



**Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο**  
Τμήμα Χημικών Μηχανικών  
Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

### Παραγωγή βιοαιθανόλης από άλγη

Κουτσαφτής Φράγκος Ερμής  
Αριθμός Μητρώου: 05118082

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:  
Παυλάτου Ευαγγελία

Αθήνα, Ιούλιος 2024



## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της κυρίας Ευαγγελίας Παυλάτου, καθηγήτριας του Ε.Μ.Π.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Παυλάτου που με εμπιστεύτηκε να φέρω εις πέρας την συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, καθώς πέρα από μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει και πολλές προοπτικές.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Φώτη Χατζημαλιάκα, ερευνητή και μέλος του προσωπικού του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές και γνώσεις που μου μετέδωσε.

Ακόμη, ιδιαίτερες ευχαριστίες στην κυρία Έλλη - Μαρία Μπαραμπούτη και στην κυρία Σοφία Μάη, ΕΔΙΠ του Ε.Μ.Π. για τη βοήθειά τους καθώς και σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου για τις συμβουλές τους και για το φιλικό και συνεργατικό κλίμα.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και στους φίλους μου για την συμπαράσταση και στήριξή τους.

Αθήνα, Ιούλιος 2024

Κουτσαφτής Φράγκος Ερμής

## Περίληψη

Η παραγωγή βιοκαυσίμων από περιβαλλοντικά φιλικές και βιώσιμες πηγές συγκεντρώνει ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον παγκοσμίως. Η βιοαιθανόλη θεωρείται ένα από τα πολλά υποσχόμενα ανανεώσιμα καύσιμα που μπορεί να αντικαταστήσει τα ορυκτά καύσιμα μεταφορών και μπορεί να ληφθεί από πρώτες ύλες που περιέχουν σακχαρόζη, αμυλώδη υλικά και λιγνοκυτταρινική βιομάζα.

Τα άλγη αναπτύσσονται με ταχείς ρυθμούς, δεν ανταγωνίζονται τις καλλιέργειες τροφίμων καθώς έχουν τη δυνατότητα να καλλιεργηθούν σε μη καλλιεργήσιμα εδάφη ή και σε θαλασσινό νερό. Επιπλέον, τα άλγη έχουν ελπιδοφόρες προοπτικές όσον αφορά στη μείωση των εκπομπών CO<sub>2</sub> αλλά και στον καθαρισμό των υδάτων, ενισχύοντας έτσι την περιβαλλοντική βιωσιμότητα.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας και η βελτιστοποίηση παραγωγής βιοαιθανόλης χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τροφοδοσία ξηρών αλγών. Πραγματοποιήθηκε μελέτη των σταδίων επεξεργασίας (προεπεξεργασία, ενζυμική υδρόλυση και ζύμωση), προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή βιοαιθανόλης.

Πιο συγκεκριμένα, μετά τον πλήρη φυσικοχημικό χαρακτηρισμό της τροφοδοσίας των αλγών, ακολούθησε μελέτη της προεπεξεργασίας της πρώτης ύλης με στόχο τη μέγιστη παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων. Το ξηρό υπόστρωμα αλγών υποβλήθηκε στις ακόλουθες προεπεξεργασίες: υδροθερμική με τη χρήση του αυτόκλειστου στους 121°C για 30 λεπτά, υδατόλουτρο στους 90°C για 75 λεπτά και υπέρηχοι στα 150W για 10 λεπτά. Η μέγιστη απόδοση σακχαροποίησης που παρατηρήθηκε ήταν ίση με 85,73 ± 1,03% για την προεπεξεργασία σε υδατόλουτρο με υδροξείδιο του νατρίου ως διαλύτη. Σε αυτές τις συνθήκες η αποικοδόμηση του στερεού υλικού έφτασε το 38,17% ενώ η αποικοδόμηση της κυτταρίνης μεγιστοποιήθηκε στο 92,72% και του αμύλου στο 96,35%.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε παραγοντικός σχεδιασμός με σκοπό τον προσδιορισμό της επίδρασης ορισμένων βασικών παραμέτρων στην απόδοση της παραγωγής βιοαιθανόλης από την τροφοδοσία άλγης, με βάση τη βέλτιστη προεπεξεργασία. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν ήταν η ποσότητα του κυτταρινολυτικού ενζύμου CelliCTec (250, 500, 750 μL/g κυτταρίνης), η ποσότητα του αμυλολυτικού ενζύμου Spirizyme (25, 45, 65 μL/g αμύλου) καθώς και η αρχική συγκέντρωση του NaOH κατά την προεπεξεργασία (0,1, 0,2 και 0,3M). Η μέγιστη απόδοση αιθανόλης που επιτεύχθηκε ήταν 76.1±4.9% στο 8<sup>ο</sup> πείραμα του παραγοντικού σχεδιασμού (0,3M NaOH, 65 μL Spirizyme /g αμύλου, 750 μL CelliCTec /g κυτταρίνης).

Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία πως είναι εφικτή η αξιοποίηση ξηρού υποστρώματος βιομάζας αλγών για παραγωγή βιοαιθανόλης, καθιστώντας τη μια πολλά υποσχόμενη πρώτη ύλη. Οι μέθοδοι προεπεξεργασίας και οι συνθήκες που επιλέχθηκαν κρίνονται αποδοτικές, όπως και η συνολική διεργασία η οποία αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω με σκοπό τη βελτιστοποίηση της διεργασίας.

## Abstract

The production of biofuels from environmentally friendly and sustainable sources is gaining increasing interest worldwide. Bioethanol is considered one of the promising renewable fuels that can replace fossil transport fuels and can be obtained from raw materials containing sucrose, starchy materials and lignocellulosic biomass.

Algae are growing rapidly and do not compete with food crops as they can be grown on uncultivated soils or even in seawater. Moreover, algae have promising prospects in terms of reducing CO<sub>2</sub> emissions and cleaning water, thus enhancing environmental sustainability.

The aim of this thesis was to investigate the feasibility and optimization of bioethanol production using dry algae feedstock as feedstock. A study of the processing steps (pre-treatment, enzymatic hydrolysis and fermentation) was carried out in order to maximise bioethanol production.

More specifically, after the complete physico-chemical characterization of the algae feed, the pre-treatment of the raw material was studied in order to maximize the production of fermentable sugars. The dry algae substrate was subjected to the following pre-treatments: hydrothermal using autoclave at 121°C for 30 min, water bath at 90°C for 75 min and ultrasound at 150W for 10 min. The maximum saccharification yield observed was equal to  $85.73 \pm 1.03\%$  for the water bath pretreatment with sodium hydroxide as solvent. Under these conditions, the degradation of the solid material reached 38.17% while the degradation of cellulose was maximized at 92.72% and starch at 96.35%.

A factorial design was then applied to determine the effect of some key parameters on the bioethanol production efficiency from the algae feed, based on optimal pretreatment. The conditions selected were the amount of the cellulolytic enzyme CelliCTec (250, 500, 750  $\mu\text{L/g}$  cellulose), the amount of the amylolytic enzyme Spirizyme (25, 45, 65  $\mu\text{L/g}$  starch) and the initial NaOH concentration during pretreatment (0.1, 0.2 and 0.3M). The maximum ethanol yield achieved was  $76.1 \pm 4.9\%$  in the 8th experiment of the factorial design (0.3M NaOH, 65  $\mu\text{L}$  Spirizyme/g starch, 750  $\mu\text{L}$  CelliCTec/g cellulose).

In conclusion, it was found in this thesis that it is feasible to utilize dry algal biomass substrate for bioethanol production, making it a promising feedstock. The pretreatment methods and the conditions chosen are found to be efficient, as well as the overall process which is worth further investigation in order to optimize the process.

## Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες .....	3
Περίληψη .....	4
Abstract.....	5
Ευρετήριο Εικόνων .....	9
Ευρετήριο Σχημάτων .....	9
Ευρετήριο Πινάκων .....	10
Ευρετήριο Διαγραμμάτων .....	11
<b>Θεωρητικό Μέρος .....</b>	<b>13</b>
Κεφάλαιο 1: Νομοθετικό Πλαίσιο .....	13
1.1 Εισαγωγή.....	13
1.2 Νομοθετικό πλαίσιο για τα βιοκαύσιμα.....	14
Κεφάλαιο 2: Άλγη .....	17
2.1 Εισαγωγικά στοιχεία για τα άλγη .....	17
2.2 Ιδιότητες αλγών για την δυνατότητα παραγωγής βιοκαυσίμων.....	18
2.3 Καλλιέργεια και συγκομιδή μικροαλγών.....	19
2.3.1 Φωτοαυτότροφη παραγωγή .....	19
2.3.2 Ετερότροφη παραγωγή.....	23
2.3.3 Μικτότροφη παραγωγή .....	24
2.4 Επίδραση της επιλογής στελέχους .....	24
2.5 Τεχνολογίες μετατροπής της βιομάζας άλγης σε βιοκαύσιμα .....	25
2.5.1 Θερμοχημική μετατροπή .....	25
2.5.2 Βιοχημική μετατροπή .....	27
Κεφάλαιο 3: Βιοκαύσιμα .....	29
3.1 Εισαγωγή.....	29
3.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα βιοκαυσίμων.....	30
3.3 Κατηγοριοποίηση βιοκαυσίμων.....	31
3.3.1 Κατηγοριοποίηση βιοκαυσίμων με βάση τη φυσική τους κατάσταση .....	31
3.3.2 Κατηγοριοποίηση βιοκαυσίμων με βάση τον βαθμό εμπορευματοποίησης της τεχνολογίας.....	32
3.4 Παραγωγή βιοκαυσίμων.....	35
3.4.1 Παραγωγή βιοντίζελ .....	35
3.4.2 Παραγωγή βιοαιθανόλης.....	36
3.4.3 Παραγωγή βιοαερίου .....	36
Κεφάλαιο 4: Βιοαιθανόλη .....	37

4.1 Εισαγωγή.....	37
4.2 Ιδιότητες αιθανόλης.....	38
4.3 Εφαρμογές αιθανόλης.....	39
4.4 Βιοαιθανόλη ως καύσιμο.....	39
4.5 Πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης.....	40
4.5.1 Αμυλούχες πρώτες ύλες.....	40
4.5.2 Σακχαρούχες πρώτες ύλες.....	41
4.5.3 Λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες.....	41
4.6 Προεπεξεργασία βιομάζας άγλης.....	42
4.6.1 Φυσική προεπεξεργασία.....	42
4.6.2 Χημική προεπεξεργασία.....	43
4.6.3 Φυσικοχημική προεπεξεργασία.....	44
4.6.4 Βιολογική προεπεξεργασία.....	45
4.7 Υδρόλυση.....	46
4.7.1 Ενζυμική Υδρόλυση.....	46
4.7.2 Όξινη Υδρόλυση.....	47
4.8 Ζύμωση.....	48
4.8.1 Διακριτή υδρόλυση και ζύμωση (SHF).....	48
4.8.2 Ταυτόχρονη Σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF).....	48
4.8.3 Σημαντικοί παράγοντες της ζύμωσης.....	48
Κεφάλαιο 5: Παραγοντικός σχεδιασμός.....	50
5.1 Εισαγωγή.....	50
5.2 Σχεδιασμοί πρώτης τάξης.....	54
5.2.1 Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός.....	54
5.2.2 Μήτρες σχεδιασμού πειραμάτων.....	54
5.2.3 Ιδιότητες ενός παραγοντικού πειράματος.....	56
5.2.3 Βαθμοί ελευθερίας και αλληλεπιδράσεις.....	57
5.3 Εκτέλεση του πειράματος.....	57
5.3.1 Σφάλματα επαναλήψεων και διακύμανση της παραμέτρου αριστοποίησης.....	57
5.3.2 Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων.....	59
5.3.3 Αντιμετώπιση σφαλμάτων.....	60
5.4 Επεξεργασία Αποτελεσμάτων.....	60
5.4.1 Προϋποθέσεις.....	60
5.4.2 Υπολογισμός συντελεστών συνάρτησης.....	60
5.4.3 Έλεγχος σημαντικότητας συντελεστών.....	62
5.4.4 Έλεγχος επάρκειας μαθηματικού μοντέλου.....	63

<b>Πειραματικό Μέρος</b> .....	64
Σκοπός .....	64
Κεφάλαιο 6: Πειραματική μεθοδολογία .....	64
6.1 Πρώτη Ύλη.....	64
6.2 Μέθοδοι Ανάλυσης .....	64
6.2.1 Προσδιορισμός των ολικών στερεών TS .....	64
6.2.2 Προσδιορισμός πτητικών στερεών VS.....	65
6.2.3 Προσδιορισμός ελαίων και λιπών .....	66
6.2.4 Προσδιορισμός υδατοδιαλυτών στερεών WS .....	67
6.2.5 Προσδιορισμός κυτταρίνης.....	68
6.2.6 Προσδιορισμός ημικυτταρίνης.....	70
6.2.7 Προσδιορισμός λιγνίνης.....	71
6.2.8 Προσδιορισμός Ελεύθερης Γλυκόζης .....	72
6.2.9 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο GOD/PAP.....	72
6.2.10 Προσδιορισμός Ολικού Αμύλου .....	73
6.2.11 Προσδιορισμός της Περιεκτικότητας του Ολικού Αζώτου σε Στερεά Δείγματα..	74
6.2.12 Προσδιορισμός Αιθανόλης.....	77
6.2.13 Προσδιορισμός pH σε υγρά δείγματα .....	77
Κεφάλαιο 7: Πειραματικό Πρωτόκολλο .....	78
7.1 Πειραματική Μεθοδολογία.....	78
7.2 Αναλύσεις κατά την ενζυμική υδρόλυση.....	79
7.3 Αποικοδομήσεις και αποδόσεις.....	80
7.4 Παραγοντικός σχεδιασμός.....	82
7.5 Αναλύσεις κατά τον παραγοντικό σχεδιασμό .....	84
Κεφάλαιο 8: Πειραματικά αποτελέσματα .....	84
8.1 Χαρακτηρισμός πρώτης ύλης.....	84
8.2 Αποτελέσματα μελέτης προεπεξεργασίας αλγών .....	85
8.2.1 Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός υπολειμμάτων ενζυμικής υδρόλυσης .....	90
8.2.2 Ποσοστά αποικοδόμησης .....	92
8.3 Αποτελέσματα παραγοντικού πειράματος.....	95
8.4 Ανάλυση παραγοντικού μοντέλου και εξαγωγή συμπερασμάτων.....	107
8.4.1 Υπολογισμός μέσων τιμών και του στατιστικού σφάλματος.....	107
8.4.2 Υπολογισμός των συντελεστών των παραγόντων.....	108
8.4.3 Έλεγχος σημαντικότητας των συντελεστών .....	111
8.4.4 Έλεγχος επάρκειας γραμμικού μοντέλου .....	112



Κεφάλαιο 9: Συμπεράσματα και μελλοντική έρευνα .....	115
9.1 Συμπεράσματα .....	115
9.2 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα .....	116
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>118</b>

## Ευρετήριο Εικόνων

<b>Εικόνα 1:</b> Αυλακοειδής λίμνη .....	21
<b>Εικόνα 2:</b> Καλλιέργεια <i>Spirulina</i> στην Calipatria, California, USA.....	21
<b>Εικόνα 3:</b> Σύστημα κλειστών σωληνοειδών φωτοβιοαντιδραστήρων .....	23
<b>Εικόνα 4:</b> Πιθανές διεργασίες μετατροπής βιομάζας αλγών.(Tsukahara & Sawayama, 2005) .....	29
<b>Εικόνα 5:</b> Γενιές βιοκαυσίμων (Khan et al., 2021).....	33
<b>Εικόνα 6:</b> Παραγωγή βιοαιθανόλης με βάση τις γενιές βιοκαυσίμων (Alalwan et al., 2019)	35
<b>Εικόνα 7:</b> Παραγωγή βιοαιθανόλης με SHF (πάνω σχήμα) και με SSF (κάτω σχήμα).....	36
<b>Εικόνα 8:</b> Διεργασία παραγωγής βιοαερίου .....	37
<b>Εικόνα 9:</b> Μοριακή δομή λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (Brandt et al., 2013) .....	42
<b>Εικόνα 10:</b> Διαφορετικές τεχνικές και διεργασίες προεπεξεργασίας για την ανάπτυξη βιοκαυσίμων από άλγη (Muthuraman & Kasianantham, 2023) .....	46
<b>Εικόνα 11:</b> Μετατροπή λιγνοκυτταρινικής βιομάζας σε βιοαιθανόλη (Rezania et al., 2020)	47
<b>Εικόνα 12:</b> Απλοποιημένη απεικόνιση των βημάτων της διεργασίας για την παραγωγή βιοαιθανόλης από άλγη (Li et al., 2014). .....	50
<b>Εικόνα 13:</b> Φούρνος ξήρανσης Carbolite.....	64
<b>Εικόνα 14:</b> Αφυγραντήρας .....	65
<b>Εικόνα 15:</b> Φούρνος μέτρησης πτητικών στερεών .....	65
<b>Εικόνα 16:</b> Διάταξη της Soxhlet .....	66
<b>Εικόνα 17:</b> Ανακινούμενο αερόλουτρο IKA KS 30001 control. ....	67
<b>Εικόνα 18:</b> Φυγόκεντρος IEC CENTRA CL2. ....	67
<b>Εικόνα 19:</b> Κλίβανος αποστείρωσης ISOLAB Laborgerate GmbH Autoclave .....	69
<b>Εικόνα 20:</b> Φωτόμετρο.....	70
<b>Εικόνα 21:</b> Ενζυμική αλληλουχία αντιδράσεων προσδιορισμού γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP .....	72
<b>Εικόνα 22:</b> Διαδικασία Χώνευσης.....	76

## Ευρετήριο Σχημάτων

<b>Σχήμα 1:</b> Παγκόσμια ενεργειακή προμήθεια 2019 .....	13
<b>Σχήμα 2:</b> Γραφική Αναπαράσταση στον Ευρωπαϊκό χάρτη του ποσοστού της τελικής Ενέργειας που προέρχεται από Α.Π.Ε., ανά κράτος μέλος της Ε.Ε (2022) (Eurostat, 2022) ...	17
<b>Σχήμα 3:</b> Διάγραμμα μαύρου κουτιού κυβερνητικής.....	51

<b>Σχήμα 4:</b> Γραφική παράσταση ενός $2^3$ πειράματος.....	56
<b>Σχήμα 5:</b> Διάγραμμα των συνιστωσών του σφάλματος μέτρησης .....	58
<b>Σχήμα 6:</b> Μέθοδοι προεπεξεργασίας που εφαρμόστηκαν.....	78
<b>Σχήμα 7:</b> Παραγωγή βιομεθανίου απο ξηρό υπόστρωμα βιομάζας αλγών .....	116
<b>Σχήμα 8:</b> Παραγωγή βιομεθανίου από νωπό υπόστρωμα βιομάζας αλγών .....	117

## Ευρετήριο Πινάκων

<b>Πίνακας 1:</b> Κύριες ομάδες μικροαλγών με βάση το χρώμα τους (Alam et al., 2012) .....	18
<b>Πίνακας 2:</b> Ιδιότητες αιθανόλης.....	39
<b>Πίνακας 3:</b> Επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις οξυγονούχων συστατικών σε βενζίνες σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό πρότυπο EN 228 .....	40
<b>Πίνακας 4:</b> Μήτρα σχεδιασμού πειραμάτων για ένα $2^2$ παραγοντικό πείραμα.....	54
<b>Πίνακας 5:</b> Μήτρα σχεδιασμού πειραμάτων για ένα $2^3$ πείραμα .....	55
<b>Πίνακας 6:</b> Βάρος ποσότητας του στερεού ανάλογα με τον τύπο δείγματος. ....	75
<b>Πίνακας 7:</b> Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για το στάδιο της προεπεξεργασίας.....	79
<b>Πίνακας 8:</b> Επίπεδα παραγοντικού σχεδιασμού.....	83
<b>Πίνακας 9:</b> Πειράματα παραγοντικού σχεδιασμού.....	83
<b>Πίνακας 10:</b> Χαρακτηρισμός της τροφοδοσίας αλγών .....	84
<b>Πίνακας 11:</b> Συγκεντρώσεις γλυκόζης σε g/L για προεπεξεργασία μέσω αυτόκλειστου για διάρκεια 72h ανά πείραμα.....	85
<b>Πίνακας 12:</b> Συγκεντρώσεις γλυκόζης σε g/L για προεπεξεργασία μέσω υδατόλουτρου για διάρκεια 72h ανά πείραμα.....	86
<b>Πίνακας 13:</b> Συγκεντρώσεις γλυκόζης σε g/L για προεπεξεργασία μέσω υπερήχων για διάρκεια 72h ανά πείραμα.....	86
<b>Πίνακας 14:</b> Αποδόσεις σακχαροποίησης για κάθε μέθοδο προεπεξεργασίας και διαλύτη .	89
<b>Πίνακας 15:</b> Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των υπολειμμάτων της ενζυμικής υδρόλυσης	91
<b>Πίνακας 16:</b> Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των πειραμάτων του παραγοντικού σχεδιασμού .....	96
<b>Πίνακας 17:</b> Συγκεντρώσεις γλυκόζης στις 0 ώρες για τα πειράματα του παραγοντικού σχεδιασμού.....	97
<b>Πίνακας 18:</b> Συγκεντρώσεις γλυκόζης στις 24 ώρες για τα πειράματα του παραγοντικού σχεδιασμού.....	97
<b>Πίνακας 19:</b> Συγκεντρώσεις αιθανόλης στις 0 ώρες για τα πειράματα του παραγοντικού σχεδιασμού.....	98
<b>Πίνακας 20:</b> Συγκεντρώσεις αιθανόλης στις 24 ώρες για τα πειράματα του παραγοντικού σχεδιασμού.....	98
<b>Πίνακας 21:</b> Συγκέντρωση και απόδοση αιθανόλης μετά τις 24 ώρες στα πειράματα του παραγοντικού σχεδιασμού.....	99
<b>Πίνακας 22:</b> Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 1 .....	99
<b>Πίνακας 23:</b> Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 2 .....	100
<b>Πίνακας 24:</b> Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 3 .....	101

<b>Πίνακας 25:</b> Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 4.....	101
<b>Πίνακας 26:</b> Επεξεργασία αποτελεσμάτων για την εύρεση του σφάλματος για απόδοση.	108
<b>Πίνακας 27:</b> Έλεγχος ομοιογένειας διασπορών. ....	108
<b>Πίνακας 28:</b> Δεδομένα υπολογισμού συντελεστών b.....	109
<b>Πίνακας 29:</b> Συντελεστές b της εξίσωσης της παραμέτρου αριστοποίησης. ....	110
<b>Πίνακας 30:</b> Η σημαντικότητα των συντελεστών των παραγόντων .....	111
<b>Πίνακας 31:</b> Υπολογισμός της διασποράς της επάρκειας. ....	112
<b>Πίνακας 32:</b> Αποτελέσματα ελέγχου επάρκειας του γραμμικού μοντέλου .....	113

## Ευρετήριο Διαγραμμάτων

<b>Διάγραμμα 1:</b> Συνολικό ποσοστό ενέργειας από Ανανεώσιμες Πηγές Ενέργειας, ανά κράτος μέλος της Ε.Ε (2021) (Eurostat, 2023).....	15
<b>Διάγραμμα 2:</b> Συγκέντρωση γλυκόζης για προεπεξεργασία μέσω αυτόκλειστου, 121°C συναρτήσει του χρόνου .....	86
<b>Διάγραμμα 3:</b> Συγκέντρωση γλυκόζης για προεπεξεργασία σε υδατόλουτρο, 90°C συναρτήσει του χρόνου.....	87
<b>Διάγραμμα 4:</b> Συγκέντρωση γλυκόζης για προεπεξεργασία σε λουτρό υπερήχων συναρτήσει του χρόνου.....	87
<b>Διάγραμμα 5:</b> Συγκεντρώσεις φαινολών ανά πείραμα μετά το πέρας των 72 ωρών ενζυμικής υδρόλυσης.....	88
<b>Διάγραμμα 6:</b> Συγκεντρώσεις πτητικών οργανικών οξέων ανά πείραμα μετά το πέρας των 72 ωρών ενζυμικής υδρόλυσης. ....	88
<b>Διάγραμμα 7:</b> Αποδόσεις σακχαροποίησης για κάθε μέθοδο προεπεξεργασίας και διαλυτή .....	89
<b>Διάγραμμα 8:</b> Ποσοστά αποικοδόμησης στερεού ανά πείραμα.....	92
<b>Διάγραμμα 9:</b> Ποσοστά αποικοδόμησης κυτταρίνης ανά πείραμα .....	93
<b>Διάγραμμα 10:</b> Ποσοστά αποικοδόμησης ημικυτταρίνης ανά πείραμα .....	93
<b>Διάγραμμα 11:</b> Ποσοστά αποικοδόμησης αμύλου ανά πείραμα.....	94
<b>Διάγραμμα 12:</b> Αποικοδομήσεις μη διαλυτού σε οξύ υπολείμματος ανά πείραμα .....	94
<b>Διάγραμμα 13:</b> Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 1 .....	100
<b>Διάγραμμα 14:</b> Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 2 .....	100
<b>Διάγραμμα 15:</b> Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 3 .....	101
<b>Διάγραμμα 16:</b> Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 4.....	102
<b>Διάγραμμα 17:</b> Απόδοση αιθανόλης στη 1 και στις 24 ώρες για τα πειράματα ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (στερεό φορτίο 10% w/w στους 35°C για 24 ώρες).....	102
<b>Διάγραμμα 18:</b> Αποικοδόμηση στερεού για τα πειράματα ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης.....	103
<b>Διάγραμμα 19:</b> Αποικοδόμηση κυτταρίνης για τα πειράματα ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης.....	103
<b>Διάγραμμα 20:</b> Αποικοδόμηση αμύλου για τα πειράματα ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης.....	104

<b>Διάγραμμα 21:</b> Αποικοδόμηση μη διαλυτού σε οξύ υπολείμματος για τα πειράματα ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης .....	104
<b>Διάγραμμα 22:</b> Απόδοση αιθανόλης για τα πειράματα 1-8 του παραγοντικού σχεδιασμού .....	105
<b>Διάγραμμα 23:</b> Μέση αποικοδόμηση στερεού για τα πειράματα 1-8 του παραγοντικού σχεδιασμού.....	105
<b>Διάγραμμα 24:</b> Μέση αποικοδόμηση κυτταρίνης για τα πειράματα του παραγοντικού σχεδιασμού.....	106
<b>Διάγραμμα 25:</b> Μέση αποικοδόμηση αμύλου για τα πειράματα 1-8 του παραγοντικού σχεδιασμού.....	106
<b>Διάγραμμα 26:</b> Μέση αποικοδόμηση μη διαλυτού σε οξύ υπολείμματος για τα πειράματα 1-8 του παραγοντικού σχεδιασμού .....	107

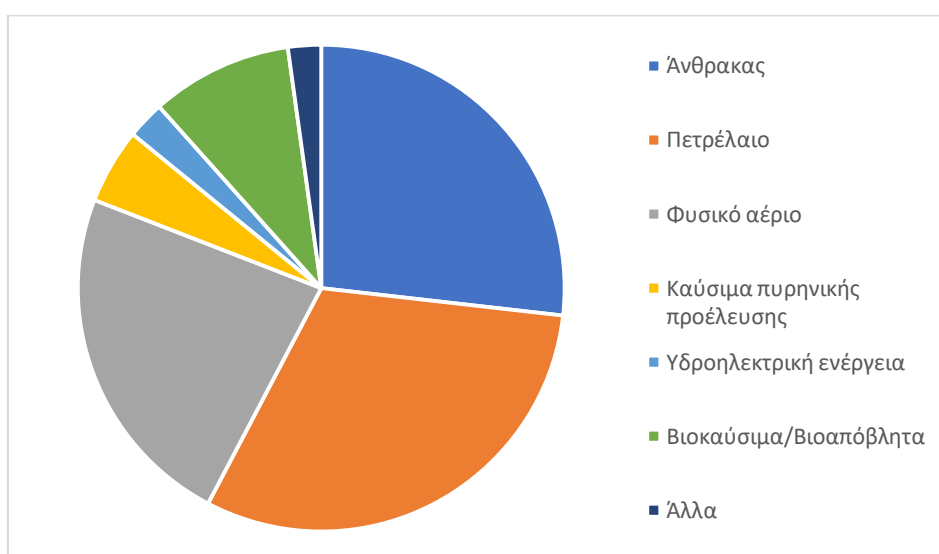
## Θεωρητικό Μέρος

### Κεφάλαιο 1: Νομοθετικό Πλαίσιο

#### 1.1 Εισαγωγή

Εδώ και χιλιάδες χρόνια, η ανθρωπότητα βασίζεται στην εκμετάλλευση των πλούσιων οργανικών πρώτων υλών που παρέχει το περιβάλλον μας, με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Αρχικά, το ξύλο αποτελούσε την κύρια πηγή ενέργειας για τον άνθρωπο, χρησιμοποιούμενο τόσο για θερμική όσο και για φωτεινή ενέργεια. Καθώς η ανθρωπότητα εξελισσόταν και διεύρυνε τις δραστηριότητές της, στράφηκε προς την εκμετάλλευση ορυκτών καυσίμων. Από την έναρξη της βιομηχανικής επανάστασης, τα ορυκτά καύσιμα ήταν η κινητήρια δύναμη πίσω από την οικονομική, κοινωνική και τεχνολογική ανάπτυξη πολλών χωρών. Ωστόσο, η υπερβολική εκμετάλλευση αυτών των πόρων και η συνεχής αύξηση των ενεργειακών αναγκών οδήγησε στην ανησυχητική εξάντληση των φυσικών αποθεμάτων ορυκτών καυσίμων. Αυτή η κατάσταση, μαζί με την αυξανόμενη ζήτηση ενέργειας στον 21ο αιώνα, εστίασε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στην αναζήτηση εναλλακτικών πηγών ενέργειας.

Με βάση μελέτες της Διεθνούς Οργάνωσης Ενέργειας για το 2019 περίπου το 80% της συνολικής πρωτογενούς ενέργειας στον κόσμο προέρχεται από ορυκτά καύσιμα, με το πετρέλαιο να αντιπροσωπεύει το 30,9%, τον άνθρακα το 26,8% και το φυσικό αέριο το 23,2% της συνολικής παγκόσμιας κατανάλωσης ενέργειας, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 1: Παγκόσμια ενεργειακή προμήθεια 2019

Η ενεργειακή στρατηγική μιας χώρας στοχεύει στην αποτελεσματικότητα, την ασφάλεια και την φιλική προς το περιβάλλον δραστηριότητα, ώστε να επιτευχθεί ένα βέλτιστο μείγμα πρώτων υλών για την παραγωγή ενέργειας. Τα ορυκτά καύσιμα θα συνεχίσουν να διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στον ενεργειακό τομέα της χώρας μας τις επόμενες δεκαετίες, ωστόσο, οι συμβατικοί ή ορυκτοί πόροι καυσίμων είναι περιορισμένοι, μη ανανεώσιμοι, ρυπογόνοι και άρα πρέπει να χρησιμοποιούνται με σύνεση.

Από την άλλη πλευρά, σε ότι αφορά ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, οι πόροι είναι μη ρυπογόνοι και σχεδόν ανεξάντλητοι. Οι πηγές αυτές μπορούν ολοένα και περισσότερο να ικανοποιήσουν τις υψηλές ενεργειακές ανάγκες της σύγχρονης εποχής με περιβαλλοντικά φιλικό και οικονομικά αποδοτικό τρόπο, ενώ ταυτόχρονα, έτσι, εξασφαλίζεται και η μείωση της εξάρτησης από την εισαγωγή ορυκτών καυσίμων και η εξασφάλιση αυτονομίας και αυτάρκειας κάθε κράτους και έτσι παρέχεται υψηλότερος βαθμός Εθνικής Ενεργειακής Ασφάλειας. Οι αναπτυσσόμενες χώρες θεωρούν τα βιοκαύσιμα ως ένα δυνητικό μέσο για την τόνωση της αγροτικής ανάπτυξης και τη δημιουργία ευκαιριών απασχόλησης εργαζομένων.

Έτσι, από το 2019 έχει τεθεί σε λειτουργία ένα συνολικότερο πλάνο αντιμετώπισης της κλιματικής αλλαγής από την Ευρωπαϊκή Ένωση (EUROPEAN GREEN DEAL), το οποίο στοχεύει στον μηδενισμό των καθαρών εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου έως το 2050, σε οικονομική ανάπτυξη αποσυνδεδεμένη από τη χρήση πόρων, ενώ υπόσχεται κανένας άνθρωπος και περιφέρεια να μη μείνουν στο περιθώριο.

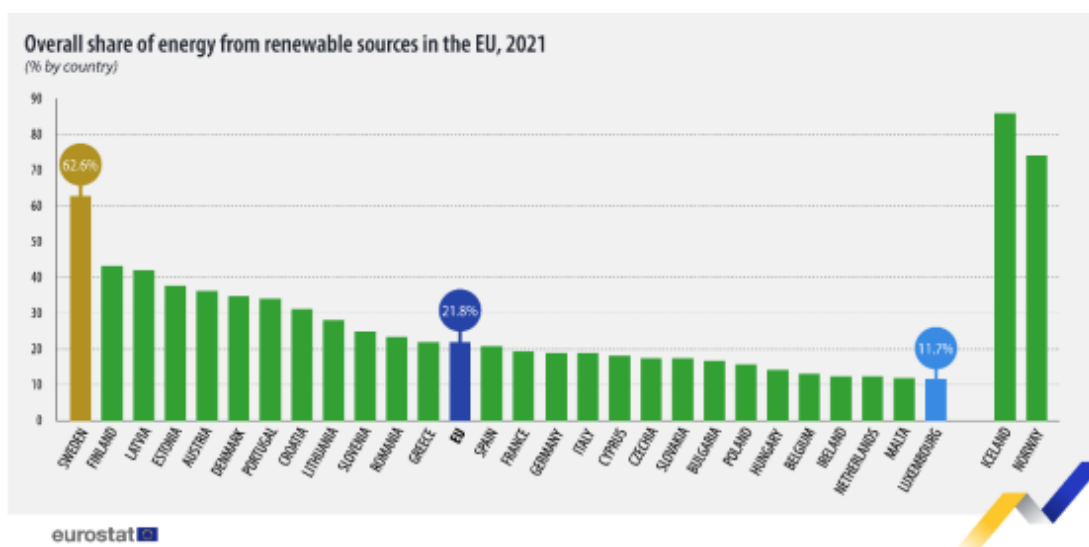
Στις μέρες μας, περισσότερο από ποτέ, η ανάγκη για στροφή προς μορφές ενέργειας όπως η βιομάζα γίνεται φανερό αν αναλογιστεί κανείς την διαρκώς αυξανόμενη τιμή του αργού πετρελαίου, τα προβλήματα στην διακίνηση του φυσικού αερίου στην Ευρώπη λόγω των πολιτικών συνθηκών αλλά και το σημαντικότερο όλων, την κλιματική αλλαγή, οι επιπτώσεις της οποίας είναι πιο φανερές από ποτέ. Το πλαίσιο αυτό, ωστόσο συνδέεται άμεσα με την αγορά των βιοκαυσίμων, καθώς το πρόβλημα της κλιματικής αλλαγής έθεσε σε εφαρμογή πληθώρα νέων προσεγγίσεων και προώθησε την ανάπτυξη της βιομάζας σε σημείο, όπου η βιομηχανία βιοκαυσίμων θεωρήθηκε ως η λύση της ενεργειακής ανασφάλειας. Ορισμένες χώρες καταργούν τους ειδικούς φόρους κατανάλωσης καυσίμων, παρέχοντας πιστώσεις συμψηφισμού σε παραγωγούς εναλλακτικών καυσίμων ή απαλλάσσουν τους φόρους για οχήματα ικανά να λειτουργούν με βιοκαύσιμα. Ενώ άλλες απαλλάσσονται από τους ειδικούς φόρους κατανάλωσης των καυσίμων ή και συνδέουν τους φορολογικούς συντελεστές με τις περιβαλλοντικές επιδόσεις συγκεκριμένων καυσίμων, διαφοροποιώντας τους παραγωγούς και τις πρώτες ύλες. Η αύξηση του ενδιαφέροντος ενασχόλησης και παραγωγής καυσίμων από ανανεώσιμες πηγές, οφείλεται λοιπόν, στα παραπάνω φορολογικά κίνητρα καθώς και στο γεγονός ότι οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι ευρείς και ποικίλοι. Οι διάφορες χώρες έχουν υιοθετήσει διαφορετικούς τρόπους για να περάσουν στη χρήση των βιοκαυσίμων, καθώς το κόστος κάθε βιοκαυσίμου ποικίλλει ανάλογα με την τοποθεσία και το είδος βιομάζας που χρησιμοποιείται.

## 1.2 Νομοθετικό πλαίσιο για τα βιοκαύσιμα

Οι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας (αιολική ενέργεια, ηλιακή ενέργεια, υδροηλεκτρική ενέργεια, ενέργεια από τους ωκεανούς, γεωθερμική ενέργεια, βιομάζα και βιοκαύσιμα) αποτελούν εναλλακτικές λύσεις αντί των ορυκτών καυσίμων και συμβάλλουν στη μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου, στη διαφοροποίηση του ενεργειακού εφοδιασμού και στη μείωση της εξάρτησης από αναξιόπιστες και ασταθείς αγορές ορυκτών καυσίμων, ειδικότερα πετρελαίου και φυσικού αερίου. Η νομοθεσία της ΕΕ για την προώθηση των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας έχει εξελιχθεί σημαντικά κατά τα τελευταία 15 έτη.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) έθεσε ως στόχο, το 2001, την κάλυψη του 12% της κατανάλωσης ενέργειας και του 22,1% της κατανάλωσης ηλεκτρικής ενέργειας με ενέργεια από

ανανεώσιμες πηγές έως το 2010, με ενδεικτικούς στόχους για κάθε κράτος μέλος που ορίζονται στην οδηγία 2001/77/ΕΚ. Ωστόσο, η έλλειψη προόδου στην επίτευξη των στόχων του 2010 οδήγησε στην έγκριση πληρέστερου νομοθετικού πλαισίου. Τον Δεκέμβριο του 2018, τέθηκε σε ισχύ η αναθεωρημένη οδηγία για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας RED II (Οδηγία ΕΕ, 2018/2001), στο πλαίσιο της δέσμης μέτρων «Καθαρή ενέργεια για όλους τους Ευρωπαίους», η οποία αποσκοπεί στο να παραμείνει η ΕΕ παγκόσμιος ηγέτης στον τομέα των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας και στοχεύει στο να βοηθήσει την ΕΕ να εκπληρώσει τις δεσμεύσεις της για μείωση των εκπομπών στο πλαίσιο της συμφωνίας του Παρισιού. Η αρχική οδηγία για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, (οδηγία 2009/28/ΕΚ) ορίζει ότι ένα υποχρεωτικό μερίδιο 20% της κατανάλωσης ενέργειας στην ΕΕ πρέπει, έως το 2020, να καλύπτεται από ΑΠΕ. Παράλληλα, όλα τα κράτη μέλη πρέπει να καλύπτουν το 10% των καυσίμων μεταφορών τους από ΑΠΕ έως το 2020. Η νέα οδηγία θεσπίζει έναν νέο δεσμευτικό στόχο για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας για την ΕΕ με ορίζοντα το 2030. Τουλάχιστον το 32% της τελικής καταναλισκόμενης ενέργειας πρέπει να προέρχεται από Α.Π.Ε., με μια ρήτρα για πιθανή προς τα άνω αναθεώρηση έως το 2023. Η οδηγία προσδιορίζει επίσης διάφορους μηχανισμούς που μπορούν να εφαρμόσουν τα κράτη μέλη για να επιτύχουν τους στόχους τους (καθεστώς στήριξης, εγγυήσεις προέλευσης, κοινά έργα, συνεργασία μεταξύ κρατών μελών και τρίτων χωρών), καθώς και κριτήρια βιωσιμότητας για τα βιοκαύσιμα.



**Διάγραμμα 1:** Συνολικό ποσοστό ενέργειας από Ανανεώσιμες Πηγές Ενέργειας, ανά κράτος μέλος της Ε.Ε (2021) (Eurostat, 2023)

Η οδηγία RED II ορίζει ορισμένα σημαντικά κριτήρια σχετικά με τα βιοκαύσιμα. Πιο συγκεκριμένα:

- Παρόλο που δεν περιλάμβανε αρχικά υποστόχους σχετικά με τις μεταφορές, στην πορεία ορίστηκε ότι τα κράτη μέλη πρέπει να απαιτούν από τους προμηθευτές καυσίμων να παρέχουν τουλάχιστον το 14% της ενέργειας που καταναλώνεται στις οδικές και σιδηροδρομικές μεταφορές έως το 2030 ως ανανεώσιμη ενέργεια.
- Παράλληλα, ορίζονται διάφορα κριτήρια σχετικά με την βιωσιμότητα και με τις εκπομπές GHGs (Greenhouse Gases) με τα οποία πρέπει να συμμορφώνονται τα βιοκαύσιμα που χρησιμοποιούνται στις μεταφορές. Ορισμένα από αυτά τα κριτήρια είναι τα ίδια όπως στο αρχικό RED, ενώ άλλα είναι νέα ή αναδιατυπωμένα.

Ειδικότερα, η RED II εισάγει την αειφορία για τις πρώτες ύλες δασοκομίας, καθώς και κριτήρια GHG για στερεά και αέρια καύσιμα βιομάζας.

- Ενώ διατηρείται το ισχύον ανώτατο όριο του 7% για τα βιοκαύσιμα σε οδικές και σιδηροδρομικές μεταφορές, εισάγεται μια υποχρέωση σε επίπεδο ΕΕ για τους προμηθευτές καυσίμων να παρέχουν ένα ορισμένο ποσοστό (6,8%) καυσίμων χαμηλών εκπομπών και ανανεώσιμων καυσίμων, και μια επέκταση του πεδίου εφαρμογής των κριτηρίων βιωσιμότητας της ΕΕ για τη βιοενέργεια (ώστε να καλύπτουν τη βιομάζα και το βιοαέριο για την παραγωγή θερμότητας, ψύξης και ηλεκτρικής ενέργειας).
- Μια ακόμη πρόταση οδηγίας στα πλαίσια του σχεδίου REPowerEU για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας είναι πως ορίστηκε στόχος σχετικά με τα με προηγμένα βιοκαύσιμα και το βιοαέριο, τα οποία έχουν ως στόχο μερίδιο 2,2 % των έως το 2030 και ενδιάμεσο στόχο 0,5 % έως το 2025.

Το 2021, η ενέργεια από ανανεώσιμες πηγές αντιπροσώπευε το 21,8 % της ακαθάριστης τελικής κατανάλωσης ενέργειας της ΕΕ. Το 2023, οι συννομοθέτες αύξησαν τον στόχο της ΕΕ για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας για το 2030 στο 42,5 %, με στόχο την επίτευξη ποσοστού 45 %. Αναλυτικότερα, στις 9 Οκτωβρίου 2023, το Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης ενέκρινε την τροποποιημένη οδηγία για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας ("RED III"), η οποία αποτελεί μέρος της δέσμης μέτρων "Fit for 55" .

Ενώ η European Green Deal (EGD) αντιπροσωπεύει ένα γενικό σχέδιο δράσης για την καταπολέμηση της κλιματικής αλλαγής, η δέσμη μέτρων Fit for 55 προσφέρει την προπαρασκευαστική πορεία για την επίτευξη των στόχων της EGD. Πιο συγκεκριμένα, το Fit for 55 επικεντρώνεται σε συγκεκριμένα θέματα που χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής και χρειάζονται μια ισχυρή πράσινη μετάβαση για την επίτευξη κλιματικής ουδετερότητας. Ειδικότερα, η δέσμη αυτή στοχεύει στη μείωση κατά 55% των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου έως το 2030 (σε σύγκριση με τα επίπεδα του 1990).

Οι πρωταρχικοί στόχοι της δέσμης μέτρων περιλαμβάνουν:

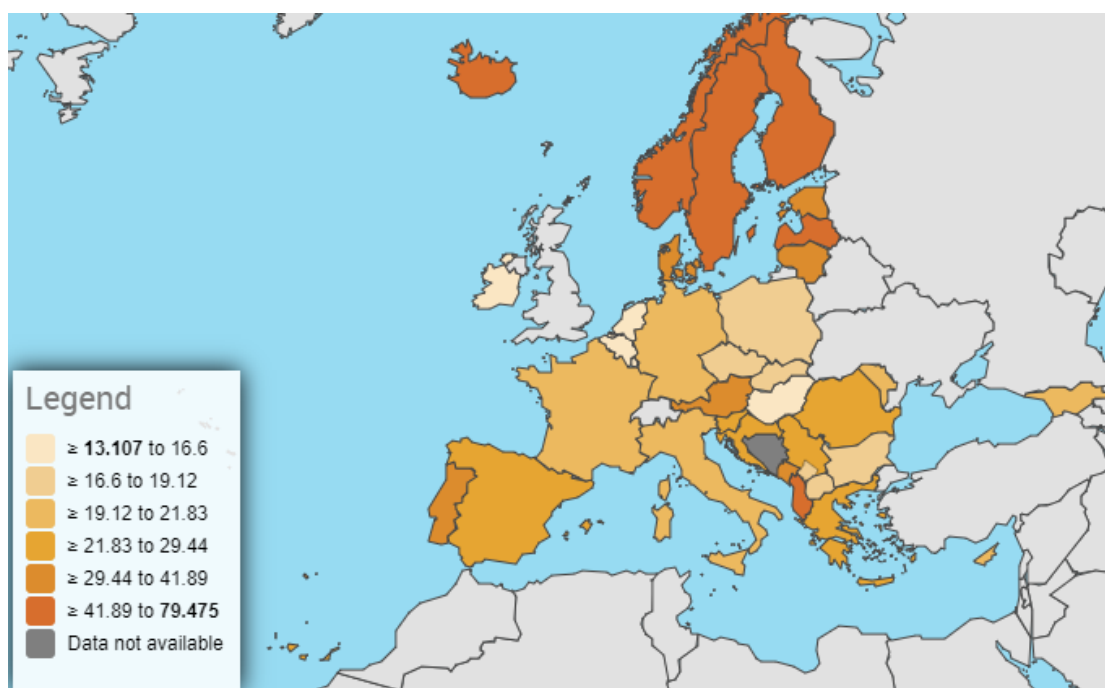
- Εγγύηση της περιβαλλοντικής ακεραιότητας και αντιμετώπιση της αλληλεγγύης
- Το σύστημα εμπορίας εκπομπών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (European Union Emissions Trading System) θα αυστηροποιηθεί και θα ενισχυθεί, συμβάλλοντας στη διασφάλιση του καταμερισμού των προσπαθειών με σχετικούς στόχους
- Πρόσθετες πολιτικές θα συμβάλουν στη διασφάλιση της εφαρμογής των τιμών άνθρακα.
- Όλα τα έσοδα από την τιμολόγηση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα στοχεύουν να επηρεάσουν θετικά τους τελικούς καταναλωτές.

Η RED III αποσκοπεί στην αύξηση του μεριδίου των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας στη συνολική ενεργειακή κατανάλωση της ΕΕ σε 42,5% έως το 2030, με περαιτέρω ενδεικτικό στόχο το 2,5%. Η οδηγία εισάγει επίσης ειδικούς στόχους για τα κράτη μέλη στους τομείς της βιομηχανίας, των μεταφορών και των κτιρίων (τηλεθέρμανση και τηλεψύξη).

Στις 12 Σεπτεμβρίου 2023, η RED III εγκρίθηκε από το Κοινοβούλιο. Η προηγούμενη έκδοση της οδηγίας (RED II) τέθηκε σε ισχύ το 2018 και είναι νομικά δεσμευτική από τον Ιούνιο του 2021. Τον Ιούλιο του 2021, η Επιτροπή πρότεινε άλλη μια αναθεώρηση της οδηγίας, αυξάνοντας τον στόχο για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας για το 2030 από 32% σε



40%. Λιγότερο από ένα χρόνο αργότερα, μετά την εισβολή της Ρωσίας στην Ουκρανία και την ανάγκη επιτάχυνσης της ανεξαρτησίας της ΕΕ από τα ορυκτά καύσιμα, η Επιτροπή πρότεινε την περαιτέρω αύξηση του στόχου στο 45% έως το 2030. Το κείμενο που εγκρίθηκε από το Κοινοβούλιο και το Συμβούλιο αντικατοπτρίζει την πολιτική συμφωνία που επιτεύχθηκε στις 30 Μαρτίου 2023.



**Σχήμα 2:** Γραφική Αναπαράσταση στον Ευρωπαϊκό χάρτη του ποσοστού της τελικής Ενέργειας που προέρχεται από Α.Π.Ε., ανά κράτος μέλος της Ε.Ε (2022) (Eurostat, 2022)

## Κεφάλαιο 2: Άλγη

### 2.1 Εισαγωγικά στοιχεία για τα άλγη

Τα άλγη αναγνωρίζονται ως μία από τις αρχαιότερες μορφές ζωής στον πλανήτη μας. Τα μικροάλγη ανήκουν συνήθως στην πρωτόγονη κατηγορία φυτών και αποτελούν μέλος των θαλλόφυτων. Αυτά τα φυτά δεν είναι ισχυρά σε ρίζες, φύλλα και βλαστό, δεν παρουσιάζουν καμία στείρα κάλυψη των κυττάρων γύρω ή δίπλα από τα αναπαραγωγικά κύτταρα και θεωρούνται ως βασική φωτοσυνθετική χρωστική ουσία. Η δομή των αλγών χρησιμοποιείται βασικά για την παραγωγή ενέργειας χωρίς κανενός είδους ανάπτυξη (Biswal et al., 2024).

Τα άλγη αντιπροσωπεύουν μια τεράστια ποικιλία φωτοσυνθετικών ειδών που ζουν σε ποικίλα περιβάλλοντα. Μπορεί να είναι αυτότροφα ή ετερότροφα. Τα αυτότροφα άλγη χρησιμοποιούν τη φωτοσύνθεση για να αξιοποιήσουν το ηλιακό φως και να αποσπάσουν τον ανόργανο άνθρακα από το ατμοσφαιρικό διοξείδιο του άνθρακα, ο οποίος στη συνέχεια αφομοιώνεται με τη μορφή αποθεμάτων τροφής, όπως οι υδατάνθρακες. Από την άλλη, υπάρχουν πολλά είδη αλγών που είναι ετερότροφα και είναι σε θέση να προσλαμβάνουν μικρά οργανικά μόρια στο περιβάλλον και να τα μετατρέπουν σε δομικά συστατικά τους, δηλαδή κυρίως λιπαρά έλαια και πρωτεΐνες. Υπάρχουν ορισμένα είδη αλγών που μπορούν να χρησιμοποιήσουν είτε ανόργανο άνθρακα από την ατμόσφαιρα ή οργανικό άνθρακα από το περιβάλλον, τα οποία αποκαλούνται μικτότροφα. Μέσω οποιασδήποτε από τις τρεις διαδικασίες, τα άλγη μπορούν να παράγουν υδατάνθρακες, λιπίδια και πρωτεΐνες σε

σύντομο χρονικό διάστημα, τα οποία δύναται στη συνέχεια να επεξεργαστούν για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Ορισμένα άλγη μπορούν να οδηγήσουν στη παραγωγή αιθανόλης κατά τη διάρκεια αναερόβιων σκοτεινών συνθηκών, χρησιμοποιώντας τα φωτοσυνθετικά τους στοιχεία (John et al., 2011). Το άμυλο των αλγών, η κυτταρίνη ή άλλοι υδατάνθρακες που συσσωρεύονται μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή αιθανόλης μετά από υδρόλυση.

Γενικά, τα άλγη ομαδοποιούνται σε δύο κατηγορίες, τα μικροάλγη και τα μακροάλγη, με βάση τη μορφολογία και το μέγεθός τους. Όπως υποδηλώνει η ονομασία, τα μικροάλγη είναι μικροσκοπικοί φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, πολλοί από τους οποίους είναι μονοκύτταροι. Απαντώνται φυσικά στο γλυκό νερό και στο θαλάσσιο περιβάλλον και βρίσκονται στο κάτω μέρος των τροφικών αλυσίδων. Υπάρχουν περισσότερα από 300.000 είδη μικροαλγών, η ποικιλομορφία των οποίων είναι πολύ μεγαλύτερη από τα φυτά (Alam et al., 2012). Αντίθετα, τα μακροάλγη, όπως για παράδειγμα οι κέλπιες, αποτελούνται από πολλαπλά κύτταρα τα οποία οργανώνονται σε δομές που μοιάζουν με ρίζες, στελέχη και φύλλα ανώτερων φυτών (Chen et al., 2009). Επιπροσθέτως, τα μικροάλγη ταξινομούνται ανάλογα με το χρώμα τους. Τα τρέχοντα συστήματα ταξινόμησης των μικροαλγών βασίζονται α) στα είδη των χρωστικών ουσιών, β) στη χημική φύση των προϊόντων αποθήκευσης και γ) στα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Λαμβάνονται επίσης υπόψη ορισμένα πρόσθετα κριτήρια που περιλαμβάνουν κυτταρολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά: εμφάνιση μαστιγωτών κυττάρων, δομή των μαστίγιων, σχήμα και πορεία της πυρηνικής και κυτταρικής διαίρεσης, παρουσία περιβλήματος ενδοπλασματικού δικτύου γύρω από τον χλωροπλάστη και πιθανή σύνδεση μεταξύ του ενδοπλασματικού δικτύου και της πυρηνικής μεμβράνης. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ορισμένες κύριες ομάδες μικροαλγών που ταξινομούνται με βάση το χρώμα

**Πίνακας 1:** Κύριες ομάδες μικροαλγών με βάση το χρώμα τους (Alam et al., 2012)

	Χρώμα	Ομάδα
1	Yellow-green algae	Xanthophyceae
2	Red algae	Rhodophyceae
3	Golden algae	Chrysophyceae
4	Green algae	Chlorophyceae
5	Brown algae	Phaeophyceae
6	Cyanobacteria	Cyanophyceae

## 2.2 Ιδιότητες αλγών για την δυνατότητα παραγωγής βιοκαυσίμων.

Υπάρχουν διάφορα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που καθιστούν τα άλγη υποψήφια για την παραγωγή ανανεώσιμης βιοαιθανόλης. Τα άλγη έχουν υψηλή απόδοση φωτοσύνθεσης και μπορούν να συνθέτουν και να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες βιομάζας πλούσιας σε υδατάνθρακες για την παραγωγή βιοαιθανόλης, από φθηνές πρώτες ύλες. Τα μικροάλγη μπορούν να ανεχθούν και να αξιοποιήσουν σημαντικά υψηλά επίπεδα CO<sub>2</sub>. Ως εκ τούτου, μπορούν να χρησιμοποιήσουν το CO<sub>2</sub> που εκπέμπεται από σταθμούς ηλεκτροπαραγωγής με βάση το πετρέλαιο ή άλλες βιομηχανικές πηγές, γεγονός που στη συνέχεια μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου. Λόγω των δομικών διαφορών μεταξύ αλγών και χερσαίων φυτών, τα άλγη είναι ικανά να παράγουν υψηλές αποδόσεις αποθηκευμένου υλικού σε σύγκριση με τα πιο παραγωγικά χερσαία φυτά. Τα δάση αλγών σε

ρηχές παλλιροϊκές περιοχές είναι από τις πιο παραγωγικές κοινότητες στη γη, παράγοντας μεγάλες ποσότητες οργανικού άνθρακα. Τα θαλάσσια άλγη μπορούν να παρέχουν τεράστια ποσότητα υδατανθράκων όλο το χρόνο. Επιπλέον, τα κύτταρα των αλγών καλλιεργούνται σε σύντομο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με άλλες πρώτες ύλες και, ως εκ τούτου, μπορούν να καλύψουν την αυξανόμενη ζήτηση πρώτων υλών για την παραγωγή αιθανόλης. Τα άλγη έχουν απλές απαιτήσεις ανάπτυξης, μπορούν να αναπτυχθούν σε υψηλές πυκνότητες και χρησιμοποιούν αποτελεσματικά το φως, το διοξείδιο του άνθρακα και άλλα ανόργανα θρεπτικά συστατικά (John et al., 2011). Η τεχνολογία μπορεί να χρησιμοποιήσει θαλάσσια ή ερημική γη αντί για γεωργική γη. Υπάρχουν ορισμένα είδη μικροαλγών των οποίων η μάζα διπλασιάζεται μέσα σε μία ημέρα. Ο συντομότερος χρόνος διπλασιασμού της βιομάζας είναι περίπου 3-4 ώρες, γεγονός που τεκμηριώνει τα μικροάλγη ως πρότυπη ανανεώσιμη πηγή για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Υπολογίστηκε ότι με βιομάζα από άλγη δύναται να παραχθούν 22712 λίτρα αιθανόλης ανά στρέμμα ετησίως, ποσότητα εμφανώς μεγαλύτερη από την αιθανόλη από καλαμπόκι που έχει ρυθμό μόνο 1514 λίτρα αιθανόλης ανά στρέμμα ετησίως.

### 2.3 Καλλιέργεια και συγκομιδή μικροαλγών

Οι μηχανισμοί παραγωγής αλγών, οι οποίοι ακολουθούν τις φυσικές διαδικασίες ανάπτυξης, συνοψίζονται στις φωτοαυτότροφες, ετερότροφες και μικτότροφες παραγωγές. Η φωτοαυτότροφη παραγωγή είναι η αυτότροφη φωτοσύνθεση, η ετερότροφη παραγωγή απαιτεί οργανικές ουσίες (π.χ. γλυκόζη) για την τόνωση της ανάπτυξης, ενώ ορισμένα στελέχη αλγών μπορούν να συνδυάσουν την αυτότροφη φωτοσύνθεση και την ετερότροφη αφομοίωση οργανικών ενώσεων σε μια μικτοτροφική διαδικασία.

#### 2.3.1 Φωτοαυτότροφη παραγωγή

Αυτό το είδος καλλιέργειας μικροαλγών πραγματοποιείται γενικά όταν τα άλγη σχηματίζουν υδατάνθρακες χρησιμοποιώντας ανόργανο άνθρακα και το φως του ήλιου μέσω της φωτοσυνθετικής διαδικασίας. Η μέθοδος αυτή είναι η πιο ευρεία μέθοδος που χρησιμοποιείται για καλλιέργεια αλγών που οδηγεί στην παραγωγή κυττάρων αλγών με συγκέντρωση λιπιδίων που κυμαίνεται από 5 έως 68%. Αυτό εξαρτάται επίσης από τους τύπους των ειδών αλγών που καλλιεργούνται. Η καλλιέργεια αλγών γίνεται γενικά για την παραγωγή ελαίου. Ως εκ τούτου, τα βασικά οφέλη από τη χρήση αυτής της τεχνικής απαντώνται στη χρήση CO<sub>2</sub> για την κάλυψη της ανάγκης για άνθρακα. Σύμφωνα με μελέτες, αυτή η τεχνολογία αποτελεί την μόνη διαδικασία που είναι οικονομικά και τεχνολογικά βιώσιμη για την παραγωγή βιομάζας από άλγη σε εμπορική βάση μεγάλης κλίμακας. Τα συστήματα που έχουν οργανωθεί βασίζονται κυρίως σε κλειστούς φωτοβιοαντιδραστήρες και τεχνολογίες ανοικτών λιμνών (Noreña-Caro & Benton, 2018).

##### 2.3.1.1 Συστήματα παραγωγής ανοιχτής λίμνης

Η καλλιέργεια μικροαλγών σε συστήματα ανοιχτής λίμνης έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει γενικά υιοθετηθεί από τη δεκαετία του 1950 (Brennan & Owende, 2010). Τα συστήματα ανοιχτής λίμνης περιλαμβάνουν φυσικές λίμνες, κυκλικές τεχνητές λίμνες, αυλακοειδείς τεχνητές λίμνες και κεκλιμένα συστήματα.

Τα κυριότερα είδη αλγών που καλλιεργούνται σε αυτό το σύστημα περιλαμβάνουν την σπιρουλίνα (*Spirulina*), τη χλωρέλλα (*Chlorella*) και τη *Dunaliella*.

Η σπιρουλίνα είναι συνήθως ένα νηματοειδές είδος κυανοβακτηρίου που αναπτύσσεται σε αλκαλικές λίμνες, εδάφη, αλατούχα, γλυκά νερά, και υφάλμυρα λύματα. Μετατρέπει τα θρεπτικά συστατικά σε κυτταρικές ουσίες και απελευθερώνει O<sub>2</sub> με τη διαδικασία της

φωτοσύνθεσης. Χρειάζεται νερό μαζί με άνθρακα, N, P, Fe, K και ορισμένα χρήσιμα ιχνοστοιχεία για την επιβίωση και την ανάπτυξη.

Τα μικροάλγη (γένος *Chlorella*) συνήθως συνθέτουν εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά υλικά, συμπεριλαμβανομένων υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπιδίων. Παρουσιάζουν πολλαπλά οφέλη σε σχέση με ανώτερα φυτά, συμπεριλαμβανομένης της υψηλότερης % απόδοσης προϊόντων βιομάζας και υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης χωρίς τη χρήση καλλιεργήσιμης γης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν δυνητικά ως πηγή θρεπτικών συστατικών από τα λύματα.

Τα μικροάλγη που εξάγονται από το γένος *Dunaliella* καλλιεργούνται λόγω της εξαιρετικής αντιοξειδωτικής τους δραστηριότητας μαζί με τον εμπλουτισμό τους σε β-καροτένιο, τα οποία έχουν την ικανότητα να συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια στρεσογόνων συνθηκών ανάπτυξης όπως η αυξημένη θερμοκρασία και η υψηλή αλατότητα. Τα μικροάλγη συνθέτουν αξιολογούμενες ποσότητες πρωτεϊνών, γλυκερίνης και λιπιδίων (Biswal et al., 2024).

Τα πλεονεκτήματα αυτών των συστημάτων είναι ο απλός σχεδιασμός, το χαμηλό κόστος κατασκευής, η υψηλή παραγωγική ικανότητα και το γεγονός ότι η διαδικασία λειτουργεί γενικά με χαμηλή απαίτηση ενέργειας μαζί με χαμηλότερο λειτουργικό κόστος και αρχική επένδυση. Είναι πιο εύκολο να κατασκευαστούν και να λειτουργήσουν από τα περισσότερα κλειστά συστήματα. Όμως, η δυνατότητα ελέγχου των καταστάσεων καλλιέργειας και της ρύπανσης σε αυτούς τους βιοαντιδραστήρες είναι περιορισμένη, καθώς τα συστήματα της ανοικτής λίμνης είναι επιρρεπή στις καιρικές συνθήκες και δεν παρέχεται κανένας έλεγχος στις συνθήκες καλλιέργειας. Έτσι, η επιτυχία των συστημάτων αυτών οφείλεται στις κλιματολογικές συνθήκες. Είναι σημαντικό να παρέχονται οι κατάλληλες κλιματολογικές συνθήκες όπως και τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των μικροαλγών στις λίμνες αυτές. Αν και τα συστήματα αυτά δεν απαιτούν υψηλό κόστος συντήρησης η χρήση τους για εμπορική παραγωγή περιορίζεται λόγω της δυσκολίας τους στις προσμείξεις. Επιπλέον, υπάρχουν πιθανότητες μόλυνσης από άλλα είδη αλγών και από πρωτόζωα. Άλλα μειονεκτήματα που σχετίζονται με τα συστήματα αυτά είναι οι απώλειες λόγω εξάτμισης, η διάχυση του CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα, η απαίτηση των μεγάλων περιοχών γης, η αναποτελεσματικότητα της ανάμειξης, η χαμηλή ταχύτητα μεταφοράς μάζας, η χαμηλή παραγωγή βιομάζας, η ανεξέλεγκτη ένταση φωτός και η μη σταθερή διακύμανση της θερμοκρασίας (Chaumont, 1993; Kiran et al., 2014).

Τα συστήματα ανοικτών λιμνών διακρίνονται σε τρεις τύπους: αυλακοειδής λίμνη (raceway pond), κυκλική λίμνη και κεκλιμένη λίμνη - ανάλογα με το μέγεθος, το σχήμα, τον τύπο ανάδευσης και την ανάμιξη.

Οι αυλακοειδείς λίμνες είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο τεχνητό σύστημα. Συνήθως αποτελούνται από ένα κλειστό βρόχο, κανάλια με οβάλ σχήμα ανακυκλοφορίας με βάθος συνήθως μεταξύ 0,2 και 0,5 m, με ανάμιξη και κυκλοφορία που απαιτούνται για τη σταθεροποίηση της ανάπτυξης και της παραγωγικότητας των αλγών. Οι αυλακοειδείς λίμνες κατασκευάζονται συνήθως από σκυρόδεμα, αλλά έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί συμπίεσμένες χωμάτινες λίμνες με λευκό πλαστικό. Σε έναν συνεχή κύκλο παραγωγής, ο ζυμός των αλγών και τα θρεπτικά συστατικά εισάγονται μπροστά από τον φτερωτό τροχό (Σχήμα 1) και κυκλοφορούν μέσω του βρόχου προς το σημείο εξαγωγής της συγκομιδής. Ο φτερωτός τροχός βρίσκεται σε συνεχή λειτουργία για να αποτρέπει την καθίζηση. Η απαίτηση των μικροαλγών σε CO<sub>2</sub> ικανοποιείται από τον επιφανειακό αέρα, αλλά υπάρχει η δυνατότητα προσθήκης βυθισμένων αεριστήρων ώστε να ενισχυθεί η απορρόφηση CO<sub>2</sub>.



**Εικόνα 1:** Αυλακοειδής λίμνη

Η μεγαλύτερη αυλακοειδής λίμνη παραγωγής βιομάζας βρίσκεται στην Calipatria στις ΗΠΑ όπου καλλιεργείται η σπιρουλίνα. Αυτή η λίμνη καταλαμβάνει μια έκταση 440.000 τ.μ (Sroloare et al., 2006). Ενώ οι αυλακοειδείς λίμνες έχουν σχετικά χαμηλό κόστος κεφαλαίου και συντήρησης, οι κυκλικές λίμνες είναι λιγότερο επιθυμητές λόγω της δαπανηρής κατασκευής από σκυρόδεμα, της υψηλής κατανάλωσης ενέργειας για την ανάδευση, της μηχανικής πολυπλοκότητας της παροχής CO<sub>2</sub> και της ανεπαρκούς χρήσης γης. Όσον αφορά την παραγωγικότητα της βιομάζας, τα συστήματα ανοικτών λιμνών είναι λιγότερο αποτελεσματικά σε σύγκριση με τους κλειστούς φωτοβιοαντιδραστήρες (Brennan & Owende, 2010).



**Εικόνα 2:** Καλλιέργεια Spirulina στην Calipatria, California, USA

#### 2.3.1.2 Σύστημα κλειστών Φωτοβιοαντιδραστήρων (PBR)

Ένας βιοαντιδραστήρας που έχει ενσωματώσει διάφορους τύπους φωτεινών πηγών ώστε να παρέχει φωτεινή ενέργεια κατά τη λειτουργία του, καλείται φωτοβιοαντιδραστήρας. Με



μία γενική ματιά πρόκειται για ένα φωτιζόμενο σκεύος που ενισχύει τη παραγωγή και τη καλλιέργεια βιομαζών σε συνθήκες ελεγχόμενες σε αντίθεση με τα ανοιχτά συστήματα. Επίσης γίνονται απόπειρες για τον σχεδιασμό φωτοβιοαντιδραστήρων όσο το δυνατόν φιλικότερων οικονομικά για την καλλιέργεια αλγών με στόχο τη παραγωγή βιοαιθανόλης. Υπάρχουν τρεις τύποι κλειστών φωτοβιοαντιδραστήρων: οι σωληνοειδείς οι επίπεδης πλάκας, και οι φωτοβιοαντιδραστήρες σε στήλη.

Οι κλειστοί φωτοβιοαντιδραστήρες μπορεί να είναι πλάκες, σωλήνες ή σακούλες από βυαλί, πλαστικό ή άλλα διαφανή υλικά, μέσα στα οποία τα άλγη αναπτύσσονται με θρεπτικά συστατικά, φως και διοξείδιο του άνθρακα. Ο κλειστός φωτοβιοαντιδραστήρας θα μπορούσε να είναι μια τεχνολογία που απομακρύνει ορισμένα από τα κύρια προβλήματα που σχετίζονται με τα συστήματα παραγωγής σε ανοικτές λίμνες. Επίσης, παρουσιάζει μεγαλύτερη απόδοση στη παραγωγή βιομάζας από άλγη απ' ότι τα συστήματα ανοιχτής λίμνης. Ακόμα, ελαχιστοποιούνται οι πιθανότητες εξωτερικής ρύπανσης και οι απειλές μόλυνσης Ωστόσο, επί του παρόντος, περίπου 100 τόνοι ετησίως, δηλαδή το 10% της βιομάζας μικροαλγών, προέρχονται από κλειστούς φωτοβιοαντιδραστήρες, ενώ το μεγαλύτερο κλάσμα καλλιεργείται σε ανοικτές λίμνες. (Bibi et al., 2017). Τα συστήματα αυτά είναι πιο κατάλληλα για ταξινομημένα στελέχη αλγών, καθώς το κλειστό σχήμα καθιστά ευκολότερο τον έλεγχο της πιθανής ρύπανσης. Μόνο λίγοι από αυτούς τους βιοαντιδραστήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν πρακτικά για μεγάλη καλλιέργεια αλγών λόγω του υψηλού κόστους εξοπλισμού και υποστρώματος. Αναλυτικότερα, παράγοντες όπως η ψύξη, η ανάμιξη και ο έλεγχος της συσσώρευσης οξυγόνου και ακαθαρσιών καθιστούν τα συστήματα αυτά πιο ακριβά για την κατασκευή και την λειτουργία τους από τα ανοιχτά συστήματα (Ugwu et al., 2008).

- Οι φωτοβιοαντιδραστήρες επίπεδης πλάκας παρουσιάζουν μεγάλη ερευνητική προσοχή λόγω της μεγάλης επιφάνειας που εκτίθεται στο φωτισμό καθώς και των υψηλών πυκνοτήτων φωτοαυτότροφων κυττάρων (μεγαλύτερη από 80g/L). Η κατασκευή τους, επιτρέπει τη διέλευση και τη δέσμευση του ηλιακού φωτός και κατά μήκος της πλάκας δημιουργείται ένα λεπτό στρώμα πυκνής καλλιέργειας που επιτρέπει την απορρόφηση της ακτινοβολίας στα πρώτα χιλιοστά πάχους. Οι φωτοβιοαντιδραστήρες επίπεδης πλάκας είναι επίσης κατάλληλοι για μαζικές καλλιέργειες αλγών λόγω της χαμηλής συσσώρευσης διαλυμένου οξυγόνου και της υψηλής φωτοσυνθετικής απόδοσης που επιτυγχάνεται.
- Οι σωληνοειδείς φωτοβιοαντιδραστήρες παγιδεύουν την ηλιακή ενέργεια. Είναι ευθυγραμμισμένοι οριζόντια, κεκλιμένα, κάθετα ή ελικοειδώς. Οι σωλήνες του αντιδραστήρα έχουν συνήθως διάμετρο 0,1m ή μικρότερη. Τα άλγη, λοιπόν, μπορούν να καλλιεργηθούν είτε μέσω ενός συστήματος αερομεταφοράς είτε μέσω μηχανικής άντλησης. Οι πρώτες διεργασίες επιτρέπουν την ανταλλαγή  $O_2$  και  $CO_2$  μεταξύ του αερίου και του υγρού μέσου, γεγονός που υποδηλώνει έναν κατάλληλο μηχανισμό ανάμιξης. Ακόμα, θεωρούνται πιο κατάλληλοι για υπαίθριες μαζικές καλλιέργειες, καθώς εκθέτουν μεγαλύτερη επιφάνεια στο ηλιακό φως. Ο κύριος περιορισμός των σωληνοειδών φωτοβιοαντιδραστήρων είναι η κακή μεταφορά μάζας και ο έλεγχος της θερμοκρασίας της καλλιέργειας αλγών. Η αύξηση του pH των καλλιεργειών οδηγεί επίσης σε κοινή επαναανθρακοποίηση των καλλιεργειών. Σε σωληνοειδείς φωτοβιοαντιδραστήρες έχει επίσης παρατηρηθεί κάποιος βαθμός ανάπτυξης τοιχωμάτων.
- Οι φωτοβιοαντιδραστήρες στήλης προσφέρουν την πιο αποτελεσματική ανάμιξη, τους υψηλότερους ογκομετρικούς ρυθμούς μεταφοράς μάζας και τις περισσότερες

ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης. Είναι χαμηλού κόστους, συμπαγείς και λειτουργούν με σχετική ευκολία. Οι κατακόρυφες στήλες αερίζονται από τον πυθμένα και φωτίζονται μέσω διαφανών τοιχωμάτων ή εσωτερικά. Παρουσιάζουν ευνοϊκότερη απόδοση από τους σωληνοειδείς αντιδραστήρες. Τέλος, συγκρίνονται από τους ερευνητές με τα συστήματα αυλακοειδούς ανοιχτής λίμνης λόγω του υψηλού ρυθμού ανάπτυξης της βιομάζας με σημαντικές δυνατότητες παραγωγής βιοκαυσίμων μαζί με χρήσιμα υποπροϊόντα.



Εικόνα 3: Σύστημα κλειστών σωληνοειδών φωτοβιοαντιδραστήρων

#### 2.3.1.3 Συστήματα υβριδικής παραγωγής

Η υβριδική παραγωγή περιλαμβάνει τα δύο προαναφερθέντα στάδια για τις διάφορες φάσεις ανάπτυξης. Αρχικά το πρώτο στάδιο καλλιέργειας συμβαίνει σε φωτοβιοαντιδραστήρα καθώς η δυνατότητα ελέγχου των καταστάσεων επιτρέπει την ολοένα και μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας από άλγη. Έπειτα, ακολουθεί η καλλιέργεια σε σύστημα ανοιχτής λίμνης, όπου η καλλιέργεια υποβάλλεται σε θρεπτικές καταπονήσεις, οι οποίες ενισχύουν τη σύνθεση της επιθυμητής ποσότητας λιπιδίων στο τελικό προϊόν. Το στάδιο αυτό είναι ιδανικό για συστήματα ανοικτών λιμνών, καθώς οι περιβαλλοντικές πιέσεις που διεγείρουν τη παραγωγή μπορούν να συμβούν φυσικά μέσω της μεταφοράς της καλλιέργειας από τους φωτοβιοαντιδραστήρες στην ανοικτή λίμνη (Degrá et al., 2019).

#### 2.3.2 Ετερότροφη παραγωγή

Σε αυτή τη διαδικασία τα μικροάλλα αναπτύσσονται σε υποστρώματα οργανικού άνθρακα, όπως η γλυκόζη, σε αναδευόμενες δεξαμενές βιοαντιδραστήρων ή σε ζυμωτήρες. Η μέθοδος αυτή μπορεί να επιτευχθεί σε έναν αντιδραστήρα που έχει μικρότερη αναλογία επιφανειών προς όγκο. Η ετερότροφη καλλιέργεια έχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως την εξάλειψη του περιορισμού του φωτός, τον υψηλό βαθμό ελέγχου της διαδικασίας καθώς και χαμηλό κόστος για τη συγκομιδή της βιομάζας λόγω των υψηλότερων κυτταρικών πυκνοτήτων που επιτυγχάνονται (G. Q. Chen & Chen, 2006).

Παρόλο που το σύστημα χρησιμοποιεί περισσότερη ενέργεια από την παραγωγή φωτοσυνθετικών μικροαλγών, το κόστος εγκατάστασης είναι ελάχιστο καθώς ο κύκλος της διαδικασίας περιλαμβάνει την αρχική παραγωγή οργανικού άνθρακα μέσω της διαδικασίας φωτοσύνθεσης. Η βιομάζα μικροαλγών που παράγεται σε ετερότροφες διεργασίες έχει υψηλότερη απόδοση και η περιεκτικότητα σε λιπίδια στα κύτταρα είναι περίπου 55%, σε αντίθεση με το 15% στην περίπτωση των αυτότροφων κυττάρων. Η ετερότροφη μέθοδος χρησιμοποιείται πλέον αποτελεσματικά και οικονομικά για μεταβολίτες και παραγωγή βιομάζας αλγών.

Στην ετερότροφη μέθοδο παραγωγής μικροαλγών, ο οργανικός άνθρακας που καταναλώνεται από τα μικροάλλα αποικοδομείται ή καταβολίζεται όπως τα βακτήρια. Τα μικροάλλα είναι γενετικά ικανά να μεταβολίζουν τον οργανικό άνθρακα ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Ο παραγόμενος άνθρακας μπορεί να μεταβολίσει ένζυμα που υπάρχουν στα μικροάλλα και αναπαράγει τον πρωταρχικό τρόπο μεταβολικής τους δραστηριότητας. Μπορεί να αποθηκεύει σταθερές πηγές άνθρακα, όπως βιοπολυμερή (άμυλο) και αργότερα υφίσταται διάσπαση και χρησιμοποιείται σε σκοτεινά περιβάλλοντα για την κυτταρική διαίρεση και την ανάπτυξη προϊόντων βιομάζας.

### 2.3.3 Μικτότροφη παραγωγή

Ορισμένες ομάδες μικροαλγών έχουν την ικανότητα να λαμβάνουν τροφή μέσω τόσο ετερότροφων όσο και αυτότροφων διαδικασιών. Μπορούν επομένως να φωτοσυνθέτουν αλλά και να προσλαμβάνουν οργανικά υλικά. Η ανάπτυξη λοιπόν των κυττάρων των μικροαλγών σε αυτή την περίπτωση δεν εξαρτάται μόνο από την ύπαρξη ή μη της φωτεινής ενέργειας καθώς την ανάπτυξη υποστηρίζουν και διάφορα οργανικά υποστρώματα.

Παραδείγματα μικροαλγών που παρουσιάζουν την μέθοδο του μικτοτροφικού μεταβολισμού για την ανάπτυξη και την ύπαρξή τους είναι τα πράσινα άλλα *Chlamydomonas reinhardtii* και τα κυανοβακτήρια *Spirulina platensis* (Li et al., 2014).

Η ανάπτυξη επηρεάζεται από το συμπλήρωμα του μέσου με γλυκόζη κατά τη διάρκεια της φωτεινής και της σκοτεινής φάσης, επομένως, υπάρχει μικρότερη απώλεια βιομάζας κατά τη σκοτεινή φάση. Ο ρυθμός ανάπτυξης των αλγών με μικτότροφη παραγωγή συγκρίνεται θετικά με την καλλιέργεια των φωτοαυτότροφων αλγών εντός ενός κλειστού φωτοβιοαντιδραστήρα. Ο ρυθμός ανάπτυξης βρέθηκε να είναι μεγαλύτερος από ότι σε καλλιέργεια ανοικτής λίμνης, αλλά σημαντικά χαμηλότερος από την ετερότροφη παραγωγή.

Επομένως, όπως αναφέρθηκε, επιτυχής παραγωγή μικτότροφων αλγών επιτρέπει την ενσωμάτωση τόσο φωτοσυνθετικών όσο και ετερότροφων συστατικών κατά τη διάρκεια του ημερήσιου κύκλου. Αυτό μειώνει τον αντίκτυπο της απώλειας βιομάζας κατά τη σκοτεινή αναπνοή και μειώνει την ποσότητα των οργανικών ουσιών που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Αυτά τα χαρακτηριστικά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μικτότροφη παραγωγή μπορεί να αποτελέσει σημαντικό μέρος της διαδικασίας μετατροπής μικροαλγών σε βιοκαύσιμα.

## 2.4 Επίδραση της επιλογής στελεχούς

Η επιλογή των κατάλληλων στελεχών άλλης είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τη συνολική επιτυχία της παραγωγής βιοκαυσίμων από μικροάλλα (Rosenberg et al., 2008). Το στέλεχος άλλης που θεωρείται ιδανικό για την παραγωγή βιοκαυσίμων θα πρέπει να παρουσιάζει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- υψηλή παραγωγικότητα λιπιδίων



- να είναι ανθεκτικό και να μπορεί να επιβιώνει στις διατμητικές καταπονήσεις που συμβαίνουν συνήθως στους φωτοβιοαντιδραστήρες
- να μπορεί να κυριαρχεί επί των άγριων στελεχών σε παραγωγή σε ανοικτή λίμνη
- να έχει υψηλή ικανότητα απορρόφησης CO<sub>2</sub>
- να έχει περιορισμένες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά
- να είναι ανεκτικό σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών που προκύπτουν από τον ημερήσιο κύκλο και τις εποχιακές διακυμάνσεις
- να παρέχει πολύτιμα συμπαράγωγα
- να έχει ταχύ παραγωγικό κύκλο
- να έχει υψηλή αποτελεσματικότητα φωτοσύνθεσης
- να παρουσιάζει χαρακτηριστικά αυτοκροκίδωσης

Προς το παρόν, κανένα γνωστό στέλεχος άλγης δεν μπορεί να εκπληρώσει όλες αυτές τις απαιτήσεις ταυτόχρονα.

## 2.5 Τεχνολογίες μετατροπής της βιομάζας άλγης σε βιοκαύσιμα

### 2.5.1 Θερμοχημική μετατροπή

Η θερμοχημική μετατροπή πρόκειται για τη θερμική αποσύνθεση των οργανικών συστατικών της βιομάζας για την παραγωγή προϊόντων καυσίμου, και επιτυγχάνεται με διάφορες διεργασίες, όπως η άμεση καύση, η αεριοποίηση, η θερμοχημική υγροποίηση και η πυρόλυση (Tsukahara & Sawayama, 2005).

#### 2.5.1.1 Αεριοποίηση

Η διεργασία της αεριοποίησης είναι η ατελής καύση ή οξείδωση βιομάζας σε εύφλεκτο αέριο μίγμα σε αυξημένη θερμοκρασία (800-1000°C). Κατά τη διαδικασία της αεριοποίησης, η βιομάζα υφίσταται μια χημική αντίδραση με ατμό και O<sub>2</sub> και σχηματίζει αέριο σύνθεσης (syngas), το οποίο είναι μείγμα CO, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> και CH<sub>4</sub>. Τα σημαντικότερα οφέλη της αεριοποίησης είναι η πορεία μετατροπής της βιομάζας σε ενέργεια, η οποία συνθέτει αέριο σύνθεσης από διαφοροποιημένες κατηγορίες σημαντικών πρώτων υλών. Το αέριο σύνθεσης διαθέτει χαμηλής θερμογόνου δύναμης αέριο συνήθως 4 έως 6 MJ/m<sup>3</sup> και κατά την άμεση καύση χρησιμοποιείται ως καύσιμο για αεριοστροβίλους ή κινητήρες αερίου. Εντοπίστηκε ότι η αεριοποίηση της βιομάζας άλγης στους 1000°C παράγει 0,64g CH<sub>3</sub>OH από 1g βιομάζας. Το ενεργειακό ισοζύγιο (λόγος CH<sub>3</sub>OH που σχηματίζεται προς τη συνολική ενέργεια που καταναλώνεται) είναι 1:1, γεγονός που υποδηλώνει ένα θετικό ενεργειακό ισοζύγιο της αεριοποίησης. Η χαμηλή τιμή του ενεργειακού ισοζυγίου αναγνωρίζεται λόγω της χρήσης μιας ενεργοβόρας μεθόδου φυγοκέντρησης κατά τη διάρκεια της απόδοσης της βιομάζας. Διαπιστώθηκε ότι η αεριοποίηση των μικροαλγών *C. vulgaris* μαζί με την ανακύκλωση του αζώτου παράγει βιοκαύσιμο εμπλουτισμένο με CH<sub>4</sub> και όλα τα συστατικά που περιέχουν N<sub>2</sub> μπορούν να μετατραπούν σε αζωτούχο λίπασμα με ποιότητα παρόμοια με την NH<sub>3</sub>. Αυτή η μέθοδος αεριοποίησης για την παραγωγή βιοκαυσίμων από βιομάζα μικροαλγών χρειάζεται εκτεταμένη έρευνα, ιδίως όσον αφορά τη διαδικασία ενεργειακού ισοζυγίου της ξήρανσης της βιομάζας μικροαλγών για αεριοποίηση (McKendry, 2002b).

#### 2.5.1.2 Θερμοχημική υγροποίηση

Σε αυτή τη μέθοδο, οι υγρές ουσίες βιομάζας μικροάλγης μετατρέπονται σε υγρό βιοκαύσιμο. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε υψηλή πίεση (5-20 MPa) και χαμηλή θερμοκρασία (300-350°C) με τη βοήθεια καταλύτη παρουσία H<sub>2</sub> που αποδίδει βιοέλαιο (Goyal et al., 2008). Ο αντιδραστήρας που χρησιμοποιείται για αυτή τη διαδικασία

μετατροπής είναι δαπανηρός και τα συστήματα τροφοδοσίας καυσίμου είναι συνήθως πολύπλοκα. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα αυτής της διεργασίας είναι ότι μπορεί να μετατρέψει υγρό υλικό βιομάζας σε ενέργεια. Στη θερμοχημική μέθοδο υγροποίησης, ενεργοποιείται μεγαλύτερη ποσότητα νερού στο υποκρίσιμο περιβάλλον για την αποικοδόμηση της βιομάζας μικροαλγών αξιοποιώντας την υψηλότερη ενεργειακή πυκνότητα. Τα μικροάλγη *B. braunii* κατά τη θερμοχημική υγροποίηση σε θερμοκρασία 300 °C επιτυγχάνουν την υψηλότερη απόδοση 64% επί ξηρού βάρους σε βάση ελαίου με υψηλότερη θερμογόνο δύναμη (HHV) περίπου 45,9 MJ/kg και προσδιορίζεται επίσης θετικό ενεργειακό ισοζύγιο αυτής της μεθόδου με λόγο παραγωγής/τροφοδοσίας 6,67:1. Ως εκ τούτου, λαμβάνοντας υπόψη όλα αυτά τα γεγονότα, μπορεί να γίνει αποδεκτό ότι η θερμοχημική υγροποίηση θεωρείται εφικτή λύση για τη μετατροπή της βιομάζας μικροαλγών σε υγρό καύσιμο

#### 2.5.1.3 Πυρόλυση

Η πυρόλυση είναι η θερμική αποσύνθεση του υλικού βιομάζας μικροαλγών σε υψηλές θερμοκρασίες (400-1000°C) χωρίς οξυγόνο και καταλύτη παράγοντας στερεό καύσιμο (κοκ και βιοεξανθράκωμα), υγρό καύσιμο (βιοέλαιο) και αέριο καύσιμο (CH<sub>4</sub> και ορισμένους ανώτερους υδρογονάνθρακες σε αέρια μορφή). Η μέθοδος πυρόλυσης είναι δύο ειδών:

- Αργή πυρόλυση με αργό ρυθμό θέρμανσης (0,1-1°C/s), χαμηλή θερμοκρασία επεξεργασίας και μεγαλύτερη χρονική διάρκεια
- Γρήγορη πυρόλυση με υψηλό ρυθμό θέρμανσης (>1000°C/s), υψηλότερη θερμοκρασία επεξεργασίας και μικρότερη χρονική διάρκεια

Κανονικά, το βιοέλαιο σχηματίζεται κατά τη διαδικασία της πυρόλυσης. Λόγω του υψηλότερου ποσοστού τέφρας που υπάρχει στα φύκια, η πυρόλυση αντιμετωπίζεται ως η πιο ευνοούμενη μέθοδος μετατροπής, αλλά υπάρχουν ορισμένα προβλήματα που συνδέονται με εκείνη όπως η οξύτητα, η σταθερότητα και το ιξώδες του συντιθέμενου βιοελαίου. Η υδατική φάση περιέχει ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, όπως πρωτογενείς αλκοόλες, κετόνες και οξέα και η μη υδατική φάση του οξυγόνου περιλαμβάνει ουσίες όπως αλειφατικές ενώσεις, καρβονύλια, αλκοόλες, κρεσόλες, φαινόλες κ.λπ. μαζί με αρωματικούς υδρογονάνθρακες

#### 2.5.1.4 Άμεση καύση

Κατά τη μέθοδο της άμεσης καύσης, η βιομάζα μικροαλγών υφίσταται καύση παρουσία οξυγόνου ή αέρα και μετατρέπει τη χημική ενέργεια που είναι αποθηκευμένη στη βιομάζα σε θερμές αέριες ουσίες. Κανονικά, κατά τον κλίβανο, ατμοστρόβιλο ή βραστήρα σε αυξημένη θερμοκρασία (πάνω από 800°C), υιοθετούνται τέτοιου είδους διεργασίες. Αν και η καύση είναι δυνατή για όλα τα είδη βιομάζας, η εφικτή και ικανοποιητική καύση είναι μόνο σε προϊόντα βιομάζας που περιέχουν χαμηλότερο ποσοστό υγρασίας. Το συνδυασμένο αποτέλεσμα της ισχύος και της θερμότητας είναι άκρως απαραίτητο για να ενισχυθεί η αποδοτικότητα της συνολικής εγκατάστασης. Η αποτελεσματικότητα της καθαρής μετατροπής της ενέργειας με καύση βιομάζας για τους σταθμούς ηλεκτροπαραγωγής κυμαίνεται μεταξύ 20 και 40%. Η αποδοτικότητα μπορεί να ενισχυθεί σε συστήματα ισχύος άνω των 100 MW με την τη συν-καύση βιομάζας με άνθρακα. Ως εκ τούτου, είναι λιγότερο δυνατή η αξιοποίηση της βιομάζας αλγών με τη μέθοδο της άμεσης καύσης. Ωστόσο, η συν-καύση άνθρακα-αλγών στον κύκλο ζωής τους είναι η αιτία λιγότερων εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου. Η μέθοδος της άμεσης καύσης πραγματοποιείται γενικά με την οξυγόνωση της βιομάζας μικροαλγών στον ατμοστρόβιλο, λέβητα, ή κλίβανο και παράγει πολύ θερμά αέρια

συστατικά. Πριν από την άμεση καύση, τα προϊόντα βιομάζας των μικροαλγών πρώτα ξηραίνονται και στη συνέχεια μετατρέπονται σε μικρά σωματίδια απαιτούμενου μεγέθους με άλεση. Στην τεχνική της υδροθερμικής ρευστοποίησης, οι πολτοί αλγών, εάν υποβληθούν σε πίεση 40-200 bar και θερμοκρασία 300-400°C, παράγουν ακατέργαστο βιοαέριο και άνθρακα. Ως εκ τούτου, διάφορες ουσίες μπορούν να αποπολυμεριστούν και να εξαχθούν από τη βιομάζα των μικροαλγών μέσω της διαδικασίας υγροποίησης. Η απόδοση του ελαίου που λαμβάνεται από την υδροθερμική υγροποίηση είναι συνήθως της τάξης του 9-97 %, η οποία είναι μεγαλύτερη από την παραγωγή βιοελαίου με πυρόλυση (McKendry, 2002a).

### 2.5.2 Βιοχημική μετατροπή

Η βιολογική διαδικασία ενεργειακής μετατροπής της βιομάζας σε άλλα καύσιμα περιλαμβάνει την αναερόβια χώνευση, την αλκοολική ζύμωση και τη φωτοβιολογική παραγωγή υδρογόνου.

#### 2.5.2.1 Αναερόβια χώνευση

Η διαδικασία μετατροπής των οργανικών αποβλήτων σε βιοαέριο που περιέχει CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> μαζί με ένα μικρό ποσοστό ορισμένων άλλων αερίων όπως H<sub>2</sub>S ονομάζεται αναερόβια χώνευση. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει γενικά διάσπαση οργανικών ουσιών με την παραγωγή ορισμένων απλών αερίων ουσιών. Για τη διαδικασία αυτή, απαιτείται περίπου 20-40% λιγότερη ενέργεια για την θέρμανση. Η μέθοδος της αναερόβιας χώνευσης είναι κατάλληλη για οργανικά υλικά που έχουν υψηλές τιμές υγρασίας περίπου 80-90% και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για υγρή βιομάζα μικροάλγης. Η μέθοδος της αναερόβιας χώνευσης πραγματοποιείται γενικά σε τρία διαφορετικά στάδια: υδρόλυση, μεθανογένεση και ζύμωση. Κατά τη μέθοδο της υδρόλυσης, η σύνθετη οργανική ουσία διασπάται σε απλά υδατοδιαλυτά σάκχαρα (WS). Στην διαδικασία της ζύμωσης, η βακτηριακή κοινότητα μετατρέπει τα απλά μόρια σακχάρων σε άλλα προϊόντα, όπως CH<sub>3</sub>COOH, πτητικά λιπαρά οξέα (VFAs), αλκοόλη και αέριες ουσίες που περιέχουν CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>, οι οποίες τελικά μεταβολίζονται σε 60-70% CH<sub>4</sub> και 30-40% CO<sub>2</sub> μέσω της διαδικασίας των μεθανογόνων. Διαπιστώθηκε ότι η μετατροπή της βιομάζας προϊόντων της άλγης σε CH<sub>4</sub> επιτυγχάνει υψηλότερη ενέργεια σε σύγκριση με την ενέργεια που λαμβάνεται από τα λιπίδια των κυττάρων. Οι μικροάλγες περιέχουν υψηλό ποσοστό πρωτεϊνών λόγω της μικρότερης αναλογίας C/N, η οποία επηρεάζει την απόδοση και τη δραστηριότητα του αναερόβιου χωνευτή. Αυτή η δυσκολία μπορεί να επιλυθεί μέσω της συν-χώνευσης με μία υψηλή τιμή λόγου C/N, με προϊόντα όπως τα απορρίμματα χαρτιού, η οποία επιτυγχάνεται με σημαντική εντατικοποίηση της παραγωγής CH<sub>4</sub> με την ανάμιξη απορριμμάτων χαρτιού με το προϊόν βιομάζας της άλγης. Η βιομάζα άλγης που έχει εμπλουτισμό σε πρωτεΐνες μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ενίσχυση της παραγωγής αμμωνίου, το οποίο μειώνει τους αναερόβιους μικροοργανισμούς. Το ιόν νατρίου είναι εξαιρετικά τοξικό για πολλούς αναερόβιους μικροοργανισμούς, ωστόσο είναι βιώσιμο να χρησιμοποιηθούν οι προσαρμοσμένοι στο αλάτι μικροοργανισμοί για την αναερόβια χώνευση των προϊόντων βιομάζας των θαλάσσιων αλγών.

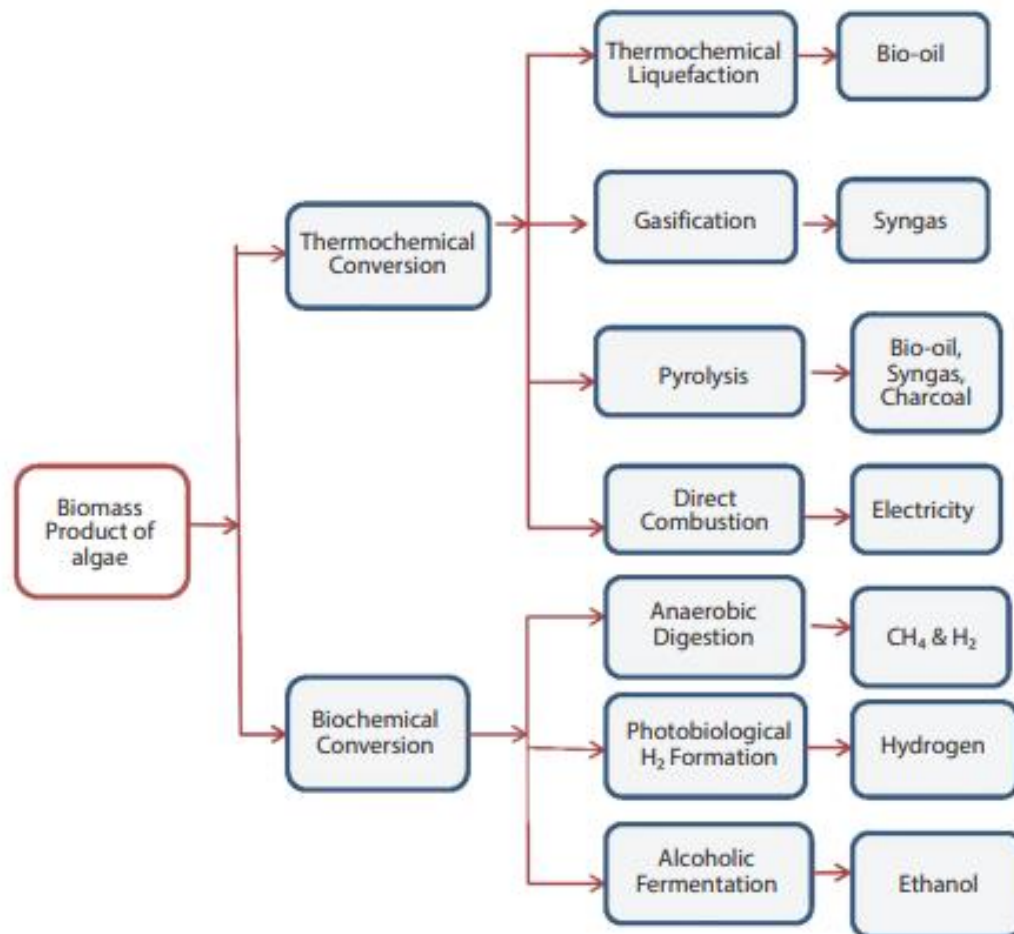
#### 2.5.2.2 Αλκοολική ζύμωση

Η διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης δεν είναι τίποτα άλλο παρά η μετατροπή των ουσιών βιομάζας (που περιέχουν σάκχαρα, κυτταρίνη και άμυλο) σε αλκοόλη (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH). Το προϊόν της βιομάζας αρχικά θρυμματίζεται και το άμυλο που λαμβάνεται μετατρέπεται σε σάκχαρα, τα οποία στη συνέχεια προστίθενται στη μαγιά και νερό. Σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία (θερμή κατάσταση), λαμβάνει χώρα η ζύμωση στον ζυμωτήρα. Τα σάκχαρα που

υπάρχουν στη βιομάζα της άλης διασπώνται από μαγιά και μετατρέπονται σε χαμηλότερη αλκοόλη. Οι προσμίξεις και το νερό μπορούν να απομακρυνθούν από την αραιή μορφή της αιθανόλης με τη διαδικασία καθαρισμού (απόσταξη). Πάνω από το 95% πυκνού διαλύματος ατμών αιθανόλης συμπυκνώνεται σε υγρή κατάσταση, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικό καύσιμο ή αναμειγνύεται με βενζίνη για χρήση σε οποιονδήποτε κινητήρα εσωτερικής καύσης. Τα στερεά υποπροϊόντα που λαμβάνονται από αυτή τη μέθοδο μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σκοπούς αεριοποίησης, για παραγωγή ενέργειας και ως ζωτροφή για βοοειδή. Η βιομάζα από μικροάλη εμπλουτισμένη με άμυλο χρειάζεται κάποια επιπλέον μοναδική τεχνολογία επεξεργασίας πριν από τη διαδικασία ζύμωσης. Τα μικροάλη (*C. vulgaris*) αντιμετωπίζονται ως εξαιρετική πηγή για τη σύνθεση  $C_2H_5OH$  και η απόδοση της μετατροπής της αιθανόλης βρέθηκε να είναι έως 65%, λόγω της παρουσίας υψηλής συγκέντρωσης αμύλου (ξηρή βάση: 37 %). Αιθανόλη μπορεί επίσης να παραχθεί από τη βιομάζα των μικροαλών μέσω της διαδικασίας σκοτεινής ζύμωσης όπου και επιτυγχάνεται μέγιστη παραγωγικότητα  $C_2H_5OH$  450 mmol/g ξηρού βάρους σε θερμοκρασία 30°C (Ueno et al., 1998).

### 2.5.2.3 Φωτοβιολογική παραγωγή υδρογόνου

Το υδρογόνο θεωρείται ως ένας αποτελεσματικός και καθαρός φορέας ενέργειας που βρίσκεται στη φύση. Τα μικροάλη είναι σημαντικά βιολογικά είδη, που διαθέτουν υψηλώς απαιτούμενα γενετικά, ενζυμικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά προκειμένου να παράγουν  $H_2$ . Διαπιστώθηκε ότι το  $H_2$  μπορεί να σχηματιστεί σε αναερόβιες συνθήκες από ευκαρυωτικά είδη μικροάλης είτε ως δότης ηλεκτρονίων κατά τη δέσμευση  $CO_2$  ή μπορεί να αναπτυχθεί τόσο σε σκοτεινή όσο και σε φωτεινή φάση. Στην διαδικασία της φωτοσύνθεσης, τα είδη μικροαλών μετατρέπουν το  $H_2O$  σε ιόντα  $H^+$  και  $O_2$ . Τα ιόντα  $H^+$  μετατρέπονται σε  $H_2$  από το ένζυμο υδρογενάση σε αναερόβιες συνθήκες. Λόγω της αντιστρεψιμότητας της χημικής αντίδρασης, το  $H_2$  είτε καταναλώνεται είτε συντίθεται μέσω της μετατροπής των ιόντων  $H^+$  σε  $H_2$ . Το  $O_2$  που παράγεται από τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα είναι η αιτία της γρήγορης αναστολής της ζωτικής υδρογονάσης και των ενζύμων και η μέθοδος παραγωγής του  $H_2$  από τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα παρεμποδίζεται. Ως εκ τούτου, η καλλιέργεια μικροάλης με σκοπό την παραγωγή  $H_2$  πρέπει να υπόκειται σε αναερόβιο περιβάλλον. Υπάρχουν συνήθως δύο βασικές μέθοδοι για την παραγωγή φωτοσυνθετικού  $H_2$  από το νερό και τα λύματα, όπου η φωτοσυνθετική παραγωγή  $H_2$  και  $O_2$  διαχωρίζονται χωρικά. Στην πρώτη φάση αυτής της διαδικασίας, η ανάπτυξη της άλης γινόταν φωτοσυνθετικά σε κατάλληλες συνθήκες και στη δεύτερη φάση, οι άλγες στερούνται του θείου μέσω της προώθησης ενός αναερόβιου περιβάλλοντος και προωθώντας τη συνεχή παραγωγή  $H_2$ . Δεδομένου ότι μετά από 60 ώρες παραγωγής η παραγωγή του  $H_2$  θα αρχίσει να σταθεροποιείται, η διαδικασία παραγωγής περιορίζεται με την πάροδο του χρόνου. Η εφαρμογή αυτού του συστήματος παραγωγής δεν είναι επιβλαβής για το περιβάλλον ούτε δημιουργεί τοξικές ουσίες, αλλά αντ' αυτού σχηματίζει πολύτιμα υλικά προϊόντων λόγω της καλλιέργειας βιομάζας. Η δεύτερη μέθοδος αφορά στην παραγωγή φωτοσυνθετικού  $H_2$  και  $O_2$ . Σε αυτή τη μέθοδο, τα ηλεκτρόνια που απελευθερώνονται λόγω της φωτοσυνθετικής οξείδωσης του  $H_2O$  υποβάλλονται άμεσα στη διαδικασία εξέλιξης του  $H_2$  με τη μεσολάβηση της υδρογενάσης. Η παραγωγή του  $H_2$  φαίνεται να είναι θεωρητικά πλεονεκτική σε μία φωτοσυνθετική προσέγγιση 2 σταδίων, αλλά η ταυτόχρονη διαδικασία δημιουργίας μπορεί να υποστεί μεγάλη αναστολή της υδρογενάσης ακόμη και μετά από πολύ μικρό χρονικό διάστημα λόγω της παραγωγής οξυγόνου φωτοσυνθετικά.



Εικόνα 4: Πιθανές διεργασίες μετατροπής βιομάζας αλγών.(Tsukahara & Sawayama, 2005)

## Κεφάλαιο 3: Βιοκαύσιμα

### 3.1 Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται ολοένα και μεγαλύτερη αύξηση του πλυθυσμού της Γης, γεγονός που συνεπάγεται και αύξηση των ενεργειακών αναγκών. Η προώθηση, έτσι, πιο φιλικών προς το περιβάλλον καυσίμων που μπορούν να οδηγήσουν στον περιορισμό των περιβαλλοντικών επιπτώσεων και στη μείωση της εξάρτησης από το πετρέλαιο κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική. Βιοκαύσιμα ονομάζονται τα στερεά, υγρά ή αέρια καύσιμα τα οποία προέρχονται από τη βιομάζα, το βιοδιασπόμενο δηλαδή κλάσμα προϊόντων ή αποβλήτων διαφόρων ανθρώπινων δραστηριοτήτων. Αποτελούν λοιπόν διαρκή και ανανεώσιμο πόρο καθώς αναπληρώνονται αδιάκοπα.

Τα βιοκαύσιμα δεν αποτελούν ανακάλυψη του 21<sup>ου</sup> αιώνα αφού τα πρώτα καύσιμα που χρησιμοποιήθηκαν από τον άνθρωπο, ανήκαν στην κατηγορία των βιοκαυσίμων. Το ξύλο, το λίπος, τα φυτικά λάδια αλλά και τα αποστάγματα, όντας οργανικής προέλευσης, εμπίπτουν στην κατηγορία των βιοκαυσίμων. Τον περασμένο αιώνα όμως έγινε και επίσημα η αρχή της χρήσης βιοκαυσίμων ως αντικατάστατο των ορυκτών καυσίμων από τον Ρούντολφ Ντίζελ με τη χρήση φυτικού ελαίου σε μηχανή συμπίεσης.



Τα ανανεώσιμα καύσιμα διακρίνονται για τις χαμηλές εκπομπές CO<sub>2</sub> κατά τη διάρκεια ολόκληρου του κύκλου ζωής τους σε σύγκριση με τα συμβατικά ορυκτά καύσιμα. Αυτό συμβαίνει διότι κατά την καύση τα βιοκαύσιμα, αν και εκπέμπουν περίπου το ίδιο ποσό CO<sub>2</sub> με τα πετρελαιοειδή, προέρχονται από οργανικές πηγές. Ο άνθρακας επομένως που περιέχουν έχει προηγουμένως δεσμευτεί από την ατμόσφαιρα κατά την ανάπτυξη της οργανικής ύλης. Κατά συνέπεια, μετά την καύση, ο δεσμευμένος άνθρακας επιστρέφει στην ατμόσφαιρα, καθιστώντας το ισοζύγιο εκπομπών σε όλο τον κύκλο ζωής του βιοκαυσίμου θεωρητικά μηδενικό και παράλληλα δεν συμβάλλει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου.

Τα υγρά βιοκαύσιμα χρησιμοποιούνται κυρίως στις μεταφορές, τα στερεά για παραγωγή θερμικής και ηλεκτρικής ενέργειας ενώ τα αέρια βιοκαύσιμα έχουν πολλαπλές χρήσεις. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν είτε μεμονωμένα ή προστιθέμενα στα συμβατικά καύσιμα σε μίγματα (Escobar et al., 2009).

Τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα βιοκαύσιμα είναι το βιοντίζελ και οι βιοαλκοόλες, συμπεριλαμβανομένης της βιοαιθανόλης και της βιοβουτανόλης που ονομάζεται επίσης και βιοβενζίνη.

### 3.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα βιοκαυσίμων

Παρακάτω θα γίνει μια ανάλυση των πλεονεκτημάτων και των μειονεκτημάτων των βιοκαυσίμων, εξετάζοντας τις περιβαλλοντικές και οικονομικές συνθήκες και το ευρύτερο τοπίο της βιωσιμότητας. Εμβαθύνοντας σε αυτές τις πτυχές, στοχεύουμε να αποκτήσουμε μια ολοκληρωμένη κατανόηση του ρόλου που διαδραματίζουν τα βιοκαύσιμα στη διαμόρφωση του μέλλοντος της ενέργειας και της περίπλοκης ισορροπίας που επιτυγχάνουν μεταξύ των οικολογικών πλεονεκτημάτων και των πιθανών μειονεκτημάτων.

Ορισμένα λοιπόν από τα οφέλη της χρήσης των βιοκαυσίμων συνοψίζονται παρακάτω:

- Τα βιοκαύσιμα είναι βιοδιασπώμενα, βιοαποδομήσιμα, βιώσιμα και φιλικά προς το περιβάλλον
- Δημιουργούνται λιγότερες εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου από τη χρήση βιοκαυσίμων συγκριτικά με τα ορυκτά καύσιμα
- Τα βιοκαύσιμα είναι καθαρά, μη τοξικά και δεν περιέχουν ενώσεις επικίνδυνες για την ανθρώπινη υγεία
- Είναι λιγότερο εύφλεκτα από τα ορυκτά καύσιμα
- Τα βιοκαύσιμα είναι ικανά να βελτιώσουν την υγεία και το βιοτικό επίπεδο των ανθρώπων
- Η παραγωγή και η αξιοποίηση των βιοκαυσίμων ενισχύει την εγχώρια γεωργική ανάπτυξη και τις επενδύσεις καθώς δημιουργούνται νέα πεδία επιχειρηματικής και εμπορικής δραστηριότητας
- Από οικονομική άποψη, τα βιοκαύσιμα συμβάλλουν στη σταθεροποίηση των τιμών της ενέργειας, στη διατήρηση του συναλλάγματος και στη δημιουργία απασχόλησης σε μακροοικονομικό επίπεδο (Awogbemi et al., 2021).
- Η εισαγωγή των βιοκαυσίμων στο ενεργειακό ισοζύγιο μιας χώρας συμβάλλει στην ενίσχυση της ενεργειακής ανεξαρτησίας και της ασφάλειας ενεργειακού εφοδιασμού σε εθνικό επίπεδο. Αυτό έχει ως πολιτική συνέπεια την ενίσχυση της γεωπολιτικής ισχύος χωρών που υποστηρίζουν τον τομέα των βιοκαυσίμων

Παρά τα σημαντικά οφέλη της χρήσης των βιοκαυσίμων, κρίνεται σημαντική και η διερεύνηση των επιπτώσεων που ενδέχεται να επιφέρουν. Αναλυτικότερα:

- Το υψηλό αρχικό κόστος παραγωγής και αποθήκευσης των βιοκαυσίμων μπορεί να αποτελέσει αποτρεπτικό παράγοντα για τους πιθανούς παραγωγούς και χρήστες
- Υπάρχουν εύλογες ανησυχίες ότι η αυξημένη ζήτηση για βιοκαύσιμα θα αυξήσει το κόστος πρώτων υλών που μέχρι τώρα είχαν προσιτές τιμές, όπως τις πρώτες ύλες ξυλείας και γεωργίας
- Όσον αφορά τη ξυλεία θα πρέπει να δοθεί προσοχή στη ραγδαία αποψίλωση των δασών, και σχετικά με τη γεωργία απαιτείται τεράστια ποσότητα γης για την καλλιέργεια ειδικών δέντρων και άλλων μη βρώσιμων ελαίων για την παραγωγή βιοκαυσίμων
- Ειδικότερα, το μεθάνιο, κύριο συστατικό του βιοαερίου, συνεισφέρει σημαντικά στην παγκόσμια κλιματική αλλαγή και η συνεχής χρήση βιοαερίου μπορεί να επιδεινώσει την καταστροφή του στρώματος του όζοντος
- Οι κινητήρες που καίνε βιοντίζελ εκπέμπουν περισσότερα οξείδια του αζώτου (NOx) σε σύγκριση με την καύση πετρελαίου κίνησης.
- Ολοένα και συχνότερα τα βιοκαύσιμα δέχονται επικρίσεις για την επίπτωσή που θα έχουν στις τιμές των γεωργικών προϊόντων, καθώς εξαιτίας τους μειώνεται η καλλιεργήσιμη γη για τρόφιμα
- Οι ποσότητες νερού που απαιτούνται για τη σωστή άρδευση των καλλιεργειών βιοκαυσίμων είναι αρκετά μεγάλες, πράγμα που επιβαρύνει τους τοπικούς και περιφερειακούς υδάτινους πόρους
- Υπάρχουν ενδείξεις ότι η διαδικασία παραγωγής του καυσίμου, συμπεριλαμβανομένων των απαραίτητων μηχανισμών για την καλλιέργεια των πρώτων υλών και των φυτών για την παραγωγή του καυσίμου, έχει μεγάλες εκπομπές άνθρακα, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τη πεποίθηση ότι τα βιοκαύσιμα είναι ουδέτερα σε εκπομπές άνθρακα

Παρά τα εμπόδια, τα βιοκαύσιμα δεν παύουν να αποτελούν μια καθαρή, βιώσιμη και προσιτή επιλογή ενεργειακών πόρων ως υποκατάστατα των ορυκτών καυσίμων και μπορούν να ληφθούν υπόψη για τη παροχή βοήθειας στην επιφανόμενη περιβαλλοντική και οικονομική κρίση των τελευταίων δεκαετιών. Η προσαρμογή τους σε διάφορους τομείς της οικονομίας είναι μια από τις στρατηγικές για τη μείωση του CO<sub>2</sub> και τον μετριασμό των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα.

### 3.3 Κατηγοριοποίηση βιοκαυσίμων

Στα υποκεφάλαια που ακολουθούν θα αναλυθούν οι επιμέρους κατηγορίες στις οποίες χωρίζονται τα βιοκαύσιμα, οι οποίες είναι η φυσική κατάσταση, ο βαθμός εμπορευματοποίησης της τεχνολογίας και η πρώτη ύλη παραγωγής τους.

#### 3.3.1 Κατηγοριοποίηση βιοκαυσίμων με βάση τη φυσική τους κατάσταση

##### 3.3.1.1 Υγρά βιοκαύσιμα

Τα υγρά βιοκαύσιμα αποτελούνται από οποιαδήποτε ανανεώσιμα βιοκαύσιμα που βρίσκονται σε υγρή μορφή και προορίζονται κυρίως για τις ανάγκες κίνησης. Τα συνηθέστερα παραδείγματα βιοκαυσίμων σε υγρή μορφή είναι το βιοντίζελ, η βιοιθανόλη, η βιοβουτανόλη, η βιοπροπανάλη και ορισμένα παράγωγά τους από την ανάμιξη με άλλες ενώσεις, όπως MTBE, ETBE και TAME. Τα υγρά βιοκαύσιμα είναι αρκετά διαδεδομένα καθώς κάποια από τα χαρακτηριστικά τους τα καθιστούν ιδανικά για εφαρμογή. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζουν υψηλή καυσιμότητα, είναι ασφαλέστερα και εύκολα στην αποθήκευση και

στη μεταφορά με αγωγούς, και σίγουρα πιο ασφαλή στη μεταφορά συγκριτικά με τη βενζίνη. Επιπλέον, είναι σχετικά φθηνά με υψηλή αναλογία ενέργειας προς μάζα (Huang & Jin, 2020).

#### 3.3.1.2 Στερεά βιοκαύσιμα

Γενικά, κάθε στερεό υλικό βιομάζας μπορεί να χαρακτηριστεί ως στερεό βιοκαύσιμο. Στερεά βιομάζα είναι οποιαδήποτε στερεή πρώτη ύλη που μπορεί να μετατραπεί σε βιοκαύσιμο. Κυρίως τέτοια στερεή βιομάζα είναι η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα και διάφοροι τύποι στερεών αποβλήτων όπως πλαστικά, επεξεργασμένη χαρτική ύλη και αστικά στερεά απόβλητα. Οι στερεές βιομάζες έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν άμεσα, χωρίς ιδιαίτερη προεπεξεργασία, ως στερεά βιοκαύσιμα είτε ως πρώτη ύλη για παραγωγή διάφορων βιοκαυσίμων (Ho et al., 2014).

#### 3.3.1.3 Αέρια βιοκαύσιμα

Στη κατηγορία αυτή το βιοαέριο, το βιομεθάνιο, το βιοϋδρογόνο και το βιοαέριο σύνθεσης ξεχωρίζουν ως οι πιο συνηθισμένοι τύποι αερίων βιοκαυσίμων. Βρίσκουν εκτεταμένες εφαρμογές σε διάφορους τομείς, όπως στη θερμική ενέργεια, στις μεταφορές, στη θέρμανση και στη παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Τα αέρια βιοκαύσιμα έχουν αποτελέσει αντικείμενο ενδεδειγμένου έρευνας και αξιοποίησης με την πάροδο του χρόνου λόγω των πολυάριθμων πλεονεκτημάτων τους, όπως η αυξημένη αντιδραστικότητα, η μειωμένη παραγωγή αποβλήτων κατά την εφαρμογή, η μειωμένη ανάγκη για οξειδωτικά, τα απλούστερα σχέδια αντιδραστήρων και οι ευκολότεροι μηχανισμοί ελέγχου (Awogbemi et al., 2021).

### 3.3.2 Κατηγοριοποίηση βιοκαυσίμων με βάση τον βαθμό εμπορευματοποίησης της τεχνολογίας

Τα βιοκαύσιμα διαχωρίζονται σε συμβατικά και σε προηγμένα ανάλογα με τον βαθμό της εμπορευματοποίησης της τεχνολογίας παραγωγής τους.

#### 3.3.2.1 Συμβατικά βιοκαύσιμα

Τα συμβατικά βιοκαύσιμα παράγονται μέσω ήδη εμπορικά διαθέσιμων τεχνολογιών, οι οποίες συνεχίζουν να αναπτύσσονται για οικονομική βιωσιμότητα και κερδοφορία. Παραδείγματα συμβατικών βιοκαυσίμων είναι η βιοαιθανόλη, το βιοντίζελ και το βιοαέριο. Οι τρόποι παραγωγής τους αντίστοιχα είναι η ζύμωση, η μετεστεροποίηση και η αναερόβια χώνευση. Οι συνήθεις πρώτες ύλες για τα συμβατικά βιοκαύσιμα περιλαμβάνουν ζαχαροκάλαμο και ζαχαρότευτλα, καλαμπόκι, σιτάρι, φυτικά έλαια, ζωικά λίπη, ανακτημένα οικιακά λίπη κ.λπ. Η εμπορευματοποίηση των συμβατικών βιοκαυσίμων παρεμποδίζεται από το υψηλό κόστος παραγωγής και τις ασύμφωνες τιμές λιανικής πώλησης.

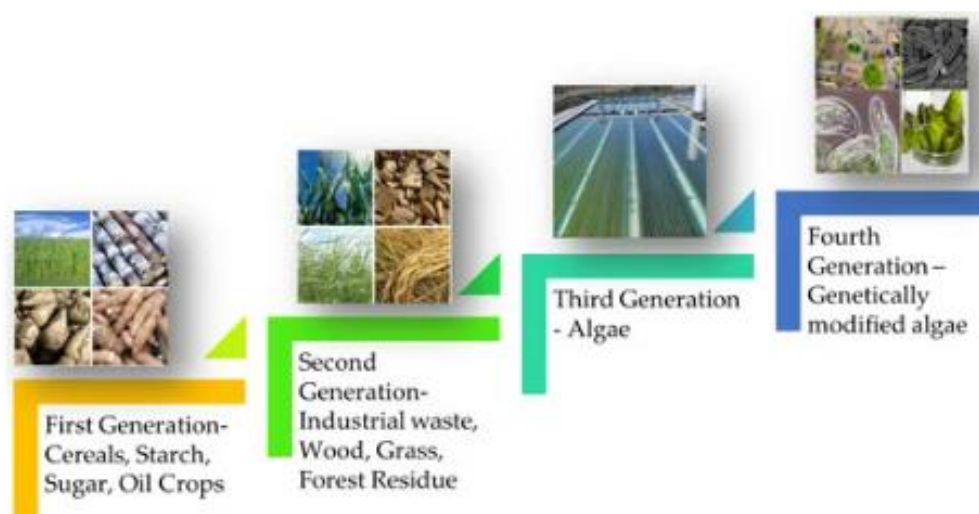
#### 3.3.2.2 Προηγμένα βιοκαύσιμα

Οι τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή προηγμένων βιοκαυσίμων βρίσκονται κυρίως σε φάση έρευνας και ανάπτυξης, επίδειξης ή πρώιμης εμπορικής εκμετάλλευσης. Βασικά παραδείγματα είναι το φυτικό έλαιο, η λιγνοκυτταρινική βιοαιθανόλη, οι εστέρες που παράγονται από βιομάζα, το βιοντίζελ από μικροάλγη και το βιοϋδρογόνο. Δεδομένων των προκλήσεων που σχετίζονται με την έλλειψη πρώτων υλών, την πιθανή παρέμβαση ορισμένων πρώτων υλών στην τροφική αλυσίδα και την περιορισμένη ανταγωνιστικότητα του κόστους των συμβατικών βιοκαυσίμων, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για επενδύσεις και παραγωγή προηγμένων βιοκαυσίμων από μη βρώσιμες πρώτες ύλες ως μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση.



### 3.3.3 Κατηγοριοποίηση βιοκαυσίμων με βάση την πρώτη ύλη παραγωγής

Τα βιοκαύσιμα ταξινομούνται με βάση τη πηγή και τη παραγωγή τους σε πρώτη, δεύτερη, τρίτη και τέταρτη γενιά, όπως αναλύονται και παρακάτω.



Εικόνα 5: Γενιές βιοκαυσίμων (Khan et al., 2021)

#### 3.3.3.1 Βιοκαύσιμα 1<sup>ης</sup> γενιάς

Τα βιοκαύσιμα που προέρχονται από καλλιέργειες που προορίζονται για την παραγωγή τροφίμων ονομάζονται βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς. Οι βρώσιμες ύλες που αποτελούν τα εν λόγω βιοκαύσιμα είναι πλούσιες σε άμυλο και σε ζάχαρη. Πρώτες ύλες από την καλλιέργεια φυτών που περιέχουν υψηλά επίπεδα ζάχαρης αποτελούν το ζαχαροκάλαμο και τα ζαχαρότευτλα. Αντίστοιχα, πρώτες αμυλούχες ύλες είναι το σιτάρι, το καλαμπόκι, η πατάτα και το κριθάρι. Τα φυτικά έλαια, όπως το έλαιο σόγιας και το φοινικέλαιο, χρησιμοποιούνται επίσης για την παραγωγή βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς.

Αυτά τα υλικά υποστηρίζουν την παραγωγή βιοαιθανόλης, βιοντίζελ και άλλων βιοκαυσίμων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας. Ακόμα, διαθέτουν χαμηλό κόστος παραγωγής, καλή αναλογία κόστους/απόδοσης και υψηλές περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες, γεγονός που τα καθιστά ιδανικά υποστρώματα για τη παραγωγή των βιοκαυσίμων με ζύμωση. Παρόλο που η πρώτη γενιά βιοκαυσίμων έχει προκαλέσει σημαντική ανάπτυξη, υπάρχουν κριτικές για τις επιπτώσεις της παραγωγής τους στην επισιτιστική παραγωγή και το περιβάλλον. Αναλυτικότερα, ορισμένα από τα βιοκαύσιμα 1<sup>ης</sup> γενιάς έχουν αρνητικό περιβαλλοντικό αποτύπωμα, καθώς απελευθερώνουν περισσότερο άνθρακα στην παραγωγή τους από την ποσότητα άνθρακα που δεσμεύεται από την πρώτη ύλη κατά την φάση της ανάπτυξής της. Επίσης, καθώς η πλειονότητα αυτών των βιοκαυσίμων παράγεται απευθείας από καλλιέργειες τροφίμων και η ζήτηση για καύσιμα γίνεται όλο και μεγαλύτερη, παρατηρείται αύξηση των καλλιεργειών τροφίμων που προορίζονται για καύσιμα δημιουργώντας έτσι μια σύγκρουση με την ανάγκη για σίτιση.

#### 3.3.3.2 Βιοκαύσιμα 2<sup>ης</sup> γενιάς

Τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς προέρχονται από λιγνοκυτταρινούχες καλλιέργειες. Πιο συγκεκριμένα πρώτες ύλες αποτελούν τα μη βρώσιμα υπολείμματα των αγροτικών καλλιεργειών και η μη βρώσιμη φυτική βιομάζα όπως το ξύλο, το γρασίδι και άλλα οργανικά λύματα. Η τεχνολογία αυτής της γενιάς επιτρέπει το διαχωρισμό της λιγνίνης και της

κυτταρίνης ενός φυτού, έτσι ώστε η κυτταρίνη να μπορεί να ζυμωθεί σε αλκοόλη. Οι τεχνολογίες βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς έχουν αναπτυχθεί ώστε να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα που προκύπτουν από τα βιοκαύσιμα της πρώτης γενιάς. Ανταγωνίζονται ως προς το κόστος τα ήδη υπάρχοντα ορυκτά καύσιμα και καθώς ξεπερνούν ορισμένους από τους κύριους περιορισμούς των βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς αυξάνουν τα καθαρά ενεργειακά κέρδη. Ωστόσο, αντιμετωπίζουν τεχνικές δυσκολίες κατά την προεπεξεργασία των λιγνοκυτταρινούχων υλικών λόγω των πολύπλοκων δομών.

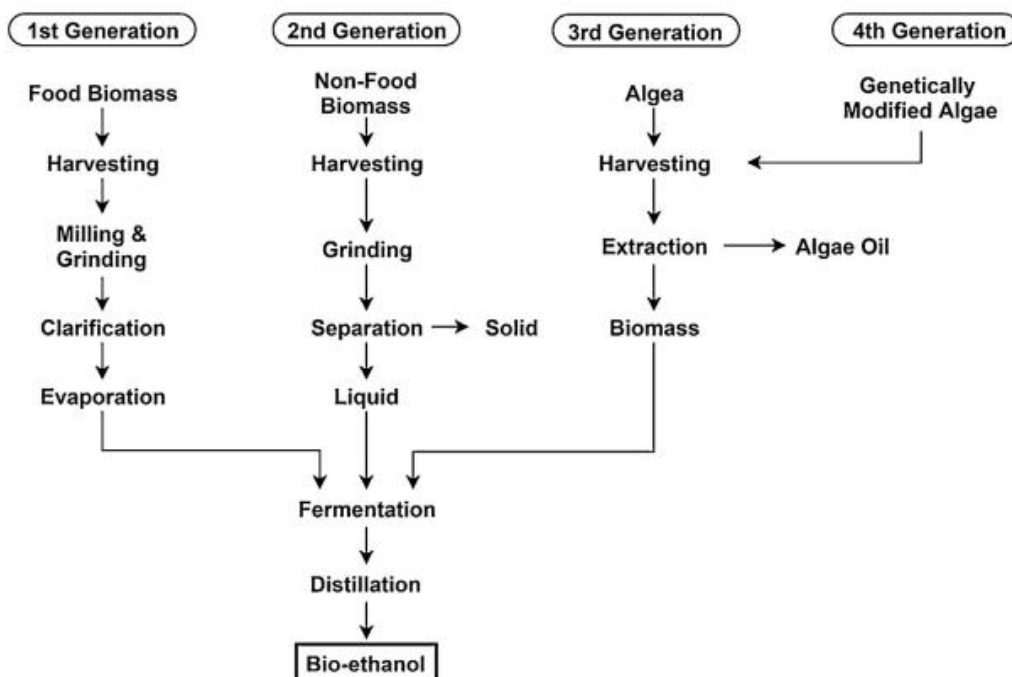
#### 3.3.3.3 Βιοκαύσιμα 3<sup>ης</sup> γενιάς

Σε αντίθεση με τα βιοκαύσιμα πρώτης και δεύτερης γενιάς, τα βιοκαύσιμα τρίτης γενιάς λαμβάνονται από υδρόβια βιομάζα αλγών (μικροάλγη και μακροάλγη), η οποία δεν ανταγωνίζεται άμεσα για τη γη με άλλες καλλιέργειες τροφίμων. Η βιομάζα αλγών παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερες αποδόσεις, με την ικανότητα να αναπτύσσεται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, έχει υψηλή ανοχή σε υψηλότερη περιεκτικότητα σε διοξείδιο του άνθρακα και χαμηλή κατανάλωση νερού. Δεν απαιτεί ούτε φυτοφάρμακα ούτε λιπάσματα. Η παρασκευή βιοκαυσίμων μέσω αλγών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την περιεκτικότητα σε λιπίδια. Τα άλγη που αναπτύσσονται γρήγορα θεωρείται ότι έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια, ενώ αυτά που αναπτύσσονται αργά έχουν υψηλότερη. Ως εκ τούτου, η επιλογή στελεχών μικροαλγών με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης μεταβολιτών είναι απαραίτητη. Τα άλγη έχουν την ικανότητα να παράγουν αργό πετρέλαιο το οποίο μπορεί, στη συνέχεια, να επεξεργαστεί εύκολα σε ντίζελ και βενζίνη. Συγκεκριμένα είδη αλγών που μπορούν να κατηγοριοποιηθούν είτε ως μικροάλγη είτε ως μακροάλγη μπορούν να τροποποιηθούν γενετικά έτσι ώστε η μεταβολική οδός του άνθρακα να διευκολύνει την παραγωγή σημαντικών τελικών προϊόντων όπως η βιοαιθανόλη (Neto et al., 2019). Προβλέπεται ότι τα άλγη θα έχουν τη δυνατότητα να παράγουν περισσότερη ενέργεια ανά στρέμμα από τις συμβατικές καλλιέργειες. Ωστόσο, λόγω της πολυπλοκότητας των διαδικασιών παραγωγής βιοκαυσίμων από άλγη, παρατηρούνται ορισμένες τεχνικές και οικονομικές δυσκολίες που δεν επιτρέπουν ακόμα την ευρεία εφαρμογή αυτών των βιοκαυσίμων.

#### 3.3.3.4 Βιοκαύσιμα 4<sup>ης</sup> γενιάς

Τα πιο υποσχόμενα προηγμένα βιοκαύσιμα είναι αυτά της τέταρτης γενιάς βιοκαυσίμων. Οι πρώτες ύλες των βιοκαυσίμων αυτών είναι γενετικά τροποποιημένα μικροάλγη, μικρόβια και κυανοβακτήρια. Η ικανότητα των μικροοργανισμών να μετατρέπουν το CO<sub>2</sub> σε καύσιμο μέσω της φωτοσύνθεσης χρησιμοποιείται αποτελεσματικά. Βασική διαφορά της γενιάς αυτής είναι πως σε κάθε στάδιο δεσμεύεται διοξείδιο του άνθρακα, από την αρχική παραγωγή της βιομάζας με τη φωτοσύνθεση, και στα υπόλοιπα στάδια με την καύση με καθαρό οξυγόνο. Το διοξείδιο του άνθρακα μπορεί στη συνέχεια να αποθηκευτεί σε εξαντλημένους θύλακες άντλησης πετρελαίου και φυσικού αερίου ή σε αλατούχους υδροφορείς. Με αυτό τον τρόπο όχι μόνο δεν υπάρχει αντίκτυπος περιβάλλον, αλλά απορροφάται και επιπλέον διοξείδιο του άνθρακα, αντικαθιστώντας έτσι με πολύ ευνοϊκούς όρους τα ορυκτά καύσιμα. Υπάρχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα στη παραγωγή βιοκαυσίμων 4ης γενιάς. Για παράδειγμα, το ισοπρένιο, ένα βιοκαύσιμο 4ης γενιάς, αποτελεί αέριο βιοκαύσιμο το οποίο διαχωρίζεται εύκολα από το ζυμό παραγωγής. Ωστόσο, η παραγωγή βιοισοπρενίου απαιτεί ακριβότερα κλειστά συστήματα φωτοβιοαντιδραστήρων για την αποφυγή διαρροής του προϊόντος, και εξασφάλισης του διαχωρισμού του από τα καυσαέρια των φωτοβιοαντιδραστήρων. Έτσι απαιτείται μελέτη για την οικονομική

βιωσιμότητα των βιοκαυσίμων αυτής της γενιάς όπως και των ιδιαίτερων τεχνικών χαρακτηριστικών τους (Lü et al., 2011).



Εικόνα 6: Παραγωγή βιοαιθανόλης με βάση τις γενιές βιοκαυσίμων (Alalwan et al., 2019)

### 3.4 Παραγωγή βιοκαυσίμων

#### 3.4.1 Παραγωγή βιοντίζελ

Το βιοντίζελ είναι συνήθως παράγωγο ορισμένων ελαιούχων καλλιεργειών και προϊόντων βιομάζας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα σε συνήθεις κινητήρες ντίζελ. Είναι ένας συνδυασμός διαφόρων μονοαλκυλεστέρων που έχουν λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (FAME), τα οποία εξάγονται από το έλαιο αλγών. Μετά την εκχύλιση των λιπαρών οξέων από το έλαιο αλγών, αυτό μπορεί να μετατραπεί σε βιοντίζελ με τη διαδικασία της μετεστεροποίησης. Η διαδικασία της μετεστεροποίησης δεν είναι τίποτε άλλο παρά η αντίδραση μεταξύ μιας αλκοόλης και τριγλυκεριδίων μαζί με την προσθήκη κατάλληλου καταλύτη προκειμένου να παραχθούν μονοεστέρες, οι οποίοι τελικά ονομάζονται βιοντίζελ. Δεδομένου ότι οι ιδιότητες του βιοντίζελ που παράγεται από φύκια συμφωνούν με το διεθνές πρότυπο βιοντίζελ για οχήματα, μπορεί να γίνει αποδεκτή ως κατάλληλη εναλλακτική λύση των ορυκτών καυσίμων.

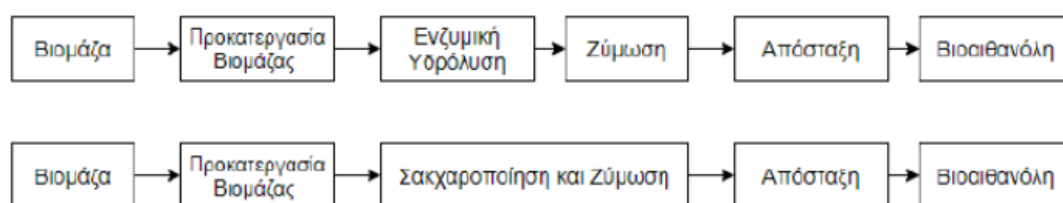
Τα έλαια αλγών περιέχουν συνήθως υψηλότερο ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε σύγκριση με τα φυτικά έλαια, που είναι η αιτία της αντίστασης στην οξείδωση κατά την αποθήκευση, επομένως η χρήση τους είναι περιορισμένη. Το βιοντίζελ που λαμβάνεται από βιομάζα αλγών διαθέτει παρόμοιες χημικές και φυσικές ιδιότητες όπως το ορυκτό πετρελαϊκό ντίζελ. Παρουσιάζει επίσης αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με το ορυκτό καύσιμο και το πετρελαϊκό ντίζελ, όπως η βιοαποικοδομησιμότητα, καθώς προέρχεται από ανανεώσιμες πηγές, και είναι σχεδόν ουδέτερο ως προς τον άνθρακα με βιώσιμο τρόπο της παραγωγής. Είναι μη τοξικό, μη επικίνδυνο και περιέχει λιγότερα σωματίδια, CO, υδρογονάνθρακες και SOx και παράγει λιγότερα σωματίδια αιθάλης κατά την καύση.

Το βιοντίζελ που προέρχεται από βιομάζα αλγών είναι συγκριτικά πιο αποδοτικό από το βιοντίζελ 1ης γενιάς για εφαρμογή στην αεροναυπηγική βιομηχανία στην οποία οι υψηλές ενεργειακές πυκνότητες και τα χαμηλά σημεία πήξης είναι σημαντικά κριτήρια. Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα του βιοντίζελ από άγλη είναι η μείωση των εκπομπών CO<sub>2</sub>, σχεδόν έως και 78% σε σύγκριση με το πετρελαϊκό ντίζελ (Karmakar et al., 2018).

### 3.4.2 Παραγωγή βιοαιθανόλης

Η βιοαιθανόλη είναι το άλλο κοινό βιοκαύσιμο που χρησιμοποιείται γενικά ως μείγμα που μπορεί να φτάσει σε περιεκτικότητα μέχρι 85% (E85). Είναι το βιοκαύσιμο που χρησιμοποιείται περισσότερο σε παγκόσμιο επίπεδο με τις ΗΠΑ να είναι σήμερα ο μεγαλύτερος παραγωγός στον κόσμο και τη Βραζιλία ο μεγαλύτερος εξαγωγέας, αντιπροσωπεύοντας μαζί το 70% της παγκόσμιας παραγωγής και το 90% της αιθανόλης που χρησιμοποιείται για καύσιμα. Στη Σουηδία και τις ΗΠΑ, ένα μείγμα βιοαιθανόλης υψηλής αναλογίας (85% αιθανόλη και 15% βενζίνη) χρησιμοποιείται σε οχήματα ευέλικτου καυσίμου (FFV) με τροποποιημένους κινητήρες που μπορούν να λειτουργούν είτε με βενζίνη, είτε με οποιοδήποτε μείγμα των δύο. Το E85 μπορεί σήμερα να αγοραστεί και σε αρκετά πρατήρια καυσίμων στο Ηνωμένο Βασίλειο (Luque et al., 2008).

Για την παραγωγή βιοαιθανόλης η πρώτη ύλη υποβάλλεται σε άλεση και κατόπιν ζυμώνεται με την μετέπειτα απόσταξη της αιθανόλης, και τα σάκχαρα ανακτώνται με την διαδικασία της εκχύλισης. Στην περίπτωση της αμυλούχας βιομάζας απαιτείται και υδρόλυση του αμύλου για να παραληφθούν τα σάκχαρα (γλυκόζη). Αντίθετα, στη περίπτωση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας οι μεγάλοι πολυσακχαρίτες (κυτταρίνη) πρέπει να διασπαστούν σε μονομερή πέρα από την υδρόλυση και με μια κατάλληλη προ-επεξεργασία. Αυτή η διάσπαση των μακρομορίων με υδρόλυση και σακχαροποίηση γίνεται είτε σε 1 ή σε 2 στάδια. Στην περίπτωση όπου τα 2 στάδια πραγματοποιούνται ξεχωριστά η διεργασία ονομάζεται Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF), ενώ εάν τα δύο στάδια πραγματοποιούνται ταυτοχρόνως καλείται Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF).



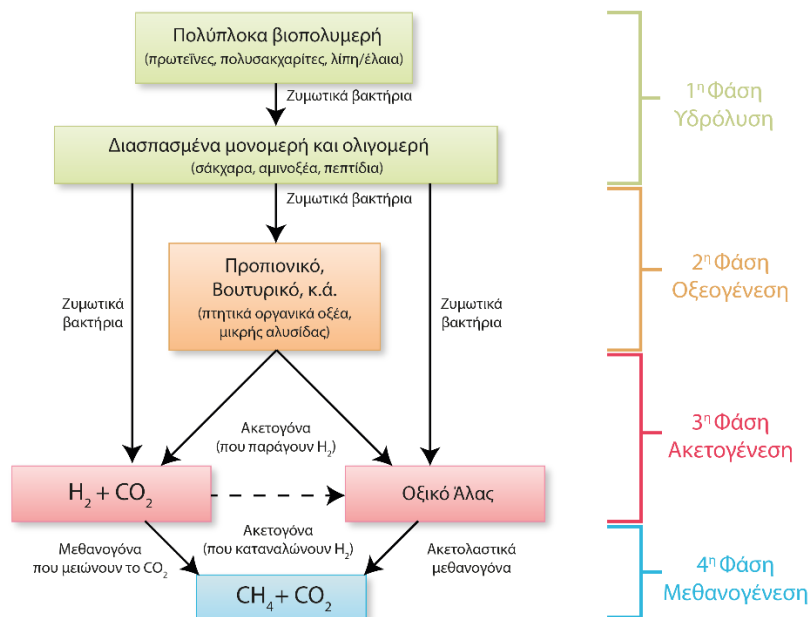
Εικόνα 7: Παραγωγή βιοαιθανόλης με SHF (πάνω σχήμα) και με SSF (κάτω σχήμα)

### 3.4.3 Παραγωγή βιοαερίου

Το βιοαέριο είναι ένα φιλικό προς το περιβάλλον, καθαρό, φθηνό και ευέλικτο καύσιμο, που αποτελείται από ένα μείγμα CH<sub>4</sub> και CO<sub>2</sub>, το οποίο συνήθως παράγεται από βακτηριακή χώνευση βιομάζας απουσία αέρα μεταξύ 10-72 °C. Σχεδόν κάθε είδος οργανικής ύλης (π.χ. ζωικά απόβλητα, βιομηχανικά απόβλητα) είναι κατάλληλο για την παραγωγή βιοαερίου, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα σε συστήματα μαγειρέματος και θέρμανσης. Η διεργασία πραγματοποιείται σε αναερόβιους χωνευτήρες που μπορεί να ποικίλλουν σε μέγεθος από 1 m<sup>3</sup> (μικρή οικιακή μονάδα) έως και 2000 m<sup>3</sup>, και περιλαμβάνει μια σταδιακή σειρά αντιδράσεων που απαιτούν τη συνεργατική δράση πολλών μικροοργανισμών. Αρχικά, μια ομάδα μικροοργανισμών (acidogens) διασπά την οργανική ύλη σε μια εύπεπτη μορφή (συνήθως απλούστερα λιπαρά οξέα) που μπορεί να αξιοποιηθεί από αναερόβια βακτήρια

που παράγουν μεθάνιο (methanogens), τα οποία παράγουν βιοαέριο ως μεταβολικό υποπροϊόν.

Η χρήση του βιοαερίου ως καυσίμου μεταφορών έχει διερευνηθεί με την εφαρμογή του σε εκρηκτικούς κινητήρες. Το βιοαέριο έχει δείξει μεγάλες δυνατότητες χρήσης του στη Βραζιλία, και σε μέρη όπως η Σουηδία χρησιμοποιείται σε αστικά λεωφορεία από το 2004. Επίσης, στη Σουηδία, ορισμένες μελέτες έχουν αξιολογήσει την οικονομική και περιβαλλοντική σκοπιμότητα του βιοαερίου ως ανανεώσιμη πηγή ενέργειας σε μεγάλη κλίμακα, δείχνοντας θετικά αποτελέσματα ως προς την εφαρμογή του στην κεντρική παραγωγή θερμότητας και ηλεκτρικής ενέργειας (Mata-Alvarez et al., 2000).



Εικόνα 8: Διεργασία παραγωγής βιοαερίου

## Κεφάλαιο 4: Βιοαιθανόλη

### 4.1 Εισαγωγή

Η αιθανόλη είναι μια ιδιαίτερα σημαντική χημική ένωση με χρήσεις και εφαρμογές σε πληθώρα τομέων και βιομηχανιών όπως τα τρόφιμα, τα αλκοολούχα ποτά, τα φαρμακευτικά προϊόντα και τα καύσιμα. Η παραγωγή αλκοολούχων ποτών που έχουν ως βάση τους κυρίως την αιθανόλη χρονολογείται περίπου τον 12ο αιώνα, κυρίως σε χώρες που ξεκίνησαν την παραγωγή μπύρας μέσω διαδικασίας ζύμωσης κυρίως αμυλούχων πρώτων υλών. Η παραγωγή της αιθανόλης είναι επίσης μια πολύ ανεπτυγμένη διαδικασία. Τον 19ο αιώνα, οι βελτιστοποιήσεις των διεργασιών παραγωγής αιθανόλης και των αποτελεσματικότερων διαδικασιών απόσταξης, οδήγησαν σε μεγάλη αύξηση του βιομηχανικού εμπορίου της. Η μεγαλύτερη ποσότητα της βιομηχανικής παραγόμενης αιθανόλης εδώ και πολλά χρόνια χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών.

Η αιθανόλη, ή αιθυλική αλκοόλη ή «καθαρή» αλκοόλη ή απλά οινόπνευμα, είναι μια οργανική χημική ένωση. Ο χημικός μοριακός τύπος της ένωσης είναι  $C_2H_6O$  ή  $C_2H_5OH$ , ο συντακτικός της τύπος είναι  $CH_3-CH_2-OH$  και ανήκει στην ομόλογη σειρά των κορεσμένων μονοσθενών αλκοολών (αλειφατικές ενώσεις) που έχουν γενικό μοριακό τύπο  $ROH$  ή  $C_nH_{(2n+1)OH}$  ή  $C_nH_{(2n+2)O}$ . Υπάρχουν κοινές παρανοήσεις σχετικά με τις διαφορές μεταξύ της



βιοαιθανόλης και της αιθανόλης. Στην ουσία, η βιοαιθανόλη είναι αλκοόλη που προέρχεται από βιομάζα. Χημικά, η βιοαιθανόλη και η αιθανόλη είναι η ίδια ακριβώς ένωση με πανομοιότυπο χημικό τύπο. Η διαφορά μεταξύ των δύο έγκειται στη μέθοδο με την οποία έχουν παραχθεί. Η βιοαιθανόλη θεωρείται ότι παράγεται μέσω μιας πιο φιλικής προς το περιβάλλον διαδικασίας χρησιμοποιώντας τη ζύμωση υλικών που προέρχονται από βιομάζα όπως ζαχαρότευτλα, καλαμπόκι, άχυρο και ξύλο. Η αιθανόλη, ή η συνθετική αιθανόλη, παράγεται από αποθέματα πετροχημικών τροφοδοσιών (παρόμοια με τα ορυκτά καύσιμα), κυρίως από την οξείδο-καταλυόμενη ενυδάτωση του αιθυλενίου. Παρά τις διαφορές στα αρχικά υλικά από τα οποία προέρχονται, η βιοαιθανόλη και η αιθανόλη λειτουργούν πανομοιότυπα. Είναι δυνατά καύσιμα τα οποία δεν περιέχουν σωματίδια και υφίστανται μια σχετικά καθαρή καύση καθώς υπάρχει πολύ οξυγόνο στη χημική τους ένωση, ανεξάρτητα από τη διαδικασία παραγωγής.

Η αιθανόλη είναι μια πολύ ενδιαφέρουσα χημική ένωση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές όπως η παραγωγή αλκοολούχων ποτών καθώς και χημικών, φαρμακευτικών προϊόντων και βιοκαυσίμων. Η παραγωγή «καθαρής» αιθανόλης είναι επίσης μια πολύ γνωστή διαδικασία. Η ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών διαδικασιών απόσταξης τον δέκατο ένατο αιώνα οδήγησε σε μεγάλη αύξηση του βιομηχανικού εμπορίου αιθανόλης. Η μεγαλύτερη ποσότητα της βιομηχανικής παραγόμενης αιθανόλης χρησιμοποιείται εδώ και πολύ καιρό κυρίως για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών, αλλά και σε άλλες εφαρμογές όπως στη χημική βιομηχανία, ως καύσιμο λαμπτήρων και ως καύσιμο μεταφοράς.

Η παραγωγή βιοαιθανόλης από ανανεώσιμες πηγές και τα πλεονεκτήματα για πιο πράσινες εναλλακτικές λύσεις έχουν οδηγήσει την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα σε ολοένα και αυξανόμενες έρευνες με σκοπό την ανάπτυξη τεχνολογιών για την επίτευξη υψηλότερης μετατροπής βιομάζας και, κατά συνέπεια, υψηλότερη απόδοση και καθαρότητα βιομηχανικού επιπέδου. Με αυτόν τον τρόπο, η παραγωγή βιοαιθανόλης μπορεί να μειώσει την κατανάλωση αργού πετρελαίου.

## 4.2 Ιδιότητες αιθανόλης

Η αιθανόλη είναι μια διαυγής, άχρωμη, εύφλεκτη, υγρή, πτητική και ευδιάλυτη στο νερό χημική ουσία, καθώς επίσης και σημαντικός διαλύτης. Αναμιγνύεται με το νερό σε κάθε αναλογία και κατά την ανάμειξη τους παρατηρείται ελάττωση όγκου, ενώ εκλύεται θερμότητα. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της σε συνδυασμό με την ανεπτυγμένη τεχνολογία για την αξιοποίηση της την καθιστούν εμπορικά αξιοποιήσιμη σε πληθώρα εφαρμογών, με το μεγαλύτερο μέρος της παραγόμενης αιθανόλης να προορίζεται για χρήση ως πρόσθετο καυσίμου ή και ως αυτούσιο καύσιμο. Από τη δεκαετία του 1980, η αιθανόλη ήταν ένας σημαντικός παράγοντας στην αγορά καυσίμων ως εναλλακτικό καύσιμο καθώς και ως οξυγονωμένο πρόσθετο για βενζίνη (Demirbas et al., 2009). Η αιθανόλη μπορεί να παραχθεί συνθετικά από πετρέλαιο και φυσικό αέριο ή βιολογικά από ζάχαρη, άμυλο και λιγνοκυτταρινικά υλικά. Η βιολογικά παραγόμενη αιθανόλη ονομάζεται μερικές φορές ζυμωτική αιθανόλη ή βιοαιθανόλη. Το μοριακό βάρος της αιθανόλης είναι 46,06844, η πυκνότητά της 0,79 Kg/L, το σημείο ζέσεως της εντοπίζεται στους 78,3 °C, ενώ τήκεται στους -117 °C. Σε σύγκριση με τη βενζίνη, η βιοαιθανόλη έχει υψηλότερο αριθμό οκτανίων (108), ευρύτερα όρια ευφλεκτότητας, ταχύτερη φλόγα και περισσότερη θερμότητα καυσαερίων. Περισσότερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Ιδιότητες αιθανόλης

Ιδιότητα	Περιγραφή
Χημικός τύπος	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O
Μοριακό βάρος (g/mol)	46.07
Εμφάνιση	Άχρωμο υγρό
Πυκνότητα στους 20°C (g/cm <sup>3</sup> )	0.789
Σημείο βρασμού (°C)	78.37
Τάση ατμών (kPa) στους 20° C	5.95
Ιξώδες (Pa*s) στους 20°C	0.0012
Σημείο ανάφλεξης (°C)	13-14

#### 4.3 Εφαρμογές αιθανόλης

Η αιθανόλη αποτελεί την βασικότερη ουσία του κρασιού και πολλών αλκοολούχων ποτών, καθώς και μία από τις σημαντικότερες χημικές ουσίες που διαθέτει η βιομηχανία. Η διαλυτική της ικανότητα την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη για την εκχύλιση πολύτιμων φυσικών προϊόντων από φυτικούς και ζωικούς ιστούς. Ως βιομηχανική πρώτη ύλη, η αιθανόλη συμμετέχει στην παρασκευή:

- Εναλλακτικών καυσίμων
- Οινοπνευματωδών ποτών
- Συγκολλητικών
- Προϊόντων υγιεινής
- Απορρυπαντικών
- Εκρηκτικών
- Μελανιών
- Χημικών
- Κρεμών χεριών
- Πλαστικών
- Χρωμάτων
- Διαλυτικών
- Κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων
- Ξυδιού και άλλων

Δύο τύποι αιθανόλης παράγονται παγκοσμίως, η ζυμωμένη και η συνθετική αιθανόλη. Η αιθανόλη που έχει υποστεί ζύμωση (βιοαιθανόλη) παράγεται από βιομάζα και χρησιμοποιείται κυρίως για καύσιμα, και για τη βιομηχανία ποτών. Η συνθετική αιθανόλη παράγεται από το αιθυλένιο, ένα υποπροϊόν του πετρελαίου και χρησιμοποιείται κυρίως σε βιομηχανικές εφαρμογές. Μια ακόμη κατηγοριοποίηση της αιθανόλης γίνεται με βάση την καθαρότητά της. Ειδικότερα, υπάρχει η αιθανόλη 95%, η καθαρή αιθανόλη (99-100%) και η μετουσιωμένη αιθανόλη.

#### 4.4 Βιοαιθανόλη ως καύσιμο

Η κατάργηση των μολυβδούχων πρόσθετων στις βενζίνες την δεκαετία του '90, για λόγους τοξικότητας, δημιούργησε την ανάγκη για εύρεση νέων συστατικών ανάμιξης της βενζίνης τα οποία και θα κάλυπταν την απώλεια αριθμού οκτανίου που προέκυπτε. Η ανάγκη αυτή

καθιέρωσε την χρήση των οξυγονούχων ενώσεων, ως συστατικών ανάμιξης, στα τελικά προϊόντα των διυλιστηρίων. Δύο είναι οι κύριες κατηγορίες ενώσεων οι οποίες χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο, οι αλκοόλες και οι αιθέρες. Οι βασικές αλκοόλες που χρησιμοποιούνται είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ισοπροπανόλη και η τριτοταγής βουτανόλη. Οι βασικότεροι αιθέρες που χρησιμοποιούνται είναι ο μέθυλο-τριτοταγήςβουτυλαιθέρας (MTBE), ο τριτοταγής- άμυλο-μεθυλαιθέρας (TAME), ο αίθυλοτριτοταγής-βουτυλαιθέρας (ETBE) και μίγματα αυτών.

Τα βασικά πλεονεκτήματα της χρήσης οξυγονούχων συστατικών συμπεριλαμβανομένης και της αιθανόλης στις βενζίνες είναι αρχικά, η μείωση εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου και κυρίως του μονοξειδίου του άνθρακα. Ακόμη, η μείωση της περιεκτικότητας της κατώτερης ατμόσφαιρας σε όζον σε περιοχές με υψηλό πληθυσμό υπό ιδιαίτερες κλιματολογικές συνθήκες. Το όζον προκύπτει από μια αλληλουχία σύνθετων χημικών αντιδράσεων μεταξύ των υδρογονανθράκων που υπάρχουν στην ατμόσφαιρα με οξείδια του αζώτου. Τέλος ιδιαίτερα σημαντικό είναι πως ικανοποιούνται οι απαιτήσεις των προδιαγραφών των βενζινών για τον αριθμό οκτανίων χωρίς την χρήση τοξικών προσθέτων αλλά με χρήση πιο περιβαλλοντικά φιλικών ενώσεων όπως οι παραπάνω αλκοόλες και αιθέρες οι οποίες μπορούν να έχουν και βιολογική προέλευση με δυνατότητα παραγωγής από ανανεώσιμες πρώτες ύλες.

Η άμεση ανάμιξη οξυγονούχων συστατικών, κυρίως αιθανόλης, είναι αρκετά διαδεδομένη στην Βραζιλία και σε μικρότερο βαθμό στις Ηνωμένες Πολιτείες και τον Καναδά. Στην Ευρώπη η χρήση τους είναι ακόμα περιορισμένη όπως φαίνεται και από τις προδιαγραφές που παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα. Παρόλα αυτά στόχος της Ευρωπαϊκής Ένωσης είναι η σταδιακή αύξηση τόσο της παραγωγής όσο και της χρήσης τους.

**Πίνακας 3:** Επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις οξυγονούχων συστατικών σε βενζίνες σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό πρότυπο EN 228

Οξυγονούχο συστατικό	Μέγιστη Συγκέντρωση (%v/v)
Μεθανόλη	3
Αιθανόλη	5
Ισοπροπυλική Αλκοόλη	10
Ισοβουτυλική Αλκοόλη	10
Τριτοταγής Βουτυλική Αλκοόλη	7
Αιθέρες με 5 ή περισσότερα άτομα άνθρακα ανά μόριο	15
Άλλες οξυγονούχες ενώσεις	10

## 4.5 Πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης

### 4.5.1 Αμυλούχες πρώτες ύλες

Οι αμυλούχες πηγές αποτελούν μια ευρέως διαδεδομένη πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης παγκοσμίως. Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω της διαθεσιμότητάς τους σε όλο τον κόσμο, της ευκολίας μετατροπής, της ικανότητας αποθήκευσης για μεγάλο χρονικό διάστημα και της υψηλής απόδοσης αιθανόλης. Αυτές οι πρώτες ύλες περιλαμβάνουν δημητριακά όπως καλαμπόκι, σιτάρι και κριθάρι τα οποία αποτελούνται από ποσοστό αμύλου από 60%



έως 80%, ρίζες με ποσοστό αμύλου 60% έως 90% , όσπρια με ποσοστό αμύλου 25 έως 50% καθώς και πράσινα και ανώριμα φρούτα με ποσοστό αμύλου έως 70% . Το καλαμπόκι, οι σπόροι σόργου, το σιτάρι, οι πατάτες και οι γλυκοπατάτες είναι μερικές από τις φημισμένες πηγές αιθανόλης καυσίμου. Το άμυλο που αποθηκεύεται σε κόκκους αποτελείται από μακριές αλυσίδες μονάδων γλυκόζης, που περιέχουν 1000 μονομερείς μονάδες ή περισσότερες ανά δομή αμυλόζης και 1000–6000 μονάδες ή περισσότερα μονομερή ανά δομή αμυλοπηκτίνης. Αυτός ο τύπος πρώτης ύλης (κυρίως το καλαμπόκι και το σιτάρι) χρησιμοποιείται περισσότερο για την παραγωγή αιθανόλης στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη. Σε τροπικές χώρες, άλλες αμυλούχες καλλιέργειες όπως οι κόνδυλοι (π.χ. μανιόκα) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εμπορική παραγωγή αιθανόλης καυσίμου (Vohra et al., 2014).

#### 4.5.2 Σακχαρούχες πρώτες ύλες

Οι σακχαρούχες πρώτες ύλες προέρχονται από ενεργειακές καλλιέργειες όπως του ζαχαροκάλαμου, από καλλιέργειες φρούτων (π.χ. σταφυλιού, καρπουζιού και μήλου) και από απόβλητα διυλιστηρίου ζάχαρης. Τα κύρια πλεονεκτήματα των καλλιεργειών αυτών ως πρώτων υλών αιθανόλης είναι η υψηλή απόδοση σακχάρων και το χαμηλό κόστος μετατροπής τους, ενώ η εποχιακή διαθεσιμότητα αυτών των καλλιεργειών είναι ο κύριος περιοριστικός παράγοντας (Chisti, 1998).

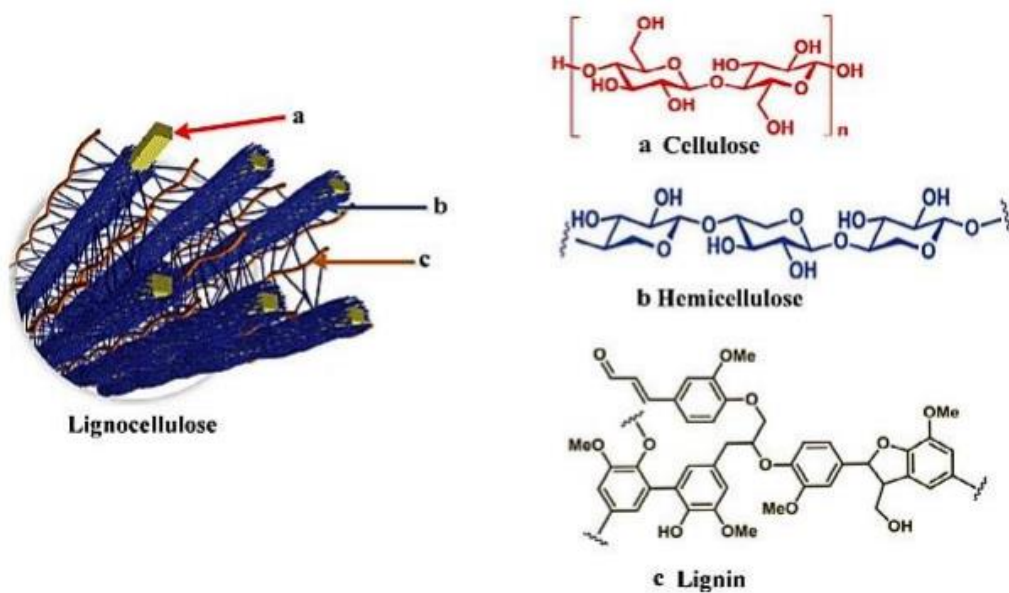
Ακόμη, η μετατροπή της σακχαρόζης σε αιθανόλη είναι ευκολότερη σε σύγκριση με τα αμυλώδη υλικά και τη λιγνοκυτταρινική βιομάζα, επειδή δεν απαιτείται προηγούμενη υδρόλυση της πρώτης ύλης, καθώς αυτός ο διασακχαρίτης μπορεί να διασπαστεί από τα κύτταρα της ζύμης.

#### 4.5.3 Λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα είναι μια άφθονη, ανανεώσιμη πηγή υδατανθράκων ιδανική για μικροβιακή μετατροπή σε χημικά προϊόντα και καύσιμα. Προέρχεται από αγροτικά υπολείμματα, όπως π.χ. το άχυρο, το ξύλο και άλλα αγροτικά απόβλητα. Ιδιαίτερα σημαντικό σημείο για την χρήση της συγκεκριμένης πρώτης ύλης για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι πως βελτιώνει την ισορροπία του CO<sub>2</sub> και παράλληλα δεδομένου ότι είναι ένας πόρος αποβλήτων, δεν ανταγωνίζεται τον άνθρωπο και την τροφική αλυσίδα (Socol et al., 2010). Η σύνθεση της κατηγοριοποιείται σε τρία κύρια μέρη:

- κυτταρίνη (30% έως 50% ξ.β. κατά βάρος)
- ημικυτταρίνη (20% έως 40% ξ.β κατά βάρος)
- λιγνίνη (10% έως 20% ξ.β κατά βάρος)

Παρακάτω απεικονίζονται οι μοριακές δομές της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης:



Εικόνα 9: Μοριακή δομή λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (Brandt et al., 2013)

#### 4.6 Προεπεξεργασία βιομάζας άλγης

Η προεπεξεργασία της βιομάζας είναι ένα από τα πιο κρίσιμα και δαπανηρά στάδια της διαδικασίας μετατροπής της βιομάζας σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Είναι λογικό επομένως, λόγω του κόστους, η προεπεξεργασία να έχει μεγάλες δυνατότητες βελτίωσης της αποδοτικότητας και έτσι ανακαλύπτεται ευρέως. Μια αποτελεσματική προεπεξεργασία μπορεί να καταστρέψει τους φυσικούς φραγμούς στο κυτταρικό τοίχωμα και να βελτιώσει τους ρυθμούς ενζυμικής υδρόλυσης, τη ζύμωση, και άλλες μεταβλητές της διεργασίας. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα παρέχουν πολλές διαφορετικές μεθόδους προεπεξεργασίας της βιομάζας άλγης, αλλά ακόμα, δεν έχει παρουσιαστεί καμία ενιαία, βέλτιστη, ιδιαίτερα παραγωγική και αποτελεσματική μέθοδος.

Η προεπεξεργασία των μικροαλγών χρησιμοποιείται συνήθως σε πολλές πιλοτικές εφαρμογές, καθώς είναι ιδανική για υλικά με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες. Αυτή η προεπεξεργασία είναι απαραίτητη για τη μετατροπή των μικροαλγών για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Η κατάλληλη προεπεξεργασία έχει ως αποτέλεσμα τη βέλτιστη απόδοση βιοαιθανόλης ενώ παράλληλα στοχεύει στο χαμηλό κόστος και είναι φιλική προς το περιβάλλον. Η παραγωγή βιοαιθανόλης από μικροάλγη μπορεί να επιτευχθεί μέσω των διαδικασιών της σακχαροποίησης και της ζύμωσης. Η σακχαροποίηση διασπά το άμυλο σε απλά σάκχαρα (γλυκόζη) χρησιμοποιώντας όξινες και αλκαλικές υδρολύσεις ή ενζυμικές αντιδράσεις, όπου και στη συνέχεια η γλυκόζη ζυμώνεται με τη χρήση μαγιάς, με αποτέλεσμα την παραγωγή βιοαιθανόλης. Ωστόσο, απαιτείται συχνά προεπεξεργασία πριν από το στάδιο της υδρόλυσης. Οι διεργασίες που χρησιμοποιούνται για την προεπεξεργασία της βιομάζας της άλγης δύνανται να είναι φυσικές, φυσικοχημικές, χημικές και βιολογικές (Li et al., 2014).

##### 4.6.1 Φυσική προεπεξεργασία

Οι τεχνικές φυσικής προεπεξεργασίας αποσκοπούν στην αύξηση της προσβάσιμης επιφάνειας και του μεγέθους των πόρων της βιομάζας άλγης. Συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη προεπεξεργασίας παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα κόστους και ευκολία εμπορίας. Μερικές από τις τεχνικές αυτές που θα αναλυθούν στη συνέχεια είναι η χρήση μικροκυμάτων, υπερήχων και η μηχανική μείωση του μεγέθους.

#### 4.6.1.1 Μικροκύματα

Η ακτινοβολία μικροκυμάτων εφαρμόζει ηλεκτρομαγνητικό πεδίο για να προκαλέσει εσωτερική θέρμανση ενός αντικειμένου. Στην παραγωγή βιοαιθανόλης, αυτή η προσέγγιση είναι εφαρμόσιμη με σκοπό τη δομική διάσπαση της προεπεξεργασμένης βιομάζας. Στο λιγνοκυτταρινικό υλικό, τα μικροκύματα επιτίθενται στους πολικούς δεσμούς δονώντας τη δομή μέχρι το υλικό να θερμανθεί εσωτερικά. Ως αποτέλεσμα, η σύνθετη λιγνοκυτταρινική δομή σπάει, διευρύνοντας την πρακτική περιοχή για την επακόλουθη ενζυματική επίθεση. Η θεραπεία με μικροκύματα θεωρείται ως μια προσπάθεια βελτίωσης μέσω της βοήθειας άλλων μεθόδων θεραπείας (Aditiya et al., 2016).

#### 4.6.1.2 Υπέρηχοι

Η τεχνική των υπερήχων χρησιμοποιεί το φαινόμενο της σπηλαίωσης που προκαλείται από τους υπερήχους σε ένα υγρό για να ενισχύσει την κυτταρική διάσπαση των μικροοργανισμών. Οι υπέρηχοι ακτινοβολούνται σε υγρά μέσα, μικρές "κενές περιοχές", οι οποίες είναι γνωστές ως μικροφουσαλίδες. Οι μικροφουσαλίδες σχηματίζονται καθώς τα μόρια του υγρού μετακινούνται από τα ακουστικά κύματα. Η σπηλαίωση κατά τη διάρκεια του υπερηχητικού συντονισμού αυξάνει τα φαινόμενα μικρο-αναταράξεων καθώς και το ιξώδες/πίεση και τα κρουστικά κύματα. Κατά τη διάρκεια της προεπεξεργασίας των κυττάρων η μικρο-ταραχή και τα κρουστικά κύματα αυξάνουν το ρυθμό διάσπασης των κυττάρων των μικροαλγών για την αποτελεσματική εκχύλιση των λιπιδίων (Onumaegbu et al., 2018).

#### 4.6.1.3 Μηχανική μείωση μεγέθους

Συμβατικά, η φυσική μείωση του μεγέθους μπορεί να γίνει με υγρή άλεση με δίσκο, άλεση με σφαίρα, δονητική άλεση με σφαίρα, άλεση με συμπίεση, σφυρόμυλο και άλεση με κύλινδρο και συμβαίνει συνήθως στην αρχή της παραγωγής της βιοαιθανόλης. Έχει αναφερθεί, ωστόσο, ότι η προσέγγιση της φυσικής μείωσης με μηχανική προεπεξεργασία χρησιμοποιεί το ένα τρίτο της συνολικής κατανάλωσης ενέργειας ολόκληρης της παραγωγής βιοαιθανόλης (Aditiya et al., 2016).

#### 4.6.1.4 Εξώθηση

Η εξώθηση αναπαριστά μια προηγμένη τεχνική μηχανικής θρυμματισμού, ειδικά σχεδιασμένη για την προεπεξεργασία βιομάζας. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει στα ένζυμα να επικεντρωθούν στους πιο προσβάσιμους υδατάνθρακες, διευρύνοντας την αποτελεσματικότητά τους. Συγκεκριμένα, η διαδικασία περιλαμβάνει τη διάτμηση και την ανάμειξη της αρχικής ύλης, η οποία περνά μέσα από έναν εξωθητή σε υψηλή θερμοκρασία. Αυτό προκαλεί τόσο φυσική όσο και χημική παραμόρφωση της βιομάζας, βελτιώνοντας την προσβασιμότητα των ενζύμων σε αυτήν. Για να επιτευχθεί αποτελεσματικά αυτή η προεπεξεργασία, πρέπει να ελέγχονται παράγοντες όπως η ταχύτητα του κοχλία, η θερμοκρασία και ο λόγος συμπίεσης (Lee et al., 2009).

#### 4.6.2 Χημική προεπεξεργασία

Η χημική προεπεξεργασία διαλύει τα πολυμερή αυξάνοντας έτσι την κυτταρική διάσπαση των κυττάρων. Αλκαλικά και όξινα αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται συχνά για τη διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης που παρουσιάζονται στη βιομάζα μικροαλγών, καθιστώντας τα ανοικτά για ενζυμικές αντιδράσεις.

#### 4.6.2.1 Όξινη προεπεξεργασία

Η όξινη προεπεξεργασία επιτρέπει στα ένζυμα να αποκτήσουν πρόσβαση στην κυτταρίνη διαλύοντας μόρια ημικυτταρίνης (Alvira et al., 2010). Υπάρχουν διάφορα κοινά οξέα που χρησιμοποιούνται στην όξινη προεπεξεργασία όπως το υδροχλωρικό οξύ, το φωσφορικό οξύ, το νιτρικό οξύ και το θειικό οξύ ως τα πιο δημοφιλή που χρησιμοποιούνται σε λιγνοκυτταρινούχα υλικά, καθώς και διάφορα οργανικά οξέα όπως το υπεροξικό οξύ, το μηλεϊκό οξύ, το γαλακτικό οξύ και το οξικό οξύ. Σε γενικές γραμμές, η όξινη προεπεξεργασία μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο μεθόδους: την προεπεξεργασία με πυκνό και την προεπεξεργασία με αραιό οξύ. Στη συμπυκνωμένη όξινη προεπεξεργασία, απαιτείται μόνο μικρότερος χρόνος και ήπια θερμοκρασία για την απόδοση των μονομερών σακχάρου. Η όξινη προεπεξεργασία αλλάζει τη δομή των κυτταρικών τοιχωμάτων των αλγών και επιτρέπει την ενζυματική μετατροπή των υδατανθράκων σε απλά σάκχαρα. Τα μειονεκτήματα της όξινης επεξεργασίας είναι η διαβρωτικότητα και η τοξικότητα των αντιδραστηρίων και η παραγωγή ανασταλτικών προϊόντων.

Σε μια βιομηχανική κλίμακα, προτιμάται η χρήση αραιού οξέος, καθώς τα ανασταλτικά προϊόντα δεν θα σχηματίζονται και έτσι δεν θα επηρεάζονται τα επόμενα στάδια της διεργασίας.

#### 4.6.2.2 Αλκαλική προεπεξεργασία

Η προεπεξεργασία με βάσεις θα προκαλέσει διόγκωση της κυτταρίνης, καταστρέφοντας τη δομή της λιγνίνης με το σπάσιμο των γλυκοζιτικών δεσμών και διαλύοντας εν μέρει την ημικυτταρίνη. Ακόμα πραγματοποιείται και σπάσιμο των εστερικών δεσμών. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες βάσεις είναι το καυστικό νάτριο (NaOH), το KOH και το CaOH<sub>2</sub>. Τα πλεονεκτήματα της αλκαλικής προεπεξεργασίας είναι οι χαμηλότερες θερμοκρασίες αντίδρασης, η αποτελεσματική απομάκρυνση του κυτταρικού τοιχώματος και η επακόλουθη αύξηση της προσβασιμότητας των ημικυτταρινών. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή απαιτεί ώρες έως ημέρες και συνεπάγεται υψηλό κόστος λόγω της απαιτούμενης μεταγενέστερης επεξεργασίας (Kusmiyati et al., 2023).

#### 4.6.2.3 Προεπεξεργασία Organosolv

Η μέθοδος Organosolv θεωρείται επίσης μία χημική προεπεξεργασία που διαλύει τη λιγνίνη στη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα. Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται με ανάμιξη οργανικού διαλύτη με ανόργανο οξύ ως καταλύτη, όπως HCl ή H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Δεδομένου ότι οι τυπικοί οργανικοί διαλύτες, όπως για παράδειγμα η αιθανόλη είναι εύφλεκτοι, αυτή η μέθοδος προεπεξεργασίας πρέπει να εκτελείται με ιδιαίτερη προσοχή στην ασφάλεια. Παρά την αποτελεσματικότητά της στην παραγωγή βιοαιθανόλης υψηλής ποιότητας, η μέθοδος αυτή θεωρείται βιομηχανικά μη πρακτική λόγω του υψηλού κόστους των διαλυτών.

#### 4.6.3 Φυσικοχημική προεπεξεργασία

Στη φυσικοχημική προεπεξεργασία συνδυάζονται φυσικές και χημικές διεργασίες για την εμφάνιση νέων μεθόδων. Κάποιες από αυτές είναι η έκρηξη ατμού, η έκρηξη ινών αμμωνίας (AFEX), το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα.

##### 4.6.3.1 Έκρηξη ατμού

Η προεπεξεργασία με έκρηξη ατμού αποτελεί υδροθερμική μέθοδο και βασίζεται στην απότομη αλλαγή πίεσης για την επεξεργασία της βιομάζας. Αρχικά, η βιομάζα εκτίθεται σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση για λίγα δευτερόλεπτα έως λεπτά, και στη συνέχεια η

διαδικασία ολοκληρώνεται μετά την αποσυμπίεση της βιομάζας, όταν ο ατμός εκρήγνυται στις ίνες της βιομάζας. Η μέθοδος αυτή κατατάσσεται στη φυσικοχημική προεπεξεργασία για τα συγχωνευμένα μηχανικά και χημικά χαρακτηριστικά της. Για τη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα η μέθοδος αυτή επιτρέπει το διαχωρισμό των ινών εντός της και επιτρέποντας την ανάκτηση της ξυλόζης προσφέροντας μια επιπλέον προοπτική σε αυτή τη μέθοδο. Έχοντας τα πλεονεκτήματα της υψηλής παραγωγής ανάκτησης ξυλόζης (περίπου 45-65%), της μικρότερης χρήσης ενέργειας και της φιλικότητας προς το περιβάλλον, η έκρηξη με ατμό είναι ευνοϊκή από οικονομική άποψη για την παραγωγή βιοαιθανόλης (Lorente et al., 2015). Πρέπει ωστόσο να δοθεί προσοχή στον σχηματισμό παραπροϊόντων που ενδέχεται να διαταράξουν τη μικροβιακή δραστηριότητα στο επόμενο στάδιο παραγωγής (ζύμωση).

#### 4.6.3.2 Έκρηξη ινών αμμωνίας

Η έκρηξη ινών αμμωνίας επιχειρεί να βλάψει τα κυτταρικά τοιχώματα εκμεταλλευόμενη τη διαστολή της υγρής άνυδρης αμμωνίας, η οποία προκαλεί αιφνίδια διόγκωση και βλάβη των κυτταρικών τοιχωμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες (60°C-100°C) και πιέσεις (250-300 psi) για περιορισμένο χρονικό διάστημα (30-60 λεπτά), ακολουθούμενο από ταχεία απελευθέρωση της πίεσης. Το κύριο αποτέλεσμα αυτής της επεξεργασίας είναι η απομάκρυνση της λιγνίνης και η μερική διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, ενώ διατηρείται η υψηλή περιεκτικότητα σε κυτταρίνη. Η μέθοδος είναι φιλική προς το περιβάλλον και σύντομη χρονικά, υστερεί ωστόσο στη προεπεξεργασία βιομάζας με υψηλή λιγνίνη και ταυτόχρονα στην ικανότητα της να διαλύει το στερεό κλάσμα της ημικυτταρίνης.

#### 4.6.3.3 Υγρή οξειδωση

Αυτή η προσέγγιση (υποβολή βιομάζας σε υψηλή πίεση και θερμοκρασία, 500-2000 kPa και 170-200 °C αντίστοιχα για περίπου 10-15 λεπτά) αποικοδομεί το λιγνοκυτταρινικό υλικό με λιγότερους αναστολείς, αφαιρεί τη λιγνίνη και μειώνει την κρυσταλλική κυτταρίνη, επομένως παρέχει καλύτερες συνθήκες για τις διεργασίες που ακολουθούν (υδρόλυση και ζύμωση) να λειτουργήσουν στο προεπεξεργασμένο προϊόν. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος έχει την κοινή πρόκληση της ενεργειακής απόδοσης και του κόστους κεφαλαίου, δεδομένου ότι περιλαμβάνει υψηλή θερμοκρασία και πίεση.

#### 4.6.3.4 Υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα

Η προεπεξεργασία με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> περιλαμβάνει την εκχύλιση υδατανθράκων από μικροάλη με χρήση CO<sub>2</sub> ως διαλύτη. Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η ευκολία ανάκτησης και η χρήση μη τοξικών και μη εύφλεκτων αντιδραστηρίων. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή συνεπάγεται υψηλό κόστος διεργασίας λόγω της απαιτούμενης υποδομής και λειτουργίας. Μαζί με την αύξηση της πίεσης και της θερμοκρασίας, αυτή η προσέγγιση θα αυξήσει την απόδοση της γλυκόζης, καθώς η επιφάνεια της βιομάζας αυξάνεται (Deshmukh et al., 2019).

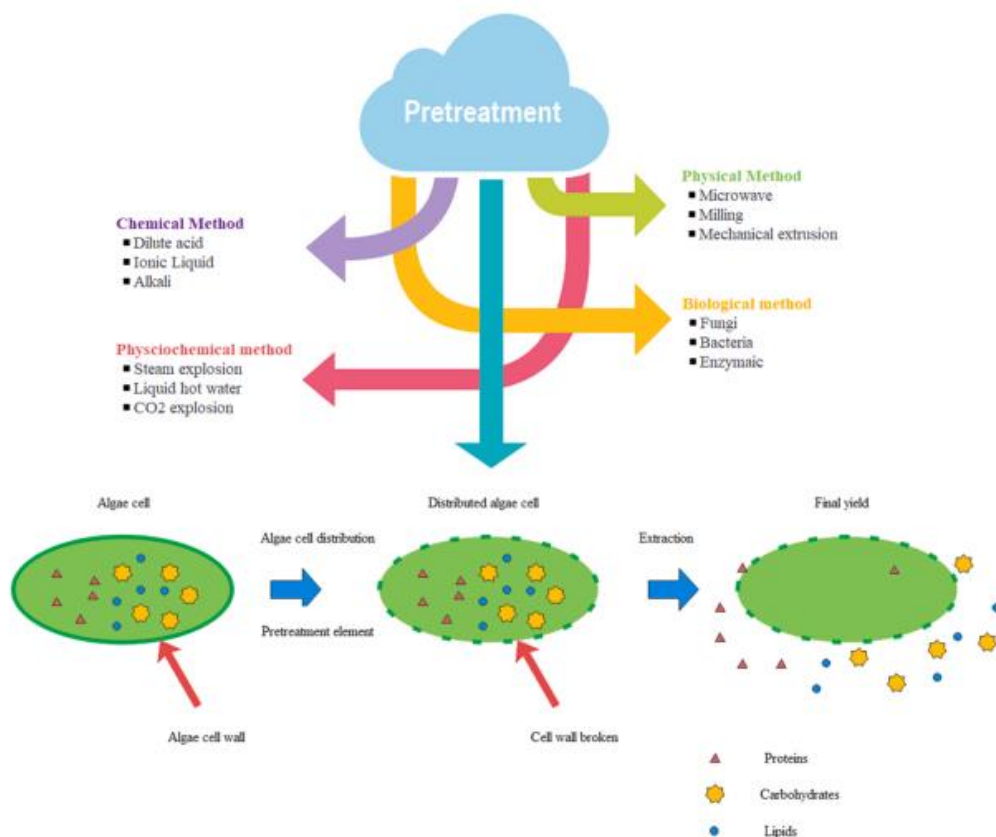
#### 4.6.4 Βιολογική προεπεξεργασία

Η βιολογική προεπεξεργασία με τη χρήση διαφόρων τύπων μυκήτων, αποτελεί μία ασφαλή και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο, καθώς δεν απαιτεί υψηλή ενέργεια για την απομάκρυνση της λιγνίνης από μια λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα.

Η βιολογική προ-επεξεργασία απαιτεί κάποιο χρόνο, αλλά μπορεί να γίνει πιο αποδοτική αν βελτιώσουμε τις συνθήκες καλλιέργειας των μικροοργανισμών. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την τροποποίηση ορισμένων παραγόντων, όπως ο χρόνος επώασης, το pH, το μέγεθος του κόκκου της βιομάζας, η περιεχόμενη υγρασία και ο βαθμός αερισμού. Επειδή τα



άλγη έχουν χαμηλά επίπεδα λιγνίνης, η μέθοδος αυτή δεν χρησιμοποιείται συχνά για την προεπεξεργασία των αλγών παρότι σε περιπτώσεις που έχει χρησιμοποιηθεί παρατηρήθηκε βελτίωση της υδρόλυσης.



**Εικόνα 10:** Διαφορετικές τεχνικές και διεργασίες προεπεξεργασίας για την ανάπτυξη βιοκαυσίμων από άλγη (Muthuraman & Kasianantham, 2023)

## 4.7 Υδρόλυση

Η διαδικασία της υδρόλυσης επιτρέπει την απομάκρυνση των μακρομορίων υδατανθράκων (όπως η κυτταρίνη ή το άμυλο) με την προσθήκη νερού και τη χρήση ενζύμων ή οξέων. Αυτό το στάδιο είναι κρίσιμο για την παραγωγή βιοαιθανόλης, καθώς η ποιότητα του υδρολύματος επηρεάζει τη διαδικασία ζύμωσης και, συνεπώς, την ποιότητα της αιθανόλης ως τελικού προϊόντος. Η διαδικασία αυτή είναι αναγκαία επειδή οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στη ζύμωση μπορούν να μετατρέψουν μόνο απλούστερα σάκχαρα που προέρχονται από τους πολύπλοκους υδατάνθρακες της βιομάζας. Αν και η ενζυμική υδρόλυση είναι οικονομικά δύσκολη λόγω του υψηλού κόστους των ενζύμων, θεωρείται λιγότερο πρακτική για εμπορικούς σκοπούς σε σύγκριση με την όξινη υδρόλυση. Ωστόσο, σε σύγκριση με την όξινη υδρόλυση, τα ένζυμα λειτουργούν σε ήπιο περιβάλλον, επομένως απαιτείται μικρότερο κόστος συντήρησης του εξοπλισμού. Επιπλέον, το σύστημα διάθεσης για την όξινη υδρόλυση είναι απαραίτητο να εξεταστεί και απαιτεί πρόσθετο κόστος που πρέπει να ληφθεί υπόψη.

### 4.7.1 Ενζυμική Υδρόλυση

Η σακχαροποίηση είναι το κρίσιμο βήμα για την παραγωγή βιοαιθανόλης, όπου οι σύνθετοι υδατάνθρακες μετατρέπονται σε απλούς μονομερείς υδατάνθρακες. Σε σύγκριση με την

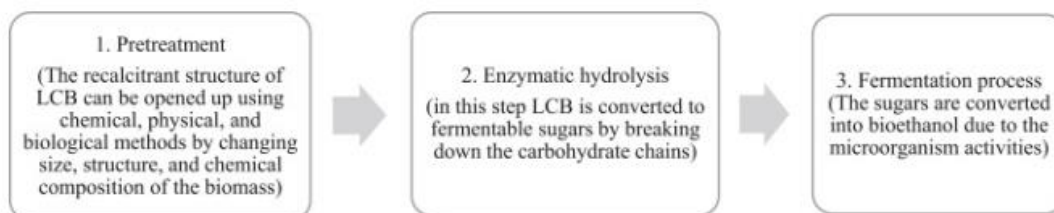
όξινη υδρόλυση, η ενζυμική υδρόλυση απαιτεί λιγότερη ενέργεια και ήπιες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. pH 4,5-5,0 και θερμοκρασία 40-50°C) και δεν παρουσιάζει πρόβλημα διάβρωσης. Ως εκ τούτου, αναμένεται χαμηλή κατανάλωση και χαμηλή τοξικότητα των υδρολυμάτων. Η ενζυμική υδρόλυση έχει πράγματι ενθαρρυνθεί γενικά, καθώς τα ένζυμα αναγνωρίζονται ως φιλικά προς το περιβάλλον κατά την εφαρμογή τους, και επίσης δεν παράγουν αναστολείς (Wang et al., 2023).

Η υδρόλυση της κυτταρίνης καταλύεται από μια κατηγορία ενζύμων γνωστή ως κυτταρινάσες. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να παραχθούν τόσο από βακτήρια όσο και από μύκητες. Μεταξύ των διαφόρων κυτταρινολυτικών μικροβιακών στελεχών, το *Trichoderma* είναι ένας από τους πιο καλά μελετημένους μύκητες που παράγουν κυτταρινάση και ημικυτταρινάση. Κατά την ενζυμική υδρόλυση, η κυτταρίνη αποικοδομείται από την κυτταρινάση σε αναγωγικά σάκχαρα που μπορούν μετ' έπειτα να ζυμώνονται από μαγιά ή βακτήρια σε αιθανόλη. Η δράση των κυτταρινολυτικών ενζύμων πραγματοποιείται μέσω τριών σταδίων προσρόφησης, βιοαποδόμησης και εκρόφησης.

Τόσο η ενζυμική όσο και η χημική υδρόλυση έχουν αναφερθεί για τη μετατροπή της βιομάζας των αλγών σε σάκχαρα. Μετά την ενζυμική υδρόλυση, οι συγκεντρώσεις των σακχάρων είναι πολύ υψηλότερες από εκείνες της χημικής υδρόλυσης. Η βιομάζα των αλγών περιέχει μεγάλες ποσότητες αμύλου, έτσι η αμυλάση μπορεί να συζευχθεί σε μεγάλο βαθμό για την υδρόλυση της βιομάζας των αλγών. Ορισμένα ειδικά ένζυμα μπορούν να προωθήσουν την υδρόλυση των πολυσακχαριτών από άλγη. Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τις αποδόσεις μονομερών σακχάρων μέσω ενζυμικής υδρόλυσης, όπως είναι η θερμοκρασία, το pH, η συγκέντρωση του υποστρώματος και η φόρτιση του ενζύμου. Το βέλτιστο pH του ενζύμου της κυτταρίνης είναι 4,5-5, οπότε πριν από την ενζυματική υδρόλυση, το υδρόλυμα πρέπει να εξουδετερωθεί με οξύ και βάση. Επιπλέον, κατά τη διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης, παράγονται συχνά όξινες ουσίες, οι οποίες θα επηρεάσουν τη σταθερότητα της λειτουργίας του συστήματος.

#### 4.7.2 Όξινη Υδρόλυση

Διάφορα οξέα χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση βιομάζας μικροαλγών, συμπεριλαμβανομένων των  $H_2SO_4$  και  $H_3PO_4$ . Η επιλογή του οξέος βασίζεται στο κόστος και στην αποτελεσματικότητα της αποικοδόμησης της λιγνοκυτταρίνης. Το  $HCl$  και το  $HNO_3$  θεωρούνται καλύτερα για την υδρόλυση βιομάζας καθώς είναι πιο πτητικά και ανακτώνται εύκολα, αλλά είναι πιο ακριβά από το  $H_2SO_4$ . Η εκτέλεση της όξινης υδρόλυσης σε υψηλές θερμοκρασίες ( $>160^\circ C$ ) μειώνει το χρόνο αντίδρασης- ωστόσο, η αντίδραση έχει μειονεκτήματα, όπως η διαβρωτικότητα των αντιδραστηρίων και η παραγωγή αναστολέων, όπως η φουρφουράλη και η υδρόξυ-μέθυλο-φουρφουράλη (Dinesh Kumar et al., 2019).

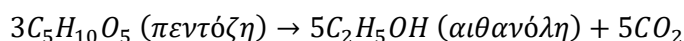
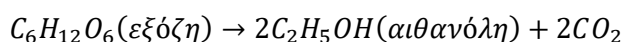


Εικόνα 11: Μετατροπή λιγνοκυτταρινικής βιομάζας σε βιοαιθανόλη (Rezania et al., 2020)



## 4.8 Ζύμωση

Σε αυτό το στάδιο σε αναερόβιες συνθήκες, οι μονοσακχαρίτες που έχουν προκύψει κατά την υδρόλυση ζυμώνονται για τη παραγωγή βιοαιθανόλης. Η ζύμωση πραγματοποιείται στο εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα. Κατά την διάρκεια αυτής της βιολογικής διεργασίας, σάκχαρα όπως φρουκτόζη, μανόζη, γαλακτόζη, γλυκόζη, ξυλόζη και αραβινόζη μεταβολίζονται από τους μικροοργανισμούς για την παραγωγή κυτταρικής ενέργειας και ως παραπροϊόντα παράγονται CO<sub>2</sub> και αιθανόλη. Οι αντιδράσεις που περιγράφουν την ζύμωση των προαναφερόμενων σακχάρων, εξόζων και πεντόζων, είναι:



Η μετατροπή των σακχάρων σε βιοαιθανόλη δύναται να συμβεί με διάφορους τρόπους. Για παράδειγμα, η χωριστή υδρόλυση και ζύμωση (SHF) περιλαμβάνει διαδοχική υδρόλυση και ζύμωση. Αν οι διεργασίες αυτές διεξαχθούν ταυτόχρονα, τότε έχουμε την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF). Θεωρητικά, ο συνδυασμός των δύο σταδίων μειώνει το κόστος παραγωγής και τον κίνδυνο μόλυνσης, αυξάνοντας παράλληλα την παραγωγή αιθανόλης. Ωστόσο, η SSF περιλαμβάνει την ανάμειξη υπολειμμάτων λιγνίνης με μαγιά, η οποία μπορεί να αναστείλει την ανακυκλοφορία της μαγιάς. Επιπλέον, οι βέλτιστες θερμοκρασίες για τα ένζυμα και τη μαγιά είναι διαφορετικές, γεγονός που δεν επιτρέπει είτε τα ένζυμα είτε τη μαγιά να δράσουν υπό βέλτιστες συνθήκες.

### 4.8.1 Διακριτή υδρόλυση και ζύμωση (SHF)

Σε αυτή τη διαδικασία, η προεπεξεργασμένη βιομάζα άλγης υδρολύεται σε γλυκόζη και στη συνέχεια ζυμώνεται σε αιθανόλη σε ξεχωριστές μονάδες. Τα κύρια πλεονεκτήματα αυτής της διεργασίας περιλαμβάνουν το χαμηλό κόστος των χημικών ουσιών, τον μικρό χρόνο παραμονής και το απλό σύστημα εξοπλισμού, τα οποία όλα προωθούν την εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα. Συνεπώς στη ξεχωριστή υδρόλυση και ζύμωση επιτυγχάνεται η βελτιστοποίηση των βημάτων μέσω του διαχωρισμού των διεργασιών. Ωστόσο, τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου περιλαμβάνουν τον αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης και πιθανών ανασταλτικών επιδράσεων.

### 4.8.2 Ταυτόχρονη Σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF)

Η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση είναι μια ενιαία διαδικασία που συνδυάζει τη σακχαροποίηση και τη ζύμωση. Σε αυτή τη διαδικασία, τα ένζυμα και οι μικροοργανισμοί προστίθενται στην ίδια μονάδα διεργασίας και η γλυκόζη καταναλώνεται αμέσως από τον μικροοργανισμό ζύμωσης. Έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να επιτευχθούν υψηλότερες ποσότητες αιθανόλης με τη χρήση SSF σε σύγκριση με την SHF. Επιπλέον στη SSF μειώνεται ο αριθμός των μονάδων λειτουργιών που απαιτούνται.

### 4.8.3 Σημαντικοί παράγοντες της ζύμωσης

Ειδικότερα, η ζύμωση απαιτεί κατάλληλες συνθήκες για τη διατήρηση των μικροβίων, δηλαδή συγκεκριμένες θερμοκρασίες και εύρος pH. Επιπλέον, πρόσθετοι παράγοντες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της ζύμωσης είναι ο ρυθμός ανάπτυξης και η γενετική σταθερότητα των μικροβίων, η ανοχή στους αναστολείς, στην όσμωση και στην αλκοόλη, η παραγωγικότητα και η απόδοση της αιθανόλης.

**pH:** Για τα βακτηριακού τύπου μικρόβια ζύμωσης, το pH 6,5-7,5 είναι συνήθως απαραίτητο για τη διατήρηση της ανάπτυξης των βακτηρίων, ενώ οι μύκητες είναι ικανοί να αντιστέκονται

σε πιο όξινο περιβάλλον pH 3,5-5,0. Μια μελέτη έδειξε την επίδραση του pH στη ζύμωση χρησιμοποιώντας σακχαροποιημένο ζυμό με pH 3.5, 4 και 4.5. Πρακτικά, έχει επιτευχθεί μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης περίπου 30 g/L για pH 4-4,5.

**Θερμοκρασία:** Οι παράγοντες της ζύμωσης είναι κυρίως μεσόφιλοι οργανισμοί και λειτουργούν καλύτερα μεταξύ 30° και 38°C. Η λειτουργία σε υψηλότερες θερμοκρασίες είναι επιθυμητή για τους ακόλουθους λόγους:

- Η υψηλή θερμοκρασία ζύμωσης αυξάνει εκθετικά το ρυθμό ανάπτυξης και την παραγωγικότητα, αφού τα βακτήρια που παράγουν αιθανόλη μπορούν να ευδοκιμήσουν σε υψηλότερη θερμοκρασία.
- Το κόστος κεφαλαίου της μονάδας είναι μικρότερο λόγω της υψηλότερης παραγωγικότητας ανά μονάδα όγκου ζυμωτήρα και της μείωσης της επένδυσης σε εξοπλισμό ψύξης.
- Το λειτουργικό κόστος είναι μικρότερο, δεδομένου ότι απαιτείται λιγότερη ενέργεια για τη διατήρηση της επιθυμητής θερμοκρασίας ζύμωσης και την ανάκτηση της αιθανόλης.
- Ο κίνδυνος μόλυνσης είναι μικρότερος, καθώς υπάρχουν λιγότεροι οργανισμοί που δρουν σε υψηλές θερμοκρασίες.
- Η διαδικασία ενζυμικής υδρόλυσης για τη σακχαροποίηση (ικανή να λειτουργήσει έως τους 55°C) μπορεί να συνδυαστεί με τη ζύμωση, μειώνοντας περαιτέρω το κεφάλαιο και την αναστολή της γλυκόζης (Hettenhaus, 1998).

**Περιεχόμενη Υγρασία:** Η ποσότητα υγρασίας στο περιβάλλον επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη και την ενεργότητα των μικροοργανισμών. Ένα υψηλό ποσοστό υγρασίας οδηγεί σε υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης, η οποία επηρεάζει τη δραστηριότητά τους. Η κατάλληλη υγρασία επηρεάζει την ανάπτυξη και τις ιδιότητες των στερεών, που από τη σειρά τους επηρεάζουν την παραγωγικότητα. Μια μείωση της υγρασίας μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη διάχυση θρεπτικών ουσιών, τη μικροβιακή ανάπτυξη και τη σταθερότητα των ενζύμων, ενώ μια αύξησή της μπορεί να επηρεάσει τη μεταφορά οξυγόνου και τη συσσώρευση σωματιδίων. Επίσης, η υψηλή υγρασία ενισχύει την ανάπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή ενζύμων σε λιγνοκυτταρικά συστήματα.

**Χρόνος επώασης στη ζύμωση:** Ο χρόνος επώασης στη ζύμωση αιθανόλης αποτελεί εξίσου παράγοντα που επηρεάζει τη ζύμωση. Η παράταση του χρόνου ζύμωσης μπορεί να αυξήσει το κόστος παραγωγής αιθανόλης αυξάνοντας την κατανάλωση ενέργειας. Ο βέλτιστος χρόνος μπορεί να ενισχύσει την παραγωγικότητα της αιθανόλης με μετριασμό της συσσώρευσης παραπροϊόντων, όπως οργανικά οξέα και γλυκερόλη, τα οποία μπορεί να αναστέλλουν τη δραστηριότητα ζύμης.

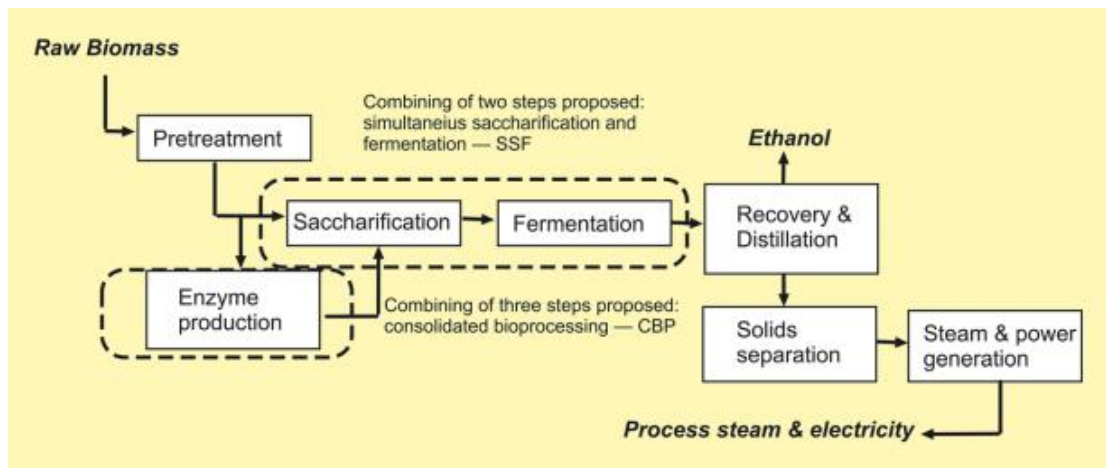
**Ανοχή σε αιθανόλη:** Η πλειονότητα των οργανισμών δεν μπορεί να ανεχθεί συγκεντρώσεις αιθανόλης πάνω από 10 έως 15 % (w/v). Η πρωτεΐνη μετουσιώνεται. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες μειώνουν την ανοχή του οργανισμού. Σε θερμοκρασίες άνω των 35°C, τα στελέχη χάνουν τη βιωσιμότητά τους σε αιθανόλη συγκέντρωσης 10% (w/v).

**Ανοχή στους αναστολείς:** Οι αναστολείς της ζύμωσης έχουν ομαδοποιηθεί σε τρεις κατηγορίες (McMillan, 1994):

1. Ενώσεις που προέρχονται από τη βιομάζα με υδρόλυση. Σε αυτές περιλαμβάνονται οργανικά οξέα όπως το οξικό, το γλυκουρονικό και το γαλακτουρονικό οξύ από την ημικυτταρίνη, και οι φαινολικές ενώσεις από τη λιγνίνη. Τα πιο ανασταλτικά από αυτά

τόσο για τη ζύμη όσο και για τα βακτήρια είναι το οξικό οξύ. Η διαλυμένη λιγνίνη αποτελεί επίσης παράγοντα.

2. Οι ενώσεις που σχηματίζονται από την αποικοδόμηση των προϊόντων που προκύπτουν από την προεπεξεργασία και την υδρόλυση της βιομάζας. Η φουρφουράλη από την ξυλόζη και η HMF (υδρόξυ-μέθυλο-φουρφουράλη) από τη γλυκόζη ηγούνται αυτής της ομάδας. Ολοκληρώνεται από μια ποικιλία αλδευδών, οξέων και αλκοολών από την αποικοδόμηση της λιγνίνης, των σακχάρων και των πρωτεϊνών.
3. Ενώσεις από άλλες πηγές. Ιόντα μετάλλων που προκύπτουν από τη διάβρωση του εξοπλισμού, σουλφίδια, SO<sub>2</sub> και γαλακτικό οξύ που εισάγονται με άλλα ρεύματα που περιέχουν θρεπτικά συστατικά και διαλύματα καθαρισμού.



Εικόνα 12: Απλοποιημένη απεικόνιση των βημάτων της διεργασίας για την παραγωγή βιοαιθανόλης από άγλη (Li et al., 2014).

## Κεφάλαιο 5: Παραγοντικός σχεδιασμός

### 5.1 Εισαγωγή

Η ανάγκη για την ταυτόχρονη μεταβολή όλων των μεταβλητών ενός συστήματος, σε αντίθεση με την καθιερωμένη αρχή της μεταβολής μίας μόνο μεταβλητής κάθε φορά ενώ διατηρούνται σταθερές οι υπόλοιπες, οδήγησε στον στατιστικό σχεδιασμό πειραμάτων. Ουσιαστικά, προτείνεται η οργάνωση από τον ερευνητή μικρών σειρών διαδοχικών πειραμάτων, σε κάθε μία από τις οποίες μεταβάλλονται συγχρόνως όλες οι μεταβλητές σύμφωνα με ορισμένους κανόνες. Οι σειρές είναι κατάλληλα οργανωμένες ώστε να είναι δυνατόν, μετά από μαθηματική επεξεργασία, να επιλεγούν οι συνθήκες για τον σχεδιασμό μια επόμενης σειράς.

Τα πλεονεκτήματα του στατιστικού σχεδιασμού είναι ότι:

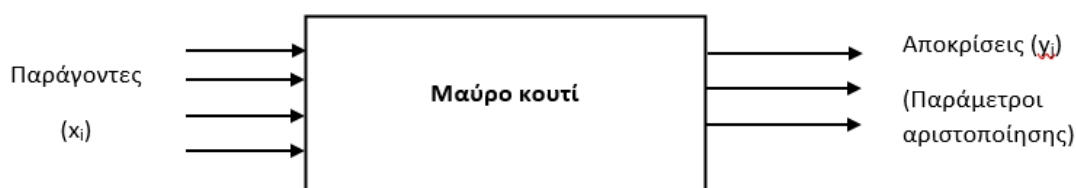
- α) Παρέχει περισσότερες πληροφορίες ανά πείραμα
- β) Εξασφαλίζει οργανωμένη συλλογή και ανάλυση πληροφοριών
- γ) Κάνει εκτίμηση της αξιοπιστίας των πληροφοριών από άποψη πειραματικών και αναλυτικών διακυμάνσεων
- δ) Δίνει τη δυνατότητα ποσοτική εκτίμησης των αλληλεπιδράσεων

ε) Οδηγεί στον εντοπισμό του αρίστου

Όσον αφορά στο πρώτο πλεονέκτημα η υπεροχή του στατιστικού σχεδιασμού σε σχέση με την μέθοδο μεταβολής μιας μόνο μεταβλητής είναι σαφής. Στην πρώτη περίπτωση ο αριθμός των πειραμάτων ενός παραγοντικού σχεδιασμού σε δύο επίπεδα είναι  $2^k$ , όπου  $k$  ο αριθμός των παραγόντων, ενώ στην δεύτερη περίπτωση ο αριθμός των πειραμάτων είναι  $4^k$ . Επομένως, είναι φανερό ότι όσο αυξάνεται ο αριθμός των παραγόντων ο αριθμός των απαιτούμενων πειραμάτων μεταβάλλοντας μόνο μια μεταβλητή αυξάνεται δραματικά.

### Βασικές έννοιες για τον σχεδιασμό πειραμάτων

Σχεδιασμός ενός στατιστικού πειράματος, είναι η μέθοδος επιλογής του αριθμού των μετρήσεων (επί μέρους πειραμάτων) και των συνθηκών εκτέλεσης τους που είναι αναγκαία και ικανά για τη λύση του προβλήματος που έχει τεθεί με την απαιτούμενη ακρίβεια. Το αντικείμενο της έρευνας απαιτεί ακριβή προσδιορισμό και γι' αυτό έχει υιοθετηθεί η αρχή του "μαύρου κουτιού" της Κυβερνητικής. Ένας πειραματιστής προκειμένου να χρησιμοποιήσει μεθόδους σχεδιασμού πειραμάτων πρέπει να μπορεί να διαμορφώσει το πρόβλημα του σύμφωνα με αυτή την αρχή.



Σχήμα 3: Διάγραμμα μαύρου κουτιού κυβερνητικής

Οι είσοδοι του μαύρου κουτιού ονομάζονται παράγοντες ( $x_i$ ), ενώ οι έξοδοί του αποτελούν τα χαρακτηριστικά ποσοτικά μεγέθη που επιδιώκεται να αριστοποιηθούν και τα οποία ονομάζονται παράμετροι αριστοποίησης ( $y_i$ ).

Τα αποτελέσματα του πειράματος χρησιμοποιούνται προκειμένου να κατασκευασθεί το μαθηματικό μοντέλο του αντικειμένου που μελετάται. Έτσι, προκύπτει η εξίσωση συσχέτισης της παραμέτρου αριστοποίησης με τους παράγοντες που ονομάζεται συνάρτηση απόκρισης ή αντικειμενική συνάρτηση:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad 0.1$$

### Παράμετροι αριστοποίησης

Η παράμετρος αριστοποίησης αποτελεί την αντίδραση (απόκριση) στη δράση των παραγόντων που επιβάλλονται στο σύστημα που μελετάται. Οι παράμετροι αριστοποίησης ταξινομούνται:

- α) Ποσοτικές ή συνεχείς (πχ. απόδοση, χρώμα, κέρδος κ.α.)
- β) Ποιοτικές ή ασυνεχείς (πχ. γεύση, καταλληλότητα φαρμάκου κ.α.)

Για να επιλεγθεί η παράμετρος αριστοποίησης πρέπει να πληροί τις παρακάτω προϋποθέσεις:

- α) Να είναι αποτελεσματική ως προς τον απώτερο σκοπό του πειράματος. Γι' αυτό, το πρόβλημα που μελετάται μέσω της πραγματοποίησης ενός παραγοντικού σχεδιασμού πρέπει να διατυπώνεται με σαφήνεια.
- β) Να έχει πληρότητα χαρακτηρισμού του αντικειμένου της έρευνας.
- γ) Να είναι ποσοτική ή να μπορεί να εκφραστεί με έναν απλό αριθμό. Για τις ποιοτικές παραμέτρους μπορεί να καθορισθεί μια αυθαίρετη κλίμακα με διαβαθμίσεις που θα δίνει μια ποσοτική εκτίμηση.
- δ) Να είναι στατιστικά αποτελεσματική, δηλαδή να προσδιορίζεται με ικανοποιητική ακρίβεια. Το σφάλμα στον προσδιορισμό ενός μεγέθους εκφράζεται από την τυπική απόκλιση  $s_y$ , η οποία θεωρείται σταθερή επομένως οι διακυμάνσεις  $s_y^2$  πρέπει να είναι ομοιογενείς σε όλη την περιοχή του χώρου των παραγόντων που εξετάζεται.
- ε) Να έχει φυσική έννοια, να είναι απλή και να υπολογίζεται εύκολα. Πολλές φορές όταν οι διακυμάνσεις των μετρήσεων είναι ανομοιογενείς, δηλαδή όταν δεν επιτυγχάνεται η στατιστική αποτελεσματικότητα, τότε πραγματοποιείται μετασχηματισμός της παραμέτρου (πχ.  $\sin y$ ) για να μετατραπούν οι διακυμάνσεις σε ομοιογενείς.
- στ) Να υπάρχει σε όλη την περιοχή του χώρου των παραγόντων που μελετάται.

### Παράγοντες σχεδιασμού

Μία μετρήσιμη μεταβλητή που παίρνει συγκεκριμένη τιμή για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, ονομάζεται παράγοντας. Οι παράγοντες αντιστοιχούν στους τρόπους επίδρασης στο αντικείμενο της έρευνας. Ωστόσο, υπάρχουν και μη ελέγξιμες ή απλά άγνωστες μεταβλητές που επιφέρουν επιπλέον σφάλματα στις τιμές της παραμέτρου αριστοποίησης.

Κάθε παράγοντας έχει και ένα πεδίο ορισμού, δηλαδή ένα σύνολο δυνατών τιμών που μπορεί να πάρει. Ανάλογα με τον τρόπο μέτρησης οι παράγοντες ταξινομούνται σε:

- α) Ποσοτικούς ή συνεχείς (πχ. θερμοκρασία, χρόνος, συγκέντρωση καταλύτη κ.α.)
- β) Δυαδικούς ή ασυνεχείς (πχ. τύπος καταλύτη, παρουσία ή μη καταλύτη κ.α.)

Στην αρχή, κατά τον σχεδιασμό των πειραμάτων οι παράγοντες είναι πολλοί, διότι πρέπει να συμπεριληφθούν όλοι οι πιθανοί. Καθώς προχωρούν τα πειράματα μειώνονται και κρατούνται οι στατιστικά σημαντικοί.

Γενικά, ο πειραματιστής πρέπει να μπορεί να διατηρεί σταθερό τον παράγοντα στο επιθυμητό επίπεδο κατά τη διάρκεια του πειράματος. Επίσης, οι παράγοντες πρέπει να έχουν άμεση επίδραση στο αντικείμενο, καθώς είναι δύσκολο να ελεγχθούν αν εξαρτώνται από άλλους. Ταυτόχρονα, πρέπει να είναι ανεξάρτητοι ως προς τη θέση τους σε ένα επίπεδο.

Ακόμη, απαιτείται οι παράγοντες να είναι συμβιβαστοί, δηλαδή για οποιονδήποτε συνδυασμό των επιπέδων τους, τα πειράματα να μπορούν να πραγματοποιηθούν με επιτυχία και με ασφάλεια. Έτσι, είναι απαραίτητο να βρεθούν οι επικίνδυνες περιοχές πριν τον σχεδιασμό του πειράματος για να αποφευχθούν, για παράδειγμα, καταστροφές προϊόντων ή εγκαταστάσεων.

### Μαθηματικά Μοντέλα

Τα μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται συνήθως σε στατιστικές προσομοιώσεις διαφόρων φαινομένων είναι πολυώνυμα μέχρι δευτέρου βαθμού, για λόγους απλότητας των εξισώσεων και ικανοποιητικής προσέγγισης. Τα μοντέλα αυτά είναι:

Μηδενικού βαθμού:  $y = b_0$

Πρώτου βαθμού:  $y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i$

Δεύτερου βαθμού:  $y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k b_{ji} x_i x_j$

Οι συντελεστές των μοντέλων που πρέπει να προσδιορισθούν (άγνωστοι) είναι 1 στο μοντέλο μηδενικής τάξης ( $b_0$ ) και  $k+1$  στο πρώτης τάξης. Στο μοντέλο δεύτερης τάξης οι συντελεστές για προσδιορισμό είναι το άθροισμα αυτών του μοντέλου πρώτης τάξης, των αλληλεπιδράσεων και των τετραγωνικών όρων:

$$k + 1 + \frac{k!}{2!(k-2)!} + k = \frac{(k+1)(k+2)}{2} \quad 0.2$$

### Δυνατότητες

Το μοντέλο μηδενικού βαθμού δείχνει ότι οι παράγοντες δεν επηρεάζουν την παράμετρο αριστοποίησης, μια κατάσταση που δεν έχει νόημα, αφού σκοπός της έρευνας είναι να βρεθεί και να καθορισθεί ποσοτικά αυτή η επίδραση. Το μοντέλο αυτό είναι αποτέλεσμα συνήθως ενός κακού σχεδιασμού ή μιας κακής εκτέλεσης του πειράματος.

Το μοντέλο πρώτου βαθμού είναι χρήσιμο και εύχρηστο. Έχει μεγάλη αξιοπιστία μέσα στα όρια σχεδιασμού του, και γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μοντέλο παρεμβολής, δεν μπορεί να δώσει καμία πρόβλεψη έξω απ' αυτά τα όρια. Χρησιμοποιείται για εντοπισμό του αρίστου με κίνηση κατά την παράγωγο.

Στη περίπτωση αδυναμίας αυτού του μοντέλου να περιγράψει το αντικείμενο της έρευνας, γίνεται νέος σχεδιασμός δεύτερης τάξης για την επίτευξη μοντέλου δεύτερου βαθμού. Μία άλλη δυνατότητα είναι η συμπλήρωση των μετρήσεων πρώτου βαθμού με ορισμένες επιπλέον, έτσι ώστε να μετατραπεί το πρωτοβάθμιο μοντέλο σε δευτεροβάθμιο (πλαισίωση αστέρα). Οι προβλέψεις των σχεδιασμών δεύτερης τάξης συνήθως είναι αναξιόπιστες έξω από τα όρια σχεδιασμού, επειδή όμως είναι εξαιρετικά καλές μέσα σε αυτά τα όρια, σπάνια είναι απαραίτητο να εξετασθούν πολυώνυμα τρίτου ή ανωτέρου βαθμού.

### Αποφάσεις πριν τον σχεδιασμό

Της πρώτης σειράς μετρήσεων προηγείται η φάση της λήψης ορισμένων μη τυποποιημένων αποφάσεων για την επιλογή της τοπικής περιοχής μεταβολής κάθε παράγοντα. Τα όρια των πεδίων ορισμού του συνόλου των παραγόντων προσδιορίζονται, είτε με αξιωματικούς περιορισμούς, είτε με τεχνικοοικονομικές θεωρήσεις. Ο καθορισμός των περιοχών αυτών σχετίζεται με την προσεκτική ανάλυση γνωστών πληροφοριών από τη βιβλιογραφία, ή από προκαταρκτικά πειράματα, για τις μεταβολές των παραγόντων και για την καμπυλότητα της επιφάνειας απόκρισης.

Η τοπική περιοχή εκτέλεσης ενός πειράματος επιλέγεται με τους προσδιορισμούς του βασικού επιπέδου και των διαστημάτων μεταβολής. Το βασικό (μηδενικό) επίπεδο είναι ένα

πολυδιάστατο σημείο του χώρου των παραγόντων. Ο σχεδιασμός ενός πειράματος συνίσταται στην επιλογή πειραματικών σημείων που να είναι συμμετρικά ως προς το βασικό επίπεδο. Σαν βασικό επίπεδο επιλέγεται γενικά το καλύτερο σημείο της βιβλιογραφίας ή των προκαταρκτικών πειραμάτων.

Το επόμενο στάδιο είναι η επιλογή του διαστήματος μεταβολής κάθε παράγοντα. Στον σχεδιασμό πρώτης τάξης επιλέγονται για κάθε παράγοντα δύο επίπεδα, στα σταθεροποιείται ο παράγοντας σε κάθε πείραμα. Το διάστημα μεταβολής ενός παράγοντα είναι η ποσότητα που όταν προστεθεί στο βασικό επίπεδο δίνει το ανώτερο και όταν αφαιρεθεί το κατώτερο επίπεδο.

Για διευκόλυνσή μας στο γράψιμο των συνθηκών του πειράματος και της επεξεργασίας των πειραματικών δεδομένων, το ανώτερο επίπεδο αντιστοιχεί στο +1 και το κατώτερο στο -1. Το βασικό επίπεδο αντιστοιχεί στο 0.

Άρα, γίνεται κωδικοποίηση των τιμών των παραγόντων με τον παρακάτω τύπο:

$$x_j = \frac{\tilde{x}_j - \tilde{x}_{j0}}{j_j} \quad 0.3$$

όπου:

$x_j$  = κωδικοποιημένη τιμή του παράγοντα

$\tilde{x}_j$  = φυσική τιμή του παράγοντα

$\tilde{x}_{j0}$  = φυσική τιμή του βασικού επιπέδου του

$j_j$  = διάστημα μεταβολής του

$j$  = αριθμός του παράγοντα

## 5. 2 Σχεδιασμοί πρώτης τάξης

### 5.2.1 Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός

Ένα πείραμα στο οποίο πραγματοποιούνται όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί λέγεται παραγοντικό πείραμα (ή πλήρες παραγοντικό πείραμα). Εάν ο αριθμός των παραγόντων είναι  $k$  και ο αριθμός των επιπέδων 2, τότε το πλήθος των μετρήσεων θα είναι:

$$N = 2^k$$

με συντεταγμένες, σε γεωμετρική παράσταση, τις κορυφές ενός υπερκύβου στο χώρο των  $k$  διαστάσεων.

### 5.2.2 Μήτρες σχεδιασμού πειραμάτων

Οι συνθήκες ενός πειράματος μπορούν να γραφούν στη μορφή ενός πίνακα, του οποίου οι γραμμές να αντιστοιχούν σε διαφορετικές μετρήσεις και οι στήλες στις τιμές των παραγόντων. Τέτοιοι πίνακες ονομάζονται μήτρες σχεδιασμού πειραμάτων. Η μήτρα σχεδιασμού ενός  $2^2$  παραγοντικού πειράματος φαίνεται στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 4:** Μήτρα σχεδιασμού πειραμάτων για ένα  $2^2$  παραγοντικό πείραμα



No Μέτρησης	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>
1	+1	+1	+1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	-1	-1	+1

Στον Πίνακα 5 οι τιμές +1 και -1 είναι οι κωδικοποιημένες τιμές των παραγόντων και οι συνδυασμοί αυτών των επιπέδων καθορίζουν τις συνθήκες εκτέλεσης κάθε πειράματος. Στο εξής, στους σχεδιασμούς πρώτης τάξης, οι τιμές αυτές αντικαθίστανται με + και - αντίστοιχα.

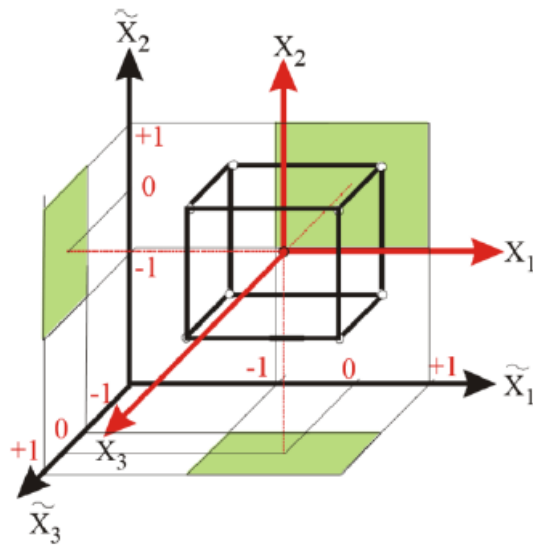
Η τελευταία στήλη του Πίνακα 5 χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων και προκύπτει σαν αλγεβρικό γινόμενο των αντίστοιχων στοιχείων των στηλών των παραγόντων.

Αντίστοιχα, η μήτρα ενός παραγοντικού πειράματος 2<sup>3</sup> απεικονίζονται στον Πίνακα 6.

**Πίνακας 5:** Μήτρα σχεδιασμού πειραμάτων για ένα 2<sup>3</sup> πείραμα

No Μέτρησης	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	-	-	-
3	+	-	+	-	+	-	-
4	+	-	-	-	-	+	+
5	-	+	+	-	-	+	-
6	-	+	-	-	+	-	+
7	-	-	+	+	-	-	+
8	-	-	-	+	+	+	-

Η γραφική παράσταση ενός παραγοντικού πειράματος 2<sup>3</sup> με μήτρα σχεδιασμού όπως η παραπάνω φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



**Σχήμα 4:** Γραφική παράσταση ενός  $2^3$  πειράματος

Σαν στήλη υπολογισμού του όρου μηδενικού βαθμού ( $b_0$ ) θεωρείται γενικά μια στήλη με στοιχεία μόνο +1.

### 5.2.3 Ιδιότητες ενός παραγοντικού πειράματος

Οι ιδιότητες ενός παραγοντικού σχεδιασμού είναι:

α) Συμμετρία ως προς το κέντρο του σχεδιασμού:

$$\sum_{i=1}^N x_{ji} = 0 \quad 0.4$$

Όπου:

$j$  = αριθμός του παράγοντα (1,2,...,k) και

$i$  = αριθμός μέτρησης (1,2,...,N)

β) Κανονικότητα της μήτρας σχεδιασμού που εκφράζεται από τη σχέση:

$$\sum_{i=1}^N x_{ji}^2 = N \quad 0.5$$

Αυτό είναι το αποτέλεσμα της χρησιμοποίησης κωδικοποιημένων τιμών (+1, -1) στη μήτρα σχεδιασμού.

γ) Ορθογωνικότητα της μήτρας σχεδιασμού που έχει σχέση με σύνθετες στήλες και πληρούνται με την ισχύ της εξίσωσης:

$$\sum_{i=1}^N x_{ji}x_{ui} = 0 \quad 0.6$$

όπου:

$j \neq u$  και

$j, u = 0, 1, 2, \dots, k$

δ) Περιστροφικότητα που προϋποθέτει ότι η ακρίβεια πρόβλεψης των τιμών της παραμέτρου αριστοποίησης είναι ίδια σε ίσες αποστάσεις από το κέντρο του σχεδιασμού και δεν εξαρτάται από την κατεύθυνση.

### 5.2.3 Βαθμοί ελευθερίας και αλληλεπιδράσεις

Ο αριθμός των συντελεστών μηδενικού και πρώτου βαθμού που πρέπει να προσδιορισθούν σε ένα παραγοντικό μοντέλο πρώτης τάξης είναι  $k+1$ . Η διαφορά μεταξύ του αριθμού των μετρήσεων και του αριθμού των συντελεστών (σταθερών) ενός μοντέλου ονομάζεται αριθμός των βαθμών ελευθερίας στη στατιστική,  $f$ :

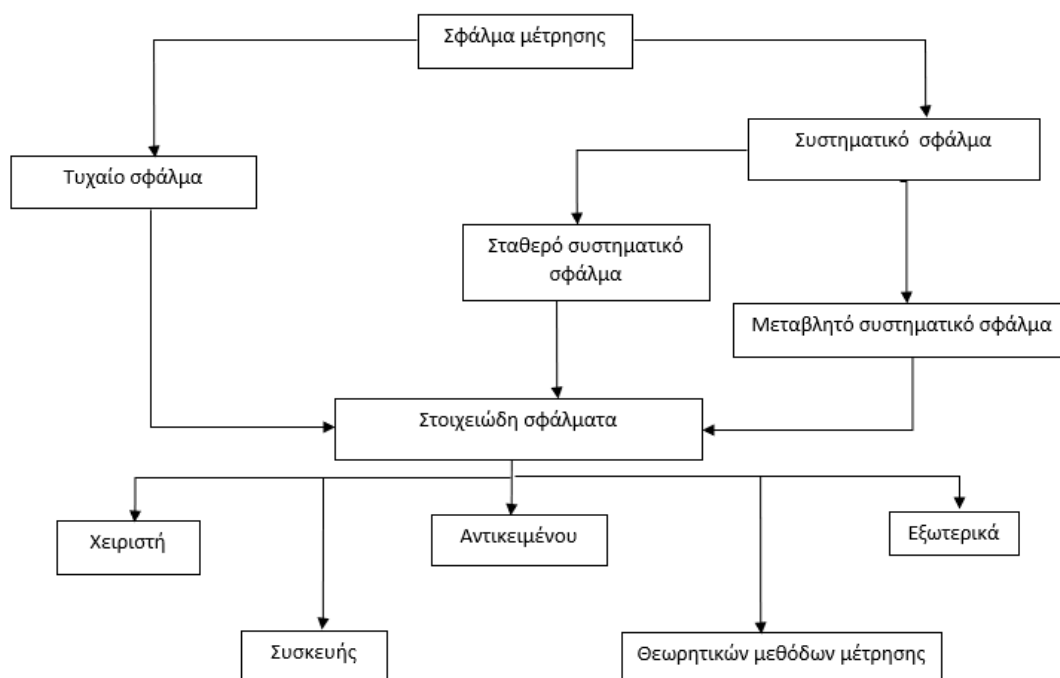
$$f = N - (k + 1) \quad 0.7$$

Ο ολικός αριθμός των μετρήσεων,  $N$ , ενός παραγοντικού πειράματος ισούται με τον ολικό αριθμό των συντελεστών, μηδενικών, πρώτου και ανωτέρων βαθμών (αλληλεπιδράσεις), λόγω της ορθογωνικότητας των μητρών σχεδιασμού. Οι βαθμοί ελευθερίας ενός παραγοντικού πειράματος ισούται με το πλήθος των αλληλεπιδράσεων του πειράματος.

## 5.3 Εκτέλεση του πειράματος

### 5.3.1 Σφάλματα επαναλήψεων και διακύμανση της παραμέτρου αριστοποίησης

Το σφάλμα μιας μέτρησης είναι το άθροισμα μιας σειράς μερικών σφαλμάτων, όπως είναι τα σφάλματα στη σταθεροποίηση των παραγόντων, στη μέτρηση της παραμέτρου αριστοποίησης, σφάλματα που οφείλονται στη γήρανση της συσκευής ή μιας από τις πρώτες ύλες κ.α. Κάθε ένα από τα σφάλματα αυτά, επίσης, μπορεί να διαιρεθεί στα συστατικά του.



**Σχήμα 5:** Διάγραμμα των συνιστωσών του σφάλματος μέτρησης

Τα σφάλματα διαιρούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα συστηματικά και τα τυχαία σφάλματα.

Τα συστηματικά σφάλματα οφείλονται σε αιτίες που επενεργούν συνήθως προς μια ορισμένη κατεύθυνση. Πολύ συχνά αυτά τα σφάλματα μπορούν να μελετηθούν και να προσδιορισθούν ποσοτικά. Εάν τα συστηματικά σφάλματα οφείλονται σε εξωτερικές συνθήκες (μεταβολές της θερμοκρασίας, στην ποιότητα της πρώτης ύλης κ.λπ.) είναι απαραίτητο να αντισταθμιστεί αυτή η επίδοση.

Τα τυχαία σφάλματα είναι αυτά που εμφανίζονται ακανόνιστα, των οποίων οι αιτίες είναι άγνωστες και τα οποία είναι αδύνατο να εκτιμηθούν από πριν.

Τα συστηματικά και τα τυχαία σφάλματα αποτελούνται από άλλα στοιχειώδη. Από αυτά, όσα οφείλονται σε σφάλματα συσκευών, μπορούν να μειωθούν σημαντικά με έλεγχο των συσκευών πριν την παρατήρηση, μερικές φορές κατά την παρατήρηση και χωρίς αμφιβολία μετά την παρατήρηση. Εμφανίζονται και σφάλματα κατά την εκτέλεση της παρατήρησης που μπορεί να οφείλονται σε μη ομοιόμορφη θέρμανση του συστήματος, σε διαφορετικούς τρόπους θέρμανσης κ.α. Σε επαναλήψεις των μετρήσεων, τέτοια σφάλματα μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα μεγάλη διασπορά των πειραματικών σφαλμάτων.

Δεν επιτρέπεται να γίνονται αυθαίρετες διορθώσεις στις επαναλήψεις κάθε μέτρησης. Για την απαλλαγή των μετρήσεων από εσφαλμένες παρατηρήσεις χρησιμοποιείται το κριτήριο  $t$  του Student. Σύμφωνα με αυτό το κριτήριο μια ύποπτη για μεγάλη απόκλιση επανάληψη συγκρίνεται με τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση των υπόλοιπων τιμών, σύμφωνα με τη παρακάτω εξίσωση

$$t_{exp} = \frac{y_i - \gamma_{μέσο}}{s_i} \quad 0.8$$

Μία παρατήρηση απορρίπτεται, εάν η απόλυτη πειραματική τιμή  $t_{exp}$  είναι μεγαλύτερη από την τιμή του πίνακα Student  $t_{tab}$  για τον ίδιο βαθμό ελευθερίας και με στατιστική σημαντικότητα 95%. Αυτή η στατιστική σημαντικότητα είναι γενικά αποδεκτή για εργαστηριακά και βιομηχανικά χημικά πειράματα και με αυτή τη βάση γίνονται όλες οι στατιστικές εκτιμήσεις που ακολουθούν. Οι βαθμοί ελευθερίας των επαναλήψεων όπως σημειώθηκε και προηγουμένως ισούται με το πλήθος των επαναλήψεων μείον ένα.

Με τους ίδιους βαθμούς ελευθερίας εκτιμάται και η διακύμανση της παραμέτρου αριστοποίησης σύμφωνα με τη σχέση:

$$s_y^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n - 1} \quad 0.9$$

Αυτή η σχέση είναι αρκετή για την περίπτωση της εκτίμησης του σφάλματος προσδιορισμού της παραμέτρου αριστοποίησης από ένα μόνο σημείο του χώρου των παραγόντων, π.χ. από το κέντρο του σχεδιασμού. Στην περίπτωση όμως, που υπάρχουν επαναλήψεις και στις μετρήσεις του σχεδιασμού, περίπτωση που είναι και προτιμότερη γιατί επισημαίνει έγκαιρα μεγάλα σφάλματα, η διακύμανση πρέπει να υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$s_y^2 = \frac{\sum_{i=1}^m f_i s_i^2}{\sum_{i=1}^m f_i} \quad 0.10$$

Όπου  $s_i^2$  είναι κάθε μία από τις διακυμάνσεις του σχεδιασμού που χρησιμοποιείται στον υπολογισμό της  $s_y^2$  και  $f_i$  οι αντίστοιχοι βαθμοί ελευθερίας.

### 5.3.2 Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων

Ο έλεγχος της ομοιογένειας των διακυμάνσεων γίνεται με τη βοήθεια διαφόρων στατιστικών κριτηρίων. Το απλούστερο απ' αυτά είναι ο λόγος F (λόγος του Fisher) που έχει σχεδιασθεί για τη σύγκριση δύο διακυμάνσεων. Ο λόγος F είναι ο λόγος της μεγαλύτερης διακύμανσης προς τη μικρότερη. Η τιμή που προκύπτει συγκρίνεται με την αντίστοιχη τιμή του πίνακα των λόγων Fisher. Εάν ο λόγος F που υπολογίζεται είναι μεγαλύτερος από την τιμή που δίνεται στον πίνακα για τους αντίστοιχους βαθμούς ελευθερίας και την επιθυμητή στατιστική σημαντικότητα, αυτό σημαίνει ότι οι διακυμάνσεις διαφέρουν σημαντικά, δηλαδή δεν είναι ομοιογενείς.

Εάν ο αριθμός των διακυμάνσεων που συγκρίνονται είναι μεγαλύτερος από δύο και μια διακύμανση είναι σημαντικά μεγαλύτερη από τις άλλες μπορεί να χρησιμοποιηθεί το κριτήριο του Cochran. Αυτό είναι χρήσιμο σε περιπτώσεις που υπάρχει ο ίδιος αριθμός επαναλήψεων σε όλα τα σημεία. Το κριτήριο του Cochran είναι ο λόγος της μεγαλύτερης διακύμανσης προς το άθροισμα όλων των διακυμάνσεων:

$$G = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^N s_i^2} \quad 0.11$$

Η υπόθεση της ομοιογένειας των διακυμάνσεων επιβεβαιώνεται, όταν η πειραματική τιμή του G δεν ξεπερνά την αντίστοιχη τιμή του πίνακα.

### 5.3.3 Αντιμετώπιση σφαλμάτων

Για την αντιμετώπιση των τυχαίων σφαλμάτων το κριτήριο του Student βοηθάει στην απόρριψη των πιο απίθανων (εσφαλμένων) τιμών. Αυτό σε συνδυασμό με την εκτέλεση νέων επαναλήψεων μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των τυχαίων σφαλμάτων.

Για τη μείωση της επίδρασης των συστηματικών σφαλμάτων που οφείλονται σε εξωτερικές συνθήκες, συνίσταται η τυχαία σειρά εκτέλεσης των μετρήσεων της μήτρας σχεδιασμού.

Η αντιμετώπιση λοιπόν των σφαλμάτων προσδιορισμού της παραμέτρου αριστοποίησης γίνεται ως εξής:

Τυχαία σφάλματα: Αντιμετώπιση με επαναλήψεις μετρήσεων

Συστηματικά σφάλματα: Αντιμετώπιση με τυχαιοποίηση μετρήσεων

## 5.4 Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

### 5.4.1 Προϋποθέσεις

Οι προϋποθέσεις για να γίνει η επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι οι ακόλουθες:

α) Η παράμετρος αριστοποίησης είναι μια τυχαία ποσότητα που υπακούει στο νόμο της κανονικής κατανομής.

β) Η διακύμανση της παραμέτρου αριστοποίησης δεν εξαρτάται από την τιμή της (υπάρχει ομοιογένεια διακυμάνσεων)

γ) Οι τιμές των παραγόντων δεν είναι τυχαίες ποσότητες, δηλαδή η τοποθέτηση και σταθεροποίηση κάθε παράγοντα στο προκαθορισμένο επίπεδο είναι πιο ακριβείς από το σφάλμα αναπαραγωγής.

### 5.4.2 Υπολογισμός συντελεστών συνάρτησης

Για τον υπολογισμό των συντελεστών μιας συνάρτησης απόκρισης χρησιμοποιείται ανάλυση παλινδρόμησης (regression analysis). Εξετάζεται πρώτα η απλή περίπτωση ενός γραμμικού μοντέλου με ένα παράγοντα:

$$y = b_0 + b_1 x_1 \quad 0.12$$

Στόχος εδώ είναι ο προσδιορισμός των αγνώστων συντελεστών  $b_0$  και  $b_1$  μετά την εκτέλεση ενός στατιστικού πειράματος και με τη χρησιμοποίηση των αποτελεσμάτων του.

Εάν όλα τα πειραματικά σημεία βρισκόντουσαν πάνω στην ευθεία που εκφράζεται με την παραπάνω εξίσωση, τότε θα ίσχυε η ακόλουθη εξίσωση για κάθε ένα από αυτά:

$$y_i - b_0 - b_1 x_{1i} = 0 \quad 0.13$$

όπου,  $i=1, 2, \dots, N$  ο αριθμός κάθε μέτρησης. Σε αυτή την περίπτωση δεν θα υπήρχε πρόβλημα. Στην πράξη όμως αυτή η εξίσωση δεν ισχύει αλλά παίρνει τη μορφή:

$$y_i - b_0 - b_1 x_{1i} = \xi_i \quad 0.14$$

όπου  $\xi_i$  είναι η διαφορά μεταξύ πειραματικής,  $y_i$ , και υπολογισμένης με την αρχική εξίσωση τιμής του  $\hat{y}_i$ .

$$\xi_i = y_i - \hat{y}_i \quad 0.15$$

Η ποσότητα  $\xi$  αναφέρεται συχνά σαν υπόλοιπο.

Για ελαχιστοποίηση των αποκλίσεων (υπολοίπων) η πιο διαδεδομένη, ευρείας εφαρμογής μέθοδος είναι αυτή των ελαχίστων τετραγώνων, όπως αναπτύχθηκε πριν από περισσότερα από 150 χρόνια από τους A. Legendre και K. Gauss, και αυτή η μέθοδος εφαρμόζεται στη συνέχεια. Σύμφωνα με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων επιδιώκεται η ελαχιστοποίηση των τετραγώνων των υπολοίπων, δηλαδή:

$$\sum_{i=1}^N \xi_i^2 = \sum_{i=1}^N (y_i - b_0 - b_1 x_{1i})^2 = \min \quad 0.16$$

Το ελάχιστο μιας συνάρτησης, εάν υπάρχει, βρίσκεται με το σύγχρονο μηδενισμό των μερικών παραγώγων ως προς κάθε άγνωστο, όπως είναι γνωστό. Στη περίπτωση μας:

$$\frac{\partial(\xi_i^2)}{\partial b_0} = \frac{\partial(\xi_i^2)}{\partial b_1} = 0 \quad 0.17$$

Από αυτές τις εξισώσεις προκύπτουν:

$$-2 \sum_{i=1}^N (y_i - b_0 - b_1 x_{1i}) = 0 \quad 0.18$$

$$-2 \sum_{i=1}^N (y_i - b_0 - b_1 x_{1i}) x_{1i} = 0 \quad 0.19$$

Η ιδιότητα της συμμετρίας της μήτρας σχεδιασμού δίνει όμως:

$$\sum_{i=1}^N x_{1i} = 0 \quad 0.20$$

Οπότε οι προηγούμενες εξισώσεις γίνονται:

$$b_0 = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N} \quad 0.21$$

και

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^N y_i x_{1i}}{\sum_{i=1}^N x_{1i}^2} \quad 0.22$$

Ο προσδιορισμός των συντελεστών μιας γραμμικής συνάρτησης απόκρισης με  $k$  παράγοντες:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + \dots + b_k x_k \quad 0.23$$

γίνεται με όμοιο τρόπο με την εφαρμογή πολλαπλής παλινδρόμησης. Επομένως, ακολουθώντας πάλι την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, επιδιώκεται η ελαχιστοποίηση των τετραγώνων των υπολοίπων:



$$\sum_{i=1}^N \xi_i^2 = \sum_{i=1}^N (y_i - b_0 - b_1 x_{1i} - b_2 x_{2i} - \dots - b_k x_{ki})^2 = \min \quad 0.24$$

Παίρνοντας k+1 μερικές παραγώγους ως προς τους αγνώστους  $b_0, b_1, b_2 \dots b_k$ , εξισώνοντάς τις με μηδέν και ανακατατάσσοντας, προκύπτουν οι k+1 εξισώσεις πολλαπλής παλινδρόμησης από τις οποίες τελικά προκύπτει:

$$b_0 = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N} \quad 0.25$$

και

$$b_j = \frac{\sum_{i=1}^N y_i x_{ji}}{\sum_{i=1}^N x_{ji}^2} \quad 0.26$$

όπου  $j = 1, 2, \dots, k$  ο αριθμός του παράγοντα. Στο σχεδιασμό πρώτης τάξης ισχύει επίσης η ιδιότητα της κανονικότητας της μήτρας σχεδιασμού, οπότε η (**Error! Reference source not found.**) μετασχηματίζεται σε:

$$b_j = \frac{\sum_{i=1}^N y_i x_{ji}}{N} \quad 0.27$$

Οι συντελεστές των αλληλεπιδράσεων υπολογίζονται με όμοιο τρόπο από τη σχέση:

$$b_{uj} = \frac{\sum_{i=1}^N y_i x_{ui} x_{ji}}{N} \quad 0.28$$

όπου  $u, j=1,2,\dots$ , είναι οι αριθμοί των παραγόντων ( $u \neq j$ ).

#### 5.4.3 Έλεγχος σημαντικότητας συντελεστών

Για τον έλεγχο σημαντικότητας των συντελεστών του μαθηματικού μοντέλου, υπολογίζονται πρώτα οι διακυμάνσεις των συντελεστών από τη σχέση:

$$s_{bj}^2 = \frac{s_y^2}{\sum_{i=1}^N x_{ji}^2} = \frac{s_y^2}{N} \quad 0.29$$

Από την εξίσωση αυτή φαίνεται ότι σε μοντέλα πρώτης τάξης οι διακυμάνσεις όλων των συντελεστών είναι ίσες μεταξύ τους.

Το διάστημα εμπιστοσύνης με το οποίο θα συγκριθούν οι συντελεστές ώστε να ελεγχθεί η σημαντικότητα τους υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\Delta b_j = \pm t \cdot s_{bj} = \frac{t \cdot s_y}{\sqrt{N}} \quad 0.30$$

όπου  $t$  είναι η τιμή του πίνακα Student με στατιστική σημαντικότητα 95% και για τους βαθμούς ελευθερίας υπολογισμού της  $s_y$ .

Ένας συντελεστής είναι σημαντικός, εάν η απόλυτη τιμή του είναι μεγαλύτερη από το διάστημα εμπιστοσύνης του.

#### 5.4.4 Έλεγχος επάρκειας μαθηματικού μοντέλου

Το άθροισμα των τετραγώνων των διαφορών των μέσων πειραματικών τιμών της παραμέτρου αριστοποίησης ( $\bar{y}$ ) από τις αντίστοιχες υπολογισμένες τιμές με βάση το μαθηματικό μοντέλο που κατασκευάστηκε ( $\hat{y}$ ), δίνει το υπόλοιπο άθροισμα των τετραγώνων.

Ο λόγος του υπολοίπου του αθροίσματος τετραγώνων με τους βαθμούς ελευθερίας ενός πειράματος δίνει την διακύμανση υπολοίπων ή διακύμανση επάρκειας ( $s_{ad}^2$ ):

$$s_{ad}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N n_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2}{f} \quad 0.31$$

όπου:

$n_i$  = ο αριθμός επαναλήψεων στην  $i$ -στη σειρά της μήτρας σχεδιασμού πειραμάτων

$f$  = βαθμοί ελευθερίας του σχεδιασμού.

Για τον έλεγχο της επάρκειας ενός γραμμικού μαθηματικού μοντέλου χρησιμοποιείται το γνωστό κριτήριο του Fisher, όπου ο λόγος  $F$  στην περίπτωση αυτή είναι:

$$F = \frac{s_{ad}^2}{s_y^2} \quad 0.32$$

## Πειραματικό Μέρος

### Σκοπός

Η παραγωγή βιοκαυσίμων από περιβαλλοντικά φιλικές και βιώσιμες πηγές συγκεντρώνει ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον παγκοσμίως. Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της δυνατότητας και της βελτιστοποίησης παραγωγής βιοαιθανόλης χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τροφοδοσία ξηραμένων αλγών. Στα πλαίσια της εργασίας ερευνάται η εύρεση της βέλτιστης μεθόδου προεπεξεργασίας της τροφοδοσίας κατά την οποία η παραγωγή σακχάρων που υπάρχουν στη τροφοδοσία μεγιστοποιείται. Έπειτα ακολουθεί η βελτιστοποίηση για την παραγωγή βιοαιθανόλης εφαρμόζοντας τις αρχές του παραγοντικού σχεδιασμού.

## Κεφάλαιο 6: Πειραματική μεθοδολογία

### 6.1 Πρώτη Ύλη

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής άσκησης χρησιμοποιήθηκε βιομάζα αλγών, την οποία έλαβε η εργαστηριακή μονάδα από την AlgEn. Η AlgEn πρόκειται για μία εταιρία που εδρεύει στην Σλοβενία με κύριο γνωστικό αντικείμενο και πρακτική εμπειρία στην καλλιέργεια αλγών. Πιο συγκεκριμένα, η AlgEn συμμετέχει ενεργά στους τομείς της ανάπτυξης και της ολοκλήρωσης συστημάτων τεχνολογίας αλγών, της καλλιέργειάς τους και της επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.

### 6.2 Μέθοδοι Ανάλυσης

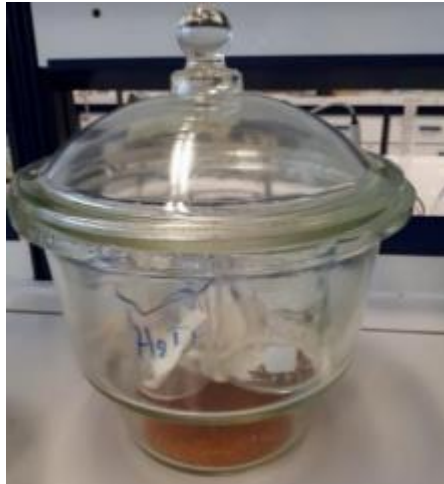
#### 6.2.1 Προσδιορισμός των ολικών στερεών TS

Για τον προσδιορισμό των ολικών στερεών TS ζυγίζεται ποσότητα 10g για κάθε δείγμα βιομάζας άλγης σε ζυγό ακριβείας τριών δεκαδικών ψηφίων. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται σε προζυγισμένα ποτήρια ζέσεως, με τρόπο ώστε να καλύπτουν τον πάτο του ποτηριού και μπαίνουν σε φούρνο ξήρανσης Carbolite στους 105°C για 24 ώρες.



Εικόνα 13: Φούρνος ξήρανσης Carbolite

Μετά το πέρας των 24 ωρών, τα δείγματα τοποθετούνται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά, ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου και ζυγίζονται ξανά.



Εικόνα 14: Αφυγραντήρας

Ο λόγος της τελικής μάζας  $m_f$  προς την αρχική  $m_i$  μας δίνει το ποσοστό των ολικών στερεών, σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$\%TS = \frac{\text{τελική μάζα δείγματος}}{\text{αρχική μάζα δείγματος}} * 100$$

#### 6.2.2 Προσδιορισμός πτητικών στερεών VS

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του περιεχόμενου οργανικού φορτίου ενός στερεού δείγματος, μέσω της καύσης του σε υψηλή θερμοκρασία για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε αναλύεται παρακάτω.

Αρχικά, ζυγίζονται περίπου 0.7 – 0.8 g για κάθε δείγμα TS και αυτά τοποθετούνται σε προζυγισμένες κάψες. Στη συνέχεια, τα δείγματα μπαίνουν στο φούρνο Barnstead Thermolyne στους 550 °C για 4-5 ώρες. Ο φούρνος που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των πτητικών στερεών απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 15: Φούρνος μέτρησης πτητικών στερεών

Μετά το πέρας των 4-5 ωρών, οι κάψες αφήνονται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά, ώστε να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, ζυγίζονται ξανά οι κάψες μαζί με τα περιεχόμενα δείγματα.

Η εκτίμηση του περιεχόμενου οργανικού φορτίου έγινε με τον υπολογισμό της απώλειας βάρους πριν και μετά την εισαγωγή του δείγματος στο φούρνο. Κατά την καύση πραγματοποιείται οξείδωση των οργανικών ουσιών για αυτό και η απώλεια βάρους που

υπολογίζεται αποτελεί στην ουσία μέτρο των οργανικών ουσιών που περιέχονται στα στερεά, παρόλο που κατά την καύση απομακρύνονται μερικές φορές και ορισμένα ανόργανα πτητικά συστατικά του δείγματος.

Ο υπολογισμός των πτητικών στερεών προκύπτει με βάση την αρχική και την τελική μάζα του ξηρού δείγματος και υπολογίζεται για όλα τα δείγματα όπως ακριβώς και με την υγρασία με βάση τη σχέση:

$$\%VS = \left( \frac{m_i - m_f}{m_i} \right) * 100$$

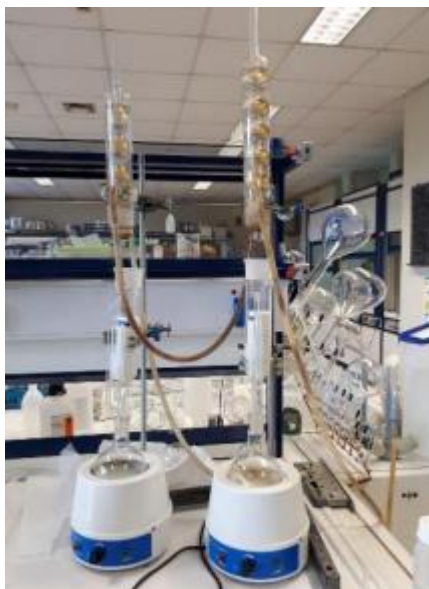
Όπου

$m_i$  = αρχική μάζα ξηρού δείγματος και

$m_f$  = τελική μάζα έπειτα από 4-5 ώρες στους 550°C

### 6.2.3 Προσδιορισμός ελαίων και λιπών

Ο προσδιορισμός των ελαίων σε στερεό πραγματοποιείται με εκχύλιση των ελαίων σε διάταξη Soxhlet, με χρήση εξανίου. Το εξάνιο είναι ένας χημικά αδρανής και πτητικός μη πολικός διαλύτης.



*Εικόνα 16: Διάταξη της Soxhlet*

Αρχικά ζυγίζεται ποσότητα ξηρού στερεού περίπου 20g και τοποθετείται σε προζυγισμένη χαρτούσα. Στην συνέχεια, η χαρτούσα μπαίνει στην Soxhlet και μαζί της ελάχιστη ποσότητα εξανίου περίπου 60 mL. Ακολούθως ζυγίζεται μία κυκλική φιάλη 24/29 με τους πυρήνες βρασμού (περίπου 6-7) και προστίθενται 300 mL εξανίου. Κατόπιν, ξεκινάει η θέρμανση του εξανίου στους 65°C και αφήνεται για 4-5 ώρες, μέχρι την πλήρη απομάκρυνση των ελαίων. Μετά τις 4-5 ώρες, δεν υπάρχουν λάδια για απομάκρυνση και φαίνεται στο εξάνιο όταν μετά από 2-3 συνεχόμενους κύκλους είναι διαυγές.

Μετά το πέρας των 4-5 ωρών, η χαρτούσα αφήνεται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά ώστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και να ζυγιστεί. Έπειτα, η φιάλη με το εξάνιο και τα έλαια οδηγείται σε απόσταξη για τον διαχωρισμό τους. Στο τέλος της απόσταξης, ζυγίζεται ξανά η φιάλη μαζί με τα περιεχόμενα έλαια.

Ο υπολογισμός των ελαίων προκύπτει με βάση την μάζα τους και την αρχική μάζα του στερεού, όπως φαίνεται στην παρακάτω σχέση:

$$\%Oils = \left( \frac{m_2 - m_1}{m_{solid}} \right) * 100$$

Όπου:

$m_1$  = μάζα φιάλης με πυρήνες βρασμού

$m_2$  = μάζα φιάλης με πυρήνες βρασμού και έλαια

$m_{solid}$  = αρχική μάζα στερεού στην χαρτούσα

#### 6.2.4 Προσδιορισμός υδατοδιαλυτών στερεών WS

Για τον προσδιορισμό των ολικών υδατοδιαλυτών στερεών αρχικά λαμβάνονται 1,25 g από κάθε δείγμα TS. Αυτά τοποθετούνται μαζί με 50 mL απιονισμένου νερού σε γυάλινα μπουκαλάκια τα οποία σφραγίζονται. Στη συνέχεια, τα γυάλινα μπουκαλάκια τοποθετούνται στο ανακινούμενο αερόλουτρο IKA KS 30001 control σε θερμοκρασία 50 0C και ταχύτητα ανάδευσης 130 rpm για 1 ώρα.



Εικόνα 17: Ανακινούμενο αερόλουτρο IKA KS 30001 control.

Μετά το πέρας της 1 ώρας, τα δείγματα διηθούνται, για να συλλεχθεί η στερεή και η υγρή φάση. Η στερεή φάση των δειγμάτων τοποθετείται σε προζυγισμένα ποτήρια ζέσεως, τα οποία μπαίνουν στον φούρνο ξήρανσης στους 45° C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών, τα δείγματα τοποθετούνται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά και ακολούθως ζυγίζονται.



Εικόνα 18: Φυγόκεντρος IEC CENTRA CL2.



Τα ολικά υδατοδιαλυτά στερεά υπολογίζονται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\%WS = \left( \frac{m_i - m_f}{m_i} \right) * 100$$

Όπου  $m_i$  = αρχική μάζα ξηρού δείγματος και

$m_f$  = τελική μάζα μετά την ξήρανση

Συλλέγεται η υγρή φάση των δειγμάτων, ώστε να μετρηθεί η ελεύθερη γλυκόζη με τη μέθοδο GOD/PAP.

Το συλλεχθέν υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος που έχει προκύψει από τη διήθηση αραιώνεται κατάλληλα και ακολουθεί η μέθοδος προσδιορισμού της ελεύθερης γλυκόζης GOD/PAP. Από το υπερκείμενο υγρό λαμβάνονται 100  $\mu$ L τα οποία τοποθετούνται σε γυάλινα φιαλίδια στα οποία προστίθενται και 2 mL αντιδραστηρίου σακχάρου. Ακολούθως, τα φιαλίδια τοποθετούνται στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C για 15 λεπτά. Τέλος, λαμβάνει χώρα φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 510 nm.

Οι μετρούμενες απορροφήσεις εισάγονται στην κατασκευασμένη καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο GOD/PAP, και στη συνέχεια, βάσει των αντίστοιχων εξισώσεων, προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ελεύθερης γλυκόζης.

$$\text{Ελεύθερη γλυκόζη} \left( \% \frac{w}{w} \right) = \frac{0,71 * ABS_{mean} * D * V * 10^{-3}}{initial\ solid} * 100$$

Όπου:

$ABS_{mean}$  = ο μέσος όρος απορρόφησης

$D$  = η αραιώση που έχει πραγματοποιηθεί στο διάλυμα ( $D=1$  όταν το διάλυμα παραμένει χωρίς αραιώση,  $D=10$  όταν η αραιώση είναι 1:10)

$V$  = ο συνολικός όγκος του διηθήματος

Initial solid = η αρχική μάζα του δείγματος

### 6.2.5 Προσδιορισμός κυτταρίνης

Η διαδικασία προσδιορισμού κυτταρίνης πραγματοποιείται με την όξινη υδρόλυση του στερεού υπολείμματος που προέκυψε από τον προσδιορισμό των ολικών υδατοδιαλυτών στερεών (WS). Ακολουθείται η εξής διαδικασία:

#### Όξινη Υδρόλυση

1. Λαμβάνονται 300 mg από κάθε δείγμα στερεού υπολείμματος που προέκυψε κατά τον προσδιορισμό WS και τοποθετούνται σε γυάλινα μπουκαλάκια. Εκεί προστίθενται 3ml  $H_2SO_4$  72%w/w.
2. Τα γυάλινα μπουκαλάκια σφραγίζονται και τοποθετούνται στο shaker σε θερμοκρασία 30°C και ταχύτητα ανάδευσης 150 rpm για 1 ώρα.
3. Μετά το πέρας της 1 ώρας, προστίθενται σε κάθε μπουκαλάκι 84 mL απιονισμένου νερού και τα δείγματα τοποθετούνται στον αποστειρωτή ISOLAB Laborgeräte mbH Autoclave για 1 ώρα και σε θερμοκρασία 121°C.



Εικόνα 19: Κλίβανος αποστείρωσης ISOLAB Laborgerate GmbH Autoclave

4. Μετά την αποστείρωση, τα δείγματα αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια διηθούνται. Τα διηθήματα αποθηκεύονται σε σωληνάρια Falcon των 50 mL, ενώ τα στερεά υπολείμματα σε πορσελάνινες προζυγισμένες κάψες. Από το υπερκείμενο υγρό προσδιορίζεται η διαλυτή λιγνίνη με φωτομέτρηση στα 320 nm, ενώ από το στερεό που συλλέγεται στις κάψες προσδιορίζονται τα μη διαλυτά σε οξύ υπολείμματα.

#### Εξουδετέρωση

1. Από τα διηθήματα που προκύπτουν από την όξινη υδρόλυση, λαμβάνονται 20mL από το καθένα και εξουδετερώνονται, υπό ανάδευση, με χρήση  $\text{CaCO}_3$  (περίπου 0,81g) έως ότου το pH να κυμαίνεται μεταξύ 5 και 6.
2. Μετά την εξουδετέρωση, τα δείγματα αφήνονται να ηρεμήσουν και συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό μέσω φυγοκέντρησης.
3. Το συλλεχθέν υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος αραιώνεται κατάλληλα και ακολουθεί η μέθοδος προσδιορισμού της ελεύθερης γλυκόζης GOD/PAP. Από το υπερκείμενο υγρό λαμβάνονται 100  $\mu\text{L}$  τα οποία τοποθετούνται σε γυάλινα φιαλίδια στα οποία προστίθενται και 2 mL αντιδραστηρίου σακχάρου. Ακολούθως, τα φιαλίδια τοποθετούνται στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C για 15 λεπτά. Τέλος, λαμβάνει χώρα φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 510 nm.



Εικόνα 20: Φωτόμετρο

Οι μετρούμενες απορροφήσεις εισάγονται στην κατασκευασμένη καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP και υπολογίζεται το ποσοστό γλυκόζης με την παρακάτω σχέση:

$$Total\ gluc\ \left(\% \frac{w}{w}\right) = \frac{0,71 * ABS_{mean} * D * 86,73 * 10^{-3}}{initial\ solid} * \frac{100}{0,897}$$

όπου:

$ABS_{mean}$  = ο μέσος όρος απορρόφησης

D = η αραίωση που έχει πραγματοποιηθεί στο διάλυμα

86,73 (mL) = προκαθορισμένη τιμή

Initial solid = η μάζα του δείγματος που λήφθηκε από τα στερεά υπολείμματα που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης

0,897 = συντελεστής διόρθωσης της συγκέντρωσης της γλυκόζης

Το ποσοστό, τέλος, της κυτταρίνης υπολογίζεται από την εξής σχέση:

$$Κυτταρίνη\ \left(\% \frac{w}{w}\right) = Total\ gluc\ \left(\% \frac{w}{w}\right) * 0,9$$

όπου:

$0,9 = \frac{Mr_{cellulose}}{Mr_{glucose}} = \frac{162}{109}$ , ο συντελεστής διόρθωσης της συγκέντρωσης της γλυκόζης.

### 6.2.6 Προσδιορισμός ημικυτταρίνης

Από το υπερκείμενο υγρό που προέκυψε μετά την εξουδετέρωση κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης, λαμβάνονται 0.5 mL από κάθε δείγμα και τοποθετούνται σε γυάλινα φιαλίδια. Σε αυτά προστίθενται 0.5 mL αντιδραστηρίου DNS και τα δείγματα αφήνονται σε βραστό νερό για 5 λεπτά. Μετά, προστίθενται 4 mL νερού στο καθένα και ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 540 nm.

Οι μετρούμενες απορροφήσεις εισάγονται στην κατασκευασμένη καμπύλη αναφοράς της ημικυτταρίνης και στη συνέχεια, βάσει των σχέσεων που ακολουθούν, προσδιορίζεται η συγκέντρωση ημικυτταρίνης.

Αρχικά, υπολογίζεται η απορρόφηση της ξυλόζης στα 540 nm:

$$ABS_{xyl} = ABS_{hcell} - \frac{0,71 * ABS_{cell}}{1,4268}$$

όπου:

$ABS_{xyl}$  = η απορρόφηση της ξυλόζης σε μήκος κύματος 540 nm

ABShcell = ο μέσος όρος απορρόφησης της ημικυτταρίνης (η απορρόφηση που μετρήθηκε στο συγκεκριμένο στάδιο)

ABScell= ο μέσος όρος απορρόφησης της κυτταρίνης (όπως βρέθηκε κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης)

Έπειτα, υπολογίζεται η συνολική περιεκτικότητα κατά βάρος ξυλόζης

$$Total\ xylose\ \left(\% \frac{w}{w}\right) = \frac{1,3861 * ABS_{xyl}}{0,86}$$

όπου,

ABS<sub>xyl</sub> = η απορρόφηση της ξυλόζης σε μήκος κύματος 540 nm

0,86 = συντελεστής διόρθωσης της συγκέντρωσης της ξυλόζης

Τέλος, η ποσότητα της ημικυτταρίνης υπολογίζεται από τη σχέση:

$$Ημικυτταρίνη\ \left(\% \frac{w}{w}\right) = \frac{total\ xylose * \left(\frac{132}{150}\right) * 0,08673 * \left(\frac{1}{1000}\right) * 100}{initial\ solid}$$

όπου:

132/150 = συντελεστής διόρθωσης της συγκέντρωσης της ξυλόζης

86,73 (mL) = προκαθορισμένη τιμή

Initial solid: η μάζα του δείγματος που λήφθηκε από τα στερεά υπολείμματα που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης.

## 6.2.7 Προσδιορισμός λιγνίνης

### 6.2.7.1 Διαλυτή λιγνίνη

Από το υπερκείμενο υγρό που προέκυψε μετά την όξινη υδρόλυση κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης, λαμβάνονται 5 mL από κάθε δείγμα και στη συνέχεια τα δείγματα υφίστανται φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 320 nm.

Στη συνέχεια με βάση τις σχέσεις που ακολουθούν προσδιορίζεται η συγκέντρωση λιγνίνης:

$$Λιγνίνη\ \left(\% \frac{w}{w}\right) = \frac{ABS_{mean} * D * 86,73 * 10^{-3}}{\epsilon * initial\ solid} * 100$$

όπου:

ABS<sub>mean</sub> = ο μέσος όρος απορρόφησης

D = Η αραίωση που έχει πραγματοποιηθεί στο διάλυμα

86,73 (mL) = προκαθορισμένη τιμή συνολικού όγκου

initial solid = η μάζα του δείγματος που λήφθηκε από τα στερεά υπολείμματα που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης

$\epsilon$  = σταθερά που εξαρτάται από το είδος της πρώτης ύλης ( $\epsilon=30 \text{ l}/(\text{g} \cdot \text{cm})$ )

#### 6.2.7.2 Μη διαλυτή λιγνίνη

Οι πορσελάνινες κάψες με τα στερεά υπολείμματα που έχουν προκύψει κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης τοποθετούνται στο φούρνο ξήρανσης στους 105 °C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών αφήνονται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά και κατόπιν ζυγίζονται. Στη συνέχεια, τοποθετούνται στο φούρνο στους 575 °C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών αφήνονται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά και ξανά ζυγίζονται. Από τη διαφορά των δυο μαζών που μετρήθηκαν προκύπτει το ποσοστό της μη διαλυτής λιγνίνης, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εξίσωση:

$$\% \text{ Μη διαλυτή λιγνίνη} = \frac{m_{105} - m_{575}}{\text{initial solid}} * 100$$

όπου:

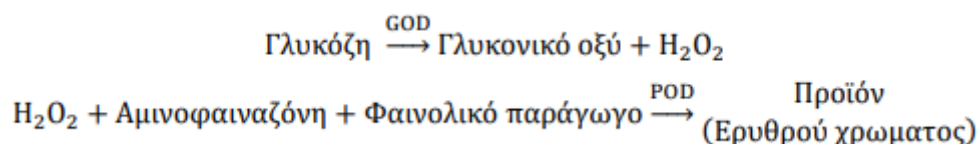
$m_{575}$  = η μάζα του δείγματος που βγήκε από το φούρνο στους 575°C

$m_{105}$  = η μάζα του δείγματος που βγήκε από το φούρνο στους 105°C

initial solid: η μάζα του δείγματος που λήφθηκε από τα στερεά υπολείμματα που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης

#### 6.2.8 Προσδιορισμός Ελεύθερης Γλυκόζης

Η μέθοδος προσδιορισμού της γλυκόζης βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος, που είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης. Αρχικά, η γλυκόζη με τη δράση της οξειδάσης μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ με ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Στη συνέχεια, το υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσία αμινοφαιναζόνης και κάποιου φαινολικού παραγώγου με τη δράση της υπεροξειδάσης μετατρέπεται σε κάποιο προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm. Οι 2 αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω (GOD=οξειδάση, POD=υπεροξειδάση):



**Εικόνα 21:** Ενζυμική αλληλουχία αντιδράσεων προσδιορισμού γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP

#### 6.2.9 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο GOD/PAP

Για τον προσδιορισμό της ελεύθερης γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP κατασκευάζεται πρώτα η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης, με την εν λόγω μέθοδο.

- Χρησιμοποιείται πρότυπο διάλυμα γλυκόζης 10 mg/mL. Πραγματοποιούνται αραιώσεις του παραπάνω διαλύματος με απιονισμένο νερό, έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα γλυκόζης 0,1 , 0,2 , 0,4 , και 0,6 mg/mL.
- Σε οχτώ δοκιμαστικούς σωλήνες (δύο για κάθε συγκέντρωση γλυκόζης) προστίθενται 2 mL διαλύματος εργασίας και 0,1 mL από το κάθε διάλυμα γλυκόζης.
- Στη συνέχεια σε δύο ακόμα δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 2 mL διαλύματος εργασίας και 0,1 mL απιονισμένου νερού (τυφλό).

- Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C για 15 min.
- Επιλέγεται στο φωτόμετρο το μήκος κύματος των 510 nm. Το όργανο μηδενίζεται με απιονισμένο νερό, οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται στη συσκευή Vortex- Genie 2, της εταιρείας Scientific Industries, και μετρούνται οι απορροφήσεις των διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

#### 6.2.10 Προσδιορισμός Ολικού Αμύλου

Η διαδικασία προσδιορισμού του ολικού αμύλου βασίζεται στην ενζυμική μέθοδο η οποία κάνει χρήση των ενζύμων αμυλογλυκοζοξειδάση και α-αμυλάση. Τα εν λόγω χρησιμοποιούμενα ένζυμα περιλαμβάνονται στο σετ αντιδραστηρίων που παρέχει η εταιρεία Megazyme προκειμένου για τον προσδιορισμό του ολικού αμύλου. Τα βήματα της διαδικασίας που ακολουθήθηκε είναι τα εξής (Megazyme, 2016):

- Από τα στερεά υπολείμματα τα οποία προέκυψαν από τη διαδικασία προσδιορισμού των ολικών υδατοδιαλυτών σακχάρων λαμβάνεται μάζα ίση με 100 mg και τοποθετείται σε γυάλινα φιαλίδια.
- Εκτός από τα ανωτέρω γυάλινα φιαλίδια ετοιμάζονται και δύο ακόμα με την πρόσθεση 100 mg απιονισμένου νερού (τυφλό).
- Στα γυάλινα φιαλίδια προστίθενται 0,2 mL αιθανόλης (80% v/v) και τα φιαλίδια αναδεύονται στη συσκευή ανάδευσης Vortex Genie 2.
- Στα γυάλινα φιαλίδια προστίθενται 2mL NaOH 1,7M και τα φιαλίδια τοποθετούνται σε παγόλουτρο για 20 min, με παράλληλη ανάδευση κάθε 5 min.
- Μετά την αφαίρεση τους από το παγόλουτρο ακολουθεί η προσθήκη 8 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου (sodium acetate buffer) με pH = 3,8, 0,1 mL α-αμυλάσης (α-amylase) και 0,1 mL αμυλογλυκοσιδάσης (AMG: amyloglucosidase).
- Τα δείγματα αναδεύονται και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 50°C για 30 min με παράλληλη ανάδευση τους κάθε 10 min. Μετά το πέρας των 30 min τα δείγματα τοποθετούνται για φυγοκέντριση για 10 min, με ταχύτητα φυγοκέντρωσης 3000 rpm, στη συσκευή φυγοκέντρωσης IEC/ CENTRA CL2 .
- Μετά τη φυγοκέντρωση, ακολουθεί η μέθοδος προσδιορισμού της ελεύθερης γλυκόζης GOPOD στο υπερκείμενο υγρό. Για κάθε δείγμα, συμπεριλαμβανομένων και των τυφλών, ετοιμάζονται δοκιμαστικοί σωλήνες, στους οποίους προστίθενται 0.1 mL διαλύματος και 3 mL διαλύματος εργασίας (GOPOD). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται στους 50°C σε υδατόλουτρο και τέλος φωτομετρώνται σε μήκος κύματος 510 nm, μετά από ανάδευση στη συσκευή ανάδευσης Vortex Genie 2 και μηδενισμό του φωτομέτρου με απιονισμένο νερό.

Οι μετρούμενες απορροφήσεις εισάγονται στην κατασκευασθείσα καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης, με τη μέθοδο GOD/PAP, και στη συνέχεια υπολογίζεται η συγκέντρωση του αμύλου, με βάση τις σχέσεις που ακολουθούν.

$$C_{\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta\varsigma} \left( \% \frac{w}{w} \right) = \frac{0,9053 * ABS_{mean} * D * 10,4 * 10^{-3}}{Initial\ solid} * 100$$

$$Ολικό\ \acute{\alpha}\mu\upsilon\lambda\omicron \left( \% \frac{w}{w} \right) = C_{\gamma\lambda\upsilon\kappa\acute{o}\zeta\eta\varsigma} * \left( \frac{M_{r,starch}}{M_{r,glucose}} \right)$$

όπου:

ABS<sub>mean</sub> = ο μέσος όρος απορρόφησης.

D = Η αραίωση που έχει πραγματοποιηθεί στο διάλυμα (D=1 όταν το διάλυμα δεν υφίσταται αραίωση, D=5 όταν η αραίωση είναι 1:5 και D=10 όταν η αραίωση είναι 1:10)

10,4 (mL) = προκαθορισμένη τιμή

initial solid = η μάζα του δείγματος, η οποία προκύπτει μετά από αναγωγή, στο δείγμα πριν την εκχύλιση, της μάζας του στερεού υπολείμματος (μετά την εκχύλιση)

$$0,9 = Mr_{\text{glucose}}/Mr_{\text{starch}}$$

### 6.2.11 Προσδιορισμός της Περιεκτικότητας του Ολικού Αζώτου σε Στερεά Δείγματα

Η μέθοδος βασίζεται στην τροποποιημένη κατά Kjeldahl μέθοδο προσδιορισμού αζώτου.

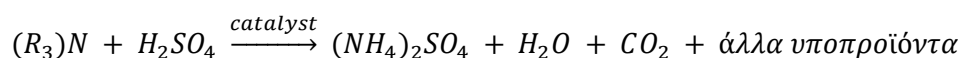
Στην κλασσική μέθοδο Kjeldahl πραγματοποιείται η μετατροπή του οργανικού αζώτου και ελεύθερου αμμωνίου σε άλας θειικού αμμωνίου στην διάρκεια χώνευσης παρουσία θειικού οξέος και καταλυτών. Στην συνέχεια η αμμωνία αποστάζεται και προσδιορίζεται ογκομετρικά με τιτλοδότηση. Τα νιτρικά και νιτρώδη άλατα δεν διασπώνται με την χώνευση κατά Kjeldahl οπότε πρέπει να γίνει μετατροπή τους σε αμμωνιακά.

Στην τροποποιημένη μέθοδο κατά Kjeldahl, το διοξείδιο του τιτανίου (TiO<sub>2</sub>) χρησιμοποιείται ως καταλύτης αντί σεληνίου. Η μετατροπή (αναγωγή) των νιτρικών (N-NO<sub>3</sub>) και νιτρώδη ενώσεων (N-NO<sub>2</sub>) σε αμμωνιακά γίνεται με χρήση σαλικυλικού οξέος και θειοθειικού νάτριου.

Η διαδικασία της μεθόδου ουσιαστικά μπορεί να χωριστεί σε τρία μέρη: (1) χώνευση, (2) απόσταξη και (3) τιτλοδότηση.

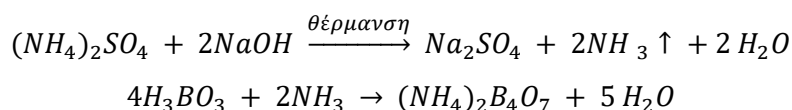
#### 1. Χώνευση δείγματος

Στην παρούσα τροποποιημένη μέθοδο Kjeldahl η προζυγισμένη ποσότητα του δείγματος προεπεξεργάζεται πριν την χώνευση με το διάλυμα του σαλικυλικού οξέος διαλυμένου στο πυκνό θειϊκό οξύ. Οι νίτρο-ενώσεις που σχηματίζονται σε όξινο περιβάλλον στην αντίδραση του σαλικυλικού οξέος με νιτρικό άζωτο δείγματος, ανάγονται σε άμινο-ενώσεις υπό θέρμανση του δείγματος με θειοθειικό νάτριο. Στην συνέχεια το μίγμα θερμαίνεται κοντά στους 400°C και πραγματοποιείται χημική αποσύνθεση του δείγματος. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ένα διάλυμα θειϊκού αμμωνίου. Η γενική εξίσωση (1) για την χώνευση ενός οργανικού δείγματος φαίνεται παρακάτω:



#### 2. Απόσταξη αμμωνίας

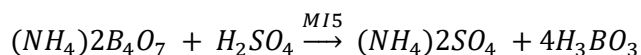
Μετά τον σχηματισμό του θειϊκού αμμωνίου, η αμμωνία ελευθερώνεται σε αλκαλικό περιβάλλον (2). Στην συνέχεια η αμμωνία αποστάζεται και δεσμεύεται σε διάλυμα βορικού οξέος (3), όπου και προσδιορίζεται εμμέσως.



#### 3. Τιτλοδότηση



Το ποσό παρούσας αμμωνίας (ως εκ τούτου το ποσό παρόντος αζώτου στο δείγμα) καθορίζεται με τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμαθειϊκού οξέος (4) παρουσία καταλλήλου δείκτη.



Η διαδικασία ανάλυσης της μεθόδου προσδιορισμού του ολικού αζώτου είναι η ακόλουθη:

- Διαδικασία χώνευσης

Ανάλογα με τον τύπο του δείγματος (αποξηραμένου στον αέρα) ζυγίζεται διαφορετική ποσότητα στερεού, όπως περιγράφεται στον.

Πίνακας 6: Βάρος ποσότητας του στερεού ανάλογα με τον τύπο δείγματος.

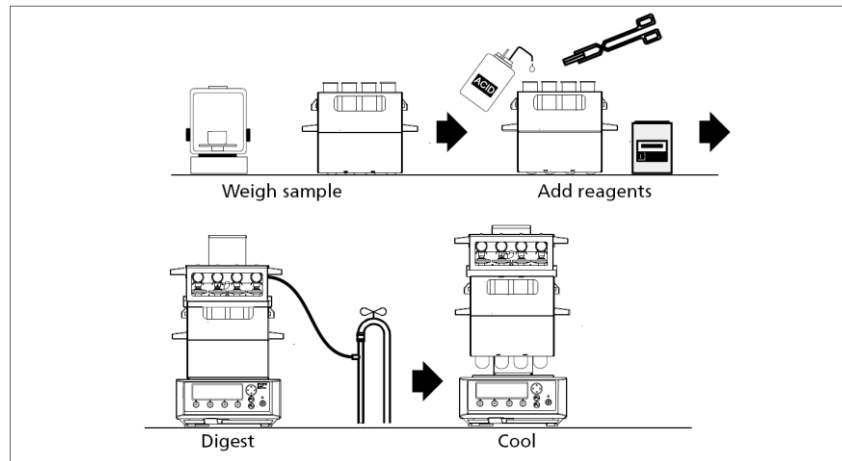
Τύπος δείγματος	Αναμενόμενη περιεκτικότητα σε άζωτο	Ποσότητα δείγματος
Χώμα	0,05 – 0,5%	1 - 10 g
Κόμποστ	0,5 – 2%	0,5 - 1 g
Λάσπη	1 – 10%	0.1 – 0,5 g

Τα βήματα που έπονται είναι τα εξής:

1. Σε ειδικό σωλήνα καύσης μεταφέρεται ποσοτικά η ζυγισμένη ποσότητα στερεού δείγματος, και στη συνέχεια 20 mL του διαλύματος σαλικυλικού οξέος σεθειϊκό οξύ. Ο σωλήνας ανακινείται μέχρις ότου το οξύ να αναμιχθεί καλά με το στερεό δείγμα. Το μίγμα αφήνεται για αρκετές ώρες (ή όλη τη νύχτα).
2. Στην συνέχεια προσθέτονται 2,5 gθειοθειϊκού νάτριου μέσω στεγνού χωνιού στον πάτο του σωλήνα και το μίγμα θερμαίνεται στους 170±10 °C στην ειδική συσκευή καύσης Gerhard Kjeldatherm KB/KBL για 30 λεπτά (μέχρι ο αφρισμός να σταματήσει) – Πρόγραμμα 5.
3. Ύστερα, ο σωλήνας ψύχεται και προσθέτονται 5,5 g μίγματος καταλύτη.
4. Ο σωλήνας ξανατοποθετείται στην συσκευή καύσης όπου θερμαίνεται ήπια έως σε συνθήκες έντονου βρασμού για 2 ώρες στους 400±10 °C. Ο σωλήνας αφήνεται να ψυχθεί (10 min/300±10 °C, 10 min/200±10 °C) – Πρόγραμμα 6.

Σημείωση: Η θερμοκρασία του διαλύματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 400 °C. Το μίγμα βράζει ήπια έως 5 ώρες, έτσι ώστε τοθειϊκό οξύ υγροποιείται περίπου στο 1/3 της διαδρομής μέχρι το λαϊμό του σωλήνα. Στις περισσότερες περιπτώσεις 2 h βρασμού είναι επαρκείς.

5. Στο τέλος της χώνευσης ο σωλήνας αφήνεται να κρυώσει και μεταφέρεται στη συσκευή απόσταξης Vapodest.
6. Επίσης, φτιάχνεται ταυτόχρονα και τουλάχιστον ένα τυφλό δείγμα (20 mL διαλύματος σαλικυλικού οξέος/θειϊκού οξέος, 2,5 gθειοθειϊκού νάτριου και 5,5 g μίγματος καταλύτη) το οποίο ακολουθεί την ίδια διαδικασία χώνευσης, απόσταξης και τιτλοδότησης.



Εικόνα 22: Διαδικασία Χώνευσης

- Διαδικασία απόσταξης

Ανοίγοντας την συσκευή απόσταξης αμέσως ανοίγεται και η βρύση με την οποία είναι συνδεδεμένο το όργανο, ώστε να υπάρχει ροή στο σύστημα και να ψύχει τους σχηματιζόμενους ατμούς. Κατά την έναρξη λειτουργίας της συσκευής απόσταξης χρειάζεται ένα τέταρτο μέχρι να προθερμανθεί. Υπάρχουν τέσσερα προγράμματα στην συσκευή:

00 TEST: αρχικός καθαρισμός της συσκευής κατά την έναρξη λειτουργίας της με φιάλη κενή.

01 AZOTO: Διαδικασία προσδιορισμού αζώτου. Αυτόματα προστίθενται 100 mL διαλύματος καυστικού νατρίου 40% w/w και 100 mL απιονισμένου νερού. Αμέσως ξεκινάει η απόσταξη για τη δέσμευση της αμμωνίας, που ελευθερώνεται στο αλκαλικό περιβάλλον, από 25 mL διαλύματος βορικού οξέος 2% w/v που περιείχε και διαλύματος δείκτη (σε κωνική φιάλη).

02 CLEAN: Πραγματοποιείται μετά από κάθε ανάλυση δείγματος για καθαρισμό λόγω επιμολύνσεων

03 KATH: Πραγματοποιείται στο τέλος όλων των αναλύσεων για τον τελικό καθαρισμό της συσκευής

Ακόλουθη διαδικασία:

1. Πραγματοποιείται αρχικός καθαρισμός της συσκευής με πρόγραμμα 00 TEST.
2. Ο σωλήνας με το χωνεμένο δείγμα προσαρμόζεται στην συσκευή απόσταξης.
3. Προστίθενται 25 mL βορικού οξέος σε κωνική φιάλη 250 mL και 3-4 σταγόνες δείκτη και η φιάλη τοποθετείται κάτω από το ψυκτήρα της συσκευής απόσταξης.
4. Πραγματοποιείται το πρόγραμμα απόσταξης 01 AZOTO.
5. Συλλεγμένο απόσταγμα στην κωνική φιάλη μεταφέρεται στην τιτλοδότηση.
6. Πραγματοποιείται το πρόγραμμα απόσταξης 02 CLEAN.
7. Στο τέλος όλων αποστάξεων πραγματοποιείται το πρόγραμμα απόσταξης 03 KATH.

- Διαδικασία τιτλοδότησης

Συλλεγμένο απόσταγμα στην κωνική φιάλη ογκομετρείται με το θειϊκό οξύ μέχρι τελικού σημείου με αλλαγή χρώματος από πράσινο σε βιολετί.

- Υπολογισμός Ολικού Αζώτου (TN)

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε ολικό άζωτο σε mg/g υπολογίζεται από παρακάτω τύπο:

$$TN = \frac{(V_{\Delta} - V_T) \times c(H^+) \times M_N}{m} \times \frac{100 + \%Y_{\varepsilon.B.}}{100}$$

Όπου:

$V_{\Delta}$  = ο όγκος, σε ml, του θειϊκού οξέος που χρησιμοποιούνται για την τιτλοδότηση του δείγματος.

$V_T$  = ο όγκος, σε ml, του θειϊκού οξέος που χρησιμοποιούνται για την τιτλοδότηση του τυφλού.

$c(H^+)$  = η συγκέντρωση των  $H^+$  σε θειϊκό οξύ, σε mole/l.

$M_N$  = το μοριακό βάρος του αζώτου, σε g/mole (= 14.0067).

$m$  = η μάζα, σε g, του ξηραμένου στερεού δείγματος.

$\%Y_{\varepsilon.B.}$  = η υγρασία δείγματος σε ξηρή βάση (%) σύμφωνα με την ΟΕ-702Γ-1.

Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται με δύο σημαντικά ψηφία.

Τα αποτελέσματα του TN αναφέρονται ως μέσος όρος για τουλάχιστον δύο μετρήσεις παραμέτρου. Η διαφορά μεταξύ δύο διαφορετικών προσδιορισμών δεν πρέπει να υπερβαίνει το 15% της μετρούμενης περιεκτικότητας σε ολικό άζωτο (μέσο όρου δυο μετρήσεων), όταν η περιεκτικότητα είναι μικρότερη από 2 mg/g, και του 10%, όταν η περιεκτικότητα είναι μεγαλύτερη από 2 mg/g.

Εναλλακτικά η περιεκτικότητα του δείγματος σε ολικό άζωτο εκφράζεται σε %N με ακόλουθο τύπο:

$$\%TN = TN (mg/g) / 10$$

#### 6.2.12 Προσδιορισμός Αιθανόλης

Για τον προσδιορισμό της αιθανόλης ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Τοποθετούνται σε γυάλινο φιαλίδιο 2 mL από το πρότυπο διάλυμα αιθανόλης Reagent 1 και προστίθεται 0,1 mL από το δείγμα.
- Σε ένα άλλο γυάλινο φιαλίδιο κατασκευάζεται το τυφλό δείγμα όπου τοποθετούνται σε γυάλινο φιαλίδιο 2 mL από το πρότυπο δείγμα αιθανόλης Reagent 1 και προστίθεται 0,1 mL από απιονισμένο νερό.
- Μετά το πέρας 3 λεπτών προστίθενται στα γυάλινα φιαλίδια 0,5 mL από το πρότυπο διάλυμα αιθανόλης Reagent 2 και αφήνονται σε ηρεμία.
- Μετά το πέρας 7 λεπτών τα δείγματα φωτομετρώνται εφόσον έχει επιλεγθεί η μέθοδος με τον AutoSelector, μετά από ανάδευση στη συσκευή ανάδευσης Vortex Genie 2 και μηδενισμό του φωτομέτρου με απιονισμένο νερό.

#### 6.2.13 Προσδιορισμός pH σε υγρά δείγματα

Το pH αποτελεί μέτρηση της δραστηριότητας των υδρογονοϊόντων και εκφράζεται ως ο αρνητικός λογάριθμος της συγκέντρωσής τους σε δεδομένη θερμοκρασία. Είναι πολύ σημαντική παράμετρος για την ανάλυση και επεξεργασία των αποβλήτων.

Το pH-μετρο αποτελείται από ένα ποτενσιόμετρο, γυάλινο ηλεκτρόδιο, ηλεκτρόδιο αναφοράς και μια συσκευή εξισορρόπησης της θερμοκρασίας. Μέσω του ποτενσιόμετρου,

σχηματίζεται κύκλωμα με την εμφύσηση των ηλεκτροδίων στο διάλυμα ελέγχου. Πολλά pH-μετρα δίνουν ένδειξη της τιμής του pH ή των millivolt και άλλα έχουν εκτεταμένη κλίμακα όπου μπορεί να αναγνώσει τιμές 0,001 pH. Ωστόσο, τα περισσότερα όργανα δεν έχουν τόσο μεγάλη ακρίβεια.

#### Διαδικασία:

1. Αρχικά, ρυθμίζεται το πεχάμετρο χρησιμοποιώντας ρυθμιστικά διαλύματα με pH 4, 7, 10 (δημιουργία καμπύλης αναφοράς).
2. Βυθίζεται το ηλεκτρόδιο στο δείγμα και μετρείται η ένδειξη στην κλίμακα του pH-μετρου. Καταγράφουμε το pH και τη θερμοκρασία.
3. Πλένεται το ηλεκτρόδιο με αποσταγμένο νερό και επαναλαμβάνεται η μέτρηση του δείγματος.
4. Σε περίπτωση δειγμάτων με μεγάλη περιεκτικότητα αιωρούμενων στερεών, αναδεύουμε καλά το διάλυμα με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα για καλή ομογενοποίηση.

## Κεφάλαιο 7: Πειραματικό Πρωτόκολλο

### 7.1 Πειραματική Μεθοδολογία



Σχήμα 6: Μέθοδοι προεπεξεργασίας που εφαρμόστηκαν.

Προκειμένου να γίνει η διερεύνηση της δυνατότητας παραγωγής σακχάρων από αρχική τροφοδοσία βιομάζας αλγών, αρχικά πραγματοποιήθηκε ένα «μηδενικό» πείραμα. Αναλυτικότερα χρησιμοποιήθηκε η τροφοδοσία σε απιονισμένο νερό και ένζυμο χωρίς τη χρήση άλλων διαλυτών. Ωστόσο, λόγω της έλλειψης επιθυμητών αποτελεσμάτων, κρίθηκε απαραίτητη η προεπεξεργασία των δειγμάτων, με βάση τους διαθέσιμους πόρους και τον εξοπλισμό της Μονάδας Περιβαλλοντικής Επιστήμης και Τεχνολογίας. Οι μέθοδοι προεπεξεργασίας που διερευνήθηκαν είναι οι εξής:

- (Α) Υδροθερμική, με τη χρήση του αυτόκλειστου στους 121°C για 30 λεπτά
- (Β) Υδατόλουτρο, στους 90°C για 75 λεπτά
- (Γ) Υπέρηχοι στα 150W για 10 λεπτά

Οι διαλύτες που εξετάστηκαν σε κάθε μία από τις περιπτώσεις είναι οι ακόλουθοι:

1. H<sub>2</sub>O
2. NaOH (0,2M)
3. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1% v/v)

Μελετήθηκαν λοιπόν οι συνδυασμοί των τριών μεθόδων με τους τρεις διαλύτες. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια των 250mL με τελικό όγκο τα 100mL. Οι συνθήκες των πειραμάτων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 7**).

Μετά το στάδιο της προεπεξεργασίας, τα δείγματα αφέθηκαν να ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, και στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH των πολτών, πριν χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την ενζυμική υδρόλυση, προκειμένου να εξασφαλιστεί η ομαλή δράση των ενζύμων.

Όσον αφορά την διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης, πραγματοποιήθηκε στους 50°C με την προσθήκη κυτταρινολυτικού ενζύμου CellicTec3 και αμυλολυτικού ενζύμου Spiritzyme Excel XHS. Ο χρόνος παραμονής των δειγμάτων ορίστηκε στις 72 ώρες όπου και πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Με βάση την εμπειρία του εργαστηριακού προσωπικού σε θέματα διαχείρισης οργανικών βιοαποβλήτων και τη βιβλιογραφία επιλέχθηκαν οι ακόλουθες συνθήκες και δόσεις για τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν.

**Πίνακας 7:** Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για το στάδιο της προεπεξεργασίας

Πείραμα	Προεπεξεργασία	Διαλύτης	Φόρτιση Στερεού (%w/w)	Δόση αμυλολυτικού (μL/γμαύλου)	Δόση κυτταρινολυτικού (μL/γκυτταρίνης)
A.1	Υδροθερμική	H <sub>2</sub> O	10	45	500
A.2	Υδροθερμική	NaOH	10	45	500
A.3	Υδροθερμική	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	45	500
B.1	Υδατόλουτρο	H <sub>2</sub> O	10	45	500
B.2	Υδατόλουτρο	NaOH	10	45	500
B.3	Υδατόλουτρο	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	45	500
Γ.1	Υπέρηχοι	H <sub>2</sub> O	10	45	500
Γ.2	Υπέρηχοι	NaOH	10	45	500
Γ.3	Υπέρηχοι	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	45	500

## 7.2 Αναλύσεις κατά την ενζυμική υδρόλυση

Μετά το πέρας της προεπεξεργασίας, όπως αναφέρεται και ανωτέρω, ακολούθησε η διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης για χρόνο 72 ωρών για την παραγωγή σακχάρων. Την χρονική στιγμή t=0h λαμβανόταν δείγμα και πραγματοποιούνταν οι ακόλουθες μετρήσεις:

- pH
- Γλυκόζη (g/L)

Έπειτα ανά τακτά χρονικά διαστήματα παρακολουθείτο η συγκέντρωση της γλυκόζης του εκάστοτε δείγματος. Τα δείγματα τα οποία ελήφθησαν για την εύρεση του σημείου όπου μεγιστοποιείτο η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν τα εξής:

1. t= 0h

2. t= 18h
3. t= 24h
4. t= 42h
5. t= 46h
6. t= 48h
7. t= 50h
8. t= 67h
9. t= 72h

Τέλος, στις 72 ώρες υδρόλυσης πραγματοποιούνταν διαχωρισμός του υγρού και του στερεού κλάσματος για περαιτέρω αναλύσεις. Στο υγρό κλάσμα μετρήθηκαν:

- Γλυκόζη (g/L)
- Φαινόλες (mg/L)
- VOA's (πτητικά οργανικά οξέα)

Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο στερεό κλάσμα είναι οι ακόλουθες:

- Ολικά στερεά (% σε ξηρή βάση)
- Υγρασία (%)
- Πτητικά στερεά (% σε ξηρή βάση)
- Τέφρα (% σε ξηρή βάση)
- Υδατοδιαλυτά στερεά (% σε ξηρή βάση)
- Άμυλο (% σε ξηρή βάση)
- Κυτταρίνη (% σε ξηρή βάση)
- Ημικυτταρίνη (% σε ξηρή βάση)
- Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη (% σε ξηρή βάση)
- Μη διαλυτό σε οξύ υπόλειμμα (% σε ξηρή βάση).

### 7.3 Αποικοδομήσεις και αποδόσεις

Παρακάτω παρατίθενται ορισμένοι ορισμοί που είναι χρήσιμοι για τους υπολογισμούς των αποδοτήσεων και των αποδόσεων της αιθανόλης που θα ακολουθήσουν.

**Θεωρητική γλυκόζη βάση κυτταρίνης:** είναι η γλυκόζη που θα παραγόταν αν πραγματοποιούνταν πλήρης διάσπαση της κυτταρίνης. Βάση της θεωρίας προκύπτει ότι:

$$\text{Θεωρητική γλυκόζη βάση κυτταρίνης (g)} = \frac{\text{θεωρητική κυτταρίνη (g)}}{0,9}$$

όπου:

$$\text{Θεωρητική κυτταρίνη (g)} = \text{Κυτταρίνη} * \text{Αρχικό στερεό κλάσμα (g)}$$

Ο συντελεστής 0,9 στην παραπάνω εξίσωση προκύπτει με βάση τη στοιχειομετρία της αντίδρασης, καθώς και από τον λόγο των μοριακών βαρών της γλυκόζης και της κυτταρίνης.

**Θεωρητική γλυκόζη βάση αμύλου:** είναι η γλυκόζη που θα παραγόταν αν πραγματοποιούνταν πλήρης διάσπαση του αμύλου. Βάση της θεωρίας προκύπτει ότι:

$$\text{Θεωρητική γλυκόζη βάση αμύλου (g)} = \frac{\text{θεωρητικό άμυλο (g)}}{0,9}$$

όπου:

$$\text{Θεωρητικό άμυλο (g)} = \text{Άμυλο\%} * \text{Αρχικό στερεό κλάσμα (g)}$$

Στην περίπτωση του αμύλου ο συντελεστής 0,9 προκύπτει και πάλι με βάση τη στοιχειομετρία της αντίδρασης, καθώς και από τον λόγο των μοριακών βαρών της γλυκόζης και του αμύλου.

Συνεπώς, ως θεωρητική αιθανόλη ορίζεται η αιθανόλη που θα παραγόταν εάν γινόταν πλήρης διάσπαση της κυτταρίνης και του αμύλου σε γλυκόζη, και με τη σειρά της, η παραγόμενη γλυκόζη και η ελεύθερη γλυκόζη μετατρέπονταν πλήρως σε αιθανόλη. Αναλυτικότερα, βάση θεωρίας προκύπτει ότι:

$$\text{θεωρητική αιθανόλη} = \left( \frac{\text{θεωρητική γλυκόζη}}{\text{βάση κυτταρίνης}} + \frac{\text{θεωρητική γλυκόζη}}{\text{βάση αμύλου}} + \frac{\text{ελεύθερη}}{\text{γλυκόζη}} \right) * 0,511$$

Όπου στον παραπάνω τύπο ο συντελεστής 0,511 προκύπτει με βάση τη στοιχειομετρία της αντίδρασης (1:2)



καθώς 1 μόριο γλυκόζης δίνει 2 μόρια αιθανόλης και από τον λόγο των μοριακών βαρών της αιθανόλης και της γλυκόζης:

$$MB_{\text{αιθανόλης}}/MB_{\text{γλυκόζης}} = 46/180 = 0,2555$$

$$\text{Άρα, } m_{\text{αιθανόλης}}/m_{\text{γλυκόζης}} = 2 * 0,2555 = 0,511$$

Ως παραγόμενη αιθανόλη με βάση την ελεύθερη γλυκόζη και την αποδόμηση της κυτταρίνης και του αμύλου ορίζεται η αιθανόλη που παράγεται από τη διασπώμενη κυτταρίνη και το άμυλο που μετατρέπονται σε γλυκόζη, και στη συνέχεια η παραγόμενη γλυκόζη και η ελεύθερη γλυκόζη μετατρέπονται πλήρως σε αιθανόλη. Πιο συγκεκριμένα, προκύπτει ότι:

$$\text{Παραγόμενη αιθανόλη (g)} = \left( \frac{\text{Διασπώμενη κυτταρίνη (g)}}{0,9} + \frac{\text{Διασπώμενο άμυλο (g)}}{0,9} + \frac{\text{Ελεύθερη γλυκόζη (g)}}{\text{γλυκόζη (g)}} \right) * 0,511$$

Στην παραπάνω εξίσωση ο συντελεστής 0,511 προκύπτει με βάση τη στοιχειομετρία της αντίδρασης, και ο συντελεστής 0,9 προκύπτει εξίσου με βάση τη στοιχειομετρία της αντίδρασης, καθώς και από τον λόγο των μοριακών βαρών της γλυκόζης και του αμύλου.

Τέλος, ορίζεται ως παραγόμενη αιθανόλη με βάση την αποδόμηση της κυτταρίνης και του αμύλου η αιθανόλη που παράγεται από τη διασπώμενη κυτταρίνη και το άμυλο που μετατρέπονται σε γλυκόζη, και έτσι, η παραγόμενη γλυκόζη μετατρέπεται πλήρως σε αιθανόλη. Πιο συγκεκριμένα, προκύπτει ότι:

$$\text{Παραγόμενη αιθανόλη (g)} = \left( \frac{\text{Διασπώμενη κυτταρίνη (g)}}{0,9} + \frac{\text{Διασπώμενο άμυλο (g)}}{0,9} \right) * 0,511$$

Όπου ο συντελεστής 0,511 προκύπτει με βάση τη στοιχειομετρία της αντίδρασης.



Η αποικοδόμηση στερεού υπολογίζεται σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Αποικοδόμηση στερεού (g)} = \frac{\text{Αρχική ποσότητα στερεού (g)} - \text{Τελική ποσότητα στερεού (g)}}{\text{Αρχική ποσότητα στερεού (g)}} \quad \text{Εξίσωση 33}$$

Με τον ίδιο τρόπο υπολογίζονται και οι αποικοδομήσεις της κυτταρίνης και του αμύλου.

Υπολογίστηκαν με βάση τους παρακάτω υπολογισμούς, η απόδοση σακχαροποίησης και η απόδοση σε αιθανόλη.

$$\text{Απόδοση σακχαροποίησης (\%)} = \frac{\text{Μάζα παραγόμενης γλυκόζης (g)}}{\text{Μάζα θεωρητικής γλυκόζης (g)}} * 100\% \quad \text{Εξίσωση 34}$$

$$\text{Απόδοση αιθανόλης (\%)} = \frac{\text{Μάζα παραγόμενης αιθανόλης (g)}}{\text{Μάζα θεωρητικής αιθανόλης (g)}} * 100\% \quad \text{Εξίσωση 35}$$

όπου:

$$\frac{\text{Μάζα παραγόμενης αιθανόλης (g)}}{\text{Μάζα παραγόμενης αιθανόλης (g)}} = \frac{\text{Συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης (g/L)}}{\text{Μάζα παραγόμενης αιθανόλης (g/L)}} * \text{όγκο υγρού στο μίγμα (L)}$$

Έτσι, η απόδοση της αιθανόλης υπολογίζεται από την αιθανόλη που παράγεται προς την αιθανόλη που εκτιμάται ότι μπορεί να παραχθεί βάση της σύστασης της τροφοδοσίας (θεωρητική αιθανόλη).

## 7.4 Παραγοντικός σχεδιασμός

Η χρήση ενός παραγοντικού σχεδιασμού που περιλαμβάνει τρεις παράγοντες, ο καθένας σε δύο επίπεδα, αποτελεί μια ισχυρή πειραματική μεθοδολογία για τη διαλεύκανση της πολύπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ των μεταβλητών. Η προσέγγιση αυτή συνεπάγεται τη διεξαγωγή ενός ολοκληρωμένου συνόλου πειραμάτων, που περιλαμβάνουν όλους τους δυνατούς συνδυασμούς των επιπέδων των παραγόντων. Ένας τέτοιος σχεδιασμός είναι καθοριστικός για τον διαχωρισμό τόσο των κύριων επιδράσεων κάθε μεμονωμένου παράγοντα όσο και των επιδράσεων αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Μεταβάλλοντας συστηματικά τα επίπεδα κάθε παράγοντα, επιτυγχάνεται η άντληση πληροφοριών όχι μόνο για το πώς κάθε παράγοντας επηρεάζει ανεξάρτητα τη μεταβλητή απόκρισης αλλά και για το πώς οι παράγοντες διαμορφώνουν από κοινού το αποτέλεσμα. Η ικανότητα του παραγοντικού σχεδιασμού να καταγράφει τα αποτελέσματα αλληλεπίδρασης είναι ιδιαίτερα πολύτιμη, καθώς αποκαλύπτει συνέργειες ή ανταγωνισμούς που μπορεί να αποκρύπτονται σε πειράματα με έναν παράγοντα τη φορά. Αυτή η ολοκληρωμένη ανάλυση επιτρέπει τη βαθύτερη κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών που οδηγούν στα παρατηρούμενα φαινόμενα, διευκολύνοντας έτσι τη λήψη πιο τεκμηριωμένων αποφάσεων και τη βελτιστοποίηση της πειραματικής έρευνας. Η εφαρμογή παραγοντικών σχεδιασμών στις πειραματικές μεθόδους είναι απαραίτητη για την αποτελεσματικότητα και το βάθος της

διορατικότητάς της, καθιστώντας την απαραίτητο εργαλείο στα πλαίσια της επιστημονικής έρευνας.

Ο στόχος του παραγοντικού σχεδιασμού είναι να προσδιοριστεί η επίδραση ορισμένων βασικών παραμέτρων στην απόδοση της παραγωγής βιοαιθανόλης από την τροφοδοσία άλγης, με βάση τη βέλτιστη προεπεξεργασία. Οι παράμετροι που επιλέχθηκαν βάση των προκαταρκτικών πειραμάτων που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριό μας είναι η ποσότητα του κυτταρινολυτικού ενζύμου CelliCTec (μL/g κυτταρίνης), η ποσότητα του αμυλολυτικού ενζύμου Spirizyme (μL/g αμύλου) καθώς και η συγκέντρωση του NaOH κατά την έναρξη των αναλύσεων (0,1, 0,2 και 0,3M). Οι παράμετροι αυτές καλούνται ρυθμιστικές παράμετροι του συστήματος. Για τον παραγοντικό σχεδιασμό χρειάζεται να οριστεί το χαμηλότερο και το υψηλότερο επίπεδο όπως φαίνεται στον Πίνακα 8. Οι συνδυασμοί των παραμέτρων καθώς και τα πειράματα που προκύπτουν με σκοπό την βελτιστοποίηση της παραγωγής βιοαιθανόλης από άλγη παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

**Πίνακας 8:** Επίπεδα παραγοντικού σχεδιασμού.

Παράμετρος	Χαμηλότερο επίπεδο (-)	Κέντρο (0)	Υψηλότερο επίπεδο (+)
NaOH (M)	0,1	0,2	0,3
Spirizyme (μL/g αμύλου)	25	45	65
CelliCTec (μL/g κυτταρίνης)	250	500	750

**Πίνακας 9:** Πειράματα παραγοντικού σχεδιασμού

Πειράματα	NaOH (M)	Spirizyme (μL/g αμύλου)	CelliCTec (μL/g κυτταρίνης)
1	0,1	25	250
2	0,1	25	250
3	0,1	25	750
4	0,1	25	750
5	0,1	65	250
6	0,1	65	250
7	0,1	65	750
8	0,1	65	750
9	0,3	25	250
10	0,3	25	250
11	0,3	25	750
12	0,3	25	750
13	0,3	65	250
14	0,3	65	250
15	0,3	65	750
16	0,3	65	750
SSF1	0,2	45	500
SSF2	0,2	45	500
SSF3	0,2	45	500
SSF4	0,2	45	500

## 7.5 Αναλύσεις κατά τον παραγοντικό σχεδιασμό

Κατά την έναρξη της ζύμωσης, στα δείγματα που αφορούν τον παραγοντικό σχεδιασμό που πραγματοποιήθηκε όσον αφορά το υγρό κλάσμα πραγματοποιούνται οι ακόλουθες αναλύσεις στις  $t=0h$ :

- pH
- Γλυκόζη (g/L)
- Αιθανόλη (g/L)

Έπειτα από 24h από την έναρξη της ζύμωσης πραγματοποιείται διαχωρισμός του υγρού και του στερεού κλάσματος. Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα μετά την φυγοκέντρηση ζυγίζεται το στερεό κλάσμα σε falcon. Ακολούθως τοποθετούνται σε φούρνο στους 35 - 40°C για την απομάκρυνση της υγρασίας. Έπειτα από το πέρας μίας ημέρας, ζυγίζονται ξανά, θρυμματίζονται, λαμβάνουν την μορφή σκόνης και συλλέγονται σε falcon των 50 mL. Οι ζυγίσεις του στερεού κλάσματος και οι μετρήσεις του υγρού κλάσματος αποσκοπούν στον υπολογισμό της αποικοδόμησης του στερεού κατά την ολοκλήρωση του πειράματος.

Έτσι, στο υγρό κλάσμα πραγματοποιούνται οι ακόλουθες αναλύσεις:

- pH
- Γλυκόζη (g/L)
- Αιθανόλη(g/L)

Από την άλλη, στο στερεό κλάσμα γίνονται οι εξής αναλύσεις:

- Πτητικά στερεά (% σε ξηρή βάση)
- Τέφρα (% σε ξηρή βάση)
- Υδατοδιαλυτά στερεά (% σε ξηρή βάση)
- Άμυλο (% σε ξηρή βάση)
- Κυτταρίνη (% σε ξηρή βάση)
- Ημικυτταρίνη (% σε ξηρή βάση)
- Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη (% σε ξηρή βάση)
- Μη διαλυτό σε οξύ υπόλειμμα (% σε ξηρή βάση).

Έπειτα από την πραγματοποίηση των αναλύσεων αυτών είναι δυνατό να υπολογιστούν τα ποσοστά αποικοδόμησης όλων των παραμέτρων σε σχέση με την αρχική τροφοδοσία.

## Κεφάλαιο 8: Πειραματικά αποτελέσματα

### 8.1 Χαρακτηρισμός πρώτης ύλης

Ως πρώτη ύλη στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε τροφοδοσία ξηρών αλγών. Τα αποτελέσματα του φυσικοχημικού χαρακτηρισμού της παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 10:** Χαρακτηρισμός της τροφοδοσίας αλγών

Παράμετρος	Τροφοδοσία
Ολικά Στερεά (%)	91,96 ± 0,78
Υγρασία (%)	8,04 ± 0,78
Πτητικά Στερεά (% ξ.β.)	65,79 ± 0,66
Τέφρα (% ξ.β.)	34,21 ± 0,66
Λίπη Έλαια (% ξ.β.)	0,95 ± 0,00

Υδατοδιαλυτά Στερεά (% ξ.β.)	12,25	± 0,004
Ελεύθερη Γλυκόζη (% ξ.β.)	0,08	± 0,01
Άμυλο (% ξ.β.)	1,78	± 0,16
Κυτταρίνη (% ξ.β.)	9,21	± 0,56
Ημικυτταρίνη (% ξ.β.)	14,27	± 0,43
Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη (% ξ.β.)	1,07	± 0,07
Μη διαλυτή σε οξύ λιγνίνη(% ξ.β.)	26,72	± 4,38
Ολικό Άζωτο κατά Kjeldahl (% ξ.β.)	4,18	± 0,15

Στον εν λόγω πίνακα παρατηρείται πως οι περιεκτικότητες υδατανθράκων στο υπόστρωμα είναι σχετικά χαμηλές σε σύγκριση με άλλα υποστρώματα, όπως οι αμυλούχες πρώτες ύλες. Πιο συγκεκριμένα, οι αμυλούχες πρώτες ύλες περιέχουν υψηλότερα επίπεδα υδατανθράκων. Η ζύμωση λοιπόν σε απλά σάκχαρα επιτυγχάνεται με μεγαλύτερους ρυθμούς με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή αιθανόλης. Ωστόσο, η αιθανόλη που μπορεί να παραχθεί από τροφοδοσία αλγών παραμένει ενδιαφέρουσα προοπτική λόγω της ταχείας ανάπτυξης των αλγών, της δυνατότητάς τους να καλλιεργηθούν σε μη καλλιεργήσιμες εκτάσεις και της περιβαλλοντικά φιλικής προέλευσής τους.

## 8.2 Αποτελέσματα μελέτης προεπεξεργασίας αλγών

Αφού ολοκληρώθηκε ο χαρακτηρισμός των πρώτων υλών, έγιναν πειραματικές δοκιμές με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης προεπεξεργασίας για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής των ζυμώσιμων σακχάρων. Στην αρχή της κάθε μεθόδου προεπεξεργασίας, λαμβάνονται 10g ξηρής τροφοδοσίας (Τροφ. Α) καθώς και 90 mL από τον εκάστοτε διαλύτη: Αναλυτικότερα, λαμβάναμε 90 mL απεσταγμένου H<sub>2</sub>O, 90 mL NaOH συγκέντρωσης 0,2M και 90 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1% v/v) αντίστοιχα. Έπειτα τα γυάλινα μπουκαλάκια των 250 mL που περιέχουν συνολικά 100 mL διαλύματος τροφοδοσίας και διαλύτη μεταφέρονται στην εκάστοτε συσκευή για την κάθε προεπεξεργασία. Συνοπτικά, δοκιμάστηκαν οι εξής τεχνικές:

- Υδροθερμική, με τη χρήση του αυτόκλειστου στους 121°C για 30 λεπτά
- Υδατόλουτρο, στους 90°C για 75 λεπτά
- Υπέρηχοι στα 150W για 10 λεπτά

Κατά τη διάρκεια των 72 ωρών που διήρκεσε η υδρόλυση, λαμβανόταν ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα 1mL δείγματος στο οποίο πραγματοποιούνταν οι μετρήσεις για την γλυκόζη. Έτσι, εκτός από την αρχή της αντίδρασης σακχαροποίησης λήφθηκαν άλλες 9 μετρήσεις στις 18, 20, 24, 42, 46, 48, 50, 67 και 72 ώρες αντίστοιχα

Συνεπώς, για κάθε μία από τις παραπάνω προεπεξεργασίες με διαλύτες το H<sub>2</sub>O, το NaOH και το H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> παρουσιάζεται η μετρούμενη συγκέντρωση της γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου και η απόδοση της σακχαροποίησης.

**Πίνακας 11:** Συγκεντρώσεις γλυκόζης σε g/L για προεπεξεργασία μέσω αυτόκλειστου για διάρκεια 72h ανά πείραμα.

Αυτόκλειστο 121°C 30min	0h	18h	20h	24h	42h	46h	48h	50h	67h	72h
A.1	0,11	3,50	3,46	3,64	3,32	2,52	2,16	0,39	0,04	0,03
A.2	0,12	5,83	6,06	9,24	9,01	8,71	5,72	1,93	0,21	0,11

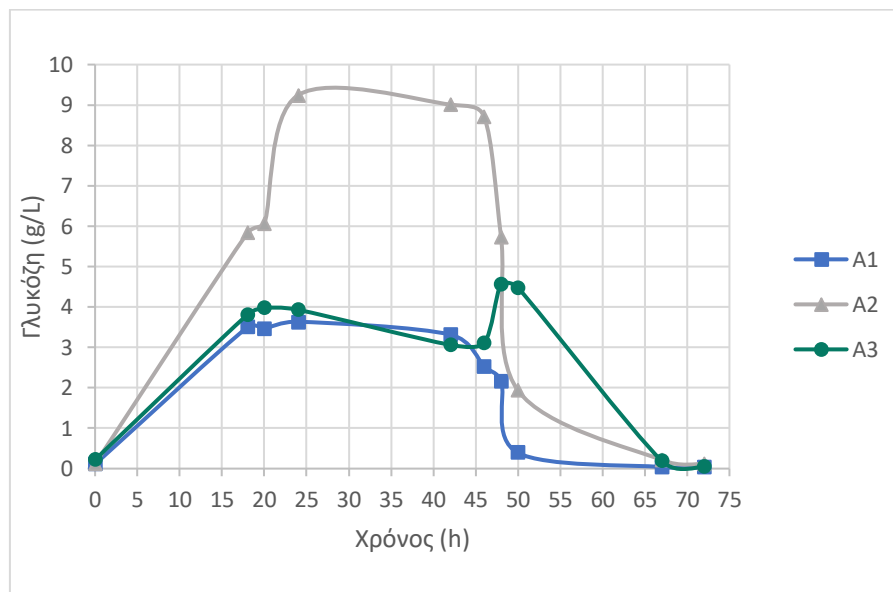
<b>A.3</b>	0,22	3,81	3,98	3,93	3,06	3,11	4,57	4,47	0,19	0,04
------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

**Πίνακας 12:** Συγκεντρώσεις γλυκόζης σε g/L για προπεξεργασία μέσω υδατόλουτρου για διάρκεια 72h ανά πείραμα.

Υδατόλουτρο 90°C 75min	0h	18h	20h	24h	42h	46h	48h	50h	67h	72h
<b>B.1</b>	0,15	0,07	0,06	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
<b>B.2</b>	0,10	9,80	8,67	4,85	1,03	0,52	0,45	0,27	0,07	0,03
<b>B.3</b>	0,09	2,46	2,71	2,55	0,26	0,21	0,18	0,14	0,06	0,04

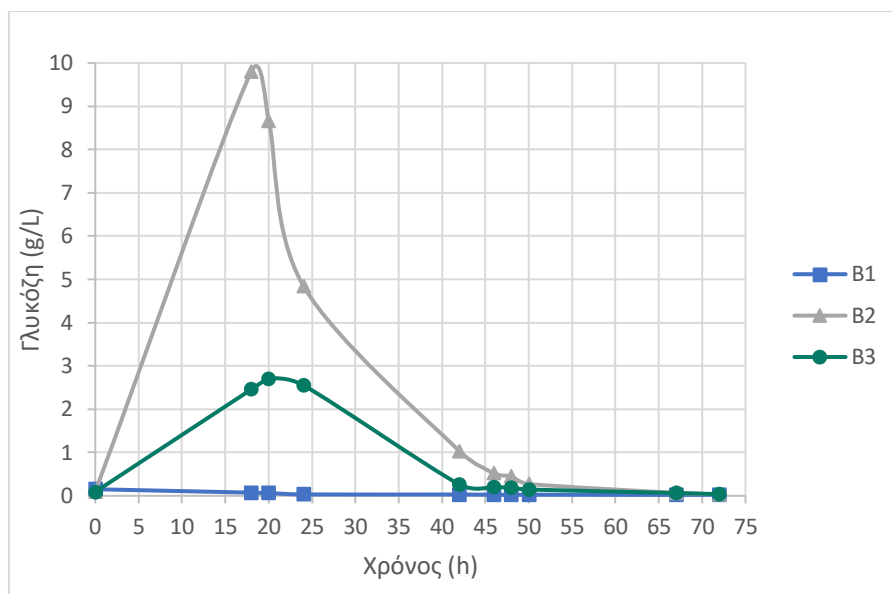
**Πίνακας 13:** Συγκεντρώσεις γλυκόζης σε g/L για προπεξεργασία μέσω υπερήχων για διάρκεια 72h ανά πείραμα.

Υπέρηχοι 150W 10min	0h	18h	20h	24h	42h	46h	48h	50h	67h	72h
<b>Γ.1</b>	0,14	0,04	0,04	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04
<b>Γ.2</b>	0,09	0,09	0,10	0,13	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04
<b>Γ.3</b>	0,21	2,93	2,96	1,89	0,08	0,02	0,02	0,03	0,04	0,04



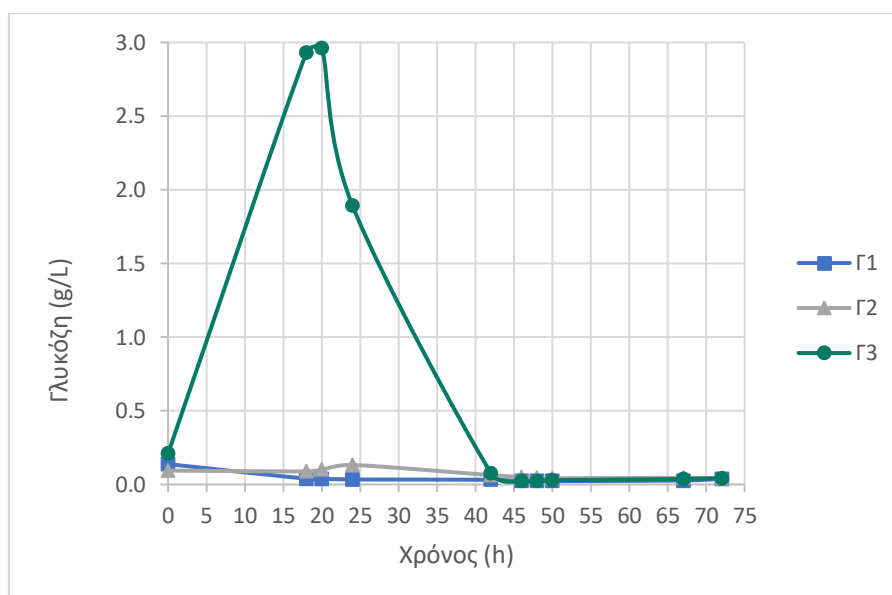
**Διάγραμμα 2:** Συγκέντρωση γλυκόζης για προπεξεργασία μέσω αυτόκλειστου, 121°C συναρτήσει του χρόνου

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 2, φαίνεται πως για διαλύτη το NaOH παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση της γλυκόζης συγκριτικά με τους υπόλοιπους διαλύτες. Αναλυτικότερα στις 24 ώρες υδρόλυσης η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι ίση με 9,24 g/L.



**Διάγραμμα 3:** Συγκέντρωση γλυκόζης για προεπεξεργασία σε υδατόλουτρο, 90°C συναρτήσε του χρόνου

Στο διάγραμμα 3 είναι φανερό πως και πάλι χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το NaOH λαμβάνει χώρα μεγαλύτερη διάσπαση της γλυκόζης. Πιο συγκεκριμένα στις 18 ώρες υδρόλυσης η τιμή της γλυκόζης είναι 9,80 g/L.

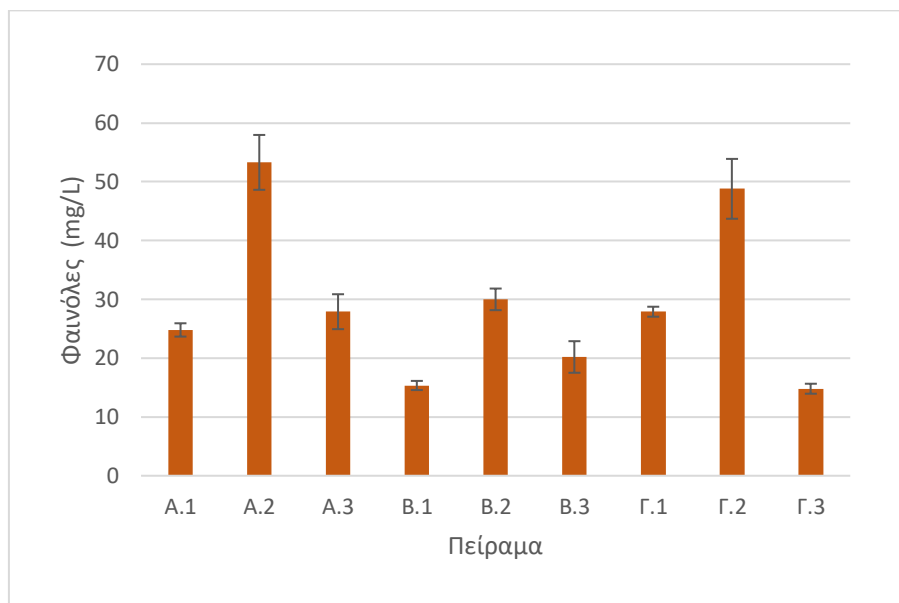


**Διάγραμμα 4:** Συγκέντρωση γλυκόζης για προεπεξεργασία σε λουτρό υπερήχων συναρτήσε του χρόνου

Στο διάγραμμα 4, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης για τον διαλύτη  $H_2SO_4$  με μέγιστη συγκέντρωση 2,96g/L στις 20h σακχαροποίησης, ενώ για τους υπόλοιπους δύο διαλύτες όπως είναι εμφανές στο διάγραμμα δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή της γλυκόζης. Ωστόσο για την παρακολούθηση του πειράματος, πραγματοποιήθηκε η ίδια δειγματοληψία.

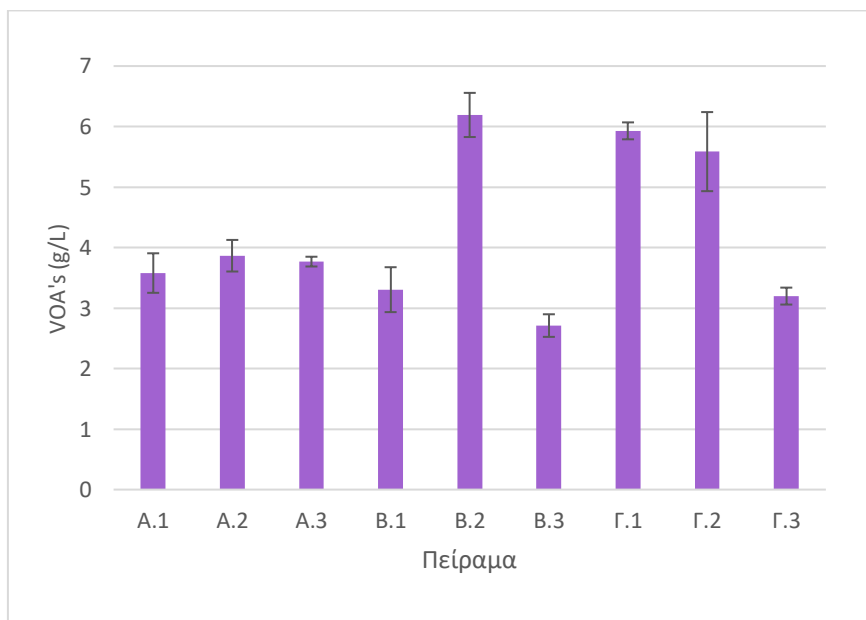
Ακόμη όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, μετά το πέρας των 72 ωρών πραγματοποιήθηκαν στο υγρό κλάσμα του κάθε δείγματος αναλύσεις για τον προσδιορισμό των πτητικών οργανικών οξέων (Volatile Organic Acids) και των φαινολών στο τελικό διάλυμα

που προέκυψε. Τα αποτελέσματα των παραπάνω μετρήσεων παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.



**Διάγραμμα 5:** Συγκεντρώσεις φαινολών ανά πείραμα μετά το πέρας των 72 ωρών ενζυμικής υδρόλυσης.

Όπως παρατηρείται από το παραπάνω διάγραμμα οι συγκεντρώσεις των φαινολών για κάθε πείραμα παρέμειναν σε χαμηλό επίπεδο για όλες τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με μέγιστη παρατηρούμενη συγκέντρωση τα  $53,3 \pm 4,67$  mg/L στο πείραμα A.2.



**Διάγραμμα 6:** Συγκεντρώσεις πτητικών οργανικών οξέων ανά πείραμα μετά το πέρας των 72 ωρών ενζυμικής υδρόλυσης.

Επιπλέον η ανάλυση για τον προσδιορισμό των VOA's έδειξε ένα αρκετά ενδιαφέρον αποτέλεσμα καθώς μετά το πέρας των 72 ωρών η συγκεντρώσεις των οργανικών οξέων είναι ιδιαίτερα αυξημένες, γεγονός που υποδηλώνει την μετατροπή των σακχάρων σε οργανικά οξέα. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στον αυξημένο χρόνο παραμονής των



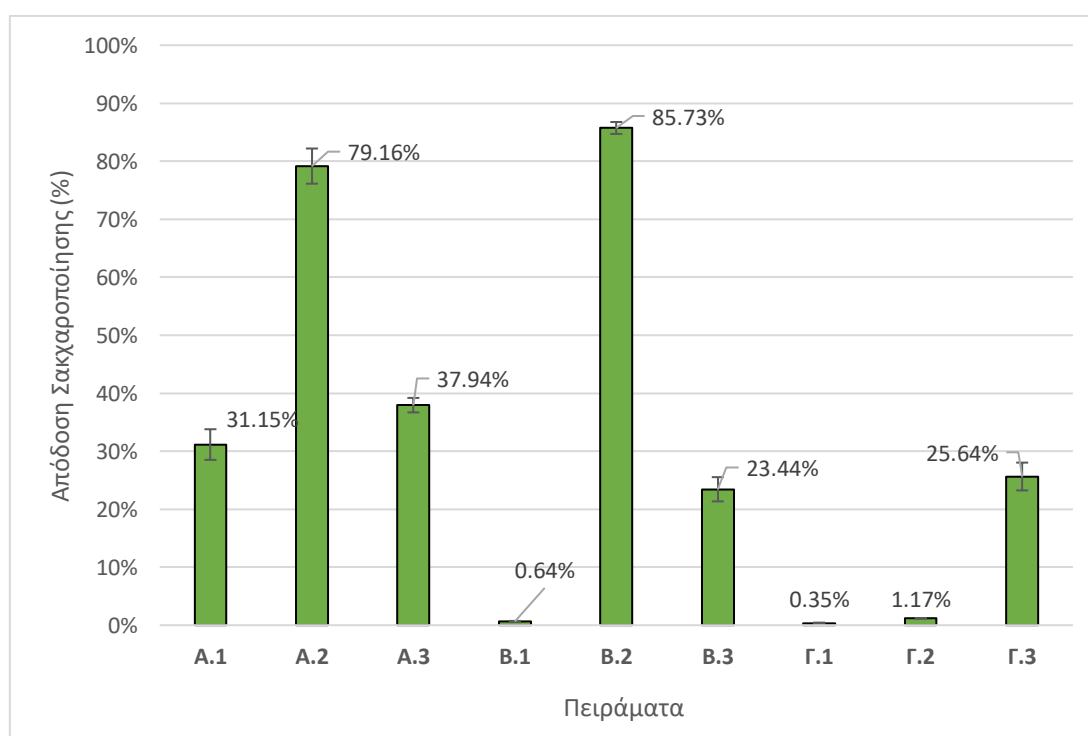
πειραμάτων σε συνδυασμό με την ορισμένη θερμοκρασία διεξαγωγής των πειραμάτων. Τέλος η μέγιστη συγκέντρωση που παρατηρήθηκε ήταν στα  $6,19 \pm 0,36$  g/L κατά το πείραμα Β.2.

### Απόδοση Σακχαροποίησης

Σύμφωνα με το κεφάλαιο 7.2 και την εξίσωση της απόδοσης σακχαροποίησης (Εξίσωση 34) υπολογίστηκαν οι εκάστοτε αποδόσεις για την κάθε προεπεξεργασία και διαλύτη ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα. Σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό που πραγματοποιήθηκε με Α συμβολίζονται τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με την χρήση υδροθερμικής προεπεξεργασίας, με Β τα πειράματα με την χρήση υδατόλουτρου ως μέθοδος προεπεξεργασίας και με Γ τα πειράματα με την χρήση υπερήχων. Με 1,2 και 3 συμβολίζονται αντίστοιχα οι διαλύτες ανά πείραμα H<sub>2</sub>O, NaOH και H<sub>2</sub>SO

**Πίνακας 14:** Αποδόσεις σακχαροποίησης για κάθε μέθοδο προεπεξεργασίας και διαλύτη

Συνθήκες	Πείραμα	Απόδοση (%)	Τυπική Απόκλιση (%)
Αυτόκλειστο 121°C 30 min	A.1	31,15	2,64
	A.2	79,16	3,03
	A.3	37,94	1,25
Υδατόλουτρο 90°C 75min	B.1	0,64	0,10
	B.2	85,73	1,03
	B.3	23,44	2,09
Υπέρηχοι 150W 10min	Γ.1	0,35	0,10
	Γ.2	1,17	0,02
	Γ.3	25,64	2,40



**Διάγραμμα 7:** Αποδόσεις σακχαροποίησης για κάθε μέθοδο προεπεξεργασίας και διαλύτη

Από το διάγραμμα 7 είναι εμφανές πώς με την χρήση του NaOH ως διαλύτη τόσο στην υδροθερμική όσο και στη προεπεξεργασία με υδατόλουτρο οι αποδόσεις σακχαροποίησης είναι μεγαλύτερες με ποσοστά 79,16 και 85,73% αντίστοιχα. Από την άλλη, όσον αφορά τη προεπεξεργασία σε λουτρό υπερήχων τα ποσοστά υπολογίζονται εμφανώς μειωμένα.

#### 8.2.1 Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός υπολειμμάτων ενζυμικής υδρόλυσης

Έπειτα από το πέρας των 72 ωρών που διήρκησε η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε ο πλήρης φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των υπολειμμάτων από την ενζυμική υδρόλυση όπως αναφέρεται και στο υποκεφάλαιο 7.1 του Πειραματικού Πρωτόκολλου, ο οποίος παρουσιάζεται παρακάτω.

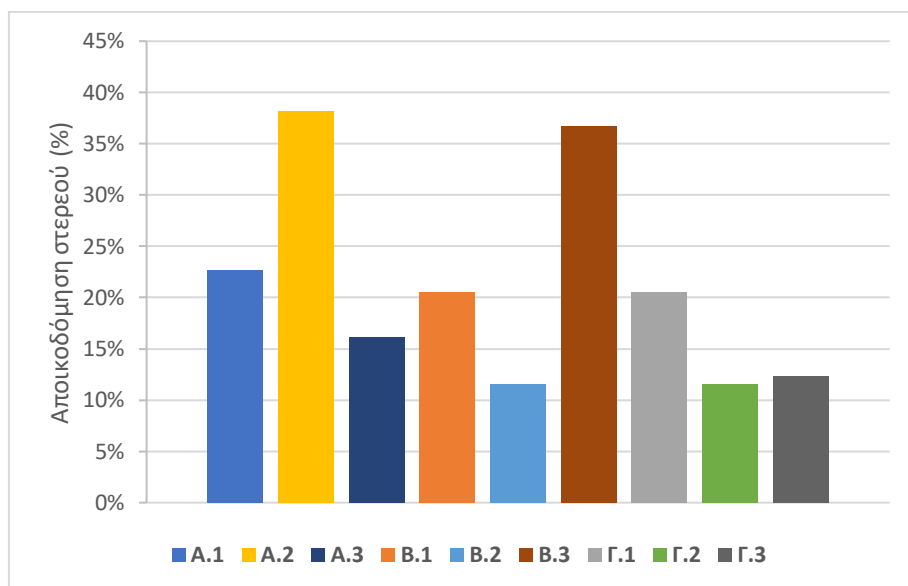
Πίνακας 15: Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των υπολειμμάτων της ενζυμικής υδρόλυσης

Χαρακτηρισμός	%		Ξηρή βάση (%)							
	Υγρασία	Πτητικά Στερεά	Τέφρα	Λίπη και έλαια	Ελεύθερη Γλυκόζη	Άμυλο	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Διαλυτή σε οξύ λιγνίνη	Μη διαλυτή λιγνίνη
A.1	71,11	63,01	36,99	0	0,40	0,53	3,22	5,05	1,00	35,01
A.2	71,51	59,65	40,35	0	0,08	0,11	1,15	3,24	1,05	29,82
A.3	72,33	65,61	34,39	0	0,10	0,58	6,68	6,37	0,85	26,74
B.1	75,77	57,71	42,29	0	0,15	0,67	2,66	6,41	0,97	36,09
B.2	79,84	58,78	41,22	0	0,05	0,15	0,76	2,64	1,07	30,64
B.3	71,44	67,24	32,76	0	0,05	0,33	8,14	6,75	0,86	19,66
Γ.1	75,75	52,05	47,95	0	0,07	0,22	1,03	10,19	0,87	27,55
Γ.2	75,96	56,93	43,07	0	0,05	0,21	2,07	3,09	0,64	22,82
Γ.3	72,17	46,36	53,64	0	0,06	0,39	4,28	10,01	0,74	25,84

### 8.2.2 Ποσοστά αποικοδόμησης

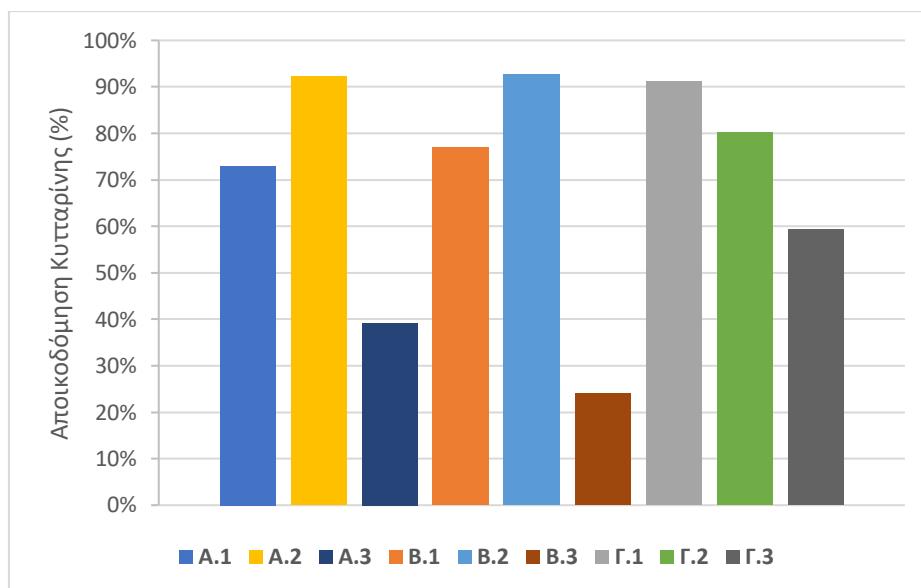
Για την καλύτερη ανάλυση των προεπεξεργασιών βάση της Εξίσωσης 33 για την αποικοδόμηση των συστατικών της τροφοδοσίας υπολογίστηκαν τα αντίστοιχα ποσοστά αποικοδόμησης που παρουσιάζονται στο παρόν κεφάλαιο.

Τα ποσοστά αποικοδόμησης του στερεού, καθώς επίσης και τα αντίστοιχα της κυτταρίνης, του αμύλου, της ημικυτταρίνης και του μη διαλυτού σε οξύ υπολείμματος για κάθε μία από τις μεθόδους προεπεξεργασίας όπως και για κάθε διαλύτη ξεχωριστά παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.



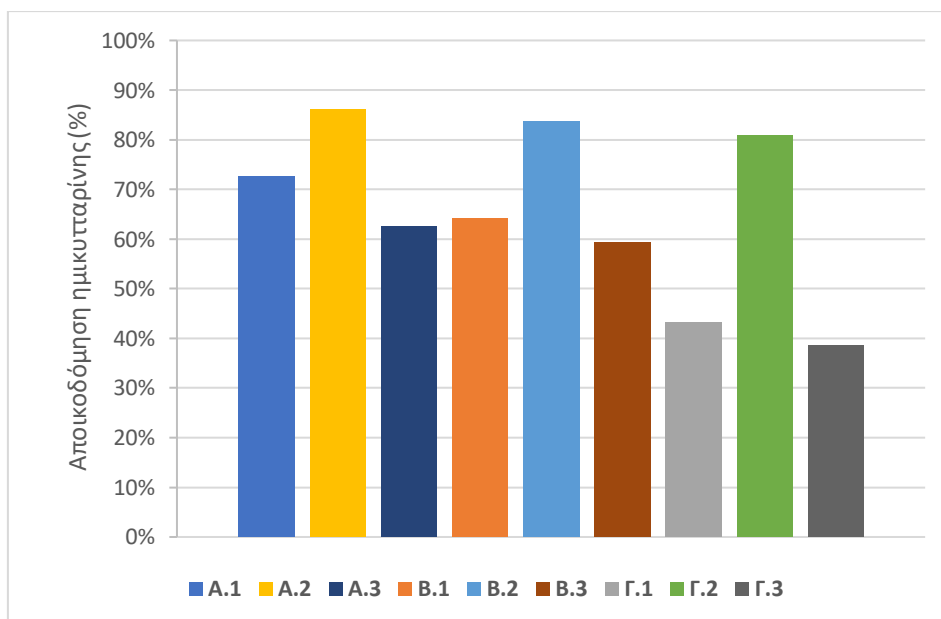
**Διάγραμμα 8:** Ποσοστά αποικοδόμησης στερεού ανά πείραμα

Σύμφωνα με το διάγραμμα 8 τα ποσοστά αποικοδόμησης του στερεού στις προεπεξεργασίες σε αυτόκλειστο και υδατόλουτρο για διαλύτη το NaOH και H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> αντίστοιχα είναι οι μεγαλύτερες που παρατηρούνται και είναι ίσες με 38,17% και 36,73% αντίστοιχα.

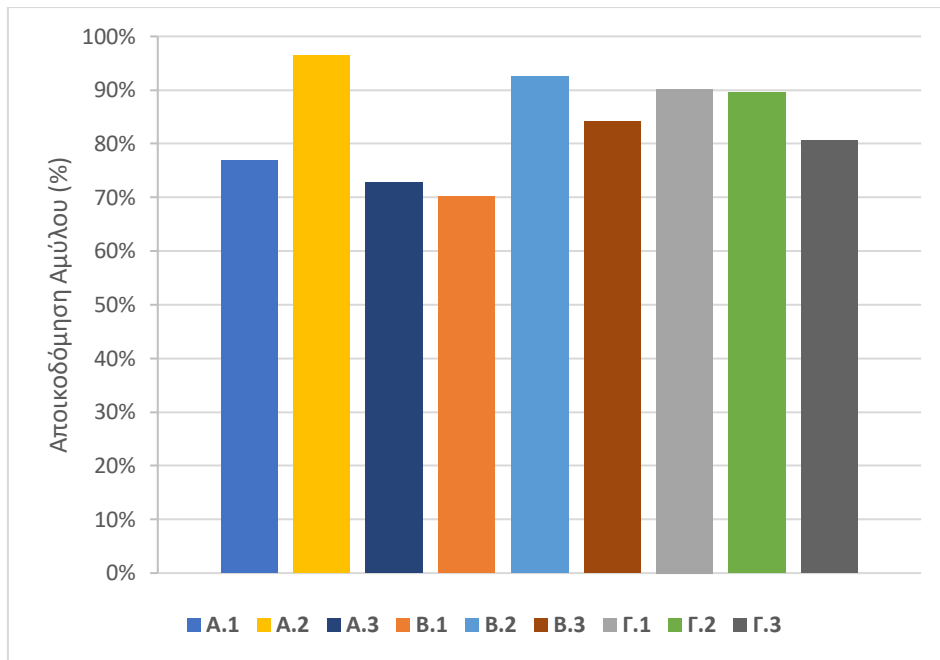


**Διάγραμμα 9:** Ποσοστά αποικοδόμησης κυτταρίνης ανά πείραμα

Στις περισσότερες περιπτώσεις σύμφωνα με το διάγραμμα 9 η αποικοδόμηση της κυτταρίνης φαίνεται ικανοποιητική καθώς ξεπερνάει το 60% με μέγιστη τιμή 92,72% στη περίπτωση του υδατόλουτρου με διαλύτη το NaOH.

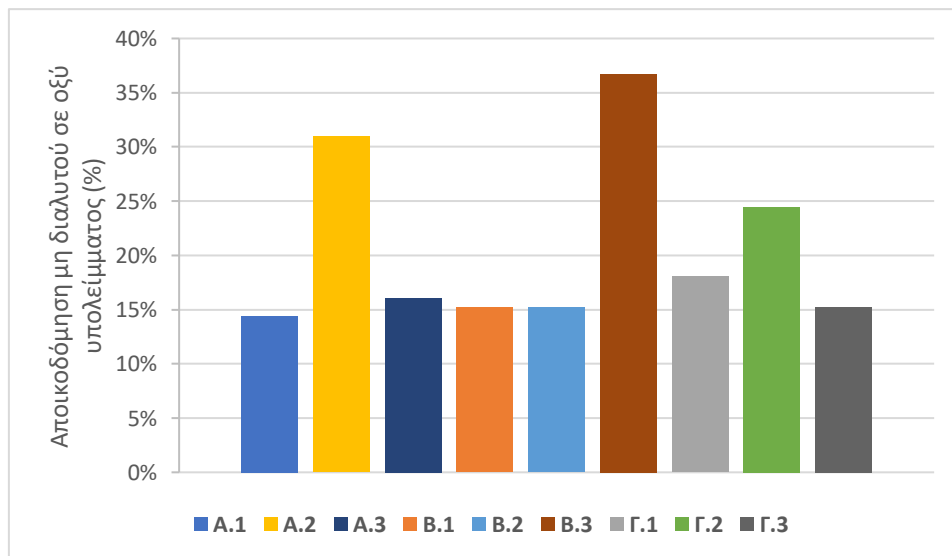


**Διάγραμμα 10:** Ποσοστά αποικοδόμησης ημικυτταρίνης ανά πείραμα



**Διάγραμμα 11:** Ποσοστά αποικοδόμησης αμύλου ανά πείραμα

Τα ποσοστά αποικοδόμησης του αμύλου είναι αρκετά ικανοποιητικά καθώς έξι από αυτά ξεπερνούν το 80%, με μέγιστη αποικοδόμηση το 96,35% που σημειώνεται με διαλύτη NaOH στο αυτόκλειστο.



**Διάγραμμα 12:** Αποικοδομήσεις μη διαλυτού σε οξύ υπολείμματος ανά πείραμα

Η μέγιστη τιμή αποκοδόμησης σύμφωνα με το Διάγραμμα 12 είναι 36,73% στη προεπεξεργασία με υδατόλουτρο χρησιμοποιώντας το  $H_2SO_4$  ως διαλύτη.

### 8.3 Αποτελέσματα παραγοντικού πειράματος

Μετά την εφαρμογή των προεπεξεργασιών που αναφέρθηκαν παραπάνω καθορίστηκε η πλέον αποδοτική μέθοδος που απέφερε τη μεγαλύτερη απόδοση σακχαροποίησης. Πιο συγκεκριμένα, η απόδοση σακχαροποίησης για την προεπεξεργασία σε υδατόλουτρο, στους 90°C για 75 λεπτά με διαλύτη το NaOH υπολογίστηκε ίση με 85,73%. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές του κέντρου του παραγοντικού σχεδιασμού (0,2M NaOH, 45 μL Spizzyme /g αμύλου, 500 μL CelliCTec /g κυτταρίνης). Πιο αναλυτικά, πραγματοποιήθηκαν τέσσερα πειράματα SSF (ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση) με την ίδια τροφοδοσία ώστε να πραγματοποιηθεί έλεγχος σχετικά με το εάν η γλυκόζη η οποία παράγεται κατά τη διάρκεια της σακχαροποίησης καταναλώνεται και δύναται να μεταβολιστεί σε αιθανόλη

Για τα πειράματα του παραγοντικού σχεδιασμού πραγματοποιήθηκε ο πλήρης φυσικοχημικός χαρακτηρισμός τους ώστε να σημειωθούν όλες οι περιεκτικότητες σε υδατάνθρακες για τον μετέπειτα υπολογισμό των αποικοδομήσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.



Πίνακας 16: Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των πειραμάτων του παραγοντικού σχεδιασμού

Πείραμα	Ολικά Στερεά(%)	Υγρσία (%)	Πτητικά Στερεά (%)	Τέφρα (%)	Λίπη και έλαια (%)	Υδατ. Στερεά (%)	Ελεύθερη γλυκόζη (%)	Άμυλο (%)	Κυτταρίνη (%)	Ημικυτταρίνη (%)	Διαλυτή λιγνίνη (%)	Μη διαλυτή λιγνίνη(%)
1	26,64	73,36	57,87	42,13	0,00	14,96	0,10	0,38	1,07	4,06	1,27	29,19
2	25,68	74,32	54,66	45,34	0,00	15,62	0,11	0,34	0,94	3,82	1,18	30,47
3	25,91	74,09	54,26	45,74	0,00	13,61	0,15	0,35	0,68	3,18	1,06	28,15
4	26,71	73,29	55,36	44,64	0,00	15,23	0,12	0,36	0,77	3,58	1,22	26,55
5	26,34	73,66	61,49	38,51	0,00	26,79	0,21	0,36	1,32	5,26	0,83	20,52
6	23,88	76,12	30,38	69,62	0,00	36,79	0,58	2,68	0,69	3,50	0,93	18,68
7	26,93	73,07	63,67	36,33	0,00	51,04	0,69	1,70	0,26	1,65	0,72	13,98
8	25,62	74,38	36,52	63,48	0,00	25,13	1,28	1,11	2,19	7,12	1,03	22,27
9	28,54	71,46	54,09	45,91	0,00	19,18	0,10	0,37	0,29	2,92	0,94	28,60
10	25,30	74,70	47,42	52,58	0,00	23,13	0,10	0,36	0,47	2,65	1,02	25,42
11	24,62	75,38	53,85	46,15	0,00	20,33	0,08	0,40	0,45	2,54	0,78	28,03
12	24,63	75,37	49,21	50,79	0,00	30,25	0,19	0,38	0,51	2,92	1,09	26,68
13	22,86	77,14	53,99	46,01	0,00	28,05	0,14	0,47	0,46	2,69	1,03	23,94
14	23,06	76,94	53,91	46,09	0,00	27,98	0,09	0,43	0,32	3,65	1,09	21,20
15	21,46	78,54	52,48	47,52	0,00	27,79	0,05	0,42	0,19	2,02	0,95	23,65
16	22,27	77,73	52,52	47,48	0,00	28,44	0,06	0,41	0,22	1,99	0,99	23,58
SSF1	25,27	74,73	45,64	54,36	0,00	18,81	0,09	0,08	0,55	6,18	1,12	22,48
SSF2	25,60	74,40	50,61	49,39	0,00	23,64	0,04	0,11	0,50	5,89	1,02	24,69
SSF3	26,62	73,38	50,66	49,34	0,00	16,54	0,06	0,11	0,39	5,70	1,04	22,04
SSF4	27,20	72,80	50,95	49,05	0,00	16,85	0,09	0,18	0,65	6,51	1,04	23,71

Παρακάτω παρουσιάζονται οι πίνακες με τις μετρήσεις για την γλυκόζη και αιθανόλη στις 0 και 24 ώρες για κάθε πείραμα του παραγοντικού σχεδιασμού.

**Πίνακας 17:** Συγκεντρώσεις γλυκόζης στις 0 ώρες για τα πειράματα του παραγοντικού σχεδιασμού

A/A	Γλυκόζη (g/L)	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση	Γλυκόζη (g)
1	0,11	0,10	0,00	0,011
2	0,10			0,010
3	0,11	0,12	0,00	0,011
4	0,12			0,012
5	0,36	0,24	0,17	0,036
6	0,11			0,011
7	0,21	0,21	0,01	0,021
8	0,20			0,020
9	0,11	0,12	0,01	0,011
10	0,13			0,013
11	0,11	0,10	0,02	0,011
12	0,08			0,008
13	0,11	0,11	0,00	0,011
14	0,11			0,011
15	0,15	0,13	0,02	0,015
16	0,12			0,012
SSF1	0,14			0,014
SSF2	0,09	0,09	0,03	0,009
SSF3	0,06			0,006
SSF4	0,07			0,007

**Πίνακας 18:** Συγκεντρώσεις γλυκόζης στις 24 ώρες για τα πειράματα του παραγοντικού σχεδιασμού

A/A	Γλυκόζη (g/L)	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση	Γλυκόζη (g)
1	0,09	0,08	0,01	0,009
2	0,07			0,007
3	0,09	0,09	0,01	0,009
4	0,08			0,008
5	0,15	0,13	0,04	0,015
6	0,10			0,010
7	0,14	0,12	0,03	0,014
8	0,09			0,009
9	0,11	0,11	0,00	0,011
10	0,11			0,011
11	0,11	0,11	0,00	0,011
12	0,10			0,010
13	0,10	0,10	0,00	0,010
14	0,10			0,010
15	0,10	0,10	0,00	0,010
16	0,11			0,011

SSF1	0,11			0,011
SSF2	0,09			0,009
SSF3	0,06	0,08	0,02	0,006
SSF4	0,06			0,006

**Πίνακας 19:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης στις 0 ώρες για τα πειράματα του παραγοντικού σχεδιασμού

A/A	Αιθανόλη (g/L)	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση	Αιθανόλη (g)
1	0,11			0,011
2	0,11	0,11	0,00	0,011
3	0,13			0,013
4	0,13	0,13	0,00	0,013
5	0,2			0,02
6	0,06	0,13	0,10	0,006
7	0,15			0,015
8	0,06	0,105	0,06	0,006
9	0,15			0,015
10	0,17	0,16	0,01	0,017
11	0,16			0,016
12	0,14	0,15	0,01	0,014
13	0,14			0,014
14	0,16	0,15	0,01	0,016
15	0,2			0,02
16	0,17	0,185	0,02	0,017
SSF1	0,11			0,011
SSF2	0,11			0,011
SSF3	0,11	0,11	0,00	0,011
SSF4	0,11			0,011

**Πίνακας 20:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης στις 24 ώρες για τα πειράματα του παραγοντικού σχεδιασμού

A/A	Αιθανόλη (g/L)	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση	Αιθανόλη (g)
1	2,80			0,28
2	3,40	3,100	0,42	0,34
3	3,40			0,34
4	3,20	3,300	0,14	0,32
5	4,20			0,42
6	2,19	3,19	1,42	0,22
7	4,60			0,46
8	2,56	3,58	1,44	0,26
9	2,60			0,26
10	3,00	2,800	0,28	0,30
11	3,80			0,38
12	4,00	3,900	0,14	0,40
13	3,60			0,36
14	3,80	3,700	0,14	0,38

15	4,60	4,400	0,28	0,46
16	4,20			0,42
SSF1	3,00	2,95	0,25	0,30
SSF2	3,20			0,32
SSF3	3,00			0,30
SSF4	2,60			0,26

Στη συνέχεια βάση του Πίνακα 20 και σύμφωνα με την **Εξίσωση 35** θα υπολογιστούν οι αποδόσεις (%) της αιθανόλης έπειτα από 24 ώρες

**Πίνακας 21:** Συγκέντρωση και απόδοση αιθανόλης μετά τις 24 ώρες στα πειράματα του παραγοντικού σχεδιασμού

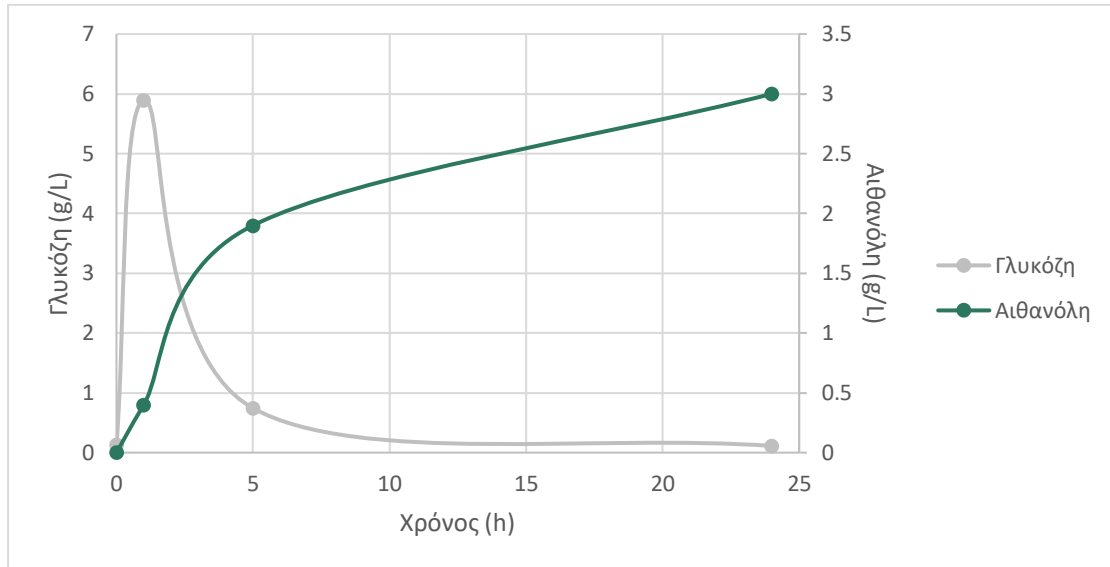
A/A	NaOH (M)	CelliCTec (μL/g κυτταρίνης)	Spirizyme (μL/g αμύλου)	Συγκέντρωση Αιθανόλης (g/L)	Απόδοση αιθανόλης (%)
1	0,1	250	25	3,1 ± 0,42	53,63
2	0,1	750	25	3,3 ± 0,14	57,09
3	0,1	250	65	3,19 ± 1,42	54,65
4	0,1	750	65	3,58 ± 1,44	61,26
5	0,3	250	25	2,8 ± 0,28	48,43
6	0,3	750	25	3,9 ± 0,14	67,47
7	0,3	250	65	3,7 ± 0,14	64,00
8	0,3	750	65	4,4 ± 0,28	76,12
Κέντρο	0,2	500	45	2,95 ± 0,25	50,26

Όπως φαίνεται στους ανωτέρω πίνακες, οι συγκεντρώσεις αιθανόλης που μετρήθηκαν, αλλά και οι αντίστοιχες αποδόσεις τους με βάση τη θεωρητικά αναμενόμενη παραγωγή αιθανόλης, είναι αρκετά ικανοποιητικές ώστε να θεωρηθεί η διεργασία αποδοτική.

Παρακάτω παρουσιάζονται πιο αναλυτικά οι πίνακες με τις μετρήσεις για την γλυκόζη και αιθανόλη σε τέσσερις διαφορετικές χρονικές στιγμές (0, 1, 5 και 24 ώρες) καθώς και τα αντίστοιχα διαγράμματα.

**Πίνακας 22:** Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 1

Δείγμα (h)	Γλυκόζη (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
0	0,14	0
1	5,90	0,4
5	0,74	1,9
24	0,11	3

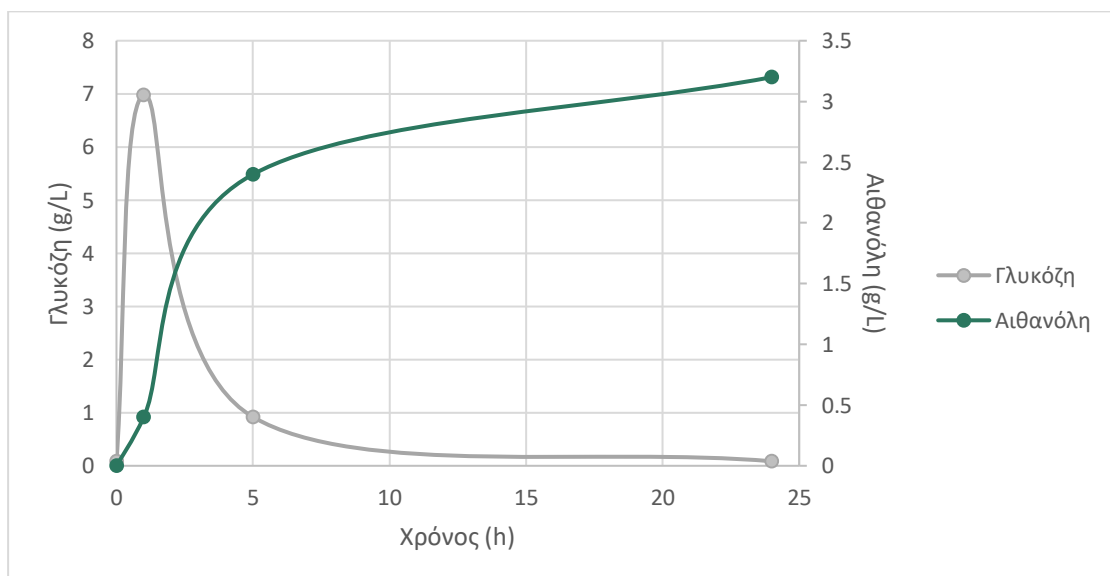


**Διάγραμμα 13:** Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 1

Σύμφωνα με το διάγραμμα 13 στις 24 ώρες από την έναρξη της ζύμωσης, η αιθανόλη έφτασε τη συγκέντρωση των 3g/L που αντιστοιχεί σε 48,78% απόδοση αιθανόλης.

**Πίνακας 23:** Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 2

Δείγμα (h)	Γλυκόζη (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
0	0,09	0
1	6,98	0,4
5	0,92	2,4
24	0,09	3,2

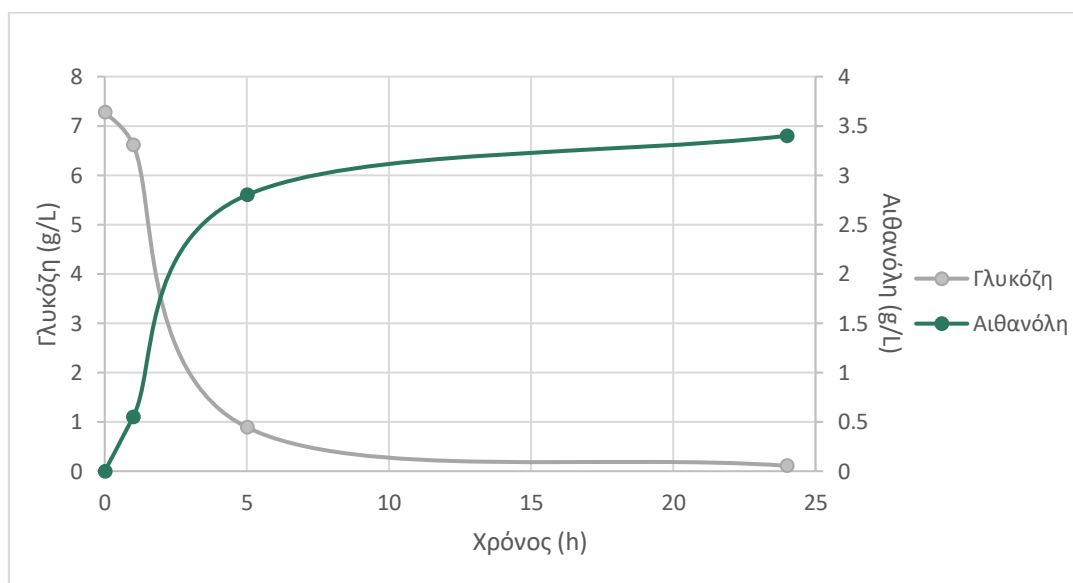


**Διάγραμμα 14:** Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 2

Για το πείραμα SSF2 η αιθανόλη στις 24 ώρες πήρε την τιμή των 3,2 g/L και απόδοση 52,03%

**Πίνακας 24:** Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 3

Δείγμα (h)	Γλυκόζη (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
0	7,27	0
1	6,62	0,55
5	0,89	2,8
24	0,11	3,4

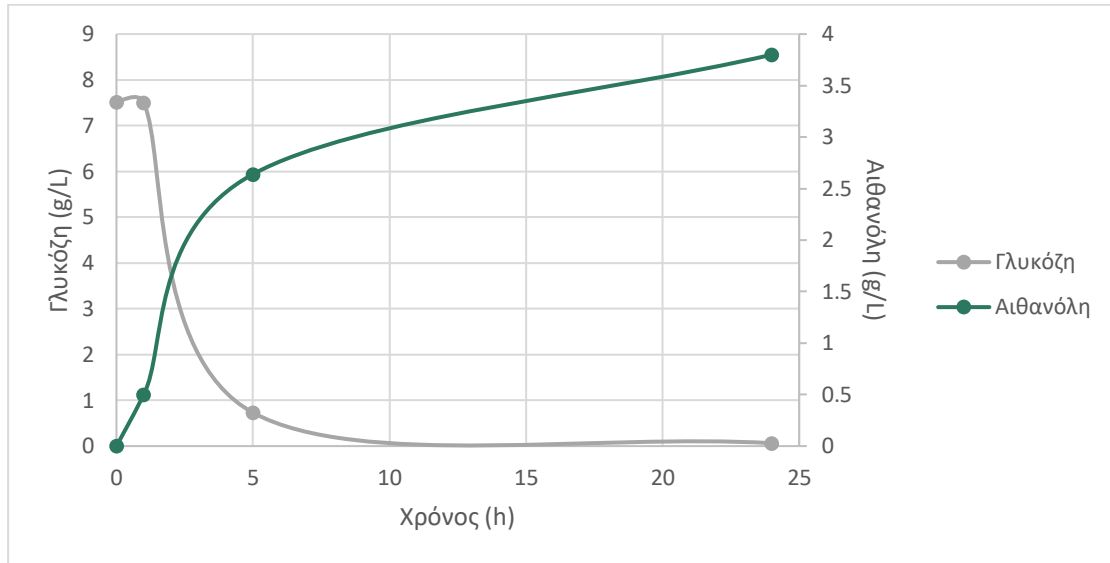


**Διάγραμμα 15:** Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 3

Στο πείραμα SSF3 στις 24 ώρες η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν ίση με 3,4 g/L με 55,41% απόδοση αιθανόλης

**Πίνακας 25:** Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 4

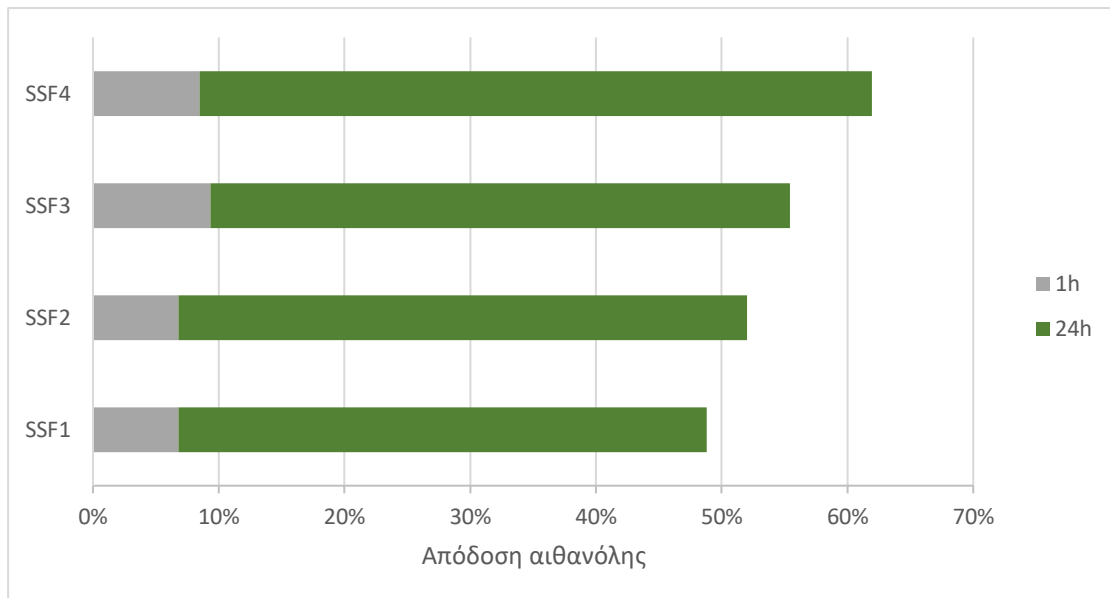
Δείγμα (h)	Γλυκόζη (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
0	7,51	0
1	7,50	0,5
5	0,73	2,64
24	0,06	3,8



**Διάγραμμα 16:** Συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης για το πείραμα SSF 4

Τέλος, για το SSF4 η απόδοση που βρέθηκε ίση με 61,92% αντιστοιχεί σε συγκέντρωση αιθανόλης ίση με 3,8 g/L στις 24 ώρες ζύμωσης.

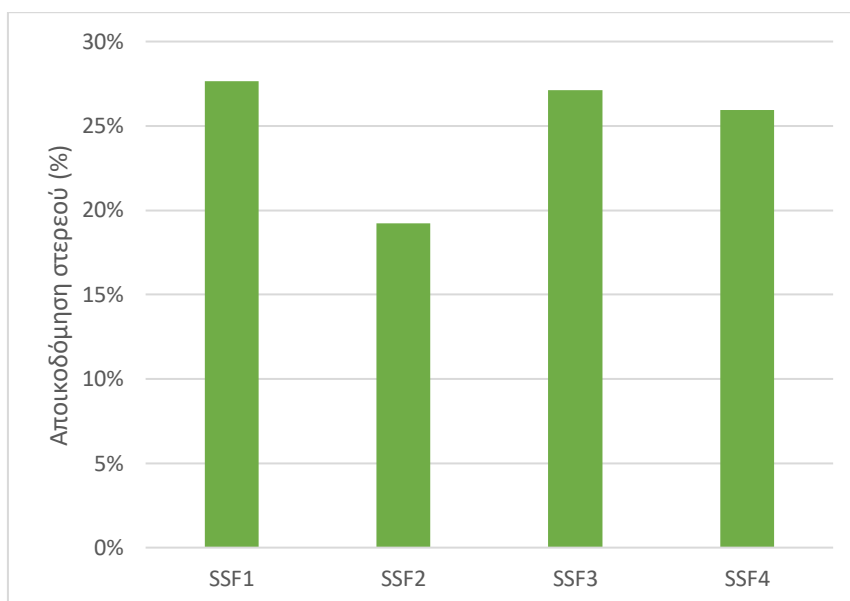
Σύμφωνα με την εξίσωση της απόδοσης αιθανόλης (**Εξίσωση 35**) παρουσιάζεται το ακόλουθο διάγραμμα.



**Διάγραμμα 17:** Απόδοση αιθανόλης στη 1 και στις 24 ώρες για τα πειράματα ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (στερεό φορτίο 10% w/w στους 35°C για 24 ώρες)

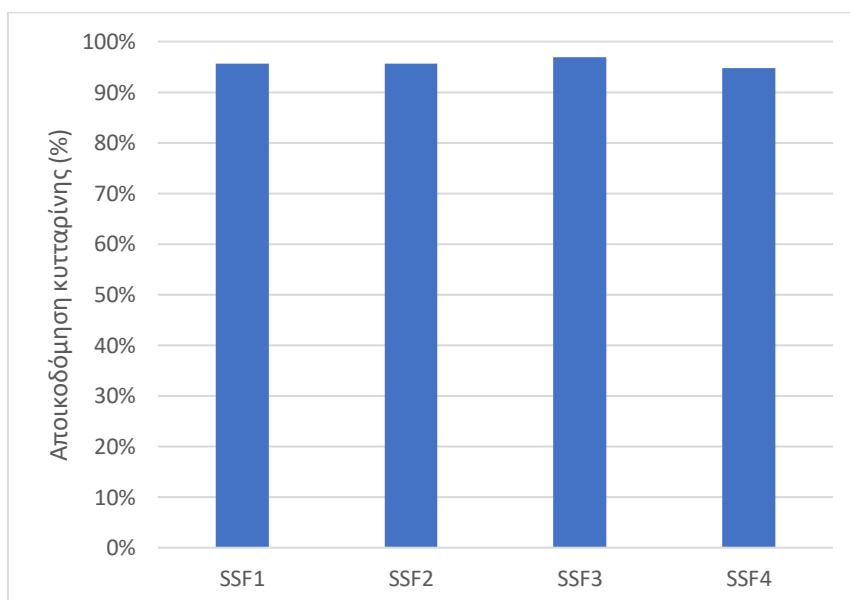
Τα πειράματα αυτά αποτελούν το κέντρο του παραγοντικού σχεδιασμού με μέση απόδοση αιθανόλης  $54,5 \pm 5,6\%$ .

Στα ακόλουθα διαγράμματα παρουσιάζονται τα ποσοστά αποικοδόμησης στερεού, κυτταρίνης, αμύλου, και μη διαλυτού σε οξύ υπολείμματος των πειραμάτων κέντρου του παραγοντικού σχεδιασμού.



**Διάγραμμα 18:** Αποικοδόμηση στερεού για τα πειράματα ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης

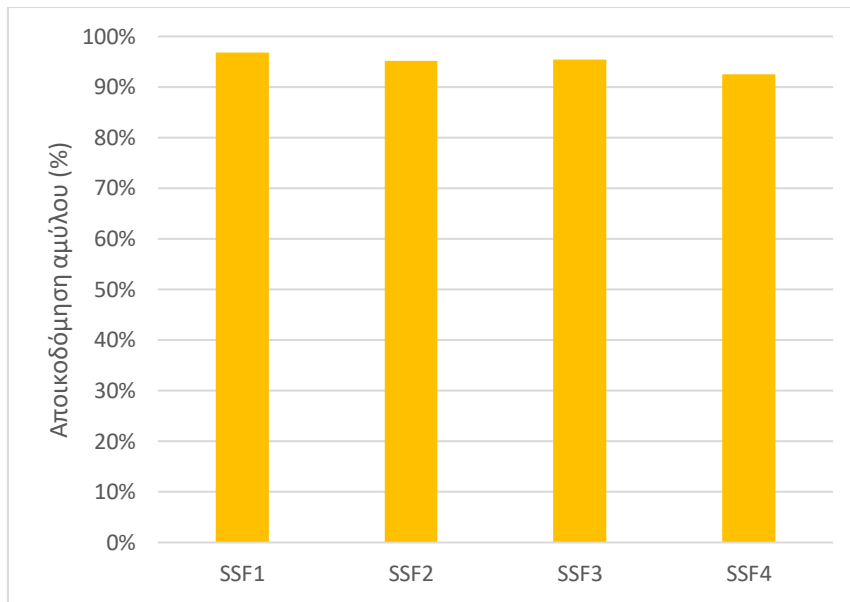
Από το παραπάνω Διάγραμμα 18 παρατηρείται η μέγιστη αποικοδόμηση στερεού στο πείραμα SSF1 όπου είναι ίση με 27,63%.



**Διάγραμμα 19:** Αποικοδόμηση κυτταρίνης για τα πειράματα ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης

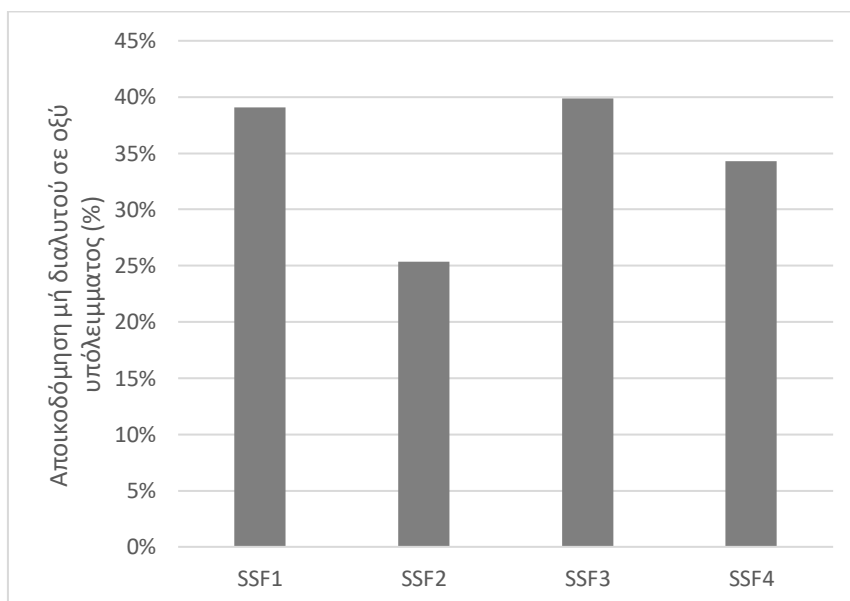
Στο παραπάνω Διάγραμμα 19 παρατηρείται η μέγιστη αποικοδόμηση κυτταρίνης στο πείραμα SSF3 όπου είναι ίση με 96,95%.





**Διάγραμμα 20:** Αποικοδόμηση αμύλου για τα πειράματα ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης

Από το Διάγραμμα 20 παρατηρείται η μέγιστη αποικοδόμηση αμύλου στο πείραμα SSF1 και είναι ίση με 96,76%.



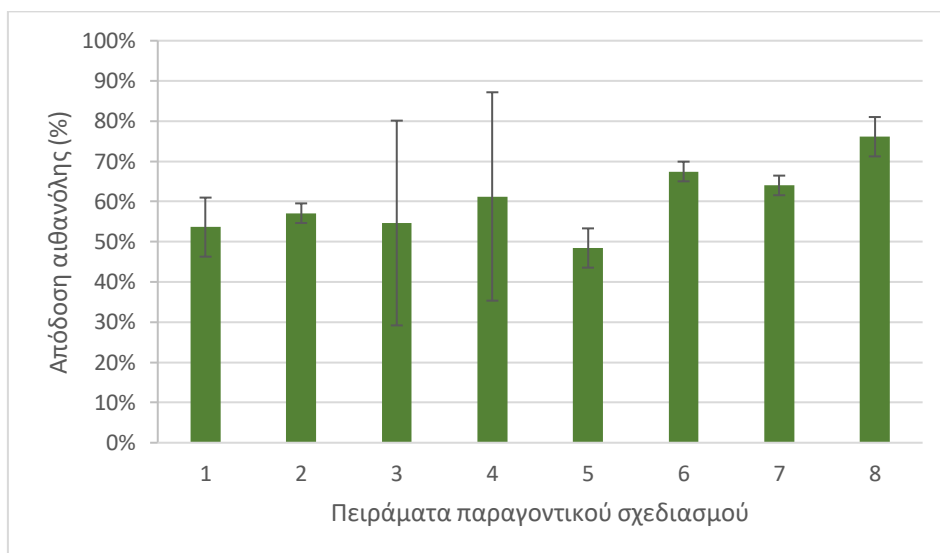
**Διάγραμμα 21:** Αποικοδόμηση μη διαλυτού σε οξύ υπολείμματος για τα πειράματα ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης

Όπως παρατηρείται από το Διάγραμμα 21 η αποικοδόμηση της μη διαλυτής σε οξύ λιγνίνης είναι της τάξης του 25 – 40 %. Η μέγιστη αποικοδόμηση που παρατηρήθηκε κατά τις τέσσερις δοκιμές για την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση ήταν στο 39,87%. Το γεγονός αυτό είναι πολύ ενθαρρυντικό καθώς σε συνδυασμό με τα προηγούμενα δεδομένα που προέκυψαν υποδηλώνει πως η μέθοδος της προεπεξεργασίας σε συνδυασμό με την διαδικασία της ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε ήταν αρκετά αποδοτική για την απομάκρυνση της λιγνίνης ώστε να επιτευχθεί ο τελικός στόχος που ήταν η παραγωγή της αλκοόλης.

Τα τέσσερα πειράματα ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενα κεφάλαια, αποτέλεσαν το κέντρο του παραγοντικού σχεδιασμού, ο οποίος

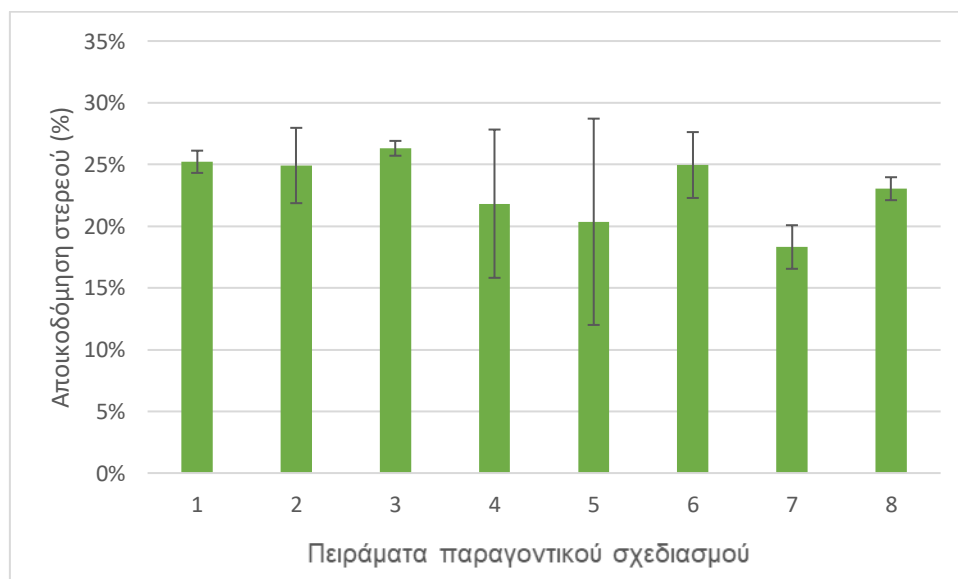
αποτελείται συνολικά από άλλα οχτώ πειράματα. Τα αντίστοιχα ποσοστά αποικοδόμησης στερεού, κυτταρίνης, αμύλου και μη διαλυτού σε οξύ υπολείμματος παρουσιάζονται παρακάτω.

Για τα πειράματα 1-8 του παραγοντικού σχεδιασμού υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες μέσες αποδόσεις αιθανόλης και παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.



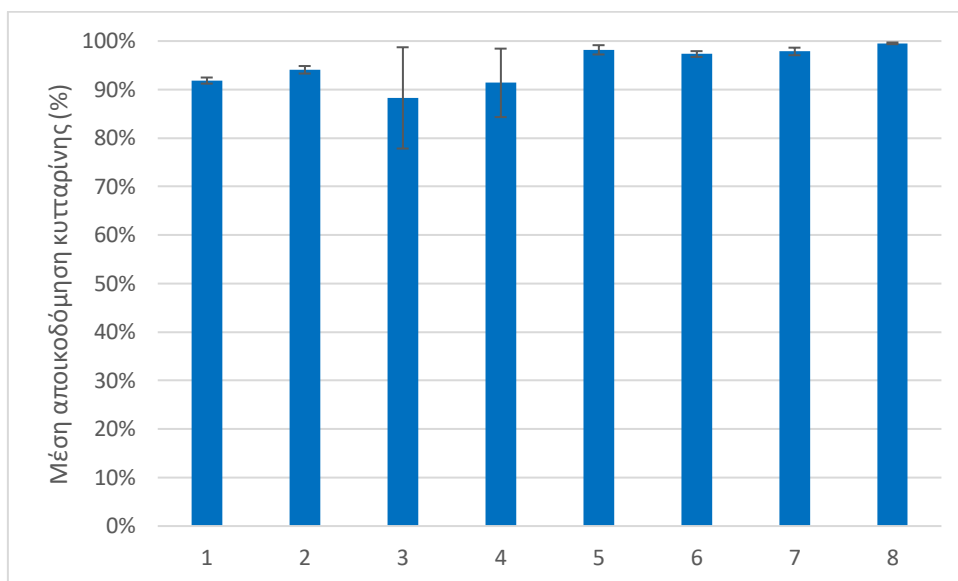
**Διάγραμμα 22:** Απόδοση αιθανόλης για τα πειράματα 1-8 του παραγοντικού σχεδιασμού

Η μέγιστη τιμή της απόδοσης αιθανόλης βρέθηκε ίση με  $76,1 \pm 4,9$  στο πείραμα 8, ποσοστό που αντιστοιχεί σε τιμή αιθανόλης 4,6 g/L. Στην πλειονότητα των πειραμάτων η απόδοση σε αιθανόλη ξεπερνάει το 50% καθιστώντας ικανοποιητικές και αποδοτικές τις συνθήκες του παραγοντικού σχεδιασμού που επιλέχθηκαν.



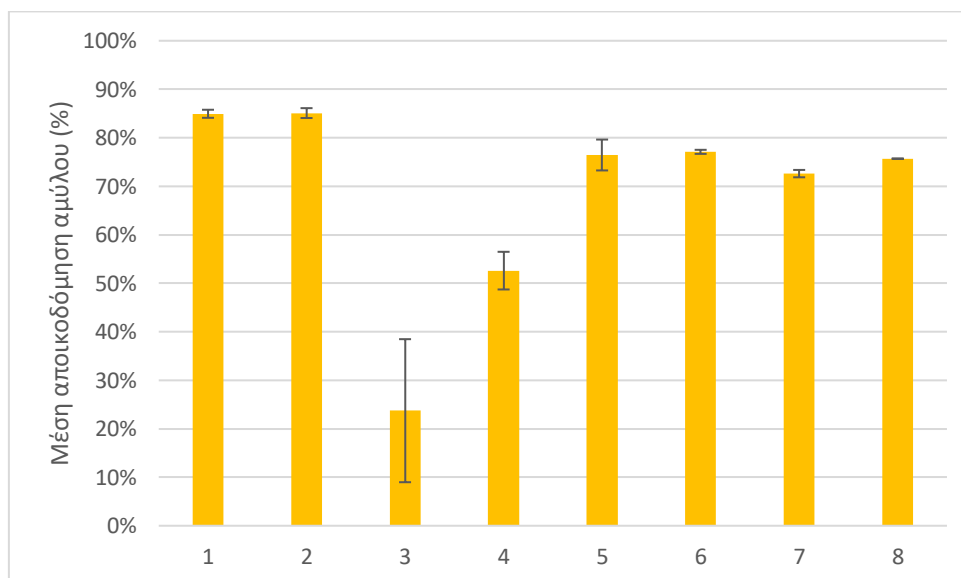
**Διάγραμμα 23:** Μέση αποικοδόμηση στερεού για τα πειράματα 1-8 του παραγοντικού σχεδιασμού

Από το παραπάνω Διάγραμμα 23 παρατηρείται η μέγιστη αποικοδόμηση στερεού στο πείραμα 3 όπου είναι ίση με 26,31%.



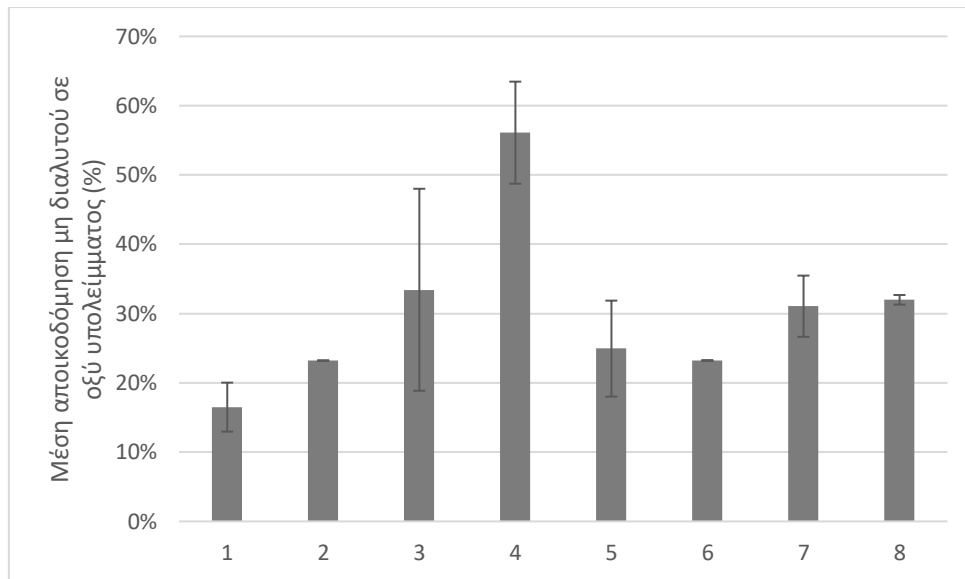
**Διάγραμμα 24:** Μέση αποικοδόμηση κυτταρίνης για τα πειράματα του παραγοντικού σχεδιασμού

Από το παραπάνω Διάγραμμα 24 παρατηρείται η μέγιστη αποικοδόμηση κυτταρίνης όπου επετεύχθηκε κατά το πείραμα 8 και είναι ίση με 99,53%. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα τα ποσοστά αποικοδόμησης της κυτταρίνης ήταν ικανοποιητικά καθώς το ποσοστό αποικοδόμησης ξεπέρασε το 90% σχεδόν σε όλα τα πειράματα.



**Διάγραμμα 25:** Μέση αποικοδόμηση αμύλου για τα πειράματα 1-8 του παραγοντικού σχεδιασμού

Από το παραπάνω Διάγραμμα 25 παρατηρείται η μέγιστη αποικοδόμηση αμύλου στο πείραμα 2 όπου είναι ίση με 85,09%.



**Διάγραμμα 26:** Μέση αποικοδόμηση μη διαλυτού σε οξύ υπολείμματος για τα πειράματα 1-8 του παραγοντικού σχεδιασμού

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 26 παρατηρείται η μέγιστη αποικοδόμηση μη διαλυτού σε οξύ υπολείμματος στο πείραμα 4 με ποσοστό 56,11%.

#### 8.4 Ανάλυση παραγοντικού μοντέλου και εξαγωγή συμπερασμάτων

Η παραγοντική ανάλυση που διεξήχθη για την απόδοση αιθανόλης επικεντρώθηκε στην αξιολόγηση της επίδρασης τριών παραγόντων: Συγκέντρωση NaOH (M), συγκέντρωση αμυλάσης και συγκέντρωση κυτταρινάσης. Το πείραμα χρησιμοποίησε έναν παραγοντικό σχεδιασμό δύο επιπέδων, με χαμηλό, υψηλό και κεντρικό επίπεδο για κάθε παράγοντα. Οι παράγοντες δοκιμάστηκαν σε συγκεντρώσεις 0,1 M και 0,3 M για το NaOH, 25 και 65 μονάδες για την αμυλάση και 250 και 750 μονάδες για την κυτταρινάση. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά οκτώ δοκιμές, με τέσσερις επαναλήψεις στο κεντρικό σημείο για την αξιολόγηση της ακρίβειας του πειράματος.

##### 8.4.1 Υπολογισμός μέσων τιμών και του στατιστικού σφάλματος

Προτού αρχίσει η διαδικασία εύρεσης του μοντέλου της πειραματικής διαδικασίας πρέπει πρώτα να εκτιμηθεί το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων καθώς επίσης και η ομοιογένεια των διακυμάνσεων των πειραματικών μετρήσεων. Για να υπολογιστεί το τυπικό σφάλμα ( $s$ ) πρέπει πρώτα να υπολογιστεί η διασπορά ( $s_y^2$ ) των πειραματικών μετρήσεων του κέντρου. Οι σχέσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της μέσης τιμής κάθε δοκιμής, της διασποράς κάθε δοκιμής και της ολικής διασποράς των αποτελεσμάτων είναι οι εξής:

$$\bar{Y}_{μέσο} = \frac{\sum_i^N Y_i}{N} \text{ όπου:}$$

$Y_i$ : απόδοση κάθε επανάληψης

$N$ : οι επαναλήψεις για κάθε δοκιμή

$$s_i^2 = \frac{\sum_1^n (Y_i - \bar{Y}_{μέσο})^2}{n-1}$$

Υμέσο : μέση τιμή κάθε δοκιμής

n: πλήθος επαναλήψεων

Πίνακας 26: Επεξεργασία αποτελεσμάτων για την εύρεση του σφάλματος για απόδοση.

N	Yi	Υμέσο (%)	si <sup>2</sup>	fi
Κέντρο	0.5189	0.5614	0.001754	3
	0.5535			
	0.5541			
	0.6192			

Στη συνέχεια πρέπει να εξεταστεί η ομοιογένεια των διασπορών μας καθώς αν δεν είναι ομοιογενείς υπάρχει κίνδυνος να οδηγηθούμε σε εσφαλμένα συμπεράσματα. Το κριτήριο που χρησιμοποιήθηκε είναι το **κριτήριο Cochran**.

Στο κριτήριο Cochran, υπολογίζεται το πηλίκο της μεγαλύτερης διασποράς με το άθροισμα όλων των διασπορών (Gexp). Στη περίπτωση που μελετάται ο λόγος αυτός είναι:

$$G = \frac{s_{max}^2}{\sum_i^N s_i^2}$$

Άρα: Gexp=0,48

Για να υπάρχει ομοιογένεια πρέπει η τιμή αυτή να είναι μικρότερη από την αντίστοιχη (Gtab) του πίνακα Cochran. Για το Gtab λαμβάνουμε υπόψη την τιμή Cochran, για N=8 (δοκιμές) και f=1 (βαθμοί ελευθερίας). Στον **Πίνακας 27** παρατίθενται τα αποτελέσματα του κριτηρίου. Όπως φυσικά μπορεί να δει κανείς, υπάρχει ομοιογένεια στις τιμές των διασπορών και συνεπώς η διαδικασία εύρεσης του μοντέλου μπορεί να συνεχιστεί.

Πίνακας 27: Έλεγχος ομοιογένειας διασπορών.

Κριτήριο Cochran	
Ομοιογένεια →	Gexp < Gtab
Gexp	0,48
Gtab	0,68
Ομοιογένεια	<b>ΝΑΙ</b>

#### 8.4.2 Υπολογισμός των συντελεστών των παραγόντων

Βασικός στόχος του παραγοντικού σχεδιασμού 2<sup>3</sup> είναι η προσέγγιση των συντελεστών του μοντέλου:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3$$

Όπου

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> : Παράγοντες σχεδιασμού

b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, b<sub>3</sub> : Οι αντίστοιχοι συντελεστές τους

$b_{12}, b_{13}, b_{23}, b_{123}$ : συντελεστές που αφορούν την αλληλεπίδραση των παραγόντων μεταξύ τους

Y: μέσος όρος της παραμέτρου αριστοποίησης για κάθε δοκιμή.

Στο σχεδιασμό της παρούσας εργασίας η παράμετρος αριστοποίησης είναι η απόδοση σε αιθανόλη κάθε δοκιμής. Με τη πραγματοποίηση των 16 πειραμάτων, δύο για κάθε δοκιμή, του  $2^3$  παραγοντικού πειράματος υπολογίζεται η μέση τιμή της παραμέτρου αριστοποίησης για κάθε δοκιμή, ώστε να υπολογιστούν στη συνέχεια οι αντίστοιχοι συντελεστές  $b_1, b_2, b_3$ , αλλά και οι συντελεστές  $b_{12}, b_{13}, b_{23}, b_{123}$ . Οι τελευταίοι συντελεστές είναι συντελεστές αλληλεπίδρασης των παραμέτρων, οι οποίοι υπολογίζονται, καθώς οι τιμές τους προσδιορίζουν το μέγεθος της ενδοδράσης.

Οι συντελεστές προκύπτουν από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$b_0 = \frac{(+Y_1(+Y_2(+Y_3(+Y_4(+Y_5(+Y_6(+Y_7(+Y_8$$

$$b_1 = \frac{(-)Y_1(-)Y_2(+Y_3(+Y_4(-)Y_5(-)Y_6(+Y_7(+Y_8$$

$$b_2 = \frac{(-)Y_1(+Y_2(-)Y_3(+Y_4(-)Y_5(+Y_6(-)Y_7(+Y_8$$

$$b_3 = \frac{(-)Y_1(-)Y_2(-)Y_3(-)Y_4(+Y_5(+Y_6(+Y_7(+Y_8$$

$$b_{12} = \frac{(+Y_1(-)Y_2(-)Y_3(+Y_4(+Y_5(-)Y_6(-)Y_7(+Y_8$$

$$b_{13} = \frac{(+Y_1(+Y_2(-)Y_3(-)Y_4(-)Y_5(-)Y_6(+Y_7(+Y_8$$

$$b_{23} = \frac{(+Y_1(-)Y_2(+Y_3(-)Y_4(-)Y_5(+Y_6(-)Y_7(+Y_8$$

$$b_{123} = \frac{(-)Y_1(+Y_2(+Y_3(-)Y_4(+Y_5(-)Y_6(-)Y_7(+Y_8$$

Στον Πίνακα 28 φαίνονται οι κωδικοποιημένες τιμές των παραμέτρων σύμφωνα με τις οποίες δημιουργήθηκαν οι εξισώσεις καθώς και οι τιμές Y (αποδόσεις) που χρειάστηκαν για τον υπολογισμό τους.

Πίνακας 28: Δεδομένα υπολογισμού συντελεστών b.

N	X0	X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3	Υμέσο	Y
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0.5363	Y1
2	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0.5709	Y2
3	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	0.5261	Y3
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.6058	Y4
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0.4843	Y5
6	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	0.6747	Y6
7	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	0.6400	Y7
8	1	1	1	1	1	1	1	1	0.7612	Y8

Στον **Πίνακα 29** καταγράφονται οι τιμές των συντελεστών  $b$  που προέκυψαν σύμφωνα με τις εξισώσεις και τα δεδομένα του Πίνακα 28.

**Πίνακας 29:** Συντελεστές  $b$  της εξίσωσης της παραμέτρου αριστοποίησης.

Σταθερές γραμμικού μοντέλου	
<b>b0</b>	0.5999
<b>b1</b>	0.0401
<b>b2</b>	0.0334
<b>b3</b>	0.0532
<b>b12</b>	0.0272
<b>b13</b>	0.0247
<b>b23</b>	-0.0030
<b>b123</b>	-0.0143

Το γραμμικό μοντέλο που προκύπτει από την εύρεση των συντελεστών του **Πίνακα 29** και αντικαθιστώντας τους στην εξίσωση είναι το εξής :

$$Y = 0,5999 + 0.0401 \cdot X_1 + 0.0334 \cdot X_2 + 0.0532 \cdot X_3$$

Με μετατροπή των παραμέτρων  $X_1$ ,  $X_2$  και  $X_3$  στη φυσική τους υπόσταση μέσω της εξίσωσης **Error! Reference source not found.** , προκύπτει :

$$X1 = \frac{E1 - 0,2}{0,1}$$

$$X2 = \frac{E2 - 45}{20}$$

$$X3 = \frac{E3 - 500}{250}$$

Όπου,

E1: Συγκέντρωση καυστικού νατρίου (M)

E2: Ποσότητα αμυλολυτικού ενζύμου ανά g αμύλου

E3: Ποσότητα κυτταρινολυτικού ενζύμου ανά g κυτταρίνης

Τελικά, με την αντικατάσταση των εξισώσεων  $X_1$ ,  $X_2$  και  $X_3$  στην παραπάνω εξίσωση προκύπτει η τελική εξίσωση:

$$Y = 0,33815 + 0,00401 \cdot E1 + 0,00167 \cdot E2 + 0,0002128 \cdot E3$$

$$0,1 < E1 < 0,3, 25 < E2 < 65, 250 < E3 < 750$$

Το μέγεθος των συντελεστών δείχνει πόση σημασία έχουν στο τελικό αποτέλεσμα της παραμέτρου αριστοποίησης, δηλαδή της απόδοσης. Το πρόσημο του δείχνει πως θα μεταβληθεί η απόδοση σε πιθανή αύξηση ή μείωση κάποιας ρυθμιστικής παραμέτρου. Πιο συγκεκριμένα, και οι 3 ρυθμιστικές παράμετροι στο συγκεκριμένο πείραμα έχουν ανάλογη σχέση με την απόδοση, με αποτέλεσμα όσο αυξάνονται να αυξάνει και η απόδοση.

### 8.4.3 Έλεγχος σημαντικότητας των συντελεστών

Μετά την εύρεση των συντελεστών των  $X_1, X_2, X_3, X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3$  και  $X_1X_2X_3$  ακολουθεί ο έλεγχος για το αν είναι σημαντικός καθένας από αυτούς τους συντελεστές. Η σημαντικότητα κάθε συντελεστή ελέγχεται χωριστά χρησιμοποιώντας το κριτήριο κατανομής student-t με τη παρακάτω μέθοδο.

Αρχικά, υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση η διασπορά των συντελεστών  $s_b^2$  :

$$s_b^2 = \frac{s_Y^2}{N}$$

όπου,

N: ο αριθμός των δοκιμών N=8

$s_b^2$  : διασπορά των πειραματικών μετρήσεων

Έπειτα υπολογίζεται από την εξίσωση το διάστημα  $\Delta b$  :

$$\Delta b = t * s_b$$

όπου,

t :η τιμή από το Πίνακα student-t για επίπεδο σημαντικότητας 99% και βαθμούς ελευθερίας 3 (όσους έχει η διασπορά  $s_Y^2$  )

Η τιμή του  $t_{99,3}$  βρίσκεται από τον Student-t και ισούται με:  $t_{99,3}=3,18$

Η τιμή του  $s_b^2$  υπολογίζεται από την εξίσωση και ισούται με:

$$s_b^2 = \frac{s_Y^2}{N} = \frac{0.001754}{8} = 0,000219$$

Συνεπώς, από την εξίσωση αυτή μπορεί να υπολογιστεί το διάστημα  $\Delta b$  και ισούται με:

$$\Delta b = t_{99,3} * s_b = 3,18 * \sqrt{0,000585} = 0,047$$

Για να είναι ένας συντελεστής σημαντικός πρέπει η απόλυτη τιμή του να είναι μεγαλύτερη από το  $\Delta b$ . Στον **Πίνακας 30** φαίνονται τα αποτελέσματα του ελέγχου.

**Πίνακας 30:** Η σημαντικότητα των συντελεστών των παραγόντων

Συντελεστές	$\Delta b$	Αποτέλεσμα
b0	0.5999	ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b1	0.0401	Συνθήκη
b2	0.0334	σημαντικότητας:
b3	0.0532	$ b_i  > 0,047$
b12	0.0272	ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b13	0.0247	ΟΧΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b23	-0.0030	ΟΧΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b123	-0.0143	ΟΧΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ



Όπως προκύπτει από τον **Πίνακα 30** μόνο οι συντελεστές  $b_0$  και  $b_3$  κρίνονται σημαντικοί. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να επηρεάσει την επάρκεια του γραμμικού μοντέλου που σχεδιάστηκε η οποία θα υπολογιστεί στη συνέχεια.

#### 8.4.4 Έλεγχος επάρκειας γραμμικού μοντέλου

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επάρκεια του γραμμικού μοντέλου που προσδιορίστηκε, αρχικά πρέπει να υπολογιστεί διασπορά της επάρκειας  $S_{ad}^2$ , σύμφωνα με την εξίσωση:

$$S_{ad}^2 = \frac{\sum_i^N (Y_i - Y_{\theta \epsilon \omega \rho})^2}{f}$$

Όπου:

$Y_i$ : Η μέση πειραματική τιμή για κάθε δοκιμή  $i$

$Y_{\theta \epsilon \omega \rho}$ : Η θεωρητική τιμή της  $i$  δοκιμής που υπολογίζεται από την εξίσωση

$f$ : βαθμοί ελευθερίας του συστήματος που υπολογίζεται από τη σχέση  $f=N-(k+1)$  όπου  $N$  ο αριθμός των δοκιμών και  $k$  ο αριθμός των παραγόντων. Συνεπώς  $f=4$ .

Στον **Πίνακα 31** παρουσιάζονται τα δεδομένα από τα οποία υπολογίστηκε το  $S_{ad}^2$  μέσω της παραπάνω εξίσωσης.

**Πίνακας 31:** Υπολογισμός της διασποράς της επάρκειας.

N	Υμέσο	Υθεωρητικό	(Υμέσο-Υθεωρητικό) <sup>2</sup>
1	0.5363	0.5467	0.0001
2	0.5709	0.6531	0.0068
3	0.5261	0.5467	0.0004
4	0.6058	0.6531	0.0022
5	0.4843	0.5467	0.0039
6	0.6747	0.6531	0.0005
7	0.6400	0.5467	0.0087
8	0.7612	0.6531	0.0117

Από την παραπάνω εξίσωση προκύπτει ότι:  $S_{ad}^2=0,01714$ .

Με  $n=2$ , το οποίο αφορά τον αριθμό των επαναλήψεων των δοκιμών.

Για τον έλεγχο της επάρκειας του γραμμικού μοντέλου εφαρμόζεται το κριτήριο του Fisher κατά το οποίο υπολογίζεται ο λόγος του Fisher σύμφωνα με την εξίσωση:

$$F = \frac{s_{ad}^2}{s_Y^2}$$

Άρα προκύπτει ότι  $F=0,83$

Η τιμή που θα προκύψει από την εξίσωση αυτή πρέπει να ακολουθεί τη κατανομή-F με επίπεδο σημαντικότητας 95%. Επισημαίνεται ότι το  $S_{ad}^2$  έχει τέσσερις βαθμούς ελευθερίας, ενώ για το  $s_Y^2$  οι βαθμοί ελευθερίας είναι έντεκα. Στον

**Πίνακας 32** απεικονίζονται τα αποτελέσματα του κριτηρίου Fisher.

**Πίνακας 32:** Αποτελέσματα ελέγχου επάρκειας του γραμμικού μοντέλου

Κριτήριο Fisher	
Επάρκεια γραμμικού μοντέλου → $F < F_{tab}$	
$S_{ad}^2$	0,01714
F	0,83
$F_{tab}(4,11)$	3,36
Επαρκές	<b>ΝΑΙ</b>

Επομένως, το γραμμικό μοντέλο κρίνεται επαρκές, αφού ισχύει η συνθήκη  $F < F_{tab}$ , και η τιμή του λόγου του Fisher, μικρότερη από την αντίστοιχη του πίνακα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα του παραγοντικού πειράματος που παρουσιάζονται στον Πίνακα 21, κατασκευάστηκε η εξής εξίσωση, σε κωδικοποιημένες και φυσικές τιμές, προκειμένου να υποδειχθεί η επίδραση των επιλεγμένων συνθηκών λειτουργίας (παραγόντων) στη μέγιστη απόδοση αιθανόλης.

$$Y_{etOH} = 0,5999 + 0,0532 * X3 \text{ ή}$$

$$Y_{etOH} = 0,33815 + 0,0002128 * E3$$

όπου  $Y_{etOH}$  η απόδοση της αιθανόλης

Τα αποτελέσματα του παραγοντικού σχεδιασμού δείχνουν ότι ένας παράγοντας επηρεάζει σημαντικά την απόδοση αιθανόλης, με διακυμάνσεις στην απόδοσή της που κυμαίνονται από 32,56% έως 79,58%. Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι η μέση απόδοση αιθανόλης και η τυπική απόκλιση της υπολογίστηκαν για κάθε δοκιμή, παρέχοντας εικόνα της μεταβλητότητας των αποτελεσμάτων. Η ανάλυση έδειξε ότι ο συνδυασμός υψηλών επιπέδων NaOH και αμυλάσης, μαζί με το υψηλό επίπεδο κυτταρινάσης, παρήγαγε την υψηλότερη απόδοση αιθανόλης. Επιπλέον, οι υπολογιζόμενες σταθερές του γραμμικού μοντέλου ( $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$ ) και οι όροι αλληλεπίδρασης ( $b_{12}$ ,  $b_{13}$ ,  $b_{23}$ ,  $b_{123}$ ) χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη της απόδοσης αιθανόλης, η οποία ταυτίστηκε στενά με τις παρατηρούμενες τιμές.

Για την επικύρωση του μοντέλου, διενεργήθηκε μια σειρά στατιστικών δοκιμών. Το κριτήριο Cochran επιβεβαίωσε την ομοιογένεια της διακύμανσης, ενώ το τεστ Fisher (F-test) επαλήθευσε την επάρκεια του μοντέλου. Η σημαντικότητα του μοντέλου υποστηρίχθηκε περαιτέρω από το t-test του Student, το οποίο προσδιόρισε τους παράγοντες με τη μεγαλύτερη επίδραση στην απόδοση αιθανόλης. Συνολικά, η παραγοντική ανάλυση παρέχει ένα στιβαρό πλαίσιο για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών παραγωγής αιθανόλης, αναδεικνύοντας τη σημασία της συγκέντρωσης NaOH και των δόσεων ενζύμων στην ενίσχυση της αποδοτικότητας της απόδοσης. Τα ευρήματα αυτά μπορούν να καθοδηγήσουν μελλοντικές βελτιστοποιήσεις διεργασιών στην παραγωγή βιοαιθανόλης από άλγη.

Τα ευρήματα της παραγοντικής ανάλυσης υπογράμμισαν ότι μεταξύ των παραγόντων που εξετάστηκαν, οι σταθερές  $b_0$  δηλαδή του μηδενικού πειράματος και  $b_3$  (συγκέντρωση κυτταρινάσης) είχαν θετικό αντίκτυπο στην απόδοση αιθανόλης. Ο παράγοντας  $b_0$  αντιπροσωπεύει τη μέση απόδοση αιθανόλης όταν όλοι οι παράγοντες βρίσκονται στα βασικά τους επίπεδα και παρουσίασε σημαντική συμβολή στη συνολική απόδοση, υποδεικνύοντας ένα ισχυρό εγγενές δυναμικό για την παραγωγή αιθανόλης στις

συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Αυτή η θετική απόδοση βάσης θέτει μια ισχυρή βάση για την ανάλυση, υποδηλώνοντας ότι ακόμη και σε ελάχιστα επίπεδα παραγόντων, το σύστημα είναι ικανό να παράγει αποτελεσματικά αιθανόλη.

Επιπλέον, ο παράγοντας b3, ο οποίος αντιστοιχεί στη συγκέντρωση κυτταρινάσης, επέδειξε σημαντική θετική επίδραση στην απόδοση αιθανόλης. Το εύρημα αυτό είναι ζωτικής σημασίας, καθώς υπογραμμίζει τη σημασία της κυτταρινάσης στη διάσπαση της κυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα, ενισχύοντας έτσι τη διαδικασία παραγωγής αιθανόλης. Ο θετικός συντελεστής για το b3 υποδεικνύει ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της κυτταρινάσης οδηγεί σταθερά σε υψηλότερες αποδόσεις αιθανόλης. Η σχέση αυτή υποδηλώνει ότι η βελτιστοποίηση των επιπέδων κυτταρινάσης αποτελεί βασική στρατηγική για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής αιθανόλης σε εφαρμογές βιοεπεξεργασίας.

Αντίθετα, οι άλλοι παράγοντες και οι όροι αλληλεπίδρασης δεν εμφάνισαν σημαντική θετική επίδραση, ενώ ορισμένοι από αυτούς υποδεικνύουν ακόμη και αμελητέες ή αρνητικές επιδράσεις. Αυτή η διαφοροποίηση αναδεικνύει τον κρίσιμο ρόλο της συγκέντρωσης κυτταρινάσης έναντι άλλων μεταβλητών στην πειραματική διάταξη. Τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι ενώ η ρύθμιση των συγκεντρώσεων NaOH και αμυλάσης είναι απαραίτητη, η πρωταρχική εστίαση για τη βελτίωση της απόδοσης πρέπει να είναι η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης της κυτταρινάσης.

## Κεφάλαιο 9: Συμπεράσματα και μελλοντική έρευνα

### 9.1 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την συνολική μελέτη των αποτελεσμάτων των υποκεφαλαίων 8.2 και 8.3. Αναλύονται επομένως τα βασικά συμπεράσματα που αφορούν τη χρήση τροφοδοσίας αλγών ως υπόστρωμα με σκοπό τη διερεύνηση της δυνατότητας παραγωγής βιοαιθανόλης.

Μέσω του φυσικοχημικού χαρακτηρισμού της πρώτης ύλης προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα σε κυτταρίνη ( $9,21 \pm 0,56\%$ ), σε άμυλο ( $1,78 \pm 0,16\%$ ), σε ημικυτταρίνη ( $14,27 \pm 0,43\%$ ), και σε ελεύθερη γλυκόζη ( $0,08 \pm 0,01\%$ ). Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες επομένως βρίσκεται σε χαμηλότερα ποσοστά σε σύγκριση με άλλες αμυλούχες πρώτες ύλες στις οποίες τα απλά σάκχαρα ζυμώνονται σε μεγαλύτερο βαθμό, επιφέροντας αυξημένη παραγωγή αιθανόλης. Ωστόσο μέσω κατάλληλης επεξεργασίας στην οποία οποίες υποβλήθηκε η τροφοδοσία παρουσιάζεται η αποδοτικότητα της παραγωγής βιοαιθανόλης από βιομάζα αλγών.

#### Μέθοδοι προεπεξεργασίας

Από τις τρεις μεθόδους προεπεξεργασίας που μελετήθηκαν (υδροθερμική με τη χρήση του αυτόκλειστου στους  $121^{\circ}\text{C}$  για 30 λεπτά, υδατόλουτρο στους  $90^{\circ}\text{C}$  για 75 λεπτά και υπέρηχοι στα 150W για 10 λεπτά), η συγκέντρωση της γλυκόζης καθώς και η απόδοση σακχαροποίησης μεγιστοποιήθηκαν για την προεπεξεργασία σε υδατόλουτρο χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το NaOH. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το ποσοστό σακχαροποίησης ανήλθε σε ( $85,73 \pm 1,03\%$ ) με αμέσως μικρότερη απόδοση ίση με ( $79,16 \pm 3,03\%$ ) μέσω της υδροθερμικής προεπεξεργασίας με διαλύτη το NaOH. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την απαραίτητη εφαρμογή προεπεξεργασίας για την περαιτέρω χρήση της βιομάζας για παραγωγή βιοαιθανόλης. Όμως ταυτόχρονα οι υψηλές αποδόσεις στην διεργασία της σακχαροποίησης υποδηλώνουν και την καταλληλότητα του υποστρώματος για την επακόλουθη διεργασία.

#### Αποικοδόμηση στερεού και πολυσακχαριτών

Τα ποσοστά αποικοδόμησης του στερεού όταν εφαρμόστηκε προεπεξεργασία με αυτόκλειστο και διαλύτη NaOH και υδατόλουτρο και διαλύτη  $\text{H}_2\text{SO}_4$  αντίστοιχα είναι οι μεγαλύτερες που παρατηρήθηκαν με ποσοστά 38,17% και 36,73%, γεγονός που υποδεικνύει την αποτελεσματικότητα των διαλυτών αυτών στη διάσπαση των υδατανθράκων. Η κυτταρίνη παρουσιάζει πολύ υψηλά ποσοστά αποικοδόμησης (ποσοστά πάνω από 60% με μέγιστο το 92,72% στη περίπτωση της προεπεξεργασίας με υδατόλουτρο με διαλύτη το NaOH). Υπάρχει επομένως ευνοϊκή μετατροπή της σε απλά σάκχαρα τα οποία με τη ζύμωσή τους θα παράξουν βιοαιθανόλη.

Όσον αφορά το άμυλο, παρουσιάζονται πιο ικανοποιητικά ποσοστά αποικοδόμησης που ξεπερνούν το 80% (με μέγιστο 96,35% με διαλύτη NaOH σε αυτόκλειστο) γεγονός που επίσης κρίνεται σημαντικό για την μετέπειτα παραγωγή βιοαιθανόλης). Η αποικοδόμηση της λιγνίνης (36,73% με  $\text{H}_2\text{SO}_4$  σε υδατόλουτρο) δείχνει ότι η προεπεξεργασία με  $\text{H}_2\text{SO}_4$  είναι αποτελεσματική στη διάσπαση λιγνίνης, κάτι που είναι κρίσιμο για τη βελτίωση της απόδοσης στη βιοαιθανόλη.

#### Παραγοντικός Σχεδιασμός

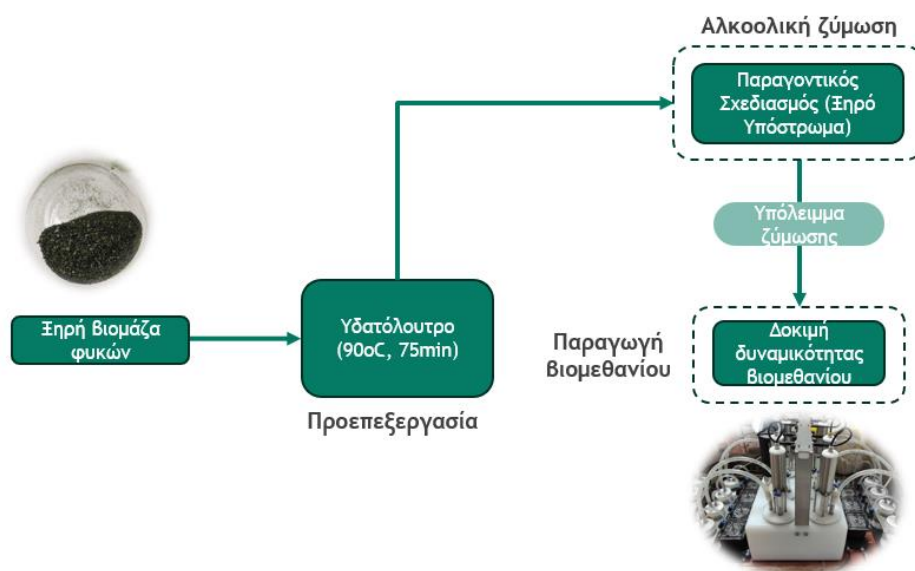
Η μαθηματική ανάλυση του παραγοντικού σχεδιασμού έδειξε ότι ο συνδυασμός υψηλών επιπέδων NaOH και αμυλάσης, μαζί με το υψηλό επίπεδο κυτταρινάσης, παρήγαγε την υψηλότερη απόδοση αιθανόλης. Βρέθηκε ακόμα πως οι σταθερές b0 (μέση απόδοση

αιθανόλης όταν όλοι οι παράγοντες βρίσκονται στα βασικά τους επίπεδα) του μηδενικού πειράματος και b3 (συγκέντρωση κυτταρινάσης) είχαν θετικό αντίκτυπο στην απόδοση αιθανόλης. Ο θετικός συντελεστής για το b0 δείχνει ότι ακόμη και σε ελάχιστα επίπεδα παραγόντων, το σύστημα είναι ικανό να παράγει αποτελεσματικά αιθανόλη ενώ για το b3 υποδεικνύει ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της κυτταρινάσης οδηγεί σταθερά σε υψηλότερες αποδόσεις αιθανόλης,

Σνοψίζοντας, η βιομάζα αλγών αποτελεί βιώσιμη και αρκετά φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική για παραγωγή βιοαιθανόλης, με πολλαπλά περιβαλλοντικά οφέλη. Το γεγονός ακόμα πως τα άλγη αναπτύσσονται ταχύτατα σε μη καλλιεργήσιμα εδάφη, καθιστώντας τα μια ανανεώσιμη πηγή πρώτης ύλης, αποτελεί έναν ενθαρρυντικό παράγοντα για την διερεύνηση της δυνατότητάς τους να οδηγήσουν στη παραγωγή βιοκαυσίμων. Συμπερασματικά αποτελούν πηγή που δύναται να παράξει βιοκαύσιμα μέσω κατάλληλων περοεπεξεργασιών και η περαιτέρω διερεύνηση των δυνατοτήτων της αποτελεί μία ενδιαφέρουσα προσέγγιση στη παραγωγή βιοαιθανόλης.

## 9.2 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

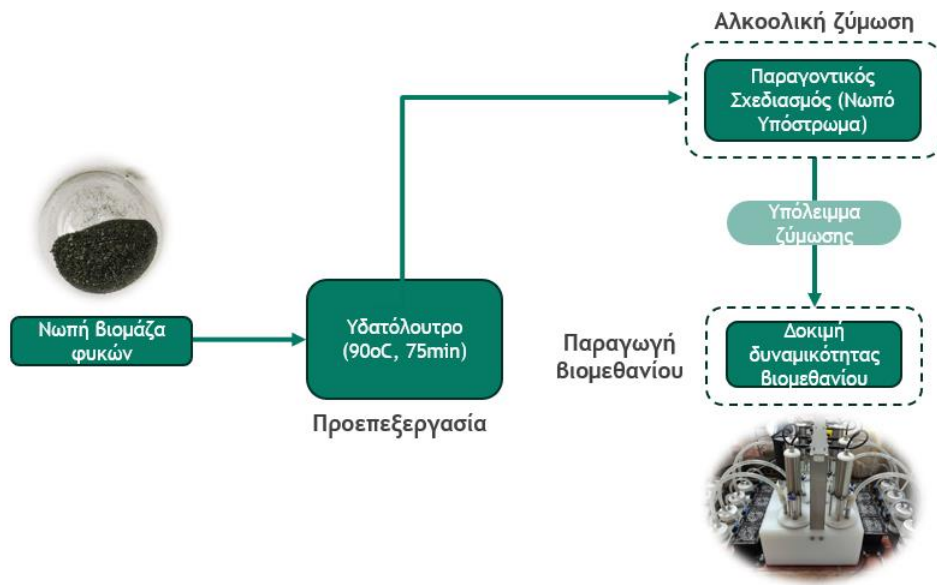
Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η αποικοδόμηση και η ζύμωση ξηρού υποστρώματος βιομάζας αλγών με σκοπό τη παραγωγή βιοαιθανόλης. Μια πιθανή κατεύθυνση για μελλοντική έρευνα είναι η αξιοποίηση του υπολείμματος του υποστρώματος από τη διεργασία της ζύμωσης προς την παραγωγή βιοαερίου. Οι δοκιμές δυναμικού βιομεθανίου (BMP - Biochemical Methane Potential) θα επιτρέψουν την αξιολόγηση της δυνητικής παραγωγής μεθανίου από τα υπολείμματα, βοηθώντας στην εκτίμηση της συνολικής ενεργειακής απόδοσης της διεργασίας και στην ανάπτυξη βέλτιστων συνθηκών για την αναερόβια χώνευση. Η ολοκληρωμένη αξιοποίηση του υποστρώματος θα μπορούσε να αυξήσει τη συνολική ενεργειακή αποδοτικότητα της διεργασίας και να μειώσει τα απόβλητα, συμβάλλοντας στην αειφορία.



Σχήμα 7: Παραγωγή βιομεθανίου από ξηρό υπόστρωμα βιομάζας αλγών

Μία ακόμα ενδιαφέρουσα κατεύθυνση για μελλοντική έρευνα αφορά τη χρήση νωπού υποστρώματος αλγών για τη παραγωγή βιοαιθανόλης. Η χρήση νωπού υποστρώματος μπορεί να αποδειχθεί επιθυμητή ενεργειακά καθώς δεν απαιτείται ενέργεια για τη ξήρανση των αλγών και για τη διατήρηση των υδατοδιαλυτών θρεπτικών συστατικών, που

ενδεχομένως βελτιώσουν την απόδοση της προεπεξεργασίας και της ζύμωσης. Η μέτρηση του δυναμικού βιοχημικού μεθανίου (BMP) των υπολειμμάτων από τη ζύμωση του νωπού υποστρώματος θα παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την αξιολόγηση της αποδοτικότητας της αναερόβιας χώνευσης και την παραγωγή βιοαερίου, συμβάλλοντας σε μια ολοκληρωμένη και βιώσιμη αξιοποίηση των αλγών για ανανεώσιμη ενέργεια.



**Σχήμα 8:** Παραγωγή βιομεθανίου από νωπό υπόστρωμα βιομάζας αλγών

## Βιβλιογραφία

- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., & Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 66). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
- Alam, F., Date, A., Rasjidin, R., Mobin, S., Moria, H., & Baqui, A. (2012). Biofuel from algae-Is it a viable alternative? *Procedia Engineering*, 49. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.10.131>
- 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). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Awogbemi, O., Von Kallon, D. V., Onuh, E. I., & Aigbodion, V. S. (2021). An overview of the classification, production and utilization of biofuels for internal combustion engine applications. *Energies*, 14(18). <https://doi.org/10.3390/en14185687>
- Bibi, R., Ahmad, Z., Imran, M., Hussain, S., Ditta, A., Mahmood, S., & Khalid, A. (2017). Algal bioethanol production technology: A trend towards sustainable development. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 71). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.126>
- Biswal, T., Shadangi, K. P., & Sarangi, P. K. (2024). Technologies of microalgae biomass cultivation for bio-fuel production: Challenges and benefits. In *Biorefineries: Production of Fuels and Platform Chemicals*. <https://doi.org/10.1002/9781119724872.ch7>
- Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J. P., & Welton, T. (2013). Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. In *Green Chemistry* (Vol. 15, Issue 3). <https://doi.org/10.1039/c2gc36364j>
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 14, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Chaumont, D. (1993). Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5(6). <https://doi.org/10.1007/BF02184638>
- Chen, G. Q., & Chen, F. (2006). Growing phototrophic cells without light. *Biotechnology Letters*, 28(9). <https://doi.org/10.1007/s10529-006-0025-4>
- Chen, P., Min, M., Chen, Y., Wang, L., Li, Y., Chen, Q., Wang, C., Wan, Y., Wang, X., Cheng, Y., Deng, S., Hennessy, K., Lin, X., Liu, Y., Wang, Y., Martinez, B., & Ruan, R. (2009). Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. In *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* (Vol. 2, Issue 4). <https://doi.org/10.3965/j.issn.1934-6344.2009.04.001-030>
- Chisti, Y. (1998). Handbook on bioethanol: Production and utilization. *Biotechnology Advances*, 16(2). [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(97\)00065-7](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(97)00065-7)
- Demirbas, M. F., Balat, M., & Balat, H. (2009). Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. *Energy Conversion and Management*, 50(7). <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2009.03.013>

- Deprá, M. C., Mérida, L. G. R., de Menezes, C. R., Zepka, L. Q., & Jacob-Lopes, E. (2019). A new hybrid photobioreactor design for microalgae culture. *Chemical Engineering Research and Design*, 144. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.01.023>
- Deshmukh, S., Kumar, R., & Bala, K. (2019). Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. In *Fuel Processing Technology* (Vol. 191). <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.03.013>
- Dinesh Kumar, M., Kaliappan, S., Gopikumar, S., Zhen, G., & Rajesh Banu, J. (2019). Synergetic pretreatment of algal biomass through H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced microwave in acidic condition for biohydrogen production. *Fuel*, 253. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.05.066>
- Escobar, J. C., Lora, E. S., Venturini, O. J., Yáñez, E. E., Castillo, E. F., & Almazan, O. (2009). Biofuels: Environment, technology and food security. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 13, Issues 6–7). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.08.014>
- Goyal, H. B., Seal, D., & Saxena, R. C. (2008). Bio-fuels from thermochemical conversion of renewable resources: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 12, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2006.07.014>
- Hettenhaus, J. (1998). Ethanol fermentation strains: present and future requirements for biomass to ethanol commercialization. *Report*.
- Ho, D. P., Ngo, H. H., & Guo, W. (2014). A mini review on renewable sources for biofuel. In *Bioresource Technology* (Vol. 169). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.022>
- Huang, H., & Jin, Q. (2020). Industrial waste valorization: Applications to the case of liquid biofuels. In *Green Energy to Sustainability: Strategies for Global Industries*. <https://doi.org/10.1002/9781119152057.ch21>
- John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2011). Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, 102(1). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.139>
- Karmakar, R., Rajor, A., Kundu, K., & Kumar, N. (2018). Production of biodiesel from unused algal biomass in Punjab, India. *Petroleum Science*, 15(1). <https://doi.org/10.1007/s12182-017-0203-0>
- Kiran, B., Kumar, R., & Deshmukh, D. (2014). Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. *Energy Conversion and Management*, 88. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.06.022>
- Kusmiyati, K., Hadiyanto, H., & Fudholi, A. (2023). Treatment updates of microalgae biomass for bioethanol production: A comparative study. In *Journal of Cleaner Production* (Vol. 383). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135236>
- Lee, S. H., Teramoto, Y., & Endo, T. (2009). Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process I - Effect of additives with cellulose affinity. *Bioresource Technology*, 100(1). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.051>
- Li, Y. R., Tsai, W. T., Hsu, Y. C., Xie, M. Z., & Chen, J. J. (2014). Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production. *Energy Procedia*, 52. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.07.088>



- Lorente, E., Farriol, X., & Salvadó, J. (2015). Steam explosion as a fractionation step in biofuel production from microalgae. *Fuel Processing Technology*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2014.11.009>
- Lü, J., Sheahan, C., & Fu, P. (2011). Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. In *Energy and Environmental Science* (Vol. 4, Issue 7). <https://doi.org/10.1039/c0ee00593b>
- Luque, R., Herrero-Davila, L., Campelo, J. M., Clark, J. H., Hidalgo, J. M., Luna, D., Marinas, J. M., & Romero, A. A. (2008). Biofuels: A technological perspective. In *Energy and Environmental Science* (Vol. 1, Issue 5). <https://doi.org/10.1039/b807094f>
- Mata-Alvarez, J., Macé, S., & Llabrés, P. (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*, 74(1). [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00023-7)
- McKendry, P. (2002a). Energy production from biomass (part 2): Conversion technologies. *Bioresource Technology*, 83(1). [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00119-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00119-5)
- McKendry, P. (2002b). Energy production from biomass (part 3): Gasification technologies. *Bioresource Technology*, 83(1). [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00120-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00120-1)
- McMillan, J. D. (1994). *Conversion of Hemicellulose Hydrolyzates to Ethanol*. <https://doi.org/10.1021/bk-1994-0566.ch021>
- Neto, J. M., Komesu, A., Martins, L. H. da S., Gonçalves, V. O. O., Oliveira, J. A. R. de, & Rai, M. (2019). Third generation biofuels: An overview. In *Sustainable Bioenergy: Advances and Impacts*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817654-2.00010-1>
- Noreña-Caro, D., & Benton, M. G. (2018). Cyanobacteria as photoautotrophic biofactories of high-value chemicals. In *Journal of CO2 Utilization* (Vol. 28). <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.10.008>
- Onumaegbu, C., Mooney, J., Alaswad, A., & Olabi, A. G. (2018). Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 93). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.015>
- Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Wilkinson, L., & Betenbaugh, M. J. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 19, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.07.008>
- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. de S., Medeiros, A. B. P., Karp, S. G., Buckeridge, M., Ramos, L. P., Pitarelo, A. P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L. M. F., Ferrara, M. A., Silva Bon, E. P. da, Moraes, L. M. P. de, Araújo, J. de A., & Torres, F. A. G. (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*, 101(13). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.067>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2). <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Tsukahara, K., & Sawayama, S. (2005). Liquid fuel production using microalgae. In *Journal of the Japan Petroleum Institute* (Vol. 48, Issue 5). <https://doi.org/10.1627/jpi.48.251>

- Ueno, Y., Kurano, N., & Miyachi, S. (1998). Ethanol production by dark fermentation in the marine green alga, *Chlorococcum littorale*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(1). [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80031-7](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80031-7)
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. In *Bioresource Technology* (Vol. 99, Issue 10). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., & Patil, S. (2014). Bioethanol production: Feedstock and current technologies. In *Journal of Environmental Chemical Engineering* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.013>
- Wang, X., Zhang, Y., Xia, C., Alqahtani, A., Sharma, A., & Pugazhendhi, A. (2023). A review on optimistic biorefinery products: Biofuel and bioproducts from algae biomass. *Fuel*, 338. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.127378>