

## Σύσταση ελαίων γηγενών μικροφυκών γλυκού νερού της Β. Ελλάδας και δυνατότητα χρήσης τους ως βιοκαύσιμο

Νικόλαος Σταμάτης<sup>1</sup>, Δέσποινα Στεργίου<sup>1</sup>, Απόστολος Παπαδημητρίου<sup>1</sup>, Σωτήριος Ορφανίδης<sup>1</sup>, Νικόλαος Νικολάου<sup>2</sup>, Αχιλλέας Χριστοφορίδης<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ - Ινστιτούτο Αλιευτικής Έρευνας, 64007 Ν. Πέραμος-Καβάλα - nikstam@otenet.gr

<sup>2</sup> ΤΕΙ Καβάλας Τμήμα Τεχνολογίας Πετρελαίου και Φυσικού Αερίου, Αγ. Λουκάς, Καβάλα - achrist@teikav.edu.gr

### ABSTRACT

**Nikolaos Stamatis, Despoina Stergiou, Apostolos Papadimitriou, Sotirios Orfanidis, Nikolaos Nikolaou, Achilleas Christoforidis: Composition of algal oil from indigenous fresh water microalgae from Northern Greece and its potential use as biofuel**

Fresh water microalgae biomass produced in municipal wastewater treatment plant runoffs seems to be a promising source for future biofuel production. The aim of this paper is to study the oil composition of two indigenous fresh water Chlorophyte strains cultivated under open air and greenhouse conditions as potential biomass providers for biofuel production in N. Greece. They were cultivated during spring to autumn 2012 using municipal wastewater treatment effluents and commercial fertilizer as nutrient sources. Relative high values of total lipids content (max. value 9.6% of dry biomass) and of non-saturated fatty acids (66.19%) of the strain II indicated it as a promising source for biofuel production and as a tool to ensure environmental and economic sustainability within an ecosystem based management framework.

**Keywords:** Chlorophytes, wastewater treatment, fatty acid profiles, open tanks cultivation

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διαδικασία της αξιοποίησης των μικροφυκών ως ανανεώσιμη πηγή ενέργειας για την παραγωγή βιοκαυσίμων είναι πολλά υποσχόμενη. Ο λόγος είναι η υψηλή ταχύτητα αύξησης των συγκεκριμένων φυτικών οργανισμών και η ικανότητά τους να συσσωρεύουν υψηλότερα ποσοστά λίπους (15 - 80% επί του ξηρού βάρους), σε σύγκριση με χερσαίους φυτικούς ιστούς από συμβατικές καλλιέργειες, οι οποίες χρησιμοποιούνται σήμερα στην παραγωγή βιοκαυσίμων (π.χ. ελαιοκράμβη, φοίνικας, ηλιάνθος με συσσώρευση λίπους έως 5% επί του ξηρού βάρους) (Amaro *et al.* 2011). Οι πρώτες δοκιμές σε μείγματα καυσίμων που έχουν παραχθεί από έλαια φυκών είναι πλέον πραγματικότητα, ενώ οι προσδοκίες από τη βιομηχανία για τη χρήση των φυκών ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων είναι αρκετά υψηλές. Βέβαια, οι γνώσεις μας σε τεχνικό επίπεδο που αφορούν (1) στην απόδοση των συστημάτων καλλιέργειας των φυκών, (2) στις μεθόδους συλλογής, επεξεργασίας και περαιτέρω μεταποίησης της βιομάζας και (3) στην καταλληλότητα του ελαίου ως βιοντίζελ, είναι ακόμη υπό διερεύνηση και αρκετά περιορισμένες (Christoforidis *et al.* 2012).

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται προκαταρκτικά αποτελέσματα της περιεκτικότητας του ολικού λίπους και του χρωματογραφικού προφίλ λιπαρών οξέων της ξηρής βιομάζας γηγενών μικροφυκών γλυκού νερού της Β. Ελλάδας, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των χλωροφυκών. Η βιομάζα συλλέχθηκε από καλλιέργειες των οργανισμών σε ανοιχτές δεξαμενές, εμπλουτισμένες με θρεπτικά άλατα που προέρχονταν είτε από εμπορικό λίπασμα είτε από λύματα του βιολογικού καθαρισμού της Ν. Πέραμου, Καβάλας. Απώτερος στόχος ήταν η αξιοποίηση της τοπικής βιοποικιλότητας στην εξεύρεση στελεχών και συνθηκών βέλτιστης καλλιέργειας για την παραγωγή βιοκαυσίμων, χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό μέσο απόβλητα βιολογικού καθαρισμού αστικών λυμάτων.

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι δειγματοληψίες της βιομάζας μικροφυκών πραγματοποιήθηκαν το χρονικό διάστημα Μάρτιου - Οκτωβρίου 2012 (συνολικά αναλύθηκαν 12 δείγματα), αντιπροσωπεύοντας τόσο την εαρινή όσο και τη θερινή περίοδο καλλιέργειας των οργανισμών. Τα δείγματα αφού ξηράθηκαν

σε λυοφιλοποιητή τύπου Christ, ομογενοποιήθηκαν και διαχωρίστηκαν σε τρία υποδείγματα για την εξαγωγή του ολικού λίπους. Στη συνέχεια το λίπος σαπωνοποιήθηκε με διάλυμα 0,5N καυστικού νατρίου και ακολούθησε η μεθυλίωση των λιπαρών οξέων με διάλυμα 14% τριφθοριούχου βορίου σε μεθανόλη (BF<sub>3</sub>\*MeOH). Αναλυτικότερα οι χημικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν ως εξής:

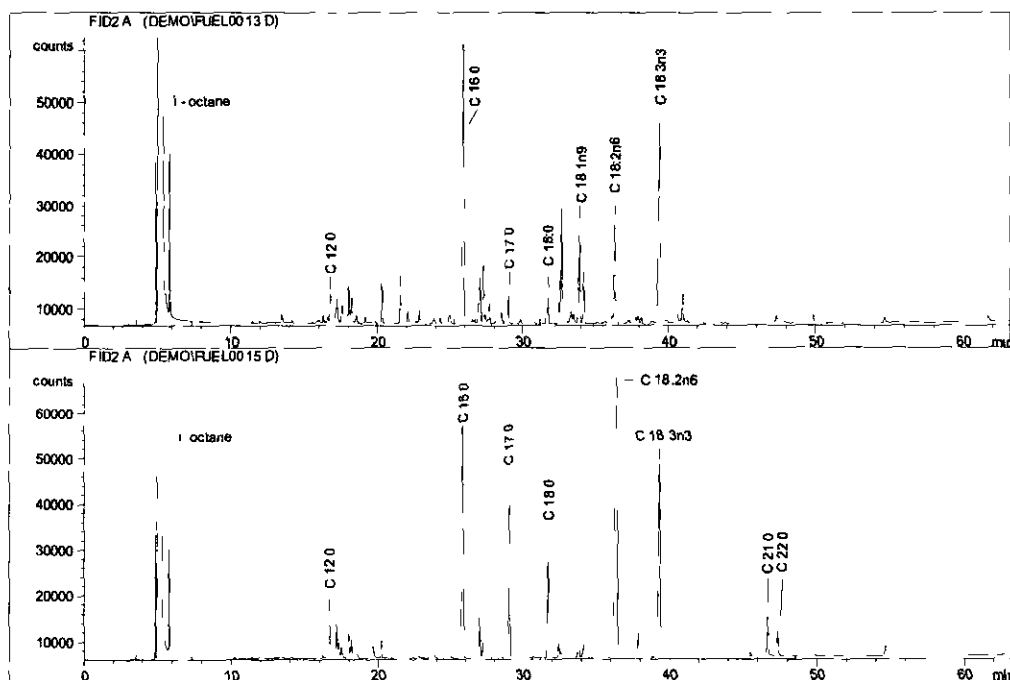
**Ολικό λίπος:** 5 g ξηρής βιομάζας, αφού επεξεργάστηκαν με ομογενοποιητή τύπου Moulipex, χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτική εκτίμηση του ολικού λίπους σύμφωνα με τη μέθοδο Soxhlet, ως εξής: 5 g βιομάζας μικροφυκών αναμιγνύεται με 5 g celite και 100 ml υδροχλωρικού οξέος (4M) ενώ ακολουθεί υδρόλυση εν θερμώ για 30 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ξήρανση του δείγματος και εκχύλιση του με πετρελαϊκό αιθέρα (40/60) σε προζυγισμένα ποτήρια ζέσης. Όταν εξατμίσθηκε ο διαλύτης, τα ποτήρια ζέσης ξαναζυγίστηκαν αφού επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου σε ξηραντήρα. Για την υδρόλυση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή τύπου Büchi (Unit B-411), ενώ για την εκχύλιση η συσκευή τύπου Büchi (System B-811). Η περιεκτικότητα λίπους (%) κάθε δείγματος δίνεται από τη σχέση: Λίπος (%) = [(B<sub>1</sub>-B<sub>2</sub>)/βάρος δείγματος]×100, όπου B<sub>1</sub> αντιπροσωπεύει το βάρος του ποτηριού ζέσης με το δείγμα ενώ B<sub>2</sub> αντιπροσωπεύει το βάρος του προζυγισμένου ποτηριού ζέσης χωρίς το δείγμα.

**Λιπαρά οξέα ως μεθυλεστέρες (FAME's):** α) Παρασκευή των FAME's: 2-25mg λίπους από την προηγούμενη ανάλυση σαπωνοποιήθηκαν με υδροξείδιο του νατρίου (0,5M), στη συνέχεια παρήχθησαν οι εστέρες με διάλυμα 14% τριφθοριούχου βορίου σε μεθανόλη, στους 100°C, για 7 λεπτά με τη χρήση συσκευής θέρμανσης τύπου Techne. Στη συνέχεια προστέθηκε κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου και ακολούθησε η εκχύλιση των μεθυλεστέρων με προσθήκη ισοοκτανίου. β) Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των FAME's: Ο προσδιορισμός αυτός πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας, τη χρήση χρωματογράφου τύπου Hewlett Packard, HP 5890, τριχοειδούς στήλης τύπου SGE BPX70, (50 m, 0,22 μm, 0,25 μm) και το ακόλουθο πρόγραμμα θερμοκρασίας: αρχική θερμοκρασία 177°C για 18 λεπτά, αύξηση της θερμοκρασίας κατά 2,3°C ανά λεπτό έως τους 210°C, παραμονή 23 λεπτά. Ο ανιχνευτής ήταν ιονισμού φλόγας σε θερμοκρασία 250°C και ο εισαγωγέας τύπου split/splitless σε θερμοκρασία 200°C. Ο όγκος του δείγματος ήταν 2 μl και το split 1:60. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ταυτοποίησης των κορυφών με μείγμα εξωτερικών πρότυπων διαλυμάτων της εταιρίας Sigma-Aldrich. Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό τύπου GC-ChemStation της εταιρίας HP. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με αναλύσεις του ίδιου δείγματος εις τριπλούν, από τον ίδιο χρήστη, την ίδια ημέρα στον αέριο χρωματογράφο HP 5890. Τα χρωματογραφήματα αυτά δεν έδειξαν απόκλιση στο χρόνο παρακράτησης των μεθυλεστέρων ενώ παρουσίασαν αποδεκτές αποκλίσεις συγκεντρώσεων (μικρότερες από ±5%) για τα σπουδαιότερα συστατικά του μείγματος. Ως σπουδαιότερα συστατικά του μείγματος ίσχυσαν αυτά με επιφάνεια κορυφής μεγαλύτερη από 5% της συνολικής επιφάνειας κορυφών στο χρωματογράφημα. Η ακρίβεια της μεθόδου προσδιορίστηκε επίσης καλύτερη από ±5%.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στις καλλιέργειες των δεξαμενών εντοπίστηκαν χρησιμοποιώντας μορφολογικά κριτήρια δύο κύρια στελέχη (I & II) μικροφυκών της κατηγορίας των χλωροφυκών, τα οποία περιέχουν διαφορετικές περιεκτικότητες (%) ολικού λίπους, κατά μέσο όρο 4,05 (από 2,2 έως 5,74) και 7,72 (από 5,64 έως 9,63), αντίστοιχα. Τα προσδιορισθέντα ποσοστά ολικού λίπους των στελεχών της Β. Ελλάδας υπολείπονται των ποσοστών λίπους άλλων μικροφυκών που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή βιοκαυσίμων όπως π.χ. *Botryococcus braunii*, *Nannochloropsis* sp., *Schizochytrium* sp., *Neochloris oleoabundans* και *Nitzschia* sp., τα οποία κυμαίνονται μεταξύ 25 και 75% ξηρού βάρους προϊόντος (Schenk *et al.* 2008). Η κατηγοριοποίηση αυτή βρέθηκε να εξαρτάται άμεσα από τις συνθήκες καλλιέργειας των οργανισμών, αλλά και από τον τρόπο συλλογής. Σε συμφωνία με την τελευταία παρατήρηση το ολικό λίπος του στελέχους II όταν συλλέγονταν από την επιφάνεια κυμαίνονταν μεταξύ 8,13 και 9,63, ενώ αν συλλέγονταν από το βάθος της δεξαμενής μεταξύ 5,64 και 5,74. Στην Εικόνα 1 δίνονται τα χρωματογραφικά προφίλ των δύο στελεχών της Β. Ελλάδας και στον Πίνακα I οι

περιεκτικότητές τους στα κυριότερα λιπαρά οξέα, επιπλέον και σε αντιπαράθεση με περιεκτικότητες για άλλα μικροφυκή ή φυτικούς ιστούς που χρησιμοποιούνται ήδη στην παραγωγή βιοκαυσίμων.



**Εικόνα 1.** Προφίλ λιπαρών οξέων των στελεχών χλωροφυκών I (πάνω) & II (κάτω) από τη Β. Ελλάδα.

**Figure 1.** Fatty acid profiles of the chlorophyte strains I (up) & II (down) from Northern Greece.

Η σύγκριση των χρωματογραφήματων της Εικόνας 1 δείχνει ότι στα δύο στελέχη περιέχονται λιπαρά οξέα με συγκρίσιμη έκταση αλυσίδων, ιδιαίτερα αυτών που είναι μονοακόρεστα ή πολυακόρεστα. Το ποσοστό των ακόρεστων λιπαρών οξέων στο σύνολο των ταυτοποιηθέντων (Πίνακας I) μετρήθηκε για το στέλεχος I ίσο με 53,86% και για το στέλεχος II ίσο με 66,19% κατά μέσο όρο. Τα ποσοστά των κορεσμένων λιπαρών οξέων κυμάνθηκαν έως 46,14 και 33,81% κατά μέσο όρο για το στέλεχος I και II, αντίστοιχα. Συνεπώς, και τα δύο στελέχη, με καλύτερο το στέλεχος II, θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς αντιπροσώπους πρώτης ύλης μικροφυκών για την παραγωγή βιοκαυσίμων, μια και περιέχουν συγκρίσιμα λιπαρά οξέα τόσο με τα άλλα μικροφύκη όσο και με φυτά εκτατικών καλλιέργειών που χρησιμοποιούνται ήδη γι' αυτόν το σκοπό (Πίνακας I). Επιπλέον τα προφίλ της Εικόνας 1 δεν μετρήθηκαν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια των δειγματοληψιών, αφού η παραχθείσα κάθε φορά πρώτη ύλη ήταν άμεσα εξαρτώμενη από τις συνθήκες καλλιέργειας και το επίπεδο ανάπτυξης των οργανισμών τη στιγμή της συγκομιδής. Ευνοικότερες και σχετικά ρυθμιζόμενες συνθήκες καλλιέργειας με σκοπό τα πλέον επιθυμητά και σταθερά προφίλ λιπαρών οξέων θα μπορούσαν να παραχθούν σε φωτοβιοαντιδραστήρες, όπου οι συνθήκες καλλιέργειας μπορούν και διατηρούνται σχετικά σταθερές (Morweiser *et al.* 2010). Βέβαια, σε τέτοιου είδους αντιδραστήρες οι προς ρύθμιση παράμετροι είναι άμεσα εξαρτώμενες από το είδος του καλλιεργούμενου μικροφύκου. Γενικότερα είναι γνωστό ότι τα βιοκαύσιμα αποτελούν μίγμα λιπαρών οξέων με αλυσίδες διαφορετικού μήκους, οι οποίες έχουν εστεροποιηθεί με αλκοόλη, κυρίως μεθανόλη. Επιπλέον, τα βιοκαύσιμα από μικροφύκη αφορούν χρήσεις κυρίως του τομέα της αεροπλοΐας, λόγω της εξαιρετικής τους ροής και της υψηλής τους πυκνότητας ενέργειας.

Συμπερασματικά, το στέλεχος II των μικροφυκών εξαιτίας της σχετικά υψηλής περιεκτικότητάς του σε ολικό λίπος, αλλά και του υψηλού ποσοστού πολυακόρεστων λιπαρών

οξέων που προσδίδει εξαιρετικές ιδιότητες ροής σε χαμηλές θερμοκρασίες εφαρμογής, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο αεροπλοΐας Έμφαση θα πρέπει να δοθεί στην περαιτέρω βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας και συλλογής, με απώτερο σκοπό την εξοικονόμηση πόρων και τη συμβολή στη βιώσιμη διαχείριση του παράκτιου περιβάλλοντος

**Πίνακας I. Προφίλ λιπαρών οξέων των στελεχών χλωροφυκών I & II από τη Β. Ελλάδα, άλλων μικροφυκών, ελαιοκράμβης και ηλίανθου (± διαστήματα εμπιστοσύνης).**

**Table I. Fatty acid profiles of Chlorophyte strains I and II from Northern Greece, and of other microalgae species, rapeseed and sunflower (± confidence intervals).**

| Λιπαρό οξύ | Χλωροφυκός I | Χλωροφυκός II | <i>Phaeodactylum tricornutum</i> <sup>(1)</sup> | <i>Botryococcus braunii</i> <sup>(2)</sup> | Ελαιοκράμβη <sup>(1)</sup> | Ηλίανθος <sup>(3)</sup> |
|------------|--------------|---------------|---|--|----------------------------|-------------------------|
| C12 0      | 1,06±0,84    | 0,71±0,36     | -   | 0,7  | -                          | -                       |
| C16 0      | 22,18±6,96   | 12,68±1,19    | 25,8  | 21,0                                       | 4,9                        | 6,2                     |
| C16 1      | 5,99±3,11    | 2,3±1,05      | 37,5  | 2,0  | -                          | 0,1                     |
| C17 0      | 1,43±0,69    | 2,67±2,66     | -   | 0,1  | -                          | -                       |
| C18 0      | 3±2,28       | 4,63±4,32     | 1,3   | 2,9  | 1,6                        | 3,7                     |
| C18 1      | 9,38±2,48    | 3,25±2,59     | -   | 3,2  | 33,0                       | 25,2                    |
| C18 2      | 6,83±2,85    | 8,38±7,03     | 5,1   | 13,6                                       | 20,4                       | 63,1                    |
| C18 3      | 7,22±3,98    | 20,85±6,52    | 2,0   | 33,0                                       | 7,9                        | 0,2                     |
| C21 0      | 0,48±0,39    | 1,8±0,77      | -   | -  | -                          | -                       |
| C22 0      | 0,34±0,37    | 1,35±0,56     | -   | -  | -                          | -                       |

<sup>(1)</sup> Jiang & Gao (2004), <sup>(2)</sup> Zhila *et al* (2011), <sup>(3)</sup> Ramos *et al* (2009)

#### ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο ΑΡΧΙΜΗΔΗΣ ΙΙΙ Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου Η παρούσα εργασία αφιερώνεται στον πρόσφατα εκλιπόντα συνάδελφο Γιώργο Μόνιο

#### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amaro HM, Guedes AC, Malcata FX (2011) Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel Applied Energy 88 3402-3410
- Christoforidis A, Nikolaou N, Mitropoulos A, Papadimitriou A, Stamatis N, Orfanidis S (2012) An integrated process of biodiesel production from indigenous microalgae in Northern Greece First Results Proceedings of International Conference “Biofuels for Sustainable Development of Southern Europe”, 19-20 November 2012, Thessaloniki, GREECE
- Jiang H, Gao K (2004) Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) Journal of Phycology 40 651-654
- Morweiser M, Kruse O, Hankamer B, Posten C (2010) Developments and perspectives of photobioreactors for biofuel production Applied Microbiology and Biotechnology 87 1291-1301
- Ramos MJ, Fernández CM, Casas A, Rodríguez L, Pérez A (2009) Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties Bioresource Technology 100 261-268
- Schenk PM, Skye RT-H, Stephens E, Marx UC, Mussgnug JH, Posten C, Kruse O, Hankamer B (2008) Second generation biofuels high-efficiency microalgae for biodiesel production Bioenergy Research 1 20-43
- Zhila NO, Kalacheva GS, Volova TG (2011) Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kutz IPPAS H-252 Journal of Applied Phycology 23 47-52

**15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων**  
**15<sup>th</sup> Hellenic Conference of Ichthyologists**



**ΠΡΑΚΤΙΚΑ**  
**PROCEEDINGS**

**Θεσσαλονίκη**  
**10-13 Οκτωβρίου 2013**

**Thessaloniki**  
**10-13 October 2013**