



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας



Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα

Θεοδώρα Γιαννακοπούλου

Επιβλέπων καθηγητής: **Δημήτρης Κέκος**
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Μάρτιος 2015

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου Δημήτρη Κέκο, τη Δρ. Διομή Μαμμά, την υποψήφια διδάκτορα Δανάη Αλαμάνου, καθώς και όλο το ανθρώπινο δυναμικό του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας για τη βοήθειά τους κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Γιαννακοπούλου Θεοδώρα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	3
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Εισαγωγή	7
2. Βιοκαύσιμα	8
2.1 Βιοαιθανόλη	8
2.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα βιοαιθανόλης έναντι της βενζίνης	10
2.3 Πρώτες ύλες παραγωγής βιοαιθανόλης	10
2.3.1 Παραγωγή βιοαιθανόλης από σακχαρούχες πρώτες ύλες	11
2.3.2 Παραγωγή βιοαιθανόλης από αμυλούχες πρώτες ύλες	11
2.3.3 Παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες	12
2.2.4 Βιοαπόβλητα (βιολογικά απόβλητα)	13
3. Διατροφικά Απορρίμματα	14
3.1 Διαχείριση διατροφικών απορριμμάτων	14
3.2 Σύσταση διατροφικών απορριμμάτων	15
3.3 Βιομετατροπή διατροφικών απορριμμάτων σε βιοαιθανόλη	19
4. Προκατεργασία πρώτης ύλης	19
4.1 Στόχοι	19
4.2 Μέθοδοι προκατεργασίας	20
4.2.1 Φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας	20
4.2.2 Φυσικοχημικές μέθοδοι προκατεργασίας	21
4.2.3 Χημικές μέθοδοι προκατεργασίας	24
4.2.4 Βιολογικές μέθοδοι προκατεργασίας	26
5. Υδρόλυση	26
5.1 Όξινη υδρόλυση	27
5.1.1 Υδρόλυση με αραιό οξύ	27
5.1.2 Υδρόλυση με πυκνό οξύ	27
5.2 Ενζυμική υδρόλυση	27
6. Αλκοολική Ζύμωση	29
6.1 Διεργασίες Παραγωγής Βιοαιθανόλης	29
6.1.1 Διακριτή Υδρόλυση και Ζύμωση (SHF)	30
6.1.2 Ταυτόχρονη Σακχαροποίηση και Ζύμωση (SSF)	30
6.1.3 Ενοποιημένη Βιοδεργασία (CBP)	31
6.2 Μικροοργανισμοί στην παραγωγή βιοαιθανόλης	31

6.2.1 Ο ζυμομύκητας <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
6.2.2 <i>Zygomonas mobilis</i>	34
6.2.3 <i>Escherichia coli</i>	34
6.2.4 <i>Pichia stipitis</i>	35
6.3 Παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης	35
6.4 Αναστολείς της αλκοολικής ζύμωσης	36
B. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	
1. Όργανα	39
2. Πρώτη ύλη	39
3. Προκατεργασία πρώτης ύλης	39
4. Ενζυμική υδρόλυση υδροθερμικά προκατεργασμένων και μη διατροφικών απορριμμάτων	40
5. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα	40
5.1 Διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωση διαλείποντος έργου (batch SSF)	41
5.2 Διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης ημιδιαλείποντος έργου (fed – batch NSSF)	41
6. Προσδιορισμός συγκέντρωσης αναγωγικών υδατανθράκων	41
7. Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης	42
8. Μέτρηση ολικής ενεργότητας κυτταρινασών (Filter paper activity)	42
9. Μέτρηση εξοκυτταρικών μεταβολιτών με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης	43
10. Ανάλυση συστατικών των διατροφικών απορριμμάτων	44
10.1. Προσδιορισμός υγρασίας (NREL/TP-510-42618)	44
10.2 Προσδιορισμός τέφρας (ASTM E1755 - 01(2007))	44
10.3. Προσδιορισμός του οργανικώς δεσμευμένου αζώτου με τη μέθοδο Kjeldahl (AOAC Method, 978.04)	45
10.4. Προσδιορισμός λιπαρών (AOAC Method 920.39C)	47
10.5. Προσδιορισμός υδατοδιαλυτών συστατικών (NREL/TP-510-42619)	48
11. Κλασμάτωση δομικών συστατικών (πολυσακχαριτών) του δείγματος	49
11.1. Απομάκρυνση πρωτεϊνικών συστατικών	50
11.2. Απομάκρυνση πηκτίνης	51
11.3. Απομάκρυνση ημικυτταρίνης	51
11.4. Απομάκρυνση κυτταρίνης	52
12. Ανάλυση στερεού υπολείμματος – Μέθοδος NREL	53
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
1. Σύσταση διατροφικών απορριμμάτων	58
2. Ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων: επίδραση της	58

προκατεργασίας και του ενζυμικού φορτίου	
3. Ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων: επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος και της θερμοκρασίας προκατεργασίας	68
4. Παραγωγή βιοαιαθανόλης από προκατεργασμένα και μη διατροφικά απορρίμματα	76
4.1. Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF)	77
4.2 Μη ισοθερμοκρασιακή ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση ημιδιαλείποντος έργου διατροφικών απορριμμάτων (NSSF)	84
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	90
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	96

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα διατροφικά απορρίμματα ανήκουν στην κατηγορία των βιοαποβλήτων, τα οποία αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό των αστικών στερεών αποβλήτων (ΑΣΑ). Λόγω της μεγάλης περιεκτικότητάς τους σε ζυμώσιμα σάκχαρα, αποτελούν κατάλληλη πρώτη ύλη για παραγωγή βιοαιθανόλης, ενός εναλλακτικού ανανεώσιμου καυσίμου κίνησης. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν την υδρόλυση και τη ζύμωσή τους προς παραγωγή βιοαιθανόλης. Τα διατροφικά απορρίμματα, τα οποία, μεταξύ άλλων, περιείχαν κυτταρίνη (18.30%, w/v), ημικυτταρίνη (7.55%, w/v) και υδατοδιαλυτά συστατικά (31.81%, w/v) χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή πειραμάτων υδρόλυσης και ζύμωσης.

Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση του ενζυμικού φορτίου και της υδροθερμικής προκατεργασίας (απουσία και παρουσία θειικού οξέος) του υλικού στην ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων. Δείγματα διατροφικών απορριμμάτων υπέστησαν ενζυμική υδρόλυση με χρήση μείγματος κυτταρινασών ολικής ενεργότητας 5, 10 και 20 FPU/g ξηρού υλικού. Αποδείχθηκε ότι η υδρόλυση ευνοείται από την αύξηση του ενζυμικού φορτίου και από την προκατεργασία του υλικού, ενώ η προσθήκη αραιού οξέος οδηγεί σε ακόμη καλύτερα αποτελέσματα. Η μέγιστη συγκέντρωση γλυκόζης (41.45 g/L) προέκυψε κατά την υδρόλυση προκατεργασμένων, παρουσία οξέος, διατροφικών απορριμμάτων με χρήση 20 FPU κυτταρινασών/g ξηρού υλικού, ενώ η αποικοδόμηση των ολικών πολυσακχαριτών κυμάνθηκε σε ποσοστά άνω του 60% σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος (30% και 50%, w/v) και της θερμοκρασίας προκατεργασίας (85, 100 και 120 °C) στην ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων. Η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος οδήγησε σε αύξηση της παραγόμενης γλυκόζης, ενώ τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα, και για τις δύο εξετασθείσες συγκεντρώσεις, προέκυψαν από τα προκατεργασμένα, παρουσία μικρής ποσότητας θειικού οξέος (1g H₂SO₄/100 g ξηρού υλικού), δείγματα στους 100 °C για 60 λεπτά.

Πραγματοποιήθηκαν, ακόμη, δοκιμές βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων, προκειμένου να ευρεθούν οι συνθήκες (ενζυμικό φορτίο, συγκέντρωση υποστρώματος, είδος διεργασίας) που μεγιστοποιούν την παραγωγή βιοαιθανόλης με εφαρμογή της διεργασίας ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της διεργασίας SSF, ο διπλασιασμός του ενζυμικού φορτίου από τα 5 στα 10 FPU/g ξηρού υλικού δεν επηρέασε σημαντικά την παραγωγή αιθανόλης, σε αντίθεση με το διπλασιασμό του από τα 10 στα 20 FPU/g ξηρού υλικού, που προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης κατά 14-16%. Η αύξηση της συγκέντρωσης υποστρώματος οδήγησε σε αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης, μειώνοντας, όμως, την απόδοση της διεργασίας. Με την προσθήκη νέου υλικού στην ήδη υπάρχουσα καλλιέργεια, αυξήθηκε τόσο η παραγόμενη αιθανόλη όσο και η απόδοση, αλλά κατέστη δυσκολότερη η διαχείριση του υλικού, λόγω του πολύ μεγάλου ιξώδους του. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίστηκε στο επόμενο στάδιο επιτυχώς, με προϋδρόλυση

του υλικού. Τα ποσοστά επί των θεωρητικών αποδόσεων, με βάση τα μη δομικά σάκχαρα και την κυτταρίνη, κυμάνθηκαν σε υψηλά επίπεδα (μεγαλύτερα του 60%), ενώ η παραγωγικότητα της διεργασίας κυμάνθηκε από 0.32 έως 1.26 g/(L·h).

Τέλος, εφαρμόστηκε διεργασία μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (NSSF) ημιδιαλείποντος έργου σε προϋδρολυμένα δείγματα τελικής συγκέντρωσης 40% (w/v), χρησιμοποιώντας ενζυμικό φορτίο ολικών κυτταρινασών 7 FPU/g ξηρού υλικού. Η μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης ανήλθε στα 42.66 g/L (10.7 g/100g ξηρού υλικού) και η παραγωγικότητα στα 1.19 g/(L·h).

ABSTRACT

Food waste is a kind of biowaste, that is a significant part of municipal solid waste (MSW). Due to its high fermentable sugar content, it is considered to be suitable for bioethanol production, which is an alternative and renewable transport fuel. The purpose of this thesis was to study the parameters, which affect the food waste hydrolysis and fermentation for bioethanol production. Food waste, containing, among others, cellulose (18.30%, w/v), hemicellulose (7.55%, w/v) and water-soluble components (31.81%, w/v), were used in hydrolysis and fermentation experiments.

At first, we examined the effect of the enzyme loading and the material's hydrothermal pretreatment (in the presence or absence of sulfuric acid) in the food waste enzymatic hydrolysis. Food waste samples were hydrolysed with a cellulase mixture at an enzyme loading of 5, 10 and 20 FPU/g dry matter. The results indicated that hydrolysis is favored by the material's pretreatment as well as the enzyme loading increase, while addition of sulfuric acid gives even better results. Maximum glucose concentration (41.45 g/L) was achieved while hydrolyzing pretreated (in the presence of sulfuric acid) food waste, using cellulase at an enzyme loading of 20 FPU/g dry HFW. The polysaccharides degradation rated above 60% in all cases examined.

Next, we studied the effect of the substrate concentration (30% and 50%, w/v) and the pretreatment temperature (85, 100 and 120 °C) in the food waste enzymatic hydrolysis. Substrate concentration increase resulted in higher glucose production. Optimal results, for both substrate concentrations tested, were obtained by the pretreated samples, in the presence of a small amount of sulfuric acid, at 100 °C for 60 minutes.

In addition, food waste bioconversion experiments took place, in order to find the conditions (enzyme loading, substrate concentration, kind of process) that maximize the bioethanol production, applying simultaneous saccharification and fermentation (SSF).

According to the results of the SSF process, doubling the enzyme loading from 5 to 10 FPU/g of dry HFW had no significant effect on ethanol production. In contrast, increasing the enzyme loading from 10 to 20 FPU/g resulted in an increase of the concentration of produced ethanol by 14 to 16%. Increasing substrate concentration resulted in an ethanol increase and a process yield reduction. The addition of fresh substrate to the existing culture enhanced both ethanol production and yield. The material's handling, though, became difficult, due to its high viscosity. This problem was successfully resolved in the next step by applying prehydrolysis. The ethanol yield, based on maximum theoretical ethanol production from the sugars presented in soluble fraction and total conversion of cellulose, ranged at high levels (higher than 60%), while the productivity of the process ranged from 0.32 to 1.26 g/(L·h).

Finally, a fed-batch nonisothermal simultaneous saccharification and fermentation (NSSF) process was applied to prehydrolysed samples at a final substrate concentration of 40% (w/v), using cellulase at an enzyme loading of 7

FPU/g dry HFW. The maximum ethanol concentration obtained was 42.66 g/L (10.7 g/100g dry matter) and the maximum productivity 1.19 g/(L·h).

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Λόγω της εξάντλησης των ορυκτών πόρων, έχει αυξηθεί παγκοσμίως το ενδιαφέρον για εναλλακτικές, μη πετρελαιούχες πηγές ενέργειας. Καθώς το πετρέλαιο παρέχει το 97% της ενέργειας που καταναλώνεται από τα μέσα μεταφοράς, τα τελευταία 20 χρόνια σε όλον τον κόσμο αναπτύσσονται και διατίθενται στο εμπόριο τεχνολογίες για παραγωγή εναλλακτικών καυσίμων κίνησης [1].

Τα μέσα μεταφοράς συμβάλλουν σημαντικά στην εκπομπή αερίων του θερμοκηπίου (Greenhouse Gas, GHG), αντιπροσωπεύοντας περίπου το 20% των παγκόσμιων εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) [2]. Οι εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου, που αποδίδονται στα ελληνικά επιβατικά αυτοκίνητα, αυξήθηκαν κατά 54% το 2010 σε σχέση με το 1990 [3]. Οι αριθμοί αυτοί αυξάνονται ταχύτερα από ό,τι για οποιονδήποτε άλλο τομέα. Ως εκ τούτου, η μείωση των εκπομπών από τον τομέα των μεταφορών θα μπορούσε να συμβάλει σημαντικά στην επίτευξη των στόχων της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την κλιματική αλλαγή [2].

Σύμφωνα με την ανάλυση των στοιχείων που υπέβαλε η Ελλάδα, βάσει της Σύμβασης της Κλιματικής Αλλαγής, το 80-83% της κατανάλωσης βενζίνης στην Ελλάδα αποδίδεται στα επιβατικά αυτοκίνητα. Η κατανάλωση πετρελαίου από επιβατικά αυτοκίνητα ήταν πρακτικά ανύπαρκτη μέχρι το 2010, διότι η κυκλοφορία πετρελαιοκίνητων επιβατικών οχημάτων είχε απαγορευθεί στις δύο μεγαλύτερες πόλεις της Ελλάδας, την Αθήνα και τη Θεσσαλονίκη [3].

Το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο του Μαρτίου 2007 επικύρωσε υποχρεωτικό στόχο 20% ως μερίδιο της ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές στη συνολική κατανάλωση ενέργειας της Κοινότητας έως το 2020 και υποχρεωτικό ελάχιστο στόχο, τον οποίο πρέπει να επιτύχουν όλα τα κράτη μέλη, 10% ως μερίδιο των βιοκαυσίμων στην κατανάλωση βενζίνης και πετρελαίου ντίζελ στις μεταφορές έως το 2020, στόχος που πρέπει να υλοποιηθεί κατά οικονομικώς συμφέροντα τρόπο [4].

Πρέπει να τονιστεί ιδιαίτερα ότι το βιοντίζελ είναι το μόνο βιοκαύσιμο κίνησης που διανέμεται στην ελληνική αγορά. Το πρότυπο EN15376 για τα «Καύσιμα κίνησης - αιθανόλη βιολογικής προέλευσης (βιοαιθανόλη) ως συστατικό ανάμειξης στη βενζίνη - Απαιτήσεις και Μεθοδολογία ελέγχου» δεν έχει μεταφερθεί ακόμη στην ελληνική νομοθεσία και, 10 χρόνια μετά την υλοποίηση της Ευρωπαϊκής Οδηγίας, δεν έχουν εγκατασταθεί ακόμη εργοστάσια βιοαιθανόλης.

Η Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης είχε εκδηλώσει ενδιαφέρον για τη μετατροπή δύο εκ των υπάρχοντων εργοστασίων ζάχαρης σε μονάδες παραγωγής βιοαιθανόλης, με ταυτόχρονη παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας, θερμότητας και ζωοτροφών υψηλής θρεπτικής αξίας, με ετήσια δυναμικότητα 150.000 m³ βιοαιθανόλης η κάθε μία. Εντούτοις, ο διεθνής διαγωνισμός μεταξύ των επενδυτών ακυρώθηκε το Νοέμβριο του 2010 [5].

Η προώθηση της παραγωγής και χρήσης βιοκαυσίμων θα μπορούσε να συμβάλει στη μείωση της εξάρτησης από τις εισαγωγές ενέργειας και των εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου. Επιπλέον, η πρόσμειξη των βιοκαυσίμων με ορυκτά καύσιμα θα διευκόλυνε την ενδεχόμενη μείωση του κόστους στο σύστημα διανομής στην Κοινότητα. Βιοκαύσιμα σε καθαρή μορφή ή σε μείγμα

μπορούν να χρησιμοποιούνται στα υπάρχοντα μηχανοκίνητα οχήματα και με τα υπάρχοντα συστήματα διανομής καυσίμων. [6].

Η αιθανόλη που προέρχεται από ζύμωση είναι ένα εναλλακτικό καύσιμο κίνησης, το οποίο είναι το πιο σημαντικό ανανεώσιμο καύσιμο που συμβάλλει στη μείωση των αρνητικών περιβαλλοντικών επιπτώσεων που προκαλούνται από τις πετρελαιούχες πηγές ενέργειας [1].

2. Βιοκαύσιμα

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ανάγκη χρήσης εναλλακτικών και ανανεώσιμων καυσίμων έναντι του πετρελαίου και των προϊόντων του, έχει αρχίσει να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον ανεπτυγμένο κόσμο. Ως βιοκαύσιμα χαρακτηρίζονται όλα τα στερεά, υγρά και αέρια καύσιμα που προέρχονται από τη βιομάζα. Τα κυριότερα από αυτά είναι:

- Το *βιοντίζελ*, που παράγεται από τα φυτικά έλαια και τα ζωικά λίπη. Αποτελεί ένα άριστο υποκατάστατο του συμβατικού ντίζελ και μπορεί να χρησιμοποιείται αυτούσιο ή σε μείγματα με αυτό στους ήδη υπάρχοντες πετρελαιοκινητήρες.
- Η *βιοαιθανόλη*, που παράγεται, κυρίως, από σακχαρούχα, κυτταρινούχα και αμυλούχα φυτά και μπορεί να χρησιμοποιείται σε μείγματα με τη βενζίνη.
- Το *βιοαέριο*, που παράγεται από τα οργανικά αγροτοβιομηχανικά και άλλα απόβλητα και υπολείμματα, καθώς και από ενεργειακά φυτά.
- Τα *πέλλετς* και οι *μπρικέττες*, που παράγονται από υπολείμματα γεωργικών καλλιεργειών και επεξεργασίας των γεωργικών προϊόντων (γεωργική βιομάζα), υπολείμματα καλλιέργειας των δασών και επεξεργασίας του ξύλου (δασική βιομάζα) κ. ά.
- Τα *βιοκαύσιμα νέας γενιάς* (βιοντίζελ, βιοαιθανόλη, πράσινο ντίζελ, αέριο σύνθεσης, βιοαέριο, βιοϋδρογόνο, συνθετικά βιοκαύσιμα κ.ά.), που θα παράγονται από απόβλητα και υπολειμματική βιομάζα με λιγότερα προβλήματα.

2.1 Βιοαιθανόλη

Η βιοαιθανόλη είναι η αιθανόλη ή αιθυλική αλκοόλη (C_2H_5OH) που προέρχεται από βιομάζα και είναι το πρώτο υγρό βιοκαύσιμο που χρησιμοποιήθηκε ως υποκατάστατο της βενζίνης σε οχήματα.

Σύμφωνα με στοιχεία του 2006, στις ΗΠΑ το 2005 η παραγωγή βιοαιθανόλης είχε ανέλθει στους 9.000.000 τόνους και αυξανόταν κατά 30% κάθε χρόνο. Η Βραζιλία διατηρούσε παγκοσμίως την πρώτη θέση στην παραγωγή βιοαιθανόλης. Στη Γερμανία και στην Ουγγαρία έχουν κατασκευαστεί μεγάλα εργοστάσια παραγωγής βιοαιθανόλης, δυναμικότητας έως και 250.000 τόνων και 400.000 τόνων το χρόνο αντίστοιχα. Στην Ισπανία, στην Ιταλία, στην Αυστρία και στις άλλες χώρες

της Κεντρικής Ευρώπης παράγονται σημαντικές ποσότητες βιοαιθανόλης και βιοντίζελ. Οι πρώτες 15 χώρες σε παραγωγή υγρής βιοαιθανόλης και βιοντίζελ για το 2011 φαίνονται στον επόμενο πίνακα:

Πίνακας Α1. Κατάταξη των 15 πρώτων χωρών σε παραγωγή υγρών βιοκαυσίμων για το έτος 2011.

A/A	Χώρα	Υγρή Βιοαιθανόλη (δισεκατομμύρια λίτρα)	Βιοντίζελ (δισεκατομμύριο λίτρα)
1	Ηνωμένες Πολιτείες	54.2	3.2
2	Βραζιλία	21.0	2.7
3	Γερμανία	0.8	3.2
4	Αργεντινή	0.2	2.8
5	Γαλλία	1.1	1.6
6	Κίνα	2.1	0.2
7	Καναδάς	1.8	0.2
8	Ινδονησία	0.0	1.4
9	Ισπανία	0.5	0.7
10	Ταϊλάνδη	0.5	0.6
11	Βέλγιο	0.4	0.4
12	Ολλανδία	0.3	0.4
13	Ιταλία	0.0	0.6
14	Κολομβία	0.3	0.3
15	Αυστρία	0.2	0.4
Συνολικά στην ΕΕ		4.3	9.2
Συνολικά παγκοσμίως		86.1	24.1

Πηγή: REN 21, Renewables Global Status Report 2009 Update

Σημείωση: Η σειρά κατάταξης είναι σύμφωνη με τη συνολική παραγωγή βιοκαυσίμων

Η βιοαιθανόλη παράγεται κυρίως από τη ζάχαρη με τη μέθοδο της αλκοολικής ζύμωσης. Μπορεί, επίσης, να συντεθεί βιομηχανικά μέσω της χημικής αντίδρασης του αιθυλενίου με ατμό. Είναι ένα άχρωμο διαυγές υγρό, υψηλής ενεργειακής περιεκτικότητας και καθαρότερο περιβαλλοντικά από τη βενζίνη. Είναι βιοαποικοδομήσιμη, χαμηλής τοξικότητας και προκαλεί πολύ μικρή περιβαλλοντική μόλυνση αν απορριφθεί στο περιβάλλον. Κατά την τέλεια καύση της παράγεται διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) και νερό (H₂O). Αποτελεί ένα καύσιμο υψηλού αριθμού οκτανίων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο για την αύξηση του αριθμού οκτανίων της βενζίνης. Με την ανάμειξή της με τη βενζίνη επιτυγχάνεται ο εμπλουτισμός του καυσίμου σε οξυγόνο, με αποτέλεσμα μία πιο ολοκληρωμένη καύση, άρα και μειωμένες εκπομπές επικίνδυνων καυσαερίων, όπως μονοξειδίου του άνθρακα (CO) κ.ά..

Καύσιμα μείγματα αιθανόλης με βενζίνη πωλούνται ευρύτατα στις Ηνωμένες Πολιτείες. Το πιο συνηθισμένο μείγμα είναι αυτό που αποτελείται από 10%

αιθανόλη και 90% βενζίνη (E10) [7]. Στη Βραζιλία η βιοαιθανόλη χρησιμοποιείται καθαρή ή αναμεμειγμένη με βενζίνη σε αναλογίες 24% βιοαιθανόλη και 76% βενζίνη [8]. Τα συμβατικά οχήματα δεν απαιτούν μετατροπή για να κινηθούν με E10. Επίσης, η χρήση του E10 δεν έχει καμία επίπτωση στην εγγύηση του οχήματος. Τα σύγχρονα οχήματα μπορούν να κινηθούν και με καύσιμο μείγμα 85% αιθανόλης και 15% βενζίνης (E85) [7].

2.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα βιοαιθανόλης έναντι της βενζίνης

Η βιοαιθανόλη έχει μεγαλύτερο αριθμό οκτανίων, ευρύτερα όρια αναφλεξιμότητας, υψηλότερες ταχύτητες μετάδοσης του μετώπου της φλόγας και υψηλότερες ενθαλπίες εξάτμισης από τη βενζίνη. Οι ιδιότητές της αυτές επιτρέπουν υψηλότερη αναλογία συμπίεσης και μικρότερο χρόνο καύσης, που οδηγούν σε καλύτερη θεωρητική απόδοση έναντι της βενζίνης σε έναν κινητήρα εσωτερικής καύσης.

Ο αριθμός οκτανίων είναι ένα μέτρο της ποιότητας των καυσίμων, και ιδιαίτερα της βενζίνης, για μηχανές εσωτερικής καύσης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη της πρόωρης ανάφλεξης, η οποία οδηγεί σε “χτυπήματα” της μηχανής. Στις μηχανές εσωτερικής καύσης προτιμάται μεγάλος αριθμός οκτανίων. Ένα οξυγονούχο καύσιμο, όπως η βιοαιθανόλη, παρέχει καλή αντικροτική ικανότητα. Επιπλέον, λόγω του ότι περιέχει οξυγόνο, η καύση της είναι πιο αποτελεσματική και, συνεπώς, μειώνει τους υδρογονάνθρακες, το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και τις εκπομπές σωματιδίων στα καυσαέρια [8]. Η συνεισφορά της στο σχηματισμό οξειδίων του αζώτου (NO_x) είναι ασήμαντη [14].

Τα μειονεκτήματα της βιοαιθανόλης περιλαμβάνουν τη χαμηλότερη ενεργειακή πυκνότητα από τη βενζίνη (η βιοαιθανόλη παρέχει το 66% της ενέργειας που παρέχει η βενζίνη), τη δυνατότητα διάβρωσής της, τη χαμηλή φωτεινότητα της φλόγας της, τη χαμηλότερη τάση ατμών (καθιστώντας, έτσι, δύσκολη την εκκίνηση με ψυχρό κινητήρα), την αναμειξιμότητά της με το νερό και την τοξικότητά της για τα οικοσυστήματα [8].

2.3 Πρώτες ύλες παραγωγής βιοαιθανόλης

Η βιοαιθανόλη παράγεται συνήθως από τις γεωργικές πρώτες ύλες που περιέχουν σάκχαρα. Οι πρώτες ύλες αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε πρώτης γενιάς (σακχαρούχες και αμυλούχες) και δεύτερης γενιάς (λιγνινοκυτταρινούχες).

Τα σάκχαρα (π.χ. από σακχαροκάλαμα, μελάσα, σακχαρότευτλα, και φρούτα) μπορούν να υποστούν απευθείας ζύμωση με χρήση ζύμης για παραγωγή αιθανόλης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι εάν χρησιμοποιούνται σακχαρούχες πρώτες ύλες, όπως οι χυμοί της μελάσας και του σακχαροκάλαμου για τη ζύμωση, τότε διεργασίες όπως η άλεση, η προκατεργασία, η υδρόλυση και η αποτοξίνωση δεν είναι απαραίτητες. Για την παραγωγή των ζυμώσιμων σακχάρων από αμυλούχα

υλικά, μπορεί να χρησιμοποιηθούν διεργασίες όπως η άλεση, η υγροποίηση και η σακχαροποίηση. Στην περίπτωση λιγνινοκυτταρινούχων πρώτων υλών, οι διεργασίες αυτές είναι απαραίτητες.

Το βήμα που προηγείται της διεργασίας ζύμωσης, είναι η κύρια διαφορά μεταξύ των διαδικασιών παραγωγής αιθανόλης από τις διάφορες πρώτες ύλες [9].

2.3.1 Παραγωγή βιοαιθανόλης από σακχαρούχες πρώτες ύλες

Τα σακχαροκάλαμα, τα σακχαρότευτλα και το γλυκό σόργο είναι καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Τα κύρια πλεονεκτήματά τους είναι η υψηλή απόδοση σακχάρων ανά στρέμμα και το χαμηλό κόστος μετατροπής. Το κύριο μειονέκτημά τους είναι οι διακυμάνσεις της διαθεσιμότητάς τους λόγω εποχής. Επειδή οι ίνες των στελεχών και των φύλλων (βαγάσση ή υπολείμματα σακχαροκάλαμου) χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ατμού και ηλεκτρικής ενέργειας για την βιοδιύλιση, το σακχαροκάλαμο έγινε μια οικονομικά αποδοτική πηγή βιοκαυσίμων. Επιπλέον, το υγρό απόβλητο (βινάσση) χρησιμοποιείται για λίπασμα και άρδευση στις φυτείες, εξαλείφοντας, έτσι, το κόστος της επεξεργασίας των λυμάτων.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η αλκοολική ζύμωση από σακχαρούχες πρώτες ύλες είναι μία πολύ γνωστή και τελειοποιημένη διαδικασία [9].



Γλυκός σόργος



Σακχαροκάλαμα



Σακχαρότευτλα

Εικόνα A1. Σακχαρούχες πρώτες ύλες για παραγωγή βιοαιθανόλης.

2.3.2 Παραγωγή βιοαιθανόλης από αμυλούχες πρώτες ύλες

Τα σιτηρά (καλαμπόκι, σιτάρι ή κριθάρι) περιέχουν κυρίως άμυλο (για παράδειγμα, το καλαμπόκι περιέχει 60-70%). Το άμυλο που είναι αποθηκευμένο στα σιτηρά αποτελείται από μακριές αλυσίδες μονάδων γλυκόζης. Οι αλυσίδες αυτές αποτελούν την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη, οι οποίες περιέχουν 1.000 ή περισσότερα μονομερή και 1.000-6.000 ή περισσότερα μονομερή γλυκόζης αντίστοιχα. Για την παραγωγή αιθανόλης από άμυλο, πρέπει να σπάσουν οι αλυσίδες αυτές, ώστε να παραληφθεί σιρόπι γλυκόζης, το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε αιθανόλη με ζυμομύκητες.

Αυτού του είδους οι πρώτες ύλες είναι οι πλέον χρησιμοποιούμενες για την παραγωγή βιοαιθανόλης στη Βόρεια Αμερική και στην Ευρώπη. Το καλαμπόκι και το σιτάρι καλλιεργούνται κυρίως με σκοπό την παραγωγή αιθανόλης. Στις τροπικές χώρες, άλλα αμυλούχα φυτά, όπως η μανιόκα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ίδιο σκοπό.

Στο άμυλο, τα πολυμερή της γλυκόζης σπάνε σε μονομερή μέσω μιας

υδρολυτικής αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο γλυκο-αμυλάση. Το προκύπτον σάκχαρο είναι γνωστό ως δεξτρόζη ή D-γλυκόζη που είναι ένα ισομερές της γλυκόζης. Στη συνέχεια ακολουθεί η ζύμωση, η απόσταξη και η αφυδάτωση ώστε να παραληφθεί, τελικά, άνυδρη αιθανόλη [9].



Καλαμπόκι

Κριθάρι

Σιτάρι

Εικόνα Α2. Αμυλούχες πρώτες ύλες για παραγωγή βιοαιθανόλης.

2.3.3 Παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες

Η βιοαιθανόλη μπορεί, ακόμη, να παραχθεί από λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες και είναι γνωστή ως βιοαιθανόλη δεύτερης γενιάς. Αυτές οι πρώτες ύλες περιλαμβάνουν αγροτικά υπολείμματα, χόρτα και υπολείμματα δασικών καλλιεργειών και ξύλου. Έχουν γίνει τεράστιες ερευνητικές προσπάθειες για την ανάπτυξη οικονομικά αποδοτικών δεύτερης γενιάς ή προηγμένων τεχνολογιών για την παραγωγή αιθανόλης ως καυσίμου στη βιβλιογραφία. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες προκλήσεις όσον αφορά τις εφαρμογές των προηγμένων τεχνολογιών στο εμπόριο.

Οι λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες αποτελούνται από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Η λιγνίνη δρα ως συνδετικό υλικό που κρατάει όλα τα άλλα συστατικά μαζί και είναι υπεύθυνη για τη δομική σταθερότητα της πρώτης ύλης. Τα σάκχαρα που υπάρχουν στην κυτταρίνη είναι κυρίως γλυκόζη. Ωστόσο, η ημικυτταρίνη είναι ένα μείγμα από διαφορετικούς τύπους σακχάρων. Περιέχει τόσο C6 (γλυκόζη, μαννόζη και γαλακτόζη) όσο και C5 (ξυλόζη, αραβινόζη, και ραμνόζη) σάκχαρα.

Η χημική σύνθεση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών αποτελεί ένα βασικό παράγοντα που επηρεάζει την αποδοτικότητα της παραγωγής βιοκαυσίμων κατά τις διεργασίες μετατροπής. Η δομική και χημική σύσταση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών είναι εξαιρετικά μεταβλητή, λόγω των γενετικών και περιβαλλοντικών επιρροών και των αλληλεπιδράσεών τους [9].



Αγροτικά υπολείμματα



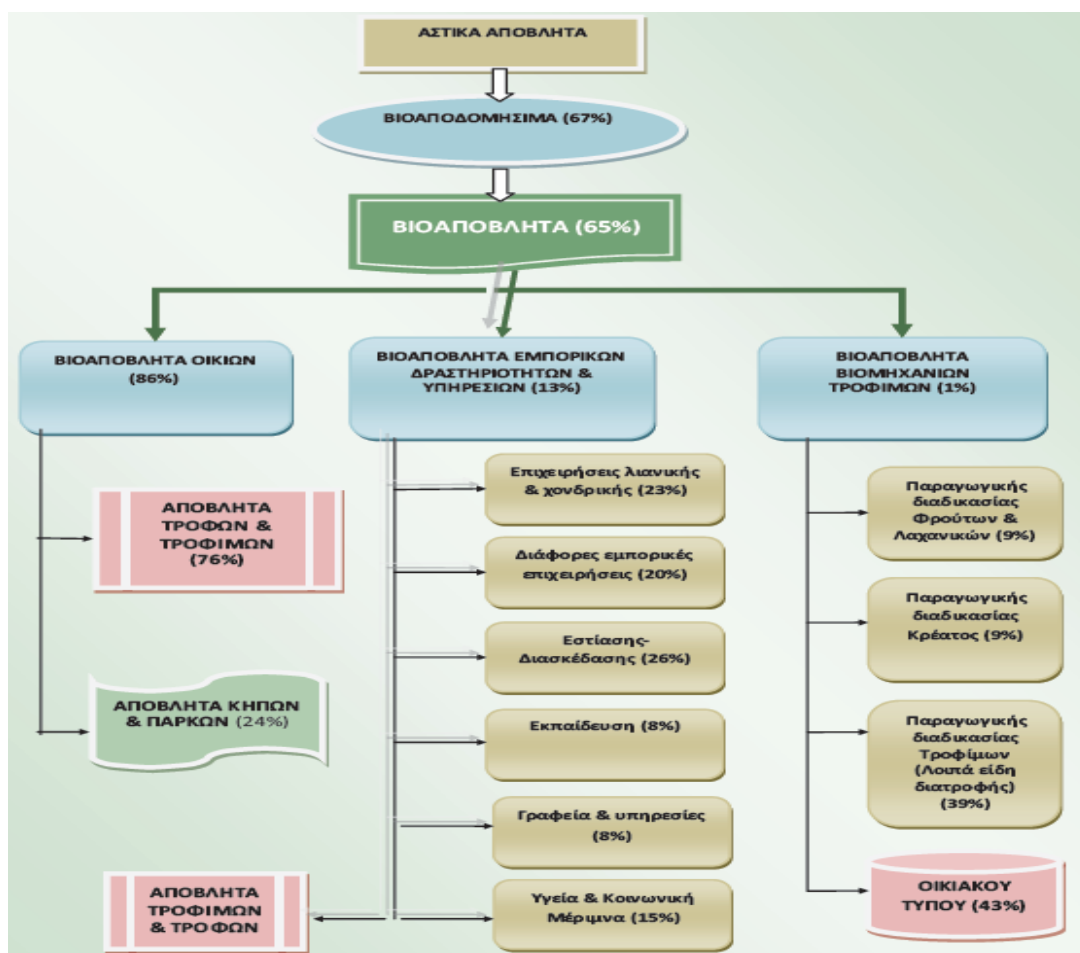
Υπολείμματα δασικών καλλιεργειών

Εικόνα Α3. Λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες για παραγωγή βιοαιθανόλης.

2.2.4 Βιοαπόβλητα (βιολογικά απόβλητα)

Σύμφωνα με την Οδηγία 98/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και την Πράσινη Βίβλο (3.12.2008 COM-2008 811), τα βιοαπόβλητα ή βιολογικά απόβλητα (ΒΑ) αποτελούν υποσύνολο των βιοαποδομήσιμων αποβλήτων (ΒΑΑ) και ορίζονται ως "τα βιοαποδομήσιμα απόβλητα κήπων και πάρκων, τα απόβλητα τροφών μαγειρειών, νοικοκυριών, εστιατορίων, μονάδων εστίασης και καταστημάτων λιανικής πώλησης και παρεμφερή απόβλητα εγκαταστάσεων επεξεργασίας τροφίμων". Πρέπει να σημειωθεί ότι στον ορισμό δεν περιλαμβάνονται τα δασικά ή γεωργικά κατάλοιπα, η κοπριά, η ιλύς επεξεργασίας λυμάτων ή άλλα βιοαποδομήσιμα απόβλητα, όπως οι φυσικές ίνες, το χαρτί ή το κατεργασμένο ξύλο. Εξαιρούνται, επίσης, τα παραπροϊόντα του τομέα παραγωγής τροφίμων που δε μετατρέπονται ποτέ σε απόβλητα.

Με βάση τον παραπάνω ορισμό, τα βιοαπόβλητα προέρχονται από οικίες, εμπορικές δραστηριότητες και υπηρεσίες, και εγκαταστάσεις παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων. Οι τρεις παραπάνω βασικές κατηγορίες προέλευσης των βιοαποβλήτων χωρίζονται σε αντίστοιχες υποκατηγορίες, εφόσον προκύπτει διακριτό ρεύμα και σημαντική ποσότητα βιοαποβλήτων που απαιτεί ξεχωριστή στόχευση και αντιμετώπιση κατά τη φάση σχεδιασμού των προγραμμάτων Διαλογής στην Πηγή (ΔσΠ). Η κατηγοριοποίηση των βιοαποβλήτων και τα διακριτά ρεύματα κάθε υποκατηγορίας τους απεικονίζονται στο σχήμα που ακολουθεί [40]:



ΣχήμαΑ1 . Κατηγορίες προέλευσης και διακριτά ρεύματα παραγωγής των βιοαποβλήτων.

Τα απόβλητα τροφών και τροφίμων που απορρίπτονται από εστιατόρια, μονάδες παραγωγής τροφίμων και οικίες αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό των αστικών στερεών αποβλήτων. Για το λόγο αυτό, μεγάλη προσοχή έχει στραφεί προς την επεξεργασία διατροφικών απορριμμάτων για την παραγωγή προϊόντων, όπως το γαλακτικό οξύ, η βιοαιθανόλη και το βιοαέριο [56].

3. Διατροφικά Απορρίμματα

Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται, συνήθως, 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, καθώς και διατροφικά απορρίμματα.

3.1 Διαχείριση διατροφικών απορριμμάτων

Τα περισσότερα υπολείμματα τροφών θάβονται σε Χώρους Υγειονομικής Ταφής Απορριμμάτων (ΧΥΤΑ) ή αποτεφρώνονται [10]. Ωστόσο, η αποτέφρωση είναι δαπανηρή και ενεργοβόρα, και δεδομένου ότι αυτά τα απορρίμματα έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, πρέπει να καίγονται μαζί με άλλα πιο ξηρά, με αποτέλεσμα την παραγωγή διοξινών [11].

Άλλος τρόπος διαχείρισης των διατροφικών απορριμμάτων είναι η χρήση τους ως ζωοτροφή, κυρίως για βοοειδή. Τα απορρίμματα μπορούν να ξηρανθούν και να διαμορφωθούν σε σβώλους πριν από την πώλησή τους ως ζωοτροφή. Ωστόσο, τα περισσότερα διατροφικά απορρίμματα έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Συνεπώς, δεν είναι ιδανικά για ζωοτροφή. Η υψηλή περιεκτικότητα ορισμένων απορριμμάτων σε λιγνίνη, για παράδειγμα των υπολειμμάτων της ελιάς και του σακχαροκάλαμου, επίσης, περιορίζουν τη δυνατότητα χρήσης τους ως ζωοτροφές, καθώς καθιστά δύσκολη τη χώνεψή τους από τα ζώα. Επιπλέον, όταν τα απορρίμματα ξηραίνονται πριν χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφή, ενδέχεται να προκύψουν πρόσθετες δαπάνες, οι οποίες σπάνια ανακτώνται από την τιμή των πωλήσεων [12].

Τον τελευταίο καιρό χρησιμοποιούνται πιο ελκυστικές, από οικονομική άποψη, μέθοδοι, όπως η κομποστοποίηση και η αναερόβια χώνευση για τη διαχείριση ορισμένων απορριμμάτων [11]. Με αναερόβια χώνευση δύο φάσεων τα απορρίμματα μπορούν να μετατρέπονται σε βιοκαύσιμα, πρωταρχικά σε υδρογόνο και στη συνέχεια σε μεθάνιο. Ωστόσο, οι ανισορροπίες στην παροχή και διαθεσιμότητα της πρώτης ύλης και το υψηλό κόστος κατασκευής δεξαμενών αναερόβιας χώνευσης, εμποδίζουν την ευρεία υιοθέτηση των εν λόγω εναλλακτικών προσεγγίσεων [13].

Επειδή αυτά τα απορρίμματα είναι πλούσια σε σάκχαρα, που θα μπορούσαν να μετατραπούν σε πιο πολύτιμα προϊόντα, μεγάλη προσοχή στρέφεται προς την

επεξεργασία τους για παραγωγή υλικών βιομάζας, όπως το γαλακτικό οξύ. Από αυτά τα σάκχαρα μπορεί, επίσης, να παραχθεί αιθανόλη. Αυτή τη στιγμή η αιθανόλη παράγεται κυρίως από καλαμπόκι στην Αμερική και την Κίνα και από πατάτα, ρύζι και σακχαροκάλαμο στη Βραζιλία. Ωστόσο, επειδή το καλαμπόκι είναι μια σημαντική πηγή τροφής, η χρήση του ως πηγή καυσίμου έχει κατακριθεί [11].

Επιπροσθέτως, η χρήση μη ανακυκλώσιμων απορριμμάτων ως πόρου θα μπορούσε να λύσει το πρόβλημα της χωρητικότητας των χώρων υγειονομικής ταφής, και να οδηγήσει σε μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου από τους χώρους διάθεσης των απορριμμάτων, βοηθώντας, έτσι, να πληρούνται οι απαιτήσεις των διαφόρων νομοθεσιών, συμπεριλαμβανομένης της οδηγίας-πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα απόβλητα [2].

Σύμφωνα με την Οδηγία 2008/98/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, για την καλύτερη προστασία του Περιβάλλοντος, η επεξεργασία των αποβλήτων πρέπει να γίνεται σύμφωνα με την ακόλουθη ιεράρχηση βάσει προτεραιότητας: πρόληψη, ελαχιστοποίηση, επαναχρησιμοποίηση, ανακύκλωση, Ανάκτηση Ενέργειας, άλλη ανάκτηση (ιδίως ενεργειακή) και τελική διάθεση (Σχήμα Α2) [41].



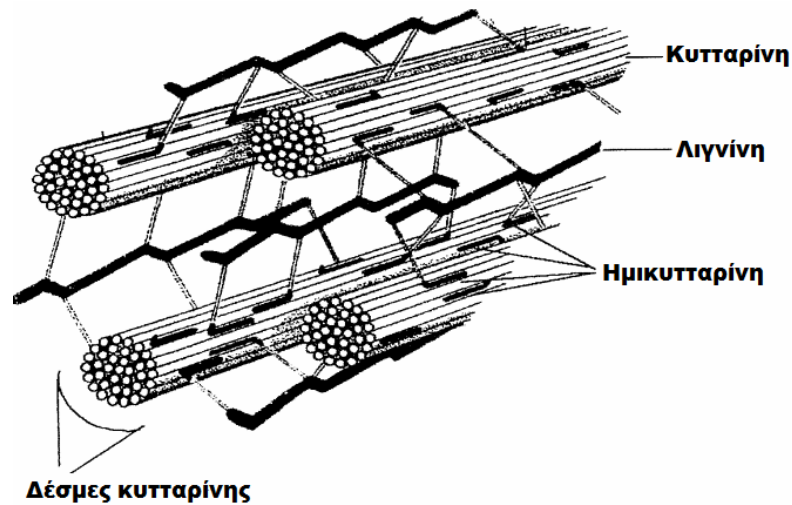
Σχήμα Α2 . Ιεράρχηση επιλογών για τη διαχείριση των στερεών αποβλήτων.

Συνεπώς, 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 βιοαιθανόλη θα μπορούσε να προσφέρει περαιτέρω οικονομικά πλεονεκτήματα, λόγω της αύξησης του κόστους διάθεσης των απορριμμάτων [10].

3.2 Σύσταση διατροφικών απορριμμάτων

Τα απορρίμματα των τροφών αποτελούνται κυρίως από υδατανθρακικά πολυμερή (άμυλο, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη), λιγνίνη, οργανικές ενώσεις (πρωτεΐνες, λιπίδια, λιπαρά, κ.λπ.) και ένα υπολειπόμενο μικρότερο ανόργανο μέρος (τέφρα)

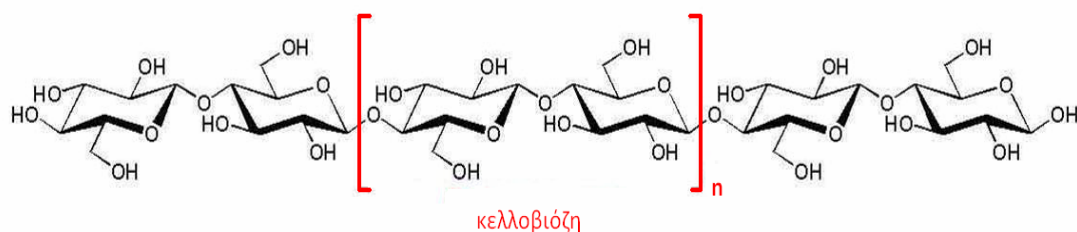
[13]. Η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη συγκροτούν τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών ιστών (Σχήμα Α3).



Σχήμα Α3 . Δομή κυτταρικού τοιχώματος.

Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων και αποτελείται από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης, συνδεδεμένων μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Λόγω των δεσμών αυτών, ο διασακχαρίτης κελλοβιόζη αποτελεί την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της αλυσίδας της κυτταρίνης (Σχήμα). Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης έχει ένα εύρος από 7.000 έως 15.000 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.

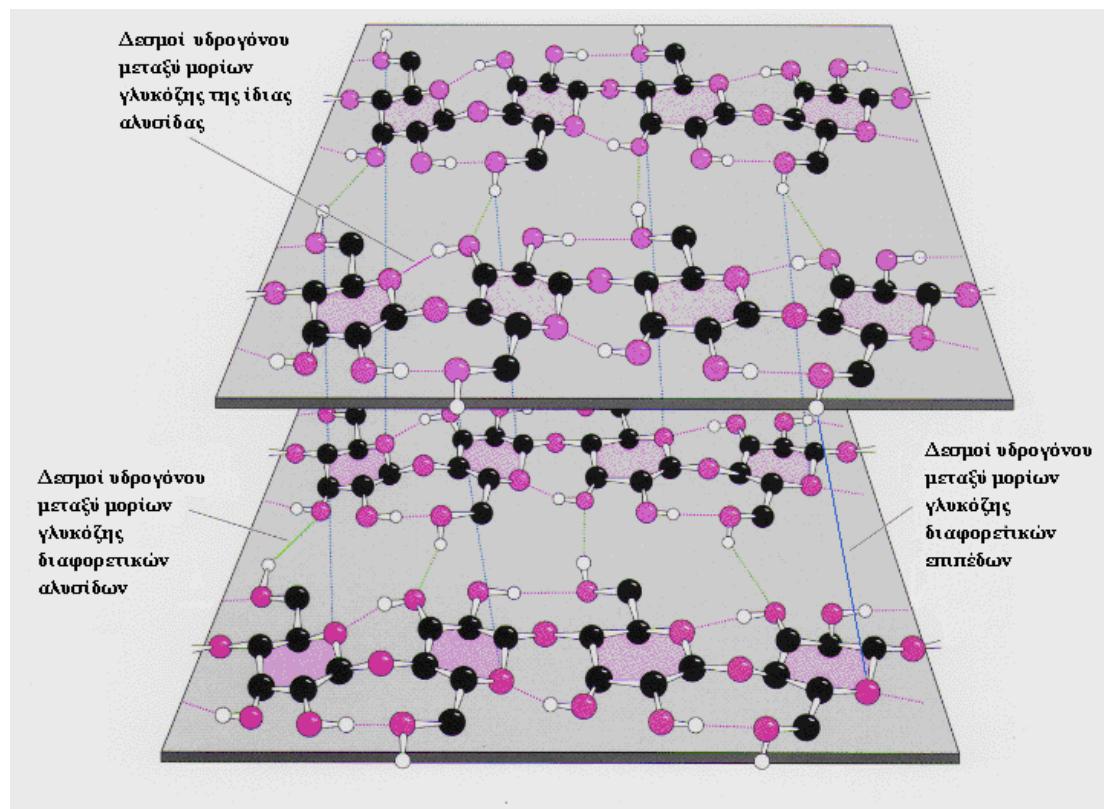


Σχήμα Α4. Δομική μονάδα κυτταρίνης. (Εντός των αγκυλών απεικονίζεται η κελλοβιόζη).

Η κυτταρίνη είναι ένας αδιάλυτος πολυσακχαρίτης που σχηματίζει κρυσταλλικές περιοχές λόγω του σχηματισμού υδρογονικών δεσμών μεταξύ των μορίων γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας καθώς και μεταξύ μορίων γλυκόζης που ανήκουν σε διαφορετικές αλυσίδες. Οι υδρογονικοί δεσμοί διευθετούν τις αλυσίδες της κυτταρίνης σε παράλληλη επίπεδη διάταξη προκαλώντας ταυτόχρονα και το σχηματισμό υδρογονικών δεσμών μεταξύ των παράλληλων επιπέδων κυτταρίνης (Σχήμα Α5). Αυτό οδηγεί στη δημιουργία συμπαγών και δύσκολα αποικοδομήσιμων

κρυσταλλικών περιοχών. Παρ' όλα αυτά, μεταξύ των κρυσταλλικών περιοχών παρεμβάλλονται και κάποιες άμορφες περιοχές, οι οποίες είναι πολύ υγροσκοπικές.

Τέλος, η κυτταρίνη διογκώνεται απεριόριστα και διαλύεται πλήρως από θειικό, υδροχλωρικό και φωσφορικό οξύ [14].



Σχήμα A5 . Υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ μορίων γλυκόζης στην κυτταρίνη.

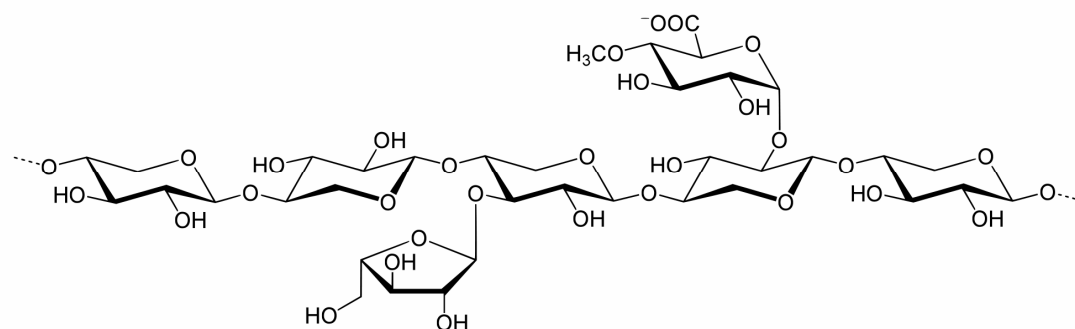
Ημικυτταρίνη

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι ημικυτταρινών και μπορούμε να τις ορίσουμε σαν το μίγμα συμπολυμερών ουσιών. Είναι άμορφες, έχουν χαμηλό βαθμό πολυμερισμού (150-300), είναι έντονα υγροσκοπικές και παρουσιάζουν υψηλή χημική δραστηριότητα.

Πιο αναλυτικά, η ημικυτταρίνη είναι ένα πλέγμα διασταυρωμένων φυτικών μη-κυτταρινικών πολυσακχαριτών, οι οποίοι αποτελούνται από πεντόζες όπως D-ξυλόζη, L-αραβινόζη, L-ραμνόζη και L-φουκόζη, από εξόζες όπως D-μαννόζη, D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη και από ουρονικά οξέα όπως D-γλυκουρονικό οξύ, D-4-O-μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ και D-γαλακτουρονικό οξύ.

Η κατηγοριοποίηση των ημικυτταρινών συνήθως γίνεται με βάση το κυριότερο μονομέρες σάκχαρο. Έτσι, οι ημικυτταρίνες διακρίνονται σε γλυκάνες, μαννάνες, αραβινάνες, γαλακτάνες και ξυλάνες. Στη φύση, οι ημικυτταρίνες σπάνια αποτελούνται από ένα, μόνο, τύπο μονοσακχαρίτη. Συνήθως έχουν μία πολύπλοκη δομή που περιλαμβάνει πάνω από έναν τύπο πολυσακχαριτών, όπως η γλυκουρονοξυλάνη (ξυλόζη και ουρονικό οξύ), η αραβινογλυκουρονοξυλάνη (αραβινόζη, ξυλόζη και ουρονικό οξύ), η αραβινογαλακτάνη (ετεροπολυμερες αραβινόζης και γαλακτόζης) κ.ά. [14].

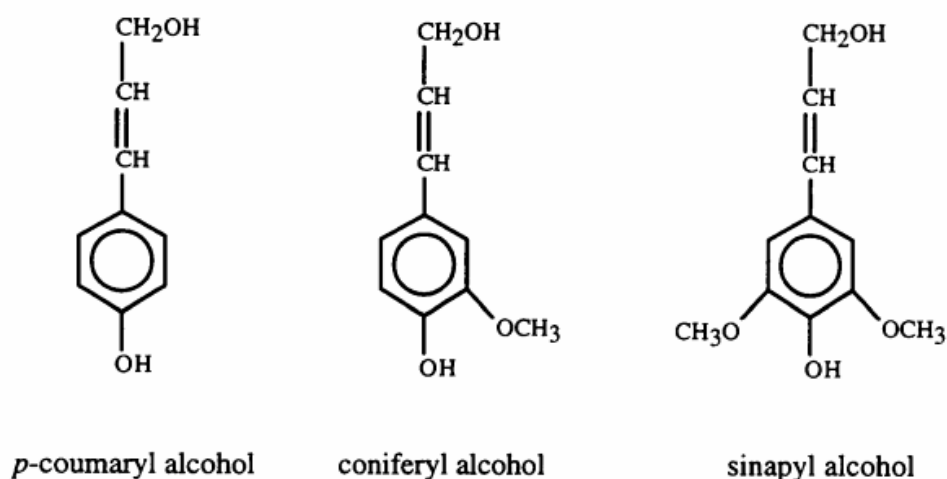
Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη έχει τυχαία, άμορφη και διακλαδισμένη δομή, και έτσι υδρολύεται πιο εύκολα προς τα μονομερή συστατικά της από οξέα [33].



Σχήμα A6 . Πιθανή δομή ξυλάνης.

Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα από τα σπουδαιότερα και πιο άφθονα συστατικά της φυτικής βιομάζας. Είναι άμορφη και έχει πολύ υψηλό βαθμό πολυμερισμού (100.000 - 300.000). Πρόκειται για ένα πολύπλοκο τρισδιάστατο πολυμερές με βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο και είναι ιδιαίτερα δύσκολο να αποικοδομηθεί. Στη λιγνίνη υπάρχουν τρία διαφορετικά φαινυλοπροπάνια (Σχήμα). Πρέπει να σημειωθεί ότι είναι έντονα υδρόφοβη ουσία, αδιάλυτη στο νερό. Οι δεσμοί στη λιγνίνη είναι αιθερικοί καθώς και δεσμοί άνθρακα – άνθρακα. Ενώνεται με χημικούς δεσμούς τόσο με τις ημικυτταρίνες όσο και με την κυτταρίνη. Η διόγκωσή της είναι χαμηλή και υδρολύεται δύσκολα κυρίως με αλκαλικά διαλύματα σε υψηλές θερμοκρασίες (150°C – 180°C). Τέλος, η λιγνίνη προσδίδει υψηλή αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση [14].

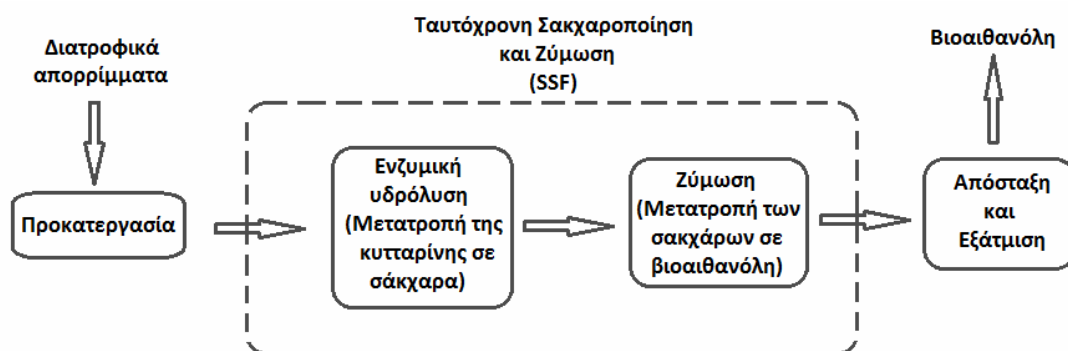


Σχήμα A7 . Τα τρία φαινυλοπροπάνια της λιγνίνης.

Αποτελεί ένα από τα μειονεκτήματα της χρήσης λιγνινοκυτταρινούχων πρώτων υλών για ζύμωση, αφού καθιστά τη λιγνινοκυτταρίνη ανθεκτική στη χημική και βιολογική αποικοδόμηση [33].

3.3 Βιομετατροπή διατροφικών απορριμμάτων σε βιοαιθανόλη

Η κυτταρίνη είναι το κύριο συστατικό των διατροφικών απορριμμάτων, το οποίο μπορεί να υδρολυθεί σε μονομερή σάκχαρα. Τα σάκχαρα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα για τη ζυμωτική παραγωγή μίας ποικιλίας προϊόντων, όπως το γαλακτικό οξύ και η βιοαιθανόλη. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με τεχνολογία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης:



Σχήμα A8. Διάγραμμα ροής διεργασίας παραγωγής βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με τεχνολογία SSF.

4. Προκατεργασία πρώτης ύλης

4.1 Στόχοι

Στόχος της προκατεργασίας είναι η μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης, η αύξηση του πορώδους της πρώτης ύλης, καθώς και η απομάκρυνση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης, οι οποίες αποτελούν τα φυσικά εμπόδια της δράσης των κυτταρινασών, ώστε να βελτιωθεί ο ρυθμός της ενζυμικής υδρόλυσης και να αυξηθεί η απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων από την κυτταρίνη ή την ημικυτταρίνη.

Η προκατεργασία πρέπει να πληροί τις ακόλουθες προϋποθέσεις: (1) να βελτιώνει την παραγωγή σακχάρων ή τη δυνατότητα παραγωγής τους με υδρόλυση, (2) να εμποδίζει την αποικοδόμηση ή την απώλεια των υδατανθράκων, (3) να εμποδίζει το σχηματισμό παραπροϊόντων, τα οποία αναστέλλουν τις μετέπειτα διεργασίες υδρόλυσης και ζύμωσης, (4) να ελαχιστοποιεί την ενεργειακή απαίτηση, (5) να μειώνει το κόστος των υλικών που απαιτούνται για την κατασκευή αντιδραστήρων προκατεργασίας, (6) να παράγει λιγότερα υπολείμματα και (7) να καταναλώνει λίγα και οικονομικά ή καθόλου χημικά [14, 32, 33].

Συγκεκριμένα, με την προκατεργασία προκαλούνται ρωγμές και θραύση του υλικού. Η ημικυτταρίνη υδρολύεται και η λιγνίνη υπόκειται σε δομικές αλλαγές που την αποδεσμεύουν από την κυτταρίνη (Σχήμα A9). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη

μείωση της κρυσταλλικότητας και του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης και την αύξηση της ενεργής επιφάνειας του υλικού [35].



Σχήμα Α9. Επίδραση προκατεργασίας στη λιγνινοκυτταρίνη

Σήμερα, γίνονται πολλές προσπάθειες με σκοπό την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών για την περαιτέρω μείωση του κόστους προκατεργασίας, την παραγωγή λιγότερο τοξικών χημικών ουσιών και υψηλότερης αξίας παραπροϊόντων, και την επίτευξη υψηλότερης απόδοσης σακχάρων. Η επιλογή της μεθόδου προκατεργασίας που εφαρμόζεται, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως ο τύπος της βιομάζας, η αξία των παραπροϊόντων, και η πολυπλοκότητα της διαδικασίας. Ο συνδυασμός διαφορετικών μεθόδων μπορεί να επιφέρει περισσότερα θετικά αποτελέσματα στο μέλλον. Οι μέθοδοι προκατεργασίας μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες: τις φυσικές, τις φυσικοχημικές, τις χημικές, τις βιολογικές ή συνδυασμούς αυτών. [34, 36].

4.2 Μέθοδοι προκατεργασίας

4.2.1 Φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας

Οι φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας μπορούν να αυξήσουν την ενεργή επιφάνεια και τους πόρους του υλικού, και να μειώσουν την κρυσταλλικότητα και το βαθμό πολυμερισμού της κυτταρίνης. Διαφορετικού τύπου φυσικές διεργασίες, όπως η άλεση (π.χ. με σφαίρα ή με δύο κυλίνδρους) και η ακτινοβολία (π.χ. με ακτίνες γάμμα, με δέσμη ηλεκτρονίων ή με μικροκύματα) μπορούν να διευκολύνουν την ενζυμική υδρόλυση της πρώτης ύλης [33].

Μηχανικός κατακερματισμός

Στόχος της προκατεργασίας με μηχανικό κατακερματισμό είναι η τροποποίηση της δομής της λιγνινοκυτταρίνης και η μείωση της κρυσταλλικότητάς της, αυξάνοντας, έτσι, την επιδεκτικότητα του υλικού στις κυτταρινάσες και διευκολύνοντας την αποδόμησή του και τη μετατροπή του σε αιθανόλη.

Η άλεση του υλικού συνήθως προηγείται της ενζυμικής υδρόλυσης ή ακόμη και άλλων διεργασιών προκατεργασίας. Έχει, όμως, μελετηθεί και η εφαρμογή της ταυτόχρονα με την ενζυμική υδρόλυση. Στην τελευταία αυτή περίπτωση οι μηχανικές ενέργειες, η μεταφορά μάζας και η ενζυμική υδρόλυση εκτελούνται ταυτόχρονα. Ανάλογα με το είδος και τη δομή του εκάστοτε υλικού, εφαρμόζονται και διαφορετικές μέθοδοι άλεσης.

Ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι οι υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις της και η συνεχής άνοδος των τιμών ενέργειας, καθιστούν τη διαδικασία οικονομικά ανέφικτη [37]. Επιπλέον, δεν έχει την ικανότητα να απομακρύνει τη λιγνίνη, η οποία εμποδίζει την πρόσβαση των υδρολυτικών ενζύμων στην κυτταρίνη και αναστέλλει τη δράση τους [33].

Ακτινοβολήση

Η ακτινοβολήση του υλικού π.χ. με ακτίνες γάμμα, δέσμη ηλεκτρονίων ή μικροκύματα μπορεί να αυξήσει την αποδόμηση της κυτταρίνης προς γλυκόζη και συνεπώς να βελτιώσει την ενζυμική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρίνης. Ο συνδυασμός της προκατεργασίας με ακτινοβολήση με άλλες μεθόδους, όπως η κατεργασία με οξύ μπορεί να επιταχύνει περαιτέρω την ενζυμική υδρόλυση.

Παρατηρήθηκε ότι η ενζυμική υδρόλυση διηθητικού χαρτιού, το οποίο δεν περιείχε καθόλου λιγνίνη δε βελτιώθηκε με την ακτινοβολήση, ενώ η ενζυμική υδρόλυση εφημερίδων, που περιείχαν μικρή ποσότητα λιγνίνης, παρουσίασε μικρή βελτίωση. Ως εκ τούτου, η επίδραση της ακτινοβολίας στο υλικό θα πρέπει να συσχετίζεται με την παρουσία της λιγνίνης, καθώς επίσης και με στοιχεία της δομής του, όπως η κρυσταλλικότητα και η πυκνότητα.

Ωστόσο, η προκατεργασία με ακτινοβολήση είναι δαπανηρή, συνεπώς δύσκολα εφαρμόζεται σε βιομηχανική κλίμακα [33].

4.2.2 Φυσικοχημικές μέθοδοι προκατεργασίας

Οι προκατεργασίες που συνδυάζουν τόσο χημικές όσο και φυσικές διεργασίες αναφέρονται ως φυσικοχημικές. Οι πιο σημαντικές από αυτές είναι οι εξής:

Εκτόνωση ατμού (έκρηξη ατμού) συνδυαζόμενη με αυτοϋδρόλυση

Στην παρούσα διεργασία το υλικό θερμαίνεται με ατμό υψηλής πίεσης σε θερμοκρασίες 160-250 °C, για μια χρονική περίοδο μερικών δευτερολέπτων έως και μερικών λεπτών. Στη συνέχεια, το υλικό υφίσταται μία εκτονωτική αποσυμπίεση, που σε συνδυασμό με την αυτοϋδρόλυση που προκαλείται από το σχηματισμό διάφορων οργανικών οξέων από τα προϋπάρχοντα οξικά οξέα του υλικού λόγω της θερμοκρασίας, προκαλείται μερική υδρόλυση και διαλυτοποίηση της

ημικυτταρίνης, με ταυτόχρονη βελτίωση του δυναμικού αποικοδόμησης της κυτταρίνης.

Μειονέκτημα αυτής της διεργασίας αποτελεί η αποικοδόμηση των σακχάρων λόγω της υψηλής θερμοκρασίας και του μεγάλου χρόνου κατεργασίας [14].

Εκτόνωση ατμού συνδυαζόμενη με προσθήκη όξινου καταλύτη

Η προσθήκη ενός όξινου καταλύτη στην προηγούμενη διεργασία αυξάνει τη δυνατότητα υδρόλυσης της κυτταρίνης. Έτσι, το υλικό πριν την προκατεργασία με εκτόνωση ατμού εμποτίζεται με 0.5-6% (w/w) θειικού οξέος (H_2SO_4) ή διοξειδίου του θείου (SO_2). Κατά τη διάρκεια της παροχής ατμού, το διοξείδιο του θείου μετατρέπεται σε θειικό οξύ, που αποτελεί και τον όξινο καταλύτη. Η χρήση του διοξειδίου του θείου πλεονεκτεί σε σύγκριση με αυτήν του θειικού οξέος, μιας και έχει τη δυνατότητα να εμποτίζει καλύτερα και γρηγορότερα το υλικό.

Για να αποφύγουμε το σχηματισμό παρεμποδιστών και να μεγιστοποιήσουμε ταυτόχρονα την ανάκτηση των σακχάρων, μπορούμε να εφαρμόσουμε διεργασίες δύο βημάτων. Στο πρώτο στάδιο, και σε σχετικά ήπιες συνθήκες (θερμοκρασία χαμηλότερη των $180\text{ }^\circ\text{C}$), διαλυτοποιείται το κλάσμα της ημικυτταρίνης. Επακολουθεί ένα δεύτερο στάδιο, όπου στο κλάσμα της κυτταρίνης εφαρμόζεται εκτόνωση ατμού σε υψηλότερη θερμοκρασία (μεγαλύτερη των $210\text{ }^\circ\text{C}$) [14].

Εκτόνωση ίνας με αμμωνία (Ammonia fiber explosion, AFEX)

Η εκτόνωση ίνας με αμμωνία είναι μία αλκαλική φυσικοχημική μέθοδος προκατεργασίας βιομάζας. Η βιομάζα κατεργάζεται με υγρή αμμωνία σε ήπια θερμοκρασία (π.χ. $90\text{-}100\text{ }^\circ\text{C}$) και σε συνθήκες υψηλής πίεσης (πάνω από 3 MPa) για ένα χρονικό διάστημα περίπου 30 min . Στη συνέχεια, η πίεση μειώνεται απότομα. Περίπου 2 kg αμμωνίας χρησιμοποιούνται ανά kg ξηρού υλικού. Η αμμωνία ανακυκλώνεται μετά από την προκατεργασία και τη μείωση της πίεσης, δεδομένου ότι είναι πολύ πτητική όταν βρίσκεται στα επίπεδα ατμοσφαιρικής πίεσης. Από τη διεργασία αυτή, προκύπτει μόνο στερεό προκατεργασμένο υλικό, σε αντίθεση με άλλες μεθόδους, από τις οποίες προκύπτει ένας πολτός που διαχωρίζεται σε στερεό και υγρό κλάσμα.

Η εκτόνωση ίνας με αμμωνία μπορεί να μειώσει αποτελεσματικά το κλάσμα της λιγνίνης στο υλικό, ενώ τα κλάσματα της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης παραμένουν σχεδόν ανέπαφα. Στις βέλτιστες συνθήκες, η μέθοδος αυτή μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την ενζυμική υδρόλυση.

Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου έναντι άλλων, αποτελεί η απουσία σχηματισμού ανασταλτικών ουσιών. Η μέθοδος, όμως, είναι αποτελεσματική σε υλικά που περιέχουν μικρό ποσοστό λιγνίνης και δε διαλυτοποιεί σχεδόν καθόλου την ημικυτταρίνη. Επιπλέον, η αμμωνία μετά το τέλος της κατεργασίας πρέπει να ανακυκλωθεί για τη μείωση του κόστους της διεργασίας και την προστασία του περιβάλλοντος [14,33].

Έκρηξη διοξειδίου του άνθρακα (CO₂)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) ως υπερκρίσιμου ρευστού. Η προκατεργασία σε υπερκρίσιμες συνθήκες μπορεί να απομακρύνει αποτελεσματικά τη λιγνίνη, αυξάνοντας την ικανότητα διάσπασης του υποστρώματος. Σε υδατικά διαλύματα, το CO₂ σχηματίζει ανθρακικό οξύ (H₂CO₃), το οποίο ευνοεί το στάδιο της υδρόλυσης, ενώ η προσθήκη διαλυτών, όπως η αιθανόλη, ευνοεί την απολιγνινοποίηση του υλικού.

Η διαδικασία γίνεται υπό συνθήκες υψηλής πίεσης και μετά την εκτονωτική αποσυμπίεση του CO₂, παρατηρείται αλλαγή στη δομή της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης και, κατά συνέπεια, αύξηση της ενεργής επιφάνειας του υποστρώματος. Τα μόρια του CO₂ έχουν παρόμοιο μέγεθος με αυτά του νερού και της αμμωνίας, και μπορούν να διεισδύσουν με τον ίδιο τρόπο στους μικρούς πόρους του υλικού.

Οι αποδόσεις των ανακτώμενων σακχάρων με τη μέθοδο της έκρηξης CO₂ είναι μικρότερες σε σχέση με τις αποδόσεις των μεθόδων εκτόνωσης ατμού ή αμμωνίας. Μία σύγκριση, όμως, μεταξύ διαφορετικών μεθόδων προκατεργασίας σε διάφορα υποστρώματα, έδειξε ότι η έκρηξη CO₂ είναι οικονομικά πιο αποδοτική από την προκατεργασία με εκτόνωση αμμωνίας και σχηματίζει λιγότερους παρεμποδιστές σε σχέση με την προκατεργασία με εκτόνωση ατμού. Πρόκειται για μία ελκυστική εναλλακτική μέθοδο, η οποία βοηθάει στη μείωση του κόστους, αφού το CO₂ παράγεται κατά τη ζύμωση. Άλλα πλεονεκτήματα είναι η μη τοξικότητά του, η μη αναφλεξιμότητά του και η εύκολη ανάκτησή του μετά από εκχύλιση.

Παρ' όλα αυτά, η απαίτηση της μεθόδου για υψηλές πιέσεις αποτελεί μειονέκτημα και έτσι οι προσπάθειες για βελτίωσή της δεν εγγυώνται την οικονομική βιωσιμότητά της [37].

Υδροθερμική προκατεργασία

Πρόκειται για μία μέθοδο, η οποία δεν απαιτεί γρήγορη αποσυμπίεση και χρήση καταλύτη ή χημικών. Κατά την υδροθερμική προκατεργασία ασκείται πίεση ώστε να διατηρηθεί το νερό σε υγρή κατάσταση σε υψηλές θερμοκρασίες (160-240 °C) και να μεταβληθεί η δομή της λιγνινοκυτταρίνης. Στόχος της προκατεργασίας είναι η διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, ώστε να αυξηθεί η προσβασιμότητα της κυτταρίνης και να αποφευχθεί ο σχηματισμός παρεμποδιστών.

Ο πολτός που παραλαμβάνεται μετά την προκατεργασία μπορεί να φιλτραρισθεί, ώστε να ληφθούν δύο κλάσματα: ένα στερεό, πλούσιο σε κυτταρίνη και ένα υγρό, πλούσιο σε σάκχαρα προερχόμενα από ημικυτταρίνη. Για την αποφυγή σχηματισμού παρεμποδιστών, το pH πρέπει να διατηρείται σε τιμές μεταξύ 4 και 7. Έχει αποδειχθεί ότι με τη μέθοδο αυτή απομακρύνεται έως και το 80% της ημικυτταρίνης και ενισχύεται η ενζυμική υδρόλυση του υλικού.

Γενικά, η υδροθερμική προκατεργασία είναι μία ελκυστική διεργασία λόγω του χαμηλού της κόστους. Πιο συγκεκριμένα, δεν απαιτείται χρήση καταλύτη και χρησιμοποιείται αντιδραστήρας χαμηλού κόστους κατασκευής, αφού δεν υπάρχει παρά πολύ μικρή πιθανότητα διάβρωσής του. Έχει, επίσης, το μεγάλο πλεονέκτημα ότι τα διαλυτοποιημένα προϊόντα της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση. Αυτό έχει ως συνέπεια τη χαμηλή συγκέντρωση των

προϊόντων αποικοδόμησης. Η υδροθερμική προκατεργασία οδηγεί σε μεγαλύτερη ανάκτηση πεντοζών και σχηματισμό λιγότερων παρεμποδιστών σε σχέση με την προκατεργασία με εκτόνωση ατμού. Παρ' όλα αυτά, απαιτεί μεγαλύτερη ποσότητα νερού και περισσότερη ενέργεια. Για το λόγο αυτό, η μέθοδος αυτή δεν εφαρμόζεται σε βιομηχανική κλίμακα [37].

Προκατεργασία με μικροκύματα και χημικά αντιδραστήρια

Η προκατεργασία με μικροκύματα περιλαμβάνει τόσο θερμικά όσο και μη θερμικά φαινόμενα. Η βιομάζα εμβαπτίζεται σε αραιά χημικά αντιδραστήρια και στη συνέχεια ακτινοβολείται με μικροκύματα για ένα χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από 5 έως 20 λεπτά. Πειραματικά αποδείχθηκε ότι κατάλληλα χημικά αντιδραστήρια για προκατεργασία με μικροκύματα είναι τα αλκάλια. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη διαφορετικών αλκαλίων κατέδειξε το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) ως το πιο αποτελεσματικό [37].

4.2.3 Χημικές μέθοδοι προκατεργασίας

Αλκαλική προκατεργασία

Η μέθοδος αυτή αφορά στη χρήση αλκαλικών διαλυμάτων, όπως το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH), το υδροξείδιο του ασβεστίου ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ή η αμμωνία (NH_3) για την απομάκρυνση της λιγνίνης και ενός μέρους της ημικυτταρίνης, με σκοπό την αύξηση της προσβασιμότητας του υδρολυτικού ενζύμου στην κυτταρίνη. Η αλκαλική προκατεργασία μπορεί να οδηγήσει σε πολλαπλασιασμό της απόδοσης σακχαροποίησης [33].

Προκατεργασία με αλκαλικό υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)

Πρόκειται για μία πολύ αποτελεσματική μέθοδο στην προκατεργασία βιομάζας, κατά την οποία η λιγνινοκυτταρίνη εμποτίζεται σε νερό, το οποίο περιέχει H_2O_2 σε θερμοκρασία δωματίου για ορισμένο χρονικό διάστημα (6-24 ώρες). Το pH του νερού έχει προηγουμένως ρυθμιστεί σε τιμή 11-12 χρησιμοποιώντας NaOH. Η διαδικασία αυτή μπορεί να βελτιώσει την ενζυμική υδρόλυση με απομάκρυνση της λιγνίνης [33].

Προκατεργασία με οργανικούς διαλύτες

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιεί οργανικούς διαλύτες ή μείγματα νερού με οργανικούς διαλύτες για να απομακρυνθεί ή να διασπαστεί το δίκτυο της λιγνίνης και πιθανόν ένα μέρος της ημικυτταρίνης. Έτσι, παρέχει κατεργασμένη κυτταρίνη, κατάλληλη για ενζυμική υδρόλυση [33].

Υγρή προκατεργασία οξείδωσης

Η υγρή προκατεργασία οξείδωσης περιλαμβάνει την κατεργασία της βιομάζας με νερό και αέρα, ή και καθαρό οξυγόνο, σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από $120\text{ }^\circ\text{C}$, μερικές φορές με την προσθήκη ενός αλκαλικού καταλύτη. Μία συνηθισμένη συνθήκη προκατεργασίας υγρής οξείδωσης περιλαμβάνει την

κατεργασία της βιομάζας σε θερμοκρασίες από 170 °C έως 200 °C και σε πιέσεις από 10 έως 12 bar οξυγόνου για 10 έως 15 min. Η μέθοδος αυτή αρμόζει σε υλικά με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη, μιας και το μεγαλύτερο μέρος αυτής (μέχρι 60-70%) οξειδώνεται και διαλυτοποιείται [14].

Προκατεργασία με οξύ

Η κατεργασία με οξύ μπορεί να βελτιώσει αποτελεσματικά την ενζυμική υδρόλυση. Συνήθως χρησιμοποιείται το θειικό οξύ, ενώ έχουν αναφερθεί και άλλα οξέα, όπως το υδροχλωρικό και το νιτρικό. Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί είτε υπό συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και χαμηλής συγκέντρωσης οξέος είτε υπό συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και υψηλής συγκέντρωσης οξέος.

Η προκατεργασία με πυκνό οξύ σε χαμηλή θερμοκρασία πλεονεκτεί έναντι εκείνης με αραιό οξύ. Παρ' όλα αυτά, τα πυκνά οξέα είναι ιδιαίτερα διαβρωτικά και επικίνδυνα, και η χρήση τους απαιτεί ειδικές, μη μεταλλικές κατασκευές, γεγονός που καθιστά τη διαδικασία δαπανηρή.

Η κατεργασία με αραιό οξύ είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος μεταξύ των χημικών μεθόδων προκατεργασίας. Μπορεί να εφαρμοστεί είτε ως προκατεργασία της λιγνινοκυτταρίνης πριν την ενζυμική υδρόλυση είτε ως μέθοδος υδρόλυσης, αυτή καθ' εαυτή, των ζυμώσιμων σακχάρων. Με τη μέθοδο αυτή, η ημικυτταρίνη διαλυτοποιείται, αυξάνοντας, έτσι, την επιδεκτικότητα της κυτταρίνης στην ενζυμική υδρόλυση.

Η προκατεργασία με αραιό οξύ μπορεί να πραγματοποιηθεί σε υψηλή θερμοκρασία (π.χ. 180 °C) για μικρό χρονικό διάστημα (π.χ. 5 min) ή σε χαμηλή θερμοκρασία (π.χ. 120 °C) για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα (π.χ. 30-90 min). Το μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης ημικυτταρίνης και η υψηλότερη απόδοση ενζυμικής υδρόλυσης επιτυγχάνονται υπό πολύ διαφορετικές συνθήκες.

Το κύριο μειονέκτημα ορισμένων μεθόδων προκατεργασίας, ιδιαίτερα αυτών που διεξάγονται σε χαμηλές τιμές pH, είναι ο σχηματισμός διάφορων ειδών αναστολέων, όπως καρβοξυλικά οξέα, φουράνια και φαινολικές ενώσεις. Αυτές οι χημικές ουσίες δεν επηρεάζουν την ενζυμική υδρόλυση, αλλά συνήθως αναστέλλουν την μικροβιακή ανάπτυξη και ζύμωση, γεγονός που οδηγεί σε μικρότερη απόδοση και παραγωγή αιθανόλης. Ως εκ τούτου, οι προκατεργασίες σε χαμηλές τιμές pH πρέπει να επιλέγονται κατάλληλα, έτσι ώστε να αποφεύγεται ή τουλάχιστον να μειώνεται ο σχηματισμός αυτών των αναστολέων [33].

Προκατεργασία με οζονόλυση

Πρόκειται για κατεργασία της πρώτης ύλης με όζον. Η μέθοδος αυτή μπορεί να αποικοδομήσει αποτελεσματικά τη λιγνίνη και ένα μέρος της ημικυτταρίνης. Οι κύριες παράμετροι της προκατεργασίας με οζονόλυση είναι η περιεκτικότητα του δείγματος σε υγρασία, το μέγεθος των σωματιδίων και η συγκέντρωση του όζοντος. Μεταξύ αυτών των παραμέτρων, το ποσοστό του νερού στην τροφοδοσία παίζει τον πιο σημαντικό ρόλο στη διαλυτοποίηση. Η βέλτιστη περιεκτικότητα νερού βρέθηκε ότι είναι περίπου 30%, ποσοστό που αντιστοιχεί στο σημείο κορεσμού των ινών.

Συνήθως διεξάγεται σε θερμοκρασία δωματίου και πίεση 1 atm. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ ελκυστική, διότι δεν αφήνει όξινα, βασικά ή τοξικά υπολείμματα

στο κατεργασμένο υλικό και δεν οδηγεί στην παραγωγή ανασταλτικών ενώσεων. Παρ' όλα αυτά, η οζονόλυση μπορεί να είναι δαπανηρή διαδικασία, αφού απαιτείται μεγάλη ποσότητα όζοντος [33].

4.2.4 Βιολογικές μέθοδοι προκατεργασίας

Στις βιολογικές προκατεργασίες χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί, όπως οι βασιδιομύκητες, οι οποίοι μπορούν να αποικοδομήσουν τη λιγνίνη. Οι μέθοδοι αυτές θεωρούνται φιλικές προς το περιβάλλον και ενεργειακά οικονομικές, καθώς δεν απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες και χρήση χημικών. Όμως, ο ρυθμός κατεργασίας των βιολογικών μεθόδων είναι πολύ χαμηλός ώστε να εφαρμοστούν σε βιομηχανική κλίμακα και ένα μέρος της πρώτης ύλης χάνεται, λόγω της κατανάλωσής της από τους μικροοργανισμούς [35].

5. Υδρόλυση

Μετά την προκατεργασία, η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη είναι έτοιμες για υδρόλυση, δηλαδή τη διάσπασή τους με την προσθήκη νερού:

Κυτταρίνη-Εξοζάνη σε εξόζη: $(C_6H_{10}O_5)_n + n H_2O \rightarrow n C_6H_{12}O_6$

Ημικυτταρίνη-Πεντοζάνη σε πεντόζη: $(C_5H_8O_4)_n + n H_2O \rightarrow n C_5H_{10}O_5$ [14].

Οι παραπάνω αντιδράσεις καταλύονται από αραιό οξύ, πυκνό οξύ ή ένζυμα. Η ενζυμική υδρόλυση παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, καθώς, λόγω των πολύ ήπιων συνθηκών, στις οποίες πραγματοποιείται, ($pH \approx 4,8$ και θερμοκρασία 45-50 °C) δίνει υψηλές αποδόσεις. Επιπλέον, το κόστος συντήρησης είναι χαμηλό σε σχέση με την αλκαλική και την όξινη υδρόλυση, αφού δεν αντιμετωπίζονται προβλήματα διάβρωσης. Υδρόλυση υλικού, το οποίο δεν έχει υποστεί προκατεργασία, δίνει, συνήθως, αποδόσεις μικρότερες από 20%, ενώ υδρόλυση υλικού, που έχει υποστεί προκατεργασία, μπορεί να δώσει αποδόσεις μεγαλύτερες από 90%.

Με την πάροδο των χρόνων, έχουν αναπτυχθεί πολλές διεργασίες υδρόλυσης της κυτταρίνης προς σχηματισμό γλυκόζης. Η συντριπτική πλειοψηφία αυτών χρησιμοποιεί είτε κυτταρινολυτικά ένζυμα είτε θειικό οξύ σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ανέκαθεν, τα ένζυμα ήταν πάρα πολύ ακριβά για μία οικονομικά αποδοτική διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης. Όμως, ένα πολύ σημαντικό μειονέκτημα της χρήσης θειικού οξέος είναι ότι, στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την υδρόλυση της κυτταρίνης, διασπά εύκολα και τη γλυκόζη.

Η πλούσια σε λιγνινοκυτταρινούχα υλικά βιομάζα μπορεί να υδρολυθεί με τη βοήθεια ακτίνων γάμμα, δέσμης ηλεκτρονίων ή μικροκυμάτων. Πρόκειται, όμως, για μία πιο πολύπλοκη διαδικασία, λόγω της παρουσίας λιγνίνης και ημικυτταρίνης [8].

5.1 Όξινη υδρόλυση

Έρευνες έχουν δείξει ότι η όξινη υδρόλυση, υπό ελεγχόμενες συνθήκες, παράγει κυρίως ξυλόζη από ξυλάνη, που είναι το βασικό πολυμερές της ημικυτταρίνης, ενώ τα κλάσματα της κυτταρίνης και της λιγνίνης παραμένουν αναλλοίωτα. Η ξυλάνη είναι επιδεκτική στην υδρόλυση με ήπια κατεργασία με οξύ, λόγω της άμορφης δομής της. Αντίθετα, η κυτταρίνη, λόγω της κρυσταλλικής της φύσης, απαιτεί έντονες συνθήκες κατεργασίας. Κατά τη διάρκεια της όξινης υδρόλυσης, η ξυλόζη διασπάται γρήγορα σε φουρφουράλη και άλλα παραπροϊόντα, τα οποία αναστέλλουν τη δράση των μικροοργανισμών.

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι υδρόλυσης είναι η υδρόλυση με αραιό οξύ και η υδρόλυση με πυκνό οξύ [8].

5.1.1 Υδρόλυση με αραιό οξύ

Πρόκειται για την πιο παλαιά μέθοδο μετατροπής βιομάζας σε αιθανόλη. Η μέθοδος πραγματοποιείται σε δύο στάδια, καθώς το κλάσμα της ημικυτταρίνης αποπολυμερίζεται σε χαμηλότερη θερμοκρασία από το κλάσμα της κυτταρίνης. Το πρώτο στάδιο γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία, ώστε να μεγιστοποιηθεί η απόδοση από την ημικυτταρίνη, ενώ το δεύτερο σε υψηλότερη θερμοκρασία, ώστε να βελτιστοποιηθεί η υδρόλυση της κυτταρίνης.

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της υδρόλυσης με αραιό οξύ είναι ο γρήγορος ρυθμός αντίδρασης, ενώ το μεγαλύτερο μειονέκτημά της είναι η χαμηλή απόδοση σε σάκχαρα [8].

5.1.2 Υδρόλυση με πυκνό οξύ

Η υδρόλυση με πυκνό οξύ παρέχει ολοκληρωμένη και ταχεία μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη και της ημικυτταρίνης σε πεντόζες. Για να είναι η διαδικασία οικονομικά βιώσιμη, απαραίτητη είναι η βελτιστοποίηση της ανάκτησης σακχάρων και η ανάκτηση του οξέος για επαναχρησιμοποίηση. Οι χαμηλές θερμοκρασίες και πιέσεις οδηγούν στην ελαχιστοποίηση της αποικοδόμησης των σακχάρων.

Το κύριο πλεονέκτημα της υδρόλυσης με πυκνό οξύ είναι το υψηλό ποσοστό ανάκτησης προϊόντος. Όμως, το πυκνό θειικό ή υδροχλωρικό οξύ είναι δύσκολα στη χρήση, καθώς όλη η ποσότητα οξέος πρέπει να ανακτηθεί και να συμπυκνωθεί για να είναι η διεργασία οικονομικά αποδοτική [8].

5.2 Ενζυμική υδρόλυση

Η ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων είναι μία πολύ αργή διαδικασία γιατί η υδρόλυση της κυτταρίνης παρεμποδίζεται από δομικές παραμέτρους του υποστρώματος, όπως το περιεχόμενό του σε λιγνίνη και

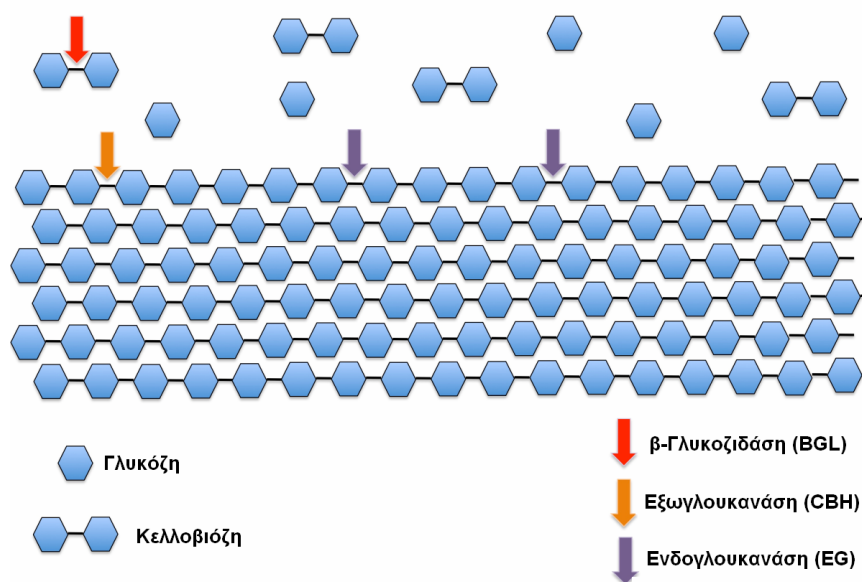
ημικυτταρίνη, η επιφάνεια επαφής και η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης. Είναι μία ελκυστική διεργασία, διότι δίνει καλύτερες αποδόσεις σε σχέση με την καταλυόμενη από οξύ υδρόλυση. Επιπλέον, οι κατασκευαστές ενζύμων έχουν μειώσει σημαντικά το κόστος τους, χρησιμοποιώντας σύγχρονες μεθόδους βιοτεχνολογίας.

Κατά την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης, η καταλυτική δράση του μείγματος κυτταρινασών περιορίζεται από πολλούς παράγοντες. Θεωρείται ότι οι περιορισμοί αυτοί αφείλονται σε παράγοντες, οι οποίοι σχετίζονται τόσο με το υπόστρωμα όσο και με τα ένζυμα.

Ο ρυθμός της ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης μειώνεται σχετικά γρήγορα. Γενικά, η ενζυμική αποικοδόμηση της κυτταρίνης χαρακτηρίζεται από μία ταχεία αρχική φάση, η οποία ακολουθείται από μία βραδεία δευτερεύουσα φάση, που μπορεί να διαρκέσει έως ότου καταναλωθεί όλο το υπόστρωμα. Αυτό οφείλεται συνήθως στη γρήγορη υδρόλυση του εύκολα προσβάσιμου κλάσματος της κυτταρίνης, στην αναστολή του προϊόντος και στην αργή απενεργοποίηση των μορίων του ενζύμου που απορροφώνται [8].

Ο ευρέως αποδεκτός μηχανισμός της ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης περιλαμβάνει τρεις συνεργιστικές ενζυμικές δράσεις (Σχήμα A10):

- Υδρόλυση εσωτερικών 1,4-β-D-γλυκοζιτικών δεσμών των αλυσίδων κυτταρίνης με "ένδο-1,4-β-D-γλουκανάσες" (EG).
- Απελευθέρωση διαλυτών μορίων κελλοβιόζης από τα άκρα της κυτταρίνης με "έξω-1,4-β-D-γλουκανάσες" (CBH).
- Απελευθέρωση D-γλυκόζης από την κελλοβιόζη με "β-γλυκοζιδάσες" (BGL)

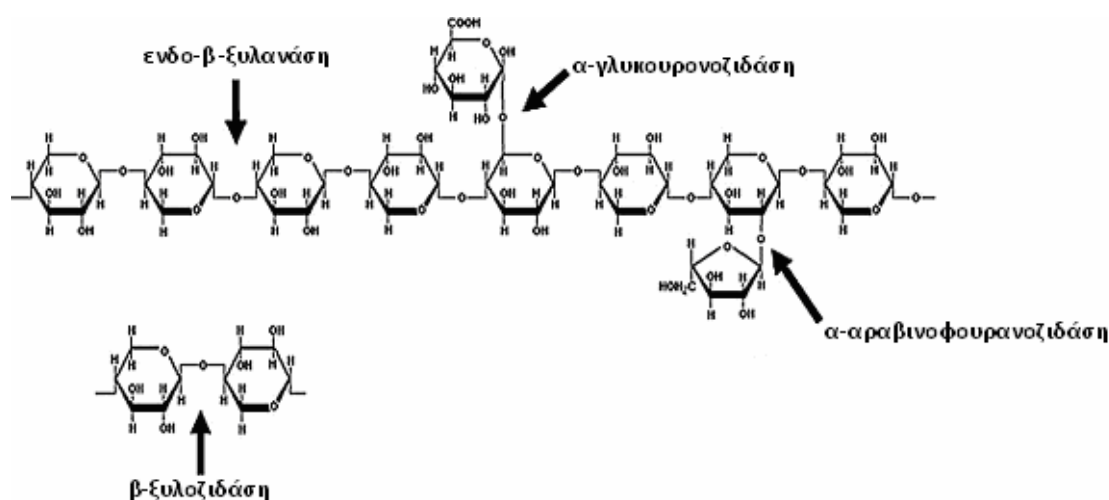


Σχήμα A10. Συνεργιστική ενζυμική δράση κυτταρινασών.

Αρχικά, η ενδογλουκανάση δρα τυχαία στις άμορφες περιοχές της κυτταρινικής αλυσίδας, δημιουργώντας νέα «ελεύθερα άκρα», όπου μπορεί να δράσει η εξωγλουκανάση, απελευθερώνοντας μόρια κελλοβιόζης. Η κελλοβιόζη, τελικά, υδρολύεται σε γλυκόζη με τη δράση της β-γλυκοζιδάσης. Η δράση της β-

γλυκοζιδάσης είναι πολύ σημαντική, καθώς η κελλοβιόζη είναι πολύ ισχυρότερος παρεμποδιστής της εξωγλυκανάσης από την γλυκόζη. Η συσσώρευση της κελλοβιόζης μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη συνολική υδρολυτική απόδοση του συστήματος των κυτταρινασών [8, 14].

Για την αποτελεσματική αξιοποίηση του υλικού, όμως, απαιτείται η αποικοδόμηση τόσο της κυτταρίνης όσο και της ημικυτταρίνης. Η ξυλάνη, υδρολύεται σε ξυλο-ολιγοσακχαρίτες από ενδο-β-1,4-ξυλανάσες και στη συνέχεια οι β-ξυλοζιδάσες υδρολύουν τους ξυλο-ολιγοσακχαρίτες (κυρίως την ξυλοβιόζη) σε μόρια ξυλόζης (Σχήμα A11). Άλλα ένζυμα που συνεισφέρουν στην αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης είναι οι α-γλυκουρονοζιδάσες, οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες, οι ακετυλ-εστεράσες και οι εστεράσες του φερουλικού οξέος. Η αποικοδόμηση των γλυκομαννάνων γίνεται από β-μαννανάσες και β-μαννοζιδάσες [35].



Σχήμα A11. Απεικόνιση ενζυμικής υδρόλυσης της ημικυτταρίνης από τα ένζυμα : ενδο-β-ξυλανάση, α-γλυκουρονοζιδάση, β-ξυλοζιδάση και α-αραβινοφουρανοζιδάση.

6. Αλκοολική Ζύμωση

6.1 Διεργασίες Παραγωγής Βιοαιθανόλης

Κατά τη διεργασία παραγωγής αιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα, η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση της γλυκόζης μπορεί να διεξαχθούν ξεχωριστά σε διαφορετικούς αντιδραστήρες, με τεχνολογία SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation: διακριτή υδρόλυση και ζύμωση) ή ταυτόχρονα στον ίδιο αντιδραστήρα, με τεχνολογίες SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation: ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση) και CBP (Consolidated Bioprocess: ενοποιημένη βιοδεργασία) [14].

6.1.1 Διακριτή Υδρόλυση και Ζύμωση (SHF)

Στο πρώτο στάδιο, τα ένζυμα απελευθερώνουν μονομερή σάκχαρα και, κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου, ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται για τη ζύμωση, μετατρέπει τα σάκχαρα αυτά σε αιθανόλη.

Το κύριο πλεονέκτημα της διεργασίας διακριτής υδρόλυσης και ζύμωσης είναι ότι εφαρμόζονται οι άριστες συνθήκες και για τις δύο διεργασίες, δηλαδή αυτές της ενζυμικής υδρόλυσης και της ζύμωσης. Έτσι, τα ένζυμα είναι δυνατόν να δρουν σε υψηλές θερμοκρασίες, αυξάνοντας την καταλυτική τους αποδοτικότητα, ενώ οι μικροοργανισμοί ζυμώνουν τα σάκχαρα σε ήπιες θερμοκρασίες, αυξάνοντας το δυναμικό χρησιμοποίησής τους [14]. Το μειονέκτημά της είναι ότι η δράση των κυτταρινολυτικών ενζύμων αναστέλλεται από τα τελικά προϊόντα. Έτσι, όταν συσσωρεύονται η γλυκόζη και η κελλοβιόζη, ο ρυθμός της υδρόλυσης σταδιακά μειώνεται [8].

Όταν επιδιώκεται και η αξιοποίηση των πεντοζών, απαιτείται ένας ξεχωριστός αντιδραστήρας γιατί οι μικροοργανισμοί που ζυμώνουν παράλληλα τις εξόζες και τις πεντόζες το κάνουν με ρυθμούς πολύ μικρότερους από εκείνους τους μικροοργανισμούς που ζυμώνουν αποκλειστικά και μόνο εξόζες. Το ρεύμα πεντοζών που προέρχεται από στάδια επεξεργασίας, που συνήθως διαλυτοποιούν την ημικυτταρίνη, συχνά περιέχουν και πολλούς παρεμποδιστές, οι οποίοι πρέπει να απομακρυνθούν [14].

6.1.2 Ταυτόχρονη Σακχαροποίηση και Ζύμωση (SSF)

Η διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης πραγματοποιείται σε έναν αντιδραστήρα, υπό συνθήκες όσο το δυνατόν άριστες τόσο για τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση, όσο και για το μικροοργανισμό που χρησιμοποιείται για τη ζύμωση. Τα σάκχαρα που υδρολύονται από τα ένζυμα, μετατρέπονται άμεσα σε αιθανόλη από το μικροοργανισμό της ζύμωσης, διατηρώντας τη συγκέντρωση των σακχάρων στον αντιδραστήρα σε χαμηλά επίπεδα.

Η διεργασία αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μεγαλύτερων αποδόσεων παραγωγής αιθανόλης, ενώ απαιτούνται και μικρότερες ποσότητες ενζύμων. Αυτό συμβαίνει διότι η πιθανή παρεμπόδιση από την παραγωγή της γλυκόζης και της κελλοβιόζης, που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης, αντιμετωπίζονται από την άμεση κατανάλωσή τους, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης [14]. Άλλα πλεονεκτήματα της διεργασίας ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης είναι οι μικροί χρόνοι διεργασίας, οι χαμηλότερες απαιτήσεις για στείρες συνθήκες, δεδομένου ότι η γλυκόζη μετατρέπεται κατευθείαν σε βιοαιθανόλη, ο μικρότερος όγκος αντιδραστήρα, η λιγότερη κατανάλωση ενέργειας και το χαμηλότερο κόστος παραγωγής, αφού τόσο η υδρόλυση όσο και η ζύμωση γίνονται στην ίδια δεξαμενή [8].

Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της διεργασίας ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης είναι οι διαφορετικές άριστες συνθήκες (κυρίως η θερμοκρασία), που απαιτούνται για την υδρόλυση της κυτταρίνης και για τη ζύμωση. Οι κυτταρινάσες υδρολύουν σε ένα άριστο pH 4-5 και σε θερμοκρασία 40-50 °C, ενώ η ζύμωση των εξοζών πραγματοποιείται περίπου στους 30 °C και σε pH επίσης 4-5 [14]. Έχει

βρεθεί ότι οι βέλτιστες συνθήκες μίας διεργασίας SSF με χρήση ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* είναι θερμοκρασία 37 °C και pH 4,5 [8].

Για την αποτελεσματική ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ανασυνδυασμένοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι μπορούν να ζυμώσουν τη γλυκόζη, την ξυλόζη και την αραβινόζη [14].

Η ενζυμική υδρόλυση στη διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία μικρότερη της βέλτιστης. Έτσι, η απαιτούμενη ποσότητα του ενζύμου αυξάνεται, καθώς η ενεργότητά του μειώνεται. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα, προτάθηκε μία διεργασία μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (Nonisothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation, NSSF). Στη διεργασία αυτή, η σακχαροποίηση και η ζύμωση πραγματοποιούνται ταυτόχρονα, αλλά σε διαφορετικούς αντιδραστήρες και στη βέλτιστη, για την κάθε μία, θερμοκρασία.

Η διεργασία NSSF έχει οδηγήσει σε μείωση της συνολικής απαίτησης για ένζυμα κατά 30-40% περίπου. Έχει παρατηρηθεί, ακόμη, ότι η διεργασία NSSF δίνει υψηλότερες αποδόσεις σε αιθανόλη και χρειάζεται λιγότερο συνολικό χρόνο σχέση με την SSF [38].

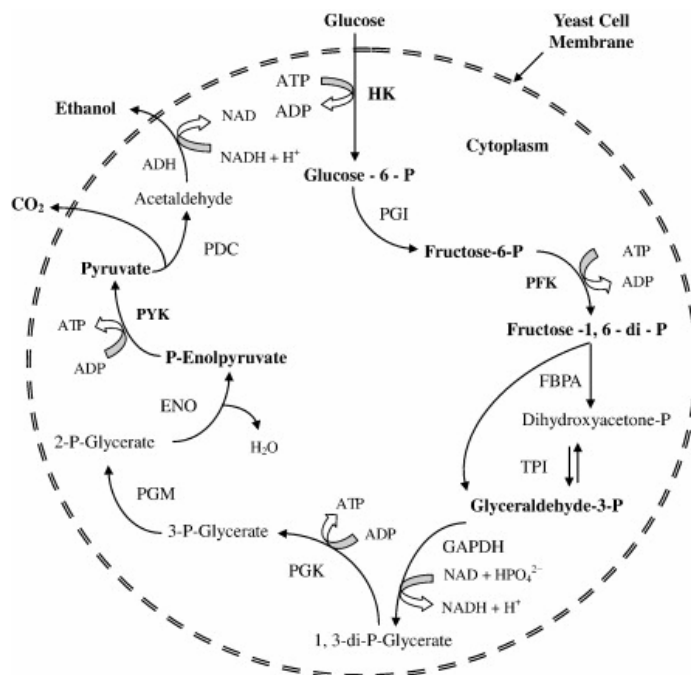
6.1.3 Ενοποιημένη Βιοδιεργασία (CBP)

Μια ιδανική βιοδιεργασία παραγωγής αιθανόλης είναι αυτή της ενοποιημένης διεργασίας (Consolidated Bioprocess, CBP), που αποτελείται από ένα στάδιο, στο οποίο ένας μικροοργανισμός σε έναν αντιδραστήρα έχει την ικανότητα να παράγει ταυτόχρονα τα απαραίτητα ένζυμα για την υδρόλυση της πρώτης ύλης, καθώς και να ζυμώνει όλα τα παραγόμενα σάκχαρα (πεντόζες και εξόζες). Τέτοιοι μικροοργανισμοί είναι ο *Fusarium oxysporum*, ο *Monilia* sp. και ο *Neurospora crassa*. Δυστυχώς, οι μικροοργανισμοί αυτοί παράγουν αιθανόλη με σχετικά χαμηλούς ρυθμούς και σε μικρές συγκεντρώσεις, ώστε να μην είναι ικανοί να χρησιμοποιηθούν σε βιομηχανικές διεργασίες. Τεχνικές μεταβολικής μηχανικής ίσως μπορέσουν να μετατρέψουν τους μικροοργανισμούς στο μέλλον σε κατάλληλους βιοκαταλύτες με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά για την παραγωγή αιθανόλης.

6.2 Μικροοργανισμοί στην παραγωγή βιοαιθανόλης

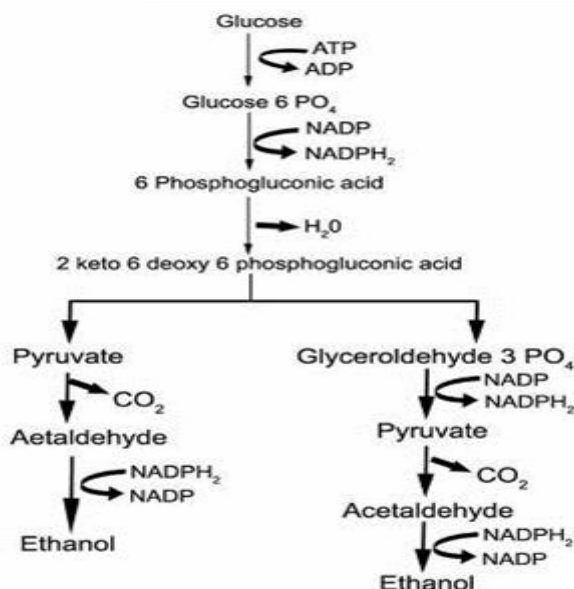
Το στάδιο της βιομετατροπής περιλαμβάνει τη χρήση μικροοργανισμών που μεταβολίζουν τα παραγόμενα από την ενζυμική υδρόλυση ζυμώσιμα σάκχαρα για την ανάπτυξή τους, παράγοντας αιθανόλη, CO₂ και άλλα παραπροϊόντα. Αρκετές μελέτες και αναφορές έχουν δημοσιευτεί για την παραγωγή αιθανόλης από διάφορους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια, ζύμες και μύκητες. Οι γενικές απαιτήσεις ενός μικροοργανισμού για χρήση στην παραγωγή αιθανόλης περιλαμβάνουν τις υψηλές αποδόσεις σε αιθανόλη, την υψηλή παραγωγικότητα και την ανθεκτικότητα σε μεγάλες συγκεντρώσεις αιθανόλης [35].

Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* μεταβολίζει τη γλυκόζη σε αιθανόλη, μέσω του μονοπατιού Embden-Meyerhof-Parnas (EMP ή γλυκόλυση) (Σχήμα A12).



Σχήμα A12. Μεταβολικό μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).

Ένα διαφορετικό μονοπάτι αφομοίωσης της γλυκόζης είναι το Entner-Doudoroff (ED) (Σχήμα A13), που αξιοποιείται συνοδευτικά με το EMP από πολλά βακτήρια, όπως του γένους *Zyotomonas*.



Σχήμα A13. Μεταβολικό μονοπάτι Entner-Doudoroff (ED).

Τα βακτήρια αυτά είναι οι μόνοι μικροοργανισμοί που μεταβολίζουν αναερόβια τη γλυκόζη μέσω του ED μονοπατιού, σε αντίθεση με το EMP. Το μονοπάτι ED αποδίδει μόνο το μισό ποσοστό ATP ανά mol γλυκόζης σε σχέση με το

EMP, με αποτέλεσμα τα βακτήρια *Zygomonas* να παράγουν λιγότερη κυτταρική βιομάζα σε σχέση με τη ζύμη και να διοχετεύουν μεγαλύτερο ποσοστό της πηγής άνθρακα προς μεταβολικά προϊόντα. Το βακτήριο *Zygomonas mobilis* είναι ένας μικροοργανισμός, που χρησιμοποιείται στη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης, ο οποίος, λόγω παραγωγής λιγότερης βιομάζας, έχει υψηλότερες αποδόσεις από τις ζύμες, αλλά αναπτύσσεται με πιο αργό ρυθμό [35].

Είναι φανερό ότι σε μία διεργασία παραγωγής αιθανόλης είναι επιθυμητό να χρησιμοποιηθούν όλα τα σάκχαρα που έχουν παραχθεί από την προκατεργασία και την υδρόλυση του υλικού και που κυρίως αποτελούνται από εξόζες και πεντόζες [14].

Όμως, η ζύμη *S. cerevisiae* και το βακτήριο *Z. mobilis* δε διαθέτουν την ικανότητα μεταβολισμού των πεντοζών. Στη φύση, ορισμένα βακτήρια, μύκητες και κάποιες ζύμες έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν πεντόζες, αλλά με χαμηλή απόδοση σε αιθανόλη. Η χρήση σε μεγάλη κλίμακα ζυμών που μεταβολίζουν πεντόζες (*Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* και *Candida shehatae*) παρουσιάζει προβλήματα λόγω της ευαισθησίας τους σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, της απαίτησης για συγκεκριμένες συνθήκες αερισμού, την υψηλή ευαισθησία σε παρεμποδιστές και την ανικανότητα να ζυμώσουν τις πεντόζες σε χαμηλά pH [35].

6.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* (Εικόνα A4) έχει εδραιωθεί στην παραγωγή αιθανόλης, μέσω διεργασιών ζύμωσης σακχάρων, καθώς εμφανίζει υψηλές αποδόσεις και παραγωγικότητα, αντοχή σε χαμηλές τιμές pH και ανθεκτικότητα στην αιθανόλη, σε παραπροϊόντα της ζύμωσης και σε άλλες παρεμποδιστικές ενώσεις που είναι παρούσες σε λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Σε αναερόβιες συνθήκες, μετατρέπει 1 mol γλυκόζης σε 2 mol αιθανόλης [14, 35].



Εικόνα A4. Ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*.

Ο μικροοργανισμός αυτός ζυμώνει όλες τις εξόζες που προέρχονται από την πρώτη ύλη και παράγει αιθανόλη με απόδοση πλησίον της μέγιστης θεωρητικής

(0.51 g αιθανόλης ανά g γλυκόζης). Παρ' όλα αυτά, η χρήση του για υποστρώματα πλούσια σε ημικυτταρίνη είναι περιοριστική, αφού, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, δεν μπορεί να ζυμώσει τις πεντόζες, που είναι το κύριο συστατικό σάκχαρο των ημικυτταρινών.

Λόγω της έλλειψης στη φύση ενός μικροοργανισμού ικανού να ζυμώνει αποτελεσματικά υποστρώματα πλούσια σε λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην "κατασκευή" ενός αποτελεσματικού βιοκαταλύτη μέσω των τεχνικών της μεταβολικής μηχανικής, δηλαδή τεχνικών που έχουν ως στόχο τη βελτίωση της παραγωγής ενός προϊόντος ή των ιδιοτήτων ενός κυττάρου μέσω της τροποποίησης μιας συγκεκριμένης βιοχημικής αντίδρασης ή την εισαγωγή νέας, με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA. Χρησιμοποιώντας τέτοιου τύπου τεχνικές, επιχειρήθηκε η εισαγωγή στο φυσικό γονιδίωμα του *S. cerevisiae* των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό της ξυλόζης από ευκαρυωτικούς ή προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, τα οποία είναι ικανά να βιομετατρέψουν την ξυλόζη σε αιθανόλη [14].

6.2.2 *Zymomonas mobilis*

Ο δεύτερος σημαντικός αιθανολοπαράγωγος μικροοργανισμός, είναι το βακτήριο *Zymomonas mobilis*, ο οποίος χρησιμοποιείται στη βιομηχανία οινοπνευματωδών και έχει την ικανότητα να πραγματοποιεί ζυμώσεις σε pH=5 και θερμοκρασίες μεταξύ 30 °C και 40 °C. Μεταβολίζει τη γλυκόζη μέσω του μονοπατιού Entner-Doudoroff, το οποίο ανά 1 mol γλυκόζης αποδίδει 2 mol πυρασταφυλικού, παράγοντας 1 mol ATP. Για να μπορέσει να επιβιώσει με τόσο μικρή ενεργειακή απόδοση, ο μεταβολισμός του μικροοργανισμού επιταχύνεται τρομερά. Για το λόγο αυτό ο *Z. mobilis*, κατέχει υψηλότατα επίπεδα ενεργότητας γλυκολυτικών και αιθανολοπαράγωγων ενζύμων, με αποτέλεσμα εξαιρετικές αποδόσεις αιθανόλης, που προσεγγίζουν την τιμή της θεωρητικής απόδοσης (0.47 g αιθανόλης ανά g γλυκόζης) και υψηλή ογκομετρική παραγωγικότητα.

Ο μικροοργανισμός αυτός δεν έχει τη δυνατότητα να ζυμώνει τις πεντόζες. Έτσι, όπως και για τον *S. cerevisiae*, έχουν εφαρμοστεί στρατηγικές εισαγωγής γονιδίων που ευθύνονται για την αποτελεσματική ζύμωση της ξυλόζης [14].

6.2.3 *Escherichia coli*

Ο *Escherichia coli* έχει τη φυσική ικανότητα να καταναλώνει ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, μετατρέποντας εξόζες, πεντόζες και ουρονικά οξέα στον κεντρικό μεταβολίτη, το πυροσταφυλικό. Αυτός ο μεταβολίτης μετατρέπεται, ακολούθως, σε ένα μείγμα αποτελούμενο από σχεδόν ίσα μέρη αιθανόλης, οξικού, γαλακτικού και φορμικού οξέος. Κατά κανόνα, οι ζυμώσεις γίνονται σε pH=7 και θερμοκρασίες μεταξύ 30 °C και 35 °C. Η παρουσία οργανικών οξέων, όπως είναι το οξικό και το γαλακτικό οξύ, στο τελικό ζυμωτικό υλικό ταυτόχρονα με την αιθανόλη, κάνει τη χρησιμοποίηση του *E. coli* μία μη ελκυστική επιλογή για την παραγωγή αιθανόλης. Επιπλέον, οι αποδόσεις παραγωγής αιθανόλης είναι χαμηλότερες από 0.2 g ανά g σακχάρων (γλυκόζης ή ξυλόζης).

Η κύρια στρατηγική για την αύξηση της παραγωγής αιθανόλης από τον *E. coli*, με στόχο να καταστεί κατάλληλος για διεργασίες χρησιμοποίησης

λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σαν πρώτες ύλες για την παραγωγή αιθανόλης, ήταν να στραφούν οι ροές άνθρακα προς την παραγωγή αιθανόλης, σε βάρος εκείνων των ροών που οδηγούσαν στην παραγωγή παραπροϊόντων, όπως το οξικό και το γαλακτικό. Αυτό επιτεύχθηκε με την εισαγωγή των γονιδίων *pdc* και *adhB* από τον *Z. Mobilis* [14].

6.2.4 *Pichia stipitis*

Το ενδιαφέρον για τη ζύμη *Pichia stipitis* ξεκίνησε λόγω της ικανότητας του μικροοργανισμού να μεταβολίζει φυσικά, εκτός από τη γλυκόζη, και την ξυλόζη. Το μειονέκτημα της διεργασίας παραγωγής αιθανόλης από το μικροοργανισμό αυτόν είναι ότι παρεμποδίζεται από τις ουσίες που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας και υδρόλυσης των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών, καθώς και το γεγονός ότι για το συμμεταβολισμό της γλυκόζης και της ξυλόζης απαιτούνται μικροαερόβιες συνθήκες. Για μια βιομηχανική ζυμωτική διεργασία παραγωγής αιθανόλης, όπου οι συνθήκες ελέγχου του αερισμού είναι δύσκολες, είναι επιθυμητή η αναερόβια παραγωγή αιθανόλης.

Η στρατηγική απου ακολουθήθηκε ήταν η εισαγωγή του γονιδίου *URA1* από τον *S. Cerevisiae*. Έτσι, η ανασυνδυασμένη ζύμη μπόρεσε να αναπτυχθεί αναερόβια μεταβολίζοντας τη γλυκόζη και την ξυλόζη [14].

6.3 Παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης

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

- *Μεθανόλη*: Δεν προέρχεται από το 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-μεθυλοπροπανόλη-1, 2-μεθυλοβουτανόλη-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.
- *Γλυκερόλη*: Είναι ενδιάμεσο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης. Ο σχηματισμός της ευνοείται από χαμηλές θερμοκρασίες, υψηλή περιεκτικότητα σε τρυγικό οξύ και από την προσθήκη SO_2 .
- *Ακεταλδεΐδη*: Είναι ενδιάμεσο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης που προκύπτει, από την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος. Αν προστεθεί $NaHSO_3$ και SO_2 στο σακχαρούχο υπόστρωμα πριν τη ζύμωση ή κατά την διάρκεια της, η παραγόμενη ακεταλδεΐδη σχηματίζει προϊόν προσθήκης και έτσι δεν ανάγεται περαιτέρω προς αιθανόλη.

- *Εστέρες:* Σπουδαιότερος είναι ο οξικός αιθυλεστέρας $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, ο οποίος σχηματίζεται από την αντίδραση του οξικού οξέος με την αιθανόλη.
- *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 ακεταλδεΐδης με την αιθανόλη [41].

6.4 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.
- *Φορμαλδεΐδη:* Η HCHO που χρησιμοποιείται με την μορφή φορμόλης ως αντισηπτικό ενάντια στα βακτήρια, υπό ορισμένες συνθήκες αναστέλλει την αλκοολική ζύμωση.
- *Θειώδες οξύ:* Το H_2SO_3 , που χρησιμοποιείται συνήθως για τη θείωση στις οινοδεξαμενές, 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 [41].

B. ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ

1. Όργανα

- Φωτόμετρο (Hitachi UV 2000)
- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία)
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας
- Φούρνος μικροκυμάτων (Microwave digestion equipment, speed wave™ MWS-2, Berghof Instruments GmbH, Γερμανία)
- microplate reader (SpectraMax 250, Molecular Devices)
- 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)
- φούρνος ξήρασης
- αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 0.1 mg
- ξηραντήρας (με silica gel)
- κλίβανος τέφρας
- συσκευή καύσης και απόσταξης Kjeldahl
- συσκευή Soxhlet
- περιστροφικός εξατμιστήρας
- θερμοστατούμενος περιστροφικός αναδευτήρας (Zhicheng 211C, Κίνα, LAB-LINE Incubator-Shaker, Η.Π.Α.)
- διάταξη διήθησης υπό κενό

2. Πρώτη ύλη

Η επεξεργασία και η διάθεση της ξηρής πρώτης ύλης για τις ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας έγινε από τη Μονάδα Περιβαλλοντικής Επιστήμης και Τεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ.

3. Προκατεργασία πρώτης ύλης

Για την προκατεργασία των διατροφικών απορριμμάτων χρησιμοποιήθηκε Φούρνος Μικροκυμάτων (Microwave digestion equipment, speedwave™ MWS-2, Berghof Instruments GmbH, Γερμανία). Η συσκευή ήταν εφοδιασμένη με ανιχνευτή υπερύθρων για την εξ αποστάσεως μέτρηση της θερμοκρασίας, χωρίς επαφή με το δείγμα, το οποίο βρισκόταν σε ειδικά φιαλίδια, ανθεκτικά σε υψηλή πίεση (≤ 40 bars) και θερμοκρασία (≤ 220 °C). Η ισχύς του φούρνου μικροκυμάτων ρυθμίστηκε στα 700 W.

Προκατεργάστηκαν υδροθερμικά δείγματα διατροφικών απορριμμάτων συγκέντρωσης στερεών 20%, 30% και 50% (w/v) στους 120 °C για 15 min. Επιπλέον, δείγματα συγκέντρωσης στερεών 30% και 50% (w/v) προκατεργάστηκαν σε θερμοκρασίες 85 °C και 100 °C για 60 min. Η πρώτη ύλη, σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, προκατεργάστηκε απουσία και παρουσία οξέος (1 g H₂SO₄/100 g ξηρού υλικού).

Τα προκατεργασμένα δείγματα, στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της ενζυμικής υδρόλυσης και της ζύμωσης, με τη βοήθεια των οποίων εκτιμήθηκε και η αποτελεσματικότητα των μεθόδων. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

4. Ενζυμική υδρόλυση υδροθερμικά προκατεργασμένων και μη διατροφικών απορριμμάτων

Η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοστατούμενο περιστροφικό αναδευτήρα (250 rpm) θερμοκρασίας 50 °C. Χρησιμοποιήθηκε μείγμα εμπορικών σκευασμάτων κυτταρινολυτικών ενζύμων Celluclast® 1.5 L και Novozyme® 188 σε αναλογία 5:1 (v/v), έτσι ώστε η τελική ολική ενεργότητα κυτταρινασών να είναι: 5, 10 και 20 FPU / g ξηρού υλικού, καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών 50 mM, pH=5.0. Επιπλέον, σε κάθε μείγμα προστέθηκε αζίδιο του νατρίου (NaN₃) τελικής συγκέντρωσης 0.01% (w/v), με σκοπό την αποτροπή μικροβιακής μόλυνσης.

Τα πειράματα της ενζυμικής υδρόλυσης διεξήχθησαν σε δείγματα προκατεργασμένων και μη διατροφικών απορριμμάτων συγκέντρωσης στερεών 20%, 30% και 50% (w/v). Σε τακτά χρονικά διαστήματα, λαμβάνονταν δείγματα, προκειμένου να προσδιοριστούν σε αυτά οι συγκεντρώσεις των αναγωγικών σακχάρων (§6) και της γλυκόζης (§7). Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

5. Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα

Τα προκατεργασμένα (παρουσία και απουσία οξέος) και μη διατροφικά απορρίμματα υπέστησαν ζύμωση, μέσω διεργασιών ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης διαλείποντος έργου (SSF) και μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης ημιδιαλείποντος έργου (NSSF).

Η ζύμωση των δειγμάτων διεξήχθη σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα (80 rpm), στους 30 °C. Σε όλα τα δείγματα είχαν προστεθεί κατάλληλη ποσότητα αποστειρωμένου ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών 50 mM, pH=5.0, κατάλληλη ποσότητα μείγματος κυτταρινασών Celluclast® 1.5L και Novozyme® 188 σε αναλογία όγκων 5:1 (v/v) και ξηρή μαγιά αρτοποιίας (Yiotis, Athens, Greece).

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές λαμβάνονταν δείγματα από τις καλλιέργειες και προσδιορίζονταν οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης (§9) και των εναπομεινάντων σακχάρων (§6 και §7). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι χειρισμοί, τόσο κατά την προετοιμασία των δειγμάτων όσο και κατά τη δειγματοληψία, πραγματοποιήθηκαν σε στείρες συνθήκες και σε θάλαμο νηματικής ροής.

5.1 Διεργασία ταυτόχρονης σακχαροποίηση και ζύμωση διαλείποντος έργου (batch SSF)

Πραγματοποιήθηκε, μέσω διεργασίας SSF διαλείποντος έργου, ζύμωση προκατεργασμένων και μη δειγμάτων συγκέντρωσης στερεών 20% (w/v) με χρήση μείγματος κυτταρινασών ολικής ενεργότητας 5, 10 και 20 FPU/g ξηρού στερεού και 15 mg ξηρής μαγιάς αρτοποιίας/g αρχικού ξηρού υλικού καθώς και δειγμάτων συγκέντρωσης στερεών 30% (w/v) με χρήση μείγματος κυτταρινασών ολικής ενεργότητας 10 FPU/g ξηρού στερεού και 15 mg ξηρής μαγιάς αρτοποιίας/g αρχικού ξηρού υλικού.

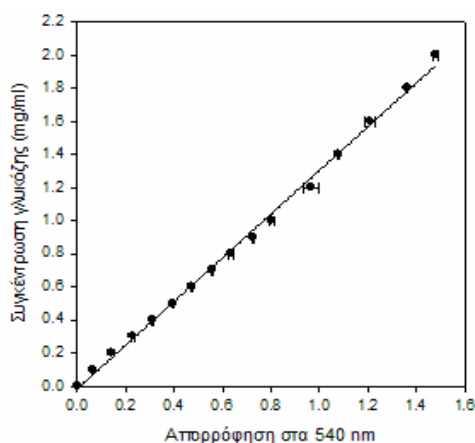
5.2 Διεργασία μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης ημιδιαλείποντος έργου (fed – batch NSSF)

Για τη ζύμωση των προκατεργασμένων και μη διατροφικών απορριμμάτων, μέσω διεργασίας NSSF ημιδιαλείποντος έργου, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αρχικής συγκέντρωσης στερεών 30% (w/v), εμβολιασμένα με κατάλληλη ποσότητα ξηρής μαγιάς αρτοποιίας (15 mg ξηρής μαγιάς αρτοποιίας/g αρχικού ξηρού υλικού). Τα δείγματα είχαν υποστεί προϋδρόλυση για 6 h, σε θερμοκρασία 50 °C με χρήση κατάλληλης ποσότητας μείγματος 5:1 (v/v) Celluclast® 1.5L και Novozyme® 188, έτσι ώστε η ολική ενεργότητα κυτταρινασών να είναι 7 FPU/g ξηρού υλικού.

12 και 24 ώρες μετά την έναρξη της διεργασίας, προστέθηκαν στις ήδη υπάρχουσες καλλιέργειες δείγματα προκατεργασμένων και μη διατροφικών απορριμμάτων, συγκέντρωσης υποστρώματος 50% (w/v), τα οποία είχαν προϋδρολυθεί και εμβολιαστεί με ζύμη, όπως ακριβώς περιγράφεται παραπάνω. Με τον τρόπο αυτόν, επετεύχθη τελική συγκέντρωση υποστρώματος 40 % (w/v).

6. Προσδιορισμός συγκέντρωσης αναγωγικών υδατανθράκων

Η μέτρηση αναγωγικών υδατανθράκων πραγματοποιήθηκε με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (2-υδροξυ-3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ ή DNS) [17]. Στο *Διάγραμμα Β1* παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς των αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης.



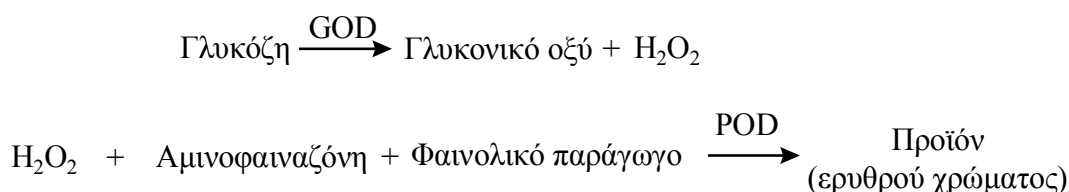
$$C_{\text{γλυκόζης}} \text{ (mg/mL)} = 1.3199 \cdot \text{ABS}_{540 \text{ nm}} - 0.0168$$
$$(R^2=0.997, p<0.0001)$$

Διάγραμμα Β1. Καμπύλη αναφοράς αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης.

7. Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης

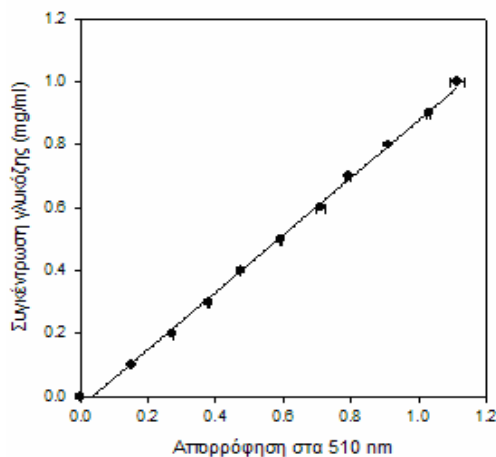
Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης έγινε με τη βοήθεια microplate reader (SpectraMax 250, Molecular Devices) και με χρήση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit). Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος, το οποίο είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης.

Αρχικά, με τη δράση της οξειδάσης της γλυκόζης, η γλυκόζη μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ, με ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ακολούθως, με τη δράση της υπεροξειδάσης της γλυκόζης, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, παρουσία αμινοφαιναζόνης και κάποιου φαινολικού παραγώγου, μετατρέπεται σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος, το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm (Σχήμα B1).



Σχήμα B1. Αλληλουχία ενζυμικών αντιδράσεων που οδηγούν στην ποσοτικοποίηση της γλυκόζης

Στο Διάγραμμα B2 παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης:



$$C_{\text{γλυκόζης}} \text{ (mg/mL)} = 0.9096 \cdot \text{ABS}_{510 \text{ nm}} - 0.0317$$
$$(R^2=0.998, p<0.0001)$$

Διάγραμμα B2. Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης.

8. Μέτρηση ολικής ενεργότητας κυτταρινασών (Filter paper activity)

Η ολική ενεργότητα των κυτταρινασών (Filter Paper Activity-FPA Units) μετρήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο κατά IUPAC [18].

Σε δοκιμαστικό σωλήνα, τοποθετημένο μέσα σε παγόλουτρο, εισήχθησαν 50 mg (διαστάσεις 1 x 6 cm) Filter Paper Whatman No1 (καθαρή κυτταρίνη) μαζί με 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών 100 mM, pH=5.0 και 1 mL ενζυμικού σκευάσματος κατάλληλα αραιωμένου. Μετά από την επώαση του προκύπτοντος διαλύματος σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας (50 °C) για 30 min και την παραμονή του σε παγόλουτρο για 15 min, ακολούθησε η φυγοκέντρισή του. Το υπερκείμενο υγρό αναλύθηκε με τη μέθοδο DNS για τον προσδιορισμό των αναγωγικών σακχάρων (§ 6).

Σημειώνεται ότι για το μηδενισμό του φωτομέτρου χρησιμοποιήθηκε δείγμα, στο οποίο αντί 1 mL ενζυμικού σκευάσματος κατάλληλα αραιωμένου περιείχε 1 mL απενεργοποιημένου ενζυμικού σκευάσματος. Η απενεργοποίηση του ενζυμικού σκευάσματος πραγματοποιήθηκε με βρασμό αυτού για περίπου 20 min.

Ορισμός ολικής ενεργότητας κυτταρινασών:

1 Unit ολικής ενεργότητας κυτταρινασών ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την παραγωγή 1 μmol γλυκόζης ανά min σε pH=5.0 και θερμοκρασία 50 °C.

9. Μέτρηση εξωκυτταρικών μεταβολιτών με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High-performance liquid chromatography, HPLC)

Οι εξωκυτταρικοί μεταβολίτες που παράγονται κατά τη βιομετατροπή των διατροφικών απορριμμάτων σε αιθανόλη (αιθανόλη, γλυκερόλη και οξικό οξύ) προσδιορίστηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC (Shimadzu LC-20AD), με στήλη 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 H₂SO₄ 5 mM με ροή 0.6 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 50 °C [19].

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των εξωκυτταρικών μεταβολιτών, (α) κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς για τον κάθε ένα από αυτούς και (β) με τη βοήθεια αυτών των καμπυλών προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους ($C_{\text{metabolite_HPLC}}$, mg/mL). Η συγκέντρωση των μεταβολιτών στα δείγματα, τα οποία πριν από την ανάλυση HPLC είχαν υποστεί αραιώση, υπολογίστηκε μέσω της Εξίσωσης 1:

$$C_{\text{metabolite}} = C_{\text{metabolite_HPLC}} \times \text{dilution} \quad \text{Εξ. 1}$$

όπου,

$C_{\text{metabolite}}$ η τελική συγκέντρωση του μεταβολίτη σε mg/mL

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

dilution ο συντελεστής αραιώσης του δείγματος

Το κάθε δείγμα, στο οποίο επρόκειτο να προσδιοριστούν οι εξωκυτταρικοί μεταβολίτες, αναλύθηκε με τη μέθοδο του HPLC εις διπλούν και ελήφθη ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων.

10. Ανάλυση συστατικών των διατροφικών απορριμμάτων

10.1. Προσδιορισμός υγρασίας (NREL/TP-510-42618)

Για τον προσδιορισμό της υγρασίας των διατροφικών απορριμμάτων, τοποθετήθηκε ποσότητα δείγματος σε ξηρά, προζυγισμένα “πιατάκια” αλουμινίου (aluminum pans) και καταγράφηκε το βάρος του ($weight_{\text{δείγματος}}$). Στη συνέχεια, τα “πιατάκια” μαζί με το δείγμα τοποθετήθηκαν στο φούρνο ξήρανσης για 16 ώρες σε θερμοκρασία 106 °C. Μετά το πέρας των 16 ωρών, μεταφέρθηκαν σε ξηραντήρα (με silica gel) για τουλάχιστον 30 λεπτά προκειμένου να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος χωρίς να επαναπροσλάβουν επιπλέον υγρασία. Τέλος, καταγράφηκε το βάρος των “πιάτων” αλουμινίου μαζί με το ξηρό πλέον δείγμα ($Weight_{\text{π.α.ξ.δ.}}$).

Να σημειωθεί ότι ο χειρισμός των “πιάτων” αλουμινίου έγινε με χρήση λαβίδας και η διαδικασία της ξήρανσης στο φούρνο επανελήφθη μέχρι σταθερού βάρους (ο όρος σταθερό βάρος ορίζεται ως η μεταβολή κατά $\pm 0.1\%$ στο ποσοστό των στερεών μετά από μία ώρα επαναξήρανση του δείγματος). Επιπλέον, όλες οι ζυγίσεις πραγματοποιήθηκαν σε αναλυτικό ζυγό με ακρίβεια 0.1 mg.

Το ποσοστό υγρασίας, συνολικών στερεών καθώς και το ξηρό βάρος του δείγματος υπολογίστηκαν με εφαρμογή των Εξισώσεων 2, 3 και 4 αντίστοιχα:

$$\% \text{Υγρασία} = 100 - \left(\frac{Weight_{\text{π.α.ξ.δ.}} - Weight_{\text{π.α.}}}{weight_{\text{δείγματος}}} \right) \times 100 \quad \text{Εξ. 2}$$

$$\% \text{ΣυνολικάΣτερεά} = \left(\frac{Weight_{\text{π.α.ξ.δ.}} - Weight_{\text{π.α.}}}{weight_{\text{δείγματος}}} \right) \times 100 \quad \text{Εξ. 3}$$

$$ODW = \left(\frac{Weight_{\text{δείγματος}} \times \% \text{ΣυνολικάΣτερεά}}{100} \right) \quad \text{Εξ. 4}$$

όπου,

$Weight_{\text{π.α.ξ.δ.}}$ το βάρος του ξηρού «πιάτου» αλουμινίου συν το βάρος του ξηρού δείγματος (g)

$Weight_{\text{π.α.}}$ το ξηρό βάρος του «πιάτου» αλουμινίου (g)

$weight_{\text{δείγματος}}$ το βάρος του δείγματος (g)

ODW το ξηρό βάρος του δείγματος (g)

10.2 Προσδιορισμός τέφρας (ASTM E1755 - 01(2007))

Για τον προσδιορισμό της τέφρας των διατροφικών απορριμμάτων, τοποθετήθηκαν 0.5-2.0 g δείγματος σε ξηρά, προζυγισμένα πορσελάνινα χωνευτήρια αποτέφρωσης και καταγράφηκε το βάρος τους ($weight_{\text{δείγματος}}$). Στη συνέχεια, τα πορσελάνινα χωνευτήρια αποτέφρωσης μαζί με το δείγμα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο αποτέφρωσης για 24 ώρες σε θερμοκρασία 575 ± 25 °C.

Μετά την αποτέφρωση τα χωνευτήρια απομακρύνθηκαν από τον κλίβανο με χρήση λαβίδας και τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα (με silica gel) για τουλάχιστον 30 λεπτά. Τα δείγματα επανατοποθετήθηκαν στον κλίβανο για ξήρανση μέχρι σταθερού βάρους ($Weight_{χ.τ.}$) (ο όρος σταθερό βάρος ορίζεται ως ± 0.3 mg μεταβολή στο συνολικό βάρος των χωνευτηρίων μετά την πάροδο μίας ώρας στον κλίβανο τέφρας).

Το ποσοστό τέφρας του δείγματος υπολογίστηκε από την *Εξίσωση 5*:

$$\% \text{ Τέφρα} = \left(\frac{Weight_{χ.τ.} - Weight_{χ.}}{ODW} \right) \times 100 \quad \text{Εξ. 5}$$

όπου,

$Weight_{χ.}$ το ξηρό βάρος του χωνευτηρίου (g),

$Weight_{χ.τ.}$ το ξηρό βάρος του χωνευτηρίου συν το βάρος της τέφρας (g)

ODW το ξηρό βάρος του δείγματος (g) (όπως προσδιορίστηκε στην §10.1, *Εξίσωση 4*)

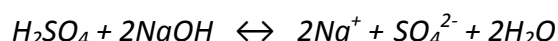
10.3. Προσδιορισμός του οργανικής δεσμευμένου αζώτου με τη μέθοδο Kjeldahl (AOAC Method, 978.04)

Η μέθοδος βασίζεται στην καύση του δείγματος με περίσσεια πυκνού θειικού οξέος, παρουσία μεταλλικών καταλυτών (οξειδίο υδραργύρου, σελήνιο, θειικό άλας χαλκού ή διοξειδίο τιτανίου) και αλάτων καλίου ή νατρίου. Από το όξινο θειικό αμμώνιο που σχηματίζεται, ελευθερώνεται αμμωνία, σε αλκαλικό περιβάλλον, η οποία αποστάζει και δεσμεύεται σε περίσσεια διαλύματος θειικού οξέος. Ακολουθεί τιτλοδότηση με τυποποιημένο αλκαλικό διάλυμα για τον προσδιορισμό της οργανικής περιεκτικότητας σε άζωτο του δείγματος.

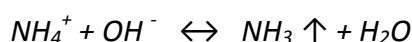
Η μέθοδος Kjeldahl πραγματοποιείται σε τρία στάδια: καύση του δείγματος, απόσταξη και τιτλοδότηση. Στο πρώτο στάδιο, το δείγμα υποβάλλεται σε καύση παρουσία ισχυρού οξέος (θειικό οξύ). Η γενικευμένη μη στοιχειομετρική αντίδραση που ακολουθεί, περιγράφει πώς ένα οργανικό υλικό που περιέχει άζωτο μετατρέπεται σε ιόντα αμμωνίου:



Μετά την καύση ακολουθεί εξουδετέρωση του όξινου μίγματος με προσθήκη αλκάλειας (NaOH):



Τα ιόντα αμμωνίου μετατρέπονται σε αμμωνία, αντιδρώντας με την περίσσεια του NaOH:



Η αμμωνία αποστάζει με υδρατμούς και δεσμεύεται σε περίσσεια διαλύματος θειικού οξέος.

Αναλυτικότερα, η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Καύση: Αρχικά, στον ειδικό σωλήνα καύσης της συσκευής Kjeldahl μεταφέρθηκαν διαδοχικά 10 g K_2SO_4 , 1 g ένυδρου $CuSO_4$, η κατάλληλη ποσότητα δείγματος (~ 1.5-2.0 g διατροφικών απορριμμάτων, η ζύγιση του οποίου έγινε με ακρίβεια 0.1 mg) και 25 mL πυκνού H_2SO_4 , το οποίο προστέθηκε τελευταίο, προκειμένου να συμπαρασύρει από τα τοιχώματα της φιάλης μικροποσότητες του K_2SO_4 , του $CuSO_4$ και του δείγματος. Αφού ανακινήθηκε καλά, ώστε να αναμειχθούν τα αντιδραστήρια με το δείγμα, η φιάλη τοποθετήθηκε στη συσκευή καύσης Kjeldahl, όπου υπέστη ήπια, στην αρχή, και εντονότερη, στη συνέχεια, θέρμανση. Όταν το μίγμα καύσης απέκτησε ένα διαυγές, κυανοπράσινο χρώμα, η θέρμανση διεκόπη.

Απόσταξη: Η φιάλη καύσης μαζί με το περιεχόμενό της αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και προστέθηκαν σε αυτή 75 mL απιονισμένου νερού, με τρόπο που να καταστήσει δυνατή την έκπλυση των εσωτερικών τοιχωμάτων της, και 125 mL διαλύματος καυστικού νατρίου, 32% (w/w). Η φιάλη προσαρμόστηκε αμέσως μετά την προσθήκη του αλκάλειου στη συσκευή απόσταξης Kjeldahl, ώστε να αποφευχθούν απώλειες σε αμμωνία. Ακολούθησε θέρμανση της φιάλης και πλήρης απόσταξη της αμμωνίας. Το απόσταγμα διαβιβάστηκε σε 50 mL διαλύματος θεικού οξέος, 0.5 N και μετά από τη συλλογή 200 mL αποστάγματος, η θέρμανση διεκόπη και η φιάλη Kjeldahl απομακρύνθηκε από τη συσκευή.

Τιτλοδότηση: Το υπολειπόμενο θεικό οξύ τιτλοδοτήθηκε με διάλυμα καυστικού νατρίου 0.5 N και δείκτη ερυθρό μεθυλίου/μπλε μεθυλενίου.

Λευκός προσδιορισμός: Για το λευκό προσδιορισμό ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας αντί του δείγματος διατροφικών απορριμμάτων, απιονισμένο νερό.

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε οργανικώς δεσμευμένο άζωτο υπολογίστηκε από την *Εξίσωση 6*:

$$\% N = 1.4007 \times \frac{(V_1 - V_2) \times N}{ODW} \quad \text{Εξ. 6}$$

όπου,

V_1 και V_2 οι καταναλωθέντες όγκοι (mL) του προτύπου διαλύματος καυστικού νατρίου κατά τον κυρίως και το λευκό προσδιορισμό αντιστοίχως,

N η κανονικότητα του προτύπου διαλύματος καυστικού νατρίου

ODW το ξηρό βάρος του δείγματος (g) (όπως προσδιορίστηκε στην §10.1, *Εξίσωση 4*)

Το ποσοστό του αζώτου στις περισσότερες πρωτεΐνες είναι 16% (w/w), έτσι χρησιμοποιείται συνήθως ο συντελεστής 6.25 για να μετατρέψει την περιεκτικότητα του αζώτου σε περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη σύμφωνα με την *Εξίσωση 7*:

$$\% Protein = 6.25 \times \% N \quad \text{Εξ. 7}$$

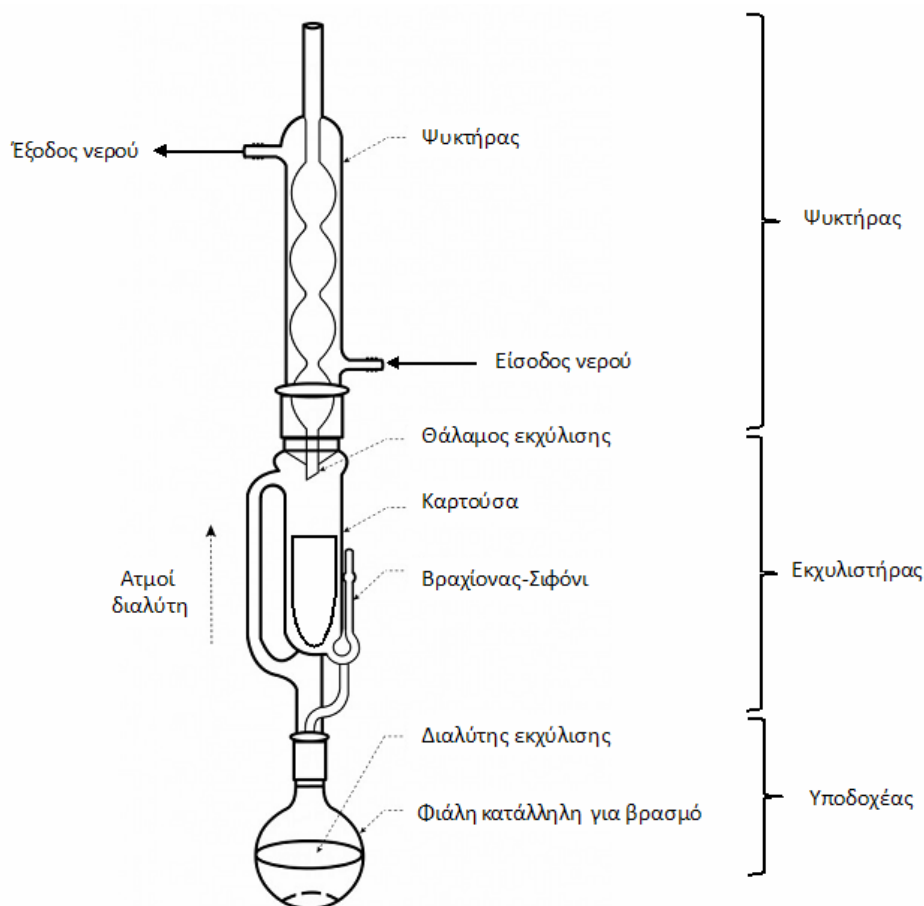
όπου,

$\% Protein$ η εκατοστιαία κατά βάρος περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη

$\% N$ η εκατοστιαία κατά βάρος περιεκτικότητα του δείγματος σε άζωτο

10.4. Προσδιορισμός λιπαρών (AOAC Method 920.39C)

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των διατροφικών απορριμμάτων σε λιπαρά έγινε με τη βοήθεια συσκευής Soxhlet, η οποία αποτελείται από (α) τον υποδοχέα, (β) τον εκχυλιστήρα και (γ) το συμπυκνωτήρα/ψυκτήρα (Σχήμα Β2).



Σχήμα Β2. Συσκευή Soxhlet

Δείγμα διατροφικών απορριμμάτων τοποθετήθηκε σε ξηρή, προζυγισμένη ειδική φύσιγγα (καρτούσα) και καταγράφηκε το βάρος της ($Weight_{\xi,\delta}$). Σε ξηρό, προζυγισμένο υποδοχέα των 1000 mL της συσκευής Soxhlet εισήχθησαν πυρήνες βρασμού και 500 mL οργανικού διαλύτη (n-εξάνιο) για την εκχύλιση των λιπαρών. Η συσκευή τέθηκε σε λειτουργία και μετά το πέρας της εκχύλισης (η οποία διαρκεί 6 ώρες από τον πρώτο σιφωνισμό του διαλύτη) η καρτούσα απομακρύνθηκε από τη συσκευή και το περιεχόμενό της παρελήφθη με διήθηση υπό κενό και χρήση ξηρών, προζυγισμένων γυάλινων ηθμών. Ακολούθησε διεξοδική έκπλυση του στερού υπολείμματος στο γυάλινο ηθμό με χρήση n-εξανίου. Ο γυάλινος ηθμός με το στερεό υπόλειμμα τοποθετήθηκαν σε φούρνο ξήρανσης για 16 ώρες σε θερμοκρασία 106 °C. Μετά το πέρας των 16 ωρών μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα για τουλάχιστον 30 λεπτά και ακολούθησε η καταγραφή του βάρους του ($Weight_{\nu,\eta,\delta}$).

Στη συνέχεια, ο οργανικός διαλύτης με τα εκχυλισθέντα λιπαρά, που βρίσκονταν στον υποδοχέα της συσκευής, αναμείχθηκε με το διήθημα και

ακολούθησε εξάτμισή του στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Έπειτα, ο υποδοχέας με το ελαιώδες υπόλειμμα υπέστησαν ξήρανση στο φούρνο στους 106 °C.

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της ξήρανσης, καταγράφηκε το βάρος τους ($Weight_{\xi.u.\epsilon\lambda.}$). Το βάρος του δείγματος, απο το οποίο επρόκειτο να εκχυλιστούν τα λιπαρά, υπολογίστηκε από την *Εξίσωση 8*:

$$Weight_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma} = Weight_{\xi.k.\delta.} - Weight_{\xi.k.} \quad \text{Εξ. 8}$$

όπου,

$Weight_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma}$ το βάρος του δείγματος που επρόκειτο να εκχυλιστεί (g)
 $Weight_{\xi.k.\delta.}$ το συνολικό βάρος της ξηρής καρτούσας συν το βάρος του δείγματος (g)
 $Weight_{\xi.k.}$ το βάρος της ξηρής καρτούσας (g)

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε λιπαρά υπολογίστηκε με εφαρμογή της *Εξίσωσης 9*:

$$\% \text{ Λιπαρά} = \frac{(Weight_{\xi.u.\epsilon\lambda.} - Weight_{\xi.u.})}{ODW} \times 100 \quad \text{Εξ. 9}$$

όπου,

$Weight_{\xi.u.\epsilon\lambda.}$ το συνολικό βάρος του ξηρού υποδοχέα συν το βάρος του ελαιώδους υπολείμματος (g)
 $Weight_{\xi.u.}$ το βάρος του ξηρού υποδοχέα (g)
 ODW το ξηρό βάρος του δείγματος (g) (όπως προσδιορίστηκε στην § 10.1, *Εξίσωση 4*)

Το ξηρό βάρος του στερεού υπολείμματος μετά από την απομάκρυνση των λιπαρών υπολογίστηκε από την *Εξίσωση 10*:

$$\Sigma.Y._1 = Weight_{\gamma.\eta.\delta.} - Weight_{\gamma.\eta.} \quad \text{Εξ. 10}$$

όπου,

$\Sigma.Y._1$ το στερεό υπόλειμμα μετά την εκχύλιση των λιπαρών (g)
 $Weight_{\gamma.\eta.}$ το ξηρό βάρος του γυάλινου ηθμού (g)
 $Weight_{\gamma.\eta.\delta.}$ το ξηρό βάρος του γυάλινου ηθμού συν το βάρος του στερεού υπολείμματος (g)

10.5. Προσδιορισμός υδατοδιαλυτών συστατικών (NREL/TP-510-42619)

Στα υδατοδιαλυτά συστατικά περιλαμβάνονται ανόργανα υλικά, μη δομικά σάκχαρα και αζωτούχα υλικά μεταξύ άλλων. Η απομάκρυνσή τους από το δείγμα είναι απαραίτητη προκειμένου να προληφθεί οποιαδήποτε εμπλοκή με τα επόμενα στάδια ανάλυσης.

Σε κωνική φιάλη τύπου Erlenmeyer τοποθετήθηκε το ελεύθερο λιπαρών στερεό υπόλειμμα ($\Sigma.Y._1$) (§10.4) μαζί με κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του αιωρήματος να είναι 2.5% (w/v). Η φιάλη πωματίστηκε και τοποθετήθηκε για 1 ώρα σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα σε θερμοκρασία 50 °C. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό με χρήση ξηρού, προζυγισμένου γυάλινου ηθμού και έκπλυση του στερεού υπολείμματος με απιονισμένο νερό. Το στερεό υπόλειμμα μεταφέρθηκε εκ νέου στη φιάλη τύπου Erlenmeyer με 200 mL απιονισμένου νερού και η διαδικασία επανελήφθη.

Ο γυάλινος ηθμός με το στερεό υπόλειμμα υπέστη ξήρανση σε φούρνο και στη συνέχεια καταγράφηκε το βάρος του ($Weight_{γ.η.δ.}$). Τα διηθήματα συλλέχτηκαν και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των μη δομικών σακχάρων σε αυτά, σύμφωνα με τις μεθόδους των παραγράφων 6 και 7. Η περιεκτικότητα του δείγματος σε υδατοδιαλυτά συστατικά υπολογίστηκε από την *Εξίσωση 11*:

$$\% \text{Υδατοδιαλυτά} = 100 - \frac{(Weight_{γ.η.δ.} - Weight_{γ.η.})}{ODW} \times 100 \quad \text{Εξ. 11}$$

Όπου,

$Weight_{γ.η.δ.}$ το συνολικό ξηρό βάρος του γυάλινου ηθμού συν το βάρος του στερεού υπολείμματος (g)

$Weight_{γ.η.}$ το βάρος του ξηρού γυάλινου ηθμού (g)

ODW το ξηρό βάρος του δείγματος (g) (όπως προσδιορίζεται στην §10.1, *Εξίσωση 4*)

Το βάρος του στερεού υπολείμματος μετά την απομάκρυνση των υδατοδιαλυτών υπολογίστηκε από την *Εξίσωση 12*:

$$\Sigma.Y._2 = Weight_{γ.η.δ.} - Weight_{γ.η.} \quad \text{Εξ. 12}$$

όπου,

$\Sigma.Y._2$ το στερεό υπόλειμμα μετά την εκχύλιση των υδατοδιαλυτών (g)

$Weight_{γ.η.}$ το ξηρό βάρος του γυάλινου ηθμού (g)

$Weight_{γ.η.δ.}$ το ξηρό βάρος του γυάλινου ηθμού συν το βάρος του στερεού υπολείμματος (g)

11. Κλασμάτωση δομικών συστατικών (πολυσακχαριτών) του δείγματος

Ο προσδιορισμός των πολυσακχαριτών (πηκτίνη, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και αδιάλυτη σε οξύ λιγνίνη) πραγματοποιείται σε δείγμα από το οποίο έχουν απομακρυνθεί τα υδατοδιαλυτά συστατικά (§10.5) καθώς και τα λιπαρά (§10.4). Η κλασμάτωση των δομικών συστατικών του δείγματος πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της μεθόδου AOAC 991.42 σύμφωνα με τους Prosky et al., (1985), Prosky et al. (1992).

11.1. Απομάκρυνση πρωτεϊνικών συστατικών

Στο στάδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε η μη εξειδικευμένη πρωτεάση από *Streptomyces griseus* με την εμπορική ονομασία Pronase®, της εταιρείας Merck KGaA, Germany.

Το ελεύθερο λιπαρών και υδατοδιαλυτών συστατικών στερεό υπόλειμμα (Σ.Υ.₂) τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη τύπου Erlenmeyer και προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα πρωτεάσης (2.5 mg Pronase/g ξηρού δείγματος) και ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.1 M, pH=7.5 (50 mL ρυθμιστικού διαλύματος/g ξηρού δείγματος), το οποίο περιείχε 0.02% (w/v) αζίδιο του νατρίου. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα για 6 ώρες στους 40 °C.

Ακολούθησε διήθηση υπό κενό με χρήση ξηρού προζυγισμένου γυάλινου ηθμού και έκπλυση του στερεού υπολείμματος διαδοχικά με (i) απιονισμένο νερό (2 x 20 mL νερού/g αρχικού ξηρού δείγματος), (ii) αιθανόλη (95%) (15 mL αιθανόλης/g αρχικού ξηρού δείγματος) και (iii) αιθέρα (15 mL αιθέρα/g αρχικού ξηρού δείγματος).

Ο γυάλινος ηθμός με το ελεύθερο πρωτεϊνών υλικό υπέστη ξήρανση, μετά από την οποία καταγράφηκε το βάρος του ($Weight_{γ.η.δ.}$). Το βάρος του στερεού υπολείμματος μετά την απομάκρυνση των πρωτεϊνικών συστατικών υπολογίστηκε από την *Εξίσωση 13*:

$$\Sigma.Y._3 = Weight_{γ.η.δ.} - Weight_{γ.η.} \quad \text{Εξ. 13}$$

όπου,

$\Sigma.Y._3$ το στερεό υπόλειμμα μετά την απομάκρυνση των πρωτεϊνικών συστατικών (g)

$Weight_{γ.η.}$ το ξηρό βάρος του γυάλινου ηθμού (g)

$Weight_{γ.η.δ.}$ το ξηρό βάρος του γυάλινου ηθμού συν το βάρος του στερεού υπολείμματος (g)

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεϊνικά συστατικά υπολογίστηκε από την *Εξίσωση 14*:

$$\% \text{ Πρωτεϊνικά} = \frac{(\Sigma.Y._2 - \Sigma.Y._3)}{ODW} \times 100 \quad \text{Εξ. 14}$$

όπου,

$\Sigma.Y._2$ το στερεό υπόλειμμα μετά την απομάκρυνση των υδατοδιαλυτών συστατικών (g)

$\Sigma.Y._3$ το στερεό υπόλειμμα μετά την απομάκρυνση των πρωτεϊνικών συστατικών (g)

ODW το ξηρό βάρος του δείγματος (g) (όπως προσδιορίστηκε στην §10.1, *Εξίσωση 4*)

11.2. Απομάκρυνση πηκτίνης

Σε κωνική φιάλη τύπου Erlenmeyer τοποθετήθηκε το ξηρό υλικό που προέκυψε μετά την απομάκρυνση των πρωτεϊνικών συστατικών (Σ.Υ.₃) και προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος οξαλικού αμμωνίου 0.25% w/v (50 mL διαλύματος οξαλικού αμμωνίου/g ξηρού δείγματος). Η φιάλη τοποθετήθηκε σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα για 4 ώρες στους 85 °C.

Ακολούθησε διήθηση υπό κενό του δείγματος με χρήση ξηρού, προζυγισμένου γυάλινου ηθμού και έκπλυση του στερεού υπολείμματος διαδοχικά με (i) απιονισμένο νερό (20 mL νερού/g αρχικού ξηρού δείγματος), (ii) αιθανόλη (95%) (2 x 20 mL αιθανόλης/g αρχικού ξηρού δείγματος) και (iii) αιθέρα (20 mL αιθέρα/g αρχικού ξηρού δείγματος).

Στη συνέχεια, ο γυάλινος ηθμός με το υλικό υπέστη ξήρανση και ζύγιση με αναλυτικό ζυγό για την καταγραφή του βάρους του ($Weight_{γ.η.δ.}$). Το βάρος του στερεού υπολείμματος μετά την απομάκρυνση της πηκτίνης υπολογίστηκε από την Εξίσωση 15:

$$\Sigma.Y._4 = Weight_{γ.η.δ.} - Weight_{γ.η.} \quad \text{Εξ. 15}$$

όπου,

Σ.Υ.₄ το στερεό υπόλειμμα μετά την απομάκρυνση της πηκτίνης (g)

$Weight_{γ.η.}$ το ξηρό βάρος του γυάλινου ηθμού (g)

$Weight_{γ.η.δ.}$ το ξηρό βάρος του γυάλινου ηθμού συν το βάρος του στερεού υπολείμματος (g)

Ακολούθως, υπολογίστηκε η περιεκτικότητα του δείγματος σε πηκτίνη από την Εξίσωση 16:

$$\% \text{ Πηκτίνη} = \frac{(\Sigma.Y._3 - \Sigma.Y._4)}{ODW} \times 100 \quad \text{Εξ. 16}$$

όπου,

Σ.Υ.₃ το στερεό υπόλειμμα μετά την απομάκρυνση των πρωτεϊνικών συστατικών (g)

Σ.Υ.₄ το στερεό υπόλειμμα μετά την απομάκρυνση της πηκτίνης (g)

ODW το ξηρό βάρος του δείγματος (g) (όπως προσδιορίστηκε στην §10.1, Εξίσωση 4) (g)

11.3. Απομάκρυνση ημικυτταρίνης

Το ξηρό υλικό που προέκυψε από την κατεργασία με το διάλυμα οξαλικού αμμωνίου (Σ.Υ.₄) για την απομάκρυνση της πηκτίνης (§11.2) εισήχθη σε φιάλη τύπου Erlenmeyer μαζί με κατάλληλη ποσότητα υδατικού διαλύματος καυστικού νατρίου 10% (w/v) (20 mL διαλύματος καυστικού νατρίου/g ξηρού δείγματος) και τοποθετήθηκε σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα για 4 ώρες στους 30 °C.

Στη συνέχεια, το μείγμα υπέστη διήθηση υπό κενό με χρήση ξηρού προζυγισμένου γυάλινου ηθμού και το στερεό υπόλειμμα έκπλυση με νερό έως ότου απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του καυστικού νατρίου από το στερεό και η τιμή του pH γίνει ίση με 7.0. Ακολούθησε ξήρανση, ζύγιση και καταγραφή του βάρους του γυάλινου ηθμού με το στερεό υπόλειμμα ($Weight_{\gamma,\eta,\delta}$). Το βάρος του στερεού υπολείμματος μετά την απομάκρυνση της ημικυτταρίνης υπολογίστηκε από την Εξίσωση 17:

$$\Sigma.Y._5 = Weight_{\gamma,\eta,\delta} - Weight_{\gamma,\eta} \quad \text{Εξ. 17}$$

όπου,

$\Sigma.Y._5$ το στερεό υπόλειμμα μετά την απομάκρυνση της ημικυτταρίνης (g)
 $Weight_{\gamma,\eta}$ το ξηρό βάρος του γυάλινου ηθμού (g)
 $Weight_{\gamma,\eta,\delta}$ το ξηρό βάρος του γυάλινου ηθμού συν το βάρος του στερεού υπολείμματος (g)

Ακολούθως υπολογίστηκε η περιεκτικότητα του δείγματος σε ημικυτταρίνη από την Εξίσωση 18:

$$\% \text{ Ημικυτταρίνη} = \frac{(\Sigma.Y._4 - \Sigma.Y._5)}{ODW} \times 100 \quad \text{Εξ. 18}$$

όπου,

$\Sigma.Y._4$ το στερεό υπόλειμμα μετά την απομάκρυνση της πηκτίνης (g)
 $\Sigma.Y._5$ το στερεό υπόλειμμα μετά την απομάκρυνση της ημικυτταρίνης (g)
 ODW το ξηρό βάρος του δείγματος (g) (όπως προσδιορίστηκε στην §10.1, Εξίσωση 4) (g)

11.4. Απομάκρυνση κυτταρίνης

Το στερεό υπόλειμμα που προέκυψε από την §11.3 υπέστη απομάκρυνση της κυτταρίνης. Στο γυάλινο ηθμό, ο οποίος περιείχε το ξηρό στερεό που προέκυψε μετά την απομάκρυνση της ημικυτταρίνης ($\Sigma.Y._5$), προστέθηκε τόση ποσότητα πυκνού θειικού οξέος όση απαιτούσε η διαδικασία, έτσι ώστε το δείγμα να παραμείνει σε επαφή με αυτό για 4 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό και έκπλυση του στερεού υπολείμματος με νερό, μέχρι να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα θειικού οξέος και το pH να αποκτήσει τιμή ίση με 7.0.

Έπειτα, ο γυάλινος ηθμός μαζί με το υλικό τοποθετήθηκε στο φούρνο για ξήρανση, ζυγίστηκε και καταγράφηκε το βάρος του ($Weight_{\gamma,\eta,\delta}$). Τέλος, στο στερεό υπόλειμμα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της τέφρας. Το βάρος του στερεού υπολείμματος μετά την απομάκρυνση της κυτταρίνης υπολογίστηκε από την Εξίσωση 19:

$$\Sigma.Y._6 = Weight_{\gamma,\eta,\delta} - Weight_{\gamma,\eta} \quad \text{Εξ. 19}$$

όπου,

$\Sigma.Y._6$ το στερεό υπόλειμμα μετά την απομάκρυνση της κυτταρίνης (g)
 $Weight_{\gamma,\eta}$ το ξηρό βάρος του γυάλινου ηθμού (g)
 $Weight_{\gamma,\eta,\delta}$ το ξηρό βάρος του γυάλινου ηθμού συν το βάρος του στερεού υπολείμματος (g)

Ακολούθως υπολογίστηκε η περιεκτικότητα του δείγματος σε κυτταρίνη από την Εξίσωση 20:

$$\% \text{Κυτταρίνη} = \frac{(\Sigma.Y_{.5} - \Sigma.Y_{.6})}{ODW} \times 100 \quad \text{Εξ. 20}$$

όπου,
 $\Sigma.Y_{.5}$ το στερεό υπόλειμμα μετά την απομάκρυνση της ημικυτταρίνης (g)
 $\Sigma.Y_{.6}$ το στερεό υπόλειμμα μετά την απομάκρυνση της κυτταρίνης (g)
 ODW το ξηρό βάρος του δείγματος (g) (όπως προσδιορίστηκε στην §10.1, Εξίσωση 4) (g)

Για την εύρεση της περιεκτικότητας σε αδιάλυτη σε οξύ λιγνίνη (λιγνίνη Klason) ισχύει:

$$\Sigma.Y_{.6} = W_{\text{τέφρας}} + W_{\alpha.o.l.} \quad \text{ή} \quad \Sigma.Y_{.6} - W_{\text{τέφρας}} = W_{\alpha.o.l.} \quad \text{Εξ. 21}$$

όπου,
 $\Sigma.Y_{.6}$ το στερεό υπόλειμμα μετά την απομάκρυνση της κυτταρίνης (g)
 $W_{\text{τέφρας}}$ το βάρος της τέφρας (g)
 $W_{\alpha.o.l.}$ το βάρος της αδιάλυτης σε οξύ λιγνίνης (g)

Υπολογίστηκε η περιεκτικότητα του δείγματος σε αδιάλυτη σε οξύ λιγνίνη (λιγνίνη Klason) από την Εξίσωση 22:

$$\% \text{Αδ.οξύ λιγνίνη} = \frac{W_{\alpha.o.l.}}{ODW} \times 100 \quad \text{Εξ. 22}$$

όπου,
 $W_{\alpha.o.l.}$ το βάρος της αδιάλυτης σε οξύ λιγνίνης (g) όπως προσδιορίστηκε από την εξίσωση 21
 ODW το ξηρό βάρος του δείγματος (g) (όπως προσδιορίστηκε στην §10.1, Εξίσωση 4)

12. Ανάλυση στερεού υπολείμματος – Μέθοδος NREL

Η ανάλυση του στερεού υπολείμματος της προκατεργασίας, της υδρόλυσης και της αλκοολικής ζύμωσης ως προς κυτταρίνη και ημικυτταρίνη έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του NREL (NREL/TP-510-42618). Συνοπτικά, περιελάμβανε την όξινη υδρόλυση 300 mg ξηρού στερεού υπολείμματος.

Αυτό έγινε με την προσθήκη 3 mL διαλύματος θειικού οξέος 72% (w/w) στο δείγμα και την παραμονή του στους 30 °C για 60 min. Ακολούθησε προσθήκη 84 mL απιονισμένου νερού και επώαση σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121 °C για 60 min. Στη συνέχεια, το διάλυμα εξουδετερώθηκε με CaCO₃ και φυγοκεντρήθηκε (10 min, 10000 rpm). Το υπερκείμενο που παρελήφθη μετά τη φυγοκέντρωση, υπέστη

διήθηση. Τέλος, το διήθημα αναλύθηκε ως προς την περιεκτικότητά του σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη.

Για την ποσοτικοποίηση των πολυσακχαριτών ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα: (α) κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς για κάθε μονοσακχαρίτη και (β) με τη βοήθεια των συγκεκριμένων καμπυλών προσδιορίστηκε η συγκέντρωση (C_{HPLC} , mg/ml) του κάθε μονοσακχαρίτη. Η συγκέντρωση των μονοσακχαριτών στα δείγματα, τα οποία πριν από την ανάλυση HPLC είχαν υποστεί αραιώση, υπολογίστηκε μέσω της Εξίσωσης 23:

$$C_x = C_{HPLC} \times dilution \quad \text{Εξ. 23}$$

όπου,

C_x	η τελική συγκέντρωση του μονοσακχαρίτη σε mg/mL
C_{HPLC}	η συγκέντρωση του μονοσακχαρίτη όπως έχει υπολογιστεί στο βήμα (β) σε mg/mL
$dilution$	ο συντελεστής αραιώσης του δείγματος

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η συγκέντρωση των πολυσακχαριτών κυτταρίνη και ημικυτταρίνη με εφαρμογή των Εξισώσεων 24 και 25 αντίστοιχα:

$$C_{anhydro_cellulose} = (C_{x_glucose}) \times 0.90 \quad \text{Εξ. 24}$$

$$C_{anhydro_xylan} = (C_{x_xylose} + C_{x_arabinose}) \times 0.88 \quad \text{Εξ. 25}$$

όπου,

$C_{anhydro_cellulose}$	η συγκέντρωση της κυτταρίνης σε mg/mL
$C_{anhydro_xylan}$	η συγκέντρωση της ημικυτταρίνης σε mg/mL
0.88	ο συντελεστής μετατροπής των πεντοζών (ξυλόζη, αραβινόζη) σε ημικυτταρίνη
0.90	ο συντελεστής μετατροπής της γλυκόζης σε κυτταρίνη

Τέλος, υπολογίστηκε η ποσότητα κυτταρίνης και ημικυτταρίνης ανά 100 g στερεού υπολείμματος με εφαρμογή των Εξισώσεων 26 και 27 αντίστοιχα:

$$\% Cellulose_{solidresidue} = \frac{C_{anhydro_cellulose} \times V_{filtrate} \times \frac{1g}{1000mg}}{ODW_{sample}} \times 100 \quad \text{Εξ. 26}$$

$$\% Xylan_{solidresidue} = \frac{C_{anhydro_xylan} \times V_{filtrate} \times \frac{1g}{1000mg}}{ODW_{sample}} \times 100 \quad \text{Εξ. 27}$$

όπου,

$\% \text{Cellulose}_{\text{solidresidue}}$

$\% \text{Xylan}_{\text{solidresidue}}$

$C_{\text{anhydro_cellulose}}$

$C_{\text{anhydro_xylan}}$

V_{filtrate}

ODW_{sample}

τα g κυτταρίνης ανά 100 g στερεού υπολείμματος
τα g ημικυτταρίνης ανά 100 g στερεού υπολείμματος
η συγκέντρωση σε mg/ml της κυτταρίνης
η συγκέντρωση σε mg/ml της ημικυτταρίνης
ο όγκος του διηθήματος ίσος με 86.73 mL
η ποσότητα σε g του ξηρού στερεού υπολείμματος που
χρησιμοποιήθηκε στην όξινη υδρόλυση (0.3 g)

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Σύσταση διατροφικών απορριμμάτων

Με εφαρμογή των μεθόδων ανάλυσης που περιγράφονται στο Β' Μέρος, ποσοτικοποιήθηκαν τα βασικά συστατικά των διατροφικών απορριμμάτων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ1.

Πίνακας Γ1. Σύσταση διατροφικών απορριμμάτων

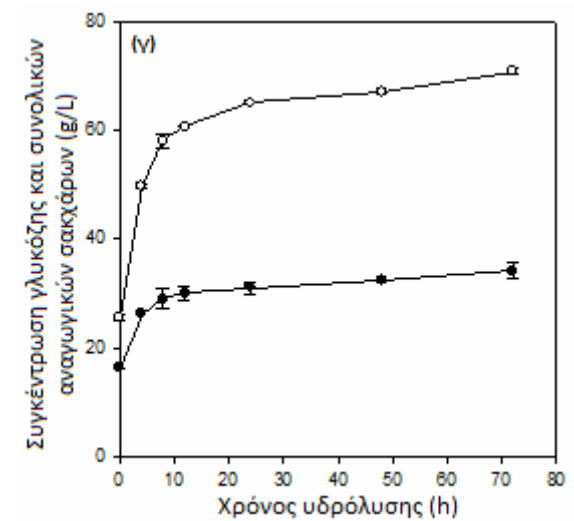
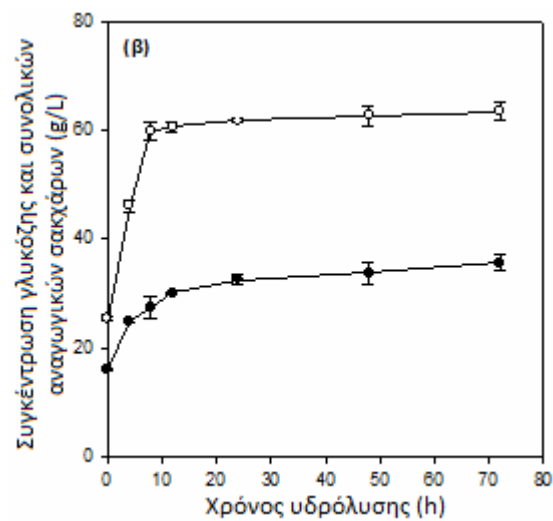
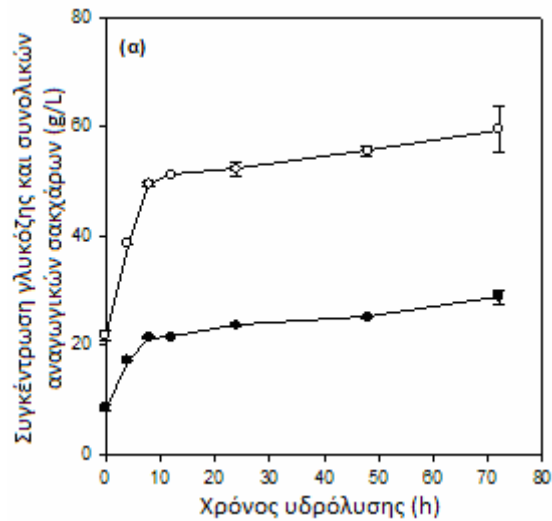
Συστατικό	Περιεκτικότητα (%, w/w, ξηρή βάση)
Υδατοδιαλυτά	31.81 ± 0.42
Λιπαρά	11.91 ± 0.68
Πρωτεΐνη	10.51 ± 0.37
Πηκτίνη	3.92 ± 0.33
Κυτταρίνη	18.30 ± 0.19
Ημικυτταρίνη	7.55 ± 0.39
Τέφρα	11.03 ± 0.42
Λιγνίνη Klason (αδιάλυτη σε οξύ λιγνίνη)	2.16 ± 0.25

* Υγρασία 1.03 ± 0.20 % (w/w)

Η ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (§9) του δείγματος των υδατοδιαλυτών συστατικών οδήγησε στην ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των κάτωθι μονοσακχαριτών και δισακχαριτών: γλυκόζη σε περιεκτικότητα 4.39 ± 0.20 % (w/w, ξηρή βάση), φρουκτόζη σε περιεκτικότητα 3.47 ± 0.12 % (w/w, ξηρή βάση) και σακχαρόζη σε περιεκτικότητα 4.38 ± 0.10 % (w/w, ξηρή βάση). Επιπλέον, το συγκεκριμένο δείγμα περιείχε πρωτεΐνη σε περιεκτικότητα 0.54 ± 0.01 (w/w, ξηρή βάση).

2. Ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων: επίδραση της προκατεργασίας και του ενζυμικού φορτίου

Τα πειράματα της ενζυμικής υδρόλυσης, με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της προκατεργασίας και του ενζυμικού φορτίου σε αυτήν, διεξήχθησαν σε δείγματα διατροφικών απορριμμάτων συγκέντρωσης στερεών 20% (w/v). Η πρώτη ύλη προκατεργάστηκε υδροθερμικά στους 120 °C για 15 min. Στη συνέχεια, τα προκατεργασμένα (απουσία και παρουσία οξέος) και μη δείγματα υπέστησαν ενζυμική υδρόλυση με χρήση του μείγματος εμπορικών σκευασμάτων Celluclast® 1.5 L και Novozyme® 188 σε αναλογία 5:1 (v/v), έτσι ώστε η τελική ενεργότητα ολικής κυτταρινάσης να είναι: 5, 10 και 20 FPU/g ξηρού υλικού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα Γ1-Γ3.



Διάγραμμα Γ1. Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων.
Ενζυμικό φορτίο: 5 FPU/g ξηρού υλικού
Συγκέντρωση υποστρώματος: 20% (w/v)
Προκατεργασία: 120 °C για 15 min

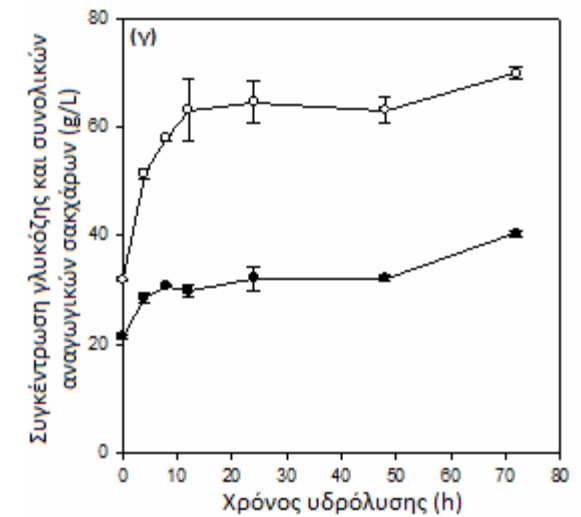
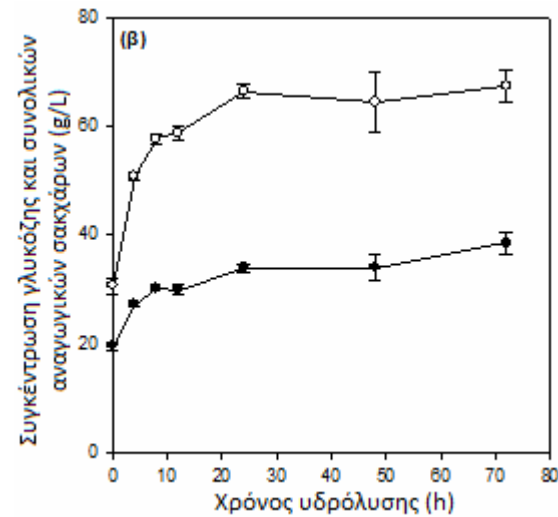
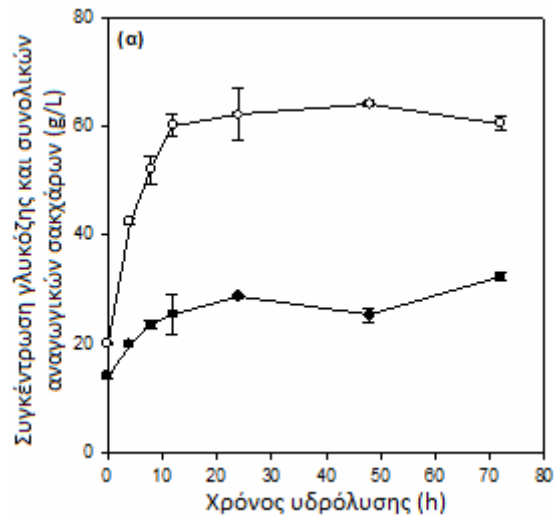
(α) ακατέργαστα

(β) προκατεργασμένα

(γ) προκατεργασμένα παρουσία H₂SO₄

○ αναγωγικές ομάδες

● γλυκόζη



Διάγραμμα Γ2. Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων.
Ενζυμικό φορτίο: 10 FPU/g ξηρού υλικού.
Συγκέντρωση υποστρώματος: 20% (w/v)
Προκατεργασία: 120 °C για 15 min

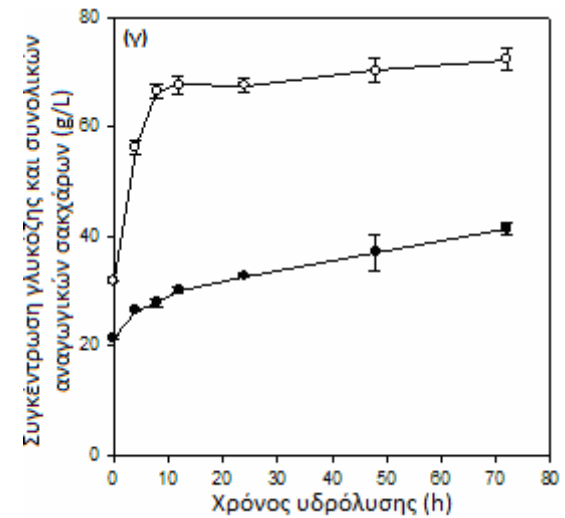
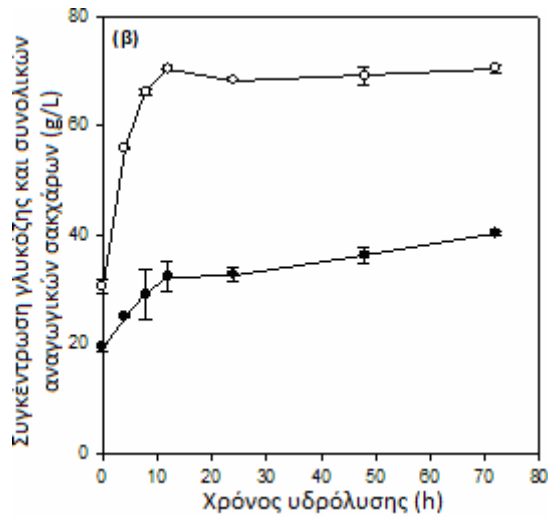
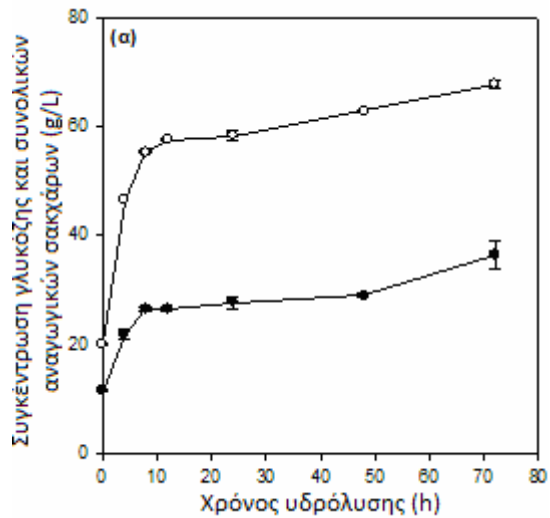
(α) ακατέργαστα

(β) προκατεργασμένα

(γ) προκατεργασμένα παρουσία H_2SO_4

○ αναγωγικές ομάδες

● γλυκόζη



Διάγραμμα Γ3. Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων.

Ενζυμικό φορτίο: 20 FPU/g ξηρού υλικού

Συγκέντρωση υποστρώματος: 20% (w/v)

Προκατεργασία: 120 °C για 15 min

(α) ακατέργαστα

(β) προκατεργασμένα

(γ) προκατεργασμένα παρουσία H₂SO₄

○ αναγωγικές ομάδες

● γλυκόζη

Από τα Διαγράμματα Γ1-Γ3 παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό τόσο των συνολικών αναγωγικών ομάδων όσο και της γλυκόζης απελευθερώνεται κατά τις πρώτες 12-24 ώρες της υδρόλυσης. Ακολούθως, ο ρυθμός της υδρόλυσης μειώνεται, γεγονός που οφείλεται στην αναστολή της δράσης των ενζύμων, λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης των παραγόμενων σακχάρων. Τα κυτταρινολυτικά ένζυμα είναι χαρακτηριστικό παράδειγμα ενζύμων, των οποίων η δράση αναστέλλεται από τα τελικά προϊόντα της υδρόλυσης (παρεμπόδιση από το προϊόν). Η μέγιστη τιμή συγκέντρωσης της γλυκόζης σε όλα τα διαγράμματα λαμβάνεται στις 72 ώρες. Παρ' όλα αυτά, η ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων ολοκληρώνεται πρακτικά στις πρώτες 24 ώρες.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι μέγιστες συγκεντρώσεις των συνολικών αναγωγικών ομάδων και της γλυκόζης κατά την ενζυμική υδρόλυση των μη προκατεργασμένων και των προκατεργασμένων, απουσία και παρουσία οξέος διατροφικών απορριμμάτων.

Πίνακας Γ2. Μέγιστες τιμές συνολικών αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων.

Είδος προκατεργασίας	Ενζυμικό φορτίο (FPU/g ξηρού υλικού)	Συνολικές αναγωγικές ομάδες (g/L)	Γλυκόζη (g/L)
Καμμία	5	59.59 ± 4.16	29.89 ± 1.28
Υδροθερμική	5	63.56 ± 1.57	35.67 ± 1.51
Υδροθερμική+οξύ	5	70.85 ± 0.47	34.19 ± 1.48
Καμμία	10	64.13 ± 0.88	32.33 ± 0.71
Υδροθερμική	10	67.42 ± 2.81	38.58 ± 2.05
Υδροθερμική+οξύ	10	69.93 ± 1.02	40.47 ± 0.52
Καμμία	20	67.82 ± 0.66	36.49 ± 2.60
Υδροθερμική	20	70.48 ± 0.69	40.33 ± 0.43
Υδροθερμική+οξύ	20	72.34 ± 1.97	41.45 ± 1.19

Από τις τιμές του Πίνακα Γ2 είναι φανερό ότι η προκατεργασία των διατροφικών απορριμμάτων ευνοεί την υδρόλυση, ενώ η προσθήκη μικρής ποσότητας οξέος δίνει ακόμα καλύτερα αποτελέσματα. Η προκατεργασία αυξάνει τη συγκέντρωση της παραγόμενης γλυκόζης κατά 11-19% έναντι του ακατέργαστου υλικού, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τα προκατεργασμένα διατροφικά απορρίμματα παρουσία οξέος είναι 14-25 %.

Η αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αύξηση των παραγόμενων σακχάρων. Στις διεργασίες βιομετατροπής λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε αιθανόλη, όμως, σημαντική συνεισφορά στο συνολικό κόστος παραγωγής έχει και το χρησιμοποιηθέν ενζυμικό φορτίο. Ως εκ τούτου, είναι επιθυμητές οι χαμηλότερες δυνατές τιμές ενζυμικής ενεργότητας.

Τα πειραματικά αποτελέσματα από την υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων προσαρμόστηκαν στο παρακάτω μαθηματικό μοντέλο [31]:

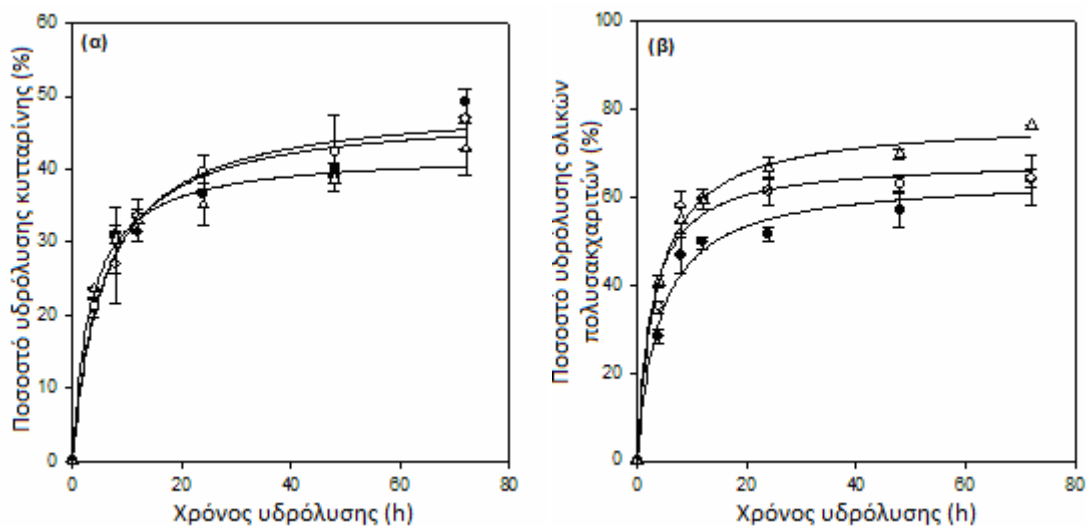
$$x = x_{max} \cdot \left(\frac{t}{t_{1/2} + t} \right)$$

Εξ. 28

όπου,

- x το ποσοστό της μετατροπής των πολυσακχαριτών (κυτταρίνη ή συνολικοί πολυσακχαρίτες) σε απλά σάκχαρα (σακχαροποίηση),
 x_{max} ο μέγιστος βαθμός σακχαροποίησης,
 t ο χρόνος της ενζυμικής σακχαροποίησης και
 $t_{1/2}$ ο χρόνος για να επιτευχθεί το 50% του μέγιστου βαθμού σακχαροποίησης

Οι προσαρμογές παρουσιάζονται στα **Διάγραμματα Γ4-Γ6** και οι τιμές x_{max} και $t_{1/2}$ στους **Πίνακες Γ3-Γ5**:



Διάγραμμα Γ4. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapfle για την υδρόλυση της κυτταρίνης και των ολικών πολυσακχαριτών των διατροφικών απορριμμάτων.

Ενζυμικό φορτίο: 5 FPU/g ξηρού υλικού.

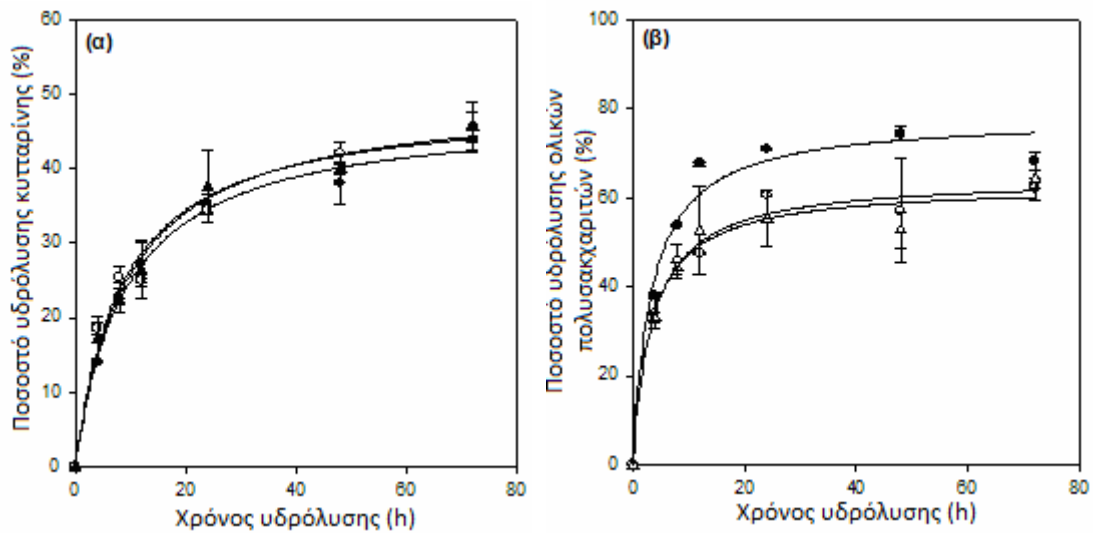
● ακατέργαστα

○ προκατεργασμένα

△ προκατεργασμένα παρουσία H₂SO₄

(α) κυτταρίνη

(β) ολικοί πολυσακχαρίτες



Διάγραμμα Γ5. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapfle για την υδρόλυση της κυτταρίνης και των ολικών πολυσακχαριτών των διατροφικών απορριμμάτων.

Ενζυμικό φορτίο: 10 FPU/g ξηρού υλικού.

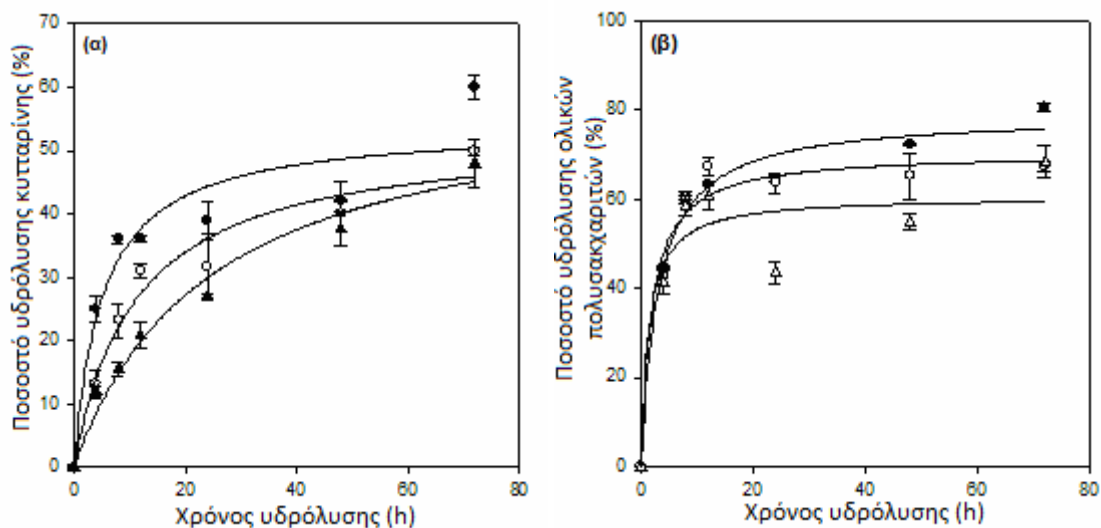
● ακατέργαστα

○ προκατεργασμένα

△ προκατεργασμένα παρουσία H₂SO₄

(α) κυτταρίνη

(β) ολικοί πολυσακχαρίτες



Διάγραμμα Γ6. Προσαρμογή εξίσωσης Holtzapfle για την υδρόλυση της κυτταρίνης και των ολικών πολυσακχαριτών των διατροφικών απορριμμάτων.

Ενζυμικό φορτίο: 20 FPU/g ξηρού υλικού.

● ακατέργαστα

○ προκατεργασμένα

△ προκατεργασμένα παρουσία H₂SO₄

(α) κυτταρίνη

(β) ολικοί πολυσακχαρίτες

Πίνακας Γ3. Τιμές X_{max} και $t_{1/2}$ για την υδρόλυση των πολυσακχαριτών των διατροφικών απορριμμάτων. **Ενζυμικό φορτίο: 5 FPU/g ξηρού υλικού**

	Ακατέργαστο	Υδροθερμικά προκατεργασμένο	Υδροθερμικά προκατεργασμένο + οξύ
		Κυτταρίνη	
x_{max} (%)	47.8351	49.0972	42.2227
$t_{1/2}$ (h)	5.3894	5.8351	3.3053
	$(R^2=0.97, P<0.0001)$	$(R^2=0.99, P<0.0001)$	$(R^2=0.99, P<0.0001)$
		Ολικοί πολυσακχαρίτες	
x_{max} (%)	64.5265	68.4273	77.4418
$t_{1/2}$ (h)	4.1636	2.6298	3.5719
	$(R^2=0.98, P<0.0001)$	$(R^2=0.97, P<0.0001)$	$(R^2=0.99, P<0.0001)$

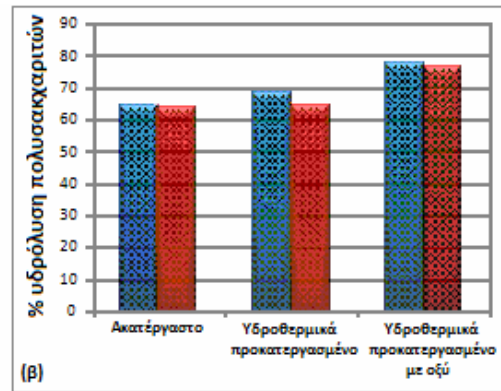
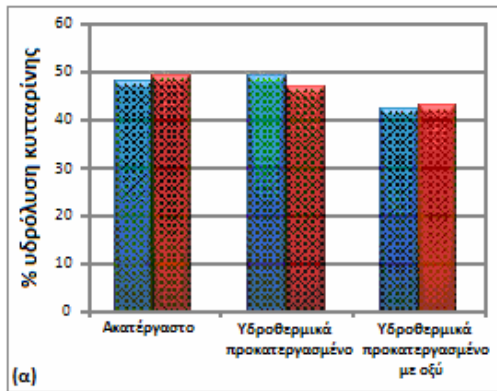
Πίνακας Γ4. Τιμές X_{max} και $t_{1/2}$ για την υδρόλυση των πολυσακχαριτών των διατροφικών απορριμμάτων. **Ενζυμικό φορτίο: 10 FPU/g ξηρού υλικού**

	Ακατέργαστο	Υδροθερμικά προκατεργασμένο	Υδροθερμικά προκατεργασμένο + οξύ
		Κυτταρίνη	
x_{max} (%)	47.8182	49.1894	50.0478
$t_{1/2}$ (h)	9.1820	8.5898	9.3646
	$(R^2=0.99, P<0.0001)$	$(R^2=0.98, P<0.0001)$	$(R^2=0.99, P<0.0001)$
		Ολικοί πολυσακχαρίτες	
x_{max} (%)	77.9602	64.4690	62.8326
$t_{1/2}$ (h)	3.3853	3.5036	3.3160
	$(R^2=0.97, P<0.0001)$	$(R^2=0.99, P<0.0001)$	$(R^2=0.98, P<0.0001)$

Πίνακας Γ5. Τιμές X_{max} και $t_{1/2}$ για την υδρόλυση των πολυσακχαριτών των διατροφικών απορριμμάτων. **Ενζυμικό φορτίο: 20 FPU/g ξηρού υλικού**

	Ακατέργαστο	Υδροθερμικά προκατεργασμένο	Υδροθερμικά προκατεργασμένο + οξύ
		Κυτταρίνη	
x_{max} (%)	53.8940	52.9767	60.4910
$t_{1/2}$ (h)	5.1512	11.1613	24.5097
	$(R^2=0.91, P<0.0001)$	$(R^2=0.96, P<0.0001)$	$(R^2=0.98, P<0.0001)$
		Ολικοί πολυσακχαρίτες	
x_{max} (%)	78.7692	70.3111	60.4824
$t_{1/2}$ (h)	3.0347	1.9007	1.3549
	$(R^2=0.98, P<0.0001)$	$(R^2=0.97, P<0.0001)$	$(R^2=0.86, P=0.0020)$

Στα Διαγράμματα Γ7-Γ9 εμφανίζεται η σύγκριση των προβλεπόμενων, από το υπερβολικό μοντέλο του Holtzappple, τιμών μέγιστης μετατροπής κυτταρίνης και ολικών πολυσακχαριτών με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές:



Διάγραμμα Γ7. Σύγκριση προβλεπόμενων τιμών μέγιστης υδρόλυσης κυτταρίνης και ολικών πολυσακχαριτών με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές.

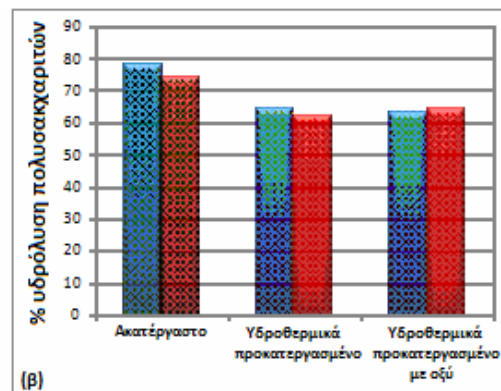
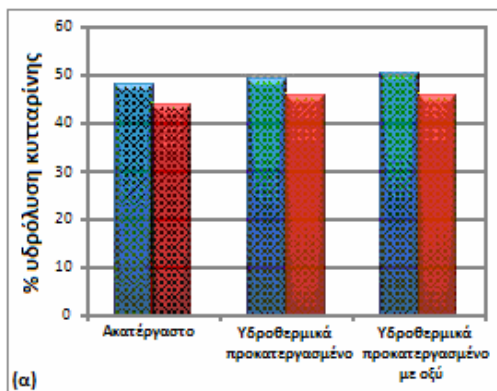
Ενζυμικό φορτίο: 5 FPU/g ξηρού υλικού.

(α) υδρόλυση κυτταρίνης

■ προβλεπόμενες τιμές

(β) υδρόλυση ολικών πολυσακχαριτών

■ πειραματικές τιμές



Διάγραμμα Γ8. Σύγκριση προβλεπόμενων τιμών μέγιστης υδρόλυσης κυτταρίνης και ολικών πολυσακχαριτών με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές.

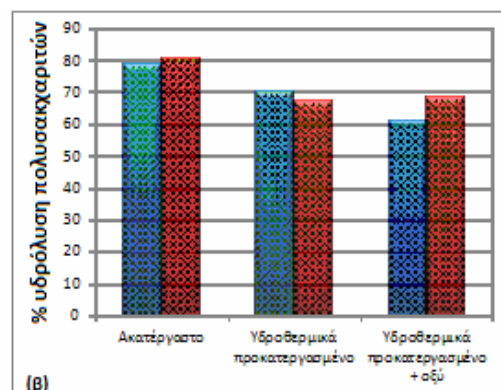
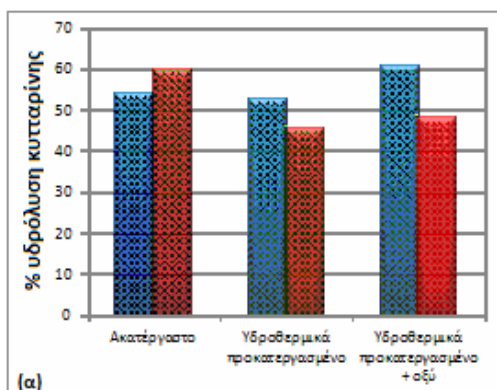
Ενζυμικό φορτίο: 10 FPU/g ξηρού υλικού.

(α) υδρόλυση κυτταρίνης

■ προβλεπόμενες τιμές

(β) υδρόλυση ολικών πολυσακχαριτών

■ πειραματικές τιμές



Διάγραμμα Γ9. Σύγκριση προβλεπόμενων τιμών μέγιστης υδρόλυσης κυτταρίνης και ολικών πολυσακχαριτών με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές.

Ενζυμικό φορτίο: 20 FPU/g ξηρού υλικού.

(α) υδρόλυση κυτταρίνης

■ προβλεπόμενες τιμές

(β) υδρόλυση ολικών πολυσακχαριτών

■ πειραματικές τιμές

Από τα *Διάγραμματα Γ7-Γ9* παρατηρείται ότι το μοντέλο του Holtzapfle προβλέπει ικανοποιητικά τις τιμές μέγιστης υδρόλυσης κυτταρίνης και ολικών πολυσακχαριτών.

Η αποικοδόμηση των ολικών πολυσακχαριτών κυμάνθηκε σε ποσοστά άνω του 60% σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της υδρόλυσης των διατροφικών απορριμμάτων κρίνονται ικανοποιητικά. Θα πρέπει, όμως, να σημειωθεί ότι η αποτελεσματικότητα της ενζυμικής υδρόλυσης θα αξιολογηθεί και στο επόμενο στάδιο, που είναι η παραγωγή βιοαιθανόλης.

Οι Ballesteros et al. (2010) υπέβαλαν σε υδρόλυση προκατεργασμένα (165 °C, 30 min) δείγματα οργανικού κλάσματος αστικών στερεών αποβλήτων (ΑΣΑ), συγκέντρωσης υποστρώματος 10% και 20% (w/v), χρησιμοποιώντας ενζυμικά φορτία 20-60 FPU/g κυτταρίνης. Η απόδοση της υδρόλυσης, με βάση την περιεχόμενη στην πρώτη ύλη γλυκόζη, κυμάνθηκε από 37 % έως 44 % [50].

Οι Li et al. (2012) μελέτησαν τη δυνατότητα παραγωγής ζυμώσιμων σακχάρων για παραγωγή αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχο συμπύκνωμα αστικών στερεών αποβλήτων, το οποίο ελήφθη μετά από μία διαδικασία διαχωρισμού με αυτόκλειστο. Επετεύχθη απόδοση υδρόλυσης περίπου ίση με 35 g συνολικών αναγωγικών σακχάρων ανά 100 g ΑΣΑ (η οποία αντιστοιχεί σε 21 g/L) με χρήση υποστρώματος 6% (w/v) και ενζυμικό φορτίο αρκετά υψηλότερο από αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (90 Units κυτταρινάσης/g υποστρώματος) [57].

Απόδοση περίπου 90% επετεύχθη από τους Li et al. (2007), οι οποίοι χρησιμοποίησαν επιλεγμένα βιοαποδομήσιμα απόβλητα (χόρτα, εφημερίδες, φλούδες καρότων και πατάτας). Η πρώτη ύλη υπεβλήθη, αρχικά, σε όξινη υδρόλυση με αραιό οξύ και ακολούθως σε κατεργασία με ατμό, με χρήση υψηλού ενζυμικού φορτίου (60 FPU/g υποστρώματος) και χαμηλών συγκεντρώσεων υποστρώματος [58]. Παρόμοια αποτελέσματα επετεύχθησαν από τους Nguyen et al. (1999), οι οποίοι χρησιμοποίησαν βιομάζα επιλεγμένη έτσι, ώστε να είναι παραπλήσια με τα λιγνινοκυτταρινούχα συστατικά των ΑΣΑ (έλατο, άχυρο σίτου και απόβλητα χαρτιού). Η πρώτη ύλη αρχικά εμποτίστηκε με οξύ, στη συνέχεια υπέστη κατεργασία με ατμό και τέλος ενζυμική υδρόλυση με υψηλό ενζυμικό φορτίο (66 FPU/g κυτταρίνης) [59].

Σύμφωνα με τους Zheng et al. (2007) χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος (ισοδύναμες με 2% κυτταρίνης) και ενζυμικό φορτίο της τάξεως των 15 FPU/g κυτταρίνης κατά τη διάρκεια υδρόλυσης του οργανικού κλάσματος ΑΣΑ, προκατεργασμένου με αραιό θειικό οξύ στους 165 °C, έχουν ως αποτέλεσμα υψηλή απόδοση γλυκόζης (περίπου 60 % της θεωρητικής) [60].

3. Ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων: επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος και της θερμοκρασίας προκατεργασίας

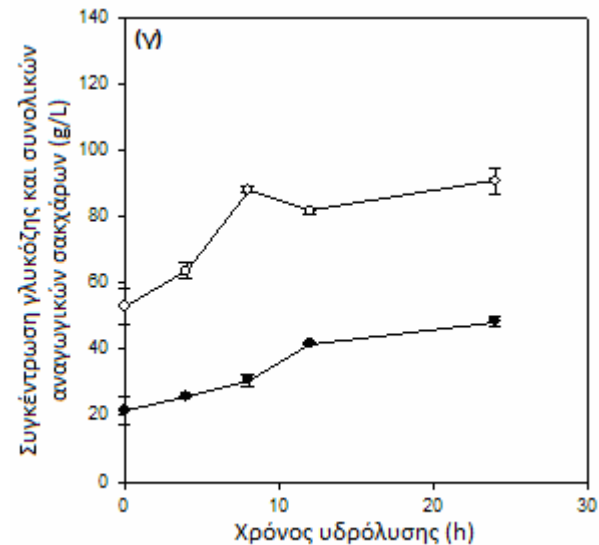
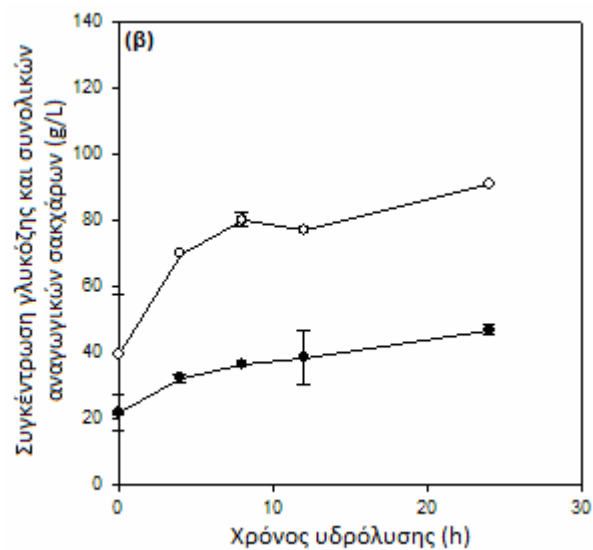
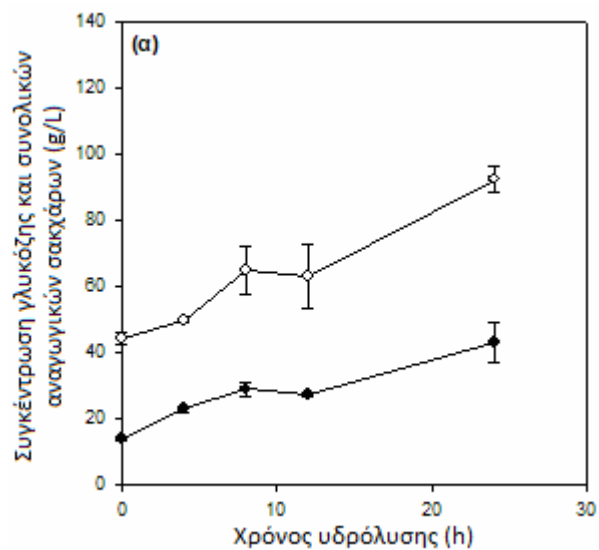
Μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στο στάδιο της προκατεργασίας και η συγκέντρωση του υποστρώματος στην ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων.

Στόχος ήταν η παραγωγή αιθανόλης σε ποσοστό μεγαλύτερο από 4% (w/v), συγκέντρωση απαραίτητη, ώστε να μειωθούν οι ενεργειακές απαιτήσεις του σταδίου της απόσταξης και να επιτευχθεί οικονομικότερη διεργασία. Για να επιτευχθεί ο στόχος αυτός, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί υπόστρωμα υψηλής συγκέντρωσης κατά τη βιομετατροπή των διατροφικών απορριμμάτων σε αιθανόλη [50]. Εξετάστηκαν, συνεπώς, συγκεντρώσεις υποστρώματος 30% και 50% (w/v).

Επιπλέον, με σκοπό την προστασία των περιεχόμενων σακχάρων στο διαλυτό κλάσμα των διατροφικών απορριμμάτων, από πιθανή αποικοδόμησή τους και τη μείωση των ενεργειακών απαιτήσεων στο στάδιο της προκατεργασίας, εξετάστηκαν χαμηλότερες θερμοκρασίες. Η πρώτη ύλη προκατεργάστηκε υδροθερμικά σε θερμοκρασίες 85 °C, 100 °C και 120 °C απουσία και παρουσία οξέος (1 g H₂SO₄ / 100 g ξηρού στερεού). Η προκατεργασία στους 85 °C και στους 100 °C διήρκεσε 60 min, ενώ η προκατεργασία στους 120 °C διήρκεσε 15 min.

Στη συνέχεια, τα προκατεργασμένα και μη δείγματα διατροφικών απορριμμάτων υπέστησαν ενζυμική υδρόλυση. Επιλέχθηκε ενζυμικό φορτίο της τάξης των 7 FPU/g ξηρού στερεού, με σκοπό τη μείωση του κόστους των ενζύμων.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της ενζυμικής υδρόλυσης των προκατεργασμένων και μη διατροφικών απορριμμάτων παρουσιάζονται στα *Διαγράμματα Γ10-Γ15* και οι μέγιστες επιτευχθείσες συγκεντρώσεις συνολικών αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης ανά συνθήκη υδρόλυσης στον *Πίνακα Γ6*.



Διάγραμμα Γ10: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων.

Ενζυμικό φορτίο: 7 FPU/g ξηρού υλικού

Συγκέντρωση υποστρώματος: 30 % (w/v)

Προκατεργασία: 85 °C για 60 min

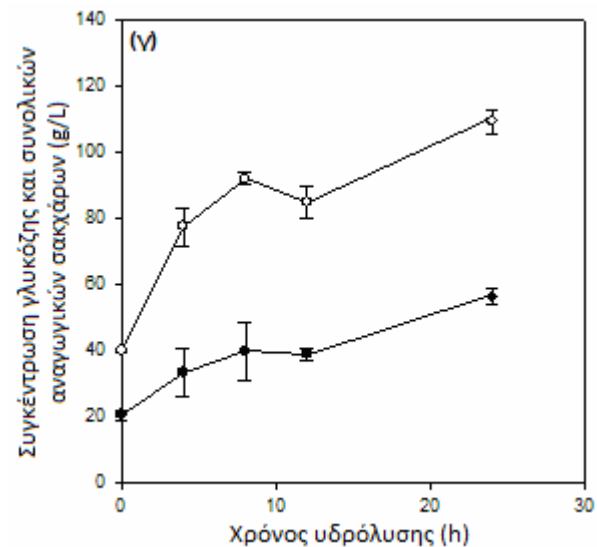
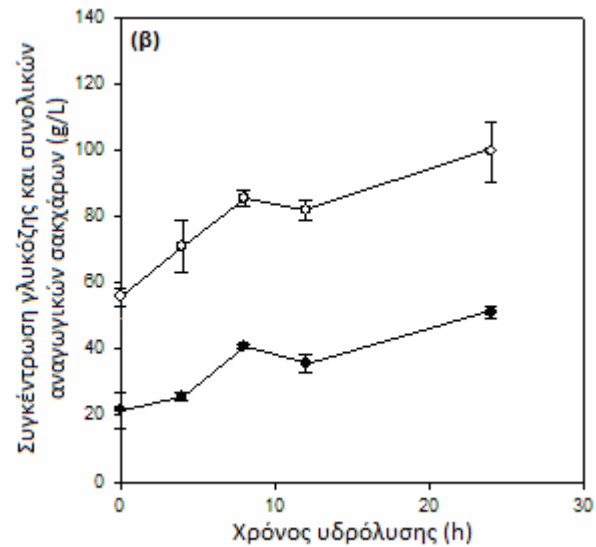
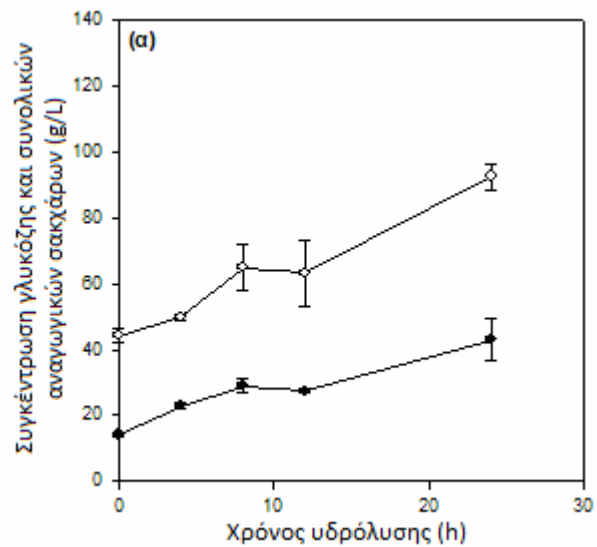
(α) ακατέργαστα

(β) προκατεργασμένα

(γ) προκατεργασμένα παρουσία H_2SO_4

○ αναγωγικές ομάδες

● γλυκόζη



Διάγραμμα Γ11: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων.
Ενζυμικό φορτίο: 7 FPU/g ξηρού υλικού
Συγκέντρωση υποστρώματος: 30 % (w/v)
Προκατεργασία: 100 °C για 60 min

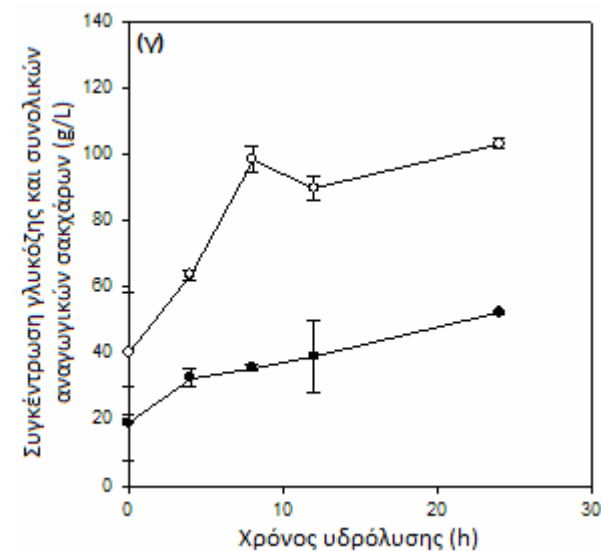
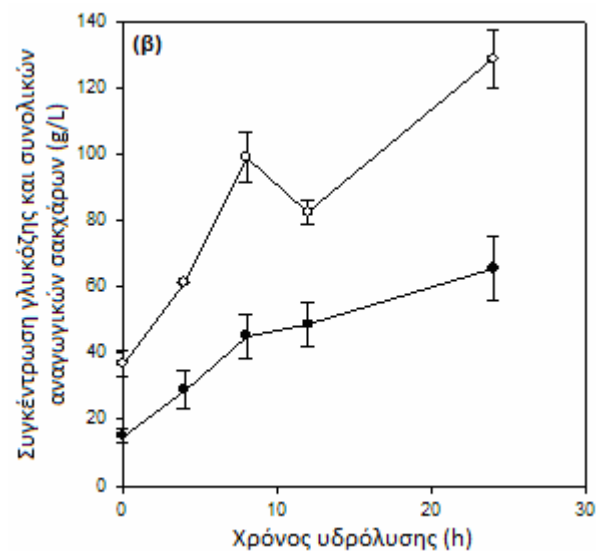
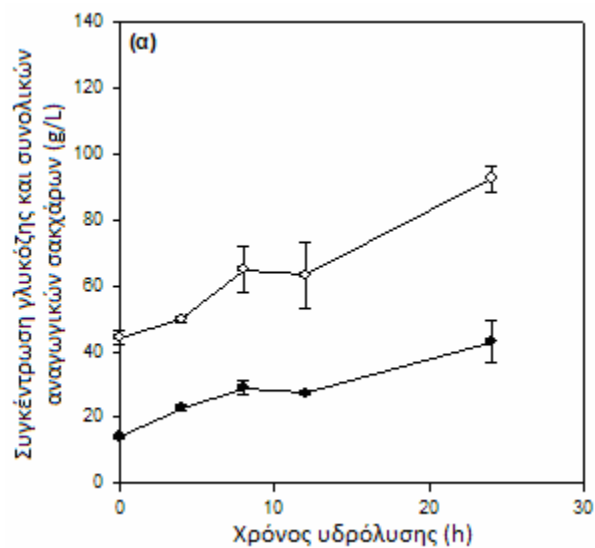
(α) ακατέργαστα

(β) προκατεργασμένα

(γ) προκατεργασμένα παρουσία H₂SO₄

○ αναγωγικές ομάδες

● γλυκόζη



Διάγραμμα Γ12: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων.
Ενζυμικό φορτίο: 7 FPU/g ξηρού υλικού
Συγκέντρωση υποστρώματος: 30 % (w/v)
Προκατεργασία: 120 °C για 15 min

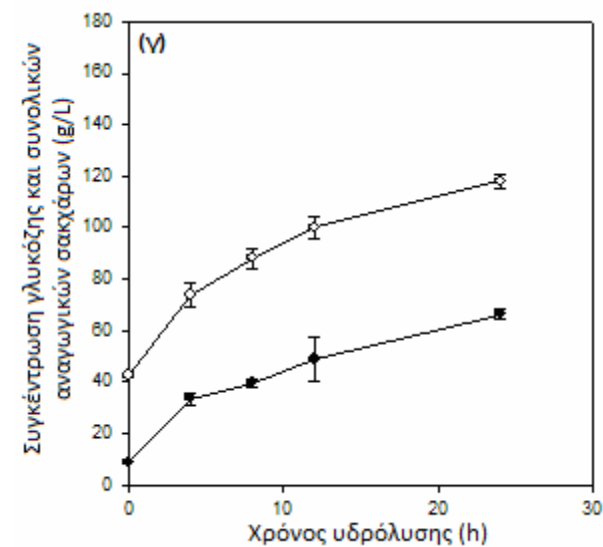
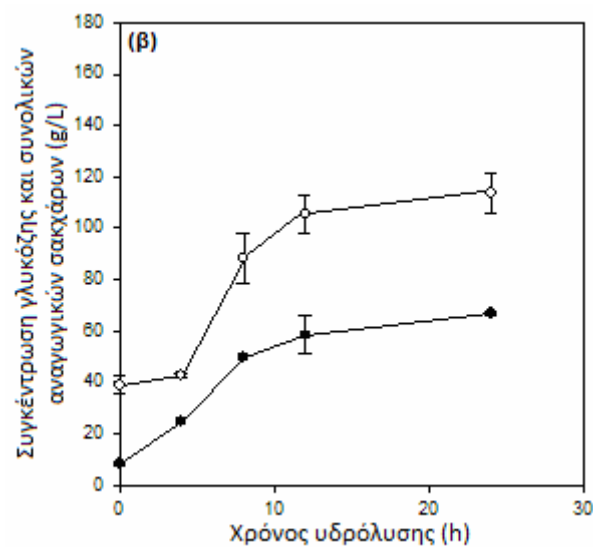
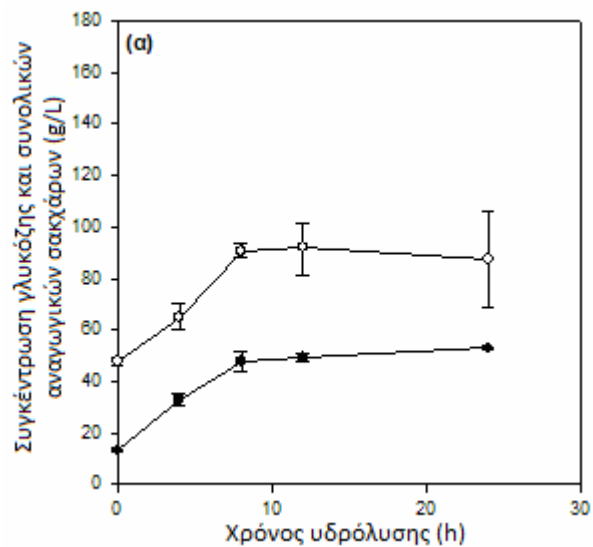
(α) ακατέργαστα

(β) προκατεργασμένα

(γ) προκατεργασμένα παρουσία H₂SO₄

○ αναγωγικές ομάδες

● γλυκόζη



Διάγραμμα Γ13: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων.
Ενζυμικό φορτίο: 7 FPU/g ξηρού υλικού
Συγκέντρωση υποστρώματος: 50 % (w/v)
Προκατεργασία: 85 °C για 60 min

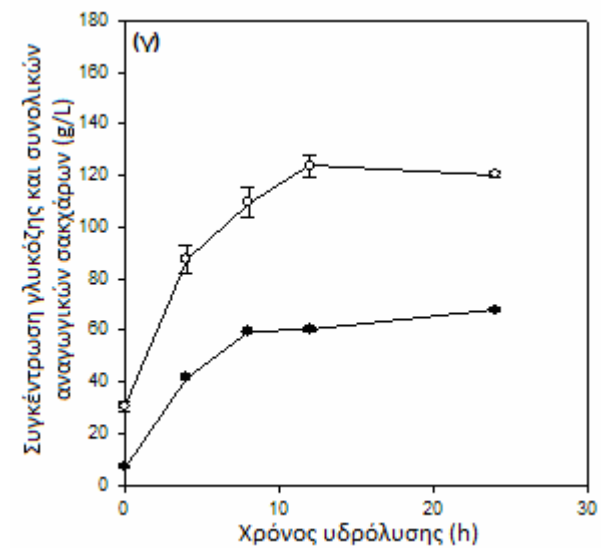
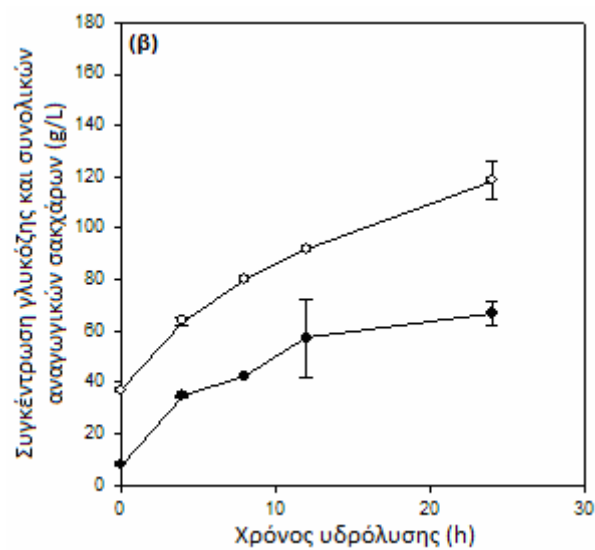
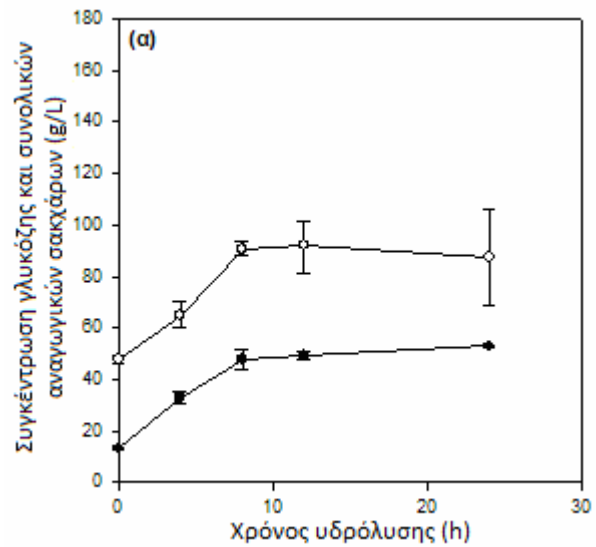
(α) ακατέργαστα

(β) προκατεργασμένα

(γ) προκατεργασμένα παρουσία H₂SO₄

○ αναγωγικές ομάδες

● γλυκόζη



Διάγραμμα Γ14: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων.
Ενζυμικό φορτίο: 7 FPU/g ξηρού υλικού
Συγκέντρωση υποστρώματος: 50 % (w/v)
Προκατεργασία: 100 °C για 60 min

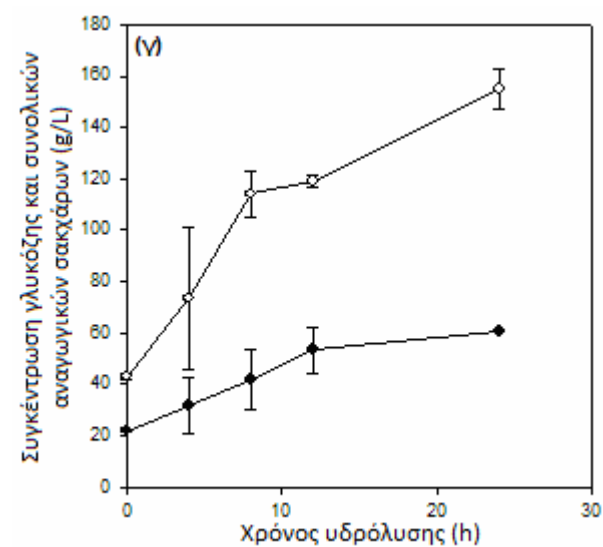
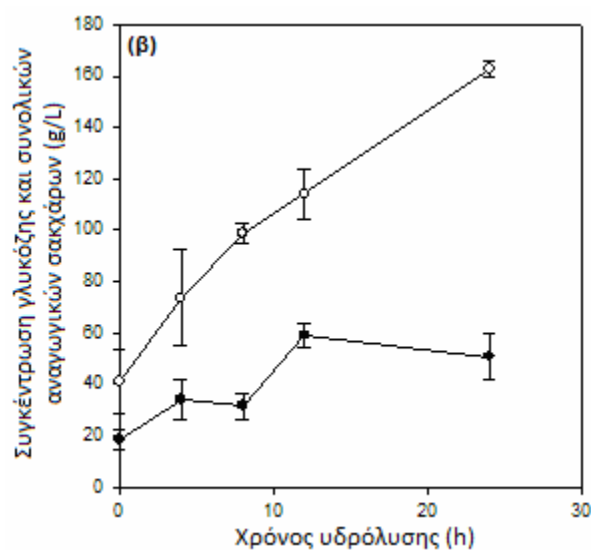
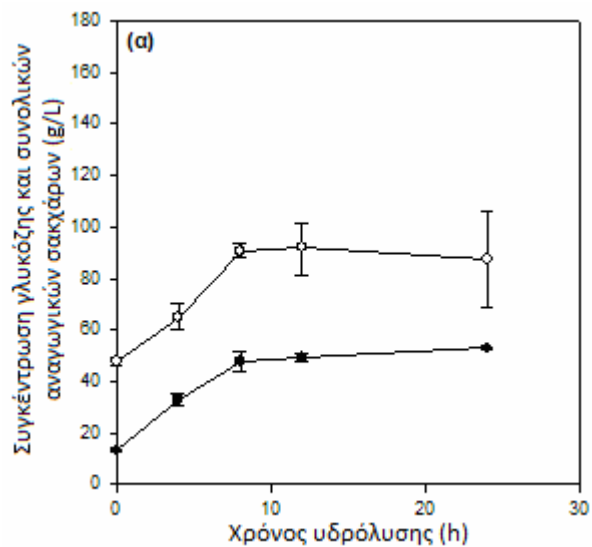
(α) ακατέργαστα

(β) προκατεργασμένα

(γ) προκατεργασμένα παρουσία H₂SO₄

○ αναγωγικές ομάδες

● γλυκόζη



Διάγραμμα Γ15: Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση διατροφικών απορριμμάτων.
Ενζυμικό φορτίο: 7 FPU/g ξηρού υλικού
Συγκέντρωση υποστρώματος: 50 % (w/v)
Προκατεργασία: 120 °C για 15 min

(α) ακατέργαστα

(β) προκατεργασμένα

(γ) προκατεργασμένα παρουσία H₂SO₄

○ αναγωγικές ομάδες

● γλυκόζη

Πίνακας Γ6. Μέγιστες τιμές συνολικών αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης κατά την υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων

Είδος προκατεργασίας	T (°C)/t (min) ^a	C _{υποστρώματος} (% w/v) ^b	Ενζυμικό φορτίο (FPU/g ξηρού υλικού)	Συγκέντρωση συνολικών αναγωγικών ομάδων (g/L)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)
Καμμία	-	30	7	92.37 ± 3.91	42.96 ± 2.06
Υδροθερμική	85 / 60	30	7	90.84 ± 0.10	46.55 ± 1.48
Υδροθερμική+οξύ	85 / 60	30	7	90.84 ± 4.02	48.33 ± 1.67
Καμμία	-	30	7	92.37 ± 3.91	42.96 ± 2.06
Υδροθερμική	100 / 60	30	7	100.68 ± 9.07	52.92 ± 1.99
Υδροθερμική+οξύ	100 / 60	30	7	110.00 ± 3.71	57.20 ± 2.38
Καμμία	-	30	7	92.37 ± 3.91	42.96 ± 2.06
Υδροθερμική	120 / 15	30	7	128.87 ± 9.74	65.75 ± 9.58
Υδροθερμική+οξύ	120 / 15	30	7	103.21 ± 1.55	52.19 ± 0.58
Καμμία	-	50	7	91.86 ± 1.41	52.92 ± 0.45
Υδροθερμική	85 / 60	50	7	113.57 ± 7.73	66.66 ± 0.45
Υδροθερμική+οξύ	85 / 60	50	7	117.94 ± 2.78	66.29 ± 1.74
Καμμία	-	50	7	91.86 ± 1.41	52.92 ± 0.45
Υδροθερμική	100 / 60	50	7	118.60 ± 7.21	66.70 ± 4.50
Υδροθερμική+οξύ	100 / 60	50	7	123.62 ± 4.64	67.79 ± 0.64
Καμμία	-	50	7	91.86 ± 1.41	52.92 ± 0.45
Υδροθερμική	120 / 15	50	7	162.89 ± 3.09	59.06 ± 4.93
Υδροθερμική+οξύ	120 / 15	50	7	155.09 ± 6.77	60.38 ± 0.19

^a Θερμοκρασία/χρόνος προκατεργασίας

^b Συγκέντρωση υποστρώματος κατά την υδρόλυση

Από τα Διαγράμματα Γ10-Γ15 παρατηρείται ότι κατά τις 12 πρώτες ώρες της υδρόλυσης, η παραγωγή της γλυκόζης αυξάνεται απότομα, ενώ, στη συνέχεια, η συγκέντρωσή της είτε παραμένει σταθερή είτε αυξάνεται με αρκετά πιο αργό ρυθμό. Αυτό σημαίνει ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η ενζυμική υδρόλυση του υλικού πρακτικά σταματάει μετά τις 12 ώρες.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα Γ6, είναι φανερό ότι σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις η προκατεργασία των διατροφικών απορριμμάτων ευνοεί την απελευθέρωση τόσο των συνολικών αναγωγικών ομάδων όσο και της γλυκόζης. Η αύξηση δε της θερμοκρασίας στο στάδιο της προκατεργασίας του υλικού αυξάνει περαιτέρω τη συγκέντρωσή τους. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση της θερμοκρασίας προκατεργασίας, παρουσία και απουσία οξέος, από τους 85 °C στους 100 °C, για τα δείγματα συγκέντρωσης στερεών 30% (w/v), οδήγησε σε αύξηση της παραγόμενης γλυκόζης κατά περίπου 18%.

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, φαίνεται ότι η προσθήκη μικρής ποσότητας θειικού οξέος βελτιώνει τη διαδικασία της υδρόλυσης. Η παρουσία, όμως, του θειικού οξέος σε συνδυασμό με την αρκετά υψηλή θερμοκρασία προκατεργασίας των 120 °C οδηγεί σε χαμηλότερη παραγωγή ολικών αναγωγικών ομάδων και γλυκόζης. Αυτό πιθανώς οφείλεται σε μερική αποικοδόμηση των σακχάρων.

Η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος, όπως ήταν αναμενόμενο, οδήγησε σε αύξηση της παραγόμενης γλυκόζης.

Συνοψίζοντας, τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα από τις παραπάνω δοκιμές ελήφθησαν κατά την προκατεργασία των διατροφικών απορριμμάτων στους 100 °C, παρουσία 1g θειικού οξέος/100 g ξηρού υλικού.

4. Παραγωγή βιοιαθανόλης από προκατεργασμένα και μη διατροφικά απορρίμματα

Η βιομετατροπή των διατροφικών απορριμμάτων προσεγγίστηκε με δύο τεχνολογίες, εκείνη της κλασικής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) και εκείνη της μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (Non Isothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation, NSSF).

Για κάθε μία από τις δύο τεχνολογίες μελετήθηκαν κρίσιμες παράμετροι βιομετατροπής, όπως η συγκέντρωση του υλικού, το ενζυμικό φορτίο που χρησιμοποιήθηκε για την υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων και το είδος της διεργασίας.

Με βάση τη σύσταση του υλικού όπως αυτή παρουσιάζεται στον Πίνακα Γ1, υπολογίστηκε η θεωρητική απόδοση αιθανόλης με βάση τα άμεσα διαθέσιμα σάκχαρα ως εξής:

Συστατικό	Απόδοση αιθανόλης (g/100 g ξηρού υλικού)
Γλυκόζη	2.24
Φρουκτόζη	1.77
Σακχαρόζη	2.24
Κυτταρίνη	10.39

Ο συντελεστής μετατροπής κυτταρίνης σε γλυκόζη είναι 1.111

Ο συντελεστής μετατροπής σακχάρου σε αιθανόλη είναι 0.511 [42].

Η θεωρητική απόδοση με βάση τα μη δομικά σάκχαρα μόνο (γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη) είναι 6.25 g/100 g ξηρού υλικού, ενώ με βάση τα μη δομικά σάκχαρα και την κυτταρίνη είναι 16.64 g/100 g ξηρού στερεού.

4.1. Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF)

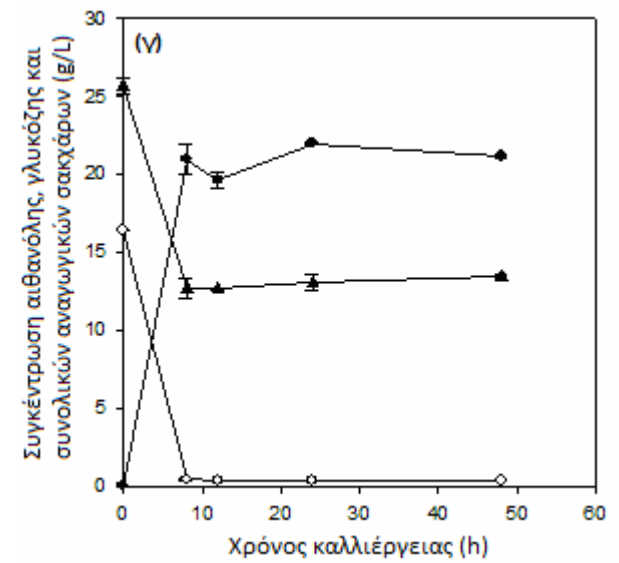
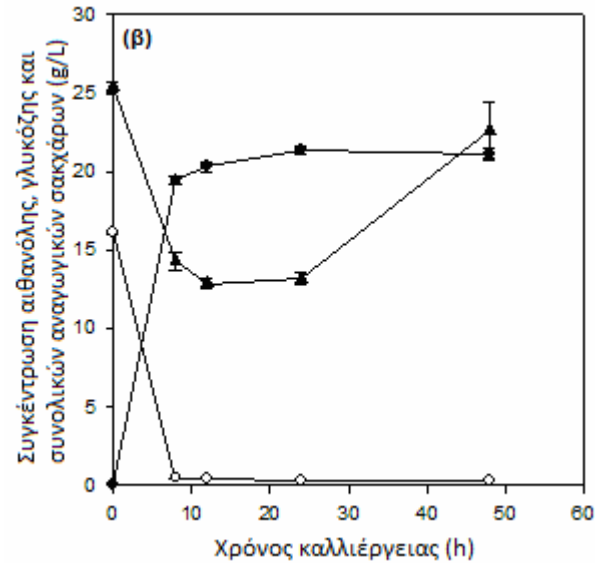
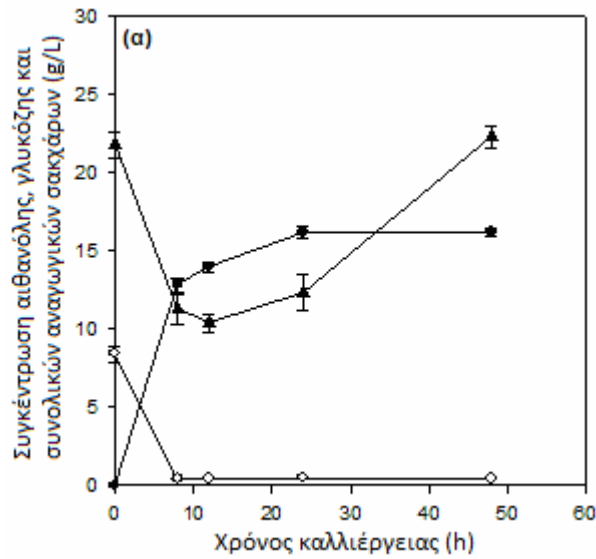
Το πλεονέκτημα της διεργασίας SSF, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι η συνεχής υδρόλυση του υλικού και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προϊόντων υδρόλυσης από το μικροοργανισμό που επιτελεί τη ζύμωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την άρση της παρεμπόδισης των κυτταρινολυτικών ενζύμων από τα προϊόντα υδρόλυσης.

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές βιομετατροπής των προκατεργασμένων και μη διατροφικών απορριμμάτων, προκειμένου να ευρεθούν οι συνθήκες που μεγιστοποιούν την παραγωγή βιοαιθανόλης, με εφαρμογή της τεχνολογίας SSF. Εξετάστηκε η επίδραση του ενζυμικού φορτίου, της αρχικής συγκέντρωσης υλικού και του είδους της διεργασίας (διαλείποντος και ημιδιαλείποντος έργου) στη ζύμωση του υλικού.

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα διατροφικών απορριμμάτων συγκέντρωσης στερεών 20% και 30% (w/v). Η ενζυμική υδρόλυση έγινε με τη βοήθεια μείγματος εμπορικών σκευασμάτων Celluclast® 1.5 L και Novozyme® 188 σε αναλογία 5:1 (v/v), έτσι ώστε η τελική ενεργότητα ολικής κυτταρινάσης να είναι 5, 10 και 20 FPU/g ξηρού υλικού. Η υδροθερμική προκατεργασία όλων των δειγμάτων, απουσία και παρουσία οξέος (1 g H₂SO₄ /100 g ξηρού υλικού), πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 120 °C για 15 min.

Για τη μελέτη της επίδρασης του είδους διεργασίας στη βιομετατροπή των διατροφικών απορριμμάτων, στα δείγματα συγκέντρωσης στερεών 20 % (w/v), που περιείχαν ένζυμα ενεργότητας 10 FPU / g ξηρού υλικού, μετά από 24 ώρες ζύμωσης, προστέθηκε επιπλέον ποσότητα υλικού. Για αυτή τη σειρά πειραμάτων, η διεργασία SSF θεωρήθηκε διαλείποντος έργου μέχρι τις 24 ώρες ζύμωσης και ημιδιαλείποντος συνολικά.

Τα αποτελέσματα της διεργασίας SSF διαλείποντος και ημιδιαλείποντος έργου παρουσιάζονται στα *Διαγράμματα Γ16-Γ19* και οι μέγιστες επιτευχθείσες τιμές, για όλες τις συνθήκες που εξετάστηκαν, στον *Πίνακα Γ7*.



Διάγραμμα Γ16. Χρονική μεταβολή αιθανόλης, γλυκόζης και συνολικών αναγωγικών σακχάρων κατά την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) διατροφικών απορριμμάτων.

Ενζυμικό φορτίο: 5 FPU/g ξηρού υλικού

Συγκέντρωση υλικού: 20 % (w/v)

Προκατεργασία: 120 °C για 15 min

Είδος διεργασίας: διαλείποντος έργου

(α) ακατέργαστα

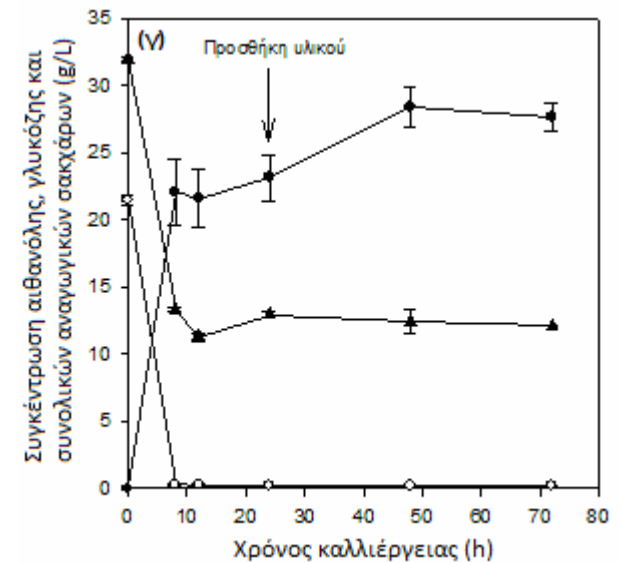
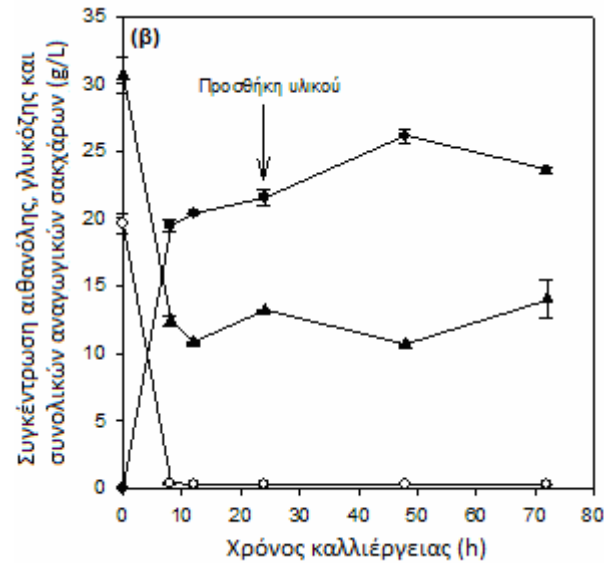
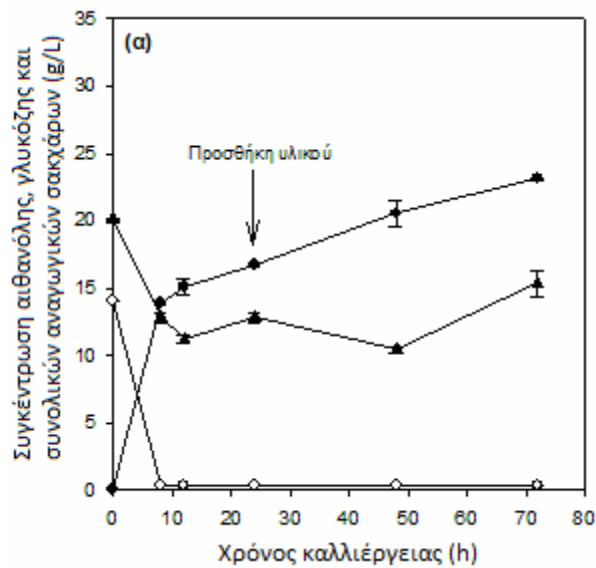
(β) προκατεργασμένα

(γ) προκατεργασμένα παρουσία H₂SO₄

● αιθανόλη

○ γλυκόζη

▲ συνολικά αναγωγικά σάκχαρα



Διάγραμμα Γ17. Χρονική μεταβολή αιθανόλης, γλυκόζης και συνολικών αναγωγικών σακχάρων κατά την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) διατροφικών απορριμμάτων.

Ενζυμικό φορτίο: 10 FPU/g ξηρού υλικού

Συγκέντρωση υλικού: 20 % (w/v)

Προκατεργασία: 120 °C για 15 min

Είδος διεργασίας: διαλείποντος έργου μέχρι την προσθήκη νέου υλικού (24 ώρες) και ημιδιαλείποντος έργου συνολικά

(α) ακατέργαστα

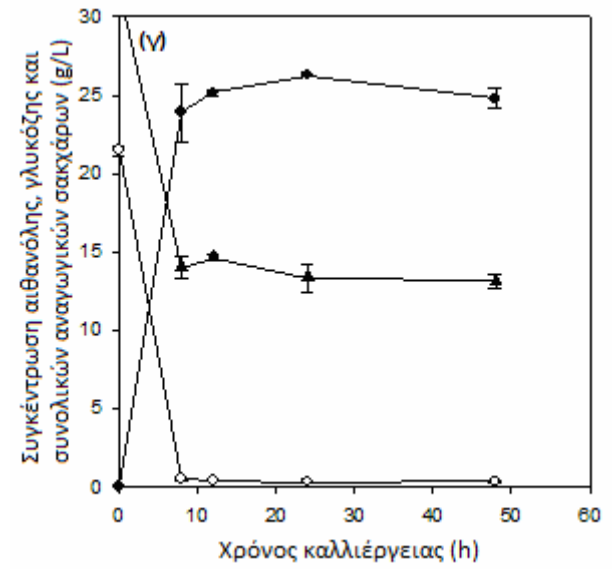
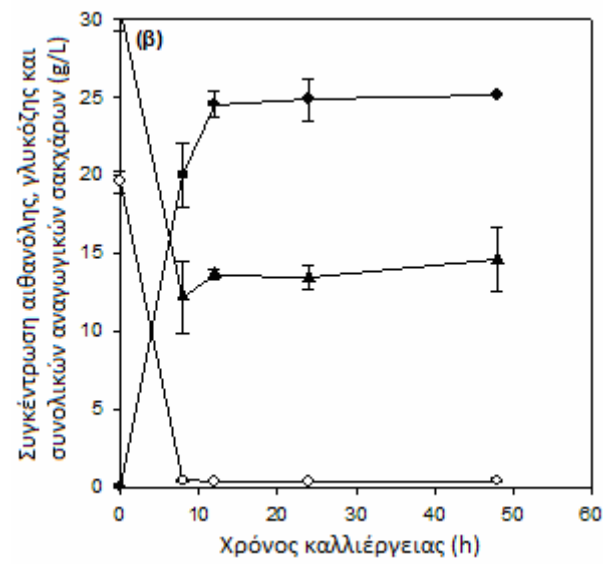
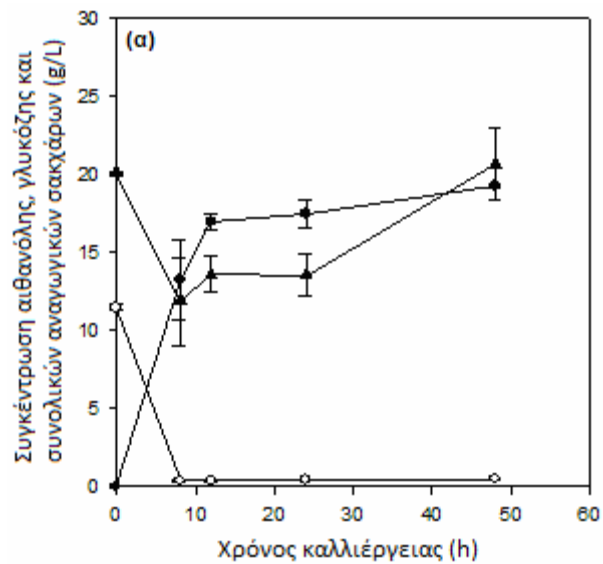
(β) προκατεργασμένα

(γ) προκατεργασμένα παρουσία H_2SO_4

● αιθανόλη

○ γλυκόζη

▲ συνολικά αναγωγικά σάκχαρα



Διάγραμμα Γ18. Χρονική μεταβολή αιθανόλης, γλυκόζης και συνολικών αναγωγικών σακχάρων κατά την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) διατροφικών απορριμμάτων.

Ενζυμικό φορτίο: 20 FPU/g ξηρού υλικού

Συγκέντρωση υλικού: 20 % (w/v)

Προκατεργασία: 120 °C για 15 min

Είδος διεργασίας: διαλείπωντος έργου

(α) ακατέργαστα

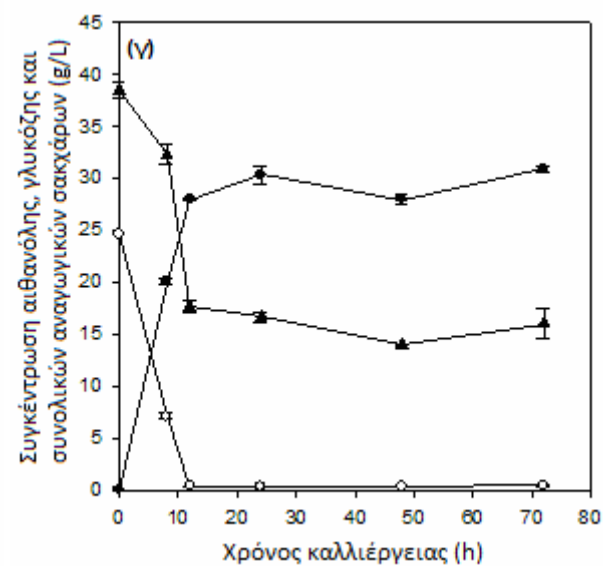
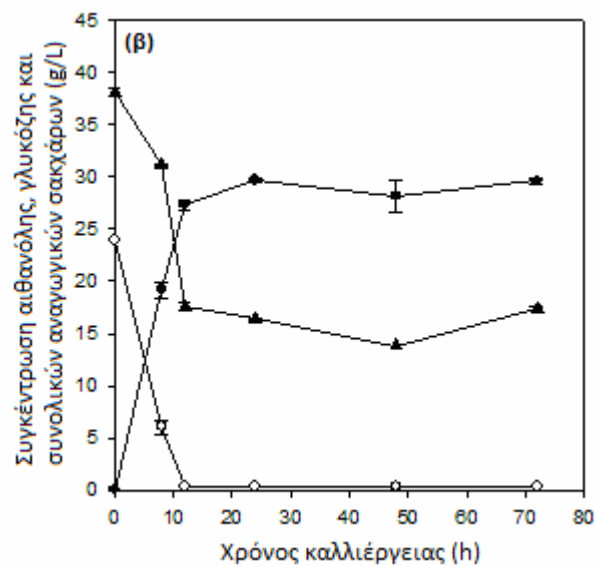
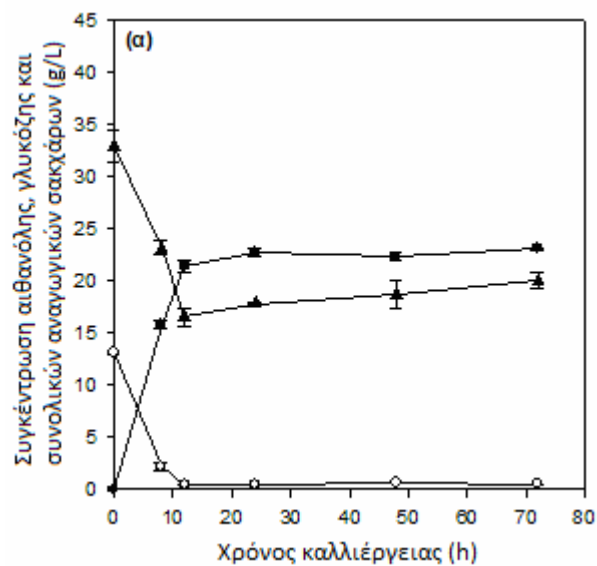
(β) προκατεργασμένα

(γ) προκατεργασμένα παρουσία H₂SO₄

● αιθανόλη

○ γλυκόζη

▲ συνολικά αναγωγικά σάκχαρα



Διάγραμμα Γ19. Χρονική μεταβολή αιθανόλης, γλυκόζης και συνολικών αναγωγικών σακχάρων κατά την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF) διατροφικών απορριμμάτων.

Ενζυμικό φορτίο: 10 FPU/g ξηρού υλικού

Συγκέντρωση υλικού: 30 % (w/v)

Προκατεργασία: 120 °C για 15 min

Είδος διεργασίας: διαλείποντος έργου

(α) ακατέργαστα

(β) προκατεργασμένα

(γ) προκατεργασμένα παρουσία H_2SO_4

● αιθανόλη

○ γλυκόζη

▲ συνολικά αναγωγικά σάκχαρα

Πίνακας Γ7. Αποτελέσματα παραγωγής βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF).

Προκατεργασία	T(°C) / t (min) ^a	Ενζυμικό φορτίο ^b	Είδος διεργασίας/ Συγκέντρωση υλικού ^c	Παραγωγή αιθανόλης (g/L)	Παραγωγικότητα αιθανόλης (g/L·h)	% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης ^d	% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης ^e
Ακατέργαστο	-	5	Δ.Ε. ^f / 20%	16.19 ± 0.38	0.67 ± 0.02	48.62 ± 1.13	129.38 ± 3.01
Υδροθερμική	120 / 15	5	Δ.Ε. / 20%	21.36 ± 0.30	0.89 ± 0.01	64.16 ± 0.90	170.75 ± 2.41
Υδροθερμική+οξύ	120 / 15	5	Δ.Ε. / 20%	21.98 ± 0.08	0.92 ± 0.00	66.01 ± 0.23	175.67 ± 0.60
Ακατέργαστο	-	10	Δ.Ε. / 20%	16.74 ± 0.12	0.70 ± 0.01	50.29 ± 0.36	133.82 ± 0.96
Υδροθερμική	120 / 15	10	Δ.Ε. / 20%	21.56 ± 0.56	0.90 ± 0.02	64.75 ± 1.67	172.31 ± 4.45
Υδροθερμική+οξύ	120 / 15	10	Δ.Ε. / 20%	23.12 ± 1.70	0.96 ± 0.07	69.44 ± 5.11	184.78 ± 3.59
Ακατέργαστο	-	20	Δ.Ε. / 20%	19.26 ± 0.12	0.40 ± 0.00	57.86 ± 0.36	153.97 ± 0.96
Υδροθερμική	120 / 15	20	Δ.Ε. / 20%	25.11 ± 0.00	0.51 ± 0.02	75.43 ± 0.00	200.73 ± 0.00
Υδροθερμική+οξύ	120 / 15	20	Δ.Ε. / 20%	26.27 ± 0.08	1.09 ± 0.00	78.90 ± 0.23	209.96 ± 0.60
Ακατέργαστο	-	10	Ημ.Δ.Ε. ^g / 24%	23.10 ± 0.09	0.32 ± 0.00	57.83 ± 0.23	153.89 ± 0.60
Υδροθερμική	120 / 15	10	Ημ.Δ.Ε. / 24%	26.09 ± 0.53	0.54 ± 0.01	65.30 ± 1.32	173.77 ± 3.51
Υδροθερμική+οξύ	120 / 15	10	Ημ.Δ.Ε. / 24%	28.32 ± 1.50	0.87 ± 0.25	70.89 ± 3.77	188.66 ± 1.02
Ακατέργαστο	-	10	Δ.Ε. / 30%	22.73 ± 0.35	0.95 ± 0.01	45.51 ± 0.69	121.11 ± 1.84
Υδροθερμική	120 / 15	10	Δ.Ε. / 30%	29.75 ± 0.20	1.24 ± 0.01	59.57 ± 0.39	158.52 ± 1.04
Υδροθερμική+οξύ	120 / 15	10	Δ.Ε. / 30%	30.32 ± 0.89	1.26 ± 0.04	60.71 ± 1.78	161.56 ± 4.73

^a Θερμοκρασία/χρόνος προκατεργασίας

^b Σε FPU/g ξηρού υλικού

^c %, (w/v)

^d Με βάση τη μέγιστη θεωρητική απόδοση αιθανόλης από τη βιομετατροπή των μη δομικών σακχάρων και της κυτταρίνης

^e Με βάση τη μέγιστη παραγόμενη αιθανόλη από τα μη δομικά σάκχαρα

^f Δ.Ε.: Διαλείποντος έργου

^g Ημ.Δ.Ε.: Ημιδιαλείποντος έργου

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις, εκτός της διεργασίας ημιδιαλείποντος έργου, η παραγωγή αιθανόλης ολοκληρώνεται σε διάστημα 24 ωρών. Η γλυκόζη αφομοιώνεται ταχύτατα από τη ζύμη και εξαντλείται εντός 8-12 ωρών καλλιέργειας. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα αναγωγικά σάκχαρα, τα οποία παραμένουν στην καλλιέργεια, είναι κυρίως πεντόζες προερχόμενες από την υδρόλυση του κλάσματος της ημικυτταρίνης του υλικού, οι οποίες δεν μπορούν να ζυμωθούν από το ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Η αύξηση της συγκέντρωσης αυτών με το χρόνο οφείλεται στη συνεχή υδρόλυση του υλικού από το χρησιμοποιηθέν ενζυμικό σύστημα.

Από τον Πίνακα Γ7 φαίνεται ότι ο διπλασιασμός του ενζυμικού φορτίου από τα 5 στα 10 FPU/g ξηρού υλικού δεν επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή αιθανόλης (αύξηση 1-5%). Ο διπλασιασμός του ενζυμικού φορτίου από τα 10 στα 20 FPU/g ξηρού υλικού προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης κατά 14-16%. Επειδή, όμως, όπως έχει ήδη αναφερθεί, σημαντική συνεισφορά στο συνολικό κόστος παραγωγής βιοαιθανόλης έχει και το κόστος των χρησιμοποιηθέντων ενζύμων, στη συνέχεια των πειραμάτων μας θα χρησιμοποιηθεί ενζυμικό φορτίο μεταξύ 5 και 10 FPU / g ξηρού υλικού.

Η προκατεργασία του υλικού ευνοεί την παραγωγή αιθανόλης, καθώς επίσης και την παραγωγικότητα της διεργασίας. Η υδροθερμική προκατεργασία σε θερμοκρασία 120 °C για 15 min αυξάνει τη συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης κατά 29-32% κατά τις διεργασίες διαλείποντος έργου έναντι του ακατέργαστου υλικού ενώ το εν λόγω ποσοστό ανέρχεται στο 36-38% στην περίπτωση προσθήκης μικρής ποσότητας θειικού οξέος κατά την υδροθερμική προκατεργασία στις προαναφερθείσες συνθήκες. Η παραγωγικότητα της διεργασίας αυξάνεται κατά 28-33% όταν χρησιμοποιούνται προκατερασμένα διατροφικά απορρίμματα, ενώ όταν προστίθεται σε αυτά θειικό οξύ, το ποσοστό αύξησης γίνεται 33-37%.

Αναφορικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος στη διεργασία, παρατηρείται ότι η αύξησή της από 20% σε 30% (w/v) αυξάνει την παραγόμενη αιθανόλη μειώνοντας, όμως, την απόδοση ανά g ξηρού υλικού. Με την προσθήκη νέου υλικού στην ήδη υπάρχουσα καλλιέργεια αυξάνεται τόσο η παραγόμενη αιθανόλη όσο και η απόδοση της διεργασίας. Συνεπώς, με εφαρμογή της διεργασίας ημιδιαλείποντος έργου μπορεί να αξιοποιηθεί αποτελεσματικότερα το υλικό.

Η παραγωγικότητα της διεργασίας κυμαίνεται από 0.32-1.26 g/(L·h) με εξάρτηση από την προκατεργασία, τη συγκέντρωση του υποστρώματος και το είδος της διεργασίας. Στην ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση η παραγωγικότητα εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τη διαθεσιμότητα των άμεσα μεταβολίσιμων σακχάρων και κατ' επέκταση από το ρυθμό υδρόλυσης του υλικού, ο οποίος είναι άμεσα συνδεδεμένος με τη θερμοκρασία, στην οποία πραγματοποιείται η ζύμωση (30 °C). Αυτό αποτελεί και το βασικό μειονέκτημα της ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης, η διαφορά, δηλαδή, στις βέλτιστες συνθήκες (θερμοκρασία και pH) δράσης των ενζύμων και των μικροοργανισμών, που χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση των πολυσακχαριτών και την παραγωγή της αιθανόλης αντίστοιχα.

Τα ποσοστά επί των θεωρητικών αποδόσεων, με βάση τα μη δομικά σάκχαρα και την κυτταρίνη, κυμάνθηκαν σε υψηλά επίπεδα (στην πλειοψηφία των

περιπτώσεων σε ποσοστά μεγαλύτερα του 60%) με εξάρτηση κυρίως από τη συγκέντρωση του υλικού και την προκατεργασία.

4.2 Μη ισοθερμοκρασιακή ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση ημιδιαλείποντος έργου διατροφικών απορριμμάτων (NSSF)

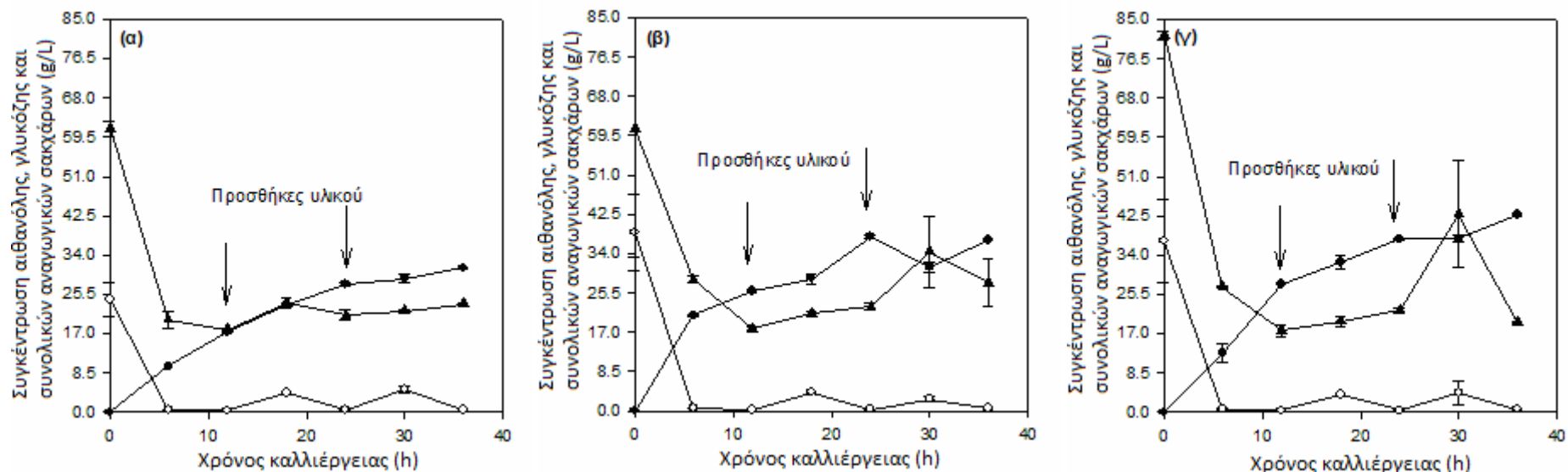
Η υδρόλυση υλικού αρχικής συγκέντρωσης μεγαλύτερης από 10-20% (w/v) παρουσιάζει τεχνικές δυσκολίες, ιδιαίτερα όταν πραγματοποιείται σε εργαστηριακή κλίμακα. Η αρχική τιμή του ιξώδους του υλικού σε τέτοιας κλίμακας συγκεντρώσεις είναι πολύ υψηλή, καθιστώντας την ανάμειξή του και συνεπώς τη μεταφορά μάζας και θερμότητας δύσκολη. Αυτό οδηγεί σε μεγάλη κατανάλωση ισχύος για τη λειτουργία των βιοαντιδραστήρων [44]. Σε πιλοτικές μονάδες παραγωγής, συγκέντρωση υλικού 15-20% (w/v) συχνά αναφέρεται ως η μέγιστη τιμή συγκέντρωσης που μπορεί να διαχειριστεί [43]. Κατά τη διάρκεια της αρχικής φάσης της υδρόλυσης, το υλικό ρευστοποιείται και το ιξώδες μειώνεται σημαντικά [43, 44]. Η διεργασία ημιδιαλείποντος έργου στην υδρόλυση ή την τεχνολογία ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης του υλικού, προσθέτοντας νέο υλικό όταν το ιξώδες του έχει μειωθεί, εφαρμόζεται με σκοπό την αύξηση της τελικής συγκέντρωσης υποστρώματος [45].

Λόγω των διαφορετικών βέλτιστων τιμών θερμοκρασίας υδρόλυσης και ζύμωσης του υλικού, το οποίο αποτελεί και το κυριότερο μειονέκτημα της διεργασίας ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF), απαιτούνται μεγαλύτερες ποσότητες ενζύμου. Το μεγαλύτερο ενζυμικό φορτίο επηρεάζει θετικά τη βιομετατροπή του υποστρώματος, αλλά αυξάνει σημαντικά το κόστος της διεργασίας [46]. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού, οι Wu και Lee [47] πρότειναν μία διεργασία μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (NSSF). Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε μία τροποποιημένη μορφή της διεργασίας ημιδιαλείποντος έργου NSSF, παρόμοια με εκείνη που αναφέρουν οι Varga et al. [48].

Με στόχο την αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης (συγκέντρωση μεγαλύτερη από 4%, w/v) και λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα των ενζυμικών υδρολύσεων καθώς και τα αποτελέσματα των πειραμάτων βιομετατροπής των διατροφικών απορριμμάτων που παρουσιάζονται παραπάνω, πραγματοποιήθηκαν πειραματισμοί υπό συνθήκες ημιδιαλείποντος έργου.

Η αρχική συγκέντρωση του υλικού ήταν 30% (w/v). Τα προκατεργασμένα και μη δείγματα προϋδρολύθηκαν για 6 ώρες σε θερμοκρασία 50 °C με χρήση μείγματος των Celluclast® 1.5 L και Novozyme® 188 ενζυμικού φορτίου 7 FPU/g ξηρού υλικού, ώστε, λόγω ρευστοποίησης του υλικού, να αποκτήσουν καλύτερες συνθήκες ανάμειξης. Μετά την πάροδο των 6 ωρών το προϋδολυμένο στερεό εμβολιάστηκε με την ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* για την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, η οποία πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 30 °C. Ακολούθησαν δύο ισόποσες προσθήκες προϋδολυμένου υλικού, συγκέντρωσης στερεών 50% (w/v), 12 και 24 ώρες μετά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Η τελική συγκέντρωση του υποστρώματος μετά τις προσθήκες ήταν 40% (w/v). Η υδροθερμική προκατεργασία των δειγμάτων έγινε παρουσία και απουσία οξέος (1 g H₂SO₄/g ξηρού υλικού) σε θερμοκρασία 100 °C για 60 min.

Τα αποτελέσματα της διεργασίας NSSF ημιδιαλείποντος έργου παρουσιάζονται στο *Διάγραμμα Γ20* και στον *Πίνακα Γ8*.



Διάγραμμα Γ20. Χρονική μεταβολή αιθανόλης, γλυκόζης και συνολικών αναγωγικών σακχάρων κατά τη μη ισοθερμοκρασιακή ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (NSSF) διατροφικών απορριμμάτων.

Ενζυμικό φορτίο: 7 FPU/g ξηρού υλικού

Τελική συγκέντρωση υλικού: 40 % (w/v)

Προκατεργασία: 100 °C για 60 min

Είδος διεργασίας: ημιδιαλείποντος έργου

(α) ακατέργαστα

(β) προκατεργασμένα

(γ) προκατεργασμένα παρουσία H_2SO_4

● αιθανόλη

○ γλυκόζη

▲ συνολικά αναγωγικά σάκχαρα

Πίνακας Γ8. Αποτελέσματα παραγωγής βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με μη ισοθερμοκρασιακή ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (NSSF) ημιδιαλείποντος έργου.

Προκατεργασία	T(°C)/t (min) ^a	Ενζυμικό φορτίο ^b	Είδος διεργασίας/ Συγκέντρωση υλικού ^c	Παραγωγή αιθανόλης (g/L)	Παραγωγικότητα αιθανόλης (g/L·h)	% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης ^d	% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης ^e
Ακατέργαστο	-	7	Ημ.Δ.Ε. ^g /40%	31.17±0.17	0.87±0.00	46.82±0.25	124.59±0.68
Υδροθερμική	100/60	7	Ημ.Δ.Ε./40%	36.88±0.00	1.02±0.00	55.39±0.00	147.41±0.00
Υδροθερμική+οξύ	100/60	7	Ημ.Δ.Ε./40%	42.66±0.38	1.19±0.01	64.07±0.57	170.51±1.53

^a Θερμοκρασία/χρόνος προκατεργασίας

^b Σε FPU/g ξηρού υλικού

^c %, (w/v)

^d Με βάση τη μέγιστη θεωρητική απόδοση αιθανόλης από τη βιομετατροπή των μη δομικών σακχάρων και της κυτταρίνης

^e Με βάση τη μέγιστη παραγόμενη αιθανόλη από τα μη δομικά σάκχαρα

^g Ημ.Δ.Ε.: Ημιδιαλείποντος έργου

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η διεργασία ημιδιαλείποντος έργου (τελική συγκέντρωση υλικού 40%, w/v) ξεπέρασε το όριο του 4% (w/v) στην παραγόμενη αιθανόλη, με ικανοποιητική αξιοποίηση του πολυσακχαρικού κλάσματος του υλικού, όπως φαίνεται από την αντίστοιχη θεωρητική απόδοση.

Η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης κατά τη ζύμωση ακατέργαστων διατροφικών απορριμμάτων είναι 24.37 g/L, ενώ στην περίπτωση του υδροθερμικά προκατεργασμένου υλικού, παρουσία ή απουσία οξέος, ανιχνεύθηκε περίπου 37% περισσότερη γλυκόζη. Σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις, η γλυκόζη καταναλώθηκε μέσα στις 6 πρώτες ώρες της ζύμωσης, ενώ 6 ώρες μετά την πρώτη προσθήκη νέου υλικού, η συγκέντρωσή της αυξήθηκε ελαφρώς (περίπου 4 g/L) και πριν από τη δεύτερη προσθήκη σχεδόν μηδενίστηκε. Παρομοίως, αύξηση της γλυκόζης παρατηρήθηκε και 6 ώρες μετά από τη δεύτερη προσθήκη υλικού, ενώ μέχρι το τέλος της διεργασίας (36 h) είχε καταναλωθεί ολόκληρη η ποσότητά της.

Η συγκέντρωση των ολικών αναγωγικών σακχάρων μειώθηκε περίπου κατά 70% στις 12 πρώτες ώρες της ζύμωσης και παρέμεινε σχεδόν σταθερή με μικρές διακυμάνσεις μετά τις δύο προσθήκες νέου υλικού μέχρι το τέλος της διεργασίας. Τα εναπομείναντα ολικά αναγωγικά σάκχαρα είναι πεντόζες, οι οποίες προέρχονται από τον αποπολυμερισμό του φράγματος της ημικυτταρίνης των διατροφικών απορριμμάτων.

Η παραγωγή αιθανόλης από τα ακατέργαστα διατροφικά απορρίμματα έφτασε τα 31.17 g/L μετά από 36 ώρες αλκοολικής ζύμωσης, ποσοστό που αντιστοιχεί στο 46.82 % της μέγιστης θεωρητικής τιμής απόδοσης, με βάση τα μη δομικά σάκχαρα και την κυτταρίνη. Όταν στη διεργασία χρησιμοποιήθηκαν προκατεργασμένα διατροφικά απορρίμματα, η παραγωγή αιθανόλης αυξήθηκε κατά 18.3% σε σχέση με το ακατέργαστο υλικό, φτάνοντας τα 36.88 g/L (55.39% της μέγιστης θεωρητικής τιμής απόδοσης). Προσθήκη μικρής ποσότητας θειικού οξέος (1 g H₂SO₄/100 g ξηρού υλικού) στο στάδιο της προκατεργασίας των διατροφικών απορριμμάτων, οδήγησε σε περαιτέρω αύξηση τόσο της παραγωγής αιθανόλης, η οποία έφτασε τα 42.66 g/L (64.07% της μέγιστης θεωρητικής τιμής απόδοσης) όσο και της παραγωγικότητας (1.19 g/(L·h)), η οποία αυξήθηκε κατά 29% σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του ακατέργαστου υλικού.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των συνθηκών υδρόλυσης και ζύμωσης διατροφικών απορριμμάτων προς παραγωγή αιθανόλης. Εξετάστηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες στο στάδιο της προκατεργασίας, καθώς και διαφορετικές ενζυμικές ενεργότητες και συγκεντρώσεις υποστρώματος κατά την υδρόλυση και ζύμωση του υλικού.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η υδρόλυση και η ζύμωση των διατροφικών απορριμμάτων ευνοούνται όταν αυτά υφίστανται υδροθερμική προκατεργασία στους 100 °C για 60 min. Το βέλτιστο ενζυμικό φορτίο των κυτταρινασών, λαμβάνοντας υπ' όψιν τόσο τους οικονομικούς παράγοντες όσο και τη συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης, είναι της τάξης των 7 FPU/g ξηρού υλικού. Τέλος, η μεγαλύτερη συγκέντρωση υποστρώματος οδήγησε σε υψηλότερη παραγωγή αιθανόλης, αλλά και σε δυσκολότερη διαχείριση του υλικού, λόγω μεγάλου ιξώδους. Το πρόβλημα αυτό, όπως αποδείχθηκε, μπορεί να αντιμετωπιστεί υποβάλλοντας το υλικό σε προϋδρόλυση.

Η ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών απορριμμάτων, συγκέντρωσης υποστρώματος 20% (w/v), έδωσε ικανοποιητικά, σε σχέση με της διεθνούς βιβλιογραφίας, αποτελέσματα (ποσοστό υδρόλυσης κυτταρίνης και ολικών πολυσακχαριτών μεγαλύτερο από 40% και 60% αντίστοιχα) για όλα τα εξετασθέντα ενζυμικά φορτία (5-20 FPU/g ξηρού στερεού).

Σύμφωνα με τους Ballesteros et al. (2010), η απόδοση της υδρόλυσης προκατεργασμένων δειγμάτων οργανικού κλάσματος αστικών στερεών αποβλήτων (ΑΣΑ) συγκέντρωσης υποστρώματος 10% και 20% (w/v) κυμάνθηκε από 37% έως 44% με χρήση ενζυμικού φορτίου 20-60 FPU/g κυτταρίνης, ποσοστό, το οποίο είναι συγκρίσιμο με το ποσοστό υδρόλυσης της κυτταρίνης της παρούσας μελέτης [50].

Οι Li et al. (2012) ανέφεραν παραγωγή 21 g/L συνολικών αναγωγικών σακχάρων από λιγνινοκυτταρινούχο συμπύκνωμα ΑΣΑ συγκέντρωσης υποστρώματος 6% (w/v). Πρέπει να σημειωθεί ότι η εν λόγω συγκέντρωση επετεύχθη με χρήση ενζυμικού φορτίου αρκετά υψηλότερου από αυτό της παρούσας μελέτης (90 Units κυτταρινάσης/g υποστρώματος).

Με εφαρμογή της διεργασίας ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF) διαλείποντος έργου, παρελήφθη αιθανόλη συγκέντρωσης 30.32 g/L. Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη νέου υλικού στην ήδη υπάρχουσα καλλιέργεια αυξάνει τόσο την παραγόμενη αιθανόλη όσο και την απόδοση της διεργασίας. Συνεπώς, με εφαρμογή της διεργασίας ημιδιαλείποντος έργου, το υλικό μπορεί να αξιοποιηθεί αποτελεσματικότερα. Προκειμένου να ξεπεραστεί το όριο του 4% (w/v) στην παραγόμενη αιθανόλη, μελετήθηκε η διεργασία μη ισοθερμοκρασιακής ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (NSSF) ημιδιαλείποντος έργου. Χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα υψηλής τελικής συγκέντρωσης (40%, w/v) και παράχθηκαν 42.66 g/L αιθανόλης (64% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης).

Τα αποτελέσματα της μελέτης είναι ικανοποιητικά συγκρινόμενα με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας. Για τη βιομετατροπή διατροφικών απορριμμάτων διαφορετικής προέλευσης σε αιθανόλη, έχουν εφαρμοστεί διάφορες διεργασίες, με

κυριότερες τη διακριτή υδρόλυση και ζύμωση (SHF) και την ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSF).

Όπως φαίνεται παρακάτω, διατροφικά απορρίμματα χαμηλότερης, σε σχέση με της παρούσας εργασίας, συγκέντρωσης υποστρώματος (10-15%, w/v) υδρολύθηκαν, με μείγματα εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων (γλυκοαμυλάση, α-αμυλάση, κυτταρινάση, πρωτεάση, carbohydrase και β-γλυκοζιδάση) και στη συνέχεια υπέστησαν ζύμωση προς παραγωγή αιθανόλης από διαφορετικά στελέχη του *Saccharomyces Cerevisiae*, μέσω διεργασίας SHF.

Σύμφωνα με τους Man et al. (2010), Tang et al. (2008) και Cekmecelioglu και Uncu (2013) η παραγωγή αιθανόλης έφτασε τα 24.17 g/L, 29.9 g/L και 23.3 g/L αντίστοιχα, συγκεντρώσεις χαμηλότερες από αυτές της παρούσας εργασίας [29, 11, 56]. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Moon et al. (2009), οι οποίοι ρευστοποιήσαν διατροφικά απορρίμματα με χρήση carbohydrases και αμυλογλυκοζιδασών και παρήγαγαν αιθανόλη συγκέντρωσης 29.1 g/L [28]. Οι Walker et al. (2012) χρησιμοποίησαν διατροφικά απορρίμματα, υψηλής περιεκτικότητας σε άμυλο (καλαμπόκι, πατάτες και ζυμαρικά). Παρ' όλα αυτά, παρήγαγαν πολύ χαμηλής συγκέντρωσης αιθανόλη (8 g/L) [55].

Οι Kim et al. (2011), εφαρμόζοντας διεργασία SHF διαλείποντος έργου σε διατροφικά απορρίμματα, παρήγαγαν 0.43 g αιθανόλης/g συνολικών στερεών. Η αντίστοιχη απόδοση για διεργασία συνεχούς έργου ήταν 0.3 g αιθανόλης/g συνολικών στερεών και η παραγωγικότητα της διεργασίας έφτασε τα 1.18 g/(L·h), τιμή συγκρίσιμη με αυτήν της παρούσας μελέτης [1].

Οι Kim et al. (2008), εφάρμοσαν διεργασία SHF σε διατροφικά απορρίμματα, τα οποία αρχικά αναμείχθηκαν με νερό σε αναλογία 1:1 (v/v) και υπέστησαν μηχανική θραύση. Ακολούθως, αραιώθηκαν εκ νέου με νερό (1:1, v/v) και υδρολύθηκαν με χρήση εμπορικού σκευάσματος αμυλογλυκοζιδάσης (η διάρκεια της υδρόλυσης ήταν 4 h). Ελήφθη η υγρή φάση, στην οποία βρίσκονταν 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 [27].

Υψηλότερη παραγωγή αιθανόλης (81.50 g/L) επετεύχθη από τους Yan et al. (2011), οι οποίοι, χρησιμοποιώντας ελεύθερα κύτταρα ζύμης, υπέβαλαν σε ζύμωση, μέσω διεργασίας SHF διαλείποντος έργου, το προϊόν της υδρόλυσης διατροφικών απορριμμάτων, το οποίο περιείχε αναγωγικά σάκχαρα σε συγκέντρωση 163.22 g/L [52]. Σύμφωνα με τους Yan et al. (2010) και Yan et al. (2012) κύτταρα ζύμης ακινητοποιημένα σε πηκτή αλγινικού ασβεστίου ή τροποποιημένο κοτσάνι καλαμποκιού (modified corn stalk) παρήγαγαν αιθανόλη συγκέντρωσης 87.91 g/L και 89.28 g/L αντίστοιχα, από ένα συμπυκνωμένο υδρόλυμα διατροφικών απορριμμάτων (περίπου 200 g/L αναγωγικά σάκχαρα) [53, 54].

Διεργασίες SSF, τόσο διαλείποντος όσο και ημιδιαλείποντος έργου, έχουν εφαρμοστεί από πολλούς ερευνητές.

Σύμφωνα με τους Lissens et al. (2004), ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση προκατεργασμένων με υγρή οξείδωση οργανικών ΑΣΑ εμπλουτισμένων με άχυρο σίτου (8% ξηρού στερεού) με τη βοήθεια του ζυμομύκητα *Sacchromyces*

cerevisiae απέδωσε συγκεντρώσεις αιθανόλης που κυμάνθηκαν από 16.5 έως 22 g/L για ενζυμικά φορτία από 5 έως 25 FPU / g ξηρού στερεού αντίστοιχα [51].

Οι Ballesteros et al. (2010), εφάρμοσαν διεργασία SSF ημιδιαλείποντος έργου σε πρώτη ύλη συγκέντρωσης υποστρώματος 25% (w/w). Χρησιμοποιώντας το οργανικό κλάσμα των ΑΣΑ, το οποίο είχε προηγουμένως υποστεί θερμική κατεργασία στους 160 °C για 30 min, παρέλαβαν αιθανόλη συγκέντρωσης 30 g/L (60% της θεωρητικής απόδοσης) [50].

Οι Wang et al. (2008) εφάρμοσαν διεργασία SSF σε οικιακά απορρίμματα (kitchen waste), των οποίων η αρχική περιεκτικότητα σε ολικά σάκχαρα ήταν 62.68% (w/w). Για την υδρόλυση της πρώτης ύλης χρησιμοποίησαν αμυλογλυκοζιδάση ολικής ενεργότητας 120 Units/g και με τη βοήθεια του ζυμομύκητα *Sacchromyces cerevisiae*, παρήγαγαν αιθανόλη συγκέντρωσης 33.05 g/L. Η απόδοση της διεργασίας έφτασε τα 0.23 g αιθανόλης/g οικιακών απορριμμάτων (77% της θεωρητικής) [30].

Σύμφωνα με τους Hong και Yoon (2011), υπολείμματα τροφών μετατράπηκαν σε αιθανόλη, μέσω διεργασίας SSF, με χρήση μείγματος αμυλογλυκοζιδάσης, α-αμυλάσης και πρωτεάσης (ολικής ενεργότητας 1.2 AGU/g ξηρού υλικού) για την ενζυμική υδρόλυση του υλικού και ζύμης *Sacchromyces cerevisiae* για τη βιομετατροπή του. Τελικά, με την προσθήκη αζώτου, ελήφθη αιθανόλη συγκέντρωσης 36 g/L από υπολείμματα τροφών συγκέντρωσης υποστρώματος 10% (w/v). Η αντίστοιχη τιμή για παραγωγή αιθανόλης απουσία αζώτου ήταν 25 g/L [10].

Οι Koike et al. (2009) ανέφεραν συγκέντρωση και απόδοση παραγόμενης αιθανόλης 44 g/L και 81.3% αντίστοιχα από απορρίμματα κυλικίων, εφαρμόζοντας επαναλαμβανόμενη (5 φορές) διεργασία SSF διαλείποντος έργου, με απομάκρυνση, κάθε φορά, του 80% του πολτοποιημένου υλικού, που είχε υποστεί ζύμωση. Η παραγωγικότητα της διεργασίας έφτασε τα 17.7 g/(L·h) [49].

Οι Kim et al. (2011), εφαρμόζοντας διεργασία SSF διαλείποντος έργου σε διατροφικά απορρίμματα, παρήγαγαν 0.31 g αιθανόλης/g συνολικών στερεών. Η αντίστοιχη απόδοση για διεργασία συνεχούς έργου ήταν 0.2 g αιθανόλης/g συνολικών στερεών και η παραγωγικότητα της διεργασίας έφτασε τα 0.8 g/(L·h) [1].

Η βιβλιογραφία, για διεργασίες SSF διατροφικών απορριμμάτων διαφορετικής προέλευσης, αναφέρει παραγωγικότητες, οι οποίες κυμαίνονται από 0.09 έως 0.8 g/(L·h) [1, 10, 30, 50, 51], ενώ εφαρμόζοντας διεργασίες διαλείποντος έργου SHF, οι παραγωγικότητες κυμάνθηκαν από 0.49 έως 1.94 g/(L·h) [1, 28, 29, 52, 54, 56]. Υψηλές τιμές παραγωγικότητας (24-49.88 g/(L·h)) σημειώθηκαν κατά τη ζύμωση υδρολυμάτων διατροφικών απορριμμάτων από ελεύθερα ή ακινητοποιημένα κύτταρα ζύμης σε διεργασίες συνεχούς έργου [11, 53, 54].

Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, καθώς και της διεθνούς βιβλιογραφίας υποδεικνύουν ότι τα διατροφικά απορρίμματα αποτελούν κατάλληλη πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης, καθώς περιέχουν μεγάλα ποσοστά ζυμώσιμων σακχάρων. Η διαφορετική διαχείρισή τους από τον κάθε ερευνητή οφείλεται στη διαφορετική σύστασή τους, ανάλογα με την εποχή και την περιοχή προέλευσής τους. Ακόμη, η μη ισοθερμοκρασιακή ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (NSSF) ημιδιαλείποντος έργου είναι μία πολλά υποσχόμενη διεργασία για την παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης.

Όπως προαναφέρθηκε η σύσταση των διατροφικών απορριμμάτων ποικίλλει. Αυτό σημαίνει ότι συχνά έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε άμυλο, το οποίο αποτελεί ένα κατάλληλο υπόστρωμα για παραγωγή βιοαιθανόλης. Για το λόγο αυτό, προτείνεται να μελετηθούν μελλοντικά διεργασίες βιομετατροπής τους σε αιθανόλη με χρήση αμυλολυτικών ενζύμων.

Παρατίθεται συγκριτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας με τα αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας:

Συγκριτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης με τα αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας.

Πρώτη ύλη	Συγκέντρωση υποστρώματος	Υδρόλυση	Είδος διεργασίας / Μικροοργανισμός	Συγκέντρωση αιθανόλης (Απόδοση)	Παραγωγικότητα	Αναφορά
Οργανικό κλάσμα ΑΣΑ	25 % (w/w) (θερμικά προκατεργασμένα στους 160 °C για 30 min)	Κυτταρινάση (20 FPU/g κυτταρίνης)	Ημιδιαλείποντος έργου SSF / <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30 g/L (12 g/100 g στερεού)	0.42 g/(L·h)	Ballesteros et al. (2010)
Υπολείμματα τροφών (food residues)	10 % (w/v)	Αμυλογλυκοζιδάση, α-αμυλάση και πρωτεάση (1.2 AGU/g ξηρού υλικού)	SSF / <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36 g/L (36 g/100 g στερεού) (παρουσία N ₂) 25 g/L (25 g/100 g στερεού) (απουσία N ₂)	0.75 g/(L·h) (παρουσία N ₂) 0.52 g/(L·h) (απουσία N ₂)	Hong and Youn (2011)
Διατροφικά απορρίμματα	55.5 % (w/w)	Carbohydrase (1.6 FBG/g ξηρού στερεού)	Διαλείποντος έργου SHF και SSF / <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(43 g/100 g στερεού) και (31 g/100 g στερεού)	-	Kim et al. (2011)
Διατροφικά απορρίμματα	55.5 % (w/w)	Carbohydrase (1.6 FBG/g ξηρού στερεού)	Συνεχούς έργου SHF και SSF / <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(30 g/100 g στερεού) και (20 g/100 g στερεού)	1.18 g/(L·h) και 0.8 g/(L·h)	Kim et al. (2011)
Οργανικό κλάσμα ΑΣΑ εμπλουτισμένο με άχυρο σίτου (8% του ξηρού στερεού)	10 % (w/v) (προκατεργασμένα με υγρή οξείδωση)	Κυτταρινάση και β-γλυκοζιδάση (5 – 25 FPU/g ξηρού στερεού) (Προϋδρόλυση με 5 FPU/g ξηρού στερεού)	SSF / <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16.5 – 22 g/L (16.5 – 22 g/100 g στερεού)	0.09 – 0.11 g/(L·h)	Lissens et al. (2010)
Διατροφικά απορρίμματα	66.67 % (w/w)	Αμυλογλυκοζιδάση (2 AGU/g ξηρού στερεού) και Carbohydrase (20 FBGU/g ξηρού στερεού)	Διαλείποντος έργου / <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29.1 g/L (23 g/100 g στερεού)	1.94 g/(L·h)	Moon et al. (2009)
Διατροφικά απορρίμματα	40 % (w/v) (υδροθερμικά προκατεργασμένα στους 100 °C για 60 min)	Κυτταρινάση (7 FPU / g ξηρού στερεού) (Προϋδρόλυση με 7 FPU/g ξηρού στερεού)	Ημιδιαλείποντος έργου SSF / <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42.66 g/L (10.7 g/100 g στερεού)	1.19 g / (L·h)	Παρούσα εργασία

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Kim J.H., Lee J.C., Pak D. *Feasibility of producing ethanol from food waste*. Waste Management 2121-2125 (2011)
- [2] Stichnothe H., Azapagic A. *Bioethanol from waste: Life cycle estimation of the greenhouse gas saving potential*. Resources, Conservation and Recycling 624–630 (2009)
- [3] C. I. Chatzikomis & K. N. Spentzas & A. G. Mamalis. *Environmental and economic effects of widespread introduction of electric vehicles in Greece*. (2014)
- [4] ΟΔΗΓΙΑ 2009/28/ΕΚ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 23ης Απριλίου 2009 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
- [5] Vouitsis I., Geivanidis S., Samaras Z. *Liquid biofuels in Greece—Current status in production and research*. Journal of Renewable and Sustainable Energy (2014)
- [6] ΟΔΗΓΙΑ 2003/30/ΕΚ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 8ης Μαΐου 2003 σχετικά με την προώθηση της χρήσης βιοκαυσίμων ή άλλων ανανεώσιμων καυσίμων για τις μεταφορές
- [7] <http://www.agroenergy.gr/categories>
- [8] Balat M., Balat H., Oz C. *Progress in bioethanol processing*. Progress in Energy and Combustion Science, 551–573 (2008)
- [9] Vohra M., Manwar J., Manmode R., Padgilwar S., Patil S. *Bioethanol production: Feedstock and current technologies*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 573–584 (2014)
- [10] Hong Y.S., Yoon H.H. *Ethanol production from food residues*. biomass and bioenergy 35, 3271-3275 (2011)
- [11] Yue-Qin Tang, Yoji Koike, Kai Liu, Ming-Zhe An, Shigeru Morimura, Xiao-Lei Wu, Kenji Kida. *Ethanol production from kitchen waste using the flocculating yeast Saccharomyces cerevisiae strain KF-7*. BIOMASS AND BIOENERGY 32; 1037 – 1045 (2008)
- [12] J.S. Van Dyk, R. Gama, D. Morrison, S. Swart, B.I. Pletschke. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Renewable and Sustainable Energy Reviews 26; 521–531 (2013)

- [13] Aikaterini Ioannis Vavouraki, Evangelos Michael Angelis, Michael Kornaros. *Optimization of thermo-chemical hydrolysis of kitchen wastes*. Waste Management, 740–745 (2013)
- [14] Χριστακόπουλος Χ., Τόπακας Ε. *Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων*, Αθήνα (2011)
- [15] Dogaris I., Karapati S., Mamma, D., Kalogeris, E. & Kekos, D. *Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production*. Bioresource Technology, 100, 6543–6549 (2009)
- [16] Dogaris I., Gkounta O., Mamma, D., & Kekos, D. *Bioconversion of dilute-acid pretreated sorghum bagasse to ethanol by Neurospora crassa*. Applied Microbiology and Biotechnology, 95, 541-550 (2012)
- [17] Miller, G. L. *Use of Dinitro-Salicylic as Reagent for the determination of reducing sugars*. Anal. Chem. 31, 426–428 (1959)
- [18] Ghose T.K. *Measurement of cellulase activity*. Pure and Applied Chemistry 59(2), 257-268 (1987)
- [19] AOAC Method, 978.04 Official methods of analysis of AOAC International, 18th ed. Official method 978.04 Nitrogen (total/crude protein) in plants. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, (2005)
- [20] AOAC Method 920.39C AOAC International. Method 920.39C: Fat (crude) or ether extract in food and animal feed-Soxhlet method. Official Methods of Analysis of AOAC International, 15th ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, (1995)
- [21] ASTM E1755 - 01(2007) Standard Test Method for Ash in Biomass
- [22] Determination of Extractives in Biomass. Technical Report NREL/TP-510-42619
- [23] Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Technical Report NREL/TP-510-42618
- [24] AOAC Method 991.42. *Insoluble dietary fiber in foods and food products. Enzymatic-gravimetric method, phosphate buffer*. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15 ed., 3rd suppl. The Association: Arlington,VA, 1992
- [25] Prosky, L., Asp, N.-G., Furda, I., De Vries, J. W., Schweizer, T. F., and Harland, B. *The determination of total dietary fiber in foods, food products: collaborative study*. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 68, 677-679 (1985)

- [26] Prosky, L., Asp, N.-G., Schweizer, T. F., De Vries, J. W., Furda, I. *Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and food products: Collaborative study*. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 75, 360-367 (1992)
- [27] Kim, J.K., Oh, B.R., Shin, H.-J., Eom, C.-Y., Kim W.S. *Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste*. Process Biochemistry 43, 1308–1312 (2008)
- [28] 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. *Enzymatic hydrolysis of food waste and ethanol fermentation*. International Journal of Energy Research 33, 164–172 (2009)
- [29] Man H.L., Behera S.K., Park H.S. *Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate*. International Journal of Environmental Science and Technology 7, 157-64 (2010)
- [30] Wang Q., Ma H., Xu W., Gong, L., Zhang, W., Zou, D. *Ethanol production from kitchen garbage using response surface methodology*. Biochemical Engineering Journal 39 (1), 604-10 (2008)
- [31] Holtzaple M.T., Caram H.S., Humphrey A.E. *A comparison of two empirical models for the enzymatic hydrolysis of pretreated Poplar wood*. Biotechnology and Bioengineering, XXVI, 936-941 (1984)
- [32] Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J., and Stroeve P. *Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production*. Ind. Eng. Chem. Res. (2009)
- [33] Taherzadeh, M.J., Karimi, K. *Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review*. Int. J. Mol. Sci., 9, 1621-1651 (2008)
- [34] Tong, Z., Cheng, N., Pullammanappallil, P. *Pretreatment of Ligno-cellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts*. (2013)
- [35] Δόγαρης Ι. *Σχεδιασμός ολοκληρωμένης διεργασίας παραγωγής βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά*. Διδακτορική Διατριβή. Αθήνα (2009)
- [36] Galbe, M., Zacchi, G. *Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production*. Adv Biochem Engin/Biotechnol 108: 41–65 (2007)
- [37] Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. *Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review*. Bioresource Technology 101 4851–4861 (2010)
- [38] Taherzadeh, M.J., Karimi, K. *Enzyme-based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic materials: A Review*. BioResources 2(4), 707-738 (2007)

- [39] Οδηγός εφαρμογής προγραμμάτων Διαλογή στην Πηγή & συστημάτων διαχείρισης των βιοαποβλήτων
- [40] http://europa.eu/legislation_summaries/environment/waste_management/v0010_el.htm
- [41] Παπανικολάου Β.: *Μέθοδοι και υλικά ακινητοποίησης βιοκαταλυτών για την παραγωγή καύσιμης και βιομηχανικής αλκοόλης σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου*. Ερευνητική Εργασία Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης. Πάτρα (2006)
- [42] Jie Lu, XueZhi Li, Jian Zhao, Yinbo Qu: *Enzymatic Saccharification and Ethanol Fermentation of Reed Pretreated with Liquid Hot Water*. Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2012, Article ID 276278 (2012)
- [43] Jørgensen, H., Kristensen, J.B., Felby, C.: *Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities*. Biofuels Bioprod. Bior. 1, 119-134 (2007)
- [44] Fan, Z.L., Lynd, L.R.: *Conversion of paper sludge to ethanol. I: Impact of feeding frequency and mixing energy characterization*. Bioproc. Biosyst. Eng. 30, 27-34 (2007)
- [45] Hoyer, K., Galbe, M., Zacchi, G.: *Effects of enzyme feeding strategy on ethanol yield in fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce at high dry matter*. Biotechnology for Biofuels, 3, 14, doi:10.1186/1754-6834-3-14 (2010)
- [46] Balat, M.: *Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review*. Energ. Convers. Manage. 52, 858-875 (2011)
- [47] Wu, A., Lee, Y.Y.: *Nonisothermal simultaneous saccharification and fermentation for direct conversion of lignocellulosic biomass to ethanol*. Appl. Biochem. Biotechnol. 70-72, 1109-1117 (1988)
- [48] Varga, E., Klinke, H.B., Réczey, K., Thomsen, A.B.: *High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol*. Biotechnol. Bioeng. 88(5), 567-574 (2004)
- [49] Koike Y., An M., Tang Y., Syo T., Osaka N., Morimura S., Kida K.: *Production of fuel ethanol and methane from garbage by high-efficiency two-stage fermentation process*. Journal of Bioscience and Bioengineering VOL. 108 No. 6, 508–512, (2009)
- [50] Ballesteros, M., Sáez, F., Ballesteros, I., Manzanares, P., Negro, M.J., Martínez, J.M., Castañeda, R., Dominguez, J.M.O.: *Ethanol production from the organic fraction obtained after thermal pretreatment of municipal solid waste*. Appl. Biochem. Biotechnol. 161, 423-431 (2010)

- [51] Lissens, G., Klinke, H., Verstraete, W., Ahring, B., Thomsen, A.B.: *Wet oxidation treatment of organic household waste enriched with wheat straw for simultaneous saccharification and fermentation into ethanol*. Environ. Technol. 25, 647-655 (2004)
- [52] Yan, S., Chen, X., Wu, J., Wang, P., Ye, J., Yao, J.: *Enzymatical hydrolysis of food waste and ethanol production from the hydrolysate*. Renew. Energ. 36, 1259-1265 (2011)
- [53] Yan, S., Wang, P., Zhai, Z., Yao, J.: *Fuel ethanol production from concentrated food waste hydrolysates in immobilized cell reactors by Saccharomyces cerevisiae H058*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 86, 731-738 (2010)
- [54] Yan, S., Chen, X., Wu, J., Wang, P.: *Ethanol production from concentrated food waste hydrolysates with yeast cells immobilized on corn stalk*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 94, 829-838 (2012)
- [55] Walker, K., Vadlani, P., Madl, R., Ugorowski, P., Hohn, K.L., *Ethanol fermentation from food processing waste*. Environ. Prog. Sus. Energ. doi: 10.1002/ep.11700 (2012)
- [56] Cekmecelioglu, D., Uncu, O.N.: *Kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of pretreated kitchen wastes for enhancing bioethanol production*. Waste Manage. 33, 735-739 (2013)
- [57] Li, K., Zhang, K., Andresen, J.M.: *Production of fermentable sugars from enzymatic hydrolysis of pretreated municipal solid waste after autoclave process*. Fuel, 92, 84-88 (2012)
- [58] Li, A., Antizar-Ladislao, B., Khraisheh, M.: *Bioconversion of municipal solid waste to glucose for bio-ethanol production*. Bioproc. Biosyst. Eng. 30, 189-196 (2007)
- [59] Nguyen, Q.A., Keller, F.A., Tucker, M.P., Lombard, C.K., Jenkins, B.M., Yomogida, D.E., Tiango, V.M.: *Bioconversion of Mixed Solids Waste to Ethanol*. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol.77-79, (1999)
- [60] Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R., Labavitch, J.M., Wang, D., Teter, S.A., Jenkins, B.M.: *Evaluation of different biomass materials as feedstock for fermentable sugar production*. Appl. Biochem. Biotechnol. 136-140, 423-435 (2007)