



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας Ανάλυσης, Σχεδιασμού και Ανάπτυξης
Διεργασιών και Συστημάτων

ΒΙΟΔΙΥΛΙΣΗ ΜΑΚΡΟΦΥΚΩΝ *Laminaria digitata* ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ, ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΩΝ ΤΡΟΦΩΝ ΠΛΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΑΕΡΙΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΛΕΝΗ ΒΑΣΙΛΑΚΟΥ



ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Γεράσιμος Λυμπεράτος

ΑΘΗΝΑ, Σεπτέμβριος 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΒΙΟΔΥΛΙΣΗ.....	15
1.1 Εισαγωγή Στη Βιοδύλιση.....	15
1.2 Ιστορικά Στοιχεία.....	16
1.3 Είδη Βιοδύλισης	17
1.4 Προϊόντα Βιοδύλισης.....	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΥΔΑΤΙΝΗ ΒΙΟΜΑΖΑ - ΜΑΚΡΟΦΥΚΗ.....	21
2.1 Μορφολογία Φυκών	21
2.2 Περιοχές Ανάπτυξης Φυκών.....	22
2.3 Παραγωγή Μακροφυκών.....	22
2.4 Επίδραση Φυκών στη Ζωή.....	23
2.5 Φύκη ως Ανανεώσιμη Πηγή Ενέργειας	23
2.5.1 Παραπροϊόντα Βιοδυλιστηρίων Φυκών	25
2.6 Σύσταση Μακροφυκών.....	25
2.7 <i>Laminaria digitata</i>	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΟΞΥ	29
3.1 Χημεία και Χρήσεις Ηλεκτρικού Οξέος	29
3.2 Παραγωγή Ηλεκτρικού Οξέος	31
3.2.1 Παραγωγή από Πετρέλαιο.....	31
3.2.2 Παραγωγή Μέσω Βιοτεχνολογίας.....	31
3.2.2.1 Διοξειδίο του Άνθρακα.....	34
3.2.2.2 Βακτήρια για Παραγωγή Ηλεκτρικού Οξέος.....	35
3.2.2.3 <i>Actinobacillus Succinogenes</i>	35
3.2.3 Περιοριστικοί Παράγοντες Ζύμωσης.....	36
3.2.4 Ενζυμική Υδρόλυση.....	36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΩΝ	39
4.1 Εισαγωγή στα Βιοκαύσιμα	39
4.2 Φύκη και Βιοκαύσιμα	40
4.3 Βιοαέριο.....	41
4.4 Αναερόβια Χώνευση.....	41
4.4.1 Υποστρώματα Αναερόβιας Χώνευσης.....	42
4.4.2 Στάδια Αναερόβιας Χώνευσης.....	43
4.5 Κύριες Εφαρμογές Βιοαερίου	46
4.6 Ιδιότητες Βιοαερίου	47
4.6.1 Σύσταση Βιοαερίου	47
4.6.2 Ειδική Απόδοση Βιοαερίου.....	48
4.6.3 Θεωρητικό Δυναμικό Βιοαερίου.....	49
4.7 Προσδιορισμός Μεθανογόνου Δυναμικού - BMP	51
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	53
5.1 Χημικά Αντιδραστήρια.....	53
5.2 Όργανα	53
5.3 Προετοιμασία Υποστρώματος	54
5.4 Ενζυμική Υδρόλυση Υποστρώματος.....	54
5.5 Καλλιέργεια Μικροοργανισμών	56
5.6 Ζύμωση του Υγρού Υδρόλυσης του <i>Laminaria digitata</i>	56
5.6.1 Ζύμωση σε Φιάλες	56
5.6.2 Ζύμωση σε Αντιδραστήρες Διαλείποντος Έργου	57
5.7 Προσδιορισμός Μεθανογόνου Δυναμικού – BMP.....	58
5.8 Προσδιορισμός Σακχάρων	60
5.9 Στοιχειακή Ανάλυση και Προσδιορισμός Αμινοξέων.....	61
5.10 Ανάλυση Μετάλλων	61
5.11 Ανάλυση Λιπιδίων	62
5.12 Μέτρηση Ολικών (TS) και Πτητικών Στερεών (VS)	62
5.13 Ποιοτική και Ποσοτική Ανάλυση Προϊόντων Ζύμωσης	62
5.14 Προσδιορισμός Μεθανογόνου Δυναμικού.....	63
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	64

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ.....	64
6.1 Χαρακτηρισμός Διαφορετικών Κλασμάτων <i>L. digitata</i>	64
6.1.1 Ολικά Σάκχαρα	64
6.1.2 Στοιχειακή Ανάλυση, Προσδιορισμός Αμινοξέων και Πρωτεϊνών	65
6.1.3 Ανάλυση Μετάλλων.....	67
6.1.4 Ανάλυση Λιπιδίων	70
6.2 Ενζυμική Υδρόλυση	72
6.3 Ζύμωση Μακροφύκους <i>L. digitata</i>	77
6.3.1 Ζύμωση σε Φιάλες	77
6.3.2 Ζύμωση σε αντιδραστήρες	78
6.4 Σύνοψη Πειραματικών Αποτελεσμάτων Ζύμωσης	81
6.5 Προσδιορισμός Μεθανογόνου Δυναμικού	82
6.6 Γενικά Συμπεράσματα	84
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	 87
 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1	 99
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2	100
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3	102
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4	104

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική αυτή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας (Biotechnology Lab) του τμήματος Περιβαλλοντικής Μηχανικής (Department of Environmental Engineering) του Πολυτεχνείου της Δανίας (Danmarks Technical University – DTU), μέσω του προγράμματος ανταλλαγής φοιτητών Erasmus για τη σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Στο σημείο αυτό αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ειλικρινείς και θερμές ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας:

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Γεράσιμο Λυμπεράτο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση αυτής της διπλωματικής και κυρίως γιατί χωρίς αυτόν θα ήταν αδύνατη η επαφή και η συνεργασία μου με το Πολυτεχνείο της Δανίας. Επίσης, η συνεχής καθοδήγηση και πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε, αποτέλεσαν καθοριστικό κομμάτι για την συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ειρήνη Αγγελιδάκη, η οποία ήταν η συνεπιβλέπουσα καθηγήτριά μου στη Δανία, για την μοναδική ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στα υπεσύγχρονα εργαστήρια του τμήματος Περιβαλλοντικής Μηχανικής στη Δανία και να συνεργαστώ με την κορυφαία ερευνητική της ομάδα. Η αμέριστη υποστήριξη και καθοδήγησή της με βοήθησαν ιδιαίτερα στη διάρκεια παραμονής μου στη Δανία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στους τρεις υπευθύνους μου στη Δανία, τους μεταδιδακτορικούς Merlin Alvarado-Morales και Ιωάννη Φωτίδη, και στον διδακτορικό Ingólfur Bragi Gunnarsson, για την αμέριστη και απλόχερη βοήθειά τους, την προθυμία τους, τις πολύτιμες γνώσεις τους και την καθοδήγησή τους στην διεκπεραίωση των πειραμάτων μου. Η συμπαράστασή τους και το άψογο κλίμα συνεργασίας ήταν καθοριστικά. Merlin, Ingo και Γιάννη ήταν τιμή μου να συνεργαστώ μαζί σας.

Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα όλους τους συμφοιτητές μου στο εργαστήριο βιοτεχνολογίας για το φιλικό και θερμό κλίμα που δημιούργησαν, ώστε να περάσουν ευχάριστα οι ατέλειωτες ώρες πειραμάτων και να δημιουργηθούν νέες φιλίες.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο προσωπικό των γραφείων Erasmus του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και του Πολυτεχνείου της Δανίας που με βοήθησαν να πραγματοποιήσω αυτό το ταξίδι.

Τέλος, η βαθύτερη ευγνωμοσύνη μου πηγαίνει στους φίλους μου για την αγάπη που μου δείχνουν καθημερινά και ιδιαίτερα στους γονείς και την αδερφή μου που είναι πάντα δίπλα μου, με παρότρυναν και με στήριζαν σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου και κατά τη διάρκεια της διαμονής μου στην Κοπεγχάγη και με έμαθαν να ξεπερνάω κάθε εμπόδιο και να αγωνίζομαι πάντα για την εκπλήρωση των στόχων μου.

Ελένη Βασιλάκου

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ηλεκτρικό οξύ ($\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$), που ανήκει στην οικογένεια των δικαρβοξυλικών οξέων, έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς είναι σημαντικός πρόδρομος πολλών χημικών ουσιών στις βιομηχανίες τροφίμων, χημικών και φαρμάκων. Σήμερα το ηλεκτρικό οξύ παράγεται ως επί το πλείστον από το πετρέλαιο μέσω χημικών διεργασιών. Τα τελευταία χρόνια, όμως, δίνεται όλο και μεγαλύτερη προσοχή στην παραγωγή του μέσω ζύμωσης βιομάζας (βιοδιύλιση) με χρήση μικροοργανισμών. Κατά τη διαδικασία της ζύμωσης το διοξείδιο του άνθρακα χρησιμοποιείται ως δότης ηλεκτρονίων από τους μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα να μην εκπέμπεται στο περιβάλλον. Επιπλέον, με τη χρήση ανανεώσιμων πηγών βιομάζας ως υπόστρωμα για τη ζύμωση, το βιο-ηλεκτρικό οξύ γίνεται ένα, φιλικό προς το περιβάλλον και βιώσιμο, προϊόν.

Ωστόσο, οι χερσαίες πηγές βιομάζας είναι περιορισμένες και χρησιμοποιούνται σε πολλές εφαρμογές, όπως η παραγωγή τροφίμων, ενέργειας και υλικών. Ως εκ τούτου, απαιτείται ο προσδιορισμός εναλλακτικών, βιώσιμων πόρων, όπως η υδρόβια βιομάζα. Για παράδειγμα, τα φύκη αποτελούν μια πηγή με μεγάλες δυνατότητες για την παραγωγή χημικών προϊόντων μεγάλης αξίας.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, το υγρό κλάσμα που προέκυψε από ενζυμική υδρόλυση των καφέ φυκών *Laminaria digitata*, η οποία είχε απόδοση σε ολικά σάκχαρα 78,2%, ελέγχθηκε επιτυχώς για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Για το λόγο αυτό διεξήχθησαν πειράματα ζύμωσης σε φιάλες και αντιδραστήρες, χρησιμοποιώντας το στέλεχος 130Z του μικροοργανισμού *Actinobacillus succinogenes*, με αποδόσεις 86,5% και 63,2% αντίστοιχα.

Επιπλέον, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα των φυκών πριν την υδρόλυση και του στερεού υπολείμματος της υδρόλυσης, σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, αμινοξέα, λιπίδια και μέταλλα. Με αύξηση των πρωτεϊνών στο στερεό υπόλειμμα κατά 6 φορές από το αρχικό υλικό και με την παρουσία Ω3 και Ω6 απαραίτητων λιπαρών οξέων (σε συγκεντρώσεις >30% επί ξηρού βάρους), αυτό το κλάσμα της βιομάζας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο σε τροφές ψαριών, συμπληρώματα ζωοτροφών και άλλες εφαρμογές.

Τέλος, μετά τη ζύμωση σε ηλεκτρικό οξύ, το αρχικό ξηρό υλικό, το στερεό υπόλειμμα της υδρόλυσης και το υγρό προϊόν της ζύμωσης μελετήθηκαν ως πιθανές πηγές για την παραγωγή βιοενέργειας, μέσω προσδιορισμού του μεθανογόνου δυναμικού τους (BMP). Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι και τα τρία κλάσματα βιομάζας παρουσίασαν ιδιαίτερα υψηλό μεθανογόνο δυναμικό, της τάξης των 290 NmL CH₄/gVS και ως εκ τούτου μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποδοτικά ως υπόστρωμα για την παραγωγή βιοαερίου.

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί την πρώτη μελέτη όπου το ηλεκτρικό οξύ παράγεται ως το κύριο προϊόν μιας διαδικασίας βιοδιύλισης, χρησιμοποιώντας φύκη ως πρώτη ύλη, και όπου το στερεό υπόλειμμα μετά την ενζυμική υδρόλυση δείχνει να έχει μεγάλες πιθανότητες να χρησιμοποιηθεί ως ένα πολύτιμο προϊόν.

ABSTRACT

Succinic acid ($\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$), a member of the dicarboxylic acid family, has attracted much interest as an important precursor of several chemicals in the food, chemical and pharmaceutical industries. Today succinic acid is produced mostly from petroleum-based chemical processes. In recent years, however, growing attention is being given to the production of succinic acid by fermentation of biomass (biorefinery concept), using microorganisms. During the fermentation process the carbon dioxide is used as an electron donor by the microorganisms, thus it is not emitted to the environment. Moreover, with the use of renewable biomass resources as a substrate for fermentation, bio-succinic acid becomes an environmentally friendly and sustainable, product.

However, land biomass resources are limited and used for many applications, such as food production, energy and materials. Therefore, it is required to identify alternative, sustainable resources, such as aquatic biomass. For example, seaweeds are a source of great potential for the production of high-value chemicals.

In this thesis, the liquid fraction obtained by enzymatic hydrolysis of the brown seaweed *Laminaria digitata*, with a total sugar yield of 78.2%, was tested successfully for the production of succinic acid. Therefore, experiments were conducted in bottles and fermenters, using the microorganism strain 130Z *Actinobacillus succinogenes*, with yields of 86.5% and 63.2% respectively.

Moreover, the carbohydrate, protein, amino acid, lipid and metal content of the raw material and the post hydrolysis solid residue, was determined. The protein increase in the solid residue by 6 fold with respect to the raw material and the presence of $\Omega 3$ and $\Omega 6$ essential fatty acids (with concentrations $> 30\%$ of dry weight), lead to the conclusion that this fraction of biomass could be used as an additive in fish feed, in food supplements and other applications.

Finally, after the succinic acid fermentation, the raw material, the post hydrolysis solid residue and the fermentation broth were investigated as potential sources for bioenergy production, by determining the biochemical methane potential (BMP). The

results showed that all three fractions had a high methane potential of around 290 NmL CH₄ / gVS and therefore they can be effectively used as a substrate for biogas production.

This thesis is the first study demonstrating that succinic acid may be produced as the main product of a biorefinery process using seaweed as feedstock, and that the post hydrolysis solid residue may have a great potential as a valuable product.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια, τα οικονομικά και περιβαλλοντικά προβλήματα, όπως η εξάντληση των ορυκτών καυσίμων και οι κλιματικές αλλαγές που οφείλονται στην υπερθέρμανση του πλανήτη, έχουν οδηγήσει στην δραματική αύξηση των επιστημονικών ερευνών σχετικά με την παραγωγή βιοκαυσίμων και προϊόντων υψηλής αξίας, μέσω της βιοτεχνολογίας.

Μία από τις προτεινόμενες λύσεις για να μειωθεί η εξάρτηση της παγκόσμιας οικονομίας από τα ορυκτά καύσιμα και τα πετροχημικά προϊόντα είναι η αντικατάσταση του πετρελαίου με προϊόντα που παράγονται βιοτεχνολογικά στα λεγόμενα βιοδιυλιστήρια (biorefineries). Ως βιοδιύλιση μπορούν να οριστούν οι διαδικασίες με τις οποίες η βιομάζα μετατρέπεται σε μια μεγάλη γκάμα προϊόντων (τρόφιμα, χημικά, υλικά) και σε ενέργεια (βιοκαύσιμα, ηλεκτρική ή/και θερμική ενέργεια), με βιώσιμο και αποτελεσματικό τρόπο.

Στο πλαίσιο αυτό, η βιοδιύλιση τρίτης γενιάς με βάση μακροφύκη (υδρόβια βιομάζα) προσφέρει μια εξαιρετική ευκαιρία για να αντικαταστήσει τα ορυκτά καύσιμα και τα προϊόντα με βάση το πετρέλαιο. Ένα από τα πλεονεκτήματα της χρήσης μακροφυκών ως πρώτη ύλη για βιοδιύλιση είναι ότι δεν είναι απαραίτητη η χρήση καλλιεργήσιμης γης και λιπασμάτων για την παραγωγή τους, σε σύγκριση με τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα, ελαχιστοποιώντας έτσι τις συγκρούσεις και τον ανταγωνισμό για γη. Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες της πρώτης ύλης είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό στοιχείο για την επιτυχία της βιοδιύλισης. Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, σε ορισμένα είδη μακροφυκών (π.χ. *Laminaria digitata* και *Saccharina latissimalatissimi*) μπορεί να φτάσει έως και το 60% του ξηρού βάρους τους [41], κάτι που τα καθιστά κατάλληλα υποστρώματα για την παραγωγή βιοαερίου, βιοαιθανόλης και άλλων μορφών ενέργειας (π.χ. βιοβουτανόλη) και χημικών υψηλής προστιθέμενης αξίας (π.χ. ηλεκτρικό οξύ, αδιπικό οξύ, λεβουλινικό οξύ, γαλακτικό οξύ, κλπ) [37]. Το ηλεκτρικό οξύ έχει αναγνωριστεί ως ένα από τα δέκα χημικά με την υψηλότερη αξία για την παραγωγή χημικών προϊόντων.

Ως εκ τούτου, πρωταρχικός σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αξιολόγηση των μακροφυκών *L. digitata* ως μια πιθανή εναλλακτική πηγή άνθρακα

για βιοδιύλιση, με στόχο την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας και ενέργειας. Επίσης θα μελετηθεί και η ανάκτηση ενέργειας με παραγωγή βιοαερίου, ως βιοκαύσιμο, καθορίζοντας το μεθανογόνο δυναμικό της βιομάζας των φυκών.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

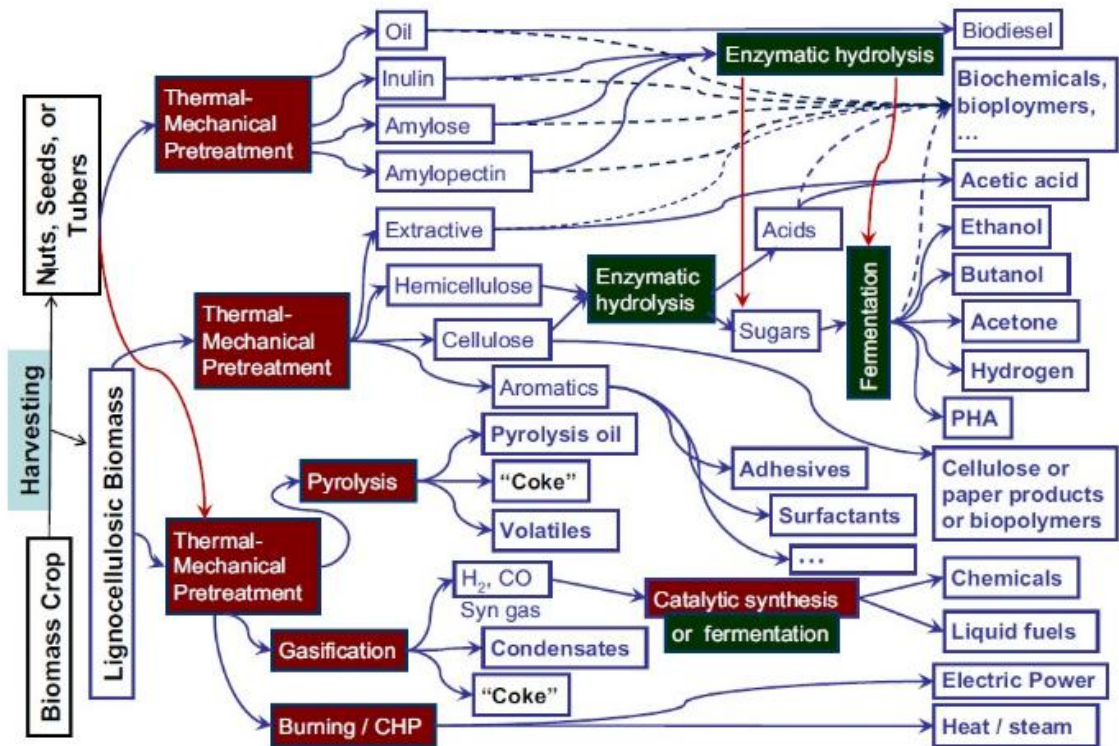
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΒΙΟΔΙΥΛΙΣΗ

1.1 Εισαγωγή Στη Βιοδιύλιση

Ο κλάδος των χημικών βιομηχανιών αντιμετωπίζει, όχι μόνο τις συχνές και ακανόνιστες αλλαγές στα κόστη και στα περιθώρια κέρδους, αλλά και την πιθανότητα εξάντλησης των πρώτων υλών στο μέλλον. Οι βιομηχανίες παραμένουν σε μεγάλο βαθμό εξαρτημένες από το πετρέλαιο και το φυσικό αέριο (80% των πρώτων υλών τους και ενέργειας σύμφωνα με τη Eurostat), ενώ τα αποθέματα πετρελαίου θα διαρκέσουν για περίπου 40 χρόνια ακόμα και του φυσικού αερίου για 60 χρόνια.

Η βιομάζα αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη εναλλακτική για την κάλυψη των αναγκών στη σημερινή κοινωνία, καθώς ήδη καλύπτει το 13% των παγκόσμιων ενεργειακών αναγκών (IEA Statistics). Επίσης, αναγνωρίζεται ως η μοναδική ανανεώσιμη πηγή καυσίμων με βάση τον άνθρακα. Το 2007 υπολογίζεται ότι η βιομάζα ξεπέρασε σε χρήση όλες τις υπόλοιπες ανανεώσιμες πηγές με ένα ποσοστό της τάξης του 53%, έναντι της υδροηλεκτρικής ενέργειας με 35%, της αιολικής ενέργειας με 5% και της ηλιακής ενέργειας με ποσοστό μόνο 1% [46].

Με κίνητρο την ανάγκη εύρεσης βιώσιμων λύσεων και τη γενική αβεβαιότητα που επικρατεί γύρω από τις τιμές του πετρελαίου και τον εφοδιασμό ενέργειας, η βιομηχανία παρουσιάζει σταθερή ανάπτυξη στην παραγωγή βιοκαυσίμων, κάτι που πλέον εξελίσσεται στην αναδυόμενη έννοια του βιοδιυλιστηρίου [18],[22]. Τα βιοκαύσιμα παρέχουν πρόσβαση σε ένα μεγάλο εύρος χημικών ουσιών, στις οποίες συγκαταλέγονται οξυγονούχα (μεθανόλη, αιθανόλη, βουτανόλη, ανάμεικτες αλκοόλες, διμεθυλεστέρες) και υδατάνθρακες (βιοντίζελ, συνθετικό ντίζελ, συνθετική βενζίνη και μεθάνιο). Το βιοδιυλιστήριο έχει την έννοια της μετατροπής βιομάζας, προερχόμενης από φυτά, σε χημικές ουσίες, ενέργεια και σε ύλες ζωτικής σημασίας, αντικαθιστώντας έτσι τις ανάγκες για πετρέλαιο, κάρβουνο, φυσικό αέριο και για άλλες μη ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και χημικών ουσιών. Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα των διεργασιών ενός βιοδιυλιστηρίου.



Σχήμα 1. Σχεδιαστική αναπαράσταση των διεργασιών ενός βιοδυλιστηρίου [53].

Η βιομάζα είναι μία ανανεώσιμη πηγή, στην οποία τα φυτά συνθέτουν χημικές ουσίες απορροφώντας ενέργεια από τον ήλιο, καθώς και διοξείδιο του άνθρακα και νερό από το περιβάλλον, αποβάλλοντας οξυγόνο. Ο κύκλος αυτός συνεχίζεται χωρίς ανθρώπινη παρέμβαση. Η καύση της βιομάζας απελευθερώνει ενέργεια, διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Η συλλογή και συσσώρευση της βιομάζας δεν επηρεάζουν αρνητικά το περιβάλλον και είναι ουδέτερες ως προς τον άνθρακα. Επομένως, ο βασικός ρόλος των βιοδυλιστηρίων είναι η διασφάλιση του κύκλου της παραγωγής βιομάζας [46].

1.2 Ιστορικά Στοιχεία

Σήμερα, οι τεχνολογίες βιοδιύλισης βασίζονται στην αξιοποίηση του συνόλου της φυτικής ή σύνθετης βιομάζας και στον συνδυασμό των παραδοσιακών και σύγχρονων μεθόδων για τη χρήση των βιολογικών πρώτων υλών. Κατά τον 19ο αιώνα και τις

αρχές του 20ου αιώνα, η χρήση σε μεγάλη κλίμακα των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας επικεντρώθηκε στην παραγωγή χαρτοπολτού και χαρτιού από ξύλο, στη σακχαροποίηση του ξύλου, στη νιτροποίηση της κυτταρίνης για μετάξι, στη παραγωγή διαλυτής κυτταρίνης για ίνες και στη παραγωγή φουρφουράλης για Nylon. Επιπλέον, οι τεχνολογίες διύλισης της ζάχαρης, παραγωγής αμύλου, διαχωρισμού των πρωτεϊνών ως ζωοτροφές, και της εξαγωγής της χλωροφύλλης για βιομηχανική χρήση, ήταν μεγάλης ιστορικής σημασίας. Αλλά επίσης, βιοτεχνολογικές διεργασίες όπως η παραγωγή αιθανόλης, οξικού οξέος, γαλακτικού οξέος, και κιτρικού οξέος ήταν ιδιαίτερα σημαντικές για τον 19ο και 20ο αιώνα.

1.3 Είδη Βιοδιύλισης

Τα είδη βιοδιύλισης είναι τρία, γνωστά και ως φάσεις I, II και III. Τα βιοδιυλιστήρια φάσης I αφορούν τις αρχικές προσπάθειες για την παραγωγή βιοκαυσίμων, όπου καθιερώθηκαν δύο μέθοδοι παραγωγής: η βιοχημική και η θερμοχημική. Επικεντρώνονται κυρίως στην παραγωγή ενός μόνο βιοκαυσίμου και χρησιμοποιούν πρώτες ύλες που προέρχονται από βρώσιμες πηγές. Τα βιοδιυλιστήρια φάσης II υιοθετούν μία διαφορετική προσέγγιση, η οποία βασίζεται στην επεξεργασία του συνόλου του φυτού. Πιο συγκεκριμένα, η προσέγγιση αυτή περιλαμβάνει πρόσθετες διεργασίες για την εκμετάλλευση των υπολειμμάτων και οδηγεί σε πολλαπλά προϊόντα (βιοκαύσιμα και ειδικά χημικά) ανάλογα με αυτά των συμβατικών διυλιστηρίων [46].

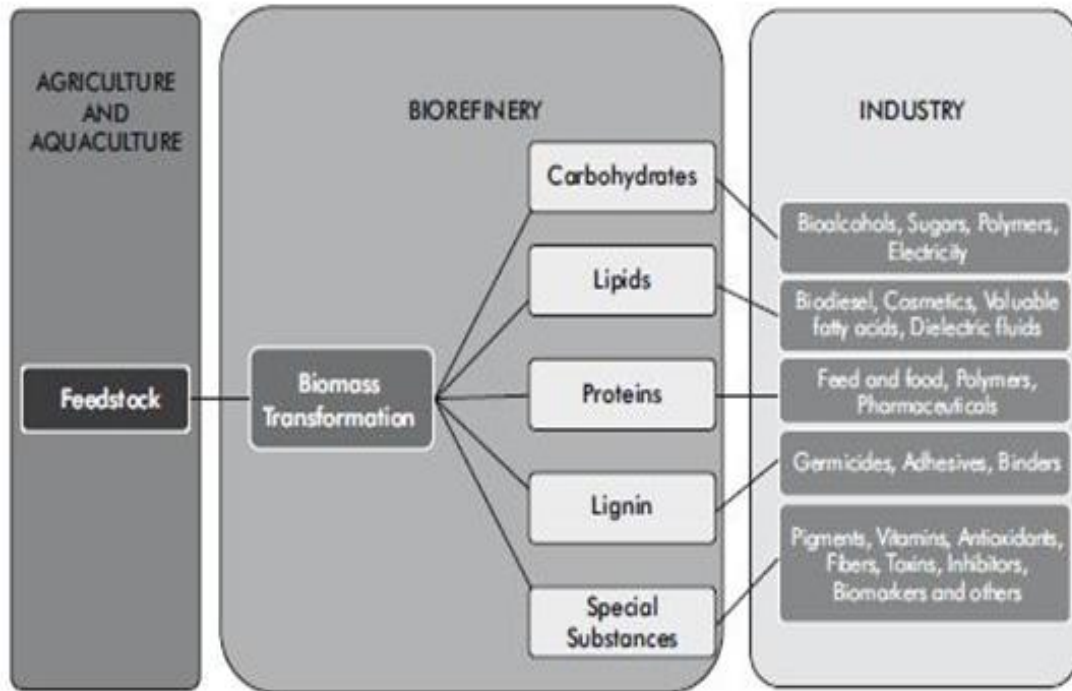
Τυπικά παραδείγματα για τη φάση I και II είναι το καλαμπόκι ξηρής άλεσης και το καλαμπόκι υγρής άλεσης, αντίστοιχα. Τα βιοδιυλιστήρια της φάσης III συνδυάζουν τη βιοδιύλιση από ολόκληρες καλλιέργειες, από πράσινες πρώτες ύλες και από λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες. Η βιοδιύλιση ολόκληρης καλλιέργειας χρησιμοποιεί πρώτες ύλες όπως τα σιτηρά ή το καλαμπόκι και καταναλώνει και επεξεργάζεται το σύνολο της καλλιέργειας για την απόκτηση χρήσιμων προϊόντων. Η πράσινη βιοδιύλιση είναι ένα σύστημα πολλαπλών προϊόντων που χειρίζεται ως εισροές τις φυσικές υγρές πρώτες ύλες που προέρχονται από μη επεξεργασμένα προϊόντα, όπως το γρασίδι, τα πράσινα φυτά και τις πράσινες καλλιέργειες. Τέλος, η βιοδιύλιση λιγνοκυτταρινούχων πρώτων υλών χρησιμοποιεί ξηρές πρώτες ύλες, όπως βιομάζα και απόβλητα πλούσια σε κυτταρίνη [44], [54].

Η παραγωγή βασικών χημικών ουσιών από βιομάζα μπορεί να έχει σημαντική συμβολή στην επίλυση δύο σημαντικών περιβαλλοντικών προβλημάτων: την κλιματική αλλαγή και την εξάντληση των ορυκτών πηγών ενέργειας. Σήμερα οι χημικές ουσίες παράγονται σχεδόν αποκλειστικά από πρώτες ύλες που προέρχονται από το αργό πετρέλαιο και το φυσικό αέριο. Η παραγωγή των ίδιων ή λειτουργικά ισοδύναμων χημικών ουσιών από ανανεώσιμες πηγές μπορεί να μειώσει τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις, για παράδειγμα, τις εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου. Νέες προοπτικές και ευκαιρίες για την παραγωγή χημικών ουσιών από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας έχουν εμφανιστεί από την πρόσφατη πρόοδο στη βιομηχανική βιοτεχνολογία (Industrial Biotechnology), κυρίως λόγω των υψηλών ποσοστών παραγωγικότητας και απόδοσης που έχουν παρατηρηθεί στις διαδικασίες ζύμωσης [38].

1.4 Προϊόντα Βιοδιύλισης

Ο στόχος της βιοδιύλισης είναι να χρησιμοποιήσει ανανεώσιμες πρώτες ύλες για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας και ποικιλίας καυσίμων και χημικών. Αρκετά προϊόντα βιοδιύλισης βρίσκονται ήδη στην αγορά, συμπεριλαμβανομένων των καυσίμων, βιομηχανικής αιθανόλης, γλυκαντικών ουσιών (σιρόπια φρουκτόζης και σορβιτόλη), οργανικών οξέων (κιτρικό και γαλακτικό οξύ), λυσίνης, ενζύμων, πολυμερών (κόμμεα ξανθάνης), τροφίμων, ζωοτροφών και ειδικών χημικών προϊόντων, με ετήσιες πωλήσεις πολλών δισεκατομμυρίων δολαρίων. Οι βιοχημικές ουσίες που παράγονται από τα σημερινά βιοδιυλιστήρια χρησιμοποιούνται σε ποικίλα προϊόντα, όπως κόλλες, ρητίνες, επιστρώσεις χαρτιού, κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα, υλικά συσκευασίας, αφρούς, διαλυτικά, καλλυντικά, χρώματα, πλαστικά και φαρμακευτικά προϊόντα.

Τα βιοπροϊόντα παρασκευάζονται με συνδυασμό διαφόρων μεθόδων και διαδικασιών (φυσικές, χημικές, βιολογικές και θερμικές). Συνεπώς, είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν βασικές τεχνολογίες βιοδιύλισης. Για το λόγο αυτό, απαιτείται βαθιά διεπιστημονική συνεργασία των διαφόρων κλάδων στον τομέα της έρευνας και της ανάπτυξης [44].

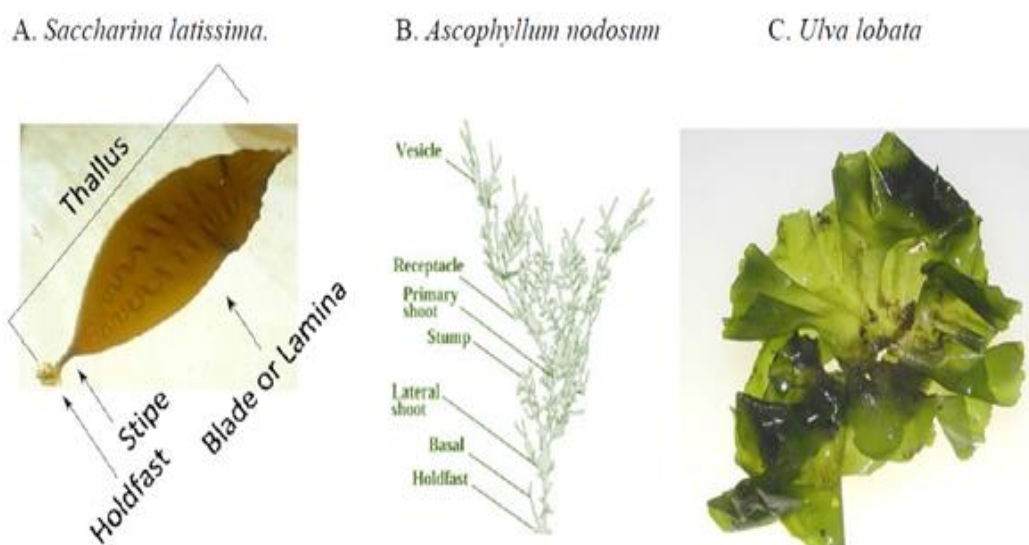


Σχήμα 2. Πρώτες ύλες, ενδιάμεσα και προϊόντα βιοδύλισης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΥΔΑΤΙΝΗ ΒΙΟΜΑΖΑ - ΜΑΚΡΟΦΥΚΗ

2.1 Μορφολογία Φυκών

Τα φύκη (algae), είναι πολυκύτταροι φωτοσυνθετικοί φυτικοί οργανισμοί που δεν έχουν βλαστούς, φύλλα, ρίζες και δεν σχηματίζουν σπέρματα, άνθη ή καρπούς όπως τα ανώτερα φυτά [64]. Τα φύκη διακρίνονται σε μικροφύκη και μακροφύκη. Τα μακροφύκη αντιπροσωπεύουν μία ποικιλόμορφη ομάδα των ευκαρυωτικών, φωτοσυνθετικών θαλάσσιων οργανισμών. Σε αντίθεση με τα μικροφύκη, που είναι μονοκύτταροι οργανισμοί, όλα τα είδη μακροφυκών είναι πολυκύτταροι οργανισμοί και διαθέτουν χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των φυτών. Τα γενικά χαρακτηριστικά των δομών τους ποικίλουν σε κάθε κατηγορία μακροφυκών (Εικόνα 1). Υπάρχουν δομές των οποίων το κύριο χαρακτηριστικό είναι τα μακριά φύλλα, δομές που διακλαδίζονται και δομές που έχουν κύστες αέρα, οι οποίες λειτουργούν ως μέσο επίπλευσης και τους επιτρέπουν να στέκονται ή να κινούνται ελεύθερα στην επιφάνεια των ωκεανών. Τα μακροφύκη κατατάσσονται ως *Phaeophyta* ή καφέ φύκη, *Rhodophyta* ή κόκκινα φύκη και *Chlorophyta* ή πράσινα φύκη με βάση τη σύνθεση των φωτοσυνθετικών χρωστικών ουσιών που περιέχουν.



Εικόνα 1. Η μορφολογία τριών ειδών μακροφυκών: A. *Saccharina latissima*, B. *Ascophyllum nososum* (καφέ φύκος) και C. *Ulva lobata* (πράσινο φύκος)

Ο κύκλος ζωής των μακροφυκών είναι πολύπλοκος και ποικιλόμορφος, με διαφορετικά είδη να παρουσιάζουν παραλλαγές στις ετήσιες και πολυετείς ζωές τους, στις μεθόδους αναπαραγωγής τους και στην εναλλαγή γενεών. Κάθε είδος έχει τη χαρακτηριστική του ιστορία ζωής, η οποία πρέπει να γίνει κατανοητή, προκειμένου να αναπτυχθούν οι κατάλληλες τεχνικές καλλιέργειας. Σήμερα το μεγαλύτερο μέρος της συγκομιδής μακροφυκών για τρόφιμα και άλλα προϊόντα προέρχεται από καλλιεργούμενα φύκη από απόθεμα σπόρων που πολλαπλασιάζονται σε επωαστήρια. Η κατανομή των μακροφυκών είναι παγκόσμια. Αφθονούν σε παράκτιες περιοχές και κυρίως στα ύδατα κοντά σε ακτές με κατάλληλο υπόστρωμα για την προσκόλλησή τους. Τα μακροφύκη συναντώνται επίσης, σε μορφή που επιπλέει στον ανοιχτό ωκεανό και τα επιπλέοντα φύκη θεωρούνται ως ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά των φυσικών υλών στην επιφάνεια της θάλασσας [24], [66].

2.2 Περιοχές Ανάπτυξης Φυκών

Τα φύκη, κυρίως τα μικροσκοπικά, συναντώνται παντού. Ιδιαίτερα στα νερά, γλυκά και αλμυρά, θάλασσες, λίμνες, ποτάμια. Ορισμένα, μικροσκοπικά, έχουν προσαρμοστεί και ζουν στο έδαφος, σε βράχους, πέτρες, ξύλα, ακόμα και σε ψυχρές ή θερμές ερημικές περιοχές. Τα μεγάλων διαστάσεων φύκη βρίσκονται στη θάλασσα. Στη θάλασσα αναπτύσσονται κυρίως πάνω σε σταθερά υποστρώματα, δηλαδή σε βράχους, σε ύφαλα πλοίων κ.ά. όπου προσκολλώνται με ένα χαρακτηριστικό όργανο, το δίσκο προσκόλλησης, ή με αποφύσεις που θυμίζουν ρίζες.

2.3 Παραγωγή Μακροφυκών

Επί του παρόντος, η βιομηχανία μακροφυκών εστιάζεται κυρίως σε προϊόντα τροφίμων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 83-90% της συνολικής αξίας των φυκών. Τα υδροκολλοειδή που προέρχονται από μακροφύκη, όπως τα αλγινικά, το άγαρ και η καραγενάνη, αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της υπόλοιπης αξίας. Η συντριπτική πλειοψηφία των μακροφυκών για τα προϊόντα αυτά παράγεται από υδατοκαλλιέργειες, οι οποίες αποτελούσαν 3,1 εκατομμύρια τόνους της ετήσιας παγκόσμιας παραγωγής το 2006, σε σύγκριση με

μόνο 22000 τόνους από τη συγκομιδή αποθεμάτων άγριων φυκών. Οι δέκα χώρες με συγκομιδή άγριων αποθεμάτων είναι γεωγραφικά κατανομημένες σε όλο τον κόσμο, αλλά η παραγωγή από υδατοκαλλιέργειες επικεντρώνεται στην Ασία, με την Κίνα να αντιπροσωπεύει το 72% της παγκόσμιας ετήσιας παραγωγής. Τα πέντε είδη μακροφυκών - *Laminaria*, *Undaria*, *Porphyra*, *Euchema* και *Gracilaria* - αντιπροσωπεύουν το 76% της συνολικής χωρητικότητας της παραγωγής μακροφυκών από υδατοκαλλιέργειες [86].

2.4 Επίδραση Φυκών στη Ζωή

Η επίδραση των φυκών στην εξέλιξη της ζωής αλλά και της διαμόρφωσης του κλίματος στον πλανήτη είναι τεράστιας σημασίας. Τα κυανοφύκη είναι οι πρώτοι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που αναπτύχθηκαν πάνω στη Γη και συντέλεσαν στον εμπλουτισμό της ατμόσφαιρας με οξυγόνο. Τα φύκη συμβάλλουν στην παραγωγή του 40-50% του οξυγόνου της ατμόσφαιρας. Επιπλέον η συμβολή τους στην κατανάλωση του διοξειδίου του άνθρακα είναι καθοριστική καθώς υπολογίζεται ότι απομακρύνουν ετησίως 2 x 10¹² kg άνθρακα έναντι 1.4 x 10¹² kg που απομακρύνονται από τη βιόσφαιρα του εδάφους. Τα φύκη αποτέλεσαν την πρώτη ύλη του ορυκτού άνθρακα με τη μορφή είτε αργού πετρελαίου είτε φυσικού αερίου [64].

2.5 Φύκη ως Ανανεώσιμη Πηγή Ενέργειας

Τα υδρόβια φύκη (μακροφύκη και μικροφύκη) αποτελούν μια ελκυστική ανανεώσιμη πηγή για την παραγωγή βιοκαυσίμων με πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη βιομάζα από τα τρόφιμα ή από κυτταρινούχα υλικά. Τα φύκη περιλαμβάνουν μια ευρεία ποικιλία φωτοσυνθετικών οργανισμών που ζουν σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα και συναντώνται σε όλα τα υπάρχοντα οικοσυστήματα της Γης. Υπό κανονικές συνθήκες, τα αυτότροφα φύκη χρησιμοποιούν το ηλιακό φως και αφομοιώνουν τον ανόργανο άνθρακα από την ατμόσφαιρα σε μορφή υδατανθράκων και λιπιδίων, τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν για παραγωγή βιοκαυσίμων. Τα υδρόβια φύκη έχουν πολλά πλεονεκτήματα ως ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Πρώτον, τα υδρόβια φύκη έχουν σχετικά υψηλή απόδοση μετατροπής φωτός και ως

εκ τούτου μπορούν να συνθέσουν γρήγορα βιομάζα μέσω της αφομοίωσης άφθονων φυσικών πόρων, όπως το φως του ήλιου, το διοξείδιο του άνθρακα, και ανόργανα θρεπτικά συστατικά. Έτσι, οι αποδόσεις παραγωγής φυκών ανά μονάδα επιφάνειας είναι σημαντικά υψηλότερες από εκείνες της χερσαίας βιομάζας. Δεύτερον, τα υδρόβια φύκη δεν περιέχουν λιγνίνη, απαραίτητη για τη διαρθρωτική στήριξη των χερσαίων φυτών (η λιγνίνη είναι ένα συστατικό που απαιτείται για την ακαμψία των χερσαίων φυτών). Έτσι, το κυτταρικό τοίχωμα των μακροφυκών είναι δομικά ευέλικτο και μπορούν να αποπολυμεριστούν σχετικά εύκολα σε σύγκριση με τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα. Τρίτον, μπορούν να καλλιεργηθούν σε μεγάλη κλίμα σε ανοιχτές δεξαμενές ή σε ειδικά σχεδιασμένους φωτοσυνθετικούς βιοαντιδραστήρες. Τέλος, τα φύκη δεν απαιτούν εκτάσεις καλλιεργήσιμης γης, μπορούν να καλλιεργηθούν σε μια ποικιλία από υδρόβια περιβάλλοντα, όπως φρέσκο νερό, θαλάσσιο νερό ή αστικά λύματα και απαιτούν ηπιότερες συνθήκες επεξεργασίας συγκριτικά με τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα. Η ικανότητά τους να αναπτυχθούν σε θαλασσινό νερό ή απόβλητα είναι ζωτικής σημασίας για την αειφόρο παραγωγή βιοκαυσίμων, προκειμένου να αποφευχθεί ο ανταγωνισμός με τις καλλιέργειες τροφίμων που απαιτούν φρέσκο νερό και καλλιεργήσιμη γη [86].

Οι τρέχουσες μέθοδοι παραγωγής χημικών ουσιών από φύκη επικεντρώνονται σε ένα μόνο προϊόν, όπως το αλγινικό οξύ, η καραγενάνη ή χρωστικές ουσίες. Το υπόλειμμα των φυκών αντιμετωπίζεται ως απόβλητο. Τα περισσότερα από τα τρέχοντα ερευνητικά προγράμματα πάνω στα φύκη επικεντρώνονται επίσης στην παραγωγή ενός μόνο προϊόντος: τα βιοκαύσιμα. Ως εναλλακτική λύση στις παραπάνω μεθόδους παρουσιάζεται η βιοδιύλιση σε στάδια, που αποσκοπεί στην εκμετάλλευση της αξίας όλων των συστατικών που υπάρχουν στη βιομάζα. Σε γενικές γραμμές, αυτή η προσέγγιση βασίζεται στην κλασματοποίηση των μορίων υδατανθράκων, πρωτεϊνών και ανόργανων αλάτων, διαχωρίζοντας τα διαφορετικά μόρια υδατανθράκων το ένα από το άλλο, και στη μετατροπή τους σε ενδιάμεσα χημικά υψηλής προστιθέμενης αξίας ή στη χρήση τους ως έχουν. Τα φύκη είναι ιδανική πρώτη ύλη για την προσέγγιση αυτή διότι περιέχουν αφενός, υψηλής αξίας συστατικά, όπως χρωστικές, βιοδραστικά μόρια και ειδικά σάκχαρα, και αφετέρου, συστατικά που αποτελούν πρώτες ύλες για άλλα χημικά, όπως η ξυλόζη και η γλυκόζη. Εκτός από την βιοδιύλιση φυκών για την παραγωγή χημικών ουσιών και καυσίμων, μπορεί να ερευνηθεί και η παραγωγή διαφόρων θρεπτικών συστατικών από αυτά [31], [78].

2.5.1 Παραπροϊόντα Βιοδιωλιστηρίων Φυκών

Δεδομένου ότι η παραγωγή των βιοκαυσίμων χρησιμοποιεί κυρίως το κλάσμα υδατανθράκων της υδρόβιας βιομάζας, θα πρέπει να ερευνηθεί η αξιοποίηση άλλων συστατικών, όπως οι φυτικές πρωτεΐνες, τα αλγινικά (αν δεν χρησιμοποιούνται) και οι φαινολικές ενώσεις, για την ενίσχυση της οικονομικής αξίας της διαδικασίας παραγωγής καυσίμων από φύκη. Επιπλέον, η ζύμωση των προϊόντων υδρόλυσης από φύκη παράγει όχι μόνο αιθανόλη, αλλά και πολλά παραπροϊόντα, όπως γλυκερίνη, οργανικά οξέα (π.χ., οξικό, ηλεκτρικό), πρωτεΐνη βιομάζας και άλλα. Η βιομηχανία βιοκαυσίμων με χρήση φυκών θα είναι πιο οικονομική όταν αυτά τα παραπροϊόντα τεθούν σε χρήση, ακριβώς όπως στη βιομηχανία πετρελαίου, όπου πολλά προϊόντα εκτός της βενζίνης είναι κερδοφόρα. Για παράδειγμα, η γλυκερίνη, ως παραπροϊόν της ζύμωσης, έχει διάφορες εφαρμογές στην παρασκευή τροφίμων, φαρμάκων, προϊόντων προσωπικής φροντίδας και άλλων χημικών ουσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας. Τα οργανικά οξέα αποτελούν χημικές πρώτες ύλες υψηλής ζήτησης για την παραγωγή αποπαγωγικών αλάτων, πρόσθετων τροφίμων και άλλων. Επιπλέον, επειδή τα φύκη δεν περιέχουν λιγνίνη, τα υπολείμματα μετά τη ζύμωση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφή ή συμπληρώματα τροφής. Επίσης, είναι δυνατή η χρήση των υπολειμμάτων βιομάζας μακροφυκών από σακχαροποίηση και ζύμωση για την παραγωγή μεθανίου μέσω αναερόβιας χώνευσης και αυτή η στρατηγική θα έχει προφανή οφέλη λόγω του ότι και τα δύο προϊόντα είναι πολύτιμα για δύο κατηγορίες ενέργειας - βιοαιθανόλη ως καύσιμο μεταφορών και μεθάνιο για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας [86].

2.6 Σύσταση Μακροφυκών

Τα μακροφύκη συνήθως αποτελούνται από 85-90% υγρασία [66] με υψηλή περιεκτικότητα σε τέφρα έως 5% της υγρής μάζας. Η υπόλοιπη μάζα αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια. Αυτά τα κλάσματα μπορούν να μετατραπούν με θερμικά ή βιολογικά μέσα στα λεγόμενα πτητικά στερεά (Volatile Solids-VS) για την παραγωγή καυσίμων. Διάφορες πηγές από τη βιβλιογραφία δείχνουν ότι η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες στα μακροφύκη κυμαίνεται από 14%

έως 68% και η περιεκτικότητα σε λιπίδια κυμαίνεται από 0,1% έως και 34,9% των VS.

Ωστόσο, τα τυπικά μακροφύκη παρουσιάζουν μία περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες μεγαλύτερη από 40% και σε λιπίδια μικρότερη του 5% [79], [80]. Σε σύγκριση με την επίγεια βιομάζα, τα μακροφύκη έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (70-90% φρέσκο νερό) και ανόργανα άλατα όπως αλκαλικά μέταλλα (10-50% του ξηρού βάρους). Αντίθετα έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (7-15% του ξηρού βάρους) και σε λιπίδια (1-5% του ξηρού βάρους) [35], [85].

Οι υδατάνθρακες είναι ένα σημαντικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος και άλλων τμημάτων των υδρόβιων φυκών. Μερικά είδη μπορεί να είναι συγκριτικά πλούσια σε λιπίδια ή πρωτεΐνες, αλλά συνήθως τα καφέ φύκη είναι πλούσια σε υδατάνθρακες. Τα μακροφύκη αποτελούνται από μεγάλες ποσότητες δομικών πολυσακχαριτών. Η διαθεσιμότητα των πολυσακχαριτών και των αλκοολών των σακχάρων κάνουν τα καφέ φύκη καλούς υποψηφίους για τη μετατροπή τους σε βιοκαύσιμα. Επίσης, η χαμηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη τα κάνει κατάλληλα για επεξεργασίες όπως είναι η αναερόβια χώνευση ή η διαδικασία της ζύμωσης [19].

2.7 Laminaria digitata

Η *Laminaria digitata* είναι ένα είδος καφέ φύκους που συναντάται κυρίως στην παράκτια ζώνη του βόρειου Ατλαντικού Ωκεανού, φτάνει μέχρι τα 4 μέτρα ύψος και παραδοσιακά χρησιμοποιούταν ως λίπασμα, ή ως πρώτη ύλη για την εξαγωγή ιωδίου. Σήμερα χρησιμοποιείται για την εξαγωγή αλγινικού οξέος, την κατασκευή οδοντόκρεμων και καλλυντικών, καθώς και στη βιομηχανία τροφίμων. Στην Πορτογαλία, μεγάλες ποσότητες της *L. digitata* βρίσκονται σε παραλίες απειλώντας την τουριστική βιομηχανία και μολύνοντας τους παρθένους τόπους της [23].



Εικόνα 2. Φωτογραφίες μακροφύκους *Laminaria digitata* [97].

Περισσότερες από 40 εταιρείες από το Ηνωμένο Βασίλειο, την Ιρλανδία, την Ισλανδία, τη Γαλλία, την Ιταλία, τη Γερμανία, τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, τον Καναδά και την Αυστραλία πωλούν περισσότερα από 100 διαφορετικά προϊόντα τα οποία περιέχουν *Laminaria digitata* ως ένα από τα συστατικά τους. Παρακάτω παρατίθενται ορισμένα παραδείγματα τέτοιων προϊόντων:

Προϊόντα προσωπικής φροντίδας:

- προϊόντα μπάνιου
- μάσκες προσώπου και προϊόντα απολέπισης
- σαμπουάν
- κρέμες καθαρισμού
- λοσιόν σώματος και ξυρίσματος
- αντιρυτιδικές κρέμες

Προϊόντα διατροφής:

- ως θαλάσσιο λαχανικό σε σνακ, σούπες, καρυκεύματα
- συμπληρώματα διατροφής και ενεργειακά ποτά

Εμπορικές εφαρμογές:

- γεωργικά και κηπουρικά λιπάσματα και ζωοτροφές
- αλγινικό οξύ για τη βιομηχανία υδροκολλοειδών
- βιοδιασπώμενα καθαριστικά επιφανειών για χρήση στο σπίτι, τον κήπο, αλλά και στη βιομηχανία [97].

Ο Πίνακας 1 παρουσιάζει τη βιοχημική σύσταση των ειδών μακροφυκών *Laminaria*.

Πίνακας 1. Τυπική χημική σύσταση των ειδών μακροφυκών *Laminaria* [24].

Συστατικό	w/w % ξ.β. (min)	w/w % ξ.β. (max)	w/w % ξ.β. (μέση τιμή)
Πρωτεΐνες	6	19	12
Λιπίδια	0,92	4	2
Κυτταρίνη	3	9	6
Αλγινικά	17	30	23
Λαμιναρίνη	14	14	14
Φουκοειδίνη	5,5	5,5	5
Μαννιτόλη	7	18,25	12

*ξ.β. = επί ξηρού βάρους

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΟΞΥ

3.1 Χημεία και Χρήσεις Ηλεκτρικού Οξέος

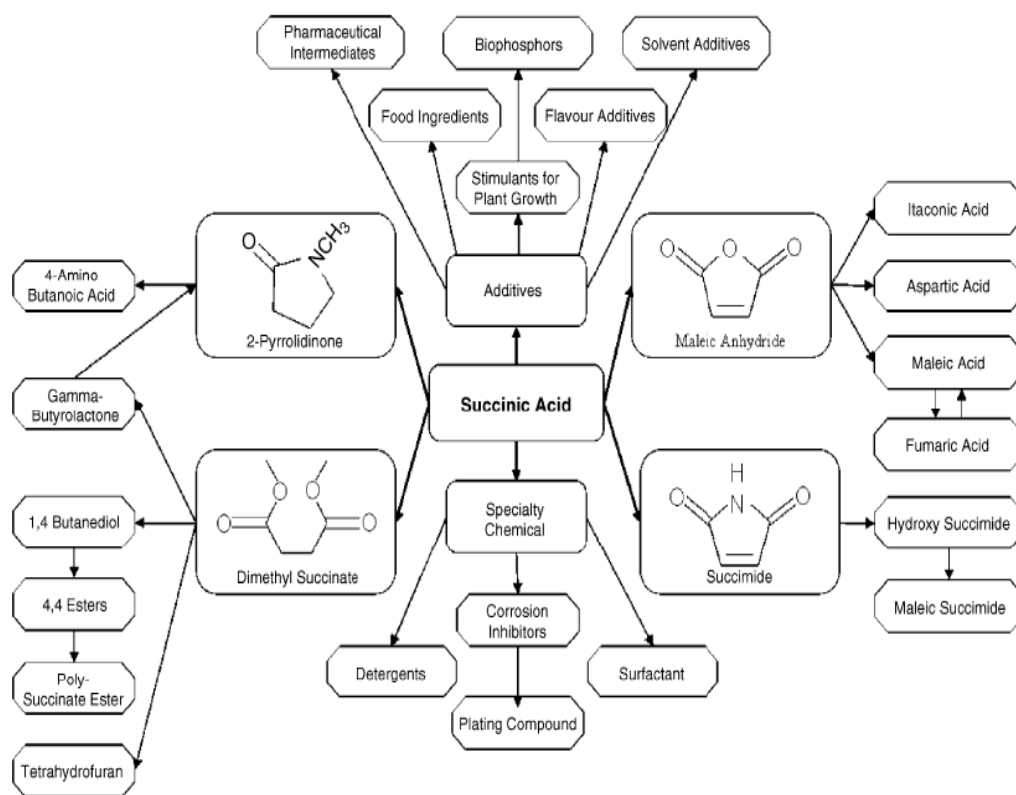
Το ηλεκτρικό οξύ (succinic acid), επίσης γνωστό ως βουτανοδιοϊκό οξύ, αποτελεί το απλούστερο γ-δικαρβονικό οξύ και έχει χημικό τύπο $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ [10]. Απαντάται σε πολλά φυτικά είδη, στα περισσότερα φρούτα και λαχανικά αλλά και στο ήλεκτρο (κεχρμπάρι) από όπου πήρε και το όνομά του. Το ηλεκτρικό οξύ είναι ένα ενδιάμεσο του κύκλου του κιτρικού οξέος (TCA - κύκλος Krebs) μέρος της διαδικασίας κατά την οποία οι ζωντανοί οργανισμοί μετατρέπουν την τροφή σε ενέργεια και ένα από τα τελικά προϊόντα ζύμωσης του αναερόβιου μεταβολισμού [39].

Το ηλεκτρικό οξύ αποτελεί μία από τις σημαντικότερες χημικές ουσίες των τελευταίων ετών και έχει αναγνωριστεί ως ένα από τα 12 κορυφαία χημικά προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας που πρέπει να παράγονται από βιομάζα, σε έκθεση που δημοσιεύθηκε από το Υπουργείο Ενέργειας των ΗΠΑ. Οι ιδιότητες του ηλεκτρικού οξέος παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2. Φυσικές ιδιότητες ηλεκτρικού οξέος.

Μοριακός τύπος	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$
Μοριακό βάρος	118,09 g/mol
Σημείο τήξεως	188°C
Σημείο βρασμού	235°C
Διαλυτότητα	100g/100ml στους 100°C
	7,69g/100 ml στους 25°C
pK _{A1}	4,21
pK _{A2}	5,64

Το ηλεκτρικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη γεωργία, στη βιομηχανία φαρμάκων και τροφίμων, ως πρόδρομος πολλών, σημαντικών για τη βιομηχανία, χημικών ουσιών, όπως τα: αδιπικό οξύ, 1,4-βουτανοδιόλη (BDO), τετραϋδροφουράνιο (THF), και γάμα-βουτυρολακτόνη (GBL) [10]. Μια δεύτερη ομάδα μορίων που προέρχονται από το ηλεκτρικό οξύ είναι οι πυρολιδόνες. Οι εφαρμογές τους αφορούν κυρίως τη βιομηχανία διαλυτών και πολυμερών. Το φουμαρικό, το μηλικό και το ιτακονικό οξύ σχηματίζουν μία τρίτη ομάδα παραγώγων ηλεκτρικού οξέος [11]. Από το ηλεκτρικό οξύ παράγεται μια μεγάλη γκάμα προϊόντων, όπως ρητίνες, βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, όπως το πολυβουτυρικό ηλεκτρικό οξύ (PBS) και τα πολυαμίδια (Nylon®x,4) [17], επιφανειοδραστικές ουσίες, απορρυπαντικά, φαρμακευτικά προϊόντα και πρόσθετα τροφίμων. Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό σε ζωοτροφές και ως τονωτικό για την ανάπτυξη των φυτών [70]. Παραδείγματα χημικών παραγώγων του ηλεκτρικού οξέος παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.

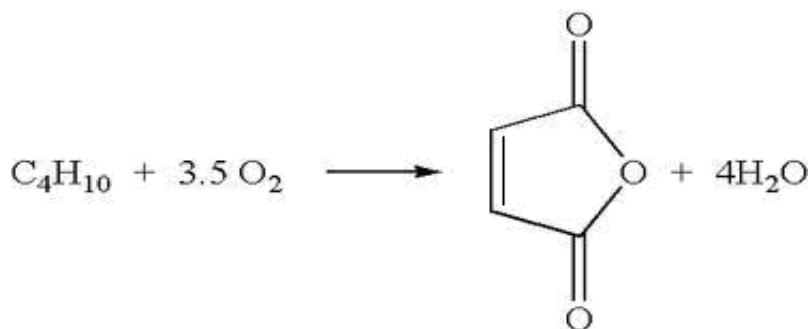


Σχήμα 3. Το ηλεκτρικό οξύ και τα χημικά παράγωγά του [70].

3.2 Παραγωγή Ηλεκτρικού Οξέος

3.2.1 Παραγωγή από Πετρέλαιο

Σήμερα, το ηλεκτρικό οξύ παράγεται κυρίως μέσω χημικών διεργασιών από N-βουτάνιο/βουταδιένιο μέσω καταλυτικής υδρογόνωσης μηλεϊνικού ανυδρίτη, που προέρχεται από το πετρέλαιο (C4 κλάσμα νάφθας) [10], [12], [91]. Η απλοποιημένη αντίδραση του N-βουτανίου σε μηλεϊνικό ανυδρίτη παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.



Σχήμα 4. Αντίδραση μετατροπής N-βουτανίου σε μηλεϊνικό ανυδρίτη.

Η αντίδραση από μηλεϊνικό ανυδρίτη σε ηλεκτρικό οξύ ξεκινάει με υδρόλυση, σπάζοντας έναν από τους μονούς δεσμούς μεταξύ άνθρακα και οξυγόνου, σχηματίζοντας μηλεϊνικό οξύ. Η αντίδραση ολοκληρώνεται με προσθήκη υδρογόνου, το οποίο σπάει το διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα και σχηματίζει ηλεκτρικό οξύ [39].

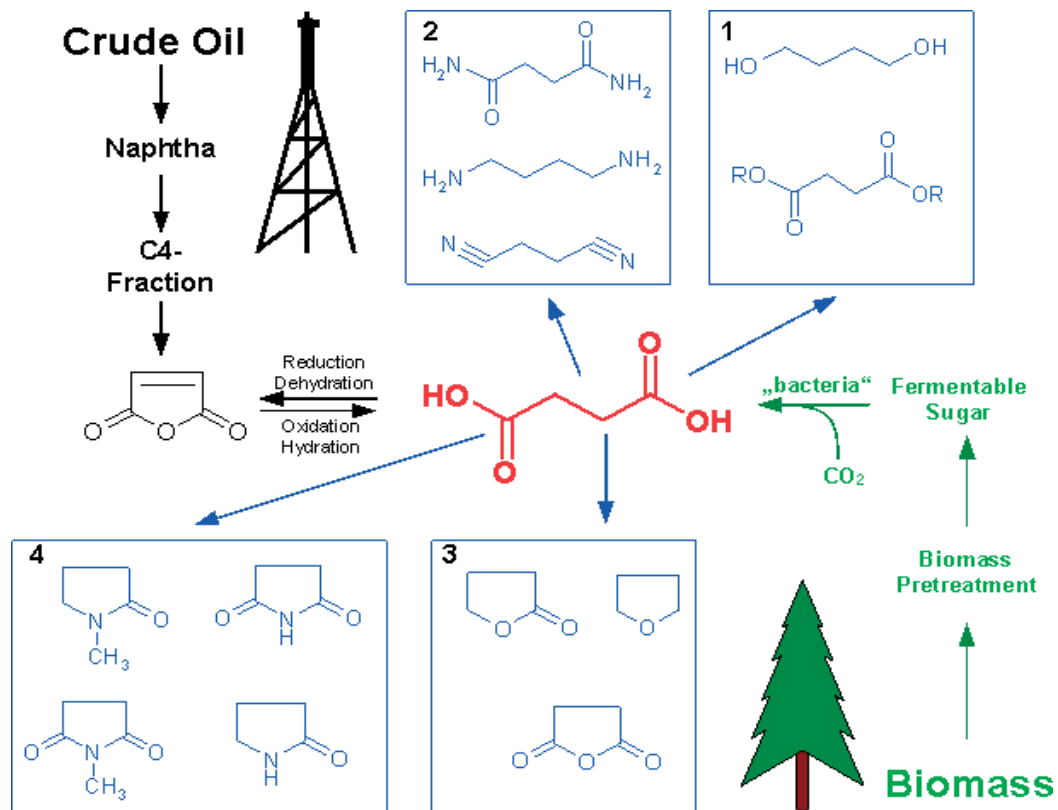
Η παγκόσμια παραγωγή ηλεκτρικού οξέος το 2011 ήταν 36.000 τόνοι, με τιμή που κυμαινόταν από 5,9 έως 9 δολάρια ανά κιλό, ανάλογα με την καθαρότητα του προϊόντος [87]. Το 2013 η παραγωγή ανέβηκε σε 46.600 τόνους και αναμένεται να ανέλθει στους 92.300 τόνους μέχρι το 2020 [96].

3.2.2 Παραγωγή Μέσω Βιοτεχνολογίας

Παρ'όλα αυτά, τα τελευταία χρόνια, λόγω της αύξησης της παγκόσμιας ζήτησης πετρελαίου και της εμφάνισης περιβαλλοντικών επιπτώσεων από την υπερβολική χρήση ορυκτών καυσίμων, συγκεντρώνει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με ζύμωση, από ανανεώσιμες πηγές βιομάζας, με χρήση αναερόβιων βακτηρίων. Χρησιμοποιώντας ανανεώσιμες πηγές άνθρακα και διοξείδιο

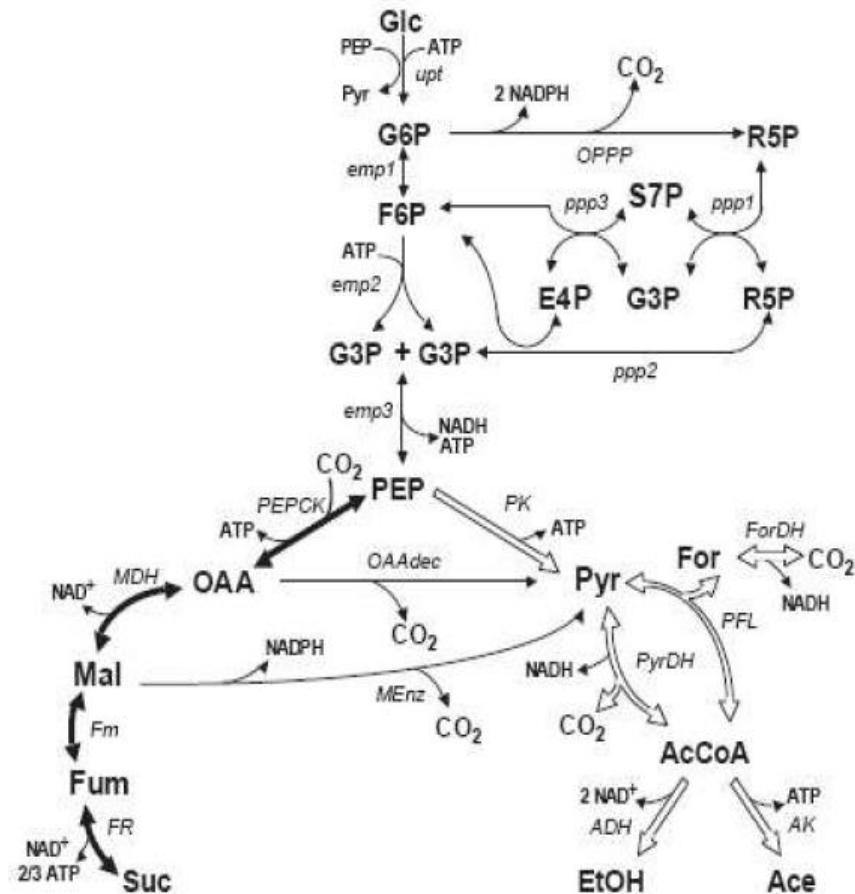
του άνθρακα ως υποστρώματα, σε αντίθεση με τις πετροχημικές διεργασίες που απελευθερώνουν CO₂, το βιο-ηλεκτρικό οξύ παρουσιάζει αξιόλογα περιβαλλοντικά και οικονομικά οφέλη [91].

Οι ανανεώσιμες πηγές βιομάζας είναι άφθονες και σήμερα εκτιμάται ότι ανέρχονται σε 170 δισεκατομμύρια τόνους ετησίως, από τις οποίες μόνο το 3,5% αξιοποιείται. Παρά το γεγονός ότι το συνολικό οικονομικό κόστος εξακολουθεί να περιορίζει τη βιο-παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, η εκτίμηση του κόστους των πρώτων υλών και η εκτίμηση του μεγέθους της μελλοντικής αγοράς δείχνουν σαφώς ότι η τρέχουσα παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από το πετρέλαιο θα αντικατασταθεί από την ζύμωση βιομάζας στο προσεχές μέλλον [70].



Σχήμα 5. Πιθανά μονοπάτια για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και προϊόντων που παράγονται από χημική μετατροπή: 1) ακυκλικές οξυγονούχες ενώσεις, 2) ακυκλικές οξυγονούχες και αζωτούχες ενώσεις, 3) κυκλικές οξυγονούχες ενώσεις, 4) κυκλικές οξυγονούχες και αζωτούχες ενώσεις [12].

Το Σχήμα 6 απεικονίζει τις αντιδράσεις και τα ένζυμα σε μία τυπική διεργασία ζύμωσης που μετατρέπει τη γλυκόζη σε ηλεκτρικό οξύ [57].



Σχήμα 6. Τυπική διεργασία ζύμωσης γλυκόζης σε ηλεκτρικό οξύ.

Πρώτα, η γλυκόζη μετατρέπεται σε -6-φωσφορική γλυκόζη (G-6P) με τη βοήθεια της εξοκινάσης, η οποία προσθέτει επίσης φωσφορικά στο μόριο. Στη συνέχεια, τρία ξεχωριστά ένζυμα, που είναι μέρος της Embden-Meyerhoff-Parnas γλυκολυτικής οδού, οδηγούν στην παραγωγή του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEP). Από το PEP, το μεταβολικό μονοπάτι μπορεί να λάβει μία από τις δύο διαδρομές, ανάλογα με το επίπεδο του διοξειδίου του άνθρακα που είναι διαθέσιμο στο σύστημα. Αν δεν υπάρχει αρκετό CO₂ στο σύστημα, το προτιμώμενο μεταβολικό μονοπάτι παράγει ως τελικά προϊόντα μηρμυκικό οξύ, αιθανόλη και οξικό οξύ, όπως φαίνεται στη δεξιά πλευρά του σχήματος 6. Αντίθετα, με άφθονη προσφορά διοξειδίου του άνθρακα στο σύστημα, ο μικροοργανισμός ευνοεί την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, στο αριστερό μισό του σχήματος 6. Μέσω αυτής της οδού, το PEP μετατρέπεται σε οξαλοξικό με

την PEP καρβοξυκινάση και την προσθήκη CO₂. Αυτό δημιουργεί μια αλυσίδα τεσσάρων ατόμων άνθρακα, δίνοντας έτσι σε αυτή τη σειρά αντιδράσεων την ονομασία «μονοπάτι C4». Η παρουσία υψηλών επιπέδων διοξειδίου του άνθρακα στο σύστημα ρυθμίζει την δραστηριότητα της PEP καρβοξυκινάσης. Η επόμενη αντίδραση προσθέτει υδρογόνο στο οξαλοξικό οξύ, ώστε να παραχθεί μηλικό οξύ, το οποίο μετατρέπεται σε φουμαρικό οξύ με τη βοήθεια φουμαράσης που απομακρύνει ένα μόριο νερού. Τέλος, με την προσθήκη του υδρογόνου, το ηλεκτρικό οξύ σχηματίζεται στην ιονισμένη του κατάσταση, η οποία είναι συνηθισμένη καθώς το εύρος του pH κατά την παραγωγή είναι πάνω από τις τιμές του pK_a του ηλεκτρικού οξέος. Η θεωρητική απόδοση του ηλεκτρικού οξέος από γλυκόζη και διοξείδιο του άνθρακα θα πρέπει να είναι 1 mole ηλεκτρικού οξέος ανά mole CO₂ με βάση την στοιχειομετρία της αντίδρασης.

Για να είναι η βιοπαραγωγή ηλεκτρικού οξέος οικονομικά βιώσιμη, πρέπει να βελτιωθούν πολλές πτυχές της βιολογικής διεργασίας, όπως ο περιορισμός της χρήσης χαμηλού κόστους αμινοξέων, η επίτευξη υψηλής απόδοσης και συγκέντρωσης και η χρήση φθινών πηγών άνθρακα. Η ζύμωση απαιτεί τόσο υπόστρωμα όσο και θρεπτικό μέσο που να περιέχουν τις πηγές ενέργειας, τα θρεπτικά συστατικά και τα ανόργανα στοιχεία που απαιτούνται για να εξασφαλιστεί η βέλτιστη παραγωγικότητα [39].

3.2.2.1 Διοξείδιο του Άνθρακα

Το διοξείδιο του άνθρακα είναι ένα βασικό συστατικό για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με τη διαδικασία της ζύμωσης, καθώς ενώνεται με το φωσφοενολοπυροσταφυλικό (PEP) για να δημιουργήσει ένα μόριο τεσσάρων ανθράκων. Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την αντίδραση παραγωγής οξαλοξικού από PEP είναι η PEP καρβοξυκινάση. Τα επίπεδα παραγωγής αυξάνουν, καθώς το διοξείδιο του άνθρακα προστίθεται στο σύστημα, δεδομένου ότι μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως δέκτης ηλεκτρονίων [71]. Η προσθήκη του διοξειδίου του άνθρακα για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος γίνεται ισοδύναμα με την προσθήκη ανθρακικού μαγνησίου (MgCO₃), το οποίο δρα επίσης ως ρυθμιστικό διάλυμα για το pH, αλλά εμπεριέχει και αυτό τον κίνδυνο αναστολής της παραγωγής και της ανάπτυξης των

κυττάρων με τη συσσώρευση αλάτων μαγνησίου. Λόγω αυτού του κινδύνου υπάρχει και η εναλλακτική λύση της παροχής αερίου διοξειδίου του άνθρακα κατευθείαν στο σύστημα.

3.2.2.2 Βακτήρια για Παραγωγή Ηλεκτρικού Οξέος

Παρ'όλο που πολλά είδη βακτηρίων παράγουν ηλεκτρικό οξύ ως προϊόν ζύμωσης, λίγα από αυτά μπορούν να το παράγουν ως το κύριο προϊόν με υψηλή απόδοση [48].

Τα κυριότερα είδη βακτηρίων που έχουν διερευνηθεί για αυτό το σκοπό είναι: *Anaerobiospirillum succiniciproducens* [48], [50], *Actinobacillus succinogenes* [10], [88], [15], [16], [17], *Mannhei succiniciproducens* MBEL 55E, [71], και το ανασυνδυασμένο *Escherichia coli* [52]. Από αυτά οι πιο σημαντικοί είναι τα *Succiniciproducens Anaerobiospirillum* και *Actinobacillus succinogenes*, λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν μια συγκριτικά μεγάλη ποσότητα ηλεκτρικού οξέος [12].

3.2.2.3 *Actinobacillus Succinogenes*

Τα κυριότερα βακτήρια για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος αξιολογήθηκαν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και ο μικροοργανισμός που επιλέχθηκε ήταν ο *Actinobacillus succinogenes* και συγκεκριμένα το στέλεχος 130Z, American Type Culture Collection (ATCC) 55618.

Το βακτήριο *A.succinogenes*, που έχει απομονωθεί αρχικά από τα περιεχόμενα στομαχιού βοοειδών, είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο, καπνοφιλικό, αρνητικό κατά gram βακτήριο, το οποίο θεωρείται ο καλύτερος μικροοργανισμός, υποψήφιος για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Το στέλεχος *A. succinogenes* 130Z είναι σε θέση να μετατρέπει ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα, όπως η αραβινόζη, η κελλοβιόζη, η φρουκτόζη, η γαλακτόζη, η γλυκόζη, η λακτόζη, η μαλτόζη, η μαννιτόλη, η μαννόζη, η σορβιτόλη, η σακχαρόζη και η ξυλόζη σε ηλεκτρικό οξύ ως κύριο προϊόν, υπό αναερόβιες συνθήκες και σε γαλακτικό οξύ, μηρμυκικό οξύ, οξικό οξύ και αιθανόλη ως παραπροϊόντα. Αυτό το στέλεχος παρουσιάζει πλεονεκτήματα ενάντια στα

υπόλοιπα, όπως η ανεκτικότητα του στην παρουσία υψηλής συγκέντρωσης υποστρώματος, η υψηλή αντοχή του στην παρεμπόδιση από το προϊόν και ο υψηλός ρυθμός παραγωγής ηλεκτρικού οξέος [12], [15], [84].

3.2.3 Περιοριστικοί Παράγοντες Ζύμωσης

Η διαδικασία της ζύμωσης είναι μια ελκυστική εναλλακτική λύση σε σύγκριση με την παραγωγή χημικών ουσιών από το αργό πετρέλαιο, λόγω της φύσης των ανανεώσιμων πρώτων υλών, αλλά υπόκειται σε αρκετούς περιορισμούς. Πρώτον, η ζύμωση λαμβάνει χώρα σε μία ορισμένη περιοχή pH και για τον *A.succinogenes* αυτή είναι μεταξύ 6 και 7,2 με βέλτιστο pH το 6,8 [84]. Ένα υψηλότερο pH θα οδηγήσει σε μεγαλύτερη κυτταρική ανάπτυξη, αλλά θα αυξήσει την ποσότητα των παραπροϊόντων που σχηματίζονται. Παρά το γεγονός ότι οι μελέτες δείχνουν ότι το ηλεκτρικό οξύ είναι το κύριο προϊόν που σχηματίζεται όσο το pH μειώνεται, υπάρχει ένα σημείο στο οποίο τα κύτταρα παύουν να ζυμώνουν τη γλυκόζη [77]. Δυστυχώς, οι τιμές pKa του ηλεκτρικού οξέος είναι 4,20 και 5,61, με αποτέλεσμα το ηλεκτρικό οξύ να παράγεται σαν ένα διαχωρισμένο μόριο. Αυτό αποτελεί πρόβλημα διότι οι περισσότερες μέθοδοι διαχωρισμού απαιτούν την αδιάστατη μορφή του, οπότε απαιτούνται παραπάνω ενέργειες για να μειωθεί το pH και να απομακρυνθούν τα προϊόντα [12]. Επίσης, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, παράγεται ηλεκτρικό οξύ, καθώς και παραπροϊόντα, όπως το μηρυκικό και το οξικό οξύ. Εξαιτίας αυτού, πρέπει να προστίθεται βάση συνεχώς στη ζύμωση για να διατηρείται το βέλτιστο pH. Αυτό γίνεται συνήθως μέσω της προσθήκης υδροξειδίου του νατρίου, το οποίο αυξάνει το pH και δίνει το ισοδύναμο ηλεκτρικό δινάτριο άλας [57]. Εάν προστεθεί μεγάλη ποσότητα νατρίου στο σύστημα, αλλάζει η οσμωτικότητα του διαλύματος και τα κύτταρα θα κροκιδωθούν. Έτσι, μειώνεται η παραγωγικότητά τους, καθώς σπαταλούν ενέργεια για τη συντήρησή τους.

3.2.4 Ενζυμική Υδρόλυση

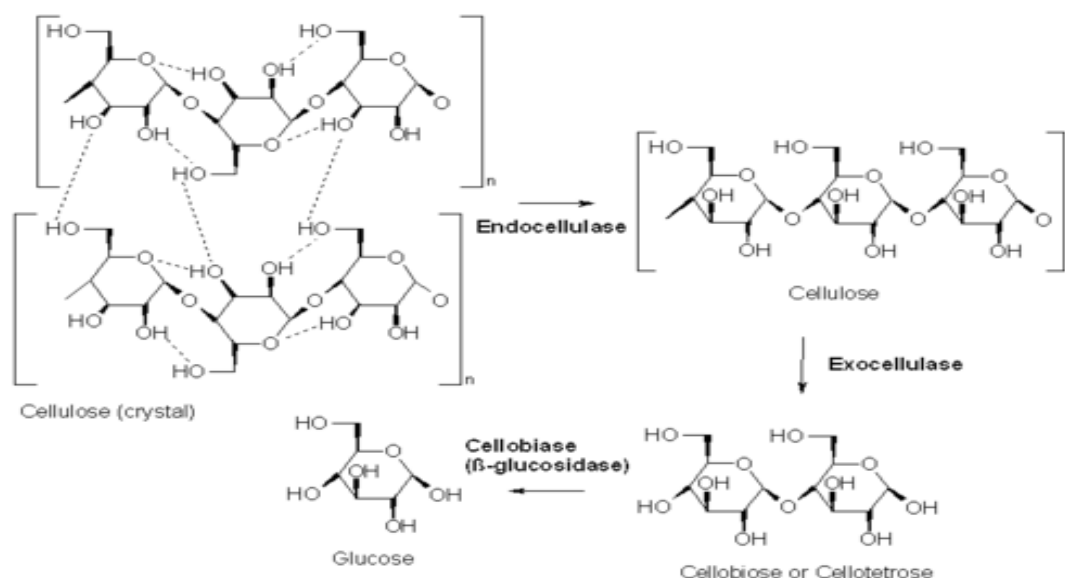
Η ενζυμική υδρόλυση είναι μια διεργασία, η οποία χρησιμοποιείται για την μετατροπή των πολυμερών κυτταρίνης και ημικυτταρίνης (τα κύρια συστατικά των

μακροφυκών) σε άμεσα μεταβολίσιμα σάκχαρα (εξόζες, πεντόζες) κυρίως με την χρήση ενζύμων (κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες), που δρουν ως καταλύτες για το σπάσιμο των γλυκοζιτικών δεσμών [81].

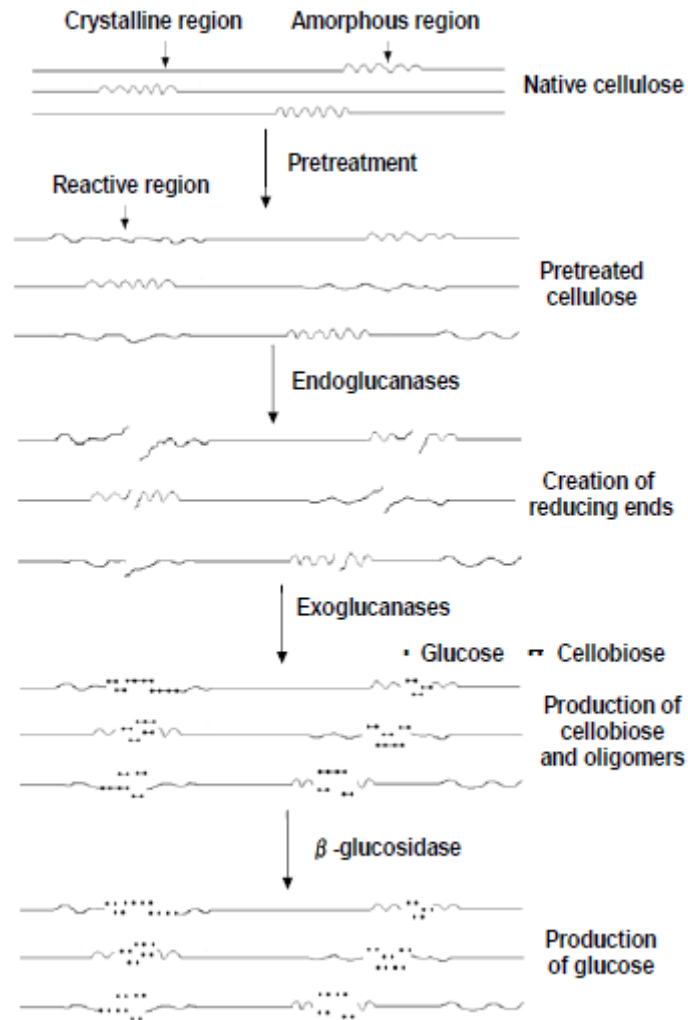
Η κυτταρίνη αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων της φυτικής βιομάζας. Αποτελείται από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης, συνδεδεμένων μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς.

Η ημικυτταρίνη είναι ετεροπολυμερές που αποτελείται από πεντόζες (ξυλόζη, αραβινόζη), εξόζες (μαννόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη) και ουρονικά οξέα. Το κυριότερο συστατικό της ημικυτταρίνης είναι η ξυλάνη η οποία αποτελεί το δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη μετά την κυτταρίνη και αποτελεί συνήθως την βασική αλυσίδα της ημικυτταρίνης [47].

Τρία είδη ενζύμων δρουν συνεργιστικά για την υδρόλυση της κυτταρίνης: οι ενδο-β-1,4-γλουκανάσες (endoglucanases-EG, EC 3.1.2.4) προσβάλλουν εσωτερικά τις άμορφες περιοχές της αλυσίδας της κυτταρίνης, οι κελλοβιοϋδρολάσες ή εξωγλουκανάσες (cellobiohydrolases-CBH, EC 3.2.1.91) προσβάλλουν τα άκρα του πολυμερούς, απελευθερώνοντας κελλοβιοζή, η οποία τελικά διασπάται σε δύο μόρια γλυκόζης από τις β-γλυκοζιδάσες (β-glucosidases-BGL, EC 3.2.1.21) (Σχήμα 7)



Σχήμα 7. Απεικόνιση ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης από τα ένζυμα : ένδο-1,4-β-γλουκανάση, έξω-1,4-β-D-γλουκανάση και β-γλυκοζιδάση [21].



Σχήμα 8. Σχηματική αναπαράσταση υδρόλυσης της κυτταρίνης σε γλυκόζη από κυτταρινούχα ένζυμα [73].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΩΝ

4.1 Εισαγωγή στα Βιοκαύσιμα

Η αξιοποίηση των σημερινών πηγών ενέργειας έχει ως αποτέλεσμα όλο και μεγαλύτερη περιβαλλοντική ρύπανση του αέρα, των υδάτων και του εδάφους με την πάροδο των χρόνων. Αυτές οι αρνητικές επιπτώσεις έχουν οδηγήσει σε αυξημένο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών με στόχο απόκτηση «πράσινης» ενέργειας, κυρίως μέσω της αξιοποίησης των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας [82].

Τα βιοκαύσιμα αποτελούνται από ένα ευρύ φάσμα καυσίμων τα οποία όλα προέρχονται με τον ένα ή τον άλλο τρόπο από βιομάζα. Ο όρος καλύπτει στερεή βιομάζα, υγρά καύσιμα και διάφορα αέρια. Τα βιοκαύσιμα κερδίζουν αυξημένη δημόσια και επιστημονική προσοχή, προερχόμενη από παράγοντες όπως η αύξηση της τιμής του πετρελαίου, η ανάγκη για ενεργειακή ασφάλεια, και φυσικά οι ανησυχίες για τις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου από τα στερεά καύσιμα.

Η υψηλή τιμή του πετρελαίου, η ανταγωνιστική ζήτηση μεταξύ τροφών και άλλων πηγών βιοκαυσίμων και η παγκόσμια κρίση στα τρόφιμα έχουν προκαλέσει ενδιαφέρον στην καλλιέργεια φυκών για την παραγωγή ελαίων, βιοντίζελ, βιοαιθανόλης, βιομεθανίου, βιοβουτανίου και άλλων βιοκαυσίμων, χρησιμοποιώντας γη η οποία δεν είναι κατάλληλη για γεωργία. Ανάμεσα στα ελκυστικά χαρακτηριστικά των καυσίμων που προέρχονται από φύκη μπορούν να συμπεριληφθούν τα ακόλουθα:

- Δεν επηρεάζουν τις πηγές γλυκού νερού.
- Μπορούν να αναπτυχθούν χρησιμοποιώντας λύματα ή θαλασσινό νερό.
- Είναι βιοδιασπάσιμα και σχετικά ακίνδυνα αν υπάρξει διαρροή στο περιβάλλον.

4.2 Φύκη και Βιοκαύσιμα

Οι πρώτες ύλες για την παραγωγή της πρώτης γενιάς βιοκαυσίμων είναι σήμερα οι καλλιέργειες τροφίμων. Παρ'όλο που αποτελούν μια υψηλής απόδοσης πηγή βιοκαυσίμων, η χρήση τους ανταγωνίζεται τη ζήτηση τροφίμων. Από την άλλη πλευρά, τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς παράγονται από πρώτες ύλες που δεν χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα, όπως υπολείμματα ξυλείας ή ποώδη φυτά. Η χρήση αυτών των πρώτων υλών δεν θέτει σε άμεσο κίνδυνο την παραγωγή τροφίμων. Ωστόσο, εξακολουθούν να ανταγωνίζονται τις καλλιέργειες τροφίμων σε ό,τι αφορά τη χρήση της γης. Έτσι, αν υδρόβια βλάστηση, όπως μακροφύκη και μικροφύκη χρησιμοποιηθούν ως πρώτες ύλες για βιοκαύσιμα, θα μπορούσε να επιτευχθεί μείωση του ανταγωνισμού έναντι των καλλιεργειών τροφίμων [55]. Τα καύσιμα από φύκη είναι επίσης γνωστά και ως βιοκαύσιμα τρίτης γενιάς. Τα βιοκαύσιμα τρίτης γενιάς είναι μια εναλλακτική ως προς τα ορυκτά καύσιμα και χρησιμοποιούν φύκη ως πηγή άνθρακα. Αρκετές εταιρίες και κρατικές υπηρεσίες χρηματοδοτούν προσπάθειες για τη μείωση του αρχικού κεφαλαίου και του λειτουργικού κόστους και να καταστήσουν την παραγωγή βιοκαυσίμων από φύκη εμπορικά εφικτή.

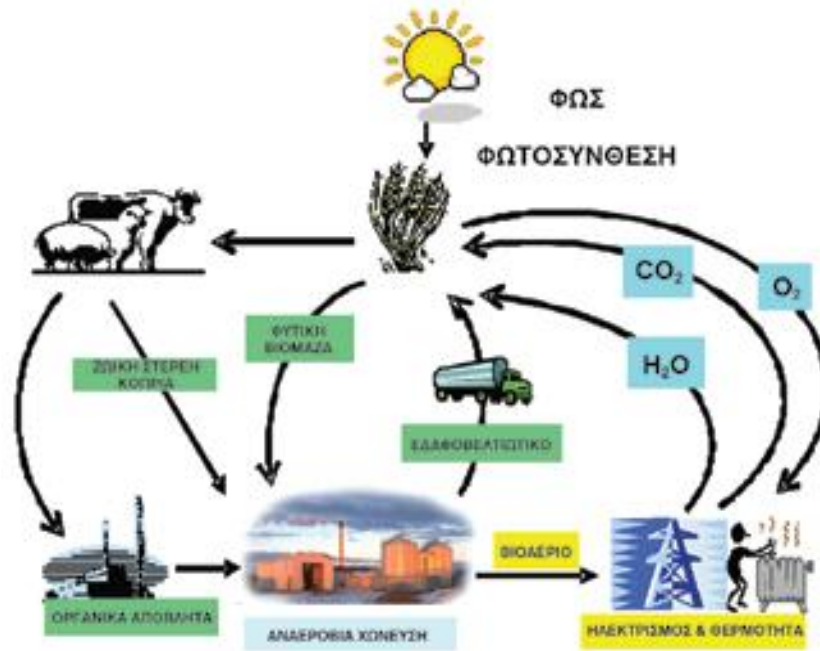
Τα φύκη είναι πρώτη ύλη που χρειάζεται λίγη αρχική ποσότητα για μεγάλη απόδοση παραγωγής βιοκαυσίμου. Με βάση εργαστηριακά πειράματα, έχειδειχθεί ότι τα φύκη μπορούν να παράξουν έως και 30 φορές περισσότερη ενέργεια ανά εκτάριο σε σύγκριση με γεωργικές καλλιέργειες όπως η σόγια, αλλά αυτό δεν έχει πραγματοποιηθεί σε μεγάλη κλίμακα. Η παραγωγή βιοκαυσίμων από φύκη δεν μειώνει το ατμοσφαιρικό διοξείδιο του άνθρακα, διότι το CO₂ που απορροφάται από τα φύκη, για την ανάπτυξη τους, επιστρέφει στην ατμόσφαιρα όταν καίγονται. Όμως μπορούν δυνητικά να μειώσουν την εισαγωγή νέου CO₂ με την εκτόπιση των ορυκτών υδρογονανθράκων. Τα θαλάσσια φύκη αποτελούνται από πολυσακχαρίτες (αλγινικά, λαμιναρίνη και μαννιτόλη), χωρίς λιγνίνη και χαμηλή περιεκτικότητα σε κυτταρίνη, κάτι που τα χαρακτηρίζει ως εύκολο υλικό για τη μετατροπή σε μεθάνιο με διεργασίες αναερόβιας χώνευσης [82].

4.3 Βιοαέριο

Το βιοαέριο αναφέρεται στο αέριο που παράγεται από τη βιολογική διάσπαση οργανικής ύλης απουσία οξυγόνου. Το βιοαέριο παράγεται μέσω αναερόβιας χώνευσης ή ζύμωσης βιοδιασπάσιμων υλικών όπως βιομάζα, κοπριά, αστικά ή βιομηχανικά λύματα, κυτταρινούχα φυτά και ενεργειακά γεωργικά προϊόντα. Αυτό το είδος βιοαερίου αποτελείται κυρίως από μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα. Τα αέρια μεθάνιο, υδρογόνο και μονοξείδιο του άνθρακα μπορούν να καούν ή να οξειδωθούν παρουσία οξυγόνου. Ο ατμοσφαιρικός αέρας περιέχει 21% οξυγόνο. Αυτή η απελευθέρωση ενέργειας επιτρέπει στο βιοαέριο να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο.

4.4 Αναερόβια Χώνευση

Η αναερόβια χώνευση (Α.Χ.) είναι μια βιοχημική διεργασία κατά τη διάρκεια της οποίας σύνθετα οργανικά στοιχεία αποσυντίθεται απουσία οξυγόνου από διάφορους τύπους αναερόβιων μικροοργανισμών. Η διεργασία της Α.Χ. είναι κοινή σε πολλά φυσικά περιβάλλοντα όπως τα ιζήματα θαλάσσιου ύδατος, το στομάχι των μηρυκαστικών ή τα έλη τύρφης. Τα βασικά προϊόντα αυτής της διεργασίας είναι το βιοαέριο και το χωνευμένο υπόλειμμα. Το βιοαέριο είναι ένα αέριο καύσιμο, αποτελούμενο κυρίως από μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα. Το χωνευμένο υπόλειμμα είναι το αποσυντεθειμένο υπόστρωμα, επακόλουθο της παραγωγής του βιοαερίου.



Σχήμα 9. Ο αειφόρος κύκλος του βιοαερίου από αναερόβια χώνευση [3].

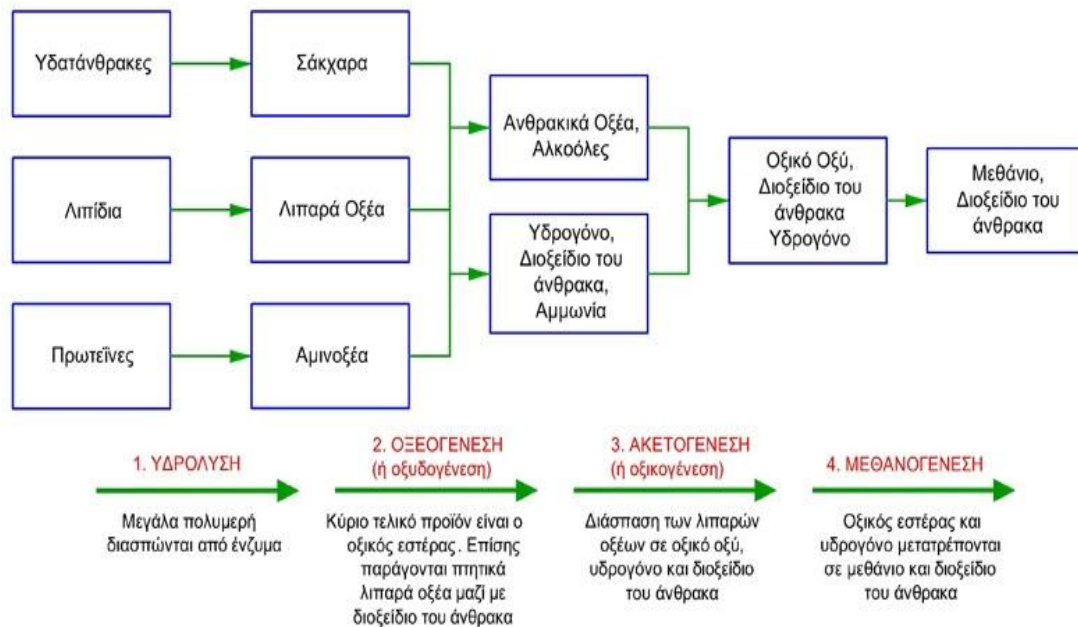
4.4.1 Υποστρώματα Αναερόβιας Χώνευσης

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα ευρύ φάσμα τύπων βιομάζας ως υπόστρωμα (πρώτη ύλη) για την παραγωγή βιοαερίου από την Α.Χ. Οι πιο κοινές κατηγορίες πρώτης ύλης που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή του βιοαερίου στην Ευρώπη είναι οι εξής:

- Στερεή και υδαρή κοπριά
- Γεωργικά υπολείμματα και υποπροϊόντα
- Οργανικά απόβλητα που μπορούν να υποστούν χώνευση από τρόφιμα και αγροτοβιομηχανίες (φυτικής και ζωικής προέλευσης)
- Το οργανικό κλάσμα των αστικών αποβλήτων και των υπολειμμάτων εστίασης (φυτικής και ζωικής προέλευσης)
- Λυματολάσπη
- Ενεργειακές καλλιέργειες (π.χ. αραβόσιτος, μίσχανθος, σόργος, τριφύλλι).

4.4.2 Στάδια Αναερόβιας Χώνευσης

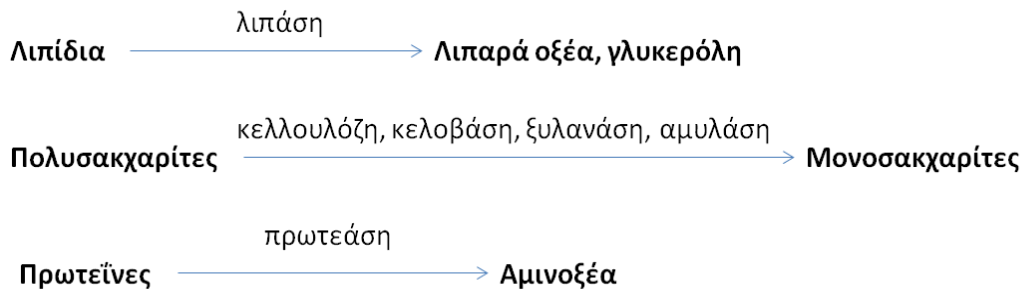
Κατά τη διάρκεια της Α.Χ. παράγεται πολύ λίγη θερμότητα σε αντίθεση με την αερόβια αποσύνθεση (παρουσία οξυγόνου), όπως είναι η κομποστοποίηση. Η ενέργεια, που είναι χημικά δεσμευμένη μέσα στο υπόστρωμα, παραμένει κυρίως στο παραγόμενο βιοαέριο με τη μορφή μεθανίου. Η διεργασία σχηματισμού του βιοαερίου είναι ένα αποτέλεσμα συνδυαστικών σταδίων, στα οποία το αρχικό υλικό συνεχώς διασπάται σε μικρότερα στοιχεία. Ειδικές ομάδες μικροοργανισμών εμπλέκονται σε καθένα από τα μεμονωμένα αυτά στάδια. Αυτοί οι οργανισμοί αποσυνθέτουν διαδοχικά τα προϊόντα των προηγούμενων σταδίων. Ένα απλουστευμένο διάγραμμα της διεργασίας της Α.Χ. παρουσιάζεται στο Σχήμα 10, όπου διακρίνονται τα τέσσερα κύρια στάδια της διεργασίας: η υδρόλυση, η οξεογένεση, η οξικογένεση και η μεθανογένεση, τα οποία αναλύονται παρακάτω.



Σχήμα 10. Τα κύρια βήματα της διεργασίας της AX [3].

1. Υδρόλυση

Η υδρόλυση είναι θεωρητικά το πρώτο βήμα της Α.Χ., κατά τη διάρκεια της οποίας η σύνθετη οργανική ουσία (πολυμερή) αποσυντίθεται σε μικρότερα στοιχεία (μονο- και ολιγομερή). Τα πολυμερή, όπως οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια, τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες, μετατρέπονται σε γλυκόζη, γλυκερίνη, πουρίνες, πυριδίνες, κλπ. Τα υδρολυτικά βακτήρια εκκρίνουν υδρολυτικά ένζυμα, μετατρέποντας τα βιοπολυμερή σε απλούστερες και διαλυτές ενώσεις, ως εξής:



Μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών εμπλέκονται στην υδρόλυση, η οποία πραγματοποιείται από τα εξωένζυμα, που παράγονται από τους μικροοργανισμούς εκείνους που αποσυνθέτουν το αδιάλυτο μοριακό υλικό. Τα προϊόντα που προκύπτουν από την υδρόλυση αποσυντίθενται περαιτέρω από τους εμπλεκόμενους μικροοργανισμούς και χρησιμοποιούνται για τις δικές τους διεργασίες μεταβολισμού.

2. Οξεογένεση

Κατά τη διάρκεια της οξεογένεσης, τα προϊόντα της υδρόλυσης μετατρέπονται από οξεογενή βακτήρια σε μεθανογενή υποστρώματα. Τα απλά σάκχαρα, τα αμινοξέα και τα λιπαρά οξέα υποβιβάζονται σε οξικό άλας, διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο (70%), καθώς επίσης και σε πτητικά λιπαρά οξέα (VFA) και αλκοόλες (30%).

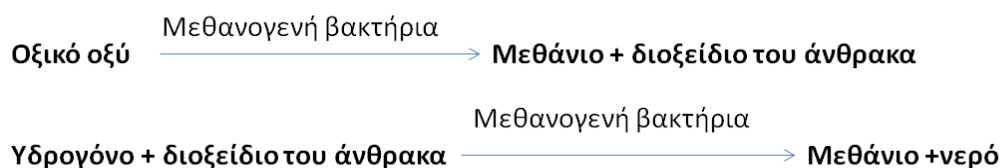
3. Οξικογένεση

Κατά τη διάρκεια της οξικογένεσης, τα προϊόντα της οξεογένεσης που δεν μπορούν να μετατραπούν άμεσα σε μεθάνιο από τα μεθανογενή βακτήρια μετατρέπονται σε μεθανογενή υποστρώματα. Τα πτητικά λιπαρά οξέα και οι αλκοόλες οξειδώνονται σε μεθανογενή υποστρώματα, όπως οξικό οξύ, υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα. Τα πτητικά λιπαρά οξέα με αλυσίδες άνθρακα με περισσότερους από δύο δεσμούς και οι αλκοόλες με αλυσίδες άνθρακα με περισσότερους από ένα δεσμό οξειδώνονται σε

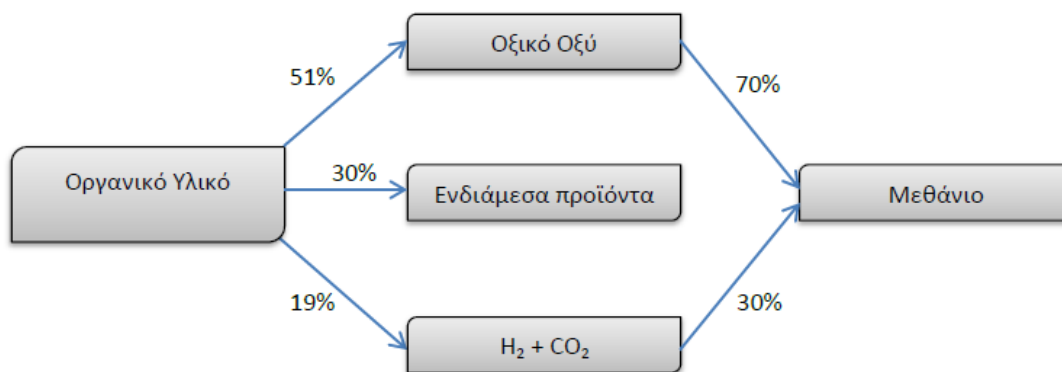
οξικό οξύ και υδρογόνο. Η παραγωγή του υδρογόνου αυξάνει την μερική πίεσή του. Αυτό μπορεί να θεωρηθεί ως «υπόλειμμα» της οξικογένεσης και εμποδίζει το μεταβολισμό των οξικογενών βακτηρίων. Κατά τη διάρκεια της μεθανογένεσης, το υδρογόνο μετατρέπεται σε μεθάνιο. Η οξικογένεση και η μεθανογένεση συνήθως λαμβάνουν χώρα παράλληλα, ως συμβίωση δύο ομάδων οργανισμών.

4. Μεθανογένεση

Η παραγωγή του μεθανίου και του διοξειδίου του άνθρακα από ενδιάμεσα προϊόντα πραγματοποιείται από τα μεθανογενή βακτήρια. Το 70% του διαμορφωμένου μεθανίου προέρχεται από οξικό άλας, ενώ το υπόλοιπο 30% παράγεται από τη μετατροπή του υδρογόνου και του CO₂ σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Η μεθανογένεση είναι ένα κρίσιμο βήμα σε ολόκληρη τη διεργασία της χώνευσης, δεδομένου ότι είναι η πιο αργή βιοχημική αντίδραση της διεργασίας. Η μεθανογένεση επηρεάζεται σοβαρά από τις συνθήκες λειτουργίας. Η σύνθεση της πρώτης ύλης, ο ρυθμός τροφοδοσίας, η θερμοκρασία και το pH είναι παραδείγματα παραγόντων που επηρεάζουν τη μεθανογένεση. Η υπερπλήρωση του χωνευτή, οι αλλαγές θερμοκρασίας ή η μεγάλη είσοδος οξυγόνου οδηγούν συνήθως στον τερματισμό της παραγωγής μεθανίου.

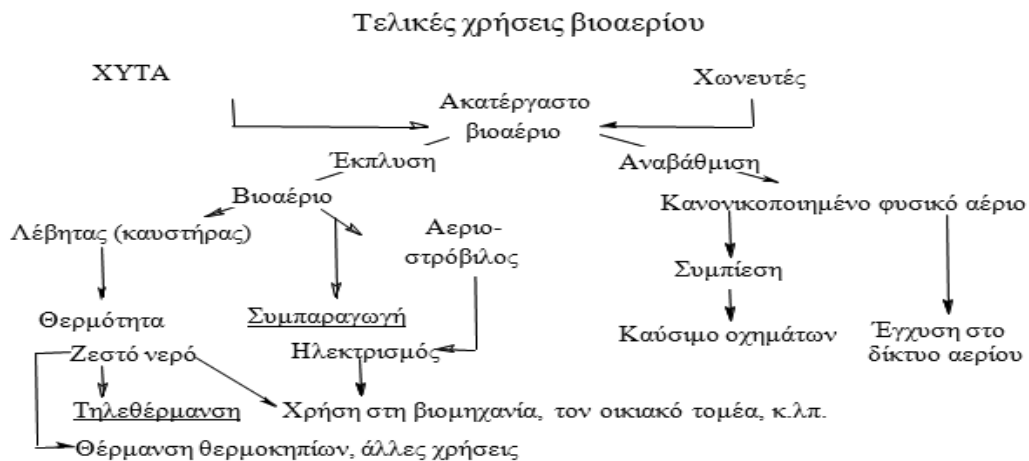


Σχήμα 11. Ροή άνθρακα στην αναερόβια χώνευση [9].

4.5 Κύριες Εφαρμογές Βιοαερίου

Η παραγωγή βιοαερίου από την Α.Χ. χρησιμοποιείται ευρέως στις σύγχρονες κοινωνίες για την επεξεργασία της στερεής και υδαρούς κοπριάς των εκτροφόμενων ζώων. Σκοπός είναι να παραχθεί ανανεώσιμη ενέργεια και να βελτιωθούν οι ιδιότητες λίπανσης της κοπριάς. Στις χώρες με μεγάλη αγροτική παραγωγή, οι συνεχώς αυστηρότεροι κανονισμοί σχετικά με την αποθήκευση και ανακύκλωση του λιπάσματος και των φυτικών υπολειμμάτων, αύξησαν το ενδιαφέρον για την Α.Χ. Επιπλέον, οι πρόσφατες εξελίξεις στην Ευρώπη, την Αμερική και άλλα μέρη στον κόσμο έχουν επίσης καταδείξει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον μεταξύ των γεωργών για τις ενεργειακές καλλιέργειες, με στόχο να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαερίου. Η Α.Χ. αποτελεί επίσης την κύρια τεχνολογία για τη σταθεροποίηση της πρωτεύουσας και δευτερεύουσας λυματολάσπης, για την επεξεργασία των βιομηχανικών υγρών αποβλήτων από τις βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων και ζύμωσης, καθώς επίσης και για την κατεργασία του οργανικού κλάσματος των αστικών στερεών αποβλήτων. Μια ειδική εφαρμογή είναι η ανάκτηση του βιοαερίου από τις χωματερές.

Το βιοαέριο έχει πολλές ενεργειακές χρήσεις, ανάλογα με τη φύση της πηγής και την τοπική ζήτηση για μια συγκεκριμένη μορφή ενέργειας. Γενικά, το βιοαέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή θερμότητας μέσω άμεσης καύσης, παραγωγή ηλεκτρισμού από κυψέλες καυσίμου ή μικροστροβίλους, συνδυασμένη παραγωγή ηλεκτρισμού και θερμότητας (ΣΗΘ) ή ως καύσιμο οχημάτων (Σχήμα 12).



Σχήμα 12. Σύνοψη των χρήσεων του βιοαερίου [3].

Εάν συμπιεστεί μπορεί να αντικαταστήσει το συμπιεσμένο φυσικό αέριο που χρησιμοποιείται και στα αυτοκίνητα, όπου μπορεί να προμηθεύσει μια μηχανή εσωτερικής καύσης και είναι πολύ πιο αποτελεσματικό στον εκτοπισμό του διοξειδίου του άνθρακα. Το μεθάνιο που βρίσκεται μέσα στο βιοαέριο μπορεί να συμπυκνωθεί στα ίδια επίπεδα με το φυσικό αέριο (το οποίο πρέπει να περάσει από διαδικασία καθαρισμού), και να μετατραπεί σε βιομεθάνιο. Εάν το τοπικό δίκτυο το επιτρέπει, ο παραγωγός του βιοαερίου μπορεί να το διανείμει μέσω του δικτύου στους καταναλωτές. Το αέριο πρέπει να είναι πολύ καθαρό πριν εισέλθει στους σωλήνες, και πρέπει να έχει την κατάλληλη σύσταση για να μπορεί να μπει στο δίκτυο διανομής. Το διοξείδιο του άνθρακα, το νερό, το υδρόθειο και τα σωματίδια πρέπει να απομακρυνθούν εάν είναι παρόντα. Εάν το βιοαέριο είναι συγκεντρωμένο και συμπιεσμένο τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε οχήματα για μετακινήσεις. Το συμπιεσμένο βιοαέριο χρησιμοποιείται ευρέως στη Σουηδία, την Ελβετία και τη Γερμανία. Ένα τρένο που κινείται με βιοαέριο βρίσκεται σε λειτουργία στην Σουηδία από το 2005 (Svensk Biogas AB) [95].

4.6 Ιδιότητες Βιοαερίου

Το ενεργειακό περιεχόμενο του βιοαερίου από την Α.Χ. είναι χημικά δεσμευμένο στο μεθάνιο. Οι ιδιότητες και η σύσταση του βιοαερίου ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο και τη δομή της πρώτης ύλης, το σύστημα της μονάδας, τη θερμοκρασία, τον χρόνο παραμονής και άλλους παράγοντες.

4.6.1 Σύσταση Βιοαερίου

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται κάποιες από τις μέσες τιμές σύστασης του βιοαερίου με βάση την βιβλιογραφία. Θεωρώντας ότι το βιοαέριο περιέχει 50% μεθάνιο, η μέση θερμαντική τιμή του είναι περίπου 21 MJ/Nm³, η μέση πυκνότητα 1,22 kg/Nm³ και η μάζα του είναι παρόμοια με αυτή του αέρα (1,29 kg/Nm³). Η σύσταση του βιοαερίου ποικίλλει ανάλογα με τη διαδικασία της αναερόβιας χώνευσης. Το βιοαέριο από ΧΥΤΑ έχει συνήθως συγκέντρωση μεθανίου περίπου 50%. Προηγμένες τεχνολογίες επεξεργασίας αποβλήτων μπορούν να πετύχουν συγκεντρώσεις μεθανίου έως και

75%. Όταν παράγεται το βιοαέριο περιέχει επίσης υδρατμούς, ο όγκος των οποίων είναι ανάλογος της θερμοκρασίας του χωνευτή.

Πίνακας 3. Τυπική σύσταση του βιοαερίου.

Συστατικό	Χημικός τύπος	Περιεκτικότητα κατ'όγκο-%
Μεθάνιο	CH ₄	50-75
Διοξείδιο του άνθρακα	CO ₂	25-45
Υδρατμοί	H ₂ O	2 (20 ⁰ C) - 7 (40 ⁰ C)
Οξυγόνο	O ₂	<2
Άζωτο	N ₂	<2
Αμμωνία	NH ₃	<1
Υδρογόνο	H ₂	<1
Υδρόθειο	H ₂ S	<1

Ο απλούστερος τρόπος χρήσης του βιοαερίου είναι η άμεση καύση του σε λέβητες ή καυστήρες, που χρησιμοποιούνται κατά κόρον, για το βιοαέριο που παράγεται από μικρούς οικογενειακούς χωνευτές. Η άμεση καύση εφαρμόζεται σε αρκετές χώρες, σε καυστήρες φυσικού αερίου. Το βιοαέριο μπορεί να καεί για την παραγωγή θερμότητας είτε επί τόπου, είτε να μεταφερθεί με σωληνώσεις στους τελικούς χρήστες. Για τις εφαρμογές θέρμανσης το βιοαέριο δεν χρειάζεται καμία αναβάθμιση, ενώ το επίπεδο μόλυνσής του δεν περιορίζει τη χρήση του αερίου τόσο όσο στην περίπτωση άλλων εφαρμογών. Ωστόσο, το βιοαέριο πρέπει να υποβληθεί σε συμπύκνωση και αφαίρεση των σωματιδίων, συμπίεση, ψύξη και ξήρανση [3].

4.6.2 Ειδική Απόδοση Βιοαερίου

Η απόλυτη παραγωγή αερίου, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από μόνη της για να αξιολογηθεί εάν η διαδικασία λειτουργεί σωστά, εάν η πραγματική παραγωγή αερίου δεν συσχετιστεί με την αναμενόμενη παραγωγή, π.χ. η παραγωγή βιοαερίου πρέπει να

συνδεθεί με το δυναμικό παραγωγής βιοαερίου της συγκεκριμένης πρώτης ύλης που χρησιμοποιήθηκε.

Το δυναμικό παραγωγής βιοαερίου μπορεί να το συναντήσει κανείς στη βιβλιογραφία με διάφορους τρόπους. Οι πιο συνήθεις είναι:

- mL βιοαερίου / g COD που προστέθηκε
- mL βιοαερίου / g VS που προστέθηκε

όπου COD αναφέρεται στην «χημική ζήτηση οξυγόνου» και VS στα «πτητικά στερεά».

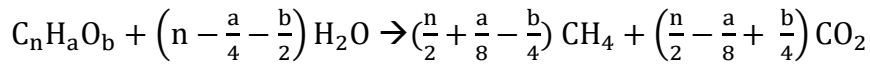
Συνδυάζοντας μετρήσεις πτητικών στερεών και έχοντας γνώση του δυναμικού παραγωγής βιοαερίου της πρώτης ύλης, μπορεί να γίνει μια εκτίμηση της παραγωγής βιοαερίου και να χρησιμοποιηθεί ως κλίμακα της πραγματικής παραγωγής. Το δυναμικό παραγωγής μεθανίου κάποιου υποστρώματος είναι η συνολική παραγωγή μετά από πολύ μεγάλο χρόνο παραγωγής όπου όλο το οργανικό υλικό έχει καταναλωθεί και έχει μετατραπεί σε βιοαέριο. Για συνήθεις χρόνους παραμονής (π.χ. 15 μέρες σε θεμόφιλη χώνευση) επιτυγχάνεται περίπου 85-90% του δυναμικού παραγωγής βιοαερίου.

Το θεωρητικό δυναμικό παραγωγής βιοαερίου μπορεί να υπολογιστεί εάν είναι γνωστή η χημική σύσταση του υποστρώματος. Ωστόσο, πρέπει να δοθεί προσοχή στο γεγονός ότι πολλά υποστρώματα δεν είναι πλήρως βιοδιασπάσιμα, και αυτό μπορεί να προκαλέσει υπερεκτίμηση του θεωρητικού δυναμικού.

4.6.3 Θεωρητικό Δυναμικό Βιοαερίου

Όταν οργανικό υλικό διασπάται αναερόβια, το τελικό αποτέλεσμα είναι άνθρακας στην πιο οξειδωμένη του μορφή (CO_2) και στην πιο ανοιγμένη του μορφή (CH_4), π.χ. γίνεται μεταφορά ενός ηλεκτρονίου μεταξύ των ατόμων άνθρακα. Ο λόγος μεταξύ μεθανίου και διοξειδίου του άνθρακα εξαρτάται από το βαθμό οξείδωσης του άνθρακα που βρίσκεται στο οργανικό υλικό, π.χ. όσο πιο μειωμένος ο οργανικός άνθρακας τόσο περισσότερο μεθάνιο θα παραχθεί.

Εφόσον η σύνθεση του οργανικού υλικού είναι γνωστή και όλο το υλικό μετατρέπεται σε βιοαέριο, το θεωρητικό δυναμικό βιοαερίου μπορεί να υπολογιστεί από την παρακάτω εξίσωση (Buswell):



Η εξίσωση έχει προκύψει από το ισοζύγιο άνθρακα θεωρώντας ότι όλο το οργανικό υλικό μετατράπηκε σε CH₄ και CO₂ και ότι η μόνη εξωτερική πηγή ήταν το H₂O, κάτω από αναερόβιες συνθήκες.

Η σχετική απόδοση παραγωγής μεθανίου, η οποία συνήθως εκφράζεται ως (STP) λίτρα μεθανίου ανά γραμμάριο πτητικών στερεών, μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:

$$B_{o,th} = \frac{\left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4}\right) \cdot 22.4}{12n + a + 16b} \quad \left[STP \frac{l CH_4}{gVS}\right]$$

όπου 22,4 είναι ο όγκος ενός mole αερίου σε κανονικές συνθήκες.

Εάν η εξίσωση του Buswell συνδυαστεί με το λόγο COD/VS, μια αντίστοιχη ειδική απόδοση παραγωγής μεθανίου προκύπτει βασισμένη όμως στο COD.

$$B_{o,th} = \frac{\left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4}\right) \cdot 22.4}{\left(n + \frac{a}{4} - \frac{b}{2}\right) \cdot 32} \quad \left[STP \frac{l CH_4}{gCOD}\right]$$

Ο Πίνακας 4 δείχνει τη θεωρητική ειδική απόδοση παραγωγής μεθανίου και την σύνθεση βιοαερίου από διάφορα τυπικά μόρια από υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λιπίδια (I. Angelidaki).

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά και δυναμικό βιοαερίου για διάφορα οργανικά υλικά κατάλληλα προς αναερόβια χώνευση.

Είδος υποστρώματος	Χημική Σύσταση	COD/VS (gCOD/gVS)	CH ₄ (STP L/gVS)	CH ₄ (STP L/gCOD)	CH ₄ (%)
Υδατάνθρακες	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	1,19	0,415	0,35	50
Πρωτεΐνες*	C ₅ H ₇ NO ₂	1,42	0,496	0,35	50
Λιπίδια	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	2,90	1,014	0,35	70
Αιθανόλη	C ₂ H ₆ O	2,09	0,730	0,35	75
Οξικό οξύ	C ₂ H ₄ O ₂	1,07	0,373	0,35	50
Προπιονικό οξύ	C ₃ H ₆ O ₂	1,51	0,530	0,35	58

*Το άζωτο μετατρέπεται σε NH₃.

4.7 Προσδιορισμός Μεθανογόνου Δυναμικού - BMP

Καθώς η αναερόβια χώνευση οργανικού υλικού γίνεται όλο και περισσότερο μια βιώσιμη προσέγγιση για τη διαχείριση των αποβλήτων και την παραγωγή ενέργειας, η ζήτηση και η ανάγκη να βρεθεί η κατάλληλη πρώτη ύλη είναι συνεχώς αυξανόμενη. Μια μέθοδος για να διερευνηθεί και να καθοριστεί η ικανότητα ενός υλικού να χρησιμεύσει ως υπόστρωμα για αναερόβια χώνευση είναι ο προσδιορισμός του μεθανογόνου δυναμικού (Biochemical Methane Potential – BMP). Αυτή η δοκιμή παρέχει πληροφορίες σχετικά με το πόσο πολύ και πόσο γρήγορα μπορεί το υλικό να αποικοδομηθεί υπό βέλτιστες συνθήκες διαλείποντος έργου, οι οποίες είναι πολύτιμες παράμετροι για το σχεδιασμό και τη λειτουργία μιας μονάδας παραγωγής βιοαερίου [60]. Είναι επίσης ένα καλό εργαλείο για την αναγνώριση και την ανάπτυξη νέων δεικτών για την αξιολόγηση πιθανών πηγών πρώτων υλών [7], [72].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Χημικά Αντιδραστήρια

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν προϊόντα της εταιρείας Sigma Aldrich ApS (Brøndby, Denmark) και τα αέρια της AGA A/S (Copenhagen, Denmark). Τα ένζυμα αγοράστηκαν από την Novozymes A/S (Denmark).

5.2 Όργανα

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- Κοπτικός μύλος Retsch SM 2000
- Δίσκος άλεσης Siebtechnik Screening disc mill TS 250.
- Φυγόκεντρος Haraeus MULTIfuge X3R
- Αυτόκλειστο Vapour-Line, VWR
- Στοιχειακός αναλυτής vario MACRO cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany).
- Φασματοόμετρο ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα Vista-MPX ICP-OES (Agilent, USA)
- Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης HPLC (Agilent) με στήλη Bio-Rad Aminex HPX - 87H (300 mm x 7.8 mm)
- Αέριος χρωματογράφος Shimadzu GC-8A (Tokyo, Japan)

5.3 Προετοιμασία Υποστρώματος

Τα δείγματα μακροφύκους *Laminaria digitata* περισυλλέχθηκαν στις αρχές του Αυγούστου 2012 στο Hamborg Strand, βόρεια του Hanstholm στη βόρεια δανέζικη ακτογραμμή. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία. Όλο το υλικό υπέστη ξήρανση μέχρι το ποσοστό υγρασίας του να είναι μικρότερο από 10%. Επίσης, μειώθηκε το μέγεθος των κόκκων του ξηρού υλικού σε μικρότερο από 2 mm με τη χρήση κοπτικού μύλου Retsch SM 2000. Για όλες τις αναλύσεις το υλικό αλέσθηκε σε σκόνη με χρήση δίσκου Siebtechnik Screening disc mill TS 250.



Εικόνα 3. Κοπτικός μύλος Retsch SM 2000

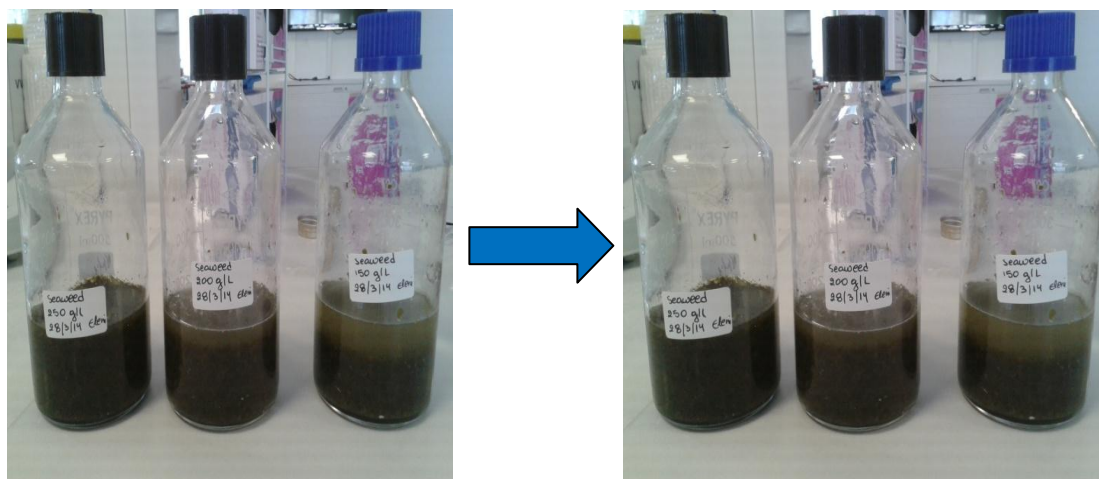


Εικόνα 4. Αρχικό ξηρό υλικό *L. digitata*

5.4 Ενζυμική Υδρόλυση Υποστρώματος

Τα μακροφύκη αναμίχθηκαν με απιονισμένο νερό με στόχο τη δημιουργία διαλυμάτων τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων: 150 g/L, 200 g/L και 250 g/L, με συνολικό όγκο 200 mL το καθένα, ώστε να βρεθεί η συγκέντρωση με τη μεγαλύτερη απόδοση για να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια. Για την υδρόλυση χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά σκευάσματα ενζύμων: Celluclast (κυτταρινάση), Novozyme 188 (β-γλυκοζιδάση) για την υδρόλυση της λαμιναρίνης και αλγινική λυάση (alginate lyase) για την υδρόλυση των αλγινικών οξέων. Οι συγκεντρώσεις των ενζύμων ήταν

Celluclast: $40 \text{ U} \cdot (\text{gdm})^{-1}$ (Units/grams of dry matter – Units/ γραμμάρια ξηρού υλικού), Novozyme 188: $40 \text{ U} \cdot (\text{gdm})^{-1}$ και αλγινική λύση: $10 \text{ U} \cdot (\text{gdm})^{-1}$. Ακολούθησε αποστείρωση των διαλυμάτων στους 121°C για 20 λεπτά. Η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε επωαστήρα ανάδευσης (50°C , 150rpm) για 48 ώρες Έγιναν δειγματοληψίες για ανάλυση ολικών σακχάρων σε χρόνο μηδέν (πριν την εισαγωγή των ενζύμων), στις 24 και στις 48 ώρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρατίθενται στο κεφάλαιο 6 επιλέχθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση (250 g/L) *L. digitata* για τα επόμενα πειράματα.



Εικόνα 5. Διαλύματα *L. digitata* διαφορετικών συγκεντρώσεων πριν από την ενζυμική υδρόλυση και μετά το πέρας της (μετά από 48h).

Με τον ίδιο τρόπο, λοιπόν, πραγματοποιείται ενζυμική υδρόλυση σε διάλυμα *L. digitata* με συγκέντρωση 250 g/L . Μετά την ενζυμική υδρόλυση το υγρό τοποθετήθηκε σε σωλήνες Falcon και ακολούθησε φυγοκέντριση (10000 rpm) για 20 λεπτά σε φυγόκεντρο Heraeus MULTIfuge X3R. Το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Ακολούθησε ξέπλυμα του στερεού υπολείμματος με νερό και φυγοκέντριση τρεις φορές, ώστε να απομακρυνθεί το υγρό της υδρόλυσης που ενδεχομένως να είχε παραμείνει στο στερεό υπόλειμμα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ξήρανση του υπολείμματος στους 105°C για μία μέρα και άλεση του υλικού για να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω ανάλυση.



Εικόνα 6. Φυγόκεντρος Haeraeus MULTIfuge X3R για το διαχωρισμό του υγρού υδρόλυσης

5.5 Καλλιέργεια Μικροοργανισμών

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος βακτηρίου *Actinobacillus succinogenes* 130Z από την DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

Παρασκευάστηκε θρεπτικό μέσο που αποτελείται από: γλυκόζη (10 g/L), εκχύλισμα ζύμης (5 g/L), NaHCO_3 (10 g/L), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (9,6 g/L) και $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (20,3 g/L). Το μέσο αποστειρώθηκε στους 121°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, καλλιεργήθηκε το βακτήριο *Actinobacillus succinogenes* 130Z στους 37°C, με ανάδευση 150 rpm σε σφραγισμένα μπουκάλια (αναερόβια) των 50 mL, τα οποία περιείχαν 30 mL μέσου ανάπτυξης και εμβολιάστηκαν με 1 mL από το απόθεμα καλλιέργειας (γλυκερόλη, -80°C).

5.6 Ζύμωση του Υγρού Υδρόλυσης του *Laminaria digitata*

5.6.1 Ζύμωση σε Φιάλες

Για την αναερόβια ζύμωση των μακροφυκών σε φιάλες, εμβολιάστηκαν κύτταρα καλλιέργειας βακτηρίων (3 mL) σε αποστειρωμένες και σφραγισμένες φιάλες των

200 mL (τριπλέτες), με 87 mL θρεπτικού μέσου που περιείχε τα ακόλουθα: εκχύλισμα ζύμης (10 g/L), K_2HPO_4 (3 g/L), $MgCl_2$ (0,2 g/L), $CaCl_2$ (0,2 g/L), NaCl (1 g/L) και $MgCO_3$ (30 g/L). Αποστειρωμένο δείγμα (20 mL) από το υγρό της ενζυμικής υδρόλυσης και 0,25 mL H_3PO_4 προστέθηκαν στις φιάλες, στις οποίες διοχετεύθηκε αέριο άζωτο (N_2) για να δημιουργηθούν αναερόβιες συνθήκες. Στη συνέχεια, οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους 37°C με ανάδευση 200 rpm για 48 ώρες και πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σε διάφορες χρονικές στιγμές για προσδιορισμό σακχάρων.

5.6.2 Ζύμωση σε Αντιδραστήρες Διαλείποντος Έργου

Πραγματοποιήθηκε ζύμωση του υγρού υδρόλυσης σε δύο πανομοιότυπους αντιδραστήρες 3 L (Sartorius BIOSTAT Aplus, Germany) με αρχικό όγκο διαλύματος 1,5 L. Παρασκευάστηκε θρεπτικό μέσο που περιείχε τα ακόλουθα: εκχύλισμα ζύμης (16,7 g/L), K_2HPO_4 (5 g/L), $MgCl_2$ (0,3 g/L), $CaCl_2$ (0,3 g/L), NaCl (1,7 g/L), $MgCO_3$ (67,5 g/L). Το μέσο αποστειρώθηκε στους 121°C για 20 λεπτά πριν την ανάμειξη. Στη συνέχεια, αναμείχθηκε το αποστειρωμένο υγρό της ενζυμικής υδρόλυσης με το θρεπτικό μέσο σε αναλογία 1:1,5. Οι αντιδραστήρες εμβολιάστηκαν με 5% v/v εμβόλιο καλλιέργειας *Actinobacillus succinogenes*. Πριν την έναρξη της ζύμωσης, ρυθμίστηκε το pH στο 6,8 με χρήση φωσφορικού οξέος 50% και προστέθηκαν 0,05mL αποστειρωμένου Antifoam 204 (Sigma Aldrich) για την αποφυγή αφρισμού. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε στους 37°C, 200 rpm για 48 ώρες. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης γινόταν αυτόματη προσθήκη διαλύματος NaOH (8M) για να διατηρηθεί η τιμή του pH και χρησιμοποιήθηκε παροχή N_2 στους αντιδραστήρες για τη διατήρηση αναερόβιων συνθηκών. Επίσης, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σε διάφορες χρονικές στιγμές για προσδιορισμό σακχάρων και άλλων συστατικών. Μετά το τέλος της ζύμωσης το υγρό συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους 4°C.



Εικόνα 7. Ο ένας από τους δύο αντιδραστήρες διαλείποντος έργου 3L που χρησιμοποιήθηκαν για τη ζύμωση.

5.7 Προσδιορισμός Μεθανογόνου Δυναμικού – BMP

Το μεθανογόνο δυναμικό υπολογίστηκε σύμφωνα με την μέθοδο Angelidaki et al. (2009) σε γυάλινα δοχεία των 320 mL (αντιδραστήρες διαλείποντος έργου) με 100 mL όγκο υγρού. Το εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε (80 mL σε κάθε δοχείο) ήταν θερμοφιλή ($53 \pm 1^{\circ}\text{C}$) καλλιέργεια μεθανογενών βακτηρίων, που προέρχεται από την κεντρική μονάδα βιοαερίου της Snerlinge στη Δανία. Τα βασικά χαρακτηριστικά του εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές BMP φαίνεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά του μεθανογενούς εμβολίου.

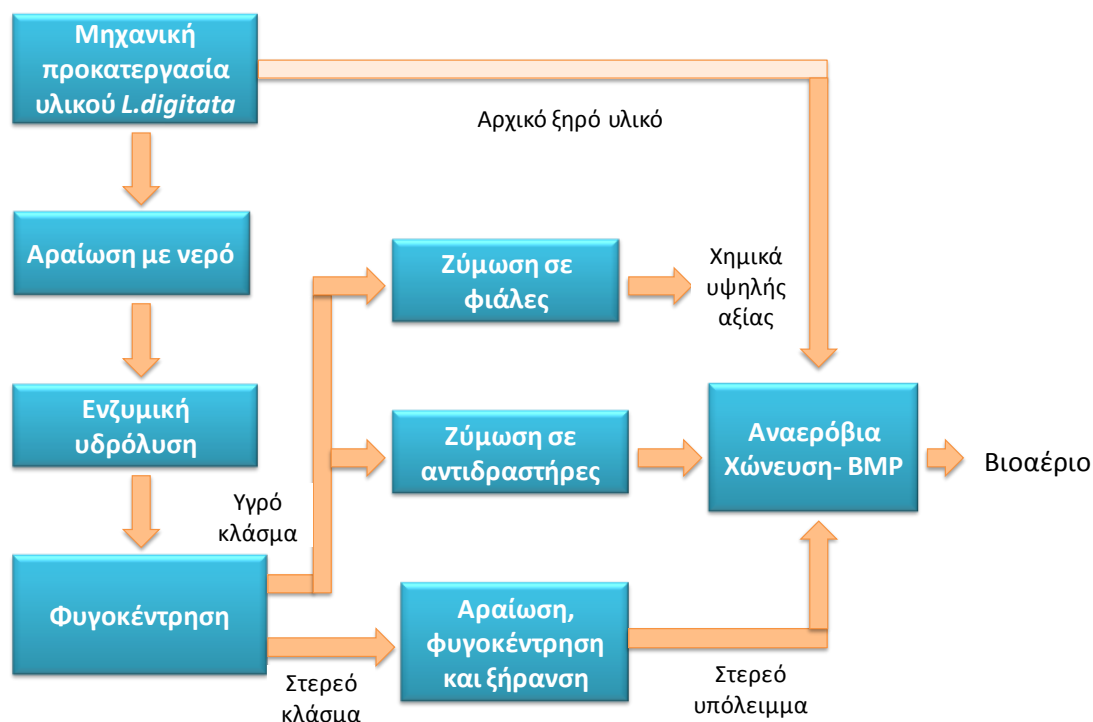
Παράμετρος	Τιμή
Ολικά στερεά (TS) (% w/w)	$2,06 \pm 0,10$
Πτητικά Στερεά (VS) (% w/w)	$1,27 \pm 0,09$
pH	7,86
Πτητικά Λιπαρά Οξέα (VFA) (g HAc L^{-1})	$1,03 \pm 0,08$
Ολικό Άζωτο (Kjeldahl Nitrogen) (g N L^{-1})	$2,98 \pm 0,12$
Ολική Αμμωνία ($\text{g NH}_4^+ \text{-N L}^{-1}$)	$2,16 \pm 0,06$

Οι δοκιμές έγιναν για τρία διαφορετικά κλάσματα βιομάζας *Laminaria digitata*, το αρχικό ξηρό υλικό, το στερεό υπόλειμμα της υδρόλυσης και το υγρό που προέκυψε μετά τη ζύμωση στους αντιδραστήρες. Επίσης, για κάθε υπόστρωμα οι δοκιμές έγιναν για δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (50 και 20 g/L) σε ξεχωριστές φιάλες και με προσθήκη νερού μέχρι τον τελικό όγκο των 100 mL. Χρησιμοποιήθηκε επίσης κυτταρίνη Avicel PH-101 (Sigma Aldrich) (2 g/L) για να επιβεβαιώσει την ακρίβεια της διαδικασίας προσδιορισμού του παραγόμενου μεθανίου. Επιπλέον συμπεριλήφθηκαν στις μετρήσεις και φιάλες που περιείχαν μόνο εμβόλιο και νερό (blanks) για να προσδιοριστεί η απομένουσα παραγωγή μεθανίου από το εμβόλιο. Τέλος, στις φιάλες διαβιβάστηκε μίγμα αερίου N₂/CO₂ (80%/20%), προστέθηκαν ελαστικά πώματα και καπάκια αλουμινίου και επώστηκαν για τουλάχιστον 30 ημέρες. Όλα τα πειράματα BMP διεξήχθησαν σε τριπλέτες.



Εικόνα 8. Δείγματα φιάλων για τον προσδιορισμό του μεθανογόνου δυναμικού. Από αριστερά προς τα δεξιά: Blank, Control (Avicel), αρχική ξηρή ύλη συγκέντρωσης 100%, 50% και 20%.

Στο Σχήμα 13 παρουσιάζεται συνοπτικά η πειραματική διαδικασία.



Σχήμα 13. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας.

5.8 Προσδιορισμός Σακχάρων

Το ξηρό αρχικό υλικό *L. digitata* και το στερεό υπόλειμμα της υδρόλυσης υπέστησαν προκατεργασία με οξύ για τον προσδιορισμό σακχάρων με υγρή χρωματογραφία. Συγκεκριμένα δείγματα 150 mg υλικού αναμείχθηκαν με 1,5 mL H₂SO₄ 72% και τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα ανάδευσης (37°C, 150rpm) για 60 λεπτά. Στη συνέχεια, το διάλυμα αραιώθηκε με 42 mL H₂O και αποστειρώθηκε στους 121°C για 60 λεπτά. Η διαδικασία έγινε για τριπλέτες του κάθε δείγματος. Ο προσδιορισμός σακχάρων έγινε με χρήση υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας (HPLC).

5.9 Στοιχειακή Ανάλυση και Προσδιορισμός Αμινοξέων.

Για τον προσδιορισμό των στοιχείων C, H, N και S του μακροφύκου *L. Digitata* (αρχικό ξηρό υλικό και στερεό υπόλειμμα υδρόλυσης) χρησιμοποιήθηκε στοιχειακός αναλυτής vario MACRO cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany). Το προφίλ των αμινοξέων προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Timm-Heinrich et al. (2013).



Εικόνα 9. Στοιχειακός αναλυτής vario MACRO cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany)

5.10 Ανάλυση Μετάλλων

Για τον προσδιορισμό των μετάλλων, δείγματα 260 mg του μακροφύκου *L. Digitata* (αρχικό ξηρό υλικό και στερεό υπόλειμμα υδρόλυσης) υπέστησαν υγρή χώνευση με HNO_3 και HCl σε κλειστά δοχεία. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις 24 μετάλλων (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, Sr, V, Zn) με χρήση φασματομέτρου ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα Vista-MPX ICP-OES (Agilent, USA).

5.11 Ανάλυση Λιπιδίων

Η ανάλυση λιπιδίων και λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε στο Department of Food (DTU) σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Bligh και Dyer (1959) [14].

5.12 Μέτρηση Ολικών (TS) και Πτητικών Στερεών (VS)

Τα ολικά και πτητικά στερεά των τριών κλασμάτων βιομάζας *Laminaria digitata*, (αρχικό ξηρό υλικό, στερεό υπόλειμμα υδρόλυσης και υγρό που προέκυψε μετά τη ζύμωση στους αντιδραστήρες) προσδιορίστηκαν μέσω της μεθόδου που περιγράφεται από τους Eugene W. Rice et al. (2012) [65].

5.13 Ποιοτική και Ποσοτική Ανάλυση Προϊόντων Ζύμωσης

Το υγρό μετά το πέρας της ζύμωσης αναλύθηκε με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, HPLC για τον προσδιορισμό των παρακάτω συστατικών: γλυκόζη, ηλεκτρικό οξύ, γαλακτικό οξύ, μηρμυκικό οξύ, οξικό οξύ και αιθανόλη. Η HPLC (Agilent) είχε έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (για ανίχνευση σακχάρων, VFAs και αιθανόλης) και μια στήλη Bio-Rad Aminex HPX - 87H (300 mm x 7.8 mm) με 0,04 M H₂SO₄ ως υγρό έκλουσης και με ταχύτητα ροής 0,6 mL/min, με θερμοκρασία στήλης 63,5 °C.



Εικόνα 10. Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης HPLC (Agilent) με στήλη Bio-Rad Aminex HPX - 87H (300 mm x 7.8 mm)

5.14 Προσδιορισμός Μεθανογόνου Δυναμικού

Η παραγωγή μεθανίου στα δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμές BMP, προσδιορίστηκε με χρήση αέριας χρωματογραφίας (Shimadzu GC-8A, Tokyo, Japan), όπως περιγράφεται από τους Fotidis et al. (2013) [29].



Εικόνα 11. Αέριος χρωματογράφος Shimadzu GC-8A (Tokyo, Japan)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

6.1 Χαρακτηρισμός Διαφορετικών Κλασμάτων *L. digitata*

Το αρχικό ξηρό υλικό και το στερεό υπόλειμμα της ενζυμικής υδρόλυσης αναλύθηκαν και προσδιορίστηκαν οι περιεκτικότητες τους σε ολικά σάκχαρα, πρωτεΐνες, μέταλλα και λιπίδια.

6.1.1 Ολικά Σάκχαρα

Με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας (HPLC) βρέθηκε ότι τα σάκχαρα που περιέχονταν στο αρχικό ξηρό υλικό *L. digitata* και στο στερεό υπόλειμμα της ενζυμικής υδρόλυσης ήταν η γλυκόζη και η μαννιτόλη. Προσθέτοντας τις τιμές τους προκύπτει η συγκέντρωση ολικών σακχάρων στα δείγματα και πολλαπλασιάζοντας τις τιμές επί 43,5 mL (από την προκατεργασία με οξύ) και διαιρώντας επί 150 mg (η αρχική μάζα δείγματος στην προκατεργασία με οξύ), προκύπτουν οι συγκεντρώσεις ολικών σακχάρων ανά γραμμάριο δείγματος. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Συγκέντρωση ολικών σακχάρων για το αρχικό ξηρό υλικό *L. digitata* και το στερεό υπόλειμμα της υδρόλυσης.

	Γλυκόζη (% ξ.β.)	Μαννιτόλη (% ξ.β.)	Ολικά σάκχαρα (% ξ.β.)
Αρχικό ξηρό υλικό <i>L. digitata</i>	69,6 ± 0,56	7,98 ± 0,17	77,57 ± 0,59
Στερεό υπόλειμμα υδρόλυσης	10,56 ± 0,70	3,60 ± 0,26	14,16 ± 0,75

Παρατηρείται ότι και στα δύο δείγματα η γλυκόζη εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τη μαννιτόλη (που γενικά βρίσκεται σε μικρές ποσότητες στα φυτά). Η περιεκτικότητα τόσο σε γλυκόζη, όσο και σε μαννιτόλη βρέθηκε σημαντικά μειωμένη στο στερεό υπόλειμμα της ενζυμικής υδρόλυσης από το αρχικό ξηρό υλικό πριν την υδρόλυση. Το συνολικό περιεχόμενο σε σάκχαρα στο αρχικό ξηρό υλικό είναι σχεδόν πενταπλάσιο από το στερεό υπόλειμμα της υδρόλυσης. Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς τα περισσότερα σάκχαρα βρίσκονται στο υγρό της ενζυμικής υδρόλυσης μετά τη φυγοκέντριση, κάτι που επετεύχθη και με τις συνεχείς προσθήκες νερού και τις φυγοκεντρίσεις που έγιναν στο υπόλειμμα.

6.1.2 Στοιχειακή Ανάλυση, Προσδιορισμός Αμινοξέων και Πρωτεϊνών

Τα αποτελέσματα προσδιορισμού των αμινοξέων δείχνουν μεγάλη διαφορά στην περιεκτικότητα αμινοξέων στο αρχικό ξηρό υλικό *L. digitata* και στο στερεό υπόλειμμα της ενζυμικής υδρόλυσης (3,45% και 11,99% επί ξ.β. αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα για όλα τα αμινοξέα δίνονται αναλυτικά στο Παράρτημα 1.

Τα αποτελέσματα της στοιχειακής ανάλυσης (Πίνακας 7) αφορούν τις περιεκτικότητες σε άνθρακα (C), υδρογόνο (H), άζωτο (N) και θείο (S) του αρχικού υλικού *L. digitata* και του στερεού υπολείμματος υδρόλυσης. Οι μεγαλύτερες διαφορές παρατηρήθηκαν στην περιεκτικότητα σε θείο και άζωτο κατά τη σύγκριση των δύο δειγμάτων. Αυτό που ενδιαφέρει περισσότερο είναι η περιεκτικότητα σε άζωτο του στερεού υπολείμματος, η οποία ήταν έξι φορές υψηλότερη από ότι στο αρχικό υλικό *L. digitata*. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη συνήθως μπορεί να εκτιμηθεί πολλαπλασιάζοντας την περιεκτικότητα αζώτου με ένα συντελεστή 6,25. Σύμφωνα όμως με τη μελέτη των Lourenco et al. (2002), αυτός ο συντελεστής μπορεί να δώσει υπερεκτιμημένα αποτελέσματα για τα φύκη. Έτσι, διαιρώντας την συνολική περιεκτικότητα σε αμινοξέα με τη συνολική περιεκτικότητα σε άζωτο στο αρχικό υλικό, ο συντελεστής μετατροπής του αζώτου σε πρωτεΐνη υπολογίστηκε 4,81. Παρατηρείται, λοιπόν, αύξηση στην περιεκτικότητα πρωτεΐνης από 3,45 % στο αρχικό υλικό *L. digitata* σε 19,15 % στο στερεό υπόλειμμα. Το μεγαλύτερο μέρος των πρωτεϊνών του υλικού μετά την ενζυμική υδρόλυση βρίσκεται συσσωρευμένο στο

στερεό υπόλειμμα, το οποίο μπορεί λόγω αυτού να χρησιμοποιηθεί σαν συμπλήρωμα τροφών (π.χ. σε τροφές ψαριών).

Πίνακας 7. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης του αρχικού υλικού *L. digitata* και του στερεού υπολείμματος υδρόλυσης.

	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	Πρωτεΐνες [%]
Αρχικό υλικό <i>L. digitata</i>	0,72 ± 0,03	42,08 ± 0,20	7,72 ± 0,03	0,51 ± 0,08	3,45 ± 0,07
Στερεό υπόλειμμα	3,98 ± 0,02	46,21 ± 0,18	6,62 ± 0,08	1,15 ± 0,06	19,15 ± 0,05

Η απομάκρυνση των υδατανθράκων από τη βιομάζα κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης φαίνεται να έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο στερεό υπόλειμμα. Το ποσοστό 3,45 % περιεκτικότητα πρωτεϊνών στο αρχικό υλικό *L. digitata* αποτελεί την κατώτερη τιμή που έχει αναφερθεί σε άλλες μελέτες, ενώ η περιεκτικότητα 19,15 % στο στερεό υπόλειμμα είναι υψηλότερη από τις τιμές 3-15% που αναφέρονται γενικά για το καφέ είδος μακροφυκών [27], [30].

Η περιεκτικότητα σε αμινοξέα βρέθηκε 3,5 φορές μεγαλύτερη στο στερεό υπόλειμμα από το αρχικό υλικό, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αλλά ήταν χαμηλότερη κατά 37,4% από την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Αυτό ίσως οφείλεται στην απώλεια των αμινοξέων τρυπτοφάνη, κυστεΐνη και μεθειονίνη κατά τη διάρκεια της κατεργασίας με οξύ πριν τον προσδιορισμό τους και στη χρήση αυτόκλειστου δοχείου, όπου το στερεό υπόλειμμα ήταν εκτεθειμένο σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση. Η χρήση αυτόκλειστου έγινε πριν και μετά την ενζυμική υδρόλυση για να αποφευχθεί μικροβιακή μόλυνση του υποστρώματος. Οι σκληρές αυτές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, προκάλεσαν ενδεχομένως την καταστροφή κάποιων αμινοξέων μέσω των αντιδράσεων Maillard, λόγω της παρουσίας σακχάρων σε υψηλές συγκεντρώσεις [28].

6.1.3 Ανάλυση Μετάλλων

Τα δείγματα αρχικού ξηρού υλικού *Laminaria digitata* και στερεού υπολείμματος της υδρόλυσης αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας ICP-OES και προσδιορίστηκαν 24 μεταλλικά στοιχεία (ppm) (Πίνακας 8).

Τα μέταλλα που βρέθηκαν να έχουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στο αρχικό υλικό ήταν το νάτριο (Na), το κάλιο (K), το ασβέστιο (Ca), το μαγνήσιο (Mg) και το θείο (S) (Διάγραμμα 1), ακολουθούμενα από το στρόντιο (Sr), το φώσφορο (P), το σίδηρο (Fe), τον ψευδάργυρο (Zn), το αργίλιο (Al), το αρσενικό (As), το μόλυβδο (Pb), το βάριο (Ba) και το χρώμιο (Cr), ενώ άλλα στοιχεία ήταν παρόντα μόνο σε απειροελάχιστες ποσότητες (<10 ppm).

Οι συγκεντρώσεις καδμίου (Cd) και λιθίου (Li) στο αρχικό υλικό βρέθηκαν να είναι χαμηλότερες από το όριο ανίχνευσης του οργάνου. Επιπλέον, η συγκέντρωση του κοβαλτίου (Co), μολυβδαινίου (Mo), αντιμονίου (Sb) και σεληνίου (Se) παρατηρήθηκε να είναι υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης, αλλά χαμηλότερη από το όριο ποσοτικού προσδιορισμού, με αποτέλεσμα οι τιμές αυτές να παρουσιάζονται με υψηλή αβεβαιότητα.

Οι συγκεντρώσεις μετάλλων (ppm) στην παρούσα διπλωματική ήταν ως επί το πλείστον στο ίδιο εύρος με αυτές που αναφέρονται στο Adams et al. (2011) [1] σε δείγματα αρχικής ύλης *L. digitata* επίσης συλλεγμένα τον Αύγουστο. Ωστόσο, υπήρχαν μεγάλες διαφορές στις συγκεντρώσεις ορισμένων τοξικών βαρέων μετάλλων όπως το χρώμιο (Cr) και ο μόλυβδος (Pb), που ήταν περίπου 4 φορές υψηλότερες, καθώς και στο νικέλιο (Ni) που παρατηρήθηκε να είναι 28 φορές υψηλότερο από τη μελέτη των Adams et al. (2011) [1]. Τοξικά βαρέα μέταλλα έχουν βρεθεί σε φύκη και σε άλλες μελέτες και οι συγκεντρώσεις τους εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τα είδη φυκών, την τοποθεσία της συγκομιδής και την εποχή του χρόνου που αυτή πραγματοποιείται [13]. Το συνολικό περιεχόμενο αρσενικού (As) στο αρχικό υλικό, που προσδιορίστηκε στην παρούσα διπλωματική, είναι περίπου το μισό από αυτό που έχει αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτη [26], [67]. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι το συνολικό περιεχόμενο σε αρσενικό που προσδιορίζεται στα φύκη δεν είναι αντιπροσωπευτικό της παρουσίας του αρσενικού σε ανόργανες μορφές, στις οποίες είναι περισσότερο τοξικό [4]. Στο είδος μακροφύκους *L. digitata* μόνο ένα πολύ μικρό

κλάσμα του συνολικού αρσενικού είναι ανόργανο καθώς το μεγαλύτερο μέρος του είναι σε μορφή ριβοσίδιου του αρσενικού (arsenotribosides) [26], η οποία δεν θεωρείται τοξική [76].

Η ανάλυση μετάλλων στο στερεό υπόλειμμα της υδρόλυσης έδειξε ότι η συγκέντρωση των 17 από τα 24 στοιχεία που αναλύθηκαν, είχε αυξηθεί, σε σύγκριση με αυτή στο αρχικό υλικό *L. digitata* (Πίνακας 8). Οι αυξήσεις κυμαίνονταν από 1,1 έως 6 φορές, όπου μεγαλύτερη αύξηση σημειώνεται στο αργίλιο, ακολουθούμενο από το βάριο και το ασβέστιο. Η μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης ήταν 0,2 φορές και παρατηρήθηκε στην περίπτωση του αντιμονίου (Sb), ενώ άλλες μειώσεις κυμάνθηκαν από 0,6 έως 0,5. Μικρές ποσότητες καδμίου και λιθίου εντοπίστηκαν στο στερεό υπόλειμμα (0,22 και 0,29 ppm αντίστοιχα), τα οποία στο αρχικό υλικό βρέθηκαν σε ποσότητες μικρότερες από το όριο ανίχνευσης. Αυτά τα επίπεδα Cd είναι κατά πολύ χαμηλότερα από το όριο που έχει οριστεί από την ΕΕ (3,0 ppm) για τα συμπληρώματα διατροφής (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2008) [25]. Οι συγκεντρώσεις του αρσενικού και του μολύβδου που βρέθηκαν στο στερεό υπόλειμμα ήταν 0,6 και 0,5 φορές χαμηλότερες, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το αρχικό υλικό, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το συγκεκριμένο κλάσμα βιομάζας μπορεί να είναι κατάλληλο για ζωοτροφές ή για συμπληρώματα διατροφής.

Πίνακας 8. Ανάλυση μετάλλων για το αρχικό ξηρό υλικό *L. digitata* και το στερεό υπόλειμμα της υδρόλυσης.

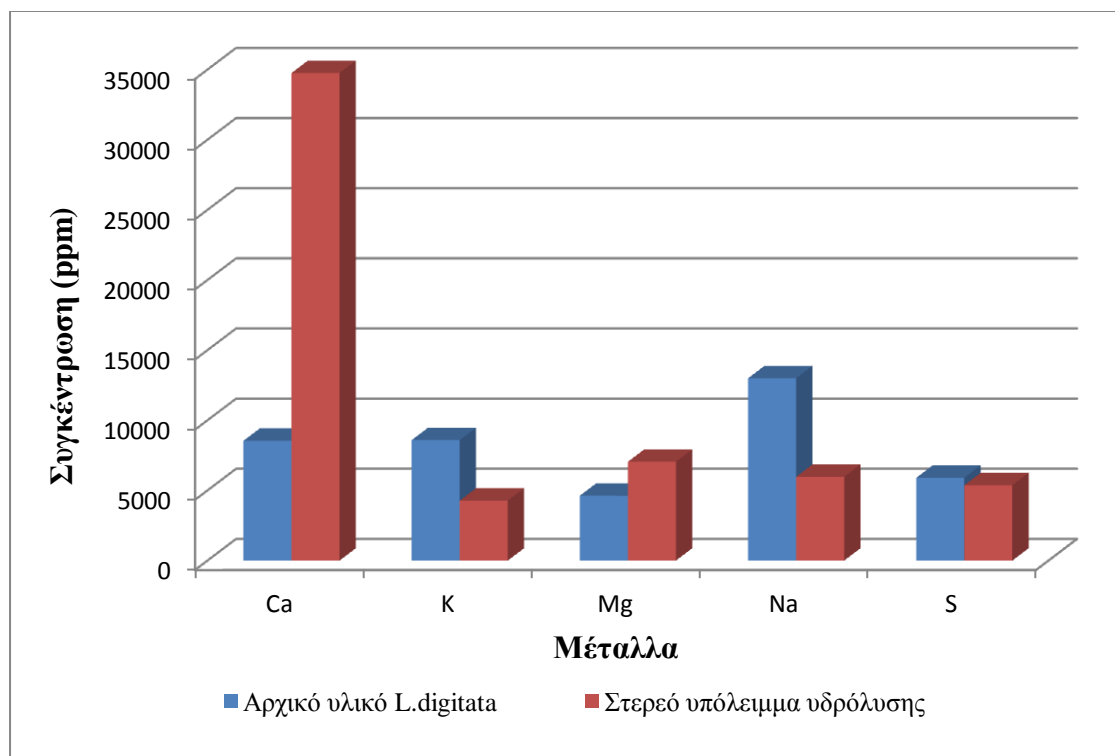
Μέταλλα	<i>Laminaria digitata</i> (ppm)	Στερεό υπόλειμμα υδρόλυσης (ppm)	Παράγοντας αύξησης/μείωσης
Al	34,22 ± 2,68	206,92 ± 15,30	6,0
As	29,91 ± 1,63	17,58 ± 0,57	0,6
Ba	11,63 ± 0,78	64,02 ± 2,19	5,5
Ca	8542,79 ± 6,26	34759,97 ± 487,83	4,1
Cd	<LOD	0,22 ± 0,00	-
Co	*0,39 ± 0,03	0,98 ± 0,01	2,5
Cr	10,60 ± 0,42	52,67 ± 2,99	5,0
Cu	4,04 ± 0,53	13,71 ± 0,43	3,4

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Μέταλλα	<i>Laminaria digitata</i> (ppm)	Στερεό υπόλειμμα υδρόλυσης (ppm)	Παράγοντας αύξησης/μείωσης
Fe	173,82 ± 0,37	600,38 ± 27,12	3,5
K	8588,88 ± 5,27	4273,58 ± 54,81	0,5
Li	<LOD	*0,29 ± 0,06	-
Mg	4626,87 ± 6,04	7047,72 ± 93,20	1,5
Mn	6,28 ± 0,43	20,25 ± 0,33	3,2
Mo	*0,42 ± 0,22	1,67 ± 0,17	4,0
Na	12997,31 ± 258,01	5970,15 ± 90,87	0,5
Ni	5,60 ± 0,05	24,76 ± 0,52	4,4
P	533,42 ± 21,64	591,28 ± 9,05	1,1
Pb	12,51 ± 0,57	5,95 ± 0,35	0,5
S	5901,59 ± 242,19	5374,50 ± 127,37	0,9
Sb	*1,85 ± 0,06	*0,46 ± 0,43	0,2
Se	*2,51 ± 1,87	<LOD	-
Sr	583,51 ± 10,06	2900,30 ± 25,55	5,0
V	0,91 ± 0,22	3,72 ± 0,14	4,1
Zn	107,29 ± 3,96	424,33 ± 6,73	4,0

* Η συγκέντρωση είναι υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης, αλλά χαμηλότερη από το όριο ποσοτικοποίησης. Έτσι, οι τιμές αυτές έχουν υψηλή αβεβαιότητα.

LOD: limit of detection (όριο ανίχνευσης)



Διάγραμμα 1. Υψηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλων στο αρχικό υλικό *L. digitata* και στο στερεό υπόλειμμα της υδρόλυσης.

6.1.4 Ανάλυση Λιπιδίων

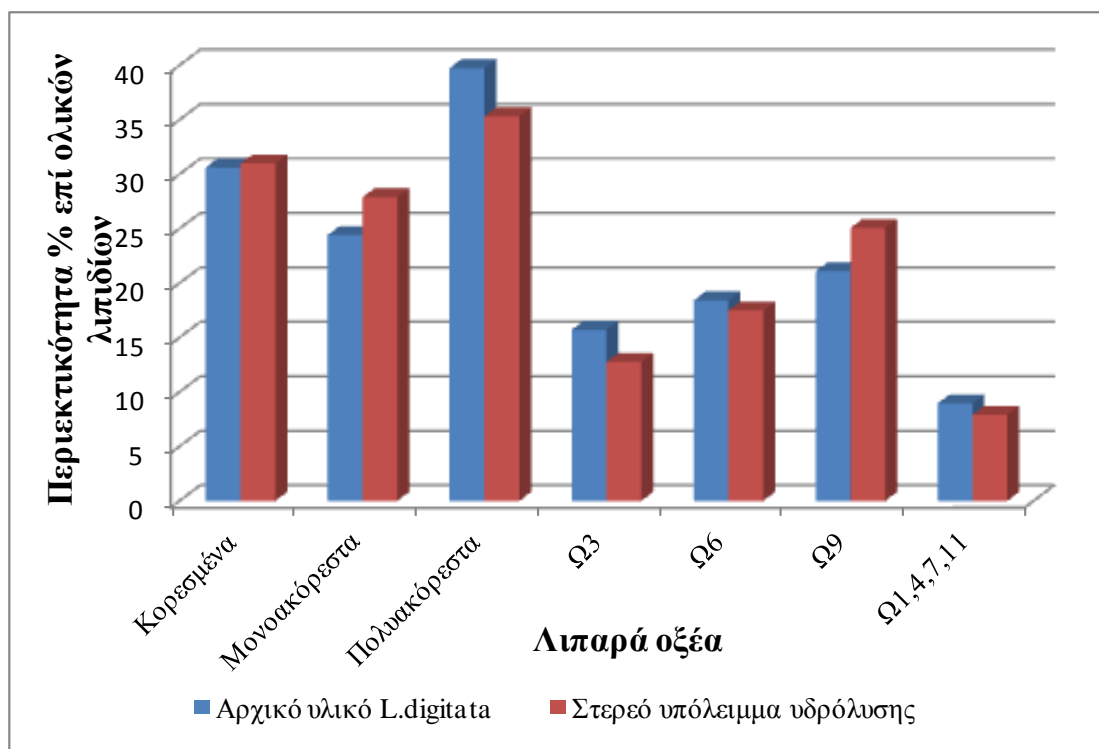
Προσδιορίστηκε το περιεχόμενο σε ολικά λιπίδια (Total Lipids - TL) και μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAME) για το αρχικό ξηρό υλικό *L. digitata* και το στερεό υπόλειμμα (Πίνακας 9). Η συνολική περιεκτικότητα λιπιδίων του αρχικού υλικού βρέθηκε να είναι 0,77% επί ξηρούς βάρους, ποσοστό που βρίσκεται μέσα στην περιοχή 0,3 έως 4,8% ξ.β. που έχει μετρηθεί για το καφέ είδος μακροφυκών [41]. Ως αποτέλεσμα της επεξεργασίας του *L. digitata*, το περιεχόμενο σε λιπίδια στο στερεό υπόλειμμα (6,61%) αυξήθηκε 8,6 φορές σε σύγκριση με το αρχικό υλικό.

Όσον αφορά στο προφίλ των λιπαρών οξέων (Διάγραμμα 2), παρατηρήθηκε ότι το περιεχόμενο (% επί των ολικών λιπιδίων) των βασικών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) (>35%) ήταν υψηλότερο σε σύγκριση με τα κορεσμένα (SFA) και τα μονοακόρεστα (MUFA) και στα δύο δείγματα. Αυτή η συσσώρευση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε φύκη έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με τη μείωση της θερμοκρασίας, καθώς και με άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Λόγω της

αύξησης της συνολικής περιεκτικότητας σε λιπίδια που παρατηρήθηκε στο στερεό υπόλειμμα και την παρουσία Ω3 και Ω6 απαραίτητων λιπαρών οξέων (>30%), το υλικό αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα τροφίμων χάρη στις ευεργετικές ιδιότητες αυτών των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, μια άλλη πιθανή χρήση του στερεού υπολείμματος θα μπορούσε να είναι ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ, εξαιτίας της παρουσίας των κορεσμένων λιπαρών οξέων (> 30%). Στο Παράρτημα 2 δίνονται αναλυτικότερα οι περιεκτικότητες σε όλα τα λιπαρά οξέα.

Πίνακας 9. Προσδιορισμός λιπιδίων και λιπαρών οξέων για το αρχικό υλικό *L. digitata* και το στερεό υπόλειμμα της υδρόλυσης.

	Αρχικό υλικό <i>L. digitata</i>	Στερεό υπόλειμμα υδρόλυσης
Ολικά λιπίδια (% επί ξ.β.)	0,77 ± 0,02	6,61 ± 0,2
Λιπαρά οξέα (% επί ολικών λιπιδίων)	Κορεσμένα	30,62 ± 0,24
	Μονοακόρεστα	24,41 ± 0,29
	Πολυακόρεστα	39,75 ± 0,10
	Ω3	15,71
	Ω6	18,40
	Ω9	21,10
	Ω1,4,7,11	8,95



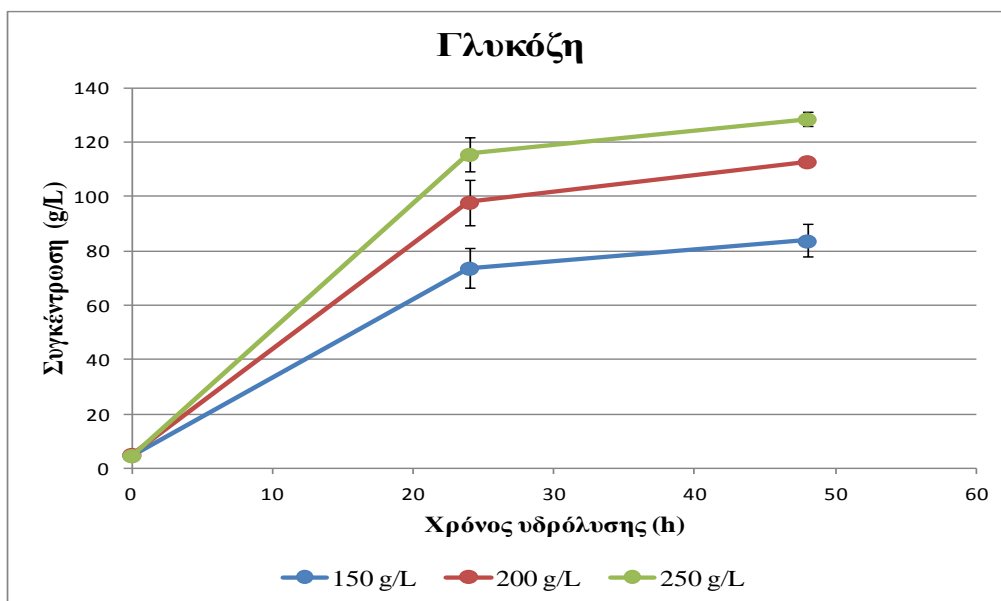
Διάγραμμα 2. Περιεκτικότητες του αρχικού υλικού *L. digitata* και του στερεού υπολείμματος υδρόλυσης σε λιπαρά οξέα.

6.2 Ενζυμική Υδρόλυση

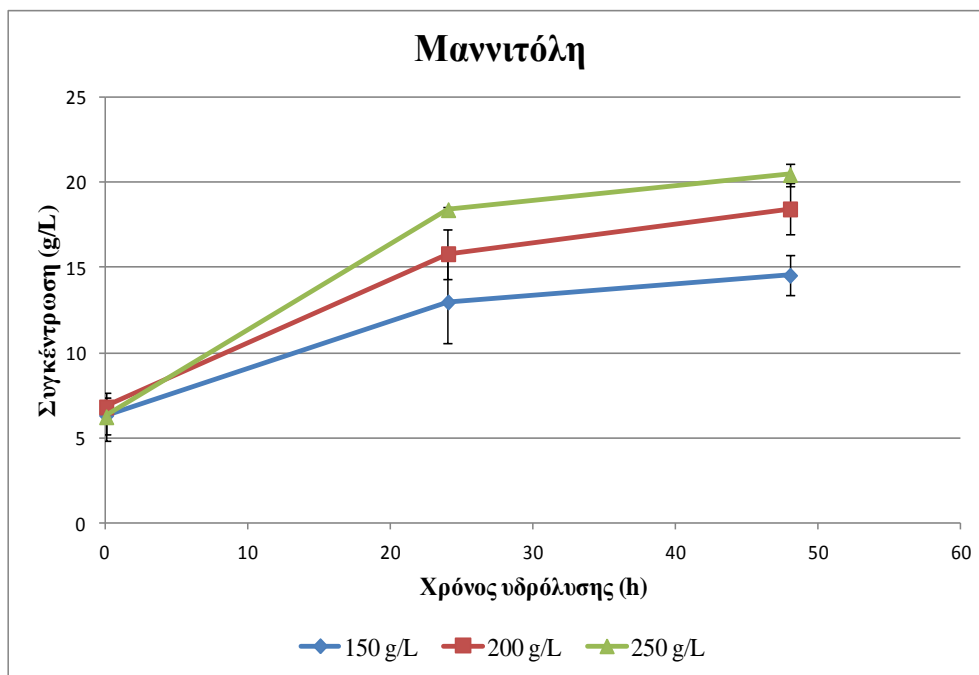
Πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση των μακροφυκών σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (150 g/L, 200 g/L και 250 g/L) ώστε να ερευνηθεί σε ποιά παρουσιάζεται μεγαλύτερη απόδοση και να χρησιμοποιηθεί στα κυρίως πειράματα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός ολικών σακχάρων με χρήση υγρής χρωματογραφίας και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 10 και στα Διαγράμματα 3 και 4. Τα ολικά σάκχαρα (γλυκόζη και μαννιτόλη) μετρήθηκαν πριν την έναρξη της ενζυμικής υδρόλυσης, 24 ώρες μετά και στο τέλος της (μετά από 48 ώρες).

Πίνακας 10. Αποτελέσματα μέτρησης σακχάρων κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος.

Συγκεντρώσεις υποστρώματος (g/L)	Χρόνος υδρόλυσης (h)	Γλυκόζη (g/L)	Μαννιτόλη (g/L)
150	0	4,90 ± 0,94	6,34 ± 1,08
	24	73,76 ± 7,25	12,99 ± 2,44
	48	83,77 ± 6,02	14,56 ± 1,18
200	0	5,24 ± 0,24	6,83 ± 0,27
	24	98,03 ± 8,31	15,82 ± 1,45
	48	112,94 ± 0,17	18,45 ± 1,47
250	0	4,78 ± 1,25	6,26 ± 1,39
	24	115,65 ± 6,24	18,40 ± 0,15
	48	128,64 ± 2,77	20,46 ± 0,66



Διάγραμμα 3. Μεταβολή συγκέντρωσης γλυκόζης κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος.



Διάγραμμα 4. Μεταβολή συγκέντρωσης μαννιτόλης κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος.

Παρατηρείται πως κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης οι συγκεντρώσεις των σακχάρων αυξάνονται, όπως είναι αναμενόμενο από τη θεωρία και οι μεγαλύτερες τιμές παρουσιάζονται για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση υποστρώματος. Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται οι τιμές των συγκεντρώσεων των σακχάρων στο αρχικό ξηρό υλικό και στο υλικό μετά το πέρας της υδρόλυσης, από τις οποίες υπολογίζεται η απόδοση της διεργασίας.

Πίνακας 11. Προσδιορισμός σακχάρων κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης υποστρωμάτων *L. digitata* διαφορετικών συγκεντρώσεων και υπολογισμός των αποδόσεων της διεργασίας.

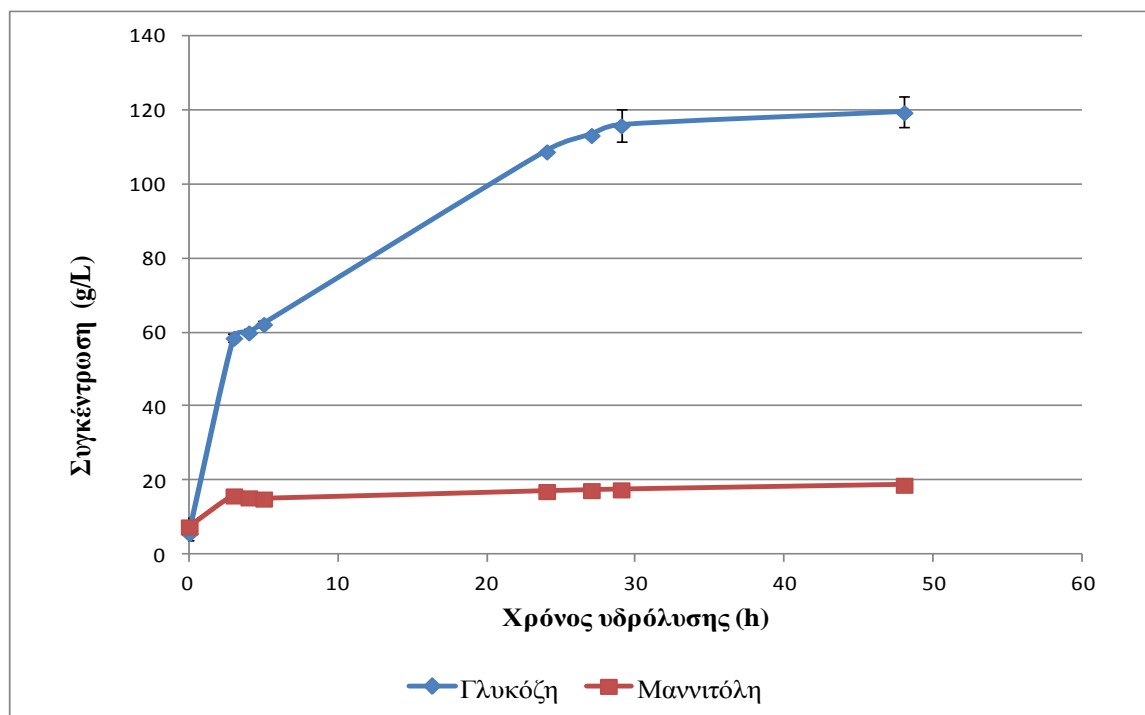
	Συγκέντρωση υποστρώματος (g/L)	Γλυκόζη (g/g ξ.β.)	Μαννιτόλη (g/g ξ.β.)	Ολικά σάκχαρα (g/g ξ.β.)	Απόδοση ενζυμικής υδρόλυσης
Αρχικό ξηρό υλικό		0,634	0,0727	0,707	
Μετά από 48h υδρόλυσης	150	0,559	0,0970	0,656	92,74 %
	200	0,565	0,0922	0,657	92,94 %
	250	0,515	0,0819	0,596	84,38 %

Η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης υπολογίζεται με βάση το συνολικό ποσοστό των σακχάρων που απελευθερώθηκαν από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη της αρχικής ύλης. Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη απόδοση εμφανίζεται για συγκέντρωση 200 g/L υποστρώματος. Παρ'όλα αυτά για τα επόμενα πειράματα επιλέχθηκε η συγκέντρωση 250 g/L γιατί η απόδοσή της είναι αρκετά ικανοποιητική (84,38 %) και όπως φαίνεται από τα Διαγράμματα 3 και 4 παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση σε ολικά σάκχαρα που είναι διαθέσιμα για τη ζύμωση που θα ακολουθήσει, ώστε να οδηγήσει και σε υψηλότερη συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος, που είναι το επιθυμητό προϊόν.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση σε νέα διαλύματα συγκέντρωσης 250 g/L υποστρώματος που παρασκευάστηκαν για να χρησιμοποιηθούν στη ζύμωση. Η μεταβολή της συγκέντρωσης των σακχάρων κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 5 και οι μετρήσεις για διάφορες χρονικές στιγμές δίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Συγκεντρώσεις σακχάρων κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης 250 g/L υποστρώματος *L. digitata*.

Χρόνος υδρόλυσης (h)	Συγκεντρώσεις σακχάρων (g/L)	
	Γλυκόζη	Μαννιτόλη
0	5,77 ± 1,82	7,58 ± 2,53
3	58,54 ± 1,11	15,94 ± 0,09
4	59,96 ± 0,98	15,42 ± 0,25
5	62,25 ± 0,83	15,10 ± 0,28
24	108,84 ± 0,38	17,13 ± 0,09
27	113,26 ± 0,50	17,38 ± 0,05
29	115,89 ± 4,48	17,58 ± 0,68
48	119,42 ± 4,14	18,83 ± 0,61



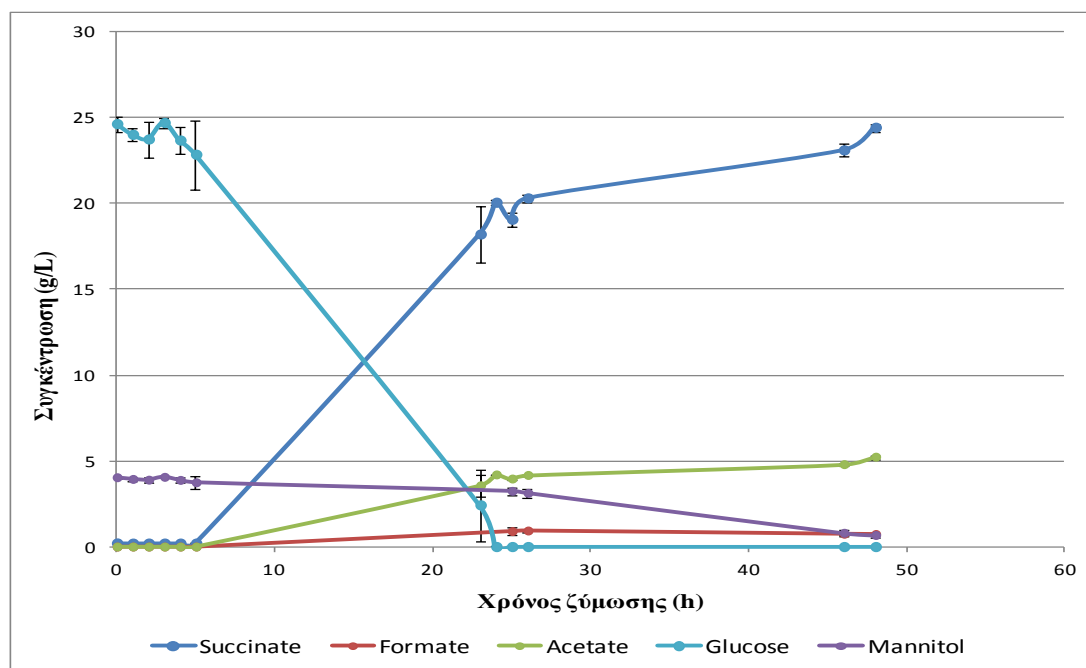
Διάγραμμα 5. Μεταβολή συγκέντρωσης σακχάρων (γλυκόζης και μαννιτόλης) κατά τη διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης υποστρώματος *L. digitata* (250 g/L).

Παρατηρείται μια αύξηση στη γλυκόζη με σταθερό ρυθμό μέχρι τις 29 h και μικρότερη μέχρι τις 48 h. Η τελική συγκέντρωση γλυκόζης στο υγρό της υδρόλυσης ήταν 119,42 g/L, η οποία αντιστοιχεί σε απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης, ως προς τη γλυκόζη, 75,32 %. Η περισσότερη ποσότητα μαννιτόλης απελευθερώθηκε μέσα στις πρώτες τρεις ώρες της ενζυμικής υδρόλυσης, καθώς είναι ήδη παρούσα στη βιομάζα των φυκών ως μονοσακχαρίτης. Η τελική συγκέντρωση της μαννιτόλης ήταν 18,83 g/L, κάτι που δείχνει πως απελευθερώθηκε σχεδόν όλη. Η ολική απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης για την απελευθέρωση των σακχάρων υπολογίστηκε ως 78,23 %.

6.3 Ζύμωση Μακροφύκου *L. digitata*

6.3.1 Ζύμωση σε Φιάλες

Πραγματοποιήθηκε ζύμωση σε φιάλες διαλείποντος έργου, του υγρού κλάσματος *L. digitata* της ενζυμικής υδρόλυσης και προσδιορισμός των προϊόντων με μέθοδο υγρής χρωματογραφίας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 6 και δίνονται αναλυτικότερα στο Παράρτημα 3.



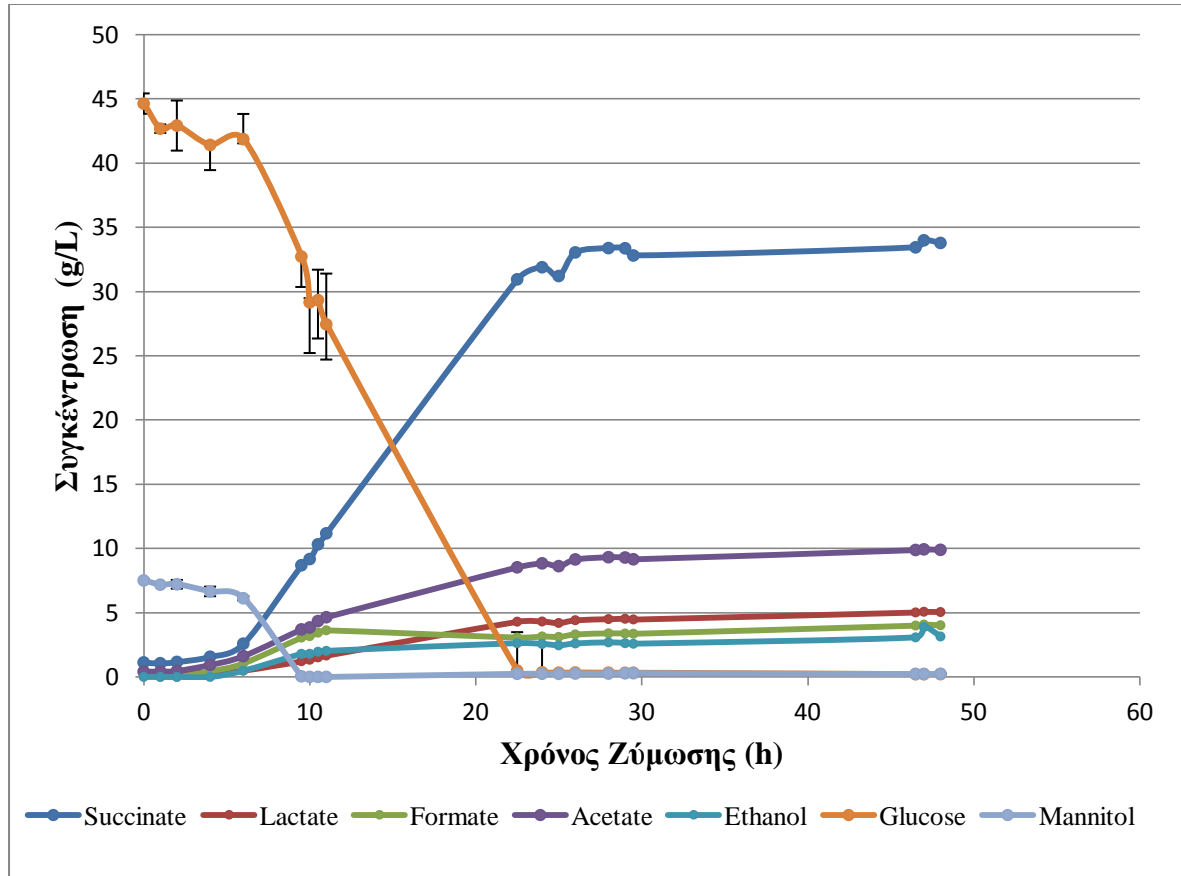
Διάγραμμα 6. Μεταβολή συγκέντρωσης συστατικών κατά τη διάρκεια ζύμωσης του υλικού *L. digitata* σε φιάλες.

Παρατηρείται ότι τα πέντε κύρια συστατικά που προσδιορίστηκαν μέσω της υγρής χρωματογραφίας είναι η γλυκόζη, η μαννιτόλη, το ηλεκτρικό οξύ (succinate), το μηρμυκικό οξύ (formate) και το οξικό οξύ (acetate). Η συγκέντρωση της γλυκόζης και της μαννιτόλης μειώνονται με το χρόνο της ζύμωσης μέχρι να μηδενιστούν, κάτι που δείχνει πως όλα τα σάκχαρα ζυμώθηκαν. Ιδιαίτερα η συγκέντρωση της γλυκόζης μηδενίζεται μετά από 24 ώρες ζύμωσης. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις των υπολοίπων συστατικών αυξάνονται με το χρόνο, κάτι αναμενόμενο καθώς αποτελούν τα προϊόντα της αντίδρασης, με κύριο και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (24,39 g/L), το ηλεκτρικό οξύ και ακολουθώντας σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις το οξικό οξύ (5,23 g/L) και το μηρμυκικό οξύ (0,42 g/L).

Καθώς το ηλεκτρικό οξύ αποτελεί το κύριο προϊόν και το επιθυμητό για την παρούσα διπλωματική, υπολογίζεται η απόδοση της ζύμωσης ως η μεταβολή στη συγκέντρωση του ηλεκτρικού οξέος από την αρχή μέχρι το τέλος της ζύμωσης, προς την αντίστοιχη μεταβολή στα ολικά σάκχαρα (γλυκόζη και μαννιτόλη). Η απόδοση υπολογίστηκε ως 86,49% και η συνολική παραγωγικότητα ήταν 0,5 g/(L·h). Έτσι, η υψηλή αυτή απόδοση της ζύμωσης οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το μακροφύκος *L. digitata* αποτελεί καλό υπόστρωμα για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος.

6.3.2 Ζύμωση σε αντιδραστήρες

Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε με το ίδιο υπόστρωμα στις ίδιες συνθήκες ανάδευσης και θερμοκρασίας με τις φιάλες, αλλά σε μεγαλύτερη κλίμακα (αντιδραστήρες διαλείποντος έργου) και τα αποτελέσματα από την ανάλυση στο υγρό ζύμωσης παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 7 και αναλυτικότερα στο Παράρτημα 3.



Διάγραμμα 7. Μεταβολή συγκέντρωσης συστατικών κατά τη διάρκεια ζύμωσης του υλικού *L. digitata* σε αντιδραστήρες.

Όπως και στη ζύμωση στις φιάλες παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης των σακχάρων με το χρόνο της ζύμωσης. Η γλυκόζη ζυμώθηκε μετά από 22,5 h ζύμωσης, ενώ η μαννιτόλη μετά από 9,5 h. Τα προϊόντα της ζύμωσης που προσδιορίστηκαν ήταν το ηλεκτρικό οξύ ως κύριο προϊόν (στη μεγαλύτερη συγκέντρωση, 33,78 g/L), ακολουθούμενο από το οξικό οξύ (9,89 g/L), το γαλακτικό οξύ (5,05 g/L), το μυρμηκικό οξύ (4,02 g/L), και την αιθανόλη (3,15 g/L) ως παραπροϊόντα. Στην περίπτωση των αντιδραστήρων, η απόδοση της ζύμωσης σε ηλεκτρικό οξύ υπολογίστηκε ως 63,18%.

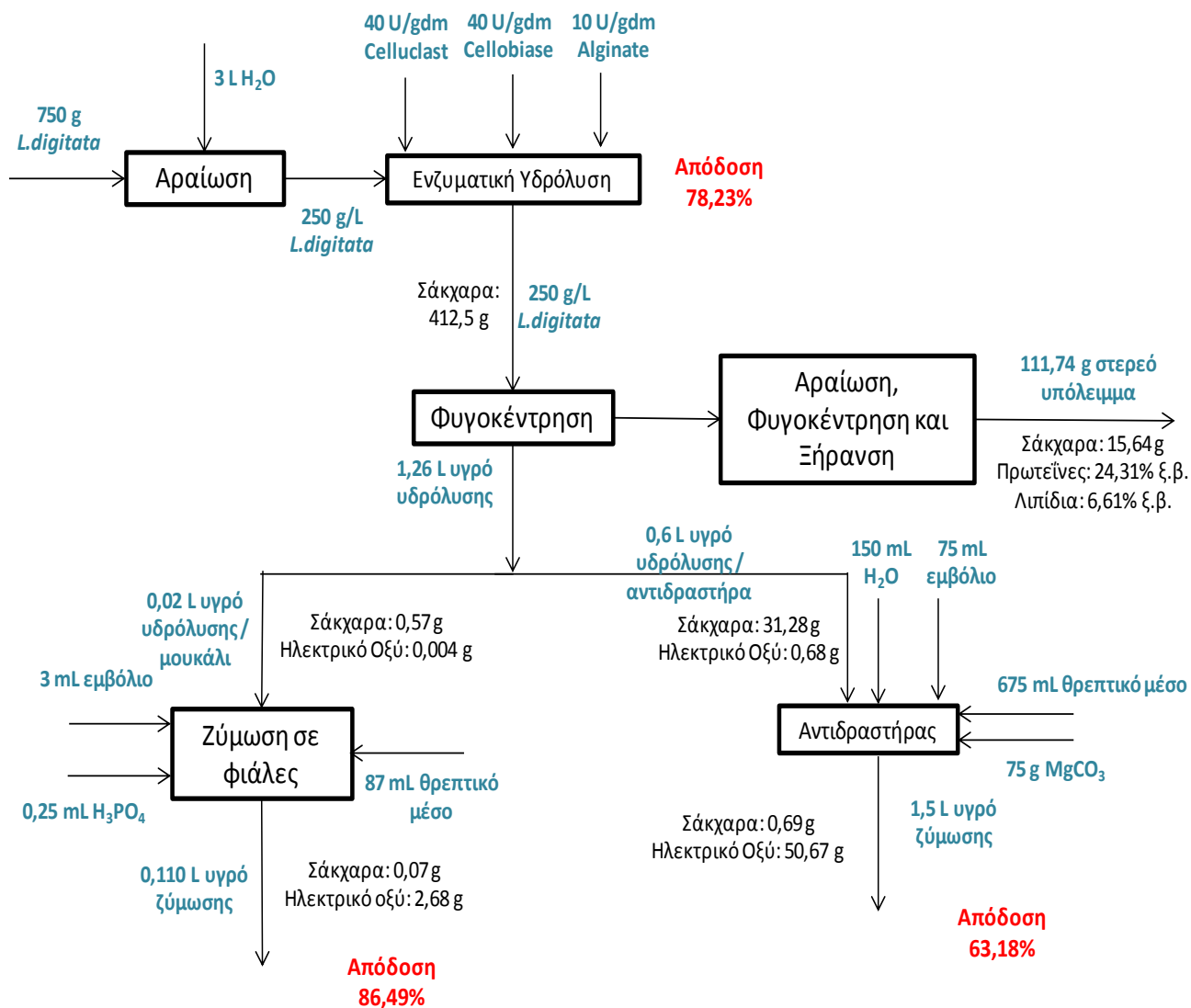
Σύγκριση αποτελεσμάτων ζύμωσης σε φιάλες και αντιδραστήρες

Η πρώτη κύρια διαφορά της ζύμωσης σε φιάλες σε σύγκριση με αυτή σε αντιδραστήρες ήταν τα προϊόντα της διεργασίας, καθώς παρατηρήθηκε πως στους αντιδραστήρες υπήρχε παραγωγή δύο ακόμα παραπροϊόντων, του γαλακτικού οξέος και της αιθανόλης, σε αντίθεση με τα μπουκάλια που η παραγωγή τους ήταν μηδαμινή. Δεν υπάρχει κάτι που να εξηγεί απόλυτα αυτό το φαινόμενο που παρατηρήθηκε, αλλά είναι πιθανό οι υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος στην αρχή της ζύμωσης να επηρέασαν την παραγωγή αυτών των παραπροϊόντων.

Η δεύτερη κύρια διαφορά που παρατηρήθηκε ήταν η απόδοση της διεργασίας: 86,5% στις φιάλες και 63,2% στους αντιδραστήρες. Καθώς η απόδοση μετρήθηκε ως το ποσοστό μετατροπής των σακχάρων σε ηλεκτρικό οξύ, αυτή η διαφορά μπορεί να αιτιολογηθεί δεδομένου ότι στους αντιδραστήρες τα παραπροϊόντα ήταν περισσότερα από ότι στις φιάλες και άρα λιγότερα σάκχαρα μετατράπηκαν σε ηλεκτρικό οξύ. Συγκεκριμένα, στις φιάλες τα παραπροϊόντα μετρήθηκαν σε συγκέντρωση 5,65 g/L, ενώ στους αντιδραστήρες σε σχεδόν τετραπλάσια (22,56 g/L). Η συσσώρευση των παραπροϊόντων της ζύμωσης έχει αναφερθεί ότι μειώνει την απόδοση της διεργασίας [51]. Έτσι είναι σαφές πως για να επιτευχθεί η ίδια απόδοση στους αντιδραστήρες με τις φιάλες, απαιτείται βελτιστοποίηση της διαδικασίας ζύμωσης.

6.4 Σύνοψη Πειραματικών Αποτελεσμάτων Ζύμωσης

Στο Σχήμα 14 παρουσιάζεται σε διάγραμμα ροής η πειραματική διαδικασία που αναλύθηκε παραπάνω και δίνονται σε αυτό τα αποτελέσματα όλων των υπολογισμών.



Σχήμα 14. Σχηματική αναπαράσταση πειραματικής διαδικασίας ζύμωσης *L. digitata*.

Από τα αποτελέσματα του Σχήματος 14, συμπεραίνεται πως με τη χρήση 750 g μακροφύκους *L. digitata*, παρήχθησαν 8,04 g ηλεκτρικό οξύ από ζύμωση σε φιάλες, 101,34 g από ζύμωση σε αντιδραστήρες, δηλαδή συνολικά 109,38 g ηλεκτρικού οξέος και 111,74 g στερεού υπολείμματος υδρόλυσης πλούσιου σε πρωτεΐνες και λιπίδια. Έτσι, σύμφωνα με τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία 1 g αρχικής ύλης μακροφύκους δίνει 0,15 g ηλεκτρικού οξέος και 0,15 g στερεού υπολείμματος. Το

υγρό της ζύμωσης αλλά και το στερεό υπόλειμμα μελετήθηκαν στη συνέχεια, ως προς το μεθανογόνο δυναμικό τους και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

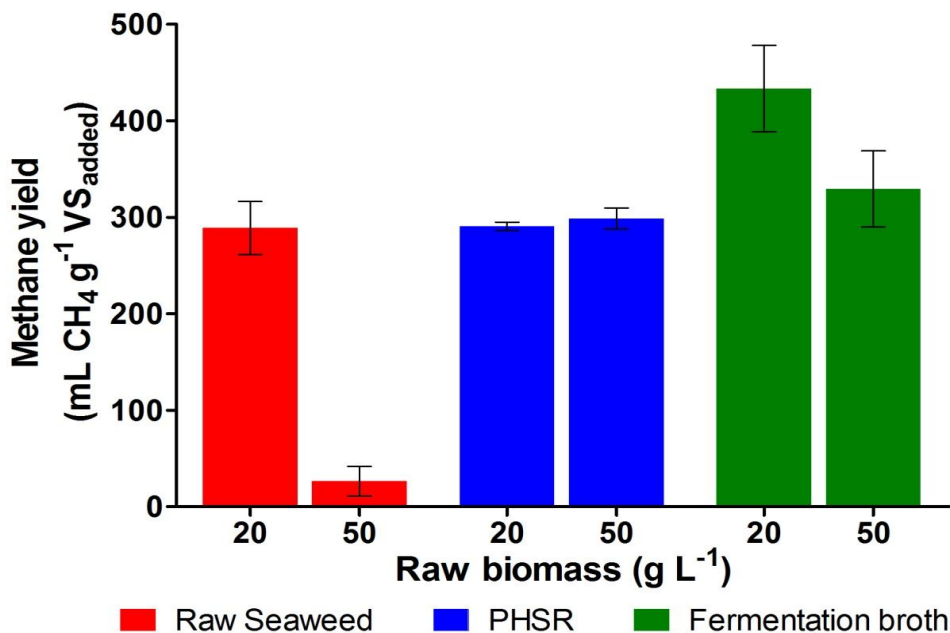
6.5 Προσδιορισμός Μεθανογόνου Δυναμικού

Ο προσδιορισμός του μεθανογόνου δυναμικού έγινε για το αρχικό ξηρό υλικό *L. digitata*, για το υγρό της ζύμωσης από τους αντιδραστήρες και το στερεό υπόλειμμα της ενζυμικής υδρόλυσης, ώστε να αξιολογηθεί η χρήση τους ως υποστρώματα για την παραγωγή βιοαερίου. Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μέτρησης ολικών και πτητικών στερεών στα τρία κλάσματα βιομάζας, που είναι απαραίτητα για την έκφραση του μεθανογόνου δυναμικού. Οι μετρήσεις των στερεών δίνονται αναλυτικότερα στο Παράρτημα 4.

Πίνακας 13. Ολικά και πτητικά στερεά αρχικού υλικού, υγρού ζύμωσης και στερεού υπολείμματος υδρόλυσης του μακροφύκου *L. digitata*.

	Αρχικό ξηρό υλικό	Υγρό ζύμωσης	Στερεό υπόλειμμα υδρόλυσης
Ολικά στερεά - TS (% ξ.β.)	91,39 ± 0,18	13,69 ± 0,37	97,65 ± 0,22
Πτητικά στερεά - VS (% ξ.β.)	84,22 ± 0,40	8,53 ± 0,37	85,65 ± 0,15

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού του μεθανογόνου δυναμικού παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8.



Διάγραμμα 8. Μεθανογόνο δυναμικό για τρία διαφορετικά κλάσματα βιομάζας *L. digitata* σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος. (Raw seaweed: αρχικό ξηρό υλικό, PHSR: στερεό υπόλειμμα υδρόλυσης, Fermentation broth: υγρό ζύμωσης).

Παρατηρείται ότι σε ό,τι αφορά τις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, το μεθανογόνο δυναμικό είναι μεγαλύτερο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση, με εξαίρεση το στερεό υπόλειμμα όπου σε συγκέντρωση υποστρώματος 20 g/L η παραγωγή μεθανίου ήταν υψηλότερη. Το υγρό της ζύμωσης παρουσίασε σημαντικά υψηλότερο μεθανογόνο δυναμικό (433±45 NmL CH₄/gVS) σε σύγκριση με το αρχικό υλικό (289±27 NmL CH₄/gVS) και το στερεό υπόλειμμα (298±11 NmL CH₄/gVS). Το υψηλό αυτό δυναμικό μπορεί να αιτιολογηθεί λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του υγρού ζύμωσης σε πτητικά λιπαρά οξέα (VFA), ειδικότερα ηλεκτρικό και οξικό οξύ, μετά τη ζύμωση από τον *A. succinogenes*. Παρ'όλα αυτά, επειδή για την προοπτική της βιοδιύλισης, το ηλεκτρικό οξύ θα διαχωριστεί, έγινε μια εκτίμηση για το μεθανογόνο δυναμικό του υγρού της ζύμωσης, χωρίς το ηλεκτρικό οξύ [68]. Έτσι, η μέγιστη εκτιμώμενη απόδοση μεθανίου του υγρού ζύμωσης χωρίς το ηλεκτρικό οξύ είναι 285±27 NmL CH₄/gVS, παρόμοια με αυτή του αρχικού υλικού και του στερεού υπολείμματος. Οι τιμές του μεθανογόνου δυναμικού του αρχικού υλικού και του στερεού υπολείμματος βρίσκονται στα ίδια επίπεδα και είναι αναμενόμενες για υποστρώματα πλούσια σε υδατάνθρακες (*L. digitata*), ή σε λιπίδια και πρωτεΐνες

(στερεό υπόλειμμα) [8]. Ιδιαίτερα το δυναμικό του αρχικού ξηρού υλικού ήταν ίδιο ή λίγο υψηλότερο σε σύγκριση με αναφορές σε προηγούμενες μελέτες, που χρησιμοποίησαν *L. digitata* ως υπόστρωμα αναερόβιας χώνευσης [2], [36]. Οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στη σύσταση των φυκών λόγω εποχιακών αλλαγών, που επηρεάζουν την παραγωγικότητα σε μεθάνιο [1]. Συμπερασματικά, το υγρό της ζύμωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αποδοτικό υπόστρωμα για την παραγωγή βιοαερίου. Έτσι, ο οργανικός άνθρακας που περιέχεται στα φύκη *L. digitata* μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά παρέχοντας προϊόντα υψηλής αξίας και βιοενέργεια, με υψηλές αποδόσεις.

6.6 Γενικά Συμπεράσματα

Η παρούσα διπλωματική εργασία βασίζεται στην μελέτη της υδάτινης βιομάζας για την χρήση της σε διεργασίες βιοδιύλισης. Αυτή η μελέτη αποτελεί την πρώτη έκθεση πάνω στη χρήση βιομάζας φυκών για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος ως κύριο προϊόν, μέσω ζύμωσης.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δείχνουν σαφώς πως τα φύκη *Laminaria digitata* αποτελούν μια ιδιαίτερα ελκυστική πρώτη ύλη για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε υδατάνθρακες και της σχετικά απλής μετατροπής τους σε ηλεκτρικό οξύ. Σχεδόν το 15% της βιομάζας των φυκών μετατράπηκε σε ηλεκτρικό οξύ. Η απόδοση της ζύμωσης σε φιάλες ήταν υψηλότερη από αυτή σε βιοαντιδραστήρες, κάτι που δίνει τροφή για περαιτέρω έρευνα με στόχο τη βελτιστοποίηση της διεργασίας. Καθώς το ηλεκτρικό οξύ χρησιμοποιείται ως πρόδρομος πολλών χημικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, απαιτείται, επίσης, περισσότερη μελέτη πάνω στη μέθοδο διαχωρισμού του από τα παραπροϊόντα της ζύμωσης.

Επιπλέον το στερεό υπόλειμμα της ενζυμικής υδρόλυσης παρουσιάζει υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και Ω3 και Ω6 λιπαρά οξέα. Ως εκ τούτου, έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ, βιοαερίου

και ως συμπλήρωμα τροφών και ζωοτροφών, προκειμένου να μην αποτελέσει απόβλητο της βιοδιύλισης.

Συνοψίζοντας, υπάρχουν πολλά πιθανά σενάρια βιοδιύλισης της υδρόβιας βιομάζας που αξίζει να διερευνηθούν περαιτέρω, με κύριους στόχους την μείωση του κόστους και την αύξηση της κλίμακας των διεργασιών, προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η χρήση αυτής της πρώτης ύλης στο μέλλον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Adams, J.M.M., Ross, A.B., Anastasakis, K., Hodgson, E.M., Gallagher, J.A., Jones, J.M., & Donnison, I.S. (2011). Seasonal variation in the chemical composition of the bioenergy feedstock *Laminaria digitata* for thermochemical conversion. *Bioresource technology*, 102(1), 226-234.
- [2] Adams, J.M.M., Schmidt, A., & Gallagher, J.A. (2014). The impact of sample preparation of the macroalgae *Laminaria digitata* on the production of the biofuels bioethanol and biomethane. *Journal of Applied Phycology*, 1-7.
- [3] Al Seadi, T. (2008). *Biogas handbook*. Syddansk Universitet.
- [4] Almela, C., Algora, S., Benito, V., Clemente, M.J., Devesa, V., Súañer, M.A., Vélez, D., & Montoro, R. (2002). Heavy Metal, Total Arsenic, and Inorganic Arsenic Contents of Algae Food Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 918–923.
- [5] Alvarado-Morales, M., Boldrin, A., Karakashev, D.B., Holdt, S.L., Angelidaki, I., & Astrup, T. (2013). Life cycle assessment of biofuel production from brown seaweed in Nordic conditions. *Bioresource technology*, 129, 92-99
- [6] Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4851-4861.
- [7] Angelidaki, I., Alves, M. M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., & Van Lier, J.B. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science & Technology*, 59.5.

- [8] Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D.J., Plugge, C.M., & Stams, A.J. (2011). Biomethanation and its potential. *Methods in Enzymology*, 494, 327-51.
- [9] Angelidaki, I., Schmidt, J.E., Ellegaard, L., & Ahring, B.K. (1998). An automatic system for simultaneous monitoring of gas evolution in multiple closed vessels. *Journal of Microbiological methods*, 33(1), 93-100.
- [10] Barros, M., Freitas, S., Padilha, G.S., & Alegre, R.M. (2013). Biotechnological Production of Succinic Acid by *Actinobacillus Succinogenes* Using Different Substrate. *Chemical Engineering Transactions*, Vol.32.
- [11] Beauprez, J.J., Mey, M., & Soetaert, W. (2010). Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers. *Process Biochemistry*, 45, 1103-1114.
- [12] Bechthold, I., Bretz, K., Kabascl, S., Kopitzky, R., & Springer, A. (2008). Review: Succinic acid: A new platform chemical for biobased polymers from renewable resources. *Chemical Engineering and Technology*, 31, No.5, 647-654.
- [13] Besada, V., Andrade, J.M., Schultze, F., & González, J.J. (2009). Heavy metals in edible seaweeds commercialised for human consumption. *Journal of Marine Systems*, 75(1), 305-313.
- [14] Bligh, E.G., & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemical Physiology*, 37, 900-917.
- [15] Borges, E., & Pereira, N. (2011). Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicelluloses hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 1001-1011.
- [16] Carvalho, M., Matos, M., Roca, C., & Reis, M.A. (2014). Succinic acid production from glycerol by *Actinobacillus succinogenes* using dimethylsulfoxide as electron acceptor. *New biotechnology*, 31(1), 133-139.

- [17] Chen, K.Q., Li, J., Ma, J.F., Jiang, M., Wei, P., Liu, Z.M., & Ying, H.J. (2011). Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* using hydrolysates of spent yeast cells and corn fiber. *Bioresource Technology*, 102, 1704-1708.
- [18] Clark, J.H. (2007). Green chemistry for the second generation biorefinery-sustainable chemical manufacturing based on biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82, 603-609.
- [19] Dave, A., Huang, Y., Rezvani, S., Wright, D.M., Novaes, M., & Hewitt, N. (2013). Techno-economic assessment of biofuel development by anaerobic digestion of European marine cold-water seaweeds. *Bioresource Technology*, 135, 120-127.
- [20] Dębowski, M., Zielinski, M., Grala, A., & Dudek, M. (2013). Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies – Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 596-604.
- [21] Demers, A. (2012). *Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass for the production of second generation biofuels* (Doctoral dissertation, Worcester Polytechnic Institute).
- [22] Demirbas, A. (2007). Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion science*, 33, 1-18.
- [23] Dittert, I.M., Brandão, H.L., Pina, F., da Silva, E.A.B., de Souza, S.G.U., de Souza, A.A.U., Botelho, C.M.S., Boaventura, R.A.R., & Vilar, V.J.P. (2014). Integrated reduction/oxidation reactions and sorption processes for Cr(VI) removal from aqueous solutions using *Laminaria digitata* macro-algae. *Chemical engineering Journal*, 237, 443-454.
- [24] Dittert, I.M., Vilar, V.J.P., da Silva E.A.B., de Souza, S.G.U., de Souza, A.A.U., Botelho, C.M.S., & Boaventura, R.A.R. (2012). Adding value to marine macro-algae *Laminaria digitata* through its use in the separation and recovery of

trivalent chromium ions from aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 193-194, 348-357.

[25] European Commission, 2008. Commission Regulation (EC) No. 629/2008 of 2 July 2008 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. Eur. Union, L173 6–9.

[26] Feldmann, J., John, K., Pengprecha, P. (2000). Arsenic metabolism in seaweed-eating sheep from Northern Scotland. *Journal of Analytical Chemistry*, 368, 116–121.

[27] Fleurence, J. (1999). Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*, 10(1), 25-28.

[28] Fontaine, J., Zimmer, U., Moughan, P.J., & Rutherfurd, S.M. (2007). Effect of heat damage in an autoclave on the reactive lysine contents of soy products and corn distillers dried grains with solubles. Use of the results to check on lysine damage in common qualities of these ingredients. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 10737–43.

[29] Fotidis, I.A., Karakashev, D., & Angelidaki, I. (2013). The dominant acetate degradation pathway/methanogenic composition in full-scale anaerobic digesters operating under different ammonia levels. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(7), 2087-2094.

[30] Galland-Irmouli, A.V., Fleurence, J., Lamghari, R., Luçon, M., Rouxel, C., Barbaroux, O., Bronowicki, J.P., Villaume, C., & Guéant, J.L. (1999). Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmate* (dulse). *The Journal of nutritional biochemistry*, 10(6), 353-359.

[31] Ghatak, H.R. (2011). Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products and processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, 4042-4052.

- [32] Goh, C.S., & Lee, K.T. (2010). A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 842-848.
- [33] Guettler, M.V., Jain, M.K., & Rumler, D. (1996). Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants. *U.S. Patent No. 5,573,931*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- [34] Gunaseelan, V.N. (2004). Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 26(4), 389-399.
- [35] Hansen, O.G., Jensen, K.S., Hansen, D.F., & Christiansen, A. (1993). Growth and grazing control of the marine macroalga, *Ulva lactuca* L. in a eutrophic Danish estuary. *Aquatic Botany*, 46, 101-109.
- [36] Hanssen, J.F., Indergaard, M., Østgaard, K., Bævre, O.A., Pedersen, T.A., & Jensen, A. (1987). Anaerobic digestion of *Laminaria* spp. and *Ascophyllum nodosum* and application of end products. *Biomass*, 14, (1), 1-13.
- [37] Harmsen, P.F.H., Hackmann, M.M., & Bos, H.L. (2014). Green building blocks for bio-based plastics. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 8, 306–324.
- [38] Hermann, B.G., & Patel, M. (2007). Today's and tomorrow's bio-based bulk chemicals from white biotechnology. *Applied biochemistry and biotechnology*, 136(3), 361-388.
- [39] Hepburn, A.J. (2011). *The synthesis of succinic acid and its extraction from fermentation broth using a two-phase partitioning bioreactor*. Master Thesis, Queen's University, Department of Chemical Engineering, Canada.
- [40] Hermann, B.G., Blok, K., & Patel, M.H. (2007). Producing Bio-based bulk chemicals using industrial biotechnology saves energy and combats climate change. *Environmental Science & Technology*, 41, 7915-7921.

- [41] Holdt, S.L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543-597.
- [42] Jung, K.A., Lim, S.R., Kim, Y., & Park, J.M. (2013). Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. *Bioresource technology*, 135, 182-190.
- [43] Kamm, B., Gruber, P.R., & Kamm, M. (2007). Biorefineries—industrial processes and products. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- [44] Kamm, B., & Kamm, M. (2004). Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 137-145.
- [45] Kim, K.H., Choi, I.S., Kim, H.M., Wi, S.G., & Bae, H.J. (2014). Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. *Bioresource technology*, 153, 47-54.
- [46] Kokossis, A.C., & Yang A. (2010). On the use of systems technologies and a systematic approach for the synthesis and the design of future biorefineries. *Computers and Chemical Engineering*, 34(9), 1397-1405.
- [47] Kumar, R., Singh, S., & Singh, O.V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(5), 377-391.
- [48] Lee, P.C., Lee, W.G., Kwon, S., Lee, S.Y., & Chang, H.N. (1999). Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: effects of the H₂/CO₂ supply and glucose concentration. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(8), 549-554
- [49] Lee, P.C., Lee, W.G., Lee, S.Y., & Chang, H.N. (1999). Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production. *Process Biochemistry*, 35, 49-55.

- [50] Lee, P.C., Lee, W.G., Lee, S.Y., Chang, H.N., & Chang, Y.K. (2000). Fermentative Production of Succinic Acid from Glucose and Corn Steep Liquor by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5:379-381.
- [51] Lin, S. K. C., Du, C., Koutinas, A., Wang, R., & Webb, C. (2008). Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Biochemical Engineering Journal*, 41(2), 128-135.
- [52] Liu, R., Liang, L., Li, F., Wu, M., Chen, K., Ma, J., Jiang, M., Wei, P., & Ouyang, P. (2013). Efficient succinic acid production from lignocellulosic biomass by simultaneous utilization of glucose and xylose in engineered *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 149, 84-91.
- [53] Liu, S., Abrahamson, L.P., & Scott, G.M. (2012). Biorefinery: Ensuring biomass as a sustainable renewable source of chemicals, materials, and energy. *Biomass and Bioenergy*, 39, 1-4.
- [54] Luo, L., van der Voet, E., & Huppes, G. (2010). Biorefining of lignocellulosic feedstock – Technical, economic and environmental considerations. *Bioresource Technology*, 101, 5023-5032.
- [55] Marquez, G.P.B., Reichardt, W.T., Azanza, R.V., Klocke, M., & Montaña, M. N.E. (2013). Thalassic biogas production from sea wrack biomass using different microbial seeds: cow manure, marine sediment and sea wrack-associated microflora. *Bioresource technology*, 133, 612-617.
- [56] McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (part 2): conversion technologies. *Bioresource technology*, 83(1), 47-54.
- [57] McKinlay, J.B., Vieille, C., & Zeikus, J.G. (2007). Prospects for a bio-based succinate industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(4), 727-740.

- [58] McKinlay, J.B., Zeikus, J.G., & Vieille, C. (2005). Insights into *Actinobacillus succinogenes* Fermentative Metabolism in a Chemically Defined Growth Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6651.
- [59] Modenbach, A.A., & Nokes, S.E. (2013). Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings-A review. *Biomass and Bioenergy*, 56, 526-544.
- [60] Moody, L., Burns, R., Wu-Haan, W., & Spajic, R. (2009, February). Use of biochemical methane potential (BMP) assays for predicting and enhancing anaerobic digester performance. In *44th Croatian & 4th International Symposium on Agriculture* (pp. 930-934).
- [61] Nkemka, V.N., & Murto, M. (2010). Evaluation of biogas production from seaweed in batch tests and in UASB reactors combined with the removal of heavy metals. *Journal of environmental management*, 91(7), 1573-1579.
- [62] Nkemka, V.N., & Murto, M. (2012). Exploring strategies for seaweed hydrolysis: Effect on methane potential and heavy metal mobilisation. *Process Biochemistry*, 47(12), 2523-2526.
- [63] Nkemka, V.N., & Murto, M. (2013). Biogas production from wheat straw in batch and UASB reactors: The roles of pretreatment and seaweed hydrolysate as a co-substrate. *Bioresource technology*, 128, 164-172.
- [64] Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 635-648.
- [65] Rice, E.W. & Bridgewater, L. (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, DC: American Public Health Association.
- [66] Roesijadi, G, Jones, S.B., Snowden-Swan, L.J.,& Zhu, Y. (2010). *Macroalgae as a Biomass Feedstock: A Preliminary Analysis*. PNNL-19944, Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA.

- [67] Ross, A.B., Jones, J.M., Kubacki, M.L., & Bridgeman, T. (2008). Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behaviour. *Bioresource technology*, 99(14), 6494-6504.
- [68] Schink, B. (1985). Mechanisms and Kinetics of Succinate and Propionate Degradation in Anoxic Freshwater Sediments and Sewage Sludge. *Journal of General Microbiology*, 131, (3), 643-650.
- [69] Siles, J.A., Brekelmans, J., Martin, M.A., Chica, A.F., & Martin, A. (2010). Impact of ammonia and sulphate concentration on thermophilic anaerobic digestion. *Bioresource technology*, 101(23), 9040-9048.
- [70] Song, H., & Lee, S.Y. (2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 352-361.
- [71] Song, H., Huh, Y.S., Lee, S.Y., Hong, W.H., & Hong, Y.K. (2007). Recovery of succinic acid produced by fermentation of a metabolically engineered *Manheimia succiniciproducens* strain. *Journal of Biotechnology*, 132, 445-452.
- [72] Strömberg, S., Nistor, M., & Liu, J. (2014). Towards eliminating systematic errors caused by the experimental conditions in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. *Waste Management*.
- [73] Taherzadeh, M.J., & Karimi, K. (2007). Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*, 2(4), 707-738.
- [74] Timm-Heinrich, M., Eymard, S., Baron, C.P., Nielsen, H.H., & Jacobsen, C. (2013). Oxidative changes during ice storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed different ratios of marine and vegetable feed ingredients. *Food Chemistry*, 136, 1220–30.
- [75] Trivedi, N., Gupta, V., Reddy, C.R.K., & Jha, B. (2013). Enzymatic hydrolysis and production of bioethanol from common macrophytic green alga *Ulva fasciata* Delile. *Bioresource technology*, 150, 106-112.

- [76] Tukai, R., Maher, W.A., McNaught, I.J., & Ellwood, M.J. (2002). Measurement of arsenic species in marine macroalgae by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, Acta 457, 173–185.
- [77] Van der Werf, M.J., Guettler, M.V., Jain, M.K., & Zeikus, J.G. (1997). Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp.130Z. *Archives of Microbiology*, 167, 332-342.
- [78] van Hal, J.W., Huijgen, W.J.J., & López-Contreras, A.M. (2014). Opportunities and challenges for seaweed in the biobased economy. *Trends in biotechnology*, 32(5), 231-233.
- [79] Vassilev, S.V., Baxter, D., Andersen, L.K., & Vassileva, C.G. (2010). An overview of the chemical composition of biomass. *Fuel*, 89(5), 913-933.
- [80] Vassilev, S.V., Baxter, D., Andersen, L.K., Vassileva, C.G., & Morgan, T.J. (2012). An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. *Fuel*, 94, 1-33.
- [81] Verardi, A., De Bari, I., Ricca, E., & Calabrò, V. (2012). *Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives*, Bioethanol, Prof. Marco Aurelio Pinheiro Lima (Ed.), ISBN: 978-953-51-0008-9, InTech, DOI: 10.5772/23987.
- [82] Vergara-Fernández, A., Vargas, G., Alarcón, N., & Velasco, A. (2008). Evaluation of marine algae as a source of biogas in a two-stage anaerobic reactor system. *Biomass and Bioenergy*, 32(4), 338-344.
- [83] Vlysidis, A., Binns, M., Webb, C., & Theodoropoulos, C. (2011). Glycerol utilisation for the production of chemicals: conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study. *Biochemical Engineering Journal*, 58, 1-11.

- [84] Wan, C., Li, Y., Shahbazi, A., & Xiu, S. (2008). Succinic Acid Production from Cheese Whey using *Actinobacillus succinogenes* 130 Z. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 145, 111-119.
- [85] Wegeberg, S., & Felby, C. (2010). *Algae biomass for bioenergy in Denmark: biological/technical challenges and opportunities*. DONG Energy, 89 p.
- [86] Wei, N., Quarterman, J., & Jin, Y.S., (2013). Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. *Trends in Biotechnology*, Vol.31, No.2.
- [87] Wensel, P., Yu, L., & Chen, S. (2011). Simulation with Computational Fluid Dynamics of Succinic Acid and Co-Product Biorefinery Process. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, S:2.
- [88] Xi, Y.I., Chen, K., Li, J., Fang, X.J., Zheng, X.Y., Sui, S.S., Jiang, M., & Wei, P. (2011). Optimization of culture conditions in CO₂ fixation for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 1605-1612.
- [89] Yang, B., Dai, Z., Ding, S.Y., & Wyman, C.E. (2011). Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2(4), 421-450.
- [90] Zeikus, J.G., Jain, M.K., & Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5), 545-552.
- [91] Zheng, P., Dong, J.J., Sun, Z.H., Ni, Y., & Fang, L. (2009). Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 100, 2425-2429.
- [92] Zheng, P., Fang, L., Xu, Y., Dong, J.J., Ni, Y., & Sun, Z.H. (2010). Succinic acid production from corn stover by simultaneous saccharification and fermentation using *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource technology*, 101(20), 7889-7894.

- [93] Zhu, Y., Malten, M., Torry-Smith, M., McMillan, J.D., & Stickel, J.J. (2011). Calculating sugar yields in high solids hydrolysis of biomass. *Bioresource technology*, 102(3), 2897-2903.
- [94] Zou, W., Zhu, L. W., Li, H.M., & Tang, Y.J. (2011). Significance of CO₂ donor on the production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618. *Microbial Cell Factories*, 10, 87.
- [95] Γαλανίδης, Χ.Σ. (2011). *Μεταπτυχιακή Εργασία: Καλλιέργεια των πράσινων μακροαλγών *Ulva lactuca* και *Ulvaria fusca* για την παραγωγή βιοκαυσίμων*. Σχολή Πολιτικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π., Αθήνα.
- [96] Report: *Bio Succinic Acid Market Analysis and Segment Forecasts to 2020*. Published in Grand View Research, March 2014.
<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/bio-succinic-acid-market>
- [97] Article: *Laminaria digitata*. Published in Seaweed Industry association.
<http://seaweedindustry.com/seaweed/type/laminaria-digitata>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Πίνακας 14. Προσδιορισμός αμινοξέων στο αρχικό υλικό *L. digitata* και στο στερεό υπόλειμμα της ενζυμικής υδρόλυσης.

Αμινοξέα (% ξ.β.)		Αρχικό Υλικό	Στερεό Υπόλειμμα
Lys	Λυσίνη	0,22 ± 0,03	0,36 ± 0,03
Ala	Αλανίνη	0,53 ± 0,11	1,09 ± 0,14
Arg	Αργινίνη	0,13 ± 0,01	0,63 ± 0,21
Cys	Κυστεΐνη	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Met	Μεθειονίνη	0,07 ± 0,01	0,44 ± 0,02
Leu	Λευκίνη	0,26 ± 0,01	1,18 ± 0,08
Tyr	Τυροσίνη	0,08 ± 0,01	0,41 ± 0,00
Phe	Φαινυλανίνη	0,23 ± 0,01	0,82 ± 0,04
Pro	Προλίνη	0,21 ± 0,02	0,76 ± 0,02
Thr	Θρεονίνη	0,12 ± 0,00	0,91 ± 0,03
Asp	Ασπαραγινικό οξύ	0,43 ± 0,04	1,36 ± 0,08
Ser	Σερίνη	0,16 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Hyp	Υδροξυπρολίνη	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,01
Glu	Γλουταμινικό οξύ	0,48 ± 0,05	1,45 ± 0,46
Val	Βαλίνη	0,13 ± 0,03	0,82 ± 0,11
His	Ιστιδίνη	0,02 ± 0,00	0,18 ± 0,01
Ile	Ισολευκίνη	0,08 ± 0,01	0,56 ± 0,06
Gly	Γλυκίνη	0,31 ± 0,31	0,97 ± 0,00
Total		3,45 ± 0,07	11,99 ± 0,55

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Πίνακας 15. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στο αρχικό υλικό *L. digitata* και στο στερεό υπόλειμμα της ενζυμικής υδρόλυσης.

		Αρχικό Υλικό	Στερεό Υπόλειμμα
Ολικά Λιπίδια (% ξ.β.)		0,77 ± 0,02	6,61 ± 0,2
Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (% ξ.β.) -FAME			
C14:0	Myristic acid	6,15 ± 0,02	6,94 ± 0,02
C15:0	Pentadecylic acid	0,45 ± 0,21	0,54 ± 0,01
C16:0	Palmitic acid	23,06 ± 0,01	23,07 ± 0,10
C17:0	Margaric acid	0,19 ± 0,01	0,01 ± 0,00
C18:0	Stearic acid	0,78 ± 0,12	0,44 ± 0,16
C18:3(n-3)	Hexadecatrienoic acid	5,03 ± 0,01	4,06 ± 0,04
C20:3(n-3)	Eicosatrienoic acid	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,01
C20:4(n-3)	Eicosatetraenoic acid	0,28 ± 0,00	0,30 ± 0,01
C20:5(n-3)	Eicosapentanoic acid	10,30 ± 0,06	8,31 ± 0,01
C20:2(n-6)t	Eicosadienoic acid	0,23 ± 0,00	0,24± 0,00
C18:2(n-6)	Linoleic acid	9,85 ± 0,06	10,16 ± 0,01
C20:2(n-6)t	Eicosadienoic acid	0,23 ± 0,00	0,24± 0,00
C20:4(n-6)	Arachidonic acid	8,14 ± 0,06	6,90 ± 0,00
C20:3(n-6)	Dihomo-gamma-linolenic acid	0,18 ± 0,00	0,18 ± 0,00
C18:1(n-9)	Oleic acid	20,15 ± 0,28	23,74 ± 0,12
C20:1(n-9)	Eicosenoic acid	0,95 ± 0,01	1,33 ± 0,00
C16:4(n-1)	Hexadecatetraenoic acid	0,14 ± 0,01	0,06 ± 0,01
C16:3(n-4)	Hexadecatrienoic acid	0,25 ± 0,01	0,20 ± 0,01
C18:2(n-4)		0,62 ± 0,01	0,56 ± 0,00
C18:3(n-4)		4,65 ± 0,02	4,27 ± 0,01
C16:1(n-7)	Palmitoleic acid	2,85 ± 0,06	2,56 ± 0,01
C18:1(n-7)	Vaccenic acid	0,33 ± 0,04	0,19 ± 0,00
C20:1(n-7)	Paullinic acid		0,04 ± 0,00
C22:1(n-11)	Cetolein acid	0,14 ± 0,01	0,03 ± 0,00
Κορεσμένα		30,62 ± 0,24	30,99 ± 0,10

	Αρχικό Υλικό	Στερεό Υπόλειμμα
Μονοακόρεστα	24,41 ± 0,29	27,89 ± 0,05
Πολυακόρεστα	39,75 ± 0,10	35,32 ± 0,01
Ω3	15,71	12,76
Ω6	18,40	17,48
Ω9	21,10	25,07
Ω1,4,7,11	8,95	7,90

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

Πίνακας 16. Προσδιορισμός προϊόντων ζύμωσης μακροφυκών *L. digitata* σε φιάλες σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.

Χρόνος ζύμωσης (h)	Γλυκόζη (g/L)	Μαννιτόλη (g/L)	Ηλεκτρικό οξύ (g/L)	Μηρμυκικό οξύ (g/L)	Οξικό οξύ (g/L)
0	24,60 ± 0,46	4,03 ± 0,09	0,21 ± 0,01	0,00	0,00
1	23,98 ± 0,37	3,93 ± 0,08	0,20 ± 0,01	0,00	0,00
2	23,71 ± 1,04	3,89 ± 0,15	0,20 ± 0,01	0,00	0,00
3	24,67 ± 0,30	4,06 ± 0,04	0,20 ± 0,01	0,00	0,00
4	23,65 ± 0,78	3,88 ± 0,14	0,20 ± 0,01	0,00	0,00
5	22,82 ± 2,02	3,74 ± 0,35	0,20 ± 0,02	0,00	0,00
23	2,42 ± 2,11	-	18,18 ± 1,66	0,89 ± 0,22	3,57 ± 0,61
24	0,00	-	20,03 ± 0,14	0,93 ± 0,07	4,20 ± 0,03
25	0,00	3,24 ± 0,21	19,04 ± 0,43	0,75 ± 0,01	3,96 ± 0,08
26	0,00	3,12 ± 0,23	20,28 ± 0,24	0,73 ± 0,06	4,17 ± 0,03
46	0,00	0,80 ± 0,18	23,07 ± 0,36	0,38 ± 0,04	4,79 ± 0,06
48	0,00	0,67 ± 0,14	24,39 ± 0,22	0,42 ± 0,02	5,23 ± 0,10

Πίνακας 17. Προσδιορισμός προϊόντων ζύμωσης μακροφυκών *L. digitata* σε αντιδραστήρες σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.

Χρόνος ζύμωσης (h)	Γλυκόζη (g/L)	Μαννιτόλη (g/L)	Ηλεκτρικό οξύ (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Μημμυκικό οξύ (g/L)	Οξικό οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
0	44,63 ± 0,79	7,51 ± 0,12	1,13 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,06 ± 0,09	0,41 ± 0,01	0,00
1	42,68 ± 0,33	7,18 ± 0,03	1,06 ± 0,05	0,31 ± 0,01	-	0,41 ± 0,03	0,00
2	42,92 ± 1,95	7,21 ± 0,34	1,17 ± 0,01	0,33 ± 0,01	-	0,46 ± 0,01	0,00
4	41,41 ± 1,96	6,65 ± 0,37	1,57 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,44 ± 0,05	0,93 ± 0,06	0,00
6	41,86 ± 0,32	6,12 ± 0,17	2,59 ± 0,36	0,50 ± 0,04	1,06 ± 0,16	1,62 ± 0,19	0,48 ± 0,10
9,5	37,72 ± 2,37	0,05 ± 0,06	8,69 ± 0,45	1,22 ± 0,08	3,06 ± 0,12	3,70 ± 0,13	1,80 ± 0,05
10	29,16 ± 3,95	-	9,17 ± 0,15	1,34 ± 0,02	3,17 ± 0,02	3,85 ± 0,01	1,80 ± 0,02
10,5	29,34 ± 2,99	-	10,32 ± 0,30	1,52 ± 0,07	3,45 ± 0,11	4,34 ± 0,13	1,96 ± 0,09
11	27,45 ± 2,74	-	11,17 ± 0,42	1,67 ± 0,07	3,63 ± 0,13	4,65 ± 0,23	2,03 ± 0,10
22,5	0,49 ± 0,09	0,24 ± 0,01	30,95 ± 0,24	4,30 ± 0,26	3,07 ± 0,01	8,53 ± 0,18	2,62 ± 0,33
24	0,35 ± 0,08	0,24 ± 0,01	31,89 ± 1,44	4,31 ± 0,47	3,15 ± 0,06	8,84 ± 0,25	2,56 ± 0,39
25	0,32 ± 0,08	0,24 ± 0,04	31,21 ± 2,82	4,20 ± 0,54	3,12 ± 0,22	8,62 ± 0,66	2,46 ± 0,48
26	0,34 ± 0,05	0,26 ± 0,01	33,05 ± 0,21	4,41 ± 0,20	3,31 ± 0,05	9,14 ± 0,12	2,60 ± 0,23
28	0,32 ± 0,04	0,26 ± 0,01	33,38 ± 0,64	4,50 ± 0,34	3,40 ± 0,02	9,32 ± 0,02	2,69 ± 0,23
29	0,32 ± 0,05	0,28 ± 0,01	33,37 ± 1,26	4,53 ± 0,44	3,38 ± 0,08	9,29 ± 0,18	2,62 ± 0,33
29,5	0,32 ± 0,07	0,29 ± 0,01	32,81 ± 1,78	4,47 ± 0,50	3,36 ± 0,13	9,16 ± 0,35	2,58 ± 0,34
46,5	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,01	33,44 ± 0,20	5,02 ± 0,71	4,00 ± 0,37	9,88 ± 0,56	3,08 ± 0,03
47	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,04	33,99 ± 0,33	5,07 ± 0,79	4,07 ± 0,31	9,93 ± 0,23	3,89 ± 0,90
48	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,05	33,78 ± 1,17	5,05 ± 0,94	4,02 ± 0,26	9,89 ± 0,06	3,15 ± 0,18

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

Πίνακας 18. Προσδιορισμός ολικών και πτητικών στερεών στο αρχικό υλικό *L. digitata*, το στερεό υπόλειμμα της υδρόλυσης και το υγρό της ζύμωσης σε τριπλέτες.

Δείγματα		Ηθμός (g)	Ηθμός με δείγμα (g)	Αρχικό Δείγμα (g)	Μετά την ξήρανση (g)	Υπόλειμμα μετά την ξήρανση (g)	TS (g/g ξ.β.)	Μέσος όρος TS (% ξ.β.)	Τυπική απόκλιση (% ξ.β.)	Μετά από θέρμανση στους 550°C	VS (g/g ξ.β.)	Μέσος όρος VS (% ξ.β.)	Τυπική απόκλιση (% ξ.β.)
1	Αρχικό ξηρό υλικό	21,3994	21,8065	0,4071	21,7716	0,3722	0,914	91,39%	0,18%	21,4306	0,838	84,22%	0,40%
2		14,9492	15,4318	0,4826	15,391	0,4418	0,915			14,9833	0,845		
3		20,4851	21,0188	0,5337	20,9718	0,4867	0,912			20,5213	0,844		
1	Στερεό υπόλειμμα υδρόλυσης	11,5402	12,036	0,4958	12,0253	0,4851	0,978	97,65%	0,22%	11,6014	0,855	85,65%	0,15%
2		11,6945	12,2201	0,5256	12,2065	0,512	0,974			11,7563	0,857		
3		11,7953	12,3646	0,5693	12,3514	0,5561	0,977			11,8629	0,858		
1	Υγρό ζύμωσης	20,4865	39,4508	18,9643	23,0368	2,5503	0,134	13,69%	0,37%	21,4644	0,083	8,53%	0,37%
2		28,4665	46,2843	17,8178	30,982	2,5155	0,141			29,3866	0,090		
3		20,1555	37,6809	17,5254	22,5226	2,3671	0,135			21,0583	0,084		

