



**Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών**  
**Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής**  
**Εργαστήριο Γεωργικών Κατασκευών**  
**ΠΜΣ Ενεργειακά Συστήματα και Ανανεώσιμες Πηγές Ενέργειας**

Διδακτορική διατριβή

**Καλλιέργεια του κυανοβακτηρίου *Arthrospira (Spirulina)*  
*platensis* υπό συνθήκες τροφοπενίας φωσφόρου για την  
ενδοκυτταρική συσσώρευση υδατανθράκων με σκοπό την  
παραγωγή βιοκαυσίμων (βιοαερίου και βιοαιθανόλης)**

Γιώργος Δ. Μάρκου

ΑΘΗΝΑ 2013

Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτριος Γεωργακάκης

Διδακτορική διατριβή

**Καλλιέργεια του κυανοβακτηρίου *Arthrospira (Spirulina) platensis* υπό συνθήκες τροφοπενίας φωσφόρου για τη συσσώρευση υδατανθράκων με σκοπό την παραγωγή βιοκαυσίμων (βιοαερίου και βιοαιθανόλης)**

Γιώργος Δ. Μάρκου

Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτριος Γεωργακάκης

Εξεταστική επιτροπή

Γεώργιος Παπαδάκης, Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

(συμβουλευτική επιτροπή)

Ιορδάνης Χατζηπαυλίδης, Επ. Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

(συμβουλευτική επιτροπή)

Χρίστος Καραβίτης, Επ. Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Κωνσταντία Λύκα, Επ. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης

Ηλίας Νεραντζής, Καθηγητής Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Αθηνών

Θεοχάρης Τσούτσος, Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Στη Σοφία

## Περίληψη

Στη διατριβή αυτή μελετήθηκε αρχικά η δυνατότητα ελέγχου της σύστασης της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis* με τη μείωση της συγκέντρωσης του παρεχόμενου φωσφόρου. Παρατήθηκε ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις φωσφόρου όταν γίνεται οριακό στοιχείο (τροφοπενία) τότε υπάρχει έντονη συσσώρευση και αύξηση της περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες από περίπου 10-20% σε 60-65%. Πειράματα για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής υδατανθράκων έδειξαν ότι αν στις καλλιέργειες παρέχεται ένα ελάχιστο ποσό φωσφόρου που να αντιστοιχεί με περίπου  $1,85 \text{ mg P g}^{-1}$  ξηρής βιομάζας τότε επιτυγχάνεται αυξημένη παραγωγή βιομάζας με ταυτόχρονα αυξημένη περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες. Η αλλαγή της σύστασης της βιομάζας σχετίζεται άμεσα με τον ενδοκυτταρικό φώσφορο. Μείωση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού φωσφόρου προκαλεί αύξηση στην περιεκτικότητα των υδατανθράκων και μείωση στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, ενώ τα λιπίδια φαίνεται να αυξάνονται μόνο όταν ο ενδοκυτταρικός φώσφορος είναι στη χαμηλότερη δυνατή συγκέντρωση. Βιομάζα με αυξημένη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή βιομεθανίου και βιοαιθανόλης. Η αυξημένη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες είχε θετική επίδραση στη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης και βελτίωσε την απόδοση σε βιομεθάνιο ( $203 \pm 10 \text{ mlCH}_4 \text{ gCOD}_{\text{infl}}^{-1}$ ) σε σχέση με το μάρτυρα ( $123 \pm 10 \text{ mlCH}_4 \text{ gCOD}_{\text{infl}}^{-1}$ ). Επίσης οι υδατάνθρακες υδρολύθηκαν με τη χρήση οξέων για την παραγωγή μονομερών σακχάρων και χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω της αναερόβιας ζύμωσης με το ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Υποστρώματα που προέκυψαν μετά την υδρόλυση με 0.5N οξέα είχαν απόδοση σε βιοαιθανόλη περίπου 16 %gEtOH ανά g ξηρής βιομάζας του *A. platensis*. Από την παρούσα διατριβή προκύπτει ότι είναι δυνατή η παραγωγή ικανοποιητικής ποσότητας βιομάζας πλούσια σε υδατάνθρακες με την καλλιέργεια υπό συνθήκες τροφοπενίας φωσφόρου για την αύξηση της παραγωγής σε βιοκαύσιμα.

## Abstract

Herein the possibility of the biomass composition manipulation of the cyanobacterium *A. platensis* using phosphorus nutrient supply variation was studied. It was observed that when phosphorus was in limited amounts a significant accumulation of carbohydrates occurred and increased from about 10-20% up to 60-65% on a dry basis. Experiments on the maximization of carbohydrate production showed that when minimum phosphorus of 1.85 mg P g<sup>-1</sup> dry biomass is provided to the cultures then the biomass production is not hindered, while the carbohydrates content is in its maximum amount. The alteration of the biomass composition was found that occurs gradually in relation to the intracellular phosphorus concentration. The decrease in intracellular phosphorus concentration results to the increase of the carbohydrates content and the decrease of the protein content, while lipid content probably increases only at the minimum intracellular phosphorus concentration. The carbohydrates-enriched biomass of *A. platensis* was consequently used as feedstock for biomethane and bioethanol production. The increased carbohydrates content improved the digestion process and resulted to an increase of the biomethane yield ( $203 \pm 10 \text{ mlCH}_4 \text{ gCOD}_{\text{infl}}^{-1}$ ) in comparison with the control ( $123 \pm 10 \text{ mlCH}_4 \text{ gCOD}_{\text{infl}}^{-1}$ ). Also the carbohydrates-enriched biomass was acid-thermal hydrolysed to release monomer sugars, in order to be used for ethanologenic fermentation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Hydrolysates with 0.5N acids resulted to a bioethanol yield of about 16 %gEtOH per g of dry biomass of *A. platensis*. This dissertation shows that biomass of *A. platensis* can be produced in adequate amounts under phosphorus limitation with an increased carbohydrates content for biofuel production improvement.

**Πίνακας περιεχομένων**

Πίνακας περιεχομένων	6
Εκτενής περίληψη	13
Γενικό μέρος	20
1 Καλλιέργεια μικροφυκών	21
1.1 Μικροφύκη	21
1.1.1 Γενικά	21
1.1.2 Χρήσεις μικροφυκών	22
1.2 Καλλιέργεια μικροφυκών	26
1.2.1 Ανοικτού τύπου καλλιέργειες	26
1.2.2 Κλειστού τύπου καλλιέργειες	28
1.3 Είδη μεταβολισμού	30
1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών	31
1.4.1 Φωτισμός	31
1.4.2 Θερμοκρασία	32
1.4.3 Θρεπτικά στοιχεία	33
1.4.4 Αλατότητα	36
1.4.5 pH	36
1.5 Συγκομιδή	37
1.6 Οικονομικότητα και αειφορία	38
2 Αναερόβια χώνευση	41
2.1 Γενικά για την αναερόβια χώνευση	41
2.2 Μικροβιακοί πληθυσμοί της αναερόβιας χώνευσης	45
2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αναερόβια χώνευση	46
2.3.1 pH και Αλκαλικότητα	46
2.3.2 Θερμοκρασία	47
2.3.3 Οργανική Φόρτιση	48
2.3.4 Χρόνος Παραμονής	49
2.3.5 Λόγος Άνθρακα προς Άζωτο (C/N)	49
2.3.6 Θρεπτικά Συστατικά	50
2.3.7 Πτητικά λιπαρά οξέα	50
2.3.8 Άλλοι παράγοντες	51
3 Αναερόβια ζύμωση	52
3.1 Γενικά για την αναερόβια ζύμωση	52

3.2	Υδρόλυση υδατανθράκων	53
3.2.1	Μέθοδοι προεπεξεργασίας	54
3.2.2	Μέθοδοι υδρόλυσης υδατανθράκων	56
3.3	Αλκοολική ζύμωση	59
3.4	Παράγοντες που επηρεάζουν την αναερόβια ζύμωση	60
3.4.1	Θερμοκρασία	61
3.4.2	Συγκέντρωση αιθανόλης	61
3.4.3	pH	62
3.4.4	Οσμωτική πίεση	62
3.4.5	Επιμολύνσεις από βακτήρια	63
	Πειραματικό μέρος	64
1	Επίδραση της έντασης του φωτός και της συγκέντρωσης του φωσφόρου στη σύσταση της βιομάζας του κυανοβακτηρίου <i>A. platensis</i>	66
	Περίληψη	66
1.1	Εισαγωγή	66
1.2	Υλικά και μέθοδοι	69
1.2.1	Μικροοργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης	69
1.2.2	Αναλυτικές μέθοδοι	70
1.2.3	Πειραματικό σχέδιο	72
1.3	Αποτελέσματα	73
1.3.1	Απομάκρυνση φωσφόρου	73
1.3.2	Παραγωγή βιομάζας	77
1.3.3	Σύσταση βιομάζας	79
1.4	Συζήτηση	82
1.4.1	Απομάκρυνση φωσφόρου	82
1.4.2	Παραγωγή βιομάζας	83
1.4.3	Σύσταση βιομάζας	84
1.5	Συμπεράσματα	87
2	Παραγωγή υδατανθράκων και αύξηση της βιοσυσσωμάτωσης της βιομάζας του κυανοβακτηρίου <i>A. platensis</i> σε καλλιέργειες με εφαρμογή της διεργασίας τροφοπενίας φωσφόρου	89
	Περίληψη	89
2.1	Εισαγωγή	89
2.2	Υλικά και μέθοδοι	91
2.2.1	Μικροοργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης	91

2.2.2	Αναλυτικές μέθοδοι	92
2.2.3	Πειραματικό σχέδιο	94
2.3	Αποτελέσματα	94
2.3.1	Ασυνεχείς καλλιέργειες	94
2.3.2	Ημι-συνεχείς καλλιέργειες	101
2.3.3	Ασυνεχείς και ημι-συνεχείς καλλιέργειες	103
2.3.4	Βιοσυσσωμάτωση βιομάζας	104
2.4	Συζήτηση	108
2.5	Συμπεράσματα	114
3	Μεταβολή της σύστασης της βιομάζας του κυανοβακτηρίου <i>A. platensis</i> με την παροχή διαφόρων συγκεντρώσεων φωσφόρου	116
	Περίληψη	116
3.2	Υλικά και μέθοδοι	117
3.2.1	Μικροοργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης	117
3.2.3	Πειραματικό σχέδιο	117
3.3	Αποτελέσματα και συζήτηση	118
3.4	Συμπεράσματα	122
4	Χρήση εμπλουτισμένης σε υδατάνθρακες βιομάζας κυανοβακτηρίων ως πρώτης ύλης για την παραγωγή βιομεθανίου μέσω της αναερόβιας χώνευσης	124
	Περίληψη	124
4.1	Εισαγωγή	124
4.2	Υλικά και μέθοδοι	126
4.2.1	Μικροοργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης	126
4.2.2	Αναλυτικές μέθοδοι	128
4.2.3	Πειραματικό σχέδιο	129
4.3	Αποτελέσματα	129
4.3.1	Απόδοση σε βιομεθάνιο	129
4.3.2	Μείωση COD και αποδόμηση των συστατικών της βιομάζας	131
4.3.3	Συγκεντρώσεις NH <sub>3</sub> -N και VFA	138
4.3.4	pH	141
4.4	Συζήτηση	142
4.4.2	Μείωση COD και αποδόμηση των συστατικών της βιομάζας	145
4.4.3	pH	148
4.5	Συμπεράσματα	149



5	Παραγωγή βιοαιθανόλης από εμπλουτισμένη σε υδατάνθρακες βιομάζα του κυανοβακτηρίου <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> υδρολυμένη με οξέα	151
	Περίληψη	151
5.1	Εισαγωγή	151
5.2	Υλικά και μέθοδοι	153
5.2.1	Μικροοργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης	153
5.2.2	Συνθήκες υδρόλυσης	153
5.2.3	Συνθήκες ζύμωσης	154
5.2.4	Αναλυτικές μέθοδοι	155
5.3	Αποτελέσματα	156
5.3.1	Υδρόλυση	156
5.3.2	Υδρόλυση στους 60 °C	156
5.3.3	Υδρόλυση στους 80 °C	157
5.3.4	Υδρόλυση στους 100 °C	158
5.3.5	Υδρόλυση στους 100 °C με μίγματα οξέων	159
5.3.6	Παραγωγή βιοαιθανόλης	164
5.4	Συζήτηση	165
5.5	Συμπεράσματα	169
6	Γενικά συμπεράσματα	171
7	Γενική συζήτηση, γενικά συμπεράσματα και προτάσεις για περαιτέρω έρευνα	174
8	Βιβλιογραφία	180

## Πίνακες

Πίνακας 1.1 Περιεκτικότητα ορισμένων μικροφυκών σε πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες.....	24
Πίνακας 1.2 Παγκόσμια παραγωγή προϊόντων από μικροφύκη.....	40
Πίνακας 2.1 Αντιδράσεις κατά τη μεθανοποίηση .....	45
Πίνακας 1.1 Πειραματικό σχέδιο.....	73
Πίνακας 1.2 Απομάκρυνση του φωσφόρου ανά μονάδα μάζας του <i>A. platensis</i> (n=6, ± S.D.).....	77
Πίνακας 1.3 Σύσταση της βιομάζας του <i>A. platensis</i> σε καλλιέργειας με διαφορετική συγκέντρωση φωσφόρου και ένταση φωτός (n=6, ± S.D.) .....	82
Πίνακας 2.1 Πειραματικό σχέδιο και σύμβολα .....	94
Πίνακας 2.2 Παραγωγή, παραγωγικότητα και σύσταση της βιομάζας του <i>A. platensis</i> σε ασυνεχείς καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	97
Πίνακας 2.3 Παραγωγή, παραγωγικότητα και σύσταση της βιομάζας του <i>A. platensis</i> σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) και ρυθμό αραίωσης 0.05, 0.1, 0.2 και 0.3 d <sup>-1</sup> .....	107
Πίνακας 4.1 Χαρακτηριστικά της βιομάζας του <i>A. platensis</i> που χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη για την αναερόβια χώνευση (± S.D., n=30). .....	128
Πίνακας 4.2 Μείωση του COD και των υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπιδίων της βιομάζας του <i>A. platensis</i> μετά τη θερμική επεξεργασία (αυτόκλειστο για 20 min). ....	132
Πίνακας 5.1 Απόδοση σε βιοαιθανόλη μετά την αναερόβια ζύμωση για 24 ώρες υδρολυμένης βιομάζας του <i>A. platensis</i> (n=9).....	160
Πίνακας 5.2 Ηλεκτρική αγωγιμότητα στο διάλυμα υδρόλυσης της βιομάζας του <i>A. platensis</i> μετά τη ρύθμιση του pH στο 4.5 με προσθήκη NaOH .....	162
Πίνακας 5.3 Απόδοση βιοαιθανόλης από βιομάζα μικροφυκών μετά από υδρόλυση των υδατανθράκων με οξέα .....	163

## Εικόνες

Εικόνα 2.1 Σχηματική παράσταση των τεσσάρων φάσεων της αναερόβιας χώνευσης ...	41
Εικόνα 3.1 Κύρια στάδια παραγωγής βιοαιθανόλης .....	52
Εικόνα 3.2 Μεταβολική οδός γλυκόλυσης της γλυκόζης και παραγωγής αιθανόλης .....	60
Εικόνα 1.1 Διακύμανση της συγκέντρωσης του φωσφόρου στις καλλιέργειες <i>A. platensis</i> σε σχέση με την ένταση του φωτός. ....	75
Εικόνα 1.2 Απομάκρυνση φωσφόρου σε σχέση με τη συγκέντρωση $K_2HPO_4$ και ένταση φωτός στις καλλιέργειες <i>A. platensis</i> .....	76
Εικόνα 1.3 Παραγωγή βιομάζας του <i>A. platensis</i> σε καλλιέργειες με διαφορετικές εντάσεις φωτός και συγκεντρώσεις φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ ).....	78
Εικόνα 1.4 Μέγιστη παραγωγή βιομάζας του <i>A. platensis</i> σε σχέση με τη συγκέντρωση του φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ ) σε τρεις διαφορετικές εντάσεις φωτός.....	79
Εικόνα 1.5 Περιεκτικότητα του <i>A. platensis</i> σε χλωροφύλλη σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ ) και εντάσεις φωτός.....	81
Εικόνα 2.1 Παραγωγή βιομάζας του <i>A. platensis</i> κατά την πάροδο του χρόνου σε ασυνεχείς καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ ).....	98
Εικόνα 2.2 Περιεκτικότητα της βιομάζας του <i>A. platensis</i> σε υδατάνθρακες α) κατά την πάροδο του χρόνου σε ασυνεχείς καλλιέργειες και β) με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ ).....	99
Εικόνα 2.3 (α) Συγκέντρωση φωσφόρου, (β) ενδοκυτταρικός φώσφορος και (γ) ρυθμός ειδικής πρόσληψης φωσφόρου σε ασυνεχείς καλλιέργειες του <i>Arthrospira platensis</i> με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ ).....	100
Εικόνα 2.4 (α) Παραγωγή υδατανθράκων και (β) παραγωγικότητα υδατανθράκων σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες <i>A. platensis</i> με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ ) και διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης.....	102
Εικόνα 2,5 (α) ενδοκυτταρικός φώσφορος και (β) ειδικός ρυθμός πρόσληψης φωσφόρου σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες <i>A. platensis</i> με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ ) και διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης. ....	103
Εικόνα 2.6 Περιεκτικότητα υδατανθράκων του <i>A. platensis</i> σε σχέση με τον ενδοκυτταρικό φώσφορο .....	104
Εικόνα 2.7 (α) κινητική βιοσυσσωμάτωση του <i>A. platensis</i> με διάφορες περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες και (β) μέγιστη βιοσυσσωμάτωση του <i>A. platensis</i> ύστερα από 60 min. ....	105
Εικόνα 2.8 Βιοσυσσωμάτωση του <i>A. platensis</i> με διαφορετικές περιεκτικότητες της βιομάζας του σε υδατάνθρακες .....	106
Εικόνα 3.1 Περιεκτικότητα της βιομάζας του <i>A. platensis</i> σε (α) υδατάνθρακες, (β) λιπίδια και (γ) πρωτεΐνες σε σχέση με τον ενδοκυτταρικό φώσφορο.....	120

Εικόνα 4.1 Παραγωγή βιομεθανίου από το <i>A. platensis</i> έχοντας τρεις διαφορετικές περιεκτικότητες της βιομάζας σε υδατάνθρακες και τρεις διαφορετικούς χρόνους παραμονής (HRT). .....	131
Εικόνα 4.2 Μείωση COD κατά την αναερόβια χώνευση βιομάζας του <i>A. platensis</i> με διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες και διαφορετικούς χρόνους παραμονής. ....	133
Εικόνα 4.3 Αποδόμηση υδατανθράκων κατά την αναερόβια χώνευση βιομάζας του <i>A. platensis</i> με διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες και διαφορετικούς χρόνους παραμονής. ....	135
Εικόνα 4.4 Αποδόμηση πρωτεϊνών κατά την αναερόβια χώνευση βιομάζας του <i>A. platensis</i> με διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες και διαφορετικούς χρόνους παραμονής. ....	136
Εικόνα 4.5 Αποδόμηση λιπιδίων κατά την αναερόβια χώνευση βιομάζας του <i>A. platensis</i> με διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες και διαφορετικούς χρόνους παραμονής. ....	137
Εικόνα 4.6 Συγκέντρωση αμμωνίας κατά την αναερόβια χώνευση βιομάζας του <i>A. platensis</i> με διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες και διαφορετικούς χρόνους παραμονής. ....	139
Εικόνα 4.7 Συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων (VFA) κατά την αναερόβια χώνευση βιομάζας του <i>A. platensis</i> με διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες και διαφορετικούς χρόνους παραμονής. ....	141
Εικόνα 4.8 Τιμές του pH στους αναερόβιους βιοαντιδραστήρες με βιομάζα του <i>A. platensis</i> με διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες και διαφορετικούς χρόνους παραμονής. ....	142
Εικόνα 5.1 Κινητικές απόδοσης σε αναγωγήμα σάκχαρα κατά την υδρόλυση του <i>A. platensis</i> στους 60 °C. ....	157
Εικόνα 5.2 Κινητικές απόδοσης σε αναγωγήμα σάκχαρα κατά την υδρόλυση του <i>A. platensis</i> στους 80 °C. ....	158
Εικόνα 5.3 Κινητικές απόδοσης σε αναγωγήμα σάκχαρα κατά την υδρόλυση του <i>A. platensis</i> στους 100 °C. ....	159
Εικόνα 5.4 Κινητικές απόδοσης σε αναγωγήμα σάκχαρα κατά την υδρόλυση του <i>A. platensis</i> με μίγματα οξέων στους 100 °C. ....	160
Εικόνα 5.5 Σχέση μεταξύ απόδοσης σε βιοαιθανόλη και ηλεκτρικής αγωγιμότητας των υποστρωμάτων ζύμωσης ( $R^2=0,936$ ). ....	165

## Εκτενής περίληψη

Η βιομάζα των μικροφυκών αυτή τη στιγμή θεωρείται μια νέα γενιά πρώτης ύλης για την παραγωγή βιοκαυσίμων και ως εκ τούτου έχει προσελκύσει έντονα το ενδιαφέρον των ερευνητών σε παγκόσμιο επίπεδο. Το κύριο ενδιαφέρον στρέφεται γύρω από την παραγωγή βιομάζας πλούσια σε λιπίδια για την παραγωγή βιοντίζελ. Παρόλα αυτά, τα μικροφύκη θα μπορούσαν να αποτελέσουν πρώτη ύλη και για την παραγωγή άλλων βιοκαυσίμων όπως βιοαιθανόλης, βιοαερίου, βιοϋδρογόνου κλπ. Η πλειονότητα των μικροφυκών όμως περιέχουν σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις σε υδατάνθρακες, οι οποίοι αποτελούν τη βασική ή την προτιμότερη πρώτη ύλη για τις περισσότερες τεχνολογίες μετατροπής της βιομάζας σε βιοενέργεια.

Είναι γνωστό ότι η σύσταση της βιομάζας των μικροφυκών μπορεί να ελεγχθεί και να αλλαχτεί με τη διαφοροποίηση ορισμένων περιβαλλοντικών και καλλιεργητικών συνθηκών, όπως για παράδειγμα οι τροφοπενίες θρεπτικών στοιχείων. Στη διατριβή αυτή μελετήθηκε αρχικά η δυνατότητα ελέγχου της σύστασης της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis* με τη μείωση της συγκέντρωσης του παρεχόμενου φωσφόρου (10, 50, 250 και 500 mg I<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) σε συνδυασμό με τη διαφοροποίηση της έντασης του φωτισμού (24, 42 και 60 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Η μέγιστη παραγωγή (συγκέντρωση) βιομάζας που παρατηρήθηκε ήταν 3592 ± 392 mg I<sup>-1</sup> στις καλλιέργειες με συγκέντρωση K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 250 mg I<sup>-1</sup> και ένταση φωτισμού 60 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> μετά από 32 μέρες καλλιέργειας. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, λιπίδια και χλωροφύλλη κυμάνθηκε από 33,59% - 60,57%, 10,68% - 26,66% και 0,78% - 2,00%, αντίστοιχα. Το πιο σημαντικό εύρημα ήταν ότι η τροφοπενία φωσφόρου (στη συγκέντρωση 10 mg I<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) προκάλεσε τη δραστική αύξηση της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες (59,64%). Επίσης η επίδραση της τροφοπενίας φωσφόρου στην περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες ήταν ανεξάρτητη της έντασης του φωτισμού.

Με βάση τα συμπεράσματα του πρώτου πειράματος πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια πείραμα για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής υδατανθράκων από καλλιέργειες του *A. platensis* με παροχή χαμηλών συγκεντρώσεων σε φώσφορο. Στο πείραμα αυτό η διακύμανση του φωσφόρου ήταν από 10 ως 50 mg I<sup>-1</sup> (ως K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) σε αντίθεση με το μάρτυρα που είχε 500 mg I<sup>-1</sup>. Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες ανήλθε στο 63,09 ± 3.43% και επιτεύχθηκε με την παροχή φωσφόρου της τάξης 1,82 ± 0.16 mg

$\text{I}^{-1}$  ανά g ξηρής βιομάζας. Εξήχθη το συμπέρασμα ότι η τιμή αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής υδατανθράκων σε καλλιέργειες του *A. platensis* των οποίων το δυναμικό παραγωγής βιομάζας είναι γνωστό. Η μέγιστη παραγωγή υδατανθράκων που επιτεύχθηκε στην παρούσα εργασία ήταν  $1147 \pm 44 \text{ mg I}^{-1}$  και  $1198 \pm 87 \text{ mg I}^{-1}$  για ασυνεχείς και ημι-συνεχείς καλλιέργειες, αντίστοιχα με παροχή φωσφόρου της τάξης  $3,58 \text{ mg P I}^{-1}$ . Η μέγιστη παραγωγικότητα σε υδατάνθρακες ανήλθε στα  $170 \pm 7 \text{ mg I}^{-1} \text{ d}^{-1}$  σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες με ρυθμό αραίωσης  $0.3 \text{ d}^{-1}$  και παροχή φωσφόρου  $1,78 \text{ mg I}^{-1}$ . Επίσης παρατηρήθηκε ότι η βιομάζα βιοσυσσωματωνόταν και καθίζανε με ρυθμούς και σε βαθμό ανάλογο με την περιεκτικότητά της σε υδατάνθρακες. Με άλλα λόγια η βιομάζα όσο πιο υψηλότερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες είχε τόσο πιο γρήγορα και σε μεγαλύτερο βαθμό βιοσυσσωματωνόταν και καθίζανε. Ο υψηλότερος βαθμός βιοσυσσωμάτωσης ήταν  $80,25 \pm 5,58\%$  μετά από 60 λεπτά ηρεμίας.

Σε μια τρίτη εργασία διερευνήθηκε η αλλαγή της σύστασης της βιομάζας του *A. platensis* κάτω από διαφορετικές συγκεντρώσεις οριακού φωσφόρου. Παρατηρήθηκε ότι η αλλαγή της σύστασης της βιομάζας γίνεται κλιμακωτά καθώς ο ενδοκυτταρικός φώσφορος μειώνεται. Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και λιπίδια αυξήθηκε από 9% σε 65% και από 4,9% σε 7,5%, αντίστοιχα ενώ η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες μειώθηκε από 46,5% σε 25% καθώς ο ενδοκυτταρικός φώσφορος μειωνόταν. Η αύξηση της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες και λιπίδια είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου άνθρακα προς άζωτο (C/N) από 4,6 στο 12,2.

Μετά τα πειράματα της παραγωγής βιομάζας πλούσιας σε υδατάνθρακες διερευνήθηκε η επίδραση της αύξησης των υδατανθράκων της βιομάζας στην απόδοση βιομεθανίου κατά την αναερόβια χώνευση. Εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές περιεκτικότητες της βιομάζας σε υδατάνθρακες (60%, 40% και 20% επί της ξηρής βιομάζας). Η γενική παρατήρηση της έρευνας ήταν ότι η αύξηση της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης σε βιομεθάνιο. Η μέγιστη απόδοση σε βιομεθάνιο ήταν  $203 \pm 10 \text{ mlCH}_4 \text{ gCOD}_{\text{infl}}^{-1}$  και παρατηρήθηκε στους βιοαντιδραστήρες με βιομάζα που περιείχε 60% υδατάνθρακες ενώ ο μάρτυρας (20% υδατάνθρακες) είχε απόδοση  $123 \pm 10 \text{ mlCH}_4 \text{ gCOD}_{\text{infl}}^{-1}$ . Αυτή η γενική τάση παρατηρήθηκε και στους τρεις χρόνους παραμονής που εξετάστηκαν (15, 20 και 30

μέρες) αλλά και μετά τη θερμική επεξεργασία της βιομάζας. Η συγκέντρωση της αμμωνίας μειώθηκε καθώς η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες αυξήθηκαν. Συμπερασματικά η εργασία αυτή έδειξε ότι η αύξηση της περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες αύξησε την απόδοση σε βιοκαύσιμο.

Σε μια δεύτερη εφαρμογή της πλούσιας σε υδατάνθρακες βιομάζας του *A. platensis* διερευνήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης των υδατανθράκων και η παραγωγή βιοαιθανόλης με τη χρήση προ-καλλιεργημένου ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Για την υδρόλυση χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά οξέα ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$  και  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις (2,5N, 1N, 0,5N και 0,25N) και τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες αντίδρασης (40 °C, 60 °C, 80 °C και 100 °C). Η γενική τάση της υδρόλυσης ήταν ότι ο ρυθμός της αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξέος και της θερμοκρασίας. Η απόδοση όμως σε αναγώγιμα σάκχαρα δεν ακολούθησε την ίδια τάση. Αύξηση της συγκέντρωσης των οξέων σε συνδυασμό με αύξηση της θερμοκρασίας μείωσε την απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα. Η μέγιστη απόδοση σε βιοαιθανόλη ήταν  $16,32 \pm 0,90$  %  $\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{g}$  ξηρής βιομάζας και  $16,27 \pm 0,97$  %  $\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{g}$  σε υποστρώματα που προέκυψαν από την υδρόλυση με 0,5N  $\text{HNO}_3$  και 0,5N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , αντίστοιχα. Αυτή η απόδοση σε βιοαιθανόλη αντιστοιχεί στο 53% περίπου της θεωρητικής απόδοσης σε βιοαιθανόλη.

Το γενικό συμπέρασμα από την παρούσα διατριβή είναι ότι το κυανοβακτήριο *A. platensis* θα μπορούσε να καλλιεργηθεί υπό συνθήκες τροφοπενίας φωσφόρου με παροχή της ελάχιστης απαιτούμενης ποσότητας φωσφόρου για τη μέγιστη παραγωγή υδατανθράκων. Η παραγωγή βιομάζας πλούσιας σε υδατάνθρακες βελτιώνει την απόδοση στα βιοκαύσιμα που διερευνήθηκαν.

## Σκοπός της εργασίας

Τα μικροφύκη θεωρείται ότι αποτελούν νέα γενιά βιομάζας για την παραγωγή βιοκαυσίμων και ως εκ τούτου υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον πάνω στο θέμα αυτό. Παρόλα αυτά, η έρευνα έχει επικεντρωθεί κυρίως στην παραγωγή μικροφυκών για τη συσσώρευση λιπιδίων τα οποία αποτελούν την πρώτη ύλη για την παρασκευή βιοντίζελ (Brennan and Owende, 2013; Hu et al., 2008). Λίγη ή και καθόλου έρευνα έχει γίνει μέχρι στιγμής για την συσσώρευση υδατανθράκων στη βιομάζα των μικροφυκών οι οποίοι αποτελούν πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων άλλων πέρα από βιοντίζελ. Είναι γνωστό ότι κάτω από διάφορες συνθήκες καταπόνησης, όπως τροφοπενία, τα μικροφύκη συσσωρεύουν είτε λιπίδια είτε υδατάνθρακες (Markou et al., 2012a). Παρόλα αυτά η συσσώρευση υδατανθράκων δεν είχε συνδεθεί ποτέ με την παραγωγή βιοκαυσίμων, όπως βιοαιθανόλη ή βιομεθάνιο (Markou and Georgakakis, 2011).

Γενικός σκοπός αυτής της διατριβής ήταν να διερευνηθεί κατά πόσο η μείωση του παρεχόμενου φωσφόρου είχε κάποια επίδραση στην αλλαγή της σύστασης της βιομάζας του *A. platensis*, και ειδικότερα αν θα προκαλούσε τη συσσώρευση υδατανθράκων έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοκαυσίμων όπως βιομεθανίου κα βιοαιθανόλης. Από τη στιγμή που αποδείχτηκε ότι η τροφοπενία φωσφόρου προκαλεί σημαντική συσσώρευση υδατανθράκων, ο επόμενος σκοπός της διατριβής ήταν η βελτιστοποίηση της παραγωγής βιομάζας πλούσιας σε υδατάνθρακες, κάνοντας την υπόθεση ότι με την παροχή μιας ελάχιστης απαιτούμενης ποσότητας φωσφόρου θα επιτρέπεται η παραγωγή βιομάζας αλλά ταυτόχρονα θα προκαλείται και η απαραίτητη καταπόνηση έτσι ώστε ο μικροοργανισμός να ωθείται να συσσωρεύει υδατάνθρακες. Η παραχθείσα πλούσια σε υδατάνθρακες βιομάζα παρουσίασε αυξημένο λόγο άνθρακα προς άζωτο (C/N) από 4 περίπου στους μάρτυρες στο 12 περίπου. Αυτή η αύξηση του λόγου C/N θεωρήθηκε ότι θα έχει θετικά αποτελέσματα στην διεργασία της αναερόβιας χώνευσης για την παραγωγή βιομεθανίου. Επίσης η παραχθείσα πλούσια σε υδατάνθρακες βιομάζα θεωρήθηκε ότι θα υδρολυόταν με τη χρήση μόνο οξέων και κάτω από χαμηλές θερμοκρασίες αντίδρασης για την απολαβή ζυμώσιμων σακχάρων για την παραγωγή βιοαιθανόλης.

Συνοπτικά οι υποθέσεις της διατριβής ήταν:



1) Η μείωση της παροχής φωσφόρου στις καλλιέργειες του κυανοβακτηρίου *A. platensis* θα είχε επίδραση στη σύσταση της βιομάζας του.

2) Είναι δυνατή η βελτιστοποίηση της παραγωγής βιομάζας πλούσιας σε υδατάνθρακες αρκεί να παρέχεται στις καλλιέργειες μια ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα φωσφόρου που θα επιτρέπει αφενός την παραγωγή βιομάζας σε μεγάλες ποσότητες και αφετέρου θα προκαλείται η απαραίτητη καταπόνηση έτσι ώστε ο μικροοργανισμός να ωθείται να συσσωρεύει υδατάνθρακες.

3) Η αύξηση του λόγου C/N της βιομάζας θα είχε θετική επίδραση στη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης και ως εκ τούτου θα βελτιωνόταν η απόδοση του συστήματος σε βιομεθάνιο.

4) Η υδρόλυση των συσσωρευμένων υδατανθράκων του *A. platensis* θα μπορούσε να επιτευχθεί μόνο με τη χρήση οξέων κάτω από χαμηλές θερμοκρασίες χωρίς τη χρήση ενζύμων. Επίσης η υδρόλυση των υδατανθράκων θα παρήγαγε ζυμώσιμα σάκχαρα και ως εκ τούτου θα ήταν δυνατή η παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω της αναερόβιας ζύμωσης.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελείται από 2 κύρια μέρη: το γενικό και το πειραματικό. Το γενικό μέρος αποτελεί μια προσπάθεια να παρουσιαστούν τα γενικότερα και κυριότερα θέματα γύρω από την καλλιέργεια των μικροφυκών και των βιολογικών τεχνολογιών παραγωγής βιοκαυσίμων, της αναερόβιας χώνευσης και της αναερόβιας ζύμωσης.

Το πειραματικό μέρος αποτελείται από δύο κύρια μέρη. Το πρώτο αφορά στην καλλιέργεια του κυανοβακτηρίου για την παραγωγή βιομάζας και το δεύτερο στη χρήση της βιομάζας για την παραγωγή βιοκαυσίμων (βιοαερίου και βιοαιθανόλης). Το πειραματικό μέρος βασίζεται σε πέντε πειραματικές εργασίες που είτε έχουν δημοσιευθεί, είτε έχουν υποβληθεί για δημοσίευση σε διεθνείς επιστημονικές επιθεωρήσεις. Οι εργασίες αυτές θα παρουσιαστούν με τη χρονική σειρά πραγματοποίησής τους κρατώντας στην πλειονότητα των σημείων την αυτονομία και την αυτοτέλεια των κειμένων τους. Επιλέχτηκε αυτός ο τρόπος παρουσίασης γιατί θεωρήθηκε ότι, από τη στιγμή που η κάθε εργασία αποτελεί τη «φυσική» συνέχεια της προηγούμενης, η παρουσίασή τους ως αυτοτελή μέρη θα διευκολύνει τον αναγνώστη ώστε να μπορέσει να

παρακολουθήσει την όλη εξέλιξη της διατριβής. Στο τέλος της διατριβής παρατίθεται ένα κεφάλαιο στο οποίο γίνεται μια γενική συζήτηση με τη βιβλιογραφία. Στο κεφάλαιο αυτό τα αυτοτελή μέρη των εργασιών ενώνονται σε ένα αδιαίρετο όλο που αποτελεί το κεντρικό θέμα της διατριβής που δεν είναι άλλο παρά μόνο η παραγωγή βιομάζας πλούσιας σε υδατάνθρακες για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Για να αποφευχθούν πολλές επαναλήψεις, όπου χρειάζεται θα γίνεται παραπομπή στην προηγούμενη εργασία. Κάποια επιλεγμένα κομμάτια των εργασιών όπως έχουν δημοσιευθεί ή υποβληθεί για δημοσίευση παρουσιάζονται στη διατριβή αυτή αναλυτικότερα.

Η διδακτορική διατριβή βασίστηκε στις παρακάτω εργασίες:

**1) Επίδραση της έντασης του φωτός και της συγκέντρωσης του φωσφόρου στη σύσταση της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis*.**

Η εργασία αυτή έχει δημοσιευθεί ως:

Markou, G., Chatzipavlidis, I., Georgakakis, D. 2012. Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28(8), 2661-2670.

**2) Παραγωγή υδατανθράκων και αύξηση της βιοσυσσωμάτωσης της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis* σε καλλιέργειες με εφαρμογή της διεργασίας τροφοπενίας φωσφόρου.**

Η εργασία αυτή έχει δημοσιευθεί ως:

Markou, G., Chatzipavlidis, I., Georgakakis, D. 2012. Carbohydrates production and bio-flocculation characteristics in cultures of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Improvements through phosphorus limitation process. *BioEnergy Research*, 5(4), 915-925.

**3) Μεταβολή της σύστασης της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis* με την παροχή διαφόρων συγκεντρώσεων φωσφόρου.**

Η εργασία αυτή έχει δημοσιευθεί ως:

Markou, G. 2012. Alteration of the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under various amounts of limited phosphorus. *Bioresour. Technol.*, 116, 533–535

4) Χρήση εμπλουτισμένης σε υδατάνθρακες βιομάζας κυανοβακτηρίων ως πρώτης ύλης για την παραγωγή βιομεθανίου μέσω της αναερόβιας χώνευσης.

Η εργασία αυτή έχει δημοσιευθεί ως:

Markou, G., Angelidaki I., Georgakakis D. 2013. Carbohydrate-enriched cyanobacterial biomass as feedstock for bio-methane production through anaerobic digestion, *Fuel*, 111: 872–879

5) Παραγωγή βιοαιθανόλης από εμπλουτισμένη σε υδατάνθρακες βιομάζα του κυανοβακτηρίου *Arthrospira (Spirulina) platensis*.

Η εργασία αυτή έχει δημοσιευθεί ως:

Markou, G., Angelidaki I., Nerantzis, E., Georgakakis D. 2013. Bioethanol production by carbohydrate-enriched *Arthrospira (Spirulina) platensis*". *Energies*, 6: 3937-3950

## **Γενικό μέρος**

---

## 1 Καλλιέργεια μικροφυκών

### 1.1 Μικροφύκη

#### 1.1.1 Γενικά

Τα φύκη (ελληνική ρίζα φύκος, λατινική ρίζα alga) είναι μια πολυφυλετική κατηγορία μονοκύτταρων ή πολυκύτταρων οργανισμών με σχήματα και μεγέθη που ποικίλουν σημαντικά. Ο όρος «φύκη» περιλαμβάνει δύο μεγάλες κύριες μορφολογικές κατηγορίες: τα μακροφύκη (macroalgae, συνήθως θαλάσσια είδη, seaweeds) και τα μικροφύκη (microalgae). Το κριτήριο της διάκρισης μεταξύ των δύο αυτών κατηγοριών είναι μόνο το μέγεθος. Τα μακροφύκη έχουν μήκος μερικών εκατοστών, το οποίο σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φτάσει και τα μερικά μέτρα. Τουναντίον, τα μικροφύκη έχουν μήκος μερικών μικρομέτρων (0,2-20  $\mu\text{m}$ ) μέχρι 100-200  $\mu\text{m}$  στις περιπτώσεις των νηματωδών πολυκύτταρων σχηματισμών όπως το κυανοβακτήριο *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. Στην τρέχουσα ταξινόμησή τους στον όρο «φύκη» συμπεριλαμβάνονται μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι  $\text{O}_2$ -γόνοι φωτοσυνθέτοντες ευκαρυωτικοί οργανισμοί, εξαιρουμένων όμως των ανώτερων φυτών (Barsanti and Gualtieri, 2006). Τα κυανοβακτήρια, στα οποία ανήκει και η *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*, παρόλο που είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί, σε αρκετές περιπτώσεις θεωρούνται ότι ανήκουν στα μικροφύκη επειδή είναι  $\text{O}_2$ -γόνοι φωτοσυνθέτοντες οργανισμοί (Brodie and Lewis, 2007). Στην παρούσα μελέτη τα κυανοβακτήρια θα θεωρούνται ότι ανήκουν στα μικροφύκη και σε όσα σημεία θα χρειαστεί να γίνει διαχωρισμός θα γίνεται με βάση τον όρο προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά μικροφύκη. Η βιολογία, η φυσιολογία και η οικολογία των μικροφυκών διαφέρουν ανάλογα με το είδος του μικροφύκου. Οι βασικότερες ομάδες μικροφυκών είναι τα χλωροφύκη (Chlorophyceae), ροδοφύκη (Rhodophyceae), διάτομα (Bacillariophyceae), φαιοφύκη (Phaeophyceae) και τα κυανοβακτήρια (Cyanobacteria – blue-green algae) (Barsanti and Gualtieri, 2006; Darley, 1982; Metting, 1996; Waterbury, 2006).

## 1.1.2 Χρήσεις μικροφυκών

### 1.1.2.1 Παραγωγή διαφόρων προϊόντων

Τα φύκη καλλιεργούνται σε παγκόσμιο επίπεδο για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων, κατά το πλείστον υψηλής αξίας και αφορούν προϊόντα για τροφή, φαρμακευτική, κοσμετολογία και γενικά βιομηχανική χρήση. Αρκετά είδη χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφής και συμπληρωμάτων διατροφής, όπως για παράδειγμα η παραγωγή πρωτεΐνης, λιπαρών οξέων (εικοσαπεντανοϊκού οξέος, δοκοσαεξαενοϊκού οξέως, γ-λινολενικού οξέος κλπ), βιταμινών, ανόργανων στοιχείων κλπ. Η παραγωγή αυτών των προϊόντων έχουν εφαρμογή στην ανθρώπινη διατροφή, στη διατροφή ζώων, ψαριών κλπ. Πολλοί από τους μεταβολίτες των φυκών έχουν φαρμακευτική αξία, είτε επειδή είναι αντιοξειδωτικά, είτε επειδή ενισχύουν το ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων, είτε επειδή έχουν ιστατική δράση. Τα κυριότερα είδη που καλλιεργούνται είναι το φύκος *Chlorella*, το *Dunaliella* και το *Arthrospira* (Brennan and Owende, 2010; Harun et al., 2010b; Pulz and Gross, 2004).

Τα φύκη επίσης καλλιεργούνται για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων για γενική βιομηχανική χρήση. Τα σημαντικότερα προϊόντα είναι διάφορα πολυμερή όπως άγαρ, αλγινικά άλατα, कारागेनάνες κλπ, χρωστικές ουσίες όπως η χλωροφύλλη, φυκοκυανίνη, ξανθοφύλλες, καροτενοειδή κλπ. Επίσης μια σημαντική εφαρμογή των φυκών είναι η παραγωγή λιπασμάτων και εδαφοβελτιωτικών προϊόντων. Η χρήση φυκών ως εδαφοβελτιωτικού παράγοντα είναι μια πρακτική που εφαρμοζόταν σε παλαιότερες εποχές. Η εδαφοβελτιωτική δράση των φυκών οφείλεται στην ικανότητα της βιομάζας τους να κατακρατούν μεγάλες ποσότητες νερού και να βελτιώνουν τα δομικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά του εδάφους. Επίσης τα φύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα αργής αποδέσμευσης (slow release) και ειδικά τα αζωτοδεσμευτικά (nitrogen-fixing) είδη όπως τα *Anabaena* και *Nostoc*, τα οποία δεσμεύουν το άζωτο από την ατμόσφαιρα και τη μετατρέπουν σε οργανική μορφή εντός της βιομάζας τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή λιπασμάτων με σαφώς πιο ήπιες περιβαλλοντικές επιπτώσεις σε σχέση με την τυπική διαδικασία παραγωγής αζωτούχων λιπασμάτων μέσω της διεργασίας Haber-Bosch (Grewe and Pulz, 2012; Metting, 1996; Pulz and Gross, 2004; Pulz et al., 2008; Razon, 2012; Spolaore et al., 2006).

### 1.1.2.2 Παραγωγή βιοκαυσίμων

Προσφάτως, τα μικροφύκη έχουν προσελκύσει πολύ έντονα το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών για την παραγωγή βιοενέργειας ως μια από τις απαντήσεις στα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκύπτουν από την αυξανόμενη χρήση ορυκτών καυσίμων για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών και από τη συσσώρευση CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα. Η παραγωγή βιομάζας μικροφυκών και κατ' επέκταση βιοενέργειας έχει όλα εκείνα τα πλεονεκτήματα της χρήσης ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Το πιο σημαντικό ίσως πλεονέκτημα της παραγωγής βιομάζας μικροφυκών είναι ότι το CO<sub>2</sub> μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας από την πηγή έκλυσής του παροχετεύοντάς το κατευθείαν στο υγρό υπόστρωμα ανάπτυξής τους (Ferreira et al., 2012; Rosa et al., 2011). Κατά αυτόν τον τρόπο το CO<sub>2</sub> επαναχρησιμοποιείται από τα μικροφύκη τα οποία το μετατρέπουν πάλι σε οργανική ύλη (βιομάζα) μέσω της φωτοσύνθεσης δημιουργώντας έναν κλειστό κύκλο στις μεταμορφώσεις του άνθρακα. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της καλλιέργειας μικροφυκών για παραγωγή ενέργειας είναι τα εξής: 1) είναι αποδοτικά βιολογικά συστήματα για την αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας, έχοντας μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τα επίγεια φυτά 2) είναι απλοί οργανισμοί χωρίς πολύπλοκα αναπαραγωγικά όργανα, 3) είναι μικροοργανισμοί που ακολουθούν έναν απλό κύκλο κυτταρικής διαίρεσης, 4) η καλλιέργειά τους μπορεί να γίνει σε αλμυρό ή υφάλμυρο νερό, 5) η καλλιέργειά τους μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας ως λιπάσματα απόβλητα και απόβλητα από διάφορους παραγωγικούς τομείς, 6) η στρεμματική απόδοση σε βιομάζα είναι μεγαλύτερη σε σχέση με εκείνη των επίγειων φυτών και η παραγωγή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μη καλλιεργήσιμες εκτάσεις. Παρόλα αυτά, η καλλιέργεια μικροφυκών παρουσιάζει και κάποια μειονεκτήματα, με τα βασικότερα να είναι το μεγάλο κόστος εγκατάστασης καλλιεργητικών μονάδων και το μεγάλο κόστος λειτουργίας και κατ' επέκταση το αυξημένο κόστος παραγωγής βιομάζας (Amin, 2009; Brennan and Owende, 2010; Chisti, 2007; Singh et al., 2011b).

Τα μικροφύκη, όπως προαναφέρθηκε, είναι μια πολυπληθής κατηγορία και μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί μερικές χιλιάδες είδη. Εικάζεται ότι το πλήθος των μικροφυκών είναι μεταξύ 200.000 ως και μερικά εκατομμύρια (Pulz and Gross, 2004).

Για την παραγωγή βιοενέργειας από μικροφύκη, το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί σχεδόν αποκλειστικά σε εκείνα μόνο τα είδη που η βιομάζα τους περιέχουν αυξημένη ποσότητα σε λιπίδια. Τα λιπίδια ενδιαφέρουν γιατί αποτελούν την πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ μετά τη μετεστεροποίησή τους σε μεθυλεστέρες (Chisti, 2007). Τα μικροφύκη, πέρα από τα λιπίδια, περιέχουν επίσης μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών και λιγότερο υδατανθράκων (Πίνακας 1), (Becker, 1994). Τα μικροφύκη αποτελούν πρώτη ύλη για την παραγωγή ενέργειας ή βιοκαυσίμων μέσω διαφόρων ενεργειακών τεχνολογιών μετατροπής της βιομάζας σε ενέργεια, όπως για παράδειγμα μέσω της αναερόβιας χώνευσης για την παραγωγή βιοαερίου, πυρολυτικών ελαίων μέσω της πυρόλυσης, αερίων σύνθεσης μέσω της αεριοποίησης, βιοαιθανόλης μέσω της αναερόβιας ζύμωσης και διαφόρων άλλων βιοκαυσίμων (Demirbas, 2010; Harun et al., 2010a; Kruse and Hankamer, 2010; Lam and Lee, 2012).

**Πίνακας 1.1 Περιεκτικότητα ορισμένων μικροφυκών σε πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες.**

Είδος	Πρωτεΐνες (%)	Λιπίδια (%)	Υδατάνθρακες (%)
<i>Euglena gracilis</i>	39–61	14–20	14–18
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	21	17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	26
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58	14–22	12–17
<i>Dunaliella salina</i>	57	6	32
<i>Arthrospira (Spirulina) maxima</i>	60–71	6–7	13–16
<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>	46–63	4–9	8–14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56	12–14	10–17

### 1.1.2.3 Διαχείριση αποβλήτων και απόνερων

Ήδη από τη δεκαετία του 1960 είχε προταθεί η καλλιέργεια μικροφυκών σε απόβλητα και απόνερα του βιομηχανικού, αστικού, γεωργο-κτηνοτροφικού και του τομέα της βιομηχανίας τροφίμων (Oswald, 2003). Η καλλιέργεια φυκών στα απόβλητα έχει ένα διττό σκοπό: από τη μία να παραχθεί χρήσιμη βιομάζα (η οποία να μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατάλληλα πχ ως εδαφοβελτιωτικό ή για βιοενέργεια) και από την άλλη να επιτευχθεί απορρύπανση των αποβλήτων και των απόνερων με τη μείωση της



συγκέντρωσης των οργανικών και ανόργανων ρύπων (κατά κύριο λόγο νιτρικά/αμμωνιακά και φωσφορικά στοιχεία). Η απορρύπανση των αποβλήτων είναι στην ουσία μια ανάκτηση των θρεπτικών στοιχείων που περιέχονται στα απόβλητα και με αυτό τον τρόπο μειώνεται η επίδρασή τους στα φαινόμενα του ευτροφισμού, της ρύπανσης υπόγειων νερών κλπ. Στον τομέα της παραγωγής βιοενέργειας η καλλιέργεια των μικροφυκών χρησιμοποιώντας απόβλητα και απόνερα κερδίζει όλα και πιο πολύ έδαφος γιατί βελτιώνει την οικονομικότητα του εγχειρήματος (δες παρακάτω) (Pittman et al., 2011).

Τα μικροφύκη για να μπορέσουν να αναπτυχθούν θα πρέπει να προσλάβουν με τον ένα ή άλλο τρόπο κάποια βασικά ανόργανα στοιχεία (C, N, P, K, S κλπ). Ειδικά ορισμένα μικροφύκη που περιέχουν υψηλές ποσότητες πρωτεϊνών, η καλλιέργειά τους προϋποθέτει την εφαρμογή σημαντικών ποσοτήτων ανόργανων αζωτούχων λιπασμάτων. Από τη σκοπιά της περιβαλλοντικής προστασίας, αλλά και της οικονομικότητας, η χρήση συνθετικών αζωτούχων (αλλά και φωσφορικών) λιπασμάτων δεν αποτελούν λύση αειφορίας. Για την κάλυψη των αναγκών των καλλιεργειών σε θρεπτικά στοιχεία αλλά και για την αποφυγή χρήσης συνθετικών λιπασμάτων, η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να γίνει σε υποστρώματα τα οποία περιέχουν απόβλητα. Ειδικά τα απόβλητα του κτηνοτροφικού τομέα, που έχουν αυξημένες συγκέντρωση αζώτου, προσιδιάζουν για τη χρήση τους για την καλλιέργεια μικροφυκών (Abeliovich, 2007; Markou and Georgakakis, 2011; Posten and Schaub, 2009; Rawat et al., 2011). Ορισμένα απόβλητα του γεωργο-κτηνοτροφικού τομέα που έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την καλλιέργεια μικροφυκών είναι του χοιροστασίου (Cañizares and Domínguez, 1993), βουστασίου (Lincoln et al., 1996), πτηνοτροφικά απόβλητα (Mahadevaswamy and Venkataraman, 1986), ελαιοτριβείου (Hodaifa et al., 2008) και τυροκομείου (Blieer et al., 1995). Η χρήση των αποβλήτων για καλλιέργεια μικροφυκών γίνεται είτε σε πρωτογενές (αδιαχειρίιστα απόβλητα) είτε σε τριτογενές στάδιο. Το τριτογενές στάδιο αναφέρεται στη χρήση αποβλήτων που έχουν υποστεί ήδη διαχείριση είτε με αερόβια σταθεροποίησή τους είτε με αναερόβια χώνευσή τους (Cañizares et al., 1994; de la Nouë and Bassères, 1989; Martin et al., 1985).

Η παραγωγή βιομάζας με τη χρήση αποβλήτων κυμαίνεται έντονα ανάλογα με το είδος του μικροφύκου και το είδος του αποβλήτου. Σε πειραματικές έρευνες έχει

αναφερθεί παραγωγή από  $5 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (ξηρή ουσία) (Mulbry and Wilkie, 2001) μέχρι και  $70 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (ξηρή ουσία) (Lincoln et al., 1996). Η μείωση των ανόργανων ρυπαντών (N και P) στα απόβλητα μετά τη διαχείρισή τους με μικροφύκη μπορεί να ανέλθει στο 70-90% (Mulbry et al., 2008) και η μείωση των οργανικών ρυπαντών μέχρι και 70% (COD) (González et al., 2008).

Αρκετά είδη μικροφυκών έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται μιξοτροφικά, που σημαίνει ότι μπορούν να αξιοποιήσουν οργανικές ουσίες ως πηγή ενέργειας ή/και άνθρακα (δες παρακάτω). Η μιξοτροφική ανάπτυξη έχει το πλεονέκτημα ότι είναι πιο ταχεία από την αυτοτροφική ή την ετεροτροφική. Αυτό το γεγονός είναι σημαντικό γιατί σε απόβλητα με οργανικό φορτίο η ανάπτυξη τέτοιων ειδών μπορεί να είναι πιο ταχεία αυξάνοντας την παραγωγικότητα σε βιομάζα (Abreu et al., 2012; Chojnacka and Zielińska, 2011; Heredia-Arroyo et al., 2011) και ταυτοχρόνως μειώνοντας η εξουδετερώνοντας την ανάγκη χρήσης ανόργανου άνθρακα (Markou et al., 2012c).

## 1.2 Καλλιέργεια μικροφυκών

Η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ανοικτούς ή κλειστούς τύπους καλλιέργειών. Στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες, τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε τεχνητούς ή φυσικούς περιέκτες, όπως δεξαμενές, νερόλακκοι, λίμνες κλπ. Στις κλειστού τύπου καλλιέργειες η καλλιέργεια γίνεται εντός διαφόρων σχημάτων κλειστών περιεκτών που ονομάζονται φωτοβιοαντιδραστήρες (photobioreactors). Οι φωτοβιοαντιδραστήρες αποτρέπουν την άμεση επαφή της καλλιέργειας με τις εξωτερικές συνθήκες και έτσι την προστατεύουν από τους διάφορους περιβαλλοντικούς κινδύνους (Pulz, 2001; Richmond, 1992).

### 1.2.1 Ανοικτού τύπου καλλιέργειες

Οι ανοικτού τύπου καλλιέργειες έχουν το πλεονέκτημα ότι έχουν σχετικά μικρότερο κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας από τις κλειστού τύπου καλλιέργειες και έχουν σχετικά καλή δυνατότητα μαζικής καλλιέργειας μικροφυκών (Jorquera et al., 2010). Στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες όμως τα μικροφύκη είναι εκτεθειμένα στους περιβαλλοντικούς παράγοντες και συνήθως επιμολύνονται από διάφορα άλλα είδη

μικροφυκών ή βακτηρίων ή άλλων μικροοργανισμών. Οι επιμολύνσεις με άλλους μικροοργανισμούς αλλοιώνει τη σύσταση των καλλιεργειών και δυσχεραίνει την εφαρμογή της μονο-καλλιέργειας. Έντονες επιμολύνσεις μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα τη μικρή παραγωγή ή και σε ορισμένες περιπτώσεις την κατάρρευση της καλλιέργειας είτε λόγω της επικράτησης άλλων μικροοργανισμών είτε λόγω της εμφάνισης παρασιτικών ασθενειών (Day et al., 2011). Οι ανοικτού τύπου καλλιέργειες πάσχουν επιπλέον λόγω της εξάτμισης νερού που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικών ποσοτήτων νερού και την αύξηση της συγκέντρωσης αλάτων που από ένα επίπεδο και πάνω επιδρούν ανασταλτικά στην αύξηση των μικροφυκών. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ανάγκη αναπλήρωσης νερού άρα και χρήση μεγάλων ποσοτήτων του. Παρόλα αυτά το νερό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί θα μπορεί να είναι υφάλμυρο ή αλμυρό, ανάλογα με το είδος του μικροφύκου που καλλιεργείται και την ανεκτικότητα του στην παρουσία αλάτων (Bilanovic et al., 2009) αντλώντας και χρησιμοποιώντας έτσι μη πόσιμο ή/και μη αρδεύσιμο νερό από διάφορες πηγές.

Επίσης η παραγωγή ανά μονάδα επιφάνειας είναι μικρότερη σε σχέση με τις κλειστού τύπου καλλιέργειες με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της βιομάζας να είναι σχετικά μικρή ανεβάζοντας πολύ το κόστος συγκομιδής (Norsker et al., 2011). Επίσης σε ορισμένες τοποθεσίες, οι περίοδοι καλλιέργειας είναι περιορισμένες, λόγω έντονων εποχιακών περιβαλλοντικών διακυμάνσεων ή χαμηλών θερμοκρασιών και ηλιοφάνειας. Για το λόγο αυτό χώρες με μεγάλη διάρκεια και ένταση ηλιοφάνειας, όπως η Ελλάδα, έχουν πλεονέκτημα για την εγκατάσταση καλλιέργειας μικροφυκών, δεδομένου ότι η παραγωγή σε βιομάζα μπορεί να είναι ως και δέκα φορές μεγαλύτερη σε σχέση με περιοχές με μικρή διάρκεια και ένταση ηλιοφάνεια (Brányiková et al., 2011).

Σε γενικές γραμμές τα κυριότερα μειονεκτήματα των ανοικτών καλλιεργειών είναι: 1) απώλειες λόγω εξάτμισης, 2) θερμοκρασιακές μεταβολές, 3) μικρή αποτελεσματικότητα στην αξιοποίηση του CO<sub>2</sub>, 4) αναποτελεσματική ανάδευση του υποστρώματος και 5) μικρή αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας (Brennan and Owende, 2010).

Τα προβλήματα των ανοικτών καλλιεργειών μπορούν να αντιμετωπιστούν με τη χρήση κατάλληλων συνθηκών για το είδος του μικροφύκου. Αποτελεσματικές συνθήκες είναι συνήθως οι ακραίες και εξειδικευμένες συνθήκες όπου μόνο το επιλεχθέν

μικροφύκος μπορεί να αναπτυχθεί, ενώ είναι ακατάλληλες για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Παραδείγματα ειδών που καλλιεργούνται σε ακραίες συνθήκες είναι η *Dunaliella salina* που καλλιεργείται σε αλμυρά νερά (>20% άλας) ή η *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* που καλλιεργείται σε αλκαλικά περιβάλλοντα (> pH 9,2). Επίσης για μια αποτελεσματική καλλιέργεια μπορεί να χρησιμοποιηθούν είδη μικροφυκών με σχετικά υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης όπως τα μικροφύκη των γενών *Chlorella*, *Scenedesmus* και *Phaeodactylum* (Borowitzka, 1999; Brennan and Owende, 2010; Chen, 1996; Ugwu et al., 2008).

Το σύστημα ανάδευσης των ανοικτών καλλιεργειών είναι μεγάλης σημασίας και στην ουσία αντικατοπτρίζει την εξέλιξη των διαφόρων τύπων δεξαμενών. Η ανάδευση είναι αναγκαία γιατί εμποδίζει τη συσσωμάτωση και καθίζηση των μικροφυκών, αυξάνει την αξιοποίηση του φωτός, ομογενοποιεί το υπόστρωμα καθιστώντας τα διαλυτά ανόργανα ή/και οργανικά στοιχεία πιο προσπελάσιμα για την πρόσληψή τους από τα μικροφύκη (Chaumont, 1993). Ο κυριότερος τύπος ανοικτών τεχνητών δεξαμενών είναι η επιμήκης λεκάνη (raceway) και η κυκλική λεκάνη. Οι αγωγοί (διάδρομοι) της επιμήκης λεκάνης μπορεί να έχουν διάφορα σχήματα (απλοί, οφειοειδής, με παράλληλους αγωγούς κλπ) και η ανάδευσή τους γίνεται συνήθως με πτερυγωτό τροχό (paddle wheel), ενώ η κυκλική λεκάνη αναδεύεται με κινούμενο βραχίονα (Richmond, 1992).

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

### **1.2.2 Κλειστού τύπου καλλιέργειες**

Στις καλλιέργειες κλειστού τύπου, οι συνθήκες είναι περισσότερο ή λιγότερο ελεγχόμενες, αναλόγως αν πρόκειται για καλλιέργειες στεγασμένες ή υπαίθριες. Στις υπαίθριες καλλιέργειες οι συνθήκες δεν ελέγχονται πλήρως (ηλιακή ένταση και

θερμοκρασία). Αντίθετα στις στεγασμένες καλλιέργειες οι συνθήκες με τον ένα ή άλλο τρόπο είναι πιο ελεγχόμενες. Οι κλειστού τύπου καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε κλειστούς περιέκτες, τους φωτοβιοαντιδραστήρες (photobioreactors). Τα υλικά κατασκευής και τα σχήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων ποικίλουν πολύ. Υπάρχουν φωτοβιοαντιδραστήρες επίπεδοι σαν ηλιακοί συλλέκτες κατακόρυφοι ή κεκλιμένοι, κυλινδρικοί με επιμήκης αγωγούς κατασκευασμένοι από διάφορα διάφανα υλικά (γυαλί ή πλαστικό), ή ελικοειδούς μορφής. Επίσης απλής κατασκευής φωτοβιοαντιδραστήρες θεωρούνται αυτοί του τύπου σακουλών πολυαιθυλενίου (Brennan and Owende, 2010; Carvalho et al., 2006; Chisti, 2007; Pulz, 2001).

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι: 1) καλύτερος έλεγχος των συνθηκών καλλιέργειας, 2) μεγαλύτερος λόγος επιφάνειας/όγκου, 3) καλύτερος έλεγχος της παροχέτευσης και της κίνησης των αερίων (πχ CO<sub>2</sub>), 4) περιορισμός της εξάτμισης νερού από το υπόστρωμα καλλιέργειας, 5) καλύτερη θερμική κατανομή στο υπόστρωμα καλλιέργειας, 6) σχετικά εύκολη εγκατάσταση σε ανοιχτό χώρο, 7) προστασία από επιμολύνσεις από διάφορους μικροοργανισμούς 8) σχετικά υψηλές αποδόσεις σε σχέση με τις ανοικτές δεξαμενές και 9) η δυνατότητα καλλιέργειας σε τύπο μιξοτροφίας ή ετεροτροφίας χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα επιμόλυνσης (Chen, 1996; Chisti, 2007).

Παρόλα τα πλεονεκτήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων σε σχέση με τις ανοικτές δεξαμενές, οι καλλιέργειες αυτού του τύπου έχουν αυξημένα κόστη κατασκευής και λειτουργίας όπως και η περιορισμένη δυνατότητα να κατασκευαστούν σε μεγάλης κλίμακα εγκαταστάσεις (scaled-up). Ένας από τους κυριότερους λόγους για την περιορισμένη δυνατότητα να κατασκευαστούν σε μεγάλης κλίμακα εγκαταστάσεις είναι η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στο υγρό υπόστρωμα ανάπτυξης. Κατά τη φωτοσύνθεση των μικροφυκών παράγεται μοριακό οξυγόνο το οποίο λόγω των συνθηκών εντός του φωτοβιοαντιδραστήρα διαλύεται στο υγρό υπόστρωμα ανάπτυξης. Το διαλυμένο οξυγόνο θα πρέπει να απομακρύνεται με κάποιο τρόπο γιατί μεγάλες συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου είναι ανασταλτικές της ανάπτυξης που μερικές φορές σε συνδυασμό με υψηλές εντάσεις φωτός προκαλείται φωτοοξειδωση. Αυτό το γεγονός περιορίζει αρκετά το μήκος των αγωγών το οποίο δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 80m. Βέβαια παράγοντες όπως η ηλιακή ένταση, η συγκέντρωση της βιομάζας, ο ρυθμός

ροής του υγρού κλπ επηρεάζουν σημαντικά τις διαστάσεις των αγωγών (Chisti, 2007; Lehr and Posten, 2009; Molina et al., 2001).

Ο σχεδιασμός των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι μια πολύπλοκη υπόθεση και προϋποθέτει την καλή γνώση διαφόρων φυσικών και βιολογικών φαινομένων για τον επιτυχή σχεδιασμό των διαφόρων υποσυστημάτων. Τα κυριότερα υποσυστήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι: 1) το σύστημα φωτισμού, 2) το σύστημα εμπλουτισμού με CO<sub>2</sub>, 3) το σύστημα ανάδευσης, 4) το σύστημα απομάκρυνση O<sub>2</sub> και διαχωρισμό αερίων, 5) το σύστημα θέρμανσης/ψύξης και 6) το σύστημα θρέψης (Chisti and Moo-Young, 2002; Eriksen, 2008; Molina et al., 2001)

### 1.3 Είδη μεταβολισμού

Όλα τα φύκη είναι O<sub>2</sub>-γόνιοι φωτοσυνθέτοντες μικροοργανισμοί που σημαίνει ότι η πηγή ενέργειας είναι ο ήλιος και η πηγή άνθρακα το CO<sub>2</sub>. Παρόλα αυτά, ορισμένα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να ακολουθούν διάφορους τύπους μεταβολισμού και να εναλλάσσουν το μεταβολισμό τους ανάλογα της μορφής της διαθέσιμης ενέργειας και του διαθέσιμου άνθρακα. Οι μεταβολικοί τύποι με τους οποίους μπορούν να αναπτυχθούν ορισμένα μικροφύκη είναι: 1) **Φωτοαυτότροφος**: στον τύπο αυτό τα μικροφύκη αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας ως πηγή ενέργειας τον ήλιο και ως πηγή άνθρακα το CO<sub>2</sub>, 2) **Ετερότροφος**: Στον τύπο αυτό τα μικροφύκη χρησιμοποιούν ως πηγή και πηγή ενέργειας και πηγή άνθρακα διάφορες οργανικές ουσίες όπως γλυκόζη, οξικό οξύ, γλυκερίνη κλπ, 3) **Μιξότροφος**: τα μικροφύκη στον τύπο αυτό είναι σε θέση να αναπτύσσονται είτε αξιοποιώντας τον ήλιο ως πηγή ενέργειας είτε αξιοποιώντας διάφορες οργανικές ουσίες και ως πηγή άνθρακα είτε το CO<sub>2</sub> είτε τις οργανικές ουσίες και 4) **Φωτοετερότροφος**: στον τύπο αυτό τα μικροφύκη χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας τον ήλιο και σαν πηγή άνθρακα τις οργανικές ενώσεις (Chojnacka and Marquez-Rocha, 2004).

Ο ετερότροφος και μιξότροφος μεταβολισμός μπορούν να αποτελέσουν ιδανική καλλιεργητική τεχνική για την παραγωγή μικροφυκών, γιατί έτσι αντιμετωπίζεται το πρόβλημα της αξιοποίησης του φωτός σε καλλιέργειες με μεγάλη πυκνότητα ή σε καλλιέργειες με φωτοπαρεμπόδιση (κατά τους καλοκαιρινούς μήνες). Στις ετερότροφες

ή/και μιξότροφες καλλιέργειες η προσθήκη οργανικού άνθρακα στο υπόστρωμα καλλιέργειας δίνει μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας σε σχέση με τις φωτοαυτότροφες καλλιέργειες. Γενικά όμως ο μιξότροφος μεταβολισμός έχει μεγαλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης και μεγαλύτερη τελική παραγωγή σε βιομάζα σε σχέση με τους άλλους τρεις μεταβολισμούς. Ειδικά για την παραγωγή μικροφυκών για ενεργειακούς σκοπούς, όπου το ζήτημα της μείωσης του κόστους των χρησιμοποιούμενων θρεπτικών υλικών είναι πολύ σημαντικό, για την πραγματοποίηση ετερότροφων ή μιξότροφων καλλιεργειών είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν οργανικά απόβλητα του παραγωγικού τομέα (Abreu et al., 2012; Andrade and Costa, 2007; Chen, 1996; Chojnacka and Zielińska, 2011; Gao et al., 2010; Zhang et al., 2011).

#### **1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών**

Οι καλλιέργειες των μικροφυκών είναι αρκετά πολύπλοκα συστήματα και η ανάπτυξή τους επηρεάζεται από διαφορετικούς βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών είναι: ο φωτισμός, η θερμοκρασία, τα θρεπτικά συστατικά (C, N, P και μικροστοιχείων), το pH του θρεπτικού υποστρώματος, η αλατότητα του θρεπτικού υποστρώματος, διάφορες παρεμποδιστικές και ανασταλτικές ουσίες που παράγονται από τα ίδια τα μικροφύκη ή που μπορεί να υπάρχουν στο θρεπτικό υπόστρωμα, ο αερισμός, η ανάδευση, η παρουσία ή μη άλλων ειδών μικροοργανισμών στην καλλιέργεια. Παρακάτω θα γίνει μια σχετικά σύντομη ανάλυση ορισμένων από τους παραπάνω παράγοντες.

##### **1.4.1 Φωτισμός**

Η διάρκεια, η ένταση και η ποιότητα του φωτισμού είναι καθοριστικοί παράγοντες για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Η ποιότητα του φάσματος του φωτός και η έντασή του πρέπει να επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπουν τη μέγιστη ανάπτυξη των μικροφυκών. Το φάσμα του φωτός που αξιοποιείται από τα μικροφύκη είναι μεταξύ 400-700 nm (ενεργή φωτοσυνθετική ακτινοβολία). Τα διάφορα είδη μικροφυκών περιέχουν σε διαφορετικές αναλογίες τις διάφορες φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες και ως εκ τούτου αξιοποιούν λιγότερο ή περισσότερο διαφορετικά μήκη κύματος. Ο φωτισμός

είναι σε γενικές γραμμές ο καθοριστικότερος παράγοντας για την ανάπτυξη των μικροφυκών και ειδικά στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες συνήθως είναι και ο περιοριστικός παράγοντας (Janssen, 2002; Suh and Lee, 2003).

Γενικά ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροφυκών αυξάνεται με την αύξηση της έντασης της ακτινοβολίας μέχρι ένα όριο. Τα περισσότερα μικροφύκη κορένονται σε ένταση φωτισμού μεταξύ 200 και 400  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Μετά το όριο αυτό ο ρυθμός ανάπτυξης παραμένει σταθερός και από ένα σημείο και έπειτα μειώνεται λόγω της βλάβης που υφίστανται τα κύτταρα λόγω φωτοοξειδωσης (Carvalho et al., 2011; Fernandes et al., 2010; Molina Grima et al., 1999).

Η πηγή του φωτός μπορεί να είναι είτε φυσική (ήλιος) είτε τεχνητή (λαμπτήρες). Ειδικά σε περιπτώσεις μικροφυκών που καλλιεργούνται για υψηλής αξίας προϊόντα ο τεχνητός φωτισμός παρέχει πιο σταθερές ελεγχόμενες συνθήκες και έτσι προτιμάται. Νέες τεχνολογίες λαμπτήρων όπως τα LED (light emitting diode) τα οποία έχουν σχετικά μικρή κατανάλωση ενέργειας ή οι οπτικές ίνες ή και υβριδικά συστήματα φυσικού και τεχνητού φωτισμού θεωρούνται ότι θα συμβάλουν αρκετά στη βελτιστοποίηση της παραγωγής μικροφυκών (Chen et al., 2011; Wang et al., 2007).

#### **1.4.2 Θερμοκρασία**

Η θερμοκρασία είναι ο πιο καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη των μικροφυκών μετά το φωτισμό. Πολλά μικροφύκη μπορούν να αντέξουν θερμοκρασίες μέχρι και 15 °C χαμηλότερα από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους, αλλά υπάρχει πιθανότητα με μια μεταβολή της τάξης των 2-4°C πάνω από το βέλτιστο σημείο να υπάρξει πλήρης απώλεια της καλλιέργειας. Στους φωτοβιοαντιδραστήρες υπάρχει ο κίνδυνος της υπερθέρμανσης που σε ζεστές μέρες η θερμοκρασία μπορεί να ανέλθει στους 55°C. Για τους παραπάνω λόγους φαίνεται ότι είναι αναγκαίο να υπάρχει εγκατεστημένο σύστημα ψύξης της καλλιέργειας (Richmond, 1999). Η θερμοκρασία είναι επίσης σημαντικός παράγοντας γιατί έχει συνεργιστική δράση με το φωτισμό. Σε χαμηλές θερμοκρασίες μειώνεται και το σημείο έντασης του φωτισμού που δημιουργεί ανασταλτικές συνθήκες ή φωτοοξειδωση. Με άλλα λόγια σε ψυχρές περιοχές ή περιόδους του έτους η φωτοοξειδωση είναι πιο έντονη και συχνότερο φαινόμενο (Carvalho et al., 2009; Jensen



and Knutsen, 1993; Richmond, 1999). Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται μεταξύ 20-30°C, αλλά υπάρχουν και θερμοφιλά στελέχη που μπορούν να αναπτυχθούν και σε θερμοκρασίες ως 40-42°C (Vonshak, 2002b).

### 1.4.3 Θρεπτικά στοιχεία

Τα μικροφύκη για να αναπτυχθούν πέρα από την ενέργεια και τον άνθρακα χρειάζονται και διάφορα άλλα ανόργανα στοιχεία τα οποία είναι αναγκαία για τις διάφορες μεταβολικές κυτταρικές διεργασίες. Τα κυριότερα θρεπτικά στοιχεία (μακροστοιχεία) που είναι αναγκαία για την ανάπτυξη των μικροφυκών, πέρα από τον άνθρακα είναι το άζωτο (N), ο φώσφορος (P) και το κάλιο (K). Αναγκαία αλλά σε μικρότερες ποσότητες τα μικροστοιχεία όπως το θείο (S), ο σίδηρος (Fe), το μαγνήσιο (Mg), το ασβέστιο (Ca), όπως και διάφορα άλλα μέταλλα (πχ μόλυβδος, νικέλιο, κλπ) (Richmond, 2004).

### Ανθρακας

Τα μικροφύκη ως φωτοσυνθέτοντες μικροοργανισμοί μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια και τον ανόργανο άνθρακα (CO<sub>2</sub>) μέσω πολύπλοκων βιοχημικών διεργασιών σε οργανικό άνθρακα (γλυκόζη). Το CO<sub>2</sub> όταν είναι διαλυμένο στο νερό διίσταται και για τις τιμές του pH στο οποίο αναπτύσσονται τα περισσότερα μικροφύκη βρίσκεται είτε σε μορφή διτανθρακικής ρίζας (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), είτε σε μορφή ανθρακικής ρίζας (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> σε μεγαλύτερες τιμές του pH). Τα μικροφύκη (με εξαίρεση ορισμένες κατηγορίες όπως για παράδειγμα τα ροδοφύκη) έχουν έναν μηχανισμό (carbon concentrating mechanism) κατά τον οποίο το διαλυμένο CO<sub>2</sub> συγκεντρώνεται γύρω από το κύτταρο και είτε ο άνθρακας απορροφάται ως διτανθρακική ρίζα είτε με τη βοήθεια ενζύμων (carbonic anhydrase) απορροφάται σε μορφή CO<sub>2</sub> (Badger and Price, 2003; Giordano et al., 2005).

Η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα είναι περίπου 360 ppmv (0,036%) και δεδομένου ότι τα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχτούν σε υπόστρωμα καλλιέργειας που να περιέχει ως και 15% διαλυμένο CO<sub>2</sub>, και ότι για την παραγωγή ενός κιλού ξηρής βιομάζας μικροφυκών χρειάζονται περίπου 1.8 κιλά CO<sub>2</sub> η παροχή CO<sub>2</sub> από την ατμόσφαιρα προϋποθέτει να παροχετεύονται στις καλλιέργειες μεγάλοι όγκοι αέρα για την ικανοποιητική ανάπτυξη βιομάζας. Για το λόγο αυτό το CO<sub>2</sub> μπορεί να παρέχεται σε

μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είτε χρησιμοποιώντας καυσαέρια από παραγωγικές δραστηριότητες είτε χρησιμοποιώντας διάφορα ανθρακικά άλατα, όπως για παράδειγμα η ανθρακική ή διτανθρακική σόδα (Brennan and Owende, 2013; Doucha et al., 2005; Ferreira et al., 2012; Wang et al., 2008).

Κατά τη φωτοσύνθεση και κατά τη μετατροπή της διτανθρακικής ρίζας σε CO<sub>2</sub> παράγονται ιόντα OH<sup>-</sup>, σύμφωνα με τη χημική αντίδραση  $\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{OH}^-$  και ως εκ τούτου η τάση στις καλλιέργειες των μικροφυκών είναι να αυξάνεται το pH τους. Σε περιπτώσεις μη-ρύθμισης του pH οι τιμές του μπορεί να ανέλθουν ακόμα και στο 11 με ανάλογες επιπτώσεις στην καλλιέργεια. Ένας τρόπος ρύθμισης του pH είναι η παροχέτευση CO<sub>2</sub> που δεσμεύει ιόντα OH<sup>-</sup> για την παραγωγή HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ενώ επίσης μπορεί να γίνει με διάφορα οξέα (ανόργανα ή και οργανικά) (Grobbelaar, 2004).

Τα μικροφύκη, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, μπορούν να αξιοποιήσουν και οργανικό άνθρακα ως πηγή άνθρακα. Τα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται αξιοποιώντας διάφορες οργανικές ουσίες τις οποίες απορροφούν με συγκεκριμένους μηχανισμούς ανάλογα με την οργανική ουσία. Για παράδειγμα η απορρόφηση γλυκόζης γίνεται μετά από φωσφορυλίωση, η γλυκερόλη με απλή διάχυση εντός των κυττάρων και τα οργανικά οξέα με τη χρήση μεταφορικών πρωτεϊνών των μεμβρανών (Perez-Garcia et al., 2011).

## Άζωτο

Το άζωτο είναι ένα από τα βασικότερα θρεπτικά στοιχεία γιατί συμμετέχει σε αρκετά σημαντικά βιοχημικά μακρομόρια (πρωτεΐνες, DNA, RNA κλπ) και η παροχή του είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Η περιεκτικότητα του αζώτου στη βιομάζα των μικροφυκών, ειδικά σε εκείνα που περιέχουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών, μπορεί να ανέλθει ακόμα και στο 10%. Το άζωτο μπορεί να προσληφθεί από διάφορες μορφές όπως αμμωνιακό άζωτο, νιτρικό και λιγότερο από τη νιτρώδη μορφή. Επίσης ορισμένα είδη μικροφυκών (όπως τα κυανοβακτήρια *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Anabaena* κλπ) μπορούν να δεσμεύσουν μοριακό άζωτο από την ατμόσφαιρα. Όταν το άζωτο είναι σε μοριακή μορφή διαχέεται κατευθείαν εντός των κυττάρων διαπερνώντας τις μεμβράνες. Τα μικροφύκη γενικά προτιμούν την πρόσληψη αζώτου υπό αμμωνιακή

μορφή γιατί δεν χρειάζονται να ξοδέψουν ενέργεια όπως χρειάζεται για τα νιτρικά τα οποία πρέπει πρώτα να αναχθούν σε αμμωνιακή μορφή (Boussiba and Gibson, 1991; Grobbelaar, 2004). Παρόλα αυτά η παροχή νιτρικών αλάτων έχει δείξει ότι έχει καλύτερα αποτελέσματα στην παραγωγή βιομάζας (Costa et al., 2001). Μεγάλες συγκεντρώσεις όμως αμμωνίας στα υποστρώματα ανάπτυξης δρουν τοξικά και αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροφυκών (Azon and Goldman, 1982).

Για τη μείωση του κόστους παραγωγής χρησιμοποιώντας νιτρικά άλατα, αρκετοί ερευνητές προσπάθησαν να τα αντικαταστήσουν με φτηνότερα υλικά. Αυτό που δείχνει να έχει ενδιαφέρον για την παραγωγή μικροφυκών σε μεγάλη κλίμακα είναι η χρήση ουρίας ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ). Στην ουρία το άζωτο είναι σε οργανική μορφή και υδρολύεται προς αμμώνιο. Η ουρία πέρα από πηγή αζώτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης και ως πηγή άνθρακα. Ένα από τα μειονεκτήματα της χρήσης ουρίας είναι ότι το παραγόμενο αμμώνιο, ειδικά σε αλκαλικά υποστρώματα ανάπτυξης διαφεύγει και χάνεται στην ατμόσφαιρα (Danesi et al., 2002; Hsieh and Wu, 2009; Matsudo et al., 2009).

## Φώσφορος

Ουσιαστικής σημασίας θρεπτικό στοιχείο για την ανάπτυξη των μικροφυκών είναι και ο φώσφορος, ο οποίος συμμετέχει ως στοιχείο σε διάφορα μακρομόρια με κυριότερο το αδενοσινοτριφωσφορικό οξύ (ATP). Τα μικροφύκη περιέχουν λιγότερο από 1% φώσφορο στη βιομάζα τους, παρόλα αυτά ο φώσφορος πολύ συχνά είναι ο περιοριστικός παράγοντας ανάπτυξης, ειδικότερα σε φυσικά περιβάλλοντα (πχ λίμνες). Ο φώσφορος προσλαμβάνεται από τα μικροφύκη ως ορθοφωσφορική ρίζα ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Η διαλυτότητα του φωσφόρου επηρεάζεται πολύ ισχυρά από την παρουσία ιόντων (πχ  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) με ποιο σημαντικό το ιόν του ασβεστίου ( $\text{Ca}^{2+}$ ) με το οποίο σχηματίζει το σχεδόν αδιάλυτο υδροξυαπατίτη ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Για τη διάλυση του φωσφόρου από τη μορφή αυτή απαιτούνται διάφορες μικροβιακές δραστηριότητες. Όταν ο φώσφορος είναι σε οργανική μορφή τότε τα μικροφύκη εκκρίνουν φωσφατάσες και με αυτό τον τρόπο ο οργανικός φώσφορος μετατρέπεται σε ορθοφωσφορικό φώσφορο. Η φωσφατάσες εκκρίνονται σε μεγαλύτερο βαθμό όταν ο ορθοφωσφορικός φώσφορος είναι σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. (Oliver and Ganf, 2000; Stal, 2012). Όταν η συγκέντρωση φωσφόρου

στο περιβάλλον είναι χαμηλή τότε τα μικροφύκη τον αποθηκεύουν σε μεγαλύτερες ποσότητες από αυτές που χρειάζονται άμεσα. Η αποθήκευση του φωσφόρου γίνεται υπό μορφή πολυφωσφορικών κόκκων και μπορεί να καλύψει τις ανάγκες δύο ή ακόμα και τριών κύκλων διαίρεσης (γενιές) (Oliver et al., 2012; Powell et al., 2011).

#### 1.4.4 Αλατότητα

Υπάρχουν ήδη μικροφυκών, όπως για παράδειγμα η *Dunaliella salina* που αναπτύσσονται καλύτερα σε αλμυρά ή υφάλμυρα νερά προϋποθέτοντας σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων. Άλλα μικροφύκη όπως για παράδειγμα το *Chlorella*, *Arthrospira*, *Porphyridium* κλπ είναι απλώς ανεκτικά ως ανθεκτικά σε μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων, παρόλο που δεν τις προϋποθέτουν. Πολλά είδη δεν αναπτύσσονται σε υποστρώματα με αλατότητα περισσότερη από  $4 \text{ g l}^{-1}$ . Για τα είδη που έχουν ανθεκτικότητα στην αλατότητα, αυτή βρέθηκε ότι πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20 και  $24 \text{ g l}^{-1}$ , αν και κάθε είδος έχει τη δικιά του βέλτιστη τιμή. Η αυξημένη αλατότητα επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των μικροφυκών επιδρώντας άμεσα στο σύστημα της φωτοσύνθεσης (φωτοσύστημα II) (Barsanti and Gualtieri, 2006; Bilanovic et al., 2009; Richmond, 2004).

#### 1.4.5 pH

Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με pH που κυμαίνεται μεταξύ 7 και 9. Παρόλα αυτά υπάρχουν είδη που είναι οξύφιλα (όπως το *Chlamydomonas acidophila*) αλλά και αλκαλόφιλα (όπως το *Arthrospira*). Απότομη αλλαγή στο pH μπορεί να έχει καταστροφικές επιπτώσεις στην καλλιέργεια. Όπως αναφέρθηκε και πριν, κατά τη φωτοσύνθεση το pH της καλλιέργειας έχει την τάση να αυξάνεται. Αν το pH αυξηθεί πάνω από μια τιμή τότε επέρχεται κυτταρόλυση. Το αντίθετο συμβαίνει όταν χρησιμοποιείται αμμωνία ως πηγή αζώτου, όπου κατά την πρόσληψή της από τα μικροφύκη παράγονται ιόντα  $\text{H}^+$ , ωθώντας το pH να μειωθεί. Μεγάλες τιμές του pH ευνοούν τη στερεοποίηση και καθίζηση του φωσφόρου με ανάλογες επιπτώσεις στην καλή ανάπτυξη των μικροφυκών (Borowitzka, 1998; Richmond, 2004)

## 1.5 Συγκομιδή

Η συγκομιδή των μικροφυκών είναι ένα πεδίο με μεγάλα περιθώρια έρευνας, δεδομένου ότι οι μέθοδοι συγκομιδής που χρησιμοποιούνται μέχρι τώρα είναι είτε αναποτελεσματικές είναι ενεργειακόβρες. Το κόστος της συγκομιδής μπορεί να ανέλθει στο 20-30% του συνολικού κόστους παραγωγής της βιομάζας (Molina Grima et al., 2003). Η μέθοδοι συγκομιδής που έχουν αναπτυχθεί μέχρι στιγμής βασίζονται σε χημικές, φυσικές, βιολογικές και ηλεκτρικές ιδιότητες των μικροφυκών. Για τη συγκομιδή της βιομάζας χρησιμοποιούνται οι εξής σημαντικότερες μέθοδοι: α) φιλτράρισμα β) φυγοκέντριση γ) συσσωμάτωση-κροκίδωση και δ) επίπλευση (flocculation).

Το φιλτράρισμα σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους είναι η πιο ανταγωνιστική μέθοδος συγκομιδής μικροφυκών. Υπάρχουν διάφοροι τύποι φιλτραρίσματος, όπως το φιλτράρισμα εφαπτόμενης ροής (TFF, tangential flow filtration), διασταυρούμενης ροής (cross-flow filtration), φιλτράρισμα με τύμπανο, φιλτράρισμα μέσω λεπτόκοκκων υλικών όπως άμμος ή ιλύς και φιλτράρισμα υπό πίεση ή υπό κενό. Από τις παραπάνω μεθόδους φιλτραρίσματος, η καθεμιά προσιδιάζει στα χαρακτηριστικά μικροφύκους που πρόκειται να συγκομιστεί. Επειδή οι διαστάσεις των μικροφυκών ποικίλουν έντονα, είναι δύσκολη η εύρεση μιας καθολικής μεθόδου συγκομιδής που να έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα σε όλα τα είδη μικροφυκών. Το κυριότερο μειονέκτημα του φιλτραρίσματος για τη συγκομιδή της βιομάζας είναι η έμφραξη των πόρων του μέσου φιλτραρίσματος, το οποίο μπορεί να αντιμετωπιστεί με ανάποδες πλύσεις των φίλτρων (Christenson and Sims, 2011; Molina Grima et al., 2003; Salim et al., 2010; Uduman et al., 2010).

Η φυγοκέντριση σαν μέθοδος συγκομιδής έχει εξεταστεί αρκετά και έχει αποδειχθεί ότι έχει καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με άλλες μεθόδους. Προτιμάται σαν μέθοδος όταν είναι να συγκομιστεί βιομάζα μικροφυκών με μεγάλη προστιθέμενη αξία γιατί σαν μέθοδος είναι ενεργειακόβρος και προσθέτει μεγάλα κόστη στο τελικό προϊόν (Christenson and Sims, 2011; Molina Grima et al., 2003).

Η μέθοδος συγκομιδής με συσσωμάτωση βασίζεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα των μικροφυκών είναι ηλεκτρικά αρνητικώς φορτισμένα εμποδίζοντας έτσι τη

συνάθροισή τους και τη δημιουργία συσσωματωμάτων. Ουδετεροποιώντας το ηλεκτρικό φορτίο είναι δυνατό να δημιουργηθεί συσσωμάτωμα που καθιζάνει στο κάτω μέρος του περιέκτη τους. Για την ουδετεροποίηση των ηλεκτρικών φορτίων χρησιμοποιούνται διάφορες χημικές ουσίες όπως μεταλλικά άλατα ( $(\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3)$ ,  $\text{FeCl}_3$  κλπ) διάφορα πολυμερή (χιτοσίνη, κατιονικό άμυλο κλπ) ή και χρήση χημικών ουσιών για την αύξηση της τιμής του pH της καλλιέργειας ( $\text{NaOH}$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ). Η χρήση μεταλλικών αλάτων μπορεί να είναι ανεπιθύμητη όταν τα μικροφύκη καλλιεργούνται και προορίζονται για διάφορες χρήσεις όπου η βιομάζα θα πρέπει να έχει κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (Papazi et al., 2010; Salim et al., 2010; Vandamme et al., 2012; Vandamme et al., 2010).

## 1.6 Οικονομικότητα και αειφορία

Τα συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών όπως περιγράφηκαν παραπάνω, είναι πολύπλοκα και το κόστος παραγωγής βιομάζας είναι μεγάλο. Τα κυριότερα υποσυστήματα που συμβάλουν ιδιαίτερα στο αυξημένο κόστος παραγωγής είναι: 1) σύστημα φωτισμού, 2) ανάδευση, 3) συγκομιδή και 4) η χρήση θρεπτικών στοιχείων. Σε γενικές γραμμές οι ανοιχτές δεξαμενές, οι οποίες είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενες για καλλιέργεια μικροφυκών σε μεγάλη κλίμακα είναι και αυτές που έχουν λιγότερο κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας (Norsker et al., 2011). Μέχρι στιγμής σε μεγάλη κλίμακα τα μικροφύκη καλλιεργούνται για την παραγωγή προϊόντων μεγάλης αξίας όπως για παράδειγμα τα μικροφύκη *Arthrospira (Spirulina)*, *Chlorella*, *Dunaliella* κλπ για την παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής, προϊόντων κοσμετολογίας κ.α. (Πίνακας 1.2).

Η καλλιέργεια των μικροφυκών για παραγωγή βιοενέργειας μέχρι στιγμής κρίνεται οικονομικά ασύμφορη αλλά και μη αειφόρα. Διάφορες μελέτες βασισμένες στη μεθοδολογία της Ανάλυσης Κύκλου Ζωής (Life cycle analysis-LCA) και Κόστος Κύκλου Ζωής (Life cycle cost-LCC) δείχνουν ότι με την παρούσα τεχνολογία οι εισροές ενέργειας είναι μεγαλύτερες από τις εκροές, που σημαίνει ότι το ενεργειακό ισοζύγιο είναι αρνητικό. Οι ανοιχτές δεξαμενές υπολογίζεται ότι έχουν 32% λιγότερες ενεργειακές απαιτήσεις για την κατασκευή και λειτουργία τους. Επίσης λιγότερες καλύτερα αποτελέσματα έδωσαν είδη μικροφυκών που αναπτύσσονται σε υφάλμυρα ως αλμυρά

νερά σε σχέση με αυτά που αναπτύσσονται σε γλυκά νερά. Παρόλα αυτά όλες οι μελέτες LCA καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι το ισοζύγιο μπορεί να βελτιωθεί με τη χρήση αποβλήτων για την κάλυψη των αναγκών ανάπτυξης της βιομάζας (Clarens et al., 2010; Razon and Tan, 2011; Resurreccion et al., 2012; Soratana and Landis, 2011).

**Πίνακας 1.2 Παγκόσμια παραγωγή προϊόντων από μικροφύκη**

Μικροφύκος	Ετήσια παραγωγή	Παραγωγός χώρα	Χρήση	Τιμή (€)
<i>Arthrospira (Spirulina)</i>	3000 τόνοι ξηρού βάρους	Κίνα, Ινδία, ΗΠΑ, Μιανμάρη, Ιαπωνία	Διατροφή Κοσμετολογία Φυκο-πρωτεΐνες	36 kg <sup>-1</sup> 11 mg <sup>-1</sup>
<i>Chlorella</i>	2000 τόνοι ξηρού βάρους	Ταϊβάν, Γερμανία, Ιαπωνία	Διατροφή Κοσμετολογία Ιχθυοκαλλιέργεια	36 kg <sup>-1</sup> 50 l <sup>-1</sup>
<i>Dunaliella</i>	1200 τόνοι ξηρού βάρους	Αυστραλία, Ισραήλ, ΗΠΑ, Ιαπωνία	Διατροφή Κοσμετολογία Β-καροτίνη	215-2150 kg <sup>-1</sup>
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	500 τόνοι ξηρού βάρους	ΗΠΑ	Διατροφή	
<i>Haematococcus</i>	300 τόνοι ξηρού βάρους	Ισραήλ, Ινδία	ΗΠΑ, Ιχθυοκαλλιέργεια Ασταξανθίνη	50 l <sup>-1</sup>
<i>Cryptocodinium</i>	240 τόνοι ξηρού βάρους	ΗΠΑ	Λιπαρά οξέα (DHA)	43 g <sup>-1</sup>
<i>Shizochytrium</i>	10 τόνοι ξηρού βάρους	ΗΠΑ	Λιπαρά οξέα (DHA)	43 g <sup>-1</sup>

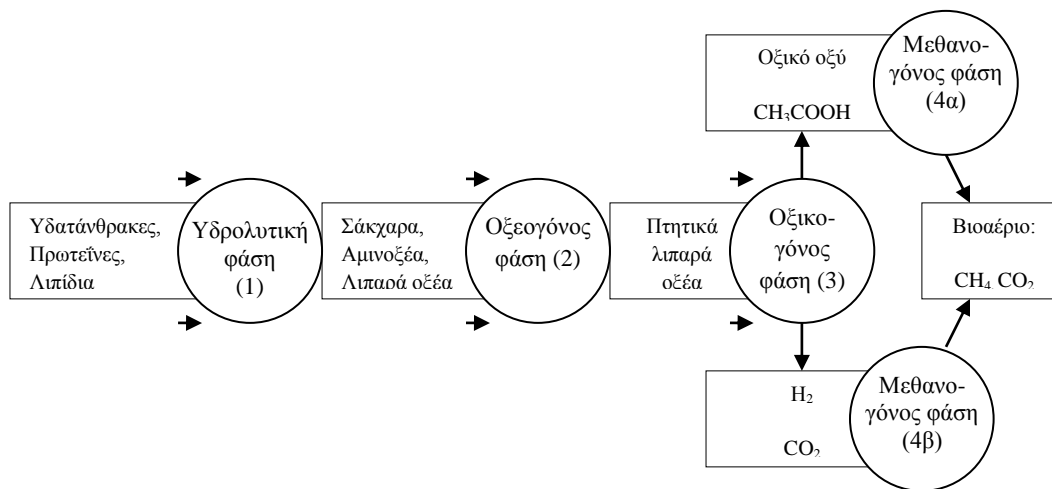
Πηγή: Brennan and Owende (2010)



## 2 Αναερόβια χώνευση

### 2.1 Γενικά για την αναερόβια χώνευση

Η αναερόβια χώνευση είναι μια βιολογική διεργασία κατά την οποία διάφοροι αναερόβιοι μικροοργανισμοί βιοαποδομούν οργανικές ουσίες παράγοντας κατά κύριο λόγο μεθάνιο ( $\text{CH}_4$ ) το οποίο αποτελεί την πιο ανηγμένη οργανική μορφή του άνθρακα και το διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ) το οποίο αποτελεί την πιο οξειδωμένη του μορφή (Angelidaki et al., 2011). Ποιο συγκεκριμένα, το παραγόμενο βιοαέριο από την αναερόβια χώνευση είναι μείγμα αερίων με τυπική σύνθεση 45-70%  $\text{CH}_4$ , 25-55%  $\text{CO}_2$  και ίχνη υδρογόνου ( $\text{H}_2$ ), αζώτου ( $\text{N}_2$ ), υδρογονανθράκων, υδρατμών και υδρόθειου ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (Klinski, 2006). Η αναερόβια χώνευση είναι μια βιολογική διεργασία που πραγματοποιείται σε συνθήκες ανοξίας και αποτελείται από τέσσερις κύριες μεταβολικές φάσεις στις οποίες συμμετέχουν αντίστοιχοι μικροοργανισμοί (Schattauer, 2006): 1) Υδρολυτική φάση, 2) Οξεογόνος φάση, 3) Οξικογόνος φάση και 4) Μεθανογόνος φάση.



**Εικόνα 2.1 Σχηματική παράσταση των τεσσάρων φάσεων της αναερόβιας χώνευσης**

1) **Υδρολυτική φάση.** Στη φάση αυτή διάφορα βακτήρια διασπούν τις μεγαλομοριακές οργανικές ενώσεις, (κυρίως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη κλπ) σε απλούστερες ενώσεις (μονομερή, διμερή και ολιγομερή όπως μόνο-, δι- και ολιγασακχαρίτες, αμινοξέα, λιπαρά οξέα κλπ.). Οι μεγαλομοριακές οργανικές ενώσεις λόγω του μεγάλου τους

μεγέθους δεν μπορούν να προσληφθούν από τα βακτήρια για την κάλυψη των μεταβολικών τους αναγκών και ως εκ τούτου είναι αναγκαία η διάσπασή τους σε μορφές μικρότερες και ευδιάλυτες. Η υδρόλυση των πολυμερών στοιχείων προς μονο- και ολιγομερή στοιχεία επιτυγχάνεται με την έκκριση υδρολυτικών ενζύμων από τα βακτήρια. Τα υδρολυτικά ένζυμα που εκκρίνουν τα βακτήρια, σπάνε τους δεσμούς υδρογόνου των μεγαλομορίων δημιουργώντας μικρότερα και ευδιάλυτα μόρια τα οποία είναι άμεσα διαθέσιμα στα βακτήρια για την πρόσληψή τους. Παρόλα αυτά, η υδρόλυση των πολυμερών δεν οφείλεται αποκλειστικά στην ενζυματική δραστηριότητα αλλά μπορεί να οφείλεται και στη δράση φυσικοχημικών παραγόντων. Η αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης επηρεάζεται κυρίως από τη θερμοκρασία, το pH, το μικροβιακό πληθυσμό, την ανάδευση, το ρυθμό έκκρισης ενζύμων, τη διάχυσή τους και όπως επίσης από διάφορα χαρακτηριστικά του υποστρώματος όπως η σύστασή του, το μέγεθος και μορφή των στοιχείων του (Bischofsberger et al., 2005; Gallert and Winter, 2005; Gavala et al., 2003; Vavilin et al., 2008).

Οι υδατάνθρακες της βιομάζας των λιγνινοκυτταρινούχων ενεργειακών φυτών κατά το μεγαλύτερο μέρος αποτελούνται από τη λιγνίνη, ημικυτταρίνη και κυτταρίνη σε αναλογίες που εξαρτώνται από το είδος του φυτού. Αυτοί οι υδατάνθρακες αποτελούν κυρίως το δομικό μέρος της βιομάζας των φυτών. Ο ρυθμός διάσπασης των υδατανθράκων εξαρτάται σημαντικά από τη μορφή τους και τη δομή τους. Η λιγνίνη υδρολύεται πολύ δύσκολα και αποτελεί την προστατευτική ασπίδα της κυτταρίνης με αποτέλεσμα τα λιγνινοκυτταρινούχα φυτά να χρειάζονται δραστηκή επεξεργασία για να αυξηθεί ο ρυθμός και ο βαθμός της υδρόλυσης. Οι πρωτεΐνες υδρολύονται από τις εξωπρωτεάσες και διασπώνται προς πολυπεπίδια και αμινοξέα. Ο ρυθμός υδρόλυσής τους θεωρείται βραδύτερος από αυτόν της υδρόλυσης των υδατανθράκων, αλλά εξαρτάται, μάλλον, περισσότερο από το είδος και τη δομή των πρωτεϊνών, το pH και τη μικροβιακή δραστηριότητα. Τα λιπίδια είναι πολυμερή διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες χαμηλής πολικότητας και αδιάλυτα στο νερό. Η πρώτη φάση της διάσπασης των λιπιδίων είναι η υδρόλυσή τους από τις λιπάσες ή τις φωσφολιπάσες δίνοντας λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Τα λιπίδια θεωρούνται ότι έχουν το χαμηλότερο ρυθμό υδρόλυσης. Επίσης τα μη δομικά συστατικά της φυτικής βιομάζας υδρολύονται πολύ πιο εύκολα από τα δομικά συστατικά. Σε γενικές γραμμές η υδρόλυση των υδατανθράκων έχει υψηλότερους

ρυθμούς από τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, με τα τελευταία να έχουν το χαμηλότερο ρυθμό υδρόλυσης (Angelidaki et al., 2011; Deublein and Steinhauser, 2010; Mosier et al., 2005; Talebnia et al., 2010; Vavilin et al., 2008)

2) **Οξεογόνος φάση.** Στη φάση αυτή οξεογόνα (ή οξεοπαραγωγά) βακτήρια ζυμώνουν τα προϊόντα της υδρολυτικής φάσης παράγοντας πτητικά οργανικά οξέα (μικρής αλυσίδας με αριθμό ανθράκων μέχρι και 5), όπως οξικό οξύ, βουτυρικό οξύ, προπιονικό οξύ κ.α. Επίσης κατά τη φάση αυτή παράγονται και αλκοόλες, υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα.

Τα οργανικά οξέα κατά τη φάση αυτή είναι προϊόντα των παρακάτω μεταβολικών οδών (Deublein and Steinhauser, 2010):

α) **Βιοαποδόμηση υδατανθράκων:** σύνθεση προπιονικού οξέος από προπιονικά βακτήρια μέσω της οδού του ηλεκτρικού και ακρυλικού οξέος.

Σύνθεση βουτυρικού οξέος από τα *Clostridium* μέσω της οδού του βουτυρικού οξέος.

Παραγωγή βουτανόλης από τα διοξικό οξύ μέσω της οδού του βουτυρικού οξέος.

β) **Λιπαρά οξέα:** τα λιπαρά οξέα βιοαποδομούνται από ακετοβακτήρια μέσω της β-οξειδωσης. Τα λιπαρά οξέα είναι συνδεδεμένα με συνένζυμα-A και οξειδώνονται σταδιακά. Σε κάθε στάδιο απομονώνονται δύο άτομα άνθρακα τα οποία απελευθερώνονται ως οξικό οξύ.

γ) **Αμινοξέα:** τα αμινοξέα διασπώνται σύμφωνα με την αντίδραση Stickland από το *Clostridium butulinum*. Από δύο αμινοξέα κάθε φορά (το ένα λειτουργεί ως δότης και το άλλο ως δέκτης υδρογόνου) παράγεται οξικό οξύ, αμμωνία και CO<sub>2</sub>.

3) **Οξικογόνος φάση.** Στη φάση αυτή τα προϊόντα της οξεογόνου φάσης μετατρέπονται σε οξικό οξύ (κύριο προϊόν), διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο. Για την παραγωγή οξικού οξέος υπάρχουν δύο μηχανισμοί: α) οξικογόνος υδρογόνωση (acetogenic hydrogenations) και β) οξικογόνος αφυδρογόνωση (acetogenic dehydrogenation). Η

οξικογόνος υδρογόνωση περιλαμβάνει την παραγωγή οξικού οξέος ως μοναδικού προϊόντος είτε από τη ζύμωση των εξοζών είτε από την αναγωγή του CO<sub>2</sub> χρησιμοποιώντας το υδρογόνο. Συνήθως, η φάση της οξικογένεσης αφορά στην οξικογόνο αφυδρογόνωση και ειδικότερα στην αναερόβια οξειδωση των πτητικών λιπαρών οξέων (μικρής αλυσίδας λιπαρά οξέα). Η οξειδωση αυτή επιτελείται από τα οξικογόνα βακτήρια τα οποία είναι υποχρεωτικά υδρογονογόνα (Gavala et al., 2003). Η σύνθεση του οξικού οξέος με αυτόν τον τρόπο δεν είναι θερμοδυναμικά ευνοϊκή παρά μόνο αν η μερική πίεση του υδρογόνου είναι χαμηλή (κάτω από 0,001 atm). Τα οξικογόνα βακτήρια μπορούν να πάρουν την αναγκαία ενέργεια για την επιβίωση και την ανάπτυξή τους μόνο κάτω από συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης υδρογόνου. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια εξειδικευμένων υδρογονοτρόφων μεθανοβακτηρίων που καταναλώνουν το υδρογόνο. Αντίθετα τα μεθανογόνα βακτήρια μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν μόνο υπό αυξημένη μερική πίεση υδρογόνου. Η ισορροπία επιτυγχάνεται με τον εξής τρόπο: όταν η μερική πίεση του υδρογόνου είναι χαμηλή τότε παράγεται κυρίως CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> και οξικό οξύ από τα οξικογόνα βακτήρια. Όταν αντίθετα η μερική πίεση του υδρογόνου είναι αυξημένη τότε παράγονται κυρίως βουτυρικό, προπιονικό, καπρονικό και βαλερικό οξύ καθώς και αιθανόλη. Τα μεθανοβακτήρια μπορούν να καταναλώσουν μόνο το οξικό οξύ το CO<sub>2</sub> και το H<sub>2</sub> και με αυτό τον τρόπο μειώνουν τη μερική πίεση του υδρογόνου. Για τους παραπάνω λόγους τα οξικογόνα βακτήρια και τα μεθανοβακτήρια βρίσκονται σε μια συμβιωτική σχέση. Οι οξικογόνες αντιδράσεις είναι ενδόθερμες, αλλά η αναγωγή του CO<sub>2</sub> με H<sub>2</sub> σε οξικό οξύ είναι εξώθερμη (Bischofsberger et al., 2005; Deublein and Steinhauser, 2010; Gavala et al., 2003; Γεωργακάκης, 2011).

4) **Μεθαναγόνος φάση.** Στη φάση αυτή τα μεθανοβακτήρια μετατρέπουν τα προϊόντα των προηγούμενων φάσεων σε βιοαέριο. Μέχρι στιγμής, οι ενώσεις που έχουν χαρακτηριστεί ως υπόστρωμα από τα μεθανοβακτήρια είναι το CO<sub>2</sub>, CO, φορμικό οξύ, οξικό οξύ, μεθανόλη, μεθυλαμίνες και θειούχο διμεθύλιο. Το μεγαλύτερο μέρος της μεθανοποίησης, κατά 65-70%, προέρχεται από τη μετατροπή του οξικού οξέος και κατά ένα 30% από την αναγωγή του CO<sub>2</sub> με H<sub>2</sub>. Η μεθανοποίηση γίνεται σε περιβάλλον ανοξίας και οι αντιδράσεις της είναι εξώθερμες (**Πίνακας 2.1**), (Deublein and

Steinhauser, 2010; Gallert and Winter, 2005; Gavala et al., 2003; Gerardi, 2003; Kayhanian and Tchobanoglous, 2007).

### Πίνακας 2.1 Αντιδράσεις κατά τη μεθανοποίηση

Χημική αντίδραση	$\Delta G'$ (kJ/mol)
$4 \text{CH}_3\text{NH}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_3$	-75,0
$4 \text{N}(\text{CH}_3)_3 + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 9 \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_3$	-74,3
$2 (\text{CH}_3)_2\text{S} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{S}$	-73,8
$2 (\text{CH}_3)_2\text{NH} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_3$	-73,2
$4 \text{C}_3\text{H}_7\text{OH} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 4 \text{OC}(\text{CH}_3)_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-36,5
$2 \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{CH}_3\text{COOH}$	-116,3
$4 \text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-314,3
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-30,9
$4 \text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{H}_2\text{O}$	-135,4
$\text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-131,0
$4 \text{HCOO}^- + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{HCO}_3^-$	-130,4
$2 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{CH}_3\text{COOH}$	-116,3
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	-113,0

Πηγή: (Deublein and Steinhauser, 2010; Gallert and Winter, 2005)

### 2.2 Μικροβιακοί πληθυσμοί της αναερόβιας χώνευσης

Τα είδη των μικροοργανισμών που υπάρχουν κάθε φορά σε έναν αναερόβιο αντιδραστήρα, εξαρτάται από τη σύσταση του υποστρώματος και των υλικών που πρέπει να διασπαστούν. Παρόλα αυτά, υπάρχουν μικροοργανισμοί που δραστηριοποιούνται σε όλες τις φάσεις της αναερόβιας χώνευσης. Τα δύο κυριότερα γένη αυτής της κατηγορίας είναι το *Acetobacterium* και *Eubacterium*. Στα υδρολυτικά βακτήρια μεγαλύτερη σημασία έχουν αυτά των γενών *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Propioni-bacterium*, *Sphingomonas*, *Sporobacterium*, *Megaspaera* και *Bifidobacterium*. Από τα οξεογόνα βακτήρια σημαντικά είναι τα *Clostridium*, *Ruminococcus*, και *Paenibacillus*. Τα οξικογόνα βακτήρια ανήκουν κυρίως στα γένη *Desulfovibrio*, *Aminobacterium*, και *Acidaminococcus*. Τα μεθανοπαραγωγά βακτήρια ανήκουν σε μια ιδιαίτερη και πολυμορφική ομάδα μικροοργανισμών τα *Archea* που αποτελούν ένα ξεχωριστό ταξινομικό βασίλειο. Τα βασικότερα γένη είναι *Methanobacterium*, *Methanospirillum* και *Methanosarcina*. Η κατηγορία των μεθανοβακτηρίων απαντάται ως η πλειοψηφία

των μικροοργανισμών στους αναερόβιους αντιδραστήρες (Deublein and Steinhauser, 2010; Gerardi, 2003; Singleton and Sainsbury, 2006).

### 2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αναερόβια χώνευση

Οι κυριότεροι παράγοντες που επιδρούν στη διεργασία της χώνευσης είναι:

- pH και αλκαλικότητα
- Θερμοκρασία
- Οργανικό φορτίο
- Χρόνος παραμονής
- Λόγος άνθρακα προς άζωτο (C/N)
- Θρεπτικά συστατικά
- Πτητικά οργανικά οξέα

#### 2.3.1 pH και Αλκαλικότητα

Κάθε μικροβιακή ομάδα έχει ένα βέλτιστο εύρος τιμών του pH. Τα οξεογόνα βακτήρια έχουν βέλτιστο εύρος 5,5-6,5 ενώ τα μεθανοβακτήρια 7,8-8,2. Ορισμένα είδη μεθανοβακτηρίων του γένους *Methanobacterium* αναπτύσσονται και σε pH που μπορεί να φτάσει το 8 ή ακόμα και 9 όπως το γένος *Methanococcus*. Γενικά όμως, η ανώτερη τιμή του pH για την ισορροπημένη διεργασία του αντιδραστήρα είναι 8,5. Βέβαια, πτώση του pH κάτω από το 6,5 είναι περισσότερο επικίνδυνη για την ομαλή διαδικασία παραγωγής μεθανίου από ότι η άνοδος του pH πάνω από 8. Σε υψηλό pH υπάρχει περίπτωση τα μεθανοβακτήρια να παράγουν μεν βιοαέριο αλλά με αρκετά χαμηλότερους ρυθμούς σε σχέση με το βέλτιστο pH. Τα μεθανοβακτήρια αναπτύσσονται με πολύ βραδύ ρυθμό όταν το pH πέσει κάτω από 6,6 με αποτέλεσμα να μην καταναλώνουν τα παραγόμενα οξέα τα οποία συσσωρεύονται μειώνοντας το pH περαιτέρω. Επιπλέον, όσο το pH πλησιάζει τις τιμές 6,5 μέχρι 5,5 τα οξεοπαραγωγά βακτήρια εισέρχονται στη βέλτιστη περιοχή τους με αποτέλεσμα τη δυσανάλογη ανάπτυξη των βακτηριακών ομάδων. Πτώση του pH κάτω από 6 έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία τοξικού περιβάλλοντος για τα μεθανοβακτήρια οδηγώντας την όλη διαδικασία σε κατάρρευση. Η

βέλτιστη τιμή για τις συνδυασμένες δράσεις των μικροβιακών πληθυσμών στο βιοαντιδραστήρα είναι 6,8-7,5 (Angelidaki et al., 2003; Kayhanian and Tchobanoglous, 2007; Khanal, 2008).

Ρυθμιστικό παράγοντα του pH των βιοαντιδραστήρων αποτελεί η αλκαλικότητα των υγρών χώνευσης. Τα υγρά χώνευσης κατά βάση είναι ένα διάλυμα ασθενών οξέων-βάσεων. Τα κύρια συστατικά του συστήματος των ασθενών οξέων βάσεων είναι το διττανθρακικό ιόν, το αμμωνιακό ιόν και τα πτητικά λιπαρά οξέα. Το διττανθρακικό ιόν λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας κρατώντας το pH σε εύρος τιμών κοντά στη βέλτιστη περιοχή λειτουργίας των βιοαντιδραστήρων. Τα πτητικά λιπαρά οξέα αντιδρούν με το διττανθρακικό ιόν μειώνοντας το pH. Το αμμωνιακό κατιόν, προστατεύει το διττανθρακικό ιόν αντιδρώντας με τα λιπαρά οξέα αφήνοντας το διττανθρακικό ιόν να λειτουργήσει ως ρυθμιστής υψηλού pH. Για την ευστάθεια της χώνευσης είναι απαραίτητη η ενίσχυση της ρυθμιστικής ικανότητας του διττανθρακικού ιόντος με την προσθήκη στοιχείων που θα κρατούν τα διτάνθρακα ιόντα σε επιθυμητά επίπεδα. Η πτώση του pH αποφεύγεται με τη διατήρηση της αλκαλικότητας του περιεχομένου του αντιδραστήρα σε υψηλά επίπεδα (Georgacakis et al., 1982; Μάρκου et al., 2011).

Η αλληλεπίδραση της ελεύθερης αμμωνίας των πτητικών λιπαρών οξέων και του pH μπορεί να οδηγήσει σε μια «παρεμποδισμένη σταθερή κατάσταση» (inhibited steady state), που σημαίνει ότι ενώ η αναερόβια διεργασία είναι σταθερή, η παραγωγή μεθανίου είναι μειωμένη και χαμηλότερη σε σύγκριση με τις βέλτιστες συνθήκες της αναερόβιας χώνευσης (Angelidaki and Ahring, 1993; Chen et al., 2008).

### 2.3.2 Θερμοκρασία

Η αναερόβια χώνευση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε τρεις θερμοκρασιακά εύρη (Gerardi, 2003):

- 1) **ψυχρόφιλη** (10-20 °C), 2) **μεσόφιλη** (20-40 °C) και 3) **θερμόφιλη** (40-60 °C)

Η ψυχρόφιλη χώνευση κατά βάση γίνεται σε συνθήκες περιβάλλοντος. Απαιτεί μεγάλους χρόνους παραμονής για την αποδόμηση της οργανικής ύλης και η παραγωγή μεθανίου είναι βραδύτερη, γεγονός που, για δεδομένη ποσότητα αποβλήτων, αυξάνει τον όγκο των βιοαντιδραστήρων και της όλης εγκατάστασης. Τα λειτουργικά έξοδα είναι

αισθητά χαμηλότερα σε σχέση με τη μεσόφιλη και θερμοφιλή και προσιδιάζει καλύτερα σε σύστημα λειτουργίας με μεγάλης-διάρκειας αποθήκευση αποβλήτων (Nohra et al., 2003).

Η μεσόφιλη και η θερμοφιλή χώνευση επιτυγχάνεται με την εισροή θερμότητας από εξωτερική πηγή. Στη μεσόφιλη περιοχή η βέλτιστη θερμοκρασία είναι οι 35-37 °C. Πτώση της θερμοκρασίας κάτω από τους 32 °C έχει σαν αποτέλεσμα την επιβράδυνση της δράσης των μεθανοβακτηρίων ενώ η δράση των οξεοπαραγωγών βακτηρίων δεν επηρεάζεται το ίδιο. Αυτό οδηγεί στη συγκέντρωση οξέων στον αντιδραστήρα ρίχνοντας το pH σε επίπεδα τέτοια που η όλη διαδικασία αποσταθεροποιείται. Γενικά πιο σταθερή χώνευση πραγματοποιείται στη μεσόφιλη περιοχή και γι' αυτό προτιμάται (Gerardi, 2003).

Στη θερμοφιλή χώνευση, η παραγωγή βιοαερίου γίνεται σε μικρούς χρόνους, αλλά απαιτεί μεγάλες ποσότητες ενέργειας για τη θέρμανση του βιοαντιδραστήρα. Επίσης, ένα άλλο μειονέκτημα στις θερμοκρασίες της περιοχής αυτής είναι ότι τα θερμοφιλικά βακτήρια τα οποία αναπτύσσονται είναι ευαίσθητα στις μεταβολές της θερμοκρασίας, πράγμα που σημαίνει πως με μικρές μεταβολές στη θερμοκρασία η όλη διαδικασία μπορεί να αποτύχει και να σταματήσει η παραγωγή βιοαερίου. Επίσης, στις θερμοκρασίες αυτές, μειώνεται η διαλυτότητα του CO<sub>2</sub> στο νερό, αυξάνοντας έτσι τη συγκέντρωση της ελεύθερης αμμωνίας η οποία είναι τοξική για τα μεθανοβακτήρια. Η θερμοκρασία στη θερμοφιλή περιοχή, όμως, δεν πρέπει να είναι κάτω των 50 °C γιατί θερμοκρασίες από 40-50 °C επιδρούν ανασταλτικά στα μεθανοβακτήρια. Συνεπώς η θερμοφιλή χώνευση είναι πιο σταθερή στους 50-60 °C με βέλτιστη θερμοκρασία αυτή των 55 °C (Angelidaki et al., 2003).

### 2.3.3 Οργανική Φόρτιση

Η οργανική φόρτιση είναι το ποσό της οργανικής ουσίας που προστίθεται ανά μονάδα όγκου και ανά μονάδα χρόνου [ $\text{kg (m}^3\cdot\text{d}^{-1})$ ] στο βιοαντιδραστήρα. Θεωρείται πολύ σημαντική παράμετρος γιατί καθορίζει το ρυθμό παραγωγής του βιοαερίου και τη σταθερότητα του συστήματος. Για κάθε είδος πρώτης, υπάρχει μια βέλτιστη τιμή οργανικής φόρτισης για την οποία προκύπτει ο μέγιστος ρυθμός παραγωγής βιοαερίου.



Αύξηση της οργανικής φόρτισης πάνω από το βέλτιστο σημείο μπορεί να οδηγήσει σε αστάθειες λόγω της συσσώρευσης παρεμποδιστικών παραγόντων (συνήθως πτητικών λιπαρών οξέων). Οι μέθοδοι που είναι διαθέσιμες αυτή τη στιγμή για τον προσδιορισμό της οργανικής φόρτισης είναι κυρίως η μέτρηση των πτητικών στερεών και του COD (Chemical Oxygen Demand) (Sánchez et al., 2005; Γεωργακάκης, 2011).

#### **2.3.4 Χρόνος Παραμονής**

Ο χρόνος παραμονής αναφέρεται στη διάρκεια παραμονής της πρώτης ύλης μέσα στο βιοαντιδραστήρα. Είναι στενά συνδεδεμένος με την οργανική φόρτιση. Είναι καθοριστικός παράγοντας γιατί από αυτόν εξαρτάται το ποσό της οργανικής ύλης που θα βιοαποδομηθεί και κατά επέκταση η ποσότητα του βιοαερίου που θα παραχθεί. Επίσης επηρεάζει τον όγκο του βιοαντιδραστήρα και την οικονομικότητά του. Μεγάλος χρόνος παραμονής έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερη βιοποδόμηση της οργανικής ύλης και τη μεγαλύτερη απόδοση βιοαερίου ανά μάζα πρώτης ύλης. Μεγάλος χρόνος παραμονής όμως σημαίνει και μεγάλος όγκος βιοαντιδραστήρα και άρα μεγαλύτερο κόστος εγκατάστασης. Μικρός χρόνος παραμονής, μειώνει μεν τον όγκο του αντιδραστήρα, αλλά έχει ως αποτέλεσμα αφενός τη χαμηλή απόδοση σε βιοαέριο και αφετέρου τη λειτουργική αστάθεια του αντιδραστήρα λόγω της ανεπαρκούς εγκλιμάτισης και ανάπτυξης των μεθανοβακτηρίων και τη συσσώρευση παρεμποδιστικών παραγόντων όπως τα πτητικά λιπαρά οξέα. Υπάρχουν διατάξεις βιοαντιδραστήρων που επιτρέπουν μεγαλύτερο χρόνο παραμονής των μικροβιακών στερεών σε σχέση με το χρόνο παραμονής των υγρών ή με την ανακύκλωση των εξερχόμενων στερεών, επιτρέποντας τη μείωση του χρόνου παραμονής για τα μεν υγρά και την ταυτόχρονη επαναχρησιμοποίηση ήδη εγκλιματισμένων μικροοργανισμών (Hill and Bolte, 2000; Schattauer, 2006).

#### **2.3.5 Λόγος Άνθρακα προς Άζωτο (C/N)**

Ο λόγος του άνθρακα προς το άζωτο είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την καλή λειτουργία του βιοαντιδραστήρα. Μεγάλος λόγος C/N οδηγεί στην ταχεία έλλειψη του αζώτου με αποτέλεσμα τη μείωση της πρωτεϊνικής σύνθεσης των μικροοργανισμών και

την κατ' επέκταση παρεμπόδιση της ανάπτυξής τους. Από την άλλη, μικρός λόγος C/N σημαίνει ότι οι αζωτούχες ουσίες είναι σε μεγάλη περιεκτικότητα στην πρώτη ύλη και μετά τη βιοαποδόμησή τους παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης της αμμωνίας που οδηγεί το pH σε τιμές πάνω από 8,5. Η βέλτιστη τιμή του λόγου C/N θεωρείται ότι είναι 20-30:1, αν και εξαρτάται από το είδος της πρώτης ύλης και το βαθμό βιοαποδομησιμότητας των συστατικών της (Deublein and Steinhauser, 2010· Angelidaki et al., 2003).

### 2.3.6 Θρεπτικά Συστατικά

Για την απρόσκοπτη ανάπτυξη των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης, θα πρέπει να παρέχονται μαζί με την πρώτη ύλη αρκετά θρεπτικά στοιχεία που να καλύπτουν τις μεταβολικές ανάγκες τους. Τα θρεπτικά στοιχεία κατατάσσονται σε 2 κατηγορίες. Τα μακροστοιχεία και τα ιχνοστοιχεία. Στα μακροστοιχεία ανήκουν το άζωτο και ο φώσφορος. Τα στοιχεία αυτά είναι διαθέσιμα στους μικροοργανισμούς, κυρίως υπό τη μορφή του αμμωνιακού αζώτου ( $NH_4^+ - N$ ) και του ορθοφωσφορικού φωσφόρου ( $HPO_4^- - P$ ). Η ποσότητα των θρεπτικών αυτών στοιχείων εξαρτάται από το οργανικό φορτίο της πρώτης ύλης και θα πρέπει να αντιστοιχεί στο βέλτιστο λόγο C/N. Γενικά, οι αναλογίες που θεωρούνται βέλτιστες είναι COD/N/P 1000:7:1 ή 350:5:1 και C:N:P:S 600:15:5:1. Τα αναγκαία μικροστοιχεία είναι το κοβάλτιο (Co) σε ποσοστό 0,01% του COD, σίδηρος (Fe) 0,2% του COD, νικέλιο (Ni) 0,001% του COD και θείο (S) 0,2 του COD (Kayhanian and Tchobanoglous, 2007· Schattauer and Weiland, 2006· Γεωργακάκης 2011).

### 2.3.7 Πτητικά λιπαρά οξέα

Η συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων, τα οποία είναι ενδιάμεσα προϊόντα για τη μετατροπή της οργανικής ουσίας σε  $CH_4$  και  $CO_2$ , (οξικό, προπιονικό, βουτυρικό, βαλερικό, ισοβαλερικό κ.α.), είναι σημαντική γιατί δείχνει άμεσα τη δραστηριότητα συγκεκριμένων βακτηριακών ομάδων και ειδικότερα εκείνων που είναι υπεύθυνες για

την υδρόλυση των οργανικών ουσιών. Επίσης η συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων δείχνει την αναμενόμενη παρεμπόδιση από τη συσσώρευση συγκεκριμένων οξέων στο βιοαντιδραστήρα. Από τα πτητικά λιπαρά οξέα ενδιαφέρον έχουν κυρίως το οξικό και το προπιονικό οξύ γιατί το άθροισμά τους αποτελεί τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, περίπου 85% του συνόλου των οργανικών οξέων. Η μέτρησή τους μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης για την πρόβλεψη παρεμποδίσεων της αναερόβιας χώνευσης. Ως κανόνας μπορεί να λεχθεί ότι αναμένεται παρεμπόδιση της αναερόβιας διεργασίας όταν η συγκέντρωση του οξικού και προπιονικού οξέος ξεπεράσει τα 1.000 mg/l. Ως δείκτες πρόβλεψης μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι συγκεντρώσεις του βουτυρικού και του βαλερικού οξέος. Η επιθυμητή συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων στον αντιδραστήρα κυμαίνεται μεταξύ 50 – 250 mg/l (Ahring et al., 1995; Angelidaki et al., 2011; Weiland, 2008).

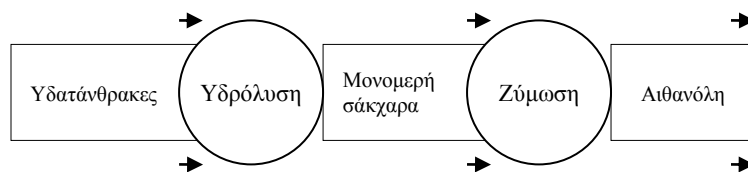
### **2.3.8 Άλλοι παράγοντες**

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την αναερόβια επεξεργασία είναι (Deublein and Steinhauser, 2010): 1) η μερική πίεση υδρογόνου 2) η συγκέντρωση των μικροοργανισμών 3) το είδος της πρώτης ύλης 4) η ειδική επιφάνεια των τεμαχιδίων της πρώτης ύλης 5) ο βαθμός βιοαποδόμησης 6) η ανάδευση της πρώτης ύλης 7) το φως 8) το αξειδοαναγωγικό δυναμικό 9) τα ιχνοστοιχεία 10) η απομάκρυνση του παραγόμενου βιοαερίου 11) διάφοροι παρεμποδιστές όπως οξυγόνο, βαριά μέταλλα, θειούχες ουσίες, νιτρικά, ταννίνες κ.α.

### 3 Αναερόβια ζύμωση

#### 3.1 Γενικά για την αναερόβια ζύμωση

Η αναερόβια ζύμωση είναι μια βιολογική διεργασία κατά την οποία διάφοροι μικροοργανισμοί ζυμώνουν οργανικές ουσίες (κυρίως σάκχαρα) και παράγουν ορισμένα προϊόντα όπως αλκοόλες, οργανικά οξέα κλπ. Για την παραγωγή βιοκαυσίμων τα προϊόντα που έχουν ενδιαφέρον είναι οι αλκοόλες και ως εκ τούτου η έρευνα εστιάζεται στη διεργασία της αλκοολικής ζύμωσης. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.1** τα βασικά στάδια της διεργασίας της ζύμωσης είναι: 1) προεπεξεργασία ή/και υδρόλυση των υδατανθράκων για την απολαβή απλών ζυμώσιμων σακχάρων, 2) ζύμωση των σακχάρων και 3) παραγωγή αιθανόλης.



**Εικόνα 3.1** Κύρια στάδια παραγωγής βιοαιθανόλης

Ως πρώτη ύλη για τη ζύμωση μπορούν να χρησιμοποιηθούν υλικά τα οποία με τον ένα ή τον άλλο τρόπο περιέχουν σάκχαρα, είτε σε απλή μορφή (απλά σάκχαρα) είτε ως πολυμερή (άμυλο, κυτταρίνη, γλυκογόνο κλπ). Η πρώτη γενιά πρώτης ύλης για την παραγωγή αλκοολών είναι τα σακχαρούχα (πχ σακχαροκάλαμα, γλυκό σόργο κλπ) και αμυλούχα (πχ δημητριακά) φυτά τα οποία περιέχουν είτε απλά σάκχαρα είτε άμυλο (το οποίο μπορεί σχετικά εύκολα να υδρολυθεί σε απλά σάκχαρα) στη βιομάζα τους. Η πρώτη γενιά πρώτης ύλης είναι αυτή που πρακτικά χρησιμοποιείται αυτήν τη στιγμή (Βραζιλία, ΗΠΑ κλπ) για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Η δεύτερη γενιά πρώτης ύλης είναι τα λιγνοκυτταρινούχα φυτά (switchgrass, πολυετή δενδρώδη είδη κλπ) και υλικά, τα οποία όμως μέχρι στιγμής δεν έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη κλίμακα και η δυνατότητα εφαρμογής τους βρίσκεται ακόμα σε ερευνητικό στάδιο προσπαθώντας να ξεπεραστούν σημαντικά πρακτικά προβλήματα με κυριότερο αυτό της υδρόλυσης της κυτταρίνης. Και οι δύο αυτές γενιές πρώτης ύλης δέχτηκαν αυστηρή κριτική από τη

σκοπία της διάθεσης πολύτιμων καλλιεργήσιμων εκτάσεων για την παραγωγή βιοκαυσίμων που δημιουργεί σοβαρά προβλήματα και ανταγωνίζεται ισχυρά τον τομέα της παραγωγής τροφίμων (Cardona and Sánchez, 2007; Demirbas, 2008; Lima and Natalense, 2012). Στη δεύτερη γενιά πρώτης ύλης συμπεριλήφθηκαν και τα υπολείμματα των καλλιεργειών (στελέχη, καλάμια σιτηρών κλπ) που θεωρείται ότι δεν ανταγωνίζεται άμεσα την παραγωγή τροφίμων (Chen et al., 2007), αλλά έχει αναφερθεί ότι η απομάκρυνσή τους από τους αγρούς δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στη δομή και τη γονιμότητα του εδάφους (Blanco-Canqui and Lal, 2007). Για τους παραπάνω λόγους τα μικροφύκη θεωρούνται ότι θα αποτελέσουν μια νέα γενιά πρώτης ύλης προσπερνώντας προβλήματα όπως η δέσμευση καλλιεργήσιμων εκτάσεων για παραγωγή βιομάζας για ενεργειακούς σκοπούς, ή τη διατάραξη του εδαφικού ισοζυγίου με την απομάκρυνση των υπολειμμάτων της βιομάζας. Έχει υπολογιστεί ότι τα μικροφύκη μπορούν να αποδώσουν βιοαιθανόλη από 45000 μέχρι και 145000 λίτρα ανά εκτάριο που είναι 4 ως 14 φορές μεγαλύτερη από αυτή που αποδίδει το πιο αποδοτικό ενεργειακό επίγειο φυτό (το switchgrass) (Mussatto et al., 2010).

### 3.2 Υδρόλυση υδατανθράκων

Ως υδρόλυση νοείται η διάσπαση των μεγαλομορίων των υδατανθράκων με τη διάρρηξη των χημικών δεσμών μεταξύ των αλυσίδων τους και η απολαβή μονομερών σακχάρων. Για να επιτευχθεί η υδρόλυση έχουν δοκιμαστεί και αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι. Ανάλογα με την πρώτη ύλη η υδρόλυση μπορεί να γίνει απευθείας με κάποια μέθοδο ή να χρειαστεί να διαμεσολαβήσει κάποιο στάδιο προεπεξεργασίας. Ένα τέτοιο στάδιο προεπεξεργασίας είναι απαραίτητο όταν η πρώτη ύλη ανθίσταται στη δράση των υδρολυτικών παραγόντων. Τέτοιος τύπος πρώτης ύλης είναι συνήθως υλικά που περιέχουν λιγνίνη και ημι-κυτταρίνη, δηλαδή η δεύτερης γενιάς πρώτη ύλη ή υλικά των οποίων οι υπό υδρόλυση υδατάνθρακες πρέπει να απελευθερωθούν για παράδειγμα η κυτταρόλυση των μικροφυκών για την απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών υδατανθράκων. Συνήθως οι μέθοδοι προεπεξεργασίας εφαρμόζονται όταν η υδρόλυση γίνεται με ενζυματικούς παράγοντες (βλέπε παρακάτω) και έχουν ως κύριο στόχο να

εκθέσουν τους υδατάνθρακες στα υδρολυτικά ένζυμα (Harun and Danquah, 2011a; Mielenz, 2001).

### **3.2.1 Μέθοδοι προεπεξεργασίας**

Οι βασικότεροι στόχοι της προεπεξεργασίας της πρώτης ύλης έτσι ώστε να προετοιμαστεί για το στάδιο της υδρόλυσης είναι (Sun and Cheng, 2002): (1) βελτίωση της απολαβής σακχάρων κατά την υδρόλυση (2) αποφυγή απώλειας σακχάρων λόγω αποδόμησής τους (3) αποφυγή παραγωγής παραπροϊόντων που μπορούν να δράσουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη των ζυμομυκήτων και (4) να είναι οικονομική.

Οι κυριότερες μέθοδοι για την προεπεξεργασία της πρώτης ύλης περιλαμβάνουν χημικές, φυσικές και φυσικο-χημικές διεργασίες. Η προεπεξεργασία δρα στη δομή της βιομάζας και διαλυτοποιεί την ημι-κυτταρίνη, μειώνει την κρυσταλικότητα του υλικού και αυξάνει την ενεργό επιφάνειά του (Mosier et al., 2005).

#### **3.2.1.1 Χημικές μέθοδοι προεπεξεργασίας**

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη χημική προεπεξεργασία είναι αυτή με τη χρήση διάφορων οξέων ως παράγοντας επεξεργασίας. Ο κυριότερος στόχος της όξινης προεπεξεργασίας είναι η διαλυτοποίηση της ημι-κυτταρίνης για να καταστεί η κυτταρίνη πιο εκτεθειμένη στη δράση των ενζύμων. Η όξινη προεπεξεργασία μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τη χρήση πυκνών ή αραιών οξέων. Η χρήση πυκνών οξέων δεν είναι βέβαια ελκυστική γιατί παράγονται παρεμποδιστικοί παράγοντες που μειώνουν την απόδοση σε βιοαιθανόλη. Η όξινη προεπεξεργασία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε υψηλές θερμοκρασίες (> 160 °C) για χαμηλής αναλογίας πρώτης ύλης προς αντιδραστήριο σε συνεχή διεργασία και σε χαμηλότερες (< 160 °C) για μεγαλύτερη αναλογία πρώτης ύλης προς αντιδραστήριο σε ασυνεχή διεργασία (Kumar et al., 2009).

Η αλκαλική προεπεξεργασία αυξάνει την αποδόμηση της κυτταρίνης και είναι πολύ πιο αποδοτική στη διαλυτοποίηση της λιγνίνης σε σχέση με τη θερμική προεπεξεργασία ή με τη χρήση οξέων. Η προεπεξεργασία με βάσεις γίνεται συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου και σε γενικές γραμμές δεν παρουσιάζει απώλεια σε σάκχαρα λόγω αποδόμησης. Κατάλληλες βάσεις για την προεπεξεργασία είναι τα υδροξείδια του

νατρίου, καλίου ασβεστίου και αμμωνίου. Το υδροξείδιο του νατρίου αυξάνει την εσωτερική επιφάνεια και μειώνει το βαθμό πολυμερισμού και την κρυσταλικότητα της κυτταρίνης τα οποία προκαλούν τη διάρρηξη της δομής της λιγνίνης. Το υδροξείδιο του ασβεστίου θεωρείται ότι έχει μικρότερο κόστος και απαιτούνται λιγότερα μέτρα ασφαλείας σε σχέση με τα άλλα χημικά αντιδραστήρια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παρόμοιο σκοπό και επίσης μπορεί να γίνει ανάκτηση με τη δράση του διοξειδίου του άνθρακα (Alvira et al., 2010; Mosier et al., 2005).

Άλλες χημικές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί με ή χωρίς ικανοποιητικά αποτελέσματα είναι 1) η οζονόλυση με τη χρήση όζοντος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, 2) η υγρή οξείδωση με την παροχή ατμοσφαιρικού οξυγόνου κάτω από υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες 3) χρήση οξειδωτικών αντιδραστηρίων (πχ υπεροξειδίου, υπεροξικού οξέος κλπ) 4) η χρήση οργανικών διαλυτών (organosolv) και 5) ιονικών ρευστών (ionic liquids) (Alvira et al., 2010; Mosier et al., 2005; Sun and Cheng, 2002).

### 3.2.1.2 Φυσικές και φυσικο-χημικές μέθοδοι προεπεξεργασίας

Οι φυσικές μέθοδοι προεπεξεργασίας περιλαμβάνουν κατά κύριο λόγο τη μείωση των διαστάσεων της πρώτης ύλης. Η μείωση των διαστάσεων έχει ως στόχο την αύξηση της ενεργής επιφάνειας για τη δράση των υδρολυτικών ενζύμων. Η μείωση των διαστάσεων επιτυγχάνεται είτε μέσω άλεσης είτε μέσω τεμαχισμού. Οι επιθυμητές διαστάσεις των τεμαχιδίων εξαρτώνται από το είδος της πρώτης ύλης. Η προεπεξεργασία αυτή έχει μεγάλο κόστος γιατί είναι ενεργειακόβαρα αλλά εξαρτάται από το μέγεθος των τεμαχιδίων (Kumar et al., 2009; Talebnia et al., 2010).

Στις φυσικο-χημικές μεθόδους συμπεριλαμβάνονται οι: 1) εκτόνωση υδρατμών (steam explosion) η οποία είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος. Η πρώτη ύλη εκτίθεται σε υπό πίεση ατμό για μερικά δευτερόλεπτα ως μερικά λεπτά όπου στη συνέχεια εκτονώνεται. Κατά τη μέθοδο αυτή οι υδατάνθρακες υδρολύονται λόγω της παραγωγής οξικού οξέως από τις ακετυλο-ομάδες της βιομάζας. Το νερό σε αυτές τις υψηλές θερμοκρασίες δρα και το ίδιο ως οξύ. Το κυριότερο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι παράγονται παρεμποδιστικοί παράγοντες με αρνητικές επιπτώσεις στη

διεργασία της ζύμωσης 2) Υγρό θερμό νερό. Σε αυτή τη μέθοδο δεν χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν χημικά αντιδραστήρια. Εφαρμόζεται κάποια πίεση για να μπορέσει να παραμείνει το θερμό νερό σε υγρή μορφή. Το νερό θερμαίνεται σε θερμοκρασία 160-240 °C και με αυτόν τον τρόπο προκαλείται αλλαγή στη δομή της ημι-κυτταρίνης και εκθέτει την κυτταρίνη στη δράση των ενζύμων 3) Εκτόνωση αερίων όπως αμμωνίας (Ammonia fiber explosion) και διοξειδίου του άνθρακα. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται υγροποιημένα αέρια κάτω από πίεση τα οποία εκτονώνονται μετά από αποσυμπίεση και αεριοποιούνται. Καθώς αεριοποιούνται προκαλούν φυσική διάρρηξη της δομής της βιομάζας. Στη μια περίπτωση χρησιμοποιείται υγρή άνυδρη αμμωνία η οποία θερμαίνεται στους 60-100 °C υπό πίεση και στην άλλη περίπτωση χρησιμοποιείται υγρό διοξείδιο του άνθρακα. Το διοξείδιο του άνθρακα θεωρείται καλύτερη μέθοδος με χαμηλότερο κόστος εφαρμογής σε σχέση με την αμμωνία 4) Χρήση μικροκυμάτων. Σε αυτή τη μέθοδο η βιομάζα αραιώνεται με διάφορα χημικά αντιδραστήρια και εκτίθεται στην ακτινοβολία μικροκυμάτων για 5 ως και 20 λεπτά. Η χρήση βάσεων μάλλον δίνει καλύτερα αποτελέσματα με το υδροξείδιο του νατρίου να είναι το πιο δραστικό 5) Χρήση υπερήχων. Η μέθοδος αυτή δεν έχει διερευνηθεί αρκετά, παρόλα αυτά έχει αναφερθεί ότι έχει αρκετά καλά αποτελέσματα (Alvira et al., 2010; Galbe and Zacchi, 2007; Hendriks and Zeeman, 2009; Kristensen et al., 2008; Mosier et al., 2005).

### 3.2.2 Μέθοδοι υδρόλυσης υδατανθράκων

Για την υδρόλυση των υδατανθράκων μέχρι στιγμής υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι, η υδρόλυση με οξέα και η υδρόλυση με ένζυμα. Οι παράμετροι για τη βέλτιστη υδρόλυση καθορίζονται από τον τύπο της πρώτης ύλης. Παρόλα αυτά, έχουν προταθεί και η χρήση αλκαλικών αντιδραστηρίων όπως και η χρήση βιολογικών συστημάτων με χρήση μυκήτων όπως οι *Phaenerochate chrysosporium*, *Cyathus stercoreus*, *Cythus bulleri*, *Rycnoporouus cinnabarinus* κ.α.), αλλά θεωρείται ότι έχουν μεγάλες απώλειες σε σάκχαρα και έτσι η απόδοσή τους δεν είναι ικανοποιητική (Chandel et al., 2007).



### 3.2.2.1 Χημικές μέθοδοι υδρόλυσης

Η χημική υδρόλυση των υδατανθράκων γίνεται κατά κύριο λόγο με τη χρήση οξέων όπως υδροχλωρικό οξύ, νιτρικό οξύ, φωσφορικό οξύ, θειικό οξύ κλπ. Η υδρόλυση με οξέα πλεονεκτεί σε σχέση με την ενζυμική όσον αφορά στην απλότητα της μεθόδου και το ρυθμό της διεργασίας. Τα κυριότερα μειονεκτήματα όμως αυτής της μεθόδου είναι ότι η εγκατάσταση χρειάζεται να είναι ανθεκτική στη διαβρωτική δράση των οξέων και η παραγωγή παρεμποδιστικών παραγόντων που δημιουργούν προβλήματα κατά το στάδιο της ζύμωσης των υδρολυμένων σακχάρων.

Κατά βάση υπάρχουν δύο κύριοι τύποι υδρόλυσης με οξέα: 1) υδρόλυση με αραιά οξέα και 2) υδρόλυση με πυκνά οξέα. Η υδρόλυση με αραιά οξέα πραγματοποιείται σε σημαντικά μεγαλύτερες θερμοκρασίες, οι οποίες κυμαίνονται από 120 ως 220 °C για σχετικά μικρό χρονικό διάστημα. Το μειονέκτημα της υδρόλυσης με αραιά οξέα είναι ότι λόγω των υψηλών θερμοκρασιών μέρος των σακχάρων αποδομείται παράγοντας παρεμποδιστικούς παράγοντες (όπως φουράνες, ασθενή οξέα και φαινολικά στοιχεία). Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών έχουν αναπτυχθεί μεθοδολογίες δύο φάσεων όπου σε κάθε φάση οι συνθήκες είναι τέτοιες ώστε να ελαχιστοποιείται η αποδόμηση των σακχάρων. Για τη μείωση της επίδρασης των παρεμποδιστικών παραγόντων έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι απομάκρυνσής τους όπως χημικές και βιολογικές. Παρόλα αυτά το κόστος απομάκρυνσης των παρεμποδιστικών παραγόντων είναι πολύ μεγάλο (Chandel et al., 2007; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000).

Η υδρόλυση με πυκνά οξέα πραγματοποιείται σε σημαντικά χαμηλότερες θερμοκρασίες (40 ως 50° C) σε σχέση με την υδρόλυση με αραιά οξέα. Ο χρόνος αντίδρασης είναι περίπου 2 με 4 ώρες. Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι τα σάκχαρα σε αυτές τις χαμηλές θερμοκρασίες δεν αποδομούνται και η απόδοση σε σάκχαρα είναι υψηλή, με σχεδόν πλήρη μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη και της ημικητταρίνης σε ξυλόζη. Η χρήση πυκνών οξέων όμως έχει ιδιαίτερα σημαντικά μειονεκτήματα με τα κυριότερα να είναι ότι προκαλούν πολύ σοβαρά προβλήματα διάβρωσης στα υλικά των συστημάτων και ότι θα πρέπει να γίνει ανάκτηση των οξέων για να είναι δυνατή η ζύμωση, γεγονός που αυξάνει πάρα πολύ το κόστος παραγωγής της βιοαιθανόλης (Chandel et al., 2007; Galbe and Zacchi, 2002).

### 3.2.2.2 Ενζυμικές μέθοδοι υδρόλυσης

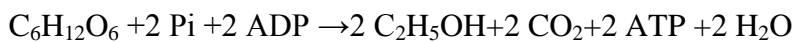
Στην ενζυμική υδρόλυση χρησιμοποιούνται διάφορα ένζυμα που λύνουν τους δεσμούς των πολυμερών υδατανθράκων και παράγουν απλά σάκχαρα (συμπεριλαμβανομένης και της γλυκόζης). Τα ένζυμα είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένα και λύνουν πολύ συγκεκριμένους χημικούς δεσμούς των πολυμερών. Διαφορετικά ένζυμα πρέπει να χρησιμοποιηθούν για τη λύση των δεσμών της κυτταρίνης, διαφορετικά για του αμύλου ή του γλυκογόνου. Για την υδρόλυση της κυτταρίνης το ένζυμο που λύνει τους δεσμούς είναι διάφορες κυτταρινάσες. Οι κυτταρινάσες παράγονται είτε από βακτήρια είτε από μύκητες. Ενδεικτικά κάποια βακτήρια που παράγουν κυτταρινάσες ανήκουν στα παρακάτω γένη: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* και *Streptomyces* ενώ οι μύκητες ανήκουν στα γένη: *Sclerotium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* και *Penicillium*. Επειδή τα βακτήρια παρόλο που παράγουν ένζυμα με υψηλής ειδικής δραστηριότητας δεν χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα γιατί η συγκέντρωση των ενζύμων που παράγουν είναι μικρή και επειδή ως αναερόβιοι μικροοργανισμοί έχουν χαμηλούς ρυθμούς ανάπτυξης. Έτσι η μεγαλύτερη προσοχή έχει δοθεί στους μύκητες, από τους οποίους οι μύκητες του γένους *Trichoderma* θεωρούνται οι πιο δραστήριοι. Αυτοί παράγουν μίγμα κυτταρινασών το οποίο μείγμα έχει καλύτερα υδρολυτικά αποτελέσματα σε σχέση με κάθε κυτταρινάση μόνη της, λόγω συνεργιστικής δράσης (Chandel et al., 2007; Galbe and Zacchi, 2002; Lin and Tanaka, 2006; Sun and Cheng, 2002).

Η ενζυμική υδρόλυση έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους με την κυριότερη ότι, επειδή η διεργασία λαμβάνει χώρο κάτω από ήπιες συνθήκες (θερμοκρασίας, pH, πίεσης κλπ), ο χρησιμοποιούμενος εξοπλισμός είναι πολύ απλός γιατί δεν υπάρχουν ζητήματα διάβρωσης ή αντοχής των υλικών κατασκευής. Η βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση των ενζύμων είναι περίπου οι 50 °C και βέλτιστο pH περίπου 5.0. Το κυριότερο όμως μειονέκτημα της ενζυμικής υδρόλυσης είναι ο αργός ρυθμός της διεργασίας (Galbe and Zacchi, 2002; Sun and Cheng, 2002).

### 3.3 Αλκοολική ζύμωση

Υπάρχουν αρκετοί μικροοργανισμοί, είτε βακτήρια είτε ζυμομύκητες οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω της αλκοολικής ζύμωσης. Είδη ζύμης που ερευνώνται για την αλκοολική ζύμωση είναι οι *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. pastorianus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia stipites*, *Kluyveromyces lactis* και *K. marxianus* ενώ τα βακτήρια που ερευνώνται είναι *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *B. Stearothrermophilus*, *Klebsiella oxytoca*, *Erwinia chrysanthemi*, *Clostridium sporogenes*, *C. indolis*, *Leuconostoc mesenterioids* και *Streptococcus lactis*. Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος μύκητας για τη βιομηχανική ζύμωση και την παραγωγή αλκοολών. Τα κυριότερα πλεονεκτήματά του που τον καθιστούν έναν από τους κυριότερους μικροοργανισμούς για την παραγωγή αλκοολών μέσω ζύμωσης είναι: 1) είναι γενικά ασφαλής μικροοργανισμός (κατηγορία GRAS – generally regarded as safe), 2) αντέχει σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, 3) αναπτύσσεται αναερόβια και 4) έχει υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης. Ο *S. cerevisiae* μπορεί και ζυμώνει τα εξής σάκχαρα: γλυκόζη, φρουκτόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, σουκρόζη, μαλτόζη και μαλτοτριόζη. Η παραγωγή αιθανόλης από το ζυμομύκητα αυτό επιτυγχάνεται μέσω της γλυκολυτικής μεταβολικής οδού (ή αλλιώς οδός Embden-Myerhof-Parnas) (**Εικόνα 3.2**) (Drapcho et al., 2008; Guimarães et al., 2010; Kruckeberg and Dickinson, 2004; Lee, 2007).

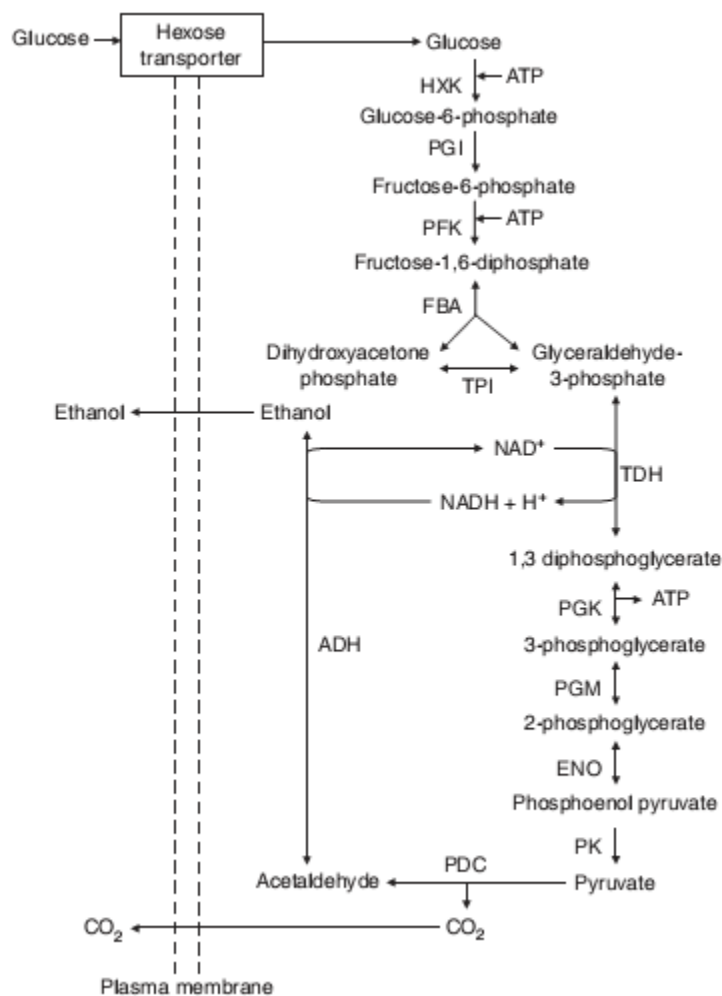
Η παραγωγή αιθανόλης εκφράζεται από την παρακάτω σχέση:



Γλυκόζη + ανόργανος φώσφορος  $\rightarrow$  αιθανόλη + διοξείδιο του άνθρακα + χημική ενέργεια (92,3 kJ mol<sup>-1</sup>)

Από την παραπάνω σχέση υπολογίζεται ότι η θεωρητική παραγωγή αιθανόλης από γλυκόζη είναι 0,511 g αιθανόλης από κάθε g γλυκόζης. Αυτή η απόδοση βέβαια ποτέ δεν μπορεί να επιτευχθεί στην πράξη γιατί ένα κομμάτι της καταναλισκόμενης γλυκόζης προορίζεται για την παραγωγή βιομάζας, για ανάγκες συντήρησης και για την παραγωγή άλλων παραπροϊόντων όπως οργανικών οξέων, γλυκερόλης κλπ. Κάτω από βέλτιστες

συνθήκες η απόδοση σε αιθανόλη μπορεί να προσεγγίσει το 90-95% (Drapcho et al., 2008; Kruckeberg and Dickinson, 2004; Lee, 2007).



**Εικόνα 3.2** Μεταβολική οδός γλυκόλυσης της γλυκόζης και παραγωγής αιθανόλης

Πηγή: (Drapcho et al., 2008)

### 3.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την αναερόβια ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση ως βιολογική διεργασία επηρεάζεται καθοριστικά από διάφορους παράγοντες, από τους οποίους οι κυριότεροι είναι η θερμοκρασία ζύμωσης, συγκέντρωση αλκοόλης, pH, οσμωτική πίεση και επιμολύνσεις από βακτήρια. Η καταπόνηση που προκαλείται από ακραίες τιμές των διαφόρων παραγόντων προκαλεί μείωση του ρυθμού της ζύμωσης και ως εκ τούτου της μείωσης του ρυθμού παραγωγής βιοαιθανόλης. Πολλές φορές η καταπόνηση είναι συνεργιστική και αθροιστική, δηλαδή

σειρά από χαμηλής έντασης καταπονήσεις στην πραγματικότητα ισούνται με μια υψηλότερης έντασης καταπόνηση. Για παράδειγμα οι ζυμομύκητες έχουν χαμηλότερη ανθεκτικότητα στη συγκέντρωση αιθανόλης σε μεγάλες θερμοκρασίες ή χαμηλότερη ανθεκτικότητα στη συγκέντρωση στα οργανικά οξέα σε χαμηλά επίπεδα pH. Ο βαθμός επίδρασης των διαφόρων παραγόντων εξαρτάται από το στέλεχος του ζυμομύκητα και ως εκ τούτου η επιλογή του κατάλληλου στελέχους είναι ουσιαστικής σημασίας (Kasavi et al., 2012; Nichols et al., 2006).

### **3.4.1 Θερμοκρασία**

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικότερους περιβαλλοντικούς παράγοντες που έχουν καθοριστική επίδραση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae* έχει βέλτιστη θερμοκρασία στους 30 °C αλλά μπορεί να αναπτυχθεί και σε υψηλότερες θερμοκρασίες μέχρι τη μέγιστη θερμοκρασία των 45 °C. Υπάρχει σχεδόν γραμμική αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης του ζυμομύκητα με τη θερμοκρασία (διπλασιασμός ρυθμού ανά 10 °C, από τους 10 ως τους 32°C) αλλά υψηλές θερμοκρασίες δεν σημαίνει ότι είναι και γενικά ευνοϊκές γιατί η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση της αρνητικής επίδρασης της συγκέντρωσης της αιθανόλης στην ανάπτυξη της ζύμης. Σε υψηλές θερμοκρασίες μεταβάλλεται η σύσταση των λιπιδίων στις κυτταρικές μεμβράνες και γενικά παρατηρείται αύξηση της ρευστότητας των λιπιδίων των μεμβρανών. Στην αντίθετη περίπτωση όπου η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη από τη βέλτιστη η μείωση της ανάπτυξης οφείλετε στην επιβράδυνση των διαφόρων ενζύμων που εμπλέκονται στις βιοχημικές διεργασίες ανάπτυξης του ζυμομύκητα (Aldiguier et al., 2004; Aranda et al., 2011; Mehdikhani et al., 2011).

### **3.4.2 Συγκέντρωση αιθανόλης**

Η συγκέντρωση της αιθανόλης στο υπόστρωμα ανάπτυξης είναι ένα από τα κυριότερα ζητήματα, γιατί το επίπεδο της συγκέντρωσης της αιθανόλης καθορίζει και την οικονομικότητα της ζύμωσης. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αιθανόλης αντιστοιχούν σε χαμηλότερη ενέργεια για την απόσταξη και την παραλαβή της αιθανόλης. Υψηλές

συγκεντρώσεις αιθανόλης όμως έχουν αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη του ζυμομύκητα. Οι υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης προκαλούν δομικές αλλαγές στις κυτταρικές μεμβράνες του *S. cerevisiae* και αυξάνει τις ενεργειακές απαιτήσεις για τη διατήρηση του ενδοκυτταρικού pH σε επιθυμητά επίπεδα. Είναι εφικτή η αύξηση της ανθεκτικότητας στη συγκέντρωση της αιθανόλης χρησιμοποιώντας διάφορες στρατηγικές, όπως για παράδειγμα σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης για να μπορέσει η ζύμη να εγκλιματιστεί. Ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae* είναι από τους πιο ανθεκτικούς αιθανολογόνους μικροοργανισμούς στη συγκέντρωση αιθανόλης και μπορεί να αντέξει μέχρι και 18-20% (v/v) (Devantier et al., 2005; Dinh et al., 2008; Lin and Tanaka, 2006; Piper, 1995; Zacchi and Axelsson, 1989).

### 3.4.3 pH

Ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae* αναπτύσσεται σε αρκετά μεγάλο εύρος pH αλλά το βέλτιστο εύρος είναι 4,0-5,0. Σε μικρότερες ή μεγαλύτερες τιμές από 4,0-5,0 ο ρυθμός ανάπτυξης και παραγωγής αιθανόλης μειώνονται σημαντικά. Φαίνεται ότι η αλλαγή του pH μεταβάλλει τη σύσταση της βιομάζας του ζυμομύκητα και επηρεάζει τη στρατηγική επιλογής της μεταβολικής οδού που θα ακολουθήσει ο μικροοργανισμός. Σε pH μεγαλύτερο από 5,0 ο ζυμομύκητας καταναλώνει γλυκόζη και αυξάνει την παραγωγή παρα-προϊόντων με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής και της απόδοσης αιθανόλης (Lin et al., 2012).

### 3.4.4 Οσμωτική πίεση

Η συγκέντρωση των διαφόρων στοιχείων του υποστρώματος επηρεάζει την αλκοολική ζύμωση επιδρώντας πάνω στο ισοζύγιο της οσμωτικής πίεσης μεταξύ κυττάρου και υποστρώματος. Αυξημένη οσμωτική πίεση έχει ως αποτέλεσμα τη συρρίκνωση του κυττάρου λόγω απώλειας ενδοκυτταρικών υγρών, ενώ στην αντίθετη περίπτωση υποτονικά υποστρώματα έχουν ως αποτέλεσμα τη διάρρηξη του κυττάρου λόγω της εισροής υγρών εντός του κυττάρου. Για την αντιμετώπιση αυξημένης οσμωτικής πίεσης ο ζυμομύκητας παράγει ενδοκυτταρικά ορισμένα προϊόντα όπως γλυκερόλη, τρεχαλόζη

κλπ. Η συνήθης συγκέντρωση σακχάρων που χρησιμοποιείται είναι 200-240 g l<sup>-1</sup> (Banat et al., 1998; Mager and Siderius, 2002).

#### **3.4.5 Επιμολύνσεις από βακτήρια**

Λόγω της παρουσίας αυξημένου οργανικού φορτίου στα υποστρώματα ζύμωσης υπάρχει μεγάλος κίνδυνος από επιμολύνσεις από διάφορους άλλους μικροοργανισμούς με κυριότερους διάφορα βακτήρια. Για το λόγο αυτό στην πράξη γίνεται αποστείρωση των υποστρωμάτων και οι ζυμώσεις πραγματοποιούνται κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Για την παραγωγή όμως βιοαιθανόλης για την παραγωγή βιοκαυσίμων, κάτι τέτοιο επιβαρύνει πάρα πολύ την οικονομικότητα του εγχειρήματος. Έτσι, για την παραγωγή βιοαιθανόλης ως βιοκαύσιμο επιζητούνται λύσεις απλούστερης λειτουργίας, όπως η ζύμωση σε ανοιχτά συστήματα χωρίς ασηπτικές συνθήκες. Κατά τη ζύμωση καθώς απελευθερώνεται διοξείδιο του άνθρακα η τάση του pH των υγρών ζύμωσης είναι να μειώνεται και συνήθως η ζύμωση σταματά αρκετά κάτω από pH 4,0. Με αυτόν τον τρόπο ο μη έλεγχος του pH της ζύμωσης και η ζύμωση σε pH κοντά ή κάτω από το 4,0 δημιουργεί μια φυσική ασπίδα, λόγω του ότι η πλειοψηφία των επιμολυντικών βακτηρίων δεν αναπτύσσονται σε τόσο χαμηλό pH (Nichols et al., 2006).

## **Πειραματικό μέρος**

---



# 1

**Επίδραση της έντασης του φωτός και της συγκέντρωσης του φωσφόρου στη σύσταση της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. Platensis***

## 1 Επίδραση της έντασης του φωτός και της συγκέντρωσης του φωσφόρου στη σύσταση της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis*

### Περίληψη

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης φωσφόρου (10, 50, 250 και 500 mg I<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) σε συνδυασμό με την ένταση του φωτισμού (24, 42 και 60 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) στην παραγωγή και τη σύσταση της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *Arthrospira platensis*. Η μέγιστη παραγωγή (συγκέντρωση) βιομάζας που παρατηρήθηκε ήταν 3592 ± 392 mg I<sup>-1</sup> στις καλλιέργειες με συγκέντρωση K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 250 mg I<sup>-1</sup> και ένταση φωτισμού 60 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> μετά από 32 μέρες καλλιέργειας. Ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης ήταν (μ<sub>max</sub>) 0,55 d<sup>-1</sup> και παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με 500 mg I<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> στα 60 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, λιπίδια και χλωροφύλλη κυμάνθηκε από 33,59% ως 60,57%, 10,68% ως 26,66% και 0,78% ως 2,00%, αντίστοιχα. Το πιο σημαντικό εύρημα ήταν ότι η τροφοπενία φωσφόρου (στη συγκέντρωση 10 mg I<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) προκάλεσε τη δραστική αύξηση της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες (59,64%). Επίσης η επίδραση της τροφοπενίας φωσφόρου στην περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες ήταν ανεξάρτητη της έντασης του φωτισμού. Οι συσσωρευμένοι υδατάνθρακες συνιστάται να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων μέσω κατάλληλης τεχνολογίας μετατροπής της βιομάζας σε βιοενέργεια. Τέλος, η απομάκρυνση του φωσφόρου από το υπόστρωμα ανάπτυξης είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης του φωσφόρου, της συγκέντρωσης της βιομάζας και της έντασης του φωτισμού.

### 1.1 Εισαγωγή

Το κυανοβακτήριο *Arthrospira (Spirulina) platensis* είναι ένας μικροοργανισμός με πολύτιμη βιομάζα. Περιέχει υψηλής αξίας συστατικά όπως χρωστικές (κυρίως φυκοκυανίνη και χλωροφύλλη), πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα (γ-λινολενικό οξύ), φαινολικά στοιχεία κλπ, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον τομέα της διατροφής και της φαρμακοβιομηχανίας (Colla et al., 2007; Costa et al., 2000; Rangel-Yagui et al., 2004).

Επιπλέον το κυανοβακτήριο *A. platensis* έχει θεωρηθεί ως ένα από τα καταλληλότερα μικροφύκη για τη διαχείριση διαφόρων αποβλήτων (Vonshak, 2002a). Η διαχείριση των αποβλήτων συνίσταται κυρίως στην απομάκρυνση και ανάκτηση του φωσφόρου και του αζώτου, τα οποία είναι υπεύθυνα για τον ευτροφισμό και τη ρύπανση των νερών. Μεταξύ των ανόργανων ρυπαντών ο φώσφορος είναι ένας από τους δυσκολότερους ρυπαντές και η απομάκρυνσή του είναι πολύ δύσκολη. Κυρίως απομακρύνεται μέσω της συσσωμάτωσης και της κατακρήμνισής του (de-Bashan and Bashan, 2010). Σήμερα υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για την απομάκρυνση του φωσφόρου από τα απόβλητα (Morse et al., 1998), αλλά η απομάκρυνσή του μέσω της καλλιέργειας μικροφυκών έχει το πλεονέκτημα ότι παράγεται επιπλέον χρήσιμη βιομάζα (Vonshak, 2002a).

Μερικοί τύποι αποβλήτων θα πρέπει πρώτα να αραιωθούν για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια μικροφυκών λόγω της παρουσίας διαφόρων παραγόντων αναστολής της ανάπτυξης των μικροφυκών. Ο πιο συχνός ανασταλτικός παράγοντας είναι η αμμωνία, της οποίας η τοξικότητα αυξάνεται όταν όσο το pH του διαλύματος γίνεται πιο αλκαλικό. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το κυανοβακτήριο *A. platensis* είναι αλκαλόφιλο και αναπτύσσεται σε pH μεταξύ 9,0 και 10,50. Επομένως, σε απόβλητα που οι ανασταλτικοί παράγοντες και κυρίως η αμμωνία περιέχονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις, αραιώση της τάξης ακόμα και 100φορές μπορεί να είναι αναγκαία. Σε αυτές τις αραιώσεις βέβαια είναι πολύ πιθανό η συγκέντρωση του φωσφόρου να είναι σημαντικά χαμηλή επηρεάζοντας αρνητικά την παραγωγή βιομάζας.

Γενικά θεωρείται ότι τα μικροφύκη θα διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στον τομέα της παραγωγής βιοενέργειας χρησιμεύοντας ως πρώτη ύλη για διάφορες τεχνολογίες μετατροπής της βιομάζας σε ενέργεια. Οι κυριότερες τεχνολογίες στις οποίες μπορεί να έχουν εφαρμογή είναι η παραγωγή βιοντίζελ μετά τη μετεστεροποίηση των λιπιδίων τους (Demirbas and Fatih Demirbas, 2011), η αναερόβια χώνευση για την παραγωγή βιοαερίου (Mussnug et al., 2010) η αναερόβια ζύμωση για την παραγωγή βιοαιθανόλης (John et al., 2011) και η παραγωγή υδρογόνου (Parmar et al., 2011). Κάθε μια από τις τεχνολογίες αυτές προσιδιάζει σε βιομάζα με διαφορετική σύσταση βιομάζας.

Για παράδειγμα η παραγωγή βιοντίζελ προσιδιάζει περισσότερο σε βιομάζα πλούσια σε λιπίδια, ενώ η αναερόβια ζύμωση προϋποθέτει βιομάζα πλούσια σε υδατάνθρακες.

Παρόλο που τα κυανοβακτήρια δεν είναι πλούσια σε λιπίδια θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαερίου ή βιοαιθανόλης έχοντας το πλεονέκτημα της σχετικά εύκολης συγκομιδής λόγω της νηματοειδούς μορφής τους (de la Nouë and Bassères, 1989; Pouliot et al., 1989). Ανάμεσα στα νηματώδη κυανοβακτήρια το *A. platensis* είναι ένα πολύ σημαντικό είδος με υψηλής αξίας βιομάζα. Επιπλέον το *A. platensis* έχει σχετικά υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης. Παρόλα τα πλεονεκτήματα του *A. platensis*, η βιομάζα του περιέχει σε υψηλή συγκέντρωση πρωτεΐνες, πράγμα που σημαίνει ότι δεν είναι κατάλληλο για την παραγωγή βιοαιθανόλης και η χρήση του ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαερίου δημιουργεί προβλήματα στη διεργασία της αναερόβια χώνευσης λόγω του μικρού λόγου άνθρακα προς άζωτο (Samson and Leduy, 1986; Sialve et al., 2009).

Είναι σχετικά γνωστό ότι η σύσταση της βιομάζας των μικροφυκών μπορεί να ελεγχθεί με τη διαφοροποίηση ορισμένων καλλιεργητικών παραγόντων όπως για παράδειγμα η συγκέντρωση θρεπτικών στοιχείων (όπως αζώτου) (Piorreck et al., 1984), η ένταση του φωτός (Tedesco and Duerr, 1989) και η θερμοκρασία (Ogbonna et al., 2007). Οι περισσότερες έρευνες πάνω στο ζήτημα της απορρόφησης φωσφόρου από τα μικροφύκη είτε σε συνθετικά υποστρώματα είτε σε απόβλητα, εστιάζουν κυρίως στο ρυθμό και το βαθμό της απομάκρυνσης του φωσφόρου (Healey and Hendzel, 1975; Lodi et al., 2003; Powell et al., 2009). Συστηματικές έρευνες πάνω στην επίδραση της συγκέντρωσης του φωσφόρου στην παραγωγή και σύσταση της βιομάζας του *A. platensis* είναι περιορισμένες. Επομένως, στόχος αυτής της πειραματικής έρευνας ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης του φωσφόρου στη σύσταση της βιομάζας και στην παραγωγικότητα του κυανοβακτηρίου *A. platensis* σε σχέση με την ένταση του φωτισμού. Η βασική στόχευση αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογηθεί αν και κατά πόσο η αλλαγή της συγκέντρωσης του φωσφόρου θα μπορούσε να αποτελέσει παράγοντα για τον έλεγχο της σύστασης της βιομάζας του *A. platensis* έτσι ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαερίου ή βιοαιθανόλης.

## 1.2 Υλικά και μέθοδοι

### 1.2.1 Μικροοργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης

Όλα τα πειράματα έγιναν με το ίδιο στέλεχος του κυανοβακτηρίου *Arthrospira platensis* SAG 21.99, του οποίου η προμήθεια έγινε από τη δημόσια γερμανική συλλογή SAG (Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen). Η καλλιέργεια του *A. platensis* έγινε σε υπόστρωμα Zarrouk με την παρακάτω σύνθεση ( $l^{-1}$ ): 16,8 g  $NaHCO_3$ , 2,5 g  $NaNO_3$ , 1,0 g  $K_2SO_4$ , 1,0 g  $NaCl$ , 0,04 g  $CaCl_2$ , 0,08 g  $Na_2EDTA$ , 0,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,01 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  και 1,0 ml ιχνοστοιχείων ( $l^{-1}$ ): 2,86 g  $H_3BO_3$ , 0,02 g  $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ , 1,8 g  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 0,08 g  $Cu_2SO_4$ , 0,22 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ . Ως πηγή φωσφόρου χρησιμοποιήθηκε το  $K_2HPO_4$ . Η συγκέντρωση  $K_2HPO_4$  στο καθιερωμένο υπόστρωμα Zarrouk είναι  $500 \text{ mg } l^{-1}$ , η οποία χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες που είχαν ρόλο μάρτυρα. Στις υπόλοιπες καλλιέργειες η συγκέντρωση του  $K_2HPO_4$  ήταν 10, 50 και  $250 \text{ mg } l^{-1}$ . Η μείωση της συγκέντρωσης καλίου (K) κρίθηκε ότι δεν είναι σημαντική και ότι η παροχή καλίου είναι επαρκής από το παρεχόμενο  $K_2SO_4$  και έτσι δεν προστέθηκε ισοδύναμη ποσότητα καλίου. Η ενδοκυτταρική αποθηκευμένη ποσότητα φωσφόρου του εμβολίου δεν συμπεριλήφθηκε στους διάφορους υπολογισμούς.

Η καλλιέργεια του *A. platensis* έγινε σε κυλινδρικούς φωτοβιοαντιδραστήρες plexiglass με εσωτερική διάμετρο 67 mm. Ο ενεργός όγκος της καλλιέργειας ήταν 500 ml. Οι καλλιέργειες φωτίζονταν από τη μία πλευρά με ένταση φωτός που κυμαινόταν από  $24 - 60 \text{ } \mu E \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Πηγή φωτός αποτελούσαν 2 κυλινδρικές λάμπες φθορισμού 57W, ψυχρού φωτισμού. Η ένταση του φωτισμού ελεγχόταν με την αλλαγή της απόστασης του φωτοβιοαντιδραστήρα από τη πηγή του φωτός. Ο φωτισμός διαρκούσε 12 ώρες και 12 ώρες επικρατούσε απόλυτο σκότος. Το pH δεν ρυθμίστηκε σε καμιά στιγμή του πειράματος αλλά μετρούταν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Στο τέλος των πειραμάτων το pH είχε τιμές μεταξύ  $10,13 \pm 0,01$  και  $10,39 \pm 0,08$ . Όλα τα πειράματα διενεργήθηκαν με δύο επαναλήψεις.

Το εμβόλιο παρασκευάστηκε με την καλλιέργεια του *A. platensis* σε υπόστρωμα Zarrouk με ένταση φωτισμού  $24 \text{ } \mu E \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Λίγο πριν τον εμβολιασμό των πειραματικών καλλιεργειών κύτταρα του *A. platensis* φυγοκεντρίθηκαν στις 2000 rpm για 10 min, ξεπλύθηκαν μερικές φορές (2-3) με απιονισμένο νερό και επαναιωρήθηκαν σε

απιονισμένο νερό. Οι πειραματικές καλλιέργειες εμβολιάστηκαν έτσι ώστε η αρχική συγκέντρωση ξηρής βιομάζας να ήταν  $50 (\pm 5) \text{ mg l}^{-1}$ .

Οι καλλιέργειες αναδεύονταν με φιλτραρισμένο αέρα που παροχετευόταν με τη βοήθεια αντλίας αέρα (Sera Air 550, Germany). Η παροχή του αέρα είχε καθοριστεί στα  $0,2 V_{\text{αέρα}} V_{\text{φωτοβιοαντιδραστήρα}}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Με αυτόν τον τρόπο απομακρυνόταν και τυχόν εγκλωβισμένο διαλυμένο οξυγόνο στο υγρό υπόστρωμα ανάπτυξης. Η ανάδευση ήταν συνεχόμενη και λειτουργούσε για ολόκληρο το 24ωρο. Η θερμοκρασία των καλλιέργειών διατηρούνταν σταθερή στους  $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 1.2.2 Αναλυτικές μέθοδοι

Η συγκέντρωση της βιομάζας ( $\text{mg l}^{-1}$ ) προσδιοριζόταν με έμμεσο τρόπο χρησιμοποιώντας τη φασματοφωτομετρική μέθοδο των Leduy and Therien (1977). Εν συντομία: δείγμα από τις καλλιέργειες μετά από φυγοκέντριση (5000 rpm και 5 min) και ξέπλυμά τους με απιονισμένο νερό και ύστερα από κατάλληλη αραιώση χρησιμοποιούταν για τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 560 nm. Η οπτική απορρόφηση συσχετιζόταν με το ξηρό βάρος της βιομάζας και η σχέση τους ήταν γραμμική ( $R^2=0,995$ ).

### Χλωροφύλλη

Η χλωροφύλλη προσδιοριζόταν φασματοφωτομετρικά μετά την εξαγωγή της από τα κύτταρα χρησιμοποιώντας μεθανόλη ως διαλύτη. Τα κύτταρα διαλύονταν σε μεθανόλη λειοτριβόταν και μεταφερόταν σε επωαστήρα στους  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  για 2 λεπτά. Η εκχυλισμένη χλωροφύλλη στη μεθανόλη προσδιοριζόταν με τη χρήση φασματοφωτόμετρου και μήκος κύματος 665 nm. Η τελική συγκέντρωση της χλωροφύλλης στο δείγμα υπολογιζόταν με τη χρήση του τύπου (Vonshak, 2002a):

Συγκέντρωση χλωροφύλλης =  $13,9 \text{ OD}_{665\text{nm}}$

όπου  $\text{OD}_{665\text{nm}}$  η οπτική απορρόφηση στα 665 nm και 13,9 ένας συντελεστής εξειδικευμένος για τη χλωροφύλλη του *A. platensis*.

### **Πρωτεΐνες**

Οι πρωτεΐνες (ολικές) προσδιορίστηκαν με τη χρωματομετρική μέθοδο Lowry (1951). Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αλβουμίνης. Η φωτομέτρηση έγινε στα 750 nm.

### **Ολικά λιπίδια**

Τα ολικά λιπίδια προσδιορίστηκαν με τη χρωματομετρική μέθοδο της σουλφο-φωσφο-βανιλίνης (Zöllner and Kirsch, 1962) μετά την εξαγωγή τους με τη μέθοδο Bligh and Dyer (1959). Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα τριελαΐνης (triolein). Η φωτομέτρηση έγινε στα 540 nm.

### **Ολικοί υδατάνθρακες**

Οι ολικοί υδατάνθρακες προσδιορίστηκαν με βάση τη χρωματομετρική μέθοδο φαινόλης-θεικού οξέος (DuBois et al., 1956). Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γλυκόζης. Η φωτομέτρηση έγινε στα 490 nm.

### **Φώσφορος**

Ο φώσφορος προσδιορίστηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο του ασκορβικού οξέος (4500-P E) σύμφωνα με τα πρότυπα των «Standard methods for the examination of water and wastewater» (APHA, 1995). Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα  $K_2HPO_4$ . Η φωτομέτρηση έγινε στα 880 nm.

### **Άλλες μετρήσεις**

Η ένταση του φωτισμού μετρήθηκε με το λουξόμετρο Digital Lux Meter, Model 1010B (China) χρησιμοποιώντας το συντελεστή  $12 \mu E m^{-2} s^{-1} klx^{-1}$  που αναφέρεται στις λάμπες φθορισμού (Sassano et al., 2010). Οι μετρήσεις έγιναν στο κέντρο των

φωτοβιοαντιδραστήρων. Η μέτρηση της παροχής του αέρα για ανάδευση των καλλιεργειών έγινε με το παροχόμετρο Aalborg GFM17 (U.S.A.).

Οι αναλύσεις που αφορούσαν τη σύσταση της βιομάζας έγιναν είτε σε φρέσκα δείγματα είτε σε δείγματα αποξηραμένα στους 45 °C (Desmorieux et al., 2010) για 24 ώρες. Τα δείγματα τα αποξηραμένα συντηρήθηκαν για μερικές μέρες στους (-20 °C). Όλες οι αναλύσεις έγιναν σε δείγματα απαλλαγμένα από το υπόστρωμα καλλιέργειάς τους. Ο καθαρισμός τους έγινε με φυγοκέντριση (5000 rpm για 10 min). Όλες οι αναλύσεις έγιναν τουλάχιστον εις τριπλούν. Για να αξιολογηθούν οι πειραματικές επιδράσεις ως προς τη στατιστική σημαντικότητά τους, τα δεδομένα υπέστησαν στατιστική επεξεργασία και αναλύθηκαν οι διασπορές τους (analysis of variation, ANOVA). Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού πακέτου Statistica 8.0 της εταιρίας StatSoft (U.S.A.).

### 1.2.3 Πειραματικό σχέδιο

Το πείραμα είχε δύο παράγοντες, την ένταση του φωτός και της συγκέντρωση του φωσφόρου. Η ένταση του φωτός είχε τρία επίπεδα: 24, 42 and 60  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Για κάθε ένα επίπεδο της έντασης του φωτός, διερευνήθηκαν τέσσερα επίπεδα της συγκέντρωσης του φωσφόρου. Οι συγκεντρώσεις του  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 10, 50, 250 and 500  $\text{mg l}^{-1}$ . Λαμβάνοντας υπόψη την αραίωση λόγω της προσθήκης του εμβολίου, η αρχική συγκέντρωση του φωσφόρου στις καλλιέργειες ήταν 1,68, 8,40, 41,98 and 83,7  $\text{mg P l}^{-1}$ . Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζεται η διάταξη των επιπέδων και τα σύμβολα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε καλλιέργεια. Τα πειράματα έγιναν με δύο επαναλήψεις και οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν για κάθε επανάληψη.

Η επιλογή της συγκέντρωσης του φωσφόρου έγινε μετά από προκαταρκτικά πειράματα τα οποία έδειξαν ότι συγκεντρώσεις  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  στο εύρος 250 – 1000  $\text{mg l}^{-1}$  δεν είχαν σημαντικές διαφορές στην παραγωγή βιομάζας.



**Πίνακας 1.1 Πειραματικό σχέδιο**

	Ένταση φωτισμού ( $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Συγκέντρωση $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ( $\text{mg l}^{-1}$ )	Συγκέντρωση φωσφόρου ( $\text{mg P l}^{-1}$ )*
R <sub>(24/10)</sub>	24	10	1,68
R <sub>(24/50)</sub>	24	50	8,40
R <sub>(24/250)</sub>	24	250	41,98
R <sub>(24/Control)</sub>	24	500	83,70
R <sub>(42/10)</sub>	42	10	1,68
R <sub>(42/50)</sub>	42	50	8,40
R <sub>(42/250)</sub>	42	250	41,98
R <sub>(42/Control)</sub>	42	500	83,70
R <sub>(60/10)</sub>	60	10	1,68
R <sub>(60/50)</sub>	60	50	8,40
R <sub>(60/250)</sub>	60	250	41,98
R <sub>(60/Control)</sub>	60	500	83,70

\*(Οι τιμές αναφέρονται στη συγκέντρωση φωσφόρου μετά την αραίωση που προέκυψε κατά την προσθήκη του εμβολίου)

### 1.3 Αποτελέσματα

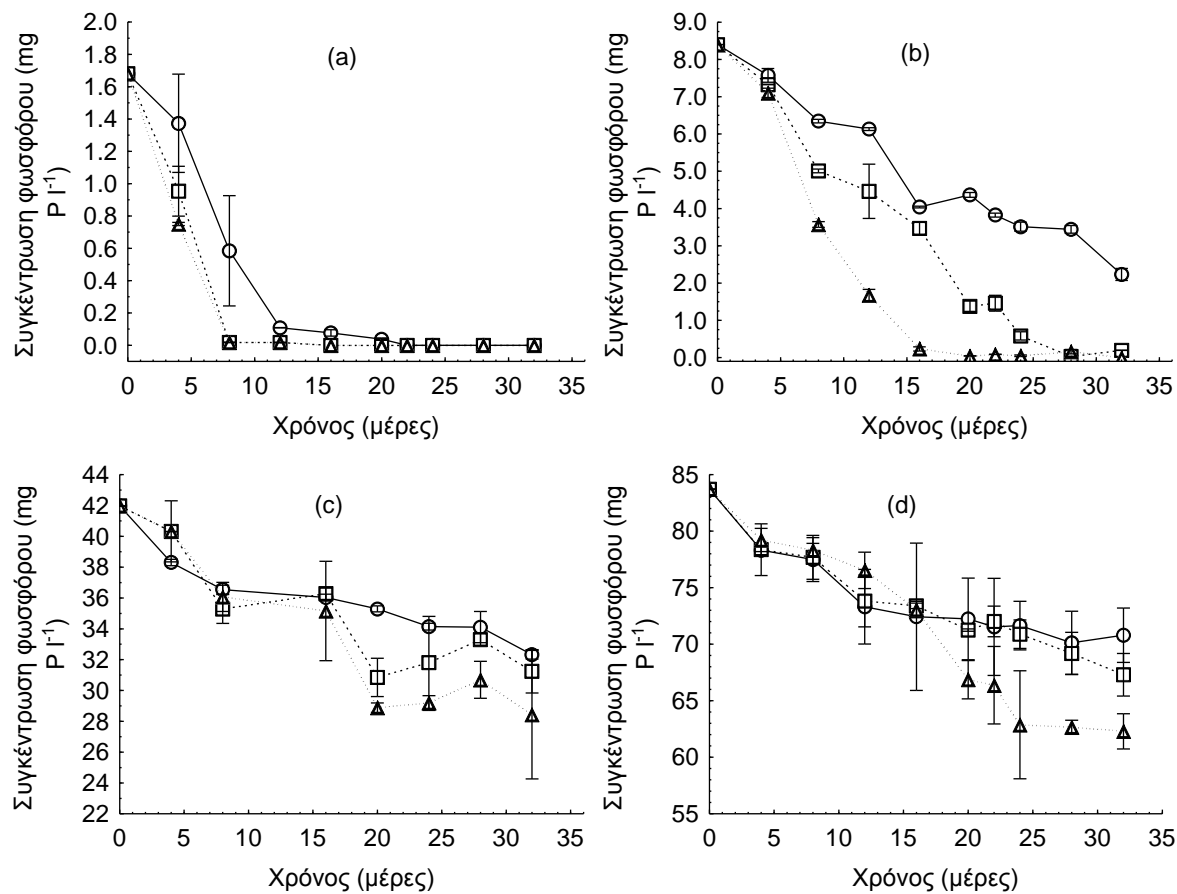
#### 1.3.1 Απομάκρυνση φωσφόρου

Στην **Εικόνα 1.1** απεικονίζεται η διακύμανση της συγκέντρωσης του φωσφόρου στα υποστρώματα καλλιέργειας του *A. platensis*. Ο φώσφορος δεν μπορούσε να ανιχνευθεί ( $<20 \mu\text{g l}^{-1}$ ) στην 8<sup>η</sup> μέρα στις καλλιέργειες R<sub>(42/10)</sub> και R<sub>(60/10)</sub>, στην 20<sup>η</sup> μέρα στην καλλιέργεια R<sub>(60/50)</sub> και στην 22<sup>η</sup> μέρα στην καλλιέργεια R<sub>(24/10)</sub>. Σχεδόν πλήρη απομάκρυνση του φωσφόρου παρατηρήθηκε και στην καλλιέργεια R<sub>(42/50)</sub> στην 28<sup>η</sup> μέρα.

Στην **Εικόνα 1.2** απεικονίζεται η απομάκρυνση του φωσφόρου ως ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσής του στις καλλιέργειες κατά το τέλος του πειράματος. Σύμφωνα με την εικόνα αυτή η απομάκρυνση του φωσφόρου ήταν μεγαλύτερη στις καλλιέργειες με αρχική χαμηλή συγκέντρωση, ενώ η απομάκρυνση ήταν μικρότερη στις καλλιέργειες με τη μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση φωσφόρου. Η ένταση του φωτός επέδρασε επίσης στην απομάκρυνση του φωσφόρου, η οποία ήταν μεγαλύτερη όσο η ένταση του φωτός αυξανόταν. Στις καλλιέργειες με συγκέντρωση  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $10 \text{ mg l}^{-1}$  η απομάκρυνση ήταν 100% και για τις τρεις εντάσεις του φωτός.

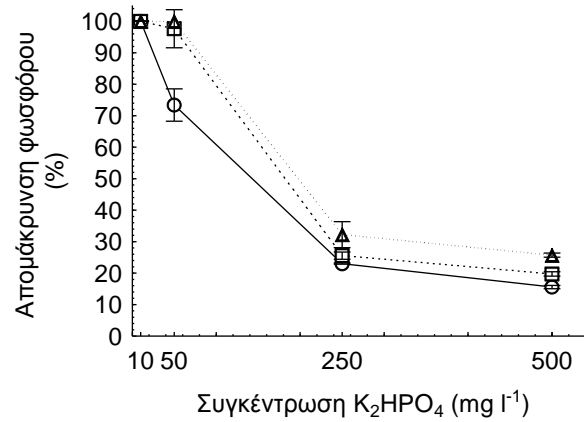
Στον **Πίνακα 2.2** φαίνεται η απομάκρυνση του φωσφόρου ανά μάζα του *A. platensis* κατά το τέλος του πειράματος. Σύμφωνα με τους υπολογισμούς του πίνακα αυτού ο απομακρυσμένος φώσφορος ανά μονάδα μάζας του *A. platensis* ήταν

υψηλότερος στις χαμηλές εντάσεις του φωτός, εκτός των καλλιεργειών όπου η απομάκρυνση του φωσφόρου ήταν πλήρης.



**Εικόνα 1.1** Διακύμανση της συγκέντρωσης του φωσφόρου στις καλλιέργειες *A. platensis* σε σχέση με την ένταση του φωτός.

(a) 10 mg l<sup>-1</sup>, (b) 50 mg l<sup>-1</sup>, (c) 250 mg l<sup>-1</sup> και (d) 500 mg l<sup>-1</sup>. (○) 24 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (□) 42 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> και (Δ) 60 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>



**Εικόνα 1.2** Απομάκρυνση φωσφόρου σε σχέση με τη συγκέντρωση  $K_2HPO_4$  και έντασης φωτός στις καλλιέργειες *A. platensis*.

(○) 24  $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$  (□) 42  $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$  and (Δ) 60  $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$

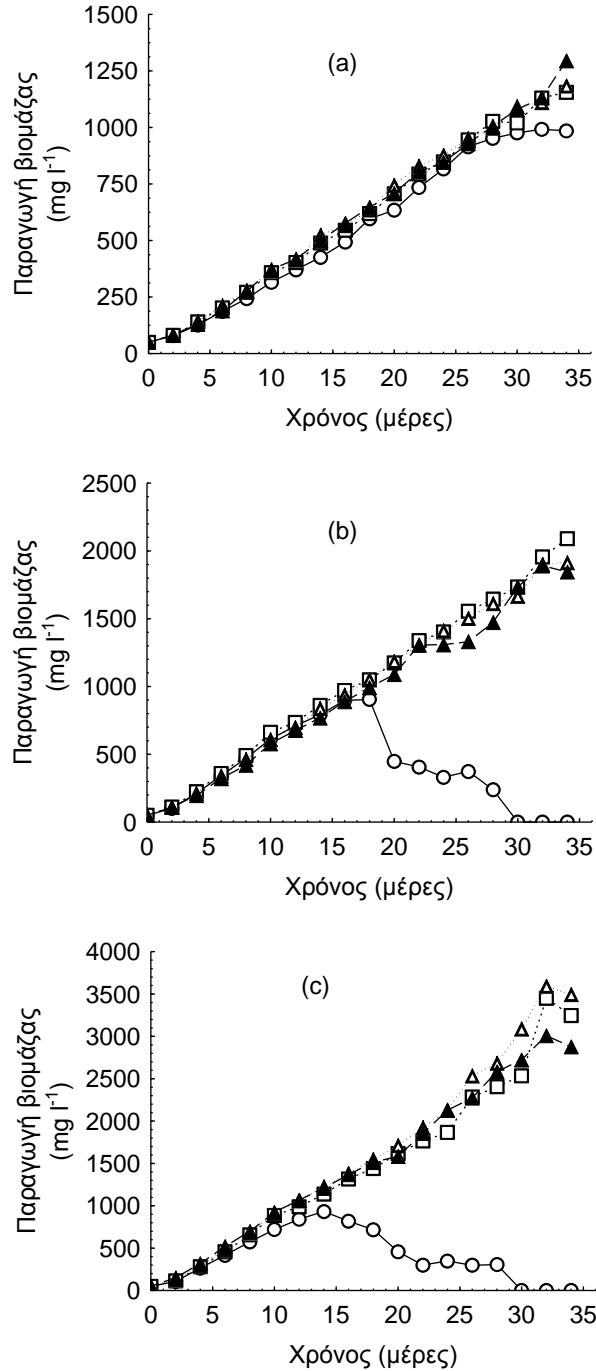
**Πίνακας 1.2** Απομάκρυνση του φωσφόρου ανά μονάδα μάζας του *A. platensis* (n=6, ± S.D.)

Καλλιέργεια	mg-P gβιομάζας <sup>-1</sup>
R <sub>(24/10)</sub>	1,77 ± 0,10
R <sub>(24/50)</sub>	5,45 ± 0,99
R <sub>(24/250)</sub>	8,70 ± 0,36
R <sub>(24/Control)</sub>	11,54 ± 2,14
R <sub>(42/10)</sub>	1,85 ± 0,01
R <sub>(42/50)</sub>	4,19 ± 0,15
R <sub>(42/250)</sub>	5,64 ± 0,04
R <sub>(42/Control)</sub>	8,77 ± 0,55
R <sub>(60/10)</sub>	1,80 ± 0,10
R <sub>(60/50)</sub>	2,43 ± 0,42
R <sub>(60/250)</sub>	3,77 ± 1,20
R <sub>(60/Control)</sub>	7,17 ± 0,64

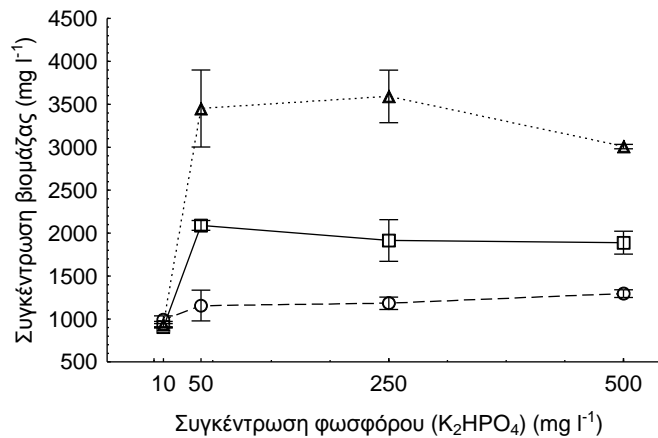
### 1.3.2 Παραγωγή βιομάζας

Η παραγωγή βιομάζας του *A. platensis* στις καλλιέργειες με διαφορετικές εντάσεις φωτός και συγκεντρώσεις φωσφόρου φαίνεται στην **Εικόνα 1.3**. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας για την κάθε ένταση φωτός παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες R<sub>(24/Control)</sub>, R<sub>(42/50)</sub> και R<sub>(60/250)</sub> με τιμές 1296 ± 15 mg l<sup>-1</sup>, 2090 ± 58 mg l<sup>-1</sup> και 3592 ± 307 mg l<sup>-1</sup>, αντίστοιχα.

Στην **Εικόνα 1.4** απεικονίζεται η σχέση μεταξύ μέγιστης παραγωγής βιομάζας και συγκέντρωσης φωσφόρου (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) στις τρεις εντάσεις φωτός. Η επίδραση του φωτός επί της μέγιστης παραγωγής ήταν στατιστικά σημαντική (p≤0,05), σε αντίθεση με την επίδραση της συγκέντρωσης του φωσφόρου (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) που δεν ήταν σημαντική παρά μόνο στις καλλιέργειες R<sub>(42/10)</sub>, R<sub>(60/10)</sub> για τις αντίστοιχες σειρές και R<sub>(60/Control)</sub> σε σχέση με το R<sub>(60/250)</sub>.



**Εικόνα 1.3 Παραγωγή βιομάζας του *A. platensis* σε καλλιέργειες με διαφορετικές εντάσεις φωτός και συγκεντρώσεις φωσφόρου ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).**  
**(a) 24  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (b) 42  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  and (c) 60  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . (○) 10  $\text{mg l}^{-1}$  (□) 50  $\text{mg l}^{-1}$  (Δ) 250  $\text{mg l}^{-1}$  (▲) 500  $\text{mg l}^{-1}$**



**Εικόνα 1.4** Μέγιστη παραγωγή βιομάζας του *A. platensis* σε σχέση με τη συγκέντρωση του φωσφόρου (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) σε τρεις διαφορετικές εντάσεις φωτός. (○) 24 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (□) 42 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> and (Δ) 60 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>

### 1.3.3 Σύσταση βιομάζας

#### 1.3.3.1 Χλωροφύλλη

Στην

Εικόνα 1.5 φαίνεται η διακύμανση της περιεκτικότητας του *A. platensis* σε χλωροφύλλη κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Σε όλες τις περιπτώσεις η γενική τάση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη ήταν να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, εκτός από τις καλλιέργειες με χαμηλή συγκέντρωση φωσφόρου. Η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη κυμάνθηκε από 0,78% ως 2,00%. Η μέγιστη παραγωγή χλωροφύλλης ήταν 23,74, 39,81 και 58,39 mg l<sup>-1</sup> για ένταση φωτός 24, 42 και 60 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, αντιστοίχως.

#### 1.3.3.2 Πρωτεΐνες

Η επίδραση της έντασης του φωτός στην περιεκτικότητα του *A. platensis* σε πρωτεΐνες δεν είχε κάποια ξεκάθαρη τάση (Πίνακας 1.3). Παρόλα αυτά σε γενικές γραμμές στις μεγαλύτερες εντάσεις φωτός η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ήταν χαμηλότερη. Στις καλλιέργειες με ένταση φωτισμού 24 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> η συγκέντρωση φωσφόρου δεν είχε σημαντική επίδραση στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Στις καλλιέργειες με ένταση

φωτός  $42 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  και  $60 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες μειωνόταν γενικά με την αύξηση της συγκέντρωσης φωσφόρου, όπου δεν ήταν περιοριστικός παράγοντας. Στις καλλιέργειες  $R_{(42/10)}$  και  $R_{(60/10)}$ , στις οποίες ο φώσφορος ήταν περιοριστικός παράγοντας η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ήταν σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τις άλλες καλλιέργειες.

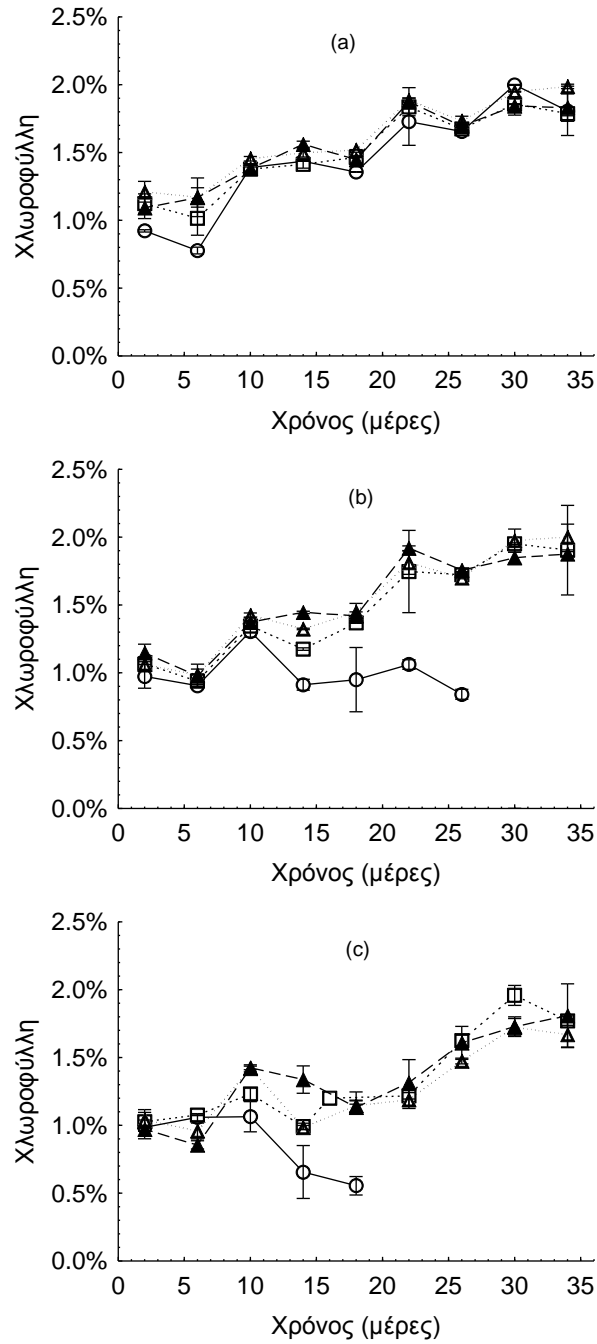
### 1.3.3.3 Λιπίδια

Η επίδραση της συγκέντρωσης φωσφόρου και της έντασης φωτός στη περιεκτικότητα της βιομάζας του *A. platensis* σε λιπίδια (Πίνακας 1.3) ήταν στατιστικά μη σημαντική στις περισσότερες καλλιέργειες όπου η περιεκτικότητα σε λιπίδια κυμάνθηκε από 6,98% ως 8,34%, εκτός από τις καλλιέργειες  $R_{(24/50)}$  και  $R_{(60/250)}$ , όπου η περιεκτικότητα σε λιπίδια ήταν 13,33% και 5,34%, αντιστοίχως.

### 1.3.3.4 Υδατάνθρακες

Σε όλες τις καλλιέργειες η περιεκτικότητα της βιομάζας του *A. platensis* σε υδατάνθρακες ήταν σε γενικές γραμμές σταθερή, εκτός στις καλλιέργειες με συγκέντρωση σε φώσφορο ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )  $10 \text{ mg l}^{-1}$  (Πίνακας 1.3) Στις καλλιέργειες  $R_{(42/10)}$  και  $R_{(60/10)}$ , η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες ανήλθε στο 59,10% και 59,64%, αντιστοίχως ενώ στην καλλιέργεια  $R_{(24/10)}$  η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες ήταν χαμηλότερη (33,97%).





**Εικόνα 1.5 Περιεκτικότητα του *A. platensis* σε χλωροφύλλη σε καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ ) και εντάσεις φωτός.**

(a)  $24 \mu E m^{-2}s^{-1}$ , (b)  $42 \mu E m^{-2}s^{-1}$  and (c)  $60 \mu E m^{-2}s^{-1}$ . (○)  $10 mg l^{-1}$  (□)  $50 mg l^{-1}$  (Δ)  $250 mg l^{-1}$  (▲)  $500 mg l^{-1}$

**Πίνακας 1.3 Σύσταση της βιομάζας του *A. platensis* σε καλλιέργειας με διαφορετική συγκέντρωση φωσφόρου και ένταση φωτός (n=6, ± S.D.)**

Καλλιέργεια	Πρωτεΐνες (%)	Λιπίδια (%)	Υδατάνθρακες (%)
R <sub>(24/10)</sub>	54,83 ± 2,29	8,34 ± 0,57	33,97 ± 0,86
R <sub>(24/50)</sub>	56,60 ± 2,03	13,33 ± 0,72	19,25 ± 0,07
R <sub>(24/250)</sub>	57,51 ± 3,33	7,34 ± 0,01	16,62 ± 0,39
R <sub>(24/Control)</sub>	56,08 ± 1,23	7,33 ± 0,25	17,72 ± 0,49
R <sub>(42/10)</sub>	36,04 ± 0,55	*	59,10 ± 1,44
R <sub>(42/50)</sub>	60,57 ± 0,37	8,07 ± 0,56	18,96 ± 1,68
R <sub>(42/250)</sub>	55,10 ± 1,26	8,11 ± 0,51	18,05 ± 1,60
R <sub>(42/Control)</sub>	51,44 ± 0,71	7,46 ± 0,10	22,82 ± 0,48
R <sub>(60/10)</sub>	33,59 ± 3,30	*	59,64 ± 1,55
R <sub>(60/50)</sub>	48,34 ± 1,40	6,98 ± 0,84	21,73 ± 0,10
R <sub>(60/250)</sub>	41,12 ± 2,13	5,34 ± 0,77	16,96 ± 1,02
R <sub>(60/Control)</sub>	40,29 ± 1,27	7,39 ± 0,51	16,18 ± 0,83

\* Τα λιπίδια δεν μπόρεσαν να προσδιοριστούν λόγω ατυχήματος και απώλειας των δειγμάτων. Οι αναλύσεις έγιναν κατά την 32<sup>η</sup> μέρα του πειράματος, εκτός των καλλιεργειών R<sub>42/10</sub> και R<sub>60/10</sub> 20<sup>η</sup> και 16<sup>η</sup> μέρα, αντίστοιχα.

## 1.4 Συζήτηση

### 1.4.1 Απομάκρυνση φωσφόρου

Είναι γνωστό ότι τα μικροφύκη συμπεριλαμβανημένου και των κυανοβακτηρίων έχουν ένα μηχανισμό αποθήκευσης φωσφόρου, με τον οποίο προσλαμβάνουν μεγαλύτερες ποσότητες από εκείνες που χρειάζονται για τις άμεσες μεταβολικές τους ανάγκες. Το φώσφορο τον αποθηκεύουν ενδοκυτταρικά ως πολυφωσφορικούς κόκκους (Powell et al., 2008). Η κατοχή αυτού του μηχανισμού από τα μικροφύκη εξηγεί την παρατήρηση ότι παρόλο που σε κάποιες καλλιέργειες ο φώσφορος είχε απομακρυνθεί πλήρως, το *A. platensis* παράγαγε βιομάζα για αρκετές ακόμη μέρες.

Σε γενικές γραμμές παρατηρήθηκε ότι η απομάκρυνση του φωσφόρου αυξανόταν με την αύξηση της έντασης του φωτός. Παρόλα αυτά ο απομακρυσμένος φώσφορος ανά μάζα του κυανοβακτηρίου αυξανόταν με τη μείωση της έντασης του φωτός. Ο φώσφορος μπορεί να απομακρυνθεί είτε βιοτικά με την πρόσληψή του από τους μικροοργανισμούς είτε αβιοτικά με την κατακρήμνισή του. Η αβιοτική απομάκρυνση ενισχύεται με τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα και την επακόλουθη αύξηση του pH. Οι Lodi et al. (2003) υπέθεσαν ότι η αβιοτική απομάκρυνση του φωσφόρου θα είναι μεγαλύτερη

καθώς θα αυξάνεται η συγκέντρωσή του. Σύμφωνα με στοιχειομετρικά δεδομένα το *A. platensis* περιέχει περίπου  $7 \text{ mg P g}^{-1}$  ξηρής βιομάζας (Lodi et al., 2003). Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 1.2** οι καλλιέργειες στις οποίες ο απομακρυσμένος φώσφορος ανά μάζα του κυανοβακτηρίου είναι οι  $R_{(24/250)}$ ,  $R_{(24/Control)}$ ,  $R_{(42/Control)}$  και  $R_{(60/Control)}$ . Υποθέτοντας ότι ο φώσφορος δεν προσλαμβάνεται πάνω από  $7 \text{ mg P g}^{-1}$  και ότι ο ενδοκυτταρικός φώσφορος είναι σταθερός (Powell et al., 2011), μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η αβιοτική απομάκρυνση του φωσφόρου αυξανόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης του φωσφόρου, γεγονός που επιβεβαιώνει την υπόθεση των Lodi et al. (2003). Επιπροσθέτως, στην παρούσα μελέτη φαίνεται ότι η βιοτική απομάκρυνση του φωσφόρου συσχετίζεται αρνητικά με την ένταση του φωτός. Σε γενικές γραμμές η απομάκρυνση του φωσφόρου είναι μια αλληλεπίδραση της συγκέντρωσης της βιομάζας, της έντασης του φωτός και της συγκέντρωσης του ίδιου του φωσφόρου.

#### 1.4.2 Παραγωγή βιομάζας

Από τη στιγμή που η ανάπτυξη του *A. platensis* κοραίνεται σε ένταση φωτός 150-200  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  και η αναστολή της ανάπτυξής του παρατηρείται σε μεγαλύτερες εντάσεις (Vonshak and Tomaselli, 2000), ήταν αναμενόμενο ότι η αύξηση της έντασης του φωτός θα είχε θετική επίδραση στην παραγωγή βιομάζας λόγω αύξησης της φωτοσύνθεσης (Carvalho et al., 2011).

Η συγκέντρωση του φωσφόρου είχε μικρή ή και καθόλου επίδραση στην παραγωγή βιομάζας εκτός των καλλιεργειών  $R_{(42/10)}$ ,  $R_{(60/10)}$  και  $R_{(60/control)}$ . Η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας ( $P_{\max}$ ) των καλλιεργειών  $R_{(42/10)}$  και  $R_{(60/10)}$  ήταν  $904 \pm 3$  και  $934 \pm 39 \text{ mg l}^{-1}$ , αντιστοίχως. Παρόλο που τα  $P_{\max}$  ήταν σχεδόν παρόμοια, ο χρόνος εμφάνισής τους ήταν διαφορετικός. Στην καλλιέργεια  $R_{(60/10)}$  το  $P_{\max}$  παρατηρήθηκε στην 14<sup>η</sup> μέρα, ενώ στην καλλιέργεια  $R_{(42/10)}$  στην 18<sup>η</sup> μέρα. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι συγκεκριμένες ποσότητες φωσφόρου μπορούν να υποστηρίξουν την παραγωγή συγκεκριμένης ποσότητας βιομάζας. Σε γενικές γραμμές η συγκέντρωση φωσφόρου δεν είχε καμιά επίδραση στην παραγωγή βιομάζας εκτός στις καλλιέργειες όπου ο φώσφορος ήταν περιοριστικός παράγοντας, με εξαίρεση το  $R_{(60/control)}$ . Στην περίπτωση της καλλιέργειας  $R_{(60/control)}$  η οποία είχε χαμηλότερη συγκέντρωση βιομάζας σε σχέση με τις

άλλες καλλιέργειες της ίδιας έντασης φωτός, πιθανώς δείχνει ότι καθώς αυξάνονται ταυτόχρονα η συγκέντρωση του φωσφόρου και η ένταση του φωτός εμφανίζεται μια κάποια παρεμπόδιση της ανάπτυξης. Σε αντίθεση με τα παραπάνω οι Çelekli et al. (2009), αναφέρουν ότι η παραγωγή του *A. platensis* ήταν η μέγιστη στα 500 mg I<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (υπόστρωμα Zarrouk) και μειώθηκε όταν η συγκέντρωση του φωσφόρου αυξήθηκε ή μειώθηκε πέρα από τα 500 mg I<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Σε όλες τις περιπτώσεις της παρούσας μελέτης το συμπέρασμα είναι ότι η συγκέντρωση του K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> μπορεί να μειωθεί από τα 500 mg I<sup>-1</sup> στα 50 mg I<sup>-1</sup> χωρίς την απώλεια παραγωγής σε βιομάζα.

### 1.4.3 Σύσταση βιομάζας

#### 1.4.3.1 Χλωροφύλλη

Η περιεκτικότητα του *A. platensis* σε χλωροφύλλη αυξήθηκε σε όλες τις καλλιέργειες με την πάροδο του χρόνου, εκτός από τις καλλιέργειες στις οποίες ο φώσφορος ήταν περιοριστικός παράγοντας. Η διείσδυση του φωτός εντός της καλλιέργειας μειώνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της βιομάζας. Ταυτόχρονα όμως, σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού ή χαμηλής διείσδυσης του αυξάνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε χλωροφύλλη έτσι ώστε να αυξάνεται η αξιοποίηση του φωτός (Rodrigues et al., 2010). Επομένως η αύξηση της παραγωγής σε βιομάζα και κατ' επέκταση η αύξηση της συγκέντρωσής της έχει ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη παραγωγή χλωροφύλλης κατά την πάροδο του χρόνου. Παρόλο που η περιεκτικότητα της βιομάζας σε χλωροφύλλη ήταν μικρότερη στις καλλιέργειες με ένταση φωτισμού 60 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> σε σχέση με τις καλλιέργειες με ένταση φωτισμού 24 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, η παραγωγή χλωροφύλλης ήταν σημαντικά αρκετά μεγαλύτερη όσο αυξάνε η ένταση του φωτός. Φαίνεται ότι υψηλές εντάσεις φωτός έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης της βιομάζας η οποία εντείνει το φαινόμενο της κυτταρικής αυτοσκίασης (self-shading effect). Για το λόγο αυτό τίθεται η υπόθεση ότι η παραγωγή χλωροφύλλης είναι ένας συνδυασμός της έντασης του φωτός, της συγκέντρωσης της βιομάζας και της ηλικίας της καλλιέργειας. Με τη σειρά αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι περισσότερη χλωροφύλλη μπορεί να παραχθεί σε μεγάλες εντάσεις φωτός λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης βιομάζας. Οι Rodrigues et al. (2010) παρατήρησαν αυξημένη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη (2.28%)

με ένταση φωτός  $156 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Από την άλλη όμως οι Danesi et al. (2004) αναφέρουν αύξηση κατά 29% στην ολική παραγωγή χλωροφύλλης όταν στις καλλιέργειες η ένταση του φωτισμού μειώθηκε από τα  $60 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  στα  $24 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Η συγκέντρωση φωσφόρου δεν είχε σημαντική επίδραση στην περιεκτικότητα της βιομάζας σε χλωροφύλλη, εκτός από τις καλλιέργειες  $R_{(42/10)}$  και  $R_{(60/10)}$ , στις οποίες η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη μειώθηκε δραστικά, πιθανώς λόγω της μικρής συγκέντρωσης σε βιομάζα αλλά και λόγω της τροφοπενίας φωσφόρου στις καλλιέργειες αυτές. Εικάζεται ότι η τροφοπενία φωσφόρου ήταν σημαντικότερος παράγοντας για την πτώση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη. Είναι γνωστό ότι τροφοπενίες βασικών στοιχείων προκαλούν το φαινόμενο της χλώρωσης, κατά το οποίο οι φωτοσυνθετικές χρωστικές διασπώνται (Luque and Forchhammer, 2008).

#### 1.4.3.2 Πρωτεΐνες

Σε γενικές γραμμές, η περιεκτικότητα του *A. platensis* σε πρωτεΐνες μειωνόταν με την αύξηση της έντασης του φωτός. Ίδια τάση έχει παρατηρηθεί και στην εργασία των Olguín et al. (2001). Στις καλλιέργειες  $R_{(42/10)}$  και  $R_{(60/10)}$ , η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες μειώθηκε σημαντικά. Αυτό συνέβη λόγω της αλλαγής των μεταβολικών συνηθειών του κυανοβακτηρίου λόγω τροφοπενίας. Τα μικροφύκη αλλάζουν τις μεταβολικές τους συνήθειες κάτω από συνθήκες καταπόνησης και ωθούνται να συσσωρεύουν ενδοκυτταρικά είτε υδατάνθρακες είτε λιπίδια (Vonshak, 2002a). Επομένως, κάτω από συνθήκες τροφοπενίας φωσφόρου η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες μειώνεται.

#### 1.4.3.3 Λιπίδια

Η καλλιέργεια μικροφυκών για την παραγωγή λιπιδίων θεωρείται από πολλούς ότι θα διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στον τομέα των βιοκαυσίμων, ως πηγή πρώτης ύλης για την παραγωγή βιοντίζελ. Παρόλο που το *A. platensis* ως τυπικό κυανοβακτήριο περιέχει χαμηλές ποσότητες σε λιπίδια (6-13% (Vonshak, 2002a)), στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί και σημαντικά μεγαλύτερες περιεκτικότητες (30%) (Rodrigues et al., 2011).

Σε γενικές γραμμές η περιεκτικότητα του *A. platensis* σε λιπίδια, στην εργασία αυτή δεν επηρεάστηκε από την ένταση του φωτός, παρόλο που στη βιβλιογραφία

αναφέρεται ότι η ένταση του φωτισμού επιδρά σημαντικά στην περιεκτικότητα λιπιδίων (Cohen et al., 1987; Tedesco and Duerr, 1989). Φαίνεται όμως ότι το επίπεδο της διαφοράς των εντάσεων δεν επέτρεψε να διαφανεί μια καθαρή επίδραση όπως στις εργασίες των Cohen et al. (1987) και Tedesco and Duerr (1989), στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν σημαντικά μεγαλύτερες εντάσεις φωτός όπως  $150\text{-}300 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  και  $170\text{-}1400 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , αντίστοιχα.

Από όσο ξέρουμε δεν υπάρχει κάποια εργασία στην οποία να έχει διερευνηθεί η επίδραση μεγάλου εύρους συγκέντρωσης φωσφόρου στην περιεκτικότητα λιπιδίων του *A. platensis*. Στη βιβλιογραφία γίνεται αναφορά ότι μικρή αύξηση της συγκέντρωσης φωσφόρου της τάξης  $50 - 5000 \mu\text{g P l}^{-1}$  δεν είχε επίδραση στην περιεκτικότητα λιπιδίων ενός άλλου κυανοβακτηρίου, του *Anabaena flos-aquae*, και ότι η τροφοπενία φωσφόρου προκαλεί αύξηση στην περιεκτικότητα των λιπιδίων (Dean et al., 2008a). Σε γενικές γραμμές στην εργασία αυτή η περιεκτικότητα του *A. platensis* σε λιπίδια δεν επηρεάστηκε από τη συγκέντρωση του φωσφόρου.

#### 1.4.3.4 Υδατάνθρακες

Η παραγωγή υδατανθράκων από μικροφύκη έχει αρχίσει να προσελκύει το ενδιαφέρον επειδή υπάρχει η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης (Dragone et al., 2011; Harun et al., 2010a). Παρόλα αυτά το *A. platensis* τυπικά περιέχει περίπου 12-20% υδατάνθρακες (Vonshak, 2002a), ποσοστό χαμηλό για την αξιοποίηση της βιομάζας για παραγωγή βιοαιθανόλης. Επιπλέον το χαμηλό αυτό ποσοστό σε υδατάνθρακες και το υψηλό σε πρωτεΐνες δημιουργεί προβλήματα στη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης λόγω χαμηλού λόγου άνθρακα προς άζωτο (C/N).

Το επίπεδο της έντασης του φωτός που εξετάστηκε σε αυτή τη μελέτη δεν είχε σημαντική επίδραση στην περιεκτικότητα της βιομάζας του *A. platensis* σε υδατάνθρακες, παρόλο που η αύξηση της έντασης του φωτός συνήθως συνοδεύεται και από αύξηση της περιεκτικότητας της βιομάζας των μικροφυκών σε υδατάνθρακες (Vonshak, 2002a). Φαίνεται ότι η υψηλότερη συγκέντρωση της βιομάζας στις υψηλότερες εντάσεις φωτός ισοστάθμιζε την επίδρασή της στη σύσταση της βιομάζας.

Η συγκέντρωση του φωσφόρου δεν είχε σημαντική επίδραση στην περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες παρά μόνο στις καλλιέργειες στις οποίες ο φώσφορος ήταν περιοριστικός παράγοντας. Στις καλλιέργειες αυτές η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες εκτινάχτηκε σε ποσοστό περίπου 60%. Επίσης σημαντικό είναι ότι η επίδραση της τροφοπενίας στην αύξηση της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες ήταν ανεξάρτητος παράγοντας από την ένταση του φωτός. Το σημείο εμφάνισης των συμπτωμάτων της τροφοπενίας φωσφόρου (πτώση παραγωγής βιομάζας) δείχνει ότι η παραγωγή βιομάζας σχετίζεται αυστηρά με μια αντίστοιχη ποσότητα του φωσφόρου που αναλογεί ανά μονάδα μάζας του μικροφύκου.

Αυξημένη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες μετά από τροφοπενία φωσφόρου έχει αναφερθεί αρκετές φορές στη βιβλιογραφία για διάφορα είδη μικροφυκών (Cade-Menun and Paytan, 2010; Dean et al., 2008b; Healey and Hendzel, 1975). Επιπλέον της τροφοπενίας φωσφόρου, συσσώρευση υδατανθράκων έχει αναφερθεί και σε περιπτώσεις καταπόνησης λόγω αυξημένης αλατότητας (Warr et al., 1985) ή λόγω τροφοπενίας αζώτου (Allen and Smith, 1969; Sassano et al., 2010). Οι Sassano et al. (2010) αναφέρουν περιεκτικότητα υδατανθράκων 55-65% στη βιομάζα του of *A. platensis* αλλά με πολύ μικρή συγκέντρωση βιομάζας (150-520 mg l<sup>-1</sup>).

## 1.5 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι η τροφοπενία φωσφόρου προκαλώντας σημαντική αύξηση της περιεκτικότητας της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis* σε υδατάνθρακες, μπορεί να θεωρηθεί μια μέθοδος για την παραγωγή βιομάζας με βελτιωμένα χαρακτηριστικά έτσι ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω της αναερόβιας ζύμωσης είτε βιοαερίου μέσω της αναερόβιας χώνευσης. Παρόλα αυτά, υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω έρευνα πάνω στο πεδίο αυτό για να γίνει βελτιστοποίηση της παραγωγής βιομάζας πλούσιας σε υδατάνθρακες.

## 2

**Παραγωγή υδατανθράκων και αύξηση της βιοσυσσωμάτωσης της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. Platensis* σε καλλιέργειες με εφαρμογή της διεργασίας τροφοπενίας φωσφόρου.**



## 2 Παραγωγή υδατανθράκων και αύξηση της βιοσυσσωμάτωσης της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis* σε καλλιέργειες με εφαρμογή της διεργασίας τροφοπενίας φωσφόρου

### Περίληψη

Η τροφοπενία φωσφόρου προκαλεί σημαντική αλλαγή της σύστασης της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis*. Η σημαντικότερη αλλαγή είναι η αύξηση της περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες. Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες ανήλθε στο  $63,09 \pm 3,43\%$  επί της ξηρής βιομάζας και επιτεύχθηκε με την παροχή φωσφόρου της τάξης  $1,82 \pm 0,16 \text{ mg l}^{-1}$  ανά g ξηρής βιομάζας. Η τιμή αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής υδατανθράκων σε καλλιέργειες του *A. platensis* των οποίων το δυναμικό παραγωγής βιομάζας είναι γνωστό. Η μέγιστη παραγωγή υδατανθράκων που επιτεύχθηκε στην παρούσα εργασία ήταν  $1147 \pm 44 \text{ mg l}^{-1}$  και  $1198 \pm 87 \text{ mg l}^{-1}$  για ασυνεχείς και ημι-συνεχείς καλλιέργειες, αντίστοιχα με παροχή φωσφόρου της τάξης  $3,58 \text{ mg P l}^{-1}$ . Η μέγιστη παραγωγικότητα σε υδατάνθρακες ανήλθε στα  $170 \pm 7 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες με ρυθμό αραίωσης  $0,3 \text{ d}^{-1}$  και παροχή φωσφόρου  $1,78 \text{ mg l}^{-1}$ . Επίσης παρατηρήθηκε ότι η βιομάζα βιοσυσσωματωνόταν και καθίζανε με ρυθμούς και σε βαθμό ανάλογο με την περιεκτικότητά της σε υδατάνθρακες. Με άλλα λόγια η βιομάζα όσο πιο υψηλότερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες είχε τόσο πιο γρήγορα και σε μεγαλύτερο βαθμό βιοσυσσωματωνόταν και καθίζανε. Ο υψηλότερος βαθμός βιοσυσσωμάτωσης ήταν  $80,25 \pm 5,58\%$  μετά από 60 λεπτά ηρεμίας. Οι παραγόμενοι υδατάνθρακες θα μπορούσαν να αποτελέσουν πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων, ενώ το χαρακτηριστικό της έντονης βιοσυσσωμάτωσης και καθίζησης της βιομάζας πολύ πιθανό να βελτιώσει τη διαδικασία της συγκομιδής καθιστώντας τη περισσότερο οικονομική.

### 2.1 Εισαγωγή

Τα μικροφύκη προσελκύουν το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω του δυναμικού τους να αποτελέσουν πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοενέργειας. Η βιομάζα των μικροφυκών αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια, αλλά η περιεκτικότητά

τους εξαρτάται από το είδος του μικροφύκου και από τις καλλιεργητικές συνθήκες (Markou and Georgakakis, 2011; Mata et al., 2010). Τα μικροφύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη από όλες σχεδόν τις τεχνολογίες μετατροπής της βιομάζας σε βιοενέργεια με ή χωρίς προ-επεξεργασία (Biller and Ross, 2011; Chader et al., 2011; Harun et al., 2010a; Heilmann et al., 2010; Schenk et al., 2008; Zamalloa et al., 2011). Σε ορισμένες από τις τεχνολογίες μετατροπής της βιομάζας σε ενέργεια όπως η αναερόβια ζύμωση (Alvira et al., 2010) οι υδατάνθρακες αποτελούν την κύρια και για πολλές περιπτώσεις τη μόνη πρώτη ύλη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

Μέχρι στιγμής υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι να παραχθούν μικροφύκη με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες. Ο ένας είναι να βρεθούν και να καλλιεργηθούν είδη μικροφυκών που έχουν τυπικά υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (Rodjaroen et al., 2007) και ο άλλος τρόπος είναι να εφαρμοστεί μια στρατηγική τροφοπενίας κάποιου θρεπτικού συστατικού (Brányiková et al., 2011; Dragone et al., 2011).

Τα μικροφύκη συνθέτουν και συσσωρεύουν υδατάνθρακες όταν βρίσκονται υπό καθεστώς καταπόνησης όπως τροφοπενία (Dean et al., 2008a), καταπόνηση από αυξημένη αλατότητα (Warr et al., 1985) ή καταπόνηση άλλων περιβαλλοντικών παραμέτρων (Hu, 2004). Η συσσώρευση υδατανθράκων αναφέρεται σε αρκετές έρευνες που πραγματοποιούνται την καλλιέργεια διαφόρων μικροφυκών όπως των διατόμων (Fuhs, 1969; Guerrini et al., 2000), των χλωροφυκών (Healey and Hendzel, 1975; Kilham et al., 1997), κυανοβακτηρίων (Dean et al., 2008a; Healey, 1973) και του φυτοπλαγκτόν εν γένει (Cade-Menun and Paytan, 2010; Stehfest et al., 2005). Η συσσώρευση των υδατανθράκων ξεκινά όταν ο ενδοκυτταρικός φώσφορος πέσει χαμηλότερα από μια οριακή συγκέντρωση (Cade-Menun and Paytan, 2010; Dean et al., 2008b).

Στη προηγούμενη εργασία (Εργασία 1) (Markou et al., 2012d) παρατηρήθηκε ότι συγκέντρωση φωσφόρου (ως  $K_2HPO_4$ ) της τάξης των  $10 \text{ mg l}^{-1}$  ήταν ικανή να υποστηρίξει συγκέντρωση βιομάζας του *A. platensis* από 904 ως 992  $\text{mg l}^{-1}$  με περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες μέχρι και 60%. Μετά την εργασία αυτή είχε τεθεί η υπόθεση ότι είναι δυνατή η καλλιέργεια του *A. platensis* έχοντας ταυτόχρονα υψηλή συγκέντρωση βιομάζας και υψηλή περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες αρκεί να είναι γνωστή η ελάχιστη ποσότητα ενδοκυτταρικού φωσφόρου η οποία θα πρέπει να είναι διαθέσιμη στην καλλιέργεια. Ακολουθώντας το πνεύμα αυτό και σε

σχέση με την παραγωγή βιοκαυσίμων από τη βιομάζα μικροφυκών πλούσια σε υδατάνθρακες, η πειραματική αυτή εργασία σκόπευε να διερευνήσει την επίδραση της συγκέντρωσης του φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ ) από 10 ως 50 mg  $l^{-1}$  (ή 1,78-8,9 mg P  $l^{-1}$ ) στη συσσώρευση των υδατανθράκων και να διερευνηθεί η παραπάνω υπόθεση με απώτερο στόχο να γίνει μεγιστοποίηση της παραγωγής υδατανθράκων σε συνεχείς και ημι-συνεχείς καλλιέργειες του κυανοβακτηρίου *A. platensis*.

Ένα από τα κύρια προβλήματα στην παραγωγή μικροφυκών είναι το ζήτημα της συγκομιδής. Έχει υπολογιστεί ότι η συγκομιδή αποτελεί το 20 - 30% του συνολικού κόστους. Μέχρι στιγμής υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τη συγκομιδή των μικροφυκών όπως η φυγοκέντριση, κροκίδωση, επίπλευση, φιλτράρισμα κλπ (Christenson and Sims, 2011; Molina Grima et al., 2003; Uduman et al., 2010). Τα νηματώδη μικροφύκη όπως είναι το *A. platensis* είναι πιο εύκολα στη συγκομιδή τους λόγω της μορφολογίας τους και των σχετικά μεγάλων διαστάσεών τους σε σχέση με άλλα μονοκύτταρα είδη. Παρόλα αυτά η μέθοδος με φιλτράρισμα αντιμετωπίζει διάφορα προβλήματα με το κυριότερο να είναι η φραγή των πόρων των φίλτρων (Uduman et al., 2010). Μεταξύ των διαφόρων μεθόδων συγκομιδής η βιοσυσσωμάτωση (βιοκροκίδωση) της βιομάζας μπορεί να θεωρηθεί ως η πιο υποσχόμενη μέθοδος για οικονομική συγκομιδή των μικροφυκών. Η συσσωμάτωση επιτυγχάνεται είτε με την προσθήκη στην καλλιέργεια διαφόρων παραγόντων συσσωμάτωσης είτε λόγω της έκκρισης των μικροφυκών διαφόρων βιοπολυμερών τα οποία δρουν ως παράγοντες συσσωμάτωσης (Christenson and Sims, 2011). Στην παρούσα εργασία είχε παρατηρηθεί ότι η βιομάζα του *A. platensis* συσσωματωνόταν και καθίζανε σε μικρό χρονικό διάστημα χωρίς την προσθήκη παραγόντων συσσωμάτωσης ή παρεμβαίνοντας με οποιονδήποτε άλλο τρόπο. Συνεπώς εξετάστηκαν οι κινητικές της βιοσυσσωμάτωσης της βιομάζας του *A. platensis* με διαφορετική περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες.

## 2.2 Υλικά και μέθοδοι

### 2.2.1 Μικροοργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης

Το κυανοβακτήριο *Arthrospira platensis* SAG 21.99 καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα Zarrouk με σύσταση όπως στην Εργασία 1 με τη διαφορά ότι η συγκέντρωση του

φωσφόρου (ως  $K_2HPO_4$ ) διακυμάνθηκε αυτή τη φορά από 10 ως 50  $mg\ l^{-1}$ . Το εμβόλιο παρασκευάστηκε με την καλλιέργεια του *A. platensis* σε υπόστρωμα Zarrouk με συγκέντρωση φωσφόρου (ως  $K_2HPO_4$ ) 20  $mg\ l^{-1}$  και ένταση φωτός 120  $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ . Η διάρκεια της καλλιέργειας για την παρασκευή του εμβολίου διήρκησε 5 μέρες. Μετά τον εμβολιασμό οι καλλιέργειες περιείχαν αρχική συγκέντρωση ξηρής βιομάζας  $10 \pm 1\ mg\ l^{-1}$ .

Οι καλλιέργειες φωτίζονταν με λάμπες φθορισμού και με ένταση φωτός 120  $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ . Ο φωτισμός ήταν συνεχής (24 ώρες το εικοσιτετράωρο, επτά μέρες την εβδομάδα). Η ανανέωση του υποστρώματος των ημι-συνεχών καλλιεργειών γινόταν κάθε μέρα, επτά μέρες την εβδομάδα.

### 2.2.2 Αναλυτικές μέθοδοι

Ο προσδιορισμός της ξηρής βιομάζας, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, λιπιδίων, χλωροφύλλης και φωσφόρου έγιναν με τις ίδιες μεθόδους όπως στην Εργασία 1.

Στους υπολογισμούς της απομάκρυνσης του φωσφόρου, θεωρήθηκε ότι ο απομακρυσμένος φώσφορος προσλήφθηκε αποκλειστικά από το μικροοργανισμό και θεωρήθηκε ως ενδοκυτταρικός και ότι δεν υπήρξε καθόλου αβιοτική απομάκρυνση (κατακρήμνιση).

Οι μετρήσεις στις ασυνεχείς καλλιέργειες ήταν τουλάχιστον εις τριπλούν, ενώ στις ημι-συνεχείς καλλιέργειες οι αναλύσεις ήταν τουλάχιστον εις διπλούν για κάθε μέρα επί τρεις συνεχόμενες μέρες. Στις ημι-συνεχείς καλλιέργειες η κατάσταση θεωρήθηκε ως σταθερή (steady state) όταν η διακύμανση της συγκέντρωσης της βιομάζας ήταν λιγότερο από 5%.

Τα δεδομένα για την κινητική της βιοσυσσωμάτωσης της βιομάζας του *A. platensis* προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 560 nm σε γυάλινα φιαλίδια των 13 mm. Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1,5 ml. Η βιομάζα καθίζανε εντός του φιαλιδίου το οποίο μεταφερόταν στο φασματοφωτόμετρο για φωτομέτρηση. Η ακρίβεια της μέτρησης ήταν  $t \pm 10\ sec$ . Ο βαθμός της βιοσυσσωμάτωσης υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Βαθμός της βιοσυσσωμάτωσης (\%)} = 100 \cdot (1 - a \cdot b^{-1})$$

όπου  $a$  είναι η οπτική απορρόφηση στα 560 nm σε χρόνο 0 και  $b$  η οπτική απορρόφηση στα 560 nm σε χρόνο  $t$ . Για να προσδιοριστεί ο βαθμός της βιοσυσσωμάτωσης επιλέχθηκαν 4 ομάδες με μέση περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες 20%, 30%, 40% και 60% ( $\pm 2,5\%$ ). Οι μετρήσεις έγιναν σε δύο σειρές για κάθε ομάδα και εις τριπλούν για κάθε σειρά.

Ο ρυθμός πρόσληψης του φωσφόρου στις ασυνεχείς καλλιέργειες υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

$$R = (S_0 - S_t) (t_0 - t_t)^{-1}$$

όπου  $S_0$  και  $S_t$  είναι η αρχική συγκέντρωση φωσφόρου ( $\text{mg l}^{-1}$ ) και η συγκέντρωση φωσφόρου ( $\text{mg l}^{-1}$ ) σε χρόνο  $t$  (d), αντίστοιχα. Ο ρυθμός πρόσληψης του φωσφόρου στις ημι-συνεχείς καλλιέργειες έγινε με βάση τον τύπο:

$$R = (S_0 - S_t) D$$

όπου  $S_0$  η συγκέντρωση φωσφόρου ( $\text{mg l}^{-1}$ ) στο υπόστρωμα ανανέωσης,  $S_t$  η συγκέντρωση φωσφόρου ( $\text{mg l}^{-1}$ ) στο εξαχθέν υπόστρωμα ( $\text{mg l}^{-1}$ ) και  $D$  ο ρυθμός αραίωσης ( $\text{d}^{-1}$ ).

Ο ρυθμός ειδικής πρόσληψης ( $\text{mg P g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) υπολογίστηκε με βάση τον τύπο

$$R = (S_0 - S_t) D B^{-1}$$

όπου  $S_0$  η συγκέντρωση φωσφόρου ( $\text{mg l}^{-1}$ ) στο υπόστρωμα ανανέωσης,  $S_t$  η συγκέντρωση φωσφόρου ( $\text{mg l}^{-1}$ ) στο εξαχθέν υπόστρωμα ( $\text{mg l}^{-1}$ ),  $D$  ο ρυθμός αραίωσης ( $\text{d}^{-1}$ ) και  $B$  η συγκέντρωση της βιομάζας ( $\text{mg l}^{-1}$ ) στην καλλιέργεια κατά το τέλος του πειράματος.

### 2.2.3 Πειραματικό σχέδιο

Το κυανοβακτήριο *A. platensis* καλλιεργήθηκε σε συνεχείς και ημι-συνεχείς καλλιέργειες στις οποίες παρεχόταν φώσφορος σε συγκεντρώσεις από 10 μέχρι 50 mg l<sup>-1</sup> (ως K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (ή 1,78-8,9 mg P l<sup>-1</sup>). Η συγκέντρωση του φωσφόρου (ως K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) στο μάρτυρα ήταν 500 mg l<sup>-1</sup>. Οι ημι-συνεχείς καλλιέργειες τροφοδοτούνταν με ρυθμό αραιώσης 0,05 d<sup>-1</sup>, 0,1 d<sup>-1</sup>, 0,2 d<sup>-1</sup> and 0,3 d<sup>-1</sup>. Οι ασυνεχείς καλλιέργειες διήρκησαν 11 μέρες και οι ημι-συνεχείς καλλιέργειες με ρυθμό αραιώσης 0,05 and 0,1 d<sup>-1</sup> διήρκησαν 25 μέρες. Οι καλλιέργειες αυτές μετά τις 25 μέρες μετατράπηκαν στις καλλιέργειες που εφαρμόστηκε ρυθμός αραιώσης 0,2 and 0,3 d<sup>-1</sup>, αντίστοιχα. Οι καλλιέργειες αυτές διήρκησαν επιπλέον 10 μέρες.

Στις ημι-συνεχείς καλλιέργειες τα σύμβολα που χρησιμοποιούνται για την κάθε μία είναι C<sub>i/j</sub>, όπου i είναι ο ρυθμός αραιώσης και j η συγκέντρωση του φωσφόρου (ως K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (mg l<sup>-1</sup>). Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζεται η διάταξη και τα σύμβολα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε καλλιέργεια.

### Πίνακας 2.1 Πειραματικό σχέδιο και σύμβολα

Καλλιέργεια	Συγκέντρωση K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	Συγκέντρωση φωσφόρου mg P l <sup>-1</sup>
B <sub>10</sub> , C <sub>i/10</sub>	10	1,78
B <sub>20</sub> , C <sub>i/20</sub>	20	3,56
B <sub>30</sub> , C <sub>i/30</sub>	30	5,34
B <sub>40</sub> , C <sub>i/40</sub>	40	7,12
B <sub>50</sub> , C <sub>i/50</sub>	50	8,9
B <sub>Control</sub> , C <sub>i/Control</sub>	500	89

B=batch και C=ημι-συνεχείς καλλιέργειες

## 2.3 Αποτελέσματα

### 2.3.1 Ασυνεχείς καλλιέργειες

Στον Πίνακα 2.2 φαίνεται η παραγωγή, η παραγωγικότητα και η σύσταση της βιομάζας του *A. platensis* σε ασυνεχείς καλλιέργειες με συγκέντρωση του φωσφόρου (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) από 10 ως 50 mg l<sup>-1</sup>.

Στην **Εικόνα 2.1** φαίνεται η παραγωγή βιομάζας του *A. platensis* σε ασυνεχείς καλλιέργειες με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις. Σύμφωνα με την εικόνα αυτή η μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας  $2274 \pm 174 \text{ mg l}^{-1}$  παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια B<sub>30</sub> και η μικρότερη  $865 \pm 42 \text{ mg l}^{-1}$  στη καλλιέργεια B<sub>10</sub>. Από την καλλιέργεια B<sub>30</sub> και όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του φωσφόρου η παραγωγή βιομάζας μειωνόταν. Παρόλα αυτά, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P > 0,05$ ) μεταξύ των τιμών των καλλιεργειών B<sub>20</sub>, B<sub>30</sub>, B<sub>40</sub>, B<sub>50</sub> και B<sub>Control</sub>.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.2a** η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες ήταν υψηλή τις πρώτες μέρες μετά τον εμβολιασμό και μειωνόταν σταδιακά μέχρι ένα συγκεκριμένο χρονικό σημείο. Στις καλλιέργειες B<sub>10</sub>, B<sub>20</sub>, B<sub>30</sub> και B<sub>40</sub> η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες άρχισε να αυξάνεται και πάλι, ενώ στις καλλιέργειες B<sub>50</sub> και B<sub>Control</sub> η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες παρέμεινε περίπου σταθερή. Σε γενικές γραμμές η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.2b** συσχετίζεται αρνητικά με τη συγκέντρωση του φωσφόρου.

Στο τέλος των καλλιεργητικών περιόδων η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες διακυμάνθηκε μεταξύ 10,99 και 66,60% (**Πίνακας 2.2**). Η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες B<sub>50</sub> και B<sub>Control</sub> και η υψηλότερη (66,60%) στην καλλιέργεια B<sub>10</sub>. Παρόλα αυτά η μεγαλύτερη συνολική παραγωγή υδατανθράκων παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια B<sub>20</sub> ( $1147 \pm 44 \text{ mg l}^{-1}$ ) λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης σε βιομάζα.

Η περιεκτικότητα της βιομάζας σε χλωροφύλλη κυμάνθηκε από 0,28 μέχρι και 1,15% (**Πίνακας 2.2**). Στις καλλιέργειες B<sub>10</sub> και B<sub>20</sub> η χαμηλή περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη αντικατοπτρίζει την κατάσταση καταπόνησης του μικροφύκου λόγω τροφοπενίας φωσφόρου. Σε γενικές γραμμές η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη συσχετίζεται θετικά με τη συγκέντρωση του φωσφόρου, με εξαίρεση την καλλιέργεια B<sub>40</sub>. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες κυμάνθηκε από 21,11 μέχρι 42,92%. Η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια B<sub>10</sub> ενώ η υψηλότερη στο μάρτυρα (B<sub>Control</sub>). Με εξαίρεση την καλλιέργεια B<sub>30</sub>, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες συσχετίζεται θετικά με τη συγκέντρωση φωσφόρου. Η περιεκτικότητα σε λιπίδια κυμάνθηκε από 3,78 μέχρι 8,41%. Σε όλες τις καλλιέργειες η περιεκτικότητα ήταν

σχετικά σταθερή (7,43-8,41%), με εξαίρεση την καλλιέργεια B<sub>10</sub>, στην οποία παρατηρήθηκε σημαντικά μικρότερη περιεκτικότητα (3,78%).

Ο φώσφορος στο υπόστρωμα ανάπτυξης των καλλιεργειών απομακρύνθηκε πλήρως σε όλες τις καλλιέργειες εκτός του μάρτυρα (B<sub>Control</sub>). Ο φώσφορος ήταν μη ανιχνεύσιμος ήδη από την 5<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> μέρα (**Εικόνα 2.3a**), αλλά βιομάζα παραγόταν μέχρι και την 10<sup>η</sup> μέρα. Ο ενδοκυτταρικός φώσφορος μειώθηκε κατά την πάροδο του χρόνου και ήταν μεγαλύτερος όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του φωσφόρου στο υπόστρωμα ανάπτυξης (**Εικόνα 2.3b**). Σε γενικές γραμμές ο ρυθμός ειδικής πρόσληψης αύξανε με την αύξηση της συγκέντρωσης του φωσφόρου στο υπόστρωμα ανάπτυξης (**Εικόνα 2.3c**).



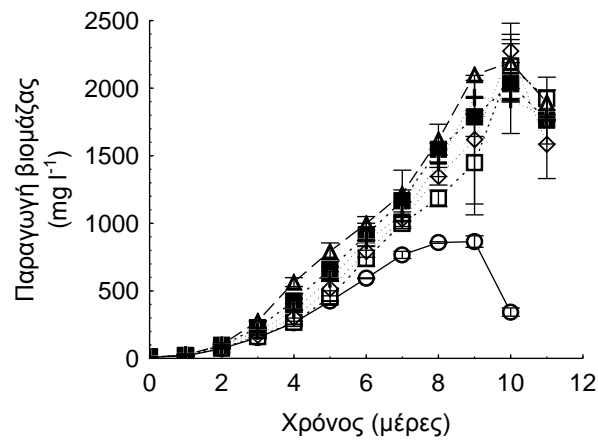
**Πίνακας 2.2 Παραγωγή, παραγωγικότητα και σύσταση της βιομάζας του *A. platensis* σε ασυνεχείς καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ )**

Καλλιέργεια	$P_{max}^1$ ( $mg\ l^{-1}$ )	Παραγωγικότητα βιομάζας ( $mg\ l^{-1}\ d^{-1}$ )	Υδατάνθρακες <sup>2</sup> (%)	Χλωροφύλλη <sup>2</sup> (%)	Πρωτεΐνες <sup>2</sup> (%)	Λιπίδια <sup>2</sup> (%)	Άλλα <sup>5</sup> (%)
B <sub>10</sub>	865 ± 42	87	66,60 ± 3,23	0,28 ± 0,02	21,11 ± 3,96	3,78 ± 0,31	8,2
B <sub>20</sub>	2162 ± 208	231	56,94 ± 2,20	0,66 ± 0,06	23,38 ± 2,13	7,43 ± 1,01	11,8
B <sub>30</sub>	2274 ± 174	227	36,61 ± 3,36	0,97 ± 0,08	41,12 ± 2,05	7,87 ± 0,33	13,4
B <sub>40</sub>	2189 ± 82	219	31,36 ± 3,46	0,94 ± 0,02	37,89 ± 0,47	8,17 ± 0,32	21,6
B <sub>50</sub>	2031 ± 271	203	13,76 ± 1,61	1,10 ± 0,01	40,98 ± 2,00	8,41 ± 0,03	35,6
B <sub>Control</sub>	1931 ± 126	193	10,99 ± 1,28	1,15 ± 0,03	42,92 ± 2,16	8,20 ± 0,08	36,7

(1) Η μέγιστη παραγωγή  $P_{max}$  αναφέρεται στη μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας που παρατηρήθηκε

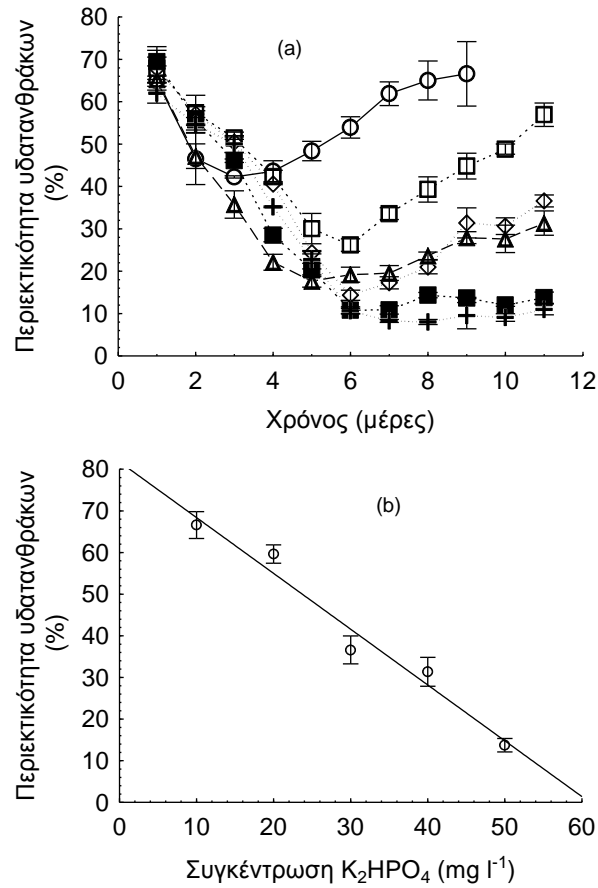
(2) Η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες, χλωροφύλλη, πρωτεΐνες και λιπίδια δεν αναφέρεται στη βιομάζα της στιγμής της μέγιστης συγκέντρωσης αλλά μια μέρα αργότερα

(3) Άλλα συστατικά αναφέρεται στο υπόλοιπο της βιομάζας μείον την περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, χλωροφύλλη, πρωτεΐνες και λιπίδια



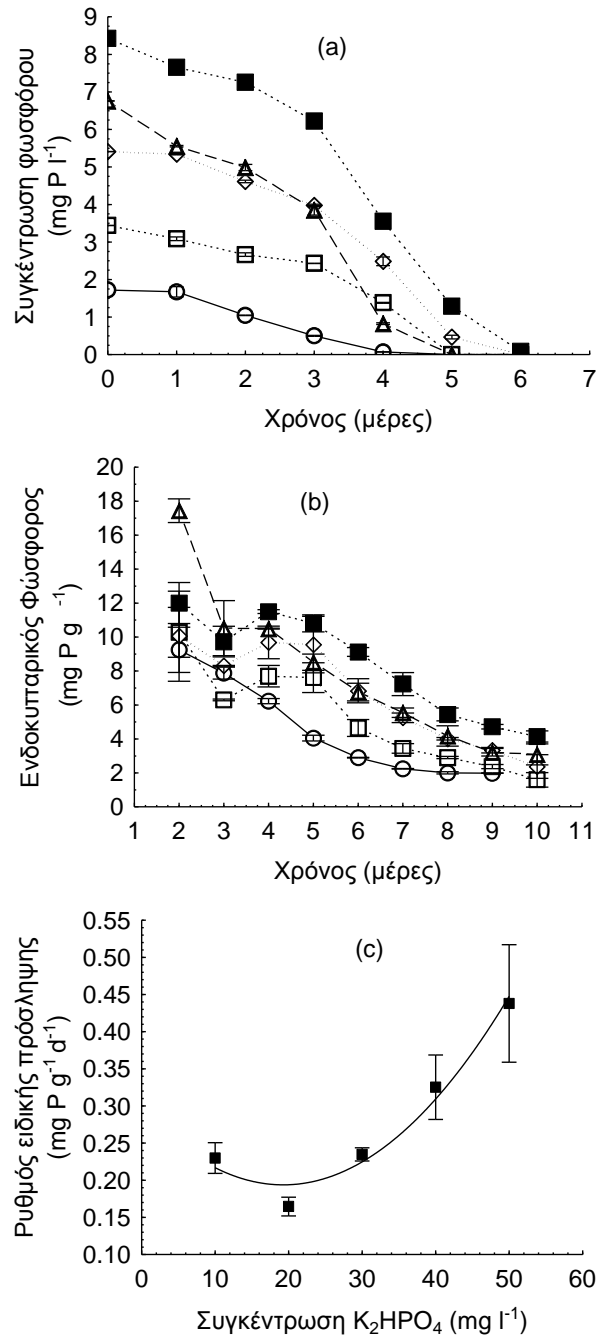
**Εικόνα 2.1 Παραγωγή βιομάζας του *A. platensis* κατά την πάροδο του χρόνου σε ασυνεχείς καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ ).**

○: B<sub>10</sub>, □: B<sub>20</sub>, ◇: B<sub>30</sub>, Δ: B<sub>40</sub>, ■: B<sub>50</sub> και +: B<sub>Control</sub>



**Εικόνα 2.2** Περιεκτικότητα της βιομάζας του *A. platensis* σε υδατάνθρακες a) κατά την πάροδο του χρόνου σε ασυνεχείς καλλιέργειες και b) με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

○: B<sub>10</sub>, □: B<sub>20</sub>, ◇: B<sub>30</sub>, Δ: B<sub>40</sub>, ■: B<sub>50</sub> και +: B<sub>Control</sub>



**Εικόνα 2.3** (a) Συγκέντρωση φωσφόρου, (b) ενδοκυτταρικός φώσφορος και (c) ρυθμός ειδικής πρόσληψης φωσφόρου σε ασυνεχείς καλλιέργειες του *Arthrospira platensis* με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

○: B<sub>10</sub>, □: B<sub>20</sub>, ◇: B<sub>30</sub>, Δ: B<sub>40</sub> και ■: B<sub>50</sub>

### 2.3.2 Ημι-συνεχείς καλλιέργειες

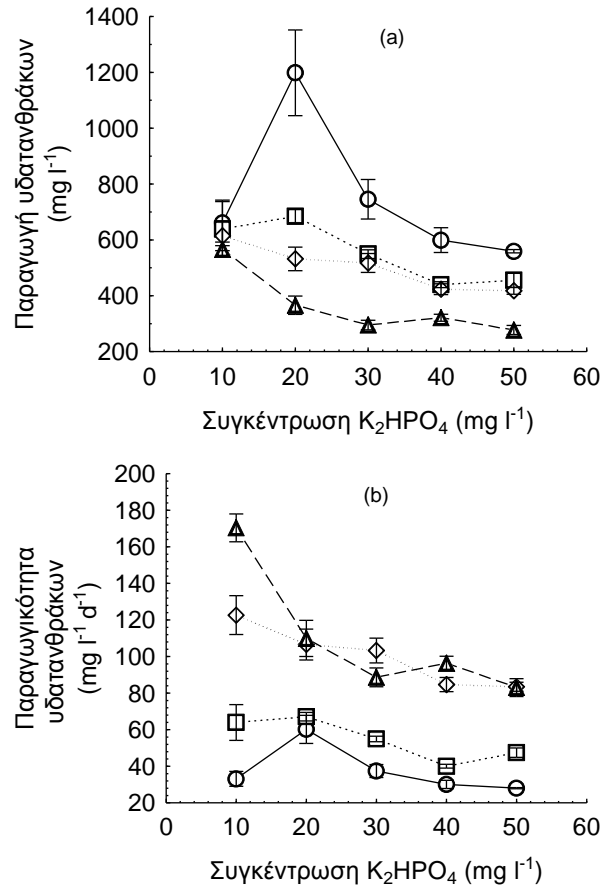
Στον **Πίνακα 2.3** φαίνεται η παραγωγή, η παραγωγικότητα και η σύσταση της βιομάζας του *A. platensis* σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ ) και ρυθμό αραίωσης 0,05, 0,1, 0,2 και 0,3  $d^{-1}$ . Η μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας ( $2933 \pm 153 \text{ mg } l^{-1}$ ) παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια  $C_{0,05/Control}$  ακολουθούμενη από την καλλιέργεια  $C_{0,05/50}$ . Η μικρότερη συγκέντρωση βιομάζας ( $937 \pm 81 \text{ mg } l^{-1}$ ) παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια  $C_{0,2/10}$ . Σε γενικές γραμμές, με εξαίρεση τις καλλιέργειες  $C_{i/10}$ , η συγκέντρωση της βιομάζας αυξανόταν με τη μείωση του ρυθμού αραίωσης. Επομένως οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βιομάζας παρατηρήθηκαν στις καλλιέργειες με το χαμηλότερο ρυθμό αραίωσης (0,05  $d^{-1}$ ). Στις καλλιέργειες  $C_{i/10}$  η συγκέντρωση της βιομάζας ήταν σχεδόν παρόμοια ( $937 - 1020 \text{ mg } l^{-1}$ ).

Η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες στις ημι-συνεχείς καλλιέργειες είχε παρόμοια τάση με τις ασυνεχείς καλλιέργειες, δηλαδή υπήρχε η γενική τάση να αυξάνεται η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες με τη μείωση της συγκέντρωσης του φωσφόρου (**Πίνακας 2.3**). Παρόλα αυτά η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε υδατάνθρακες παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια  $C_{0,05/20}$  ( $1198 \pm 87 \text{ mg } l^{-1}$ , **Εικόνα 2.4a**) και η μέγιστη παραγωγικότητα υδατανθράκων παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια  $C_{0,3/10}$  ( $170 \pm 7 \text{ mg } l^{-1} d^{-1}$ , **Εικόνα 2.4b**).

Η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη κυμάνθηκε από 0,46% ως 1,35%. Η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια  $C_{0,1/10}$  και η μεγαλύτερη στην καλλιέργεια  $C_{0,1/30}$ . Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες κυμάνθηκε μεταξύ 22,07% και 41,28%. Η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια  $C_{0,05/10}$  και η μεγαλύτερη στην καλλιέργεια  $C_{0,05/40}$ . Η περιεκτικότητα σε λιπίδια κυμάνθηκε από 4,72% ως 12,65%. Σε γενικές γραμμές η περιεκτικότητα σε λιπίδια ήταν χαμηλότερη στις καλλιέργειες με χαμηλή συγκέντρωση φωσφόρου, ενώ ήταν μεγαλύτερη στις καλλιέργειες του μάρτυρα. Στις υπόλοιπες καλλιέργειες η περιεκτικότητα ήταν περισσότερο ή λιγότερο σταθερή (5,61% ως 7,28%).

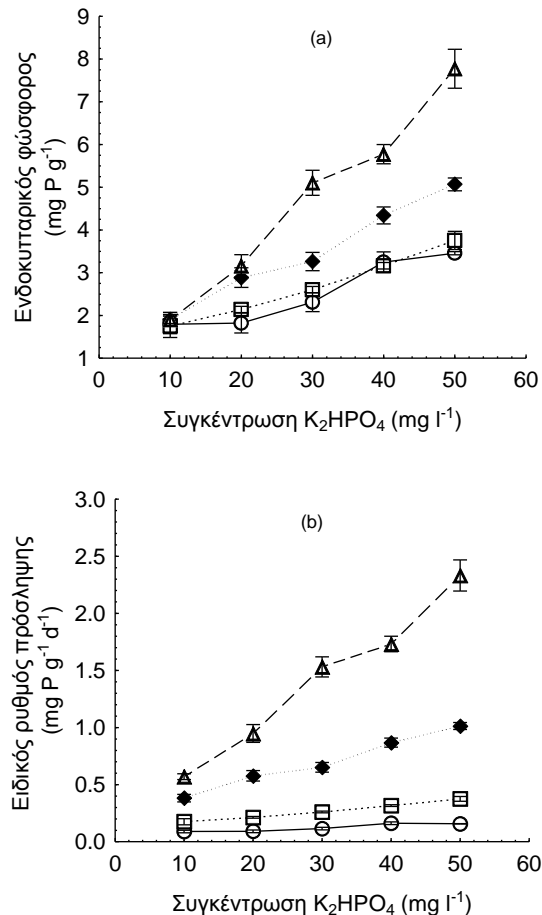
Η μόνη καλλιέργεια, εκτός των μαρτύρων στην οποία ανιχνεύθηκε φώσφορος στο υπόστρωμα ανάπτυξης ήταν η  $C_{0,3/50}$  με συγκέντρωση φωσφόρου  $819 \pm 79 \text{ } \mu\text{g } P l^{-1}$ . Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2,5 ο ενδοκυτταρικός φώσφορος και ο ρυθμός ειδικής πρόσληψης

του ήταν μεγαλύτεροι όσο αύξανε η αρχική συγκέντρωση του φωσφόρου στο υπόστρωμα ανάπτυξης.



**Εικόνα 2.4 (α) Παραγωγή υδατανθράκων και (β) παραγωγικότητα υδατανθράκων σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες *A. platensis* με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) και διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης.**

○: C<sub>0,05/j</sub>, □: C<sub>0,1/j</sub>, ◇: C<sub>0,2/j</sub> και Δ: C<sub>0,3/j</sub>



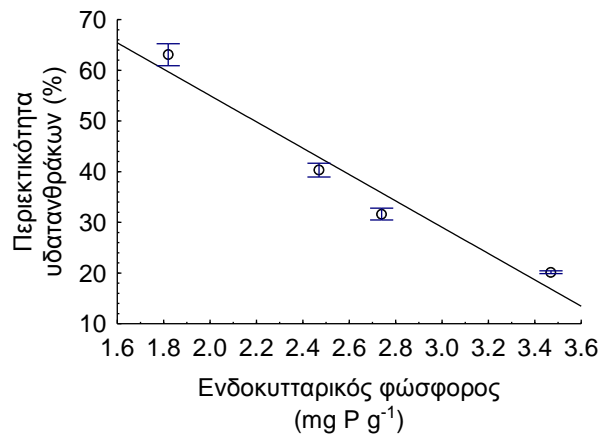
**Εικόνα 2,5 (α) ενδοκυτταρικός φώσφορος και (β) ειδικός ρυθμός πρόσληψης φωσφόρου σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες *A. platensis* με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) και διαφορετικούς ρυθμούς αραιώσης.**

○: C<sub>0,05/j</sub>, □: C<sub>0,1/j</sub>, ◇: C<sub>0,2/j</sub> και Δ: C<sub>0,3/j</sub>

### 2.3.3 Ασυνεχείς και ημι-συνεχείς καλλιέργειες

Είχε παρατηρηθεί ότι η συγκέντρωση φωσφόρου επηρέαζε στον ίδιο βαθμό τη σύσταση της βιομάζας του *A. platensis* σε όλους τους τύπους καλλιέργειας (ασυνεχής και ημι-συνεχής). Για το λόγο αυτό επιλέξαμε από όλες τις καλλιέργειες και τα δεδομένα μας τέσσερις ομάδες με βάση την περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (60%, 40%, 30% και 20%) για να τις συσχετίσουμε με τον αντίστοιχο για κάθε καλλιέργεια ενδοκυτταρικό φώσφορο. Τα αποτελέσματα αυτής της συσχέτισης φαίνονται στην **Εικόνα 2.6**. Παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις περιπτώσεις ότι ο ενδοκυτταρικός φώσφορος δεν ήταν

δυνατό να μειωθεί πέρα από την ελάχιστη τιμή των  $1,82 \text{ mg g}^{-1}$  (μέση τιμή). Η βιομάζα με αυτή την ελάχιστη τιμή ενδοκυτταρικού φωσφόρου είχε τη μέγιστη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (63,09%). Όπως φαίνεται από την εικόνα αυτή η σχέση της περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες έχει αρνητική σχέση με τον ενδοκυτταρικό φώσφορο.

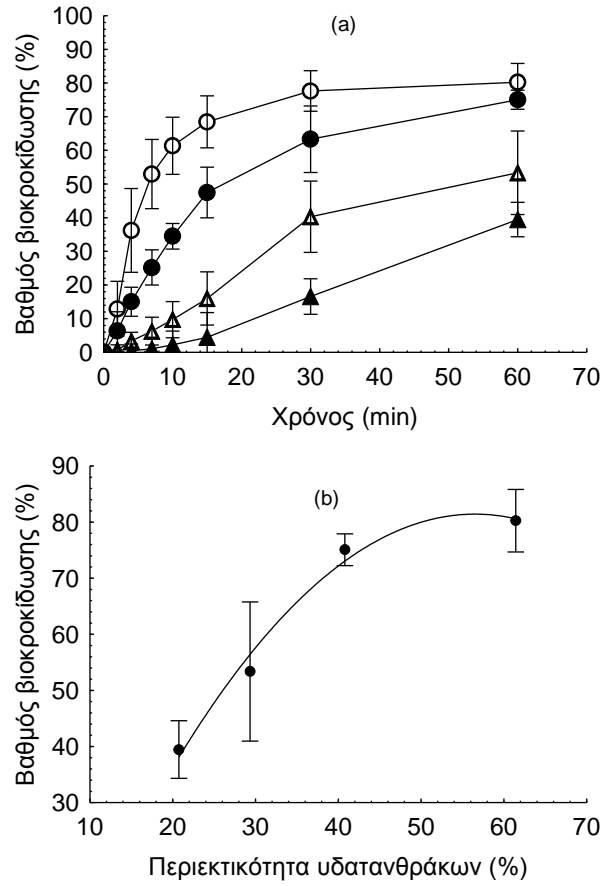


**Εικόνα 2.6** Περιεκτικότητα υδατανθράκων του *A. platensis* σε σχέση με τον ενδοκυτταρικό φώσφορο

### 2.3.4 Βιοσυσσωμάτωση βιομάζας

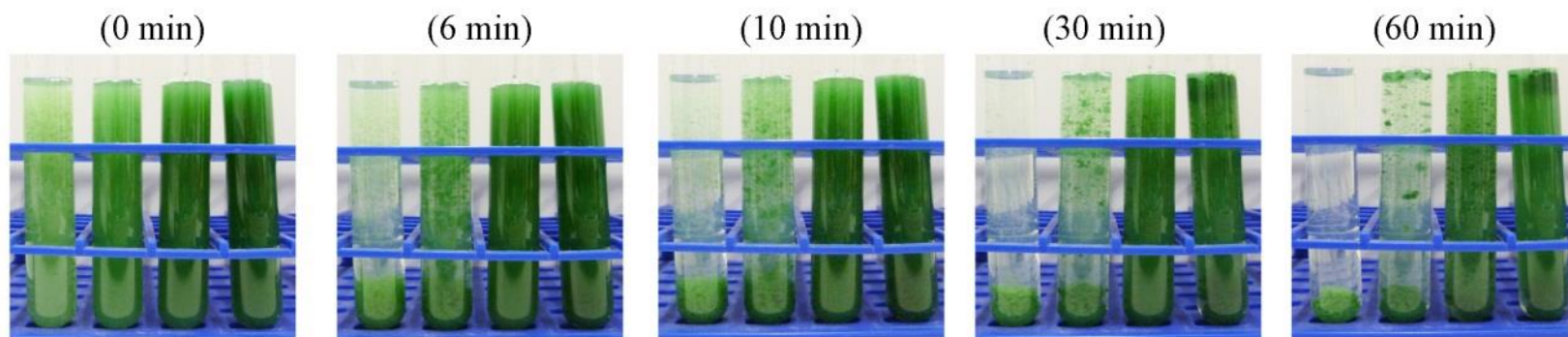
Στην **Εικόνα 2.7a** φαίνονται οι κινητικές της βιοσυσσωμάτωσης του *A. platensis* τεσσάρων ομάδων με βάση την περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες με 60%, 40%, 30% και 20%. Στην **Εικόνα 2.7b** φαίνεται η μέγιστη βιοσυσσωμάτωση για κάθε ομάδα ύστερα από 60 λεπτών ηρεμία. Σύμφωνα με τις εικόνες αυτές ο ρυθμός και ο βαθμός της βιοσυσσωμάτωσης ήταν μεγαλύτεροι όσο αυξανόταν η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες. Στην ομάδα με 60% υδατάνθρακες ο βαθμός της βιοσυσσωμάτωσης ήταν  $68,49\% \pm 7,73\%$  εντός 15 λεπτά και ανήλθε  $80,25\% \pm 5,58\%$  σε 60 λεπτά. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ενώ στις ομάδες με 60%, 40% και 30% υδατανθράκων η βιομάζα καθίζανε στην ομάδα με 20% υδατάνθρακες η βιομάζα είχε μια τάση να επιπλέει στην επιφάνεια (**Εικόνα 2.8**).





**Εικόνα 2.7 (a) κινητική βιοσυσσώματωση του *A. platensis* με διάφορες περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες και (b) μέγιστη βιοσυσσώματωση του *A. platensis* ύστερα από 60 min.**

○: 60%, ●: 40%, △: 30% και ▲: 20%.



**Εικόνα 2.8 Βιοσυσσώματωση του *A. platensis* με διαφορετικές περιεκτικότητες της βιομάζας του σε υδατόνθρακες.**

Από αριστερά προς τα δεξιά φαίνονται οι ομάδες με περιεκτικότητα σε υδατόνθρακες 60%, 40%, 30% και 20%.

**Πίνακας 2.3 Παραγωγή, παραγωγικότητα και σύσταση της βιομάζας του *A. platensis* σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ ) και ρυθμό αραίωσης 0.05, 0.1, 0.2 και 0.3  $d^{-1}$**

Καλλιέργεια	$P_{max}^1$ ( $mg\ l^{-1}$ )	Παραγωγικότητα βιομάζας ( $mg\ l^{-1}\ d^{-1}$ )	Υδατάνθρακες (%)	Χλωροφύλλη (%)	Πρωτεΐνες (%)	Λιπίδια (%)	Άλλα <sup>2</sup> (%)
<b>Ημι-συνεχείς</b>							
$C_{i/j}^3$							
$C_{0,05/10}$	997 ± 123	50	66,29 ± 4,27	0,52 ± 0,01	22,07 ± 3,79	5,24 ± 0,74	5,9
$C_{0,05/20}$	1952 ± 250	98	61,40 ± 4,46	0,65 ± 0,04	30,48 ± 2,10	6,63 ± 0,59	0,8
$C_{0,05/30}$	2312 ± 220	116	32,25 ± 1,43	1,16 ± 0,08	36,65 ± 0,66	6,81 ± 0,82	23,1
$C_{0,05/40}$	2190 ± 160	110	27,37 ± 1,74	1,09 ± 0,07	41,23 ± 2,88	6,27 ± 0,82	24,0
$C_{0,05/50}$	2574 ± 28	129	21,74 ± 2,03	1,06 ± 0,04	35,76 ± 2,29	7,28 ± 0,95	34,2
$C_{0,05/Control}$	2933 ± 153	147	8,48 ± 1,09	1,25 ± 0,03	43,21 ± 1,20	9,76 ± 1,31	37,3
$C_{0,1/10}$	1020 ± 156	102	62,69 ± 2,24	0,46 ± 0,03	23,43 ± 1,98	4,72 ± 0,45	8,7
$C_{0,1/20}$	1663 ± 57	163	41,19 ± 2,70	0,90 ± 0,06	36,29 ± 1,95	7,12 ± 0,09	14,5
$C_{0,1/30}$	2049 ± 57	205	26,80 ± 1,13	1,35 ± 0,06	41,28 ± 1,69	7,27 ± 0,73	23,3
$C_{0,1/40}$	2251 ± 54	205	19,54 ± 1,40	1,15 ± 0,02	39,56 ± 1,49	6,64 ± 0,36	33,1
$C_{0,1/50}$	2369 ± 134	247	19,22 ± 1,90	1,17 ± 0,03	37,06 ± 1,20	6,33 ± 0,29	36,2
$C_{0,1/Control}$	2439 ± 95	244	9,68 ± 0,79	1,21 ± 0,06	36,76 ± 0,29	11,38 ± 0,55	40,95
$C_{0,2/10}$	937 ± 81	187	65,61 ± 2,86	-	20,39 ± 5,06	3,95 ± 0,39	10,1
$C_{0,2/20}$	1233 ± 98	247	43,15 ± 1,91	0,68 ± 0,06	26,61 ± 2,42	5,69 ± 1,21	23,9
$C_{0,2/30}$	1637 ± 107	327	31,60 ± 3,50	1,11 ± 0,09	33,92 ± 2,07	5,61 ± 0,66	27,8
$C_{0,2/40}$	1640 ± 75	328	25,83 ± 1,86	1,32 ± 0,05	39,93 ± 2,58	6,50 ± 0,42	26,4
$C_{0,2/50}$	1756 ± 52	351	23,80 ± 1,37	1,27 ± 0,06	40,29 ± 2,01	5,98 ± 0,37	28,66
$C_{0,2/Control}$	1874 ± 69	375	15,77 ± 0,99	1,37 ± 0,05	40,45 ± 1,97	9,03 ± 0,94	33,4
$C_{0,3/10}$	942 ± 42	283	60,21 ± 2,22	-	22,17 ± 2,73	4,51 ± 0,41	13,1
$C_{0,3/20}$	1126 ± 93	338	32,52 ± 1,64	1,11 ± 0,09	31,71 ± 1,67	6,34 ± 0,87	28,3
$C_{0,3/30}$	1046 ± 60	314	28,23 ± 1,94	1,37 ± 0,09	36,72 ± 3,40	7,13 ± 0,30	26,6
$C_{0,3/40}$	1233 ± 48	370	26,06 ± 1,97	1,39 ± 0,07	39,70 ± 2,97	6,87 ± 0,32	26,0
$C_{0,3/50}$	1042 ± 61	312	26,62 ± 2,20	1,35 ± 0,06	42,01 ± 2,50	6,92 ± 0,37	23,1
$C_{0,3/Control}$	1337 ± 54	401	22,50 ± 1,48	1,36 ± 0,07	41,30 ± 2,54	12,65 ± 0,86	22,2

(1) Η μέγιστη παραγωγή  $P_{max}$  αναφέρεται στη συγκέντρωση βιομάζας που μετρήθηκε για τρεις συνεχόμενες μέρες

(2) Άλλα συστατικά αναφέρεται στο υπόλοιπο της βιομάζας μείον την περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, χλωροφύλλη, πρωτεΐνες και λιπίδια

(3) Όπου i είναι ο ρυθμός αραίωσης και j η συγκέντρωση του φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ )

## 2.4 Συζήτηση

Στην εργασία αυτή εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του φωσφόρου ( $K_2HPO_4$ ) με εύρος τιμών 10 ως 50  $mg\ l^{-1}$  (ή 1,78 ως 8,9  $mg\ P\ l^{-1}$ ) στην περιεκτικότητα της βιομάζας του *A. platensis* σε υδατάνθρακες, με απώτερο σκοπό να γίνει βελτιστοποίηση των παραγόμενων υδατανθράκων. Οι παραγόμενοι υδατάνθρακες προτείνεται να αποτελούν πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων.

Στις ασυνεχείς καλλιέργειες η παραγωγή βιομάζας ήταν σχεδόν παρόμοια για όλες τις καλλιέργειες ( $P>0,05$ ) εκτός της καλλιέργειας  $B_{10}$ . Στις ημι-συνεχείς καλλιέργειες ο ρυθμός αραίωσης επέδρασε σημαντικά στην παραγωγή και στην παραγωγικότητα σε βιομάζα. Όσο αυξανόταν ο ρυθμός αραίωσης μειωνόταν η συγκέντρωση της βιομάζας αλλά αυξανόταν η παραγωγικότητά της. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε απόλυτη συμφωνία με τη θεωρία των ημι-συνεχών καλλιεργειών εν γένει αλλά και συγκεκριμένα καλλιεργειών του *A. platensis* (Bezerra et al., 2011; Maier, 2008). Στις ημι-συνεχείς καλλιέργειες η συγκέντρωση της βιομάζας ήταν υψηλότερη στους μάρτυρες αλλά οι διαφορές των μαρτύρων με άλλες καλλιέργειες με χαμηλή συγκέντρωση φωσφόρου ήταν στατιστικά μη σημαντική, εκτός του ρυθμού αραίωσης  $0,05\ d^{-1}$ .

Το κυανοβακτήριο *A. platensis* είναι ένα από τα σημαντικά υποψήφια μικροφύκη για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Παρόλα αυτά η καλλιέργειά του προϋποθέτει σχετικά μεγάλες ποσότητες θρεπτικών στοιχείων (λιπασμάτων). Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα ανάπτυξης είναι το Zarrouk (1966) και το Schlösser (1982), τα οποία στη σύστασή τους περιέχουν φώσφορο (ως  $K_2HPO_4$ ) σε συγκέντρωση  $500\ mg\ l^{-1}$ . Με βάση την υπόθεση ότι οι πηγές φωσφόρου μπορεί να έχουν εξαντληθεί σε 50-100 χρόνια (Cordell et al., 2009; Elser, 2012), η χρήση φωσφόρου για παραγωγή βιομάζας για ενεργειακούς σκοπούς θα πρέπει να μειωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας όπως και της προηγούμενης (Εργασία 1), (Markou et al., 2012d) δείχνουν ότι είναι δυνατή η μείωση της χρησιμοποιούμενης ποσότητας φωσφόρου κατά μια τάξη μεγέθους χωρίς τη σημαντική μείωση στην παραγόμενη βιομάζα.

Τα μικροφύκη μάλλον περιέχουν περισσότερο φώσφορο στη βιομάζα του σε σχέση με κάποια χερσαία ενεργειακά φυτά. Για το λόγο αυτό οι χρησιμοποιούμενες ποσότητες φωσφόρου για την καλλιέργεια μικροφυκών είναι περισσότερες (Kering et al., 2012; Monti et al., 2008; Tokuzoglu and Ünal, 2003). Παρόλα αυτά η καλλιέργεια των μικροφυκών γίνεται με τον ένα ή τον άλλο τρόπο σε κλειστά συστήματα (ανοιχτές δεξαμενές είτε φωτοβιοαντιδραστήρες) τα οποία μάλλον έχουν μεγαλύτερη απόδοση εφαρμογής λιπασμάτων σε σχέση με τα χερσαία φυτά, γιατί στα τελευταία υπάρχουν μεγάλες απώλειες λιπασμάτων λόγω απορροών (Blanco-Canqui, 2010). Η βιομάζα των μικροφυκών τυπικά περιέχει περίπου 1% σε φώσφορο (Powell et al., 2009), αλλά το *A. platensis* σε σχέση με άλλα είδη μικροφυκών περιέχει λιγότερο φώσφορο (Tokuzoglu and Ünal, 2003). Επομένως, με βάση την υπόθεση ότι οι επίγειες πηγές φωσφόρου στερούν (Cordell et al., 2009; Elser, 2012) η καλλιέργεια του *A. platensis* υπό συνθήκες τροφopenίας φωσφόρου μπορεί να είναι πλεονεκτικότερη της καλλιέργειας χερσαίων ενεργειακών φυτών για την παραγωγή βιοκαυσίμων.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.2** η αρχική περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες του *A. platensis* ήταν υψηλή και μειώθηκε κάποια στιγμή. Στις καλλιέργειες B<sub>10</sub>, B<sub>20</sub>, B<sub>30</sub> και B<sub>40</sub> η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες άρχισε να αυξάνεται πάλι, γεγονός που δείχνει ότι οι καλλιέργειες αυτές εισερχόταν σε κατάσταση τροφopenίας. Σε αντίθεση στις καλλιέργειες B<sub>50</sub> και B<sub>Control</sub> η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες παρέμεινε σταθερή λόγω της περίσσιας του παρεχόμενου φωσφόρου. Η αρχική υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες μπορεί να οφείλεται στο ότι στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης της βιομάζας επικρατούσαν συνθήκες υψηλού φωτισμού, οποίος ευνοεί τη συσσώρευση υδατανθράκων στη βιομάζα των μικροφυκών (Hu, 2004). Παρόμοια αρχική περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες έχει αναφερθεί και από τους Valenzuela-Espinoza et al. (2002) και Stehfest et al. (2005). Οι Valenzuela-Espinoza et al. (2002) παρατήρησαν ότι η περιεκτικότητα της βιομάζας του *Isochrysis aff. glabana* (clone T-Iso) σε υδατάνθρακες μειώθηκε περίπου κατά τρεις φορές μέσα σε τέσσερις μέρες, ενώ οι Stehfest et al. (2005) παρατήρησαν μείωση της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες του φυτοπλαγκτόν κατά δύο φορές μέσα σε επτά μέρες.

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες του *A. platensis* αυξανόταν γενικά όσο η συγκέντρωση του φωσφόρου αυξανόταν. Η μόνη σημαντική επίδραση ήταν στις καλλιέργειες με τροφοπενία φωσφόρου στις οποίες η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ήταν σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τις άλλες καλλιέργειες λόγω της έντονης συσσώρευσης υδατανθράκων (Cade-Menun and Paytan, 2010; Healey and Hendzel, 1975; Kilham et al., 1997). Φαίνεται ότι η αύξηση του λόγου υδατανθράκων προς πρωτεΐνες οφείλεται κυρίως στην αύξηση της σύνθεσης των υδατανθράκων παρά στη μείωση της σύνθεσης πρωτεϊνών (Dean et al., 2008a).

Η συγκέντρωση του φωσφόρου δεν έδειξε μια ξεκάθαρη τάση στην επίδρασή της στην περιεκτικότητα της βιομάζας σε λιπίδια, εκτός από τις καλλιέργειες με την ελάχιστη συγκέντρωση φωσφόρου. Σε αυτές τις καλλιέργειες η περιεκτικότητα σε λιπίδια ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τις άλλες. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με παρατηρήσεις άλλων ερευνών (Cade-Menun and Paytan, 2010; Dean et al., 2008a) στις οποίες αναφέρεται το αντίθετο, ότι δηλαδή η τροφοπενία φωσφόρου προκαλεί αύξηση της περιεκτικότητας σε λιπίδια.

Η περιεκτικότητα της βιομάζας σε χλωροφύλλη μειωνόταν όσο μειωνόταν η συγκέντρωση του φωσφόρου. Οι καλλιέργειες με τροφοπενία φωσφόρου είχαν όψη ξανθή (κιτρίνισμα) η οποία είναι τυπικό σύμπτωμα της χλώρωσης λόγω τροφοπενίας κατά την οποία οι φωτοσυνθετικές χρωστικές αποδομούνται (Luque and Forchhammer, 2008).

Ο έλεγχος της σύστασης της βιομάζας μέσω της διεργασίας της τροφοπενίας φαίνεται να είναι μια μέθοδος ικανή για την παραγωγή βιομάζας μικροφυκών πλούσια σε επιθυμητά συστατικά. Η κατάσταση τροφοπενίας ωθεί τα μικροφύκη να αλλάξουν τις μεταβολικές τους συνήθειες έτσι ώστε να ανταπεξέλθουν κάτω από τις συνθήκες καταπόνησης που προκαλεί η τροφοπενία. Αυτό ωθεί το μικροοργανισμό να συσσωρεύει είτε υδατάνθρακες είτε λιπίδια εις βάρος άλλων μεταβολιτών ανάλογα του θρεπτικού στοιχείου της τροφοπενίας. Η συσσώρευση μεταβολιτών υψηλής αξίας έχει επίσης αναφερθεί (Orosa et al., 2001; Yaşar, 2007). Η πλειοψηφία της έρευνας έχει επικεντρωθεί στη συσσώρευση λιπιδίων στη βιομάζα των μικροφυκών για την παραγωγή βιοντίζελ (Hu et al., 2008; USDOE, 2010). Έρευνες για τη συσσώρευση υδατανθράκων

στη βιομάζα μικροφυκών με τροφοπενία για την παραγωγή βιοκαυσίμων άλλων από βιοντίξελ είναι σπάνιες (Brányiková et al., 2011; Dragone et al., 2011).

Η τροφοπενία φωσφόρου προκαλεί μια δραστική αύξηση της περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες, ο βαθμός της οποίας φαίνεται να είναι αντιστρόφως ανάλογος του ενδοκυτταρικού φωσφόρου (**Εικόνα 2.6**). Αυτή η παρατήρηση μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το ένζυμο ADP-glucose pyrophosphorylase το οποίο ελέγχει τη σύνθεση των υδατανθράκων ενεργοποιείται από το 3-phosphoglycerate και παρεμποδίζεται από τον ανόργανο φώσφορο. Όταν η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου εντός του κυτοπλάσματος είναι χαμηλή τότε ενεργοποιείται το ένζυμο ADPG (ADP-glucose pyrophosphorylase) και έτσι προκαλεί τη σύνθεση υδατανθράκων. Ο βαθμός της συσσώρευσης των υδατανθράκων είναι ανάλογος του λόγου GP (3-phosphoglycerate) προς τον ανόργανο φώσφορο (Gómez-Casati et al., 2003; Gómez Casati et al., 2001; Heldt et al., 1977). Επιπλέον, ο φώσφορος είναι συστατικό του ενεργειακού φορέα ATP, ο οποίος φορέας είναι ουσιαστικός για την επιτέλεση διαφόρων μεταβολικών διεργασιών. Μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι η τροφοπενία του φωσφόρου μειώνει τη διαθεσιμότητα του ATP και την περιορίζει στη μεταβολική οδό του κύκλου Calvin-Benson στον οποίο δεσμεύεται ο άνθρακας και συντίθενται οι υδατάνθρακες. Αυτό προκαλεί τη συσσώρευση των παραγόμενων υδατανθράκων και τη μείωση της σύνθεσης άλλων συστατικών (πχ πρωτεϊνών). Στην παρούσα εργασία η περιεκτικότητα των υδατανθράκων ανήλθε σε ένα μέγιστο ποσοστό  $63.09 \pm 3.43\%$  για ποσότητα φωσφόρου  $1,82 \pm 0,16$  mg ανά g βιομάζας. Αυτό σημαίνει ότι συγκεκριμένες ποσότητες φωσφόρου μπορούν να υποστηρίξουν μία μέγιστη παραγωγή βιομάζας η οποία έχει και μέγιστη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες. Σε αντίθεση με άλλες έρευνες (Brányiková et al., 2011), στις οποίες το θρεπτικό συστατικό εξαιρείται από την αρχή, αυτή η έρευνα προτείνει ότι η καλλιέργεια μικροφυκών με τροφοπενία θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη μια ελάχιστη ποσότητα του θρεπτικού συστατικού η οποία θα πρέπει να παρέχεται στις καλλιέργειες έτσι ώστε αφενός να παράγεται η μέγιστη ποσότητα βιομάζας και αφετέρου ταυτόχρονα η βιομάζα να έχει συσσωρεύσει υδατάνθρακες στο μέγιστο βαθμό. Από όσα είναι γνωστά αυτή η έρευνα είναι η πρώτη που προτείνει κάτι τέτοιο και έχει ως στόχο τη μεγιστοποίηση της παραγωγής υδατανθράκων από βιομάζα κυανοβακτηρίων μέσω της διεργασίας της τροφοπενίας φωσφόρου.

Ενώ ορισμένα είδη μικροφυκών έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες όπως το *Spirogyra* sp (33-64%), *Porphyridium cruentum* (40-57%) και *Scenedesmus dimorphus* (21-52%) (Harun et al., 2010a), το *A. platensis* είναι γνωστό για τη σχετικά υψηλή παραγωγικότητα βιομάζας (Brennan and Owende, 2010; Mata et al., 2010). Επίσης το *A. platensis* πλεονεκτεί σε σχέση με άλλα είδη λόγω της ικανότητάς του να αναπτύσσεται σε υφάλμυρα και αλμυρά νερά έχοντας χαμηλό κίνδυνο επιμολύνσεων (Markou and Georgakakis, 2011), χαρακτηριστικά που το κάνουν να είναι ένα από τα κύρια είδη μικροφυκών για την παραγωγή βιοκαυσίμων.

Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες στα χερσαία ενεργειακά φυτά όπως είναι το switchgrass ή ο μίσχανθος ανέρχεται ως και στο 90%. Παρόλα αυτά, οι υδατάνθρακες αυτοί είναι κυρίως κυτταρίνη, ημι-κυτταρίνη και λιγνίνη (Chang et al., 2001; Sørensen et al., 2008). Ειδικά η ημι-κυτταρίνη και η λιγνίνη είναι μορφές υδατανθράκων που ανθίστανται ισχυρά στα ένζυμα και θα πρέπει να προ-επεξεργαστούν πρώτα για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για βιολογικές τεχνολογίες μετατροπής της βιομάζας σε βιοενέργεια (Alvira et al., 2010). Σε αντίθεση με τα λιγνοκυτταρινούχα φυτά τα μικροφύκη δεν περιέχουν ημι-κυτταρίνη και λιγνίνη και μερικά είδη δεν περιέχουν καν κυτταρίνη ή υπάρχουν ήδη που τα κύτταρά τους αποδομούνται εύκολα όπως του *A. platensis* (Mussgnug et al., 2010). Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά καταστούν τα μικροφύκη ως σημαντική πρώτη ύλη για βιολογικές τεχνολογίες μετατροπής της βιομάζας σε ενέργεια.

Όπως φαίνεται στους πίνακες 2.2 και 2.3 το μέρος της βιομάζας που αφορά συστατικά άλλα από τους υδατάνθρακες, τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τη χλωροφύλλη, όπως ανόργανα στοιχεία, DNA, RNA, βιταμίνες κλπ δεν είναι σταθερό και διακυμαίνεται ανάλογα τη συγκέντρωση του φωσφόρου. Η γενική τάση του μέρους αυτού είναι να μειώνεται με το βαθμό της τροφοπενίας. Αυτό πιθανόν να οφείλεται, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω στο ότι κατά την τροφοπενία συσσωρεύονται κυρίως υδατάνθρακες εις βάρος των άλλων συστατικών της βιομάζας.

Ένα σημαντικό πρόβλημα που αντιμετωπίζει η καλλιέργεια μικροφυκών είναι το ζήτημα της συγκομιδής. Ανάμεσα στις διάφορες μεθοδολογίες συγκομιδής η βιοσυσσωμάτωση θεωρείται ως η πιο οικονομική λύση (Lavoie and de la Nouë, 1987; Van Den Hendel et al., 2011). Συσσωμάτωση της βιομάζας μπορεί να επιτευχθεί με την



προσθήκη παραγόντων συσσωμάτωσης (de Godos et al., 2011; Papazi et al., 2010; Vandamme et al., 2010) ή με την παρουσία διαφόρων άλλων μικροοργανισμών που προκαλούν συσσωμάτωση (Salim et al., 2010; Van Den Hende et al., 2011) ή με βιολογικό τρόπο (βιοσυσσωμάτωση) (Lavoie and de la Noüe, 1987; Sukenik and Shelef, 1984). Η βιολογική (ή φυσική) συσσωμάτωση των μικροφυκών μπορεί να χωριστεί σε δύο τύπους (α) την αυτοσυσσωμάτωση και (β) τη βιοσυσσωμάτωση. Ο μηχανισμός της αυτοσυσσωμάτωσης έχει περιγραφεί από τους Sukenik and Shelef (1984) που σύμφωνα με αυτούς συμβαίνει όταν το pH της καλλιέργειας ανέβει σημαντικά και αλληλεπιδράσει με τις συγκεντρώσεις του φωσφόρου και του ασβεστίου. Ο μηχανισμός της βιοσυσσωμάτωσης προκύπτει λόγω των εκκρινόμενων πολυμερών (π.χ. πολυσακχαριτών) τα οποία δρουν ως παράγοντες συσσωμάτωσης (Lavoie and de la Noüe, 1987). Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε ότι η πλούσια σε υδατάνθρακες βιομάζα συσσωματωνόταν γρήγορα. Όταν σταμάτησε η ανάδευση των καλλιεργειών η βιομάζα συσσωματωνόταν και καθίζανε. Ο ρυθμός και ο βαθμός αυτών των φαινομένων ήταν ανάλογος της περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες. Όσο αυξανόταν η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες τόσο τα φαινόμενα αυτά ήταν εντονότερα. Οι εκκριμένοι υδατάνθρακες του *A. platensis* στο υπόστρωμα ανάπτυξης ήταν περισσότεροι στις καλλιέργειες με βιομάζα με μικρή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και μειωνόταν καθώς η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες αυξανόταν (τα δεδομένα δεν παρατίθενται). Από πρώτη ματιά αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη θεώρηση ότι τα πολυμερή εκκρίματα δρουν ως παράγοντες συσσωμάτωσης (Christenson and Sims, 2011; Lavoie and de la Noüe, 1987). Παρόλο που τα πολυμερή εκκρίματα ενδέχεται να δρουν ως παράγοντες συσσωμάτωσης, από την έρευνα αυτή εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ενδοκυτταρική περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες είναι σημαντικότερος και ουσιαστικότερος παράγοντας για την εμφάνιση του φαινομένου της βιοσυσσωμάτωσης. Από όσα είναι γνωστά αυτή η έρευνα είναι η πρώτη που συσχετίζει την περιεκτικότητα της βιομάζας των μικροφυκών σε υδατάνθρακες και το φαινόμενο της βιοσυσσωμάτωσης. Παρόλα αυτά πολύ περισσότερη έρευνα χρειάζεται πάνω σε αυτό το ζήτημα για να καθοριστούν και διάφοροι άλλοι παράγοντες που ενδέχεται να επηρεάζουν το ρυθμό και το βαθμό βιοσυσσωμάτωσης, όπως το pH, η συγκέντρωση και μορφολογία της βιομάζας, οι διαστάσεις και το σχήμα των φωτοβιοαντιδραστήρων κλπ.

Οι καλλιέργειες B<sub>10</sub>, B<sub>20</sub> και B<sub>30</sub> κατά την 13<sup>η</sup> μέρα κατέρρευσαν. Το κυριότερο χαρακτηριστικό πριν την κατάρρευση ήταν η έντονη συσσωμάτωση των κυττάρων. Επίσης σε ορισμένες ημι-συνεχείς καλλιέργειες (C<sub>0,05/10</sub>, C<sub>0,05/20</sub>, C<sub>0,1/10</sub>, C<sub>0,1/20</sub> και C<sub>0,2/10</sub>) η συσσωμάτωση των κυττάρων είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του αριθμού των κυττάρων εν αιωρήσει. Θεωρείται ότι αυτά τα χαρακτηριστικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό του χρόνου συγκομιδής της καλλιέργειας.

## 2.5 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά μπορεί να ειπωθεί ότι η καλλιέργεια του κυανοβακτηρίου *A. platensis* με τη διεργασία της τροφοπενίας φωσφόρου η οποία επιτρέπει να παραχθεί βιομάζα πλούσια σε υδατάνθρακες η οποία βιοσυσσωματώνεται γρήγορα, αποτελεί μια καλή λύση για την παραγωγή πρώτης ύλης για ενεργειακούς σκοπούς.

### 3

## **Μεταβολή της σύστασης της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis* με την παροχή διαφόρων συγκεντρώσεων φωσφόρου**

### 3 Μεταβολή της σύστασης της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis* με την παροχή διαφόρων συγκεντρώσεων φωσφόρου

#### Περίληψη

Στην εργασία αυτή διερευνήθηκε η αλλαγή της σύστασης της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *Arthrospira (Spirulina) platensis* κάτω από διαφορετικές συγκεντρώσεις οριακού φωσφόρου. Παρατηρήθηκε ότι η αλλαγή της σύστασης της βιομάζας γίνεται κλιμακωτά καθώς ο ενδοκυτταρικός φώσφορος μειώνεται. Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και λιπίδια αυξήθηκε από 9% σε 65% και από 4,9% σε 7,5%, αντίστοιχα ενώ η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες μειώθηκε από 46,5% σε 25% καθώς ο ενδοκυτταρικός φώσφορος μειωνόταν. Η αύξηση της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες και λιπίδια είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου άνθρακα προς άζωτο (C/N) από 4,6 στο 12,2.

#### 3.1 Εισαγωγή

Τα μικροφύκη είναι φωτοσυνθέτοντες μικροοργανισμοί οι οποίοι μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια και ορισμένα ανόργανα στοιχεία σε οργανικές ουσίες τις οποίες αποθηκεύουν στη βιομάζα τους. Θεωρούνται ότι έχουν υψηλή φωτοσυνθετική απόδοση και αναπτύσσονται γρήγορα με μικρές ανάγκες σε λιπάσματα. Για τους λόγους αυτούς θεωρούνται ότι έχουν περισσότερα πλεονεκτήματα σε σχέση με τα χερσαία φυτά για την παραγωγή βιομάζας (Costa and de Morais, 2011). Η αποθηκευμένη χημική ενέργεια στη βιομάζα είναι κυρίως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λιπίδια. Η σύσταση της βιομάζας των μικροφυκών επηρεάζεται έντονα από τους περιβαλλοντικούς και καλλιεργητικούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό η σύσταση της βιομάζας τους είναι δυνατό να ελεγχθεί. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον έλεγχο της σύστασης της βιομάζας των μικροφυκών σχετίζεται με την τροφοπενία αζώτου για τη μεταβολή της μεταβολικής οδού έτσι ώστε το μικροφύκος να συσσωρεύει λιπίδια για την παραγωγή βιοντίζελ (Li et al., 2008). Εκτός της παραγωγής βιοντίζελ τα μικροφύκη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης και βιοαερίου. Ειδικά για την παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω της αναερόβιας χώνευσης η βασική πρώτη ύλη

είναι οι υδατάνθρακες, ενώ για την παραγωγή βιοαερίου μέσω της αναερόβιας χώνευσης η ελεγχόμενη σύσταση της βιομάζας έχοντας το λόγο άνθρακα προς άζωτο μεταξύ του εύρους 20:1 και 35:1 μπορεί να είναι επιθυμητή (Demirbas, 2010; Sialve et al., 2009).

Σε μια προηγούμενη εργασία (Εργασία 2), (Markou et al., 2012b) η τροφοπενία φωσφόρου σε καλλιέργειες του of *A. platensis* είχε ως αποτέλεσμα την έντονη αύξηση της περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες. Παρατηρήθηκε ότι η μεταβολή της σύστασης της βιομάζας ήταν ανάλογη του βαθμού της τροφοπενίας. Για το λόγο αυτό η παρούσα εργασία έχει ως στόχο να παρουσιάσει και να συζητήσει τη σχέση μεταξύ τροφοπενίας φωσφόρου και σύστασης της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis* με περισσότερες λεπτομέρειες σε σχέση με την Εργασία 2.

## 3.2 Υλικά και μέθοδοι

### 3.2.1 Μικροοργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης

Οι συνθήκες ανάπτυξης του *A. platensis* είναι παρόμοιες με αυτές της Εργασίας 2. Η μόνη διαφορά είναι ότι χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση φωσφόρου από 3 ως 9 mgP l<sup>-1</sup> και ότι οι καλλιέργειες είχαν ενεργό όγκο 250ml.

### 3.2.2 Αναλυτικές μέθοδοι

Οι αναλυτικές μέθοδοι είναι ακριβώς οι ίδιες με αυτές της Εργασίας 2.

### 3.2.3 Πειραματικό σχέδιο

Το *A. platensis* καλλιεργήθηκε με ημι-συνεχή τρόπο με καθημερινή αραίωση. Ο ρυθμός αραίωσης ήταν 0,05 d<sup>-1</sup> και 0,1 d<sup>-1</sup>, Κάθε ρυθμός αραίωσης είχε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις 3, 4,5, 6, 7,5 και 9 mg l<sup>-1</sup> με μάρτυρα που είχε συγκέντρωση φωσφόρου 89 mg l<sup>-1</sup> (0,5 g l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

Σε όλες τις καλλιέργειες δεν ανιχνεύτηκε φώσφορος στο υπόστρωμα ανάπτυξης της εξαγωγής και θεωρήθηκε ότι η απομάκρυνση του φωσφόρου ήταν λόγω της πρόσληψής του από τη βιομάζα και ως εκ τούτου θεωρήθηκε ως ενδοκυτταρικός φώσφορος.

### 3.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Είναι γνωστό ότι η τροφοπενία προκαλεί μεταβολή της σύστασης της βιομάζας των μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες τροφοπενίας μεταβάλλουν τη μεταβολική τους στρατηγική και συσσωρεύουν διάφορους μεταβολίτες έτσι ώστε να ανταπεξέλθουν στις συνθήκες καταπόνησης. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές έρευνες που πραγματεύονται την επίδραση του μηχανισμού της τροφοπενίας στη σύσταση της βιομάζας (Dean et al., 2008a; Fuhs, 1969). Στον τομέα της καλλιέργειας μικροφυκών για την παραγωγή βιοκαυσίμων η πιο συχνά αναφερόμενη χρήση τροφοπενίας για τον έλεγχο της σύστασης της βιομάζας είναι αυτή του αζώτου για τη συσσώρευση λιπιδίων για παραγωγή βιοντίζελ (Rodolfi et al., 2009). Έρευνες πάνω στην τροφοπενία φωσφόρου για τον έλεγχο της σύστασης της βιομάζας ευκαρυωτικών μικροφυκών είναι λίγες και αντιφατικές (Brányiková et al., 2011; Rodolfi et al., 2009) και λιγότερες για τα προκαρυωτικά μικροφύκη (Markou et al., 2012b). Επιπλέον, έρευνες που να εξετάζουν το βαθμό της μεταβολής της σύστασης της βιομάζας σε σχέση με το επίπεδο τροφοπενίας είναι περιορισμένες (Healey and Hendzel, 1975).

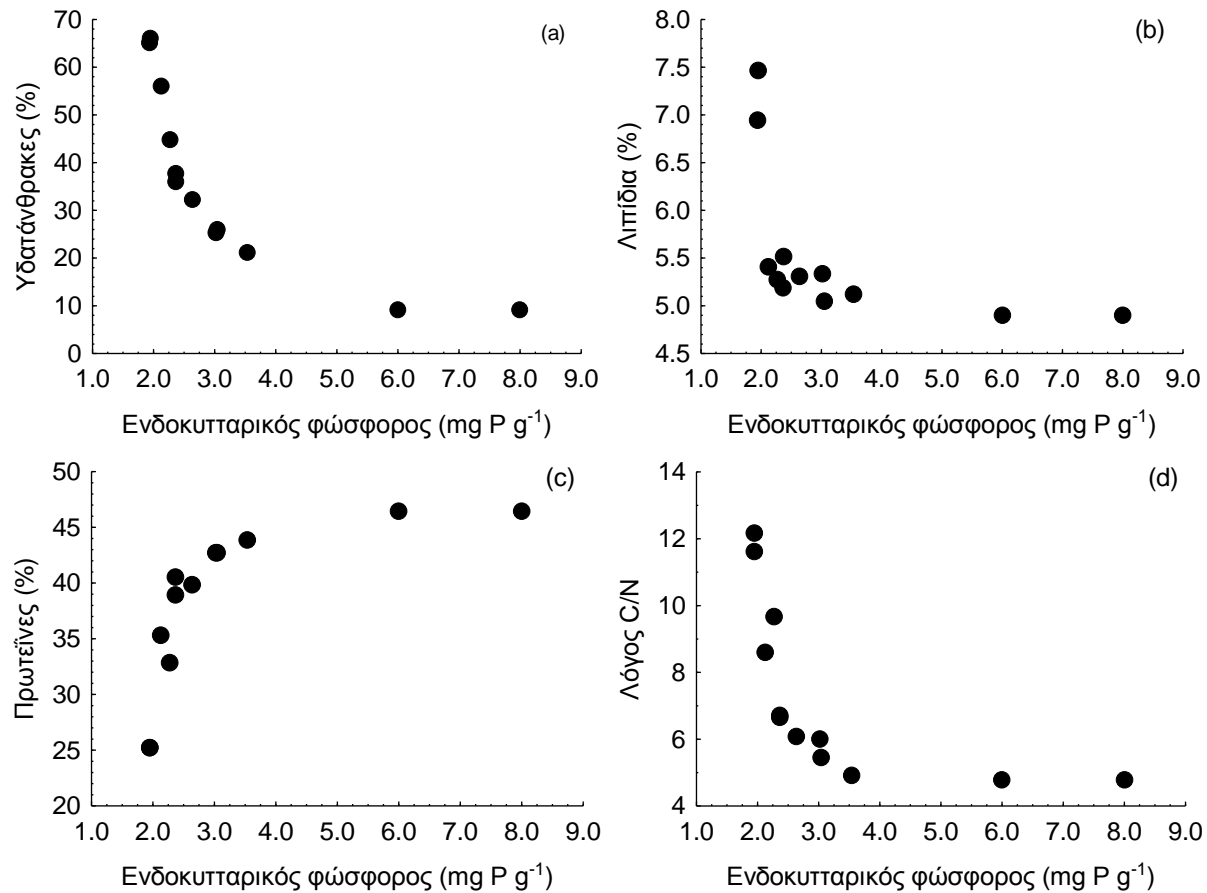
Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.1** η αύξηση ή μείωση της περιεκτικότητας των κυριότερων συστατικών της βιομάζας είναι σταδιακή και κλιμακωτή καθώς μειώνεται ο ενδοκυτταρικός φώσφορος. Στην εργασία αυτή εξετάζονται οι επιδράσεις του ενδοκυτταρικού φωσφόρου στην περιεκτικότητα των υδατανθράκων, λιπιδίων και πρωτεϊνών της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis*.

Η ελάχιστη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού φωσφόρου που παρατηρήθηκε ήταν  $1,85 \text{ mg P g}^{-1}$ . Το *A. platensis* σε τυπικές καλλιεργητικές συνθήκες περιέχει στοιχειομετρικά περίπου  $6 \text{ mg P g}^{-1}$  ενδοκυτταρικού φωσφόρου (Cornet et al., 1992) αλλά περισσότερος φώσφορος μπορεί να προσληφθεί λόγω του μηχανισμού της «πρόσληψης σε περίσσια» (luxury uptake). Στην εργασία αυτή θεωρήθηκε ότι η σύσταση της βιομάζας θα είναι σταθερή για ενδοκυτταρικό φώσφορο μεγαλύτερο από  $6 \text{ mg P g}^{-1}$  και έτσι θεωρήθηκε παρόμοια και ίση με τη σύσταση των καλλιεργειών του μάρτυρα.

Στην **Εικόνα 3.1a** φαίνεται η διακύμανση της περιεκτικότητας των υδατανθράκων του *A. platensis* σε σχέση με τον ενδοκυτταρικό φώσφορο. Όπως είναι φανερό η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες αυξάνει όσο ο ενδοκυτταρικός φώσφορος

μειώνετε. Το μέγιστο της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες (περίπου 65%) παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση ενδοκυτταρικού φωσφόρου  $1,85 \text{ mg P g}^{-1}$  η οποία συγκέντρωση ήταν η ελάχιστη δυνατή. Καθώς ο ενδοκυτταρικός φώσφορος αυξανόταν η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες μειωνόταν μέχρι ένα ελάχιστο σημείο περίπου 9%.

Στα κυανοβακτήρια οι αποθηκευμένοι υδατάνθρακες είναι κυρίως σε μορφή γλυκογόνου ( $\alpha$ -1,4 γλυκάνη) και συντίθενται εντός του κυτοπλάσματος. Η διεργασία της σύνθεσης γλυκογόνου δεν καταναλώνει ανόργανο φώσφορο. Επίσης το ένζυμο το οποίο ελέγχει τη σύνθεση του γλυκογόνου ενεργοποιείται από την παρουσία του 3-phosphoglycerate (3-PGA) και παρεμποδίζεται από την παρουσία ανόργανου φωσφόρου. Όταν ο ανόργανος φώσφορος είναι σε χαμηλή συγκέντρωση τότε η σύνθεση γλυκογόνου ισχυροποιείται. Το γεγονός αυτό εξηγεί γιατί η περιεκτικότητα των υδατανθράκων είναι κλιμακωτή και ανάλογη με το βαθμό της τροφοπενίας, ο οποίος μπορεί να εκφραστεί ως η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού φωσφόρου (Gómez-Casati et al., 2003; Heldt et al., 1977).



**Εικόνα 3.1** Περιεκτικότητα της βιομάζας του *A. platensis* σε (a) υδατάνθρακες, (b) λιπίδια και (c) πρωτεΐνες σε σχέση με τον ενδοκυτταρικό φώσφορο.



Στην **Εικόνα 3.1b** φαίνεται η διακύμανση της περιεκτικότητας της βιομάζας του *A. platensis* σε λιπίδια σε σχέση με τον ενδοκυτταρικό φώσφορο. Η περιεκτικότητα της βιομάζας σε λιπίδια επηρεάστηκε από την τροφοπενία του φωσφόρου μόνο στις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις του ενδοκυτταρικού φωσφόρου ( $1,85 \text{ mg P g}^{-1}$ ), ενώ για πάνω από  $2 \text{ mg P g}^{-1}$  η περιεκτικότητα σε λιπίδια ήταν σχετικά σταθερή. Οι κυριότερες ομάδες λιπιδίων των κυανοβακτηρίων είναι τα γλυκολιπίδια, γλυκερολιπίδια και φωσφολιπίδια. Η τροφοπενία φωσφόρου έχει αναφερθεί ότι προκαλεί αύξηση της περιεκτικότητας σε λιπίδια (Dean et al., 2008a) και ότι εν γένει τα κυανοβακτήρια αντιδρούν στην τροφοπενία φωσφόρου αντικαθιστώντας φωσφολιπίδια με γλυκολιπίδια για να αξιοποιήσουν το φώσφορο των φωσφολιπιδίων σε άλλες μεταβολικές διεργασίες οι οποίες χρειάζονται φώσφορο (Sato and Wada, 2010). Στην παρούσα εργασία επιβεβαιώνεται ότι η τροφοπενία φωσφόρου προκάλεσε αύξηση της σύνθεσης (Dean et al., 2008a), αλλά αυτό φαίνεται να συμβαίνει μόνο στην περίπτωση της πλήρους τροφοπενίας φωσφόρου. Παρόλα αυτά σε προηγούμενη εργασία (Εργασία 2) (Markou et al., 2012b) η περιεκτικότητα σε λιπίδια του *A. platensis* μειώθηκε σε πλήρη τροφοπενία φωσφόρου, παρόλο που οι καλλιεργητικές συνθήκες ήταν πανομοιότυπες με την παρούσα εργασία. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι κάποιοι άλλοι άγνωστοι παράγοντες επιδρούν ισχυρά στη σύνθεση των λιπιδίων.

Στην **Εικόνα 3.1c** φαίνεται η σχέση μεταξύ της περιεκτικότητας της βιομάζας σε πρωτεΐνες και του ενδοκυτταρικού φωσφόρου. Η μικρότερη περιεκτικότητα πρωτεϊνών που παρατηρήθηκε ήταν περίπου 25% όταν ο ενδοκυτταρικός φώσφορος ήταν ο ελάχιστος  $1,85 \text{ mg P g}^{-1}$ . Με την αύξηση του ενδοκυτταρικού φωσφόρου αυξανόταν και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες του *A. platensis* σε αντίθεση με τους υδατάνθρακες και τα λιπίδια μειωνόταν όσο ο ενδοκυτταρικός φώσφορος μειωνόταν. Ίδια αποτελέσματα αναφέρονται και σε άλλες έρευνες (Dean et al., 2008a). Παρόλο που οι πρωτεΐνες έχουν σχεδόν ίσο θερμιδικό περιεχόμενο με τους υδατάνθρακες η σύνθεσή τους είναι η πιο απαιτητική διεργασία σε ενέργεια και ATP. Οι πρωτεΐνες χρειάζονται περίπου 4 ATP για τη σύνθεσή τους ενώ για τους υδατάνθρακες χρειάζονται μόλις 0,5 ATP (Wilhelm and Jakob, 2011). Ο φώσφορος είναι ένα ουσιαστικό συστατικό του ATP και ως εκ τούτου η τροφοπενία φωσφόρου μεταβάλλει

την ενεργειακή στρατηγική των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα να μειώνουν τη σύνθεση ενεργειακών συστατικών και την αύξηση της συσσώρευσης υδατανθράκων ή λιπιδίων.

Στην **Εικόνα 3.1d** απεικονίζεται η αλλαγή του λόγου άνθρακα προς άζωτο. Η τυπική βιομάζα του *A. platensis* όπως μετρήθηκε στην εργασία αυτή είναι 4,6 και αυξήθηκε σταδιακά με μέγιστο λόγο 12,2 στην ελάχιστη ενδοκυτταρική συγκέντρωση του φωσφόρου ( $1,85 \text{ mg P g}^{-1}$ ). Τα μικροφύκη λόγω της σχετικά μεγάλης περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες έχουν μικρό λόγο άνθρακα προς άζωτο που είναι της τάξης του 10 (Sialve et al., 2009), ενώ τα κυανοβακτήρια όπως του γένους *Arthrospira* λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες παρουσιάζουν ακόμα χαμηλότερο λόγο άνθρακα προς άζωτο που μπορεί να φτάσει και στο 4,2 (Samson and Leduy, 1986). Το γεγονός αυτό μπορεί να δημιουργήσει λειτουργικά προβλήματα κατά την αναερόβια χώνευση. Για σταθερή αναερόβια χώνευση ο λόγος άνθρακα προς άζωτο πρέπει να κυμαίνεται από 20-30 (Sialve et al., 2009).

Ως αποτέλεσμα της τροφοπενίας φωσφόρου και την αύξηση της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες ο λόγος του άνθρακα προς άζωτο αυξήθηκε από περίπου 4,6 στο 12,2, μια αύξηση περίπου 2,5 φορές. Παρόλο που ο λόγος άνθρακα προς άζωτο του επιπέδου 12,2 απέχει σημαντικά από το βέλτιστο εύρος 20-30, η αύξηση αυτή εικάζεται ότι θα έχει θετική επίδραση στην αναερόβια χώνευση.

### 3.4 Συμπεράσματα

Σε γενικές γραμμές η παρούσα εργασία δείχνει ότι η τροφοπενία του φωσφόρου και η μέτρηση του ενδοκυτταρικού φωσφόρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της σύστασης της βιομάζας του *A. platensis*. Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και σε λιπίδια αυξήθηκε με τη μείωση του ενδοκυτταρικού φωσφόρου, ενώ οι πρωτεΐνες μειώθηκαν. Ως αποτέλεσμα αυτού παρατηρήθηκε αύξηση του λόγου C/N η οποία αύξηση μπορεί να αποτελέσει παράγοντα βελτίωσης της διεργασίας της αναερόβιας χώνευσης της βιομάζας του κυανοβακτηρίου.

## **4**

**Χρήση εμπλουτισμένης σε υδατάνθρακες βιομάζας  
κυανοβακτηρίων ως πρώτης ύλης για την παραγωγή  
βιομεθανίου μέσω της αναερόβιας χώνευσης**

#### 4 Χρήση εμπλουτισμένης σε υδατάνθρακες βιομάζας κυανοβακτηρίων ως πρώτης ύλης για την παραγωγή βιομεθανίου μέσω της αναερόβιας χώνευσης

##### Περίληψη

Η παραγωγή βιοκαυσίμων από μικροφύκη έλκει ολοένα και πιο πολύ το ενδιαφέρον των ερευνητών. Ανάμεσα στις διάφορες τεχνολογίες μετατροπής της βιομάζας σε ενέργεια, η αναερόβια χώνευση θεωρείται μια από τις πιο αποδοτικές. Παρόλα αυτά, υπάρχει μια δυσκολία στη χρήση μικροφυκών με τη συγκεκριμένη τεχνολογία και αυτή σχετίζεται με τη σχετικά υψηλή περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες, γεγονός που σημαίνει ότι ο λόγος του άνθρακα προς άζωτο(C/N) είναι μικρός. Σε αυτή την εργασία διερευνήθηκε η επίδραση της διαφοροποίησης της σύστασης της βιομάζας του *A. platensis*, δηλαδή η αύξηση της περιεκτικότητάς της σε υδατάνθρακες στην απόδοση της αναερόβιας χώνευσης σε βιομεθάνιο. Εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές περιεκτικότητες της βιομάζας σε υδατάνθρακες (60%, 40% και 20% επί της ξηρής βιομάζας). Η γενική παρατήρηση της έρευνας ήταν ότι η αύξηση της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης σε βιομεθάνιο. Η μέγιστη απόδοση σε βιομεθάνιο ήταν  $203 \pm 10 \text{ mlCH}_4 \text{ gCOD}_{\text{infl}}^{-1}$  και παρατηρήθηκε στους βιοαντιδραστήρες με βιομάζα που περιείχε 60% υδατάνθρακες ενώ ο μάρτυρας (20% υδατάνθρακες) είχε απόδοση  $123 \pm 10 \text{ mlCH}_4 \text{ gCOD}_{\text{infl}}^{-1}$ . Αυτή η γενική τάση παρατηρήθηκε και στους τρεις χρόνους παραμονής που εξετάστηκαν (15, 20 και 30 μέρες) αλλά και μετά τη θερμική επεξεργασία της βιομάζας. Η συγκέντρωση της αμμωνίας μειώθηκε καθώς η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες αυξήθηκαν. Συμπερασματικά η εργασία αυτή δείχνει ότι η αύξηση της περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες αύξησε την απόδοση σε βιοκαύσιμο.

##### 4.1 Εισαγωγή

Τα φύκη και κυρίως τα μικροφύκη έχουν θεωρηθεί ότι αποτελούν την πρώτη ύλη για την τρίτη γενιά βιοκαυσίμων. Θεωρείται ότι θα διαδραματίσουν ένα σημαντικό ρόλο στην παραγωγή βιοκαυσίμων λόγω των υψηλών ρυθμών ανάπτυξης και της ικανότητάς τους να αναπτύσσονται σε νερά με αυξημένη αλατότητα. Επίσης οι ανάγκες τους σε θρεπτικά

στοιχεία μπορούν να καλυφτούν με τη χρήση αποβλήτων και ως εκ τούτου να βελτιώσουν την οικονομικότητα του εγχειρήματος. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν τα μικροφύκη προτιμότερα από τα χερσαία φυτά λαμβάνοντας επίσης υπόψη ότι υπάρχει μεγάλος ανταγωνισμός μεταξύ του τομέα των βιοκαυσίμων και του τομέα παραγωγής τροφής που ανταγωνίζονται έντονα για τη διαθεσιμότητα καλλιεργήσιμης γης (Lam and Lee, 2012; Singh et al., 2011a; Singh et al., 2011c).

Η αναερόβια χώνευση είναι μια ώριμη τεχνολογία για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Ως τεχνολογία χρησιμοποιείται κυρίως στα αγρο-βιομηχανικά οργανικά απόβλητα αφενός για να γίνει διαχείριση των αποβλήτων αυτών μειώνοντας το οργανικό τους φορτίο και από αφετέρου παράγοντας βιοενέργεια. Το παραγόμενο βιοαέριο συνίσταται κυρίως από μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα (Angelidaki et al., 2011). Η χρήση των μικροφυκών ως μοναδική πρώτη ύλη ή ως μίγμα για την παραγωγή βιοαερίου έλκει το ενδιαφέρον αρκετών ερευνητών (Collet et al., 2011; De Schampheleire and Verstraete, 2009; Ehimen et al., 2009; Ehimen et al., 2011; González-Fernández et al., 2011a; Inglesby and Fisher, 2012; Mairet et al., 2011; Mussnug et al., 2010; Park and Li, 2012; Ras et al., 2011; Sialve et al., 2009; Vergara-Fernández et al., 2008; Yen and Brune, 2007; Zamalloa et al., 2012; Zamalloa et al., 2011). Παρόλο που η τεχνολογία της αναερόβιας χώνευσης λειτουργεί με όλες τις μορφές οργανικής ουσίας, το κύριο πρόβλημα στη χρήση των μικροφυκών ως πρώτη ύλη είναι ο μικρός λόγος άνθρακα προς άζωτο (C/N) λόγω της αυξημένης περιεκτικότητά τους σε άζωτούχες ουσίες (κυρίως πρωτεϊνών). Ο μικρός λόγος C/N προκαλεί ανισορροπίες στις διεργασίες της αναερόβιας χώνευσης επειδή η παραγόμενη αμμωνία (προϊόν διάσπασης των πρωτεϊνών) δρα τοξικά στους αναερόβιους μικροοργανισμούς (Sialve et al., 2009; Yen and Brune, 2007). Η κύρια πρόταση για την άμβλυνση αυτού του προβλήματος είναι να αναμιχθεί μαζί με τη βιομάζα των μικροφυκών και ένα επιπλέον μέρος ενός πλούσιου σε άνθρακα υποστρώματος έτσι ώστε ο λόγος C/N να αυξηθεί στο επιθυμητό εύρος τιμών του (20-30) ωθώντας την όλη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης να λειτουργεί με σταθερότητα (González-Fernández et al., 2011b; Samson and LeDuy, 1983a; Yen and Brune, 2007). Επιπλέον, μια άλλη πρόταση η οποία πηγάζει από την παρούσα διδακτορική διατριβή είναι η καλλιέργεια των μικροφυκών κάτω από συνθήκες καταπόνησης έτσι ώστε να αυξηθεί η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες. Οι καλλιεργητικές μέθοδοι που

θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη συσσώρευση υδατανθράκων έχουν περιγραφεί αναλυτικά στην εργασία των Markou et al., (2012a).

Ένας επιπλέον παράγοντας που μπορεί να είναι αρνητικός στη χρήση μικροφυκών για την αναερόβια χώνευση είναι η αντίσταση της βιομάζας τους στα μέχρι τώρα γνωστά υδρολυτικά ένζυμα. Η βιοαποδομησιμότητα των μικροφυκών εξαρτάται βέβαια από το είδος του μικροφύκου. Μερικά είδη βιοαποδομούνται ευκολότερα από άλλα (Mussnug et al., 2010; Zamalloa et al., 2012). Για τη βελτίωση της βιοαποδομησιμότητας διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί, όπως θερμικές, θερμοχημικές, ή μηχανικές κλπ (Chen and Oswald, 1998; González-Fernández et al., 2012).

Σε προηγούμενες εργασίες (Markou, 2012; Markou et al., 2012b) το *A. platensis* καλλιεργήθηκε κάτω από τροφοπενία φωσφόρου και η περιεκτικότητα της βιομάζας του σε υδατάνθρακες αυξήθηκε από 15-20% σε 65%. Η αύξηση αυτή στους υδατάνθρακες προκάλεσε και μια αύξηση στο λόγο C/N από 4,6 στο 12,2. Επομένως αυτή η αύξηση του λόγου C/N θεωρήθηκε ότι θα βελτίωνε τη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης (Sialve et al., 2009). Για το λόγο αυτό η εργασία αυτή έχει ως στόχο να διερευνήσει την παραγωγή βιομεθανίου από το *A. platensis* με διαφορετικές συστάσεις της βιομάζας του με ή χωρίς θερμική επεξεργασία. Επίσης διερευνήθηκε η συμμετοχή και βιοαποδόμηση του κάθε συστατικού στην όλη παραγωγή βιομεθανίου.

## 4.2 Υλικά και μέθοδοι

### 4.2.1 Μικροοργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης

#### Ανάπτυξη του *A. platensis*

Το κυανοβακτήριο *Arthrospira platensis* SAG 21.99 καλλιεργήθηκε όπως στις Εργασίες 2 και 3 με ορισμένες διαφορές. Ο παρεχόμενος φώσφορος ήταν τέτοιος ώστε η σύσταση της βιομάζας να αποτελείται από 3 ομάδες, μια ομάδα με υδατάνθρακες 60%, μία με 40 και μια τελευταία με 20 (η οποία ήταν και καλλιέργεια μάρτυρας). Ο ενεργός όγκος των καλλιεργειών ήταν 2,5 l και ο φωτισμός γινόταν και από τις δύο πλευρές των φωτοβιοαντιδραστήρων με ένταση φωτός  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Ο ρυθμός αραίωσης είχε

επιλεχτεί  $0,1 \text{ d}^{-1}$  και συγκομιδή της βιομάζας και η ανανέωση του υποστρώματος γινόταν ανά δύο μέρες.

### **Αναερόβιοι βιοαντιδραστήρες**

Οι αναερόβιοι βιοαντιδραστήρες αποτελούνταν από 200 ml γυάλινα φιαλίδια με ενεργό όγκο 150 ml. Είχαν κατασκευαστεί με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να έχουν δύο σωληνώσεις, η μία για την εισαγωγή και εξαγωγή του υποστρώματος και μια άλλη για την παροχέτευση του παραγόμενου βιοαερίου σε άλλη φιάλη η οποία περιείχε διάλυμα 5% NaOH. Η τροφοδοσία γινόταν μια φορά κάθε δύο μέρες. Η ανάδευση γινόταν με μαγνητική ανάδευση για 15 λεπτά κάθε 2 ώρες. Ως εμβόλιο χρησιμοποιήθηκαν υγρά εξαγωγής από αναερόβια χώνευση αποβλήτων βουστασίου από άλλο πείραμα του εργαστηρίου. Οι αναερόβιοι βιοαντιδραστήρες τοποθετήθηκαν εντός υδατόλουτρου σταθερής θερμοκρασίας ( $35 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Η τροφοδοσία γινόταν με χρήση συριγγών. Τα πειράματα έγιναν με δύο επαναλήψεις.

### **Πρώτη ύλη για την αναερόβια χώνευση**

Η βιομάζα του *A. platensis* συγκομιζόταν με φιλτράρισμα και επαναιωρούνταν σε απιονισμένο νερό με τελική συγκέντρωση βιομάζας περίπου  $13\text{-}14 \text{ g l}^{-1}$ . Στις πρώτες σειρές των πειραμάτων η βιομάζα δεν δέχτηκε καμιά επεξεργασία και παροχετεύονταν στους αναερόβιους βιοαντιδραστήρες νωπή περίπου 30 λεπτά μετά τη συγκομιδή της. Σε προκαταρκτικά πειράματα είχε παρατηρηθεί ότι η παραγωγή του βιοαερίου ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης της βιομάζας σε ενδοκυτταρικό φώσφορο. Οι βιοαντιδραστήρες που περιείχαν βιομάζα η οποία είχε παραχθεί με τροφοπενία φωσφόρου είχαν χαμηλότερη παραγωγή σε βιοαέριο σε σχέση με τις άλλες βιομάζες. Ο ενδοκυτταρικός φώσφορος για κάθε τύπο βιομάζας κυμαινόταν από  $1,86$  ως  $6 \text{ mg-P g}^{-1}$  (Πίνακας 4.1). Μετά από αυτό είχε εξαχθεί το συμπέρασμα ότι μικροφύκη με χαμηλή περιεκτικότητα σε φώσφορο είναι πιθανό να παρουσιάσουν περιορισμό στην παραγωγή βιοαερίου λόγω της ανεπάρκειας σε φώσφορο για τη λειτουργία της αναερόβιας χώνευσης. Για το λόγο αυτό προστέθηκε στους αναερόβιους βιοαντιδραστήρες όξινο

φωσφορικό κάλιο ώστε η τελική συγκέντρωση του φωσφόρου να είναι περίπου 20 mg-P  $\Gamma^{-1}$ . Τα κύρια χαρακτηριστικά της βιομάζας του *A. platensis* φαίνονται στον **Πίνακα 4.1**.

Σε μια δεύτερη σειρά πειραμάτων διερευνήθηκε η αναερόβια χώνευση του *A. platensis* μετά από θερμική επεξεργασία. Η θερμική επεξεργασία αφορούσε την υποβολή της βιομάζας σε συνθήκες κορεσμένου ατμού σε αυτόκλειστο για 20 λεπτά. Η θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα χωνεύτηκε αναεροβίως όπως ακριβώς η νωπή βιομάζα στην πρώτη σειρά πειραμάτων.

**Πίνακας 4.1 Χαρακτηριστικά της βιομάζας του *A. platensis* που χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη για την αναερόβια χώνευση ( $\pm$  S.D., n=30).**

	60%	40%	20% (control)
pH	7,02 $\pm$ 0,04	7,05 $\pm$ 0,02	7,14 $\pm$ 0,24
Υδατάνθρακες (%)	56,20 $\pm$ 5,90	42,90 $\pm$ 5,79	23,33 $\pm$ 3,70
Λιπίδια (%)	4,62 $\pm$ 0,38	5,03 $\pm$ 0,66	6,00 $\pm$ 0,33
Πρωτεΐνες (%)	24,72 $\pm$ 3,49	28,36 $\pm$ 4,21	38,62 $\pm$ 4,97
Ενδοκυτταρικός φώσφορος (mgP $g^{-1}$ )	1,85	2,2	6,0
COD/TS ( $g\ g^{-1}$ )	1,23	1,31	1,39

#### 4.2.2 Αναλυτικές μέθοδοι

Η ξηρή βιομάζα του μικροφύκου εκφρασμένο ως ολικά στερεά (total solids, TS) προσδιορίστηκε βαρομετρικά μετά την ξήρασή της στους 90 °C για 24 ώρες. Η βιομάζα είχε φιλτραριστεί και ξεπλυθεί για αρκετές φορές με απιονισμένο νερό έτσι ώστε να ξεπλυθούν τα άλατα του υποστρώματος ανάπτυξης ώστε να μην προσμετρηθούν στο βάρος της βιομάζας.

Οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και οι υδατάνθρακες προσδιορίστηκαν όπως στις προηγούμενες εργασίες της παρούσας διατριβής. Η συγκέντρωση της αμμωνίας ( $NH_3-N$ ) και του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (chemical oxygen demand, COD) στα χωνευμένα υγρά εξαγωγής προσδιορίστηκαν με standard methods (APHA, 1995). Τα πτητικά λιπαρά οξέα (volatile fatty acids, VFA) προσδιορίστηκαν από το υπερκείμενο τους δείγματος μετά τη φυγοκέντρίσή του για 10 λεπτά στις 5000 rpm σύμφωνα με τους Montgomery et al. (1962). Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε οξικό οξύ ως πρότυπο διάλυμα.



Το βιομεθάνιο μετρήθηκε με τη μέθοδο της εκτόπισης υγρού κατά την παραγωγή βιοαερίου. Το βιομεθάνιο προσδιορίστηκε βαρομετρικά μέσω της εκτόπισης υγρού διαλύματος 5% NaOH. Το διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για την παρακράτηση του διοξειδίου του άνθρακα από το βιοαέριο. Με αυτό τον τρόπο το εκτοπισμένο υγρό διάλυμα θεωρήθηκε ότι αντιπροσωπεύει αντίστοιχο όγκο παραγόμενου βιομεθανίου. Ο όγκος κανονικοποιήθηκε για συνθήκες πίεσης 1 atm και θερμοκρασία 20 °C. Το pH μετρήθηκε με το όργανο Hach Q40.

Όλες οι τιμές αντιπροσωπεύουν αναλύσεις εις τριπλούν για τρεις συνεχόμενες τροφοδοσίες (n=18), εκτός των τιμών του βιομεθανίου που αντιπροσωπεύει τις μετρήσεις των αναερόβιων βιοαντιδραστήρων για τρεις συνεχόμενες τροφοδοσίες (n=6).

### 4.2.3 Πειραματικό σχέδιο

Για να διερευνηθεί η επίδραση της σύστασης της βιομάζας του *A. platensis* στη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης και στην παραγωγή βιοαερίου το πειραματικό σχέδιο αποτελούνταν από δύο παράγοντες 1) η σύσταση της βιομάζας και 2) ο χρόνος παραμονής. Κάθε παράγοντας είχε τρία επίπεδα, δηλαδή η σύσταση της βιομάζας αποτελούνταν από 20%, 40% και 60% σε υδατάνθρακες και ο χρόνος παραμονής ήταν 15, 20 και 30 μέρες. Επιπροσθέτως, δύο σειρές πειραμάτων με το ίδιο πειραματικό σχέδιο είχαν διενεργηθεί για την αξιολόγηση της επίδρασης της θερμικής επεξεργασίας στην παραγωγή της βιομάζας. Οι πειραματικές δοκιμές συμβολίστηκαν ως  $R_{a/i/j}$ , όπου “a” η σειρά με νωπή βιομάζα (R) ή με θερμικά επεξεργασμένη (T), “i” είναι η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες (60%, 40% και 20%, το τελευταίο ως μάρτυρας) και ως “j”, ο χρόνος παραμονής με 15, 20 και 30 μέρες.

## 4.3 Αποτελέσματα

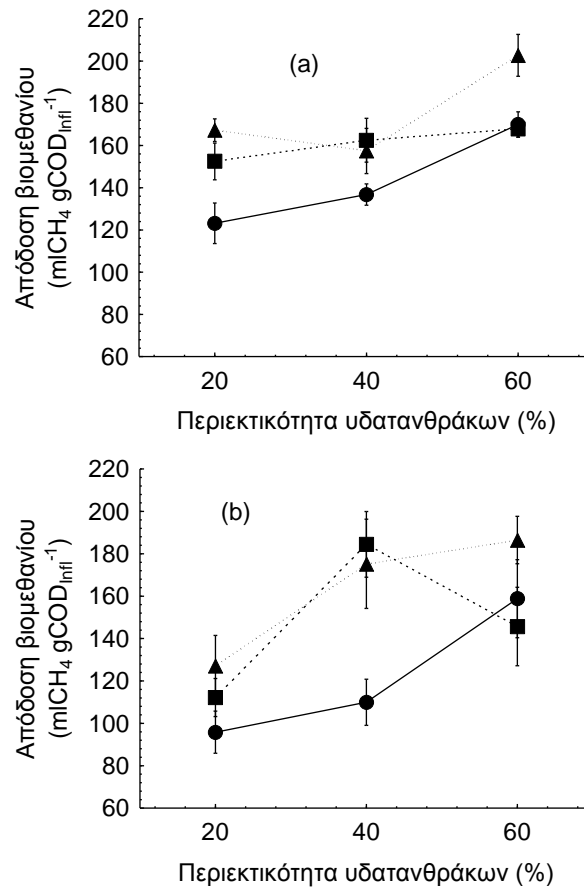
### 4.3.1 Απόδοση σε βιομεθάνιο

Στην **Εικόνα 4.1** φαίνεται η απόδοση σε βιομεθάνιο από την αναερόβια χώνευση βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis* με τρεις διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες και τρεις διαφορετικούς χρόνους παραμονής, σε δύο σειρές πειραμάτων όπου στη μία η βιομάζα ήταν νωπή και στην άλλη θερμικά επεξεργασμένη. Όπως

φαίνεται σε αυτή την εικόνα, στη σειρά πειραμάτων με νωπή βιομάζα η γενική τάση των δεδομένων είναι η απόδοση σε βιομεθάνιο να αυξάνεται καθώς αυξανόταν η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες. Επίσης, με εξαίρεση ορισμένες πειραματικές δοκιμές η απόδοση σε βιομεθάνιο αυξανόταν όσο αυξανόταν ο χρόνος παραμονής. Η υψηλότερη απόδοση σε μεθάνιο της σειράς με νωπή βιομάζα ήταν  $203 \pm 10 \text{ mlCH}_4 \text{ gCOD}_{\text{infl}}^{-1}$  (infl= κατά την εισαγωγή) και παρατηρήθηκε στο βιοαντιδραστήρα  $R_{R/60/30}$ , ενώ η χαμηλότερη είχε απόδοση  $123 \pm 10 \text{ mlCH}_4 \text{ gCOD}_{\text{infl}}^{-1}$  και παρατηρήθηκε στο βιοαντιδραστήρα  $R_{R/20/15}$ .

Παρόμοιες γενικές τάσεις όπως στην πειραματική σειρά με νωπή βιομάζα παρατηρήθηκαν και στη σειρά με θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα με εξαίρεση το βιοαντιδραστήρα  $R_{T/60/20}$ . Η υψηλότερη απόδοση σε μεθάνιο της σειράς με θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα ήταν  $187 \pm 12 \text{ mlCH}_4 \text{ gCOD}_{\text{infl}}^{-1}$  και παρατηρήθηκε στο βιοαντιδραστήρα  $R_{T/60/30}$ , ενώ η χαμηλότερη απόδοση ήταν  $96 \pm 9 \text{ mlCH}_4 \text{ gCOD}_{\text{infl}}^{-1}$  και παρατηρήθηκε στο βιοαντιδραστήρα  $R_{T/20/15}$ . Μεταξύ των δύο πειραματικών σειρών η σειρά με τη νωπή βιομάζα είχε γενικά μεγαλύτερη απόδοση σε βιομεθάνιο (με εξαίρεση μερικούς βιοαντιδραστήρες) παρόλο που η μείωση του COD ήταν μεγαλύτερη στη σειρά με θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα (βλέπε παρακάτω). Η βιομάζα με αυξημένη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες είχε βελτιωμένη απόδοση σε βιομεθάνιο που κυμάνθηκε από 7% ως και 38% και από 15% ως και 66%, για τη σειρά με νωπή και θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα, αντίστοιχα.

Οι υδατάνθρακες περιέχουν COD περίπου  $1,19 \text{ gCOD gVS}^{-1}$ , ενώ οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια έχουν  $1,42$  και  $2,90 \text{ gCOD gVS}^{-1}$ , αντίστοιχα (Angelidaki et al., 2011). Παρόλο που η υψηλότερη περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της περιεκτικότητας της βιομάζας σε COD (Πίνακας 4.1), η απόδοση σε βιομεθάνιο εκφρασμένη ανά ξηρή βιομάζα (TS) σε αρκετές περιπτώσεις παρέμεινε υψηλότερη στη βιομάζα με υψηλότερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες.



**Εικόνα 4.1 Παραγωγή βιομεθανίου από το *A. platensis* έχοντας τρεις διαφορετικές περιεκτικότητες της βιομάζας σε υδατάνθρακες και τρεις διαφορετικούς χρόνους παραμονής (HRT).**

Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα, n=6. (a) σειρά με νωπή βιομάζα και (b) με θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα. ● HRT15, ■ HRT20 and ▲ HRT30.

### 4.3.2 Μείωση COD και αποδόμηση των συστατικών της βιομάζας

#### 4.3.2.1 Μείωση COD

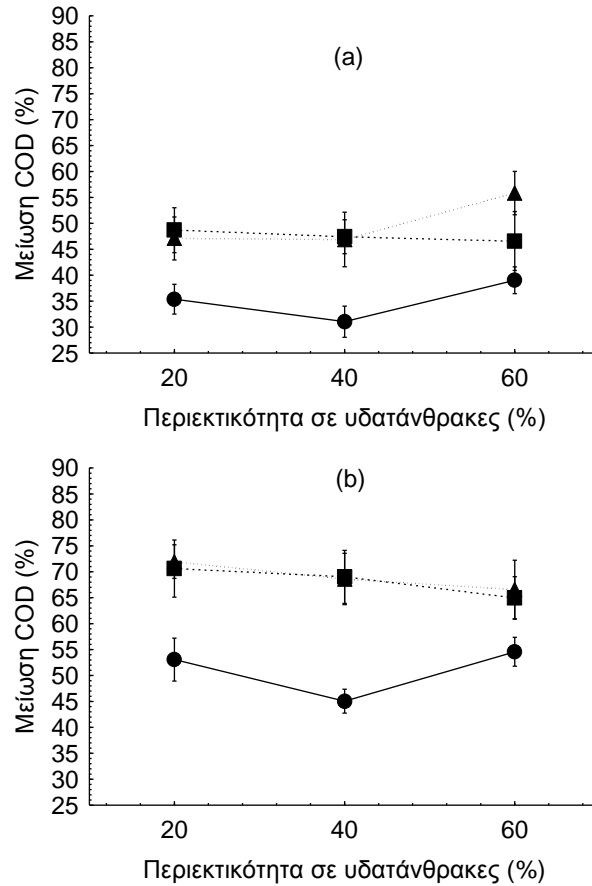
Στην Εικόνα 4.2a φαίνεται η μείωση του COD του περιεχομένου των αναερόβιων βιοαντιδραστήρων κατά την αναερόβια χώνευση νωπής βιομάζας του *A. platensis*. Στην πειραματική σειρά με νωπή βιομάζα η υψηλότερη μείωση COD ( $56\% \pm 4\%$ ) παρατηρήθηκε στο βιοαντιδραστήρα R<sub>R/60/30</sub>, στον οποίο και η απόδοση σε βιομεθάνιο ήταν το υψηλότερο. Παρόλα αυτά η μείωση του COD σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις με εξαίρεση το βιοαντιδραστήρα R<sub>R/60/15</sub>, η μείωση του COD ήταν παρόμοια χωρίς

στατιστική σημαντικότητα. Ο χρόνος παραμονής είχε σημαντική επίδραση στη μείωση του COD. Η χαμηλότερη μείωση του COD ( $31\% \pm 3\%$ ) παρατηρήθηκε στις δοκιμές με χρόνο παραμονής 15 μέρες, ενώ με χρόνο 20 και 30 μέρες η μείωση COD ήταν σχεδόν σταθερή, με εξαίρεση το βιοαντιδραστήρα  $R_{R/60/30}$ .

Στην Εικόνα **4.2b** φαίνεται μείωση του COD του περιεχομένου των αναερόβιων βιοαντιδραστήρων κατά την αναερόβια χώνευση θερμικά επεξεργασμένης βιομάζας του *A. platensis*. Στην πειραματική αυτή σειρά η μείωση του COD σε όλες τις περιπτώσεις ήταν υψηλότερη από τις αντίστοιχες δοκιμές της σειράς με νωπή βιομάζα. Η γενική τάση σε όλες τις περιπτώσεις εκτός του βιοαντιδραστήρα  $R_{T/60/15}$  ήταν να μειώνεται ελαφρώς καθώς η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες αυξανόταν. Παρόλα αυτά τα δεδομένα δεν είχαν στατιστική σημαντικότητα παρά μόνο για το βιοαντιδραστήρα  $R_{T/40/15}$ . Η μείωση του COD για τους χρόνους παραμονής με 20 και 30 μέρες κυμάνθηκε μεταξύ 64% και 72%, ενώ για χρόνο παραμονής με 15 μέρες η μείωση του COD κυμάνθηκε από 45% ως 54%. Και στην πειραματική αυτή σειρά η αναερόβια χώνευση με 15 μέρες χρόνο παραμονής είχε σημαντικά χαμηλότερη μείωση του COD. Ένα σημαντικό κλάσμα της μείωσης του COD οφειλόταν στην επίδραση της θερμικής επεξεργασίας. Παρατηρήθηκε ότι η πρώτη ύλη μετά τη θερμική επεξεργασία είχε μειωμένη περιεκτικότητα σε COD κατά 17.33 - 25.44% (Πίνακας 4.2).

**Πίνακας 4.2 Μείωση του COD και των υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπιδίων της βιομάζας του *A. platensis* μετά τη θερμική επεξεργασία (αυτόκλειστο για 20 min).**

Βιοαντιδραστήρας	COD %	Υδατάνθρακες %	Πρωτεΐνες %	Λιπίδια %
$R_{T/20/j}$	$23,01 \pm 0,89$	$3,11 \pm 2,92$	$39,56 \pm 1,09$	$10,17 \pm 1,23$
$R_{T/40/j}$	$17,33 \pm 3,35$	$-1,11 \pm 1,53$	$38,95 \pm 1,19$	$15,76 \pm 0,52$
$R_{T/60/j}$	$25,44 \pm 4,79$	$4,21 \pm 6,44$	$26,49 \pm 0,76$	$9,23 \pm 2,13$



**Εικόνα 4.2 Μείωση COD κατά την αναερόβια χώνευση βιομάζας του *A. platensis* με διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες και διαφορετικούς χρόνους παραμονής.**

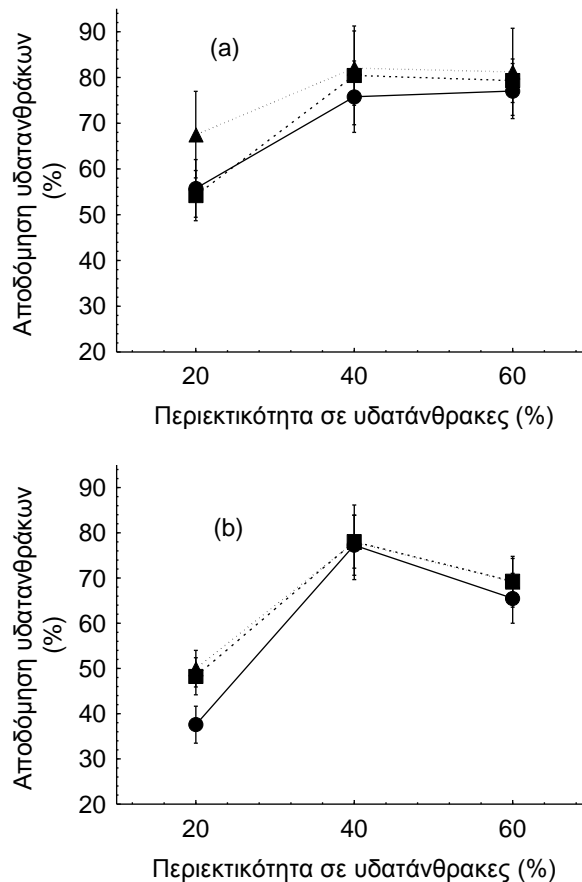
Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα, n=18. (a) νωπή βιομάζα και (b) θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα. ● HRT15, ■ HRT20 and ▲ HRT30.

#### 4.3.2.2 Αποδόμηση υδατανθράκων

Στην **Εικόνα 4.3a** φαίνεται η αποδόμηση των υδατανθράκων της νωπής βιομάζας του *A. platensis* μετά την αναερόβια χώνευσή της. Η χαμηλότερη αποδόμηση των υδατανθράκων παρατηρήθηκε στους βιοαντιδραστήρες  $R_{R/20/j}$  και κυμάνθηκε μεταξύ 54% και 67%, ενώ στους υπόλοιπους βιοαντιδραστήρες η αποδόμηση κυμάνθηκε από 75% μέχρι 82%. Η σύσταση της βιομάζας είχε σημαντική επίδραση στην αποδόμηση των υδατανθράκων. Οι βιοαντιδραστήρες με βιομάζα με περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες 40% και 60% είχαν σημαντικά μεγαλύτερη αποδόμηση υδατανθράκων σε σχέση με τους βιοαντιδραστήρες του μάρτυρα (20% υδατάνθρακες), με εξαίρεση το βιοαντιδραστήρα

$R_{R/20/30}$ . Ο χρόνος παραμονής δεν φάνηκε να έχει σημαντική επίδραση και λόγω των μεγάλων τιμών στις τυπικές αποκλίσεις οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Στην **Εικόνα 4.3b** φαίνεται η αποδόμηση των υδατανθράκων της θερμικά επεξεργασμένης βιομάζας του *A. platensis* μετά την αναερόβια χώνευσή της. Σε αυτή τη σειρά η χαμηλότερη αποδόμηση υδατανθράκων παρατηρήθηκε στους βιοαντιδραστήρες  $R_{T/20/j}$ , δηλαδή σε αυτούς που η βιομάζας είχε περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες 20%. Η αποδόμηση κυμάνθηκε από 37% ως 50% ενώ οι βιοαντιδραστήρες  $R_{R/40/j}$  παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αποδόμηση η οποία ανήλθε στο 77% - 78%. Με εξαίρεση τους βιοαντιδραστήρες  $R_{T/40/j}$ , η θερμική επεξεργασία είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της αποδόμησης των υδατανθράκων σε σχέση με τους αντίστοιχους βιοαντιδραστήρες της σειράς με νωπή βιομάζα. Είχε παρατηρηθεί ότι η θερμική επεξεργασία είχε ως αποτέλεσμα η πρώτη ύλη να αποκτήσει κολλώδη υφή με αυξημένο ιξώδες. Ο βαθμός του ιξώδους ήταν ανάλογος της περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες, δηλαδή όσο πιο μεγάλη ήταν η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες τόσο πιο έντονο ήταν το φαινόμενο. Είναι πολύ πιθανό αυτό να ήταν και ένας από τους λόγους για τους οποίους στη θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα η αποδόμηση των υδατανθράκων ήταν μικρότερη (με εξαίρεση τους βιοαντιδραστήρες  $R_{T/40/j}$ ).



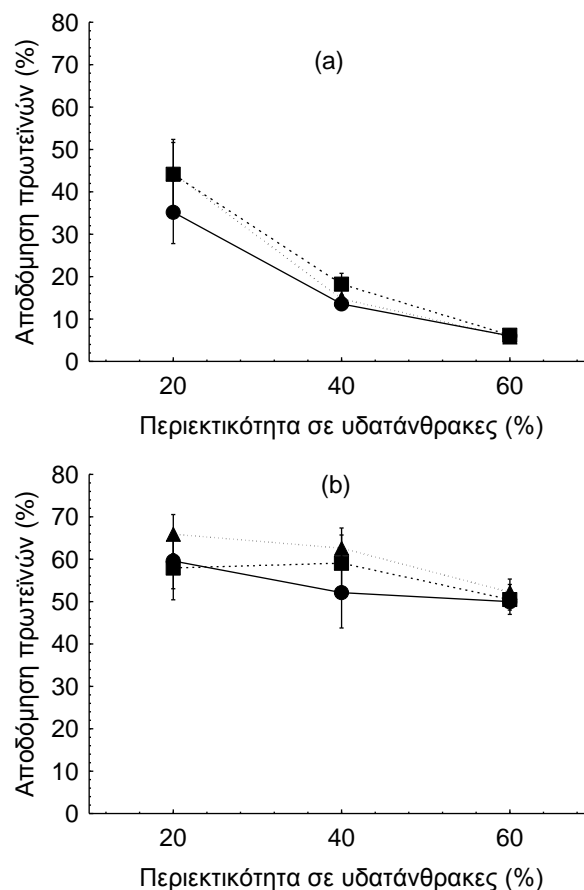
**Εικόνα 4.3** Αποδόμηση υδατανθράκων κατά την αναερόβια χώνευση βιομάζας του *A. platensis* με διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες και διαφορετικούς χρόνους παραμονής.

Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα,  $n=18$ . (a) νωπή βιομάζα και (b) θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα. ● HRT15, ■ HRT20 and ▲ HRT30.

#### 4.3.2.3 Αποδόμηση πρωτεϊνών

Στην Εικόνα 4.4a φαίνεται η αποδόμηση των πρωτεϊνών της νωπής βιομάζας του *A. platensis* μετά την αναερόβια χώνευσή της. Σε αυτή τη σειρά η αποδόμηση των πρωτεϊνών ήταν υψηλότερη στους βιοαντιδραστήρες  $R_{R/20/j}$ , δηλαδή σε εκείνους όπου η βιομάζα είχε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λιγότερη σε υδατάνθρακες. Η αποδόμηση των πρωτεϊνών κυμάνθηκε μεταξύ 35% και 44% και είχε μια γενική τάση να μειώνεται όσο αυξανόταν η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες. Ο χρόνος παραμονής δεν επέδρασε σημαντικά στην αποδόμηση των πρωτεϊνών.

Στην Εικόνα **4.4b** φαίνεται η αποδόμηση των πρωτεϊνών της θερμικά επεξεργασμένης βιομάζας του *A. platensis* μετά την αναερόβια χώνευσή της. Σε αυτή τη σειρά η αποδόμηση των πρωτεϊνών ήταν υψηλότερη σε σχέση με τη νωπή βιομάζα και είχε μια ελαφριά τάση να μειώνεται όσο αυξανόταν η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες. Ένα πολύ σημαντικό μέρος των πρωτεϊνών αποδομήθηκε κατά τη θερμική επεξεργασία και κυμάνθηκε μεταξύ 26,49 και 39,56% (Πίνακας 4.2). Ακόμα και μετά τη θερμική επεξεργασία η αποδόμηση των πρωτεϊνών είχε μια ελαφριά τάση να μειώνεται καθώς η περιεκτικότητα των υδατανθράκων της βιομάζας αυξανόταν.



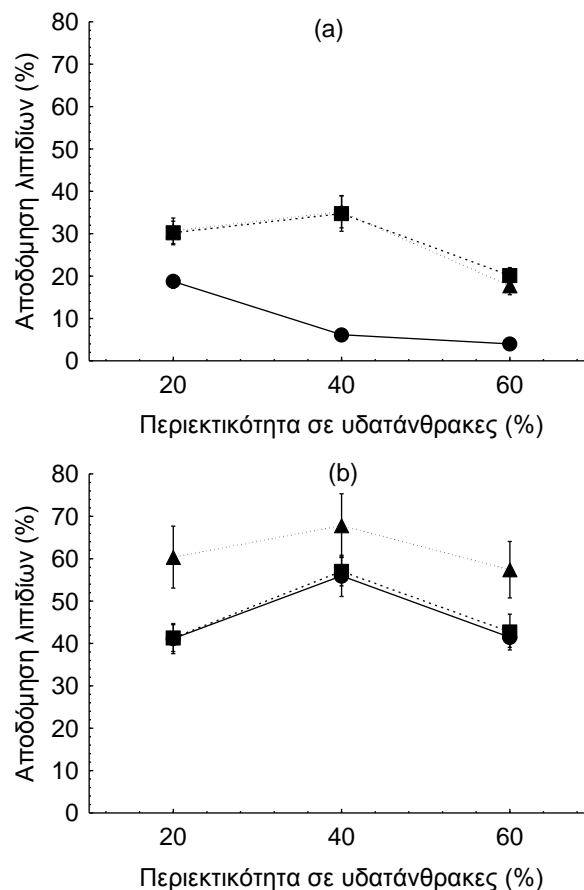
**Εικόνα 4.4** Αποδόμηση πρωτεϊνών κατά την αναερόβια χώνευση βιομάζας του *A. platensis* με διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες και διαφορετικούς χρόνους παραμονής.

Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα, n=18. (a) νωπή βιομάζα και (b) θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα ● HRT15, ■ HRT20 and ▲ HRT30.



#### 4.3.2.4 Αποδόμηση λιπιδίων

Στην **Εικόνα 4.5a** φαίνεται η αποδόμηση των λιπιδίων της νοπής βιομάζας του *A. platensis* μετά την αναερόβια χώνευσή της. Η υψηλότερη αποδόμηση των λιπιδίων, περίπου 35% σε αυτή τη σειρά παρατηρήθηκε στους βιοαντιδραστήρες  $R_{R/40/30}$  και  $R_{R/40/20}$ , ενώ η χαμηλότερη, 4% παρατηρήθηκε στο βιοαντιδραστήρα  $R_{R/60/15}$ . Σε αντίθεση με την αποδόμηση των πρωτεϊνών, η αποδόμηση των λιπιδίων είχε επηρεαστεί από το χρόνο παραμονής. Ενώ χρόνοι παραμονής 20 και 30 ημερών είχαν παρόμοια επίδραση, οι βιοαντιδραστήρες με χρόνο παραμονής 15 ημερών είχαν σημαντικά χαμηλότερη αποδόμηση.



**Εικόνα 4.5** Αποδόμηση λιπιδίων κατά την αναερόβια χώνευση βιομάζας του *A. platensis* με διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες και διαφορετικούς χρόνους παραμονής.

Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα, n=18. (a) νωπή βιομάζα και (b) θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα. ● HRT15, ■ HRT20 and ▲ HRT30.

Στην **Εικόνα 4.5b** φαίνεται η αποδόμηση των λιπιδίων της θερμικά επεξεργασμένης βιομάζας του *A. platensis* μετά την αναερόβια χώνευσή της. Η υψηλότερη αποδόμηση λιπιδίων παρατηρήθηκε στους βιοαντιδραστήρες R<sub>T/40/j</sub> με υψηλότερη (68%) στο βιοαντιδραστήρα R<sub>T/40/30</sub>. Χρόνος παραμονής 30 ημερών είχε ως αποτέλεσμα την υψηλότερη αποδόμηση λιπιδίων, ενώ οι υπόλοιποι χρόνοι παραμονής είχαν παρόμοια αποτελέσματα. Σε σχέση με τη σειρά με τη νωπή βιομάζα η θερμική επεξεργασία είχε ως αποτέλεσμα η αποδόμηση των λιπιδίων να είναι υψηλότερη. Επίσης ένα σημαντικό μέρος των λιπιδίων αποδομήθηκε κατά τη θερμική επεξεργασία, που κυμάνθηκε από 9,23% ως 15,73%.

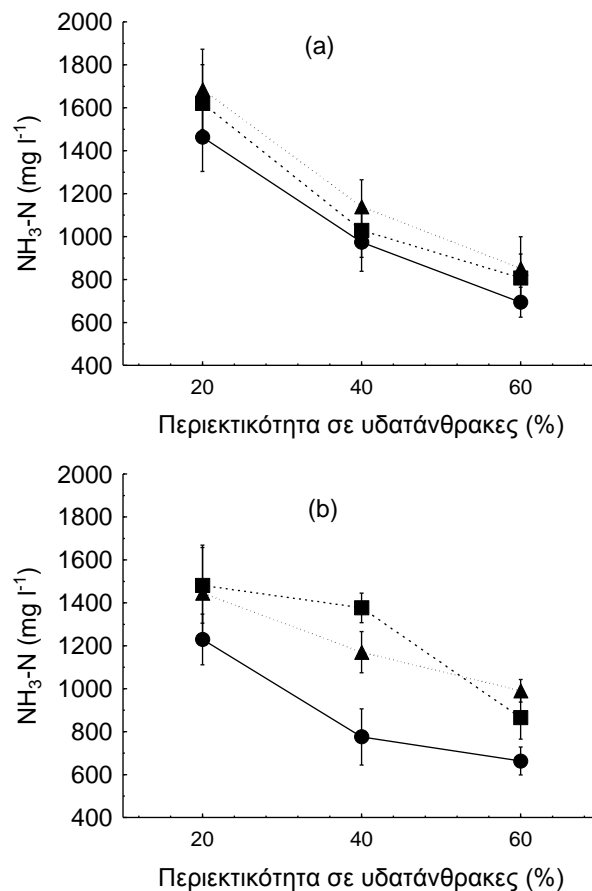
### 4.3.3 Συγκεντρώσεις NH<sub>3</sub>-N και VFA

#### 4.3.3.1 Συγκεντρώσεις NH<sub>3</sub>-N

Στην **Εικόνα 4.6a** φαίνεται η συγκέντρωση της αμμωνίας στους αναερόβιους βιοαντιδραστήρες της πειραματικής σειράς με νωπή βιομάζα του *A. platensis*. Όπως είναι εμφανές από την εικόνα αυτή η γενική τάση της συγκέντρωσης της αμμωνίας ήταν να μειώνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες. Επίσης η συγκέντρωση αμμωνίας αυξανόταν ελαφριά με την αύξηση του χρόνου παραμονής. Η χαμηλότερη συγκέντρωση αμμωνίας παρατηρήθηκε στους βιοαντιδραστήρες R<sub>R/60/j</sub> και κυμάνθηκε από 695 μέχρι 893 mg l<sup>-1</sup>, ενώ η υψηλότερη παρατηρήθηκε στους βιοαντιδραστήρες R<sub>R/20/j</sub> και κυμάνθηκε μεταξύ 1463 και 1686 mg l<sup>-1</sup>

Στην **Εικόνα 4.6b** φαίνεται η συγκέντρωση της αμμωνίας στους αναερόβιους βιοαντιδραστήρες της πειραματικής σειράς με θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα του *A. platensis*. Όμοια με την προηγούμενη πειραματική σειρά με νωπή βιομάζα στη σειρά αυτή η συγκέντρωση της αμμωνίας είχε παρόμοια τάση, δηλαδή να μειώνεται καθώς η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες αυξανόταν. Σε σύγκριση με τη σειρά με νωπή βιομάζα η συγκέντρωση αμμωνίας ήταν γενικά χαμηλότερη με τους αντίστοιχους βιοαντιδραστήρες, με εξαίρεση το βιοαντιδραστήρα R<sub>T/40/15</sub> στον οποίο η συγκέντρωση αμμωνίας αυξήθηκε σε σχέση με τον αντίστοιχο της άλλης σειράς. Στους

βιοαντιδραστήρες  $R_{T/20j}$  παρόλο που η αποδόμηση των πρωτεϊνών ήταν υψηλότερη σε σχέση με τη σειρά με νωπή βιομάζα, η συγκέντρωση αμμωνίας ήταν χαμηλότερη και κυμάνθηκε από 1229-1445  $\text{mg l}^{-1}$ . Το πιο πιθανό είναι κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας κάποιο μέρος από τις πρωτεΐνες που αποδομήθηκαν να σχημάτισαν αμμωνία η οποία αεριοποιήθηκε στις υψηλές θερμοκρασίες και χάθηκε στην ατμόσφαιρα.



**Εικόνα 4.6 Συγκέντρωση αμμωνίας κατά την αναερόβια χώνευση βιομάζας του *A. platensis* με διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες και διαφορετικούς χρόνους παραμονής.**

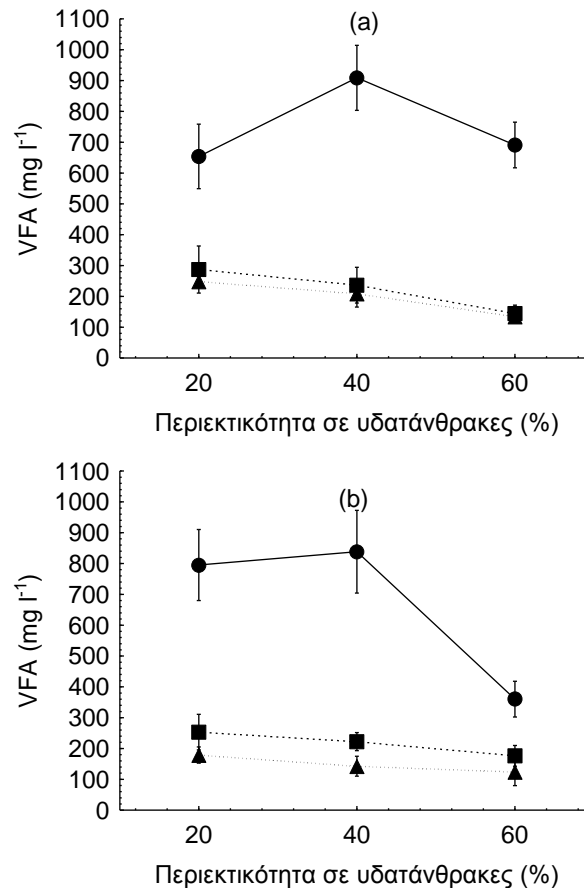
Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα,  $n=18$ . (a) νωπή βιομάζα και (b) θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα. ● HRT15, ■ HRT20 and ▲ HRT30.

#### 4.3.3.2 Συγκεντρώσεις VFA

Στην **Εικόνα 4.7a** φαίνεται η συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων (volatile fatty acids - VFA) στους αναερόβιους βιοαντιδραστήρες της πειραματικής

σειράς με νωπή βιομάζα του *A. platensis*. Όπως φαίνεται από την εικόνα η συγκέντρωση των VFA στους βιοαντιδραστήρες  $R_{R/i/30}$  και  $R_{R/i/20}$  είχε μια ελαφριά τάση να μειώνεται καθώς αυξανόταν η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες. Ο χρόνος παραμονής ήταν σημαντικός παράγοντας μόνο για χρόνο παραμονής 15 ημερών, όπου οι βιοαντιδραστήρες  $R_{R/i/15}$  είχαν σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση σε VFA σε σχέση με τους άλλους χρόνους παραμονής. Παρόλα αυτά σε αυτόν το χρόνο παραμονής η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες δεν επέδρασε με ξεκάθαρο τρόπο στη συγκέντρωση των VFA. Η υψηλότερη συγκέντρωση των VFA παρατηρήθηκε στο βιοαντιδραστήρα  $R_{R/40/15}$  με τιμή περίπου  $910 \text{ mg l}^{-1}$ .

Στην **Εικόνα 4.7b** φαίνεται η συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων (VFA) στους αναερόβιους βιοαντιδραστήρες της πειραματικής σειράς με νωπή βιομάζα του *A. platensis*. Σε γενικές γραμμές η συγκέντρωση των VFA σε αυτή τη σειρά είχε ακριβώς την ίδια συμπεριφορά όπως και στην πειραματική σειρά με νωπή βιομάζα, με εξαίρεση το βιοαντιδραστήρα  $R_{T/60/15}$  ο οποίος παρουσίασε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των VFA.

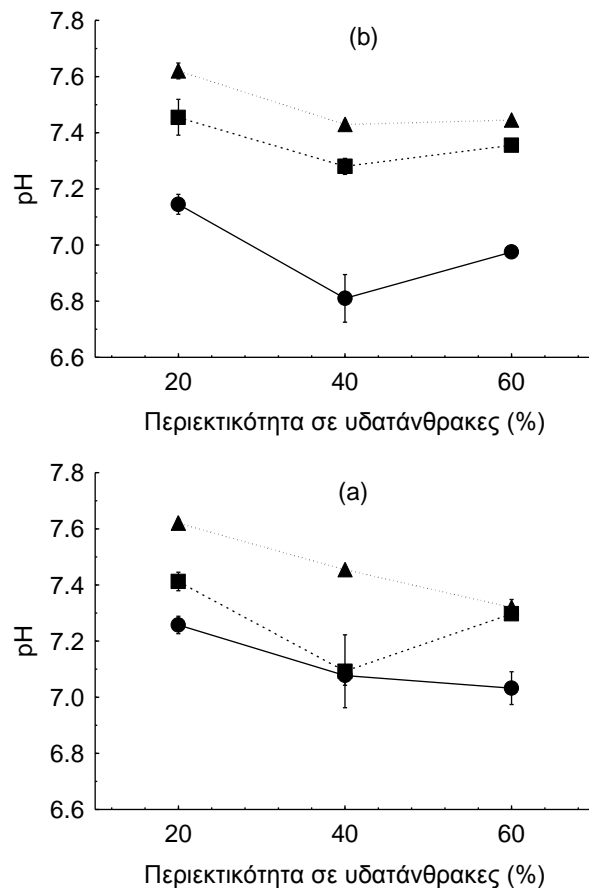


**Εικόνα 4.7 Συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων (VFA) κατά την αναερόβια χώνευση βιομάζας του *A. platensis* με διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες και διαφορετικούς χρόνους παραμονής.**

Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα, n=18. (a) νωπή βιομάζα και (b) θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα. ● HRT15, ■ HRT20 and ▲ HRT30.

#### 4.3.4 pH

Στην Εικόνα **4.8a** φαίνονται οι τιμές του pH στους αναερόβιους βιοαντιδραστήρες της πειραματικής σειράς με νωπή βιομάζα του *A. platensis*. Όπως φαίνεται στην εικόνα αυτή ο εμπλουτισμός της βιομάζας σε υδατάνθρακες είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση των τιμών του pH. Οι χαμηλότερες τιμές pH παρατηρήθηκαν στους βιοαντιδραστήρες R<sub>R/40/j</sub>. Στην Εικόνα **4.8b** φαίνονται οι τιμές του pH στους αναερόβιους βιοαντιδραστήρες της πειραματικής σειράς με θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα του *A. platensis*. Σε αυτή τη σειρά οι τιμές του pH είχαν μια καθαρή τάση να μειώνονται καθώς αυξανόταν η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες, με εξαίρεση το βιοαντιδραστήρα R<sub>T/60/20</sub>.



**Εικόνα 4.8 Τιμές του pH στους αναερόβιους βιοαντιδραστήρες με βιομάζα του *A. platensis* με διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες και διαφορετικούς χρόνους παραμονής.**

Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα,  $n=6$ . (a) νωπή βιομάζα και (b) θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα. ● HRT15, ■ HRT20 and ▲ HRT30.

#### 4.4 Συζήτηση

##### 4.4.1 Απόδοση σε βιομεθάνιο

Στην εργασία αυτή εξετάστηκε η επίδραση της αύξησης της περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες στη διεργασία της αναερόβιας χώνευσής της. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως μοναδική πρώτη ύλη βιομάζα του *A. platensis* με τρεις διαφορετικές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες 60%, 40% και 20% σε τρεις διαφορετικούς χρόνους παραμονής, 15, 20 και 30 μερών.

Σε γενικές γραμμές από την έρευνα αυτή συνάγεται το συμπέρασμα ότι η αύξηση της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης της

βιομάζας σε βιομεθάνιο. Η αύξηση που παρατηρήθηκε ανήλθε ως και 38% για την πειραματική σειρά με νωπή βιομάζα και ως 66% για τη σειρά με θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα. Η μέγιστη απόδοση σε βιομεθάνιο που παρατηρήθηκε ανήλθε στα  $203 \pm 10$  mlCH<sub>4</sub> gCOD<sub>infl</sub><sup>-1</sup> και παρατηρήθηκε σε βιοαντιδραστήρα με πρώτη ύλη βιομάζα με 60% περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και χρόνο παραμονής 30 ημερών, ενώ η αντίστοιχη απόδοση του μάρτυρα (βιομάζα με περιεκτικότητα 20% σε υδατάνθρακες) ήταν  $123 \pm 10$  mlCH<sub>4</sub> gCOD<sub>infl</sub><sup>-1</sup>. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν διάφορες έρευνες που πραγματοποιούνται την αναερόβια χώνευση διάφορων ειδών του γένους *Arthrospira*. Η απόδοση σε βιομεθάνιο που αναφέρεται κυμαίνεται από 293 ml gVS<sup>-1</sup> (ή 196 mlCH<sub>4</sub> gCOD<sup>-1</sup>, σύμφωνα με δικούς μας υπολογισμούς<sup>a</sup>) σε ασυνεχείς βιοαντιδραστήρες και πρώτη ύλη *A. platensis* (Mussgnug et al., 2010), μέχρι και 350 ml gVS<sup>-1</sup> (ή 234 mlCH<sub>4</sub> gCOD<sup>-1</sup>, σύμφωνα με δικούς μας υπολογισμούς) σε συνεχείς βιοαντιδραστήρες με πρώτη ύλη το *Spirulina (Arthrospira) maxima* και χρόνο παραμονής 30 μερών (Samson and Leduy, 1986). Οι Varel et al. (1988), αναφέρουν απόδοση σε βιομεθάνιο 150 mlCH<sub>4</sub> gCOD<sup>-1</sup> σε συνεχή χώνευση και του *Spirulina (Arthrospira) maxima* 15 μέρες χρόνο παραμονής. Πρόσφατα, οι Inglesby and Fisher (2012) ανέφεραν απόδοση σε βιομεθάνιο 173 mlCH<sub>4</sub> gVS<sup>-1</sup> (ή 116 mlCH<sub>4</sub> gCOD<sup>-1</sup>, σύμφωνα με τους υπολογισμούς μας) χρησιμοποιώντας *A. maxima* ως πρώτη ύλη. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν μέγιστη απόδοση βιομεθανίου 90 mlCH<sub>4</sub> gVS<sup>-1</sup> (ή 60 mlCH<sub>4</sub> gCOD<sup>-1</sup>, σύμφωνα με τους υπολογισμούς μας) σε ημι-συνεχή βιοαντιδραστήρα με χρόνο παραμονής 10 μέρες. Η μεγάλη διακύμανση στις αποδόσεις μάλλον οφείλονται σε ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των προαναφερόμενων εργασιών. Επίσης το είδος του μικροφύκου επιδρά σημαντικά στην απόδοση σε βιομεθάνιο, με κάποια να αποδίδουν περισσότερο από άλλα (Mussgnug et al., 2010; Zamalloa et al., 2012). Οι καλλιεργητικές συνθήκες είναι πολύ πιθανό να επηρεάζουν επίσης το βαθμό αποδόμησης της βιομάζας και κατ' επέκταση της απόδοσης σε βιομεθάνιο.

Η αύξηση της απόδοσης σε βιομεθάνιο που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία καθώς αυξανόταν η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες είναι πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι οι συσσωρευμένοι υδατάνθρακες στη βιομάζα μικροφυκών που έχουν υποστεί τροφοπενία φωσφόρου είναι σε μορφή ενδοκυτταρικών αποθηκευτικών κόκκων

---

<sup>a</sup> Η τιμή παρατίθεται σύμφωνα με δικούς μας υπολογισμούς. Για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκαν οι συντελεστές 1.39 gCOD gTS<sup>-1</sup>, και VS (πηκτικών στερεών) να είναι το 93% των TS (ολικών στερεών).

και λιγότερο ως δομικά στοιχεία των κυτταρικών τοιχωμάτων (Tillberg and Rowley, 1989). Οι αποθηκευμένοι υδατάνθρακες στο κυτόπλασμα είναι πιθανό πιο εύκολα προσβάσιμοι και πιο εύκολα βιοαποδομήσιμοι άπαξ και λυθεί το κυτταρικό τοίχωμα. Οι Mussgnug et al. (2010) παρατήρησαν επίσης ότι μικροφύκος το οποίο είχε συσσωρεύσει υδατάνθρακες στη βιομάζα του είχε μεγαλύτερες αποδόσεις σε βιοαέριο.

Για τη βελτίωση της βιοαποδόμησης της βιομάζας των μικροφυκών διάφορες μέθοδοι επεξεργασίας έχουν αναπτυχθεί και διερευνηθεί, όπως θερμικές, θερμοχημικές ή μηχανικές κλπ (Chen and Oswald, 1998; González-Fernández et al., 2012; Samson and Leduy, 1983b). Ο κυριότερος στόχος της επεξεργασίας της βιομάζας είναι να επιτευχθεί κυτταρόλυση και να υδρολυθούν διάφορα συστατικά της βιομάζας (όπως πχ τα κυτταρικά τοιχώματα) που ανθίστανται στην ενζυματική υδρόλυση (González-Fernández et al., 2011b; Samson and Leduy, 1983b). Παρόλα αυτά, στην παρούσα εργασία η θερμική επεξεργασία της βιομάζας του *A. platensis* δεν αύξησε την απόδοση σε βιομεθάνιο, παρόλο που η μείωση του οργανικού περιεχομένου (εκφρασμένου ως COD) μειώθηκε μετά τη χώνευση περισσότερο σε σχέση με τη νωπή βιομάζα. Αυτό μάλλον οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τη θερμική επεξεργασία σημαντικό μέρος του οργανικού περιεχομένου της βιομάζας χάθηκε (Πίνακας 4.2). Η νωπή βιομάζα είχε μεγαλύτερες αποδόσεις σε βιομεθάνιο σε σχέση με τη θερμικά επεξεργασμένη βιομάζα, με εξαίρεση τους βιοαντιδραστήρες  $R_{T/40/20}$  και  $R_{T/40/15}$ . Η μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ των δύο πειρατικών σειρών ήταν 36% και παρατηρήθηκε στο βιοαντιδραστήρα  $R_{R/20/20}$  (36%) και η μικρότερη διαφορά 7% παρατηρήθηκε στον  $R_{R/60/15}$  (7%). Αντιθέτως, στους βιοαντιδραστήρες  $R_{T/40/20}$  και  $R_{T/40/15}$  η απόδοση σε βιομεθάνιο ήταν μεγαλύτερη 12% και 10%, από τους αντίστοιχους βιοαντιδραστήρες με νωπή βιομάζα.

Το γενικό συμπέρασμα είναι ότι η αύξηση της περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της απόδοσης της αναερόβιας χώνευσης βιομάζας του *A. platensis* σε βιομεθάνιο. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και οι Elbeshbishy and Nakhla (2012), οι οποίοι διερεύνησαν της αναερόβια χώνευση μείγματος καθαρών υδατανθράκων και πρωτεϊνών σε διαφορετικές αναλογίες και συμπέραναν ότι η αναερόβια χώνευση μείγματος με μεγαλύτερο κλάσμα υδατανθράκων είχε μεγαλύτερη απόδοση σε βιομεθάνιο και ότι οι υδατάνθρακες μεθανοποιούνται σε μεγαλύτερο βαθμό από τις πρωτεΐνες.



#### 4.4.2 Μείωση COD και αποδόμηση των συστατικών της βιομάζας

Διερευνήθηκε η αποδόμηση των συστατικών της βιομάζας για να εξεταστεί η συμμετοχή του κάθε συστατικού στην τελική απόδοση σε βιομεθάνιο. Ένα τυπικό κύτταρο του *A. platensis* περικλείεται από τέσσερις στοιβάδες (i) την κυτοπλασματική μεμβράνη, (ii) το κυτταρικό τοίχωμα, (iii) ένα προστατευτικό περίβλημα (sheath) και (iv) την κάψα συν ένα ιξώδες στρώμα. Ειδικότερα το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από πεπτιδογλυκάνες, πρωτεΐνες και λιποπολυσακχαρίτες (Bertocchi et al., 1990; Van Eykelenburg, 1977; Van Eykelenburg et al., 1980). Στα μικροφύκη που έχουν υποστεί τροφοπενία οι υδατάνθρακες της βιομάζας τους συντίθενται και συσσωρεύονται εις βάρος των άλλων συστατικών και συσσωρεύονται κυρίως ενδοκυτταρικά (Tillberg and Rowley, 1989). Τα υπόλοιπα συστατικά της βιομάζας κατά την τροφοπενία συντίθενται σε πολύ μικρότερο βαθμό (δες και Εργασίες 2 και 3) και πιθανό να χρησιμεύουν στα κύτταρα ως δομικά συστατικά και λιγότερο (ή καθόλου) ως αποθηκευτικά. Επίσης, μάλλον τα δομικά συστατικά της βιομάζας είναι περισσότερο ανθεκτικά στην ενζυματική υδρόλυση. Το γεγονός αυτό πιθανό να εξηγεί την παρατήρηση ότι στην πειραματική σειρά με νωπή βιομάζα η αποδόμηση των πρωτεϊνών και λιπιδίων ήταν χαμηλότερη όσο μεγαλύτερη ήταν η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες. Με άλλα λόγια στην τροφοπενία καθώς συσσωρεύονται οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια που εξακολουθούν να συντίθενται παίζουν δομικό μόνο ρόλο. Άρα η αποδόμησή τους είναι τόσο χαμηλότερη όσο περισσότερο παίζουν δομικό ρόλο και άρα και η συμμετοχή τους στην παραγωγή βιομεθανίου είναι χαμηλότερη. Φαίνεται ότι τα ενδοκυτταρικά αποθηκευμένα συστατικά της βιομάζας αποδομούνται σε μεγαλύτερο βαθμό από τα δομικά συστατικά της βιομάζας.

Στην περίπτωση των πρωτεϊνών έχει αναφερθεί ότι η αποδόμησή τους μειώνεται όσο αυξάνει η παρουσία υδατανθράκων στο υπόστρωμα της χώνευσης. Αυτή η μείωση της αποδόμησης δείχνει ότι μάλλον οι υδατάνθρακες είναι προτιμότερο υπόστρωμα για τους αναερόβιους μικροοργανισμούς από ότι είναι οι πρωτεΐνες. Επίσης είναι γνωστό ότι η παρουσία γλυκόζης και άλλων εύκολα αποδομήσιμων ουσιών παρεμποδίζουν τη σύνθεση εξωπρωτεασών, δηλαδή ενζύμων για την υδρόλυση των πρωτεϊνών (Breure et

al., 1986). Πιθανό αυτή να είναι μια ακόμα εξήγηση για τη μείωση της αποδόμησης των πρωτεϊνών καθώς αυξάνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες.

Η θερμική επεξεργασία φαίνεται ότι σπάει και καθιστά αυτά τα δομικά συστατικά ευκολότερα στην ενζυματική υδρόλυση. Αυτό το συμπέρασμα ισχυροποιείται από το γεγονός ότι η αποδόμηση των διαφόρων συστατικών της βιομάζας ήταν υψηλότερη σε σχέση με τη σειρά με νωπή βιομάζα. Παρόλα αυτά η συγκεκριμένη θερμική επεξεργασία δεν αύξησε την απόδοση σε βιομεθάνιο. Η μείωση του οργανικού περιεχομένου κατά τη θερμική επεξεργασία μειώνει τη δυναμικότητα της πρώτης ύλης για παραγωγή βιομεθανίου.

Κατά τη θερμική επεξεργασία παρατηρήθηκε αποδόμηση των διαφόρων συστατικών της βιομάζας. Μεταξύ των συστατικών της βιομάζας, οι υδατάνθρακες αποδομήθηκαν ενώ οι πρωτεΐνες ήταν πιο ευαίσθητες στην επίδραση της θερμοκρασίας. Οι πρωτεΐνες του *A. platensis* είναι γνωστό ότι αποδομούνται σε θερμοκρασίες 60-70 °C (Desmorieux et al., 2010), οι οποίες είναι σημαντικά χαμηλότερες από τους 121 °C που επικρατούν στα αυτόκλειστα.

#### 4.4.2.1 Συγκεντρώσεις NH<sub>3</sub>-N

Η αμμωνία (NH<sub>3</sub>) παράγεται κατά την αποδόμηση αζωτούχων ουσιών (όπως οι πρωτεΐνες). Παρόλο που οι πρωτεΐνες αποδομήθηκαν σχετικά λίγο, η συγκέντρωση της αμμωνίας σε ορισμένους βιοαντιδραστήρες ήταν αρκετά υψηλή. Η παραγόμενη αμμωνία ανά μειωμένου COD κυμάνθηκε από 117-251 mgNH<sub>3</sub>-N gCOD<sup>-1</sup>. Αυτή η σχετικά μεγάλη τιμή και δεδομένου ότι η παραγόμενη αμμωνία για κάθε COD πρωτεΐνης είναι (...τιμη) πιθανό να δείχνει ότι πέρα από τις πρωτεΐνες και άλλα συστατικά με υψηλό περιεχόμενο σε άζωτο μπορεί να συμβάλλουν έντονα στην παραγωγή αμμωνίας. Συστατικά του κυττάρου με μεγάλο περιεχόμενο σε άζωτο είναι για παράδειγμα το ATP και τα νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA). Ειδικά τα νουκλεϊκά οξέα μπορεί να συμβάλουν σημαντικά δεδομένου ότι το *A. platensis* ως προκαρυωτικός οργανισμός είναι πλούσιος σε αυτά (González López et al., 2010). Υψηλές συγκεντρώσεις σε αμμωνία σε αναερόβιους βιοαντιδραστήρες έχουν αναφερθεί και από τους Samson and Leduy (1986)

και ειδικά σε δοκιμές κατά τις οποίες η αποδόμηση της βιομάζας και κατ' επέκταση των πρωτεϊνών ήταν πολύ μικρή.

Η πιθανή παρεμπόδιση και τοξική δράση της αμμωνίας έχει συζητηθεί εκτεταμένα στη βιβλιογραφία. Συγκέντρωση αμμωνίας πάνω από 1700 mg l<sup>-1</sup> θεωρείται ότι δρα τοξικά στους μεθανογόνους μικροοργανισμούς (Chen et al., 2008). Επίσης έχει τονιστεί ιδιαίτερα η πιθανή τοξικότητα της παραγόμενης αμμωνίας κατά τη χώνευση βιομάζας μικροφυκών τα οποία έχουν μεγάλη σχετικά περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (González-Fernández et al., 2011b; Sialve et al., 2009).

Στην παρούσα εργασία η παρατήρηση ότι η τάση της συγκέντρωσης της αμμωνίας μειώνεται καθώς αυξάνεται η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες αποδίδεται στο γεγονός ότι κατά τη συσσώρευση υδατανθράκων στη βιομάζα η σύνθεση των πρωτεϊνών μειώνεται και κατ' επέκταση μειώνεται και η παραγωγή αμμωνίας. Παρόλο που οι συγκεντρώσεις αμμωνίας δεν ήταν υψηλές έτσι ώστε να παρουσιαστεί κάποια αστάθεια στη λειτουργία των βιοαντιδραστήρων, το γεγονός ότι με την αύξηση των υδατανθράκων μειώνεται η συγκέντρωση αμμωνίας μπορεί να αποδειχθεί αρκετά σημαντικό όταν η οργανική φόρτιση του βιοαντιδραστήρα είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή της παρούσας εργασίας.

#### 4.4.2.2 Συγκεντρώσεις VFA

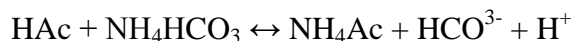
Τα πτητικά λιπαρά οξέα (VFA) είναι τα τελικά προϊόντα της υδρόλυσης των διαφόρων οργανικών συστατικών της βιομάζας κατά την αναερόβια χώνευση. Οι υδατάνθρακες υδρολύονται γρήγορα σε μονομερή σάκχαρα και μετά ζυμώνονται για την παραγωγή των VFA. Οι πρωτεΐνες υδρολύονται πρώτα σε αμινοξέα, ενώ τα λιπίδια σε γλυκερόλη και σε λιπαρά οξέα μεγάλης αλυσίδας. Στη συνέχεια όλες αυτές οι ουσίες ζυμώνονται προς VFA. Τα VFA είναι η κύρια πρώτη ύλη για τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς. Όταν ο ρυθμός υδρόλυσης και παραγωγής VFA είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό κατανάλωσής τους από τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς τότε προκαλείται συσσώρευσή τους στους βιοαντιδραστήρες με αποτέλεσμα την οξύνιση των υγρών της χώνευσης και την περαιτέρω παρεμπόδιση της μεθανογένεσης (Vavilin et al., 2008). Στην παρούσα εργασία οι βιοαντιδραστήρες με χρόνο παραμονής 20 και 30 μέρες είχαν πολύ χαμηλή

συγκέντρωση VFA χωρίς την πιθανότητα να προκληθεί κάποια αστάθεια εξαιτίας της. Στους βιοαντιδραστήρες με χρόνο παραμονής 15 μέρες η συγκέντρωση των VFA ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τους άλλους χρόνους παραμονής, γεγονός που αντικατοπτρίζει ότι η οξεογένεση και οξικογένεση είχαν μεγαλύτερο ρυθμό από την κατανάλωσή τους με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους. Παρόλα αυτά η συγκέντρωσή τους ήταν και σε αυτή περίπτωση χαμηλή ώστε να προκαλέσει λειτουργικές αστάθειες στην αναερόβια χώνευση.

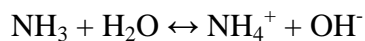
#### 4.4.3 pH

Οι τιμές του pH των αναερόβιων βιοαντιδραστήρων είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης τριών βασικών υποσυστημάτων, του διτανθρακικού ιόντος, της αμμωνίας και των πτητικών λιπαρών οξέων.

Τα πτητικά λιπαρά οξέα μειώνουν το ρυθμιστικό δυναμικό του διτανθρακικού ιόντος ( $\text{HCO}_3^-$ ) και ωθούν το pH να λάβει χαμηλές τιμές, ενώ αντίθετα η παρουσία αμμωνίας ( $\text{NH}_3$ ) το ενισχύει αποδεσμεύοντας διτανθρακικά ιόντα αντιδρώντας με τα οξέα και ωθώντας το pH να λάβει υψηλές τιμές (Georgacakis, 1979):



και



Οι φυσικές αυτές ρυθμιστικές ουσίες με κατάλληλη αυξομείωση του βαθμού διάστασής τους είτε κατορθώνουν να διατηρούν την τιμή του pH σταθερή μέσα στο ανεκτό για τους μικροοργανισμούς εύρος τιμών 6,6 – 7,6 (McCarty, 1964) ή λόγω των μεγάλων συγκεντρώσεών τους το ωθούν εκτός αυτών των ορίων, με αποτέλεσμα πολλές φορές την κατάρρευση του βιοαντιδραστήρα. Στην παρούσα εργασία επειδή κανένα από τα στοιχεία αυτά (VFA και αμμωνία) δεν ήταν σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις και οι βιοαντιδραστήρες λειτουργούσαν εντός των ασφαλών ορίων pH.

#### 4.5 Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία έδειξε ότι η χρήση βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis* πλούσιας σε υδατάνθρακες ως υπόστρωμα για την παραγωγή βιοκαυσίμων μέσω της αναερόβιας χώνευσης βελτίωσε την απόδοση σε βιοκαύσιμο (βιομεθάνιο). Η βελτίωση της απόδοσης σε βιομεθάνιο οφείλεται μάλλον στο γεγονός ότι οι συσσωρευμένοι υδατάνθρακες μετά την τροφοπενία φωσφόρου είναι σε μορφή ενδοκυτταρικών αποθηκευτικών κόκκων με αποτέλεσμα να βιοαποδομούνται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα δομικά στοιχεία των κυττάρων. Η συγκέντρωση της αμμωνίας μειώθηκε με την αύξηση της περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες με πιθανό αποτέλεσμα τη βελτίωση των συνθηκών της αναερόβιας χώνευσης. Η οργανική φόρτιση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν όμως σχετικά χαμηλή και οι συγκεντρώσεις της αμμωνίας δεν είχαν κάποια εμφανή αρνητική επίδραση στην όλη χώνευση. Εικάζεται ότι σε υψηλότερες οργανικές φορτίσεις η θετική επίδραση της αύξησης της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες θα έχει πιο εμφανή επίδραση. Για το λόγο αυτό περαιτέρω έρευνα είναι αναγκαία.

## 5

### **Παραγωγή βιοαιθανόλης από εμπλουτισμένη σε υδατόνθρακες βιομάζα του κυανοβακτηρίου *Arthrospira (Spirulina) platensis* υδρολυμένη με οξέα**

## 5 Παραγωγή βιοαιθανόλης από εμπλουτισμένη σε υδατάνθρακες βιομάζα του κυανοβακτηρίου *Arthrospira (Spirulina) platensis* υδρολυμένη με οξέα

### Περίληψη

Σε αυτή την εργασία εξετάστηκε η δυνατότητα υδρόλυσης της εμπλουτισμένης σε υδατάνθρακες βιομάζας του κυανοβακτηρίου *Arthrospira platensis* καλλιεργημένου κάτω από συνθήκες τροφοπενίας φωσφόρου. Για την υδρόλυση χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά οξέα ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$  και  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις (2,5N, 1N, 0,5N και 0,25N) και τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες αντίδρασης (40 °C, 60 °C, 80 °C και 100 °C). Η απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα είναι συνάρτηση των τριών παραμέτρων που εξετάστηκαν, με γενική τάση ο ρυθμός υδρόλυσης να αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξέος και της θερμοκρασίας. Η απόδοση όμως σε αναγώγιμα σάκχαρα δεν ακολούθησε την ίδια τάση. Αύξηση της συγκέντρωσης των οξέων σε συνδυασμό με αύξηση της θερμοκρασίας μείωσε την απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα. Η μέγιστη απόδοση σε βιοαιθανόλη ήταν  $16,32 \pm 0,90$  %  $\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{g}$  ξηρής βιομάζας και  $16,27 \pm 0,97$  %  $\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{g}$  σε υποστρώματα που προέκυψαν από την υδρόλυση με 0,5N  $\text{HNO}_3$  και 0,5N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , αντίστοιχα. Αυτή η απόδοση σε βιοαιθανόλη αντιστοιχεί στο 53% περίπου της θεωρητικής απόδοσης σε βιοαιθανόλη.

### 5.1 Εισαγωγή

Η αναερόβια ζύμωση είναι μια βιολογική τεχνολογία κατά την οποία διάφοροι μικροοργανισμοί όπως οι ζυμομύκητες ζυμώνουν διάφορα σάκχαρα (κυρίως γλυκόζη) και παράγουν αιθανόλη. Με την εξαίρεση κάποιων ειδών μικροφυκών, τα οποία έχουν βιομάζα με αυξημένη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, τα περισσότερα γνωστά είδη έχουν σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες. Συνεπώς η χρήση μικροφυκών ως υπόστρωμα για την παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω της αναερόβιας ζύμωσης δεν έχει ελκύσει ιδιαίτερα την προσοχή των ερευνητών (Choi et al., 2010; Doan et al., 2012; Eshaq et al., 2011; Harun and Danquah, 2011b; Kim et al., 2012; Miranda et al., 2012a;

Miranda et al., 2012b; Mustaqim and Ohtaguchi, 1997; Nguyen et al., 2009; Sulfahri et al., 2011; Zhou et al., 2011).

Βέβαια, όπως έχει αναλυθεί σε προηγούμενα μέρη της παρούσας διατριβής, η σύσταση της βιομάζας των μικροφυκών μπορεί να ελεγχθεί με διάφορες τεχνικές (Markou et al., 2012a). Στο ίδιο πλαίσιο σκέψης οι Nguyen et al. (2009) και οι Choi et al. (2010) καλλιέργησαν το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* κάτω από ισχυρή ένταση φωτισμού ( $450 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) και με την προσθήκη οξικού οξέος για τον έλεγχο του pH με αποτέλεσμα η βιομάζα του μικροφύκους να συσσωρεύσει υδατάνθρακες περίπου 60%. Επίσης οι Miranda et al. (Miranda et al., 2012a) καλλιέργησαν *Scenedesmus obliquus* και το συγκόμισαν μετά από εξάντληση του παρεχόμενου αζώτου από το υπόστρωμα ανάπτυξης. Η βιομάζα του *Scenedesmus obliquus* περιείχε υδατάνθρακες περίπου 29%. Και στις τρεις παραπάνω εργασίες η βιομάζα των μικροφυκών χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω της αναερόβιας ζύμωσης χρησιμοποιώντας ζυμομύκητες.

Τα εμπόδια που προκύπτουν από τη χρήση μικροφυκών για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι ότι οι ζυμομύκητες μπορούν να ζυμώνουν μόνο μονομερή σάκχαρα όπως γλυκόζη, φρουκτόζη κλπ. Συνεπώς, για να μπορέσουν τα μικροφύκη να αποτελέσουν υπόστρωμα ζύμωσης θα πρέπει οι υδατάνθρακές τους (πολυμερή σακχάρων) να υδρολυθούν προς μονομερή σάκχαρα (Talebnia et al., 2010). Μέχρι στιγμής έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι για την υδρόλυση των υδατανθράκων. Μεταξύ αυτών η υδρόλυση με οξέα χρησιμοποιείται πολύ συχνά για την επεξεργασία λιγνοκυτταρινούχων υλικών (Ballesteros et al., 2008; Sun and Cheng, 2002; Tasić et al., 2009). Οι υδατάνθρακες της τυπικής βιομάζας του *A. platensis* είναι κυρίως σε μορφή δομικών στοιχείων του κυτταρικού τοιχώματος (πεπτιδογλυκάνες) και ένα ακόμα μέρος ως αποθηκευμένοι υδατάνθρακες (κόκκοι γλυκογόνου) εντός του κυτοπλάσματος (Van Eykelenburg, 1977). Η βιομάζα του *A. platensis* δεν περιέχει λιγνίνη, ημι-κυτταρίνη και κυτταρίνη (Babadzhanov et al., 2004). Επιπλέον, κάτω από συνθήκες τροφοπενίας φωσφόρου, όπως αναφέρθηκε και στην Εργασία 4, οι υδατάνθρακες βρίσκονται εντός του κυτοπλάσματος σε μορφή αποθηκευμένων στοιχείων (Tillberg and Rowley, 1989). Επομένως, οι υδατάνθρακες του *A. platensis* καλλιεργημένου υπό συνθήκες τροφοπενίας φωσφόρου είναι πιθανό να μην ανθίστανται



στην υδρόλυση όσο η λιγνίνη και η ημι-κυτταρίνη στα λιγνοκυτταρινούχα υλικά. Οι τρεις κυριότερες παράμετροι που επηρεάζουν την όλη διεργασία της υδρόλυσης είναι η θερμοκρασία, η συγκέντρωση των οξέων και ο χρόνος αντίδρασης (Nguyen et al., 2009). Για την υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχων υλικών με χρήση οξέων ως καταλυτών οι θερμοκρασίες που συνήθως εφαρμόζονται είναι μεταξύ 140 °C και 200 °C (Galbe and Zacchi, 2007). Θεωρήθηκε ότι χαμηλή θερμοκρασία αντίδρασης θα επαρκούσε για την ικανοποιητική υδρόλυση των συσσωρευμένων υδατανθράκων του *A. platensis*. Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να διερευνηθούν τα οξέα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub>, HCl και H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ως πιθανοί καταλύτες σε συγκεντρώσεις 2,5N, 1N, 0,5N και 0,25N με θερμοκρασίες αντίδρασης 40 °C, 60 °C, 80 °C και 100 °C για την υδρόλυση των υδατανθράκων του *A. platensis*, το οποίο καλλιεργήθηκε κάτω από συνθήκες τροφοπενίας φωσφόρου. Σαν επακόλουθο της υδρόλυσης διερευνήθηκε η δυνατότητα ζύμωσης των υδρολυμένων υδατανθράκων με τη χρήση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* ο οποίος είχε προσαρμοστεί σε συνθήκες υψηλής αλατότητας.

## 5.2 Υλικά και μέθοδοι

### 5.2.1 Μικροοργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης

Η καλλιέργεια του κυανοβακτηρίου *Arthrospira platensis* SAG 21.99 έγινε ακριβώς με τις ίδιες συνθήκες όπως στην Εργασία 4, με μόνη διαφορά ότι σε αυτή την εργασία η παραγωγή έγινε αποκλειστικά με το γνώμονα της μεγίστης περιεκτικότητας και παραγωγής υδατανθράκων.

### 5.2.2 Συνθήκες υδρόλυσης

Το κυανοβακτήριο *A. platensis* συγκομίστηκε με φιλτράρισμα μετά από 30 min βιοσυσσωμάτωσης και καθίζησης της βιομάζας (Εργασία 2), (Markou et al., 2012b). Η φιλτραρισμένη βιομάζα αραιώθηκε και η τελική συγκέντρωση της βιομάζας ήταν 12-13 g l<sup>-1</sup>. Σε δείγματα με βιομάζα του *A. platensis* προστέθηκαν οξέα σε ποσότητες τέτοιες έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή τους (εκφρασμένη ως κανονικότητα με βάση τα ιόντα του H<sup>+</sup>) να είναι 2,5N, 1N, 0,5N και 0,25N. Τα οξέα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub>, HCl και H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Τα δείγματα περιέχονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες

πολυπροπυλενίου με βιδωτό καπάκι τα οποία τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασίες 40 °C, 60 °C, 80 °C και 100 °C. Σε μια επιπλέον σειρά δοκιμών, διερευνήθηκε η επίδραση μιγμάτων οξέων στην υδρόλυση των υδατανθράκων του κυανοβακτηρίου. Τα μίγματα είχαν αναλογίες (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub>:HCl) 1,5:5,5:1, 2,5:4,5:1, 3,5:3,5:1, 4,5:2,5:1 και 5,5:1,5:1. Η ολική συγκέντρωση των μιγμάτων ήταν 1N και 0.5N. Ως θερμοκρασία αντίδρασης επιλέχθηκαν οι 100 °C. Για τα πειράματα ζύμωσης χρησιμοποιώντας υδρολυμένα σάκχαρα με μίγματα οξέων η θερμοκρασία υδρόλυσης ήταν 100 °C. Και ο χρόνος αντίδρασης 90 min και 180 min, αντίστοιχα. Για τον προσδιορισμό των αναγώγιμων σακχάρων οι δοκιμαστικοί σωλήνες ψύχονταν με τρεχούμενο νερό θερμοκρασίας αρδευτικού δικτύου και λαμβανόταν δείγμα. Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετούνταν πάλι στο υδατόλουτρο μέχρι την επόμενη λήψη δείγματος. Τα δείγματα που λαμβανόταν εξουδετερωνόταν με 6N NaOH και φυγοκεντρούταν για 4-5 λεπτά στις 7000-8000 rpm. Το υπερκείμενο του δείγματος μετά από κατάλληλη αραίωση χρησιμοποιούταν για τον προσδιορισμό των αναγώγιμων σακχάρων με τη μέθοδο DNS. Η απόδοση της υδρόλυσης σε αναγώγιμα σάκχαρα υπολογιζόταν με βάση των παρακάτω τύπο:

$$\text{Απόδοση αναγώγιμων σακχάρων} = \frac{\text{αναγώγιμα σάκχαρα}}{\text{ολικά σάκχαρα}}$$

Για όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε νωπή βιομάζα του *A. platensis* συγκομισμένη το πολύ 1 ώρα πριν τις δοκιμές.

### 5.2.3 Συνθήκες ζύμωσης

Τα υδρολυμένα σάκχαρα του *A. platensis* χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της πιθανότητας παραγωγής βιοαιθανόλης. Από τα οξέα που διερευνήθηκαν στην πρώτη φάση τελικά επιλέχθηκαν τα τρία (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub> και HCl) για περαιτέρω διερεύνηση, ενώ το H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> θεωρήθηκε ότι έχει πολύ χαμηλή απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα. Οι συγκεντρώσεις υδρόλυσης που επιλέχθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση ήταν 2,5N, 1N και 0,5N, ενώ το 0,25N θεωρήθηκε ότι έχει πολύ χαμηλή απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα.. Ο χρόνος αντίδρασης της υδρόλυσης ήταν 45 λεπτά, 90 λεπτά και 180 λεπτά

για συγκεντρώσεις 2,5N, 1N και 0,5N, αντίστοιχα. Στα δείγματα αυτά προστέθηκαν τα παρακάτω στοιχεία:  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  (2 g/l),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1 g/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/l),  $\text{ZnSO}_4$  (0,2 g/l),  $\text{MgSO}_4$  (0,2 g/l) και εκχύλισμα ζύμης (2 g/l). Το pH των δειγμάτων με τα υδρολυμένα σάκχαρα ρυθμίστηκε με NaOH για να λάβει τιμή 4,5 ( $\pm 0.1$ ). Τα δείγματα αποστειρώθηκαν στους 120 °C για 25 min σε αυτόκλειστο.

Στον **Πίνακα 5.1** φαίνεται η ηλεκτρική αγωγιμότητα των δειγμάτων μετά την προσθήκη NaOH για τη ρύθμιση του pH στο 4,5. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ζυμομύκητας για την αλκοολική ζύμωση στη βιομηχανία είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*, λόγω σειράς από πλεονεκτήματα όπως η καλή ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (μέχρι και 20%, v/v) και η ικανότητά του να αναπτύσσεται γρήγορα κάτω από αναερόβιες συνθήκες (Guimarães et al., 2010; Kasavi et al., 2012). Επιπλέον, ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae* αναπτύσσεται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων μετά την προσαρμογή του με τη μέθοδο της προ-καλλιέργειας σε συνθήκες καταπόνησης σε υψηλή αλατότητα. Για τους λόγους αυτούς για τη διερεύνηση της δυνατότητας της παραγωγής βιοαιθανόλης από τα υδρολυμένα σάκχαρα του *A. platensis* τα δείγματα εμβολιάστηκαν με προ-καλλιεργημένο ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* MV 92081 (Martin Vialatte) προσαρμοσμένου σε υψηλή συγκέντρωση αλάτων σύμφωνα με την πατενταρισμένη μεθοδολογία των Νεραντζή και Λογοθέτη (2007). Ο εμβολιασμός έγινε κάτω από ασηπτικές συνθήκες και τα δείγματα αφέθηκαν να ζυμωθούν στους 30 ( $\pm 1$ ) °C για 24 ώρες. Τα πειράματα με τις ζυμώσεις έγιναν έχοντας τρεις επαναλήψεις.

Η θεωρητική απόδοση σε βιοαιθανόλη υπολογίστηκε με βάση την παραγωγή 0,51 g EtOH ανά g αναγώγιμων σακχάρων, παρόλο που είναι πιθανό ότι δεν είναι όλα τα αναγώγιμα σάκχαρα ζυμώσιμα.

#### 5.2.4 Αναλυτικές μέθοδοι

Τα ολικά σάκχαρα (ολικοί υδατάνθρακες) προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο φαινόλης-θεικού οξέος (DuBois et al., 1956), ενώ τα αναγώγιμα σάκχαρα προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο το 3,5 δινιτρο-σαλικυλικού οξέος (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS), (Miller, 1959). Και στις δύο μεθόδους για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε

διάλυμα γλυκόζης. Η αιθανόλη προσδιορίστηκε ενζυμικά σύμφωνα με τους Prencipe et al. (1987), όπου για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αιθανόλης. Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν για κάθε επανάληψη (n=9). pH και ηλεκτρική αγωγιμότητα μετρήθηκαν με το όργανο Hach HQ40.

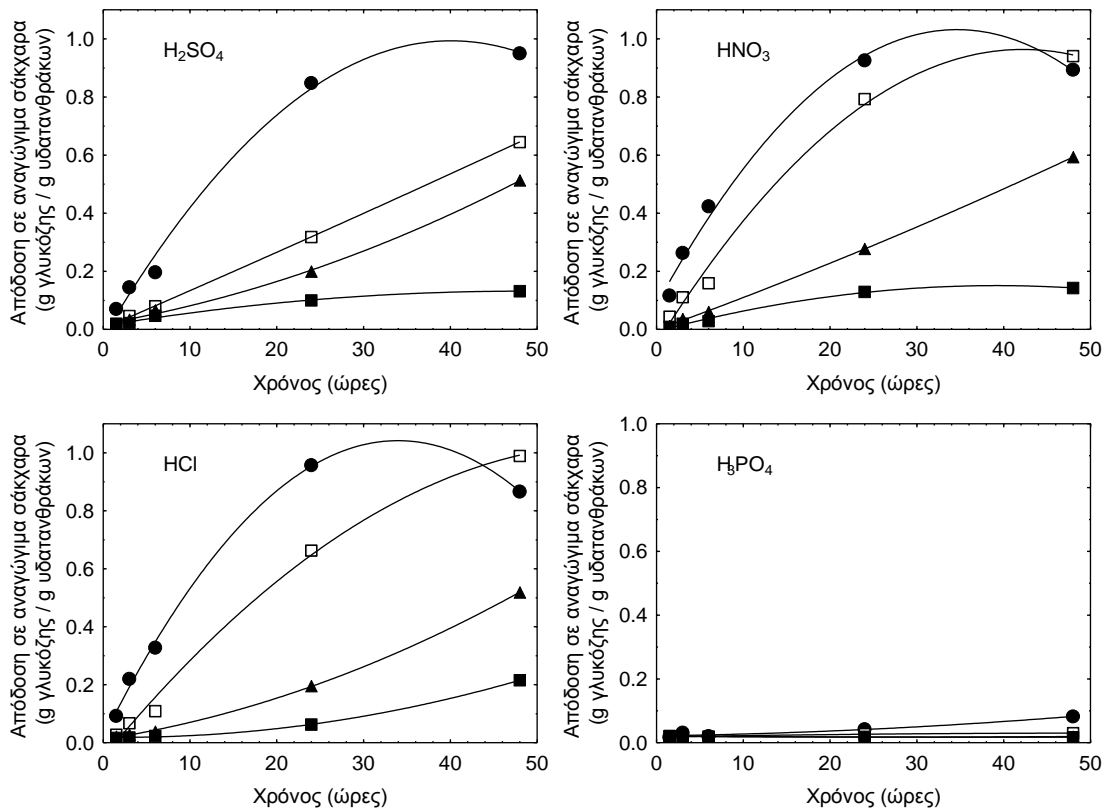
### 5.3 Αποτελέσματα

#### 5.3.1 Υδρόλυση

Στην εργασία αυτή για την υδρόλυση της εμπλουτισμένης σε υδατάνθρακες βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis* χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα οξέα ( $H_2SO_4$ ,  $HNO_3$ ,  $HCl$  και  $H_3PO_4$ ) σε τέσσερις συγκεντρώσεις (2,5N, 1N, 0,5N και 0,25N) και τέσσερις θερμοκρασίες αντίδρασης (40 °C, 60 °C, 80 °C and 100 °C). Σκοπός ήταν η διερεύνηση και η βελτιστοποίηση της υδρόλυσης των υδατανθράκων για την παραλαβή μονομερών σακχάρων. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στις εικόνες 5.1 ως 5.4. Στις δοκιμές με θερμοκρασία αντίδρασης τους 40 °C η απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα ήταν λιγότερο από 4% ακόμα και μετά από 24 ώρες αντίδρασης και συγκέντρωση οξέων 2.5N, γεγονός που σημαίνει ότι αυτή η θερμοκρασία αποκλείεται για οποιαδήποτε περαιτέρω διερεύνηση.

#### 5.3.2 Υδρόλυση στους 60 °C

Στην **Εικόνα 5.1** φαίνονται οι κινητικές της υδρόλυσης του of *A. platensis* σε θερμοκρασία 60 °C. Σε όλα τα οξέα που εξετάστηκαν η συγκέντρωση που είχε την υψηλότερη απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα ήταν η 2.5N. ανάμεσα από τα τέσσερα οξέα το  $HCl$  είχε την υψηλότερη απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα, παρόλα αυτά οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ( $p>0.05$ ), εκτός από το  $H_3PO_4$ , του οποίου η απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα ήταν σημαντικά χαμηλότερη. Στη συγκέντρωση 1N, οι υψηλότερες αποδόσεις σε αναγώγιμα σάκχαρα ήταν 94% και 98% για τα οξέα  $HNO_3$  και  $HCl$ , αντίστοιχα μετά από 48 ώρες αντίδρασης. Σε συγκέντρωση 0,5N η υψηλότερη απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα ήταν 59% και παρατηρήθηκε στις δοκιμές με  $HNO_3$  και με 48 ώρες αντίδρασης.



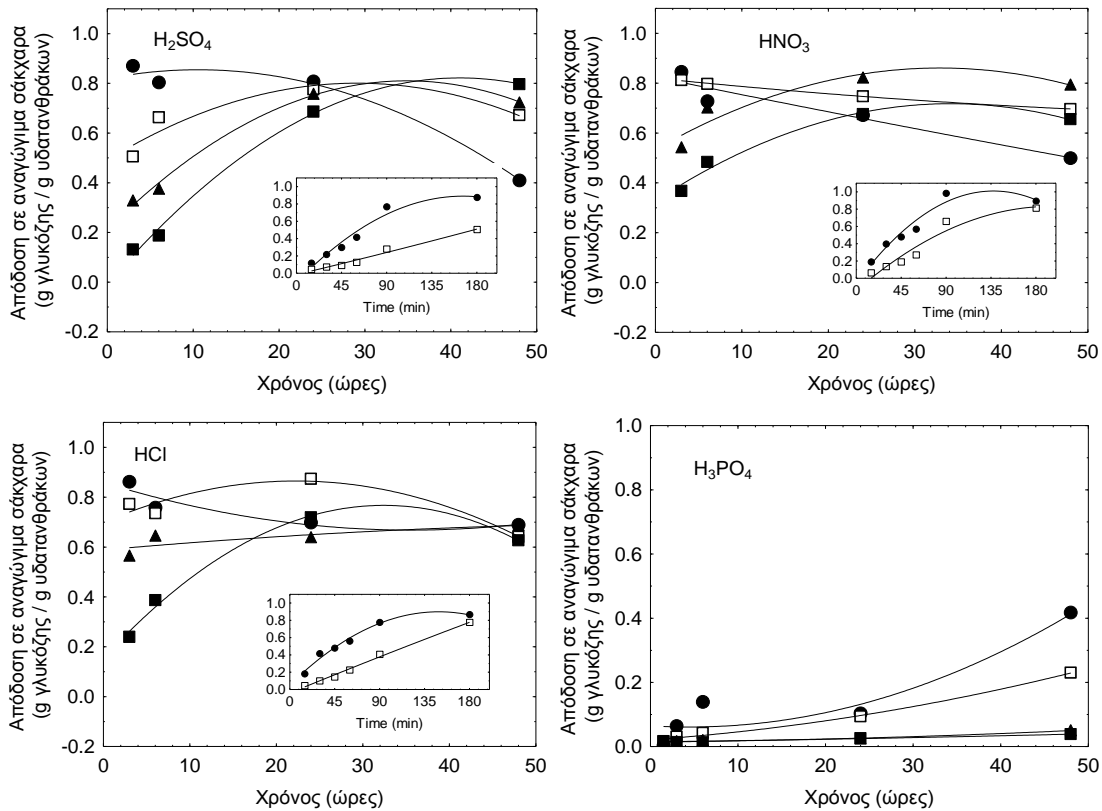
**Εικόνα 5.1** Κινητικές απόδοσης σε αναγώγιμα σάκχαρα κατά την υδρόλυση του *A. platensis* στους 60 °C.

(●: 2,5N; □: 1N; ▲: 0,5N and ■: 0,25N).

### 5.3.3 Υδρόλυση στους 80 °C

Στην **Εικόνα 5.2** φαίνονται οι κινητικές της υδρόλυσης του of *A. platensis* σε θερμοκρασία 80 °C. Σε σύγκριση με τις δοκιμές με θερμοκρασία 60 °C στις δοκιμές με θερμοκρασία 80 °C η υδρόλυση είχε απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα με υψηλότερους ρυθμούς. Η υψηλότερη απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα παρατηρήθηκε στο οξύ HNO<sub>3</sub>, με συγκέντρωση 2,5N και μετά από 90 λεπτά χρόνο αντίδρασης, ενώ το H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και HCl είχαν σχεδόν παρόμοια απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα αλλά μετά από 3 ώρες αντίδρασης. Το H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> είχε τη χαμηλότερη απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα σε σχέση με τα άλλα οξέα όπως ακριβώς και στις δοκιμές με θερμοκρασία 60 °C, δίνοντας τη μέγιστη απόδοση (42%) με συγκέντρωση 2,5N και μετά από 48 ώρες αντίδρασης. Στις δοκιμές με συγκέντρωση οξέων 1N η απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα ανήλθε περίπου στο επίπεδα

απόδοσης όπως στις δοκιμές με 2,5N, και ειδικότερα το HCl και το HNO<sub>3</sub> είχαν τη μέγιστη απόδοση μετά από 3 ώρες αντίδρασης, ενώ το H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> όχι πριν τις 24 ώρες. Στις δοκιμές με συγκεντρώσεις 0,5N οι αποδόσεις των HNO<sub>3</sub> και H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> προσέγγισαν τις αποδόσεις σε αναγώγιμα σάκχαρα των δοκιμών με συγκεντρώσεις 2,5N και 1N, αλλά σε μεγαλύτερο χρόνο αντίδρασης.



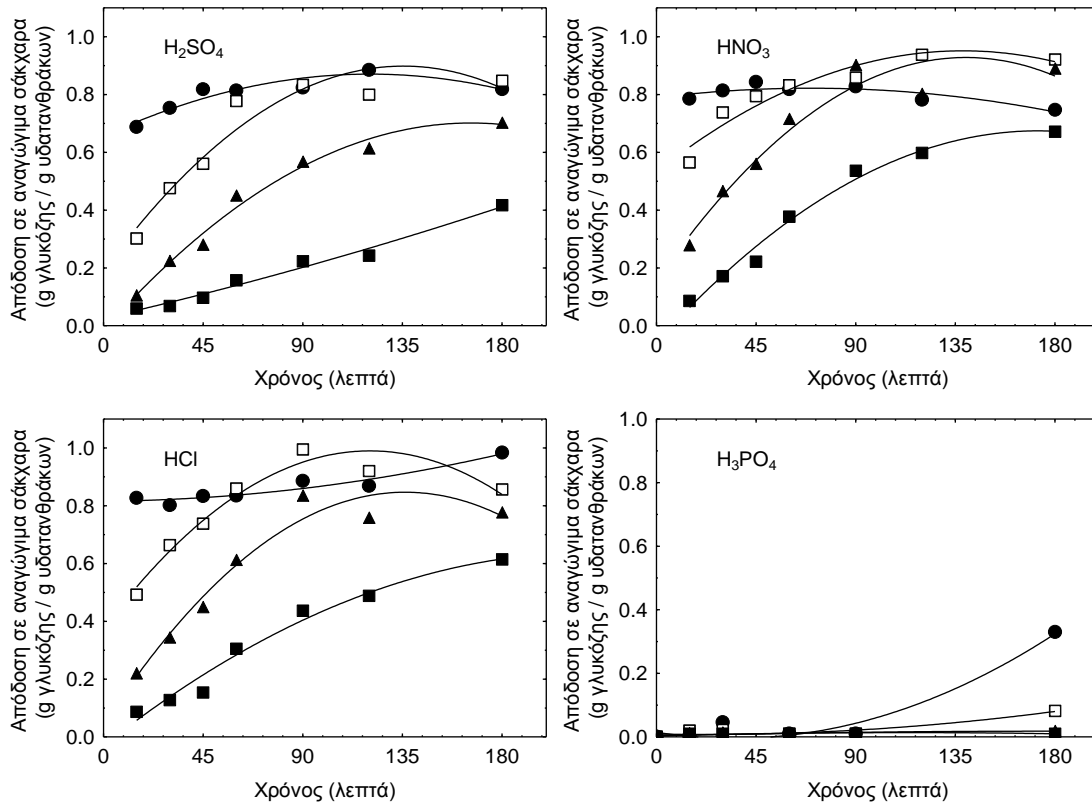
**Εικόνα 5.2** Κινητικές αποδόσεις σε αναγώγιμα σάκχαρα κατά την υδρόλυση του *A. platensis* στους 80 °C.

(●: 2,5N; □: 1N; ▲: 0,5N and ■: 0,25N).

### 5.3.4 Υδρόλυση στους 100 °C

Στην Εικόνα 5.3 φαίνονται οι κινητικές της υδρόλυσης του of *A. platensis* σε θερμοκρασία 100 °C. Όπως φαίνεται η υδρόλυση σε αυτή τη θερμοκρασία είχε υψηλότερο ρυθμό σε σχέση με τις άλλες θερμοκρασίες, παρόλα αυτά οι μέγιστες αποδόσεις σε αναγώγιμα σάκχαρα ήταν ελαφρά χαμηλότερες σε σύγκριση με τις άλλες

θερμοκρασίες όμως με μη στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p>0,05$ ). Σε αυτή τη θερμοκρασία παρατηρήθηκε επίσης ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις έδωσαν και υψηλότερους ρυθμούς υδρόλυσης. Τα οξέα HCl και HNO<sub>3</sub> έδωσαν υψηλότερους ρυθμούς υδρόλυσης σε σχέση με το H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Το H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> όπως και στις άλλες θερμοκρασίες είχε σημαντικά χαμηλότερη απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα σε σχέση με τα άλλα οξέα.



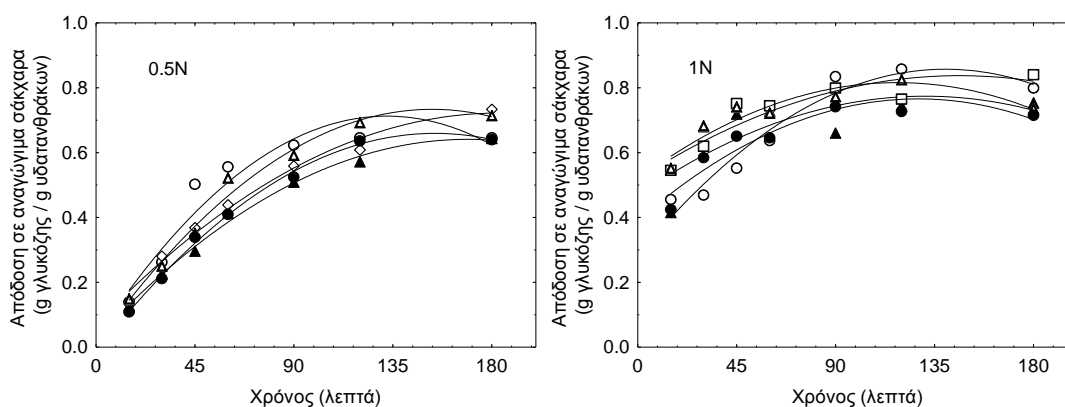
**Εικόνα 5.3** Κινητικές απόδοσης σε αναγώγιμα σάκχαρα κατά την υδρόλυση του *A. platensis* στους 100 °C.

(●: 2,5N; □: 1N; ▲: 0,5N and ■: 0,25N).

### 5.3.5 Υδρόλυση στους 100 °C με μίγματα οξέων

Στην **Εικόνα 5.4** φαίνονται οι κινητικές της υδρόλυσης του of *A. platensis* χρησιμοποιώντας μείγμα οξέων σε θερμοκρασία 100 °C. Το γενικό συμπέρασμα που προκύπτει από τα δεδομένα είναι ότι ο ρυθμός υδρόλυσης και η απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα είναι ανάλογος με την ισχύ του κάθε οξέος και τη συμμετοχή του στο μείγμα.

Με άλλα λόγια, με βάση τα δεδομένα από τις υδρολύσεις με χρήση μοναδικών οξέων όπου παρατηρήθηκε ότι το  $\text{HNO}_3$  ήταν πιο ισχυρό από τα άλλα οξέα, στις δοκιμές που το  $\text{HNO}_3$  ήταν σε μεγαλύτερη αναλογία οι ρυθμοί υδρόλυσης ήταν μεγαλύτεροι σε σχέση με τις δοκιμές όπου το  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ήταν σε μεγαλύτερη αναλογία. Επίσης η συνολική συγκέντρωση των οξέων είχε σημαντική επίδραση στις κινητικές της υδρόλυσης. Τα μείγματα με συγκέντρωση 1N είχαν υψηλότερους ρυθμούς υδρόλυσης σε σχέση με τα μείγματα 0,5N.



**Εικόνα 5.4** Κινητικές απόδοσης σε αναγώγιμα σάκχαρα κατά την υδρόλυση του *A. platensis* με μίγματα οξέων στους 100 °C.

( $\Delta$ : 1.5:5.5:1;  $\circ$ : 2.5:4.5:1;  $\square$ : 3.5:3.5:1;  $\blacktriangle$ : 4.5:2.5:1 and  $\bullet$ : 5.5:1.5:1) (η αναλογία αναφέρεται  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : $\text{HNO}_3$ : $\text{HCl}$ )

T

**Πίνακας 5.1** Απόδοση σε βιοαιθανόλη μετά την αναερόβια ζύμωση για 24 ώρες υδρολυμένης βιομάζας του *A. platensis* (n=9)

Οξύ	Συγκέντρωση οξέος	Απόδοση σε βιοαιθανόλη (% g EtOH/g <sub>dw</sub> biomass)	Ποσοστό επί της θεωρητικής απόδοσης σε βιοαιθανόλη <sup>1</sup> (%)
$\text{H}_2\text{SO}_4$	2,5N	< 0,5	-
	1N	9,27 ± 0,42	30,4 ± 1,6
	0,5N	16,27 ± 0,97	53,3 ± 3,4
$\text{HNO}_3$	2,5N	< 0,5	-
	1N	< 0,5	-
	0,5N	16,32 ± 0,90	53,5 ± 3,0
HCl	2,5N	< 0,5	-
	1N	0,78 ± 0,01	2,6 ± 0,21
	0,5N	13,41 ± 0,86	44,1 ± 2,3
Μείγμα ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ : $\text{HNO}_3$ : $\text{HCl}$ )			
	3,5:3,5:1	1N	< 0,5
	2,5:4,5:1	1N	< 0,5
	4,5:2,5:1	1N	< 0,5



3,5:3,5:1	0,5N	11,3 ± 1,2	37,2 ± 1,2
2,5:4,5:1	0,5N	9,6 ± 0,2	31,5 ± 0,9
4,5:2,5:1	0,5N	11,6 ± 0,3	38,0 ± 1,2

---

1. Υπολογίστηκε με βάση τη θεωρητική απόδοση κατά την οποία 0,51 g EtOH παράγονται από κάθε g αναγωγικών σακχάρων (γλυκόζης)

---

**Πίνακας 5.2 Ηλεκτρική αγωγιμότητα στο διάλυμα υδρόλυσης της βιομάζας του *A. platensis* μετά τη ρύθμιση του pH στο 4.5 με προσθήκη NaOH**

Οξύ	Συγκέντρωση	Ηλεκτρική αγωγιμότητα (mS/cm)	Συγκέντρωση αλάτων <sup>1</sup> (g/l)	Σχηματισμένο άλας
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5N	95	177	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	1N	50	71	
	0,5N	31	35	
HNO <sub>3</sub>	2,5N	152	212	NaNO <sub>3</sub>
	1N	79	85	
	0,5N	41	42	
HCl	2,5N	170	146	NaCl
	1N	86	58	
	0,5N	46	29	
Μείγμα οξέων (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :HNO <sub>3</sub> :HCl)				
3,5:3,5:1	1N	87	76	
2,5:4,5:1	1N	82	77	
4,5:2,5:1	1N	75	74	
3,5:3,5:1	0,5N	56	38	
2,5:4,5:1	0,5N	59	39	
4,5:2,5:1	0,5N	49	37	

<sup>1</sup> Υπολογισμένα με βάση την ποσότητα προσθήκης NaOH για την εξουδετέρωση του κάθε οξέος

**Πίνακας 5.3 Απόδοση βιοαιθανόλης από βιομάζα μικροφυκών μετά από υδρόλυση των υδατανθράκων με οξέα**

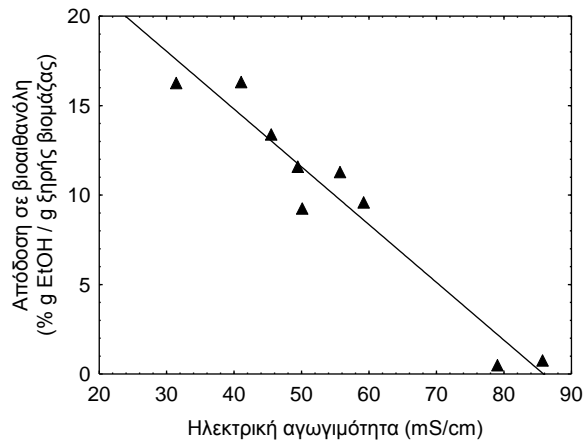
Μικροφύκος	Συγκέντρωση οξέος	Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)	Χρόνος αντίδρασης (min)	Θεωρητική απόδοση (%)	Απόδοση σε βιοαιθανόλη (% gEtOH/gBiomass)	Ζυμομύκητας	Αναφορά
<i>Scenedesmus obliquus</i>	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	120	30		2,24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Miranda et al., 2012a)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	120	30		2,34	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	(Miranda et al., 2012a)
<i>Chlamydomonas Reinhardtii</i>	3% HCl	110	30	100	29,2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Nguyen et al., 2009)
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	3M HCl	80	20	82	(υπολογισμένο)	<i>Saccharomyces sake</i>	(Mustaqim and Ohtaguchi, 1997)
<i>A. platensis</i>	0,5N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	180	53,3	16,27	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Στην παρούσα εργασία
<i>A. platensis</i>	0,5N HNO <sub>3</sub>	100	180	53,5	16,32	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Στην παρούσα εργασία

### 5.3.6 Παραγωγή βιοαιθανόλης

Στον Πίνακα 5.1 παρουσιάζονται οι αποδόσεις σε βιοαιθανόλη μετά την αναερόβια ζύμωση της υδρολυμένης βιομάζας του *A. platensis* με τη χρήση διαφόρων οξέων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αιθανολογόνου ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Η υψηλότερη απόδοση σε βιοαιθανόλη παρατηρήθηκε στις δοκιμές με υδρολυμένη βιομάζα χρησιμοποιώντας 0.5N οξέων. Η απόδοση σε βιοαιθανόλη ήταν 13,41% g EtOH/g ξηρή βιομάζα με το HCl ως καταλύτη, ενώ ανήλθε στα 16,27 και 16,32% g EtOH/g ξηρή βιομάζα με καταλύτες το H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και HNO<sub>3</sub>, αντίστοιχα. Στα υποστρώματα ζύμωσης με 1N οξέων η μόνη ικανοποιητική απόδοση σε βιοαιθανόλη παρατηρήθηκε με καταλύτη το H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ενώ με το HNO<sub>3</sub> και το HCl η παραγόμενη βιοαιθανόλη ήταν πολύ χαμηλή. Στα υποστρώματα ζύμωσης που προέκυψαν με συγκέντρωση οξέων 2,5N σε όλες τις περιπτώσεις η απόδοση σε βιοαιθανόλη ήταν πολύ χαμηλή (λιγότερο από 0,5 % g EtOH/g ξηρή βιομάζα).

Στις δοκιμές όπου χρησιμοποιήθηκαν μείγματα οξέων για την υδρόλυση της βιομάζας και ζύμωσής τους, οι αποδόσεις ήταν 11,3, 9,6 και 11,6 % g EtOH/g ξηρή βιομάζα για μείγματα με συγκέντρωση 0,5N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub>:HCl) 3,5:3,5:1, 2,5:4,5:1 και 4,5:2,5:1 αντίστοιχα, ενώ για μείγματα με συγκέντρωση 1N η απόδοση ήταν πολύ χαμηλή.

Στην Εικόνα 5.5 φαίνεται η σχέση μεταξύ απόδοσης σε βιοαιθανόλη και την ηλεκτρική αγωγιμότητα του υποστρώματος ζύμωσης. Όπως γίνεται φανερό, υπάρχει μια αρνητική σχέση μεταξύ αυτών των δύο παραμέτρων.



**Εικόνα 5.5 Σχέση μεταξύ απόδοσης σε βιοαιθανόλη και ηλεκτρικής αγωγιμότητας των υποστρωμάτων ζύμωσης ( $R^2=0,936$ ).**

#### 5.4 Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία για την υδρόλυση των υδατανθράκων της βιομάζας του *A. platensis* χρησιμοποιήθηκαν οξέα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε συνδυασμό με χαμηλές θερμοκρασίες, με την υπόθεση ότι εφόσον η βιομάζα του *A. platensis* δεν περιέχει λιγνίνη και ημι-κυτταρίνη, η υδρόλυση θα μπορούσε να επιτελεστεί σε ήπιες συνθήκες. Τα δεδομένα δείχνουν ότι η υδρόλυση είναι συνάρτηση της θερμοκρασίας αντίδρασης, της συγκέντρωσης του οξέος και του χρόνου αντίδρασης. Υψηλότερες συγκεντρώσεις οξέων οδηγούν σε υψηλότερους ρυθμούς υδρόλυσης. Η αύξηση της θερμοκρασίας αντίδρασης παρόλο που αύξησε το ρυθμό υδρόλυσης δεν αύξησε και τις αποδόσεις σε αναγώγιμα σάκχαρα. Οι υψηλότερες αποδόσεις σε αναγώγιμα σάκχαρα παρατηρήθηκαν στη θερμοκρασία 80 °C αλλά σε πολύ μεγαλύτερο χρόνο αντίδρασης σε σχέση με τους 100 °C. Υψηλές θερμοκρασίες σε συνδυασμό με υψηλές συγκεντρώσεις οξέος είχαν σαν αποτέλεσμα τη χαμηλότερη απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα λόγω μάλλον της αποδόμησης των σακχάρων. Για το λόγο αυτό η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων οξέος μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της απόδοσης σε αναγώγιμα σάκχαρα. Στη μελέτη των Miranda et al. (2012b) όπου μελετήθηκε η υδρόλυση με οξέα της βιομάζας του μικροφύκου *Scenedesmus obliquus* η μέγιστη απόδοση σε αναγώγιμα σάκχαρα (95,8%) παρατηρήθηκε όταν η συγκέντρωση του οξέος ήταν 2N. Περεταίρω

αύξηση της συγκέντρωσης του οξέος προκάλεσε τη μείωση της απόδοσης σε αναγώγιμα σάκχαρα.

Η ισχύς του οξέος επέδρασε σημαντικά στο ρυθμό της υδρόλυσης και στις αποδόσεις σε αναγώγιμα σάκχαρα. Οι χαμηλότερες αποδόσεις σε αναγώγιμα σάκχαρα παρατηρήθηκαν με το  $H_3PO_4$ , το οποίο είναι ένα τριπρωτικό μάλλον ασθενές οξύ, ενώ με το  $HNO_3$  ο ρυθμός υδρόλυσης ήταν υψηλότερος σε σχέση με τα  $HCl$  και  $H_2SO_4$ . Παρόμοια συμπεριφορά των οξέων αναφέρεται στην υδρόλυση βαγάσσης ζαχαροκάλαμου όπου το  $HNO_3$  έδωσε υψηλότερους ρυθμούς υδρόλυσης σε σύγκριση με τα  $H_2SO_4$  και  $HCl$  (Rodríguez-Chong et al., 2004).

Μια δεύτερη σειρά πειραμάτων διενεργήθηκε με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση μειγμάτων οξέων στην υδρόλυση της βιομάζας του *A. platensis*. Η υπόθεση που έγινε για τη διενέργεια αυτής της σειράς πειραμάτων ήταν ότι πιθανόν να υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση και συνεργηστική δράση των οξέων έτσι ώστε το τελικό αποτέλεσμα να δίνει υψηλότερους ρυθμούς και βαθμό υδρόλυσης. Παρόλα αυτά η υπόθεση αυτή δεν επιβεβαιώθηκε και μπορεί να εξαχθεί ως συμπέρασμα ότι ο ρυθμός και ο βαθμός της υδρόλυσης με χρήση μειγμάτων οξέων είναι ανάλογοι της δραστηριότητας του κάθε μοναδικού οξέος και της αναλογίας τους στο μείγμα.

Παρόλο που ο ζυμομύκητας που χρησιμοποιήθηκε ήταν προσαρμοσμένος έτσι ώστε να αντέχει υψηλές συγκεντρώσεις σε άλατα, φαίνεται ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η συγκέντρωση των αλάτων στο υπόστρωμα ζύμωσης ήταν υψηλότερη από εκείνη στην οποία μπορεί ο ζυμομύκητας να αναπτυχθεί. Φαίνεται επίσης ότι υπάρχει μια αρνητική σχέση μεταξύ της απόδοσης σε βιοαιθανόλη και της ηλεκτρικής αγωγιμότητας (**Εικόνα 5.5**). Στα υδρολυμένα υποστρώματα με συγκέντρωση οξέων 2,5N παρατηρήθηκε πολύ χαμηλή απόδοση σε βιοαιθανόλη γεγονός που αντικατοπτρίζει την υψηλή συγκέντρωση των υποστρωμάτων σε άλατα. Στις δοκιμές με υπόστρωμα με τη χρήση 1N οξέων, ικανοποιητική απόδοση παρατηρήθηκε μόνο όταν το οξύ ήταν το  $H_2SO_4$  ως καταλύτης. Αυτό οφείλεται μάλλον στο γεγονός ότι το  $H_2SO_4$  είναι διπρωτικό οξύ και ως εκ τούτου μετά τη ρύθμιση του pH στο 4.5 για να πραγματοποιηθεί η ζύμωση τα παραγόμενα άλατα ήταν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα άλλα οξέα (**Πίνακας 5.2**) με αποτέλεσμα τη μικρότερη παρεμπόδιση του ζυμομύκητα και την υψηλότερη απόδοση σε βιοαιθανόλη. Η υψηλότερη απόδοση σε βιοαιθανόλη παρατηρήθηκε στις δοκιμές με

υπόστρωμα με συγκέντρωση οξέων 0,5N. Η απόδοση σε βιοαιθανόλη ήταν 13,41% g EtOH/g ξηρή βιομάζα με το HCl ως καταλύτη, ενώ ανήλθε στα 16,27 και 16,32% g EtOH/g ξηρή βιομάζα με καταλύτες το H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και HNO<sub>3</sub>, αντίστοιχα. Στις δοκιμές με χρήση μειγμάτων με οξέα η απόδοση σε βιοαιθανόλη στα υποστρώματα με συγκέντρωση 1N ήταν εξαιρετικά χαμηλή (<0,5 % g EtOH/g ξηρής βιομάζας), ενώ η απόδοση σε βιοαιθανόλη με υποστρώματα συγκέντρωσης οξέων 0,5N ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με τα υποστρώματα που είχαν μοναδικά οξέα λόγω των υψηλότερων τιμών σε ηλεκτρική αγωγιμότητα.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι μέγιστες αποδόσεις σε βιοαιθανόλη αποτελούσαν μόνο το 53% της θεωρητικής απόδοσης σε βιοαιθανόλη. Αυτό οφείλεται σε διάφορους λόγους. Ένας από τους λόγους είναι ότι ένα μέρος των σακχάρων προσλαμβάνεται από τους μύκητες και καταναλώνεται για την ανάπτυξη και παραγωγή βιομάζας του μύκητα όπως επίσης και για την κάλυψη διαφόρων ενεργειακών αναγκών συντήρησης των πληθυσμών του ζυμομύκητα. Βέβαια τα παραπάνω μπορούν να εξηγήσουν την κατανάλωση λιγότερο από το 10% των σακχάρων για τους σκοπούς αυτούς. Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι λόγω της καταπόνησης από την υψηλή αλατότητα οι ζυμομύκητες κατανάλωσαν ένα μέρος από τα σάκχαρα για τη σύνθεση οσμωλυτικών παραγόντων όπως τρεχαλόζη, γλυκερόλη, σουκρόζη κλπ οι οποίοι προστατεύουν τα κύτταρα από την αυξημένη οσμωτική πίεση λόγω της αλατότητας (Serrano et al., 1999). Πέρα των παραπάνω η σημαντικότερη εξήγηση είναι ότι δεν ζυμώνονται όλα τα αναγώγιμα σάκχαρα της βιομάζας του *A. platensis* με αποτέλεσμα τη χαμηλότερη απόδοση σε βιοαιθανόλη από την αναμενόμενη (θεωρητική).

Ταυτόχρονα με την καταπόνηση λόγω αλατότητας οι ζυμομύκητες μπορεί να επηρεαστούν αρνητικά από την παρουσία διαφόρων ανασταλτικών της ανάπτυξης παραγόντων που παράγονται κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης. Τέτοιοι ανασταλτικοί παράγοντες είναι διάφορα οργανικά οξέα και παράγωγα φουράνης (φαινολικές ουσίες δεν αναμένεται να παραχθούν λόγω απουσίας λιγνίνης) που συντίθενται κατά την υδρόλυση των υδατανθράκων (Chandel et al., 2011). Παρόλα αυτά, σε χαμηλές συγκεντρώσεις βιομάζας, όπως χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, οι παραγόμενοι ανασταλτικοί παράγοντες δεν αναμένεται να βρίσκονται σε συγκεντρώσεις τέτοιες που να δρουν ανασταλτικά (Miranda et al., 2012b). Από τη στιγμή που η

συγκέντρωση της βιομάζας που πρόκειται να υδρολυθεί μπορεί να αυξηθεί ώστε τα σάκχαρα να ανέλθουν σε συγκέντρωση άνω των  $100 \text{ g l}^{-1}$  (που βελτιώνεται η ικανότητα ζύμωσης του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*) χωρίς τη μείωση της απόδοσης σε αναγώγιμα σάκχαρα (Miranda et al., 2012b) η παραγωγή ανασταλτικών της ανάπτυξης παραγόντων θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας όσον αφορά στις αποδόσεις σε βιοαιθανόλη δείχνουν ότι υπάρχουν περιθώρια βελτίωσης της διεργασίας της ζύμωσης για την απολαβή υψηλότερων ποσοτήτων βιοαιθανόλης. Φαίνεται ότι η αφαλάτωση του υποστρώματος μετά την υδρόλυση είναι μια σημαντική παράμετρος για τη βελτίωση της ζύμωσης. Αφαλάτωση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση ιοντοανταλλακτικών υλικών (Mustaqim and Ohtaguchi, 1997) ή με διαχωρισμό, απομάκρυνση και ανάκτηση των καταλυτών της υδρόλυσης (Cheng et al., 2008; Nguyen et al., 2009; Zhou et al., 2012). Παρόλα αυτά η αφαλάτωση είναι μια διεργασία που προσθέτει μεγάλο κόστος στην όλη παραγωγική διαδικασία. Για το λόγο αυτό μάλλον είναι ανάγκη να γίνει περαιτέρω έρευνα γύρω από τη μείωση του κόστους της αφαλάτωσης των υποστρωμάτων ή στην εύρεση στελεχών των ζυμομυκήτων που να είναι ανθεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων ή την εύρεση προ-παρασκευαστικών μεθόδων που θα βελτιώνουν την ανθεκτικότητα των ζυμομυκήτων σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων.

Στην περίπτωση που η απομάκρυνση των ανασταλτικών παραγόντων είναι αναγκαία, τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες μέθοδοι. Οι κυριότερες μέθοδοι είναι η χρήση ενεργού άνθρακα ή τη χρήση ανθρακικού ασβεστίου (Chandel et al., 2011). Επίσης η όλη διεργασία της ζύμωσης και η αύξηση της ανθεκτικότητας των ζυμομυκήτων μπορούν να βελτιωθούν είτε με την αύξηση του pH της ζύμωσης από το 4,5 στ 6-6,5 ή την αύξηση της ποσότητας του μολύσματος (Green and Shelef, 1989).

Στον **Πίνακα 5.3** παρατίθενται διάφορες μελέτες πάνω στη χρήση βιομάζας μικροφυκών για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα και σε σχέση με τις άλλες έρευνες που παρατίθενται, η εμπλουτισμένη σε υδατάνθρακες βιομάζα του *A. platensis* μετά την καλλιέργειά του υπό συνθήκες τροφοπενίας φωσφόρου μπορεί να θεωρηθεί ως υποψήφια πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω της αναερόβιας ζύμωσης με σχετικά καλές αποδόσεις σε βιοαιθανόλη.



## 5.5 Συμπεράσματα

Η βιομάζα των μικροφυκών θεωρείται ότι είναι μια πολλά υποσχόμενη πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Παρόλα αυτά, ειδικά στην τεχνολογία της αναερόβιας ζύμωσης τα μικροφύκη θα πρέπει να είναι πλούσια σε υδατάνθρακες γιατί οι τελευταίοι είναι η μόνη πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω της ζύμωσης από ζυμομύκητες όπως ο *S. cerevisiae*. Πριν όμως χρησιμοποιηθούν οι υδατάνθρακες των μικροφυκών για τη ζύμωση θα πρέπει πρώτα να υδρολυθούν προς απλούστερα σάκχαρα. Η υδρόλυση των υδατανθράκων με τη χρήση οξέων ως καταλυτών φαίνεται ότι είναι μια μέθοδος κατά την οποία παράγονται ζυμώσιμα σάκχαρα. Η συγκέντρωση των οξέων βέβαια επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή βιοαιθανόλης. Παρατηρήθηκε ότι η χρήση οξέων σε συγκέντρωση 0,5N έχει την υψηλότερη απόδοση σε βιοαιθανόλη που ανέρχεται περίπου στο 16% gEtOH ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis*, τιμή που αναλογεί στο περίπου 53% της θεωρητικής απόδοσης σε βιοαιθανόλη.

## **6. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

## 6 Γενικά συμπεράσματα

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι η τροφοπενία φωσφόρου προκαλεί σημαντική αύξηση της περιεκτικότητας της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis* σε υδατάνθρακες και ως εκ τούτου μπορεί να θεωρηθεί μια μέθοδος για την παραγωγή βιομάζας με βελτιωμένα χαρακτηριστικά έτσι ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω της αναερόβιας ζύμωσης είτε βιομεθανίου μέσω της αναερόβιας χώνευσης. Επιπλέον της αύξησης της περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες, η παροχή μιας ελάχιστης απαιτούμενης ποσότητας φωσφόρου που να αναλογεί σε  $1,85 \text{ mgP g}^{-1}$  ξηρής βιομάζας επιτρέπει την αύξηση της παραγόμενης βιομάζας έτσι ώστε να είναι δυνατή η καλλιέργεια του κυανοβακτηρίου *A. platensis* με υψηλή παραγωγή σε βιομάζα και ταυτόχρονα πλούσια σε υδατάνθρακες. Επίσης η πλούσια σε υδατάνθρακες βιομάζα η οποία βιοσυσσωματώνεται και καθιζάνει γρήγορα, πιθανόν να αποτελεί μια καλή λύση για την παραγωγή πρώτης ύλης για ενεργειακούς σκοπούς.

Η ποσότητα του ενδοκυτταρικού φωσφόρου έχει στενή σχέση με το επίπεδο της περιεκτικότητας της βιομάζας στα διάφορα συστατικά της, όπως υδατάνθρακες, λιπίδια και πρωτεΐνες. Ο βαθμός καταπόνησης του μικροοργανισμού έχει σχέση με το επίπεδο του ενδοκυτταρικού φωσφόρου. Με την μείωση του ενδοκυτταρικού φωσφόρου η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και σε λιπίδια αυξήθηκε, ενώ οι πρωτεΐνες μειώθηκαν. Ως αποτέλεσμα αυτού παρατηρήθηκε αύξηση του λόγου C/N η οποία αύξηση μπορεί να αποτελέσει παράγοντα βελτίωσης της διεργασίας της αναερόβιας χώνευσης της βιομάζας του κυανοβακτηρίου. Η χρήση βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis* πλούσιας σε υδατάνθρακες ως υπόστρωμα για την παραγωγή βιοκαυσίμων μέσω της αναερόβιας χώνευσης βελτίωσε την απόδοση σε βιοκαύσιμο (βιομεθάνιο). Η βελτίωση της απόδοσης σε βιομεθάνιο οφείλεται μάλλον στο γεγονός ότι οι συσσωρευμένοι υδατάνθρακες μετά την τροφοπενία φωσφόρου είναι σε μορφή ενδοκυτταρικών αποθηκευτικών κόκκων με αποτέλεσμα να βιοαποδομούνται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα δομικά στοιχεία των κυττάρων. Επίσης η συγκέντρωση της αμμωνίας μειώθηκε με την αύξηση της

περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες με πιθανό αποτέλεσμα τη βελτίωση των συνθηκών της αναερόβιας χώνευσης.

Οι υδατάνθρακες είναι η μόνη πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω της ζύμωσης από ζυμομύκητες όπως ο *S. cerevisiae*. Πριν όμως χρησιμοποιηθούν οι υδατάνθρακες για τη ζύμωση θα πρέπει πρώτα να υδρολυθούν προς απλούστερα σάκχαρα. Η υδρόλυση των υδατανθράκων του *A. platensis* με τη χρήση οξέων ως καταλυτών φαίνεται ότι είναι μια μέθοδος κατά την οποία παράγονται ζυμώσιμα σάκχαρα. Η συγκέντρωση των οξέων βέβαια επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή βιοαιθανόλης. Παρατηρήθηκε ότι η χρήση οξέων σε συγκέντρωση 0,5N είχε την υψηλότερη απόδοση σε βιοαιθανόλη, περίπου 16% gEtOH ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis*, τιμή που αναλογεί στο περίπου 53% της θεωρητικής απόδοσης σε βιοαιθανόλη.

## **7. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## 7 Γενική συζήτηση, γενικά συμπεράσματα και προτάσεις για περαιτέρω έρευνα

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε αν και κατά πόσο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η μείωση του παρεχόμενου φωσφόρου στις καλλιέργειες του κυανοβακτηρίου *A. platensis* ως μέθοδος για τον έλεγχο της σύστασης της βιομάζας του. Ειδικότερα, ο επιθυμητός στόχος ήταν η αύξηση της περιεκτικότητας της βιομάζας σε υδατάνθρακες έτσι ώστε να αποτελέσουν πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων (βιομεθανίου και βιοαιθανόλης). Στη βιβλιογραφία για την παραγωγή βιομάζας πλούσιας σε υδατάνθρακες δύο είναι οι κυριότερες προτάσεις: 1) η καλλιέργεια ειδών μικροφυκών που έχουν τυπικά υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (Rodjaroen et al., 2007) και 2) η εφαρμογή κάποιας καλλιεργητικής μεθόδου όπου θα εξαναγκάσει τα μικροφύκη να συσσωρεύσουν κάποιο συστατικό της βιομάζας (Markou et al., 2012a). Η πρώτη πρόταση όσο εύλογη και να ακούγεται έχει τον κύριο περιορισμό ότι τα είδη που έχουν τυπικά υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες είναι περιορισμένα και δεν έχει αποδειχθεί ακόμα ότι παρουσιάζουν ευκολία στην καλλιέργειά τους. Από τη δεύτερη πρόταση η μέθοδος που φαίνεται να έχει πρακτικό ενδιαφέρον είναι η χρήση της μεθόδου της τροφοπενίας. Παρόλα αυτά η τροφοπενία προκαλεί έντονη μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης και στην τελική παραγωγή βιομάζας. Η μέχρι τώρα πρόταση για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος είναι η καλλιέργεια μικροφυκών σε δύο φάσεις, όπου στην πρώτη φάση θα γίνεται καλλιέργεια με σκοπό την παραγωγή βιομάζας υπό βέλτιστες καλλιεργητικές συνθήκες και στη δεύτερη φάση η παραχθείσα βιομάζα θα υποβάλλεται σε συνθήκες τροφοπενίας (Dragone et al., 2011). Το κύριο όμως πρόβλημα αυτής της πρότασης είναι ότι για να υποβληθεί η βιομάζα σε συνθήκες τροφοπενίας θα πρέπει να συγκομιστεί από το υπόστρωμα της πρώτης φάσης και να καλλιεργηθεί σε νέο υπόστρωμα που δεν θα περιέχει το θρεπτικό στοιχείο το οποίο θα προκαλέσει συνθήκες τροφοπενίας. Από τη στιγμή όμως που η συγκομιδή της βιομάζας των μικροφυκών εξακολουθεί να είναι ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα στην καλλιέργεια μικροφυκών (Jonker and Faaij, 2012; Molina Grima et al., 2003) η πρόταση της καλλιέργειας σε δύο φάσεις μάλλον έχει πρακτικούς περιορισμούς. Η τροφοπενία φωσφόρου που διερευνήθηκε στην παρούσα διατριβή προκάλεσε σημαντική αύξηση της περιεκτικότητας της βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis* σε υδατάνθρακες (από 15-20% σε 60-65%) και ήταν

δυνατό με την παροχή μιας ελάχιστης απαραίτητης ποσότητας φωσφόρου (ίση με 1,85 mg P g<sup>-1</sup> ξηρής βιομάζας) να γίνει μεγιστοποίηση της παραγωγής βιομάζας πλούσιας σε υδατάνθρακες αμβλύνοντας με αυτόν τον τρόπο το κύριο πρόβλημα της μεθόδου της τροφοπενίας που είναι όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η μειωμένη παραγωγή βιομάζας. Η συμβολή της διατριβής αυτής είναι ότι προτείνει τη βελτιστοποίηση της παραγωγής βιομάζας πλούσιας σε υδατάνθρακες με την παροχή μιας απαραίτητης ελάχιστης ποσότητας του θρεπτικού στοιχείου έτσι ώστε να παράγεται απρόσκοπτα βιομάζα η οποία όμως να βρίσκεται ταυτόχρονα κάτω από συνθήκες καταπόνησης, εν προκειμένω τροφοπενίας έτσι ώστε να συσσωρεύονται υδατάνθρακες (Εργασία 2). Επίσης η διατριβή αυτή, από όσα είναι γνωστά για πρώτη φορά παρουσίασε τη σχέση μεταξύ ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης φωσφόρου και της περιεκτικότητας των κύριων συστατικών της βιομάζας (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λιπίδια) (Εργασία 3) δείχνοντας ότι η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού φωσφόρου σχετίζεται με συγκεκριμένη περιεκτικότητα της βιομάζας στα τρία βασικά συστατικά της (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λιπίδια) και ότι εν τέλει ο έλεγχος του επιπέδου του παρεχόμενου θρεπτικού στοιχείου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της σύστασης της βιομάζας.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζει η καλλιέργεια μικροφυκών είναι η συγκομιδή τους (Jonker and Faaij, 2012; Molina Grima et al., 2003). Ανάμεσα στις διάφορες μεθοδολογίες συγκομιδής η συσσωμάτωση θεωρείται ως η πιο οικονομική λύση (Lavoie and de la Noüe, 1987; Van Den Hende et al., 2011). Η συσσωμάτωση της βιομάζας επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους, αλλά σταθερά αποτελέσματα μάλλον δίνει η προσθήκη παραγόντων συσσωμάτωσης (de Godos et al., 2011; Papazi et al., 2010; Vandamme et al., 2010). Παρόλα αυτά η προσθήκη παραγόντων συσσωμάτωσης επηρεάζει την ποιότητα της συγκομισμένης βιομάζας. Σε ορισμένες περιπτώσεις ειδικά αν οι παράγοντες συσσωμάτωσης περιέχουν ιόντα μετάλλων υπάρχει υποβάθμιση της ποιότητας της βιομάζας και ίσως να αποδειχτεί ότι επιδρούν αρνητικά στις βιολογικές τεχνολογίες μετατροπής της βιομάζας σε βιοενέργεια παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των διαφόρων μικροοργανισμών της κάθε τεχνολογίας. Επίσης ένα πρακτικό πρόβλημα που μπορεί να αποδειχτεί ότι παρουσιάζει η χρήση παραγόντων συσσωμάτωσης είναι το θέμα της επαναχρησιμοποίησης του υποστρώματος ανάπτυξης μετά τη συγκομιδή. Είναι πιθανό

ότι λόγω της παρουσίας υπολειμμάτων των παραγόντων αυτών το υπόστρωμα ανάπτυξης να μην μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί καθιστώντας τη συγκεκριμένη μέθοδο συγκομιδής προβληματική. Η βιολογική συσσωμάτωση χωρίς την προσθήκη παραγόντων συσσωμάτωσης μέχρι τώρα θεωρείται ότι οφείλεται είτε στην αύξηση του pH σε συνδυασμό με τις συγκεντρώσεις ασβεστίου και φωσφόρου είτε λόγω των εκκρινόμενων από τα μικροφύκη πολυμερών (π.χ. πολυσακχαριτών) τα οποία δρουν ως παράγοντες συσσωμάτωσης. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων όμως η βιολογική συσσωμάτωση δεν έχει εξηγηθεί επαρκώς και θεωρείται ότι συμβαίνει τυχαία (Christenson and Sims, 2011; Lavoie and de la Noüe, 1987; Sukenik and Shelef, 1984). Σημαντικό εύρημα της παρούσας διατριβής είναι ότι η σύσταση της βιομάζας και συγκεκριμένα το επίπεδο της τροφοπενίας φωσφόρου και η περιεκτικότητα της βιομάζας σε υδατάνθρακες επιδρούν κλιμακωτά στο φαινόμενο της βιολογικής συσσωμάτωσης (βιοσυσσωμάτωσης) (Εργασία 2). Επίσης το γεγονός ότι η εμπλουτισμένη σε υδατάνθρακες βιομάζα βιοσυσσωματώνεται και καθιζάνει γρήγορα αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό για την ευκολότερη συγκομιδή της. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδειχθεί πολύ χρήσιμο και να συμβάλει καθοριστικά στη μείωση των προβλημάτων και κατ' επέκταση του κόστους της συγκομιδής της βιομάζας.

Κατά την καλλιέργεια του *A. platensis* υπό συνθήκες τροφοπενίας φωσφόρου η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και σε λιπίδια αυξήθηκε με τη μείωση του ενδοκυτταρικού φωσφόρου, ενώ οι πρωτεΐνες μειώθηκαν. Ως αποτέλεσμα αυτού παρατηρήθηκε αύξηση του λόγου C/N. Τα πειράματα εφαρμογής της εμπλουτισμένης σε υδατάνθρακες βιομάζας έδειξαν ότι για την αναερόβια χώνευση η αύξηση της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες είχε θετική επίδραση στην απόδοση σε βιομεθάνιο λόγω της αύξησης του λόγου C/N. Η μέχρι τώρα πρόταση για τη βελτίωση του λόγου C/N για την καλύτερη διεργασία της χώνευσης των μικροφυκών είναι η προσθήκη υλικού πλούσιου σε άνθρακα (González-Fernández et al., 2011b; Yen and Brune, 2007). Δεδομένου ότι η διάθεση τέτοιων υλικών μπορεί να είναι περιορισμένη και δύσκολη είτε ακόμα και αδύνατη σε ορισμένες περιπτώσεις, η χρήση της εμπλουτισμένης σε υδατάνθρακες βιομάζας είναι μια πρόταση που μπορεί να αποδειχτεί πρακτικά χρήσιμη για να μπορέσει να εγκατασταθεί μια μονάδα παραγωγής βιομεθανίου σε σχετικά



αποκεντρωμένη περιοχή και να λειτουργεί με μοναδικό υπόστρωμα μικροφύκη χωρίς την ανάγκη μεταφοράς άλλων υλικών πλούσιων σε άνθρακα.

Το ενδιαφέρον για τη χρήση μικροφυκών ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης δεν έχει προσελκύσει τόσο το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω της σχετικά χαμηλής περιεκτικότητας των κυριότερων μικροφυκών σε υδατάνθρακες. Παρόλα αυτά γίνεται προσπάθεια από ορισμένους ερευνητές να εφαρμοστεί η τροφοπενία αζώτου ως μέθοδος για τη συσσώρευση υδατανθράκων που θα αποτελέσουν πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης (Ho et al., 2012; Miranda et al., 2012a). Φαίνεται ότι το ενδιαφέρον για την παραγωγή μικροφυκών χρησιμοποιώντας κάποια καλλιεργητική μέθοδο καταπόνησης κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος και θα αποτελέσει αιχμή έρευνας στο άμεσο μέλλον. Τα πειράματα της παρούσας διατριβής που αφορούσαν την παραγωγή βιοαιθανόλης από εμπλουτισμένη σε υδατάνθρακες βιομάζα έδειξαν ότι η υδρόλυση των υδατανθράκων με τη χρήση οξέων ως καταλυτών είναι μια μέθοδος κατά την οποία παράγονται ζυμώσιμα σάκχαρα. Παρατηρήθηκε ότι η χρήση οξέων σε συγκέντρωση 0.5N είχε την υψηλότερη απόδοση σε βιοαιθανόλη που ανήλθε περίπου στο 16% gEtOH ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας του κυανοβακτηρίου *A. platensis*, τιμή που αναλογεί στο 53% περίπου της θεωρητικής απόδοσης σε βιοαιθανόλη. Δεδομένου ότι υπάρχει περιθώριο για τη βελτίωση της υδρόλυσης χρησιμοποιώντας μικρότερης συγκέντρωσης οξέα και ότι υπάρχει περιθώριο για τη βελτίωση της διεργασίας της ζύμωσης, από την παρούσα διατριβή φαίνεται ότι η χρήση της εμπλουτισμένης σε υδατάνθρακες βιομάζας έχει ικανοποιητική απόδοση σε βιοαιθανόλη. Συμπερασματικά οι δύο παραπάνω εφαρμογές (παραγωγή βιομεθανίου και βιοαιθανόλης) έδειξαν ότι η καλλιέργεια του κυανοβακτηρίου υπό συνθήκες τροφοπενίας φωσφόρου αυξάνει σημαντικά την απόδοση σε βιοκαύσιμα.

Για περαιτέρω έρευνα προτείνονται τα εξής θέματα:

- Διερεύνηση της επίδρασης της τροφοπενίας του φωσφόρου στη μορφολογία του κυανοβακτηρίου. Με αυτόν τον τρόπο θα φανεί με καθαρότερο τρόπο σε ποια μορφή βρίσκονται τα συστατικά της βιομάζας και πως κατανέμονται στη δομή του κυττάρου.

- Πειράματα για τη διερεύνηση της επίδρασης διαφόρων παραγόντων στο βαθμό και ρυθμό βιοσυσσωμάτωσης και καθίζησης της βιομάζας. Οι κυριότεροι παράγοντες που θα μπορούσαν να διερευνηθούν είναι: pH καλλιέργειας, συγκέντρωση βιομάζας, διαστάσεις και σχήμα του φωτοβιοντιδραστήρα. Επίσης θα μπορούσε να γίνει μια γενική διερεύνηση της οικονομικότητας της συγκομιδής με βιοσυσσωμάτωση και καθίζηση.
- Πειράματα για τη διερεύνηση της επίδρασης της αύξησης της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες στην αναερόβια χώνευση σε συνθήκες αυξημένης οργανικής φόρτισης.
- Πειράματα για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής βιοαιθανόλης με τη χρήση υδρολυμένων υδατανθράκων με χρήση χαμηλών συγκεντρώσεων οξέων και υψηλότερων θερμοκρασιών. Επίσης είναι ανάγκη να γίνει διερεύνηση χρήσης ενζυμικής υδρόλυσης.
- Τέλος θα μπορούσε να γίνει μια οικονομικοτεχνική ανάλυση καθώς και ανάλυση κύκλου ζωής για την αξιολόγηση της όλης διαδικασίας, δηλαδή από το στάδιο της παραγωγής βιομάζας μέχρι και το τελικό στάδιο της παραγωγής βιοκαυσίμων.

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη σε όσους και όσες συνέβαλλαν με τον έναν ή τον άλλο τρόπο στην πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου, τον Δημήτρη Γεωργακάκη που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο πολυεπίπεδο και πολυσχιδές αντικείμενο όπως είναι μια διδακτορική έρευνα. Θεωρώ ότι ενσάρκωσε με τον καλύτερο και ουσιαστικότερο τρόπο τον ρόλο του επιβλέποντα καθηγητή, με το να δίνει τον απαραίτητο χώρο και την απαραίτητη αυτονομία κινήσεων αλλά ταυτόχρονα να επιβλέπει από κατάλληλη εγγύτητα την όλη έρευνα ώστε να δίνει τις κατευθύνσεις που να οδηγούν στο καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Επίσης ευχαριστώ πολύ τα δύο άλλα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον καθηγητή Γ. Παπαδάκη και τον Ι. Χατζηπαυλίδη για την βοήθειά τους (συμβουλευτική αλλά και τεχνική, υλική και οικονομική) στην πραγματοποίηση των πειραμάτων. Θα ήθελα, επίσης να εκφράσω και τις ευχαριστίες μου στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Χ. Καραβίτη, Κ. Λύκα, Η. Νερατζή και Θ. Τσούτσο που με τον ένα ή άλλο τρόπο έδρασαν καθοριστικά στη τελική μορφή αυτής της διατριβής.

Από τις ευχαριστίες δεν θα μπορούσα να παραλείψω όλους τους κοντινούς μου ανθρώπους (σύζυγο, γονείς, συγγενείς και φίλους) οι οποίοι με την συμπαράσταση και την βοήθειά τους δημιούργησαν εκείνες τις ευνοϊκές συνθήκες ώστε να είναι δυνατή η πραγματοποίηση αυτής της διατριβής. Και επίσης, από το κάδρο δεν μπορεί να λείπει η κόρη μου η Σοφία, η οποία γεννήθηκε την περίοδο που ξεκίνησε αυτή η διατριβή. Η Σοφία με τον δικό της τρόπο, τραβώντας μου τα μανίκια την ώρα που έγραφα τούτες τις σελίδες, μου έδειχνε ότι αυτή η διατριβή είναι ένα κομμάτι της ζωής μου.

Τέλος είμαι υποχρεωμένος να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την παροχή οικονομικής βοήθειας.

## 8 Βιβλιογραφία

- Abeliovich, A. 2007. Water pollution and bioremediation by microalgae: Water purification. Algae in wastewater oxidation ponds. in: *Handbook of Microalgal Culture*, Blackwell Publishing Ltd, pp. 430-438.
- Abreu, A.P., Fernandes, B., Vicente, A.A., Teixeira, J., Dragone, G. 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresour. Technol.*, 118, 61-66.
- Ahring, B., Sandberg, M., Angelidaki, I. 1995. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 559-565.
- Aldigui, A.S., Alfenore, S., Cameleyre, X., Goma, G., Uribelarrea, J.L., Guillouet, S.E., Molina-Jouve, C. 2004. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess Biosystems Eng.*, 26, 217-222.
- Allen, M.M., Smith, A.J. 1969. Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Arch. Microbiol.*, 69, 114-120.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.*, 101, 4851-4861.
- Amin, S. 2009. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energ. Convers. Manage.*, 50, 1834-1840.
- Andrade, M.R., Costa, J.A.V. 2007. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 264, 130-134.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K. 1993. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 560-564.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B. 2003. Applications of the anaerobic digestion process. in: *Biomethanation II*, (Eds.) B. Ahring, B. Ahring, I. Angelidaki, J. Dolfing, L. Euegaard, H. Gavala, F. Haagenzen, A. Mogensen, G. Lyberatos, P. Pind, J. Schmidt, I. Skiadas, K. Stamatelatos, Vol. 82, Springer Berlin / Heidelberg, pp. 1-33.
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D.J., Plugge, C.M., Stams, A.J.M. 2011. Biomethanation and its potential. in: *Methods Enzymol.*, (Eds.) C.R. Amy, W.R. Stephen, Vol. Volume 494, Academic Press, pp. 327-351.
- APHA. 1995. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, Washington DC.
- Aranda, A., Matallana, E., Olmo, M.I.d. 2011. Chapter 1 - *Saccharomyces* Yeasts I: Primary Fermentation. in: *Molecular Wine Microbiology*, (Eds.) V.C.S. Alfonso, M. Rosario, R.M. Ramon Gonzalez GarciaA2 - Alfonso V. Carrascosa Santiago, G. Ramon Gonzalez, Academic Press. San Diego, pp. 1-31.
- Azov, Y., Goldman, J.C. 1982. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 735-739.

- Babadzhanov, A.S., Abdusamatova, N., Yusupova, F.M., Faizullaeva, N., Mezhlumyan, L.G., Malikova, M.K. 2004. Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan. *Chem. Nat. Compd.*, 40, 276-279.
- Badger, M.R., Price, G.D. 2003. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *JExB*, 54, 609-622.
- Ballesteros, I., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M.J., Oliva, J.M., Sáez, F. 2008. Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. *Biochem. Eng. J.*, 42, 84-91.
- Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R., McHale, A.P. 1998. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeasts in general. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 809-821.
- Barsanti, L., Gualtieri, P. 2006. *Algae: Anatomy, biochemistry and biotechnology*. CRC Taylor & Francis, New York.
- Becker, E.W. 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bertocchi, C., Navarini, L., Cesàro, A., Anastasio, M. 1990. Polysaccharides from cyanobacteria. *Carbohydr. Polym.*, 12, 127-153.
- Bezerra, R.P., Montoya, E.Y.O., Sato, S., Perego, P., de Carvalho, J.C.M., Converti, A. 2011. Effects of light intensity and dilution rate on the semicontinuous cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. A kinetic Monod-type approach. *Bioresour. Technol.*, 102, 3215-3219.
- Bilanovic, D., Andargatchew, A., Kroeger, T., Shelef, G. 2009. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO<sub>2</sub> at different C and N concentrations – Response surface methodology analysis. *Energ. Convers. Manage.*, 50, 262-267.
- Biller, P., Ross, A.B. 2011. Potential yields and properties of oil from the hydrothermal liquefaction of microalgae with different biochemical content. *Bioresour. Technol.*, 102, 215-225.
- Bischofsberger, V.W., Dichtl, N., Rosenwinkel, K., Seyfried, C.F., Bohnke, B. 2005. *Anaerobtechnik*. Springer Verlag.
- Blanco-Canqui, H. 2010. Energy crops and their implications on soil and environment. *Agron. J.*, 102, 403-419.
- Blanco-Canqui, H., Lal, R. 2007. Soil and crop response to harvesting corn residues for biofuel production. *Geoderma* 141, 355-362.
- Blier, R., Laliberté, G., de la Noüe, J. 1995. Tertiary treatment of cheese factory anaerobic effluent with *Phormidium bohneri* and *Micractinium pusillum*. *Bioresour. Technol.*, 52, 151-155.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37, 911-917.
- Borowitzka, M. 1998. Limits to growth. in: *Wastewater treatment with algae*, (Eds.) Y.S. Wong, N.F.Y. Tam, Springer, pp. 203-226.
- Borowitzka, M.A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J. Biotechnol.*, 70, 313-321.
- Boussiba, S., Gibson, J. 1991. Ammonia translocation in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 88, 1-14.

- Brányiková, I., Maršálková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., Vítová, M. 2011. Microalgae—novel highly efficient starch producers. *Biotechnol. Bioeng.*, 108, 766-776.
- Brennan, L., Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 14, 557-577.
- Brennan, L., Owende, P. 2013. Biofuels from microalgae: Towards meeting advanced fuel standards. in: *Advanced biofuels and bioproducts*, (Ed.) J.W. Lee, Springer New York, pp. 553-599.
- Breure, A.M., Mooijman, K.A., Andel, J.G. 1986. Protein degradation in anaerobic digestion: influence of volatile fatty acids and carbohydrates on hydrolysis and acidogenic fermentation of gelatin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 426-431.
- Brodie, J., Lewis, J. 2007. Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics. in: *Systematics association special volumes 75*, CRC Press. London, UK.
- Cade-Menun, B.J., Paytan, A. 2010. Nutrient temperature and light stress alter phosphorus and carbon forms in culture-grown algae. *Mar. Chem.*, 121, 27-36.
- Cañizares, R.O., Domínguez, A.R. 1993. Growth of *Spirulina maxima* on swine waste. *Bioresour. Technol.*, 45, 73-75.
- Cañizares, R.O., Rivas, L., Montes, C., Domínguez, A.R., Travieso, L., Benitez, F. 1994. Aerated swine-wastewater treatment with K-carrageenan-immobilized *Spirulina maxima*. *Bioresour. Technol.*, 47, 89-91.
- Cardona, C.A., Sánchez, Ó.J. 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresour. Technol.*, 98, 2415-2457.
- Carvalho, A., Monteiro, C., Malcata, F. 2009. Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. *J. Appl. Phycol.*, 21, 543-552.
- Carvalho, A., Silva, S., Baptista, J., Malcata, F. 2011. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89, 1275-1288.
- Carvalho, A.P., Meireles, L.A., Malcata, F.X. 2006. Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.*, 22, 1490-1506.
- Çelekli, A., Yavuzatmaca, M., Bozkurt, H. 2009. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresour. Technol.*, 100, 3625-3629.
- Chader, S., Mahmah, B., Chetehouna, K., Amrouche, F., Abdeladim, K. 2011. Biohydrogen production using green microalgae as an approach to operate a small proton exchange membrane fuel cell. *Int. J. Hydrog Energ.*, 36, 4089-4093.
- Chandel, A.K., da Silva, S.S., Singh, O.V. 2011. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production. in: *Biofuel production-Recent developments and prospects*, (Ed.) M.A.d.S. Bernardes, InTech.
- Chandel, A.K., Es, C., Rudravaram, R., Narasu, M.L., Rao, L.V., Ravindra, P. 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2, 14-32.
- Chang, V.S., Kaar, W.E., Burr, B., Holtzapple, M.T. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lime-treated biomass. *Biotechnol. Lett.*, 23, 1327-1333.

- Chaumont, D. 1993. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *J. Appl. Phycol.*, 5, 593-604.
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., Chang, J.-S. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour. Technol.*, 102, 71-81.
- Chen, F. 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends Biotechnol.*, 14, 421-426.
- Chen, P.H., Oswald, W.J. 1998. Thermochemical treatment for algal fermentation. *Environ. Int.*, 24, 889-897.
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour. Technol.*, 99, 4044-4064.
- Chen, Y., Sharma-Shivappa, R., Keshwani, D., Chen, C. 2007. Potential of Agricultural Residues and Hay for Bioethanol Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 142, 276-290.
- Cheng, K.-K., Cai, B.-Y., Zhang, J.-A., Ling, H.-Z., Zhou, Y.-J., Ge, J.-P., Xu, J.-M. 2008. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochem. Eng. J.*, 38, 105-109.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 25, 294-306.
- Chisti, Y., Moo-Young, M. 2002. Bioreactors. in: *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, (Ed.) R.A. Meyers, Vol. 2, Academic Press. San Diego, pp. 247-271.
- Choi, S.P., Nguyen, M.T., Sim, S.J. 2010. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresour. Technol.*, 101, 5330-5336.
- Chojnacka, K., Marquez-Rocha, F.J. 2004. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 3, 21-34.
- Chojnacka, K., Zielińska, A. 2011. Evaluation of growth yield of *Spirulina (Arthrospira)* sp. in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1-9.
- Christenson, L., Sims, R. 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol. Adv.*, 29, 686-702.
- Clarens, A.F., Resurreccion, E.P., White, M.A., Colosi, L.M. 2010. Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 1813-1819.
- Cohen, Z., Vonshak, A., Richmond, A. 1987. Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various environmental conditions. *Phytochemistry*, 26, 2255-2258.
- Colla, L.M., Oliveira Reinehr, C., Reichert, C., Costa, J.A.V. 2007. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresour. Technol.*, 98, 1489-1493.
- Collet, P., Hélias, A., Lardon, L., Ras, M., Goy, R.-A., Steyer, J.-P. 2011. Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresour. Technol.*, 102, 207-214.
- Cordell, D., Drangert, J.-O., White, S. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environ. Change*, 19, 292-305.
- Cornet, J.F., Dussap, C.G., Cluzel, P., Dubertret, G. 1992. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in

- photobioreactors: II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 826-834.
- Costa, J.A.V., Cozza, K.L., Oliveira, L., Magagnin, G. 2001. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 439-442.
- Costa, J.A.V., de Morais, M.G. 2011. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresour. Technol.*, 102, 2-9.
- Costa, J.A.V., Linde, G.A., Atala, D.I.P., Mibielli, G.M., Krüger, R.T. 2000. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 15-18.
- Danesi, E.D.G., de O. Rangel-Yagui, C., de Carvalho, J.C.M., Sato, S. 2002. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioenerg*, 23, 261-269.
- Danesi, E.D.G., Rangel-Yagui, C.O., Carvalho, J.C.M., Sato, S. 2004. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioenerg*, 26, 329-335.
- Darley, W.M. 1982. Algal biology: A physical approach. in: *Basic microbiology*, (Ed.) J.F. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications. London, pp. 30-52.
- Day, J.G., Slocombe, S.P., Stanley, M.S. 2011. Overcoming biological constraints to enable the exploitation of microalgae for biofuels. *Bioresour. Technol.*
- de-Bashan, L.E., Bashan, Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresour. Technol.*, 101, 1611-1627.
- de Godos, I., Guzman, H.O., Soto, R., García-Encina, P.A., Becares, E., Muñoz, R., Vargas, V.A. 2011. Coagulation/flocculation-based removal of algal-bacterial biomass from piggery wastewater treatment. *Bioresour. Technol.*, 102, 923-927.
- de la Noüe, J., Bassères, A. 1989. Biotreatment of anaerobically digested swine manure with microalgae. *Biological Wastes*, 29, 17-31.
- De Schamphelaire, L., Verstraete, W. 2009. Revival of the biological sunlight-to-biogas energy conversion system. *Biotechnol. Bioeng.*, 103, 296-304.
- Dean, A.P., Estrada, B., Nicholson, J.M., Sigee, D.C. 2008a. Molecular response of *Anabaena flos-aquae* to differing concentrations of phosphorus: A combined Fourier transform infrared and X-ray microanalytical study. *Phycol. Res.*, 56, 193-201.
- Dean, A.P., Nicholson, J.M., Sigee, D.C. 2008b. Impact of phosphorus quota and growth phase on carbon allocation in *Chlamydomonas reinhardtii* : an FTIR microspectroscopy study. *Eur. J. Phycol.*, 43, 345-354.
- Demirbas, A. 2008. *Biofuels, Securing the planet's future energy needs*. Springer.
- Demirbas, A. 2010. Use of algae as biofuel sources. *Energ. Convers. Manage.*, 51, 2738-2749.
- Demirbas, A., Fatih Demirbas, M. 2011. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energ. Convers. Manage.*, 52, 163-170.
- Desmorieux, H., Madiouli, J., Herraud, C., Mouaziz, H. 2010. Effects of size and form of *Arthrospira Spirulina* biomass on the shrinkage and porosity during drying. *J. Food Eng.*, 100, 585-595.
- Deublein, D., Steinhauser, A. 2010. *Biogas from waste and renewable resources: An Introduction. Second ed.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.



- Devantier, R., Pedersen, S., Olsson, L. 2005. Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68, 622-629.
- Dinh, T.N., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Furusawa, C., Shimizu, H. 2008. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* Cells to High Ethanol Concentration and Changes in Fatty Acid Composition of Membrane and Cell Size. *PLoS ONE*, 3, e2623.
- Doan, Q.C., Moheimani, N.R., Mastrangelo, A.J., Lewis, D.M. 2012. Microalgal biomass for bioethanol fermentation: Implications for hypersaline systems with industrial focus. *Biomass Bioenerg*, In Press.
- Doucha, J., Straka, F., Lívanský, K. 2005. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *J. Appl. Phycol.*, 17, 403-412.
- Dragone, G., Fernandes, B.D., Abreu, A.P., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Appl. Energ.* 88, 3331-3335.
- Drapcho, C.M., Nhuan, N.P., Walker, T.H. 2008. *Biofuels engineering process technology*. McGraw-Hill.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356.
- Ehimen, E.A., Connaughton, S., Sun, Z., Carrington, G.C. 2009. Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol codigested microalgae biomass. *GCB Bioenergy*, 1, 371-381.
- Ehimen, E.A., Sun, Z.F., Carrington, C.G., Birch, E.J., Eaton-Rye, J.J. 2011. Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process. *Appl. Energ.* 88, 3454-3463.
- Elbeshbishy, E., Nakhla, G. 2012. Batch anaerobic co-digestion of proteins and carbohydrates. *Bioresour. Technol.*, 116, 170-178.
- Elser, J.J. 2012. Phosphorus: a limiting nutrient for humanity? *Curr. Opin. Biotechnol.*
- Eriksen, N. 2008. The technology of microalgal culturing. *Biotechnol. Lett.*, 30, 1525-1536.
- Eshaq, F.S., Ali, M.N., Mohd, M.K. 2011. Production of bioethanol from next generation feed-stock alga *Spirogyra* species. *Int J Eng Sci Technol*, 3, 1749-1755.
- Fernandes, B., Dragone, G., Teixeira, J., Vicente, A. 2010. Light regime characterization in an airlift photobioreactor for production of microalgae with high starch content. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 161, 218-226.
- Ferreira, L.S., Rodrigues, M.S., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J.C.M. 2012. *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO<sub>2</sub> from ethanol fermentation. *Appl. Energ.* 92, 379-385.
- Fuhs, G.W. 1969. Phosphorus content and rate of growth in the diatoms *Cyclotella nana* and *Thalassiosira fluviatis*. *J. Phycol.*, 5, 312-321.
- Galbe, M., Zacchi, G. 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 108, 41-65.
- Galbe, M., Zacchi, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 618-628.

- Gallert, C., Winter, J. 2005. Bacterial metabolism in wastewater treatment systems. in: *Environmental biotechnology*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1-48.
- Gao, C., Zhai, Y., Ding, Y., Wu, Q. 2010. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. *Appl Energ*, 87, 756-761.
- Gavala, H.N., Angelidaki, I., Ahring, B.K. 2003. Kinetics and modeling of anaerobic digestion process. in: *Biomethanation I*, (Ed.) B.K. Ahring, Springer. Berlin, pp. 37.
- Georgacakis, D. 1979. VFA-NH<sub>3</sub> buffer relationships in anaerobic digesters, University of Missouri. Columbia.
- Georgacakis, D., Sievers, D.M., Iannotti, E.L. 1982. Buffer stability in manure digesters. *Agricultural Wastes*, 4, 427-441.
- Gerardi, M.H. 2003. *The microbiology of anaerobic digesters*. John Willey & Sons Inc. .
- Giordano, M., Beardall, J., Raven, J. 2005. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, 99-131.
- Gómez-Casati, D.F., Cortassa, S., Aon, M.A., Iglesias, A.A. 2003. Ultrasensitive behavior in the synthesis of storage polysaccharides in cyanobacteria. *Planta*, 216, 969-975.
- Gómez Casati, D.F., Aon, M.A., Cortassa, S., Iglesias, A.A. 2001. Measurement of the glycogen synthetic pathway in permeabilized cells of cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 194, 7-11.
- González-Fernández, C., Molinuevo-Salces, B., García-González, M.C. 2011a. Evaluation of anaerobic codigestion of microalgal biomass and swine manure via response surface methodology. *Appl Energ*, 88, 3448-3453.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.-P. 2011b. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6, 205-218.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P. 2012. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass Bioenerg*, 40, 105-111.
- González, C., Marciniak, J., Villaverde, S., León, C., García, P.A., Muñoz, R. 2008. Efficient nutrient removal from swine manure in a tubular biofilm photobioreactor using algae-bacteria consortia. *Water Sci. Technol.*, 58, 95-102.
- González López, C.V., García, M.d.C.C., Fernández, F.G.A., Bustos, C.S., Chisti, Y., Sevilla, J.M.F. 2010. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour. Technol.*, 101, 7587-7591.
- Green, M., Shelef, G. 1989. Ethanol fermentation of acid hydrolysate of municipal solid waste. *The Chemical Engineering Journal*, 40, B25-B28.
- Grewe, C.B., Pulz, O. 2012. The Biotechnology of Cyanobacteria. in: *Ecology of Cyanobacteria II*, (Ed.) B.A. Whitton, Springer Netherlands, pp. 707-739.
- Grobbelaar, J.U. 2004. Algal nutrition. Mineral nutrition. in: *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, (Ed.) A. Richmond, Blackwell Publishing Ltd. Oxford, pp. 97-115.

- Guerrini, F., Cangini, M., Boni, L., Trost, P., Pistocchi, R. 2000. Metabolic responses of the diatom *Achnanthes brevipes* (Bacillariophyceae) to nutrient limitation. *J. Phycol.*, 36, 882-890.
- Guimarães, P.M.R., Teixeira, J.A., Domingues, L. 2010. Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol. Adv.*, 28, 375-384.
- Harun, R., Danquah, M.K. 2011a. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. *Chem. Eng. J.*, 168, 1079-1084.
- Harun, R., Danquah, M.K. 2011b. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochem.*, 46, 304-309.
- Harun, R., Jason, W.S.Y., Cherrington, T., Danquah, M.K. 2010a. Microalgal biomass as a cellulosic fermentation feedstock for, bioethanol production. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, In Press, Uncorrected Proof.
- Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K. 2010b. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 14, 1037-1047.
- Healey, F.P. 1973. Characteristics of phosphorus deficiency in *Anabaena*. *J. Phycol.*, 9, 383-394.
- Healey, F.P., Hendzel, L.L. 1975. Effect of phosphorus deficiency on two algae growing in chemostats. *J. Phycol.*, 11, 303-309.
- Heilmann, S.M., Davis, H.T., Jader, L.R., Lefebvre, P.A., Sadowsky, M.J., Schendel, F.J., von Keitz, M.G., Valentas, K.J. 2010. Hydrothermal carbonization of microalgae. *Biomass Bioenerg.*, 34, 875-882.
- Heldt, H.W., Chon, C.J., Maronde, D., Herold, A., Stankovic, Z.S., Walker, D.A., Kraminer, A., Kirk, M.R., Heber, U. 1977. Role of orthophosphate and other factors in the regulation of starch formation in leaves and isolated chloroplasts. *Plant Physiol.*, 59, 1146-1155.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, 100, 10-18.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Ruan, R., Hu, B. 2011. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass Bioenerg.*, 35, 2245-2253.
- Hill, D.T., Bolte, J.P. 2000. Methane production from low solid concentration liquid swine waste using conventional anaerobic fermentation. *Bioresour. Technol.*, 74, 241-247.
- Ho, S.-H., Huang, S.-W., Chen, C.-Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, J.-S. 2012. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresour. Technol.*, In press.
- Hodaifa, G., Martínez, M.E., Sánchez, S. 2008. Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.*, 99, 1111-1117.
- Hsieh, C.-H., Wu, W.-T. 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresour. Technol.*, 100, 3921-3926.
- Hu, Q. 2004. Environmental effects on cell composition. in: *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, (Ed.) A. Richmond, Blackwell Publishing Ltd. Oxford.

- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *PIJ*, 54, 621-639.
- Inglesby, A.E., Fisher, A.C. 2012. Enhanced methane yields from anaerobic digestion of *Arthrospira maxima* biomass in an advanced flow-through reactor with an integrated recirculation loop microbial fuel cell. *Energy and Environmental Science*, 5, 7996-8006.
- Janssen, M. 2002. Cultivation of microalgae, effect of light/dark cycles on biomass yield, Vol. PhD, Wageningen University. Wageningen.
- Jensen, S., Knutsen, G. 1993. Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol.*, 5, 495-504.
- John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M., Pandey, A. 2011. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.*, 102, 186-193.
- Jonker, J.G.G., Faaij, A.P.C. 2012. Techno-economic assessment of micro-algae as feedstock for renewable bio-energy production. *Appl Energ*, In press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.053>.
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E.A., Embiruçu, M., Ghirardi, M.L. 2010. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresour. Technol.*, 101, 1406-1413.
- Kasavi, C., Finore, I., Lama, L., Nicolaus, B., Oliver, S.G., Toksoy Oner, E., Kirdar, B. 2012. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass. *Biomass Bioenerg*, 45, 230-238.
- Kayhanian, M., Tchobanoglous, G. 2007. *Biomass conversion processes for energy recovery*. Taylor & Francis Group LLC. .
- Kering, M., Biermacher, J., Butler, T., Mosali, J., Guretzky, J. 2012. Biomass yield and nutrient responses of switchgrass to phosphorus application. *Bioenerg Res*, 5, 71-78.
- Khanal, S.K. 2008. *Microbiology and biochemistry of anaerobic biotechnology*. John, Wiley & Sons Inc.
- Kilham, S., Kreeger, D., Goulden, C., Lynn, S. 1997. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwat. Biol.*, 38, 591-596.
- Kim, J., Um, B.-H., Kim, T. 2012. Bioethanol production from micro-algae, *Schizocytrium* sp., using hydrothermal treatment and biological conversion. *Korean J. Chem. Eng.*, 29, 209-214.
- Klinski, S. 2006. Einspeisung von Biogas in das Erdgasnetz. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (<http://www.unendlich-viel-energie.de/uploads/media/Einspeisestudie.pdf>).
- Kristensen, J., Thygesen, L., Felby, C., Jørgensen, H., Elder, T. 2008. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 1, 1-9.
- Kruckeberg, A.L., Dickinson, J.R. 2004. Carbon metabolism. in: *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*, (Eds.) J.R. Dickinson, M. Schweizer, CRC Press, pp. 42-103.
- Kruse, O., Hankamer, B. 2010. Microalgal hydrogen production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 21, 238-243.

- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P. 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48, 3713-3729.
- Lam, M.K., Lee, K.T. 2012. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnol. Adv.*, 30, 673–690.
- Lavoie, A., de la Noüe, J. 1987. Harvesting of *Scenedesmus obliquus* in wastewaters: Auto- or bioflocculation? *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 852-859.
- Leduy, A., Therien, N. 1977. An improved method for optical density measurement of the semimicroscopic blue green alga *Spirulina maxima*. *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 1219-1224.
- Lee, S. 2007. Ethanol from corn. in: *Handbook of alternative fuel technologies*, (Eds.) L. Lee, J.G. Speight, S.K. Loyalka, Taylor & Francis Group, pp. 323-341.
- Lehr, F., Posten, C. 2009. Closed photo-bioreactors as tools for biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 20, 280-285.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81, 629-636.
- Lima, M.A.P., Natalense, A.P.P. 2012. *Bioethanol*. InTech, Rijeka, Croatia.
- Lin, Y., Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69, 627–642.
- Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., Kong, H. 2012. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass Bioenerg.*
- Lincoln, E.P., Wilkie, A.C., French, B.T. 1996. Cyanobacterial process for renovating dairy wastewater. *Biomass Bioenerg.*, 10, 63-68.
- Lodi, A., Binaghi, L., Solisio, C., Converti, A., Borghi, M. 2003. Nitrate and phosphate removal by *Spirulina platensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 656-660.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Luque, I., Forchhammer, K. 2008. Nitrogen assimilation and C/N balance sensing. in: *The cyanobacteria. Molecular biology, genetics and evolution*, (Eds.) A. Herrero, E. Flores, Caister Academic Press. Norfolk, pp. 335-382.
- Mager, W.H., Siderius, M. 2002. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res.*, 2, 251-257.
- Mahadevaswamy, M., Venkataraman, L.V. 1986. Bioconversion of poultry droppings for biogas and algal production. *Agricultural Wastes*, 18, 93-101.
- Maier, R. 2008. Bacterial Growth. in: *Environ. Microbiol.*, (Eds.) R. Maier, I. Pepper, C. Gerba, Academic Press, pp. 38-56.
- Mairet, F., Bernard, O., Ras, M., Lardon, L., Steyer, J.-P. 2011. Modeling anaerobic digestion of microalgae using ADM1. *Bioresour. Technol.*, 102, 6823-6829.
- Markou, G. 2012. Alteration of the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under various amounts of limited phosphorus. *Bioresour. Technol.*, 116, 533–535.
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D. 2012a. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main

- bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96, 631-645.
- Markou, G., Chatzipavlidis, I., Georgakakis, D. 2012b. Carbohydrates production and bio-flocculation characteristics in cultures of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Improvements through phosphorus limitation process. *Bioenerg Res*, 5, 915-925.
- Markou, G., Chatzipavlidis, I., Georgakakis, D. 2012c. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in olive-oil mill wastewater treated with sodium hypochlorite. *Bioresour. Technol.*, 112, 234-241.
- Markou, G., Chatzipavlidis, I., Georgakakis, D. 2012d. Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 2661-2670.
- Markou, G., Georgakakis, D. 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Appl Energ*, 88, 3389-3401.
- Martin, C., de la Noüe, J., Picard, G. 1985. Intensive cultivation of freshwater microalgae on aerated pig manure. *Biomass*, 7, 245-259.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 14, 217-232.
- Matsudo, M.C., Bezerra, R.P., Sato, S., Perego, P., Converti, A., Carvalho, J.C.M. 2009. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using urea as nitrogen source. *Biochem. Eng. J.*, 43, 52-57.
- McCarty, P. 1964. Anaerobic waste treatment fundamentals. *Public Works*, 95, 107-112.
- Mehdikhani, P., Bari, M.R., Hovsepyan, H. 2011. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* for high tolerance of ethanol concentration and temperature. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 2654-2660.
- Metting, F.B. 1996. Biodiversity and application of microalgae. *J. Ind. Microbiol.*, 17, 477-489.
- Mielenz, J.R. 2001. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Curr. Opin. Microbiol.*, 4, 324-329.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
- Miranda, J., Passarinho, P., Gouveia, L. 2012a. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: the influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96, 555-564.
- Miranda, J.R., Passarinho, P.C., Gouveia, L. 2012b. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresour. Technol.*, 104, 342-348.
- Molina, E., Fernández, J., Ación, F.G., Chisti, Y. 2001. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *J. Biotechnol.*, 92, 113-131.
- Molina Grima, E., Belarbi, E.H., Ación Fernández, F.G., Robles Medina, A., Chisti, Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.*, 20, 491-515.
- Molina Grima, E., Fernández, F.G.A., García Camacho, F., Chisti, Y. 1999. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *J. Biotechnol.*, 70, 231-247.

- Montgomery, H., Dymock, J.F., Thom, N.S. 1962. The rapid colorimetric determination of organic acids and their salts in sewage sludge liquor. *Ana*, 87, 947-952.
- Monti, A., Di Virgilio, N., Venturi, G. 2008. Mineral composition and ash content of six major energy crops. *Biomass Bioenerg*, 32, 216-223.
- Morse, G.K., Brett, S.W., Guy, J.A., Lester, J.N. 1998. Review: Phosphorus removal and recovery technologies. *Sci. Total Environ.*, 212, 69-81.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, 96, 673-686.
- Mulbry, W., Kondrad, S., Pizarro, C., Kebede-Westhead, E. 2008. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresour. Technol.*, 99, 8137-8142.
- Mulbry, W.W., Wilkie, A.C. 2001. Growth of benthic freshwater algae on dairy manures. *J. Appl. Phycol.*, 13, 301-306.
- Mussatto, S.I., Dragone, G., Guimaraes, P.M.R., Silva, J.P.A., Carneiro, L.M., Roberto, I.C., Vicente, A., Domingues, L., Teixeira, J.A. 2010. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnol. Adv.*, 28, 817-830.
- Mussgnug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O. 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J. Biotechnol.*, 150, 51-56.
- Mustaqim, D., Ohtaguchi, K. 1997. A synthesis of bioreactions for the production of ethanol from CO<sub>2</sub>. *Energ*, 22, 353-356.
- Nguyen, M.T., Choi, S.P., Lee, J., Lee, J.H., Sim, S.J. 2009. Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 161-166.
- Nichols, N.N., Dien, B.S., Bothast, R.J., Cotta, M.A. 2006. The corn ethanol industry. in: *Alcoholic fuels*, (Ed.) S. Minter, Taylor & Francis, pp. 60-78.
- Nohra, J.A., Barrington, S., Frigon, J.C., Guiot, S.R. 2003. In storage psychrophilic anaerobic digestion of swine slurry. *Resources, Conservation and Recycling*, 38, 23-37.
- Norsker, N.-H., Barbosa, M.J., Vermuë, M.H., Wijffels, R.H. 2011. Microalgal production — A close look at the economics. *Biotechnol. Adv.*, 29, 24-27.
- Ogbonda, K.H., Aminigo, R.E., Abu, G.O. 2007. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresour. Technol.*, 98, 2207-2211.
- Olguín, E.J., Galicia, S., Angulo-Guerrero, O., Hernández, E. 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Bioresour. Technol.*, 77, 19-24.
- Oliver, R.L., Ganf, G.G. 2000. Freshwaters blooms. in: *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*, (Eds.) B.A. Whitton, M. Potts, Kluwer Academic Publishers. New York, pp. 149-194.
- Oliver, R.L., Hamilton, D.P., Brookes, J.D., Ganf, G.G. 2012. Physiology, Blooms and Prediction of Planktonic Cyanobacteria. in: *Ecology of Cyanobacteria II*, (Ed.) B.A. Whitton, Springer Netherlands, pp. 155-194.

- Orosa, M., Valero, J.F., Herrero, C., Abalde, J. 2001. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. *Biotechnol. Lett.*, 23, 1079-1085.
- Oswald, W.J. 2003. My sixty years in applied algology. *J. Appl. Phycol.*, 15, 99-106.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol.*, 74, 17-24.
- Papazi, A., Makridis, P., Divanach, P. 2010. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. *J. Appl. Phycol.*, 22, 349-355.
- Park, S., Li, Y. 2012. Evaluation of methane production and macronutrient degradation in the anaerobic co-digestion of algae biomass residue and lipid waste. *Bioresour. Technol.*, 111, 42-48.
- Parmar, A., Singh, N.K., Pandey, A., Gnansounou, E., Madamwar, D. 2011. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresour. Technol.*, 102, 10163-10172.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.*, 45, 11-36.
- Piorreck, M., Baasch, K.-H., Pohl, P. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, 23, 207-216.
- Piper, P.W. 1995. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.*, 134, 121-127.
- Pittman, J.K., Dean, A.P., Osundeko, O. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour. Technol.*, 102, 17-25.
- Posten, C., Schaub, G. 2009. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels--A process view. *J. Biotechnol.*, 142, 64-69.
- Pouliot, Y., Buelna, G., Racine, C., de la Noüe, J. 1989. Culture of cyanobacteria for tertiary wastewater treatment and biomass production. *Biological Wastes*, 29, 81-91.
- Powell, N., Shilton, A., Chisti, Y., Pratt, S. 2009. Towards a luxury uptake process via microalgae - Defining the polyphosphate dynamics. *Water Res.*, 43, 4207-4213.
- Powell, N., Shilton, A., Pratt, S., Chisti, Y. 2011. Luxury uptake of phosphorus by microalgae in full-scale waste stabilisation ponds. *Water Sci. Technol.*, 63, 704-709.
- Powell, N., Shilton, A.N., Pratt, S., Chisti, Y. 2008. Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 5958-5962.
- Prencipe, L., Iaccheri, E., Manzati, C. 1987. Enzymic ethanol assay: a new colorimetric method based on measurement of hydrogen peroxide. *Clin. Chem.*, 33, 486-9.
- Pulz, O., Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65, 635-648.
- Pulz, O., Scheibenbogen, K., Groß, W. 2008. Biotechnology with Cyanobacteria and Microalgae. in: *Biotechnology Set*, Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 105-136.
- Pulz, O.P. 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57, 287-293.



- Rangel-Yagui, C.d.O., Danesi, E.D.G., de Carvalho, J.C.M., Sato, S. 2004. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresour. Technol.*, 92, 133-141.
- Ras, M., Lardon, L., Bruno, S., Bernet, N., Steyer, J.-P. 2011. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.*, 102, 200-206.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F. 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Appl Energ*, 88, 3411-3424.
- Razon, L.F. 2012. Life cycle energy and greenhouse gas profile of a process for the production of ammonium sulfate from nitrogen-fixing photosynthetic cyanobacteria. *Bioresour. Technol.*, 107, 339-346.
- Razon, L.F., Tan, R.R. 2011. Net energy analysis of the production of biodiesel and biogas from the microalgae: *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis*. *Appl Energ*, 88, 3507-3514.
- Resurreccion, E.P., Colosi, L.M., White, M.A., Clarens, A.F. 2012. Comparison of Algae Cultivation Methods for Bioenergy Production Using a Combined Life Cycle Assessment and Life Cycle Costing Approach. *Bioresour. Technol.*, In press.
- Richmond, A. 2004. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, Blackwell Science Ltd. Oxford, pp. 566.
- Richmond, A. 1992. Open systems for the mass production of photoautotrophic microalgae outdoors: physiological principles. *J. Appl. Phycol.*, 4, 281-286.
- Richmond, A. 1999. Physiological principles and modes of cultivation in mass production of photoautotrophic microalgae. in: *Chemical from Microalgae*, (Ed.) Z. Cohen, Taylor and Francis. Philadelphia, pp. 353-386.
- Rodjaroen, S., Juntawong, N., Mahakhant, A., Miyamoto, K. 2007. High biomass production and starch accumulation in native green algal strains and cyanobacterial strains of Thailand. *Kasetsart J Nat Sci*, 41, 570-575.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 102, 100-112.
- Rodrigues, M.S., Ferreira, L.S., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J.C.M. 2010. Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresour. Technol.*, 101, 4491-4498.
- Rodrigues, M.S., Ferreira, L.S., Converti, A., Sato, S., de Carvalho, J.C.M. 2011. Influence of ammonium sulphate feeding time on fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation and biomass composition with and without pH control. *Bioresour. Technol.*, 102, 6587-6592.
- Rodríguez-Chong, A., Alberto Ramírez, J., Garrote, G., Vázquez, M. 2004. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. *J. Food Eng.*, 61, 143-152.
- Rosa, A.P.C.d., Carvalho, L.F., Goldbeck, L., Costa, J.A.V. 2011. Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energ. Convers. Manage.*, 52, 3071-3073.

- Salim, S., Bosma, R., Vermuë, M., Wijffels, R. 2010. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *J. Appl. Phycol.*, 23, 849-855.
- Samson, R., Leduy, A. 1986. Detailed study of anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1014-1023.
- Samson, R., LeDuy, A. 1983a. Improved performance of anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass by addition of carbon-rich wastes. *Biotechnol. Lett.*, 5, 677-682.
- Samson, R., Leduy, A. 1983b. Influence of mechanical and thermochemical pretreatments on anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. *Biotechnol. Lett.*, 5, 671-676.
- Sánchez, E., Borja, R., Travieso, L., Martín, A., Colmenarejo, M.F. 2005. Effect of organic loading rate on the stability, operational parameters and performance of a secondary upflow anaerobic sludge bed reactor treating piggy waste. *Bioresour. Technol.*, 96, 335-344.
- Sassano, C.E.N., Gioielli, L.A., Ferreira, L.S., Rodrigues, M.S., Sato, S., Converti, A., Carvalho, J.C.M. 2010. Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira (Spirulina) platensis* using ammonium chloride as nitrogen source. *Biomass Bioenerg.*, 34, 1732-1738.
- Sato, N., Wada, H. 2010. Lipid biosynthesis and its regulation in cyanobacteria lipids in photosynthesis, (Eds.) H. Wada, N. Murata, Vol. 30, Springer Netherlands, pp. 157-177.
- Schattauer, A., Weiland, P. 2006. Grundlagen der anaeroben Fermentation. in: *Handreichung. Biogasgewinnung und -nutzung, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. Gülzow*, pp. 25-35.
- Schenk, P., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx, U., Mussgnug, J., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B. 2008. Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg Res*, 1, 20-43.
- Schlösser, U.G. 1982. Sammlung von Algenkulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 95, 181-276.
- Serrano, R., Mulet, J.M., Rios, G., Marquez, J.A., Larrinoa, I.i.F.d., Leube, M.P., Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., Ros, R., Montesinos, C. 1999. A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *JExB*, 50, 1023-1036.
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O. 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnol. Adv.*, 27, 409-416.
- Singh, A., Nigam, P.S., Murphy, J.D. 2011a. Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. *Bioresour. Technol.*, 102, 26-34.
- Singh, A., Nigam, P.S., Murphy, J.D. 2011b. Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresour. Technol.*, 102, 10-16.
- Singh, A., Olsen, S.I., Nigam, P.S. 2011c. A viable technology to generate third-generation biofuel. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 86, 1349-1353.
- Singleton, P., Sainsbury, D. 2006. *Dictionary of microbiology and molecular biology. 3rd ed.* John Wiley & Sons Inc.
- Soratana, K., Landis, A.E. 2011. Evaluating industrial symbiosis and algae cultivation from a life cycle perspective. *Bioresour. Technol.*, 102, 6892-6901.

- Sørensen, A., Teller, P.J., Hilstrøm, T., Ahring, B.K. 2008. Hydrolysis of Miscanthus for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pre-treatment and enzymatic treatment. *Bioresour. Technol.*, 99, 6602-6607.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.*, 101, 87-96.
- Stal, L.J. 2012. Cyanobacterial Mats and Stromatolites. in: *Ecology of Cyanobacteria II*, (Ed.) B.A. Whitton, Springer Netherlands, pp. 65-125.
- Stehfest, K., Toepel, J., Wilhelm, C. 2005. The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. *Plant Physiol. Biochem.*, 43, 717-726.
- Suh, I., Lee, C.-G. 2003. Photobioreactor engineering: Design and performance. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 8, 313-321.
- Sukenik, A., Shelef, G. 1984. Algal autoflocculation—verification and proposed mechanism. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 142-147.
- Sulfahri, S.M., Sunarto, E., Irvansyah, M.Y., Utami, R.S., Mangkoedihardjo, S. 2011. Ethanol production from algae *Spirogyra* with fermentation by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Basic Appl. Sci. Res.*, 1, 589-593.
- Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.*, 83, 1-11.
- Talebna, F., Karakashev, D., Angelidaki, I. 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.*, 101, 4744-4753.
- Tasić, M.B., Konstantinović, B.V., Lazić, M.L., Veljković, V.B. 2009. The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. *Biochem. Eng. J.*, 43, 208-211.
- Tedesco, M., Duerr, E. 1989. Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. *J. Appl. Phycol.*, 1, 201-209.
- Tillberg, J.E., Rowley, J.R. 1989. Physiological and structural effects of phosphorus starvation on the unicellular green alga *Scenedesmus*. *Physiol. Plant.*, 75, 315-324.
- Tokuşoglu, Ö., Ünal, M.K. 2003. Biomass Nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *J. Food Sci.*, 68, 1144-1148.
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M.K., Forde, G.M., Hoadley, A. 2010. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *J Renew Sust Energ*, 2, 012701.
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., Uchiyama, H. 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour. Technol.*, 99, 4021-4028.
- USDOE. 2010. National Algal Biofuels Technology Roadmap, U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program.
- Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R., Núñez-Cebrero, F. 2002. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacult. Eng.*, 25, 207-216.

- Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Desmet, S., Boon, N. 2011. Bioflocculation of microalgae and bacteria combined with flue gas to improve sewage treatment. *New Biotechnol*, 29, 23–31.
- Van Eykelenburg, C. 1977. On the morphology and ultrastructure of the cell wall of *Spirulina platensis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 43, 89-99.
- Van Eykelenburg, C., Fuchs, A., Schmidt, G.H. 1980. Some theoretical considerations on the in vitro shape of the cross-walls in *Spirulina* spp. *J. Theor. Biol.*, 82, 271-282.
- Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I., Meesschaert, B., Muylaert, K. 2012. Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresour. Technol.*, 105, 114-119.
- Vandamme, D., Foubert, I., Meesschaert, B., Muylaert, K. 2010. Flocculation of microalgae using cationic starch. *J. Appl. Phycol.*, 22, 525-530.
- Varel, V.H., Chen, T.H., Hashimoto, A.G. 1988. Thermophilic and mesophilic methane production from anaerobic degradation of the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Resources, Conservation and Recycling*, 1, 19-26.
- Vavilin, V.A., Fernandez, B., Palatsi, J., Flotats, X. 2008. Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Manage.*, 28, 939-951.
- Vergara-Fernández, A., Vargas, G., Alarcón, N., Velasco, A. 2008. Evaluation of marine algae as a source of biogas in a two-stage anaerobic reactor system. *Biomass Bioenerg*, 32, 338-344.
- Vonshak, A. 2002a. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. Taylor & Francis, London.
- Vonshak, A. 2002b. *Spirulina: Growth, physiology and biochemistry*. in: *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and Biotechnology*, (Ed.) A. Vonshak, Taylor & Francis. London, pp. 43-65.
- Vonshak, A., Tomaselli, L. 2000. *Arthrospira (Spirulina): Systematics and ecophysiology biochemistry*. in: *The ecology of cyanobacteria*, (Eds.) B.A. Whitton, M. Potts, Kluwer Academic Publishers. New York, pp. 505-522.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C. 2008. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 79, 707-718.
- Wang, C.-Y., Fu, C.-C., Liu, Y.-C. 2007. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochem. Eng. J.*, 37, 21-25.
- Warr, S.R.C., Reed, R.H., Stewart, W.D.P. 1985. Carbohydrate accumulation in osmotically stressed cyanobacteria (blue-green algae): interactions of temperature and salinity. *New Phytol.*, 100, 285-292.
- Waterbury, J.B. 2006. The Cyanobacteria—Isolation, Purification and Identification. Third ed. in: *The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria*, (Ed.) M. Dworkin, Vol. 4, pp. 1053–1073.
- Weiland, P. 2008. *Wichtige Messdaten für den Prozessablauf und Stand der Technik in der Praxis*.
- Wilhelm, C., Jakob, T. 2011. From photons to biomass and biofuels: evaluation of different strategies for the improvement of algal biotechnology based on comparative energy balances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 92, 909-919.

- Yaşar, D. 2007. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture*, 272, 717-722.
- Yen, H.-W., Brune, D.E. 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresour. Technol.*, 98, 130-134.
- Zacchi, G., Axelsson, A. 1989. Economic evaluation of preconcentration in production of ethanol from dilute sugar solutions. *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 223-233.
- Zamalloa, C., Boon, N., Verstraete, W. 2012. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. *Appl Energ*, 92, 733-738.
- Zamalloa, C., Vulsteke, E., Albrecht, J., Verstraete, W. 2011. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. *Bioresour. Technol.*, 102, 1149-1158.
- Zarrouk, C. 1966. Contribution a l'etude d'une cyanophycee. Influence de divers facteurs physiques. et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima*. in: *University of Paris*, Vol. Ph.D Thesis.
- Zhang, H., Wang, W., Li, Y., Yang, W., Shen, G. 2011. Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*. *Biomass Bioenerg*, 35, 1710-1715.
- Zhou, N., Zhang, Y., Gong, X., Wang, Q., Ma, Y. 2012. Ionic liquids-based hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars. *Bioresour. Technol.*, 118, 512-517.
- Zhou, N., Zhang, Y., Wu, X., Gong, X., Wang, Q. 2011. Hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl<sub>2</sub>. *Bioresour. Technol.*, 102, 158-161.
- Zöllner, N., Kirsch, K. 1962. Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. *Res. Exp. Med. (Berl)*. 135, 545-561.
- Γεωργακάκης, Δ. 2011. *Αναερόβιες Διεργασίες, Διαχείριση αποβλήτων, Τεύχος 3ο, Μέρος Α'*. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, Αθήνα.
- Μάρκου, Γ., Δρούγα, Μ., Γεωργακάκης, Δ. 2011. Έλεγχος της πορείας της αναερόβιας χώνευσης κατά την παραγωγή βιοαερίου με τη βοήθεια διαγραμμάτων του δείκτη b. in: *7ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Εταιρείας Γεωργικών Μηχανικών Ελλάδος*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (24 έως 27 Νοεμβρίου 2011).
- Νεραντζής, Η., Λογοθέτης, Σ. 2007. Μέθοδος για την αύξηση της βιωσιμότητας των ζυμομυκήτων και της παραγωγικότητας τους σε αλκοόλη, Οργανισμός Πνευματικής Ιδιοκτησίας, 1005698-22/10/2007.