



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

*ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ*

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας



**Μελέτη της διεργασίας
παραγωγής βιοαιθανόλης
από διατροφικά
απορρίμματα**

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

Επιβλέπων : Δημήτριος Κέκος
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Ιούλιος 2014

Στους γονείς μου,
Νίκο και Παναγιώτα

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ε.Μ.Π. Δημήτριου Κέκου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο της διπλωματικής μου εργασίας, Καθηγητή του Ε.Μ.Π., Δημήτριο Κέκο για την ανάθεση του θέματος και την υπεύθυνη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, Δρ. Διομή Μαμμά για την επιστημονική υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές της, καθ' όλη την διάρκεια πραγματοποίησής του.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στην υποψήφια διδάκτορα Δανάη Αλαμάνου, η οποία έδειξε μεγάλη υπομονή και επιμονή καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, μεταλαμπαδεύοντάς μου τις γνώσεις και τις εμπειρίες της.

Φυσικά θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που μου προσέφεραν.

Τέλος, θα ήθελα να δώσω τις βαθύτερες ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου, για την στήριξή της, όχι μόνο κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας αλλά καθ' όλη την διάρκεια του κύκλου σπουδών μου.

Παπαδοπούλου Γεωργία
Αθήνα, Ιούλιος 2014

Περίληψη

Η παραγωγή βιοκαυσίμων, και συγκεκριμένα βιοαιθανόλης, από βιομάζα αποτελεί το κέντρο επιστημονικού και βιομηχανικού ενδιαφέροντος τα τελευταία χρόνια. Συγκεκριμένα για να αποκτήσει βιώσιμο χαρακτήρα η παραγωγή 2^{ης} γενιάς βιοαιθανόλης, η προσπάθεια έχει επικεντρωθεί στην μείωση του κόστους των πρώτων υλών. Η διαχείριση των διατροφικών απορριμμάτων είναι ένα σημαντικό ζήτημα τόσο για την προστασία του περιβάλλοντος, όσο και για τη διατήρηση των πόρων. Η μετατροπή των υπολειμμάτων των τροφών σε αιθανόλη θα μπορούσε να προσφέρει περαιτέρω οικονομικά πλεονεκτήματα, λόγω της αύξησης του κόστους διάθεσης των απορριμμάτων. Το γεγονός ότι τα διατροφικά απορρίμματα είναι πλούσια σε ζυμώσιμα σάκχαρα, τα καθιστά κατάλληλη πρώτη ύλη για παραγωγή βιοαιθανόλης, ενός εναλλακτικού και ανανεώσιμου καυσίμου κίνησης.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της διεργασίας παραγωγής βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα και η βελτιστοποίηση των συνθηκών παραγωγής της.

Αρχικά, η πρώτη ύλη προκατεργάζεται υδροθερμικά σε θερμοκρασία 100° C για 1 hour παρουσία και μη H₂SO₄ σε περιεκτικότητα 1g/100g στερεού, με συγκέντρωση στερεού 30 % β/ο . Το ποσοστό του αμύλου που αποικοδομείται είναι 47,13% μετά από υδροθερμική προκατεργασία παρουσία H₂SO₄, 1g/100g ξ.σ. και 45,72% μετά από υδροθερμική προκατεργασία απουσία οξέος. Ακολουθεί ενζυμική υδρόλυση του προκατεργασμένου υλικού με χρήση αμυλολυτικών (Liquozyme SC DS και Spirizyme Fuel) με ενεργότητες 0,053U/g αμύλου για την α-αμυλάση και 5.06, 10.2, 20.24 U/g αμύλου για την γλυκοαμυλάση και κυτταρινολυτικών (Celluclast 1,5L/Novozyme 188 (5:1) και Cellic® CTec2) εμπορικά διαθέσιμων ενζυμικών σκευασμάτων με ενεργότητες 1,3,5,7,9 FPU/g υλικού. Η υδρόλυση του αμύλου κυμαίνεται μεταξύ 72,30 και 86,32%. Το θεωρητικό ποσοστό υδρόλυσης της κυτταρίνης με βάση την παραχθείσα γλυκόζη κατά την υδρόλυση με μίγμα

Celluclast 1,5L/Novozyme 188 (5:1) κυμαίνεται μεταξύ 75,28% και 97,63%, ενώ όσον αφορά στην υδρόλυση με χρήση του σκευάσματος Cellic® CTec2 το αντίστοιχο ποσοστό είναι 25,70% έως 64,22%. Τέλος, πραγματοποιείται μελέτη της συμπεριφοράς των αμυλολυτικών και κυτταρινολυτικών ενζυμικών σκευασμάτων καθώς και της συνεργιστικής τους δράσης κατά την παραγωγή αιθανόλης με εφαρμογή της τεχνολογίας ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF). Οι ενζυμικές ενεργότητες που εφαρμόζονται στο στάδιο των ζυμώσεων είναι αυτές που παρουσιάζουν τα βέλτιστα αποτελέσματα κατά την υδρόλυση του υλικού. Η παραγωγικότητα της διεργασίας κυμάνθηκε από 0,08-0,26 g/L*h. Το εύρος τιμών παραγωγής αιθανόλης κατά την ζύμωση είναι 7,22±0,84 – 18,70±0,13g/L, ενώ τα ποσοστά % των μέγιστων θεωρητικών αποδόσεων είναι 68,87±1,09 και 288,30±4,43 βάσει της μέγιστης παραγόμενης αιθανόλης των μη δομικών σακχάρων, της κυτταρίνης και του αμύλου και βάσει της μέγιστης παραγόμενης αιθανόλης από τα μη δομικά σάκχαρα.

Abstract

The production of biofuels, particularly bioethanol, by biomass has been the center of scientific and industrial interest in the recent years. Specifically, in order for the production of second generation bioethanol to become sustainable, a considerable effort is placed into reducing the cost of raw materials. The management of food waste is a major concern in terms of protecting the environment and conserving the resources. The conversion of waste food into ethanol could potentially offer further cost advantages, due to the rising cost of waste disposal. The fact that food waste is rich in fermentable sugars, makes it suitable feedstock for bioethanol, an alternative and renewable transport fuel.

The purpose of this thesis is to study the process of bioethanol production from food waste and optimize the respective production conditions.

Initially, the raw material is pretreated hydrothermally at 100°C temperature for 1 hour with and without the presence of H₂SO₄ in solid content 1g/100g, with a concentration of solid of 30% w/v. The percentage of starch is degraded 47.13% after hydrothermal pretreatment with H₂SO₄, 1g/100g of substrate and 45.72% after hydrothermal pretreatment without acid. Enzymatic hydrolysis of the pretreated material is carried out using amyolytic (Liquozyme SC DS and Spirizyme Fuel) with activities 0,053 U / g of starch to alpha-amylase and 5.06, 10.2, 20.24 U / g starch to glucoamylase and cellulolytic (Celluclast 1,5 L / Novozyme 188 (5:1) and Cellic ® CTec2) commercially available enzymes with activities 1,3,5,7,9 FPU / g material. Starch hydrolysis is between 72.30% and 86.32%. The theoretical rate of hydrolysis of the cellulose, based in the produced glucose during the hydrolysis with mixture of Celluclast 1,5 L / Novozyme 188 (5:1) is between 75.28% and 97.63%, while regarding the hydrolysis by using the formula Cellic ® CTec2 the figure is 25.70% to 64.22%. Finally, it is studied the behavior of amyolytic and cellulolytic enzyme formulas and their synergistic effect against the production of ethanol by application of the technology of simultaneous saccharification and fermentation (SSF). The enzyme activities applied at the stage of fermentation are those that show the best results in the hydrolysis of the material. The process productivity ranged from 0,08-0,26 g / L * h. The range of ethanol production during fermentation is 7,22 ± 0,84 - 18,70 ±

0,13 g / L, while the percentage of the maximum theoretical yield is $68,87 \pm 1,09$ and $288,30 \pm 4,43$ based on the maximum of the produced ethanol from nonstructural sugars, cellulose and starch and the maximum ethanol produced from the non-structural sugars.

Περιεχόμενα

<i>Ευχαριστίες</i>	0
Περίληψη	1
Abstract	3
Θεωρητικό μέρος	7
1. Εισαγωγή	17
2. Βιοαιθανόλη	17
2.1. Βιοχημεία της παραγωγής βιο – αιθανόλης	20
3. Βιομάζα	21
3.1. Πρώτες ύλες για παραγωγή βιοαιθανόλης	21
3.2. Βιολογικά απόβλητα	22
3.2.1. Νομοθετήματα πολιτικής της Ε.Ε. για το περιβάλλον και τη διαχείριση απορριμμάτων, και εφαρμογή τους στον Ελληνικό χώρο	25
4. Διατροφικά απορρίμματα ως πρώτη ύλη	30
4.1. Άμυλο	30
4.2. Κυτταρίνη	32
5. Προκατεργασία της πρώτης ύλης (διατροφικά απορρίμματα)	33
5.1. Στόχος της προκατεργασίας	33
5.2. Μέθοδοι προκατεργασίας	35
5.2.1. Φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας	35
5.2.1.1. Μηχανικός κατακερματισμός	35
5.2.1.2. Ακτινοβολήση	35
5.2.2. Χημικές μέθοδοι προκατεργασίας	36
5.2.2.1. Αλκαλική προκατεργασία	36
5.2.2.2. Όξινη προκατεργασία	36
5.2.2.3. Προκατεργασία με άλλους διαλύτες	37
5.2.2.4. Προκατεργασία με οργανικούς διαλύτες	38
5.2.3. Φυσικοχημική προκατεργασία	39
5.2.3.1. Προκατεργασία με έκρηξη ατμού (steam explosion)- Έκρηξη ατμού με προσθήκη SO ₂	39
5.2.3.2. Υδροθερμόλυση (hydrothermolysis, liquid hot-water treatment)	40
5.2.3.3. Υγρή προκατεργασία οξειδωσης	41
5.2.3.4. Εκτόνωση ίνας με αμμωνία (Ammonia fiber explosion, AFEX)	42
5.2.3.5. Προκατεργασία με χρήση μικροκυμάτων	43
5.2.3.6. Έκρηξη CO ₂	43
6.2.4. Βιολογικές προκατεργασίες	44
6. Μέθοδοι υδρόλυσης – Χημική και ενζυμική υδρόλυση	46
6.1. Χημική υδρόλυση	46

6.2.	Ενζυμική υδρόλυση	47
7.	Αλκοολική ζύμωση	50
7.1.	Παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης	50
7.2.	Αναστολείς της αλκοολικής ζύμωσης	51
7.3.	Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για παραγωγή βιοαιθανόλης	52
7.3.1.	Ο μύκητας <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
8.	Τεχνολογίες παραγωγής βιοαιθανόλης	54
	Υλικά και μέθοδοι	17
1.	Πρώτη ύλη	57
2.	Μικροοργανισμός	57
3.	Χημικά αντιδραστήρια	57
4.	Όργανα	59
5.	Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων	59
6.	Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης με τη χρήση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit)	59
7.	Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινολυτικών και ενζυμικών σκευασμάτων	60
8.	Ανάλυση στερεού υπολείμματος – Μέθοδος NREL	61
9.	Μέτρηση της παραγόμενης αιθανόλης με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	61
10.	Προσδιορισμός διαλυτού αμύλου	63
11.	Προσδιορισμός αμύλου στερεού	63
	Αποτελέσματα-Συμπεράσματα	57
1.	Μελέτη της προκατεργασίας των διατροφικών απορριμμάτων	67
2.	Μελέτη της επίδρασης της ενεργότητας των ενζύμων στην υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων.	70
3.	Μελέτη της συμπεριφοράς των αμυλολυτικών και κυτταρινολυτικών ενζυμικών σκευασμάτων καθώς και της συνεργιστικής τους δράσης κατά την παραγωγή αιθανόλης με ζύμωση.	85
	Συμπεράσματα	98
	Βιβλιογραφία	100

Θεωρητικό μέρος

1. Εισαγωγή

Τα ορυκτά καύσιμα (πετρέλαιο, φυσικό αέριο και γαιάνθρακας) συνεισφέρουν στο ~80% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής ενέργειας. Η αναπόφευκτη εξάντληση των αποθεμάτων των ορυκτών καυσίμων, η ανησυχία για ενεργειακή ασφάλεια και η ανάγκη αντίδρασης στην κλιματική αλλαγή έχουν αυξήσει το ενδιαφέρον για εναλλακτικές πηγές ενέργειας, όπως τα βιοκαύσιμα. Η βιοαιθανόλη κατέχει με διαφορά την πρώτη θέση στην παγκόσμια παραγωγή βιοκαυσίμων. Παρόλα αυτά, η υποστήριξη της ανάπτυξης των βιοκαυσίμων σε πολλά κράτη ήρθε αντιμέτωπη με ανησυχίες για το περιβάλλον και την επάρκεια των τροφίμων. Η αλλαγή χρήσης των γεωργικών εκτάσεων για ενεργειακές καλλιέργειες έχει θεωρηθεί εν μέρει υπεύθυνη για την παγκόσμια έλλειψη τροφής και έχει συσχετιστεί με τις αυξανόμενες τιμές βασικών προϊόντων διατροφής όπως ο αραβόσιτος και το ρύζι. Για το λόγο αυτό η αναγνώριση εναλλακτικών πρώτων υλών για την παραγωγή βιοκαυσίμων αποτελεί προτεραιότητα (Balat et al. 2008).

Τα βιοαποδομήσιμα απορρίμματα, είναι ένα σημαντικό κομμάτι της συνολικής ποσότητας των παραγόμενων απορριμμάτων διεθνώς (<http://eurlex.europa.eu/en/tools/about.html>). Αποτελούν το 30% έως 45% της συνολικής ποσότητας των αστικών απορριμμάτων σε Ευρωπαϊκό επίπεδο. Τα βιοαπόβλητα που παράγονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε), σε επίπεδο οικίας, υπολογίζονται σε 118-138 τόνους ετησίως και είναι κυρίως διατροφικά απορρίμματα. Τα απορρίμματα αυτού του τύπου, είναι υπεύθυνα για την παραγωγή 170 Mt CO₂ στην Ε.Ε κάθε χρόνο(<http://www.biowaste.eu/>).

2. Βιοαιθανόλη

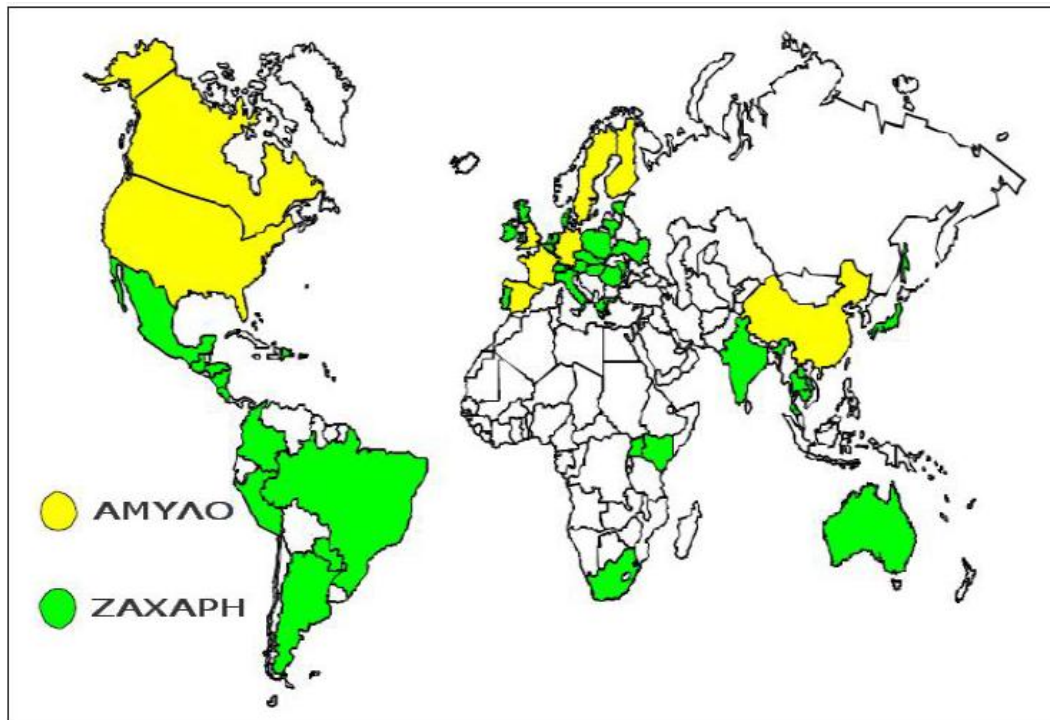
Ο πρώτος που αναφέρθηκε στη δυνατότητα χρήσης της αιθανόλης σαν καύσιμο ήταν ο Φόρντ το 1890. Η αιθανόλη είναι καύσιμο 113 αριθμού οκτανίων (υψηλότερου της βενζίνης) και με υψηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο (περίπου 35% κατά βάρος). Έτσι μπορεί να αυτοαναφλέγεται σε μεγαλύτερη συμπίεση από την βενζίνη επιτρέποντας στους κινητήρες να αποδίδουν πολύ μεγαλύτερη ισχύ. Μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί και ως πρόσθετο αύξησης του αριθμού οκτανίων της βενζίνης. Με την ανάμιξη της με βενζίνη επιτυγχάνεται επίσης ο

εμπλουτισμός του μίγματος του καυσίμου σε οξυγόνο, με αποτέλεσμα μια πιο ολοκληρωμένη καύση και κατά συνέπεια μειωμένες εκπομπές επικίνδυνων καυσαερίων. Η συνεισφορά της στο σχηματισμό οξειδίων του αζώτου είναι ασήμαντη. Από την άλλη, η προσθήκη αιθανόλης, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των πιητικών οργανικών ρύπων καθώς και τον σχηματισμό μεγαλύτερων αλδευδών. Το πρόβλημα όμως αυτό αντιμετωπίζεται από τους τριοδικούς καταλύτες που διαθέτουν τα σύγχρονα οχήματα (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2012).

Η παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης το 2010 σύμφωνα με τον RFA (Renewable Fuels Association) ανέρχεται στα 86.9 δισεκατομμύρια λίτρα, ενώ το 2000 ήταν 17 δισεκατομμύρια λίτρα, από τα οποία τα 50 δισεκατομμύρια λίτρα παράχθηκαν στις ΗΠΑ, τα 26.2 δισεκατομμύρια λίτρα στην Βραζιλία, τα 4.45 δισεκατομμύρια λίτρα στην Ευρωπαϊκή Ένωση και περίπου 2 δισεκατομμύρια λίτρα στην Κίνα (<http://www.ethanolrfa.org/pages/how-ethanol-is-made>).

Η βιομηχανική παραγωγή βιοαιθανόλης στην ΕΕ ανήλθε το 2009 και κατ' εκτίμηση το 2010, στα 3.480 και 4.810 εκατομμύρια λίτρα, αντίστοιχα με σειρά μεγέθους παραγωγής τη Γερμανία, τις Κάτω Χώρες (Ολλανδία, Βέλγιο, Λουξεμβούργο), τη Γαλλία, την Ισπανία, το Ηνωμένο Βασίλειο, την Πολωνία, κ.ά. (Spencer et al. 2011).

Το πιο συνηθισμένο μίγμα αιθανόλης- βενζίνης είναι αυτό που αποτελείται από 10% αιθανόλη και 90% βενζίνη (**E10**). Οι κινητήρες των συμβατικών οχημάτων δεν απαιτούν μετατροπή για να κινηθούν με **E10**, επιπλέον η χρήση E10 δεν έχει καμία επίπτωση στην εγγύηση του οχήματος. Μόνο ευέλικτα οχήματα μπορούν να κινηθούν με καύσιμο μίγμα 85% αιθανόλης και 15% βενζίνης (**E85**) (<http://www.biofuels.gr/bioethanol/bioethanol/>).



Εικόνα 1: Παγκόσμια παραγωγή βιοαιθανόλης το 2013 (Πηγή: F.O.Licht)

Η κατάσταση στην Ελλάδα

Μέχρι σήμερα η αγορά της Ελλάδας δεν έχει υποδεχτεί τη βιοαιθανόλη. Δεν υπάρχει παραγωγή ή εισαγωγή βιοαιθανόλης για χρήση ως καυσίμου μεταφορών, παρά μόνο για την παρασκευή αλκοολούχων ποτών και φαρμάκων. Βέβαια, μία μικρή ποσότητα αιθανόλης παράγεται για βιομηχανική χρήση κυρίως στην ποτοποιία, αλλά και ως εναλλακτικό καύσιμο τζακιών. Έτσι την ώρα που η παραγωγή βιοαιθανόλης στην Ευρωπαϊκή Ένωση φτάνει στα 3,7 εκατ. λίτρα, η ελληνική παραγωγή είναι ...μηδέν, παρότι η χώρα μας λόγω κλίματος είναι ιδανική για την καλλιέργεια των ενεργειακών φυτών -όπως το γλυκό σόργο- που είναι τα παραγωγικότερα σε βιοαιθανόλη.

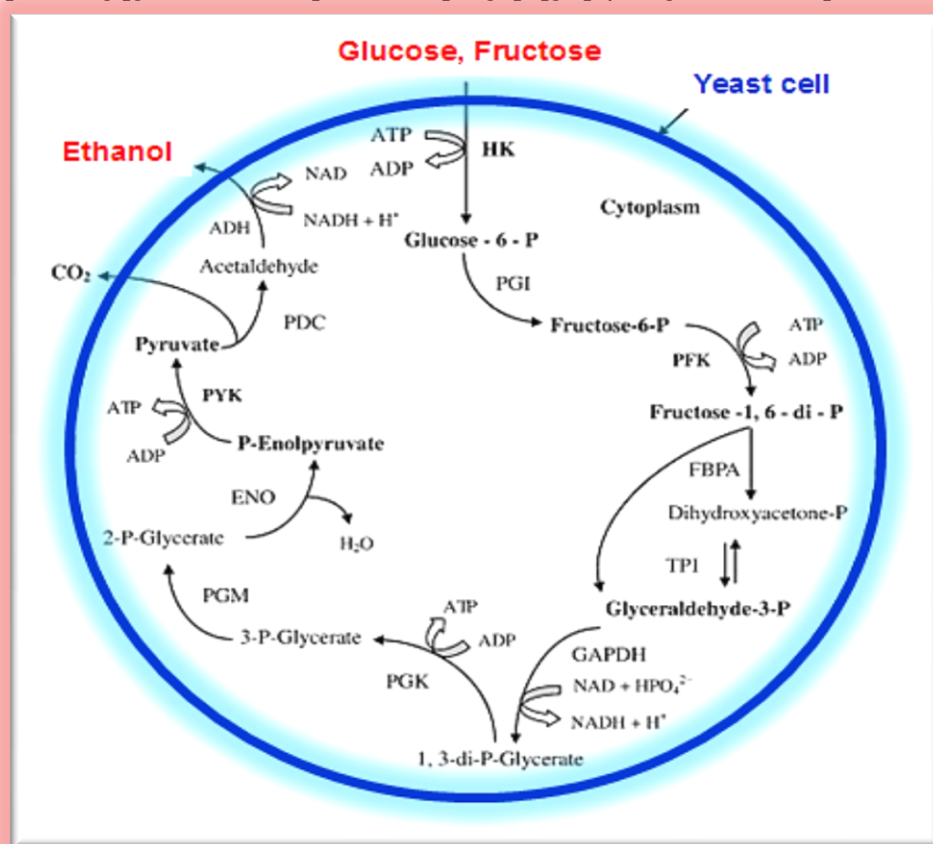
Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή οδηγία 2003/30/EK μέχρι το τέλος του 2010 το 5,75% της εγχώριας βενζίνης θα έπρεπε να υποκαθίσταται από βιοαιθανόλη ή άλλο συμβατό με τη βενζίνη πρόσθετο.

Στόχος που όμως εν έτει 2012 δεν έχει επιτευχθεί. Το γεγονός αυτό επιβάλλει την δραστηριοποίηση της Ελλάδας στον τομέα της παραγωγής υγρών καυσίμων. Μέχρι το 2020 η κατανάλωση βενζίνης υπολογίζεται ότι θα αγγίζει τους 5,5 εκατ. τόνους στην Ελλάδα. Αν το 10%, βάσει ενεργειακού περιεχομένου, πρέπει να καλύπτεται από βιοαιθανόλη θα έχουμε ανάγκες σε βιοκαύσιμο ποσότητας 895 χιλιάδων τόνων (Ε. Λόης, Αν. Λάμπρου 2007)

2.1. Βιοχημεία της παραγωγής βιο – αιθανόλης

Σάκχαρα όπως η γλυκόζη, σακχαρόζη, κλπ. μπορούν να μετατραπούν σε αιθανόλη με ζύμωση. Τέτοια σάκχαρα είναι παρόντα σε περισσότερο ή λιγότερο πολυμερισμένες μορφές ως διαλυτή ζάχαρη (ζαχαροκάλαμο, κλπ.), άμυλο (αραβοσίτου, κλπ.), και λιγνινοκυτταρίνη (ξύλο, κλπ.). Ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού, τα σάκχαρα πρέπει να υποβληθούν σε ένα ή περισσότερα στάδια επεξεργασίας, με σκοπό την μετατροπή των διαφόρων πολυμερικών αλυσίδων σε απλά ζυμώσιμα σάκχαρα. Μετά τη ζύμωση με τη βοήθεια μικροοργανισμών (ζύμες, βακτηρίδια, κλπ), η αιθανόλη ανακτάται με απόσταξη (ένυδρη αιθανόλη σε 92-96% v/v) που ακολουθείται από αφυδάτωση (άνυδρη αιθανόλη σε 99,7% v/v) (Baia, 2008).

Το μεγαλύτερο μέρος του διαλυτού περιεχομένου σε ζάχαρη των πρώτων υλών για παραγωγή αιθανόλης είναι η σακχαρόζη, ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από γλυκόζη και φρουκτόζη. Η κλασική βιοχημική οδός της ζύμωσης της γλυκόζης και της φρουκτόζης σε αιθανόλη σε κύτταρα ζύμης εμφανίζεται στο παρακάτω Σχήμα.



Εικόνα 2: Μεταβολικό μονοπάτι της ζύμωσης της αιθανόλης στον ζυμομύκητα *S. Cerevisiae* (Baia, 2008).

3. Βιομάζα

Ένα από τα πιο σημαντικά θέματα στην παραγωγή βιοαιθανόλης είναι η διαθεσιμότητα των πρώτων υλών, η οποία μπορεί να ποικίλλει σημαντικά από εποχή σε εποχή και εξαρτάται από τη γεωγραφική τοποθεσία. Οι συχνές μεταβολές της τιμής των πρώτων υλών επηρεάζουν και το κόστος της παραγωγής βιοαιθανόλης, καθώς το κόστος των πρώτων υλών αποτελεί περισσότερο από το 1/3 του συνολικού κόστους παραγωγής (Δόγαρης, Διδακτορική διατριβή ΕΒ, 2009).

3.1. Πρώτες ύλες για παραγωγή βιοαιθανόλης

Οι πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης μπορούν να χωριστούν στις παρακάτω κατηγορίες:

- ✚ **Σακχαρούχες πηγές:** όταν η πρώτη ύλη είναι φυτά σακχαρούχου σύστασης όπως σακχαρότευτλα, σακχαροκάλαμα και σόργο υπόκεινται, μετά από κατάλληλη φυσική προκατεργασία σε άμεση ζύμωση για την παραγωγή βιοαιθανόλης.



Εικόνα 3: Γλυκό σόργο

- ✚ **Αμυλούχες πηγές:** όταν η πρώτη ύλη είναι ενεργειακά φυτά αμυλούχου σύστασης όπως οι σπόροι καλαμποκιού, σίτου και κριθής πριν το στάδιο της ζύμωσης προηγείται ένα στάδιο υδρόλυσης με την χρήση αμυλασών.



CORN

WHEAT

BARLEY

Εικόνα 4: Σπόροι δημητριακών

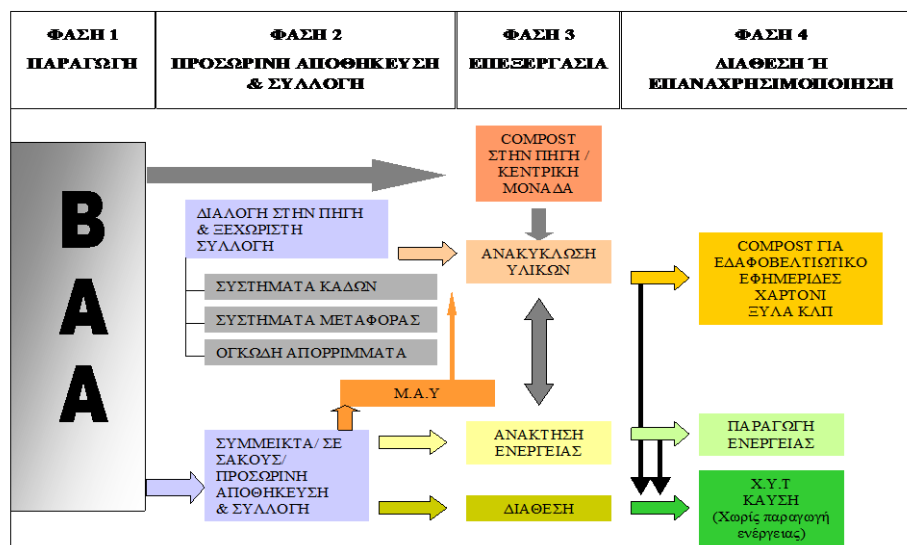
- ✚ **Λιγνινοκυτταρινούχες πηγές:** Όταν η πρώτη ύλη είναι λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα στην οποία κατατάσσονται τα υπολείμματα

της υλοτομίας, της γεωργίας, της βιομηχανίας τροφίμων, τα αστικά στερεά λύματα καθώς και οι ενεργειακές καλλιέργειες. (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2010).

3.2. Βιολογικά απόβλητα

Οι πρώτες ύλες που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο κοστίζουν περίπου το 50% της τιμής της παραγόμενης αιθανόλης, ανάλογα με το είδος της χρησιμοποιούμενης βιομάζας. Ως εκ τούτου, προκειμένου να μειωθεί το κόστος της, μελετώνται χαμηλού κόστους πρώτες ύλες, όπως υπολείμματα καλλιεργειών, δημοτικά και βιομηχανικά στερεά απόβλητα.

Τα βιολογικά απόβλητα, όπως ορίζονται στο πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τα απόβλητα, περιλαμβάνει τα βιοαποδομήσιμα απόβλητα κήπων και πάρκων, τα απορρίμματα τροφών από μαγειρεία, σπίτια, εστιατόρια, καφετέριες και τα συναφή απόβλητα από εγκαταστάσεις μεταποίησης τροφίμων. Δεν περιλαμβάνει απόβλητα δασοκομίας ή γεωργικά κατάλοιπα, κοπριά, λυματολάσπη ή άλλα βιοαποικοδομήσιμα απόβλητα, όπως τα φυσικά υφάσματα, το χαρτί ή το επεξεργασμένο ξύλο. Από την κατηγορία αυτή επίσης εξαιρούνται τα υποπροϊόντα της παραγωγής τροφίμων που ποτέ δεν καθίστανται απόβλητα (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2008).

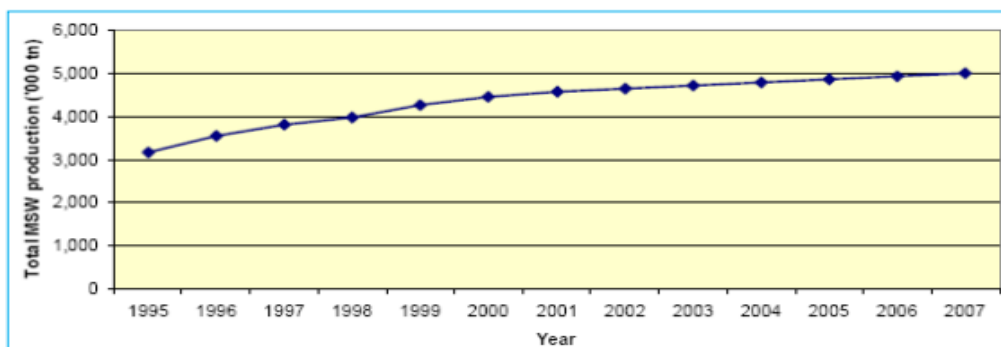


Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής για τον κύκλο ζωής των Βιολογικών Αστικών Αποβλήτων (Πηγή: ΕΕΑ 2002, ΕΠΕΜ 2003).

*Β.Α.Α. :Βιολογικά Αστικά Απόβλητα

Στις ευρωπαϊκές χώρες το 22% με 49% των αστικών στερεών αποβλήτων αποτελείται από απόβλητα τροφών και κηπουρικής. Από τους 118-138 εκατομμύρια τόνους βιολογικών αποβλήτων που παράγονται κάθε χρόνο στην ΕΕ, 88 εκατομμύρια τόνοι αποτελούν τα αστικά απόβλητα. Προβλέπεται να αυξηθούν κατά μέσο όρο κατά 10% μέχρι το 2020 (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2010).

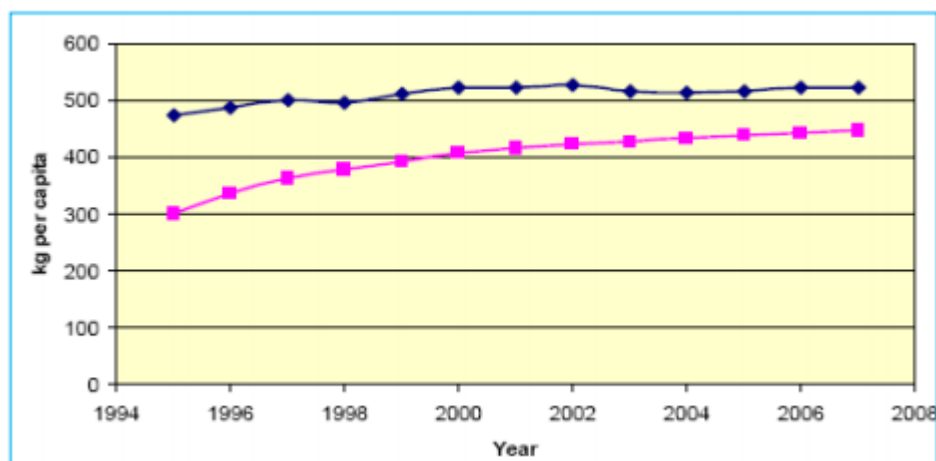
Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει την ετήσια παραγωγή ΑΣΑ ανά κάτοικο στην Ελλάδα από το 1995 μέχρι το 2007.



Διάγραμμα 2: Ετήσια παραγωγή ΑΣΑ στην Ελλάδα (JESSICA, 2010)

Πίνακας 1: Παραχθείσες ποσότητες ΑΣΑ(τόνου/έτος) στην Ελλάδα (ΕΣΔΑ)

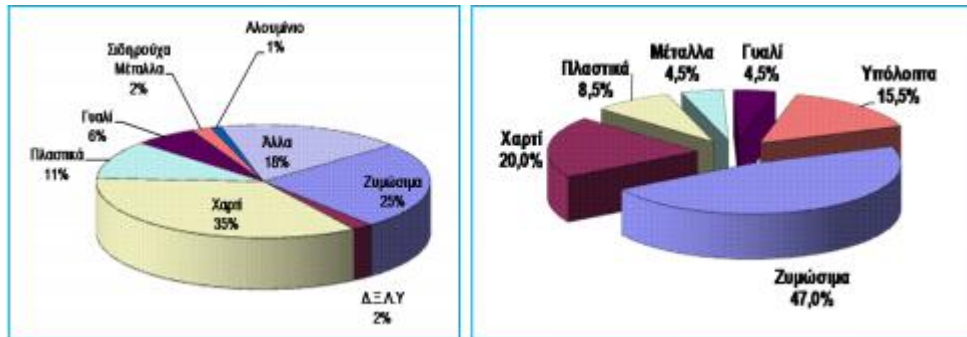
1997	1998	1999	2000	2001	2011
3.900.000	4.082.000	4.264.000	4.447.000	4.559.000	6.000.000



Διάγραμμα 3: Ετήσια παραγωγή ΑΣΑ (Kg/άτομο) στην Ελλάδα και στην Ε.Ε. (JESSICA, 2010)

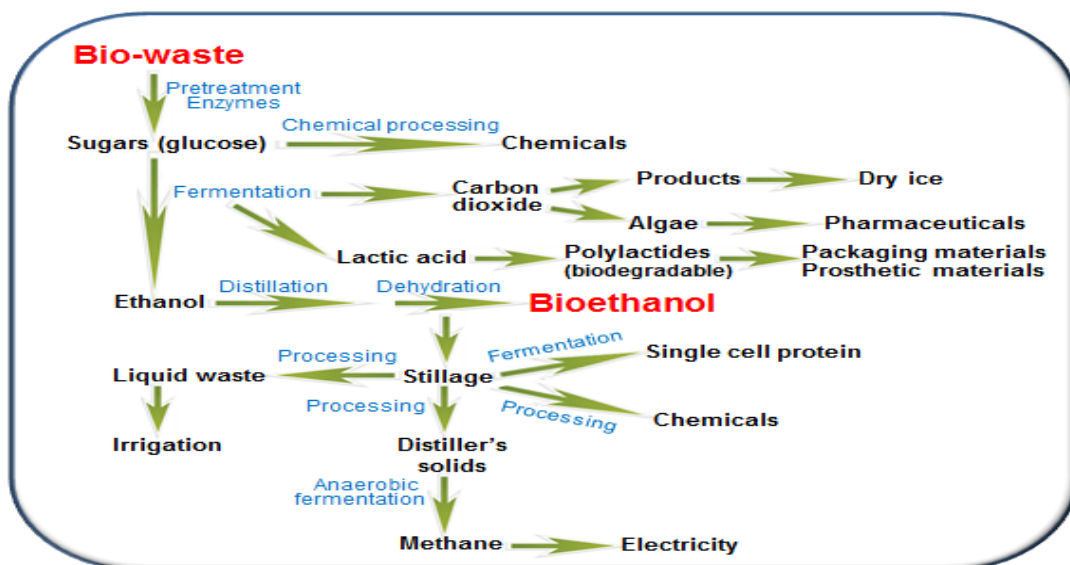
Ποιοτικά χαρακτηριστικά διαχείρισης αστικών αποβλήτων

Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται το ζυμώσιμο κλάσμα των αστικών αποβλήτων στην Ε.Ε. και στην Ελλάδα.



Διάγραμμα 4: Σύσταση ΑΣΑ στην Ευρωπαϊκή Ένωση και στην Ελλάδα (ΕΕΣΛΑ)

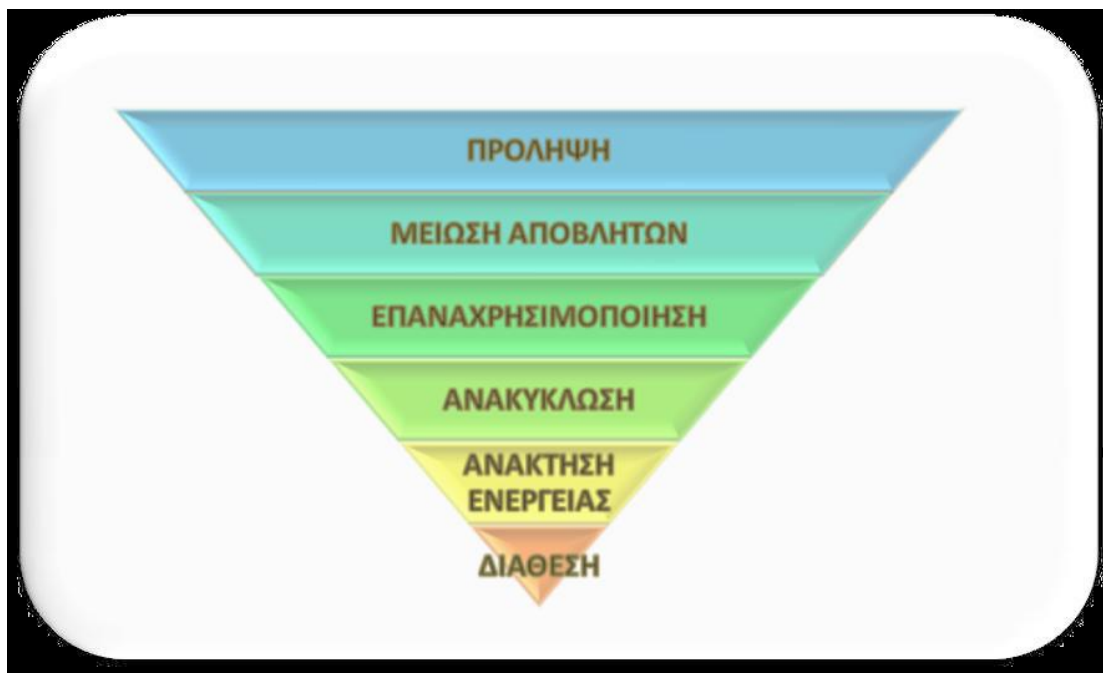
Τα Βιολογικά απόβλητα έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων, χρησιμοποιώντας χημικές και μικροβιακές διεργασίες. Η πλειοψηφία αυτών των προϊόντων, προϊόντα είναι το μεθάνιο, η βιοαιθανόλη και η ενέργεια (ηλεκτρική ενέργεια), προέρχεται από βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της αερόβιας και αναερόβιας ζύμωσης.



Εικόνα 5: Παραγωγή πολλών προϊόντων προστιθέμενης αξίας από τα βιολογικά απόβλητα (van Wyk JPH, 2001)

3.2.1. Νομοθετήματα πολιτικής της Ε.Ε. για το περιβάλλον και τη διαχείριση απορριμμάτων, και εφαρμογή τους στον Ελληνικό χώρο

Οι επιταγές σχετικά με τα απόβλητα εφαρμόζονται σε Ευρωπαϊκό επίπεδο ήδη από το 1989 και με δεκάδες αναθεωρήσεις μέχρι και σήμερα (Shinn, 2005), αναγνωρίζοντας τα προβλήματα που δημιουργούνται λόγω των συνεχώς αυξανόμενων όγκων σκουπιδιών και λαμβάνοντας μέτρα με στόχο τον περιορισμό της απώλειας υλικών και ενέργειας, των περιβαλλοντικών ζημιών και των αρνητικών συνεπειών στην υγεία και στην ποιότητα ζωής (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2011). Η επίλυση του μείζονος προβλήματος των απορριμμάτων, προσεγγίζεται ταυτόχρονα από διαφορετικές πλευρές μέσω των διαφόρων τομέων των πολιτικών που βρίσκονται εν εξέλιξη στην Ε.Ε.. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι ο χαρακτήρας των προτάσεων της Ε.Ε. για τη διαχείριση των αποβλήτων δεν είναι δεσμευτικός -εφόσον τηρούνται ορισμένες προϋποθέσεις πλαισίου (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2011) πέραν της τελικής Απόφασης του 6ου κοινοτικού προγράμματος δράσης για το περιβάλλον όπου υπάρχει νομική δέσμευση για την Επιτροπή και τα Κράτη-Μέλη (Shinn, 2005).



Εικόνα 6: Πυραμίδα ιεραρχίας για τις προτεραιότητες διαχείρισης των απορριμμάτων βασισμένη στην Οδηγία 2008/98/ΕΚ

Η μεταφορά και ενσωμάτωση του νομικού πλαισίου της Ε.Ε. στη νομοθεσία των κρατών-μελών χαρακτηρίζεται, σε μερικές περιπτώσεις, ως μία αργή και/ή

πλημμελής διαδικασία (Τσαντίλης και Χατζημπίρος, 2007). Η επίτευξη των στόχων και η υλοποίηση των αρχών που θεσπίζονται καταρτίζονται στον Εθνικό Σχέδιο Διαχείρισης Στερεών Αποβλήτων (Ε.Σ.Δ.Α.), στα Ειδικά Εθνικά Σχέδια Διαχείρισης Αποβλήτων (Ε.Ε.Σ.Δ.Α.) και στα Περιφερειακά Σχέδια Διαχείρισης Αποβλήτων (Π.Ε.Σ.Δ.Α.), τα οποία καλύπτουν συνδυασμένα το σύνολο της επικράτειας της χώρας για όλα τα είδη αποβλήτων. Καθ' αυτόν τον τρόπο, μέχρι το 2015, στο πλαίσιο της νέας Οδηγίας Πλαίσιο για τα απόβλητα, η Ελλάδα οφείλει να εισαγάγει τη διαλογή στην πηγή για κάθε τύπο ανακυκλώσιμων υλικών (Πρόγραμμα ISWM-TINOS, 2012). Ακόλουθα έως το 2020, η προετοιμασία για επαναχρησιμοποίηση και ανακύκλωση των υλικών αποβλήτων για τουλάχιστον το χαρτί, το μέταλλο, το πλαστικό και το γυαλί από τα νοικοκυριά και ενδεχομένως άλλης προέλευσης στο βαθμό που τα απόβλητα αυτά είναι παρόμοια με τα απόβλητα των νοικοκυριών, πρέπει να αυξηθεί κατ' ελάχιστον στο 50 % ως προς το συνολικό βάρος.

Επιπλέον, σύμφωνα με την Οδηγία για την υγειονομική ταφή, η Ελλάδα μέχρι την 16η Ιουλίου 2013 πρέπει να μειώσει την ποσότητα των βιοαποδομήσιμων αστικών αποβλήτων τελικής διάθεσης κατά 50% της συνολικής κατά βάρος ποσότητας των βιοαποδομήσιμων αστικών αποβλήτων του 1995, μέχρι τη 16η Ιουλίου 2020 πρέπει να μειώσει την ποσότητα των βιοαποδομήσιμων αστικών αποβλήτων τελικής διάθεσης κατά 35% της συνολικής κατά βάρος ποσότητας των βιοαποδομήσιμων αστικών αποβλήτων του 1995 και κατά 50% ως προς του 2000 μέχρι το 2050 (Πρόγραμμα ISWM-TINOS).

Συγκεκριμένα για τα βιοαπόβλητα, προσδιορίζεται η στρατηγική και τα μέτρα για την υλοποίηση της μείωσης των βιοαποδομήσιμων αστικών αποβλήτων, τα οποία προορίζονται για διάθεση σε χώρους υγειονομικής ταφής, η οποία αναφέρεται στο άρθρο 5 της οδηγίας 1999/31/ΕΚ. Συνοπτικά, η μεταφορά της νομοθεσίας της Ε.Ε. σχετικά με τα βιοαπόβλητα στην ελληνική νομοθεσία αποτυπώνεται στον παρακάτω Πίνακα. Χαρακτηριστικό των νομοθετημάτων αποτελεί η προώθηση της αξιοποίησης των αποβλήτων και ειδικότερα η ανακύκλωση, η λιπασματοποίηση, η παραγωγή βιομεθανίου και η ανάκτηση υλικών και ενέργειας.

Πίνακας 2: Αποτύπωση της νομοθεσίας της Ε.Ε. σχετικά με τα βιοαπόβλητα στην ελληνική νομοθεσία κατηγοριοποιημένη με βάση την ιεραρχία διαχείρισης απορριμμάτων

Ιεράρχηση διαχείρισης	Νομοθεσία Ε.Ε.	Μεταφορά στην Ελληνική νομοθεσία
Γενικό πλαίσιο διαχείρισης	Οδηγία 2008/98/ΕΚ σχετικά με τα απόβλητα και την κατάργηση ορισμένων οδηγιών	Ν. 4042/2012
	Προγενέστερη Οδηγία 2006/12/ΕΚ	ΚΥΑ 114218/1997 (ΦΕΚ Β 1016/17.11.97) «Κατάρτιση πλαισίου Προδιαγραφών και γενικών προγραμμάτων διαχείρισης στερεών αποβλήτων» ΚΥΑ 50910/2727/2003 (ΦΕΚ Β 1909/22.12.2003) «Μέτρα και Όροι για τη διαχείριση Στερεών
		Αποβλήτων. Εθνικός και Περιφερειακός Σχεδιασμός Διαχείρισης»
Πρόληψη και Ελαχιστοποίηση	Οδηγία 2008/1/ΕΚ σχετικά με την ολοκληρωμένη πρόληψη και έλεγχο της ρύπανσης (IPCC)	Ν. 2965/2001 (ΦΕΚ 68/Α'/11.3.2005) «Βιώσιμη ανάπτυξη Αττικής και άλλες διατάξεις» Ν. 3325/2005 (ΦΕΚ 270/Α'/23.11.2001) «Ίδρυση και λειτουργία βιομηχανικών, βιοτεχνικών εγκαταστάσεων στο πλαίσιο της αειφόρου ανάπτυξης και άλλες διατάξεις» Σε μερική εναρμόνιση με την Οδηγία 96/61/ΕΟΚ προγενέστερη της Οδηγίας 2008/1/ΕΚ
Επαναχρησιμοποίηση και ανακύκλωση	Αποφάσεις 2006/799/ΕΚ και 2007/64/ΕΚ περί καθορισμού αναθεωρημένων οικολογικών κριτηρίων και των σχετικών απαιτήσεων αξιολόγησης και εξακριβωσης για την απονομή κοινοτικού οικολογικού σήματος σε βελτιωτικά εδάφους και σε καλλιεργητικά μέσα αντίστοιχα	
Ανάκτηση ενέργειας	Οδηγία 2000/76/ΕΚ	ΚΥΑ 22912/1117/2005

	σχετικά με την αποτέφρωση των αποβλήτων	(ΦΕΚ Β 759/06.06.2005) «Μέτρα και όροι για την πρόληψη και τον περιορισμό της ρύπανσης του περιβάλλοντος από την αποτέφρωση των αποβλήτων»
	Οδηγία 2009/28/ΕΚ σχετικά με την προώθηση της χρήσης ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές και την τροποποίηση και τη συνακόλουθη κατάργηση των οδηγιών 2001/77/ΕΚ και 2003/30/ΕΚ	N. 4042/2012
Τελική διάθεση	Οδηγία 1999/31/ΕΚ περί υγειονομικής ταφής των αποβλήτων	ΚΥΑ 29407/3508/2002 (ΦΕΚ Β 1572/16.12.02) «Μέτρα και όροι για την υγειονομική ταφή των αποβλήτων» ΚΥΑ 4641/232/2006 (ΦΕΚ Β 168/13-02-06) «Καθορισμός τεχνικών προδιαγραφών μικρών χώρων υγειονομικής ταφής αποβλήτων σε νησιά και απομονωμένους οικισμούς, κατ' εφαρμογή του άρθρου 3 (παρ.4) σε συνδυασμό με το άρθρο 20 (παράρτημα Ι) της υπ' αριθμ. 29407/3508/2002» ΚΥΑ «Μέτρα και όροι για υγειονομική ταφή των αποβλήτων (Β' 1572)»

Πηγή: Πρόγραμμα ΑΘΗΝSBIOWASTE (<http://www.biowaste.gr/site/general/legal>)

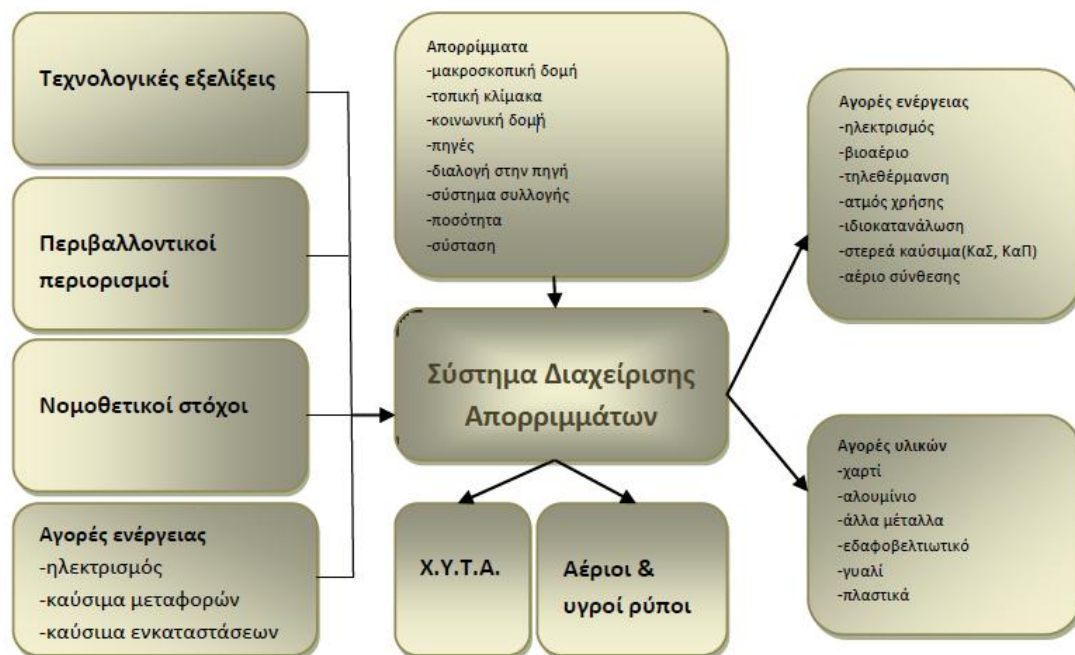
Αλυσίδα διαχείρισης αποβλήτων με μνείες για τα βιοαπόβλητα σε κράτη-μέλη της Ε.Ε

Οι βασικές αρχές που διέπουν πλέον τη διαχείριση αποβλήτων αφορούν στην:

- Ιεραρχία επιλογών διαχείρισης των απορριμμάτων (με σειρά παρουσίασης από το βέλτιστο προς το χειρίστο: πρόληψη, ελαχιστοποίηση, επαναχρησιμοποίηση, ανακύκλωση-ανάκτηση, διάθεση)
- Ορθολογική κοστολόγηση υπηρεσιών καθαριότητας (Pay-As-You-Throw) (Μουσιόπουλος και Καραγιαννίδης, 2002).
- Αποκατάσταση των υλικών ή της ενέργειας (Σκορδίλης, 2009)

- Ευθύνη
- Δημοσίευση
- Αρχή «Ο ρυπαίνων πληρώνει» και η Αρχή της Διευρυμένης Ευθύνης του Παραγωγού
- Η αρχή της προφύλαξης
- Οι αρχές της «αυτάρκειας» και της «εγγύτητας» (Πρόγραμμα ISWM-TINOS, 2012)

Κάνοντας λόγο για πρακτικά θέματα σχεδίασης και εφαρμογής ενός συστήματος διαχείρισης στερεών αποβλήτων, το επίπεδο εφαρμογής και οι τεχνολογίες του εκάστοτε προτεινόμενου ολοκληρωμένου συστήματος διαχείρισης απορριμμάτων εξαρτώνται από παράγοντες όπως οι τεχνολογικές εξελίξεις, η τοπική κοινωνία, οι περιβαλλοντικοί περιορισμοί, οι νομοθετικοί στόχοι, οι αγορές ενέργειας και υλικών κ.ά. (Σχήμα 1).

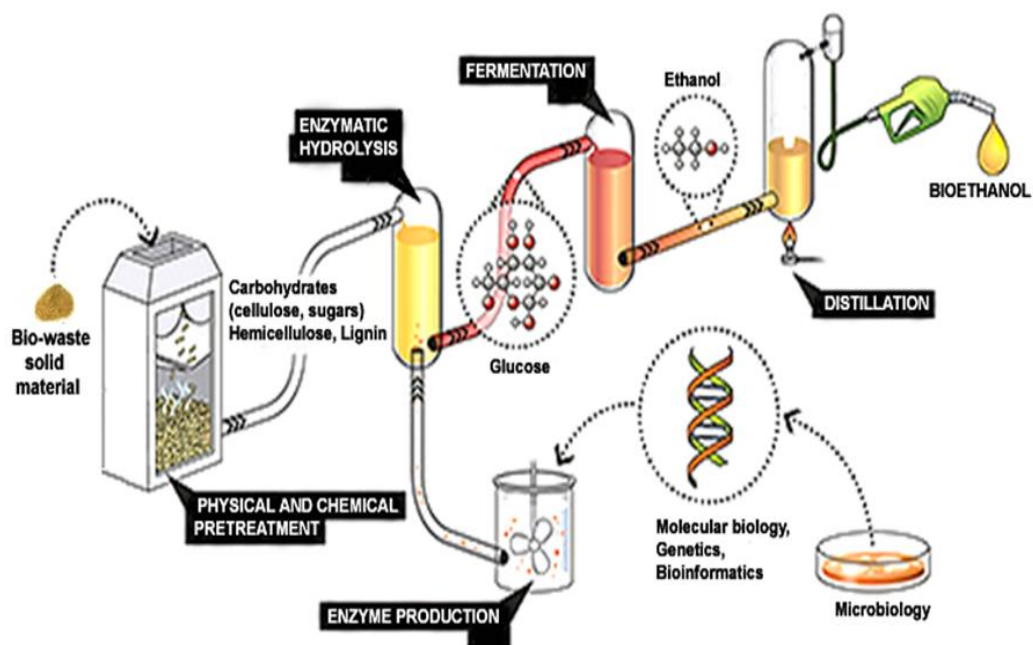


Σχήμα 1: Σχηματική αποτύπωση μερικών εκ των πιο βασικών παραγόντων που λαμβάνονται υπόψη στο σχεδιασμό ενός συστήματος διαχείρισης απορριμμάτων

Πηγή: (Καραγιαννίδης Α., 1996), (Μουσιόπουλος Ν. και Καραγιαννίδης, 2002)

4. Διατροφικά απορρίμματα ως πρώτη ύλη

Τα απορρίμματα τροφίμων είναι μια σύνθετη βιομάζα που αποτελείται από πολυμερή υδατανθράκων (άμυλο, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη), λιγνίνη, άλλα οργανικά (πρωτεΐνες, λιπίδια, οξέα κλπ.) και ένα υπόλοιπο μικρότερο ανόργανο μέρος (τέφρα). Το άμυλο και η κυτταρίνη είναι τα κύρια συστατικά των υπολειμμάτων των τροφίμων, τα οποία μπορούν να υδρολύονται περαιτέρω σε σάκχαρα. Τα σάκχαρα στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για την ζυμωτική παραγωγή μιας ποικιλίας χημικών προϊόντων, όπως η βιοαιθανόλη.



Εικόνα 7: Παραγωγή βιο-αιθανόλης από ζύμωση σακχάρων (γλυκόζη)

4.1. Άμυλο

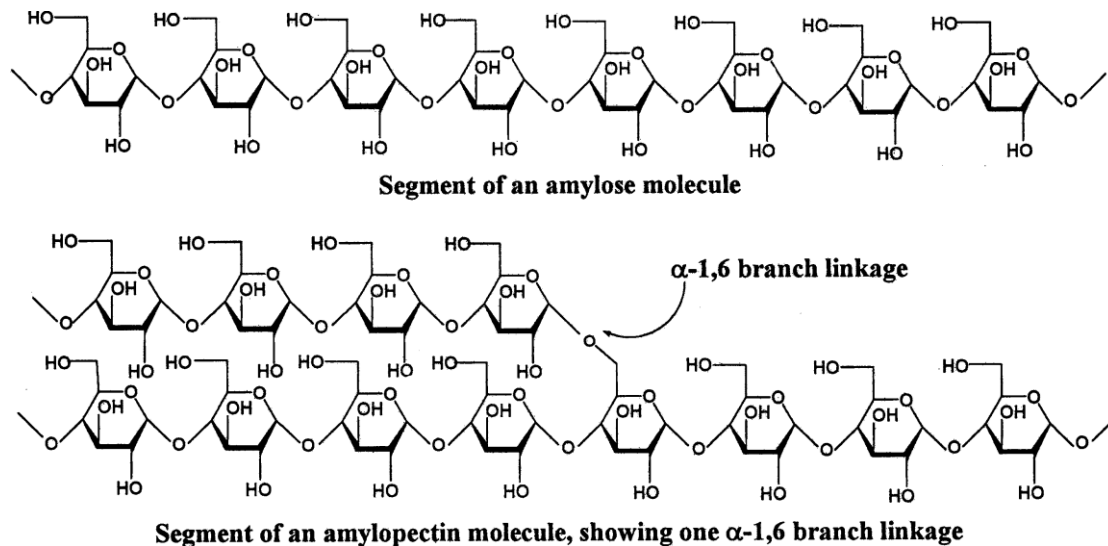
Το άμυλο είναι ένας πολυσακχαρίτης. Αποτελείται από δεκάδες χιλιάδες μόρια γλυκόζης, που ενώνονται με τον αποκαλούμενο "γλυκοζιτικό δεσμό" και σχηματίζουν σπειροειδή και διακλαδισμένη αλυσίδα. Συναντάται σε μορφή

αμυλόκοκκων οι οποίοι περιλαμβάνουν την αμυλόζη (πολλά μόρια γλυκόζης σε ευθεία διάταξη) και την αμυλοπηκτίνη (πολλά μόρια γλυκόζης σε διακλαδισμένη διάταξη) (Robyt JF, 1967).

Η αμυλόζη από χημικής άποψης είναι ένα γραμμικό πολυμερές εκατοντάδων έως και χιλιάδων μονάδων γλυκόζης, ενωμένων μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς τύπου $\alpha(1\rightarrow4)$. Σε καθαρή κατάσταση η αλυσίδα της αμυλόζης έχει άτακτη δομή, ενώ στο άμυλο απαντάται με την μορφή έλικας, συνήθως με έξι έως οκτώ μονάδες γλυκόζης σε κάθε σπείρα. Η ελικοειδής δομή σταθεροποιείται με τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου. Σε αντίθεση με την αμυλοπηκτίνη, η αμυλόζη είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό. Αυτό έχει ως συνέπεια η περιεκτικότητα του αμύλου σε αμυλόζη να καθορίζει την ολική διαλυτότητά του στο νερό, και κατ' επέκταση την ευκολία με την οποία αυτό ζελατινοποιείται.

Η αμυλοπηκτίνη είναι ένα πολυμερές χιλιάδων μορίων γλυκόζης, ενωμένων μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς τύπου $\alpha(1\rightarrow4)$ και $\alpha(1\rightarrow6)$. Οι περισσότερες μονάδες γλυκόζης είναι ενωμένες μεταξύ τους με δεσμούς $\alpha(1\rightarrow4)$, ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από τους δεσμούς $\alpha(1\rightarrow6)$, που υπάρχουν σε διαστήματα περίπου 30 δακτυλίων γλυκόζης. Η αμυλοπηκτίνη μοιάζει πολύ με το γλυκογόνο, τον αποταμιευτικό υδατάνθρακα των ζώων, ο οποίος όμως εμφανίζει πολύ πιο έντονη διακλάδωση (κάθε 10 δακτυλίους γλυκόζης). Οι διακλαδώσεις, σε αντίθεση με την ευθεία αλυσίδα της αμυλόζης, καθιστούν την αμυλοπηκτίνη διαλυτή στο νερό.

Η δομή της αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης του αμύλου επιτρέπουν τη μετατροπή του σε γλυκόζη, μια σημαντική πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης. Συνήθως η αμυλοπηκτίνη αποτελεί το κύριο συστατικό, με αναλογία 1:3 ή ~ 25% αμυλόζη και ~ 75% αμυλοπηκτίνη.



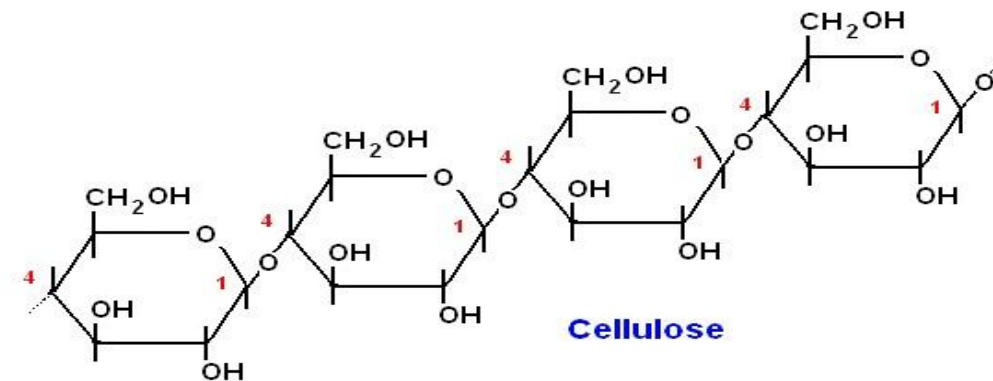
Εικόνα 8: Οι δομές των τμημάτων της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης (Robyt JF, 1967)

Το άμυλο αποτελεί αποταμιευτικό πολυσακχαρίτη των φυτών και διασπώμενο αποδίδει μόρια γλυκόζης τα οποία το φυτό χρησιμοποιεί για την παραγωγή ενέργειας.

4.2. Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων. Αποτελείται από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης, συνδεδεμένων μεταξύ τους με β -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Λόγω του είδους των δεσμών αυτών, ο διασακχαρίτης κελλοβιόζη αποτελεί την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της αλυσίδας της κυτταρίνης. Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης έχει ένα εύρος από 7000 έως 15000 μονάδες γλυκόζης. Τα πολυμερή κυτταρίνης παρουσιάζονται ως διατεταγμένες δομές (μικροϊνίδια) και η κύρια λειτουργία τους είναι να εξασφαλίσουν την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Η κυτταρίνη είναι ένας αδιάλυτος πολυσακχαρίτης που σχηματίζει κρυσταλλικές περιοχές. Αυτές σχηματίζονται από τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των μορίων γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας καθώς και μεταξύ των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ μορίων γλυκόζης που ανήκουν σε διαφορετικές αλυσίδες. Ένα μέρος της κυτταρίνης είναι άμορφο και παρεμβάλλεται μεταξύ των κρυσταλλικών περιοχών. Οι δεσμοί υδρογόνου διευθετούν τις αλυσίδες της κυτταρίνης σε παράλληλη επίπεδη διάταξη

προκαλώντας ταυτόχρονα και το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των παράλληλων αυτών επιπέδων, δημιουργώντας έτσι συμπαγείς και δύσκολα αποικοδομήσιμες κρυσταλλικές περιοχές. Υπάρχουν επίσης και άμορφες περιοχές οι οποίες είναι πολύ υγροσκοπικές. Τέλος, η κυτταρίνη διογκώνεται και διαλύεται πλήρως από θειικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ και φωσφορικό οξύ. (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2010)

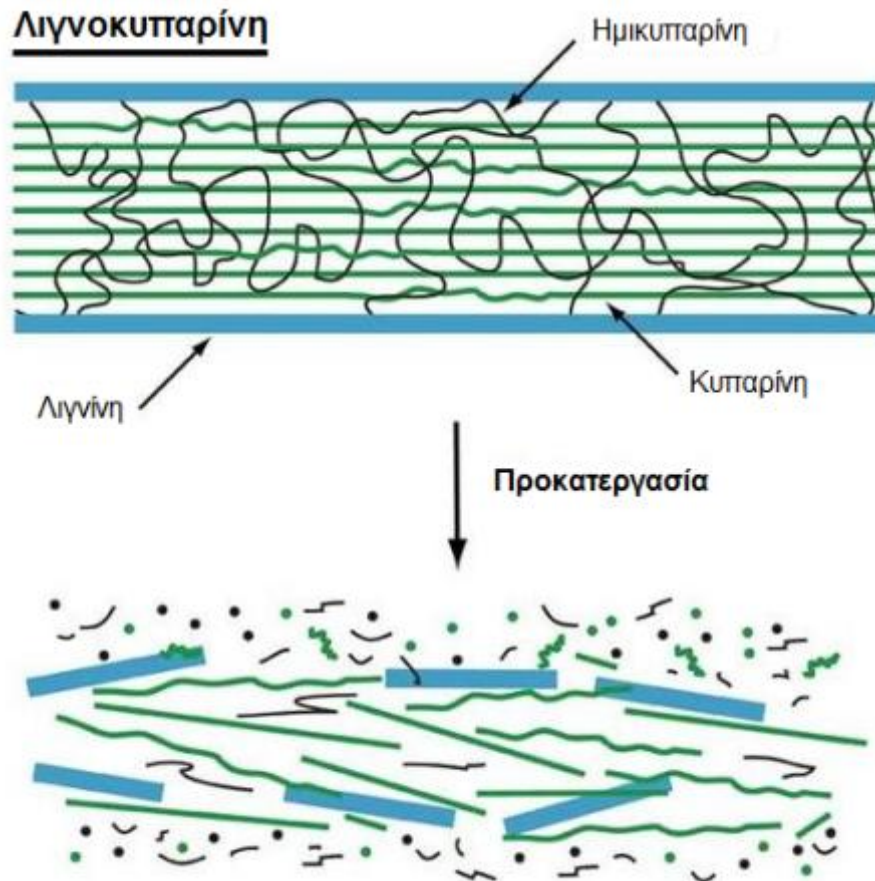


Εικόνα 9: Δομή της κυτταρίνης

5. Προκατεργασία της πρώτης ύλης (διατροφικά απορρίμματα)

5.1. Στόχος της προκατεργασίας

Με την προκατεργασία προκαλούνται ρωγμές και θραύση του υλικού, υδρολύεται η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη υπόκειται σε δομικές αλλαγές που την αποδεσμεύουν από την κυτταρίνη με αποτέλεσμα τη μείωση της κρυσταλλικότητας και του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης και την αύξηση της ενεργής επιφάνειας του υλικού. (Δόγαρης Διδακτορική διατριβή ΕΒ,2009).



Εικόνα 10: Σχηματικά οι στόχοι της προκατεργασίας σε λιγνινοκυτταρινούχο υλικό (Hsu et al. 1996)

Μία αποτελεσματική προκατεργασία οφείλει :

- να οδηγεί σε απελευθέρωση ή να αυξάνει την απόδοση,
- να παράγονται σάκχαρα κατά την ενζυμική υδρόλυση,
- να διατηρεί τα κλάσματα των πεντοζών,
- να περιορίζει τον σχηματισμό προϊόντων αποικοδόμησης τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ζύμωσης,
- να ελαχιστοποιεί τις ενεργειακές ανάγκες και
- να περιορίζει το κόστος. (Mosier et al. 2004)

5.2. Μέθοδοι προκατεργασίας

Ένα πλήθος από διαφορετικές μεθόδους προκατεργασίας έχουν προταθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες :

- ✚ φυσικές (άλεσμα, ακτινοβόληση)
- ✚ χημικές (άλκαλι, αραιά οξέα, οξειδωτικά και οργανικοί διαλύτες)
- ✚ φυσικοχημικές (προκατεργασία με ατμό/αυτοϋδρόλυση, υδροθερμόλυση και υγρή οξείδωση) και
- ✚ βιολογικές ή συνδυασμοί αυτών.

5.2.1. Φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας

5.2.1.1. Μηχανικός κατακερματισμός

Στόχος της άλεσης είναι η τροποποίηση της δομής του υλικού και η μείωση της κρυσταλλικότητάς του καθιστώντας το περισσότερο επιδεκτικό στις κυτταρινάσες. Η άλεση και η μείωση του μεγέθους του υλικού είναι από τις πρώτες προκατεργασίες που εφαρμόστηκαν. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι αλέσματος όπως άλεση με κολλοειδή μύλο που είναι κατάλληλη για υλικά σε υγρή μορφή ή άλεση με σφυρόμυλο, η οποία είναι κατάλληλη για ξηρά υλικά.

Η άλεση είναι ενεργηθόρα διαδικασία γεγονός που την καθιστά οικονομικά ασύμφορη για την εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα (Alvira et al. 2009).

5.2.1.2. Ακτινοβόληση

Η ακτινοβόληση με ακτίνες γ, δέσμη ηλεκτρονίων και μικροκύματα μπορούν να βελτιώσουν την ενζυμική υδρόλυση. Ο συνδυασμός της ακτινοβολίας με κάποια άλλη μέθοδο όπως η όξινη προκατεργασία μπορεί να επιταχύνει την ενζυμική

υδρόλυση (Galbe, 2007). Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι υψηλού κόστους και υπάρχουν δυσκολίες στη βιομηχανική της εφαρμογή (Hayes, 2009).

5.2.2. Χημικές μέθοδοι προκατεργασίας

5.2.2.1. Αλκαλική προκατεργασία

Η αλκαλική προκατεργασία αυξάνει την επιδεκτικότητα της κυτταρίνης σε ένζυμα, εμφανίζει μικρά ποσοστά διαλυτοποίησης κυτταρίνης συγκριτικά με την όξινη προκατεργασία ή τις υδροθερμικές προκατεργασίες. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί χαμηλότερες θερμοκρασίες και πιέσεις σε σχέση με άλλες μεθόδους προκατεργασίας. Η αλκαλική προκατεργασία μπορεί να πραγματοποιείται σε συνθήκες περιβάλλοντος αλλά ο χρόνος προκατεργασίας κυμαίνεται από ώρες μέχρι και μέρες. Η κατεργασία με NaOH προκαλεί την διόγκωση των πόρων του υλικού που οδηγεί σε αύξηση της εσωτερικής επιφάνειας επιτρέποντας έτσι την διείσδυση μορίων νερού σε εσωτερικά στρώματα και στην διάσπαση των δεσμών μεταξύ της ημικυτταρίνης και υδρογονανθράκων της λιγνίνης, σε μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης και στην διαταραχή της δομής της λιγνίνης. Επιπροσθέτως, η αλκαλική προκατεργασία απομακρύνει διάφορους υποκαταστάτες της ημικυτταρίνης που μειώνουν την προσβασιμότητα των ενζύμων στην επιφάνεια της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης. (Alvira et al. 2009, Eklund et al. 1995).

5.2.2.2. Όξινη προκατεργασία

Ο κύριος στόχος της όξινης προκατεργασίας είναι η διαλυτοποίηση του κλάσματος ημικυτταρίνης της βιομάζας και η αύξηση της επιδεκτικότητας της κυτταρίνης σε ένζυμα. Σε αυτήν την μέθοδο προκατεργασίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί και πυκνό και αραιό οξύ αλλά το πυκνό οξύ είναι λιγότερο ελκυστικό όταν πρόκειται για παραγωγή αιθανόλης εξαιτίας του σχηματισμού παρεμποδιστών. Επιπλέον, με τη χρησιμοποίηση πυκνών οξέων στην προκατεργασία η ανάκτηση του οξέος καθώς και τα προβλήματα διάβρωσης του εξοπλισμού είναι σημαντικά μειονεκτήματα. Τα υψηλό λειτουργικό κόστος και το υψηλό κόστος συντήρησης είναι ανασταλτικοί

παράγοντες στην εφαρμογή της όξινης προκατεργασίας με την χρησιμοποίηση πυκνών οξέων σε εμπορική κλίμακα.

Καταλληλότερη μέθοδος για βιομηχανικές εφαρμογές είναι η προκατεργασία με την χρήση αραιού οξέος (κυρίως θειικού οξέος). Μπορεί να πραγματοποιηθεί σε υψηλές θερμοκρασίες (180° C) για μικρό χρονικό διάστημα ή σε χαμηλές θερμοκρασίες (120° C) για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (30-90 min). Γενικά, υψηλότερες θερμοκρασίες προκατεργασίας και μικρότεροι χρόνοι παραμονής έχουν ως αποτέλεσμα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης ξυλόζης. Εκτός από την διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης αυτή η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα της μετατροπής της διαλυμένης ημικυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Ωστόσο ανιχνεύονται ενώσεις από την αποικοδόμηση σακχάρων (όπως η φουρφουράλη), οι οποίες στο στάδιο της ζύμωσης επηρεάζουν τον μεταβολισμό των μικροοργανισμών.

Ένα άλλο ζήτημα με την χρησιμοποίηση οξέων είναι η ρυθμιστική ικανότητα του υλικού και η χρήση προσθέτων που θα εξουδετερώσουν την οξύτητα του μίγματος πριν την υδρόλυσή του. Επιπροσθέτως, πρέπει να επισημανθεί και η επίδραση που έχει η όξινη προκατεργασία στην κυτταρίνη. Μερικές άμορφες περιοχές της κυτταρίνης είναι πιθανόν να υδρολυθούν με αποτέλεσμα την μείωση του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης. (Alvira et al. 2009)

5.2.2.3. Προκατεργασία με άλλους διαλύτες

Το όζον, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, η γλυκερόλη και η φαινόλη είναι μερικοί διαλύτες που έχουν δείξει ότι μπορεί να συνεισφέρουν στην μείωση της κρυσταλλικότητας και του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης. Το όζον είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό που συνεισφέρει αποτελεσματικά στην απολιγνινοποίηση του υλικού. Η απομάκρυνση της λιγνίνης αυξάνει την απόδοση του ακολουθούμενου σταδίου, της ενζυμικής υδρόλυσης.

Τα Πs είναι άλατα τα οποία αποτελούνται από ένα μεγάλο οργανικό κατιόν και ένα μικρό ανόργανο ανιόν και τα οποία είναι σε υγρή μορφή σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου). Αυτοί οι διαλύτες έχουν χημική και θερμική σταθερότητα, δεν είναι εύφλεκτοι, έχουν χαμηλή τάση ατμών

και παραμένουν υγροί σε ένα ευρύ εύρος θερμοκρασιών. Αφού δεν σχηματίζονται τοξικά ή εκρηκτικά αέρια τα PLs καλούνται «πράσινο» διαλύτες. Για την εφαρμογή τους σε βιομηχανική κλίμακα περαιτέρω έρευνα πρέπει να διεξαχθεί για την μείωση του κόστους της διεργασίας, αφού οι PLs είναι ακριβοί και δεν έχουν αναπτυχθεί ακόμη αποτελεσματικές μέθοδοι για την ανάκτησή τους.

5.2.2.4. Προκατεργασία με οργανικούς διαλύτες

Σε αυτή την προκατεργασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα οργανικά ή υδατικά διαλύματα, όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, η γλυκόλη και η τετραϋδροφουρουλική αλκοόλη, με σκοπό την διαλυτοποίηση της λιγνίνης και την παραγωγή προκατεργασμένης κυτταρίνης καταλληλότερη για ενζυμική υδρόλυση.

Σε διάφορες μελέτες αυτά τα διαλύματα συνδυάστηκαν με την δράση όξινων καταλυτών (HCl, H₂SO₄, οξαλικό ή σαλικυλικό οξύ) για την διάσπαση των ημικυτταρινικών δεσμών. Μπορεί να επιτευχθεί υψηλή απόδοση ανάκτησης ξυλόζης με την προσθήκη κάποιου οξέος. Αυτή η μέθοδος μπορεί να συνδυαστεί με όξινη υδρόλυση για τον διαχωρισμό της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης σε έναν κλασματικό διαχωρισμό δύο σταδίων (το στάδιο της όξινης υδρόλυσης προηγείται του σταδίου προκατεργασίας με οργανικούς διαλύτες). Η απομάκρυνση των διαλυτών είναι απαραίτητη, χρησιμοποιώντας κατάλληλες μεθόδους διαχωρισμού όπως η εξάτμιση και η συμπύκνωση και ανακυκλώνονται έτσι ώστε να μειωθεί το λειτουργικό κόστος. Οι διαλύτες πρέπει να διαχωρίζονται γιατί μπορεί να δρουν σαν παρεμποδιστές στην ενζυμική υδρόλυση και στην ζύμωση. Η υψηλή εμπορική αξία των διαλυτών είναι ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας που πρέπει να εξεταστεί για την εφαρμογή αυτή της μεθόδου σε βιομηχανική κλίμακα (προτιμούνται αλκοόλες με χαμηλό μοριακό βάρος και με χαμηλό σημείο βρασμού όπως η αιθανόλη και η μεθανόλη) (Alvira et al. 2009).

5.2.3. Φυσικοχημική προκατεργασία

5.2.3.1. Προκατεργασία με έκρηξη ατμού (steam explosion)- Έκρηξη ατμού με προσθήκη SO₂

Είναι μία υδροθερμική προκατεργασία στην οποία το υλικό υπόκειται σε συμπιεσμένο ατμό για ένα χρονικό διάστημα (από δευτερόλεπτα μέχρι και λεπτά) και μετά απότομα αποσυμπιέζεται. Το υλικό που προκύπτει είναι πιο επιδεκτικό σε ενζυμική υδρόλυση εξαιτίας της υδρόλυσης της ημικυτταρίνης (η οποία καταλύεται από το οξικό και άλλα οξέα τα οποία απελευθερώνονται από τον ατμό και επίσης και το νερό δρα καταλυτικά σαν οξύ σε υψηλές θερμοκρασίες). Σε συνδυασμό με την υδρόλυση και την διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, η λιγνίνη απομακρύνεται μέχρι ένα βαθμό. Η απομάκρυνση της ημικυτταρίνης αυξάνει την ενεργή επιφάνεια της κυτταρίνης και αυξάνει την προσβασιμότητα των ενζύμων στα ινίδια κυτταρίνης. Τα πλεονεκτήματα αυτής της διεργασίας σχετικά με άλλες προκατεργασίες είναι: α) λιγότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις, β) χαμηλότερο κεφάλαιο επένδυσης, γ) περισσότερες δυνατότητες για ενεργειακή αποδοτικότητα, δ) πλήρης ανάκτηση των σακχάρων και λιγότερες επικίνδυνες διεργασίες με χημικά. Ωστόσο, με την προσθήκη όξινου καταλύτη η επιδεκτικότητα της κυτταρίνης σε ένζυμα αυξάνεται, η υδρόλυση της ημικυτταρίνης βελτιώνεται και, ανάλογα με την θερμοκρασία, ο σχηματισμός προϊόντων αποικοδόμησης μειώνεται.

Με σκοπό να μεγιστοποιηθεί η ανάκτηση των σακχάρων έχει προταθεί μία μέθοδος προκατεργασίας σε δύο στάδια. Στο πρώτο, η προκατεργασία πραγματοποιείται σε χαμηλή θερμοκρασία ώστε να διαλυτοποιηθεί το κλάσμα της ημικυτταρίνης και το κλάσμα της κυτταρίνης υπόκειται, στο δεύτερο στάδιο της προκατεργασίας, σε θερμοκρασίες άνω των 210° C. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτουν υψηλότερες αποδόσεις αιθανόλης και στην ενζυμική υδρόλυση απαιτούνται μικρότερες ποσότητες ενζύμων. Τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η μερική αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης και η παραγωγή μερικών τοξικών ενώσεων (ανάλογα με την πρώτη ύλη και τις συνθήκες της προκατεργασίας) που μπορεί να επηρεάσουν τα στάδια της υδρόλυσης και της ζύμωσης. Οι κυριότεροι παρεμποδιστές είναι παράγωγα φουρανίου, φαινολικές ενώσεις και ασθενή οξέα.

Η φουρφουράλη και η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη είναι τα κύρια παράγωγα του φουρανίου, τα οποία σχηματίζονται από την αποικοδόμηση των πεντοζών και των εξοζών, αντίστοιχα. Και τα δύο θεωρούνται ότι παρατείνουν την λανθάνουσα φάση στο στάδιο της ζύμωσης.

Τα ασθενή οξέα που σχηματίζονται κατά την διάρκεια της προκατεργασίας είναι κυρίως οξικά οξέα που προέρχονται από το κλάσμα της ημικυτταρίνης και οξέα όπως το μυρμηκικό που προέρχεται από περαιτέρω αποικοδόμηση της φουρφουράλης. Οι φαινολικές ενώσεις που σχηματίζονται προέρχονται από την διάσπαση της λιγνίνης και ποικίλλουν ανάλογα με την πρώτη ύλη. (Alvira et al. 2009, Eklund et al. 1995).

Η έκρηξη ατμού μπορεί να πραγματοποιηθεί με την προσθήκη διοξειδίου του θείου με σκοπό την βελτίωση της ανάκτησης των κλασμάτων κυτταρίνης και ημικυτταρίνης. Η προκατεργασία πραγματοποιείται με την προσθήκη διαλύματος SO₂ περιεκτικότητας 1-4%(w/w υποστρώματος) σε θερμοκρασίες 160-230° C για 10 λεπτά (Elmherst College. Charles E. Ophardt, 2003).

5.2.3.2. Υδροθερμόλυση (hydrothermolysis, liquid hot-water treatment)

Πρόκειται για μία υδροθερμική κατεργασία που δεν απαιτεί ραγδαία αποσυμπίεση και δεν χρησιμοποιεί κανένα καταλύτη ή χημικό. Πίεση εφαρμόζεται για την διατήρηση του νερού σε υγρή μορφή σε υψηλές θερμοκρασίες (160-240° C) και προκαλεί μετατροπές στη δομή του υλικού.

Ο στόχος αυτής της προκατεργασίας είναι η διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, η αύξηση της προσβασιμότητας της κυτταρίνης και η αποφυγή του σχηματισμού παρεμποδιστών. Το μίγμα που προκύπτει μετά την προκατεργασία μπορεί να φιλτραριστεί για την ανάκτηση δύο κλασμάτων: ένα στερεό κλάσμα πλούσιο σε κυτταρίνη και ένα υγρό κλάσμα πλούσιο σε σάκχαρα που προέρχονται από την ημικυτταρίνη (κυρίως ξυλόζη). Για την αποφυγή του σχηματισμού παρεμποδιστών το pH πρέπει να διατηρείται στο 4-7. Η προκατεργασία με θερμό νερό απομακρύνει μέχρι και το 80% της ημικυτταρίνης και ενισχύει την ενισχύει την επιδεκτικότητα του υλικού σε ένζυμα. Η λιγνίνη αποπολυμερίζεται και

διαλυτοποιείται μερικώς κατά την προκατεργασία αλλά η απολιγνινοποίηση μόνο με θερμό νερό δεν είναι δυνατή εξαιτίας της ανασυμπύκνωσης διαλυτών ενώσεων που προέρχονται από τη λιγνίνη.

Γενικά, η προκατεργασία με θερμό νερό είναι ελκυστική εξαιτίας του χαμηλού κόστους της. Δεν απαιτείται καταλύτης και το κόστος κατασκευής και συντήρησης είναι χαμηλό αφού υπάρχει χαμηλός κίνδυνος για διάβρωση. Έχει επίσης το μεγάλο πλεονέκτημα της μειωμένης συγκέντρωσης αποικοδομήσιμων προϊόντων και αυτό οφείλεται στο ότι τα διαλυμένα προϊόντα της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση εξαιτίας των υψηλών ποσοτήτων νερού που χρησιμοποιούνται .

Ωστόσο, αυτή η διεργασία απαιτεί υψηλές ποσότητες νερού και περισσότερη ενέργεια από ότι διεργασίες που όπως η προκατεργασία με εκτόνωση ατμού. (Alvira et al. 2009, Eklund et al. 1995).

6.2.3.3. Υγρή προκατεργασία οξείδωσης

Η υγρή προκατεργασία οξείδωσης είναι μία οξειδωτική μέθοδος προκατεργασίας που χρησιμοποιεί οξυγόνο ή αέρα ως καταλύτη. Η προκατεργασία πραγματοποιείται για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασίες 170-200° C και σε πιέσεις 10-12 bar οξυγόνου. Η προσθήκη οξυγόνου σε θερμοκρασίες πάνω από 170° C καθιστά τη διεργασία εξώθερμη μειώνοντας τις ενεργειακές δαπάνες. Οι κύριες αντιδράσεις στην υγρή προκατεργασία οξείδωσης είναι ο σχηματισμός οξέων από τις υδρολυτικές διαδικασίες και οι οξειδωτικές αντιδράσεις. Αυτή η μέθοδος είναι αποτελεσματική για την διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης αλλά είναι κατάλληλη για υλικά χαμηλής περιεκτικότητας σε λιγνίνη, αφού η απόδοση δείχνει να μειώνεται όταν αυξάνεται η περιεκτικότητα σε λιγνίνη και αφού ένα μεγάλο μέρος της λιγνίνης οξειδώνεται και διαλύεται. Επιπλέον, το κόστος του οξυγόνου θεωρείται ότι είναι το σημαντικότερο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου (Alvira et al. 2009, Hayes 2009).

5.2.3.4. Εκτόνωση ίνας με αμμωνία (Ammonia fiber explosion, AFEX)

Σε αυτή την προκατεργασία το υλικό κατεργάζεται με υγρή άνυδρη αμμωνία σε θερμοκρασίες 60-100° C και σε υψηλές πιέσεις (άνω των 3 MPa) για διάφορα χρονικά διαστήματα (10-60 λεπτά). Περίπου 2 kg αμμωνίας απαιτούνται ανά kg ξηρής βιομάζας. Σε αυτήν την μέθοδο πραγματοποιείται εκτονωτική αποσυμπίεση με αποτέλεσμα την ραγδαία διαστολή της αμμωνίας (σε αέρια φάση) που προκαλεί την διόγκωση των πόρων του υλικού, την μηχανική διαταραχή των ινών του υλικού και μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Να σημειωθεί ότι σε αντίθεση με άλλες μεθόδους, το προκατεργασμένο υλικό που προκύπτει με αυτή τη διεργασία είναι στερεό. Κατά την διεργασία μόνο ένα μικρό μέρος του στερεού υλικού διαλυτοποιείται, κυρίως ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Η ανάκτηση και η ανακύκλωση της αμμωνίας είναι εφικτή εξαιτίας της υψηλής της πτητικότητας όμως η πολυπλοκότητα και το κόστος για αυτές τις διεργασίες είναι σημαντικά. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν παρατηρείται σχηματισμός παρεμποδιστών. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος είναι περισσότερο αποτελεσματική σε υλικά με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη.

Ένας άλλος τύπος διεργασίας που χρησιμοποιεί αμμωνία είναι η μέθοδος της ανακύκλωσης και διήθησης της αμμωνίας (ammonia recycle percolation). Σε αυτή την διεργασία υδατική αμμωνία διαπερνά τη βιομάζα σε αυξανόμενες θερμοκρασίες (140-210° C) με την αμμωνία να ανακτάται αργότερα. Αυτή η μέθοδος είναι αποτελεσματική στην απομάκρυνση της λιγνίνης (κυρίως σε αγροτικά υπολείμματα) στην διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης διατηρώντας ανέπαφο το κλάσμα της κυτταρίνης (Alvira et al. 2009, Hayes 2009).

5.2.3.5. Προκατεργασία με χρήση μικροκυμάτων

Σε αυτήν την μέθοδο το υλικό επεξεργάζεται με αραιά χημικά διαλύματα και στη συνέχεια το μίγμα ακτινοβολούνται με μικροκύματα για χρόνος που κυμαίνονται από 5 μέχρι και 20 λεπτά. Ο Zhu (2006) έδειξε ότι η χρήση αλκαλικών διαλυμάτων είναι κατάλληλη για αυτή την μέθοδο προκατεργασίας. Το πιο αποτελεσματικό αλκαλικό διάλυμα αποδείχτηκε ότι ήταν το NaOH (Alvira et al. 2009).

5.2.3.6. Έκρηξη CO₂

Αυτή η μέθοδος προκατεργασίας βασίζεται στην χρησιμοποίηση του CO₂ ως υπερκρίσιμου ρευστού δηλαδή ενός ρευστού που είναι σε αέρια μορφή που όμως έχει συμπιεστεί σε θερμοκρασίες πάνω από το κρίσιμο σημείο του με αποτέλεσμα η πυκνότητά του να είναι σαν υγρού ρευστού. Οι συνθήκες που απαιτούνται για να φτάσει το ρευστό σε υπερκρίσιμη κατάσταση απομακρύνουν αποτελεσματικά την λιγνίνη. Η προσθήκη διαλυμάτων όπως η αιθανόλη βελτιώνει την απολιγνινοποίηση. Σε υδατικά διαλύματα το CO₂ σχηματίζει οργανικά οξέα τα οποία ευνοούν το μετέπειτα στάδιο της υδρόλυσης. Το μέγεθος των μορίων CO₂ είναι ισοδύναμο με το μέγεθος των μορίου νερού και αμμωνίας και μπορούν να εισχωρήσουν με τον ίδιο τρόπο στους πόρους του υλικού. Αυτός ο μηχανισμός διευκολύνεται από τις υψηλές πιέσεις που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη μέθοδο. Μετά την εκτονωτική αποσυμπίεση του CO₂ επέρχεται διαταραχή στη δομή της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης με αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργής επιφάνειας του υλικού. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους αυτή η μέθοδος λειτουργεί σε χαμηλές θερμοκρασίες και ως εκ τούτου δεν παρατηρείται αποικοδόμηση μονοσακχαριτών αλλά σε σύγκριση με την έκρηξη ατμού ή την έκρηξη αμμωνίας οι αποδόσεις των σακχάρων που ανακτούνται είναι χαμηλότερες. Επίσης απαιτούνται ιδιαίτερα υψηλές πιέσεις.

Ωστόσο είναι οικονομικά αποδοτικότερο από την προκατεργασία με έκρηξη αμμωνίας και έχει χαμηλότερο σχηματισμό παρεμποδιστών από την προκατεργασία με έκρηξη ατμού. Επίσης η χρησιμοποίηση του CO₂ είναι ελκυστική εναλλακτική για την μείωση του κόστους αφού παράγεται ούτως ή άλλως στο στάδιο της

ζύμωσης. Άλλα πλεονεκτήματα του CO₂ είναι ότι είναι μη τοξικό, μη εύφλεκτο και ανακτάται εύκολα (Alvira et al. 2009).

6.2.4. Βιολογικές προκατεργασίες

Η βιολογική προκατεργασία μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς που διασπούν τη λιγνίνη και την ημικυτταρίνη. Αυτή η μέθοδος θεωρείται ότι είναι φιλική προς το περιβάλλον και ενεργειακά οικονομική καθώς πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες και δεν χρειάζεται την προσθήκη χημικών. Ωστόσο, ο ρυθμός των βιολογικών μεθόδων προκατεργασίας είναι πολύ χαμηλός για βιομηχανική χρήση και μερικά υλικά χάνονται καθώς οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν, σε κάποιο βαθμό, ημικυτταρίνη, λιγνίνη ή και κυτταρίνη. Παρόλα αυτά αυτή η μέθοδος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν ένα πρώτο στάδιο ακολουθούμενο από μία άλλη μέθοδο προκατεργασίας (Hayes 2009).

Πίνακας 3: Σύνοψη των σημαντικότερων μεθόδων προκατεργασίας, είδη χημικών ενώσεων/διαλυτών ή καταλυτών που χρησιμοποιούνται, και επίδραση στη βιομάζα και τα παραγόμενα προϊόντα.

Είδος προκατεργασίας	Χημική ένωση/καταλύτης	Επίδραση στη βιομάζα
Όξινη- Αραιό οξύ (<6%)	<ul style="list-style-type: none"> Ανόργανο: H₂SO₄, HCl, H₃PO₄, HNO₃ Οργανικό:οξικό, γαλακτικό,μηλεϊνικό, φουμαρικό, μυρμηκικό, οξαλικό 	<ul style="list-style-type: none"> Υδρόλυση της ημικυτταρίνης Μερική απομάκρυνση λιγνίνης Μικρή ή καθόλου υδρόλυση κυτταρίνης <ul style="list-style-type: none"> Σχηματισμός προϊόντων αποικοδόμησης (φουρφουράλη, HMF, λεβουλινικό οξύ, μυρμηκικό οξύ)
Αλκαλική	<ul style="list-style-type: none"> Ανόργανη: NaOH, KOH, Ca(OH)₂ Οργανική: NH₃, Αμμωνία (εμβάπτιση), Αμμωνία Recycle Percolation 	<ul style="list-style-type: none"> Διάσπαση δεσμών λιγνίνης- ημικυτταρίνης, Απομάκρυνση λιγνίνης <ul style="list-style-type: none"> Απομάκρυνση οξικού/ουρονικών οξέων από την ημικυτταρίνη Ελάττωση κρυσταλλικότητας Κυτταρίνης

Υδροθερμική/ Ατμός	CH ₃ COOH (λόγω της υδρόλυσης των οξικών εστέρων της ημικυτταρίνης που περιέχονται στη βιομάζα, απελευθερώνεται οξικό οξύ που δρα ως καταλύτης προκατερργασίας ελατώνοντας το pH των υγρών)	<ul style="list-style-type: none"> • Απομάκρυνση οξικού οξέος από ημικυτταρίνη • Υδρόλυση ημικυτταρίνης • Μερική απομάκρυνση λιγνίνης • Μικρή ή καθόλου απομάκρυνση κυτταρίνης • Διάσπαση ινών (έκρηξη ατμού) • Σχηματισμός προϊόντων αποικοδόμησης (φουρφουράλη, HMF, λεβουλιλικό οξύ, μυρμηκικό οξύ)
Συνδυασμός φυσικής/χημικής (οξύ)	<ul style="list-style-type: none"> • Καταλυόμενη έκρηξη ατμού με H₂SO₄ • Καταλυόμενη έκρηξη ατμού με SO₂ • Έκρηξη υπερκρίσιμου CO₂ • Θειώδη και μηχανική μείωση μεγέθους (SPORL) 	<ul style="list-style-type: none"> • Βελτιωμένη απομάκρυνση ημικυτταρίνης • Ελάττωση κρυσταλλικότητας κυτταρίνης • Διαλυτοποίηση ημικυτταρίνης, μερική απομάκρυνση λιγνίνης, • Ελάττωση μεγέθους σωματιδίων
Συνδυασμός φυσικής/χημικής (βάση)	Έκρηξη ινών με Αμμωνία (AFEX)	<ul style="list-style-type: none"> • Μείωση κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης • Αλλαγές στη λιγνίνη • Απομάκρυνση οξικού οξέος από ημικυτταρίνη • Αύξηση διαθέσιμης επιφάνειας • Αύξηση ενζυμικής υδρόλυσης με μικρή ποσότητα ενζύμου
Οξειδωτική	Οζονισμός (O ₃) Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H ₂ O ₂) Υγρή οξείδωση (O ₂) Υπεροξικό οξύ Ένζυμα (Λακάσες)	<ul style="list-style-type: none"> • Επιλεκτική απομάκρυνση λιγνίνης • Απομάκρυνση λιγνίνης και ημικυτταρίνης • Διαλυτοποίηση ημικυτταρίνης και λιγνίνης

		<ul style="list-style-type: none"> • Επιλεκτική απομάκρυνση λιγνίνης • Απολιγνινοποίηση με τη χρήση φυσικών ή προθέτων ενδιάμεσων ενώσεων
--	--	---

6. Μέθοδοι υδρόλυσης – Χημική και ενζυμική υδρόλυση

Η υδρόλυση περιλαμβάνει διάσπαση των πολυμερών της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης σε μονομερή τους. Η ολοκληρωμένη υδρόλυση της κυτταρίνης δίνει γλυκόζη, ενώ η ημικυτταρίνη δίνει αρκετές πεντόζες και εξόζες. Ενώ η μαλακή ημικυτταρίνη αποτελείται κυρίως από μαννόζη, το κυρίαρχο σάκχαρο στην ημικυτταρίνη του σκληρού ξύλου ή των υπολειμμάτων της συγκομιδής είναι συνήθως η ξυλόζη. Στην υδρόλυση επίσης περιλαμβάνεται η διάσπαση του αμύλου. Η υδρόλυση του αμύλου δίνει σε πρώτο στάδιο μαλτοδεξτρίνες και τέλος την παραγωγή γλυκόζης.

6.1. Χημική υδρόλυση

Η χημική υδρόλυση περιλαμβάνει έκθεση του υλικού σε ένα χημικό για μια χρονική περίοδο σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, και οδηγεί σε μονομερή σάκχαρα. Τα οξέα εφαρμόζονται κατά κύριο λόγο σε χημικές υδρολύσεις. Το θειικό οξύ είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιημένο, αν και άλλα οξέα όπως το HCL έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί. Οι υδρολύσεις οξέος μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες : α) την συμπυκνωμένη - όξινη υδρόλυση και β) την αραιή όξινη υδρόλυση.

Μεταξύ των δύο μεθόδων της χημική υδρόλυσης, η αραιή - όξινη υδρόλυση συνήθως εφαρμόζεται. Είναι μια μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως προκατεργασία και προηγείται της ενζυμικής υδρόλυσης, ή ως πραγματική μέθοδος υδρόλυσης (Doreen Steffien, 2014).

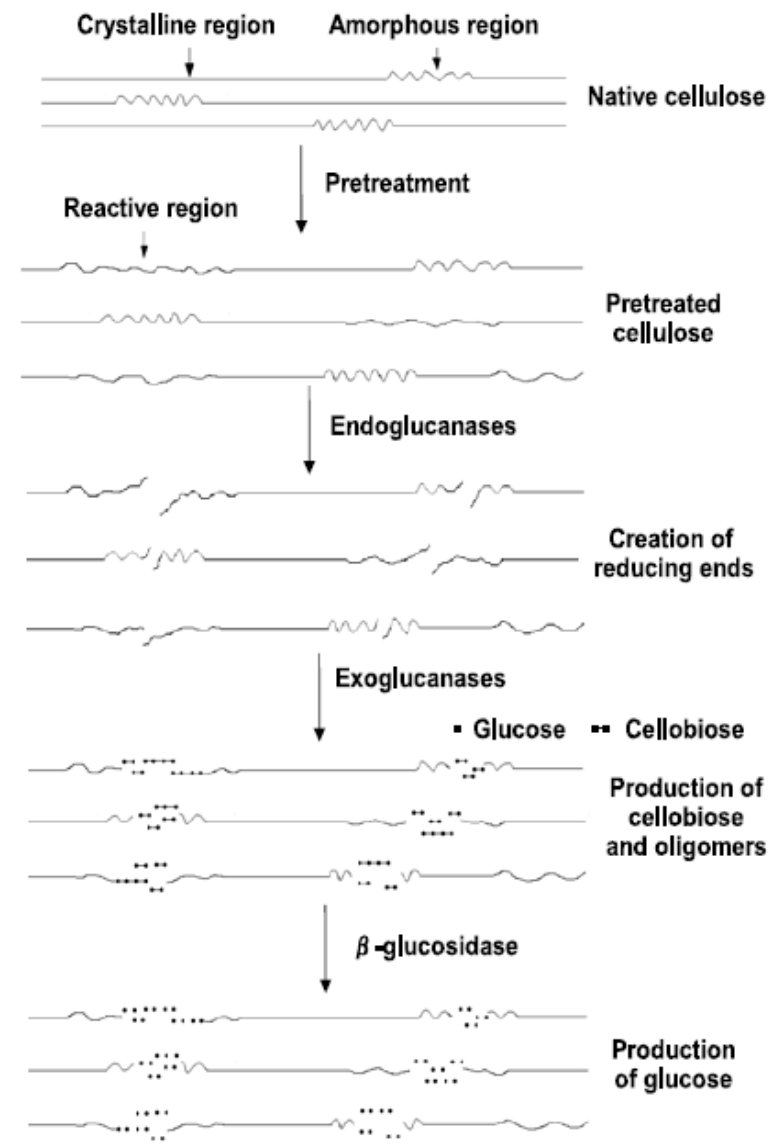
6.2. Ενζυμική υδρόλυση

Η ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης και του αμύλου είναι μία αρκετά ελκυστική μέθοδος λόγω της χαμηλής παραγωγής παραπροϊόντων κατά την υδρολυτική διαδικασία, τις χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις και τις ήπιες συνθήκες λειτουργίας.

Πριν την ενζυμική υδρόλυση, η οποία είναι και η διεργασία που επικράτησε στην παρούσα εργασία, είναι απαραίτητο να προηγηθεί μία προκατεργασία της βιομάζας, η οποία θα αυξήσει την επιδεκτικότητα του αμύλου και της κυτταρίνης στις διάφορες ενζυμικές δράσεις.

Η κυτταρίνη είναι ο κύριος πολυσακχαρίτης που απομένει μετά από τις περισσότερες προκατεργασίες. Τρία είδη ενζύμων δρουν συνεργιστικά για την υδρόλυση της κυτταρίνης (κατά UIPAC):

1. Ενδογλυκανάσες ή ένδο-1,4-β-D-γλυκάνο γλυκανοϋδρολάσες: Οι ενδογλυκανάσες διασπούν το γλυκοζιτικό δεσμό σε τυχαίες θέσεις στο εσωτερικό της αλυσίδας της κυτταρίνης και σε άμορφες περιοχές (μη κρυσταλλικές, δηλαδή περιοχές που η δομή των αλυσίδων είναι πιο άτακτη). Παράγουν διαλυτούς ολιγοσακχαρίτες με διάφορα μεγέθη και δημιουργούν νέα άκρα στην κυτταρινική αλυσίδα. Είναι δραστικές έναντι άμορφης κυτταρίνης και διαλυτά παράγωγα κυτταρίνης όπως η καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC).
2. Εξωγλυκανάσες ή 1, 4-β-D- ολιγογλυκανο κελλοβιοϋδρολάσες: Είναι γνωστές και ως κελλοδεξτρινάσες, και καταλύουν την παραγωγή κελλοβιόζης από κελλοολιγοσακχαρίτες (δηλαδή διαλυτά ολιγομερή της κυτταρίνης, όπως αυτά που παράγονται από τις ενδογλυκανάσες) αλλά δεν είναι δραστικές έναντι της άμορφης κυτταρίνης ή της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης.
3. β-γλυκοσιδάσες ή β-D-γλυκοσιδο γλυκοϋδρολάσες: Υδρολύουν την κελλοβιόζη και τις διαλυτές κελλοδεξτρίνες παράγοντας γλυκόζη, ενώ δεν είναι δραστικές έναντι της κρυσταλλικής ή της άμορφης κυτταρίνης. (Ning Guo et al.2013)



Εικόνα 11: Απεικόνιση ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης από τα ένζυμα: ενδο-1,4-β-γλουκανάση, εξω-1,4-β-D-γλουκανάση, β-γλυκοζιδάση (Doreen Steffien, 2014)

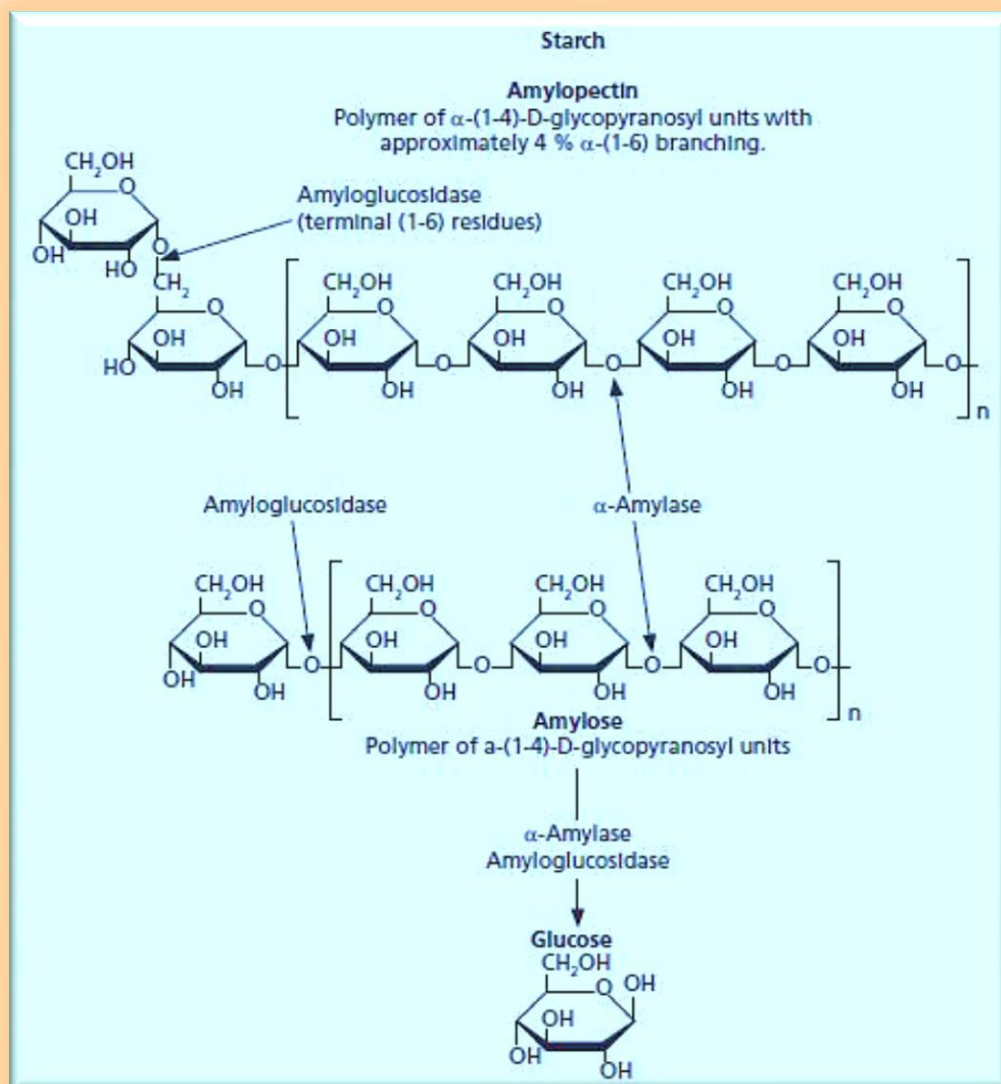
Η κύρια κατηγορία των ενζύμων που υδρολύουν τους α-(1 → 4) δεσμούς του αμύλου είναι οι α-αμυλάσες. Αυτά τα ένζυμα παράγονται από βακτήρια, μύκητες, φυτά και ζώα.

Οι α-αμυλάσες είναι ενδο-ενεργά ένζυμα που προσβάλλουν τα εσωτερικά τμήματα των πολυμερικών αλυσίδων του αμύλου, προκαλώντας μια ταχεία μείωση του ιξώδους και μια ταχεία μεταβολή του χρώματος ιωδιούχου διαλύματος. Λόγω των ιδιοτήτων αυτών, μερικές φορές ονομάζονται “ένζυμα υγροποίησης”. Όταν η α-αμυλάση αντιμετωπίσει μια αλυσίδα αμύλου και υδρολύσει τον α-(1 → 4) δεσμό, παράγονται μαλτοδεξτρίνες χαμηλού μοριακού βάρους με μια διαδικασία που

ονομάζεται “πολλαπλή επίθεση” σε μία από τις δύο αλυσίδες που αρχικά είχαν διασπαστεί. (Robyt JF, 1967 , Robyt JF, 1970).

Μια κοινή παρανόηση σχετικά με τη δράση των α-αμυλασών είναι ότι δρουν τυχαία, αλλά αυτό δεν είναι αλήθεια. Τα κύρια προϊόντα μαλτοδεξτρίνης που σχηματίζονται είναι συγκεκριμένου μεγέθους και εξαρτώνται από την ιδιαίτερη βιολογική πηγή της α-αμυλάσης.

Μια ακόμη πιο κοινή παρανόηση σχετικά με τη δράση των α-αμυλασών είναι ότι η γλυκόζη είναι το κύριο προϊόν. Η γλυκόζη, στην πραγματικότητα, είναι ένα δευτερεύον προϊόν, που παράγεται από μια αργή δευτερεύουσα υδρόλυση της πρωτογενούς μαλτοδεξτρίνης μετά από δράση του ενζύμου αμυλογλυκοζιδάση (Robyt JF, 1967).



Εικόνα 12: Ενζυμική υδρόλυση αμύλου(Siegrist, 2013)

Σύγκριση όξινης – ενζυμικής υδρόλυσης (Συνοπτική παρουσίαση)

Πίνακας 4: Σύγκριση μεταξύ αραιής-όξινης και ενζυμικής υδρόλυσης (Doreen Steffien, 2014)

Μεταβλητές σύγκρισης	Αραιή- όξινη υδρόλυση	Ενζυμική υδρόλυση
Ήπιες συνθήκες υδρόλυσης	όχι	ναι
Υψηλές αποδόσεις υδρόλυσης	όχι	ναι
Αναστολή προϊόντος κατά την υδρόλυση	όχι	ναι
Σχηματισμός ανασταλτικών παραπροϊόντων	ναι	όχι
Χαμηλό κόστος του καταλύτη	ναι	όχι
Μικρός χρόνος υδρόλυσης	ναι	όχι

7. Αλκοολική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση γίνεται με έναν πολύπλοκο μηχανισμό, τα διάφορα στάδια του οποίου καταλύονται από μια σειρά ενζύμων.

7.1. Παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης

Τα παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης είναι χημικές ενώσεις που προέρχονται είτε από τον μηχανισμό της, είτε από άλλες παράλληλες χημικές, είτε τέλος κατά την ωρίμανση των προϊόντων ζύμωσης. Τα κυριότερα παραπροϊόντα είναι:

- ❖ **Μεθανόλη:** Δεν προέρχεται από τον μηχανισμό της αλκοολικής ζύμωσης, αλλά παράγεται από την απομεθυλίωση των πηκτινών που περιέχονται στο υπόστρωμα.

- ❖ **Ανώτερες αλκοόλες:** Οι κυριότερες ανώτερες αλκοόλες είναι οι προπανόλη-1, βουτανόλη-1, βουτανόλη-2, 2-μέθυλοπροπανόλη-1, 2-μέθυλοβουτανόλη-1, πεντανόλη-1 και εξανόλη-1. Παράγονται κατά την απαμίνωση των ελεύθερων αμινοξέων, αλλά και των αμινοξέων που προκύπτουν από την πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών της ζύμης και του υποστρώματος.
- ❖ **Γλυκερίνη:** Είναι ενδιάμεσο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης. Ο σχηματισμός της ευνοείται από χαμηλές θερμοκρασίες, υψηλή περιεκτικότητα σε τρυγικό οξύ και από την προσθήκη SO₂.
- ❖ **Ακεταλδεΰδη:** Είναι ενδιάμεσο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης που προκύπτει, από την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος. Αν προστεθεί NaHSO₃ και SO₂ στο σακχαρούχο υπόστρωμα πριν τη ζύμωση ή κατά την διάρκεια της, η παραγόμενη ακεταλδεΰδη σχηματίζει προϊόν προσθήκης και έτσι δεν ανάγεται περαιτέρω προς αιθανόλη.
- ❖ **Εστέρες:** Σπουδαιότερος είναι ο οξικός αιθυλεστέρας CH₃COOC₂H₅, ο οποίος σχηματίζεται από την αντίδραση του οξικού οξέος με την αιθανόλη (Yoshioka et al, 1984).
- ❖ **Οξέα:** Κυριότερο είναι το οξικό οξύ, το οποίο παράγεται ως κανονικό προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης σε ποσότητες μικρότερες από 300 mg/l. Υψηλά επίπεδα οξικού οξέος, συνήθως σχετίζονται με παρουσία στο εκχύλισμα βακτηρίων του οξικού και του γαλακτικού οξέος.
- ❖ **Ακετάλες:** Σχηματίζονται από την αντίδραση της ακεταλδεΰδης με την αιθανόλη. (Σ. Μπερζεγιάννη, 2011)

7.2. Αναστολείς της αλκοολικής ζύμωσης

Υπάρχουν ορισμένοι χημικοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να μειώσουν την απόδοση της αλκοολικής ζύμωσης ή ακόμα και να την αναστείλουν. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να ελέγχονται. Οι πιο σημαντικοί από τους αναστολείς είναι:

- ❖ **Αιθανόλη:** Το ίδιο το προϊόν δρα σαν αναστολέας σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Αλκοολικοί βαθμοί μεγαλύτεροι των 5 αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό ορισμένων ζυμών, ενώ σε βαθμούς μεγαλύτερους των 12 τα περισσότερα κύτταρα θανατώνονται.

- ❖ **Φορμαλδεΰδη:** Η HCHO που χρησιμοποιείται με την μορφή φορμόλης ως αντισηπτικό ενάντια στα βακτήρια, υπό ορισμένες συνθήκες αναστέλλει την αλκοολική ζύμωση.
- ❖ **Θειώδες οξύ:** Το H₂SO₃ χρησιμοποιείται συνήθως για τη θείωση στις οينوδεξαμενές πρέπει να είναι ελεύθερο αρσενικού, γιατί σε αντίθετη περίπτωση αποτελεί αναστολέα της ζύμωσης.
- ❖ **Μέταλλα:** Ορισμένα μέταλλα όπως το Cd, ο Cu, ο Pb, και ο Hg σε ορισμένες συγκεντρώσεις δρουν σαν αναστολείς (Σ. Μπερζεγιάννη, 2011).

7.3. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για παραγωγή βιοαιθανόλης

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση της αλκοολικής ζύμωσης είναι κυρίως οι ζύμες και ορισμένα βακτήρια (πίνακας 5)

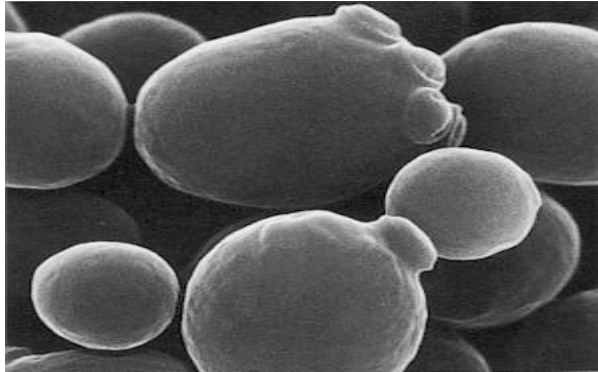
Οι μικροοργανισμοί είναι σημαντικότερος παράγοντας στην μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη. Υπάρχουν αρκετά σημαντικά ή τουλάχιστον επιθυμητά χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτει ένας μικροοργανισμός για την βιομηχανική διεργασία μετατροπής του υδρολύματος σε αιθανόλη. Παρακάτω παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα τα χαρακτηριστικά αυτά:

Πίνακας 5: Επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός μικροοργανισμού που θα χρησιμοποιηθεί για την αποτελεσματική βιομετατροπή της βιομάζας σε αιθανόλη. (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2012)

Βασικά χαρακτηριστικά	Επιθυμητά χαρακτηριστικά
Δυνατότητα χρήσης μεγάλου εύρους υποστρωμάτων (εξόζες-πεντόζες)	Ταυτόχρονο μεταβολισμό διαφορετικών σακχάρων
Υψηλή απόδοση αιθανόλης και αυξημένη ογκομετρική παραγωγικότητα	Δυνατότητα υδρόλυσης κυτταρίνης και ημικυτταρίνης
Ελάχιστη παραγωγή παραπροϊόντων	GRAS Status
Υψηλή αντοχή σε αιθανόλη και παρεμποδιστές	Ελάχιστη απαίτηση για προσθήκη θρεπτικών ουσιών
Αυξημένη αντοχή σε επίπονες διεργασίες	Αντοχή σε χαμηλές τιμές pH και υψηλές θερμοκρασίες

7.3.1. Ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae*

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο *Saccharomyces cerevisiae*, ο οποίος παρέχει υψηλή παραγωγικότητα και απόδοση σε αιθανόλη ενώ εμφανίζει μεγάλη ανθεκτικότητα απέναντι σε αυτή.



Εικόνα 13: Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* [<http://www.bath.ac.uk/bio-sci/wheals2.htm>].

Σε κατάλληλο περιβάλλον ακόμα και με μικρό αρχικό πληθυσμό πολλαπλασιάζεται περνώντας διαδοχικά από τις φάσεις: λανθάνουσα, εκθετικής ανάπτυξης, στασιμότητας και θανάτου. Ο *S.c* λειτουργεί σε περιοχές pH 3,0 – 7,5 με την άριστη περιοχή να είναι συνάρτηση και της θερμοκρασίας. Είναι μεσόφιλος οργανισμός με ευνοϊκή θερμοκρασία από 20 έως 40° C. Η απόδοση σε αιθανόλη αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας έως 30-32° C ενώ με περαιτέρω αύξηση επέρχεται μείωση στην απόδοση (Θ Τσούτσος, Διδακτορική διατριβή, 1990).

Το υπόστρωμα του *S.c* αποτελείται από γλυκόζη, ανόργανα άλατα και θρεπτικό πρόσθετο. Η γλυκόζη αποτελεί μέσον διατροφής και πηγή ενέργειας του κυττάρου και επηρεάζει την συγκέντρωση της ζύμης και την παραγωγή αιθανόλης. (Θ. Τσούτσος Διδακτορική διατριβή 1990, Chen 1981).

Η συγκέντρωση του διαλυμένου O₂ έχει μεγάλη επίδραση στο ρυθμό μικροβιακής ανάπτυξης και της παραγωγής των προϊόντων. Αύξηση της συγκέντρωσης του διαλυμένου O₂ ευνοεί τον σχηματισμό προϊόντων μέσα από έντονα οξειδωτικά ενδιάμεσα στάδια, ενώ η μείωση του ευνοεί το σχηματισμό προϊόντων με αναγωγικές δράσεις. Γενικά οι αναερόβιες συνθήκες ευνοούν το μεταβολισμό της γλυκόζης σε αιθανόλη, ενώ σε αερόβιες σχηματίζεται ζύμη η οποία όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο υπόστρωμα φτάσει τα 70 g/L, μετατρέπεται μερικά

σε αιθανόλη και CO₂. Μικρή συγκέντρωση O₂ ωστόσο είναι απαραίτητη για διάφορες λειτουργίες της ζύμης. (Θ Τσούτσος, Διδακτορική διατριβή, 1990)

8. Τεχνολογίες παραγωγής βιοαιθανόλης

Διακριτή υδρόλυση και ζύμωση (SHF)

Το προεπεξεργασμένο υλικό υδρολύεται σε γλυκόζη και στη συνέχεια οδηγείται προς ζύμωση για παραγωγή αιθανόλης σε ξεχωριστές μονάδες. Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι είναι δυνατή η διεξαγωγή της υδρόλυσης της κυτταρίνης και της ζύμωσης σε δικές τους βέλτιστες συνθήκες. Η συσσώρευση των τελικών προϊόντων της υδρόλυσης (γλυκόζη και κελλοβιόζη) παρεμποδίζει τη δράση των κυτταρινασών, ιδιαίτερα τη β-γλυκοζιδάση που καταλύει την υδρόλυση της κελλοβιόζης σε γλυκόζη. Το αποτέλεσμα είναι η μείωση του ρυθμού σακχαροποίησης και της τελικής συγκέντρωσης των σακχάρων, που οδηγούν σε μικρότερη απόδοση αιθανόλης, το οποίο αποτελεί και το κύριο μειονέκτημα της SHF. (Doreen Steffien, 2014)

Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF)

Στο σύστημα αυτό, σακχαροποίηση και ζύμωση λαμβάνουν χώρα στον ίδιο αντιδραστήρα, υπό συνθήκες όσο το δυνατόν πιο άριστες τόσο για τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση, όσο και για τον μικροοργανισμό που χρησιμοποιείται για τη ζύμωση. Η SSF συγχωνεύει την υδρόλυση της κυτταρίνης και τη ζύμωση των εξοζών σε ένα στάδιο, ενώ η παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων και η ζύμωση των πεντοζών που προκύπτουν από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης πραγματοποιούνται σε δύο επιπρόσθετα ξεχωριστά στάδια.

Με την SSF επιτυγχάνουμε μεγαλύτερες αποδόσεις παραγωγής αιθανόλης, σε σχέση με την SHF, καθώς η παρεμπόδιση από την παραγωγή της γλυκόζης και κελλοβιόζης αντιμετωπίζεται από την άμεση κατανάλωσή τους κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Έχει μικρότερες απαιτήσεις στην ποσότητα των ενζύμων που χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση, μικρότερο χρονική διάρκεια της διεργασίας,

καθώς επίσης και μικρότερο κίνδυνο μόλυνσης του μέσου καλλιέργειας από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς λόγω της παρουσίας αιθανόλης.

Παρ' όλα αυτά, το μεγαλύτερο μειονέκτημα της διεργασίας αυτής είναι οι διαφορετικές βέλτιστες συνθήκες που απαιτούνται για την υδρόλυση της κυτταρίνης και τη ζύμωση. Οι κυτταρινάσες υδρολύουν σε ένα άριστο pH 4-5 και σε θερμοκρασία 40-50° C, ενώ η ζύμωση των εξοζών πραγματοποιείται στους 30° C και pH 4-5. Γι'αυτό χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν ανασυνδυασμένοι μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να ζυμώσουν την γλυκόζη, την ξυλόζη και αραβινόζη. (Doreen Steffien, 2014)

Άμεση μικροβιακή μετατροπή – ενοποιημένη βιοδιεργασία (CBP)

Στο σύστημα αυτό, όλα τα απαραίτητα στάδια βιομετατροπής του κυτταρινούχου υλικού σε αιθανόλη, δηλαδή η παραγωγή των σακχαρολυτικών ενζύμων (κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες), η υδρόλυση του υποστρώματος σε απλούστερα σάκχαρα (πεντόζες και εξόζες) και η ζύμωση αυτών σε αιθανόλη, πραγματοποιούνται σε ένα μόνο στάδιο.

Η βασική διαφορά της άμεσης μικροβιακής μετατροπής από τις υπόλοιπες είναι η απουσία ξεχωριστού σταδίου για την παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την απαλοιφή του κόστους που σχετίζεται με αυτό το στάδιο. Σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους, ολόκληρη η ποσότητα της πρώτης ύλης είναι διαθέσιμη για την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων. Υπάρχει ακόμα η δυνατότητα χρήσης κυτταρινάσων με μεγάλη ειδική ενεργότητα και είναι εφικτή η συνεργεία ενζύμου – μικροοργανισμού. Αποτέλεσμα είναι η αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης και η περαιτέρω μείωση του κόστους επένδυσης λόγω μείωσης του όγκου του αντιδραστήρα. Επιπλέον, με τη μέθοδο αυτή μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος, καθώς και βελτίωση της σταθερότητας των καλλιεργειών και των στελεχών που χρησιμοποιούνται (Doreen Steffien, 2014). Ωστόσο, η CBP είναι μια μη αποτελεσματική διαδικασία λόγω της μικρής απόδοσης αιθανόλης και της μακράς περιόδου ζύμωσης. (Szciodrak J., Fiedurek J., 1996).

Υλικά και μέθοδοι

1. Πρώτη ύλη

Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι διατροφικά απορρίμματα, τα οποία ελήφθησαν από τη Μονάδα Περιβαλλοντικής Επιστήμης και Τεχνολογίας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ.

Η σύστασή τους βρέθηκε ότι είναι η παρακάτω:

Πίνακας 6: Σύσταση διατροφικών απορριμμάτων

Συστατικό	Περιεκτικότητα (%w/w, ξηρή βάση)
Υδατοδιαλυτά	39.29±0.03
Γλυκόζη	4.17±0.014
Ολικά διαλυτά σάκχαρα	17.4±0.65
Λίπη	6.63±0.023
Πρωτεΐνη	12.00±1.00
Πηκτίνη	1.48±0.24
Ημικυτταρίνη	4.98±0.03
Κυτταρίνη	11.8±0.50
Άμυλο	9.93±1.30
Τέφρα	12.79±0.14

*Υγρασία: 8,06±0,28% (β/β)

2. Μικροοργανισμός

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή αιθανόλης στην παρούσα εργασία είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* (ξηρή μαγιά αρτοποιίας – Γιώτης Α.Ε.).

3. Χημικά αντιδραστήρια

Για την μελέτη της προκατεργασίας χρησιμοποιήθηκε H_2SO_4 (1g/100g υποστρώματος).

Για την ενζυμική υδρόλυση χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα προσφορά της εταιρείας Novozymes A/S (Δανία):

❖ Αμυλάσες:

- Liquezyme SC DS : πρόκειται για ένα μείγμα αμυλασών με υψηλό επίπεδο α- αμυλάσης. Ο ρόλος του είναι να σπάει σε διάφορα σημεία το άμυλο υδρολύοντας τον α-(1 → 4) δεσμό, παράγοντας μαλτοδεξτρίνες χαμηλού μοριακού βάρους.
- Spirizyme Fuel: πρόκειται για μια αμυλογλυκοζιδάση. Βοηθάει στην υδρόλυση των μαλτοδεξτρινών για την παραγωγή γλυκόζης.

Η βέλτιστη θερμοκρασία και το pH για τα αμυλολυτικά εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα είναι 65° C και το pH να κυμαίνεται από 5.0- 5.5 .

❖ Κυτταρινάσες:

- Cellic® CTec2 : πρόκειται για ένα μείγμα κυτταρινασών, υψηλού επιπέδου β-γλυκοσιδάσης και ημικυτταρινάσης.
- Celluclast 1.5L(κυτταρινάση): πρόκειται για μίγμα κελλοβιοϋδρολασών και ενδογλουκανασών που έχουν παραχθεί από το μύκητα *Trichoderma reesei* .
- Novozym 188 (β-γλυκοζιδάση): πρόκειται για β-γλυκοζιδάση η οποία έχει παραχθεί από το μύκητα *Aspergillus niger*.

Η βέλτιστη θερμοκρασία και το pH για τα κυτταρινολυτικά εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα είναι 45-50° C και το pH να κυμαίνεται από 5.0- 5.5 .

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα σκευάσματα Celluclast 1.5L και Novozym 188 χρησιμοποιούνται συνδυαστικά σε αναλογία 5:1 (o/o) αντίστοιχα. Η συγκεκριμένη αναλογία χρησιμοποιείται ευρέως στη διεθνή βιβλιογραφία για την υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχων υλικών. Η συνδυαστική τους εφαρμογή οφείλεται στην χαμηλή ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης του σκευάματος Celluclast 1.5L.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι κυτταρινάσες που παράγονται από τα είδη μυκήτων *Trichoderma viride* και *Trichoderma reesei* χαρακτηρίζονται από χαμηλή ενεργότητα σε β-γλυκοσιδάση, με αποτέλεσμα το κύριο προϊόν της ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης να είναι η κελλοβιοζή, η οποία παρεμποδίζει τη δράση των ενδο-β-γλυκανασών και εξω-β-γλυκανασών (Woodward & Wiseman, 1982). Επομένως, καθίσταται αναγκαίος ο εμπλουτισμός των κυτταρινασών (που παράγονται από τα είδη μυκήτων *Trichoderma viride* και *Trichoderma reesei*) με β-γλυκοσιδάση από άλλες πηγές (Pemberton et al., 1980).

4. Όργανα

- Φωτόμετρο UV-Vis Cam Spec M302, Labequip
- Συσκευή μέτρησης pH 537, WTW
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας
- Vortex
- Microplate reader (SpectraMax 250, Molecular Devices)
- HPLC (Shimadzu LC-20AD)
- Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng
- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO
- Φυγόκεντρος Beckman Coulter και φυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200
- Συσκευή διήθησης υπό κενό

5. Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων

Ο προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS ή 2-υδρόξυ-3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ) (Miller, 1959).

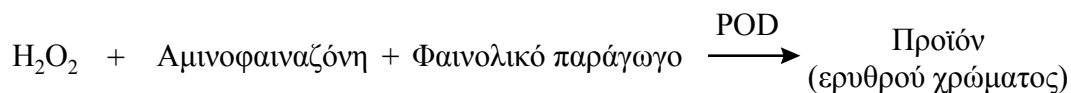


Εικόνα 14: Φωτόμετρο

6. Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης με τη χρήση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit)

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης. Αρχικά, η γλυκόζη με τη δράση της οξειδάσης της γλυκόζης μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ με την ταυτόχρονη

παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ακολουθως, το υπεροξειδίο του υδρογόνου παρουσία αμινοφαιναζόνης και κάποιου φαινολικού παραγωγού με τη δράση της υπεροξειδάσης μετατρέπεται σε κάποιο προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm (Σχήμα 2).



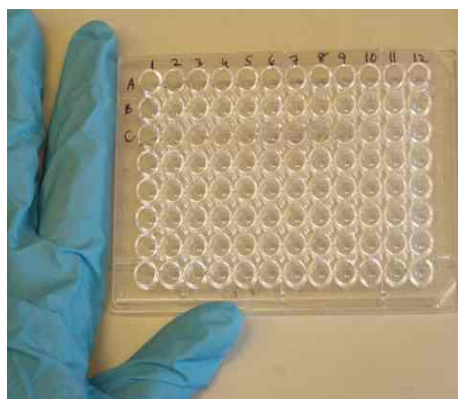
GOD: οξειδάση της γλυκόζης, POD: υπεροξειδάση της γλυκόζης

Σχήμα 2: Αλληλουχία ενζυμικών αντιδράσεων που οδηγούν στην ποσοτικοποίηση της γλυκόζης.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης γίνεται με τη βοήθεια microplate reader (SpectraMax 250, Molecular Devices).



Εικόνα 15: Microplate reader (SpectraMax 250 Molecular Devices)



Εικόνα 16: Πλάκα μικροτιτλοδότησης

7. Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινολυτικών και ενζυμικών σκευασμάτων

Η ολική ενεργότητα κυτταρινασών και αμυλασών (Filter Paper Activity-FPA Units) μετρήθηκε σύμφωνα με τη επίσημη μέθοδο κατά IUPAC (Ghose 1987).

8. Ανάλυση στερεού υπολείμματος – Μέθοδος NREL

Η ανάλυση του στερεού υπολείμματος της προκατεργασίας, υδρόλυσης και αλκοολικής ζύμωσης ως προς κυτταρίνη και ημικυτταρίνη έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του NREL (NREL/TP-510-42618).

Συνοπτικά, περιλάμβανε την όξινη υδρόλυση 300 mg ξηρού στερεού υπολείμματος με 3 mL διαλύματος 72% (β/β) θειικού οξέος για 60 λεπτά στους 30°C, έπειτα αραιώση με 84 mL απιονισμένο νερό και επώαση σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C για 60 λεπτά. Ακολουθεί η εξουδετέρωση των διαλυμάτων με CaCO₃ και φυγοκέντρωση για 10 min στις 10000 rpm. Το διήθημα που συγκεντρώνεται οδηγείται προς ανάλυση με χρήση του kit για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της γλυκόζης. (NREL/TP-510-42618).

9. Μέτρηση της παραγόμενης αιθανόλης με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η αιθανόλη που παράγεται κατά τη βιομετατροπή των διατροφικών απορριμμάτων προσδιορίστηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC (Shimadzu LC-20AD), με στήλη Aminex Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300 x 7.8 mm, particle size 9 μm) και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Shimadzu RID 10A). Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 5 mM H₂SO₄ με ροή 0.6 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 50°C (Dogaris et al. 2009).



Εικόνα 17: Διάταξη HPLC

Για την ποσοτικοποίηση της αιθανόλης ακολουθούνται τα κάτωθι βήματα:

- α) Κατασκευάζονται καμπύλες αναφοράς με τη μέθοδο ανάλυσης στο σύστημα HPLC, όπως περιγράφεται παραπάνω.
- β) Με τη βοήθεια των συγκεκριμένων καμπυλών προσδιορίζεται η συγκέντρωση ($C_{\text{ethanol HPLC}}$, mg/mL) της αιθανόλης.

γ) Αν έχει προηγηθεί αραιώση του δείγματος πριν την ανάλυση με HPLC τότε η συγκέντρωση της υπολογίζεται με την εξίσωση 1.

$$C_{\text{ethanol}} = C_{\text{ethanol HPLC}} \times \text{dilution} \quad \text{εξ.1}$$

όπου,

C_{ethanol} : η τελική συγκέντρωση του μεταβολίτη σε mg/mL

$C_{\text{ethanol HPLC}}$: η συγκέντρωση του μεταβολίτη όπως έχει υπολογιστεί στο βήμα (β) σε mg/mL

dilution: ο συντελεστής αραιώσης του δείγματος

δ) Το κάθε δείγμα στο οποίο πρόκειται να προσδιοριστεί η αιθανόλη αναλύεται με τη μέθοδο του HPLC εις διπλούν και λαμβάνεται ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων.

10. Προσδιορισμός διαλυτού αμύλου

Η μελέτη του διαλυτού αμύλου γίνεται σε 2 ml δείγματος, το οποίο προέκυψε από την προκατεργασία και προσθέτοντας σε αυτό 8 ml EtOH 95% o/o. Τα παραπάνω, αναμιγνύονται και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Ύστερα ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 10min, αποχύνεται το υπερκείμενο και στο εναπομείναν στερεό προστίθεται 1ml H₂O και το μίγμα ογκομετρείται μέχρι τα 3,9 ml με ρυθμιστικό διάλυμα pH=5,0. Προστίθεται 0,1 ml αμυλογλυκοζιδάση καταλλήλως αραιωμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα. Το προκύπτον μίγμα επωάζεται στους 50° C για 30min. Τέλος, ακολουθεί μέτρηση της γλυκόζης που προέκυψε από τη διάσπαση του αμύλου, με τη χρήση Kit.

11. Προσδιορισμός αμύλου στερεού

Ζυγίζονται 100mg δείγματος στερεού υπολείμματος και τοποθετούνται σε ειδικό δοκιμαστικό σωλήνα. Προστίθενται 5ml EtOH περιεκτικότητας 80% o/o, και το μίγμα αναδεύεται σε vortex. Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 80-85°C για 5min. Γίνεται μετάγγιση σε falcon, προσθήκη 5ml EtOH 80% o/o και φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 10min. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και στο παραμένον στερεό προστίθενται 10 ml EtOH 80% (o/o) και μετά από ανάδευση επαναλαμβάνεται το βήμα της φυγοκέντρησης. Με τον τρόπο αυτό απομακρύνεται όλη η ελεύθερη γλυκόζη, αφού η αιθανόλη διαλυτοποιεί τα ελεύθερα σάκχαρα. Έπειτα, προστίθενται 2ml διαλύματος KOH συγκέντρωσης 2M και το μίγμα αφήνεται σε παγόλουτρο για 20min. Ακολουθεί προσθήκη 8ml ρυθμιστικού διαλύματος pH=3,8 και άμεση προσθήκη 100μl α-αμυλάσης και 100μl αμυλογλυκοζιδάσης. Το μίγμα επωάζεται τους 50° C για 30min με ενδιάμεση ανάδευση (ανά 10min). Τέλος, μετράται η γλυκόζη που απελευθερώνεται με χρήση kit.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Τα πειραματικά αποτελέσματα προήλθαν από τις δειγματοληψίες, που έγιναν σε κάθε πειραματική διαδικασία και αφορούσαν στην μέτρηση της απελευθέρωσης των ολικών αναγωγικών σακχάρων (μέτρηση με DNS) καθώς και της γλυκόζης (μέτρηση με glucotest).

Όσον αφορά στη διαδικασία της δειγματοληψίας, αυτή πραγματοποιείται ως εξής: τα δείγματα που λαμβάνονται τοποθετούνται σε erpendorfs, φυγοκεντρώνονται για 20 λεπτά ώστε να διαχωριστούν τα στερεά και λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό. Αφού πραγματοποιούνται κατάλληλες αραιώσεις, γίνεται προσδιορισμός τόσο των συνολικών αναγωγικών σακχάρων όσο και της γλυκόζης. Για να βρεθεί η καθαρή συγκέντρωση των σακχάρων που απελευθερώθηκαν από την δράση των ενζύμων, στο χρόνο μηδέν λαμβάνεται δείγμα και αναλύεται όμοια με τα άλλα. Από όλες τις επόμενες μετρήσεις αφαιρούνται οι συγκεντρώσεις των σακχάρων που προϋπάρχουν στο δείγμα.

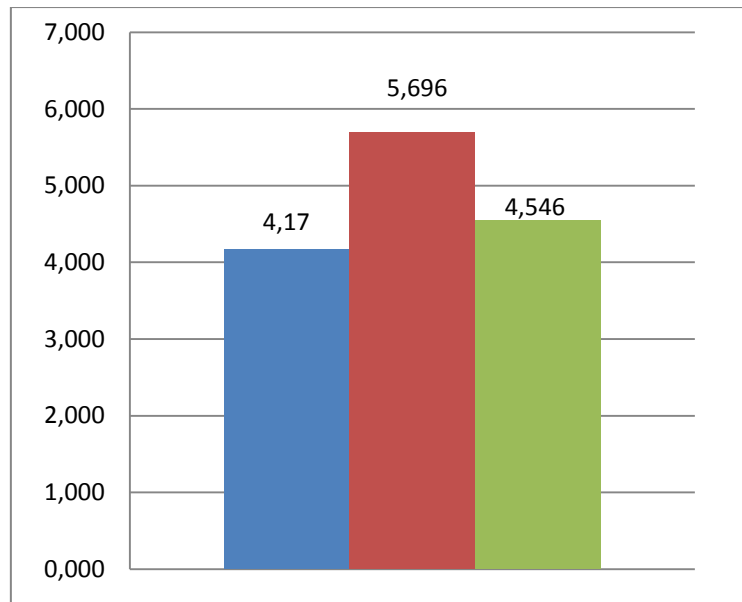
1. Μελέτη της προκατεργασίας των διατροφικών απορριμμάτων

Η υδροθερμική κατεργασία ή υδροθερμόλυση (hydrothermolysis, liquid hot-water treatment) περιλαμβάνει την κατεργασία σε νερό σε υψηλές θερμοκρασίες και μπορεί ενισχυθεί με την προσθήκη ενός καταλύτη, συνήθως οξέος.

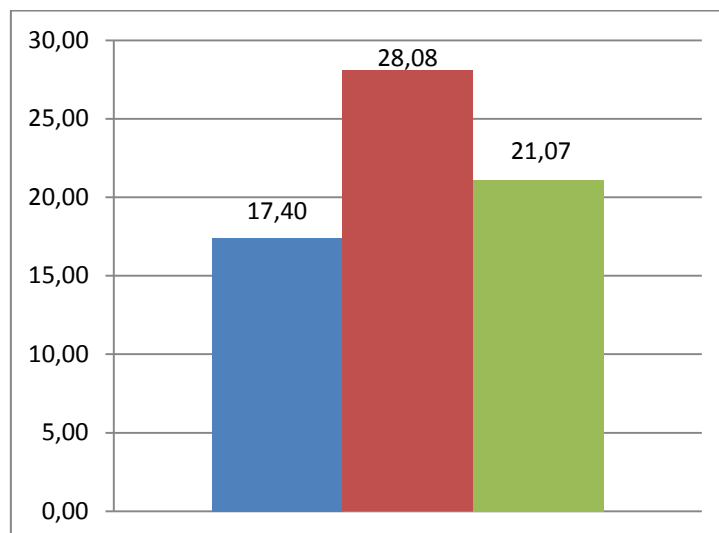
Οι συνθήκες προκατεργασίας που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία είναι:

- συγκέντρωση του στερεού 30% (β/ο)
- θερμοκρασία προκατεργασίας 100° C.
- χρόνος προκατεργασίας 1 h.

Η προκατεργασία μελετήθηκε απουσία και παρουσία θεικού οξέος (1 g H₂SO₄ / 100 g στερεού).



Διάγραμμα 5: Σύγκριση της γλυκόζης που περιέχεται στα διατροφικά απορρίμματα (δ.α) πριν το στάδιο της προκατεργασίας (μπλε χρώμα) με την γλυκόζη που μετράται ύστερα από προκατεργασία των δ.α. για 1 hour σε θερμοκρασία 100° C με χρήση H_2SO_4 (κόκκινο χρώμα) και με την γλυκόζη που μετράται ύστερα από προκατεργασία χωρίς την χρήση του οξέος (πράσινο χρώμα).



Διάγραμμα 6: Σύγκριση των συνολικών αναγωγικών σακχάρων που περιέχονται στα διατροφικά απορρίμματα (δ.α) πριν το στάδιο της προκατεργασίας (μπλε χρώμα) με τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα που μετρώνται ύστερα από προκατεργασία των δ.α. για 1 hour σε θερμοκρασία 100° C με χρήση H_2SO_4 (κόκκινο χρώμα) και με τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα που μετρώνται ύστερα από προκατεργασία χωρίς την χρήση του οξέος (πράσινο χρώμα).

Πίνακας 7: Συγκέντρωση γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων μετά την υδροθερμική προκατεργασία παρουσία και απουσία οξέος (H_2SO_4) σε περιεκτικότητα 1g/100g ξηρού στερεού.

	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)	Συγκέντρωση ολικών αναγωγικών σακχάρων (g/L)
Αρχικά	1,06±0,03	4,38±0,31
Υδροθερμική προκατεργασία παρουσία οξέος (H_2SO_4, 1g/100g ξ.σ.)	14,23±0,82	70,02±2,45
Υδροθερμική προκατεργασία απουσία οξέος (H_2SO_4, 1g/100g ξ.σ.)	11,72±0,46	55,29±3,86

Πίνακας 8: Υπολογισμός κυτταρίνης και αμύλου μετά την υδροθερμική προκατεργασία παρουσία και απουσία οξέος (H_2SO_4) σε περιεκτικότητα 1g/100g ξηρού στερεού.

	Κυτταρίνη (g/100g ξ.σ.)	Άμυλο (g/100g ξ.σ.)	
		Διαλυτό	Αδιάλυτο
Χωρίς προκατεργασία	11,8±0,50	-	9,93±1,30
Υδροθερμική προκατεργασία παρουσία οξέος (H_2SO_4, 1g/100g ξ.σ.)	12,29±1,15	4,68±0,17	7,62±0,46
Υδροθερμική προκατεργασία απουσία οξέος (H_2SO_4, 1g/100g ξ.σ.)	12,23±1,79	4,54±0,41	7,79±0,38

Από την ανάλυση του υλικού μετά την προκατεργασία προκύπτει αύξηση αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης (Πίνακας 7) η οποία οφείλεται στην αποδόμηση του αμύλου. Από τον Πίνακα 8 φαίνεται ότι το ποσοστό του αμύλου που αποικοδομείται είναι 47,13% μετά από υδροθερμική προκατεργασία παρουσία H_2SO_4 , 1g/100g ξ.σ. και 45,72% μετά από υδροθερμική προκατεργασία απουσία οξέος. Από τα αποτελέσματα της μελέτης της επίδρασης της προκατεργασίας στη σύσταση του υλικού εξάγεται επίσης το συμπέρασμα ότι η κυτταρίνη δεν επηρεάζεται από την υδροθερμική προκατεργασία στους 100°C παρουσία/απουσία οξέος (Πίνακας 8).

2. Μελέτη της επίδρασης της ενεργότητας των ενζύμων στην υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων.

Στόχος των πειραμάτων ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας υδρόλυσης των διατροφικών απορριμμάτων από εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα. Τα πειράματα ενζυμικής υδρόλυσης πραγματοποιήθηκαν σε κατάλληλους αντιδραστήρες (υάλινες φιάλες όγκου 100 mL) υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης (80rpm) σε θερμαινόμενο αναδευτήρα κατάλληλης θερμοκρασίας.

Το υλικό αφού προκατεργάστηκε υδροθερμικά παρουσία και απουσία οξέος υδρολύθηκε ενζυμικά :

(α) Με χρήση αμυλολυτικών σκευασμάτων.

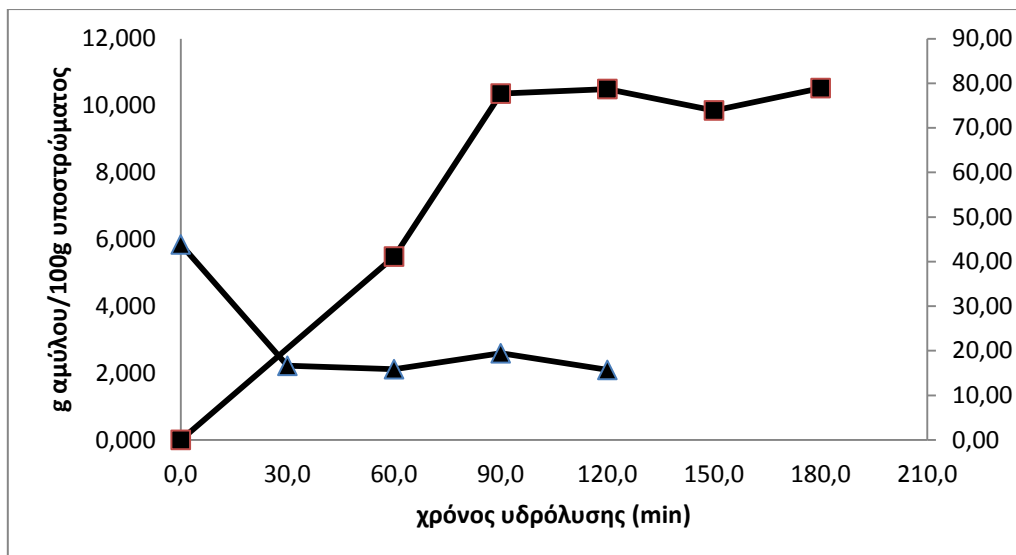
Στο υλικό που προήλθε από το στάδιο της προκατεργασίας (§ 1) πραγματοποιείται ρύθμιση του pH μεταξύ των τιμών 5.0 και 5.5 με χρήση διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 1M. Ακολουθεί προσθήκη 0.053 Units/g αμύλου Liquezyme SC DS και 5.06, 10.2 και 20.24 Units/g αμύλου Spirizyme Fuel. Η θερμοκρασία της υδρόλυσης ορίζεται ίση με 65° C. Σε τακτά χρονικά διαστήματα (0 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min) παραλαμβάνεται δείγμα και μετρώνται τα αναγωγικά σάκχαρα με τη μέθοδο DNS και η γλυκόζη kit.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες και διαγράμματα.

Πίνακας 9: Μετατροπή του αμύλου(%) κατά την υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων με τελική ενεργότητα των ενζυμικών σκευασμάτων Liquezyme SC DS (α -amylase) 0.053U/g αμύλου και Spirizyme Fuel(Glucoamylase) 5,06 U/g αμύλου.

Χρόνος υδρόλυσης (min) *	Περιεκτικότητα αμύλου (g/100g ξ.α.σ)	% μετατροπή του αμύλου
0,0	9,93	0,00
60,0	5,846	41,12
90,0	2,216	77,69
120,0	2,114	78,71
150,0	2,591	73,90
180,0	2,093	78,92

*Συμπεριλαμβάνεται ο χρόνος προκατεργασίας 1h/100°C

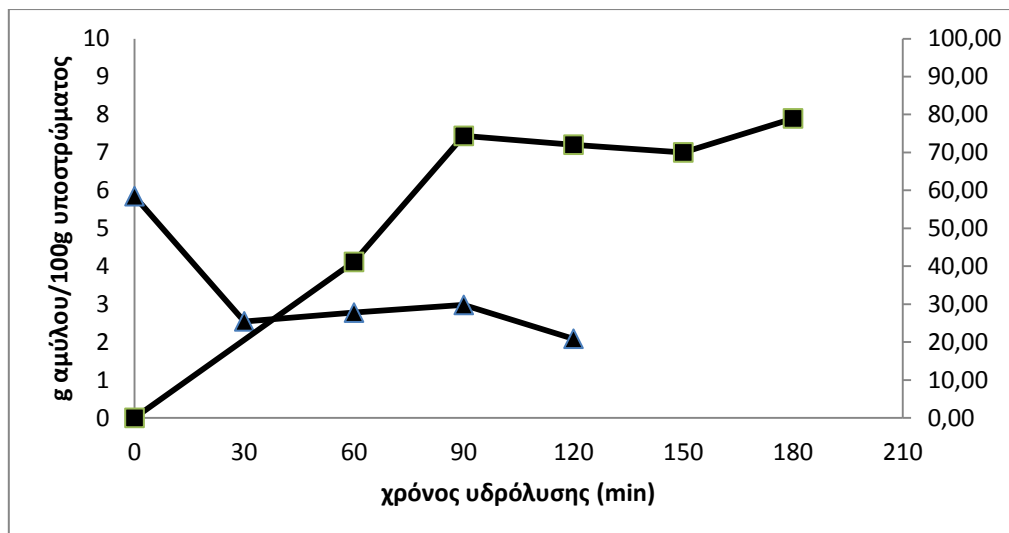


Διάγραμμα 7: Χρονική μεταβολή της περιεκτικότητας του αμύλου (▲) που περιέχεται στα διατροφικά απορρίμματα και μετατροπή του σε ζυμώσιμα σάκχαρα (■) κατά την υδρόλυση τους (συμπεριλαμβάνεται ο χρόνος προκατεργασίας 1h) με τελική ενεργότητα των ενζυμικών σκευασμάτων Liquozyme SC DS 0.053U/g αμύλου και Spirizyme Fuel 5,06 U/g αμύλου.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών απορριμμάτων με τελική ενεργότητα των ενζυμικών σκευασμάτων Liquozyme SC DS (α-amylose) 0.053U/g αμύλου και Spirizyme Fuel(Glucoamylase) 10,2 U/g αμύλου.

Χρόνος υδρόλυσης (min) *	Περιεκτικότητα αμύλου (g/100g ξ.α.σ)	% μετατροπή του αμύλου
0,0	9,93	0,00
60,0	5,594	43,67
90,0	2,751	72,30
120,0	3,023	69,56
150,0	3,260	67,17
180,0	2,245	77,39

*Συμπεριλαμβάνεται ο χρόνος προκατεργασίας 1h/100°C

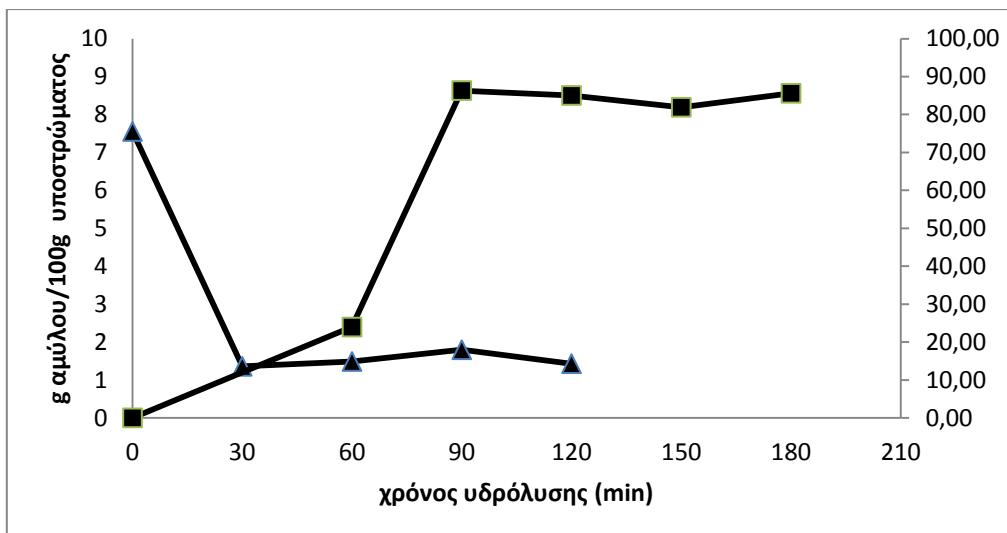


Διάγραμμα 8: Χρονική μεταβολή της περιεκτικότητας του αμύλου (▲) που περιέχεται στα διατροφικά απορρίμματα και μετατροπή του σε ζυμώσιμα σάκχαρα (■) κατά την υδρόλυση τους (στον χρόνο συμπεριλαμβάνεται και ο χρόνος προκατεργασίας 1h) με τελική ενεργότητα των ενζυμικών σκευασμάτων Liquezyme SC DS 0.053U/g αμύλου και Spirizyme Fuel 10.2 U/g αμύλου.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών απορριμμάτων με τελική ενεργότητα των εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων Liquezyme SC DS (α -amylase) 0.053U/g αμύλου και Spirizyme Fuel(Glucoamylase) 20.24 U/g αμύλου.

Χρόνος υδρόλυσης (min)*	Περιεκτικότητα αμύλου (g/100g ξ.α.σ)	% μετατροπή του αμύλου
0,0	9,93	0,00
60,0	7,553	23,94
90,0	1,359	86,32
120,0	1,486	85,03
150,0	1,796	81,91
180,0	1,430	85,60

*Συμπεριλαμβάνεται ο χρόνος προκατεργασίας 1h/100°C



Διάγραμμα 9: Χρονική μεταβολή της περιεκτικότητας του αμύλου (▲) που περιέχεται στα διατροφικά απορρίμματα και μετατροπή του σε ζυμώσιμα σάκχαρα (■) κατά την υδρόλυση τους (στον χρόνο συμπεριλαμβάνεται και ο χρόνος προκτεργασίας 1h) με τελική ενεργότητα των ενζυμικών σκευασμάτων Liquozyme SC DS 0.053U/g αμύλου και Spirizyme Fuel 20.24U/g αμύλου.

Από τους Πίνακες 9-11 είναι φανερό ότι η ενζυμική υδρόλυση με χρήση των Liquozyme SC DS με ενεργότητα 0.053U/g αμύλου και Spirizyme Fuel με ενεργότητα 5,06 U/g αμύλου φτάνει σε υψηλό ποσοστό μετατροπής του αμύλου 77,69% στα πρώτα 30 λεπτά της υδρόλυσης. Στον ίδιο χρόνο, δηλαδή 30 λεπτά, με ενεργότητα Liquozyme SC DS 0.053U/g αμύλου και Spirizyme Fuel 10,02 U/g αμύλου το ποσοστό μετατροπής του αμύλου φτάνει σε ποσοστό 72,30%. Τέλος, για ενεργότητα Liquozyme SC DS 0.053U/g αμύλου και Spirizyme Fuel 20.24U/g αμύλου το ποσοστό μετατροπής φτάνει το 86,32%, για χρόνο επίσης 30 λεπτά.

Στις διεργασίες βιομετατροπής λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε αιθανόλη σημαντική συνεισφορά στο συνολικό κόστος παραγωγής έχει και η χρησιμοποιηθείσα ενζυμική ενεργότητα. Ως εκ τούτου είναι επιθυμητές οι χαμηλότερες δυνατές ενζυμικές ενεργότητες. Για τον λόγο αυτό για την συνέχεια των πειραμάτων επιλέγεται η ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων να γίνει με ενεργότητα του Liquozyme SC DS 0.053U/g αμύλου και του Spirizyme Fuel 5,06 U/g αμύλου. Ως χρόνος υδρόλυσης επιλέγονται τα 30 λεπτά, αφού δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα και στις τρεις περιπτώσεις.

Σε σύγκριση με την διεθνή βιβλιογραφία:

Ο Zhao, 2008 χρησιμοποιεί τις ποσότητες που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 12: Ποσότητες α-αμυλάσης και γλυκοαμυλάσης που χρησιμοποιεί ο Zhao.

	U/g of starch		
Liquozyme SC DS (α-amylase) 177.74U/g	0.053	0.1057	0.1586
Spirizyme Fuel (glucoamylase) 2108,59U/g	11.597	17.319	23.093

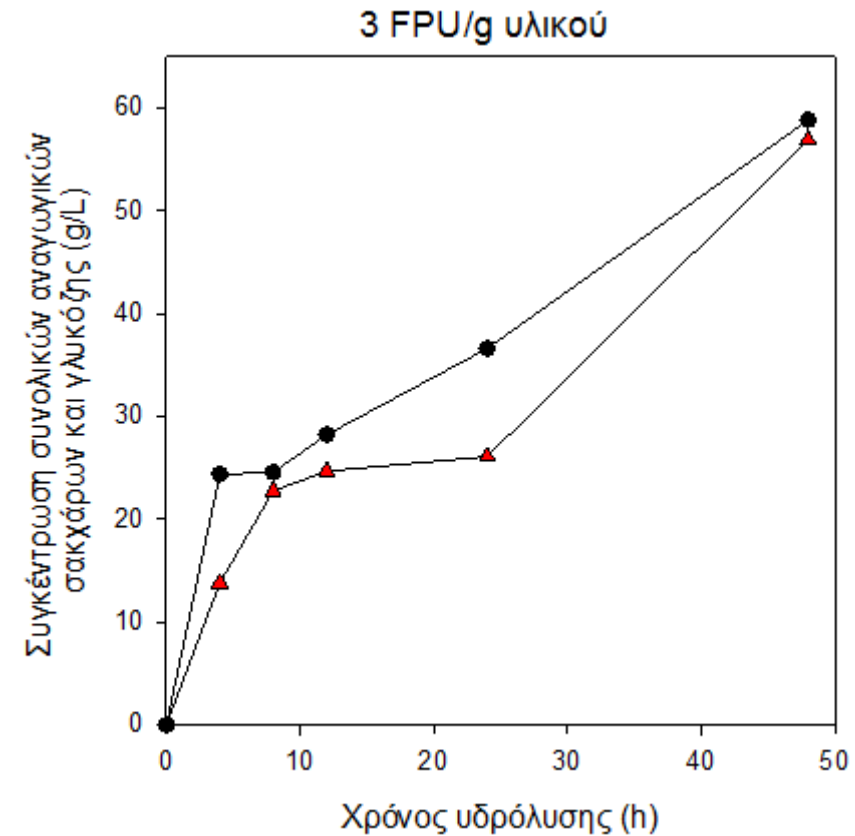
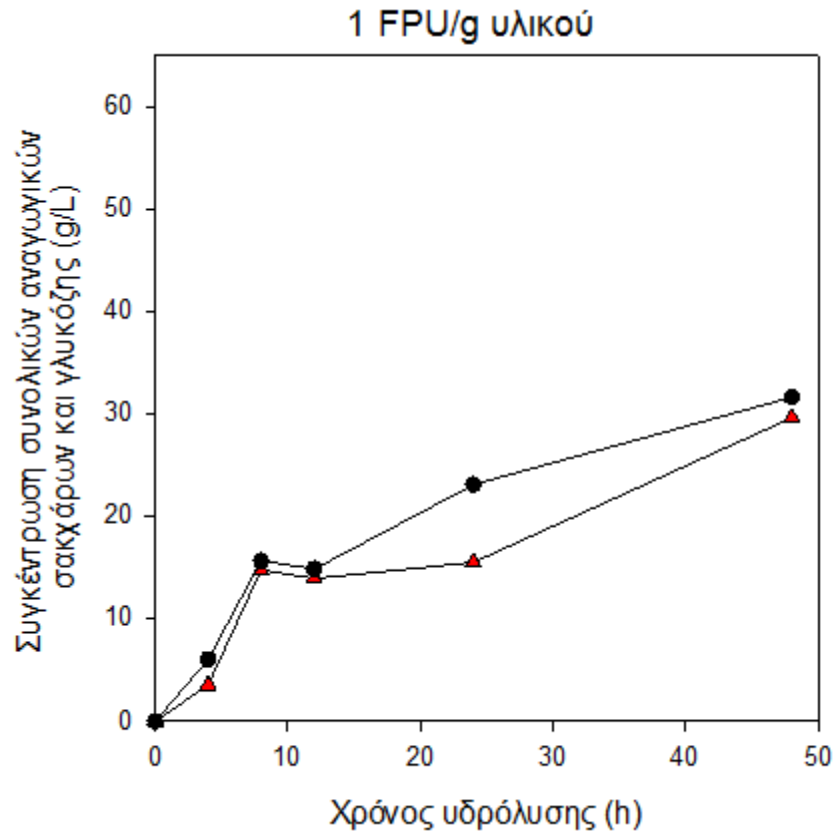
Επίσης, ο Zhao, 2008 χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα 9 ποικιλίες sorgum grain με περιεκτικότητα σε άμυλο 68-72% (M.O. 70%). Οι βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης είναι στους 86°C για 90min και σακχαροποίησης στους 68°C για 90min. Η μέγιστη μετατροπή αμύλου είναι 62,4% και επιτυγχάνεται με τις μέγιστες ποσότητες αμυλασών. Σε ένα δείγμα επιτυγχάνει 87,3% μετατροπή και έχει ethanol yield prediction 13.75% v/v average με SSF.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται ίδια ποσότητα με τη μικρότερη του Zhao, 2008 όσον αφορά την α-αμυλάση, ενώ όσον αφορά τη γλυκοαμυλάση εδώ χρησιμοποιούνται 5.06, 10.2 και 20.24 U/g αμύλου ενώ ο Zhao, 2008 χρησιμοποιεί 11.5, 17 και 23 U/g αμύλου.

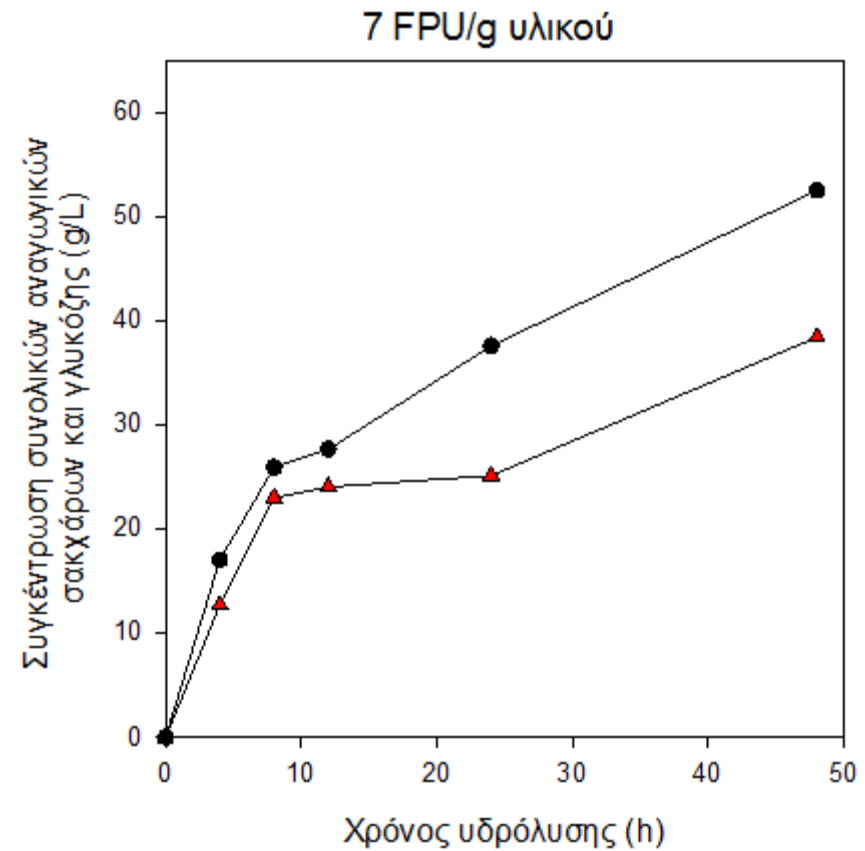
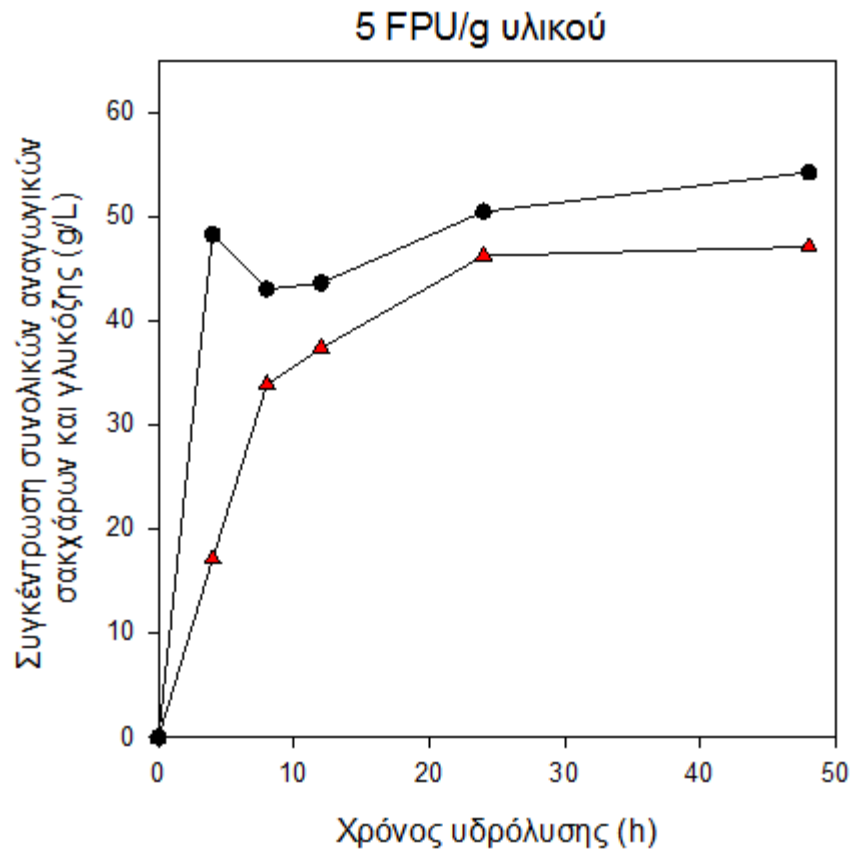
(β) Με χρήση κυτταρινολυτικών σκευασμάτων.

Στο υλικό που προήλθε από το στάδιο της προκατεργασίας (§ 3.1) πραγματοποιείται ρύθμιση του pH μεταξύ των τιμών 5.0 και 5.5 με χρήση διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 1M. Ακολουθεί προσθήκη του μίγματος του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος: μίγμα Celluclast 1.5L/ Novozyme 188 ενεργότητας 83FPU/ml σε αναλογία 5:1 (ο/ο) με τελικές ενεργότητες 1, 3, 5, 7, 9 FPU/g υλικού (8.47, 24.42, 42.37, 59.32 και 76.27 FPU/g κυτταρίνης). Η θερμοκρασία της υδρόλυσης ορίζεται ίση με 50° C. Για την καλύτερη κινητική περιγραφή του φαινομένου, το πείραμα της υδρόλυσης των διατροφικών απορριμμάτων παρουσία του μίγματος των ενζύμων, επαναλήφθηκε με συχνότερη δειγματοληψία στο κρίσιμο χρονικό διάστημα των πρώτων ωρών, αφού ο αρχικός ρυθμός με τον οποίο λαμβάνει χώρα η ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης είναι σχετικά μεγάλος και με το πέρασμα του χρόνου μειώνεται. Σε τακτά χρονικά διαστήματα (0, 4, 8, 12, 24, 48 hours) παραλαμβάνεται δείγμα και μετρώνται τα αναγωγικά σάκχαρα με τη μέθοδο DNS και η γλυκόζη kit.

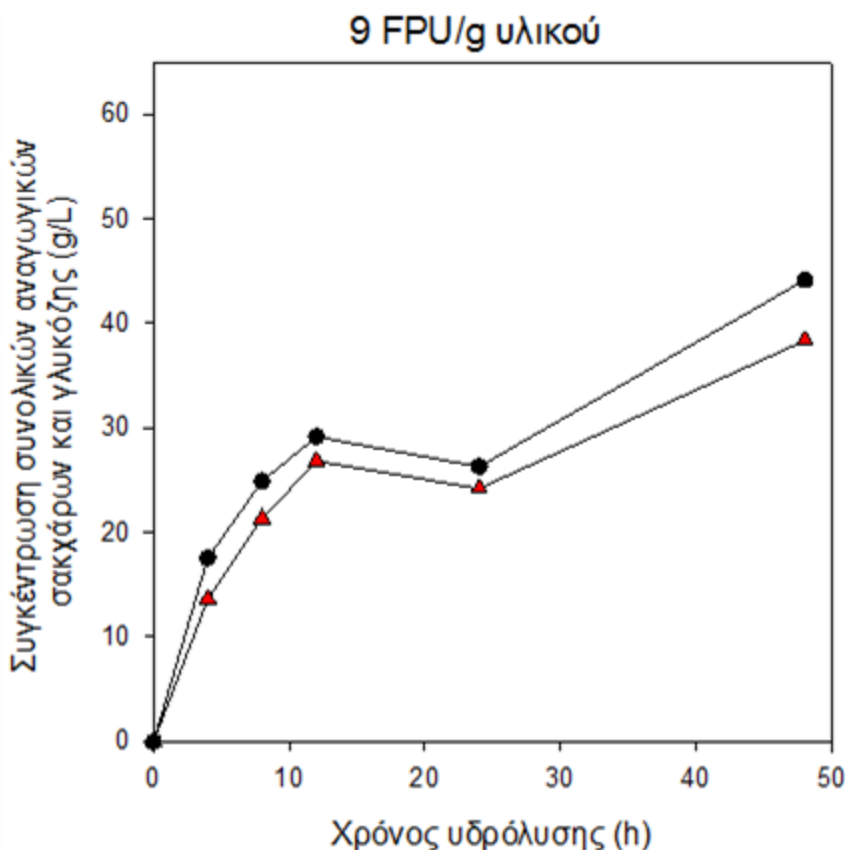
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 10-14.



Διαγράμματα 10, 11 : Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης των συνολικών αναγωγικών σακχάρων (●) και γλυκόζης (▲) κατά την υδρόλυση προκατεργασμένων διατροφικών απορριμμάτων περιεκτικότητας 30% (β/ο), με χρήση του εμπορικού σκευάσματος celluclast 1,5L/Novozyme 188(5:1) έτσι ώστε η τελική ενεργότητα της κυτταρινάσης να είναι 1, 3 FPU/g διατροφικών απορριμμάτων



Διαγράμματα 12, 13 : Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης των συνολικών αναγωγικών σακχάρων (●) και γλυκόζης (▲) κατά την υδρόλυση προκατεργασμένων διατροφικών απορριμμάτων περιεκτικότητας 30% (β/ο), με χρήση του εμπορικού σκευάσματος celluclast 1,5L/Novozyme 188(5:1) έτσι ώστε η τελική ενεργότητα της κυτταρινάσης να είναι 5, 7 FPU/g διατροφικών απορριμμάτων.



Διάγραμμα 14.: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης των συνολικών αναγωγικών σακχάρων (●) και της γλυκόζης (▲) κατά την υδρόλυση προκατεργασμένων διατροφικών απορριμμάτων περιεκτικότητας 30% (β/ο), με χρήση του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος celluclast: μίγμα 1,5L/Novozyme 188(5:1) έτσι ώστε η τελική ενεργότητα της κυτταρινάσης να είναι 9 FPU/g διατροφικών απορριμμάτων.

Από τα Διαγράμματα 10-14 παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό σακχάρων απελευθερώνεται κατά τις πρώτες 12 ώρες της υδρόλυσης. Ακολούθως, ο ρυθμός υδρόλυσης μειώνεται, γεγονός που οφείλεται στην αναστολή της δράσης των ενζύμων με την αύξηση της συγκέντρωσης των σακχάρων. Τα παραγόμενα από την υδρόλυση σάκχαρα δρουν τα ίδια ως παρεμποδιστές γιατί δεσμεύονται σε διαφορετικές περιοχές από τις ενεργές περιοχές του ενζύμου, αλλάζοντας έτσι την μορφολογία του ενζύμου και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του ενζύμου (Holtzapple et al.,1990). Τα κυτταρινολυτικά ένζυμα είναι χαρακτηριστικό παράδειγμα ενζύμων των οποίων η δράση αναστέλλεται από τα τελικά προϊόντα της υδρόλυσης (παρεμπόδιση από το προϊόν). Στα Διαγράμματα 11, 13 και 14 φαίνεται ότι μετά τις 24 ώρες τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα παρουσιάζουν μια μεγάλη απελευθέρωση. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ολιγομερή που δεν υδρολύθηκαν πιθανώς από την β- γλυκοζιδάση. Στους παρακάτω πίνακες

(Πίνακας 13) παρουσιάζονται οι μέγιστες συγκεντρώσεις γλυκόζης και αποδόσεις της ενζυμικής υδρόλυσης (καθαρές και συνολικές) για κάθε ενζυμικό φορτίο.

Πίνακας 13: Μέγιστες συγκεντρώσεις και αποδόσεις γλυκόζης κατά την ενζυμική υδρόλυση των προκατεργασμένων διατροφικών απορριμμάτων με χρήση του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος: μίγμα celluclast 1,5L/Novozyme 188 (5:1).

Ενζυμικό φορτίο (FPU/g υλικού)	Μέγιστες συγκεντρώσεις γλυκόζης (g/L)	Απόδοση της υδρόλυσης (g/100 g υλικού)	Θεωρητικό ποσοστό υδρόλυσης κυτταρίνης με βάση την παραχθείσα γλυκόζη (%)
1	29,62±3,02	9,87±1,01	75,28±1,01
3	56,88±5,55	18,96±1,85	91,37±1,85
5	47,06±4,11	15,69±1,37	97,25±1,37
7	38,41±4,93	12,80±1,64	97,63±1,64
9	38,39±1,52	12,80±0,51	97,63±0,51

Από τον Πίνακα 13 φαίνεται ότι το θεωρητικό ποσοστό υδρόλυσης της κυτταρίνης με βάση την παραχθείσα γλυκόζη φτάνει σχεδόν στο μέγιστό του όταν η τελική ενεργότητα του κυτταρινολυτικού ενζυμικού σκευάσματος: μίγμα Celluclast 1,5L/Novozyme 188(5:1) είναι 5 FPU/g υλικού.

Σε σύγκριση με την διεθνή βιβλιογραφία:

Οι Agustriyanto et al., (2012) κατά την υδρόλυση του στερεού υπολείμματος προκατεργασμένου φλοιού καρύδας (100°C, 1 h, 1.5% w/v θειικό οξύ) συγκέντρωσης 4% (β/ο) με χρήση 15 FPU/g κυτταρίνης μίγματος Celluclast/Novozymes ανέφεραν παραγωγή 1.128 g/L ολικών αναγωγικών σακχάρων (2.82 g/100 g προκατεργασμένου φλοιού καρύδας).

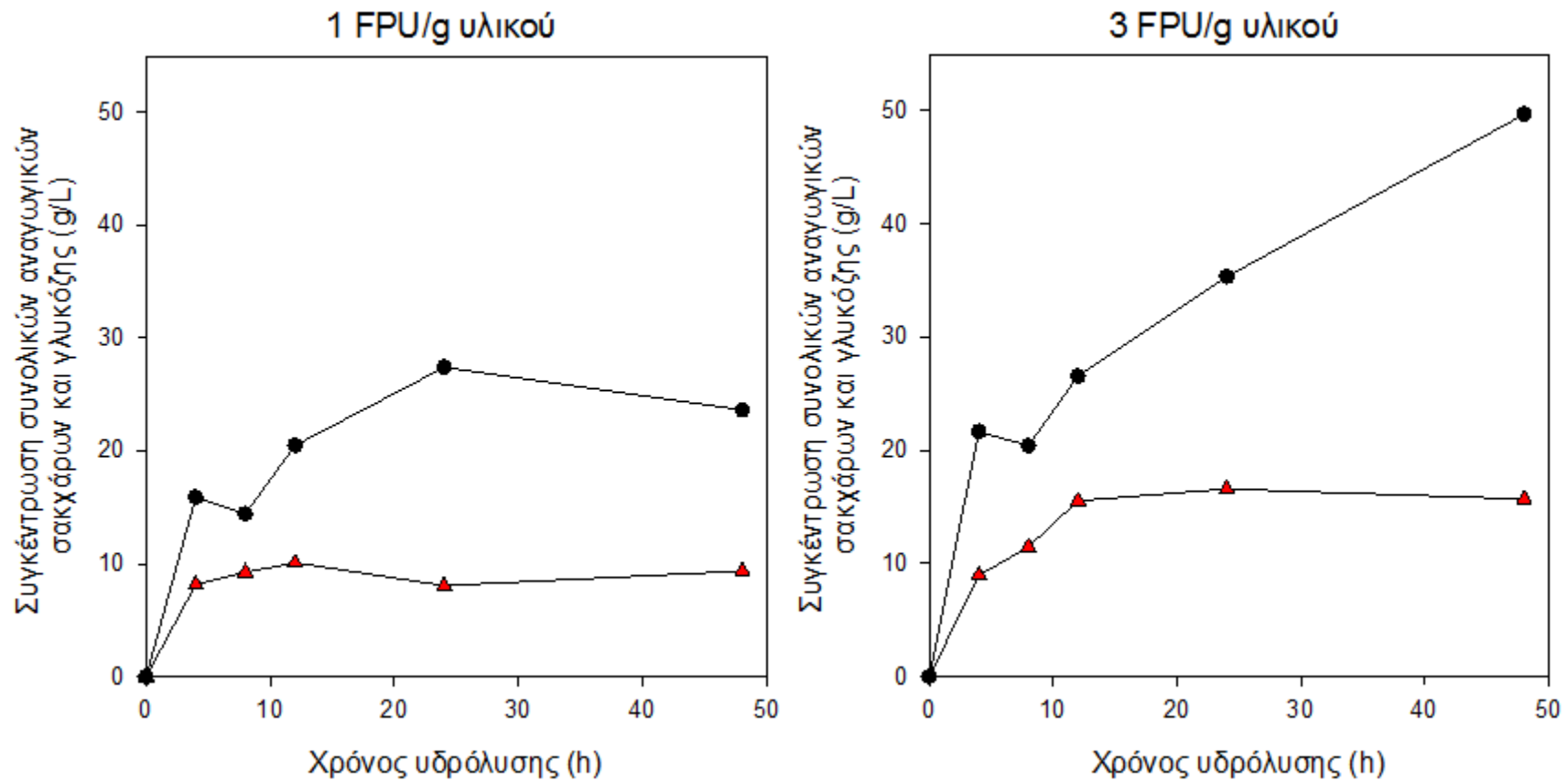
Η υδρόλυση του στερεού υπολείμματος αλκαλικής επεξεργασίας κοκοφοίνικα (11% NaOH, 100° C, 1h) σε συγκέντρωση 4% (β/ο) με χρήση 15 FPU/g κυτταρίνης μίγματος ενδογλουκανάσης (Cellulase, *Trichoderma reesei* ATCC 26 921, Sigma Aldrich) και β-γλυκοζιδάσης (Cellobiase, *Aspergillus niger*, Sigma Aldrich) οδήγησε στην παραγωγή 7.57 g/L ολικών αναγωγικών σακχάρων (18.9 g/100 g προκατεργασμένου κοκοφοίνικα) (Fatmawati et al., 2013).

Τα διατροφικά απορρίμματα που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία περιέχουν 11,8% κυτταρίνη. Οι αποδόσεις υδρόλυσης που επετεύχθησαν στην παρούσα εργασία, στο μικρότερο χρησιμοποιηθέν ενζυμικό φορτίο (1 FPU/g υλικού ή 8.4 FPU/g κυτταρίνης) είναι πολύ υψηλότερες αυτών που επετεύχθησαν από τους Agustriyanto et al., (2012) και μικρότερες αυτών των Fatmawati et al., 2013. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πολύ υψηλότερη συγκέντρωση υποστρώματος στην υδρόλυση (30% έναντι 4% των προαναφερθέντων εργασιών). Η υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος είναι

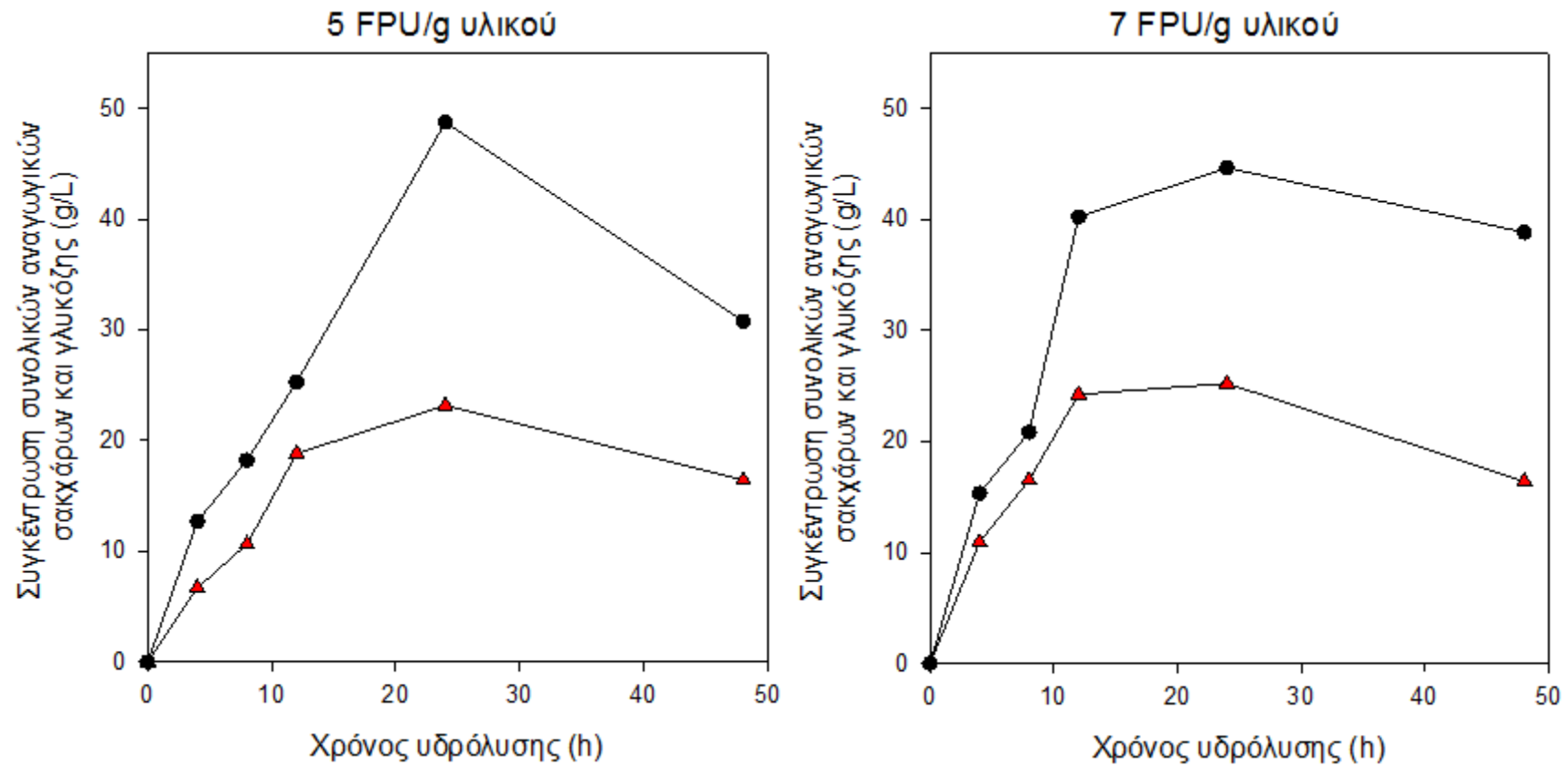
απαραίτητη προκειμένου να επιτευχθεί στο στάδιο της βιομετατροπής σε αιθανόλη παραγωγή της τάξης του 4% (β/β), συγκέντρωση η οποία σύμφωνα με μελέτη των Hahn-Hagerdal et al., (2006) αποτελεί το όριο προκειμένου να μειωθούν οι ενεργειακές απαιτήσεις του σταδίου της απόσταξης και να καταστεί οικονομικότερη η διεργασία.

Ομοίως (στις ίδιες συνθήκες και για τα ίδια ενζυμικά φορτία) μελετάται και η υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων με τη χρήση του εμπορικού σκευάσματος Cellic[®]CTec2.

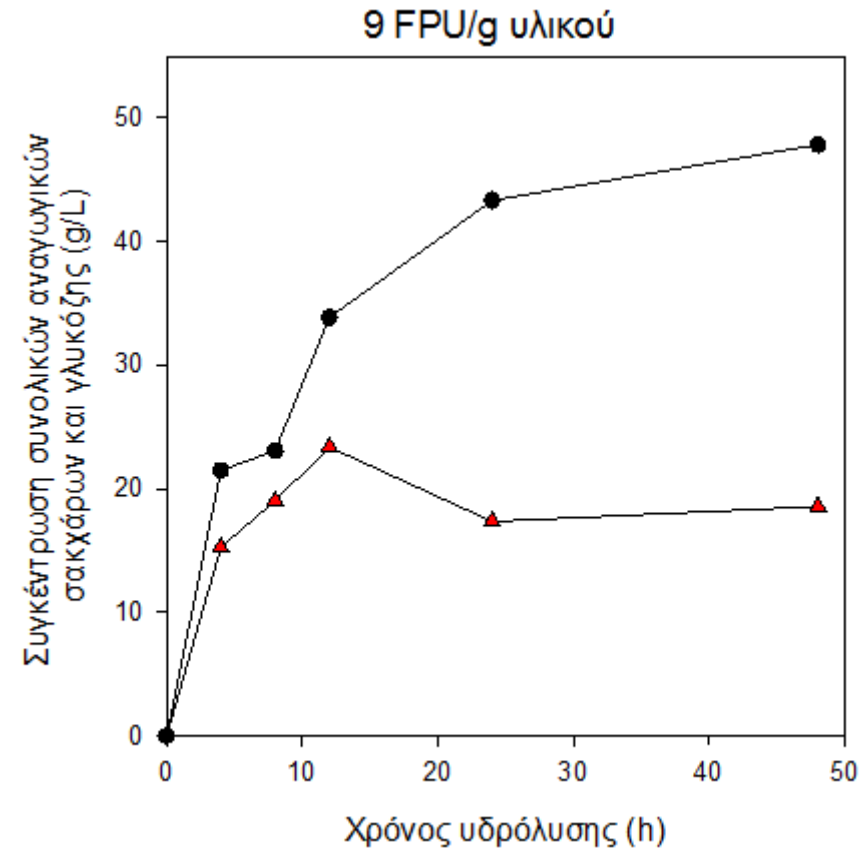
Από τα Διαγράμματα 15-19 φαίνεται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των συνολικών αναγωγικών ομάδων και της γλυκόζης απελευθερώνεται κατά τις πρώτες 12 ώρες της υδρόλυσης. Ακολουθώς, ο ρυθμός υδρόλυσης μειώνεται, γεγονός που οφείλεται στον ίδιο λόγο που αναφέρθηκε και παραπάνω για το μίγμα Celluclast 1,5L/Novozyme 188, στην αναστολή δηλαδή της δράσης των ενζύμων με την αύξηση της συγκέντρωσης των σακχάρων.



Διαγράμματα 15, 16 : Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης των συνολικών αναγωγικών σακχάρων (●) και της γλυκόζης (▲) κατά την υδρόλυση προκατεργασμένων διατροφικών απορριμμάτων περιεκτικότητας 30% (β/ο), με χρήση του εμπορικού σκευάσματος Cellic® CTec2 έτσι ώστε η τελική ενεργότητα της κυτταρινάσης να είναι 1 και 3 FPU/g διατροφικών απορριμμάτων.



Διαγράμματα 17, 18: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης των συνολικών αναγωγικών σακχάρων (●) και της γλυκόζης (▲) κατά την υδρόλυση προκατεργασμένων διατροφικών απορριμμάτων περιεκτικότητας 30% (β/ο), με χρήση του εμπορικού σκευάσματος Cellic® CTec2 έτσι ώστε η τελική ενεργότητα της κυτταρινάσης να είναι 5 και 7 FPU/g διατροφικών απορριμμάτων.



Διάγραμμα 19: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης των συνολικών αναγωγικών σακχάρων (●) και της γλυκόζης (▲) κατά την υδρόλυση προκατεργασμένων διατροφικών απορριμμάτων περιεκτικότητας 30% (β/ο), με χρήση του εμπορικού σκευάσματος Cellic® CTec2 έτσι ώστε η τελική ενεργότητα της κυτταρινάσης να είναι 9 FPU/g διατροφικών απορριμμάτων.

Πίνακας 14: Μέγιστες συγκεντρώσεις και αποδόσεις γλυκόζης κατά την ενζυμική υδρόλυση (καθαρές) των διατροφικών απορριμμάτων με χρήση του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος Cellic® CTec2.

Ενζυμικό φορτίο (FPU/g υλικού)	Μέγιστες συγκεντρώσεις γλυκόζης (g/L)	Απόδοση της υδρόλυσης (g/100 g υλικού)	Θεωρητικό ποσοστό υδρόλυσης κυτταρίνης με βάση την παραχθείσα γλυκόζη (%)
1	10,10±4,08	3,37±1,36	25,70±1,36
3	16,58±4,07	5,53±1,36	42,18±1,36
5	23,18±2,78	7,73±0,93	58,96±0,93
7	25,26±5,31	8,42±1,77	64,22±1,77
9	23,36±2,54	7,79±0,85	59,42±0,85

Από τον Πίνακα 14 παρατηρείται ότι η καθαρή μέγιστη συγκέντρωση γλυκόζης εμφανίζεται από την ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων με χρήση του ενζυμικού σκευάσματος με τελική ενεργότητα 7FPU/g υλικού.

Σε σύγκριση με την διεθνή βιβλιογραφία:

Η ενζυμική υδρόλυση προκατεργασμένου άχυρου σίτου συγκέντρωσης 2% (β/ο) (περιεκτικότητα σε κυτταρίνη 48,1%) με χρήση 6 FPU/g υλικού Cellic® CTec2 είχε ως αποτέλεσμα 85% μετατροπή υποστρώματος (Alftrén & Hobley, 2014). Το ποσοστό μετατροπής της κυτταρίνης (με βάση την παραχθείσα γλυκόζη) που επιτεύχθηκε στην παρούσα εργασία με χρήση του ίδιου ενζυμικού σκευάσματος σε φορτίο 7 FPU/g υλικού, είναι ελαφρά μικρότερο των Alftrén & Hobley, 2014, αλλά με χρήση 5-πλάσιας συγκέντρωσης υποστρώματος.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις ενζυμικές υδρολύσεις με χρήση των ανωτέρω κυτταρινολυτικών ενζυμικών σκευασμάτων Celluclast 1,5L/Novozyme 188 και Cellic®CTec2 επιλέγεται επίσης να εφαρμοστεί υδρόλυση της πρώτης ύλης διάρκειας 6 ωρών.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αποτελεσματικότητα της ενζυμικής υδρόλυσης θα αξιολογηθεί περαιτέρω στο επόμενο στάδιο που είναι η παραγωγή βιοαιθανόλης.

3. Μελέτη της συμπεριφοράς των αμυλολυτικών και κυτταρινολυτικών ενζυμικών σκευασμάτων καθώς και της συνεργιστικής τους δράσης κατά την παραγωγή αιθανόλης με ζύμωση.

Πραγματοποιούνται δοκιμές βιομετατροπής των προκατεργασμένων διατροφικών απορριμμάτων προκειμένου να ευρεθούν οι συνθήκες που μεγιστοποιούν την παραγωγή βιοαιθανόλης με εφαρμογή της τεχνολογίας ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF). Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί κυρίως προς τη διεργασία του ενός σταδίου, ιδιαίτερα στην παραγωγή αιθανόλης από κυτταρίνη, καθώς περιορίζεται σημαντικά η παρεμπόδιση των ενζύμων (κυτταρινασών) από τα προϊόντα της υδρόλυσης (κυρίως από την παραγόμενη κελλοβιόζη), ενώ μειώνεται σημαντικά το κόστος της διεργασίας, αφού δεν απαιτούνται διαφορετικοί αντιδραστήρες για την υδρόλυση και την αναερόβια ζύμωση (Vinzant et al., 1997).

Με βάση τη σύσταση του υλικού όπως αυτή παρουσιάζεται στον Πίνακα 6 και τον θεωρητικό συντελεστή $Y_{\text{αιθανόλη/σακχάρου}}=0.511$ υπολογίστηκε η θεωρητική απόδοση αιθανόλης ως εξής:

(α) Θεωρητική απόδοση με βάση τα άμεσα διαθέσιμα σάκχαρα (μη δομικά σάκχαρα)

Συστατικό	% Β/Β	Απόδοση αιθανόλης (g/100 g ξηρού υλικού)
Γλυκόζη	4,17	2,13
Σύνολο		2,13

(β) Θεωρητική απόδοση με βάση τα άμεσα διαθέσιμα σάκχαρα (μη δομικά σάκχαρα, άμυλο και κυτταρίνη)

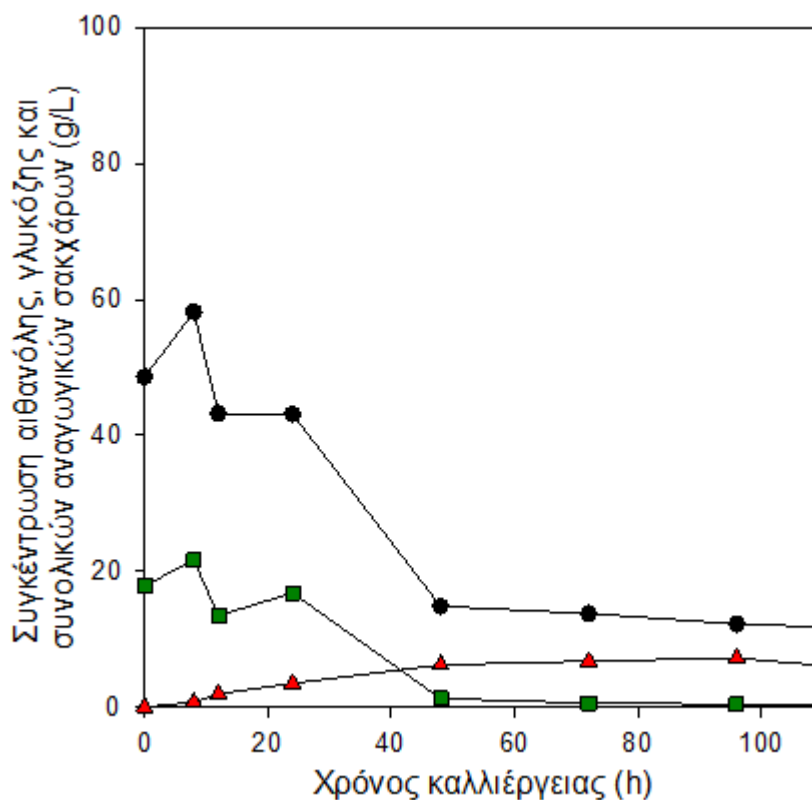
Συστατικό	% Β/Β	Απόδοση αιθανόλης (g/100 g ξηρού υλικού)
Άμυλο	9,93	5,64
Κυτταρίνη	11,8	6,70
Σύνολο		12,34

*Ο συντελεστής μετατροπής κυτταρίνης σε γλυκόζη είναι 1.11

Έγινε η διεξαγωγή των παρακάτω πειραμάτων:

Πείραμα Α.1: Στο υλικό που προήλθε από το στάδιο της προκατεργασίας (§1), αφού γίνει ρύθμιση του pH με χρήση NaOH, γίνεται προϋδρόλυση του για 30min σε θερμοκρασία 65° C με προσθήκη 0.053 Units/g αμύλου Liquezyme SC DS και

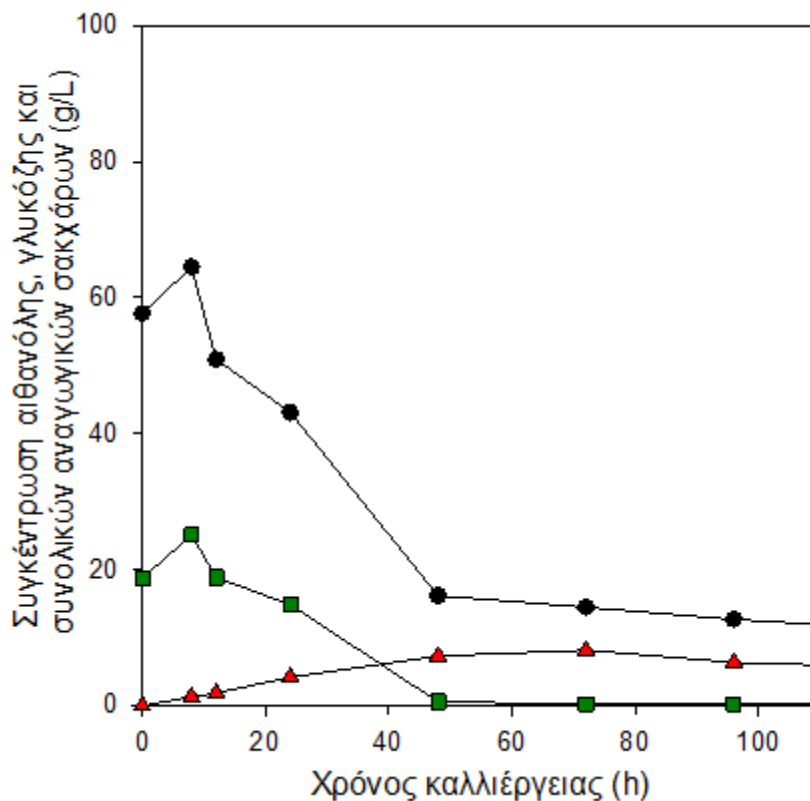
5.06Units/g αμύλου Spirizyme Fuel. Μετά την πάροδο των 30 min το προϋδρολυμένο στερεό εμβολιάζεται με την ζύμη *S. Cerevisiae* (ξηρή μαγιά αρτοποιίας – Γιώτης Α.Ε.) για την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Το μείγμα οδηγείται σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα (80 rpm) θερμοκρασίας 30° C. Σε τακτά χρονικά διαστήματα (0, 8, 12, 24, 48, 72, 96 hours) παραλαμβάνεται δείγμα και μετρώνται τα αναγωγικά σάκχαρα με τη μέθοδο DNS, η γλυκόζη kit και η παραγόμενη αιθανόλη με την μέθοδο HPLC. Η διαδικασία του πειράματος συνοπτικά: προκατεργασία → προϋδρόλυση με αμυλολυτικά ενζυμικά σκευάσματα (30min, 65° C)→ ζύμωση (30° C). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 20.



Διάγραμμα 20: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης της αιθανόλης (▲), της γλυκόζης (■) και των συνολικών αναγωγικών σακχάρων(●) κατά την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) υδροθερμικά προκατεργασμένων παρουσία θειικού οξέος διατροφικών απορριμμάτων συγκέντρωσης διατροφικών απορριμμάτων 30% (β/ο), 30min προϋδρόλυση σε θερμοκρασία 65° C με εμπορικό ενζυμικό σκεύασμα: μίγμα των Liquozyme SC DS με ενεργότητα 0,053 U/g αμύλου και Spirizyme Fuel με ενεργότητα 5,06U/g αμύλου, θερμοκρασία βιομετατροπής 30 °C.

Πείραμα Α.2.: Όμοια με Πείραμα Α.1., με την διαφορά ότι όταν γίνει η προσθήκη των αμυλολυτικών ενζυμικών σκευασμάτων το μείγμα οδηγείται απευθείας στον θερμοστατούμενο αναδευτήρα 30° C, χωρίς να προηγηθεί προϋδρόλυση. Η διαδικασία του πειράματος συνοπτικά: προκατεργασία →SSF με αμυλολυτικά ενζυμικά σκευάσματα (30° C)

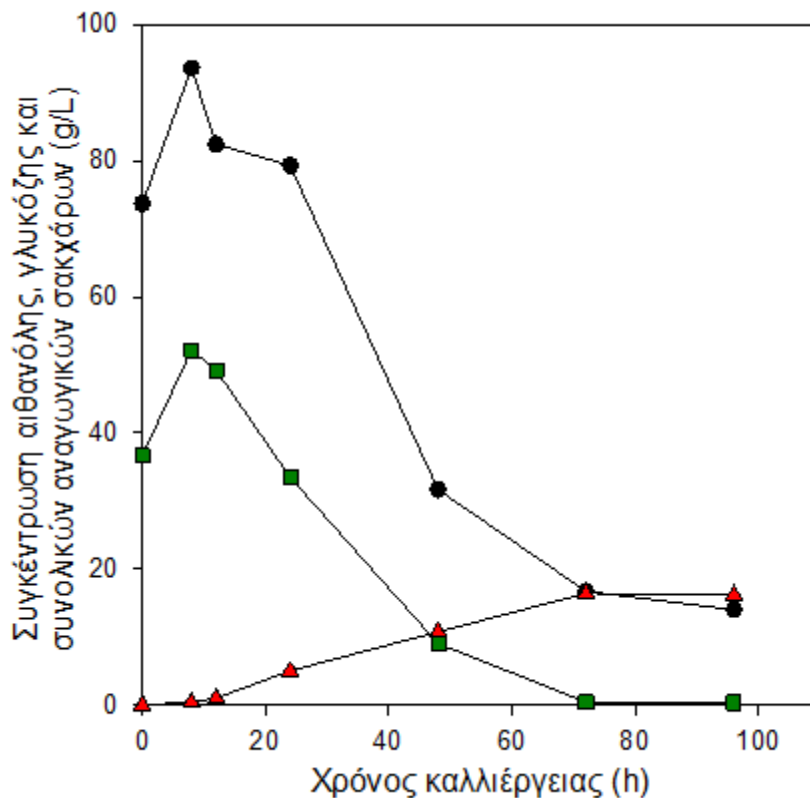
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 21.



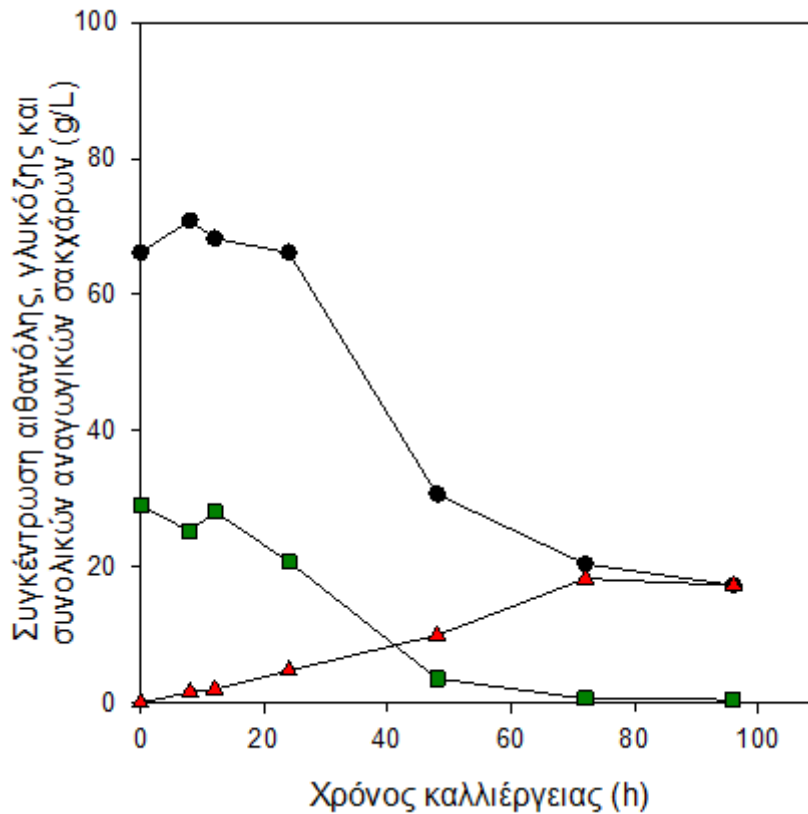
Διάγραμμα 21: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης της αιθανόλης (▲), της γλυκόζης (■) και των συνολικών αναγωγικών σακχάρων (●) κατά τη ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) υδροθερμικά προκατεργασμένων παρουσία θειικού οξέος διατροφικών απορριμμάτων συγκέντρωσης 30% (β/ο), χωρίς προϋδρόλυση του υλικού με ενζυμικό σκεύασμα: μίγμα των Liquezyme SC DS με ενεργότητα 0,053 U/g αμύλου και Spirizyme Fuel με ενεργότητα 5,06U/g αμύλου, θερμοκρασία βιομετατροπής 30 °C.

Πείραμα Β.: Στο υλικό που προήλθε από το στάδιο της προκατεργασίας (§ 1), αφού γίνει ρύθμιση του pH με χρήση NaOH, γίνεται προϋδρόλυση του υλικού για 6 ώρες σε θερμοκρασία 50° C με την χρήση του κυτταρινολυτικού ενζυμικού σκευάσματος: μείγμα Celluclast 1,5L/Novozyme 188(5:1) με τελική ενεργότητα 5 FPU/g υλικού. Μετά την πάροδο των 6 ωρών το προϋδρολυμένο στερεό

εμβολιάζεται με την ζύμη *S. Cerevisiae* (ξηρή μαγιά αρτοποιίας – Γιώτης Α.Ε.) για την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Το μείγμα οδηγείται σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα (80 rpm) θερμοκρασίας 30° C. Σε τακτά χρονικά διαστήματα (0, 8, 12, 24, 48, 72, 96 hours) παραλαμβάνεται δείγμα και μετρώνται τα αναγωγικά σάκχαρα με τη μέθοδο DNS, η γλυκόζη kit και η παραγόμενη αιθανόλη με την μέθοδο HPLC. Το ίδιο πείραμα επαναλαμβάνεται με προϋδρόλυση του υλικού με το εμπορικό ενζυμικό σκεύασμα Cellic® CTec2 με τελική ενεργότητα 7FPU/g υλικού. Η διαδικασία του πειράματος συνοπτικά: προκατεργασία → προϋδρόλυση με κυτταρινολυτικά ενζυμικά σκευάσματα (6hours, 50° C) → ζύμωση (30° C). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 22 και 23.



Διάγραμμα 22: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης της αιθανόλης (▲), της γλυκόζης (■) και των συνολικών αναγωγικών σακχάρων (●) κατά τη ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) υδροθερμικά προκατεργασμένων παρούσια θειικού οξέος διατροφικών απορριμμάτων. Συνθήκες: συγκέντρωση διατροφικών απορριμμάτων 30% (β/ο), 6 ώρες προϋδρόλυση σε θερμοκρασία 50° C του υλικού με κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα: μίγμα των Celluclast® 1.5 L και Novozyme® 188 σε αναλογία 5:1 (v/v), ενζυμικό φορτίο 5 FPU/g ξηρού υλικού, θερμοκρασία βιομετατροπής 30 °C.



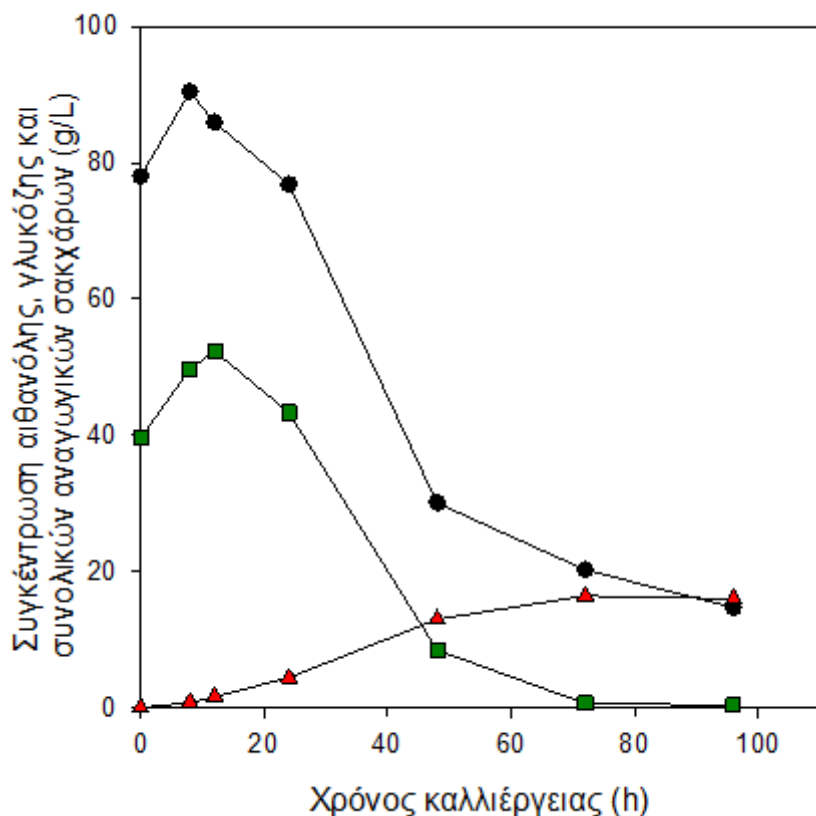
Διάγραμμα 23: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης της αιθανόλης (▲), της γλυκόζης (■) και των συνολικών αναγωγικών σακχάρων(●) κατά τη ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) υδροθερμικά προκατεργασμένων παρουσία θεικού οξέος διατροφικών απορριμμάτων συγκέντρωσης 30% (β/ο), 6 ώρες προϋδρόλυση σε θερμοκρασία 50° C του υλικού με κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα:Celli@CTec2, ενζυμικό φορτίο 7 FPU/g ξηρού υλικού, θερμοκρασία βιομετατροπής 30 °C.

Πείραμα Γ.1.: Στο υλικό που προήλθε από το στάδιο της προκατεργασίας (§ 3.1), αφού γίνει ρύθμιση του pH με χρήση NaOH, γίνεται προϋδρόλυση του για 30min σε θερμοκρασία 65° C με προσθήκη των αμυλολυτικού ενζυμικού σκευάσματος: μίγμα των Liquozyme SC DS με ενεργότητα 0,053 U/g αμύλου και Spirizyme Fuel με ενεργότητα 5,06U/g αμύλου Στο προκύπτον μείγμα προστίθεται το κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα: μίγμα των Celluclast® 1.5 L και Novozyme® 188 σε αναλογία 5:1 (o/o) με ενζυμικό φορτίο 5 FPU/g ξηρού υλικού και ακολουθεί προϋδρόλυση για 6 hours στους 50° C. Στο τελικό μείγμα προστίθεται ξηρή μαγιά αρτοποιίας – Γιώτης Α.Ε. και το μείγμα οδηγείται σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα (80 rpm) θερμοκρασίας 30° C. Σε τακτά χρονικά διαστήματα (0, 8, 12, 24, 48, 72, 96 hours) παραλαμβάνεται δείγμα και μετρώνται τα αναγωγικά σάκχαρα με τη μέθοδο DNS , η γλυκόζη kit και η παραγόμενη αιθανόλη με την μέθοδο HPLC.

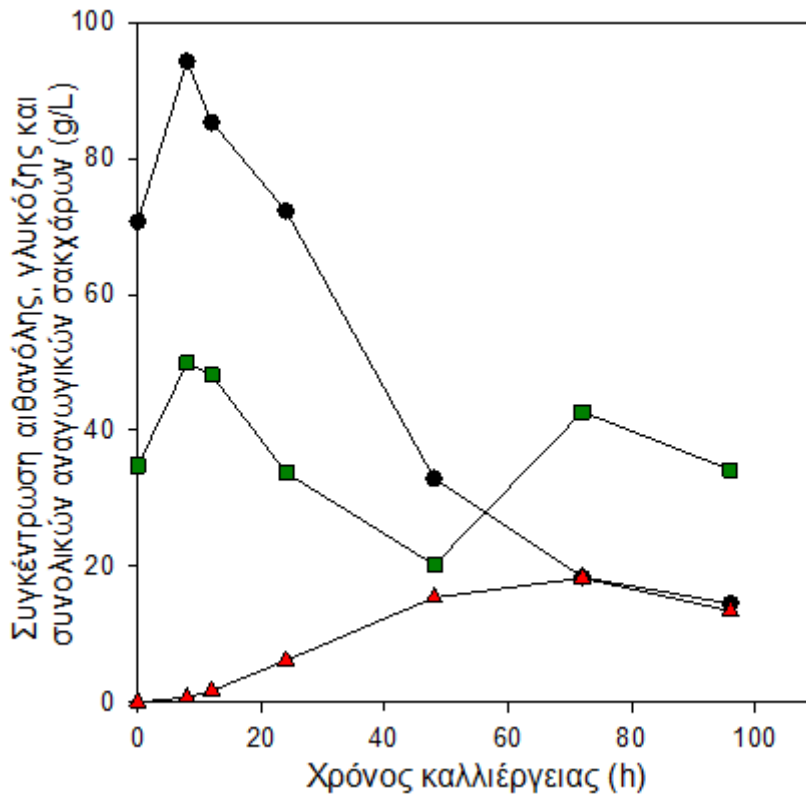
Το ίδιο πείραμα επαναλαμβάνεται με προϋδρόλυση του υλικού με το εμπορικό ενζυμικό σκεύασμα Cellic® CTec2 με τελική ενεργότητα 7FPU/g υλικού.

Η διαδικασία του πειράματος συνοπτικά: Προκατεργασία → προϋδρόλυση με αμυλολυτικά ένζυμα(30min,65°C) → προϋδρόλυση με κυτταρινολυτικά ένζυμα (6hours,50°C) → ζύμωση (30° C).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 24 και 25.

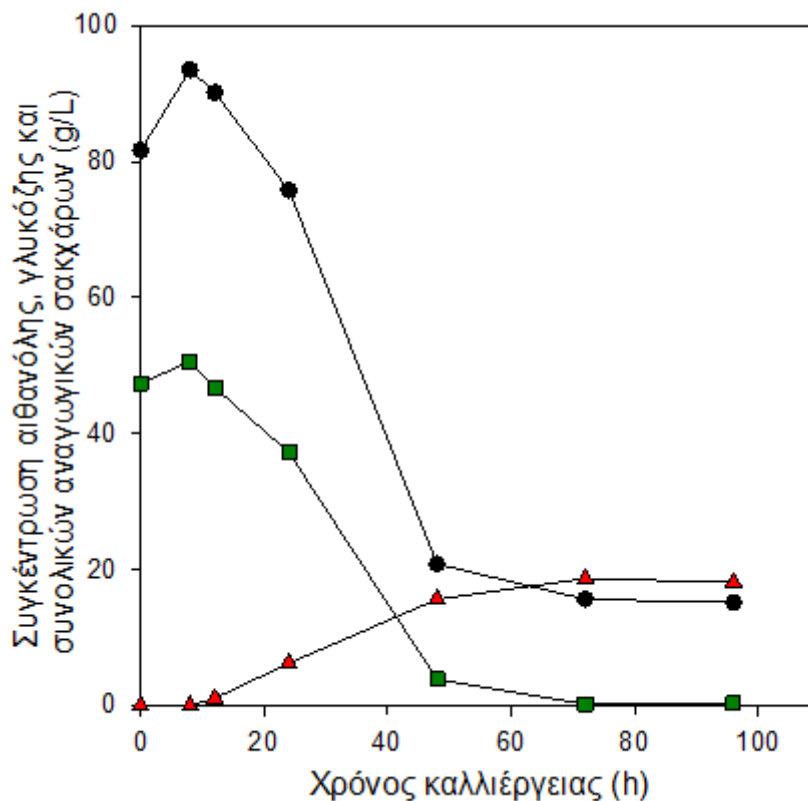


Διάγραμμα 24: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης της αιθανόλης (▲), της γλυκόζης (■) και των συνολικών αναγωγικών σακχάρων(●) κατά τη ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) υδροθερμικά προκατεργασμένων παρουσία θειικού οξέος διατροφικών απορριμμάτων συγκέντρωσης 30% (β/ο), 30 min προϋδρόλυση του υλικού σε θερμοκρασία 65° C με ενζυμικό σκεύασμα μίγμα των Liquezyme SC DS με ενεργότητα 0,053 U/g αμύλου και Spirizyme Fuel με ενεργότητα 5,06U/g αμύλου και κατόπιν 6 ώρες προϋδρόλυση στους 50° C με ενζυμικό σκεύασμα μίγμα των Celluclast® 1.5 L και Novozyme® 188 σε αναλογία 5:1 (ο/ο) με ενζυμικό φορτίο 5 FPU/g ξηρού υλικού, θερμοκρασία βιομετατροπής 30 °C,

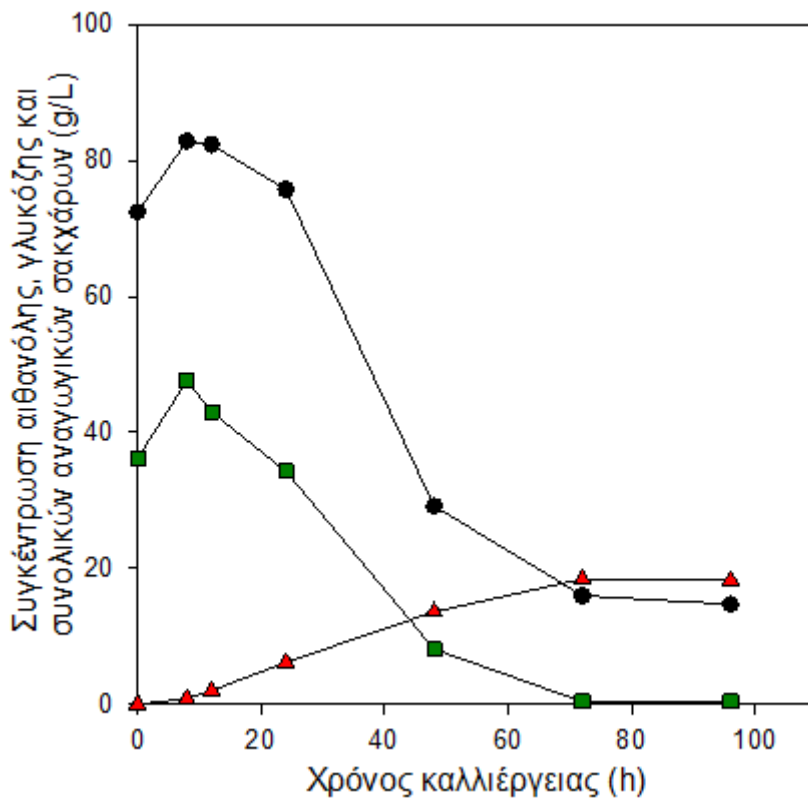


Διάγραμμα 25: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης της αιθανόλης (▲), της γλυκόζης (■) και των συνολικών αναγωγικών σακχάρων (●) κατά τη ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) υδροθερμικά προκατεργασμένων παρουσία θεικού οξέος διατροφικών απορριμμάτων συγκέντρωσης 30%(β/ο), 30 min προϋδρόλυση του υλικού σε θερμοκρασία 65° C με ενζυμικό σκεύασμα μείγμα των Liquezyme SC DS με ενεργότητα 0,053 U/g αμύλου και Spirizyme Fuel με ενεργότητα 5,06U/g αμύλου και 6 ώρες προϋδρόλυση σε θερμοκρασία 50° C με ενζυμικό σκεύασμα Cellic ®CTec2 με ενεργότητα 7 FPU/g ξηρού υλικού, θερμοκρασία βιομετατροπής 30 °C.

Πείραμα Γ.2.: Όμοια με πείραμα Γ.1. , μόνο που έγινε προϋδρόλυση του υλικού με την ταυτόχρονη προσθήκη αμυλολυτικών και κυτταρινολυτικών ενζύμων και εν συνεχεία το μείγμα οδηγήθηκε στον θερμοστατούμενο αναδευτήρα για ζύμωση. Συνοπτικά η διαδικασία του πειράματος: Προκατεργασία → προϋδρόλυση με αμυλολυτικά και κυτταρινολυτικά ένζυμα(6hours,50°C) → ζύμωση(30° C). Τα αποτελέσματα φαίνονται στα Διαγράμματα 26 και 27.



Διάγραμμα 26: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης της αιθανόλης (▲), της γλυκόζης (■) και των συνολικών αναγωγικών σακχάρων(●) κατά τη ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) υδροθερμικά προκατεργασμένων παρουσία θεικού οξέος διατροφικών απορριμμάτων συγκέντρωσης 30% (β/ο) με προϋδρόλυση για 6 ώρες του υλικού σε θερμοκρασία 50° C με τα ενζυμικά σκευάσματα: μείγμα των Liquozyme SC DS με ενεργότητα 0,053 U/g αμύλου και Spirizyme Fuel με ενεργότητα 5,06U/g αμύλου και με ενζυμικό σκευάσμα celluclast 1,5 L/novozyme 188 με ενεργότητα 5 FPU/g ξηρού υλικού, θερμοκρασία βιομετατροπής 30° C.

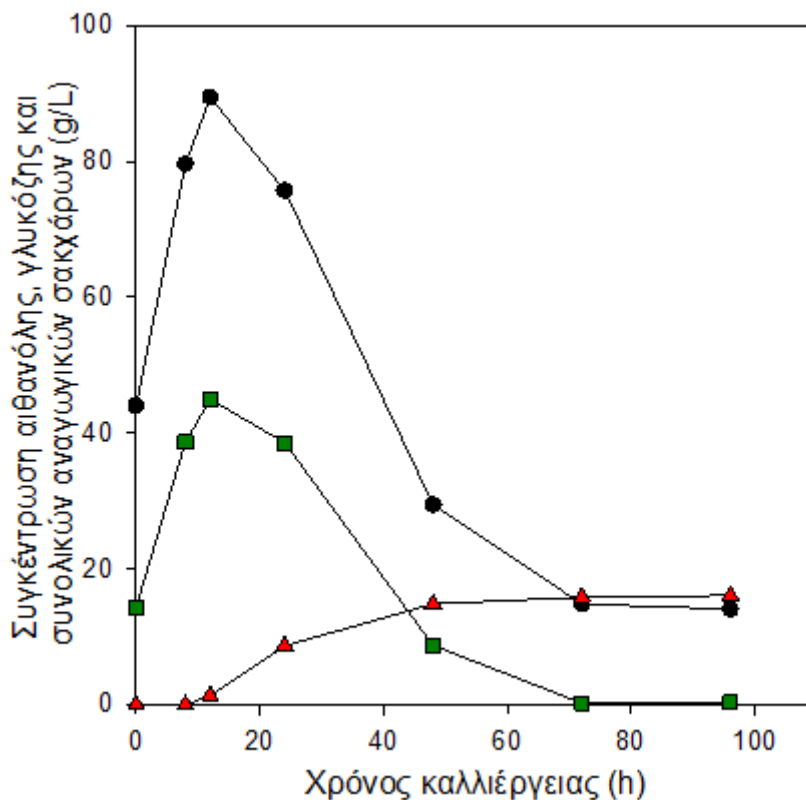


Διάγραμμα 27: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης της αιθανόλης (▲), της γλυκόζης (■) και των συνολικών αναγωγικών σακχάρων (●) κατά τη ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) υδροθερμικά προκατεργασμένων παρούσια θεικού οξέος διατροφικών απορριμμάτων συγκέντρωσης 30%(β/ο) με προϋδρόλυση για 6 ώρες του υλικού σε θερμοκρασία 50° C με τα εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα: μείγμα των Liquezyme SC DS με ενεργότητα 0,053 U/g αμύλου και Spirizyme Fuel με ενεργότητα 5,06U/g αμύλου και με ενζυμικό σκεύασμα Cellic® CTec2 με ενεργότητα 7 FPU/g ξηρού υλικού, θερμοκρασία βιομετατροπής 30°C.

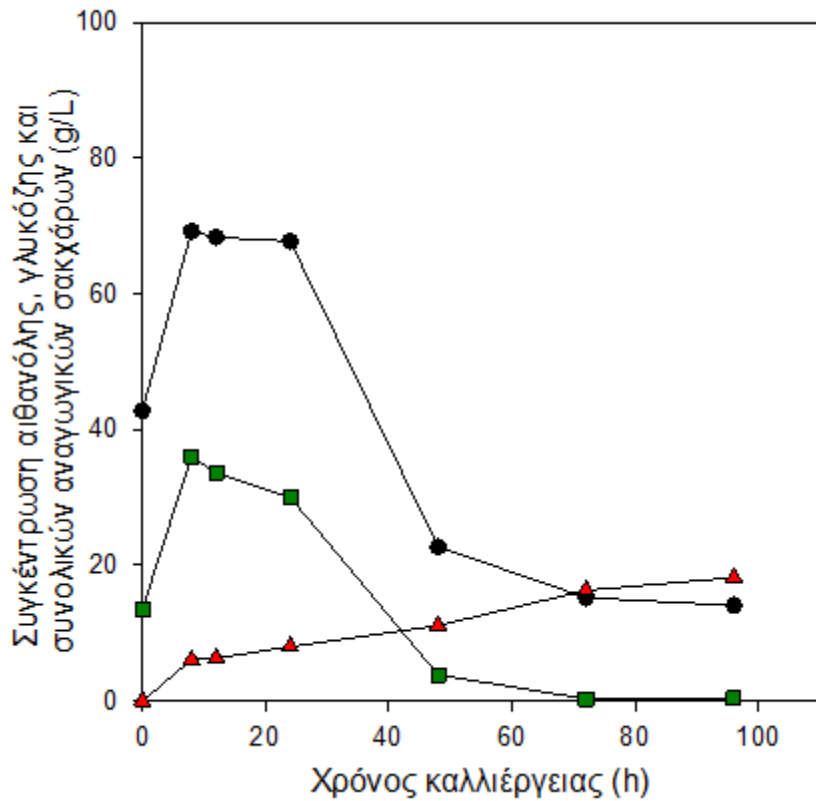
Πείραμα Δ: Όμοια με πείραμα Γ., με την διαφορά ότι μετά την προσθήκη των αμυλολυτικών και κυτταρινολυτικών ενζυμικών σκευασμάτων το μείγμα οδηγήθηκε απευθείας στον θερμοστατούμενο αναδευτήρα (30° C).

Συνοπτικά η διαδικασία του πειράματος: προκατεργασία → SSF με αμυλολυτικά και κυτταρινολυτικά ενζυμικά σκευάσματα (30° C).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 28 και 29.



Διάγραμμα 28: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης της αιθανόλης (▲), της γλυκόζης (■) και των συνολικών αναγωγικών σακχάρων (●) κατά τη ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) υδροθερμικά προκατεργασμένων παρουσία θεικού οξέος διατροφικών απορριμμάτων συγκέντρωσης 30% (β/ο), χωρίς προϋδρόλυση του υλικού με τα ενζυμικά σκευάσματα (μείγμα των Liquezyme SC DS με ενεργότητα 0,053 U/g αμύλου και Spirizyme Fuel με ενεργότητα 5,06U/g αμύλου και celluclast 1,5 L/novozyme 188 με ενεργότητα 5 FPU/g ξηρού υλικού, θερμοκρασία βιομετατροπής 30 °C).



Διάγραμμα 29: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης της αιθανόλης (▲), της γλυκόζης (■) και των συνολικών αναγωγικών σακχάρων (●) κατά τη ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) υδροθερμικά προκατεργασμένων παρούσια θειικού οξέος διατροφικών απορριμμάτων συγκέντρωσης 30%(β/ο). χωρίς προυδρόλυση του υλικού με τα ενζυμικά σκευάσματα (μείγμα των Liquezyme SC DS με ενεργότητα 0,053 U/g αμύλου και Spirizyme Fuel με ενεργότητα 5,06U/g αμύλου και Cellic® CTec2 με ενεργότητα 7 FPU/g ξηρού υλικού), θερμοκρασία βιομετατροπής 30 °C.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα παραγωγής βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση.

Προυδρόλυση 1	Προυδρόλυση 2	Ζύμωση	Αμυλάση Units/g αμύλου	Κυτταρινάση FPU/g υλικού	Παραγωγή αιθανόλης (g/L)	Απόδοση αιθανόλης (g/100 g υλικού)	Παραγωγή/τητα αιθανόλης (g/L · h)	% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης ¹	% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης ²
65oC/30min	όχι	30oC	0.053 + 5.06	όχι	7,22±0,84	2,41±0,28	0,08±0,01	30,96±3,61	112,87±13,16
όχι	όχι	30oC	0.053 + 5.06	όχι	8,17±1,65	2,72±0,55	0,11±0,01	35,03±7,07	127,73±25,77
65oC/30min	50oC/6h	30oC	0.053 + 5.06	5,00	16,42±0,83	5,47±0,28	0,17±0,02	37,82±2,61	256,78±17,70
65oC/30min	50oC/6h	30oC	0.053 + 5.06	7,00	18,25±0,29	6,08±0,10	0,25±0,00	42,03±0,67	285,41±4,54
όχι	50oC/6h	30oC	όχι	5,00	16,42±0,83	5,47±0,28	0,23±0,01	61,96±5,18	256,78±21,46
όχι	50oC/6h	30oC	όχι	7,00	18,25±0,29	6,08±0,10	0,25±0,00	68,87±1,09	285,41±4,54
όχι	50oC/6h	30oC	0.053 + 5.06	5,00	18,70±0,13	6,23±0,04	0,26±0,00	43,08±0,73	292,53±4,98
όχι	50oC/6h	30oC	0.053 + 5.06	7,00	18,43±0,57	6,14±0,19	0,26±0,01	42,46±1,30	288,30±8,85
όχι	όχι	30oC	0.053 + 5.06	5,00	16,09±0,04	5,36±0,01	0,17±0,00	37,07±0,09	251,69±0,66
όχι	όχι	30oC	0.053 + 5.06	7,00	18,43±0,56	6,14±0,19	0,23±0,00	42,46±0,65	288,30±4,43

Απόδοση 1 = με βάση τη μέγιστη παραγόμενη αιθανόλη από τα μη δομικά σάκχαρα, την κυτταρίνη και το άμυλο

Απόδοση 2 = με βάση τη μέγιστη παραγόμενη αιθανόλη από τα μη δομικά σάκχαρα

Από τον Πίνακα 15 φαίνεται ότι κατά τη ζύμωση του υλικού με χρήση μόνο αμυλολυτικών σκευασμάτων, δεν παρουσιάζεται διαφορά στην παραγωγή αιθανόλης εάν εφαρμοστεί προϋδρόλυση του υλικού για 30min σε θερμοκρασία 65° C. Η ζύμωση με εφαρμογή της μεθόδου SSF αποδίδει όμοια ποσότητα αιθανόλης. Έτσι, εάν ταυτόχρονα ληφθούν υποψη και τα αποτελέσματα της υδρόλυσης του αμύλου (Πίνακες 9,10,11) αποδεικνύεται ότι ο χρόνος προϋδρόλυσης που εφαρμόστηκε δεν ήταν επαρκής για την παραγωγή αρκετής ποσότητας σακχάρων για την άμεση βιομετατροπή τους σε αιθανόλη με την έναρξη της ζύμωσης.

Όσον αφορά στα κυτταρινολυτικά ένζυμα φαίνεται ότι δρουν επαρκώς αφού οδηγούν σε καθαρή απόδοση που αγγίζει το 68%. Σύγκριση μεταξύ των δύο σκευασμάτων κυτταρινολυτικών ενζύμων (Celluclast/Novozyme(5:1) και Cellic CTec2) δεν μπορεί να γίνει αφού εφαρμόζονται διαφορετικές ενεργότητες στις ζυμώσεις. Η παραγωγικότητα της διεργασίας κυμάνθηκε από 0,08-0,26 g/L*h (Πίνακας 14) και φαίνεται ότι εξαρτάται από την προϋδρόλυση του υλικού. Η μέγιστη τιμή παραγωγικότητας (0,26±0,00 g/L*h) επιτυγχάνεται ύστερα από μία προϋδρόλυση του προκατεργασμένου υλικού στους 50°C για 6 ώρες με αμυλολυτικά ένζυμα και κυτταρινολυτικά ένζυμα. Όλες οι ζυμώσεις που λαμβάνουν χώρα παρατηρείται ότι ολοκληρώνονται στις 48h, ενώ η ζύμη παρουσιάζει μια μικρή καθυστέρηση στην αφομοίωση της γλυκόζης προς παραγωγή αιθανόλης. Το εύρος τιμών παραγωγής αιθανόλης κατά την ζύμωση είναι 7,22±0,84 – 18,70±0,13g/L, ενώ τα ποσοστά % των μέγιστων θεωρητικών αποδόσεων είναι 68,87±1,09 της μέγιστης παραγόμενης αιθανόλης με βάση τα μη δομικά σάκχαρα, την κυτταρίνη και το άμυλο και 288,30±4,43 βάση της μέγιστης παραγόμενης αιθανόλης από τα μη δομικά σάκχαρα.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η διεργασία (τελική συγκέντρωση υλικού 30%, β/ο) δεν ξεπέρασε το όριο του 4% (β/ο) (Hahn-Hägerbal et al, 2006), το οποίο είναι αναγκαίο προκειμένου να μειωθούν οι ενεργειακές απαιτήσεις του σταδίου απόσταξης και να καταστεί οικονομικότερη η διεργασία.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα των πειραμάτων των ζυμώσεων δεν είναι τόσο ικανοποιητικά, αφού η παραγόμενη αιθανόλη δεν ξεπερνά το 4% β/ο, το οποίο είναι αναγκαίο προκειμένου να μειωθεί το συνολικό κόστος της διεργασίας. Παρεκκλίνουν από τα όρια της μέσης τιμής με τα τυπικά σφάλματα, διότι το μέγεθος του δείγματος στο πείραμα είναι πολύ μικρό για να σχηματιστεί μια καλή στατιστική εκτίμηση και η ομοιογένεια της προκατεργασμένης βιομάζας αμφισβητείται, η οποία φέρνει μεγαλύτερη παρέκκλιση.

Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν είναι ικανοποιητικά συγκρινόμενα με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας.

Οι Kim et al., (2008) εφάρμοσαν την τεχνολογία της διακριτής υδρόλυσης και ζύμωσης (SHF) σε διατροφικά απορρίμματα. Τα απορρίμματα αρχικά αναμίχτηκαν σε αναλογία 1:1 (ο/ο) με νερό και υπέστησαν μηχανική θραύση (μέγεθος σωματιδίων 1-2 mm). Ακολούθως αραιώθηκαν εκ νέου με νερό (1:1, ο/ο) και υδρολύθηκαν με χρήση εμπορικού σκευάσματος αμυλογλυκοζιδάσης. Η διάρκεια της υδρόλυσης ήταν 4 ώρες. Ελήφθη η υγρή φάση στην οποία βρίσκονται τα αναγωγικά σάκχαρα και χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή αιθανόλης με τη ζύμη *Sacchromyces cerevisiae* KA4. Η παραγωγή αιθανόλης ανήλθε σε 57.5 g/L από 120.1 g/L συνολικά αναγωγικά σάκχαρα τα οποία προέκυψαν από την υδρόλυση.

Ρευστοποίηση και ζύμωση εφαρμόστηκε από τους Moon et al. (2009). Ρευστοποίησαν διατροφικά απορρίμματα με χρήση carbohydrases και αμυλογλυκοζιδασών. Η ρευστοποίηση διήρκεσε 3 ώρες και η παραγόμενη αιθανόλη ανήλθε στα 29.1 g/L τιμή η οποία είναι χαμηλότερη από αυτή που επιτεύχθηκε στην παρούσα μελέτη.

Οι Man et al. (2010) ανέφεραν παραγωγή αιθανόλης της τάξης των 24.17 g/L από τη ζύμη *Kluyveromyces marxianus* σε food waste leachate.

Οι Wang et al (2008) ανέφεραν παραγωγή αιθανόλης της τάξης των 33.05 g/L από οικιακά απορρίμματα (kitchen waste) όπου βέβαια η αρχική περιεκτικότητα σε ολικά σάκχαρα ήταν πολύ υψηλή (63.88 % β/β). Από την άλλη πλευρά οι Walker et al. (2012) χρησιμοποίησαν απορρίμματα τροφών με υψηλή περιεκτικότητα σε άμυλο αλλά η παραγόμενη αιθανόλη ήταν εξαιρετικά χαμηλή (8 g/L).

Βιβλιογραφία

Ευρωπαϊκή Επιτροπή (2011). Πράσινη Βίβλος Από τις προκλήσεις στις ευκαιρίες: προς ένα κοινό πλαίσιο στρατηγικής για τη χρηματοδότηση της έρευνας και της καινοτομίας στην Ε.Ε. (COM(2011). Διαθέσιμο: http://ec.europa.eu/research/horizon2020/pdf/com_2011_0048_csf_green_paper_el.pdf

ΕΠΕΜ (2003), “Σχεδιασμός Διαχείρισης του Βιοαποδομήσιμου Κλάσματος των Αστικών Αποβλήτων”, Μελέτη ΥΠΕΧΩΔΕ, Αθήνα.

Ε. Λόης, Αν. Λάμπρου, 2007, «Τα βιοκαύσιμα στην Ελλάδα», Δημερίδα για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, Διαθέσιμο στο: (http://library.tee.gr/digital/kdth/kdth_3460/kdth_3460_lois.pdf)

Καραγιαννίδης Α., 1996. Μοντελοποίηση Ολοκληρωμένης Διαχείρισης Απορριμμάτων, Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Μετάδοσης Θερμότητας και Περιβαλλοντικής Μηχανικής, Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών.

Μουσιόπουλος Ν. και Καραγιαννίδης Α., 2002. Σημειώσεις στο μάθημα Διαχείριση απορριμμάτων. Θεσσαλονίκη: Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών, Εργαστήριο Μετάδοσης Θερμότητας και Περιβαλλοντικής Μηχανικής. Διαθέσιμο: [http:// aix.meng.auth.gr /lhtee/education /courses.html#c5](http://aix.meng.auth.gr/lhtee/education/courses.html#c5)

Σ. Μπερζεγιάννη, Α. Λάμπας, Σ. Βουτετάκης, Ι. Βασάλος, 2011, «Βιοκαύσιμα και Βιοδιυλιστήρια», 8ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής, **Παπανικολάου Βασιλική**, 2006, Μεταπτυχιακή Εργασία: Μέθοδοι και υλικά ακινητοποίησης βιοκαταλυτών για την παραγωγή καύσιμης και βιομηχανικής αλκοόλης σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου.

Σκορδίλης Α., 2009. Εναλλακτική διαχείριση στερεών απορριμμάτων. 1ο Ελληνικό φόρουμ για το περιβάλλον. Τ.Ε.Ε.: Δεκέμβριος 3-4. Διαθέσιμο: http://library.tee.gr/digital/m2470/m2470_skordilis_gr.pdf

Τσαντίλης Δ. και Χατζημήτρος Κ., 2007. Ευρωπαϊκή περιβαλλοντική πολιτική. Νέα Ευρωπαϊκή Ένωση, Μαραβέγιας Ν. και Τουνισιζέλης Μ. (επιμ.).

Θ Τσούτσος, 1990, 'Πειραματική και τεχνικοοικονομική αξιολόγηση συστημάτων που αξιοποιούν ενεργειακά κυτταρινούχα υλικά προς αιθανόλη', Διδακτορική διατριβή

Χριστακόπουλος Παύλος & Τόπακας Ευάγγελος, Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων, Αθήνα 2012.

Alvira P., Tomas-Pejo E., M. Ballesteros, M.J. Negro (2009). Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process based on Enzymatic Hydrolysis: A Review, *Biosource Technology*, 101(13), 4851-4861.

Alfrén Johan, John Hobley Timothy, 2014, Immobilization of cellulose mixtures on magnetic particles of hydrolysis of lignocelluloses and ease of recycling. , Pages 72–78

Agustriyanto R., Fatmawati A., Liasari Y. (2012). Study of Enzymatic Hydrolysis of Dilute Acid Pretreated Coconut Husk. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 7(2): 137-141.

Baia F.W, Andersona W.A, Moo-Younga M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*. 89–105

Balat M., Balat H., Öz C., (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34 (5):551-573.

Chen, 1981: "Production of ethanol from D-Xylose by using D-Xylose isomerase and yeasts" *APPL ENVIRON MICROB* 41 (2): 430-436 1981

Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Technical Report NREL/TP-510-42618

Dogaris I., Vakontios G., Kalogeris E., Mamma D., Kekos D. (2009) Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state

cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. *Industrial Crops and Products* 29 (2-3), pp. 404-411.

Doreen Steffien, Ines Aubel, Martin Bertau (2014), Enzymatic hydrolysis of pre-treated lignocellulose with *Penicillium verruculosum* cellulases, *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic* Volume 103, Pages 29-35.

EC. 2008. Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008. Brussels, 18.5.2010

EC. 2010. Communication From the Commission to the Council and the European Parliament on Future Steps in Bio-waste Management in the European Union {SEC(2010) 577}, COM(2010)235 final

Eklund, R., Galbe, M., Zacchi, G. (1995). The influence of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of willow prior to steam pretreatment, *Bioresource Technology*, 52(3), 225-229.

Elmherst College. Charles E. Ophardt, Virtual Chembook: Starch Διαθέσιμο: <http://www.elmherst.edu/~chm/vchembook/547starch.html>

Fatmawati A. , Agustriyanto R., Liasari Y, 2013, Enzymatic Hydrolysis of Alkaline Pretreated Coconut Coir, *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 8 (1), 2013, 34 - 39

F.O.Lichts. 2013. **Industry Statistics:** World Fuel Ethanol Production. Renewable Fuels Association. Retrieved.

Galbe M., Zacchi G. (2007). Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108, 41-65.

Ghose (1987). Measurement of cellulose activities, biochemical engineering research centre, Indian Institute of Technology, New Delhi-110016 India.

GREEN PAPER on the management of bio-waste in the European Union, 2008, Brussels, 3.12.2008 COM(2008) 811 final, {SEC(2008) 2936} on line available on: <http://eur-lex.europa.eu/en/tools/about.html>

Hayes D.J (2009). An examination of biorefining processes, catalysts and challenges, *Catalysis Today*, 145(1-2), 138-151.

Holtzapple M., Brown R., (1990). A comparison of the Michaelis–Menten and HCH-1 models, *Biotechnology and Bioengineering*, 36(11), 1151-1154.

Hsu, T.A., 1996, Pretreatment of biomass, in *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, C.E. Wyman, Taylor & Francis: Washington DC. p. 179-212.

JESSICA, 2010, Instruments for Solid Waste Management in Greece, EUROCONSULTANTS, EPTA.

Kim, J.K., Oh, B.R., Shin, H.-J., Eom, C.-Y., Kim W.S. (2008). Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. *Process Biochemistry* 43, 1308–1312.

Man H.L., Behera S.K., Park H.S., (2010). *Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate*. *International Journal of Environmental Science and Technology* 7, 157-64.

Miller, G. L. 1959. Use of Dinitro-Salicylic as Reagent for the determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31, 426–428.

Moon H.C., Song I.S., Kim J.C., Shirai, Y., Lee, D.H., Kim, J.K., Chung, S.O., Kim, D.H., Oh, K.K., Cho, Y.S. (2009) *Enzymatic hydrolysis of food waste and ethanol fermentation*. *International Journal of Energy Research* 33, 164–172.

Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander B., Lee Y.Y., Holtzapple M., Ladisch

M.(2004). Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, *Biosource Tecnology*, 96(2005), 673-686.

Ning Guo, Jia Zheng, Li-shuang Wu, Jian Tian, Hong-bo Zhou, 2013, Engineered bifunctional enzymes of endo-1,4- β -xylanase/endo-1,4- β -mannanase were constructed for synergistically hydrolyzing hemicellulose *Journal of Molecular catalysis B: enzymatic* Volume 97, Pages 311-318.

Pemberton M.S., Brown R.D., Emert G.H. 1980. The role of β glucosidase in the bioconversion of cellulose to ethanol. *Can. J. Chem. Eng.* 58, 723-729.

Robyt JF, French D (1967) *Arch Biochem Biophys*122:8.

Robyt JF, French D (1970) *Arch Biochem Biophys*138:622.

Shinn M. (2005).Waste. EU Environmental Policy Handbook: A Critical Analysis of EU Environmental Legislation Making it accessible to environmentalists and decision makers. Available at: <http://www.eeb.org/?LinkServID=3E1E422E-AAB4-A68D-221A63343325A81B&showMeta=0>

Siegrist J. 2013. Enzymatic Food Analysis. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytix/enzymatic-food-analysis.html>

Spencer, P., Flach B., Lieberz, S., Bendz K., Dahlbacka B. (2011), "EU-27 Annual Biofuels Report". Gain Report Number: NL1013.

Taherzadeh 2007, Acid based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials.

Van Wyk, J. P. H. 2001. Bio/technology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development.

Vinzant T.B., Ehrman C.I., Adney W.S., Thomas S.R., Himmel M.E., 1997. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated hardwoods. Effects

of native lignin content. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 62, 99-104.

Wang Q., Ma H., Xu W., Gong, L., Zhang, W., Zou, D. (2008). Ethanol production from kitchen garbage using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 39 (1), 604-10.

Woodward J.; Wiseman A., 1982. Fungal and other β -D-glucosidases. Their properties and applications. *Enzyme Microb. Technol.* 4, 73-79.

Ιστοσελίδες:

<http://www.ethanolrfa.org/pages/how-ethanol-is-made>

Position paper of the Bio-waste alliance., 2009, on line available on:

<http://www.biowaste.eu/>

<http://www.biofuels.gr/bioethanol/bioethanol/>

Οδηγία 2003/30/EK: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003L0030:EL:HTML>

EEA (2002), “Biodegradable municipal waste management in Europe. Part 1: Strategies and instruments”, EEA, www.eea.eu.int.

<http://www.eedsa.gr>

Πρόγραμμα ISWM-TINOS, διαθέσιμο στο :

http://uest.ntua.gr/iswmtinos/?page_id=69&lang=el

<http://www.biowaste.gr/site/general/legal/>