολογία προσφέρει στη στο τομέα αυτό με δύο τρόπους: (1) με την προχωρημένη ανάλυση των κυτταρικών φαινοτύπων (2) διαμέσου των λεπτομερών μεταβολικών μοντέλων που προορίζονται για σχεδιασμό βελτιωμένων κυττάρων.



Current Opinion in Biotechnology

Σχήμα 39 : Προσέγγιση της συστημικής βιολογίας. Συμπλέγματα βιολογικών συστημάτων αναλύονται με ταχείες διαβιβαστικές αναλυτικές τεχνικές και αφομοιώνονται σε μαθηματικά μοντέλα γονιδιώματος ώστε να κατασκευαστούν νέα κύτταρα ή να εμπλουτιστεί η μηχανική των κυττάρων ή των βιολογικών συστημάτων (Bouke de Jong, CoBiot, σελ.3)

Σήμερα είναι δυνατόν να αναλυθεί ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων που επηρεάζουν τα κύτταρα χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνολογίες “omics”. [48] Ο όρος omics είναι ένας γενικός ορισμός για κλάδους επιστήμης και μηχανικής που αφορούν πληροφορίες των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων πάνω σε διάφορα omes (Τα omes αναφέρονται στο αντικείμενο της μελέτης αυτών των πεδίων). Οι βασικοί στόχοι (1) η καταγραφή πληροφοριών για στοιχεία όπως γονίδια, πρωτεΐνες και δεσμούς (2) η εύρεση των σχέσεων αλληλεπίδρασης των στοιχείων αυτών (3) τροποποιήσεις δικτύων και στοιχείων για την κατανόηση και το χειρισμό των ρυθμιστικών μηχανισμών (4) αφομοίωση των omes και omics [66]. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνολογία “omics” είναι αυτή της ανάλυσης της γονιδιακής μεταγραφής (genome-wide transcription analysis). Η τεχνολογία αυτή επιτρέπει την άμεση ενσωμάτωση πληροφοριών πάνω σε γονιδιακό επίπεδο χρησιμοποιώντας

διάφορες προσεγγίσεις. Σε πολλές περιπτώσεις είναι πολύ χρήσιμο να συνδυάζονται διαφορετικές τεχνολογίες “omics” για να κατανοηθεί πως οι γενετικές διαγραφές ή υπερεκφράσεις οδηγούν σε συγκεκριμένους φαινότυπους. Αυτό έχει φανεί πολύτιμο στο να κατανοηθούν εις βάθος τα σύνθετα ρυθμιστικά μονοπάτια που ελέγχουν το μεταβολισμό. Επίσης, η χρήση των μαθηματικών μοντέλων για το σχεδιασμό κυττάρων είναι ένα άλλο κλειδί της συστημικής βιολογίας στη μεταβολική μηχανική. Με τη βοήθεια των μαθηματικών μοντέλων είναι εφικτό να συνδυάζεται η μοντελοποίηση απευθείας με τους στόχους της μεταβολικής μηχανικής [48].

Η αλλαγή του βαθμού ακορεστότητας των λιπαρών αλυσίδων καθώς και η αύξηση και μείωση του μήκους της αλυσίδας των λιπαρών οξέων είναι οι βασικές προκλήσεις για τη τροποποίηση λιπιδίων. Όλα αυτά διακανονίζονται από ένζυμα. Όμως τα περισσότερα ένζυμα συνδέονται με τη μεμβράνη πράγμα που δυσχεραίνει τις προσπάθειες μελέτης των λειτουργιών τους. Τρεις πολύ βασικές και αλληλένδετες μεταξύ τους γενετικές τεχνολογίες εμπλέκονται: 1. Κλωνοποίηση των γονιδίων των κρίσιμων ενζύμων 2. διαγονιδιακή έκφραση αυτών των γονιδίων που αποσκοπεί στη δημιουργία ενός ανασυνδυασμένου στελέχους που παράγει υψηλό ποσό μικροβιακού ελαίου 3. Τροποποίηση των κλωνοποιημένων γονιδίων ώστε να εκφραστεί η πρωτεΐνη. Υπάρχουν πρόσφατα παραδείγματα ανασυνδυασμένων ελαιούχων μικροοργανισμών. Τέτοια παράγωγα λιπαρών οξέων είναι οι κηροί (wax ester) από ανασυνδυασμένο *Pseudomonas citronellolis*, εστέρες βουτανόλης (FABEs) από ανασυνδυασμένο *E.coli* και μεθυλεστέρες (FAMEs) από ανασυνδυασμένο *S. Cerevisiae*. Με ετερόλογη έκφραση (heterologous expression: ενός στοιχείου του κυττάρου το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν υπάρχει στο είδος αυτό αλλά προέρχεται από κάποιο άλλο [43].) των αποκαρβοξυλασών του πυροσταφυλικού οξέος (pyruvate decarboxylase) και αφυδρογονασών των αλκοολών από το *Zymomonas mobilis* και της μη εξειδικευμένης ακυλοτρανσφεράσης από *Actinobacter baylyi* στέλεχος ADP1, στο *E.coli*, οδήγησε σε συγκεντρώσεις FAEE1.28 g/L και περιεχόμενο in vino 26% ξηρής κυτταρικής μάζας.

Μέχρι στιγμής μεγαλύτερο βάρος έχει δοθεί στους ελαιούχους μικροοργανισμούς κυρίως εξαιτίας της ικανότητας τους να συσσωρεύουν υψηλά ποσά εσωκυτταρικών λιπιδίων, των σχετικά υψηλών ρυθμών ανάπτυξης και της ομοιότητας των κλασμάτων τριγλυκεριδίων με τα φυτικά έλαια. Όταν όμως μιλάμε για παραγωγή βιοντίζελ, μόνο αυτά με υψηλά ποσοστά στεατικού οξέος (C18:0) και ελαϊκού οξέος (C18:1) ενδιαφέρουν γιατί αυτά τα μικροβιακά λιπίδια μιμούνται τις ιδιότητες υψηλής αξίας ελαίων, τη βελτιωμένη οξειδωτική σταθερότητα και την ικανότητα προσαρμογής στη βιομηχανική παραγωγή βιοντίζελ.



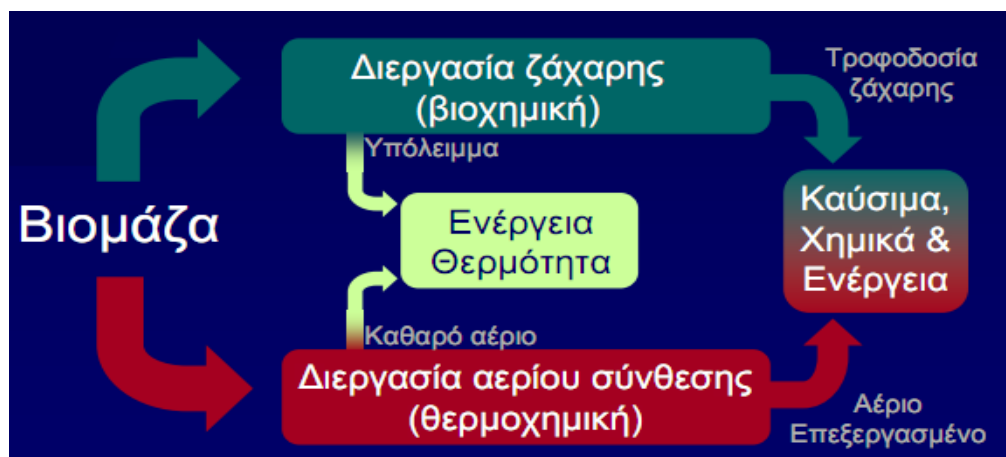
Η αλλαγή της περιεκτικότητας των λιπιδίων των ελαιούχων μικροοργανισμών ώστε να ικανοποιεί τη παραγωγή βιοντίζελ, και τροποποίηση των λιπαρών οξέων με τις μεθόδους της γενετικής μηχανικής, έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία. Έτσι η σύνθεση λιπιδίων με ποικίλη σύσταση λιπαρών οξέων είναι εφικτή με την καλλιέργεια ελαιούχων μικροοργανισμών υπό διαφορετικές συνθήκες και με διαφορετικές μεταβολικές ρυθμίσεις. Την δεκαετία του '90 αναφέρθηκε ότι παρατηρήθηκε αλλαγή στη σύσταση των λιπαρών οξέων των συσσωρευμένων λιπιδίων διαφόρων ελαιούχων κυττάρων, όταν αυτά υποβλήθηκαν σε θερμοκρασιακές αλλαγές. Παράδειγμα, στους 20°C η αναλογία παλμιτικού οξέος μειώθηκε ενώ του παλμιτοελαϊκού και βαξενικού οξέος αυξήθηκε. Τόσο για τα βακτήρια όσο και για τις ζύμες έχει αναφερθεί ότι αυξάνεται η αναλογία των ακόρεστων λιπαρών οξέων με τη μείωση της θερμοκρασίας [24].

Τα έλαια προερχόμενα από μικροφύκη διαφέρουν από τα φυτικά έλαια όντας πλουσιότερα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με τέσσερις ή περισσότερους απλούς δεσμούς, γεγονός που το κάνει ευπαθή σε οξειδωση κατά την αποθήκευση και με αποτέλεσμα να υπάρχουν προβληματισμοί για τη χρήση του στη παραγωγή βιοντίζελ. Για παράδειγμα ο βαθμός της ακορεστότητας του ελαίου του μικροφύκου και της περιεκτικότητας του σε λιπαρά οξέα με τέσσερις ή παραπάνω διπλούς δεσμούς μπορεί να αναχθεί εύκολα με μερική καταλυτική υδρογόνωση του ελαίου. Οι διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας επίσης παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνθεση λιπιδίων όπως για παράδειγμα η αναλογία C:N η οποία είναι από τους βασικότερους παράγοντες. Όταν οι ελαιούχοι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε περίσσεια άνθρακα και περιορισμένη ποσότητα αζώτου (υψηλό C:N) μπορεί να συσσωρευθούν >60% του κυτταρικού ξηρού βάρους σε εσωκυτταρικά λιπίδια. Η συγκέντρωση των λιπιδίων του *C. curvatus* έφτασε τη μέγιστη τιμή των 70 g/L και τα βασικά λιπίδια ήταν τα παλμικό (C16:0) στεατικό (C18:0) και το ελαϊκό οξύ (C18:1). Παρατηρήθηκε μια σημαντική διαφορά στη σύσταση των λιπαρών οξέων σε δείγματα από *Bacillus subtilis* που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό (C:N=50) και σε αυθεντικό θρεπτικό υλικό. Όταν η αναλογία C:N αυξήθηκε διακλαδισμένα λιπαρά οξέα ενίσχυσαν την παραγωγή λιπιδίων από 16.3% σε 42.7%. Ως εκ τούτου το πως μπορεί να βελτιωθεί το σύνολο των λιπαρών οξέων και να μεταβληθεί η σύσταση των λιπιδίων ώστε να είναι δυνατή η προσαρμογή του στη παραγωγή βιοντίζελ με χρήσιμες μεθόδους είναι πολύ σημαντικό [24].

## Πλήρης χρήση παραπροϊόντων

Κατά την παραγωγή των λιπαρών οξέων συνήθως σχηματίζονται και παραπροϊόντα που είναι χρήσιμα στη βιομηχανία. Εκτός από τα έλαια, οι ελαιούχοι μικροοργανισμοί περιέχουν σημαντικές ποσότητες πρωτεϊνών, υδατανθράκων και άλλων θρεπτικών συστατικών. Έτσι το πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα παραπροϊόντα αυτά στη βιομηχανία είναι ένας ακόμη τρόπος για να μειωθεί το κόστος παραγωγής βιοντίζελ. Για παράδειγμα τα υπολείμματα της βιομάζας από τη παραγωγή βιοντίζελ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως τροφή για τα ζώα καθώς και για παραγωγή μεθανίου με αναερόβια χώνεψη. Ακόμη η γλυκερόλη που σχηματίζεται κατά τη παραγωγή βιοντίζελ μπορεί με μερικές τροποποιήσεις να αποτελέσει μια σπουδαία χημική ουσία. Επίσης, η τιμή του τελικού προϊόντος μπορεί να μειωθεί σημαντικά με αυτό το τρόπο [24].

Στο σημείο αυτό, αξίζει να αναφέρουμε λίγα λόγια για την έννοια του βιοδιυλιστηρίου (biorefinery). Το βιοδιυλιστήριο είναι η διαδικασία παραγωγής βιοκαυσίμων από βιομάζα συμπεριλαμβανομένου και την περαιτέρω αξιοποίηση των παραπροϊόντων. Ουσιαστικά, η έννοια του βιοδιυλιστηρίου ενσωματώνει τη διαδικασία μετατροπής βιομάζας και τον εξοπλισμό για την παραγωγή καυσίμων, ενέργειας και χημικών από αυτήν. Ο σκοπός του βιοδιυλιστηρίου είναι να μετατρέψει τη βιομάζα σε χρήσιμα προϊόντα (Σχήμα 40) [49]. Η βιοδιύλιση αναφέρεται στη κλασματοποίηση της βιομάζας σε διάφορα ξεχωριστά προϊόντα που πιθανότατα μπορούν να υποβληθούν σε επιπλέον βιολογική, (βιο)χημική, φυσική ή/και θερμική διεργασία και διαχωρισμό. Με την συν-παραγωγή σχετικής υψηλής αξίας χημικών (πχ. φαρμακευτικά, πολυμερή) το κόστος παραγωγής των δευτερογενών προϊόντων (πχ. ενέργεια, καύσιμα, θέρμανση) μπορεί να ανταγωνιστεί τις τιμές της αγοράς, ειδικά όταν το βιοδιυλιστήριο ενσωματωθεί στις ήδη υπάρχουσες εγκαταστάσεις [50].



Σχήμα 40 : Έννοια βιοδιυλιστηρίου [49]

### 4.3 Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων σε μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται για παραγωγή SCO

Αν και όλοι οι ζωντανοί μικροοργανισμοί πρέπει να συνθέτουν ένα μικρό ποσό λιπιδίων για τις μεμβράνες τους και για τις διάφορες δομικές και λειτουργικές διεργασίες, μόνο ένας σχετικά μικρός αριθμός μικροοργανισμών είναι ικανός να συσσωρεύσει λιπίδια πάνω από 20% της κυτταρικής του μάζας το οποίο λειτουργεί ως απόθεμα. Τα βακτήρια γενικά δεν αποθηκεύουν TAGs αλλά βουτυλρεστέρες (poly-β-hydroxy-butyrate) και αλκανοειδή (alkanoates) ως αποθηκευτικά πολυμερή. Ως εκ τούτου, η συσσώρευση ελαίου βρίσκεται μόνο σε κάποια είδη ζυμών, μυκήτων και σε ένα μικρό αριθμό φυκών. Αυτά είναι που ορίζονται ως ελαιούχα είδη. Με μια πρώτη ματιά η βιοσυνθετική οδός είναι ίδια με αυτή των μη ελαιούχων ειδών. Υπάρχει όμως, μια κρίσιμη διαφορά ανάμεσα στους ελαιούχους και μη ελαιούχους μικροοργανισμούς.

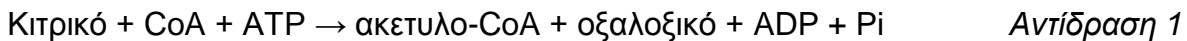
Για να επιτευχθεί συσσώρευση λιπιδίων ένας μικροοργανισμός χρειάζεται να αναπτυχθεί σε μέσο με περίσσεια άνθρακα και περιορισμένο άζωτο (το άζωτο είναι η πιο συνηθισμένη περίπτωση). Τότε γίνεται συντονισμός των λειτουργιών του κυττάρου προς σύνθεση λιπιδίων και σχηματισμό διάσπαρτων μικροσταγονιδίων λιπιδίων στο κύτταρο. Η συσσώρευση ελαίου μπορεί να φτάσει το 70% της κυτταρικής βιομάζας αλλά όχι σε όλα τα είδη. Οι μη ελαιούχοι μικροοργανισμοί δεν συσσωρεύουν λιπίδια. Όταν τοποθετούνται σε όμοιο περιβάλλον-περιορισμένο σε άζωτο- είτε θα σταματήσουν τον πολλαπλασιασμό τους είτε θα σχηματίσουν διάφορους πολυσακχαρίτες, πχ. γλυκογόνο, εάν συνεχίσουν να αφομοιώνουν το διαθέσιμο υπόστρωμα υδατανθράκων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως η ικανότητα του μικροοργανισμού να συσσωρεύει μεγάλες ποσότητες ελαίου πρέπει να βρίσκεται εκτός του μηχανισμού βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων, εφόσον ο μηχανισμός αυτός είναι κοινός για όλους του μικροοργανισμούς. Οι λόγοι για την παραγωγή ελαίου βρίσκονται:

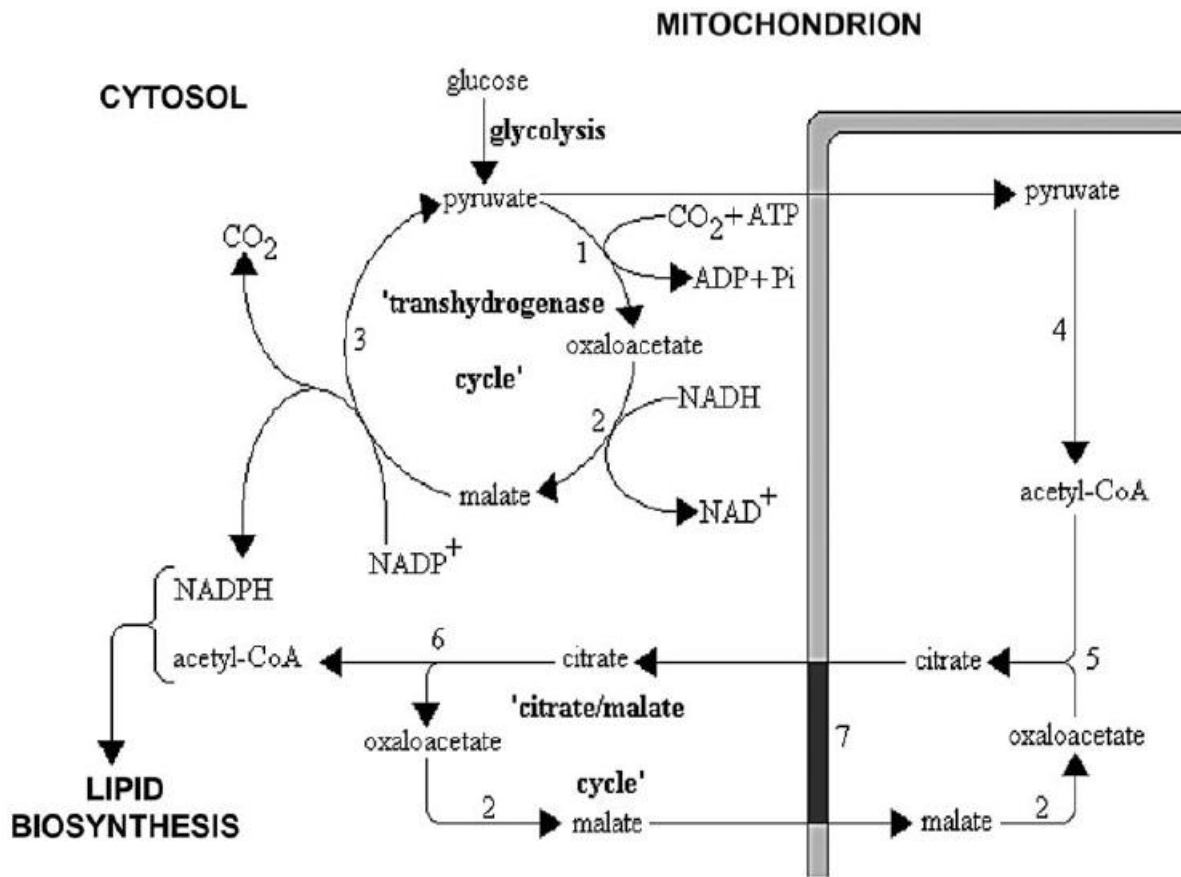
- Στην ικανότητα συνεχούς και επαρκούς παραγωγής ακετυλο-CoA απευθείας στο κυτοσόλιο του κυττάρου, η οποία είναι απαραίτητη πρόδρομη ουσία για την συνθετάση λιπαρών οξέων (FAS)
- Στην ικανότητα να παράγεται επαρκές NADPH το οποίο είναι το βασικό αναγωγικό μέσο που χρησιμοποιείται στη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων

Ο σχηματισμός του ακετυλο-CoA στους ελαιούχους μικροοργανισμούς εξαρτάται από τη παρουσία της ATP:κιτρικής λυάσης (ACL, ακυλο-φέρουσα πρωτεΐνη) (αντίδραση 1) η οποία

δεν σχηματίζεται στην πλειοψηφία των μη ελαιούχων μικροοργανισμών. Το ένζυμο αυτό καταλύει τη διάσπαση του κιτρικού σε ακετυλο-CoA και οξαλοξικό.



Για να λειτουργήσει αποτελεσματικά το υπόστρωμα, συγκεκριμένα το κιτρικό πρέπει να είναι επαρκές και διαθέσιμο στο κυτοσόλιο του κυττάρου όπου λαμβάνει χώρα η σύνθεση των λιπαρών οξέων. Το κιτρικό οξύ συντίθεται ως μέρος του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA ή αλλιώς κύκλος του Krebs ή του κιτρικού οξέος) στο μιτοχόνδριο του κυττάρου. Το χαρακτηριστικό που είναι μοναδικό στους ελαιούχους μικροοργανισμούς και το οποίο επιτρέπει τη συσσώρευση του κιτρικού οξέος, είναι το γεγονός ότι η δράση της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης, ως συστατικό του κύκλου του TCA, εξαρτάται από την παρουσία της AMP (μονοφωσφορικής αδενοσίνης). Αυτή η εξάρτηση δεν συμβαίνει στα ένζυμα των μη ελαιούχων μικροοργανισμών. Η συγκέντρωση της AMP ρυθμίζεται από τη δραστηριότητα της AMP απαμινάσης (AMP deaminase). Η δραστηριότητα του ενζύμου αυτού αυξάνεται με τον περιορισμό του αζώτου στο μέσο ανάπτυξης. Το περιορισμένο άζωτο προκαλεί μια ακολουθία αντιδράσεων που οδηγούν στο σχηματισμό του ακετυλο-CoA. Η διαδοχή των διεργασιών αναπαρίστανται γραφικά στο σχήμα 41 [51].



Σχήμα 41 : Σχήμα το οποίο δείχνει πως ο κιτρικός/μαλικός κύκλος και ο κυτοσολικός κύκλος της τρανσυδρογονάσης μπορούν να παρέχουν επαρκείς πρόδρομους του ακετυλο-CoA και NADPH για λιπογένεση στους ελαιούχους μικροοργανισμούς. Ένζυμα: 1.Αποκαρβοξυλάση πυροσταφυλικού οξέος (pyruvate decarboxylase) 2.Μηλική αφυδρογονάση (malate dehydrogenase) 3.Μηλικό ένζυμο (malic enzyme) 4.Αποκαρβοξυλάση πυροσταφυλικού οξέος 5.Κιτρική συνθάση (citrate synthase) 6. ATP: κιτρική λυάση (ATP:citrate lyase) 7.Citrate/malate translocase. Ισοζύγιο άνθρακα: πυροσταφυλικό→ακετυλο-CoA+CO<sub>2</sub>. Δίκτυο αντιδράσεων για παραγωγή NADPH: NADPH+NADP<sup>+</sup>+ATP→NAD+NADPH+P<sub>i</sub>. Ο κύκλος των υδρογονασών μπορεί να λειτουργήσει ανεξάρτητα από τη ροή του άνθρακα από το κιτρικό στο μιτοχονδριακό κετυλο-CoA στο κυτοσόλιο με αποτέλεσμα να παρέχει όλο το απαιτούμενο NADPH για τη βιοσύνθεση και την επιμήκυνση των λιπαρών οξέων. (C.Ratlede, Biochimie, σελ54)

- Ο περιορισμός αζώτου στα ελαιούχα κύτταρα οδηγεί στην αύξηση της AMP απαμινάσης
- Η αυξημένη δραστηριότητα της AMP απαμινάσης μειώνει την περιεκτικότητα σε AMP του κυττάρου και του μιτοχονδρίου

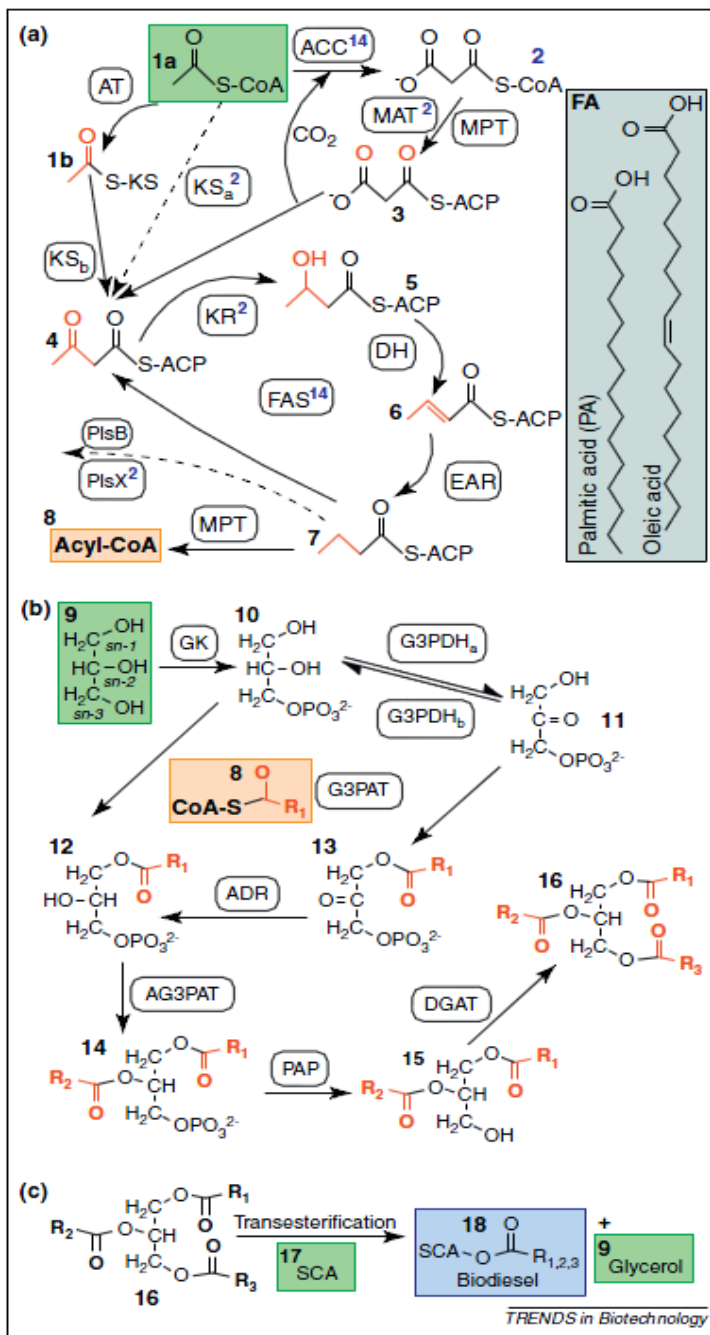
- Η χαμηλή περιεκτικότητα σε AMP στο μιτοχόνδριο σταματά την ισοκιτρική αφυδρογονάση με αποτέλεσμα να μη μεταβολίζεται το ισοκιτρικό και να οδηγηθούμε στη συσσώρευση του κιτρικού οξέος στο μιτοχόνδριο
- Το κιτρικό εξέρχεται από την μιτοχονδριακή μεμβράνη εισέρχεται στο κυτοσόλιο και διασπάται από την ACL προς ακυλο-CoA και οξαλοξικό.
- Το ακυλο-CoA χρησιμοποιείται στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων

Παρόλο που ο μεταβολισμός της γλυκόζης σε ακετυλο-CoA είναι υπεύθυνος για τη ροή του υποστρώματος άνθρακα στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, υπό συνθήκες περιορισμένου αζώτου, δεν είναι και ο αποκλειστικός παράγοντας. Έχουν βρεθεί μικροοργανισμοί όπου είναι παρούσα η ACL αλλά δεν συσσωρεύεται έλαιο στα κύτταρα. Όλα τα κύτταρα που συσσωρεύουν έλαιο φέρουν την δραστηριότητα της ACL. Συνεπώς υπάρχουν κάποια ακόμα ένζυμα που συνεισφέρουν στην συσσώρευση λιπιδίων.

Τα λιπαρά οξέα είναι υψηλά ανηγμένα υλικά (highly reduced materials) και για να επιτευχθεί η σύνθεσή τους είναι απαραίτητοι αναγωγικοί παράγοντες όπως οι NADPH. Η σύνθεση 1 mol λιπαρού οξέος C18 απαιτεί 16 mols NADPH. Ο βασικός προμηθευτής NADPH για τη σύνθεση λιπαρών οξέων θεωρείται το μηλικό ένζυμο (malic enzyme). Η δραστηριότητα του μηλικού ενζύμου έχει βρεθεί στους περισσότερους ελαιούχους μικροοργανισμούς και η βασική λειτουργία του είναι να διασφαλίζει την κατεύθυνση των ακετυλο-CoA προς το σχηματισμό λιπαρών οξέων τα οποία τελικά εστεροποιούνται με γλυκερόλη σε TAGs και ενσωματώνονται σε μικροσταγονίδια λιπαρών οξέων. Υπάρχουν κάποιες περιπτώσεις μικροοργανισμών όπου το μηλικό ένζυμο δεν είναι παρόν, όπως για παράδειγμα στο ελαιούχο είδος *Lipomyces sp.* Εδώ είναι ξεκάθαρη η πιθανότητα του σεναρίου πως κάποιο εναλλακτικό ένζυμο οδηγεί στη παραγωγή NADPH. Για αυτό το λόγο κάποιοι επιστήμονες υποστηρίζουν ότι τους ελαιούχους μικροοργανισμούς δεν υπάρχει κάτι σαν γενική δεξαμενή NADPH που παράγεται από έναν αριθμό ενζύμων. Υποστηρίζουν πως για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων προσαρμόζεται όλο το σύστημα παραγωγής NADPH. Μόνο έτσι μπορεί να επιτευχθεί συντονισμένη παραγωγή TAGs [51].

Αξιοσημείωτο επίσης, είναι το γεγονός πως η σύνθεση και αποδόμηση των λιπαρών οξέων είναι εντοπισμένα σε διαφορετικές θέσεις μέσα στο κύτταρο: το ακετυλο-CoA που παράγεται στα μιτοχόνδρια δεν μπορεί να αξιοποιηθεί για τη σύνθεση λιπαρών οξέων. Για να γίνει αυτό πρέπει να εξέλθει από τα μιτοχόνδρια πράγμα που γίνεται μέσω του κιτρικού. Έτσι ο κύκλος του κιτρικού οξέος γίνεται σημαντικός ρυθμιστικός κόμβος: αν ο κύκλος του κιτρικού οξέος

προχωρεί με πλήρη ταχύτητα προς παραγωγή ATP, το κιτρικό οξύ δεν μπορεί να εξέλθει από τα μιτοχόνδρια. Αν όμως ο κιτρικός κύκλος ανασταλεί λόγω περίσσειας ATP, εξέρχεται κιτρικό οξύ και προμηθεύει στο διαλυτό κυτταρόπλασμα το απαιτούμενο για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων ακετυλο-CoA. ([52] σελ 281-2) Στο παρακάτω σχήμα 42 αναπαριστάνεται αρκετά αναλυτικά η βιοσύνθεση TAG και η παραγωγή βιοντίζελ από ετερότροφα μικρόβια. Στον πίνακα 30 παρουσιάζονται τα ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και TAGs και στον πίνακα 31 τα πιο αποτελεσματικά ελαιούχα στελέχη σύμφωνα με την παραγωγικότητά τους.



Σχήμα 42: Παραγωγή βιοντίζελ διαμέσου σύνθεσης TAG σε ετερότροφα μικρόβια. Στο παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι πλήρεις ονομασίες των ενζύμων. Τα διακεκομμένα βέλη δείχνουν τις οδούς των βακτηρίων και τα συμπαγή των ζυμών. (M.Kosa, trends in biotechnology, σελ.54)

(a) Σύνθεση λιπαρών οξέων (FA) με προϊόν παλμιτικό και ελαιικό οξύ στα δεξιά. Ξεκινά με ακετυλο-CoA (1a) (πράσινο πλαίσιο) και τελειώνει με ακυλο- CoA 8 (πορτοκαλί πλαίσιο)

(b) Σύνθεση τελικού προϊόντος TAG (16) από ακυλο- CoA 8 και γλυκερόλη (9)

(c) (9) είναι το συνπρόϊόν του βιοντίζελ (18) μαζί με μια μικρή αλκοόλη (short chain alcohol, SCA)

Πίνακας 30: Ένζυμα που παίρνουν μέρος σε βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων (*M.Kosa, trends in biotechnology, σελ.55*)

| Enzyme  |  | <i>E. coli</i> FASII                      | <i>S. cerevisiae</i> FASI              |
|---|--|---|--|
| <b>FA synthesis</b>   |  |   |  |
| ACC   | Acetyl-CoA carboxylase                               | AccABCD                                   | Acc1                                   |
| ACP   | Acyl carrier protein                                 | AcpP                                      | Fas2                                   |
| AT/MPT  | Ac(et)yl transacylase/malonyl-palmitoyl transacylase |   | Fas1                                   |
| DH  | $\beta$ -Hydroxyacyl-ACP dehydratase                 | FabZ, FabA<br>(FabL, FabK) <sup>c</sup>   | Fas1                                   |
| EAR   | Enoyl-ACP reductase                                  | FabI                                      | Fas1                                   |
| KR  | $\beta$ -Ketoacyl-ACP reductase                      | FabG                                      | Fas2                                   |
| KS  | $\beta$ -Ketoacyl-ACP synthase                       | FabB (KSI)<br>FabF (KSII)<br>FabH (KSIII) | Fas2                                   |
| MAT   | Malonyl-CoA:ACP transacylase                         | FabD                                      |  |
| PPT   | Phosphopantetheine transferase                       |   | Fas2                                   |
| <b>TAG synthesis (also acyl-ACP modification in Gram-positive bacteria<sup>g</sup>)</b> |  |   |  |
|   | Acyl-ACP:G3P acyltransferase                         | PlsB<br>(PlsX, PlsY) <sup>c</sup>         |  |
|   | Acyl-ACP:1-acyl-G3P acyltransferase                  | PlsC                                      |  |
| ADR   | 1-Acyl-DHAP-reductase                                |   | Ayr1                                   |
| AG3PAT  | Acyl-CoA-1-acyl-G3P acyltransferase                  |   | Slc1, Slc4<br>Ict1 <sup>f</sup>        |
| DGAT  | Acyl-CoA:DAG acyltransferase                         | (Atf1, Atf2) <sup>d</sup>                 | Dga1, Are1, Are2                       |
| G3PAT   | Acyl-CoA:G3P acyltransferase                         |   | Gat1 (Gpt2)<br>Gat2 (Sct1)             |
| GK  | Glycerol kinase                                      |   | Gut1                                   |
| G3PDH <sub>a,b</sub>  | G3P dehydrogenase <sup>g</sup>                       |   | Gut2 <sup>g</sup><br>Gpd1 <sup>e</sup> |
| PAP   | Phosphatidate phosphatase                            |   | Pah1, Dpp1, Lpp1                       |
|   |  | PgpB                                      |  |

<sup>a</sup>*S. cerevisiae* yeast.

<sup>b</sup>*E. coli* Gram-negative bacteria model.

<sup>c</sup>*B. subtilis* Gram-positive bacteria model organism enzymes.

<sup>d</sup>Oleaginous *R. opacus* DGAT enzyme genes.

Πίνακας 31: Τα πιο αποτελεσματικά ελαιούχα στελέχη σύμφωνα με την παραγωγικότητά τους (*M.Kosa, trends in biotechnology, σελ.59*)

| Species                                       | Productivity<br>(g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) | Carbon source  | Major FAs in total lipid                  |  |
|---|--|----------------|---|--|
|   |  |                | FA<br>(C atoms:double bonds) <sup>a</sup> | Occurrence (%)                                     |
| <i>Lipomyces starkeyi</i>                     | 0.60   | Ethanol        | np  |  |
| <i>Cryptococcus curvatus</i> <sup>a</sup>     | 0.59   | Glycerol       | 16:0<br>18:0<br>18:1<br>18:2              | 18<br>16<br>50<br>16                               |
| <i>Rhodospiridium torulooides</i>             | 0.54   | Glucose        | 16:0<br>18:0<br>18:1<br>18:2              | 20<br>14.6<br>46.9<br>13.1                         |
| <i>C. curvatus</i> <sup>b,c</sup>             | 0.42   | Glucose        | np  |  |
| <i>Candida</i> sp. 107                        | 0.40   | Glucose        | np  |  |
| <i>C. curvatus</i> <sup>b</sup>               | 0.38   | Whey           | np  |  |
| <i>R. torulooides</i>                         | 0.38   | JA extract     | np  |  |
| <i>Rhodococcus opacus</i> PD630               | 0.38   | Glucose        | 16:0<br>16:1<br>17:1<br>18:1              | 30.8<br>9.9<br>12.3<br>24.4                        |
| <i>R. torulooides</i> <sup>d</sup>            | 0.28   | Starch         | np  |  |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>               | 0.18   | Cassava starch | 16:0<br>18:0<br>18:1<br>18:2              | 22.3 ± 0.4<br>5.2 ± 0.5<br>63.5 ± 1.8<br>5.7 ± 0.2 |
| <i>Mortierella ramanniana</i>                 | 0.17   | Glucose        | np  |  |
| <i>Trichosporon cutaneum</i>                  | 0.14   | Glucose        | np  |  |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>                    | 0.12   | Glycerol       | 16:0<br>18:0<br>18:1<br>18:2              | 15 ± 3<br>13 ± 2<br>47 ± 4<br>21 ± 3               |
| <i>Mortierella isabellina</i>                 | 0.12   | Sweet sorghum  | 16:0<br>18:1<br>18:2                      | ~24-39<br>~37-55<br>~2-11                          |
| <i>Escherichia coli</i> <sup>e</sup>          | 0.11   | Glycerol       | np  |  |
| <i>Trichosporon fermentans</i> <sup>f</sup>   | 0.10   | Glucose        | np  |  |
| <i>Y. lipolytica</i>                          | 0.08   | Stearin        | 16:0<br>18:0<br>18:1                      | 17 ± 2<br>78 ± 3<br>5 ± 2                          |
| <i>Cunninghamella echinulata</i> <sup>f</sup> | 0.07   | Glucose        | GLA                                       | 11-18  |

<sup>a</sup>FAs: 16:0, palmitic acid; 16:1, palmitoleic acid; 17:1, heptadecenoic acid; 18:0, stearic acid; 18:1, oleic acid; 18:2, linoleic acid; GLA,  $\gamma$ -linolenic acid.

<sup>b</sup>*C. curvatus* has also been known as *Apiotrichum curvatum* and *Candida curvata*.

<sup>c</sup>Unsaturated fatty acid auxotroph.

<sup>d</sup>Co-fermented with *Saccharomyces fibuligera*.

<sup>e</sup>Genetically engineered.

<sup>f</sup>Cultivated in shake-flasks, whereas others are grown in well-aerated fermenters.



## 4.4 Ενίσχυση λιπιδιακής παραγωγής

### 4.4.1 Επισκόπηση του γενικού μονοπατιού βιοσύνθεσης λιπιδίων

Σύμφωνα με το σχήμα 43 τα μονοπάτια της γενικής σύνθεσης των TAGs στα κύτταρα αποτελείται από 3 βασικά στάδια: (1) καρβοξυλίωση των ακετυλο-CoA προς σχηματισμό μηλονυλο-CoA που είναι και το εναρκτήριο βήμα της βιοσύνθεσης του λιπαρού οξέος (2) επιμήκυνση της ακυλο-αλυσίδας (3) σχηματισμός TAG. Παρακάτω, θα αναφερθούν κάποια από τα ένζυμα που εμπλέκονται σε αυτές τις μεταβολικές οδούς [54].

- Εναρκτήριο βήμα (committing step)

Η σύνθεση λιπαρών οξέων και λίπους γίνεται συνήθως από υδατάνθρακες. Η γλυκόλυση δίνει πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο με οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση δίνει ακετυλο-CoA που καρβοξυλιώνεται σε μηλονυλο-CoA [52]. Όπως φαίνεται στο σχήμα 43 η βιοσύνθεση λιπιδίων ξεκινά με την ακετυλο-CoA καρβοξυλάση (ACC, η οποία περιέχει βιοτίνη) η οποία καταλύει το σημαντικό εναρκτήριο βήμα της συνθετικής οδού για τη σύνθεση λιπαρών οξέων με καρβοξυλίωση του ακετυλο-CoA προς σχηματισμό μηλονυλο-CoA. Στα ζωικά κύτταρα η ACC βρίσκεται στο κυτόπλασμα και για αυτό χρησιμοποιεί το κυτοσολικό ακετυλο-CoA για το σχηματισμό του μηλονυλο-CoA και την επιμήκυνση της αλυσίδας. Οι ζύμες έχουν και κυτοσολική και μιτοχονδριακή ACC, αλλά έχει βρεθεί πως επιβιώνουν με το μη-μιτοχονδριακό ένζυμο. Στα φυτά η σύνθεση λιπαρών οξέων γίνεται εξ' ολοκλήρου στα πλαστίδια των σπόρων. Η ACC χρησιμοποιεί ακετυλο-CoA που βρίσκεται σε αυτά τα οργανίδια. Ακόμα, η ACC των πλαστιδίων έχει διαφορετική δομή από αυτή του κυτοσόλιου. Η ACC πρωτεΐνη στο *E.coli* περιέχει τέσσερις υποομάδες οι οποίες κωδικοποιούνται από τέσσερα διαφορετικά γονίδια (*accA*, *accB*, *accC*, *accD*) και βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις στο χρωμόσωμα. Αντίθετα τα ευκαρυωτικά κύτταρα κωδικοποιούν ένα πολυπεπτίδιο το οποίο είναι υπεύθυνο για όλες τις λειτουργίες της ACC.

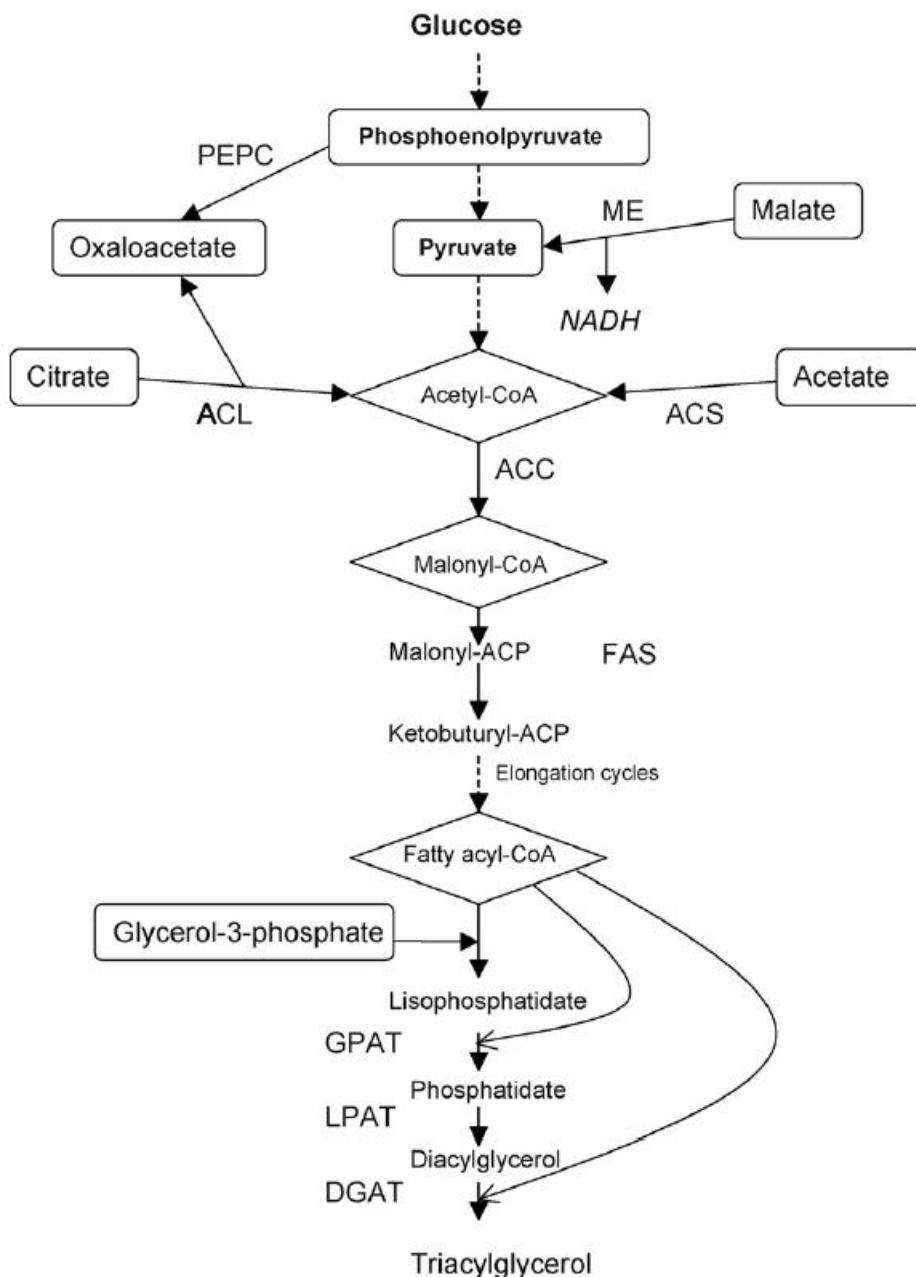
- Επιμήκυνση αλυσίδας

Μόλις συντεθεί το μηλονυλο-CoA μεταφέρεται από την μηλονυλο-CoA:ACP τρανσακετυλάση στην ακυλοφέρουσα πρωτεΐνη (ACP) της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (FAS, είναι σύμπλεγμα ενζύμων). Τα βακτήρια και τα φυτά έχουν τον II FAS τύπο, η οποία είναι μία πρωτεΐνη με πολλές υπομονάδες, ενώ τα σπονδυλωτά και οι ζύμες έχουν τον τύπο I FAS η

οποία είναι μια πρωτεΐνη με πολλές λειτουργίες. Η FAS καταλύει την επιμήκυνση των λιπαρών οξέων συμπυκνώνοντας τα μόρια μηλονυλο-CoA και ακετυλο-CoA. Η διεργασία της επιμήκυνσης λαμβάνει μέρος σε διαφορετικές υποομάδες της FAS καταλύοντας διαφορετικές αντιδράσεις. Η αλληλουχία των αντιδράσεων επαναλαμβάνεται μέχρι να σχηματιστεί μια κορεσμένη αλυσίδα παλμιτικού (C16:0) ή στεατικού (C18:0) οξέος (Αυτό εξηγεί το λόγο που τα λιπαρά οξέα που απαντώνται στα φυσικά λίπη περιέχουν πάντοτε άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα. Κατά την επιμήκυνση της αλυσίδας προστίθενται δύο άτομα άνθρακα σε κάθε βήμα) [54]. Τότε αποχωρίζεται το λιπαρό οξύ από το ενζυμικό σύμπλοκο και τα λιπαρά οξέα διαχέονται και μπορούν είτε να χρησιμοποιηθούν ενδοκυτταρικά για τη σύνθεση ουδέτερου λίπους είτε να αποδοθούν στη κυκλοφορία [52]. Σε όλη τη διαδικασία της επιμήκυνσης της αλυσίδας πραγματοποιούνται διάφορες αντιδράσεις συμπύκνωσης, αναγωγής, αφυδρογόνωσης από τις διάφορες υπομονάδες της FAS.

- Σχηματισμός TAG

Για τους ευκαρυωτές οργανισμούς ο σχηματισμός TAG πραγματοποιείται σε ειδικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια ή/και πλαστίδια (για φυτά) που βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αντίθετα η σύνθεση των TAG στα προκαρυωτικά κύτταρα γίνεται στο κυτόπλασμα. Αυτή η διεργασία αποδίδει ουδέτερα λιπίδια που είναι ένας τρόπος αποθήκευσης λιπαρών οξέων και ενέργειας. Το πρώτο βήμα για την σύνθεση TAG είναι η συμπύκνωση της φωσφορικής γλυκερίνης (G3P) με ένα ακυλο-CoA προς σχηματισμό λυσοφωσφατιδίου (LPA). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο GPAT (acyl-CoA:glycerol-sn-3-phosphate acyl transferase). Στη συνέχεια το LPA υπόκειται σε περαιτέρω συμπύκνωση προς σχηματισμό φωσφατιδικού οξέος (PA phosphatidate). Το PA αποφωσφορυλιώνεται και σχηματίζεται διγλυκερίδιο. Τέλος η σύνθεση TAG καταλύεται από την DGAT (acyl-CoA:diacylglycerol acyl-transferase) η οποία ενσωματώνει το 3<sup>ο</sup> ακυλο-CoA στο μόριο του διγλυκεριδίου. Το ένζυμο αυτό είναι επίσης πολύ σημαντικό για τη ρύθμιση αυτής της μεταβολικής οδού [54]. Με τη σειρά του το διγλυκερίδιο μπορεί να αποτελέσει τον πρόδρομο του τριγλυκεριδίου ή να συντονιστεί προς την βιοσύνθεση του φωσφολιπιδίου (σχήμα 43) [35].



Σχήμα 43 : Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων (N.M.D.Courchesne, journal of biotechnology, σελ.34)

#### 4.4.2 Υπερέκφραση των ενζύμων που βρίσκονται στο μεταβολικό μονοπάτι σχηματισμού των τριγλυκεριδίων

Υπάρχει ένα μεγάλος αριθμός μελετών που χρησιμοποίησαν την γενετική μηχανική (Genetic engineering, GE) για να ενισχύσουν τη συσσώρευση λιπιδίων σε διάφορα είδη. Κάποιες από αυτές τις μελέτες βρίσκονται στον πίνακα 32. Παρακάτω θα αναπτύξουμε ενδεικτικά κάποια παραδείγματα.

Πίνακας 32 : Γονίδια (ένζυμα) για την ενίσχυση της λιπιδιακής σύνθεσης (N.M.D.Courchesne, *journal of biotechnology*, σελ.35)

| Gene (enzyme)  | Source-species  | Receiver-species                    | Note  |
|--|---|-------------------------------------|---|
| accA, accB, accC, accD, (ACC), tesA (thioesterase I) | <i>E. coli</i> (BL21) (bacteria)                                  | <i>E. coli</i> (BL21) (bacteria)    | 6× fatty acid synthesis                         |
| Acc1 (cytosolic ACC)                                 | <i>Arabidopsis</i> (plant)  | <i>Brassica napus</i> (plant)       | 1–2 × plastid ACC + 6% fatty acid content       |
| Acc1 (ACC)   | <i>Arabidopsis</i> (plant)  | <i>Solanum tuberosum</i> (plant)    | 5× TAG content                                  |
| Acc1 (ACC)   | <i>Cyclotella cryptica</i> (alga)                                 | <i>Cyclotella cryptica</i> (alga)   | 2–3 × ACC activity, no change in lipid content  |
| Acc1 (ACC)   | <i>Cyclotella cryptica</i> (alga)                                 | <i>Navicula saprophila</i> (alga)   | 2–3 × ACC activity, no change in lipid content  |
| fabF (KAS II)  | <i>E. coli</i> (bacteria)   | <i>E. coli</i> (bacteria)           | Toxic (CoA pool from 0.5–40% in malonyl-CoA)    |
| fabH (KAS III)                                       | <i>E. coli</i> (bacteria)   | <i>Brassica napus</i> (plant)       | Stress, arrest of the cell growth               |
| KAS III  | <i>Spinacia oleracea</i> (plant)                                  | <i>Nicotiana tabacum</i> (plant)    | 16:0 accumulation lower oil content             |
| KAS III  | <i>Spinacia oleracea</i> (plant)                                  | <i>Arabidopsis</i> (plant)          | 16:0 accumulation lower oil content             |
| KAS III  | <i>Spinacia oleracea</i> (plant)                                  | <i>Brassica napus</i> (plant)       | 16:0 accumulation lower oil content             |
| LPAT   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yeast)                           | <i>Brassica napus</i> (plant)       | 6× oil content                                  |
| are1 and are2 (DGAT)                                 | <i>Arabidopsis thaliana</i> (plant)                               | Yeast                               | 3–9× TAG content                                |
| are1 and are2 (DGAT)                                 | <i>Arabidopsis thaliana</i> (plant)                               | <i>Nicotiana tabacum</i> (plant)    | 7× TAG content                                  |
| DGAT   | <i>Arabidopsis</i> (plant)  | <i>Arabidopsis</i> (plant)          | +10–70% oil content                             |
| acs (ACS)  | <i>E. coli</i> (MG1655) (bacteria)                                | <i>E. coli</i> (MG1655) (bacteria)  | 9× ACS activity, increased acetate assimilation |
| malEMt and malEMc (ME)                               | <i>Mortierella alpina</i> and <i>Mucor circinelloides</i> (fungi) | <i>Mucor circinelloides</i> (fungi) | 2.5× lipid accumulation                         |
| ACL  | Rat   | Tobacco                             | +16% lipid content                              |
| Antisens PEP gene                                    | <i>Agrobacterium tumefaciens</i>                                  | <i>Brassica napus</i>               | +6.4–18% oil content                            |

- Ακετυλο-CoA καρβοξυλάση (ACC)

Έχει αποδειχθεί ότι η ACC παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της σύνθεσης των λιπαρών οξέων στα φυτά, για αυτό το λόγο το συγκεκριμένο ένζυμο υπερέκφραστηκε σε διάφορα είδη για την ενίσχυση της παραγωγής λιπιδίων. Επιστήμονες κλωνοποίησαν τέσσερα γονίδια ACC τα accA, accB, accC, accD του *E. coli* BL21 και τα υπερέκφρασαν στο ίδιο στέλεχος. Οι ACCυποομάδες παράχθηκαν σε ισομοριακές ποσότητες. Αυτό με τη σειρά του προκάλεσε μια αύξηση στο εσωτερικό του μηλονυλο-CoA ως αποτέλεσμα της αυξημένης ACC ενζυμικής δραστηριότητας. Αυτό τελικά είχε σαν αποτέλεσμα την 6πλάσια αύξηση στο ρυθμό σύνθεσης λιπαρών οξέων επιβεβαιώνοντας ότι το στάδιο που καταλύει η ACC είναι πραγματικά το περιοριστικό στάδιο για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων σ' αυτό το στέλεχος. Ωστόσο, το ότι δεν ενισχύθηκε η παραγωγή λιπιδίων οδήγησε στο συμπέρασμα πως ένα δευτερεύον περιοριστικό βήμα μετά το σχηματισμό των λιπαρών οξέων εμπόδισε τη επαρκή μετατροπή των λιπαρών οξέων σε λιπίδια στο *E.coli*.

Κάποιοι επιστήμονες πρότειναν ότι η υπερέκφραση του ACC ενζύμου από μόνο του μπορεί να μην αρκεί για την ενίσχυση ολόκληρου του μεταβολικού μονοπατιού της βιοσύνθεσης

λιπιδίων στα διάτομα. Αυτό το συμπέρασμα φαίνεται να είναι μια γενική αλήθεια για τα περισσότερα είδη εφόσον σπάνια αναφέρονταν αύξηση συσσώρευσης λιπιδίων έστω και αν υπήρχε σημαντική αύξηση των σχετικών ενζύμων ή ενδιάμεσων προϊόντων όπως πχ. τα λιπαρά οξέα. Δύο είναι οι προφανείς λόγοι για αυτό το φαινόμενο: (1) το βασικό βήμα που καταλύεται από την ACC δεν είναι και το περιοριστικό για τα συγκεκριμένα είδη (2) υπάρχει ένας δευτερεύον περιορισμός (bottleneck) όταν η ACC υπερεκφράζεται.

- DGAT

Όπως προαναφέρθηκε η DGAT καταλύει το τελευταίο στάδιο σχηματισμού του TAG από διγλυκερίδιο και λιπαρό ακυλο-CoA. Έχουν πραγματοποιηθεί μεταλλάξεις σε ζύμες με το *Arabidopsis* DGAT. Παρατηρήθηκε 200-600πλάσια αύξηση της δραστηριότητας της DGAT στη μεταλλαγμένη ζύμη η οποία οδήγησε σε 3-9πλάσια συσσώρευση των TAGs. Η αποτελεσματικότητα της DGAT εξηγείται από το γεγονός ότι το υπόστρωμα της DGAT, το διγλυκερίδιο, μπορεί να προέρχεται είτε από τη βιοσύνθεση του φωσφολιπιδίου είτε από το σχηματισμό των TAG. Η υπερέκφραση της DGAT θα δεσμεύσει περισσότερα διγλυκερίδια για να σχηματιστεί TAG παρά για να σχηματίσει φωσφολιπίδια. Όλα αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν στο ότι η αντίδραση που καταλύεται από DGAT είναι ένα σημαντικό στάδιο στη βιοσύνθεση λιπιδίων.

Ακόμα ένας τρόπος για να ενισχυθεί η βιοσύνθεση ενζύμων είναι με την υπερέκφραση ενζύμων που σχετίζονται έμμεσα με τη βιοσύνθεση λιπιδίων. Ένας μικρός αριθμός ενζύμων που δεν σχετίζεται άμεσα με τον μεταβολισμό λιπιδίων έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τον ρυθμό συσσώρευσης λιπιδίων λόγω του ότι αυξάνει τη δεξαμενή των απαραίτητων μεταβολιτών για την βιοσύνθεσή τους. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα ένζυμα ATP:κιτρική λυάση (ACL), η ακετυλο-CoA συνθετάση (ACS) και το μηλικό ένζυμο.

Από την σκοπιά της μεταβολικής μηχανικής, η ανάσχεση των ανταγωνιστικών μονοπατιών (blocking competing pathways) μπορούν επίσης να ενισχύσουν την μεταβολική ροή της βιοσύνθεσης των TAGs. Η β-οξειδωση είναι η βασική μεταβολική οδός υπεύθυνη για τη διάσπαση των λιπαρών οξέων στους ευκαρυωτές. Καταναλώνοντας τα λιπαρά οξέα ουσιαστικά μειώνει τα μόρια που πρόκειται να σχηματιστούν σε TAG. Έτσι, αναστέλλοντας αυτό το μονοπάτι είναι εφικτό να ενισχύσουμε την παραγωγή των TAG. Η βιοσύνθεση φωσφολιπιδίων είναι ένα ακόμη ανταγωνιστικό μονοπάτι για τον σχηματισμό των TAG εξαιτίας του κοινού υποστρώματος του φωσφατιδίου. Εάν το φωσφατίδιο μετατραπεί σε CDP-διγλυκερίδιο αντί για διγλυκερίδιο τότε εισέρχεται στο μεταβολικό μονοπάτι της σύνθεσης των φωσφολιπιδίων. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η υπερέκφραση του

ενζύμου DGAT έχει σαν αποτέλεσμα τον συντονισμό του φωσφατιδίου προς TAG. Ωστόσο, η παρεμπόδιση του σχηματισμού των φωσφολιπιδίων οδηγεί σε αφύσικα μακριά λιπαρά οξέα εξαιτίας των συμπληρωματικών κύκλων επιμήκυνσης. Ο τρίτος ανταγωνιστικός μεταβολικός δρόμος είναι η μετατροπή του φωσφοενολο-πυροσταφυλικού σε οξαλοξικό το οποίο καταλύεται από την PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase). Η βιοσύνθεση της TAG επίσης απαιτεί φωσφοενολο-πυροσταφυλικό [54].

#### **4.5 Ποιότητα βιοντίζελ προερχόμενου από μικροοργανισμούς**

Το βιοντίζελ για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο του ορυκτού ντίζελ χρειάζεται να πληροί κάποιες προδιαγραφές και χαρακτηριστικά. Λεπτομέρειες για το θέμα αυτό έχουν προηγηθεί σε προηγούμενα κεφάλαια. Τα έλαια των μικροοργανισμών διαφέρουν αρκετά από τα περισσότερα φυτικά έλαια, όντας πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Αυτό για το βιοντίζελ που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για θέρμανση δεν αποτελεί περιορισμό, αλλά για άλλες εφαρμογές ο βαθμός ακορεστότητας (οποίος προσδιορίζεται από το βαθμό ιωδίου) πρέπει να καλύπτει τις συνιστώμενες προδιαγραφές [24].

#### **4.6 Επιθυμητές ιδιότητες ξενιστών για βιοκαύσιμα**

Η εύρεση και η κατασκευή του βέλτιστου ξενιστή για την παραγωγή βιοκαυσίμου είναι από τις πιο προφανείς και σημαντικές απαιτήσεις για τη μεταβολική μηχανική. Στα πλαίσια αυτά, ο ιδανικός ξενιστής θα πρέπει να διασπά το υπόστρωμα πχ. λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, να ζυμώνει τα σάκχαρα που προκύπτουν με υψηλούς ρυθμούς και αποδόσεις, να είναι ανθεκτικός σε υψηλές συγκεντρώσεις τελικού προϊόντος, σε υψηλές θερμοκρασίες και σε ακραία pH. Το γεγονός ότι υπάρχει αξιοσημείωτη βιοποικιλότητα, ειδικά για μικροοργανισμούς μας κάνει να υποθέσουμε ότι ο ιδανικός ξενιστής για παραγωγή βιοκαυσίμων ήδη υπάρχει και η πρόκληση είναι να βρεθεί. Επειδή αυτό είναι σαν να ψάχνουμε «βελόνα στα άχυρα», οι ερευνητές επέλεξαν να λύσουν το «πρόβλημα» με το να κατασκευάσουν έναν ξενιστή με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά χρησιμοποιώντας την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Κάθε τέτοιου είδους προσπάθεια απαιτεί την αλλαγή του φαινότυπου ο οποίος ορίζεται από πολλά γονίδια. Η εφαρμογή αυτής της προσέγγισης απαιτεί ουσιαστική γνώση πληροφοριών για τον ξενιστή και για αυτό προτιμώνται τα οικεία εργαστηριακά στελέχη. Τα κύρια χαρακτηριστικά που οδήγησαν στην επιλογή αυτών των στελεχών κυρίως είναι: (α) η ικανότητα του στελέχους να δεχθεί ξένο DNA. Οι υψηλές αποδόσεις των μεταλλάξεων είναι

επιθυμητές ειδικά για γονίδια που προσδίδουν συγκεκριμένους φαινότυπους (β) είναι η διαθεσιμότητα των μοντέλων που έχουν υποστεί μεταβολική μηχανική και επιτρέπουν τον χειρισμό του γονότυπου με διάφορους τρόπους. Παραδείγματα είναι οι αλληλουχίες τερματισμού, οι υποκινητές, πλασμίδια κτλ. (γ) η διαθεσιμότητα των “omics” και αλγορίθμων για τον χαρακτηρισμό των κυτταρικών αντιδράσεων σε διάφορους χειρισμούς και διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες (δ) το πιο σημαντικό από όλα τα χαρακτηριστικά είναι το μεγάλο ποσό της γνώσης που έχει συσσωρευτεί μετά από πολλές γενιές έρευνας πάνω στα συγκεκριμένα είδη.

Η ανάγκη για είδος ξενιστή που να είναι οικείος και προβλέψιμος γίνεται όλο και πιο έντονη. Η κατανόηση σχέσεων μεταξύ της φάσης της ανάπτυξης και του σχηματισμού προϊόντος καθώς και της κινητικής είναι απαραίτητα στοιχεία για το σχεδιασμό. Πολύ σημαντικό επίσης είναι, για οποιαδήποτε ζύμωση μεγάλης κλίμακας, το κόστος για να διατηρηθούν στείρες συνθήκες και μειωμένες οι πιθανότητες μόλυνσης. Η χρήση αντιβιοτικών είναι ανεπιθύμητη αφενός για οικονομικούς λόγους και αφετέρου για τυχόν ανάπτυξη μηχανισμών αντίστασης. Οι ζυμώσεις σε χαμηλό pH είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος αλλά απαιτεί ξενιστές ανθεκτικούς στην οξύτητα. Οι υψηλές θερμοκρασίες απαιτούν θερμοφίλους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί που παράγουν τα συστατικά που ενδιαφέρουν, σπανίως είναι ανθεκτικά σε υψηλές θερμοκρασίες ή όξινο περιβάλλον. Όσον αφορά τη θερμική ανθεκτικότητα, έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή λόγω του ότι οι ζυμώσεις σε υψηλές θερμοκρασίες μειώνουν το κόστος ψύξης και τις πιθανότητες μόλυνσης. Η θερμότητα αυξάνει τη ρευστότητα της μεμβράνης, μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και προκαλεί τη συσσωμάτωσή τους επηρεάζοντας άμεσα τις κυτταρικές λειτουργίες. Ένα παράδειγμα είναι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης hsp22.4 στο *S.cerevisiae* αύξησε την ζωτικότητα των κυττάρων μετά από την υποβολή τους στους 51°C για 4 ώρες. Η προσέγγιση αυτή έχει εφαρμοστεί από βακτήρια μέχρι και σε πολυκύτταρους οργανισμούς. Η αντοχή στο περιβάλλον ορίζεται από το φαινότυπο με την έκφραση πολλών γονιδίων. Για να «εισαχθούν» τα συστατικά αυτά σε έναν ξενιστή, ο ξενιστής πρέπει να έχει μελετηθεί εις βάθος και για αυτό προτιμώνται τα εργαστηριακά στελέχη. Οι γενετικές αλλαγές για τη βελτίωση των στελεχών μπορεί να είναι δύο ειδών: στοχευμένες (rational) ή τυχαίες (combinatorial). Η πρώτη είναι απλή όταν πρόκειται για γνωστή γενετική αλληλουχία που προσδίδει το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό. Η δεύτερη προτιμάται όταν δεν υπάρχουν επαρκείς γνώσεις και στηρίζεται στην ικανότητα να κατασκευάσουμε ποικίλους γενετικά πληθυσμούς και να τους παρακολουθήσουμε [47].

#### 4.7 Τεχνολογίες για την ενίσχυση παραγωγής λιπιδίων

Υπάρχουν τρεις βασικές υποσχόμενες στρατηγικές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση παραγωγής λιπιδίων από μικροφύκη και άλλους μικροοργανισμούς: Η βιοχημική μηχανική (biochemical Engineering, BE), η γενετική μηχανική (genetic engineering, GE) και η μηχανική μεταγραφικών παραγόντων (transcription factor engineering, TFE).

Η προσέγγιση της βιοχημικής μηχανικής εδώ αναφέρεται στη στρατηγική ενίσχυσης παραγωγής λιπιδίων από μικροφύκη και μικροοργανισμούς ελέγχοντας τα θρεπτικά συστατικά ή τις συνθήκες καλλιέργειας (θερμοκρασία, pH, αλατότητα) ώστε να γίνει συντονισμός των μεταβολικών οδών προς τη σύνθεση βιολιπιδίων. Μειονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι πως η στέρηση των θρεπτικών συστατικών ή η υποβολή σε ακραίες συνθήκες που απαιτούνται για την υψηλή συσσώρευση λιπιδίων στο κύτταρο, μειώνει την κυτταρική διαίρεση με την οποία και σχετίζεται άμεσα. Εφόσον τα λιπίδια είναι εσωκυτταρικά προϊόντα η ολική παραγωγικότητα λιπιδίων είναι το προϊόν του περιεχομένου στο κύτταρο λιπαρό επί την παραγωγικότητα της βιομάζας [54].

Η γενετική μηχανική ή τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA ορίζεται ως το σύνολο των τεχνικών με τις οποίες τμήματα DNA διαφορετικής προέλευσης συνδυάζονται για τη δημιουργία ενός νέου μορίου DNA. Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται ευρέως για την κλωνοποίηση γονιδίων, τη γενετική τροποποίηση των οργανισμών και γενικά στη μοριακή βιολογία [65]. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες γενετικές μεταλλάξεις πάνω σε μικροφύκη, έχουν απομονωθεί γονίδια από έναν μικροοργανισμό και έχουν υπερεκφραστεί σε έναν άλλο ώστε να επιτευχθεί μια σημαντική αύξηση στη συσσώρευση των λιπιδίων.

Πρόσφατα υποστηρίχθηκε ότι η ρύθμιση των μεταβολικών οδών πρέπει να μελετώνται στα πλαίσια ολόκληρου του κυττάρου και όχι στο επίπεδο μιας μόνο οδού. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει προκαλέσει η χρήση των ρυθμιστικών παραγόντων όπως, οι μεταγραφικοί παράγοντες, για τον έλεγχο της διαθεσιμότητας ή δραστηριότητας πλήθος ενζύμων που σχετίζονται με την παραγωγή επιθυμητών προϊόντων. Αυτή η προσέγγιση αναφέρεται ως μηχανική των παραγόντων μεταγραφής (Transcription factors, TFs). (transcription factor engineering TFE) και πιο συγκεκριμένα μπορούμε να το περιγράψουμε ως μια καινοτόμο τεχνολογία η οποία χρησιμοποιεί την υπερέκφραση των TFs που ρυθμίζουν προς τα άνω ή προς τα κάτω τα μονοπάτια που εμπλέκονται στο σχηματισμό των επιθυμητών μεταβολιτών για την υπερπαραγωγή αυτών.

Τα TFs είναι πρωτεΐνες που ελέγχουν την DNA μεταγραφή αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και αναπτύσσουν σχέσεις μεταξύ πρωτεΐνης – DNA και πρωτεΐνης-



πρωτεΐνης. Έχουν ταξινομηθεί σε παραπάνω από 50 οικογένειες σύμφωνα με τη δομή τους και τους DNA δεσμούς. Μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το μηχανισμό μεταγραφής όπως η DNA πολυμεράση και ενεργοποιήσουν και να επαυξήσουν τη μεταγραφή συγκεκριμένων ομάδων γονιδίων. Επίσης μπορούν να δράσουν ως καταστολείς ή να κάνουν διακριτικές αλλαγές και να περιορίσουν σε μικρότερο βαθμό τα προϊόντα μεταβολισμού. Σε αντίθεση με την προσέγγιση της γενετικής μηχανικής, η οποία στοχεύει σε ένα γονίδιο, η TFE προσέγγιση επηρεάζει έναν μεγάλο αριθμό γονιδίων που εμπλέκεται σε πολλαπλές μεταβολικές οδούς οδηγώντας σε μια ταυτόχρονη ενοποιημένη ρύθμιση (είτε προς τα άνω είτε προς τα κάτω) των οδών αυτών.

Τα αναδυόμενα δευτερεύοντα εμπόδια (bottlenecks) απασχολούν ιδιαίτερα τη γενετική μηχανική. Κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει με τις προσεγγίσεις της TFE. Αυτή η οπτική της μεταβολικής μηχανικής έχει αποδείξει ότι μπορεί να βελτιώσει την παραγωγή πολύτιμων μεταβολιτών και αναπαριστά μια από τις πιο ελκυστικές και καινοτόμες εναλλακτικές για την οικονομική παραγωγή TAG. (Πίνακας 33) [54].

Πίνακας 33: Παράγοντες μεταγραφής που ενισχύουν την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας (N.M.D.Courchesne, *journal of biotechnology*, σελ.38)

| TF                      | Source-species (taxonomy)           | Receiver-species (taxonomy)         | Effectiveness   |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---|
| Artificial zinc fingers | Artificial                          | Tobacco (plant)                     | High level activation of a $\beta$ -glucuronidase gene stable, inheritable, non-toxic |
| Zinc fingers            | Human                               | CHO cells                           | 2-fold increase of IgG antibody production  |
| MYB and bHLH            | <i>Arabidopsis thaliana</i> (plant) | <i>Arabidopsis thaliana</i> (plant) | Strongly enhanced flavonoid biosynthesis  |
| ORCA2                   | <i>Catharanthus roseus</i> (plant)  | <i>Catharanthus roseus</i> (plant)  | Induction of genes leading to TIA biosynthesis  |

#### 4.8 Προοπτικές της μικροβιακής παραγωγής βιοντίζελ

Όπως προαναφέρθηκε, τα έλαια που προέρχονται από ελαιούχους μικροοργανισμούς είναι μια πολλά υποσχόμενη πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ. Η χρησιμοποίηση γρήγορα αναπτυσσόμενων μικροοργανισμών κάνει δυνατή την εκμετάλλευση μεγαλύτερης ποικιλίας πρώτης ύλης. Έτσι περιορίζεται η χρήση της καλλιεργήσιμης γης και γίνεται εκμετάλλευση οικονομικότερων και πιο άφθονων πρώτων υλών. Επιπλέον, με τη βοήθεια της μεταβολικής μηχανικής και της συνθετικής βιολογίας το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην τροποποίηση των πολύ καλά μελετημένων μικροβίων, όπως *E.coli*, *S.cerevisiae*, σε κυτταρικά εργοστάσια παραγωγής βιοντίζελ. Το παραπάνω μπορεί να πραγματοποιηθεί εισάγοντας ένα μονοπάτι

σύνθεσης εστέρα που μπορεί να οδηγήσει σε απευθείας παραγωγή αιθυλεστέρων του λιπαρού οξέος με απευθείας εστεροποίηση τη αιθανόλης με τα αλκύλια των CoA θειοεστερασών των λιπαρών οξέων.. Αυτά τα τροποποιημένα κύτταρα μπορούν να παράξουν κατευθείαν βιοντίζελ από φτηνά και ευρέως διαθέσιμα σάκχαρα, όπως γλυκόζη και λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, παρακάμπτοντας έτσι την διαδικασία της μετεστεροποίησης η οποία απαιτεί πολύπλοκη προεπεξεργασία και διαχωρισμό. Είναι ξεκάθαρο ότι περιλαμβάνοντας όλη τη διεργασία της μετεστεροποίησης σε ένα μόνο στάδιο θα είναι θά είναι ο πιο εύκολος και ο πιο οικονομικά συμφέρον τρόπος για την παραγωγή βιοντίζελ σε μεγάλη κλίμακα.

Ουσιαστικά, υπάρχουν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις για την παραγωγή βιοντίζελ από μικροβιακές ζυμώσεις: (1) η έμμεση παραγωγή βιοντίζελ από ελαιούχα μικρόβια με *in vitro* μετεστεροποίηση (2) απευθείας παραγωγή βιοντίζελ από ανασυνδυασμένα κυτταρικά εργοστάσια.

- *Έμμεση παραγωγή βιοντίζελ από ελαιούχους μικροοργανισμούς*

Οι ελαιούχοι μικροοργανισμοί αναπαριστούν μια νέα πηγή λιπιδίων για την παραγωγή βιοντίζελ. Τα έλαια μπορούν να εκχυλιστούν από τους μικροοργανισμούς και να μετεστεροποιηθούν με μικρές αλκοόλες αποδίδοντας υψηλής ποιότητας βιοντίζελ που να συμφωνεί με τις υπάρχουσες απαιτούμενες προδιαγραφές. Επιπλέον, το μεγάλο εύρος των μικροβιακών λιπιδίων, καθιστά δυνατό τον συνδυασμό ιδιοτήτων βιοντιζέλ ώστε να έχει βελτιωμένες ιδιότητες καυσίμου παραδείγματος χάριν, υψηλό αριθμό κετανίου ή χαμηλό ιξώδες. Επίσης να προσθέσουμε ότι η χρήση των ελαιούχων μικροοργανισμών για τη παραγωγή βιοντίζελ έχει μικρότερες συνέπειες στη παραγωγή αγροτικών προϊόντων και τροφών.

- *Απευθείας παραγωγή βιοντίζελ από τροποποιημένους μικροοργανισμούς*

Έχουν γίνει πολλές έρευνες με στόχο την άμεση παραγωγή βιοντίζελ μέσω της μικροβιακής μετατροπής άφθονων, ανανεώσιμων και οικονομικών πρώτων υλών χωρίς επιπλέον τροποποιήσεις. Αυτό έγινε εφικτό με την χρησιμοποίηση του ενζύμου WS/DGAT (wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase). Το παραπάνω ένζυμο μπορεί και συνθέτει κηρούς από αλκοόλες και ακυλο-CoA (fatty acid coenzyme A thiesters). Το βιοντίζελ που παράγεται με αυτό το τρόπο είναι κυρίως FAEEs οι οποίοι έχουν καλύτερες αποδόσεις από τους FAMES. Επιπλέον δεν γίνεται χρήση της μεθανόλης, η οποία είναι τοξική και προέρχεται

από μη ανανεώσιμες πηγές και αυτό είναι ένα ακόμα πλεονέκτημα της παραγωγής βιοντίζελ (FAEEs) με τη μέθοδο αυτή. Μέχρι τώρα υπάρχουν δύο οργανισμοί-μοντέλα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη της απευθείας παραγωγής βιοντίζελ: το *E.coli* και *S.cerevisiae*.

Η ιδέα για τη παραγωγή κηρών πρωτοεφαρμόστηκε αποτελεσματικά από τον Kalscheuer et al (βλ.κεφάλαιο παράδειγμα παραγωγής microdiesel). Αυτή η μελέτη είναι αξιοσημείωτη λόγω του ότι είναι δυνατό να παραχθούν απευθείας εστέρες των λιπαρών οξέων από μικρόβια. Βέβαια, ο μεταβολισμός αυτός χρειάζεται επιπλέον βελτίωση. Επιπροσθέτως, μια άλλη επιστημονική ομάδα, έπειτα από εντατική μελέτη του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων, τροποποίησε γενετικά το *E.coli* ώστε να παράξει απευθείας βιοντίζελ από απλά σάκχαρα. Το μεταβολικό μονοπάτι των λιπαρών οξέων ενισχύθηκε αυξάνοντας τη παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων και ακυλο-CoA. Αυτό επιτεύχθηκε με το περιορισμό της β-οξειδωσης και με την υπερέκφραση θειοεστερασών και ακυλο-CoA λιγκασών. Το βιοντίζελ παράχθηκε με την έκφραση της συνθετάσης των κηρών (wax synthase) και των γονιδίων που σχετίζονται με τη παραγωγή αιθανόλης. Παρουσία γλυκόζης η απόδοση του βιοντίζελ που παράχθηκε έφτασε τα 674mg/L. Με την επιπλέον εισαγωγή της ξυλανάσης το τροποποιημένο *E.coli* παρήγαγε βιοντίζελ απευθείας από ημικυτταρίνη βιοντίζελ 11.6 mg/L. Για να πραγματοποιηθεί η παραγωγή βιοντίζελ από *E.coli* αρχικά, αποκόπηκαν τα γονίδια τα οποία δεν ήταν υπεύθυνα για την αποδόμηση των λιπαρών οξέων και των λιπαρών ακυλο-CoA. Έπειτα, για να τεθεί σε εφαρμογή η ικανότητα παραγωγής λιπαρών οξέων και άλλων παραγώγων υπερεκφράστηκαν γονίδια που κωδικοποιούν τα συγκεκριμένα ένζυμα που προσδίδουν την ιδιότητα αυτή. Το επόμενο βήμα είναι να ενισχυθεί επιπλέον η παραγωγή των λιπαρών οξέων το οποίο και αυτό επιτυγχάνεται μέσω της έκφρασης των επιθυμητών γονιδίων. Ενδιαφέρον έχει επίσης η διαπίστωση ότι η προσθήκη μίγματος τουλάχιστον δύο αλκοολών στο μέσο ανάπτυξης, του τροποποιημένου *E.coli*, είχε σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό τουλάχιστον δύο διαφορετικών εστέρων του λιπαρού οξέος. Συμπερασματικά αυτό σημαίνει πως με την επιλογή διαφορετικών ειδών ή/και ποσοτήτων αλκοολών μπορούμε να οδηγηθούμε σε εστέρες λιπαρών οξέων με την επιθυμητή σύσταση και κατ' επέκταση, ιδιότητες.

Ωστόσο όμως, να σημειωθεί ότι η αιθανόλη, δεν παράγεται φυσικά από το *E.coli*. Η ετερόλογη βιοσύνθεση της αλκοόλης είναι ένα προαπαιτούμενο για αυτόν τον μικροοργανισμό- παραγωγό βιοντίζελ. Από αυτή την άποψη, μια πολύ καλύτερη επιλογή μικροοργανισμού είναι η ζύμη *S.cerevisiae*, ο οποίος είναι ένας γνωστός μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται στη παραγωγή αιθανόλης μέσω της ζύμωσης της γλυκόζης.

Χρησιμοποιώντας τις ίδιες αρχές με αυτές του *E.coli*, έχει αναφερθεί ότι μπορούν να παραχθούν λιπίδια στο *S.cerevisiae H1246*, περιλαμβανομένου FAEE και ισοαμυλικούς εστέρες των λιπαρών οξέων (fatty acid isoamyl ester, FAIE), με προσθήκη ελαϊκού οξέος και με την έκφραση της διλειτουργικής WS/DGAT από το *A.baylyi*. Μια πρόσφατη καινοτόμος ευρεσιτεχνία περιγράφει μια μέθοδο για τη παραγωγή βιοντίζελ και κηρών με την ετερόλογη έκφραση της συνθάση κηρών (wax synthase)(WS2) από το *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* στο *S. Cerevisiae*, με εξωγενή τροφοδοσία λιπαρών οξέων. Το προαναφερθέν WS2 παρουσιάζει υψηλή δραστηριότητα της wax synthase για αιθανόλη σε σύγκριση με το διλειτουργικό ένζυμο WS/DGAT από το *A.baylyi*. Επιπλέον, αντίθετα από το WS/DGAT, το WS2 δεν μπορεί να καταλύσει τα TAG προερχόμενα από τα λιπαρά οξέα. Έτσι η σύνθεση των TAG θα λειτουργεί ως ένα ανταγωνιστικό μονοπάτι για την παραγωγή βιοντίζελ. Ως εκ τούτου, το WS2 από το *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* είναι κατάλληλο για το σκοπό αυτό της παραγωγής βιοντίζελ και οδηγεί σε μια συγκέντρωση αιθυλεστέρα του ελαϊκού οξέος περίπου 62 mg/L [37].

#### 4.8.1 Παράδειγμα παραγωγής Microdiesel

Το 2006 μια επιστημονική ομάδα πέτυχε την βιοσύνθεση επαρκούς ποσότητας βιοντίζελ (FAEEs), το λεγόμενο Microdiesel, σε *E.coli* που έχει υποστεί μεταβολική μηχανική.

Το βακτήριο *Acinetobacter baylyi* στέλεχος ADP1 επιτυγχάνει την ενδοκυτοπλασματική συσσώρευση των λιπιδίων με τη βοήθεια του WS/DGAT (wax ester synthase/acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase) που είναι προϊόν του γονιδίου *artfA*. Αυτή η μη εκλεκτική ακυλοτρανσφεράση συνθέτει ταυτόχρονα κηρούς (wax ester) και TAGs χρησιμοποιώντας μακριές αλκοόλες ή διγλυκερίδια και ακυλο-CoA (fatty acid coenzyme A thioesters) ως υποστρώματα. Βιοχημικοί χαρακτηρισμοί του WS/DGAT αποκάλυψαν ότι αυτή η ακυλοτρανσφεράση παρουσιάζει πού χαμηλή εκλεκτικότητα με αποτέλεσμα να έχει πολύ μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων: από πολύ μικρές μέχρι και πολύ μεγάλες αλκοόλες πρωτοταγείς και μη, διόλες θειόλες, μονο-και διγλυκερίδια καθώς και στερόλες. Η μη εκλεκτικότητα του WS/DGAT έχει ήδη εκμεταλλευτεί και εκφραστεί σε ανασυνδυασμένους ξενιστές για να συντεθούν διάφοροι εστέρες λιπαρών οξέων in vivo. Ο τύπος των εστέρων των λιπαρών οξέων που συντίθεται από την WS/DGAT καθορίζεται από το φυσιολογικό υπόβαθρο (physiological background) του ξενιστή όσον αφορά τη διαθεσιμότητα και τον τύπο των υποστρωμάτων του φυσικού μεταβολισμού, του μέσου καλλιέργειας ή της γενετικής μηχανικής. Παραδείγματα μερικών ξενιστών που έχουν υποστεί μεταβολική μηχανική με το

γονίδιο αυτό είναι η σύνθεση κηρών και βουτυλεστέρων λιπαρών οξέων σε ανασυνδυασμένο *E.coli*, TAGs FAEEs και ισοαμυλικούς εστέρες λιπαρών οξέων (FAIEs) σε ανασυνδυασμένο *Saccharomyces cerevisiae*. Αν και τα παραπάνω παράχθηκαν σε ίχνη, η ανασυνδυασμένη βιοσύνθεση FAEEs και FAIEs στις ζύμες, και FABEs στο *E.coli*, ήταν ένδειξη ότι είναι εφικτή η παραγωγή μονοαλκυλεστέρων των λιπαρών οξέων κατάλληλο για βιοντίζελ, χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένους μικροοργανισμούς με το WS/DGAT. Ο στόχος της έρευνας αυτής, ήταν η ανάπτυξη μιας μικροβιακής διεργασίας παραγωγής FAEEs για χρήση βιοντίζελ από απλές και ανανεώσιμες πηγές άνθρακα. Για τη συγκεκριμένη προσέγγιση ο φυσικός ξενιστής του WS/DGAT, το *A.baylyi* στέλεχος *ADP1*, δεν ήταν κατάλληλο εφόσον, είναι αυστηρά αερόβιο βακτήριο ανίκανο να συνθέσει αιθανόλη. Για αυτό και καθιερώθηκε η βιοσύνθεση FAEE σε ανασυνδυασμένο *E.coli* όπου εκφράστηκαν και τα γονίδια παραγωγής αιθανόλης από το βακτήριο *Zymomonas mobilis* σε συνδυασμό με το WS/DGAT από το *A.baylyi* στέλεχος *ADP1*. Η συνέκφραση των τριών γονιδίων: το γονίδιο *artfA* από *A.baylyi* στέλεχος *ADP1* (χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο *pBBR1MCS-2::atfA*) για την μη ειδικευμένη ακυλοτρανφεράση WS/DGAT, το γονίδιο *pdc* για την πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση και το γονίδιο *adhB* για την αλκοολική αφυδρογονάση (alcohol dehydrogenase) (χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο *pLOI297*) από το αυστηρά αναερόβιο Gram-αρνητικό βακτήριο *Zymomonas mobilis* για να είναι εφικτή η βιοσύνθεση αιθανόλης, οδήγησε στη βιοσύνθεση σημαντικών ποσοτήτων FAEE. Η βιοσύνθεση FAEE εξαρτάται αυστηρά από την παρουσία του ελαϊκού νατρίου (sodium oleate) στο μέσο ανάπτυξης. Τα FAEEs σχηματίζονται εσωκυτταρικά. Με ανάλυση GC-MS των FAEE που συλλέχθηκαν από το *E.coli* TOP10 (*pBBR1MCS-2::atfA*+*pLOI297*) που καλλιεργήθηκε σε μέσο όπου παρέχονταν ελαϊκό νάτριο, αποκαλύφθηκε ότι το μίγμα εστέρων αποτελούνταν κυρίως από αιθυλεστέρας του ελαϊκού οξέος (ethyl-oleate), μικρά ποσά αιθυλεστέρα του παλμιτικού οξέος και αιθυλεστέρα του παλμιτοελαϊκού οξέος (ethyl palmitate και ethyl palmitoleate). Η παρουσία του αιθυλεστέρα του παλμιτικού οξέος υποδεικνύει ότι κάποια λιπαρά οξέα προέρχονται από τη *de novo* βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και συντονίζονται στη παραγωγή FAEE.

Όσον αφορά το πώς επηρεάζει το οξυγόνο την παραγωγή FAEE, μετά από σειρά πειραμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις οξυγόνου, διαπιστώθηκε, αντίθετα με τα αποτελέσματα που αναμένονταν, ότι η FAEE βιοσύνθεση ήταν σημαντικά πιο υψηλή υπό αερόβιες συνθήκες. Επίσης δεν ήταν περιορισμένη σε κάποια φάση της ανάπτυξης, αλλά ο σχηματισμός FAEE συνεχίστηκε καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας φτάνοντας τελικά 0,26g/L μετά από 48h. Η τελική κυτταρική ξηρή βιομάζα ήταν 4,3 g/L σε αερόβια καλλιέργεια, το οποίο αντιστοιχεί σε 6,1% (w/w) περιεχόμενο σε FAEE.

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε το πλασμίδιο pMicrodiesel το οποίο περιέχει τα τρία γονίδια που αναφέρθηκαν με σκοπό την απλούστευση της μεθόδου και την μείωση της χρήσης των αντιβιοτικών. Αντίστοιχα πειράματα έδειξαν ότι το ίδιο στέλεχος E.coli και στις ίδιες συνθήκες αλλά ανασυνδυασμένο με το pMicrodiesel διπλασίασε σχεδόν τη παραγωγή FAEE. Αυτό σημαίνει ότι η διάταξη των τριών γονιδίων ευνοεί την απόδοση σε FAEE. Επιπλέον βελτίωση επιτεύχθηκε με τη ρύθμιση του pH μεταξύ 6-8.5 αντί για αυστηρό pH 7. Με όλες τις παραπάνω τροποποιήσεις τελικά επιτεύχθηκε μια τελική περιεκτικότητα σε FAEE 1,28 g/l μετά από 72h (το οποίο είναι σχεδόν 5 φορές υψηλότερο από το αρχικό) η ξηρή κυτταρική βιομάζα ήταν 4.9 g/l δηλαδή 26%(w/w) κυτταρικού FAEE. Να σημειωθεί επίσης, ότι οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου με ανάδευση.

Αν και το E.coli δεν παράγει τέτοιες ουσίες στο φυσικό μεταβολισμό του, τα ανασυνδυασμένα είδη κατάφεραν να παράξουν μεγάλα ποσά αιθανόλης και στη συνέχεια FAEEs, χρησιμοποιώντας τις δυνατότητες των γονιδίων που του δόθηκαν. Αν και κατακτήθηκε ένα υψηλό ποσοστό όπως αυτό του 26% με το E.coli, ο μικροοργανισμός αυτός δεν είναι ιδανικός για παραγωγή Microdiesel. Η βιοσύνθεση FAEE εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα των εξωγενών λιπαρών οξέων. Αυτό αποδεικνύει ότι η *de novo* βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, σε αντίθεση με τη β-οξειδωση λιπαρών οξέων, δεν μπορεί να παρέχει επαρκές εσωκυτταρικό ακυλο-υπόστρωμα για το WS/DGAT ώστε να συντεθούν FAEE. Για αυτό θεωρείται πρόκληση η παραγωγή Microdiesel από απλή φυτική βιομάζα όπως η κυτταρίνη, η μικκυτταρίνη και σάκχαρα. Μια εναλλακτική είναι τα βακτήρια της ομάδας του ακτινομύκητα τα οποία συνθέτουν υψηλά ποσά λιπαρών οξέων (~70% ξηρής κυτταρικής βιομάζας) χρησιμοποιώντας πηγές άνθρακα όπως, γλυκόζη, και τα συσσωρεύουν εσωκυτταρικά σε μορφή TAGs. Εάν τα βακτήρια που αποθηκεύουν λιπίδια υποβάλλονταν σε γενετικούς χειρισμούς, με τους οποίους τα λιπαρά οξέα οδηγούνταν από TAG προς βιοσύνθεση FAEE, θα αποτελούσαν υποψήφιους παραγωγούς Microdiesel για το μέλλον και με απλούστερη διαδικασία.

Άλλο ένα εμπόδιο που παρουσιάζεται με τη μέθοδο αυτή είναι ο χαμηλός ρυθμός αντίδρασης της WS/DGAT με την αιθανόλη σε σχέση με τις μεγάλες μήκους αλκοόλες (C10-C18). Υπάρχουν πολλά γονίδια που κωδικοποιούν ομόλογα της WS/DGAT και έχουν εντοπιστεί σε πολλά βακτήρια. Κάποια από όλες αυτές τις ακυλοτρανσφεράσες μπορεί να παρουσιάζει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για τη αιθανόλη.

Η βελτιστοποίηση της παραγωγής Microdiesel από μικροοργανισμούς που έχουν υποστεί μετατροπές μπορούν να προσφέρουν πολλά στη διεργασία παραγωγής. Η βιοτεχνολογική παραγωγή βιοντίζελ μπορεί να είναι πολύ πιο οικονομική από τη συμβατική παραγωγή

βιοντίζελ εάν φυτικά συστατικά όπως το άμυλο και η λιγνινοκυτταρίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη παραγωγή. Αυτά τα φυτικά πολυμερή δεν είναι μόνο οικονομικότερα από τα φυτικά έλαια, αλλά και πολύ πιο άφθονα. Έτσι η παραγωγή Microdiesel δεν θα περιοριστεί. Σε αντίθεση με το συμβατικό βιοντίζελ το Microdiesel είναι πλήρως βιώσιμο και προέρχεται από ανανεώσιμα υλικά και δεν χρησιμοποιεί μεθανόλη η οποία είναι τοξική [55].

#### 4.8.2 Παράδειγμα παραγωγής βιοντίζελ από ελαιούχο μύκητα

Στο σημείο αυτό θα παραθέσουμε ένα παράδειγμα παραγωγής βιοντίζελ από ελαιούχο μικροοργανισμό και συγκεκριμένα, από τον ελαιούχο μύκητα *Mucor circinelloides*. Αυτός ο μύκητας παρουσιάζει πολλά επιθυμητά χαρακτηριστικά για τη χρήση του στη παραγωγή βιοντίζελ. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι τα υψηλά ποσά λιπιδίων που φτάνουν το 25% της ξηρής βιομάζας στον άγριο τύπο, η ικανοποιητική παραγωγή βιομάζας κατά την καλλιέργειά του σε βιοαντιδραστήρες διαλείποντος έργου και η ευρεία χρήση πηγών άνθρακα. Επίσης, ο μύκητας αυτός έχει αποδείξει την ικανότητά του να αναπτύσσεται σε μεγάλους βιομηχανικούς ζυμωτήρες για παραγωγή ελαίου πλούσιο σε γ-λινολεϊκό οξύ. Πολύ σημαντικό επίσης είναι ότι η ρύθμιση της συσσώρευσης λιπιδίων στο μύκητα αυτό έχει μελετηθεί διεξοδικά και έχουν εντοπιστεί τα ένζυμα-κλειδιά που θα μπορούσαν να τροποποιηθούν χρησιμοποιώντας ένα ήδη μεγάλο αριθμό υπάρχοντων μοριακών εργαλείων περιλαμβάνοντας και τα σιωπηλά γονίδια (RNAi).

Στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε, περιλαμβάνεται η διεργασία της εκχύλισης των λιπιδίων, ο χαρακτηρισμός τους και η παραγωγή βιοντίζελ από τη βιομάζα του *M.circinelloides*. Δύο διεργασίες για την παραγωγή λιπιδίων συγκρίθηκαν: η εκχύλιση λιπιδίων από τη βιομάζα του *M.circinelloides* ακολουθούμενη από μετεστεροποίηση των λιπιδίων που εκχυλίστηκαν σε μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAMES) και η άμεση μετατροπή της βιομάζας του *M.circinelloides* χωρίς προηγούμενη εκχύλιση για την παραγωγή FAMES. Χρησιμοποιώντας την άμεση μέθοδο παράχθηκε υψηλής ποιότητας βιοντίζελ και το οποίο πληροί τις Ευρωπαϊκές και Αμερικάνικες προδιαγραφές και αποδεικνύει πως η βιομάζα του *M. Circinelloides* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για τη παραγωγή βιοντίζελ. Στην έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος MU241 προερχόμενο από το R7B μετά από αντικατάσταση του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου *leuA* από ένα αλληλόμορφου άγριου τύπου.

Για την παραγωγή βιοντίζελ από το μύκητα, το πρώτο βήμα ήταν η παραγωγή βιομάζας του *M.circinelloides* από το πρωτότροφο στέλεχος MU421 η οποία και αναπτύχθηκε σε στερεό μέσο καλλιέργειας με πηγή άνθρακα, τη γλυκόζη. Μετά από 3 μέρες λήφθηκε η ξηρή βιομάζα

του μύκητα. Τα λιπίδια εκχειλίστηκαν από τη ξηρή βιομάζα χρησιμοποιώντας μίγματα διαλυτών: χλωροφόρμιο-μεθανόλη, χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό και η-εξάνιο. Το δυαδικό μίγμα χλωροφόρμιο μεθανόλη οδήγησε σε υψηλότερες τιμές εκχειλισμένων λιπιδίων (19,9wt%) και σε χαμηλότερες τιμές ελλείμματος κατά την εκχύλιση (1,7wt%). Εάν συγκριθούν τα ποσά των λιπιδίων που εκχυλίστηκαν από το μικροοργανισμό αυτό (15-19wt%) με τα ποσά των ελαιούχων σπόρων από ηλίανθο και ελαιοκράμβη, (40 wt% 35 wt% αντίστοιχα), θα μας φανούν σαφώς χαμηλότερα. Στη πραγματικότητα όμως, στις τιμές αυτές δεν λαμβάνεται υπόψη ολόκληρη η φυτική καλλιέργεια παρά μόνο οι σπόροι. Αν ληφθεί υπόψη το βάρος ολόκληρου του φυτού τότε οι αποδόσεις των φυτών σε έλαιο μειώνονται δραματικά και παράλληλα φαίνεται η υπεροχή των μικροοργανισμών.

- Χαρακτηρισμός λιπιδίων

Δεν είναι όλα τα λιπίδια που λαμβάνονται από μικροβιακή βιομάζα κατάλληλα για τον σχηματισμό βιοντίζελ. Μόνο τα λιπίδια με εστερικούς δεσμούς που (σαπωνοποιήσιμα λίπη) και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μπορούν να παράξουν FAMES και τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοντίζελ εφόσον συμβιβάζονται με τις τρέχουσες προδιαγραφές. Όπως και τα συμβατικά φυσικά έλαια, έτσι και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και τα σαπωνοποιήσιμα λιπίδια μπορούν να μετατραπούν σε FAMES μέσω της εστερο/μετεστεροποίησης αντίστοιχα, με μεθανόλη παρουσία κατάλληλου καταλύτη.

Τα σαπωνοποιήσιμα λίπη και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα αποτελούν το 86,15% των συνολικών λιπιδίων που εκχυλίστηκαν από τη βιομάζα του *M.circinelloides* με τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, πολικά λιπίδια (φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια, σακχαρολιπίδια) και τα τριγλυκερίδια ως τα βασικά συστατικά Πίνακα 34.

Πίνακας 34 : Η σύσταση των λιπαρών που εκχυλίστηκε από το *M.circinelloides* (G.Vicente, *Biochemical engineering journal*, σελ.26)

| ταξινόμηση λιπιδίων                      | τύπος λιπιδίου                   | συγκέντρωση (wt%) |
|--|----------------------------------|-------------------|
| Free fatty acids and saponifiable lipids | Free fatty acids                 | 31.60 ± 1.30      |
|  | Triglycerides                    | 13.70 ± 1.80      |
|  | Diglycerides                     | 3.20 ± 0.50       |
|  | Monoglycerides                   | 1.60 ± 0.20       |
|  | Phospholipids                    | 20.80 ± 1.90      |
|  | Sphingolipids and saccharolipids | 15.50 ± 1.90      |
|  | Sterol esters                    | 0.09 ± 0.02       |
|  | Total saponifiable lipids        | 86.50             |
| Non-saponifiable lipids                  | Carotenoids                      | 6.40 ± 1.30       |
|  | Sterols and tocopherols          | 0.09 ± 0.04       |
|  | Retinoids                        | 7.00 ± 0.30       |
|  | Total non-saponifiable lipids    | 13.50             |



Το κλάσμα των μη σαπωνοποιήσιμων λιπιδίων αποτελείται από μικρά ποσά καροτενοειδών, στερολών, τοκοφερολών και ρετινοειδών. Οι υψηλές συγκεντρώσεις των ελεύθερων λιπαρών οξέων ( $31,6 \pm 1,3\%$ ) στο *M.circinelloides* ορίζει ότι η όξινα καταλυόμενη διεργασία είναι καταλληλότερη για τη παραγωγή βιοντίζελ. Η αλκαλική δεν επιλέχθηκε για να αποφευχθούν οι απώλειες από την εξουδετέρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Τα μικροβιακά έλαια συνήθως διαφέρουν από τα περισσότερα φυτικά έλαια όντας αρκετά πιο πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Ο υψηλός βαθμός ακορεστότητας, που είναι εγγενής στους FAMES που προέρχονται από αυτά τα λιπαρά οξέα, δικαιολογεί τη χαμηλή οξειδωτική σταθερότητα και τις εξαιρετικές ιδιότητες καυσίμου σε χαμηλές θερμοκρασίες το οποίο είναι πλεονέκτημα για τη χειμερινή χρήση. Στο έλαιο από *M.circinelloides* απουσιάζουν λιπαρά οξέα με τέσσερις ή παραπάνω διπλούς δεσμούς αλλά περιέχονται  $14,3 \pm 0,6\%$  και  $18,5 \pm 0,7\%$  λινοελαϊκού (δύο διπλούς δεσμούς) και λινολενικού (τρεις διπλούς δεσμούς) οξέος αντίστοιχα. Επίσης, περιέχει κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα αυτός ο μύκητας περιέχει μεγάλα ποσά ελαϊκού οξέος ( $37 \pm 1\%$ ) και παλμιτικού οξέος ( $20 \pm 1\%$ ). Ο βαθμός ιωδίου είναι ένα μέτρο της ακορεστότητας και εξαρτάται μόνο από το έλαιο που χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη. Ο βαθμός ιωδίου που μετρήθηκε για τα σαπωνοποιήσιμα λιπίδια και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που εκχυλίστηκαν από τον μύκητα ήταν  $107,6 \text{ mg I}_2 \text{ g}^{-1}$  το οποίο είναι αρκετά χαμηλότερο από το όριο των  $120 \text{ mg I}_2 \text{ g}^{-1}$  που ορίζεται από τις προδιαγραφές της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

- Παραγωγή βιοντίζελ από μικροβιακό έλαιο

Οι αντιδράσεις εστεροποίησης/μετεστεροποίησης του ελαίου που εκχυλίστηκε πραγματοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες ( $25$  και  $65^\circ\text{C}$ ) με τον καθένα από τους όξινους καταλύτες:  $\text{BF}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , και  $\text{HCl}$ . Οι αποδόσεις σε FAMES, με βάση το ξηρό βάρος της βιομάζας στους  $25^\circ\text{C}$ , ήταν σχεδόν σταθερό για τους τρεις καταλύτες μεταξύ  $14,1\%$  και  $14,6\%$ . Στους  $65^\circ\text{C}$  οι καταλύτες  $\text{BF}_3$ , και  $\text{H}_2\text{SO}_4$  είχαν παρόμοιες αποδόσεις  $13$  και  $14\%$  αντίστοιχα ενώ του  $\text{HCl}$  ήταν χαμηλότερη.

Η ανάλυση της σύστασης του βιοντίζελ που παράχθηκε στους  $25^\circ\text{C}$  μετά από  $8 \text{ hr}$  αντίδρασης, έδειξε ότι το περιεχόμενο του εστέρα ήταν χαμηλότερο από τις προδιαγραφές EN14214. Επιπλέον το περιεχόμενο των τριγλυκεριδίων ξεπέρασε τις αντίστοιχες προδιαγραφές υποδεικνύοντας ότι αυτές οι συνθήκες αντίδρασης δεν είναι κατάλληλες για την μετεστεροποίηση του *M.circinelloides* Πίνακα 12. Να σημειωθεί ότι οι αντίστοιχες αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν και σε έλαιο από ηλίανθο, το οποίο είναι πλούσιο σε ελεύθερα λιπαρά οξέα. Στη περίπτωση αυτή, παρατηρήθηκε πως ένα μεγάλο ποσοστό

τριγλυκεριδίων πάνω από 50% δεν μετεστεροποιήθηκε, ενώ στο μικροβιακό ελαίο, η μετατροπή των τριγλυκεριδίων ήταν πάνω από 90%. Ο μεγάλος αριθμός μετατροπής των TAG που παρατηρείται στους μικροοργανισμούς μπορεί να οφείλεται στο υψηλό ποσό μικρού μήκους λιπαρών οξέων τα οποία είναι πιο δραστικά κατά τις αντιδράσεις μετεστεροποίησης. Περισσότερες λεπτομέρειες για τα αποτελέσματα της μετεστεροποίησης/εστεροποίησης με αυτή τη μέθοδο και σύγκριση με τις επιθυμητές προδιαγραφές, παρουσιάζονται στον πίνακα 35.

Πίνακας 35 : Ποιοτικός έλεγχος του βιοντίζελ που παράχθηκε με την τεχνική δύο σταδίων από το εκχυλισμένο έλαιο του *M.circinelloides* (G.Vicente, *Biochemical engineering journal*, σελ.27)

| Property                             | 25 °C            |                                |                  | 65 °C            |                                |                  | EU Standard EN 14214 | US Standard ASTM D6751 |
|--------------------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|------------------|--------------------------------|------------------|----------------------|------------------------|
|                                      | BF <sub>3</sub>  | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | HCl              | BF <sub>3</sub>  | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | HCl              |                      |                        |
| Ester content (wt%)                  | 90.7             | 88.8                           | 91.9             | 98.0             | 91.5                           | 95.8             | 96.5 min.            | n.s <sup>a</sup>       |
| Monoglyceride content (wt%)          | n.d <sup>a</sup> | n.d <sup>a</sup>               | n.d <sup>a</sup> | n.d <sup>a</sup> | n.d <sup>a</sup>               | n.d <sup>a</sup> | 0.8 max.             | n.s <sup>a</sup>       |
| Diglyceride content (wt%)            | n.d <sup>a</sup> | n.d <sup>a</sup>               | n.d <sup>a</sup> | n.d <sup>a</sup> | 0.1                            | n.d <sup>a</sup> | 0.2 max.             | n.s <sup>a</sup>       |
| Triglyceride content (wt%)           | 1.2              | 0.8                            | 1.1              | n.d <sup>a</sup> | 0.1                            | 0.1              | 0.2 max.             | n.s <sup>a</sup>       |
| Free glycerol (wt%)                  | 0.0022           | 0.0035                         | 0.0030           | 0.0020           | 0.0030                         | 0.0030           | 0.02 max.            | 0.02 max.              |
| Total glycerol (wt%)                 | 1.2022           | 0.8035                         | 1.1030           | 0.0020           | 0.2030                         | 0.1030           | 0.25 max.            | 0.24 max.              |
| Acid value (mg KOH g <sup>-1</sup> ) | 0.2              | 0.8                            | n.d <sup>a</sup> | n.d <sup>a</sup> | 0.6                            | 0.2              | 0.5 max.             | 0.5 max.               |
| Non-saponifiable lipids (wt%)        | 7.9              | 9.9                            | 6.8              | 2.0              | 8.0                            | 4.0              | n.s <sup>a</sup>     | n.s <sup>a</sup>       |
| Polar lipids (wt%)                   | 0.1              | 0.1                            | 0.2              | n.d <sup>a</sup> | n.d <sup>a</sup>               | n.d <sup>a</sup> | n.s <sup>a</sup>     | n.s <sup>a</sup>       |

<sup>a</sup> n.d = not detected; n.s = not specified limit.

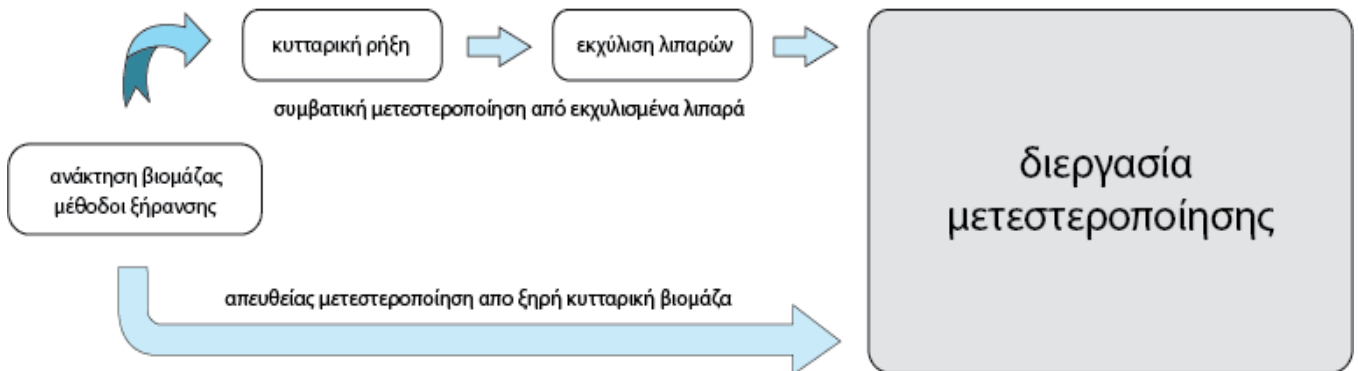
Όσον αφορά τις αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στους 65°C, παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στην καθαρότητα των μεθυλεστέρων για όλες τις καταλυτικές διεργασίες πίνακα 35. Παρόλα αυτά, το ποσό των μεθυλεστέρων που εκπλήρωσε τις ευρωπαϊκές προδιαγραφές ήταν αυτό στο οποίο χρησιμοποιήθηκε BF<sub>3</sub> καταλύτης. Το περιεχόμενο σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, γλυκερίδια, ελεύθερη γλυκερόλη και συνολική γλυκερόλη πληροί και σχεδόν τις δύο προδιαγραφές. Αυτό σημαίνει ότι οι αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης ολοκληρώθηκαν και ότι η γλυκερόλη περιορίστηκε κατά την επεξεργασία καθαρισμού. Στους 65°C οι μετατροπές των τριγλυκεριδίων με όλους τους καταλύτες τόσο στα πειράματα με τα μικροβιακά έλαια όσο και με τα φυτικά ήταν πάνω από 99%. Οι μετατροπές στα πολικά λιπίδια ήταν σχεδόν 100%.

Αν και η αντίδραση στους 65°C με χρήση BF<sub>3</sub> καταλύτη παράγει FAMES που υπακούν στις προδιαγραφές του βιοντίζελ, πραγματοποιήθηκαν μια ακόμη μέθοδος που συνδυάζει την εκχύλιση λιπιδίων και την όξινα καταλυόμενη αντίδραση εστεροποίησης/μετεστεροποίησης των λιπιδίων αυτών μόνο σ' ένα στάδιο. Στη διεργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν ως σύστημα διαλυτών μεθανόλη και χλωροφόρμιο και οι ίδιοι όξινοι καταλύτες. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 65°C για 8 ώρες και οι αποδόσεις βιοντίζελ ήταν 18,5%, 18,0%,

17,5% βάση της ξηρής βιομάζας *M.circinelloides* χρησιμοποιώντας  $H_2SO_4$ , HCl και  $BF_3$  αντίστοιχα. Σε σύγκριση με τη διεργασία, που περιέχει το επιπλέον προηγούμενο στάδιο της εκχύλισης, οι αποδόσεις είναι ιδιαίτερα υψηλές. Οι αποδόσεις αυτές είναι υψηλότερες ακόμη και από τις αντίστοιχες θεωρητικά υπολογισμένες για το μικροοργανισμό αυτό (15,3%). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η άμεση μετεστεροποίηση βελτιώνει το συνολικό ποσό των εκχυλισμένων λιπιδίων συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης λιπιδίων από μικροοργανισμούς. Οι αποδόσεις αυτές μπορεί να είναι συνέπεια της αυξημένης οξύτητας του μέσου της εκχύλισης-αντίδρασης το οποίο προκαλεί σημαντικές κυτταρικές ρίξεις. Η ποιότητα του βιοντίζελ που παράγεται στη διεργασία αυτή του ενός σταδίου συγκρίθηκε με τις Αμερικάνικες και Ευρωπαϊκές προδιαγραφές για το βιοντίζελ (Πίνακας 35). Ανάλογα με τον καταλύτη το περιεχόμενο σε εστέρα κυμαίνεται μεταξύ 99,1 και 99,9%. Οι τιμές αυτές είναι αρκετά υψηλότερες από τις αντίστοιχες ελάχιστες προδιαγραφές της Ευρωπαϊκής Ένωσης (minimum 96,5%). Επίσης τα ποσοστά των παραπροϊόντων που αναλύθηκαν (γλυκερίδια, ελεύθερη γλυκερόλη, συνολική γλυκερόλη, ελεύθερα λιπαρά οξέα) ήταν κάτω από τις μέγιστες επιτρεπόμενες τιμές. Ακόμη, τα μη σαπωνοποιήσιμα λιπίδια δεν ανιχνεύθηκαν στο βιοντίζελ που παράχθηκε. Συνεπώς, όλοι οι παράμετροι που αναλύθηκαν στο βιοντίζελ παραγόμενο σε ένα μόνο στάδιο από τη βιομάζα του *M.circinelloides* συμφωνούν με τις Ευρωπαϊκές και Αμερικάνικες προδιαγραφές αποδεικνύοντας ότι και τα λιπίδια που προορίζονται για αποθήκευση (TAG, FFA) και τα λιπίδια που προορίζονται για τις δομικές λειτουργίες μετατράπηκαν σε μεθυλεστέρες.

Συνοψίζοντας, η παρούσα εργασία προτείνει ότι τα λιπίδια από *M.circinelloides* αποτελούν κατάλληλη πρώτη ύλη για τη παραγωγή βιοντίζελ. Το σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο-μεθανόλη, παρουσίασε την υψηλότερη λιπιδιακή απόδοση ανάμεσα από τις τρεις διεργασίες εκχύλισης που μελετήθηκαν. Οι FAMES παράχθηκαν με όξινα καταλυόμενη εστεροποίηση και μετεστεροποίηση στους  $65^\circ C$  για 8 hr και οι δύο διαφορετικές προσεγγίσεις συγκρίθηκαν: η μετατροπή των προηγούμενων εκχυλισμένων λιπιδίων και η απευθείας μετατροπή μυκητιακής βιομάζας. Η μελέτη έδειξε ότι η άμεση μέθοδος όχι μόνο παράξε υψηλής καθαρότητας FAME (>99%) και με τους τρεις καταλύτες αλλά επιπλέον, αύξησε την απόδοση των FAMES. Τα χαρακτηριστικά του βιοντίζελ από *M.circinelloides* υποδεικνύουν ότι η παραγωγή βιοντίζελ με άμεση μετεστεροποίηση της μυκητιακής βιομάζας χωρίς ενδιάμεσο στάδιο εκχύλισης λιπιδίων είναι τεχνικά εφικτό και αποτελεί σημείο εκκίνησης για περεταίρω μελέτη με σκοπό την ανάπτυξη της διεργασίας σε βιομηχανική κλίμακα [56]. Στο σχήμα 44 παρουσιάζεται η διεργασία που ακολουθείται για τη σύνθεση βιοντίζελ εστέρων από

ελαιούχους μικροοργανισμούς με τη συμβατική μετεστεροποίηση εκχυλισμένων λιπιδίων από τα κύτταρα ή με την απευθείας μετεστεροποίηση της κυτταρικής βιομάζας.



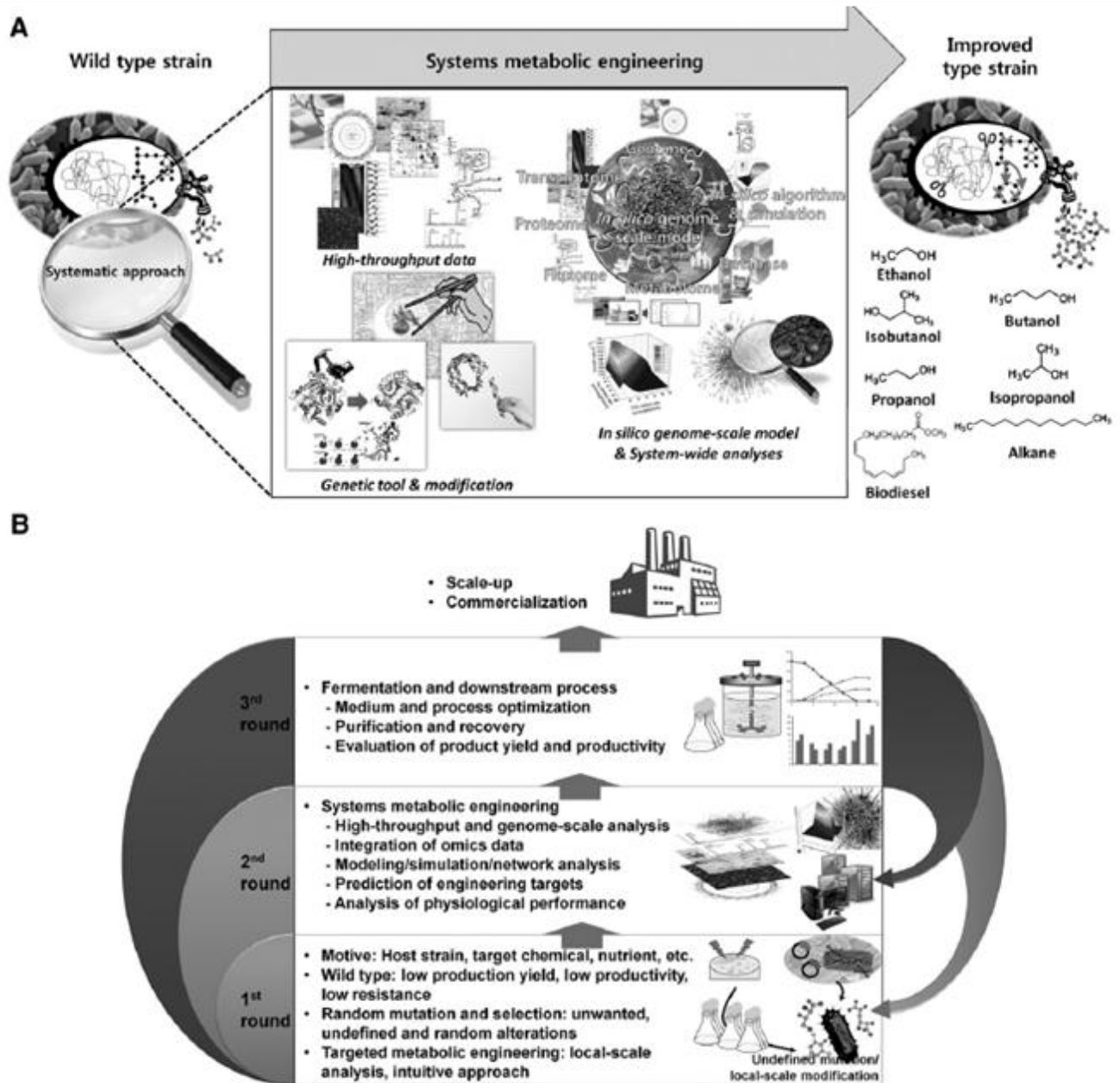
Σχήμα 44 : Διεργασία έμμεσης παραγωγής βιοντίζελ από μικροοργανισμούς και διεργασία απευθείας παραγωγής βιοντίζελ από τα κύτταρα [37]

Παρόλα αυτά, η μέθοδος του ενός σταδίου δεν καταφέρνει να δώσει λύση στο θέμα του κόστους καθώς έχει υψηλές απαιτήσεις για την προεπεξεργασία της βιομάζας. Το κόστος θα μπορούσε να μειωθεί εάν αναπτύσσονταν μέθοδοι χωρίς να απαιτείται ξήρανση της βιομάζας. Ακόμα, οι χημικοί καταλύτες που χρησιμοποιούνται, έχουν χαμηλό κόστος και υψηλές αποδόσεις αλλά, απαιτούνται επιπλέον διεργασίες για την ανάκτηση του εστέρα και την επεξεργασία του μολυσμένου νερού. Οι τεχνικές μετεστεροποίησης με βιοκαταλύτες, όπως οι λιπάσες, άρχισαν να κερδίζουν έδαφος καθώς είναι πιο φιλικές προς το περιβάλλον, έχουν χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις και οι αποδόσεις τους είναι ικανοποιητικές [37].

#### 4.9 Μελλοντικές προοπτικές πάνω στη συστημική μεταβολική μηχανική για την παραγωγή βιοκαυσίμων

Η τυχαία μεταλλαξιγένεση (rational mutagenesis) και η μεταβολική μηχανική έχουν καθιερωθεί ως οι βασικές στρατηγικές τις τελευταίες δύο δεκαετίες για την κατασκευή μικροβιακών στελεχών για την παραγωγή βιοντίζελ. Ωστόσο, η προσέγγιση της τυχαίας μετάλλαξης και η διαδικασία της επιλογής καθιστά αρκετά δύσκολο την βελτίωση της κυτταρικής απόδοσης εξαιτίας της πολυπλοκότητας που σχετίζεται με την αναγνώριση του τροποποιημένου γονιδίου ως συνέπεια της τυχαίας μετάλλαξης. Η μεταβολική μηχανική, αντιθέτως, αποσκοπεί στη βελτίωση της κυτταρικής απόδοσης θεωρώντας το μεταβολικό μονοπάτι ως μια ολότητα και χειρίζεται συγκεκριμένα γονίδια που έχουν γίνει στόχος βάσει των «μηχανικών εργαλείων» και με τα οποία βελτιώθηκε η γνώση μας πάνω στη κυτταρική

φυσιολογία και στα επακόλουθα αποτελέσματα των μηχανικών επεμβάσεων. Τα τελευταία χρόνια επιπλέον νέες οπτικές και στρατηγικές υιοθετούνται. Τα δεδομένα υψηλής ευκρίνειας (high-throughput data), η υπολογιστική και συστημική βιολογία έχουν καταφέρει να αναλύσουν ένα μεγάλο ποσό πληροφοριών που αφορούν τα omics του κυτταρικού μεταβολισμού και τη φυσιολογία σε συστημικό επίπεδο. Η μεταβολική μηχανική έχει αφομοιώσει τις συστημικές αναλύσεις και τα υπολογιστικά εργαλεία στοχεύοντας σε κάτι παραπάνω από την απλή γενετική τροποποίηση των κυττάρων. Αυτή η προσέγγιση ορίζεται ως συστημική μεταβολική μηχανική και παρέχει νέα πρότυπα στην ανάπτυξη των ειδών για την παραγωγή βιοκαυσίμων.



Σχήμα 45: Μελλοντικές προοπτικές για την παραγωγή βιοκαυσίμων χρησιμοποιώντας τη συστημική μεταβολική μηχανική, των διαδικασιών για την ανάπτυξη στελεχών και εφαρμογών τους. (A) Συστημική μεταβολική μηχανική για την ανάπτυξη παραγωγών βιοκαυσίμων με τον συνδυασμό πειραματικών δεδομένων με συστηματικές αναλύσεις βασισμένες σε *in silico* Μοντέλα και προσομοιωτές. (B) Οι συνολικές στρατηγικές και διεργασίες για την ανάπτυξη στελεχών με συστημική μεταβολική μηχανική. Οι παραδοσιακές μέθοδοι για την ανάπτυξη βελτιωμένων στελεχών όπως η τυχαία ή στοχευμένη μετάλλαξη είναι ιδιαίτερα περιοριστικές. Η συστημική βιολογία μας επιτρέπει να μελετήσουμε τον οργανισμό σε επίπεδο συστήματος χρησιμοποιώντας διάφορα «εργαλεία» γονιδιακής φύσης (Y.S.Jang, *Biotechnology advances*, σελ.8)

## Τα εργαλεία και οι προσεγγίσεις της μεταβολικής μηχανικής

Οι κυτταρικές λειτουργίες μπορούν να χαρακτηριστούν κυρίως βάση τριών βασικών δικτύων στο κύτταρο: μεταβολικό, το δίκτυο ρύθμισης γονιδίων και το σηματοδοτικό δίκτυο (signaling network). Πάνω σε αυτά έχουν αναπτυχθεί διάφορα εργαλεία (σχήμα 45)

Οι πλήρεις αλληλουχίες του γονιδιώματος και ο γονιδιακός σχολιασμός (annotation) των οργανισμών που ενδιαφέρουν, επιτρέπουν την ανάλυση και σύγκριση του γονιδιώματος και έτσι είναι δυνατόν να αναγνωριστούν τα γονίδια και οι ρυθμιστικές περιοχές που χρειάζεται να εισαχθούν, να διαγραφούν, να ρυθμιστούν είτε για μεγαλύτερη είτε για μικρότερη απόδοση, ώστε να επιτευχθεί ο επιθυμητός φαινότυπος. Σύμφωνα με τα παραπάνω, το στέλεχος που πρόκειται να τροποποιηθεί μπορεί να συγκριθεί με το γονιδίωμα ενός άλλου στελέχους, που περιέχει τους μεταβολικούς και κυτταρικούς φαινότυπους που ενδιαφέρουν, και να αναγνωριστούν και τα γονίδια και οι περιοχές στο γονιδίωμα που πρόκειται να τροποποιηθούν.

Το προφίλ της μεταγραφομικής (transcriptomics) επιτρέπει την εξέταση έκφρασης του γονιδίου στο επίπεδο του mRNA το οποίο μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τις γενετικές και περιβαλλοντικές συνθήκες. Βάση του μεταγραφομικού προφίλ τα γονιδια-στόχοι που πρόκειται να τροποποιηθούν καθώς και οι στρατηγικές για βελτίωση ειδών, μπορούν να ταυτοποιηθούν συγκρίνοντας το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων μεταξύ δειγμάτων ίδιων ειδών καλλιεργιμένων σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες ή μεταξύ ειδών με διαφορετικό γονότυπο κάτω από ίδιες ή διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Παρομοίως, η πρωτεομική (proteomics) επιτρέπει την εξέταση σε επίπεδο πρωτεϊνών στο κύτταρο χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων ή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας. Η συγκριτική ανάλυση του πρωτεομικού προφίλ ανάμεσα σε διαφορετικά δείγματα υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές ή γενετικές συνθήκες μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να αναγνωριστούν αυτές οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν μεταβολή στο επίπεδο έκφρασης και των πρωτεϊνών που τροποποιήθηκαν μετα-μεταγραφικά και χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτίωση του στελέχους.

Η μεταβολομική (metabolomics) αφορά τους μεταβολίτες οι οποίοι είναι υποστρώματα, προϊόντα ή ενδιάμεσα του κυτταρικού μεταβολισμού κάτω από τις επιθυμητές συνθήκες καλλιέργειας χρησιμοποιώντας χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας και NMR. Τα προφίλ των μεταβολιτών αναπαριστούν τη μεταβολική κατάσταση του κυττάρου και

έτσι παρέχει πληροφορίες για τις φυσιολογικές αλλαγές σε περιπτώσεις γενετικών και περιβαλλοντικών αλλαγών.

Τα fluxomics ποσοτικοποιούν τις μεταβολικές ροές και επιλεκτικά αναπαριστούν τα μεταβολικά χαρακτηριστικά ενός κυττάρου υπό δεδομένες συνθήκες. Δύο είναι οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των μεταβολικών ροών και την κατανόηση των φυσιολογικών και μεταβολικών καταστάσεων του κυττάρου στις συνθήκες που ενδιαφέρουν. Έχουν χρησιμοποιηθεί η ανάλυση που βασίζεται στη ροή του  $^{13}\text{C}$  και ανάλυση της ροής των διαφόρων ενώσεων (constraints-based flux analysis) για να υπολογίσουν τις μεταβολικές ροές και να κατανοήσουν τις φυσιολογικές και μεταβολικές καταστάσεις του κυττάρου στις ενδιαφερόμενες συνθήκες.

Επίσης, αρκετοί είναι και οι in silico αλγόριθμοι που έχουν αναπτυχθεί για να προβλέψουν την κυτταρική φυσιολογία με περισσότερη λεπτομέρεια και να αναγνωρίσουν τα γονίδια-στόχους που πρόκειται να διαγραφούν ή να εισαχθούν ή να ρυθμιστούν προς τα άνω ή κάτω [57].

## **Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα - Ερωτηματικά για τα βιοκαύσιμα και ανάγκη εξέλιξης**

### **5.1 Συμπεράσματα**

Οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις των ορυκτών καυσίμων και η ανησυχία για τη μείωση των αποθεμάτων του πετρελαίου έχει κεντρίσει την έρευνα για ανανεώσιμα καύσιμα. Το βιοντίζελ  $1^{\text{ης}}$  γενιάς παράγεται από εδώδιμα έλαια γεγονός όμως που οδήγησε σε αύξηση των τιμών των τροφίμων. Οι αστοχίες των βιοκαυσίμων της  $1^{\text{ης}}$  γενιάς όπως, ο ανταγωνισμός μεταξύ καυσίμων και τροφίμων, το υψηλό κόστος παραγωγής, οδήγησαν στα  $2^{\text{ης}}$  γενιάς βιοκαύσιμα που προέρχονται από οικονομικότερες και πιο άφθονες πηγές όπως η λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα και μη εδώδιμα έλαια. Η βασική διαδικασία της παραγωγής βιοντίζελ περιλαμβάνει τη μετεστεροποίηση. Η μετεστεροποίηση μπορεί να γίνει είτε χημικά έχοντας υψηλές αποδόσεις σε γρήγορο χρονικό διάστημα και με σχετικά μικρό κόστος είτε ενζυμικά με λιπάσες. Οι λιπάσες υπερτερούν σε πολλά σημεία έναντι των χημικών καταλυτών ωστόσο, το βασικό μειονέκτημά τους είναι το ιδιαίτερα υψηλό κόστος. Σήμερα, η βασική πρόκληση είναι η παραγωγή βιοντίζελ από μικροοργανισμούς. Η μέθοδος αυτή έχει πιο έντονα τον ανανεώσιμο χαρακτήρα και δεν τίθεται θέμα ανταγωνισμού τροφίμων-καυσίμων. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να καλλιεργηθούν με στόχο την οικονομικότερη παραγωγή ελαίων με προορισμό το βιοντίζελ ή με στόχο την απευθείας παραγωγή βιοντίζελ. Πρόσφατα έγινε εφικτή η απευθείας



παραγωγή βιοντίζελ από E.coli πράγμα που υπόσχεται πολλά για το μέλλον του βιοντίζελ και των βιοκαυσίμων γενικότερα. Η ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων και στρατηγικών όπως, αυτή της συστημικής μεταβολικής μηχανικής κατάφεραν να φέρουν στην επιφάνεια νέες πληροφορίες και τεχνικές οι οποίες υπόσχονται πολλά στο τομέα της παραγωγής βιοκαυσίμων από μικροοργανισμούς.

Ωστόσο, μέχρι σήμερα η παραγωγή του βιοντίζελ δεν έχει γίνει οικονομικά βιώσιμη. Απαιτούνται βελτιώσεις και νέοι σχεδιασμοί στις μηχανές καύσης, στους βιοαντιδραστήρες παραγωγής βιομάζας, νέες τεχνολογίες για τις επιμέρους επεξεργασίες κατά την παραγωγή του όπως είναι ο διαχωρισμός, η ξήρανση, η εκχύλιση, η μετεστεροποίηση, απαιτείται ακόμα ανάπτυξη νέων στρατηγικών για την ανάπτυξη μικροοργανισμών που θα παράγουν σε μεγαλύτερο ποσοστό λιπίδια με τον οικονομικότερο δυνατόν τρόπο καθώς και εμπλουτισμός των διαθέσιμων πληροφοριών πάνω στις γενετικές πληροφορίες των μικροοργανισμών.

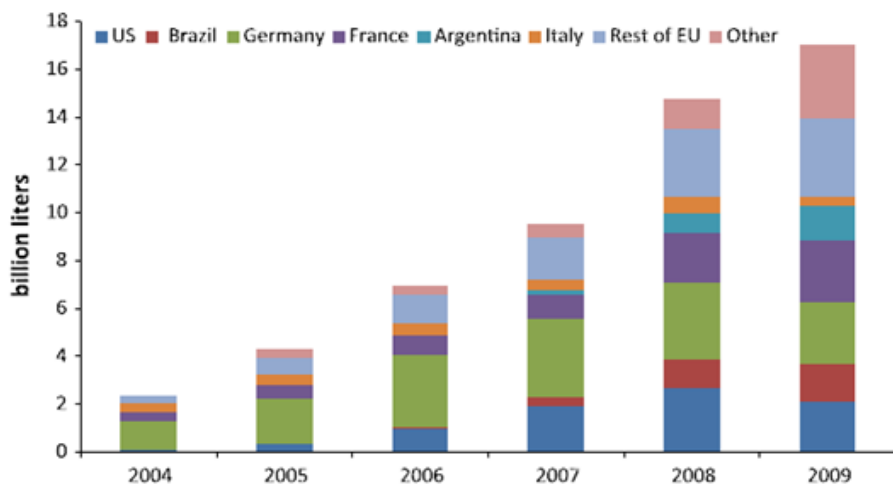
## **5.2 Ερωτηματικά για τα βιοκαύσιμα και ανάγκη εξέλιξης**

Με αφορμή την πετρελαϊκή κρίση του 1973 το ενδιαφέρον άρχισε να στρέφεται προς τις εναλλακτικές πηγές ενέργειας. Τα βιοκαύσιμα ήταν μια από αυτές. Θέματα που αφορούν την επάρκεια της ενέργειας, τις κλιματικές αλλαγές και τις ασταθείς τιμές του πετρελαίου ενέτειναν ακόμα περισσότερο το ενδιαφέρον για τα βιοκαύσιμα και την τεχνολογία τους. Ωστόσο όμως, υπάρχουν αμφιβολίες και αντιδικίες για το αν τα βιοκαύσιμα αποτελούν πανάκεια για τα ενεργειακά και περιβαλλοντικά ζητήματα καθώς και αβεβαιότητα για τις επιπτώσεις στον κοινωνικο-οικονομικό τομέα και το περιβάλλον.

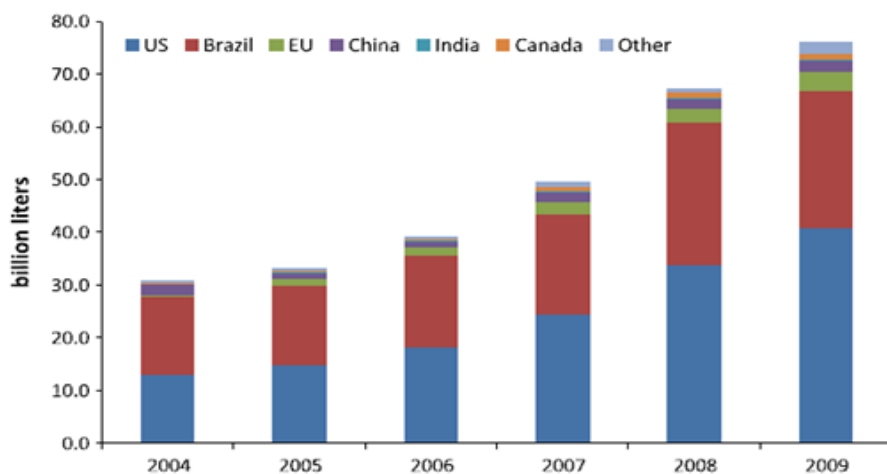
Το βασικό μειονέκτημα των βιοκαυσίμων 1<sup>ης</sup> γενιάς είναι ότι ανταγωνίζονται τις καλλιέργειες που προορίζονται για τροφή. Για τον παραπάνω λόγο τα βιοκαύσιμα 2<sup>ης</sup> γενιάς είναι προτιμότερα εφόσον, η πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται είναι μη εδώδιμη. Ο βασικός αναστολέας των καυσίμων 2<sup>ης</sup> γενιάς, παρόλο το χαμηλό κόστος της πρώτης ύλης, είναι το υψηλό κόστος της τεχνολογίας που απαιτείται για την μετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου ύλης σε καύσιμο. Τα βιοκαύσιμα μέχρι στιγμής δεν είναι οικονομικά ανταγωνίσιμα χωρίς την κρατική χρηματική υποστήριξη. Το κόστος παραγωγής τους είναι στενά συνδεδεμένο με το κόστος των πρωτογενών υλών που χρησιμοποιούνται. Επίσης, απαιτούνται κάποιες επιπλέον μελέτες όσον αφορά τις ιδιότητες των βιοκαυσίμων. Συγκεκριμένα για το βιοντίζελ, εκκρεμούν ακόμα τροποποιήσεις ώστε να βελτιωθούν οι τεχνικές του ιδιότητές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το σημείο απόφραξης ψυχρού φίλτρου και η τάση για

οξειδωση. Ακόμα, οι υπάρχουσες υποδομές είναι συμβατές με μίγματα βιοντίζελ μέχρι και 5% πράγμα που περιορίζει την επέκταση του βιοντίζελ στην αγορά.

Στα σχήματα 46 και 47 παρουσιάζονται η παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης και βιοντίζελ. Αν και σε σχέση με την συνολική παραγωγή αιθανόλης η παραγωγή βιοντίζελ είναι μικρότερη, ο ρυθμός ανάπτυξης του είναι αρκετά υψηλότερος από αυτόν της αιθανόλης. Συγκεκριμένα, ο μέσος ετήσιος ρυθμός ανάπτυξης ήταν σχεδόν 50% για το 2004 με 2009. Η παγκόσμια παραγωγή βιοντίζελ αναπτύχθηκε κατά 43% μεταξύ του 2005 και 2007. Εκτός της Ευρωπαϊκής Ένωσης και των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής, χώρες όπως η Βραζιλία, Ινδονησία, Μαλαισία, Αργεντινή άρχισαν και συνεισέφεραν σημαντικά στη παραγωγή βιοντίζελ. Παρόλη την τεράστια ανάπτυξη στη παραγωγή βιοκαυσίμων, το ποσοστό συνεισφοράς τους στις συνολικές απαιτήσεις για τις μετακινήσεις ήταν πάνω από το 2% το 2004 μόνο για τις χώρες Βραζιλία, Κούβα, Σουηδία και η παγκόσμια απόδοση στην κατανάλωση των οδικών καυσίμων μετακίνησης ήταν 1%.



Σχήμα 46 : Παγκόσμια παραγωγή βιοντίζελ (G.R. Timilsina, Energy,σελ.2057)



Σχήμα 47 : Παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης (G.R. Timilsina, Energy,σελ.2058)

Στα φτωχότερα νοικοκυριά το μεγαλύτερο ποσό των δαπανών τους προορίζεται για την τροφή με αποτέλεσμα η αύξηση των τιμών των τροφίμων να έχει πολύ σοβαρές επιπτώσεις. Ο FAO υπολογίζει πως ήδη υπάρχουν 932 εκατομμύρια υποσιτισμένων ανθρώπων παγκοσμίως και η ταχύτερη ανάπτυξη παραγωγής βιοκαυσίμων, η οποία απαιτεί σημαντικά ποσά αγροτικών αγαθών (καλαμπόκι, ελαιούχους σπόρους, φοινικέλαιο), έχει την δυνατότητα να επηρεάσει την διατροφική ασφάλεια τόσο σε εθνικό επίπεδο όσο σε επίπεδο νοικοκυριού μέσω της αύξησης των τιμών των τροφίμων. Βάσει υπολογισμών η παγκόσμια αύξηση παραγωγής βιοκαυσίμων από το 2008-2010 είναι υπεύθυνη για το 17% της αύξησης της τιμής του καλαμπόκιου και του 14% της σόγιας. Αξίζει να σημειωθεί ότι το μέγεθος των επιπτώσεων των βιοκαυσίμων στις τιμές των τροφίμων επηρεάζεται ανάλογα με το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση. Δηλαδή οι μοντελοποιήσεις που χρησιμοποίησαν δεδομένα μόνο από τον τομέα τροφίμων και τον αγροτικό τομέα παρατήρησαν σοβαρότερες επιπτώσεις στις τιμές των τροφίμων παρά τα μοντέλα που εμπειρεύσαν και αλληλεπιδράσεις και με άλλους τομείς και παράγοντες.

Ένας από τους στόχους των βιοκαυσίμων είναι η αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων και ταυτόχρονα η μείωση και η εξομάλυνση των εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου. Για να γίνει εκτίμηση της συνεισφοράς ενός βιοκαυσίμου στη μείωση των αερίων του θερμοκηπίου από μια συγκεκριμένη πρώτη ύλη γίνεται ανάλυση του κύκλου ζωής του (life circle analysis, LCA). Έτσι το βιοντίζελ 1<sup>ης</sup> γενιάς από φοινικέλαιο θεωρείται πως έχει κέρδος 50-80% στα αέρια του θερμοκηπίου. Αν όμως λάβουμε υπόψη το ποσό του CO<sub>2</sub> που ελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα από την καταστροφή των δασικών εκτάσεων για να μετατραπούν σε καλλιεργήσιμη γη φοινικόδεντρων, τότε τα αποτελέσματα αλλάζουν δραματικά. Με βάση κάποιες μελέτες υποστηρίζεται ότι αν συμπεριληφθούν οι εκπομπές άνθρακα που σχετίζονται με την τροποποίηση των δασικών εκτάσεων σε καλλιεργήσιμη γη για παραγωγή βιοκαυσίμων, τότε οι εκπομπές θα ήταν τόσο υψηλές που θα χρειάζονταν δεκάδες με εκατοντάδες χρόνια για να εξισορροπιστεί η αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων. Τα χρόνια που απαιτούνται για να εξισορροπιστούν οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου που ελευθερώνονται από την εκμετάλλευση της γης μέσω της αντικατάστασης των ορυκτών καυσίμων με βιοκαύσιμα είναι γνωστό ως «χρέος του άνθρακα» (carbon payback period). Εάν παρακάμψουμε τις εκπομπές που σχετίζονται με την εκμετάλλευση της γης για βιοκαύσιμα τότε ανάλογα με τον τύπο του φυτού παρατηρείται μείωση 49-90% στα αέρια του θερμοκηπίου. Αντίθετα, αν αυτές υπολογιστούν τότε οδηγούμαστε σε αύξηση 1-102%.

Σημαντικές επίσης είναι και οι επιπτώσεις στην βιοποικιλότητα καθώς τα τροπικά δάση καταστρέφονται για τη δημιουργία αγροτικών εκτάσεων. Οι περιοχές με τροπικό κλίμα είναι

προτιμότερες καθώς τα ενεργειακά φυτά που ευδοκιμούν εκεί έχουν μεγαλύτερες αποδόσεις σε έλαια (φοινικόδετρο και jatropha). Επίσης το νερό είναι ένα ακόμα θέμα που ταλανίζει την παραγωγή βιοκαυσίμων. Ήδη το 70% του γλυκού νερού του πλανήτη προορίζεται για την γεωργία. Τα φυτά που καλλιεργούνται για εν δυνάμει βιοκαύσιμα έχουν υψηλές απαιτήσεις σε νερό. Επιπροσθέτως, προκύπτουν σημαντικά προβλήματα όσον αφορά την μόλυνση των νερών με τη χρήση λιπασμάτων και χημικών για την αυξημένη απόδοση σοδιάς [59].

Με τη βοήθεια της μεταβολικής μηχανικής, της γονιδιακής μηχανικής, της συστημικής βιολογίας και πολλών άλλων νέων κλάδων της βιοτεχνολογίας και της βιολογίας οι επιστήμονες υποστηρίζουν ότι τα παραπάνω προβλήματα των 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς βιοκαυσίμων μπορούν να ξεπεραστούν. Αυτό θα συμβεί με τη χρησιμοποίηση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών και μικροφυκών που θα μπορούν να «υπερ-παράγουν» πρώτη ύλη για βιοκαύσιμα ή ακόμη και απευθείας βιοκαύσιμα. Έτσι δεν θα τίθεται θέμα ανταγωνισμού τροφής-βιοκαύσιμα. Ωστόσο και η προσέγγιση αυτή δεν είναι απαλλαγμένη από αμφιβολίες και κινδύνους. Υπάρχουν έντονες διαμάχες μεταξύ των επιστημών για την ασφάλεια και την εφαρμογή της στρατηγικής αυτής.

Σύμφωνα με τις επιστήμες της οικολογίας και του περιβάλλοντος οι αλλαγές ενός τμήματος του οικοσυστήματος μπορεί να επηρεάσει τις μορφές ζωής που εμπεριέχει καθώς όλες οι μορφές ζωής αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Είναι πολύ πιθανό να μην βρεθούν καταναλωτές για τους γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς με αποτέλεσμα να μην ελέγχεται ο πληθυσμός τους και να διαταραχθεί η φυσική ισορροπία και η τροφική αλυσίδα. Ήδη από τα γενετικά τροποποιημένα φυτά γνωρίζουμε ότι έχουν τη δυνατότητα να εξελίσσονται και να ανταλλάσσουν μεταξύ τους γενετικό υλικό επηρεάζοντας δραστικά ολόκληρα οικοσυστήματα. Εάν ένας γενετικά μεταλλαγμένος μικροοργανισμός «αποδράσει» από μια εργαστηριακή μονάδα είναι άγνωστο αν και τι είδους επιπτώσεις μπορεί να έχει. Αυτού του είδους η μόλυνση ονομάζεται «γενετική μόλυνση» (genetic pollution) και είναι σχεδόν αδύνατο να περιοριστεί. Ένα σενάριο (worse case scenario) όσον αφορά τα τροποποιημένα κυανοβακτήρια που προορίζονται για παραγωγή βιοκαυσίμων σε ανοιχτές λεκάνες είναι το εξής: Τα βακτήρια αυτά θα είναι τροποποιημένα έτσι ώστε να είναι πιο ανθεκτικά και να υπερτερούν σε σχέση με άλλους ανταγωνιστές μικροοργανισμούς. Εάν ένας τέτοιος μικροοργανισμός εξαπλωθεί σε κάποιο φυσικό περιβάλλον, πχ. ποτάμια, λίμνες, θα οδηγήσει σε ανεπιθύμητες αλλαγές του οικοσυστήματος επικίνδυνες ακόμα και για την υγεία. Για να αποφευχθεί κάτι τέτοιο οι επιστήμονες κάνουν λόγο για το σχεδιασμό “suicide genes” ή αλλιώς “kill-switch” τα οποία χρησιμοποιηθούν για να σταματήσουν οποιοδήποτε μικροοργανισμό ξεφύγει από τον έλεγχο. Αυτό που ισχύει, είναι πως βαθμός κινδύνου μιας

απόδρασης ενός μεταλλαγμένου μικροοργανισμού είναι ακαθόριστος και μη προβλέψιμος [58].

Καταλήγοντας, υπάρχουν πολλά ακόμα ζητήματα που καλείται η επιστημονική κοινότητα να λύσει και να αντιμετωπίσει. Χρειάζεται να εκτιμηθούν όλες οι περιβαλλοντικές, οικονομικές, κοινωνικές, και στην ανθρώπινη υγεία επιπτώσεις. Οι ανησυχίες εξαιτίας της παγκόσμιας κρίσης τροφίμων το 2007-2008 και των αμφιβολιών όσον αφορά τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις των βιοκαυσίμων οδήγησαν πολλές βιομηχανικές και αναπτυσσόμενες χώρες να επανεξετάσουν τα αισιόδοξα σενάρια των βιοκαυσίμων και να υιοθετήσουν πιο συντηρητικές απόψεις. Ανακοίνωσαν ότι το πρόγραμμα βιοκαυσίμων χρειαζόνταν επανασχεδιασμό για να αποφευχθεί ο ανταγωνισμός τροφής-καύσιμο. Αυτό ήταν που μας οδήγησε από τα καύσιμα της 1<sup>ης</sup> γενιάς στα καύσιμα της 2<sup>ης</sup>. Παρόλα αυτά και στη περίπτωση των 2<sup>ης</sup> γενιάς καυσίμων ο ανταγωνισμός για την χρήση της γης για τρόφιμα ή καύσιμα δεν εξαλείφεται. Τα βιοκαύσιμα είναι μια σημαντική ανανεώσιμη πηγή ενέργειας και μπορεί να αντικαταστήσει τα καύσιμα κυρίως στον τομέα των μεταφορών οι προοπτικές τους όμως είναι αβέβαιες. Αντίθετα με τις άλλες ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, όπως η αιολική, η ηλιακή οι οποίες δεν έχουν κανένα κόστος, η πρώτη ύλη των βιοκαυσίμων είναι υπεύθυνη για ένα μεγάλο μερίδιο του τελικού κόστους του καυσίμου. Εάν τα βιοκαύσιμα παίξουν σημαντικό ρόλο ή όχι στο μέλλον της ενέργειας, θα εξαρτηθεί από την ανάπτυξη της τεχνολογίας της παραγωγής βιοκαυσίμων και την αποφυγή ή περιορισμό του ανταγωνισμού τροφής-καυσίμου καθώς και από το αν εκπληρώσει τους περιβαλλοντικούς στόχους. Τα βιοκαύσιμα 2<sup>ης</sup> γενιάς έχουν τη δυνατότητα να ξεπεράσουν πολλά εμπόδια της 1<sup>ης</sup> γενιάς βιοκαύσιμα. Όμως, εφόσον ακόμη τα 1<sup>ης</sup> γενιάς βιοκαύσιμα δεν είναι οικονομικά βιώσιμα απουσία δημοσιονομικής υποστήριξης η κλιμάκωση των καυσίμων της 2<sup>ης</sup> γενιάς φαίνεται απίθανη στο προσεχές μέλλον. Η παραγωγή βιοκαυσίμων με την βοήθεια μικροοργανισμών είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για οικονομικότερα καύσιμα και με πιο ανανεώσιμο χαρακτήρα. Ακόμα όμως απαιτείται μεγάλης έκτασης έρευνα για να γίνει λόγος για επόμενη γενιάς βιοκαύσιμο. Παρά την ουσιαστική πρόοδο που έχει σημειωθεί στη βιοτεχνολογία και στις σχετικές επιστήμες υπάρχουν ακόμα πολλά αναπάντητα ερωτήματα και περιθώρια εξέλιξης για να φτάσουμε στα επιθυμητά αποτελέσματα και των απαραίτητα για την ανθρωπότητα, ανανεώσιμα καύσιμα [58,59].



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Working groups of the IPCC, Climate change 2007: Synthesis report Assessment, 2007
2. Working groups of the IPCC, Frequently asked questions from the report accepted by working group I of IPCC, 2007
3. Working groups of the IPCC, ANNEX I user guide and access to more detailed information, 2007
4. Working groups of the IPCC, Summary of policymakers Emission scenarios, 2007
5. WMO, Greenhouse Gas Bulletin, The state of GHG in the atmosphere based on global observations through 2009, 2010
6. Working groups of the IPCC, Special report on renewable energy sources and climate change mitigation summary for policymakers, 2011
7. [www.oregon.gov](http://www.oregon.gov)
8. N.L. Panwas, S.C. Kausik, Surendra Kothark: Role of renewable energy sources in environmental protection: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 15 (2011) 1513–1524
9. Π. Χριστακόπουλος, Ε. Τόπακας «Βιοτεχνολογία Παραγωγής βιοκαυσίμων» Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα 2008
10. [www.biofuels-platform.ch](http://www.biofuels-platform.ch)
11. S.N. Naik, Vaibhav V. Goud, Prasant K. Rout, Ajay K. Dalai: Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14 (2010) 578–597
12. UNEP Assessing biofuels (2009)
13. Ayhan Demirbas: Progress and recent trends in biodiesel fuels. Energy Conversion and Management 50 (2009) 14–34
14. [www.biodiesel.org](http://www.biodiesel.org)
15. Gerhard Knothe Biodiesel and renewable diesel: A comparison. Progress in Energy and Combustion Science 36 (2010) 364–373

16. S.P. Singh, Dipti Singh: Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as a substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 200–216
17. N.N.A.N. Yusuf, S.K. Kamarudin Z. Yaakub: Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Conversion and Management* 52 (2011) 2741–2751
18. Σ. Στουρνάς, Ε. Λοής, Φ. Ζαννίκος «Τεχνολογία καυσίμων και λιπαντικών» Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα 2007
19. [www.biodiesel.org/pdf\\_files/fuel\\_factsheets/B20\\_specification.pdf](http://www.biodiesel.org/pdf_files/fuel_factsheets/B20_specification.pdf)
20. National biodiesel board, 'biodiesel emissions'
21. National biodiesel board, 'lifecycle summary'
22. United States Environmental Protection Agency, A comprehensive analysis of biodiesel impacts on exhaust emissions, draft technological report, 2002
23. Κ.Τζιά, Π.Ταύκης, Β. Ωρσιοπούλου: Επιστήμη και μηχανική τροφίμων: Συστατικά ιδιότητες –ρεολογία-микροβιολογία-ποιότητα-συσκευασία, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα 2007
24. Xin Meng, Jianmin Yang, Xin Xu, Lei Zhang, Quing juan Mo Xian: Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy* 34 (2009) 1–5
25. Ejazz M. Shahid, Younis Jamal: Production of biodiesel: A technical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15 (2011) 4732– 4745
26. Aninidita Karmakar, Subrata Karmakar, Souti Mukherjee: Properties of various plants and animal feedstocks for biodiesel production. *Bioresource Technology* 101 (2010) 7201–7210
27. Maria Jesus Ramos, Carmen Maria Fernadez, Abraham Casas, Lourdes Rodvigez, Angel Perez: Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology* 100 (2009) 261–268
28. [www.eng.wayne.edu](http://www.eng.wayne.edu)
29. Ruengwit Sawangkeaw, Kunchana Bungakiat, Somkiat Ngamprasertsith: A review of laboratory scale research on lipid conversion to biodiesel with supercritical methanol. *J. of Supercritical Fluids* 55 (2010) 1–13



30. Mirostawa Szczesna Antczakk, Anta Kubiak, Tudeuz Antczak, Stanistaw Bielecki: Enzymatic biodiesel synthesis –key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy* 34 (2009) 1185–1194
31. J.M. Marchetti, V.U. Miguel, A.F. Erazzu: Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 11 (2007) 1300–1311
32. Ozunr Kose, Melek Tuter, H.Ayşe Aksoy: Immobilized candida antartica lipase catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent free medium. *Bioresource Technology* 83 (2002) 125–129
33. Mamoru Iso, Baoxue Chen, Mashasi Eguchi, Takashi Kudo, Surekha Shrestha: Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16 (2001) 53–58
34. [www.bioxcorp.com](http://www.bioxcorp.com)
35. Manddalena Rossi, Alberto Amaretti, Stefano Raimond, Alan Leonard: Getting lipids for biodiesel production from oleaginous fungi. *Biodiesel feedstocks and processing technology*, 2011
36. H. M. Alvarez, A. Steinbuchel: Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* (2002) 60:367–376
37. Shuoboshi, Juan Octario Valle- Rodriguez, Verena Siewers, Jens Nielsen: Prospects for biodiesel production. *Biotechnol. J.* 2011, 6, 277–285
38. Teresa M. Mata, Antonio A. Martins, Nidia S. Caetano: Microalgae for biodiesel production and other applications: a review
39. A. Ahmad, N.H. Mat YAsin, C.J.C Derek, J.K. Lim: Microalgae a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15 (2011) 584–593
40. Randor Randakovits, Robert E. Jikerson, Al. Darzanis, Matthew C. Posewiti: Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic Cell* 2010, 9(4):486. DOI: 10.1128/EC.00364-09.
41. Meisam Tabatabaei, Masoud Tohidfar, Gholamreza Salehi Jouzani, Mohammadrezan Safarnejad, Mohammad Pazouki: Biodiesel production from genetically engineered

- microalgae future of bioenergy in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15 (2011) 1918–1927
42. Helena M. Amaro, A. Catarina Guedes, F. Xavier Malcata: Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy* 88 (2011) 3402–3410
43. [www.biology-online.org](http://www.biology-online.org)
44. Asha Pamar, Niraj Kumar Singh, Ashok Pandey, Edgard Gnansounou, Datta Madamwar: Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology* 102 (2011) 10163–10172
45. Xuenfeng Lu: A perspective: Photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in genetically engineered cyanobacteria. *Biotechnology Advances* 28 (2010) 742–746
46. Koffas M., Roberge C. Leek, Stephanopoulos G.: Metabolic Engineering (abstract) *Annual Review of Biomedical Engineering*, Vol. 1: 535-557 (Volume publication date August 1999)
47. Curt R. Fischer, Daniel Klein-Marcuscramer, Gregory Stephanopoulos: Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metabolic Engineering* 10 (2008) 295–304
48. Bouke de Jong, Verena Siewers, Jens Nielsen: System biology of yeast: enabling technology for development of cell factories for production of advanced biofuels. *Current Opinion in Biotechnology* 2011, 23:1–7
49. [www.nrel.gov](http://www.nrel.gov)
50. [www.biorefinery.nl](http://www.biorefinery.nl)
51. Colin Ratledge: Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for a single cell oil production. *Biochimie* 86 (2004) 807–815
52. Peter Karlson, Delef Doenecke, Jan Koolman: Βιοχημεία, Ιατρικές εκδόσεις Λιπσας 14<sup>η</sup> έκδοση
53. Matyas Kosa, Arthur J. Raraukas: Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research. *Trends in Biotechnology*, February 2011, Vol. 29, No. 2

54. Noemie Manuelle Doral Courchesne, Albert Parisien, Bei Wnag, Christopher Q. Lan : Enhancement of lipid production using biochemical genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology* 141 (2009) 31–41
55. Rainer Kalscheuer, Torsten Stolting, Alexandre Steinbuchel: Microdiesel: *Escherichia Coli* engineered for fuel production. *Microbiology* (2006), 152,2529-2536
56. Gemma Vicente, L. Fernando Bautista: Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungi. *Biochemical Engineering Journal* 48 (2009) 22–27
57. Yu-sin Jang, Jong Myoung Park: Engineering of microorganisms for the production of biofuels and perspectives based on systems metabolic engineered approaches. *Biotechnology Advances* xxx (2011) xxx–xxx
58. Synthetic solutions to the climate crisis : The danger of synthetic biology for biofuels production, FOE, 2011
59. Gorinda R. Timilsina, Ashish Shrestha: How much hope should we have for biofuels? *Energy* 36 (2011) 2055e2069
60. Glossary.el.eea.europa.eu
61. [unfccc.int/essential\\_background/glossary](http://unfccc.int/essential_background/glossary)
62. [www.ipcc.ch](http://www.ipcc.ch)
63. [www.enveng.tuc.gr](http://www.enveng.tuc.gr)
64. [http://microbegr.env.uoi.gr/files/public/page/attachments/Aggelis\\_MicrobeGR.pdf](http://microbegr.env.uoi.gr/files/public/page/attachments/Aggelis_MicrobeGR.pdf)
65. Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter: Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας τόμος I & II Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
66. [Omics.org](http://Omics.org)
67. [www.aua.gr/fasseas/biologia](http://www.aua.gr/fasseas/biologia), Ένζυμα
68. [www.aua.gr](http://www.aua.gr), Λειτουργική γενωματική
69. [Biolexicon.blogspot.com](http://Biolexicon.blogspot.com)
70. [Lipidlibrary.aocs.org](http://Lipidlibrary.aocs.org)
71. [Biology-forums.com/definitions](http://Biology-forums.com/definitions)
72. Michwel L. Shuler, Fikret Kargi «Μηχανική βιοδιεργασιών, Βασικές Έννοιες», Πανεπιστημιακές εκδόσεις Ε.Μ.Π, Αθήνα 2005

