



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ, ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΞΗΡΑΝΣΗΣ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *Stichococcus* sp.**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΤΗΣ**

**ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΤΣΑΝΤΟΠΟΥΛΟΥ**

**Χανιά, Φεβρουάριος, 2023**

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για μη κερδοσκοπικό σκοπό, εκπαιδευτικού ή ερευνητικού χαρακτήρα, με την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για άλλη χρήση θα πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης.



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**Εργαστήριο Σχεδιασμού Περιβαλλοντικών Διεργασιών**

**ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ, ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΞΗΡΑΝΣΗΣ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *Stichococcus* sp.**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΤΗΣ**

**ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΤΣΑΝΤΟΠΟΥΛΟΥ**

**Τριμελής επιτροπή:**

Πέτρος Γκίκας, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Κωνσταντίνος Χρυσικόπουλος, Καθηγητής

Δανάη Βενιέρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

## Περίληψη

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία συγκρίνει τις διάφορες συνθήκες ανάπτυξης, διαχωρισμού και ξήρανσης του στελέχους μικροφυκών *Stichococcus* sp. με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων μεθόδων ώστε να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή ξηρής βιομάζας και βιο-προϊόντων (πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες, ολική χλωροφύλλη και β-καροτένιο). Εξετάζεται επιπλέον η ενεργειακή αποδοτικότητα των μεθόδων διαχωρισμού και αφυδάτωσης βιομάζας.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκαν δύο στελέχη *Stichococcus* sp., το άγριο και ένα μεταλλαγμένο στέλεχος με χαμηλότερη χλωροφύλλη και υψηλότερη βιομάζα. Τα μικροφύκη καλλιεργήθηκαν σε μικρή κλίμακα (ποτήρια ζέσεως) και σε φωτο-βιοαντιδραστήρα (μόνο άγριο στέλεχος) και στις δύο περιπτώσεις με χρήση γυαλιού αμμοβολής στον πυθμένα για την προσκόλληση των κυττάρων πάνω σε αυτό. Κατά την ανάπτυξη των μικροφυκών στα ποτήρια ζέσεων, έγιναν δοκιμές ως προς τον τύπο φωτισμού (σταθερός/με αναλαμπές), τη συγκέντρωση  $\text{NaNO}_3$  ( $0,25/0,75 \text{ g L}^{-1}$ ) και την πενία αζώτου (3 ημέρες). Απεδείχθη ότι η παραγωγή ξηρής βιομάζας και ολικών βιο-προϊόντων βελτιστοποιείται, όταν οι συνθήκες ανάπτυξης είναι: σταθερός φωτισμός και  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ . Αξίζει να σημειωθεί ότι ο τύπος φωτισμού και η πενία αζώτου δεν έχουν καθοριστικό ρόλο στα τελικά αποτελέσματα. Η ανάπτυξη στο φωτο-βιοαντιδραστήρα έγινε σε συνθήκες φωτισμού με αναλαμπές και  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ . Η συγκέντρωση ξηρής βιομάζας από το φωτο-βιοαντιδραστήρα είναι  $49,17 \text{ g L}^{-1}$  και των ολικών βιο-προϊόντων είναι  $41,70 \text{ g L}^{-1}$ .

Στη συνέχεια, για τη βελτιστοποίηση διαχωρισμού βιομάζας έγινε σύγκριση μεταξύ των διεργασιών φυγοκέντρισης, διήθησης, κροκίδωσης, σε σχέση με την απομάκρυνση βιομάζας από σύστημα καλλιέργειας ακινητοποιημένων κυττάρων. Η απόξεση βιομάζας αν και σημειώνει χαμηλή ανάκτηση ( $0,22 \text{ g/150 mL}$ ), φαίνεται να είναι η πιο ενεργειακά αποδοτική, απαιτώντας τη χαμηλότερη κατανάλωση ηλεκτρικού ρεύματος ( $0,7 \text{ kWh kg}^{-1}$ ) και το υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας θα μπορούσε να επαναχρησιμοποιηθεί ως προκαλλιέργεια σε επόμενους κύκλους καλλιέργειας.

Για να βρεθεί η βέλτιστη μέθοδος ξήρανσης της βιομάζας, δοκιμάστηκαν τρεις τρόποι, συναγωγή, ηλιακή ξήρανση και λυοφιλίωση. Ο πιο γρήγορος τρόπος αποδείχθηκε η συναγωγή (5 h) όμως αποδείχθηκε και ο τρόπος με τη μεγαλύτερη ενεργειακή απαίτηση ( $58,5 \text{ kWh kg}^{-1}$ ). Από την άλλη, για την ηλιακή ξήρανση απαιτούνται 6,5 h και μηδενική ενέργεια. Η λυοφιλίωση είναι μια μέθοδος που ολοκληρώνεται σε 8 h και έχει ενεργειακή απαίτηση  $49,7 \text{ kWh kg}^{-1}$ . Καμία μέθοδος δεν μπορεί να χαρακτηριστεί βέλτιστη με μόνο αυτά τα αποτελέσματα, καθώς η

συναγωγή είναι ασύμφορη ενεργειακά, η ηλιακή ξήρανση είναι μια μέθοδος που δεν είναι βάσιμη καθ' όλη τη διάρκεια του έτους και η λυοφιλίωση είναι χρονοβόρα. Έτσι, λαμβάνονται υπόψη οι τελικές συγκεντρώσεις του κάθε βιο-προϊόντος χωριστά που προκύπτουν από κάθε μια από τις μεθόδους ξήρανσης. Παρατηρείται ότι η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων ( $0,26 \text{ g g}^{-1}$  ξηρής βιομάζας), ολικής χλωροφύλλης ( $6,99 \text{ mg g}^{-1}$  ξηρής βιομάζας) και β-καροτενίου ( $1,44 \text{ mg g}^{-1}$  ξηρής βιομάζας) προέρχεται από τη μέθοδο της λυοφιλίωσης. Έπειτα, η βέλτιστη συγκέντρωση των υδατανθράκων προέρχεται από ξήρανση σε κλίβανο ( $0,45 \text{ g g}^{-1}$  ξηρής βιομάζας) ενώ φαίνεται ότι η παραγωγή των πρωτεϊνών δεν επηρεάζεται από το τρόπο ξήρανσης.

## Abstract

This thesis compares the different growth, separation and drying conditions of the microalgae strain *Stichococcus* sp. in order to find the best methods to maximize the production of dry biomass and bio-products (proteins, lipids, carbohydrates, total chlorophyll,  $\beta$ -carotene). In addition, it examines whether the methods are energetically beneficial.

Two types of the *Stichococcus* sp. strain, the wild type and the mutant strain, were tested. Microalgae were grown in beakers and in a bioreactor (wild strain only) in both cases using a sandblasted glass bottom. During the growth of the microalgae in the beakers, tests were performed regarding the type of lighting (steady, flashing),  $\text{NaNO}_3$  concentration ( $0.75 \text{ g L}^{-1}$ ,  $0.25 \text{ g L}^{-1}$ ) and nitrogen deficiency (3 days). It was shown that the production of dry biomass and total bio-products is optimized when the growth conditions are: constant lighting and  $0.75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ . It is worth noting that the type of lighting and lack of nitrogen do not have a decisive role in the final results. Growth in the bio-reactor was done under flash lighting conditions and  $0.75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ . The dry biomass concentration from the bio-reactor is  $49.17 \text{ g L}^{-1}$  and the total bio-products is  $41.70 \text{ g L}^{-1}$ .

Then, to optimize biomass separation, a comparison was made between centrifugation, filtration, flocculation with biomass removal from an immobilized cell culture system. Biomass scraping, although with a low recovery ( $0.22 \text{ g}/150 \text{ ml}$ ), appears to be the most energy efficient, requiring the lowest electricity consumption ( $0.7 \text{ kWh kg}^{-1}$ ), and the culture supernatant could be reused as a pre-culture in subsequent cycles cultivation.

To find the optimal biomass drying method, three ways, convection, solar drying and freeze-drying, were tested. Convection proved to be the fastest way (5 h) but it was also the way with the highest energy requirement ( $58.5 \text{ kWh kg}^{-1}$ ). On the other hand, solar drying requires 6.5 h and zero energy. Freeze-drying is a method that is completed in 8 h and has an energy requirement of  $49.7 \text{ kWh kg}^{-1}$ . Neither method can be called optimal with these results alone, as convection is energy inefficient, solar drying is a method you cannot rely on year-round, and freeze-drying is time-consuming.

Thus, the final concentrations of each bio-product separately resulting from each of the drying methods are taken into account. It is observed that the maximum production of lipids ( $0.26 \text{ g g}^{-1}$  dry biomass), total chlorophyll ( $6.99 \text{ mg g}^{-1}$  dry biomass) and  $\beta$ -carotene ( $1.44 \text{ mg g}^{-1}$  dry biomass) comes from the freeze-drying method. Then, the optimal concentration of

carbohydrates comes from convection ( $0.45 \text{ g g}^{-1}$  dry biomass) while it seems that the production of proteins is not affected by the drying method.

## **Πρόλογος και Ευχαριστίες**

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Πέτρο Γκίκα για την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπό μου. Η καθοδήγηση και ο συντονισμός του ήταν καθοριστικής σημασίας στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Επιπλέον δε, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον υποψήφιο διδάκτορα Γιώργο Μακάρογλου και στη διδάκτορα Ροδούλα Κομπογεννητάκη που στάθηκαν αρωγοί στη διαδικασία των πειραμάτων. Η βοήθειά τους ήταν πολύτιμη.



## Περιεχόμενα

Κατάλογος Πινάκων .....	10
Κατάλογος Διαγραμμάτων/Εικόνων .....	11
<b>1 Εισαγωγή .....</b>	<b>14</b>
1.1 Φύκη .....	14
1.2 Μικροφύκη .....	14
1.3 Τρόποι καλλιέργειας μικροφυκών .....	16
1.3.1 Φωτοαυτότροφη καλλιέργεια μικροφυκών .....	16
1.3.2 Ετερότροφη καλλιέργεια μικροφυκών .....	17
1.3.3 Μιξότροφη καλλιέργεια μικροφυκών .....	17
1.3.4 Φωτοετεροτροφική καλλιέργεια μικροφυκών .....	18
1.4 Παράγοντες αύξησης μικροφυκών .....	19
1.4.1 Φως .....	20
1.4.2 Θερμοκρασία .....	20
1.4.3 pH .....	20
1.4.4 Θρεπτικά συστατικά .....	21
1.5 Βιο-προϊόντα μικροφυκών .....	22
1.6 Συστήματα καλλιέργειας .....	23
1.6.1 Κλειστού τύπου καλλιέργειες .....	23
1.6.2 Ανοικτού τύπου καλλιέργειες .....	26
1.7 Τρόποι ανάκτησης μικροφυκών .....	26
1.7.1 Διήθηση .....	27
1.7.2 Φυγοκέντριση .....	27
1.7.3 Χημική κροκίδωση .....	28
1.7.4 Ηλεκτροκροκίδωση .....	30
1.7.5 Βιοκροκίδωση .....	30
1.7.6 Επίπλευση .....	31
1.8 Τρόποι ξήρανσης μικροφυκών .....	31
1.8.1 Ξήρανση σε κλίβανο .....	32
1.8.2 Ηλιακή ξήρανση .....	32
1.8.3 Λυοφιλίωση (Freeze dry) .....	32
1.8.4 Ξήρανση με ψεκασμό .....	32
1.9 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας .....	33

<b>2</b>	<b>Μεθοδολογία .....</b>	<b>35</b>
2.1	Ανάπτυξη μικροφυκών .....	35
2.1.1	Εργαστηριακή κλίμακα .....	35
2.1.2	Κλίμακα φωτο-βιοαντιδραστήρα .....	39
2.2	Πρωτόκολλα διαχωρισμού βιομάζας από το υγρό καλλιέργειας .....	41
2.2.1	Ανάκτηση ακινητοποιημένων κυττάρων .....	41
2.2.2	Φυγοκέντριση.....	42
2.2.3	Διήθηση υπό κενό.....	42
2.2.4	Κροκίδωση .....	43
2.3	Πρωτόκολλα Αφυδάτωσης Βιομάζας.....	45
2.3.1	Ξήρανση σε κλίβανο .....	45
2.3.2	Ηλιακή ξήρανση.....	45
2.3.3	Λυοφιλίωση .....	45
2.4	Πρωτόκολλα μέτρησης βιο-προϊόντων .....	46
2.4.1	Υδατάνθρακες .....	46
2.4.2	Λιπίδια.....	46
2.4.3	Χρωστικές ουσίες.....	47
2.4.4	Πρωτεΐνες.....	48
<b>3</b>	<b>Αποτελέσματα.....</b>	<b>49</b>
3.1	Βελτιστοποίηση βιομάζας και βιο-προϊόντων .....	49
3.2	Βέλτιστος Διαχωρισμός Βιομάζας .....	76
3.2.1	Εύρεση Βέλτιστης Δόσης Κροκιδωτικού.....	76
3.2.2	Πρωτόκολλα Διαχωρισμού Βιομάζας.....	78
3.3	Πρωτόκολλα Αφυδάτωσης Βιομάζας.....	81
3.4	Πρωτόκολλα Μέτρησης Βιο-προϊόντων .....	83
<b>4</b>	<b>Συμπεράσματα - Προτάσεις .....</b>	<b>85</b>
<b>5</b>	<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>87</b>

## Κατάλογος Πινάκων

<b>Πίνακας 2.1</b> Σύσταση θρεπτικού υλικού Bold's Basal Medium (Bischoff and Bold 1963; Starr and Zeikus 1993).....	35
<b>Πίνακας 2.2</b> Συνθήκες καλλιέργειας εργαστηριακής κλίμακας για τα στελέχη Wild και μεταλλαγμένο <i>Stichococcus</i> sp. ....	39
<b>Πίνακας 2.3</b> Συνθήκες καλλιέργειας κλίμακας φωτο-βιοαντιδραστήρα για το στέλεχος Wild <i>Stichococcus</i> sp.....	39

## Κατάλογος Διαγραμμάτων/Εικόνων

<b>Σχήμα 1.1</b> Διάφορες μεταβολικές δυνατότητες των φυκών. ....	19
<b>Σχήμα 1.2</b> Κύκλος αύξησης μικροοργανισμών σε κλειστά συστήματα. ....	25
<b>Σχήμα 2.1</b> Πειραματική διάταξη φωτο-βιοαντιδραστήρα. ....	37
<b>Σχήμα 2.2 Α)</b> Πειραματική διάταξη φωτο-βιοαντιδραστήρα, διαστάσεων 150x4x15 cm. Στο εσωτερικό του φωτο-βιοαντιδραστήρα γίνεται η ανάπτυξη των μικροφυκών (πράσινο χρώμα), ενώ εξωτερικά περικλείεται από νερό (μπλε χρώμα) για τη μόνωση του φωτο-βιοαντιδραστήρα. <b>Β)</b> Επίπεδος φωτο-βιοαντιδραστήρας για την ανάπτυξη των καλλιεργειών μικρής κλίμακα που διεξάχθηκαν σε ποτήρια ζέσεως. ....	37
<b>Σχήμα 2.3</b> Δοχεία καλλιέργειας ακινητοποιημένων μικροφυκών σε υλικό από γυαλί αμμοβολής. ....	38
<b>Σχήμα 2.4</b> Επίπεδος φωτο-βιοαντιδραστήρας με κλιμάκωση βιομάζας. ....	40
<b>Σχήμα 2.5</b> Φωτο-βιοαντιδραστήρας διαλείποντος έργου. ....	40
<b>Σχήμα 2.6</b> Απόξεση βιομάζας μικροφυκών ακινητοποιημένη σε γυαλί αμμοβολής από <b>Α)</b> επιφάνεια μικρής κλίμακας και <b>Β)</b> επιφάνεια κλίμακας φωτο-αντιδραστήρα. ....	42
<b>Σχήμα 2.7</b> Jar test για την κροκίδωση καλλιέργειας μικροφυκών. ....	44
<b>Σχήμα 2.8</b> Μέθοδοι διαχωρισμού βιομάζας από το υγρό της καλλιέργειας. ....	44
<b>Σχήμα 3.1</b> Παραγωγή ξηρής βιομάζας άγριου στελέχους στις διάφορες συνθήκες ....	50
<b>Σχήμα 3.2</b> Παραγωγή ξηρής βιομάζας μεταλλαγμένου στελέχους στις διάφορες συνθήκες ....	51
<b>Σχήμα 3.3</b> Παραγωγή πρωτεϊνών άγριου στελέχους στις διάφορες συνθήκες ....	51
<b>Σχήμα 3.4</b> Παραγωγή πρωτεϊνών μεταλλαγμένου στελέχους στις διάφορες συνθήκες ....	52
<b>Σχήμα 3.5</b> Παραγωγή λιπιδίων άγριου στελέχους στις διάφορες συνθήκες. ....	53
<b>Σχήμα 3.6</b> Παραγωγή λιπιδίων μεταλλαγμένου στελέχους στις διάφορες συνθήκες. ....	53
<b>Σχήμα 3.7</b> Παραγωγή υδατανθράκων άγριου στελέχους στις διάφορες συνθήκες. ....	54
<b>Σχήμα 3.8</b> Παραγωγή υδατανθράκων μεταλλαγμένου στελέχους στις διάφορες συνθήκες. ....	55
<b>Σχήμα 3.9</b> Παραγωγή ολ. Χλωροφύλλης άγριου στελέχους στις διάφορες συνθήκες. ....	56
<b>Σχήμα 3.10</b> Παραγωγή ολικής Χλωροφύλλης μεταλλαγμένου στελέχους στις διάφορες συνθήκες. ....	56
<b>Σχήμα 3.11</b> Παραγωγή β-καροτένιου άγριου στελέχους στις διάφορες συνθήκες ....	57
<b>Σχήμα 3.12</b> Παραγωγή β-καροτένιου μεταλλαγμένου στελέχους στις διάφορες συνθήκες ....	58
<b>Σχήμα 3.13</b> Παραγωγή ολικών βιο-προϊόντων άγριου στελέχους στις διάφορες συνθήκες ....	59
<b>Σχήμα 3.14</b> Παραγωγή ολικών βιο-προϊόντων μεταλλαγμένου στελέχους στις διάφορες συνθήκες. ....	60
<b>Σχήμα 3.15</b> Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής ξηρής βιομάζας άγριου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου. ....	61
<b>Σχήμα 3.16</b> Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής ξηρής βιομάζας μεταλλαγμένου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου. ....	62
<b>Σχήμα 3.17</b> Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής πρωτεϊνών άγριου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου. ....	63

<b>Σχήμα 3.18</b> Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής πρωτεϊνών μεταλλαγμένου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου. ....	64
<b>Σχήμα 3.19</b> Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής λιπιδίων άγριου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου. ....	65
<b>Σχήμα 3.20</b> Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής λιπιδίων μεταλλαγμένου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου. ....	66
<b>Σχήμα 3.21</b> Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής υδατανθράκων άγριου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου. ....	67
<b>Σχήμα 3.22</b> Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής υδατανθράκων μεταλλαγμένου στελέχους σύγκρισης (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου. ....	68
<b>Σχήμα 3.23</b> Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής ολικής χλωροφύλλης άγριου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου. ....	69
<b>Σχήμα 3.24</b> Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής ολικής χλωροφύλλης μεταλλαγμένου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου. ....	70
<b>Σχήμα 3.25</b> Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής β-καροτενίου άγριου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου. ....	71
<b>Σχήμα 3.26</b> Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής β-καροτενίου μεταλλαγμένου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου. ....	72
<b>Σχήμα 3.27</b> Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής ολικών βιο-προϊόντων άγριου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου. ....	73
<b>Σχήμα 3.28</b> Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής ολικών βιο-προϊόντων μεταλλαγμένου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου. ....	74
<b>Σχήμα 3.29</b> Παραγωγή ξηρής βιομάζας από το φωτο-βιοαντιδραστήρα.....	75
<b>Σχήμα 3.30</b> Παραγωγή βιο-προϊόντων από το φωτο-βιοαντιδραστήρα.....	76
<b>Σχήμα 3.31 Α)</b> Θολερότητα στο υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας σε σχέση με τη συγκέντρωση χιτοζάνης (mg L <sup>-1</sup> ), <b>Β)</b> Οπτική πυκνότητα στο υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας σε σχέση με τη συγκέντρωση χιτοζάνης (mg L <sup>-1</sup> ) και <b>Γ)</b> Συγκέντρωση ξηρής βιομάζας στο υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας, πριν και μετά την κροκίδωση με τη βέλτιστη δόση κροκιδωτικού. ....	77

<b>Σχήμα 3.32 Α)</b> Δεδομένα ξηρής βιομάζας <i>Stichococcus</i> sp. σε g ανά 150 mL όγκου καλλιέργειας, εφαρμόζοντας διαφορετικά πρωτόκολλα ανάκτησης: Κροκίδωση, Φυγοκέντρωση, Διήθηση και <b>Β)</b> Μηχανικό ξέστρο.....	79
<b>Σχήμα 3.33</b> Ενεργειακή απαίτηση ηλεκτρικού ρεύματος ανά κιλό υγρού που αφαιρέθηκε για κάθε μία από τις εξεταζόμενες διεργασίες διαχωρισμού από το υγρό της καλλιέργειας. ....	81
<b>Σχήμα 3.34</b> Καμπύλες μείωσης λόγου υγρασίας σε σχέση με το χρόνο, εφαρμόζοντας διαφορετικές διεργασίες ξήρανσης βιομάζας μικροφυκών. ....	82
<b>Σχήμα 3.35</b> Ενεργειακή απαίτηση ηλεκτρικού ρεύματος ανά κιλό υγρής βιομάζας για κάθε μία από τις εξεταζόμενες διεργασίες αφυδάτωσης. ....	83
<b>Σχήμα 3.36</b> Παραγωγή βιο-προϊόντων από βιομάζα <i>Stichococcus</i> sp., έπειτα από την εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων αφυδάτωσης. ....	84

# 1 Εισαγωγή

## 1.1 Φύκη

Τα φύκη είναι φωτοσυνθετικοί φυτικοί οργανισμοί, οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως θαλλόφυτα, δηλαδή χωρίς βλαστούς, φύλλα, ρίζες. Αναπαράγονται σχηματίζοντας σπόρια. Τα σπόρια προκύπτουν από τη μιτωτική διαίρεση των βλαστητικών κυττάρων. Τα τελευταία διακρίνονται σε κύτταρα με μαστίγια και σε κύτταρα χωρίς μαστίγια. Στη συνέχεια, λόγω ότι στα φύκη συμπεριλαμβάνονται οργανισμοί που δεν ανήκουν αυστηρά σε αυτόν τον ορισμό, τα φύκη οριοθετούνται μέσω των οικολογικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών τους.

Το βασικό χαρακτηριστικό των φυκών είναι ότι βρίσκονται σε υδάτινα οικοσυστήματα όπως λίμνες, ποτάμια, παράκτιες περιοχές ακόμα και ωκεανούς. Ζουν είτε ως επιπλέοντες ή κολυμβητικοί οργανισμοί που αποτελούν το φυτοπλαγκτόν είτε προσκολλημένοι στο θαλάσσιο πυθμένα ή σε βράχους που αποτελούν το περίφυτο (Γκέλης, 2015).

Μορφολογικά διακρίνονται σε απλές μονοκύτταρες μορφές, αποικιακές, μικροσκοπικές, νηματοειδείς έως πολύπλοκες διακλαδισμένες ή μη διακλαδισμένες. Πιο συγκεκριμένα πολλά μονοκύτταρα είδη εμφανίζονται με τη μορφή μικρών σφαιρών και ονομάζονται κοκκοειδή φύκη. Τα φύκη που σχηματίζουν αποικίες διευθετούνται χαλαρά ή πιο αυστηρά με έναν γενετικά καθορισμένο τρόπο όπως τα κοινόβια. Στη συνέχεια στα νηματοειδή φύκη τα κύτταρα βρίσκονται σε γραμμική σειρά ενωμένα από άκρη σε άκρη.

Τα φύκη διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθός τους. Η πρώτη κατηγορία είναι τα **μικροφύκη** τα οποία δεν είναι ορατά με γυμνό μάτι και η δεύτερη κατηγορία είναι τα **μακροφύκη** των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται από λίγα εκατοστά έως μερικές δεκάδες μέτρα.

## 1.2 Μικροφύκη

Τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιοτεχνολογία προσφέροντας πολύτιμα αγαθά και είναι χρήσιμα σε πολλαπλές εφαρμογές. Αυτό οφείλεται στην τεράστια βιοποικιλότητα των μικροφυκών, στα πρόσφατα εργαλεία γενετικής μηχανικής και στις τεχνικές καλλιέργειας. Υπάρχουν τρεις κύριες πιθανές προσεγγίσεις για νέες ενώσεις φυκών: (1) πρόσφατα απομονωμένα αλλά λιγότερο γνωστά μικροφύκη (2) επιλογή συνθηκών πίεσης (3) ενζυμικά

ρυθμισμένες ενώσεις από συμβατικά μόρια. Όλες αυτές οι προσεγγίσεις μπορούν να συνδυαστούν με συγκεκριμένο τρόπο (Abu-Ghosh et al., 2021).

Τα μικροφύκη είναι μια ομάδα μικροοργανισμών που απαντώνται στο νερό, στο έδαφος (Subashchandrabose et al., 2011), στον αέρα (Sahu and Tangutur. 2015), στους φλοιούς των δέντρων (Wicker & Bhatnagar, 2020) και σε ορισμένες περιπτώσεις στα ζώα (Pauli et al., 2014). Τα μικροφύκη είναι ικανά να αναπτυχθούν σε άγονα, άνυδρα, ημίξηρα και ρυπασμένα εδάφη τα οποία δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συμβατική γεωργία (Junying et al., 2013). Επιπρόσθετα αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν σε αλατούχο νερό ακόμη και σε λύματα εμπλουτισμένα με θρεπτικά συστατικά. Ένα ακόμα θετικό στην καλλιέργεια μικροφυκών είναι ότι δεν περιορίζεται στις εποχές και μπορεί να συλλέγονται καθημερινά (Gouveia and Oliveira, 2009).

Τα μικροφύκη είναι μικροσκοπικοί οργανισμοί οι οποίοι δεν είναι ορατοί με γυμνό μάτι. Ανάλογα με το μέγεθος (από 0,2  $\mu\text{m}$  έως και πάνω από 200  $\mu\text{m}$ ), το χρώμα και τη διάταξη των φωτοσυνθετικών μεμβρανών χαρακτηρίζονται ως χλωροφύκη, φωτοσυνθετικά σταχυομαστιγωτά, απτόφυτα, κρυπτοφύκη, δινοφύκη και κυανοβακτήρια (Anastopoulos & Kyzas, 2015). Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα είδη είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί εκτός από τα κυανοβακτήρια που είναι προκαρυωτικοί. Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί είναι φωτοσυνθετικοί, δηλαδή περιορίζουν το  $\text{CO}_2$  στην ατμόσφαιρα μετατρέποντάς το σε  $\text{O}_2$  και θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των κυττάρων.

Η έρευνα πάνω στα μικροφύκη περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια. Το αρχικό στάδιο περιλαμβάνει την καλλιέργεια των μικροφυκών και τη μεγιστοποίηση της παραγωγής βιομάζας. Το ενδιάμεσο στάδιο αναφέρεται στη συλλογή των μικροφυκών από τις καλλιέργειες και στη ξήρανση της συλλεγόμενης βιομάζας. Τέλος, το τρίτο στάδιο στοχεύει στην εξαγωγή και τον καθαρισμό του βιο-προϊόντος από τη βιομάζα των μικροφυκών (Manirafasha et al., 2016).

Το στέλεχος *Stichococcus* ανήκει στα πράσινα μικροφύκη (Chlorophyta). Η δομή του είναι απλή, έχει ραβδοειδές σχήμα και απαντάται τόσο σε χερσαία όσο και σε υδάτινα οικοσυστήματα. Το μικρό του μέγεθος διευκολύνει τη διασπορά του σε μεγάλες αποστάσεις. Γι' αυτό άλλωστε το χερσαίο είδος *Stichococcus* είναι από τα πιο ανθεκτικά πράσινα μικροφύκη. Το συγκεκριμένο στέλεχος έχει βρεθεί ακόμα και στα σκληρά χερσαία και γλυκά νερά της Ανταρκτικής και Αρκτικής (Hodač et al., 2016).

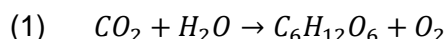


### 1.3 Τρόποι καλλιέργειας μικροφυκών

Ανάλογα με την ανάγκη σε άνθρακα και ενέργεια, τα μικροφύκη κατηγοριοποιούνται σε φωτοαυτότροφα, ετερότροφα και μιξότροφα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ετερότροφα και μιξότροφα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να μεταβολίσουν φωτοαυτοτροφικά. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να παρατηρηθούν σε ορισμένα φωτοαυτότροφα είδη μικροοργανισμών, ετερότροφες και μιξότροφες διεργασίες ως δευτερεύουσες (Daneshvar et al., 2021a).

#### 1.3.1 Φωτοαυτότροφη καλλιέργεια μικροφυκών

Η φωτοαυτοτροφική καλλιέργεια είναι η πιο κοινή μέθοδος καλλιέργειας (Chew et al., 2018a). Τα φωτοαυτότροφα μικροφύκη βιοσυνθέτουν οργανική ύλη χρησιμοποιώντας τον ανόργανο άνθρακα ως πηγή άνθρακα και το φως ως πηγή ενέργειας (Huang et al., 2010), δημιουργώντας χημική ενέργεια μέσω της φωτοσύνθεσης. Η Εξ. (1) παρουσιάζει τη δέσμευση του άνθρακα και τη φωτοσύνθεση σε οργανισμούς με χλωροφύλλη α:



Το  $CO_2$  και τα διττανθρακικά ( $HCO_3^-$ ) είναι οι κύριες πηγές άνθρακα για την κυτταρική ανάπτυξη φωτοαυτοτροφικών μικροφυκών (Kim et al., 2014). Λόγω της ικανότητας των φωτοαυτότροφων μικροφυκών να δεσμεύουν  $CO_2$ , έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές δέσμευσης και χρήσης άνθρακα (Carbon Capture and Utilization, CCU). Οι στρατηγικές αυτές μπορεί να βοηθήσουν στη μείωση των εκπομπών αερίων θερμοκηπίου (GHG) και κατά συνέπεια να συμβάλουν στον περιορισμό της κλιματικής αλλαγής. Επιπλέον ο άνθρακας που δεσμεύεται από τα μικροφύκη είναι σταθερός στη μοριακή του δομή, όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή διάφορων προϊόντων (Subhash et al., 2017). Ένα ακόμη θετικό στο συγκεκριμένο είδος καλλιέργειας είναι η απουσία οργανικού άνθρακα με αποτέλεσμα ο κίνδυνος μόλυνσης να είναι χαμηλός. Γι' αυτό το λόγο η φωτοαυτοτροφική καλλιέργεια είναι πιο κατάλληλη για την υπαίθρια καλλιέργεια μικροφυκών από άλλους τρόπους (Chew et al., 2018b).

Η φωτοαυτότροφη καλλιέργεια είναι κατάλληλη για ανοιχτά συστήματα και για κλειστούς φωτοβιοαντιδραστήρες (PBRs). Στα ανοιχτά συστήματα υπάρχει ο περιορισμός της εξάρτησης από το φως. Η ακτινοβολία του ηλιακού φωτός ποικίλει ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, την εποχή και τις κλιματικές συνθήκες. Ένα ακόμα μειονέκτημα είναι η χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας από φωτοαυτότροφες καλλιέργειες σε σύγκριση με ετερότροφες και μιξότροφες

(Daneshvar et al., 2021a). Η χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας οφείλεται στην αυτοσκίαση των μικροφυκών και δεν επιτρέπει την πιο πυκνή καλλιέργεια (Nitsos et al., 2020). Από την άλλη, στους κλειστούς βιοαντιδραστήρες η παραγωγή τεχνητού φωτός είναι ακριβή διαδικασία. Ως εκ τούτου, το φως ως πηγή ενέργειας διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην επιτυχή εφαρμογή του τρόπου καλλιέργειας φωτοαυτοτροφικών μικροφυκών (Daneshvar et al., 2021b).

### **1.3.2 Ετερότροφη καλλιέργεια μικροφυκών**

Στην ετερότροφη καλλιέργεια τα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν απουσία φωτός. Ο απαραίτητος άνθρακας και ενέργεια για τον κυτταρικό μεταβολισμό παρέχεται μέσω της κατανάλωσης οργανικού άνθρακα από τα ετερότροφα μικροφύκη (Lam & Lee, 2012). Τα ετερότροφα μικροφύκη έχουν μοναδικά χαρακτηριστικά. Στο συγκεκριμένο τρόπο καλλιέργειας, η παραγωγή βιομάζας είναι υψηλότερη σε σύγκριση με της φωτοαυτότροφης καλλιέργειας. Αυτό οφείλεται στην ανεξαρτησία από το φως των ετερότροφων μικροφυκών που διευκολύνουν την υψηλή κυτταρική πυκνότητα χωρίς φωτοαναστολή, έναν περιοριστικό παράγοντα στη φωτοαυτότροφη καλλιέργεια (Chew et al., 2018c). Ένα ακόμη θετικό είναι ότι ο σχεδιασμός του βιοαντιδραστήρα ετερότροφων μικροοργανισμών είναι πιο εύκολος λόγω της μείωσης στην απαίτηση υψηλής αναλογίας επιφάνειας προς όγκο μέσω των σκοτεινών συνθηκών που απαιτούνται (Zhan et al., 2017). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η υψηλή παραγωγή βιομάζας και η ανεξαρτησία από το φως της ετερότροφης καλλιέργειας μειώνουν το κόστος σε σχέση με τη φωτοαυτότροφη. Ωστόσο η ετερότροφη καλλιέργεια έχει αρκετά μειονεκτήματα που πρέπει να ληφθούν υπόψη. Πιο αναλυτικά, αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν φωτοαυτοτροφικά αλλά λίγα μπορούν ετεροτροφικά. Επιπρόσθετα, τα ετερότροφα μικροφύκη δεν μπορούν να καταναλώσουν CO<sub>2</sub>, παρόλο που παράγουν CO<sub>2</sub> μέσω του μεταβολισμού του ενεργού άνθρακα (Daneshvar et al., 2021a). Ως εκ τούτου, δεν είναι χρήσιμα στην έρευνα περιορισμού του CO<sub>2</sub>. (Hu et al., 2018). Άλλο ένα αρνητικό είναι ο υψηλός κίνδυνος βιολογικής μόλυνσης από βακτήρια, ζυμομύκητες και μύκητες (Daneshvar et al., 2021b).

### **1.3.3 Μιξότροφη καλλιέργεια μικροφυκών**

Μερικά είδη μικροφυκών αναπτύσσονται υπό μιξοτροφικές συνθήκες χρησιμοποιώντας ανόργανο άνθρακα και οργανικές ενώσεις ταυτόχρονα καθώς και τα δύο είναι εξίσου

απαραίτητα για την ανάπτυξή τους. Κατά τη διάρκεια της μιξοτροφικής καλλιέργειας τα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν φωτοαυτοτροφικά ή ετεροτροφικά και δεν υπάρχει εμφανής αλλαγή μεταξύ αυτών των δύο μεταβολισμών (Daneshvar et al., 2021a). Ως εκ τούτου η αλλαγή μεταξύ αυτών των δύο μεθόδων δεν πρέπει να συγχέεται με τη μιξότροφη. Αυτό διότι τα μιξότροφα μικροφύκη χρειάζονται φωτισμό για την απομάκρυνση του CO<sub>2</sub> μέσω της φωτοσύνθεσης και οργανικά υποστρώματα για την αερόβια αναπνοή ενώ στο απόλυτο σκοτάδι, ο μεταβολισμός μετατρέπεται σε ετερότροφος (Perez-Garcia et al., 2015). Όπως αναφέρθηκε, τα μιξότροφα μικροφύκη συμμετέχουν στη μείωση του CO<sub>2</sub> μέσω της φωτοσύνθεσης. Το εκλυόμενο CO<sub>2</sub> από την αναπνοή υπό ετερότροφο μεταβολισμό, παγιδεύεται και επαναχρησιμοποιείται κατά τη φωτοαυτοτροφική ανάπτυξη (Gaignard et al., 2019). Επιπρόσθετα, η παραγωγικότητα της βιομάζας στη μιξοτροφική καλλιέργεια είναι υψηλότερη από ότι στη φωτοαυτότροφη και ετερότροφη καλλιέργεια. Από την άλλη, παρόμοια με τον τρόπο ετερότροφης καλλιέργειας, η εφαρμογή ενός οργανικού υποστρώματος αυξάνει το κόστος της μιξοτροφικής καλλιέργειας (Daneshvar et al., 2021a). Επιπλέον, ο κίνδυνος μόλυνσης από ανεπιθύμητους ετερότροφους μικροοργανισμούς είναι υψηλός λόγω των ενώσεων καλλιέργειας με βάση τη ζάχαρη. Ως εκ τούτου, η μιξοτροφική καλλιέργεια απαιτεί οργανικά υποστρώματα και αποστείρωση που αυξάνουν το κόστος του σχεδιασμού και της λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα. Τέλος, μόνο λίγα είδη μικροφυκών αναπτύσσονται μιξοτροφικά, γεγονός που μειώνει την ερευνητική ευκαιρία (Daneshvar et al., 2021a).

#### 1.3.4 Φωτοετεροτροφική καλλιέργεια μικροφυκών

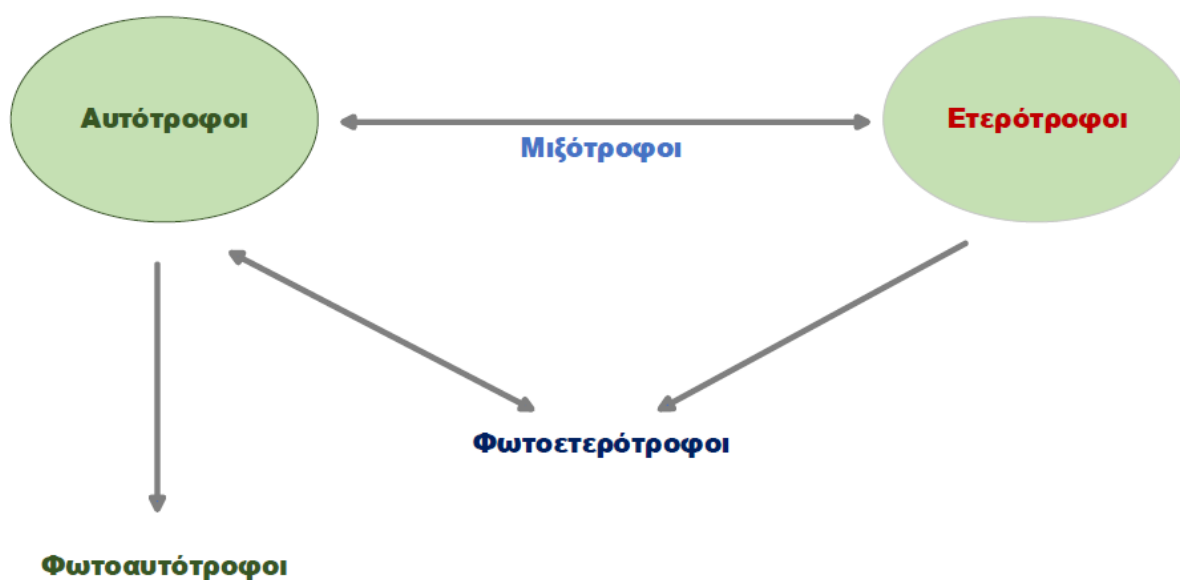
Τα φωτοετερότροφα μικροφύκη όπως τα *Chlorella vulgaris* ESP-31 είναι μια ομάδα μικροφυκών που απαιτούν το φως ως πηγή ενέργειας και τον οργανικό άνθρακα ως πηγή άνθρακα (Yeh et al., 2012). Σε αντίθεση με τα φωτοαυτότροφα και τα μιξότροφα, τα φωτοετερότροφα δεν μπορούν να μεταβολίσουν το CO<sub>2</sub>. Σε αντίθεση με τα ετερότροφα, τα φωτοετερότροφα δεν μπορούν να αναπτυχθούν στη γλυκόζη χωρίς φως. Τα φωτοετερότροφα χρησιμοποιούν τη γλυκόζη ως δομικό υλικό αλλά όχι ως πηγή ενέργειας. Σε αντίθεση με τα μιξότροφα και τα ετερότροφα, η παραγωγή CO<sub>2</sub> είναι αμελητέα στα φωτοετερότροφα καθώς ο κύκλος Calvin<sup>1</sup> δεν είναι ενεργός (Chojnacka and Marquez-Rocha, 2004). Η φωτοετερότροφη καλλιέργεια είναι ακριβός τρόπος καλλιέργειας καθώς τα μικροφύκη χρειάζονται τόσο οργανικό άνθρακα όσο και

---

<sup>1</sup> Είναι η διαδικασία όπου τα φυτά και τα μικροφύκη μετατρέπουν το CO<sub>2</sub> σε ζάχαρη (απαραίτητη τροφή για τους αυτότροφους οργανισμούς).

φωτισμό για την ανάπτυξη και απαιτείται ειδικός σχεδιασμός φωτο-βιοαντιδραστήρα για την καλλιέργεια μικροφυκών (Ananthi et al., 2021).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι οι ποικίλες μεταβολικές οδοί επιτρέπουν στα μικροφύκη να προσαρμοστούν και να χρησιμοποιούν διαφορετικές πηγές ενέργειας και άνθρακα. Οι τρόποι καλλιέργειας μικροφυκών μπορεί να είναι ευέλικτοι ανάλογα με τη διαθεσιμότητα φωτός, CO<sub>2</sub> και οργανικού άνθρακα. Αν και η φωτοαυτότροφη είναι η κυρίαρχη καλλιέργεια, όλα τα άλλα είδη καλλιέργειας έχουν τα δικά τους πλεονεκτήματα που τα καθιστούν κατάλληλα για μια ποικιλία εφαρμογών (Daneshvar et al., 2021a).



**Σχήμα 1.1** Διάφορες μεταβολικές δυνατότητες των φυκών.

#### 1.4 Παράγοντες αύξησης μικροφυκών

Τα μικροφύκη έχουν παρόμοιες τροφικές απαιτήσεις με τα ανώτερα φυτά. Οι κυριότεροι παράγοντες που καθορίζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών και είναι απαραίτητο να λαμβάνονται, σε κάθε περίπτωση, υπόψη είναι το φως, η θερμοκρασία, τα θρεπτικά (C, N, P, ιχνοστοιχεία), το PH του θρεπτικού μέσου, ο αερισμός και οι επιμολύνσεις (Daneshvar et al., 2021a).

### 1.4.1 Φως

Η διάρκεια, η ένταση και η ποιότητα του φωτός που φτάνει στα μικροφύκη είναι καθοριστικοί παράγοντες για την ανάπτυξή τους. Πιο συγκεκριμένα, ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροφυκών αυξάνεται με την αύξηση της έντασης της ακτινοβολίας μέχρι ένα όριο. Τα περισσότερα μικροφύκη, ανάλογα με την πυκνότητα της καλλιέργειας, κυμαίνονται σε ένταση φωτισμού μεταξύ 200 – 400  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Daneshvar et al., 2021a). Το φως είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των μικροφυκών όμως η ακτινοβολία υψηλής φωτεινής έντασης μπορεί να προκαλέσει αναστολή των φωτοχημικών αντιδράσεων, φωτοοξειδωση, φωτοαναστολή, καταστροφή φωτοχρωστικών, κυτοχρωμάτων και άλλων συστατικών της φωτοσυνθετικής συστήματος, με αποτέλεσμα την ελάττωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης. Τέλος, η πηγή φωτός μπορεί να είναι είτε φυσική (ήλιος) είτε τεχνητή (λαμπτήρες), ανάλογα με τον τύπο της καλλιέργειας (Γκέλης, 2015).

### 1.4.2 Θερμοκρασία

Μετά το φως, καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη των μικροφυκών, είναι η θερμοκρασία. Το πιο σύνηθες εύρος θερμοκρασίας που μπορούν να αναπτυχθούν τα μικροφύκη είναι 20 – 30 °C. Υπάρχουν και θερμοφιλά είδη που μπορούν να αναπτυχθούν σε έως 40 °C και ψυχρόφιλα είδη τα οποία έχουν την ικανότητα να αντέξουν θερμοκρασίες μέχρι και 15 °C χαμηλότερες από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες συχνά μειώνουν την αύξηση των μικροφυκών διότι επιβραδύνουν τις κυτταρικές διεργασίες, περιορίζουν την πρόσληψη του αζώτου και σε ορισμένες περιπτώσεις επηρεάζουν τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Όταν ο σκοπός είναι η βέλτιστη αύξηση των μικροφυκών τότε είναι απαραίτητη η εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας για το συγκεκριμένο είδος ή στέλεχος. Τέλος, στους φωτο-βιοαντιδραστήρες που είναι εγκατεστημένοι στην Ελλάδα ή σε χώρες με παρόμοιο κλίμα, όπου κατά τους θερινούς μήνες η θερμοκρασία μπορεί να αγγίξει τους 55 °C, συνήθως υπάρχει εγκατεστημένο σύστημα ψύξης της καλλιέργειας (Daneshvar et al., 2021a).

### 1.4.3 pH

Τα μικροφύκη κυμαίνονται στην ουδέτερη περιοχή pH (7,0 – 7,5) και ελαφρώς στην αλκαλική (8,0 – 9,0). Ωστόσο, υπάρχουν οξεόφιλα και αλκαλόφιλα είδη. Στις καλλιέργειες των

μικροφυκών υπάρχει η τάση να αυξάνεται το pH. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι για τις τιμές pH όπου αναπτύσσονται τα περισσότερα μικροφύκη, το CO<sub>2</sub> βρίσκεται είτε με μορφή διττανθρακικού (HCO<sup>-</sup>) είτε σε μορφή ανθρακικού ιόντος (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) δηλαδή κατά τη φωτοσύνθεση και κατά τη μετατροπή των ανθρακικών ιόντων σε CO<sub>2</sub> και τη δέσμευσή του, παράγονται ιόντα OH<sup>-</sup> τα οποία αυξάνουν το pH. Έπειτα οι απότομες αλλαγές στο pH μπορεί να είναι καταστροφικές σε μια καλλιέργεια επομένως, για να αποφευχθεί αυτό ένας τρόπος είναι να χρησιμοποιηθεί κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα. Ένας άλλος τρόπος είναι η παροχέτευση CO<sub>2</sub> που δεσμεύει ιόντα OH<sup>-</sup> για την παραγωγή HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> αλλιώς η ρύθμιση του pH γίνεται με διάφορα οξέα (ανόργανα και οργανικά) (Daneshvar et al., 2021a).

#### 1.4.4 Θρεπτικά συστατικά

Τα θρεπτικά στοιχεία (μακροστοιχεία) που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροφυκών είναι ο άνθρακας (C), το άζωτο (N), ο φώσφορος (P), το κάλιο (K) και σε ορισμένες περιπτώσεις το πυρίτιο (Si). Επιπλέον τα αναγκαία μικροστοιχεία είναι το θείο (S), ο σίδηρος (Fe), το μαγνήσιο (Mg), το ασβέστιο (Ca), καθώς και διάφορα άλλα μέταλλα (Daneshvar et al., 2021a).

Τα μικροφύκη αναπτύσσονται και φυσικά στα νερά όμως σε πολύ μικρότερες ποσότητες και αναλογίες από ότι στα θρεπτικά μέσα στα οποία συνήθως καλλιεργούνται τα μικροφύκη. Δηλαδή έστω ότι στα υδάτινα ενδιαιτήματα το φως είναι αρκετό, η αύξηση περιορίζεται και πάλι από εκείνα τα θρεπτικά στοιχεία των οποίων οι περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις βρίσκονται στα ελάχιστα απαιτούμενα επίπεδα. Για το λόγο αυτό, στις καλλιέργειες είναι απαραίτητο η γνώση στις επακριβώς τροφικές απαιτήσεις ώστε ο οργανισμός να λαμβάνει τις σωστές ποσότητες και αναλογίες με σκοπό τη βέλτιστη ανάπτυξή του (Daneshvar et al., 2021a). Τέλος, η επιλογή του θρεπτικού διαλύματος εξαρτάται τόσο από το είδος του οργανισμού όσο και από τον τύπο της καλλιέργειας. Στις πειραματικές καλλιέργειες εργαστηρίου παρασκευάζονται θρεπτικά μέσα με καθαρές χημικές ουσίες ενώ στις εμπορικές καλλιέργειες λόγω του όγκου της παραγωγής με συνέπεια του κόστους, χρησιμοποιούνται κοινά λιπάσματα ή υγρά απόβλητα από διάφορες μονάδες (Daneshvar et al., 2021a).

##### 1.4.4.1 Άνθρακας

Όλοι οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί επομένως και τα μικροφύκη έχουν ως βασική μεταβολική διεργασία τη μετατροπή της ηλιακής ενέργειας και του CO<sub>2</sub> μέσω πολύπλοκων βιοχημικών

διεργασιών σε οργανικό άνθρακα (γλυκόζη). Λόγω του ότι η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα είναι περίπου 0,04%, μια καλλιέργεια μικροφυκών απαιτεί να παροχετεύονται μεγάλοι όγκοι αέρα. Τα περισσότερα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει ως και 15% διαλυμένο CO<sub>2</sub>. Το CO<sub>2</sub> μπορεί να παρέχεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είτε χρησιμοποιώντας μη τοξικά καυσάερια από παραγωγικές δραστηριότητες είτε χρησιμοποιώντας διάφορα ανθρακικά άλατα (π.χ. ανθρακική σόδα). Επίσης, τα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται αξιοποιώντας διάφορες οργανικές ουσίες τις οποίες απορροφούν με συγκεκριμένους μηχανισμούς ανάλογα με την οργανική ουσία (Daneshvar et al., 2021a).

#### 1.4.4.2 Άζωτο

Το άζωτο αποτελεί μέρος των σημαντικότερων μακρομορίων (πρωτεΐνες, DNA, RNA). Η πρόσληψη του αζώτου γίνεται κυρίως με τη μορφή αμμωνιακών ή νιτρικών αλάτων. Τα φύκη γενικά προτιμούν την πρόσληψη αζώτου με τη μορφή αμμωνιακών ιόντων διότι έτσι δεν απαιτείται κάποια μετατροπή. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις έχει αποδειχθεί ότι επιτυγχάνεται μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας με την παροχή νιτρικών αλάτων (Daneshvar et al., 2021a).

#### 1.4.4.3 Φώσφορος

Ο φώσφορος προσλαμβάνεται από τα μικροφύκη με τη μορφή ορθοφωσφορικών ιόντων (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) και η διαλυτότητα του επηρεάζεται πολλές φορές από την παρουσία ιόντων. Όταν ο φώσφορος είναι διαθέσιμος μόνο σε οργανική μορφή τότε ορισμένα φύκη έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν φωσφατάσεις ώστε να μετατρέψουν τον οργανικό φώσφορο σε ορθοφωσφορικά ιόντα. Κάποια μικροφύκη (π.χ. κυανοβακτήρια) μπορούν να αποθηκεύσουν το φώσφορο στο κύτταρο υπό μορφή κόκκων πολυφωσφορικού οξέος και έτσι μπορεί να καλυφθούν οι ανάγκες δύο ή ακόμα και τριών γενεών (Daneshvar et al., 2021a).

### 1.5 Βιο-προϊόντα μικροφυκών

Η ενασχόληση με τα μικροφύκη γίνεται με σκοπό την παραγωγή βιο-προϊόντων. Από την ανακτημένη βιομάζα μικροφυκών μπορούν να παραχθούν χρωστικές, λιπίδια, αμινοξέα, υδατάνθρακες, βιταμίνες και μέταλλα, πολυμερή, φυτοστερόλες, φαινόλες και τοξίνες. Τα πιο

συνήθη βιο-προϊόντα είναι οι υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια και χρωστικές με εφαρμογές σε μεγάλες βιομηχανίες.

Τα βασικότερα είδη υδατανθράκων που παράγονται από τα μικροφύκη είναι το άμυλο, β-1-2-γλυκάνη και κυτταρίνη. Οι υδατάνθρακες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτες ύλες στην παραγωγή μέσω ενζύμων ή βακτηρίων βιοχημικών, βιοπολυμερών και βιοκαυσίμων (Πενλόγλου et al., 2019)

Οι πρωτεΐνες που παράγονται από τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται σε βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών και καλλυντικών (Κούτρα, 2019).

Τα είδη των λιπιδίων είναι οι υδρογονάνθρακες, TAGs και PUFAs. Τα λιπίδια απομονώνονται από τη βιομάζα με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή βιοντίζελ, σε βιομηχανίες καλλυντικών καθώς και βιομηχανίες ζωοτροφών και τροφίμων (Κούτρα, 2019).

Οι βασικότερες χρωστικές είναι οι χλωροφύλλες α & β, β-καροτένιο, ασταξανθίνη και φυκομπαλίνες. Οι χρωστικές αυτές βρίσκουν εφαρμογή στην παραγωγή χρωστικών ουσιών, καλλυντικών, πρόσθετα τροφίμων και ζωοτροφών ακόμα και σε φαρμακευτικά προϊόντα (Koller et al., 2014).

## **1.6 Συστήματα καλλιέργειας**

Η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε κλειστούς ή ανοιχτούς τύπους. Οι κλειστού τύπου καλλιέργειες μπορεί να θεωρηθούν μια απλή γυάλινη ή πλαστική κωνική φιάλη έως και πολύπλοκες κατασκευές που ονομάζονται φωτο-βιοαντιδραστήρες. Στις κλειστού τύπου καλλιέργειες τα μικροφύκη αναπτύσσονται απομονωμένα από το εξωτερικό περιβάλλον, προστατευμένα από τους περιβαλλοντικούς κινδύνους και χωρίς να μεταβάλλονται οι συνθήκες της καλλιέργειας. Από την άλλη, στις ανοιχτού τύπου καλλιέργειες, τα μικροφύκη αναπτύσσονται σε δεξαμενές, νερόλακκους, λίμνες ή ακόμα και απευθείας στην ανοιχτή θάλασσα.

### **1.6.1 Κλειστού τύπου καλλιέργειες**

#### **1.6.1.1 Στατικές καλλιέργειες**

Στις στατικές καλλιέργειες ή καλλιέργειες δέσμης ο όγκος του θρεπτικού μέσου παραμένει σταθερός έως και την ολοκλήρωση της καλλιέργειας των μικροφυκών. Αυτός ο τύπος καλλιέργειας χρησιμοποιείται κυρίως για τη συντήρηση αποθέματος καλλιεργειών, την απομόνωση στελεχών και τη δημιουργία νέων καλλιεργειών, τη διερεύνηση του ρυθμού

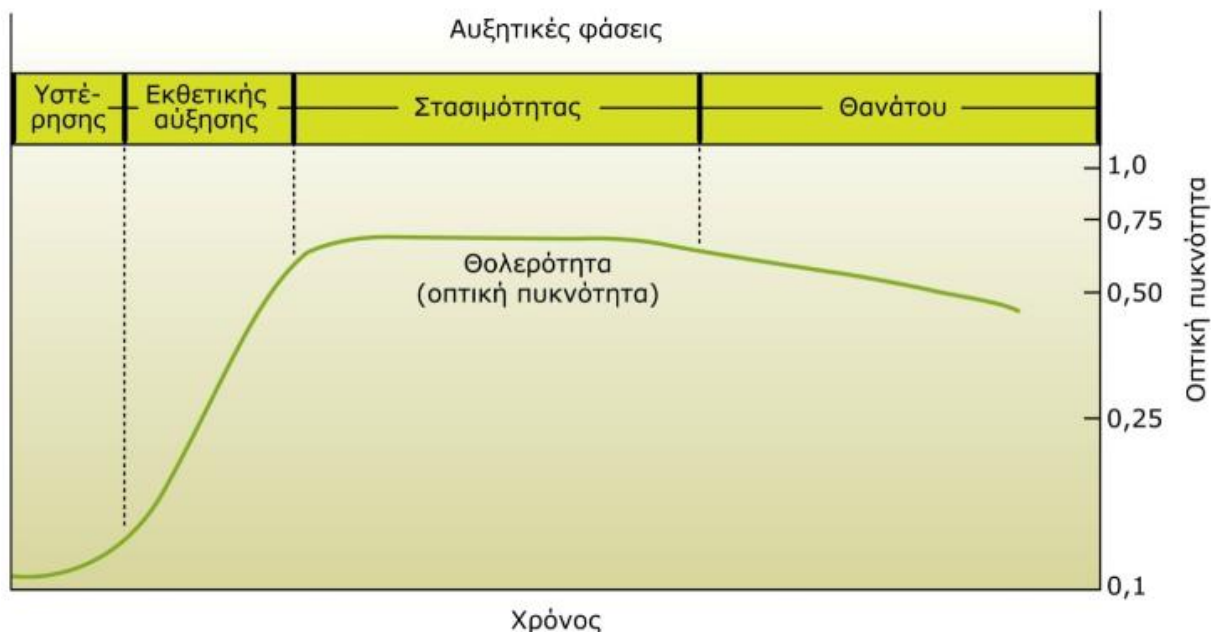


αύξησης ή των αναπτυξιακών φάσεων ενός φύκου. Οι στατικές καλλιέργειες μπορεί να γίνουν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, τριβλία Petri, κωνικές φιάλες ή διαφανείς σάκους πολυαιθυλενίου. Η μοναδική επέμβαση που γίνεται στις συγκεκριμένες καλλιέργειες είναι η περιοδική ή συνεχής ανάμιξη του θρεπτικού μέσου. Η ανάμιξη αυτή επιτυγχάνεται είτε με μηχανική ανάδευση ολόκληρου του δοχείου της καλλιέργειας είτε με παροχή αέρα στη βάση των δοχείων καλλιέργειας.

Μια τροποποίηση των στατικών καλλιεργειών είναι οι **ημι-συνεχείς καλλιέργειες**. Πιο συγκεκριμένα, στις ημι-συνεχείς καλλιέργειες γίνεται περιοδική λήψη συγκεκριμένου όγκου καλλιέργειας και αναπλήρωσή του με ισόποσο όγκο θρεπτικού μέσου. Αυτός ο τρόπος παραγωγής είναι ευρέως γνωστός σε καλλιέργειες μικροφυκών που χρησιμοποιούνται ως τροφή σε ιχθυοκαλλιέργειες.

Ένα σύστημα παραγωγής ξεκινάει με τον ενοφθαλμισμό, δηλαδή τη μεταφορά ζώντων κυττάρων στο μέσον ανάπτυξης. Καθοριστική σημασία για την εξέλιξη της καλλιέργειας έχει ο τρόπος και η ποσότητα του αρχικού εμβολίου καθώς έτσι επηρεάζεται η καθαρότητα της καλλιέργειας. Για να χαρακτηριστεί ως επιτυχημένος ένας ενοφθαλμισμός είναι αναγκαία η χρήση αποστειρωμένων σκευών καθώς και η χρήση κατάλληλων εγκαταστάσεων.

Ο κύκλος αύξησης ενός μικροφύκου που καλλιεργείται σε στατικό κλειστό σύστημα αναπαρίσταται στο **(Σχήμα 1.2)**. Αρχικά είναι η **λανθάνουσα φάση ή φάση υστέρησης** η οποία είναι μια φάση προσαρμογής που ξεκινά από τον εμβολιασμό έως και την αρχή αύξησης του μικροοργανισμού και κατά την οποία ο οργανισμός δεν αυξάνεται. Αμέσως μετά ξεκινά η **εκθετική φάση** όπου αυξάνεται ο αριθμός των ατόμων. Έπειτα εφόσον οι φυσικοί και οι χημικοί παράγοντες το επιβάλλουν, η καλλιέργεια εισέρχεται στη **φάση στασιμότητας** κατά την οποία δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού των ατόμων. Τέλος, είναι η **φάση θανάτου** όπου παρουσιάζεται εκθετική μείωση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων (Γκέλης, 2015).



**Σχήμα 1.2** Κύκλος αύξησης μικροοργανισμών σε κλειστά συστήματα.

#### 1.6.1.2 Συνεχείς καλλιέργειες – Φωτο-βιοαντιδραστήρες

Στις συνεχείς καλλιέργειες γίνεται σταδιακή αφαίρεση όγκου καλλιέργειας και ταυτόχρονη προσθήκη ισόποσου όγκου θρεπτικού μέσου. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται υψηλότερος ρυθμός αύξησης και μεγαλύτερος βαθμός ασφαλείας σε ποιοτικά μεγέθη των προϊόντων της καλλιέργειας. Συνεχείς καλλιέργειες εμφανίζονται σε πειραματικό επίπεδο για παραγωγή βιομάζας με σκοπό τη χρήση σε φαρμακοβιομηχανίες, για μετάβαση από μικρότερου σε μεγαλύτερου όγκου εμπορικές καλλιέργειες καθώς και σε μικρής – μεσαίας κλίμακας εμπορικές καλλιέργειες.

Οι κλειστού τύπου καλλιέργειες πραγματοποιούνται στους φωτο-βιοαντιδραστήρες. Τα είδη των φωτο-βιοαντιδραστήρων είναι: επίπεδοι ή κεκλιμένο, κυλινδρικοί με επιμήκης αγωγούς κατασκευασμένοι από γυαλί ή πλαστικό ή ελικοειδούς μορφής. Οι φωτο-βιοαντιδραστήρες απαρτίζονται από σύστημα φωτισμού, σύστημα εμπλουτισμού  $\text{CO}_2$ , σύστημα ανάδευσης, σύστημα απομάκρυνσης  $\text{O}_2$  και διαχωρισμό αερίων, σύστημα θέρμανσης/ψύξης και σύστημα θρέψης.

Τα πλεονεκτήματα των βιοαντιδραστήρων σε σχέση με τις ανοικτές δεξαμενές είναι ότι ο κίνδυνος για μολύνσεις είναι χαμηλός, απαιτούν μικρό χώρο, δεν υπάρχει απώλεια νερού και

CO<sub>2</sub>, όλα τα μικροφύκη μπορούν να καλλιεργηθούν, η καλλιέργεια είναι ελεγχόμενη και οι καιρικές συνθήκες αδιάφορες. Επίσης, η συγκέντρωση της βιομάζας κατά την περίοδο της παραγωγής είναι υψηλή. Από την άλλη, οι φωτο-βιοαντιδραστήρες έχουν αυξημένο κόστος κατασκευής και λειτουργίας. Επιπρόσθετα, είναι δύσκολο να εφαρμοστούν σε μεγάλη κλίμακα. Ο λόγος είναι το μοριακό οξυγόνο που παράγεται κατά τη φωτοσύνθεση διαλύεται σε θρεπτικό μέσο και πρέπει να απομακρύνεται αλλιώς περιορίζει την ανάπτυξη. Το γεγονός αυτό επηρεάζει το μήκος των αγωγών.

### **1.6.2 Ανοικτού τύπου καλλιέργειες**

Οι ανοικτού τύπου καλλιέργειες αναπτύσσονται είτε σε φυσικά συστήματα (λίμνες, θάλασσες) είτε σε τεχνητά (υδατοσυλλογές, δεξαμενές κυρίως με τη μορφή υδατοδιαδρόμου). Τα πλεονεκτήματα των ανοικτών καλλιεργειών σε σχέση με των κλειστών είναι το χαμηλό κόστος κατασκευής και λειτουργίας και η δυνατότητα μαζικής καλλιέργειας. όμως, δεν θα μπορούσαν να παραλειφθούν τα αρνητικά τα οποία είναι η έκθεση των φυκών στις καιρικές συνθήκες, οι επιμολύνσεις από διάφορα άλλα είδη μικροφυκών, η απώλεια σημαντικών ποσοτήτων νερού λόγω της εξάτμισης και η αύξηση της συγκέντρωσης των αλάτων. Επιπλέον η παραγωγή ανά μονάδα επιφάνειας είναι μικρότερη σε σχέση με τις κλειστού τύπου με αποτέλεσμα να ανεβαίνει το κόστος συγκομιδής.

Οι ανοικτές καλλιέργειες είναι αναγκαίο να έχουν σύστημα ανάδευσης ώστε να εμποδίζεται η συσσωμάτωση και καθίζηση των μικροφυκών, να ομογενοποιείται το υπόστρωμα και να υπάρχει καλύτερη κατανομή του φωτός. Οι κυριότεροι τύποι ανοικτών δεξαμενών είναι οι υδατοδιάδρομοι και οι κυκλικές δεξαμενές. Οι υδατοδιάδρομοι είναι ένα σύστημα καναλιών, ωοειδούς σχήματος όπου παρέχεται συνεχής ανάμιξη, συνήθως με πτερυγτώ τροχό για αύξηση της παραγωγικότητας. Στις κυκλικές δεξαμενές η ανάδευση γίνεται με κινούμενο βραχίονα. Τέλος, βασική παράμετρος για το σχεδιασμό ανοικτού τύπου δεξαμενών αποτελεί το βάθος το οποίο πρέπει να κυμαίνεται 0,2 – 0,3 m για τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης.

### **1.7 Τρόποι ανάκτησης μικροφυκών**

Με τον όρο ανάκτηση μικροφυκών νοείται η απομόνωση της βιομάζας με διάφορους τρόπους που έχει ως σκοπό την περεταίρω επεξεργασία της και χρήση της στην παραγωγή. Οι τρόποι

ανάκτησης είναι: διήθηση μέσω φίλτρων, φυγοκέντριση, χημική κροκίδωση, ηλεκτροκροκίδωση, βιοκροκίδωση, επίπλευση.

### 1.7.1 Διήθηση

Η διήθηση φίλτρων κατά την οποία χρησιμοποιείται αντλία υπό πίεση ή υπό κενό, μπορεί να ανακτήσει σχετικά μεγάλου μεγέθους μικροφύκη. Επιπλέον η χρήση διατομικής γης (διοξείδιο του πυριτίου και άλλα ενεργά οξείδια) ή η κυτταρίνη ως προεπικαλυπτώμενη στρώση, μπορεί να κάνει πιο αποτελεσματική τη διήθηση του περιστροφικού φίλτρου δίσκων και να γίνεται περισσότερη ανάκτηση βιομάζας μικροφυκών (Molina Grima et al., 2003). Ωστόσο είναι δύσκολος ο διαχωρισμός της προεπικαλυπτώμενης στρώσης από την ανακτημένη βιομάζα. Από την άλλη, για μικρά είδη μικροφυκών (2-40  $\mu\text{m}$ ) χρησιμοποιείται μικροδιήθηση με φίλτρα μεμβράνης. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροδιήθηση εγκάρσιας ροής είναι το μέγεθος πόρων, η ταχύτητα ροής, η διαμεμβρανική πίεση (TMP) καθώς και ο τύπος των μεμβρανών επηρεάζει τη διαπερατότητα. Αξίζει να σημειωθεί ότι μια κεραμική μεμβράνη είναι πιο κατάλληλη για την ανάκτηση βιομάζας μικροφυκών από την πολυμερή. Στη συνέχεια, η αύξηση της διαμεμβρανικής πίεσης μπορεί να αυξήσει τη ροή διείσδυσης αλλά συγχρόνως αυξάνει και το βαθμό μόλυνσεως. Από την άλλη, εάν αυξηθεί η πίεση στη μεμβράνη και συγχρόνως αυξηθεί η ταχύτητα περιστροφής μπορεί να μειώσει τη ρύπανση (Rios et al., 2011). Η δυναμική μικροδιήθηση είναι πιο οικονομική μέθοδος από τη διήθηση εγκάρσιας ροής.

Μια εναλλακτική μέθοδος ανάκτησης βιομάζας είναι η υπερδιήθηση. Κατά την υπερδιήθηση εγκάρσιας ροής η ροή διείσδυσης είναι η ίδια ή υψηλότερη σε σχέση με τη μικροδιήθηση (Chen et al., 2015).

### 1.7.2 Φυγοκέντριση

Η φυγοκέντριση είναι άλλη μια διαδικασία ανάκτησης βιομάζας όπου χρησιμοποιείται η φυγόκεντρος δύναμη για το διαχωρισμό των μικροφυκών από το ελαιώρημα. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία της φυγοκέντρισης είναι το είδος των μικροφυκών, ο χρόνος παραμονής και το βάθος των φιαλιδίων που θα χρειαστεί να καθιζάνουν τα μικροφύκη.

Οι πιο κοινοί τύποι φυγοκέντρισης είναι η φυγοκέντριση δίσκου, οριζόντια φυγοκέντριση και οι υδροκυκλώνες. Από αυτές τις τρεις μεθόδους, οι υδροκυκλώνες έχουν τη χαμηλότερη κατανάλωση ενέργειας ταυτοχρόνως όμως έχουν και τη χειρότερη απόδοση. Από την άλλη η

φυγοκέντριση δίσκου είναι η ιδανικότερη μέθοδος για διαχωρισμό μικροφυκών λόγω ότι μπορεί να διαχωρίσει υλικά με διαφορετικές πυκνότητες σε πολλά λεπτά στρώματα. Όχι μόνο έχει τη δυνατότητα να διαχωρίσει στερεό με υγρό αλλά και υγρό με υγρό ή ακόμα και υγρό/υγρό/στερεό. Έπειτα η οριζόντια φυγοκέντριση μπορεί να προσφέρει ένα πιο συγκεντρωμένο αποτέλεσμα όμως έχει μικρότερη απόδοση σε ανάκτηση βιομάζας από τη φυγοκέντριση δίσκων και χρησιμοποιεί περισσότερη ενέργεια (Chen et al., 2015).

Παρόλο τη θετική συμβολή της φυγοκέντρισης στην ανάκτηση βιομάζας μικροφυκών, έχει κάποια αρνητικά. Ένα αρνητικό είναι οι υψηλές βαρυτικές και διατμητικές δυνάμεις που μπορεί να καταστρέψουν την κυτταρική δομή. Επιπλέον η διαδικασία αυτή είναι χρονοβόρα, ειδικότερα όταν εφαρμόζεται σε μεγαλύτερη κλίμακα. Τέλος, το κόστος και η ενέργεια είναι εξίσου υψηλά (Chen et al., 2015).

### 1.7.3 Χημική κροκίδωση

Με τη μέθοδο της κροκίδωσης εξουδετερώνεται το φορτίο στην επιφάνεια των μικροφυκών. Προσθέτοντας κατιόντα με φορτίο +3, όπως θειικό αλουμίνιο ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ) και χλωριούχο πολυαλουμίνιο (PAC) μπορούν να εξουδετερώσουν πλήρως το αρνητικό φορτίο των κυττάρων των μικροφυκών. Από την άλλη, εάν χρησιμοποιηθούν άλατα πολυσθενών μετάλλων, η βιομάζα των μικροφυκών θα μολυνθεί, έτσι θα περιπλέξει τη μεταγενέστερη επεξεργασία (Chen et al., 2015).

Αξίζει να σημειωθεί ότι πολυμερικά κροκιδωτικά, αμφότερα φυσικά (π.χ. πολυσακχαρίτες) και συνθετικά (π.χ. πολυακρυλαμίδιο), είναι ικανά να ανακτήσουν τη βιομάζα σε ικανοποιητικό βαθμό. Ωστόσο λόγω του ότι τα φυσικά κροκιδωτικά έχουν χαμηλότερα μοριακά βάρη και μικρότερη διάρκεια ζωής, είναι πιθανό να απαιτηθεί υψηλότερη δόση φυσικών κροκιδωτικών για να υπάρξει απόδοση. Αντίθετα, τα κατιονικά πολυμερή λόγω της ικανότητάς τους να εξουδετερώνουν το φορτίο και των υψηλών μοριακών βαρών έχουν μεγαλύτερη απόδοση από τα φυσικά πολυμερή. Ορισμένα όμως κατιονικά πολυακρυλαμίδια είναι λιγότερο αποτελεσματικά ως προς τα μικροφύκη σε σχέση με τα παραδοσιακά κροκιδωτικά, όπως το  $\text{Al}^{3+}$  και το  $\text{Fe}^{3+}$  (Chen et al., 2015).

Η χιτοζάνη, η οποία παράγεται από την αποακετυλίωση της χιτίνης, είναι ένα φυσικά υδρόφιλο πολυμερές με θετικό φορτίο. Λόγω του μοναδικού συνδυασμού ιδιοτήτων της, συμπεριλαμβανομένων της βιοαποδομησιμότητας, βιοσυμβατότητας, ανανεώσιμη ικανότητα,

βιοδραστηριότητα, οικολογική αποδοχή και των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων, η χιτοζάνη θεωρείται ένα σημαντικό βιοπολυμερές με ποικίλες εφαρμογές (Chen et al., 2014). Η χιτοζάνη συγκρινόμενη με τα παραδοσιακά κροκιδωτικά, επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα με μικρότερη δόση. Επιπλέον, είναι μη τοξική και δεν προκαλεί βλάβη στις επόμενες διαδικασίες (Chen et al., 2015). Ένα μειονέκτημα της χιτοζάνης είναι το υψηλό κόστος αγοράς. Για να γίνει καλύτερα αντιληπτό, η κροκίδωση με χιτοζάνη είναι 21,7 φορές πιο ακριβή από την κροκίδωση με PAC (Tran et al., 2013).

Εκτός από τη χιτοζάνη, υπάρχουν κι άλλα φυσικά κροκιδωτικά, όπως το άμυλο και τα παράγωγά του. Τα κροκιδωτικά με βάση το άμυλο χρησιμοποιούνται ευρέως για ανάκτηση βιομάζας μικροφυκών διότι είναι οικονομικά και υπάρχει ένα ευρύ φάσμα. Συγκριτικά με τα παραδοσιακά κροκιδωτικά, αυτά με βάση το άμυλο έχουν μικρότερη αποτελεσματικότητα (Rakesh et al., 2014). Ωστόσο η κυτταρική πυκνότητα με χρήση κροκιδωτικού με βάση το άμυλο είναι υψηλότερη από αυτή των παραδοσιακών κροκιδωτικών.

Η καθίζηση των περισσότερων μικροφυκών θεωρείται ως ελεύθερη καθίζηση, εκτός από εκείνα τα μικροφύκη που πήζουν από μόνα τους επειδή η συγκέντρωση βιομάζας του εναιωρήματος είναι πολύ χαμηλή για να παρέμβουν τα κύτταρα μεταξύ τους. Ο νόμος του Stokes υποθέτει ότι η ταχύτητα καθίζησης είναι ανάλογη με το τετράγωνο της ακτίνας των μικροφυκών και η διαφορά πυκνότητας μεταξύ των μικροφυκών και του μέσου, χρησιμοποιείται έτσι ώστε να περιγράψει τη συμπεριφορά της ιζηματογένεσης των μικροφυκών. Η εξίσωση του νόμου είναι η εξής:

$$\text{Ταχύτητα καθίζησης} = \frac{2(\rho_s - \rho_l)}{9\eta} gr^2$$

Όπου,  $\rho_s$  και  $\rho_l$ , οι πυκνότητες του στερεού και του υγρού αντίστοιχα,  $\eta$  είναι το μέσο δυναμικό ιξώδες και  $r$  είναι η ακτίνα των κυττάρων των μικροφυκών. Στην πράξη όμως, υπάρχουν πάρα πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό καθίζησης των μικροφυκών. Κάποιοι από τους παράγοντες είναι το είδος, το σχήμα, η επιφάνεια, το pH και η σύνθεση του μέσου.

Η κροκίδωση αν και αποτελεσματική έχει κάποια σημαντικά μειονεκτήματα. Αρχικά, λόγω της προσθήκης χημικών κροκιδωτικών, μια σημαντική πρώτη ύλη, μετατρέπεται σε λάσπη αποβλήτων και απορρίπτεται. Επιπρόσθετα, τα προστιθέμενα άλατα αυξάνουν την αλατότητα στο διάλυμα και προκαλούν δευτερογενή ρύπανση (Jiang et al., 1993).

#### 1.7.4 Ηλεκτροκροκίδωση

Η ηλεκτροκροκίδωση εφαρμόζεται στην επεξεργασία λυμάτων. Η χρήση της είναι εύκολη με χαμηλή χρήση χημικών και δεν παραμένουν υπολειμματικά ανιόντα (π.χ. χλωριούχο και θειικό) στο διάλυμα. Η ηλεκτροκροκίδωση, λοιπόν, έχει γίνει μια βασική εναλλακτική λύση στις συμβατικές διαδικασίες κροκίδωσης. Δεδομένου ότι οι φλόκοι που δημιουργούνται από τη διαδικασία της ηλεκτροκροκίδωσης, συνήθως συνοδεύονται από μικρές μικροφυσαλίδες που δημιουργούνται από μεταλλικές ανόδους, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος συλλογής των αδρανών που προκύπτουν είναι η επίπλευση. Οι παράγοντες που επηρεάζουν αυτή τη διαδικασία είναι το ηλεκτροϋλικό, η τάση ηλεκτρόλυσης, η πυκνότητα του ρεύματος, ο χρόνος ηλεκτρόλυσης και οι λοιπές ιδιότητες είναι το pH και η σύνθεση του εναιωρήματος μικροφυκών. Η αποσταθεροποίηση της διασποράς του εναιωρήματος μικροφυκών γίνεται καλύτερα με ηλεκτροκροκίδωση με ηλεκτρόδιο αλουμινίου παρά με ηλεκτρόδιο σιδήρου (Dassey & Theegala, 2014). Η απόδοση της κροκίδωσης αυξάνεται παράλληλα με την κατανάλωση ενέργειας, η οποία αυξάνεται λόγω της προσθήκης τάσης ηλεκτρόλυσης ή ρεύματος. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα της κροκίδωσης αυξάνεται και με το χρόνο αντίδρασης (Chen et al., 2015).

#### 1.7.5 Βιοκροκίδωση

Τα βιοκροκιδωτικά μπορεί να είναι προϊόντα από βακτήρια (Kim et al., 2011), μικροφύκη και μύκητες (Chen et al., 2015). Τα κύρια συστατικά των βιοκροκιδωτικών είναι οι υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, χουμικές ουσίες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και επιφανειοδραστικές ουσίες από βακτήρια. Τα συγκεκριμένα κροκιδωτικά ορίζονται ως καψοειδή, λάσπη, χαλαρά δεσμευμένα και στενά συνδεδεμένα με τη βάση της φύσης τους, της συσχέτισης με τα κύτταρα ή τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή τους από τα βακτηριακά κύτταρα (More et al., 2014). Τα βιοκροκιδωτικά από βακτήρια έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε εφαρμογές που σχετίζονται με την επεξεργασία νερού, την κροκίδωση και καθίζηση λυμάτων, αφυδάτωση λάσπης, αφαίρεση ή ανάκτηση μετάλλων, απομάκρυνση τοξικών οργανικών ενώσεων, στραγγίσματα χωματερής και αποκατάσταση του εδάφους (More et al., 2014). Μερικά από τα βακτηριακά βιοκροκιδωτικά που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία λυμάτων μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη συλλογή μικροφυκών, όπως το *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus quadricauda*, *Selenastrum capricornutum* και *C. Vulgaris*. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα βιοκροκιδωτικά έχουν σημαντικές δυνατότητες (Wan et al., 2013) και είναι πιο αποτελεσματικά, όσον αφορά την κροκίδωση μικροφυκών, από τα χημικά κροκιδωτικά. Ωστόσο το πρόβλημα με τα

βιοκροκιδωτικά από βακτήρια είναι το υψηλό κόστος για τον καθαρισμό, ο οποίος αποτελείται από φυγοκέντριση σε χαμηλή θερμοκρασία και πλύσιμο με διαλύτη.

Ένας άλλος τύπος βιοκροκίδωσης είναι η χρήση αυτοκροκιδωτικών μικροφυκών για να συσσωματώνουν τα μη-κροκιδωτικά μικροφύκη (Salim et al., 2011). Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η χαμηλή κατανάλωση ενέργειας. Όμως η καλύτερη απόδοση είναι μόνο περίπου στο 72% (Salim et al., 2011).

Ένα άλλο είδος βιοκροκίδωσης είναι η χρήση νηματοειδών μυκητών όπως ο *Aspergillus* sp. και ο *Cunninghamella echinulatato*. Πιο συγκεκριμένα, η ανάκτηση βιομάζας μικροφυκών με μύκητες επιτρέπει σχεδόν την πλήρη απομάκρυνση των μικροφυκών από το υγρό μέσο δημιουργώντας σφαιρίδια (pellets). Τα pellets μπορούν να συλλεχθούν απευθείας χρησιμοποιώντας κόσκινο, λόγω του μεγάλου μεγέθους τους. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ο μεγάλος χρόνος συγκαλλιέργειας.

#### 1.7.6 Επίπλευση

Η επίπλευση είναι άλλη μια κοινή μέθοδος ανάκτησης βιομάζας μικροφυκών. Τα είδη επίπλευσης είναι η επίπλευση με διαλυμένο αέρα, ηλεκτρολυτική επίπλευση και επίπλευση με διασκορπισμένο αέρα. Η επίπλευση με διαλυμένο αέρα απαιτεί υψηλή πίεση για να διαλύσει τον αέρα στο νερό και μετά δημιουργούνται φυσαλίδες με μέσο μέγεθος 40 μm λόγω της υψηλής πίεσης. Στη συνέχεια η ηλεκτρολυτική επίπλευση είναι συνδυασμός ηλεκτροκροκίδωσης και παραγωγής φυσαλίδων από την άνοδο του O<sub>2</sub> και την κάθοδο H<sub>2</sub>. Πάραυτα, η παραγωγή φυσαλίδων δεν είναι αρκετό για να κάνει όλα τα κύτταρα να επιπλεύσουν. Από την άλλη η επίπλευση με διασκορπισμένο αέρα χρησιμοποιεί ανάδευση σε συνδυασμό με έγχυση αέρα ή φυσαλίδες αέρα μέσω ενός πορώδους μέσου για την παραγωγή μεγάλων φυσαλίδων με μέγεθος περίπου 1 mm (Chen et al., 2015).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της επίπλευσης είναι ο τύπος του συλλέκτη (επιφανειοδραστικό ή κροκιδωτικό), το pH, η ιοντική ισχύς στο μέσο και ο τύπος του σχήματος της φυσαλίδας.

### 1.8 Τρόποι ξήρανσης μικροφυκών

Μετά την ανάκτηση της βιομάζας, το δείγμα είναι ακόμα υγρό οπότε είναι απαραίτητη η ξήρανσή της. Η ξήρανση επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους. Οι βασικότεροι είναι: 1) ξήρανση σε κλίβανο, 2) ηλιακή ξήρανση, 3) λυοφιλίωση (freeze dry) και 4) ξήρανση με ψεκασμό.



### 1.8.1 Ξήρανση σε κλίβανο

Η ξήρανση σε κλίβανο είναι ένας από τους πιο διαδεδομένους τρόπους ξήρανσης βιομάζας. Χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, το εύρος της θερμοκρασίας για ξήρανση του στελέχους *Stichococcus* sp. κυμαίνεται μεταξύ 40 – 55 °C και το ποσοστό απώλειας φυκοκυανίνης είναι περίπου 37%. Επιπλέον, η σύνθεση λιπαρών οξέων της προκύπτουσας ξηρής βιομάζας δεν διαφέρει σημαντικά από τη φρέσκια βιομάζα (Chen et al., 2015).

### 1.8.2 Ηλιακή ξήρανση

Η ηλιακή ξήρανση αποτελεί μια από τις πιο οικονομικές μεθόδους αλλά χρειάζεται περισσότερο χρόνο από τις άλλες μεθόδους ξήρανσης. Επιπλέον, είναι δύσκολο το τελικό προϊόν να είναι ικανοποιητικό καθώς λόγω της αργής ξήρανσης και των χαμηλών θερμοκρασιών είναι πολύ πιθανό η βιομάζα να μολυνθεί από βακτήρια (Chen et al., 2015). Στη συνέχεια, κάποιες κλειστές ηλιακές συσκευές ξήρανσης, μπορούν να αυξήσουν τη θερμοκρασία περιβάλλοντος στο εσωτερικό από 35 °C έως 60 °C και η υγρασία στο τελικό προϊόν είναι λιγότερο από 10% εντός 3-5 ωρών από τη ξήρανση (Prakash et al., 1997).

### 1.8.3 Λυοφιλίωση (Freeze dry)

Η λυοφιλίωση είναι ένας τρόπος ξήρανσης μικροφυκών που χρησιμοποιείται κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων και σε εργαστηριακή κλίμακα. Είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος ξήρανσης διότι όλα τα συστατικά του κυττάρου διατηρούνται χωρίς να διασπάται το κυτταρικό τοίχωμα. Επιπλέον, σε σύγκριση με τους υπόλοιπους τρόπους ξήρανσης, η λυοφιλίωση διατηρεί το μέγιστο ποσοστό πρωτεϊνών σε ξηρή βιομάζα. Από την άλλη, η χρήση του freeze dry πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή καθώς εάν τα δείγματα παγώνουν αργά, σχηματίζονται κρύσταλλοι από πάγο και προκαλείται διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος (Chen et al., 2015).

### 1.8.4 Ξήρανση με ψεκασμό

Η ξήρανση με ψεκασμό είναι μια μέθοδος που προτιμάτε όταν υπάρχουν μικροφύκη υψηλής ποιότητας. Μέσω αυτής της μεθόδου παράγεται προϊόν σκούρου πράσινου χρώματος. Τα προϊόντα που παράγονται από τη ξήρανση με ψεκασμό μπορούν να διατηρήσουν περισσότερα

θρεπτικά συστατικά σε σύγκριση με τη ξήρανση σε κλίβανο κατά την οποία υπάρχει απώλεια πρωτεϊνών 10-20%. Τέλος, η ξήρανση με ψεκασμό είναι λιγότερο επιρρεπής στη λιπόλυση κατά την αποθήκευση, αλλά τα καροτενοειδή στα ξηραμένα με ψεκασμό μικροφύκη, οξειδώνονται πιο εύκολα από τα λυοφιλωμένα μικροφύκη (Chen et al., 2015).

## 1.9 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αρχικά αποτελεί η βελτιστοποίηση ανάπτυξης και παραγωγής βιο-προϊόντων του στελέχους *Stichococcus* sp. σε εργαστηριακή κλίμακα και εν συνεχεία η κλιμάκωση του σε φωτο-βιοαντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας. Τόσο στη μικρή, όσο και στη μεγάλη κλίμακα, γίνεται τροφοδοσία μίγματος αερίου που προσομοιώνει απαέρια από μονάδα παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας με καύση φυσικού αερίου, με σκοπό τη μείωση του περιεχόμενου CO<sub>2</sub>. Ακολουθεί η σύγκριση διαφορετικών μεθόδων ανάκτησης (με στελέχη υπό αιώρηση και ακινητοποιημένα στελέχη) και ξήρανσης της βιομάζας του προαναφερθέντος στελέχους σε εργαστηριακή κλίμακα για τη βελτιστοποίηση ανάκτησης βιο-προϊόντων, έπειτα από την κάθε μέθοδο ξήρανσης.

Για την ανάκτηση της βιομάζας, εξετάστηκαν οι εξής τρόποι:

- Διήθηση μέσω φίλτρων
- Φυγοκέντρωση
- Κροκίδωση
- Απόξεση ακινητοποιημένων κυττάρων

Όσον αφορά τη ξήρανση της βιομάζας, έγινε σύγκριση μεταξύ των παρακάτω μεθόδων:

- Ξήρανση σε κλίβανο
- Ηλιακή ξήρανση
- Λυοφιλίωση (freeze dry)

Έπεται της ξήρανσης, η παραγωγή βιο-προϊόντων σε εργαστηριακή κλίμακα αλλά με προοπτική αυτές οι εφαρμογές να χρησιμοποιηθούν σε πιλοτικά και βιομηχανικά συστήματα.

Τα βιο-προϊόντα που ποσοτικοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- Λιπίδια
- Υδατάνθρακες
- Ολική χλωροφύλλη

- β-καροτένιο
- Πρωτεΐνες

Για την επίτευξη των ανωτέρων στόχων χρησιμοποιούνται πρωτόκολλα της βιβλιογραφίας (αυτούσια ή μερικώς τροποποιημένα).

## 2 Μεθοδολογία

### 2.1 Ανάπτυξη μικροφυκών

#### 2.1.1 Εργαστηριακή κλίμακα

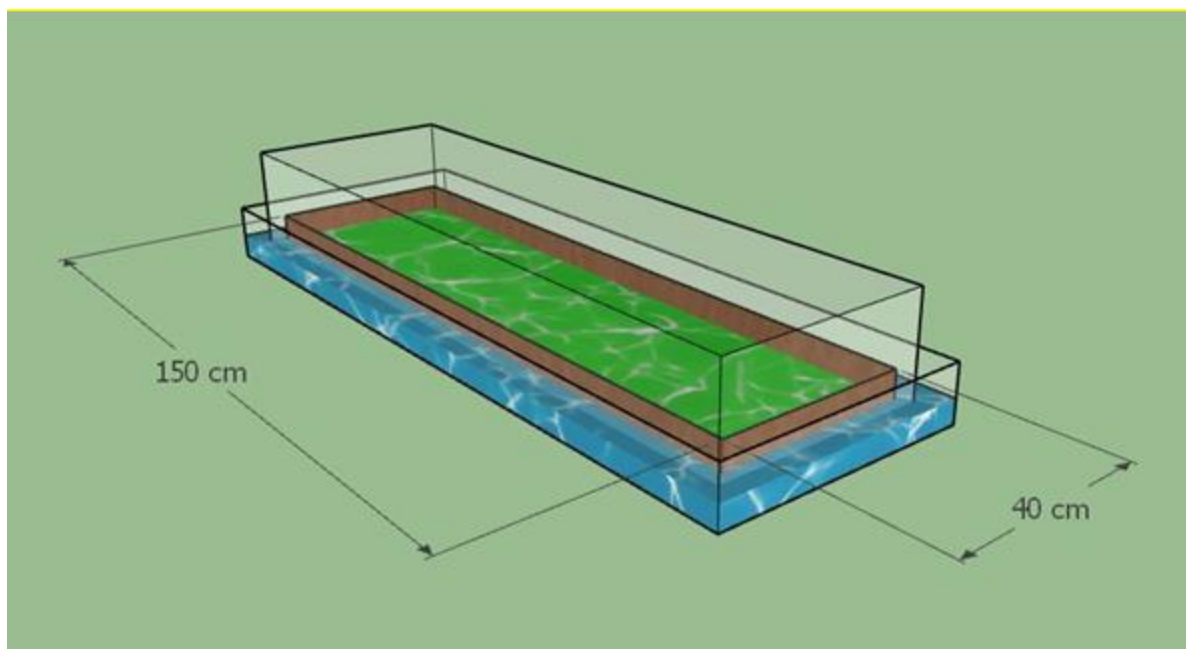
Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη του *Stichococcus* sp. Το ένα στέλεχος ήταν το άγριο (Wild), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο, ενώ το δεύτερο ήταν μεταλλαγμένο, δηλαδή σημειώνει υψηλότερη ανάπτυξη βιομάζας, αλλά ταυτόχρονα με μειωμένη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη. Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε τροποποιημένο θρεπτικό υλικό Bold's Basal Medium (BBM), του οποίου η σύσταση δίνεται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 2.1** Σύσταση θρεπτικού υλικού Bold's Basal Medium (Bischoff and Bold 1963; Starr and Zeikus 1993).

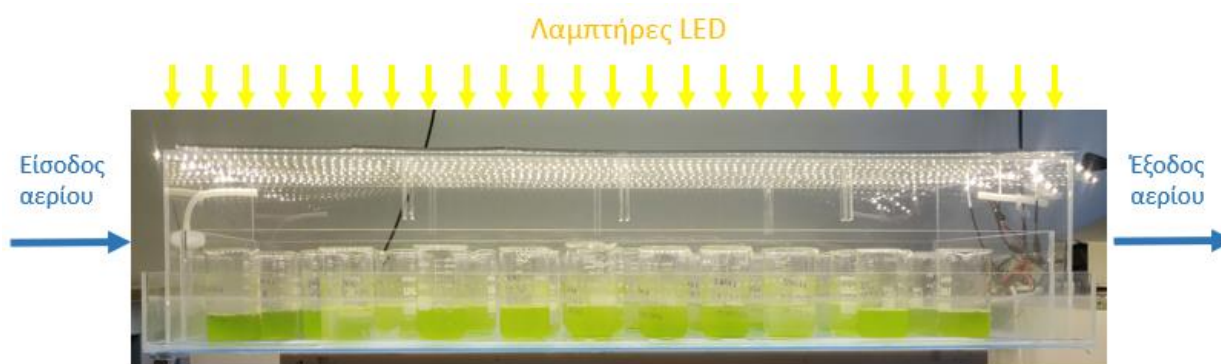
Bold Basal Modified (3N-BBM+V)	
Συστατικό	Συγκέντρωση (g L <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>3</sub>	0,75
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,175
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,075
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,075
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,025
NaCl	35
Ιχνοστοιχεία	
Na <sub>2</sub> EDTA	0,00000436
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,00000315
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0000098
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,000022
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,00001
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,00018
NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,0000063
Βιταμίνες	
B1	0,0002
Biotin	0,000001
B12	0,000001

Το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο, στους 121 °C για 20 λεπτά. Τα διαλύματα ιχνοστοιχείων και βιταμινών αποστειρώθηκαν χρησιμοποιώντας φίλτρα σύριγγας από υλικό PES και διάμετρο πόρων 0,20  $\mu\text{m}$  (Whatman). Η αρχική τιμή pH του θρεπτικού μέσου ρυθμίζεται στο 6,5, με τη χρήση ενός ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{pH}=8,0$ ). Για όλες τις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε ένα προφίλ χρόνου φωτισμού με φωτισμό 16 ωρών ακολουθούμενο από σκοτάδι 8 ωρών. Για το φωτισμό των καλλιέργειών χρησιμοποιήθηκε σύστημα φωτισμού LED με λυχνίες φυσικού λευκού φωτός (4500 K) τοποθετημένο στο επάνω μέρος του φωτο-βιοαντιδραστήρα. Οι λυχνίες LED έχουν δυνατότητα ρύθμισης της έντασης φωτεινότητας και του ρυθμού που αναβοσβήνουν. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εξετάστηκαν μία ένταση φωτεινότητας (5500 lux) και δύο τύποι φωτισμού, σταθερός και με αναλαμπές στα 10.000 Hz. Η θερμοκρασία των καλλιέργειών ρυθμιζόταν μέσω μονάδας A/C και ήταν  $25 \pm 1$  °C. Εκτός από τη λήψη θρεπτικών στοιχείων από το μέσο καλλιέργειας, τα μικροφύκη λάμβαναν άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ) μέσω παροχής ατμοσφαιρικού αέρα, αλλά και μίγματος αέρα- $\text{CO}_2$ , με το  $\text{CO}_2$  να βρίσκεται σε συγκέντρωση 5%, το  $\text{O}_2$  14% και το υπόλοιπο  $\text{N}_2$  (81%). Οι συγκεντρώσεις αυτές προσομοιώνουν τα απαέρια από μονάδα παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας με καύση φυσικού αερίου. Το μίγμα αερίου αποστειρωνόταν με τη χρήση φίλτρου PTFE 0,2  $\mu\text{m}$ , πριν την είσοδο στο φωτο-βιοαντιδραστήρα με συνολική παροχή 1 L  $\text{min}^{-1}$ .

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μικρής-εργαστηριακής κλίμακας. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε ποτήρια ζέσεως των 600 mL, με όγκο καλλιέργειας 150 mL και για χρονικό διάστημα 21 ημερών. Για να επιτευχθούν όμοιες συνθήκες ανάπτυξης, οι καλλιέργειες ήταν τοποθετημένες στο εσωτερικό ενός επίπεδου φωτο-βιοαντιδραστήρα. Ο επίπεδος φωτο-βιοαντιδραστήρας σχεδιάστηκε ειδικά για τις ανάγκες του παρόντος πειράματος από το Πολυτεχνείο Κρήτης. Αποτελείται από υλικό Poly(methyl methacrylate) με την εμπορική ονομασία "Plexiglass" (**Σχήμα 2.1**). Οι διαστάσεις του φωτο-βιοαντιδραστήρα είναι 150x40x15 cm. Η ανάπτυξη των καλλιέργειών παρακολουθείτο μέσω της οπτικής πυκνότητας (optical density, OD) στα 600 nm με τη χρήση φασματοφωτομέτρου (Shimadzu Europe-UV mini-1240).



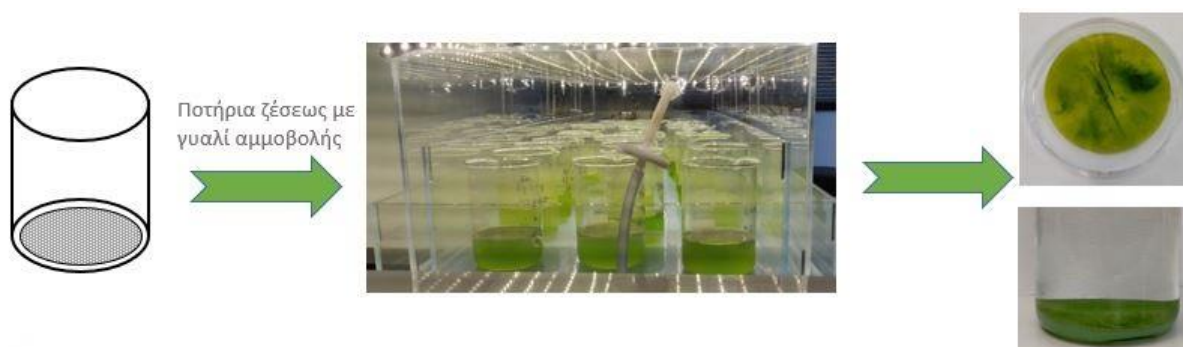
**Σχήμα 2.1** Πειραματική διάταξη φωτο-βιοαντιδραστήρα.



**Σχήμα 2.2 Α)** Πειραματική διάταξη φωτο-βιοαντιδραστήρα, διαστάσεων 150x4x15 cm. Στο εσωτερικό του φωτο-βιοαντιδραστήρα γίνεται η ανάπτυξη των μικροφυκών (πράσινο χρώμα), ενώ εξωτερικά περικλείεται από νερό (μπλε χρώμα) για τη μόνωση του φωτο-βιοαντιδραστήρα.  
**Β)** Επίπεδος φωτο-βιοαντιδραστήρας για την ανάπτυξη των καλλιεργειών μικρής κλίμακα που διεξάχθηκαν σε ποτήρια ζέσεως.

Για τους σκοπούς της παρούσας διπλωματικής εργασίας εξετάστηκαν δύο συστήματα καλλιέργειας, 1) ανάπτυξη κυττάρων υπό αιώρηση και 2) ακινητοποιημένα.

Όσον αφορά το σύστημα ακινητοποιημένων κυττάρων, τα μικροφύκη αναπτύχθηκαν πάνω σε γυαλιά αμμοβολής, τοποθετημένα σε οριζόντια θέση, καλύπτοντας όλο τον πυθμένα των δοχείων καλλιέργειας (**Σχήμα 2.3**). Από παλαιότερη μελέτη των Makaroglou et al. (2021) είχε επιλεχθεί το συγκεκριμένο υλικό ως το πιο κατάλληλο για την ανάπτυξη του *Stichococcus* sp. πάνω σε αυτό. Αντιθέτως, στα δείγματα που αναπτύχθηκαν υπό αιώρηση δεν προστέθηκε κάποιο υλικό στο εσωτερικό της καλλιέργειας.



**Σχήμα 2.3** Δοχεία καλλιέργειας ακινητοποιημένων μικροφυκών σε υλικό από γυαλί αμμοβολής.

Για τη βελτιστοποίηση ανάπτυξης του στελέχους *Stichococcus* sp. σε μικρή κλίμακα, εξετάστηκαν διαφορετικές τιμές παραμέτρων ανάπτυξης, οι οποίοι είναι ο τύπος του φωτισμού, η συγκέντρωση  $\text{NaNO}_3$  στο υγρό της καλλιέργειας και η πηνία αζώτου για την αύξηση των ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Η πηνία αζώτου εφαρμόστηκε 3 ημέρες πριν την ανάκτηση των κυττάρων. Πραγματοποιείται, αντλώντας το υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας και πληρώνοντας με νέο BBM, χωρίς την ύπαρξη  $\text{NaNO}_3$ .

Εξετάστηκαν δύο κύκλοι καλλιιεργειών μικροφυκών, οι οποίες αποτυπώνονται στον παρακάτω (**Πίνακας 2.2**).

**Πίνακας 2.2** Συνθήκες καλλιέργειας εργαστηριακής κλίμακας για τα στελέχη *Wild* και μεταλλαγμένο *Stichococcus sp.*

	Τύπος φωτισμού	Συγκέντρωση CO <sub>2</sub> (%)	Συγκέντρωση NaNO <sub>3</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Ένταση φωτεινότητας (lux)	Αερισμός (L min <sup>-1</sup> )	Πενία αζώτου	Θερμοκρασία (°C)	pH
1 <sup>ος</sup> κύκλος	Σταθερός	5	0,25 / 0,75	5.500	1	0 / 3	25 ± 1	6,5
2 <sup>ος</sup> κύκλος	Με αναλαμπές							

### 2.1.2 Κλίμακα φωτο-βιοαντιδραστήρα

Αφού ολοκληρώθηκαν τα πειράματα του κεφαλαίου 2.1.1, έγινε κλιμάκωση καλλιέργειας του στελέχους *Wild Stichococcus sp.* στον επίπεδο φωτο-βιοαντιδραστήρα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα εργαστηριακή κλίμακας. Ο όγκος της καλλιέργειας ήταν 15 L. Από τα 15 L, τα 14 L ήταν το BBM με 35 g L<sup>-1</sup> NaCl και το υπόλοιπο 1 L με την προκαλλιέργεια *Stichococcus sp.* Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν για 21 ημέρες ακινητοποιημένα σε γυαλί αμμοβολής, το οποίο κάλυπτε τον πυθμένα του φωτο-βιοαντιδραστήρα.

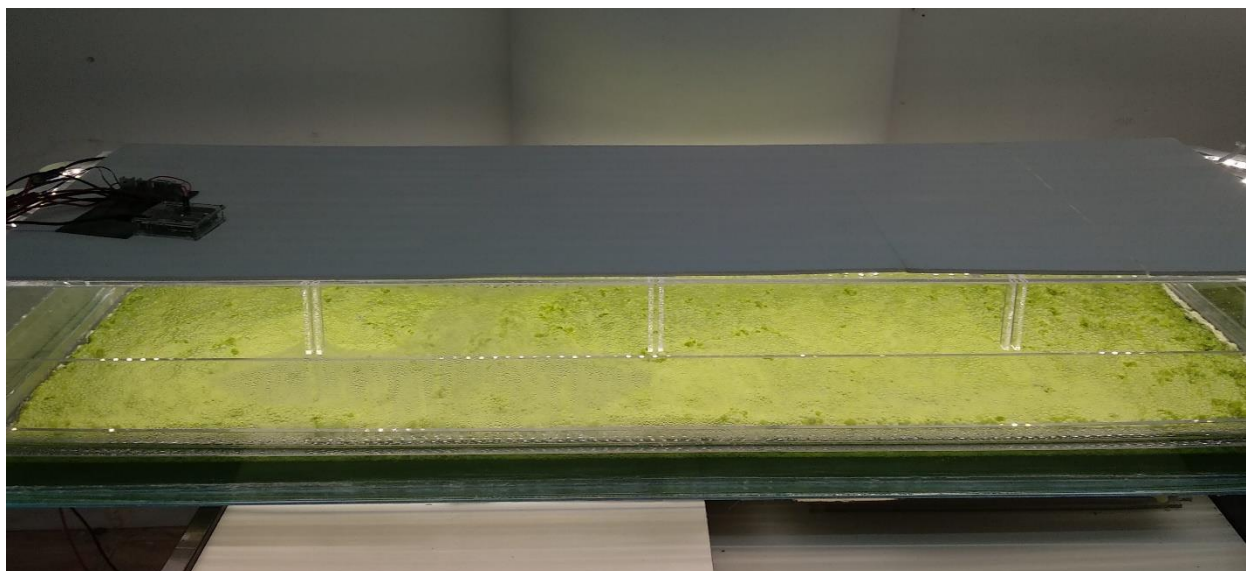
Οι συνθήκες καλλιέργειας επιλέχθηκαν βάσει των πειραματικών αποτελεσμάτων από τα πειράματα εργαστηριακής κλίμακας (Κεφ. 2.1.1). Οι εξεταζόμενες συνθήκες δίνονται στον παρακάτω (Πίνακας 2.3).

**Πίνακας 2.3** Συνθήκες καλλιέργειας κλίμακας φωτο-βιοαντιδραστήρα για το στέλεχος *Wild Stichococcus sp.*

Τύπος φωτισμού	Συγκέντρωση CO <sub>2</sub> (%)	Συγκέντρωση NaNO <sub>3</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Ένταση φωτεινότητας (lux)	Αερισμός (L min <sup>-1</sup> )	Θερμοκρασία (°C)	pH
Με αναλαμπές	5	0,75	5.500	1	25 ± 1	6,5

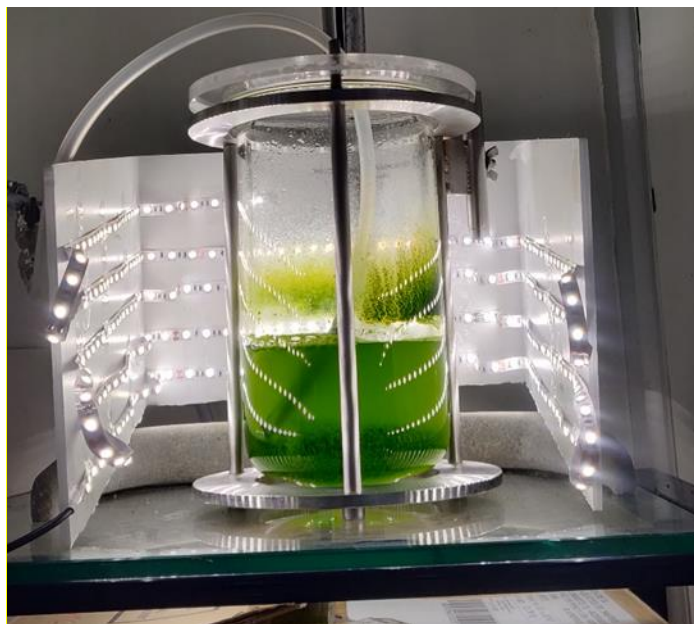
Η πειραματική διάταξη με την καλλιέργεια του *Stichococcus sp.* αποτυπώνεται στην παρακάτω εικόνα.





**Σχήμα 2.4** Επίπεδος φωτο-βιοαντιδραστήρας με κλιμάκωση βιομάζας.

Παράλληλα, διεξάχθηκαν πειράματα καλλιέργειας του *Stichococcus* υπό αιώρηση σε φωτο-βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου με ενεργό όγκο 1,5 L (**Σχήμα 2.5**). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε συνθήκες σταθερού φωτισμού εντάσεως 5.500 lux, φωτοπεριόδου 16:8 h (Ημέρα:Νύχτα) και παροχής μίγματος αέρα – CO<sub>2</sub> με παροχή 1 L min<sup>-1</sup>.



**Σχήμα 2.5** Φωτο-βιοαντιδραστήρας διαλείποντος έργου.

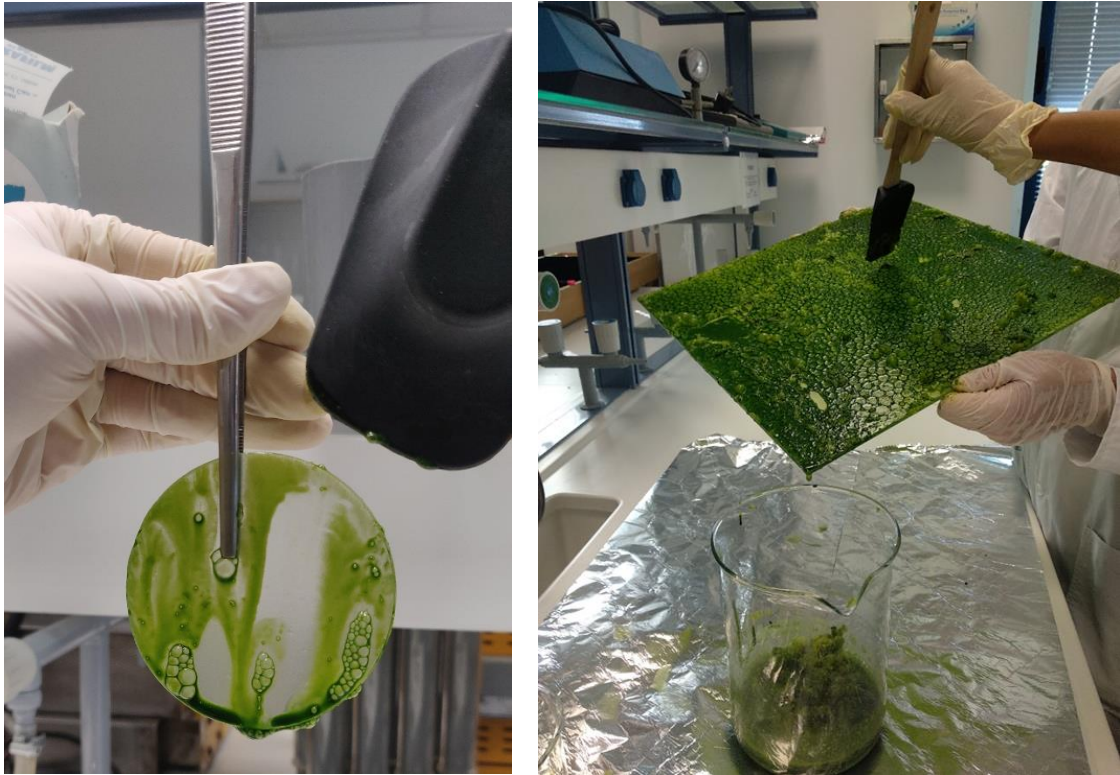
## 2.2 Πρωτόκολλα διαχωρισμού βιομάζας από το υγρό καλλιέργειας

Για το διαχωρισμό της βιομάζας από το υγρό της καλλιέργειας εφαρμόστηκε μια καινοτόμα μέθοδος ανάκτησης ακινητοποιημένων κυττάρων (μέσω απόξεσης), και έγινε σύγκριση αυτής με τις συμβατικές μεθόδους της φυγοκέντρισης, διήθησης υπό κενό και κροκίδωσης. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά οι μέθοδοι διαχωρισμού βιομάζας από το υγρό της καλλιέργειας.

### 2.2.1 Ανάκτηση ακινητοποιημένων κυττάρων

Για το διαχωρισμό βιομάζας συνήθως χρησιμοποιούνται οι συμβατικές μέθοδοι της διήθησης μέσω φίλτρων, φυγοκέντρισης, κροκίδωσης, επίπλευσης κ.α. Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε μία καινοτόμα μέθοδος ανάκτησης βιομάζας από το υγρό της καλλιέργειας. Όπως αναφέρθηκε στα υποκεφάλαια 2.1.1 & 2.1.2, στον πυθμένα των δοχείων καλλιέργειας που περιείχαν τις καλλιέργειες ήταν τοποθετημένα γυαλιά αμμοβολής, με σκοπό την προσκόλληση των κυττάρων πάνω σε αυτά.

Στο τέλος του κύκλου καλλιέργειας γίνεται άντληση του υπερκείμενου υγρού, με προσοχή για να μην γίνει άντληση και των ακινητοποιημένων κυττάρων. Στη συνέχεια, αφαιρείται το γυαλί αμμοβολής και τα κύτταρα απομακρύνονται με τη βοήθεια ξέστρου. Στο δείγμα από τα ποτήρια ζέσεως γίνεται διήθηση μέσω φίλτρων (**Σχήμα 2.6 A**) και τα φίλτρα ξηραίνονται σε κλίβανο στους 60 °C. Από την άλλη, η ακινητοποιημένη βιομάζα που συλλέγεται από το κουτί (**Σχήμα 2.6 B**), φυγοκεντρείται και έπειτα αφυδατώνεται με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης (freeze-dry) για 24 h, με σκοπό την εύρεση ξηρής βιομάζας ανά μονάδα επιφανείας ( $\text{g m}^{-2}$ ).



**Σχήμα 2.6** Απόξεση βιομάζας μικροφυκών ακινητοποιημένη σε γυαλί αμμοβολής από **A)** επιφάνεια μικρής κλίμακας και **B)** επιφάνεια κλίμακας φωτο-αντιδραστήρα.

### 2.2.2 Φυγοκέντρωση

Δείγματα 50 mL καλλιέργειας συλλέχθηκαν σε σωληνάρια falcon και τοποθετήθηκαν στις θήκες του ρότορα της συσκευής φυγοκέντρωσης (Hettich ROTOFIX 32 A). Ο χρόνος φυγοκέντρωσης ήταν 10 min και η ταχύτητα περιστροφής 4.000 rpm. Στη συνέχεια αφαιρούνται τα φιαλίδια από τη συσκευή και με προσοχή ώστε να μην γίνει ανάμιξη του υγρού, αφαιρείται το υπερκείμενο από το φιαλίδιο. Η βιομάζα αφυδατώνεται με τη χρήση freeze-dry για 24 h και στο τέλος υπολογίζεται το βάρος της ξηρής βιομάζας.

### 2.2.3 Διήθηση υπό κενό

Για τη διήθηση υπό κενό (Vacuubrand 2c) συλλέγονται 50 mL βιομάζας και διηθούνται με τη χρήση φίλτρων glass fiber, με διάμετρο πόρων 1,2  $\mu\text{m}$  (οίκος Whatman). Η ανακτημένη βιομάζα

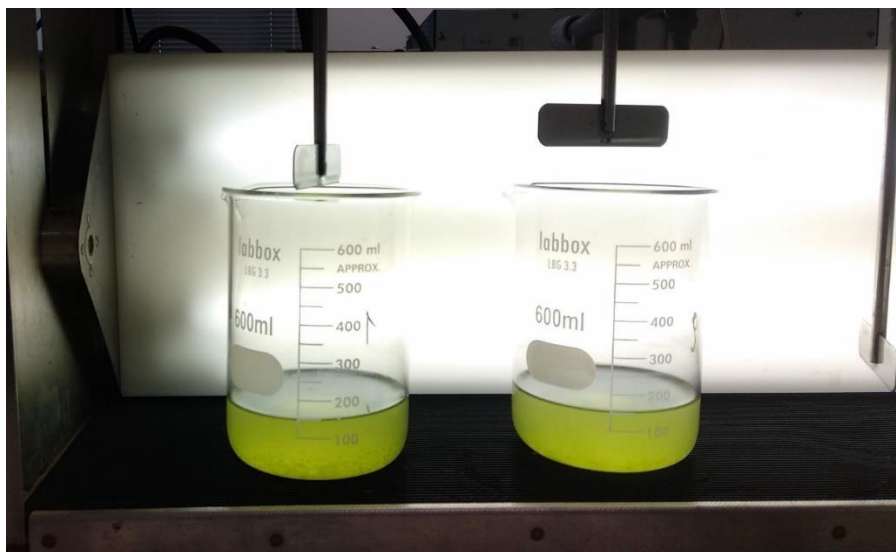
αφυδατώνεται μέσω freeze-drying για 24 h υπολογίζεται το ξηρό βάρος μέσω εργαστηριακού ζυγού.

#### 2.2.4 Κροκίδωση

Για το διαχωρισμό βιομάζας μέσω κροκίδωσης έγινε χρήση χιτοζάνης. Η χιτοζάνη είναι σε μορφή σκόνης που προέρχεται από κελύφη γαρίδας και άλλων καρκινοειδών επεξεργασμένα με αλκαλική ουσία, όπως υδροξείδιο του νατρίου. Για την παρασκευή του διαλύματος, ζυγίζονται 100 mg χιτοζάνης τα οποία διαλύονται σε 10 mL HCl με συγκέντρωση 0,1 M. Έπειτα για την πλήρη διάλυση της χιτοζάνης, τοποθετείται μέσα στο διάλυμα μαγνήτης ανάδευσης και αναδεύεται σε αναδευτήρα για 10 min. Το τελευταίο βήμα για την παρασκευή του κροκιδωτικού είναι η προσθήκη απιονισμένου νερού στο διάλυμα έως ότου φτάσει τα 100 mL συνολικά. Στη συνέχεια, σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται 400 mL καλλιέργειας και το διάλυμα χιτοζάνης. Αφού γίνει προσθήκη του κροκιδωτικού, το μίγμα αναδεύεται γρήγορα στα 150 rpm για 5 min και στη συνέχεια ακολουθείται αργή ανάδευση στα 10 rpm για 30 min. Όλα τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία για 30 min. Τέλος, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα του υπερκείμενου υγρού στα 686 nm και η θολερότητα χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο (Shimadzu Europe-UV mini-1240) και θολόμετρο (Hach Ratio XR Turbidimeter) αντίστοιχα.

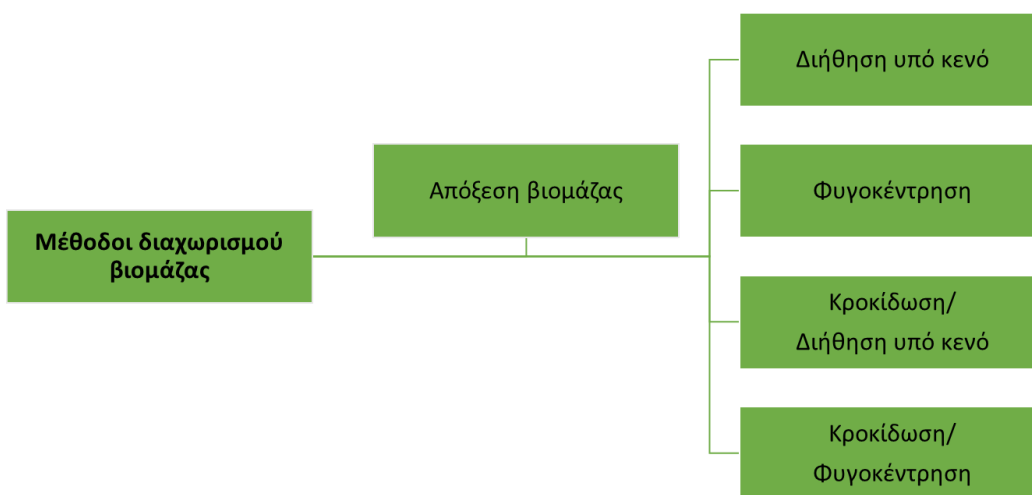
Για να βρεθεί η βέλτιστη δόση χιτοζάνης που χρειάζεται για τη συλλογή μικροφυκών, είναι απαραίτητες οι δοκιμές συγκεντρώσεων. Δοκιμάστηκε ένα εύρος δοσολογίας χιτοζάνης (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 και 120 mg L<sup>-1</sup>) με την εφαρμογή πειράματος Jar test (**Σχήμα 2.7**). Σε όλες τις συγκεντρώσεις ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ανάμιξης (150 rpm για 5 min, 10 rpm για 30 min και ηρεμία για 30 min). Μετά το πέρας κάθε πειράματος κροκίδωσης συλλέγονται 5 mL δείγματος για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας και της θολερότητας, με σκοπό τη δημιουργία καμπύλης αποτελεσματικότητας της κροκίδωσης και κατ' επέκταση την εύρεση βέλτιστης δόσης κροκιδωτικού. Για τα πειράματα Jar-test χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Flocumatic του οίκου JP Selecta.

Το HCl χρησιμοποιήθηκε ως πηκτικό μέσο κατά την προετοιμασία του διαλύματος χιτοζάνης δηλαδή να συμβάλλει στην ανάκτηση της βιομάζας.



**Σχήμα 2.7** Jar test για την κροκίδωση καλλιέργειας μικροφυκών.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, επιλέχθηκαν να εφαρμοστούν συγκεκριμένες μέθοδοι και συνδυασμοί αυτών για το διαχωρισμό της βιομάζας από το υγρό καλλιέργειας, οι οποίες απεικονίζονται συνολικά στο **Σχήμα 2.8**.



**Σχήμα 2.8** Μέθοδοι διαχωρισμού βιομάζας από το υγρό της καλλιέργειας.

## **2.3 Πρωτόκολλα Αφυδάτωσης Βιομάζας**

Η αφυδάτωση της βιομάζας δοκιμάστηκε με τρεις τρόπους που παρουσιάζονται παρακάτω:

- 1) Ξήρανση σε κλίβανο
- 2) Ηλιακή ξήρανση
- 3) Λυοφιλίωση

Για να επιτευχθούν όμοιες συνθήκες αφυδάτωσης, ποσότητα 21 g υγρής βιομάζας με ποσοστό υγρασίας 39% απλώθηκε σε τριβλίο petri, δημιουργώντας μια λεπτή στρώση. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τριπλότυπο. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν ζυγίσεις των δειγμάτων έως την εύρεση σταθερού βάρους. Στα Κεφάλαια 2.3.1 έως 2.3.3 περιγράφονται οι συνθήκες της κάθε μεθόδου αφυδάτωσης.

### **2.3.1 Ξήρανση σε κλίβανο**

Για την αφυδάτωση με συναγωγή χρησιμοποιήθηκε κλίβανος με ροή θερμού αέρα (Memmert UL30). Η θερμοκρασία ξήρανσης είχε οριστεί στους 60 °C.

### **2.3.2 Ηλιακή ξήρανση**

Κατασκευάστηκε κουτί από ξύλο βαμμένο σε μαύρο χρώμα για καλύτερη απορρόφηση ηλιακής ενέργειας. Εντός του κουτιού τοποθετήθηκαν τα φίλτρα και τα τριβλία με την ανακτημένη βιομάζα. Το ξηραντήριο είναι παθητικού τύπου και δεν απαιτεί ηλεκτρική ενέργεια για τη ροή του θερμού αέρα, η οποία γίνεται με φυσικό αερισμό.

### **2.3.3 Λυοφιλίωση**

Τα τριβλία με την ανακτημένη βιομάζα τοποθετήθηκαν στο freeze dryer σε θερμοκρασία -55 °C. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Cooling Trap Pro του οίκου ScanVac.



## 2.4 Πρωτόκολλα μέτρησης βιο-προϊόντων

Η ξηραμένη βιομάζα επεξεργάστηκε περαιτέρω και έδωσε τα επιθυμητά βιο-προϊόντα (υδατάνθρακες, λιπίδια, χρωστικές ουσίες και πρωτεΐνες). Τα στάδια της μετέπειτα επεξεργασίας παρουσιάζονται παρακάτω για κάθε βιο-προϊόν ξεχωριστά.

### 2.4.1 Υδατάνθρακες

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υδατανθράκων παρασκευάζονται διαλύματα  $2,5 \text{ mol L}^{-1}$  HCl και  $2,5 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH με τελικό όγκο 100 mL. Στη συνέχεια, ζυγίζονται 1,5 mg λυοφιλιωμένης βιομάζας. Προστίθενται 5 mL HCl ( $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) και το αιώρημα επωάζεται στους  $100^\circ\text{C}$  για 3 h. Για την εξουδετέρωση του οξέος γίνεται προσθήκη 5 mL NaOH ( $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ ). Έπειτα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υδατανθράκων χρησιμοποιείται η μέθοδος φαινόλης-θειϊκού οξέος (Nielsen, 2009). Πιο συγκεκριμένα, για τη μέθοδο αυτή διαλύονται 100 mg glucose σε 1 L νερό. Στο διάλυμα αυτό γίνεται προσθήκη 0,05 mL φαινόλης περιεκτικότητας 80% και προσθήκη 5,0 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Το διάλυμα αναδεύεται στο Vortex και αφήνεται να καθίσει για 10 min. Στη συνέχεια, τοποθετείται σε υδρόλουτρο στους  $25^\circ\text{C}$  για 10 min με σκοπό το δείγμα να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν τη φασματοφωτομέτρηση το δείγμα αναδεύεται ξανά για λίγα δευτερόλεπτα στο Vortex. Τέλος, το φασματοφωτόμετρο μηδενίζεται με δείγμα που περιέχει 0  $\mu\text{g}$  glucose/2 mL (τυφλό δείγμα). Γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα υπόλοιπα δείγματα από το χαμηλότερης συγκεντρώσεως γλυκόζη προς το υψηλότερης, στα 490 nm.

### 2.4.2 Λιπίδια

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των λιπιδίων στα κύτταρα των μικροφυκών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Folch (Folch et al., 1957). Αρχικά, ζυγίζονται 100 mg λυοφιλιωμένης βιομάζας τα οποία μεταφέρονται σε falcon των 50 mL. Έπειτα προστίθενται 20 mL χλωροφόρμιο:μεθανόλη 2:1. Γίνεται ανάδευση των falcon μέσω Vortex. Αμέσως μετά τα falcon τοποθετούνται σε συσκευή υπερήχων για 10 min. Κατόπιν εφαρμόζεται φυγοκέντριση για 10 min με ταχύτητα περιστροφής 4.000 rpm. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη των 100 mL ή των 250 mL (εξαρτάται από την ποσότητα των λιπιδίων). Στο falcon προστίθενται πάλι 20 mL χλωροφόρμιο:μεθανόλη 2:1. Η διαδικασία από τη φυγοκέντριση και μετά επαναλαμβάνεται έως ότου το χρώμα του διαλύτη να είναι ανοιχτό πράσινο και να

παραμένει ίδιο από την προηγούμενη φορά. Σκοπός είναι να γίνει όσο το δυνατόν περισσότερη ανάκτηση λιπιδίων από τη βιομάζα. Αφού συλλεχθεί όλη η ποσότητα του υπερκείμενου υγρού στη διαχωριστική χοάνη, τότε τοποθετείται ποσότητα KCl (0,74% w/v) ίση με 0,2 x ποσότητα (mL) διαλύτη. Γίνεται ανακίνηση της διαχωριστικής χοάνης (2-3 ανακινήσεις) και ανοίγεται η στρόφιγγα για απελευθέρωση αέρα. Μόλις διαχωριστούν οι δύο φάσεις, τότε η κάθε φάση συλλέγεται σε κωνική φιάλη των 100 mL. Το χλωροφόρμιο με τα λιπίδια επανατοποθετούνται στη διαχωριστική φιάλη και γίνεται ξανά προσθήκη KCl, έτσι επιτυγχάνεται ο δεύτερος διαχωρισμός. Στη συνέχεια συλλέγεται η κάτω φάση σε μια κωνική φιάλη των 250 mL, η οποία περιέχει Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, για την απομάκρυνση της υγρασίας. Έπειτα συλλέγεται και η πάνω φάση, η οποία τοποθετείται στην κωνική που βρισκόταν η 1<sup>η</sup> πάνω φάση από την 1<sup>η</sup> εκχύλιση. Και οι δύο πάνω φάσεις μπαίνουν ξανά στη διαχωριστική χοάνη και προστίθεται KCl. Η κάτω φάση συλλέγεται στην κωνική των 250 mL, όπου ήδη υπάρχουν το χλωροφόρμιο με τα λιπίδια από τις προηγούμενες κάτω φάσεις. Οι κάτω φάσεις που συλλέχθηκαν στην κωνική φιάλη, τοποθετούνται σε κατάλληλη σφαιρική φιάλη (50 ή 100 ή 250 mL, ανάλογα της ποσότητας λιπιδίων). Πάνω από τη σφαιρική φιάλη, τοποθετείται γυάλινο χωνί με διηθητικό χαρτί που περιείχε Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Στη συνέχεια γίνεται έκπλυση του Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> της κωνικής φιάλης με χρήση καθαρού χλωροφόρμιου, το οποίο και αυτό έχει ξηραθεί με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Αυτό γίνεται για όσες φορές απαιτείται ώστε να «ασπρίσει» πάλι το αλάτι. Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε rotavaporator, σε θερμοκρασία νερού 58 °C και κενό μείον (-) 450 mbar. Σε κάθε ξηραμένη σφαιρική φιάλη, τοποθετείται λίγο ξηραμένο χλωροφόρμιο και το υγρό μεταφέρεται (με γυάλινη πιπέτα παστέρ) σε ξηραμένα, προζυγισμένα φιαλίδια των 4 mL. Τα φιαλίδια τοποθετούνται σε θερμαντική πλάκα, στους 58 °C και με ρεύμα αζώτου για την επίτευξη ξήρανσης του χλωροφορμίου. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου εκπλυθεί η σφαιρική φιάλη. Τέλος, γίνεται βαρυμετρικός υπολογισμός των λιπιδίων σε κάθε φιαλίδιο των 4 mL.

### 2.4.3 Χρωστικές ουσίες

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης ζυγίζονται 5 mg από τη λυοφιλιωμένη βιομάζα. Αμέσως μετά προστίθενται 2 mL μεθανόλης (99,8%) στο στερεό ίζημα των κυττάρων. Το αιώρημα αφήνεται σε ηρεμία για 20-30 min. Αφού παρέλθει το χρονικό διάστημα, το αιώρημα φυγοκεντρείται στις 4.000 rpm για 10 min, έτσι ώστε το υπερκείμενο να απορροφήσει τις χρωστικές ουσίες. Στη συνέχεια γίνεται μέτρηση της απορρόφησης του υπερκείμενου διαλύματος στα 470, 652 και 665 nm σε UV-Vis φασματοφωτόμετρο. Κατά τη μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο γίνεται αραιώση 1:4 ή διαφορετική κατάλληλη προκειμένου οι



τιμές μέτρησης να βρίσκονται εντός του φάσματος μέτρησης του μηχανήματος (0-1). Τέλος, για τον προσδιορισμό της ολικής χλωροφύλλης (χλωροφύλλη α, χλωροφύλλη β) και του β-καροτένιου, χρησιμοποιούνται οι παρακάτω εξισώσεις (Lichtenthaler, 1987):

- $Chl_a = (16.72 \cdot A_{665}) - (9.16 \cdot A_{652}) \left[ \frac{\mu g}{mL \text{ καλλιέργειας}} \right]$
- $Chl_b = (34.09 \cdot A_{652}) - (15.28 \cdot A_{665}) \left[ \frac{\mu g}{mL \text{ καλλιέργειας}} \right]$
- $Chl_{ολική} = Chl_a + Chl_b$
- $Carot_b = \frac{(1000 \cdot A_{470}) - (1.63 \cdot Chl_a) - (104.96 \cdot Chl_b)}{221} \left[ \frac{\mu g}{mL \text{ καλλιέργειας}} \right]$

#### 2.4.4 Πρωτεΐνες

Για την εξαγωγή των πρωτεϊνών, αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 0,5 NaOH με 5% MeOH (R1), στο οποίο προστίθεται ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα (PB) 0,05 M (pH=7,4), σε αναλογία 1% v/v. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται διασπορά της λυοφιλιωμένης βιομάζας (3 mg) σε 10 mL του μίγματος R1 και γίνεται χρήση υπερήχων με σκοπό τη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η ένταση των υπερήχων είναι στο 50% της μέγιστης ισχύος και η λειτουργία είναι διακοπτόμενη, συνολικής διάρκειας 10 min. Έπειτα γίνεται προσθήκη διαλύματος R1 έως ότου ο τελικός όγκος φτάσει τα 15 mL. Ακολουθείται θέρμανση του αιωρήματος στους 100 °C σε ελαιόλουτρο για 30 min υπό συνεχή ανάδευση στα 280 rpm. Αμέσως μετά πραγματοποιείται φυγοκέντριση για 10 min στα 4.000 rpm. Η μέτρηση των πρωτεϊνών γίνεται στο ανακτηθέν υπερκείμενο διάλυμα με την αναλυτική μέθοδο micro-BCA, η οποία βασίζεται στη μετατροπή του  $Cu^{2+}$  σε  $Cu^{+}$ , κάτω από αλκαλικές συνθήκες. Ο χαλκός ανιχνεύεται μετά από αντίδραση του με το BCA: παρουσία των πρωτεϊνών γίνεται έντονος χρωματισμός του διαλύματος. Το προκύπτον μωβ χρώμα απορροφά στα 562 nm σε φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους φωτός. Η μέθοδος βαθμονομείται με χρήση ορού αλβουμίνης (BSA) ως πρότυπη πρωτεΐνη. Ετοιμάζονται 8 πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης BSA, σε εύρος 0,5-200  $\mu g \text{ mL}^{-1}$ . Επιπρόσθετα, γίνεται προετοιμασία ενός δείγματος μηδενικής περιεκτικότητας σε BSA που χρησιμεύει για τη διόρθωση της αρχικής τιμής του σήματος. Τα πρότυπα διαλύματα περιέχουν ως διαλύτη 1% MeOH σε 0,1 N NaOH με 0,534% v/v PB. Οι ποσότητες αυτές δεν αλληλεπιδρούν με τα αντιδραστήρια της μεθόδου και επομένως δεν αλλοιώνουν το αποτέλεσμα των μετρήσεων.

### 3 Αποτελέσματα

Στη διάρκεια της συγκεκριμένης Διπλωματικής Εργασίας πραγματοποιήθηκαν σειρές πειραμάτων που είχαν στόχο την εύρεση του βέλτιστου τρόπου ανάπτυξης, ανάκτησης και ξήρανση βιομάζας μικροφυκών στελέχους *Stichococcus* sp.

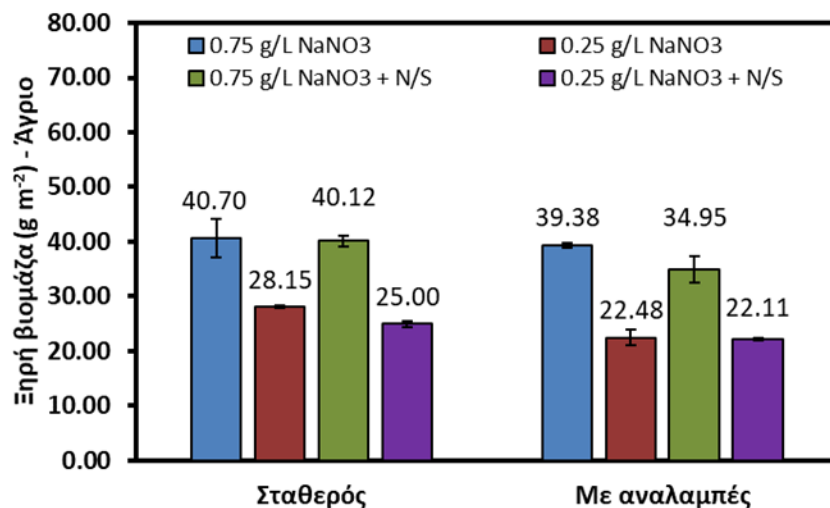
#### 3.1 Βελτιστοποίηση βιομάζας και βιο-προϊόντων

Για να βρεθεί η μέγιστη απόδοση της βιομάζας και των βιο-προϊόντων, διεξήχθησαν δοκιμές σε δύο στελέχη *Stichococcus* sp. (άγριο και μεταλλαγμένο). Το μεταλλαγμένο στέλεχος σημειώνει χαμηλότερη χλωροφύλλη και υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας, σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Για τη βελτιστοποίηση ανάπτυξης και παραγωγή βιο-προϊόντων των παραπάνω στελεχών, ερευνήθηκαν οι τρεις (3) παρακάτω παράμετροι ανάπτυξης:

- 1) Τύπος φωτισμού: i) σταθερός, ii) με αναλαμπές
- 2) Συγκέντρωση  $\text{NaNO}_3$  στο θρεπτικό υλικό: i) 0,25, ii) 0,75 g L<sup>-1</sup>
- 3) Πενία αζώτου (Nitrogen Starvation, N/S): i) 0, ii) 3 ημέρες

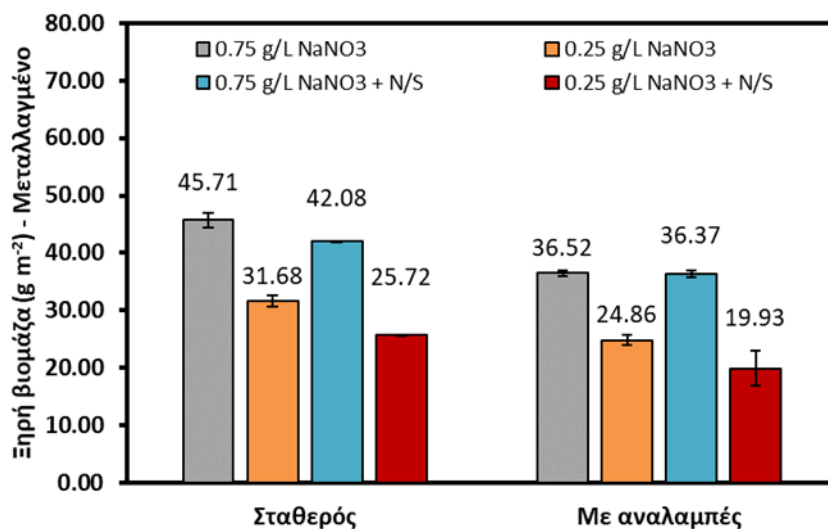
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δοκιμών αυτών.

Ως προς το πρώτο πείραμα που διεξήχθη και αφορά τη ξηρή βιομάζα του άγριου στελέχους (**Σχήμα 3.1**), φαίνεται ότι η υψηλότερη παραγωγή βιομάζας είναι σε συνθήκες σταθερού φωτισμού, συγκέντρωση  $\text{NaNO}_3$  0,75 g L<sup>-1</sup> και χωρίς πενία αζώτου, σημειώνοντας παραγωγή 40,70 g m<sup>-2</sup>. Όμως παρατηρείται ότι το σφάλμα αυτής της δοκιμής είναι κοντά στο αποτέλεσμα της δοκιμής υπό σταθερό φωτισμό,  $\text{NaNO}_3$  0,75 g L<sup>-1</sup> + N/S. Άρα, οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάπτυξη του άγριου στελέχους προέρχονται και από τις δύο δοκιμές. Υψηλά παρατηρείται και η παραγωγή βιομάζας υπό συνθήκες φωτισμού με αναλαμπές και συγκέντρωση  $\text{NaNO}_3$  0,75 g L<sup>-1</sup> χωρίς πενία αζώτου (39,38 g m<sup>-2</sup>). Συνεπώς, με την εφαρμογή του φωτισμού με αναλαμπές, επιτυγχάνεται εξοικονόμηση ηλεκτρικού ρεύματος, με ελάχιστη απώλεια στην παραγωγή βιομάζας. Η απόδοση των λοιπών πειραμάτων είναι 30-45% μικρότερη από αυτή των πειραμάτων που σχολιάστηκαν σαν μέγιστα. Τα στελέχη των χαμηλών σε απόδοση δοκιμών αναπτύχθηκαν στις εξής συνθήκες: 1) φωτισμός με αναλαμπές, 0,75 g L<sup>-1</sup>  $\text{NaNO}_3$  + N/S, 2) σταθερός φωτισμός, 0,25 g L<sup>-1</sup>  $\text{NaNO}_3$ , 3) σταθερός φωτισμός, 0,25 g L<sup>-1</sup>  $\text{NaNO}_3$  + N/S, 4) φωτισμός με αναλαμπές, 0,25 g L<sup>-1</sup>  $\text{NaNO}_3$  και τέλος 5) φωτισμός με αναλαμπές, 0,25 g L<sup>-1</sup>  $\text{NaNO}_3$  + N/S. Τέλος, παρατηρείται ότι καθοριστικό ρόλο για την ανάπτυξη των μικροφυκών έχει η συγκέντρωση του  $\text{NaNO}_3$ .



**Σχήμα 3.1** Παραγωγή ξηρής βιομάζας άγριου στελέχους στις διάφορες συνθήκες

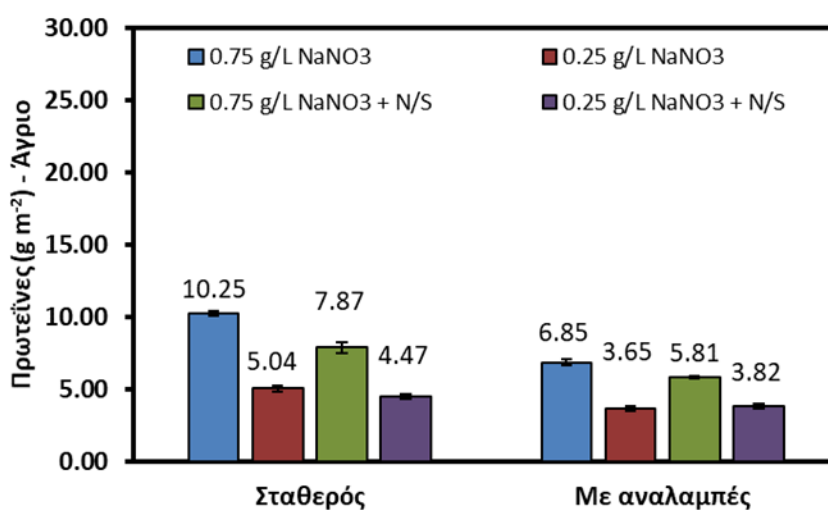
Στο παρακάτω διάγραμμα (**Σχήμα 3.2**) παρουσιάζεται η παραγωγή ξηρής βιομάζας μεταλλαγμένου στελέχους. Η υψηλότερη παραγωγή παρατηρείται σε συνθήκες σταθερού φωτισμού και συγκεντρώσεως  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  χωρίς πενία αζώτου. Έπειτα με λίγο μικρότερη απόδοση βρίσκονται οι καλλιέργειες οι οποίες αναπτύχθηκαν σε συνθήκες σταθερού φωτισμού και με  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3 + \text{N/S}$ . Στη συνέχεια παρατηρείται ότι οι καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες α) φωτισμός με αναλαμπές,  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  χωρίς πενία αζώτου και β) φωτισμός με αναλαμπές,  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3 + \text{N/S}$  έχουν απόδοση περίπου 20% μικρότερη από το πείραμα με την υψηλότερη παραγωγή. Πιο χαμηλά και σε ποσοστό που αγγίζει έως και τα 56% διαφορά από τη μέγιστη απόδοση πειράματος βρίσκονται οι υπόλοιπες δοκιμές.



**Σχήμα 3.2** Παραγωγή ξηρής βιομάζας μεταλλαγμένου στελέχους στις διάφορες συνθήκες

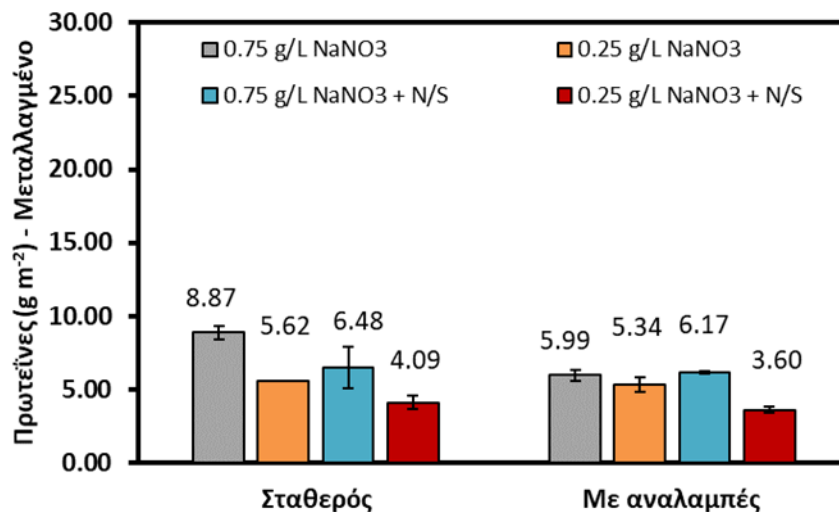
Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες καλλιεργούνται τα στελέχη μικροφυκών, επηρεάζουν και την παραγωγή των βιο-προϊόντων.

Έτσι, η υψηλότερη παραγωγή πρωτεϊνών από άγριο στέλεχος, παρατηρείται όταν το στέλεχος αναπτύσσεται σε σταθερό φωτισμό με 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> χωρίς πενία αζώτου (**Σχήμα 3.3**). Οι υπόλοιπες δοκιμές έχουν αρκετά πιο χαμηλή απόδοση με διαφορά, από το βέλτιστο πείραμα, που κυμαίνεται μεταξύ 23% έως 64%.



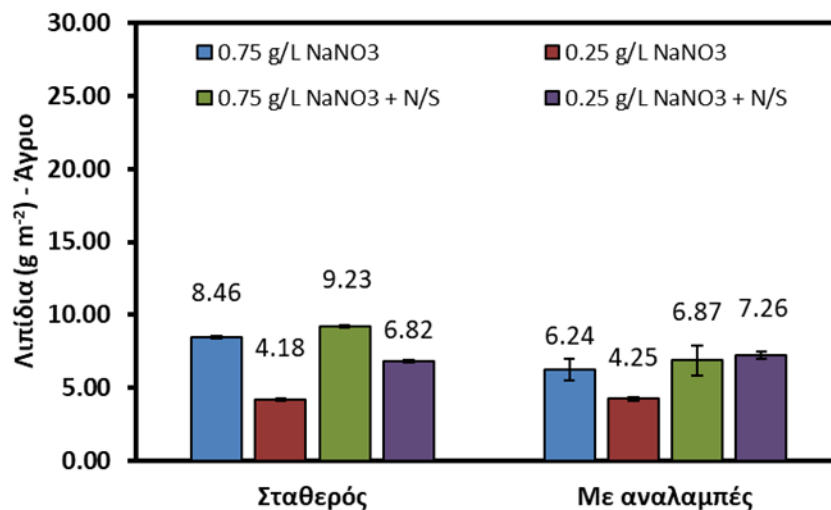
**Σχήμα 3.3** Παραγωγή πρωτεϊνών άγριου στελέχους στις διάφορες συνθήκες

Όπως στο άγριο έτσι και στο μεταλλαγμένο (**Σχήμα 3.4**), η μεγαλύτερη παραγωγή πρωτεϊνών προκύπτει από την ανάπτυξη των μικροφυκών υπό σταθερό φωτισμό με  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  χωρίς πενία αζώτου. Η χαμηλότερη απόδοση προέρχεται από τα πειράματα με προσθήκη  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3 + \text{N/S}$ .



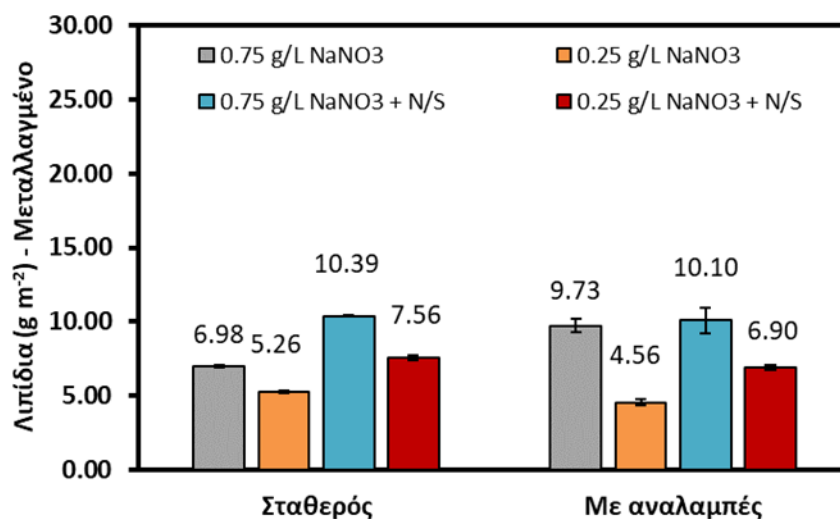
**Σχήμα 3.4** Παραγωγή πρωτεϊνών μεταλλαγμένου στελέχους στις διάφορες συνθήκες

Στη συνέχεια η παραγωγή των λιπιδίων από άγριο στέλεχος, βελτιστοποιείται σε συνθήκες παροχής σταθερού φωτός και προσθήκης  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3 +$  πενία αζώτου (N/S) με τελική συγκέντρωση  $9,23 \text{ g m}^{-2}$  (**Σχήμα 3.5**). Τα πειράματα με  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  και στους δύο τρόπους φωτισμού, έχουν τη χαμηλότερη παραγωγή λιπιδίων, με συγκέντρωση  $4,18 \text{ g m}^{-2}$  στο σταθερό φωτισμό και  $4,25 \text{ g m}^{-2} \text{ NaNO}_3$  στο φωτισμό με αναλαμπές. Από την άλλη, τα πειράματα με  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3 + \text{N/S}$  έχουν μεγαλύτερη παραγωγή από αυτά χωρίς πενία αζώτου.



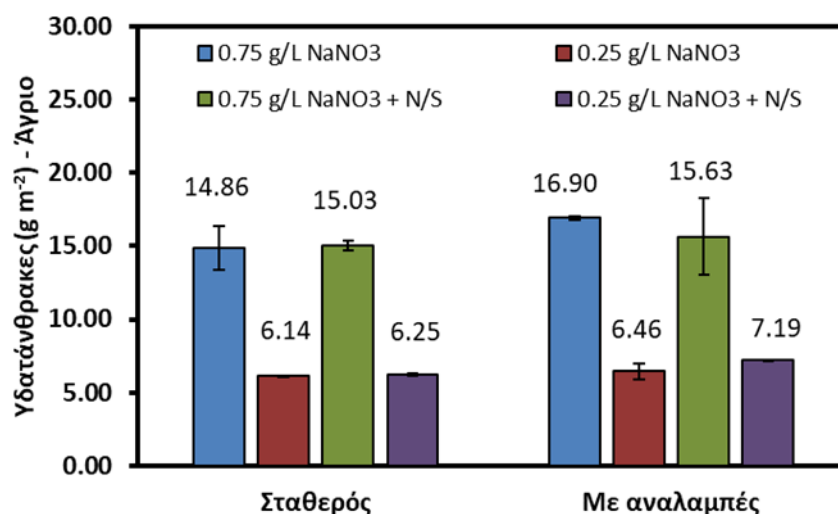
**Σχήμα 3.5** Παραγωγή λιπιδίων άγριου στελέχους στις διάφορες συνθήκες

Όπως στο άγριο, το ίδιο συμβαίνει και στο μεταλλαγμένο (Σχήμα 3.6). Η παραγωγή των λιπιδίων μεγιστοποιείται σε συνθήκες σταθερού φωτός και προσθήκη 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με πενία αζώτου με τελική συγκέντρωση που φτάνει τα 10,39 g m<sup>-2</sup>. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο συγκεκριμένο πείραμα ο φωτισμός δεν έχει καθοριστικό ρόλο καθώς όπως παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, οι διαφορές μεταξύ σταθερού φωτισμού και με αναλαμπές, είναι μικρές. Μόνο στο πείραμα με 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> χωρίς πενία αζώτου παρατηρείται διαφορά 2,75 g m<sup>-2</sup>.



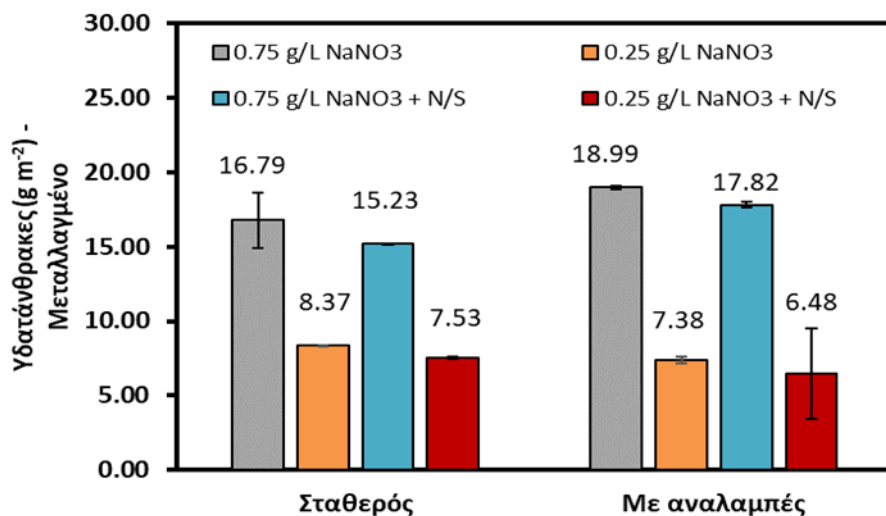
**Σχήμα 3.6** Παραγωγή λιπιδίων μεταλλαγμένου στελέχους στις διάφορες συνθήκες

Οι βέλτιστες συνθήκες για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής των υδατανθράκων από άγριο στέλεχος αποδείχθηκαν ότι είναι ο φωτισμός με αναλαμπές σε συνδυασμό με  $\text{NaNO}_3$  συγκέντρωσης  $0,75 \text{ g L}^{-1}$  χωρίς πενία αζώτου με τελική συγκέντρωση  $16,90 \text{ g m}^{-2}$  (**Σχήμα 3.7**). Αξίζει να σημειωθεί ότι το σφάλμα στην περίπτωση του πειράματος με χρήση φωτισμού με αναλαμπές και  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3 + \text{N/S}$ , είναι μεγάλο οπότε σαν δεύτερο καλύτερο σε απόδοση χαρακτηρίζεται το πείραμα με σταθερό φωτισμό και  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3 + \text{N/S}$ . Τέλος, είναι φανερό ότι στην περίπτωση της παραγωγής υδατανθράκων, η συγκέντρωση  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  προσφέρει πολύ χαμηλότερη απόδοση από την  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ . Τα αποτελέσματα των πειραμάτων με συγκέντρωση  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  κυμαίνονται από  $7,19 \text{ g m}^{-2}$  έως  $6,14 \text{ g m}^{-2}$ .



**Σχήμα 3.7** Παραγωγή υδατανθράκων άγριου στελέχους στις διάφορες συνθήκες

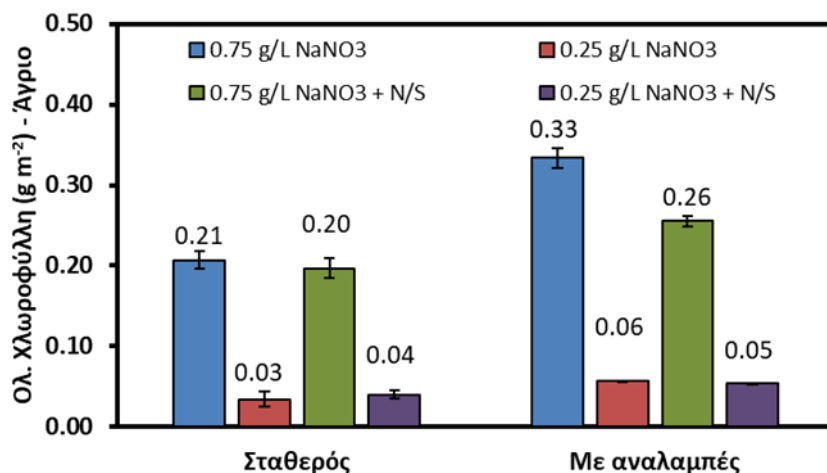
Όσον αφορά την παραγωγή υδατανθράκων από το μεταλλαγμένο στέλεχος, φαίνεται ότι η καλύτερη απόδοση είναι από καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε φωτισμό με αναλαμπές και  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  χωρίς πενία αζώτου με τελική συγκέντρωση  $18,99 \text{ g m}^{-2}$  (**Σχήμα 3.8**). Έπειτα ακολουθούν οι καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε φωτισμό με αναλαμπές και  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3 + \text{N/S}$  με παραγωγή  $17,82 \text{ g m}^{-2}$  υδατανθράκων. Πολύ μικρή παραγωγή με υψηλότερη συγκέντρωση τα  $8,37 \text{ g m}^{-2}$  έχουν τα πειράματα που διεξήχθησαν με  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ .



**Σχήμα 3.8** Παραγωγή υδατανθράκων μεταλλαγμένου στελέχους στις διάφορες συνθήκες

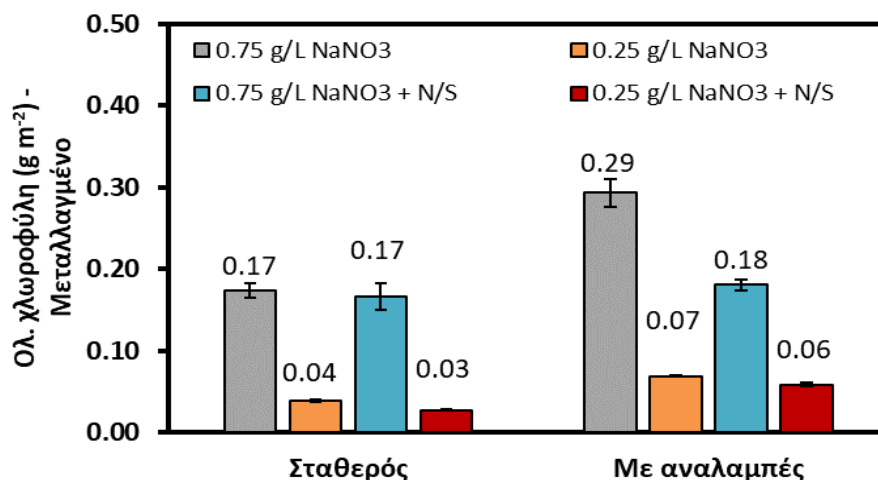
Στη συνέχεια, παρουσιάζεται το διάγραμμα των συγκεντρώσεων της ολικής χλωροφύλλης από άγριο στέλεχος (**Σχήμα 3.9**). Η καλλιέργεια με την καλύτερη απόδοση είναι αυτή που φωτιζόταν με αναλαμπές και η συγκέντρωση του NaNO<sub>3</sub> ήταν στα 0,75 g L<sup>-1</sup> με παραγωγή 0,33 g m<sup>-2</sup> ολ. χλωροφύλλης. Στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρείται ότι η συγκέντρωση του NaNO<sub>3</sub> έχει καθοριστικό ρόλο για τις καλλιέργειες καθώς οι διαφορές στις τελικές συγκεντρώσεις, μεταξύ καλλιεργειών με 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και καλλιεργειών με 0,25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>, είναι πολύ μεγάλες. Ενδεικτικό παράδειγμα αποτελούν οι δύο δοκιμές σε συνθήκες σταθερού φωτισμού, χωρίς πενία αζώτου με μόνη διαφορά τη συγκέντρωση NaNO<sub>3</sub>. Το πείραμα με 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> έχει τελική συγκέντρωση 0,21 g m<sup>-2</sup> ενώ το πείραμα με 0,25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> έχει συγκέντρωση 0,03 g m<sup>-2</sup>.





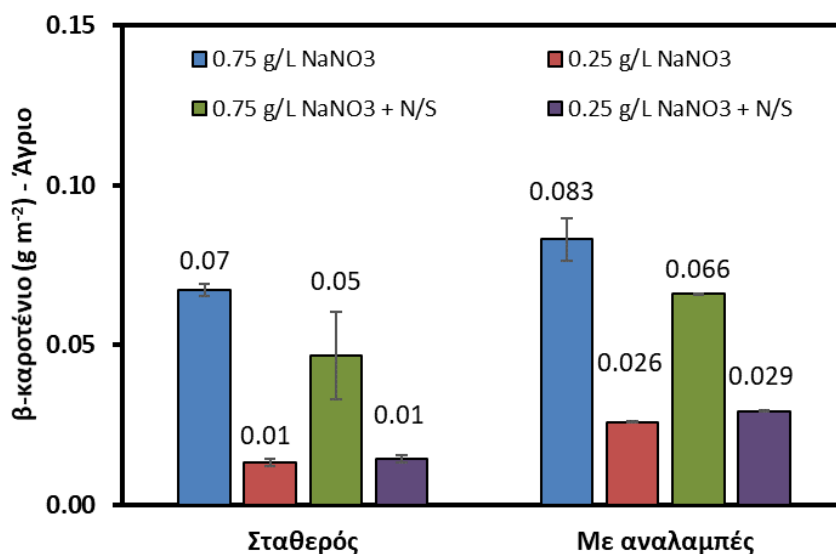
**Σχήμα 3.9** Παραγωγή ολ. Χλωροφύλλης άγριου στελέχους στις διάφορες συνθήκες

Η ολική χλωροφύλλη από μεταλλαγμένο στέλεχος έχει την καλύτερη απόδοση όταν αναπτύσσεται σε συνθήκες φωτισμού με αναλαμπές και 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>, χωρίς πενία αζώτου (0,29 g m<sup>-2</sup>) όπως ισχύει και για το άγριο στέλεχος (**Σχήμα 3.10**). Αντίστοιχα, σημαντικότερο ρόλο έχει η συγκέντρωση του NaNO<sub>3</sub> καθώς οι διαφορές στην συγκέντρωση του βιο-προϊόντος, μεταξύ 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και 0,25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>, είναι μεγάλες. Επιπλέον παρατηρείται ότι ο συνδυασμός 0,25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με πενία αζώτου, δίνει τη χαμηλότερη παραγωγή, ίση με 0,03 g m<sup>-2</sup>, ολικής Χλωροφύλλης.



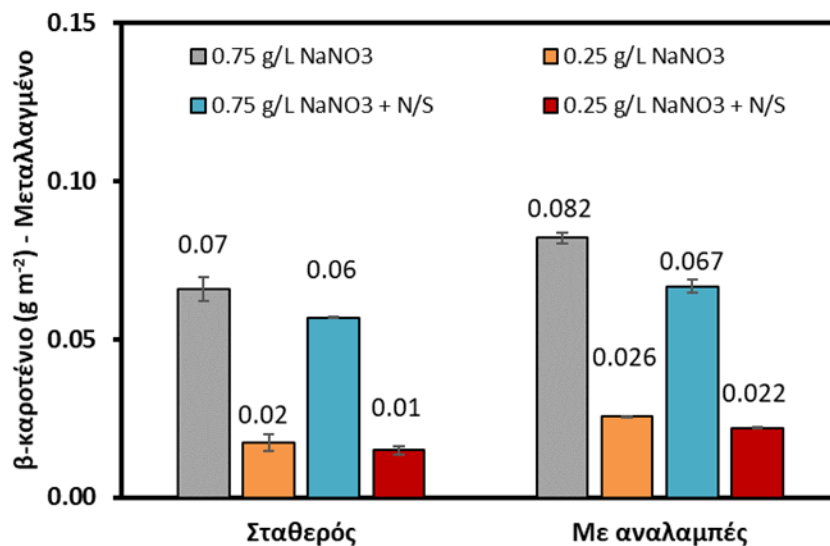
**Σχήμα 3.10** Παραγωγή ολικής Χλωροφύλλης μεταλλαγμένου στελέχους στις διάφορες συνθήκες

Για τη μέγιστη παραγωγή του β-καροτενίου, άγριου στελέχους (**Σχήμα 3.11**), συνέβαλλε ο φωτισμός με αναλαμπές και το  $\text{NaNO}_3$  σε συγκέντρωση  $0,75 \text{ g L}^{-1}$  χωρίς πενία αζώτου με τελικό βιο-προϊόν συγκεντρώσεως  $0,083 \text{ g m}^{-2}$ . Όπως παρατηρείται και στο β-καροτένιο, η παραγωγή είναι πολύ χαμηλή στα πειράματα όπου χρησιμοποιείται  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ . Για παράδειγμα, η χαμηλότερη συγκέντρωση είναι  $0,01 \text{ g m}^{-2}$  και προέρχεται από δύο διαφορετικές μεθόδους καλλιέργειας α) σταθερός φωτισμός,  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  και β) σταθερός φωτισμός,  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3 + \text{N/S}$ . Επιπλέον, φαίνεται ότι ο φωτισμός έχει σημαντικό ρόλο στο συγκεκριμένο βιο-προϊόν καθώς με φωτισμό με αναλαμπές, η απόδοση είναι καλύτερη.



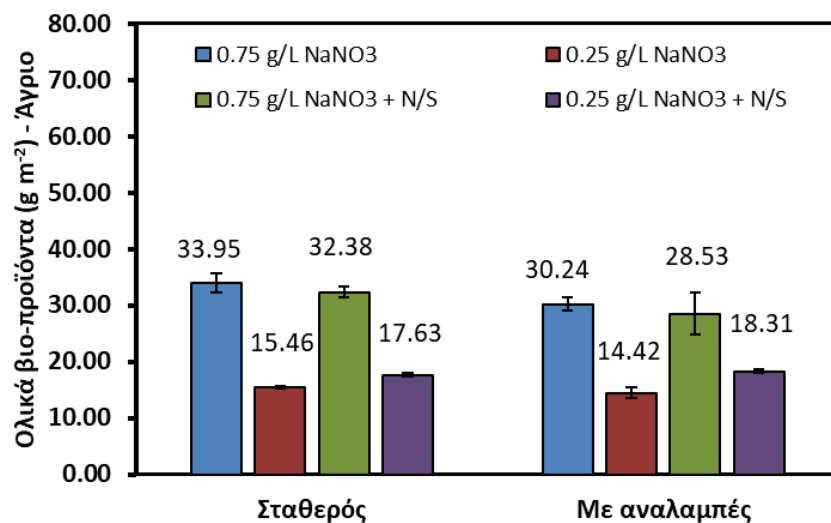
**Σχήμα 3.11** Παραγωγή β-καροτενίου άγριου στελέχους στις διάφορες συνθήκες

Το β-καροτένιο από μεταλλαγμένο στέλεχος έχει τη μεγαλύτερη παραγωγή σε συνθήκες φωτός με αναλαμπές και συγκέντρωση  $\text{NaNO}_3$  στα  $0,75 \text{ g L}^{-1}$  με παραγωγή  $0,082 \text{ g m}^{-2}$  (**Σχήμα 3.12**). Όπως και στο άγριο, έτσι και εδώ, παρατηρείται ότι οι καλλιέργειες που φωτίζονταν με αναλαμπές έχουν υψηλότερη παραγωγή β-καροτενίου. Επιπλέον, οι καλλιέργειες με  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  και δη αυτές υπό σταθερό φωτισμό, έχουν πολύ χαμηλή παραγωγή.



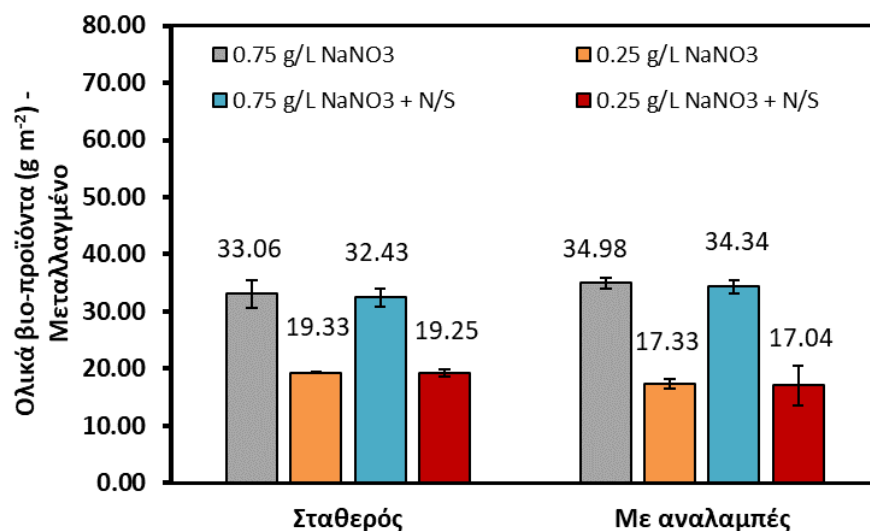
**Σχήμα 3.12** Παραγωγή β-καροτένιου μεταλλαγμένου στελέχους στις διάφορες συνθήκες

Λαμβάνοντας υπόψη την παραγωγή των επιμέρους βιο-προϊόντων, συμπεραίνεται ότι στην παραγωγή των ολικών βιο-προϊόντων από το άγριο στέλεχος (**Σχήμα 3.13**), οι βέλτιστες καλλιέργειες είναι αυτές που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες σταθερού φωτισμού και συγκέντρωσης  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  με τελική παραγωγή  $33,95 \text{ g m}^{-2}$ . Επιπλέον υψηλή παραγωγή παρατηρείται και στα βιο-προϊόντα που αναπτύχθηκαν με σταθερό φωτισμό και  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  + πενία αζώτου με παραγωγή  $32,28 \text{ g m}^{-2}$ . Στη συνέχεια, η χαμηλότερη παραγωγή παρατηρείται στα  $14,42 \text{ g m}^{-2}$ , σε συνθήκες φωτισμού με αναλαμπές,  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  χωρίς πενία αζώτου. Εξίσου χαμηλά, στα  $15,46 \text{ g m}^{-2}$  βρίσκεται και η παραγωγή υπό σταθερό φωτισμό,  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  χωρίς πενία αζώτου.



**Σχήμα 3.13** Παραγωγή ολικών βιο-προϊόντων άγριου στελέχους στις διάφορες συνθήκες

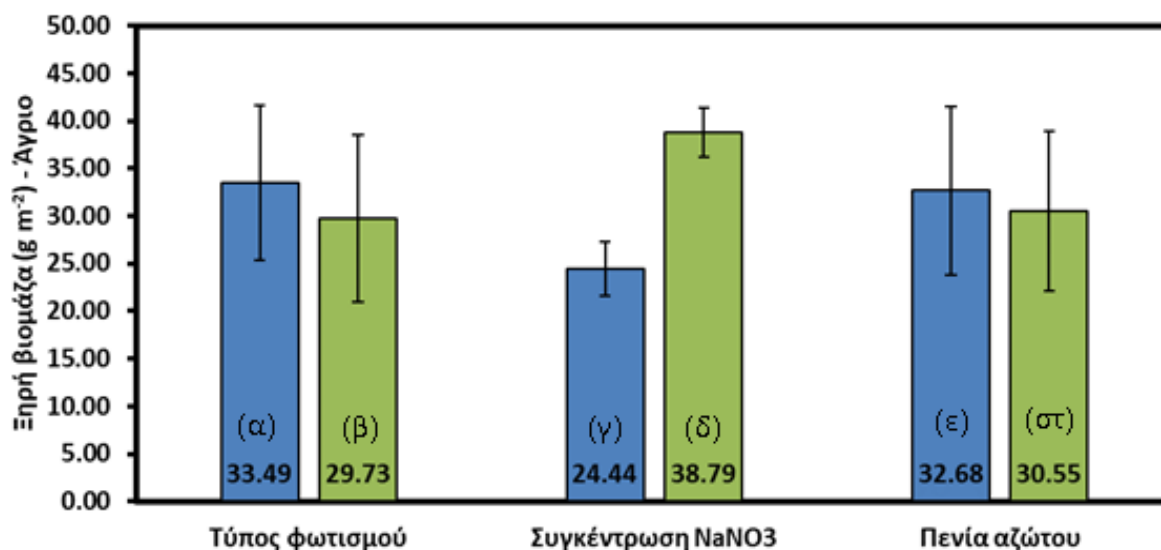
Η βέλτιστη παραγωγή ολικών βιο-προϊόντων μεταλλαγμένου στελέχους φαίνεται ότι προκύπτει όταν τα μικροφύκη αναπτυχθούν σε συνθήκες φωτισμού με αναλαμπές και συγκέντρωσης 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> στα 34,98 g m<sup>-2</sup> (**Σχήμα 3.14**). Η διαφορά μεταξύ αυτής της καλλιέργειας και της καλλιέργειας σε συνθήκες φωτισμού με αναλαμπές και συγκέντρωσης 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> + N/S, είναι ελάχιστη. Συγκεκριμένα, διαφέρουν κατά 0,64 g m<sup>-2</sup>. Οπότε και το δεύτερο πείραμα θεωρείται επιτυχημένο. Στη συνέχεια, παρατηρείται ότι εάν αλλάξει μόνο το φως και γίνει σταθερό, τότε η παραγωγή βιο-προϊόντων παραμένει σε υψηλά επίπεδα (33,06 g m<sup>-2</sup> και 32,43 g m<sup>-2</sup> αντίστοιχα). Συνεπώς, οι μεταβολές στο φως δεν παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των μεταλλαγμένων στελεχών, όσο παίζει, πρωτίστως, η συγκέντρωση του NaNO<sub>3</sub> και έπειτα η πενία του αζώτου.



**Σχήμα 3.14** Παραγωγή ολικών βιο-προϊόντων μεταλλαγμένου στελέχους στις διάφορες συνθήκες

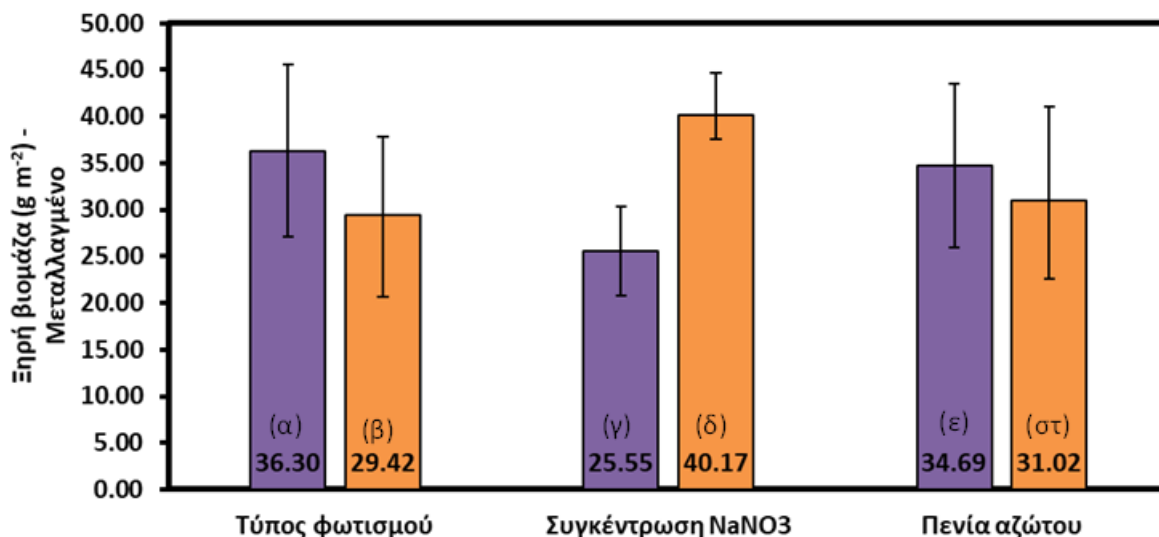
Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα ανάλυσης μέσω τιμών για την επιρροή που είχε κάθε παράμετρος ανάπτυξης ξεχωριστά, στον τρόπο καλλιέργειας.

Στο παρακάτω διάγραμμα (**Σχήμα 3.15**) προβάλλεται η απόδοση σε ξηρή βιομάζα της κάθε μεταβολής ξεχωριστά για το άγριο στέλεχος. Πρώτα στον τύπο του φωτισμού παρατηρείται μικρή διαφορά ανάμεσα σε σταθερό φωτισμό και με αναλαμπές. Συγκεκριμένα η διαφορά τους είναι  $3,76 \text{ g m}^{-2}$ . Πάραυτα ο σταθερός φωτισμός αναδεικνύεται καλύτερος. Στη συνέχεια, καθοριστικός παράγοντας για τη βέλτιστη απόδοση φαίνεται ότι είναι η συγκέντρωση του  $\text{NaNO}_3$ . Η παραγωγή ξηρής βιομάζας με συγκέντρωση  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  είναι στα  $38,79 \text{ g m}^{-2}$ , εμφανώς υψηλότερα από την παραγωγή με συγκέντρωση  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  που βρίσκεται μόλις στα  $24,44 \text{ g m}^{-2}$ . Από την άλλη, στην πενία αζώτου, η διαφορά με ή χωρίς πενία είναι μικρή. Η βέλτιστη απόδοση παρατηρείται όταν δεν χρησιμοποιείται η πενία του αζώτου με τη μεταξύ τους διαφορά να είναι στα  $2,13 \text{ g m}^{-2}$ .



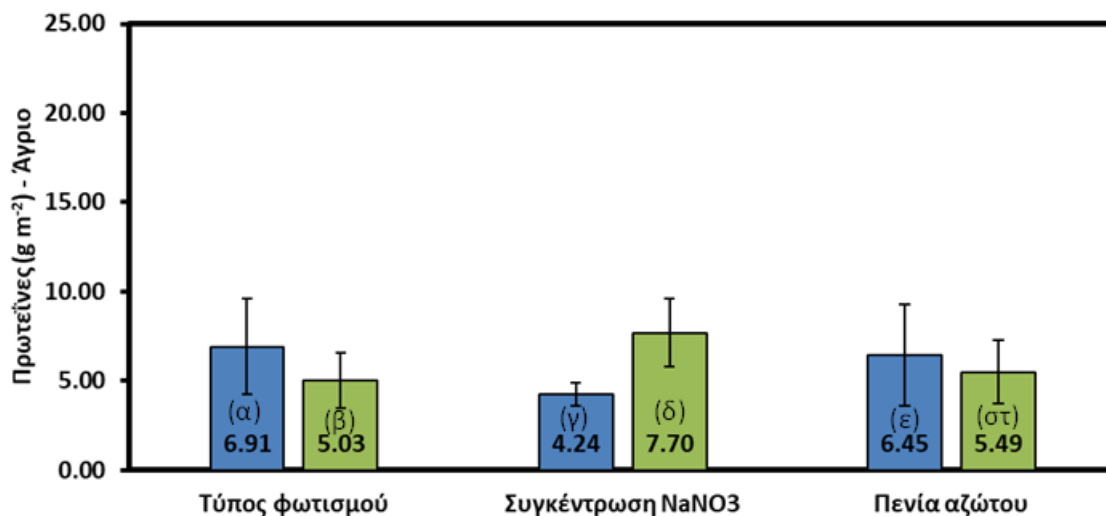
**Σχήμα 3.15** Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής ξηρής βιομάζας άγριου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου.

Η ξηρή βιομάζα από το μεταλλαγμένο στέλεχος (**Σχήμα 3.16**) έχει τη βέλτιστη απόδοση όταν ο φωτισμός είναι σταθερός (36,30 g m<sup>-2</sup>), η συγκέντρωση NaNO<sub>3</sub> είναι στα 0,75 g L<sup>-1</sup> (40,17 g m<sup>-2</sup>) και δεν εφαρμόζεται πενία αζώτου (34,69 g m<sup>-2</sup>). Και στο μεταλλαγμένο στέλεχος, η μεγαλύτερη διαφορά βρίσκεται στη συγκέντρωση του NaNO<sub>3</sub>. Συγκεκριμένα, η διαφορά του 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> από το 0,25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> είναι 14,62 g m<sup>-2</sup>.



**Σχήμα 3.16** Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής ξηρής βιομάζας μεταλλαγμένου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου.

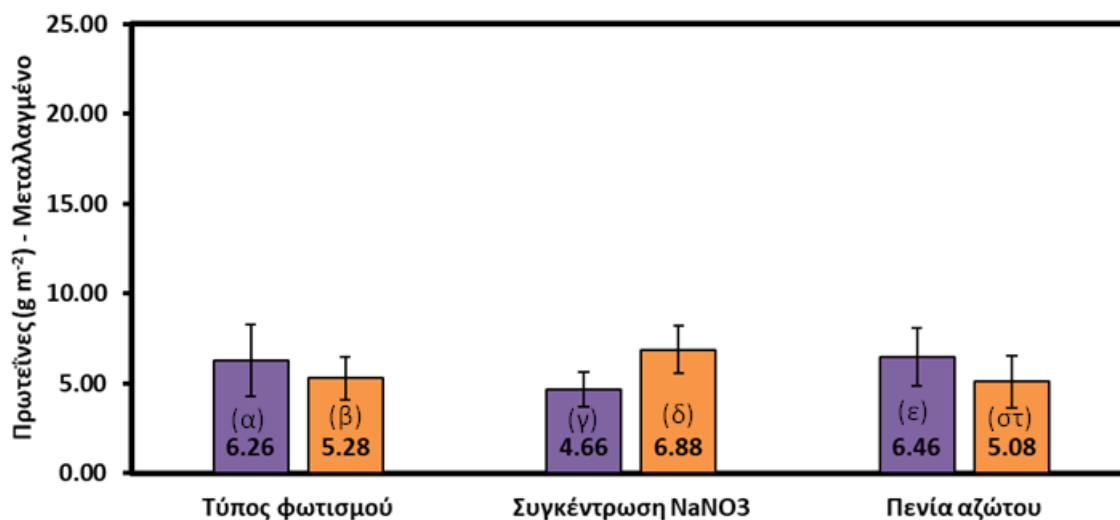
Όπως φαίνεται παρακάτω (**Σχήμα 3.17**) πιο αποδοτικοί μέθοδοι για τη βέλτιστη παραγωγή πρωτεϊνών από άγριο στέλεχος είναι πρώτα ο σταθερός φωτισμός με παραγωγή 6,91 g m<sup>-2</sup> ενώ για το φωτισμό με αναλαμπές είναι 5,03 g m<sup>-2</sup>. Έπειτα η συγκέντρωση 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> δίνει αποτέλεσμα 7,70 g m<sup>-2</sup>, και σε αυτή την περίπτωση, πολύ καλύτερο από το αποτέλεσμα του 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> που είναι 4,24 g m<sup>-2</sup>. Τέλος, παρατηρείται ότι, υψηλότερη παραγωγή πρωτεϊνών δίνουν τα πειράματα δίχως πενία αζώτου (6,45 g m<sup>-2</sup>).



**Σχήμα 3.17** Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής πρωτεϊνών άγριου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου.

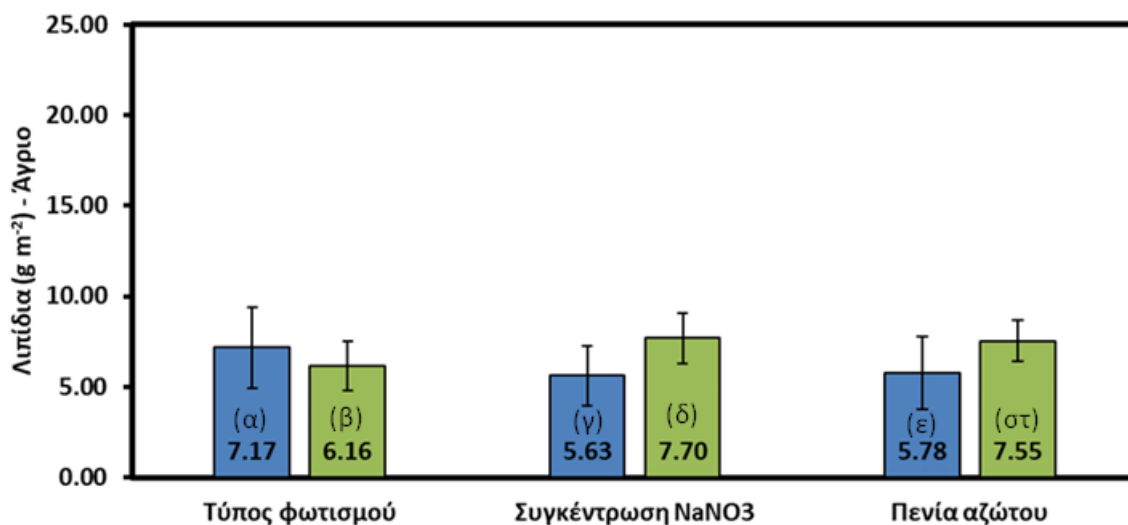
Τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών από μεταλλαγμένο στέλεχος (**Σχήμα 3.18**) είναι παρόμοια με αυτά του άγριου στελέχους. Έτσι, οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης μεταλλαγμένου στελέχους για μέγιστη απόδοση των πρωτεϊνών είναι ο σταθερός φωτισμός με 6,26 g m<sup>-2</sup> παραγωγή, 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> που δίνει συγκέντρωση 6,88 g m<sup>-2</sup> και χωρίς πενία αζώτου με τελικό αποτέλεσμα 6,46 g m<sup>-2</sup>.





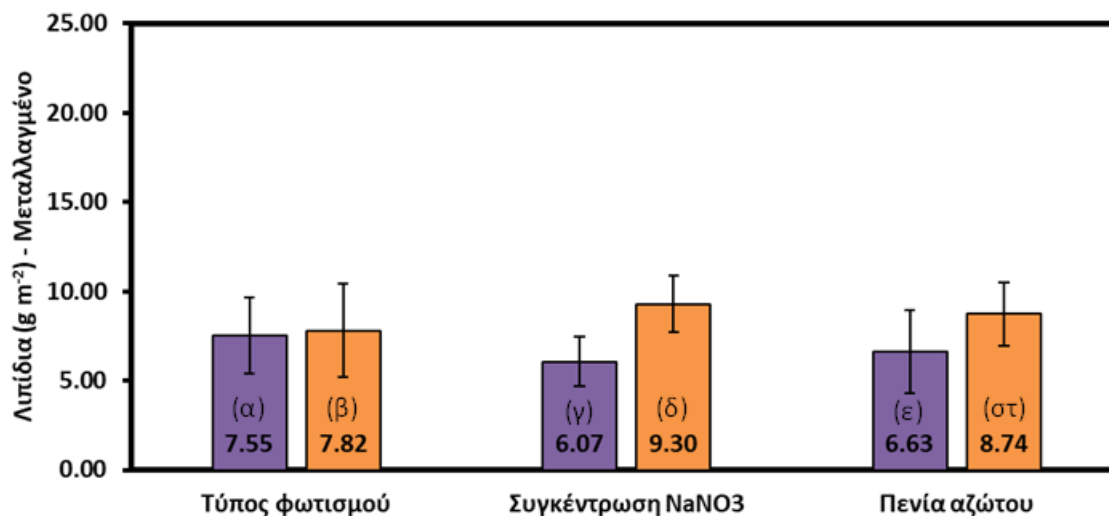
**Σχήμα 3.18** Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής πρωτεϊνών μεταλλαγμένου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου.

Παρακάτω παρατηρείται ότι στη βελτιστοποίηση των λιπιδίων άγριου στελέχους (**Σχήμα 3.19**) συμβάλλει ο σταθερός φωτισμός, η συγκέντρωση του NaNO<sub>3</sub> στα 0,75 g L<sup>-1</sup> σε συνδυασμό με πενία αζώτου. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αποκλίσεις μεταξύ των δοκιμών των διάφορων τύπων, είναι ελάχιστες. Ειδικότερα στον τύπο του φωτισμού που η διαφορά μεταξύ των δύο τύπων είναι 1,01 g m<sup>-2</sup>.



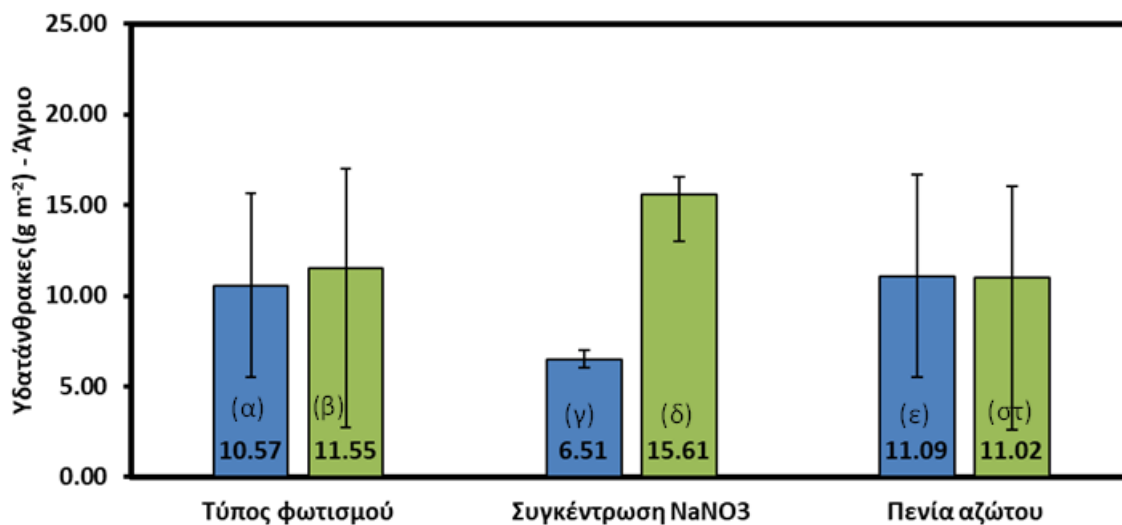
**Σχήμα 3.19** Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής λιπιδίων άγριου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου.

Για τα βέλτιστα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των λιπιδίων μεταλλαγμένου στελέχους (**Σχήμα 3.20**) παρατηρείται ότι ο τύπος του φωτισμού παίζει αμυδρό ρόλο καθώς ο φωτισμός με αναλαμπές δίνει συγκέντρωση 7,82 g m<sup>-2</sup> ενώ ο σταθερός φωτισμός 7,55 g m<sup>-2</sup>, δηλαδή η διαφορά τους είναι 0,27 g m<sup>-2</sup>. Έπειτα καλύτερα αποτελέσματα δίνει η συγκέντρωση 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με τη διαφορά από το 0,25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>, να είναι 3,23 g m<sup>-2</sup>. Η τρίτη παράμετρος που εξετάστηκε είναι αυτή της πενίας αζώτου και σύμφωνα με τα αποτελέσματα, υψηλότερη παραγωγή δίνει η πενία αζώτου, με τιμή 8,74 g m<sup>-2</sup>.



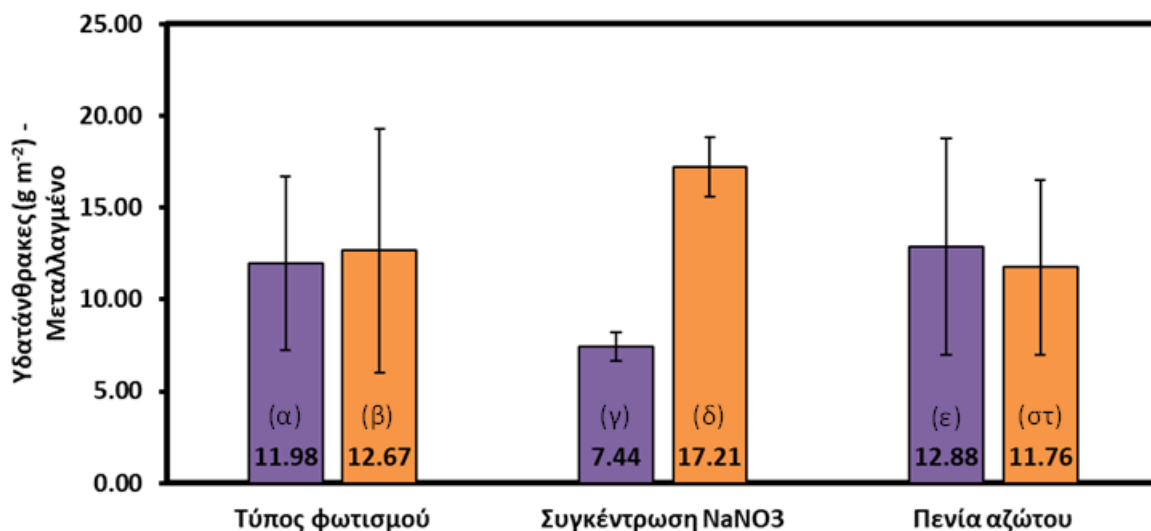
**Σχήμα 3.20** Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής λιπιδίων μεταλλαγμένου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου.

Ο πρώτος παράγοντας που επηρεάζει τη βελτιστοποίηση των υδατανθράκων άγριου στελέχους είναι ο τύπος φωτισμού. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα (**Σχήμα 3.21**), ο φωτισμός με αναλαμπές δίνει υψηλότερη συγκέντρωση υδατανθράκων, όμως παρατηρείται ότι το σφάλμα είναι πολύ μεγάλο και αρκετά πιο κάτω από τη συγκέντρωση που δίνει ο σταθερός φωτισμός. Οπότε καλύτερα αποτελέσματα δίνει ο σταθερός φωτισμός με 10,57 g m<sup>-2</sup>. Όσον αφορά τη συγκέντρωση των NaNO<sub>3</sub>, η βέλτιστη συγκέντρωση υδατανθράκων προέρχεται από 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με τη διαφορά από το 0,25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> να βρίσκεται στα 9,1 g m<sup>-2</sup>. Τέλος, οι καλλιέργειες χωρίς πενία αζώτου είναι πιο επιτυχημένες καθώς έχουν μικρότερο σφάλμα από αυτές με πενία αζώτου.



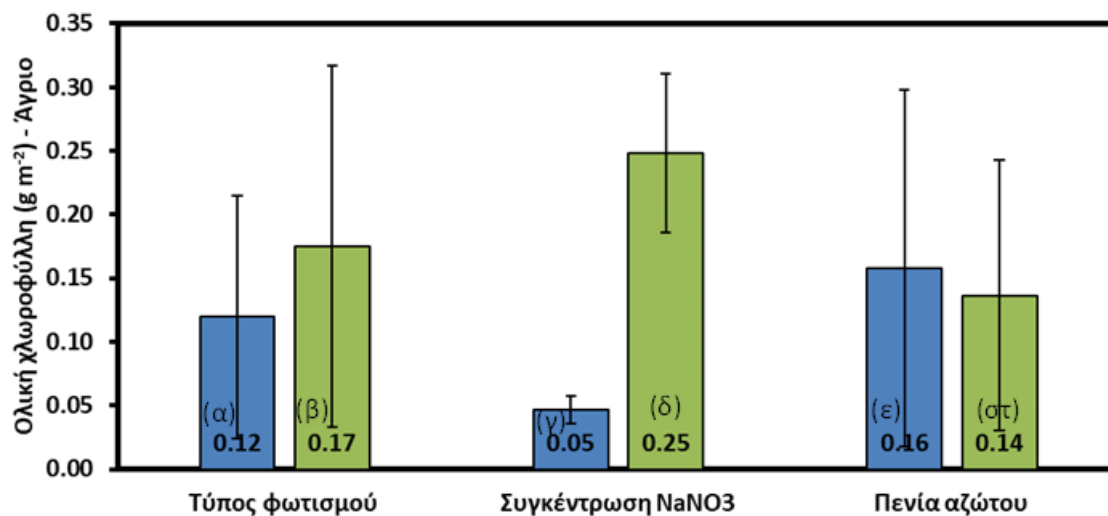
**Σχήμα 3.21** Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής υδατανθράκων άγριου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου.

Η παραγωγή υδατανθράκων από το μεταλλαγμένο στέλεχος δεν διαφέρει πολύ από αυτή του άγριου στελέχους (**Σχήμα 3.22**). Ο τύπος φωτισμού με αναλαμπές και σε αυτή την περίπτωση δίνει υψηλότερη συγκέντρωση υδατανθράκων όμως έχει μεγάλο σφάλμα άρα καθιστά το σταθερό φωτισμό καλύτερο τρόπο. Μετέπειτα η συγκέντρωση 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> δίνει κατά 9,77 g m<sup>-2</sup> καλύτερη παραγωγή υδατανθράκων από την 0,25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>. Τέλος, χωρίς πενία αζώτου, τα αποτελέσματα είναι βέλτιστα.



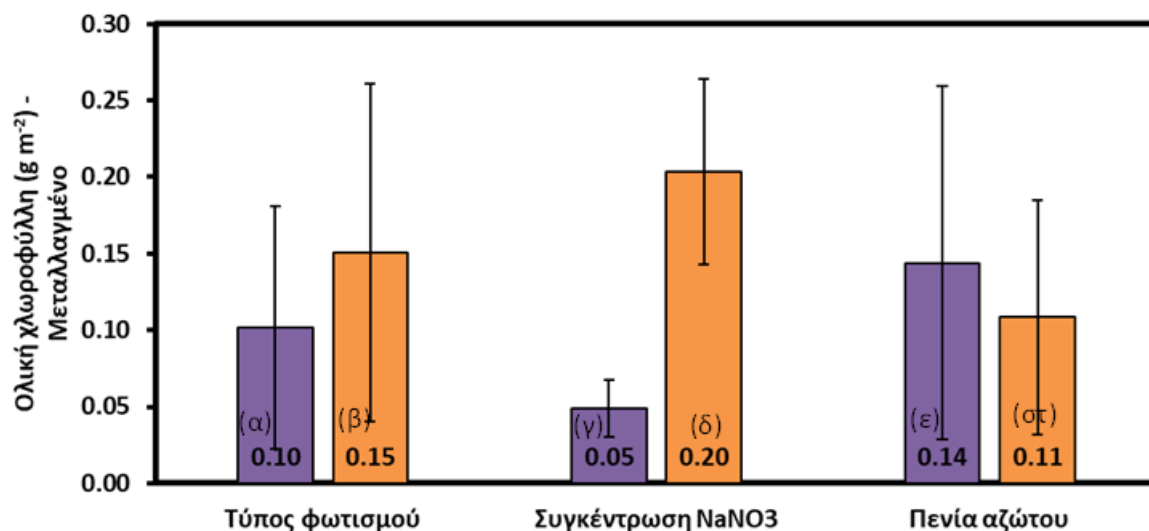
**Σχήμα 3.22** Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής υδατανθράκων μεταλλαγμένου στελέχους σύγκρισης (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25  $\text{g L}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$  με (δ) 0.75  $\text{g L}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$  και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου.

Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις ολικής χλωροφύλλης άγριου στελέχους προέρχονται από φωτισμό με αναλαμπές με διαφορά κατά 0,05  $\text{g m}^{-2}$  από τα αποτελέσματα του σταθερού φωτισμού (**Σχήμα 3.23**). Επόμενος παράγοντας που συμβάλει στη βελτιστοποίηση της παραγωγής είναι η 0,75  $\text{g L}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$  με διαφορά κατά 0,20  $\text{g m}^{-2}$ . Τέλος, η πενία αζώτου δεν επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα.



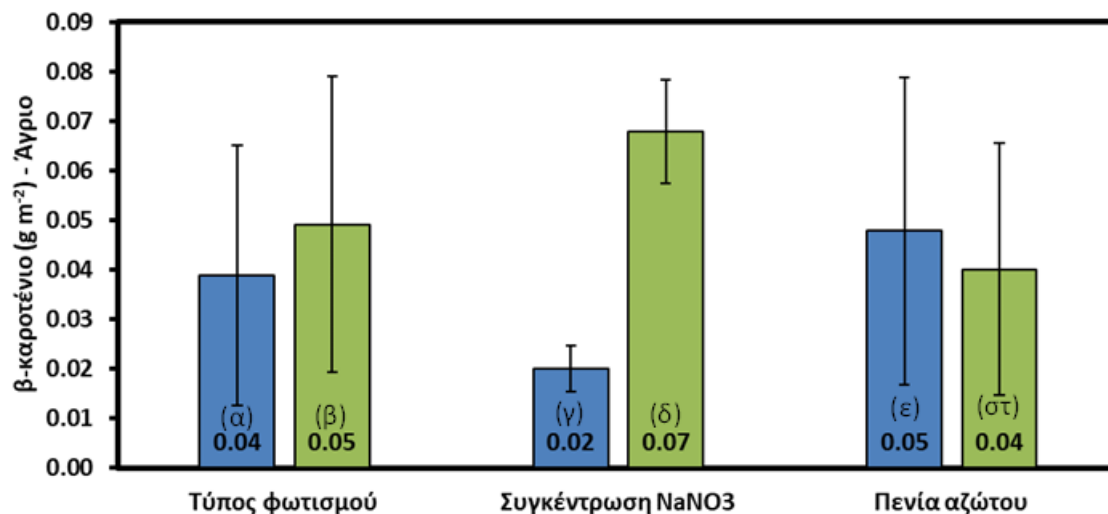
**Σχήμα 3.23** Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής ολικής χλωροφύλλης άγριου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου.

Τα αποτελέσματα ολικής χλωροφύλλης μεταλλαγμένου στελέχους δεν διαφέρουν πολύ από αυτά του άγριου (**Σχήμα 3.24**). Οι βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας των μικροφυκών είναι υπό φωτισμό με αναλαμπές, 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> χωρίς πενία αζώτου. Η μεγαλύτερη διαφορά είναι και σε αυτή την περίπτωση, μεταξύ των αποτελεσμάτων του 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και 0,25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και είναι ίση με 0,20 g m<sup>-2</sup>.



**Σχήμα 3.24** Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής ολικής χλωροφύλλης μεταλλαγμένου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου.

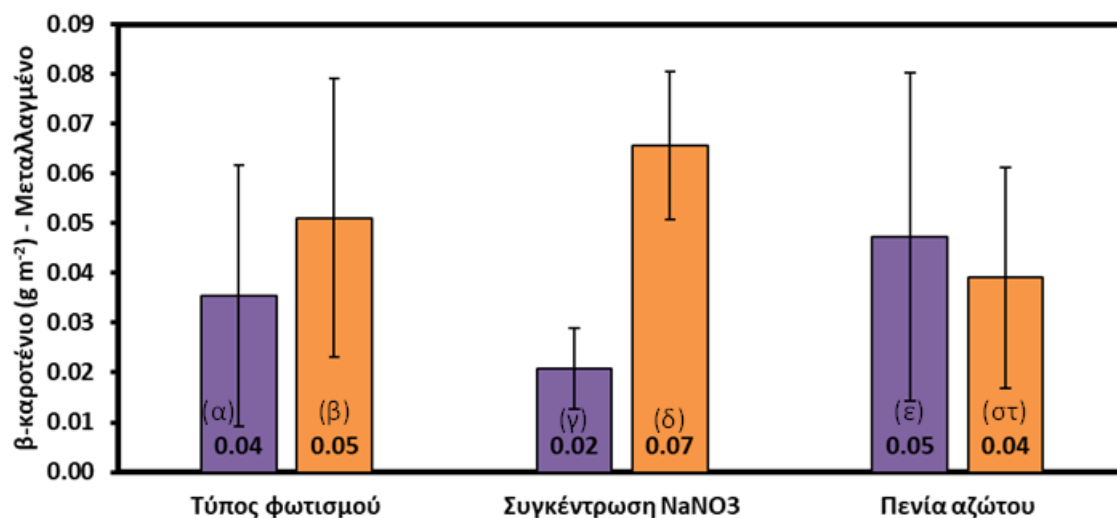
Στο (Σχήμα 3.25) παρουσιάζεται η συγκέντρωση του β-καροτενίου άγριου στελέχους. Αρχικά η παραγωγή του βελτιστοποιείται σε συνθήκες φωτισμού με αναλαμπές με 0,01 g m<sup>-2</sup> διαφορά από το σταθερό φωτισμό. Έπειτα τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη χρήση 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> είναι κατά 0,05 g m<sup>-2</sup> υψηλότερα από αυτά που προκύπτουν από τις δοκιμές με 0,25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>. Ο τρίτος παράγοντας που εξετάζεται είναι η πενία του αζώτου. Μέγιστη παραγωγή β-καροτενίου παρατηρείται όταν οι καλλιέργειες αναπτύσσονται χωρίς πενία αζώτου.



**Σχήμα 3.25** Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής β-καροτενίου άγριου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου.

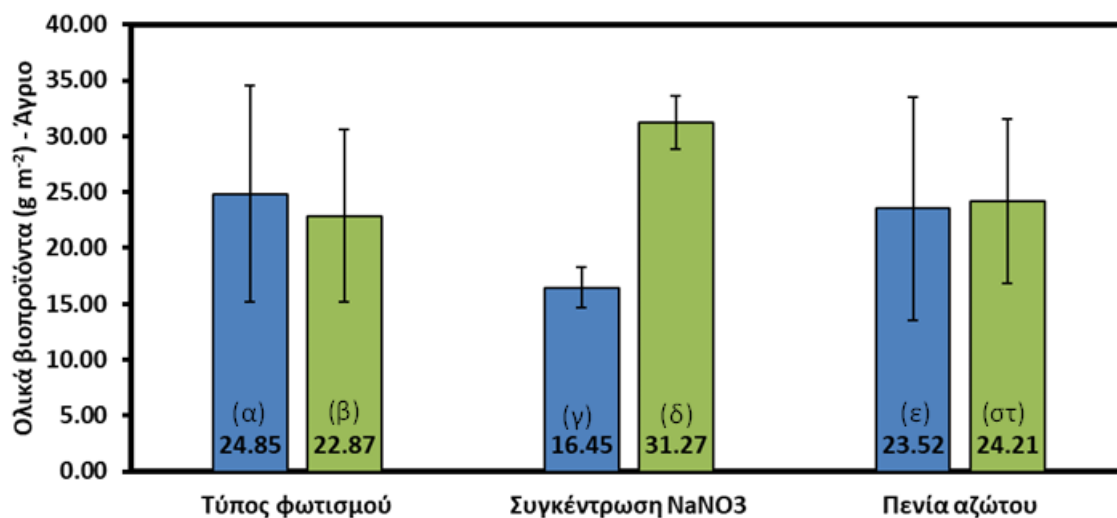
Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 3.26** οι συνθήκες ανάπτυξης μεταλλαγμένου στελέχους που δίνουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις β-καροτενίου είναι ο φωτισμός με αναλαμπές, κατά 0,01 g m<sup>-2</sup> από το σταθερό φωτισμό, η συγκέντρωση 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> χωρίς πενία αζώτου κατά 0,05 g m<sup>-2</sup> και 0,01 g m<sup>-2</sup> από τη συγκέντρωση 0,25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και την πενία αζώτου αντίστοιχα.





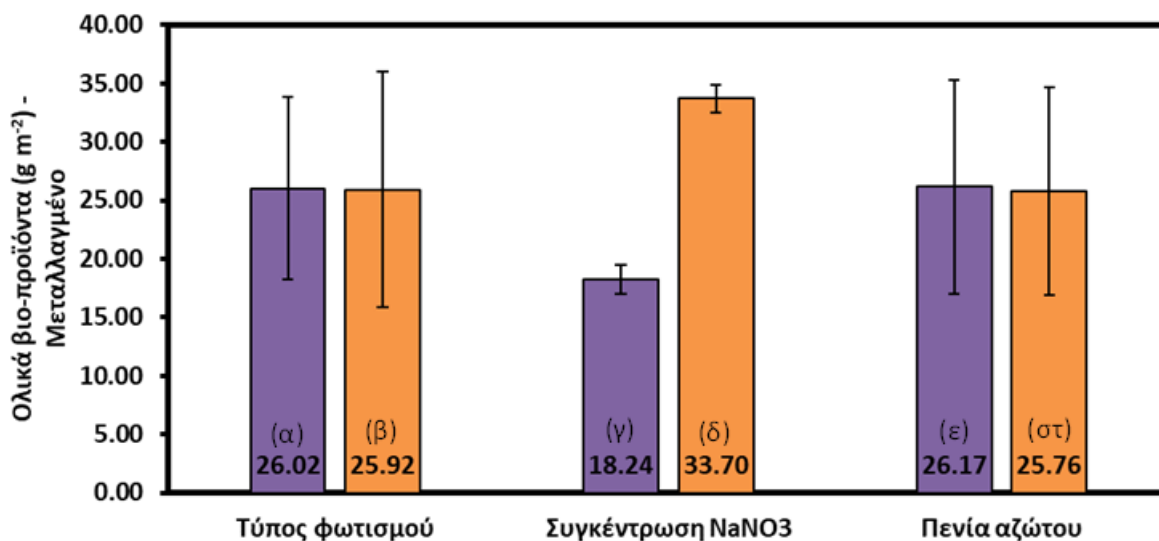
**Σχήμα 3.26** Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής β-καροτενίου μεταλλαγμένου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου.

Παρακάτω στο **Σχήμα 3.27** παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι τελικές συγκεντρώσεις των ολικών βιο-προϊόντων άγριου στελέχους. Παρατηρείται ότι ο βέλτιστος τύπος φωτισμού είναι ο σταθερός με παραγωγή κατά 1,98 g m<sup>-2</sup> μεγαλύτερη από αυτήν του φωτισμού με αναλαμπές. Στη συνέχεια, η συγκέντρωση 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> έχει παραγωγή 31,27 g m<sup>-2</sup>, κατά 14,82 g m<sup>-2</sup> υψηλότερη από την παραγωγή που προκύπτει από τη συγκέντρωση 0,25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>. Τέλος, η πενία αζώτου φαίνεται να βελτιστοποιεί την παραγωγή των ολικών βιο-προϊόντων άγριου στελέχους.



**Σχήμα 3.27** Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής ολικών βιο-προϊόντων άγριου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ) 0.25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> με (δ) 0.75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου.

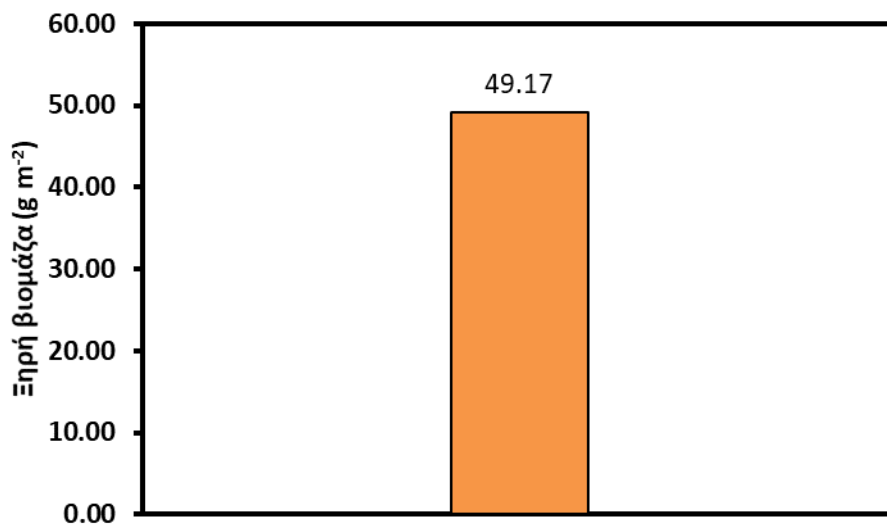
Ως προς τα ολικά βιο-προϊόντα μεταλλαγμένου στελέχους, οι συνθήκες που προσφέρουν τις βέλτιστες συγκεντρώσεις παρουσιάζονται στο **Σχήμα 3.28**. Όπως φαίνεται, ο πιο αποδοτικός τύπος φωτισμού είναι ο σταθερός φωτισμός με παραγωγή 26,02 g m<sup>-2</sup>. Έπειτα παρατηρείται ότι βέλτιστο αποτέλεσμα δίνεται όταν γίνεται χρήση 0,75 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> αντί για 0,25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>. Η Τρίτη παράμετρος που εξετάστηκε είναι η πενία του αζώτου και από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μη ύπαρξη πενίας αζώτου, βελτιστοποιεί την ανάπτυξη.



**Σχήμα 3.28** Συγκεντρωτικό διάγραμμα παραγωγής ολικών βιο-προϊόντων μεταλλαγμένου στελέχους σύγκρισης αποτελεσμάτων (α) σταθερού φωτισμού με (β) φωτισμό με αναλαμπές, (γ)  $0.25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  με (δ)  $0.75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  και (ε) χωρίς πενία αζώτου σε σχέση με (στ) την πενία αζώτου.

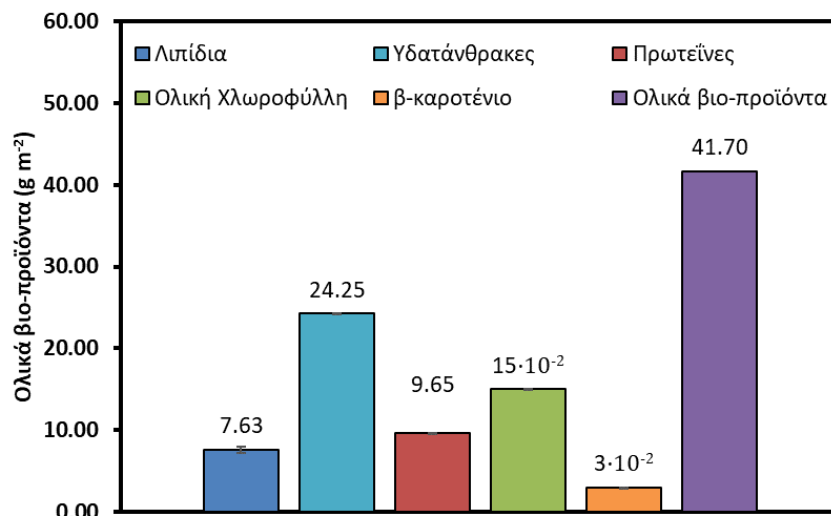
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ξηρής βιομάζας (**Σχήμα 3.29**) και των βιο-προϊόντων (**Σχήμα 3.30**) που προέρχονται από το πείραμα κλιμάκωσης του άγριου στελέχους *Stichococcus* sp. που διεξήχθη σε φωτο-βιοαντιδραστήρα με επιλεγμένες συνθήκες ανάπτυξης. Η πολιτική λειτουργίας που επιλέχθηκε ήταν με γνώμονα τη μεγιστοποίηση παραγωγής βιομάζας και πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό, η συγκέντρωση  $\text{NaNO}_3$  ήταν  $0,75 \text{ g L}^{-1}$ , ο φωτισμός σταθερός (χωρίς αναλαμπές) και δεν εφαρμόστηκε πενία αζώτου. Σημειώνεται ότι η πολιτική λειτουργίας επιλέγεται ανάλογα με το ενδιαφέρον που υπάρχει για την ανάκτηση βιομάζας ή για το κάθε βιοπροϊόν, αντίστοιχα. Η τροφοδοσία της καλλιέργειας με  $\text{CO}_2$  γινόταν και αυτή μέσω αερίου μίγματος που προσομοιώνει ατμόσφαιρα φυσικού αερίου από μονάδα παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας, όπως στην περίπτωση των πειραμάτων μικρής κλίμακας.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.29** η παραγωγή ξηρής βιομάζας από το φωτο-βιοαντιδραστήρα διαστάσεων  $150 \times 40 \times 15 \text{ cm}$ , είναι  $49,17 \text{ g m}^{-2}$ .



**Σχήμα 3.29** Παραγωγή ξηρής βιομάζας από το φωτο-βιοαντιδραστήρα

Όσον αφορά τα βιο-προϊόντα που προέκυψαν από την καλλιέργεια σε φωτο-βιοαντιδραστήρα, αυτά παρουσιάζονται στο **Σχήμα 3.30**. Αναλυτικότερα, παρατηρείται ότι η υψηλότερη παραγωγή προκύπτει στους υδατάνθρακες με συγκέντρωση 24,25 g m<sup>-2</sup>. Έπειτα το επόμενο βιο-προϊόν που προέκυψε είναι οι πρωτεΐνες με συγκέντρωση 9,65 g m<sup>-2</sup>. Ακολουθούν τα λιπίδια με 7,63 g m<sup>-2</sup>, η ολική χλωροφύλλη με 0,15 g m<sup>-2</sup> και το β-καροτένιο με 0,03 g m<sup>-2</sup>. Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις συγκεντρώσεις, προέκυψαν τα ολικά βιο-προϊόντα, 41,70 g m<sup>-2</sup>.



**Σχήμα 3.30** Παραγωγή βιο-προϊόντων από το φωτο-βιοαντιδραστήρα

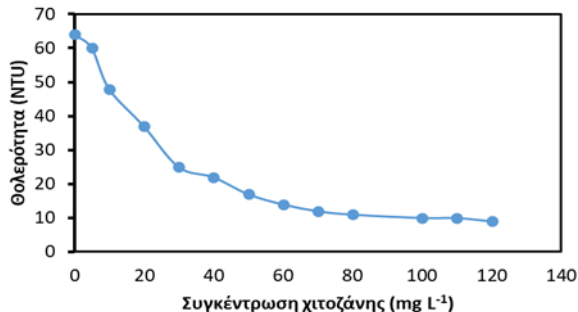
### 3.2 Βέλτιστος Διαχωρισμός Βιομάζας

Για το διαχωρισμό της βιομάζας από το υγρό καλλιέργειας εξετάστηκαν πέντε (5) διαφορετικές μέθοδοι, όπως αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2.2. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των συμβατικών μεθόδων φυγοκέντρησης, διήθησης, κροκίδωσης, σε σχέση με την απομάκρυνση βιομάζας από σύστημα καλλιέργειας ακινητοποιημένων κυττάρων. Η κροκίδωση των κυττάρων συνδυάστηκε με τις μεθόδους φυγοκέντρησης και διήθησης. Στην επόμενη ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα πειραμάτων για την εύρεση βέλτιστης δόσης κροκιδωτικού.

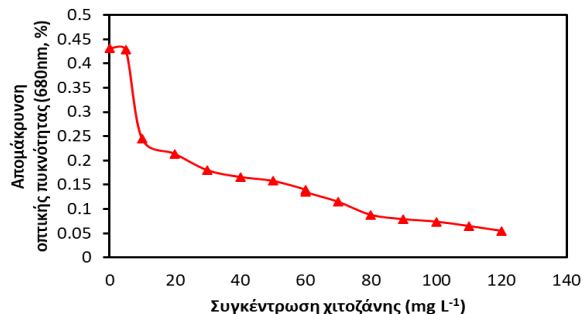
#### 3.2.1 Εύρεση Βέλτιστης Δόσης Κροκιδωτικού

Στα Σχήματα **Σχήμα 3.31** απεικονίζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της θολερότητας και οπτικής πυκνότητας σε σχέση με τη συγκέντρωση του κροκιδωτικού μέσου, καθώς και της ξηρής βιομάζας στο υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας πριν και μετά την κροκίδωση εφαρμόζοντας τη βέλτιστη δόση. Ως κροκιδωτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε η χιτοζάνη.

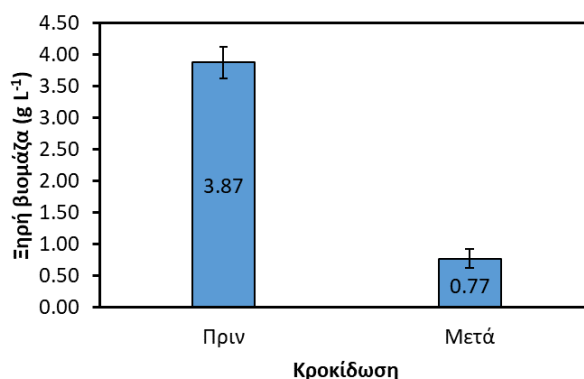
**A)**



**B)**



**Γ)**



**Σχήμα 3.31 A)** Θολρότητα στο υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας σε σχέση με τη συγκέντρωση χιτοζάνης (mg L<sup>-1</sup>), **B)** Οπτική πυκνότητα στο υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας σε σχέση με τη συγκέντρωση χιτοζάνης (mg L<sup>-1</sup>) και **Γ)** Συγκέντρωση ξηρής βιομάζας στο υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας, πριν και μετά την κροκίδωση με τη βέλτιστη δόση κροκιδωτικού.

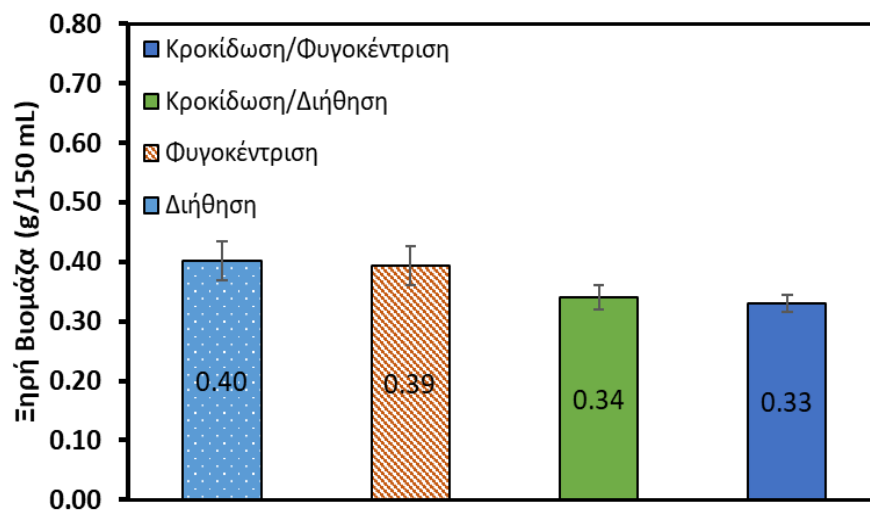
Από τα παραπάνω διαγράμματα (**Σχήμα 3.31 A & B**) παρατηρείται πως η ελάχιστη συγκέντρωση κροκιδωτικού είναι τα 80 mg L<sup>-1</sup>, επιτυγχάνοντας καθίζηση των κυττάρων κατά 80%. Εφαρμόζοντας μέχρι και 120 mg L<sup>-1</sup> χιτοζάνης, προκαλείται έως και 87% απομάκρυνση οπτικής πυκνότητας του υγρού καλλιέργειας. Το pH των δειγμάτων πριν την κροκίδωση ήταν 8,03±0,04, το οποίο σύμφωνα με τους Blockx et al. (2018) πρέπει να είναι >7,5 για την κροκίδωση σε θαλασσινό νερό, όπως στη συγκεκριμένη μελέτη. Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν στοιχεία για την κροκίδωση του *Stichococcus* sp. με τη χρήση χιτοζάνης. Όμως, στη

μελέτη των Blockx et al. (2018), η βέλτιστη δόση για το *Nannochloropsis* σε περιβάλλον θαλασσινού νερού ήταν στα  $75 \text{ g L}^{-1}$ , παραπλήσιο με το βέλτιστο των  $80 \text{ mg L}^{-1}$  της παρούσας μελέτης. Στο **(Σχήμα 3.31 Γ)** δίνονται τα αποτελέσματα ξηρής βιομάζας πριν και μετά την εφαρμογή κροκίδωσης, χρησιμοποιώντας τη βέλτιστη δόση κροκιδωτικού. Η βιομάζα στο εναιώρημα μειώθηκε από  $3,87 \text{ g L}^{-1}$ , στα  $0,77 \text{ g L}^{-1}$ . Στη συνέχεια, η κροκιδωμένη βιομάζα ανακτήθηκε με τις μεθόδους φυγοκέντρισης και διήθησης, όπως περιγράφονται στο επόμενο κεφάλαιο.

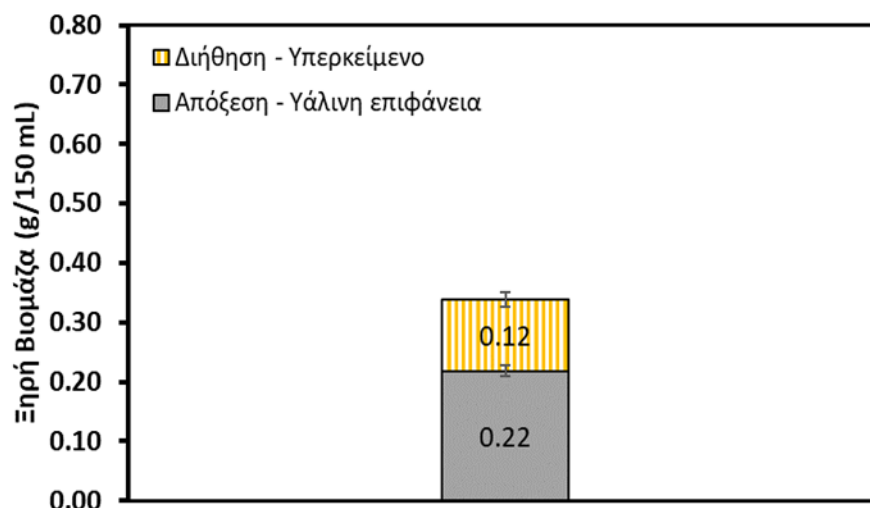
### 3.2.2 Πρωτόκολλα Διαχωρισμού Βιομάζας

Για το διαχωρισμό της βιομάζας εξετάστηκαν 5 μεθοδολογίες, όπως παρουσιάζονται στο Οι 3 κύριες μέθοδοι είναι η διήθηση, η φυγοκέντρωση και η απόξεση ακινητοποιημένων κυττάρων. Η διήθηση και η φυγοκέντρωση συνδυάστηκαν και με τη μέθοδο της κροκίδωσης. Όσον αφορά τα αποτελέσματα απόξεσης με μηχανικό ξέστρο, μετρήθηκε η συγκέντρωση τόσο στην ανακτημένη βιομάζα, όσο στο υπερκείμενο υγρό που αντλήθηκε για την απομάκρυνση των γυαλιών αμμοβολής από τον πυθμένα των δοχείων καλλιέργειας.

A)



**B)**



**Σχήμα 3.32 Α)** Δεδομένα ξηρής βιομάζας *Stichococcus sp.* σε g ανά 150 mL όγκου καλλιέργειας, εφαρμόζοντας διαφορετικά πρωτόκολλα ανάκτησης: Κροκίδωση, Φυγοκέντριση, Διήθηση και **Β)** Μηχανικό ξέστρο

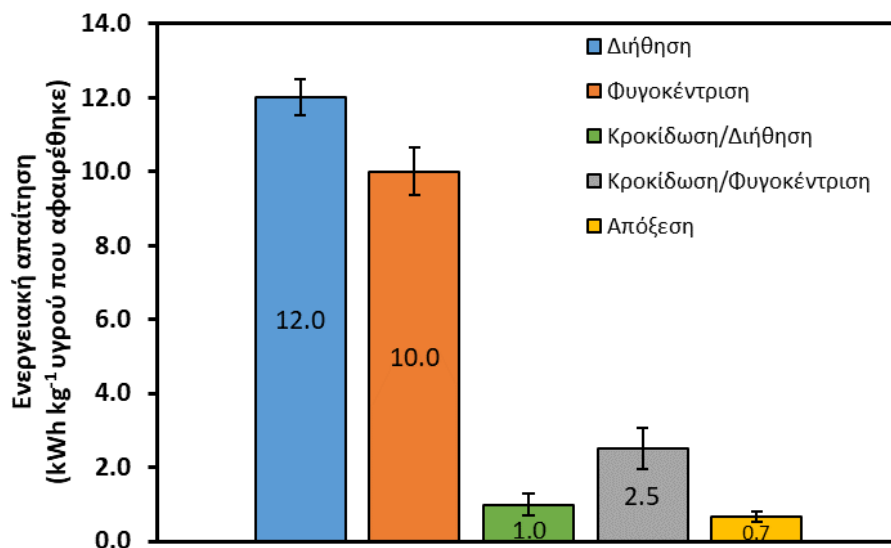
Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται ότι με την εφαρμογή των μεθόδων διήθησης και φυγοκέντρισης επιτυγχάνεται μέγιστη ανάκτηση 0,4 και 0,39 g/150 mL, αντίστοιχα, σε σχέση με τις λοιπές μεθόδους. Αυτό προκύπτει, καθώς όλο το υλικό καλλιέργειας επεξεργάζεται για την ανάκτηση των κυττάρων, επομένως, επιτυγχάνεται μέγιστη ανάκτηση. Συνδυάζοντας τις παραπάνω μεθόδους με την κροκίδωση, η ανάκτηση μειώνεται κατά 13-20%, το οποίο δικαιολογείται από τα αποτελέσματα του **Σχήμα 3.31**, καθώς μετά την εφαρμογή κροκίδωσης επιτυγχάνεται 80% ανάκτηση. Όσον αφορά την ανάκτηση ακινητοποιημένων κυττάρων από την υάλινη επιφάνεια, παρατηρείται ότι η ξηρή βιομάζα έχει τη μικρότερη τιμή, ήτοι 0,22 g/150 mL, ενώ στο υπερκείμενο είναι 0,12 g/150 mL. Αυτό συμβαίνει διότι κατά την άντληση του υπερκείμενου υγρού απομακρύνεται και ένα μέρος αιωρούμενων κυττάρων που δεν έχουν προσκολληθεί στο γυαλί αμβολής. Όμως, το ανακτημένο υπερκείμενο υγρό, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εμβόλιο (inoculum) για τον επόμενο κύκλο καλλιέργειας καθώς περιέχει ικανοποιητική ποσότητα βιομάζας ή να επεξεργαστεί περαιτέρω για το διαχωρισμό των κυττάρων. Επίσης, το υπερκείμενο υγρό δεν περιέχει υπολείμματα από προηγούμενη επεξεργασία, όπως π.χ. από τη διεργασία της κροκίδωσης, τα οποία θα επιμολύνουν τις μελλοντικές καλλιέργειες.



Προκειμένου να γίνει καλύτερη σύγκριση των διεργασιών διαχωρισμού βιομάζας από το υγρό της καλλιέργειας, έγινε εκτίμηση της ενεργειακής απαίτησης με βάση τον εργαστηριακό εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η κατανάλωση ρεύματος σε kWh ανά kg υγρής καλλιέργειας για την κάθε διεργασία που εφαρμόστηκε.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρατηρείται ότι τη μεγαλύτερη κατανάλωση ηλεκτρικού ρεύματος έχει η διήθηση υπό κενό, με τιμή  $12,0 \text{ kWh kg}^{-1}$  υγρού που αφαιρέθηκε, ενώ ακολουθεί η φυγοκέντρωση με τιμή  $10,0 \text{ kWh kg}^{-1}$ . Σε αντίθεση, τη χαμηλότερη κατανάλωση παρουσιάζει η απόξεση ακινητοποιημένης βιομάζας από τα γυαλιά αμμοβολής.

Με βάση τα Σχήμα 3.32 και Σχήμα 3.33, αν και η ανάκτηση ακινητοποιημένης βιομάζας μέσω μηχανικού ξέστρου έχει χαμηλή απόδοση, σε σχέση με τις υπόλοιπες διεργασίες που εφαρμόζονται σε συστήματα καλλιέργειας κυττάρων υπό αιώρηση (Σχήμα 3.32), σημειώνει τη χαμηλότερη ενεργειακή απαίτηση και το ανακτημένο υγρό (Σχήμα 3.33), μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκ νέου σε επόμενες καλλιέργειες με την προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού. Η κροκίδωση, σε σχέση με τη διήθηση και τη φυγοκέντρωση μόνο, απαιτεί αρκετά μικρότερη ενέργεια, συγκεκριμένα μία τάξη μεγέθους παρακάτω, καθώς το υλικό καλλιέργειας έχει ήδη υποστεί προεπεξεργασία και έχει γίνει ένας αρχικός διαχωρισμός της βιομάζας από το υγρό της καλλιέργειας. Συνεπώς, δεν επεξεργάζεται όλο το υλικό καλλιέργειας, αλλά μόνο η κροκιδωμένη βιομάζα (μέσω διήθησης ή φυγοκέντρωσης). Τα προαναφερθέντα επιβεβαιώνονται και από τους Fasaei et al. (2018). Παρόμοιο με την κροκίδωση συμβαίνει και στην περίπτωση της καλλιέργειας ακινητοποιημένων κυττάρων με τη μετέπειτα απόξεση τους. Επιτυγχάνεται η χαμηλότερη κατανάλωση ενέργειας όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χωρίς την επιπλέον χρήση κροκιδωτικών, μειώνοντας τα στάδια επεξεργασίας και κρατώντας σε χαμηλό επίπεδο το κόστος ανάκτησης.



**Σχήμα 3.33** Ενεργειακή απαίτηση ηλεκτρικού ρεύματος ανά κιλό υγρού που αφαιρέθηκε για κάθε μία από τις εξεταζόμενες διεργασίες διαχωρισμού από το υγρό της καλλιέργειας.

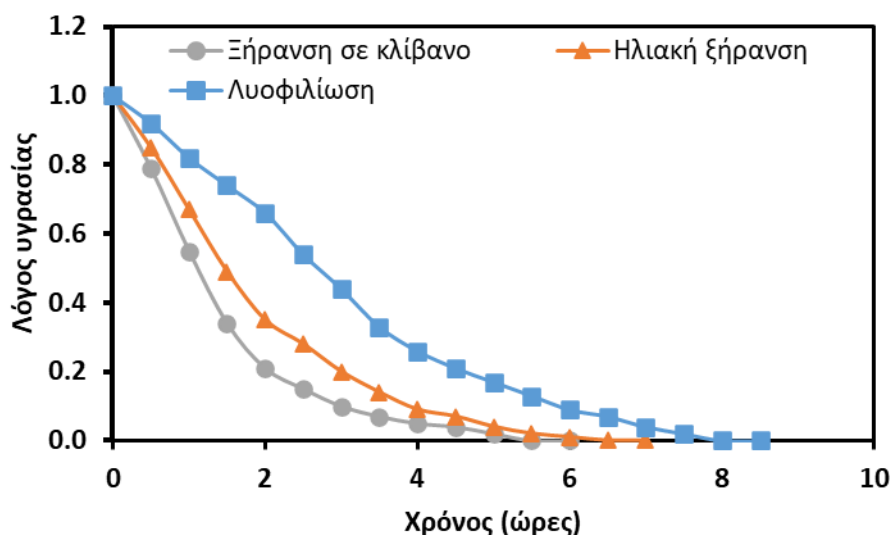
Συνέχεια του διαχωρισμού βιομάζας έχει η αφυδάτωση της, καθώς η περιεκτικότητα σε υγρασία είναι ακόμα υψηλή. Στις επόμενες ενότητες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μεθοδολογιών αφυδάτωσης που εξετάστηκαν.

### 3.3 Πρωτόκολλα Αφυδάτωσης Βιομάζας

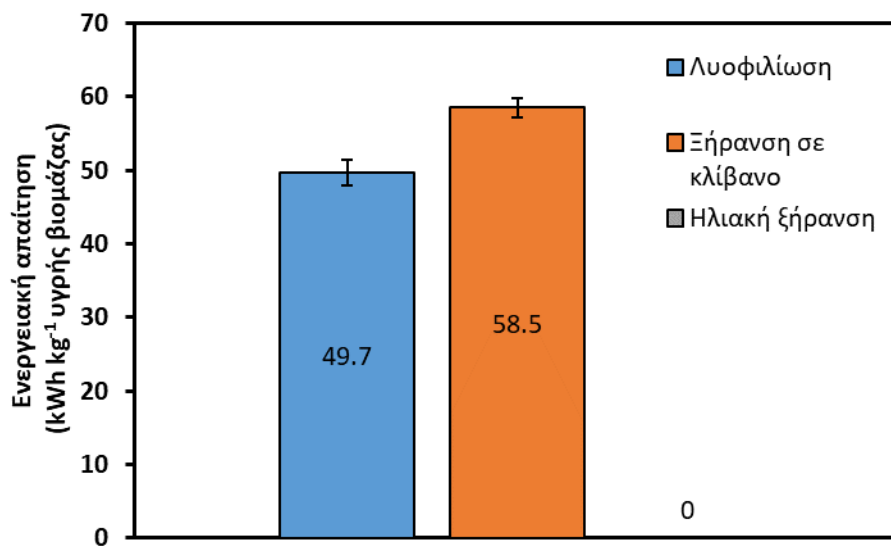
Έπειτα από το διαχωρισμό της βιομάζας ακολούθησε η αφυδάτωση της εφαρμόζοντας τρεις διαφορετικές μεθόδους: τη ξήρανση σε κλίβανο, την ηλιακή ξήρανση και τη λυοφιλίωση. Όμοια ποσότητα βιομάζας 21 g με περιεκτικότητα σε υγρασία 39% απλώθηκε σε τριβλία petri για τη διερεύνηση του χρόνου ξήρανσης.

Στο **Σχήμα 3.34** παρατηρείται ότι η ταχύτερη μέθοδος ξήρανσης είναι η ξήρανση σε κλίβανο, απαιτώντας περίπου 5 h για την αφυδάτωση του δείγματος. Για την ηλιακή ξήρανση απαιτήθηκαν 6,5 h, ενώ για τη λυοφιλίωση 8 h. Σημειώνεται ότι, η ηλιακή ξήρανση εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, επομένως δεν μπορεί να εφαρμοστεί καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, η μέγιστη θερμοκρασία εντός του ηλιακού ξηραντή κυμαινόταν στους 58-60 °C, η οποία ήταν παραπλήσια με τη θερμοκρασία που είχε επιλεγεί στον κλίβανο (60 °C). Τα αποτελέσματα ξήρανσης σε κλίβανο και ηλιακής ξήρανσης είναι συγκρίσιμα με των Agbede et al. (2020).

Συγκρίνοντας την ενεργειακή απαίτηση των παραπάνω μεθόδων αφυδάτωσης, διαπιστώθηκε ότι η ξήρανση σε κλίβανο, αν και ήταν η ταχύτερη μέθοδος (**Σχήμα 3.34**), σημειώνει τη μεγαλύτερη κατανάλωση ηλεκτρικού ρεύματος, με τιμή  $58,5 \text{ kWh kg}^{-1}$  υγρής βιομάζας (**Σχήμα 3.35**). Η ηλιακή ξήρανση σημειώνει μηδενική κατανάλωση, διότι χρησιμοποιήθηκε παθητικός ηλιακός ξηραντής, ο οποίος δε διαθέτει ηλεκτρονικό σύστημα αερισμού, αλλά φυσικό. Οι Min et al., αναφέρουν ότι για τη λυοφιλίωση απαιτούνται περίπου  $45,75 \text{ kWh kg}^{-1}$ , για τη ξήρανση σε κλίβανο  $55,87\text{--}60,67 \text{ kWh kg}^{-1}$  και για την ηλιακή ξήρανση  $0,01\text{--}0,1 \text{ kWh kg}^{-1}$ . Παρόμοια αποτελέσματα για τη ξήρανση σε κλίβανο έχουν βρεθεί και από τους Agbede et al. (2020) και Behera et al. (2021).



**Σχήμα 3.34** Καμπύλες μείωσης λόγου υγρασίας σε σχέση με το χρόνο, εφαρμόζοντας διαφορετικές διεργασίες ξήρανσης βιομάζας μικροφυκών.

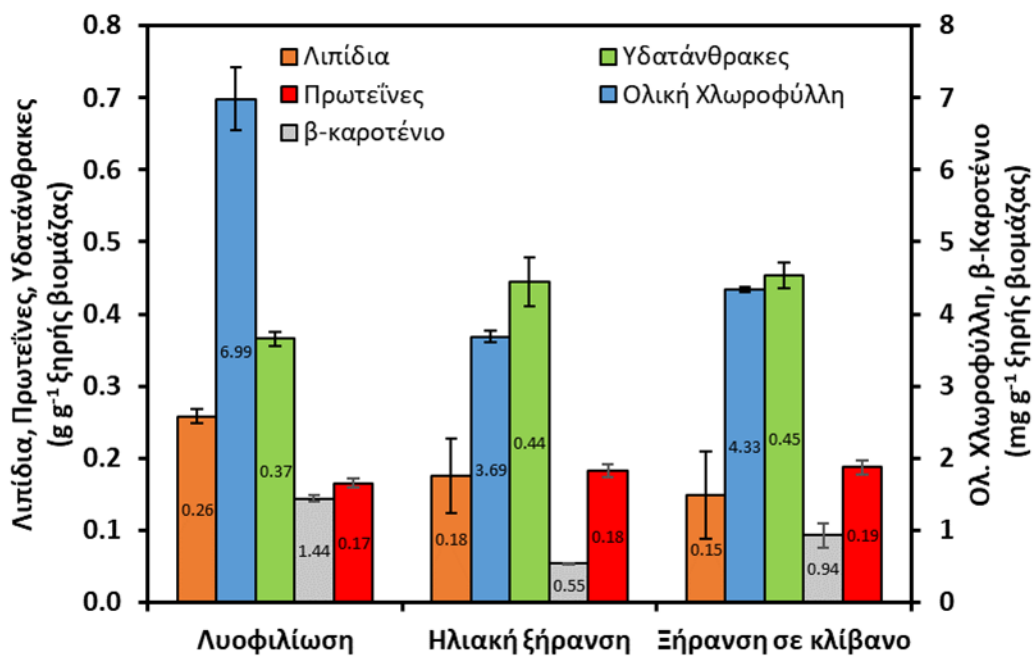


**Σχήμα 3.35** Ενεργειακή απαίτηση ηλεκτρικού ρεύματος ανά κιλό υγρής βιομάζας για κάθε μία από τις εξεταζόμενες διεργασίες αφυδάτωσης.

### 3.4 Πρωτόκολλα Μέτρησης Βιο-προϊόντων

Τελικό στάδιο επεξεργασίας της ανακτημένης βιομάζας, αποτέλεσε η μετατροπή της σε βιο-προϊόντα. Μετρήθηκαν τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, η ολική χλωροφύλλη και το β-καροτένιο, έπειτα από κάθε μέθοδο αφυδάτωσης.

Με βάση το παρακάτω διάγραμμα (**Σχήμα 3.36**) παρατηρείται ότι εφαρμόζοντας τη μέθοδο της λυοφιλίωσης σημειώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά στα αποτελέσματα λιπιδίων, ολικής χλωροφύλλης και β-καροτενίου, με τις μέγιστες τιμές να είναι 0,3 g g<sup>-1</sup>, 7,0 mg g<sup>-1</sup> και 1,4 mg g<sup>-1</sup> βιομάζας. Στην περίπτωση των θερμών ξηράσεων, προκαλείται οξειδωτική αποδόμηση των κυττάρων, με αποτέλεσμα τη χαμηλότερη ανάκτηση των προϊόντων αυτών, σε σχέση με τη λυοφιλίωση (Shekarabi et al., 2019). Το ίδιο επιβεβαιώνεται και στην περίπτωση των λιπιδίων, σύμφωνα με τους Behera et al., (2021) και Hosseinizand et al. (2017). Όσον αφορά τους υδατάνθρακες, η μεγιστοποίηση επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλιακής ξήρανσης και ξήρανσης σε κλίβανο, με μέγιστη τιμή 0,45 g g<sup>-1</sup> βιομάζας. Τέλος, για τις πρωτεΐνες δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μεθόδων αφυδάτωσης, με τη μέγιστη τιμή να είναι 0,19 g g<sup>-1</sup> βιομάζας και προκύπτει από τη ξήρανση σε κλίβανο. Παρόμοια αποτελέσματα μη επιρροής των πρωτεϊνών από τις μεθόδους ξήρανσης έχουν βρεθεί και από τους Hosseinizand et al. (2017).



**Σχήμα 3.36** Παραγωγή βιο-προϊόντων από βιομάζα *Stichococcus* sp., έπειτα από την εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων αφυδάτωσης.

#### 4 Συμπεράσματα - Προτάσεις

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι χρήσιμα για την ανάπτυξη αποτελεσματικών διαδικασιών ανάκτησης και ξήρανσης βιομάζας μικροφυκών, με χαμηλές περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Αρχικά, έγιναν δοκιμές ώστε να βρεθεί η μέθοδος που προσφέρει τη βέλτιστη ανάπτυξη των μικροφυκών. Οι δοκιμές αυτές έγιναν στις μικρής κλίμακας καλλιέργειες, που αναπτύχθηκαν σε ποτήρια ζέσεως, και αφορούσαν τον τύπο του φωτισμού (σταθερός ή με αναλαμπές), τη συγκέντρωση  $\text{NaNO}_3$  ( $0,25$  ή  $0,75 \text{ g L}^{-1}$ ) και την πενία αζώτου (χωρίς πενία ή με πενία τριών ημερών). Από τις συγκεκριμένες καλλιέργειες υπολογίστηκε η ξηρή βιομάζα και τα ολικά βιο-προϊόντα άγριου και μεταλλαγμένου στελέχους. Αποδείχθηκε ότι ο τύπος του φωτισμού δεν προκάλεσε σημαντικές διαφορές (αρνητική πτώση) στην παραγωγή ξηρής βιομάζας και βιο-προϊόντων, επομένως, θα μπορούσε να εφαρμοσθεί ένα τέτοιο σύστημα για τη μείωση κατανάλωσης ηλεκτρικού ρεύματος, παράγοντας ικανοποιητικές ποσότητες βιομάζας. Από την άλλη, η συγκέντρωση του  $\text{NaNO}_3$  είχε σημαντικές συνέπειες στην παραγωγή. Αναλυτικότερα, από τη χρήση  $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  προέκυψε υψηλή παραγωγή ξηρής βιομάζας και βιο-προϊόντων, ανεξαιρέτου άγριου και μεταλλαγμένου στελέχους, ενώ με τη χρήση  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ , η παραγωγή ήταν πολύ χαμηλή. Στη συνέχεια, η πενία αζώτου δεν προκάλεσε σημαντικές διαφορές στην παραγωγή ξηρής βιομάζας και βιο-προϊόντων εκτός των λιπιδίων. Συγκεκριμένα, η πενία αζώτου συνέβαλε θετικά στην υψηλότερη παραγωγή λιπιδίων. Το περιεχόμενο  $\text{CO}_2$  του αερίου μίγματος τροφοδοσίας δεσμεύτηκε επιτυχώς από τη βιομάζα *Stichococcus*, αυξάνοντας σημαντικά την ανάπτυξη του στελέχους.

Έπειτα, εξετάστηκε η αποδοτικότητα επιλεγμένων μεθόδων: (1) διαχωρισμού βιομάζας από το υγρό καλλιέργειας (διήθηση, φυγοκέντρωση, κροκίδωση, απόξεση βιομάζας), (2) αφυδάτωσης βιομάζας (λυοφιλίωση, κλίβανος, ηλιακή ξήρανση) και (3) προσδιορισμό προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, χλωροφύλλη, β-καροτένιο) έπειτα από την εφαρμογή κάθε μεθόδου αφυδάτωσης. Η απόξεση βιομάζας από σύστημα ακινητοποιημένων κυττάρων αν και σημειώνει χαμηλή ανάκτηση, φαίνεται να είναι η πιο ενεργειακά αποδοτική, απαιτώντας τη χαμηλότερη κατανάλωση ηλεκτρικού ρεύματος, καθώς μειώνονται τα στάδια επεξεργασίας και το υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας θα μπορούσε να επαναχρησιμοποιηθεί ως προκαλλιέργεια σε επόμενους κύκλους καλλιέργειας. Όσον αφορά τις διαδικασίες ξήρανσης, η ξήρανση σε φούρνο ήταν η ταχύτερη, αλλά η πιο ενεργοβόρα διαδικασία, ακολουθούμενη από τη λυοφιλίωση. Αν και η ηλιακή ξήρανση έχει μηδενικές ενεργειακές απαιτήσεις, στερείται συνέπειας λόγω των μεταβαλλόμενων καιρικών συνθηκών. Οι διαδικασίες ξήρανσης συνδέονται με την ανάκτηση βιο-προϊόντων, καθώς επηρεάζουν την

απόδοση ανάκτησης τους. Η επιλογή των κατάλληλων διαδικασιών ανάκτησης και ξήρανσης βιομάζας θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά το κόστος παραγωγής, μεγιστοποιώντας τα έσοδα από προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Με βάση την παρούσα διπλωματική εργασία και τα όσα εξετάστηκαν, θα μπορούσαν να δοθούν οι παρακάτω μελλοντικές προτάσεις για μελέτη, με σκοπό τον εμπλουτισμό της βιβλιογραφίας ως προς το στέλεχος *Stichococcus* sp.

Οι μελλοντικές προτάσεις που δίνονται είναι οι εξής:

- Εξέταση περισσότερων παραμέτρων ανάπτυξης και χρήση διαφορετικών τύπων φωτο-βιοαντιδραστήρα.
- Αναφορικά με την ανάπτυξη του στελέχους *Stichococcus* sp., θα ήταν χρήσιμο να γίνει η ίδια έρευνα με χρήση όμως πραγματικών καυσαερίων, πχ. από εργοστάσιο παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας, με σκοπό τη δέσμευση CO<sub>2</sub> και τη μετατροπή του σε βιο-προϊόντα μικροφυκών.
- Μέτρηση του προφίλ λιπαρών οξέων και παραγωγή βιοντίζελ από τη βιομάζα του στελέχους *Stichococcus* sp.
- Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα ανάπτυξης, ανάκτησης και αφυδάτωσης βιομάζας, θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν τεχνοοικονομικές αναλύσεις και προσομοιώσεις σε ειδικό λογισμικό H/Y για την κλιμάκωση των μικροφυκών σε βιομηχανική κλίμακα.

## 5 Βιβλιογραφία

- Abu-Ghosh, S., Dubinsky, Z., Verdelho, V., & Iluz, D. (2021). Unconventional high-value products from microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 329, 124895. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.124895>
- Agbede, O. O., Oke, E. O., Akinfenwa, S. I., Wahab, K. T., Ogundipe, S., Aworanti, O. A., Arinkoola, A. O., Agarry, S. E., Ogunleye, O. O., Osuolale, F. N., Babatunde, K. A., **2020**. Thin layer drying of green microalgae (*Chlorella* sp.) paste biomass: Drying characteristics, energy requirement and mathematical modeling. *Bioresource Technology Reports*, 11: 10046. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100467>
- Ananthi, V., Raja, R., Carvalho, I. S., Brindhadevi, K., Pugazhendhi, A., & Arun, A. (2021). A realistic scenario on microalgae based biodiesel production: Third generation biofuel. *Fuel*, 284, 118965. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2020.118965>
- Anastopoulos, I., & Kyzas, G. Z. (2015). Progress in batch biosorption of heavy metals onto algae. *Journal of Molecular Liquids*, 209, 77–86. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2015.05.023>
- Behera, B., Balasubramanian, P., **2021**. Experimental and modelling studies of convective and microwave drying kinetics for microalgae. *Bioresource Technology*, 340: 125721. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125721>
- Bischoff HW, Bold HC, **1963**. Some Soil Algae from Enchanted Rock and Related Algal Species. Phycological Studies IV., University of Texas Publication No. 6318, Austin, Texas.
- Blockx, J., Verfaillie, A., Thielemans, W., Muylaert, K, **2018**. Unravelling the Mechanism of Chitosan-Driven Flocculation of Microalgae in Seawater as a Function of pH. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 6(9): 11273–11279. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04802>
- Chen, C. L., Chang, J. S., & Lee, D. J. (2015). Dewatering and Drying Methods for Microalgae. *Drying Technology*, 33(4), 443–454. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.997881>
- Chen, G., Zhao, L., Qi, Y., & Cui, Y. L. (2014). Chitosan and its derivatives applied in harvesting microalgae for biodiesel production: An outlook. *Journal of Nanomaterials*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/217537>
- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., & Chang, J. S. (2018a). Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 91, 332–344. <https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2018.05.039>
- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., & Chang, J. S. (2018b). Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 91, 332–344. <https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2018.05.039>
- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., & Chang, J. S. (2018c). Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A



- review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 91, 332–344.  
<https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2018.05.039>
- Daneshvar, E., Sik Ok, Y., Tavakoli, S., Sarkar, B., Shaheen, S. M., Hong, H., Luo, Y., Rinklebe, J., Song, H., & Bhatnagar, A. (2021a). Insights into upstream processing of microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 329, 124870.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.124870>
- Daneshvar, E., Sik Ok, Y., Tavakoli, S., Sarkar, B., Shaheen, S. M., Hong, H., Luo, Y., Rinklebe, J., Song, H., & Bhatnagar, A. (2021b). Insights into upstream processing of microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 329, 124870.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.124870>
- Dassey, A. J., & Theegala, C. S. (2014). Reducing electrocoagulation harvesting costs for practical microalgal biodiesel production. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 35(6), 691–697. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.842602>
- Fasaei, F., Bitter, J. H., Slegers, P. M., van Boxtel, A. J. B., **2018**. Techno-economic evaluation of microalgae harvesting and dewatering systems. *Algal Research*, 31: 347-362.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.038>.
- Folch J, Lees M, Stanley S, **1957**. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226(1): 497-509.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
- Gaignard, C., Gargouch, N., Dubessay, P., Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Fendri, I., Abdelkafi, S., & Michaud, P. (2019). New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnology Advances*, 37(1), 193–222.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2018.11.014>
- Hodač, L., Hallmann, C., Spitzer, K., Elster, J., Faßhauer, F., Brinkmann, N., Lepka, D., Diwan, V., & Friedl, T. (2016). Widespread green algae *Chlorella* and *Stichococcus* exhibit polar-temperate and tropical-temperate biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8), 122.  
<https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIW122>
- Hosseinizand, H., Sokhansanj, S., Lim, C. J., **2017**. Studying the drying mechanism of microalgae *Chlorella vulgaris* and the optimum drying temperature to preserve quality characteristics. *Drying Technology*, 36(9): 1049-1060.  
<https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1369986>
- Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J. S., & Lee, D. J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 54–67.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2017.09.009>
- Huang, G. H., Chen, F., Wei, D., Zhang, X. W., & Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87(1), 38–46.  
<https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2009.06.016>
- Jiang, J. Q., Graham, N. J. D., & Harward, C. (1993). Comparison of polyferric sulphate with other coagulants for the removal of algae and algae-derived organic matter. *Water Science and Technology (United Kingdom)*. <https://doi.org/10.3/JQUERY-UI.JS>

- Kim, D. G., La, H. J., Ahn, C. Y., Park, Y. H., & Oh, H. M. (2011). Harvest of *Scenedesmus* sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures. *Bioresource Technology*, 102(3), 3163–3168. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.10.108>
- Kim, J. M., Kim, S. R., Kim, J., Kim, M., & Lee, S. W. (2014). A liquid crystal display with consistent moving image quality regardless of viewing angles. *Optics & Laser Technology*, 60, 34–40. <https://doi.org/10.1016/J.OPTLASTEC.2014.01.004>
- Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 6(PA), 52–63. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2014.09.002>
- Lam, M. K., & Lee, K. T. (2012). Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30(3), 673–690. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2011.11.008>
- Lichtenthaler HK, **1987**. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148C:350-382. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Manirafasha, E., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y., & Jing, K. (2016). Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 282–296. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2016.01.025>
- Makaroglou, G., Marakas, H., Fodelianakis, S., Axaopoulou, V. A., Koumi, I., Kalogerakis, N., & Gikas, P., **2021**. Optimization of biomass production from *Stichococcus* sp. biofilms coupled to wastewater treatment. *Biochemical Engineering Journal* 169: 107964. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.107964>
- Makaroglou G., **2021**. Optimization of *Stichococcus* sp. cultivation in lab and pilot scale photo-bioreactors for efficient CO<sub>2</sub> fixation and bio-products production, 3<sup>rd</sup> online International Conference on Environmental Sustainability and Climate Change
- Makaroglou G., Gikas P., **2022**, Lab and photo-bioreactor scale optimization of *Stichococcus* sp. strain for CO<sub>2</sub> sequestration and bio-products production. 1<sup>st</sup> International Conference on Sustainable Chemical and Environmental Engineering, Rethymno, Crete, Greece
- Mitrogiannis D., Makaroglou G. and Gikas P., **2022**, CO<sub>2</sub> mitigation of industrial flue gas using an attached system microalgal photo-bioreactor, 1<sup>st</sup> International Conference on Sustainable Chemical and Environmental Engineering, Rethymno, Crete, Greece. <https://www.susteng.eu/e/1st-international-conference-on-sustainable-chemical-and-environmental-engineering/posters>
- Min, K. H., Kim, D. H., Ki, M.-R., Pack, S., P., **2022**. Recent progress in flocculation, dewatering, and drying technologies for microalgae utilization: Scalable and low-cost harvesting process development. *Bioresource Technology*, 344(Part B): 126404. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126404>
- Molina Grima, E., Belarbi, E. H., Acien Fernández, F. G., Robles Medina, A., & Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20(7–8), 491–515. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2)

- More, T. T., Yadav, J. S. S., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2014). Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management*, 144, 1–25. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2014.05.010>
- Nielsen SS, **2010**. Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates, in: Nielsen, S.S. (eds) Food Analysis Laboratory Manual. Food Science Texts Series. Springer, Boston, MA, pp. 47–53. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_6)
- Nitsos, C., Filali, R., Taidi, B., & Lemaire, J. (2020). Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review. *Biotechnology Advances*, 45, 107650. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2020.107650>
- Perez-Garcia, O., Bashan, Y., Bashan, Y., & Bashan, Y. (2015). Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. *Algal Biorefineries: Volume 2: Products and Refinery Design*, 61–131. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_3)
- Prakash, J., Pushparaj, B., Carlozzi, P., Torzillo, G., Montaini, E., & Materassi, R. (1997). Microalgal biomass drying by a simple solar device. *International Journal of Solar Energy*, 18(4), 303–311. <https://doi.org/10.1080/01425919708914325>
- Rakesh, S., Saxena, S., Dhar, D. W., Prasanna, R., & Saxena, A. K. (2014). Comparative evaluation of inorganic and organic amendments for their flocculation efficiency of selected microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 399–406. <https://doi.org/10.1007/S10811-013-0114-4>
- Rios, S. D., Clavero, E., Salvadó, J., Farriol, X., & Torras, C. (2011). Dynamic Microfiltration in microalgae harvesting for biodiesel Production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 50(4), 2455–2460. <https://doi.org/10.1021/IE101070Q>
- Salim, S., Bosma, R., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2011). Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *Journal of Applied Phycology*, 23(5), 849–855. <https://doi.org/10.1007/S10811-010-9591-X/FIGURES/5>
- Shekarabi, S. P. H., Mehrgan, M. S., Razi, N., & Sabzi, S. (2019). BIOCHEMICAL COMPOSITION AND FATTY ACID PROFILE OF THE MARINE MICROALGA *Isochrysis galbana* DRIED WITH DIFFERENT METHODS. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(3), 521–524. <https://doi.org/10.15414/JMBFS.2019/20.9.3.521-524>
- Subashchandrabose, S. R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2011). Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnology Advances*, 29(6), 896–907. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2011.07.009>
- Starr, R. C., Zeikus, J. A. (1993). UTEX—THE CULTURE COLLECTION OF ALGAE AT THE UNIVERSITY OF TEXAS AT AUSTIN 1993 LIST OF CULTURES. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0022-3646.1993.00001.x>
- Tran, D. T., Le, B. H., Lee, D. J., Chen, C. L., Wang, H. Y., & Chang, J. S. (2013). Microalgae harvesting and subsequent biodiesel conversion. *Bioresource Technology*, 140, 179–186. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.04.084>

- Wan, C., Zhao, X. Q., Guo, S. L., Asraful Alam, M., & Bai, F. W. (2013). Biofloculant production from *Solibacillus silvestris* W01 and its application in cost-effective harvest of marine microalga *Nannochloropsis oceanica* by flocculation. *Bioresource Technology*, 135, 207–212. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.10.004>
- Wicker, R., & Bhatnagar, A. (2020). Application of Nordic microalgal-bacterial consortia for nutrient removal from wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 398, 125567. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2020.125567>
- Yeh, K. L., Chen, C. Y., & Chang, J. S. (2012). pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. *Biochemical Engineering Journal*, 64, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2012.02.006>
- Zhan, J., Rong, J., & Wang, Q. (2017). Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(12), 8505–8517. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2016.12.021>
- Γκέλης, Σ. (2015). Κεφάλαιο 6: Καλλιέργεια φυκών. In Ε. , Voultsiadou, T. , Ampatzopoulos, E. , Antonopoulou, K. , Gkanias, S. , Gkelis, A. , Staikou, & A. Triantafyllidis (Eds.), *AQUACULTURE*. Kallipos, Open Academic Editions. [https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/5089/2/02\\_Chapter\\_6.pdf](https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/5089/2/02_Chapter_6.pdf)
- Κούτρα, Ε. **2019**. *Βιολογική Επεξεργασία Και Αξιοποίηση Αποβλητων Με Τη Χρηση Μικροφυκων*.
- Πενλόγλου, Γ., Παύλου, Α., & Κυπαρισσίδης, Κ. **2019**. Βιομετατροπή Του Co2 Απο Αεριους Ρυπους Μοναδων Παραγωγης Ενεργειας Σε Προϊοντα Υψηλης Αξιας Μεσω Καλλιεργειων Μικροφυκων. *12ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής*, 29-31 Μαΐου, Αθήνα.