



## Διπλωματική Εργασία

# Μελέτη Υδρόλυσης, Σακχαροποίησης και Απολιγνίνωσης Λιγνοκυτταρινούχων Πρώτων Υλών με Χρήση Μυκήτων για Παραγωγή Μεθανίου

Όνοματεπώνυμο σπουδαστή:

- Γιαμαλάκης Δημήτρης (Α.Μ.:05111030)

Επιβλέπων: Γ. Λυμπεράτος, Καθηγητής

Αθήνα, 2016

## Πινάκας Περιεχομένων

Περίληψη.....	4
Abstract.....	4
Σκοπός.....	4
<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>5</b>
1.1 Η αξιοποίηση βιομάζας ως μοχλός ανάπτυξης στη σύγχρονη ελληνική πραγματικότητα .....	6
1.2 Ταξινόμηση κλάδου ανανεώσιμων πηγών ενέργειας στην Ελλάδα.....	8
1.3 Δυναμικό πρώτων υλών για παραγωγή βιοαερίου στην Ελλάδα.....	8
1.4 Διάρθρωση κλάδου στην Ελλάδα .....	12
1.5 Ο κλάδος των βιοκαυσίμων στην Ευρωπαϊκή Ένωση (EU-28).....	13
1.6 Προβλήματα και προοπτικές του κλάδου των βιοκαυσίμων .....	15
<b>2. Θεωρητικό Μέρος.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Βιοκαύσιμα .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.1. Διάκριση βιοκαυσίμων με βάση την γενιά των πρώτων υλών .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.2. Βιοαέριο και αναερόβια χώνευση.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2. Λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα.....</b>	<b>21</b>
2.2.1. Λιγνοκυτταρινούχες πηγές βιομάζας.....	21
2.2.2. Επίδραση της σύστασης της λιγνόκυτταρινούχας βιομάζας στη υδρόλυση και τη βιομετατροπή.....	22
2.2.3. Φυσικές και δομικές ιδιότητες κυτταρίνης.....	24
2.2.4. Φυσικές και δομικές ιδιότητες ημικυτταρίνης.....	25
2.2.5. Φυσικές και δομικές ιδιότητες λιγνίνης .....	26
2.2.6. Ιτιά ( <i>Salix</i> ).....	27
2.2.6.1. Χρήσεις ιτιάς .....	28
<b>2.3. Μέθοδοι προεπεξεργασίας.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.1. Επίδραση στη αποικοδομησιμότητα της λιγνοκυτταρινούχας                 βιομάζας .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.2. Φυσικές μέθοδοι προεπεξεργασίας.....</b>	<b>30</b>
2.3.2.1. Κονιορτοποίηση .....	31
2.3.2.2. Έκρηξη ατμού.....	31
2.3.2.3. Υγρό θερμό νερό .....	32
2.3.2.4. Εξώθηση .....	32
2.3.2.5. Ακτινοβολήση .....	33
<b>2.3.3. Χημικές μέθοδοι προεπεξεργασίας.....</b>	<b>33</b>
2.3.3.1. Αλκαλική προεπεξεργασία .....	34
2.3.3.1.1. Έκρηξη ινών με αμμωνία (AFEX) ή υπερκρίσιμο CO <sub>2</sub> .....	35
2.3.3.2. Όξινη προεπεξεργασία.....	35
2.3.3.3. Καταλυτική έκρηξη ατμού .....	36
2.3.3.4. Υγρή οξείδωση .....	37
2.3.3.5. Οζονόλυση.....	37
2.3.3.6. Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (Organosolv) .....	38
2.3.3.7. Προεπεξεργασία με ιοντικά υγρά.....	38
<b>2.3.4. Βιολογική προεπεξεργασία.....</b>	<b>39</b>
2.3.4.1. Προεπεξεργασία με μύκητες .....	39
2.3.4.2. Προεπεξεργασία με καλλιέργεια μικροοργανισμών .....	40
2.3.4.3. Ενζυμική προεπεξεργασία.....	40
<b>2.3.5. Συνδυαστικές μέθοδοι προεπεξεργασίας .....</b>	<b>40</b>
<b>2.4. Προεπεξεργασία με μύκητες.....</b>	<b>41</b>

2.4.1.	Μύκητες λευκής σήψης.....	41
2.4.2.	Λιγνολυτικά ένζυμα .....	42
2.4.3.	Διεργασία προεπεξεργασίας με μύκητες .....	43
2.4.3.1.	Εμβόλιο.....	43
2.4.3.2.	Υγρασία .....	43
2.4.3.3.	Κοκκομετρία.....	44
2.4.3.4.	Προσθήκη διεγερτών και θρεπτικών συστατικών .....	44
2.4.3.5.	Θερμοκρασία .....	44
2.4.3.6.	Αερισμός.....	44
2.4.3.7.	Απολύμανση .....	45
2.4.3.8.	Χρόνος προεπεξεργασίας .....	45
2.4.4.	Συνδυασμός βιολογικών μεθόδων προεπεξεργασίας με άλλες μεθόδους.....	45
2.4.5.	Προκλήσεις στη βιολογική προεπεξεργασία .....	46
3.	<i>Πειραματικό μέρος</i> .....	48
3.1.	Προετοιμασία εμβολίου .....	48
3.2.	Προετοιμασία στερεής καλλιέργειας.....	49
3.3.	Προσδιορισμός εκχυλίσιμων ουσιών βιομάζας.....	50
3.4.	Προσδιορισμός σακχάρων στο υγρό κλάσμα των προϊόντων προεπεξεργασίας.....	50
3.5.	Προσδιορισμός δομικών υδατανθράκων και λιγνίνης στη βιομάζα.....	51
3.6.	Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων .....	52
3.7.	Προσδιορισμός γλυκόζης.....	54
3.8.	Προσδιορισμός χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD).....	55
3.9.	Προσδιορισμός pH .....	57
3.10.	Προσδιορισμός μυκητιακής ανάπτυξης (γλυκοζαμίνη) .....	57
3.11.	Προσδιορισμός Ολικών Αιωρούμενων Στερεών (TSS) .....	59
3.12.	Προσδιορισμός Πτητικών Αιωρούμενων Στερεών (VSS) .....	60
3.13.	Προσδιορισμός Ολικών, Πτητικών Στερεών (TS, VS) και τέφρας ....	60
3.14.	Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών (Bradford).....	60
3.15.	Ποροσιμετρία υδραργύρου .....	62
3.16.	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης .....	64
3.17.	Δομή πειράματος.....	65
4.	<i>Αποτελέσματα και Συζήτηση Αποτελεσμάτων</i> .....	66
4.1.	Συνθήκες πειράματος.....	66
4.2.	Επιλογή στελεχών.....	68
4.3.	Χαρακτηρισμός υποστρώματος (ιτιάς) .....	71
	Στον Πίνακα 25 δίνονται τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού υποστρώματος. ...	71
4.4.	Αποτελέσματα πειράματος ρυθμού.....	71
4.5.	Μοντελοποίηση αποτελεσμάτων.....	79
4.6.	Αποτελέσματα ποροσιμετρίας.....	83
4.7.	Αποτελέσματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης .....	85
5.	<i>Συμπεράσματα - Προτάσεις</i> .....	88
5.1.	Πρόταση συστήματος προεπεξεργασίας .....	88
6.	<i>Βιβλιογραφία</i> .....	90

**Περίληψη:** Η παρούσα διπλωματική εργασία ερευνά την προεπεξεργασία με μύκητες λευκής σήψης της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας και συγκεκριμένα της ιτιάς με στόχο την βελτίωση της απόδοσης της αναερόβιας χώνευσης για παραγωγή βιοαερίου. Αρχικά, τεκμηριώνεται η ανάγκη για την παρούσα τεχνολογία. Στην συνέχεια, παρουσιάζονται τα δομικά χαρακτηριστικά της βιομάζας που πρέπει να μεταβληθούν και οι παράμετροι της διεργασίας. Ακολουθεί, η διαδικασία της αξιολόγησης στελεχών μυκήτων με σκοπό την εύρεση των καλύτερων. Η πειραματική διαδικασία ολοκληρώθηκε με πειράματα ρυθμού για την εύρεση του τρόπου απολιγνίνωσης του υποστρώματος. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρονική μικροσκοπία (SEM) και ποροσιμετρία για τη διερεύνηση της μεταβολής των θεμελιωδών χαρακτηριστικών της βιομάζας (28 ημερών). Τέλος, έγινε μοντελοποίηση των αποτελεσμάτων της μυκητιακής ανάπτυξης και της απολιγνίνωσης ενώ έγιναν και προτάσεις για πιθανές διατάξεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρούσα διεργασία.

**Abstract:** This diploma thesis deals with the fungal pretreatment of lignocellulosic biomass, namely of willow, using white rot fungi in order to enhance biogas production through anaerobic digestion. First the need for this technology is established. The structural characteristics that cause the recalcitrance of the biomass and the key process parameters are presented. In the sequel, screening experiments are carried out for choosing the best strain and experiments for the determination of the conversion rate follow. Then, scanning electron microscopy (SEM) and porosimetry are used for the samples taken after 30 days in order to investigate the change in the fundamental characteristics of the biomass. Finally, fungal growth and biomass delignification are modelled and alternative process configurations are discussed.

**Key words:** Biogas, Fungal pretreatment, willow, delignification, white rot fungi, anaerobic digestion.

**Σκοπός:** Η διερεύνηση της ικανότητας προεπεξεργασίας (απολιγνίνωσης και υδρόλυσης) υπολειμμάτων ιτιάς από διάφορους μύκητες ώστε να καταστεί δυνατή η χρήση του ξυλώδους υποστρώματος για παραγωγή βιοαερίου. Επιπλέον, η ποσοτικοποίηση των μεταβολών που οφείλονται στη δράση των μυκήτων και η μοντελοποίηση της διεργασίας προεπεξεργασίας (απολιγνίνωσης) από τους μύκητες με το λογισμικό Aquasim.

## 1. Εισαγωγή

Η κλιματική αλλαγή βρίσκεται στην κορυφή της πολιτικής ατζέντας και διαπραγματεύσεις βρίσκονται σε εξέλιξη, προκειμένου να οριστεί ένα διεθνές πολιτικό πλαίσιο για την μετά-Κιότο εποχή, όπου οι αναπτυσσόμενες χώρες αναμένεται να διαδραματίσουν αυξημένο ρόλο στον μετριασμό της κλιματικής αλλαγής. Τα βιοκαύσιμα εμφανίζονται ιδιαίτερα υποσχόμενα για τον εκτοπισμό των ορυκτών καυσίμων τόσο στον τομέα των μεταφορών όσο και για κάποιες μη κινητές ενεργειακές εφαρμογές, γεγονός που βοηθά αποτελεσματικά στην μείωση των εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου. Επιπλέον, τα βιοκαύσιμα μπορούν να παρέχουν πρόσθετα οφέλη σε τοπικό και περιφερειακό επίπεδο προσφέροντας ενεργειακή ασφάλεια, αγροτική ανάπτυξη, αύξηση του τοπικού ΑΕΠ (ακαθάριστο εθνικό προϊόν) και μείωση των εκπεμπόμενων ατμοσφαιρικών ρύπων. Οι βασικοί οδηγοί ανάπτυξης των βιοκαυσίμων περιλαμβάνουν:

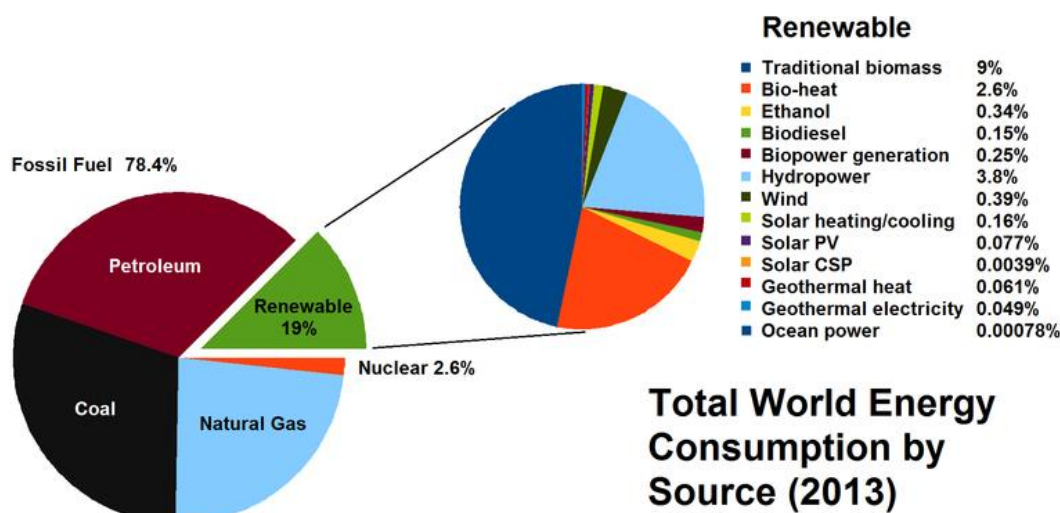
- Συμβολή στην ενεργειακή ασφάλεια με τη διαφοροποίηση του μείγματος ενέργειας, την αύξηση των χωρών που παράγουν ενέργεια και τη δυνατότητα κάλυψης του μεγαλύτερου μέρους της ζήτησης με ίδια μέσα.
- Δυνατότητα συμβολής στην επίτευξη των στόχων μείωσης των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου μέσω της αντικατάστασης των ορυκτών καυσίμων.
- Δυνατότητα συμβολής στην ανάπτυξη, με ιδιαίτερη έμφαση στην αγροτική ανάπτυξη, επανεκτίμηση των αγροτικών περιοχών και βελτίωση πρόσβασης σε σύγχρονες ενεργειακές υπηρεσίες .

Επιπλέον, η αύξηση των τιμών της ενέργειας και ειδικότερα του πετρελαίου τα προηγούμενα χρόνια έχει οδηγήσει στην αναζήτηση εναλλακτικών πηγών ενέργειας, με αποτέλεσμα η βιοενέργεια να εμφανίζεται ιδιαίτερα ανταγωνιστική στις αναπτυσσόμενες χώρες λόγω των ευμενών κλιματικών συνθηκών, των συγκριτικά μεγάλων διαθέσιμων/αχρησιμοποίητων περιοχών γης και του χαμηλού κόστους παραγωγή βιομάζας [1].

Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα τελευταία 150 χρόνια η ανθρώπινη δραστηριότητα έχει προκαλέσει δραματική αύξηση στην εκπομπή μεγάλων ποσοτήτων αερίων γνωστών ως αερίων του θερμοκηπίου, όπως το CH<sub>4</sub>, το SO<sub>2</sub>, τα NO<sub>x</sub> και κυρίως το CO<sub>2</sub>, γεγονός που έχει επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην ατμόσφαιρα. Από το 1970 έως και το 2004, οι εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου σε παγκόσμια κλίμακα σημείωσαν αύξηση κατά 70%. Συγκεκριμένα, υπολογίζεται ότι το CO<sub>2</sub> θα αυξηθεί από 1,9 δις τόνους το 2004 σε 2,7 δις τόνους το 2030. Οι χώρες που συμμετέχουν στον ΟΟΣΑ (Οργανισμός για την Οικονομική Συνεργασία και Ανάπτυξη), συμβάλλουν περισσότερο από το 50% στη συνολική παγκόσμια εκπομπή CO<sub>2</sub>. Ο τομέας των μεταφορών ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό εκπομπών CO<sub>2</sub> και δυστυχώς το ποσοστό αυτό αυξάνεται με το χρόνο. Η υπερθέρμανση του πλανήτη καθώς και φαινόμενα όπως η όξινη βροχή και η αιθαλομίχλη στις αναπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες σχετίζονται άμεσα με τη χρήση του πετρελαίου και των συμβατικών καυσίμων, για την κάλυψη των βασικών ενεργειακών αναγκών τους. Η καύση των συμβατικών καυσίμων ευθύνεται για το 73% της παραγωγής CO<sub>2</sub> το 2005, ενώ από την ατελή καύση τους παράγονται ταυτόχρονα και άλλα βλαβερά για το περιβάλλον και τον άνθρωπο αέρια, όπως CH<sub>4</sub>, SO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O [2].

Συνεπώς, η κλιματική αλλαγή σε συνδυασμό με την σταδιακή εξάντληση των αποθεμάτων των συμβατικών καυσίμων καθιστά αναγκαία τη χρησιμοποίηση εναλλακτικών πηγών ενέργειας και τη χρήση εναλλακτικών καυσίμων. Η

αντικατάσταση των συμβατικών καυσίμων με εναλλακτικά είναι ικανή να μειώσει τις εκπομπές των ρυπογόνων ουσιών που ευθύνονται για την κλιματική αλλαγή και τη μόλυνση του περιβάλλοντος, ικανοποιώντας ταυτόχρονα και τους στόχους για αγροτική ανάπτυξη. Αξίζει να σημειωθεί ότι, το 2013 το 78,4% της παγκόσμιας κατανάλωσης ενέργειας καλύφθηκε από ορυκτά καύσιμα, ενώ από το 19% που καταλαμβάνουν οι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας πάνω από το 50% προέρχεται από της αξιοποίηση της βιομάζας [2].



Εικόνα 1: Μερίδιο των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας στην παγκόσμια κατανάλωση για το 2013 [3].

Παρόλα αυτά, η υποστήριξη της ανάπτυξης των βιοκαυσίμων σε πολλά κράτη ήρθε αντιμέτωπη με ανησυχίες για το περιβάλλον και την επάρκεια των τροφίμων. Η αλλαγή χρήσης των γεωργικών εκτάσεων για ενεργειακές καλλιέργειες έχει θεωρηθεί εν μέρει υπεύθυνη για την παγκόσμια έλλειψη τροφής και έχει συσχετιστεί με τις αυξανόμενες τιμές βασικών προϊόντων διατροφής όπως ο αραβόσιτος και το ρύζι. Είναι αναγκαίο να αναφερθεί ότι, έχουν γίνει ποικίλες μελέτες για τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις των βιοκαυσίμων, στις οποίες προκύπτει ότι εμφανίζονται μεγάλες διαφοροποιήσεις από χώρα σε χώρα και ότι ορισμένες εφοδιαστικές αλυσίδες, παραγωγικές πρακτικές και τεχνολογίες είναι πιο αποδοτικές από άλλες. Οι επιπτώσεις των έργων βιοενέργειας εξαρτώνται, μεταξύ άλλων, από τις φυσικές συνθήκες (κλίμα, έδαφος), την κοινωνικοοικονομική κατάσταση της χώρας (απασχόληση, επίπεδα φτώχειας, οργάνωση διακυβέρνησης) και ειδικά από το σύστημα παραγωγής πρώτων υλών που χρησιμοποιείται (είδος καλλιέργειας, σύστημα γεωργικής διαχείρισης), ενώ η συλλογή δεδομένων κρίνεται ως ιδιαίτερα προβληματική για τα αναπτυσσόμενα κράτη. Επομένως, η ανάγκη εξασφάλισης της επάρκειας τροφίμων παράλληλα με την απεξάρτηση από τα ορυκτά καύσιμα οδήγησε στην ανάγκη ανάπτυξης τεχνολογίας για την αποτελεσματικότερη αξιοποίηση της βιομάζας και κυρίως των αποβλήτων (βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς) [1,2].

### 1.1 Η αξιοποίηση βιομάζας ως μοχλός ανάπτυξης στη σύγχρονη ελληνική πραγματικότητα

Μέσα στην τρέχουσα κοινωνικοοικονομική συγκυρία υπάρχει διάχυτη η εντύπωση ότι πολύ δύσκολα θα μπορέσει να δρατετεύσει η Ελλάδα από το φαύλο κύκλο της ύφεσης, της ανεργίας και της έλλειψης ανταγωνιστικότητας. Ωστόσο, η κατάλληλα σχεδιασμένη και εφαρμοσμένη αξιοποίηση της βιομάζας μπορεί να δώσει μεσο-

μακροπρόθεσμα αξιόπιστες λύσεις και ώθηση προς μία περισσότερο αυτάρκη, βιώσιμη και περιβαλλοντικά υπεύθυνη κατεύθυνση.

Οι βασικοί λόγοι που καθιστούν την αξιοποίηση της βιομάζας μια αξιόπιστη λύση σε εθνικό επίπεδο είναι:

- Αντιμετώπιση της ενεργειακής φτώχειας σε εθνικό και ευρωπαϊκό επίπεδο.

Παρά τη συγκυριακή δραστική μείωση των διεθνών τιμών των ορυκτών καυσίμων, η βιομάζα εξακολουθεί να αποτελεί και να αναγνωρίζεται ως μία οικονομική ενεργειακή λύση για τα νοικοκυριά και τις επιχειρήσεις, παραμένοντας ανεπηρέαστη από γεωπολιτικές σκοπιμότητες. Οι αγορές βιοενέργειας δημιουργούν νέες ευκαιρίες στους επαγγελματίες και στις επιχειρήσεις ώστε να επενδύσουν σε νέα ενεργειακά προϊόντα και υπηρεσίες και να επωφεληθούν από τη συμμετοχή στην πράσινη οικονομία της Ευρώπης.

- Συμβολή στην μελλοντική ενεργειακή σταθερότητα και ασφάλεια.

Ως γνωστόν, οι εισαγωγές ορυκτών καυσίμων (πετρελαίου και φυσικού αερίου), από τις οποίες εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό η Ελλάδα και οι περισσότερες χώρες της Ευρωπαϊκής ένωσης, προέρχονται από πολιτικά και οικονομικά ασταθείς περιοχές του πλανήτη. Η ενεργειακή αξιοποίηση βιομάζας (ηλεκτροπαραγωγή και παραγωγή θερμότητας) από εγχώρια αγροτικά και δασικά υπολείμματα με χρήση κατάλληλων νέων τεχνολογιών, σε συνδυασμό με συνέργειες και με άλλες ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, μπορεί να οδηγήσει σε ανατροπή της συγκεκριμένης κατάστασης.

- Ενεργοποίηση και στήριξη της αγροτικής ανάπτυξης

Η αξιοποίηση των υπολειμμάτων βιομάζας για ενεργειακή χρήση, παραγωγή οργανικών λιπασμάτων και ζωοτροφών περιορίζει την αστυφιλία, δίνει το έρεισμα στον αγροτικό κόσμο της χώρας και τους νέους που στρέφονται σε νέες καλλιέργειες να επιμείνουν στην προσπάθειά τους, παρά τα συσσωρευμένα προβλήματα του κλάδου, και να αποκτήσουν ένα συμπληρωματικό εισόδημα.

- Δημιουργία θέσεων εργασίας (μείωση ενεργείας και ανάπτυξη)

Η αξιοποίηση βιομάζας αποτελεί οδηγό ανάπτυξης και επενδύσεων, έχοντας δημιουργήσει πάνω από 500.000 θέσεις εργασίας σε πανευρωπαϊκό επίπεδο τα τελευταία χρόνια σε όλους τους κρίκους της εφοδιαστικής αλυσίδας από τον πρωτογενή τομέα, μέχρι τη μεταποίηση, τη διακίνηση εμπορευμάτων και την παροχή επιστημονικών και συμβουλευτικών υπηρεσιών.

- Προστασία περιβάλλοντος

Η πολυποίκιλη αξιοποίηση υπολειμμάτων της μεταποιητικής βιομηχανίας τροφίμων και της αγροκτηνοτροφικής παραγωγής και επεξεργασίας ξύλου αποτρέπει την ανεξέλεγκτη απόρριψη ρύπων σε ακατάλληλους αποδέκτες. Παράλληλα, ο περιορισμός εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου χάρη στη σταδιακή και εξορθολογισμένη διεύθυνση της βιοενέργειας στο ενεργειακό μίγμα μετριάξει τις επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής και βελτιώνει το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της εθνικής οικονομίας

Ο αντικειμενικός σκοπός της προεπεξεργασίας λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας που πραγματοποιείται στην παρούσα διπλωματική είναι η παραγωγή βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς και ειδικότερα βιοαερίου. Επομένως, παρακάτω θα γίνει μια συνοπτική παρουσίαση των οικονομικών στοιχείων του κλάδου των βιοκαυσίμων με

ιδιαίτερη έμφαση στον τομέα του βιοαερίου. Τέλος, σημειώνεται ότι τα βιοκαύσιμα εντάσσονται στον ευρύτερο κλάδο των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας [4].

## **1.2 Ταξινόμηση κλάδου ανανεώσιμων πηγών ενέργειας στην Ελλάδα**

Ανανεώσιμες Πηγές Ενέργειας (Α.Π.Ε.) θεωρούνται μόνο οι μη ορυκτές πηγές ενέργειας, όπως η αιολική, η ηλιακή, η κυματική, η παλιρροϊκή, η γεωθερμική και η υδροηλεκτρική ενέργεια καθώς και η βιομάζα και τα προϊόντα της, όπως το βιοαέριο. Βιοενέργεια είναι η ενέργεια που προέρχεται από την καύση βιομάζας ή προϊόντων της (βιοκαύσιμα). Η βιομάζα είναι προϊόν της φωτοσύνθεσης, μέσω της οποίας μετασχηματίζεται η ηλιακή ακτινοβολία σε καύσιμη ύλη (άνθρακα). Η βιοενέργεια δεν επιβαρύνει το περιβάλλον και είναι θεωρητικά ανεξάντλητη, αφού ανανεώνεται μέσω του κύκλου της φύσης (άνθρακα) και υπάρχει σε αφθονία παντού. Το κλειδί για την αξιοποίηση της είναι η ανάπτυξη οικολογικά ωφέλιμων και οικονομικά αποδοτικών τεχνολογιών που θα την κάνει ανταγωνιστική σε σχέση με τα ορυκτά καύσιμα.

Από στατιστική άποψη, η βιοενέργεια δεν αποτελεί αυτόνομο κλάδο αλλά τμήματα υποκλάδων των κλάδων 40 και 24. Σύμφωνα με την κωδικοποίηση NACE (αλλά και τη ΣΤΑΚΟΔ), οι Ανανεώσιμες Πηγές Ενέργειας (ΑΠΕ) υπάγονται στον κλάδο 40 για Παροχή Ηλεκτρικού Ρεύματος, Φυσικού αερίου, Ατμού και ζεστού νερού. Στον υποκλάδο 40.11 (Παραγωγή ηλεκτρικού ρεύματος), υπάγονται η παραγωγή ηλεκτρισμού από βιομάζα, στον 40.21 (Παραγωγή φυσικού αερίου), η παραγωγή βιοαερίου και αερίων που παράγονται στους ΧΥΤΑ και στον 40.30 (Παροχή ατμού και ζεστού νερού), η παραγωγή θερμότητας από βιομάζα. Η παραγωγή βιοκαυσίμων υπάγεται στον υποκλάδο 24.66 (Παραγωγή άλλων χημικών προϊόντων που δεν κατατάσσονται αλλού). Σύμφωνα με το «νόμο για την εισαγωγή των βιοκαυσίμων στην Ελληνική αγορά», η βιομάζα είναι το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα προϊόντων, αποβλήτων και καταλοίπων που προέρχονται από τις γεωργικές, συμπεριλαμβανομένων φυτικών και ζωικών ουσιών, τις δασοκομικές και τις συναφείς βιομηχανικές δραστηριότητες, καθώς και το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα βιομηχανικών αποβλήτων και αστικών λυμάτων και απορριμμάτων [5].

## **1.3 Δυναμικό πρώτων υλών για παραγωγή βιοαερίου στην Ελλάδα**

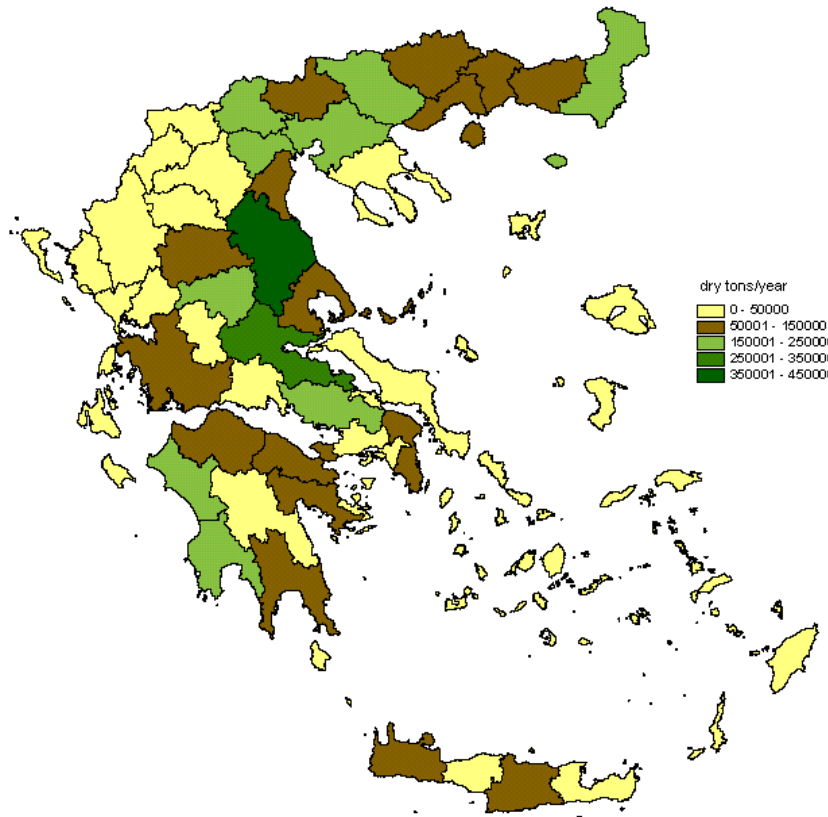
### **Αγροτικά Απόβλητα**

Η σημερινή παραγωγή βιοκαυσίμων στην Ελλάδα στηρίζεται κυρίως στα φυτικά υπολείμματα της αγροτικής παραγωγής και ιδιαίτερα στη βαμβακόπιτα που είναι υποπροϊόν της επεξεργασίας βάμβακος. Άλλα φυτικά υπολείμματα που παρουσιάζουν ενδιαφέρον προέρχονται από την βιομηχανία τροφίμων όπως τις κονσερβοποιίες. Οι περιοχές στις οποίες υπάρχει υψηλή συγκέντρωση παραγωγής φυτικών υπολειμμάτων είναι οι νομοί Λάρισας και Φθιώτιδας, ενώ ικανοποιητική παραγωγή έχει η Κεντρική Μακεδονία, η Δυτική Πελοπόννησος, ο νομός Έβρου, ο νομός Βοιωτίας και ο νομός Καρδίτσας [5].

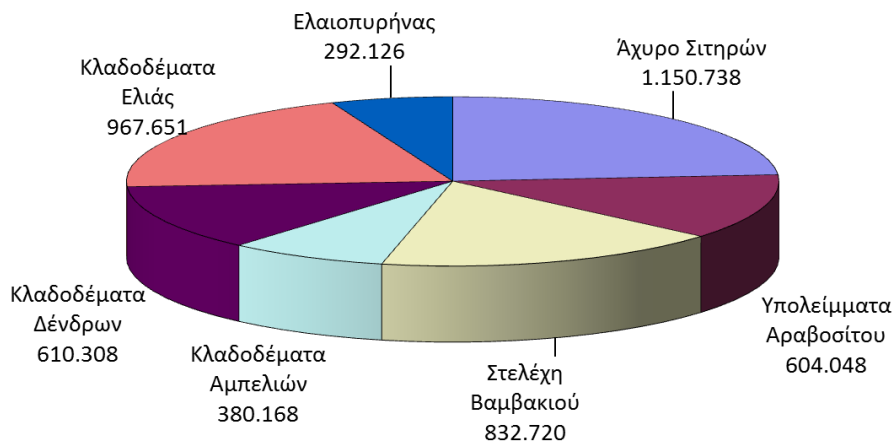
Το θεωρητικό δυναμικό βιομάζας από φυτικά υπολείμματα ανέρχεται σε 8,7 εκ. τόνους ετησίως, ενώ το θεωρητικά διαθέσιμο (δυναμικά εκμεταλλεύσιμο) σε περίπου 5,5 εκ. τόνους ετησίως. Το μεγαλύτερο μέρος της εκμεταλλεύσιμης βιομάζας αφορά υποπροϊόντα αγροτικών καλλιεργειών και ξύλο κλαδεμάτων δένδρων. Σύμφωνα με τα στοιχεία του ΥΠΕΧΩΔΕ για το 2009 η θεωρητικά διαθέσιμη βιομάζα προέρχεται από τις ακόλουθες πηγές: Υπολείμματα βάμβακος ( $832.720 \frac{tn}{yr}$ ), Άχυρο ( $1.150.738$



$tn/yr$ ), Κλαδέματα ελιάς ( $967651 \text{ } tn/yr$ ), Κλαδέματα άλλων δένδρων ( $610.308 \text{ } tn/yr$ ), Υπολείμματα αραβοσίτου ( $604.048 \text{ } tn/yr$ ), Κλαδέματα αμπελιών ( $380.168 \text{ } tn/yr$ ), Ελαιοπυρήνες( $292.126 \text{ } tn/yr$ ). Εκτός των ανωτέρω θεωρούνται εκμεταλλεύσιμα και αρκετά υπολείμματα γεωργικών βιομηχανιών, όπως οι πυρήνες φρούτων, ο φλοιός ρυζιού, το κέλυφος αμυγδάλων, με θεωρητικό δυναμικό περίπου  $700.000 \text{ } tn/yr$  [5].



Εικόνα 2: Τεχνικά διαθέσιμο δυναμικό γεωργικών υπολειμμάτων για το 2009. [6]

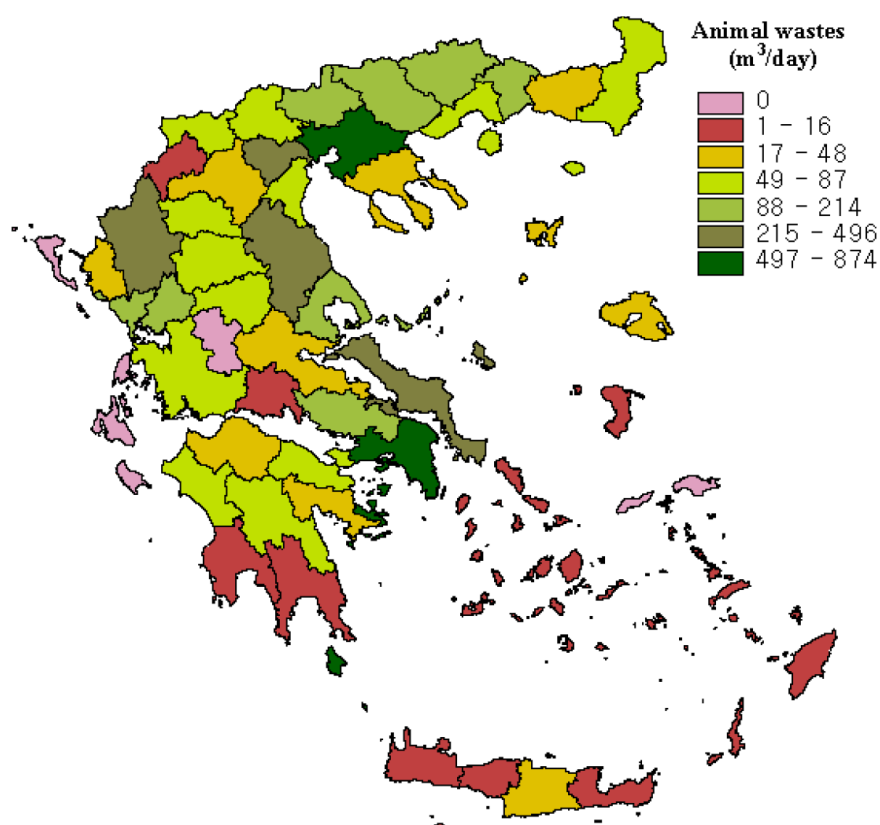


Διάγραμμα 1: Τεχνικά διαθέσιμο δυναμικό των γεωργικών υπολειμμάτων σε τόνους ξηρής μάζας για το 2009. [6]

Από τα παραπάνω δεδομένα είναι εμφανές ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των αποβλήτων είναι λιγνοκυτταρινούχα, γεγονός που καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη αποδοτικής τεχνολογίας για την επεξεργασία των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων προς βιοκαύσιμα. Η παραπάνω παρατήρηση προσβλέπει στην αύξηση της κατά μάζα απόδοσης σε βιοκαύσιμα, καθώς αξιοποιείται μεγαλύτερο κλάσμα της βιομάζας, και στην αποδοτικότερη από περιβαλλοντική και οικονομική σκοπιά αξιοποίηση των αποβλήτων [5].

### Κτηνοτροφικά απόβλητα

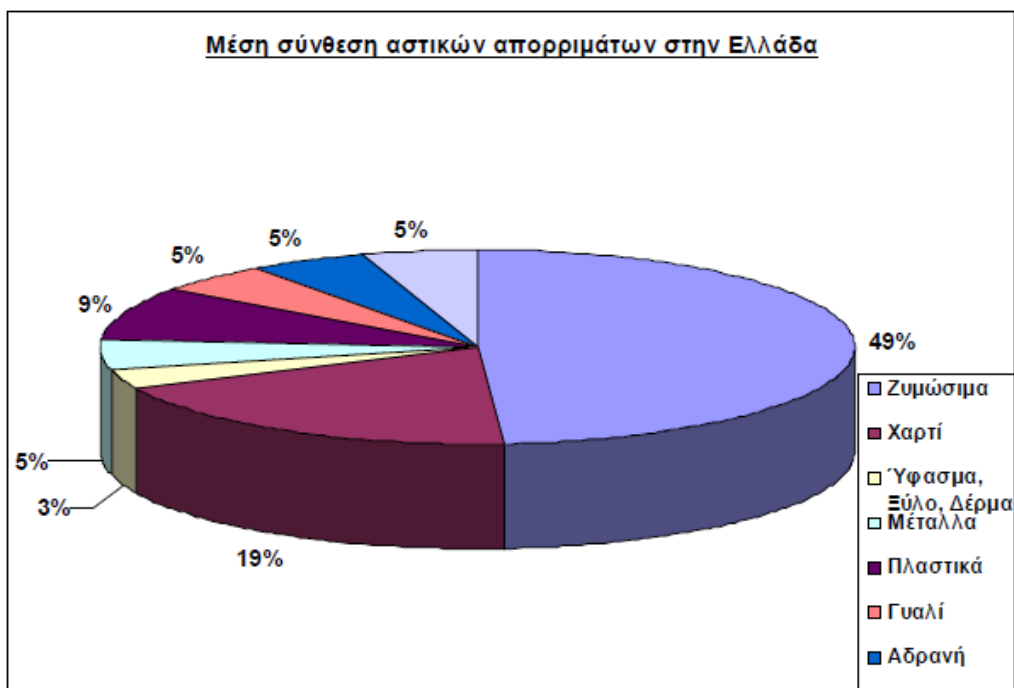
Το βιοαέριο, παράγεται από την αναερόβια χώνευση κτηνοτροφικών κυρίως αποβλήτων (λύματα από χοιροστάσια, βουστάσια), αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων και λυμάτων. Αποτελείται τυπικά κατά 50-65% από μεθάνιο και κατά 35-50% από διοξείδιο του άνθρακα και μπορεί να αξιοποιηθεί ενεργειακά, σε μηχανές εσωτερικής καύσης, σε καυστήρες αερίου ή σε αεροστροβίλους για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας και θερμότητας. Η παραγωγή ζωικών αποβλήτων από κτηνοτροφικές και πτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις στην Ελλάδα, εκτιμάται σε περισσότερα από 5.700 m<sup>3</sup> ημερησίως ή από 2 εκατομμύρια m<sup>3</sup> ετησίως. Σημαντική παραγωγή ζωικών υπολειμμάτων υπάρχει στους νομούς Αττικής και Θεσσαλονίκης ενώ αρκετά υψηλή παραγωγή έχουν οι νομοί Ευβοίας, Ημαθίας και Ιωαννίνων. Οι μονάδες εκτροφής βοοειδών βρίσκονται κυρίως στη Βόρειο Ελλάδα, οι χοιροτροφικές μονάδες είναι διεσπαρμένες σχεδόν σε όλη τη χώρα και οι πτηνοτροφικές κυρίως σε 3 νομούς (Εύβοια, Αττική, Ιωάννινα). Στην Ελλάδα σήμερα υπάρχουν περίπου 33.000 αγελαδοτροφικές μονάδες με 723.000 ζωικό πληθυσμό, 36.000 χοιροτροφικές μονάδες με 970.000 ζωικό πληθυσμό, 100 σφαγεία και ένας σημαντικός αριθμός βιομηχανιών τροφίμων. Παρά το υψηλό αυτό δυναμικό, δεν υπάρχει καμία μονάδα διαχείρισης ζωικών αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων για παραγωγή βιοαερίου [6].



Εικόνα 3: Τεχνικά διαθέσιμο δυναμικό των κτηνοτροφικών αποβλήτων [6]

## Αστικά απόβλητα

Σήμερα στην Ελλάδα παράγονται περισσότεροι από 5 εκατομμύρια τόνοι αστικών στερεών αποβλήτων, που περιλαμβάνουν κυρίως απορρίμματα οικιακής προέλευσης και σε μικρότερο βαθμό άλλων δραστηριοτήτων. Διαχρονικά παρατηρείται σημαντική αύξηση της παραγωγής αστικών αποβλήτων, λόγω της ανόδου του βιοτικού επιπέδου, της αλλαγής των καταναλωτικών συνηθειών, της ανάπτυξης μεγάλων αστικών κέντρων και της αύξησης του τουριστικού ρεύματος προς τη χώρα. Μέχρι πρόσφατα, η κύρια μέθοδος διαχείρισης των αστικών αποβλήτων, ήταν η διάθεση σε χώρους απόθεσης δημοτικών αποβλήτων (ΧΑΔΑ), σε χώρους υγειονομικής ταφής απορριμμάτων (ΧΥΤΑ) ή σε παράνομες χωματερές. Σύμφωνα με τα στοιχεία του ΥΠΕΧΩΔΕ υπάρχουν συνολικά 2.626 χώροι απόθεσης αστικών αποβλήτων, από τους οποίους οι 1.453 είναι ενεργοί και οι 1.173 ανενεργοί. Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται σε όλη τη χώρα οι χώροι υγειονομικής ταφής απορριμμάτων οι οποίοι λόγω των χαρακτηριστικών (σύσταση αποβλήτων, υψηλή υγρασία) και του μεγέθους τους προσφέρονται για παραγωγή βιοαερίου. Σήμερα λειτουργούν ή βρίσκονται σε φάση κατασκευής, περισσότεροι από 100 ΧΥΤΑ που εξυπηρετούν περίπου 1000 ΟΤΑ (Οργανισμοί Τοπικής Αυτοδιοίκησης) σε όλη τη χώρα. Το 2007 λειτουργούσαν επίσης 10 συστήματα εναλλακτικής διαχείρισης απορριμμάτων, μέσω των οποίων ανακυκλώνονταν περισσότερο από 20% των απορριμμάτων (έναντι 6% το 2004). Εκτιμάται ότι στην Ελλάδα το 80% των αστικών αποβλήτων καταλήγουν σε χώρους υγειονομικής ταφής, ποσοστό που είναι από τα υψηλότερα της Ευρώπης. Άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των Ελληνικών αποβλήτων είναι η πολύ υψηλή συμμετοχή των ζυμώσιμων αποβλήτων (49% έναντι 21,3% στην Ευρώπη), η πολύ υψηλή υγρασία (περίπου 60% έναντι 35% στην Ευρώπη) και η χαμηλή θερμοαντική ικανότητα. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν ορισμένες μεθόδους όπως η καύση ή η πυρόλυση ασύμφορες οικονομικά ενώ ευνοούν μεθόδους αναερόβιας ζύμωσης για παραγωγή βιοαερίου [5].



Εικόνα 4: Σύσταση αστικών απορριμμάτων.

## 1.4 Διάρθρωση κλάδου στην Ελλάδα

Η συμμετοχή της βιομάζας και του βιοαερίου στην πρωτογενή παραγωγή ενέργειας από ΑΠΕ είναι εντυπωσιακή αφού καλύπτει το 58,9% του συνόλου. Η βιομάζα αντιπροσωπεύει 967.000 τόνους ισοδύναμου πετρελαίου (Τ.Ι.Π.) και το βιοαέριο 28.000 Τ.Ι.Π.. Το 72,9% της ενέργειας από βιομάζα αφορά οικιακές χρήσεις (θέρμανση, μαγείρεμα), το 25,3% βιομηχανικές χρήσεις, το 1,2 αγροτικές και το 0,5% λοιπές χρήσεις.

Πίνακας 1: Παραγωγή πρωτογενούς ενέργειας από ΑΠΕ

<b>Συνολική Πρωτογενής Παραγωγή Ενέργειας από Α.Π.Ε. (000 Τ.Ι.Π.)</b>				
<b>Ενεργειακό προϊόν</b>	<b>Έτος</b>	<b>%</b>	<b>Έτος</b>	<b>%</b>
	<b>2004</b>		<b>2005</b>	
Ηλιακή	108	6,7%	101	6,0%
Αιολική	96	6,0%	109	6,5%
<b>Σύνολο βιομάζας εκ των οποίων :</b>	<b>921</b>	<b>57,3%</b>	<b>967</b>	<b>57,3%</b>
α. Βιομηχανία	208	13,0%	245	14,5%
β. Οικιακός	705	43,9%	705	41,7%
γ. Αγροτικός	8	0,5%	12	0,7%
δ. Λοιποί	-	-	5	0,3%
Γεωθερμία	1	0,1%	1	0,1%
Βιοαέριο (για παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας)	32	2,0%	28	1,7%
<b>Σύνολο Υδροηλεκτρικών εκ των οποίων :</b>	<b>448</b>	<b>27,9%</b>	<b>483</b>	<b>28,6%</b>
α. Μικρά υδροηλεκτρικά (<10 MW)	26	1,6%	28	1,7%
β. Μεγάλα υδροηλεκτρικά (>10 MW)	376	23,4%	404	23,9%
γ. Αντλησιοταμιευτικά	46	2,9%	51	3,0%
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>1.606</b>	<b>100,0%</b>	<b>1.689</b>	<b>100,0%</b>

Όσον αφορά την παραγωγή ηλεκτρισμού από βιοαέριο, η σημερινή εγκατεστημένη ισχύς είναι περίπου 24 MW και αφορά κυρίως αξιοποίηση του βιοαερίου που παράγεται σε χώρους υγειονομικής ταφής (ΧΥΤΑ) και σε μονάδες βιολογικού καθαρισμού. Το 87% περίπου (20,7MW) της συνολικής εγκατεστημένης ισχύος βρίσκεται στην Αττική, το 10,5% στην Κεντρική Μακεδονία, το 1,5% στη Θεσσαλία και το 0,7% στην Κρήτη. Οι σημαντικότερες μονάδες βρίσκονται στη χωματερή Λιοσίων στην Αττική (με εγκατεστημένη ισχύ 13,8 MW), στους βιολογικούς καθαρισμούς της Ψυττάλειας (7,1 MW) και στους Ταγαράδες Θεσσαλονίκης (2,5 MW) [5]. Τέλος, στον πίνακα 2 παραθέτονται οι βασικοί αριθμοδείκτες του τομέα παραγωγής ενέργειας από βιοαέριο.

**Πίνακας 2: Αριθμοδείκτες ισολογισμών τομέα παραγωγής ενέργειας από βιοαέριο [5]**

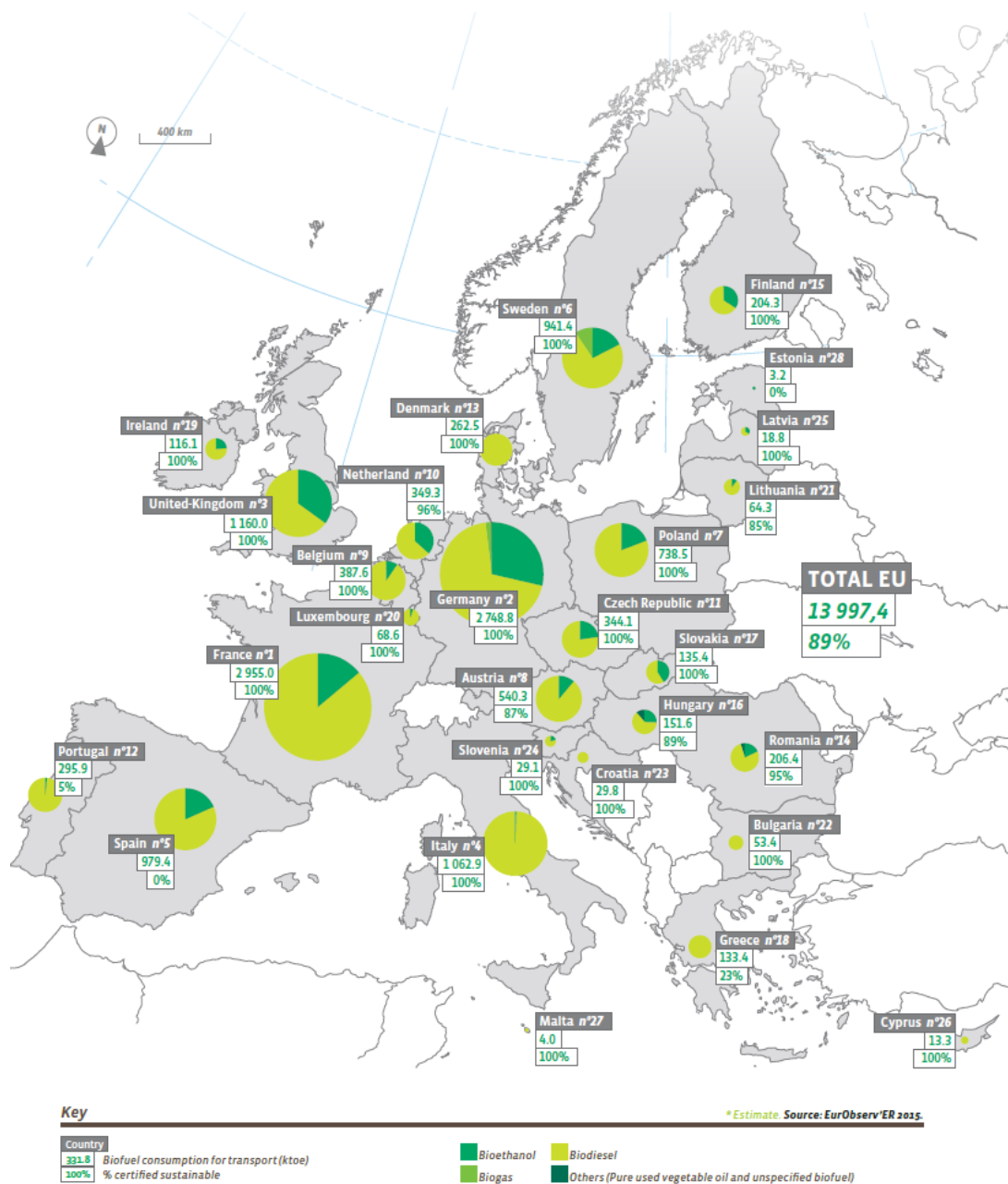
<b>ΑΡΙΘΜΟΔΕΙΚΤΕΣ ΕΝΟΠ. ΙΣΟΛΟΓΙΣΜΟΥ</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>
<b>ΝΟΜΙΣΜΑ: ΕΥΡΩ</b>			
<b>ΔΕΙΓΜΑ ΕΤΑΙΡΙΩΝ:</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>7</b>
ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΙΔΙΟΥ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ(1) %	8,12	10,59	7,01
ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΑΣΧ.ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ(2) %	8,26	10,18	4,10
ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΑΣΧ.ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ(1) %	5,94	8,16	3,51
ΠΕΡΙΘΩΡΙΟ ΜΙΚΤΟΥ ΚΕΡΔΟΥΣ %	23,91	27,10	26,97
ΠΕΡΙΘΩΡΙΟ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΥ ΚΕΡΔΟΥΣ %	8,60	14,52	13,21
ΠΕΡΙΘΩΡΙΟ ΚΑΘΑΡΟΥ ΚΕΡΔΟΥΣ(2) %	29,48	31,48	30,50
ΠΕΡΙΘΩΡΙΟ ΚΑΘΑΡΟΥ ΚΕΡΔΟΥΣ(1) %	21,22	25,25	26,09
ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΚΗ ΤΑΧΥΤΗΣ ΑΠΑΣΧ.ΚΕΦ. Χ	0,28	0,32	0,13
ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΚΗ ΤΑΧΥΤΗΣ ΙΔΙΟΥ ΚΕΦ. Χ	0,38	0,42	0,27
ΑΠΑΣΧΟΛΟΥΜΕΝΑ ΚΕΦΑΛΑΙΑ/ΚΑΘ.ΠΑΓΙΑ :1	1,09	1,06	1,30
ΣΧΕΣΗ ΞΕΝΩΝ ΠΡΟΣ ΙΔΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΑ :1	0,62	0,58	1,36
ΚΑΛΥΨΗ ΧΡΗΜΑΤΟΟΙΚ. ΔΑΠΑΝΩΝ(2) :1	3,57	5,06	6,91
ΣΧΕΣΗ ΙΔΙΩΝ ΠΡΟΣ ΑΠΑΣΧ.ΚΕΦΑΛΑΙΑ :1	0,73	0,77	0,50
ΓΕΝΙΚΗ ΡΕΥΣΤΟΤΗΤΑ Χ	1,42	1,25	2,30
ΑΜΕΣΗ ΡΕΥΣΤΟΤΗΤΑ Χ	1,37	1,17	2,22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΚΙΝΗΣΗΣ - ΣΕ ΧΙΛ. ΕΥΡΩ	1,555	1,035	10,592
ΑΠΑΣΧΟΛ.ΚΕΦΑΛΑΙΟ - ΣΕ ΧΙΛ. ΕΥΡΩ	19,63	19,096	45,635
Μ.Ο.ΠΡΟΘΕΣ.ΕΙΣΠΡΑΞΕΩΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΩΝ ΗΜ.	104,99	120,96	216,81
Μ.Ο.ΠΡΟΘ.ΕΞΟΦΛ.ΠΡΟΜΗΘ.& ΠΙΣΤΩΤΩΝ ΗΜ.	188,66	199,19	380,75
ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΚΗ ΤΑΧΥΤΗΣ ΑΠΟΘΕΜΑΤΩΝ ΗΜ.	0,07	0,00	0,00

(1)=ΠΡΟ ΦΟΡΟΥ ΕΙΣΟΔ.(2)=ΠΡΟ ΤΟΚΩΝ & ΠΡΟ Φ.ΕΙΣ.

## 1.5 Ο κλάδος των βιοκαυσίμων στην Ευρωπαϊκή Ένωση (EU-28)

Τον Μάιο του 2003, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή υιοθέτησε την Οδηγία 2003/30/ΕΚ [ΕΚ, 2003] σχετικά με την προώθηση της χρήσης βιοκαυσίμων ή άλλων ανανεώσιμων καυσίμων για τις μεταφορές. Η Οδηγία προέβλεπε ένα συγκεκριμένο ελάχιστο ποσοστό βιοκαυσίμων να αντικαταστήσει μέρος του ντίζελ και της βενζίνης και τέθηκε σε ισχύ το 2005. Τα προτεινόμενα ποσοστά για τη διείσδυση των βιοκαυσίμων στα καύσιμα μεταφορών ξεκινούν από το 2% για το 2005 και φτάνουν το 5.75% για το 2010. Τα κράτη μέλη όφειλαν να λάβουν μέτρα (με προτεινόμενο εργαλείο τα πολυετή προγράμματα αποφορολόγησης) για την επίτευξη των στόχων αυτών.

Για το βιοντίζελ έχει ήδη θεσπιστεί πρότυπο (EN 14214), και έχει τροποποιηθεί το πρότυπο του Ντίζελ (EN 590) ώστε να επιτρέπει την ανάμιξη μέχρι 5%. Παράλληλα προετοιμάζεται και το πρότυπο της βιοαιθανόλης. Με τα μέτρα που ελήφθησαν στην Ε.Ε. βάσει της οδηγίας 2003/30/ΕΚ σημειώθηκε αλματώδης ανάπτυξη της παραγωγής και χρήσης βιοκαυσίμων, κυρίως του βιοντίζελ στο οποίο η Ε.Ε. κατέχει κυρίαρχη θέση σε παγκόσμιο επίπεδο. Ακόμη, το βιοντίζελ κάλυπτε το 2006 το 71,6% της συνολικής κατανάλωσης βιοκαυσίμων, η βιοαιθανόλη το 16,3% και τα λοιπά (υγροποιημένο βιοαέριο και βιοέλαια) το 12,1%, ενώ η ετήσια αύξηση της κατανάλωσης ήταν 71,4% για το βιοντίζελ, 57,5% για την βιοαιθανόλη και 240% για τα λοιπά [5].



Εικόνα 5: Κατανάλωση βιοκαυσίμων στον τομέα των μεταφορών για την ΕU-28 σε ktOE [7].

Η παραγωγή βιοαερίου στην Ε.Ε. προέρχεται κατά 58,3% από τις χωματερές, κατά 24% από λοιπές πηγές (γεωργία, κτηνοτροφία, κτλ) και κατά 17,8% από βιολογικούς καθαρισμούς. Το 2006 η Γερμανία κατείχε το 36,0% της πρωτογενούς παραγωγής βιοαερίου στην Ε.Ε., το Ηνωμένο Βασίλειο το 31,7%, η Ιταλία το 6,6%, η Ισπανία το 6,3%, η Γαλλία το 4,2%, η Ολλανδία και η Αυστρία το 2,2%, η Δανία και η Πολωνία το 1,8%, το Βέλγιο το 1,6%, η Ελλάδα το 1,3% και οι υπόλοιπες χώρες το 4,4% [5].



Πίνακας 3: Παραγωγή βιοαερίου στην ΕΕ-28 [5]

<b>Πρωτογενής παραγωγή βιοαερίου στην Ε.Ε. το 2005 και 2006, σε ΚΤΟΕ</b>								
	<b>2005</b>				<b>2006</b>			
	Χωμα τερές	Βιολογ ικοί καθαρι σμοί	Λοιπά	Σύνολο	Χωμα τερές	Βιολογ ικοί καθαρι σμοί	Λοιπά	Σύνολο
Γερμανία	573,2	369,8	651,4	1.594,4	573,2	369,8	980,2	1.923,2
Ηνωμένο Βασίλειο	1.421,0	179,0	–	1.600,0	1.515,0	181,0	–	1.696,0
Ιταλία	301,7	0,9	40,9	343,5	310,8	0,9	42,1	353,8
Ισπανία	236,5	56,8	23,6	316,9	251,6	56,8	25,8	334,3
Γαλλία	141,0	75,0	4,0	220,0	148,0	75,0	4,0	227,0
Ολλανδία	38,8	50,8	29,4	119,0	38,8	50,8	29,4	119,0
Αυστρία	8,3	2,7	19,8	30,8	11,2	3,5	103,4	118,1
Δανία	14,2	23,3	54,0	91,5	14,2	23,5	56,5	94,2
Πολωνία	25,1	25,3	0,3	50,7	27,5	65,8	0,5	93,8
Βέλγιο	51,1	25,2	7,7	84,0	50,6	25,0	7,8	83,3
Ελλάδα	20,5	15,5	–	36,0	54,2	15,2	–	69,4
Φινλανδία	50,9	12,7	–	63,5	50,9	12,7	–	63,5
Τσεχία	21,5	31,4	2,9	55,8	25,2	31,1	3,6	59,9
Ιρλανδία	24,9	4,8	4,5	34,3	25,4	4,8	4,5	34,7
Σουηδία	10,1	18,7	0,9	29,8	11,3	21,0	1,0	33,3
Ουγγαρία	0,1	4,6	2,4	7,1	0,1	7,3	3,1	10,5
Πορτογαλία	–	–	10,1	10,1	–	–	9,2	9,2
Λουξεμβούργο	–	–	7,4	7,4	–	–	8,9	8,9
Σλοβενία	6,0	0,7	–	6,8	6,9	1,1	0,4	8,4
Σλοβακία	–	4,3	0,6	4,8	–	4,3	0,6	4,8
Εσθονία	1,3	–	–	1,3	1,3	–	–	1,3
Μάλτα	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Ε.Ε.</b>	<b>2.946,2</b>	<b>901,6</b>	<b>859,8</b>	<b>4.707,6</b>	<b>3.116,2</b>	<b>949,5</b>	<b>1.281,1</b>	<b>5.346,7</b>

### 1.6 Προβλήματα και προοπτικές του κλάδου των βιοκαυσίμων

Τα σημαντικότερα προβλήματα του κλάδου σχετίζονται με την επάρκεια πρώτων υλών, το κόστος παραγωγής και την υπερβάλλουσα παραγωγική δυναμικότητα των μονάδων. Σε τοπικό επίπεδο οι αντιδράσεις περιορίζονται κυρίως στην παραγωγή βιοαερίου, λόγω των οσμών που προκαλούνται από την έκλυση υδροθείου στην ατμόσφαιρα και στην καύση βιομάζας για παραγωγή ενέργειας.

Σε διεθνές επίπεδο εκφράζονται σοβαρές επιφυλάξεις για τις επιπτώσεις της αλόγιστης επέκτασης των ενεργειακών καλλιεργειών όχι μόνο στο περιβάλλον αλλά και στο διατροφικό πρόβλημα. Οι επιφυλάξεις αυτές στηρίζονται στην εμπειρία χωρών όπως η Μαλαισία και η Ινδονησία στις οποίες η ανάπτυξη της παραγωγής φοινικέλαιου προκάλεσε την καταστροφή μεγάλου μέρους των τροπικών δασών με δυσμενείς επιπτώσεις στο φαινόμενο του θερμοκηπίου. Στον διατροφικό τομέα η αύξηση της τιμής του καλαμποκιού, που προκλήθηκε εν μέρει από την αυξημένη ζήτηση της Αμερικανικής βιομηχανίας βιοαιθανόλης, προκάλεσε το 2006 κοινωνικές εκρήξεις στο Μεξικό και σε άλλες χώρες της Λατινικής Αμερικής, στις οποίες το καλαμπόκι αποτελεί τη βάση της διατροφής του πληθυσμού. Πολλοί ειδικοί διεθνών οργανισμών (ΟΗΕ, ΟΟΣΑ), εκφράζουν ήδη τις ανησυχίες τους και συνιστούν στις κυβερνήσεις να αποφύγουν πηγές βιομάζας που χρειάζονται καλά εδάφη, πολύ νερό και πολλά λιπάσματα, ενώ ζητούν και τη δημιουργία διεθνούς πλαισίου για την πιστοποίηση των βιοκαυσίμων ως φιλικών προς το περιβάλλον.

Παρά τους παραπάνω προβληματισμούς, οι βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες προοπτικές της βιοενέργειας θεωρούνται συνολικά θετικές. Οι παράγοντες που συνηγορούν είναι η επιτακτική πλέον αναγκαιότητα για μείωση των αερίων του

θερμοκηπίου, η εξάντληση των αποθεμάτων πετρελαίου, η αντίθεση της πλειοψηφίας των πολιτών στην χρήση πυρηνικής ενέργειας, η ανάγκη αναδιάρθρωσης της αγροτικής παραγωγής. Υπάρχουν επίσης, θετικές επιπτώσεις λόγω του οξυγόνου που περιέχεται στα βιοκαύσιμα και της καλύτερης καύσης που επιτυγχάνεται, της μείωσης της όξινης βροχής, των μικρότερων απαιτήσεων σε λιπάσματα και φυτοφάρμακα, της καλύτερης διαχείρισης νερού και της προστασίας φτωχών εδαφών από τη διάβρωση.

Οι οικονομικές και κοινωνικές προοπτικές από την ανάπτυξη της βιοενέργειας είναι ίσως πολύ πιο ενδιαφέρουσες από τις περιβαλλοντικές. Η προσφορά εναλλακτικών καλλιεργητικών διεξόδων, η αύξηση του αγροτικού εισοδήματος, η ενδυνάμωση του γεωργικού τομέα, η μείωση των περιφερειακών ανισοτήτων, η εξασφάλιση αειφόρου περιφερειακής ανάπτυξης και η μείωση της εξάρτησης της χώρας από το πετρέλαιο αποτελούν ορισμένες από τις συγκεκριμένες προοπτικές.

Οι τεχνολογικές εξελίξεις ευνοούν επίσης την ανάπτυξη του κλάδου διότι αυξάνουν την ανταγωνιστικότητα των βιοκαυσίμων έναντι των υδρογονανθράκων. Η βιοενέργεια θεωρείται ήδη τεχνολογικά ώριμος κλάδος των ΑΠΕ και το κόστος των βιοκαυσίμων τείνει να γίνει ανταγωνιστικό του κόστους πετρελαίου ή άνθρακα. Ακόμα, με την ανάπτυξη και την ωρίμανση των τεχνολογιών παραγωγής βιοκαυσίμων 2<sup>ης</sup> γενιάς που αναμένεται σε μία με δύο δεκαετίες περίπου, το κόστος των βιοκαυσίμων προβλέπεται να γίνει χαμηλότερο από αυτό των συμβατικών καυσίμων.

Τα βιοκαύσιμα 2<sup>ης</sup> γενιάς παράγονται μεταξύ άλλων και με εξαέρωση της βιομάζας, μέθοδος που προσφέρει σημαντική ευελιξία καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ποικίλες πρώτες ύλες για την παρασκευή πολλών διαφορετικών καυσίμων, όπως βιοντίζελ, βιομεθανόλη, βιοαέριο και DME (διμεθυλεστέρας). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη ποσότητα διαθέσιμων πρώτων υλών, περιορισμό της εποχικότητας λειτουργίας των εργοστασίων, δυνατότητα ανάμιξης βιοκαυσίμων σε μεγαλύτερα ποσοστά ή και χρήση αποκλειστικά βιοκαυσίμων και τέλος μεγαλύτερη συμβολή στη μείωση των αερίων θερμοκηπίου. Στα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς, μια από τις πιο υποσχόμενες τεχνολογίες είναι η λιγνοκυτταρινική διεργασία, κατά την οποία γίνεται προεπεξεργασία και βιολογική επεξεργασία της βιομάζας, η συγκεκριμένη τεχνολογία έχει ήδη προχωρήσει αρκετά και λειτουργούν τρία εργοστάσια, στη Σουηδία, την Ισπανία και τη Δανία. Τέλος, οι τεχνολογίες για τη μετατροπή της βιομάζας προς υγρά βιοκαύσιμα (BtL) που περιλαμβάνουν το βιοντίζελ Fischer-Tropsch και το βιο-DME (διμεθυλαιθέρας), σημειώνουν επίσης σημαντική πρόοδο και έχουν ήδη κατασκευαστεί πιλοτικές μονάδες παραγωγής στη Γερμανία και τη Σουηδία.

Το συνθετικό αέριο (SNG) που θα παράγεται τόσο από ορυκτές όσο και από ανανεώσιμες πηγές (συνθετικό βιοαέριο) παρουσιάζει επίσης σημαντικά πλεονεκτήματα για τη μείωση του CO<sub>2</sub> και θα αποτελέσει αποφασιστικό βήμα για την ανάπτυξη και άλλων αερίων καυσίμων νέας γενιάς. Επίσης, οι νέες τεχνολογίες βιοκαυσίμου θα ήταν δυνατόν να αποτελέσουν ενδιάμεσο βήμα για την παραγωγή υδρογόνου από ανανεώσιμες πηγές, ωστόσο απαιτούνται σημαντικές επενδύσεις σε έρευνα – ανάπτυξη στους τομείς των κινητήρων και των κυψελών υδρογόνου.

Οι τομείς στους οποίους παρατηρείται επιχειρηματική δραστηριότητα είναι κυρίως η παραγωγή βιοκαυσίμων και σε μικρότερο βαθμό η παραγωγή θερμότητας ή ηλεκτρισμού από βιομάζα ή βιοαέριο. Η βιομάζα χρησιμοποιείται κυρίως για παραγωγή ατμού ή θερμότητας σε βιομηχανικές μονάδες και δεν υπάρχει σαν



αυτόνομη δραστηριότητα. Ακόμα, σημειώνεται ότι το βιοαέριο προέρχεται κυρίως από τη ζύμωση οργανικών απορριμμάτων στις μεγάλες χωματερές ή τους βιολογικούς καθαρισμούς και χρησιμοποιείται για παραγωγή ηλεκτρισμού.

Τέλος, οι προοπτικές ανάπτυξης του κλάδου κρίνονται συνολικά θετικά λόγω της ευνοϊκών συνθηκών που δημιουργούν η περιβαλλοντική και η αγροτική πολιτική της Ευρωπαϊκής Ένωσης, της ύπαρξης ικανοποιητικής εγχώριας αγοράς και της αύξησης της ανταγωνιστικότητας των βιοκαυσίμων έναντι του πετρελαίου καθώς οι τιμές του τελευταίου παρουσιάζουν ανοδική τάση. Θετική επίδραση αναμένεται να έχει τις επόμενες δεκαετίες η ανάπτυξη τεχνολογιών 2<sup>ης</sup> γενιάς που θα επιτρέψει την παραγωγή νέων βιοκαυσίμων σε μεγαλύτερες ποσότητες, με χαμηλότερο κόστος και χωρίς τους περιορισμούς των σημερινών βιοκαυσίμων, όσον αφορά την ανάμιξη τους με συμβατικά καύσιμα [5].

## **2. Θεωρητικό Μέρος**

### **2.1. Βιοκαύσιμα**

Ο όρος βιοκαύσιμα αναφέρεται σε αέρια, υγρά και στερεά καύσιμα που παράγονται κυρίως από βιομάζα. Ωστόσο, τα βιοκαύσιμα δεν αποτελούν καινούργιο είδος καυσίμων διότι τόσο τα στερεά βιοκαύσιμα χρησιμοποιούνταν από την αρχαιότητα για θέρμανση όσο και τα υγρά βιοκαύσιμα, όπως η αιθανόλη, χρησιμοποιούνταν, πριν την ανακάλυψη των μηχανών εσωτερικής καύσης τον 19ο αιώνα, για χρήση σε λάμπες φωτισμού και στο μαγείρεμα[8].

Τα βιοκαύσιμα περιλαμβάνουν τη βιοαιθανόλη, τη βιομεθανόλη, τα φυτικά έλαια, το βιοντίζελ, το βιοαέριο, το βιουδρογόνο, το βιοαέριο σύνθεσης, τα βιοέλαια, τη βιόπισσα και τα υγρά κλάσματα Fischer-Tropsch (τα προερχόμενα από το βιοαέριο σύνθεσης). Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί ότι τα υγρά βιοκαύσιμα κατατάσσονται σε βιοαλκοόλες, φυτικά έλαια και βιοντίζελ/βιοέλαια, ενώ, συνηθίζεται να εμπορεύονται σε μείγματα βιοκαυσίμων και κλασμάτων ορυκτών καυσίμων λόγω της κείμενης νομοθεσίας για τον τομέα των μεταφορών [9].

#### **2.1.1. Διάκριση βιοκαυσίμων με βάση την γενιά των πρώτων υλών**

Τα βιοκαύσιμα διακρίνονται κυρίως με βάση την προέλευση των πρώτων υλών σε πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς.

Τα πρώτης γενιάς βιοκαύσιμα περιλαμβάνουν την αιθανόλη και το βιοντίζελ που είναι άμεσα συνδεδεμένα με βιομάζα που χαρακτηρίζεται ως βρώσιμη. Η αιθανόλη, γενικώς, παράγεται από ζύμωση εξοζών (κυρίως γλυκόζης) χρησιμοποιώντας κλασσικά ή γενετικά τροποποιημένα στελέχη ζυμομυκήτων όπως ο *Saccharomyces cerevisiae*. Οι πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης πρώτης γενιάς είναι κυρίως ζαχαροκάλαμο και καλαμπόκι ενώ χρησιμοποιείται σε μικρότερο βαθμό και ο ορός γάλακτος, τα απόβλητα πατάτας και τα σακχαρότευτλα. Όσον αφορά το βιοντίζελ, η παραγωγική του διαδικασία διαφέρει πολύ από αυτή της βιοαιθανόλης καθώς θεωρείται ως χημική διεργασία, αφού στηρίζεται στην αντίδραση μετεστεροποίησης των λιπαρών οξέων με μεθανόλη. Οι πρώτες ύλες για την παραγωγή του βιοντίζελ εμφανίζουν μεγαλύτερη ποικιλία συγκριτικά με τις πρώτες ύλες της βιοαιθανόλης και προέρχονται από ελαιώδη φυτά και σπόρους, όπως η σόγια, η ελαιοκράμβη και ο φοίνικας.

Τα δεύτερης γενιάς βιοκαύσιμα ορίζονται ως τα καύσιμα που παράγονται από ένα μεγάλο πλήθος διαφορετικών πρώτων υλών και προέρχονται κυρίως, αλλά χωρίς να υπάρχει περιορισμός, από μη βρώσιμη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα. Η βιομάζα που χρησιμοποιείται για τα δεύτερης γενιάς βιοκαύσιμα συνήθως διακρίνεται σε 3 κατηγορίες: ομογενή όπως τα πριονίδια λευκού ξύλου, ημιομογενή όπως τα αγροτικά και δασικά υπολείμματα και ανομοιογενή (χαμηλής αξίας πρώτες ύλες) όπως το αστικά στερεά απόβλητα. Ακόμη αξίζει να σημειωθεί ότι, η τιμή της βιομάζας είναι σημαντικά μικρότερη από την τιμή της βιομάζας που χρησιμοποιείται για τα πρώτης γενιάς βιοκαύσιμα, γεγονός που αποτελεί κίνητρο για την μετατόπιση προς τα δεύτερης γενιάς βιοκαύσιμα. Ωστόσο, η μετατροπή της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας είναι πιο πολύπλοκη και η παραγωγή εξαρτάται από νέες τεχνολογίες. Ακόμη, η παραγωγή βιοκαυσίμων είναι στενά συνδεδεμένη με την αγορά αγαθών με αποτέλεσμα να απαιτείται η διατήρηση του κόστους μετατροπής σε χαμηλά επίπεδα ώστε να εξασφαλίζεται η κερδοφορία. Επιπλέον, πολλοί τύποι βιομάζας προσφέρουν την δυνατότητα παραγωγής μιας ποικιλίας προϊόντων ενισχύοντας την ιδέα του

βιοδιωλιστηρίου. Τέλος, οι διεργασίες μετατροπής για την παραγωγή δευτερογενών βιοκαυσίμων ακολουθούν δυο διαφορετικές προσεγγίσεις, οι οποίες αναφέρονται ως θερμοχημικό και βιολογικό μονοπάτι.

Ως τρίτης γενιάς βιοκαύσιμα, σύμφωνα με τον πιο αποδεκτό ορισμό τους, χαρακτηρίζονται τα καύσιμα που παράγονται από βιομάζα φυκών, η οποία έχει πολύ υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τα κλασσικά λιγνοκυτταρινούχα υλικά. Η παραγωγή βιοκαυσίμων από φύκη συνήθως στηρίζεται στο λιπιδιακό περιεχόμενο των μικροοργανισμών. Συνήθως, προτιμώνται είδη όπως το *Chlorella* λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια (60 – 70%) και της υψηλής παραγωγικότητας τους (7,4 g/L/d). Υπάρχουν πολλές προκλήσεις που συνδέονται με την βιομάζα φυκών, κάποιες γεωγραφικές και κάποιες τεχνικές. Τυπικά, η παραγωγή βιομάζας σε ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης είναι 1 έως 7  $\frac{g}{L \cdot d}$ . Αυτό συνεπάγεται τη απαίτηση μεγάλων όγκων νερού για την βιομηχανική κλίμακα, παρουσιάζοντας ένα σημαντικό πρόβλημα για χώρες όπως ο Καναδάς όπου η θερμοκρασία είναι κάτω από 0°C κατά τη διάρκεια ενός μεγάλου μέρους του έτους. Η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό είναι επίσης ένα πρόβλημα καθώς θα πρέπει να εξαχθούν τα λιπίδια από την βιομάζα φυκών, με αποτέλεσμα να απαιτείται αφυδάτωση, είτε μέσω φυγοκέντρησης είτε μέσω διήθησης πριν από την εκχύλιση λιπιδίων. Τα λιπίδια που προέρχονται από φύκη μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία μέσω μετεστεροποίησης (βιοντίζελ) ή μπορούν να υποστούν υδρογονόλυση για να παραχθεί καύσιμο τύπου κηροζίνης κατάλληλο για χρήση στα καύσιμα αεροπορίας [8-9].

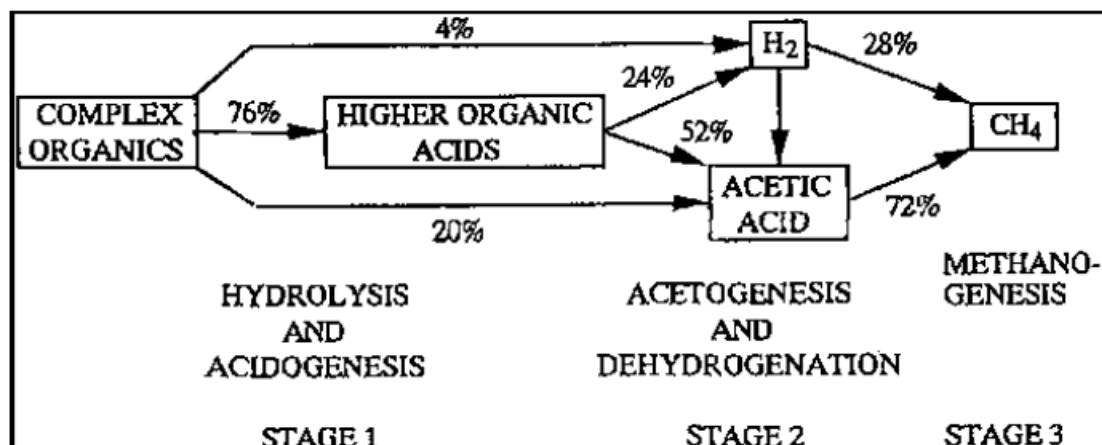
### 2.1.2. Βιοαέριο και αναερόβια χώνευση

Η αναερόβια χώνευση είναι ένα ευέλικτο βιοτεχνολογικό μέσο μετατροπής σχεδόν όλων των τύπων πολυμερικών υλικών σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Αυτό επιτυγχάνεται ως αποτέλεσμα της διαδοχικών βιοχημικών διασπάσεων των πολυμερών σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα, που πραγματοποιείται σε ένα περιβάλλον στο οποίο οι μικροβιακές καλλιέργειες, που περιλαμβάνουν μικροοργανισμούς ζύμωσης (οξεογόνα βακτήρια), υδρογονοπαραγωγούς μικροοργανισμούς, οξικοπαραγωγούς μικροοργανισμούς (οξικογόνα βακτήρια) και μικροοργανισμούς που παράγουν μεθάνιο (μεθανογόνα βακτήρια), μπορούν αρμονικά να αναπτυχθούν και να παράγουν τα τελικά προϊόντα [10].

Αξίζει να σημειωθεί ότι, η αναερόβια ζύμωση προσφέρει ένα αποτελεσματικό μέσο μείωσης της ρύπανσης, ανώτερο εκείνης που επιτυγχάνεται μέσω των συμβατικών αερόβιων διεργασιών. Ακόμη, χαρακτηρίζεται ως αποδοτικότερη της θερμοχημικής μετατροπής των λιγνοκυτταρινούχων πρώτων υλών λόγω του υψηλού λόγου εισροής/εκροής (28/1) ενέργειας που εμφανίζει [10-11].

Η αναερόβια χώνευση είναι η συνέπεια μιας σειράς μεταβολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών. Μια περιγραφή των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην αναερόβια χώνευση γίνεται με βάση την ανάλυση των βακτηρίων που απομονώθηκαν από χωνευτές ιλύος καθαρισμού λυμάτων και από τη προστόμαχο μερικών ζώων. Η πρώτη ομάδα των μικροοργανισμών εκκρίνει ένζυμα που υδρολύουν πολυμερή υλικά προς μονομερή όπως γλυκόζη και αμινοξέα, τα οποία μεταγενέστερα μετατρέπονται σε υψηλότερα πτητικά λιπαρά οξέα, H<sub>2</sub> και οξικό οξύ (Εικόνα 6). Σε δεύτερο στάδιο, το υδρογόνο που παράγουν οξικογενή βακτήρια μετατρέπει τα πτητικά λιπαρά οξέα, όπως το προπιονικό και το βουτυρικό

οξύ σε H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, και οξικό οξύ. Τέλος, η τρίτη ομάδα των μεθανογόνων βακτηρίων μετατρέπουν H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, και οξικό οξύ, σε CH<sub>4</sub> και CO<sub>2</sub> [10].



Εικόνα 6: Βασικά στάδια αναερόβιας χώνευσης [10].

Το ενεργειακό περιεχόμενο του βιοαερίου από την αναερόβια χώνευση είναι χημικά δεσμευμένο στο μεθάνιο. Οι ιδιότητες και η σύσταση του βιοαερίου ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο και τη δομή της πρώτης ύλης, το σύστημα της μονάδας, την θερμοκρασία, τον χρόνο παραμονής και άλλους παράγοντες. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται κάποιες από τις μέσες τιμές σύστασης του βιοαερίου με βάση την βιβλιογραφία. Θεωρώντας ότι το βιοαέριο περιέχει 50% μεθάνιο, η μέση θερμογόνος δύναμη του είναι περίπου  $21 \text{ MJ}/\text{Nm}^3$ , η μέση πυκνότητα  $1,22 \text{ kg}/\text{Nm}^3$  και η μάζα του είναι παρόμοια με αυτή του αέρα ( $d_{\text{air}}=1,29 \text{ kg}/\text{Nm}^3$ ). [12]

Πίνακας 4: Τυπική σύσταση βιοαερίου [12].

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

Η βιοχημική σύσταση των διαφορετικών τύπων πρώτης ύλης ποικίλλει και είναι καθοριστική για τη θεωρητική παραγωγή του μεθανίου, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Θεωρητική παραγωγή βιοαερίου [12].

Υπόστρωμα	Λίτρα αερίου / kg TS*	CH <sub>4</sub> [%]	CO <sub>2</sub> [%]
Ακατέργαστη πρωτεΐνη	700	70 με 71	29 με 30
Ακατέργαστο λίπος	1.200 με 1.250	67 με 68	32 με 33
Υδατάνθρακες	790 με 800	50	50

Τέλος, η παραγωγή μεθανίου των διαφόρων υποστρωμάτων της αναερόβιας χώνευσης εξαρτάται από το περιεχόμενό τους σε πρωτεΐνες, λίπη, και υδατάνθρακες, όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.

**Πίνακας 6: Παραγωγή μεθανίου από διάφορες πρώτες ύλες (ΦΠΥ: φρέσκια πρώτη ύλη) [12].**

Πρώτη ύλη	Παραγωγή μεθανίου [%]	Παραγωγή βιοαερίου [m <sup>3</sup> /tΦΠΥ*]
Υδαρής κοπριά βοοειδών	60	25
Υδαρής κοπριά χοίρων	65	28
Υπολείμματα αποστακτηρίων με διαλυτά	61	40
Στερεή κοπριά βοοειδών	60	45
Στερεή κοπριά χοίρων	60	60
Στερεή κοπριά πουλερικών	60	80
Τεύτλα	53	88
Οργανικά απόβλητα	61	100
Γλυκό σόργο	54	108
Τεύτλα κτηνοτροφής	51	111
Σωρός χλόης	54	172
Σωρός καλαμποκιού	52	202

## 2.2. Λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα

### 2.2.1. Λιγνοκυτταρινούχες πηγές βιομάζας

Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα αποτελεί την μεγαλύτερη ανανεώσιμη πηγή βιοκαυσίμων στον κόσμο. Υπάρχουν αρκετές ομάδες πρώτων υλών οι οποίες διαφοροποιούνται με βάση την προέλευση, τη σύσταση και τη δομή τους. Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά προέρχονται κυρίως από δασικά και αγροτικά απόβλητα. Τα δασικά απόβλητα περιλαμβάνουν κυρίως ξυλώδη βιομάζα δηλαδή βιομάζα σκληρών και μαλακών ξύλων ακολουθούμενη από πριονίδι, κλαδέματα και υπολείμματα λέπτυνσης φλοιού. Όσον αφορά τα αγροτικά υπολείμματα αυτά περιλαμβάνουν απόβλητα από εδάδιμες ή μη εδάδιμες καλλιέργειες και χλόη. Ακόμα, τα δημοτικά και τα βιομηχανικά απόβλητα μπορούν να αξιοποιηθούν ως πιθανές πηγές λιγνοκυτταρινούχων υλικών, όπως για παράδειγμα τα απόβλητα τροφίμων και η ιλύς της χαρτοποιίας.

#### Ξυλώδεις πρώτες ύλες από δάση

Τα ξυλώδη υλικά διακρίνονται σε δυο ευρείες κατηγορίες, στα μαλακά και στα σκληρά ξύλα. Τα μαλακά ξύλα προέρχονται κυρίως από κωνοφόρα και γυμνόσπερμα δένδρα ενώ, σε αντίθεση με τα σκληρά ξύλα, εμφανίζουν μικρότερη πυκνότητα και αναπτύσσονται ταχύτερα. Τα γυμνόσπερμα περιλαμβάνουν κυρίως αιθαλή είδη, όπως το πεύκο, το κέδρο, το έλατο και ο κυπαρίσσι. Τα σκληρά ξύλα είναι αγγειόσπερμα δένδρα και κυρίως φυλλοβόλα. Τα σκληρά δένδρα βρίσκονται κυρίως στο βόρειο ημισφαίριο και περιλαμβάνουν δένδρα όπως λεύκες, ιτιές και βελανιδιές. Αξίζει να σημειωθεί ότι αντίθετα με τη γεωργική βιομάζα, η ξυλώδης βιομάζα προσφέρει ευέλικτη συγκομιδή με αποτέλεσμα να αποφεύγονται οι μεγάλες λανθάνουσες περιόδους αποθήκευσης. Ακόμη, αναφέρεται ότι η ξυλώδης βιομάζα περιέχει περισσότερη λιγνίνη σε σχέση με τα γεωργικά υπολείμματα και λιγότερη τέφρα (κοντά στο 0). Η παραπάνω διαπίστωση, σε συνδυασμό με την υψηλότερη πυκνότητα, καθιστά τις ξυλώδεις πρώτες ύλες ελκυστικές ως προς την δυνατότητα αξιοποίησης τους ακόμα και αν απαιτείται μεταφορά. Τέλος, είναι αναγκαίο να αναφερθεί ότι υπάρχει η δυνατότητα αξιοποίησης των αποβλήτων δασοκομίας όπως είναι τα πριονίδια και τα κλαδιά από τα νεκρά δένδρα.

### Γεωργικά υπολείμματα, ποώδη φυτά και αστικά στερεά απόβλητα

Τα γεωργικά απόβλητα αποτελούνται από μια μεγάλη ποικιλία ειδών και κυρίως προέρχονται από στελέχη καλαμποκιού, ρυζιού, σιταριού και ζαχαροκάλαμου βαγάσσης. Πρέπει να σημειωθεί ότι, τα υπολείμματα καλλιεργειών περιέχουν περισσότερες ημικυτταρίνες σε σχέση με τη ξυλώδη βιομάζα, ενώ παράλληλα βοηθούν στην μείωση της εξάρτησης από την ξυλώδη βιομάζα και τον περιορισμό της αποψίλωσης των δένδρων. Εκτός από κυτταρινικές πρώτες ύλες, τα στερεά απόβλητα αστικών και βιομηχανικών διεργασιών αποτελούν επίσης μια δυνητική πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Η χρήση τους περιορίζει τα περιβαλλοντικά προβλήματα που συνδέονται με την διάθεση των οικιακών απορριμμάτων και την διαχείριση των υποπροϊόντων μεταποίησης τροφίμων και πολτών [13].

**Πίνακας 7: Σύσταση διαφόρων πρώτων υλών λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας**

Raw material	Hemicelluloses	Cellulose	Lignin	Others (i.e., ash)
Agricultural residues	25–50	37–50	5–15	12–16
Hardwood	25–40	45–47	20–25	0.80
Softwood	25–29	40–45	30–60	0.50
Grasses	35–50	25–40	— <sup>a</sup>	—
Waste papers from chemical pulps	12–20	50–70	6–10	—
Newspaper	25–40	40–55	18–30	—
Switch grass	30–35	40–45	12	—

#### **2.2.2. Επίδραση της σύστασης της λιγνόκυτταρινούχας βιομάζας στη υδρόλυση και τη βιομετατροπή.**

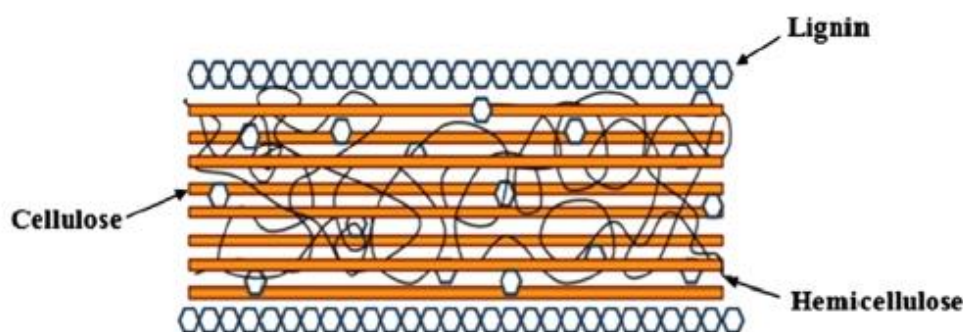
Η σύσταση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας είναι κρίσιμης σημασίας για την απόδοση και την αποτελεσματικότητα των σταδίων προεπεξεργασίας και βιομετατροπής. Η χρήση της κυτταρίνης στην φυσική της μορφή όχι μόνο απαιτεί τη χρήση μεγάλων ποσοτήτων ενζύμων, αλλά οδηγεί και σε μικρή απόδοση της αποδόμησης της κυτταρίνης (μικρότερη από 20%). Έτσι, κρίνεται αναγκαία η επιβολή δομικών τροποποιήσεων στα λιγνοκυτταρινούχα υλικά (προεπεξεργασία) και απαιτείται να επιλεγθεί η κατάλληλη τεχνολογία προεπεξεργασίας για τη οποία είναι απαραίτητη η αναγνώριση των κύριων διαρθρωτικών περιοριστικών παραγόντων των λιγνοκυτταρινών. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν την ειδική επιφάνεια, τον δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης (CPI), τον βαθμό πολυμερισμού (DP), τον βαθμό επικάλυψης της κυτταρίνης από την ημικυτταρίνη και το λιγνινικό και ακετικό περιεχόμενο [14].

- Βαθμός πολυμερισμού κυτταρίνης (DP) και Κρυσταλλικότητα κυτταρίνης (CPI)

Ο βαθμός πολυμερισμού και η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες για τον προσδιορισμό του βαθμού υδρόλυσης των κυτταρινικών υποστρωμάτων, αλλά τα δεδομένα από διάφορες ανεξάρτητες έρευνες δείχνουν ότι οι συγκεκριμένες παράμετροι δεν μπορούν να εξηγήσουν από μόνες τους τη δυστροπία των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων. Στην πραγματικότητα, έχουν ταυτοποιηθεί κυτταρινάσες που είναι ικανές να υδρολύσουν την κρυσταλλική κυτταρίνη μέσω συγκεκριμένων συμπλόκων. Σε ορισμένες μελέτες, λιγνοκυτταρινούχων υλικών με υψηλή κρυσταλλικότητα κυτταρίνης και εφαρμογή μηχανικής προεπεξεργασίας διαπιστώθηκε ότι οποιαδήποτε μείωση της κρυσταλλικότητας συνοδεύτηκε από μια αλλοίωση άλλων χαρακτηριστικών του υποστρώματος, όπως η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων ή η αύξηση της διαθέσιμης επιφάνειας.

Ακόμα, έχει παρατηρηθεί ότι η προεπεξεργασία των λιγνοκυτταρινούχων υλικών βελτιώνει την υδρολυσιμότητα τους, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις αυξάνει παράλληλα την κρυσταλλικότητα. Το γεγονός αυτό θεωρείται ότι οφείλεται σε απομάκρυνση ή μείωση της πιο εύκολα διαθέσιμης άμορφης κυτταρίνης, μετά από έντονες μεθόδους προεπεξεργασίας, όπως η έκρηξη ατμού. Αντίθετα, με μεθόδους προεπεξεργασίας σε υψηλό pH έχει βρεθεί ότι μειώνεται η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης, με μικρότερες τροποποιήσεις της υπόλοιπης δομής.

Ο βαθμός πολυμερισμού είναι στενά συνδεδεμένος με την κρυσταλλικότητα. Αν και ο ρόλος του μήκους της αλυσίδας γλυκάνης δεν είναι οριστικά γνωστός, πιστεύεται ότι επηρεάζει υδρόλυση της κυτταρίνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι, ο αποπολυμερισμός εξαρτάται από τη φύση του κυτταρινικού υποστρώματος. Στην ενζυμική υδρόλυση, οι ενδογλουκανάσες κόβουν σε εσωτερικές θέσεις των αλυσίδων κυτταρίνης και κατά προτίμηση στις λιγότερο διατεταγμένες, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο βαθμός πολυμερισμού των κυτταρινικών υποστρωμάτων. Ωστόσο, ανεξάρτητα από τη δράση των ενζύμων ο βαθμός πολυμερισμού σταθεροποιείται γεγονός που συσχετίζεται με την αυξημένη δυστροπία της υπολειμματικής κρυσταλλικής κυτταρίνης. Τέλος, αναφέρεται ότι η απομάκρυνση της ημικυτταρίνης οδηγεί σε πιο σημαντική μείωση του μεγέθους της κυτταρικής αλυσίδας σε σχέση με την απομάκρυνση της λιγνίνης, όπως μπορεί να γίνει κατανοητό και από την παρακάτω εικόνα λόγω της σχετικής θέσης των συστατικών στο υπόστρωμα.



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση δομής λιγνοκυτταρινούχου υλικού. [14]

- Διαθέσιμη επιφάνεια υποστρώματος (όγκος πόρων)

Η προσβασιμότητα του υποστρώματος στα κυτταρινολυτικά ενζύμα είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία της υδρόλυσης. Έτσι, ένας από τους κύριους στόχους της προεπεξεργασίας είναι να αυξηθεί η εσωτερική επιφάνεια.

- Λιγνινικός φραγμός (περιεχόμενο και κατανομή)

Η παρουσία της λιγνίνης και ημικυτταρίνης παρεμποδίζει την πρόσβαση των κυτταρινασών, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης. Η λιγνίνη περιορίζει το ρυθμό της ενζυμικής υδρόλυσης δρώντας ως φυσικό εμπόδιο, εμποδίζοντας το εύπεπτο τμήμα του υποστρώματος για να υδρολυθεί. Εκτός αυτού, φαίνεται ότι η λιγνίνη παρεμποδίζει την υδρόλυση της κυτταρίνης μέσω μη παραγωγικών συμπλόκων που σχηματίζει με τα κυτταρινολυτικά ένζυμα. Διαφορετικές στρατηγικές έχουν μελετηθεί πρόσφατα για να ξεπεραστεί η μη παραγωγική προσρόφηση κυτταρινάσης στη λιγνίνη όπως αλκαλική εκχύλιση και προσθήκη πρωτεΐνης (όπως BSA) ή άλλων πρόσθετων (όπως πολυ-αιθυλενογλυκόλη και Tween 20). Παρόλο που η χρήση των προσθέτων εισάγει ένα επιπλέον κόστος για



την παραγωγική διαδικασία, σημαντικά οφέλη μπορούν να επιτευχθούν με τη βελτίωση της ενζυμικής υδρόλυσης.

Η μη αποδοτική συμπλοκοποίηση των ενζύμων στη λιγνίνη επηρεάζεται, επίσης, από τη φύση του υποστρώματος. Ακόμη, οι διάφορες κυτταρινάσες διαφέρουν ως προς την αναστολή τους από τη λιγνίνη σε σχέση με τις ξυλανάσες και τις γλυκοσιδάσες που επηρεάζονται λιγότερο. Ορισμένες μέθοδοι προεπεξεργασίας έχει αναφερθεί ότι παράγουν διαφορετικά αποτελέσματα όπως την τήξη και την μετεγκατάσταση της λιγνίνης (έκρηξη ατμού) ή την διάσπαση των δεσμών λιγνίνης-υδατανθράκων (AFEX). Πρέπει να σημειωθεί ότι η χημεία της λιγνίνης είναι ένα σημαντικό ερευνητικό πεδίο στην σημερινή εποχή. Τέλος, επειδή η λιγνίνη αποτελεί κύριο συστατικό των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων ερευνάται η αξιοποίηση της για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

- Ημικυτταρινικό περιεχόμενο

Η απομάκρυνση της ημικυτταρίνης αυξάνει το μέσο μέγεθος πόρων του υποστρώματος και επομένως αυξάνει την προσβασιμότητα και την πιθανότητα της κυτταρίνης να υδρολυθεί. Από την άλλη πλευρά, τα ημικυτταρινικά σάκχαρα μπορούν να ανακτηθούν καθώς αποτελούν πηγή άνθρακα για τις κατάντη διεργασίες. Ωστόσο, ο βαθμός ακετυλίωσης στην ημικυτταρίνη είναι ένας σημαντικός παράγοντας, διότι η λιγνίνη και οι ακετυλομάδες συνδέονται στη ημικυτταρινική μήτρα και μπορεί να παρεμποδίσουν τη διάσπαση των πολυσακχαριτών.

- Κοκκομετρία πρώτων υλών

Αναφέρεται στην βιβλιογραφία ότι η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων αυξάνει την ειδική επιφάνεια και εν συνεχεία την προσβασιμότητα της κυτταρίνης από τα ένζυμα. Επομένως, φαίνεται η υψηλή σημασία της επιλογής σωστής κοκκομετρίας στις διεργασίες ελάττωσης μεγέθους.

- Πορώδες

Μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι το μέγεθος των πόρων του υποστρώματος σε σχέση με το μέγεθος των ενζύμων είναι ο κύριος περιοριστικός παράγοντας για την ενζυμική υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας καθώς, οι κυτταρινάσες μπορεί να παγιδευτούν στους πόρους αν η εσωτερική περιοχή είναι πολύ μεγαλύτερη από την εξωτερική περιοχή, γεγονός που συμβαίνει στα περισσότερα λιγνοκυτταρινούχα υλικά. Επομένως, η αύξηση του πορώδους σε διεργασίες προεπεξεργασίας μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την υδρόλυση.

- Πάχος κυτταρινικού τοιχώματος (τραχύτητα)

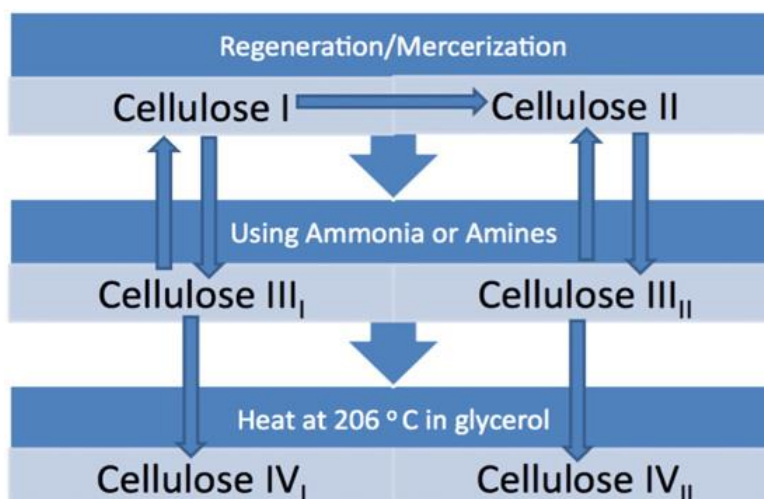
Το κηρώδες φράγμα που περιλαμβάνει το εξωτερικό στρώμα του γρασίδιου και του φλοιού των δένδρων παρεμποδίζει τη διείσδυση των ενζύμων, ενώ λόγω του υδροφοβικού τους χαρακτήρα ακόμα και αλεσμένα τα συγκεκριμένα υποστρώματα μπορεί να παρουσιάζουν δυσκολία στην αποτελεσματική διαβροχή τους [15].

### **2.2.3. Φυσικές και δομικές ιδιότητες κυτταρίνης**

Η κυτταρίνη είναι ένα υψηλής σταθερότητας πολυμερές που προσφέρει δομική στήριξη στα φυτά. Όταν υφίσταται ως διακλαδισμένο ομοπολυμερές, η κυτταρίνη αποτελείται ομάδες β-D-γλυκοκυρανόζης, συνδεδεμένες με β-(1,4)-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Ο βαθμός πολυμερισμού των κυτταρινικών αλυσίδων στην φύση κυμαίνεται από 10.000 μονάδες γλυκοκυρανόζης στο ξύλο έως 15.000 στο φυσικό βαμβάκι. Η επαναλαμβανόμενη μονάδα της κυτταρινικής αλυσίδας είναι ο δυσσακχαρίτης της



κελλοβιόζης σε αντίθεση με την γλυκόζη που εμφανίζεται στα γλυκανικά πολυμερή. Οι κυτταρινικές αλυσίδες (20-300) ομαδοποιούνται προς τον σχηματισμό μικροϊνών, που συνδέονται προς τον σχηματισμό των κυτταρινικών ινών. Οι κυτταρινικές μικροΐνες είναι κυρίως ανεξάρτητες, ωστόσο η υπερδομή της κυτταρίνης οφείλεται στην παρουσία ομοιοπολικών δεσμών, δεσμών υδρογόνου και δυνάμεων Van der Waals. Οι δεσμοί υδρογόνου στις κυτταρινικές μικροΐνες προσδίδουν αντοχή στην αλυσίδα, αλλά οι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου προσδίδουν τάξη (κρυσταλλικότητα) στην δομή της κυτταρίνης. Ακόμη, η κυτταρίνη είναι αδιάλυτη στο νερό και στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Τέλος, ο χημικός τύπος της κυτταρίνης είναι  $(C_6H_{10}O_5)_n$  και η δομή φαίνεται στην εικόνα 9 [14,16-17].



Εικόνα 8: Αλληλομετατροπή της μορφολογίας της κυτταρίνης. Η κυτταρίνη I είναι η φυσική κυτταρίνη. Η κυτταρίνη II προκύπτει από την κυτταρίνη I με διαλυτοποίηση σε διαλύτη ακολουθούμενη από καταβύθιση σε νερό (αναγέννηση). Η κυτταρίνη III<sub>I</sub> και III<sub>II</sub> προκύπτει από επεξεργασία των παραπάνω κυτταρινών με αμμωνία ή αμίνες. Η κυτταρίνη IV<sub>I</sub> και IV<sub>II</sub> προκύπτει από τις III<sub>I</sub> και III<sub>II</sub> με θέρμανση στους 206°C σε γλυκερόλη [16].

#### 2.2.4. Φυσικές και δομικές ιδιότητες ημικυτταρίνης

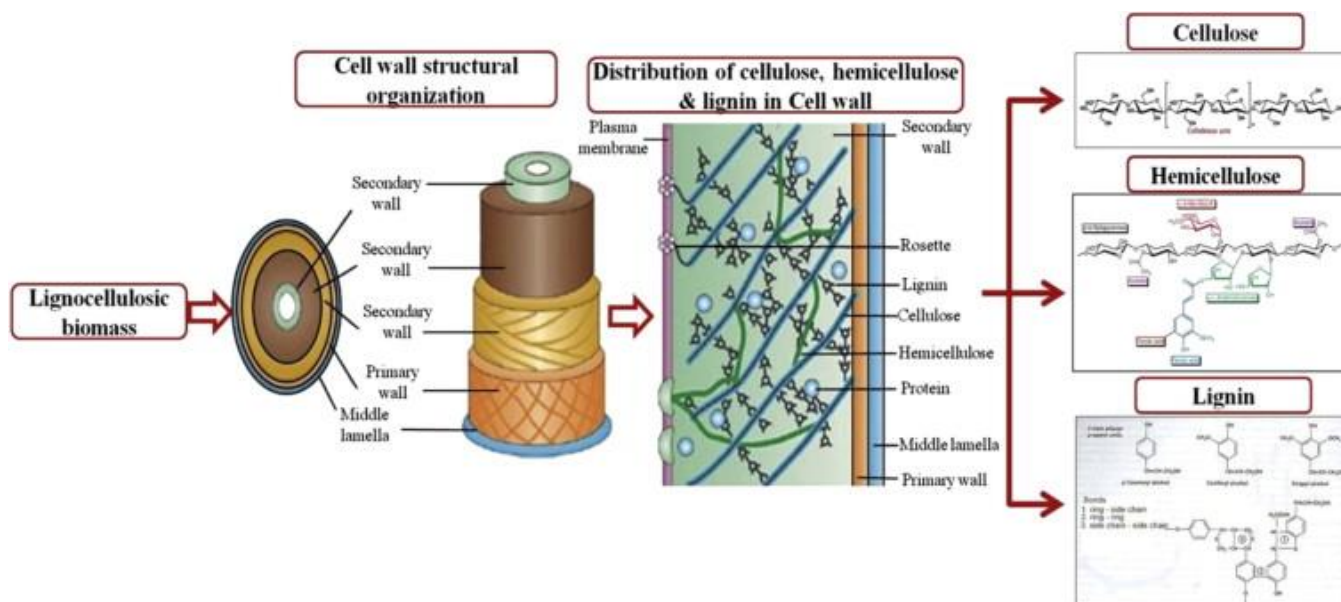
Η ημικυτταρίνη είναι το δεύτερο πιο διαδεδομένο ετερογενές πολυμερές στη φύση και κυρίως αποτελείται από γλυκοξυλάνη, γλυκομαννάνη και ίχνη από άλλους πολυσακχαρίτες. Η χλόη και τα άχυρα αποτελούνται κυρίως από αριβινάνη, γαλακτάνη και γλυκάνη ενώ η μαννάνη είναι συστατικό στα μαλακά και σκληρά ξύλα<sup>1</sup>. Η δομή τους περιλαμβάνει πολυμερή σάκχαρων όπως ξυλάνες, μαννάνες και γλουκάνες στην ραχοκοκαλιά του μορίου συνδεδεμένα με β-1,4 δεσμούς, με τα δύο πρώτα σάκχαρα να είναι πιο συχνά εμφανιζόμενα. Οι γαλακτάνες, αραβινάνες και αραβινογαλακτάνες συμμετέχουν στον σχηματισμό των ημικυτταρινών αλλά όχι στην ραχοκοκαλιά τους. Στα σκληρά ξύλα, η γλυκοξυλάνη (Ο-ακέτυ-4-Ο-μεθύλ-γλυκερινό-β-D-ξυλάνη)) είναι το κυριότερο συστατικό και οι ξυλοπυρανόζες αποτελούν την κύρια αλυσίδα του πολυμερούς ενώ συνδέονται με β-1,4 δεσμούς. Ακόμα, το μέσο μοριακό βάρος των ημικυτταρινών είναι μικρότερο από 30000Da. Η ημικυτταρίνη συνδέεται στενά με μη ομοιοπολικούς δεσμούς στην επιφάνεια των μικροϊνών της κυτταρίνης, ενώ η ημικυτταρίνη πιστεύεται ότι αποτελεί ενδιάμεσο στην βιοσύνθεση της κυτταρίνης [14,17].

<sup>1</sup> Οι παραπάνω πολυσακχαρίτες προέρχονται από μονομερή εξοζών (β-D-μαννόζη, β-D-γλυκόζη, α-D-γαλακτόζη), πεντοζών (β-D-ξυλόζη, α-L-αραβινόζη) και ουρονικών οξέων (α-D-γλουκορονικό, α-D-4-Ο-μεθυλ-γαλακτουρονικό και , α-D-γαλακτουρονικό οξύ)

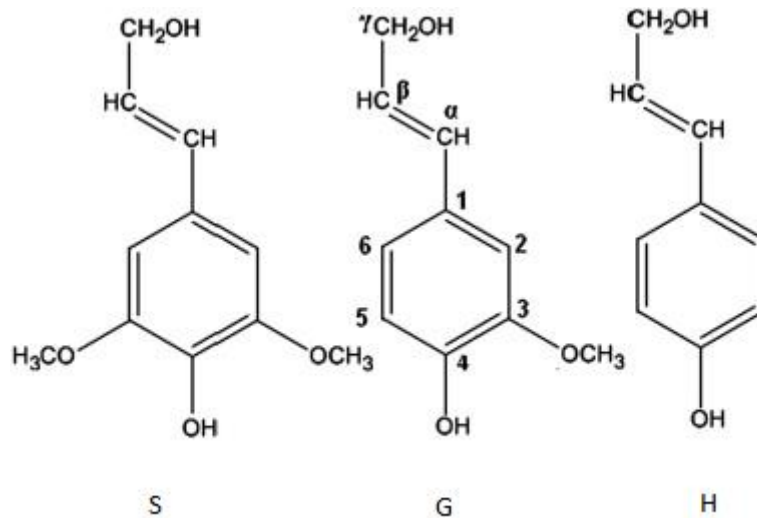
Η διαλυτότητα των διαφόρων συστατικών της ημικυτταρίνης είναι σε φθίνουσα σειρά: μαννόζη, ξυλόζη, γλυκόζη, αραβινόζη και γαλακτόζη. Αύξηση της διαλυτότητας παρατηρείται με αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ η διαλυτότητα των υψηλότερου μοριακού βάρους πολυμερών δεν μπορεί να προβλεφθεί, λόγω των άγνωστων σημείων τήξης. Η διαλυτοποίηση των ενώσεων της ημικυτταρίνης στο νερό ξεκινά γύρω στους 180°C σε ουδέτερες συνθήκες. Τέλος, ο χημικός τύπος της κυτταρίνης είναι  $(C_5H_8O_4)_n$  και η δομή φαίνεται στην εικόνα 9 [14,18].

### 2.2.5. Φυσικές και δομικές ιδιότητες λιγνίνης

Η λιγνίνη είναι μετά την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη ένα από τα πιο διαδεδομένα πολυμερή της φύσης και είναι παρούσα στα κυτταρικά τοιχώματα. Είναι ένα άμορφο πολυμερές με κύριο σκοπό την δομική στήριξη του φυτού, την αδιαπερατότητα του και την αντίσταση έναντι σε μικροβιακές επιθέσεις και οξειδωτικά στρες. Η λιγνίνη αποτελείται από σύνθετα και μεγάλου μοριακού βάρους πολυμερή φαινυλοπροπανίου, μεθοξυομάδων και μη υδατανθρακικών πολυφαινολικών ομάδων, τα όποια συνδέουν τα κυτταρικά τοιχώματα μεταξύ τους. Ενώ ως μονομερή της λιγνίνης (monolignol: 2 μεθοξυλικές ομάδες) μπορούν να θεωρηθούν οι μονάδες συργγύλης (S), οι γουαϊακυλικές μονάδες (G) και οι μονάδες p-hydroxyphenylpropane (H) (βλ. εικόνα 10). Τα Φαινυλοπροπάνια (3 άνθρακες συνδεδεμένοι στο βενζολικό δακτύλιο) είναι τα κύρια συστατικά της λιγνίνης και συμβολίζονται με 0, I, II ανάλογα με τα μεθοξύλια που συνδέονται με τους δακτυλίους προσδίδοντας τις ειδικές δομές I, II και III. Αυτές οι ομάδες εξαρτώνται από το φυτό που προέρχεται η λιγνίνη. Οπότε, η Δομή I υπάρχει στη χλόη και η δομή II συναντάται στο ξύλο κωνοφόρων δένδρων, ενώ η δομή III υπάρχει στο ξύλο φυλλοβόλων δένδρων. Λιγνίνη, όπως ακριβώς και η ημικυτταρίνη, αρχίζει να διαλύεται στο νερό γύρω στους 180°C υπό ουδέτερες συνθήκες. Τέλος, ο χημικός τύπος της κυτταρίνης είναι  $[C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0.9-1.7}]_n$  και η δομή φαίνεται στην εικόνα 9 [14,17-18].



Εικόνα 9: Διαγραμματική απεικόνιση λιγνοκυτταρινούχου υλικού και των δομικών του συστατικών [17].



Εικόνα 10: Μονομερή λιγνίνης

### 2.2.6. Ιτιά (*Salix*)

Το γένος *Salix* εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία και αντιπροσωπεύει περισσότερα από 300 είδη, ενώ αναπτύσσεται με τη μορφή δένδρων, θάμνων ή μικρών θάμνων με πρηνή στελέχη. Το γένος *Salix* (ιτιά) είναι στενά συνδεδεμένο με το γένος *Populus* (Λεύκα). Η ιτιά ανήκει στην οικογένεια *Salicaceae*, διαίρεση *Magnoliophyta*, τάξη *Magnoliopsida*, υποκατηγορία *Dilleniidae*. Η ταξινόμηση του γένους της ιτιάς είναι περίπλοκη και υπό έρευνα καθώς τα παραδοσιακά μορφολογικά χαρακτηριστικά δεν είναι αξιόπιστα, λόγω των υβριδισμών που εμφανίζονται. Ακόμα, η σύσταση της ιτιάς κυμαίνεται σε 63,7 – 64,5%w/w ολοκυτταρίνη (κυτταρίνη + ημικυτταρίνη) και 24,5-28,8%w/w λιγνίνη επί ξηρής βάσης [19 – 20].

Οι ιτιές έχουν μια ευρεία κατανομή και είναι σε θέση να ακμάζουν σε ένα μεγάλο εύρος ζωνών κλίματος και τύπων εδαφών. Οι ιτιές είναι αυτόχθονες σε αρκτικές, εύκρατες, υποτροπικές και τροπικές περιοχές της Ευρώπης, της Ασίας και της Βόρειας Αμερικής, ενώ υπάρχει ένα είδος, *S. humboldtiana*, προέρχεται από τη Νότια Αμερική. Οι ιτιές καλλιεργούνται εκτενώς σε όλο το κόσμο για παραγωγή βιοενέργειας ή για χρήση σε εφαρμογές περιβαλλοντικής μηχανικής, συμπεριλαμβανομένων των εύκρατων περιοχών της Ευρώπης, της Βόρειας Αμερικής, της Ρωσίας, της Κίνας, της Νέας Ζηλανδίας, και τμημάτων της Νότιας Αμερικής. Στη Βόρεια Αμερική, οι ιτιές έχουν δοκιμαστεί ως καλλιέργεια για παραγωγή βιοενέργειας σε όλες τις Ηνωμένες Πολιτείες, ενώ στην Ευρώπη, υπάρχει εκτεταμένη καλλιέργεια των θάμνων ιτιάς στη Σουηδία, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Ιρλανδία και η Δανία [19].

Τα είδη *Salix* είναι πολυετή και φυλλοβόλα, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών του χώματος μετά την πτώση των φύλλων. Σε γενικές γραμμές, η ιτιά είναι πρωτοπόρο είδος που είναι ανθεκτικό στη σκιά και ικανό να αποικίσει σε διαταραγμένα εδάφη. Ακόμα, τείνουν να αυξάνονται και να ανταγωνίζονται άλλα είδη σε παραποτάμιες περιοχές και υγροτόπους. Ωστόσο για βιοενέργεια χρησιμοποιούνται κυρίως θάμνοι, καθώς αναπτύσσονται καλά χωρίς άρδευση σε ορεινές και καλά στραγγιζόμενες περιοχές, που λαμβάνουν τακτικές βροχοπτώσεις καθ' όλη την καλλιεργητική περίοδο. Τα μεμονωμένα φυτά έχουν σχετικά μικρή διάρκεια ζωής για τα είδη σκληρού ξύλου συνήθως 40 – 60 χρόνια, αλλά δεδομένου ότι τα περισσότερα είδη είναι ικανά αγενούς πολλαπλασιασμού, ένας συγκεκριμένος γονότυπος μπορεί θεωρητικά να εξακολουθήσει να υπάρχει σε έναν

πληθυσμό για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Στις χρησιμοποιούμενες για βιοενέργεια φυτείες, όταν η βιομάζα συλλέγεται με κοπή των μίσχων κοντά το έδαφος (η διαδικασία της πρεμνοφυούς διαχείρισης), τα φυτά παράγουν νέους, ενεργούς βλαστούς από το υπάρχον ριζικό σύστημα. Η παραπάνω διαδικασία επιτρέπει επαναλαμβανόμενες συγκομιδές για πολλά χρόνια, συνήθως κάθε τρία έως τέσσερα, για τουλάχιστον είκοσι χρόνια πριν απαιτηθεί αναφύτευση [19].

#### 2.2.6.1. Χρήσεις ιτιάς

Οι επιλογές προϊόντων για τις οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ιτιά ως πρώτη ύλη είναι πολλές και κυμαίνονται από ξυλεία σε καπλαμά, κόντρα πλακέ, έως σε σύνθετα προϊόντα με βάση το ξύλο, όπως επίσης και πολτό ή χαρτί ως προϊόντα με βάση τις ίνες του ξύλου. Επιπλέον, πολλά χημικά και ενέργεια μπορούν να παραχθούν από την ιτιά. Τα προϊόντα ξύλου, με τη σειρά τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλές κατασκευαστικές εφαρμογές, καθώς και για δοχεία και έπιπλα. Επιπλέον, αρκετές νέες τεχνολογίες και νέες εναλλακτικές χρήσεις για ξύλο ιτιάς έχουν προταθεί σε παγκόσμιο επίπεδο, ειδικά στο τομέα της μηχανικής σύνθετου ξύλου. Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της χρήσης ιτιάς για διάφορα προϊόντα είναι ταχύς ρυθμός ανάπτυξης, επιτρέποντας την παραγωγή σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (μικρός χρόνος ανάμεσα στις συγκομιδές) [21].

### 2.3. Μέθοδοι προεπεξεργασίας

#### 2.3.1. Επίδραση στη αποικοδομησιμότητα της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας

Οι ιδιότητες της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας την καθιστούν ανθεκτική στη βιοαποικοδόμηση. Λόγω της πολυπλοκότητας και της μεταβλητότητας της χημικής δομής της βιομάζας, η βέλτιστη μέθοδος και συνθήκες προεπεξεργασίας εξαρτώνται από τους τύπους της λιγνοκυτταρίνης που περιέχονται στην εκάστοτε βιομάζα. Αρκετές διαρθρωτικές και χημικές ιδιότητες βρέθηκαν να έχουν επιπτώσεις στην βιοδιασπασιμότητα της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας, συμπεριλαμβανομένης της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης, της διαθέσιμης επιφάνειας, του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης, του περιεχομένου λιγνίνης και ημικυτταρίνης, και του βαθμού ακετυλίωσης της ημικυτταρίνης, όπως αναλυτικότερα αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 2.2.2. Ο στόχος της προεπεξεργασίας είναι να μεταβάλει τις παραπάνω ιδιότητες με σκοπό τη βελτίωση της βιοαποικοδομησιμότητας της βιομάζας από ένζυμα και μικροοργανισμούς. Οι επιδράσεις των διαφορετικών τεχνικών προεπεξεργασίας στη χημική σύνθεση και στα φυσικά χαρακτηριστικά της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας συνοψίζονται στον Πίνακα 8. Γενικά, οι διαφορετικές μέθοδοι προεπεξεργασίας επηρεάζουν αυτές τις ιδιότητες σε διαφορετικό βαθμό. Ωστόσο, όλες οι μέθοδοι έχουν σημαντική επίδραση στην προσβάσιμη περιοχή της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα αποτελέσματα των μεθόδων προεπεξεργασίας στις ιδιότητες της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας για την ενζυμική υδρόλυση με σκοπό την παραγωγή βιοαιθανόλης εξετάζονται διεξοδικά στη βιβλιογραφία. Ωστόσο, μόνο λίγες μελέτες έχουν αναφερθεί σχετικά με την συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής βιοαερίου και των ιδιοτήτων της βιομάζας, με τις περισσότερες να εστιάζουν στην κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης και στο περιεχόμενο της λιγνίνης. Οι μέθοδοι προεπεξεργασίας διακρίνονται σε φυσικές, χημικές και βιολογικές μεθόδους. Ακόμη αναφέρεται ότι, έχει ερευνηθεί και η σχέση μεταξύ της παραγωγής βιοαερίου και της

διαθέσιμης επιφάνειας του υποστρώματος με αποτέλεσμα να προκύπτει ότι η αυξημένη προσβάσιμη περιοχή της επιφάνειας του υποστρώματος (λιγνοκυτταρίνη) προσφέρει ενισχυμένη απόδοση στην παραγωγή μεθανίου.

**Πίνακας 8: Επίδραση προεπεξεργασίας στη σύσταση και τη δομή της βιομάζας [22].**

Pretreatment	Increase of accessible surface area	Decrystallization of cellulose	Solubilization of hemicellulose	Solubilization of lignin	Alteration of lignin structure	Formation of furfural/hydroxymethylfurfural (HMF)
Mechanical	●	●				
Irradiation	●	○	○			○
Steam-explosion	●		●	○	●	●
Liquid hot water	●	ND	●		○	○
Catalyzed steam-explosion	●		●	●/○	●/○	●
Acid	●		●	○	●	●
Alkaline	●		○	●/○	●	○
Oxidative	●	ND		●/○	●	○
Ionic liquids	●	●	○			
Thermal acid	●	ND	●			●
Thermal alkaline	●	ND	○	●/○	●	○
Thermal oxidative	●	ND	○	●/○	●	○
Ammonia fiber explosion	●	●	○	●	●	○
Biological pretreatment	●	ND	○	●	●	

<sup>a</sup> ● = major effect, ○ = minor effect, ND = not determined, and blank = no effect.

Η μείωση της κρυσταλλικότητας γενικά έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την απόδοση σε βιοαέριο, αλλά και η αντίστροφη περίπτωση έχει επίσης αναφερθεί. Η αλκαλική προεπεξεργασία ξυλώδους υποστρώματος επέφερε την αύξηση της παραγωγής βιοαερίου, ενώ η δομική ανάλυση έδειξε μείωση της κρυσταλλικότητας και του περιεχομένου της λιγνίνης. Αντίθετα, η ίδια μέθοδος προεπεξεργασίας σε άχυρο είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής μεθανίου και την αύξηση της κρυσταλλικότητας, ενώ το περιεχόμενο της λιγνίνης είχε μειωθεί. Από τα παραπάνω, καθίσταται εμφανές ότι το περιεχόμενο της λιγνίνης στην προεπεξεργασμένη βιομάζα αποτελεί τον κύριο παράγοντα που επηρεάζει την παραγωγή βιοαερίου.

Γενικά, η μειωμένη περιεκτικότητα λιγνίνης οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή βιοαερίου. Αναφέρεται ότι η βιοδιασπασιμότητα της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας αυξήθηκε μειώνοντας το περιεχόμενο λιγνίνης, δηλαδή, όσο υψηλότερη η περιεκτικότητα λιγνίνης, τόσο μειώνεται η παραγωγή βιοαερίου. Διαπιστώθηκε επίσης ότι η προεπεξεργασία με θερμό ασβέστη [Ca(OH)<sub>2</sub>] βελτίωσε την απόδοση βιοαερίου από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, ειδικά για πρώτη ύλη με υψηλή περιεκτικότητα λιγνίνης, επειδή η άσβεστος λειτουργεί ως μέσο διαλυτοποίησης της λιγνίνης. Ακόμη, αναφέρεται ότι για τη προεπεξεργασία χαρτιού εφημερίδων, χρησιμοποιείται ένα μίγμα οξικού οξέος και νιτρικού οξέος (όξινη προεπεξεργασία) με αποτέλεσμα την απομάκρυνση του 80% της λιγνίνης και τη 75% μεγαλύτερη απόδοση σε μεθάνιο, σε σύγκριση με τα μη προεπεξεργασμένα υλικά.

Η συσχέτιση μεταξύ της αποικοδόμησης της βιομάζας, της σύστασης και των διαρθρωτικών ιδιοτήτων της παραμένει ασαφής και αντιφατική, παρ' όλη την εκτεταμένη έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί για την επίδραση της προεπεξεργασίας στην παραγωγή βιοαιθανόλης. Οι διαφορετικές απόψεις επικεντρώνονται στη σχετική συνεισφορά του κάθε χαρακτηριστικού στην αντίσταση της κυτταρίνης για βιοαποικοδόμηση. Φαίνεται ότι όταν ένα εμπόδιο μειώνεται ή εξαλείφεται, ένα άλλο μπορεί να γίνει ο περιοριστικός παράγοντας κατά τη διάρκεια της προεπεξεργασίας, λόγω της πολυπλοκότητας της κάθε συνιστώσας και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων. Ακόμα, κρίνεται αναγκαίο να αναφερθεί ότι αποτελεσματική μέθοδος προεπεξεργασίας νοείται αυτή που θα μειώσει τα εμπόδια αυτά ή θα παράγει πολλαπλά επιθυμητά αποτελέσματα, όπως για παράδειγμα ταυτόχρονη απομάκρυνση λιγνίνης και μειωμένη κυτταρινική κρυσταλλικότητα, έτσι ώστε η βιομάζα να μπορεί να αποδομηθεί αποτελεσματικά για υψηλή παραγωγή βιοαερίου.



Προκειμένου να βελτιωθεί η παραγωγή βιοαερίου από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, είναι αναγκαία μια διαδικασία προεπεξεργασίας, ώστε να διασπαστούν οι δεσμοί υδατανθράκων – λιγνίνης που μειώνουν τη προσβασιμότητα των ενζύμων και των μικροοργανισμών σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Τα θετικά αποτελέσματα της προεπεξεργασίας έχουν αναγνωριστεί, αλλά η επιλογή των τεχνολογιών προεπεξεργασίας εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως ο τύπος της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας και οι κατόντη διεργασίες βιολογικής μετατροπής.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι προεπεξεργασίας λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας, ανεπτυγμένες εκτενώς για την παραγωγή βιοαιθανόλης κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών. Ωστόσο ορισμένες από αυτές τις μεθόδους, όπως η έκρηξη ινών με αμμωνία (AFEX) και η έκρηξη CO<sub>2</sub>, δεν έχουν αξιολογηθεί σε διαδικασίες αναερόβιας χώνευσης για παραγωγή βιοαερίου. Επιπλέον, η ενζυμική υδρόλυση που απαιτείται για την παραγωγή βιοαιθανόλης, συνήθως δεν χρειάζεται για την αναερόβια χώνευση επειδή οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί (όπως το *Clostridium spp.*) έχουν το δικό τους ενζυμικό υδρολυτικό σύστημα. Ως εκ τούτου, αν και ο σκοπός της προεπεξεργασίας τόσο για τη βιοαιθανόλη όσο και για το βιοαέριο είναι να ξεπεραστεί το περιοριστικό στάδιο της υδρόλυσης υποστρώματος με τη βελτίωση της ενζυμικής αποδομής της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας, η επιλογή και η εφαρμογή των μεθόδων προεπεξεργασίας, οι παράμετροι και οι στρατηγικές μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τις κατόντη διεργασίες. Για παράδειγμα, η ένταση των διεργασιών προεπεξεργασίας θα μπορούσε να είναι ηπιότερη από εκείνη για την παραγωγή βιοαιθανόλης και η προεπεξεργασία για την απομάκρυνση της ημικυτταρίνης μπορεί να μην αναγκαία στην περίπτωση του βιοαερίου.

Μια άλλη διαφορά είναι ότι η απορροή των μονάδων προεπεξεργασίας περιέχει συχνά αναστολές της ζύμωσης, όπως φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF), και η αναστολή αυτή είναι διαφορετική για τους μεθανογόνους οργανισμούς απ' ό,τι για τους μύκητες που συνήθως χρησιμοποιούνται στην αλκοολική ζύμωση. Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί είναι πιο ευαίσθητοι στους αναστολές που προκύπτουν από την προεπεξεργασία, καθώς οι αναστολές ανήκουν στην κατηγορία των φουρφουράλων, ωστόσο υπάρχει η δυνατότητα εγκλιματισμού του συστήματος στους συγκεκριμένους αναστολές με αποτέλεσμα την ελάττωση της επίδρασης τους στο σύστημα[22].

### 2.3.2. Φυσικές μέθοδοι προεπεξεργασίας

Η φυσική προεπεξεργασία αναφέρεται σε μεθόδους που δεν χρησιμοποιούν χημικά ή μικροοργανισμούς κατά την διεργασία προεπεξεργασίας. Οι υπάρχουσες μέθοδοι φυσικής προεπεξεργασίας περιλαμβάνουν κονιορτοποίηση (άλεση με τριβή και κρούση), έκρηξη ατμού (αυτουδρόλυση), προεπεξεργασία με υγρό καυτό νερό (υδροθερμόλυση), εξώθηση και ακτινοβολήση (υπερήχους, μικροκύματα, ακτίνες γ). Ακόμα, έχει αναφερθεί η χρήση κατάψυξης για την προεπεξεργασία, αλλά η συγκεκριμένη μέθοδος παρότι εμφανίζει υψηλή απόδοση έχει αρκετά υψηλό κόστος. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης των φυσικών μεθόδων προεπεξεργασίας στην παραγωγή μεθανίου [14,16, 22].

**Πίνακας 9: Σύγκριση μεθόδων φυσικής προεπεξεργασίας λιγνοκυτταρινούχων πρώτων υλών για παραγωγή βιοαερίου. [22]**

Physical pretreatment	Feedstock	Pretreatment conditions	Results
Comminution	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agricultural residuals: wheat straw, rice straw, oat, clover, bagasse, coconut fiber, hemp, banana peelings, cauliflower leaves, and digested biofibers</li> <li>• Forest residuals: mirabilis leaves</li> <li>• Grass: dump grass and grass hay</li> <li>• Municipal solid waste (MSW): organic fraction of MSW (OFMSW)</li> </ul>	Particle size: 0.003–30 mm	Up to 30% improvement of methane yield. Occasionally, reduced size decreased biogas production.
Steam-explosion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agricultural residuals: wheat straw, corn stalks, corn straw, citrus waste, potato pulp, rape straw, and digested biofibers</li> <li>• Hardwood: Japanese cedar, willow, and birch</li> <li>• Grass: bulrush, <i>Miscanthus</i>, and seaweed</li> <li>• MSW: OFMSW and paper tube residuals</li> <li>• Softwood: bamboo</li> </ul>	160–260 °C, 0.7–4.8 MPa, and seconds to a few minutes	Positive effect of up to 40% increase in biogas yield. Occasional zero or negative effect also occurred.
Liquid hot water (LHW)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agricultural residuals: Wheat straw, rice straw, oil palm empty fruit bunches (OPEFB), sunflower stalks, and sugarcane bagasse</li> <li>• Grass: <i>Miscanthus</i> and hybrid grass</li> <li>• MSW: OFMSW and paper tube residuals</li> </ul>	100–230 °C (0.1–2.8 MPa) for a few minutes to hours	7–220% increase of methane yield
Extrusion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agricultural residuals: barley straw, maize, and solid fraction of manure</li> <li>• Grass: <i>Lolium multiflorum</i> and pelleted hay</li> <li>• MSW: OFMSW</li> </ul>	0.45–3.5 MPa for a few minutes (e.g. 4–12 min) and typical temperature of 60–90 °C	8–70% improvement of methane yield
Irradiation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agricultural residuals: wheat straw, barley straw, spring wheat, winter wheat, oat straw, and rice stalks</li> <li>• Grass: switchgrass and hybrid grass</li> <li>• MSW: OFMSW</li> </ul>	115–300 °C for a few minutes to hours	4–28% improvement of methane yield. No or adverse effects were found. Combination with acids or alkali could achieve greater improvement of biogas yield.

### 2.3.2.1. Κονιορτοποίηση

Η κονιορτοποίηση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας χρησιμοποιείται για τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και τυπικά εφαρμόζεται στις περισσότερες διεργασίες παραγωγής βιοκαυσίμων πριν τις άλλες μεθόδους προεπεξεργασίας για την βελτίωση της ικανότητας χειρισμού και επεξεργασίας των πρώτων υλών. Η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων της βιομάζας μπορεί να αλλάξει την φυσική υπερδομή της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας, αυξάνοντας της διαθέσιμη επιφάνεια, μειώνοντας το βαθμό κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης και τον βαθμό πολυμερισμού με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ζυμοσιμότητα της βιομάζας. Η κονιορτοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας διαφόρους τύπους αλεστικών μηχανών όπως σφαιρόμυλοι, κυλινδρόμυλοι, εξωθητήρες, μηχανές με δόνηση και σφυριά. Η επιλογή της κατάλληλης διάταξης εξαρτάται από την υγρασία των πρώτων υλών και από την επιθυμητή τελική κοκκομετρία του υλικού. Ωστόσο, η μηχανική κονιορτοποίηση θεωρείται ως μια από τις πιο ακριβές διεργασίες που χρησιμοποιούνται για την μετατροπή της βιομάζας σε βιοκαύσιμα λόγω των υψηλών ενεργειακών απαιτήσεων της. Για παράδειγμα, η συμβατική μηχανική κονιορτοποίησης απαιτεί 70% περισσότερη ενέργεια σε σχέση με την έκρηξη ατμού για την μείωση της κοκκομετρίας της βιομάζας στα ίδια επίπεδα. Οι ενεργειακές απαιτήσεις της μηχανικής κονιορτοποίησης σχετίζονται με τον τύπο της διάταξης και εξαρτώνται από το αρχικό και τελικό μέγεθος των σωματιδίων και τα χαρακτηριστικά της βιομάζας (φαινόμενη πυκνότητα, δυναμικότητα, σύσταση και υγρασία). Τέλος, είναι αναγκαίο να αναφερθεί ότι οι ενεργειακές απαιτήσεις αυξάνονται με την αύξηση της υγρασίας και τη μείωση του τελικού μεγέθους των σωματιδίων, ενώ το μεγαλύτερο μέρος της προσφερόμενης ενέργειας χάνεται ως θερμότητα [16,22].

### 2.3.2.2. Έκρηξη ατμού

Η έκρηξη ατμού που καλείται και αυτοϋδρόλυση, διαφέρει από την καταλυτική έκρηξη ατμού, καθώς δεν χρησιμοποιούνται πρόσθετα χημικά στη διεργασία. Σε αυτή τη μέθοδο, τα σωματίδια βιομάζας θερμαίνονται με υψηλής πίεσης κορεσμένο ατμό

για ένα μικρό χρονικό διάστημα και στη συνέχεια μειώνεται η πίεση για να τερματιστούν οι αντιδράσεις. Η παραπάνω μείωση της πίεσης προκαλεί στη βιομάζα εκρηκτική αποσύνθεση. Οι τυπικές παράμετροι της διεργασίας κυμαίνονται στην περιοχή 160 – 260°C, 0,69 – 4,83MPa, και 0,5 – 30min για τη θερμοκρασία, τη πίεση και το χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχα. Υπό αυτές τις συνθήκες, η ημικυτταρίνη υδρολύεται προς τα αντίστοιχα σάκχαρα, οι δεσμοί λιγνίνης υδατανθράκων λόγω της υψηλής θερμοκρασίας διασπώνται και η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης αυξάνεται λόγω κρυσταλλοποίησης των άμορφων περιοχών, ωστόσο παρά την κρυστάλλοποίηση των άμορφων περιοχών της κυτταρίνης αυξάνεται η αποδομησιμότητα της βιομάζας, λόγω της επίδρασης στους παράγοντες του περιεχομένου λιγνίνης και ημικυτταρίνης. Η υδρόλυση της ημικυτταρίνης πραγματοποιείται από οργανικά οξέα όπως το οξικό οξύ και άλλα οξέα που προκύπτουν από ακετικές ή άλλες ομάδες, ακόμα σε αυτές τις συνθήκες το νερό εμφανίζει όξινη συμπεριφορά, συμβάλλοντας στην περαιτέρω υδρόλυση της ημικυτταρίνης, την απομάκρυνση της λιγνίνης αλλά και στην αποδόμηση των αναγωγικών σακχάρων που προκύπτουν [18, 22].

Η έκρηξη ατμού είναι μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προεπεξεργασίας και θεωρείται μια από τις πιο αποδοτικές τεχνολογίες. Για τους παραπάνω λόγους η συγκεκριμένη τεχνολογία είναι εμπορικά διαθέσιμη για εφαρμογές σε αγροτικά απόβλητα και σκληρά ξύλα. Τα πλεονεκτήματα της έκρηξης ατμού περιλαμβάνουν τις μικρές απαιτήσεις ενέργειας, τα μικρά επίπεδα ρύπανσης και το γεγονός ότι δεν υπάρχει ρεύμα αποβλήτων προς διαχείριση. Ωστόσο, ανάλογα με την ένταση της διεργασίας συμβαίνει ο σχηματισμός των αναστολέων, φουρφουράλη και HMF, τα όποια δεν επηρεάζουν όμως την παραγωγικότητα της διεργασίας της αναερόβιας χώνευσης εφόσον έχει πραγματοποιηθεί εγκλιματισμός. Τέλος, κατά την συγκεκριμένη μέθοδο προεπεξεργασίας πέραν των παραπάνω αναστολέων παράγονται και φαινολικές ενώσεις από την αποδόμηση της λιγνίνης οι οποίες μειώνουν την παραγωγή μεθανίου λόγω ανασταλτικών φαινομένων [22].

#### 2.3.2.3. Υγρό θερμό νερό

Η μέθοδος με υγρό θερμό νερό (LHW: liquid hot water) είναι μια από της υδροθεμικές μεθόδους προεπεξεργασίας που δεν απαιτεί την χρήση χημικών και χρησιμοποιείται στην χαρτοβιομηχανία. Σε αυτή τη μέθοδο προεπεξεργασίας, η πίεση χρησιμοποιείται για τη διατήρηση του νερού στην υγρή κατάσταση σε υψηλές θερμοκρασίες. Κατά τη προεπεξεργασία, το νερό διεισδύει στην κυτταρική δομή της βιομάζας, υδρολύοντας τη κυτταρίνη, διαλυτοποιώντας την ημικυτταρίνη και απομακρύνοντας ένα μικρό μέρος της λιγνίνης. Επομένως, η συγκεκριμένη μέθοδος κρίνεται κατάλληλη για πρώτες ύλες με μειωμένο περιεχόμενο λιγνίνης. Η προεπεξεργασία με υγρό θερμό νερό είναι αρκετά αποτελεσματική στην αύξηση της προσβάσιμης περιοχής της κυτταρίνης και στην αύξηση της αποδομησιμότητας της κυτταρίνης από τους μικροοργανισμούς. Τέλος, για την ελαχιστοποίηση της αποδόμησης των σακχάρων είναι αναγκαία η ρύθμιση του pH στην περιοχή 4 – 7 ενώ οι παράμετροι λειτουργίας είναι 160 – 220°C και 15min για τη θερμοκρασία και τον χρόνο παραμονής αντίστοιχα [22].

#### 2.3.2.4. Εξώθηση

Η εξώθηση (extrusion) είναι μια διαδικασία που συνδυάζει πολλαπλές λειτουργίες σε μία μονάδα. Οι πρώτες ύλες τροφοδοτούνται στο ένα άκρο του εκβολέα και στη συνέχεια μεταφέρονται κατά μήκος του κυλίνδρου με ένα κοιλία οδήγησης. Καθώς το υλικό κινείται κατά μήκος του δοχείου, υποβάλλεται σε ανάμειξη, και έντονη



διάτμηση μετά την απελευθέρωση του από το ελεύθερο άκρο ενώ αναπτύσσεται θερμότητα λόγω έντονης τριβής. Ο σχεδιασμός του κοιλία μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της διεργασίας. Τα αποτελέσματα της εξώθησης είναι παρόμοια με αυτά της έκρηξης ατμού διότι κατά την απελευθέρωση του υλικού από το ελεύθερο άκρο λόγω πτώσης πίεσης, προκαλείται διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων. Ακόμα, διαπιστώθηκε ότι η εξώθηση μπορεί να προκαλέσει αποπολυμερισμό στην κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη, και πρωτεΐνη ενώ θα μπορούσε επίσης να προκαλέσει θερμική αποικοδόμηση των σακχάρων και αμινοξέων, ανάλογα με την ένταση της διεργασίας. Η μέθοδος της εξώθησης επιταχύνει τη διάσπαση των αργά διασπώμενων, και ακόμη και μερικών μη-διασπώμενων ενώσεων. Οι κρίσιμες παράμετροι λειτουργίας περιλαμβάνουν χρόνο παραμονής και την πίεση [18, 22].

Παρόμοια με άλλες θερμικές μεθόδους προεπεξεργασίας, η εξώθηση είναι μια διαδικασία που θα μπορούσε να παράγει αναστολές, οπότε πρέπει να ληφθεί υπόψη η συγκεκριμένη παρατήρηση και να ρυθμιστούν οι συνθήκες ώστε να μειωθεί ή να εξαιρεθεί η παραγωγή αναστολέων. Υπό ορισμένες συνθήκες εξώθησης, ιδιαίτερα σε υψηλή πίεση, η παραγωγή των αναστολέων όπως φουρφουράλης και φαινολικών ενώσεων που οφείλονται διάσπαση σακχάρων και λιγνίνης είναι αναπόφευκτη με αποτέλεσμα να προκύπτει μειωμένη παραγωγή βιοαερίου [18, 22].

#### 2.3.2.5. Ακτινοβολήση

Η ακτινοβολήση είναι μια φυσική μέθοδος προεπεξεργασίας που περιλαμβάνει τα μικροκύματα, τους υπερήχους, τις ακτίνες γ και τη δέσμη ηλεκτρονίων. Η επεξεργασία με μικροκύματα είναι η πιο μελετημένη μέθοδος ακτινοβολήσης. Η ενέργεια παράγεται από ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο και μεταφέρεται άμεσα στο υλικό για να προκαλέσει την έμμεση θέρμανση του με μειωμένες θερμοκρασιακές βαθμίδες. Το πεδίο μικροκυμάτων και η διηλεκτρική απόκριση του υλικού καθορίζουν την ικανότητα του να θερμαίνεται με ενέργεια μικροκυμάτων. Η ενέργεια μικροκυμάτων είναι μια αποτελεσματική εναλλακτική της συμβατικής θέρμανσης και μπορεί να προσφέρει ταχεία θέρμανση μεγάλων όγκων μειώνοντας τον χρόνο επεξεργασίας και την απαιτούμενη ενέργεια. Όσο αφορά την προεπεξεργασία με υπερήχους, οι υπερήχοι μπορούν να διασπάσουν τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος, να αυξήσουν την ειδική επιφάνεια, και να μειώσουν το βαθμό πολυμερισμού, με αποτέλεσμα την αυξημένη βιοαποικοδομησιμότητα της βιομάζας. Η προεπεξεργασία με υπερήχους προκαλεί ισχυρή μεταβολή της χημικής φύσης της βιομάζας μέσω σχηματισμού ελεύθερων ριζών [22, 24].

#### 2.3.3. **Χημικές μέθοδοι προεπεξεργασίας**

Οι χημικές μέθοδοι προεπεξεργασίας αναφέρονται στις μεθόδους που χρησιμοποιούν χημικά, όπως οξέα, βάσεις και ιονικά υγρά για τη μεταβολή των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας. Μεταξύ των μεθόδων προεπεξεργασίας οι χημικές μέθοδοι είναι αυτές που έχουν ερευνηθεί περισσότερο. Παρά το γεγονός ότι πολλά χημικά έχουν μελετηθεί για την κυτταρινική παραγωγή αιθανόλης, μόνο μερικά από αυτά έχουν εφαρμοστεί στην παραγωγή βιοαερίου μέσω διαδικασιών αναερόβιας χώνευσης. Χημικές μέθοδοι προεπεξεργασίας που μελετήθηκαν για την παραγωγή βιοαερίου συνοψίζονται στον Πίνακα 10 και συζητούνται παρακάτω [22].

**Πίνακας 10: Σύγκριση μεθόδων χημικής προεπεξεργασίας λιγνοκυτταρινούχων πρώτων υλών για παραγωγή βιοαερίου. [22]**

Chemical pretreatment	Feedstock	Pretreatment conditions	Results
Alkaline	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agricultural residuals: Wheat straw, rice straw, corn stover, sugar beet leaves, maize, ensiled hay, sugarcane bagasse, rapeseed, sunflower stalks, grape pomace, and OPEFB</li> <li>• Forest residuals: fallen leaves</li> <li>• Hardwood: birch</li> <li>• Softwood: spruce and pine</li> <li>• Grass: switchgrass, smooth cordgrass and jost tall wheatgrass</li> <li>• MSW: OFMSW and paper pulp/sludge</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chemicals: NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, CaO, KOH, and NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O</li> <li>• Chemical loading = 1–10% (g/g dry matter)</li> <li>• Temperature = –15–170 °C</li> <li>• Time = 1 h to 10 days</li> </ul>	Positive effect in most cases with 3.2% to 2.3 folds increase of methane yield. Negative effects also occurred in very few cases. In general, it is more effective on biomass containing more lignin.
Acid	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agricultural residuals: sunflower oil cakes, greenhouse residues, sugarcane bagasse, herbal-extraction process residue (HPR), sunflower stalks, coconut fiber, OPEFB, rapeseed, sunflower meals, straws, and bracken</li> <li>• Grass: hay</li> <li>• MSW: newsprint</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chemicals: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, acetic acid, and maleic acid</li> <li>• Chemical loading = 1–4% (g/g dry matter) (organic acid could be much higher, e.g. acetic acid = 35–80%)</li> <li>• Temperature = ambient temperature–170 °C</li> <li>• Time = a few minutes to hours, even 30 days</li> </ul>	Positive effect in most cases with 20–200% increase of methane yield. Negative effects also occurred in very few cases (e.g. 2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> on rapeseed).
Catalyzed steam-explosion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agricultural residuals: digested bio-fiber, hemp, wheat straw</li> <li>• MSW: paper tube residuals</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chemicals: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, SO<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NaOH with and without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> <li>• Chemical loading = 0.5–4% (g/g dry matter)</li> <li>• Temperature = 155–220 °C</li> <li>• Time = 5 min–1 h</li> <li>• Temperature = 180–220 °C</li> <li>• Oxygen pressure = 0–1.2 MPa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could be added)</li> <li>• Time = a few minutes</li> </ul>	18–107% enhancement of methane yield
Wet oxidation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agricultural residuals: wheat straw, digested biowaste, corn stalks, winter rye straw, oilseed rape straw, and faba bean straw</li> <li>• Hardwood: willow</li> <li>• Grass: <i>Miscanthus</i></li> <li>• MSW: waste newspaper and yard waste</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chemicals primarily include H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with dose 1–4% (g/g dry matter). NaOH (0–2%) was also used on top of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for further improvement of methane yield.</li> <li>• Time = a few minutes to 7 days</li> <li>• Temperature = 25–220 °C</li> <li>• ILs: N-methylmorpholine-N-oxide monohydrate (NMMO) and 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride (BMIMCl)</li> <li>• Chemical loading = 70–85%</li> <li>• Temperature = 90–130 °C</li> <li>• Time = 1–15 h</li> </ul>	34–136% enhancement of methane yield
Oxidative pretreatment with peroxides	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agricultural residuals: rice straw and sunflower stalks, sorghum, sida hermaphrodita</li> <li>• MSW: OFMSW and paper tube residuals</li> <li>• Grass: <i>Miscanthus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chemicals primarily include H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with dose 1–4% (g/g dry matter). NaOH (0–2%) was also used on top of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for further improvement of methane yield.</li> <li>• Time = a few minutes to 7 days</li> <li>• Temperature = 25–220 °C</li> <li>• ILs: N-methylmorpholine-N-oxide monohydrate (NMMO) and 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride (BMIMCl)</li> <li>• Chemical loading = 70–85%</li> <li>• Temperature = 90–130 °C</li> <li>• Time = 1–15 h</li> </ul>	33–120% improvement of methane yield. Negative effects were also observed.
Ionic liquids (ILs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agricultural residuals: defatted and bleached cotton linter, OPEFB, straw residuals of manure, wheat straw, rice straw, and triticale straw (a hybrid of rye and wheat)</li> <li>• Grass: water hyacinth</li> <li>• Softwood: spruce</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chemicals primarily include H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with dose 1–4% (g/g dry matter). NaOH (0–2%) was also used on top of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for further improvement of methane yield.</li> <li>• Time = a few minutes to 7 days</li> <li>• Temperature = 25–220 °C</li> <li>• ILs: N-methylmorpholine-N-oxide monohydrate (NMMO) and 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride (BMIMCl)</li> <li>• Chemical loading = 70–85%</li> <li>• Temperature = 90–130 °C</li> <li>• Time = 1–15 h</li> </ul>	16–1200% improvement of methane yield (e.g. methane yield of softwood, spruce increased 1200%, compared with untreated material)

### 2.3.3.1. Αλκαλική προεπεξεργασία

Η αλκαλική προεπεξεργασία χρησιμοποιεί βάσεις, όπως NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, KOH και NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O για την απομάκρυνση λιγνίνης, ημικυτταρίνης και ενδεχομένως κυτταρίνης καθιστώντας την λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα πιο αποδομήσιμη από τους μικροοργανισμούς και τα ένζυμα. Η αλκαλική επεξεργασία χρησιμοποιείται εκτεταμένα στη χαρτοβιομηχανία και η αρχή λειτουργίας της πιστεύεται ότι είναι η σαπωνοποίηση και η διάσπαση των δεσμών λιγνίνης – υδατανθράκων. Με την απομάκρυνση των παραπάνω δεσμών η αλκαλική προεπεξεργασία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του πορώδους και της εσωτερικής επιφάνειας, την δομική διόγκωση, την μείωση του βαθμού πολυμερισμού και της κρυσταλλικότητας και την διάσπαση των δεσμών της λιγνίνης με άλλα πολυμερή. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η αποτελεσματικότητα της αλκαλικής προεπεξεργασίας εξαρτάται από το περιεχόμενο λιγνίνης της βιομάζας.

Το NaOH είναι η πιο διαδεδομένη βάση που χρησιμοποιείται στην αλκαλική προεπεξεργασία και έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την παραγωγή βιοαερίου από όλα τα είδη λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας (σκληρά, μαλακά ξύλα, πώδη φυτά και αστικά στερεά απόβλητα). Ακόμα, η αποτελεσματικότητα του KOH είναι παρόμοια με του

NaOH ωστόσο δεν χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό σε σχέση με τα NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub> διότι είναι ακριβότερο. Όμως, το KOH έχει περιβαλλοντικά οφέλη δεδομένου του ότι το προεπεξεργασμένο κλάσμα των αποβλήτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα. Το NaOH είναι η πιο οικονομικώς αποδοτική και ευρέως χρησιμοποιούμενη βάση για την προεπεξεργασία βιομάζας αλλά μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή, λόγω των ιόντων Na<sup>+</sup>, της μεθανογένεσης. Ακόμα, η απόθεση της απορροής του αντιδραστήρα της αναερόβιας χώνευσης που περιέχει Na<sup>+</sup> μπορεί να προκαλέσει περιβαλλοντικές επιπτώσεις όπως αύξηση της αλατότητας του εδάφους και ρύπανση των υδάτων. Επομένως, για τους παραπάνω λόγους έχουν προταθεί ολοκληρωμένα συστήματα με ανάκτηση NaOH ώστε να μειωθούν το κόστος προεπεξεργασίας και η πιθανότητα περιβαλλοντικής ρύπανσης [18,22].

#### 2.3.3.1.1. Έκρηξη ινών με αμμωνία (AFEX) ή υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub>

Η AFEX είναι μία αλκαλική φυσικοχημική διεργασία προεπεξεργασίας. Στην συγκεκριμένη μέθοδο η βιομάζα είναι εκτεθειμένη σε υγρή αμμωνία σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία (90 – 100°C) για μια περίοδο περίπου 30 λεπτών, που ακολουθείται με άμεση μείωση της πίεσης. Οι λειτουργικές παράμετροι στη διαδικασία AFEX είναι η φόρτιση αμμωνίας, η θερμοκρασία, η φόρτιση νερού, η πτώση πίεσης, ο χρόνος, και ο αριθμός των σταδίων. Η διαδικασία AFEX παράγει μόνο στερεό υλικό, ενώ κάποιες άλλες μέθοδοι, όπως η έκρηξη ατμού παράγουν έναν πολτό που μπορεί να διαχωριστεί σε ένα στερεό και ένα υγρό κλάσμα. Η διαδικασία AFEX μπορεί είτε να τροποποιήσει είτε να μειώσει αποτελεσματικά το κλάσμα λιγνίνης των λιγνοκυτταρούχων υλικών, ενώ τα κλάσματα ημικυτταρίνης και κυτταρίνης μπορούν να παραμείνουν ανέπαφα.

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της AFEX προεπεξεργασίας είναι ότι δεν σχηματίζονται μερικοί τύποι ανασταλτικών παραπροϊόντων, ωστόσο, μέρος των φαινολικών θραυσμάτων της λιγνίνης και άλλων εκχυλισμάτων του κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να παραμείνουν στην κυτταρινική επιφάνεια. Ως εκ τούτου, η έκπλυση με νερό δύναται να καταστεί απαραίτητη για την αφαίρεση μέρους αυτών των ανασταλτικών συστατικών γεγονός που αυξάνει τα απόβλητα της διεργασίας.

Ωστόσο, υπάρχουν κάποια επιπλέον μειονεκτήματα στη χρήση της διαδικασίας AFEX σε σύγκριση με κάποιες άλλες διεργασίες, όπως ότι δεν είναι αποδοτική για υψηλά επίπεδα λιγνίνης και ότι το κόστος της αμμωνίας είναι υψηλό. Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι η AFEX κρίνεται ως η πιο αποτελεσματική για τη βιομάζα που περιέχει μικρά ποσοστά λιγνίνης, καθώς δεν διαλυτοποιεί σημαντικά την ημικυτταρίνη σε σύγκριση με άλλες μεθόδους προεπεξεργασίας όπως με αραιό οξύ, ενώ, η αμμωνία πρέπει να ανακυκλωθεί μετά τη προεπεξεργασία ώστε να μειωθεί το κόστος και να διασφαλιστεί η προστασία του περιβάλλοντος. Τέλος, η έκρηξη ινών μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub> (Tc=31°C, Pc=7,4MPa), η αρχή λειτουργίας είναι παρόμοια ενώ η μέθοδος αυτή παρουσιάζει μικρότερο κόστος λόγω της χαμηλότερης θερμοκρασίας και τη μειωμένης επικινδυνότητας (μη τοξικό, άφλεκτο υλικό). [14,23]

#### 2.3.3.2. Όξινη προεπεξεργασία

Η προεπεξεργασία με οξύ μπορεί να διεξαχθεί είτε με συμπυκνωμένο οξύ (30 – 70%) και χαμηλή θερμοκρασία (40°C) ή με αραιό οξύ (1%) και υψηλή θερμοκρασία (230°C). Τόσο ανόργανα όσο και οργανικά οξέα, συμπεριλαμβανομένου του θεικού οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), υδροχλωρικού οξέος (HCl), νιτρικού οξέος (HNO<sub>3</sub>), φωσφορικού οξέος (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), οξικού οξέος, και μηλεϊνικού οξέος, έχουν χρησιμοποιηθεί για την

προεπεξεργασία με αραιό οξύ, με το  $H_2SO_4$  να χρησιμοποιείται πιο συχνά. Αν και το πυκνό οξύ είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό για την υδρόλυση της κυτταρίνης, είναι επιπλέον εξαιρετικά τοξικό, διαβρωτικό και επικίνδυνο, ενώ απαιτεί ακριβά υλικά, όπως εξειδικευμένα μη μεταλλικά υλικά ή κράματα, για την κατασκευή του αντιδραστήρα. Επιπλέον, το οξύ πρέπει να ανακτηθεί μετά την επεξεργασία της βιομάζας για οικονομικούς λόγους. Ως εκ τούτου, το αραιό οξύ ευνοείται σε σχέση με το πυκνό οξύ για την προεπεξεργασία της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας, και εκτεταμένες μελέτες έχουν διεξαχθεί με αποτέλεσμα να είναι μια από τις πιο συχνά εφαρμοζόμενες μεθόδους χημικής προεπεξεργασίας.

Η διεργασία με αραιό οξύ πρωτίστως υδρολύει μέχρι 100% της ημικυτταρίνης στα περιεχόμενα σάκχαρα, ανάλογα με τις συνθήκες προκατεργασίας. Μπορεί επίσης να διασπάσει τους δεσμούς της λιγνίνης σε ένα υψηλό βαθμό, αλλά δεν είναι αποτελεσματική στη διάλυση λιγνίνης στις περισσότερες περιπτώσεις. Το κύριο αποτέλεσμα της προεπεξεργασίας με αραιό οξύ είναι η σημαντική αύξηση της αποδομησιμότητας της κυτταρίνης από ένζυμα και μικροοργανισμούς. Αξίζει να σημειωθεί ότι, ενώ η προεπεξεργασία με οξύ είναι μια κοινή τεχνολογία για τη παραγωγή βιοαιθανόλης, λίγες μελέτες έχουν αναφερθεί για τις επιπτώσεις της όξινης προεπεξεργασίας στην παραγωγή βιοαερίου από αναερόβια χώνευση.[16,22]

Ακόμα, αναφέρεται ότι η προεπεξεργασία με αραιό οξύ δεν είναι πάντα αποτελεσματική για την βελτίωση της παραγωγής βιοαερίου από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα. Θα πρέπει να σημειωθεί επιπλέον ότι, η εξουδετέρωση του προεπεξεργασμένου υλικού είναι αναγκαία πριν από την αναερόβια χώνευση, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια μεγάλη ποσότητα γύψου (εξουδετέρωση με ασβέστη), η οποία προκαλεί προβλήματα διάθεσης. Η προεπεξεργασία με αραιό οξύ παράγει επίσης διάφορους αναστολείς, όπως καρβοξυλικά οξέα (π.χ. μυρμηκικό και οξικό οξύ), φουρφουράλη, HMF, και φαινολικές ενώσεις. Το μυρμηκικό και οξικό οξύ μπορούν να μετατραπούν σε βιοαέριο άμεσα στη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης. Η φουρφουράλη και το HMF συνήθως δεν αναστέλλουν την ανάπτυξη αναερόβιων μικροοργανισμών ή τις μεταβολικές διαδικασίες μέχρι η συγκέντρωση γίνεται μεγαλύτερη από 15 – 20 mM, ενώ η ανασταλτική συμπεριφορά των φαινολικών ενώσεων εξαρτάται από τη συγκέντρωση τους και τις φυσικοχημικές ιδιότητες τους, όπως διαλυτότητα, υδροφοβικότητα και το μοριακό βάρος. Ως εκ τούτου, οι συνθήκες προεπεξεργασίας (θερμοκρασία, συγκέντρωση οξέος και χρόνος παραμονής) πρέπει να επιλέγονται σωστά για να εξαλειφθεί ή να μειωθεί ο σχηματισμός των αναστολέων.

Επιπλέον, ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται για την επιλογή του οξέος. Για παράδειγμα, το  $H_2SO_4$  και το  $HNO_3$  όταν χρησιμοποιούνται μπορεί να οδηγήσουν στο σχηματισμό  $H_2S$  και  $N_2$  λόγω της αναγωγής των θεικών και νιτρικών ιόντων, αντίστοιχα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της παραγωγής μεθανίου ή/και την ανάγκη για επιπλέον καθαρισμό αερίων. Ακόμα και αν προεπεξεργασία με αραιό οξύ μπορεί να ενισχύσει σημαντικά την αποδομησιμότητα της κυτταρίνης, το κόστος της είναι συνήθως υψηλότερο από κάποια άλλη διεργασία προεπεξεργασίας όπως έκρηξη ατμού ή προεπεξεργασία ασβέστη, με αποτέλεσμα να μειώνεται το δυναμικό για την εμπορική αξιοποίηση της [22].

#### 2.3.3.3. Καταλυτική έκρηξη ατμού

Η προεπεξεργασία με έκρηξη ατμού μπορεί να πραγματοποιηθεί με την προσθήκη καταλυτών όπως  $H_2SO_4$ ,  $SO_2$ , και  $NaOH$ . Η παρουσία ενός καταλύτη μπορεί να βελτιώσει τη βιοδιασπασιμότητα της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας, να μειώσει την

παραγωγή ανασταλτικών ενώσεων και να έχει ως αποτέλεσμα πληρέστερη διαλυτοποίηση/ανάκτηση ημικυτταρίνης. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών για την καταλυτική έκρηξη ατμού αναφέρει τη βελτίωση της ενζυμικής υδρόλυσης και της παραγωγής αιθανόλης, αλλά λίγη έρευνα έχει γίνει για τη χρήση της μεθόδου για την παραγωγή βιοαερίου, η οποία ωστόσο δείχνει βελτίωση της απόδοσης σε βιοαέριο. Ακόμα και αν προεπεξεργασία είναι πολύ αποτελεσματική όταν χρησιμοποιείται  $H_2SO_4$  ή  $SO_2$ , το οξύ μπορεί να προκαλέσει υψηλές συγκεντρώσεις θεικών ιόντων, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανταγωνισμού μεταξύ των θεικοαναγωγικών και μεθανογόνων βακτηρίων και την μείωση της παραγωγής μεθανίου, οπότε κρίνεται αναγκαία η αριστοποίηση της συγκέντρωσης του καταλύτη και η ανάκτηση του καταλύτη για την αποφυγή της παραπάνω κατάστασης και την μείωση του κόστους της διεργασίας [22].

#### 2.3.3.4. Υγρή οξείδωση

Υγρή οξείδωση είναι μια μέθοδος προεπεξεργασίας, οξειδωτική που πραγματοποιείται με προσθήκη νερού και ενός οξειδωτικού παράγοντα (αέρας, οξυγόνο, και υπεροξείδιο του υδρογόνου [ $H_2O_2$ ]) για πρώτες ύλες πριν από την επεξεργασία. Η θερμοκρασία, ο χρόνος παραμονής, η μερική πίεση του οξυγόνου και η περιεκτικότητα σε νερό είναι οι πιο κρίσιμες παράμετροι για την υγρή οξείδωση. Η διαδικασία πραγματοποιείται συνήθως σε υψηλή θερμοκρασία ( $125 - 300^\circ C$ ) και υψηλή πίεση ( $0.5 - 20$  MPa), ενώ ο χρόνος κυμαίνεται από μερικά λεπτά έως ώρες. Η παρουσία του οξυγόνου μπορεί να αυξήσει τους ρυθμούς αντίδρασης και την παραγωγή των ελευθέρων ριζών, ακόμα, μπορούν να επιτευχθούν ταχύτεροι ρυθμοί αντίδρασης με υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου κάτι που συνεπάγεται ωστόσο την αύξηση των λειτουργικών εξόδων της μονάδας. Ως εκ τούτου, ο αέρας συνήθως χρησιμοποιείται ως οξειδωτικό μέσο στη συγκεκριμένη μέθοδο προεπεξεργασίας. Η διαδικασία της υγρής οξείδωσης είναι εξώθερμη, και επομένως η θερμότητα που παράγεται από τις αντιδράσεις στις περισσότερες περιπτώσεις αρκεί για να διατηρήσει τη θερμοκρασία σε ένα επιθυμητό επίπεδο συμβάλλοντας στην μείωση έως εξάλειψη των ενεργειακών απαιτήσεων της μονάδας. Κατά την διάρκεια της υγρής οξείδωσης, οι κύριες αντιδράσεις περιλαμβάνουν οξειδωτική διάσπαση αρωματικών δακτυλίων, ηλεκτρονιόφιλες υποκαταστάσεις, μετατόπιση των πλευρικών αλυσίδων, και διάσπαση των αλκυλ-, αρυλ- αιθέρικων δεσμών. Στην περίπτωση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας και τα τρία κλάσματα επηρεάζονται, η ημικυτταρίνη διασπάται σε μονομερή σάκχαρα και υποβαθμίζεται σε οργανικά οξέα, κυτταρίνη διασπάται μερικώς, και λιγνίνη υφίσταται τόσο διάσπαση όσο και οξείδωση. Υγρή οξείδωση μπορεί αποτελεσματικά να αυξήσει την βιολογική προσβασιμότητα του κλάσματος κυτταρίνης προς τους μικροοργανισμούς και τα ένζυμα, μέσω απομάκρυνσης της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης [22].

Δεδομένου ότι είναι μια μη επιλεκτική διαδικασία, υγρή προεπεξεργασία οξείδωσης συνοδεύεται συχνά από απώλεια οργανικής ύλης. Υψηλός επίσης είναι κίνδυνος σχηματισμού αναστολέων, όπως φουρφουράλη και διαλυτές αρωματικές ενώσεις που προέρχονται από την οξείδωση της λιγνίνης. Η διεργασία της υγρής οξείδωσης του λιγνοκυτταρινικού υλικό εφαρμόζεται συχνότατα στη διαδικασία παραγωγής βιοαιθανόλης, ενώ η εφαρμογή της για την παραγωγή βιοαερίου είναι περιορισμένη, αλλά προσελκύοντας όλο και περισσότερο ενδιαφέρον [22].

#### 2.3.3.5. Οζονόλυση

Το όζον είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο προεπεξεργασίας (Οζονόλυση) για τη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα. Η οζονόλυση

οδηγεί σε μια πιο αποικοδομήσιμη βιομάζα κατά κύριο λόγο μέσω της υποβάθμισης της λιγνίνης και της μικρής μεταβολής της ημικυτταρίνης, ωστόσο, έχει πολύ μικρή επίδραση επί της κυτταρίνης. Κύριες παράμετροι προεπεξεργασίας είναι η περιεκτικότητα σε νερό στον αντιδραστήρα, το μέγεθος των σωματιδίων, και η συγκέντρωση του όζοντος στο αέριο ρεύμα. Μεταξύ αυτών των παραμέτρων, η περιεκτικότητα σε νερό είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την διαλυτοποίηση των πρώτων υλών. Όταν το όζον εφαρμόζεται κατά τη διάρκεια της προεπεξεργασίας, τα μόρια του διασπώνται παράγοντας ατομικό οξυγόνο που αντιδρά με το νερό και παράγει ρίζες υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ), καταλήγοντας σε δράσεις από ένα συνδυασμό οξειδώσεων τόσο από το όζον όσο και από τις υδροξυλικές ρίζες. Ως εκ τούτου, το pH του διαλύματος καθορίζει σε μεγάλο βαθμό το είδος των αντιδράσεων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της οζονόλυσης. Ακόμη, επειδή ο χρόνος παραμονής του όζοντος στον αντιδραστήρα είναι αρκετά περιορισμένος, μόνο ένα κλάσμα του παρεχόμενου όζοντος καταναλώνεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, με αποτέλεσμα, να απαιτείται μεγάλη ποσότητα όζοντος (υψηλή μερική πίεση όζοντος για την αύξηση των ρυθμών) για τη προεπεξεργασία, καθιστώντας αυτή τη μέθοδο μάλλον ακριβή. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι, η προεπεξεργασία διεξάγεται σε θερμοκρασία και πίεση περιβάλλοντος, και δεν παράγει τις ανασταλτικές ενώσεις που συνδέονται με άλλες θερμοοξειδωτικές μεθόδους προεπεξεργασίας [22].

#### 2.3.3.6. Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (Organosolv)

Οργανικοί διαλύτες όπως μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, αιθυλενογλυκόλη με ή χωρίς την προσθήκη καταλύτη μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην συγκεκριμένη μέθοδο. Οι καταλύτες που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν οργανικά ή ανόργανα οξέα ( $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) και βάσεις [ $\text{NaOH}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ]. Η συγκεκριμένη μέθοδος προεπεξεργασίας είναι κατάλληλη για τη διάσπαση των εσωτερικών δεσμών λιγνίνης ημικυτταρίνης και για αυτό το λόγο είναι ιδιαίτερα αποδοτική για βιομάζα με υψηλά ποσοστά λιγνίνης. Ακόμα, μπορεί να παραχθεί ως παραπροϊόν της διεργασίας σχετικά καθαρή και υψηλής ποιότητας λιγνίνη καθώς και λόγω της απομάκρυνσης της λιγνίνης επιτυγχάνεται αύξηση της εσωτερικής επιφάνειας, καθιστώντας την κυτταρίνη πιο αποδομήσιμη. Τα κύρια μειονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι το χαμηλό σημείο ζέσης των διαλυτών που επιβάλει την χρήση υψηλών πιέσεων και η αναφλεξιμότητα των διαλυτών. Τέλος, οι διαλύτες για τη διατήρηση του λειτουργικού κόστους σε χαμηλά επίπεδα και την αποφυγή ανασταλτικών φαινομένων θα πρέπει να ανακυκλώνονται [14].

#### 2.3.3.7. Προεπεξεργασία με ιοντικά υγρά

Έρευνα έχει διεξαχθεί για την αποτελεσματικότητα των ιοντικών υγρών (ILs) στη διάλυση της κυτταρίνης για την παραγωγή βιοαιθανόλης αλλά όχι σε μεγάλη έκταση για την παραγωγή βιοαερίου. Τα ILs εμφανίζονται ως αποτελεσματικοί και υποσχόμενοι «πράσινοι» διαλύτες κυτταρίνης. Επίσης, είναι ελκυστικά λόγω της μεγάλης διαλυτότητας της κυτταρίνης σε ήπιες συνθήκες ( $90 - 130^\circ\text{C}$  και πίεση περιβάλλοντος) που μειώνει τις ενεργειακές απαιτήσεις της μονάδας και του γεγονότος ότι είναι εφικτή η ανάκτηση σχεδόν 100% των ιοντικών υγρών στην αρχική καθαρότητά τους με ελάχιστα υπολείμματα για τη κατάντη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης. Επομένως, η προεπεξεργασία με ιοντικά υγρά είναι μια σχετικά νέα τεχνική που επιτρέπει την αποτελεσματική χρησιμοποίηση λιγνοκυτταρινικών πρώτων υλών για βιοκαύσιμα και βιοπροϊόντα, ενώ υπάρχουν ακόμα πολλές προκλήσεις στην πρακτική εφαρμογή της. Οι προκλήσεις αυτές περιλαμβάνουν το υψηλό κόστος των ILs, τις απαιτήσεις αναγέννησης, την έλλειψη

τοξικολογικών δεδομένων και γνώσεων σχετικά με τα βασικά φυσιολογικά χαρακτηριστικά, την επίδραση του τρόπου δράσης ανάλογα με το περιεχόμενο ημικυτταρίνης/λιγνίνης, και θέματα παραγωγής αναστολέων. Επομένως, περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την αντιμετώπιση των παραπάνω προκλήσεων [22].

### 2.3.4. Βιολογική προεπεξεργασία

Βιολογική προεπεξεργασία για την ενίσχυση της παραγωγής βιοαερίου στην αναερόβια χώνευση έχει επικεντρωθεί κυρίως στην προεπεξεργασία με μύκητες, προεπεξεργασία με μικτή καλλιέργεια μικροοργανισμών, και ενζυμική προεπεξεργασία. Η ενσίλωση έχει μελετηθεί επιπλέον ως μέθοδος προεπεξεργασίας για παραγωγή βιοαερίου χωρίς ικανοποιητικά αποτελέσματα. Σε σύγκριση με τη φυσική και χημική προεπεξεργασία, η βιολογική προεπεξεργασία συνήθως έχει μικρότερες ενεργειακές απαιτήσεις και δεν απαιτεί αναλώσιμα χημικά, ενώ διεξάγεται υπό πολύ ηπιότερες περιβαλλοντικές συνθήκες, έτσι ώστε να δημιουργούνται λίγοι αναστολείς, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά την αναερόβια χώνευση. Ωστόσο, ο υψηλός χρόνος προεπεξεργασίας έχει περιορίσει τη χρήση αυτών των διαδικασιών σε εμπορικές εφαρμογές. Επιπλέον, υπάρχει ανταγωνισμός για τους υδατάνθρακες μεταξύ προεπεξεργασίας και της καταντή διεργασίας παραγωγής βιοαερίου, καθώς ορισμένα επίπεδα υδατανθράκων απαιτούνται από τους μικροοργανισμούς κατά τη διάρκεια της βιολογικής προεπεξεργασίας. Από την άλλη πλευρά, η προσβασιμότητα της κυτταρίνης είναι αυξημένη μετά την προεπεξεργασία, γεγονός που μπορεί να βελτιώσει την παραγωγή βιοαερίου. Ως εκ τούτου, οι κύριοι στόχοι της βιολογικής προεπεξεργασίας είναι να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια των υδατανθράκων και, παράλληλα, να μεγιστοποιηθεί η απομάκρυνση της λιγνίνης [22].

**Πίνακας 11: Σύγκριση μεθόδων βιολογικής προεπεξεργασίας λιγνοκυτταρινούχων πρώτων υλών για παραγωγή βιοαερίου [22].**

Biological pretreatment	Microbes and enzymes	Feedstocks	Pretreatment conditions	Results
Fungal pretreatment	White-, brown-, and soft-rot fungi (e.g. <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> , <i>Auricularia auricula-judae</i> , <i>Trichoderma reesei</i> ), and basidiomycete fungi (e.g. <i>Ischnoderma resinosum</i> and <i>Fomitella fraxinea</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>Agricultural residuals: sweet chestnut leaves/hay and sisal leaf decortication residue (SLDR)</li> <li>Hardwood: Japanese cedar wood chip</li> </ul>	28–37 °C for 12 days to 8 weeks; Autoclaving or no autoclaving of feedstock before inoculation; Aerobic condition	15% to 5 folds increase of methane yield
Microbial consortium	Complex microbial agents containing yeast and cellulolytic bacteria, heat-treated sludge, <i>Clostridium thermocellum</i> , and mixture of fungi and composting microbes	<ul style="list-style-type: none"> <li>Agricultural residuals: corn straw, corn stalks, cotton stalks, cassava residues, and manure biofibers</li> </ul>	20–55 °C for 12 h–20 days; Autoclaving or no autoclaving of feedstock before inoculation; Aerobic condition	Methane yield improvement by 25–96.63%
Enzymatic pretreatment	Laccase; pectinase; mixture of cellulase and hemicellulases; mixture of cellulase, hemicellulase and $\beta$ -glucosidase; and crude <i>Trichoderma</i> enzyme complex	<ul style="list-style-type: none"> <li>Agricultural residuals: Sugar beet pulp, spent hops, and manure biofibers</li> <li>MSW: pulp and paper sludge</li> <li>Grass: jost tall wheatgrass</li> </ul>	37 °C for 4–24 h; No sterilization before loading of enzymes; Aerobic (if pretreatment is separated from AD) or anaerobic (if enzymes were loaded into AD reactors directly) condition	0–34% increase of methane yield
Ensilaging	Mixture of homo- and hetero-fermentative bacteria; mixture of lactic acid bacteria and enzymes ( $\alpha$ -amylase, cellulase, hemicellulase, and pentosanase); and mixture of homo- and hetero-fermentative lactic acid bacteria, yeast, and fungi	<ul style="list-style-type: none"> <li>Agricultural residuals: maize</li> </ul>	Ambient temperature for 7 weeks; Anaerobic condition; in sterilized jars	15% increase of methane yield, but negative effect was also found

#### 2.3.4.1. Προεπεξεργασία με μύκητες

Η έρευνα για τη προεπεξεργασία με μύκητες εστιάζεται κατά κύριο λόγο στην αξιολόγηση των μυκήτων που υποβαθμίζουν επιλεκτικά λιγνίνη και ημικυτταρίνη, ενώ επηρεάζουν σε μικρό βαθμό τη κυτταρίνη. Η κυτταρίνη εμφανίζει την μεγαλύτερη αντίσταση στη προσβολή από μύκητες σε σχέση με τα άλλα συστατικά. Ακόμα, η υποβάθμιση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης έχει ως αποτέλεσμα την



αυξημένη αποδομησιμότητα της κυτταρίνης, η οποία συμβάλλει στην αύξηση της απόδοσης της αναερόβιας χώνευσης. Αρκετά στελέχη μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων λευκής, καφέ και μαλακής σήψης, έχουν χρησιμοποιηθεί για την προεπεξεργασία της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας για την παραγωγή βιοαερίου, με τους μύκητες λευκής σήψης να είναι οι πιο αποτελεσματικοί. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι, η προεπεξεργασία με μύκητες διεξάγεται συνήθως υπό άσηπτες συνθήκες [22, 25].

#### 2.3.4.2. Προεπεξεργασία με καλλιέργεια μικροοργανισμών

Προεπεξεργασία με μεικτή καλλιέργεια μικροοργανισμών διεξάγεται από τα μικρόβια που έχουν «φυσικά» επιλεγεί από το περιβάλλον από υποστρώματα λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας που βρίσκονται σε σήψη. Σε αντίθεση, με τη προεπεξεργασία με μύκητες, η οποία προσβάλλει κυρίως τη λιγνίνη, η καλλιέργεια συνήθως προκαλεί υψηλή αποικοδόμηση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η αποστείρωση των λιγνοκυτταρινικών πρώτων υλών δεν είναι απαραίτητη κατά τη χρήση μιας μικροβιακής καλλιέργειας για την προεπεξεργασία, γεγονός που αποτελεί πλεονέκτημα έναντι της προεπεξεργασίας με μύκητες [22, 25].

#### 2.3.4.3. Ενζυμική προεπεξεργασία

Στην αναερόβια χώνευση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας, η υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης πιστεύεται ότι είναι το περιοριστικό στάδιο του ρυθμού. Οπότε για να αυξηθεί η παραγωγή βιοαερίου από τη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, ένζυμα μπορούν να εφαρμοστούν πριν ή κατά την αναερόβια χώνευση βιομάζας. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ένζυμα περιλαμβάνουν την κυτταρινάση και την ημικυτταρινάση. Στις περισσότερες περιπτώσεις, βάση της βιβλιογραφίας, η επίδραση των ενζύμων για την ενίσχυση της παραγωγής βιοαερίου ήταν μικρή και το κόστος ενζύμων ήταν υψηλό, επομένως λόγω και της εγγενούς υδρόλυσης που πραγματοποιείται από την αναερόβια καλλιέργεια, η εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου στην διεργασία παραγωγής βιοαερίου είναι περιορισμένη [22].

#### 2.3.5. Συνδυαστικές μέθοδοι προεπεξεργασίας

Η προεπεξεργασία της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας από φυσικές, χημικές, ή βιολογικές μεθόδους έχει ερευνηθεί για την ενίσχυση της παραγωγής βιοαερίου μέσω αναερόβιας χώνευσης. Δεδομένου του ότι η βιοδιασπασσιμότητα της βιομάζας περιορίζεται από διάφορους παράγοντες όπως η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης, το περιεχόμενο λιγνίνης και οι δεσμοί μεταξύ ημικυτταρίνης και λιγνίνης, μια μέθοδος από μόνη της δεν παρέχει ικανοποιητικά αποτελέσματα διότι δρα σε μία συγκεκριμένη κατεύθυνση όπως η προεπεξεργασία με NaOH που δρα κυρίως στην λιγνίνη και όχι στην ημικυτταρίνη, ενώ όλες οι μέθοδοι έχουν και εγγενή μειονεκτήματα. Επομένως, είναι επιθυμητό να συνδυαστούν δύο ή περισσότερες μέθοδοι προεπεξεργασίας από την ίδια ή διαφορετικές κατηγορίες και να προκύψει μια μέθοδος μεγαλύτερης απόδοσης. Σε σύγκριση με τις απλές μεθόδους προεπεξεργασίας, οι συνδυαστικές μέθοδοι μπορεί να είναι πιο επωφελείς, λόγω της υψηλότερης απόδοσης μεθανίου, της μειωμένης έντασης προεπεξεργασίας, και της πιο ολοκληρωμένης αξιοποίησης βιομάζας, καθώς αξιοποιούνται τα πλεονεκτήματα των επιμέρους μεθόδων ενώ αναιρούνται τα μειονεκτήματά τους. Ωστόσο, είναι πιθανή η αύξηση του κόστους προεπεξεργασίας, οπότε καθίσταται αναγκαία μια οικονομική ανάλυση για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας της εκάστοτε επιλογής [22].



## 2.4. Προεπεξεργασία με μύκητες

### 2.4.1. Μύκητες λευκής σήψης

Οι βασιδιομύκητες αποσύνθεσης ξύλου συνήθως χωρίζονται σε λευκής και καφέ σήψης μύκητες. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, διάφοροι μύκητες λευκής σήψης εμπλέκονται στην βιοαποικοδόμηση της λιγνίνης όπως *P. chrysosporium*, *C. subvermispora*, *Phlebia subserialis*, *Echinodontium taxodii*. Οι πλειονότητα των μυκήτων λευκής σήψης αναπτύσσονται σε σκληρά ξύλα όπως η σημύδα. Από την άλλη πλευρά, ορισμένα είδη όπως τα *Heterobasidion annosum*, *Phellinus pini*, και *P. radiata* αναπτύσσονται σε μαλακά ξύλα, όπως το πεύκο και το έλατο. Ωστόσο, η ανάπτυξη της διεργασίας της βιολογικής προεπεξεργασίας είναι ακόμα σε πρώιμο στάδιο λόγω του εξαιρετικά μεγάλου χρόνου επεξεργασίας αλλά και της δυσκολίας για επιλεκτική αποδόμηση της λιγνίνης.

Η ανάπτυξη των μυκήτων σε λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ξηρής μάζας. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μυκήτων, όλα τα κύρια συστατικά (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, και λιγνίνης) καταναλώνονται εν μέρει από το μύκητα για την ανάπτυξή του και τις μεταβολικές του δραστηριότητες. Η απώλεια και η επιλεκτική αποικοδόμηση της λιγνίνης είναι στενά συνδεδεμένη με το στέλεχος του μύκητα που πραγματοποιεί τη διεργασία της απολιγνίνωσης (προεπεξεργασίας). Για παράδειγμα, οι *Flammulina velutipes*, *Fomes marginatus*, και *Laetiporus sulfurous* αποσυνθέτουν άχυρο σίτου πολύ αργά, ως εκ τούτου, αυτοί οι μύκητες λευκής σήψης είναι ακατάλληλοι για τη βιολογική απολιγνίνωση. Ωστόσο, άλλοι μύκητες όπως οι *Ganoderma applanatum*, *Poria sp.*, και *Trametes gibbosa* αναπτύσσονται ικανοποιητικά στο άχυρο σίτου, αλλά αποδομούν σε μεγάλο βαθμό την ημικυτταρίνη και την κυτταρίνη. Επομένως, αυτά τα στελέχη δεν κρίνονται ως κατάλληλα για απολιγνίνωση. Αν και είναι πολύ δύσκολος ο διαχωρισμός της λιγνίνης από τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά, υπάρχουν μερικά είδη μυκήτων, όπως οι *Stropharia rugosoannulata*, *Hapalopilus rutilans*, *P. ostreatus*, *C. subvermispora*, *Lentinula edodes*, και *Pleurotus eryngii* που έχουν υψηλή συγγένεια με τη λιγνίνη και είναι σε θέση να καταναλώνουν λιγνίνη πιο γρήγορα από τα άλλα συστατικά της βιομάζας. Επομένως, αυτά τα στελέχη είναι καλοί απολιγνινωτές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά στη βιολογική προεπεξεργασία.

Οι μύκητες λευκής σήψης πιο συχνά αναπτύσσονται σε αγγειόσπερμα απ' ό,τι σε γυμνόσπερμα είδη ξύλου στη φύση. Διάφορες συνθήκες, όπως ο χρόνος καλλιέργειας, το pH, τα θρεπτικά συστατικά (πηγή αζώτου), και το επίπεδο του οξυγόνου έχουν βελτιστοποιηθεί από πολλούς ερευνητές, προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη αποδόμηση λιγνίνης. Η απολιγνίνωση από μύκητες λευκής σήψης λαμβάνει χώρα μέσω της δράσης του λιγνολιτικών ενζύμων όπως οι υπεροξειδάσες (LiP και MnP) και οι φαινολοξειδάσες (λακκάσες: Lac). Πρέπει να σημειωθεί ότι, αυτά τα ένζυμα ρυθμίζονται από πηγές άνθρακα και αζώτου. Τέλος, σχεδόν όλοι οι μύκητες λευκής σήψης παράγουν Lac και MnP, αλλά μόνο μερικοί από αυτούς παράγουν LiP.

Οι μύκητες λευκής σήψης αποδομούν την λιγνίνη της βιομάζας με δύο διαφορετικούς τρόπους, επιλεκτικά και μη-επιλεκτικά. Στη μη-επιλεκτική αποδόμηση, όλα τα συστατικά (λιγνίνη, κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) αποδομούνται εξίσου, ενώ στην επιλεκτική αποδόμηση διασπώνται κυρίως η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη. Περισσότερα από 1.500 είδη μυκήτων λευκής σήψης είναι σε θέση να αποσυνθέσουν τη λιγνίνη με μικρή κατανάλωση κυτταρίνης. Υπάρχουν επίσης ορισμένοι μύκητες που είναι σε θέση να αποδομούν το ίδιο ξύλο και με τα δύο είδη της επιλεκτικής και

της μη-επιλεκτικής αποδόμησης με πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα του *G. applanatum* και *H. annosum*. Ωστόσο, η αναλογία αποδόμησης λιγνίνης, ημικυτταρίνης και κυτταρίνης από ένα επιλεγμένο μύκητα μπορεί να διαφέρει πάρα πολύ και ακόμη, διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους, για παράδειγμα, *P. chrysosporium* και *C. subvermispora*, μπορούν να ενεργήσουν με άλλο τρόπο στο ίδιο είδος ξύλου [26].

**Πίνακας 12: Αποτελέσματα βιολογικής προεπεξεργασίας για διάφορα λιγνοκυτταρινούχα συστατικά [26].**

Raw material	Strain name	Weight loss (%)	Lignin loss (%)	Cellulose loss (%)	Hemicellulose loss (%)
Softwood, <i>Pinus densiflora</i>	<i>Ceriporia laceratalacerate</i>	9.5 ± 0.5	13.1 ± 0.4	8.0 ± 0.5	–
	<i>Polyporus brumalis</i>	9.9 ± 0.4	11.6 ± 0.3	10.6 ± 0.3	–
	<i>Stereum hirsutum</i>	10.7 ± 0.7	14.5 ± 0.4	7.8 ± 0.3	–
Sugarcane trashes	<i>Cellulomonas cartae</i>	15.5 ± 3.83	5.5 ± 0.26	25.4 ± 0.66	–
	<i>Cellulomonas uda</i>	24.3 ± 2.06	5.5 ± 0.25	21.8 ± 1.25	–
	<i>Bacillus macerans</i>	17.5 ± 0.49	5.5 ± 0.22	30.4 ± 0.51	–
<i>Prosopis juliflora</i> wood	<i>Zymomonas mobilis</i>	17.9 ± 0.54	8 ± 0.51	26.8 ± 0.63	–
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	18.87 ± 1.11	8.87 ± 0.22	4.06 ± 0.18	–
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	15.4 ± 1.88	13.13 ± 1.32	2.34 ± 0.54 <sup>a</sup>	–
<i>Lantana camara</i> wood	<i>Echinodontium taxodii</i>	32.5 ± 1.7	45.6 ± 2.0	26.7 ± 0.2	50.8 ± 1.8
Chinese willow ( <i>Salix babylonica</i> , hardwood)	<i>Echinodontium taxodii</i>	24.1 ± 0.9	39.8 ± 1.2	12.6 ± 0.1	31.4 ± 2.7
China-fir ( <i>Cunninghamia lanceolata</i> , softwood)	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	18.8	39.2	4.8 ± 0.25	28 ± 0.5
Corn stover	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	14.59 ± 0.28	31.33 ± 1.01	4.49 ± 1.29	22.45 ± 0.54
	<i>Echinodontium taxodii</i>	10.58	24.28	1.64	28.46
Bamboo clums	<i>Flammulina velutipes</i>	2.27	3.14	3.88	4.82
	<i>Ganoderma lucidum</i>	12.1	10.56	12.83	15.16
	<i>Trametes ochracea</i>	15.21	18.63	10.79	29.22
	<i>Trichaptum bifforme</i>	11.04	12.54	8.48	32.7
	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	31.9 ± 0.2	19.1 ± 0.4	30.1 ± 0.5	37.5 ± 0.1
Water hyacinth	<i>Pleurotus florida</i>	28.8 ± 0.4	19.7 ± 0.3	28.5 ± 0.8	30.5 ± 0.7
	<i>Irpex lacteus</i>	–	17.87 ± 0.83	48.20 ± 0.92	18.50 ± 0.97
Moso Bamboo	<i>Fomes fomentarius</i>	–	35 ± 1	45 ± 1	51 ± 27
Wheat straw	<i>Auricularia polytricha</i> , <i>Irpex lacteus</i>	–	17.8 ± 1.0	31.5 ± 0.8	16.8 ± 0.9

#### 2.4.2. Λιγνολυτικά ένζυμα

Είναι γνωστό ότι η υπεροξειδάση λιγνίνης (LiP), η υπεροξειδάση μαγγανίου (MnP), και η λακκάση είναι τα τρία κύρια οξειδωτικά ένζυμα που εκκρίνονται από τους μύκητες λευκής σήψης και είναι υπεύθυνα για τη αποδόμηση της λιγνίνης. Ωστόσο, δεν ανιχνεύονται όλα αυτά τα ένζυμα στις καλλιέργειες των μυκήτων λευκής σήψης. Για παράδειγμα, ο *P. chrysosporium* παράγει LiP και MnP, αλλά όχι λακκάση. Η υπεροξειδάση λιγνίνης (επίσης «λιγνινάση», EC 1.11.1.14) είναι μια αιμοπρωτεΐνη, που συμμετέχει στην οξειδωτική διάσπαση των μη φαινολικών αρωματικών χαρακτηριστικών ομάδων της λιγνίνης και παρόμοιων ενώσεων. Η υπεροξειδάση μαγγανίου (EC 1.11.1.13) είναι ένα ένζυμο που εκκρίνεται για τη αποδόμηση της λιγνίνης και δρα καταλύοντας τη χημική αντίδραση που οξειδώνει πολυάριθμες φαινολικές ενώσεις, ειδικά της συριγνύλης (3, 5-διμεθοξυ-4-υδροξυφαινόλες) και τις βινύλο-υποκατεστημένες πλευρικές αλυσίδες παρουσία  $Mn^{2+}$ . Οι λακκάσες (EC 1.10.3.2) είναι ένζυμα οξειδάσης που περιέχουν χαλκό που δρουν σε φαινόλες και παρόμοια μόρια, εκτελώντας οξειδώσεις ενός ηλεκτρονίου. Τα λιγνολυτικά ένζυμα ακόμα φαίνεται να μην εξειδικεύονται στα διαφορετικά υποστρώματα λιγνίνης και να δρουν με τις ίδιες αντιδράσεις αποδόμησης (διττή συμπεριφορά). Για παράδειγμα, οι LiP και MnP φαίνεται να αποδομούν μη φαινολική λιγνίνη με οξείδωση ενός ηλεκτρονίου στον αρωματικό δακτύλιο, οπότε είναι εμφανές ότι υπάρχουν συνεργειακά φαινόμενα ανάμεσα στα ένζυμα. Ακόμη, υπάρχει η πηκτική υπεροξειδάση (VP) που απομονώνεται από *Pleurotus* και *Bjerkandera* θεωρείται ως το τρίτο είδος υπεροξειδάσης, καθώς αποτελεί ένα υβρίδιο LiP-MnP και είναι ικανή για την αποικοδόμηση φαινολικών και μη φαινολικών ενώσεων.

Ωστόσο, λόγω της περίπλοκης και ετερογενούς φύσης της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας, ο ρόλος των λιγνιολυτικών ενζύμων για την αποσύνθεση σε πρώιμο στάδιο των πρώτων υλών εξακολουθεί να παραμένει ασαφής. Έχει αποδειχθεί ότι τα λιγνολυτικά ένζυμα λόγω μεγάλου μοριακού βάρους δεν μπορούν να διαχυθούν στο κυτταρικό τοίχωμα. Όμως, τα οξειδωτικά ένζυμα είναι ενεργά στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος με αποτέλεσμα να ευνοείται ο σχηματισμός χαμηλού μοριακού βάρους προϊόντων όπως οι ελεύθερες ρίζες και το οξαλικό οξύ. Αυτές οι χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις διαχέονται στο κυτταρικό τοίχωμα του ξυλώδους υποστρώματος και διευκολύνουν τη διείσδυση των ενζύμων αποικοδόμησης της λιγνίνης [26-27].

### 2.4.3. Διεργασία προεπεξεργασίας με μύκητες

Η διεργασία της προεπεξεργασίας λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας με βιολογικό τρόπο πραγματοποιείται σε στερεά κατάσταση<sup>2</sup> για την ελαχιστοποίηση της χρήσης νερού και του όγκου του αντιδραστήρα. Ακόμα, η στερεά κατάσταση εξασφαλίζει τις απαραίτητες συνθήκες για την ανάπτυξη των υφών του μύκητα στο υπόστρωμα και την επίτευξη της επιθυμητής απολιγνίνωσης. Η επεξεργασία των παραμέτρων, όπως υγρασία, θερμοκρασία, και ο αερισμός, είναι υψηλής σημασίας για την αποικοδόμηση της λιγνίνης. Γενικά, αναφέρεται ότι ένα υγρό περιβάλλον ευνοεί την ανάπτυξη των μυκήτων και τη δραστηριότητα τους καθώς τα θρεπτικά συστατικά μπορούν να είναι άμεσα προσβάσιμα στους μύκητες μέσω διάχυσης. Παρακάτω θα γίνει ανάλυση των παραμέτρων της διεργασίας [27].

#### 2.4.3.1. Εμβόλιο

Το εμβόλιο για την στερεάς κατάστασης προεπεξεργασία με μύκητες μπορεί να παρασκευαστεί με διαφορετικές μεθόδους, όπως ανάπτυξη μικκυλίων σε υγρό μέσο ή άγαρ και καλλιέργεια μυκητιακών αποικιών σε σπόρους δημητριακών. Υπάρχουν μύκητες όπως ο *Phanerochaete chrysosporium* που παράγουν σπόρια, οπότε ο εμβολιασμός και η ανάμειξη είναι πιο εύκολη σε σχέση με τους μύκητες λευκής σήψης που δεν παράγουν σπόρια οπότε χρησιμοποιείται καλλιέργεια προαποικισμού (προετοιμασμένο εμβόλιο) για τον εμβολιασμό. Ακόμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εμβόλιο και λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα που έχει υποστεί ήδη επεξεργασία για τον εμβολισμό του φρέσκου υποστρώματος. Επιπλέον, μια ελάχιστη ποσότητα εμβολίου απαιτείται για τον αποτελεσματικό αποικισμό και την επακόλουθη απολιγνίνωση. Τέλος, η περαιτέρω αύξηση στην ποσότητα του εμβολίου έχει μόνο οριακή επίδραση στην ρυθμό αποικισμού του μύκητα και την επακόλουθη ανάπτυξη.

#### 2.4.3.2. Υγρασία

Το αρχικό περιεχόμενο υγρασίας του υποστρώματος είναι σημαντική παράμετρος για την μυκητιακή ανάπτυξη και επηρεάζει τον δευτερογενή μεταβολισμό στη διεργασία της προεπεξεργασίας με μύκητες. Προηγούμενες μελέτες πρότειναν ότι αρχική υγρασία που κυμαίνεται από 70 έως 80% ήταν το βέλτιστο επίπεδο για τη διεργασία της απολιγνίνωσης από μύκητες λευκής σήψης. Σε γενικές γραμμές, η υψηλή υγρασία είναι ευνοϊκή για τον σχηματισμό των μικκυλίων, αλλά όχι κατ' ανάγκη για την επίτευξη αυξημένης απολιγνίνωσης. Ένα ακόμα μειονέκτημα της υψηλής υγρασίας είναι το μειωμένο φορτίο στερεών για την προεπεξεργασία με μύκητες. Από την άλλη

<sup>2</sup> Στερεάς κατάστασης προεπεξεργασία με μύκητες περιλαμβάνει αποικοδόμηση της πρώτης ύλης με φόρτιση στερεών μεγαλύτερη από ή ίση του 20%.

πλευρά, πολύ χαμηλή υγρασία θα μπορούσε να περιορίσει την απολιγνίνωση με μύκητες, αφού δεν παρέχεται αρκετό νερό για τη μυκητιακή ανάπτυξη.

#### 2.4.3.3. Κοκκομετρία

Το μέγεθος των σωματιδίων του υποστρώματος είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση της διεργασίας. Μεγάλο μέγεθος σωματιδίων μπορεί να παρεμποδίσει τη διείσδυση των μυκήτων στη βιομάζα και επίσης εμποδίζει την διάχυση του αέρα, του νερού, και των ενδιάμεσων μεταβολιτών ανάμεσα στα σωματίδια της βιομάζας. Ωστόσο, η μειωμένη κοκκομετρία (αυξημένη λεπτότητα) του υλικού οδηγεί σε μειωμένο μέγεθος διασωματιδιακών καναλιών, που επηρεάζει αρνητικά την κυκλοφορία των αερίων, με αποτέλεσμα να προκύπτει μειωμένος ρυθμός απολιγνίνωσης.

#### 2.4.3.4. Προσθήκη διεγερτών και θρεπτικών συστατικών

Η συμπλήρωση διεγερτών, όπως  $Mn^{2+}$ ,  $H_2O_2$ , και αρωματικών ενώσεων, μπορεί δυνητικά να διεγείρει την έκκριση λιγνινολυτικών ενζύμων και την αποδόμηση της λιγνίνης. Ακόμα, η προσθήκη θρεπτικών συστατικών προκαλεί αυξημένο σχηματισμό μυκητιακής βιομάζας και διευκολύνει επίσης τον αποικισμό στα βαθύτερα στρώματα των πρώτων υλών. Ως χαμηλού κόστους πηγή C/N, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το υγρό εμποτισμού από καλαμπόκι, καθώς χρησιμοποιείται εμπορικά για να αυξήσει την μυκητιακή βιομάζα σε διεργασίες βιοπολιτοποίησης, ώστε να μειωθεί η ενεργειακή κατανάλωση στις κατόπιν διεργασίες μηχανικής πολτοποίησης. Πρέπει να σημειωθεί ότι, για τους περισσότερους μύκητες λευκής σήψης, ο αποπολυμερισμός λιγνίνης πραγματοποιείται υπό περιορισμό αζώτου, οπότε η προσθήκη συμπληρωματικού αζώτου μπορεί να αναστείλει την αποδόμηση της λιγνίνης, τονώνοντας παράλληλα την αύξηση της μυκητιακής βιομάζας και την κατανάλωση υδατανθράκων. Άρα, υπάρχει βέλτιστη ποσότητα αζώτου ώστε να επιτευχθεί αποτελεσματική διείσδυση στη βιομάζα και παράλληλα απολιγνίνωση.

#### 2.4.3.5. Θερμοκρασία

Σε γενικές γραμμές, οι ασκοδιομύκητες λευκής σήψης αναπτύσσονται καλά περίπου στους  $39^{\circ}C$  ενώ οι βασιδιομύκητες λευκής σήψης μπορούν να αναπτυχθούν μεταξύ  $15$  και  $35^{\circ}C$ , όμως υψηλός ρυθμός απολιγνίνωσης επιτυγχάνεται στην περιοχή θερμοκρασίας  $25 - 30^{\circ}C$ . Ακόμα, ο μεταβολισμός των μυκήτων λευκής σήψης παράγει θερμότητα και προκαλεί θερμοκρασιακές βαθμίδες στην καλλιέργεια στερεάς κατάστασης. Η συσσωρευμένη θερμότητα μπορεί να σκοτώσει ή να αναστείλει την ανάπτυξη μυκήτων και να επηρεάσει τον μεταβολισμό τους. Ως εκ τούτου, για τη κλιμάκωση μεγέθους (scale-up) της διεργασίας, η απαγωγή θερμότητας είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη στο σχεδιασμό βιοαντιδραστήρα.

#### 2.4.3.6. Αερισμός

Ο αερισμός είναι γνωστό ότι επηρεάζει σημαντικά την απόδοση των διεργασιών στερεάς κατάστασης. Δεδομένου ότι η αποδόμηση της λιγνίνης είναι μια οξειδωτική διαδικασία, η διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι σημαντική για τη λιγνινολυτική ενζυμική δραστηριότητα των μυκήτων λευκής σήψης. Σε αντιδραστήρες κωνικής φιάλης (<500ml), η παθητική διάχυση του αέρα μέσω βαμβακιού είναι επαρκής, καθώς εμφανίζεται εξαναγκασμένη κυκλοφορία αέρα κατά τη διεργασία της απολιγνίνωσης. Ωστόσο, για τους αντιδραστήρες που περιέχουν πακτωμένη πρώτη ύλη ο ενεργός αερισμός είναι αναγκαίος ώστε να επιταχύνεται ομοιόμορφη διάχυση

του αέρα σε όλο το υπόστρωμα. Επομένως, η παράμετρος του αερισμού θα πρέπει να ελέγχεται ώστε να εξασφαλίζεται η απόδοση της προεπεξεργασίας με μύκητες.

#### 2.4.3.7. Απολύμανση

Απολύμανση των πρώτων υλών (με αέριο, ατμό ή χημικές ουσίες) μπορεί αποτελεσματικά να σκοτώσει ή να αναστείλει την λειτουργία των αυτοχθόνων μικροοργανισμών της πρώτης ύλης και γενικά απαιτείται πριν από τη προεπεξεργασία με μύκητες, ειδικά για τους βασιδιομύκητες λευκής σήψης. Αν και η έρευνα έχει δείξει ότι, η πλειονότητα των μυκήτων απολιγνίνωσης δεν επηρεάζεται κατά τη διεργασία της απολιγνίνωσης από τους εγγενείς μικροοργανισμούς της βιομάζας, σε μεγαλύτερη κλίμακα εφαρμογών, η απολύμανση είναι απαραίτητη και αποτελεί μία από τις σημαντικότερες δαπάνες για προεπεξεργασία με μύκητες. Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι η πλήρης αποστείρωση δεν ήταν αναγκαία και αρκεί η χρήση ατμισμού με ατμοσφαιρικής πίεσης ατμό για μικρό χρονικό διάστημα (~ 15 s), ενώ, αντί της απολύμανσης με ατμοσφαιρικό ατμό ή αυτόκλειστο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν χαμηλού κόστους χημικά όπως θειικό νάτριο ή όξινο θειικό νάτριο, που έχει αναφερθεί ότι είναι αποτελεσματικά σε συγκεντρώσεις 600-1200 ppm για απολύμανση των υπολειμμάτων ξυλείας.

#### 2.4.3.8. Χρόνος προεπεξεργασίας

Ο μεγάλος απαιτούμενος χρόνος προεπεξεργασίας, λόγω των χαμηλών ρυθμών απολιγνίνωσης, είναι ένα από τα σημαντικότερα εμπόδια για την μεγάλης κλίμακας εφαρμογή της προεπεξεργασίας με μύκητες. Γενικά, αρκετές εβδομάδες έως μήνες απαιτούνται για την επίτευξη ενός υψηλού βαθμού απολιγνίνωσης [28].

### **2.4.4. Συνδυασμός βιολογικών μεθόδων προεπεξεργασίας με άλλες μεθόδους**

Με σκοπό την επίτευξη της αποτελεσματικής βιολογικής επεξεργασίας, η μέθοδος μπορεί να συνδυαστεί με μεθόδους φυσικής και χημικής προεπεξεργασίας καθώς το κύριο μειονέκτημα της βιολογικής προεπεξεργασίας είναι η απώλεια πολυσακχαριτών (κυτταρίνης/ημικυτταρίνης) και η μεγάλη διάρκεια προεπεξεργασίας σε σχέση με τις χημικές και φυσικές μεθόδους. Ο συνδυασμός της βιολογικής προεπεξεργασίας με μεθόδους χημικής/φυσικής προεπεξεργασίας μπορεί να ενισχύσει τη μετατροπή της βιομάζας σε ζυμώσιμα σάκχαρα και να βελτιώσει την απόδοση της προεπεξεργασίας σε σύγκριση με την καθεμία μέθοδο ξεχωριστά.

Είναι προφανές ότι η χημική/φυσική προεπεξεργασία πριν από τη βιολογική προεπεξεργασία καθιστά το υπόστρωμα πιο προσβάσιμο για τους μύκητες που αποδομούν τη λιγνίνη. Ως εκ τούτου, είναι αναγκαία η βελτιστοποίηση της συνολικής διεργασίας προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί το συνολικό κόστος της προεπεξεργασίας, ο χρόνος και οι απαιτήσεις σε ενέργεια, και να μεγιστοποιηθεί η απόδοση των κατάντη διεργασιών (αναερόβια χώνευση). Ο συνδυασμός μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους (i) τη χημική/φυσική προεπεξεργασία πριν από τη βιολογική προεπεξεργασία, (ii) τη χημική/φυσική επεξεργασία μετά από βιολογική επεξεργασία [26].

**Πίνακας 13: Συγκρίσεις συνδυασμού βιολογικών μεθόδων προεπεξεργασίας λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας με χημικές/φυσικές μεθόδους.**

Raw materials	Chemical/physical pretreatment	Biological treatment	Achievement
Rice straw	Steam explosion prior to biological pretreatment	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Reduction in pretreatment duration from 60 days to 36 days for obtaining 33 % glucose yield
Rice straw	Pretreated with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 %, 48 h) before biological pretreatment	<i>Echinodontium taxodii</i>	Reduction in pretreatment duration from 60 days to 18 days
Water hyacinth	After the biological pretreatment, 0.25 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> acid treatment	<i>Echinodontium taxodii</i> , <i>Eichhorina crassipes</i>	Sugar yield increased by a factor of 1.13 to 2.11
Beech wood chips	Biological pretreatment prior to organosolv treatment	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Ethanol yield increased by 1.16 times and saved 15 % electrical energy
<i>Pinus radiata</i>	Biological pretreatment carried out prior to ethanolysis	<i>Gloephyllum trabeum</i>	Increased solvent accessibility and decreased H factor from 6,000 to 1,156 for obtaining 161 g ethanol/kg of wood
Corn stover	Thermochemical decomposition after the biological pretreatment	<i>Fomitopsis</i> sp. IMER2	Oil yield increased from 32.7 % to 50.8 %
Corn stalks	Alkaline treatment after the biological pretreatment	<i>Irpex lacteus</i>	Lignin loss increased from 75.67 % to 80 %
Wheat straw	Thermal decomposition after the biological pretreatment	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Significant reduction in the thermal degradation temperature
Corn straw	Biological pretreatment for 15 days followed by alkali/oxidative pretreatment	<i>Echinodontium taxodii</i>	Sugar yield increased by 50.7 %

#### 2.4.5. Προκλήσεις στη βιολογική προεπεξεργασία

Η απώλεια σακχάρων και ο σχετικά μεγάλος χρόνος της προεπεξεργασίας σε σύγκριση με τη φυσική/χημική προεπεξεργασία αποτελούν σημαντικές προκλήσεις για τη διεργασία της βιολογικής προεπεξεργασίας. Ακόμα, η βιολογική προεπεξεργασία απαιτεί περισσότερο χώρο και μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ως εκ τούτου, αυξάνεται η πιθανότητα μόλυνσης. Κατά συνέπεια, αυτοί οι παράγοντες αυξάνουν το κόστος της διαδικασίας.

Για να ξεπεραστούν τα παραπάνω προβλήματα και να καταστεί η διαδικασία πιο αποδοτική και ωφέλιμη, θα πρέπει να επιλεγθεί και αξιοποιηθεί ο κατάλληλος μικροοργανισμός, ώστε να μπορεί να μειωθεί η δυστροπία των λιγνοκυτταρινούχων υλικών με την ελάχιστη απώλεια σακχάρων και σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η αποτελεσματικότητα της βιολογικής προεπεξεργασίας επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως:

- Επιλογή στελέχους: Το στέλεχος πρέπει να έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τη λιγνίνη σε σχέση με τα άλλα συστατικά.
- Υψηλό ποσοστό αποδόμησης της λιγνίνης
- Απαιτήσεις πηγής αζώτου
- Απαιτήσεις σε ιχνοστοιχεία

Όσον αφορά την μείωση του κόστους επένδυσης, του χρόνου επώασης και την αποτελεσματική βιολογική προεπεξεργασία με ελάχιστη απώλεια σακχάρων, οι ακόλουθες προσεγγίσεις μπορούν να εφαρμοστούν:

- Συνδυασμός βιολογικών και χημικών/φυσικών μεθόδων για την αποδοτική προεπεξεργασία των λιγνοκυτταρινούχων υλικών.
- Χρήση προηγμένων εργαλείων, όπως βιοπληροφορικής και μεταγονιδιωματικής, για την αύξηση της απόδοσης της διεργασίας. Για παράδειγμα, η αφαίρεση των γονιδίων για τα ένζυμα της κυτταρινάσης/ημικυτταρινάσης.
- Νέα στελέχη ή νέα ένζυμα μπορούν να απομονωθούν για την καλύτερη αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινών.
- Χρήση αναστολέων ή μεταβολιτών για την παρεμπόδιση της δράσης των κυτταρινασών και την ενίσχυση της δράσης των λιγνολυτικών ενζύμων αντίστοιχα[26].



### **3. Πειραματικό μέρος**

#### **Όργανα – Ειδικές συσκευές**

- Συσκευή εκχύλισης Soxhlet
- Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας 0,1mg (Kern ABS 220-4)
- Διηθητική συσκευή κενού
- Πεχάμετρο (Seko PR 75-A)
- Μετρήτης υγρασίας (ADAM AMB 50)
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Hitachi U-200)
- Πυριατήριο (Memmert)
- Κάμινος (Sunlight)
- Αυτόκλειστο
- Περιδυνητής (Vortex)
- Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM JEOL 6380 GSM)
- Macropore Unit 120
- Porosimeter 2000

#### **Αντιδραστήρια**

- Potato Dextrose Agar (10,25% potato starch from infusion, 51.29% Dextrose, 38.46% Agar, Difco)
- Malt extract (Merck)
- Αιθυλική αλκοόλη 95%v/v (Merck)
- DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid) (Alfa Aesar)
- Potassium sodium tatarate
- Διάλυμα εργασίας Glucotest (εμπορικό kit BioSis)
- Θεϊκό οξύ ( $H_2SO_4$ ) 96-98% (Sigma Aldrich)
- Ανθρακικό ασβέστιο ( $CaCO_3$ ) (Merck)
- Διχρωμικό κάλιο ( $K_2Cr_2O_7$ )
- Θεϊκός υδράργυρος ( $HgSO_4$ )
- Θεϊκός άργυρος ( $Ag_2SO_4$ )
- NaOH (Penta)
- $NaNO_2$  (Merck)
- $KHSO_4$  (Ferak)
- $NH_4SO_3NH_2$  (Sigma Aldrich)
- 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazonehydrochloride (MBTH) (Sigma Aldrich)
- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (Merck)
- Αντιδραστήριο Bradford
- $Na_2HPO_4$  (Hewlab)
- $NaH_2PO_4$  (Hewlab)
- Υδράργυρος

#### **3.1. Προετοιμασία εμβολίου**

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια της συλλογής των μυκήτων (βλ. Πίνακα 14) του Εργαστηρίου Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας που βρίσκονταν στην συντήρηση (4°C). Η ανακαλλιέργεια έγινε σε τριβλία Petri με θρεπτικό συστατικό PDA (potato dextrose agar) 39g/L. Ο χρόνος ανάπτυξης στα νέα Petri ήταν 7 ημέρες. Στην συνέχεια, από τα νέα ανεπτυγμένα petri λήφθηκε εμβόλιο σε μορφή κομματιών

μεγέθους 1x1cm για υγρές καλλιέργειες. Οι υγρές καλλιέργειες παρασκευάστηκαν από 20g/L εκχύλισμα βύνης (malt extract) σε κωνική φιάλη των 100mL, κάθε κωνική πληρώθηκε με 50mL θρεπτικού, πωματίστηκε με υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και αποστειρώθηκε για 20min σε αυτόκλειστο (121°C). Η χρήση βαμβακιού και αλουμινόχαρτου εξασφαλίζει την αποφυγή εισροής υγρασίας από το αυτόκλειστο και τον αερισμό της καλλιέργειας. Έπειτα, οι καλλιέργειες εμβολιάστηκαν με 2-3 κομμάτια εμβολίου και αναπτύχθηκαν για 7 ημέρες. Τέλος, οι υγρές καλλιέργειες με χρήση μηχανικού αναδευτήρα αλέσθηκαν και έγινε εμβολισμός της στερεής καλλιέργειας με 2 mL αλεσμένης υγρής καλλιέργειας.

**Πίνακας 14: Στελέχη μυκήτων εργαστηρίου χημικής τεχνολογίας**

α/α	Στέλεχος	AMRL
1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	141
2	<i>Pleurotus ostreatus</i>	
3	<i>Pleurotus ostreatus wild</i>	
4	<i>Pleurotus ostreatus</i>	135
5	<i>Pleurotus ostreatus</i>	136
6	<i>Pleurotus ostreatus</i>	138
7	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	177
8	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	178
9	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	179
10	<i>Pleurotus erygnii</i>	
11	<i>Ganoderma australe</i>	316
12	<i>Ganoderma resinaseum</i>	325
13	<i>Ganoderma applanatum</i>	341
14	<i>Lentinula edodes</i>	119
15	<i>Lentinula edodes</i>	121
16	<i>Lentinula edodes</i>	122
17	<i>Coprinus xanthophrix</i>	350
18	<i>Polyporus brumalis</i>	251
19	<i>Polysporus sp2</i>	242
20	<i>Psathyrella sp.</i>	352
21	<i>Pholiota aurivella</i>	
22	<i>Chemeng fungi</i>	

### 3.2. Προετοιμασία στερεής καλλιέργειας

Σωλήνες διαστάσεων 19,7x2,6 (lxd) αριθμήθηκαν και ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0,1mg, στην συνέχεια πληρώθηκαν με ενυδατωμένη ιτιά κοκκομετρίας 710μm και υγρασίας 80% (~20g) και ζυγίστηκαν για την ακριβή γνώση της μάζας της πρώτης ύλης. Έπειτα, οι σωλήνες πωματίστηκαν με υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο, αποστειρώθηκαν και ζυγίστηκαν για την διερεύνηση της απώλειας υγρασίας. Στην συνέχεια, εμβολιάστηκαν με 2mL του παραπάνω υγρού εμβολίου και ζυγίστηκαν με σκοπό την διερεύνηση της απώλειας μάζας κατά την προεπεξεργασία. Παρόμοια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για το υλικό κοκκομετρίας 750μm και υγρασίας 75%. Τέλος, έγινε διήθηση υπό κενό ενός αντιπροσωπευτικού υγρού εμβολίου και υπολογίστηκαν τα ολικά στερεά του εμβολίου.

### **3.3. Προσδιορισμός εκχυλίσμων ουσιών βιομάζας**

Αρχικά, γίνεται ξήρανση των υαλικών της εκχυλιστικής συσκευής στο πυριαντήριο για 12 ώρες στους  $105\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Μετά το πέρας του παραπάνω χρόνου, πραγματοποιείται ψύξη στον ξηραντήρα μέχρι τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και ζύγιση του κλασματήρα με τους πυρήνες βρασμού, το βάρος καταγράφεται ως ODW (oven dry weight). Έπειτα, προσθέτονται 2 – 10g δείγματος στην προζυγισμένη δακτυλήθρα (χαρτούσα) εκχύλισης και καταγράφεται το βάρος με ακρίβεια 0,1 mg. Ακόμα, κρίνεται αναγκαίο να σημειωθεί ότι, το ύψος της βιομάζας δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το ύψος του σιφωνίου. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη  $190\pm 5\text{ml}$  αιθανόλης στον κλασματήρα και ρύθμιση της παρεχομένης θερμότητας από τον μανδύα ώστε να γίνονται 6 – 10 κύκλοι ανά ώρα. Η επανακυκλοφορία του διαλύτη πραγματοποιείται για 16 – 24 ώρες και όταν ολοκληρωθεί, κλείνεται η παροχή θερμότητας και αφού ψυχθεί η συσκευή, η παροχή νερού ψύξης. Μετά, μεταφέρεται το υπολειμματικό στερεό ποσοτικά στη διηθητική συσκευή και πραγματοποιείται έκπλυση των στερεών με 100ml φρέσκου διαλύτη και ξήρανση με υπό κενό διήθησή (ή σε ατμοσφαιρικές συνθήκες). Τέλος, απομακρύνεται ο διαλύτης εκχύλισης με χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα, εξοπλισμένου με υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους  $40\pm 5^{\circ}\text{C}$  και πηγή κενού, γίνεται ξήρανση του κλασματήρα στο πυριαντήριο για 24 ώρες στους  $105\pm 5^{\circ}\text{C}$  και ζύγιση για τον υπολογισμό του εκχυλίσμου κλάσματος [29].

### **3.4. Προσδιορισμός σακχάρων στο υγρό κλάσμα των προϊόντων προεπεξεργασίας**

Αρχικά, παρασκευάζεται ένα αιώρημα  $10\%w/v$  σε υγρή βάση<sup>3</sup> για το στερεό (5g υγρού στερεού στα 50mL αιωρήματος) και πραγματοποιείται επώαση στους  $50^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και έκπλυση του υπολείμματος με 2 όγκους νερού (50mL κάθε φορά). Τα επιμέρους διηθήματα (συνολικά 3) διατηρούνται και ογκομεντρούνται ενώ το υπόλειμμα μεταφέρεται ποσοτικά σε συσκευή Soxhlet για την πραγματοποίηση εξαντλητικής εκχύλισης με αιθανόλη για 2 ώρες. Παράλληλα με την πραγματοποίηση της εξαντλητικής εκχύλισης στο πρώτο και πιο πυκνό διήθημα πραγματοποιείται μέτρηση pH και COD (χημικά απαιτούμενου οξυγόνου), ενώ, σε όλα τα διηθήματα (3 για κάθε δείγμα) πραγματοποιούνται DNS και Glucotest. Μετά, την ολοκλήρωση του κύκλου της Soxhlet, σταματά η παροχή θερμότητας και διακόπτεται η παροχή νερού όταν η συσκευή κρυώσει. Στη συνέχεια το στερεό μεταφέρεται ποσοτικά σε διηθητική συσκευή και εκπλένεται με ένα όγκο αιθανόλης. Το στερεό τοποθετείται στο πυριαντήριο για τουλάχιστον 8 ώρες στους  $105\pm 5^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια πραγματοποιείται προσδιορισμός δομικών υδατανθράκων και λιγνίνης. Στην συγκεκριμένη μέθοδο, γίνεται η παραδοχή ότι όλοι οι μονοσακχαρίτες απομακρύνονται στο πρώτο στάδιο της υδατικής εκχύλισης [30-31].

<sup>3</sup> Η περιεκτικότητα αιωρήματος σε υγρή βάση ορίζεται η περιεκτικότητα οι οποία έχει προκύψει από τον συνυπολογισμό του στερεού και της υγρασίας του.

### 3.5. Προσδιορισμός δομικών υδατανθράκων και λιγνίνης στη βιομάζα

#### Υδρόλυση

Αρχικά, πραγματοποιείται ζύγιση  $300 \pm 10$  mg δείγματος σε φιάλη duran και καταγραφή της μάζας του με ακρίβεια 0,1mg. Ταυτόχρονα μετράται η υγρασία του δείγματος, ενώ η ανάλυση θα πρέπει να γίνεται τουλάχιστον εις διπλούν. Ο προτεινόμενος αριθμός δειγμάτων από κάθε καλλιέργεια (batch) είναι 3-6, ενώ στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Στη συνέχεια, προστίθεται  $3 \pm 0,01$  mL 72% θειικό οξύ σε κάθε φιάλη και γίνεται ανάδευση με ράβδο για 1 min μέχρι το δείγμα να διαβρέχει και αναμειχθεί καλά. Ακολουθώς οι φιάλες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους  $30 \pm 3^\circ\text{C}$  με σκοπό την επώαση του δείγματος για  $60 \pm 5$  min. Χρησιμοποιώντας ράβδο, γίνεται ανάμειξη του δείγματος κάθε 5 – 10 min χωρίς να αφαιρείται το δείγμα από το υδατόλουτρο. Η ανάμειξη είναι απαραίτητη, καθώς εξασφαλίζει τη διαβροχή των σωματιδίων από το οξύ και την ομοιόμορφη υδρόλυση. Μετά την ολοκλήρωση της υδρόλυσης, απομακρύνονται οι φιάλες από το υδατόλουτρο και αραιώνεται το οξύ σε συγκέντρωση 4% με την προσθήκη  $84 \pm 0,04$  mL απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια, αναδεύονται οι φιάλες μέχρι να εξαλειφθεί ο διαχωρισμός μεταξύ στρωμάτων υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης οξέος (το τελικό διάλυμα θα πρέπει να έχει όγκο 86,73 mL). Ακόμα, προετοιμάζεται πρότυπο ανάκτησης σακχάρων (SRS) ώστε να διορθωθούν τυχόν απώλειες που θα προκύψουν κατά την υδρόλυση με αραιό οξύ. Το SRS είναι ένα διάλυμα 10g/L γλυκόζης<sup>4</sup>. Το φιαλίδιο falkon του SRS αποψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, αναμειγνύεται με περιδύνηση και λαμβάνονται 10 ml προς μεταφορά σε φιάλη duran στην οποία προστίθεται 348 μL 72% θειικό οξύ για την επίτευξη περιεκτικότητας σε οξύ 4%. Τέλος, οι φιάλες σφραγίζονται και τοποθετούνται στο αυτόκλειστο για μια ώρα στους  $121^\circ\text{C}$ . Μετά την ολοκλήρωση του κύκλου, οι κωνικές αφήνονται να κρυώσουν αργά σε θερμοκρασία δωματίου πριν την αφαίρεση των πωμάτων τους.

#### Ανάλυση του δείγματος για μη διαλύτη σε οξύ λιγνίνη (Klason)

Διήθηση υπό κενό των υδρολυμένων δειγμάτων σε προζυγισμένους ηθμούς 0,55 μm και λήψη κάθε διηθήματος σε μία κωνική φιάλη. Στη συνέχεια, μεταφέρεται ένα μέρος του υγρού κλάσματος, περίπου 50 mL, για τον προσδιορισμό της διαλυτής σε οξύ λιγνίνης και το υπόλοιπο υγρό κλάσμα χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των δομικών υδατανθράκων. Ο προσδιορισμός θα πρέπει να γίνει σε διάστημα 6 ωρών από την υδρόλυση ή 2 εβδομάδων εφόσον το δείγμα τοποθετηθεί στο ψυγείο. Οι ηθμοί εκπλένονται με 2 όγκους (~90 mL) θερμού νερού και τοποθετούνται σε πυριατήριο στους  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  για 24 ώρες. Έπειτα, γίνεται ψύξη σε ξηραντήρα, ζύγιση με ακρίβεια 0,1 mg και τοποθέτηση των ηθμών στον φούρνο στους  $575 \pm 25^\circ\text{C}$  για 5 ώρες. Τέλος, οι ηθμοί ψύχονται σε ξηραντήρα και ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg. Η διαφορά των παραπάνω μαζών δίνει την Klason λιγνίνη.

<sup>4</sup> Δεν απαιτείται παρασκευή καινούργιου δείγματος SRS κάθε φορά, αλλά μπορεί να παρασκευαστεί μια ποσότητα και να διαμοιραστεί σε φιαλίδια falkon των 15 mL και να καταψυχθεί. Όταν απαιτηθεί η χρήση του προτύπου μπορεί να γίνει απόψυξη και περιδύνηση (vortex) του αντίστοιχου φιαλιδίου.

### Ανάλυση του δείγματος για τη διαλυτή σε οξύ λιγνίνη

Σε ένα φασματόμετρο UV-Vis γίνεται εκτέλεση μέτρησης (background) για το τυφλό δείγμα (4% θεικό οξύ). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση απορρόφησης του διηθήματος του υδρολυμένου δείγματος με φασματόμετρο UV-Vis στα 240nm σύμφωνα με την τελευταία γραμμή του πίνακα 15, λόγω της συνάφειας μεταξύ λεύκας και ιτιάς.

**Πίνακας 15: Σταθερές απορρόφησης για διάφορα είδη βιομάζας**

Biomass type	Lambda max (nm)	Absorptivity at lambda max (L/g cm)	Recommended wavelength (nm)	Absorptivity at recommended wavelength (L/g cm)
Pinus Radiata- NIST SRM 8493	198	25	240	12
Bagasse- NIST SRM 8491	198	40	240	25
Corn Stover- NREL supplied feedstock	198	55	320	30
Populus deltoides- NIST SRM 8492	197	60	240	25

Ακόμα, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η απορρόφηση θα πρέπει να είναι στην περιοχή 0,7-1 και η αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων θα πρέπει να είναι  $\pm 0,05$  μονάδες απορρόφησης.

### Ανάλυση του δείγματος για δομικούς υδατάνθρακες

Γίνεται χρήση ανθρακικού ασβεστίου για την εξουδετέρωση του δείγματος (υγρού κλάσματος που διαχωρίστηκε προηγουμένως) σε pH 5-6. Πρέπει να αποφεύγεται η εξουδετέρωση σε pH μεγαλύτερο του 6 οπότε γίνεται παρακολούθηση του pH με πεχάμετρο. Ακόμη, η προσθήκη ανθρακικού ασβεστίου θα πρέπει να γίνεται αργά μετά το pH 3 και να σταματήσει στο pH 5-6, ώστε το μείγμα να κατακαθίσει και με απόχυση του υπερκείμενου να ληφθεί ουδέτερο υγρό (pH 7). Σε καμία περίπτωση δεν θα πρέπει το pH να υπερβεί το 9, διότι αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια σακχάρων. Στην συνέχεια, πραγματοποιούνται οι μετρήσεις DNS και Glucotest για την μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων και της γλυκόζης του υδρολύματος. Σε αυτό το σημείο γίνεται παραδοχή ότι η κυτταρίνη (κύριο κλάσμα των πολυσακχαριτών εξόζης) αποτελείται μόνο από γλυκόζη και ότι από τη διαφορά (ολικών) αναγωγικών σακχάρων και γλυκόζης προκύπτει ένα κλάσμα πολυσακχαριτών (πεντόζης) που θεωρείται ότι αποτελείται μόνο από ξυλόζη (καμπύλη αναφοράς ξυλόζης) και αντιπροσωπεύει το κλάσμα της ημικυτταρίνης [32].

## **3.6. Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων**

### Αρχή μεθόδου

Η μέτρηση αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Αξίζει να σημειωθεί ότι, ως αναγωγικό σάκχαρο ορίζεται το σάκχαρο που έχει ελεύθερο ημιακεταλικό υδροξύλιο. Το υδροξύλιο της ημιακεταλικής ομάδας μπορεί να αντιδράσει με το δινιτροσαλικυλικό οξύ και να σχηματίσει ένα χρωμοφόρο σύμπλοκο που εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 540nm. Η πραγματοποίηση της παραπάνω μέτρησης απαιτεί θερμοκρασία μεγαλύτερη των 70°C.

### Παρασκευή αντιδραστηρίου DNS (1L)

Αρχικά, παρασκευάζονται 200 mL NaOH 8% w/w και προστίθενται σε σκουρόχρωμη φιάλη με 500mL απιονισμένου νερού. Έπειτα, προσθέτονται 10g DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid) και 402,7g potassium sodium tatrata σε δυο δόσεις, βροχιδών και υπό ήπια θέρμανση. Στην συνέχεια, αφήνεται το σύστημα υπό ανάδευση και χωρίς θέρμανση για ένα βράδυ και την επόμενη ημέρα διηθείται και αραιώνεται στο 1L.

### Πειραματική διαδικασία

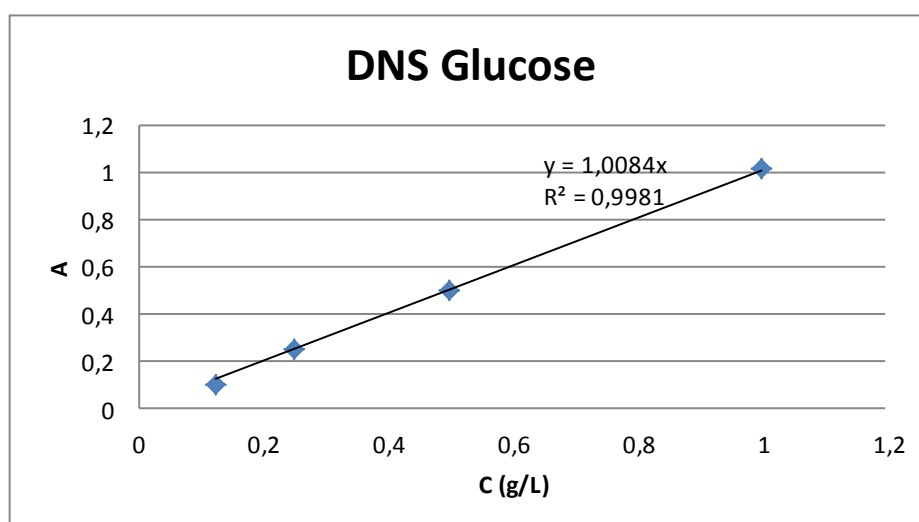
Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 250μL δειγμα και 250μL αντιδραστήριο DNS. Στην συνέχεια, ο σωλήνας περιδυνίζεται (vortex) και ακολουθεί η εμφύσηση του σε βραστό νερό για 5min ακριβώς, μετά προστίθεται 2 mL νερό γίνεται περιδύνηση και φωτομέτρηση στα 540nm [33].

### Καμπύλη βαθμονόμησης DNS σε ισοδύναμα γλυκόζης

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν 5 πρότυπα διαλύματα γλυκόζης από 0,125-2g/L ωστόσο η μέτρηση απορρόφησης για τα 2g/L απορρίφθηκε, καθώς οι μετρήσεις πραγματοποιούνται, σύμφωνα με το νόμο του Lambert – Beer, στην περιοχή απορρόφησης 0 – 1 παρά την καλή προσαρμογή της ευθείας και στην απορρόφηση των 2 g/L.

**Πίνακας 16: Αποτελέσματα βαθμονόμησης DNS σε ισοδύναμα γλυκόζης.**

C(g/L)	A
0,125	0,0985
0,25	0,246
0,5	0,497
1	1,017
2	1,938



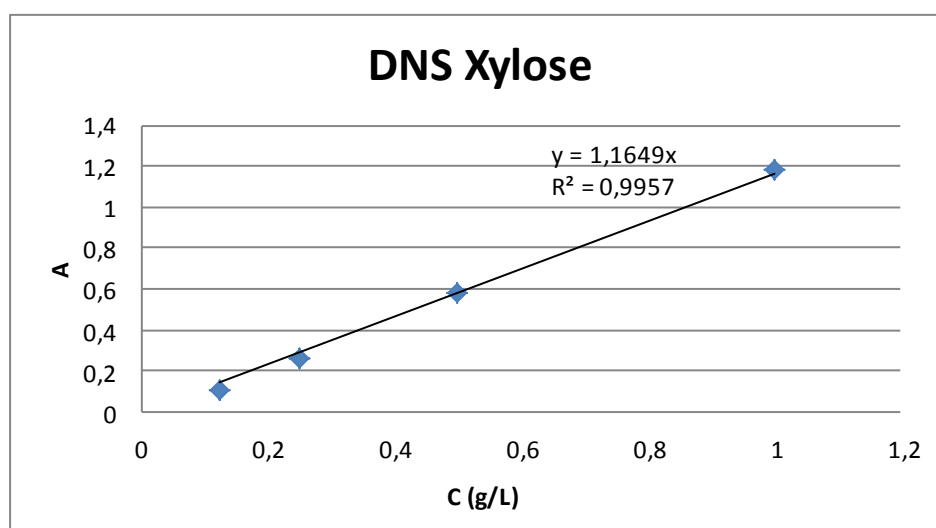
**Διάγραμμα 2: Καμπύλη βαθμονόμησης DNS σε ισοδύναμα γλυκόζης.**

### Καμπύλη βαθμονόμησης DNS σε ισοδύναμα ξυλόζης

Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε ήταν παρόμοια με αυτή της βαθμονόμησης DNS σε ισοδύναμα γλυκόζης.

**Πίνακας 17: Αποτελέσματα βαθμονόμησης DNS σε ισοδύναμα ξυλόζης.**

C(g/L)	A
0,125	0,106
0,25	0,2575
0,5	0,582
1	1,1785
2	2,235

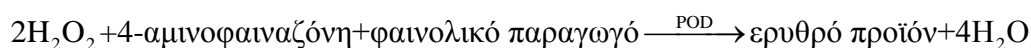
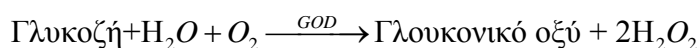


**Διάγραμμα 3: Καμπύλη βαθμονόμησης DNS σε ισοδύναμα ξυλόζης.**

### **3.7. Προσδιορισμός γλυκόζης**

#### Αρχή μεθόδου

Η μέτρηση της γλυκόζης πραγματοποιείται ενζυμικά με τη χρήση ειδικού εμπορικού σκευάσματος για αιματολογικά τεστ (kit Biosis). Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης δυο ενζύμων. Αρχικά, η γλυκόζη παρουσία του ενζύμου της οξειδάσης γλυκόζης (GOD) μετατρέπεται σε γλουκονικό οξύ και  $H_2O_2$  και το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδρά με την 4-αμινοφαιναζόνη και κάποιο φαινολικό παράγωγο παρουσία της υπεροξειδάσης της γλυκόζης (POD) που δρα ως καταλύτης (ένζυμο) προς το χρωμοφόρο προϊόν. Το χρωμοφόρο προϊόν εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 510nm.



#### Παρασκευή διαλύματος εργασίας

Το διάλυμα εργασίας προκύπτει μεταφέροντας ποσοτικά ένα φιαλίδιο ενζύμου σε ένα φιαλίδιο ρυθμιστικού διαλύματος. Το διάλυμα εργασίας είναι σταθερό για 45 ημέρες στους 2-10°C. Οι τελικές συγκεντρώσεις που προκύπτουν είναι  $GOD > 3.5 \text{ kU/L}$ ,



POD>0.08kU/L, παράγωγο φαινόλης 10mM, 4-αμινοφαιναζόνη 0,05mM και ρυθμιστικό φωσφορικών 0,1M.

#### Πειραματική διαδικασία

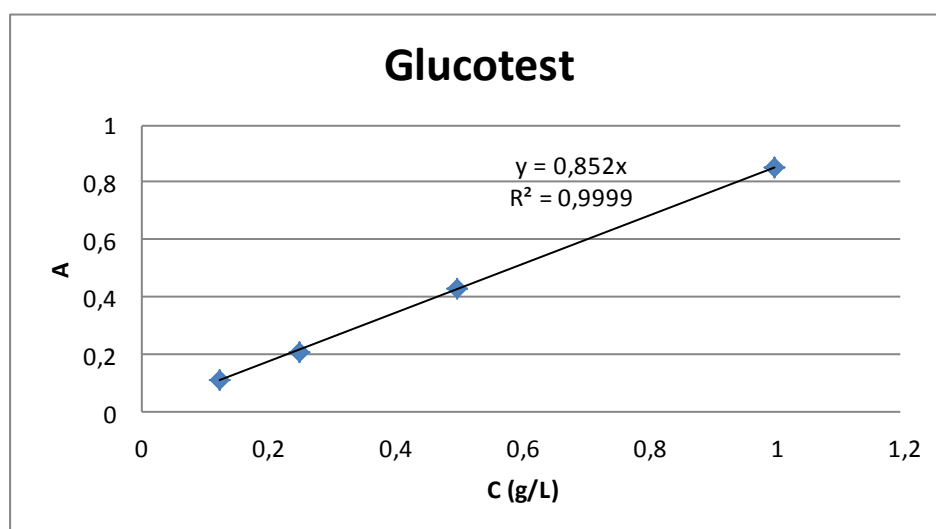
Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 25μL δείγματος και 2,5mL διαλύματος εργασίας, γίνεται περιδύνηση και τοποθέτηση σε υδατόλουτρο 37°C για 15min ακριβώς. Τέλος, γίνεται φωτομέτρηση του δείγματος στα 510nm. Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την μέτρηση το διάλυμα εργασίας τοποθετείται σε παγόλουτρο [34].

#### Καμπύλη βαθμονόμησης Glucotest

Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε ήταν παρόμοια με αυτή της βαθμονόμησης του DNS.

**Πίνακας 18: Αποτελέσματα βαθμονόμησης Glucotest.**

C(g/L)	A
0,125	0,11
0,25	0,2085
0,5	0,4295
1	0,851
2	1,61075



**Διάγραμμα 4: Καμπύλη βαθμονόμησης Glucotest**

### **3.8. Προσδιορισμός χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD)**

Ο προσδιορισμός του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου πραγματοποιείται σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο Standard Methods κεφ. 5220. Σε ένα φιαλίδιο των 6 ml προστίθενται 2 ml δείγματος (εκχυλίσματος σε νερό για 1h στους 50°C). Το δείγμα έχει υποστεί διήθηση (διαλυτό COD). Λόγω της ιδιαιτερότητας του δείγματος, προστίθεται στο φιαλίδιο αντί για 2ml δείγματος, ποσότητα δείγματος ίση με 1 ml η οποία αραιώνεται με 1ml απιονισμένου νερού ώστε ο τελικό όγκος να είναι 2ml (αραίωση ½). Το δείγμα προστίθεται στο φιαλίδιο το οποίο περιέχει 1,2 ml διαλύματος διχρωμικού καλίου και 2,8 ml καταλύτη. Το διάλυμα διχρωμικού καλίου περιέχει θειικό οξύ (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) και θειικό υδράργυρο (HgSO<sub>4</sub>) και το διάλυμα καταλύτη περιέχει θειικό οξύ και θειικό άργυρο (AgSO<sub>4</sub>). Ο θειικός υδράργυρος προστίθεται

στο φιαλίδιο ώστε να προστατέψει τα ιόντα αργύρου, επομένως και την απόδοση του καταλύτη, από ιόντα χλωρίου, βρωμίου και ιωδίου που μπορεί να βρίσκονται στο δείγμα και δημιουργούν με τα ιόντα αργύρου ( $\text{Ag}^+$ ) ίζημα. Το πρωτόκολλο αναφέρει πως 1g  $\text{HgSO}_4$  επαρκεί για 50 ml δείγματος. Το φιαλίδιο εν συνεχεία ανακινείται έως ότου το μείγμα να γίνει ομοιογενές και στη συνέχεια τοποθετείται προς θέρμανση σε ειδικό φούρνο (HACH Lange L200) για 120 λεπτά στους  $148^\circ\text{C}$ . Τέλος, όταν τα φιαλίδια αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου φωτομετρούνται στα 600nm εντός των αρχικών φιαλιδίων που λειτουργούν και ως κυψελίδες [35].

#### Παρασκευή αντιδραστηρίων COD

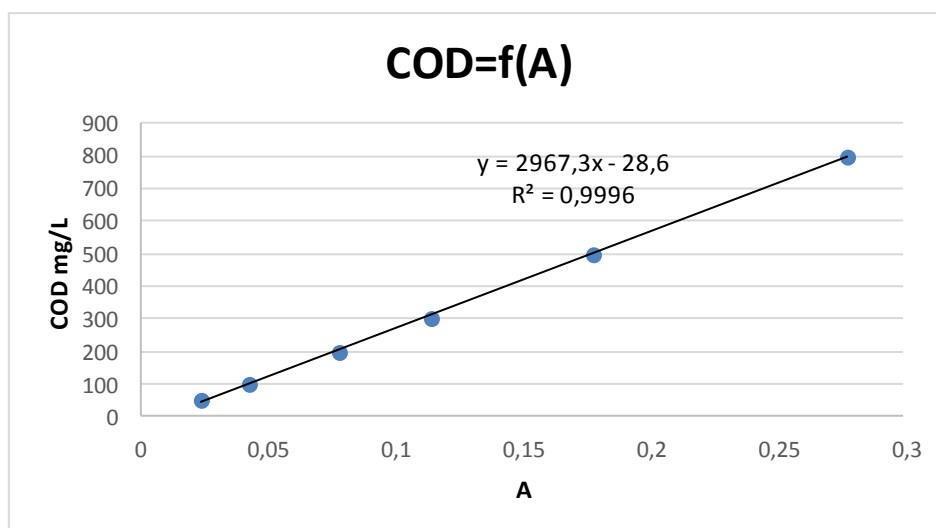
Αντιδραστήριο χώνευσης (διχρωμικό κάλιο): 10.216g  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , ξηραμένου στους  $105^\circ\text{C}$ , προστίθενται σε 500mL περίπου απιονισμένο νερό, 167mL πυκνό  $\text{H}_2\text{SO}_4$  και 33.3g  $\text{HgSO}_4$ . Το διάλυμα αναμιγνύεται, και αφού διαλυθεί καλά και κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου αραιώνεται στο 1L.

Καταλύτης θεικού οξέος: προστίθεται  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  σε πυκνό  $\text{H}_2\text{SO}_4$  σε αναλογία 5.5g  $\text{Ag}_2\text{SO}_4/\text{kg H}_2\text{SO}_4$ . Αφήνεται για 1-2 ημέρες ώστε να διαλυθεί ο  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ .

#### Καμπύλη βαθμονόμησης COD

**Πίνακας 19: Αποτελέσματα βαθμονόμησης COD**

COD (mg/l)	A
50	0,024
100	0,043
200	0,078
300	0,114
500	0,178
800	0,278



**Διάγραμμα 5: Καμπύλη βαθμονόμησης COD**

Είναι αναγκαίο να αναφερθεί ότι η μέθοδος προσδιορισμού του COD λειτουργεί μεταξύ των άκρων βαθμονόμησης καθότι εκτός του διαστήματος 50-800mg/L η καμπύλη δεν είναι γραμμική.

### 3.9. Προσδιορισμός pH

Ο προσδιορισμός του pH πραγματοποιείται με χρήση του ηλεκτρονικού πεχαμέτρου Seko PR 75-A. Λαμβάνοντας το διήθημα της εκχύλισης με νερό και τοποθετώντας το ηλεκτρόδιο του πεχαμέτρου μέσα στο δείγμα, υπό συνεχή ανάδευση για καλύτερη ομογενοποίηση, λαμβάνεται η ένδειξη του pH.

### 3.10. Προσδιορισμός μυκητιακής ανάπτυξης (γλυκοζαμίνη)

Ο προσδιορισμός της βιομάζας του μύκητα προσδιορίστηκε με την έμμεση μέθοδο της υδρόλυσης της χιτίνης σε N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η μέτρηση της βιομάζας σε στερεό υπόστρωμα παρουσιάζει δυσκολίες λόγω της δυσκολίας απομόνωσης του μικυλίου από το υπόστρωμα. Οπότε απαιτείται μια έμμεση μέθοδος για τον παραπάνω προσδιορισμό, όπως μέσω ενζυμικής ενεργότητας ή μέσω ανάλυσης συστατικών του κυττάρου (γλυκοζαμίνη, εργοστερόλη). Από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους κρίνεται η μέτρηση ενός συστατικού του κυτταρικού τοιχώματος, όπως η γλυκοζαμίνη, η οποία αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της ανάπτυξης του κυττάρου αντίθετα με την ενζυμική ενεργότητα που ποικίλει ανάλογα με την φάση ανάπτυξης του μύκητα [36].

#### Πειραματική διαδικασία

Για κάθε δείγμα στερεής καλλιέργειας σε φιάλη duran ζυγίζονται 5g καλλιέργειας και προσδιορίζεται η υγρασία της καλλιέργειας με χρήση του μετρητή υγρασίας. Στη συνέχεια προσθέτονται 5mL 72%  $H_2SO_4$  και οι φιάλες τοποθετούνται σε περιστροφικό αναδευτήρα στα 130rpm για 30min. Έπειτα, πραγματοποιείται αραιώση με 54mL απιονισμένο νερό, οι φιάλες πωματίζονται και τοποθετούνται σε αυτόκλειστο ( $121^{\circ}C$ ) για 2h. Μετά την ολοκλήρωση της υδρόλυσης γίνεται εξουδετέρωση με 10M και 0,5M NaOH (αλλαγή από 10 σε 0,5M σε pH 3). Για τον χρωματομετρικό προσδιορισμό της γλυκοζαμίνης σε κωνική φιάλη των 50 mL προσθέτονται 3mL υδρολύματος, 3mL 5% w/v  $NaNO_2$  και 3mL 5% w/v  $KHSO_4$  και το διάλυμα αναδεύεται για 15 στα 130rpm. Στην συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση στα 1500g για 2min στους  $2^{\circ}C$  και λαμβάνονται 2 επαναλήψεις των 3mL από το υπερκείμενο. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες, προστίθεται το υπερκείμενο (3 mL) και 1mL 12,5% w/v  $NH_4SO_3NH_2$  γίνεται περιδίνηση και αφήνεται σε ηρεμία για 5min. Έπειτα, προστίθεται 1mL 0,5% w/v 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride (MBTH), το οποίο πρέπει να παρασκευάζεται καθημερινά και να διατηρείται σε παγόλουτρο κατά την μέτρηση. Οι σωλήνες τοποθετούνται σε βραστό νερό για 3min και αφήνονται να κρυώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά προστίθεται 1mL 0,5% w/v  $FeCl_3$ , το οποίο διατηρείται για 3 ημέρες στη συντήρηση, γίνεται περιδίνηση, το σύστημα αφήνεται σε ηρεμία για 30min και ακολουθεί φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο φωτομετρείται στα 650nm με τυφλό στερεό μέσο καλλιέργειας (ιτιά). Τέλος, για την καμπύλη βαθμονόμησης πραγματοποιήθηκε η παραπάνω διαδικασία σε υγρή καλλιέργεια μύκητα όπου έγινε υπό κενό διήθηση για λήψη του μύκητα και η υδρόλυση έγινε στον μύκητα μαζί με το φίλτρο ενώ για τυφλό χρησιμοποιήθηκε φίλτρο στο οποίο είχε διηθηθεί μόνο θρεπτικό μέσο [37].

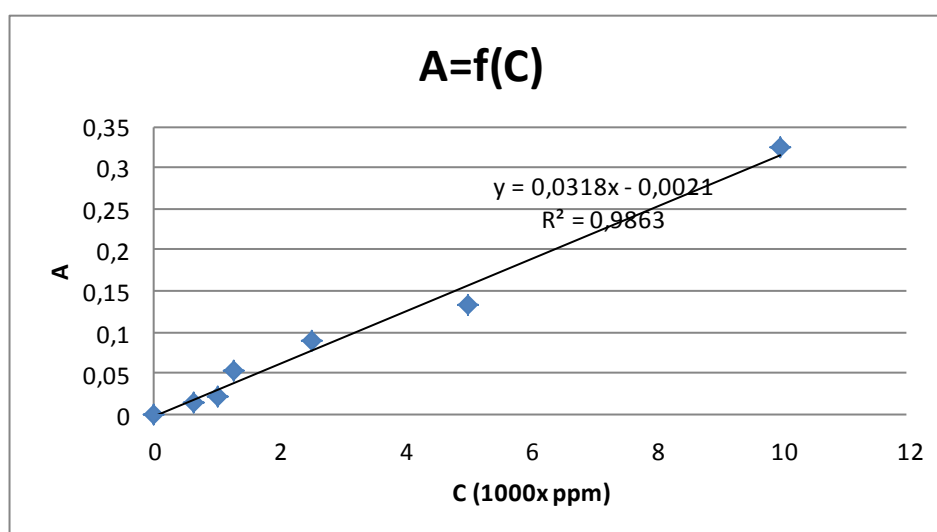
#### Καμπύλη βαθμονόμησης Γλυκοζαμίνης

Για τον προσδιορισμό της μυκητιακής ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε τόσο καμπύλη βαθμονόμησης βάση της συγκέντρωσης πρότυπης γλυκοζαμίνης όσο και καμπύλη βαθμονόμησης βάση της ξηρής μάζας του κάθε μύκητα. Για την καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπης γλυκοζαμίνης παρασκευάστηκαν 6 διαλύματα από 625 ppm

έως 10000 ppm και πραγματοποιήθηκε μόνο το χρωματομετρικό μέρος του προσδιορισμού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:

**Πίνακας 20: Αποτελέσματα βαθμονόμησης πρότυπης ουσίας γλυκοζαμίνης.**

<b>C (1000 ppm)</b>	<b>A</b>
10	0,324
5	0,134
2,5	0,09
1,25	0,052
1	0,021
0,625	0,013
0	0

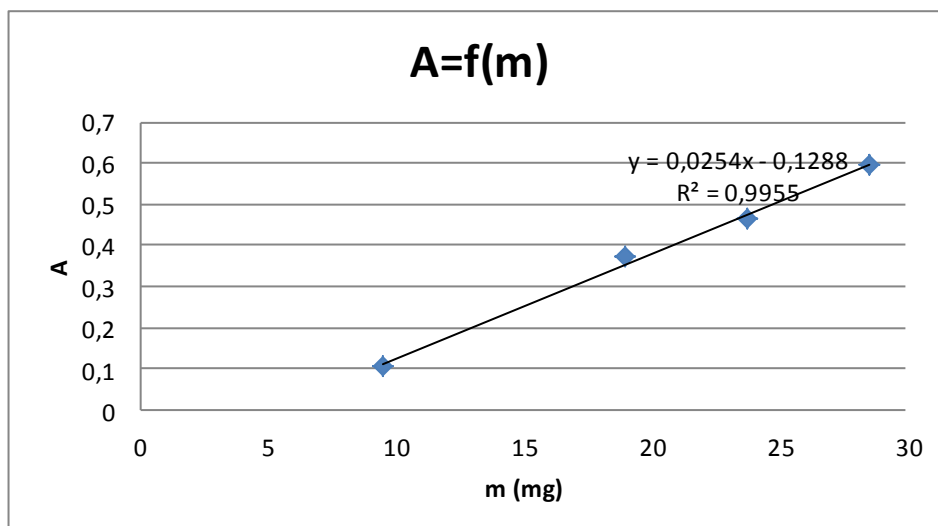


**Διάγραμμα 6: Καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπης ουσίας γλυκοζαμίνης.**

Για την καμπύλη βαθμονόμησης με βάση της ξηρή μάζα του μύκητα πραγματοποιήθηκε η διαδικασία προσδιορισμού όπως αναφέρεται στο πειραματικό μέρος για κάθε μύκητα ξεχωριστά, ενώ, για τα διαφορετικά δείγματα προτύπου έγιναν αραιώσεις του υδρολύματος. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι, οι καμπύλες βαθμονόμησης ισχύουν μόνο στην περιοχή μεταξύ των απορροφήσεων που προέκυψαν και όχι στην περιοχή (0 – 1), καθώς τόσο σε υψηλότερες αλλά κυρίως σε χαμηλότερες μάζες η γραμμικότητα διαταράσσεται.

**Πίνακας 21: Αποτελέσματα βαθμονόμησης γλυκοζαμίνης για Ganoderma resinaseum AMRL 325**

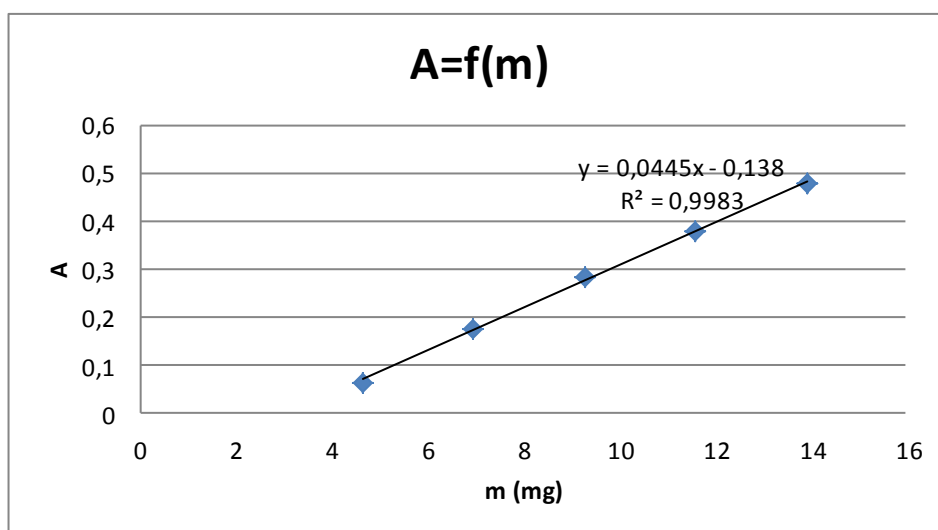
<b>Μάζα (mg)</b>	<b>A</b>
28,57	0,5955
23,80833	0,4645
19,04667	0,375
9,523333	0,106



Διάγραμμα 7: Καμπύλη βαθμονόμησης γλυκοζαμίνης για *Ganoderma resinaseum* AMRL 325

Πίνακας 22: Αποτελέσματα βαθμονόμησης γλυκοζαμίνης για *Lentinula edodes* AMRL 122

Μάζα (mg)	A
13,93	0,476
11,608333	0,3785
9,286667	0,2835
6,965	0,176
4,6433333	0,061



Διάγραμμα 8: Καμπύλη βαθμονόμησης γλυκοζαμίνης για *Lentinula edodes* AMRL 122

### 3.11. Προσδιορισμός Ολικών Αιωρούμενων Στερεών (TSS)

Ο προσδιορισμός των Ολικών Αιωρούμενων Στερεών ακολουθεί την διαδικασία που περιγράφεται στα Standard Methods κεφ. 2540. Διήθηση υπό κενό του υγρού εμβολίου με τη χρήση κατάλληλης διάταξης, μέσω προζυγισμένου φίλτρου Whatman GF-1 διαμέτρου 0,55mm. Το φίλτρο στη συνέχεια τοποθετείται σε πυριατήριο θερμοκρασίας 105°C για 24 ώρες. Έπειτα, το φίλτρο τοποθετείται σε ξηραντήρα έως ότου να έρθει σε θερμική ισορροπία με το περιβάλλον χωρίς να συσσωρευτεί

υγρασία. Το φίλτρο κατόπιν ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό με ακρίβεια 0,1mg. Η ποσότητα των Ολικών Αιωρούμενων Στερεών υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$TSS = \frac{m_{\text{φίλτρου μετά τη ξήρανση}} - m_{\text{φίλτρου}}}{V_{\text{εμβολίου}}}$$

### 3.12. Προσδιορισμός Πτητικών Αιωρούμενων Στερεών (VSS)

Ο προσδιορισμός των Πτητικών Αιωρούμενων Στερεών ακολουθεί την διαδικασία που περιγράφεται στα Standard Methods κεφ 2540. Το φίλτρο που προκύπτει από την διαδικασία προσδιορισμού των Ολικών Αιωρούμενων Στερεών τοποθετείται σε φούρνο θερμοκρασίας 550°C για 30 λεπτά. Έπειτα, το φίλτρο τοποθετείται σε ξηραντήρα έως ότου να έρθει σε θερμική ισορροπία με το περιβάλλον χωρίς να συσσωρευτεί υγρασία. Το φίλτρο κατόπιν ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό με ακρίβεια 0,1mg. Η ποσότητα των Πτητικών Αιωρούμενων Στερεών υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$VSS = \frac{m_{\text{δείγματος μετά τη ξήρανση}} - m_{\text{δείγματος μετά το φούρνο}}}{V_{\text{εμβολίου}}}$$

### 3.13. Προσδιορισμός Ολικών, Πτητικών Στερεών (TS, VS) και τέφρας

Ο προσδιορισμός των Ολικών, Πτητικών Στερεών και τέφρας ακολουθεί την διαδικασία που περιγράφεται από το LAP του NREL. Αρχικά, τοποθετούνται τα χωνευτήρια που θα χρησιμοποιηθούν στο φούρνο στους 550°C για καθαρισμό. Ο προσδιορισμός γίνεται εις διπλούν οπότε δυο χωνευτήρια πληρώνονται, αφού κρυώσουν σε ξηραντήρα, με 2,5 – 200mg ιτιάς και τοποθετούνται στο πυριατήριο στους 105°C για 24h. Στην συνέχεια ζυγίζονται, αφού κρυώσουν σε ξηραντήρα, με ακρίβεια 0,1mg (ολικά στερεά) και τοποθετούνται σε φούρνο στους 550°C για 30min. Μετά το φούρνο τοποθετούνται σε ξηραντήρα και αφού κρυώσουν τα χωνευτήρια ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1mg, για την μέτρηση των πτητικών στερεών. Τέλος, τα χωνευτήρια τοποθετούνται για 5h στους 550°C και αφού κρυώσουν σε ξηραντήρα ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1mg για τον προσδιορισμό της τέφρας [38-39]. Παρακάτω, παρουσιάζονται οι εξισώσεις υπολογισμού των TS, VS και τέφρας:

- $TS = \frac{m_{\text{χωνευτηρίου μετά τη ξήρανση}} - m_{\text{χωνευτηρίου}}}{m_{\text{δείγματος}}}$
- $VS = \frac{m_{\text{χωνευτηρίου πριν τα 30' στους 550°C}} - m_{\text{χωνευτηρίου μετά τα 30' στους 550°C}}}{m_{\text{δείγματος}}}$
- $\text{Τέφρα} = \frac{m_{\text{χωνευτηρίου πριν από 5h στους 550°C}} - m_{\text{χωνευτηρίου μετά από 5h στους 550°C}}}{m_{\text{δείγματος}}}$

### 3.14. Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών (Bradford)

#### Εκχύλιση

Αρχικά, υπολογίζεται η υγρασία της στερεής καλλιέργειας, με χρήση του μετρητή υγρασίας, ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα καλλιέργειας που απαιτείται για την προσθήκη 2,5g ξηρής βάσης. Στην συνέχεια, στην κωνική που περιέχει την στερεή καλλιέργεια προστίθεται 50mL ρυθμιστικού pH 7 (sodium phosphate 0,1M προερχόμενο από Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M και NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M) και το σύστημα αφήνεται

αναδεδυμένο για 8h στο ψυγείο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 40min στα 4000rpm και διήθηση ως ότου διαυγάσει. Το διάλυμα διατηρείται στο ψυγείο

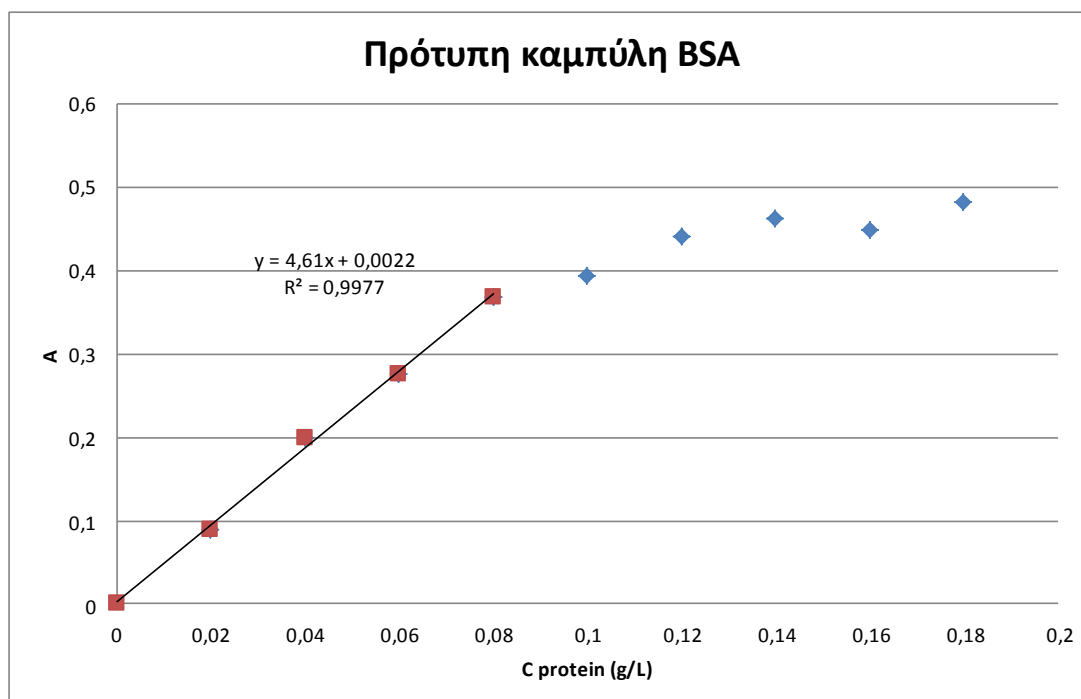
### Πειραματική διαδικασία

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 1mL δείγματος και 4 mL διαλύματος Bradford, ο σωλήνας περιδονίζεται, αφήνεται για 5min σε ηρεμία και φωτομετράται με νερό για τυφλό στα 595nm. Ως πρότυπο πρωτεΐνης για την παραπάνω μέθοδο χρησιμοποιήθηκε BSA (Bovine serum albumin) [40].

### Καμπύλη βαθμονόμησης Bradford

**Πίνακας 23: Αποτελέσματα βαθμονόμησης μεθόδου Bradford**

C protein(g/l)	A
0,02	0,09
0,04	0,199
0,06	0,276
0,08	0,368
0,1	0,394
0,12	0,4395
0,14	0,4615
0,16	0,449
0,18	0,481
0,02	0,5045
0	0



**Διάγραμμα 9: Καμπύλη βαθμονόμησης μεθόδου Bradford**

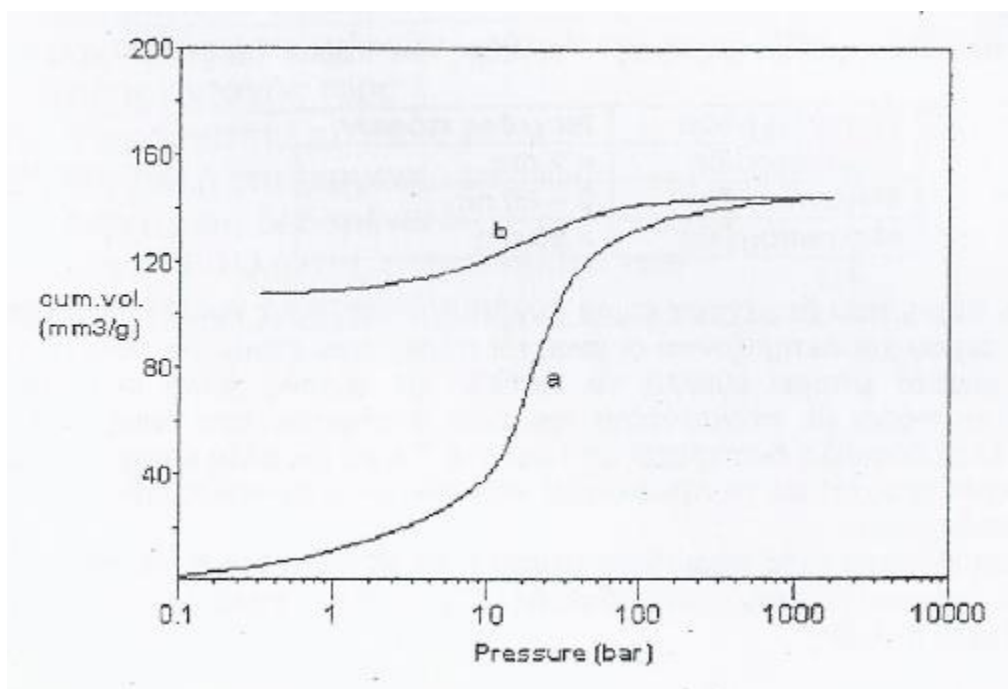
Από το παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανές ότι για συγκεντρώσεις πρωτεϊνών πάνω από 0,08 g/L, η μέθοδος δεν μπορεί να δώσει αξιόπιστο αποτέλεσμα άρα στην συγκεκριμένη μέθοδο πραγματοποιήθηκαν οι ακατάλληλες αραιώσεις ώστε να επιτυγχάνεται απορρόφηση κάτω από 0,4.



### 3.15. Ποροσιμετρία υδραργύρου

#### Αρχή μεθόδου

Η ποροσιμετρία υδραργύρου αποτελεί μια από τις σημαντικότερες μεθόδους εκτίμησης και ανάλυσης της μικροδομής των πορώδων υλικών και προσδιορισμού του πορώδους τους. Η τεχνική βασίζεται στη βαθμιαία διείσδυση του υδράργυρου (μη διαβρέχον υγρό) σε ένα πορώδες υλικό εκκενωμένο από αέρα, με αύξηση της εξωτερικής πίεσης και στην συνέχεια απομάκρυνση του υδραργύρου, καθώς η πίεση ελαττώνεται. Συγκεκριμένα, επειδή ο υδράργυρος αποτελεί μη διαβρέχον υγρό για το σύνολο σχεδόν των υλικών, απαιτεί την επιβολή πίεσης για να διεισδύσει στους πόρους ενός πορώδους υλικού. Με την εξωτερική επιβαλλόμενη πίεση ο υδράργυρος διεισδύει πρώτα στους πόρους μεγαλύτερου μεγέθους και στην συνέχεια στους μικρότερους πόρους, όσο αυξάνεται η πίεση. Τυπικές καμπύλες είσδυσης – απομάκρυνσης (υστέρησης) υδραργύρου παρουσιάζονται στο επόμενο σχήμα.

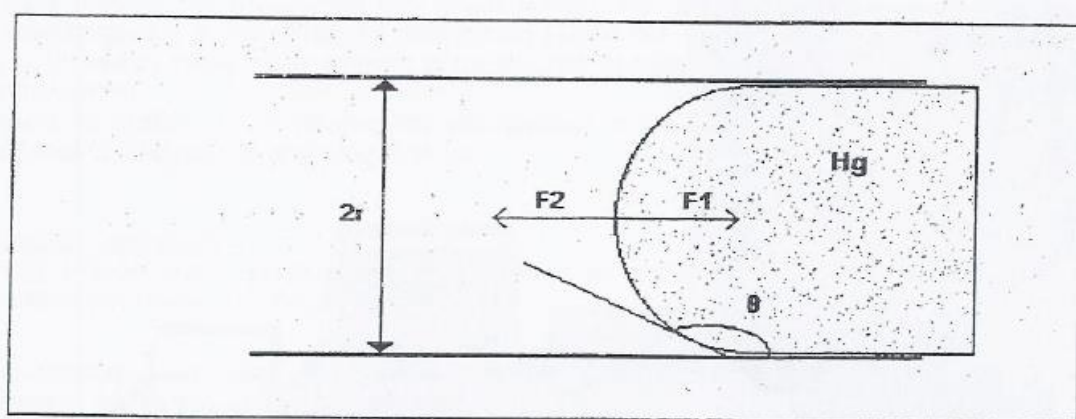


Εικόνα 11: Τυπικές καμπύλες είσδυσης (a) απομάκρυνσης (b) υδραργύρου

Τα τριχοειδή φαινόμενα και οι δυνάμεις που σχετίζονται με αυτά κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ποροσιμετρία υδραργύρου. Αν σε ένα σωλήνα λεπτής διατομής υπήρχε διαβρέχον υγρό, όπως το νερό, τότε οι τριχοειδείς δυνάμεις θα ωθούσαν το νερό στο τριχοειδή σωλήνα μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία με τις βαρυτικές δυνάμεις. Όμως, επειδή χρησιμοποιείται ο υδράργυρος που είναι μη διαβρέχον υγρό, οι τριχοειδείς δυνάμεις δρουν προς την αντίθετη κατεύθυνση προσπαθώντας να κρατήσουν το υγρό έξω από το σωλήνα. Οπότε για κάθε σωλήνα η δύναμη που ασκείται στον υδράργυρο δίνεται από την εξίσωση:

$$F_1 = 2 \cdot \pi \cdot R \cdot \gamma \cdot \cos \theta,$$

όπου R: ακτίνα σωλήνα,  $\gamma$ : η επιφανειακή τάση του υδραργύρου (480 dyn/cm),  $\theta$ : η γωνία επαφής του υδραργύρου με τα τοιχώματα του σωλήνα (135 – 145°).



**Εικόνα 12: Μηνίσκος υδραργύρου καθώς εισέρχεται σε τριχοειδή σωλήνα.**

Προκειμένου να εισέλθει ο υδράργυρος στο σωλήνα θα πρέπει να εφαρμοστεί εξωτερική δύναμη, η οποία είναι  $F_2 = \pi \cdot R^2 \cdot P$ , όπου P η πίεση που ασκείται κάθετα στη διατομή του σωλήνα.

Το 1921, ο Washburn συνδύασε τις παραπάνω εξισώσεις στην:

$$P = -\frac{2 \cdot \gamma \cdot \cos \theta}{R}$$

Η εξίσωση αυτή αποτελεί ειδική περίπτωση της εξίσωσης Young-Laplace και πήρε το όνομα του Washburn. Συσχετίζει την ακτίνα του τριχοειδούς σωλήνα και της πίεσης που πρέπει να εξασκηθεί προκειμένου να εισέρθει ο υδράργυρος στο σωλήνα, που αντιπροσωπεύει τον κυλινδρικό πόρο, διατομής  $\pi R^2$ .

#### Πειραματική διαδικασία

Το υλικό, αφού αφαιρεθεί με προσοχή από τον σωλήνα, κόβεται κατάλληλα ώστε να χωράει στην κυψελίδα υποδοχής δείγματος. Αρχικά, ξηραίνεται στους 60°C για 48h ώστε να αφαιρεθεί η περιεχόμενη υγρασία και στη συνέχεια ψύχεται σε ξηραντήρα. Ακόμα, ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1mg και εισάγεται η μάζα του δείγματος στον υπολογιστή. Στη συνέχεια, η κυψελίδα του Macropore Unit 120 όπου θα εισαχθεί το δείγμα εξαερώνεται με τη χρήση περιστροφικής αντλίας κενού, θέτοντας το δείγμα και την κυψελίδα υπό κενό ώστε να μειωθεί η ασκούμενη πίεση κάτω από την ατμοσφαιρική στις  $10^{-2}$ atm περίπου. Για το πρώτο στάδιο της μέτρησης πόρων μετρίου και μεγάλου μεγέθους εισάγεται ο υδράργυρος στον θάλαμο μέχρι την αντίστοιχη χαραγή. Έπειτα, γίνεται σταδιακή αύξηση της πίεσης μέχρι την ατμοσφαιρική, μέσω μικροβαλβίδας εισαγωγής αέρα, οπότε ασκείται αυξανόμενη δύναμη ικανή να ωθήσει τον υδράργυρο μέσα στους πόρους του υλικού. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με το όργανο Macropore Unit 120 ( $1.3 \cdot 10^{-2}$  – 1atm). Το δείγμα υφίσταται νέα ζύγιση και το αποτέλεσμα αυτής εισάγεται στον υπολογιστή. Για την συνέχεια της μέτρησης του μικροπορώδους το δείγμα μεταφέρεται στην συσκευή Porosimeter 2000 (1-2000bar), όπου η πίεση μπορεί να αυξηθεί σε στάδια και μέχρι τα 2000bar. Εκεί, σε δεδομένη πίεση καταγράφεται αυτοματοποιημένα από το όργανο ο όγκος διεισδυσίας του υδραργύρου στο υλικό και η μέτρηση εισάγεται αυτόματα στον υπολογιστή. Με το τέλος της διαδικασίας της μέτρησης το υλικό και ο θάλαμος αποσυμπιέζονται και το μεγαλύτερο ποσοστό του υδραργύρου που έχει διεισδύσει στο υλικό εξάγεται από αυτό.

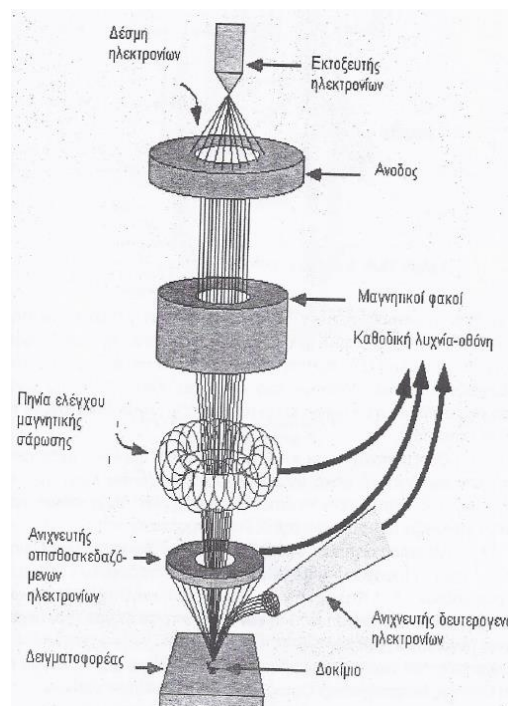
Η μονάδα ελέγχου είναι συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου και λαμβάνονται με κατάλληλο λογισμικό πληθώρα πληροφοριών για τους πόρους του δείγματος και πιο συγκεκριμένα :

- Το ολικό ανοικτό πορώδες (P%)
- Η κατανομή μεγέθους των πόρων
- Η μέση ακτίνα των πόρων
- Η φαινόμενη και διορθωμένη φαινόμενη πυκνότητα
- Η ειδική επιφάνεια
- Διάγραμμα ολικού ειδικού εισερχομένου όγκου υδραργύρου-πίεσης [41]

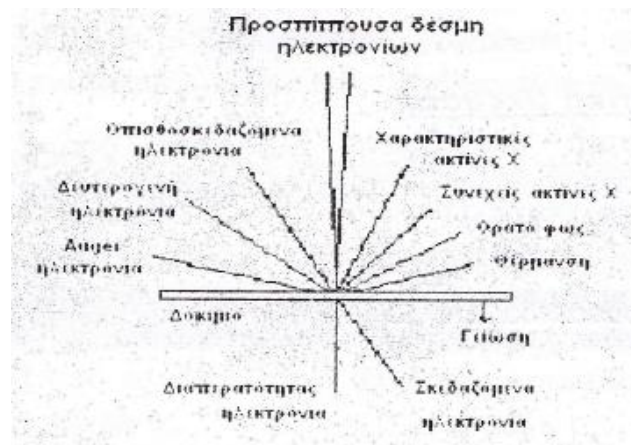
### 3.16. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης

#### Αρχή μεθόδου

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM), η επιφάνεια ενός στερεού δείγματος σαρώνεται παλινδρομικά με δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. Τα ηλεκτρόνια, λόγω της κυματικής τους φύσης μπορούν να εστιαστούν όπως και τα φωτόνια αλλά σε πολύ μικρότερη επιφάνεια από αυτά. Με τη διαδικασία αυτή λαμβάνονται πολλά είδη σημάτων από την επιφάνεια, όπως οπισθοσκεδαζόμενα και δευτερογενή ηλεκτρόνια, ηλεκτρόνια Auger, φωτόνια φθορισμού ακτίνων X και άλλα φωτόνια διαφόρων ενεργειών. Όλα αυτά τα σήματα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη επιφανειών, όμως τα πιο συνηθισμένα χρησιμοποιούμενα είναι τα οπισθοσκεδαζόμενα και τα δευτερογενή ηλεκτρόνια καθώς και η εκπομπή ακτίνων X.



Εικόνα 14: Διάγραμμα λειτουργίας μικροσκοπίου.



Εικόνα 13: Πιθανές αλληλεπιδράσεις δέσμης ηλεκτρονίων-στερεού δείγματος

#### Πειραματική διαδικασία

Στη παρούσα μελέτη, η τεχνική SEM χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της μορφολογίας (μεγέθους και σχήματος) των σωματιδίων της βιομάζας και της επίδρασης της προεπεξεργασίας με μύκητες στην υφή της. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ολοκληρωμένο σύστημα Αναλυτικού Ηλεκτρονικού

Μικροσκοπίου Σάρωσης που αποτελείται από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης JEOL 6380 GSM, με μεγέθυνση από 10x έως 300.000x και Φασματοφωτόμετρο Διασπειρόμενης Ενέργειας (EDS) ISIS2000 με δυνατότητα ποιοτικής και ημιποσοτικής μικροανάλυσης. Ακόμα, επειδή το δείγμα είναι μη αγώγιμο έπρεπε να καταστεί αγώγιμο. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται με χρήση ταινίας άνθρακα διπλής όψης αντί για επιχρύσωση. Τέλος, το δείγμα πρέπει να είναι ξηρό ώστε να μπορεί να γίνει ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης όποτε το δείγμα αφού αφαιρέθηκε με προσοχή από τον σωλήνα ώστε να μην υπάρξει μεταβολή στις υφές ξηράνθηκε για 24h στους 40°C. Στην συνέχεια, έγινε η φωτογράφιση των καταλληλότερων περιοχών [42,43].

### **3.17.Δομή πειράματος**

Αρχικά, έγινε διερεύνηση των συνθηκών διενέργειας του πειράματος με δοκιμές σε διάφορες υγρασίες, σκεύη και τρόπους εμβολιασμού. Στην συνέχεια, έγινε πείραμα για την διερεύνηση της ικανοποιητικής ανάπτυξης τού κάθε μύκητα στο υπόστρωμά ιτιάς (διαλογή), κατά το οποίο γινόταν μέτρηση του μήκους ανάπτυξης των υφών του μύκητα στο σωλήνα της καλλιέργειας (μέτρηση μήκους ανάπτυξης του μύκητα στο υλικό) σε 3 επαναλήψεις (3 σωλήνες για κάθε στέλεχος). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της πρώτης ύλης με μετρήσεις κλάσματος εκχυλίσμων, υγρασίας, κλάσματος πρωτεϊνών (Bradford), κλάσματος πτητικών στερεών και τέφρας. Ακόμα, για την πρώτη ύλη πραγματοποιήθηκε μέτρηση των μονομερών ελεύθερων σακχάρων, του pH, του COD, στο υδατικό εκχύλισμα της ιτιάς για 1h στους 50°C, ενώ έγινε και μέτρηση των δομικών υδατανθράκων, της λιγνίνης. Επιπλέον, για τα δείγματα των στερεών καλλιέργειών (πειράματος επιλογής στελέχους και πειράματος ρυθμού) έγιναν 3 επαναλήψεις λόγω μεγάλης ανομοιομορφίας και χρησιμοποιήθηκαν από τα περίπου 20g, τα 15 (3x5g) για τον προσδιορισμό μονομερών σακχάρων, pH, COD, πολυσακχαριτών και λιγνίνης και 5g για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης του μύκητα στην καλλιέργεια μέσω μέτρησης γλυκοζαμίνης. Τέλος, στα δείγματα 28 ημερών πραγματοποιήθηκαν πειράματα ποροσιμετρίας και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης.



## 4. Αποτελέσματα και Συζήτηση Αποτελεσμάτων

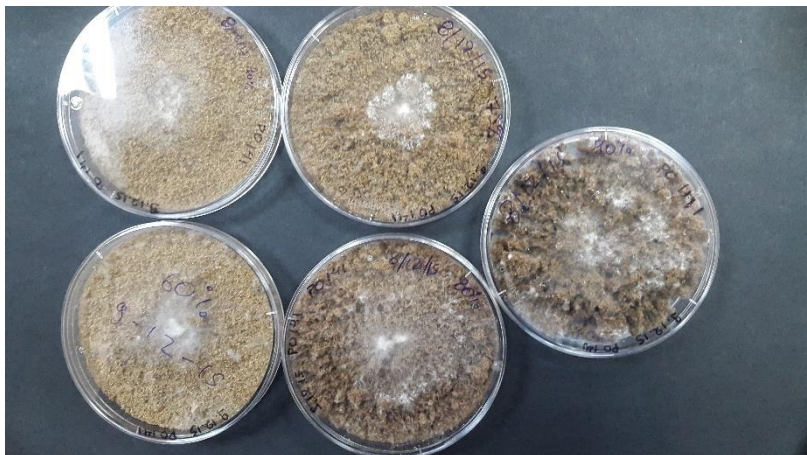
### 4.1. Συνθήκες πειράματος

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την εύρεση του βέλτιστου τρόπου ανάπτυξης του μύκητα στο υπόστρωμα της ιτιάς. Οπότε, έγιναν δοκιμές σε διάφορα σκεύη όπως κωνικές φιάλες, μεγάλου μεγέθους, δοκιμαστικοί σωλήνες και τρυβλία Petri, ενώ στα τρυβλία χρησιμοποιήθηκε και ένας συνδυασμός ιτιάς και άγαρ με σκοπό την αναπλήρωση υγρασίας. Ακόμη, δοκιμάστηκαν διάφορες υγρασίες υποστρώματος και είδη εμβολίου όπως από τρυβλίο ή από υγρή καλλιέργεια. Παρακάτω, θα γίνει μία παρουσίαση ορισμένων εικόνων και θα επεξηγηθούν τα συμπεράσματα που προέκυψαν από το κάθε πείραμα.



**Εικόνα 15:** Επίδραση της υγρασίας στο φαινόμενο πορώδες του υποστρώματος.

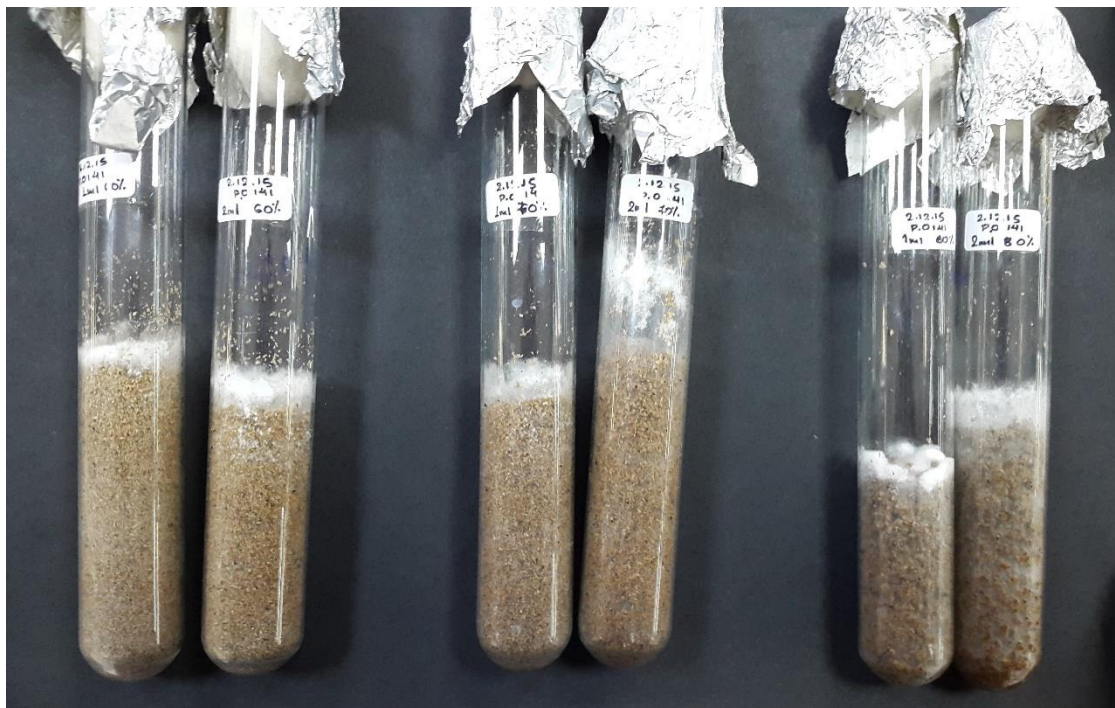
Από την εικόνα 15 είναι εμφανές ότι όσο αυξάνεται η υγρασία τόσο μειώνεται η φαινόμενη λεπτότητα του υλικού και τόσο αυξάνεται το φαινόμενο πορώδες που έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ικανότητα εγγενούς αερισμού. Τα παραπάνω φαινόμενο προκύπτει λόγω της εξαιρετικής υδροφοβικότητας των προιονιδίων της ιτιάς.



**Εικόνα 16:** Στερεή καλλιέργεια σε τρυβλία Petri.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι φωτογραφίες λήφθηκαν στις 22/12/15 οπότε από την Εικόνα 16 είναι εμφανής η απώλεια υγρασίας που συμβαίνει σε χρονικό διάστημα 14 ημερών. Λόγω της μειωμένης υγρασίας και της έλλειψης υπερκείμενου χώρου προκύπτει μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης στα τρυβλία σε σχέση με τους μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες.

Στη συνέχεια, έγινε δοκιμή ανάπτυξης της καλλιέργειας σε κωνική φιάλη ωστόσο σε αυτήν την περίπτωση δεν θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν η συγκρίσεις με βάση της ανάπτυξη του μύκητα, οπότε βρέθηκε η λύση του μεγάλου δοκιμαστικού σωλήνα όπου υπήρχαν τα πλεονεκτήματα του υπερκείμενου χώρου, της διατήρησης της υγρασίας και της δυνατότητας ποσοτικοποίησης της μυκητιακής ανάπτυξης.

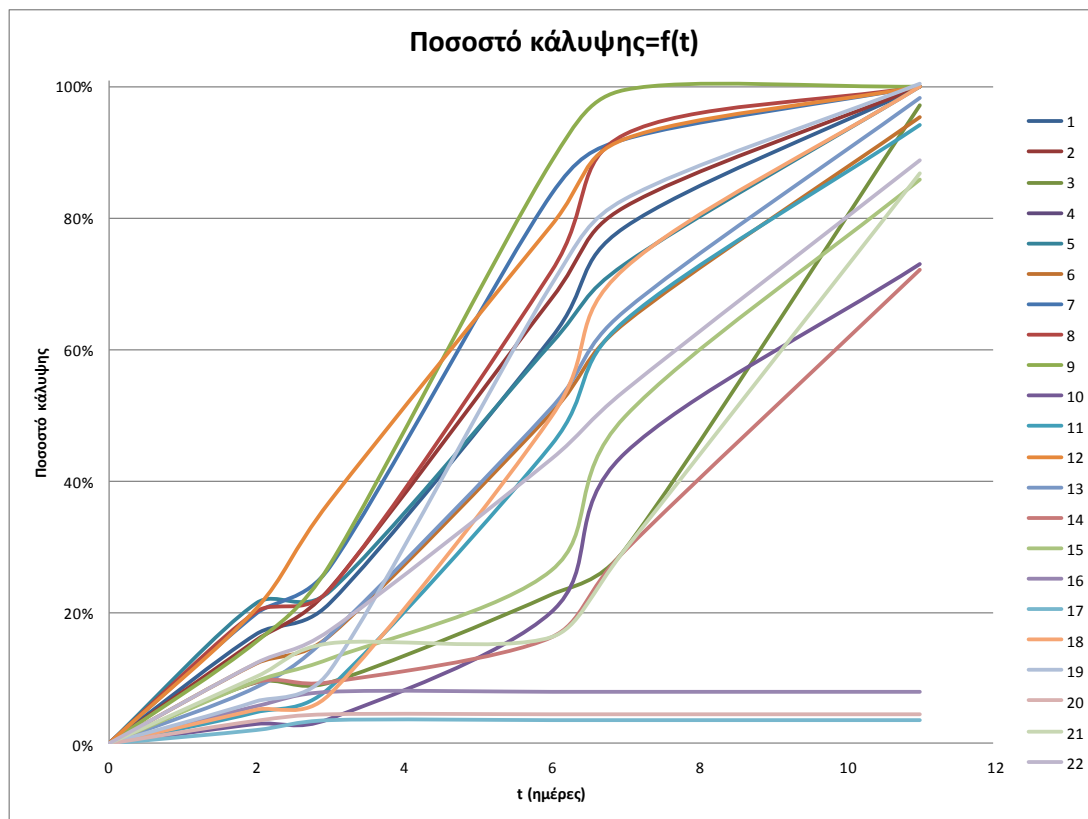


**Εικόνα 17:** Στερεές καλλιέργειες σε δοκιμαστικούς σωλήνες για διάφορες υγρασίες και ποσότητες εμβολίου.

Από την παραπάνω εικόνα αλλά και την εικόνα 16 είναι εμφανές ότι ο μύκητας αναπτύσσεται καλύτερα σε 80% υγρασία και με 2mL εμβολίου. Το παραπάνω αποτέλεσμα ερμηνεύεται ότι προκύπτει λόγω είτε του καλύτερου αερισμού είτε του αυξημένου διαθέσιμου χώρου για την ανάπτυξη των μυκητιακών υφών που οφείλεται τόσο στο αυξημένο πορώδες όσο στον υπερκείμενο κενό χώρο. Ακόμη, βάση των οπτικών αποτελεσμάτων στο υλικό κοκκομετρίας 750 $\mu$ m, εμφανίζεται μικρότερος ρυθμός ανάπτυξης καθώς οι μυκητιακές υφές στις 14 ημέρες παρατηρούνται αραιές και δεν έχουν πληρώσει των σωλήνα για κανένα από τους 2 εξεταζόμενους μύκητες σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την Εικόνα 17. Οπότε, είναι εμφανής η υψηλή σημασία της κοκκομετρίας και της υγρασίας καθώς επηρεάζουν την φαινόμενη λεπτότητα και το πορώδες του υλικού και επομένως επηρεάζουν τον παθητικό αερισμό της καλλιέργειας και τον διαθέσιμο χώρο για την ανάπτυξη των μυκητιακών υφών. Οι συγκεκριμένες συνθήκες εμβολιασμού και υγρασίας αποτελούν τις συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε το πείραμα.

## 4.2. Επιλογή στελεχών

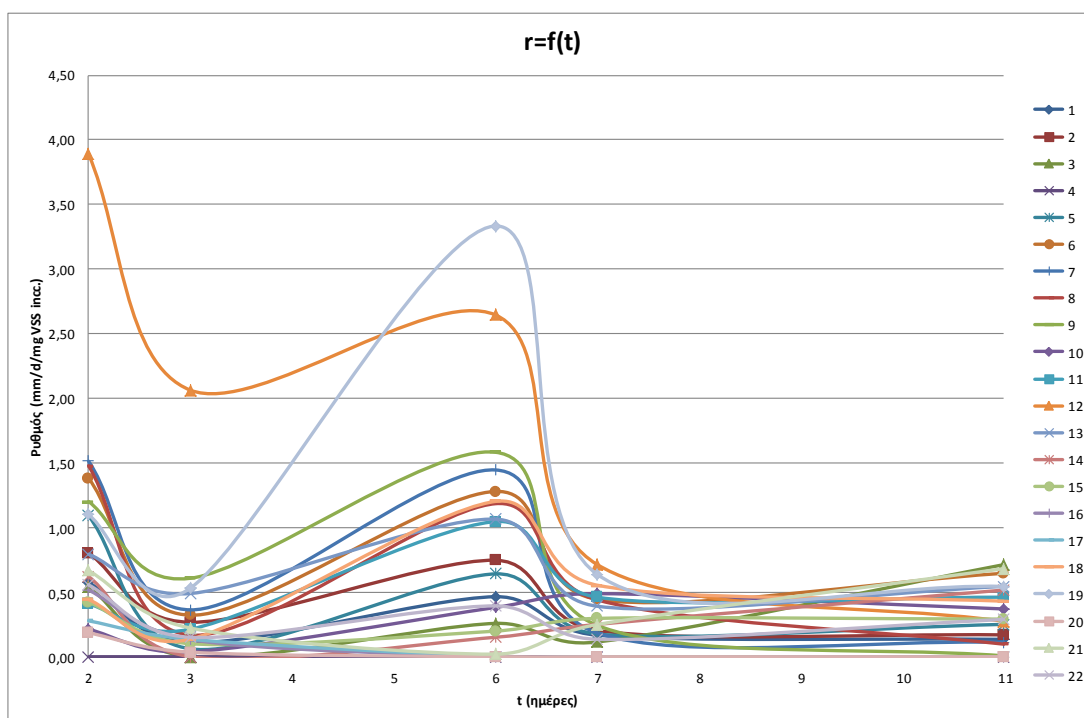
Στην συνέχεια, ήταν αναγκαία η επιλογή των μυκητιακών στελεχών που θα χρησιμοποιηθούν στο υπόλοιπο πείραμα. Η επιλογή έγινε σε δυο στάδια λόγω του μεγάλου πλήθους στελεχών, πρώτον, με μέτρηση του μήκους ανάπτυξης των υφών των μυκήτων κατά την διάρκεια 11 ημερών σε τρεις επαναλήψεις και στη συνέχεια για τους μύκητες που αναπτύχθηκαν γρηγορότερα και πληρέστερα με μέτρηση λιγνινών και μονοσακχαριτών. Στο διάγραμμα 10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πρώτης φάσης διαλογής των μυκήτων.



Διάγραμμα 10: Ποσοστό κάλυψης υποστρώματος από μύκητα συναρτήσει του χρόνου ανάπτυξης.

Ακόμα, υπολογίστηκε ο ρυθμός κάλυψης του υποστρώματος ανοιγμένος ανά μονάδα μάζας πτητικών στερεών εμβολίου ως  $r(t) = \frac{1}{VSS_{inoc}} \frac{\ell_2 - \ell_1}{\Delta t}$ . Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 11.





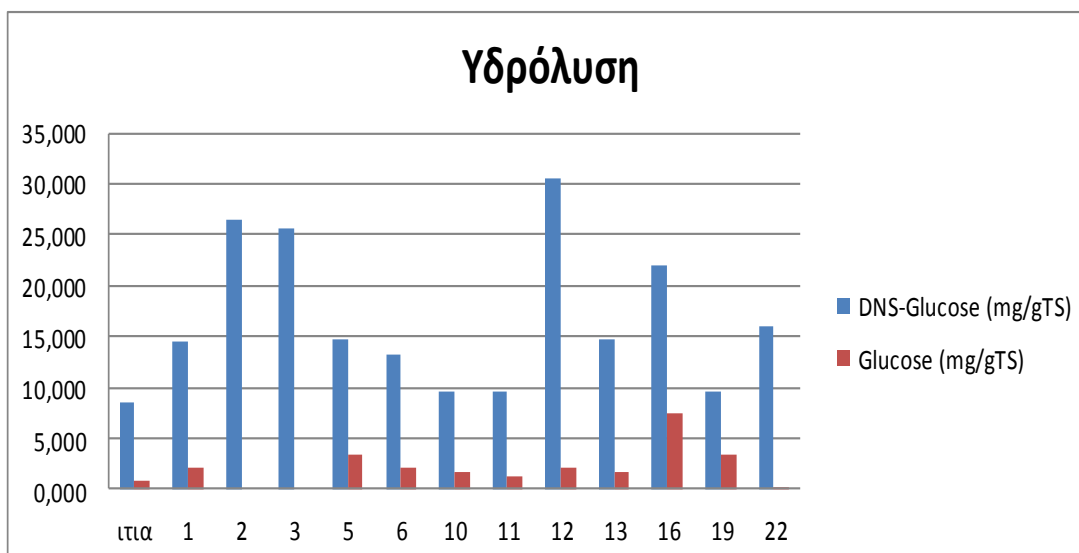
**Διάγραμμα 11:** Ρυθμός κάλυψης υποστρώματος από μύκητα συναρτήσει του χρόνου ανάπτυξης.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα και την οπτική παρατήρηση της πυκνότητας των μυκητιακών υφών επιλεχθήκαν 13 μύκητες (Πίνακας 24) για τη δεύτερη φάση της διαδικασίας επιλογής, οι οποία περιλαμβάνει το σύνολο των μετρήσεων που αναφέρθηκαν στο πειραματικό μέρος για τον προσδιορισμό των δειγμάτων.

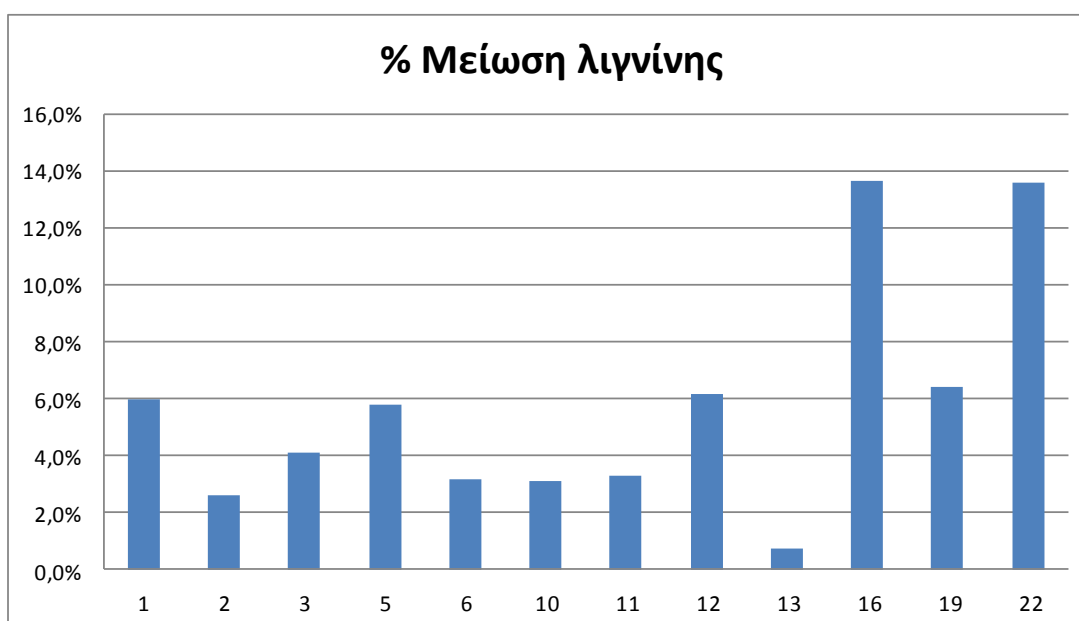
**Πίνακας 24:** Επιλεγμένα στελέχη μυκήτων από την πρώτη φάση της διαδικασίας επιλογής

α/α	Στέλεχος	AMRL
1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	141
2	<i>Pleurotus ostreatus</i>	
3	<i>Pleurotus ostreatus wild</i>	
5	<i>Pleurotus ostreatus</i>	136
6	<i>Pleurotus ostreatus</i>	138
10	<i>Pleurotus erygnii</i>	
11	<i>Ganoderma australe</i>	316
12	<i>Ganoderma resinaseum</i>	325
13	<i>Ganoderma applanatum</i>	341
16	<i>Lentinula edodes</i>	122
19	<i>Polysporus sp2</i>	242
22	<i>Chemeng fungi</i>	

Από τις μετρήσεις των σακχάρων στο υδατικό εκχύλισμά για τους παραπάνω μύκητες στις 30 ημέρες προέκυψε η επιλογή του αποδοτικότερου μύκητα όσον αφορά την υδρόλυση, ενώ από το ποσοστό μείωσης λιγνίνης προέκυψε η επιλογή του αποδοτικότερου μύκητα όσον αφορά την διεργασία της απολιγνίνωσης. Τα συγκριτικά διαγράμματα 12 και 13 χρησιμοποιήθηκαν για την τελική επιλογή μυκητιακών στελεχών.



**Διάγραμμα 12:** Συγκριτικό διάγραμμα μονοσακχαριστών στο υδατικό εκχύλισμα για διάφορους μύκητες. Οι μπλε ράβδοι αντιστοιχούν στα αναγωγικά σάκχαρα εκτός γλυκόζης εκφρασμένα σε ισοδύναμα ξυλόζης.



**Διάγραμμα 13:** Συγκριτικό διάγραμμα μείωσης λιγνίνης από διάφορους μύκητες.

Βάση των διαγράμματος 12 και 13 επιλέχθηκαν τα 2 στελέχη για τα οποία πραγματοποιήθηκαν πειράματα ρυθμού. Τα συγκεκριμένα στελέχη είναι το 12 (*Ganoderma resinaseum* AMRL 325) με βάση τα αποτελέσματα υδρόλυσης και το 16 (*Lentinula edodes* AMRL 122) με βάση τη μείωση λιγνίνης.

### 4.3. Χαρακτηρισμός υποστρώματος (ιτιάς)

Στον Πίνακα 25 δίνονται τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού υποστρώματος.

Πίνακας 25: Αποτελέσματα πειραμάτων χαρακτηρισμού υποστρώματος

Χαρακτηριστικό	Τιμή
Ολικά στερεά (%)	77,48±2,1
Πτητικά Στερεά (g/100g TS)	81,74±0,6
Κυτταρίνη (g/100g TS)	33,76±0,33
Ημικυτταρίνη (g/100g TS)	25,48±0,26
Λιγνίνη (g/100g TS)	41,48±0,42
Εκχυλίσιμες ουσίες (g/100g TS)	3,1±0,1
Πρωτείνες (g/100g TS)	1,06±0,1
Τέφρα (g/100g TS)	0,97±0,03

Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εμφανές ότι τα η πρώτη ύλη έχει μεγάλο περιεχόμενο λιγνίνης και μικρό περιεχόμενο τέφρας, όπως είναι αναμενόμενο για τα σκλήρα ξύλα.

### 4.4. Αποτελέσματα πειράματος ρυθμού

Κατά το πείραμα ρυθμού πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις μάζας για τον υπολογισμό της απώλειας μάζας κατά τη διεργασία της προεπεξεργασίας με μύκητες.

Πίνακας 26: Αποτελέσματα απώλειας μάζας για *Ganoderma resinaseum* AMRL 325

Ημέρα	TS αρχικό	TS	Μάζα αρχική	Μάζα	Μάζα σωλήνα, βαμβακιού και αλουμινόχαρτου	Απώλεια μάζας
4	0,1329	0,1764	67,0379	61,5714	44,8665	-0,0002
8	0,1329	0,1589	65,4519	62,1659	44,7592	-0,006
12	0,1329	0,1564	66,7027	63,4124	44,7197	-0,0007
16	0,1329	0,1429	68,11	66,6269	45,4895	-0,005
20	0,1329	0,162	67,6615	63,7849	45,5246	-0,006
24	0,1329	0,1556	65,7067	62,8648	46,2271	4,9·10 <sup>-06</sup>
28	0,1329	0,1714	66,9849	62,2675	45,8945	-0,001

Πίνακας 27: Αποτελέσματα απώλειας μάζας για *Lentinula edodes* AMRL 122

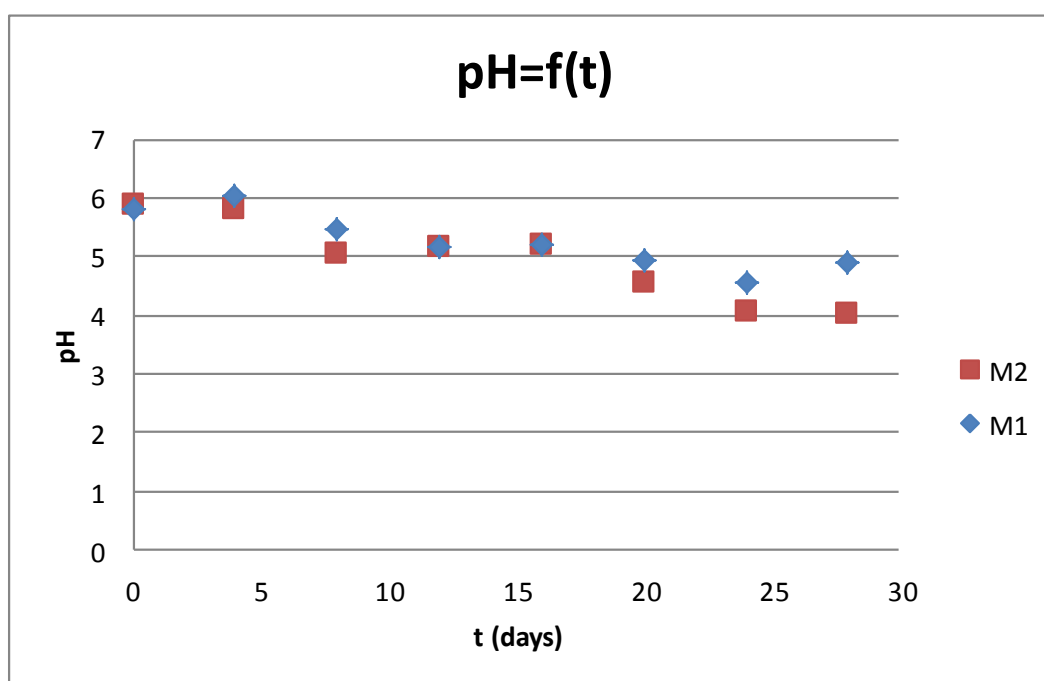
Ημέρα	TS αρχικό	TS	Μάζα αρχική	Μάζα	Μάζα σωλήνα, βαμβακιού και αλουμινόχαρτου	Απώλεια μάζας
4	0,1629	0,1835	66,0343	63,7465	45,5583	-0,0006
8	0,1629	0,1787	66,5583	64,952	46,1306	-0,01
12	0,1629	0,1787	63,5526	61,992	44,8848	-0,005
16	0,1629	0,1807	68,9575	66,9229	46,2742	-0,01
20	0,1629	0,179	67,1	65,104	44,9095	4,9·10 <sup>-06</sup>
24	0,1629	0,1714	66,3443	65,3834	45,3559	-0,004
28	0,1629	0,1791	66,384	64,2325	42,4877	-0,0005

Από τους Πίνακες 26 και 27 είναι εμφανές ότι δεν παρατηρείται απώλεια μάζας κατά την προεπεξεργασία και η μείωση της μάζας του σωλήνα οφείλεται σε απώλεια υγρασίας. Οι ελαφρώς αρνητικές τιμές που προκύπτουν ως απώλεια μάζας οφείλονται σε πειραματικό σφάλμα του μετρητή υγρασίας που οφείλεται κυρίως στην ανομοιογένεια του υλικού. Ακόμα, από το παραπάνω αποτέλεσμα είναι εμφανές ότι, υπάρχει μετατροπή της μάζας του στερεού υποστρώματος σε μάζα μύκητα.

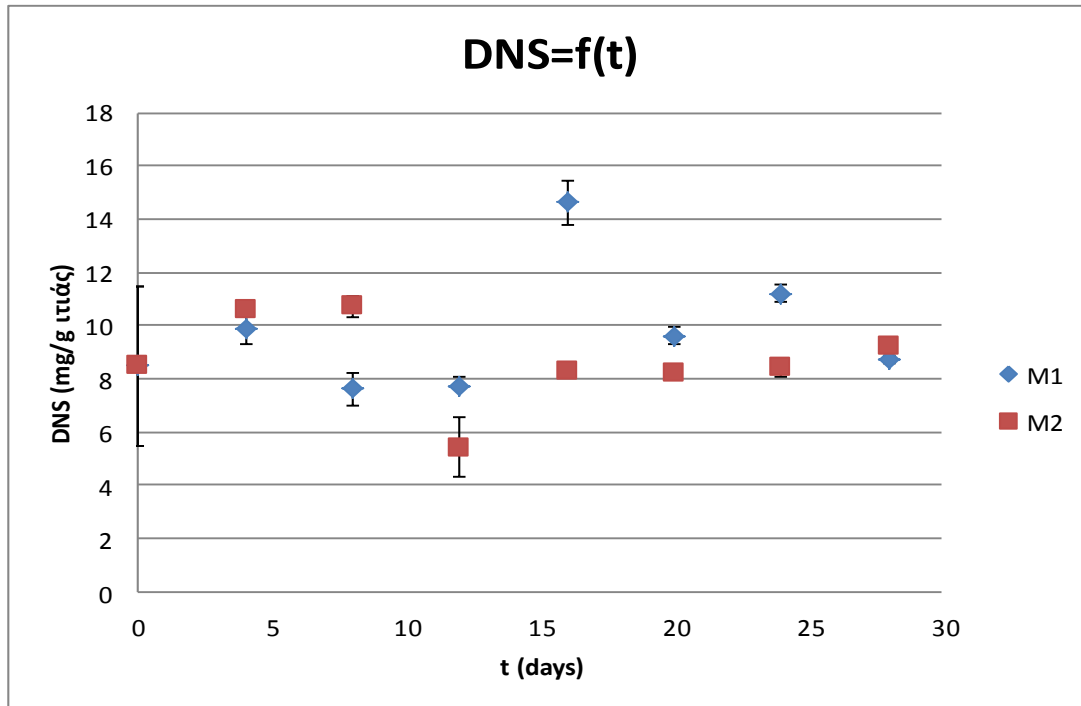
Στη συνέχεια, από τις μετρήσεις σακχάρων στο υδατικό εκχύλισμα υπολογίστηκαν οι μονοσακχαρίτες που υπήρχαν ελεύθεροι στο στερεό σε mg σακχάρων/g ιτιάς. Ο προαναφερθείς υπολογισμός έγινε πολλαπλασιάζοντας τα αποτελέσματα που προκύπτουν ανά g TS με την ανάκτηση υποστρώματος (ιτιάς), η οποία ορίζεται λόγω της μηδενικής απώλειας μάζας ως:

$$\% \text{Ανάκτηση} = 100\% - \% \text{μυκητα}$$

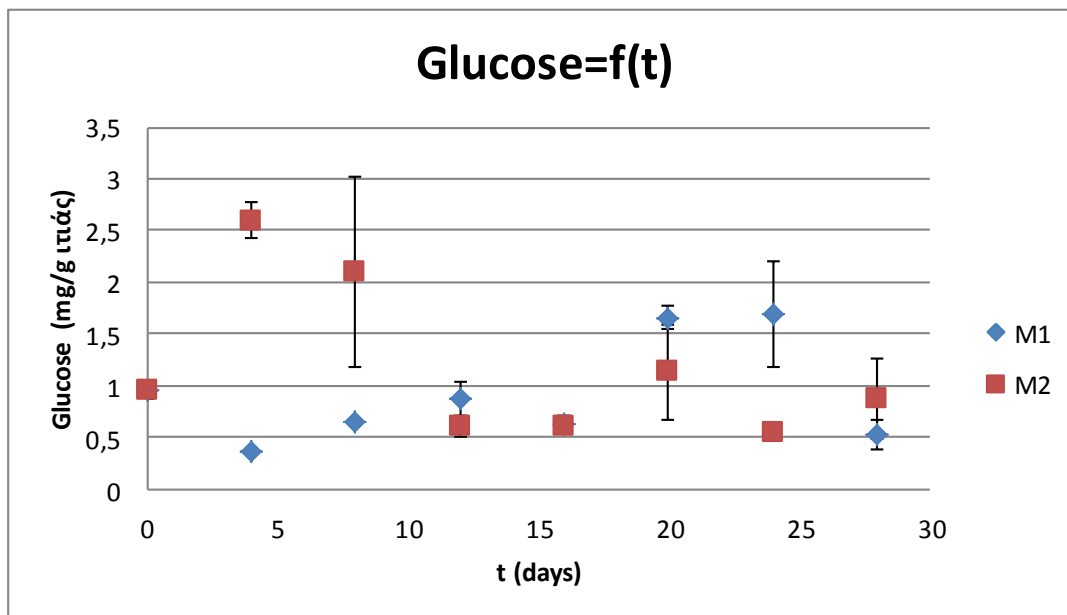
Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι ο υπολογισμός των σφαλμάτων έγινε σε όλα τα αποτελέσματα με βάση το μέγιστο και το ελάχιστο επί μέρους αποτέλεσμα, καθώς τα αποτελέσματα αποτελούν μέσο όρο των 3 επαναλήψεων.



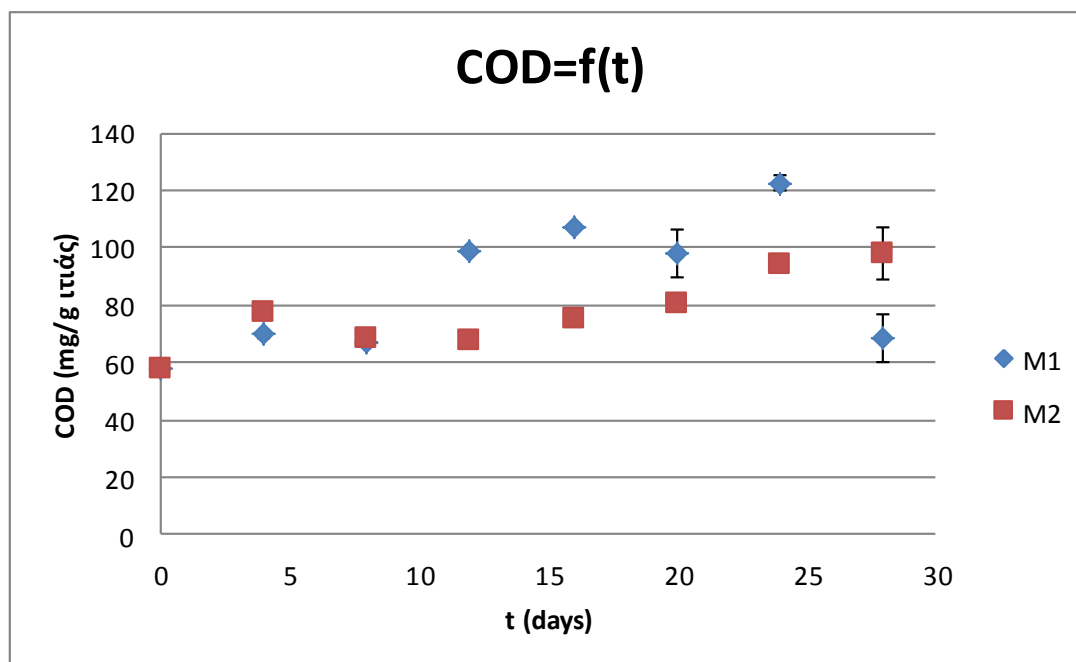
Διάγραμμα 14: Χρονική εξέλιξη του pH του υδατικού εκχυλίσματος για τους 2 μύκητες, όπου M1: *Ganoderma resinaseum* AMRL 325 και M2: *Lentinula edodes* AMRL 122)



Διάγραμμα 15: Χρονική μεταβολή των αναγωγικών σακχάρων στο υδατικό εκχύλισμα, όπου M1: *Ganoderma resinaseum* AMRL 325 και M2: *Lentinula edodes* AMRL 122)



Διάγραμμα 16: Μεταβολή της γλυκόζης στο υδατικό εκχύλισμα συναρτήσει του χρόνου, όπου M1: *Ganoderma resinaseum* AMRL 325 και M2: *Lentinula edodes* AMRL 122)

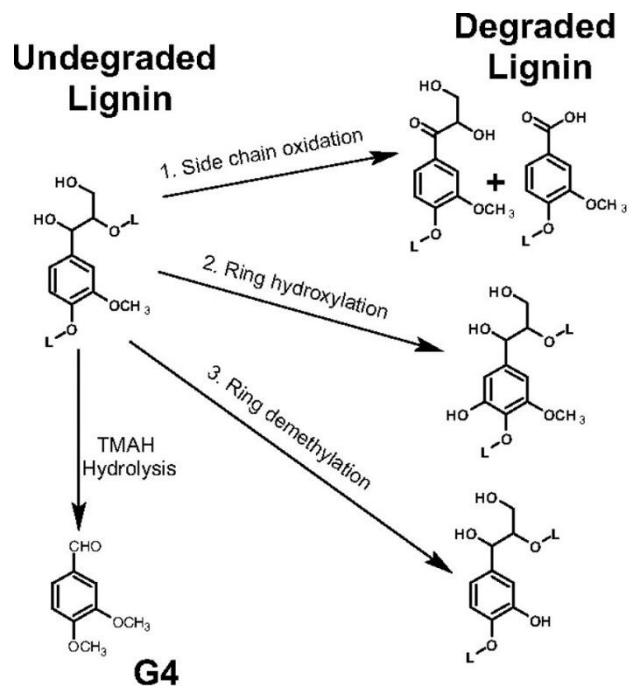


Διάγραμμα 17: Χρονική μεταβολή του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου στο υδατικό πυκνό εκχύλισμα, όπου M1: *Ganoderma resinaseum* AMRL 325 και M2: *Lentinula edodes* AMRL 122)

Από τα παραπάνω διαγράμματα είναι εμφανές ότι, το pH κατά την προεπεξεργασία μειώνεται σε διαφορετικό βαθμό για κάθε μύκητα και σε υψηλούς χρόνους τείνει να σταθεροποιηθεί σε pH 4 για το *Lentinula* και σε pH 4,5 – 5 για το *Ganoderma*. Ακόμα, παρατηρείται ότι υπάρχει διακύμανση στα σάκχαρα και το COD κατά τη διεργασία, η οποία οφείλεται στην ταυτόχρονη υδρόλυση πολυσακχαριτών, κατανάλωση σακχάρων από τους μύκητες και την σχέση των δυο ρυθμών (υδρόλυσης, κατανάλωσης). Τέλος, αποδεικνύεται η προφανής αρχή ότι η μορφή των καμπυλών σακχάρων και COD θα έχει παρόμοια μορφή δεδομένου του γεγονότος ότι οι μεταβολές του συστήματος συμβαίνουν λόγω μεταβολών στα σάκχαρα.

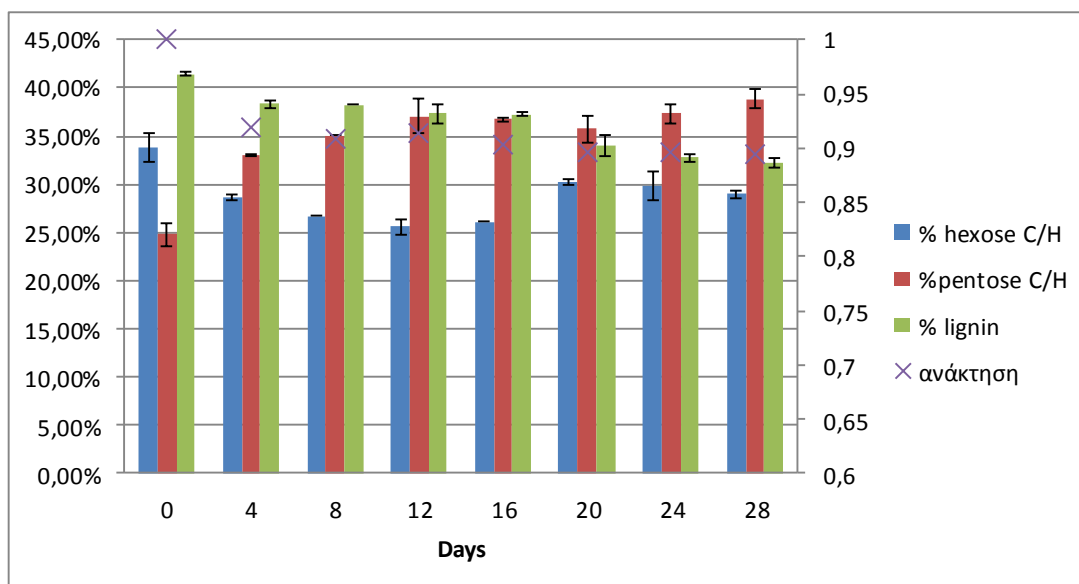
Βάσει των αποτελεσμάτων των δομικών υδατανθράκων και της λιγνίνης, παρουσιάζονται τα παρακάτω αποτελέσματα για καθένα από τους μύκητες. Αξίζει να σημειωθεί ότι, λόγω της ανίχνευσης με την μέθοδο του DNS των αναγωγικών άκρων της οξειδωμένης λιγνίνης (περίπτωση διάνοιξης δακτυλίου, βλ. Εικόνα 18), τα συγκεκριμένα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν μόνο για την διερεύνηση των απωλειών του ισοζυγίου μάζας. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε ο έμμεσος προσδιορισμός της ημικυτταρίνης ως:

$$\% \text{ημικυτταρίνη} = 100\% - \% \text{κυτταρίνη} - \% \text{λιγνίνη}$$

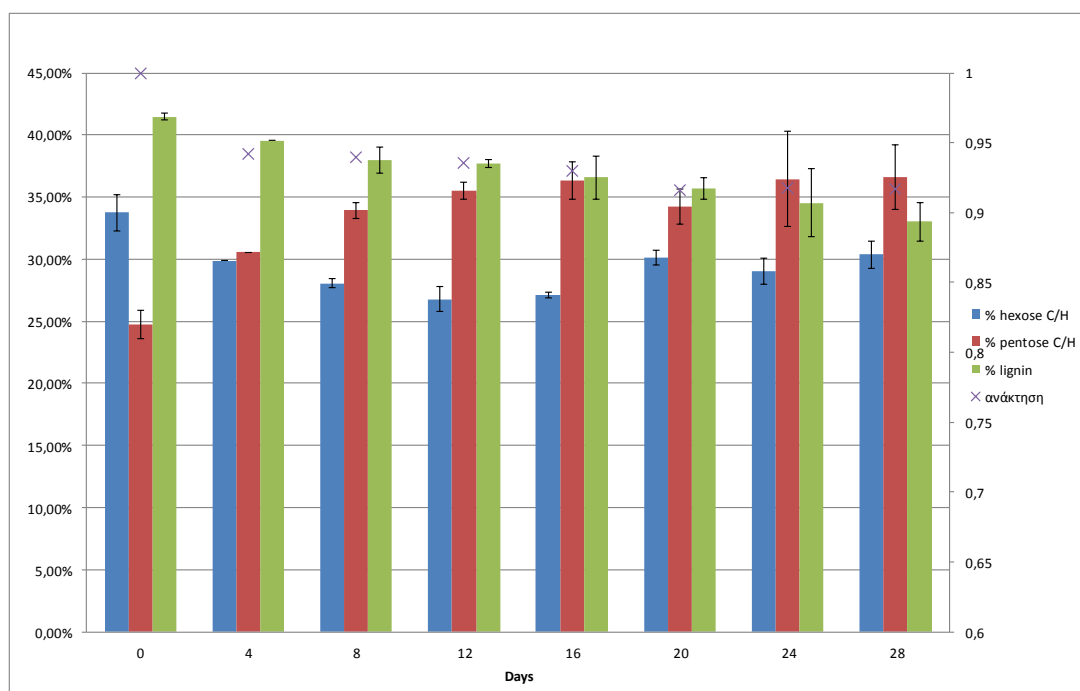


**Εικόνα 18: Οξείδωση λιγνίνης**

Ακόμα, αν και έγινε εφαρμογή της ανάκτησης υποστρώματος στα αποτελέσματα των δομικών υδατανθράκων ώστε τα αποτελέσματα να αναφέρονται μόνο στην ιτιά, λόγω της ανισοκατανομής των πολυσακχαριτών ανάμεσα σε μύκητα και υπόστρωμα, προκύπτει παρεμβολή στα αποτελέσματα της κυτταρίνης, ημικυτταρίνης ενώ το γεγονός αυτό δεν συμβαίνει στην λιγνίνη καθότι δεν παράγεται από τους μύκητες κάτι που να μπορεί να ανιχνευτεί με τις μεθόδους προσδιορισμού λιγνίνης. Οπότε, είναι πιο ορθό λόγω της ανικανότητας των μυκήτων να συνθέσουν κυτταρίνη και ημικυτταρίνη, τα αποτελέσματα να αναφέρονται ως πολυσακχαρίτες εξοζών και πεντοζών αντίστοιχα.



**Διάγραμμα 18: Μεταβολή χαρακτηριστικών στερεάς καλλιέργειας με το χρόνο του συστήματος προεπεξεργασίας με *Ganoderma resinaseum* AMRL 325.**



**Διάγραμμα 19: Μεταβολή χαρακτηριστικών στερεάς καλλιέργειας με το χρόνο του συστήματος προεπεξεργασίας με *Lentinula edodes* AMRL 122.**

Από τα διαγράμματα 18, 19 προκύπτει το συμπέρασμα ότι όσο μεγαλύτερη είναι η μυκητιακή ανάπτυξη, δηλαδή όσο μικρότερη είναι η ανάκτηση υποστρώματος τόσο αυξάνεται η απολιγνίνωση που πραγματοποιείται. Αναλυτικότερα, ο μύκητας *Ganoderma resinaseum* εμφανίζει ανάκτηση στις 28 ημέρες 89,45% και απολιγνίνωση 22,44%. Η μείωση της λιγνίνης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ολοκυτταρίνης (κυτταρίνης + ημικυτταρίνης) και συγκεκριμένα οδηγεί σε αύξηση 56,94% της ημικυτταρίνης και μείωση 14,27% της κυτταρίνης. Ακόμα, ο μύκητας *Lentinula edodes* εμφανίζει ανάκτηση στις 28 ημέρες ίση με 91,67% και απολιγνίνωση 20,57% που οδηγεί σε αύξηση της ημικυτταρίνης κατά 47,42% και μείωση της κυτταρίνης 10,28%. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι ο μύκητας έχει αυξημένη ικανότητα υδρόλυσης των κυτταρινών αλλά όχι των ημικυτταρινών, ενώ φαίνεται και η παρεμβολή των πολυσακχαριτών του μύκητα καθώς η αποικοδόμηση κυρίως της λιγνίνης και σε μικρότερο βαθμό της κυτταρίνης κατά τις διεργασίες ανάπτυξης του μύκητα μετατρέπεται κυρίως σε ημικυτταρίνη στο εσωτερικό του μύκητα. Τέλος, η διαφορά της επιτυγχανόμενης απολιγνίνωσης ανάμεσα στα αρχικά αποτελέσματα επιλογής στελέχους και στα αποτελέσματα ρυθμού οφείλεται στην διαφορετική ποσότητα εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε.

Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα ισοζύγια μάζας με βάση τα πρωτογενή πειραματικά δεδομένα για 1000mg στερεής καλλιέργειας, οι αποκλίσεις οι οποίες κρίνονται υψηλές και θεωρείται ότι οφείλονται στην παρεμβολή του DNS που εξηγήθηκε στην εικόνα 18.



Πίνακας 28: Πρωτογενή ισοζύγια μάζας για τις στερεές καλλιέργειες του *Ganoderma resinaseum* AMRL 325.

Ημέρες	m μύκητα (mg)	m ιτιάς (mg)	DNS (mg)	Glucose (mg)	Στερεό υπόλειμμα (mg)	% hexose C/H	% pentose C/H	% lignin	Απόκλιση (%)
0	6,80	993,20	8,48	0,95	991,52	33,76%	25,48%	41,48%	-1%
4	80,75	919,25	9,89	0,37	990,11	28,62%	42,50%	38,36%	-9%
8	90,80	909,20	7,61	0,64	992,39	26,74%	44,39%	38,24%	-9%
12	86,55	913,45	7,73	0,87	992,27	25,57%	28,34%	37,36%	9%
16	97,24	902,76	14,63	0,63	985,37	26,08%	31,25%	37,21%	5%
20	103,76	896,24	9,62	1,66	990,38	30,24%	30,63%	34,01%	5%
24	103,71	896,29	11,21	1,69	988,79	29,86%	28,14%	32,75%	9%
28	105,47	894,53	8,74	0,52	991,26	28,95%	19,43%	32,18%	19%

Πίνακας 29: Πρωτογενή ισοζύγια μάζας για τις στερεές καλλιέργειες του *Lentinula edodes* AMRL 122.

Ημέρες	m μύκητα (mg)	m ιτιάς (mg)	DNS (mg)	Glucose (mg)	Στερεό υπόλειμμα (mg)	% hexose C/H	% pentose C/H	% lignin	Απόκλιση (%)
0	9,50	990,50	8,48	0,95	991,52	33,76%	25,48%	41,48%	-1%
4	57,97	942,03	10,63	2,60	989,37	29,87%	48,43%	39,56%	-18%
8	60,52	939,48	10,72	2,10	989,28	28,07%	28,93%	37,99%	5%
12	64,34	935,66	5,42	0,61	994,58	26,80%	32,34%	37,72%	3%
16	70,29	929,71	8,26	0,61	991,74	27,12%	30,69%	36,57%	6%
20	83,94	916,06	8,21	1,13	991,79	30,11%	18,09%	35,70%	16%
24	81,91	918,09	8,43	0,55	991,57	29,02%	27,94%	34,54%	8%
28	83,27	916,73	11,05	1,05	988,95	30,37%	29,37%	33,03%	7%

Λόγω των μεγάλων αποκλίσεων που εμφανίζονται παραπάνω κρίνεται αναγκαίος ο έμμεσος υπολογισμός του κλάσματος των πολυσακχαριτών πεντόζης, όπως παρουσιάστηκε προηγουμένως για τις ημικυτταρίνες, δεδομένου ότι οι πολυσακχαρίτες πεντόζης αποτελούνται κυρίως από ημικυτταρίνες. Ακόμα, θεωρείται ότι στο υδατικό εκχύλισμα απομακρύνονται όλοι οι μονοσακχαρίτες, οπότε το στερεό υπόλειμμα αποτελείται από μύκητα και υπόστρωμα, σε αυτό το σημείο περιλαμβάνεται στην ανάλυση η μάζα του μύκητα ώστε να απορροφηθεί η παρεμβολή των πολυσακχαριτών των μυκήτων. Επομένως, το στερεό υπόλειμμα προκύπτει ως η διαφορά:

$$\text{Στερεό υπόλειμμα} = \text{Στερεά καλλιέργεια} - \text{DNS}$$

Παρακάτω, παρουσιάζονται σε πινακοποιημένη μορφή τα τροποποιημένα ισοζύγια μάζας που θα χρησιμοποιηθούν για την ερμηνεία και μοντελοποίηση της διεργασίας.

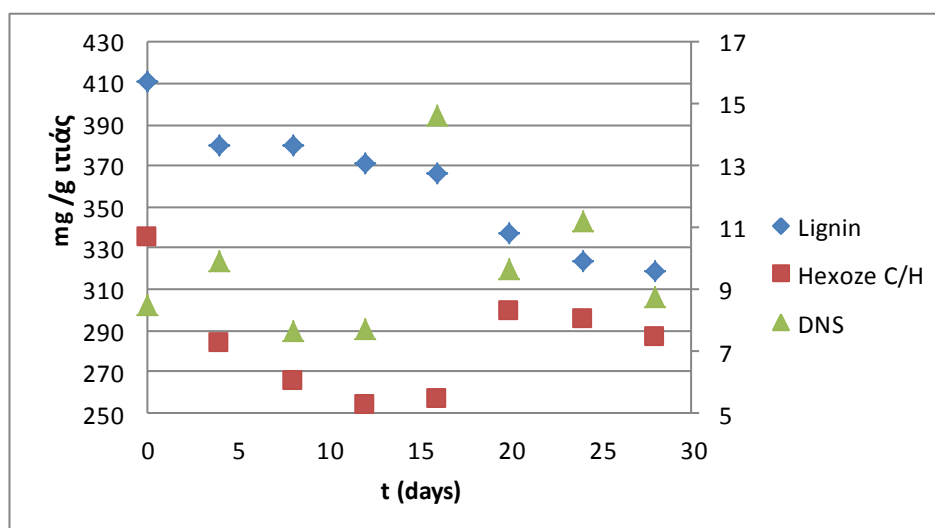
Πίνακας 30: Ισοζύγια μάζας για τις στερεές καλλιέργειες του *Ganoderma resinaseum* AMRL 325.

Ημέρες	μύκητας (mg)	ιτιά (mg)	DNS (mg)	Glucose (mg)	Στερεό υπόλειμμα (mg)	hexose C/H (mg)	pentose C/H (mg)	lignin (mg)
0	6,80	993,20	8,48	0,95	991,52	334,73	245,53	411,26
4	80,75	919,25	9,89	0,37	990,11	283,33	327,00	379,78
8	90,80	909,20	7,61	0,64	992,39	265,37	347,58	379,44
12	86,55	913,45	7,73	0,87	992,27	253,69	367,85	370,74
16	97,24	902,76	14,63	0,63	985,37	256,94	361,79	366,64
20	103,76	896,24	9,62	1,66	990,38	299,54	354,00	336,84
24	103,71	896,29	11,21	1,69	988,79	295,27	369,67	323,85
28	105,47	894,53	8,74	0,52	991,26	286,97	385,34	318,95

Πίνακας 31: Ισοζύγια μάζας για τις στερεές καλλιέργειες του *Lentinula edodes* AMRL 122.

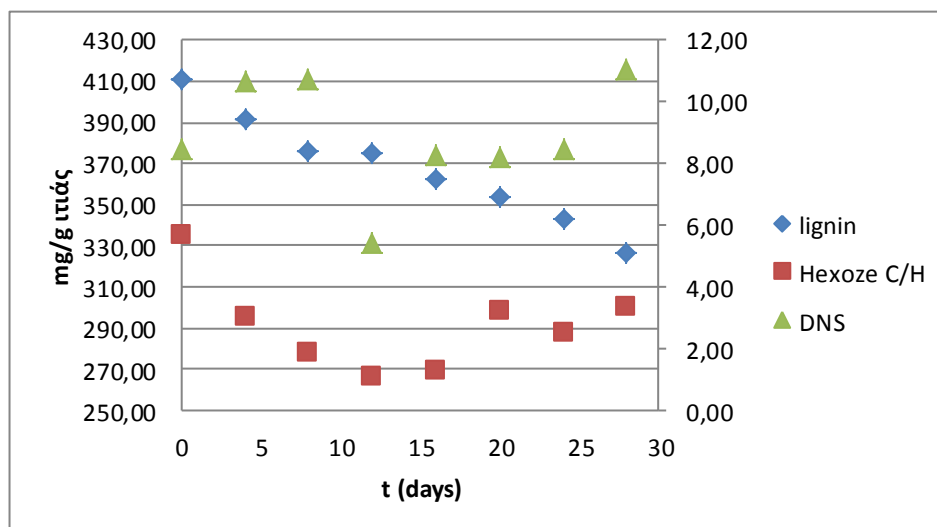
Ημέρες	μύκητας (mg)	ιτιά (mg)	DNS (mg)	Glucose (mg)	Στερεό υπόλειμμα (mg)	hexose C/H (mg)	pentose C/H (mg)	lignin (mg)
0	9,50	990,50	8,48	0,95	991,52	334,73	245,53	411,26
4	57,97	942,03	10,63	2,60	989,37	295,50	302,50	391,37
8	60,52	939,48	10,72	2,10	989,28	277,73	335,77	375,78
12	64,34	935,66	5,42	0,61	994,58	266,51	352,96	375,12
16	70,29	929,71	8,26	0,61	991,74	268,94	360,16	362,65
20	83,94	916,06	8,21	1,13	991,79	298,62	339,13	354,04
24	81,91	918,09	8,43	0,55	991,57	287,80	361,31	342,46
28	83,27	916,73	11,05	1,05	988,95	300,31	361,96	326,68

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (Πίνακας 30 και 31) κατασκευάζονται τα διαγράμματα 20 και 21 με σκοπό την επεξήγηση του φαινομένου της απολιγνίνωσης.



Διάγραμμα 20: Μεταβολή λιγνίνης, πολυσακχαριτών εξόζης και αναγωγικών σακχάρων με τον χρόνο για την στερεή καλλιέργεια του *Ganoderma resinaseum* AMRL 325. Στον αριστερό άξονα δίνονται τα αποτελέσματα για την λιγνίνη και τους υδατάνθρακες εξόζης ενώ στον δεξιό για τα αναγωγικά σάκχαρα.

Από το Διάγραμμα 20 είναι εμφανές ότι ο ρυθμός απολιγνίνωσης μειώνεται στις 8 – 12d. Η παραπάνω παρατήρηση ερμηνεύεται ως περιορισμός από πηγή άνθρακα καθώς σε αυτή την χρονική περίοδο τα αναγωγικά σάκχαρα μειώνονται σε επίπεδο κάτω από 8mg/g ιτιάς, οπότε ο μύκητας, καθότι βρίσκεται σε συνθήκες πείνας, ενισχύει την υδρολυτική του δράση. Η αύξηση της υδρολυτικής του δράσης φαίνεται από την μεγάλη αύξηση των DNS μετά την περίοδο των 12 ημερών, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της λιγνολυτικής δράσης του μύκητα. Ακόμα, μετά την αύξηση των DNS παρατηρείται επανέναρξη των δράσεων απολιγνίνωσης και αύξηση των πολυσακχαριτών εξόζης που οφείλεται σε μετατροπή της λιγνίνης σε μυκητιακή μάζα και επομένως σε πολυσακχαρίτες.



**Διάγραμμα 21:** Μεταβολή λιγνίνης, πολυσακχαριτών εξόζης και αναγωγικών σακχάρων με τον χρόνο για την στερεή καλλιέργεια του *Lentinula edodes* AMRL 122. Στον αριστερό άξονα δίνονται τα αποτελέσματα για την λιγνίνη και τους υδατάνθρακες εξόζης ενώ στον δεξιό για τα αναγωγικά σάκχαρα.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από το Διάγραμμα 21 είναι παρόμοια με αυτά που αναφέρθηκαν προηγουμένως για τον μύκητα *Ganoderma resinaseum*, ωστόσο το όριο περιορισμού που παρατηρείται για τον *Lentinula edodes* φαίνεται να είναι στο επίπεδο των 6 mg/g ιτιάς, μικρότερο από του *Ganoderma resinaseum*. Ακόμα, είναι εμφανές ότι όσο μεγαλύτερη είναι η διαθεσιμότητα αναγωγικών σακχάρων τόσο μεγαλύτερη απολιγνίνωση παρατηρείται.

#### 4.5. Μοντελοποίηση αποτελεσμάτων

Από τα παραπάνω αποτελέσματα του πειράματος ρυθμού και την ερμηνεία που τους αποδόθηκε είναι εμφανές ότι, τα αποτελέσματα που μπορούν να μοντελοποιηθούν είναι η ανάπτυξη του μύκητα και η μείωση της λιγνίνης. Αξίζει να αναφερθεί ότι, δεδομένου του γεγονότος ότι η διεργασία που πραγματοποιείται είναι η απολιγνίνωση δεν έχει νόημα η μοντελοποίηση επιπλέον αποτελεσμάτων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του φαινομένου σε δύο φάσεις, η πρώτη αφορά τον χρόνο 0 – 12d όπου και παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού απολιγνίνωσης λόγω του περιορισμού που εξηγήθηκε παραπάνω και η δεύτερη περιλαμβάνει τον υπολειπόμενο χρόνο (12 – 28d).

Η μοντελοποίηση της μυκητιακής ανάπτυξης έγινε με χρήση του μοντέλου ανάπτυξης Gompertz, καθώς παρατηρείται σε πρώιμα στάδια σύμφωνα και με την βιβλιογραφία μικρή ανάπτυξη λόγω εγκλιματισμού (υστέρηση), στη συνέχεια αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης και στο τέλος πάλι μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. [44] Το μοντέλο Gompertz είναι:

$$\frac{dX}{dt} = A \log\left(\frac{k}{X}\right) \cdot X$$

όπου  $X$  ορίζεται η μάζα του μύκητα εκφρασμένη σε mg,  $A$  η σταθερά εγγενούς ανάπτυξης των κυττάρων εκφρασμένη σε  $1/d$  και  $k$  η χωρητικότητα του συστήματος με βάση τα διαθέσιμα συστατικά εκφρασμένη σε g μύκητα.

Για την μοντελοποίηση των αποτελεσμάτων απολιγνίνωσης χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο που συσχετίζει την συγκεκριμένη δράση με την βιομάζα ως εξής:

$$\frac{dL}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/L}} \frac{dX}{dt} - m \cdot X$$

Όπου,  $L$  ορίζεται η μάζα λιγνίνης εκφρασμένη σε mg,  $Y_{X/L}$  ο συντελεστής μετατροπής λιγνίνης σε βιομάζα μύκητα εκφρασμένος σε  $\frac{g_{\text{βιομάζας μύκητα}}}{g_{\text{λιγνίνης}}}$  και  $m$  ο

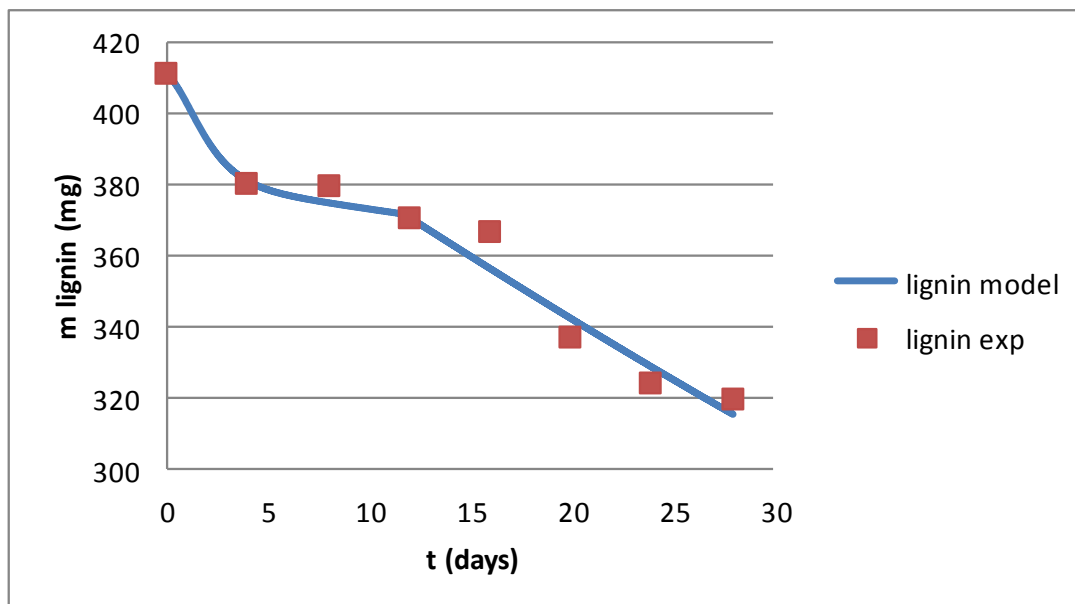
συντελεστής συντήρησης εκφρασμένος σε  $\frac{g_{\text{λιγνίνης}}}{g_{\text{βιομάζας μύκητα}} \cdot d}$ . Τα παραπάνω μοντέλα με

χρήση του Aquasim προσαρμόστηκαν στα πειραματικά δεδομένα. Παρακάτω δίνονται για κάθε φάση της διεργασίας οι τιμές των παραμέτρων και τα διαγράμματα προσαρμογής για κάθε μύκητα.

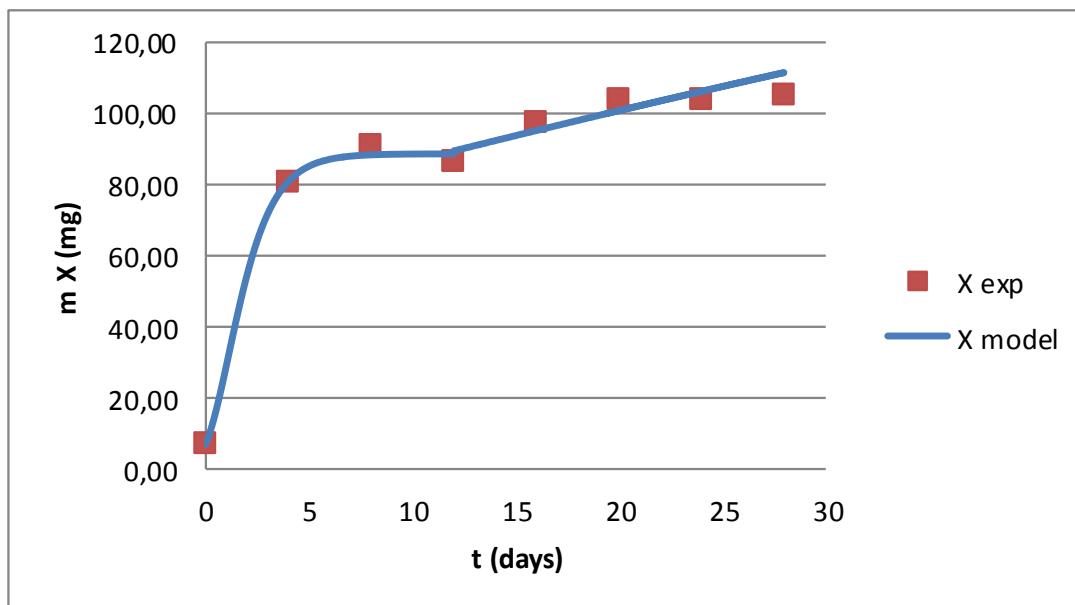
*Ganoderma resinaseum* AMRL 325

Πίνακας 32: Παράμετροι μοντέλου για *Ganoderma resinaseum* AMRL 325

Φάση	A	k	b	m
1	0,831465	88,748013	0,3719635	0,009239
2	0,2346	105,81268	0,0672244	0,034233



Διάγραμμα 22: Διαγραμματική απεικόνιση του μοντέλου της διεργασίας απολιγνίνωσης.

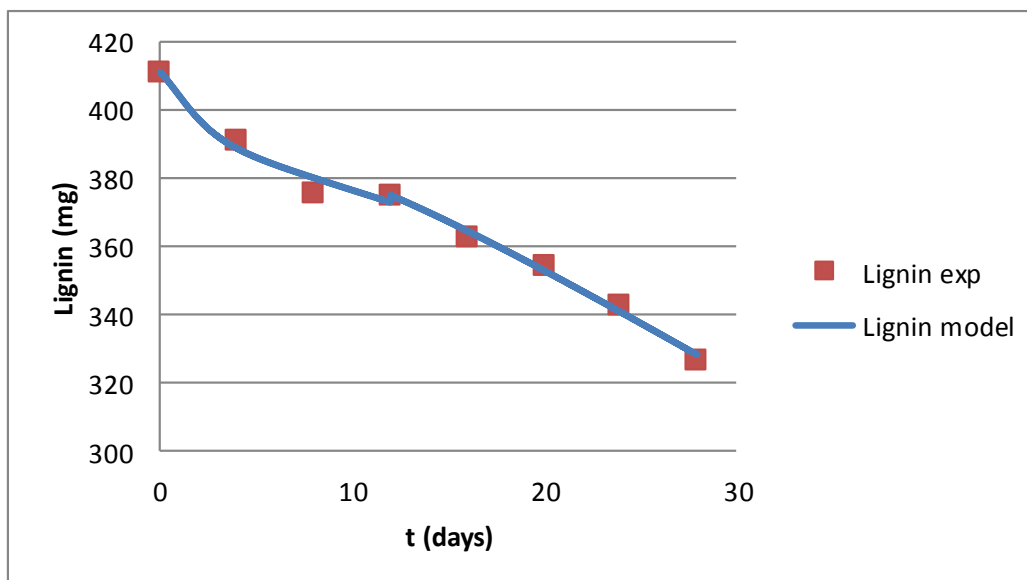


Διάγραμμα 23: Διαγραμματική απεικόνιση του μοντέλου ανάπτυξης του μύκητα.

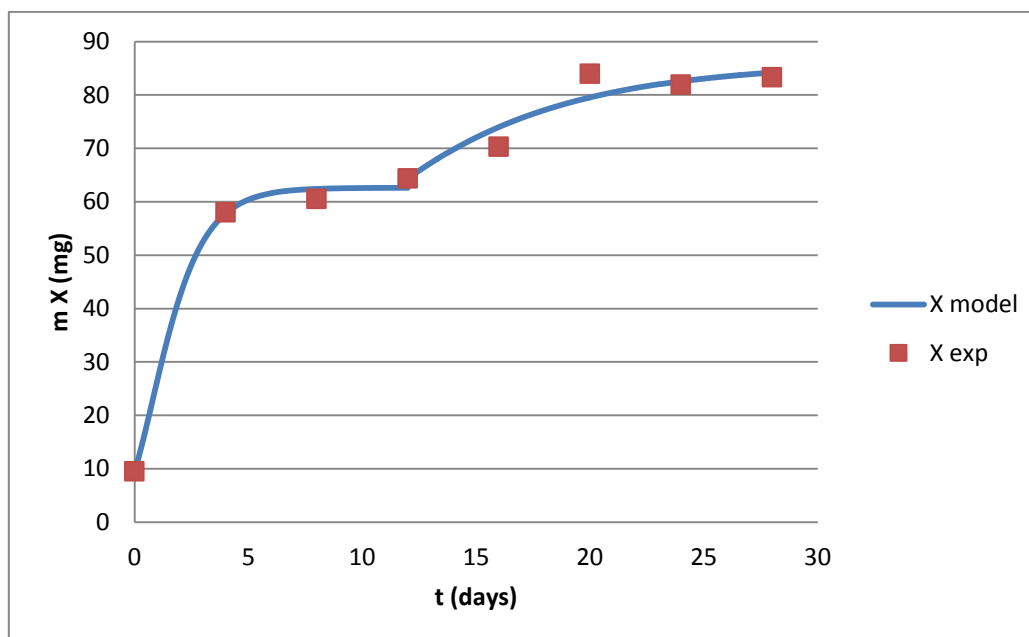
*Lentinula edodes* AMRL 122

Πίνακας 33: Παράμετροι μοντέλου για *Lentinula edodes* AMRL 122.

Φάση	A	k	b	m
1	0,790321	62,61622	0,371514	0,028463
2	0,164426	85,96521	0	0,037794



Διάγραμμα 24: Διαγραμματική απεικόνιση του μοντέλου της διεργασίας απολιγνίνωσης.

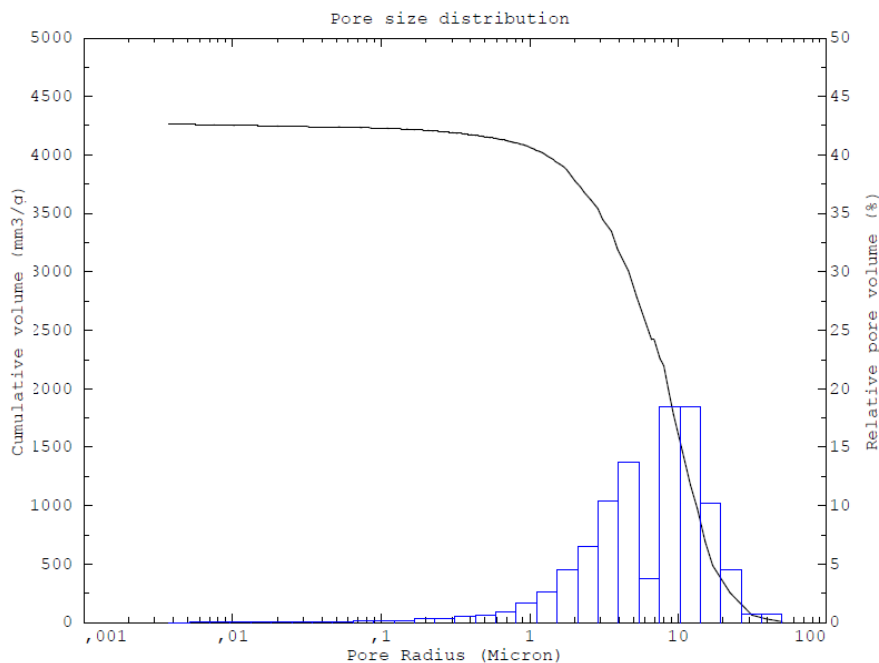


Διάγραμμα 25: Διαγραμματική απεικόνιση του μοντέλου ανάπτυξης του μύκητα.

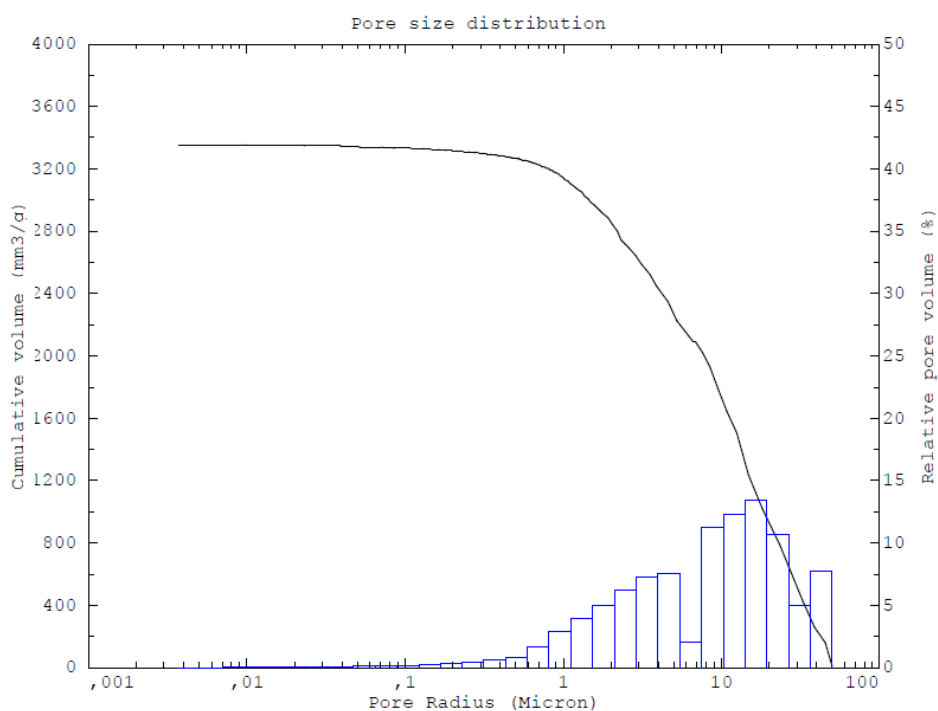
Από τις παραμέτρους των παραπάνω προσαρμοσμένων μοντέλων είναι εμφανές ότι το *Ganoderma* εμφανίζει μεγαλύτερη συνάφεια με το υπόστρωμα καθώς παρατηρείται μεγαλύτερη σταθερά εγγενούς ανάπτυξης και μεγαλύτερη χωρητικότητα συστήματος σε σχέση με τον *Lentinula*. Ακόμα, παρατηρείται ότι ο *Ganoderma* απαιτεί μικρότερη ποσότητα λιγνίνης για την ικανοποίηση των φυσιολογικών του αναγκών σε σχέση τον *Lentinula* καθώς η σταθερά m είναι σε κάθε περίπτωση μικρότερη.

#### 4.6. Αποτελέσματα ποροσιμετρίας

Παρακάτω παραθέτονται τα διαγράμματα κατανομής των πόρων του προεπεξεργασμένου υποστρώματος για 28 ημέρες με τους δύο μύκητες όπως αυτά προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία της ποροσιμετρίας. Ακόμα, κατασκευάστηκε ο συγκριτικός Πινάκας 33.



**Διάγραμμα 26:** Κατ' όγκο κατανομή μεγέθους πόρων που προκύπτει από την καμπύλη διείσδυσης για την προεπεξεργασμένη με *Ganoderma resinaseum* AMRL 325 ιτιά.



**Διάγραμμα 27:** Κατ' όγκο κατανομή μεγέθους πόρων που προκύπτει από την καμπύλη διείσδυσης για την προεπεξεργασμένη με *Lentinula edodes* AMRL 122 ιτιά.

Πίνακας 34: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων ποροσιμετρίας

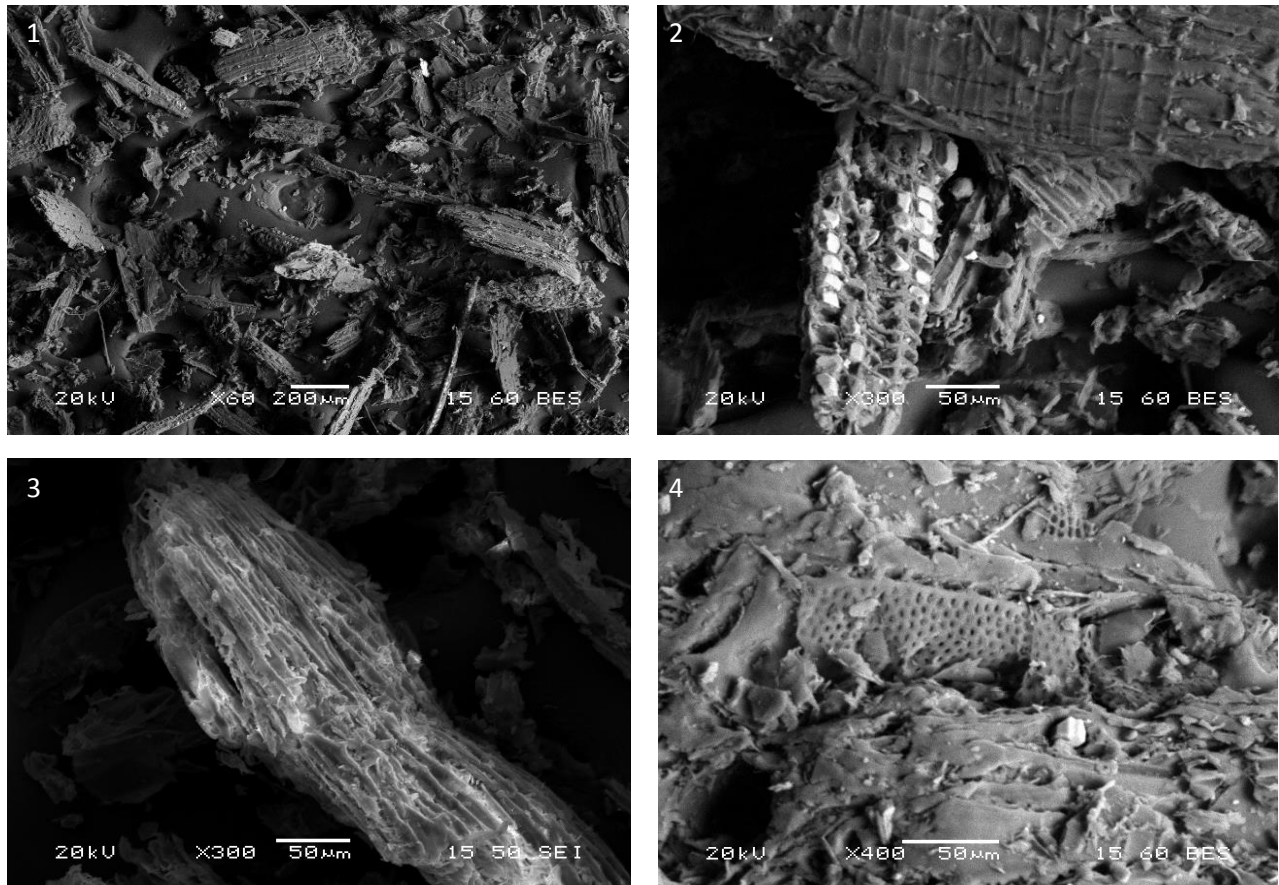
Αποτελέσματα\στέλεχος	<i>Ganoderma resinaseum</i> AMRL 325	<i>Lentinula edodes</i> AMRL 122
Ολικός όγκος διείσδυσης (mm <sup>3</sup> /g)	4261,46	3354,51
Ολική ειδική επιφάνεια (m <sup>2</sup> /g)	6,424	3,53
Μέση ακτίνα πόρων (μm)	12,036	16,523
Ολικό πορώδες	83	81,05
Φαινόμενη πυκνότητα	1,146	1,275

Από τα διαγράμματα κατανομής (Διαγράμματα 26 και 27) προκύπτει ότι η προεπεξεργασμένη με *Ganoderma* ιτιά εμφανίζει πιο στενή κατανομή πόρων με μέγιστο σε μεγέθη πόρων μεγαλύτερα σε σχέση με την προεπεξεργασμένη με *Lentinula* ιτιά. Ωστόσο, λόγω της ευρείας κατανομής πόρων, όπως προκύπτει και από τα συγκριτικά αποτελέσματα του Πίνακα 32, η προεπεξεργασμένη με *Ganoderma* ιτιά εμφανίζει μικρότερη ακτίνα πόρων και υψηλότερη ειδική επιφάνεια σε σχέση με την προεπεξεργασμένη με *Lentinula* ιτιά. Ακόμη, η προεπεξεργασία με *Ganoderma* κρίνεται πιο αποτελεσματική διότι παράγει ένα στερεό με ειδική επιφάνεια σχεδόν διπλάσια σε σχέση με τον *Lentinula* γεγονός που αποδεικνύει ότι η προεπεξεργασία με *Ganoderma* έχει μεγαλύτερη επίδραση στην δομή του στερεού. Επομένως, δεδομένου ότι η υδρόλυση που θα πραγματοποιηθεί στις κατάντη διεργασίες είναι επιφανειακή αντίδραση η ιτιά που έχει προεπεξεργαστεί με *Ganoderma* θα σακχαροποιηθεί με μεγαλύτερο ρυθμό. Τέλος, τα συγκεκριμένα αποτελέσματα εμφανίζουν ποιοτική συνάφεια με τα αποτελέσματα του πειράματος ρυθμού.



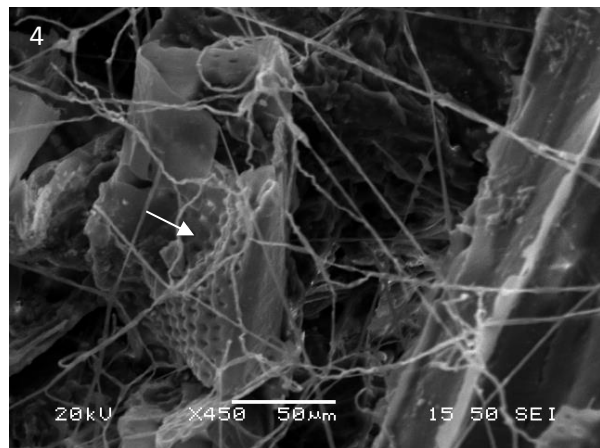
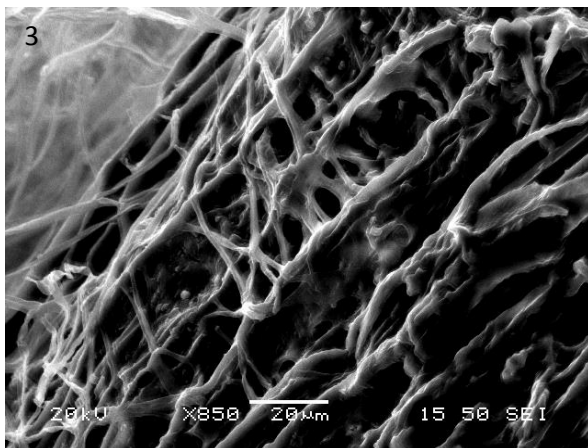
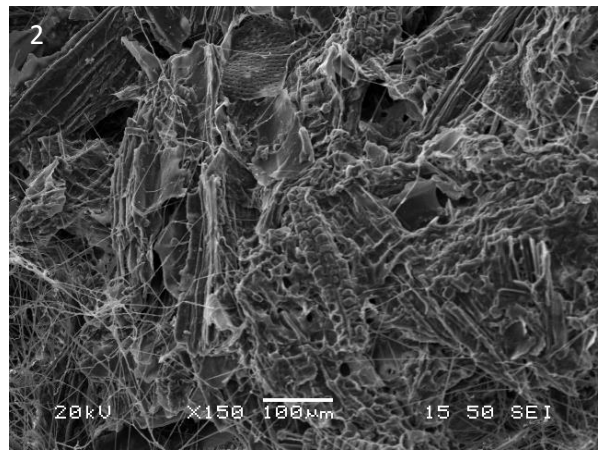
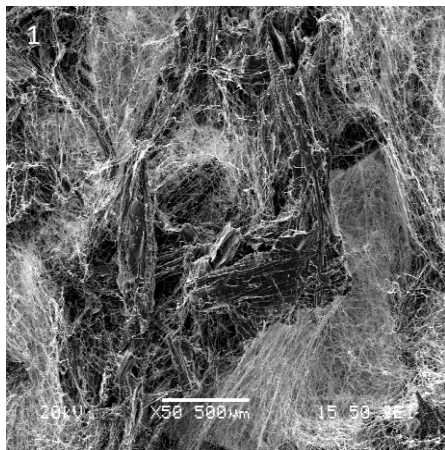
#### 4.7. Αποτελέσματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης

Αρχικά, θα πραγματοποιηθεί η παράθεση των πιο επεξηγηματικών εικόνων για την ανεπεξέργαστη ιτιά (πρώτη ύλη) και θα επεξηγηθούν οι αντίστοιχες δομές. Στην συνέχεια, θα δοθούν οι εικόνες για την προεπεξεργασμένη ιτιά με τους αντίστοιχους μύκητες.

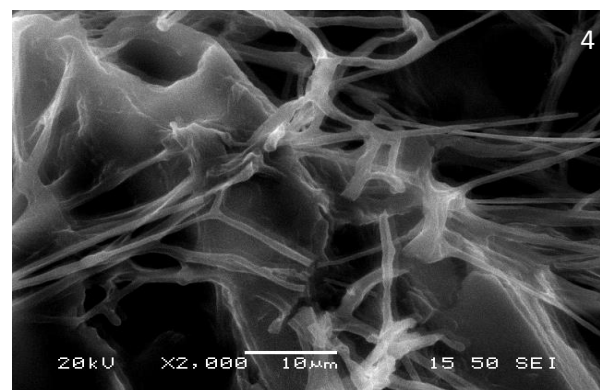
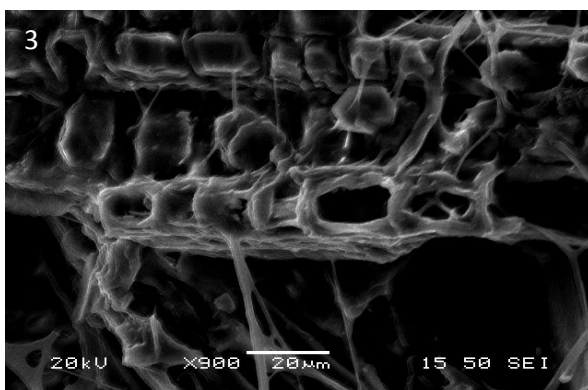
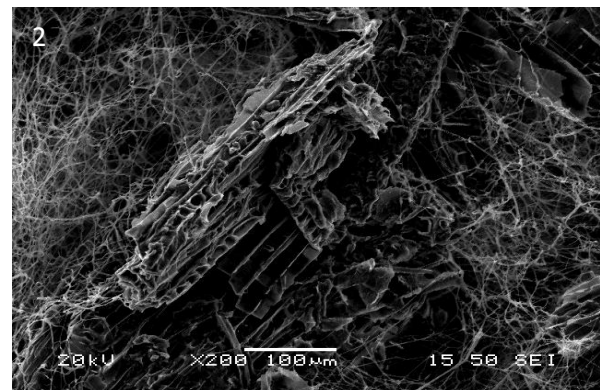
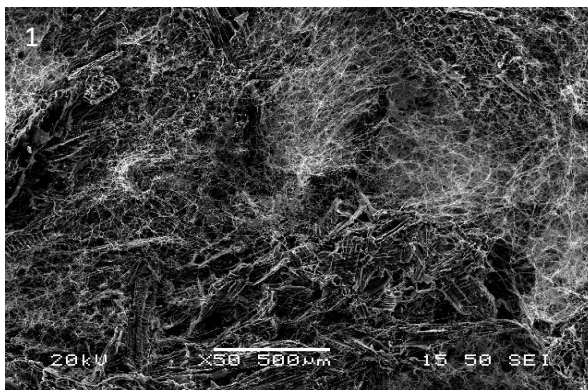


Εικόνα 19: Φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της ιτιάς σε διάφορες μεγεθύνσεις

Στην παραπάνω εικόνα φαίνονται οι διάφορες δομές των λιγνοκυτταρινούχων υλικών. Συγκεκριμένα, στην εικόνα 19/1 δίνεται μια γενική άποψη της πρώτης ύλης (πριονίδια ιτιάς), στην εικόνα 19/2 δίνεται η δομή των κυτταρινικών μικροϊνών ενώ στην εικόνα 19/3 εμφανίζεται η δομή των κυτταρινικών μικροϊνών μαζί με το προστατευτικό πορώδες περίβλημα λιγνίνης. Τέλος, στην εικόνα 19/4 φαίνεται η μικροπορώδης δομή που προκύπτει από την λιγνίνη και την ημικυτταρίνη και δρα προστατευτικά όπως εξηγήθηκε στο 2.2.5 [45].



Εικόνα 21: Φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της προεπεξεργασμένης ιτιάς *Ganoderma resinaseum* AMRL 325 σε διάφορες μεγεθύνσεις



Εικόνα 22: Φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της προεπεξεργασμένης ιτιάς *Lentinula edodes* AMRL 122 σε διάφορες μεγεθύνσεις

Από την σύγκριση των εικόνων 21/1 και 22/1 προκύπτει ότι οι υφές του *Ganoderma resinaseum* AMRL 325 είναι πιο πυκνές από τις υφές του *Lentinula edodes* AMRL 122. Ακόμα, από την σύγκριση των εικόνων 21/2 και 22/2 φαίνεται ότι η διείσδυση των μυκητιακών υφών είναι πολύ μεγαλύτερη για τον *Ganoderma*. Ακόμη το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από την αξιολόγηση των εικόνων 21/3 και 22/3 καθώς ο *Ganoderma* έχει καλύψει σχεδόν εξ' ολοκλήρου την κυτταρινική μικροΐνα σε αντίθεση με τον *Lentinula* που την έχει καλύψει εν μέρη. Τέλος, αν και ο *Lentinula* εμφανίζεται να διεισδύει στο μικροπορώδες τμήμα του υλικού (εικόνα 22/4), ο *Ganoderma* εμφανίζει μεταβολή της μορφολογίας του υλικού και αποσύνθεση ενός μέρους του στην εικόνα 21/4. Τα παραπάνω αποτελέσματα μορφολογίας είναι σε πλήρη συνάφεια με τις μετρήσεις πολυσακχαριτών και λιγνίνης καθώς ο *Ganoderma* εμφανίζει μεγαλύτερη μείωση λιγνίνης και κυτταρίνης.

## **5. Συμπεράσματα - Προτάσεις**

Ο κλάδος των βιοκαυσίμων και ειδικά της αξιοποίησης της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας εμφανίζεται, λόγω του υψηλού δυναμικού που υπάρχει στην Ελλάδα, ως υποσχόμενη εναλλακτική που θα αξιοποιηθεί τα επόμενα χρόνια. Επομένως, οι τεχνολογίες αξιοποίησης και μετατροπής της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας όπως η βιολογική προεπεξεργασία εμφανίζουν αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον. Από την αξιοποίηση των αποτελεσμάτων και των παρατηρήσεων που προέκυψαν από αυτά, είναι εμφανές ότι η βιολογική προεπεξεργασία από μόνη της δεν μπορεί να αξιοποιηθεί για την απολιγνίνωση υποστρωμάτων με μεγάλο περιεχόμενο λιγνίνης, όπως η ιτιά. Οπότε κρίνεται αναγκαίος ο συνδυασμός της συγκεκριμένης τεχνολογίας με κάποια άλλη φυσική ή χημική μέθοδο προεπεξεργασίας ώστε να επιτευχθεί μείωση της λιγνίνης σε επίπεδα ικανά για την αποδοτική αξιοποίηση της ιτιάς. Αναλύοντας τη βιβλιογραφία, ο πιο αποδοτικός συνδυασμός μεθόδων είναι η χρήση πριν την βιολογική προεπεξεργασία της χημικής προεπεξεργασίας με NaOH ή O<sub>3</sub> καθώς παρέχονται στο σύστημα OH<sup>-</sup> που έχουν την ικανότητα να δράσουν ως διεγέρτες για την βιολογική προεπεξεργασία και επειδή οι συγκεκριμένες μέθοδοι προεπεξεργασίας απομακρύνουν μέσω διαλυτοποίησης την λιγνίνη ή τα παράγωγα της, μειώνεται η πιθανότητα να προκύψει παρεμπόδιση από φαινόλες στις κατάντη διεργασίες. Ακόμα, με χρήση συνδυαστικών τεχνικών μειώνεται ο χρόνος προεπεξεργασίας που είναι ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα αυτής της τεχνολογίας ενώ υπάρχει η δυνατότητα μείωσης των παρεμποδιστών λόγω μεταβολισμού τους από τους μύκητες εφόσον χρησιμοποιηθεί τελευταία η βιολογική προεπεξεργασία.

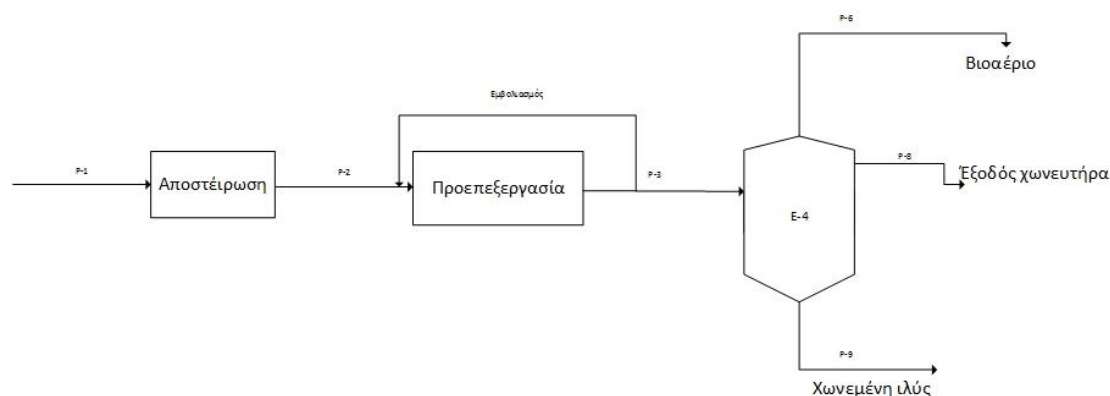
Όσον αφορά την σύγκριση των δύο μυκήτων, ο *Ganoderma* κρίνεται ως ο πιο αποτελεσματικός διότι μειώνει σε μεγαλύτερο βαθμό την λιγνίνη και προκαλεί μεγαλύτερη ποσοστιαία αύξηση των πολυσακχαριτών του υποστρώματος (15,86% έναντι 14,32%), ενώ εμφανίζει και υψηλότερο COD για το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα με αποτέλεσμα το υγρό κλάσμα της διεργασίας να μπορεί να αξιοποιηθεί με αναερόβια χώνευση. Οπότε, δεδομένου του ότι ο *Ganoderma* θεωρείται ως πιο αποδοτικός μύκητας της συλλογής είναι αναγκαία η πραγματοποίηση κάποιων επιπλέον πειραμάτων σε μια στερεά καλλιέργεια με *Ganoderma resinaseum* AMRL 325, με σκοπό την διερεύνηση του φαινομένου και την ανίχνευση της δυνατότητας αύξησης της λιγνολυτικής δράσης. Επομένως, θα μπορούσε να γίνει χρήση θρεπτικών συμπληρωμάτων (άζωτο, φώσφορος) για την ανίχνευση του τρόπου που επηρεάζει η έλλειψη θρεπτικών το σύστημα. Κρίνεται αναγκαία και η δοκιμή ενός συστήματος επιπλέουσας καλλιέργειας, καθώς μπορεί τα φαινόμενα μεταφοράς στο σύστημα της στερεάς καλλιέργειας να επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση του συστήματος. Τέλος, είναι αναγκαία η διεξαγωγή πειραμάτων στην στερεά καλλιέργεια για τον προσδιορισμό των ενζύμων που δρουν στο σύστημα και του μεθανογόνου δυναμικού που μπορεί να επιτευχθεί.

### **5.1. Πρόταση συστήματος προεπεξεργασίας**

Για την αξιοποίηση της συγκεκριμένης μεθόδου σε μεγάλη κλίμακα, δεδομένου ότι απαιτείται υψηλός χρόνος παραμονής, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένα σύστημα παρόμοιο με τα συστήματα που χρησιμοποιούνται για την κομποστοποίηση, όπως τα συστήματα με σειράδια. Το σύστημα των σειραδίων κρίνεται ως αξιοποιήσιμο διότι μπορεί να γίνεται ανάδευση ανά κάποιες ημέρες ενώ οι σωλήνες που υπάρχουν κάτω από την καλλιέργεια μπορούν να ελέγχουν τον αερισμό που αποτελεί πολύ σημαντική

παράμετρο για τη διεργασία. Ωστόσο, παρά την υπάρχουσα τεχνογνωσία, θα πρέπει να υπάρξει μέριμνά κατά την ανάδευση για την αναπλήρωση υγρασίας. Ένα εναλλακτικό σύστημα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί αλλά έχει επιπλέον κόστος σε σχέση με το προηγούμενο είναι σε τούνελ με ταινιοδιάδρομο που στο τέλος της προεπεξεργασίας θα εκφορτώνει το περιεχόμενο σε ένα χώρο που θα μπορεί να πλημμυριστεί ώστε να φτάσει σε ικανή φόρτιση για ένα αναερόβιο χωνευτήρα. Στο συγκεκριμένο τούνελ μπορούν να επιτευχθούν οι σωστές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας ώστε να αναπτύσσονται οι μύκητες, κάτι που δεν διασφαλίζεται στο σύστημα των σειραδίων.

Ακόμη, ως σύστημα διαλείποντος έργου μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια πληρωμένη με το υπόστρωμα στήλη, στην οποία θα υπάρχει ένα σύστημα ανακυκλοφορίας νερού για την απομάκρυνση των σακχάρων. Το σύστημα νερού θα προσθέτει στάγδην νερό στην κορυφή και θα το απομακρύνει από τον πυθμένα ενώ όταν αποκτήσει ικανή φόρτιση θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα χωνευτήρα ενισχύοντας παράλληλα και την υδρολυτική του ικανότητα λόγω των εκχυλισμένων ενζύμων. Ωστόσο αυτό το σύστημα απαιτεί και την χρήση διάταξης αερισμού καθώς κατά την προεπεξεργασία υπάρχουν έντονες ανάγκες αερισμού λόγω της οξειδωτικής φύσης της διεργασίας, ενώ παράλληλα με χρήση του αέρα μπορούν να εξαλειφθούν οι θερμοκρασιακές βαθμίδες που δημιουργούνται, καθώς οι δράσεις είναι εξώθερμες. Ακόμη, σε κάθε σύστημα πριν την προεπεξεργασία, θα πρέπει να προηγηθεί ήπια αποστείρωση/απολύμανση. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι στο σύστημα του τούνελ και της πληρωμένης στήλης δεν υπάρχει κάποιο σύστημα ανάδευσης επομένως, δεδομένου του ότι δεν είναι γνωστός ο τρόπος που επηρεάζει το σύστημα η ανάδευση, είναι αναγκαία η πραγματοποίηση αντιπροσωπευτικών πειραμάτων, καθώς κατά την ανάδευση καταστρέφονται οι ανεπτυγμένες μυκητιακές υφές.



**Διάγραμμα 28: Προτεινόμενο διάγραμμα ροής διεργασίας**

## **6. Βιβλιογραφία**

- [1]. Van Eijck, Janske, Bothwell Batidzirai, and André Faaij. "Current and future economic performance of first and second generation biofuels in developing countries." *Applied Energy* 135 (2014): 115-141.
- [2]. Ανθόπουλος Θ., «Ενζυμική υδρόλυση υδροθερμικά προκατεργασμένης βαγάσσης σόργου με χρήση του εμπορικού σκευάσματος Cellic® CTec2», Ε.Μ.Π., Αθήνα (2012):3-5.
- [3]. REN 21, Renewables 2014 Global Status Report. Retrieved March 10, 2016 from [http://www.ren21.net/Portals/0/documents/Resources/GSR/2014/GSR2014\\_full%20report\\_low%20res.pdf](http://www.ren21.net/Portals/0/documents/Resources/GSR/2014/GSR2014_full%20report_low%20res.pdf)
- [4]. Building Green Magazine, Building Sustainable Environment, «Πρόσκληση Κλαδικής Προβολής της Αξιοποίησης Βιομάζας & Βιοενέργειας Building Green – Bioenergy Expo 2016», Retrieved March 10, 2016 from <http://buildinggreenexpo.gr/biomass-bioenergy-expo-2016>.
- [5]. Δασκαλίδης Α., Κλαδική μελέτη «Βιομάζα-Βιοκαύσιμα-Βιοαέριο», Μονάδα οικονομική ανάλυσης αγορών Τράπεζας Πειραιώς, Αθήνα, 2007.
- [6]. Χρήστου Μ., «Ενεργειακό δυναμικό αγροτικών, κτηνοτροφικών και δασικών υπολειμμάτων στην Ελλάδα», Παρουσίαση στο ΚΑΠΕ, Δεκέμβριος 2013
- [7]. EuroObserver, "Biofuels barometer 2015", Retrieved March 10, 2016 from <http://www.euroobserv-er.org/biofuels-barometer-2015>.
- [8]. Lee, Roland Arthur, and Jean-Michel Lavoie. "From first-to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity." *Animal Frontiers* 3.2 (2013): 6-11.
- [9]. Demirbas, Ayhan. "Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections." *Energy conversion and management* 49.8 (2008): 2106-2116.
- [10]. Shalaby, Emad A. *Biofuel: Sources, Extraction and Determination*. INTECH Open Access Publisher, 2013.
- [11]. Zheng, Yi, et al. "Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production." *Progress in Energy and Combustion Science* 42 (2014): 35-53.
- [12]. Al Seadi, T., et al. *Biogas handbook*. BiG> East Project funded by the European Commission (EIE/07/214), University of Southern Denmark Esbjerg, Denmark, p 142. ISBN 978-87-992962-0-0, 2008.
- [13]. Limayem, Alya, and Steven C. Ricke. "Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects." *Progress in Energy and Combustion Science* 38.4 (2012): 449-467.
- [14]. Mood, Sohrab Haghghi, et al. "Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27 (2013): 77-93.
- [15]. Alvira, Petal, et al. "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review." *Bioresource technology* 101.13 (2010): 4851-4861.
- [16]. Agbor, Valery B., et al. "Biomass pretreatment: fundamentals toward application." *Biotechnology advances* 29.6 (2011): 675-685.
- [17]. Anwar, Zahid, Muhammad Gulfray, and Muhammad Irshad. "Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review." *Journal of radiation research and applied sciences* 7.2 (2014): 163-173.
- [18]. Hendriks, A. T. W. M., and G. Zeeman. "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass." *Bioresource technology* 100.1 (2009): 10-18.

- [19]. Smart, Lawrence B., and Kimberly D. Cameron. "Genetic improvement of willow (*Salix* spp.) as a dedicated bioenergy crop." *Genetic improvement of bioenergy crops*. Springer New York, 2008. 377-396.
- [20]. Alexandropoulou, Maria, et al. "Fungal pretreatment of willow sawdust and its combination with alkaline treatment for enhancing biogas production." *Journal of Environmental Management* (2016).
- [21]. Isebrands, Jud G., and Jim Richardson, eds. *Poplars and Willows: trees for society and the environment*. CABI, 2014.
- [22]. Zheng, Yi, et al. "Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production." *Progress in Energy and Combustion Science* 42 (2014): 35-53.
- [23]. Taherzadeh, Mohammad J., and Keikhosro Karimi. "Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review." *International journal of molecular sciences* 9.9 (2008): 1621-1651.
- [24]. Cesaro, Alessandra, and Vincenzo Belgiorno. "Pretreatment methods to improve anaerobic biodegradability of organic municipal solid waste fractions." *Chemical Engineering Journal* 240 (2014): 24-37.
- [25]. Canam, Thomas, et al. "Pretreatment of lignocellulosic biomass using microorganisms: Approaches, Advantages, and Limitations." (2013): 181-189.
- [26]. Narayanaswamy, Nandhagopal, et al. "Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic saccharification." *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries*. Springer Berlin Heidelberg, 2013. 3-34.
- [27]. Wan, Caixia, and Yebo Li. "Solid-State Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass." *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production*. Springer Netherlands, 2013. 67-86.
- [28]. Wan, Caixia, and Yebo Li. "Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass." *Biotechnology Advances* 30.6 (2012): 1447-1457.
- [29]. Sluiter, A., et al. "Determination of extractives in biomass." *Laboratory Analytical Procedure (LAP)* 1617 (2005).
- [30]. Sluiter, A., et al. "Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples." *Golden: National Renewable Energy Laboratory* (2006).
- [31]. Ανθοπουλος, Θ. Θ. Ν, Ενζυμική υδρόλυση υδροθερμικά προκατεργασμένης βγάσσης σόργου με χρήση του εμπορικού σκευάσματος, Ε. Μ. Π., (2012)
- [32]. Sluiter, A., et al. "Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass." *Golden: National Renewable Energy Laboratory* (2012).
- [33]. Miller, Gail Lorenz. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." *Analytical chemistry* 31.3 (1959): 426-428.
- [34]. Trinder, Paul. "Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor." *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry in medicine* 6.1 (1969): 24-27.
- [35]. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1997), American Public Health Association/American Water Works Association/ Water Environment Federation, Washington DC, USA
- [36]. Παπαδοπούλου, Κωνσταντίνα Βιοεξυγίανση ρυπασμένων εδαφών με μύκητες, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ), (2007): 210.
- [37]. Philippoussis, A., et al. "Biomass, laccase and endoglucanase production by *Lentinula edodes* during solid state fermentation of reed grass, bean stalks and wheat straw residues." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27.2 (2011): 285-297.

- [38]. Sluiter, A., et al. "Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples." National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, NREL Technical Report No. NREL/TP-510-42621 (2008): 1-6.
- [39]. Determination of Ash in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP): Issue Date, 7/17/2005. National Renewable Energy Laboratory, 2008.
- [40]. NPTEL, Lecture 5:Determination of Protein Concentration by Bradford Method, Retrieved May 12, 2016 from <http://nptel.ac.in/courses/102103047/5>.
- [41]. Α. Μπακόλας, «Ποροσιμετρία Υδραργύρου», Εργαστηριακός οδηγός: Επιστήμης και Τεχνικής υλικών, 7<sup>ο</sup> Εξαμήνου Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα, 2014.
- [42]. Συλλογική έκδοση εργαστηρίου ανόργανης και αναλυτικής χημείας Ε.Μ.Π., Φυσικές μέθοδοι ανάλυσης, Εργαστηριακές ασκήσεις, 3<sup>η</sup> έκδοση, Αθήνα 2009, σελ 189-207.
- [43]. Νίτσος Χ., «Υδροθερμική προκατεργασία και ενζυμική υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας», Ε.Μ.Π., Θεσσαλονίκη (2013): 119
- [44]. Fang, Hua, et al. "Fungal degradation of chlorpyrifos by *Verticillium* sp. DSP in pure cultures and its use in bioremediation of contaminated soil and pakchoi." *International Biodeterioration & Biodegradation* 61.4 (2008): 294-303.
- [45]. Zhang, Yue, et al. "Preparation and characterization of lignocellulosic oil sorbent by hydrothermal treatment of populus fiber." *Materials* 7.9 (2014): 6733-6747.